

Anti-Humano TCR C β 1 (JOVI.1)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	JOVIF	100 test



DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Otros nombres: Anti-Receptor de células T Beta; TCRB; TRBC1; anti-TCR Cbeta1; a; TCRCb1; TRBC1; TRBC-1

Descripción: el anticuerpo monoclonal anti-Human TCR C β 1 procede de la hibridación de células de mieloma y células de bazo de ratón inmunizado con células T de una línea de ratón transgénico que expresaba Tcr humano V β 2C β 1¹. El anticuerpo está formado por una cadena pesada IgG2a y una cadena ligera kappa.

Clon: JOVI.1

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-TCR C β 1 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 (mg/ml)
FITC (Fluorescein isothiocyanate)	100 ug en 0,2 ml	0,5

USO PROPUESTO.

El anticuerpo Anti-Humano TCR C β 1 de Immunostep, es un anticuerpo monoclonal conjugado, para uso en diagnóstico in vitro por citometría de flujo para la identificación de las poblaciones de células T que expresen la subunidad C β 1 del receptor de células T TCR, lo que significa un 50-75% de los linfocitos CD3+ de sangre periférica en individuos sanos de acuerdo con su inmunofenotipo normal general, pudiendo proporcionar una prueba de clonalidad de una manera similar al análisis de restricción de cadenas ligeras para linfocitos B³. El Anti-Humano TCR C β 1 conjugado con un fluorocromo es un reactivo de inmunofluorescencia directa de un solo color destinado a la identificación de células T que expresen la subunidad constante beta1 (C β 1) del receptor de células T (TCR)²

RELEVANCIA CLÍNICA

Este marcador puede ser utilizado por sí solo o en combinación con otros marcadores para el diagnóstico o pronóstico de algunas enfermedades hematológicas como la leucemia linfocítica granular de células T grandes (en inglés T-cell large granular lymphocytic leukemia, T-LGLL), identificación de poblaciones linfocíticas granulares de células T con significado incierto (en inglés, clonal T-cell large granular lymphocytic populations of uncertain significance, T-CUS), linfoma de células T cutáneas (en inglés Cutaneous T-cell lymphoma, CTCL)^{2-4,8}.

PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-TCR C β 1 se une a la superficie de las células T que expresan el antígeno cadena β 1 del receptor de células T humanas¹.

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^o-8^o 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.
- Antes de adquirir las muestras se debe verificar que el citómetro de flujo está calibrado y compensado.
- 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)^{9,10,11}. 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 isotópicos:

Fluorocromo	Control isotópico	Referencia Immunostep
FITC	Mouse IgG2a	ICIGG2AF-100UG

- 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 isotópico 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 y determinar el porcentaje de células marcadas. Se debe usar un control isotópico conjugado con el mismo fluorocromo, del mismo tipo de cadena pesada de inmunoglobulina y concentración que el anticuerpo 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 en sangre periférica de un donante sano.

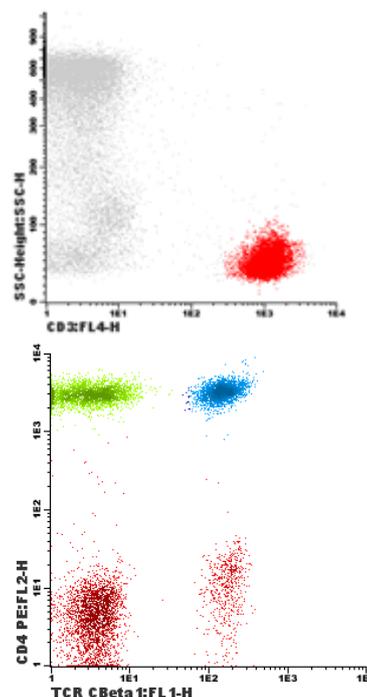


Fig. 1: Arriba una representación biparamétrica de la intensidad media de fluorescencia de la población de linfocitos CD3+ y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de donante sano. Abajo la representación de la misma muestra con la selección de los linfocitos CD3+ enfrentando la expresión de CD4 con los TCR Cβ1.

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.

- 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 resultados⁵⁻⁷.

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-Humano TCR C β 1 clon JOVI.1 es específico frente a diferentes regiones TcR β de todas las líneas de células T que expresan TcR C β 1, y no reconoce la línea de células T HPB-ALL que expresa TCR V β 5C β 2, sin embargo, una línea de células T transfectada y un clon de células T que expresan TcR C β 2 muestran reactividad con el anticuerpo aunque esta es muy débil.

El anticuerpo monoclonal JOVI-1 reacciona con el 50-75% de CD3+ de los linfocitos de sangre periférica, aunque el perfil de marcaje es significativamente diferente en las subpoblaciones CD4 y CD8. En cuanto a los linfocitos CD8 de sangre periférica de individuos sanos, el anticuerpo JOVI-1 reconoce dos subpoblaciones diferentes en cuanto a su expresión, los JOVI-1 altos y los JOVI-1 bajos, mientras que para la población de linfocitos de sangre periférica CD4+, el marcaje de linfocitos es más heterogéneo. La variación en el nivel de intensidad del marcaje con JOVI-1 no es una consecuencia de la regulación a la baja de los niveles de TcR en una proporción de células CD4 + porque esta población expresa niveles uniformemente altos de CD3.

Por lo tanto, no está claro qué epítipo en el TcR es reconocido por JOVI-1. Es posible que reconozca un determinante supertípico en dominios V β o un epítipo V β que está influenciado por el V α particular asociado con el dominio V β . Otra explicación es que JOVI.1 pueda reconocer un determinante C β que está enmascarado en algunas células T por interacciones del TcR con otras proteínas. En este contexto, está claro que el TcR forma asociaciones dinámicas en la superficie celular con una serie de otras estructuras superficiales.

Sin embargo, esta explicación no es coherente con la observación que JOVI-1 no pudo inmunoprecipitar el TcR de extractos detergentes de células HPB-ALL cuando se espera que las asociaciones débiles proteína-proteína estuvieran rotas.

Serán necesarios trabajos adicionales para establecer la base molecular de las interacciones del anticuerpo JOVI-1.¹

LINEALIDAD

Para el análisis de la linealidad se realizaron diferentes diluciones de una muestra de formada por por la línea de células T Jurkat que expresa un TCR V β 8C β 1 y la línea de células Pre-B Nalm-6 que no expresa ningún TCR de forma que el número de células totales e (1x10e6 células) y el volumen de la muestra permaneció constante. Para cada dilución se realizaron 3 réplicas.

Los datos obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

R	R Cuadrado	Regresión lineal
0,997	0.994	Y=1.030X + 0.928

PRECISIÓN

Para el estudio de la precisión, de acuerdo a las recomendaciones de la CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute), se diseñó el siguiente esquema: 3 sitios X 5 días X 5 carreras X 3 (lotes) X 1 (muestra formada por un pool de 3 muestras).

La adquisición de datos se llevó a cabo en un citómetro FACS Calibur (BD Bioscience) y se analizó el porcentaje de linfocitos CD4 TCR C β 1 positivos.

Los resultados de la precisión del reactivo se muestran en la siguiente tabla:

	*Repetibilidad (Whitin-run)	**Interserie (Between-run)	***Interdía (between-day)	Reproducibilidad ****
N	25,0000	5,0000	5,0000	225,0000
Valor Medio	40,2912	39,5140	39,2860	40,2376
SD	1,1409	0,7484	0,9434	1,2073
CV (%)	2,8317	1,8939	2,4014	3,0003

* La repetibilidad (Whitin-run) fue calculada con los datos de un laboratorio y un lote.

** La repetibilidad interserie (Between-run) fue calculada con los datos obtenidos de un laboratorio, un lote y un día.

*** La repetibilidad inter día (Between-day) fue calculada con los datos obtenidos de un laboratorio, un lote y una carrera.

**** La reproducibilidad incluye todos los datos obtenidos de los 3 laboratorios, los 5 días, las 5 carreras y los 3 lotes.

REPRODUCIBILIDAD

En el mismo ensayo, analizamos la reproducibilidad entre lotes y la precisión inter-laboratorio e intra-laboratorio. Los laboratorios en los que se llevó a cabo el ensayo estaban separados físicamente y contaban con técnicos e instrumentos independientes.

Para el cálculo de la reproducibilidad se analizó el porcentaje de células positivas.

El resultado del análisis aparece mostrado en el siguiente cuadro:

	*Entre lotes (Between-batch)	**Inter-laboratorio (Between-lab)	***Intra-laboratorio Lab1	***Intra-laboratorio Lab2	***Intra-laboratorio Lab3
N	15,0000	75,0000	25,0000	25,0000	25,0000
Valor Medio	40,4307	40,2980	39,9620	40,2912	40,0364
SD	1,1920	1,1909	0,8289	1,1409	1,2765
CV (%)	2,9482	2,9551	2,0743	2,8317	3,1883

* La reproducibilidad entre lotes (Between-batch) fue obtenida con los datos obtenidos por un laboratorio durante un día.

** La reproducibilidad Inter-laboratorios (Between-lab) fue obtenida con los datos de un lote por lo que engloba la precisión entre carreras y la precisión entre días.

*** La reproducibilidad intra-laboratorio fue obtenida con todos los datos obtenidos en el estudio por cada laboratorio por lo que engloba la precisión entre carreras y la precisión entre días por laboratorio.

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

- Viney JL, Prosser HM, Hewitt CR, Lamb JR, Owen MJ. Generation of monoclonal antibodies against a human T cell receptor beta chain expressed in transgenic mice. *Hybridoma*. 1992 Dec;11(6):701-13. doi: 10.1089/hyb.1992.11.701. PMID: 1284120.
- Shi M, Olteanu H, Jevremovic D, He R, Viswanatha D, Corley H, Horna P. T-cell clones of uncertain significance are highly prevalent and show close resemblance to T-cell large granular lymphocytic leukemia. Implications for laboratory diagnostics. *Mod Pathol*. 2020 Oct;33(10):2046-2057. doi: 10.1038/s41379-020-0568-2. Epub 2020 May 13. PMID: 32404954.
- Horna P, Shi M, Olteanu H, Johansson U. Emerging Role of T-cell Receptor Constant β Chain-1 (TRBC1) Expression in the Flow Cytometric Diagnosis of T-cell Malignancies. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 12;22(4):1817. doi: 10.3390/ijms22041817. PMID: 33673033; PMCID: PMC7918842.
- Shi M, Jevremovic D, Otteson GE, Timm MM, Olteanu H, Horna P. Single Antibody Detection of T-Cell Receptor $\alpha\beta$ Clonality by Flow Cytometry Rapidly Identifies Mature T-Cell Neoplasms and Monotypic Small CD8-Positive Subsets of Uncertain Significance. *Cytometry B Clin Cytom*. 2020 Jan;98(1):99-107. doi: 10.1002/cyto.b.21782. Epub 2019 Apr 11. PMID: 30972977.
- 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.
- Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. *Am J Clin Pathol* 100:111-5 (1993)
- Reichert et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol* 60:190-208 (1991).
- Noemí Muñoz-García et al. Anti-TRBC1 Antibody-Based Flow Cytometric Detection of T-Cell Clonality: Standardization of Sample Preparation and Diagnostic Implementation. *Cancers*. 2021, 13(17), 4379.
- 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.
- Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
- 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.

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