

Anti- Human CD7 (HIT7)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	7F-100T	100 test
APC	7A-100T	100 test



PRODUCT DESCRIPTION

Otros nombres: antígeno de células T CD7, GP-40, antígeno de leucemia de células T, antígeno de superficie celular Leu-9, TP41.

Descripción: el anticuerpo monoclonal anti-CD7 procede de la hibridación de células de mieloma de ratón SP2 y células de bazo de ratón BALB/c inmunizado con células polimorfonucleares T humanas. El anticuerpo está formado por una cadena pesada IgG1 y una cadena ligera kappa.

Clon: HIT7

HLDA: El anticuerpo anti-CD7 clon HIT7 fue incluido en el 5º taller de trabajo sobre antígenos de diferenciación de Leucocitos humanos con el código T-CD07.03.

Isotipo: Ratón IgG1, kappa

Reactividad: Humano.

Fuente: Fluido ascítico de ratón inmunizado con células del hibridoma productor.

Purificación: Cromatografía de afinidad

Composición: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD7 humano conjugado con un fluorocromo y en solución acuosa que contiene proteína estabilizante y el 0,09% de azida sódica (NaN_3).

Fluorocromo	Reactivos suministrados	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
FITC (Isotiocianato de fluoresceína)	50 ug en 2 ml	25
APC (Aloficiocianina)	25 ug en 2 ml	12,5

USO PROPUESTO.

El CD7 clon HIT7 de Immunostep es un anticuerpo monoclonal que puede ser usado en diagnóstico invitro para la identificación y enumeración de linfocitos de muestras humanas que expresen CD7 por citometría de flujo.

RELEVANCIA CLÍNICA

Este anticuerpo puede ser utilizado en citometría de flujo para el análisis de muestras de sangre y de médula ósea o en inmunohistoquímica. El antígeno CD7 también puede expresarse en leucemias mieloblasticas. Es adecuado para la identificación de neoplasias de células T por inmunohistoquímica. El CD7 también se utiliza para analizar subconjuntos de células T y NK y para la caracterización de todas las células T y otras leucemias linfoblásticas de células T.

PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD7 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD7.

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

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 desecharados. 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
- 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 pipetejar 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)²³.

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	Mouse IgG1	ICIGGIF-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 μ l 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 μ L de muestra (hasta 10^6 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 μ l 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 μ l 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.

ANALISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Recoger la fluorescencia atribuida al anticuerpo monoclonal CD7 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 CD7 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.

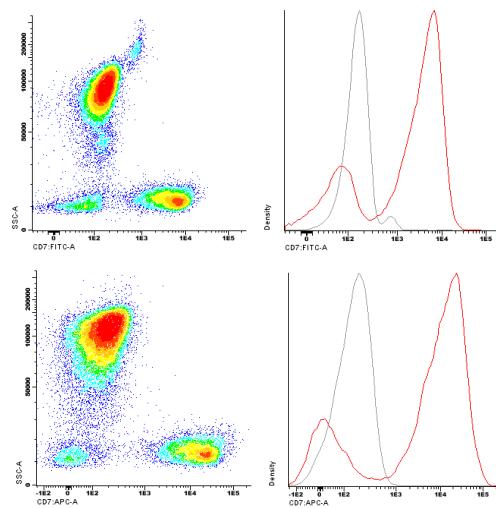


Fig. 1: A la izquierda una representación biparamétrica de la intensidad media de fluorescencia de la población de linfocitos CD7 y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de donante sano. A la derecha una representación de la misma muestra en un histograma identificando la población de linfocitos en rojo.

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 antigenicos 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 antigenica 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^{4,5,6}.

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-CD7 clon HIT7 fue incluido en el 5º taller de trabajo sobre antígenos de diferenciación de Leucocitos humanos (HLDA) con el código T-CD07.03

El anticuerpo va dirigido contra el antígeno CD7 también llamado antígeno Leu9 o GP40, expresado durante la diferenciación de linfocitos T y en el 85%-90% de los linfocitos T de sangre periférica. En individuos normales reconoce el total de linfocitos T CD8+ y aproximadamente el 90% de los linfocitos T CD4+ junto con la mayoría de las células NK. El CD7 es negativo o muy débil en granulocitos, monocitos, linfocitos B, plaquetas y eritrocitos⁷.

Para analizar la especificidad se evaluaron 10 muestras obtenidas de individuos sanos de raza caucásica. Estas fueron teñidas con anticuerpo monoclonal CD7 FITC y procesadas según el protocolo descrito en el punto 6. Además, se utilizaron otros anticuerpos específicos de las diferentes poblaciones analizadas.

Se seleccionaron las células positivas para CD7 dentro de la región de los linfocitos, monocitos, y neutrófilos.

El resultado se muestra en la siguiente tabla:

Estadística descriptiva

	Media	Mediana	Desviación típica
% Linfocitos	59,3850	60,2300	5,61264
% Monocitos	18,5190	18,3150	7,03061
% Neutrófilos	17,8120	17,2200	6,07972
Validos N	10	10	10

LINEARIDAD

Para el análisis de la linearidad se realizaron diferentes diluciones de una muestra de sangre periférica normal manteniendo el número total de células constante y se analizó la relación de los porcentajes esperados con los porcentajes obtenidos.

Los datos obtenidos para el CD7 APC se muestran en la siguiente tabla:

R	R Cuadrado	Error típico de la estimación	Regresión lineal
1	,995	,44439	Y= 0,957X - 0,546

REPETIBILIDAD y PRECISIÓN ENTRE LOTES

La repetibilidad del anticuerpo monoclonal CD7 clon HIT7 fue determinada realizando 10 réplicas de 10 sangres periféricas anticoaguladas procedentes de individuos sanos con diferentes rangos de linfocitos.

Además la precisión entre lotes fue analizada utilizando 3 lotes diferentes del anticuerpo CD7 APC para cada muestra⁸. Esto hace un total de 300 determinaciones para analizar la repetibilidad del anticuerpo y su precisión entre lotes.

Para el anticuerpo CD7 FITC la precisión entre lotes fue analizada utilizando 2 lotes diferentes del anticuerpo. Esto hace un total de 200 determinaciones para analizar la repetibilidad y precisión entre los lotes. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

	Parámetro analizado	Repetibilidad		Precisión entre lotes	
		Desviación típica	% CV	Desviación típica	% CV
FITC	IMF	64,81	2,55	35,34	1,45
	% células positivas	0,96	4,34	0,46	2,09
APC	IMF	3196,51	22,22	3033,96	20,90
	% células positivas	2,28	9,10	1,05	4,02

REPRODUCIBILIDAD

Para demostrar la reproducibilidad o la precisión inter-laboratorio, se marcaron 5 réplicas de 5 muestras diferentes de sangre periférica anticoagulada, procedente de donantes sanos y estabilizadas con estabilizante celular⁸. Las muestras fueron adquiridas durante 5 días en tres laboratorios diferentes.

Un total de 375 determinaciones fueron realizadas para demostrar la precisión inter-laboratorio del CD7 clon HIT7.

El resultado del análisis aparece mostrado en el siguiente cuadro:

Parámetro	Precisión entre días		Precisión entre laboratorios	
	SD	% CV	SD	% CV
% células positivas	2,00	11,30	2,97	16,76

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. Gerby BI, Clappier E, Armstrong F, Deswarte C, Calvo J, Poglio S, Soulier J, Boissel N, Leblanc T, Baruchel A, Landman-Parker J, Roméo PH, Ballerini P, Pflumio F. Expression of CD34 and CD7 on human T-cell acute lymphoblastic leukemia discriminates functionally heterogeneous cell populations. *Leukemia*. 2011 Aug;25(8):1249-58
2. Del Poeta GI, Stasi R, Venditti A, Cox C, Aronica G, Masi M, Bruno A, Simone MD, Buccisano F, Papa G. CD7 expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1995 Mar;17(1-2):11-9.
3. Palker TJ, Scearce RM, Hensley LL, Ho W, Haynes BF. Comparison of the CD7 (3A1) group of T cell workshop antibodies. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:303-313.
4. K M, Warnke R, Finlay J, et al. A single monoclonal antibody identifies T-cell lineage of childhood lymphoid malignancies. *Blood*. 1983;62:722-728.
5. Weiss LM, Crabtree GS, Rouse RV, Warnke RA. Morphologic and immunologic characterization of 50 peripheral T-cell lymphomas. *Am J Pathol*. 1985;118:316-324.
6. CLSI EP05-A3. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline-Third Edition.
7. van Dongen JJM, Adriaansen HJ. Chapter 6. Immunobiology of leukaemia. In: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF. *Leukemia*. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: WB Saunders Company; 1996. p. 83-130.
8. Sempowski GD, Lee DM, Kaufman RE, Haynes BF. Structure and function of the CD7 molecule. *Crit Rev Immunol* 1999;19:331-48.
9. Miwa H, Nakase K, Kita K. Biological characteristics of CD7(+) acute leukemia. *Leukemia Lymphoma* 1996;21:239-44.
10. Al Saati T, Alibaud L, Lamant L, Boyes J, March M, Delsol G. A new monoclonal anti-CD7 antibody reactive on paraffin sections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001;9:289-96.
11. 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.
12. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
13. 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.
14. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. *Am J Clin Pathol* 100:III-5 (1993)
15. 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