

# Anti-Humano CD4 (HP2/6)

| Fluorocromo | Referencia | Test     |
|-------------|------------|----------|
| FITC        | 4F-100T    | 100 test |
| PerCP       | 4PP-100T   | 100 test |
| APC         | 4A-100T    | 100 test |



## DESCRIPCION DE PRODUCTO

**Otros nombres:** T-cell surface glycoprotein CD4, T-cell surface antigen T4/Leu-3

**Descripción:** El anticuerpo monoclonal anti-CD4 se deriva de la hibridación de células de mieloma SP2 de ratón y células de bazo de ratones BALB / c inmunizados con linfocitos T humanos. El anticuerpo está formado por una cadena pesada IgG2a y una cadena ligera kappa.

**Clon:** HP2/6

**HLDA:** El anticuerpo anti-CD4, clon HP2 / 6, se incluyó en los 4º Talleres internacionales sobre diferenciación de leucocitos humanos, código WS 116.

**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-CD4 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                                | Reactivo suministrado | Concentración (µg/ml) |
|--------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| FITC (Fluorescein isothiocyanate)          | 50 ug en 2 ml         | 25                    |
| PerCP (Peridin-cholophyll-protein complex) | 50 ug en 2 ml         | 25                    |
| APC (Allophycocyanin)                      | 20 ug en 2 ml         | 10                    |

## USO RECOMENDADO

El CD4 clon HP2/6 de Immunostep es un anticuerpo monoclonal que puede ser usado en diagnóstico in vitro para la identificación y enumeración de linfocitos de muestras humanas que expresen CD4 por citometría de flujo.

## RELEVANCIA CLÍNICA

El anticuerpo monoclonal de Immunostep CD4 se puede usar, en combinación con otros marcadores, para el diagnóstico o pronóstico de algunas enfermedades de inmunodeficiencia, incluida la diferenciación tímica y la respuesta inmune.

El CD4 se elimina de la membrana plasmática por la Proteína Nef del VIH-1 que aumenta la endocitosis dependiente de clatrina de este antígeno para dirigirlo a la degradación lisosomal. La expresión de la superficie celular también está modulada a la baja por la poliproteína gp160 de la Envoltura del VIH-1 que interactúa con, y secuestra CD4 en el retículo endoplásmico.<sup>1-5</sup>

## PRINCIPIOS DEL TEST

El anticuerpo monoclonal anti-CD4 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno 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 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>6,7</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        | Mouse IgG2a       | ICIGG2AF-100          |
| PerCP       |                   | ICIGG2APP-100         |
| APC         |                   | ICIGG2AA-50           |

- 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%.
- StepCount – 25 tests (Ref: 139999121). Reactivo disponible para recuento celular plataforma única, que puede ser utilizado en combinación con este reactivo.
- Sistema de vacío
- Solución de lisis
- Citómetro de flujo equipado con láser y filtros adecuados al fluorocromo.
- Agitador Vortex

## PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El reactivo está diseñado para protocolos con y sin lavado después de la lisis. Este último caso es habitual en protocolos de recuento celular.

### Protocolo de lisis con lavados:

- 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*).
- Añadir 100 µL de muestra (hasta 10<sup>6</sup> células) y mezclar adecuadamente en el vortex.
- Incubar en oscuridad a temperatura ambiente (20-25° C) durante 15 minutos o a 4° C durante 30 minutos.
- 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.
- 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.
- Resuspender el pellet.
- Añadir 2 ml de PBS (*ver materiales requeridos pero no suministrados*).

- 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.
- 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.

### Protocolo de lisis sin lavados:

- Añadir el volumen recomendado de anticuerpo monoclonal conjugado en un tubo de citometría de 12 x 75 mm. Es recomendable preparar un tubo adicional con el control isotípico adecuado (*ver materiales requeridos pero no suministrados*).
- Añadir 50 µL de muestra bien homogeneizada y mezclar adecuadamente en el vortex.
- Incubar en oscuridad a temperatura ambiente (20-25° C) durante 15 minutos o a 4° C durante 30 minutos.
- Añadir 450 µl de solución de lisis al tubo. Agitar en vortex e incubar en oscuridad durante 10 minutos (o hasta observar la clarificación de la muestra, indicando la lisis completa de los eritrocitos).

La muestra está lista para ser analizada al citómetro de flujo.

### Recomendaciones técnicas:

- El procedimiento de lisis sin lavado produce background (autofluorescencia y señal de anticuerpos sin unir) que puede provocar resultados erróneos. Es necesario ajustar los voltajes de los PMT y los settings de compensación para optimizar el método.

- Es crítico titular el reactivo para ajustarlo a la muestra para minimizar la unión inespecífica del reactivo no unido, aumentando así la resolución entre población positiva y negativa.

- Para obtener la máxima integridad de los datos, analice las muestras dentro del período de estabilidad validado de los fluorocromos para evitar la degradación de la señal o artefactos de lisis celular.

## ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Recoger la fluorescencia atribuida al anticuerpo monoclonal 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 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 y para incluir las células marcadas correctamente.

A continuación se muestra un ejemplo de representación del marcaje celular.

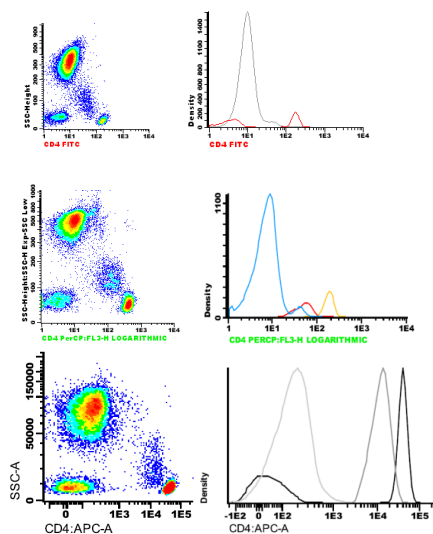


Fig. 1: A la izquierda, un diagrama biparamétrico de la intensidad de fluorescencia promedio de la población de linfocitos T CD4 + y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de un donante sano. A la derecha, un diagrama de la misma muestra en formato de histograma.

## Resultados

Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas por población de linfocitos o como número de células positivas por microlitro de sangre (recuento absoluto).

Cálculo de recuentos absolutos: Durante el análisis, el número absoluto (células/ $\mu$ L) de células positivas en la muestra se puede determinar comparando los eventos celulares con los eventos de microesferas. Si se utiliza el software Immunostep, los recuentos absolutos serán determinados por el software. Para el análisis manual de los datos, el recuento absoluto de la población celular (A) se puede calcular utilizando la siguiente ecuación:  $A = X/Y \times N/V$

Donde:

- X es el número de eventos celulares positivos
- Y es el número de eventos de microesferas
- N es el número de microesferas por prueba, que se encuentra en la bolsa de aluminio de los tubos de recuento STEPCOUNT y puede variar de un lote a otro
- V es el volumen de la muestra (50  $\mu$ L)

## 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

Los valores obtenidos de individuos sanos podrían variar entre distintos laboratorios. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de normalidad. El uso de controles comerciales también está recomendado, por lo que Immunostep recomienda utilizar CD-Chex Plus (Streck) normal y CD4 Low como controles de proceso. Para realizar el control de calidad: mezcle bien el control CD-Chex Plus (Streck) adecuado o un control de proceso equivalente. Consulte las instrucciones de uso del control para obtener instrucciones detalladas.

## CARACTERÍSTICAS

### ESPECIFICIDAD

El anticuerpo anti-CD4, clon HP2/6, se incluyó en el Cuarto Taller sobre Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos (HDLA), utilizando el Código 1167. CD4 está presente en el 54% de los linfocitos T de sangre periférica, el 50% de los timocitos y algunas células malignas de origen de células T. Los linfocitos B normales, monocitos o granulocitos no expresan el antígeno CD4 de superficie, aunque se ha observado expresión citoplásmica en monocitos / macrófagos. La subpoblación de linfocitos T CD4 positivos se ha caracterizado funcionalmente como células auxiliares activas en la amplificación de las respuestas inmunitarias.

Las muestras de sangre utilizadas en estos ensayos se obtuvieron de donantes sanos normales y se marcaron con el anticuerpo monoclonal CD4. Las células contenidas en las regiones de linfocitos B, plaquetas, neutrófilos y eritrocitos se seleccionaron para el análisis. Las muestras de sangre se procesaron de acuerdo con el protocolo de marcaje de antígenos de membrana por citometría de flujo. 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 de isotipo adecuado y el MAb para estudiar. Se evaluó el porcentaje de linfocitos, monocitos y granulocitos teñidos con el MAb mencionado.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

| Estadísticas   |          |                     |             |               |                |               |
|----------------|----------|---------------------|-------------|---------------|----------------|---------------|
|                |          | % control isotípico | % Plaquetas | % Eritrocitos | % B Linfocitos | % Neutrofilos |
| N              | Validos  | 10                  | 10          | 10            | 10             | 10            |
|                | Perdidos | 0                   | 0           | 0             | 0              | 0             |
| Media          |          | 0,50                | 0,02        | 0,24          | 0,01           | 0,17          |
| Mediana        |          | 0,40                | 0,01        | 0,06          | 0,00           | 0,14          |
| Desviación std |          | 0,31                | 0,03        | 0,46          | 0,03           | 0,10          |
| Mínimo         |          | 0,01                | 0,00        | 0,00          | 0,00           | 0,08          |
| Máximo         |          | 1,12                | 0,10        | 1,53          | 0,10           | 0,37          |
| Percentiles    | 25       | 0,29                | 0,00        | 0,00          | 0,00           | 0,09          |
|                | 50       | 0,40                | 0,01        | 0,06          | 0,00           | 0,14          |
|                | 75       | 0,71                | 0,03        | 0,26          | 0,01           | 0,23          |

### LINEARIDAD

La linealidad del anticuerpo monoclonal Immunostep CD4 se determinó marcando la línea celular Raji como población positiva y la línea celular Nalm-6 como población negativa (PerCP) y sangre periférica (FITC y APC). 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%.

Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo de acuerdo con 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.

| Modelo | R                  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> ajustada | Error estándar estimado |
|--------|--------------------|----------------|-------------------------|-------------------------|
| FITC   | 0,995 <sup>a</sup> | 0,99           | 0,98                    | 0,43                    |
| APC    | 0,995 <sup>a</sup> | 0,99           | 0,98                    | 0,58                    |
| PerCP  | 0,994 <sup>a</sup> | 0,98           | 0,98                    | 4,07                    |

### REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad de los anticuerpos monoclonales conjugados CD4 se determinó realizando 10 determinaciones replicadas de cada anticuerpo en cada uno de los tres rangos de CD4 +, alto, medio y bajo. Así, se realizaron un total de 30 determinaciones para cada forma de CD4. 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. Los linfocitos 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 CD4 +. Las muestras de rango medio y bajo se obtuvieron mezclando las células CD4 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 la manera en que cada laboratorio obtuvo, marcó y analizó muestras de sangre separadas.

|       |                  | N  | Mínimo | Máximo | Media | Desviación estándar |
|-------|------------------|----|--------|--------|-------|---------------------|
| APC   | Alto             | 10 | 15,17  | 16,06  | 15,47 | 0,25                |
|       | Medio            | 10 | 2,94   | 3,29   | 3,14  | 0,11                |
|       | Bajo             | 10 | 1,00   | 1,44   | 1,29  | 0,12                |
|       | Valido N (lista) | 10 |        |        |       |                     |
| FITC  | Alto             | 10 | 1,93   | 2,14   | 2,03  | 0,06                |
|       | Medio            | 10 | 3,71   | 4,24   | 3,91  | 0,16                |
|       | Bajo             | 10 | 6,95   | 7,54   | 7,21  | 0,21                |
|       | Valido N (lista) | 10 |        |        |       |                     |
| PerCP | Alto             | 10 | 15,17  | 16,06  | 15,47 | 0,25                |
|       | Medio            | 10 | 2,94   | 3,29   | 3,14  | 0,11                |
|       | Bajo             | 10 | 1,00   | 1,44   | 1,29  | 0,12                |
|       | Valido N (lista) | 10 |        |        |       |                     |

### GARANTÍA

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. Perosa F, Dammacco F. Human CD4 "internal antigen" mimicry by anti-idiotypic monoclonal antibodies. *Int J Clin Lab Res.* 1994;24(1):33-40.
2. Perosa F, Dannecker G, Ferrone S, Dammacco F. Immunochemical and functional characterization of anti-idiotypic antibodies to a mouse anti-CD4 monoclonal antibody. *Int J Clin Lab Res.* 1991;21(2):179-85.
3. FEDERICO PEROSA, ELVIRA FAVOINO, MARIA ANTONIETTA CARAGNANO, AND FRANCO DAMMACCO CD20 Mimicry by a mAb Rituximab-Specific Linear Peptide: A Potential Tool for Active Immunotherapy of Autoimmune Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* Volume 1051 Page 672 - June 2005
4. Vitale et al. Isolation of a novel KIR2DL3-specific mAb: comparative analysis of the surface distribution... *Int. Immunol.* 2004; 16: 1459-1466
5. Cristina Bottino, Michela Falco, Simona Sivori, Lorenzo Moretta, Alessandro Moretta, Roberto Biassoni Identification and molecular characterization of a natural mutant of the p50.2/KIR2DS2 activating NK receptor that fails to mediate NK cell triggering. *European Journal of Immunology* Volume 30, Issue 12, Pages 3569 - 3574
6. 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.
7. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)

### 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)