

Anti-CD4/CD8 humano (HP2-6/143-44)

Fluorocromo	Referencia	Prueba
FITC/PE	4F18PE1-50T	50 test



DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

Clon: HP2-6, 143-44

Isotipo: IgG2a de ratón/IgG1 de ratón

Aplicación probada: citometría de flujo

Inmunógeno: El anticuerpo monoclonal anti-CD4 se deriva de células T de leucemia HPB-ALL. El anticuerpo monoclonal anti-CD8 se deriva de células T humanas.

Reactividad en especies: Humana

Instrucciones de almacenamiento: conservar en la oscuridad a 2-8 °C

Tampón de almacenamiento: solución tampón acuosa que contiene estabilizador de proteínas y azida sódica al 0,09 % (NaN₃).

Uso recomendado: CD4/CD8 de Immunostep es un reactivo de inmunofluorescencia directa bicolores para el recuento porcentual de linfocitos T helper/inductores (CD4+) y supresores/citotóxicos (CD8+) maduros en sangre total lisada con eritrocitos (LWVB). También se puede determinar la relación helper/supresor (CD4+/CD8+).

Presentación: líquido

Origen: Sobrenadante proveniente de un cultivo celular in vitro de un hibridoma celular.

Purificación: cromatografía de afinidad

DETALLES DEL ANTÍGENO

Descripción detallada: Los porcentajes de linfocitos CD4+ y CD8+ se utilizan para monitorizar el estado inmunitario de pacientes con enfermedades de inmunodeficiencia, enfermedades autoinmunes o reacciones inmunitarias.

El porcentaje relativo del subconjunto CD4+ está reducido y el porcentaje relativo del subconjunto CD8+ está elevado en muchos pacientes con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas 1, como la inmunodeficiencia combinada grave (SCID) 1 y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

El porcentaje de linfocitos supresores/citotóxicos puede estar fuera del rango de referencia normal en algunas enfermedades autoinmunes 4 y en ciertas reacciones inmunitarias, como la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) aguda y el rechazo de trasplantes. El porcentaje relativo de la población de linfocitos CD8+ puede estar a menudo disminuido en el lupus eritematoso sistémico (LES) activo, pero también puede estar aumentado en pacientes con LES sometidos a tratamiento con esteroides.

La relación de linfocitos CD4+/CD8+ (auxiliares/supresores), cuantificada como la relación entre los linfocitos CD4 positivos para isotiocianato de fluoresceína (FITC) y los linfocitos CD8 positivos para ficoeritrina (PE), se ha utilizado para evaluar el estado inmunitario de pacientes con trastornos autoinmunes o inmunodeficiencias, o con sospecha de desarrollarlos. En muchos casos, los porcentajes relativos de linfocitos auxiliares disminuyen y los de linfocitos supresores aumentan en estados de inmunodeficiencia. Estos estados también pueden caracterizarse por linfopenia de células T. Además, la relación se ha utilizado para monitorizar a pacientes trasplantados de médula ósea ante la aparición de EICH aguda. Aunque es un indicador útil, la relación de linfocitos CD4+/CD8+ (auxiliares/supresores) tiene limitaciones específicas. ⁽¹⁻²⁾

Para obtener más información, consulte el servicio de asistencia técnica de www.immunostep.com.

INSTRUCCIONES DE USO

Almacenamiento y dilución de la solución de lisis RBCX10:

1. Diluya el concentrado 10X RBCX10 en una proporción de 1:10 con agua desionizada a temperatura ambiente (20–25 °C).
2. La solución preparada se mantiene estable durante un mes si se conserva en un recipiente de vidrio o de polietileno de alta densidad (HDPE) a temperatura ambiente.

Realización del control de calidad: De acuerdo con las directrices del Colegio Americano de Patólogos (CAP), recomendamos utilizar dos niveles de material de control líquido (control de proceso). Los controles deben realizarse al menos una vez al día en que se realicen pruebas a pacientes. Utilice controles comerciales que proporcionen valores establecidos para el porcentaje de positivos y los recuentos absolutos en cada ejecución para evaluar el rendimiento del sistema. Immunostep recomienda utilizar CDChex 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.

1. Tiña la muestra de control utilizando el anticuerpo CD4/CD8 de Immunostep tal y como se describe en la siguiente sección. La muestra de control debe procesarse igual que las muestras de los pacientes para supervisar el rendimiento continuo de todo el proceso analítico.
2. Adquiera la muestra de control teñida en el citómetro de flujo.
3. Inspeccione visualmente el diagrama de puntos CD45 frente a SSC. La población de linfocitos debe aparecer como un grupo brillante y compacto con un SSC bajo. Los monocitos y los granulocitos también deben aparecer como grupos diferenciados. No continúe con el análisis si las poblaciones son difusas y hay poca o ninguna separación entre los grupos.
4. Verifique que los resultados se encuentran dentro de los valores indicados en la hoja de valores del ensayo.

Tinción de las células:

Tenga cuidado de proteger los tubos de la luz directa. Realice el procedimiento a temperatura ambiente. Consulte las «Precauciones y condiciones de interferencia».

1. Para cada muestra de paciente, etiquete un tubo de 12 × 75 mm con el número de identificación de la muestra. Para recuentos absolutos, etiquete un tubo de recuento STEPCOUNT en lugar del tubo de 12 × 75 mm. Nota: Antes de su uso, compruebe que el sedimento de microesferas del STEPCOUNT esté intacto y dentro del retenedor metálico situado en el fondo del tubo. Si no es así, deseche el tubo de recuento STEPCOUNT y sustitúyalo por otro.
2. Introduzca 20 µL del anticuerpo CD4/CD8 de Immunostep en el fondo del tubo. Nota: Si utiliza un tubo de recuento STEPCOUNT, introduzca el reactivo en la pared lateral del tubo, justo por encima del retenedor metálico, sin tocar el sedimento de microesferas.
3. Pipete 50 µL de sangre total anticoagulada y bien mezclada en el fondo del tubo. Nota: Si utiliza un tubo de recuento STEPCOUNT, recomendamos utilizar la técnica de pipeteo inverso para pipetear la muestra en el lateral del tubo, justo por encima del retenedor metálico. Evite manchar de sangre el lateral del tubo. Si queda sangre total en el lateral del tubo, no se teñirá con el reactivo y puede afectar a los resultados.
4. Tape el tubo y agítelo suavemente con un vórtex para mezclar.
5. Incube durante 15-30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25 °C).
6. Añade 450 µL de solución de lisis RBCX10 1X al tubo.
7. Tape el tubo y agítelo suavemente con el vórtex para mezclar.
8. Incube durante 15-30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25 °C). La muestra ya está lista para

ser analizada en el citómetro de flujo. Si las muestras no se van a analizar inmediatamente después de la tinción, guárdelas en la oscuridad a temperatura ambiente (20–25 °C).

Obtención de las muestras:

1. Agite las células a fondo en el vórtex a baja velocidad. Es importante reducir la agregación antes de analizar las muestras en el citómetro de flujo. Nota: Si utiliza un cargador, agite los tubos en el vórtex inmediatamente antes de colocarlos en las bandejas del cargador.
2. Instale el tubo en el citómetro y adquiera la muestra. Antes de adquirir las muestras, ajuste el umbral para minimizar los residuos y asegurarse de que se incluyan las poblaciones de interés.
3. Analice los datos utilizando el software específico del citómetro correspondiente. Consulte las instrucciones de uso del citómetro para obtener más información.

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

Cálculo de recuentos absolutos: Durante el análisis, el número absoluto (células/ μ L) de células positivas en la muestra puede determinarse comparando los eventos celulares con los eventos de las 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) puede calcularse 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 μ L)

Controles:

- **Controles positivos:** Utilice CD-Chex Plus (Streck) normal y CD4 Low para validar el protocolo de tinción.
- **Controles negativos:** Incluya controles de isotipo y células sin tinte para establecer estrategias de gating adecuadas.

Material no suministrado:

- Tubos de recuento STEPCOUNT (ref. 1399991218)
- Solución de lisis RBCX10 (ref. RBCX10-50ML)
- CD-Chex Plus (Streck) normal y CD4 Low

REFERENCIAS

1. Giorgi JV. Caracterización de las alteraciones de los subconjuntos de linfocitos T mediante citometría de flujo en la enfermedad por VIH. Ann N Y Acad Sci. 20 de marzo de 1993;677:126-37. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb38771.x. PMID: 8494202.
2. Gratama JW, Naipal A, Olijans P, Zwaan FE, Verdonck LF, de Witte T, Vossen JM, Bolhuis RL, de Gast GC, Jansen J. Repoblación y diferenciación de linfocitos T tras un trasplante de médula ósea. Los cambios tempranos en la proporción entre linfocitos T4+ y T8+ se correlacionan con la aparición de la enfermedad de injerto contra huésped aguda. Blood. Junio de 1984 junio; 63(6):1416-23. PMID: 6372896.

FABRICANTE:

Immunostep S.L
Avda. Universidad de Coimbra, s/n Centro de Investigación
Oncológica (CIC) Campus Miguel de Unamuno 37007
Salamanca (España)
Tel. (+34) 923 294 827
www.immunostep.com

