

# Anti-Humano CD3 – CD19 (33-2A3/A3-B1)

| Fluorocromo | Referencia   | Test    |
|-------------|--------------|---------|
| FITC/PE     | 3F119PEI-50T | 50 test |



## DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

**Descripción:** el anticuerpo monoclonal anti-CD3/CD19 procede de leucocitos humanos (CD3) y de células de amígdala (CD19).

**Clon:** 33-2A3, A3-B1

**HLDA:** CD3 → 2<sup>nd</sup> Taller internacional sobre diferenciación de leucocitos humanos.

**Isotipo:** Ratón IgG2a, kappa

**Reactividad:** Humano

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

**Purificación:** cromatografía de afinidad.

**Composición:** Anticuerpo monoclonal anti-CD3/CD19 de ratón conjugado con fluorocromos y en una solución acuosa que contiene proteína estabilizante y azida sódica al 0,09% (NaN<sub>3</sub>).

| Fluorocromo                         | Reactivo suministrado | Concentración (µg/ml) |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| FITC (isotiocinato de fluoresceína) | 20 ug en 2 ml         | 10                    |
| PE (R-ficoeritrina)                 | 10 ug en 2 ml         | 5                     |

## USO RECOMENDADO

El CD3/CD19 de Immunostep, clones 33-2A3 y A3-B1, es un anticuerpo monoclonal destinado al diagnóstico in vitro para la identificación y enumeración de linfocitos en muestras humanas que expresan CD3 y CD19 usando citometría de flujo.

## IMPORTANCIA CLINICA

El CD3 se utiliza para el diagnóstico de algunas enfermedades que cursan con disminución de la cantidad de células inmunocompetentes, generalmente, descenso en el número de linfocitos CD3+ T maduros.

El CD19 puede utilizarse para el diagnóstico o pronóstico de algunas enfermedades de inmunodeficiencias relacionadas con los linfocitos B CD19+. El reactivo también puede ser de valor para determinar el linaje de células linfoides malignas en casos de leucemia crónica y aguda y linfoma, con la gran mayoría de los tumores malignos de células B que expresan CD19<sup>(7-9)</sup>.

## PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD3/CD19 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD3 y CD19. Para identificar estas células se incubó 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. Ficha de datos de seguridad (FDS) 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>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 isotópicos:

| Fluorocromo | Control isotópico | Referencia Immunostep |
|-------------|-------------------|-----------------------|
| FITC        | Ratón IgG2a       | ICIGG2AF-100UG        |
| PE          |                   | ICIGG2APE-50UG        |

- 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:

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 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/CD19 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 CD3/CD19 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 6.

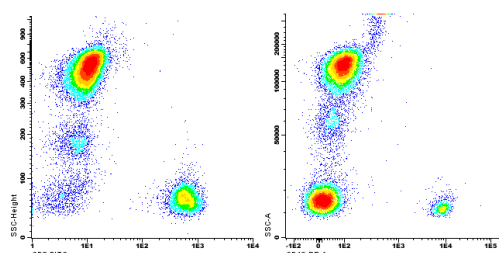


Fig. 1: Diagrama biparamétrico de la intensidad media de fluorescencia de los linfocitos CD3+ Y CD19+ y su complejidad interna (SSC) en sangre periférica normal de un paciente sano.

## 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/µL) de células positivas en la 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 µL)

## 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. 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.

5. Los valores obtenidos de individuos normales pueden variar entre distintos laboratorios, por tanto, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de normalidad.
6. 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.

#### 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>4,5,6</sup>.

Los valores obtenidos de individuos sanos podrían variar entre distintos laboratorios. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de normalidad.

También se recomienda el uso de controles comerciales. 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

Las muestras de sangre se obtuvieron de donantes caucásicos sanos, y fueron tratadas con los anticuerpos monoclonales CD3 FITC (Clon: 33-2A3) y CD19 PE (Clon: A3-B1). Se seleccionaron para el análisis las células contenidas en las regiones de linfocitos, monocitos y granulocitos. Las muestras de sangre fueron procesadas por un método de marcaje de fluorescencia directa.

##### CD3 FITC

|       | Leucocitos |           |              |
|-------|------------|-----------|--------------|
|       | Linfocitos | Monocitos | Granulocitos |
| SPN1  | 89,38      | 6,96      | 8,08         |
| SPN2  | 82,87      | 3,33      | 8,93         |
| SPN3  | 80,4       | 3,22      | 4,67         |
| SPN4  | 84,98      | 1,38      | 3,48         |
| SPN5  | 78,98      | 7,80      | 7,36         |
| SPN6  | 71,39      | 6,00      | 5,68         |
| SPN7  | 87,82      | 1,41      | 7,25         |
| SPN8  | 79,52      | 3,69      | 4,11         |
| SPN9  | 91,32      | 3,73      | 5,94         |
| SPN10 | 62,53      | 4,78      | 3,22         |

| Estadística         | %Linfocitos + | %Monocitos + | %Granulocitos + |
|---------------------|---------------|--------------|-----------------|
| N                   | 10            | 10           | 10              |
| Media               | 80,92         | 4,23         | 5,87            |
| Mediana             | 81,635        | 3,71         | 5,81            |
| Desviación Estándar | 8,709092      | 2,162298     | 1,991240        |
| Mínimo              | 62,53         | 1,38         | 3,22            |
| Máximo              | 91,32         | 7,80         | 8,93            |

#### CD19 PE

|       | Leucocitos |           |              |
|-------|------------|-----------|--------------|
|       | Linfocitos | Monocitos | Granulocitos |
| SPN1  | 36         | 6,45      | 0,28         |
| SPN2  | 2,26       | 18,10     | 0,34         |
| SPN3  | 26,42      | 17,58     | 0,29         |
| SPN4  | 4,47       | 9,70      | 0,58         |
| SPN5  | 13,17      | 9,13      | 0,40         |
| SPN6  | 9,39       | 5,27      | 0,29         |
| SPN7  | 13,71      | 5,17      | 0,46         |
| SPN8  | 11,24      | 3,13      | 0,27         |
| SPN9  | 6,6        | 8,81      | 0,36         |
| SPN10 | 11,08      | 4,79      | 0,53         |

| Estadística         | %Linfocitos + | %Monocitos + | %Granulocitos + |
|---------------------|---------------|--------------|-----------------|
| N                   | 10            | 10           | 10              |
| Media               | 26,87         | 17,63        | 0,76            |
| Mediana             | 11,16         | 7,63         | 0,35            |
| Desviación Estándar | 10,30981431   | 5,205606     | 0,110352969     |
| Mínimo              | 2,26          | 3,13         | 0,27            |
| Máximo              | 26,42         | 18,10        | 0,58            |

##### SENSIBILIDAD

La sensibilidad de los anticuerpos monoclonales CD3 FITC y CD19 PE se determina por medio del marcaje de una muestra sanguínea de un donante sano. Para determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado se usan concentraciones crecientes de cada anticuerpo (deliberadas). Proporcionando una indicación de su fiabilidad durante un uso normal.

##### CD3 FITC

| Modelo | R                   | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> ajustada | Error estandar de la estimación |
|--------|---------------------|----------------|-------------------------|---------------------------------|
| 1      | ,997 <sup>(a)</sup> | ,993           | ,992                    | ,63659                          |

(a) Predictores: (Constante), Esperados

##### CD19 PE

| Modelo | R                   | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> ajustada | Error estandar de la estimación |
|--------|---------------------|----------------|-------------------------|---------------------------------|
| 1      | ,997 <sup>(a)</sup> | ,994           | ,993                    | ,17612                          |

(a) Predictors: (Constant), Obtained

## REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad de los anticuerpos monoclonales CD3 FITC y CD19 PE, se determinó utilizando 10 muestras para cada anticuerpo en tres rangos de valores para CD3+ y CD19+, alto, medio y bajo. Así, un total de 30 muestras fueron marcadas con CD3 y CD19.

De esta manera, se demostró la reproducibilidad a través del todo el rango de valores.

Los 10 valores de cada rango fueron marcados, procesados y analizados por separado. Se seleccionaron linfocitos para el análisis del porcentaje total de células para cada uno de los tres rangos.

Para la realización de este estudio, se obtuvo sangre de donantes normales que expresaban niveles altos de linfocitos. Los rangos medios y bajos se obtuvieron mezclando linfocitos conocidos en ratios apropiados, mientras se mantenía la concentración total de células para los tres rangos.

El estudio se realizó en tres laboratorios independientes, donde cada uno obtuvo, marcó y analizó por separado las muestras de sangre.

### CD3 FITC

|            | ALTO % | MEDIO % | BAJO % |
|------------|--------|---------|--------|
| MUESTRA 1  | 29,48  | 23,06   | 14,44  |
| MUESTRA 2  | 29,51  | 22,18   | 14,74  |
| MUESTRA 3  | 29,51  | 25,54   | 15,99  |
| MUESTRA 4  | 29,7   | 25,78   | 16,38  |
| MUESTRA 5  | 29,34  | 25,97   | 15,58  |
| MUESTRA 6  | 29,18  | 25,32   | 15,88  |
| MUESTRA 7  | 28,12  | 24,98   | 16,53  |
| MUESTRA 8  | 29,17  | 25,17   | 15,76  |
| MUESTRA 9  | 28,87  | 25,26   | 16,24  |
| MUESTRA 10 | 29,6   | 25,36   | 15,91  |

| Estadísticas        | ALTO %     | MEDIO %  | BAJO %      |
|---------------------|------------|----------|-------------|
| N                   | 10         | 10       | 10          |
| Media               | 29,241162  | 24,80296 | 15,71786494 |
| CV (%)              | 1,59338133 | 4,973496 | 4,2996180   |
| Desviación Estándar | 0,465923   | 1,233574 | 0,67580815  |
| Mínimo              | 28,12      | 22,18    | 14,44       |
| Máximo              | 29,7       | 25,97    | 16,53       |

### CD19 PE

|            | ALTO % | MEDIO % | BAJO % |
|------------|--------|---------|--------|
| MUESTRA 1  | 13,99  | 5,67    | 0,77   |
| MUESTRA 2  | 13,95  | 5,73    | 0,51   |
| MUESTRA 3  | 14,4   | 5,4     | 0,61   |
| MUESTRA 4  | 14,11  | 5,67    | 0,33   |
| MUESTRA 5  | 14,14  | 5,7     | 0,48   |
| MUESTRA 6  | 14,1   | 5,66    | 0,54   |
| MUESTRA 7  | 14,19  | 5,61    | 0,53   |
| MUESTRA 8  | 14,06  | 5,76    | 0,47   |
| MUESTRA 9  | 14,14  | 5,6     | 0,49   |
| MUESTRA 10 | 14     | 5,89    | 0,53   |

| Estadísticas        | ALTO %   | MEDIO %     | BAJO %     |
|---------------------|----------|-------------|------------|
| N                   | 10       | 10          | 10         |
| Media               | 14,10696 | 5,6664578   | 0,504887   |
| CV (%)              | 0,90582  | 2,2205434   | 22,09888   |
| Desviación Estándar | 0,127784 | 0,125826159 | 0,11574589 |
| Mínimo              | 13,95    | 5,4         | 0,33       |
| Máximo              | 14,4     | 5,89        | 0,77       |

### 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. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
3. 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.
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 EPO5-A3. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline-Third Edition.
7. Idoia Gimferrer, Montse Farnós, María Calvo, María Mittelbrunn, Carlos Enrich, Francisco Sánchez-Madrid, Jordi Vives, and Francisco Lozano. The Accessory Molecules CD5 and CD6 Associate on the Membrane of Lymphoid T Cells J. Biol. Chem., Vol. 278, Issue 10, 8564-8571, March 7, 2003
8. Miranda Kleijn and Christopher G Proud. The regulation of protein synthesis and translation factors by CD3 and CD28 in human primary T lymphocytes. BMC Biochem. 2002; 3: 11.
9. Kubel M, Freistedt B, Hammer P, Thierbach V, Helbig W, Hausteil B, Schultze W. Thrombocyte substitution in acute leukemia. Effect of histocompatibility on the clinical efficacy. 1982;109(2):355-64

### 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)

## VIGILANCIA Y NOTIFICACIÓN

De acuerdo con el Anexo I, sección 20.4.1(n) del Reglamento (UE) 2017/746, el usuario tiene la obligación de notificar cualquier incidente grave relacionado con el uso del producto.

- **Al Fabricante:** Contacte con nuestro departamento de Vigilancia en [vigilancia@immunostep.com](mailto:vigilancia@immunostep.com)
- **A la Autoridad Competente:** Notifique a través de los canales oficiales del Estado miembro.

## EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS

|   |  |
|---|--|
|  | CE etiquetado                              |
|  | <i>In vitro</i> dispositivo de diagnóstico |
|  | Fabricado                                  |
|  | Presta atención a                          |