

Anti-Humano CD2 (TP1/31)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	2F-100T	100 test
PE	2PE-100T	100 test



DESCRIPCIÓN DE PRODUCTO

Otros nombres: T11, LFA-2, CD2R, E-rosette receptor, Erythrocyte receptor, LFA-3 receptor, Rosette receptor, T-cell surface antigen T11/Leu-7.

Descripción: El anticuerpo monoclonal anti-CD2 deriva células biológicas activadas con PMA e ionomicina (humano).

Clon: TP1/31

Isotipo: Ratón IgG1, 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-CD2 humano conjugado con un fluorocromo y en solución acuosa que contiene proteína estabilizante y el 0,09% de azida sódica (NaN₃).

Fluorocromo	Reactive suministrado	Concentración (µg/ml)
FITC (Fluorescein isothiocyanate)	100 ug en 2 ml	50
PE (R-Phycoerythrin)	50 ug en 2 ml	25

USO RECOMENDADO

El CD2 de Immunostep, clon TP1 / 31, es un anticuerpo monoclonal destinado para uso diagnóstico in vitro en la identificación y enumeración de linfocitos T periféricos humanos y el 90% de los timocitos que mediante citometría de flujo.

RELAEVANCIA CLINICA

El anticuerpo monoclonal CD2 de Immunostep puede ser utilizado como marcador en la evaluación de neoplasias malignas linfoides ya que se expresa tanto en la mayoría de los precursores de los linfomas como de las leucemias. En algunas poblaciones neoplásicas de células T por ejemplo, en los linfomas periféricos de células T, el CD2 se puede eliminar de manera aberrante.¹⁶

PRINCIPIOS DEL TEST

El anticuerpo monoclonal anti-CD2 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD2. Para identificar estas células, la muestra se incuba con el anticuerpo y se analiza mediante citometría de flujo.

CONDICIONES APROPIADAS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

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.

- 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.

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)^{7,8}. 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
PE	Mouse IgG1	ICIGGPE-50
FITC		ICIGGIF-100

- 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 isotípico 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 CD2 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 CD2 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.

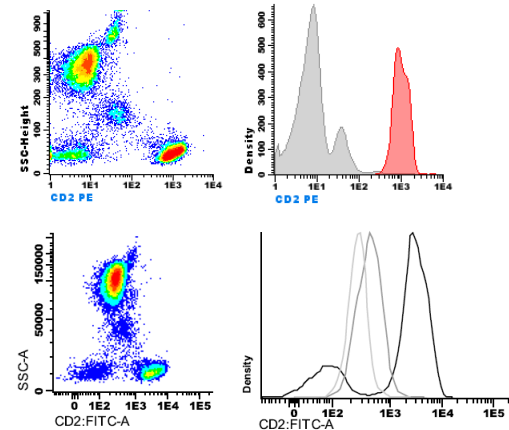


Fig. 1: A la izquierda, un diagrama biparamétrico de la intensidad de fluorescencia promedio de la población de linfocitos CD2+ y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de un donante sano. A la derecha, un diagrama de la misma muestra en formato de histograma.

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 resultados⁹.

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

CARACTERISTICAS

ESPECIFICIDAD

Para evaluar la especificidad del reactivo, se estudiaron 10 muestras de sangre de donantes sanos marcadas con un control isotípico adecuado y el Mab CD2 PE. Se evaluó el porcentaje de linfocitos, monocitos y granulocitos marcados con el MAb mencionado. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
SPN1	82,22	11,44	0,84
SPN2	84,23	6,82	0,48
SPN3	79,78	10,78	0,41
SPN4	77,07	4,74	0,37
SPN5	69,38	11,96	1,00
SPN6	81,42	8,22	0,57
SPN7	67,6	7,80	0,33
SPN8	55,07	11,20	0,73
SPN9	81,98	8,86	0,47
SPN10	83,39	3,35	0,51
10	10	10	10

		Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
N	Validos	10	10	10
	Perdidos	0	0	0
Media		76,21	8,51	0,57
Mediana		80,60	8,54	0,49
Moda		55,07	3,35	0,33
Desviación stdr		9,39	2,93	0,21
Varianza		88,17	8,58	0,04

SENSIBILIDAD

La sensibilidad del anticuerpo monoclonal CD2 se determinó marcando una muestra de sangre de un donante normal. Se hicieron diluciones de una muestra de sangre periférica para verificar la escala de concentración de las células marcadas obtenidas. Los resultados muestran un excelente nivel de correlación entre los resultados obtenidos y los esperados en función de la dilución utilizada.

Para determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado CD2 FITC en lugar de pequeñas variaciones (pero deliberadas). Proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.

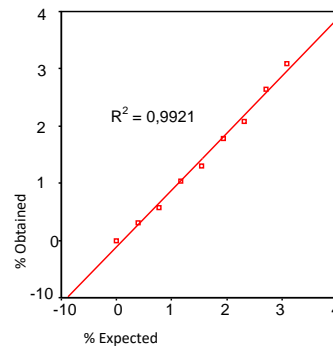
Resumen datos

	Muestra	Dilucion	Esperados	Obtenidos
1	400µl A + 0µl B	100,00	21,38	21,38
2	350µl A + 50µl B	87,50	18,70	19,70
3	300µl A + 100µl B	75,00	16,03	15,96
4	250µl A + 150µl B	62,50	13,36	12,99
5	200µl A + 200µl B	50,00	10,69	9,95
6	150µl A + 250µl B	37,50	8,01	8,64
7	100µl A + 300µl B	25,00	5,34	6,12
8	50µl A + 350µl B	12,50	2,67	2,82
9	0µl A + 400µl B	0,00	0,00	0,00
N	9	9	9	9

Resumen modelo

Modelo	R	R ²	Ajustada R ²	Estimación del error estandar
1	0,997(a)	0,994	0,993	0,59824

a Predicción: (Constante), Esperados



REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad del anticuerpo monoclonal conjugado con CD2 se determinó realizando 10 determinaciones repetidas de cada anticuerpo en cada uno de los tres rangos de CD2 +, alto, medio y bajo. Por lo tanto, se realizaron un total de 30 determinaciones para cada forma de CD2. 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 CD2 +. Las muestras de rango medio y bajo se obtuvieron mezclando las células CD2 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.

Estadística descriptiva

	N	Minimo	Maximo	Media	Desviacion stdr.	Coef. variación	
CD2 FITC	Alto	10	26,24	28,76	27,36	0,77	0,78
	Medio	10	18,11	19,28	18,81	0,36	0,36
	Bajo	10	15,69	18,17	17,29	0,71	0,71
	Validos	10					
CD2 PE	Alto	10	32,26	39,28	34,03	2,19	4,80
	Medio	10	19,18	20,98	20,17	0,58	,34
	Bajo	10	2,87	3,83	3,39	0,24	,06
	Validos	10					

**Nota: datos analizados con SPSS para Windows 11.0.*

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. Galocha B, López D, López de Castro JA. Clonal heterogeneity in LFA-3 and ICAM-1 requirement for lysis by alloreactive T lymphocytes. *J Immunol.* 1993 Mar 1;150(5):1653-62.
2. Orfao A, Ciudad J, González M. Flow cytometry in the diagnosis of cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;221:145-52.
3. Kaleem Z, White G, Zutter MM. Aberrant expression of T-cell-associated antigens on B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Am J Clin Pathol* 2001;115:396-403.
4. Jamal S, Picker LJ, Aquino DB, McKenna RW, Dawson DB, Kroft SH. Immunophenotypic analysis of peripheral T-cell neoplasms. A multiparameter flow cytometric approach. *Am J Clin Pathol.* 2001;116:512-526.
5. Uckun FM, Steinherz PG, Sather H, et al. CD2 antigen expression on leukemic cells as a predictor of event-free survival after chemotherapy for T-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood.* 1996;88:4288-4295.
6. Foley R, Soamboonsrup P, Carter RF, et al. CD34-positive acute promyelocytic leukemia is associated with leukocytosis, microgranular/hypogranular morphology, expression of CD2 and bcr3 isoform. *Am J Hematol.* 2001;67:34-41.
7. 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.

8. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
9. 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