

# Anti-Humano CD5 (L17F12)

Fluorocromo	Referencia	Test
APC	5A-100T	100 test



## DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

**Otros nombres:** glicoproteína de superficie de células T, antígeno de leucocitos T1/Leu-1, Leu-1, Ly-1, T1, Tp67.

**Descripción:** El anticuerpo monoclonal anti-CD5 deriva de células humanas T de leucemia linfocítica aguda (ALL). El anticuerpo está formado por una cadena pesada IgG1 y una cadena ligera kappa.

**Clon:** L17F12

**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-CD5 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)
APC (Alofocianina)	20 ug en 2 ml	10

## USO PROPUESTO.

El CD5 clon L17F12 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 CD5 por citometría de flujo.

## RELEVANCIA CLÍNICA

El anticuerpo monoclonal CD5 de IMMUNOSTEP se puede también utilizar, sólo o en combinación con otros anticuerpos para el diagnóstico o pronóstico, tal como un marcador fenotípico para algunos trastornos linfoproliferativos de células B (B-CLL, linfoma de la zona del manto, leucemia de células pilosas, etc ...).

El marcador (CD5 +) de la población se expande en algunos trastornos autoinmunes (artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, insulino-dependiente diabetes mellitus, enfermedad de Graves, etc ...) e in vivo, induce insensibilidad de las células T, y es reportado para prevenir la encefalomiелitis autoinmune experimental en la rata.

El tratamiento con anticuerpos Anti-CD5 tiene un efecto terapéutico sobre la artritis parcial de colágeno de tipo II inducida en ratones DBA / y en GVHD después del trasplante alogénico de médula ósea en los seres humanos.

La frecuencia de células T CD3 + que carecen de expresión de CD5 se incrementa dramáticamente después de trasplante de médula ósea y se correlaciona con la presencia de la EICH.

Por último, las infecciones por virus Herpes inducen la pérdida de la expresión de CD5 (y otras moléculas coestimuladoras, tales como CD28 y CD6) en las células T humanas CD8 + expandida.

## PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD5 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD5. 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. 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.

- r) 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>3,4</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
APC	Mouse IgG2a	ICIGG2AA-50UG

- 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:

- 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.

#### ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Recoger la fluorescencia atribuida al anticuerpo monoclonal CD5 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 CD5 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.

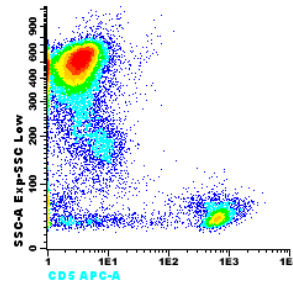


Fig. 1: La imagen es una representación de datos de citometría en sangre periférica (individuo sano) marcadas con el anticuerpo CD5 APC. El reactivo permite identificar los linfocitos CD5+.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 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.
- Los valores obtenidos de individuos normales pueden variar entre distintos laboratorios, por tanto, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de normalidad.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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<sup>5,6,7</sup>.

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

## CARACTERÍSTICAS

### ESPECIFICIDAD

Las muestras utilizadas en este ensayo fueron obtenidas de individuos sanos de raza caucásica. Estas fueron teñidas con anticuerpo monoclonal CD5 APC de Immunostep y procesadas según el protocolo descrito en el punto 5. Se seleccionaron las células dentro de la región de los monocitos, neutrófilos, linfocitos B, eritrocitos y plaquetas.

Además, para evaluar la reactividad producida por la fracción constante del anticuerpo, se estudiaron 10 muestras de sangre periférica de individuos sanos marcadas con un control

Se analizó el porcentaje de células identificadas con estos anticuerpos y el resultado se muestra en la siguiente tabla:

Estadística descriptiva					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación stdr
% control isotópico	10	,14	2,66	,9450	,86341
% Platquetas	10	,02	1,13	,2980	,38583
% Eritrocitos	10	,00	,32	,0800	,09250
% Monocitos	10	,00	,37	,1090	,11846
% Neutrófilos	10	,00	1,38	,2700	,46442
Validos N	10				

### LINEARIDAD

La linealidad del CD5 APC de IMMUNOSTEP se determinó por marcaje de los linfocitos (población positiva) y lo neutrófilos (población negativa) con las células previamente separadas en un FACS Aria II procedentes de un donante humano. Se hicieron diferentes diluciones de dos muestras para determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado y la diferencia de las pequeñas variaciones (deliberadas) para comprobar la escala de concentración de las células marcadas obtenidas.

Los resultados muestran un excelente nivel de correlación entre los resultados obtenidos con los esperados en base a la dilución efectuada. Proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.

Modelo	R	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustada	Error	Ecuación de recta
1	,995 (a)	,990	,988	3,87690	Y= 1,044X - 1,578

Predicción: (Constante), obtenidos

### REPETIBILIDAD

La repetibilidad intra-laboratorio (dentro del laboratorio de precisión) para el anticuerpo monoclonal CD5 APC de IMMUNOSTEP se determinó de acuerdo Clinical and Laboratory Standards Institute documento EPO5-A3 e ISO 5725 mediante la realización de 10 determinaciones o replicas de 10 muestras de sangre anticoagulada a partir de donantes sanos con diferentes rangos de linfocitos y con 3 lotes diferentes.

Por lo tanto, se realizaron un total de 300 determinaciones para calcular la repetibilidad.

Parámetro	Precisión medidas entre		Precisión entre lotes	
	SD	% CV	SD	% CV
MFI	178,27	2,51	412,19	5,53
% células positivas	0,34	4,51	0,61	7,6

### REPRODUCIBILIDAD

La Reproducibilidad entre laboratorios y precisión del anticuerpo monoclonal CD5 APC de IMMUNOSTEP se determinó de acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute documento EPO5-A3 e ISO 5725 mediante la realización de 5 determinaciones o replicas de 5 muestras de sangre anticoagulada a partir donantes sanos recogidas en tubos de Cyto-Chex BCT y adquirida más de 5 días en tres laboratorios diferentes con diferentes citómetros de flujo: un FACS Aria II, un FACSCalibur y un C6 FACS Accury.

Por lo tanto, se realizaron un total de 375 determinaciones para calcular la reproducibilidad.

Parametro	Precisión entre-días		Precisión laboratorios entre-	
	SD	% CV	SD	% CV
% células positivas	0,27	3,63	0,05	0,66

## 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. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to valueate hematology neoplasias: results of an international consensus meeting. Cytometry 2001; 46:23-7.

2. Lozano F, Simarro M, Calvo J. CD Guide. CD5. In: Kishimoto T, Kikutani, H von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th Internacional Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan, New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 1112-3.
3. Lozano F, Calvo J, Roca A, Places L, Simarro M. TC6. CD5 Workshop panel report. In: Kishimoto T, Kikutani, H von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan, New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 56-8.
4. Leong AS-Y, Cooper K, Leong FJW-M. Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. London: Oxford University Press; 1999.p. 51-2.
5. Stein H, Lennert K, Feller AC, Mason DY. Immunohistological analysis of human lymphoma: correlation of histological and immunological categories. Adv Cancer Res 1984;42:67-147.
6. Erber Wn, Mynheer LC, Mason DY. APAAP labelling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia. Lancet 1986;i:761-5.

**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)