

# Anti-Humano CD4 – CD8 (HP2/6/143-44)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC/PE	4F18PEI-50T	50 test



## DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

**Descripción:** El anticuerpo monoclonal CD4/CD8 deriva de células T de leucemia HPB-ALL (CD4) y la hibridación de células de mieloma SP2 de ratón y células de bazo de ratones BALB /c inmunizados con linfocitos T humanos (CD8).

**Clon:** HP2/6, 143-44

**HLDA:** CD4 → 4<sup>th</sup> Taller internacional sobre diferenciación de leucocitos humanos, WS Code 116  
CD8 → 4<sup>th</sup> Taller internacional sobre diferenciación de leucocitos humanos, WS Code 169.

**Isotipo:** ratón IgG2a, kappa and IgG1, kappa

**Reactividad:** Humano

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

**Purificación:** Cromatografía de afinidad

**Composición:** Anticuerpo monoclonal anti-CD3/CD4 de ratón conjugado con fluorocromos y en una solución acuosa que contiene estabilizantes de proteínas y azida sódica al 0,09% (NaN<sub>3</sub>).

Fluorocromo	Reactivo suministrado	Concentración (µg/ml)
FITC (Fluorescein isothiocyanate)	10 µg en 2 ml	510
PE (R-Phycoerythrin)	10 µg en 2 ml	55

## RECOMMENDED USAGE

El CD4/CD8 de Immunostep, clones HP2/6 y 143-44, es un anticuerpo monoclonal destinado al diagnóstico in vitro para la identificación y enumeración de linfocitos en muestras humanas que expresan CD4 y CD8 usando citometría de flujo.

## RELEVANCIA CLÍNICA

Los porcentajes de linfocitos CD4 + y CD8 + se utilizan para monitorear el estado inmunológico de pacientes con enfermedades de inmunodeficiencia, enfermedades autoinmunes o reacciones inmunes.

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

El porcentaje de linfocitos supresores / citotóxicos puede estar fuera del rango de referencia normal en algunas enfermedades autoinmunes y en ciertas reacciones inmunes como la enfermedad de injerto contra huésped aguda (EICH) y el rechazo de trasplantes.

El porcentaje relativo de la población de linfocitos CD8 + a menudo puede disminuir en el lupus eritematoso sistémico activo (LES), pero también puede aumentar en pacientes con LES sometidos a terapia con esteroides.

## PRINCIPLES OF THE TEST

El anticuerpo monoclonal anti-CD4 / CD8 se une a la superficie de las células que expresan los antígenos CD4 / CD8. Para identificar estas células, la muestra se incuba con el anticuerpo y se analiza mediante citometría 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 isotípicos:

Fluorocromo	Control isotípico	Referencia Immunostep
FITC	Mouse IgG2a	ICIGG2AF-100UG
PE	Mouse IgG1	ICIGGIPE-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:

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 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 CD4/CD8 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/CD8 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.

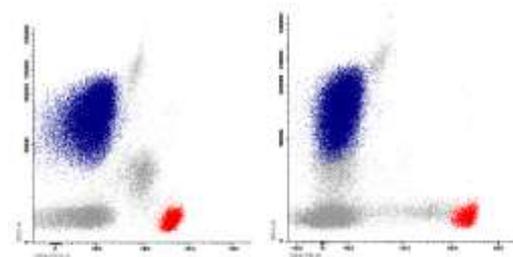


Fig. 1: Diagrama biparamétrico de la intensidad media de fluorescencia de los linfocitos CD3+ Y CD4+ y su complejidad interna (SSC) en sangre periférica normal de un paciente sano.

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

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

## CARACTERISTICAS

### ESPECIFICIDAD

Se obtuvieron muestras de sangre de donantes sanos normales de raza caucásica y se marcaron con el anticuerpo monoclonal de Immunostep CD4 FITC / CD8 PE. Las células contenidas en las regiones de linfocitos, monocitos y granulocitos se seleccionaron para el análisis. Las muestras de sangre se procesaron mediante un método de leucocitos, con tinción de inmunofluorescencia directa para análisis por citometría de flujo.

Para evaluar la Especificidad del reactivo (reactividad cruzada con otras poblaciones celulares) se estudiaron 10 muestras de sangre de donantes sanos, marcadas con un control isotípico adecuado y el MAb a estudiar. Se evaluó el porcentaje de linfocitos, monocitos y granulocitos marcados con el mencionado MAb. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

### CD4 FITC

#### Resumen de los casos

	Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
1	53,84	92,86	84,91
2	37,36	100,00	67,38
3	43,78	100	82,39
4	59,05	90,03	85,28
5	73,11	87,07	82,09
6	55,01	88,10	87,54
7	42,91	78,77	70,03
8	32,75	89,22	89,69
9	55,08	82,15	70,92
10	59,21	100,00	76,85
Total	10	10	10

	Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
N	Validos	10	10
	Perdidos	0	0
Media	51,21	90,82	79,70
Mediana	54,42	89,62	82,24
Moda	32,75 (a)	100,00 (a)	67,38 (a)
Desviacion std.	12,00	7,46	7,90
Varianza	144,23	55,77	62,55
Rango	40,36	21,23	22,31

(a). Existen múltiples modas. Se muestran los valores más bajos

### CD8 PE

#### Resumen de los casos

Muestra	Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
1	49,89	6,09	5,51
2	51,97	0,00	0,00
3	25,62	6,1	1,65
4	34,48	0,00	0,00
5	28,56	0,00	0,00
6	43,81	9,33	0,00
7	38,61	3,46	0,71
8	33,83	0,00	3,74
9	21,12	0,00	0,00
10	38,32	0,00	0,00
10	10	10	10

	Linfocitos	Monocitos	Granulocitos
N	Validos	10	10
	Perdidos	0	0
Media	36,62	2,49	1,16
Mediana	36,40	0,00	0,00
Moda	21,12 (a)	0,00 (a)	0,00 (a)
Desviacion std.	10,04	3,51	1,94
Varianza	100,98	12,32	3,78
Rango	30,85	9,33	5,51

Existen múltiples modas. Se muestran los valores más bajos

### SENSIBILIDAD

La sensibilidad del anticuerpo monoclonal de Immunostep CD4 FITC/CD8 PE se determinó mediante el marcaje de una muestra de sangre de un donante. Se realizaron diluciones de una muestra de sangre periférica para comprobar la escala de concentración de células marcadas obtenidas. Los resultados muestran un excelente nivel de correlación entre los resultados obtenidos y los esperados en función de la dilución utilizada.

Determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado frente a pequeñas variaciones (pero deliberadas), proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.

	Modelo	R	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustada	Error estandar de la estimación
CD4 FITC	1	0,995 (a)	0,990	0,989	0,43654
CD8 PE	1	0,983(a)	0,967	0,962	1,10648

(a) Predicción: (Constante), Esperado

### REPRODUCIBILIDAD

Se determinó la reproducibilidad para el anticuerpo monoclonal conjugado CD4 FITC/CD8 PE, realizando 10 determinaciones con el anticuerpo en cada uno de los tres intervalos de linfocitos; Alto, medio y bajo. Así, se realizó un total de 30 determinaciones. De esta manera, se demostró la reproducibilidad a lo largo de todo el rango de medición.

Las 10 determinaciones para cada intervalo se realizaron mediante marcaje, procesamiento y análisis por separado. Los linfocitos se seleccionaron para el análisis del porcentaje de células marcadas en cada uno de los tres intervalos.

Para realizar este estudio, se obtuvo sangre anticoagulada de un donante sano que expresaba un porcentaje alto, medio y bajo de células linfocitarias. Se mantiene la misma concentración total de células para los tres rangos.

El estudio se realizó en laboratorios independientes, de la manera en que cada laboratorio obtuvo, marcó y analizó muestras de sangre separadas.

CD4 FITC					
	N	Minimo	Maximo	Media	Desviación std.
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
Validos N	10				
CD8 PE					
	N	Minimo	Maximo	Media	Desviación std.
Alto	10	10,57	13,42	11,5330	,90093
Medio	10	1,80	2,54	2,1050	,19996
Bajo	10	,72	,97	,8050	,07472
Validos N	10				

\*Note: datos analizados con SPSS para Windows 11.0.1

#### 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. r 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. Perosa F, Dammacco F. Human CD4 "internal antigen" mimicry by anti-idiotypic monoclonal antibodies. Int J Clin Lab Res. 1994;24(1):33-40.

8. 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.
9. 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.
10. Mason DY, Cordell JL, Gaulard P, Tse AGD, Brown MH. Immunohistological detection of human cytotoxic/suppressor T cells using antibodies to a CD8 peptide sequence. J Clin Pathol 1992;45:1084-8.
11. Nuckols JD, Shea CR, Horenstein MG, Burchette JL, Prieto VG. Quantitation of intraepidermal T-cell subsets in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue helps in the diagnosis of mycosis fungoides. J Cutan Pathol 1999;26:169-75.
12. Nakauchi H. TC9. CD8 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. 65-7.
13. Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, Elder DE, Albelda S, Cotsarelis G. Human hair follicle bulge cells are biochemically distinct and possess an epithelial stem cell phenotype. J Invest Dermatol Symp Proc 1999;4:296-301

#### 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)