

# Anti- Humano CD8 (143-44)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	8FI-100T	100 test
PE	8PEI-100T	100 test
APC	8AI-100T	100 test



## DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

**Otros nombres:** T8, Leu2, Antígeno de diferenciación de linfocitos T T8/Leu-2

**Descripción:** el anticuerpo monoclonal anti-CD8 procede de la hibridación de células de mieloma de ratón SP2 y células de bazo de ratón BALB/c inmunizado con linfocitos T humanos. El anticuerpo está formado por una cadena pesada IgG1 y una cadena ligera kappa.

**Clon:** 143-44

**HLDA:** El anticuerpo anti-CD8 clon 143-44 fue incluido en el 4º taller de trabajo sobre antígenos de diferenciación de Leucocitos humanos con el código 169

**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-CD8 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)
FITC (Isotiocianato de fluoresceína)	20 ug en 2 ml	10
PE (Ficoeritrina)	10 ug en 2 ml	5
APC (Alofocianina)	20 ug en 2 ml	10

## USO PROPUESTO.

El CD8 clon 143-44 de Immunostep es un anticuerpo monoclonal que puede ser usado en diagnóstico invitro para la identificación y enumeración de linfocitos de muestras humanas que expresen CD8 por citometría de flujo.

## RELEVANCIA CLÍNICA

Este marcador puede ser usado sólo o en combinación con otros marcadores para el diagnóstico o pronóstico de algunas inmunodeficiencias, incluyendo gamma-globulinaemia<sup>9</sup>, inmunodeficiencia combinada grave (SCID)<sup>10</sup> y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)<sup>11</sup>.

Un aumento en el número de linfocitos CD8+ se ha reconocido en las infecciones con virus tales como el citomegalovirus, hepatitis B o el VIH<sup>11</sup>.

## PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD8 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD8. Para identificar estas células se incubaba 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.
- 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>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 IgG1	ICIGGIF-100UG
PE		ICIGGPE-50UG
APC		ICIGGIA-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 CD8 y determinar el porcentaje de células T marcadas. Se debe usar un control isotípico conjugado con el mismo fluorocromo, del mismo tipo de cadena pesada de inmunoglobulina y concentración que el 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 y para incluir las células marcadas correctamente.

A continuación se muestra un ejemplo de representación del marcaje en sangre periférica de un donante sano.

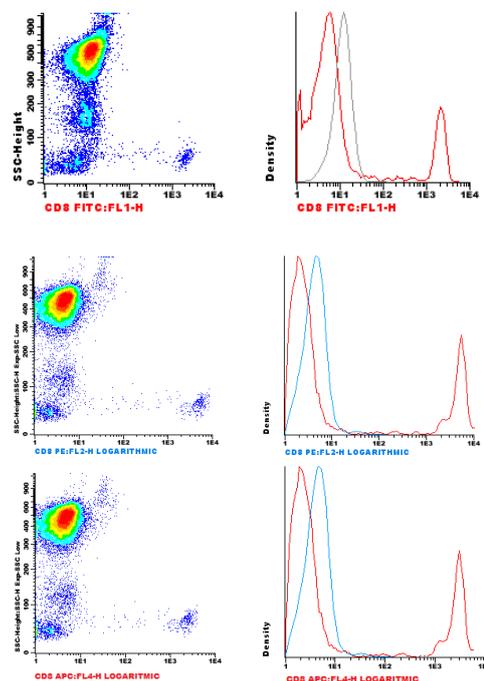


Fig. 1: A la izquierda una representación biparamétrica de la intensidad media de fluorescencia de la población de linfocitos T CD8+ y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de donante sano. A la derecha una representación de la misma muestra en un histograma.

## 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.
- 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>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.

#### CARACTERÍSTICAS

##### ESPECIFICIDAD

El anticuerpo anti-CD8 clon 143-44 fue incluido en el 4º taller de trabajo sobre antígenos de diferenciación de Leucocitos humanos (HLDA) con el código 169<sup>7</sup>

El anticuerpo va dirigido contra el antígeno CD8 también llamado antígeno T8 o Leu2, expresado en el 20-30% de los linfocitos T de sangre periférica, 60% de timocitos y un número limitado de enfermedades con origen en células T. Linfocitos B normales, monocitos, eritrocitos, plaquetas o granulocitos no expresan el antígeno CD8 en superficie<sup>6</sup>.

Para analizar la especificidad se evaluaron 10 muestras obtenidas de individuos sanos de raza caucásica. Estas fueron teñidas con anticuerpo monoclonal CD8 FITC y procesadas según el protocolo descrito en el punto 6. Además, se utilizaron otros anticuerpos específicos de las diferentes poblaciones analizadas.

Se seleccionaron las células positivas para CD8 dentro de la región de los linfocitos T, monocitos, neutrófilos, linfocitos B, eritrocitos y plaquetas. Además, se analizó el porcentaje de células positivas en la región del CD8 FITC para el control isotópico IgG1 conjugado en FITC.

El resultado se muestra en la siguiente tabla:

#### Estadística descriptiva

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
% Control isotópico	,00	,09	,0500	,03162
% Linfocitos T	3,71	9,47	6,50	2,49643
% Plaquetas	,00	,28	,0990	,09445
% Eritrocitos	,00	,09	,0310	,02470
% Linfocitos B	,01	,03	,0170	,00823
% Monocitos	,01	,05	,0210	,01595
% Neutrófilos	,00	1,00	,1060	,31423
Validos N	10			

#### LINEARIDAD

Para el análisis de la linealidad se realizaron diferentes diluciones de una población positiva (linfocitos T CD8) y una población negativa (neutrófilos) manteniendo el número total de células constante y se analizó la relación de los porcentajes esperados con los porcentajes obtenidos.

Los datos obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

R	R Cuadrado	Error típico de la estimación	Regresión lineal
1	,997	,993	Y= 1,012X - 0,479

#### REPETIBILIDAD u PRECISIÓN ENTRE LOTES

La repetibilidad del anticuerpo monoclonal CD8 clon 143-44 fue determinada realizando 10 réplicas de 10 sangres periféricas anticuaguladas procedentes de individuos sanos con diferentes rangos de linfocitos. Además la precisión entre lotes fue analizada utilizando 2-3 lotes diferentes del anticuerpo para cada muestra<sup>8</sup>.

Esto hace un total de 200-300 determinaciones para analizar la repetibilidad de cada producto y su precisión entre lotes. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

	Parámetro analizado	Repetibilidad		Precisión entre lotes	
		Desviación típica	% CV	Desviación típica	% CV
FITC	IMF	178,27	2,51	412,19	5,53
	% células positivas	0,34	4,51	0,61	7,6
PE	IMF	1982,75	10,73	1864,03	10,71
	% células positivas	0,22	2,45	0,07	0,76
APC	IMF	5513,01	10,53	5138,16	9,81
	% células positivas	0,22	1,90	0,01	0,11

## REPRODUCIBILIDAD

Para demostrar la reproducibilidad o la precisión inter-laboratorio, se marcaron 5 réplicas de 5 muestras diferentes de sangre periférica anticoagulada, procedente de donantes sanos y estabilizadas con estabilizante celular<sup>8</sup>. Las muestras fueron adquiridas durante 5 días en tres laboratorios diferentes.

Un total de 375 determinaciones fueron realizadas para demostrar la precisión inter-laboratorio del CD8 clon 143-44.

El resultado del análisis aparece mostrado en el siguiente cuadro:

Parametro	Precisión entre días		Precisión entre laboratorios	
	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. Lu W, Mehraj V, Vyboh K, Cao W, Li T, Routy JPI. J. Int. AIDS Soc. 2015 Jun 29. CD4:CD8 ratio as a frontier marker for clinical outcome, immune dysfunction and viral reservoir size in virologically suppressed HIV-positive patients.
2. 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.
3. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
4. 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.
5. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. Am J Clin Pathol 100:111-5 (1993)
6. Reichert et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. Clin Immunol Immunopathol 60:190-208 (1991)
7. Knapp W, Dorken B, Gilks W et al., eds. Leucocyte Typing IV. Oxford: Oxford University Press, 1989. Garland Publishing Inc.; 1997. p. 65-7.
8. CLSI EPO5-A3. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline-Third Edition.
9. Raziuddin SI, Teklu B. Severe T lymphocyte immunodeficiency associated with hypogammaglobulinemia: defective lymphokine secretion but enhanced autologous mixed lymphocyte reaction. J Clin Immunol. 1989 Nov;9.
10. Rijkers GTI, Scharenberg JG, Van Dongen JJ, Neijens HJ, Zegers BJ. Abnormal signal transduction in a patient with severe combined immunodeficiency disease. Pediatr Res. 1991 Mar;29
11. Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. Science. 1986 Dec 19.

## **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)