

# Anti- Humano CD3 (33-2A3)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	3FI-100T	100 test
PE	3PE1-100T	100 test
APC	3AI-100T	100 test



## DESCRIPCIÓN DE PRODUCTO

**Otros nombres:** T3, CD3 $\epsilon$

**Descripción:** El anticuerpo monoclonal anti-CD3 deriva de la hibridación de células de mieloma SP2 de ratón y células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con linfocitos T humanos. El anticuerpo está formado por una cadena pesada IgG2a y una cadena ligera kappa.

**Clon:** 33-2A3

**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-CD3 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 (Fluorescein isothiocyanate)	50 ug en 2 ml	25
PE (R-Phycoerythrin)	10 ug en 2 ml	5
APC (Allophycocyanin)	20 ug en 2 ml	10

## USO RECOMENDADO

El CD3 de Immunostep, el clon 33-2A3, es un anticuerpo monoclonal diseñado para uso diagnóstico in vitro en la identificación y enumeración de linfocitos de muestras humanas que expresan CD3 mediante citometría de flujo.

## RELEVANCIA CLINICA

El anticuerpo monoclonal de Immunostep CD3 puede usarse, en combinación con otros indicadores, para el diagnóstico o pronóstico de algunas enfermedades de inmunodeficiencia, incluida la gammaglobulinemia y la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave (SCID), que muestran porcentajes reducidos de linfocitos T<sup>(1-6)</sup>.

También se pueden observar porcentajes reducidos de linfocitos T en algunas enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico (LES), la esclerosis múltiple y la enfermedad de Sjogren, así como en ciertas enfermedades virales causadas por el citomegalovirus y el virus de Epstein-Barr.

En general, las enfermedades que tienen una inmunocompetencia celular disminuida como componente pueden mostrar una disminución en los linfocitos T maduros CD3<sup>+</sup>.

Además, un gran número de leucemias son trastornos relacionados con las células T, en los cuales los anticuerpos que reconocen el complejo CD3 / TCR son una herramienta de diagnóstico importante. La diferenciación entre AML, T-ALL y B-ALL se puede realizar mediante inmunofenotipificación con marcadores de diferenciación (precoces). La detección de antígenos de superficie celular utilizando anticuerpos CD3 puede aplicarse para la detección de T-ALL madura, mientras que la T-ALL inmadura expresa en el citoplasma (cyCD3) pero no CD3 de superficie.

Se utilizan anticuerpos CD3 en la caracterización de varios subtipos de leucemias linfoides crónicas. Ejemplos de estas leucemias de células T crónicas son la T-CLL (síndrome de Sezary) y el linfoma periférico de células T (ATLL) que coexpresan los antígenos CD3, CD2, CD4 y CD5. El linfoma de células NK o el linfoma de células T intestinales, coexpresan CD3, CD2 y CD8.

## PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD3 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD3. 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.

- c) Debe evitarse la exposición a la luz. Use luz tenue durante la manipulación, incubación con células y antes del análisis.
- d) No pipetear con la boca.
- e) En el caso de contacto con la piel lavar con abundante agua.
- f) Las muestras deben tratarse de la misma manera que aquellas que pudiesen transmitir infecciones. Debe disponerse de los métodos apropiados para su manejo.
- g) No usar después de la fecha de caducidad establecida en el vial.
- h) Desviaciones de los procedimientos recomendados podrían invalidar los resultados de los análisis.
- i) PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
- j) Sólo para uso profesional.
- k) Antes de adquirir las muestras se debe verificar que el citómetro de flujo está calibrado y compensado.

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 DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Recolectar la fluorescencia atribuida al anticuerpo monoclonal CD3 y determinar el porcentaje de células marcadas. Es necesario usar un control isotípico conjugado con el mismo fluorocromo, del mismo tipo de cadena pesada de inmunoglobulina y concentración que la del CD3, para evaluar y corregir la unión no específica de los linfocitos (consulte los materiales requeridos pero no suministrados). Establezca una región de análisis para eliminar el ruido de fondo de fluorescencia e incluir las células marcadas positivamente.

A continuación se muestra un diagrama de ejemplo del marcaje de sangre periférica:

#### 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>7-9</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	Ratón IgG2a	ICIGG2AF-100
PE		ICIGG2APE-50
APC		ICIGG2AA-50

- 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.

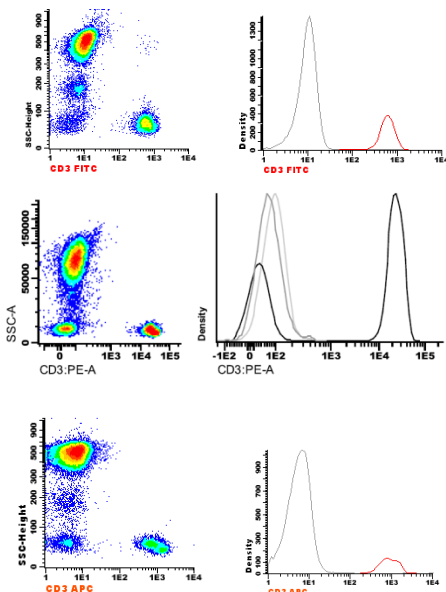


Fig. 1: a la izquierda, un diagrama biparamétrico de la intensidad de fluorescencia promedio de la población de linfocitos CD3+ y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de un donante sano. A la derecha, un diagrama de la misma muestra en formato de histograma.

#### 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.

- 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>10,11</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

El anticuerpo anti-CD3, clon 33-2A3, se incluyó en el Segundo Taller Internacional sobre Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos (HLDA, por sus siglas en inglés).

El anticuerpo está dirigido contra el antígeno CD3, también conocido como T3 o CD3, reacciona con el 85% de los linfocitos T de sangre periférica, el 70% de los timocitos, la mayoría de las leucemias linfocíticas crónicas de células T, las leucemias de Sezary y aproximadamente el 70% de las leucemias linfoblásticas agudas de origen de las células T.<sup>12</sup>

##### LINEARIDAD

La linealidad del anticuerpo monoclonal de Immunostep CD3 se determinó marcando la línea celular Jurkat como población positiva y la línea celular Ramos como población negativa o bien con sangre periférica normal.

Las células se mezclaron en diferentes proporciones con un número final constante de  $1 \times 10^6$  células para lograr diferentes relaciones celulares de 0% de células positivas a 100%.

Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo de acuerdo con la cantidad recomendada durante 15 minutos. Finalmente las células se lavaron de acuerdo con el protocolo estándar. Se calculó una regresión lineal entre los valores esperados y los valores observados.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
CD3 PerCP	0,99 <sup>a</sup>	0,98	0,98	4,99
CD3 FITC	0,99 <sup>a</sup>	0,99	0,99	0,63
CD3 PE	0,99 <sup>a</sup>	0,98	0,98	0,66
CD3 APC	0,99 <sup>a</sup>	0,98	0,98	0,77

a. Predictors: (Constant), % Expected

Los datos confirman la linealidad y la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado en oposición a pequeñas pero deliberadas variaciones. Los datos proporcionan una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.

#### REPRODUCIBILIDAD INTRA LABORATORIO

La reproducibilidad para el anticuerpo monoclonal CD3 se llevó a cabo mediante la realización de 10 determinaciones con distintas réplicas de muestras de sangre anticoagulada de tres donantes sanos en tres rangos de CD3 +; Alto, medio y bajo. Así, un total de 30 determinaciones se realizaron para cada forma de CD3 en el mismo día y utilizando el mismo citómetro.

Los linfocitos se seleccionaron para el análisis del porcentaje de células marcadas en cada uno de los tres rangos.

Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	
CD3 APC	Alto	10	21,00	24,37	22,30	1,01
	Medio	10	6,14	6,63	6,39	0,16
	Bajo	10	1,16	1,47	1,33	0,10
	Validos N	10				
CD3 PE	Alto	10	24,53	27,22	25,76	0,96
	Medio	10	21,70	23,47	22,69	0,44
	Bajo	10	20,12	21,75	20,98	0,52
	Validos N	10				
CD3 FITC	Alto	10	28,12	29,70	29,24	0,46
	Medio	10	22,18	25,97	24,86	1,23
	Bajo	10	14,44	16,53	15,74	0,67
	Validos N	10				
	Validos N	10				

#### 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 replazo de los productos o el reembolso del precio de compra.

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)

#### REFERENCIAS

1. Pilar María Hernández-Campo , Julia Almeida, María Luz Sánchez , Mariester Malvezzi , Alberto Orfao. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: A frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clinical Cytometry*. Volume 70B, Issue 2 , Pages 71 - 81Published Online: 21 Feb 2006.
2. Orfao A, Ciudad J, López-Berges MC, López A, Vidriales B, Caballero MD. Acute Lymphoblastic leukemia (ALL): detection of minimal residual disease (MRD) at flow cytometry. *Leuk Lymph* 1994;13:87-90.
3. Piatier-Tonneau D. CD Guide. CD4. In: Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, et al., editors. *Leucocyte typing VII. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 7th International Workshop and Conference*; 2000 Jun 19-23; Harrogate, United Kingdom. New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p. 750-51.
4. Miedema F, Terpstra FG, Melief CJM. T cell-dependent immunoglobulin synthesis in the human system. Studies with T cell-specific monoclonal antibodies. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, editors. *Leukocyte typing II. Proceedings of the 2nd International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens*; 1984 Sept 17-20; Boston, USA. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer-Verlag; 1986. Volume I. p. 213-22.
5. 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.
6. 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
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. 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.
10. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. *Am J Clin Pathol* 100:111-5 (1993)
11. Reichert et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol* 60:190-208 (1991)
12. Knapp W, Dorken B, Gilks W et al., eds. *Leucocyte Typing IV*. Oxford: Oxford University Press, 1989. Garland Publishing Inc.; 1997. p. 65-7.
13. CLSI EPO5-A3. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline-Third Edition.