

**Dynabeads™ T4 Quant Kit**

Para la cuantificación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la sangre humana periférica

Pub. No. MAN0007792 Rev. Date: 15 October 2015 (Rev. A.0)

Catalog Number: 11321D

Conservar a una temperatura entre 2 y 8 °C

**Descripción del producto**

Dynabeads™ T4 Quant Kit está concebido para facilitar una cuantificación rápida y fácil de las células T CD4<sup>+</sup> humanas directamente en sangre entera.

Las microesferas magnéticas Dynabeads™ CD14 y Dynabeads™ CD4 son microesferas de poliestireno superparamagnéticas uniformes (de 4,5 µm de diámetro) recubiertas con anticuerpos monoclonales de ratón específicos para los antígenos CD14 de monocitos o los antígenos CD4 del subconjunto de células T CD4<sup>+</sup>, respectivamente.

Las microesferas magnéticas Dynabeads™ CD14 se emplean para eliminar los monocitos CD14<sup>+</sup> que pueden expresar niveles bajos de CD4 (1, 2) e inflar artificialmente los recuentos de células T CD4<sup>+</sup>. A continuación las células T CD4<sup>+</sup> se aíslan con las microesferas magnéticas Dynabeads™ CD4. El mismo protocolo es válido para cuantificar las células T CD8<sup>+</sup> con Dynabeads™ CD8.

El procedimiento de aislamiento se lleva a cabo a temperatura ambiente en solo 30 minutos y consta de tres pasos:



La cuantificación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> es uno de los mejores indicadores de la evolución de las enfermedades de inmunodeficiencia como la agammaglobulinemia, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y la aplasia del timo. Una disminución del recuento de células T CD4<sup>+</sup> a menos de 200 por µl de sangre indica un aumento del riesgo de padecer enfermedades oportunistas.

**Contenido del producto**

El Dynabeads™ T4 Quant Kit tiene una cantidad suficiente para 80 pruebas (125 µl de sangre entera/prueba).

Componentes	Cantidad
Dynabeads™ CD14 [etiqueta azul]	2 ml
Dynabeads™ CD4 [etiqueta amarilla]	2 ml
Lysis Solution	7 ml

Las microesferas magnéticas Dynabeads™ CD14 y Dynabeads™ CD4 se suministran en solución salina tamponada con fosfato (PBS), de pH 7,4, con un 0,1 % de albúmina en suero bovino (BSA) y un 0,02 % de azida de sodio como conservante.

**¡PRECAUCIÓN!** La azida de sodio puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar azidas metálicas muy explosivas.

**¡PRECAUCIÓN!** Lysis Solution contiene formaldehído. Deséchela conforme a las normativas.

**Materiales necesarios**

- Imán: MPC™-T4 Quant.
- Mezcladora con capacidad de giro e inclinación (p. ej. MX1 Mixer).
- Tubos de microcentrifugado (p. ej. Eppendorf™ Safe-Lock Tubes™ de 15 ml).
- Mallassez haemocytometer.
- Tubos de recogida de sangre con anticoagulante (ACD o EDTA).
- Pipetas (25 µl, 500 µl) y Parafilm.
- Microscopio de fluorescencia o microscopio óptico.
- Tampones y soluciones (consulte la Tabla 1).

**Tabla 1** Tampones y soluciones\*

Acridine Orange Stain (solución de referencia 10X)	
Añadir los siguientes componentes a un vaso de precipitados:	
Acridine Orange	15 mg
Etanol al 96 %	1 ml
Agua destilada	49 ml
Mezclar bien. Dividir en alícuotas de 1 ml y conservar a -20°C.	
Acridine Orange Stain (solución de trabajo 1X)	
Descongelar 1 ml de solución de referencia Acridine Orange Stain y añadir 9 ml de PBS, pH 7,4.	
Mezclar bien y conservar a una temperatura entre 2 y 8 °C.	
Sternheimer-Malbin Stain	
Mezclar los siguientes componentes en un vaso de precipitados:	
Cristal violeta	100 mg
Safranina	200 mg
Etanol	10 ml
Oxalato amónico	30 mg
Agua destilada	hasta 100 ml
Conservar a una temperatura entre 2 y 8 °C.	
Turck Stain	
Mezclar los siguientes componentes en un vaso de precipitados:	
Ácido acético glacial	2 ml
Violeta genciana	0,0128 g
Agua desionizada	hasta 100 ml
Conservar en un frasco ámbar a una temperatura entre 2 y 8 °C.	
Washing/dilution Buffer (PBS isotónica, pH 7,4)	
Mezclar los siguientes componentes en un vaso de precipitados:	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,16 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,98 g
NaCl	8,10 g
Agua destilada	hasta 1 l
Añadir 0,1 % (p/v) de BSA. Para la conservación a largo plazo, añadir como conservante un 0,02 % de azida de sodio [concentración final].	

\* Preparar con reactivos de calidad analítica.

**Protocolo**

**Preparación de las células**

- Use muestras de sangre frescas recogidas como máximo 24 horas antes. Las muestras de sangre conservadas a una temperatura entre 2 y 8 °C, o a temperatura ambiente durante menos de 24 horas, no muestran una disminución significativa del recuento de células.
- No use heparina como anticoagulante, ya que esta activa las plaquetas y se han observado depósitos de fibrina en las muestras de sangre tratadas con heparina, lo que puede afectar a la precisión de los recuentos de células.

**Elimine los monocitos CD14<sup>+</sup> humanos**

1. Recoja la sangre en un tubo de recogida de sangre que contenga ACD o EDTA.
2. Incube durante más de 5 minutos a temperatura ambiente, mientras inclina y gira con suavidad.
3. Resuspenda las microesferas Dynabeads™ CD14 (etiqueta azul) en el vial (es decir, agite en vórtex durante más de 30 segundos o incline y gire durante 5 minutos).
4. Añada 350 µl de Washing/dilution Buffer, 125 µl de sangre y 25 µl de microesferas Dynabeads™ CD14 a un tubo limpio de microcentrifugado. Tape el tubo y mezcle la muestra con cuidado.
5. Incube la mezcla, girándola e inclinándola con suavidad, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Dé unos ligeros golpecitos para desprender las gotas de sangre que se hayan adherido al tapón.
6. Retire el tapón con precaución y coloque el tubo en el imán durante 2 minutos. **Nota:** si el tubo se mantiene en el imán durante más de 5 minutos, se producirá sedimentación, lo que afecta al recuento de células CD4<sup>+</sup>. Para evitarlo, con una micropipeta resuspenda la muestra en el tubo con cuidado antes de continuar con el siguiente paso.

7. Transfiera 200 µl de sangre con los monocitos eliminados (sobrenadante) a otro tubo de microcentrifugado para poder utilizarlo sin perturbar el pellet de microesferas en la pared del tubo. Deseche el tubo con los monocitos eliminados.

**Nota:** para la cuantificación de las células T CD8<sup>+</sup>, transfiera otros 200 µl de la muestra a un segundo tubo para aislar las células T CD8<sup>+</sup>.

**Aísle las células T CD4<sup>+</sup> humanas**

Si se utilizan tubos de microcentrifugado para el aislamiento, pliegue una pieza de Parafilm tres veces y colóquela entre el tubo y el tapón para evitar que quede atrapada sangre en el tapón.

1. Resuspenda las microesferas Dynabeads™ CD4 (etiqueta amarilla) en el vial (es decir, agite en vórtex durante más de 30 segundos o incline y gire durante 5 minutos).
2. Añada 200 µl de Washing/dilution Buffer a un tubo con 200 µl de la sangre con los monocitos eliminados.
3. Añada al tubo 25 µl de Dynabeads™ CD4 resuspendidas. Tape el tubo y mezcle la muestra con cuidado.
4. Incube la mezcla, girándola e inclinándola con suavidad durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Dé unos ligeros golpecitos para desprender las gotas de sangre que se hayan adherido a la tapa.
6. Retire el tapón con precaución y coloque el tubo en el imán durante 2 minutos.
7. Con el tubo en el imán, retire y deseche el sobrenadante. Evite alterar las células T CD4<sup>+</sup> ligadas a las microesferas.
8. Lave las células T CD4<sup>+</sup> aisladas, quitando la guía del imán del imán y añadiendo al tubo 500 µl de Washing/dilution Buffer. Coloque sobre el tubo una lámina de Parafilm. Gire el tubo varias veces hasta que las células ligadas a las microesferas estén completamente resuspendidas.
9. Retire la lámina de Parafilm con cuidado. Vuelva a montar la guía del imán en el imán e incube durante dos minutos, para aislar las células T CD4<sup>+</sup> ligadas a las microesferas. **Nota:** se recomienda que los usuarios sin experiencia con esta técnica realicen un segundo lavado (pasos 8-9) para aumentar la pureza.

**Recuento de células T CD4<sup>+</sup> humanas**

Realice el recuento de las células T CD4<sup>+</sup> utilizando un hemocitómetro mediante microscopía por fluorescencia u óptica.

**Nota:** en algunos casos (<2 %), se ha observado contaminación de las células T CD4<sup>+</sup> aisladas con granulocitos/leucocitos olimorfonucleares (PML), donde el recuento de células sobrepasa el intervalo normal en varios órdenes de magnitud. No obstante, una contaminación importante de granulocitos puede observarse fácilmente en el microscopio, debido a la forma característica de su núcleo.

**Tinción de las células para microscopía por fluorescencia**

1. Con el tubo en el imán, retire el Washing/dilution Buffer. Evite perturbar el pellet de las microesferas en la pared del tubo.
2. Quite la guía del imán del imán y lave todas las células ligadas a las microesferas de la pared del tubo con 50 µl de Lysis Solution.
3. Agite en vórtex e incube las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Añada 50 µl de 1X Acridine Orange Stain. Conserve las muestras en un lugar oscuro a una temperatura de 2 a 8 °C hasta que esté listo para realizar el recuento. **Nota:** cuente las muestras en un plazo no superior a una hora después de añadir la Lysis Solution.
5. Agite en vórtex durante 5 segundos y transfiera aproximadamente 20 µl de la suspensión al hemocitómetro. Cuento la cantidad de células en un volumen conocido con un microscopio de fluorescencia, con luz de excitación azul (450/490 nm) y blanca, para visualizar la cuadrícula (consulte "Recuento de células").

## Tinción de las células para microscopía óptica

- Con el tubo en el imán, retire el Washing/dilution Buffer. Evite perturbar el pellet de las microesferas en la pared del tubo.
- Quite la guía del imán del tubo.
- Lave las células ligadas a las microesferas de la pared del tubo con Lysis Solution:
  - 80 µl para Sternheimer-Malbin Stain.
  - 50 µl para Turck Stain.
- Incube las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Añada 20 µl de Sternheimer-Malbin Stain O 50 µl de Turck Stain (el volumen total de la tinción es de 100 µl).
- Conserve las muestras en un lugar oscuro a una temperatura de 2 a 8 °C hasta que esté listo para realizar el recuento.
 

**Nota:** cuente las muestras en un plazo no superior a una hora después de añadir la Lysis Solution.
- Agite en vórtex durante 5 segundos, transfiera unos 20 µl de la suspensión al hemocitómetro y cuente las células en un volumen conocido utilizando un microscopio de luz blanca convencional. (Consulte "Recuento de células").

## Recuento de células

Los núcleos teñidos con Sternheimer-Malbin Stain se ven de color púrpura con un microscopio de luz blanca, y aquellos teñidos con Turck Stain aparecen violeta en un microscopio del mismo tipo.

**Nota:** estos núcleos teñidos no son tan aparentes como los teñidos con acridine orange. Por consiguiente, se necesita una gran agudeza visual y se espera un recuento menor de células, si el recuento se hace con un microscopio óptico.

- Si están presentes menos de 100 células en la cámara del hemocitómetro, repita el recuento y haga una media de los dos recuentos.
- La concentración de células T CD4<sup>+</sup> lisadas en la muestra corresponde a la mitad de la concentración de las células T CD4<sup>+</sup> en la sangre entera.
- Con la fórmula siguiente, convierta el número de células que ha contado en el hemocitómetro en la concentración de las células T CD4<sup>+</sup> de la sangre entera:

$$\text{Cells}/\mu\text{l} = (n \times 2)/v$$

$n$  = número de células contadas  
 $v$  = volumen (µl) contado en el hemocitómetro

## Garantía de calidad

Se recomienda contar con un procedimiento de garantía de calidad para todos los trabajos realizados de forma habitual en un laboratorio.

### Control de calidad interno

Realice tres pruebas ciegas con la misma muestra en una serie de pruebas. La reproducibilidad con la misma muestra es fundamental para determinar los aumentos o disminuciones del número de células T CD4<sup>+</sup>.

### Control de calidad externo

Compare los resultados de sus mediciones de células T CD4<sup>+</sup> con el resultado de un laboratorio de referencia. Las muestras de sangre estabilizadas en una solución como Transfix™ Reagent pueden enviarse al laboratorio de referencia para la realización de mediciones de citometría de flujo.

## Rendimiento y limitaciones

### Especificidad

El coeficiente de correlación de la cuantificación de células T CD4<sup>+</sup> entre el Dynabeads™ T4 Quant Kit y el patrón de referencia de citometría de flujo está comprendido entre 0,89 y 0,96 (3, 4, 5, 6, 8).

### Sensibilidad

Se contaron las células T CD4<sup>+</sup> en 32 puntos en una serie de 3 disoluciones de las muestras. El límite de detección es de 6 células T CD4<sup>+</sup>/µl de sangre entera, con un fondo de +2 desviaciones estándar. La eficiencia de selección de Dynabeads™ CD4 para células T CD4<sup>+</sup> es de 99 % (8).

### Reproducibilidad

El coeficiente de variación es de 8,4 %, mientras que para la citometría de flujo es de 8,3 % (6).

## Limitaciones

- El resultado puede subestimarse para recuentos de más de 800 células T CD4<sup>+</sup> con microscopía.
- Las muestras de sangre conservadas a una temperatura entre 2 y 8 °C o a temperatura ambiente durante más de 24 horas muestran una disminución del recuento de células T CD4<sup>+</sup>.
- El pH del Washing/dilution Buffer es fundamental. Un pH menor de 7,2 dificulta mucho la captura de las células T CD4<sup>+</sup>.

## Intervalos de referencia

Los intervalos de referencia se determinaron a partir de una comparación entre resultados del Dynabeads™ T4 Quant Kit y los producidos por la citometría de flujo. La muestra incluyó 43 individuos sanos que no tomaban ninguna medicación. El límite de confianza de 2,5 % a 97,5 % de los datos clasificados es el intervalo de referencia definido por la comparación de Dynabeads™ T4 Quant Kit y la citometría de flujo (ver la Tabla 2).

Asimismo se determinaron los intervalos de referencia para el Dynabeads™ T4 Quant Kit por sexo (Tabla 4) y por edad (Tabla 5).

Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de referencia normal a partir de la población local.

**Tabla 2** Intervalos de referencia de 95 % para la cuantificación de células T CD4<sup>+</sup>

Técnica	Límite inferior	Límite superior	Promedio	N.º de casos*
Dynabeads™ T4 Quant Kit	438	1570	948	41
FCM	421	1592	964	41
T4 Quant frente a FCM	17	-22	-16	N/A

\* De las 43 personas, uno produjo un valor por encima del corte de 97,5 %, y otro un valor por debajo del corte de 2,5 %.

**Tabla 3** Correlación entre FCM y el Dynabeads™ T4 Quant kit para pacientes sanos.

Técnica	Dynabeads™ T4 Quant Kit	FCM
FCM	0,90	1
Dynabeads™ T4 Quant Kit	1	0,90

**Tabla 4** Intervalos de referencia de 95 % para la cuantificación de células T CD4<sup>+</sup> por sexo.

Clase	Límite inferior	Límite superior	Promedio	N.º de casos
Mujeres	540	1570	998	17
Hombres	438	1504	912	24

**Tabla 5** Intervalos de referencia de 95 % para la cuantificación de células T CD4<sup>+</sup> por edad.

Clase	Límite inferior	Límite superior	Promedio	N.º de casos
< 15 años	734	1570	1230	10
16 a 25 años	656	1242	927	11
26 a 45 años	556	1374	834	9
> 46 años	438	1504	809	5

## Productos relacionados

Producto	N.º de cat.
MPC™-T4 Quant	12030D
Dynabeads™ CD8	11147D
Acridine Orange Staining Solution	93001
Turck Staining Solution	93005
MX1 Mixer	15907
Mallassez Haemocytometer	99503
Washing/dilution Buffer	9408

## Referencias

- Wood GS. et al. (1983) Anti Leu-3/T4 antibodies react with cells monocyte/macrophage and langerhans lineage. *J. Immunol.* 131, 212-216.
- Stewart SJ. et al. (1986) Human T lymphocytes and monocytes bear the same Leu-3 (T4) antigen. *J. Immunol.* 136 3773-3778.
- Lyamuya, E.F. et al. (1996) Evaluation of the FACS count, TRAx CD4 and Dynabeads methods for CD4 lymphocytes determination. *J. Imm. Methods* 195: 103-112.
- Didier, J.M. et al. (2001) Comparative assessment of alternative methods for CD4+ T lymphocytes enumeration in developing countries. *JAIDS* 26 (2).
- Crowe, S. et al. (2003) Monitoring of human immunodeficiency virus infection in resource-constrained countries. *Clin. Infect. Dis.* 37 (Suppl1): 25-35.
- Diagbouga, S. et al. (2003) Successful implementation for a low-cost method for enumerating CD4+ T lymphocytes in resource-limited settings: the ANRS 12-26 study. *AIDS* 2003, 17: 2201-2208.
- Besson-Faure I. et al. (1993) Numération des lymphocytes CD4 et CD8: Etude d'une nouvelle technique par immunoséparation magnétique.
- Poncellet P. et al. (1993) Numération des lymphocytes CD4+ et CD8+ après immunoséparation magnétique. Conférence de Gonsensus l'immunophénotypage lymphocytaire au cours de l'infection à VIH Avril 1993.

## Explicación de los símbolos

	Contiene suficiente cantidad para n pruebas		Precaución, consulte la documentación que se adjunta
	Número de catálogo		

Read SDS en las etiquetas significa: Leer la ficha de seguridad

Abrir viales que tengan la misma vida útil que la impresa en la etiqueta específica del lote, siempre que se almacenen a una temperatura entre 2 y 8 °C.

## Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at [www.lifetechnologies.com/termsandconditions](http://www.lifetechnologies.com/termsandconditions). If you have any questions, please contact Life Technologies at [www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support).

## Limited Use Label License No. 451: No Right to Resell

Notice to Purchaser: Resale of this product is expressly prohibited. No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. For information on obtaining additional rights, please contact [outlicensing@lifetech.com](mailto:outlicensing@lifetech.com) or Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

Fabricado por Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, V.A.Graiciuno 8, LT-02241 Vilnius, Lithuania. Thermo Fisher Scientific Baltics complies with the Quality System Standards ISO 9001 and ISO 13485.

**DISCLAIMER:** TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Corporate entity: Life Technologies | Carlsbad, CA 92008 USA | Toll Free in USA 1.800.955.6288

© 2015 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.