

Anti-Humano CD25 (TP1/6)

Fluorocromo	Referencia	Test
FITC	25F-100T	100 test
PE	25PE-100T	100 test



DESCRIPCIÓN DE PRODUCTO

Otros nombres: Low affinity IL-2R, IL-2R α chain, Tac, p55, Interleukin-2 receptor subunit alpha, IL-2 receptor subunit alpha, IL-2-RA, IL-2R subunit alpha, IL2-RA, TAC antigen.

Descripción: el anticuerpo monoclonal CD25 de Immunostep deriva de células T activadas con PMA y ionomicina.

Clon: TP1/6

Isotipo: Ratón IgG2b, 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-CD25 humano conjugado con un fluorocromo y en solución acuosa que contiene proteína estabilizante y el 0,09% de azida sódica (NaN_3).

Fluorocromo	Reactivo suministrado	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
FITC (Fluorescein isothiocyanate)	100 ug en 2 ml	50
PE (R-Phycoerythrin)	25 ug en 2 ml	12,5

USO RECOMENDADO

El CD25 clon TP1/6 de Immunostep es un anticuerpo monoclonal que puede ser usado en diagnóstico in vitro para la identificación y enumeración de leucocitos de muestras humanas que expresen CD25 por citometría de flujo.

RELEVANCIA CLINICA

El antígeno CD25 está presente en células malignas de pacientes con linfoma / leucemia asociada con el virus linfotrópico humano de células T⁽¹⁻³⁾

PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-CD25 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno CD25. Para identificar estas células se incuba 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

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
- 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)^{4,5}. 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 IgG2b	ICIGG2BF-100UG
PE	Ratón IgG2b	ICIGG2BPE-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 10⁶ 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.

FLOW CYTOMETRY ANALYSIS

Recoger la fluorescencia atribuida al anticuerpo monoclonal CD25 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 CD25 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.

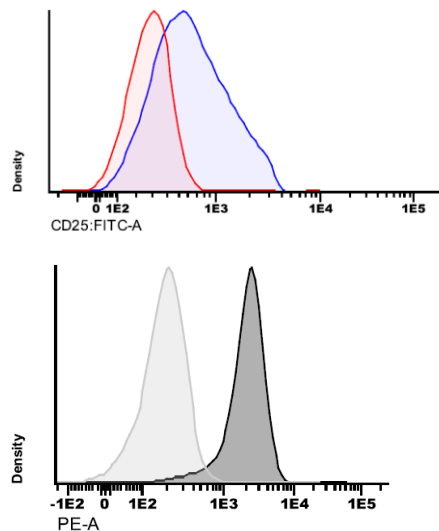


Fig. 1 Intensidad media de fluorescencia de la población de linfocitos CD25+ células activadas por PHA y PMA (12 H) en formato de histograma.

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.
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^{7,8,9}.

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

CARACTERISTICAS

ESPECIFICIDAD

Las muestras de sangre se obtuvieron de donantes sanos normales de raza blanca y se marcaron con el anticuerpo monoclonal de Immunostep CD25. Las células contenidas en las regiones de linfocitos, monocitos, granulocitos, plaquetas y eritrocitos se seleccionaron para el análisis. Las muestras de sangre se procesaron mediante un método de inmunofluorescencia directa para antígenos de membrana por citometría de flujo.

Para evaluar la especificidad del reactivo (reactividad cruzada con otras poblaciones de células), se estudiaron 10 muestras de sangre de donantes sanos, se marcaron con un control isotípico adecuado y el MAb para estudiar. Se evaluó el porcentaje de linfocitos, monocitos, granulocitos, plaquetas y eritrocitos marcados con el MAb mencionado.

Los resultados obtenidos para CD25 FITC se muestran en la siguiente tabla:

Estadística descriptiva					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación std
% linfocitos	10	15,08	31,37	22,16	6,8052
% Monocitos	10	11,52	27,76	17,97	6,1295
% Granulocitos	10	7,59	31,42	17,17	8,5597
Validos N (lista)	10				

SENSIBILIDAD

La sensibilidad de los anticuerpos monoclonales de Immunostep CD25 se determinó marcando una muestra de sangre del donante. Se hicieron diluciones de una muestra de sangre periférica para verificar la escala de concentración de las células marcadas obtenidas. Los resultados muestran un excelente nivel de correlación entre los resultados obtenidos y los esperados en función de la dilución utilizada.

Este estudio se realiza para determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado en oposición a pequeñas variaciones (pero deliberadas) lo cual proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,997(a)	,995	,994	,37577

a Predictors: (Constant), Expected

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad de los anticuerpos monoclonales conjugados CD25 se determinó realizando 10 determinaciones replicadas de cada anticuerpo en cada uno de los tres rangos de CD25 +, alto, medio y bajo. Por lo tanto, se realizaron un total de 30 determinaciones para cada forma de CD25. De esta manera, se demostró la reproducibilidad en todo el rango de medición.

Las 10 determinaciones para cada rango se realizaron mediante el marcaje, el procesamiento y el análisis de 10 muestras separadas. Los linfocitos se seleccionaron para el análisis del porcentaje de células marcadas en cada uno de los tres rangos.

Para realizar este estudio, se obtuvo sangre anticoagulada de un donante normal que expresa un alto porcentaje de células CD25 +. Las muestras de rango medio y bajo se obtuvieron mezclando las células CD25 conocidas en proporciones apropiadas, mientras se mantenía la misma concentración celular total para los tres rangos.

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

Estadística descriptiva						
FITC						
	N		Minimo	Maximo	Media	Desviacion std
Alto	10	10	11,9	13,54	12,4940	0,5063
Medio	10	10	5,48	7,49	6,0937	0,7251
Bajo	10	10	2,58	3,52	2,9136	0,3233
Validos N (lista)	10					
PE						
Alto	10	10	16,04	18,83	17,3880	,84355
Medio	10	10	11,54	13,00	12,0370	,49477
Bajo	10	10	2,85	3,56	3,1910	,18586
Validos N (lista)	10					

*Nota: datos analizados con SPSS para Windows 21

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. Uchiyama, T., Broder, S., and Waldman, T.A. 1981. A monoclonal antibody (Anti-Tac) reactive with activated and functionally mature T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac(+) cells. J. Immunol. 126:1393.
2. Leonard, W.J., Depper, J.M., Robb, R.J., Waldman, T.A. and Greene, W.C. 1983. Characterization of the human receptor for TCGF (T Cell Growth Factor). Proc. Natl. Acad. Sci. 80:6957.
3. Chung IY, Dong HF, Zhang X, Hassanein NM, Howard OM, Oppenheim JJ, Chen X. Effects of IL-7 and dexamethasone: Induction of CD25, the high affinity IL-2 receptor, on human CD4(+) cells. Cell Immunol. 2004 Nov-Dec;232(1-2):57-63.
4. 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.
5. Standard Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens", publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)
6. Quality assurance and immunophenotyping of lymphocytes; approved guideline (1998). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document H42-A.
7. Kotylo PK et al. Reference ranges for lymphocyte subsets in pediatric patients. Am J Clin Pathol 100:111-5 (1993)
8. Reichert et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. Clin Immunol Immunopathol 60:190-208 (1991)

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