

# Anti-humano CD300e (IREM2) (UP-H2)

Fluorocromo	Referencia	Test
APC	IREM2A-100T	100 test



## DESCRIPCION DEL PRODUCTO

**Otros nombres:** alfa-Mar; CD300e; CLM-2; CMRF35-A5

**Descripción:** el anticuerpo monoclonal anti-IREM2 procede de células 300.19 transfectadas con IREM-2 marcado con HA. El anticuerpo está formado por una cadena pesada IgG1 y una cadena ligera kappa.

**Clon:** UP-H2

**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-IREM2 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)
APC (Alofocianina)	25 ug en 2 ml	12,5

## USO PROPUESTO.

El IREM2 clon UP-H2 de Immunostep es un anticuerpo monoclonal que puede ser usado en diagnóstico invitro para la identificación y enumeración de leucocitos de muestras humanas que expresen IREM2 por citometría de flujo.

## RELEVANCIA CLÍNICA

El anti-IREM2 es un anticuerpo específico para monocitos y la línea de células dendríticas mieloides. En sangre periférica normal debería ser positivo para el 80% de los monocitos. Este anticuerpo puede ser usado para clasificar los diferentes tipos de leucemias mieloides, especialmente con componentes monocíticos<sup>1,2</sup>.

## PRINCIPIOS DEL TEST.

El anticuerpo monoclonal anti-IREM2 se une a la superficie de las células que expresan el antígeno IREM2. Para identificar estas células se incubaba la muestra con el anticuerpo y se analiza en un Citómetro de flujo.

## CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO 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>3,4</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
APC	Mouse IgG1	ICIGGIA-5OUG

- 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

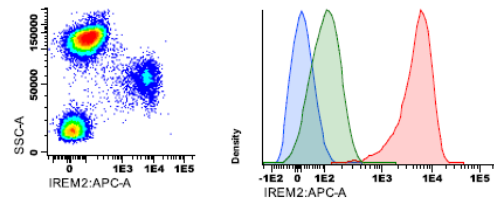


Fig. 1: A la izquierda una representación biparamétrica de la intensidad media de fluorescencia de la población de monocitos IREM2+ y su complejidad interna (SSC) en una muestra de sangre periférica de donante sano. A la derecha una representación de la misma muestra en un histograma.

#### 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 isotópico 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 IREM2 y determinar el porcentaje de células monocíticas marcadas. Se debe usar un control isotópico conjugado con el mismo fluorocromo, del mismo tipo de cadena pesada de inmunoglobulina y concentración que el IREM2 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.

#### 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>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

Las muestras de sangre que se obtuvieron de donantes Caucásicos sanos fueron tratadas con el anticuerpo monoclonal de Immunostep IREM-2 APC (Clon UP-H2). Se seleccionaron para el análisis las células contenidas en las regiones de linfocitos, monocitos y granulocitos. Las muestras de sangre fueron procesadas por el método de inmunofluorescencia directa.

Para evaluar la especificidad del reactivo (reactividad cruzada con otras poblaciones de células), se estudiaron 5 muestras de sangre de donantes sanos, teñidas con un control isotípico adecuado y el anticuerpo a estudiar. Se evaluó el porcentaje de linfocitos, monocitos y granulocitos marcados con dicho anticuerpo. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

**Resumen datos**

	% linfocitos	% monocitos	% granulocitos
1	3,35	98,37	96,53
2	6,17	96,1	96,92
3	1,15	98,14	98,77
4	2,02	94,97	95,93
5	0,38	97,47	96,58
6	1,72	95,48	89,85
7	4,66	97,89	97,86
8	3,64	94,58	97,44
9	2,65	98,41	98,81
10	1,23	97,57	98,28
total N	10	10	10
Media	2,697	96,898	96,697
Mediana	2,335	97,52	97,18
Mínimo	0,38	94,58	89,85
Máximo	6,17	98,41	98,81
Dev. Std.	1,78137	1,47182	2,59773
Varianza	3,173	2,166	6,748

### SENSIBILIDAD

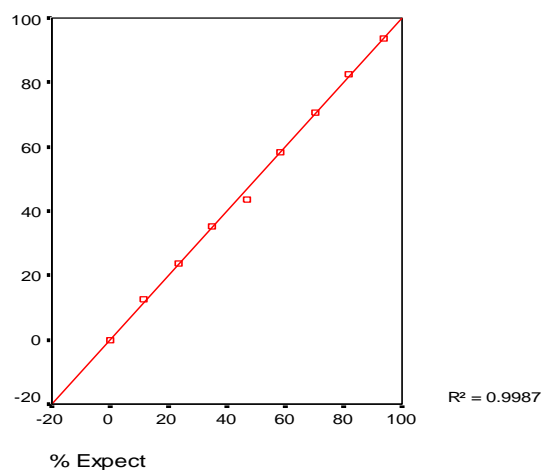
La sensibilidad del anticuerpo monoclonal de IMMUNOSTEP IREM-2 de APC clon UP-H2 se determinó teñiendo una muestra de sangre de un donante sano. Se realizaron diluciones de una muestra de sangre periférica para comprobar la escala de concentración de las células marcadas obtenidas. Los resultados muestran un excelente nivel de correlación entre los resultados obtenidos respecto a los esperados en base a la dilución efectuada.

Para determinar la consistencia del anticuerpo monoclonal conjugado se usan concentraciones crecientes del anticuerpo (deliberadas). Esto, proporciona una indicación de su fiabilidad durante un uso normal en diferentes situaciones.

	Muestra	Dilución	Obtenido	Esperado
1	400µl A + 0µl B	100,00	93,45	93,45
2	350µl A + 50µl B	87,50	82,36	81,76
3	300µl A + 100µl B	75,00	70,54	70,08
4	250µl A + 150µl B	62,50	58,39	58,40
5	200µl A + 200µl B	50,00	43,72	46,72
6	150µl A + 250µl B	37,50	35,43	35,04
7	100µl A + 300µl B	25,00	23,51	23,36
8	50µl A + 350µl B	12,50	12,62	11,68
9	0µl A + 400µl B	,00	0	0
Total	9	9		

**Resumen del modelo**

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,999(a)	0,999	0,999	1,23
Estadísticos de cambio				
Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. del cambio en F
1	,999(a)	0,999	0,999	1,23



De este modo se puede decir que la variable dependiente (el % de células IREM2+ obtenido) puede predecirse a partir de los valores de la variable independiente (el % de células IREM2+ esperado), con una gran precisión.

#### REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad del anticuerpo monoclonal conjugado de Immunostep IREM2 APC (Clon UP-H2), se determinó utilizando 10 muestras por cada anticuerpo en tres rangos de valores para los monocitos; alto, medio y bajo. Así, un total de 30 muestras fueron marcadas con el IREM2 APC. De esta manera, se demostró la reproducibilidad a través de todo el rango de valores.

Los 10 valores de cada rango fueron marcados, procesados y analizados por separado. Se seleccionaron los monocitos para el análisis del porcentaje total de células para cada uno de los tres rangos.

Para la realización de este estudio, se obtuvo sangre anticoagulada de donantes normales que expresaban niveles altos, medios y bajos de monocitos.

#### Resúmenes de casos

	Muestra	Alto	Medio	Bajo
1	1	95,64	95,22	93,85
2	2	95,67	94,56	88,37
3	3	94,99	89,79	91,55
4	4	93,93	95,29	86,21
5	5	92,59	93,95	91,67
6	6	96,08	97,91	92,31
7	7	95,35	95,49	92,36
8	8	96,95	93,23	87,72
9	9	95,92	89,51	90,21
10	10	93,98	97,56	92,52
Total	N	10	10	10

#### Estadística descriptiva

		Altos	Medios	Bajos
N	Validos	10	10	10
	Perdidos	0	0	0
Media		95,11	94,251	90,68
Mediana		95,49 5	94,89	91,61
Desv. Típica		1,2766	2,81854	2,471
Varianza		1,6298 7	7,94417	6,106
Mínimo		92,59	89,51	86,21
Máximo		98,95	97,91	93,85

#### 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.

#### REFERENCIAS

1. Helena Aguilar, Damiana Álvarez-Errico, Andrés C. García-Montero Alberto Orfao, Joan Sayós, and Miguel López-Botet, Molecular Characterization of a Novel Immune Receptor Restricted to the Monocytic Lineage. The Journal of Immunology, 2004, 173: 6703-6711.
2. M. Ferran, F. Gallardo, A.M. Ferrer, A. Salar, E. Pérez-Vila, N. Juanpere, R. Salgado, B. Espinet, A. Orfao, L. Florensa and R.M. Pujol. Acute myeloid dendritic cell leukaemia with specific cutaneous involvement: a diagnostic challenge. British Journal of Dermatology Volume 158 Issue 5, Pages 1129 – 1133. 22 Feb 2008.
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)

#### 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)