

Anti-human CD300e (UP-H2) (IREM2) (UP-H2)

Fluorokrom	Reference	Test
APC	IREM2A-100T	100 test



PRODUKTBEKRÆFTELSE

Andre navne: alpha-Sea; CD300e; CLM-2; CMRF35-A5

Beskrivelse: Anti-IREM2 monoklonalt antistof stammer fra 300.19-celler, der er transfekteret med HA-tagget IREM-2. Antistoffet består af en tung IgG1-kæde og en let kappa-kæde.

Klon: UP-H2

Isotype: Mus-IgG1, kappa

Reaktivitet: Menneske.

Kilde: Supernatant fra en invitro-kultur af hybridomceller.

Oprensning: Affinitetskromatografi

Sammensætning: Fluorokrom-konjugeret monoklonalt anti-humant IREM2-antistof fra mus i en vandig opløsning, der indeholder stabiliserende protein og 0,09 % natriumazid (NaN_3).

Fluorokrom	Medfølgende reagens	Koncentration ($\mu\text{g/ml}$)
APC (allofycocyanin)	25 μg i 2 ml	12,5

FORESLÅET ANVENDELSE.

Immunosteps IREM2-klon UP-H2 er et monoklonalt antistof, der kan bruges i in vitro-diagnostik til identifikation og optælling af leukocyter fra humane prøver, der udtrykker IREM2, ved hjælp af flowcytometri.

KLINISK RELEVANS

Anti-IREM2 er et antistof, der er specifikt for monocytter og den myeloide dendritiske celledelinje. I normalt perifert blod bør det være positivt for 80 % af monocytterne. Dette antistof kan bruges til at klassificere de forskellige typer af myeloide leukæmier, især med monocytiske komponenter^{1,2}.

PRINCIPPER FOR TESTEN.

Det monoklonale anti-IREM2-antistof binder sig til overfladen af celler, der udtrykker IREM2-antigenet. For at identificere disse celler inkuberes prøven med antistoffet og analyseres i et flowcytometer.

BETINGELSER FRA OPBEVARING OG HÅNDTERINGSFORHOLD.

Opbevares mørkt og på køl mellem 2 og 8 °C. MÅ IKKE FRYSES. Antistoffet er stabilt indtil den dato, der er angivet på etiketten på hætteglasset, hvis det opbevares ved 2-8 °C. Må ikke bruges efter denne dato.

Når produktet er åbnet, er det stabilt i en periode på 90 dage.

TEGN PÅ FORRINGELSE.

Reagenser bør ikke anvendes, hvis der er tegn på forringelse. For yderligere information, kontakt venligst vores tekniske service tech@immunostep.com

Det normale udseende er en halvgennemsigtig, lugtfri væske. Der må ikke være udfældninger eller uklarheder. Der bør ikke være nogen lugt.

ANBEFALINGER OG ADVARSLER.



- Reagenserne indeholder natriumazid. Under sure forhold omdannes det til hydrazonsyre, a ekstremt giftig forbindelse.
A z i d f o r b i n d e l s e r skal opløses med postevand før bortskaffelse. Disse forhold anbefales for at undgå aflejringer i rørledninger, hvor der kan opstå eksplosive forhold. Sikkerhedsdatablad (SDS) tilgængeligt på www.immunostep.com på hjemmeside
- Undgå mikrobiel kontaminering af reagenset.
- Udsættelse for lys bør undgås. Brug svagt lys under håndtering, inkubation med celler og før analyse.
- Må ikke pipetteres i munden.
- Ved kontakt med huden vaskes med rigeligt vand.
- Prøver skal behandles på samme måde som dem, der kan overføre infektioner. Der skal være passende håndteringsmetoder til rådighed.
- Må ikke anvendes efter den udløbsdato, der er angivet på hætteglasset.
- Afvielser fra de anbefalede procedurer kan gøre analyseresultaterne ugyldige.
- TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUG
- Kun til professionel brug.
- Kontrollér, at flowcytometret er kalibreret og kompenseret, før du indsamler prøver.

INDSAMLING AF PRØVER.

Venøs blodprøvetagning skal foretages i blodopsamlingsrør med passende antikoagulant (EDTA eller heparin)^(3,4). For at opnå optimale resultater skal prøven behandles inden for 6 timer efter indsamlingen. Prøver, der ikke kan behandles inden for 48 timer efter indsamlingen, skal kasseres.

NØDVENDIGE MATERIALER IKKE LEVERET.

- Isotypiske kontroller:

Fluorokrom	Isotypisk kontrol	Reference Immunostep
APC	Mus-IgG1	ICIGG1A-50UG

- Centrifuge
- 12 x 75 mm reagensglas, der er almindelige til flowcytometri
- Mikropipetter, der kan dispensere mængder mellem 5 µl og 2 ml.
- Blodopsamlingsrør med antikoagulant.
- Fosfatbuffersaltvand (PBS) med 0,09 % natriumazid. Tilsætning af 0,5 % BSA anbefales.
- Vakuumsystem
- Lysisopløsning
- Flowcytometer udstyret med laser og filtre, der passer til fluorokromet.
- Vortex-omrører

PRØVEFORBEREDELSE:

1. Tilsæt den anbefalede mængde i antistofglasset til et 12x75 mm cytometrør. Det anbefales at forberede et ekstra rør med den passende isotypiske kontrol (*se materialer, der kræves, men ikke medfølger*).
2. Tilsæt 100 µL prøve (op til 10⁶ celler), og bland ordentligt i vortexen.
3. Inkuber i mørke ved stuetemperatur (20-25 °C) i 15 minutter eller ved 4 °C i 30 minutter.
4. Tilsæt 2 ml af lysisopløsningen, vortex og inkubér i mørke i 10 minutter, eller indtil prøven er lyseret.
5. Centrifuger ved 540 g i 5 minutter, og sug supernatanten op, så du ikke rører ved cellepelleten. Efterlad ca. 50 µL væske uden aspiration.
6. Resuspender pelleten.
7. Tilsæt 2 ml PBS (*se materialer, der kræves, men ikke medfølger*).
8. Centrifuger ved 540 g i 5 minutter, og sug supernatanten op, så du ikke rører ved cellepelleten. Efterlad ca. 50 µL væske uden aspiration.
9. Resuspender pelleten i 0,3 ml PBS.

Optag i et flowcytometer, eller opbevar ved 2-8 °C i mørke indtil analyse. Prøverne skal indsamles inden for 3 timer efter lysis.

FLOWCYTOMETRI-ANALYSE.

Indsaml den fluorescens, der tilskrives det monoklonale antistof IREM2, og bestem procentdelen af monocytiske celler, der er mærket. En isotypisk kontrol, der er konjugeret med samme fluorokrom, immunoglobulintunge kædetype og koncentration som IREM2, skal bruges til at estimere og korrigere for uspecifik lymfocytbinding (*se materialer, der kræves, men ikke leveres*). Generer et analyseområde for at fjerne baggrundsstøj fra fluorescensen og for at inkludere korrekt mærkede celler.

Et eksempel på en fremstilling af perifer blodtypebestemmelse hos en sund donor er vist nedenfor.

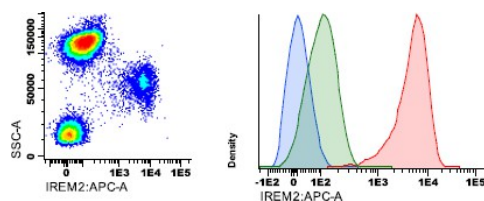


Fig. 1: Til venstre en biparametrisk fremstilling af den gennemsnitlige fluorescensintensitet af IREM2+ monocytpopulationen og dens interne kompleksitet (SSC) i en perifer blodprøve fra en sund donor. Til højre en histogramfremstilling af den samme prøve.

BEGRÆNSNINGER I PROCEDUREN

1. Inkubation af antistoffet med cellerne uden at følge de anbefalede procedurer kan resultere i et fald eller tab af antigene determinanter på celleoverfladen.
2. Værdier fra normale personer kan variere fra laboratorium til laboratorium, og det anbefales derfor, at hvert laboratorium fastsætter sine egne normalitetsintervaller.
3. Unormale celler eller cellelinjer kan udvise en højere antigenæthed end normale celler. Dette kan i nogle tilfælde kræve brug af en større mængde monoklonalt antistof end angivet i prøveforberedelsesprocedurerne.
4. I fuldblodsprøver kan erythrocytter, der findes i patologiske prøver, samt nukleare røde blodlegemer (fra både normale og patologiske prøver) være resistente over for lysis. Længere erythrocytlysetider kan være nødvendige for at undgå inklusion af ikke-lyserede celler i det leukocytfafrænsede område.
5. Blodprøver bør ikke opbevares på køl i for lang tid (mere end 24 timer), da antallet af levedygtige celler vil falde med tiden og endda kan forstyrre analysen.
For at opnå de bedste resultater skal det opbevares ved stuetemperatur få minutter før inkubation med det monoklonale antistof.
6. De mest nøjagtige resultater med flowcytometriprocedurer afhænger af korrekt justering og kalibrering af laserne samt etablering af de korrekte områder.

REFERENCEVÆRDIER.

Unormale resultater i procentdelen af antigeneksprimerende celler eller antigenekspressionsniveauer kan skyldes patologiske tilstande. Det er tilrådeligt at kende de normale mønstre for antigenekspression for at kunne foretage en korrekt fortolkning af resultaterne^{5,6}.

Værdier fra raske personer kan variere fra laboratorium til laboratorium. Det anbefales, at hvert laboratorium fastlægger sine egne normalitetsintervaller.

EGENSKABER

SPECIFIKATION

Blodprøver fra raske kaukasiske donorer blev behandlet med Immunosteps monoklonale antistof IREM-2 APC (klon UP-H2). Celler i lymfocyt-, monocyt- og granulocytregionerne blev udvalgt til analyse. Blodprøverne blev behandlet ved den direkte immunfluorescensmetode.

For at vurdere reagensets specificitet (krydsreaktivitet med andre cellepopulationer) blev der undersøgt 5 blodprøver fra raske donorer, der var farvet med en passende isotypisk kontrol og det antistof, der skulle undersøges. Procentdelen af lymfocytter, monocytter og granulocytter, der var mærket med antistoffet, blev vurderet. De opnåede resultater er vist i tabellen nedenfor:

Oversigt over data

	% lymfocytter	% monocytter	% granulocytter
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
samlet N	10	10	10
Medier	2,697	96,898	96,697
Medium	2,335	97,52	97,18
Minimum	0,38	94,58	89,85
Maksimum	6,17	98,41	98,81
Dev. Std.	1,78137	1,47182	2,59773
Afvigelse	3,173	2,166	6,748

SENSITIVITET

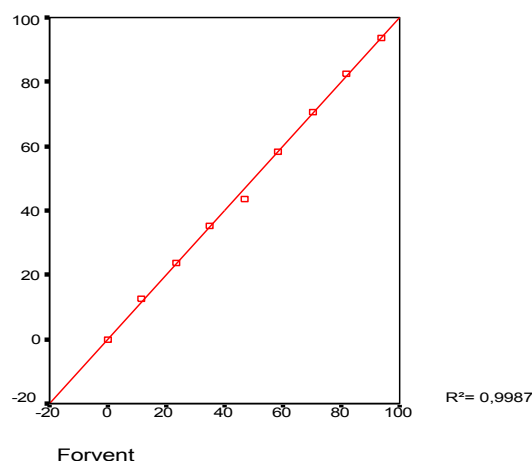
Følsomheden af det monoklonale antistof mod IMMUNOSTEP IREM-2 fra APC klon UP-H2 var blev bestemt ved farvning af en blodprøve fra en sund donor. Fortyndinger af en perifer blodprøve blev udført for at kontrollere koncentrationsområdet for de opnåede mærkede celler. Resultaterne viser en fremragende korrelation mellem de opnåede resultater og de forventede resultater baseret på den udførte fortynding.

For at bestemme konsistensen af det konjugerede monoklonale antistof anvendes stigende koncentrationer af (bevidst) antistof. Dette giver en indikation af dets pålidelighed under normal brug i forskellige situationer.

	Prøve	Fortynding	Hentet	Forventet
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
I alt	9	9		

Sammenfatning af modellen

Model	R	R firkantet	R-kvadrat korrigeret	Standardfejl ved estimering
1	,999(a)	0,999	0,999	1,23
Statistik over forandringer				
Ændring i R-kvadrat	Ændring i F	gl1	gl2	Sig. af ændring i F
1	,999(a)	0,999	0,999	1,23



Således kan den afhængige variabel (% af opnåede IREM2+-celler) forudsiges ud fra værdierne for den uafhængige variabel (% af forventede IREM2+-celler) med stor nøjagtighed.

REPRODUCERBARHED

Reproducerbarheden af det Immunostep-konjugerede monoklonale antistof IREM2 APC (klon UP-H2) blev bestemt ved hjælp af 10 prøver for hvert antistof i tre intervaller af monocytværdier; høj, medium og lav. Således blev i alt 30 prøver mærket med IREM2 APC. På denne måde blev reproducerbarheden over hele værdiområdet demonstreret.

De 10 værdier fra hvert område blev markeret, behandlet og analyseret separat. Monocytter blev udvalgt til analyse af den samlede procentdel af celler for hvert af de tre områder.

Til denne undersøgelse fik vi antikoaguleret blod fra normale donorer, der udtrykte høje, mellemstore og lave niveauer af monocytter.

Resumé af sager

	Prøve	Høj	Medium	Under
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
I alt	N	10	10	10

Beskrivende statistik

		Altos	Medier	Bas
N	Gyldig	10	10	10
	Fortabt	0	0	0
Medier		95,11	94,251	90,68
Medium		95,495	94,89	91,61
Standardafvigelse		1,2766	2,81854	2,471
Afgivelse		1,62987	7,94417	6,106
Minimum		92,59	89,51	86,21
Maksimum		98,95	97,91	93,85

GARANTI

Immunostep-produkter garanteres for den mængde og det indhold, der er angivet på produktetiketten på leveringstidspunktet til kunden. Immunostep fraskriver sig enhver anden

garanti. Immunosteps ansvar er begrænset til udskiftning af produkterne eller tilbagebetaling af købsprisen.

REFERENCER

1. Helena Aguilar, Damiana Álvarez-Errico, Andrés C. García-Montero Alberto Orfao, Joan Sayós og 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 og R.M. Pujol. Akut myeloid dendritisk celleleukæmi med specifik kutan involvering: en diagnostisk udfordring. British Journal of Dermatology Volume 158 Issue 5, Pages 1129 - 1133. 22. februar 2008.
3. Standardprocedurer for indsamling af diagnostiske blodprøver", udgivet af National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).
4. Kliniske anvendelser af flowcytometri: Kvalitetssikring og immunfænotypning af lymfocytter; godkendt retningslinje (1998). Wayne PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Dokument H42-A.
5. Kotylo PK et al. Referenceområder for lymfocytundergrupper hos pædiatriske patienter. Am J Clin Pathol 100:111-5 (1993)
6. Reichert et al. Lymfocyt subset referenceområder hos voksne kaukasiere. Clin Immunol Immunopathol 60:190-208 (1991)

FREMSTILLET AF:



Immunostep S.L
 Avda. Universidad de Coimbra, s/n
 Cancer Research Center (CIC)
 Campus Miguel de Unamuno
 37007 Salamanca (Spanien)
 Tlf. (+34) 923 294 827
www.immunostep.com