



## Kit de Screening para la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN)

Ref: CYT-HPN-1

Para uso en investigación

### USO PROPUESTO

El Kit de *Screening* para la detección de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) es un reactivo de inmunofluorescencia directa de cuatro colores diseñado para la detección de células con déficit de las moléculas de glucosil-fosfatidil-inositol (GPI) en monocitos y neutrófilos por citometría de flujo (CF). Actualmente está indicado para la realización del *screening* de HPN en pacientes que presentan anemia hemolítica no inmune, hemoglobinuria, trombosis en sitios infrecuentes, aplasia medular (AM) o síndromes mielodisplásicos (SMD) tipo anemia refractaria simple, y en citopenias mantenidas de origen desconocido <sup>(1)</sup>.

### GENERALIDADES

La CF es una herramienta importante en la caracterización analítica y cuantitativa de células por su capacidad de ofrecer información simultánea, rápida y cuantitativa de varios parámetros de cada una de las células que constituyen la muestra a analizar. La CF requiere suspensiones celulares que se incuban con anticuerpos marcados de forma fluorescente y que están dirigidos contra proteínas celulares específicas. El citómetro de flujo detecta las señales de fluorescencia del complejo antígeno-anticuerpo marcado con el fluorocromo, de forma que la intensidad de fluorescencia de las células marcadas es proporcional a la cantidad de sitios antigénicos presentes en la célula.

La HPN es una enfermedad clonal adquirida que afecta a las células hematopoyéticas pluripotenciales. El amplio espectro clínico y el curso variable de la enfermedad son un reto para el clínico en términos de diagnóstico y manejo. La presentación clínica clásica de la enfermedad es la anemia hemolítica intravascular acompañada de hemoglobinuria durante la noche. Además de la hemólisis, el diagnóstico de esta entidad patológica puede presentarse como aplasia medular, trombosis e inclusive confundirse con síndrome mielodisplásico. La enfermedad se caracteriza por la deficiencia total o parcial de las proteínas de membrana ancladas a la superficie celular a través de la molécula glucosil-fosfatidil-inositol (GPI) en células HPN <sup>(2)</sup>. Este defecto fenotípico se debe a la mutación del gen PIG-A, que se localiza en el brazo corto del cromosoma X, el cual codifica una enzima necesaria para la síntesis de la molécula GPI <sup>(3)</sup>.

La detección de una expresión deficiente de las moléculas ancladas al GPI en la superficie celular mediante anticuerpos monoclonales (AcMo) mediante CF constituyen la prueba más específica para el diagnóstico de HPN <sup>(4)</sup>. Recientemente se ha publicado que la mejor combinación de marcadores para el rastreo diagnóstico de HPN debe incluir la evaluación del antígeno CD14 en monocitos y el antígeno CD16 en neutrófilos ya que ambos marcadores permiten la identificación inequívoca de células HPN en todos los pacientes analizados y, además, el mayor porcentaje de células afectadas corresponde de forma sistemática a estas dos poblaciones celulares <sup>(5)</sup>. El kit para el *screening* de HPN está compuesto de la siguiente combinación de AcMo: CD16-FITC/CD64-PE/CD45PerCP-Cyanine5.5/CD14-APC, la expresión de CD45 y CD64 permiten la identificación específica de las poblaciones de monocitos y neutrófilos, y la evaluación de la pérdida de expresión del antígeno CD14 en monocitos y del antígeno CD16 en neutrófilos lo cual nos permite detectar la existencia del clon HPN de forma rápida y específica.

### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La CF es una técnica de análisis celular multiparamétrica cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas, generalmente células, alineadas de una en una por delante de un haz de luz láser. La interacción de las células con el haz de luz genera señales de dos tipos: la generada por la dispersión de la luz (FSC/SSC) y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula. Estas señales se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que se procesan en el ordenador.

Cuando se añade el reactivo a la muestra, los anticuerpos monoclonales (AcMo) presentes en el reactivo (CD16-FITC, CD64-PE, CD45-PerCP-Cyanine5.5 y CD14-APC) se unen de forma específica a los antígenos frente a los que están dirigidos, permitiendo la detección por CF de las poblaciones celulares que presentan los antígenos.

La población de eritrocitos, que podría dificultar la detección de la población de interés, se elimina usando una solución lisante de hematíes previa a la adquisición de la muestra en el citómetro. Se recomienda la utilización de la solución lisante de eritrocitos Quicklysis™ (CYT-QL-1) que no requiere lavados posteriores ni contiene fijador y por tanto minimiza la manipulación de la muestra y evita la pérdida celular asociada al proceso de centrifugación <sup>(6, 7)</sup>.

### COMPOSICIÓN DEL REACTIVO

El reactivo CD16-FITC/CD64-PE/CD45-PerCP-Cyanine5.5/CD14-APC se suministra en PBS con azida sódica menor al 0,1% y contiene:

- Anticuerpo monoclonal CD16 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), clon: 3G8, isotipo: IgG1.
- Anticuerpo monoclonal CD64 marcado con R-ficoeritrina (PE), clon: 22, isotipo: IgG1.
- Anticuerpo monoclonal CD45 marcado con el tándem PerCP-Cianina 5.5 (PerCP-Cyanine5.5), clon: HI30, isotipo: IgG1.
- Anticuerpo monoclonal CD14 marcado con alofococianina (APC), clon: 47-3D6, isotipo: IgG1.

Purificación: cromatografía de afinidad

Cantidad suministrada por vial: 1,250 mL (25 determinaciones si se usan 50 µl de reactivo por 10<sup>6</sup> células)

El reactivo no es considerado estéril.

### **CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO**

El reactivo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a una temperatura de 2-8°C. El reactivo no se debe congelar ni exponer a luz directa durante el almacenamiento o la incubación con las células. Mantener el vial seco. Una vez abierto, el vial debe ser almacenado en posición vertical para evitar posibles derrames.

### **ADVERTENCIAS Y RECOMENDACIONES**

1. Para uso en investigación.
2. Se desaconseja realizar el rastreo de HPN en muestras de médula ósea, ya que la expresión de proteínas ancladas a GPI depende del estadio madurativo de las diferentes series hematopoyéticas, lo que complica de forma innecesaria el análisis <sup>(1)</sup>.
3. Este producto se presenta listo para su utilización. Si se altera mediante dilución o adición de otros componentes, tales cambios deben ser validados por el usuario.
4. El reactivo es estable durante el periodo de tiempo indicado en la fecha de caducidad cuando se almacena apropiadamente. No debe utilizarse después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto. Si se almacena en condiciones diferentes a las especificadas, tales condiciones deben ser validadas por el usuario.
5. Alteraciones en la apariencia del producto, como la presencia de precipitados o cambios de color son indicativos de inestabilidad o deterioro. En esas condiciones el reactivo no debe ser utilizado.
6. Contiene 0,09% (p/v) de azida sódica (CAS-Nr. 26628-22-8) como conservante, pero aun así se debe tener cuidado para evitar la contaminación bacteriana del reactivo puesto que en esas circunstancias podrían obtenerse resultados incorrectos.

#### **Indicaciones de peligro:**

H302 Nocivo en caso de ingestión

#### **Indicaciones de prudencia:**

P264 Lavarse concienzudamente tras la manipulación.

P270 No comer, beber ni fumar durante su utilización.

P301+P312 En caso de ingestión, llamar a un centro de información toxicológica o a un médico en caso de malestar.

P301+P330 En caso de ingestión, enjuagarse la boca.

P501 Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con la normativa local, regional, nacional o internacional

7. Todas las muestras biológicas y los materiales con los que estén en contacto deben considerarse como riesgos biológicos. Se recomienda su manipulación como sustancias capaces de transmitir infecciones <sup>(8)</sup> y desecharse con las precauciones reglamentarias establecidas para este tipo de productos. Se recomienda su manipulación con ropa y guantes protectores apropiados y su uso por personal suficientemente cualificado para las técnicas descritas. Evitar el contacto de las muestras con la piel y las membranas mucosas, en caso de contacto lavar inmediatamente con abundante agua.
8. La utilización del reactivo usando tiempos de incubación o temperaturas diferentes a las recomendadas pueden provocar resultados erróneos. Cualquiera de estos cambios deben ser validados por el usuario.

### **PROCEDIMIENTO**

#### **Material suministrado**

CD16-FITC/CD64-PE/CD45-PerCP-Cyanine5.5/CD14-APC suficiente para 25 determinaciones si se usan 50µl de reactivo por 10<sup>6</sup> células

#### **Material requerido pero no suministrado**

- Citómetro de Flujo equipado con láser de ion argón de 488 nm y láser rojo con 633nm y el ordenador y software asociado.
- Tubos de ensayo adecuados para la adquisición de las muestras en el citómetro de flujo utilizado. Habitualmente se utilizan tubos con fondo redondo de 6 mL, 12x 75 mm.
- Pipeta automática (100µL) y puntas.
- Micropipeta con puntas.
- Cronómetro
- Agitador Vortex
- Control isotípico negativo
- Solución lisante Quicklysis™
- Tampón fosfato (PBS) con azida sódica a una concentración menor al 0,1%.

#### **Preparación**

La obtención de sangre se debe hacer en forma aséptica por punción venosa <sup>(9, 10)</sup> en un tubo estéril de recolección de sangre que contenga un anticoagulante apropiado (se recomienda el uso de EDTA). El análisis requiere cien (100) µl de muestra de sangre total por tubo, asumiendo un rango normal de 4-10 x 10<sup>3</sup> leucocitos por µl. Para muestras con recuento de leucocitos muy alto se recomienda diluir las muestras con PBS hasta obtener una concentración óptima aproximada de 1x10<sup>4</sup> células/µL. Almacenar las muestras sanguíneas entre 18-22°C hasta su procesamiento. Se recomienda procesar las muestras de sangre dentro de las 24 horas siguientes a su extracción. No deben utilizarse muestras hemolizadas o con agregados celulares en suspensión.

1. Mezclar 100µl de sangre periférica con 50µl de CD16-FITC/CD64-PE/CD45-PerCP-Cyanine5.5/CD14-APC. Para evaluar la unión inespecífica del anticuerpo puede prepararse un tubo control isotópico.
  2. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
  3. Añadir 2 ml de solución lisante de hematíes Quicklysis™\* e incubar la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
  4. Adquirir directamente en el citómetro de flujo dentro de las cuatro primeras horas de finalizar la preparación de la muestra. Si las muestras no se analizan inmediatamente después de la preparación, se deben almacenar en oscuridad a 2-8°C. Para llegar a la máxima sensibilidad del kit, se recomienda adquirir 100.000 eventos, especialmente si las muestras a estudio presentan síndrome de fallo medular (AM y/o SMD).  
La calibración del instrumento debe hacerse según las recomendaciones del fabricante del citómetro. Antes de adquirir las muestras, ajustar las condiciones de adquisición para minimizar la *debris celular* y asegurarse de que la población celular de interés se distingue apropiadamente.
- \*Nota: El empleo de otras soluciones de lisis diferentes puede requerir la eliminación de los hematíes lisados. En ese caso se debe seguir el protocolo recomendado por el fabricante de la solución de lisis empleada

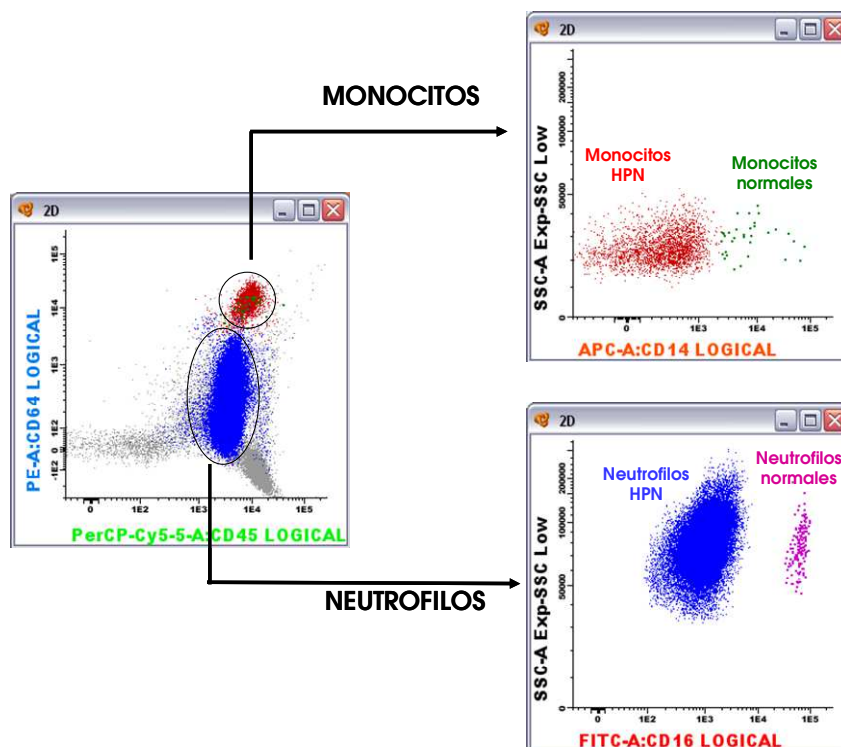
### Análisis por CF

Verificar que el citómetro está alineado correctamente y estandarizado para dispersión de la luz (FSC/SSC en escala lineal) e intensidad de fluorescencia (FL1, FL2, FL3 FL4 en escala logarítmica) y que se ha fijado la compensación adecuada siguiendo las instrucciones del fabricante del citómetro.

Seleccionar las poblaciones de monocitos (CD45+/CD64++) y de neutrófilos (CD45+/CD64+) en base a su característico patrón de expresión de los antígenos CD45 y CD64. Verificar que la población de eosinófilos no está incluida en la población de neutrófilos seleccionada.

A continuación analizar la posible pérdida de expresión del antígeno CD14 sobre la población de monocitos y del antígeno CD16 sobre la población de neutrófilos. Las muestras HPN positivas mostrarán una expresión bimodal de los dos antígenos a estudio, CD14 en monocitos y CD16 en neutrófilos. En estos casos se recomienda realizar un análisis posterior de las moléculas CD55 y CD59, pues la observación de una expresión deficitaria en estas proteínas por parte de otras poblaciones celulares, como por ejemplo los hematíes, tiene un interés clínico adicional.

La figura siguiente muestra un resultado representativo de sangre periférica de un individuo HPN positivo en el que claramente se aprecia la expresión bimodal del antígeno CD14 en monocitos y del antígeno CD16 en neutrófilos característica de esta enfermedad.



### LIMITACIONES

- Las muestras de sangre deben almacenarse a 18-22°C y procesarse dentro de las 24 horas siguientes a su recolección.
- Es recomendable adquirir en el citómetro las muestras teñidas lo antes posible para optimizar los resultados, en caso contrario podrían marcarse de forma inespecífica células no viables. La exposición prolongada a reactivos líticos puede producir la degradación de los leucocitos y la pérdida de células de la población de interés.
- Los resultados obtenidos por CF pueden ser erróneos si el láser del citómetro no está perfectamente alineado o las ventanas de análisis están colocadas de forma incorrecta.

- Las muestras de algunos pacientes pueden resultar difíciles de analizar si existen alteraciones o números muy bajos de la población celular a estudio.

### **CONTROL DE CALIDAD**

- Para obtener resultados óptimos se recomienda verificar la precisión de las pipetas y que el citómetro está correctamente calibrado.
- Los fluorocromos como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), la ficoeritrina (PE), el PerCP-Cianina 5.5 (PerCP-Cyanine5.5) y la Alofocianina (APC) emiten a distintas longitudes de onda pero tienen cierto solapamiento espectral que debe corregirse mediante compensación electrónica si se emplean combinaciones de distintos AcMo conjugados con estos fluorocromos. Los valores óptimos de compensación pueden establecerse mediante el análisis en un diagrama de puntos de células de individuos normales teñidas con AcMo mutuamente excluyentes conjugados con los fluorocromos a utilizar en el ensayo.
- Para evaluar la unión inespecífica del anticuerpo puede prepararse un tubo de control isotípico.









### **BIBLIOGRAFÍA**

- Hernández-Campos PM et al. Hemoglobinuria paroxística nocturna. Med Clin 2008; 131 (16): 617-630.
- Richards SJ, Hillmen P. Advances in the laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Clin Appl Immunol Rev 2001; 1:315-330.
- Takeda J et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Cell 1993; 73:703-711
- Richards SJ et al. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Cytometry 2000; 42:223-233.
- Hernández-Campos PM et al. Detailed immunophenotypic characterization of different major and minor subsets of peripheral blood cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Transfusion 2008; 48:1403-1414.
- Menéndez P, et al. Comparison between a lyse-and-then-wash method and a lyse-non-wash technique for the enumeration of CD34+ hematopoietic progenitor cells. Cytometry (Comm. Clin. Cytometry) 34: 264-271 (1998)
- Gratama JW, Menéndez P, Kraan J, Orfao A. Loss of CD34+ hematopoietic progenitor cells due to washing can be reduced by the use of fixative-free erythrocyte lysing reagents. J Immunol. Methods 239: 13-23 (2000)
- Protection of Laboratory Workers from occupationally acquired infections. Second edition; approved guideline (2001). Villanova PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; Document M29-A2.
- 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.
- 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.

### **GARANTÍA**

Este producto está garantizado sólo en cuanto a su conformidad con la cantidad y el contenido indicados en la etiqueta. No hay otras garantías más allá de lo indicado en la etiqueta del producto. La única responsabilidad de CYTOGNOS se limita a la sustitución del producto o el reembolso del precio de compra.

### **EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS**

	Fecha de caducidad (generalmente AAAA-MM)
	Límite de temperatura
	Manténgase fuera de la luz del sol
	Consulte las instrucciones de uso
	Para uso en investigación
	Código de lote
	Código de catálogo
	Fabricante

### **FABRICADO POR**

#### **CYTOGNOS SL**

Polígono La Serna, Nave 9  
37900 Santa Marta de Tormes  
Salamanca (España)  
Tel: + 34-923-125067  
Fax: + 34-923-125128

Información sobre pedidos: [admin@cytognos.com](mailto:admin@cytognos.com)

Información técnica: [support@cytognos.com](mailto:support@cytognos.com)

[www.cytognos.com](http://www.cytognos.com)