

# remel ES

## Fitohemaglutinina (grado reactivo)

**FINALIDAD DE USO**

La fitohemaglutinina se utiliza para estimular la mitosis de los linfocitos en cultivos celulares y para facilitar los estudios citogenéticos de los cromosomas.

**RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO**<sup>3,5,6</sup>

Fitohemaglutinina (PHA) es el nombre genérico de los extractos acuosos de las semillas de ciertas plantas, en particular del *Phaseolus* spp. Su primera aplicación fue la de separar los leucocitos de la sangre debido a su propiedad de aglutinación de los eritrocitos<sup>2</sup> y, posteriormente, se descubrió que provoca la mitosis progresiva de los linfocitos en cultivos tisulares<sup>4</sup>.

Posteriormente se ha demostrado que la PHA es el estimulante más efectivo y adecuado de linfocitos de muchas especies animales. El uso extendido de cultivos de sangre periférica para el análisis de cromosomas depende en gran medida de esta propiedad de la PHA.

**PRINCIPIOS BIOLÓGICOS DEL PROCEDIMIENTO**

Este procedimiento implica realizar un cultivo adecuado de linfocitos al que se le añade PHA. Ésta estimula la mitosis, que se suspende en la metafase añadiendo Colcemid (deacetil metilcolchicina). Es en esta fase cuando los cromosomas son más visibles. La muestra se trata con una solución hipotónica que, después de hinchar las células y lisar los eritrocitos, facilita la identificación de los cromosomas en las preparaciones fijadas y teñidas en portaobjetos.

**REACTIVOS**

CONTENIDO DEL KIT	
Fitohemaglutinina (grado reactivo)	
HA15/R30852701	1 frasco

DESCRIPCIÓN, PREPARACIÓN PARA EL USO Y ALMACENAMIENTO

Si desea más información, consulte el apartado **Advertencias y precauciones** en este folleto.



Si se almacena a una temperatura entre 2° y 8°C, el material liofilizado permanece activo al menos hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

**PHYTO-HAEMAGGLUTININ**

**Fitohemaglutinina (grado reactivo)**

Es una preparación liofilizada de extractos acuosos de semillas seleccionadas del *Phaseolus* spp. Cada frasco contiene aproximadamente 45 mg de extracto liofilizado.

Cada frasco de PHA liofilizada se debe reconstituir añadiendo 5 ml de salino fisiológico estéril con una jeringa hipodérmica desechable. Se debe tener en cuenta que el uso de otras soluciones puede causar turbiedad. Esterilice el tapón del frasco frotándolo con éter, puncione el centro del tapón de goma con la aguja de la jeringa y manténgala en posición vertical durante la reconstitución.

El material reconstituido se debe almacenar a una temperatura entre 2° y 8°C y utilizarse antes de 1 mes.

**ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

Sólo para uso profesional.

Si desea más información sobre los componentes potencialmente peligrosos, consulte la hoja de seguridad del fabricante y el etiquetado de los productos.

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Después del uso, se deben esterilizar los materiales no desechables. El método adecuado es la esterilización con autoclave a una temperatura de 121°C durante al menos 15 minutos. Los materiales desechables se deben esterilizar con autoclave o incinerar.
- Las salpicaduras de los materiales potencialmente infecciosos se deben eliminar inmediatamente con papel absorbente y se debe limpiar la zona contaminada con un desinfectante bactericida común o con alcohol al 70%. Los materiales utilizados para limpiar las salpicaduras, incluidos los guantes, se deben eliminar de igual modo que los desechos potencialmente infecciosos.
- No pipetee con la boca. Utilice guantes desechables y protección para los ojos cuando manipule las muestras y realice el ensayo. Lávese bien las manos cuando haya terminado el análisis.
- De acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, se recomienda manejar las muestras como material potencialmente infeccioso.

PRECAUCIONES DE MANIPULACIÓN

- Los materiales que presenten contaminación bacteriana se deben desechar. En algunas ocasiones, se puede desarrollar una ligera turbiedad en ausencia de crecimiento bacteriano; sin embargo, no altera las propiedades de la PHA.
- Es muy importante que el procedimiento sea aséptico.
- No utilice los reactivos transcurrida la fecha de caducidad.

**RECÓGIDA, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS**

RECÓGIDA DE LAS MUESTRAS<sup>5</sup>

La preparación correcta de los hemocultivos para el análisis citogenético depende del nivel de linfocitos normales en el momento de la recogida de la muestra. Debido a que las infecciones o los fármacos pueden afectar esta cantidad, siempre que sea posible, los individuos que se vayan a someter a estudios citogenéticos no deben tomar fármacos durante 7 días antes de la recogida de las muestras. Del mismo modo, el índice de mitosis se puede reducir enormemente durante la fase anérgica de determinadas enfermedades (p.ej., enfermedad de Hodgkin, sarcoidosis, etc.) y, en menor medida, en las mujeres normales al final del embarazo.

No se deben añadir conservantes a las muestras de sangre con las que se vaya a preparar un cultivo de linfocitos. Es muy importante que el procedimiento sea aséptico.

ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Siempre que sea posible las muestras de sangre se deben analizar lo antes posible. Si es absolutamente necesario, se pueden almacenar a una temperatura entre 2° y 8°C durante 48 horas como máximo.

**PROCEDIMIENTO**

MATERIALES SUMINISTRADOS

Consulte el apartado **Contenido del kit** en este folleto.

MATERIALES Y EQUIPO NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Medio de microcultivo
  - Suficiente para 25 ensayos
  - 100 ml de medio RPM1 1 640
  - 25 ml de suero fetal de ternera
  - 1,25 ml de glutamina (200 mmol/l)
  - 1,25 ml de penicilina (5 000 UI/ml)/estreptomicina (5 000 µg/ml)
  - 2,5 ml de heparina sin fenol (1 000 UI/ml)
- Colcemid (de Sigma Laboratories): 25 µg/ml de solución.
- 75 mmol/l de solución de cloruro potásico.
- Alcohol acético. 1 parte de ácido acético glacial: 3 partes de metanol (de grado analítico reactivo).
- Giemsa o ácido-orceína acético al 2%.
- Montante.
- Portaobjetos de vidrio y cubreobjetos.
- Tubos de centrifuga de plástico.
- Incubador.
- Centrífuga.
- Agitador de tubos tipo Vortex.
- Microscopio óptico.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO<sup>1,6</sup>

Habitualmente se utiliza sangre o leucocitos separados en los estudios citogenéticos, pero la utilización de la sangre es más fácil y está más extendida en los estudios. Como ocurre con todos los procedimientos de cultivos celulares, se deben establecer las condiciones de cultivo adecuadas para obtener resultados óptimos. Antes del uso, los aditivos del suero se deben analizar para evitar utilizar lotes con efectos inhibitorios. Debido a que el contenido relativo de PHA activa puede variar ligeramente entre los lotes, se recomienda que analice 2 concentraciones de PHA.

<b>A.</b>	<b>Preparación de los microcultivos de sangre</b>
<b>Paso 1</b>	Recoja entre 5 ml y 20 ml de sangre con heparina sin fenol y mezcle por inversión.
<b>Paso 2</b>	Reconstituya la fitohemaglutinina añadiendo 5 ml de salino fisiológico estéril con una jeringa estéril.
<b>Paso 3</b>	Prepare asépticamente el volumen necesario de medio de microcultivo dejando 5 ml para cada muestra de sangre.
<b>Paso 4</b>	Dispense el medio de microcultivo en un frasco estéril con tapón de rosca (adecuadamente etiquetado) y añada asépticamente 0,1 ml de PHA reconstituida. Inmediatamente antes de preparar el cultivo, añada 0,4 ml de sangre recogida con heparina utilizando una jeringa estéril desechable.
<b>Paso 5</b>	Incube los cultivos a una temperatura de 37°C durante 72 horas. Mezcle por inversión el contenido de los frascos todos los días.
<b>B.</b>	<b>Recogida de los cultivos</b>
<b>Paso 1</b>	Saque los frascos con los cultivos del incubador 1,5 horas antes de la recogida del cultivo.
<b>Paso 2</b>	Añada 0,15 ml de solución de Colcemid (25 µg/ml) a cada cultivo.
<b>Paso 3</b>	Mezcle suavemente los frascos y vuelva a colocarlos en el incubador a una temperatura de 37°C.
<b>Paso 4</b>	Saque los cultivos del incubador y transfírellos a tubos de centrifuga de plástico graduados (pegue una etiqueta con la información sobre la muestra).
<b>Paso 5</b>	Centrifugue los cultivos en una centrífuga a una FCR (fuerza centrífuga relativa) de 500 x g durante 5 minutos.
<b>Paso 6</b>	Retire la mayor parte del sobrenadante y deséchelo.
<b>Paso 7</b>	Resuspenda el depósito en 6 ml a 8 ml de solución de 75 mmol/l de cloruro potásico precalentada a una temperatura de 37°C e incube a una temperatura de 37°C durante 10 minutos.

**Paso 8** Centrifugue todos los tubos de la misma manera que en el paso 5 y deseche el sobrenadante.

**Paso 9** Con una pipeta Pasteur añada lentamente entre 6 ml y 8 ml de alcohol acético recién preparado al depósito mientras se agita en un agitador de tubos tipo Vortex. Añada el fijador, gota a gota, en primer lugar y, a continuación, unas gotas para reducir el daño celular y la formación de grumos.

**Paso 10** Deje reposar a una temperatura entre 2° y 8°C durante 10 minutos.

**Paso 11** Centrifugue ligeramente, elimine el sobrenadante (de la manera indicada anteriormente) y añada lentamente otros 5 ml de alcohol acético para resuspender el depósito.

**Paso 12** Repita 2 veces más el paso 11 y resuspenda, por última vez, con 0,5 ml de alcohol acético. Utilice esta suspensión celular para preparar los portaobjetos para el análisis. Se debe tener cuidado de no agitar las células.

**C.** **Preparación de los portaobjetos**

**Paso 1** Los portaobjetos deben estar muy limpios. Un procedimiento adecuado para la limpieza de los portaobjetos es dejarlos sumergidos en ácido crómico durante una noche, después de la cual, se deben lavar con agua corriente durante al menos media hora y secar con un paño que no deje pelusas.

**Paso 2** Añada 1 ó 2 gotas de la preparación celular resuspendida en el centro del portaobjetos y deje que se extiendan.

**Paso 3** Elimine el exceso de fijador de los extremos del portaobjetos con papel de filtro.

**Paso 4** Si aparecen anillos de Newton, elimínelos soplando suavemente para acelerar el secado del portaobjetos.

**Paso 5** Teñia con Giemsa o con ácido acético-orceína al 2% y monte el portaobjetos.

Si se almacenan correctamente, los portaobjetos (una vez fijados, teñidos y montados) se pueden utilizar indefinidamente. La exploración a bajos aumentos, la observación a aumentos elevados y la fotomicrografía correspondiente conducen a la preparación de cariogramas que se pueden estudiar en detalle y conservar junto con el historial clínico.

**RESULTADOS**

CONTROL DE CALIDAD

Existen diferentes factores, entre los que se incluyen la fuente de la muestra, las condiciones de cultivo y la selección de los reactivos, que pueden influir en los resultados obtenidos. Se recomienda analizar en paralelo cada lote de reactivos con material de referencia con actividad conocida antes de utilizar los reactivos.

**LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

No se conoce todavía el mecanismo exacto de la transformación de los linfocitos, por lo que se pueden presentar errores técnicos sin causa aparente. Factores séricos, todavía sin identificar, pueden causar interferencias, sin embargo, la contaminación microbiana de los cultivos celulares sigue siendo la causa más frecuente de resultados erróneos. Por lo tanto, se deben seguir exactamente las instrucciones indicadas en este folleto para los cultivos de linfocitos con el fin de obtener resultados correctos. Los resultados correctos dependen de las condiciones del cultivo y de la utilización de reactivos que proporcionen un índice adecuado de mitosis. Por esta razón, se recomienda el análisis de los aditivos del suero antes del uso, la titulación de la PHA y saber cómo puede afectar la historia clínica del paciente a la respuesta de los linfocitos.

**APLICACIONES CLÍNICAS**

El número modal de cromosomas humanos es 46. Los cromosomas humanos están clasificados de acuerdo con su longitud y posición del centrómero (clasificación de Denver<sup>7</sup>). Las aberraciones en la constitución de los cromosomas se asocian a varios trastornos congénitos como el síndrome de Down (presenta habitualmente un autósoma pequeño de más) y a síndromes relacionados con sexualidad indeterminada (síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter y otros síndromes en los que los cromosomas sexuales son anormales). Algunas anomalidades cromosómicas adquiridas se pueden detectar en una parte de los leucocitos en la leucemia mieloide crónica (cromosoma "Philadelphia") y el alcance del tratamiento se puede evaluar mediante este marcador. Al acercarse al límite de tolerancia en la terapia por radiación, se produce un aumento marcado en la proporción de las células cuya constitución cromosómica es extraña. La aparición de dichas células se debe

## BIBLIOGRAPHY

- <sup>1</sup> **Arakaki, D.T. and Sparkes, R.S.** (1963). Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics*, 2, 57-60.
- <sup>2</sup> **Li, J.G. and Osgood, E.E.** (1949). A method for the rapid separation of leukocytes and nucleated erythrocytes from blood or marrow with a phytohemagglutinin from red beans (*Phaseolus vulgaris*). *Blood*, 4, 670.
- <sup>3</sup> **Maluish, A.E. and Strong, D.M.** (1986). Lymphocyte proliferation. *In* Manual of Clinical Laboratory Immunology, pp. 274-281, 3rd Edition. Eds. N.R. Rose, H. Friedman and J.L. Fahey. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- <sup>4</sup> **Nowell, P.C.** (1960). Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Research*, 20, 462-466.
- <sup>5</sup> **Waithe, W.I. and Hirschorn, K.** (1978). Lymphocyte response to activators. *In* Handbook of Experimental Immunology, 3rd Edition, D.M. Weir, Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Chapter 26-Lymphocyte response to activators.
- <sup>6</sup> **Watt, J.L. and Stephen, G.S.** (1986). Lymphocyte culture for chromosome analysis. *In* Human Cytogenetics: a practical approach, pp. 39-55. Eds. D.E. Rooney and B.H. Czepulkowski, IRL Press Ltd., Oxford.
- <sup>7</sup> A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. (1960). *Lancet*, 1, 1063.

## ENVASE

**REF** HA15/R30852701.....5 ml

## Leyenda de los símbolos

- REF** N° del catálogo
-  Consultar instrucciones de uso (IFU)
-  Límites de temperatura (Temp. de almacenamiento)
- LOT** Código del lote (nº de lote)
-  Utilizar antes de (fecha de caducidad)
-  Fabricante

IFU X7813 revisado noviembre 2011

 Remel Europe Ltd  
Clipper Boulevard West, Crossways  
Dartford, Kent, DA2 6PT  
UK

Para obtener asistencia técnica póngase en contacto con su distribuidor local.