



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 911**

51 Int. Cl.:
G01N 33/80 (2006.01)
G01N 33/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02760881 .9**
86 Fecha de presentación : **04.09.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1423706**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2004**

54 Título: **Determinación y cuantificación de poblaciones de glóbulos rojos en muestras.**

30 Prioridad: **04.09.2001 EP 01203341**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **IQ Corporation B.V.**
Rozenburglaan 13A
9727 DL Groningen, NL

72 Inventor/es: **Van Weeghel, Robert, Paul y**
Suk, Roelf, Johan

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 284 911 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Determinación y cuantificación de poblaciones de glóbulos rojos en muestras.

5 La presente invención se refiere a la detección y la determinación de eritrocitopatías y de hemoglobinopatías.

La detección de células fetales circulantes en muestras de sangre materna representa una parte importante del apoyo del laboratorio a los cuidados de obstetricia de mujeres. Aunque la concentración de eritrocitos fetales encontrados en la circulación sanguínea materna durante el embarazo es normalmente muy pequeña y sin una significación clínica clara, en muchos casos, una hemorragia substancial puede ser resultado de muchas causas, entre las que se incluyen el trauma fetal o maternal y los defectos placentarios (1). La cuantificación de glóbulos rojos fetales (RBC) es lo que se utiliza más comúnmente para estimar el grado de hemorragia feto-materna (FMH), en casos de trauma con sospecha de lesión placentaria o en la situación de incompatibilidad de RhD entre el feto y la madre, para la prevención de la enfermedad hemolítica del recién nacido (HDN) durante el embarazo (2, 3). Los cuidados de obstetricia de mujeres incluyen la prevención de la inmunización de la madre contra un antígeno de células fetales foráneas, y la monitorización de la concentración de anticuerpos maternos. Para prevenir una respuesta inmune, se da a la madre una inmunoprolifaxis basada en anticuerpos policlonales anti-RhD, en una dosis proporcional al recuento estimado de RBC fetales presentes en la circulación sanguínea materna (4, 5). Por lo tanto, es importante disponer de la capacidad de, como mínimo, semicuantificar la cantidad relativa de dichas células.

20 La mayor parte de los laboratorios clínicos llevan a cabo estimaciones de FMH en base a variaciones del método de conteo microscópico basado en preparaciones de elución ácida descrito originalmente como Prueba de Kleihauer-Betke (6). Aunque este ensayo ha demostrado ser clínicamente útil en la detección de episodios importantes de FMH que requieren el tratamiento materno con más inmunoglobulina Rh que la correspondiente a la dosis estándar, es laborioso y se ve afectado por la subjetividad y la imprecisión (7, 8). Aparte de la experiencia de los técnicos de laboratorio para la interpretación de los resultados, la prueba tiene una tendencia a sobrestimar el tamaño de las hemorragias feto-maternas, debido a que los RBC que contienen HbF maternos o células F se cuentan dentro de la población de células fetales (9).

30 Se han propuesto y descrito varios métodos alternativos de rastreo ("screening") más exactos para detectar FMH mediante citometría de flujo. Los primeros informes que investigaron la viabilidad de la utilización de la citometría de flujo para el conteo de células fetales dependían de la detección del antígeno D humano sobre la superficie celular de los RBC (10, 11, 12, 13). Todas estas tentativas mostraron una mayor sensibilidad y precisión que los métodos manuales. Sin embargo, la utilización de anti-RhD solamente es aplicable a situaciones clínicas con incompatibilidad al antígeno Rh o D y no se puede utilizar en todos los casos de trauma materno y de sospecha de FMH. Recientemente se han descrito otros métodos diferentes para la detección por citometría de flujo de células fetales en sangre materna periférica. Los métodos se diferencian en sus medios de utilización de las diferentes etapas de fijación y permeabilización celular, generalmente en combinación con la detección intracelular del antígeno de hemoglobina fetal (HbF) mediante la utilización de anticuerpos anti-HbF.

40 Dado que un aumento de la expresión de la hemoglobina fetal (HbF) en glóbulos rojos periféricos es también una característica común en hemoglobinopatías que comprenden trastornos genéticos de la hemoglobina, tales como la anemia falciforme y la beta-talasemia (14, 15, 16, 17), un método para la detección de HbF en células sanguíneas también encuentra su utilidad en el diagnóstico de hemoglobinopatías diferentes a las relacionadas con FMH.

45 La presente invención da a conocer un método para la distinción entre subconjuntos de glóbulos rojos en una muestra, que comprende el poner en contacto dicha muestra, como mínimo, con un primer reactivo marcador, reactivo con la hemoglobina F de un glóbulo rojo y, como mínimo, con un segundo reactivo marcador, reactivo con una anhidrasa carbónica de un glóbulo rojo y la determinación de la reactividad de dichos marcadores con dichas células. En una realización preferente, la invención da a conocer un método para la distinción entre diferentes subconjuntos de eritrocitos en una muestra y/o su cuantificación, que comprende la utilización de dichos, como mínimo, dos marcadores reactivos, como mínimo, con dos subconjuntos de glóbulos rojos. Para diagnosticar o determinar la FMH, la presente invención distingue entre subconjuntos de glóbulos rojos en una muestra que comprende la combinación de pruebas para un determinante de células esencialmente fetales con un determinante para células esencialmente de adulto. Por supuesto, los diferentes subconjuntos pueden coincidir en el sentido de que algunas células de cada subconjunto llevan dos de los marcadores utilizados en el método elegido. Dicho método es más útil para distinguir entre subconjuntos de eritrocitos maduros, es decir, aquéllos que han madurado más allá del RBC nucleado o de la fase inmadura de reticulocito. En una realización, la presente invención da a conocer un método para la distinción entre glóbulos rojos fetales (RBC) en la sangre materna y/o su cuantificación, que comprende la utilización de dichos, como mínimo, dos marcadores, reactivos con diferentes subconjuntos de glóbulos rojos. En otra realización, la presente invención da a conocer un método para la distinción entre RBC de adulto en sangre que contienen HbF y/o su cuantificación, que comprende la utilización, como mínimo, de dichos dos marcadores, reactivos con varios subconjuntos de glóbulos rojos. A pesar de los resultados dados a conocer recientemente sobre la detección de células que contienen HbF fetal en diferentes muestras de sangre materna, la utilización de un único parámetro no ofrece una calificación exacta y fiable de RBC fetales y células F maternas. Una tentativa de marcador dual o múltiple presenta varias ventajas. Aunque la utilización del antígeno HbF como marcador único permite extensas aplicaciones para la detección de glóbulos rojos fetales en muchas situaciones clínicas, la utilización de anti-HbF por sí misma proporciona la posibilidad de una sobrestimación de la proporción de células fetales reales en una población dada de HbF. La utilización del marcador

de células Anhidrasa carbónica (CA) intracelular para RBC de adulto (18) en combinación con HbF debería permitir, por ejemplo, la distinción clara de glóbulos rojos fetales entre células F maternas interferentes, las cuales tienen un contenido celular de HbF más bajo y son positivas para el marcador CA. En individuos de cualquier edad se encuentran poblaciones pequeñas de eritrocitos de adulto que contienen HbF; a estas células se les ha denominado células F. Para la gente con anemia falciforme, estas células son bastante importantes a nivel funcional ya que son capaces de transportar y liberar el oxígeno.

Se da a conocer un método para la distinción entre varios subconjuntos de glóbulos rojos en una muestra que comprende el poner en contacto dicha muestra, como mínimo, con un primer reactivo marcador, reactivo con una hemoglobina F de un glóbulo rojo y, como mínimo, con un segundo reactivo marcador, reactivo con una anhidrasa carbónica de un glóbulo rojo, y la determinación de la reactividad de dichos reactivos marcadores con dichas células. Entre los componentes de la superficie celular adecuados para detectarse también, se encuentran, por ejemplo, CD71, una glicoproteína de membrana de tipo II de 90-95 kDa que existe como homodímero en la mayor parte de las células en división, entre las que se incluyen los RBC. La proteína desempeña un papel crítico en la captación de hierro a través de la unión y endocitosis de la transferrina, la principal proteína transportadora de hierro; GpA, una sialoglicoproteína de la superficie celular de 41 kDa que se expresa exclusivamente sobre las células eritroides humanas y sus progenitores. La proteína GpA es importante clínicamente en la clasificación de leucemias agudas i, una estructura de antígeno de Lewis glicosilada expresada en linfocitos T y B adultos y en linfocitos fetales y RBC durante los primeros 8 meses de desarrollo. Para algunas aplicaciones, tales como la detección por citometría de flujo, es preferente que, como mínimo, uno de los componentes que se pretenden detectar, comprenda un componente intracelular. Entre los componentes intracelulares adecuados se encuentran, por ejemplo: HbE, una proteína hemoglobina intracelular que consiste en 4 subunidades de proteína de 140 aminoácidos aproximadamente. El tetrámero de hemoglobina embrionaria comprende, además, diferentes cadenas de polipéptidos, epsilon y zeta o epsilon y alfa. La expresión de HbE es más marcada en glóbulos rojos embrionarios. Las anhidrasas carbónicas CA (carbonato deshidratasa; carbonato hidrolasa) forman una gran familia de genes que codifican metaloenzimas de zinc de gran importancia fisiológica. Como catalizadores de la hidratación reversible del dióxido de carbono, estos enzimas participan en una variedad de procesos biológicos, entre los que se incluyen la respiración, la calcificación, el equilibrio ácido-base, la resorción ósea y la formación del humor acuoso, el fluido cerebroespinal, la saliva y el ácido gástrico. Las CAs están codificadas por miembros de 3 familias de genes de CA independientes, es decir, alfa-CA, beta-CA y gamma-CA. Los genes en la familia de la alfa-anhidrasa carbónica codifican isoenzimas de anhidrasa carbónica activos o proteínas relacionadas con la anhidrasa carbónica "acatalíticas" (es decir, desprovistas de actividad de hidratación de CO₂). Las alfa-anhidrasas carbónicas muestran una diversidad extensa en la distribución de los tejidos y en sus funciones biológicas supuestas o establecidas. Algunas de las alfa-CAs se expresan en casi todos los tejidos (por ejemplo, CA 2), mientras que algunas muestran una expresión más restringida, tal como la CA 1 en eritrocitos. La anhidrasa carbónica de eritrocito tiene 2 isoenzimas con diferentes secuencias de aminoácidos y actividades específicas. Las designaciones originales para estas 2 formas principales fueron B y C, las cuales se nombraron posteriormente CA I (o A) y CA II (o B), respectivamente. En las células, las anhidrasas carbónicas pueden residir en el citoplasma, en las mitocondrias o en gránulos secretorios, o asociadas con membranas.

Un componente intracelular de este tipo a detectar puede ser el componente entero *per se*, o puede ser, por ejemplo, la parte intracitosólica de una proteína o un receptor que, de otra manera, se extiende a través de la membrana celular. Para la detección intracelular de componentes intracelulares, se requiere la fijación y permeabilización de los glóbulos rojos, lo cual proporciona de forma ventajosa rigidez y estabilidad a los eritrocitos que deben identificarse; la detección de antígenos intracelulares en eritrocitos fijados de este modo, presenta menos ruido de fondo que sólo la detección de antígenos extracelulares en células no fijadas. Un método preferente es la utilización de una combinación de dos componentes intracelulares (proteínas diana o antígenos) para distinguir entre diferentes poblaciones de glóbulos rojos, por ejemplo, de origen fetal, parental o adulto.

La presente invención da a conocer un método en el que dicho primer componente comprende hemoglobina F. La hemoglobina (Hb) es una proteína intracelular que consiste en 4 subunidades proteicas de 140 aminoácidos aproximadamente. El tetrámero de hemoglobina fetal también comprende diferentes cadenas de polipéptidos, gamma y zeta o gamma y alfa. La expresión de HbF es esencialmente fetal, en el sentido que es más marcada en glóbulos rojos fetales, pero también está presente en glóbulos rojos de adulto a bajas concentraciones. HbF es específica de glóbulo rojo. Debido a la discriminación precisa entre poblaciones de células con HbF y otra proteína intracelular, la presente invención da a conocer un método para cuantificar casi de forma real las células fetales reales y que no incluye ni recuenta posibles células F de adulto interferentes. En otra realización preferente, la presente invención da a conocer un método en el que dicho segundo componente comprende anhidrasa carbónica B. La anhidrasa carbónica es una proteína o metaloenzima con actividad catalítica para el CO₂. La expresión de CA tiene lugar esencialmente o predominantemente en células de adulto. Todavía más preferente (y explicado en más profundidad en la descripción detallada de la presente invención) es un método en el que dicho primer componente comprende hemoglobina F y dicho segundo componente comprende anhidrasa carbónica, especialmente en el que dicha anhidrasa carbónica es de tipo I.

Un reactivo marcador utilizado en un método según la presente invención puede comprender cualquier tipo de molécula de unión, tal como moléculas de unión obtenidas a partir de fagos (a veces también denominadas anticuerpos de fago), pero es preferente un método en el que, como mínimo, uno de dichos reactivos marcadores comprende un anticuerpo. Un anticuerpo, en el formato de Ab completo o Fab, Fv, aFv, cadena simple obtenida de camello o cualquier otra forma de estructura de proteína, es una proteína que comprende una cadena llamada ligera y/o una

cadena pesada, cadenas, que son responsables, cada una o en combinación, de la unión específica del antígeno diana. Un anticuerpo HbF particularmente útil es específico de la subunidad proteica gamma de la hemoglobina F. Los anticuerpos que aumentan contra el antígeno i, a menudo son, en su mayoría, específicos de esta proteína de superficie en la forma glicosilada. El anticuerpo monoclonal CD71 se dirige hacia el receptor de la transferrina, mientras que el anticuerpo anti-GpA reconoce un epítipo sobre el antígeno de la Glicoforina A. Otro anticuerpo útil es específico de la cadena polipeptídica epsilon de la hemoglobina embrionaria (HbE). Los anticuerpos que aumentan contra isotipos de CA son específicos de varios epítipos presentes sobre diferentes anhidrasas carbónicas. Por supuesto, es preferente para su facilidad de detección que, como mínimo, dos o todos los mencionados reactivos marcadores, contengan un anticuerpo, siendo cada uno de dichos anticuerpos reactivos con un componente antigénico distinto de un glóbulo rojo. Tras la fijación y permeabilización el anticuerpo entrará en la célula y se unirá a la proteína diana intracelular fijada.

Otro tipo de reactivo marcador según la presente invención contiene una molécula no proteínica, que puede unirse con elevada especificidad a un componente diana, como un inhibidor que puede unirse a una enzima diana. Por ejemplo, un inhibidor de la sulfonamida se puede complejar a la anhidrasa carbónica a través de la coordinación de un grupo sulfonamida primario al sitio activo del ión de zinc (19). La detección de tal reactivo marcador enlazado a una diana se consigue de forma más fácil mediante la utilización de un inhibidor etiquetado, por ejemplo, un derivado fluorescente del inhibidor. Un reactivo marcador útil para la detección de una proteína diana según la presente invención es una molécula inhibidora fluorescente que etiqueta células a una concentración baja, tal como en el rango nanomolar, y con un tiempo de carga corto, por ejemplo, en 10 minutos. Además, la eficacia de tal inhibidor debería mantenerse sustancialmente inalterada por la etiqueta fluorescente. Un reactivo marcador particularmente adecuado para poner en práctica la presente invención contiene acetazolamida modificada con Bodipy 558/568, un inhibidor fluorescente de CA (20). Esta acetazolamida modificada se utilizó para localizar CA en osteoclastos vivos y se puede obtener de Molecular Probes o empresas similares. En una realización, la presente invención da a conocer un método para distinguir células fetales de sangre materna mediante un anticuerpo contra HbF, como primer reactivo marcador y un inhibidor fluorescente de CA, como segundo reactivo marcador.

En otra realización de la presente invención, las células fetales se identifican a través de la utilización de un reactivo marcador capaz de unirse a un componente intracelular, en el que dicho componente es un ácido nucleico. El término ácido nucleico, tal como se utiliza en la presente invención, hace referencia a ADN o bien a ARN. Por ejemplo, son útiles sondas de ácido nucleico para detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico específica en una célula. Se conocen bien una variedad de métodos para la medición específica de ADN y ARN mediante técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un método para la evaluación de la presencia de cierto ácido nucleico en una muestra implica la utilización de tecnología de hibridación fluorescente *in situ* (FISH). En éste, una muestra se pone en contacto con una sonda etiquetada fluorescente que tiene una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia de ARN o ADN de interés. Posteriormente, se puede medir la hibridación de una sonda a ácido nucleico por un sistema de detección de fluorescencia, por ejemplo, mediante microscopía fluorescente o citometría de flujo. Se ha desarrollado un método FISH rápido y sensible para crear sondas de contenidos de ARN o ADN de células individuales mediante citometría de flujo. Las células fijadas en suspensión se hibridaron con oligodeoxinucleótidos etiquetados con fluorocromo en el extremo 5', complementarios a regiones definidas del ácido nucleico de interés y se analizaron mediante citometría de flujo (21). La presente invención se puede poner en práctica, por ejemplo, mediante un anticuerpo HbF como primer reactivo marcador y una sonda de oligodeoxinucleótido conjugada con fluoresceína en el extremo 5' complementaria a un trozo de ARNm de anhidrasa carbónica como segundo reactivo marcador. También se pueden utilizar los oligonucleótidos etiquetados con otro fluorocromo, tal como cumarina, rodamina, ficoeritrina, Rojo Texas y similares.

Tal como se ha mencionado, la forma más fácil de detectar los reactivos marcadores, ya sean anticuerpos u otras moléculas de unión, es cuando se han etiquetado. Es útil la detección a través de una etiqueta que contiene un fluorocromo.

Un fluorocromo a utilizarse puede ser cualquiera de las moléculas conocidas utilizadas en citometría de flujo y microscopía. Entre los ejemplos de fluorocromos se encuentran: etiquetas de proteína como R-PE, APC, GPF, y etiquetas químicas como tintes Alexa, tintes Cy, etiquetas en tándem entre los tintes mencionados u otros. La mayoría de los tintes se pueden adquirir a Molecular Probes o empresas similares. Es preferente un método en el que, como mínimo, dos de dichos reactivos marcadores contienen un fluorocromo, teniendo cada uno de los fluorocromos un espectro de emisión diferente. El espectro de emisión oscila preferentemente entre 350 y 800 nm. Las enzimas (peroxidasa, fosfatasa alcalina y otros) son generalmente proteínas nativas o recombinantes que se pueden unir a anticuerpos u otros reactivos marcadores (etiquetados) y utilizar para visualizar el desarrollo de color con diferentes sustratos fluorescentes o no fluorescentes como el 2-(5'-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona, (denominado fosfato ELF-97), tetrametil benzidina (TMB) y otros, que se pueden adquirir a Molecular Probes, Pierce y otros.

Es preferente un método, tal como se da a conocer en la presente invención, que comprende además la determinación de la reactividad de dichos reactivos marcadores con dichas células mediante citometría de flujo, es decir, mediante la detección de dicha reactividad de dichos reactivos marcadores con dichas células, mediante la detección de fluorescencia.

La presente invención da a conocer también un equipo de diagnóstico adecuado para la diferenciación de subconjuntos de eritrocitos, comprendiendo dicho equipo, como mínimo, un primer reactivo marcador, reactivo con un primer componente de un glóbulo rojo y un segundo reactivo marcador, reactivo un segundo componente de un glóbu-

ES 2 284 911 T3

lo rojo, preferentemente en el que dicho primer componente comprende hemoglobina F y/o en el que dicho segundo componente comprende anhidrasa carbónica.

5 La anhidrasa carbónica de tipo I es preferente por los motivos explicados anteriormente. Dicho reactivo marcador es preferentemente un anticuerpo, pero en esencia puede ser cualquier molécula de unión con la especificidad de unión deseada, siendo dicho anticuerpo o molécula de unión reactivo con un componente preferentemente intracelular y antigénico de un glóbulo rojo. Dicho equipo también puede comprender el fluorocromo deseado o varios fluorocromos diferentes que tienen un espectro de emisión diferente.

10 La presente invención también da a conocer una mezcla de reactivos adecuada para su inclusión en tal equipo y adecuada para la diferenciación de subconjuntos de eritrocitos, comprendiendo dicha mezcla de reactivos, como mínimo, un primer reactivo marcador, reactivo con un primer componente de un glóbulo rojo y un segundo reactivo marcador, reactivo con un segundo componente de un glóbulo rojo, en la que preferentemente dicho primer componente comprende hemoglobina F y/o en la que dicho segundo componente comprende anhidrasa carbónica. La anhidrasa carbónica de tipo I es preferente por los motivos explicados anteriormente.

20 En la descripción detallada, los presentes inventores informan de un procedimiento altamente exacto y cuantitativo para la detección de distintas poblaciones de células fetales y células F mediante citometría de flujo que puede llevarse a cabo de forma rutinaria. La descripción demuestra, además, que la utilización de un ensayo de un parámetro fluorescente dual, en base a la detección combinada de hemoglobina fetal (HbF) y anhidrasa carbónica (CA), es capaz de separar RBC fetales auténticos de las células F maternas interferentes.

25 Además, en ciertas enfermedades, también se encuentra en adultos un antígeno fetal o fetoproteína. Por ejemplo, un incremento en la expresión de la hemoglobina fetal (HbF) en glóbulos rojos periféricos es una característica común en hemoglobinopatías que comprenden trastornos genéticos de la hemoglobina, tales como la anemia falciforme y la beta talasemia. La presente invención también da a conocer un método para la detección de HbF u otra fetoproteína en glóbulos rojos en muestras de un individuo con una enfermedad, tal como una hemoglobinopatía.

30 Un método según la presente invención también encuentra su utilidad en el campo de las pruebas prenatales no invasivas. Las pruebas prenatales incluyen la evaluación diagnóstica o prenatal cuantitativa o cualitativa, incluyendo la determinación del sexo del feto, la determinación de anomalías cromosómicas, por un solo gen o de proteínas, y la determinación de la presencia o ausencia de determinados genes, ácidos nucleicos o proteínas. Hasta la fecha, hay más de 300 trastornos diferentes que se pueden detectar durante el embarazo. Algunos de éstos son anomalías cromosómicas, tales como el síndrome de Down; algunos son trastornos por un solo gen, tal como la fibrosis quística, la enfermedad de Tay-Sachs y la anemia falciforme. Actualmente, el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas requiere técnicas invasivas, tal como la amniocentesis y la muestra del villus coriónico que conllevan riesgos pequeños pero finitos de pérdida del feto. Una tentativa no invasiva es el aislamiento de células fetales de la sangre materna mediante selección por flujo seguida de un análisis de la interfase genética con hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Un método de diagnóstico genético prenatal no invasivo requiere la selección de células fetales de la circulación materna, la cual permite la recuperación efectiva de células fetales para el análisis FISH. En general, la célula candidata es un glóbulo rojo nucleado fetal (NRBC). Un método actual para el enriquecimiento de NRBC implica la separación inicial de la sangre en un gradiente de densidad, la reducción de glóbulos blancos mediante una técnica de "panning" o inmunopurificación con un anticuerpo monoclonal CD45 seguido de la selección por flujo basada en la selección de CD71+, CD45- y LDS-751 o gamma hemoglobina (22). Tal como se han mencionado anteriormente, la discriminación entre células de sangre fetal y materna en base a un marcador único a menudo es problemática. Un diagnóstico prenatal de este tipo requiere obviamente una separación óptima de células fetales de las células maternas. Los diagnósticos prenatales actuales a menudo se ven dificultados por una identificación pobre de subpoblaciones de células maternas y fetales en una muestra de sangre materna. En una realización de la presente invención, se da a conocer un método para la realización de una prueba prenatal no invasiva a un feto, comprendiendo dicho método las etapas de identificación y aislamiento de células fetales de una muestra de sangre materna, según la presente invención y las pruebas a dichas células fetales.

55 La presente invención da a conocer un método muy exacto y sensible para la identificación y/o aislamiento de células fetales que circulan en la sangre materna, que se basa en la combinación de dos reactivos marcadores. Un método de citometría de flujo de color dual permite la detección simultánea de estos dos reactivos. La utilización de un método, tal como el que se da a conocer, permite la identificación y aislamiento de una población de células fetales de células maternas con una elevada sensibilidad y exactitud. En una realización preferente, las células en una muestra de sangre materna se tiñen con un anticuerpo anti-HbF, como primer reactivo marcador y un anticuerpo reactivo con CA, como segundo reactivo marcador. Los RBC fetales se reconocen por su tinción brillante de la HbF en combinación con una completa ausencia de expresión de CA. Posteriormente, esta población HbF-positiva, CA-negativa, correspondiente a las células sanguíneas fetales, se puede separar de las células maternas mediante selección por flujo. La selección por flujo se puede llevar a cabo mediante selección celular por citometría de flujo multiparámetro normal o de alta velocidad. A continuación, las células fetales aisladas se pueden expandir, primero, mediante un cultivo *in vitro* o se pueden analizar directamente para detectar, por ejemplo, anomalías cromosómicas.

65 En otra realización, un marcador de células embrionarias se utiliza junto con un anticuerpo anti-CA para la identificación de una población de RBC embrionaria que circula en la corriente sanguínea de una mujer embarazada. Por ejemplo, tal procedimiento se puede utilizar para aislar células embrionarias, tal como eritroblastos, median-

te selección celular por citometría de flujo. Posteriormente las células embrionarias se pueden someter a un diagnóstico prenatal, por ejemplo, se pueden tratar para proporcionar los ácidos nucleicos y/o proteínas embrionarias disponibles para la identificación y/o amplificación. Tal método permite un diagnóstico cuantitativo o cualitativo o una evaluación prenatal en una etapa muy temprana del desarrollo embrionario, por ejemplo, tan pronto como a las seis semanas después de la concepción. A veces es preferente la utilización de anticuerpos de epsilon Hb embrionaria como reactivo marcador para la identificación de células fetales. En una realización preferente de la presente invención, un primer reactivo marcador que reacciona con hemoglobina embrionaria (HbE), por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra la cadena epsilon de HbE, se combina preferentemente con un segundo reactivo marcador, reactivo con CA para la detección y/o aislamiento de la población excepcional de células embrionarias que circula en la corriente sanguínea de una mujer embarazada. Otros marcadores embrionarios o fetales adecuados, que se pueden utilizar en la presente invención se caracterizan por su patrón de expresión temporal. Preferentemente, un marcador de este tipo comprende una proteína intracelular que se expresa ampliamente en células embrionarias y/o fetales, mientras que su expresión se reduce fuertemente o esencialmente no existe tras el nacimiento. Entre éstos se pueden incluir las proteínas relacionadas con la apoptosis, tal como la survivina, los factores de transcripción, tal como el factor de transcripción de la familia básica hélice-bucle-hélice (bHLH) o un factor de transcripción similar a GATA.

Además, un método que se da a conocer en la presente invención encuentra su aplicación en otras situaciones clínicas, tales como la transfusión intrauterina (IUT). La IUT permite que se administren transfusiones sanguíneas y/o medicación al bebé mientras está en el útero. La transfusión sanguínea mediante IUT se ha utilizado, por ejemplo, durante las últimas tres décadas como tratamiento de la anemia fetal provocada por la incompatibilidad Rhesus. La IUT se ha vuelto cada vez más común y relativamente segura, debido al desarrollo del ultrasonido de alta resolución. La eficacia de la IUT se puede asegurar mediante la extracción de muestras de sangre fetal y la tinción de las células fetales. A la circulación fetal se accede normalmente a través la inserción del cordón en la placenta aunque se puede utilizar también un bucle libre o inserción del cordón fetal. Mediante la tinción de células fetales se puede determinar el porcentaje de glóbulos rojos del donante en la circulación fetal. La utilización de un reactivo marcador único, tal como un anticuerpo anti-HbF, comporta el riesgo de sobreestimación de la proporción de células fetales reales en una población dada de HbF. Tal como se ejemplifica en la presente invención, un método que utiliza dos reactivos marcadores, tal como se da a conocer en la presente invención, permite la distinción de células fetales de poblaciones pequeñas, aún significativas, de células de adulto que contienen HbF, también denominadas células F. De este modo, la presente invención da a conocer un método para la producción de datos exactos de frecuencia de células fetales reales para monitorizar la eficacia de un procedimiento clínico como el IUT. Por ejemplo, el método que se da a conocer permite la cuantificación de células fetales en una muestra de sangre fetal y el cálculo del porcentaje de glóbulos rojos de un donante en la circulación fetal. Aún en otra realización de la presente invención, un método según la presente invención encuentra su utilidad en la monitorización de células fetales anormales circulantes en preeclampsia y otros trastornos relacionados con el embarazo.

Tal como se ejemplifica en la descripción detallada, el procedimiento de citometría de flujo dual dado a conocer en la presente invención, muestra una linealidad y precisión excelentes, ambas por debajo y por encima de la frecuencia de células fetales clínicamente importante del 0,6%. Se analizaron diluciones en serie de mezclas de sangre de cordón y sangre de adulto con un intervalo de frecuencia de células fetales del 0 al 5%. Se evaluó la precisión mediante la realización de 10 repeticiones sobre cada muestra en un período de 5 días; esto mostró de forma consistente un coeficiente de variación (CV) de <5%. En una realización preferente, el método que se da a conocer en la presente invención presenta un CV de <10% para muestras de sangre con >0,1 por ciento de células fetales, más preferentemente un CV de <7%, y el más preferente, un CV de <5%.

El análisis por citometría de flujo permite el análisis de diferentes muestras clínicas, como de hasta 5 o incluso hasta siete muestras de prueba diferentes en una hora o menos, y da a conocer, por lo tanto, un método relativamente sencillo, susceptible al uso clínico. El método de citometría de flujo dual según la presente invención proporciona una alternativa superior técnicamente a los procedimientos de citometría de flujo de un color existentes. El método que se da a conocer permite el análisis de un gran número de células en un tiempo relativamente corto, comparado con otras técnicas de detección, tales como la inspección visual de cada muestra de prueba mediante microscopía fluorescente. También en lo que respecta a la facilidad de utilización en laboratorios clínicos comunes, la citometría de flujo se prefiere actualmente a la microscopía.

En conjunto, el método para la distinción entre glóbulos rojos que se ha dado a conocer en la presente invención presenta un rendimiento mejorado y es más fácil y rápido en su utilización si se compara con los procedimientos existentes.

Figuras

Figura 1

Los citogramas de la figura 1 muestran la población de WBC autofluorescentes contaminantes que se pueden detectar y separar mediante el tinte LDS 751, para la tinción del ADN.

Figura 2

Los citogramas de la figura 2 representan un 10% de sangre de cordón mezclada con sangre de adulto normal y teñida con anticuerpo monoclonal dirigido a HbF. En los diferentes citogramas se indican las distribuciones de células HbF+++ fetales, células HbF+ de adulto y células HbF- de adulto. Es difícil separar la población interferente de células F de adulto (HbF+) de los RBC fetales en R10 y de las células de adulto negativas a la tinción (HbF-) en 4, tal como muestra la figura 2D.

Figura 3

Los citogramas de la figura 3 representan una mezcla de un 5% de sangre de cordón mezclada con sangre de adulto normal y teñida con anticuerpos dirigidos a HbF y CA1 específica de eritrocito. Las distribuciones de las células fetales HbF+++ , las células fetales HbF++/CA++ , las células de adulto HbF+/CA++ o F y las células de adulto HbF-/CA++ se indican en los diferentes cuadrantes del citograma final. La figura 3D muestra la separación de las células F de adulto interferentes (R8) de las células fetales verdaderas en R10.

Figura 4

Representación gráfica de la linealidad de los experimentos con sangre de cordón mezclada. Los anticuerpos, anti-HbF y anti-CA se utilizan para detectar el porcentaje de glóbulos rojos fetales en un fondo de sangre de adulto normal. La representación gráfica muestra que la detección y linealidad es exacta entre, como mínimo, el 0,1% y el 10% de sangre de cordón obtenida por punción.

Figura 5

Datos de una transfusión intrauterina (IUT), tal como se detectan con anticuerpos anti-HbF y anti-CA. A. Los citogramas muestran la población de glóbulos rojos que contienen HbF de una muestra de sangre del feto. B. Los citogramas muestran la detección de las poblaciones de glóbulos rojos fetales y de adulto en la sangre del feto, tras el 50% de transfusión con la sangre del donante adulto. C. Los citogramas muestran la población de glóbulos rojos que contienen CA presente en la muestra de sangre del adulto donante.

Descripción detallada

Se han propuesto y descrito varios métodos de selección alternativos y más precisos para detectar FMH mediante citometría de flujo. Los primeros informes que investigaron la viabilidad de la utilización de citometría de flujo para el conteo de células fetales dependían de la detección del antígeno D humano sobre la superficie de los RBC (10, 11, 12, 13). Todas estas tentativas demostraron una mayor sensibilidad y precisión que los métodos manuales. Sin embargo, la utilización de anti-RhD es aplicable solamente a las situaciones clínicas con incompatibilidad Rh o al antígeno D, y no se puede utilizar en todos los casos de trauma maternal y sospecha de FMH. Recientemente se han descrito una variedad de otros métodos de detección por citometría de flujo de células fetales en sangre periférica materna (14, 15, 16, 17). Los métodos se diferencian en sus medios de utilización de las diferentes etapas de fijación y permeabilización celular, en combinación con la detección intracelular del antígeno HbF, mediante anticuerpos anti-HbF. La tentativa de citometría de flujo anti-HbF presenta varias ventajas potenciales y el antígeno HbF permite la amplia aplicación de la detección de glóbulos rojos fetales por citometría de flujo para varias situaciones clínicas. Además, el método anti-HbF proporciona una buena correlación con la prueba estándar de Kleihauer-Betke de detección de células fetales, aunque con una precisión mucho mayor que el ensayo de elución ácida manual. Sin embargo, los descubrimientos de los presentes inventores con la tentativa de un marcador de células, tal como HbF, indicaron que este ensayo de un solo color no era suficientemente preciso para la enumeración de células fetales reales y no podía excluir un porcentaje bajo de falsos positivos de células F. Se observó una población pequeña del 2 al 8% de células que contenían cantidades bajas de HbF. Es muy importante la separación y distinción clara de ambas poblaciones de células fetales que contienen HbF y células F de adulto interferentes con un contenido más bajo de HbF para producir datos exactos de frecuencia de células fetales reales en sangre materna para la evaluación de FMH o la medición de células F.

Los descubrimientos de los presentes inventores describen una tentativa alternativa a la cuantificación por citometría de flujo de RBC fetales mediante anticuerpos contra la Hemoglobina Fetal (HbF) localizada de forma intracelular y la anhidrasa Carbónica (CA), y una técnica de tinción intracelular óptima. El método o procedimiento se basa en la discriminación entre glóbulos rojos fetales y de adulto mediante anticuerpos específicos anti-anhidrasa Carbónica (CA) policlonal y anti-HbF monoclonal. La HbF antígeno/proteína es el mejor marcador para la detección de glóbulos rojos fetales, mientras que la CA antígeno/proteína es un buen marcador para glóbulos rojos de adulto y está casi ausente en glóbulos rojos fetales. Los anticuerpos monoclonales y policlonales que se utilizan en la prueba están conjugados a un fluorocromo para la detección directa e indirecta de marcadores HbF y CA en un análisis por citometría de flujo dual. Se mostró que ambas preparaciones de anticuerpos eran específicas para HbF y CA, respectivamente, utilizando el protocolo, tal como se describe en el apartado de material. En ningún caso se mostró una tinción de células positiva sin permeabilización de las células.

Los resultados preliminares del método de citometría de flujo de color dual fueron comparables a los de algunos informes previos que describían datos de anti-HbF. Los porcentajes de células F en sangre total de donantes normales que se obtuvieron durante el estudio también eran comparables a los de los informes previos. Los descubrimientos

de los presentes inventores muestran que es posible identificar diferentes poblaciones de glóbulos rojos mediante la adición de un segundo marcador de células único, tal como la anhidrasa Carbónica, al método de citometría de flujo de HbF. El nuevo método es capaz de discriminar entre células fetales reales y posibles falsos positivos de células F, mediante el desplazamiento de la pequeña población de células F que contienen HbF desde la población de células fetales a la población más grande de células de adulto positivas a CA. La tinción de color dual completa y el análisis de hasta 5 muestras se puede llevar a cabo con facilidad en 1,5 horas desde la recogida de la sangre. La detección exacta de glóbulos rojos fetales que contienen HbF en la circulación sanguínea materna ayudará a estimar el grado de hemorragia feto-materna (FMH) en las mujeres durante el embarazo, y posteriormente en el manejo de la enfermedad hemolítica del recién nacido (HDN).

Finalmente, el nuevo método de citometría de flujo sensible, que utiliza un procedimiento de tinción fluorescente dual, identificará y cuantificará de forma exacta tanto las poblaciones de células F maternas interferentes como las de glóbulos rojos fetales. De acuerdo con otros estudios (14, 15, 16, 17), representa una alternativa práctica y técnicamente superior para la medición de rutina de la hemorragia feto-materna comparada con la prueba manual de Kleihauer-Betke, más subjetiva.

Materiales y métodos

Recolección de Muestras

Se recolectaron sobre EDTA de 0,5 a 1 ml de sangre total de donantes normales así como de sangre de cordón. Por lo general, las muestras se ensayaron durante el mismo día o se almacenaron a 4 - 8°C durante 1 semana antes de la prueba.

Anticuerpos y Reactivos

El anticuerpo monoclonal NaM16-2F4 (IgG1 de ratón) específico para la cadena gamma de la HbF humana se describió previamente (14) y se adquirió a Biotatlantic (Nantes, Francia). Se conjugaron preparaciones puras de anticuerpos directamente a R-ficoeritrina (R-PE) seguido de procedimientos de etiquetado estándares. El control de isotipo de IgG1 conjugado a PE se purificó y etiquetó mediante procedimientos de etiquetado estándares. Se adquirió anhidrasa carbónica antihumana de cabra policlonal a AbCAM mientras que el anti-cabra conjugado a FITC se obtuvo de Sigma. El tinte LDS 751 para la tinción del ADN se adquirió a Molecular Probes y se almacenó a 4°C hasta su utilización. Se adquirió suero de ternera recién nacida a Greiner. Todos los otros reactivos eran de pureza analítica.

Fijación de Células y Permeabilización

Se resuspendieron diez microlitros de sangre total o sangre de cordón en 100 μ l de suero de ternera recién nacida (NCS) en PBS, tras lo cual se fijaron los RBC con 100 μ l de paraformaldehído al 20% en PBS, se agitaron con vórtice durante 5 s y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Tras la fijación, las células se lavaron una vez con 2 ml de PBS con heparina y se resuspendieron en 100 μ l de PBS con heparina. Para la permeabilización de los RBC, se mezclaron con intensidad 100 μ l de las células fijadas con 100 μ l de dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,3% en PBS con heparina y se dejaron reposar a TA durante 3 min. Para la eliminación del SDS, las células se lavaron dos veces con 2 ml de PBS con heparina y se suspendieron en 1 ml de la misma solución.

Detección de HbF y CA por citometría de Flujo

A continuación, para el inmunofenotipaje, se mezclaron 100 μ l de la suspensión de células lavadas con 50 μ l de MoAb anti-HbF-PE diluidos a 40 μ g/ml en PBS, con 50 μ l de PoAb anti-Anhidrasa Carbónica diluida 1 a 500, y con 50 μ l de LDS 751; o 100 μ l de la suspensión de células lavadas se mezclaron con 50 μ l de LDS 751 y 50 μ l de PBS y 50 μ l de control de isotipo como control negativo. Tras una incubación de 15 min a TA en la oscuridad, las células se lavaron una vez con 2 ml de PBS que contenía heparina. Las soluciones de células suspendidas en 100 μ l se mezclaron ambas con 50 μ l de IgG anti-Cabra-FITC y se incubaron a TA durante 15 min. Las células se lavaron para eliminar el conjugado etiquetado secundario y finalmente se resuspendieron en 0,5 ml de PBS con heparina, a punto para la citometría de flujo. El control de isotipo se utilizó como control negativo en lugar del MoAb anti-HbF.

La adquisición de muestras se llevó a cabo sobre un citómetro de flujo Coulter Epics XL MCL (Beckman-Coulter, U.S.A.). Las células HbF y CA se contaron estableciendo la auto parada en los 50.000 y 100.000 eventos, con la recolección de mediciones de logFSC y logSSC, y señales de fluorescencia de logFL1, logFL2 y logFL4 como archivos en modo de lista. El análisis de los datos se llevó a cabo con software (Winlist, Verity Software, Topsham, ME) sobre archivos en modo de lista. El "live gate" sobre las células negativas a LDS 751 se utilizó para excluir posibles glóbulos blancos con núcleo interferentes. El punto de corte de positivos fue aproximadamente al 0,5% de la población anterior negativa de células de tinción de control de isotipo.

Resultados

Un método de citometría de flujo de color dual da como resultado la detección simultánea de dos antígenos intracelulares y proporciona una prueba rápida y conveniente que se puede completar en 1,5 horas después de la recogida de sangre. La utilización de paraformaldehído como reactivo de fijación y dodecil sulfato sódico (SDS) para la per-

meabilización de los RBC fijados dio como resultado una tinción de fondo baja, una fuga de HbF negligible y una aglutinación de células mínima. Después de la fijación y permeabilización se pudieron detectar los marcadores de antígeno de ambas células con señales de fluorescencia altas, las cuales dieron como resultado una distinción clara entre diferentes poblaciones de células teñidas.

5

Un aspecto importante de los datos del conteo de células fetales por citometría de flujo es la exclusión de posibles RBC de adulto interferentes que contienen hemoglobina y WBCs autofluorescentes presentes desde la región de identificación de células fetales. Los WBCs autofluorescentes inducidos se pueden excluir fácilmente de la población de células fetales mediante la tinción de estas células con núcleo con un tinte para la tinción del ADN, tal como LDS 751, tal como se muestra en la figura 1.

10

La separación imprecisa de células F que contienen HbF de las células fetales reales que contienen HbF se muestra en los citogramas de la figura 2. El hecho de que sea difícil establecer una región exacta sobre las células fetales sin la interferencia de células F, conduce a la sobreestimación de la población real de células fetales que contienen HbF. Especialmente cuando el número de células fetales es bajo (0,4-0,6%), el conteo real de células fetales en un fondo de células F contaminantes con cantidades variables de HbF no es exacto. Los resultados por citometría de flujo de la combinación de los dos marcadores diferentes de glóbulos rojos, HbF y CA, tal como se presentan en la figura 3, demuestran que la mayoría de los RBC fetales con un contenido en HbF alto y sin CA se podrían separar bien de las células F de adulto interferentes con un contenido en HbF más bajo pero que contienen cantidades elevadas de CA. Los RBC de adulto sin HbF, tal como se esperaba, sólo fueron positivos para CA. Al lado de la población de células fetales y también separada claramente de las células F, se detectó otra población de células fetales pequeña, aunque no inesperada, con un contenido en HbF elevado y más bajo en CA. Ambas poblaciones de células fetales combinadas entre ellas dieron como resultado el conteo real de RBC fetales en sangre de cordón y mezclas de sangre de cordón y de adulto.

25

La linealidad y precisión del método de citometría de flujo de color dual se estudió en mezclas de sangre de cordón y sangre total de adultos sin embarazo. Tal como se muestra en la figura 4, se observó una linealidad excelente para el método, mediante diluciones en serie de mezclas de sangre de cordón y de sangre de adulto (n=10), con un intervalo de frecuencia de células fetales del 0 al 5%. La precisión del método se determinó mediante el desarrollo de un análisis sobre la misma preparación de mezclas de sangre de cordón y de adulto dentro de un período de 5 días. La precisión de todas las muestras dio como resultado, de forma consistente, un coeficiente de variación (CV) de <5%. Por lo tanto, el nuevo método de citometría de flujo mostró un rendimiento de ensayo excelente y se observó que era lineal y preciso, ambos por encima y debajo de la frecuencia de células fetales importante clínicamente del 0,6% aproximadamente. La linealidad de las mediciones se determinó para muestras que consistían en diferentes proporciones de sangre de cordón mezclada con sangre de adulto normal en el intervalo de 0,0-10% de células de sangre de cordón positivas (HbF/CA). La sangre de cordón de 9 meses comprende el 85% de RBC fetales. El método de regresión lineal se utilizó para representar gráficamente los valores esperados frente a los valores observados para el porcentaje de células fetales doblemente etiquetadas determinado por el método de citometría fluorescente doble.

30

35

40

La figura 5 muestra que el método que se da a conocer en la presente invención para la distinción entre subconjuntos de glóbulos rojos en una muestra también se utiliza de forma ventajosa para la monitorización de la eficacia de la transfusión de sangre intrauterina. Los citogramas mostraron una clara distinción entre poblaciones de glóbulos rojos en una muestra de sangre de adulto donante y en una muestra de sangre fetal, antes y después de una transfusión con la sangre del donante.

45

Los estudios de los presentes inventores indican que la utilización de un segundo anticuerpo para la detección de CA, preferentemente en combinación con el marcador HbF o con otro determinante de células esencialmente fetales, proporciona una discriminación más detallada de las diferentes poblaciones de RBC fetales y de adulto y da como resultado una mejora en la capacidad de determinación de la frecuencia de RBC fetales.

50

Bibliografía

1. **Sebring, E.S., Polesky, H.F.** 1990. Hemorragia Fetomaterna: incidencia, factores de riesgo, momento en el que ocurre y efectos clínicos ("Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects"). *Transfusion* 30: 344-357.

55

2. **Garratty, G., y Arndt, P.A.** 1999. Aplicaciones de la citofluorometría de flujo a la inmunología de los glóbulos rojos ("Applications of flow cytometry to red blood cell immunology"). *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 38: 259-267.

60

3. **Nance, S.J., Nelson, J.M., Arndt, P.A., y otros** 1989. Cuantificación de la hemorragia Feto-materna mediante citometría de flujo, método simple y exacto ("Quantitation of Feto-maternal hemorrhage by flow cytometry, a simple and accurate method"). *Am. J. Clin. Pathol.* 91: 288-292.

65

4. **Lee, D., Contreras, M., Robson, S.C., Rodeck, C.H., Whittle, M.J.** 1999. Recomendaciones para la utilización de inmunoglobulina anti-D para la profilaxis Rh ("Recommendations for the use of anti-D immunoglobulin for Rh prophylaxis"). *Transf. Med.* 9: 93-97.

5. **Polesky, H., Sebring, E.** 1981. Evaluación de métodos para la detección y cuantificación de células fetales y su efecto sobre la utilización de RhIgG (“Evaluation of methods for detection and quantitation of fetal cells and their effect on RhIgG usage”). *Am. J. Clin. Pathol.* 76: 525-529.
6. **Kleihauer, P., Braun, H., and Betke, K.** 1957. Muestra de hemoglobina fetal en eritrocitos de un frotis de sangre (“Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear”). *Elin. Wochenschr.* 35: 637-638.
7. **Davis, B.H., Olsen, S., Bigelow, N.C., Chen, J.C.** 1998. Detección de glóbulos rojos fetales en hemorragia fetomaternal mediante un anticuerpo monoclonal de hemoglobina fetal por citometría de flujo (“Detection of fetal red cells in fetomaternal hemorrhage using a fetal hemoglobin monoclonal antibody by flow cytometry”). *Immunohematology* 38: 749-756.
8. **Johnson, P.R., Tait, R.C., Austin, E.B., y otros** 1995. Citometría de flujo en el diagnóstico y manejo de la hemorragia fetomaternal importante (“Flow cytometry in diagnosis and management of large fetomaternal haemorrhage”). *J. Clin. Pathol.* 48: 1005-1008.
9. **Garratty, G., Arndt, P.** 1994. Aplicaciones de la citofluorometría de flujo a la ciencia de las transfusiones (“Applications of flow cytofluorometry to transfusion science”). *Transfusion* 35: 157-178.
10. **Nelson, M., Popp, H., Horky, K., Forsyth, C., Gibson, J.** 1994. Desarrollo de una prueba de citometría de flujo para la detección de células fetales D-positivas tras la hemorragia fetomaternal y estudio de la frecuencia en mujeres D-negativas (“Development of a flow cytometric test for the detection of D-positive fetal cells after foetalmaternal hemorrhage and survey of the prevalence in D-negative women”). *Immunohematology* 10: 55-59.
11. **Medearis, AL. Hensleigh, P.A., Parks, D.R., Herzenberg, L.A.** 1984. Detección de eritrocitos fetales en sangre materna después del parto con el selector celular activado por fluorescencia (“Detection of fetal erythrocytes in maternal blood post partum with the fluorescence-activated cell sorter”). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 148: 290-295.
12. **Lloyd-Evans, P., Kumpel, B.M., Bromelow, I., Austin, E., Taylor, E.** 1996. Utilización de un anti-D (BRAD-3) monoclonal conjugado directamente para la cuantificación de la hemorragia fetomaternal mediante citometría de flujo (“Use of a directly conjugated monoclonal anti-D (BRAD-3) for quantification of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry”). *Transfusion* 36: 432-437.
13. **Corsetti, J.P., Cox, C., Leary, J.F., Cox, M.T., Blumberg, N., Doherty, R.A.** 1987. Comparación de las técnicas cuantitativas de elución ácida y citometría de flujo para la detección de hemorragia fetomaternal (“Comparison of quantitative acid-elution technique and flow cytometry for detecting fetomaternal hemorrhage”) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 17: 197-206.
14. **Navenot, J.M., Merghoub, T., Ducrocq, R., Krishnamcorthy, R., Blanchard, D.** 1998. Nuevo método para la determinación cuantitativa de glóbulos rojos que contienen hemoglobina fetal mediante citometría de flujo: aplicación en la anemia falciforme (“A new method for quantitative determination of fetal hemoglobin-containing red blood cells by flow cytometry: application to sickle cell disease”). *Cytometry* 32: 186-190.
15. **Nelson, M., Zarkos, K., Popp, H., Gilson, J.** 1998. Una equivalente por citometría de flujo a la prueba de Kleinhauer (“A flow-cytometric equivalent of the Kleihauer test”). *Vox Sang.* 75: 234-241.
16. **Davis, B.H., Olsen, S., Bigelow, N.C., Chen, J.C.** 1998. Detección de glóbulos rojos fetales en hemorragia fetomaternal mediante un anticuerpo monoclonal de hemoglobina fetal por citometría de flujo (“Detection of fetal red cells in fetomaternal hemorrhage using a fetal hemoglobin monoclonal antibody by flow cytometry”). *Transfusion* 32: 749-756.
17. **Mundee, Y., Bigelow, N.C., Davis, B.H., Porter, J.B.** 2000. Método de citometría de flujo simplificado para glóbulos rojos que contienen hemoglobina fetal (“Simplified flow cytometric method for fetal hemoglobin containing red blood cells”). *Cytometry* 42: 389-393.
18. **Bernini, L.F., Kanhai, H.H.H., Losekoot, M., Giordano, P., Harteveld, C.L.** 1994 Diagnóstico prenatal de α -talasemia homocigótica mediante un método inmunológico (“Prenatal diagnosis of homozygous α -thalassemia by an immunological method”). *Annals New York Academy of Sciences.* 731: 193-196
19. **Boriack-Sjodin, P.A., Zeitlin, S., Chen, H.H., Crenshaw, L., Gross, S., Dantanarayana, A., Delgado, P., May, J.A., Dean, T., Christianson, D.W.** 1999. Análisis estructural de la unión de un inhibidor a la anhidrasa carbónica II humana (“Structural analysis of inhibitor binding to human carbonic anhydrase II”). *Protein Sci.* 12: 2483-2489.
20. **Brubaker, D.K., ao, F., Gay, C.V.** 1999. Localización de la anhidrasa carbónica en osteoclastos vivos con acetazolamida modificada con bodipy 558/568, un inhibidor tiadiazol de la anhidrasa carbónica (“Localization of carbonic anhydrase in living osteoclasts with bodipy 558/568-modified acetazolamide, a thiadiazole carbonic anhydrase inhibitor”). *J Histochem Cytochem* 4: 545-550.

ES 2 284 911 T3

21. **Yu, H., Ernst, L., Wagner, M., Waggoner, A.** 1992. Detección sensible de ARNs en células solas mediante citometría de flujo (“Sensitive detection of RNAs in single cells by flow cytometry”). *Nucl Acids Res* 1: 83-88.

22. **Lewis, D.E., Schober, W., Murrell, S., Nguyen, D., Scott, J., Boinoff, J., Simpson, J.L., Bischoff, F.Z., Elias, S.** 1996. Selección excepcional de casos de eritrocitos nucleados fetales en sangre materna mediante citometría de flujo (“Rare event selection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood by flow cytometry”). *Cytometry* 23: 218-227.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 284 911 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la distinción entre subconjuntos de glóbulos rojos en una muestra, que comprende el poner en contacto dicha muestra, como mínimo, con un primer reactivo marcador, reactivo con la hemoglobina F de un glóbulo rojo y, como mínimo, con un segundo reactivo marcador, reactivo con una anhidrasa carbónica de un glóbulo rojo y la determinación de la reactividad de los dichos reactivos marcadores con dichas células.
- 10 2. Método, según la reivindicación 1, en el que, como mínimo, uno de dichos reactivos marcadores comprende un anticuerpo.
3. Método, según la reivindicación 2, en el que, como mínimo, dos de dichos reactivos marcadores comprenden un anticuerpo, siendo cada uno de dichos anticuerpos reactivo con un componente antigénico distinto de un glóbulo rojo.
- 15 4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que, como mínimo, uno de dichos reactivos comprende un fluorocromo.
5. Método, según la reivindicación 4, en el que, como mínimo, dos de dichos reactivos marcadores comprenden un fluorocromo, teniendo cada uno de dichos fluorocromos un espectro de emisión diferente.
- 20 6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que también comprende la determinación de la reactividad de dichos reactivos marcadores con dichas células mediante citometría de flujo.
7. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que también comprende la determinación de la reactividad de dichos reactivos marcadores con dichas células mediante la detección de fluorescencia.
- 25 8. Equipo de diagnóstico adecuado para la diferenciación de subconjuntos de eritrocitos, comprendiendo dicho equipo, como mínimo, un primer reactivo marcador, reactivo con la hemoglobina F de un glóbulo rojo y un segundo reactivo marcador, reactivo con una anhidrasa carbónica de un glóbulo rojo.
- 30 9. Equipo, según la reivindicación 8, en el que la reactividad de dichos reactivos marcadores con dichas células se determina mediante citometría de flujo.
10. Equipo, según la reivindicación 8 ó 9, en el que dicha anhidrasa carbónica comprende anhidrasa carbónica B.
- 35 11. Mezcla de reactivos adecuada para su utilización en la diferenciación de subconjuntos de eritrocitos, comprendiendo dicha mezcla, como mínimo, un primer reactivo marcador, reactivo con una hemoglobina F de un glóbulo rojo y un segundo reactivo marcador, reactivo con una anhidrasa carbónica de un glóbulo rojo.
- 40 12. Método para la monitorización de la eficacia de la transfusión intrauterina (IUT), comprendiendo dicho método la cuantificación de células fetales en una muestra de sangre fetal, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y el cálculo del porcentaje de glóbulos rojos de un donante en la circulación fetal.
- 45 13. Método para la prueba prenatal no invasiva de un feto, comprendiendo dicho método las etapas de identificación y aislamiento de células fetales de una muestra de sangre materna, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y la prueba de dichas células fetales.

50

55

60

65

Fig. 1

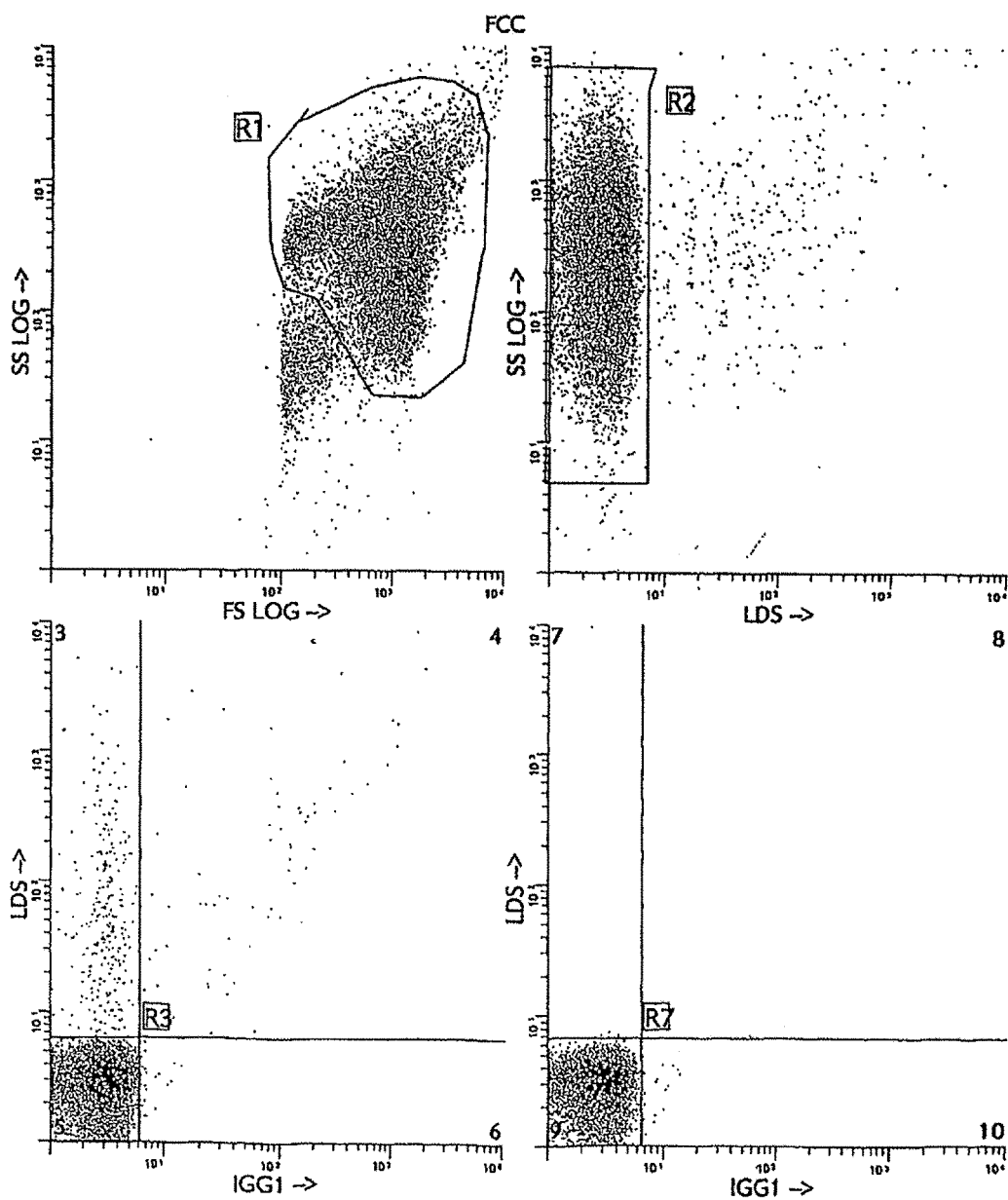


Fig. 2

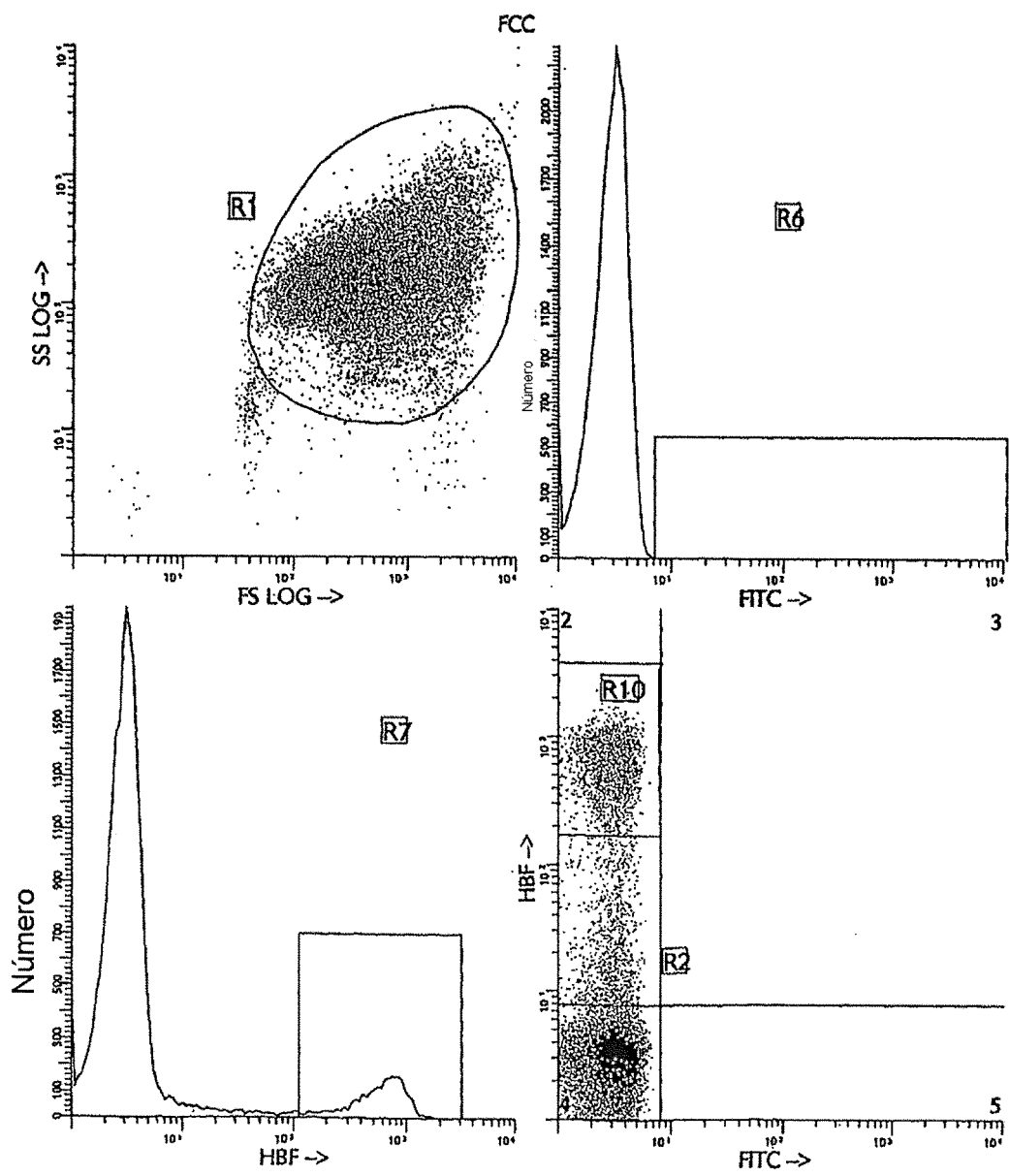
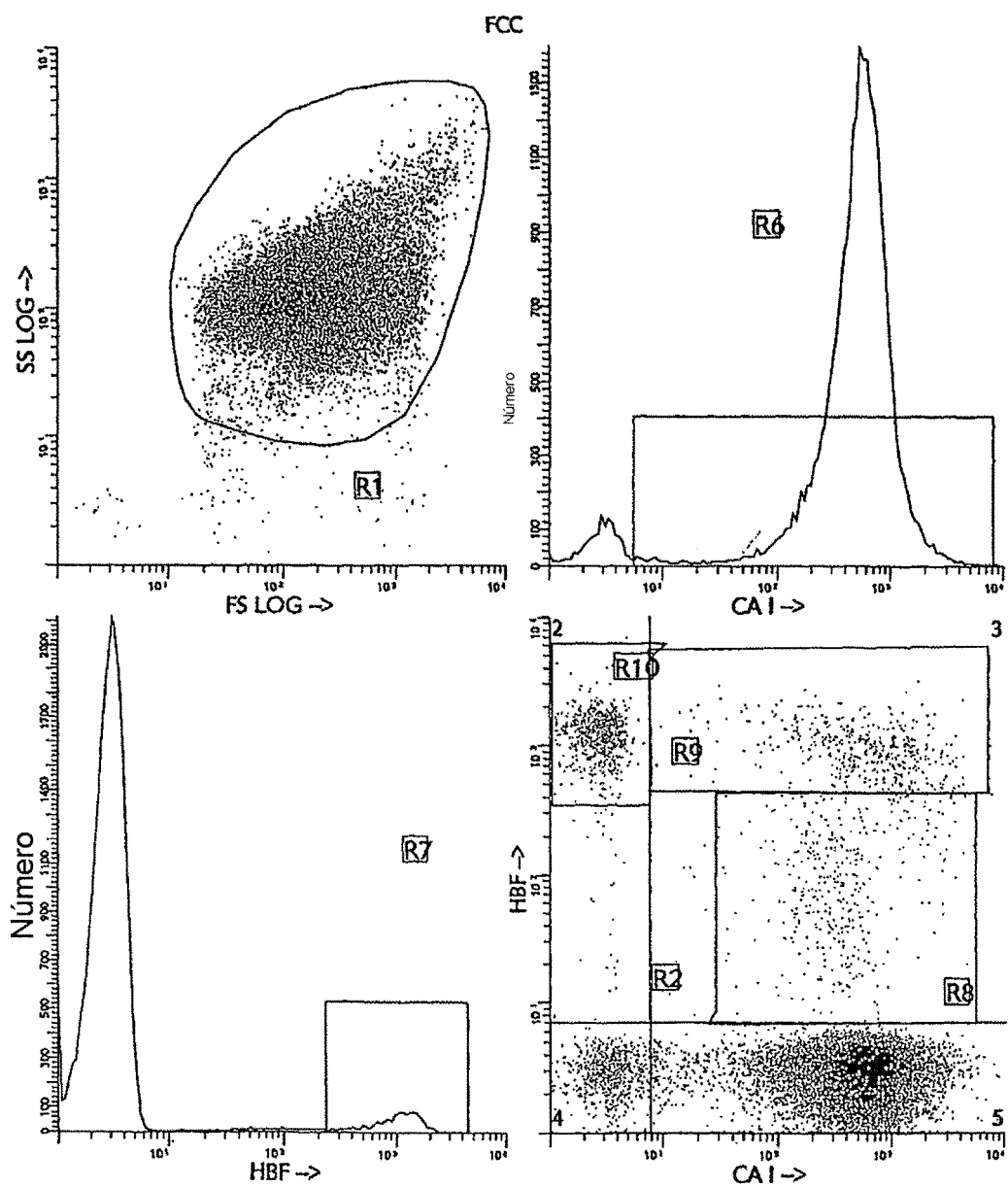


Fig. 3



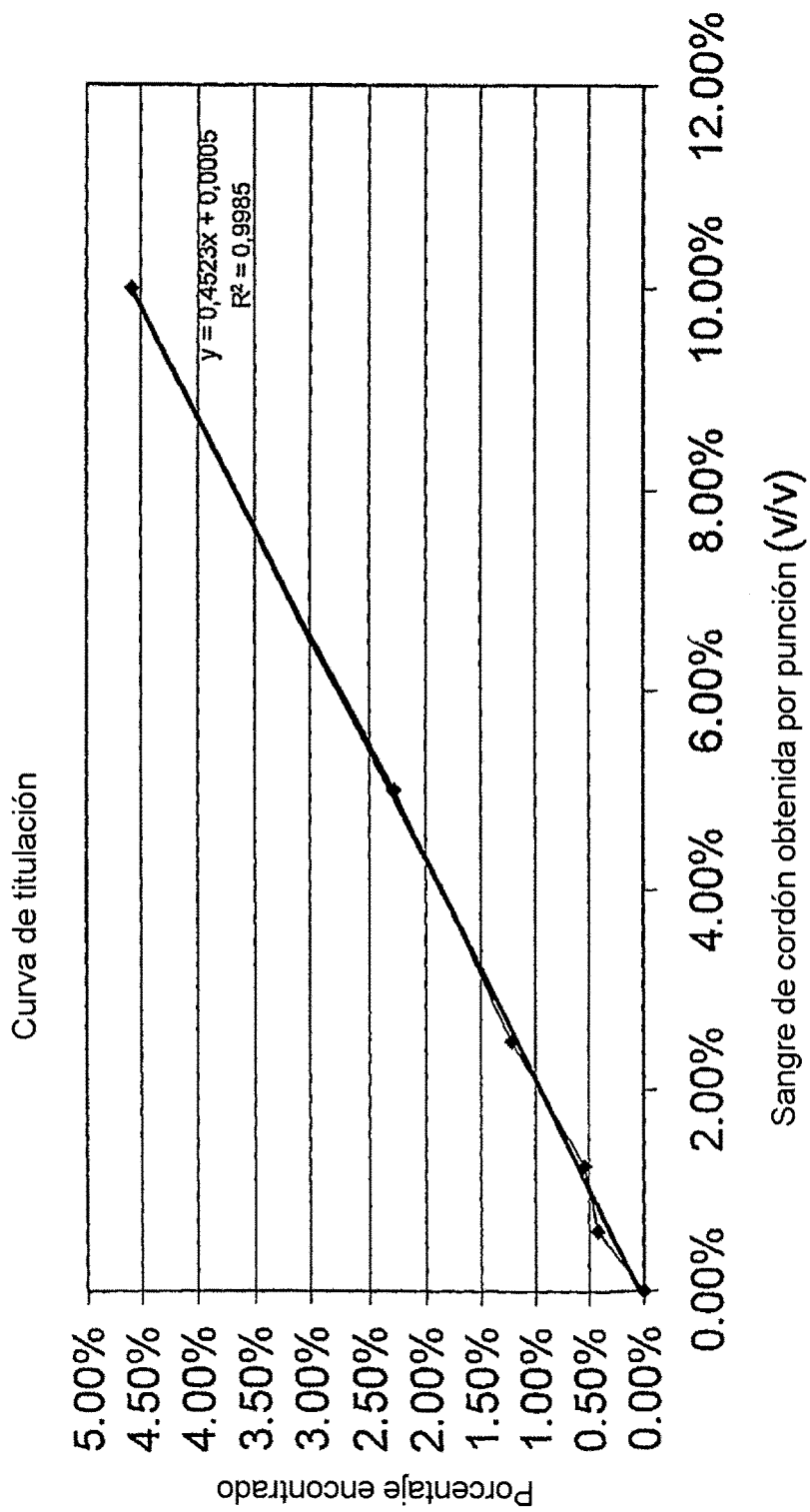


Fig. 4

Fig. 5

