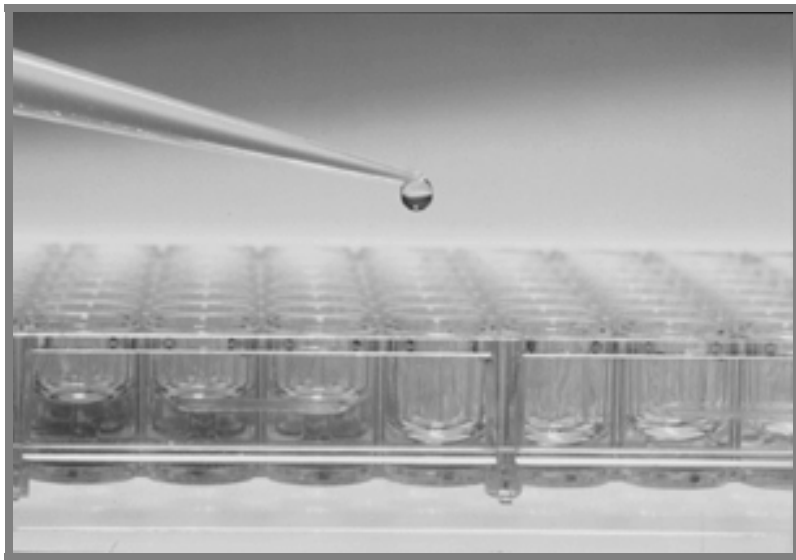


UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
Facultad de Microbiología
Instituto Clodomiro Picado



Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica



Bruno Lomonte V., MQC, PhD

2009

Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica

Tercera Edición, 2009

Este folleto puede descargarse gratuitamente por internet, en la siguiente dirección:

<http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>



Si requiere referirse a este manual como cita bibliográfica:

Lomonte, B. (2009) Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica, 122 pp.
Universidad de Costa Rica. Acceso libre en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>

para comentarios o sugerencias, dirigirse a:

bruno.lomonte@ucr.ac.cr

INDICE

SECCIÓN I: PRUEBAS PARA LA EVALUACIÓN DEL SISTEMA INMUNE.

Cap. 1	Aislamiento de linfocitos mediante centrifugación en gradiente de densidad	1
Cap. 2	Cuantificación de linfocitos T mediante formación de rosetas	7
Cap. 3	Cuantificación de poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo	14
Cap. 4	Evaluación de la respuesta mitogénica de linfocitos <i>in vitro</i>	22
Cap. 5	Cuantificación de inmunoglobulinas séricas	28
Cap. 6	Determinación de la actividad hemolítica del complemento (CH ₅₀)	39
Cap. 7	Prueba de reducción del NBT en fagocitos	49

SECCIÓN II: PRUEBAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA HIPERSENSIBILIDAD.

Cap. 8	Determinación de IgE sérica total e IgE contra alérgenos	54
Cap. 9	Pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada	62

SECCIÓN III: PRUEBAS DE APOYO DIAGNÓSTICO EN PATOLOGÍAS AUTOINMUNES.

Cap. 10	Determinación de factor reumatoide	70
Cap. 11	Determinación de anticuerpos contra proteínas y péptidos citrulinados	76
Cap. 12	Determinación de anticuerpos antinucleares mediante inmunofluorescencia	79

SECCIÓN IV: TIPIFICACIÓN DE HLA EN TRANSPLANTES.

Cap. 13	Determinación de HLA clase I mediante microlinfocitotoxicidad	85
----------------	---	----

SECCIÓN V: PRUEBAS SEROLÓGICAS DE APOYO DIAGNÓSTICO EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

Cap. 14	Determinación de anticuerpos heterófilos de la mononucleosis infecciosa	89
Cap. 15	Determinación de anticuerpos contra la estreptolisina O	94
Cap. 16	Prueba del VDRL	99

SECCIÓN VI: OTRAS PRUEBAS SEROLÓGICAS.

Cap. 17	Determinación de hormona gonadotropina coriónica	108
Cap. 18	Determinación de proteína C-reactiva (CRP)	114

APÉNDICE:

Reactivos	117
------------------------	-----

PREFACIO

El presente manual pretende proporcionar al estudiante de la carrera de Microbiología y Química Clínica la información esencial para comprender, ejecutar e interpretar un conjunto de técnicas inmunológicas de aplicación clínica, como parte de su formación en el curso MB-4003, *Laboratorio de Inmunología Clínica*. Se asume que el estudiante posee de antemano una formación básica en Inmunología General, tanto teórica (curso MB-3510) como de laboratorio (curso MB-3511).

Siguiendo la tradición de versiones anteriores, los capítulos presentan un breve introducción que resume los fundamentos teóricos de cada técnica, seguida de una descripción general de los procedimientos, algunas notas sobre los principales cuidados e interpretación, y una bibliografía sucinta. Los reactivos utilizados y su preparación se describen todos juntos al final, en el Apéndice.

Agradezco muy especialmente a los colegas y estudiantes que han hecho valiosas observaciones constructivas a las versiones anteriores de este manual. La presente edición regresa al formato inicial de copias sencillas, luego de la experiencia de unos cinco años con una versión hecha en imprenta, con el fin de facilitar la realización de cambios, actualizaciones, y mejoras. Espero que este modesto trabajo didáctico sea de utilidad a los estudiantes en su formación, así como en su futuro ejercicio profesional.

San José, enero 2009

Bruno Lomonte V.

Capítulo 1

Aislamiento de linfocitos mediante centrifugación en gradiente de densidad

Introducción

Para muchas pruebas inmunológicas *in vitro* se requieren preparaciones purificadas o enriquecidas de linfocitos de la sangre periférica. Algunos ejemplos son la enumeración o recuento de linfocitos T y B por métodos manuales, las pruebas de respuesta proliferativa hacia mitógenos en cultivo, la determinación de antígenos HLA, la respuesta al cultivo mixto de linfocitos, y otros procedimientos de utilidad tanto en el laboratorio clínico de rutina como en el de investigación.

Las primeras técnicas empleadas para aislar los linfocitos sanguíneos consistían en mezclar la muestra con un agente aglutinante de eritrocitos, con el fin de que estos se separaran debido a la sedimentación de los grumos. Sin embargo, estas técnicas son lentas, dan un bajo rendimiento final y una baja pureza. Posteriormente se desarrollaron las técnicas de centrifugación en gradientes. Bøyum (1958) ideó un método basado en la centrifugación de la muestra sobre un **gradiente de densidad discontinuo**, cuyo medio original consistía en una mezcla de ficoll y metrizoato de sodio, con densidad de 1,077 g/ml. Este método es rápido y simple, por lo que se utiliza muy comunmente para obtener preparaciones enriquecidas de linfocitos sanguíneos. Aunque estrictamente esta técnica resulta en la separación de los leucocitos **mononucleares**, que incluyen tanto a los linfocitos como a los monocitos, los primeros superan ampliamente en número a los segundos, cuando se trabaja con muestras de sangre periférica.

El medio de separación

El medio de separación para purificar linfocitos sanguíneos consiste en una mezcla de dos componentes. El **ficoll 400** es un polímero sintético de sacarosa y epíclorhidrina, de 400.000 daltons, soluble en agua. Por otra parte, el **diatrizoato de sodio** (que ha sustituido al metrizoato de la fórmula original de Bøyum) es un compuesto que, al ser mezclado con el ficoll, forma soluciones de baja viscosidad y alta densidad. La función del diatrizoato es proveer la densidad óptima para la separación y a la vez la osmolaridad adecuada para mantener la viabilidad de las células. Además, el ficoll causa la aglutinación de los eritrocitos, lo cual facilita aún más su sedimentación. Es recomendable que el medio de separación se mantenga en envases protegidos de la luz, debido a la fotosensibilidad del diatrizoato. La mezcla de ficoll-diatrizoato está disponible comercialmente, estéril y lista para su uso, por una variedad de fabricantes (ejs. Ficoll-Paque[®], Lymphoprep[®], etc.). También puede prepararse esta mezcla a partir de sus dos componentes, ajustando la densidad final a $1,077 \pm 0,001$ g/ml (ver Apéndice: Reactivos).

Fundamento de la separación

Al estratificar una muestra de sangre sobre el ficoll-diatrizoato y centrifugar, las células mononucleares se separan de las demás debido a diferencias de densidad. Como se mencionó, el ficoll aglutina los eritrocitos, por lo que estos pasan a través del medio y sedimentan al fondo. Los granulocitos también sedimentan por su tamaño y densidad, y por su tendencia a formar agregados. Los mononucleares (linfocitos y monocitos), por su menor densidad, se quedan en la interfase entre el plasma y el medio (Figs.1.1 y 1.2), con una contaminación relativamente baja de plaquetas y otros tipos celulares. Al final de la centrifugación, los leucocitos mononucleares se recogen del anillo blanco que se forma en la interfase entre el plasma y el ficoll-diatrizoato. Este procedimiento permite recuperar alrededor de un 50% de los linfocitos presentes en la muestra, con una viabilidad mayor del 90% (determinada mediante exclusión del azul tripán, ver abajo). Por ejemplo, el fabricante del Ficoll-Paque[®] describe los resultados obtenidos con su medio de la siguiente manera:

linfocitos:	>90% de las células de la fracción obtenida >90% viabilidad 50 ± 15% rendimiento (recuperación de linfocitos de la muestra)
otras células:	<5% granulocitos <10% eritrocitos plaquetas en cantidades bajas

Los mononucleares que se obtienen por esta técnica (>90% linfocitos) deben ser lavados con una solución balanceada de sales (SSB) o con el medio que se va a utilizar en la prueba particular, con el fin de eliminar restos del reactivo, de plasma y de plaquetas.

Factores que afectan el procedimiento

La cantidad de sangre a procesar debe guardar proporción con el volumen y la altura del medio de separación. Al aumentar la altura del estrato de sangre con respecto a la altura del medio, se aumenta la contaminación con eritrocitos en la interfase. Por esto, el diámetro del tubo es un factor importante para establecer el volumen de sangre óptimo para fraccionar. Para aumentar el tamaño de la muestra, es preferible aumentar el diámetro del tubo, tratando de no variar la altura de las capas de medio y de sangre.

El rendimiento y la pureza de los linfocitos dependen en gran parte de la eficiencia en la remoción de los eritrocitos. Cuando estos son aglutinados por el ficoll, algunos linfocitos son atrapados dentro de los grumos, y por lo tanto se pierden. Este fenómeno se reduce diluyendo la sangre 1:2 antes de fraccionarla, usando una solución salina balanceada, con el fin de mejorar el rendimiento final de los linfocitos.

La aglutinación de los glóbulos rojos se favorece conforme aumenta la temperatura, con lo cual se acelera la separación, pero se disminuye el rendimiento (ej. a 37°C). En

bajas temperaturas (4°C) se disminuye la velocidad de agregación, por lo que hay que prolongar el tiempo de separación. Una temperatura de alrededor de 18°C da resultados óptimos en cuanto al balance entre tiempo y rendimiento.

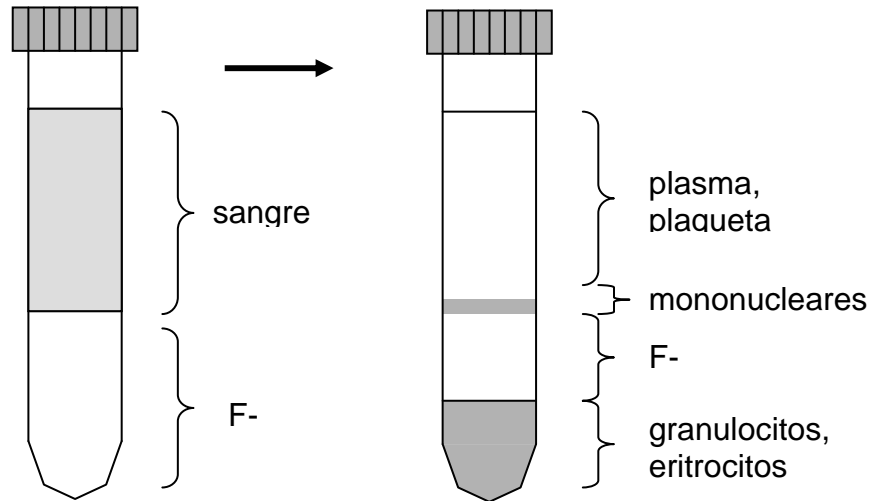


Figura 1.1: Distribución de los componentes sanguíneos en el gradiente de ficoll-diatrizoato antes (izquierda) y después (derecha) de centrifugar.

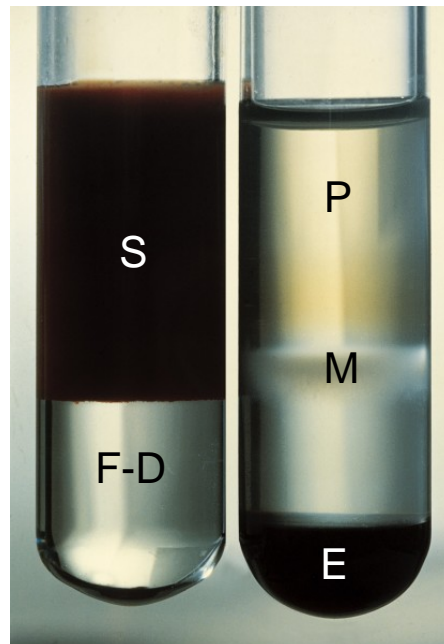


Figura 1.2: El tubo a la izquierda presenta una muestra de sangre (S) estratificada sobre el ficoll-diatrizoato (F-D), lista para ser centrifugada. A la derecha, después de la centrifugación, se observa al fondo el paquete de eritrocitos (E) y un anillo blancuzco con las células monocitocitos (M), mayoritariamente linfocitos, en la interfase entre el plasma (P) y el F-D.

Procedimiento

1. Colocar 3 ml de F-D (ficoll-diatrizoato) en un tubo de 10-15 ml.
2. Diluir 2 ml de sangre (anticoagulada¹ o desfibrinada) con 2 ml de solución salina balanceada (SSB) o con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) pH 7,2.
3. **Estratificar** cuidadosamente 4 ml de la sangre diluída sobre el F-D (**¡no mezclar!**).
4. Centrifugar a 400 xg durante 20 min, a temperatura ambiente, en un rotor de ángulo libre.
5. Con cuidado de no mezclar las capas, sacar el tubo de la centrífuga y aspirar el plasma (capa superior) con una pipeta, delicadamente, dejando intacto el anillo blanquecino de células mononucleares en la interfase.
6. Aspirar el anillo de células mononucleares, sin recoger demasiado² plasma, ni F-D. Depositar las células en un tubo limpio.
7. Lavar las células agregando ~8-10 ml de SSB y resuspendiendo suavemente con una pipeta. Recuerde que está trabajando con células vivas que son sensibles a fuerzas mecánicas, así como a la osmolaridad y todos los componentes de la solución en que se encuentran suspendidas.
8. Centrifugar a 100 xg por 5 min. Botar el sobrenadante mediante la inversión rápida del tubo (las células se quedan adheridas al fondo, formando un botón) y repetir el lavado.
9. Después del segundo lavado, los linfocitos pueden ser resuspendidos suavemente en el medio apropiado que se va a utilizar para cada propósito.
10. Para comprobar el porcentaje de viabilidad celular, mezclar partes iguales de la suspensión de células y de azul tripán, por ejemplo 100 µl + 100 µl, y cargar una cámara de recuento (Figs. 1.3 y 1.4). Observar inmediatamente al microscopio y contar las células viables (claras), distinguiéndolas de las dañadas (azules). Calcular la concentración de células en la suspensión original, tomando en cuenta cualquier dilución realizada previamente al recuento.

¹ el anticoagulante depende de la prueba particular en que se van a utilizar los linfocitos. Uno de los más utilizados es la heparina sódica (10-50 U/ml de sangre). La sangre desfibrinada se prefiere en técnicas donde las plaquetas pueden causar interferencia.

² aspirar un exceso de F-D aumenta la contaminación con eritrocitos y granulocitos; aspirar un exceso de plasma aumenta la contaminación con plaquetas y proteínas

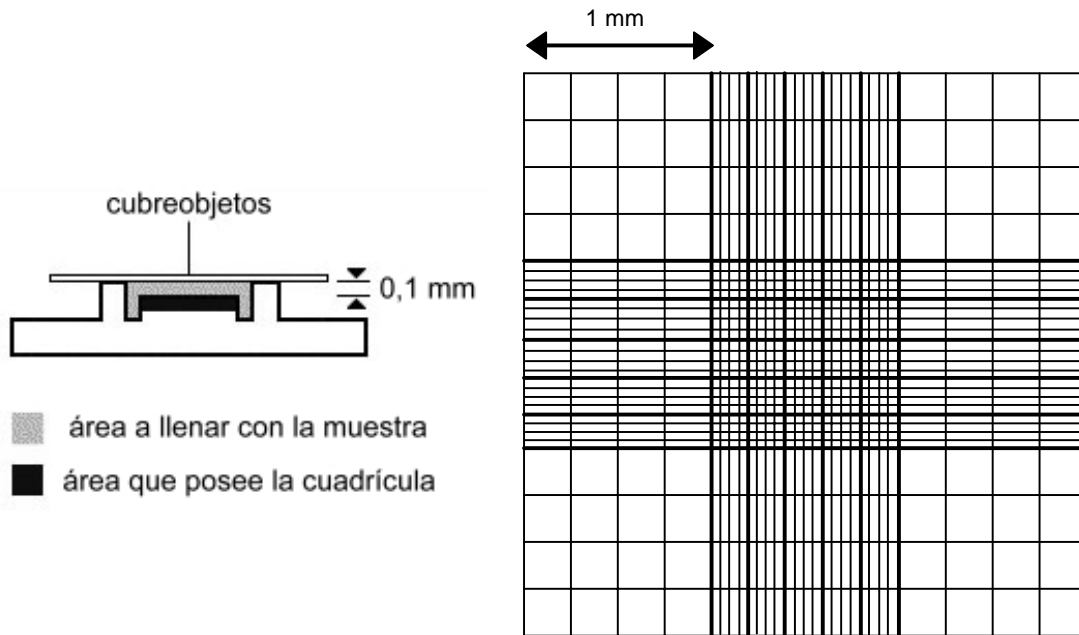


Figura 1.3: Hemocitómetro o cámara de recuento celular (versión Neubauer). El retículo o cuadrícula está formado por 9 áreas iguales, de 1 mm^2 cada una. La profundidad de la cámara (espacio que queda entre la superficie de la cuadrícula y el cubreobjetos) es de $0,1 \text{ mm}$. El número de células contadas en 1 mm^2 , multiplicado por 10 (altura), proporciona el número de células por mm^3 ($1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{l}$). Los leucocitos pueden contarse en los cuadrantes externos de 1 mm^2 (de 4×4).



Figura 1.4: Vista de un hemocitómetro con su cubreobjetos especial (izquierda) y forma de llenar la cámara por un borde, con una micropipeta, tocando la muesca o cuña lateral por debajo del cubreobjetos (derecha).

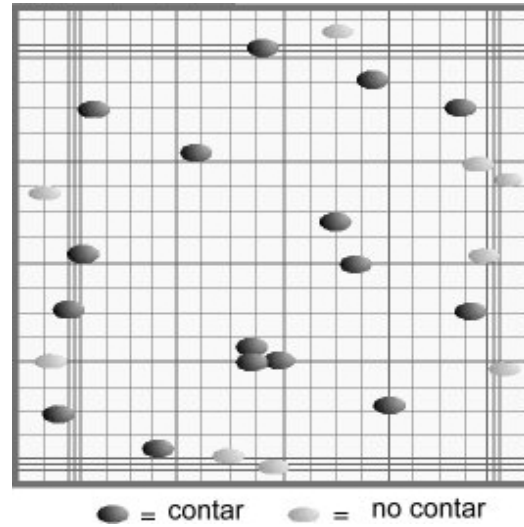


Figura 1.5: Convención para contar las células que quedan en los bordes de las áreas. Las células que tocan los bordes superior e izquierdo se cuentan, mientras que se excluyen las células que tocan los bordes inferior y derecho. El diagrama representa como círculos oscuros aquellas células que se contarían, y como círculos más claros las que no.

Referencias

- Bøyum, A. (1964) Separation of white blood cells. *Nature* **204**, 793.
- Bøyum, A. (1976) Isolation of lymphocytes and macrophages. En: *Lymphocytes, isolation, fractionation and characterization*, p 9. (Natvig, J.B., Perlmann, P. y Wigzell, H., Eds.) Supl. No. 5, *Scand. J. Immunol.* **5**, 9.
- Ficoll-Paque for *in vitro* isolation of lymphocytes (1975). Folleto de Pharmacia Fine Chemicals Co., Uppsala, Suecia.
- Hudson, L. y Hay, F.C. (1989) *Practical Immunology*, 507 pp. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Mishell, B.B. y Shiigi, S.M. (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology*, 486 pp. San Francisco: W.H. Freeman & Co.

Capítulo 2

Cuantificación de linfocitos T mediante formación de rosetas

Introducción

Las diferentes poblaciones y subpoblaciones de linfocitos no son distinguibles morfológicamente. Para identificarlas, se requieren métodos de laboratorio que detectan, por lo general, proteínas de membrana que utilizamos como "marcadores" de dichas poblaciones. Alrededor de 1970 se encontró que los linfocitos T humanos poseen la propiedad de unirse espontáneamente a los eritrocitos de carnero *in vitro*, formando agrupaciones llamadas **rosetas E** (Brain *et al.*, 1970; Lay *et al.*, 1971) (Fig.2.1). Esta propiedad ha sido útil para desarrollar una técnica sencilla y de bajo costo para la cuantificación de los linfocitos T. El fenómeno de formación de rosetas se debe a que los linfocitos T humanos poseen en su superficie un receptor que media la unión (fortuita) con los eritrocitos de carnero. Inicialmente, este receptor fue denominado "antígeno T11", cuando se generaron las primeras series de anticuerpos monoclonales contra marcadores de los linfocitos T humanos. Posteriormente, cuando se introdujo el uso de la nomenclatura de "grupos de diferenciación" (CD, *clusters of differentiation*), se cambió su nombre a **CD2**. Esta es una glicoproteína de membrana de 50 kDa, presente en todos los linfocitos T humanos maduros, cuya función natural (que obviamente no puede ser la de unirse a eritrocitos de carnero) es la interacción con una glicoproteína de 40-70 kDa, denominada **LFA-3** (*leukocyte function antigen*) o **CD58**, presente en la superficie de diversos tipos celulares. Los eritrocitos de carnero poseen una molécula análoga al LFA-3 humano en su superficie. El receptor CD2 posiblemente cumple una función en la estabilización de las interacciones celulares durante la adhesión y la activación de los linfocitos T. El CD2 puede activar a las células T por medio de una vía diferente de la que utiliza el complejo TCR/CD3 (receptor para antígeno) (Hale y Haynes, 1992).

Independientemente de la función natural del CD2, su presencia es útil para identificar a los linfocitos T humanos, a través de la formación de rosetas. También se ha explotado este fenómeno para depletar los linfocitos T maduros en suspensiones linfocitarias (incubándolas con los eritrocitos y separando las células formadoras de rosetas de las demás células mediante centrifugación en ficoll-diatrizoato), previo a trasplantes de médula ósea (Jankovic y Vukovic, 1989).

El sencillo método de las rosetas para cuantificar los linfocitos T humanos ha sido ampliamente sustituido por métodos de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales, ya sea manuales o automatizados, especialmente con el impresionante desarrollo de las técnicas de **citometría de flujo** (Capítulo 3). Sin embargo, dado su bajo costo en reactivos y equipo, el método de rosetas E constituye una alternativa válida y todavía útil para el laboratorio pequeño, no especializado.

Es importante tener en cuenta que este, y otros métodos de cuantificación de células, solo proveen información acerca del **número** de un determinado tipo celular (en este caso linfocitos T), pero no dan información sobre su **funcionalidad**. Es posible tener cifras normales de linfocitos T, pero que funcionalmente sean deficientes. Su funcionalidad se puede evaluar a través de distintos métodos, algunos de los cuales se describen en otros capítulos del presente manual.

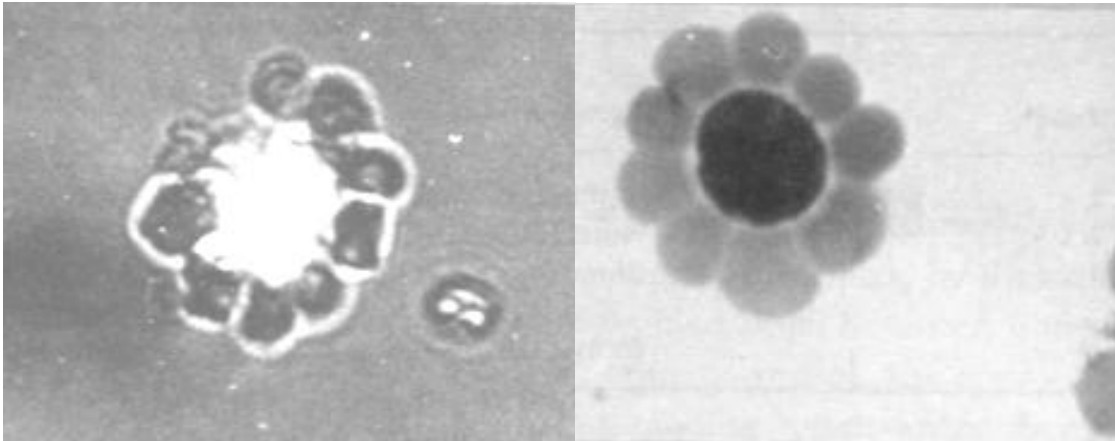


Figura 2.1: Microfotografía (al fresco) de una roseta E formada por un linfocito T humano, rodeado de numerosos eritrocitos de carnero (izquierda). Note la célula contigua que no se unió a los eritrocitos, y que por lo tanto se cuenta como "no-T". A la derecha se muestra una roseta fijada y teñida (en una preparación de citocentrífuga).

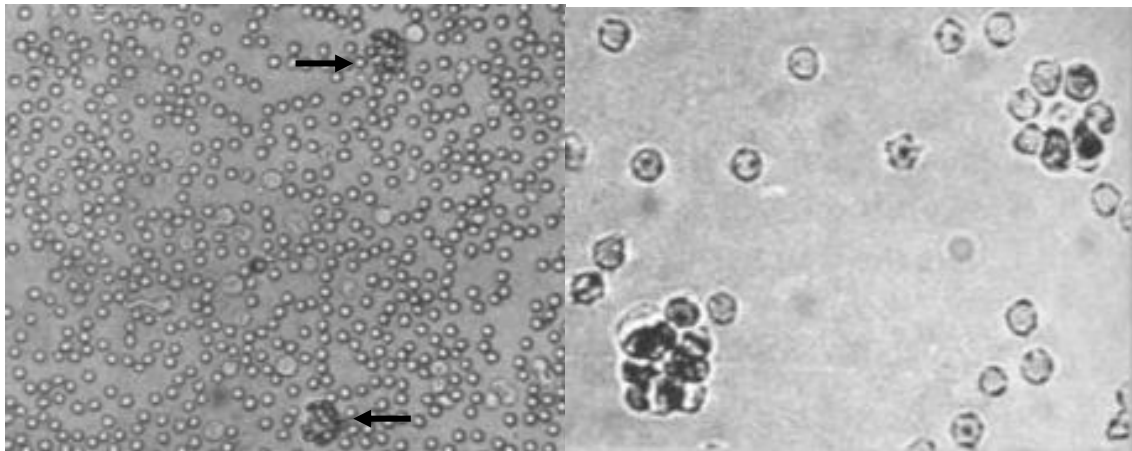


Figura 2.2: A la izquierda se muestra una vista microscópica en bajo poder (objetivo 10x) de la mezcla de linfocitos y eritrocitos de carnero, en donde las flechas señalan dos rosetas. A la derecha se observa en mayor detalle (objetivo 40x) la formación de dos rosetas.

La unión que se establece entre los linfocitos T y los eritrocitos de carnero es muy frágil, lo cual constituye el principal problema técnico de este método: las agitaciones, aún leves, pueden desintegrar las rosetas y causar amplias variaciones en los resultados. Algunas sustancias como la neuraminidasa y el AET (2-aminoetilisotiuronio) refuerzan la unión eritrocito-linfocito T, y pueden ser utilizadas para pre-tratar los eritrocitos, lográndose así una mayor estabilidad de las rosetas. Otras opciones para aumentar la estabilidad de la interacción son la adición de una alta concentración de proteínas en el medio (por ejemplo agregando suero fetal bovino a la mezcla de células) o de polietilén glicol (PEG, 10.000 Da) al 1-4% (Ocklind, 1988).

Solamente los linfocitos T viables pueden formar rosetas, por lo que las células muertas (que se detectan porque han incorporado el colorante supravital azul de tripán) no deben ser tomadas en cuenta para establecer el porcentaje de linfocitos T por este método. La formación óptima de las rosetas se logra con una incubación breve a 37°C, seguida de un período más largo a 4°C, a pH fisiológico.

Indicaciones clínicas para la cuantificación de linfocitos T

La cuantificación de linfocitos T circulantes es de suma importancia para la evaluación de pacientes en estudio por deficiencias de su sistema inmune, ya sean innatas o adquiridas. La enumeración de las poblaciones linfocitarias (T y B), en conjunto con las pruebas que evalúan su funcionalidad, contribuyen a precisar la naturaleza de la inmunodeficiencia y a predecir las complicaciones más probables que enfrentará el paciente, así como a establecer una base para las estrategias profilácticas y terapéuticas posibles. Por ejemplo, la evaluación del estado inmunológico de los pacientes infectados por el **virus de inmunodeficiencia humana (HIV)**, incluye un control periódico de sus cifras de linfocitos T, en especial la subpoblación CD4⁺ (T cooperadores), cuyas disminuciones muestran correlación con la aparición de los signos y síntomas característicos del **síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)**.

Por otra parte, durante el seguimiento y control de pacientes que reciben tratamientos inmunosupresivos fuertes (por ejemplo en receptores de **transplantes**, o pacientes con **neoplasias** tratadas mediante quimioterapia/radioterapia, etc.), la evaluación de linfocitos T y B puede proveer información útil para regular la dosificación del tratamiento. Algunos estudios han descrito que es posible predecir tempranamente una crisis de rechazo en transplantes renales mediante la detección de un aumento de los linfocitos T circulantes (Cosimi *et al.*, 1981; Ellis *et al.*, 1982).

En el caso de **enfermedades linfoproliferativas** como las leucemias linfocíticas, la clasificación con base en su origen T, B, o NK posee interés, dado que el pronóstico y la susceptibilidad a distintas terapias pueden mostrar diferencias. Por ejemplo, entre las leucemias linfocíticas agudas (LLA), la LLA no-B/no-T posee relativamente buen pronóstico, mientras la LLA-T es de pobre pronóstico y la LLA-B es la de peor pronóstico (Detrick-Hooks y Bernard, 1981). Por otro lado, entre las leucemias linfocíticas crónicas (LLC), las producidas por linfocitos T tienden a ser más agresivas que las de linfocitos B. Aunque la expresión de los diversos receptores y marcadores en las células neoplásicas depende en parte de la etapa de diferenciación celular en que ocurre la transformación maligna, un porcentaje importante de casos es clasificable en cuanto a su linaje leucocitario.

En enfermedades autoinmunes y otras enfermedades con alteraciones inmunológicas, la cuantificación de poblaciones de linfocitos puede ser de interés principalmente investigativo. El valor diagnóstico en estos cuadros es bajo, sin embargo los resultados pueden proveer información de interés para el especialista.

Formación de rosetas E

El método de las rosetas E no requiere trabajar en condiciones de esterilidad. Básicamente consiste en purificar linfocitos de sangre periférica (mediante la técnica del ficoll-diatrizoato; Capítulo 1), ajustar su concentración, y mezclarlos con eritrocitos de carnero. Después de un período de incubación, se coloca cuidadosamente la mezcla de células en una cámara de Neubauer, para observar la proporción (%) de linfocitos que formaron rosetas o no. El uso de la cámara en esta etapa es esencial, ya que si la lectura final se realiza en un portaobjetos con cubreobjetos convencional, la presión que ejerce este último, al colocarlo, disgrega un cierto número de rosetas. En cambio, el espacio (0,1 mm) existente entre el cubreobjetos y la superficie de la cámara de Neubauer evita este problema.

El anticoagulante recomendado para obtener la muestra de sangre es la heparina sódica (10-50 U/ml) sin preservantes. El EDTA puede causar una disminución en la formación de rosetas. La muestra debe ser procesada el mismo día, para preservar al máximo la viabilidad linfocitaria.

Procedimiento

1. Obtener linfocitos de sangre periférica (heparinizada) por el método del ficoll-diatrizoato (Capítulo 1) y ajustar la suspensión a 5×10^6 cél/ml en SSB (solución salina balanceada).
2. Lavar eritrocitos (E) de carnero (mantenidos en anticoagulante de Alsever¹) 4 veces con solución salina al 0,85% y resuspenderlos finalmente en SSB, al 0,5% v/v (por ejemplo: 0,1 ml de E empacados en 20 ml de SSB).
3. Mezclar en un tubo de 12x75 mm (preferiblemente de plástico y con tapa) 0,1 ml de E y 0,1 ml de linfocitos. Agregar 20 μ l de suero fetal bovino (previamente inactivado por calor por 30 min a 56°C).
4. Centrifugar a 50 xg durante 5 min y luego colocar en refrigeración (4-8°C) durante 90 min, sin causar disturbios en el botón de células.
5. Inmediatamente antes de examinar la muestra, agregar 100 μ l de azul tripán.

¹ la estabilidad de los eritrocitos de carnero en Alsever (para esta prueba) es de 3-4 semanas. La suspensión de trabajo se prepara para cada día y se descarta.

6. Resuspender **suavemente** las células, inclinando el tubo hasta una posición casi horizontal y rotándolo lentamente por 20-30 seg. Con una pipeta Pasteur **sin** bulbo, transferir por capilaridad una gota de la suspensión a una cámara de recuento celular.

7. Contar 100 linfocitos con el objetivo de 40x y anotar como "rosetas" aquellos linfocitos que posean **3 o más** eritrocitos adheridos. No deben contarse las células permeables al azul tripán (dañadas), ni los monocitos (estos se pueden "marcar", agregando desde el inicio partículas de látex de 1 μm , las cuales van a ser fagocitadas).

8. Calcular el porcentaje de linfocitos T (%T o % células E^+), así como su número absoluto ($T/\mu\text{l}$ o células $E^+/\mu\text{l}$) con base en los datos del hemograma de la muestra (número de leucocitos totales y fórmula leucocitaria diferencial).

- Ejemplo del cálculo de la cifra absoluta de linfocitos T:

recuento de leucocitos	=	8000/ μl
% de linfocitos	=	30%
% de células E^+	=	55%
→cifra absoluta de T		= $8000 \times 0,3 \times 0,55 = 1.320 \text{ cél.T}/\mu\text{l}$

Expresión de resultados e interpretación

Las cifras de linfocitos T obtenidas deben expresarse tanto en números **absolutos** (T/mm^3 , $T/\mu\text{l}$) como **relativos** (%), para evitar errores de interpretación. Los valores de referencia deben ser preferentemente establecidos en las condiciones de cada laboratorio (ver Cuadro 2.1). Empleando el presente método en un estudio realizado en adultos sanos costarricenses ($n=40$), los valores hallados fueron: %T= 49 ± 11 y $T/\mu\text{l} = 1.520 \pm 650$ (Quesada *et al.*, 1985).

En los recién nacidos es común encontrar un menor porcentaje de linfocitos T por este método. Sin embargo, la cifra absoluta de células T es mayor que en adultos, debido a que normalmente hay más linfocitos totales por μl . El porcentaje de linfocitos T aumenta gradualmente hasta alrededor de los 7 años, mientras la cifra absoluta disminuye en forma similar hasta nivelarse a la misma edad (Falcao, 1980). En edades avanzadas se describe una ligera reducción en las cifras de rosetas E (Brohee, 1988).

Rosetas E "activas"

Se ha descrito en la literatura una modificación al método convencional de rosetas E, que consiste en una incubación muy breve de los linfocitos con los eritrocitos (apenas de 5 min) bajo centrifugación a 200 xg y empleando una proporción linfocito/eritrocito de 1:8. Bajo estas condiciones, solamente los linfocitos T con mayor avidéz por los eritrocitos forman las rosetas. Algunos autores han propuesto que este método, denominado "rosetas

E activas", podría correlacionar mejor con el estado de la inmunidad celular *in vivo* (Wybran, 1979).

Cuadro 2.1: Algunos ejemplos de valores de linfocitos T en sangre periférica (por el método de rosetas E) descritos en la literatura.

Referencia	n	%T	T/ μ l
Bernego <i>et al.</i> (1979)	24	64 \pm 7	1.543 \pm 519
Merker <i>et al.</i> (1979)	49	62 \pm 8	n.d.
Scadding <i>et al.</i> (1979)	14	76 \pm 9	1.861 \pm 758
Falcao (1980)	51	67 \pm 6	1.320 \pm 460
Nagarkatti <i>et al.</i> (1980)	20	42 \pm 18	886 \pm 239
Sharpin <i>et al.</i> (1981)	25	56 \pm 12	1.740 \pm 450
Quesada <i>et al.</i> (1985)	40	49 \pm 11	1.521 \pm 647

n.d.: no descrito

Referencias

- Aksentijevich, I. y Flinn, I.W. (2003) Chronic lymphocytic leukemia: advances in biology and therapeutics. *Curr. Opin. Oncol.* **15**, 16.
- Bernego, M., Capella, G., De Matteis, A., Tovo, P. y Zina, G. (1979) The *in vitro* effect of a calf thymus extract on the peripheral blood lymphocytes of sixty-six melanoma patients. *Clin. Exp. Immunol.* **36**, 279.
- Brain, P., Gordon, J. y Willets, W. A. (1970) Rosette formation by peripheral lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **6**, 681.
- Brohee, D. (1988) E-rosettes in aging: meta-analysis of the literature. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **7**, 179.
- Cosimi, A.B., Calvin, R.B., Burton, R.C., Rubin, R.H., Goldstein, G., Kung, P.C., Hansen, W.P., Delmonico, F.L. y Russel, P.S. (1981) Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. *N. Engl. J. Med.* **305**, 308.
- Detrick-Hooks, B. y Bernard, A.T. (1981) T and B lymphocytes: Assays in malignant and nonmalignant disease. *Lab. Management*, Mayo, p.41.
- Ellis, T.M., Berry, C., Méndez, G., Goldman, M., Lower, R., Lee, H. y Mohanakumar, A. (1982) Immunological monitoring of renal allograft recipients using monoclonal antibodies to human T lymphocyte subpopulations. *Transplantation* **33**, 317.
- Falcao, R.P. (1980) Human blood lymphocyte subpopulations from birth to eight years. *Clin. Exp. Immunol.* **39**, 203.
- Foucar, K. y Goeken, J. (1982) Clinical application of immunological techniques to the diagnosis of lymphoproliferative and immunodeficiency disorders. *Lab. Medicine* **13**, 403.

- Gómez, E., San Miguel, J.F., González, M., Orfao, A., López-Berges, C., Ríos, A., López-Borrasca, A. (1991) Heterogeneity of T cell lymphoblastic leukaemias. *J. Clin. Pathol.* **44**, 628.
- Hale, L.P. y Haynes, B.F. (1992) Bromelain treatment of human T cells removes CD44, CD45RA, E2/MIC2, CD6, CD7, CD8, and Leu 8/LAM1 surface molecules and markedly enhances CD2-mediated T cell activation. *J. Immunol.* **149**, 3809.
- Jankovic, M.B. y Vukovic, I. (1989) Elimination of T cells from human bone marrow and peripheral blood by means of E-rosettes and density gradient centrifugation. *Bone Marrow Transplant* (diciembre, supl. 3), 110.
- Jondal, M. (1976) SRBC rosette formation as a human T lymphocyte marker *Scand. J. Immunol.* **5**, Suppl. 5, 69.
- Lay, W.H., Mendes, N.F., Bianco, C. y Nussenzweig, V. (1971) Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes. *Nature* **230**, 531.
- Merker, R., Check I. y Hunter, R.L. (1979) Use of cryopreserved cells in quality control of human lymphocyte assays: analysis of variation and limits of reproducibility in long-term replicate studies. *Clin. Exp. Immunol.* **38**, 116.
- Nagarkatti P., Nagarkatti, M. y Jain, V. (1980) *In vivo* and *in vitro* action of chloroquine on surface markers of human peripheral lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **41**, 166.
- Parker, J. (1981) A new look at malignant lymphomas. *Diagnostic Medicine* (June, special issue).
- Ocklind, G. (1988) All CD2-positive human lymphocytes rosette with sheep erythrocytes in the presence of polyethylene glycol. *J. Immunol. Meth.* **112**, 169.
- Quesada, S. y Ramírez, M. (1984) Porcentaje y cifra absoluta de linfocitos T en sangre periférica por el método de rosetas E: Estudio de cuarenta adultos sanos. Trabajo Final de Graduación, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- Quesada, S., Ramírez, M. y Lomonte, B. (1985) Porcentaje y cifra absoluta de linfocitos T en sangre periférica por el método de rosetas E: estudio de cuarenta adultos sanos. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* **6**, 7.
- Scadding, G., Thomas, H. y Harvard, W. (1979) The immunological effects of thymectomy in myasthenia gravis. *Clin. Exp. Immunol.* **36**, 205.
- Sharpin, R., Simmons, M. y Wilson, J. (1981) T cells in peripheral blood lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **45**, 538.
- Stites, D.P., Folds, J.D. y Schmitz, J. (1998) Métodos de laboratorio clínico para detección de inmunidad celular. En: *Inmunología Básica y Clínica*, (Stites, D.P., Terr, A.I. y Parslow, T.G., Eds.), p.293. México: Editorial Manual Moderno.
- Townsend, A. (1985) Molecules at work on the T-cell surface. *Immunol. Today* **6**, 68.
- Winchester, R.J. y Ross, G. (1976) Methods for enumerating lymphocyte populations. En: *Manual of Clinical Immunology* (Rose, N.R. y Friedman, H., Eds.), p.64.
- Wybran, J. (1979). The active T rosette test: its significance and its use. En: *Cell Biology and Immunology of Leukocyte Function*, (Quastel, M.R., Ed.), p.745. New York: Academic Press.

Capítulo 3

Cuantificación de poblaciones linfocíticas mediante citometría de flujo

Introducción

La citometría de flujo representa uno de los desarrollos tecnológicos de mayor impacto para la medicina moderna, al permitirnos realizar mediciones muy rápidas en células (u otras partículas) individuales en suspensión, conforme estas pasan -una por una- a través de un punto específico de análisis. El aspecto más importante de esta tecnología es que las mediciones se realizan sobre cada célula o partícula individual, y no sobre un promedio de toda su población. La capacidad de poder analizar cuantitativamente múltiples parámetros de las células mediante un haz de luz láser, constituye una de las mayores fortalezas de estas técnicas instrumentales. Un desarrollo ulterior de los citómetros de flujo, el **separador de células activado por fluorescencia** (FACS, *fluorescence-activated cell sorter*), permite no solamente el análisis de las células, sino su aislamiento, con base en propiedades predeterminadas por el usuario.

En los campos de la inmunología y la hematología, las técnicas de citometría de flujo han emergido como un pilar fundamental para el análisis y la caracterización detallada de las células sanguíneas. Entre las aplicaciones clínicas más frecuentes de estos métodos se encuentran la caracterización de leucocitos en estados de inmunodeficiencia (innatos o adquiridos) y en enfermedades onco-hematológicas. El desarrollo de la tecnología de hibridomas, al proveer anticuerpos monoclonales capaces de reconocer epitopos únicos de las moléculas de superficie celular, ha expandido enormemente las posibilidades de los análisis basados en la citometría. A esto se debe agregar el desarrollo de un gran número de fluorocromos, que son utilizados para marcar covalentemente a los anticuerpos monoclonales que se emplean en estas técnicas (Cuadro 3.1).

En el Capítulo 2 se señalaron las principales indicaciones clínicas de las pruebas de cuantificación de linfocitos T y B, y sus subpoblaciones. Estas determinaciones se han realizado tradicionalmente a través de métodos manuales de **inmunofluorescencia directa**, utilizando anticuerpos marcados que reconocen determinadas estructuras de la superficie linfocitaria, y contando en un microscopio las cifras de células positivas y negativas para el marcador en cuestión. En el caso de los linfocitos T, la posibilidad de detectarlos a través de la formación de rosetas, incluso ha permitido obviar el uso de la inmunofluorescencia, cuando este tipo de instrumentación no se encuentra disponible. Sin embargo, los métodos de recuento manuales son muy lentos y laboriosos, en comparación con las amplias posibilidades de análisis y la automatización que ofrece la citometría de flujo. Obviamente, el principal obstáculo para una mayor difusión de la citometría de flujo en laboratorios medianos y pequeños radica en el alto costo de los instrumentos, así como en la complejidad técnica para el adecuado mantenimiento de los mismos.

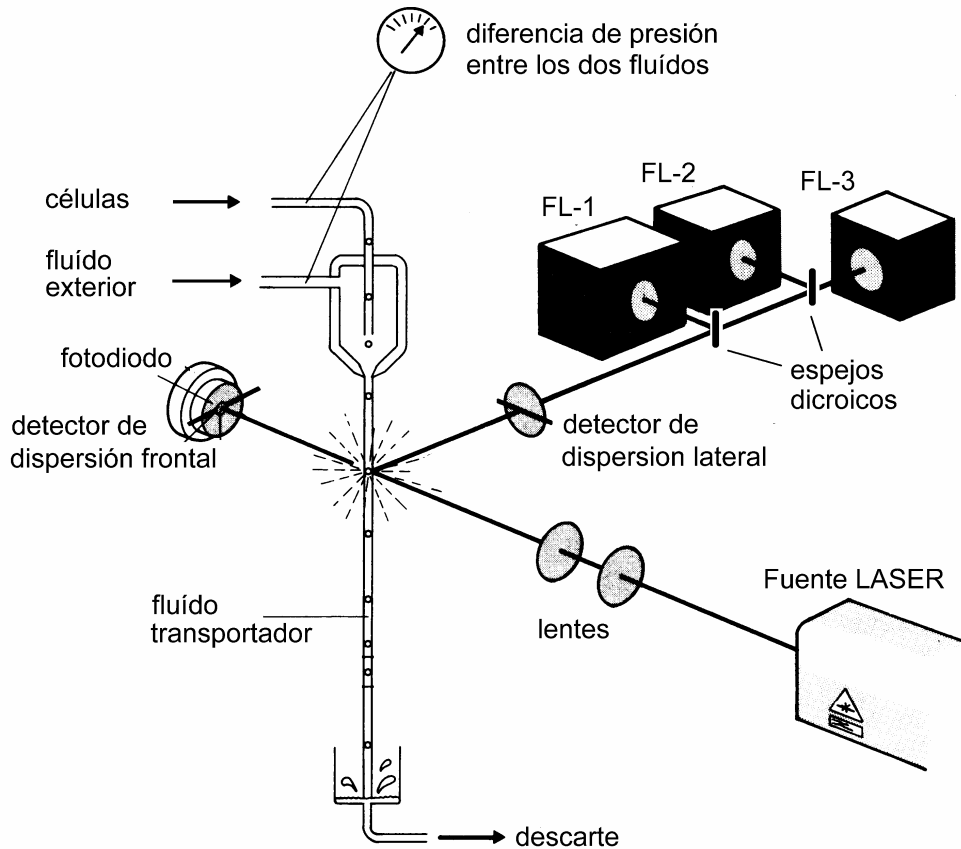


Figura 3.1: Diagrama simplificado de un citómetro de flujo. El haz de luz láser es enfocado sobre el punto de análisis, por el cual cruzan continuamente las células. La dispersión frontal de luz es detectada en línea con la trayectoria incidente, mientras la dispersión lateral es detectada en un ángulo de 90°. Adicionalmente, un conjunto de espejos dicroicos dirige los distintos tipos de luz fluorescente (emitida por anticuerpos marcados) a los tubos fotomultiplicadores. El esquema representa un instrumento con 3 canales de fluorescencia (FL).

Principios de la citometría de flujo

La suspensión celular que se quiere analizar mediante un citómetro de flujo es conducida mecánicamente a una sección que la convierte en una delgada corriente de fluido, finalmente dispersado en gotas microscópicas sobre las cuales incide un fino haz de luz láser¹ (Figs.3.1 y 3.2). Cada célula dispersa en varias direcciones esta luz, la cual es recogida por distintos fotodiodos y tubos fotomultiplicadores. Dos parámetros físicos de las células son cuantificados con base en la dispersión de la luz: la **dispersión frontal** (*forward scattering*), que correlaciona principalmente con su tamaño, y la **dispersión lateral** (*side scattering*), a 90°, que correlaciona mayormente con su granularidad, o

¹ LASER, acrónimo de "light amplification by stimulated emission of radiation".

complejidad de la superficie. Además, si las células son pretratadas con anticuerpos fluorescentes contra distintos marcadores, la luz láser activa a los fluorocromos correspondientes y las señales lumínicas emitidas son detectadas por tubos fotomultiplicadores. Algunos citómetros modernos poseen capacidad para utilizar múltiples canales distintos para la cuantificación de fluorescencia, lo que permite analizar, por tanto, la presencia de un conjunto de hasta 5, 6 o más marcadores celulares simultáneamente.

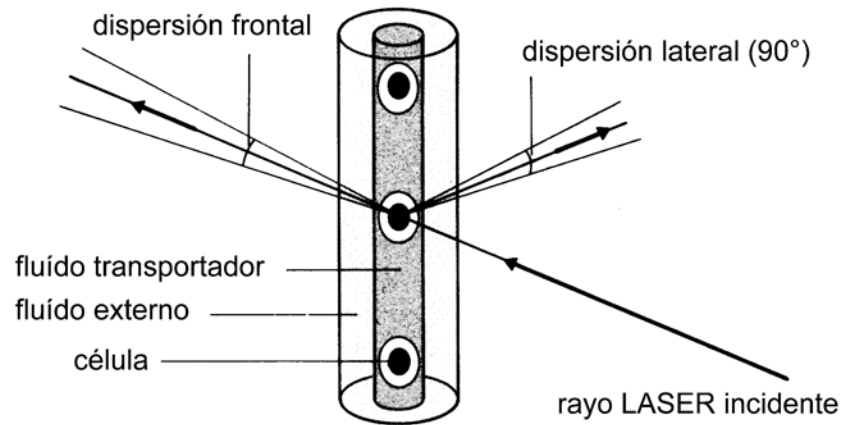


Figura 3.2: Detalle esquemático del punto de análisis de un citómetro de flujo, en donde las células cruzan el rayo de luz láser, dispersando la luz y emitiendo fluorescencia (si se han pretratado con anticuerpos marcados con fluorocromos).

Cuadro 3.1: Algunos fluorocromos utilizados para marcar anticuerpos en inmunofluorescencia y citometría de flujo*.

Fluorocromo	Pico de absorción	Pico de emisión
fluoresceína	495 nm	520 nm
tetrametilrodamina	543 nm	570 nm
rojo Texas	596 nm	620 nm
rojo Princeton	490 nm	579 nm
ficoeritrina-R	495 y 564 nm	576 nm
aloficocianina	650 nm	660 nm
cumarina	357 nm	460 nm

* Ormerod (1990).

Un citómetro de flujo puede analizar suspensiones celulares a velocidades tan altas como 500-1.000 células por segundo. El paso de cada célula es contabilizado como un evento individual, y todos los parámetros que registra el sistema de análisis óptico son

integrados mediante una computadora. Usualmente se analizan unos 10.000 eventos por muestra, en apenas unos pocos minutos. A través de poderosos programas de captura de datos y análisis, es posible desplegar los resultados en forma tanto numérica como gráfica, con un conjunto de posibilidades de presentación que incluye diagramas de dispersión (Fig.3.3), de contorno (Fig.3.5), histogramas de frecuencias (Fig.3.6) y muchos otros.

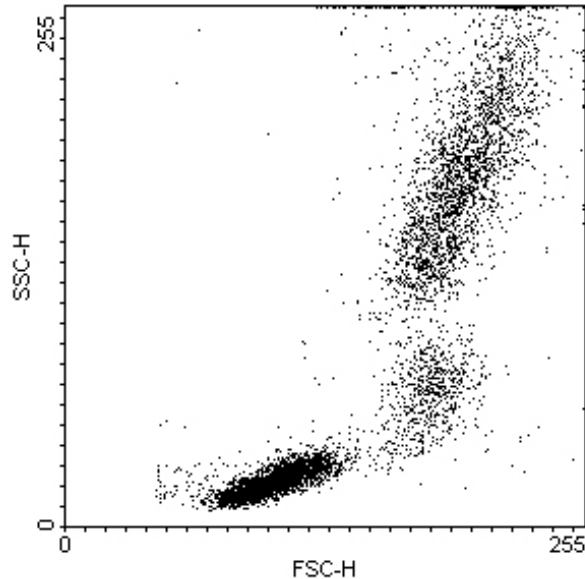


Figura 3.3: Diagrama de dispersión de una muestra de leucocitos sanguíneos analizada por citometría de flujo. El eje vertical indica la dispersión lateral (granularidad de las células), mientras el horizontal indica la dispersión frontal (tamaño). Cada célula es graficada como un punto. La zona de puntos más densa (región con menor tamaño y granularidad, abajo), corresponde a los linfocitos. Arriba a la derecha se ubica la región de los granulocitos, mientras los monocitos se ubican entre ambas zonas.

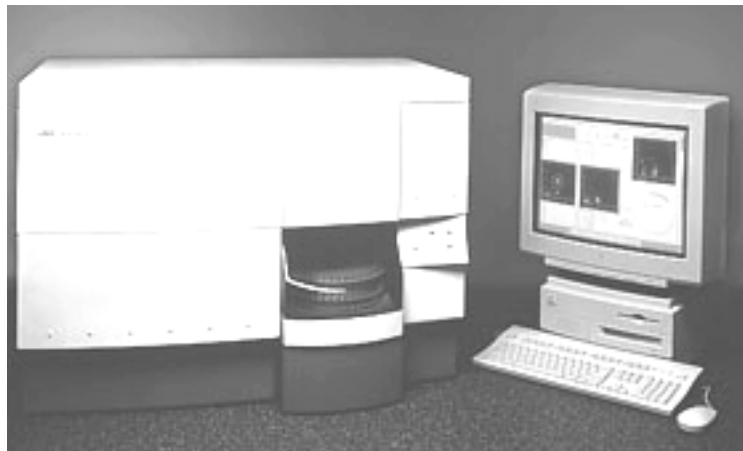


Figura 3.4: Un citómetro de flujo.

Procedimiento

El siguiente procedimiento permite el análisis de linfocitos sanguíneos utilizando anticuerpos fluorescentes contra distintos marcadores. Para los linfocitos T totales, es usual utilizar un anticuerpo monoclonal anti-CD3. Las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores y T citotóxicos se evalúan con anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8, respectivamente. Los linfocitos B son usualmente evaluados mediante el uso de anti-CD19.

1. Obtener 10 ml de sangre anticoagulada y distribuirla en 5 tubos de 50 ml (2 ml/tubo).
2. Un tubo a la vez, agregar 45 ml de solución de lisis (ver Apéndice: Reactivos) y mezclar de inmediato. Repetir para los demás tubos.
3. Esperar 10 min a temperatura ambiente (para que los eritrocitos se lisen).
4. Centrifugar a 400 xg por 10 min a 4°C y decantar el sobrenadante.
5. Resuspender cada botón celular con 5 ml de solución SSB-BSA y combinar todo en un solo tubo.
6. Centrifugar a 400 xg por 5 min a 4°C y decantar el sobrenadante.
7. Lavar las células con 25 ml de solución SSB-BSA y centrifugar como en el paso anterior.
8. Ajustar la concentración de la suspensión a 5×10^6 células/ml y mantener sobre hielo.
9. Colocar 100 μ l de cada anticuerpo conjugado² a utilizar (en la dilución previamente optimizada) en un tubo sobre hielo. Correr en paralelo los siguientes controles: **(a)** 100 μ l de solución SSB-BSA, sin ningún anticuerpo; **(b)** 100 μ l de algún anticuerpo conjugado de igual isotipo que cada anticuerpo anterior, pero dirigido contra un epitopo irrelevante.
10. Colocar 100 μ l de la suspensión de leucocitos en los tubos con los anticuerpos y mezclar suavemente.
11. Incubar durante 30 min sobre hielo, protegiendo de la luz.
12. Agregar 1,5 ml de solución SSB-BSA a cada tubo y centrifugar a 400 xg por 5 min a 4°C. Decantar el sobrenadante y repetir este lavado.
13. Resuspender el botón celular en 450 μ l de fijador de formalina-SSB-BSA y mantener a 4°C protegido de la luz, hasta la aplicación en el citómetro, según las instrucciones específicas de cada instrumento.

² Para reducir la posible unión "inespecífica" de los anticuerpos conjugados a los receptores para Fc de los leucocitos (FcR), se puede agregar al medio un anticuerpo monoclonal de especificidad irrelevante, del mismo isotipo que el conjugado, a una concentración 10 veces mayor que este.

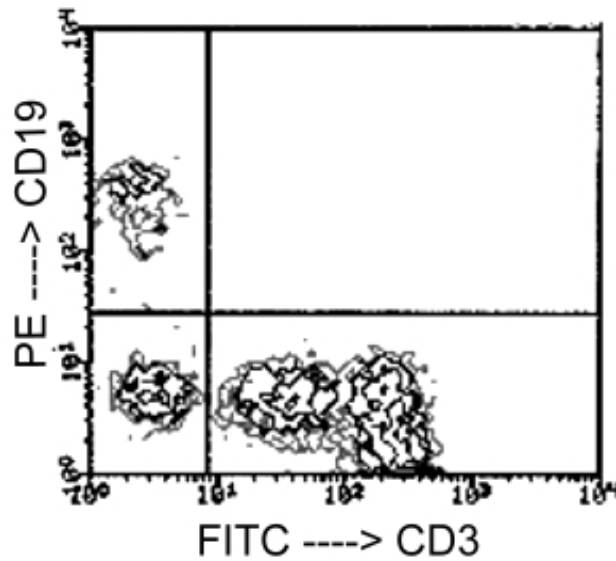


Figura 3.5: Cuantificación de linfocitos T y B. El eje vertical indica la fluorescencia emitida por el anti-CD19-ficoeritrina (PE), que marca a los linfocitos B. El eje horizontal corresponde al anti-CD3-fluoresceína (FITC), como marcador de los linfocitos T. El gráfico es una representación de tipo "contorno", con cuatro décadas logarítmicas para la intensidad de la fluorescencia en cada eje. Las 2 líneas internas establecen los límites de positividad de la señal (en contraposición con la señal negativa del cuadrante inferior izquierdo). Puede observarse el predominio de los linfocitos T (cuadrante inferior derecho) sobre los B (cuadrante superior izquierdo), así como la ausencia de células con ambos marcadores (cuadrante superior derecho).

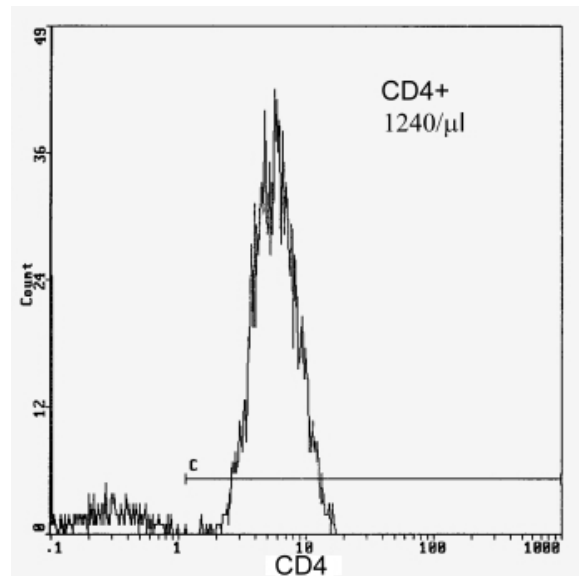


Figura 3.6: Representación de tipo histograma para el análisis de un solo marcador celular. En este ejemplo, las células se trataron con anti-CD4-FITC, para la cuantificación de linfocitos T cooperadores.

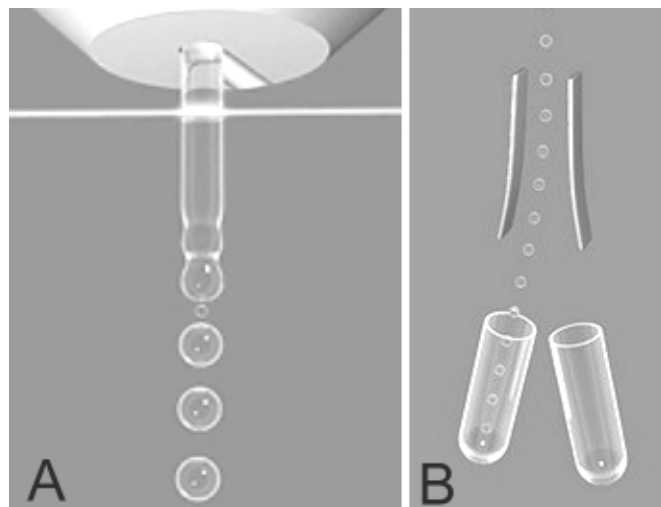


Figura 3.7: En el separador de células activado por fluorescencia (FACS, *fluorescence-activated cell sorter*), después del análisis de las células es posible aislar una determinada subpoblación. El fluido transportador de las células es disgregado en gotas microscópicas (A), cuya trayectoria puede ser desviada mediante la aplicación de una carga eléctrica momentánea, al pasar por placas deflectoras magnéticas (B). De este modo, el instrumento dirige las gotas hacia recipientes distintos, para aislar las células que expresan un marcador dado.

Cuadro 3.2: Valores de referencia para la cuantificación de linfocitos T y B en sangre mediante citometría de flujo.

Categoría	T ^{***}		CD4 ⁺		CD8 ⁺		B	
	%	#/μl	%	#/μl	%	#/μl	%	#/μl
neonatos **								
mediana	72	4.459	53	3.209	25	1.514	25	1.579
inferior	57	2.642	39	1.728	16	842	12	637
superior	87	6.510	63	5.060	33	2.319	42	2.785
adultos								
mediana	73	1.605	46	935	27	519	13	246
inferior	61	959	32	544	13	272	7	122
superior	84	2.577	60	1.633	40	932	21	632

* Fahey (2001). Los valores se muestran como medianas, y límites inferior y superior del ámbito de referencia al 95%. El valor "n" utilizado varió entre 57 y 139 individuos.

** Edad de 1 a 6 meses.

*** Anticuerpos utilizados: Leu 4 (CD3); Leu 3a (CD4); Leu 2a (CD8); y Leu 12 (CD19). Citómetro FACScan[®] de Becton-Dickinson.

Referencias

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pober, J.S. (2002) *Inmunología Celular y Molecular*, 577 pp. Madrid: McGraw Hill Interamericana.
- Aksentjevich, I. y Flinn, I.W. (2003) Chronic lymphocytic leukemia: advances in biology and therapeutics. *Curr. Opin. Oncol.* **15**, 16.
- Carter, N.P. (1990) Measurements of cellular subsets using antibodies. En: *Flow Cytometry, a Practical Approach* (Ormerod, M.G., Ed.), 45-67. Oxford: IRL Press.
- Fahey, J.L. (2001) Boletín: Reference values for lymphocyte subsets. Center for Interdisciplinary Research in Immunologic Diseases, UCLA School of Medicine.
- Hale, L.P. y Haynes, B.F. (1992) Bromelain treatment of human T cells removes CD44, CD45RA, E2/MIC2, CD6, CD7, CD8, and Leu 8/LAM1 surface molecules and markedly enhances CD2-mediated T cell activation. *J. Immunol.* **149**, 3809.
- Hudson, L. y Hay, F.C. (1989) *Practical Immunology*, 507 pp. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Lanier, L. y Jackson, A. (1992) Monoclonal antibodies: differentiation antigens expressed on leukocytes. En: *Manual of Clinical Laboratory Immunology* (Rose, N. et al., Eds.). Washington DC: American Society for Microbiology.
- Mishell, B.B. y Shiigi, S.M. (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology*, 486 pp. San Francisco: W.H. Freeman & Co.
- Ormerod, M.G. (1990) An introduction to fluorescence technology. En: *Flow Cytometry, a Practical Approach* (Ormerod, M.G., Ed.), 29-44. Oxford: IRL Press.
- Roitt, I.M., Brostoff, J. y Male, D. (2001) *Immunology*, 480 pp. Edinburgh: Mosby.
- Stites, D.P., Folds, J.D. y Schmitz, J. (1998) Métodos de laboratorio clínico para detección de inmunidad celular. En: *Inmunología Básica y Clínica*, (Stites, D.P., Terr, A.I. y Parslow, T.G., Eds.), p.293. México: Editorial Manual Moderno.

Capítulo 4

Evaluación de la respuesta mitogénica de linfocitos *in vitro*

Introducción

Los linfocitos pueden ser inducidos a dividirse, en cultivo, mediante una variedad de estímulos. Su capacidad de realizar mitosis *in vitro* se ha utilizado como un criterio para evaluar la funcionalidad de los mecanismos de activación celular y proliferación durante las respuestas inmunes en el organismo. La respuesta mitogénica de los linfocitos puede ser cuantificada mediante técnicas basadas en la incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-T}$) al ADN celular, o alternativamente, mediante técnicas colorimétricas que detectan, por ejemplo, la actividad de enzimas intracelulares, mitocondriales, etc.

Los estímulos mitogénicos en cultivo se pueden dividir en tres grupos principales: **(a)** activación por antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) alogénicos, por ejemplo en la técnica del cultivo mixto de linfocitos; **(b)** activación por un antígeno exógeno, en individuos previamente expuestos al mismo *in vivo*; y **(c)** activación por mitógenos policlonales, tales como algunas lectinas vegetales, moléculas de origen microbiano, o por anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas de superficie que originan señales para la proliferación (ej. anti-CD3, anti-CD2, etc.).

Entre los mitógenos policlonales, algunos muestran cierto grado de selectividad hacia una determinada población de linfocitos, por ejemplo T o B. Esto posee utilidad para la evaluación del estado funcional de dicha población en el individuo, al menos en cuanto a su capacidad para proliferar. Por ejemplo, la **fitohemaglutinina** (PHA)¹ y la **concanavalina A** (Con A) son lectinas de origen vegetal que estimulan con cierta selectividad a los linfocitos T humanos, por lo que se emplean en el estudio de pacientes por inmunodeficiencia. La respuesta mitogénica a estas lectinas está disminuída o ausente en sujetos con defectos en sus linfocitos T.

Fundamento

Si se cultiva un número constante de linfocitos en presencia de una cantidad óptima de un mitógeno (ej. PHA), durante unos días, las células entrarán en mitosis. Al agregar un **pulso** de timidina radioactiva² al cultivo, esta se incorporará al ADN sintetizado *de novo*, en forma proporcional a la actividad mitótica de las células (Fig.4.1).

¹ la fitohemaglutinina es extraída a partir de algunas especies de frijol (*Phaseolus*), mientras la concanavalina A es extraída de la planta *Canavalia ensiformis*.

² la timidina es utilizada (en lugar de los otros nucleótidos) por ser específica del ADN; otros nucleótidos no permitirían distinguir si la señal de incorporación radioactiva es debida a la síntesis de ADN o de ARN mensajero (para producir proteínas).

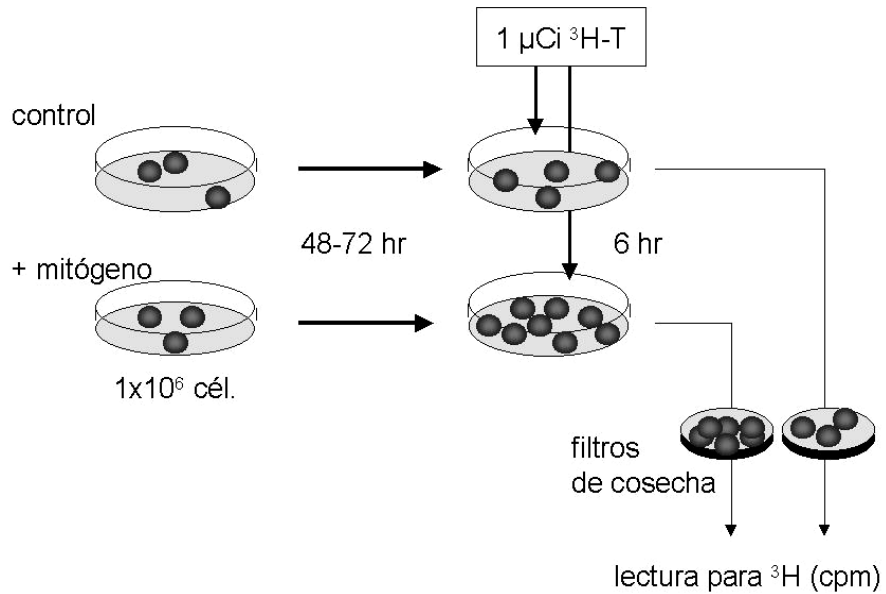


Figura 4.1: Principio de la cuantificación de la respuesta proliferativa frente a un mitógeno, mediante la incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-T}$). Los linfocitos en estudio se cultivan solos (control) o en presencia del mitógeno, durante 48-72 hr. En este punto se agrega la timidina radioactiva, y 6 hr más tarde se cosechan las células en filtros porosos, los cuales son llevados a un contador de emisiones beta para obtener las lecturas correspondientes.

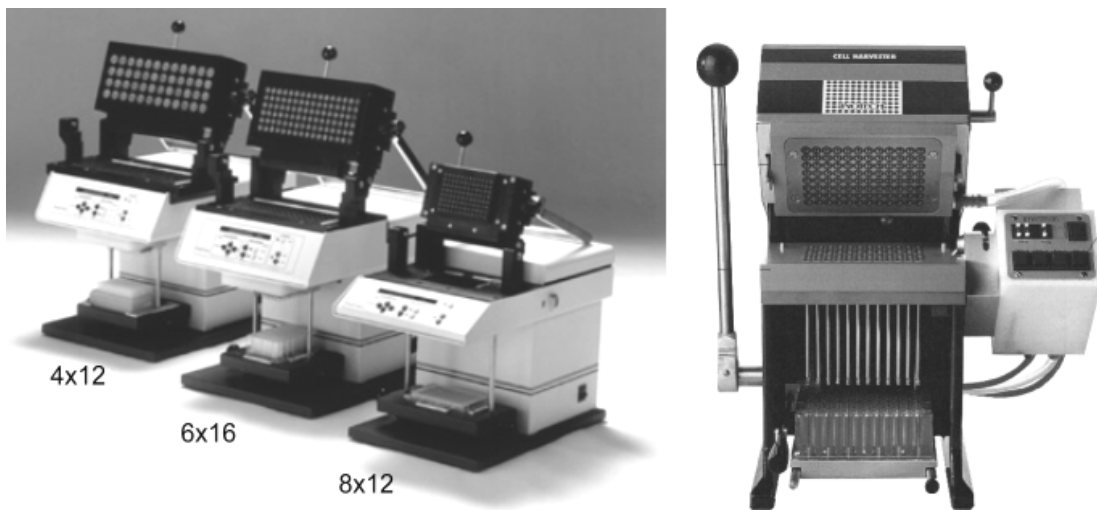


Figura 4.2: Cosechadores de células para la técnica de mitogénesis. A la izquierda se muestran instrumentos para tres formatos de cultivo (en tubos o microplacas): 4x12, 6x16, y 8x12 (placa de 96 hoyos). A la derecha se muestra un cosechador de 96 hoyos. La hoja del filtro poroso se coloca dentro del bloque principal (abierto en la ilustración), el cual luego se cierra con la palanca principal. El medio de los cultivos se aspira mediante una bomba de vacío, con lo cual las células quedan atrapadas en la membrana, para su lectura final.

La radioactividad incorporada en las nuevas células puede medirse, recogiendo a las mismas mediante filtración en una membrana o filtro poroso. Esto se realiza en un aditamento denominado "cosechador" de células (Fig.4.2). La lectura de la radioactividad emitida por la timidina en las células cosechadas al final del cultivo se realiza en un contador de emisiones beta (Fig.4.3). Un control de células sin mitógeno nos dará el nivel de incorporación basal de timidina, y utilizando este dato como punto de referencia, podremos comparar cuántas veces más radioactividad se ha incorporado en el cultivo con mitógeno, y obtener un **índice de estimulación** relativo.

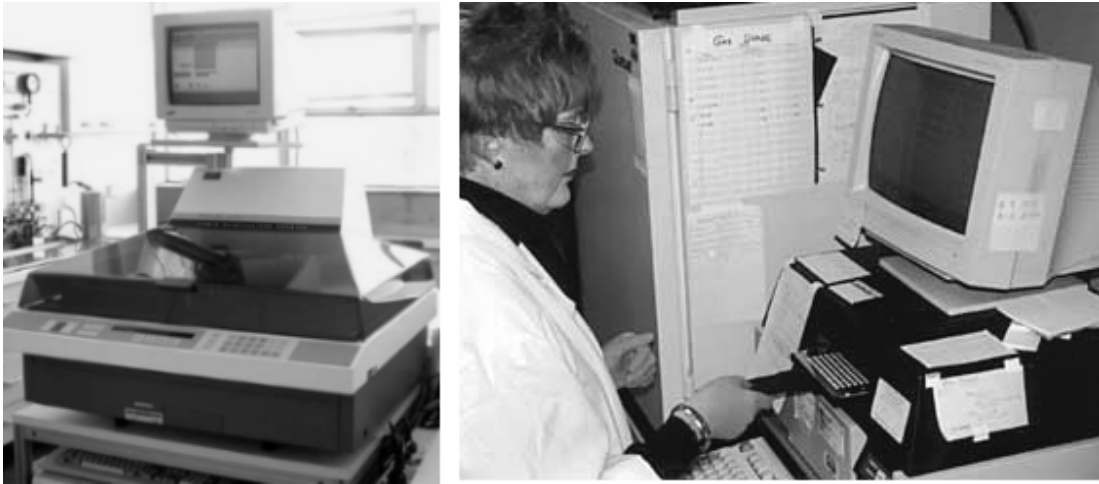


Figura 4.3: Contadores de emisiones beta para la cuantificación de timidina tritiada. A la izquierda se muestra un instrumento contador de fase líquida, en el cual los pequeños filtros o discos que contienen el radioisótopo deben ser sumergidos en viales que contienen líquido de centelleo. Las emisiones beta del tritio causan la emisión de fotones en el líquido, las cuales son detectadas por el instrumento como "cuentas por minuto" (cpm). A la derecha se muestra un contador de fase gaseosa, el cual no requiere líquido de centelleo. Este instrumento es muy conveniente para el trabajo con formato de 96 hoyos, dado que una placa entera puede ser "cosechada" en una sola hoja de filtro, el cual se introduce directamente al lector mediante una bandeja (como se muestra), para obtener las 96 lecturas en "cpm".

A continuación se describe un micrométodo para la evaluación de la respuesta mitogénica a la PHA, un mitógeno para los linfocitos T humanos. En general, la actividad biológica de distintas preparaciones de lectinas comerciales es variable, por lo que es importante probar cada lote y estandarizar una concentración óptima para la estimulación mitogénica. Las curvas de dosis-respuesta hacia los mitógenos usualmente muestran una región de ascenso, un pico óptimo, y una región de descenso (Fig.4.4). Esta última es presumiblemente debida a fenómenos complejos como la toxicidad relativa de las preparaciones del mitógeno, el consumo de los nutrientes del medio, u otras causas.

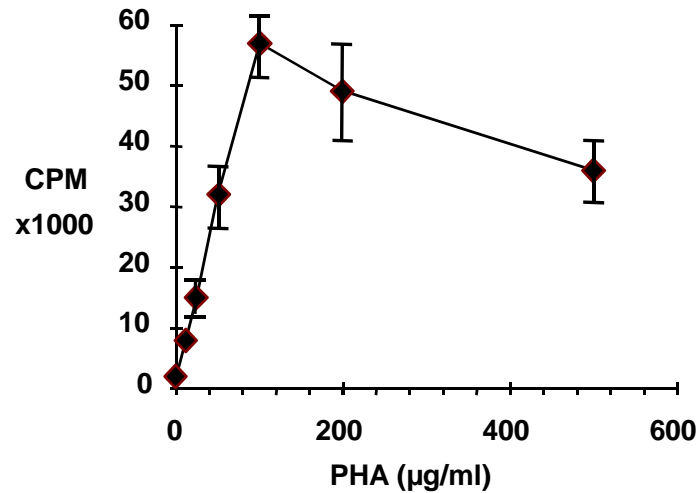


Figura 4.4: Ejemplo de una curva de dosis-respuesta para seleccionar la concentración óptima de un mitógeno (en este caso, la fitohemaglutinina, PHA). Los puntos indican el promedio \pm desviación estándar de los triplicados de los cultivos. El eje vertical indica la incorporación de timidina tritiada, expresada como cuentas por minuto (cpm). Con ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ de la lectina se obtuvo una lectura de alrededor de 55.000 ± 5.000 cpm.

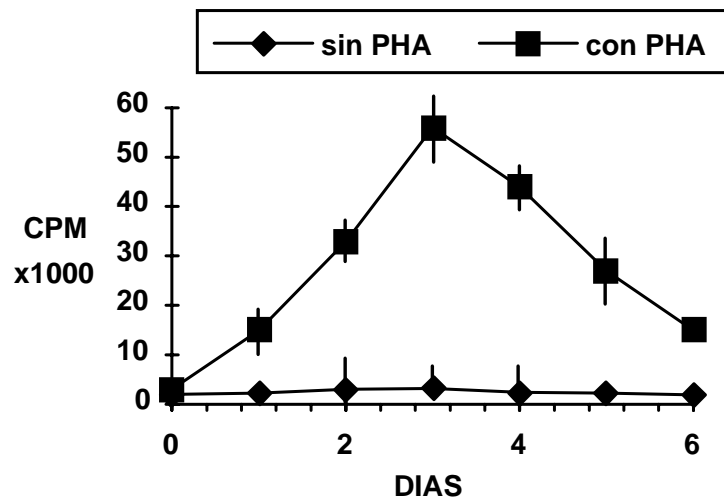


Figura 4.5: Ejemplo de la cinética de la incorporación de timidina tritiada en pruebas de respuesta mitogénica a la fitohemaglutinina (PHA). La incorporación máxima se obtuvo con 72 hr de cultivo. En la respuesta a mitógenos policlonales o a los aloantígenos, el pico de proliferación es más rápido, ya que se estimula un alto número de células de la muestra (independientemente de su especificidad). En cambio, en la evaluación de la respuesta mitogénica a un antígeno específico (ej. PPD, toxoide tetánico, etc.) la proliferación es más lenta, con un máximo en 5-7 días, ya que solo se estimula una baja proporción de los linfocitos presentes en la muestra.

Procedimiento: respuesta mitogénica a la PHA

1. Todo el proceso se debe realizar en condiciones de esterilidad. Obtener una muestra de sangre y aislar los mononucleares por el método del ficoll-diatrizoato (Capítulo 1). Después de los lavados, ajustar la suspensión de linfocitos a 5×10^6 células/ml en medio RPMI-1640³ suplementado con 10% de suero fetal bovino. En cada corrida de pacientes en estudio, debe incluirse linfocitos de un individuo sano como control. Algunos laboratorios utilizan alícuotas de linfocitos "normales", almacenadas por criopreservación en nitrógeno líquido.

2. Por triplicado (Fig.4.6), sembrar en los hoyos:

- (a) 100 μ l de suspensión de linfocitos + 100 μ l de medio sin mitógeno, como control
- (b) 100 μ l de suspensión de linfocitos + 100 μ l de medio con una concentración óptima⁴ (estimuladora máxima) de la PHA;
- (c) 100 μ l de suspensión de linfocitos + 100 μ l de medio con una concentración subóptima⁵ (submáxima) de la PHA.

3. Incubar a 37°C con 5-7% CO₂ durante 68 hr y luego agregar 0,5 μ Ci/hoyo de timidina tritiada (en 25 μ l) durante 4-6 hr.

4. Filtrar los cultivos utilizando un cosechador conectado a una bomba de vacío. Realizar dos lavados de los hoyos, aspirando todo el material, para asegurarse de recoger el máximo de células. Secar los filtros en una estufa y transferirlos a viales de plástico con 10 ml de líquido de centelleo para contar las emisiones β (si el contador es de fase líquida), o pasar directamente el filtro al contador β (si este es de fase gaseosa).

5. Para expresar los resultados, calcular el índice de estimulación de cada muestra:

$$\text{IE} = \frac{\text{promedio de cpm de los cultivos estimulados (con mitógeno)}}{\text{promedio de cpm de los cultivos no estimulados (control)}}$$

Es importante también proporcionar los datos absolutos de las lecturas (promedio y desviación estándar de cada conjunto de triplicados), para evitar errores de interpretación por resultados relativos. Un índice de estimulación de 3 o mayor es generalmente considerado como normal.

³ también pueden utilizarse otros medios de cultivo como base, tales como Dulbecco, MEM, etc.

⁴ la dosificación de la PHA se estandariza probando unos 3-5 individuos normales con diferentes concentraciones de la lectina.

⁵ es recomendable utilizar dos concentraciones de PHA, una óptima (máxima estimulación) y una subóptima, por ejemplo, una dilución 1:3 de la anterior; esto permite detectar mejor defectos en la respuesta que podrían pasar desapercibidos si se utiliza solo la dosis óptima.

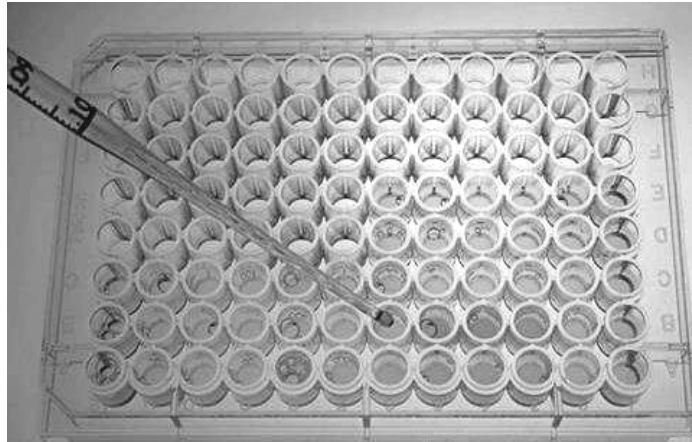


Figura 4.6: Placa de cultivo de 96 hoyos. Este formato es ampliamente utilizado en las pruebas de respuesta mitogénica de linfocitos, ya que trabaja con microcultivos (150-200 μ l) y además puede explotar el uso de pipetas "multicanal" para algunos de los pasos.

Referencias

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pober, J.S. (2002) *Inmunología Celular y Molecular*, 577 pp. Madrid: McGraw Hill Interamericana.
- Fitzgerald, M.G. (1971) The establishment of a normal human population dose-response curve for lymphocytes cultured with phytohaemagglutinin. *Clin. Exp. Immunol.* **8**, 421.
- Fletcher, M.A., Klimas, N., Morgan, R. y Gjerset, G. (1992) Lymphocyte proliferation. En: *Manual of Clinical Laboratory Immunology* (Rose, N.R., Conway, E., Fahey, J.L., Friedman, H., y Penn, G.M., Eds.), p.213. Washington: American Society for Microbiology.
- Greaves, M., Janossy, G. y Doenhoff, M. (1974) Selective triggering of human T and B lymphocytes *in vitro* by polyclonal mitogens. *J. Exp. Med.* **140**, 1.
- Hudson, L. y Hay, F.C. (1989) *Practical Immunology*, 507 pp. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Mishell, B.B. y Shiigi, S.M. (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology*, 486 pp. San Francisco: W.H. Freeman & Co.
- Roitt, I.M., Brostoff, J. y Male, D. (2001) *Immunology*, 480 pp. Edinburgh: Mosby.
- Stites, D.P., Folds, J.D. y Schmitz, J. (1998) Métodos de laboratorio clínico para detección de inmunidad celular. En: *Inmunología Básica y Clínica*, (Stites, D.P., Terr, A.I. y Parslow, T.G., Eds.), p.293. México: Editorial Manual Moderno.
- Waller, C.A. y MacLennan, I.C.M. (1977) Analysis of lymphocytes in blood and tissues. En: *Techniques in Clinical Immunology* (Thompson, R.A., Ed.), p.170. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Capítulo 5

Cuantificación de inmunoglobulinas séricas

Introducción

Las inmunoglobulinas (Igs) constituyen el componente humoral de la respuesta inmune específica en todos los animales vertebrados. En el humano se distinguen cinco clases (**isotipos**) de Igs, denominadas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, según la nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Estos isotipos se diferencian con base en las propiedades estructurales y antigénicas de sus cadenas pesadas (γ , α , μ , δ , ϵ). Las cadenas livianas, ya sean kappa (κ) o lambda (λ), son compartidas por todos los isotipos.

Debido a su gran heterogeneidad estructural y funcional (probablemente la más notable de todas las proteínas séricas), las Igs solamente pueden ser cuantificadas mediante técnicas inmunoquímicas. En estas técnicas, las Igs actúan como antígeno frente a antisueros que reconocen epitopos característicos de cada clase de cadena pesada.

Entre los métodos de mayor utilización para cuantificar las clases de Igs séricas más abundantes en el plasma (IgG, IgA e IgM) se destacan la **inmunodifusión radial** y la **inmunonefelometría**. Otra técnica que posibilita realizar esta cuantificación, la inmunoelectroforesis en cohete, ha quedado en desuso. Por otro lado, la cuantificación de IgE requiere de métodos de alta sensibilidad física (debido a su baja concentración en plasma), tales como las técnicas inmunoenzimáticas o las radioinmunes, en tanto que la cuantificación de IgD no tiene aún utilidad clínica conocida.

Inmunodifusión radial (IDR)

Esta técnica se basa en la difusión libre de la muestra en un gel que contiene anticuerpos contra la Ig que se desea cuantificar. La formación de los complejos entre antígenos y anticuerpos da lugar a la formación de un anillo o círculo de precipitación alrededor del punto de aplicación, cuya área es proporcional a la concentración de antígeno en la muestra (Fig.5.1).

La determinación de Igs séricas por inmunodifusión radial se puede efectuar de dos maneras. La primera, llamada de **difusión completa** (Mancini *et al.*, 1965), permite la difusión máxima de la muestra, en un tiempo de 48-72 hr, y da como resultado una línea recta al graficar el cuadrado del diámetro del anillo vs. la concentración de Ig (Fig.5.4). La segunda, denominada de **difusión parcial** (Fahey y McKelvey, 1965), utiliza un tiempo de difusión limitado (4-18 hr) y da como resultado una recta cuando se grafica el diámetro del anillo vs. el logaritmo de la concentración de Ig. A pesar de que esta variante es más rápida, su precisión es menor, en comparación con el método de difusión completa.

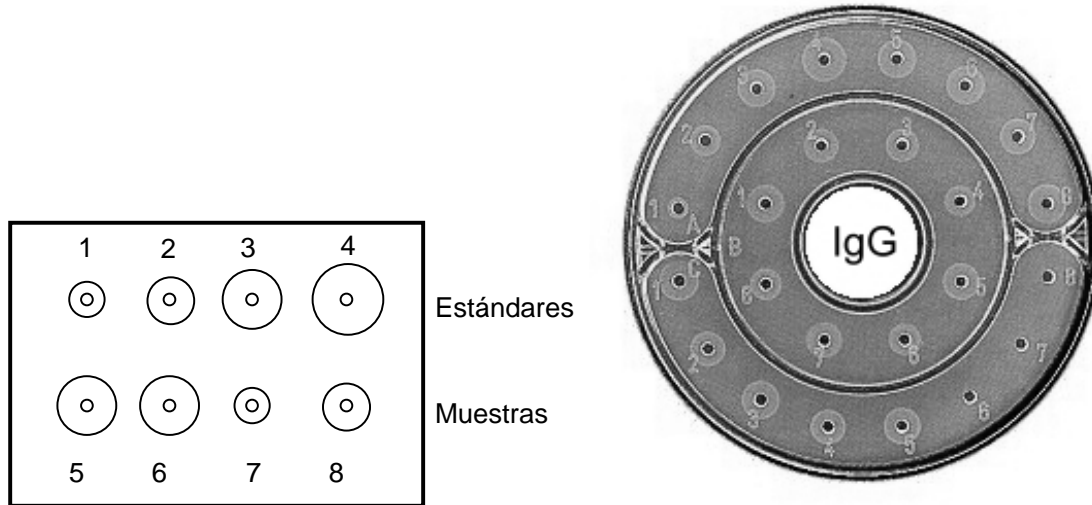


Figura 5.1: Principio de la inmunodifusión radial. Se colocan estándares de concentración conocida del antígeno (hoyos 1-4) en un gel que contiene anticuerpos contra él, para que se formen anillos de precipitado, cuyo diámetro depende de la concentración del antígeno. Trazando una curva de referencia, como se describe en el texto, se puede interpolar la concentración de antígeno en las muestras desconocidas (hoyos 5-8), según el diámetro de sus respectivos anillos de precipitación. A la derecha se muestra una placa comercial para la cuantificación de IgG humana, con los anillos de precipitación sin teñir.

Debido a su simplicidad y a que no requiere de equipo complejo, la IDR es una técnica muy utilizada para la cuantificación de Igs, por lo que muchas casas comerciales ofrecen placas listas para su uso. Sin embargo, dos limitaciones de la IDR son: **(a)** el largo tiempo de lectura; y **(b)** los problemas que ocasionan las Igs anormales (ya sea formas poliméricas o incompletas que se producen en ciertas patologías) cuya velocidad de difusión en el gel -por depender del peso molecular- puede inducir a resultados erróneos. Un requisito indispensable de esta técnica es que el antisuero contenido en el gel debe ser absolutamente monoespecífico, es decir, debe producir un solo anillo de precipitación con las muestras a analizar.

Inmunonefelometría

Esta técnica se basa en la medición de la dispersión de la luz causada por la formación de complejos insolubles antígeno-anticuerpo, al agregar un suero anti-Ig (IgG, IgA o IgM, según el caso) a la muestra de suero a determinar (Fig.5.2). Sus principales ventajas son: **(a)** provee resultados en minutos; **(b)** puede automatizarse, para el manejo de un alto número de muestras; y **(c)** debido a que no se basa en un principio de difusión, la presencia de polímeros de Igs de tamaños diversos no conduce a errores importantes. Su principal desventaja radica en la interferencia que puede causar la turbidez propia de la muestra, ya sea por la presencia de complejos inmunes pre-existentes o de otros agregados moleculares

insolubles de origen no-inmunológico. Este aspecto se controla en la técnica mediante la utilización de un "blanco" de muestra.

Los nefelómetros más simples se basan en una lectura de **punto final**, en donde la dispersión de la luz se mide una vez cumplido un período de incubación determinado. Otros nefelómetros, más sofisticados, utilizan un sistema de lectura continua para computar la **cinética** de la formación de los complejos, es decir, el cambio de señal por unidad de tiempo.

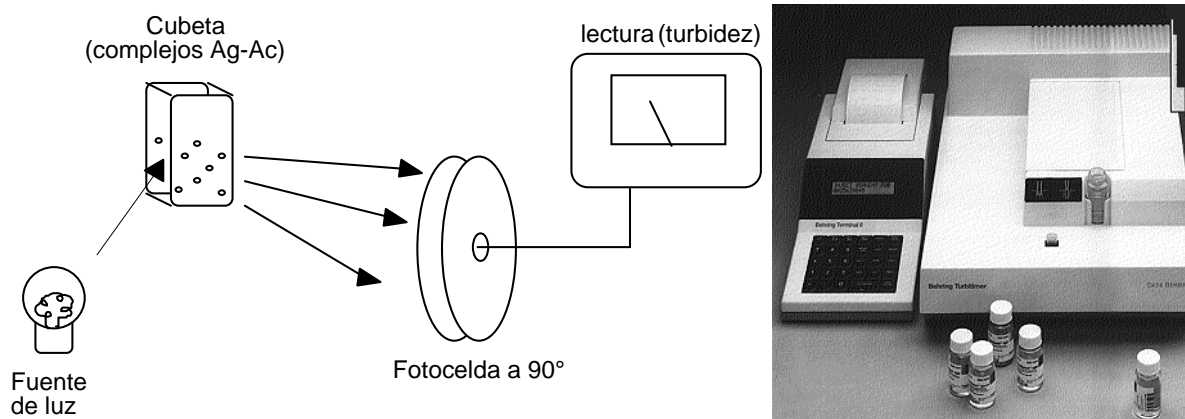


Figura 5.2: Principio de la inmunonefelometría. Los complejos antígeno-anticuerpo que se forman al mezclar la muestra con el correspondiente antisuero dispersan la luz, la cual es detectada mediante una fotocelda a 90° (izquierda). A la derecha se muestra un nefelómetro comercial, con estándares para la cuantificación de inmunoglobulinas.

Indicaciones clínicas de la cuantificación de Igs

Según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se sugiere cuantificar las Igs séricas en los siguientes casos:

- (a).en el estudio por inmunodeficiencia, ya sea innata o adquirida, sugerida por infecciones frecuentes, recurrentes, y/o debidas a microorganismos de baja virulencia.
- (b).en la vigilancia de pacientes que sufren formas graves de hipogammaglobulinemia y que reciben terapia de sustitución con preparaciones de Igs inyectables.
- (c).para ayudar a distinguir entre gamapatías monoclonales idiopáticas benignas y paraproteinemias malignas como el mieloma múltiple. En este último caso, frecuentemente se produce una disminución en los niveles de las otras clases de Igs distintas a la implicada en el proceso neoplásico, a diferencia del primero.

- (d).para contribuir al diagnóstico de una infección congénita, principalmente a través de la cuantificación de IgM en la sangre de cordón del neonato, ya que esta clase de anticuerpos es la primera en el desarrollo ontogénico y se eleva sensiblemente en tales procesos infecciosos.

En otras condiciones patológicas esta determinación posee poco valor diagnóstico y su realización obedece más bien a fines de investigación clínica especializada.

Estandarización internacional de la cuantificación de Igs

La concentración de Igs puede expresarse en unidades de masa (mg/dl) o en unidades internacionales arbitrarias (UI/ml). Históricamente, las unidades absolutas de masa se utilizaron en un inicio, basándose en estándares de referencia preparados por cada laboratorio especializado, mediante la purificación de las Igs. Alrededor de 1970, diversos estudios colaborativos, coordinados por el Centro de Referencia para Inmunoglobulinas de la OMS, demostraron que había dificultad para estandarizar y unificar los resultados con este sistema, ya que aún los principales laboratorios en el campo obtenían variaciones importantes al analizar, con sus propios estándares, distintas muestras codificadas. A la vez, los estudios demostraron que se lograba una mejor reproducibilidad entre laboratorios si se utilizaba un estándar de referencia único, al cual se le había asignado unidades de potencia arbitrarias, para representar los valores desconocidos de IgG, IgA e IgM. Esto motivó a la preparación de un estándar internacional de referencia para dichas Igs por parte de la OMS, y a la adopción de unidades arbitrarias designadas como **Unidades Internacionales (UI)**, cuyo uso fue recomendado por dicha entidad. Sin embargo, el sistema de unidades arbitrarias no tuvo gran aceptación, fundamentalmente por razones de costumbre. Ante tal situación, los comités de la OMS propusieron el uso de ambos tipos de unidades (UI/ml y mg/dl), a través de factores de conversión basados en las mejores determinaciones absolutas disponibles. Cabe destacar que los factores de conversión de unidades arbitrarias a unidades de masa están sujetos a una gran incertidumbre, ya que los métodos de purificación de las Igs no permiten una recuperación cuantitativa y a la vez de alta homogeneidad de cada proteína. Es por esto que cada fabricante de placas comerciales para la determinación de Igs proporciona sus factores de conversión a unidades de masa, con ligeras variaciones entre ellos, a pesar de que los estándares comerciales son patrones secundarios calibrados con respecto al estándar internacional de referencia, en UI/ml.

Valores de referencia para las Igs séricas

Muchas investigaciones indican que los niveles séricos de Igs varían en las distintas poblaciones, tanto por factores genéticos como ambientales (Cuadro 5.1). Como consecuencia, los niveles "normales" (de referencia) en una población dada no son necesariamente extrapolables a otras poblaciones. Los resultados obtenidos al analizar una pequeña muestra en Costa Rica, correspondiente a adultos jóvenes, se indican en el Cuadro 5.2.

Las concentraciones séricas de Igs en los niños poseen una marcada variación, según la edad. El neonato posee altos niveles de IgG materna obtenida transplacentariamente, cuya concentración declina gradualmente a la vez que aumentan las Igs propias, comenzando por la IgM. Un estudio completo sobre los niveles de Igs y sus variaciones durante la niñez en la población estadounidense se presenta en el Cuadro 5.3. Sin embargo, las investigaciones han demostrado que pueden existir diferencias en el comportamiento de distintas poblaciones, en cuanto al desarrollo de los niveles de Igs séricas durante la niñez. Por ejemplo, mientras se describe que en EUA los niños alcanzan el nivel de IgG del adulto en edad escolar (Cuadro 5.3), en una población indígena de Guatemala se encontró que a los 6 meses de edad los niños ya tenían la misma concentración sérica de IgG de sus madres, probablemente como reflejo de una estimulación antigénica más intensa (Lechtig *et al.*, 1972).

Procedimiento

Método de inmunodifusión radial por difusión completa (Mancini *et al.*, 1965).

1. Utilizar como muestra suero obtenido por punción venosa, en ayuno. El mismo puede analizarse de inmediato o congelarse a -30°C hasta por períodos de 12 meses (evitando la descongelación repetida).
2. Destapar la placa de inmunodifusión por unos 3-5 min, para evaporar restos de agua de condensación.
3. Aplicar en cada hoyo el volumen de muestra indicado por el fabricante (ej. 5 μl), tanto para los estándares como para las muestras, con una micropipeta apropiada (ej. "Hamilton microsyringe"; Fig.5.5). La aplicación mediante capilares precalibrados es muy imprecisa.
4. Tapar la placa y colocarla sobre una superficie nivelada¹, a temperatura ambiente, durante al menos 48 hr (para IgG e IgA) o 72 hr (para IgM, de menor difusibilidad por su alto peso molecular).
5. Leer el diámetro de los círculos de precipitación, preferiblemente con un visor de precisión con escala de 0,1 mm (Fig.5.6), o alternativamente con una regla calibrada a escala de 0,5 mm. La lectura se facilita utilizando una iluminación oblicua del gel.
6. Graficar, en papel milimétrico, el diámetro elevado al cuadrado (d^2) en el eje Y, contra la concentración de los estándares (mg/dl o UI/ml) en el eje X. Trazar la línea de mejor ajuste entre los puntos (notar que no sale del origen; ver Fig.5.4). En condiciones óptimas, los puntos son prácticamente colineales, por lo que las desviaciones usualmente sugieren imprecisión instrumental o manual, y/o deterioro de los reactivos.

¹ un desnivel en la incubación puede ocasionar la formación de precipitados ovalados, con el consiguiente error en la lectura.

7. Interpolar² en el gráfico de calibración el valor obtenido para cada muestra (d^2) y obtener su concentración.

Método de inmunodifusión radial por difusión parcial (Fahey y Mc Kelvey, 1965):

1. La aplicación de las muestras es igual que en el método anterior (pasos 1-3).
2. La incubación es por un período más breve, dado por el fabricante (usualmente entre 4 y 16 horas). El tiempo de lectura es crítico, es decir, se debe realizar exactamente al cumplirse el lapso, tanto para los estándares como para las muestras.
3. Graficar, en papel semilogarítmico, el diámetro (d) de los anillos de precipitado (en la escala lineal) contra la concentración de los estándares (escala logarítmica). Trazar la línea de referencia al igual que en el caso anterior, e interpolar los valores obtenidos para cada muestra.

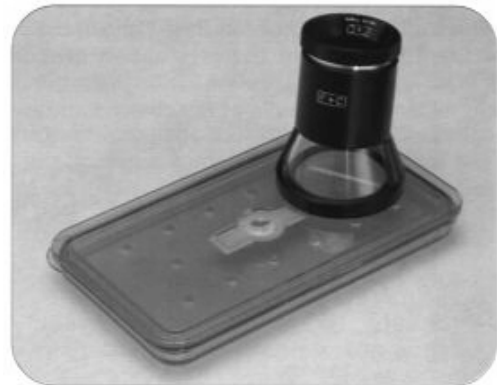
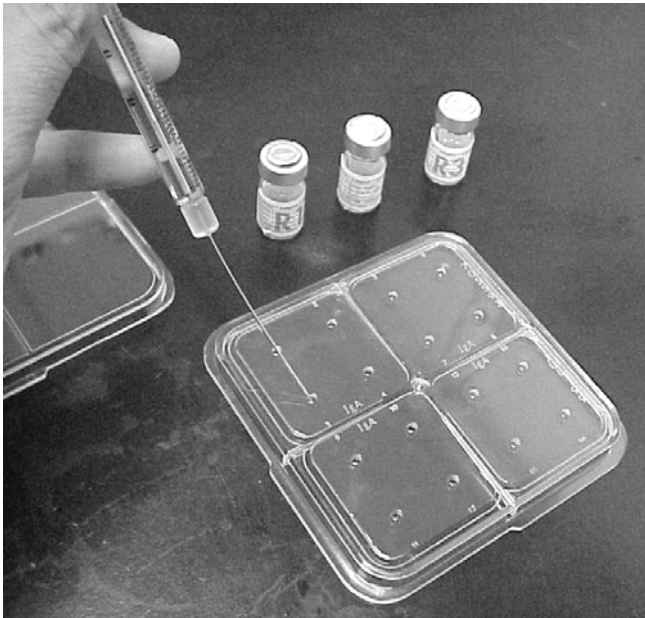


Figura 5.3: Aplicación de las muestras y estándares de concentración conocida en una placa de inmunodifusión radial para la determinación de IgA sérica, empleando una microjeringa Hamilton (izquierda). Un visor de precisión (derecha) para medir los diámetros de los precipitados en la inmunodifusión radial. Este tipo de lente posee impresa una escala con divisiones de 0,1 mm.

² las muestras que presentan una concentración muy elevada de inmunoglobulinas no deben extrapolarse, sino que debe repetirse su análisis con una nueva dilución.

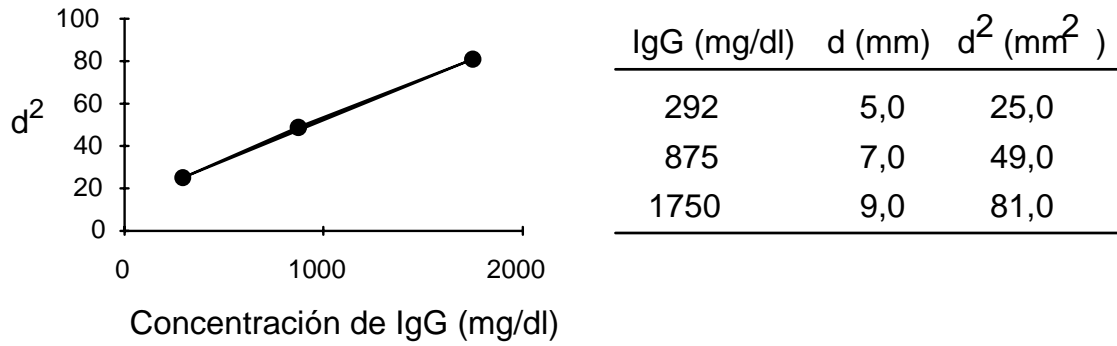


Figura 5.4: Ejemplo de una curva de referencia (difusión completa) para la cuantificación de IgG mediante inmunodifusión radial. Las lecturas de los 3 estándares se indican en el cuadro. Note que la extrapolación de la recta no se origina de cero, ya que el valor mínimo de Y es el cuadrado del diámetro del hoyo sin precipitado.

Método de inmunonefelometría para cuantificación de IgG sérica.

A modo de ejemplo, se describe a continuación el procedimiento utilizado para los reactivos de la casa comercial Orion Diagnostics, empleando el instrumento de punto final Turbox[®] (Fig.5.3) En este ensayo, el fabricante prepara una curva de calibración con estándares de concentración conocida de IgG, y graba los parámetros en una tarjeta magnética que acompaña cada lote de reactivos. El usuario introduce dichos parámetros en el instrumento deslizando la banda magnética de la tarjeta a través de una ranura. Una vez cargados en el instrumento, los parámetros de la curva de calibración permiten que las lecturas de las distintas muestras sean interpoladas directamente y procesadas para obtener los valores de concentración del analito, en este caso la IgG sérica, en g/L. Para un mayor control de la técnica, se corre junto con las muestras una alícuota de un estándar, o calibrador, cuyo resultado final debe quedar dentro de un ámbito pre-establecido, para que los resultados tengan validez. Las desviaciones en este resultado indicarían un problema, tal como deterioro de los reactivos, error instrumental, o error personal.



Figura 5.3: El Turbox[®] (Orion Diagnostics) es un nefelómetro simple que se basa en lecturas de punto final para la determinación de inmunoglobulinas séricas (IgG, IgA, IgM) y algunas otras determinaciones de interés en el laboratorio clínico.

1. Diluir el suero anti-IgG humana (preparado en cerdo), agregando 500 µl del suero a los 30 ml de la botella de buffer. Esta solución diluída de anti-IgG es estable hasta por 3 meses en refrigeración.

2. Diluir la solución del calibrador 1:51 con solución salina (NaCl 0,9%).

3. Diluir las muestras de suero o plasma (anticoagulado con EDTA o heparina) 1:51 con solución salina. Si la muestra presenta turbidez evidente, centrifugarla a 2000xg por 15 min.

4. Preparar una serie de cubetas nuevas, provistas con el juego de reactivos. No debe tocarse la parte inferior de las cubetas, para evitar posibles interferencias al paso de la luz. Pipetear los siguientes volúmenes y homogenizarlos sin generar espuma o burbujas:

calibrador: 20 µl calibrador diluído + 500 µl anti-IgG diluído
(se recomienda preparar este calibrador en duplicado)

blanco del calibrador: 20 µl calibrador diluído + 500 µl buffer de blancos

muestra: 20 µl muestra + 500 µl anti-IgG diluído

blanco de muestra: 20 µl muestra + 500 µl buffer de blancos

5. Incubar 30 ± 5 min a temperatura ambiente (18-25°C)

6. Mezclar suavemente cada cubeta antes de la lectura. Leer el calibrador (duplicado) y cada muestra y sus respectivos blancos, siguiendo las instrucciones que aparecen en la pantalla del instrumento. El orden programado en la tarjeta magnética es el siguiente:

Calibrator blank

Calibrator test 1

Calibrator test 2

Sample 1 blank

Sample 1 test

Sample 2 blank

Sample 2 test

etc.

7. Al final de la última lectura, presione la tecla END. Si el resultado de alguna muestra fuera muy elevado (>30 g/L), debe repetirse la determinación empleando una dilución 1:2 de la muestra con solución salina. Si una muestra posee turbidez excesiva, la lectura del instrumento indicará "*Blank too high*". En tal caso se puede intentar clarificar la muestra por centrifugación, u obtener una nueva muestra.

Cuadro 5.1: Concentración de inmunoglobulinas séricas en adultos: algunos valores de referencia descritos en la literatura.

País	Muestra n, sexo, edad	IgG		IgA		IgM		Referencia Expr*
		mg/dl	UI/ml	mg/dl	UI/ml	mg/dl	UI/ml	
Alemania	45,M,20-29		86-178		48-244		59-298	A Rowe (1972)
Argelia	100,M,20-29		97-213		84-317		84-429	A Rowe (1972)
Australia	94,M,20-29		94-219		56-286		86-425	A Rowe (1972)
Bulgaria	60,MF,21-50		64-180		48-240		60-295	A Sinkov (1973)
Chile	100,M,20-29		83-292		73-365		109-228	A Rowe (1972)
Costa Rica	45,MF,18-25	1495±387		187±55		142±57		B Lomonte (1985)
Costa Rica [¶]	34,MF,	1774±385		284±92		171±52		B Lomonte (1986)
EUA	20,M,-	1240±220		280±70		120±35		B Fahey (1965)
EUA	30,MF,-	1158±305		200±61		99±27		B Stiehm (1966)
		569-1919		61-330		47-147		A
EUA	55,M,14-27		115±1,3		65±1,7		63±1,6	C Buckley (1970)
	63,F,14-27		107±1,3		34±1,8		85±1,7	C
EUA	22,M,-		82-228		50-254		48-310	A Cejka (1974)
EUA	50,M,20-40	900-1013		149-183		113-145		D Maddison (1976)
EUA	300,MF,18-60	719-1728		88-397		66-270		E Hyland Labs. (1982)
Guatemala	24,F,-	1470		350		220		F Lechtig (1972)
Guatemala	25,MF,15-29	1195-1930		196-330		112-310		A Cáceres (1974)
Holanda	15,M,-	664-1401		103-404		55-141		A Stoop (1969)
Holanda	100,M,20-29		65-206		40-223		48-334	A Rowe (1972)
Inglaterra	51,M,20-29		73-207		46-289		47-372	A Rowe (1972)
Japón	98,M,20-29		102-210		70-237		68-308	A Rowe (1972)
México	100,M,20-29		82-196		29-327		12-333	A Rowe (1972)
Nigeria	100,M,20-29		146-567		31-207		34-1413	A Rowe (1972)
Suecia	94,M,20-29		90-177		57-282		52-345	A Rowe (1972)
Suiza	100,M,20-29		87-208		56-334		81-380	A Rowe (1972)
Surinam	6,M,-	2105±301		379±64		248±104		B Zegers (1973)
		1748-2545		311-473		176-457		A
	6,F,-	1990±441		290±59		145±44		B
		1355-2457		198-347		104-230		A

* expresión de resultados en (A) ámbito, (B) promedio ± desviación estándar, (C) promedio ± error estándar, (D) promedio ± 2 error estándar, (E) intervalo del 5-95%, y (F) promedio.

[¶] indígenas Cabécar y Guaymí de Costa Rica.

Cuadro 5.2: Niveles séricos de IgG, IgA e IgM en una muestra de adultos jóvenes sanos costarricenses (n=49)*.

Ig	x ± S	Ambito	Unidades
IgG	1.495 ± 387	740-2480	mg/dl
	185 ± 48	92-308	UI/ml
IgA	187 ± 55	60-290	mg/dl
	132 ± 39	42-204	UI/ml
IgM	142 ± 57	42-308	mg/dl
	168 ± 67	50-363	UI/ml

* Lomonte *et al.* (1985).**Cuadro 5.3:** Variación de las concentraciones de inmunoglobulinas séricas en individuos normales según la edad (EUA)*.

Edad	n	IgG		IgA		IgM		Igs totales
		mg/dl	% ad [¶]	mg/dl	% ad	mg/dl	% ad	% ad
neonato	22	1031±200	89±17	2±3	1±2	11±5	11±5	67±13
1-3 meses	29	430±119	37±10	21±13	11±7	30±11	30±11	31±9
4-6 meses	33	427±186	37±16	28±18	14±9	43±17	43±17	32±13
7-12 meses	56	661±219	58±19	37±18	19±9	54±23	55±23	48±15
13-24 meses	59	762±209	66±18	50±24	25±12	58±23	59±23	56±16
25-36 meses	33	892±183	77±16	71±37	36±19	61±19	62±19	65±14
3-5 años	28	929±228	80±20	93±27	47±14	56±18	57±18	69±17
6-8 años	18	923±256	80±22	124±45	62±23	65±25	66±25	71±20
9-11 años	9	1124±235	97±20	131±60	66±30	79±33	80±33	85±17
12-16 años	9	946±124	82±11	148±63	74±32	59±20	60±20	74±12
adultos	30	1158±305	100±26	200±61	100±31	99±27	100±27	100±24

* Stiehm y Fudenberg (1966). Los valores representan el promedio ± desviación estándar.

[¶] porcentaje del nivel de adultos.

Referencias

- Buckley, C.F. y Dorsey, F.C. (1970) The effect of aging on human serum immunoglobulin concentrations. *J. Immunol.* **105**, 964-972.
- Cáceres, A. y Mata, L.J. (1974) Niveles de inmunoglobulinas en una población del altiplano guatemalteco. *Bol. Of. Sanit. Panam.* **76**, 115-124.
- Cejka, J., Mood, D.W. y Kim, C.S. (1974) Immunoglobulin concentrations in sera of normal children: quantitation against an international reference preparation. *Clin. Chem.* **20**, 656-659.
- Fahey, J.L. y Mc Kelvey, E.M. (1965) Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.* **94**, 84.
- Hosty, T.A., Hollenbeck, M. y Shane, S. (1973) Intercomparison of results obtained with five commercial diffusion plates supplied for quantitation of immunoglobulins. *Clin. Chem.* **19**, 524.
- Hyland Diagnostics (1982) Immunoplate III radial immunodiffusion test kits (instructivo).
- Lechtig, A., Ovalle, J. y Mata, L.J. (1972) Niveles de IgG, IgA, IgM y C3 en niños indígenas de Guatemala durante los primeros seis meses de edad. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* **14**, 65.
- Lomonte, B., Bonilla, C. y Castro, E. (1985) Niveles de inmunoglobulinas séricas (IgG, IgA e IgM) en adultos jóvenes sanos, por el método de inmunodifusión radial. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* **6**, 183.
- Lomonte, B. y Mata, E. (1985) Producción de placas de inmunodifusión radial para la cuantificación de IgG humana. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* **6**, 227-231.
- Lomonte, B., Bonilla, C., Gené, J.A., Mata, E. y Alvarado, J. (1986) Serum immunoglobulin levels in Cabécar and Guaymí indians in Southeastern Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **35**, 339.
- Mancini, G., Carbonara, A.O. y Heremans, J.F. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**, 235.
- Maddison, S.E. y Reimer, C.B. (1976) Normative values of serum immunoglobulins by single radial immunodiffusion. *Clin. Chem.* **22**, 594-599.
- Organización Mundial de la Salud (1983) Uso y abuso de ocho procedimientos de diagnóstico muy difundidos en inmunología clínica. *Bol. Of. Sanit. Panam.* **94**, 83.
- Reimer, C.B. y Maddison, S.E. (1976) Standardization of human immunoglobulins quantitation: a review of current status and problems. *Clin. Chem.* **22**, 577.
- Rowe, D.S. (1972) Concentration of serum immunoglobulins in healthy young adult males estimated against the international reference preparation. *Lancet* **ii**, 1232-1233.
- Rowe, D.S., Grab, B. y Anderson, S.G. (1972) An international reference preparation for human serum immunoglobulins G, A and M: content of immunoglobulins by weight. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **46**, 67.
- Sinkov, D., Toler, V. y Stereva, T. (1973) Concentrations of IgG, IgA and IgM in terms of international units in the sera of healthy individuals. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **49**, 217-218.
- Stiehm, E.R. y Fudenberg, H.H. (1966) Serum levels of immune globulins in health and disease: a survey. *Pediatrics* **37**, 715.
- Stoop, J.W., Zegers, B.J.M., Sander, P.C. y Ballieux, R.E. (1969) Serum immunoglobulin levels in healthy children and adults. *Clin. Exp. Immunol.* **4**, 101-112.

Capítulo 6

Determinación de la actividad hemolítica del complemento (CH₅₀)

Introducción

El sistema de complemento (C') está constituido por un conjunto de proteínas plasmáticas capaces de ser activadas ante ciertos estímulos, en forma de cascada, como parte de los mecanismos inespecíficos de inmunidad en los vertebrados. Sus acciones son variadas, incluyendo actividades tales como la promoción de la inflamación y de la fagocitosis, así como el ataque lítico hacia membranas y la facilitación de la remoción de complejos inmunes.

La activación del sistema de C' puede ocurrir por tres vías. La **vía alterna**, filogenéticamente más antigua, es activada principalmente por polímeros (ej. polisacáridos) y superficies de origen microbiano. La **vía clásica** es iniciada por el reconocimiento de complejos antígeno-anticuerpo (IgM, IgG₁ e IgG₃, principalmente). Por último, la **vía de las lectinas** es iniciada por lectinas que reconocen residuos de manosa en las superficies microbianas, tales como la MBL (*mannose-binding lectin*). Todas estas vías de activación conducen a una fase efectora común, que culmina con el ataque lítico a membranas.

Para la comprensión de los métodos de cuantificación del sistema de C' o de sus componentes individuales, así como para interpretar adecuadamente los resultados de laboratorio, es necesario tener claros los aspectos básicos de la cascada general, sus componentes e interacciones, y su regulación. Para tal fin se sugiere la lectura de un texto o revisión reciente sobre el tema.

Indicaciones clínicas de la determinación de C'

La evaluación del C' en el laboratorio clínico tiene importancia en diversas situaciones. En el estudio por inmunodeficiencias, se buscan posibles defectos en este sistema, los cuales por lo general consisten en la ausencia o la afuncionalidad de alguno de los factores de la cascada, por causas genéticas. En las enfermedades autoinmunes, el C' juega un papel importante en la lesión a los tejidos y su determinación puede orientar el diagnóstico, así como ayudar a evaluar el curso y la actividad de la enfermedad. Un ejemplo de lo anterior es el lupus eritematoso sistémico, que tiende a cursar con consumo de los factores del sistema de C'. Finalmente, en diversas formas de vasculitis mediadas por complejos inmunes (o hipersensibilidad tipo III), glomerulonefritis, hepatopatías crónicas y en el rechazo de transplantes, también puede ser de utilidad evaluar el sistema del C' (Cuadro 6.1).

Alternativas metodológicas

La evaluación del sistema de C' plantea algunas dificultades, que se originan en la complejidad propia del sistema. La labilidad de sus componentes, su degradación e inhibición por factores reguladores, y la amplificación enzimática que ocurre en varios pasos de la cascada, son algunos ejemplos de los factores que limitan la posibilidad de evaluar el C' en una forma simple, cuantitativa y reproducible.

Las técnicas para evaluar C' pueden dividirse en dos grupos generales: las pruebas **funcionales** y las pruebas **inmunoquímicas**. Ambos tipos de técnicas poseen sus virtudes y sus limitaciones, por lo que probablemente su combinación representa la mejor opción para una evaluación adecuada del C'.

La cuantificación de los componentes mayoritarios del sistema (C3, C4, y Clq), puede realizarse fácilmente mediante técnicas como la **inmunodifusión radial** o la **inmunonefelometría** (Capítulo 5). Una limitación de estas técnicas es que detectan tanto los componentes funcionales normales, como los afuncionales (por ejemplo inactivados, mutados, etc.). Además, algunos antisueros utilizados en placas de inmunodifusión radial pueden detectar fragmentos de degradación de los componentes nativos, que pueden llevar a valores falsos (tanto por ser inactivos como por difundir más rápido). Estas limitaciones, que son inherentes a los métodos inmunoquímicos en general, pueden obviarse a través de la cuantificación funcional de los componentes del sistema.

Se han desarrollado métodos para la cuantificación funcional de prácticamente cada componente individual del C'. Sin embargo, estos métodos son complejos, por lo que se restringen usualmente a los laboratorios especializados en este campo. La única prueba de carácter funcional sencilla, que se adapta bien a las condiciones de trabajo rutinario, es la cuantificación de la **actividad hemolítica del complemento sérico**, denominada **CH₅₀**. Esta técnica proporciona una visión global de la funcionalidad del sistema. Sin embargo, también posee limitaciones, tales como su baja sensibilidad para detectar disminuciones en el C' sérico. Se ha descrito que disminuciones hasta de un 50% en algunos componentes, no se detectan en el resultado final de esta prueba. Por otro lado, la CH₅₀ evalúa todo el sistema y no provee información acerca de cuál o cuáles factores pueden estar disminuidos. Finalmente, su estandarización y control son más complejos que en el caso de las técnicas inmunoquímicas.

Fundamento del método de CH₅₀

Al mezclar suero fresco con una suspensión de eritrocitos "sensibilizados" (recubiertos) con anticuerpos, el C' se activará por la vía clásica y causará hemólisis. La hemoglobina liberada es un indicador cuantitativo del grado de lisis de los eritrocitos. Si se grafica la cantidad de suero agregado al sistema indicador, contra el porcentaje de hemólisis resultante, se obtiene una curva sigmoide (Fig.6.1). Este tipo de curvas poseen su mejor exactitud en la región central, es decir, alrededor del 50% de hemólisis. De tal modo que se determina cuál es el **volumen de suero que lisa el 50% de los eritrocitos**, lo que se define arbitrariamente como una **unidad hemolítica 50%**. Por ejemplo, si con 10 µl de suero se lisó el 50% de los eritrocitos, entonces el número de unidades CH₅₀ por mililitro de suero será de 100 U/ml (= 1000 µl ÷ 10 µl).

El fenómeno de lisis eritrocítica por el C' se puede describir mediante la ecuación desarrollada por von Krogh en 1916:

$$x = K \left[\frac{y}{(1-y)} \right]^{1/n}$$

x = ml de suero agregado
 y = grado de lisis
 K = constante, unidad 50%
 n = $0,2 \pm 10\%$

La conversión logarítmica de esta ecuación es mucho más conveniente para graficar y analizar los resultados, ya que transforma la curva sigmoide en una recta (Fig.6.1). La utilización de una recta permite trabajar con menos puntos, proporciona un menor error de interpolación y permite detectar fácilmente posibles desviaciones en los resultados debidas a causas instrumentales, personales o de deterioro de los reactivos:

$$\log x = \log K + \frac{1}{n} \log \left(\frac{y}{1-y} \right)$$

El carácter funcional de la prueba de CH_{50} , sumado a la naturaleza enzimática de una parte del sistema, hace que los resultados sean altamente dependientes de las condiciones experimentales, entre ellas el pH, la temperatura, el tiempo, la ionicidad, la concentración de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} y la fragilidad osmótica de los eritrocitos utilizados. De ahí que esta técnica requiere de una minuciosa realización y un adecuado control de calidad (Fig.6.3), para detectar cualquier deterioro en los reactivos u otros problemas.

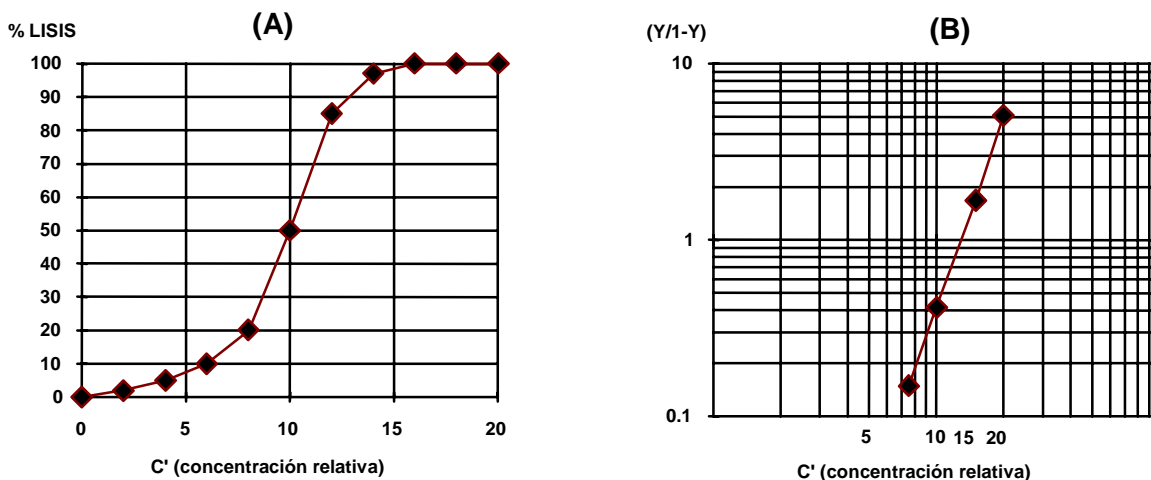


Figura 6.1: La hemólisis causada por cantidades crecientes de complemento tiene un comportamiento sigmoide (gráfico A). La transformación logarítmica según la ecuación de Von Krogh (ver texto) resulta en una línea recta (gráfico B), más adecuada para la interpolación del valor de hemólisis 50%. Este punto corresponde a un valor de (Y/1-Y) de 1,0.

Procedimiento (CH₅₀)

I.Preparación de los eritrocitos de carnero (E):

1. Recoger estérilmente sangre de carnero en anticoagulante de Alsever y refrigerarla (máximo 4 semanas). El mismo día de la prueba, lavar 3 veces los eritrocitos (5 ml) con PBS y resuspenderlos finalmente en 15 ml de amortiguador de barbital para CH₅₀, en una probeta de 25 ml.

2. Homogenizar la suspensión de E y transferir 0,5 ml de la misma a un tubo con 12,5 ml de agua destilada, para lisar los eritrocitos. Leer la absorbancia a 540 nm contra agua. Una suspensión de eritrocitos al 6% debe leer (en cubeta de 1 cm) entre 0,48 y 0,50. Ajustar la suspensión de acuerdo con la lectura obtenida. Corroborar la concentración final haciendo una segunda lisis. Ejemplo:

Lectura (A₅₄₀) de la primera lisis = 0,62

Cálculo: 0,50 corresponde a ----- 6%
 0,62 corresponde a ----- x ⇒ x = 7,44%

entonces: (14,5 ml) (7,44%) = (x ml) (6%)
 ⇒ x = 17,98 = 18 ml

⇒ llevar el remanente de la probeta original (14,5 ml) hasta 18 ml con amortiguador de barbital. Corroborar que la concentración haya quedado en 6% mediante una segunda lisis en agua, la cual deberá leer ~0,50 de absorbancia a 540 nm.

II.Sensibilización de los eritrocitos con anticuerpos (EA):

El antisuero contra eritrocitos de carnero (preparado en conejo), también llamado "hemolisina", debe ser utilizado en una concentración sub-aglutinante. La dilución óptima es la máxima dilución que active completamente el C'. Esto varía entre distintos lotes de antisuero y debe determinarse probando varias diluciones frente a una cantidad fija de C'. Una guía aproximada es utilizar 1-2 pasos de dilución posteriores al título aglutinante.

3. Mezclar en un erlenmeyer de 100 ml: 15 ml de barbital + 15 ml de E 6% + 50 µl de hemolisina (en este ejemplo particular, corresponde a 1:600). Homogenizar cuidadosamente, sin dañar mecánicamente a los eritrocitos.

4. Incubar 30 min a 37°C. Esta suspensión de EA se debe usar solo durante el mismo día.

III. Montaje de las diluciones:

La muestra de C' puede ser suero o plasma-EDTA. Debe mantenerse a 4°C después de separada y procesarse rápidamente. Períodos hasta de 6 hr a 4°C no alteran el resultado visiblemente. Si la muestra no puede ser analizada el mismo día, se puede congelar a -70°C, aunque esto resulta en una ligera disminución de la actividad.

5. Diluir cada muestra 1:20 con barbital (0,2 ml + 3,8 ml). Incluir en cada corrida una alícuota de suero control. Este consiste de una mezcla de sueros, alicuotados y liofilizados, o mantenidos a -70°C.

6. Preparar una serie de siete tubos por cada muestra, como se indica:

TUBO	1	2	3	4	5	6	7
Amortiguador (ml)	1,1	1,05	1,0	0,9	0,8	1,2	-
Agua destilada (ml)	-	-	-	-	-	-	1,2
Suero 1:20 (ml)	0,1	0,15	0,2	0,3	0,4	-	-

7. Agregar a todos los tubos 0,3 ml de los eritrocitos sensibilizados con los anticuerpos (EA).

8. Incubar por 60 min a 37°C, agitando cada 15 min para resuspender las células.

9. Sacar los tubos y sumergirlos de inmediato en agua con hielo. Agregar 3 ml de barbital frío (4°C) a cada tubo y centrifugar 5 min a 800 xg.

10. Transferir cuidadosamente cada sobrenadante a una cubeta y leer su absorbancia (A) a 540 nm, contra el amortiguador de barbital como blanco.

IV. Procesamiento de las lecturas:

11. Restar a las lecturas de los tubos 1-5, la A del tubo 6, para obtener la A corregida (A').

12. Calcular el grado de lisis (Y) dividiendo las A' de los tubos 1-5, entre la A del tubo 7.

13. Calcular la expresión $(Y/1-Y)$ para los tubos 1-5.

14. En papel logarítmico de 2x2 ciclos graficar $(Y/1-Y)$ en el eje vertical, contra los μ l de suero **absolutos** en el eje horizontal (estos corresponden a 5, 7,5, 10, 15 y 20 μ l). Trazar la recta solamente con los puntos cuyo valor de $(Y/1-Y)$ esté entre 0,1 y 10.

15. Determinar (gráficamente o mediante regresión) los μ l de suero correspondientes al valor $(Y/1-Y) = 1$ (es decir, el 50% de hemólisis). Por último, dividir 1000 entre dicho valor. Este será el número de unidades CH_{50} por ml de suero (U/ml).

Valores de referencia

Como se indicó, la cuantificación funcional del C' es una técnica que pretende evaluar un sistema biológico complejo, y es susceptible de variar por numerosos factores, que deben estandarizarse al máximo para obtener resultados confiables y reproducibles. Es recomendable que cada laboratorio establezca un ámbito de valores de referencia con sus propias condiciones estándar, utilizando muestras de individuos aparentemente sanos. En un estudio de donadores de sangre (n=53), utilizando la presente técnica de CH₅₀, se obtuvo los siguientes resultados (Mata y Lomonte, 1986):

$$\begin{aligned} \text{ámbito} &= 71-128 \text{ U/ml} \\ \text{promedio} \pm \text{DE} &= 93 \pm 14 \text{ U/ml} \end{aligned}$$

Los cálculos y la graficación de los resultados de esta prueba pueden facilitarse con la ayuda de un programa en BASIC¹ (Lomonte *et al.*, 1986). Igualmente, puede utilizarse una hoja de cálculo para simplificar el procesamiento numérico de las lecturas de los tubos.

Ejemplo del cálculo de resultados

Con el método manual, se corrigen las absorbancias (A) de cada tubo según se indica en el procedimiento, para obtener (A'), (Y), y (Y/1-Y), graficando finalmente en papel logarítmico. Con el método automatizado, el programa es alimentado con las lecturas de cada tubo (en transmitancia o en absorbancia). El programa descarta los puntos cuyo valor de Y/1-Y sean menores que 0,1 o mayores que 10. Los valores de los tubos 6 y 7 (0% y 100% de lisis) son expresados como ceros en las columnas "Y", "Y/1-Y" y "log Y/1-Y" para indicar que no se computan en el gráfico. Las Figs.6.2 y 6.3 muestran un ejemplo de las pantallas de resultados.

Tubo	A'	Y	Y/1-Y	log Y/1-Y	
1	0.0117	0.0267	0.0275	-1.5612	
2	0.0567	0.1295	0.1488	-.8273	
3	0.1280	0.2924	0.4133	-.3837	
4	0.2742	0.6265	1.6771	0.2245	
5	0.3657	0.8355	5.0792	0.7058	
6	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
7	0.4377	0.0000	0.0000	0.0000	Valor CH ₅₀ (en U/ml) = 78.0
Presione c para continuar					
?					

Figura 6.2: Ejemplo del uso del programa en BASIC para el cálculo de las unidades CH₅₀. La pantalla muestra los datos procesados y el valor CH₅₀ obtenido, en U/ml.

¹ el programa es de uso libre y puede solicitarse al autor

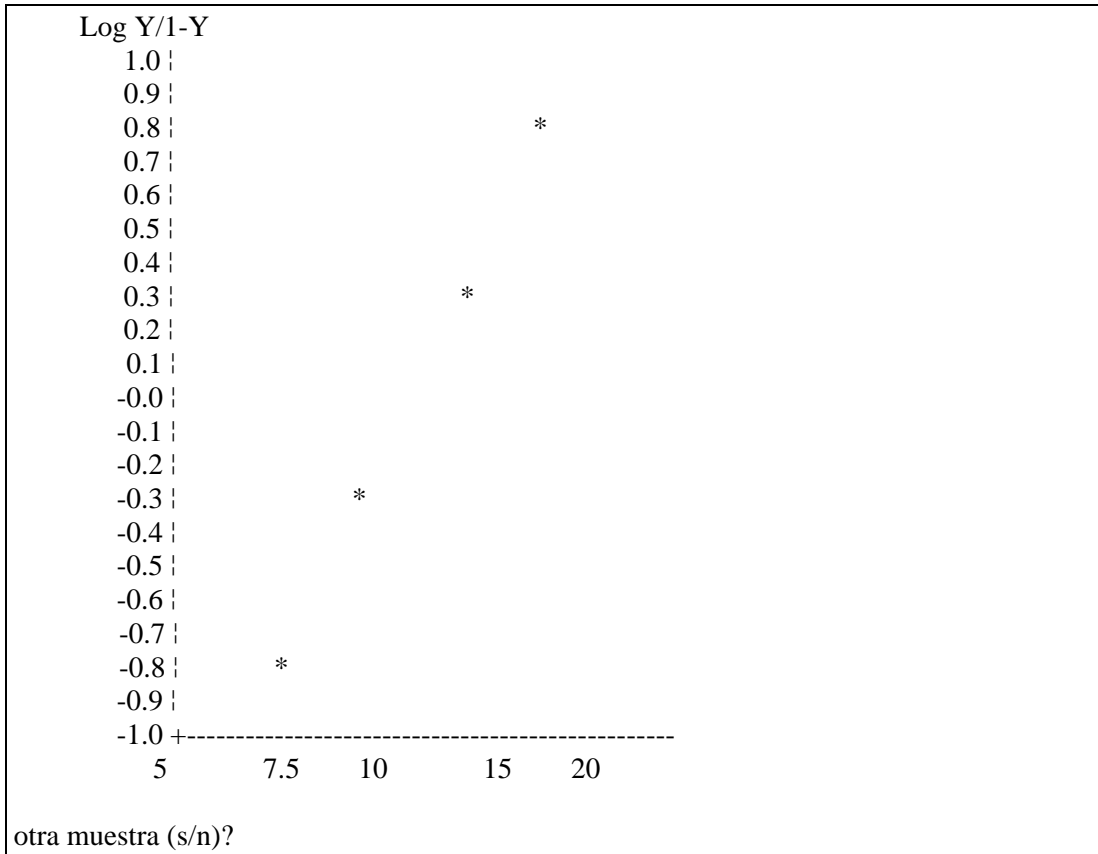
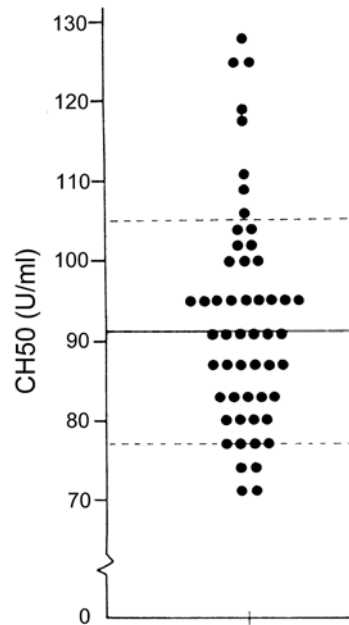


Figura 6.3: Ejemplo de la graficación automatizada de la curva de hemólisis (CH_{50}) utilizando el programa en BASIC. Al pulsar "c" en la pantalla de resultados (Fig.6.2), aparece la ubicación de los puntos en el gráfico, útil para detectar posibles desviaciones en la técnica.

Figura 6.4: Distribución de los valores séricos de CH_{50} en 53 donadores de sangre (Mata y Lomonte, 1986). La línea central representa el promedio y las líneas punteadas representan la desviación estándar.



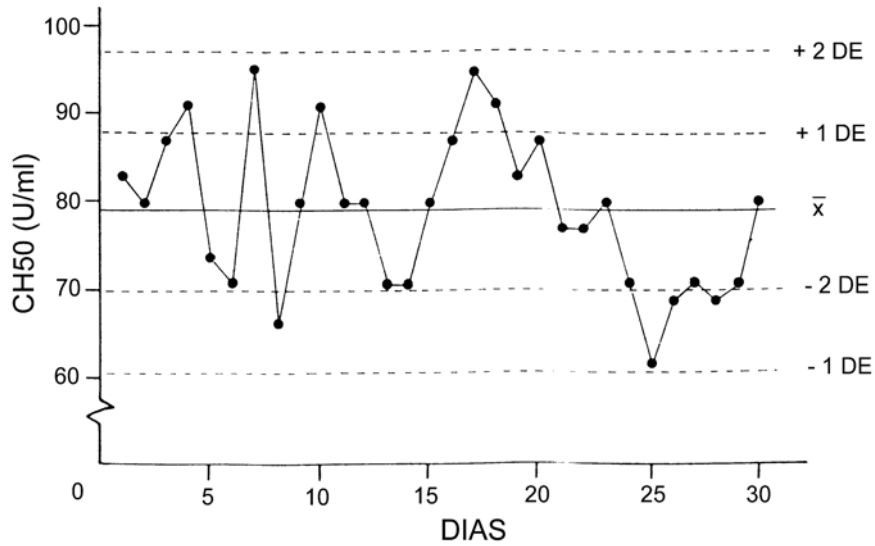


Figura 6.5: Ejemplo de un gráfico de control de calidad en la determinación CH_{50} . Cada punto representa una alícuota del suero control liofilizado, corrido en distintos días durante un mes. Nótese la fluctuación dentro del ámbito de ± 2 desviaciones estándar.

Estimación de la actividad del complemento mediante hemólisis en gel

Una manera simple para estimar la actividad lítica global del sistema de complemento es una modificación de la técnica de CH_{50} , que utiliza la lisis de eritrocitos que han sido incorporados en un gel de agarosa. Al agregar un suero que posee C' activo a un hoyo del gel, que contiene eritrocitos sensibilizados con anticuerpos, el C' difunde radialmente y genera un halo circular de lisis, que puede ser fácilmente medido (Fig.6.6).

El área (y por tanto, el diámetro) del halo de lisis, guarda relación con la concentración y funcionalidad del C' de la muestra. Este método ha sido denominado por algunos fabricantes como **CH₁₀₀**, para indicar que evalúa el límite o borde donde la muestra pasa de 100% a 0% de lisis. Otra denominación es la de **hemólisis en gel**. Existen placas de agarosa/EA disponibles comercialmente para esta determinación. Alternativamente, su preparación en el laboratorio es sencilla, como se describe a continuación.

Procedimiento (hemólisis en gel)

1. Las etapas de preparación, ajuste, y sensibilización de los eritrocitos de carnero con los anticuerpos de conejo (EA) se realizan igual que en la técnica en tubo para CH_{50} .

2. En un baño a $\sim 45^{\circ}\text{C}$, mezclar los EA con agarosa fundida (al 1% en amortiguador de barbital), para que queden al 2% (v/v) de concentración final. Ej. 250 μl de EA en 12,5 ml de agarosa. No debe sobrepasarse la temperatura indicada, para no dañar los eritrocitos. Homogenizar la suspensión cuidadosamente y verter de inmediato sobre una placa de

plástico o de vidrio (en este caso con capa base) nivelada. Dejar gelificar.

3. Abrir hoyos de 3 mm de diámetro en el gel, y cargar 10 μ l de muestra en cada uno. Tapar la placa (si es un sistema de placa de plástico con tapa sellada), o colocar en cámara húmeda (si es una placa abierta). Incubar por 24 hr a 37°C.

4. Leer el diámetro de los halos de lisis, los cuales aparecen como zonas translúcidas en el gel opaco (Fig.6.6). Incluir una alícuota de suero control en cada lote de muestras. Los valores normales para los diámetros deben ser establecidos en cada laboratorio, según las variables utilizadas, como forma de la placa, volumen y grosor del gel, diámetro de los hoyos, etc.

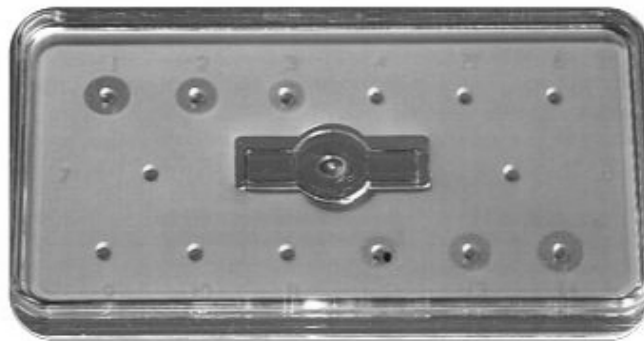


Figura 6.6: Determinación de la actividad lítica del complemento sérico mediante hemólisis en gel. La agarosa contiene eritrocitos recubiertos con anticuerpos, los cuales son lisados por la acción del C' de las muestras, colocadas en los distintos hoyos. El diámetro de la lisis es proporcional al nivel de C' en la muestra.

Cuadro 6.1: Enfermedades asociadas con alteraciones del complemento *

Disminución		Aumento
Lupus eritematoso sistémico	Edema angioneurótico hereditario	Ictericia obstructiva
Glomerulonefritis aguda	Deficiencia hereditaria de C2	Tiroiditis
Glomerulonefritis membranoproliferativa	Hemoglobinuria paroxística nocturna	Artritis reumatoide
Enfermedad del suero	Linfoma	Fiebre reumática aguda
Enfermedades por complejos inmunes	Rechazo de aloinjertos	Periarteritis nodosa
Cirrosis hepática avanzada	Crioglobulinemia mixta (IgG-IgM)	Dermatomiositis
Hepatitis infecciosa con artritis	Miastenia gravis	Infarto agudo del miocardio
Inmunodeficiencia combinada grave		Colitis ulcerativa
Endocarditis infecciosa con glomerulonefritis		Fiebre tifoidea
Derivaciones ventriculoarteriales infectadas		Diabetes
Coagulación intravascular diseminada		Gota
		Síndrome de Reiter

* Stites *et al.* (1998).

Referencias

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pober, J.S. (2002) *Inmunología Celular y Molecular*, 577 pp. Madrid: McGraw Hill Interamericana.
- Brown, D. y Hobart, M.J. (1977). Complement and complement fixation. En: *Techniques in Clinical Immunology*, p.65 (Thompson, R.A., Ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Hudson, L. y Hay, F.C. (1989) *Practical Immunology*, 507 pp. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Kabat, E.A. y Mayer, M.M. (1961). *Experimental Immunochemistry*, p.133. Springfield: Charles Thomas Publisher.
- Lint, T.F. (1982) Laboratory detection of complement activation and complement deficiencies. *Am. J. Med. Technol.* **48**, 749.
- Lomonte, B., Robles, A., Mata, E. y Cerdas, L. (1986). Cálculo de la actividad hemolítica del complemento sérico (CH_{50}) mediante un programa en "BASIC": comparación con el método gráfico manual. *Rev. Méd. Hosp. Nac. Niños* **21**, 179.
- Mata, E. (1985) Estandarización de un método para la determinación cuantitativa de la actividad lítica del complemento sérico humano. Trabajo Final de Graduación, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- Mata, E. y Lomonte, B. (1986). Determinación cuantitativa de la actividad lítica del complemento sérico (CH_{50}) en adultos costarricenses. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* **7**, 41.
- Montero, J. y Trejos, M. (1989) Efecto del suero antiofídico polivalente sobre la actividad hemolítica del complemento sérico. Trabajo Final de Graduación, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- Montero, J., Trejos, M. y Lomonte, B. (1989) Efecto del suero antiofídico sobre la actividad hemolítica del complemento humano (*in vitro*) y de conejo (*in vitro* e *in vivo*). *Rev. Cost. Cienc. Méd.* **10**, 1-10.
- Roitt, I.M., Brostoff, J. y Male, D. (2001) *Immunology*, 480 pp. Edinburgh: Mosby.
- Stites, D.P., Channing, R.P., Folds, J.D. y Schmitz, J. (1998) Métodos de laboratorio clínico para detección de antígenos y anticuerpos. En: *Inmunología Básica y Clínica*, (Stites, D.P., Terr, A.I. y Parslow, T.G., Eds.), p.243. México: Editorial Manual Moderno.

Capítulo 7

Prueba de reducción del NBT en fagocitos

Introducción

Los fagocitos (macrófagos y neutrófilos) cumplen un papel primordial como elementos celulares de la inmunidad innata en la defensa del organismo. La evaluación funcional de estas células incluye pruebas que se enfocan en distintos aspectos de su actividad: **(a)** la capacidad fagocítica, **(b)** la capacidad microbicida, **(c)** la respuesta quimiotáctica, y **(d)** la activación del metabolismo celular.

Existen diversas técnicas para la evaluación de la **actividad fagocítica**. Su principio general consiste en incubar una fracción rica en leucocitos (obtenida de sangre periférica) con una suspensión de partículas inertes (ej. microesferas de látex) o de microorganismos (ej. bacterias como *Staphylococcus* o levaduras como *Candida* o *Saccharomyces*), para permitir la fagocitosis, y luego cuantificarla mediante la observación microscópica de las células teñidas, en portaobjetos. Sin embargo, un problema general de estos métodos es la imposibilidad de diferenciar entre las partículas fagocitadas y aquellas que solo se han adherido superficialmente a las células, dado que la lectura microscópica simple es inherentemente bidimensional.

Por otro lado, las técnicas que evalúan la **actividad microbicida** de los fagocitos proveen resultados más significativos, pues van más allá de la simple ingestión de los microorganismos: determinan si los fagocitos son capaces de aniquilarlos. Estos métodos son más laboriosos que los anteriormente descritos. En estos se incuban los fagocitos con una cantidad determinada de un microorganismo (bacterias, levaduras), y después de un tiempo de incubación, se realiza un recuento de la viabilidad residual del agente microbiano. La disminución del número original de unidades formadoras de colonias (UFC) nos indica la destrucción del agente por parte de los fagocitos.

Un método simple y útil para evaluar la **activación del metabolismo celular** (también denominado "estallido respiratorio" post-activación) de los fagocitos sanguíneos, es la prueba de reducción del NBT. Con ella se puede evaluar pacientes en estudio por inmunodeficiencia, principalmente niños, como un primer análisis de su sistema fagocítico. El NBT (nitrobluetetrazolium) es un compuesto soluble amarillo que, al ser endocitado y reducido por la acción de enzimas intracelulares del fagocito, precipita en forma de cristales color púrpura oscuro (cristales de formazán). En ciertas deficiencias innatas de los fagocitos como la **enfermedad granulomatosa crónica**, existen defectos genéticos que afectan al sistema de oxidasas del NADPH generadoras de anión superóxido (ej. citocromos), lo cual disminuye su capacidad microbicida y expone a los pacientes a serias infecciones bacterianas y fúngicas (Heyworth *et al.*, 1999). Estos defectos se pueden detectar en el laboratorio como una incapacidad de los fagocitos para reducir el NBT. En individuos normales, cuando se estimula a los fagocitos con lipopolisacáridos (LPS) bacterianos u otros agentes (ej. ésteres de forbol como el PMA), se observa que la gran mayoría de las células (>90%) reducen el NBT, generando formazán.

La ausencia de reducción del NBT (<10% de células positivas) en leucocitos que han sido estimulados por LPS indica que existe un defecto metabólico importante, usualmente asociado con la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) u otros trastornos de los fagocitos. Dado que esta enfermedad frecuentemente puede hallarse ligada al cromosoma X (Stossel y Taylor, 1976; Goldsby *et al.*, 2000), es posible hallar estados **portadores** (heterocigotas) en mujeres, con resultados intermedios en esta prueba (ej. 10-40% de positividad con LPS). Sin embargo, también existen formas de la enfermedad granulomatosa crónica que son autosómicas recesivas. Otra condición que puede inducir valores bajos en la reducción del NBT es la deficiencia de deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato (G6PD). Se ha descrito que, ocasionalmente, algunos pacientes que cursan con infecciones pueden dar porcentajes altos en la prueba sin estímulo con LPS, probablemente por la activación de los fagocitos *in vivo*.

Los métodos presentados a continuación se basan en el recuento microscópico manual de las células que reducen el NBT. También se han descrito variantes de esta técnica en donde el precipitado de formazán es extraído de las células, solubilizado, y finalmente cuantificado por espectrofotometría (Segal y Peters, 1975; Hudson y Hay, 1989). Bajo esta modalidad, se obvia el recuento microscópico de las células, así como la subjetividad en la lectura de células cuya morfología (presencia del formazán) es limítrofe entre positivo y negativo.

Procedimientos

Método I.Reducción del NBT en leucocitos purificados (Wilkinson, 1977).

1.Obtener una muestra¹ de sangre (2-3 ml) con heparina (10-50 U/ml). Agregar 1 volumen de dextrán-70 al 6% en PBS por cada 9 volúmenes de sangre (para aglutinar los eritrocitos) y dejar sedimentar por 60 min, a temperatura ambiente, en un tubo de plástico. Correr en paralelo una muestra normal, como control.

2.Obtener la capa superior del tubo, rica en leucocitos². Lavarlos 2 veces con SSB, centrifugando por 5 min a 300 xg. Resuspender los leucocitos en 0,5-1 ml de SSB, hacer un recuento en cámara, y ajustar a 5×10^6 cél/ml.

3.Mezclar en un tubo nuevo 0,5 ml de los leucocitos y 0,1 ml de plasma con LPS. Este último se prepara añadiendo 15 μ l de LPS de *E. coli* (1 mg/ml) por cada ml de plasma³, e incubando por 30 min a 37°C. En otro tubo (control sin estimular), mezclar 0,5 ml de los leucocitos y 0,1 ml de BSS.

¹ note que esta técnica requiere un volumen considerable de sangre, lo que en ocasiones restringe su utilidad en el caso de recién nacidos o niños de muy corta edad.

² los neutrófilos son células más delicadas que los mononucleares; deben centrifugarse a bajas velocidades, y resuspenderse suavemente. El tiempo de manipulación debe reducirse a un mínimo y debe evitarse el contacto con superficies de vidrio que pueden activarlos (elevando artificialmente su metabolismo basal). Por esta razón, tanto los tubos como las pipetas deben ser de plástico, preferiblemente de polipropileno.

³ se puede preparar una cierta cantidad de plasma-LPS y congelar alícuotas a -70°C.

4. Agregar 0,2 ml de solución de NBT a ambos tubos. Proteger de la luz e incubar por 20 min a 37°C.

5. Centrifugar a 400 xg por 4 min. Decantar el sobrenadante, agregar 1 gota de PBS y resuspender suavemente.

6. Colocar una gota sobre un portaobjetos y dejar secar (sin extender). Teñir con fucsina carbólica por 15 seg y lavar con agua.

7. Bajo el objetivo de 100x en inmersión, observar 100 neutrófilos y determinar el porcentaje que posee gránulos de formazán (aparece como un precipitado oscuro púrpura, de aspecto fino a intermedio, en el citoplasma).

8. Los valores de referencia para este método son:

leucocitos no-estimulados (sin LPS): $\leq 10\%$ de positividad

leucocitos estimulados con LPS: $\geq 80\%$ de positividad

Método II. Micrométodo en sangre total (contribución del Dr. César Bonilla Esquivel).

1. Obtener 0,3-0,4 ml de sangre heparinizada (10-50 U/ml).

2. Mezclar 100 μ l de sangre y 10 μ l de LPS de *E. coli* o *Salmonella* (25 μ g/ml en PBS). Correr una muestra estimulada con LPS y otra sin estimular. Incluir un control normal en la prueba. Incubar por 20 min a temperatura ambiente.

3. Agregar 100 μ l de solución de NBT e incubar por 15 min a 37°C, en la oscuridad.

4. Preparar una extensión gruesa de cada tubo y teñir con colorante de Wright (1 min en colorante y 3 min cubierto con agua). Contar los polimorfonucleares neutrófilos positivos y negativos, igual que en el método anterior.

5. Los valores de referencia para este método son:

leucocitos no-estimulados (sin LPS): 0-10% de positividad

leucocitos estimulados con LPS: 40-90% de positividad

Método III. Micrométodo en sangre total y estimulación con PMA (Coates *et al.*, 1992).

1. Tomar 2 portaobjetos y colocar en cada uno una gota grande de sangre total, anticoagulada con heparina, EDTA o citrato). Colocar en cámara húmeda e incubar por 30 min a 37°C, con 5-7% de CO₂ (incubadora de cultivo celular).

2.Lavar muy suavemente las células no adheridas, con PBS, colocar de nuevo en la cámara húmeda y cubrir cada portaobjeto con la solución de NBT correspondiente (NBT con éster de forbol [NBT/PMA] y NBT solo). Incubar por 15 min a 37°C.

3.Lavar muy suavemente con PBS y secar al aire.

4.Teñir con safranina al 1% en agua por 2 min, lavar con agua destilada y secar al aire.

5.Examinar 100 células al microscopio y determinar el porcentaje que redujo el NBT.

6.Los valores de referencia para este método son:

leucocitos no-estimulados (sin PMA): <5% de positividad

leucocitos estimulados con PMA: >90% de positividad

Método IV.Cuantificación espectrofotométrica del NBT reducido (Segal y Peters, 1975).

1.Obtener una muestra (3-5 ml) de sangre heparinizada (10-50 U/ml) y procesarla antes de 60 min.

2.Agregar 15 µl de LPS (1 mg/ml) a 1,5 ml de sangre. Correr en paralelo una muestra igual de sangre sin estimular. Incubar por 10 min a 37°C.

3.Agregar a cada tubo 0,1 ml de solución NBT e incubar por 20 min a 37°C, en la oscuridad.

4.Pasar cada muestra por una columna de lana de nylon, gota a gota. Lavar la columna con 2 ml de PBS y luego con 2 ml de agua destilada (esta lisará los eritrocitos).

5.Agregar 10 gotas de HCl 0,1 M a cada columna, para detener la reducción del NBT, y lavar con 2 ml de agua destilada.

6.Sacar con pinzas la lana de nylon de cada columna y colocarla en un tubo de vidrio con 5 ml de dioxano.

7.Calentar a 70°C, agitando ocasionalmente, hasta extraer todo el color de la lana de nylon, que vuelve a su aspecto blanquecino.

8.Centrifugar el extracto de dioxano por 10 min a 1000xg, para eliminar las fibras y posibles precipitados.

9.Leer la absorbancia del sobrenadante a 520 nm contra un blanco de dioxano.

10. La reducción del NBT, detectada por el aumento de absorbancia, se debe relacionar con el número de neutrófilos en la muestra original de sangre (obtenido mediante un recuento).

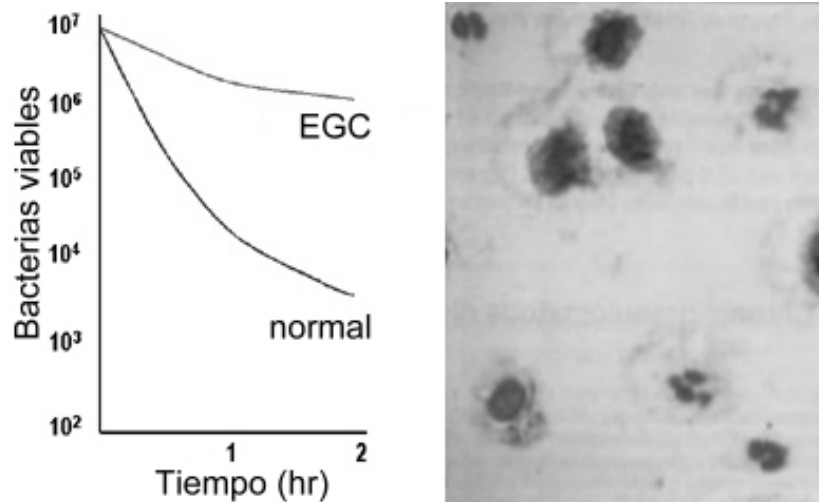


Figura 7.1: La actividad microbicida de los fagocitos en la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) se encuentra significativamente disminuída con respecto a un control normal (izquierda). En un paciente con EGC, los neutrófilos aparecen con una capacidad disminuída para reducir el NBT (derecha).

Referencias

- Coates, T.D., Beyer, L.L. y Baehner, R.L. (1992) Laboratory evaluation of neutropenia and neutrophil dysfunction. En: *Manual of Clinical Laboratory Immunology* (Rose, N.R., Conway, E., Fahey, J.L., Friedman, H., y Penn, G.M., Eds.), p.409. Washington: American Society for Microbiology.
- Heyworth, P.G., Noack, D., Ellis, B.A., Curnutte, J.T. y Cross, A.R. (1999) Molecular genetics and biochemistry of chronic granulomatous disease. *The Scripps Institute Scientific Reports of 1998-1999* (boletín).
- Hudson, L. y Hay, F.C. (1989) *Practical Immunology*, p.188. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J. y Osborne, B.A. (2000) *Kuby Immunology*, 670 pp. New York: W.H. Freeman.
- Roesler, J. y Emmendorffer, A. (1991) Diagnosis of chronic granulomatous disease. *Blood* **78**, 1387.
- Segal, A.W. y Peters, T.T. (1975) The nylon column dye test; a possible screening test of phagocyte function. *Clin. Sci. Mol. Med.* **49**, 591.
- Stossel, T.P. y Taylor, M. (1976) Phagocytosis. En: *Manual of Clinical Immunology* (Rose, N.R. y Friedman, H., Eds.), p.148. Washington: American Society for Microbiology.
- Wilkinson, P.C. (1977) Neutrophil leucocyte function tests. En: *Techniques in Clinical Immunology* (Thompson, R.A., Ed.), p.201. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Capítulo 8

Determinación de IgE sérica total y anticuerpos IgE contra alérgenos

Introducción

En 1967, los Ishizaka, en EUA, describían una nueva clase de inmunoglobulinas cuyas propiedades no coincidían con ninguna de las conocidas (Ishizaka e Ishizaka, 1967). Paralelamente, Johansson y su grupo, en Suecia, confirmaban este descubrimiento, al hallar por primera vez un mieloma productor de una inmunoglobulina no clasificable (Stanworth *et al.*, 1967). En 1968, los análisis finales de estas proteínas culminaban con el reconocimiento, por parte del Centro de Referencia para Inmunoglobulinas de la Organización Mundial de la Salud en Suiza, de una nueva clase: la IgE (Bennich *et al.*, 1968).

La IgE es el isotipo de anticuerpos que posee la menor concentración en el plasma, en el orden de 10^{-7} M (~ng/ml). Por tal razón, su cuantificación requiere de técnicas inmunológicas de alta sensibilidad física, entre las que destacan los métodos radioinmunes y los inmunoenzimáticos. A pesar de su baja concentración como moléculas libres en el plasma, las IgE poseen importantes actividades biológicas, dadas principalmente por su capacidad de unirse a receptores de superficie en diversos leucocitos, especialmente en los basófilos y mastocitos, que reconocen su cadena pesada épsilon (FcεR). Se han caracterizado dos tipos de estos receptores, FcεR I y FcεR II (CD23), siendo el primero de alta afinidad y encontrado principalmente en basófilos y mastocitos.

Desde su descubrimiento, se observó que las IgE tienen un papel central en los procesos de **hipersensibilidad tipo I**, precisamente cuando reconocen antígenos estando unida a la superficie de basófilos y mastocitos. Si el antígeno (alérgeno) entrelaza distintas moléculas de IgE que están unidas a los receptores FcεR I, dichas células se degranulan rápidamente y vierten sus potentes mediadores inflamatorios al medio exterior. La magnitud de este fenómeno puede variar desde leves reacciones localizadas, sin graves consecuencias para el organismo, hasta reacciones de gran magnitud como las sistémicas (por ejemplo el choque anafiláctico), que pueden incluso llegar a poner en riesgo la vida del paciente.

Existe una notable variabilidad individual en la predisposición a responder frente a ciertos antígenos con anticuerpos de la clase IgE. Ciertamente se evidencia una influencia genética, que se refleja por la mayor prevalencia de fenómenos alérgicos en individuos cuyos padres, hermanos, u otros familiares cercanos sufren de alergias. Sin embargo, esta predisposición no es una herencia simple. Se ha encontrado cierta influencia del complejo principal de histocompatibilidad (HLA), que podría estar relacionada con el tipo de linfocitos T cooperadores (CD4⁺) que se estimulan durante la presentación de los antígenos. Los linfocitos con perfil Th2 liberan citocinas como IL-4 e IL-5, conocidas por su influencia sobre los linfocitos B a inducir un cambio de isotipo hacia la IgE. Se espera que esta intensa área de investigación pueda llegar a proporcionar nuevas formas de manipular

las respuestas inmunes frente a los alérgenos, para resolver problemas de hipersensibilidad tipo I tan frecuentes e importantes como el asma, la rinitis, las dermatitis, o las reacciones alérgicas a alimentos, por ejemplo. El asma, en particular, es probablemente la patología más importante dentro de este tipo de trastornos, por su alta prevalencia y peligrosidad para los pacientes.

Uno de los grandes avances en la comprensión de las alergias (hipersensibilidad tipo I) fue el reconocimiento del papel central de la IgE en los mecanismos de patogénesis. En consecuencia, la cuantificación de IgE sérica (tanto total, como específica para alérgenos), se convirtió rápidamente en un importante elemento de apoyo diagnóstico en este campo.

Los niveles de **IgE sérica total** se encuentran elevados principalmente en dos condiciones: en las alergias (por mecanismos tipo I) y en las parasitosis (especialmente en algunas helmintiasis). También se conocen algunos síndromes que cursan con niveles elevados de IgE, menos frecuentes en la población (por ejemplo el síndrome de Job o síndrome de hiper-IgE). Esto hace que la cuantificación de la IgE total sea menos informativa para orientar el diagnóstico de alergia, en comparación con la detección y cuantificación de anticuerpos IgE específicos para determinados antígenos (alérgenos). Sin embargo, ambas determinaciones son de utilidad. Un bajo nivel de IgE sérica en un adulto (ej. <20 U/ml) sugiere fuertemente descartar un trastorno alérgico. Un alto nivel (ej. >200 U/ml), en aparente ausencia de parasitosis, sugiere una alta probabilidad de alergia.

Por otro lado, la detección de **anticuerpos IgE contra alérgenos** particulares es de gran utilidad para el diagnóstico y, por ende, para el establecimiento de un tratamiento farmacológico apropiado. Además, la identificación del alérgeno (o grupo de alérgenos) involucrados en una alergia permite planear posibles estrategias de prevención a la exposición, o incluso iniciar procesos de inmunoterapia, tales como la **hiposensibilización**. En estos procedimientos, se somete al paciente a un programa de inmunizaciones controladas y repetitivas con pequeñas dosis del alérgeno, para intentar disminuir la respuesta de IgE hacia él, estimulando a la vez una mayor respuesta de anticuerpos IgG.

Los avances en la caracterización molecular e inmunológica de muchos alérgenos han permitido disponer de amplias baterías, que son utilizadas en las pruebas de laboratorio para la detección de los correspondientes anticuerpos IgE. Entre las categorías de alérgenos ambientales más comunes se encuentran los pólenes, hierbas, mohos, componentes de artrópodos (en especial ácaros), de animales domésticos y alimentos. También existen alérgenos que se relacionan con una exposición de tipo ocupacional, entre ellos muchas sustancias químicas, pero también productos naturales. Para el personal de salud es importante, por ejemplo, el desarrollo de alergia al látex de los guantes.

Las baterías o paneles de alérgenos son muy útiles no solo *in vitro*, sino también para la realización de pruebas cutáneas en los pacientes. Existe una aceptable correlación entre los resultados que se obtienen *in vivo* (pruebas dérmicas e intradérmicas) con los alérgenos, y las pruebas laboratoriales *in vitro* para la detección de IgE contra ellos. Algunas ventajas de estas últimas son: **(a)** se evita la exposición del paciente a los alérgenos, que conlleva un riesgo (aunque bajo) de reacciones fuertes de tipo anafiláctico; **(b)** se evita la interferencia de posibles medicamentos tomados por el paciente, tales como antihistamínicos u otros antiinflamatorios, en los resultados; **(c)** el suero puede ser conservado en congelación, para probarse con numerosos alérgenos. Por otro lado, una limitación de las pruebas *in vitro* es que no reproducen todo el fenómeno inflamatorio que se observa en las pruebas cutáneas, sino que solo proveen información sobre la presencia de los anticuerpos IgE contra los

alergenos. Finalmente, los problemas de pureza y estandarización de los alergenicos, son compartidos por ambos tipos de pruebas (*in vivo* e *in vitro*).

Existe una amplia gama de procedimientos comercialmente disponibles para la cuantificación de IgE total. Los formatos pueden ser variables, aunque su principio común consiste en la captura de la IgE de la muestra mediante anticuerpos (ya sea un anticuerpo monoclonal o anticuerpos policlonales) contra la cadena ϵ , que se encuentran unidos a una fase sólida. Posteriormente al lavado, se detecta la IgE capturada mediante otra capa de anticuerpos anti- ϵ conjugados con una enzima, un radioisótopo, u otro marcador apropiado. Uno de los términos que han sido utilizados para la técnica de determinación de IgE total deriva de un nombre comercial, el **RIST** (*radio-immunosorbent test*). Los diversos ensayos disponibles pueden ser procedimientos manuales o automatizados. A continuación se describe un ejemplo de procedimiento manual que utiliza un inmunoensayo enzimático.

Procedimiento

Cuantificación de IgE total en suero mediante la prueba "IgE-EIA" (Farmacia).

Note que en esta determinación la IgE actúa como antígeno. El estuche comercial de reactivos contiene tubos de plástico recubiertos (covalentemente) con un anticuerpo monoclonal anti-cadena ϵ humana, que captura la IgE de la muestra. Otro anticuerpo monoclonal, pero conjugado con fosfatasa alcalina, detecta la IgE capturada.

1. Prelavar los tubos agregando 2 ml de solución lavadora, y luego aspirando completamente (esto elimina los preservantes e hidrata las superficies).
2. Agregar 50 μ l de muestra (suero) o de estándares de IgE humana, a los tubos correspondientes, por duplicado. Simultáneamente¹, agregar 50 μ l del conjugado anti-IgE/fosfatasa alcalina.
3. Tapar los tubos con Parafilm[®], e incubar sobre un agitador por 3 hr a temperatura ambiente.
4. Lavar los tubos 3 veces con 2 ml de la solución lavadora, aspirando completamente entre cada lavado.
5. Agregar 200 μ l de la solución de sustrato a cada tubo, e incubar por 30 min a 37°C.
6. Detener la reacción con 1 ml del reactivo correspondiente. Leer la absorbancia final de la solución a 420 nm, contra un blanco de reactivos sin muestra.
7. Graficar la curva de referencia (Fig.8.1) con los estándares e interpolar las muestras desconocidas. El suero control incluido en el estuche debe dar el valor esperado (entre 68 y 104 U/ml o kU/l) para que los resultados de cada corrida sean aceptados.

¹ es posible agregar al mismo tiempo la muestra y el conjugado, por tratarse de un diseño "de dos sitios" en el cual los dos anticuerpos monoclonales utilizados no interfieren entre sí por la unión al antígeno (IgE).

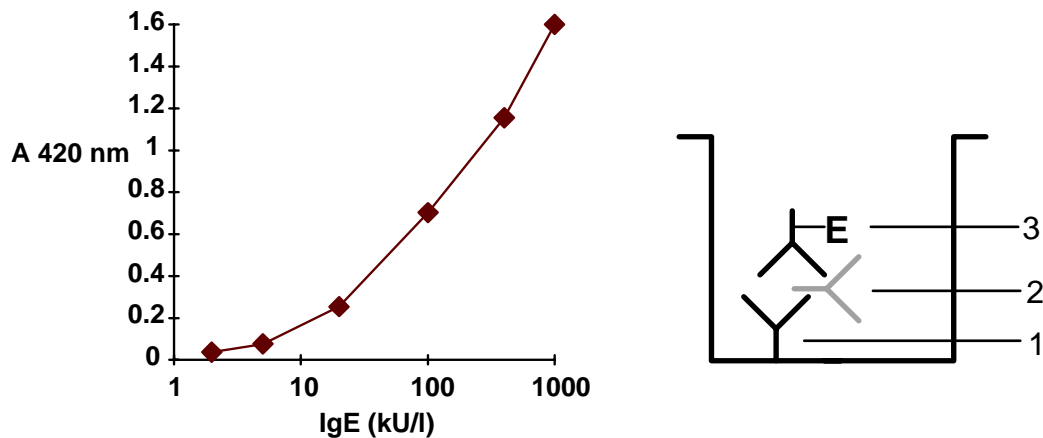


Figura 8.1: Ejemplo de una curva de referencia para la cuantificación inmunoenzimática de IgE sérica (IgE-EIA, casa Pharmacia). Cada punto representa el promedio de tres réplicas. La desviación estándar es menor que el tamaño del símbolo. A la derecha se esquematiza el diseño del método: (1) anticuerpo monoclonal anti-IgE; (2) IgE (muestra); (3) anticuerpo monoclonal anti-IgE conjugado con fosfatasa alcalina.

Los valores de referencia para esta determinación, dados por el fabricante, se indican en el Cuadro 8.1. Sin embargo, es importante que los valores sean establecidos por cada laboratorio, según las condiciones y características de la población particular. En un estudio realizado en niños de la meseta central de Costa Rica, comparando individuos asmáticos y aparentemente sanos, respectivamente, se obtuvo la distribución que se muestra en la Fig.8.2. En dicho estudio, también se evaluó la correlación entre el método inmunoenzimático descrito arriba y un método radioinmune (Fig.8.3).

Cuadro 8.1: Valores de concentración sérica de IgE total según la edad.

Edad	Promedio geométrico*	+1 SD*	límite normal**
1,5 meses	0,6 kU/l***	2,3 kU/l	< 5 kU/l
3 meses	1,0	4,1	< 5
6 meses	1,8	7,3	< 5
1 año	3,2	13	< 5
2 años	5,7	23	< 12
3 años	8,0	32	< 12
4 años	10	40	< 12
5 años	12	48	< 40
8 años	18	71	< 80
10 años	22	85	< 80
adultos	15	41	<100

* según Pharmacia AB, Suecia.

** según Diagnostic Laboratory Services, Inc., EUA.

*** 1 U = 2,4 ng IgE

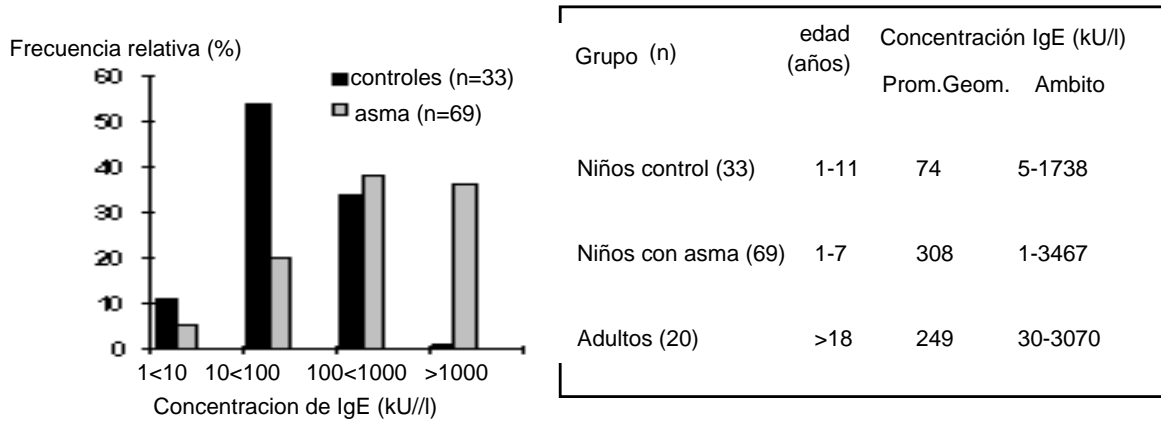


Figura 8.2: Comparación de la distribución de frecuencias de los niveles de IgE sérica en niños asmáticos y niños control aparentemente sanos (izquierda). Nótese la marcada tendencia a tener una alta concentración de IgE en el grupo con asma. A la derecha se indican los promedios y ámbitos hallados en los dos grupos, así como en una pequeña muestra (n=20) de adultos, donantes de sangre (Lomonte *et al.*, 1991).

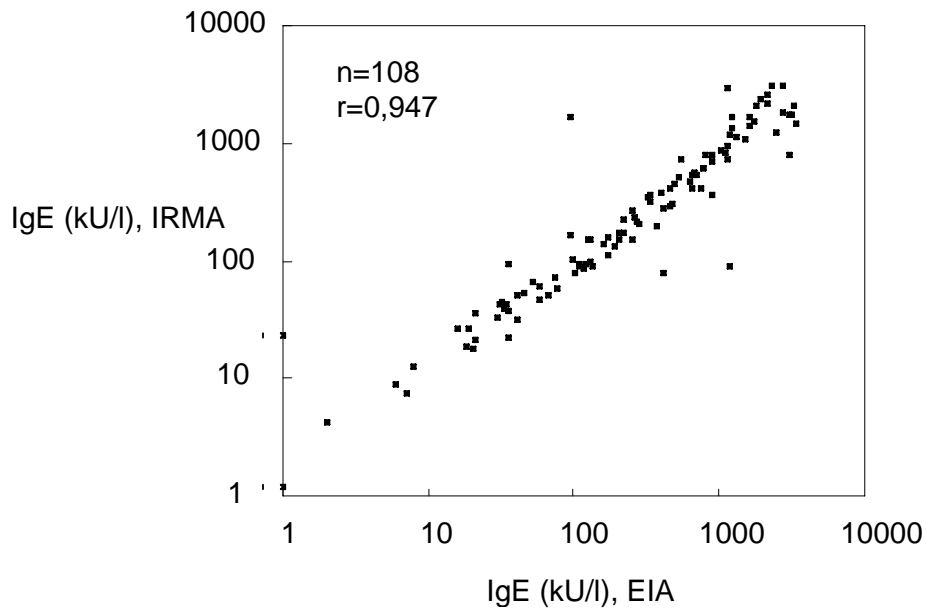


Figura 8.3: Análisis de correlación entre dos métodos para la cuantificación de IgE sérica (inmunoenzimático "IgE-EIA" vs. radioinmune "IRMA-count total IgE"), en 108 muestras. El coeficiente de correlación (r) es de 0,947 (Lomonte *et al.*, 1991).

Cuantificación de anticuerpos IgE específicos contra alérgenos

Como se mencionó, la detección de estos anticuerpos tiene un importante valor como apoyo diagnóstico en las alergias. Dada la corta vida media de la IgE circulante (2,5 días), la cuantificación de IgE específica contra alérgenos refleja la formación de nuevos anticuerpos y la actividad inmune prevaleciente en el paciente. Las técnicas disponibles utilizan una variedad de formatos, empleando diversos tipos de fase sólida, como tubos, esferas, placas de ELISA, discos de nitrocelulosa, y otros. El nombre **RAST** (*radio-allergo sorbent test*) se popularizó en una época para describir este tipo de ensayos *in vitro* que detectan anticuerpos IgE específicos contra alérgenos. Las diversas técnicas utilizan baterías de alérgenos comunes para la población, acoplados a una fase sólida, a los cuales se unen los anticuerpos IgE del suero. Estos son luego detectados a través de anticuerpos contra la cadena ϵ humana, conjugados con enzimas, radioisótopos u otros marcadores apropiados.

Una lista parcial de categorías de alérgenos comúnmente utilizados se presenta en el Cuadro 8.3. Los tamizajes para la amplia variedad de posibles alérgenos son orientados por la historia clínica del paciente, y además pueden utilizarse inicialmente mezclas de alérgenos por categorías. En el caso de hallar un resultado positivo frente a una mezcla dada, se procede a analizar en mayor detalle la presencia de anticuerpos IgE contra cada alérgeno particular de esa categoría. Es importante mencionar que los alérgenos mejor estudiados y caracterizados son aquellos que afectan a la población de las naciones más desarrolladas, que no necesariamente coinciden con los alérgenos más importantes en las regiones tropicales. Por ejemplo, las descamaciones de cucarachas tienen un papel importante en los padecimientos asmáticos en países como Costa Rica (Soto-Quirós et al., 1998, 2002).

En estas pruebas *in vitro*, la estandarización de los resultados es más compleja que en el caso de la cuantificación de IgE total. Muchas casas comerciales proporcionan sueros calibrados contra sueros estándar de referencia internacional, para expresar los resultados de las muestras en términos de porcentajes de actividad. Otro estilo de resultados frecuentemente utilizado es el empleo de categorías o clases numéricas, de 0 a 6, que describen el grado de "reactividad" de un suero (contenido relativo de anticuerpos IgE) contra un alérgeno, según el nivel de la señal que proporcionan en el ensayo. Un ejemplo se muestra en el Cuadro 8.2.

Cuadro 8.2: Ejemplo de la expresión de resultados en la determinación de anticuerpos IgE específicos contra alérgenos, en suero.

% del suero de referencia	clase o categoría	nivel de IgE contra el alérgeno
< 60	0	no detectable
60-70	0-1	equivoco o ambiguo
70-110	1	límite de detección
110-220	2	} niveles crecientes de anticuerpos IgE contra el alérgeno
220-600	3	
600-3000	4	
2000-6000	5	
> 6000	6	

* los resultados se describen como porcentaje de la señal dada por el suero de referencia (estándar de 0,35 U/ml).

Cuadro 8.3: Algunos alérgenos comunes utilizados para la detección de anticuerpos IgE específicos en suero.

Acaros del polvo	Mohos	Pescados
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	<i>Penicillium notatum</i>	bacalao
<i>Dermatophagoides farinae</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	atún
Epitelios	<i>Aspergillus fumigatus</i>	salmón
pelusa/epitelio de gato	<i>Mucor racemosus</i>	trucha
pelusa/epitelio de perro	<i>Candida albicans</i>	macarela
plumas de ganso	<i>Alternaria tenuis</i>	halibut
plumas de gallina	<i>Helminthosporium halodes</i>	perca
plumas de pato	<i>Stemphylium botryosum</i>	Frutas
Hierbas/zacates	<i>Aureobasidium pullulans</i>	naranja
zacate Bermuda	<i>Phoma betae</i>	manzana
Fescue meadow	Mariscos/crustáceos	banano
zacate Timothy	cangrejo	pera
zacate red top	camarón	melocotón
zacate Johnson	langosta	uva
zacate Bahia	almejas	Vegetales
semilla de algodón	ostras	arveja
Granos	Legumbres/nueces	tomate
trigo	maní	zanahoria
centeno	soya	papa
cebada	almendra	cebolla
avena	pistacho	apio
maíz	nuez	lechuga
arroz	Otros alimentos	repollo
Carnes	clara de huevo	broccoli
cerdo	leche	pepino
res/ternero	levadura	frijol
pollo	chocolate	coliflor
pavo	Misceláneos	lentejas
mezcla de huevo	látex	frijol nacido

Referencias

- Bennich, H.H., Ishizaka, K., Johansson, S.G.O., Rowe, D.S., Stanworth, D.R. y Terry, V.D. (1968) Immunoglobulin E, a new class of human immunoglobulin. *Bull. W.H.O.* **38**, 151.
- Celedón, J.C., Soto-Quirós, M.E., Hanson, L.Å. y Weiss, S.T. (2002) The relationship among markers of allergy, asthma, allergic rhinitis, and eczema in Costa Rica. *Pediat. Allergy Immunol.* **13**, 91.
- Diagnostic Laboratory Services (2002) Allergen specific IgE. Technical Bulletin.
- Ishizaka, K. e Ishizaka, T. (1967) Identification of E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.* **99**, 1187.
- Lomonte, B., Salas, P. y Quesada, F. (1991) Determinación inmunoenzimática de los niveles séricos de inmunoglobulina E en niños asmáticos de la meseta central de Costa Rica. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* **12**, 1.
- Roitt, I.M., Brostoff, J. y Male, D. (2001) *Immunology*, 480 pp. Edinburgh: Mosby.
- Soto-Quirós, M., Bustamante, M., Gutiérrez, I., Hanson, L.Å., Strannegård, I.L. y Karlberg, J. (1994) The prevalence of childhood asthma in Costa Rica. *Clin. Exp. Allergy* **24**, 1130.

- Soto-Quirós, M.E., Ståhl, A., Calderón, O., Sánchez, C., Hanson, L.Å. y Belin, L. (1998) Guanine, mite, and cockroach allergens in Costa Rican homes. *Allergy* **53**, 499.
- Soto-Quirós, M.E., Soto-Martínez, M. y Lars Hanson, L.Å. (2002) Epidemiological studies of the very high prevalence of asthma and related symptoms among school children in Costa Rica from 1989 to 1998. *Pediat. Allergy Immunol.* **13**, 342.
- Stanworth, D.R., Humphrey, J.H., Bennich, H. y Johansson, S.G.O. (1967) Specific inhibition of the Prausnitz-Kiistner reaction by an atypical human rnyelorna protein. *Lancet* **2**, 330.
- Terr, A.I. (1998) Mecanismos de hipersensibilidad. En: *Inmunología Básica y Clínica*, (Stites, D.P., Terr, A.I. y Parslow, T.G., Eds.), p.447. México: Editorial Manual Moderno.
- Williams, P.B., Dolen, W.K. y Koepke, J.W. (1992) Comparison of skin testing and three *in vitro* assays for specific IgE in the clinical evaluation of immediate hypersensitivity. *Ann. Allergy* **68**, 35.

Capítulo 9

Pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada

Introducción

El mecanismo de hipersensibilidad tipo IV es denominado también **hipersensibilidad celular** o **retardada**, dado que sus manifestaciones son mediadas por células y que su máxima intensidad se evidencia en un lapso de 1-3 días. En este mecanismo participan fundamentalmente los linfocitos T cooperadores ($CD4^+$), al reconocer un antígeno -contactado previamente por el sistema inmune- sobre la superficie de células presentadoras (macrófagos y células dendríticas), liberando así una serie de citokinas. Estos mediadores solubles atraen más macrófagos y linfocitos T al tejido, por lo que este acumula un infiltrado celular que, en el caso de la piel, se evidencia como una **zona de induración**, palpable y de borde más o menos definido. La zona de induración puede presentar un área hiperhémica (eritema) alrededor, que sin embargo no se considera parte de la reacción celular en las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada, y por tanto no se incluye a la hora de realizar la medición del diámetro de la reacción.

Otro nombre que reciben las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada es el de **intradermoreacciones**, ya que la administración del antígeno se realiza por la vía intradérmica. La finalidad de estas pruebas es variada. En primer lugar, pueden ser utilizadas para determinar si un individuo ha tenido contacto con un agente infeccioso y ha desarrollado una respuesta celular detectable. Para este fin, se inyecta una pequeña cantidad de un extracto del microorganismo, por vía intradérmica, en un volumen de 100 μ l. Después de 48-72 hr se lee la prueba, observando si hay una reacción local de induración en la piel. Se puede hacer una estimación del grado de respuesta midiendo el diámetro de la zona de reacción. Esta aplicación es útil para realizar estudios epidemiológicos sobre una determinada enfermedad infecciosa, ya que puede realizarse la prueba en una población y determinar el porcentaje de positividad (exposición al agente) en distintas edades, regiones geográficas, etc. Algunos ejemplos de microorganismos con los cuales se preparan extractos para realizar pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada se indican en el Cuadro 9.1.

La segunda utilidad de estas técnicas es la de evaluar el estado de la respuesta inmune celular en pacientes que se estudian por posibles inmunodeficiencias. Para esto se utiliza una batería de antígenos extraídos de agentes infecciosos comunes, a los cuales ha estado expuesta una gran proporción de la población. Si el paciente no responde ante esta serie de estímulos, se habla de un estado de **anergia cutánea**. La anergia cutánea hacia una batería de antígenos comunes sugiere una inmunodeficiencia (ya sea innata o adquirida) que involucra al sistema de linfocitos T. El Cuadro 9.2 resume algunas causas que se asocian con anergia cutánea (incluyendo posibles errores técnicos de la prueba).

Debe aclararse que las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada poseen poca utilidad en niños de corta edad, por ejemplo durante el primer año de vida, dado que la negatividad en los resultados puede deberse a la falta de exposición al agente, más que a defectos del sistema inmune. Los recién nacidos menores de 6 semanas por lo general no

muestran aún ninguna respuesta de hipersensibilidad retardada a las pruebas cutáneas (Smith y de Shazo, 1992).

En ausencia de un defecto inmunitario, la prueba puede proveer información de apoyo diagnóstico. En condiciones normales, una prueba negativa sugiere descartar el posible agente infeccioso. Una prueba positiva solamente indica exposición (antigua o reciente) al agente, ya sea en forma **natural** (ya sea con manifestaciones clínicas, o en forma subclínica, desapercibida), o **artificial** (inducida por vacunación). Hay una cierta correlación entre las reacciones sumamente intensas y la presencia de un proceso infeccioso activo (por ejemplo en la tuberculosis y otras infecciones). Sin embargo, esto no es una regla absoluta, ya que existen también infecciones que pueden causar una disminución de la reactividad cutánea, paradójicamente. Por último, otra utilidad más de estas pruebas es la evaluación de la "positivización" de poblaciones que han sido vacunadas con un determinado agente.

Por su simplicidad y bajo costo, así como por su buena correlación general con las pruebas *in vitro* de respuesta linfocitaria a antígenos (mitogénesis, producción de citokinas inducida por antígenos, etc.), las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada constituyen un método conveniente y útil para la evaluación de la función inmune celular en el humano.

Cuadro 9.1: Algunos ejemplos de extractos antigénicos de microorganismos (o sus productos) utilizados en pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada *

Microorganismo/producto	Nombre común del extracto
Protozoarios	
<i>Toxoplasma</i>	toxoplasmina
<i>Leishmania</i>	leishmanina
<i>Entamoeba histolytica</i>	extracto de E.histolytica
Bacterias	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	tuberculina, PPD
<i>Staphylococcus aureus</i>	lisado Staphage®
Toxinas bacterianas	
De <i>Clostridium tetani</i>	toxoides tetánico
De <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	toxoides diftérico
Hongos	
<i>Candida</i>	candidina
<i>Blastomyces</i>	blastomicina
<i>Coccidioides</i>	coccidioidina
<i>Histoplasma</i>	histoplasmina
<i>Sporothrix</i>	esporotricina
Helminintos	
<i>Trichinella</i>	extracto de <i>Trichinella</i>
<i>Schistosoma</i>	extracto de <i>Schistosoma</i>
Virus	
Sarampión	antígenos de sarampión

* Grieco y Meriney (1983); Smith y de Shazo (1992).

Las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada son consideradas positivas, generalmente, cuando la induración tiene un diámetro de 5 mm o mayor. Sin embargo, para algunos antígenos se consideran positivas las reacciones de 10 mm o más. Muchos fabricantes de antígenos proporcionan una guía sobre este particular, con base en estudios realizados en muestras grandes de la población. Se ha descrito que los individuos originalmente negativos a un antígeno, por ejemplo la tuberculina, no van a desarrollar positividad por causa de múltiples pruebas cutáneas con ese antígeno. Probablemente esto obedece a que las cantidades de antígeno inyectadas en la prueba son muy bajas. Sin embargo, algunos estudios han reportado que una baja proporción de individuos se pueden positivizar por esta razón (Richeldi et al., 2006), por lo que este punto parece controversial.

Cuadro 9.2: Factores clínicos y otras condiciones que pueden inhibir las respuestas de hipersensibilidad retardada en las pruebas cutáneas, en forma persistente o temporal. *

Grupo	Ejemplos
I. Errores técnicos en la prueba cutánea	deterioro del antígeno por diversas causas inyección incorrecta lectura incorrecta
II. Deficiencias del sistema inmune	
primarias: combinadas T y B	ataxia-telangiectasia síndrome de Wiskott-Aldrich síndrome de Nezelof inmunodeficiencia grave combinada
primarias: sistema T	aplasia tímica congénita candidiasis mucocutánea
adquiridas/secundarias	síndrome de inmunodeficiencia adquirida drogas inmunosupresoras
III. Neoplasias	linfomas, leucemias, carcinomas
IV. Enfermedades autoinmunes	sarcoidosis enfermedad de Crohn
V. Desórdenes metabólicos y nutricionales	cirrosis diabetes desnutrición uremia
VI. Infecciones sistémicas y trauma	cirugía tifo, escarlatina infección micótica diseminada vacunas virales, influenza, paperas, sarampión tuberculosis miliar y activa lepra lepromatosa

* Stites (1987); Smith y de Shazo (1992)

Problemas de la purificación y estandarización de extractos

Uno de los principales problemas que presenta el uso de extractos antigénicos de microorganismos es la heterogeneidad en su composición y grado de pureza. La tendencia general es hacia la utilización de extractos cada vez más purificados, para evitar en lo posible las reacciones cruzadas con otros agentes relacionados, así como para eliminar contaminantes de los medios en donde se cultivó el agente. Sin embargo, existe mucha heterogeneidad en la preparación de los extractos por parte de los fabricantes, como lo señala Stites (1987). La estandarización en cuanto a contenido de proteína, unidades de potencia biológica, composición, etc., constituye una de las mayores dificultades que presenta la preparación de los extractos.

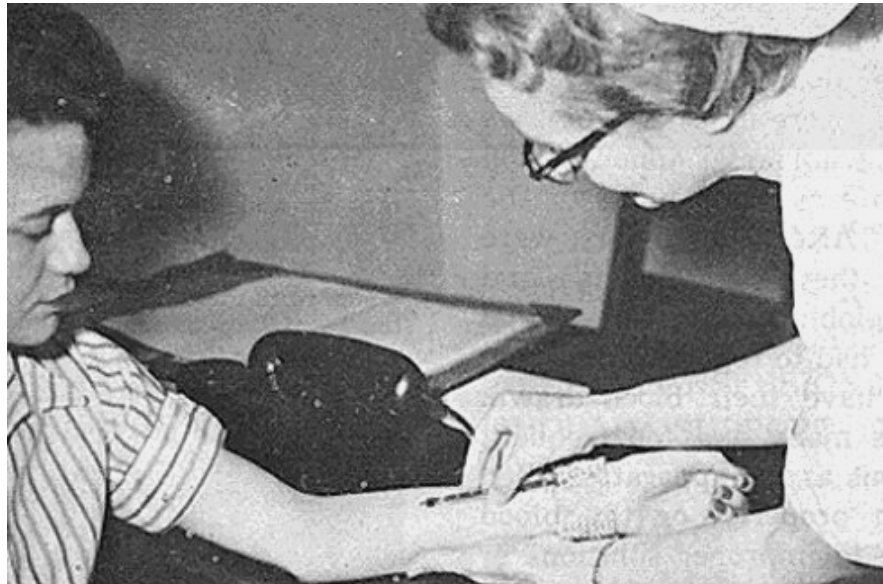


Figura 9.1: Posición del brazo del paciente para la aplicación de una prueba cutánea de hipersensibilidad retardada o intradermoreacción.

Procedimiento

Prueba de la tuberculina (prueba de Mantoux)

El extracto para esta prueba se denomina tuberculina o PPD (*purified protein derivative*) y es un precipitado proteico relativamente crudo de cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*. Hay PPD de varias potencias biológicas, y por lo general se utiliza la de potencia intermedia (5 UT; unidades tuberculina). La tuberculina de 1 UT se utiliza para pacientes en los que hay una fuerte sospecha clínica de tuberculosis activa.

1. Revisar que el frasco que contiene el antígeno no esté turbio, ni alterado.

2.Desinfectar con alcohol de 70° el tapón del vial de PPD (5 UT). Cargar una jeringa de 1 ml (con marcas de 0,1 ml; tipo tuberculina) con 0,1 ml de la solución, utilizando una aguja calibre 26 ó 27. Eliminar las burbujas antes de sacar la aguja del vial, para no desperdiciar antígeno. Tapar inmediatamente la aguja para evitar su contaminación.

3.Desinfectar con alcohol yodado el sitio de punción en la cara anterior del antebrazo. Inyectar 0,1 ml de PPD por vía **intradérmica**. Para esto, colocar la aguja con el bisel hacia arriba, en posición paralela a la piel, e introducir superficialmente la aguja en la dermis, sin pasar al estrato subcutáneo. Puede ayudar el tensar la piel del antebrazo del paciente con la mano libre (Fig.9.1) mientras la aguja penetra. Esto disminuye la posibilidad de formar un pliegue durante la punción. Al inyectar lentamente, debe levantarse una ampolla con el líquido, claramente visible (Fig.9.2). De no suceder esto, significa que la inyección fue subcutánea y deberá repetirse, en otro sitio. Esperar unos segundos y retirar la aguja con un movimiento seco. Verificar que el líquido no salga por el sitio de punción.



Figura 9.2: Aplicación intradérmica de la tuberculina. La aguja debe ingresar en un ángulo muy leve, casi paralela a la piel (izquierda), y levantar una ampolla visible al inyectarse el antígeno.

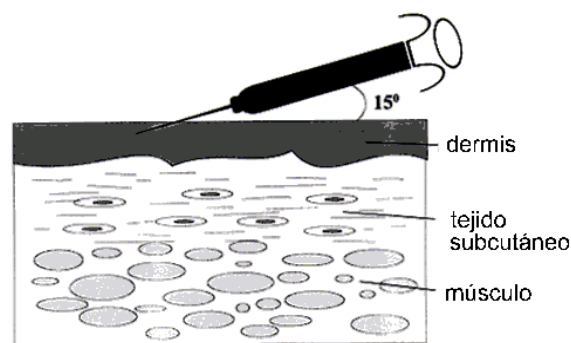


Figura 9.3: Diagrama de la inyección intradérmica de un antígeno. La aguja no debe penetrar en el tejido subcutáneo.

4.Descartar aguja y jeringa en los recipientes apropiados. Tome las precauciones del caso para evitar accidentes por punción.

5. Explicar al paciente que no deberá tocarse ni rascarse la zona de la prueba, ya que esto puede ocasionar reacciones (y hasta lesiones) que dificultan la lectura. A las 72 hr (Singh *et al.*, 2002), observar el sitio de inyección y determinar si se produjo induración, mediante palpación. Marcar con un bolígrafo el contorno de la zona de induración y estimar el diámetro (Fig.9.4). La prueba se considera positiva con 10 mm de induración (diámetro) o más. No debe medirse el eritema, pues no es parte de la respuesta celular. Es más apropiado describir el resultado como "mm de induración", que simplemente como "positivo" o "negativo", ya que el médico puede considerar con flexibilidad de criterio las reacciones intermedias (ej. entre 5 y 9 mm), en el contexto clínico y epidemiológico del paciente.

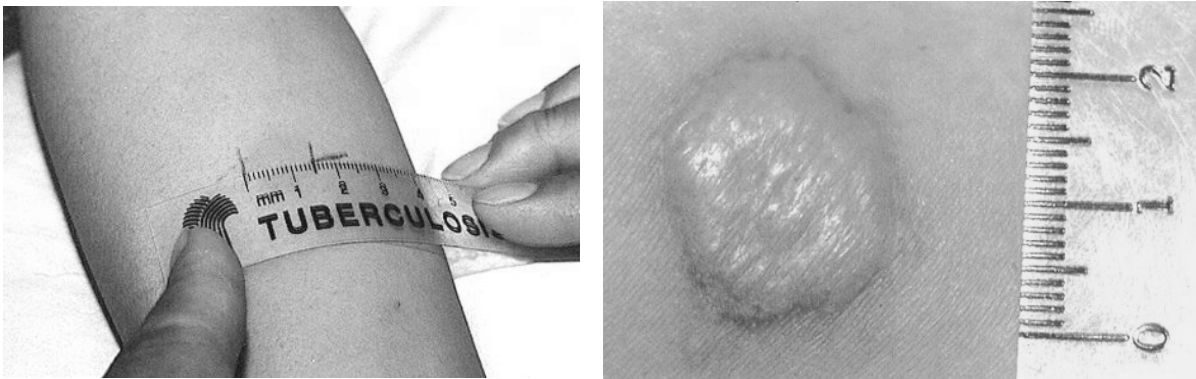


Figura 9.4: Lectura de una intradermoreacción positiva. Izquierda: los bordes de la induración palpable fueron marcados con un bolígrafo y luego medidos con una regla, aproximadamente 15 mm. Derecha: detalle de una reacción positiva de unos 20 mm.

En un estudio realizado en pacientes con tuberculosis probada bacteriológicamente, se halló que la respuesta cutánea a la tuberculina estándar (5 TU) varió entre 0 y 26 mm de diámetro, con una distribución unimodal, cuyo promedio fue de 16-17 mm (Lefford, 1992). Debe enfatizarse, como se mencionó, que un resultado positivo no necesariamente implica tuberculosis activa, sino que demuestra que se ha tenido exposición al antígeno. Esto puede deberse a distintas razones: **(a)** infección previa con la micobacteria, clínica o subclínica, que se encuentra curada o inactiva; **(b)** infección activa por la micobacteria, clínica o subclínica; o **(c)** vacunación con *Mycobacterium bovis* o BCG (bacilo de Calmette y Guerin).

Sistemas de agujones impregnados

Existen algunas preparaciones de PPD que vienen listas, en sistemas descartables que poseen agujones impregnados, a modo de un sello que se presiona sobre la piel (ej. Sclavotest-PPD®). Aunque en principio este formato es más práctico y fácil de aplicar (Fig.9.5), algunos autores lo consideran menos recomendable, debido a que la dosis de

extracto que penetra en la dermis es mucho más variable y difícil de controlar, en comparación con el sistema de inyección intradérmica.

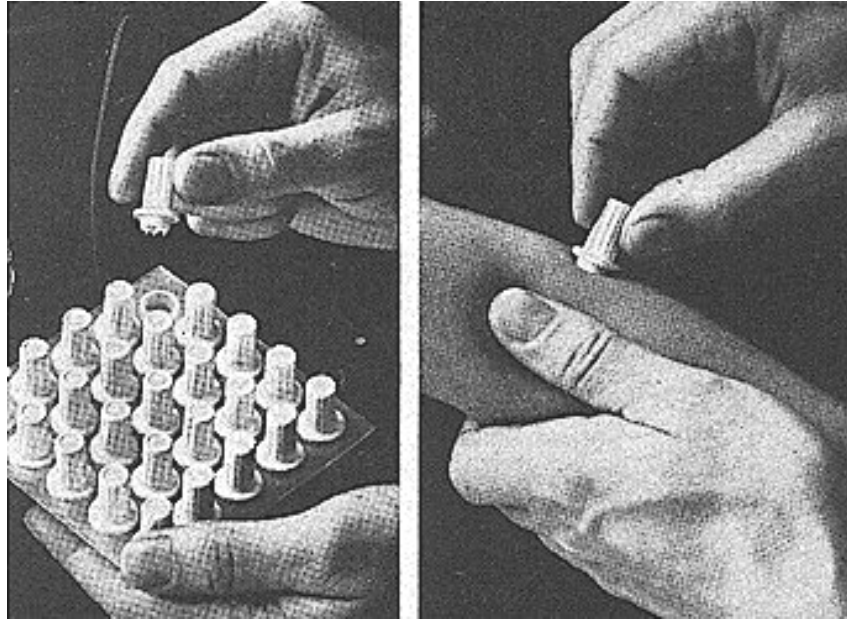


Figura 9.5: Sistema de tuberculina en agujones impregnados descartables. Las unidades individuales estériles se destapan y se aplican fácilmente sobre la cara anterior del antebrazo, como se muestra a la derecha. El PPD se encuentra en la superficie de los cortos agujones (4 puntos) que laceran muy superficialmente la dermis.

Reacciones adversas en las intradermoreacciones

Ocasionalmente se encuentran individuos que reaccionan muy sensiblemente a un antígeno, dando una respuesta intensa con eritema marcado, induración extensa, pudiendo llegar hasta la dermonecrosis, con vesiculación y ulceración local (Fig.9.6). Estos casos pueden atenuarse mediante la aplicación local de corticosteroides. Otra posibilidad, aunque poco frecuente, es que un individuo pueda desarrollar una respuesta de hipersensibilidad inmediata, además de la respuesta retardada. Por esta razón, es importante que las pruebas se lleven a cabo en un lugar en donde existan los medios para el manejo adecuado de posibles reacciones adversas inmediatas, incluyendo la anafilaxia sistémica.

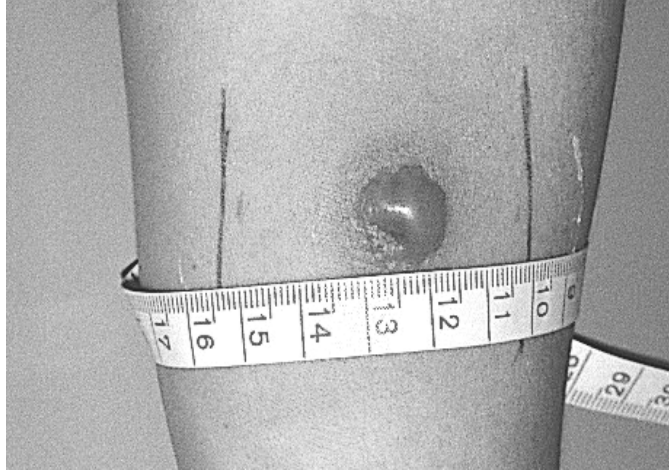


Figura 9.6: Ejemplo de una reacción a la tuberculina de gran intensidad. La zona de induración alcanzó unos 50 mm, con vesiculación y dermonecrosis en el área central.

Referencias

- Centers for Disease Control (1998) Mantoux tuberculin skin test. Division of tuberculosis elimination (panfleto).
- Drutz, D. J. y Graybill, J. R. (1987) Enfermedades infecciosas. En: *Inmunología Básica y Clínica*, (Stites, D., Stobo, J. y Wells, J., Eds.), p. 536. México: Editorial Manual Modemo.
- Grieco, M.H. y Meriney, D.K. (1983) *Immunodiagnosis for Clinicians*, p. 50. Chicago: Year Book Medical Publishers.
- Lefford, M.J. (1992) Immune response to Mycobacteria: diagnostic methods. En: *Manual of Clinical Laboratory Immunology* (Rose, N.R., Conway, E., Fahey, J.L., Friedman, H., y Penn, G.M., Eds.), p.489. Washington: American Society for Microbiology.
- Richeldi, L., Ewer, K., Losi, M., Roversi, P., Fabbri, L.M., Lalvani, A. (2006) Repeated tuberculin testing does not induce false positive ELISPOT results. *Thorax* **61**, 180.
- Sclavo Biologicals (1990) Folleto instructivo del producto "Sclavo-test PPD". Siena, Italia.
- Singh, D., Sutton, C. y Woodcock, A. (2002) Tuberculin test measurement variability due to the time of reading. *Chest* **122**, 1299.
- Smith, D.L. y de Shazo, R.D. (1992) Delayed hypersensitivity skin testing. En: *Manual of Clinical Laboratory Immunology* (Rase, N.R., Conway, E., Fahey, J.L., Friedman, H., y Penn, G.M., Eds.), p.202. Washington: American Society for Microbiology.
- Stites, D.P. (1987) Métodos clínicos de laboratorio para detectar la función inmunitaria celular. En: *Inmunología Básica y Clínica*, (Stites, D., Stobo, J. y Wells, J., Eds.), p. 281. México: Editorial Manual Modemo.
- Wang, L., Turner, M.O., Elwood, R.K., Schulzer, M. y FitzGerald, J.M. (2002) A meta-analysis of the effect of BCG vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* **57**, 804.

Capítulo 10

Determinación de factor reumatoide

Introducción

El principio fundamental que rige el funcionamiento del sistema inmune es la discriminación entre lo propio y lo extraño (no propio). Esto permite mantener la integridad del organismo frente a la multitud de moléculas y agentes biológicos que tienen potencial para invadirlo y dañarlo. Por simple que parezca este principio, no se han terminado de comprender en detalle los mecanismos regulatorios que dictan a las células inmunes cuándo deben tolerar y cuándo deben responder frente a una determinada entidad molecular. Normalmente el sistema inmune no responde hacia los componentes propios en forma destructiva, pero existen ejemplos de respuestas fisiológicas contra **autoantígenos**, que forman parte de las funciones de homeostasia. Las respuestas anti-idiotipo y la eliminación inmune de células propias envejecidas constituyen muestras de ello.

Los mecanismos regulatorios de tolerancia hacia los componentes propios están sujetos a fallas, que pueden conducir a respuestas autoinmunes que afectan el funcionamiento normal del organismo, dando lugar a patologías complejas colectivamente denominadas **enfermedades autoinmunes**. En estas, los elementos humorales y celulares del sistema inmune van a causar inflamación y daños en los tejidos y órganos, utilizando los mismos mecanismos que normalmente nos defienden de los antígenos exógenos.

Entre las respuestas humorales contra componentes propios, encontramos una variedad de **autoanticuerpos**, de prácticamente cualquier isotipo, que poseen una amplia gama de especificidades. Un tipo de estos autoanticuerpos son los **factores reumatoides**, dirigidos contra epitopos ubicados en las cadenas pesadas de la IgG, especialmente en la región que une los dominios C_{H2} y C_{H3} de la región Fc. Algunos de estos epitopos representan estructuras conservadas entre las inmunoglobulinas de distintas especies. La mayoría de factores reumatoides son del isotipo IgM y reconocen epitopos de las IgG. Sin embargo, existen factores reumatoides de todos los isotipos. La subclase IgG₃ parece ser uno de sus blancos más comunes, aunque dependiendo de su especificidad fina, algunos factores reumatoides reconocen todas las subclases. Interesantemente, algunos de los epitopos reconocidos aparecen o se exponen cuando los anticuerpos IgG forman un complejo con su antígeno correspondiente.

El término factor reumatoide se originó del hallazgo inicial de estos autoanticuerpos en el suero de pacientes con **artritis reumatoide**. Esta es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la inflamación crónica de las articulaciones, que conlleva a dolor, tumefacción y erosión de las mismas, con pérdida importante de su movilidad y funcionalidad. Aunque un alto porcentaje (75-80%) de los pacientes con artritis reumatoide presentan altos niveles de factor reumatoide en su plasma, estos autoanticuerpos también pueden ser hallados en otras condiciones (autoinmunes o no), como se ilustra en el Cuadro 10.1. La presencia del factor reumatoide es uno de los criterios del *American College of Rheumatology* para el diagnóstico de artritis reumatoide (van Venrooij, 2002).

Cuadro 10.1: Enfermedades asociadas con títulos elevados de factor reumatoide

Enfermedad	% de positividad
artritis reumatoide	75
síndrome de Sjögren	90
fibrosis idiopática pulmonar	60
dermatomiositis	50
endocarditis bacteriana subaguda	40
lupus eritamatoso sistémico	35
hepatitis crónica activa	25
cirrosis	25
lepra	25
sarcoidosis	15
artritis juvenil crónica	15
espondilitis anquilosante	5-10
artritis psoriática	5-10
normales ≤60 años	5
normales >80 años	30

* Lawlor y Fischer (1981).

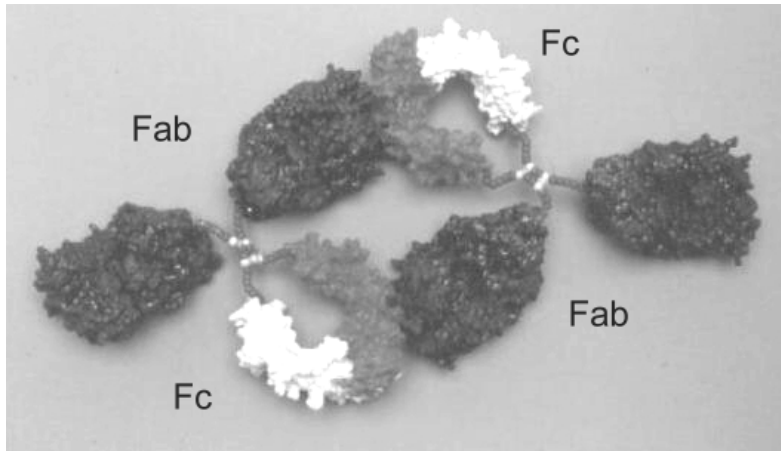


Figura 10.1: Modelo molecular de un complejo dimérico de un factor reumatoide tipo IgG anti-IgG, en donde los Fab reconocen mutuamente el epitopo correspondiente en la región Fc.

No es aún claro el papel patogénico del factor reumatoide en la artritis reumatoide y otras enfermedades. Ciertamente la formación de complejos (Fig.10.1) entre la IgG y los factores reumatoides puede activar al sistema de complemento y promover la inflamación. Sin embargo, la administración de factor reumatoide por sí solo, en modelos animales, no reproduce por completo el cuadro de artritis. Esto deja abierta la posibilidad de que la producción de factor reumatoide sea un epifenómeno asociado al daño autoinmune y no necesariamente la causa primaria de la inflamación articular. Independientemente de ello, las

elevaciones marcadas en los niveles de factor reumatoide tienden a correlacionar con períodos de recrudescencia y activación de la artritis, por lo cual su determinación posee utilidad en el seguimiento de los pacientes. Por otro lado, la sensibilidad y especificidad diagnósticas de la determinación de factor reumatoide son bajas.

Los factores reumatoides forman complejos inmunes de tamaño variable, detectables en el plasma, los tejidos y las articulaciones (por ejemplo en el líquido sinovial). Estos complejos son normalmente eliminados de la circulación por el sistema mononuclear fagocítico. Aunque los complejos son solubles a la temperatura corporal, en algunos casos pueden precipitar por el frío (crioglobulinas), *in vitro*. El hallazgo de crioglobulinas plasmáticas es más frecuente en pacientes con predisposición a sufrir lesiones secundarias en la artritis, como vasculitis y glomerulonefritis.

Métodos para la detección de factor reumatoide

Las técnicas de laboratorio más utilizadas para la detección de factores reumatoides son las aglutinaciones, la nefelometría y las determinaciones inmunoenzimáticas. Las primeras tienden a favorecer la detección de factor reumatoide de tipo IgM anti-IgG (por el sesgo intrínseco de las técnicas de aglutinación hacia este isotipo). Las técnicas inmunoenzimáticas, aunque son menos utilizadas en rutina que las aglutinaciones y la nefelometría, pueden ser adaptadas para la detección de isotipos particulares de factores reumatoides como IgM, IgG o IgA, mediante el uso de conjugados anti-inmunoglobulina apropiados.

Desde los 1940's, Waaler observó que el suero de ciertos individuos podía aglutinar eritrocitos de carnero que habían sido recubiertos por anticuerpos (IgG) contra ellos, preparados en conejo. Estos sueros contenían precisamente factor reumatoide, que reconoce la IgG de conejo, y esta prueba, posteriormente modificada por Rose, se convirtió en una de las más utilizadas para su detección (método de Waaler y Rose). La modificación introducida por Rose fue la utilización paralela de eritrocitos de carnero "control" (sin recubrir con los anticuerpos), para asegurar que la aglutinación es debida a la presencia de factor reumatoide, y no de anticuerpos naturales contra eritrocitos.

Posteriormente, con la aparición de las partículas de látex (microesferas de poliestireno), Singer y Plotz desarrollaron una técnica de aglutinación similar, para detectar la presencia de factor reumatoide en suero. En esta, las partículas son recubiertas por una fracción proteica de globulinas humanas (fracción II de Cohn del plasma humano), rica en IgG. Esta aglutinación pasiva con látex como medio de soporte, evita los problemas de especificidad ocasionados por la utilización de eritrocitos (en la técnica de Waaler y Rose) y además proporciona una mayor sensibilidad física, y por tanto, mayores títulos.

Procedimiento

Determinación de factor reumatoide mediante aglutinación pasiva con látex.

1. Obtener una muestra de suero. Conservar en refrigeración hasta por 24 hr o congelar para plazos mayores. Antes de iniciar la prueba la muestra y los reactivos deben estar a

temperatura ambiente.

2. Diluir la muestra 1:10 con PBS y preparar una serie de diluciones dobles a partir de dicha dilución.

3. Colocar una gota (50 μ l) de cada muestra (o sus diluciones) sobre una lámina de fondo oscuro limpia. Correr sueros control (+) y (-) en cada lote de muestras.

4. Homogenizar la suspensión del látex-IgG y agregar una gota a cada muestra. Evitar el contacto del gotero con las muestras.

5. Mezclar con la ayuda de un aplicador, rotar la lámina por 2 min y leer (Fig.10.3).

6. Dependiendo de cada reactivo comercial, la prueba se considera positiva cuando se presenta aglutinación en títulos mayores de 1:10, 1:40 o 1:80. Es recomendable establecer valores de referencia en cada laboratorio, utilizando sueros normales. A la vez, es importante considerar la edad del paciente, ya que en edades avanzadas es posible encontrar individuos sanos con títulos moderados de factor reumatoide, en ausencia de patología. Hasta un 20-25% de pacientes con artritis reumatoide pueden tener una prueba de factor reumatoide negativa.

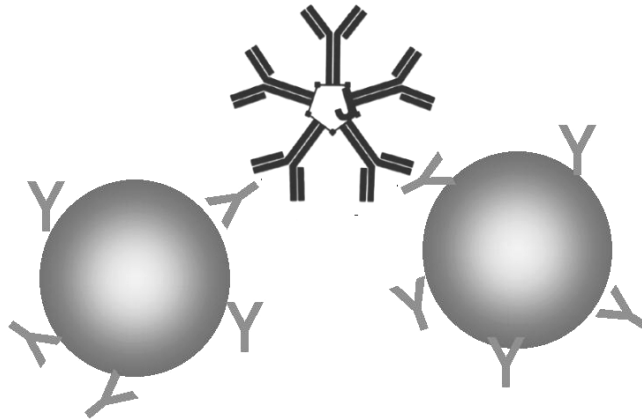


Figura 10.2: Aglutinación pasiva de las partículas de látex por factor reumatoide de tipo IgM. Generalmente, las partículas están recubiertas con la fracción II de Cohn del plasma humano, rica en IgG.

Interferencia de los factores reumatoides en los inmunoensayos

Debido a que los factores reumatoides son anticuerpos capaces de reconocer la región Fc de las inmunoglobulinas, su presencia en el suero puede causar importantes interferencias en los inmunoensayos. Particularmente, existe el riesgo de que el factor

reumatoide funcione como "puente" entre los anticuerpos de captura y los anticuerpos de detección de un antígeno, llevando a resultados falsamente positivos. Por esta razón, los sueros que poseen altos niveles de factor reumatoide (al igual que los que contienen anticuerpos heterófilos; Capítulo 14) deben ser tratados con precaución en las determinaciones inmunológicas y en la interpretación de sus resultados.

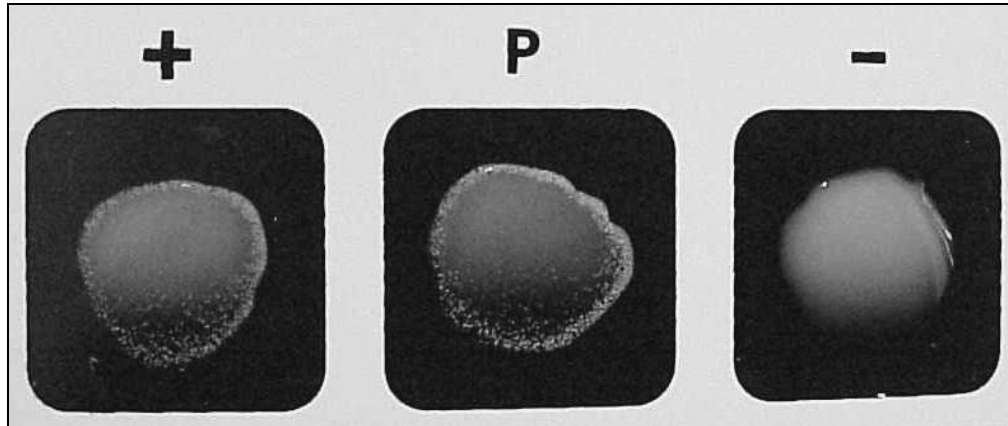


Figura 10.3: Prueba de aglutinación con látex para la determinación de factor reumatoide. El suero del paciente (P) presenta una aglutinación positiva, al igual que la muestra control (izquierda).

Referencias

- Arguedas, O., Porrás, O. y Fasth, A. (1995) Juvenile chronic arthritis in Costa Rica: a pilot referral study. *Clin. Exp. Rheumatol.* **13**, 119.
- Bonagura, V.R., Agostino, N., Marie Børretzen, M., Thompson, K.M., Natvig, J.B. y Morrison, S.L. (1998) Mapping IgG epitopes bound by rheumatoid factors from immunized controls identifies disease-specific rheumatoid factors produced by patients with rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* **160**, 2496.
- Condemi, J.J. (1983) Autoimmune diseases. En: *Immunodiagnosis for Clinicians* (Grieco, M.H. y Meriney, D.K., Eds.), p.129. Chicago: Year Book Medical Publishers.
- Eichenfield, A.H., Athreya, B.H., Doughty, R.A. y Cebul, R.D. (1986) Utility of rheumatoid factor in the diagnosis of juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatrics* **78**, 480.
- Sack, K.E. y Fye, K.H. (1998) Enfermedades reumáticas. En: *Inmunología Básica y Clínica* (Stites, D., Terr, A.I. y Parslow, T.G., Eds.), p.547. México: Editorial Manual Moderno.
- Lawlor, G. y Fischer, T. (1981) *Manual of Allergy and Immunology: Diagnosis and Therapy*, p.269. Boston: Little, Brown and Company.
- Shmerling, R.H. y Delbanco, T.L. (1992) How useful is the rheumatoid factor? *Arch. Intern. Med.* **152**, 2417.
- Stites, D.P., Stobo, J.D. y Wells, J.V. (1988) *Inmunología Básica y Clínica*, p. 360. México: Editorial Manual Moderno.
- van Venrooij, W. (2002) The use of autoantibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin. Lab. International* **26**, 6.

- Visser, H., Gelinck, L.B., Kampfraath, A.H., Breedveld, F.C. y Hazes, J.M. (1996) Diagnostic and prognostic characteristics of the enzyme linked immunosorbent rheumatoid factor assays in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **55**, 157.
- Williams, R.C., Malone, C.C. y Casali, P. (1992) Heteroclitic polyclonal and monoclonal anti-Gm(a) and anti-Gm(g) human rheumatoid factors react with epitopes induced in Gm(a-), Gm(g-) IgG by interaction with antigen or by nonspecific aggregation. A possible mechanism for the *in vivo* generation of rheumatoid factors. *J. Immunol.* **149**, 1817.
- Winchester, R. (1976) Tests for detection of the rheumatoid factors. En: *Manual of Clinical Immunology* (Rose, N. y Friedman, H., Eds.), p.665. Washington: American Society for Microbiology.

Capítulo 11

Determinación de anticuerpos contra proteínas y péptidos citrulinados

Introducción

La artritis reumatoide (AR) es la enfermedad articular más frecuente, con una prevalencia mundial estimada en 0,5-1% (Dejaco *et al.*, 2006). La prueba serológica de apoyo diagnóstico más tradicional para esta enfermedad ha sido la determinación del factor reumatoide (Capítulo 10), la cual adolece de una baja especificidad diagnóstica. A pesar de que el factor reumatoide puede ser encontrado hasta en el 80% de los pacientes que sufren AR, es conocido que otras enfermedades autoinmunes, y aún hasta un 5-30% de personas sanas de edad avanzada, pueden presentar este marcador serológico. Algunos otros autoanticuerpos que se encuentran en los pacientes con AR poseen menor sensibilidad diagnóstica, pero mayor especificidad para detectar esta enfermedad. Entre estos autoanticuerpos están el denominado "factor perinuclear" y los anticuerpos anti-queratina. Al estudiar la especificidad molecular de estos autoanticuerpos, se encontró que reconocen una proteína producida en las etapas avanzadas de la diferenciación de las células epiteliales durante la keratinización, llamada **filagrina** (Kuhn *et al.*, 2006).

Durante el procesamiento de la filagrina, algunos de sus residuos de arginina son deaminados por enzimas de la familia de las peptidilarginina deaminasas (PADs), que los convierten de esta manera en residuos de citrulina (Fig.11.1). El suero de los pacientes con AR posee frecuentemente anticuerpos que reconocen regiones citrulinadas de la filagrina, así como de al menos dos proteínas más que presentan este tipo de modificación post-traducciona, como lo son la **fibrina** y la **vimentina** citrulinadas. Interesantemente, existe evidencia de que los autoanticuerpos que reconocen proteínas citrulinadas no solo tienen un interés diagnóstico, sino que pueden jugar un papel patogénico en modelos de artritis reumatoide experimentales (Kuhn *et al.*, 2006), a diferencia del factor reumatoide.

Las primeras pruebas serológicas dirigidas a detectar anticuerpos contra filagrina citrulinada utilizaron esta proteína, obtenida en forma recombinante y posteriormente modificada *in vitro*. Sin embargo, algunas de las limitaciones de esta estrategia fueron la dificultad en obtener un contenido reproducible de citrulina en este antígeno, afectando la estandarización de la prueba. Sumado a esto, se demostró que en los sueros de pacientes con AR y aún en individuos sanos, pueden hallarse autoanticuerpos contra la filagrina no citrulinada, que podían conducir a resultados falsamente positivos. Un adelanto importante en el desarrollo de estas pruebas sobrevino al introducirse el uso de un péptido sintético citrulinado, derivado de la filagrina. Esto simplificó la detección de los anticuerpos contra proteínas citrulinadas y mejoró sustancialmente la estandarización, en comparación con el uso de la proteína completa. Mediante la ciclización del péptido, se encontró que el epitopo que contiene citrulina queda óptimamente expuesto, llevando a una mejor sensibilidad de la técnica. Los primeros estudios basados en el uso de un péptido cíclico citrulinado (CCP) describieron una sensibilidad diagnóstica de 68% con una especificidad para AR de 97-98%

(Pruijn *et al.*, 2005). Mediante técnicas de tamizaje realizadas sobre bibliotecas especiales de péptidos citrulinados se introdujo el uso de nuevas generaciones de CCP que han permitido elevar la sensibilidad diagnóstica para AR hasta 80% (similar a la que provee la determinación del factor reumatoide), con una especificidad del 98%. Un conjunto de estudios apoyan la conclusión de que la detección de anticuerpos contra CCP provee un mejor apoyo diagnóstico para distinguir la artritis reumatoide de otras enfermedades.

Adicionalmente, se ha encontrado que la detección de anti-CCP, cuya presencia en individuos sanos es menor del 1%, es un marcador temprano para el desarrollo de AR. El seguimiento de un grupo de individuos que presentaron la prueba positiva, en ausencia de manifestaciones clínicas, mostró que posteriormente una proporción desarrolló la enfermedad. Esta utilidad pronóstica es sumamente valiosa, dado que le posibilita al clínico apoyar sus decisiones terapéuticas en la implementación de un control farmacológico temprano de esta enfermedad, antes de que se presenten lesiones erosivas avanzadas en las articulaciones.

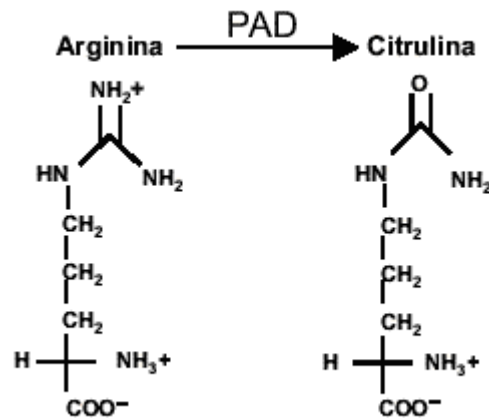


Figura 11.1: La conversión de un residuo de arginina en citrulina es catalizada por enzimas de la familia de las peptidilarginina deiminadas (PADs). Estas enzimas poseen polimorfismos genéticos que podrían tener alguna influencia en la predisposición para generar proteínas citrulinadas en distintos individuos, las cuales podrían inducir la respuesta autoinmune causante de artritis reumatoide.

Las técnicas para la determinación de anti-CCP se basan principalmente en ensayos inmunoenzimáticos. El CCP se une a una fase sólida, usualmente en formato de placas de ELISA, en las que se adiciona el suero en estudio. La presencia de anticuerpos contra el CCP es evidenciada mediante un conjugado anti-IgG humana/enzima y sustrato. A continuación se describe un método comercial (QUANTA Lite[®] CCP3 ELISA) para esta determinación.

Procedimiento

Determinación de anticuerpos contra péptido cíclico citrulinado (CCP).

1. Diluir las muestras de suero en estudio 1:100 (ej. 5 μ l en 495 μ l del diluyente provisto en el estuche de reactivos). Pipetear 100 μ l de esta dilución en pocillos, por duplicado.
2. Pipetear 100 μ l de los sueros control positivo, positivo débil y negativo, por duplicado.
3. Incubar por 30 min a temperatura ambiente y lavar 3 veces con la solución de lavados.
4. Agregar 100 μ l del conjugado anti-IgG-peroxidasa a cada hoyo e incubar por 30 min.
5. Lavar 3 veces y posteriormente agregar 100 μ l del sustrato (TMB) por 30 min a temperatura ambiente, en oscuridad.
6. Detener la reacción con 100 μ l de la solución correspondiente del juego de reactivos, y leer las absorbancias finales a 450 nm. Si se dispone de un lector bicromático, usar 620 nm como longitud de onda de referencia.
7. Los resultados deben cumplir los siguientes requisitos para tener validez: (a) el control positivo debe ser mayor al positivo débil, y este a su vez mayor que el control negativo; (b) la lectura del control positivo fuerte debe ser $\geq 1,0$; (c) la lectura del control negativo debe ser $\leq 0,2$; la lectura del positivo débil debe ser al menos el doble que la del control negativo.
8. Para estimar el valor de las muestras, se divide su absorbancia promedio entre la del promedio del control positivo débil, y se multiplica por el valor asignado por el fabricante a este último, en Unidades. Un valor de ≤ 20 U se considera negativo. El ámbito de positividad débil va de 20 a 39 U, positividad moderada de 40 a 59 U, y positividad fuerte ≥ 60 U.

Nota: también puede utilizarse un conjunto de sueros estándar precalibrados para construir una curva de referencia, en la cual se interpolan las lecturas de las muestras para obtener las respectivas unidades de anti-CCP.

Referencias

- Dejaco, C., Klotz, W., Larcher, H., Duftner, C., Schirmer, M. y Herold, M. (2006) Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **8**, R119 (doi:10.1186/ar2008).
- Kuhn, K.A., Kulik, L., Tomokaa, B., Braschler, K.J., Arend, W.P., Robinson, W.H. y Holers, V.M. (2006) Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J. Clin. Invest.* **116**, 961-973.
- Pruijn, G.J.M., Vossenaar, E.R., Drijfhout, J.W., van Venrooij, W.J. y Zendman, A.J.W. (2005) Anti-CCP antibody detection facilitates early diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rev.* **1**, 1-7.

Capítulo 12

Determinación de anticuerpos antinucleares mediante inmunofluorescencia

Introducción

Muchas de las enfermedades causadas por la desregulación de los mecanismos de autotolerancia, y el consiguiente daño autoinmune a células, tejidos u órganos, cursan con la aparición de anticuerpos contra diversos antígenos nucleares. Estos autoanticuerpos pueden estar dirigidos contra varias formas del ADN (por ejemplo de banda simple o de banda doble), nucleoproteínas, y otros componentes del núcleo celular. La detección de estos autoanticuerpos es útil para el diagnóstico y seguimiento de dichas enfermedades, en especial el lupus eritematoso sistémico (Cuadro 12.1).

Históricamente, la primera prueba utilizada para evaluar la presencia de los anticuerpos antinucleares, fue la visualización de las **células LE** (siglas de lupus eritematoso), leucocitos polimorfonucleares neutrófilos que contienen un núcleo celular fagocitado. Esta prueba, descrita desde 1948, fue posteriormente reemplazada por métodos más sensibles, como la inmunofluorescencia indirecta y los ensayos inmunoenzimáticos.

Cuadro 12.1: Ejemplos de enfermedades autoinmunes que presentan frecuentemente anticuerpos antinucleares.

Lupus eritematoso sistémico
Síndrome de Sjögren
Esclerodermia
Polimiositis/Dermatomiositis
Enfermedad mixta del tejido conectivo

La inmunofluorescencia indirecta es una de las técnicas de laboratorio más utilizadas para la detección de anticuerpos antinucleares. En ella, se incuban diferentes diluciones del suero en estudio sobre portaobjetos que poseen el sustrato o preparación de antígeno. Este puede consistir en un corte histológico de hígado o de riñón, el cual se permeabiliza y se conserva en congelación. También son muy utilizadas las células que se han cultivado sobre laminillas de vidrio (por ejemplo la línea HEP-2, un epiteloma humano). Sobre estos sustratos tisulares o celulares, se incuba el suero en estudio, para permitir la unión de los posibles autoanticuerpos a los antígenos presentes en el núcleo. Después de lavar el material no unido, los autoanticuerpos son detectados mediante la adición de un conjugado anti-inmunoglobulina humana marcado con un fluorocromo. La preparación es finalmente observada bajo el microscopio de fluorescencia, en donde la presencia del conjugado se

evidencia como un brillo verde claro, cuando se utiliza el isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Fig.12.1). Al igual que otros métodos de inmunofluorescencia indirecta, esta técnica permite no solo detectar los anticuerpos antinucleares, sino también titularlos (mediante diluciones seriadas) y clasificarlos según sus diversos patrones de reconocimiento.

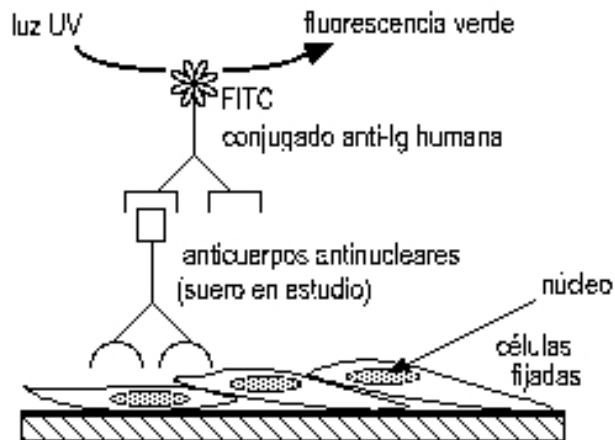


Figura 12.1: Técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos antinucleares.

Clásicamente se definen cinco patrones de reactividad antinuclear (Fig.12.2): **(a)** patrón homogéneo o difuso; **(b)** patrón periférico o anular; **(c)** patrón nucleolar; **(d)** patrón moteado; y **(e)** patrón centromérico. Algunos patrones tienden a asociarse con enfermedades particulares, aunque las correlaciones no son muy altas. Por ejemplo, un patrón nucleolar puro, de alto título ($>1:1000$), se asocia fuertemente con un diagnóstico de escleroderma (Condemi, 1983). Una limitación en estas asociaciones entre patrones y enfermedades, es el hallazgo de patrones mixtos, en donde al titular el suero se diluye una de las especificidades antes que otra, cambiando el patrón. El patrón de fluorescencia homogéneo parece estar dado por anticuerpos anti-histonas, y puede hallarse en muchas enfermedades autoinmunes. El patrón periférico se halla mayormente en el lupus eritematoso y probablemente corresponde a anticuerpos contra el ADN. El patrón moteado se da en muchas enfermedades autoinmunes, sin mayor prevalencia en alguna en particular.

Es fundamental que cada laboratorio establezca sus valores normales de anticuerpos antinucleares (ANA, *anti-nuclear antibodies*), utilizando un número adecuado de sueros de individuos normales de distintas edades, y su sustrato, método, materiales y microscopio de fluorescencia particulares. En la interpretación de los resultados es importante tomar en consideración la edad del paciente, dado que se puede hallar títulos bajos en un cierto porcentaje ($\sim 20\%$) de individuos sanos, mayores de 65 años. En la población joven se describe $<4\%$ de positividad para anticuerpos antinucleares, en individuos sanos.

Luego de una determinación positiva de anticuerpos antinucleares en el suero de un paciente en estudio, el siguiente paso es identificar la especificidad de los anticuerpos involucrados, utilizando varios antígenos nucleares, que incluyen ADN de cadena simple,

ADN de cadena doble, antígeno Sm, RNP (ribonucleoproteínas), SSA, SSB, y otros. Las técnicas inmunológicas empleadas en su determinación son variadas, incluyendo la doble inmunodifusión en gel, la contrainmunolectroforesis, técnicas de hemaglutinación pasiva, inmunofluorescencia indirecta, métodos radioinmunes y distintos ELISAs. Estos últimos han tenido mayor aceptación por su versatilidad y sensibilidad.

Cuadro 12.2: Descripción de los patrones de reconocimiento de los anticuerpos antinucleares en inmunofluorescencia.

Homogéneo	Fluorescencia uniforme y homogénea en todo el interior del núcleo de la célula en interfase. Fluorescencia intensa en las células en mitosis.
Periférico	Marcaje en la periferia del núcleo, de mayor intensidad en el perímetro interior, y marcaje homogéneo más leve en el resto del núcleo.
Moteado	Marcaje fluorescente en forma de granulado grueso. Los nucleolos no están marcados. Los gránulos pueden tener tamaños y formas diversas dependiendo del antígeno reconocido.
Nucleolar	El marcaje nucleolar puede ser uniforme (a menudo acompañado de un débil marcaje homogéneo en el resto del núcleo) o moteado.
Centromérico	Punteado discreto en las células en interfase (46 puntos o múltiples). Los puntos se alinean con los cromosomas en las células en metafase.

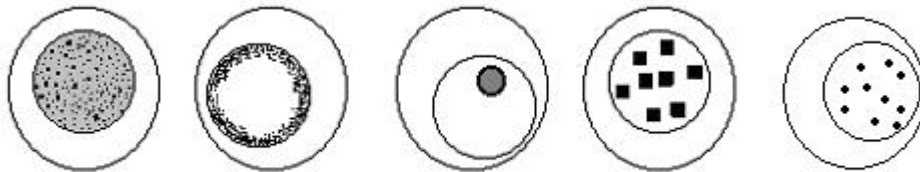


Figura 12.2: Representación esquemática de los patrones de reconocimiento de los anticuerpos antinucleares en inmunofluorescencia. De izquierda a derecha: patrón homogéneo, patrón periférico, patrón nucleolar, patrón moteado, y patrón centromérico.

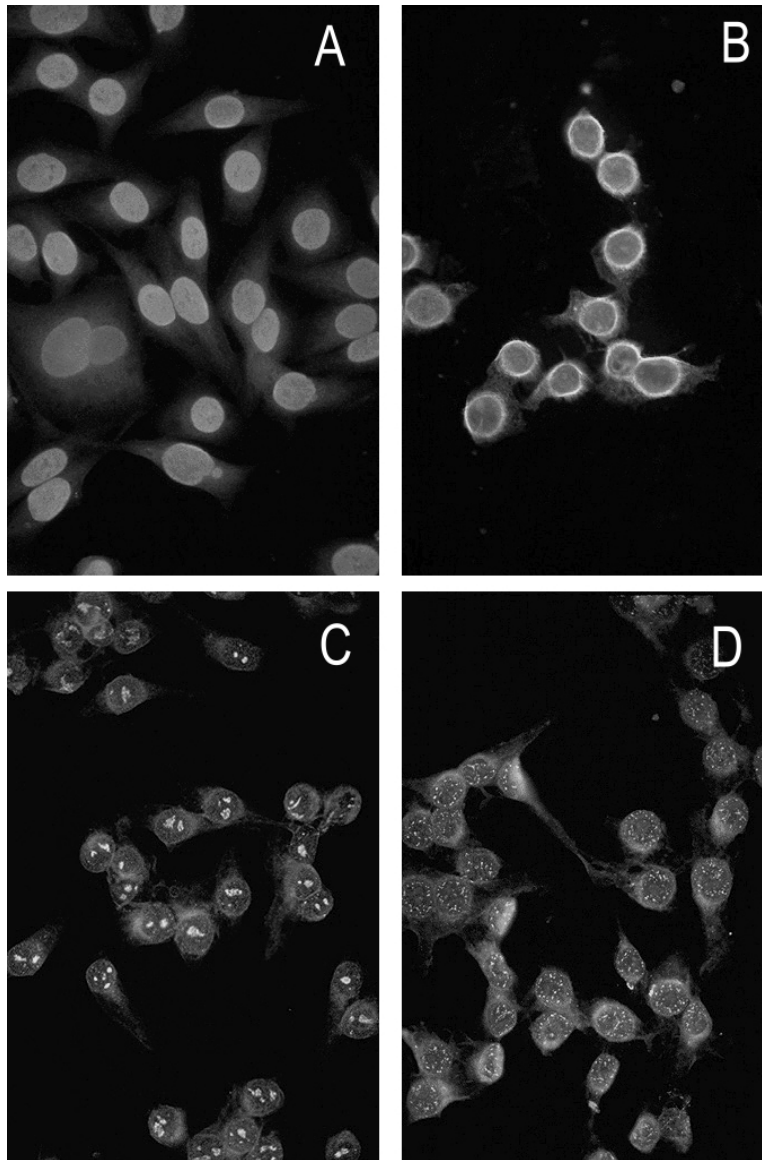


Figura 12.3: Patrones de inmunofluorescencia en la determinación de anticuerpos antinucleares. (A) patrón difuso; (B) patrón periférico; (C) patrón nucleolar; (D) patrón moteado.

Procedimiento

Detección de anticuerpos antinucleares (ANA) por inmunofluorescencia indirecta.

1. Utilizar como sustrato cortes de hígado y de riñón de rata, de 2 μm de grosor, preparados en criostato, o células obtenidas de cultivos (ej. HEp-2). Montar en portaobjetos, fijar con una mezcla de 50% acetona y 50% metanol, a temperatura ambiente, por 2 min. Enjuagar

luego con PBS, y conservar en congelación a -70°C .

- 2.Preparar diluciones seriadas (dobles) del suero en estudio, en PBS, comenzando con 1:10.
- 3.Colocar cada dilución del suero en estudio sobre el sustrato o antígeno, en el portaobjetos. Incluir sueros control (positivo y negativo). Incubar a 37°C por 30 min en cámara húmeda.
- 4.Lavar 2 veces (10 min c/u) en PBS para eliminar las proteínas no unidas.
- 5.Agregar el conjugado anti-inmunoglobulina humana/fluoresceína, en su dilución óptima de trabajo. Incubar igual que en el paso 3.
- 6.Lavar 2 veces, igual que en el paso 4.
- 7.Leer en el microscopio de fluorescencia, observando si hay color verde brillante en los núcleos del sustrato. Determinar la dilución máxima que presenta fluorescencia en los núcleos, así como el tipo de patrón presente (Fig.11.3). Los títulos de 1:20 o mayores tienen significado para orientar el diagnóstico de enfermedades autoinmunes. Usualmente los pacientes con enfermedad activa muestran títulos mucho mayores.

Determinación inmunocitoquímica de anticuerpos antinucleares

Una alternativa a la determinación de anticuerpos anti-nucleares por inmunofluorescencia se basa en el revelado inmunoenzimático con sustrato precipitable, lo cual permite realizar la lectura con un microscopio simple de luz. Algunas casas comerciales proveen portaobjetos con células fijadas, listas para la prueba, utilizando el mismo principio de la inmunofluorescencia, pero sustituyendo el conjugado fluorescente por uno marcado con enzima (ej. peroxidasa). Los distintos patrones finales se observan bajo microscopía de luz, con una sensibilidad física comparable a la obtenida con los fluorocromos. Las células utilizadas como sustrato de la prueba pueden ser incluso manipuladas para que sobre-expresen algunos de los autoantígenos de interés, por ejemplo el SSA/Ro, como lo realiza el fabricante ImmunoConcepts para su juego de reactivos ANA-Ro HEp-2 COLORZYME[®]. La Fig. 12.4 muestra algunos patrones de anticuerpos antinucleares obtenidos por este método.

Referencias

- Chapel, H. y Haeney, M. (1993) *Essentials of Clinical Immunology*, p.167. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Condemi, J.J. (1983) Autoimmune diseases. En: *Immunodiagnosis for clinicians* (Grieco, M.H. y Meriney, D.K., Eds.), p.113. Chicago: Year Book Medical Publishers.
- Gardner, G.C. (1999) Laboratory testing in the rheumatic diseases: antinuclear antibodies, 7 pp. EUA: University of Washington School of Medicine.
- Harlow, E. y Lane, D. (1988) *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Publications.

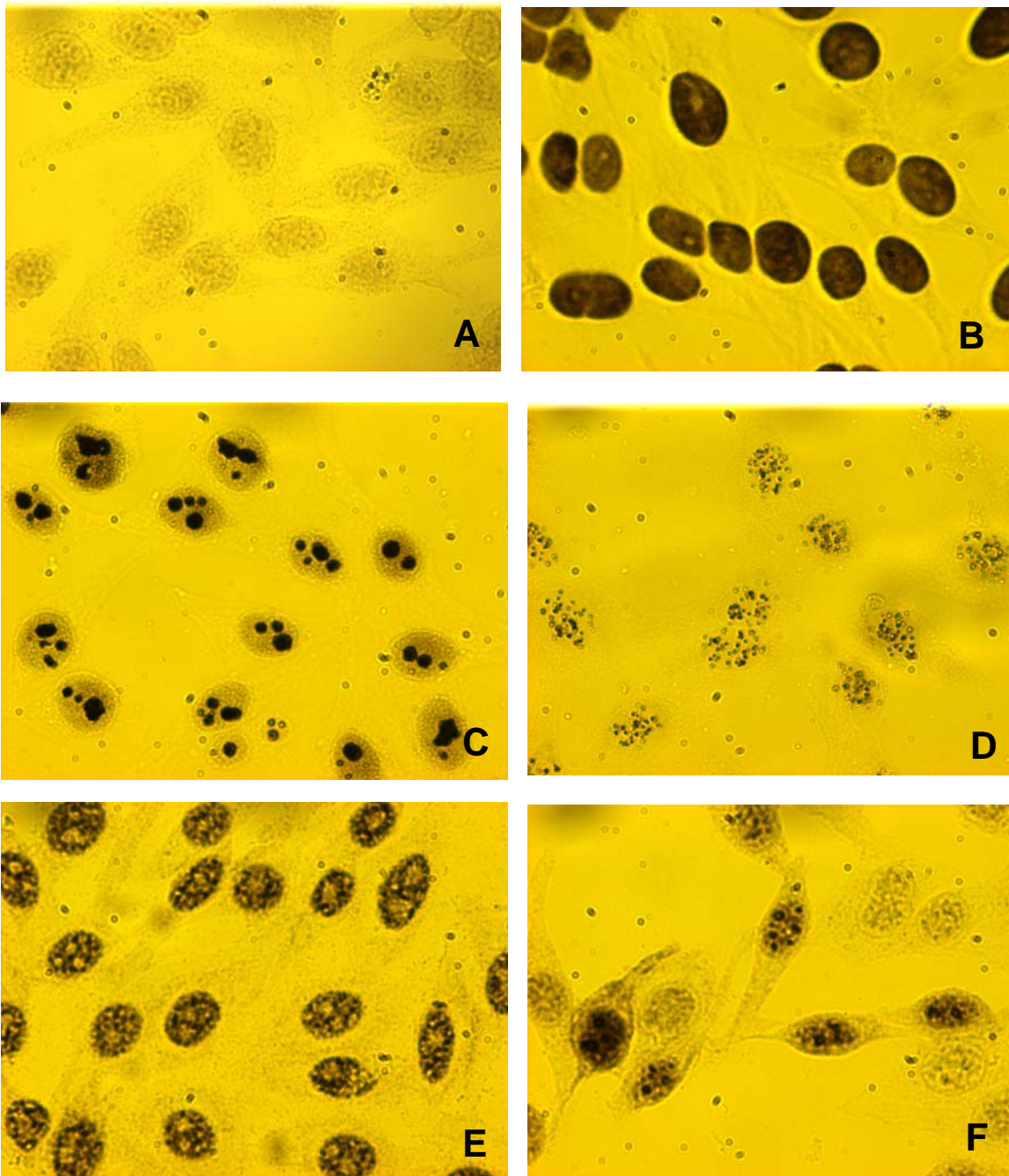


Figura 12.4: Patrones de anticuerpos antinucleares obtenidos con la técnica inmunocitoquímica COLORZYME[®], visualizados en microscopio de luz (A) control negativo; (B) patrón homogéneo; (C) patrón nucleolar; (D) patrón centromérico; (E) patrón moteado; (F) patrón SSA.

Capítulo 13

Determinación de HLA clase I mediante microlinfocitotoxicidad

Introducción

El **complejo principal de histocompatibilidad** (CPH) es denominado HLA (siglas de *human leukocyte antigens*) en el humano, y está localizado en el brazo corto del cromosoma 6. Esta región del genoma codifica para los antígenos HLA de clase I (loci A, B, y C) en la membrana de todas las células nucleadas del organismo, así como para los antígenos de clase II (locus D) en la membrana de varios tipos de células que forman parte del sistema inmune, principalmente células presentadoras de antígeno, linfocitos B y algunos linfocitos T activados. Los productos de los genes de la clase III, también incluidos en la región HLA, incluyen algunos factores del sistema de complemento (por ejemplo C2, C4, y factor B).

El complejo HLA es altamente polimórfico en la población, y es determinante para el rechazo o aceptación de un **aloinjerto** (transplante), a pesar de que esta no es su función natural. Las moléculas HLA de clase II y clase I permiten la presentación de péptidos (producto del procesamiento de antígenos) a los linfocitos T cooperadores (CD4⁺) y T citotóxicos (CD8⁺), respectivamente.

La tipificación de los antígenos HLA se realiza principalmente para fines de selección de donantes en diversos tipos de transplante. También ha tenido utilidad histórica en medicina legal (ej. establecimiento de paternidad, casos forenses, etc.), aunque las modernas técnicas basadas en marcadores de ADN han reemplazado su uso. En algunos casos, la tipificación puede realizarse para fines de apoyo diagnóstico, buscando un antígeno que posee alta asociación con una determinada enfermedad, y que por tanto es considerado como marcador de la misma. Por ejemplo, en la espondilitis anquilosante hay una alta asociación con el antígeno HLA B27. Sin embargo, estas asociaciones poseen un aporte diagnóstico muy limitado, y se realizan más bien para fines de investigación.

Los antígenos de clase I se han denominado también **serológicamente definidos**, para indicar que se determinan mediante pruebas que utilizan anticuerpos. En cambio, los antígenos clase II (locus D) se han llamado **definidos por linfocitos**, para indicar que se determinan principalmente mediante técnicas de cultivo de dichas células. Una excepción a esto son los antígenos DR y DQ de la clase II, los cuales son tipificables por serología.

Método de microlinfocitotoxicidad

Esta es la técnica más simple para la determinación de los antígenos HLA A, B y C (clase I). También ha sido conocida con el nombre de técnica de Terasaki, en honor al investigador que la desarrolló en forma de micrométodo. En ella se utilizan placas de plástico que poseen una serie de pequeños hoyos, en los que se lleva a cabo las reacciones.

En los hoyos se coloca una pequeña cantidad (1 µl) de distintos antisueros, dirigidos contra cada antígeno de las series A, B, y C, cubiertos con una gota de aceite mineral para evitar la evaporación. Dichos antisueros son obtenidos de distintas fuentes, principalmente de mujeres múltiparas que desarrollan altos títulos de anticuerpos contra los antígenos HLA (de herencia paterna) de los fetos. Las placas ya listas pueden conservarse en congelación hasta el momento de realizar la prueba. Para ello, se coloca un número de linfocitos en cada hoyo con antisuero y, luego de una incubación, se añade una fuente de complemento (C') fresco. Si las células poseen el antígeno reconocido por los anticuerpos presentes en el hoyo, serán lisadas por el complemento, lo cual se evidenciará posteriormente mediante la adición de azul tripán (u otro colorante supravital), que penetra en las células dañadas (Fig.13.1).

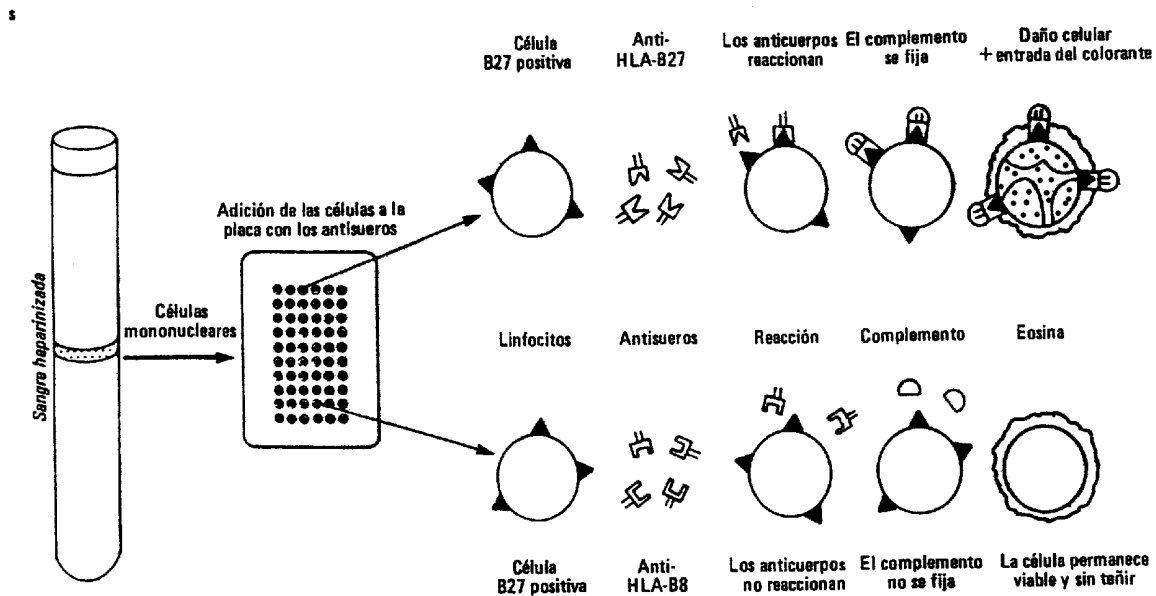


Figura 13.1: Esquemización del método de microlinfocitotoxicidad para la tipificación de antígenos HLA clase I (A, B, y C).



Figura 13.2: Microplacas tipo Terasaki para la realización de la técnica de microlinfocitotoxicidad. A la derecha se muestra una microjeringa Hamilton con aditamento para repetición.

La disponibilidad de un número cada vez mayor de anticuerpos monoclonales contra antígenos de histocompatibilidad está teniendo un importante impacto en la estandarización de las técnicas serológicas de tipificación (Middleton *et al.*, 1993). Además, las modernas técnicas de genética molecular se están imponiendo cada vez más en el terreno de la tipificación de los antígenos HLA (Savage *et al.*, 1993). En estas, se tipifican las moléculas del HLA con base en su ADN, en vez de detectar los productos proteicos expresado sobre la superficie celular.

Procedimiento

Tipificación de HLA clase I por microlinfocitotoxicidad.

1. Obtener una muestra de sangre y desfibrarla¹ con perlas de vidrio.
2. Separar los mononucleares de la muestra por el método del ficoll-diatrizoato (Capítulo 1). Después de los lavados², ajustar la suspensión a $1-2 \times 10^6$ células/ml.
3. Colocar 1 μ l de la suspensión de linfocitos en cada hoyo de la placa, por debajo del aceite. Para esto se puede utilizar una microjeringa Hamilton con un dispositivo de repetición. La placa contiene los distintos antisueros (1 μ l/hoyo). Incubar por 30 min a temperatura ambiente.
4. Agregar 5 μ l de suero fresco de conejo a cada hoyo (como fuente de complemento) e incubar por 60 min a temperatura ambiente.
5. Descartar el sobrenadante mediante un movimiento rápido y seco de la placa y agregar a cada hoyo 1 μ l de azul tripán. Leer de inmediato la reacción de cada hoyo bajo el microscopio. Las células muertas se tiñen de azul. Una reacción es positiva cuando se observa por lo menos un 75-80% de células muertas en el hoyo. La citotoxicidad basal en los diversos hoyos control debe ser inferior al 10%.
6. Se debe incluir todos los controles posibles, incluyendo:
 - (a) posible toxicidad del complemento solo: células + C' sin antisuero; debe ser negativa.
 - (b) actividad del complemento: antisuero + células conocidas + C'; debe ser capaz de lisar.
 - (c) controles de células conocidas: deben dar el resultado esperado. Pueden utilizarse alícuotas de células criopreservadas en nitrógeno líquido.

¹ se prefiere desfibrar la sangre para eliminar las plaquetas, las cuales pueden interferir en la determinación, ya que poseen antígenos HLA (remanentes del estadio de megacariocito).

² es fundamental que la viabilidad final de las células purificadas sea alta, para que la citotoxicidad basal de la prueba sea lo más baja posible.

Referencias

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pober, J.S. (2002) *Inmunología Celular y Molecular*, 577 pp. Madrid: McGraw Hill Interamericana.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J. y Osborne, B.A. (2000) *Kuby Immunology*, 670 pp. New York: W.H. Freeman.
- González, L. (1994) ¿Qué es eso de la histocompatibilidad? *Rev. Cost. Cienc. Méd.* **15**, 57.
- Mackintosh, P. (1977) HLA typing. En: *Techniques in Clinical Immunology* (Thompson, R.A., Ed.), p.157. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Middleton, D., Bodmer, J., Heyes, J. y Marsh, S. (1993) HLA typing reagents: alloantisera and monoclonal antibodies. En: *Histocompatibility Testing: a practical approach* (Dyer, P. y Middleton, D., Eds.), p.13. Oxford: IRL Press.
- Savage, D., Baxter, L.A., Gorsky, J. y Middleton, D. (1993) Molecular Methods. En: *Histocompatibility Testing: a practical approach* (Dyer, P. y Middleton, D., Eds.), p.107. Oxford: IRL Press.
- Schwartz, B.D. (1987) Complejo principal de histocompatibilidad HLA humano. En: *Inmunología Basica y Clínica* (Stites, D.P., Stobo, J.D. y Wells, J.V., Eds.), p.46. México: Editorial Manual Moderno.
- Terasaki, P.I. y McClelland, J.D. (1964) Microdroplet assay of human cytotoxins. *Nature* **204**, 998.

Capítulo 14

Determinación de anticuerpos heterófilos de la mononucleosis infecciosa

Introducción

En la naturaleza existe una gran variedad de antígenos que, aunque provienen de diversas fuentes, dan reacciones cruzadas entre sí por semejanza estructural. Entre ellos se encuentran los llamados antígenos **heterófilos**. Muchos de estos son polisacáridos simples. En 1911, Forssman demostró su existencia, al hallar que los extractos de varios tejidos del cobayo, inducían una respuesta de anticuerpos en conejos, capaz de lisar eritrocitos de carnero en presencia de complemento. Este "antígeno de Forssman" ha sido encontrado en tejidos de muchos otros animales, así como en ciertas bacterias y hongos, y en eritrocitos de carnero y humanos (grupos sanguíneos A y AB). Otros ejemplos de antígenos heterófilos son los carbohidratos del grupo sanguíneo A, que dan reacción cruzada con el polisacárido capsular neumocócico tipo XIV, y los de grupo B, con antígenos de *Escherichia coli*.

Los anticuerpos que se producen contra dichos polisacáridos reciben el nombre de **anticuerpos heterófilos**, y por lo general son de tipo IgM. Se han encontrado en el suero de individuos normales (anticuerpos de Forssman) y en pacientes que sufren algunas enfermedades, tales como la **enfermedad del suero** (una reacción de hipersensibilidad tipo III, mediada por complejos inmunes), la **mononucleosis infecciosa**, y otras. Estos anticuerpos aglutinan los eritrocitos de carnero, y para diferenciar los cuadros que los originan se realizan absorciones con diferentes antígenos (Cuadro 14.1) en la técnica prueba tradicionalmente conocida como prueba de Paul-Bunnell-Davidsohn.

Cuadro 14.1: Diferenciación de anticuerpos heterófilos mediante absorciones.

Entidad	Aglutinación de eritrocitos de carnero después de la absorción con:		
	Ninguna	Riñón de cobayo	Eritrocitos buey
Anticuerpos de Forssman	(+)	(-)	(+)
Enfermedad del suero	(+)	(-)	(-)
Mononucleosis infecciosa	(+)	(+)	(-)

La mononucleosis infecciosa es una enfermedad de distribución mundial, causada por el virus de Epstein-Barr (EBV), un herpesvirus, el cual infecta linfocitos B humanos a través del receptor para el fragmento C3d del complemento (CR2 o CD21). Esta enfermedad se presenta como un trastorno linfoproliferativo agudo y, por lo general, autolimitado y benigno. Su máxima frecuencia se da en adolescentes y adultos jóvenes, en los países desarrollados. En algunos países subdesarrollados se describe que a la edad de 3 años el 99% de los niños ya han sido infectados por EBV, subclínicamente (Chapel y Haeney, 1993). La enfermedad se manifiesta clínicamente por fiebre, linfadenopatía, esplenomegalia, y linfocitosis absoluta, con presencia de linfocitos atípicos ($CD8^+$) en sangre. Se producen anticuerpos séricos contra distintos antígenos del virus EB, así como anticuerpos heterófilos. El origen de estos últimos, aunque es poco comprendido, podría ser debido a la capacidad del virus para activar policlonalmente a los linfocitos B. Independientemente de las razones por las cuales aparecen estos anticuerpos heterófilos, su presencia es un indicador útil para apoyo diagnóstico, a través de una simple técnica de aglutinación activa de eritrocitos equinos (Fig.14.1).

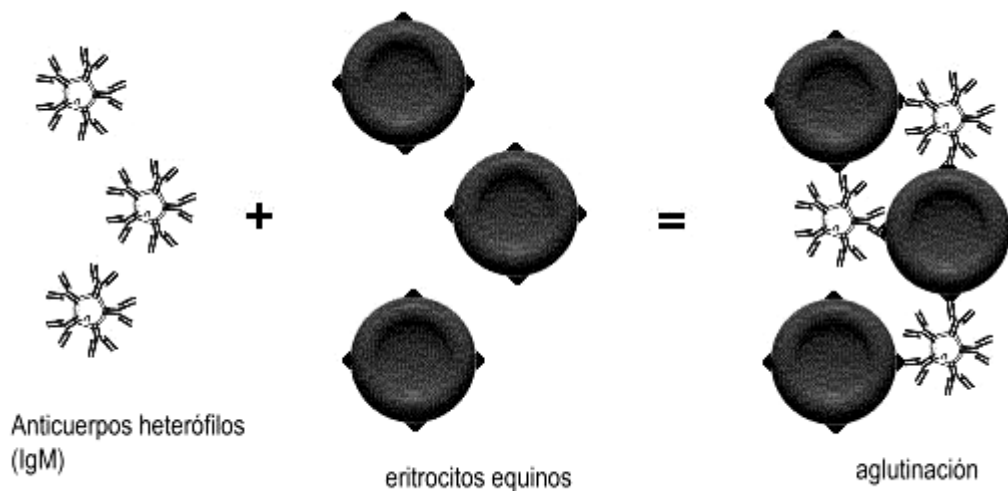


Figura 14.1: Aglutinación directa de eritrocitos equinos para la detección de anticuerpos heterófilos de la mononucleosis infecciosa.

El título de anticuerpos heterófilos de la mononucleosis infecciosa se eleva en la primera semana de la enfermedad, alcanza un máximo a las dos semanas y permanece alto por aproximadamente 6 semanas. Sin embargo, puede haber casos en que dichos anticuerpos aparezcan tardíamente en la enfermedad. El retraso en la aparición de los anticuerpos se asocia con convalecencias prolongadas (Gross, 1983). Posteriormente, una vez resuelto el cuadro clínico, pueden persistir títulos bajos durante meses o incluso años. Los anticuerpos heterófilos (IgM) se encuentran en 80-90% de los pacientes que padecen esta enfermedad, aunque también es posible encontrarlos, en menor grado, en ciertos tipos de leucemias, linfoma de Burkitt (que está fuertemente asociado a la infección por EBV), hepatitis viral, enfermedad de Hodgkin, lupus eritematoso sistémico, y otras condiciones.

Métodos de detección de anticuerpos heterófilos

En 1932, Paul y Bunnell describieron que el suero de pacientes con mononucleosis infecciosa aglutinaba fuertemente a los eritrocitos de carnero. En 1936, Beer mostró que dichos sueros también aglutinaban los eritrocitos de otras especies, como los equinos. Un año después, Davidsohn perfeccionó la prueba de Paul-Bunnell, incluyendo un paso de absorción para eliminar los anticuerpos heterófilos encontrados en pacientes con enfermedad del suero, y en individuos normales que presentaban "anticuerpos de Forssman" (Cuadro 14.1).

En la actualidad, la detección de anticuerpos heterófilos emplea una prueba más específica y rápida, que utiliza eritrocitos de caballo estabilizados, sin requerir técnicas de absorción. Esta prueba de aglutinación directa (Fig.14.1) detecta los anticuerpos de la mononucleosis infecciosa, pero no a los anticuerpos hallados en la enfermedad del suero, o en individuos normales (con anticuerpos de Forssman). También existen en el mercado reactivos basados en técnicas de inmunocromatografía (Fig.14.2) para la detección de los anticuerpos heterófilos.



Figura 14.2: Detección de anticuerpos heterófilos de la mononucleosis infecciosa mediante inmunocromatografía. El dispositivo posee una franja (T) donde se acopló un extracto de eritrocitos equinos. Al colocar una gota de suero en el hoyo de la derecha, este difunde por el soporte y los posibles anticuerpos IgM son retenidos por el antígeno (en T). Un conjugado anti-IgM marcado con partículas de oro coloidal es arrastrado simultáneamente por la muestra, y concentrado sobre la región "T" cuando la muestra es positiva (arriba), dando un color rojizo. La línea "C" posee anticuerpos que capturan al anti-IgM marcado, lo cual permite asegurar que la muestra pasó sobre la zona de prueba (T).

Además de las pruebas para la detección de anticuerpos heterófilos, existen pruebas que detectan anticuerpos contra antígenos propios del virus, ya sea mediante inmunofluorescencia, ELISA, técnicas radioinmunes, neutralización viral, inmunocromatografía, u otros métodos. También es posible la detección de distintos antígenos virales, aunque la presencia de estos no establece necesariamente el diagnóstico de infección reciente, ya que el virus puede hallarse hasta años después del cuadro agudo de la enfermedad en muestras de garganta y en linfocitos circulantes (Fig.14.3).

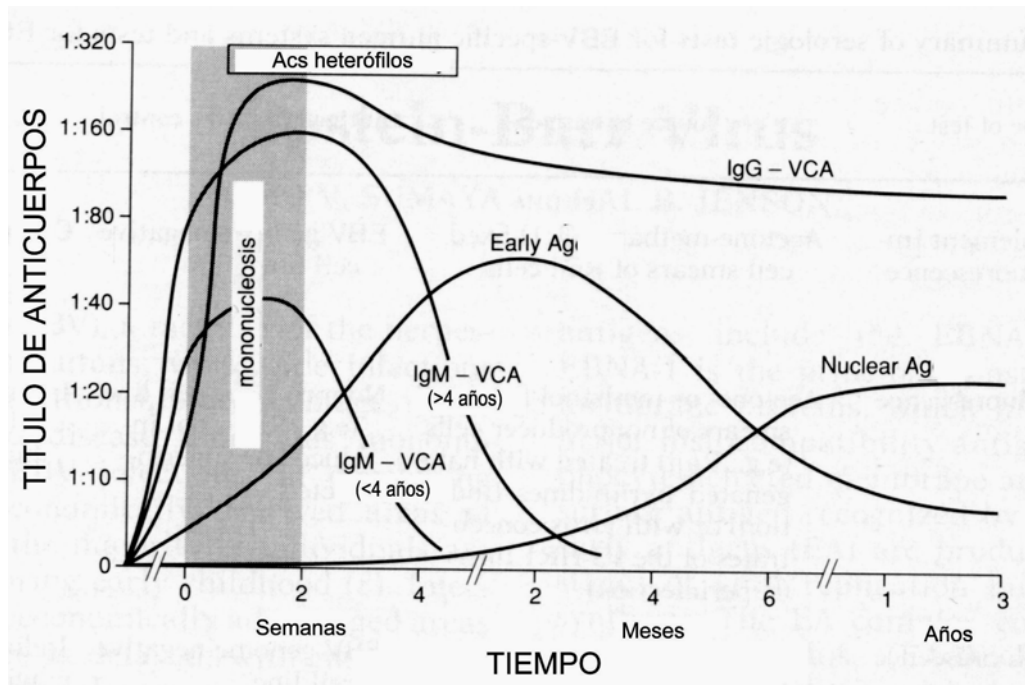


Figura 14.3: Evolución de los anticuerpos contra el virus Epstein-Barr, anticuerpos heterófilos y antigenemias en la mononucleosis infecciosa. VCA: antígeno de la cápside viral. Adaptado de Sumaya y Jenson (1992).

Procedimiento

Detección de anticuerpos heterófilos mediante aglutinación.

El reactivo utilizado (ej. Mono-test[®]) consiste en una suspensión de eritrocitos equinos estabilizados, los cuales aglutinan en presencia de los anticuerpos heterófilos de la mononucleosis infecciosa. Una aglutinación positiva indica exposición al agente viral, reciente o pasada. El título de anticuerpos no guarda relación con la gravedad de la enfermedad. Una seroconversión significativa sugiere una infección reciente. Como se mencionó, existe la posibilidad de encontrar títulos residuales de estos anticuerpos hasta meses o años después de la infección. Esta prueba presenta menos de un 1% de falsos positivos. Excepcionalmente se puede encontrar pacientes con títulos altos de anticuerpos debidos a la enfermedad del suero (especialmente cuando la seroterapia heteróloga ha sido con proteínas equinas), quienes podrían dar resultados falsos positivos. Los anticuerpos heterófilos de la mononucleosis infecciosa han sido descritos ocasionalmente en otras enfermedades como leucemias, linfoma de Burkitt, artritis reumatoide, hepatitis viral, e incluso en personas aparentemente sanas.

1. Obtener una muestra de suero, preferiblemente en ayuno. Puede guardarse por 24 hr en refrigeración o congelarse para plazos mayores.
2. Colocar una gota (50 μ l) del suero en una lámina de aglutinación. Correr sueros control

(positivo y negativo) con cada lote de muestras.

3. Agregar una gota de la suspensión de eritrocitos equinos, previamente homogenizada y a temperatura ambiente, a cada muestra. Mezclar con un aplicador en un área de unos 2 cm de diámetro, rotar durante 2 min y leer por aglutinación.

4. Si se desea determinar el título de anticuerpos en la muestra, probar diluciones dobles en forma igual.

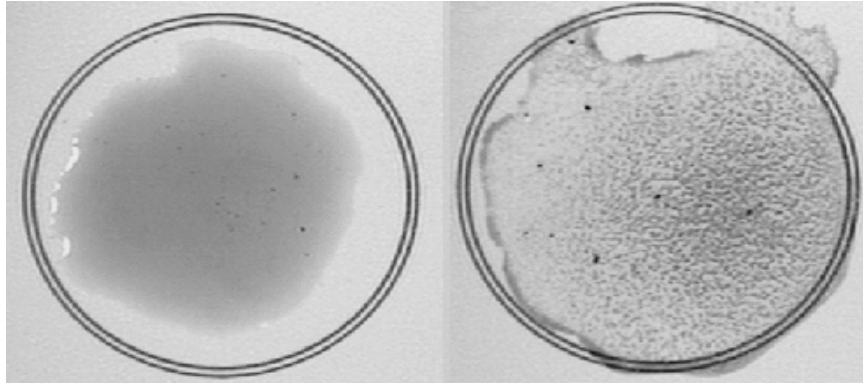


Figura 14.4: Resultados de una prueba de aglutinación de eritrocitos equinos (Mono-test®) para la detección de anticuerpos heterófilos de la mononucleosis infecciosa. A la izquierda se muestra una aglutinación negativa, mientras la muestra a la derecha es positiva.

Referencias

- Andiman, W.A. y Miller G. (1976) Epstein-Barr Virus. En: *Manual of Clinical Immunology* (Rose, N.R. y Friedman. H., Eds.), p.428. Washington: American Society for Microbiology.
- Boza, R. (1986) Mononucleosis infecciosa crónica: a propósito del primer caso publicado en Costa Rica. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* **7**, 87-91.
- Chapel, H. y Haeney, M. (1993) *Essentials of Clinical Immunology*, p.37. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Folleto instructivo del producto "Mono-Test". Wampole Laboratories, Crambury, E.U.A.
- Gross, P.A. (1983) Infectious diseases: viral, chlamydial, mycoplasmal, and rickettsial immunology. En: *Immunodiagnosis for Clinicians* (Grieco, M.H. y Meriney, D.K., Eds.), p.273. Chicago: Year Book Medical Publishers.
- Paul, J.R. y Bunnell, W. (1932) The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Am. J. Med. Sci.* **183**, 90.
- Sumaya, C.V. y Jenson, H.B. (1992) Epstein-Barr virus. En: *Manual of Clinical Laboratory Immunology* (Rose, N.R., Conway, E., Fahey, J.L., Friedman, H., y Penn, G.M., Eds.), p.568. Washington: American Society for Microbiology.
- Wells, J.V., Isbister, J.P. y Ries, C.A. (1987) Enfermedades hematológicas. En: *Inmunología Básica y Clínica* (Stites, D.P., Stobo, J. y Wells, J.V., Eds.), p.403. México: Editorial Manual Moderno.

Capítulo 15

Determinación de anti-estreptolisina "O"

Introducción

Los estreptococos β -hemolíticos se dividen en varios serogrupos, de los cuales algunos son capaces de ocasionar importantes infecciones. La mayoría de estas son de tipo supurativo e involucran estreptococos del grupo A. Entre las infecciones que pueden causar se incluyen faringitis, impétigo, fiebre escarlatina, erisipela, osteomielitis, pericarditis, sinusitis, endocarditis y meningitis. Algunas complicaciones o secuelas post-estreptocócicas frecuentes son la fiebre reumática y la glomerulonefritis aguda.

Además de las técnicas microbiológicas para aislar a estas bacterias, las técnicas serológicas contribuyen a determinar su presencia, ya sea directamente (mediante la detección de antígenos específicos), o indirectamente (mediante la detección de sus correspondientes anticuerpos). En las complicaciones post-estreptocócicas, que pueden presentarse hasta 10-20 días después de una infección aguda, y donde las posibilidades de aislamiento bacteriano son reducidas, la serología es útil para establecer antecedentes de una infección reciente por estreptococos.

Por lo general, la respuesta de anticuerpos contra antígenos de estreptococos se eleva en pocos días, y alcanza un pico 2-3 semanas después de la infección inicial (Fig.15.1). Las pruebas serológicas evalúan la presencia de anticuerpos contra uno o más antígenos de la bacteria, tanto celulares como secretados, como se resume en el Cuadro 15.1.

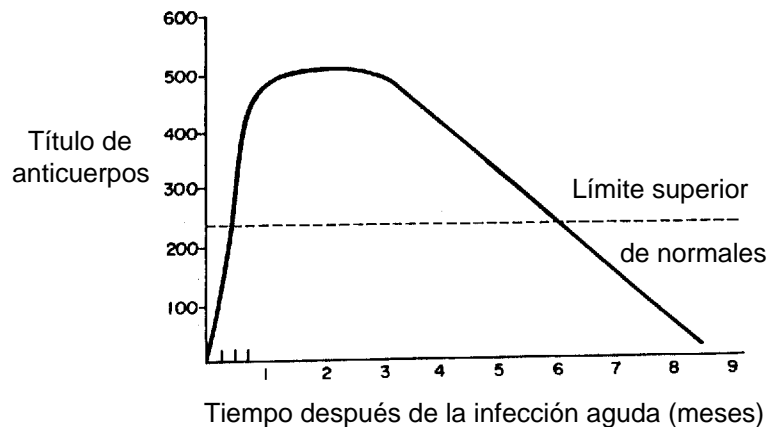


Figura 15.1: Patrón general de la respuesta de anticuerpos contra antígenos extracelulares de estreptococos grupo A.

Uno de los primeros métodos utilizados para determinar anticuerpos anti-estreptocócicos fue la prueba de anti-estreptolisina O (ASO), introducida por Todd. Esta

determina la presencia de anticuerpos séricos contra una exotoxina del estreptococo, la estreptolisina "O". Esta toxina es una potente hemolisina, lábil al oxígeno e inmunogénica (a diferencia de la estreptolisina "S", que es estable al oxígeno y no es inmunogénica).

Existen también muchas otras técnicas para la detección de anticuerpos contra estreptococos, por ejemplo la determinación de anti-ADNasas (isoenzimas A, B, C y D), o ELISAs para la detección de anticuerpos contra polisacáridos estreptocócicos específicos de grupo. Otra útil alternativa es la prueba "Streptozyme®", una hemaglutinación en la cual se recubren los eritrocitos con 5 diferentes antígenos de la bacteria (estreptolisina O, hialuronidasa estreptokinasa, ADNasa y adenina dinucleótido glicohidrolasa).

Cuadro 15.1: Pruebas serológicas para determinar anticuerpos contra antígenos de estreptococos grupo A

Antígenos	Prueba**
Extracelulares	
estreptolisina O	ASO
estreptokinasa	ASK
hialuronidasa	ASH
ADNasa B	Anti-DNAase B
ADNasa	Anti-DNAase
todos los anteriores	Streptozyme
Intracelulares	
proteína M tipo-específico	type-specific (M)
polisacárido grupo-específico	anti-A-CHO

* Ayoub y Harden (1992)

** siglas en inglés.

Fundamento de la prueba de anti-estreptolisina O (ASO)

La técnica de ASO es una prueba de neutralización de la actividad hemolítica de la estreptolisina O, debida a los correspondientes anticuerpos en el suero del paciente en estudio. El método consiste en mezclar una cantidad constante de toxina con cantidades variables del suero, y luego probar si la toxina ha sido neutralizada, agregando eritrocitos. A mayor cantidad de anticuerpos en el suero, mayor será la dilución en la cual la toxina es neutralizada. Al igual que en otras pruebas serológicas para agentes infecciosos, la presencia de los anticuerpos no necesariamente indica infección activa, sino estrictamente demuestra exposición. Sin embargo, una elevación significativa del título de anticuerpos (**seroconversión**) en muestras espaciadas por 1-2 semanas, o un único título pero muy elevado, son sugestivos de infección reciente. Por otro lado, una prueba negativa sugiere descartar la posibilidad de infección por estreptococos.

Existe una modificación de esta técnica, en la cual se utiliza una cantidad constante de suero frente a cantidades crecientes de toxina, que están impregnadas en una fila de hoyos de plástico (ej. ASO-quantum®). En este caso, se observa cuál es la cantidad máxima de toxina

que el suero puede neutralizar, y los datos son finalmente convertidos a las unidades Todd del método convencional, mediante una tabla de equivalencias.

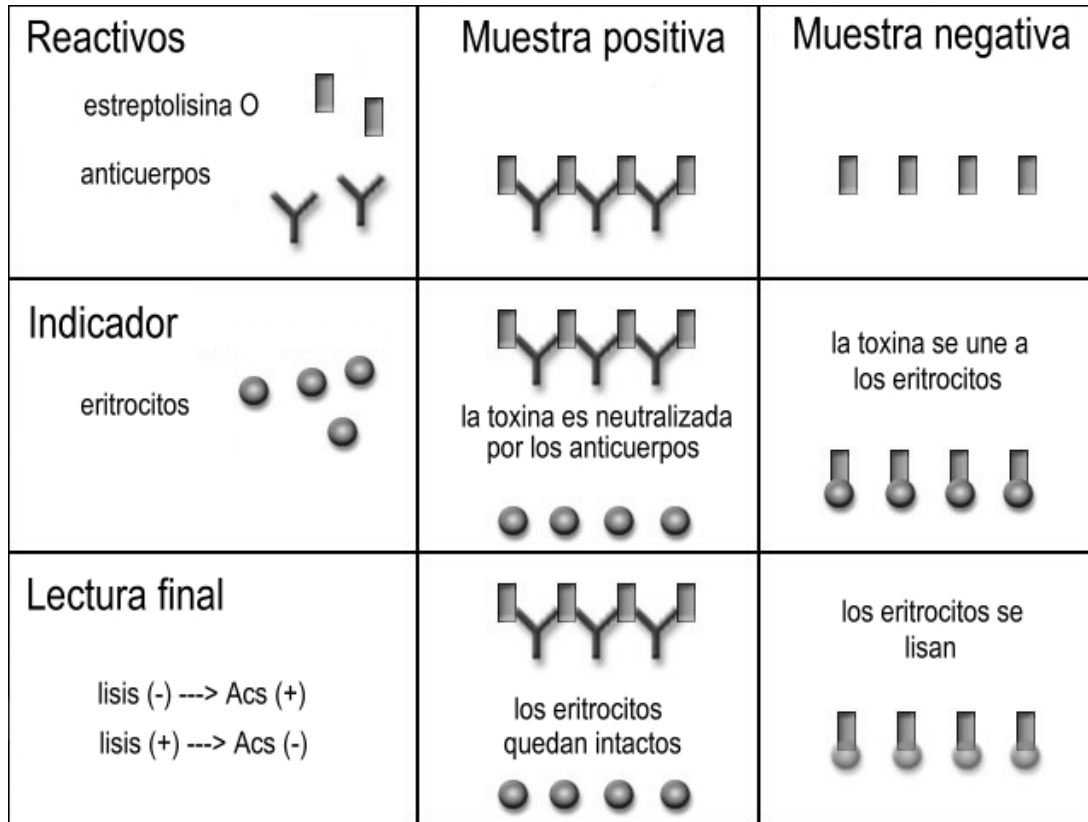


Figura 15.2: Fundamento de la prueba de anti-estreptolisina O.

Procedimiento

1. Lavar 3 veces eritrocitos humanos grupo O con PBS (también puede utilizarse eritrocitos de conejo). Resuspender 0,5 ml de eritrocitos empacados en un tubo con 9,5 ml del amortiguador¹, para obtener una suspensión aproximadamente al 5%.

2. Obtener una muestra de suero e inactivarlo a 56°C por 30 min. El suero puede conservarse hasta 1 día en refrigeración. Correr una alícuota de un suero control con cada grupo de muestras.

3. Preparar las siguientes diluciones del suero, con el amortiguador de trabajo:

¹ muchos fabricantes de reactivos comerciales para ASO incluyen un amortiguador concentrado para preparar las diluciones y para reconstituir la toxina; alternativamente, puede utilizarse PBS (pH 7,2) como sustituto.

dilución 1:10 = 0,5 ml suero + 4,5 ml amortiguador
 dilución 1:100 = 1,0 ml anterior + 9,0 ml amortiguador
 dilución 1:500 = 2,0 ml anterior + 8,0 ml amortiguador

4.Reconstituir la toxina reducida y liofilizada apenas antes de usarla, con el amortiguador, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.Para cada muestra, preparar una serie de tubos según el siguiente cuadro:

Dilución del suero	1:10		1:100					1:500					controles	
Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	(-)	(+)
ml dilución	0,8	0,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	-	-
ml amortig.	0,2	0,8	-	0,2	0,4	0,6	0,7	-	0,2	0,4	0,6	0,8	1,5	1,0
ml toxina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5
U Todd	12	50	100	125	166	250	333	500	625	833	1250	2500	-	-

6.Mezclar suavemente e incubar a 37°C por 15 min para que ocurra la neutralización (si hay anticuerpos en la muestra).

7.Agregar 0,5 ml de la suspensión de eritrocitos a cada tubo, mezclar suavemente e incubar a 37°C por 45 min, resuspendiendo cada 15 min.

8.Centrifugar los tubos por 5 min a 800 xg y observar cuál es el último tubo (máxima dilución) en el cual no hay **ningún grado de hemólisis**. Este se toma como punto final de la prueba, la cual se puede expresar como título, o como unidades Todd (tienen el mismo valor numérico).

Observaciones adicionales

El tubo control de eritrocitos (control negativo) debe tener un sobrenadante completamente claro y el tubo control de la toxina (control positivo) debe quedar lisado, para que la prueba sea técnicamente válida. Además, la muestra control debe resultar dentro de los límites del valor esperado. Se considera una seroconversión significativa cuando el aumento del título es de más de 2 diluciones, aún en títulos bajos. Los títulos elevados (>250 U Todd) o las seroconversiones significativas, sugieren una infección reciente. En algunas enfermedades hepáticas, el aumento de ciertas β -lipoproteínas que inhiben la toxina puede causar resultados falsamente positivos. En pacientes con trastornos hepáticos se debe verificar los resultados con otras pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti-estreptocócicos.

Referencias

- Estreptolisina "O", Manual de Productos Bioxon, p.82, Bioxon de México, S.A.
- Facklam, R. R. (1974) Streptococci. En: *Manual of Clinical Microbiology* (Lenette, E.H., Spaulding, E.H. y Truant, J. P., Eds.), p.96. Washington: American Society for Microbiology.
- Ayoub, E.M. y Harden, E. (1992) Immune response to streptococcal antigens: diagnostic methods. En: *Manual of Clinical Laboratory Immunology* (Rose, N.R., Conway, E., Fahey, J.L., Friedman, H., y Penn, G.M., Eds.), p.427. Washington: American Society for Microbiology.
- Robbins, S.L. (1974) *Patología Estructural y Funcional*, p.360. México: Editorial Interamericana.

Capítulo 16

Prueba del VDRL

Introducción

La prueba denominada VDRL recibe su nombre de las siglas del *Venereal Diseases Research Laboratory*, institución que la desarrolló alrededor de 1946. Es una de las pruebas serológicas que ayudan al diagnóstico de **sífilis** o **enfermedad de Lues**, causada por la espiroqueta *Treponema pallidum*. Por su bajo costo, simpleza y rapidez, es utilizada como primer tamizaje serológico para la detección de esta infección, seguida de pruebas confirmatorias, como la inmunofluorescencia indirecta para anticuerpos anti-treponémicos (ej. FTA-ABS, *fluorescent treponemal antibodies absorption test*), u otras.

La infección por treponemas patógenos al humano como el *T. pallidum*, induce la producción de anticuerpos anti-treponémicos, que reconocen tanto a dicha bacteria como a cepas estrechamente relacionadas. Además, durante el desarrollo de la infección se produce otro tipo de anticuerpos, que van dirigidos contra componentes normales del hospedero, tales como la **cardiolipina**, un fosfolípido abundante en membranas (por ejemplo la membrana mitocondrial). Se ha propuesto que la destrucción tisular durante la infección treponémica hace que se produzcan este tipo de autoanticuerpos. La serología tradicional denominó originalmente como "reaginas" a los anticuerpos contra la cardiolipina. Interesantemente, durante algunos años no se tuvo claro si estas "reaginas" eran o no anticuerpos. Por otro lado, este nombre causó confusión por la costumbre de llamar también "reaginas" a los anticuerpos IgE que se encuentran elevados en los trastornos alérgicos. En la actualidad, el uso de este término ha sido prácticamente abandonado.

La prueba de VDRL detecta anticuerpos contra la cardiolipina (por tanto, anticuerpos no-treponémicos) en el suero o en el líquido cefalorraquídeo del paciente en estudio, mediante una aglutinación pasiva de microcristales (también llamada **microfloculación**). La presencia de estos anticuerpos correlaciona bastante bien con la infección por *Treponema*. Sin embargo, la sífilis no es el único proceso patológico que puede llevar a la aparición de anticuerpos anti-cardiolipina. Aún así, la prueba tiene gran utilidad como tamizaje inicial, especialmente para el análisis de gran número de muestras, a un bajo costo. Las muestras positivas deben evaluarse por métodos de mayor especificidad diagnóstica, en los que se busca anticuerpos contra componentes del agente infeccioso (anticuerpos treponémicos). Existe una amplia gama de técnicas para este propósito. Además, es importante tener en cuenta los aspectos clínicos, y también las técnicas bacteriológicas, en el diagnóstico. En las fases iniciales de la enfermedad es posible observar microscópicamente las espiroquetas obtenidas de las lesiones mucocutáneas.

Fundamento del método

El antígeno empleado en la técnica de VDRL es la cardiolipina y el método cumple la

definición de una microaglutinación pasiva, aunque también se ha clasificado como una microfloculación, por el pequeño tamaño y aspecto de los grumos. Se utiliza una solución alcohólica que contiene cardiolipina (0,03%), colesterol (0,9%) y lecitina (0,2%). Esta es la "solución madre" de antígeno, que se obtiene comercialmente. Con ella se prepara una suspensión de trabajo, estable durante un día, en la cual, al pasar los componentes desde la solución alcohólica hacia un medio acuoso, forman cristales de colesterol recubiertos con el antígeno. Por tanto, el colesterol actúa como medio de soporte para evidenciar la microaglutinación. La función de la lecitina (fosfatidilcolina) es la de estabilizar los microcristales.

La formación de los microcristales es afectada por varios factores, por lo que el método se ha estandarizado minuciosamente, y es importante seguirlo al pie de la letra para obtener resultados reproducibles día a día, intra- e inter-laboratorios. Los problemas durante la preparación de la suspensión de antígeno se describen como una de las causas más importantes de resultados erróneos.

Procedimiento

I.Preparación de la suspensión de trabajo (antígeno).

1.La solución madre de antígeno y el amortiguador deben estar a temperatura ambiente. Colocar 0,4 ml del amortiguador en una botella de fondo plano de 30 ml. Verificar que el amortiguador quede esparcido por todo el fondo del frasco, formando una película. El frasco debe tener un tapón de vidrio esmerilado, para poder ser utilizado en la última fase de la preparación del antígeno.

2.Agregar 0,5 ml del antígeno madre, de la siguiente manera: llenar la mitad inferior de una pipeta de vidrio de 1 ml y colocarla en la boca del frasco, sin tocar las paredes, hasta 1/3 de la altura del frasco. Luego, dejar caer gota a gota la solución, agitando en forma de círculos, en un tiempo total de 6 seg. La agitación no debe ser tan fuerte como para que la solución salpique la pipeta. La velocidad apropiada de la rotación es aproximadamente de 3 círculos/seg con un diámetro de 5 cm.

3.Soplar la última gota de antígeno y continuar la rotación de la botella por 10 seg adicionales.

4.Agregar 4,1 ml del amortiguador con una pipeta de vidrio de 5 ml.

5.Tapar la botella y agitar verticalmente (dirección fondo-tapa), aproximadamente 30 veces en 10 seg.

6.Probar la suspensión preparada con un grupo de sueros control (un suero positivo titulado, un suero positivo débil y un suero negativo¹). Si los resultados son apropiados, usar la

¹ otra manera en que se acostumbra denominar a los sueros en esta prueba es: reactivo, reactivo débil y no-reactivo.

suspensión para analizar las muestras desconocidas. Descartar la suspensión de trabajo al final del día.

II.Preparación de las muestras y sueros control

Obtener suero fresco e inactivarlo a 56°C por 30 min. Esto inactiva el complemento, el cual puede interferir en la reacción. Si el suero ha permanecido más de 4 hr desde que se inactivó, hay que re-inactivarlo.

Para los sueros control, se prepara una mezcla de algunos sueros positivos y negativos, respectivamente. Se envasan en pequeñas alícuotas que se pueden conservar a -20°C, para utilizarse una en cada día de trabajo, al momento de probar el antígeno preparado.

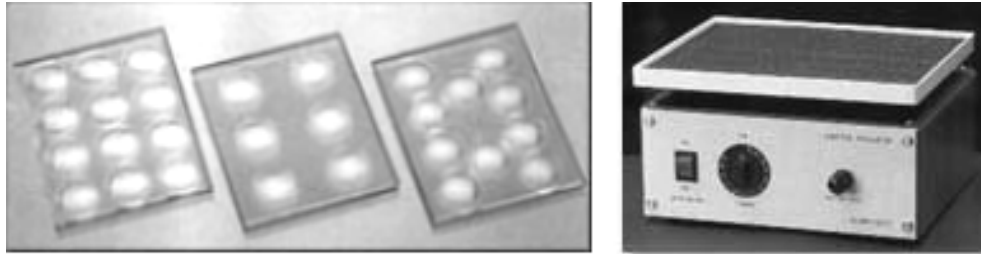


Figura 16.1: Ejemplos de láminas de vidrio con distintas disposiciones de anillos parafinados, para la realización de la prueba de VDRL (izquierda). A la derecha se muestra un agitador rotativo, cuya velocidad se ajusta a 180 rpm para esta prueba.

III.Prueba cualitativa

La prueba de VDRL se realiza en láminas planas de vidrio, con anillos de parafina o de cerámica de 14 mm de diámetro (Fig.16.1). No se recomiendan las láminas con concavidades o con anillos de vidrio.

- 1.Colocar 50 μ l del suero (inactivado)² en un anillo.
- 2.Agregar 17 μ l de la suspensión de antígeno (homogenizada).
- 3.Colocar la lámina sobre el rotador (Fig.16.1) durante 4 min. La velocidad debe ser de 180 rpm, con un diámetro de círculo de 1,9 cm.

² en la descripción original del método se recomienda medir los volúmenes de muestra y reactivos utilizando agujas pre-calibradas, que al gotear, entregan el volumen requerido. Esta descripción es clásica y ha perdurado a lo largo de los años; sin embargo, actualmente existen excelentes instrumentos para el manejo de volúmenes en microlitros (μ l), y comercialmente se ofrecen micropipetas para VDRL. El procedimiento se describirá con los volúmenes en μ l; el método clásico que emplea agujas con bisel recortado se describe al final (ver adelante).

4. Colocar de inmediato la lámina en el microscopio, bajo el objetivo de 10x y leer. La formación de grumos de los microcristales indica una aglutinación positiva (Fig.16.2). La presencia de grumos pequeños, junto con cristales sin aglutinar, se considera como positivo débil (reactivo débil). Los microcristales sueltos y dispersos homogéneamente indican un resultado negativo (no-reactivo).

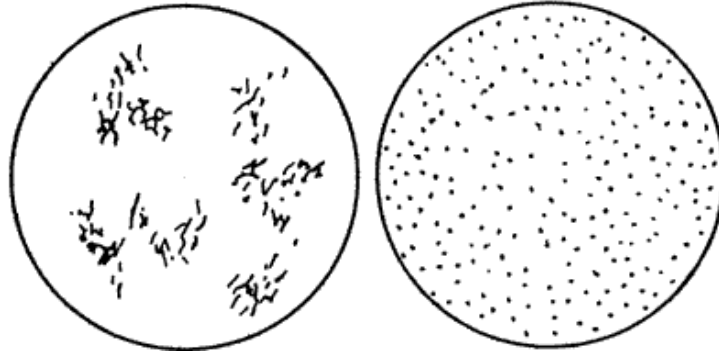


Figura 16.2: Representación esquemática de la lectura en el VDRL (izquierda: positivo; derecha: negativo).

IV. Prueba cuantitativa

La finalidad de la prueba cuantitativa es estimar un título de anticuerpos anticardiolipina en las muestras de suero. Ocasionalmente, sueros con un título muy alto de anticuerpos anti-cardiolipina pueden inducir un fenómeno de pre-zona y aparecer como positivos débiles (reactivos débiles). Afortunadamente, no es usual que den una reacción completamente negativa por fenómeno de pre-zona. Por tanto, los sueros positivos y positivos débiles se titulan, probando diluciones desde 1:1 (sin diluir) hasta 1:32.

1. Preparar una dilución 1:8 de cada muestra a titular (0,1 + 0,7 ml salina).
2. Colocar 0,04 ml, 0,02 ml y 0,01 ml de la dilución 1:8 en los anillos 4, 5 y 6 de una lámina (Fig.15.3). Colocar los mismos volúmenes de suero sin diluir, en los anillos 1, 2 y 3.
3. Colocar 0,02 ml de salina en los anillos 2 y 5. Colocar 0,03 ml de salina en los anillos 3 y 6.
4. Mezclar suavemente por rotación manual. Agregar luego 13 µl de la suspensión de antígeno y proseguir la prueba igual que en la prueba cualitativa (4 min de rotación y lectura microscópica). Tomar como título la última dilución francamente positiva.
5. Si aún la dilución de 1:32 resultara positiva, preparar una dilución 1:64 tomando 0,1 ml del suero 1:8 y agregándolo a 0,7 ml de salina. Montar en forma similar a la descrita, tres diluciones más (1:64, 1:128 y 1:256).

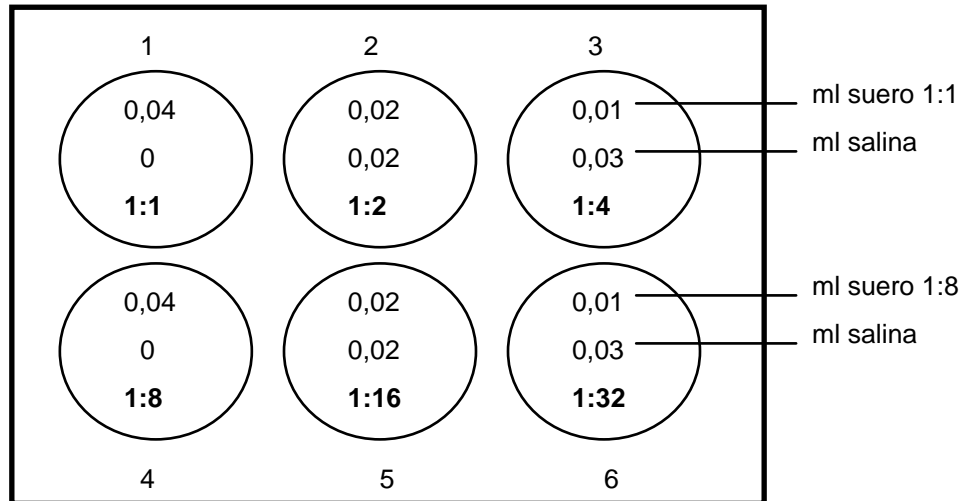


Figura 16.3: Colocación de las diluciones para una prueba de VDRL cuantitativa.

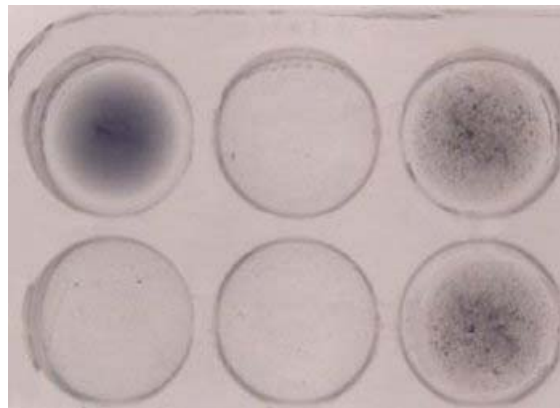


Figura 16.4: Imagen de una prueba de VDRL a simple vista (no bajo el microscopio). Aunque las reacciones fuertemente positivas son a menudo evidenciables al ojo desnudo, es fundamental siempre realizar la lectura bajo el microscopio, por el pequeño tamaño de los grumos de microcristales, que podrían pasar desapercibidos.

Interpretación de la prueba de VDRL

A diferencia del examen directo por microscopía de campo oscuro, que es una evidencia inequívoca de sífilis (excepto en muestras bucales), los exámenes serológicos requieren de una cautelosa interpretación. En primer lugar, los resultados serológicos deben integrarse a una evaluación clínica y epidemiológica del paciente. Utilizando solo el criterio serológico se puede cometer errores, ya que algunos pacientes con la enfermedad pueden tener serología negativa, y personas sin la enfermedad pueden tener serología positiva.

Todas las muestras positivas en VDRL deben ser analizadas complementariamente por una prueba confirmatoria, basada en la detección de anticuerpos treponémicos.

Entre las muchas condiciones que se han encontrado como posibles causantes de positividad en VDRL, sin tratarse de sífilis, están:

(a).Condiciones agudas: infecciones por bacterias, plasmodios, virus (ej. mononucleosis infecciosa), protozoarios; vacunaciones; embarazo. El título de VDRL observado es por lo general menor de 1:8, y tiende a desaparecer con el tiempo.

(b).Condiciones crónicas: tienden a ser más problemáticas, al permanecer la positividad durante largos períodos. Varias enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso, artritis reumatoide, tiroiditis autoinmune, síndromes antifosfolípidos), estados de regeneración tisular, drogas antihipertensivas, estupefacientes (heroína), lepra, pueden inducir a estados de seropositividad en VDRL.

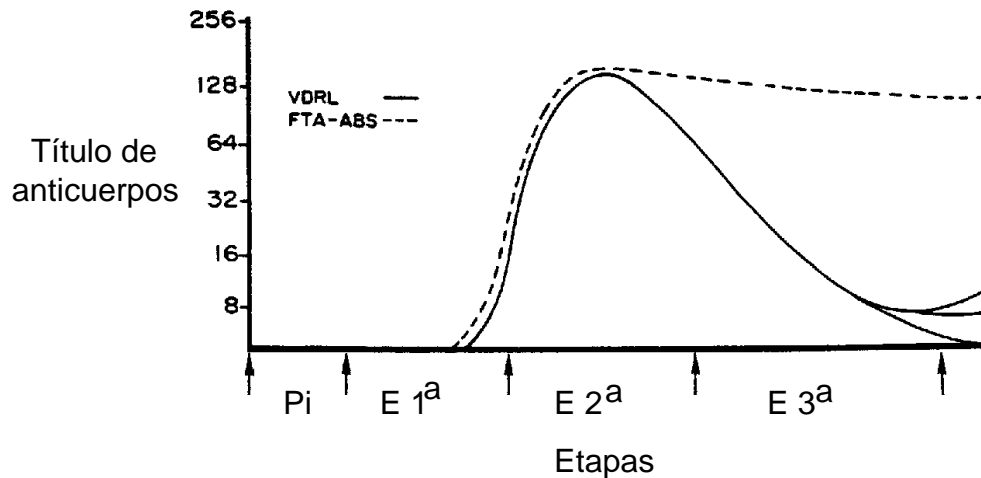


Figura 15.5: Curso natural de la sífilis no tratada y su relación con los hallazgos serológicos. El período de incubación (Pi) puede variar de 10 hasta 90 días (promedio 20 días), y no muestra ningún tipo de serología positiva. En la etapa primaria (E1ª), que dura 2-4 semanas, aparece la lesión mucocutánea indolora denominada chancro. En este período es de utilidad la observación del material de la lesión por microscopía de campo oscuro, y la presencia de ganglios regionales inflamados (linfadenopatías). La lesión se cura espontáneamente, y se pasa a la etapa secundaria (E2ª), que se prolonga por 4-6 semanas. En esta etapa, virtualmente 100% de los pacientes presentan serología positiva por VDRL, que alcanza su máximo título (~1:64-1:256). En la etapa terciaria o latente de la enfermedad (E3ª), que abarca períodos de años, los títulos de VDRL desaparecen en un tercio de los pacientes (no tratados), se mantienen presentes en bajo título en otro tercio, y pueden permanecer elevados en el tercio restante. Los anticuerpos anti-treponémicos (ej. FTA-ABS) permanecen por toda la vida, aún cuando se administra un tratamiento temprano adecuado (Rytel, 1983).

Los títulos en aumento en el VDRL pueden ser indicativos de una infección reciente, o de una reinfección o recaída. Los títulos en descenso pueden indicar un tratamiento adecuado del paciente en las etapas tempranas de la sífilis. Los títulos que permanecen constantes durante largos períodos indican la permanencia de los anticuerpos en individuos que han tenido un tratamiento eficaz, pero en los que perdura la seroreactividad. En la mayoría de casos, la reactividad en VDRL ocurre en las primeras 2 semanas después de la aparición de la lesión mucocutánea o chancro. Este, a su vez, aparece entre 10 y 40 días después de la infección. En la etapa secundaria de la enfermedad, la prueba de VDRL es positiva prácticamente en todos los casos, mientras que en las etapas tardías, sus resultados son más variables (en sífilis terciaria/latente la sensibilidad diagnóstica del VDRL disminuye notablemente; Fig.16.5).

Los anticuerpos IgG anti-cardiolipina son transferidos transplacentariamente, y permanecen en el neonato durante un cierto tiempo, no mayor de 3 meses. Para el diagnóstico de sífilis congénita se debe considerar el cuadro clínico completo y la serología, preferentemente utilizando técnicas treponémicas en las que se pueden determinar selectivamente los anticuerpos IgM. Una serología negativa en el neonato no excluye el diagnóstico de sífilis congénita. Un alto número de recién nacidos con infección son seronegativos, especialmente si la madre ha contraído la enfermedad tardíamente en el embarazo. En estos casos, la seronegatividad del neonato se mantiene durante las primeras 4-12 semanas, y posteriormente aparecen títulos de anticuerpos no-treponémicos en elevación.

Una técnica alternativa al VDRL en el tamizaje serológico de sífilis es la denominada **RPR** (*rapid reagin card test*), que utiliza una suspensión de partículas de carbón recubiertas con cardiolipina. El suero se mezcla con la suspensión sobre una tarjeta de plástico y se rota por 8 min, leyéndose finalmente por aglutinación. A diferencia del VDRL, el RPR no requiere la inactivación del complemento, y la lectura se realiza a simple vista. Los títulos con RPR son de 2 a 4 veces mayores en el RPR que en el VDRL. Ambos métodos muestran una concordancia de ~98,5%, y el RPR tiene una sensibilidad clínica ligeramente mayor (Ryter, 1983).

Técnicas para la detección de anticuerpos treponémicos

Algunos ejemplos de técnicas para detectar anticuerpos anti-treponémicos son:

(a).TPI: (*T. pallidum immobilization test*).

En esta técnica, se utiliza el suero en estudio para determinar si es capaz de inmovilizar a los treponemas vivos, con la ayuda del complemento. Es una técnica de referencia disponible solamente en algunos laboratorios de investigación (no es apta para uso en rutina).

(b).FTA-ABS: (*Fluorescent treponemal antibodies-absorbed*). Es un método de inmunofluorescencia indirecta, que utiliza el *T. pallidum* (cepa Nichols) liofilizado como antígeno. Los sueros en estudio son absorbidos con un extracto de treponemas no-patogénicos cultivables (cepa Reiter) para eliminar anticuerpos contra antígenos comunes del género. Es una técnica muy utilizada como método de referencia para verificar las

reacciones positivas del VDRL (y otras técnicas no-treponémicas como el RPR). Tiene la ventaja de poder realizarse con conjugados fluoresceinados anti- γ o anti- μ , para detectar anticuerpos IgG o IgM, respectivamente. La presencia de anticuerpos IgM sugiere exposición reciente al agente.

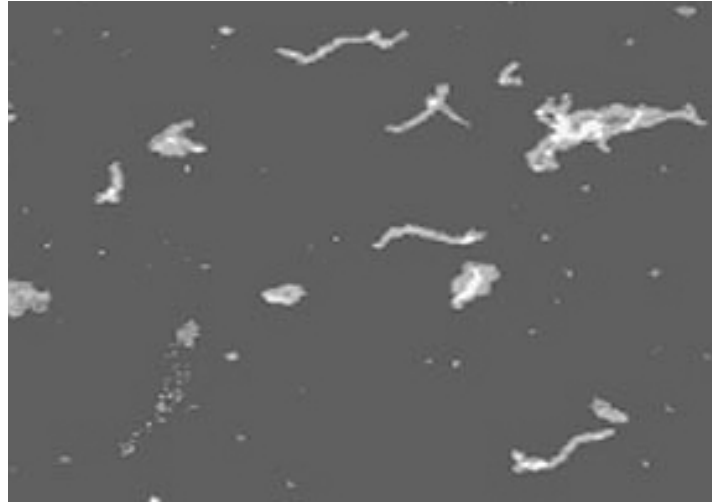


Figura 15.6: Prueba de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra *T. pallidum* (FTA-ABS). Puede observarse en color claro algunas espiroquetas alargadas fluoresciendo contra un fondo oscuro.

(c).MHA-TP: (*Microhemagglutination assay for T. pallidum*). Es una microaglutinación de eritrocitos (de carnero, pavo u otras especies) recubiertos con antígenos de un lisado de *T. pallidum* patogénicos (cepa Nichols). Los eritrocitos aglutinan pasivamente en presencia de anticuerpos anti-treponémicos (Fig.15.7). Se utilizan eritrocitos no recubiertos como parte de los controles, y también se puede absorber los anticuerpos hacia treponemas no patógenos (como en el FTA-ABS). Esta prueba, a pesar de ser muy conveniente, parece tener una sensibilidad diagnóstica ligeramente menor que el FTA-ABS (Feldman y Nikitas, 1980; Orlich *et al.*, 1980; Rytel, 1983).

Finalmente, entre las alternativas más modernas disponibles actualmente, se ofrecen varios ensayos inmunoenzimáticos que utilizan antígenos seleccionados del *T. pallidum*, que son expresados a partir de su ADN recombinante.

Consideraciones especiales

Por las implicaciones que puede poseer el resultado en estas pruebas, tanto el profesional como el personal auxiliar deben mantener su comportamiento ético, con absoluta confidencialidad, como debe ser todo el trabajo de laboratorio. Además, debe recordarse que la sífilis es una enfermedad de informe obligatorio al Ministerio de Salud.

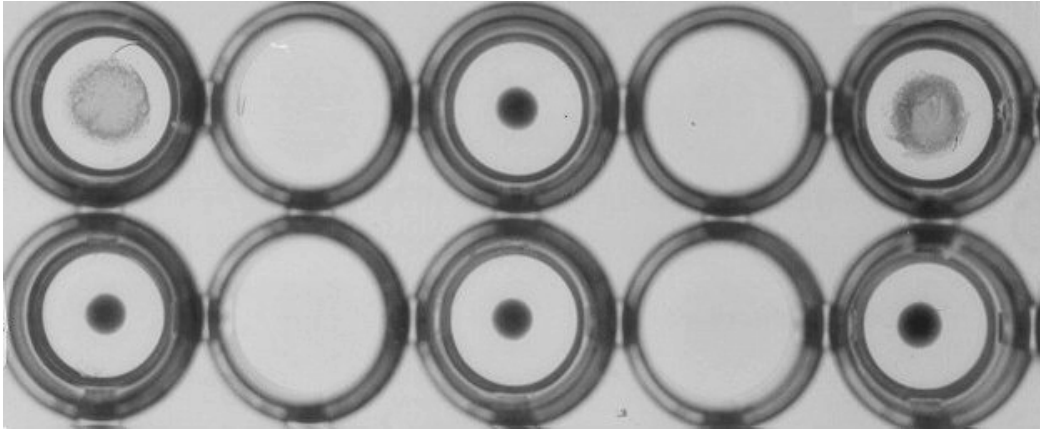


Figura 16.7: Prueba de microhemaglutinación para la detección de anticuerpos treponémicos en suero. Los eritrocitos están recubiertos con un extracto antigénico de *T. pallidum* (cepa Nichols). La técnica se realiza mediante sedimentación en pocillos con fondo en "U", en donde la formación de un botón o punto indica una aglutinación negativa, mientras un tapete amplio indica aglutinación.

Notas sobre el uso de agujas precalibradas

Si se desea utilizar la forma clásica del VDRL para la medición de volúmenes con agujas precalibradas, se recomienda lo siguiente:

(a). para la prueba cualitativa (17 μ l de antígeno) se utiliza 1 gota de aguja calibre 18, calibrada para que 1 ml de líquido entregue 60 ± 2 gotas.

(b). para la prueba cuantitativa (17 μ l de antígeno) se utiliza 1 gota de aguja calibre 19-20, calibrada para que 1 ml de líquido entregue 75 ± 2 gotas.

Referencias

- Feldman, Y. M. y Nikitas, M. A. (1980) Syphilis serology today. *Arch. Dermatol.* **116**, 84.
- Orlich, J., Mejía, B., Zamora, C. y Solano, J. R. (1980) Comparación de métodos serológicos para el diagnóstico de sífilis: una realidad costarricense. *Acta Méd. Cost.* **23**, 19.
- Rytel, M.W. (1983) Bacterial Immunology. En: *Immunodiagnosis for clinicians* (Grieco, M.H. y Meriney, D.K., Eds.), p.235. Chicago: Year Book Medical Publishers.
- Wood, R. M. (1974) Tests for syphilis. En: *Manual of Clinical Microbiology* (Lenette, E. H., Spaulding, E. H. y Truant, J. P., Eds.) p.445. Washington, American Society for Microbiology.

Capítulo 17

Determinación de hormona gonadotropina coriónica

Introducción

La gonadotropina coriónica (HGC) es una hormona producida por las células trofoblásticas del blastocisto en desarrollo, y más tarde por el corion y la placenta, durante el embarazo. Esta hormona normalmente es sintetizada por el organismo en pequeñas cantidades, incrementándose en el embarazo para estimular al cuerpo lúteo, evitando que degenera, y estimulando la producción de esteroides (progesterona y otros) que mantienen el embarazo.

Propiedades inmunoquímicas de la HGC

La HGC es una glicoproteína de 38 kDa, compuesta por dos subunidades (α y β) unidas no covalentemente. La subunidad α consta de 96 aminoácidos, y su secuencia es idéntica tanto en esta hormona, como en la hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona estimulante de la tiroides (TSH). La cadena β , sin embargo, es específica para cada una de estas hormonas, a pesar de su alta homología (Kikuchi *et al.*, 1994). Por ejemplo, las cadenas β de la HGC y LH poseen 94 (85%) de los primeros 110 aminoácidos de su secuencia en común. La β -HGC posee 145 aminoácidos (mientras que la β -HL posee 121), por lo que últimos 24 residuos del extremo C-terminal no están presentes en la β -HL. Esta región C-terminal permite la preparación de anticuerpos que reconocen selectivamente a la HGC, tanto policlonales como monoclonales. En la actualidad, estos últimos han dado lugar a técnicas más sensibles y específicas que las disponibles hace algunos años.

La HGC en el embarazo

Los niveles de HGC se incrementan rápidamente después de la primera semana de gestación, con un pico máximo entre la 7^a y 10^a semana, disminuyendo alrededor de la 12^a semana hasta alcanzar niveles bajos después de la 16^a semana que se mantienen hasta el final del embarazo (Fig.17.1). Durante el primer trimestre, los niveles de HGC correlacionan con el progreso gestacional, lo cual es de ayuda para el seguimiento del desarrollo del feto y para detectar casos de hipofunción placentaria, que pueden sugerir un embarazo ectópico o una amenaza de aborto. En el segundo trimestre, la relación entre la HGC y el crecimiento fetal se pierde, por lo tanto la cuantificación de esta hormona no es un buen indicador del desarrollo gestacional, ya que puede ocurrir incluso muerte fetal *in utero*, sin afectar

considerablemente los niveles de HGC. Otras hormonas como la progesterona, estrógenos y sus metabolitos (pregnandiol, estriol) pueden evaluar mejor el desarrollo del feto, sobre todo durante el último trimestre.

Es importante tener en cuenta que existen procesos patológicos que pueden inducir incrementos de HGC y que podrían ser confundidos con un embarazo. Estos incluyen algunas neoplasias (teratomas de ovario, corioepitelioma), eclampsia, enfermedades del tejido trofoblástico, polihidramios y mola hidatiforme. La mayoría de estos estados pueden ser diferenciados de un embarazo normal realizando curvas de seguimiento de los niveles de HGC, en cuyo caso se observarán curvas con fluctuaciones irregulares o anormales. Una única determinación aislada no es suficiente para predecir el desarrollo gestacional (Daily *et al.*, 1994). En el hombre, el carcinoma testicular también puede causar una elevación del nivel de HGC.

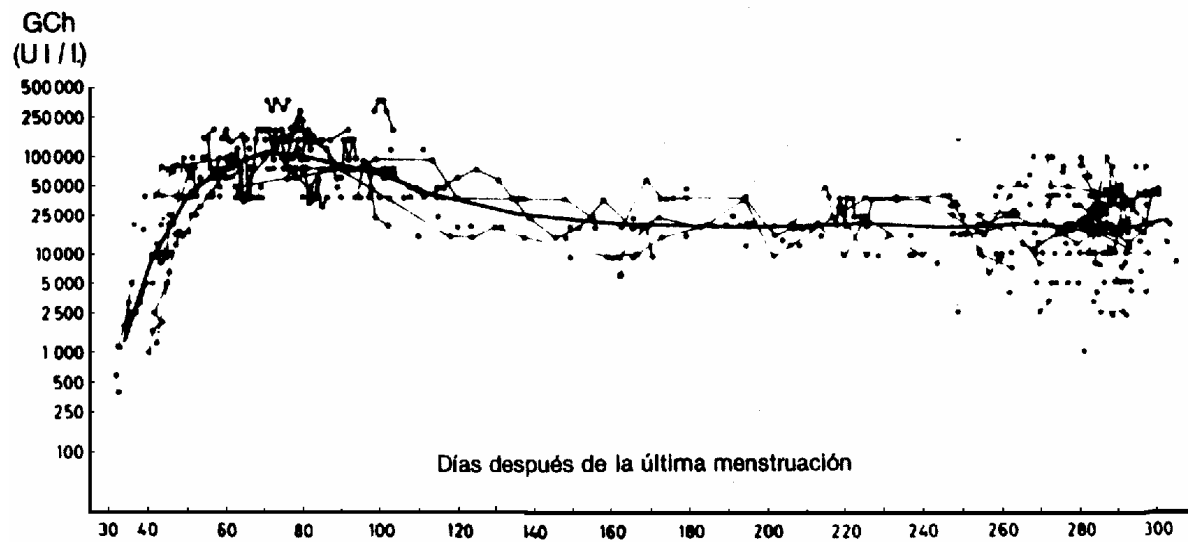


Figura 17.1: Niveles de hormona gonadotropina coriónica durante el embarazo. El trazo representa el promedio, con una amplia franja de variación biológica.

Detección y cuantificación de HGC

Los primeros métodos empleados para detectar la HGC fueron los bioensayos. Por ejemplo, la prueba de Asheim-Zandek (que data de 1928) utilizaba ratas inmaduras, a las cuales se les inyectaba orina y se observaba si había hiperemia en los ovarios. En la prueba de Friedman (1931) se inyectaba orina por vía intravenosa en conejas adultas para observar si ocurría ovulación precoz. La prueba de Galli-Mainini (1947) empleaba sapos machos adultos (*Bufo marinus*) inyectándoles orina por vía intraperitoneal, y observando la aparición de espermatoreas. Estos bioensayos fueron pronto reemplazados por técnicas inmunológicas, de mayor reproducibilidad, sensibilidad, y simplicidad. Las principales técnicas utilizadas son las de aglutinación (inhibición y reversa), técnicas radioinmunes, inmunocromatográficas e inmunoenzimáticas. En especial, estas últimas se han adaptado

muy bien al trabajo con analizadores automatizados.

Pruebas de aglutinación para HGC

Los métodos manuales más utilizados, sobretodo en laboratorios pequeños, se basan en técnicas de aglutinación reversa y de inhibición de la aglutinación. Actualmente también han tenido gran auge los métodos inmunocromatográficos e inmunoenzimáticos de uso popular (sin recurrir al laboratorio), utilizando formatos sencillos. Sin embargo, es importante mencionar la gran heterogeneidad que se ha demostrado entre este tipo de productos, en términos de su calidad, eficiencia y control.

Las técnicas de aglutinación reversa emplean un medio de soporte particulado (látex) recubierto generalmente con anticuerpos monoclonales anti- β HGC. Al mezclar el látex con una muestra de orina que contiene la hormona, ocurrirá una aglutinación pasiva de las partículas. Estas técnicas de aglutinación reversa pueden ser afectadas por un exceso de hormona en la muestra (fenómeno de post-zona), en cuyo caso se debe diluir la muestra.

Por otra parte, las técnicas de inhibición de la aglutinación (Fig.17.2) tienden a tener una mayor sensibilidad física, y además, no se ven afectadas por un exceso de antígeno (HGC) en las muestras. En estas técnicas, se dispone de partículas de látex recubiertas con HGC, y por otro lado, de anticuerpos anti-HGC (monoclonal o policlonales) en solución. Las partículas aglutinan al ser mezcladas con el anti-HGC. Pero, si se agrega al sistema una muestra que contiene antígeno libre (HGC en la orina), la aglutinación se inhibe, ya que los anticuerpos se unirán a la hormona presente en la muestra, por un fenómeno de competencia. De esta forma, la aglutinación de las partículas refleja la ausencia de la hormona, y viceversa, la no-aglutinación significa presencia de la hormona. Debe notarse que la interpretación de la lectura de ambas pruebas (reversa e inhibición), es radicalmente diferente.

Existen diversas formas de reactivos comerciales basados en inhibición de la aglutinación. Por un lado, están las pruebas rápidas en lámina, de lectura en 2 min. Estas utilizan por lo general partículas de látex recubiertas con HGC y poseen una sensibilidad de 0,5-2,0 UI/ml (según el tipo de anticuerpos en que se basen, y otros factores). Por otra parte, están las pruebas en tubo (o en placas de microaglutinación), que utilizan eritrocitos recubiertos con HGC. Estas son por lo general un poco más sensibles (0,1-0,5 UI/ml), pero con un tiempo de lectura mayor, hasta de 2 horas. En sus inicios, los reactivos comerciales detectaban la HGC completa (mediante anticuerpos policlonales contra ambas subunidades). Actualmente, la mayoría de los reactivos utilizan algún anticuerpo monoclonal contra la subunidad β .

Las pruebas en lámina y en tubo no están diseñadas para cuantificar los niveles de HGC en orina. Sin embargo, conociendo la sensibilidad del método y el título de la hormona en la muestra, es posible obtener una estimación de la concentración de HGC en orina, en UI/ml, multiplicando: (título de hormona en orina) x (sensibilidad del método). Por lo general este análisis se realiza en muestras de orina de 24 horas, con el fin de uniformar valores y obviar las diferencias por variaciones de concentración en muestras aisladas de orina. En estos casos el resultado se expresa en UI/24 horas, calculado de la siguiente manera: (título de HGC) x (sensibilidad del método) x (ml de orina en 24 horas).

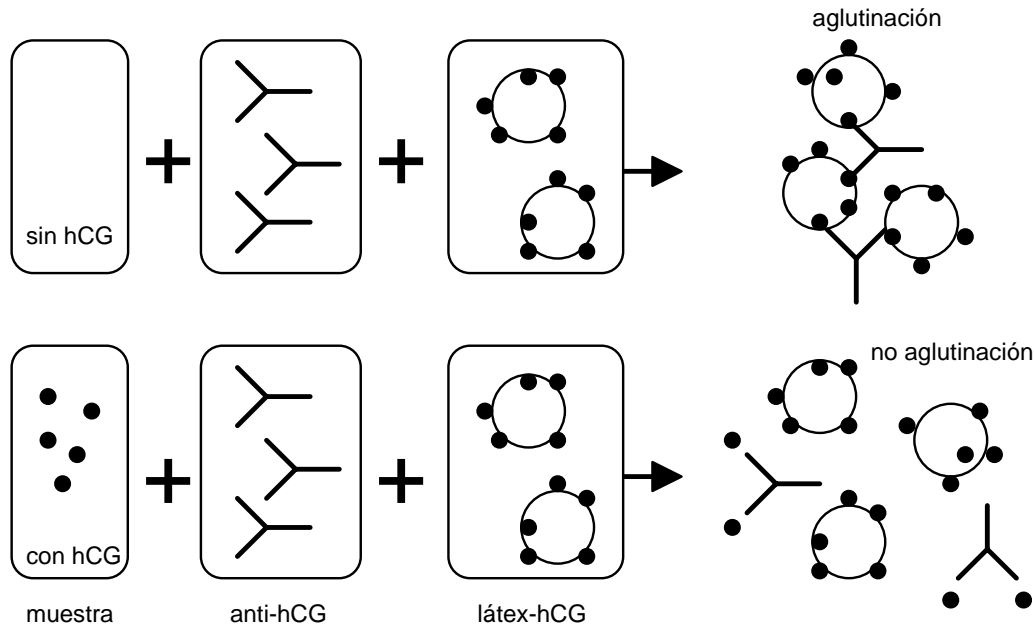


Figura 17.2: Fundamento de la inhibición de la aglutinación. Una muestra negativa para el antígeno a determinar (HGC), va a resultar en una lectura de aglutinación del látex-hormona. Una muestra positiva para el antígeno inhibirá la aglutinación, al interactuar los anticuerpos con el antígeno libre.

Técnicas radioinmunes e inmunoenzimáticas

En estas se utilizan radioisótopos o enzimas como marcadores, respectivamente. Su sensibilidad física es mucho mayor, llegando hasta el ámbito de los picogramos (10^{-12} g), lo cual permite utilizar incluso suero para realizar la determinación (Cuadro 16.1). Existen muchas variantes disponibles (Cuadro 17.2), siendo los reactivos inmunoenzimáticos los que han ganado más terreno. Como se mencionó, su simplicidad los ha llevado hasta el punto de ser utilizados en pruebas que están a disposición del público general, en algunos países, como prueba preliminar a la visita formal a un laboratorio. La alta sensibilidad de las técnicas basadas en marcaje permite diagnosticar un embarazo aún antes de la falta de menstruación (Cuadro 17.2).

Es importante tener presente que todas las técnicas descritas determinan la presencia de HGC y no necesariamente la existencia de un feto. En caso de un resultado negativo, si la sospecha de embarazo continúa, se debe repetir la determinación unos días después, ya que en una etapa muy temprana del embarazo los niveles de HGC pueden estar aún muy bajos.

Un cuidado particular de la mayoría de técnicas para la detección de la HGC que utilizan suero, es el efecto que pueden causar los altos niveles de factores reumatoides o de anticuerpos heterófilos en las muestras. Estos anticuerpos pueden entrelazar, como si fueran la hormona, a los anticuerpos de captura y detección. De este modo pueden ocasionar un resultado falsamente positivo. La detección de HGC, en mujeres que no presentan embarazo, es un importante signo de alerta para tumores, y se han documentado casos drásticos de terapia antitumoral en mujeres que mostraban resultados a la postre falsos en esta determinación (Lomonte, 2001).

Cuadro 17.1: Valores de referencia de HGC en suero, mediante radioinmunoensayo (RIA).

Tiempo de gestación	Concentración (UI/ml)
1a. semana	0,01 - 0,03
2a. semana	0,03 - 0,1
3a. semana	0,1 - 1
4a. semana	1 - 10
1er. trimestre	30 - 100
2do. trimestre	1 - 10
3er. trimestre	5 - 15

Cuadro 17.2: Comparación de métodos para la determinación de HGC.

Prueba	Semana de Gestación	Días de atraso	Muestra	Duración de la técnica	Sensib. (UI/ml)
Bioensayos	3-5	10-20	O	16-100 hr	0,5-1,5
Aglut. lámina	3-5	10-20	O	2 min	0,5-2
Aglut. tubo	3-4	8-14	O	1-3 hr	0,1-0,5
RIA	1-2	0-antes	O, S	0,5-3 hr	0,002
IRMA	1-2	0-antes	O, S	0,5-1,5 hr	<0,001
ELISA	1-2	0-antes	O, S	2 min-2 hr	<0,001

O: orina; S: suero.

Procedimiento

I. Detección de HGC por inhibición de la aglutinación en lámina (látex).

1. Recoger una muestra de orina, preferiblemente la primera de la mañana, en un recipiente limpio de vidrio o plástico. Mantener en refrigeración (hasta por 24 hr) o congelar para plazos mayores. Para determinaciones cuantitativas se debe obtener orina de 24 hr. Si la muestra es turbia se debe centrifugar o filtrar.

2. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente. Estos consisten en látex recubierto con HGC y una solución de anti-HGC (policlonal o monoclonal).

3. En una lámina de fondo oscuro limpia, colocar 1 gota del anti-HGC, luego agregar 2 gotas de la muestra y mezclar. Correr siempre un control positivo y un control negativo.

4. Agregar 1 gota del látex, previamente homogenizado. Mezclar lentamente por 2 min y leer por aglutinación.

II. Detección de HGC por inhibición de la hemaglutinación en placas de 96 hoyos.

1. Preparar la muestra como se describió para la prueba anterior.
2. Asignar un hoyo (fondo en "U") para cada muestra, así como para los controles (-) y (+) en una placa para aglutinaciones.
3. Agregar 25 μ l del anti-HGC a cada hoyo. Luego agregar 100 μ l de cada muestra y de los controles.
4. Agregar 50 μ l de la suspensión de eritrocitos sensibilizados con HGC (previamente homogenizada). Mezclar suavemente, y dejar en reposo durante 2 hr. Evitar perturbaciones mecánicas durante la incubación.
5. Leer por hemaglutinación, observando los patrones de sedimentación de las células. Un botón o punto en el fondo indica la ausencia de aglutinación, mientras un tapete extendido de células indica aglutinación.

Referencias

- Daily, C.A., Laurent, S.L. y Nunley, W.C. (1994) The prognostic value of serum progesterone and quantitative β -human chorionic gonadotropin in early human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **171**, 380.
- Kikuchi, T., Koyama, Miyai, K., Kimura, T., Nishikiori, N., Kimura, T., Azuma, C., Kusunoki, M., Saji, F. y Tanizawa, O. (1994) Loss of biological activity of human chorionic gonadotropin (hCG) by the amino acid substitution on the "CMGCC" region of the α -subunit. *Molec. Cell. Endocrinol.* **102**, 1.
- Laboratorios Wampole (1980) Folleto instructivo de la prueba UCG-beta stat. Cranbury, EUA.
- Lomonte, B. (2001) Peligros de los falsos positivos en la determinación de gonadotropina coriónica. *Rev. Col. Microbiol. Quím. Clín. Costa Rica* **7**, 88.
- Rose, N. y Friedman, H. (1977) *Manual of Clinical Immunology*, p.214. Washington, American Society for Microbiology.
- Stanley, R. (1976) *Medical Laboratory Technology*, p.527. W.B. Saunders Company.
- Stevens, V. C. (1986) Current status of antifertility vaccines using gonadotropin immunogens. *Immunol. Today* **7**, 369.
- Thompson, R.A. (1977) *Techniques in Clinical Immunology*, p.63. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Capítulo 18

Determinación de proteína C-reactiva

Introducción

La proteína C-reactiva (usualmente abreviada como CRP, por sus siglas de *C-reactive protein*) pertenece a un grupo de glicoproteínas séricas denominadas **proteínas de fase aguda** (Fig.18.1). Estas proteínas son sintetizadas en su mayoría por el hígado y normalmente se pueden encontrar circulando en bajas concentraciones. Sin embargo, tienen la particularidad de que sus niveles pueden incrementarse significativamente, hasta en varios órdenes de magnitud, en respuesta a una variedad de estímulos que se desencadenan durante la inflamación y el daño tisular. Por ejemplo las infecciones bacterianas, quemaduras, el infarto de miocardio, traumas, etc., conducen a un aumento de las proteínas de fase aguda. Estas proteínas regresan a su concentración normal cuando el proceso inflamatorio o de daño tisular desaparecen.

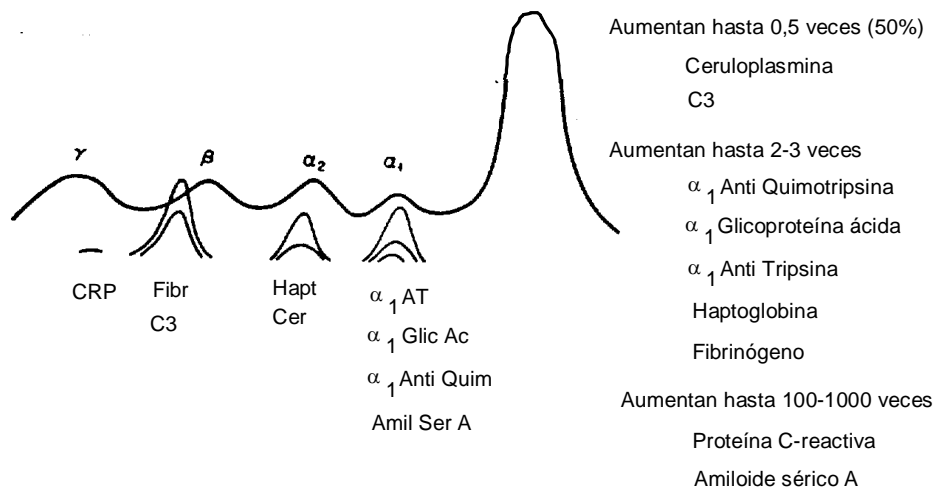


Figura 18.1: Principales proteínas de fase aguda, su movilidad electroforética y niveles de aumento (Gorevic, 1983).

En general, las proteínas de fase aguda tienen una vida media ($t_{1/2}$) en plasma de 2-3 días. Su síntesis por los hepatocitos es inducida por el grupo de citocinas proinflamatorias, principalmente la interleukina 6 (IL-6), y en menor grado la IL-1 y el TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). Se ha demostrado que la IL-6 estimula directamente la síntesis de CRP en cultivos de hepatocitos humanos.

La CRP fue descrita originalmente por Tillet y Francis en 1930, quienes hallaron que los sueros de pacientes que sufrían infecciones agudas por estreptococos, precipitaban el polisacárido C de *Streptococcus pneumoniae*, en presencia de calcio. Por esto, a la proteína causante de dicha reacción se le llamó "proteína C-reactiva". Esta migra entre las regiones electroforéticas β y γ de las globulinas, y normalmente su concentración sérica es menor de 3-4 $\mu\text{g/ml}$, pero aumenta hasta varios cientos de veces durante una respuesta de fase aguda, con un pico máximo entre 2 y 3 días.

La CRP se une a residuos de fosforilcolina de los ácidos teicoicos del neumococo y otras bacterias, formando complejos capaces de activar la vía clásica del complemento. Además, la CRP posee actividad opsonizante (Fig.18.2), constituyendo así un importante mecanismo innato de inmunidad. Esta proteína es filogenéticamente muy antigua y se piensa que formó parte de una respuesta inmune primitiva.

En el laboratorio clínico, la determinación de los niveles séricos de CRP es de utilidad para el seguimiento y control de procesos infecciosos, inflamatorios o de daño tisular. A pesar de que es un indicador inespecífico de tales procesos, provee información valiosa sobre el estado inflamatorio de un paciente, en forma análoga a pruebas más indirectas para evaluar este parámetro, como la **velocidad de eritrosedimentación**.

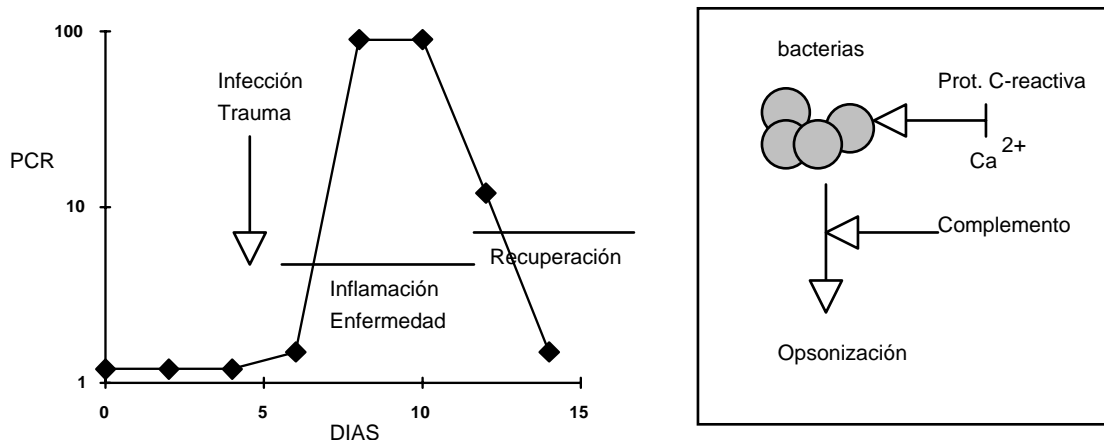


Figura 18.2: Aumento exponencial de la proteína C-reactiva (y otras proteínas de fase aguda) al producirse un estímulo inflamatorio con daño tisular, y regreso a sus niveles normales asociado a la fase de recuperación. A la derecha se esquematiza la acción opsonizante de dicha proteína, en presencia de iones calcio y complemento (Roitt, 1985).

Métodos de detección de CRP

Los métodos inmunoquímicos son los más utilizados para detectar y cuantificar los niveles de CRP en suero o plasma. Existe una variedad de técnicas nefelométricas, de aglutinación reversa, inmunoenzimáticas, radioinmunes, y otras. El método manual más común, por su sencillez y bajo costo, es la aglutinación pasiva reversa. Esta utiliza partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-CRP, que aglutinan en presencia de esta proteína.

Procedimiento

Determinación de proteína C-reactiva (CRP) por aglutinación reversa.

1. Obtener una muestra de suero. Refrigerar hasta por 24 hr o congelar para plazos mayores.
2. Diluir el suero 1:6 con PBS (ej. 0,1 + 0,5 ml).
3. En una lámina de fondo oscuro limpia, colocar una gota (50 μ l) del suero diluído. Correr igualmente sueros control (+) y (-) en cada lote de muestras.
4. Homogenizar la suspensión del látex-anti-CRP y agregar una gota a cada muestra. Evitar el contacto del gotero con las muestras. Mezclar con un aplicador, rotar la lámina durante 2 min y leer por aglutinación.
5. Para estimar los niveles, se pueden probar diluciones dobles, preparadas a partir de la dilución 1:6. La mayor dilución que resulte en aglutinación es el título de CRP. Este puede multiplicarse por la sensibilidad mínima del reactivo, dada por el fabricante¹, para estimar la concentración de la proteína.

La concentración de CRP en individuos aparentemente sanos es inferior a 3 μ g/ml, en el 90% de la población (e inferior a 10 μ g/ml en el 99%). Es importante tener en cuenta que la presencia de factores reumatoides en la muestra puede causar falsos positivos con esta técnica.

Referencias

- Folleto instructivo del producto "Denco, CRP-Test". Carter-Wallace, Cranbury, E.U.A.
Folleto instructivo del producto "Reumagen-PCR" (1986) Barcelona, España.
- Gorevic, P.D. (1983) Assessment of immunoglobulins and other serum proteins: gammopathies. En: *Immunodiagnosis for Clinicians* (Grieco, M.H. y Meriney, D.K., Eds.), p.77. Chicago: Year Book Medical Publishers.
- Horowitz, J., Volanakis, J. y Briles, D. (1987) Blood clearance of *S. pneumoniae* by C-reactive protein. *J. Immunol.* **138**, 2598.
- Roitt, I.M. (1985) *Immunology*, p.1.3 London, Gower Medical Publishing.
- Tejani, N.R., Chonmaitree, T., Rassin, D.K., Howie, V.M., Owen, M.J. y Goldman, A.S. (1995) Use of C-reactive protein in differentiation between acute bacterial and viral otitis media. *Pediatrics* **95**, 664.
- Young, B., Gleeson, M. y Cripps, A.W. (1991) C-reactive protein: a critical review. *Pathology* **23**, 118.

¹ por ejemplo, el reactivo "Rheumagen-CRP[®]" aglutina en concentraciones de CRP \geq 6 μ g/ml.

Apéndice

REACTIVOS

Amortiguador de barbital (concentración 5x), para CH₅₀

Solución **A**: 42,5 g NaCl; 1,9 g dietilbarbiturato de sodio; disolver en unos 700 ml de agua destilada.

Solución **B**: 2,9 g ácido dietilbarbitúrico; disolver en 200 ml de agua caliente.

Solución **C**: 20,3 g MgCl₂·6H₂O; 3,3 g CaCl₂; aforar a 100 ml.

Mezclar A+B y enfriar. Agregar 2,5 ml de C. Ajustar el pH a $7,60 \pm 0,05$. Aforar a 1000 ml y conservar a 4°C. Diluir 5 veces al momento de usar.

Anticoagulante de Alsever

2,05 g glucosa; 0,8 g citrato de sodio; 0,42 g NaCl; disolver en unos 70 ml de agua destilada, ajustar pH a 6,1 con ácido cítrico y aforar a 100 ml. Esterilizar por filtración en membrana de 0,22 µm. Para su uso, mezclar el anticoagulante con un volumen igual de sangre.

Azul Tripán 0.16%

Pesar 16 mg de Azul Tripán y disolver en 10 ml de PBS. Filtrar por membrana de 0,22 µm. Mantener a temperatura ambiente.

Ester de forbol (PMA; "phorbol miristate acetate")

Disolver a 1 mg/ml en dimetilsulfóxido. Congelar alícuotas de 50 µl a -70°C (proteger de la luz).

Ficoll-diatrizoato (F-D)

Preparar una solución al 14% (p/v) de ficoll 400, disolviendo por agitación durante 10-16 hr a temperatura ambiente; mezclar 12 partes del ficoll con 5 partes de diatrizoato de sodio al 32,8%. Ajustar la densidad a $1,077 \pm 0,001$ g/ml y la osmolaridad a 280-308 mOsm. Esterilizar por filtración y conservar en envases color ámbar, protegidos de la luz, a 4°C.

Fijador de formalina - SSB - BSA

Agregar 5 ml de formaldehído concentrado (37-40%) a 100 ml de solución salina balanceada (SSB) con 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA). Filtrar a través de una membrana de 0,45 μm y guardar a 4°C.

Líquido de centelleo (para contadores de emisiones beta)

Mezclar 1200 ml de tolueno; 800 ml de etilenglicol-monoetil éter; 14,0 g de butil-P-B-D; y 60,0 g de naftaleno.

Nitrobluetetrazolium (NBT), solución madre

Disolver NBT a 2,8 mg/ml en solución salina balanceada (SSB) y esterilizar por filtración en membrana de 0,22 μm . Guardar alícuotas a 4°C protegidas de la luz. Antes de usar, centrifugar para eliminar posibles precipitados.

Nitrobluetetrazolium (NBT), solución de trabajo

Mezclar 0,25 ml de albúmina sérica al 30% en PBS; 0,27 ml de solución madre de NBT; y 0,98 ml de SSB.

NBT - PMA, solución de trabajo (nitrobluetetrazolium + éster de forbol PMA)

Agregar 1,5 μl de solución madre de éster de forbol (PMA) a un tubo con 1,5 ml de solución de trabajo de NBT.

Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), pH 7,2

Disolver 8,0 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 1,15 g de Na_2HPO_4 ; y 0,2 g de KH_2PO_4 , en 1000 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,2. Si se requiere esterilizar, autoclavar por 20 min a 121°C, o filtrar por membrana de 0,22 μm .

Solución salina balanceada (SSB)

Disolver 0,14 g CaCl_2 ; 8,0 g de NaCl; 0,4 g de KCl; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,06 g KH_2PO_4 ; y 0,24 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, en 1000 ml de agua destilada. Si se requiere esterilizar, filtrar por membrana de 0,22 μm . Conservar a 4°C.

SSB - BSA (Solución salina balanceada + BSA)

Disolver albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% en solución salina balanceada (SSB). Filtrar a través de una membrana de 0,45 μm y conservar a 4°C.

Solución de lisis (cloruro de amonio) para eritrocitos

Disolver 8,3 g de cloruro de amonio en 1000 ml de agua destilada (parte **A**). Disolver 20,6 g de Tris base en 900 ml de agua, ajustar el pH a 7,6 con HCl y llevar a 1000 ml (parte **B**). Para la solución de trabajo, mezclar 90 ml de la parte **A** con 10 ml de la parte **B**, ajustando el pH a 7,2 si es necesario, con HCl.