

Técnico Superior
en Laboratorio de
Diagnóstico Clínico
y Biomédico

Técnicas de inmunodiagnóstico

Coordinador

Miguel Fernández Arquero

ARÁN



Autores

Director

Julián Sanz Ortega

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo Especialista de Área del Hospital Universitario Clínico San Carlos y de la Universidad Complutense de Madrid, desde 1996. Desde el año 2000 es Director Científico del Biobanco del Hospital Universitario Clínico San Carlos y del Biobanco de la RTICC de ISCIII. Responsable de Patología Molecular y Dianas Terapéuticas. Nombrado Presidente Territorial de Madrid de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) en el año 2012. Autor de 66 artículos científicos: publicaciones internacionales en revistas indexadas y nacionales. Premio Extraordinario de la Universidad Complutense de Madrid y Premio de la Fundación San Nicolás de la Real Academia Nacional de Medicina en 1994.

Coordinador

Miguel Fernández Arquero

Profesor Asociado en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Facultativo Especialista de Área en el Servicio de Inmunología Clínica del Hospital Universitario Clínico San Carlos desde 1994. Responsable de la Sección de Inmunogenética e Histocompatibilidad en el Servicio de Inmunología Clínica del Hospital Universitario Clínico San Carlos desde 1996.

Coordinador de la Unidad Transversal de Genómica: Inmunogenética y Secuenciación del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario Clínico San Carlos.
Autor de más 100 artículos publicados indexados y miembro de diferentes sociedades científicas nacionales e internacionales.

Autores

Romina Dieli Crimi

Residente en el Servicio de Inmunología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Miguel Fernández Arquero

Facultativo Especialista de Área en el Servicio de Inmunología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Esther Fernández Fernández

Becario Predoctoral en el Servicio de Inmunología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Lidia Fernández Paredes

Residente en el Servicio de Inmunología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Luz María Medrano de Dios

Residente en el Servicio de Inmunología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

María Núñez Beltrán

Residente en el Servicio de Inmunología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Miguel Ángel Ortiz Rosales

Residente en el Servicio de Inmunología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Virginia Pascual Pascual

Residente en el Servicio de Inmunología Clínica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Índice

Capítulo 1

Aplicación de técnicas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo secundarias	13
1. Técnicas de aglutinación	14
2. Técnicas de precipitación en medio líquido.....	16
3. Técnicas de precipitación en gel	19
4. Técnicas de fijación del complemento	22
5. Diagnóstico y seguimiento serológico de las enfermedades	22

Capítulo 2

Aplicación de técnicas basadas en reacciones de antígeno-anticuerpo primarias	35
1. Clasificación de inmunoensayos	36
2. Representación de datos y obtención de resultados.....	40
3. Sistemas de amplificación de señales	45
4. Enzimoinmunoensayos homogéneos	46
5. Enzimoinmunoensayos heterogéneos	49
6. Radioinmunoensayos.....	55
7. Fluoroinmunoensayos.....	58
8. Test inmunocromatográficos	63
9. Técnicas de inmunofluorescencia	65
10. Técnicas de Western blot.....	66

Capítulo 3

Detección de autoanticuerpos	79
1. Enfermedades autoinmunes y anticuerpos asociados	80
2. Anticuerpos organoespecíficos	87
3. Anticuerpos no organoespecíficos	90
4. Determinación de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta	92
5. Determinación de anticuerpos mediante ELISA.....	103

Capítulo 4

Aplicación de técnicas de estudio de hipersensibilidad	113
1. Técnicas para el diagnóstico de alergias	114

Capítulo 5

Aplicación de técnicas de identificación de poblaciones celulares por citometría de flujo	139
1. Preparación de suspensiones celulares	140
2. Funcionamiento de un citómetro de flujo	147
3. Aplicaciones de la citometría de flujo	155
4. Otras técnicas de separación celular.....	164

Capítulo 6

Valoración de la funcionalidad de la inmunidad celular	177
1. Técnicas de separación de linfocitos por centrifugación en gradiente de ficoll	178
2. Estudio de la funcionalidad de los linfocitos B	184
3. Estudio de la funcionalidad de los linfocitos T: estudios de proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos	191
4. Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T.....	194
5. Estudio de las células fagocíticas.....	195
6. Estudio de las alteraciones del complemento.....	201

Capítulo 7

Aplicación de estudios de tipificación HLA	215
1. Moléculas MHC	216
2. Estudios de histocompatibilidad	221
3. Aplicaciones de los estudios de histocompatibilidad	227
Soluciones “Evalúate tú mismo”	240



APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE ESTUDIO DE HIPERSENSIBILIDAD

*Romina Dieli Crimi,
Miguel Fernández Arquero*

Sumario

1. Técnicas para el diagnóstico de alergias

La **hipersensibilidad** es definida como una reacción inadecuada o exagerada del sistema inmune frente a sustancias que las considera como nocivas llamadas **alérgenos**, y que en la mayoría de las personas no causan ninguna reacción. De acuerdo a la clasificación de Coombs y Gell se dividen en:

- › **Alergia o hipersensibilidad I:** mediada por IgE, es una reacción secundaria a la ingesta, inhalación o contacto con una partícula o sustancia. Es imprescindible que el individuo haya sido previamente sensibilizado; es decir, haber estado en contacto.
- › **Hipersensibilidad II:** reacción producida por la interacción antígeno-anticuerpo en la superficie de las células, lo que genera una reacción de citotoxicidad.
- › **Hipersensibilidad III:** reacciones por inmunocomplejos de anticuerpos IgG e IgM que se depositan en los tejidos desencadenando una respuesta inmunitaria con activación del complemento.
- › **Hipersensibilidad IV:** o retardada, generalmente por contacto cutáneo, es mediada por células, no por anticuerpos.

Para el **diagnóstico** de este tipo de patologías, principalmente hipersensibilidad I y IV, contamos con **varios tipos y subtipos de técnicas** que se realizan directamente en el paciente o en el laboratorio, y que iremos desarrollando a lo largo de este capítulo.

Nuestro objetivo principal es realizar una revisión de esas técnicas y de su correspondiente interpretación.

I. TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ALERGIAS

Los métodos diagnósticos en alergia cuentan con **técnicas *in vivo***, que podrían definirse como las técnicas que se realizan sobre el propio paciente, y **técnicas *in vitro***, correspondientes a pruebas de laboratorio que confirman el diagnóstico de las anteriores o que se llevan a cabo ante la imposibilidad de realización de los test *in vivo* por circunstancias especiales de los pacientes. Comprenden las siguientes técnicas:

**RECUERDA QUE**

Se debe utilizar una aguja diferente para cada extracto.

la liberación de mediadores químicos como histamina, triptasa, neuro-mediadores, etc., encargados de la respuesta inmediata.

► **Prick test:** es una técnica de lectura inmediata, de bajo costo y eficaz para la confirmación diagnóstica, que realizada de manera correcta se evitan posibles falsos positivos o negativos. Es importante tener en cuenta que es un método seguro de diagnóstico y que las probabilidades de reacción sistémica son muy bajas.

Se realiza sobre el antebrazo del paciente colocando unas gotas de un control positivo (histamina), uno negativo (solución salina fisiológica) y de los extractos que se quieran estudiar en ese paciente. Entre las gotas debe haber una separación adecuada de 2 cm con el objetivo de evitar reacciones enmascaradas. A continuación, con una aguja hipodérmica se realiza una incisión en la epidermis con una pequeña angulación, es decir, no de manera perpendicular.

Ejemplo de *prick test*



Antebrazo de un paciente con: 1ª gota de control (+), 2ª de control (-) y 3ª correspondiente al alérgeno que se va a estudiar.

**RECUERDA QUE**

La concentración de los extractos es de 1.000 a 10.000 veces menor que la utilizada para prick test.

► **Intracutánea:** es una prueba que presenta ciertas similitudes y algunas diferencias con respecto al anterior. Se basa también en la inyección de extractos alérgicos (0,05-0,07 ml), pero a nivel intradérmico del antebrazo generando una pápula de 2-3 mm, de ahí la importancia de mantener una distancia de 2 cm por lo menos entre cada alérgeno para evitar errores en los resultados. Se utilizan las mismas sustancias para los controles positivo y negativo.

Ejemplo prueba intracutánea



Pápula de 10 mm.

Una situación importante ocurre en lactantes: a partir de los 3 meses de edad se produce una pápula significativa con la histamina, por lo que la interpretación de la reacción frente a los extractos estudiados se la evalúa comparándola con la pápula del control positivo y no con los criterios antes mencionados.

AMPLÍA TUS CONOCIMIENTOS

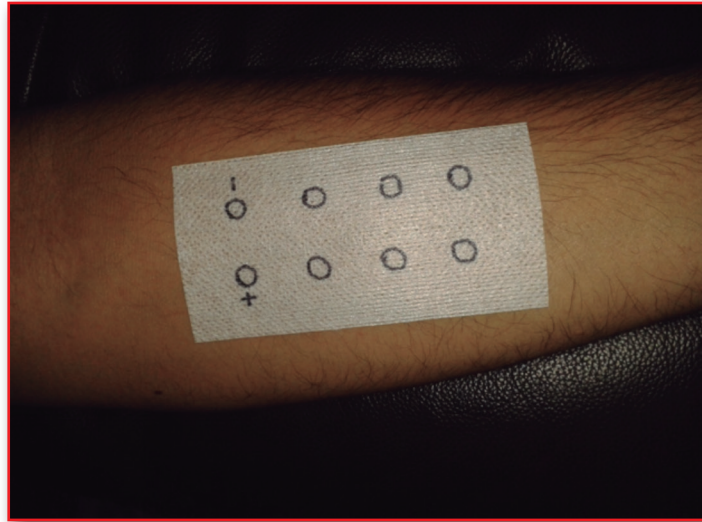
Siempre que se realizan pruebas cutáneas *in vivo*, se deben tomar las **precauciones** correspondientes:

- 】 Supervisión de un médico.
- 】 Utilizar extractos estandarizados y en sus correctas concentraciones.
- 】 Colocar un control positivo y uno negativo.
- 】 Realizar una técnica adecuada, sin causar daño.
- 】 Tener en cuenta la medicación que haya tomado o esté tomando el paciente.
- 】 Registrar todas las reacciones que ocurran en el paciente.

**RECUERDA QUE**

Las precauciones que se deben tomar son las mismas que para las pruebas de sensibilización inmediata.

Ejemplo de sensibilización retardada

**1.1.2. Pruebas de función respiratoria**

Estas pruebas son de gran importancia porque sirven para la confirmación del **diagnóstico de asma**, valoración de la gravedad, seguimiento de la clínica y evaluación a la respuesta al tratamiento. Se deben realizar cuando se sospeche esa patología en los pacientes, siempre y cuando la edad lo permita; ejemplo de esto es el caso de niños pequeños, quienes no pueden entender las pautas para una correcta realización de estas pruebas, para estas situaciones se utilizan otros tipos de técnicas más complejas que requieren sedación y que no se tratarán en esta edición.

Espirometría

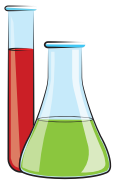
La técnica es una maniobra de **capacidad vital forzada**: a partir de una espiración normal efectuar una inspiración máxima, unos segundos de apnea y una espiración forzada. El paciente se encontrará en una posición adecuada para poder realizar las maniobras respiratorias: sentado con la espalda a 90°, utilizando pinzas nasales y boquillas de tamaño adecuado y no deformables.

Es imprescindible que el personal se encuentre capacitado y sepa dar las explicaciones de manera clara y concisa al paciente.

La mayoría de los **espirómetros** detectan si la prueba ha sido correctamente realizada. Si no se dispone de equipos modernos, se aconseja realizar la técnica tres veces y escoger la mejor de las curvas.

**RECUERDA QUE**

Es importante calibrar los espirómetros diariamente.



Los
*inmunoensayos
 enzimáticos y los
 radioinmunoensayos
 son los métodos
 elegidos por su alta
 sensibilidad.*

1.2.1. Determinación de IgE sérica total

La IgE está implicada en las reacciones de hipersensibilidad tipo I, es la inmunoglobulina que se encuentra sobre la superficie de mastocitos, eosinófilos y basófilos, y que tras el reconocimiento de un antígeno desencadena la degranulación de las células anteriores con liberación de histamina y otras sustancias químicas. Su cuantificación es un test de rutina en los laboratorios de alergia. Su valor puede tener variaciones con la edad, el sexo, el proceso alérgico intercurrente, etc.

Valor IgE según edad	
Edad	IgE (kU/l)
6 semanas	0,7
6 meses	2,7
9 meses	2,4
1 año	7
2 años	11
3 años	11
4 años	20
7 años	26
10 años	39
14 años	32

La IgE es una proteína monomérica que circula en la sangre en muy baja concentración, es necesario utilizar métodos diferentes a los usados para el estudio de otras inmunoglobulinas. Los **inmunoensayos enzimáticos** y los **radioinmunoensayos** son los métodos elegidos por su alta sensibilidad, capaces de cuantificar pequeñas cantidades de esta proteína.

Inmunoensayos enzimáticos (EIA)

Se utiliza como marcador la actividad enzimática de una enzima unida de forma covalente al AC o Ag (Figura 1). Según el sustrato utilizado podemos utilizar diferentes equipos de detección.

» **Equipos colorimétricos:** detectan el aumento de color de la reacción enzimática.

- › **Equipos fluorométricos:** detectan la aparición de fluorescencia en el sistema.
- › **Rx y otros equipos de detección valoran la aparición de la luminiscencia.**

El fundamento de esta técnica está basado en el uso de una Ac anti IgE pegado a la fase sólida que reconoce la IgE presente en el suero, finalmente se incorpora un segundo anticuerpo que reconoce otros epítomos de la IgE con enzima unida de forma covalente, responsable de la actividad enzimática (ver Figura 1).

Existe una serie de **enfermedades que cursan la la IgE alta:**

- › Enfermedades atópicas.
- › Infecciones parasitarias.
- › Cirrosis hepática.
- › Mononucleosis.

La determinación de **IgE sérica total** tiene un valor limitado por ser dependiente de la edad y de otros factores, estando indicado su estudio en:

- › Evaluación de la aspergilosis.
- › Estudio de inmunodeficiencia: síndrome Hiper IgE.

Es importante destacar que su cuantificación también se utiliza para objetivar la respuesta al tratamiento, ya que su descenso implica remisión de la patología alérgica.



RECUERDA QUE

La elevación de la IgE no solo se relaciona con procesos alérgicos, sino también con parasitosis y algunas inmunodeficiencias.

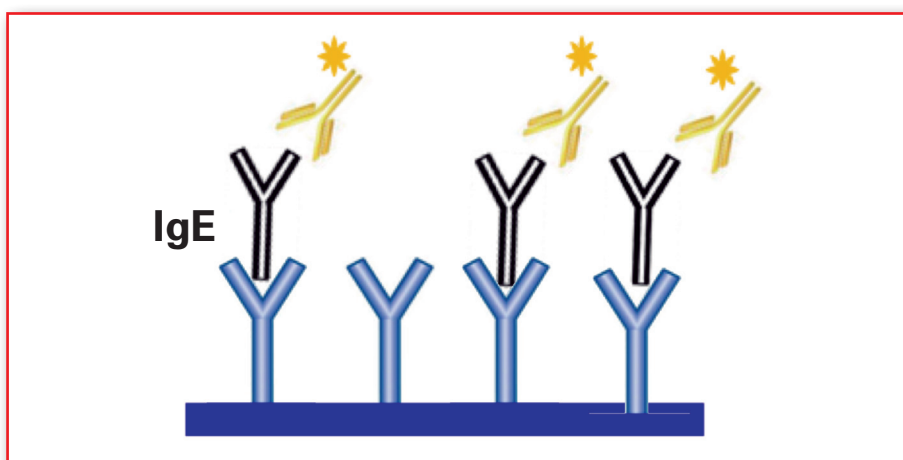


Figura 1. Determinación de IgE total. En esta figura se muestra un estudio en fase sólida de un Ac anti IgE pegado, reconociendo la IgE presente en el suero. Se añade a la reacción un segundo anticuerpo con una enzima unida de forma covalente. En caso de reacción aparecerá color en el pocillo de la placa en estudio.

hiperreactividad bronquial inespecífica. Sirve para evaluar respuesta al tratamiento en pacientes asmáticos, ya que su disminución se correlaciona con disminución de las crisis y mejoría de la función pulmonar.

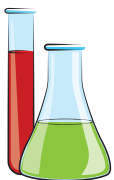
1.2.7. *Determinación de triptasa*

Se determina en reacciones anafilácticas. Es una proteína que se encuentra en los **mastocitos** y se puede detectar a las 3 h de producida la reacción.

1.2.8. *Test de activación de basófilos (TAB) por citometría*

Se trata de una técnica muy sensible y específica por el uso de la citometría de flujo. En los últimos años su aplicación clínica se ha dirigido al estudio de alergias a medicamentos, alimentos y el estudio de procesos alérgicos con IgE específica.

La citometría de flujo es una herramienta válida para el **análisis de diferentes tipos celulares**. Los granulocitos basófilos son los leucocitos circulantes menos comunes en la sangre y representan solamente del 0,5 al 1 % de la población total de glóbulos blancos (Figura 3). Los basófilos de sangre periférica y los mastocitos de tejidos son las células efectoras primarias de las reacciones inmediatas mediadas por IgE tales como rinitis, asma y anafilaxia, pero también se encuentran involucradas en otro tipo de reacciones alérgicas o pseudoalérgicas, en las que se implican mecanismos de activación, tales como la activación por complemento o reacciones no mediadas por IgE o mecanismos no inmunológicos.



Los basófilos de sangre periférica y los mastocitos de tejidos son las células efectoras primarias de las reacciones inmediatas mediadas por IgE.

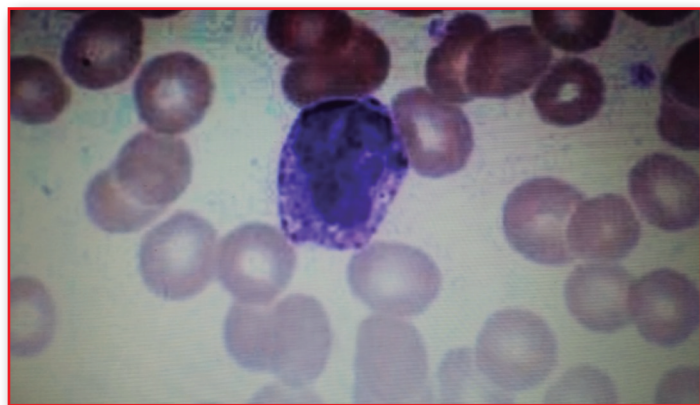


Figura 3. En la figura se muestra un basófilo, tipo de leucocito cuyos gránulos intracitoplásmicos son básicos por su tinción. La proporción en la sangre es menor del 1 % del total de glóbulos blancos.

El **TAB** está basado en la capacidad que tienen estas células de activarse tras un estímulo antigénico específico (alérgeno) y son capaces de liberar el contenido de sus gránulos tras un proceso de activación dependiente del estímulo antigénico (Figura 4).

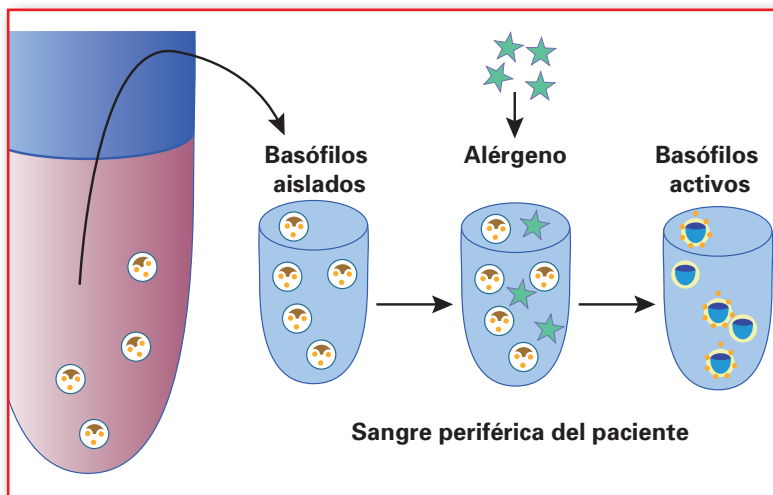


Figura 4. En esta figura se representa la activación del basófilo de sangre periférica dependiente del estímulo antigénico, un alérgeno.

El alérgeno divalente provocará el **punteo** de los receptores de IgE y con ello una **degranulación** (Figura 5). Estos eventos promueven la fusión intracitoplasmática de los gránulos y la fusión de la membrana

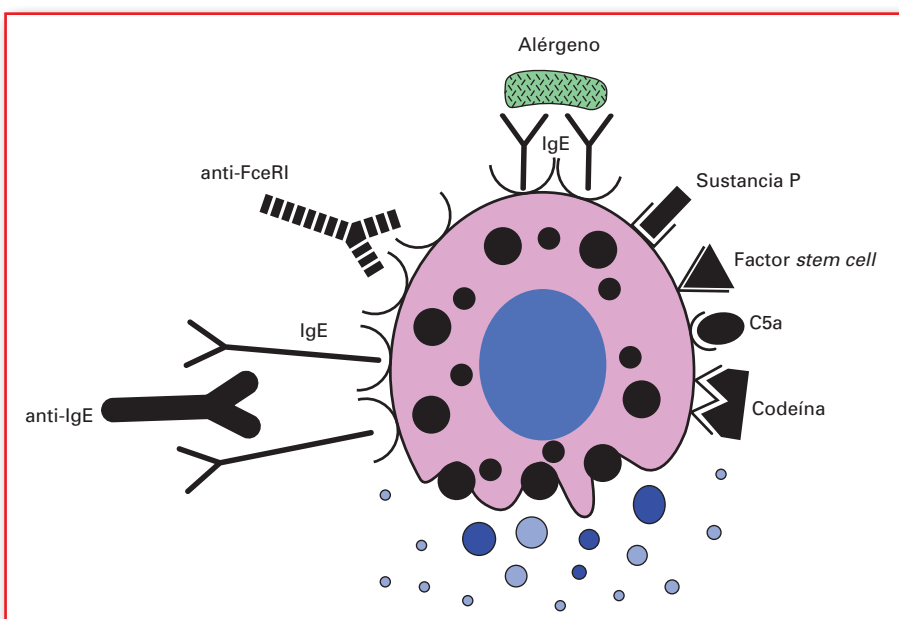


Figura 5. Esta figura refleja el proceso de degranulación por la activación que sufren los basófilos; este proceso fisiológico se ha utilizado para realizar el test de activación de estas células.

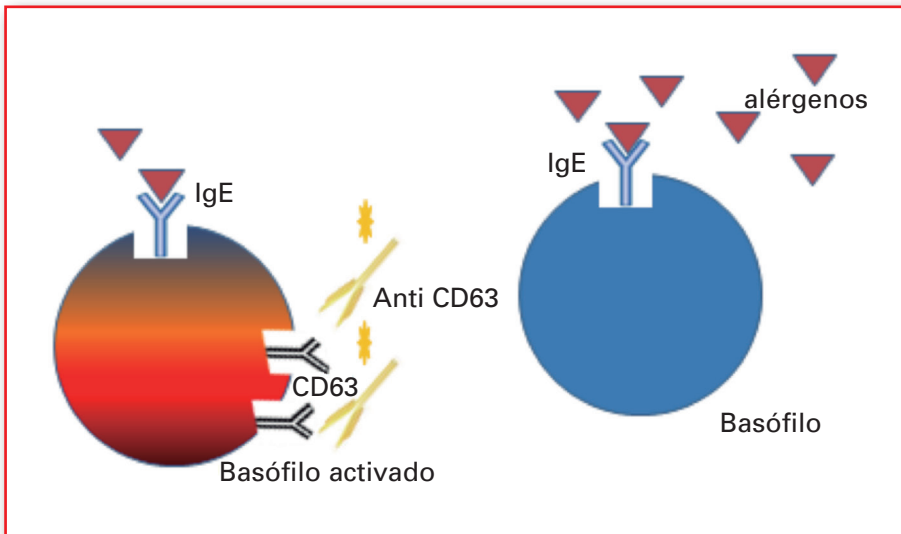


Figura 7. Test de activación de basófilos. En el TAB se valora la activación de estas células por la aparición de un nuevo marcador CD63. Un anticuerpo monoclonal nos permitirá su detección y conocer la cantidad de células positivas.

Las **ventajas** que ofrece el TAB:

- 】 Es una técnica que reproduce *in vitro* los mecanismos de hipersensibilidad celular implicados en una reacción alérgica de tipo inmediato.
- 】 Permite el diagnóstico de reacciones alérgicas y pseudoalérgicas especialmente para medicamentos, que no son detectables mediante técnicas serológicas, tales como la determinación de IgE específica.
- 】 Los resultados se obtienen en unas pocas horas.
- 】 Se pueden testar en paralelo varios alérgenos con una cantidad de sangre pequeña.
- 】 Evita, en muchos casos, la realización de la prueba de exposición al alérgeno.

Por todo lo comentado, se aconseja su utilización en la rutina diagnóstica en los laboratorios de inmunología.

RESUMEN

- ✓ La **hipersensibilidad** es una reacción inadecuada o exagerada del sistema inmune frente a sustancias que considera nocivas.
- ✓ En este capítulo se han tratado de forma meticulosa las **técnicas necesarias** que ayudan a **cuantificar la respuesta inmune** frente a determinados antígenos. Estas técnicas enumeradas en este capítulo *in vitro/in vivo* son muy necesarias para realizar un diagnóstico diferencial y personalizado al paciente en estudio.

G L O S A R I O

Ácaro: subclase de arácnidos, diminutos, que pueden ser terrestres o acuáticos; el ácaro del polvo es causante de alergias.

Alérgeno: agente que genera reacciones de hipersensibilidad mediada por IgE.

Ampolla: lesión cutánea de contenido líquido, mayor a 5 mm.

Asma: enfermedad crónica inflamatoria de las vías aéreas.

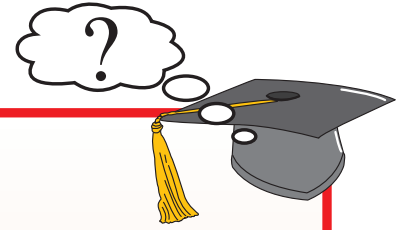
Broncoespasmo: estrechamiento de la luz bronquial por contracción de la musculatura de los bronquios, produciendo dificultad respiratoria.

Eosinófilo: tipo de leucocito, de núcleo bilobulado y gránulos en su citoplasma.

Epífora: presencia de lagrimeo continuo.

Epitelio: tejido de una o varias capas de células unidas que recubre toda la superficie. Los principales que generan alergia son el epitelio de perro, gato o caballo.

Eritema: enrojecimiento de la piel debido a un proceso inflamatorio que genera exceso de riego sanguíneo.



EJERCICIOS

- » **E1. En una muestra de 2 ml de sangre periférica con EDTA de una persona sana, valora la proporción de leucocitos, linfocitos y basófilos presentes mediante el uso de un citómetro de flujo.**

 - ¿Cuál sería la proporción de basófilos del total de leucocitos?
- » **E2. En una muestra de 2 ml de sangre periférica con EDTA de una persona con alergia a las gramíneas, valora la proporción de leucocitos, linfocitos y basófilos presentes mediante el uso de un citómetro de flujo.**

 - ¿Cuál sería la proporción de basófilos del total de leucocitos?
 - ¿Encontrarías diferencias en el número total de leucocitos, linfocitos T, linfocitos B y basófilos? Razona tu respuesta.
- » **E3. Cogiendo el total de basófilos, haces un marcaje específico frente a CD63 y calculad el porcentaje de células positivas en la sangre de una persona normal.**
- » **E4. Coge sangre de un individuo sensibilizado y alérgico frente a gramíneas para realizar el marcaje frente a CD63. ¿Encontrarías diferencias del número de basófilos frente al apartado anterior? Razona tu respuesta.**

EVALÚATE TÚ MISMO



- 1. ¿Qué tipo de hipersensibilidad es la mediada con anticuerpos IgE específicos?:**

 - a) Hipersensibilidad de tipo IV.
 - b) Hipersensibilidad de tipo I.
 - c) Hipersensibilidad de tipo II.
 - d) No existe una hipersensibilidad mediada por estos anticuerpos.



SOLUCIONES
EVALÚATE TÚ MISMO



http://www.aranformacion.es/_soluciones/index.asp?ID=19

