

**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

<b>Aplicación de técnicas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo secundarias</b> .....	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

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





### Capítulo 3

<b>Detección de autoanticuerpos</b> .....	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

<b>Aplicación de técnicas de estudio de hipersensibilidad</b> .....	113
1. Técnicas para el diagnóstico de alergias .....	114

### Capítulo 5

<b>Aplicación de técnicas de identificación de poblaciones celulares por citometría de flujo</b> .....	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

<b>Valoración de la funcionalidad de la inmunidad celular</b> .....	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

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



capítulo

I

## **APLICACIÓN DE TÉCNICAS BASADAS EN REACCIONES ANTÍGENO-ANTICUERPO SECUNDARIAS**

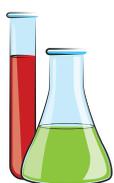
*María Núñez Beltrán  
Miguel Fernández Arquero*

### **Sumario**

1. Técnicas de aglutinación
2. Técnicas de precipitación en medio líquido
3. Técnicas de precipitación en gel
4. Técnicas de fijación del complemento
5. Diagnóstico y seguimiento serológico de las enfermedades

En este capítulo se dará a conocer la **importancia y las propiedades de las moléculas de MHC** (acrónimo del inglés, Major Histocompatibility Complex) o Complejo mayor principal de histocompatibilidad, tanto a nivel molecular como genético.

Una vez conocida toda esa información, se pasará a explicar las **diferentes técnicas para el estudio de histocompatibilidad**, a nivel serológico y genético; sus puntos fuertes y débiles; y, finalmente, la utilidad de estos estudios en el campo de **la medicina y la investigación**.



*Gracias a la acción del sistema inmune, nuestro cuerpo está continuamente protegido de agentes exógenos extraños, denominados antígenos.*

## I. MOLÉCULAS MHC

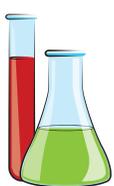
Gracias a la acción del sistema inmune, nuestro cuerpo está continuamente protegido de agentes exógenos extraños, denominados **antígenos**. Una definición más apropiada de antígeno es "cualquier sustancia capaz de unirse específicamente a receptores del sistema inmune", lo que no debe confundirse con **inmunógeno**, que es cualquier sustancia capaz de inducir una respuesta inmune. Así pues, todos los inmunógenos son antígenos, pero no todos los antígenos son inmunógenos.

La primera línea de defensa o inmunidad innata consta de:

- 】 **Barreras físicas y químicas.** Descamación, sudor, mucosas, secreciones, reflejo de toser, etc.
- 】 **Defensa celular.** Una vez atravesadas las barreras físico-químicas, la siguiente línea de defensa son los leucocitos de la respuesta innata, especialmente los fagocitos y células *Natural Killer* (NK).

Una vez el **antígeno** ha pasado las primeras barreras y se encuentra con las células del sistema innato, estas lo captan, lo procesan y lo presentan al exterior para que las demás células lo reconozcan como extraño y lo eliminen si se encuentran con él. La presentación del antígeno en la superficie celular se lleva a cabo a través del **complejo principal de histocompatibilidad o MHC** (de las siglas en inglés *Major Histocompatibility Complex*).

MHC es el nombre genérico y según la especie de la que se esté hablando las siglas cambian, como por ejemplo HLA (*Human Leukocyte Antigen*) en humanos, BLA (*Bovine Leukocyte Antigen*) en animales bovinos, SLA (*Swine Leukocyte Antigen*) en cerdos o H-2 en ratones. A partir de ahora, **nos referiremos a la molécula de MHC como HLA**, puesto que se hablará sobre humanos.



*La presentación del antígeno en la superficie celular se lleva a cabo a través del complejo principal de histocompatibilidad.*

### 3. SISTEMAS DE AMPLIFICACIÓN DE SEÑALES

Dentro de las limitaciones que se encuentran en los inmunoensayos, una de las más importantes históricamente ha sido la **detectabilidad de la reacción**.

Con el fin de aumentarla, se han llevado a cabo varias estrategias:

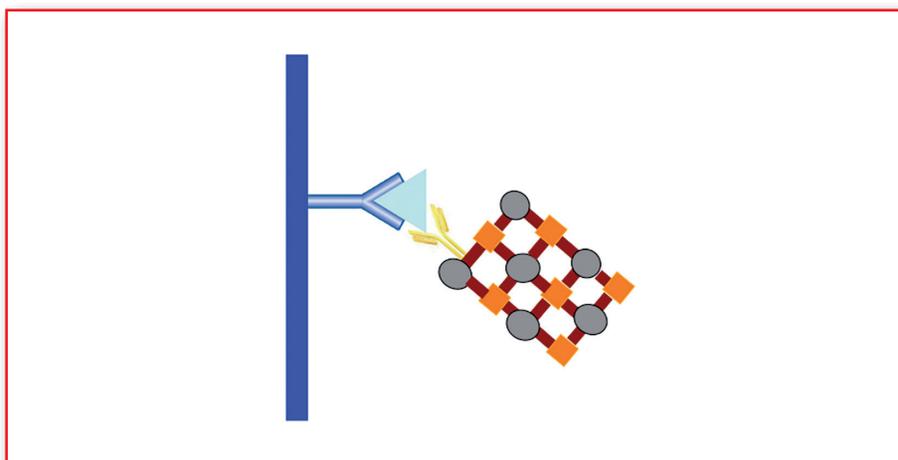
- › Métodos para disminuir el ruido de fondo, debido a uniones inespecíficas.
- › Mejora de los sistemas de detección del marcador.
- › Utilización de sistemas para amplificar la reacción.

Ya se ha comentado que existen diferentes métodos para marcar en producto del inmunoensayos (el complejo antígeno-anticuerpo). La elección del marcaje determinará la metodología para amplificar su señal.

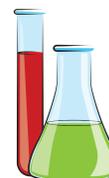
#### 3.1. Enzimoinmunoensayos

Cuando el marcaje se basa en **enzimas**, son de gran utilidad las moléculas que actúan de **conexiones**. Se explica a modo de ejemplo, el caso de la biotina-avidina:

La **biotina** y la **avidina** son moléculas con una alta capacidad de agregación, llegando a formar grandes polímeros. La biotina tiene una elevada facilidad de unión a macromoléculas biológicamente activas, sin alterar su función. Esta capacidad se utiliza para crear amplias redes de biotina-avidina-enzimas marcadoras que se acoplan a un solo anticuerpo (Figura 8).



**Figura 8.** Representación de la capacidad que tiene la avidina para crear amplias redes de biotina-avidina-enzimas marcadoras: se acoplan a un solo anticuerpo proporcionando una amplificación importante de la señal.

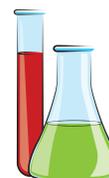


*El punto de corte es un valor cuantitativo, a partir del cual el resultado es positivo.*



#### RECUERDA QUE

*Sensibilidad y especificidad son parámetros de la técnica. Cuando uno aumenta mucho, el otro disminuye. El punto de corte debe establecer el mayor equilibrio posible entre ambos.*

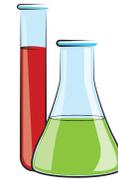


*Un resultado puede variar ligeramente en distintas determinaciones en función de la precisión.*

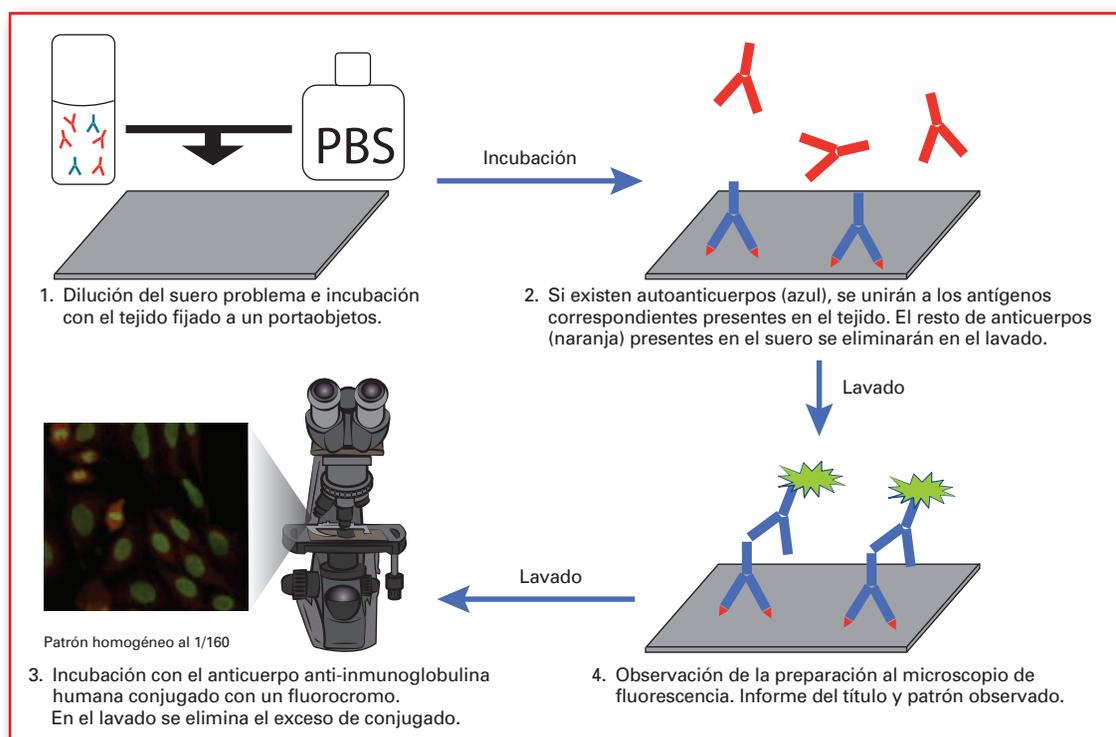
Es una **técnica altamente sensible, aunque poco específica**, siendo capaz de detectar concentraciones de anticuerpo menores a 0,01 mg/ml. Los resultados se informan como un título, que se corresponde al valor de la máxima dilución del suero del paciente a la que sigue observándose fluorescencia. Es por tanto una **técnica semicuantitativa**, ya que no somos capaces de dar un valor de concentración de anticuerpo. La lectura debe realizarse por personal experto.

Para la determinación de anticuerpos por IFI se utilizan normalmente como sustrato portaobjetos con cortes de **tejidos de animales** de experimentación, como rata o mono.

El **procedimiento** se resume en la Figura 2: se diluye el suero del paciente y se pone en contacto con el tejido. Tras la incubación, se realiza una serie de lavados para eliminar los anticuerpos que no se hayan unido y otras sustancias séricas que podrían interferir en el resultado. A continuación, se incuba con un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana que va conjugado con un fluorocromo (anticuerpo secundario), de forma que, al observarlo al microscopio de fluorescencia, se verán fluorescentes las zonas del tejido donde se han unido los autoanticuerpos, si es que estaban presentes. Según la zona del tejido que se marca, se puede determinar la naturaleza de los antígenos frente a los que se dirige el autoanticuerpo.



La **inmunofluorescencia indirecta (IFI)** es la técnica más empleada en los laboratorios para valorar la presencia o ausencia de autoanticuerpos en el suero de un paciente.



**Figura 2.** En esta figura se resume la técnica de inmunofluorescencia, muy utilizada en el diagnóstico inmunológico.

## AMPLÍA TUS CONOCIMIENTOS

Las principales **diferencias entre las técnicas directas e indirectas** son: las directas hacen uso de un único anticuerpo, unido a un fluoróforo, el cual se une directamente a la molécula diana. Esta técnica reduce el número de pasos resultando ser más rápida y segura, puesto que se evitan ciertas interferencias por reacciones inespecíficas de los anticuerpos. Las técnicas indirectas utilizan dos anticuerpos: el primario se une a la molécula diana, y el secundario, marcado con un fluoróforo, que reconoce al primario y se une a él. Las ventajas de esta técnica es su elevada sensibilidad por la unión de más de un anticuerpo secundario al primario, obteniéndose una señal amplificada.

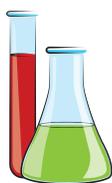
El **anticuerpo anti-inmunoglobulina humana** utilizado puede dirigirse contra algún isotipo en particular o contra todos, en función de lo que queramos determinar. El **fluorocromo** que más frecuentemente se conjuga al anticuerpo secundario es el FITC (fluoresceína isotiocianato).

Es importante utilizar siempre un **control positivo** y **uno negativo** que nos sirvan de referencia a la hora de interpretar los resultados. Una fluorescencia basal en el control negativo debería ser tenida en cuenta para no informar resultados falsamente positivos.

Como se comentó anteriormente, cuando tenemos un resultado positivo a la dilución dada se preparan diluciones sucesivas de ese suero hasta que el resultado observado sea negativo. La última dilución en que se observa fluorescencia es la que se informa.

El tipo de tejido que se utiliza se elige teniendo en cuenta la sospecha diagnóstica del paciente (Tabla 2). En función del tejido elegido la dilución de la muestra que debe hacerse del suero también será distinta.

En pacientes con sospecha de alguna de las enfermedades autoinmunes sistémicas, el sustrato de elección son las **células Hep2**, obtenidas de cáncer de laringe humano. Estas células son de elección por su gran tamaño y constante división y proliferación de forma que pode-



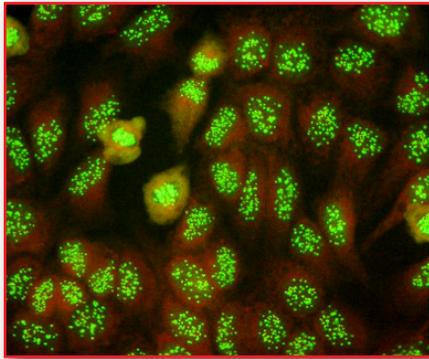
*El tipo de tejido que se utiliza se elige en base a la sospecha diagnóstica del paciente.*

A continuación se muestran los **distintos patrones de IFI** que se pueden observar en una preparación sobre células Hep 2 y otros tejidos (Tabla 3).

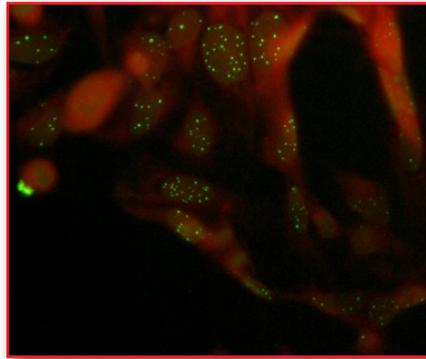
**TABLA 3**

**Patrones observados por IFI**

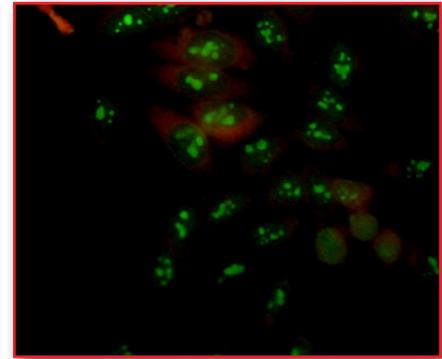
Patrón IFI	Características del patrón	Enfermedad asociada
<b>Nucleoplasma</b>		
dsDNA	Nuclear homogéneo	LES
Sm	Nuclear moteado grueso	LES
U1-RNP	Nuclear moteado grueso	EMTC, LES, Raynaud
SS-A/Ro	Nuclear moteado fino	SS, LES
SS-B/La	Nuclear moteado fino	SS, LES
PCNA	Nuclear moteado pleomórfico	LES
Centrómero	Nuclear moteado puntiforme. Centrómeros en metafase	Scl, Raynaud, CBP
Coilina p80	1-6 puntos en interfase. Cromatina negativa	SS
Sp100	Más de 6 puntos en interfase	CBP
Mi-2	Nuclear moteado fino	DM/PM
<b>Nucleolares</b>		
Fibrilarina	Nucleolar "clumpy"	Scl
NOR-90	Nucleolar moteado	Raynaud
PM/Scl	Nucleolar, nucleoplasma difuso	Overlap Scl/PM, Raynaud
Ku		Overlap Scl/PM, LES
Scl-70	Nucleolar granular, nucleoplasma y cromatina homogéneos	Scl, Overlap PM/Scl
SRP	Nucleolar y citoplásmico difuso	PM/DM
<b>Otros antígenos nucleares</b>		
Láminas	Anillo nuclear	LES, HAI
Poros nuclear	Anillo nuclear	CBP
NuMA	Huso mitótico en interfase	SS
<b>Citoplasma</b>		
RNP	Citoplásmico denso	LES
Jo-1	Citoplásmico moteado en 30 % células	PM
PL-7 y PL-12	Citoplásmico moteado	PM
Centriolo/centrosoma	Puntos citoplásmicos en los polos opuestos a la cromatina en metafase	Scl, Raynaud
Golgi	Aparato de Golgi	SS
Filamentos intermedios	Tipo vimentina	
Microfilamentos	Tipo actina	HAI 1



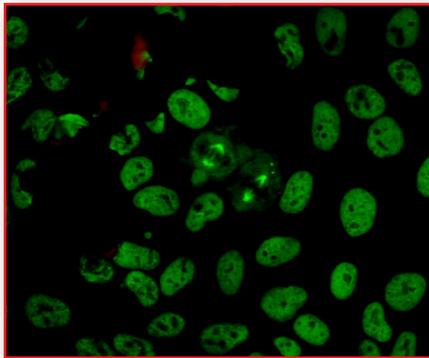
*Patrón punteado tipo centrómero.*



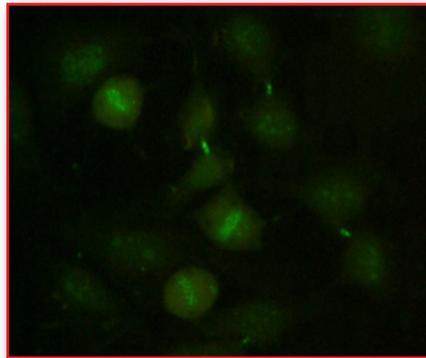
*Patrón punteado tipo Sp100.*



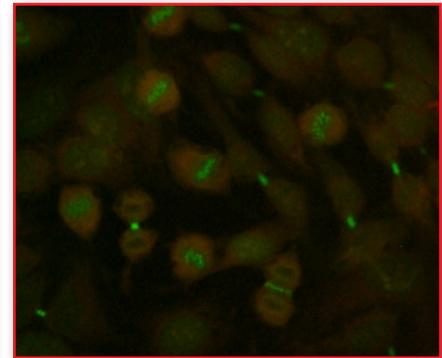
*Patrón nucleolar homogéneo.*



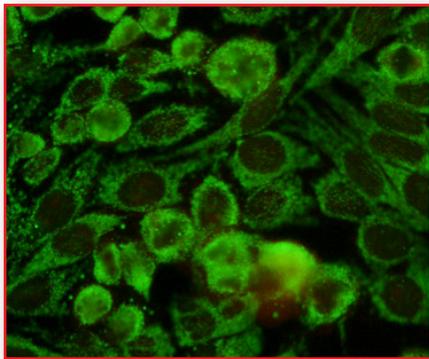
*Patrón huso mitótico más moteado fino.*



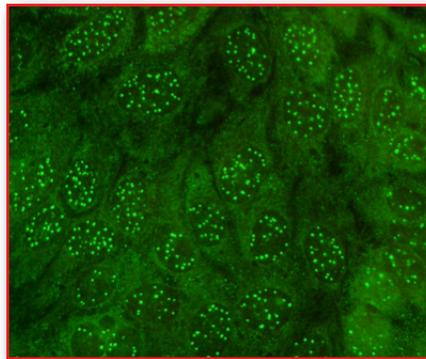
*Patrón midbody.*



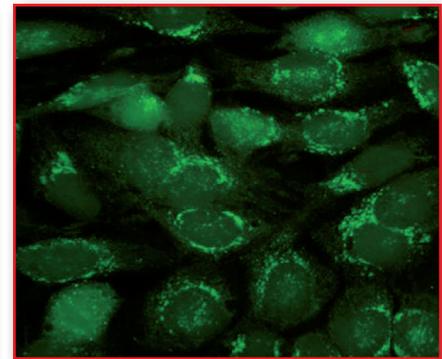
*Patrón CENP-F.*



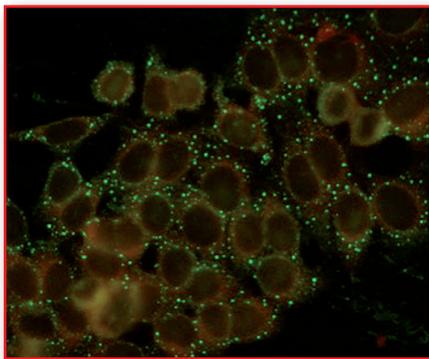
*Patrón citoplásmico moteado fino.*



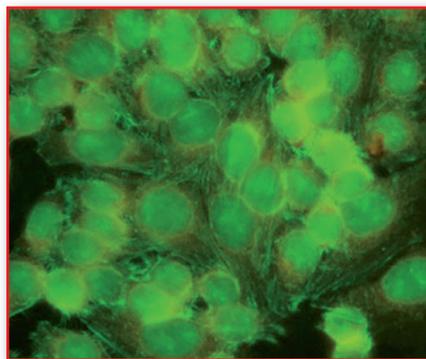
*Patrón AMA más Sp100.*



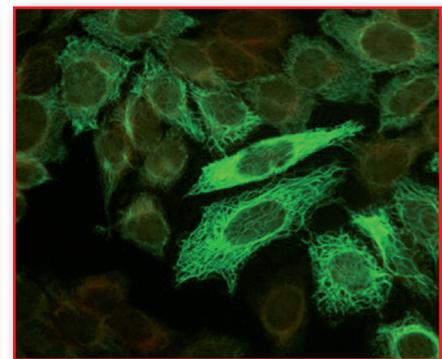
*Patrón tipo Golgi.*



*Patrón lisosomal.*



*Patrón citoesqueleto tipo actina.*



*Patrón citoesqueleto tipo filamentos intermedios.*



Cuando existe una sospecha de enfermedad autoinmune sistémica, debe realizarse la **determinación de ANA por IFI**. Cuando se observan anticuerpos positivos, se recomienda realizar otras técnicas para el estudio e identificación de los antígenos reconocidos por los autoanticuerpos. Entre estas técnicas destacan principalmente el **enzimoinmunoensayo (ELISA)** y el **inmunoblot (IB)**.

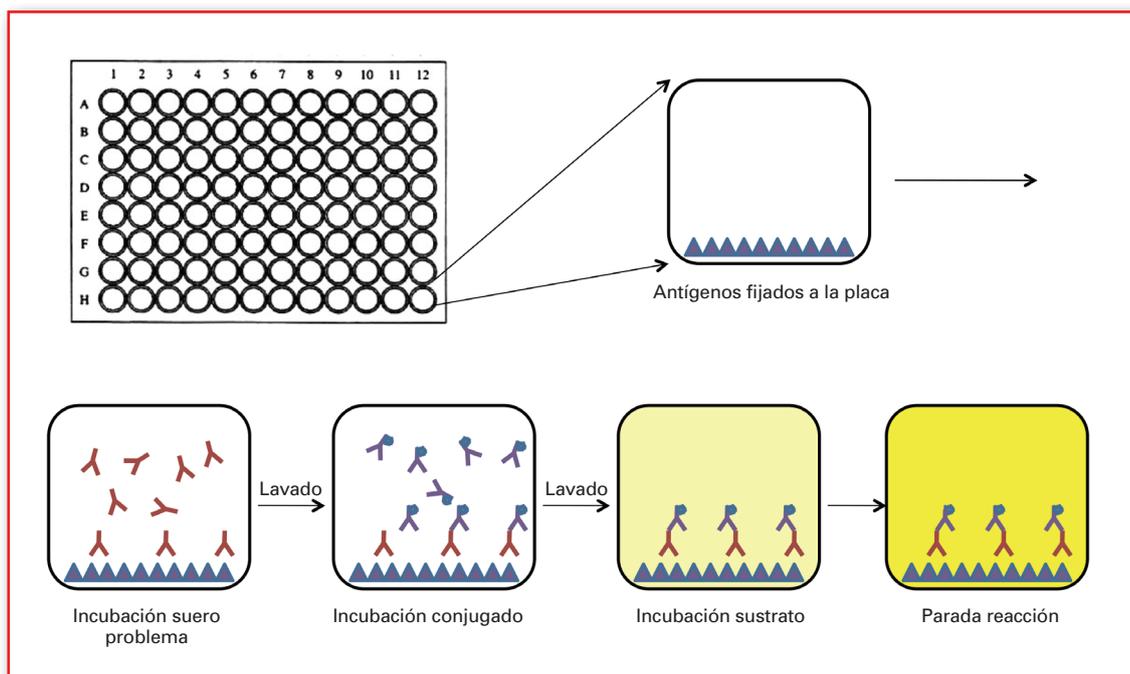
## 5. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE ELISA

Para la detección de autoanticuerpos por ELISA, se fija el **antígeno en placas de poliestireno** (Figura 4). Al igual que en la IFI, existe una primera fase de incubación con el suero del paciente. En la segunda fase, se añaden anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas marcados en este caso con una enzima, un radioisótopo o una molécula luminiscente. Finalmente, se mide la cantidad de producto coloreado, o luminiscencia o radiactividad de forma que obtenemos una medida cuantitativa de la cantidad de autoanticuerpo presente en la muestra. Para ello, es necesario utilizar una **curva estándar calibrada patrón** usando sueros de concentración conocida, para finalmente poder interpolar la medida del suero en la curva y poder conocer la cantidad de anticuerpo presente en el suero. Esta curva normalmente no es lineal y pueden existir variaciones en las determinaciones sucesivas de un



### RECUERDA QUE

*La técnica del ELISA es una técnica altamente específica, lo que se traduce en la aparición de muy pocos resultados falsamente positivos; es decir, se reduce el número de muestras informadas como positivas que realmente son negativas.*



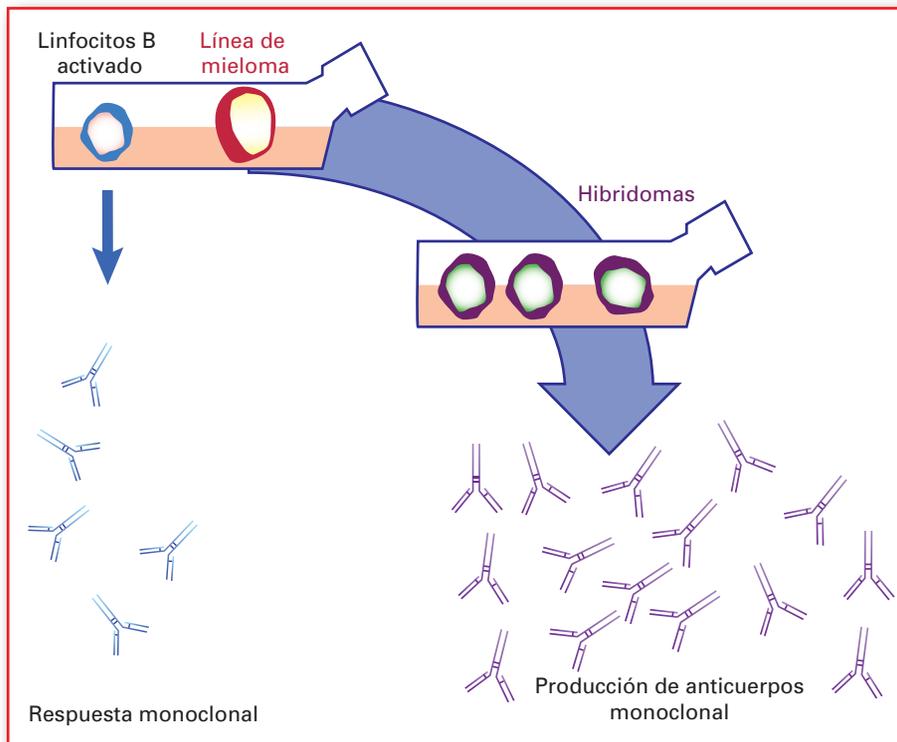
**Figura 4.** Se resume la técnica de ELISA trabajando en una placa poliestireno multipocillo para ver la existencia de diferentes anticuerpos presentes en las patologías estudiadas para un buen diagnóstico.

## I.I. Fluorocromos

La utilización de **compuestos fluorescentes**, denominados **fluorocromos**, ha sido fundamental en el desarrollo de la CMF. Son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a una longitud de onda superior de menor energía. Se caracterizan por sus **espectros de excitación o absorción**, que es el rango sobre el que un fluorocromo absorbe luz y por sus **espectros de emisión**, que es el rango sobre el que un fluorocromo emite luz. Por lo tanto, su utilización está condicionada por el tipo de láser del que disponga el citómetro y por la longitud de onda a la que se exciten ellos mismos (Figura 2).

Fluorocromo	Color de emisión de fluorescencia	Excitación máxima (nm)	Línea de excitación del láser (nm)	Emisión máxima (nm)
Alexa Fluor® 405	Azul	401	360, 405, 407	421
Pacific Blue®	Azul	405	360, 405, 407	455
AmCyan	Verde	457	405, 407	491
Alexa Fluor® 488	Verde	495	488	519
FITC	Verde	494	488	519
PE	Amarillo	496, 564	488, 532	578
PE-Texas Red®	Naranja	496, 564	488, 532	615
Texas Red®	Naranja	595	595	615
APC	Rojo	650	595, 633, 635, 647	660
Alexa Fluor® 647	Rojo	650	595, 633, 635, 647	668
PE-Cy5	Rojo	496, 564	488, 532	667
PerCP	Rojo	482	488, 532	678
PerCP-Cy5.5	Rojo Lejano	482	488, 532	695
Alexa Fluor® 700	Rojo Lejano	696	633, 635	719
PE-Cy7	Infrarrojo	496, 564	488, 532	785
APC-Cy7	Infrarrojo	650	595, 633, 635, 647	785

Figura 2. Longitudes de onda de excitación y emisión de los principales fluorocromos.



<http://www.humanimmunologyportal.com/protocols/preparing-a-single-cell-suspension-from-either-frozen-or-primary-tissue-samples/>

**Figura 6.** Representación esquemática de la producción de un hibridoma por la fusión de un linfocito B y una célula de mieloma para la producción de anticuerpos monoclonales.

## 2. FUNCIONAMIENTO DE UN CITÓMETRO DE FLUJO

La CMF permite obtener información sobre poblaciones celulares a partir del **estudio individualizado de un gran número de células** (habitualmente entre 50.000 y 100.000) que supone una muestra suficientemente representativa del tamaño poblacional. Brevemente, la suspensión celular en solución isotónica se hace pasar a través de un pequeño orificio de modo que cuando salen las células lo hacen una a una formando parte de una corriente continua o flujo cilíndrico. Sobre esta corriente se hace incidir un haz de luz láser. A continuación, se describirán cada uno de los elementos por los que pasa una muestra en su paso por el citómetro.

### 2.1. Estructura de un citómetro de flujo

Los citómetros de flujo constan de los siguientes componentes:

- ▶ **Sistema de inyección de la muestra.** Permite que las células se transporten a una corriente de flujo hidrodinámico. Pueden ser de dos tipos:
  - ▶ **Sistema de presión diferencial.** Un regulador de presión mantiene una presión superior en el contenedor de la muestra respecto al



#### RECUERDA QUE

Los antígenos son moléculas (proteínas, hidratos de carbono o lípidos) presentes en las células y que son capaces de unir anticuerpos de antígenos dirigidos específicamente contra ellos.

Control	0,12 µl PHA	0,25 µl PHA	0,5 µl PHA
0,5 µl α CD3	1 µl α CD3	Control	

El volumen total de cada pocillo será 250 µl

**Figura 7.** Se representa el experimento para valorar, con diferentes concentraciones de mitógeno (PHA) y anticuerpo CD3, la activación y proliferación celular.

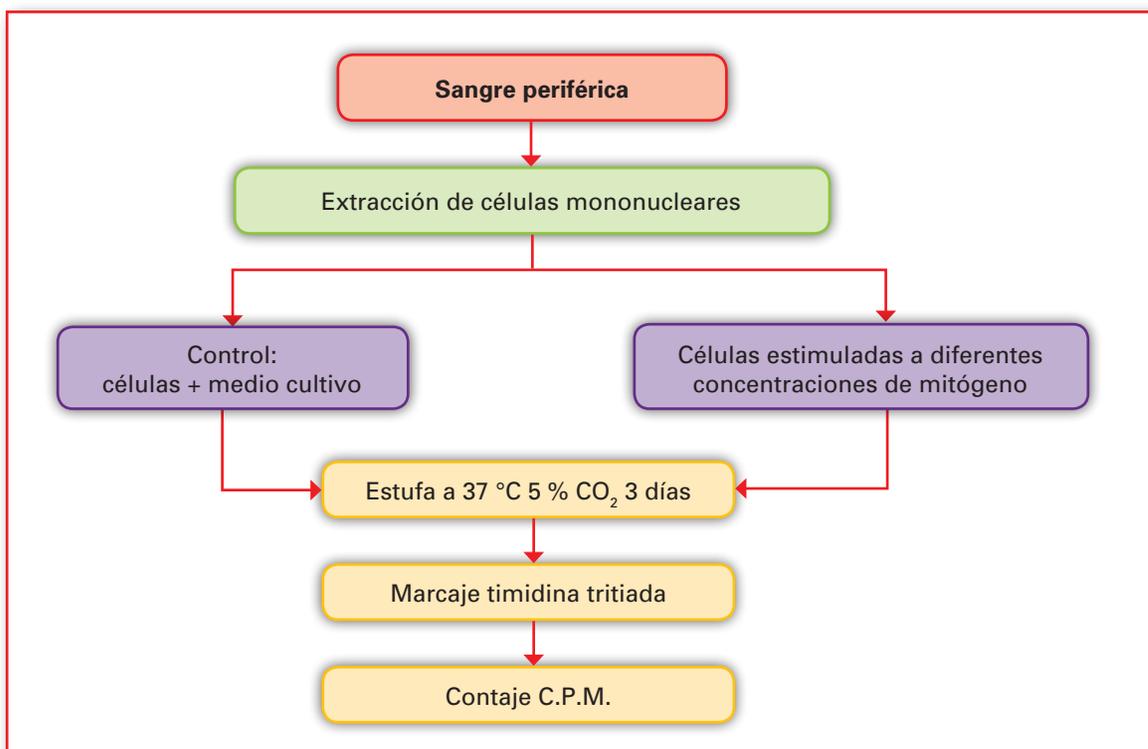


**RECUERDA QUE**

Ante resultados de estimulación negativos hay que ver si el paciente estaba en tratamiento con algún fármaco que nos pueda alterar el resultado.

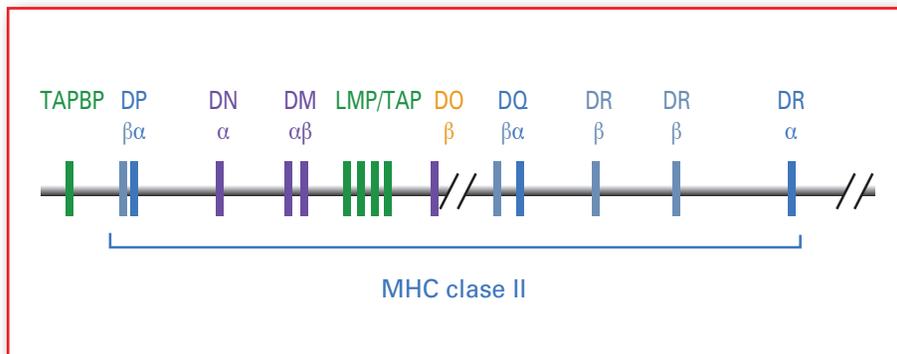
Un índice de estimulación de tres o más está considerado dentro de la normalidad.

En la Figura 8 se resumen los pasos principales de esta técnica.



**Figura 8.** En esta figura se representa un esquema para valorar la activación y proliferación celular por incorporación de timidina tritiada.

Es importante tener en cuenta una serie de consideraciones, como mirar la desviación estándar de nuestras réplicas para una buena interpretación de los resultados.



**Figura 5.** Región HLA de clase II. Se representan los genes ubicados en esta región HLA de clase II.



**RECUERDA QUE**

Locus es la posición que ocupa un gen/ alelo en concreto dentro de un cromosoma. El plural de locus es loci.

Existen dos propiedades de las moléculas HLA que hacen difícil a los patógenos evadir una respuesta del sistema inmune. La primera es que la HLA es **altamente poligénica**, es decir, contiene varios genes para HLA de clase I y HLA de clase II, por lo que cada individuo posee un set de moléculas HLA con diferentes especificidades para la unión del péptido. Y segundo, la molécula de HLA es **altamente polimórfica**. Eso significa que hay múltiples variantes de cada gen hablando desde una perspectiva de la población global.

En general, existen **más de 3.000 alelos para los genes de HLA** tanto de clase I como de clase II. Cada alelo está presente en la población en diferentes frecuencias, por lo que es poco común encontrar el mismo alelo en ambos cromosomas de un individuo (homocigoto). La mayor parte de la población es **heterocigota**. La expresión de los alelos de HLA es codominante, por lo que ambos alelos, uno paterno y otro materno, se expresan en la célula y son capaces de presentar los antígenos a los linfocitos T. Esta variabilidad permite que un patógeno que puede ser letal para un individuo, no pueda evadir el sistema inmune a nivel poblacional.

**1.3.3. HLA clase III**

En este *locus* se localizan genes que codifican para las proteínas con distintas actividades, desde inflamatorias (TNF, HSP) hasta otras con diferentes funciones dentro del sistema inmune, como las proteínas del complemento (C2, C4, factor B, etc.).

**2. ESTUDIOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD**

Los estudios de **histocompatibilidad** están a la orden del día, su utilidad es incuestionable a la hora de la determinación de la variación genética y fenómenos inmunológicos involucrados en diversas patologías.



**RECUERDA QUE**

Histocompatibilidad es la semejanza entre dos o más tejidos a nivel genético e inmunológico. Un ejemplo sería el sistema ABO sanguíneo y HLA.

## RESUMEN

- ✓ En este capítulo se ha tratado la **citometría de flujo**, una de las técnicas de mayor utilidad en los laboratorios clínicos y de investigación.
- ✓ Se han tratado, en primer lugar, los **tipos de muestras** a analizar, los **contenedores** en los que se recogen en cada caso y la **forma de procesamiento** para obtener una adecuada suspensión celular previa al marcaje con los fluorocromos o anticuerpos monoclonales.
- ✓ En segundo lugar, se han tratado todos los **elementos** de los que se compone un **citómetro de flujo** y el paso de la muestra por cada uno de sus elementos. Además, los avances en citometría de flujo han permitido que se pueda realizar no solo un **análisis de las células de una suspensión celular** sino que también se pueda realizar una correcta **separación de una determinada población celular** de interés para hacer posteriores estudios. Este aspecto, junto con otras técnicas de separación celular no dependientes de un citómetro, también se han tratado en este capítulo.
- ✓ Se han intentado resumir brevemente algunas de las **aplicaciones de la citometría de flujo**, haciendo énfasis principalmente en el fundamento más que en el procedimiento, ya que los protocolos de trabajo y el método de marcaje pueden diferir de un laboratorio a otro, dependiendo del citómetro y de los anticuerpos monoclonales utilizados. Finalmente, se ha incluido un apartado en el que se incluyen unas **recomendaciones** a tener en cuenta para llevar a cabo un correcto **inmunofenotipaje** de la muestra que se esté estudiando.

## G L O S A R I O

**Anticuerpo monoclonal:** principal reactivo utilizado en CMF cuando están o pueden ser conjugados con fluorocromos. Son Ac específicos para un solo Ag. En CMF se utilizan para identificar poblaciones celulares específicas gracias a combinaciones de anticuerpos monoclonales para antígenos presentes en estas células.



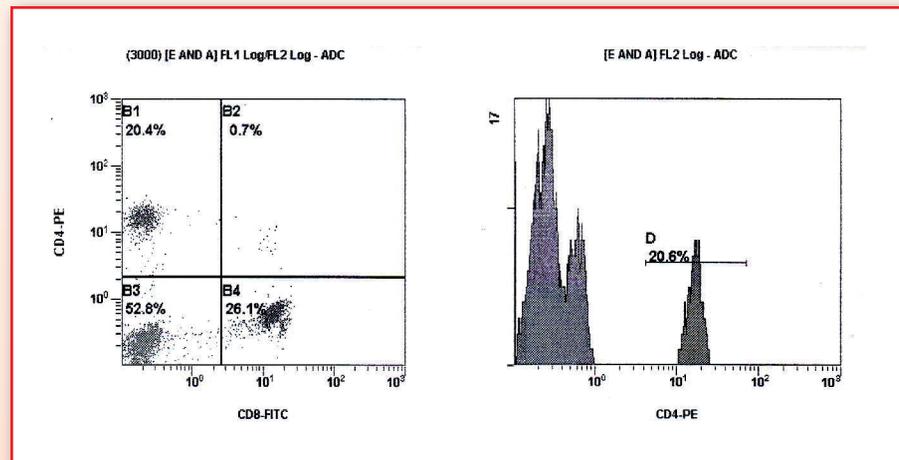
## EJERCICIOS

» E1. ¿Se puede llevar a cabo el análisis de las poblaciones leucocitarias en sangre total de un paciente recogida en un tubo seco?

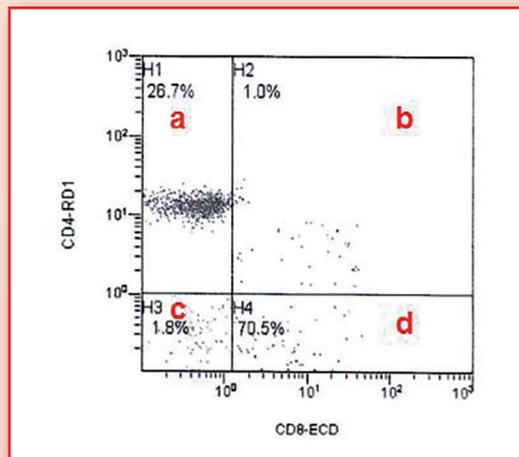
» E2. Une cada uno de los anticuerpos monoclonales con las células que reconocen:

Anti-CD21	Linfocitos <i>T helper</i>
Anti-CD56	Células plasmáticas
Anti-CD4	Linfocitos T citotóxicos
Anti-CD138	Linfocitos B
Anti-CD8	Linfocitos NK

» E3. ¿Cuál de los dos es un histograma uniparamétrico? ¿Y uno bidimensional?



» E4. En el siguiente histograma, asigna a, b, c o d según corresponda y señala su porcentaje:





## EVALÚATE TÚ MISMO

### 1. ¿Cuál de las siguientes muestras se puede estudiar por citometría de flujo?:

- a) Líquidos cefalorraquídeos.
- b) Lavados bronqueolabeolares y exudados.
- c) Sangre total.
- d) Todas las respuestas anteriores son correctas.

### 2. ¿Cuál de los siguientes métodos se utiliza con una muestra de sangre total?:

- a) Un método enzimático.
- b) Un método químico.
- c) Un método mecánico.
- d) Ninguna de las respuestas anteriores es correcta.

### 3. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones es cierta?:

- a) La disponibilidad de una suspensión celular no constituye un factor limitante común en los estudios por citometría de flujo (CMF).
- b) No se requieren suspensiones celulares de muy alta calidad para los estudios de citometría de flujo.
- c) Se requiere un volumen de muestra celular suficiente para llevar a cabo los estudios necesarios.
- d) La presencia de agregados en una suspensión celular es deseable, ya que contienen una gran cantidad de células en su interior y no pueden llegar a obstruir el citómetro.

### 4. ¿Cuál de las siguientes definiciones se refiere a un fluorocromo?:

- a) Son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a una longitud de onda superior de menor energía.
- b) Son moléculas que emiten luz de forma espontánea.
- c) Son moléculas que se producen a partir de la fusión de un linfocito B con una célula de un mieloma.
- d) Son moléculas que después de conjugarse con un anticuerpo son capaces de emitir fluorescencia.

### 5. Respecto a un fluorocromo, ¿qué afirmación es falsa?:

- a) Deben ser fotoestables.
- b) Deben poseer un corto estado de excitación.
- c) Su espectro de absorción debe ser lo más cercano posible al espectro de emisión del láser utilizado.
- d) Su espectro de absorción debe ser lo más lejano posible al espectro de emisión del láser utilizado.



**SOLUCIONES**  
**EVALÚATE TÚ MISMO**



[http://www.aranformacion.es/\\_soluciones/index.asp?ID=19](http://www.aranformacion.es/_soluciones/index.asp?ID=19)

