

# **- GUIA DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS 2011 -**

**- Inmunología - Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología.**

**Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires**

## **INDICE**

1. Interacción antígeno-anticuerpo	Página 1
2. Interacción Secundaria Ag-Ac	Página 1
2.a. Reacciones de precipitación	Página 1
2.b. Técnicas inmunológicas basadas en reacciones de precipitación.	Página 2
Inmunodifusión Radial	Página 2
Inmunoelectroforesis	Página 2
2.c. Reacciones de aglutinación	Página 3
2.d. Concepto de título	Página 5
3. Interacción primaria Ag-Ac	Página 7
3.a. Inmunomarcación	Página 7
Inmunomarcación con Acs conjugados a ENZIMAS	Página 8
Inmunomarcación con Acs conjugados a FLUOROCROMOS	Página 8
Citometría de Flujo	Página 9
3.b. Radioinmunoanálisis y Técnicas radioinmunométricas	Página 12
3.c. ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)	Página 13
4. Otras técnicas	
4.a. Proteinograma electroforético	Página 14
4.b. Nefelometría	Página 15
4.c. Western Blot	Página 15
5. Técnicas de tipificación de antígenos de histocompatibilidad	Página 16
5.a. Técnicas serológicas	Página 17
5.b. Técnicas moleculares	Página 18
6. Cross match	Página 22
7. Técnicas inmunológicas para estudiar la funcionalidad de los fagocitos	Página 22

## 1. INTERACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO

La unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) es una interacción reversible en la que están involucrados enlaces no-covalentes. En la interacción *in vitro* de un antígeno (Ag) con su correspondiente anticuerpo (Ac) se distinguen dos etapas, la **interacción primaria** no visualizable y la **interacción secundaria**, que sigue a la anterior y se caracteriza por la aparición de un fenómeno visible como la aglutinación o la precipitación. Por otro lado, no siempre que se produce la interacción primaria Ag-Ac, se produce la interacción secundaria, ya que, para conseguir fenómenos visibles, son indispensables determinadas concentraciones y características de los Ags y Acs.

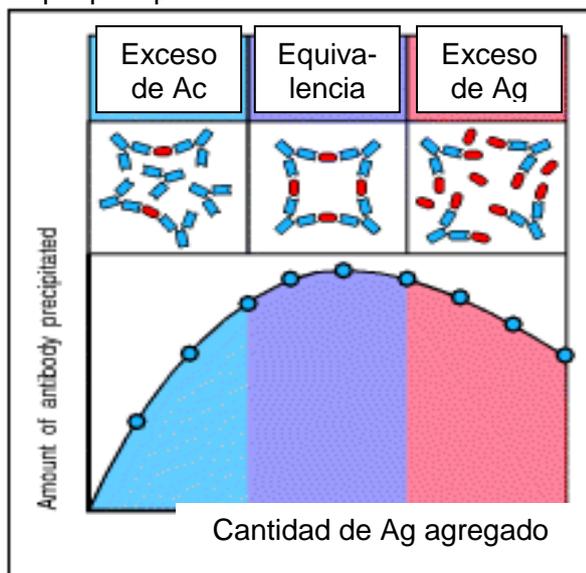
## 2. INTERACCIÓN SECUNDARIA ANTÍGENO-ANTICUERPO.

Las técnicas inmunológicas que evidencian la interacción Ag-Ac a través de una reacción secundaria (precipitación o aglutinación) son, generalmente, más económicas y sencillas que aquellas que permiten visualizar la interacción primaria (ver más adelante).

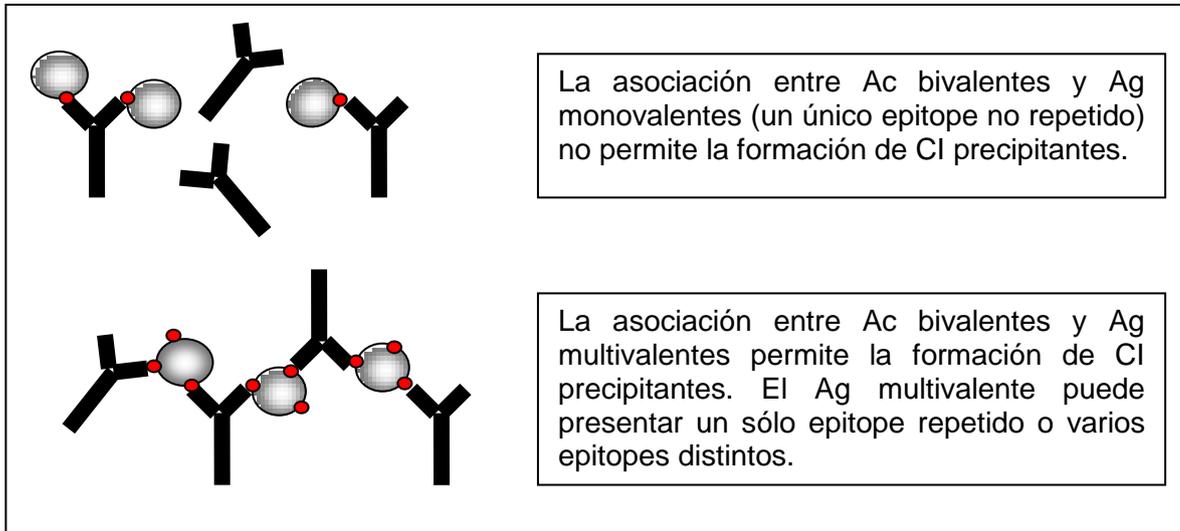
### 2.a. Reacciones de precipitación

Al mezclar cantidades suficientes de Ag soluble con Acs específicos, la interacción Ag-Ac puede dar lugar a una red capaz de ser visualizada como un precipitado. Esa red de la que hablamos, no es otra cosa que grandes complejos inmunes (CI) formados por la interacción Ag-Ac. Tal como se observa en la figura, cuando se agregan concentraciones crecientes de **Ag soluble** a una cantidad fija de suero conteniendo Acs específicos, a medida que la cantidad de Ag agregado aumenta, la cantidad de precipitado se incrementa hasta alcanzar un máximo, luego del cual declina.

En un extremo de la curva de precipitación, cuando se agregan pequeñas cantidades de Ag, los CI se forman en **exceso de Ac**. En el otro extremo, al agregar grandes cantidades de Ag, los CI se forman en **exceso de Ag** siendo pequeños y probablemente constituidos por una molécula de Ac y dos de Ag. Entre estas dos situaciones extremas se encuentra la **zona de equivalencia**, en donde la relación Ag-Ac permite la formación de grandes redes de CI que precipitan.



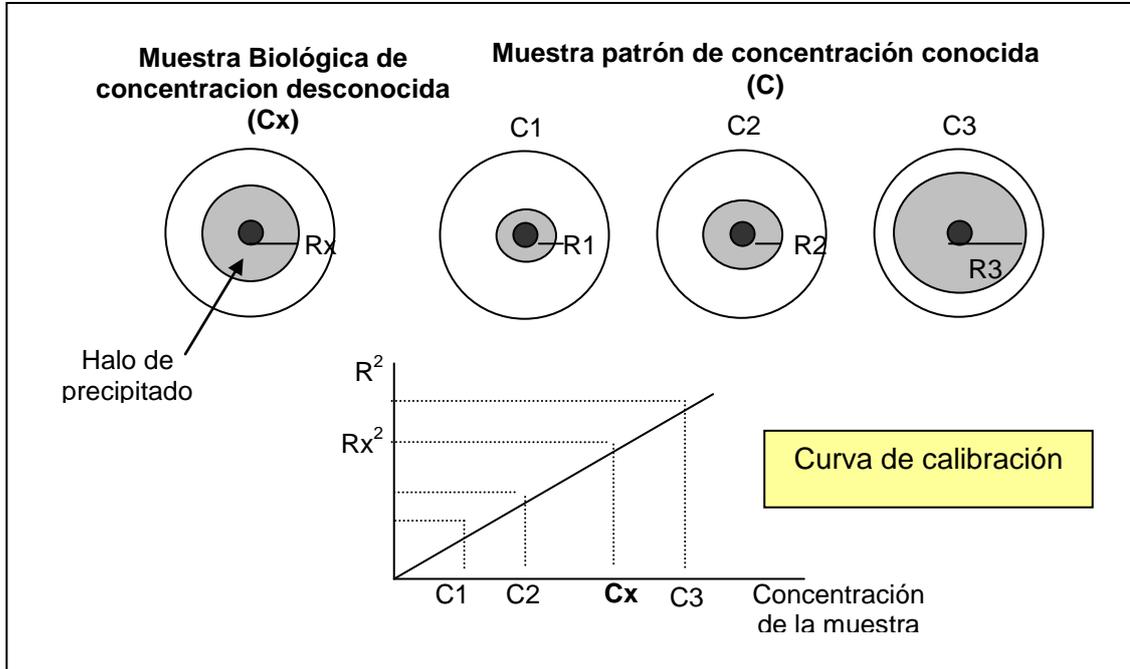
La reacción de precipitación depende de la **VALENCIA** del Ac y del Ag. La valencia del Ac da idea del número de sitios que posee para reconocer al Ag. De esta manera, un Ac bivalente posee dos sitios capaces de reconocer al Ag. Del mismo modo, la valencia de un Ag nos habla del máximo número de epitopes que posee. Para que se pueda producir la interacción secundaria Ag-Ac con la consecuente formación del precipitado, tanto el Ag como el Ac deben ser, al menos, bivalentes.



## 2.b. Técnicas inmunológicas basadas en reacciones de precipitación.

### 1- Inmuno Difusión Radial (IDR)

Esta técnica permite cuantificar de manera sencilla y económica inmunoglobulinas de isotipo G, M y A o antígenos solubles (C3, C4, transferrina, etc) presentes en muestras biológicas. La técnica se basa en la difusión de la muestra conteniendo el antígeno a medir (inmunoglobulinas o antígenos solubles) en una matriz semisólida de agar en la que se encuentra disuelto el Ac específico. La muestra biológica se introduce en los orificios cilíndricos excavados en el agar y a medida que el antígeno difunde en forma radial, se alcanza la relación Ag-Ac que permite la formación de precipitados visibles. Una vez finalizada la difusión se mide el radio (R) de los precipitados que es proporcional a la concentración de antígeno (C). La concentración de proteína en la muestra biológica (Cx) se calcula realizando una curva de calibración utilizando muestras patrones de concentración conocida.

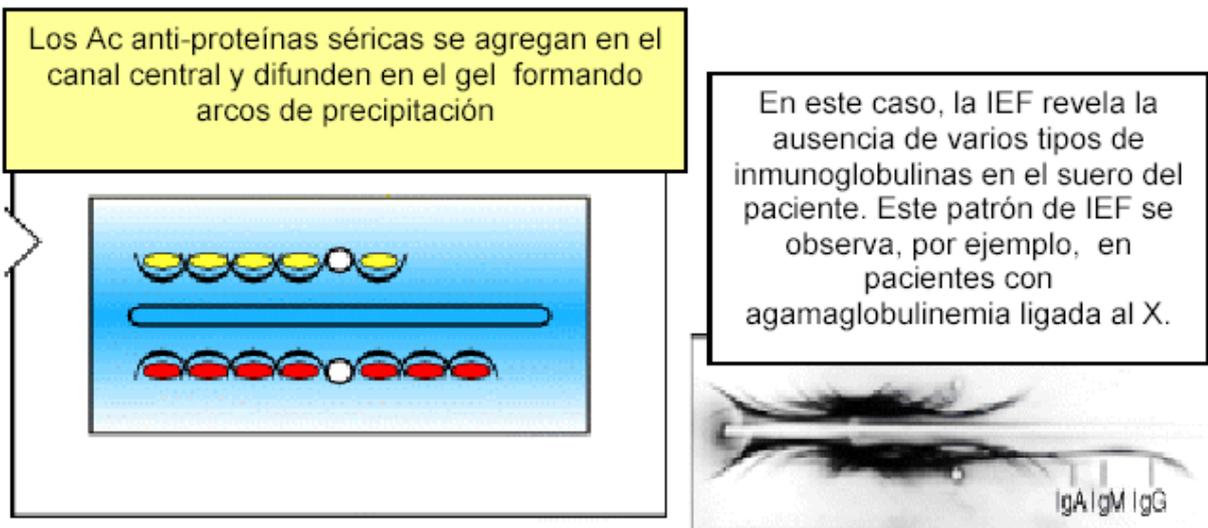
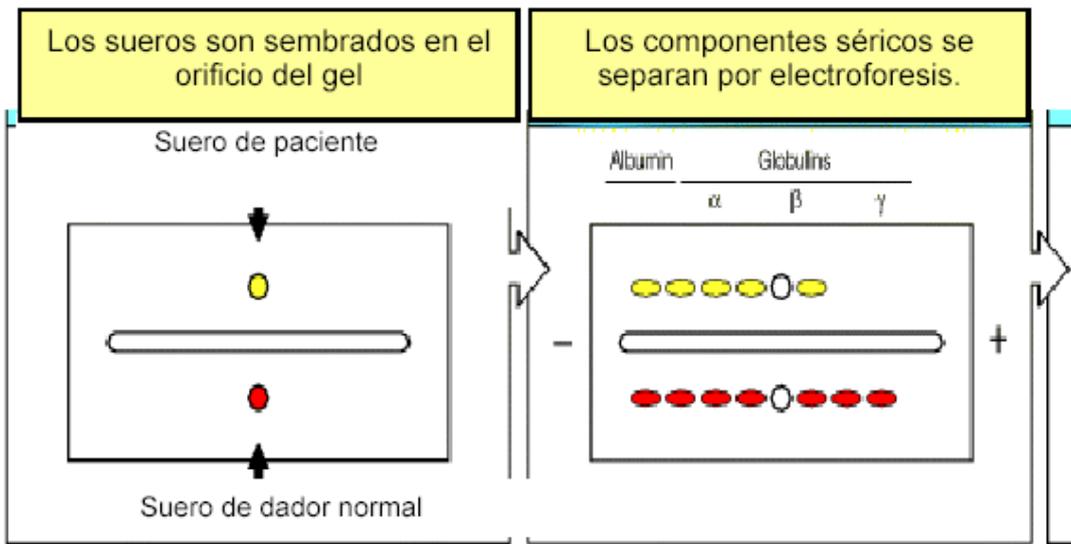


### 2- Inmunolectroforesis (IEF).

La inmunolectroforesis es una técnica cualitativa que permite la identificación de diferentes componentes proteicos presentes en distintas muestras biológicas (suero, orina, etc) a través de arcos de precipitación. La técnica se realiza preferentemente en geles de agarosa y se distinguen dos etapas:

- 1) Las muestras se someten a una separación electroforética.

2) Terminada la electroforesis, las proteínas interactúan con los Acs específicos aplicados en el agar en un canal paralelo al eje de migración. Luego de un período de difusión de los Acs, se observan arcos de precipitación cuya forma y posición dependen de las características inmunológicas y de la concentración de cada proteína.



### 2.c. Reacciones de aglutinación

Las reacciones de aglutinación, tal como vimos para las reacciones de precipitación, involucran una interacción secundaria entre Ag-Ac que llevará a la aparición de un aglutinado que se visualiza como grumos. Los principios fisicoquímicos que gobiernan la formación de estos aglutinados son los mismos que gobiernan la formación de un precipitado. En otras palabras, los principios discutidos anteriormente acerca de la zona de exceso de antígeno, la zona de equivalencia y la zona de exceso de anticuerpo, son válidas y aplicables a las reacciones de aglutinación. La gran diferencia entre las reacciones de precipitación y las reacciones de aglutinación son las características del antígeno: mientras que en las reacciones de precipitación se emplean antígenos solubles, en las reacciones de aglutinación el **Ag es particulado**. Con un Ag soluble, también es posible diseñar una reacción de aglutinación gracias a que es posible utilizar distintas partículas (partículas inertes o glóbulos rojos) y realizar un pegado químico o fisicoquímico del Ag soluble a dichas partículas, generando de esa manera un "Ag particulado" útil para fines diagnósticos.

La ventajas de las reacciones de aglutinación desde el punto de vista de su utilidad en el laboratorio es que son muy sencillas de realizar, no requieren de ningún equipamiento para su lectura, son rápidas y fáciles de implementar. Además, presentan una mayor sensibilidad que las reacciones de precipitación por lo que las

han sustituido en muchos casos. Sin embargo, cabe mencionar, que las reacciones de aglutinación presentan una menor sensibilidad que las reacciones de interacción primaria tales como ELISA e Inmunofluorescencia indirecta (ver mas adelante). Esto hace que en determinados casos se prefiera el empleo de una de estas 2 técnicas para la detección de Acs contra un determinado agente patógeno. Las ventajas enumeradas hacen de las reacciones de aglutinación una valiosa herramienta para diversos estudios serológicos (búsqueda de Acs específicos contra agentes patógenos) y para la detección de antígenos en fluidos biológicos.

Tipos de reacciones de aglutinación según las características de las partículas aglutinantes:

De acuerdo a las características de las partículas aglutinantes, las reacciones de aglutinación pueden clasificarse en:

- reacciones de aglutinación activa; o
- reacciones de aglutinación pasiva.

Las reacciones de aglutinación activa se basan en el empleo de la partícula aglutinante como antígeno. Como ejemplos podemos mencionar:

Partícula aglutinante	Reacción	Utilidad diagnóstica
Glóbulos rojos		Determinación de grupo sanguíneo y factor Rh
Glóbulos rojos	Coombs indirecta	Determinación de sensibilización por incompatibilidad Rh
Glóbulos rojos	Coombs directa	Determinación de eritroblastosis fetal
Bacterias ( <i>Brucella</i> )	Huddleson	Búsqueda de Ac anti- <i>Brucella</i> en sueros humanos (banco de sangre)
Parásitos ( <i>Trypanosoma cruzi</i> )	AD-Chagas	Búsqueda de Ac anti- <i>T. cruzi</i> en sueros humanos (banco de sangre)
Parásitos ( <i>Toxoplasma gondii</i> )	AD-Toxo	Búsqueda de Ac anti- <i>T. gondii</i> en sueros humanos (banco de sangre)

Las reacciones de aglutinación pasiva se basan en el empleo de una partícula aglutinante inerte a la cual se la ha unido un antígeno. Como ejemplos podemos mencionar:

Partícula aglutinante	Reacción	Utilidad diagnóstica
Glóbulos rojos + lisado de <i>T. cruzi</i>	HAI-Chagas	Búsqueda de Ac anti- <i>T. Cruzi</i> en sueros humanos (banco de sangre)
Glóbulos rojos + lisado de <i>T. gondii</i>	HAI-Toxo	Búsqueda de Ac anti- <i>T. Gondii</i> en sueros humanos (banco de sangre)
Látex + gp120		Búsqueda de Ac anti-VIH en sueros humanos (banco de sangre)
Látex + sHBV		Búsqueda de Ac anti-HBV en sueros humanos (banco de sangre)
Látex + estreptolisina O	ASTO	Búsqueda de Ac anti-estreptolisina O en sueros humanos (infección por estreptococo $\beta$ -hemolítico)

Como se desprende de la tabla anterior, los soportes particulados para las reacciones de aglutinación indirecta pueden ser glóbulos rojos (en este caso se habla en general de “hemaglutinación”) o partículas de látex. El empleo de este tipo de partículas inertes ha permitido extender el rango de utilidad de la técnica de aglutinación a la determinación de Ac contra agentes infecciosos tales como el VIH o el HBV, e inclusive para la determinación de Ac contra moléculas solubles (estreptolisina O, proteína C reactiva, etc.).

Como paso indispensable para la preparación de este tipo de reactivos, es necesaria una etapa de incubación entre la partícula inerte y el antígeno soluble sensibilizante (en general, los Ag sensibilizantes son proteínas, aunque es posible inmovilizar hidratos de carbono), que permitirá el “pegado” del mismo a la partícula. Este procedimiento puede realizarse por simple adsorción (unión no covalente del Ag a la partícula) o por unión covalente. En la mayoría de los casos se requiere un acondicionamiento previo de la superficie de la partícula. Para el caso de los glóbulos rojos, esto se logra por incubación con ácido tánico (proceso denominado “tanado”) o con CrCl<sub>3</sub>. Una vez realizado el “pegado” del Ag a la superficie del glóbulo rojo, las partículas pueden ser fijadas con agentes químicos tales como el glutaraldehído con el objeto de darles

mayor estabilidad en el tiempo y a los cambios de temperatura, lo que aumenta la vida útil del reactivo diagnóstico.

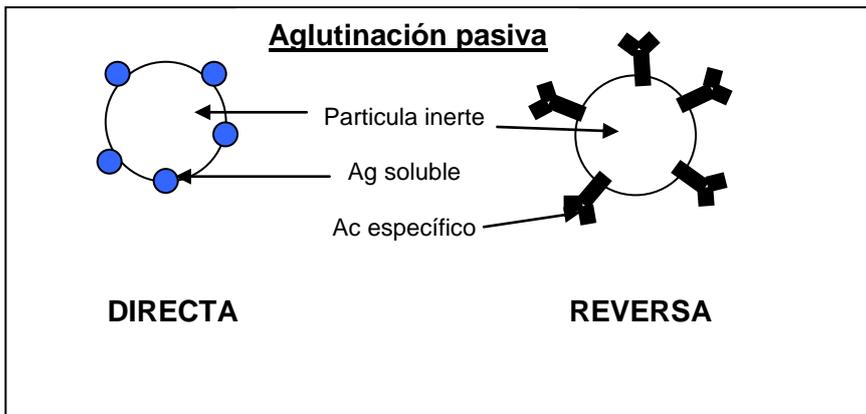
Tipos de reacciones de aglutinación pasiva según la identidad de la especie “pegada” a las partículas aglutinantes:

Considerando que es posible inmovilizar muchos tipos diferentes de proteínas a distintos tipos de partículas inertes, es posible clasificar las reacciones de aglutinación pasiva en:

- reacciones de aglutinación pasiva directa; o
- reacciones de aglutinación pasiva reversa.

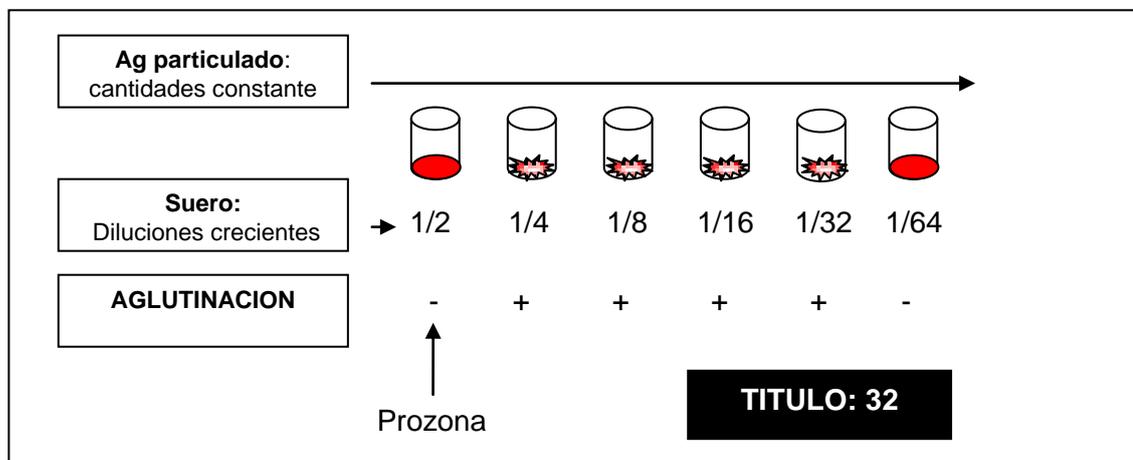
Las reacciones de aglutinación directa se basan en la sensibilización de la partícula inerte con el Ag, por lo que resultan útiles para la detección y titulación de Ac en distintos fluidos biológicos. Como ejemplos, basta repasar la información brindada en la tabla anterior.

Por el contrario, las reacciones de aglutinación reversa se basan en la inmovilización del Ac (en general, se inmoviliza un anticuerpo monoclonal –AcMo-) en la superficie de la partícula inerte, siendo este tipo de reacciones particularmente útiles para la detección de Ag en distintas muestras biológicas.



**2.d. Concepto de TÍTULO**

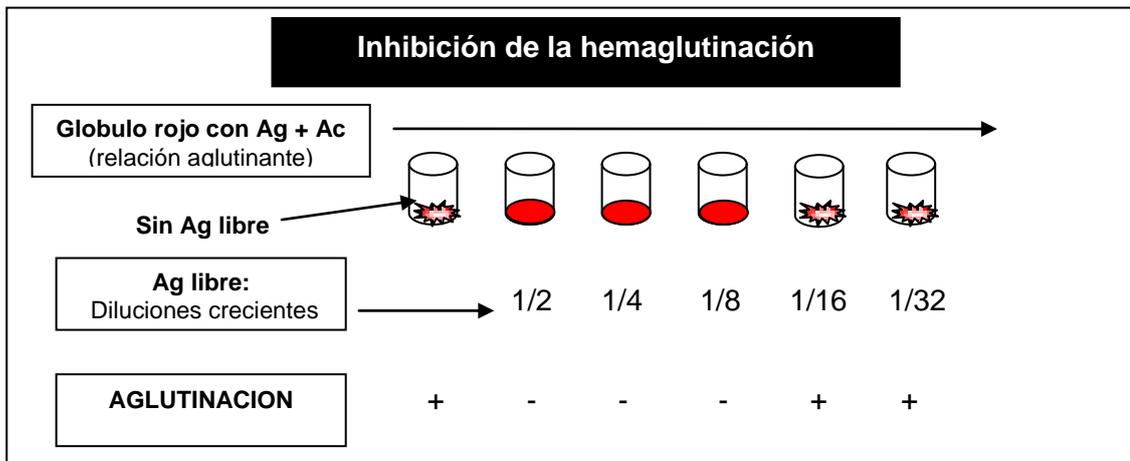
Ya se mencionó que las reacciones de aglutinación directa son útiles para la detección y titulación de Ac en distintos fluidos biológicos. Es importante destacar que NO es posible determinar la concentración de Ac sino que, en el mejor de los casos, será posible calcular un título de Ac. Para ello, se realiza la incubación de diluciones seriadas del suero del paciente con cantidades constantes de Ag y se elige arbitrariamente como título *la inversa de la máxima dilución de suero que produce aglutinación visible*. En determinadas muestras en las que existe una gran cantidad de Ac es posible que a diluciones bajas (es decir, a altas concentraciones de suero) no se observe aglutinación. Este fenómeno se denomina efecto “prozona” y se debe a que en exceso de Ac se forman preferentemente complejos Ag-Ac solubles (como los formados en la zona de exceso de Ac en la curva de precipitación). En este caso, el título de Ac sigue siendo la *máxima dilución de suero que produce aglutinación visible*.



Teniendo dos muestras de suero de un mismo paciente tomadas a diferentes tiempos, es posible comparar mediante esta técnica el título de Acs en ambas muestras. Se denomina **SEROCONVERSION** a la aparición de Acs o al aumento del título de Acs en 4 veces en un periodo entre 3 y 4 semanas.

En el caso de reacciones de aglutinación reversa, será posible calcular una concentración de Ag en una muestra si se realiza en paralelo una curva de titulación empleando una solución estándar de Ag. Por comparación de la máxima dilución de la solución estándar que produce aglutinación visible con la máxima dilución de la muestra que produce aglutinación visible, se podrá calcular la concentración de Ag en la muestra.

Existe además una variante de la aglutinación que permite calcular la concentración de Ag en una muestra. Dicha técnica se denomina "**inhibición de la hemaglutinación**" y consiste en incubar cantidades constantes de la partícula aglutinante sensibilizada con el Ag de interés (*Ag particulado*), con cantidades constantes y aglutinantes del Ac específico. A esta mezcla, capaz de aglutinar, se la enfrenta con cantidades variables de Ag libre como competidor. A partir de una determinada concentración de Ag libre, se producirá una inhibición de la aglutinación por competición del Ag libre por el Ac (que de esta manera no podrá unirse al *Ag particulado* para aglutinar).



Si se realiza una curva de este tipo con una solución estándar de Ag libre se podrá calcular la concentración (micromolar,  $\mu\text{g/ml}$ , etc) que inhibe la aglutinación. Luego, determinando qué dilución de Ag libre presente en una muestra biológica produce dicha inhibición de la aglutinación, será posible calcular la concentración de Ag libre en la muestra problema.

#### Detección de IgG e IgM+IgG: reacciones de aglutinación con y sin 2-mercaptoetanol (2-ME):

Varios reactivos diagnósticos actualmente disponibles en el mercado y en los laboratorios permiten determinar si el título de Ac obtenido en una reacción de aglutinación directa o indirecta corresponden a IgG o a la suma de IgM más IgG. Esto se debe a que ambos tipos de inmunoglobulinas son aglutinantes. Por otra parte, en muchos casos es útil conocer si el paciente posee Ac de tipo IgM o IgG porque eso puede facilitar el seguimiento del paciente o determinar un tratamiento. Para ello, se ha desarrollado la técnica de aglutinación en ausencia y en presencia de 2-ME. Cuando se realiza la titulación del suero del paciente por aglutinación en ausencia de 2-ME y se informa un título, en realidad se está informando una actividad aglutinante que es la suma de la actividad aglutinante de la IgM y de la IgG. Si, siguiendo el protocolo provisto por el fabricante, se realiza la técnica en presencia de 2-ME produce una reducción suave/parcial de la IgM. Como la IgM monomérica resultante no es aglutinante, el título que se obtiene al realizar la técnica de aglutinación en presencia de 2-ME corresponderá exclusivamente a la actividad aglutinante de la IgG. De este modo, la realización de la aglutinación en presencia y ausencia de 2-ME permitirá determinar la presencia de IgG e IgM contra el Ag sensibilizante. En determinados casos (toxoplasmosis) es importante determinar la presencia de IgM porque es indicio de infección activa. La caída en el título del suero por aglutinación en ausencia vs. en presencia de 2-ME es indicio de la presencia de IgM específica para el parásito.

### 3. INTERACCIÓN PRIMARIA ANTÍGENO-ANTICUERPO

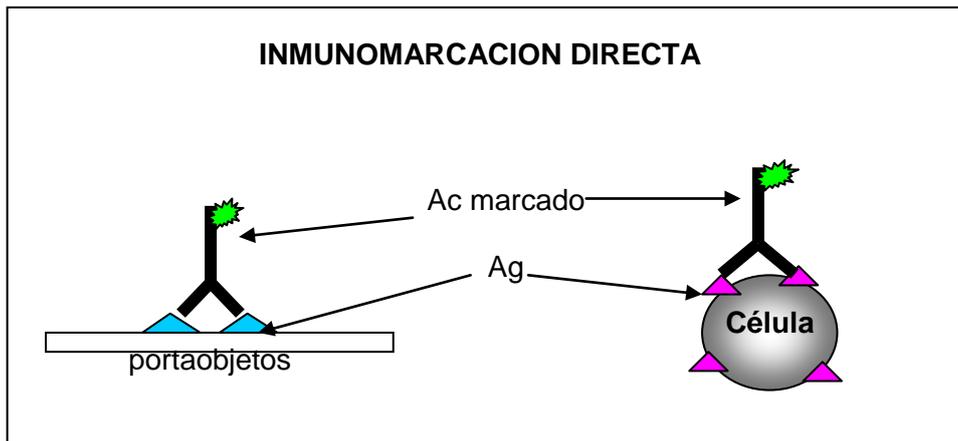
Si bien la interacción primaria Ag-Ac no es visible, existen distintos métodos que hacen posible visualizarla. La estrategia consiste en "marcar" al Ac o al Ag mediante la unión covalente (conjugación) de determinadas moléculas, tales como FLUOROCROMOS, ISOTOPOS RADIOACTIVOS o ENZIMAS, para poder hacer visible esa primera interacción. Tal como se observa en la Tabla, dependiendo del marcador que se utilice, la técnica inmunológica recibe un determinado nombre y utiliza un sistema de detección diferente. Las técnicas que veremos a continuación no son tan sencillas y económicas como las que vimos anteriormente, sin embargo son mucho más sensibles, es decir, son capaces de detectar menores concentraciones de Ag o Ac.

Técnica Inmunológica	MARCADOR	Sistema de detección
<b>a- Inmunomarcación</b>	Enzima	Microscopio óptico
	Fluorocromo	Microscopio de fluorescencia Citómetro de Flujo
<b>b- Radioinmunoanálisis (RIA) Técnicas radioinmunométricas (PRIST, RAST)</b>	Isótopo Radioactivo	Contador de Radiación
<b>c- ELISA</b>	Enzima	Espectrofotómetro

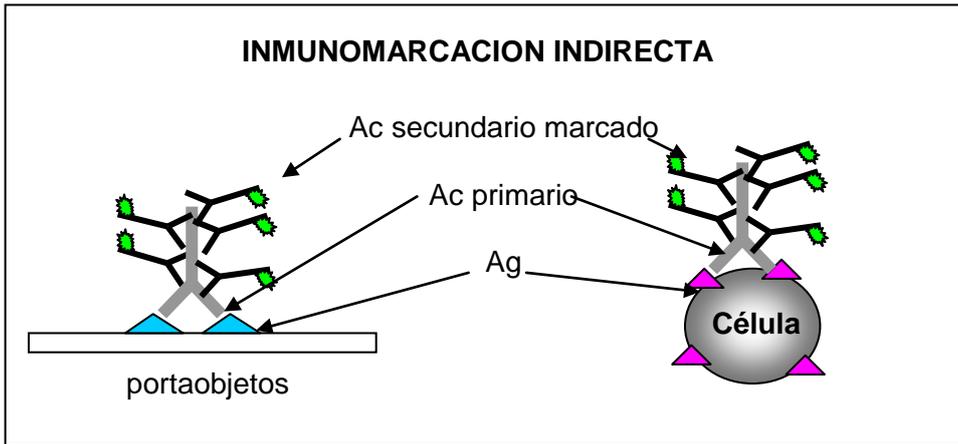
#### 3.a. INMUNOMARCACION

Las técnicas de inmunomarcación utilizando Ac conjugados permiten detectar la presencia de Ags en tejidos (inmunohistoquímica) o células (inmunocitoquímica). La inmunomarcación de tejidos se realiza sobre cortes de tejido fijado montado sobre un portaobjetos. A través de estas técnicas es posible detectar tanto Ags celulares (de membrana, citoplasmáticos o nucleares) como extracelulares (matriz extracelular, membrana basal, etc.) La inmunomarcación de células puede efectuarse sobre células vivas o fijadas, las cuales pueden hallarse en suspensión o adheridas a un soporte sólido (portaobjetos). Esta técnica permite detectar Ags localizados en la membrana plasmática, citoplasma o núcleo de la célula.

La inmunomarcación DIRECTA es la forma más simple de localizar un Ag y consiste en utilizar un Ac "marcado" específico para dicho Ag (Ac primario). Para realizar esta técnica, se incuba la muestra con el Ac primario "marcado" durante un determinado tiempo, a la temperatura indicada, luego del cual se retira el exceso de Ac mediante un lavado y se procede a la detección de la marca.



La inmunomarcación INDIRECTA utiliza un Ac primario sin marcar que reconoce al Ag de interés y luego, para evidenciar la presencia del Ag, emplea un segundo Ac marcado (Ac secundario) capaz de reconocer el Ac primario. Por ejemplo, si el Ac primario es una IgG de ratón, el Ac secundario podrá ser anti-IgG de ratón hecho en conejo.



Para realizar esta técnica, se incuba la muestra con el Ac primario, tal como vimos anteriormente, se realiza un lavado para retirar el exeso de Ac y luego se incuba con el segundo Ac marcado. Posteriormente se realiza un lavado y se procede a la detección de la marca.

Inmunomarcación	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>Directa</b>	Rápida y sencilla.	Se necesita un Ac primario marcado para cada Ag a detectar (los Ac marcados son más caros que los Ac no marcados . Menos sensible.
<b>Indirecta</b>	Mas sensible. Un mismo Ac secundario puede reconocer distintos Ac primarios (generados en la misma especie)	Lleva mas tiempo.

### Inmunomarcación con Acs conjugados a ENZIMAS

Esta técnica suele utilizarse para inmunohistoquímica y para detectar Ag sobre células adheridas a portaobjetos. Una vez realizada la inmunomarcación (directa o indirecta) la presencia del Ac conjugado con la enzima se evidencia por el agregado de un sustrato incoloro. La acción de la enzima sobre el sustrato genera un producto coloreado que precipita en el lugar donde ocurrió la reacción y es visualizado al **microscopio óptico**. Los sustratos incoloros que viran a un producto coloreado se los conoce con el nombre de cromógenos. El hecho de que existan distintos cromógenos capaces de generar productos de distinto color, permite que puedan detectarse Ag diferentes en un mismo corte de tejido o célula.

### Inmunomarcación con Acs conjugados a FLUOROCROMOS

Esta técnica es comúnmente conocida como **Inmunofluorescencia** se utiliza tanto para inmunohistoquímica como para inmunocitoquímica. La presencia del Ac conjugado con el fluorocromo no necesita de ninguna reacción química para hacerse evidente. Los fluorocromos emiten luz de una determinada longitud de onda luego de ser excitados por un haz de luz de longitud de onda menor. Cada fluorocromo es capaz de emitir luz dentro de un determinado espectro de longitud de onda. Por ejemplo, el fluorocromo denominado Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) emite en la gama del verde, mientras que la Ficoeritrina emite en la gama del rojo. El hecho de que existan distintos fluorocromos capaces de emitir a diferentes longitudes de onda, permite que puedan detectarse Ag diferentes en un mismo corte de tejido o célula. La visualización de la fluorescencia puede realizarse utilizando un **microscopio de fluorescencia** (para cortes de tejido o células en portaobjetos) o por **Citometría de flujo** (para células en suspensión).

## Citometría de flujo

La citometría de flujo (CMF) es un procedimiento altamente eficiente para caracterizar poblaciones celulares que se encuentren en suspensión. En un principio, se utilizaba fundamentalmente para identificar el fenotipo celular, es decir la expresión diferencial de antígenos en la membrana plasmática, pero hoy día son muchos los parámetros estructurales y funcionales que se pueden medir por CMF (Figura 1). Entre las muchas ventajas que presenta en relación a la microscopía de fluorescencia se encuentran la posibilidad de analizar un número muy elevado de células en pocos segundos y la posibilidad de cuantificar la intensidad de fluorescencia. La principal desventaja radica en el alto costo de la adquisición y mantenimiento del citómetro de flujo.

Figura 1:

Parámetros medibles por CMF		
	ESTRUCTURALES	FUNCIONALES
Intrínsecos	Tamaño y forma celular Granularidad citoplasmática Contenido pigmentos Fluoresc. proteínas	Estado de Red-Ox
Extrínsecos	Contenido DNA, RNA. Ratio bases ADN Estructura cromatínica Proteínas totales o básicas Grupos químicos Antígenos Azúcares superficie Estructura citoesqueleto	Estudios membrana Actividad enzimática Endocitosis Síntesis ADN Receptores Potencial de membrana pH, calcio, carga superficie

La citometría de flujo se ha utilizado en biomedicina con diferentes objetivos:

En hematología: conteo celular, fórmula leucocitaria, conteo reticulocitario, análisis de médula ósea.

En farmacología: estudios de cinética celular.

En inmunología: subpoblaciones de linfocitos, estimulación linfocitaria.

En oncología: diagnóstico/pronóstico, monitorizar tratamiento.

En microbiología: diagnóstico bacteriano y vírico, sensibilidad a antibióticos.

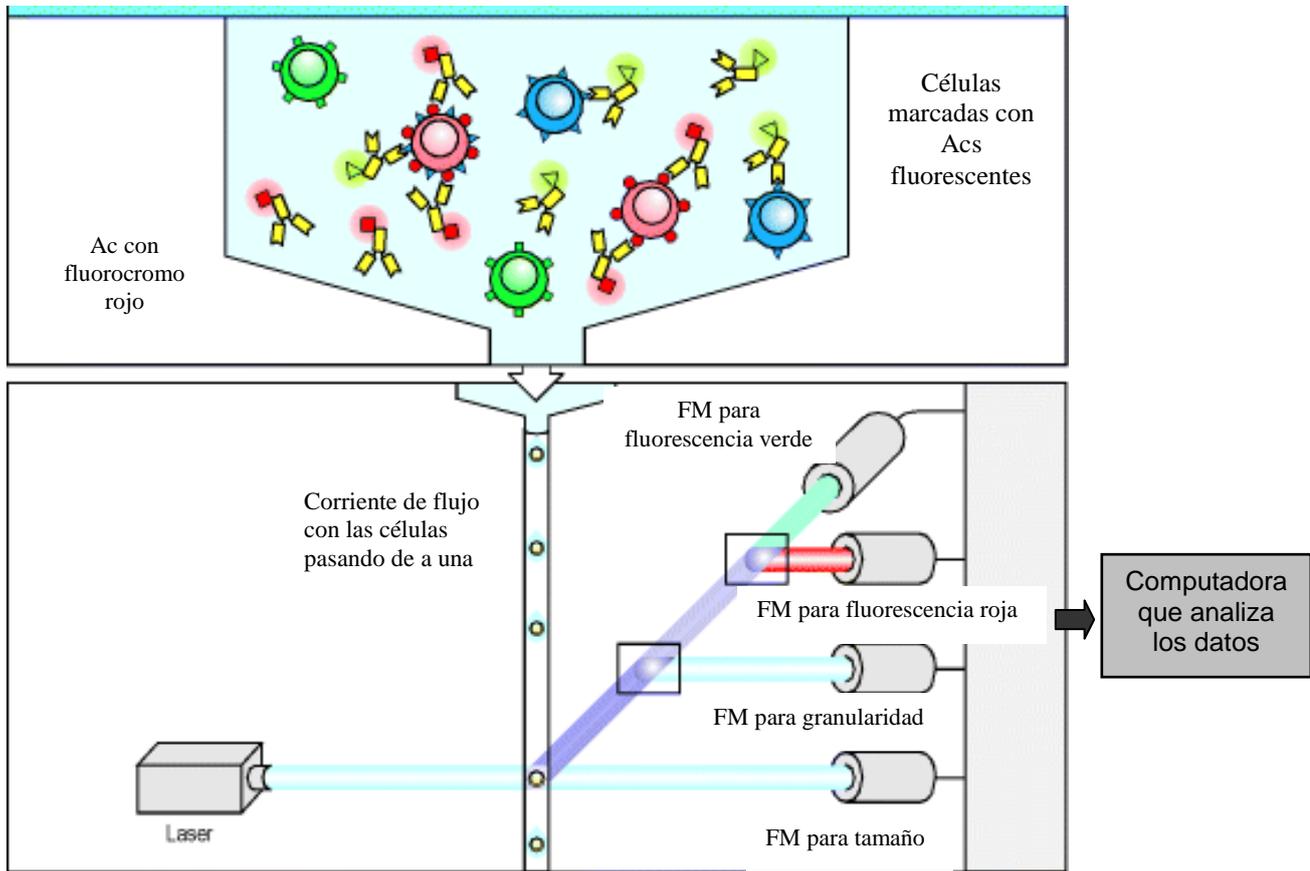
## Citómetro de flujo:

Se define como citómetro de flujo al aparato que es capaz de medir componentes y propiedades de células y organelas celulares (partículas biológicas) que fluyen en una suspensión celular. Los *cell sorters* tienen las mismas prestaciones y posibilidades que los citómetros de flujo pero con la capacidad adicional de separar partículas selectivamente de la suspensión líquida.

Debido a las especiales características de los citómetros de flujo, la muestra a analizar debe encontrarse en forma de **suspensión monodispersa**. Hay muestras como la sangre periférica, médula ósea, u otros fluidos biológicos, que precisan de un mínimo procesamiento; en cambio los tumores sólidos o las muestras parafinadas necesitan de una disgregación más o menos intensa (mecánica, enzimática, etc.).

Para su análisis, las células en suspensión son forzadas a pasar, de a una por vez, a través de un filamento muy delgado. Un haz de rayo láser incide en cada célula lo que resulta en la dispersión de la luz en distintas direcciones. Una serie de tubos fotomultiplicadores (FM) detectan la luz dispersada brindando información acerca del tamaño, la granularidad o complejidad celular, como así también de la emisión de fluorescencia en el caso de que la célula haya unido un anticuerpo marcado con un fluorocromo.

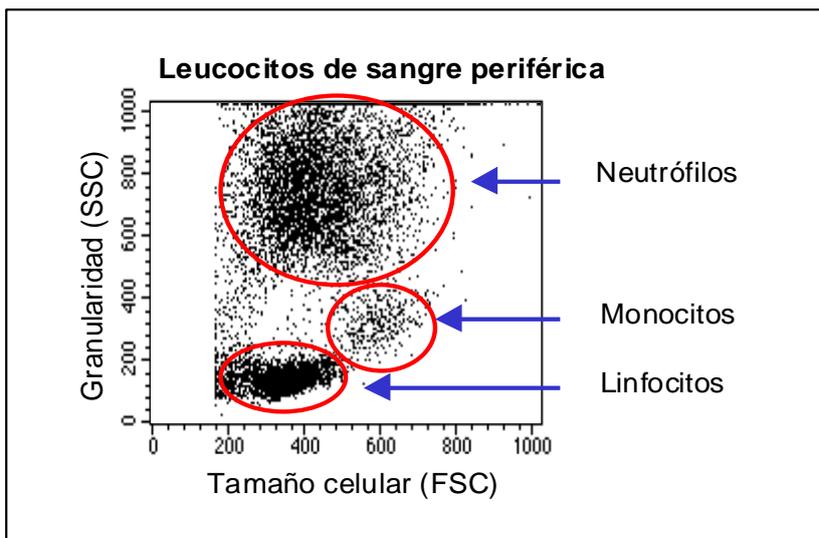
A continuación, se muestra un esquema de un citómetro de flujo:



Análisis y presentación de los resultados:

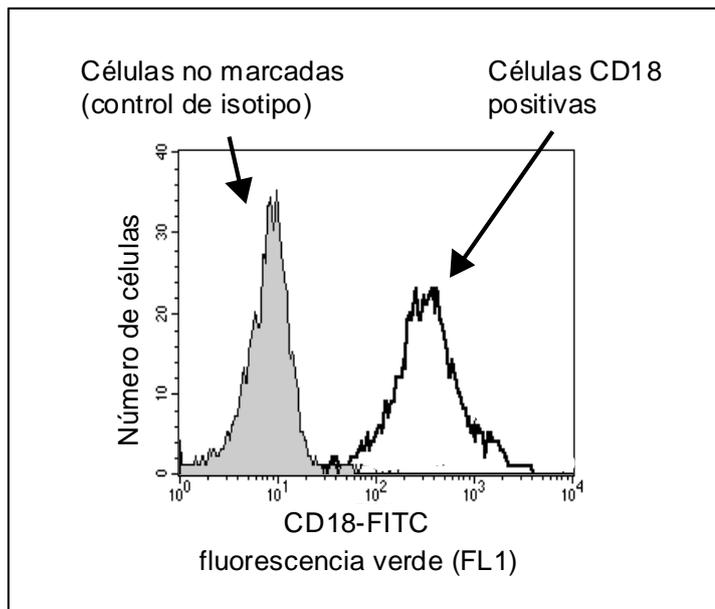
Los datos de tamaño celular, granularidad celular y fluorescencia (en caso de haberse usado anticuerpos marcados con fluorocromos) son analizados mediante un software específico y se presentan como gráficos, de los cuales se dan a continuación los ejemplos más comunes:

1) Gráfico “dot plot” de tamaño versus granularidad:



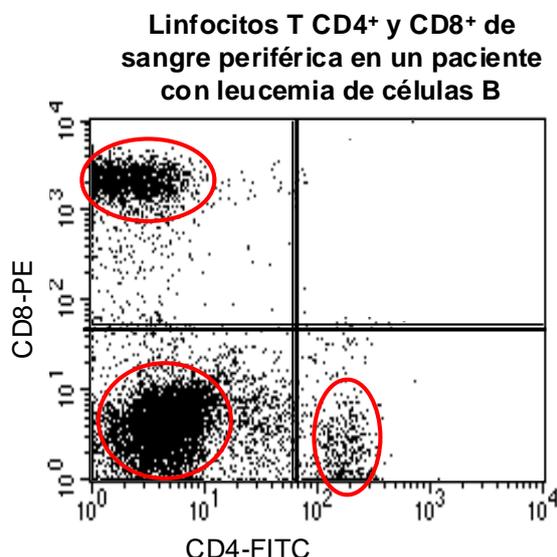
Se muestra un ejemplo de leucocitos de sangre periférica humana en el que se diferencian claramente las regiones correspondientes a los neutrófilos (de mayor complejidad granular por la presencia de lisosomas), monocitos (de complejidad intermedia, pero mayor tamaño) y linfocitos (pequeños y sin gránulos en el citoplasma). En este caso no se utilizó ningún anticuerpo para marcar las células.

## 2) Histograma de fluorescencia:



Se muestra un ejemplo de células de estirpe monocítica marcadas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno CD18. El anticuerpo está marcado con isocianato de fluoresceína (FITC) (fluorescencia verde) y es de isotipo IgG1 murino. Como control de pegado inespecífico, las células se incuban, por otro lado, con IgG1 murina marcada con FITC pero que no está dirigida contra ningún antígeno celular (control de isotipo).

## 3) Gráfico "dot plot" de fluorescencia verde (FL1) versus fluorescencia roja (FL2):

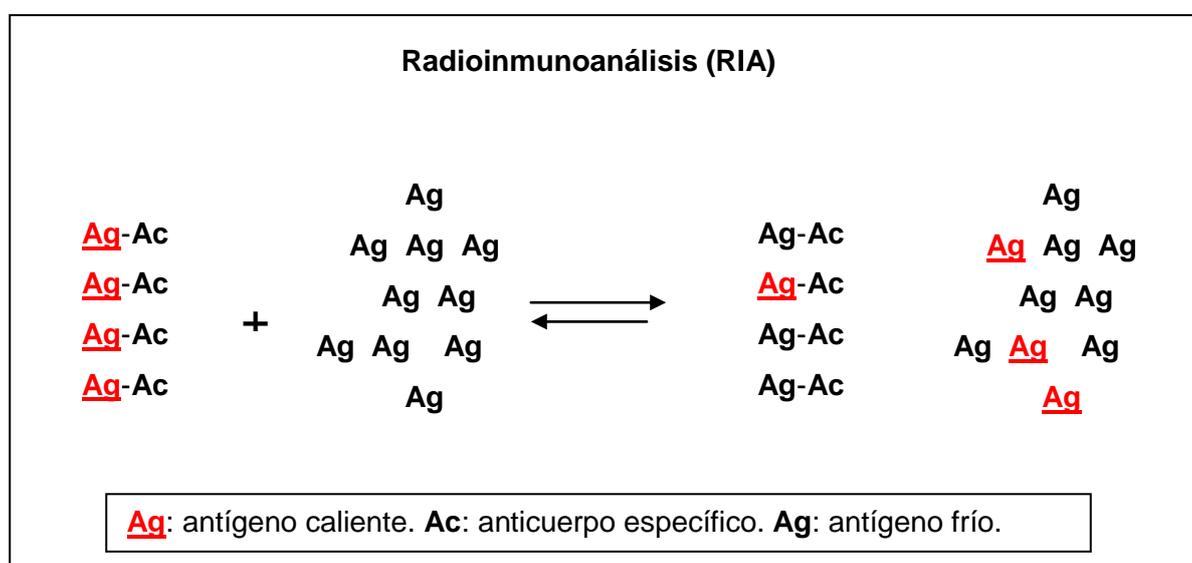


Se muestra un ejemplo de leucocitos de sangre periférica de un paciente con leucemia linfática crónica de células B que fueron marcados simultáneamente con 2 anticuerpos: anti-CD4 marcado con FITC y anti-CD8 marcado con ficoeritrina (PE) (fluorescencia roja, FL2). Se distinguen 3 poblaciones: en el cuadrante superior izquierdo se encuentran los linfocitos T CD8 positivos, en el cuadrante inferior derecho, los T CD4 positivos y en el cuadrante inferior izquierdo las células que no expresan ni CD8 ni CD4 (linfocitos B, células NK). La ausencia de puntos en el cuadrante superior derecho indica que no hay células que expresen simultáneamente CD4 y CD8. Si se hubiesen marcado células de timo, la mayoría de los puntos se encontrarían en el cuadrante superior derecho.

### 3.b. RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA) Y TÉCNICAS RADIOINMUNOMÉTRICAS (PRIST, RAST)

La técnica de **radioinmunoanálisis (RIA)** permite cuantificar la presencia de pequeñas cantidades de un determinado Ag o Ac en una muestra biológica. Si bien es una técnica sumante sensible, en la actualidad no es tan utilizada como lo era antes y ha sido reemplazada por otras técnicas que no utilizan radioisótopos. La técnica se basa en la inhibición competitiva de la unión de un Ag marcado radiactivamente con su Ac específico, por parte de Ags idénticos no marcados presentes en la muestra a analizar. Para realizar la técnica debe contarse de antemano con: 1) Acs específicos contra la molécula a cuantificar (esa molécula puede ser un Ag o una inmunoglobulina), 2) la molécula a cuantificar marcada radioactivamente y 3) la muestra a analizar (donde se encuentra la molécula a cuantificar).

Tal como puede verse en el esquema, los complejos inmunes formados por la molécula marcada (Ag caliente) y el anticuerpo específico se enfrentan a la muestra que posee la molécula sin marcar (Ag frío). Si la concentración de Ag frío es mayor, se producirá el desplazamiento del Ag caliente y por lo tanto, la radioactividad de los complejos Ag-Ac irá disminuyendo, mientras que la radioactividad de la fracción de Ag libre aumentará. Realizando una curva patrón con concentraciones conocidas de Ag libre puede calcularse, luego, la concentración de Ag en la muestra biológica.

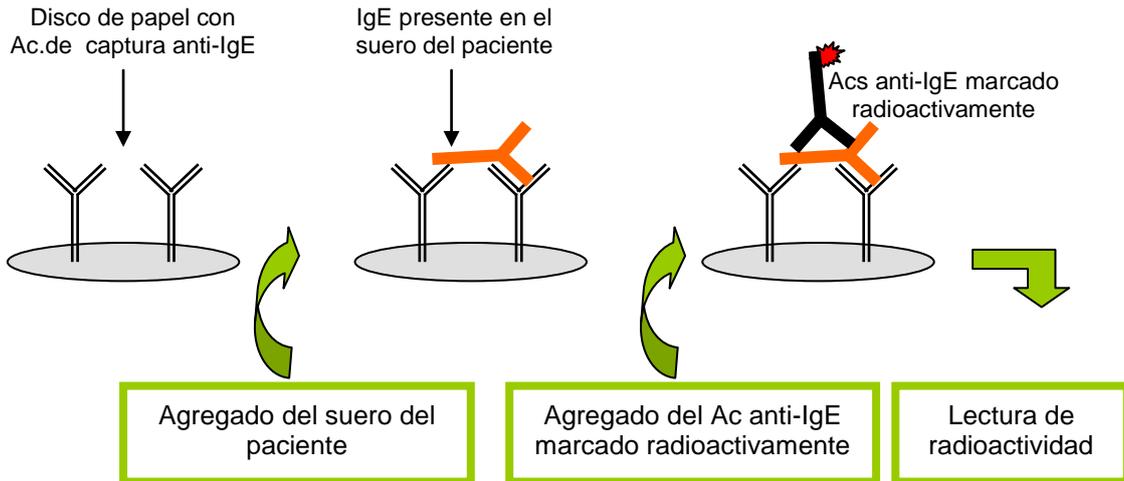


Las **técnicas radioinmunométricas** permiten la detección de un Ag presente en una muestra mediante el uso de anticuerpos conjugados a un isótopo radioactivo. No deben considerarse sinónimo de RIA ya que no se basan en la inhibición competitiva por desplazamiento del Ag caliente.

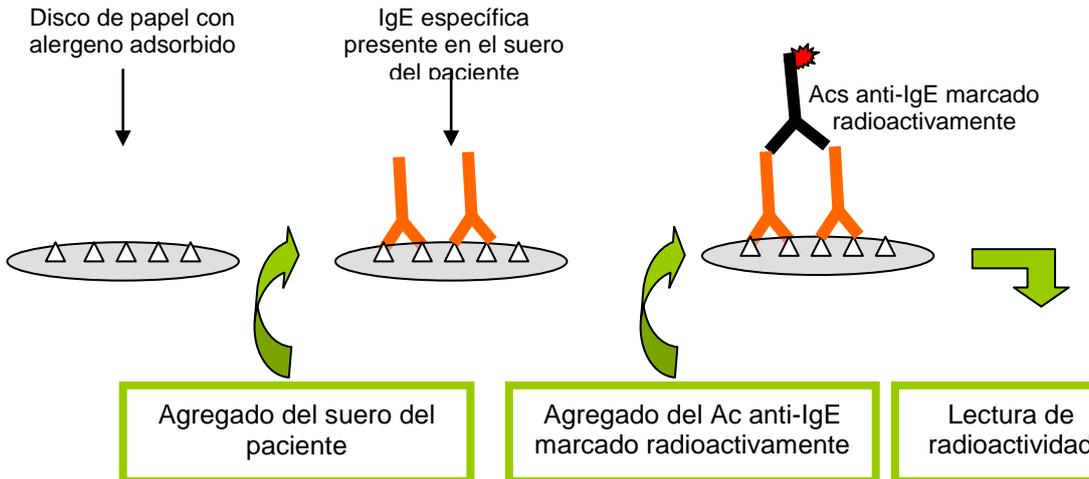
La técnica de **PRIST** (Paper disk Radio ImmunoSorbent Test) es utilizada para medir los niveles de IgE en sueros. La IgE sérica está presente normalmente en bajas concentraciones y se encuentra aumentada, por ejemplo, en pacientes alérgicos. Tal como se observa en la figura, se utiliza un soporte sólido (disco de papel) en el cual vienen adsorbidos los Ac anti-IgE (anticuerpos de captura). Los discos de papel se incuban con el suero del paciente y los Ac IgE presentes en el suero se unirán con los Ac específicos del disco de papel. Luego de la incubación y lavado, se adiciona un Ac anti-IgE conjugado con un isótopo radioactivo, el cual reconocerá a la IgE unida al anticuerpo de captura. Luego de la incubación y lavado, se realiza la lectura de radioactividad del disco de papel. Los resultados se comparan con aquellos obtenidos en una curva de calibración a fin de determinar la concentración de IgE en el suero.

La técnica de **RAST** (disk RadioAllergoSorbent Test) se utiliza para dosar los niveles de IgE específica para un alérgeno en particular. El alérgeno viene adsorbido a un disco de papel y luego se incuban el suero del paciente alérgico. Si en el suero están presentes las IgEs específicas quedarán unidas al alérgeno y luego podrán ser reconocidas por Acs anti-IgE conjugados con isótopos radioactivos. Luego de la incubación y lavado, se realiza la lectura de radioactividad del disco de papel y los resultados se comparan con aquellos obtenidos en una curva de calibración a fin de determinar la concentración de IgE específica en el suero.

## PRIST



## RAST



### 3.c. ELISA (Enzyme Linked ImmunoAdsorbent Assay)

La técnica de ELISA utiliza Acs marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa) para poder visualizar la reacción Ag-Ac. La técnica se utiliza tanto para la determinación de Ags como de Acs.

#### Determinación de Ag por ELISA

La modalidad más frecuente del método ELISA para la determinación de Ags es el modelo ELISA "Sandwich" directo. En este modelo, el Ac específico para el Ag de interés, se encuentra adsorbido en un soporte sólido (placa de petri), sobre el que se añadirá la muestra biológica. En el caso de que en dicha muestra se encuentre el Ag, quedará capturado en la placa y será puesto en evidencia tras la adición de otro Ac específico conjugado con la enzima. Por último, se añade el sustrato sustrato incoloro que, por acción de la enzima, dará un producto coloreado que producirá un color observable a simple vista y cuantificable mediante un espectrofotómetro.



### Determinación de Acs por ELISA

Para la determinación de Acs específicos para un determinado Ag se utiliza normalmente la modalidad de ELISA indirecto en donde el Ag de interés se encuentra adsorbido en la placa de ELISA. Se pueden utilizar como antígenos, proteínas virales o bacterianas e incluso virus completos, pero cada día es más frecuente adsorber exclusivamente las proteínas de interés inmunológico. Esta es una de las técnicas de elección para buscar Acs contra proteínas del virus HIV en sueros de pacientes. Los pasos de la técnica se encuentran esquematizados en la figura.



## 4. OTRAS TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

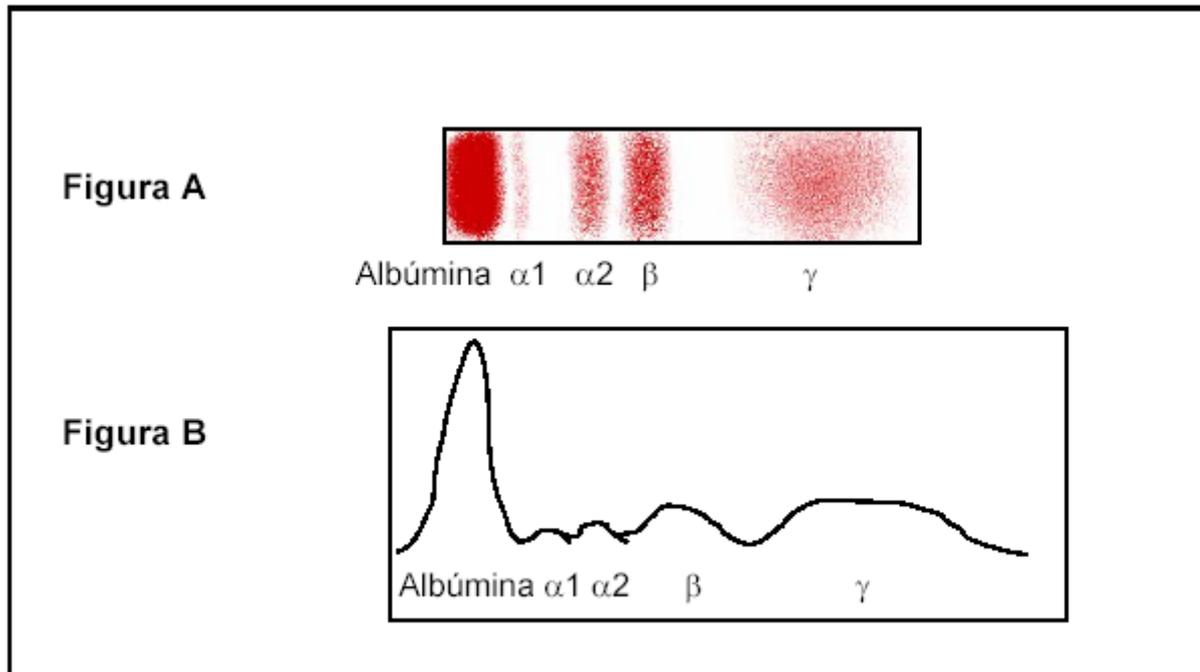
### **4.a PROTEÍNOGRAMA ELECTROFORÉTICO**

El proteínograma electroforético es un técnica sencilla de laboratorio que permite separar en 5 fracciones o grupos a las proteínas presentes en un determinado fluido biológico (suero, orina, etc.). La técnica se basa en la separación electroforética de las distintas proteínas por medio de la aplicación de un campo eléctrico sobre un soporte de agarosa o acetato de celulosa. Una vez finalizada la corrida electroforética las bandas proteicas pueden ser visualizadas luego de la utilización de colorantes para proteínas. Posteriormente, las bandas que se observan a simple vista (Figura A) pueden ser cuantificadas por un densitómetro, el cual cuantifica la intensidad y anchura de cada banda (Figura B), pudiendo obtenerse los porcentajes de cada una de las 5 fracciones proteicas.

Las distintas fracciones que podemos encontrar son: Albumina, alfa 1 globulinas ( $\alpha_1$ ), alfa 2 globulinas ( $\alpha_2$ ), beta globulinas ( $\beta$ ) y gamma globulinas ( $\gamma$ ).

- **ALBÚMINA:** es una proteína que se sintetiza en el hígado y es la de mayor concentración en el suero.
- **$\alpha_1$ :** dentro de esta fracción se encuentran numerosas proteínas entre las cuales podemos mencionar a la alfa 1-antitripsina y la alfa 1-antiquimiotripsina

- $\alpha_2$ : dentro de esta fracción se incluyen la haptoglobina y la proteína C reactiva.
- $\beta$ : en esta fracción podemos encontrar, entre otras, a la fibronectina, transferrina y beta 2 microglobulina.
- $\gamma$ : en esta fracción se encuentran las inmunoglobulinas, las cuales pueden disminuir en ciertas inmunodeficiencias y aumentar en ciertos procesos de inflamación crónica (artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico), infecciones y alergias.



#### 4.b. NEFELOMETRIA.

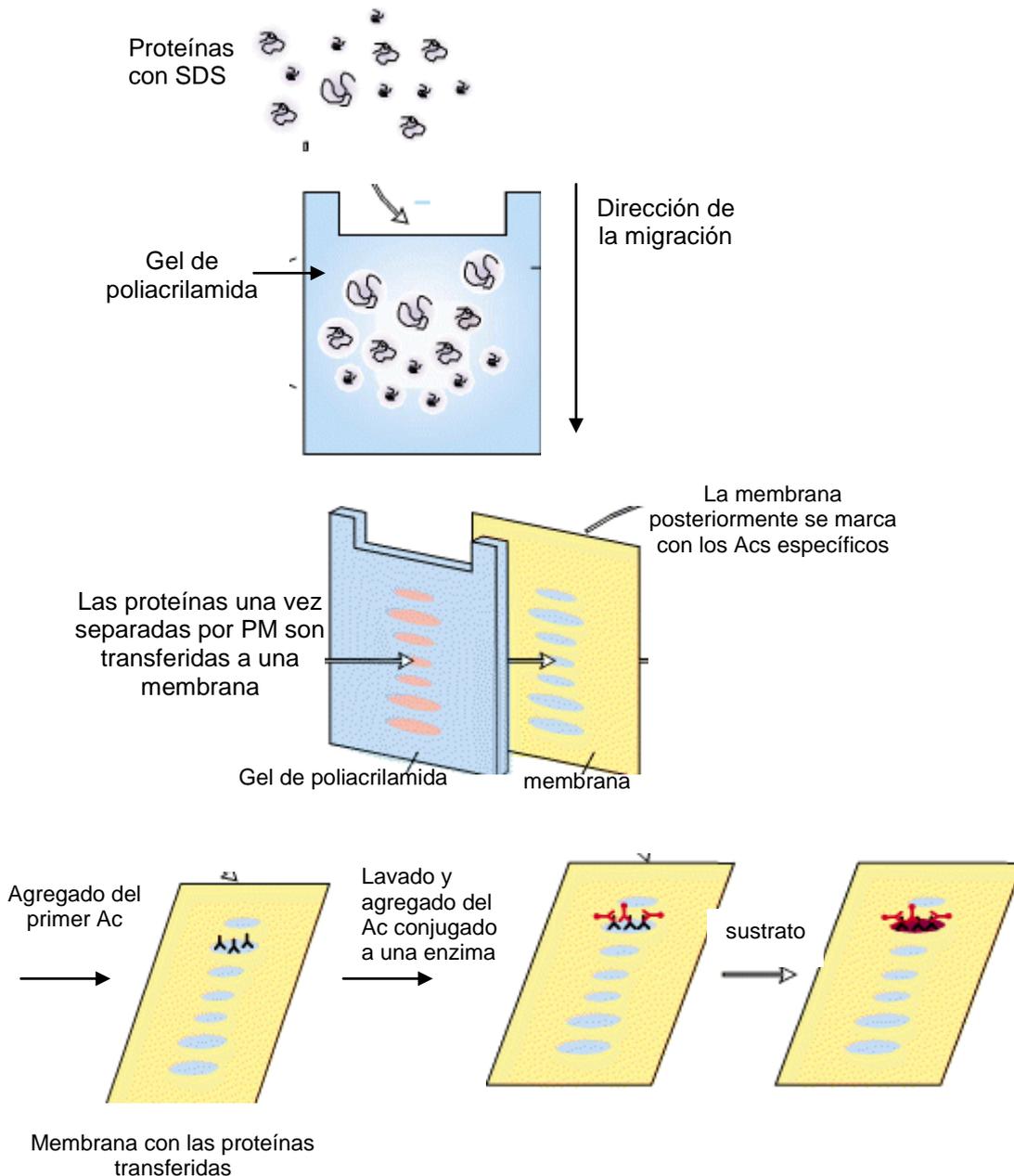
Las inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA también pueden cuantificarse por nefelometría. Para ello, el suero incógnita deberá ser incubado con exceso del anticuerpo específico (anti-IgM, anti-IgG o anti-IgA) a fin de que se produzca la formación de complejos inmunes. Esta técnica, es un método óptico que cuantifica la luz dispersada por los complejos inmunes formados, la cual es proporcional a la concentración del antígeno específico (en nuestro caso, la IgM, IgG o IgA del suero incógnita).

#### 4.c. WESTERN BLOT

Es una técnica muy sensible que permite identificar Ags y Acs. Tal como puede observarse en la figura, la técnica de Western Blot se basa en la separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida, la transferencia (blotting) de dichas proteínas a un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa o nylon) y la posterior detección de una o más bandas identificadas por Acs específicos. La migración de las proteínas se realiza en presencia de detergentes (Dodecil Sulfato de Sodio, SDS) a fin de que su migración dependa fundamentalmente de peso molecular (PM) de los péptidos.

Así descrita, la técnica permite investigar la presencia de un antígeno dado en una mezcla de proteínas presentes en una determinada muestra y para ello se debe disponer del Ac específico para marcar la membrana. Sin embargo, la técnica de Western Blot es también muy útil para la detección de Acs específicos en sueros. Si se desea detectar Acs específicos, debe contarse con el Ag de interés separado por electroforesis y transferido a una membrana, la cual se incubará con el suero a analizar. Posteriormente esa membrana deberá incubarse con el segundo anticuerpo marcado con la enzima para poder detectar las bandas específicas.

La técnica de Western Blot para determinar la especificidad de los Acs contra Ag del virus de HIV es la prueba confirmatoria de elección para los casos en que los sueros de los pacientes dieron un ELISA positivo



## 5. TÉCNICAS DE TIPIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

### Objetivos:

1. Estudios de histocompatibilidad para trasplante de órganos vascularizados
2. Estudios de histocompatibilidad para trasplante de médula ósea
3. Estudios de paternidad
4. Estudios de asociación de alelos del HLA con enfermedades (susceptibilidad)
5. Estudios antropológicos para establecer posibles relaciones entre distintas poblaciones o grupos étnicos.

### Clasificación de las técnicas de tipificación

5.a. Técnicas serológicas: microlinfocitotoxicidad en placas de Terasaki

5.b. Técnicas moleculares

- a. PCR con cebadores específicos de secuencia (SSP)
- b. PCR con cebadores específicos de locus e hibridación con sondas marcadas, específicas de alelos (SSOP)
- c. Secuenciación directa (SBT)
- d. Otras: RFLP, SSCP

## 5.a. TÉCNICAS SEROLÓGICAS:

### Microlinfocitotoxicidad en placas de Terasaki

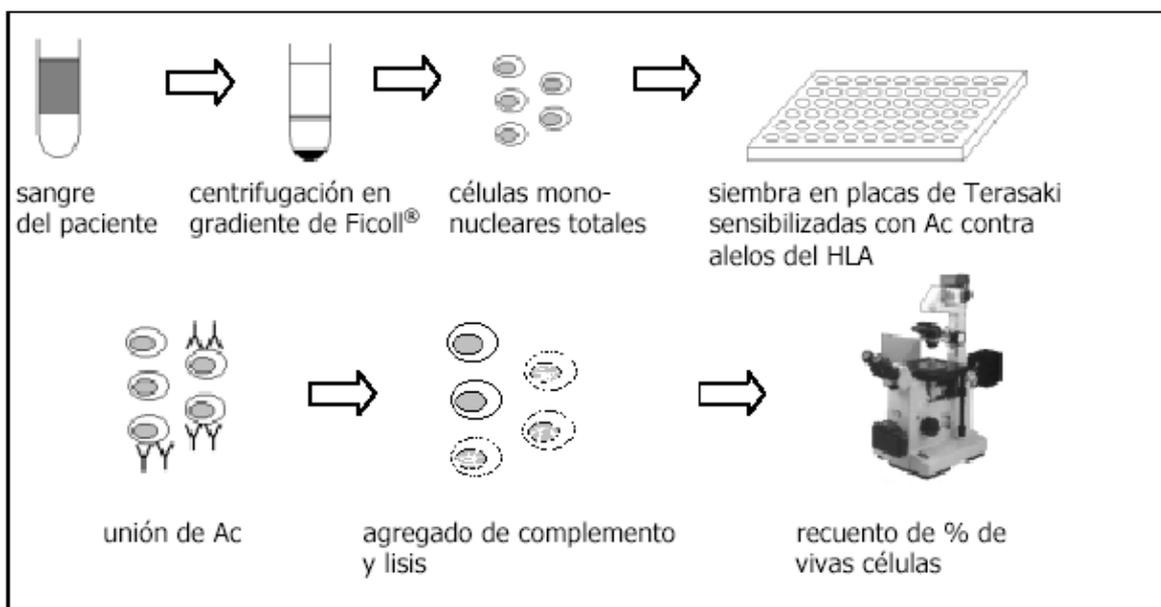
#### Fundamento:

Este método se basa en el empleo de anticuerpos específicos contra diferentes alelos del HLA (moléculas de clase I y de clase II). Cuando estos anticuerpos reconocen al antígeno contra el cual son específicos, y en presencia de complemento, se produce la lisis celular. El ensayo se realiza en placas plásticas de 60 fosas denominadas placas de Terasaki y la muerte celular se cuantifica mediante una tinción diferencial de células viables y muertas.

#### Etapas:

1. Extracción de sangre del paciente
2. Aislamiento de células mononucleares (centrifugación en gradiente de Ficoll®)
3. Siembra de células en fosas de placas de Terasaki previamente sensibilizadas con sueros policlonales contra diferentes alelos del HLA.
4. Incubación (unión de los Ac a las moléculas de clase I o de clase II del HLA)
5. Agregado de fuente de complemento (suero de conejo)
6. Incubación y lisis de células que unieron Ac en la etapa anterior
7. Agregado de un colorante de contraste para diferenciación de células vivas y muertas (diacetato de fluoresceína)
8. Observación microscópica y clasificación.

#### Esquema general de la técnica



#### Variantes de la técnica:

##### Método de la anti-inmunoglobulina

1. Extracción de sangre del paciente
2. Aislamiento de células mononucleares (centrifugación en gradiente de Ficoll®)
3. Siembra de células en fosas de placas de Terasaki\*
4. Incubación (unión de los Ac a las moléculas de clase I del HLA)
5. Incubación con IgG de conejo anti-inmunoglobulinas humanas
6. Agregado de fuente de complemento
7. Incubación y lisis de células que unieron Ac
8. Agregado de un colorante de contraste para diferenciación de células vivas y muertas (diacetato de fluoresceína)
9. Observación microscópica y clasificación o "scoring"

#### Consideraciones:

##### Origen de los sueros:

1. Suero de mujeres multíparas (4 o más hijos del mismo padre), dado que durante el parto se produce pasaje de sangre del feto a la madre y eso permite que células fetales semialogeneicas actúen como

inmunógenos en la madre, quien montará una respuesta inmune contra los alelos del HLA del padre que las células fetales expresen.

2. Sueros de pacientes que hayan rechazado un trasplante previo, donde en general se observa una respuesta inmune humoral (y celular) dirigida contra los alelos del HLA que el trasplante expresaba.
3. Sueros de pacientes politransfundidos, dado que en la sangre transfundida hay leucocitos de los donantes, que actuarán como inmunógenos en el paciente transfundido.

**Ventajas:**

- Técnica sencilla que requiere poco equipamiento sofisticado (microscopio invertido de epifluorescencia)

**Desventajas:**

- La técnica debe realizarse sin interrupción desde su inicio hasta su finalización, dado que se trabaja con células viables.
- No se detectan Ac no fijadores de complemento, excepto en la variante que emplea la anti-inmunoglobulina
- Alto costo
- Baja resolución
- No existen sueros contra alelos poco frecuentes
- La mayoría de los sueros no son monoespecíficos y además presentan reactividad cruzada con otros alelos. La alta homología e identidad entre muchos epitopes de las moléculas de clase I y de clase II del HLA permite agrupar a estas moléculas en "grupos de reactividad cruzada" o "CREGs"
- No adecuado para tipificación de donantes cadavéricos (en especial en el caso de trasplante de médula ósea)
- Interpretación difícil por escasez de sueros monoespecíficos y reactividades cruzadas
- No se detecta homocigosis (en general se informa 1 alelo y el otro se informa como "blanco")
- Ambigüedades (no se pueden definir determinadas combinaciones de alelos)

**5.b. TÉCNICAS MOLECULARES:**

**SSP**

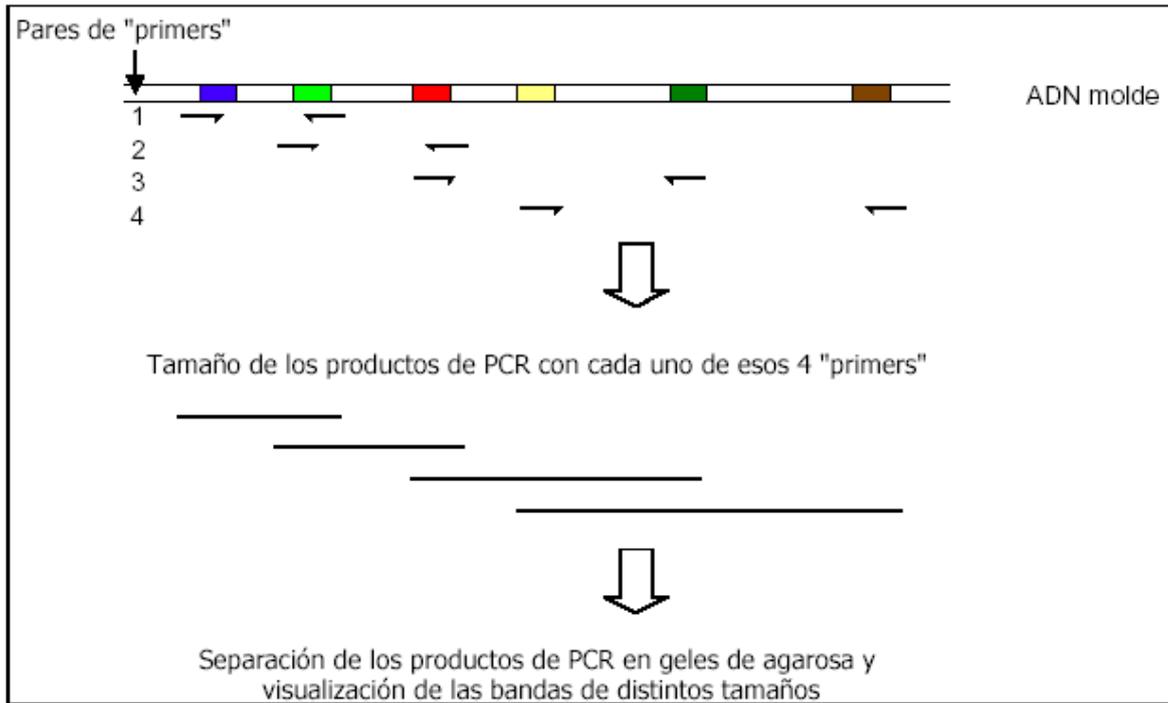
**Fundamento:**

En este método se realiza una reacción de cadena de polimerasa (PCR) utilizando como molde el ADN extraído de células de sangre periférica del paciente. Como oligonucleótidos cebadores ("primers") se emplean combinaciones de oligonucleótidos específicos para diferentes alelos del HLA. De esta manera se logra la amplificación de fragmentos de ADN de diferente longitud. El patrón de fragmentos de ADN obtenido, que se analiza en una electroforesis en gel de agarosa, permite asignar alelos a la muestra analizada. Esto implica que para cada muestra se deben realizar un número considerable de reacciones de PCR (tantas como pares de "primers" se estén empleando, lo que a su vez se reflejará en el grado de resolución alcanzado).

**Etapas:**

1. Extracción de sangre del paciente
2. Aislamiento del ADN
3. Reacción de cadena de polimerasa (PCR) con diferentes combinaciones de "primers"
4. Electroforesis en geles de agarosa conteniendo bromuro de etidio
5. Observación del patrón de bandas de ADN amplificadas en la PCR bajo luz UV
6. Integración de los resultados obtenidos
7. Asignación de alelos a la muestra analizada

**Esquema general de la técnica**



### Consideraciones:

#### Ventajas:

- Técnica sencilla que requiere poco equipamiento sofisticado (máquina para PCR)
- No requiere el aislamiento de células (se trabaja con sangre entera)
- Resolución mayor que las técnicas serológicas ("Resolución intermedia", lo que significa que no se pueden resolver determinadas combinaciones de alelos)
- Costo relativamente bajo
- Se puede interrumpir la técnica en diversos pasos (luego de la extracción del ADN, luego de la PCR o luego de la electroforesis)
- Permite la detección de alelos "nulos"

#### Desventajas:

- No es adecuado para tipificación de donantes cadavéricos (en especial en el caso de trasplante de médula ósea) debido a que la resolución alcanzada es intermedia
- Ambigüedades (no se pueden definir determinadas combinaciones de alelos)
- Cada par de "primers" permite amplificar uno o unos pocos alelos del HLA, por lo que debido al elevado polimorfismo de este sistema, será necesario el empleo de un gran número de pares de "primers" con el fin de obtener una resolución aceptable en la asignación de alelos a la muestra. Por lo tanto, cada muestra requiere de un número elevado de reacciones de PCR (que se realizan en forma simultánea). De esta manera el método no resulta práctico para análisis simultáneo de un gran número de muestras.
- No se detecta homocigosis.

## SSOP

### Fundamento:

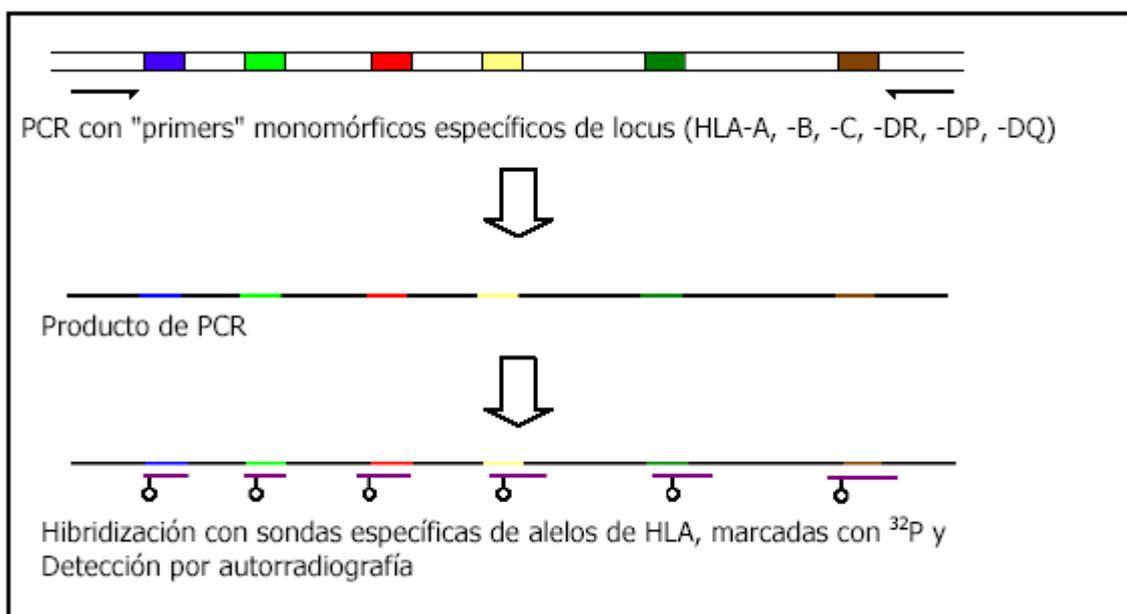
En este método se realiza una reacción de cadena de polimerasa (PCR) utilizando como molde el ADN extraído de células de sangre periférica del paciente. Como oligonucleótidos cebadores ("primers") se emplean pares de oligonucleótidos específicos para diferentes loci del HLA (se amplifica por separado el locus HLA-A, el locus HLA-B, el locus HLA-C, etc). Los fragmentos de ADN amplificados son luego inmovilizados sobre membranas de nylon e hibridizados con sondas (oligonucleótidos) marcadas, específicas para diferentes alelos del HLA. El patrón de señales obtenidas de acuerdo a las sondas que reaccionaron se detecta con placas de autorradiografía, lo que permite asignar un alelo a la muestra analizada.

### Etapas:

1. Extracción de sangre del paciente

2. Aislamiento del ADN
3. Reacción de cadena de polimerasa (PCR) con diferentes "primers" específicos para diferentes loci del HLA
4. Electroforesis en geles de agarosa para chequear la calidad de la reacción de PCR
5. Inmovilización de los productos de la PCR en membranas de nylon
6. Hibridización de las membranas con sondas específicas de alelos, marcadas con  $^{32}\text{P}$
7. Exposición de las membranas a placas de rayos X
8. Análisis del patrón de señales obtenidas en las membranas
9. Integración de los resultados obtenidos
10. Asignación de alelos a la muestra analizada

### Esquema general de la técnica



### Consideraciones:

#### Ventajas:

- No requiere el aislamiento de células (se trabaja con sangre entera)
- Alta resolución
- Se puede interrumpir la técnica en diversos pasos
- Empleando un número suficientemente alto de sondas, es posible detectar homocigosis
- Adecuado para tipificación de donantes cadavéricos
- Utilizando sondas marcadas con digoxigenina y anticuerpos anti-digoxigenina marcados con peroxidasa, se puede realizar la detección por quimioluminiscencia, por lo que no se generan desechos radiactivos
- Permite la detección de alelos "nulos"
- Permite el análisis simultáneo de un número grande de muestras

#### Desventajas:

- Interpretación compleja (reactividad cruzada entre sondas, detección de determinadas combinaciones de alelos producen patrones similares en las placas de autorradiografía)
- Las condiciones de lavado de las diferentes sondas pueden ser diferentes, lo que complica en procesamiento simultáneo de muchas muestras
- A pesar de su elevada resolución, siguen existiendo ambigüedades (aunque son muchas menos que en las técnicas anteriores)
- Técnica compleja y costosa que requiere equipamiento algo más sofisticado (máquina para PCR, horno para hibridaciones, infraestructura para manipulación de radioisótopos)
- Generación de desechos radiactivos

### SBT

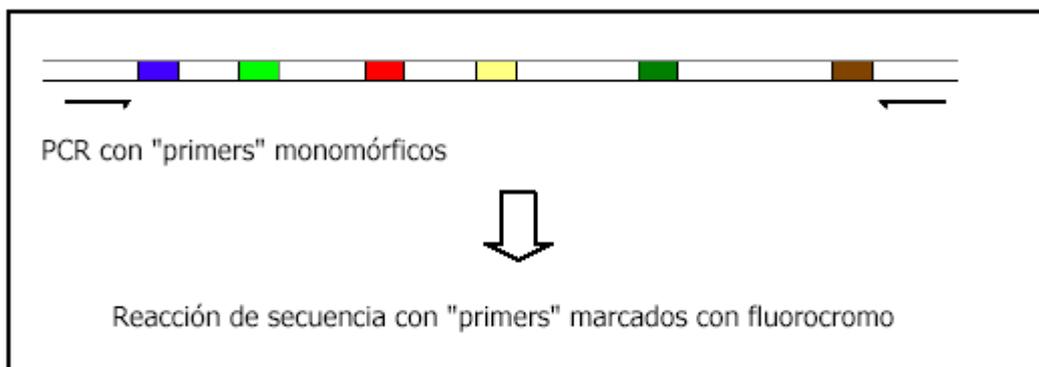
#### Fundamento:

En este método se realiza una reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando como molde el ADN extraído de células de sangre periférica del paciente. Como oligonucleótidos cebadores ("primers") se emplean pares de oligonucleótidos específicos para diferentes loci del HLA (se amplifica por separado el locus HLA-A, el locus HLA-B, el locus HLA-C, etc). Los fragmentos de ADN amplificados son luego secuenciados directamente mediante el empleo de un secuenciador automático de ADN, que además analiza las secuencias obtenidas y por comparación con una base de datos interna, realiza la asignación de alelos de HLA a la muestra analizada.

#### **Etapas:**

1. Extracción de sangre del paciente
2. Aislamiento del ADN
3. Reacción de cadena de polimerasa (PCR) con diferentes "primers" específicos para diferentes loci del HLA
4. Electroforesis en geles de agarosa para chequear la calidad de la reacción de PCR
5. Realización de la reacción de secuencia mediante el empleo de "primers" marcados con fluorocromos adecuados para el tipo de detector que posee el secuenciador
6. Análisis de las secuencias obtenidas
7. Comparación con la base de datos de secuencias que posee el aparato e integración de los resultados obtenidos
8. Asignación de alelos a la muestra analizada

#### **Esquema general de la técnica**



#### **Consideraciones:**

##### **Ventajas:**

- No requiere el aislamiento de células (se trabaja con sangre entera)
- Alta resolución (se alcanza el máximo de resolución posible)
- Se puede interrumpir la técnica en diversos pasos
- Ideal para la detección de homocigosis
- Óptimo para tipificación de donantes cadavéricos
- Interpretación automatizada
- Permite la detección de alelos "nulos"

##### **Desventajas:**

- Técnica sofisticada que requiere equipamiento complejo y altamente costoso (secuenciador automático de ADN)
- Elevado costo (todavía)
- Se puede analizar un número reducido de muestras simultáneamente (dependiendo esto del tipo de detector que posee el secuenciador)

## 6. CROSS MATCH.

### Objetivo:

Determinar la presencia de anticuerpos específicos contra alelos del HLA en suero de pacientes en lista de espera para trasplante de órganos sólidos vascularizados.

### Modalidades:

#### 6.a. Cross-match final contra dador:

Tiene por objeto analizar la presencia de anticuerpos séricos dirigidos específicamente contra los alelos del HLA de un posible donante. El análisis de la presencia o ausencia de estos anticuerpos es fundamental para decidir si el trasplante se realiza o no. Esto se debe a que la presencia de este tipo de anticuerpos preformados en el receptor de un trasplante lleva inevitablemente a un rechazo hiperagudo.

Esta técnica puede realizarse por microlinfocitotoxicidad en placas de Terasaki o citometría de flujo. En el primer caso se enfrenta suero del receptor con células de sangre periférica del posible donante (si es donante vivo) o con células de bazo o ganglio linfático (si es donante cadavérico). Luego de una etapa de incubación, se agrega fuente de complemento y se prosigue con la técnica tal como se describió en "Microlinfocitotoxicidad en placas de Terasaki".

En el caso del cross-match final contra dador por citometría de flujo, se enfrentan células mononucleares de sangre periférica o de bazo o ganglio linfático del posible donante, con suero del receptor. Luego de una incubación, se revela el sistema con inmunoglobulinas de cabra o conejo anti-inmunoglobulinas humanas, marcadas con fluorocromos (en general se emplea isotiocianato de fluoresceína). Finalmente, se analizan las células en un citómetro de flujo.

#### 6.b. Cross-match contra panel:

Tiene por objeto analizar la presencia de anticuerpos séricos dirigidos contra diferentes alelos del HLA de un posible donante. Esta técnica suele realizarse por microlinfocitotoxicidad en placas de Terasaki, donde se enfrenta suero del receptor con células de sangre periférica de diferentes individuos cuyos alelos del HLA sean representativos de la población (en general se emplean 20 individuos heterocigotas de manera de cubrir 40 alelos de cada locus). Luego de una etapa de incubación, se agrega fuente de complemento y se prosigue con la técnica tal como se describió en "Microlinfocitotoxicidad en placas de Terasaki". Mediante esta técnica se calcula el porcentaje de células que son lisadas en el ensayo, lo que es equivalente al número de alelos contra los cuales el paciente posee Ac específicos, expresado como porcentaje respecto del número total de alelos analizados en el ensayo. El parámetro calculado se denomina PRA ("*panel reactive antibodies*") y se ha observado que existe una relación entre el PRA y la probabilidad de éxito o fracaso de un trasplante renal.

## 7. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS PARA ESTUDIAR LA FUNCIONALIDAD DE LOS FAGOCITOS

### 7.a Ensayo de Reducción del Nitroblue Tetrazolium (NBT)

Este ensayo evalúa la capacidad microbicida de determinadas células del sistema inmune a través de la conversión un compuesto químico incoloro, el NBT, en un compuesto intensamente coloreado.

Para este ensayo se le extrae sangre al paciente y se realiza un procedimiento de separación de las células polimorfonucleares (en su mayoría neutrófilos). A estas células se les agrega el NBT. Los neutrófilos tienen la enzima NADPH Oxidasa que es capaz de generar intermediarios reactivos del oxígeno que atacan a los microorganismos. Estos intermediarios reactivos del oxígeno son también los responsables de convertir al NBT incoloro en un compuesto azul oscuro, llamado Formazán. Esto se visualiza observando los neutrófilos del paciente en el microscopio para ver si éstos tienen el compuesto azul oscuro.

Si los neutrófilos del paciente tienen alguna alteración en el funcionamiento de la enzima NADPH Oxidasa (tal como ocurre en aquellos que padecen enfermedad granulomatosa crónica) podrán ingerir bacterias pero no destruirlas y, por lo tanto, no podrán inducir el cambio de color del NBT.

En un individuo sano, más del 95% de los neutrófilos son capaces de reducir el NBT. En la mayoría de los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica sólo entre el 20% y el 80% de los neutrófilos son capaces de reducir el NBT. En los casos donde la sospecha clínica de enfermedad granulomatosa crónica es alta se deben realizar ensayos más específicos del metabolismo oxidativo de los neutrófilos (oxidación por parte de los neutrófilos de colorantes que producen compuestos fluorescentes, etc).

El uso de la droga D-Penicilamina puede dar resultados anormales en el ensayo de reducción del NBT, tal como si se tratara de la enfermedad granulomatosa crónica.

### 7.b. Ensayo Microbicida

Este ensayo evalúa la función fagocítica de las células del sistema inmune. Requiere que estas células sean capaces de fagocitar y de hacer el estallido respiratorio, dependiente de la enzima NADPH Oxidasa.

Para este ensayo se le extrae sangre al paciente y se realiza un procedimiento de separación de las células polimorfonucleares (en su mayoría neutrófilos) o de monocitos. A estas células se les agregan bacterias opsonizadas (*Staphylococcus aureus*), se incuban a 37°C y se extraen muestras a intervalos de 30 minutos durante 2 horas. Estas muestras son plaqueadas en agar sangre\* e incubadas durante toda la noche a 37°C. Esto permite que las bacterias crezcan y formen colonias visibles. Así, se cuenta el número de colonias para cada tiempo de extracción y se grafica el nº de colonias vs tiempo. Es de esperar que a medida que el tiempo de incubación es mayor, el número de colonias sea menor porque las células del paciente fagocitan a las bacterias y, por lo tanto, cada vez hay menos bacterias.

\*El **agar** es un medio de cultivo nutritivo (parece gelatina). En particular, el agar sangre está enriquecido con sangre y sirve para detectar ciertas bacterias como *Staphylococcus aureus*, que liberan exotoxinas llamadas hemolisinas que son capaces de lisis los glóbulos rojos.

