

Crónica

USO Y ABUSO DE OCHO PROCEDIMIENTOS DE DIAGNOSTICO MUY DIFUNDIDOS EN INMUNOLOGIA CLINICA¹

La reciente expansión de la inmunología clínica se ha acompañado de la introducción de una serie de pruebas para el diagnóstico inmunológico en los laboratorios clínicos. A causa del creciente interés de los clínicos en esos procedimientos, se los ha utilizado en forma exagerada y es opinión general que con- vendría definir mejor las indicaciones de esas pruebas de acuerdo con las nece- sidades de los pacientes.

Huelga decir que las pruebas inmunológicas, como cualquier otro tipo de pruebas de diagnóstico, pueden clasificarse según su utilidad en la atención de pacientes. Algunas son esenciales para el diagnóstico, el pronóstico o la vigilan- cia de la enfermedad; muchas son útiles pero opcionales en las investigaciones ordinarias; finalmente, otras tienen interés únicamente para fines de investiga- ción. Además, una serie de pruebas inmunológicas no son de ninguna utilidad en ciertas circunstancias.

Hay consenso entre los inmunólogos acerca de que es preciso tratar de redu- cir su contribución al costo cada vez mayor de las investigaciones médicas en el laboratorio. Esto exige autolimitarse en la aplicación habitual de algunas téc- nicas inmunológicas, sin desmedro de la atención del paciente. En este docu- mento se intenta definir las indicaciones de las pruebas inmunológicas. Nos he- mos restringido al análisis de ocho procedimientos de diagnóstico de uso muy difundido.

Se han considerado dos aspectos en cada procedimiento. Primero, se presen- tan en líneas generales los principales métodos recomendados comúnmente y se analizan sus deficiencias. En segundo lugar, se ha otorgado particular aten- ción a la definición de las condiciones clínicas en las que la prueba es esencial para el diagnóstico, aquéllas en las que la prueba resulta útil para evaluar o vi- gilar la actividad de la enfermedad, y también las condiciones en las que la prueba debe usarse sólo con propósitos de investigación clínica.

Las conclusiones del grupo reflejan el estado actual de los métodos y no excluyen futuros perfeccionamientos. Se opinó que el objetivo fundamental de la inmunología debía ser ayudar al paciente en la forma más eficaz en función del costo.

¹ Documento preparado por integrantes de un grupo de trabajo organizado en forma conjunta por la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología y la Organización Mundial de la Salud, reunido en Ginebra del 18 al 20 de mayo de 1981. Or- ganización Mundial de la Salud. *Bull WHO* 59(5):717:728, 1981.

CUANTIFICACION DE LAS INMUNOGLOBULINAS

La evaluación de las tres clases principales de inmunoglobulinas presentes en los fluidos orgánicos requiere tres técnicas de laboratorio: electroforesis del suero, cuantificación de las principales clases de inmunoglobulinas e inmunoelectroforesis. La medición de la IgE exige técnicas más sensibles. La medición de la IgD sérica carece de indicaciones clínicas.

La cuantificación de las clases de inmunoglobulinas mediante métodos inmunológicos tiene importancia en un número limitado de condiciones clínicas, pero con frecuencia se realiza esta prueba sin una indicación justificada.

Consideraciones metodológicas

Se han descrito muchos métodos para la evaluación cuantitativa de las inmunoglobulinas. Dos de ellos tienen en la actualidad mayor valor y son de precisión comparable: a) la inmunodifusión radial (IDR) y b) la nefelometría.

Cuando el número de pacientes es relativamente bajo, el método de elección probablemente sigue siendo la IDR. No obstante, cuando son numerosos los pacientes y se cuenta con un nefelómetro, es útil la nefelometría.

Inmunodifusión radial

La inmunodifusión radial tiene un coeficiente constante de variación que, en condiciones óptimas, puede ser inferior al 10%, excepto en concentraciones extremadamente bajas. El límite de las valoraciones precisas de proteínas, utilizando concentraciones bajas de antisueros, es de unos 10 mg/l (10 µg/ml). Las técnicas en que se utiliza la difusión limitada son más precisas que las que usan la difusión sincronizada. Con el suero normal, se pueden obtener resultados después de 24 h de difusión, pero tal vez se requiera más tiempo para evaluar concentraciones muy altas o muy bajas.

Deficiencias. La IDR es sensible a las diferencias en las constantes de difusión; deben tomarse precauciones especiales para asegurarse de que las inmunoglobulinas en los sueros tipos y los de las pruebas no estén divididas o aglutinadas, y que se encuentren en la misma forma. Por ejemplo, las mediciones fiables de proteínas tales como la IgM de bajo peso molecular relativo y la IgA secretoria, no pueden efectuarse a menos que se utilicen preparaciones normalizadas de estas clases de inmunoglobulinas.

Técnicas de nefelometría

Estas técnicas se usan cada vez más para cuantificar las concentraciones de inmunoglobulinas en el suero. Se pueden aplicar procedimientos turbidimétricos y la detección de complejos de antígenos y anticuerpos mediante la dispersión de la luz. Su ventaja consiste en que permiten obtener resultados en un lapso muy breve, se pueden automatizar por completo y no existen problemas en cuanto a la inmunoglobulina polimérica.

Deficiencias. Se requieren instrumentos costosos y puede ser necesario clarificar las muestras de suero turbio.

Patrones y antisueros

Se han presentado discrepancias en los resultados a causa de que los distintos laboratorios usan patrones diferentes. La OMS ofrece sus Preparaciones Internacionales de Referencia para las cinco clases de inmunoglobulinas del suero humano y se recomienda que los patrones de trabajo se relacionen con esas preparaciones.

Se debe comprobar que cada antisuero, incluso aquellos de fabricación comercial, es específico para la prueba en que se utilice. Los anticuerpos monoclonales derivados de hibridomas pueden llegar a ser útiles en el futuro; sin embargo, muchos anticuerpos monoclonales no provocan la precipitación de antígenos cuando se usan solos y, en consecuencia, tal vez se requieran mezclas de esos anticuerpos. Con ellos, puede resultar más fácil cuantificar subtipos y subclases de inmunoglobulinas.

Valores normales

Las concentraciones de las inmunoglobulinas en el suero varían según la edad, el medio geográfico y el sexo. Cada laboratorio debe medir las concentraciones de inmunoglobulinas séricas en un grupo testigo de características semejantes.

Indicaciones clínicas

Suero

Se considera esencial la cuantificación de inmunoglobulinas séricas cuando se sospecha la presencia de inmunodeficiencia (ID) primaria o secundaria, aun cuando no se observen anomalías en la electroforesis. No obstante, las concentraciones de inmunoglobulinas no pueden utilizarse como único criterio para el diagnóstico de ID primaria. Puede existir deficiencia selectiva de IgA sin indicios de enfermedad relacionada con esa deficiencia, y no se puede detectar la IgA en aproximadamente del 0,03 al 0,2% de la población normal. Por otra parte, a veces se puede observar ausencia de respuesta a uno o más antígenos en pacientes con concentraciones normales o elevadas de todas las inmunoglobulinas. En consecuencia, unas concentraciones inmunoglobulínicas normales no excluyen la deficiencia de anticuerpos. La vigilancia de las concentraciones séricas de inmunoglobulinas es esencial en pacientes que sufren formas graves de hipogammaglobulinemia, que reciben terapia de sustitución con inmunoglobulinas.

La cuantificación de inmunoglobulinas séricas se considera útil para distinguir las gammapatías monoclonales idiopáticas "benignas" de las paraproteinemias causadas por mielomas. En estos últimos casos, generalmente dismi-

nuyen las concentraciones de inmunoglobulinas normales, mientras que esas concentraciones no se modifican en las formas "benignas". En este contexto, es preciso señalar que las inmunoglobulinas monoclonales tienden a dar valores falsamente elevados en las evaluaciones mediante inmunodifusión. Cuando existen cantidades suficientemente grandes de la proteína monoclonal, se logra mayor precisión midiendo la proteína en la zona que está bajo la espiga en la electroforesis de proteína sérica.

Se ha comprobado el valor de cuantificar las inmunoglobulinas séricas con propósitos clínicos en algunos casos más, como en la determinación de las concentraciones de IgM en la sangre del cordón de recién nacidos en quienes se sospecha la existencia de infecciones congénitas, y como ayuda para el diagnóstico de tripanosomiasis o esplenomegalia tropical.

Con fines de investigación, se pueden cuantificar las inmunoglobulinas en la hipergammaglobulinemia difusa y en estados tales como ciertas enfermedades linfoproliferativas, cirrosis hepática o lupus eritematoso generalizado. Podrían resultar provechosos los estudios de inmunoglobulinas en las familias de pacientes con inmunodeficiencias o inmunoglobulinas homogéneas, con el objeto de aclarar la función de factores genéticos.

Otros fluidos orgánicos

Orina. Es posible cuantificar las inmunoglobulinas presentes en la orina, pero esta tarea está plagada de dificultades. Por ejemplo, las moléculas de inmunoglobulina en la orina pueden estar escindidas, o pueden estar en forma de cadenas ligeras, como monómeros, lo cual hace difícil la normalización. Para la comprobación de las proteínas de Bence-Jones, es más útil la combinación de la electroforesis y la inmunolectroforesis de proteínas.

Líquido cefalorraquídeo (LCR). La cuantificación de inmunoglobulinas debe efectuarse con LCR sin concentrar, pues los procedimientos de concentración provocarán la aglutinación de inmunoglobulinas, especialmente la IgG, y un falso valor bajo en la IDR.

La cuantificación de inmunoglobulinas en el LCR es importante en enfermedades como la esclerosis múltiple y la panencefalitis esclerosante subaguda, en las que las concentraciones de IgG en relación con el total de proteínas o albúmina aumentan con frecuencia, aunque no siempre. En la tripanosomiasis africana, el aumento de las concentraciones inmunoglobulínicas en el LCR es un indicio de que el parásito ha invadido el sistema nervioso central.

ANALISIS INMUNOELECTROFORETICO DE INMUNOGLOBULINAS DE LOS FLUIDOS BIOLÓGICOS

La inmunolectroforesis (IEL) permite la identificación rápida de las principales clases de inmunoglobulinas. Es el método de elección para identificar las inmunoglobulinas monoclonales pues detecta simultáneamente su homogeneidad electroforética y antigénica. No es una técnica cuantitativa precisa y no debe ser utilizada para el estudio sistemático de las proteínas séricas.

Consideraciones metodológicas

La IEL es un método útil para estudiar las inmunoglobulinas en otros fluidos además del suero, por ejemplo, la orina, el líquido cefalorraquídeo, la saliva o el jugo intestinal. En estos casos, por lo general es necesario concentrar las proteínas antes de efectuar la IEL, y someter al mismo tiempo al procedimiento una muestra de suero del mismo paciente.

El medio de elección para la IEL es el agar o la agarosa y, cuando es posible, se utiliza el mismo tipo de gel para la electroforesis de proteínas séricas.

La IEL requiere el empleo de antisueros específicos potentes. Se recomienda usar en el primer paso antisueros polivalentes que contengan anticuerpos precipitantes contra las diversas clases de inmunoglobulinas y los varios tipos de cadenas ligeras. Para identificar las inmunoglobulinas monoclonales a menudo se requieren antisueros específicos para cada una de las diversas cadenas pesadas y ligeras de Ig. Estos antisueros pueden obtenerse en los laboratorios comerciales, y siempre debe verificarse su contenido de precipitinas y su especificidad.

La determinación de la clase de cadena pesada de una inmunoglobulina monoclonal a veces, si bien no siempre, requiere el empleo de un antisuero específico para esa clase. Estos antisueros son necesarios para el diagnóstico de mielomas IgD o IgE. La identificación de la subclase de cadena pesada de componentes IgG o IgA monoclonales tiene importancia principalmente para la investigación. La identificación de las cadenas ligeras de tipo κ o λ es necesaria para el diagnóstico de las proteínas de Bence-Jones y optativa cuando se trata de proteínas de mieloma. Sin embargo, el tipo de cadena ligera puede tener importancia para el pronóstico de casos de mieloma. La IEL con antisueros contra los tipos κ o λ permite detectar pequeños elementos monoclonales cuando existe hiperinmunoglobulinemia difusa y, a veces, también es posible detectar elementos monoclonales múltiples.

Deficiencias

Como resultado de la escasa disponibilidad de determinantes antigénicos para los enlaces cruzados, muchos antisueros contra los tipos de cadena ligera no pueden provocar la precipitación de algunas moléculas de inmunoglobulinas monoclonales, especialmente la IgA-lambda y/o algunas cadenas ligeras libres (proteínas de Bence-Jones). En consecuencia, para el diagnóstico de enfermedades de la cadena pesada (en particular la enfermedad de la cadena alfa) es necesario utilizar otros procedimientos, por ejemplo, la IEL con antisueros que contengan precipitinas que actúan sobre los determinantes que conforman la región Fab, o la inmunoselección combinada con IEL, empleando antisueros potentes incorporados al gel, que actúan sobre las cadenas ligeras o la región Fab. Como en todos los procedimientos de inmunoprecipitación, el exceso de antígeno puede impedir la visualización de una banda de precipitina, en especial cuando se utilizan antisueros equinos. Este es el caso cuando se analizan proteínas de Bence-Jones.

Cuando en el suero existe una crioglobulina, el análisis inmunolectroforético

co del suero entero debe efectuarse después de calentarlo a 37 °C y de una nueva disolución.

Para lograr la pronta identificación de algunas proteínas IgM y verificar su naturaleza monoclonal mediante la tipificación de cadenas ligeras, puede ser necesario recurrir a otros procedimientos tales como la agregación de un agente reductor al fluido estudiado (con el propósito de convertir la IgM de 19S en subunidades de 8S) o la separación preliminar de la IgM de la IgG mediante técnicas fisicoquímicas. En esos casos puede resultar particularmente útil la inmunofijación, una técnica desarrollada recientemente para identificar inmunoglobulinas monoclonales.

Al interpretar los patrones inmunoelectroforéticos es preciso tomar en cuenta las posibles asociaciones de inmunoglobulinas monoclonales con otras proteínas, tales como la albumina sérica, la α -1-antitripsina y las lipoproteínas.

Indicaciones clínicas

Suero

El análisis mediante la IEL es esencial:

a) Cuando los datos clínicos, hematológicos o patológicos inducen a diagnosticar o sospechar que existen las siguientes enfermedades: mieloma, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedades de la cadena pesada, amiloidosis, o enfermedad por depósito de inmunoglobulina.

b) En presencia de las siguientes anomalías biológicas:

- Una banda angosta anormal en la electroforesis de la proteína sérica. Sin embargo, es preciso destacar que la IEL permite detectar elementos monoclonales en situaciones en que no existe un patrón electroforético definido.

- Una crioglobulina. En estos casos, es necesaria la IEL para identificar las proteínas del crioprecipitado y para distinguir las crioprecipitinas inmunoglobulínicas homogéneas de una sola clase, de las crioglobulinas mezcladas con o sin un elemento monoclonal. También se debe efectuar la IEL del suero completo.

- Proteinuria del tipo de Bence-Jones.

- Una piroglobulina, hiperviscosidad del suero o una discrepancia entre la concentración inmunoglobulínica estimada mediante procedimientos inmunológicos y la concentración observada en la electroforesis.

La IEL puede resultar útil en el caso de algunos trastornos inmunoproliferativos como leucemias linfocíticas crónicas (para la detección de la enfermedad de la cadena λ y de inmunoglobulinas monoclonales) y la enfermedad por crioaglutininas, y en trastornos como la enfermedad de Gaucher o papulosis mucinosa (elementos monoclonales) y la tripanosomiasis (concentración elevada de IgM policlonal).

La IEL puede resultar útil para propósitos de investigación en casos tales como inmunodeficiencias primarias (sumada a las mediciones de concentraciones de Ig), injertos de médula ósea en pacientes que sufren leucemia, aplasia medular o inmunodeficiencias combinadas graves; algunos trastornos por

autoinmunidad; ciertos procesos hematológicos, como la leucemia mielomonocítica; diversas infecciones como las provocadas por citomegalovirus o la toxoplasmosis congénita; el estudio sistemático de los familiares de pacientes que sufren gammapatías monoclonales.

Orina

La IEL es esencial en casos de mieloma (con o sin Ig sérica homogénea total); amiloidosis, enfermedad por depósito de inmunoglobulina; en todos los casos en que se ha encontrado Ig monoclonal en el suero, cualquiera que sea el estado clínico; en los casos en que se ha detectado una banda angosta anormal en los espectros electroforéticos de proteínas urinarias.

La IEL se emplea en forma discrecional en las enfermedades linfoproliferativas malignas que no sean mielomas (macroglobulinemia, leucemia linfática crónica, linfoma, enfermedades de la cadena pesada) y en las inmunodeficiencias primarias.

Otros fluidos

La IEL de las proteínas del líquido cefalorraquídeo también es útil para la detección de elementos oligoclonales en pacientes con panencefalitis esclerosante subaguda, o que sufren mieloma o macroglobulinemia con compromiso neurológico. En la esclerosis múltiple, da mejores resultados la técnica del enfoque isoelectrónico.

La IEL del jugo intestinal es esencial en la "enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado" en que se sospecha la existencia de enfermedad de la cadena α , cuando no se detecta la proteína anormal en el suero del paciente.

MEDICION DE LA IgE TOTAL Y ESPECIFICA

La IgE es el factor más importante que interviene en la enfermedad atópica. En algunas parasitosis también aumenta considerablemente la concentración de IgE. No obstante, es limitado el valor clínico de la determinación de esta inmunoglobulina.

IgE total. Consideraciones metodológicas

Los métodos recomendados para medir la IgE sérica (generalmente presente en proporciones de $\mu\text{g}/\text{l}$) son las técnicas ELISA y el radioinmunoensayo en fase sólida.

El principio común en que se basan esos dos métodos es el empleo de anticuerpos anti-IgE sin solubilizar. Este reactivo se puede utilizar en un ensayo de unión competitiva usando IgE marcada radioactivamente e IgE tipificada, o

en un ensayo no competitivo en que se emplea anti-IgE marcada radioactivamente. Como otros ensayos competitivos, el primer procedimiento está sujeto a la inhibición no específica provocada por otros factores séricos, tiene una sensibilidad limitada y, por lo tanto, no se recomienda su empleo. Las ventajas de los ensayos no competitivos son: mayor sensibilidad y precisión, y el hecho de que por lo general están libres de interferencia por parte de factores séricos no específicos.

Si bien inicialmente se utilizaron radioinmunoensayos, las técnicas ELISA ofrecen muchas posibilidades y ventajas, en particular para el empleo en los países en desarrollo.

Las principales ventajas de esas técnicas consisten en que se evita el empleo de isótopos marcadores, los reactivos se pueden almacenar largo tiempo y la evaluación se efectúa por medio de un fotómetro en lugar de recurrir al contador γ . La única limitación es que las técnicas ELISA desarrolladas hasta ahora no tienen sensibilidad suficiente para medir concentraciones muy bajas de IgE.

El radioinmunoensayo es, por lo tanto, el método más conveniente cuando se trata de pacientes pediátricos, inmunodeficiencias, análisis de la sangre del cordón, sobrenadantes de cultivos celulares, etc. Cuando se requieren mayor sensibilidad y reproducibilidad para propósitos de investigación, se emplean ensayos adecuados con anticuerpos dobles.

Los valores obtenidos deben ser comparados con los correspondientes a un grupo testigo de la misma edad y situación geográfica. Se dispone de una Preparación Internacional de Referencia elaborada por la OMS.

Indicaciones

No es esencial la determinación de la IgE total, excepto en el diagnóstico del poco frecuente síndrome de hiper-IgE asociado con eosinofilia e infecciones recurrentes que ha descrito Buckley.

La determinación de la IgE total puede ser útil para diferenciar trastornos en los que interviene la IgE, de aquellos en los que esa inmunoglobulina no tiene ninguna participación, cuando no se puede lograr esto con medios clínicos. Esos trastornos incluyen rinitis perenne, asma bronquial, dermatitis, urticaria crónica e intolerancia alimentaria. Sin embargo, las concentraciones de IgE tienen un valor limitado puesto que la concentración de IgE total puede encontrarse dentro de la gama normal en las enfermedades en que dicha inmunoglobulina es un factor importante (por ejemplo, la fiebre de heno), y puede aumentar por la acción de mecanismos no atópicos como la infestación por parásitos. En consecuencia, los resultados deben interpretarse con precaución tomando en cuenta toda la demás información clínica pertinente. Las determinaciones seriadas también tienen importancia limitada, con la posible excepción de la aspergilosis broncopulmonar alérgica.

En los estudios prospectivos, el aumento de la IgE en las primeras épocas de la infancia puede ser un útil indicador de riesgo elevado de enfermedades atópicas.

La determinación de la IgE total puede considerarse un instrumento en la investigación de ciertas inmunodeficiencias y de familias atópicas.

IgE específica. Consideraciones metodológicas

Se dispone de dos técnicas principales. En una se emplea anti-IgE marcada radioactivamente (la prueba de radio-alergosorbencia = RAST) y en la otra se utiliza anti-IgE marcada con enzimas (ELISA). Es preciso usar con precauciones toda modificación de los procedimientos normalizados de la RAST. Con frecuencia se logra mayor sensibilidad a costa de menos especificidad. Las posibles ventajas de los ensayos inmunoenzimáticos para detectar la IgE específica son las mismas que en el caso de la IgE total.

Una serie de deficiencias dificultan la interpretación de los resultados:

- a) Los equipos de pruebas de fabricación comercial que se emplean comúnmente ofrecen resultados en relación con un único suero de referencia. Por esta razón, es casi imposible realizar comparaciones con otros resultados.
- b) Las distintas clases de RAST para diferentes alérgenos no son comparables.
- c) La mayoría de las preparaciones de alérgenos son impuras.
- d) Causan interferencia los anticuerpos de otras clases de inmunoglobulinas presentes en la misma muestra de suero.

Otro importante obstáculo es la dificultad de transformar los resultados de la RAST en grados de sensibilidad clínica que tengan sentido para el médico que atiende a los pacientes.

Indicaciones

La medición de la IgE específica no es esencial en ninguna situación clínica; no representa una alternativa que sustituya a una cuidadosa historia clínica y pruebas cutáneas. Por lo general, estas últimas se relacionan más estrechamente con la manifestación que el ensayo para detectar la IgE específica. No obstante, las pruebas *in vivo* pueden estar sujetas a influencias no específicas (irritantes).

La medición de la IgE específica es útil en las siguientes situaciones: dermatografismo o dermatitis grave que impidan las pruebas cutáneas; cuando no se puede interrumpir el tratamiento sintomático que influye sobre las reacciones cutáneas (por ejemplo, el tratamiento con medicamentos antihistamínicos); cuando los grados de sensibilización son altos y las pruebas cutáneas resultarían peligrosas para el paciente; cuando se trata de alérgenos que no pueden emplearse en las pruebas cutáneas (sustancias tóxicas, insolubles en agua o muy sensibilizantes); en alergias alimentarias en las que son menos fiables las pruebas cutáneas, y en la interpretación de estas pruebas cuando sus resultados son dudosos. En este sentido, es preciso destacar que la composición antigénica de las soluciones empleadas en las pruebas cutáneas no es necesariamente la misma que se emplea como sustrato en la prueba *in vitro*.

Si se emplea adecuadamente, la medición de la IgE específica puede disminuir la frecuencia de las pruebas de provocación.

Con propósitos de investigación, se emplean mediciones de IgE específica en diversas enfermedades mediadas por esa inmunoglobulina y también en algunas enfermedades parasitarias.

Las mediciones de la IgE específica no deben ser consideradas como un "examen selectivo" para detectar enfermedades alérgicas o solicitarse para evaluar condiciones alérgicas en las que no intervienen mecanismos en los que es un factor la IgE (por ejemplo, las dermatitis de contacto).

MEDICIONES DEL COMPLEMENTO

El complemento está constituido por una serie de proteínas sometidas a activación secuencial como consecuencia de la interacción con una serie de agentes. La medición del complemento se puede lograr mediante la medición funcional de todo el sistema, la medición funcional de componentes individuales o la medición inmunoquímica de estos componentes utilizando antisueros específicos. Estas mediciones representan el equilibrio entre síntesis y consumo. Las concentraciones elevadas del complemento pueden presentarse como consecuencia del aumento de síntesis, especialmente después de inflamación aguda y traumatismo, mientras que se encuentran concentraciones bajas como resultado del aumento de consumo y/o disminución de síntesis. Esto último puede estar determinado genéticamente.

Consideraciones metodológicas

La evaluación hemolítica del complemento total (CH_{50})

En este ensayo se evalúa la capacidad del suero de producir la lisis de una suspensión normalizada de eritrocitos de carnero sensibilizados en grado óptimo mediante anticuerpos de conejo antihematíes de carnero. La prueba, según se efectúa habitualmente, sirve para evaluar principalmente la actividad funcional de los componentes que generan la vía clásica de C3-convertasa y del mismo C3. También permite detectar la presencia de C5-C9, componentes terminales funcionalmente activos, si bien no es sensible a las variaciones de los valores de estos componentes.

La prueba se realiza de diversas maneras, pero la técnica que permite reproducir resultados más fácilmente y tiene mayor aplicación clínica es la descrita por Mayer. En este procedimiento hay variantes en que se usan diferentes concentraciones de células y/o distintos volúmenes de reactivos y tiempos de incubación. También es posible medir el CH_{50} con métodos automatizados.

El valor de esta determinación depende de las condiciones de la prueba, y los resultados pueden variar si los hematíes no son frescos, no están adecuadamente tipificados, tienen un bajo contenido de potasio o no están adecuadamente sensibilizados. Por esta razón, en todas las series que se evalúen es preciso incluir un suero normalizado cuyo valor se conozca. Además, la reunión y conservación inadecuadas de las muestras para la prueba puede causar valores falsamente bajos. Se debe separar el suero dentro de la primera hora posterior a la toma de la sangre y conservarlo a -70°C antes de las pruebas. Cuando no sea posible hacer esto, se ha recomendado usar plasma EDTA. Cuando el suero contiene crioglobulina, se pueden obtener valores funcionales e inmunoquímicos del complemento ficticiamente bajos.

Medición de componentes individuales

Rara vez es necesaria en la práctica clínica la medición funcional de los componentes, a menos que se sospeche que existe una deficiencia genética del complemento. Se cuenta con antisueros para la mayoría de las proteínas del complemento, en particular para el C3, C4, C1q, el inhibidor de C1-esterasa y el Factor B. La estimación de los componentes individuales mediante técnicas inmunoquímicas es adecuada para gran parte de los propósitos clínicos y resulta particularmente útil cuando se trata de muestras conservadas en forma deficiente. Si bien existen defectos genéticos poco frecuentes que producen la síntesis de moléculas anormales sin actividad funcional, en general los valores de componentes estimados con procedimientos inmunoquímicos reflejan los valores funcionales *in vivo*.

La estimación inmunoquímica del C3, el C4 y otras proteínas del complemento se puede efectuar mediante la prueba de difusión radial simple o con algún procedimiento de nefelometría. No se recomienda el empleo de la inmunoelectroforesis "en cohete" a causa de las alteraciones de la movilidad electroforética de las moléculas durante el almacenamiento. La OMS dispone de Preparaciones Internacionales de Referencia para el C3, C4, C1q y el Factor B. Tiene importancia la especificidad del antisuero usado en el análisis y en el caso del C3, sólo debe emplearse antisuero específico para ese componente.

Las estimaciones del C3 y el C4 son las más útiles de las mediciones ordinarias de componentes del complemento. En ciertas condiciones, el valor de C4 puede ser anormalmente bajo aunque sea normal el CH_{50} . En ocasiones un CH_{50} bajo es consecuencia sobre todo de un C2 bajo, pero no se obtienen con facilidad antisueros para este último componente, y es difícil efectuar pruebas funcionales con esta proteína en los laboratorios comunes. Los valores del inhibidor de la C1-esterasa tienen importancia principalmente en el diagnóstico diferencial de angioedema.

Indicaciones clínicas

Las estimaciones del complemento CH_{50} son esenciales sólo en circunstancias en que se sospecha que existe una deficiencia genética del complemento, por ejemplo, en pacientes que sufren infecciones recurrentes, en especial meningitis recurrente, angioedema hereditario o enfermedades de inmunocomplejos comprobadas en familias. Para confirmar la existencia de angioedema, es esencial medir el valor inhibidor de C1-esterasa y, si se obtiene un valor inmunoquímico normal, es preciso efectuar una evaluación funcional pues entre el 10 y el 15% de parientes de sangre pueden producir moléculas no funcionales. Si el CH_{50} es normal, las valoraciones funcionales de componentes individuales no son necesarias excepto cuando se desea detectar estados heterocigóticos.

Las estimaciones del complemento (CH_{50} , C3 y C4) son útiles para la evaluación y vigilancia de pacientes con glomerulonefritis, enfermedades comprobadas por inmunocomplejos como el lupus eritematoso generalizado y ciertas formas de vasculitis, y en estados tales como el dengue fiebre hemorrágica. En los casos en que se encuentran valores bajos, éstos con frecuencia vuelven a la

normalidad cuando se produce la remisión y los valores del complemento pueden servir para vigilar el tratamiento.

Las pruebas ordinarias de medición del complemento tienen escaso valor en la mayoría de las demás enfermedades inflamatorias o infecciosas crónicas.

DETECCION DE INMUNOCOMPLEJOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS DEL HOMBRE

Se ha comprobado que los inmunocomplejos (IC) están involucrados en la patogénesis de lesiones tisulares de una serie de enfermedades del hombre.

Desde 1972, con el propósito de detectar el IC circulante se han elaborado más de 30 métodos de uso muy difundido, en espera de que constituirán instrumentos ideales para el diagnóstico de enfermedades causadas por IC. Sin embargo, no se han cumplido totalmente esas expectativas.

Consideraciones metodológicas

La mayoría de los métodos se han diseñado con el propósito de detectar inmunoglobulinas que forman complejos inmunes, sin considerar la naturaleza del o los antígenos involucrados en el IC. Estos métodos son los más usados en la práctica clínica.

Algunos métodos se basan en las diferencias fisicoquímicas entre la Ig monomérica y la Ig que forma complejos. La precipitación en polietilenglicol (PEG) es un método común muy usado. Si bien puede resultar útil para concentrar complejos, no es específico para los IC pues, aun con concentraciones bajas, también se precipitan una serie de proteínas séricas de molécula grande. No se recomienda la cuantificación del total de proteínas ni de las proteínas individuales en el precipitado PEG como medición de la concentración de IC.

Los métodos biológicos se basan en el reconocimiento de IC en sistemas humorales o receptores de células. Si bien con todos estos métodos es posible detectar los IC, no permiten cuantificar las proteínas del IC. Las pruebas en que se utilizan receptores Fc de macrófagos, células K, o plaquetas, han caído en desuso por dos razones: a) su gran sensibilidad a factores que interfieren, y b) la dificultad de lograr resultados reproducibles.

Si bien los factores que interfieren pueden causar resultados positivos falsos, ahora parece que, en la mayoría de los casos, un resultado positivo probablemente indique la presencia de IC cuando se utilizan los siguientes métodos: pruebas de fijación con C1q en fase sólida o en fase líquida; evaluaciones con conglutinina; inhibición del factor reumatoide (FR) monoclonal; valoración utilizando células Raji. En recientes estudios en colaboración efectuados por OMS/UI SI, se ha comprobado que éstas son las pruebas más aceptables. Algunas de ellas (por ejemplo, la prueba con C1q en fase sólida o la de conglutinina) pueden utilizarse para detectar la clase de anticuerpo presente en el complejo mediante el empleo de antisueros específicos adecuados en la última etapa.

Las principales deficiencias de estos cuatro métodos son las siguientes:

a) Con estos métodos se detectarán Ig agregadas no específicamente así como

Ig que forman inmunocomplejos. Algunos de esos métodos requieren un tratamiento previo de la muestra (calentamiento a 56 °C) que pueden inducir la agregación de las Ig.

b) Es preciso efectuar con cuidado la toma y almacenamiento de muestras para la detección de Ig, evitando la contaminación por bacterias y el congelamiento y descongelamiento repetidos. Se debe dejar que la sangre se coagule durante dos horas a 37 °C antes de separar el suero. La temperatura de conservación debe ser de -70 °C.

c) Las pruebas en que se usa Clq pueden resultar influidas por la presencia de heparina, endotoxinas o ADN libre en la muestra.

d) Los métodos en que se emplean FR no son adecuados para los IC que contiene IgM, y no pueden utilizarse con sueros que contienen FR o en presencia de concentraciones elevadas de IgG. También ha resultado difícil normalizar preparaciones con FR.

e) En el caso de las pruebas con células Raji, pueden obtenerse resultados positivos falsos en presencia de anticuerpos antilinfocitarios. Se requiere particular cuidado en cuanto a las condiciones de cultivo de las células para evitar variaciones en la sensibilidad.

f) Por las razones antes mencionadas, los resultados de las distintas pruebas para detectar IC tal vez no sean siempre directamente comparables.

g) La cuantificación de IC se ha hecho hasta ahora sin las adecuadas preparaciones de referencia. Por consiguiente, los resultados publicados expresados en "µg de complejos" o como "equivalentes de µg de IgG agregada térmicamente" no son comparables entre un laboratorio y otro. Se puede solicitar ahora preparaciones de referencia de IgG agregada a IC preformado (complejos antígeno-anticuerpo de anatoxina tetánica).²

Si bien la detección de antígenos específicos de los inmunocomplejos debería ser el objetivo de este tipo de investigaciones, sólo en condiciones clínicas limitadas se ha obtenido información concerniente a la naturaleza del o los antígenos involucrados en los IC formados *in vivo*, utilizando métodos elaborados con ese propósito particular (por ejemplo, antígenos microbianos, ADN, etc.). La información lograda mediante el análisis de IC purificados a partir del suero, indica que esos IC a menudo son el resultado de interacciones específicas entre moléculas inmunoglobulínicas (FR, antiidiotipos). Por lo tanto, la presencia de IC en muestras de suero no implica la presencia de un antígeno particular de origen autólogo, microbiano o exógeno.

Indicaciones clínicas

La detección de IC no es esencial en ningún estado clínico. La presencia de IC en el suero no es específica de enfermedad de inmunocomplejo. Pueden presentarse lesiones inducidas por IC (por ejemplo, glomerulonefritis) sin que existan IC circulantes detectables y con frecuencia se encuentran inmunocomplejos en el suero sin que haya indicios de lesiones típicas relacionadas con IC.

Puede resultar útil detectar los IC para evaluar y vigilar la actividad de la en-

² Las solicitudes deben dirigirse al Dr. U. Nydegger, Servicio de Transfusiones CRS, Laboratorio Central, Wankdorfstrasse 10, 3000 Berna 22, Suiza.

fermedad en enfermedades como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso generalizado. Esa detección puede también ser valiosa para la vigilancia de los efectos de la plasmaféresis. También puede ser importante en el pronóstico de enfermedades malignas como la leucemia aguda.

En todas las circunstancias en que se sospecha que existe enfermedad de IC, es preciso efectuar, siempre que sea posible, exámenes directos de muestras de tejidos (por ejemplo, de riñón, piel, etc.). Esos estudios no pueden ser reemplazados por la detección de IC circulantes.

DETECCION DE ANTICUERPOS MEDIANTE LA INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA

El método más difundido para la detección de autoanticuerpos contra los antígenos tisulares es la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Sin embargo, muchos otros métodos de uso común proporcionan información para el diagnóstico mediante el empleo de antígenos definidos y, en el futuro, la utilización de antígenos purificados será más frecuente.

Consideraciones metodológicas

El procedimiento de la IFI implica la aplicación del suero de un paciente a una sección adecuada de tejido humano o animal, la eliminación de la globulina libre por medio de repetidos lavados y la posterior adición de un antisuero contra la inmunoglobulina humana (preparado mediante inmunización de un animal de experimentación), conjugado con un marcador fluorescente. Se puede observar el sitio de fijación de anticuerpos gracias a la microscopia de fluorescencia. En lugar de la tinción fluorescente para marcar el anticuerpo, se puede emplear una enzima como la peroxidasa y entonces se utilizan métodos citoquímicos adecuados para detectar la localización del anticuerpo. Las variables más importantes en una técnica reproducible son: a) el tipo de sustrato empleado, incluyendo la fuente, el método de fijación, la conservación y la preparación; b) la duración de la incubación y el lavado del suero del paciente; y c) la especificidad y la sensibilidad del conjugado antiglobulínico. Es parte esencial de cada prueba la incorporación de sueros positivos y negativos conocidos empleados como testigos.

Los cuatro grupos de autoanticuerpos cuya detección se solicita con más frecuencia son los anticuerpos antinucleares, antitiroideos, antimitocondriales y antimúsculos lisos. Es posible preparar bloques compuestos de varios tejidos para someterlos al procedimiento de una sola vez.

Anticuerpos antinucleares

Los sustratos adecuados para detectar anticuepros antinucleares (AAN) son cortes criostáticos de hígado o riñón de roedores, pero en casos especiales se usan leucocitos humanos. Se pueden obtener en laboratorios comerciales tejidos de células cultivadas fijadas, pero resultan menos satisfactorios desde el punto de vista de la visualización, pues producen más fluorescencia inespecífica.

Los sueros de distintos pacientes pueden dar imágenes diferentes de tinción nuclear. Los anticuerpos que producen una coloración homogénea actúan principalmente contra las nucleohistonas. Las imágenes periféricas probablemente son causadas por anticuerpos contra el propio ADN. Los anticuerpos que se relacionan con la tinción en manchas actúan contra antígenos nucleares solubles, como el Sm o las ribonucleoproteínas (RNP). Las imágenes en nucléolos son causadas por la reacción con el ARN.

Anticuerpos antitiroideos

El sustrato para comprobar la presencia de autoanticuerpos antitiroideos está constituido por tejido tiroideo congelado ya sea humano o de mono; el procedimiento es el mismo que se describió en el caso de los AAN. Mediante la IFI se pueden diferenciar por los menos dos autoanticuerpos bien definidos que actúan contra las células epiteliales tiroideas y contra el coloide tiroideo, respectivamente. Cuando la prueba del suero de un paciente en portaobjetos sin fijar da resultados positivos, se observa una fluorescencia brillante en las células epiteliales. El autoanticuerpo responsable de esta reacción actúa sobre una lipoproteína microsómica de la célula epitelial. Los autoanticuerpos que reaccionan contra el coloide pueden observarse sólo cuando se usan extensiones fijadas con metanol. También puede comprobarse la presencia de estos autoanticuerpos recurriendo a pruebas de hemaglutinación con hematíes recubiertos con los antígenos respectivos.

Anticuerpos antimitocondriales

Para demostrar la presencia de anticuerpos antimitocondriales se emplea riñón de rata como sustrato; se observa inmunofluorescencia en el citoplasma de las células epiteliales que revisten los conductos.

Anticuerpos contra los músculos lisos

Para detectar anticuerpos contra los músculos lisos generalmente se emplean como sustrato secciones del estómago de la rata.

Indicaciones clínicas

Es preciso insistir en que no se solicite la detección no específica de autoanticuerpos. Los clínicos deben más bien requerir pruebas para detectar determinados autoanticuerpos pertinentes al contexto clínico.

Anticuerpos antinucleares

Las pruebas para detectar la presencia de AAN son esenciales para el diagnóstico del lupus eritematoso generalizado (LEG). La presencia de títulos bajos de AAN es relativamente frecuente y se relaciona con una serie de trastornos. Aun

en el suero de individuos normales se observa una incidencia escasa de AAN, en particular entre las personas de edad. Por consiguiente, la principal utilidad de las pruebas para detectar AAN consiste en excluir el diagnóstico de LEG ya que en la mayoría de los casos activos de LEG se obtienen resultados positivos. Para una nueva confirmación del diagnóstico de LEG activo se requiere comprobar la presencia de anticuerpos contra el propio ADN (de doble cadena), lo que se puede lograr mediante la IFI (con cinetoplasto de *Criothidia lucilleae*) o con otras técnicas; la comprobación de la presencia de anticuerpos contra el antígeno Sm tiene también gran valor para el diagnóstico de esa enfermedad.

Las pruebas para detectar AAN son convenientes en el diagnóstico de la "enfermedad mixta del tejido conectivo" (patrón de manchas relacionado con anticuerpos contra las RNP) y la forma autoinmune de la hepatitis activa crónica. También son útiles en muchos casos de LEG inducido por fármacos y cuando se presenta una imagen característica de tinción de nucléolos en la esclerosis generalizada progresiva. Los AAN algunas veces tienen importancia en el estudio de familiares de pacientes con LEG, porque pueden permitir la detección temprana de esta enfermedad.

Autoanticuerpos antitiroideos

Las pruebas para comprobar la presencia de autoanticuerpos antitiroideos son esenciales para el diagnóstico de tiroiditis crónica y de mixedema espontáneo del adulto. Más del 90% de los pacientes con tiroiditis tienen autoanticuerpos que actúan contra el antígeno microsómico celular, contra la tiroglobulina o contra ambos a la vez. Sin embargo, los resultados positivos de las pruebas no eliminan la posibilidad de que se trate de afecciones tales como el adenocarcinoma o la enfermedad de Graves, pues el 20% de los pacientes que sufren estas últimas enfermedades tienen anticuerpos contra el antígeno tiroideo, si bien los títulos son generalmente más bajos que en los pacientes con tiroiditis.

Anticuerpos antimitocondriales

Los anticuerpos de este tipo son característicos pero no específicos de la cirrosis biliar primaria.

Anticuerpos antimúsculos lisos

Por lo general se encuentran títulos elevados de estos anticuerpos en el suero de pacientes que sufren hepatitis activa crónica. Tanto estos anticuerpos como los antimitocondriales están presentes en muchos otros procesos, pero es de esperar que las pruebas lleguen a ser más útiles cuando se cuente con antígenos purificados.

Otros autoanticuerpos

En ciertas enfermedades poco frecuentes se encuentran otros autoanticuerpos de interés clínico. Por ejemplo, los anticuerpos contra la sustancia intercelular del epitelio escamoso estratificado están presentes en los casos de pénfigo,

mientras que en el penfigoide se presenta una imagen de fluorescencia característica en la membrana basal del epitelio estratificado.

Con frecuencia se detectan anticuepos contra los músculos estriados en el suero de pacientes que sufren miastenia grave. No obstante, en estos casos es más conveniente detectar anticuerpos contra los receptores de acetilcolina mediante radioinmunoensayo.

Los autoanticuerpos contra la corteza suprarrenal presentes en casos de insuficiencia suprarrenal idiopática, o contra los islotes pancreáticos en ciertos casos de diabetes mellitus insulino dependiente, no son muy frecuentes y, por lo tanto, no tienen gran valor para el diagnóstico aunque son útiles para las investigaciones clínicas.

DETERMINACION DE LAS CELULAS B y T

Se logró un gran progreso en el estudio de las poblaciones de linfocitos cuando se comprobó que podían caracterizarse de acuerdo con ciertos marcadores en la superficie celular. Desde entonces, las células B y T se han mencionado en una serie de estudios sobre la salud y la enfermedad. Si bien esas investigaciones no han resultado muy fructíferas desde el punto de vista clínico, han contribuido a definir los marcadores celulares y a aumentar nuestros conocimientos sobre la fisiología de los linfocitos humanos.

Consideraciones metodológicas

Separación de las células linfoides

La mayoría de los estudios sobre las células T y B humanas se realizan con sangre periférica y para la separación de células mononucleares se utiliza el método de Ficoll-Isopaque. Las preparaciones contienen un número considerable de monocitos, que es importante distinguir de los linfocitos. Esto se puede lograr con mayor facilidad mediante la ingestión de partículas de látex o la tinción con peroxidasa.

Es conveniente realizar estudios de los marcadores celulares con muestras de sangre recién extraídas y verificar la viabilidad de las células, pues esto puede influir sobre las características de la superficie celular.

Marcadores de las células T

En la actualidad se recomiendan dos tipos de métodos para detectar todas las células T periféricas: la formación de rosetas con eritrocitos de carnero (rosetas E) y el empleo de anticuerpos monoclonales específicos contra las células T.

La formación de rosetas E es el procedimiento más empleado y recomendado para detectar las células T. Distintos laboratorios han comunicado porcentajes muy variables de rosetas E en la población normal; estas variaciones son todavía frecuentes a pesar de que se ha progresado gracias a la mayor normali-

zación de las técnicas. Son factores importantes la fuente de eritrocitos de carnero, su conservación, la presencia de pequeñas cantidades de suero (suero fetal de becerro o suero humano AB) y la manipulación cuidadosa de las preparaciones con rosetas. Los factores séricos (como los anticuerpos contra componentes de la superficie celular o las lipoproteínas) pueden interferir en la formación de rosetas en ciertas condiciones, al revestir las células y competir con los eritrocitos de carnero por los sitios de unión. En esas situaciones, un cultivo breve (1 a 18 h) de las células por lo general ayuda a eliminar o esparcir esas sustancias.

Se va extendiendo cada vez más el empleo de antisueros contra las células T para detectar todas esas células entre los linfocitos de la sangre periférica y en los órganos linfoides. Esos reactivos actúan contra los receptores E o contra otros determinantes comunes de la membrana de las células T. Los reactivos más fiables y promisorios son los anticuerpos monoclonales. El método preferido al usar esos anticuerpos es la marcación fluorescente indirecta, antes que la citotoxicidad, que es menos precisa.

Inicialmente se definían los subconjuntos de células T según la presencia de receptores para el Fc de IgM o de IgG. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales caracterizados recientemente son reactivos más fiables y precisos para definir subconjuntos de células T.

Marcadores de células B

La Ig de la membrana superficial es el más fiable marcador de células B si la prueba se realiza en forma adecuada. La inmunoglobulina de la membrana (SmIg) se identifica más comúnmente mediante antisueros antiinmunoglobulínicos marcados con fluorocromo. Los reactivos recomendados para la enumeración de células B son antisueros que actúan contra la fracción Fab y/o una mezcla de anticadenas ligeras kappa y lambda. Se pueden obtener en laboratorios comerciales, pero es preciso verificar cuidadosamente su especificidad. Se usan reactivos mono-específicos para las diversas cadenas Ig con el propósito de caracterizar las cadenas pesadas y ligeras de la membrana celular y el citoplasma.

Es necesario destacar las siguientes dificultades: a) la participación de los receptores para el Fc que pueden enlazar Ig autóloga además de la del reactivo, problema que puede superarse mediante la incubación y el empleo de reactivos F(ab)₂ marcados para inmunofluorescencia; b) se requiere una cuidadosa verificación de la especificidad y potencia de los reactivos; c) la identificación inadecuada de los monocitos; d) la posible interferencia de anticuerpos antilinfocitarios que reaccionan en forma autóloga y provocan tinción de la superficie de una célula que, de otra forma, daría resultados negativos a la SmIg.

Las antiinmunoglobulinas también pueden ser marcadas mediante enzimas, isótopos o eritrocitos, para determinar la presencia de SmIg.

Utilizando un enfoque similar al empleado con las células T, se han descrito recientemente antisueros y/o anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con todas las células B. También se ha informado que existen anticuerpos contra los subconjuntos de células B, que es preciso caracterizar con más detalle.

Se ha descrito un grupo de otros marcadores presentes en las membranas de las células B. Algunos, como el receptor para el complemento y el receptor para Fc, no son específicos de las células B. En consecuencia, no se recomiendan actualmente procedimientos tales como la formación de rosetas EAC para la enumeración ordinaria de células B. Sin embargo, los estudios de estos receptores así como el del virus de Epstein-Barr y los receptores de eritrocitos de ratón para diferenciar las células B y los subconjuntos de estas células podrían usarse con propósitos de investigación.

Por consiguiente, los métodos básicos recomendados para la determinación de células B y T son ahora la detección de SmIg, la formación de rosetas E y, cuando sea posible, el empleo de anticuerpos monoclonales adecuados.

Indicaciones clínicas

La enumeración de células T y B es esencial para la evaluación y vigilancia de las inmunodeficiencias primarias y útil en el diagnóstico de la inmunodeficiencia secundaria y en la clasificación de trastornos linfoproliferativos. Cuando sea posible, debe incluirse más de un reactivo, por ejemplo, antiinmunoglobulinas monoespecíficas y/o anticuerpos monoclonales contra las poblaciones linfoides.

Por otra parte, el estudio de subconjuntos de células B y T puede ser útil en determinados pacientes y, principalmente, para propósitos de investigación, ya que hasta ahora no se ha comprobado que la enumeración de células B y T tenga valor clínico en casos de enfermedades infecciosas, autoinmunes o perniciosas no linfoides.

LA RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS EN LA EVALUACION DE LA INMUNIDAD CELULAR

La investigación de la inmunidad de mediación celular (IMC) es importante en la evaluación de la capacidad inmunológica del huésped. Con este propósito, se emplean una serie de procedimientos *in vivo* e *in vitro*.

Es esencial utilizar estos procedimientos en forma ordenada para obtener información pertinente, disminuir los abusos y superar dificultades.

La prueba de hipersensibilidad cutánea tardía, utilizando dos o más antígenos estimulantes comunes (estreptoquinasa-estreptodornasa, DPP, *Candida*, *Trichophyton*, antígeno de parotiditis), debe ser la primera de las pruebas realizadas.³ Sólo después de esta etapa inicial y cuando los resultados obtenidos indiquen posibles alteraciones de la IMC, debe investigarse esa función celular *in vitro*. Además de las respuestas a los mitógenos, es preciso investigar también la respuesta linfocítica a antígenos y aloantígenos extraños.

Las observaciones que presentamos a continuación se refieren exclusivamente a las respuestas de carácter proliferativo ante los mitógenos.

³ La sensibilización con 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (DNCB) es actualmente el único método para explorar la respuesta primaria *in vivo*, pero sólo debe emplearse con pacientes escogidos.

Consideraciones metodológicas

Se puede medir mejor la respuesta proliferativa de los linfocitos ante varios mitógenos mediante la absorción de timidina radioactiva. En el micrométodo se deben usar células mononucleares separadas de la sangre periférica con el método de Ficoll-Hipaque. Los resultados por lo general se expresan como absorción total de radioactividad.

Para lograr resultados óptimos es esencial definir las condiciones de cultivo, normalizar los reactivos biológicos y de fabricación comercial, y verificar el número de células en el cultivo (incluyendo las concentraciones de monocitos). Además, a causa de la gran variabilidad inherente a los sistemas, es fundamental utilizar testigos con características similares. Es preciso incluir testigos para los pacientes y también muestras testigo a fin de estimar la variación diaria en el laboratorio. Los resultados deben entonces expresarse como índice de respuesta proliferativa relativa, en el que se toman en cuenta los factores antes mencionados. Las curvas de dosis y respuestas también tienen importancia para lograr la respuesta óptima, mientras que las concentraciones inferiores a la óptima pueden ser útiles en el estudio de algunas enfermedades, como ciertas inmunodeficiencias.

En la evaluación de la respuesta proliferativa es necesario tomar en cuenta la concentración básica, pues evidentemente puede afectar los resultados finales. El empleo del cultivo durante una noche antes de agregar el mitógeno, tal vez contribuya a explicar la disminución de respuestas proliferativas, secundarias en relación con factores inhibidores.

Los mitógenos usados más frecuentemente son la fitohemaglutinina, la concanavalina A y el extracto de hierba carmín; las dos primeras son fundamentalmente mitógenos de las células T, mientras que el último es un estimulante de las células B y T. Sin embargo, es posible que tanto éstos como otros mitógenos estimulen subpoblaciones de células B y T que no están bien definidas.

Indicaciones clínicas

La medición de la respuesta linfocítica a los mitógenos no está indicada como procedimiento habitual y debe emplearse en casos especiales. Los resultados anormales de pruebas de IMC únicas y aisladas no tienen significación clínica y no indican necesariamente anomalías de la IMC del paciente.

La evaluación de la inmunidad de mediación celular es esencial para determinar la intensidad de una inmunodeficiencia primaria presunta o comprobada. La medición de la IMC es útil en: a) la evaluación de inmunodeficiencias secundarias, incluidas las que se relacionan con infecciones crónicas, y b) vigilancia y evaluación de la aplicación de terapia inmunoestimulante. Puede ser conveniente en la investigación de enfermedades en las que posiblemente exista deterioro de las funciones inmunológicas, como en los procesos de autoinmunidad y cáncer, y también en la determinación del efecto de fármacos inmunosupresivos.