

---

## GUÍA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS EN EL LABORATORIO CLÍNICO

A. Fonseca-Gutiérrez<sup>1</sup>, D. Patiño-Cuervo<sup>2</sup>, M. Ortega-López<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Inmunología. Hospital de La Samaritana

<sup>2</sup> Especialización en Laboratorio de Inmunología Clínica. Facultad de Ciencias.

Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 No. 43-82, Bogotá, Colombia

<sup>3</sup> Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 No. 43-82, Bogotá, Colombia

*dpatino@javeriana.edu.co*

### RESUMEN

Las inmunodeficiencias primarias son un grupo heterogéneo de desórdenes hereditarios que afectan los mecanismos de la inmunidad inespecífica y específica del huésped. En la mayoría de los casos se manifiestan en los primeros cinco años de vida, pero pueden presentarse a cualquier edad, encontrándose un gran predominio masculino (Oleastro, 2001). Han sido clasificadas, de acuerdo al defecto molecular que presentan, en inmunodeficiencias ligadas al cromosoma X e inmunodeficiencias autosómicas recesivas (Jones, 2000). Su prevalencia se ha establecido en 1 por cada 10.000 nacidos vivos, aumentando considerablemente desde el primer caso reportado en 1969 (Lim, 2004). Este incremento puede estar favorecido por la existencia de pruebas especializadas de laboratorio que permiten hacer una detección temprana de anomalías inmunológicas. La valoración de la inmunocompetencia en un individuo con sospecha de inmunodeficiencia primaria requiere de un análisis cuantitativo, cualitativo o estructural y de estudios funcionales que permiten detectar la integridad de sus mecanismos de defensa. De acuerdo con el componente inmune que se quiere evaluar existen diferentes estudios que se pueden realizar de acuerdo a su grado de complejidad en pruebas de primera, segunda y tercera etapa, las cuales serán revisadas en este artículo. (Montoya, 2004, Ortega, 2005).

**Palabras clave:** inmunodeficiencias primarias, técnicas diagnósticas, infecciones recurrentes.

### ABSTRACT

The primary immunodeficiency diseases (PID) are a heterogeneous group of hereditary disorders that affect the host's non specific and specific immune mechanisms. In the majority of cases, the symptoms appear within the first five years of life but they can also appear at any age, and are found to be very predominant in males (Oleastro, 2001). The PID's have been classified according to the molecular defect that is present, as X-Chromosome Linked Immune Deficiencies and Autosomic Recessive Immune Deficiencies (Jones, 2000). Their prevalence has been established as 1 in every 10.000 live births, increasing considerably since the first reported case in 1969 (Lim, 2004). This increase could have been helped by the new specialized laboratory tests that make the early detection of immunological abnormalities possible. The immunocompetence evaluation of an individual, who is suspected of having a PID, requires a quantitative, qualitative or structural analysis and studies of immune function in order to determine the integrity of the defense mechanisms. Depending on the components of the immune system that need to be evaluated, there are different tests that can be performed; these tests have been classified according to their degree of complexity, as: first, second and third stage tests, which will be reviewed in this article. (Montoya, 2004; Ortega, 2005).

**Key words:** primary immunodeficiencies, diagnostic techniques, recurrent infections.

## **GENERALIDADES DE LAS INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS**

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son un grupo heterogéneo de desórdenes de origen hereditario que afectan la inmunidad específica de tipo celular (linfocitos T) y humoral (linfocitos B) o los mecanismos de defensa no específicos del huésped (células fagocíticas, citocinas y proteínas del complemento, entre otras). Se caracterizan por una incrementada susceptibilidad a las infecciones así como al desarrollo de enfermedades autoinmunes y neoplasias (Lim, 2004). Las manifestaciones clínicas de las inmunodeficiencias primarias pueden ser muy variadas en función del defecto inmunológico. En algunos niños se presenta desmedro en el crecimiento y en el desarrollo como consecuencia de las infecciones a repetición. Otros síntomas que podrían estar asociados a las inmunodeficiencias primarias son: erupciones y alteraciones en la pigmentación de la piel así como, anomalías en el desarrollo de la cara, del sistema esquelético y del corazón. Los defectos que implican alguna alteración en la función de los linfocitos B dan lugar a infecciones pulmonares recurrentes, a menudo relacionados con septicemia bacteriana. La carencia de la producción de anticuerpos puede también aumentar la susceptibilidad a las infecciones por enterovirus dando como resultado el desarrollo de meningitis viral crónica y giardiasis gastrointestinal. Las células T son esenciales para el control de la enfermedad viral y fúngica ya que colaboran con las células B mediante la liberación de citocinas que promueven una respuesta inmune adecuada y efectiva. Así, desórdenes como la inmunodeficiencia combinada severa de LT y LB da como resultado una mayor susceptibilidad a los patógenos virales, fúngicos y bacterianos (Lim, 2004).

## **DISTRIBUCIÓN DE LAS IDP**

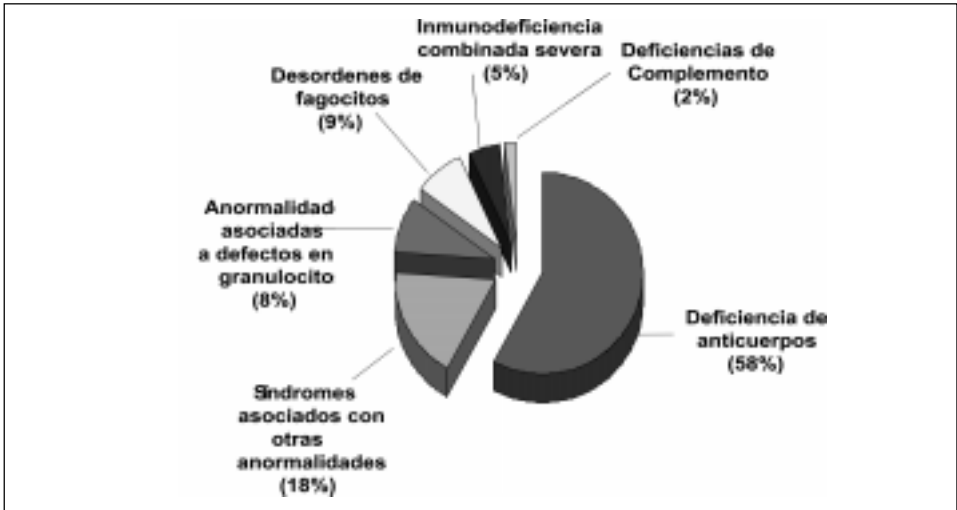
En la mayoría de los casos las inmunodeficiencias primarias se manifiestan en los pri-

meros cinco años de vida (90%), pero pueden presentarse en cualquier edad. Con respecto a su distribución por sexo casi todos los registros demuestran predominio masculino (60-80%) (Oleastro, 2001). En cuanto a la prevalencia de inmunodeficiencias primarias se sabe que 1 de cada 10.000 niños nacidos vivos presenta algún tipo de inmunodeficiencia primaria durante su infancia, en Latinoamérica existen diferentes reportes como el publicado por la Asociación Latinoamericana de Inmunodeficiencias Primarias (LAGID) en 1998 en el que se encontró que las inmunodeficiencias primarias por defectos en los anticuerpos son las más frecuentes (Zelazko, 1998) (figura 1).

En Colombia, actualmente los únicos datos de prevalencia de estas enfermedades, son los publicados por el Grupo de Inmunodeficiencias Primarias de la Universidad de Antioquia. En este estudio se tomaron 698 pacientes a quienes se les hizo seguimiento por varios años (1994-2002), obteniéndose que las deficiencias de anticuerpos son las predominantes en nuestro país seguidas por las deficiencias combinadas (tabla 1) (Montoya, 2002). Estos datos concuerdan con los encontrados a nivel mundial en otros estudios como los de LAGID de 1998.

## **CLASIFICACIÓN DE LAS IDP**

La caracterización de los defectos moleculares de muchas de las inmunodeficiencias primarias ha llevado a grandes avances en el diagnóstico y manejo de estas patologías lo que ha permitido clasificarlas de acuerdo al tipo de defecto genético en inmunodeficiencias ligadas al cromosoma X (tabla 2) e inmunodeficiencias autosómicas recesivas las que a su vez, se subclasifican en asociadas a inmunodeficiencia combinada severa (ISC) (tabla 3) y en no asociadas a Inmunodeficiencia Combinada Severa (tabla 4) (Jones, 2000)



**Figura 1. Frecuencia de las inmunodeficiencias primarias en Latinoamérica.**  
(Tomado de Zelasko, 1998)

**Tabla 1**  
**Prevalencia de IDP en Antioquia, Colombia 1994-2002.**  
(Tomado de Montoya, 2002)

Fenotipo predominante	Hombres	Mujeres	Total	
<b>Deficiencias predominantes de anticuerpos</b>				
Hipoagmaglobulinemia transitoria de la infancia	10	4	14	
Inmunodeficiencia común variable	2	9	11	
Agamaglobulinemia congénita	8	0	8	
Déficit de IgA	2	1	3	
Síndrome de hiper IgM	1	1	2	
Deficiencia de anticuerpos con Ig normales	0	0	1	
Inmunodeficiencia común variable con timoma	1	0	1	
Subtotal (%)				40 (40.8)
<b>Deficiencias combinadas</b>				
Inmunodeficiencia combinada severa	5	8	13	
Inmunodeficiencia combinada no severa	2	0	2	
inmunodeficiencia celular con Igs normales	1	5	6	
Subtotal (%)				21 (21.5)
<b>Deficiencias celulares y de anticuerpos asociadas con otros defectos mayores</b>				
Candidiasis mucocutánea crónica	4	2	6	
Síndrome de Wiskott Aldrich	4	0	4	
Ataxia telangiectasia	1	1	2	
Anomalia de DiGeorge	0	2	2	
Enanismo con extremidades cortas	1	0	1	
Subtotal (%)				15 (15.3)

Fenotipo predominante	Hombres	Mujeres	Total	
<b>Síndromes de inmunodeficiencia asociados con disfunción de los fagocitos</b>				
Síndrome de hiper IgE con infecciones recurrentes	6	4	10	
Síndrome de Chediak Higashi	2	3	5	
Subtotal (%)				15 (15.3)
<b>Defectos primarios de las células fagocíticas</b>				
<b>Enfermedad granulomatosa crónica</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	
Neutropenia congénita severa	1	1	2	
Subtotal (%)				6 (6.1)
<b>Deficiencias del complemento</b>				
Edema angioneurótico hereditario	0	1	1	
Subtotal (%)				1 (1.0)
Total		55	43	98 100%

**Tabla 2**  
**Inmunodeficiencias ligadas al cromosoma X. (Tomado de Jones, 2000).**

Desorden (año de definición del defecto molecular)	Localización cromosómica	Gen	Defecto	Prueba diagnóstica
Enfermedad granulomatosa crónica ligada a X (1986)	Xp21	gp91phox	Componente de fagocitosis NADPH.	Nitro azul de tetrazolio (NBT), inmunoblot para gp91phox, análisis de mutaciones.
Agamaglobulinemia ligada a X (1993).	Xq22	Tirosin Kinasa de Bruton	Vía de señalización intracelular esencial para la maduración de células pre-B.	Inmunoblot para Btk o análisis por citometría de flujo, análisis de mutaciones.
Inmunodeficiencia combinada severa ligada a X (1993).	Xq13	Cadena común $\gamma$	Componentes de los receptores para IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, desarrollo de células T y NK, función de células T y B.	Expresión de CD154 sobre LT activados por citometría de flujo, análisis de mutaciones.
Síndrome de Hyper-IgM (deficiencia de CD40L) (1993).	Xq26	CD40L (CD154)	Cambio de Isotipo, función de LT.	Expresión de CD145 sobre LT activados por citometría de flujo, análisis de mutaciones.
Síndrome de Wistkott-Aldrich (1994)	Xp11	WASP	Formación del citoesqueleto, movilidad y tráfico de células inmunes.	Expresión de WASP por inmunoblot, análisis de mutaciones.
Síndrome linfoproliferativo ligado a X (Síndrome de Duncan) (1998).	Xq25	SAP	Regulación de la respuesta de LT a EBV y otras infecciones virales.	Análisis de mutaciones, expresión de SAP.
Deficiencia de properdina (1992)	Xp21	Properdina	Componente terminal del complemento.	Niveles de properdina.

**Tabla 3**  
**Inmunodeficiencias autosómicas recesivas, asociadas a Inmunodeficiencia**  
**Combinada Severa (ISC).**  
**(Tomado de Jones, 2000)**

<b>Desorden (año de definición del defecto molecular)</b>	<b>Localización cromosómica</b>	<b>Gen</b>	<b>Defecto</b>	<b>Prueba diagnóstica</b>
Deficiencia de adenosín deaminasa (ADA) (1983).	20q12-13	Adenosín deaminasa.	Enzima en la vía de las purinas, acumulación de metabolitos tóxicos.	Niveles de ADA y metabolitos en eritrocitos, análisis de mutaciones.
Deficiencia de la fosforilasa de purina (PNP) (1987)	14q11	Fosforilasa de purina	Enzima en la vía de las purinas, acumulación de metabolitos tóxicos.	Niveles de PNP y metabolitos en eritrocitos, análisis de mutaciones.
Deficiencia del gen de activación de la recombinasa (RAG 1 y 2) (1996) Síndrome de Omenn	11p13	RAG1 y RAG2	Defectos en la recombinación de DNA afectando inmunoglobulinas y el gen del receptor de LT.	Análisis de las mutaciones en RAG1 y RAG2.
Deficiencia en el receptor de LT (1987)	11q23	CD3 $\alpha$ /CD3 $\beta$	Función y señalización del receptor de LT.	Intensidad de fluorescencia de CD3, análisis de mutaciones.
Deficiencia de Zap70 (1994)	2q12	Zap70	Función de LT, selección de LTCD8 $^{+}$ durante el desarrollo del timocito.	Expresión y activación de Zap70, análisis de mutaciones.
Deficiencia de JAK3 (T-B+NK-SCID) (1995)	19p13	JAK3	Receptor de señalización de Il-2, Il-4, IL-7, IL-9, IL-15, desarrollo de LT y NK, función de LT y LB.	Activación y expresión de JAK3, análisis de mutaciones.
Deficiencia en el receptor de IL-7 (1998)	5p13	Receptor $\alpha$ de IL-7	Rol esencial en desarrollo y función de LT.	Expresión de IL-7 $\alpha$ por citometría, análisis de mutaciones.

**Tabla 4**  
**Inmunodeficiencias autosómicas recesivas, no asociadas a**  
**Inmunodeficiencia Combinada Severa.**  
**(Tomado de Jones, 2000)**

<b>Desorden (año de definición del defecto molecular)</b>	<b>Localización cromosómica</b>	<b>Gen</b>	<b>Defecto</b>	<b>Prueba diagnóstica</b>
Deficiencia de adhesión leucocitaria tipo I (1987).	21q22	CD11/CD18	Defectos en la adhesión y migración de leucocitos.	Análisis de la expresión de CD18/CD11 por citometría, análisis de mutaciones.
Enfermedad granulomatosa crónica (1990) (1990) (1988)	7q11, 1q25, 16p24	p47 <i>phox</i> , p67 <i>phox</i> , p22 <i>phox</i>	Defectos en la bolsa respiratoria y muerte intracelular de fagocitos.	Expresión de p47 <i>phox</i> , p67 <i>phox</i> , p22 <i>phox</i> por inmunoblot, análisis de mutaciones.
Síndrome de Chediak Higashi (1996).	1q42	LYST	Anormalidades en los microtúbulos mediado por las proteínas lisosomales circulantes.	Inclusiones gigantes en los granulocitos, análisis de mutaciones.
Deficiencia de MHC clase II (1993) (1998) (1995) (1997)	16p13, 19p12, 1q21, 13q13	CIITA (MHC2TA), RFXANK, RFX5, RFXAP	Defecto en la regulación transcripcional de la expresión de las moléculas de MHCII.	Expresión de MHC-II, análisis de mutaciones.
Deficiencia de MHC clase I (1994) (1999)	6p21 6p21	TAP2 TAP1	Defecto en el ensamblaje del péptido y en la presentación de las moléculas de MHCI.	Expresión de MHCI.
Síndromes autoinmunes linfoproliferativos (ALPS) (1995)	10q24	APT1 (Fas)	Defectos en la apoptosis de linfocitos.	Expresión de Fas, ensayos de apoptosis, análisis de mutaciones.
Ataxia telangiectasia (1995)	11q22	ATM	Control del ciclo celular y respuesta de daño de DNA.	Sensibilidad del DNA a la radiación, análisis de mutaciones.
Susceptibilidad inherente a micobacterias (1996) (1998) (1998)	6q23 5q31 19p13	Receptor de interferón $\gamma$ , IL-12 p40, Receptor $\beta$ 1 de IL-12	Defecto en la producción de Interferón $\gamma$ y en la función de señalización.	Expresión del receptor de interferón $\gamma$ , expresión de IL-12, Expresión del receptor de IL-12, análisis de mutaciones.

## ASPECTOS CLÍNICOS DE LAS IDP

El grupo de inmunodeficiencias primarias de la Universidad de Antioquia ha propuesto un algoritmo para el manejo de los pacientes con infección recurrente teniendo en cuenta los criterios de anormalidad como son: presentar más de tres infecciones en el último año, haber aislado por el laboratorio un microorganismo patógeno que no sea el agente etiológico típico de la enfermedad, tener antecedentes familiares de algún tipo de desorden inmunológico y presentar una respuesta inadecuada al tratamiento médico establecido de rutina. Si el paciente no cumple con estos criterios de anormalidad se puede pensar en un Síndrome de Infección Recurrente Normal (SIRN) lo que puede ser debido a una simple inmadurez del sistema inmune; si el paciente presenta alguno o todos los criterios de anormalidad se piensa en un Síndrome de Infección Recurrente Anormal (SIRA). Se debe por lo tanto, observar si existe algún factor anatómico o fisiológico que pueda ser el causante de la infección. Si no se encuentra alguno de estos factores se piensa en un Síndrome de Infección Recurrente de origen inmunológico y se debe observar si existe alguna causa de tipo nutricional (desnutrición), infecciosa (infección por el virus de inmunodeficiencia humana) o desórdenes neoplásicos (leucemias) que lleven a un diagnóstico de inmunodeficiencia secundaria. Si no se encuentra ninguno de estos factores se debe pensar en un problema inmunológico de tipo genético; es decir, en una inmunodeficiencia primaria la cual debe ser evaluada por el laboratorio (figura 2) (Olivares, 2004)

## DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA DE LAS IDP

Según el mecanismo de defensa que se quiere evaluar existen diferentes exámenes de

laboratorio organizados de acuerdo a su grado de complejidad en: pruebas de primera, segunda y tercera etapa (figura 3) (Montoya, 2004; Ortega M., 2005).

### Pruebas diagnósticas para el estudio preliminar de las IDP

Entre las pruebas de primera etapa están el cuadro hemático con velocidad de sedimentación globular, frotis de sangre periférica (FSP) con recuento plaquetario, electrofóresis de proteínas séricas (EFP) y estudios microbiológicos (Montoya, 2004). El cuadro hemático es una de las pruebas de rutina que reporta la cantidad de células sanguíneas circulantes en un paciente, al igual que la concentración de hemoglobina presente en los glóbulos rojos. Se ha encontrado asociación entre algunas características reportadas en el cuadro hemático como linfopenia, neutropenia, eosinofilia y trombocitopenia y algunas inmunodeficiencias primarias como el síndrome de Chediak higashi, ataxia telangiectasia, agamaglobulinemia ligada a X y el síndrome de Wiskott Aldrich (Salgado, 2000). El FSP ha sido uno de los exámenes más antiguos e importantes en el laboratorio clínico y su práctica es de gran utilidad en hematología ya que permite visualizar la morfología celular, estimar el número de células en sangre periférica y determinar la eventual presencia de elementos atípicos. Los resultados obtenidos en el FSP son reflejo del funcionamiento de la médula ósea y de los factores que influyen en las diferentes poblaciones celulares lo cual se correlaciona con la fisiopatología de ciertas enfermedades, y puede proporcionar una adecuada orientación en la evaluación de la respuesta inmune y un manejo inicial simplificado de los pacientes. El FSP es una herramienta de gran valor en la evaluación del paciente con infección recurrente y sus hallazgos cualitativos y cuantitativos son claves para la orientación diagnóstica ini-

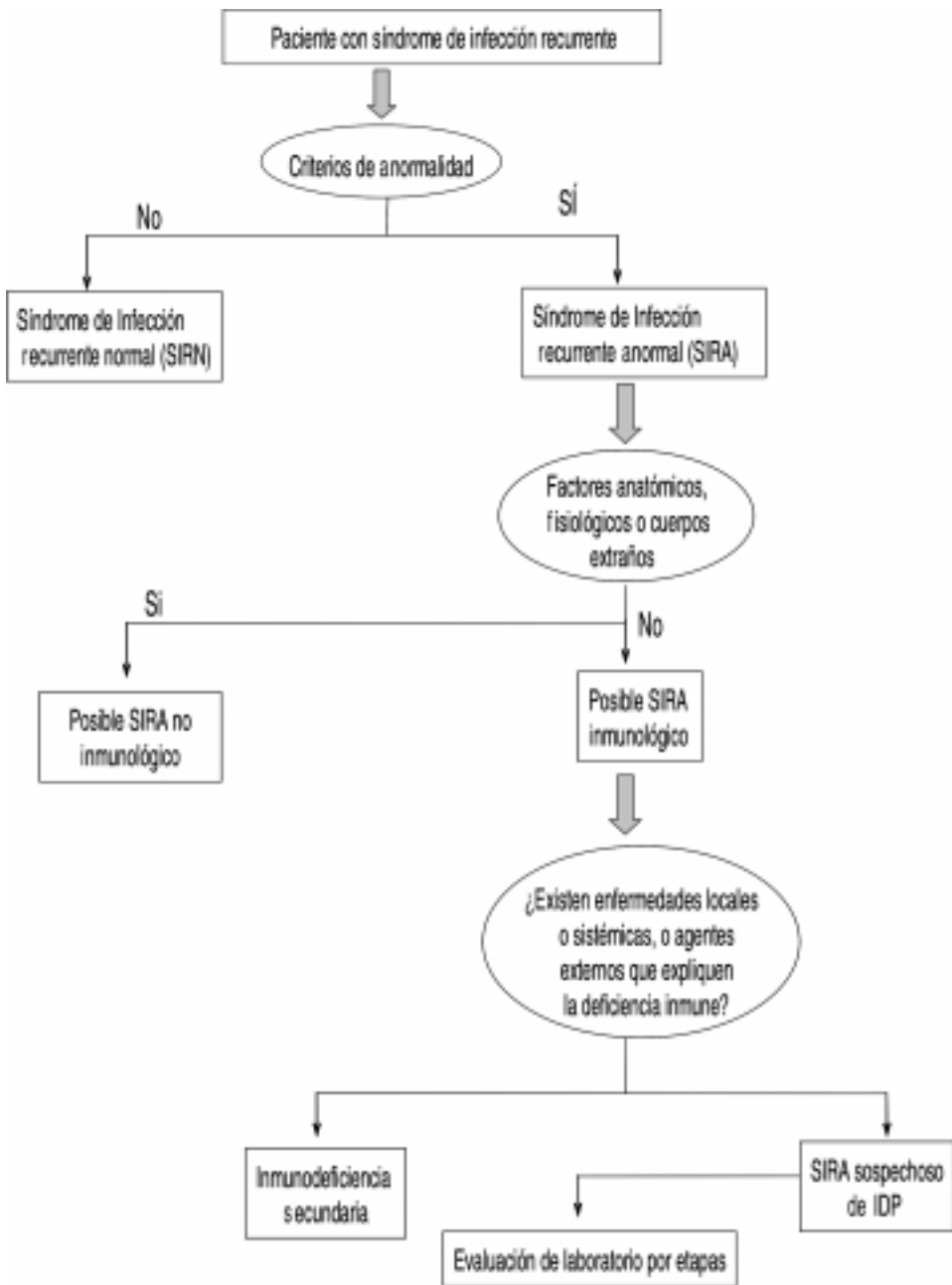


Figura 2



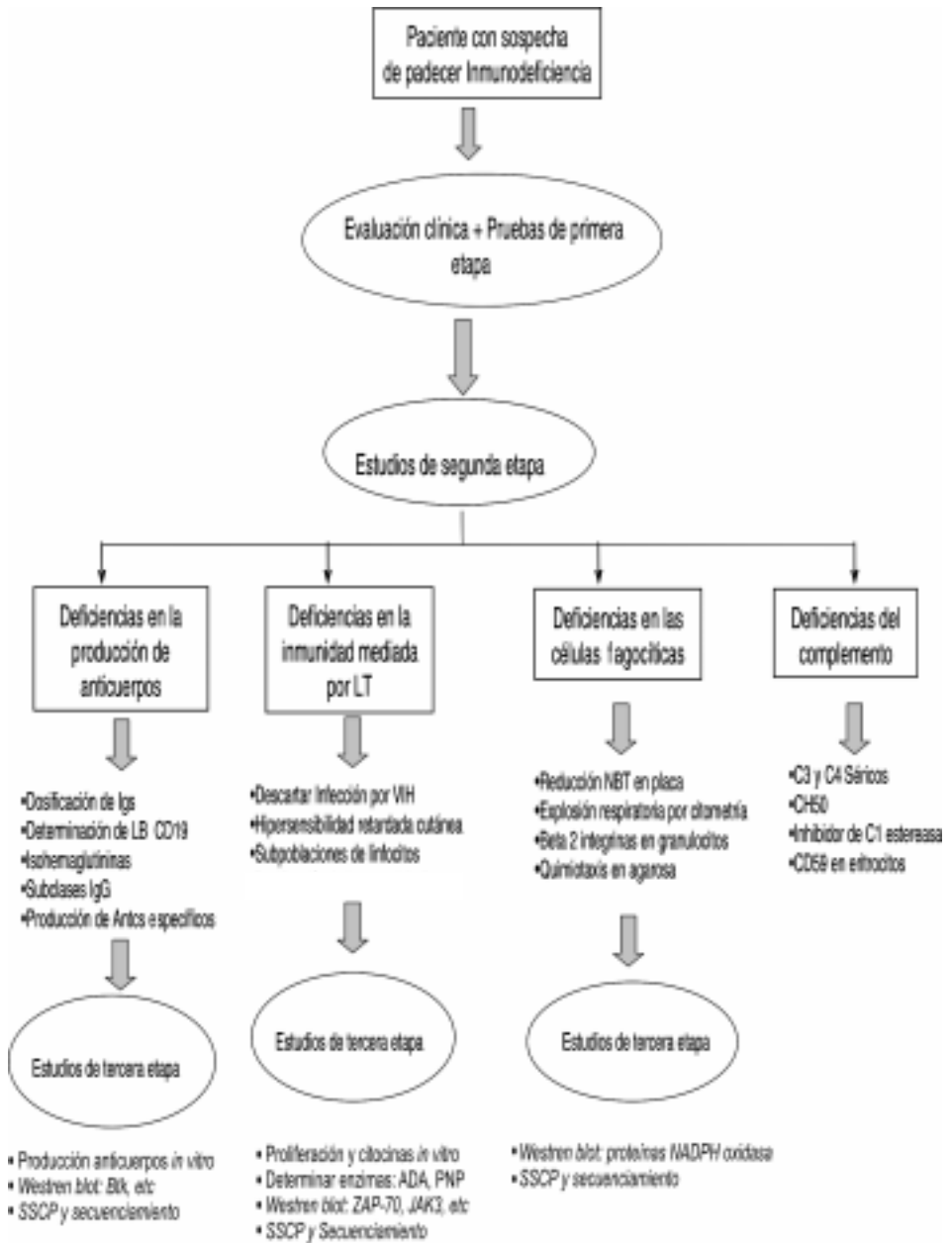


Figura 3

cial de una inmunodeficiencia primaria (Castaño, 2003). En cuanto a la electrofóresis de proteínas séricas se ha determinado su inmenso valor diagnóstico en patologías en las que los niveles de inmunoglobulinas se ven seriamente alterados como es el caso de la hipogamaglobulinemia o agamaglobulinemia (Stites, 1999).

Las pruebas diagnósticas realizadas por el laboratorio de microbiología son muy útiles para la identificación del agente causal de la enfermedad así como, la determinación de la sensibilidad o resistencia que presentan frente a los antibióticos que son utilizados en la terapia antimicrobiana. Se han asociado deficiencias en la inmunidad celular con el desarrollo de infecciones producidas por microorganismos como *Aspergillus* spp, *Candida albicans*, micobacterias, herpes virus y citomegalovirus. En inmunodeficiencias combinadas se ha observado la presencia de infecciones por bacterias extracelulares (Salgado, 2000).

### **Pruebas diagnósticas para el estudio de las alteraciones en los linfocitos B**

En los linfocitos B se ha descrito un número considerable de defectos. Ciertas características como son el desarrollo de infecciones en las primeras etapas de la vida y fallas en la respuesta adecuada a éstas, aún después de un tratamiento farmacológico, hacen pensar en algún tipo de deficiencia de linfocitos B. La deficiencia de estas células puede ser relativamente moderada y no presentar síntomas muy evidentes o llevar a una deficiencia severa caracterizada por una alteración absoluta en la secreción de anticuerpos (Folds, 2003). La evaluación de la producción de anticuerpos incluye varias pruebas de laboratorio de segunda y tercera etapa; como la cuantificación de niveles séricos de inmunoglobulinas, medición de subclases de IgG, producción de anticuerpos específicos y cuantificación de linfocitos B entre otras.

El estudio de las principales clases de inmunoglobulinas G, M y A, es de especial interés en el laboratorio de inmunología. La determinación de estas inmunoglobulinas contribuye significativamente al diagnóstico de diversas enfermedades como inmunodeficiencias, gammapatías monoclonales, enfermedades infecciosas crónicas y agudas, entre otras. Los niveles séricos de las inmunoglobulinas dependen de diversos factores del desarrollo, genéticos y ambientales, como características étnicas, edad, sexo, antecedentes de alergia, o infecciones recidivantes y factores geográficos (Alonso, 2004). Habitualmente en el laboratorio se cuantifican los niveles de IgG, IgM, IgA e IgE. Actualmente el método más usado para la cuantificación de IgG, IgM e IgA es la turbidimetría. Para la cuantificación de la IgE total el método más utilizado es el análisis inmunoenzimático (ELISA). Las alteraciones en la cantidad de inmunoglobulinas se asocian con inmunodeficiencia combinada severa, síndrome de Wiskott Aldrich, síndrome de Hiper IgE y síndrome de Hiper IgM (Salgado, 2000).

La IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub> son las subclases de inmunoglobulina G que se miden en el laboratorio y se hace principalmente por la técnica de nefelometría (Hernández, 2004). Es una prueba muy útil cuando se sospecha inmunodeficiencia humoral de subclases con niveles normales de IgG. La alteración en la IgG<sub>2</sub> se asocia principalmente a una respuesta defectuosa a antígenos de polisacáridos como los presentes en la cápsula del *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* tipo B. Dado que la IgG<sub>2</sub> es el isotipo de anticuerpo predominante en respuesta a determinados polisacáridos, los niveles disminuidos de esta subclase son los responsables de una pobre respuesta a infecciones por estas bacterias encapsuladas.

Una prueba útil es la medición de anticuerpos específicos producidos frente a la inmunización con vacunas desarrolladas con bacterias como *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*. La presencia de anticuerpos producidos en respuesta a estas vacunas son indicativos de una adecuada respuesta inmune de tipo humoral. Sin embargo, cuando existen fallas a este nivel no se encuentran anticuerpos específicos de tipo IgG contra estos microorganismos y se puede asociar a inmunodeficiencias primarias por deficiencia de anticuerpos específicos (Folds, 2003; Mendoza, 1998). Los métodos de cuantificación de anticuerpos específicos circulantes que se realizan actualmente en su mayoría utilizan la técnica de ELISA (Zielen, 2000; Neldya, 1998; Wernette, 2003; Kolibab, 2005).

Los linfocitos B pueden ser cuantificados en el laboratorio ya que éstos expresan diversas moléculas de superficie como CD19, CD20 y HLA-DR. Las células B inmaduras pueden expresar moléculas adicionales como CD10. La cuantificación de los LB se realiza mediante la técnica de citometría de flujo la cual utiliza anticuerpos monoclonales fluorescentes lo que permite realizar un análisis celular multiparamétrico (Stites, 1999).

Las pruebas de tercera etapa para la evaluación de las deficiencias en la síntesis de anticuerpos incluyen ensayos que valoran su producción *in vitro*. En esta prueba se activan los LB con antígenos o mitógenos, los cuales generan cantidades pequeñas, pero detectables, de inmunoglobulinas policlonales que van a ser cuantificadas por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) o ELISA (Stites, 1999). En el diagnóstico de estas patologías la prueba de Western Blot (Técnica de electroforesis en gel y transferencia al papel de nitrocelulosa) para la detección de las proteínas BtK, BLNK, NEMO es también muy útil, ya que éstas se encuentran estrechamente relacionadas con

la maduración y proliferación de los linfocitos B (Jones, 2000; Feder, 1998). Otra prueba de tercera etapa es el análisis de polimorfismos conformacionales del DNA de cadena simple (SSCP). Este es el método más simple y más usado para la detección de mutaciones, en esta prueba se utiliza la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la región de DNA de interés, posteriormente es separado por electroforesis donde cada una de las hebras de DNA migra de manera diferencial, con respecto a los patrones, en caso de presentar alguna mutación así sea de una sola base. Estas mutaciones son detectadas por autorradiografía y analizadas en un secuenciador automatizado (Inazuka, 1996).

#### **Pruebas diagnósticas para el estudio de las alteraciones de los linfocitos T**

En cuanto a las pruebas de segunda y tercera etapa para las deficiencias en la inmunidad mediada por linfocitos T se encuentran la prueba cutánea de hipersensibilidad tardía, la determinación de subpoblaciones de timocitos, el ensayo de linfoproliferación y la cuantificación de citocinas, entre otras. La prueba cutánea de hipersensibilidad tardía es considerada como una correlación *in vivo* de la respuesta inmune celular, puede ser usada como método de monitoreo para defectos en la inmunidad mediada por células. El procedimiento de esta prueba consiste en la inoculación intracutánea en el antebrazo de una cantidad definida de un antígeno conocido como PPD (derivado proteico purificado de *Mycobacterium tuberculosis*) o *Candida albicans* (Folds, 2003). La mayoría de individuos inmunocompetentes presentan una prueba positiva a por lo menos uno de los dos antígenos, mientras que los individuos con algún tipo de inmunodeficiencia de células T presentan resultados negativos (tabla 5) (Stites, 1999).

**Tabla 5**  
**Deficiencias inmunitarias que presentan resultados negativos para la prueba de hipersensibilidad retardada.**  
**(Tomado de Stites, 1999)**

<b>Deficiencias inmunitarias</b>
<b>Congénitas</b>
Deficiencias combinadas de inmunidad celular y humoral Ataxia-telangiectasia Síndrome de Nezelof Inmunodeficiencia combinada severa Síndrome de Wiskott-Aldrich
<b>Celulares</b>
Síndrome de DiGeorge Candidiasis monocutánea
<b>Adquirida</b>
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida Sarcoidosis Leucemia linfocítica crónica Carcinoma

Los linfocitos T poseen dos subgrupos que pueden distinguirse por la presencia de dos proteínas de superficie específicas para cada uno; los linfocitos T ayudadores (LTh) que expresan en su superficie la molécula CD4 y los linfocitos T citotóxicos (LTc) que expresan CD8. La mayor parte de los LT/CD8+ tienen actividad citotóxica, es decir, tienen la propiedad de destruir células que expresen moléculas extrañas en su superficie, estos linfocitos son muy importantes en la defensa contra infecciones virales. Los linfocitos LT/CD4+ funcionan como células cooperadoras promotoras de la proliferación, maduración y función inmunitaria de otros tipos celulares mediante la secreción de citocinas (Stites, 1999). La cuantificación de LT/CD4 y LT/CD8 se realiza principalmente por la técnica de ci-

tometría de flujo. Esta técnica también permite identificar moléculas de superficie de los LT como moléculas de adhesión entre las que se encuentran las caderinas, moléculas pertenecientes a la super familia de las inmunoglobulinas así como integrinas, selectinas y el proteoglicano. También se pueden medir moléculas de superficie como el receptor para el antígeno de la célula T (TCR), moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y los receptores tipo Toll (TR) al igual que moléculas coestimuladoras como el CD28.

Existen mecanismos efectoros en algunas poblaciones de linfocitos como los LT CD8+ y las células "natural Killer" (NK), entre estos mecanismos se encuentra la citotoxicidad celular que consiste en la ca-

pacidad para interactuar con otras células y destruirlas. Este mecanismo de respuesta interviene en la defensa frente a infecciones víricas y a células neoplásicas así como, en la destrucción de células alogénicas en trasplante de órganos. Esta función citotóxica es estudiada en el laboratorio mediante la prueba de citotoxicidad, cuyo principio básico radica en la capacidad de los LT CD8+ o las NK de lisar la célula blanco mediante uno de sus mecanismos citotóxicos como la liberación de perforinas (Herrera, 1999). Adicionalmente, las células NK son una fuente importante de una gran variedad de citocinas involucradas en la respuesta inmune frente a patógenos. Cuando existen defectos en este tipo de células se aumenta la posibilidad de presentar una mayor susceptibilidad a infecciones virales. La cuantificación de estas células se realiza por la técnica de citometría de flujo, estas células coexpresan en su superficie las moléculas CD16/CD56 razón por la cual es sencilla su cuantificación en sangre periférica (Folds, 2003).

Las pruebas de tercera etapa para LT incluyen la linfoproliferación en cultivo, donde se evalúa la habilidad de los linfocitos de proliferar en respuesta a mitógenos como la fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (Con-A), entre otros (Stites, 1999). También se puede hacer cuantificación de la producción de citocinas *in vitro*; esta técnica consiste en cultivar células mononucleares de sangre periférica estimuladas con un antígeno específico, las citocinas producidas son medidas en el sobrenadante de dicho cultivo. La cantidad de citocinas secretadas por las células en el cultivo se puede determinar por técnicas como ELISA, técnica inmunoenzimática de lectura de puntos (ELISPOT) y más recientemente por citometría de flujo, que incluso permite cuantificar citocinas intracelulares (Folds, 2003). Otra prueba muy útil es el Western Blot para la determinación de las proteínas ZAP-70 y JAK3 (Candotti, 1997),

la primera se encuentra expresada exclusivamente en linfocitos T y células NK y juega un papel esencial en el proceso de selección positiva y negativa durante la maduración de los timocitos. La segunda, interviene en la señalización intracelular generada por las citocinas a través de su receptor específico, señal necesaria para que se complete el desarrollo de los linfocitos T. Las proteínas ZAP-70 y JAK3 se encuentran alteradas principalmente en la inmunodeficiencia combinada severa, análisis que hace parte fundamental en el diagnóstico definitivo de esta patología (Lim, 2004).

### **Pruebas diagnósticas para el estudio de las alteraciones de las células fagocíticas**

Con respecto a las células que participan en la inmunidad celular inespecífica los neutrófilos y monocitos/macrófagos son unos de sus principales protagonistas ya que cumplen una función importante en la defensa contra infecciones ocasionadas por diferentes microorganismos. Desempeñan una función esencial como células efectoras, en el flujo sanguíneo y en los espacios extravasculares estas células fagocíticas ejercen sus efectos antimicrobianos a través de interacciones con anticuerpos, complemento y factores quimiotácticos (Stites, 1999).

Para poder estudiar los defectos cualitativos de estas células existen pruebas de laboratorio que permiten: primero; valorar la integridad de los mecanismos microbicidas por medio de técnicas como la reducción del colorante nitroazul de tetrazolio (NBT) en placa o por citometría de flujo (Stites, 1999); la cuantificación de radicales libres de oxígeno (ROS), por medio de técnicas espectrofotométricas o haciendo uso de la citometría de flujo (Gastell, 1999); la determinación de las enzimas implicadas en la síntesis de estos agentes antioxidantes por tecnología de Western Blot (Sistema

enzimático NADPH oxidasa: gp91phox, gp22phox, p47phox o p67phox) (Bum, 2004), y la evaluación de la capacidad fagocítica y de destrucción intracelular de antígenos específicos en placa. Segundo; evaluar la capacidad migratoria de las células fagocíticas frente a un agente específico por medio de ensayos de quimiotaxis a través de un filtro o bajo un gel de agarosa. Tercero; determinar la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de estas células como la presencia de beta-2 integrinas y de CD18/CD11 por citometría de flujo (Jones, 2000).

En algunas inmunodeficiencias la actividad fagocítica se encuentra conservada pero la capacidad microbicida dependiente de oxígeno está alterada, tal es el caso de la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) en la cual la técnica de NBT y la determinación de las enzimas del sistema NADPH oxidasa son herramientas útiles para su diagnóstico. Las técnicas utilizadas para la evaluación de la capacidad quimiotáctica de las células fagocíticas son de gran utilidad diagnóstica en alteraciones como Chediak Hisgahi y síndrome de Hiper IgE así mismo; en síndromes como la deficiencia de adhesión leucocitaria tipo I, la determinación de moléculas de adhesión en la superficie celular es de utilidad diagnóstica.

### **Pruebas diagnósticas para el estudio de las alteraciones del sistema del complemento**

Dentro de los principales mecanismos de inmunidad humoral inespecífica se encuentra el sistema del complemento que en conjunto con otros componentes del sistema inmune innato y adaptativo, proporciona elementos fundamentales para la destrucción de microorganismos. Este sistema está conformado por más de 40 glicoproteínas que trabajan en cascada y existen en el plasma en forma de precursores. Se ha observa-

do que individuos con defectos heterocigotos en los genes que codifican dichas glicoproteínas usualmente son asintomáticos. En contraste, los pacientes homocigotos desarrollan la sintomatología típica de las inmunodeficiencias primarias relacionadas con defectos en el sistema del complemento. Las pruebas de laboratorio útiles en el diagnóstico de deficiencias específicas de componentes del complemento incluyen: la cuantificación de las fracciones C3 y C4 del complemento se realiza por métodos como nefelometría, inmunoprecipitación, RIA, ELISA y turbidimetría, siendo ésta última la de mayor uso en la actualidad. Si los niveles séricos de C3 y C4 se encuentran disminuidos se debe sospechar de una deficiencia del inhibidor de C1 esterase, dado que este es uno de los principales mecanismos de regulación negativa de la activación de la vía clásica del complemento, ésta última proteína se puede medir por citometría de flujo. Adicionalmente, por esta misma tecnología es posible determinar la presencia de otros reguladores fisiológicos de la activación del complemento como es el caso del marcador CD59, presente en la superficie de los glóbulos rojos principalmente (Wen, 2004). La técnica denominada complemento hemolítico 50 (CH50) determina la actividad hemolítica de las proteínas que hacen parte de la vía clásica del complemento presentes en el suero del paciente, proteínas que median la lisis de glóbulos rojos recubiertos de anticuerpos. Porcentajes de hemólisis bajos se han asociado a una activación crónica del sistema del complemento o a la deficiencia congénita de alguno de sus componentes (Folds, 2003).

En resumen; las pruebas de laboratorio de inmunología clínica con las que en la actualidad contamos, son herramientas fundamentales para la valoración de los componentes tanto celulares como humorales del sistema inmunológico de pacientes con sospecha clínica de inmunodeficien-

cia primaria. El acceso a estas técnicas especializadas permite al médico general y al especialista, evaluar tempranamente a los pacientes con manifestaciones clínicas del Síndrome de Infección Recurrente Anormal y correlacionar con los resultados de laboratorio para establecer un diagnóstico lo más acertado posible. Disminuyendo en consecuencia, la necesidad de ingresos frecuentes a instituciones hospitalarias por causa infecciosa, minimizando la posibilidad de resistencia antimicrobiana y limitando los altos costos de tratamiento, todo en aras de mejorar la calidad de vida de los individuos afectados. Es importante destacar que, una vez, los médicos tratantes generales y especialistas se vean enfrentados a un paciente con alta sospecha de Síndrome de Infección Recurrente Anormal puedan utilizar las herramientas diagnósticas mencionadas y, de manera organizada y por etapas de estudio puedan hacer aproximaciones diagnósticas pertinentes y oportunas.

## LITERATURA CITADA

- ALONSO, V.; MELCHOR, A.; LÓPEZ, R.; GÓMEZ, I.; ZULETA, O.; HERNÁNDEZ, L.; ÁLVAREZ, M.; MORALES, E.; TURRO, G. 2004. Ensayo inmunoturbidimétrico para la cuantificación de IgA, IgG e IgM en suero humano. *Bioquímica* 29: 45-54.
- BUM, H.; OH, SEOK, J.; WOOCHANG, P.; JIN, S.; HYUK, J.; YOUNG, S. 2004. Molecular analysis of X-linked Chronic Granulomatous Disease in Five Unrelated Korean Patients. *J Korean Med* 19: 218-222.
- CANDOTTI, F.; OAKES, S.; JOHNSTON, J.; GILIANI, S.; SCHUMACHER, R.; MELLA, P.; FIORINI, M.; UGAZIO, A.; BADOLATO, R.; NORAT-ARANGELO, L.; BOZZI, F.; MACCHI, P.; STRINA, D.; VEZZONI, P.; BLAESE, M.; O'SHEA, J.; VILLA, A. 1997. Structural and Functional Basis for JAK3-Deficient Severe. *Blood* 90: 3996-4003.
- CASTAÑO, D.; RUGELES, C.; PATIÑO, P.; MONTOYA, C. 2003. Alteraciones en el extendido de sangre periférica en las inmunodeficiencias primarias. *Revista de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología* 12: 1-10.
- FEDER, E.; WEISS, M.; BRANDAU, O.; JEDELE, K.; NORE, B.; BACKESJO, M.; VIHINEN, M.; HUBBARD, S.; BELOHRADSKY, B.; SMITH, C.; MEINNDL, A. 1998. Mutation Screening of the BTK Gene in 56 Families With X-Linked Agammaglobulinemia (XLA): 47 Unique Mutations Without Correlation to Clinical Course. *Pediatrics* 101: 276-284.
- FOLDS, J.; SCHMITZ, J. 2003. Clinical and laboratory assessment of immunity. *Journal Allergy and clinical immunology* 11: S702-S711.
- GASTEL, P.; DE ALEJO, J. 1999. Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Médica Militar* 29: 192-198.
- HERNANDEZ, A.; BLANCO, R. Subclases de IgG en enfermedades: significado clínico. 2004. *Revista Cubana de Hematología* 20.
- HERRERA, S.; GONZÁLEZ, J.; BONELO, A.; ARÉVALO, M. 1999. Los linfocitos T CD8+ en la respuesta inmune celular: ¿Cómo funcionan?, ¿Cómo se evalúan? *Revista de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología* 8.
- INAZUKA, M.; TAHIRA, 1996. Rapid detection of point mutations using SSCP Analysis on the ABI PRISM 310 Genetic analyzer. *Genome Research* 6: 551-557.
- JONES, A.; GASPAR, H. 2000. Inmunogenetics: changing the face of immunodeficiency.

- ciency. *Journal Clinical Pathology* 53: 60-65.
- KOLIBAB, K.; SMITHSON, S.; SHRINER, A.; KHUDR, S.; STEINER, S.; CARLONE, G.; WESTERINK, J. 2005. Immune response to pneumococcal polysaccharides 4 and 14 in elderly and young adults. I antibody concentrations, avidity and functional activity. *Immunity ageing* 2: 1-9.
- LIM, M.; ELENITIBA, K. 2004. The molecular pathology of primary immunodeficiencies. *Journal of Molecular Diagnostics* 6: 59-83.
- MENDOZA, L.; SHEARER, W. 1998. Screening for primary immunodeficiencies in the clinical immunology laboratory. *Clinical Immunology and Immunopathology* 86: 237-245.
- MONTOYA, C. 2004. Inmunodeficiencias Primarias. En: Rugeles y Patiño, P. (eds). *Inmunología- Una ciencia activa*.
- MONTOYA, C.; HENAO, J.; SALGADO, H.; OLIVARES, M.; LÓPEZ, J.; RUGELES, C.; FRANCO, J.; ORREGO, J.; GARCÍA, D.; PATIÑO, P. 2002. Diagnóstico fenotípico de las inmunodeficiencias primarias en Antioquia, Colombia, 1994-2002. *Biomédica* 22: 510-518.
- NELDYA, C.; FRASCH, C. 1998. Evaluation of previously assigned antibody concentrations in pneumococcal polysaccharide reference serum 89SF by the method of cross-standardization. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 199-204.
- NOROSKI, L.; SHEARER, W. 1998. Screening for primary immunodeficiencies in the clinical immunology laboratory. *Clinical Immunology And Immunopathology* 86: 237-245.
- OLEASTRO, M.; GALICCHIO, M.; KRASOVEC, S. 2001. Inmunodeficiencias primarias. [www.emc.alergia.org.ar/enfoq5\\_1\\_12\\_2001.pdf](http://www.emc.alergia.org.ar/enfoq5_1_12_2001.pdf).
- OLIVARES, M. 2004. Evaluación clínica del paciente con infección recurrente. En: Rugeles y Patiño, P. (eds). *Inmunología. Una ciencia activa*.
- ORTEGA, MC. 2005. Generalidades sobre inmunodeficiencias primarias. *Universitas Médica*, 46, 2: 48-51.
- SALGADO, H.; MONTOYA, C.; HENAO, J.; ORREGO, J.; LÓPEZ, J.; PATIÑO, P. 2000 Guía de estudio y manejo del paciente sospechoso de presentar alteraciones en la respuesta inmune celular específica. *Revista de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología* 9: 9-13.
- STITES, D.; TERR, A.; PARSLow, T. 1999. *Inmunología básica y clínica*. Novena edición. Manual Moderno. México, D.F. 1080 págs.
- WEN, L.; ATKINSON, J.; GICLAS, P. 2004. Clinical and laboratory evaluation of complement deficiency. *Current Reviews of Allergy And clinical Immunology* 113: 585-593.
- WERNETTE, C.; FRASCH, C.; MADORE, D.; CARLONE, G.; GOLDBLATT, D.; PLIKAYTIS, B.; BENJAMÍN, W.; QUATAERT, S.; HILDRETH, S.; SIKKEMA, D.; KÄYHTY, H.; JONSDOTTIR, I.; NAHM, M. 2003. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of human antibodies to pneumococcal polysaccharides. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 514-519.
- ZELAZKO, M.; SAMPAIO, M.; DE LUIGI, M.; OLARTE, D.; MADRIGAL, O.; PÉREZ, R.; CABELLO, A.; ROSTAN, M.; SORENSEN, R. 1998. Primary Immunodeficiency



Diseases in Latin America: First Report From Eight Countries Participating In The LAGID. *Journal of Clinical Immunology* 18: 161-166.

ZIELEN, S.; BÜHRING, I.; STRNAD, N.; REICHENBACH, J.; HOFMANN, D. 2000 Immu-

nogenicity and tolerance of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in nonresponders to the 23-valent pneumococcal vaccine. *Infection and Immunity* 68: 1435-1440.

Recibido: 20.01.2006  
Aprobado: 31.08.2006

