



Médicos de El Salvador – <http://www.medicosdeelsalvador.com>

Este artículo fue escrito por:

Dra. Marta Alicia Larín López

Inmunólogo Clínico, Alergóloga y Medicina Interna

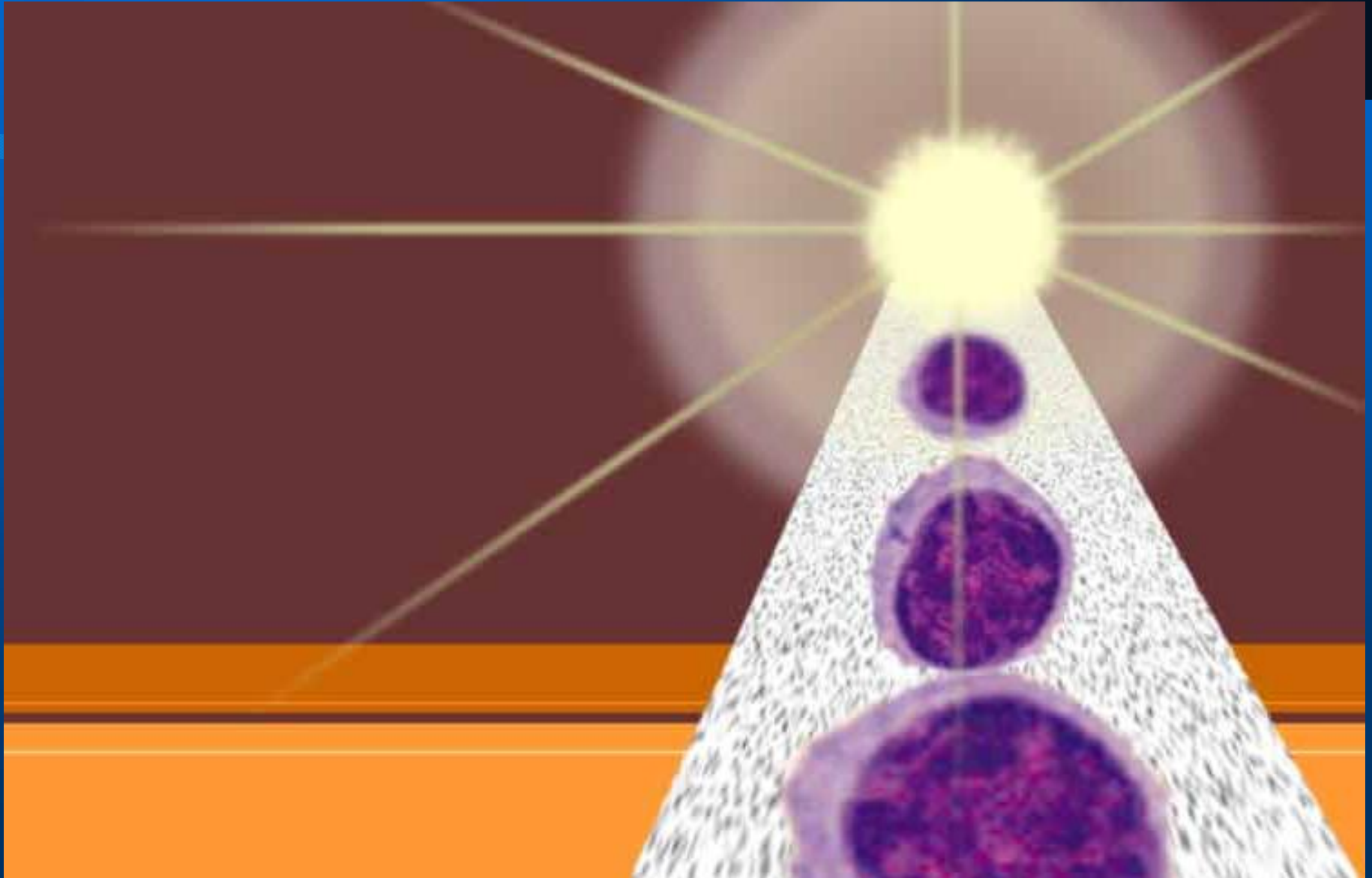
<http://www.medicosdeelsalvador.com/doctora/larin>

Todos los derechos reservados.

DIAGNÓSTICO DE ALERGIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

APLICACIONES ACTUALES Y
PERSPECTIVAS FUTURAS

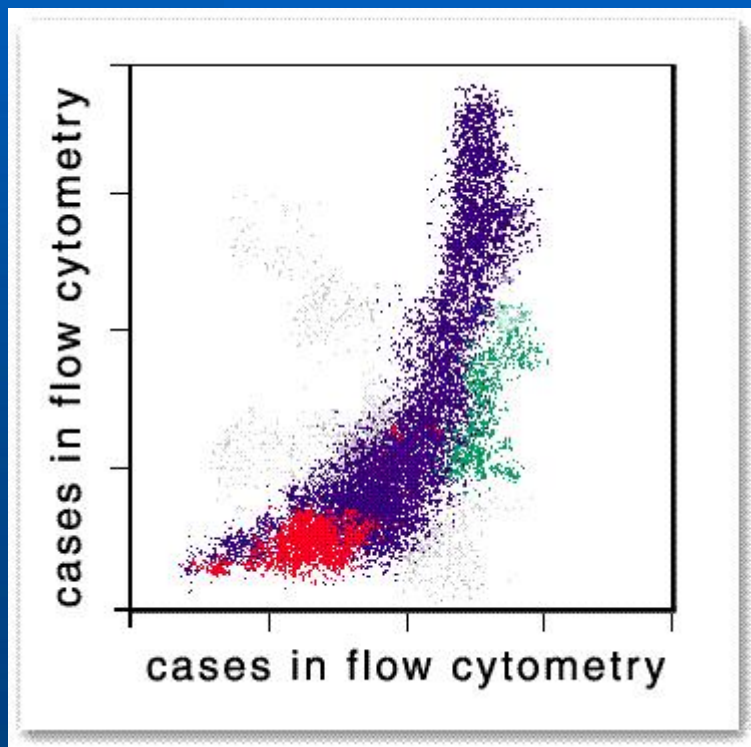
CITOMETRIA DE FLUJO



CITOMETRO DE FLUJO



CITOMETRIA DE FLUJO



- Análisis de células en suspensión.
- Tamaño relativo
- Complejidad
- Expresión de moléculas

CITOMETRIA DE FLUJO

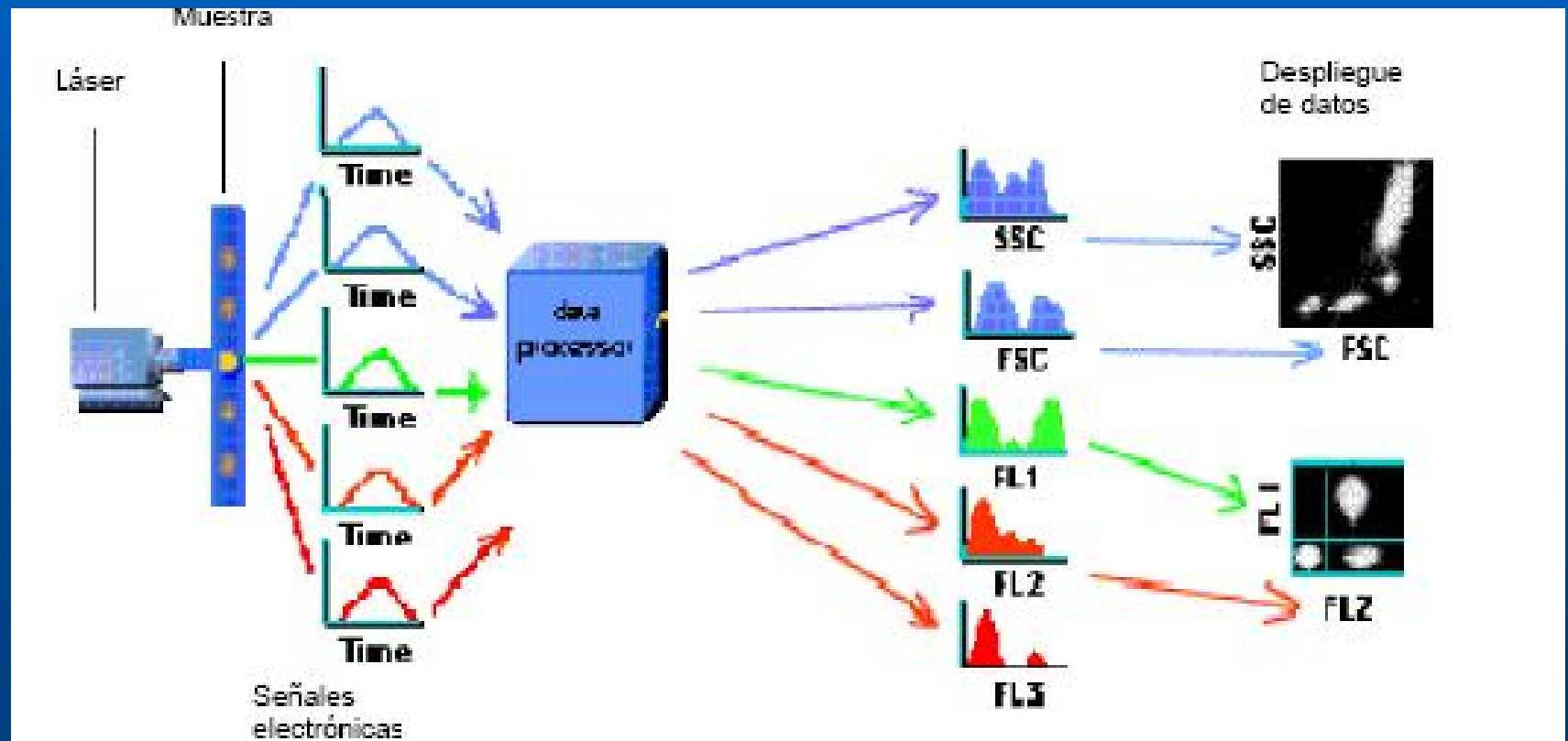


Figura 1: Señales producidas por la dispersión de la luz y la fluorescencia convertidas a pulsos electrónicos y representadas gráficamente

CITOMETRIA DE FUJO

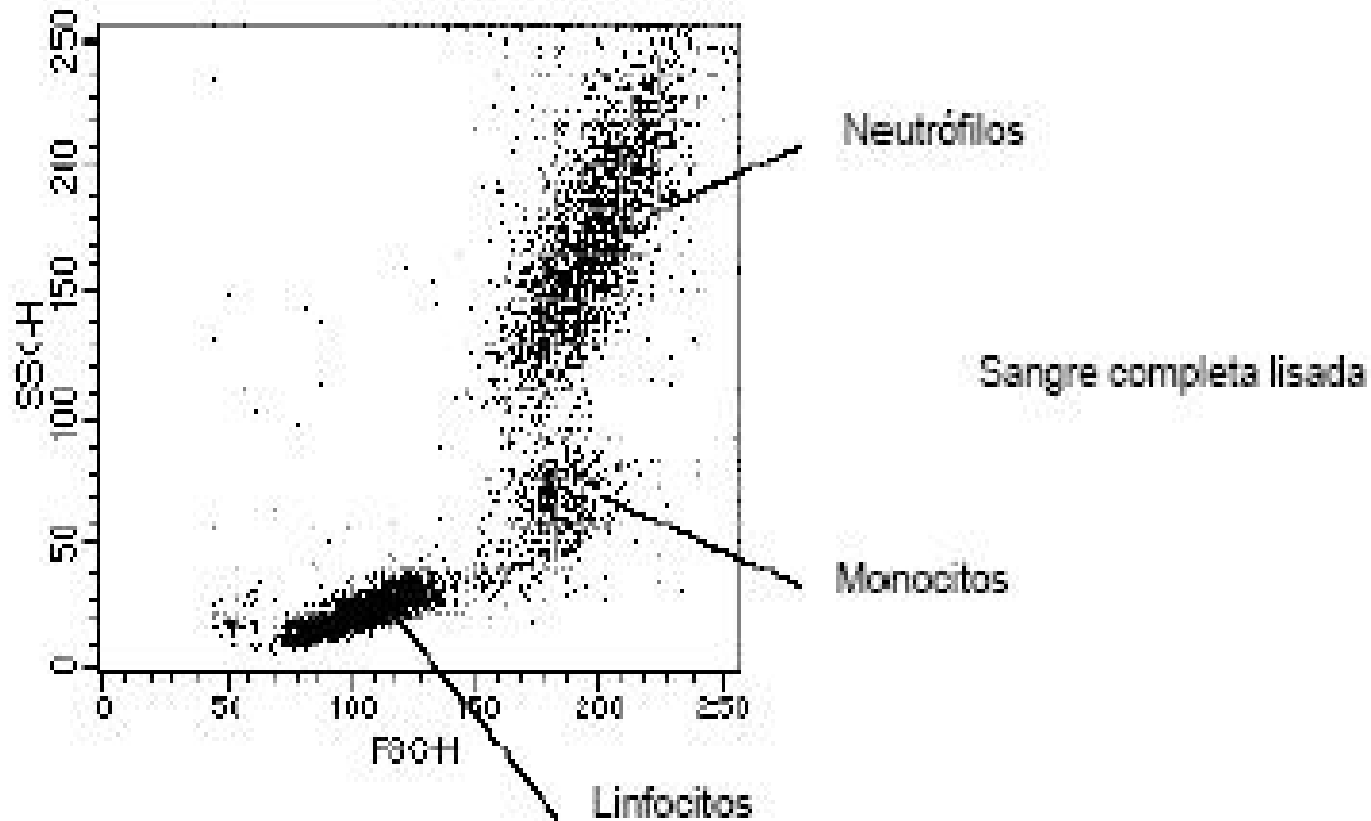
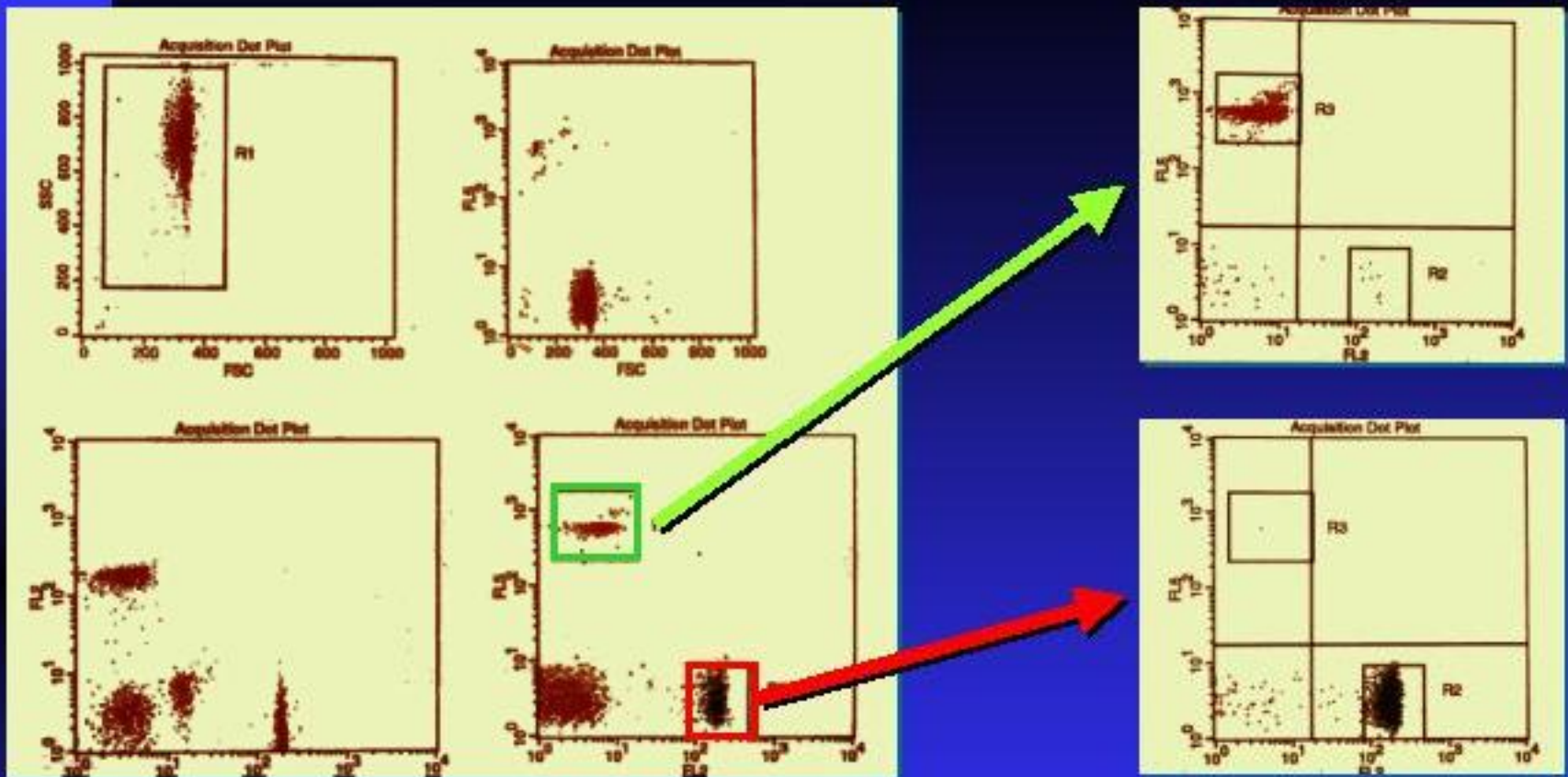


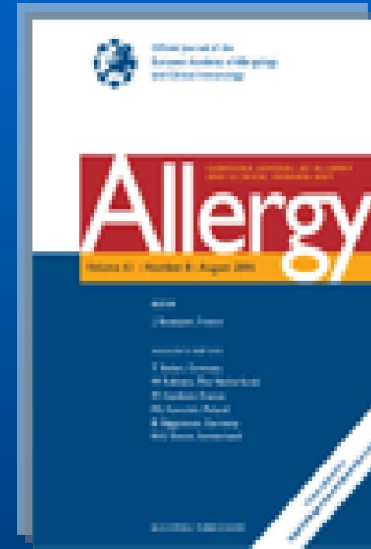
Figura 4: Identificación de subpoblaciones celulares basandose en FSC y SSC



- Función: selección, separación y enriquecimiento de partículas de suspensiones heterogéneas

DIAGNÓSTICO DE ALERGIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

- D.G. Ebo
- J. Sainte-Laudy
- C.H. Bridts
- C.H. Mertens
- M.M.Hagendorens
- A.J.Schuerwegh



Vol 61 pagina 1028
Septiembre 2006

DIAGNÓSTICO DE ALERGIA

- Métodos usados actualmente:
 - Sospecha clínica de una alergia mediada por IgE basándose en la historia.
 - Cuantificación de la IgE específica sérica (IgE)
 - Pruebas de piel
 - Pruebas de provocación.
 - Pruebas *in vitro*: liberación de histamina

DIAGNOSTICO IN VITRO

Las pruebas in vitro actuales fallan en cuanto a la técnica por lo que no han sido validadas y no tienen aplicación clínica:

- Test de liberación de histamina
- Test de liberación de leucotrienos

DIAGNÓSTICO DE ALERGIA

Sin embargo muchas veces, la identificación del alergeno causante no puede ser establecida con certeza.



CITOMETRIA DE FLUJO

Permitirá la cuantificación de alteraciones en la expresión de marcadores de activación específicos del basófilo.

ACTIVACION DEL BASOFILO

- Después de la estimulación con el alérgeno específico que se une al receptor de alta afinidad de la IgE (*Fc ϵ RI*) los basófilos también estimulan la sobreexpresión de diferentes marcadores de activación susceptibles de ser medidos célula por célula en un análisis multicolor por citometría de flujo, usando anticuerpos monoclonales .

ANTIGENOS DE ACTIVACION DEL BASOFILO

CD63

CD203

CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE CD63

SINONIMO	Gp53 ó lisosima asociada a proteína de membrana (LAMP)-3
SUPERFAMILIA	Superfamilia Transmembrana-4 (tretaspanins) Es expresado por basófilos, mastocitos tisulares, macrófagos y plaquetas
BASOFILO EN REPOSO	Está anclado a los gránulos intracitoplasmáticos y es raramente detectable fuera de la membrana externa, tanto en sujetos sanos como en alérgicos.
BASOFILO ACTIVADO POR IgE	Se sobre-expresa dentro de 10 minutos Se expresa en alta densidad (al menos 1 log escala)

CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE CD203

SINONIMO	Antígeno de superficie de diferenciación de células neurales E-NPP3 ó PD-1B, B10, gp130
SUPERFAMILIA	Pirofosfatasa/fosfodiesterasa (E-NPPs)
BASOFILO EN REPOSO	Constitutivo y se expresa exclusivamente en el basófilo. Presente (+)
BASOFILO ACTIVADO POR IgE	Se sobre-expresa dentro de 5 minutos en respuesta a estimulación anti-FcERI. Pico máximo a los 10-15 minutos Su sobre expresión es menos prominente que la del CD63.

DIAGNÓSTICO DE ALERGIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

- El descubrimiento del CD63 como un antígeno de activación del basófilo, constituye el comienzo del desarrollo de técnicas por citometría de flujo para analizar y cuantificar in vitro la activación de los basófilos en sangre periférica.

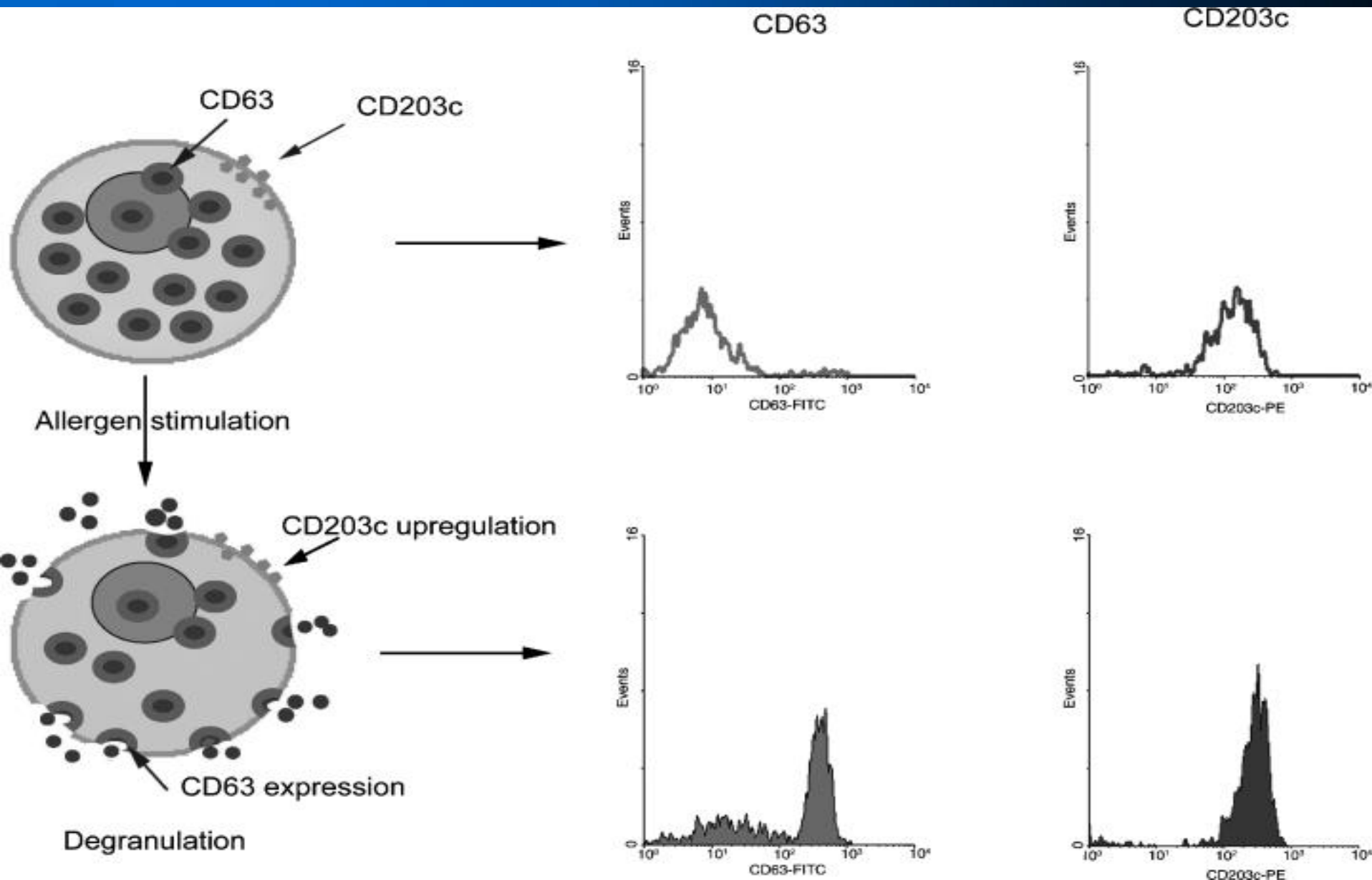
DIAGNÓSTICO DE ALERGIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

- La activación del basófilo puede seguir dos vías:
 - LA DEGRADACIÓN ANAFILÁCTICA: caracterizada por rápidos cambios morfológicos, exocitosis de los gránulos intracelulares y liberación de mediadores (histamina).

DEGRANULACION EN PIECEMETAL

- Caracterizada por:
 - Cambios morfológicos lentos sin exocitosis.

DEGRANULACION ANAFILACTICA



TECNICAS

- SANGRE COMPLETA
 - Menos centrifugadas
 - Puede haber interferencia con otros componentes séricos
- BASÓFILOS AISLADOS.
 - Puede haber pérdida de células en el proceso.
- PRE-ACTIVACION CON IL-3
 - sensibiliza a la célula
 - Incrementa la liberación de mediadores
 - Incrementa la expresión de CD63
 - No se han hecho estudios con CD203.

ESTIMULACION CON ALERGENOS

- Apropiaada selección del alérgeno es crítica.
- Extractos de alérgenos naturales no son recomendados por ser muy heterogéneos en su composición y pueden contener sustancias inhibitorias o estimulatorias.
- Alérgenos recombinantes.

EXPERIMENTOS DOSIS RESPUESTA

- La respuesta puede ser altamente heterogénea entre pacientes.
- La sobre-expresión del CD63 y CD203 generalmente no es restringida a una estimulación única sino que se hace a diferentes concentraciones en escala logarítmica.
- Concentración óptima que discrimina entre pacientes.
- Determinar concentraciones citotóxicas
 - para evitar resultados falsos positivos o negativos
- Desafortunadamente no todos los alérgenos se comportan igual
 - Las drogas como los agentes bloqueadores neuro-musculares tienen rangos muy pequeños.

ANALISIS IN VITRO DE BASOFILOS ACTIVADOS DE PACIENTES

- Actualmente se puede hacer el diagnóstico de diferentes alergias mediadas por IgE:
 - Pólenes, polvo casero:
 - Sensibilidad y especificidad mayor al 90%
 - Alergia a alimentos:
 - Se ha confirmado la sensibilidad al olivo, aditivos alimentarios como guar gum y sensibilidad oral a la papaya
 - Alergia a alimentos por reacción cruzada con pólenes
 - Alergia al látex:
 - Discrimina las reacciones cruzadas con determinantes carbohidratos
 - Alergia a venenos de Himenópteros:
 - Alergia a drogas
 - Sensibilización a transfusiones sanguíneas mediada por IgE

ESTUDIOS REPORTADOS

Table 2. Flow cytometric analysis of *in vitro* allergen-activated basophils: sensitivity and specificity data

Stimulus	Reference test	Sensitivity	Specificity	Numbers	Reference
House dust mite (HDM)	H + IgE and/or ST	56–78	91–100	20	(19)
<i>Dactylis glomerata</i>	H + IgE and/or ST	73–100	100		
Cypress pollen	H + ST + PT	91	100	75	(48)
HDM and <i>Lolium perenne</i>	H + IgE + ST	93	98	128	(20)
Latex	H + IgE + ST	93	92	102	(23)
Latex	H + ST	93	100	73	(53)
Latex	H + IgE and/or ST	80	97	79	(74)
Wasp venom	H	92	80	70	(49)
Wasp venom	H	85	83	87	(58)
Bee venom	H	91	90		
β -lactam	H + ST	50	93	88	(25)
β -lactam	H \pm ST \pm IgE \pm PT	49	91	110	(84)
Metamizol	H \pm PT	42	100	55	(85)
Aspirin and NSAID	H \pm PT	15–55	74–100	90	(86)
Neuromuscular blocking agent	H	64	93	50	(51)
Neuromuscular blocking agent	H \pm ST	54	100	60	(24)
Neuromuscular blocking agent	H	79	100	24	(27)
Carrot–celery–hazelnut	H (OAS)	85–90	80–90		(81)
Apple	H (OAS)	90	100	59	(26)
		88*	75*		
Apple (Mal d 1)	H (OAS)	75	64	54	(50)
Celery (Api g 1)		65	86		
Carrot (Dau c 1)		75	82		
Serum of patients with CIU	H + ASST	20	70	65	(102)

DROGAS Y COMPONENTES RELACIONADOS

- Diagnóstico difícil:
 - Amplio espectro de respuestas inmunológicas y no inmunológicas.
 - Epítopes desconocidos.
 - Test de provocación complicado o no realizable.
 - Uso de múltiples medicamentos simultáneamente

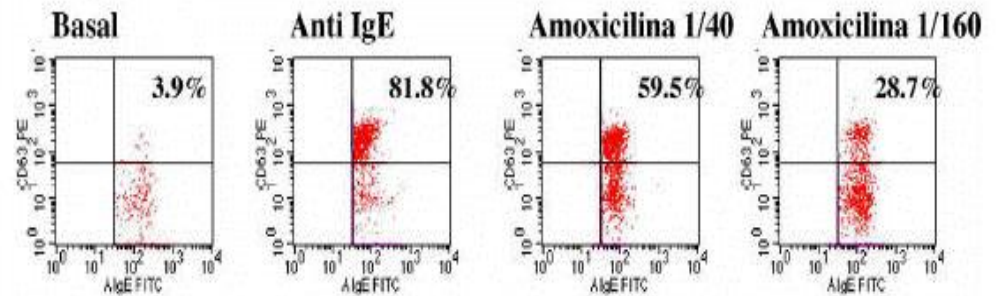
BLOQUEADORES NEUROMUSCULARES

- Puede discriminar entre una reacción anafilactoide y una verdadera reacción anafiláctica en agentes que tienen un amonio cuaternario, con una sensibilidad de 64 y especificidad del 93%.
- En un estudio con rocuroniun se comparó a pacientes con anafilaxia y pacientes que lo toleraron, encontrando una sensibilidad y especificidad de 91.7 y 100% respectivamente.
- Podría servir para demostrar reactividad cruzada entre el rocuronium y otros relajantes como el vecuronium.

BETA LACTAMICOS

- Un análisis comparativo entre cuantificación de IgE específica y activación de basófilos.
- 58 pacientes con test de piel + a beta-lactámicos
- 30 individuos sanos
- Sensibilidad y especificidad fue de 38% y 87% para la IgE
- Sensibilidad y especificidad por CF fue de 50% y 94%

Ejemplo n°1



Ejemplo n°2

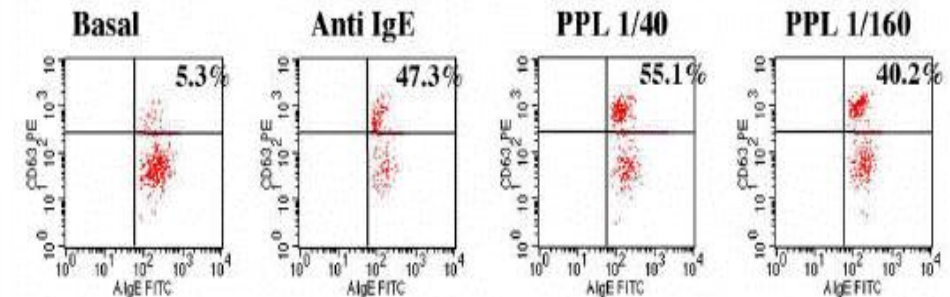


Figura 1. TAB en alergia a betalactámicos.

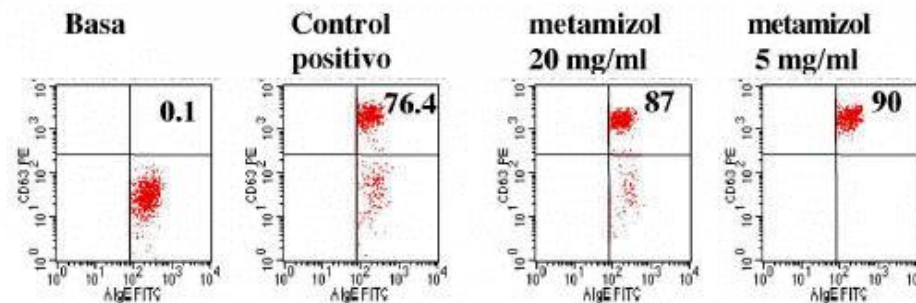
ASPIRINA Y AINES

- 2 estudios evaluaron la hipersensibilidad a ASA, metamizol y AINES:
 - Primer estudio: sensibilidad y especificidad 42 y 100%
 - Segundo estudio: la sensibilidad para los diferentes AINES varió desde 15 hasta 55% para el Naproxeno y la especificidad fue del 90%.

Tabla 1. Sensibilidad, especificidad, puntos de corte y valores predictivos positivo y negativo del TAB para antibióticos betalactámicos y metamizol.

Medicamento	n	SE	ES	P. Corte	VPP	VPN
Betalactámicos	58	52,8	92,6	> 5-SI >2	18,9	98,4
Metamizol	26	42,3	100	> 5-SI >5	100	99,4

Ejemplo 1



Ejemplo 2

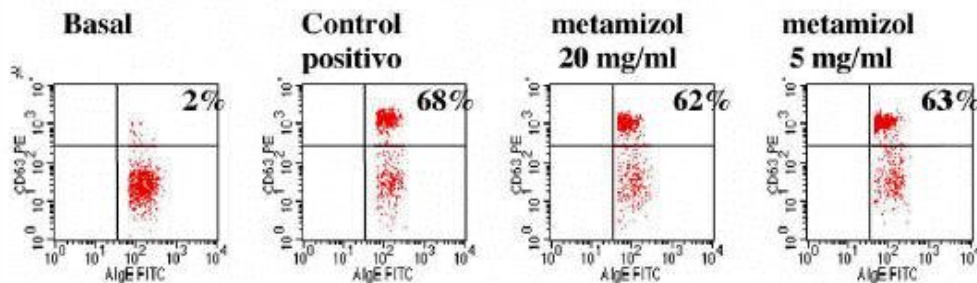


Figura 1. TAB en alergia a metamizol.

MISCELANEOS

- EXPANSOR DEL PLASMA HIDROXIL ETIL SULFATO (emulsificador de laticlosporina intravenosa)
- ALBUMINA SERICA BOVINA presente en el semen para la inseminación artificial.
- OMEPRAZOL
- HEPARINAS DE DIFERENTES PESOS MOLECULARES
- HIALURONIDASA
- CLORHEXIDINA
- VISCOTOXINAS DE MISTLETOE
- COLORANTE AZUL

ANALISIS DE BASOFILOS ACTIVADOS IN VITRO

- Puede ser aplicada a alérgicos y no alérgicos.
- Detección de anticuerpos liberadores de mediadores para la urticaria crónica inmune (sueros autólogos).

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y ESPECULACIONES

- En las últimas 2 décadas, el desarrollo de la CF ha expandido su uso en diferentes campos de la Medicina:
 - Hematología
 - Oncología
 - Inmunología

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y ESPECULACIONES

La aplicación del análisis in vitro de los basófilos activados aplicando el CD63 y el CD203c puede constituir un instrumento que provea al médico un nuevo abordaje diagnóstico.

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y ESPECULACIONES

- La técnica ha sido validada para varias alergias mediadas por IgE, incluyendo:
 - Alergia a inhalantes
 - Alergia a alimentos primarias y secundarias
 - Alergia al látex
 - Alergia al veneno de Himenópteros
 - Alergia a drogas.

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y ESPECULACIONES

- La técnica podría ser adoptada para:
 - discriminar entre resultados IgE irrelevantes
 - Evaluar la alergenicidad residual a alérgenos naturales o recombinantes.
 - Inmunoterapia específica
 - Demostrar la ocurrencia de tolerancia natural
 - Seguimiento de inmunoterapia (estimulación submáxima, estimulación máxima)
 - Diferenciar entre reacciones anafilactoides independientes de IgE



GRACIAS POR SU ATENCION