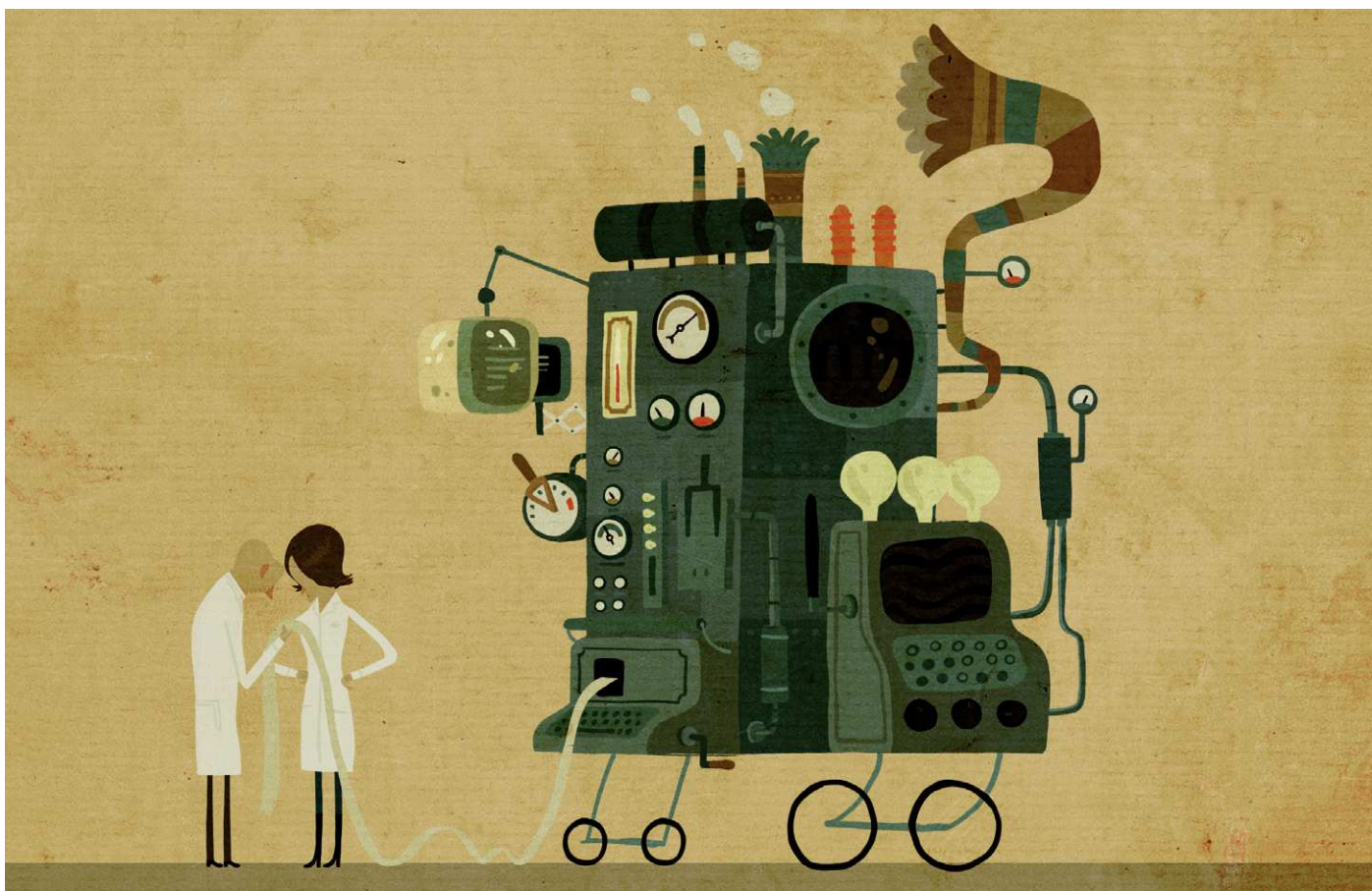


Desde el laboratorio a la clínica

# Pruebas de laboratorio en el diagnóstico de las inmunodeficiencias primarias

JESÚS RUÍZ CONTRERAS Y LUIS IGNACIO GONZÁLEZ GRANADO

Unidad de Inmunodeficiencias. Servicio de Pediatría. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid. España.  
jruihc.hdoc@salud.madrid.org; nachgonzalez@gmail.com



## Puntos clave

- Muchas inmunodeficiencias primarias (IP) tienen manifestaciones en sangre periférica, fundamentalmente citopenias.
- Es necesario prestar atención a la cifra de linfocitos en sangre, sobre todo en los lactantes.
- Una cifra de linfocitos  $< 2.500-3.000/\mu\text{l}$  en lactantes menores de un año puede ser un signo de inmunodeficiencia combinada grave, incluso en ausencia de otras manifestaciones clínicas.
- La citometría de flujo es el método más útil en el diagnóstico de las IP, por su facilidad de realización y rapidez.
- El diagnóstico de IP debe estar centrado en el paciente, solicitando las pruebas de laboratorio, paso a paso, de acuerdo con los hallazgos de la historia personal, familiar y de la exploración física.
- El escrutinio inicial de IP incluye, casi siempre, hemograma, bioquímica general, cuantificación de inmunoglobulinas y poblaciones de linfocitos T, B y NK.

## Introducción

La sospecha de inmunodeficiencia primaria (IP) parte, casi siempre, de un niño o un adulto que presenta infecciones recurrentes, difíciles de tratar, o causadas por microorganismos oportunistas<sup>1-5</sup> (tabla 1). Sin embargo, en algunas IP puede haber una infección única en toda la vida del sujeto<sup>6,7</sup>, manifestaciones autoinmunes<sup>8-13</sup> u otros signos o síntomas<sup>1,5</sup> más difíciles de relacionar con IP como: úlceras o aftas gigantes de mucosas; rasgos dismórficos faciales; alteraciones cutáneas o del pelo (albinismo, vitiligo, manchas hipercrómicas, Petequias, telangiectasias, alopecia); eritrodermias y dermatitis<sup>14-20</sup>.

En general, en cualquier infección que curse de manera inexplicable, con manifestaciones clínicas «raras» o acompañada de algunos de los signos anteriores, se debería descartar una IP.

## Pruebas de laboratorio en el diagnóstico y la evolución de las inmunodeficiencias primarias

Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de las IP pueden dividirse en 4 grandes bloques o niveles: *a*) pruebas comunes de laboratorio; *b*) estudios de citometría de flujo (CF); *c*) pruebas funcionales de los linfocitos, y *d*) estudios genéticos y moleculares.

## Pruebas comunes de laboratorio

Aunque el diagnóstico final depende muchas veces de estudios inmunológicos, genéticos y moleculares, lo cierto es que en un gran porcentaje de casos se puede hacer una aproximación diagnóstica inicial (la más importante para el pronóstico del niño que padece una IP) con pruebas de laboratorio consideradas «corrientes o habituales».

La sangre constituye la mejor ventana al sistema inmunitario y muchas IP tienen expresión en sangre periférica.

La linfopenia menor de 2.500-3.000 linfocitos/ $\mu$ l en un lactante menor de un año puede ser la primera alerta de una inmunodeficiencia combinada grave (ICG), incluso en ausencia de otras manifestaciones clínicas. Una cifra en este rango obliga a repetir el hemograma para descartar esta grave enfermedad<sup>21</sup>.

Las citopenias inmunes, afectando a una o más de las 3 series, son frecuentes en varias otras IP<sup>22-26</sup>. En la inmunodeficiencia variable común (IVC), las citopenias pueden presentarse varios años antes que otras manifestaciones clínicas de la enfermedad. También algunas IP celulares, como el síndrome de DiGeorge, y las deficiencias de adenosín deaminasa (ADA) o nucleótido fosforilasa pueden cursar con citopenias autoinmunes.

En el síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), hay trombocitopenia con plaquetas que tienen un volumen plaquetario disminuido<sup>14,15</sup>, lo que es diagnóstico de la enfermedad en un varón. De hecho, la trombocitopenia ligada al X puede

ser la única manifestación de algunas mutaciones del gen (WAS)<sup>14-16</sup>. Más raramente, otras mutaciones asociadas a una ganancia de proteína dan lugar a la neutropenia crónica ligada al X<sup>14,16,27</sup>.

Por último, la cuantificación de inmunoglobulinas es una prueba sencilla y esencial para el diagnóstico de las inmunodeficiencias humorales.

## Caracterización de las inmunodeficiencias primarias por citometría de flujo<sup>28-30</sup>

La citometría de flujo es la técnica más útil en el estudio de la mayoría de las IP, ya que permite evaluar las poblaciones y subpoblaciones celulares, así como identificar moléculas de la membrana y del citosol, e incluso valorar la función anormal de una proteína.

Como escrutinio de las IP, es útil realizar un inmunofenotipo de las poblaciones celulares de la sangre mediante la identificación de marcadores celulares de superficie mediante CF (tabla 2). Con ello se logra la presunción diagnóstica de la mayoría de IP de células T y células B, que posteriormente se confirma, mediante otros estudios (tabla 3).

### Inmunodeficiencias combinadas graves<sup>1-4</sup>

#### *Inmunodeficiencia combinada grave ligada al X por déficit de cadena $\gamma$ común*

Esta IP, la más frecuente de las formas de las ICG (50%), se produce por mutaciones en el gen que codifica la cadena común ( $\gamma$ C o CD132), que forma parte de los receptores de las interleucinas (IL)-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. La IL-7 es esencial para el desarrollo de los linfocitos T, mientras que la IL-15 lo es para el desarrollo de las células NK. Por tanto, los individuos con esta mutación carecen de ambos tipos celulares, pero sí tienen células B (fenotipo T<sup>-</sup>, B<sup>+</sup>, NK<sup>-</sup>). El diagnóstico definitivo se hace demostrando, por CF, la expresión anormal o ausente de la cadena  $\gamma$ C (CD132). El estudio genético permite identificar la mutación causante de la enfermedad.

#### *Inmunodeficiencia combinada grave autosómica por mutación de Jak-3*

La enzima Janus cinasa 3 (Jak-3) es una tirosincinasa que se asocia a la porción citoplasmática de los receptores de varias IL (entre otras, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21) formando, por tanto, parte de la vía de activación celular. La mutación de Jak-3 da lugar a una ICG con idéntico fenotipo al de la ICG ligada al X (T<sup>-</sup>, B<sup>+</sup>, NK<sup>-</sup>), pero menos frecuente y con herencia autosómica recesiva.

#### *Inmunodeficiencia combinada grave por mutaciones en el receptor de la interleucina 7 (IL-7Ra)*

La unión de la IL-7 con su receptor es esencial para el desarrollo de los linfocitos T. La ausencia de este receptor da lugar a una inmunodeficiencia con fenotipo T<sup>-</sup>, B<sup>+</sup>, NK<sup>+</sup>.

**Tabla 1.** Fenotipo clínico de las inmunodeficiencias primarias

Tipo de patógeno	Historia y manifestaciones clínicas	Defecto inmune	Otros hallazgos y comentarios
Neumococo, <i>H. influenzae</i> tipo b, <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Campylobacter</i> spp., <i>Mycoplasma</i> spp. enterovirus, <i>Giardia lamblia</i>	Infecciones sinopulmonares recurrentes, diarrea crónica, meningoencefalitis por enterovirus, artritis, sepsis por <i>P. aeruginosa</i>	Células B	Comienzo a partir de los 4-6 meses en las agammaglobulinemias congénitas  La inmunodeficiencia variable común afecta con más frecuencia a niños mayores y adultos jóvenes
Virus: varicela zóster, citomegalovirus, Epstein-Barr, herpes simple 1 y 2, molusco, HPV  Hongos: <i>Pneumocystis jirovecii</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus</i> spp.  Protozoos: <i>Cryptosporidium</i>	Diarrea crónica, candidiasis oral persistente, neumonía por <i>P. jirovecii</i> , molusco y verrugas diseminadas o recurrentes,  eritrodermia en las primeras semanas de vida  A veces, úlceras o aftas gigantes en mucosas	Células T	Comienzan a los pocos meses después del nacimiento e incluso en el periodo neonatal. A veces, hay exantemas, en las primeras semanas de vida, por enfermedad injerto contra huésped por paso de linfocitos maternos
<i>S. aureus</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>B. cepacia</i> , <i>Nocardia</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp.  Bacilos gramnegativos, <i>S. aureus</i> , <i>Candida</i> spp. y <i>Aspergillus</i> spp.	Neumonías, abscesos cutáneos y de partes blandas, abscesos hepáticos, adenitis supurada, osteomielitis, sepsis  Abscesos de piel, tejidos blandos, pulmón, acompañadas de leucocitosis y neutrofilia muy altas	Defectos del sistema fagocítico (enfermedad granulomatosa crónica)  Defectos de moléculas de adhesión leucocitarias	Úlceras aftosas recurrentes, síntomas obstructivos de órganos huecos (antro pilórico, vejiga urinaria, esófago), enteritis/colitis granulomatosa, coriorretinitis  Gingivitis y periodontitis. Retraso en la caída del umbilical
Micobacterias atípicas, BCG, <i>Salmonella</i> spp.	Infecciones diseminadas	Defectos del eje interferón gamma/interleucina 12	Incapacidad para formar granulomas
Bacterias piógenas  <i>Neisseria</i> spp.	Bacteriemia y sepsis  Bacteriemia y sepsis	Defectos de C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4  Defectos de C5, C6, C7, C8, C9 y vía alterna	Síndromes reumatoides y cuadros similares al lupus sistémico  Característicamente, la sepsis por <i>Neisseria</i> ocurre en niños mayores y no suele ser fulminante, salvo en el déficit de properdina
Herpesvirus	Encefalitis herpética	Defectos en el TLR3 y UNC93B1	Un único episodio

**Immunodeficiencia T<sup>-</sup>, B-NK<sup>+</sup> por mutaciones en los genes RAG1, RAG2, artemis y ligasa IV**

Los productos de los genes anteriores intervienen en el mecanismo de recombinación (*rearrangement*) del ADN de la célula B y T, que genera la extraordinaria diversidad de inmunoglobulinas y receptores de la célula T (TCR), necesaria para enfrentarse a cualquier antígeno potencial.

La mutación en cualquiera de estos genes afecta a tanto al desarrollo de los linfocitos T como de los B, y da lugar a una ICG grave con fenotipo T<sup>-</sup>, B<sup>-</sup> y NK<sup>+</sup>. Las mutaciones en el complejo RAG1/RAG2 causan el 20% de ICG en Europa.

**Immunodeficiencia combinada grave por déficit de adenosín deaminasa**

La deficiencia de ADA hace que se acumule un metabolito tóxico para los linfocitos, dando lugar a una profunda linfopenia (habitualmente menos de 500/μl). El fenotipo linfocitario de esta enfermedad es T<sup>-</sup>, B<sup>-</sup>, NK<sup>-</sup>.

**Tabla 2.** Poblaciones y subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo en el escrutinio de inmunodeficiencias primarias

Población de células	Marcadores
Células B	CD3-CD19+, CD20+ o CD3-HLA-DR+
Células T maduras (periféricas)	CD3+
Células T helper o cooperadoras	CD3+ CD4+
Células T supresoras/citotóxicas	CD3+ CD8+
Células NK	CD3-, CD16+ o CD56+
Células T activadas	CD3+, HLA-DR+

NK: natural killer.

### Síndrome de Omenn

En algunos pacientes con mutaciones hipomórficas (que no causan la pérdida de función total de la proteína codificada) de Artemis, RAG1/RAG2 e IL-7R, IL-2R, ADA, ADN-ligasa 4 y RN-asa mitocondrial se produce una inmunodeficiencia con aumento de secreción de citocinas, que causan fenómenos autoinmunes e inflamación alérgica. El aumento de citocinas se debe a una expansión clonal de una población de células T, que están anormalmente activadas (como lo demuestra el aumento de su expresión de HLA DR+). Además tienen un repertorio contraído del TCR, que se puede demostrar por CF. Clínicamente, los pacientes presentan eritrodermia, hepatoesplenomegalia, diarrea e infecciones recurrentes. Hay eosinofilia en sangre periférica y aumento de IgE.

### Síndrome de DiGeorge

El diagnóstico de las diferentes formas de síndrome de DiGeorge exige una valoración cuidadosa del fenotipo físico y la demostración de la delección del 22q11.2. La CF

ayuda a establecer la gravedad y el grado de inmunodeficiencia, determinando las subpoblaciones de los linfocitos T, así como función de los mismos mediante la respuesta proliferativas a mitógenos.

### Otras inmunodeficiencias celulares

En la tabla 3, se exponen otras IP celulares que pueden diagnosticarse por CF.

### Inmunodeficiencias humorales<sup>1-4,31,32</sup>

La CF es también primordial en el estudio de las IP humorales, ya que permite, de forma muy sencilla, hacer una primera aproximación diagnóstica al saber si el paciente tiene o no células B. Los marcadores que identifican las células B por CF son: a) el CD19 que es el marcador que identifica a todas las células B, en cualquiera de sus estadios evolutivos, excepto en el de célula plasmática; b) el CD20 que aparece después del

**Tabla 3.** Diagnóstico de las inmunodeficiencias primarias por citometría de flujo

Enfermedad	Diagnóstico por citometría de flujo
Agammaglobulinemia congénita ligada al X	Tirosina cinasa de Bruton en monocitos y plaquetas
Síndrome de hiper-IgM ligado al X	CD40L (CD154) en las células T activadas
Síndrome de hiper-IgM tipo 3	CD40 en las células B o en los monocitos
Alteraciones en la inmunodeficiencia variable común	ICOS (células T activadas), BAFF, TACI y CD19 (en linfocitos B) Células <i>switch memory</i> (CD27 + IgD-IgM-) y linfocitos B CD21 <sup>low</sup>
Síndrome WHIM (warts o verrugas, hipogammaglobulinemia, infecciones y mielocatexis)	CXCR4 (linfocitos T)
Inmunodeficiencia combinada grave por déficit de cadena gamma común	CD132 en células T activadas
Síndrome del linfocito desnudo	
Tipo I	Expresión de MCH-I en monocitos
Tipo II	Expresión de MCH-II en células B y células T activadas
Deficiencia de CD25	CD25 (IL2R $\alpha$ )
Inmunodeficiencia con enteropatía ligada al X	FOXP3 en células T reguladoras (CD4+, CD25+, FOXP3+)
Síndrome de Wiskott Aldrich, trombocitopenia crónica ligada al X, neutropenia crónica ligada al X	Proteína WAS
Enfermedad granulomatosa crónica	Producción de radicales libres del oxígeno (explosión o <i>burst</i> de oxígeno)
Deficiencia de moléculas de adhesión leucocitarias tipo I	Expresión de CD18, CD11a y CD11b en los leucocitos
Deficiencia de moléculas de adhesión leucocitarias tipo II	Expresión de CD15 en neutrófilos y linfocitos
Deficiencia del receptor 1 del IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ R1
Deficiencia del receptor 2 del IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ R2
Deficiencia del receptor $\beta$ 1 de la IL-12 y de la IL-23	IL-12R $\beta$ 1
Linfohistiocitosis hemofagocítica familiar	Expresión de perforina en los linfocitos CD8+ y ensayo de degranulación del CD107a
Síndrome linfoproliferativo ligado al X	SAP (SH2D1A)
Síndrome linfoproliferativo ligado al X por deficiencia del inhibidor de la apoptosis	XIAP

IL: interleucina; IFN- $\gamma$ : interferón gamma. SAP: proteína asociada a SLAM; XIAP: deficiencia proteína que inhibe la apoptosis ligada por X).

anterior en la diferenciación del linfocito B; *c*) el CD21 que es un marcador de activación de los linfocitos B maduros, y *d*) los HLA-DR, expresados de forma constitutiva por los linfocitos B (los linfocitos T solo lo hacen cuando están activados).

### **Agammaglobulinemias congénitas**

Abarcan tanto la forma ligada al X por déficit de la tirosina cinasa de Bruton (Btk), como las formas autosómicas. Todas ellas se caracterizan, además de por agammaglobulinemia (cifras de IgG, IgA e IgM por debajo de 2 desviaciones estándar [DE] de los valores normales) por poseer un fenotipo CD3+, CD19-, CD20-CD21- y HLA-DR-, es decir, una ausencia de células B (menos del 2% de los linfocitos).

La mayoría de las agammaglobulinemias congénitas responde a la deficiencia de Btk, cuya ausencia de expresión puede demostrarse en plaquetas y monocitos por CF. La ausencia de esta proteína es sinónima de la enfermedad, pero su presencia no descarta el diagnóstico, ya que la proteína expresada puede ser funcionalmente anormal.

### **Síndromes de hiper-IgM o deficiencias en la recombinación para el cambio de isotipo**

Tras el estímulo antigénico, la célula B en reposo, que expresa IgM e IgD en su superficie, sufre una expansión clonal con secreción de IgM. Posteriormente, se produce el cambio de isotipo o *switching* (se forman células plasmáticas que secretan IgG o IgA en lugar de IgM), maduración de la afinidad de los anticuerpos (por hipermutación somática) y producción de células de la memoria. Para que se produzcan estos eventos, es necesaria la unión del CD40L del linfocito T helper (TH) activado y el CD40 del linfocito B. Los pacientes en los que esta conexión fracasa, por mutaciones en el CD40 o en el CD40L, tienen una IgG e IgA bajas con IgM alta o normal, al no producirse el cambio de isotipo o *switching*. Otros defectos genéticos de la vía de activación del CD40-CD40L son el modulador esencial NF- $\kappa$ B, la uracil-ADN-glucosidasa, la activación inducida de la citidina deaminasa, IKBA y PMS2.

Además de las alteraciones de la inmunidad humoral, los defectos en el CD40L tienen también profundas alteraciones de la célula T e infecciones oportunistas.

El síndrome de Hiper-IgM más frecuente (aproximadamente el 75% de los casos) es la forma ligada al X por deficiencia del CD40L (síndrome HIGEX). En esta forma falta la expresión del CD40L (CD154) en los T<sub>H</sub> previamente activadas (no se expresa en las células en reposo) con ionóforos del calcio más forbol-miristol acetato (PMA).

También por CF se determina el receptor CD40 en las células B (CD19 o CD 20).

Las células B de memoria vienen identificadas por la expresión de la molécula CD27 en su superficie. Por tanto, su fenotipo es CD19+, CD27+. Las células de memoria sin cambio de isotipo (*non-switching*) son CD19+, CD27+, IgM+ y IgD+ (expresan en su superficie las inmunoglobulinas IgM e IgD), mientras que la célula de memoria con cambio de isotipo (*célula switch memory*) tiene el fenotipo CD19+, CD27+, IgM- e IgD-. Estas células están disminuidas en el síndrome HIGEX (pero no en las formas autosómicas del síndrome), en algunos subgrupos de inmunodeficiencia variable común y de síndrome linfoproliferativo autoinmune<sup>28</sup>.

### **Inmunodeficiencia variable común<sup>9,13,26,33,34</sup>**

Esta IP se caracteriza por disminución significativa de los niveles de IgG (caída por debajo de 2DS) e IgA y/o IgM, con producción disminuida o ausente de anticuerpos, un número de células B circulantes (> 2%) y exclusión de otras causas de hipogammaglobulinemia.

Como en todas las hipogammaglobulinemias, el primer paso es determinar, por CF, las subpoblaciones linfocitarias T y B (tabla 2) para demostrar que no se trata de una agammaglobulinemia congénita.

La producción de anticuerpos específicos se mide determinando las isohemaglutininas u otros anticuerpos frente a antígenos a los que el individuo ha estado expuesto (vacunas tétanos, difteria, hepatitis B, hepatitis A, rubéola, sarampión) o vacunado al sujeto con distintas vacunas y demostrando el incremento de títulos de anticuerpos entre una muestra de suero prevacunal y posvacunal.

La CF permite también definir subgrupos de la IVC<sup>9,13,34</sup>. Los pacientes que tienen menos del 2% de células B de memoria con cambio de isotipo (CD19+, CD27+, IgM-, IgD-) tienen mayor riesgo de esplenomegalia, granulomatosis y niveles más bajos de inmunoglobulinas<sup>30</sup>. Otro subgrupo de IVC es el constituido por pacientes con expansión de una población de linfocitos B (caracterizada por una expresión baja de CD21 y de CD38, y un aumento de la expresión de CD19) conocida como CD21<sup>low</sup>. Un porcentaje de CD21<sup>low</sup> superior al 10% de los linfocitos B se asocia, más que ningún otro parámetro, a esplenomegalia y citopenias autoinmunes<sup>9,30</sup>.

También es posible identificar por CF los defectos genéticos de algunas formas de IVC como ICOS, CD19, CD21 y BAFF-R<sup>26,33,35</sup>.

## **Inmunodeficiencias primarias que afectan a la inmunidad innata**

### **Enfermedad granulomatosa crónica<sup>19,20</sup>**

Mediante citometría de flujo puede determinarse la producción de radicales derivados del oxígeno para el diagnóstico de las diferentes formas de enfermedad granulomatosa crónica, en las que existe una incapacidad para generar radicales libre del oxígeno, por defectos en alguno de los componentes del sistema NADPH. El llamado test de la explosión o *burst* de oxígeno mide la producción de estos radicales mediante citometría de flujo utilizando un colorante intracelular —la dihidrorodamina 123—, que se convierte en un colorante fluorescente al activar los granulocitos con PMA (formol-miristol-acetato). Las células de los sujetos con la enfermedad no presentan fluorescencia o está muy disminuida, a diferencia de los sujetos normales. En las madres portadoras hay 2 grupos de poblaciones celulares.

### **Defectos del eje interleucina-12/interferón gamma<sup>6,7</sup>**

Esta vía implica los receptores del interferón gamma (INF- $\gamma$ ), IFN- $\gamma$ R1 e IFN- $\gamma$ R2, la IL-12 (IL12-p40) y el receptor de la IL-12 (IL-12Rb1). La IL-12, producida por las células dendríticas, activa los linfocitos CD4+ y células NK para que produzcan IFN-g, que, a su vez, activa los macrófagos y estimula a las células TCD4+, dando lugar a una respuesta Th1. Las alteraciones de esta vía dan lugar a infecciones por organismos intracelulares, como infección

nes diseminadas por micobacterias atípicas (*Mycobacterium avium* sobre todo), BCG, y *Salmonella* spp. La ausencia de las moléculas anteriores se demuestra por CF.

El IFN- $\gamma$  activa a célula CD4+ a través de la fosforilización de un activador de la transcripción llamado STAT1, que facilita la transcripción de varios genes de activación, mientras que la IL-12 activa el linfocito CD4+ por la vía de STAT4. La falta de fosforilización de STAT 1 o STAT4 demostrada por CF sugiere defectos en la vía del IFN-g y la IL-12, respectivamente.

## Inmunodeficiencias con disregulación inmune

### Linfoblastocitosis eritrofagocítica familiar

Hay 3 defectos genéticos conocidos que se asocian a esta IP: el déficit de perforina, la mutación en Munc-13 y la mutación de la sintaxina 11.

El déficit de perforina, que corresponde al 20-30% de los casos de esta enfermedad, puede demostrarse, por CF, mediante tinción intracelular de las células NK (CD16+/CD57+) y linfocitos citotóxicos (CD8+).

La expresión de CD107a por las NK siguiendo a su estimulación predice los defectos de Munc-13 y sintaxina 11, y puede ser utilizada como cribado.

### Síndrome linfoproliferativo autoinmune

Este síndrome se caracteriza por linfoproliferación (linfadenopatía y esplenomegalia crónicas), hipergammaglobulinemia

y fenómenos autoinmunes (los más frecuentes son las citopenias)<sup>36</sup>. Se debe a defectos en las vías que conducen a la apoptosis celular, encargada de mantener la homeostasis linfocitaria. La forma más frecuente obedece a deficiencia de FAS (CD95/APO1). Otras formas menos habituales son las mutaciones en Fas ligando (FASL) y las caspasas intracelulares 8 y 10, todas ellas implicadas en la vía de la apoptosis mediadas por FAS.

En todas estas formas es muy característico el aumento de las llamadas células T dobles negativas, que no expresan la molécula CD4 ni CD8 (células TCRab+, CD4-, CD8-). Cuando estas células suponen más de un 1,5% de los linfocitos totales o > 2,5% de los linfocitos CD3+, la posibilidad de esta enfermedad es muy alta. También por CF, mediante diversos métodos, puede evaluarse la apoptosis mediada por Fas.

### Otras inmunodeficiencias primarias que se puede estudiar mediante CF

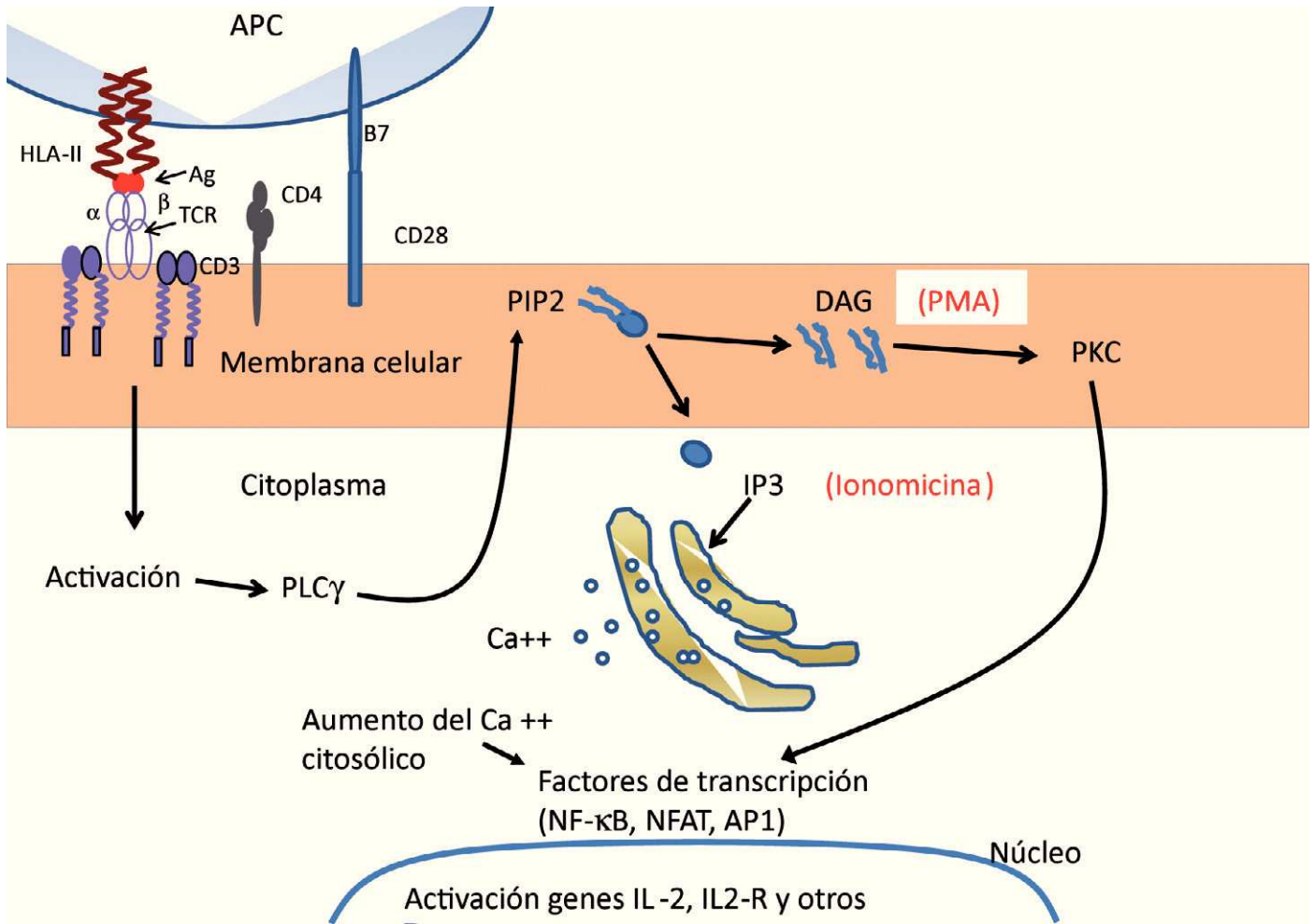
Los defectos de moléculas de adhesión tipo 1 (LAD-1) se produce por mutaciones en el gen que codifica la cadena b (CD18) de las  $\beta$ -integrinas leucocitarias. La ausencia de esta cadena imposibilita el transporte a la superficie celular de otras cadenas (CD11a, CD11b, CD11c) que forman parte de las  $\beta$ -integrinas. La disminución de expresión de la molécula CD11b en los granulocitos en reposo o estimulados, demostrada mediante CF, sirve para realizar el diagnóstico de la enfermedad, al tiempo que permite establecer grupos pronósticos, según la intensidad de la disminución.

En la tabla 3 se exponen otras IP a cuyo diagnóstico se puede llegar por CF.

**Tabla 4.** Mitógenos y antígenos utilizados para valorar la función linfocitaria

Mitógeno o antígeno	Función y significado
Superantígenos (enterotoxinas estafilocócicas A y C)	Se unen, sin procesamiento, al borde lateral del HLA-II de la célula presentadora de antígeno, y del complejo TCR-CD3. Estimula a un número mucho mayor de linfocitos T que los antígenos (hasta un 20%)
Anti-CD3	Estimula el receptor CD3, saltándose el reconocimiento del antígeno, e inicia la cascada que conduce a la activación de la célula T
Lectinas: fitohemaglutinina y concanavalina	Aglutinan azúcares de moléculas como TCR-CD3, CD4, CD8, CD2, CD5, CD43 y activan al linfocito T de forma independiente al TCR
Ionóforos del Ca <sup>++</sup> (ionomicina)	Actúan de manera similar al inositol trifosfato, aumentando el Ca <sup>++</sup> intracelular
PMA	Tiene el mismo mecanismo de actuación que la PKC
	El uso combinado de ionomicina y PMA activa el linfocito T, independientemente de CD3 y CD2
CD28	Es una molécula coestimuladora. Estabiliza los transcritos de ARN de la IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TNF- $\alpha$ y potencia a otros mitógenos como CD3, CD2, lectinas y PMA
CD26 y CD69	Moléculas coestimuladoras. Potencia la proliferación de los linfocitos T estimulados por PMA
IL-2	Corrige la proliferación en los defectos de IL-2 con expresión normal de los receptores de la IL-2
Mitógeno Pokeweed	Mitógeno de la célula B, dependiente de la célula T. Explora función de células B y T, y la cooperación entre ellas
Anti-CD2	El CD2 o T11 es el receptor de los hematíes de carnero de los linfocitos T. Es el marcador Pan-T por excelencia. En anti-CD2 hace proliferar al linfocito T por una vía alternativa al TCR-CD3

TNF: factor de necrosis tumoral; HLA: antígeno de histocompatibilidad de clase A; IFN- $\gamma$ : interferón gamma; Ig: inmunoglobulina. IL: interleucina; PMA: forbol miristil acetato; TCR: receptores de la célula T; TNF- $\alpha$ : interferón alfa.



**Figura 1.** Activación de linfocito T helper. La célula presentadora de antígeno (APC) fagocita y elabora, digiriendo el antígeno, un pequeño péptido, que es presentado mediante los HLA-II al TCR (receptor específico del linfocito T) con sus 2 cadenas α y β, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y que está en conexión con el complejo CD3 formado, a su vez, por varias moléculas. La presentación del antígeno activa una serie de enzimas (muchas de ellas cinasas) que fosforilizan diferentes proteínas y finalmente activan a la fosfolipasa C (PLCγ). Esta enzima hidroliza los fosfolípidos de la membrana (fosfatidil inositol bifosfato o PIP2 en inositol trifosfato [IP3] y diacilglicerol [DAG]). El IP3 pasa al citosol y libera Ca<sup>++</sup> del retículo endoplásmico, aumentando la concentración citosólica del Ca<sup>++</sup>. El DAG queda en la membrana celular y estimula la fosfoquinasa C (PKC) que pasa al citosol. El aumento de Ca<sup>++</sup> citosólico y la activación de la PKC activan a su vez diferentes factores de transcripción (NF-κB, NFAT, AP1) que se traslocan al núcleo y activan la transcripción de diferentes genes, fundamentalmente los genes de la IL-2 y su receptor, cuyo resultado final es la expansión clonal específica del linfocito T helper que ha reconocido al antígeno.

En la activación del linfocito T intervienen, además, otras moléculas —llamadas moléculas coestimuladoras— que potencian las reacciones anteriores. Dos de las más importantes son la B7, que aparece en la APC, y la CD28, que se expresa en el linfocito T helper y reconoce a la anterior. Estas moléculas potencian la activación del linfocito T.

## Respuestas proliferativas linfocitarias a mitógenos y antígenos

Se utilizan para evaluar la función linfocitaria, provocando «*in vitro*» la activación y la proliferación de los linfocitos mediante diferentes moléculas, que simulan la activación natural del linfocito T<sub>H</sub><sup>37</sup> (fig. 1). La función y el punto donde actúan los mitógenos, que se usan solos o en combinación con otros, se exponen en la tabla 4.

Para estudiar la respuesta del linfocito T<sub>H</sub> a los mitógenos y antígenos, se obtienen células mononucleares de sangre

periférica en heparina o EDTA, que se colocan en un medio de cultivo con nucleótidos, algunos de ellos con una base marcada, como la timidina tritiada (TT). El grado de activación o proliferación de linfocitos «*in vitro*» en respuesta a un estímulo (mitógeno o antígeno) se puede evaluar mediante la medida de la incorporación de la TT al ADN que se sintetiza *de novo* por las células en proliferación. La proliferación de las células del paciente se compara con la del control sano.

Una proliferación normal tras el uso de un mitógeno concreto implica que toda la vía de activación, desde el punto donde actúa el mitógeno hasta la síntesis de IL-2 y su receptor, que son los estadios finales de la activación

**Tabla 5.** Pruebas a realizar según el tipo de inmunodeficiencia que se sospecha

Inmunodeficiencias humorales	Inmunodeficiencias celulares	Desórdenes fagocíticos	Desórdenes del complemento
Hemograma	Hemograma	Hemograma	Hemograma
Cuantificación de IgA, IgM, IgG	Cuantificación de IgA, IgM, IgG	Marcadores monocitarios (CD14+)	C3, C4 y CH50 o CH100
Determinación de linfocitos B, T, T cooperadores y T citotóxicos supresores	Determinación de linfocitos B, T, T cooperadores y T citotóxicos supresores	Explosión de oxígeno por citometría de flujo (actividad de NADPH oxidasa)	
Respuesta de anticuerpos (sobre todo en déficit de IgA sintomáticos)	Células CD3+, CD4+, 5RA+ (linfocitos T naïve) y CD3+, CD+, 45RO+ (linfocitos T de memoria)	CD18 y CD11 (si procede)	
Radiografía de tórax	Radiografía de tórax	Radiografía de tórax	

IL: interleucina; IFN- $\gamma$ : interferón gamma; PKC: fosfocinasa C; PMA: forbol-miristol-acetato; TCR: receptores de la célula T; TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

y proliferación celular final, es normal. Por el contrario, una proliferación disminuida significa algún trastorno de la vía a partir del punto de actuación del mitógeno. Así, utilizando diversos mitógenos o antígenos, se puede llegar a conocer dónde se encuentra el trastorno funcional del linfocito T<sub>H</sub>.

### Cribado de inmunodeficiencia primaria<sup>5</sup>

El escrutinio inicial de laboratorio de IP debe estar centrado en el paciente, dependiendo de la historia personal y familiar y de las manifestaciones clínicas (tabla 1). Después debe establecerse un protocolo paso a paso hasta llegar al diagnóstico mediante otras pruebas de CF (tablas 2 y 4), test de proliferación linfocitaria (tabla 5) y estudios de genética y biología molecular.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía



- Importante
- Muy importante
- Epidemiología
- Metanálisis
- Ensayo clínico controlado

1. ●● Bonilla FA, Bernstein IL, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank M, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005;94:S1-S63.
2. ●● Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125: S182-94.

3. McCusker C, Warrington R. Primary immunodeficiency. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2011;7: Suppl 1:S11.
4. ●● Oliveira JB, Fleisher TA. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:S295-305.
5. ●● De Vries, for the Clinical Working Party of the European Society for immunodeficiencies. Patient-centred screening for primary immunodeficiency, a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists: 2011 update. *Clin Exper Immunol.* 2012;167:108-19.
6. Bustamante J, Zhang SY, Von Bernuth H, Abel L, Casanova JL. From infectious diseases to primary immunodeficiencies. *Immunol Allergy Clin N Am.* 2008;28:235-58.
7. Bousfiha A, Picard C, Boisson-Dupuis S, Zhang SY, Bustamante J, Puel A, et al. Primary immunodeficiencies of protective immunity to primary infections. *Clin Immunol.* 2010;135:204-9.
8. ● Cunningham-Rundles C. Autoimmunity in primary immune deficiency: taking lessons from our patients. *Clin Exper Immunol.* 2011;164:S6-S11. doi: 4388.6.11.
9. Boileau J, Mouillot G, Gérard L, Carmagnat M, Rabian C, Oksenhendler E, et al. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: Correlation with lymphocyte phenotype in the French DEFI study. *J Autoimmunity.* 2011;36:25-32.
10. Chapel H, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CIVDs) and the management of patients with these conditions. *Br J Haematol.* 2009;145:709-22.
11. ● Goyal R, Bulua AC, Nikolov NP, Schwartzberg PL, Siegel RM. Rheumatologic and autoimmune manifestations of primary immunodeficiency disorders. *Curr Opin Rheumatol.* 2009;21:78-84.
12. Versky JW, Chatila TA. T-regulatory cells in primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2011;11: 539-44.
13. Mouillot G, Carmagnat M, Gérard L, Garnier JL, Fieschi C, Vince N, et al. B-cell and T-cell phenotypes in CIVD patients correlate with the clinical phenotype of the disease. *J Clin Immunol.* 2010;30:746-55.
14. Ochs HD, Thrasher AJ. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:725-38.
15. Ochs HD, Filipovich AH, Veys P, Cowan MJ, Kapoor N. Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, clinical and laboratory manifestations, and treatment. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:84-90.
16. Ochs HD, Notarangelo LD. Structure and function of the Wiskott-Aldrich protein. *Curr Opin Hematol.* 2005;12:284-91.
17. Holland SM, DeLeo FR, Eloumi HD, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, et al. STAT3 mutations in the Hyper-IgE Syndrome. *N Engl J Med.* 2007;357:1608-19.
18. Zhang Q, Davis JC, Lamborn IT, Freeman AF, Jing H, Favreau AJ, et al. Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations. *N Engl J Med.* 2009;361:2046-55.
19. Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010;38:3-10.
20. Seger RA. Modern Management of chronic granulomatous disease. *BMJ.* 2008;140:255-66.
21. Krishna MT, Tarrant JL, Cheadle EA, Noorani S, Hackett S, Huissoon AP. An audit of lymphopenia in infants under 3 months of age. *Arch Dis Child.* 2008;93:90-1.
22. ●● Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies (PIDs) presenting with cytopenias. *Hematology.* 2009;139-143.
23. Heeney MM, Zimmerman SA, Ware RE. Childhood autoimmune cytopenia secondary to unsuspected common variable immunodeficiency. *J Pediatr. Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009;139-43. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.139.
24. Pasic S. Autoimmune cytopenia in common variable immunodeficiency. *J Pediatr.* 2004;144:689.
25. Bader-Meunier B, Guitton C, Lorotte S. Childhood autoimmune cytopenia, common variable immunodeficiency and sarcoidosis. *J Pediatr.* 2004;145:861.
26. ●● Cunningham-Rundles C. How I treat common variable immunodeficiency. *Blood.* 2010;116:7-15.



27. Beel K, Cotter MM, Blatny J, Bond J, Lucas G, Green F, et al. A large kindred with X-linked neutropenia with an I294T mutation of the Wiskott-Aldrich syndrome gen. *Br J Haematol.* 2008;144:120-6.
28. ● Oliveira JB, Fleisher TA. Molecular-and flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency disorders. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2010;10:460-7.
29. ● Oliveira JB, Notarangelo LD, Fleisher TA. Applications of flow cytometry for the study of primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;499-509.
30. ● ● O'Gorman RMC. Role of flow cytometry in the diagnosis and monitoring of primary immunodeficiency disease. *Clin Lab Med.* 2007;27:591-626.
31. Driessen G, Van der BurG M. Primary antibody deficiencies. *Eur J Pediatr.* 2011;170:693-702.
32. Fried AJ, Bonilla FA. Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibodies deficiencies and infections. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:396-414.
33. Park MA, Li JT, Hagan JB, Maddox DE, Abraham RS. Common variable immunodeficiency: a new look at and old disease. *Lancet.* 2008;372:489-502.
34. Werh C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EURO-class trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood.* 2008;111:77-85.
35. Thiel J, Kimmig L, Salzer U, Grudzien M, Lebrecht D, Hagen T, et al. Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:801-10.
36. Oliveira JB, Blesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, et al. International Workshop lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood.* 2010;116:35-40.
37. Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C. Lymphocyte activation. En: Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C, editores. *Immunology.* 1.ª ed. Philadelphia/Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 121-38.

## Bibliografía recomendada

**Bonilla FA, Bernstein IL, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, M. Frank, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005;94:S1-S63.**

*Este excelente trabajo puede ser considerado casi como libro de consulta para el diagnóstico de las inmunodeficiencias primarias (IP). Su extensión (63 páginas) viene justificada por incluir una breve descripción de todas las IP, su diagnóstico (citometría de flujo, estudios funcionales de linfocitos), el defecto genético e incluso el tratamiento. Lo más relevante: incluye varios esquemas de flujo para el diagnóstico de las diferentes IP, a través de los cuales es fácil transitar en el diagnóstico de las IP. A pesar de que es un trabajo de hace 7 años, su vigencia no ha decrecido.*

**O'Gorman RMC. Role of flow cytometry in the diagnosis and monitoring of primary immunodeficiency disease. *Clin Lab Med.* 2007;27:591-626.**

*El presente trabajo ofrece una excelente revisión de la importancia de la citometría de flujo en el diagnóstico de las IP, sin renunciar a una breve descripción clínica en el contexto del defecto funcional o genético. Presenta, como ejemplos, varios gráficos de CF en diferentes IP, en los que el lector interesado se puede detener para familiarizarse con la lectura de esta técnica.*

**De Vries for the Clinical Working Party of the European Society for immunodeficiencies. Patient-centred screening for primary immunodeficiency, a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists: 2011 update. *Clin Exper Immunol.* 2012;167:108-19.**

*Este artículo presenta el diagnóstico de las IP centrado en el paciente (según los datos de la historia personal y familiar y las manifestaciones clínicas), con varias tablas, en las que se describe paso a paso las actuaciones diagnósticas necesarias según el tipo de IP que se sospecha.*

**Oliveira JB, Fleisher TA. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:S295-305.**

*A primera vista, este trabajo, por su sencillez y brevedad, puede parecer insuficiente para tratar un tema tan extenso y variado como es la evaluación de las IP mediante pruebas de laboratorio. Sin embargo, contiene, de forma abreviada y perfectamente sistematizada, toda la información necesaria sobre lo que el laboratorio ofrece en el diagnóstico de las IP.*