



Test de activación de basófilos.

Se trata de una técnica ya utilizada hace años, pero que gracias a su más reciente combinación con la citometría de flujo ha mejorado su sensibilidad y especificidad. En los últimos años su aplicación clínica se ha extendido, utilizándose, fundamentalmente, en el estudio de alergias a medicamentos, como escalón previo a la prueba de exposición. También es de utilidad en alergia alimentaria, para monitorizar la eficacia de la inmunoterapia, en los procedimientos de desensibilización y en el estudio de procesos alérgicos en los que no se puede detectar por los métodos convencionales la existencia de IgE específica.

En el Servicio de Alergia del Hospital LaFe, se realiza por medio de un kit comercial (**Basotest®**), que es un kit reactivo para la determinación cuantitativa de la degranulación de basófilos en sangre humana entera heparinizada. Por medio de este kit se determina el porcentaje de granulocitos basófilos que se han degranulado tras la incubación con el alérgeno y se compara con una estimulación inespecífica (inducida por fMLP) y con la estimulación basal del paciente. A diferencia de la técnica inicial, que se realizaba contando a través del microscopio las células degranuladas, actualmente la evaluación de la degranulación se realiza mediante citometría de flujo. Este método se correlaciona bien con ensayos de liberación de histamina.

Aplicación

El test de activación de basófilos (**Basotest®**) permite el diagnóstico de la hipersensibilidad de tipo inmediato (reacciones de tipo I, en las que participan los anticuerpos IgE) y acelerado (reacciones de tipo 2), especialmente en respuesta a de tipo retardada con participación de otros tipos de células (como las reacciones de tipo IV).

Procedimiento

Los granulocitos basófilos son los leucocitos circulantes menos comunes en la sangre y representan solamente del 0,5 al 1% de la población total de glóbulos blancos. Los anticuerpos IgE específicos de antígeno se unen a los receptores Fc de gran afinidad en la membrana de los mastocitos tisulares y basófilos. El procedimiento incluye la utilización del péptido quimiotáctico N-formyl-Met-Leu-Phe-(fMLP) como control positivo, un reactivo bicolor con anticuerpos para evaluar la activación basófilos humanos y otros reactivos necesarios para la realización del ensayo.

La sangre entera heparinizada se incuba primero con un tampón de estimulación durante 10 minutos a 37°C, después con alérgenos a diversas concentraciones durante 20 minutos a 37°C. El reactivo E que contiene el péptido N-formyl-Met-Leu-Phe-(fMLP) se utiliza como control positivo y la solución limpiadora o tampón de lavado se utiliza como control negativo. La unión de los alérgenos a la IgE presente en la superficie celular induce la activación de los basófilos, provocando la fusión de

gránulos citoplásmicos con la membrana plasmática y de esta manera se liberan los mediadores inflamatorios. El proceso de degranulación se detiene mediante la incubación de las muestras de sangre en hielo. A continuación, las células se marcan con un reactivo bicolor con anticuerpos compuesto por dos diferentes anticuerpos monoclonales conjugados con diversos fluorocromos. El anticuerpo monoclonal anti-IgE-PE se conjuga con ficoeritrina, reaccionando con IgE humana y, por lo tanto, detectando basófilos. El anticuerpo monoclonal anti-CD63-FITC se conjuga con isotiocianato de fluoresceína y reconoce la glicoproteína gp53 (CD 63) expresada en los basófilos activados. Tras la tinción de los basófilos con los anticuerpos, los eritrocitos se eliminan mediante una solución de lisis, una centrifugación, un último lavado con solución limpiadora y otra centrifugación. En este punto el porcentaje de basófilos activados se determina mediante citometría de flujo.

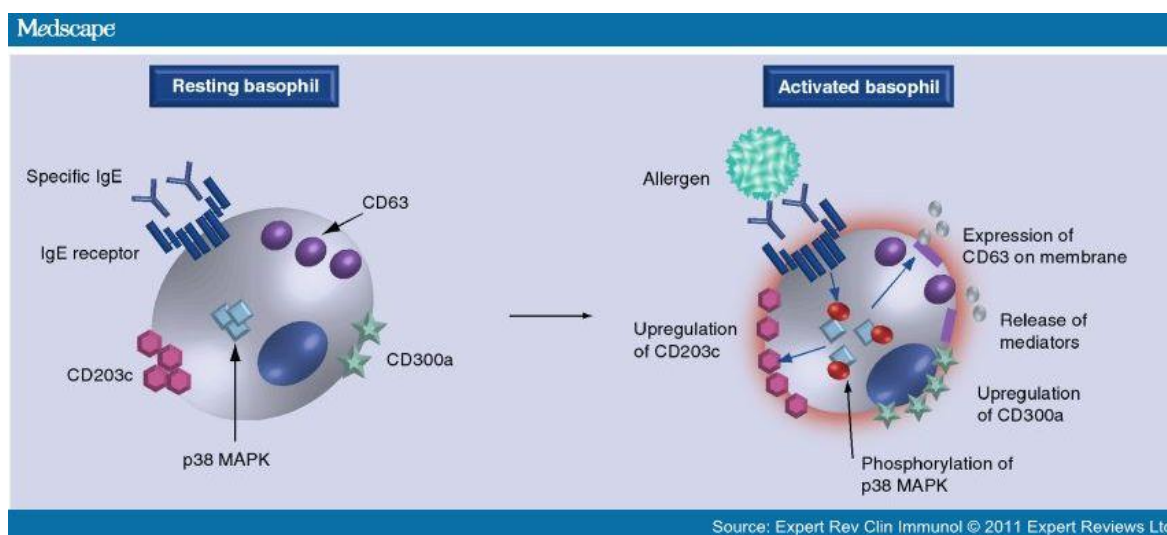


Figura 1. Modelo de activación de un basófilo.

Análisis mediante citometría de flujo

Las células se analizan mediante citometría de flujo utilizando luz de excitación azul-verde (488nm).



Figura 2. Citómetro de flujo FACScan.

Se trata de un análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en un flujo laminar en suspensión de partículas que circula por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula produce señales (de dispersión y fluorescencia) que se detectan y pueden cuantificarse. Se pueden detectar unas 5000 partículas/segundo.

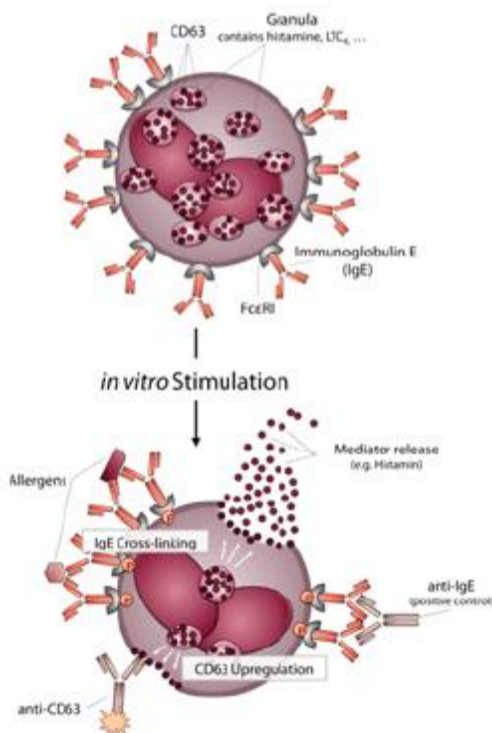


Figura 3. Activación de basófilos y marcadores detectables por medio de citometría



Los fluorocromos conjugados en citometría usados en el test de activación de basófilos son el FITC (isotiocianato de fluoresceína) y el PE (ficoeritrina), éste último tiene un gran poder de absorción, rendimiento y fotoestabilidad. Ambos pertenecen al grupo de los marcadores fluorescentes de unión covalente.

FITC (máximo de excitación 494nm/máximo de emisión 520nm), es un fluorocromo sensible a cambio de pH y fotoblanqueo. En el test de activación de basófilos nos da información sobre el marcador de membrana CD63.

PE (máx. excitación 496nm/ máximo de emisión 578nm), es un pigmento fotosintético que se encuentra en las algas rojas. Es el fluorocromo más brillante en citometría de flujo, pero sus propiedades de fotoblanqueo lo hacen inadecuado para microscopía de fluorescencia. Identifica los basófilos, ya que éstos poseen IgE en superficie.

Interpretación de resultados

La estimulación basal se obtiene en base al porcentaje de basófilos activados en el control negativo, siendo ésta la activación normal de los basófilos en el individuo estudiado. En el control positivo se induce una activación excesiva con fMLP.

Cuando los porcentajes de activación de basófilos en las muestras problema con las distintas concentraciones de alérgeno son, por norma general, mayores al 5% se considera resultado positivo, es decir, se confirma alergia. A veces suelen aparecer estimulaciones basales muy altas (>5%) que pueden complicar la determinación de alergia. Para solventar este hecho se calcula el índice de estimulación:

$$\text{IE} = \% \text{ activación para la concentración de alérgeno } / \% \text{ activación basal (C-)}$$

Si IE es mayor o igual a 2 el test se considera positivo (alergia).

Otro parámetro que se puede evaluar en el test de activación de basófilos es el CD-sens. Este valor mide la sensibilidad del paciente a un determinado alérgeno. Se calcula como el inverso de la concentración de alérgeno necesaria para conseguir una activación basofílica del 50%.

$$\text{CD-sens} = (1/\text{Conc } 50) \times 100$$

Por tanto, cuanto menor sea la sensibilidad del paciente al alérgeno mayor será la concentración de éste para lograr una activación del 50% y por tanto el nivel de CD-sens será menor.



Ramón López Salgueiro
Belén García Lorenzo
Dolores Hernández F. de Rojas
Servicio de Alergia
Hospital La Fe, Valencia