

METODOS INMUNOENZIMATICOS

Vargas Burgoa Oscar Alexandro¹
Colaboración: Velarde Guarachi Edith Elsa²

RESUMEN

La observación y estudio de los elementos patógenos en un organismo infectado es una práctica esencial para el diagnóstico y futuro tratamiento de una enfermedad, por lo tanto se debe realizar un estudio más profundo implementando exámenes laboratoriales, para lo cual se debe obtener un producto biológico que pueda ser transportado al laboratorio o examinado en ese momento.

El aislamiento del elemento patológico en un cultivo es fundamental para lograr la correcta observación, análisis y diagnóstico de una determinada enfermedad.

Un importante recurso para la determinación del elemento patológico es marcar a los elementos con anticuerpos policlonales u monoclonales para que así estos conformen el complejo antígeno – anticuerpo pudiendo mejorarse su estudio utilizando complementariamente fluorescencia y de ésta manera el observador puede identificar el tipo de microorganismo causante de la enfermedad.

Existen distintos mecanismos de los cuales los más relevantes son la inmunofluorescencia, el radioinmunoanálisis y la inmuoabsorción ligada a enzimas.

PALABRAS CLAVE

Antígeno. Anticuerpo. Especificidad. Sensibilidad. Ensayo. Diagnóstico. Aglutinación.

¹Univ. Tercer Año Facultad de Odontología UMSA
²Univ. Tercer Año Facultad de Odontología UMSA

ABSTRACT

The observation and study of pathogens in an infected organism is an essential practice for future diagnosis and treatment of disease, therefore you must make a deeper study implementing laboratory tests , for which you must obtain a biological product it can be transported to the laboratory and examined at that time.

Isolation of pathological element in culture is essential to achieve the correct observation, analysis and diagnosis of a particular disease.

An important resource for determining the pathological element is to mark the elements with polyclonal or monoclonal antibodies so that these conform the antigen - antibody can be improved complementary study using fluorescence and in this way the observer can identify the type of organism causing disease .

There are different mechanisms of which the most important are immunofluorescence, radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent.

KEY WORDS

Antigen.Antibody. Specificity. Sensitivity. Test. Agglutination.

INTRODUCCION

En la actualidad el uso de laboratorios de microbiología clínica es uno de los principales métodos de diagnóstico para las enfermedades infecciosas, gracias al uso de técnicas como el radioinmunoanálisis y el enzimoimunoanálisis los cuales logran identificar directamente los antígenos

microbianos presentes en la muestra sujeta a ser estudiada.

El inmunoensayo es una técnica que básicamente se basa en la reacción antígeno – anticuerpo (Ag – Ac) la cual permitirá determinar y cuantificar los distintos elementos que existen en la muestra de estudio debido a que la mayor parte de los agentes patógenos tienen determinados antígenos como proteínas y polisacáridos que pueden ser claramente diferenciados, por lo general la muestra de estudio son fluidos orgánicos. Las técnicas inmunológicas deben ser sensibles, rápidos, convenientes y además lo suficientemente específicos como para no interferir con sustancias de poco interés, las técnicas más empleadas en la actualidad son la inmunofluorescencia, la fijación de complemento, el radioinmunoensayo, inmunoabsorbencia, hemaglutinación, inhibición de la hemaglutinación, neutralización, aglutinación y la inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA).¹⁻³

TIPOS DE INMUNOENSAYO

Pueden ser:

a) *Inmunoensayo competitivo*: Este tipo de inmunoensayo se basa en el equilibrio competitivo entre una inmunoespecie (Ag o Ac) conjugada con una determinada enzima y de esta forma se cuantificará la actividad de la enzima en la superficie del transductor al formarse el complejo, habrá una competencia por formar el complejo con la enzima entre los antígenos que no fueron marcados (Ag) y los antígenos marcados (Ag*) cuanto más Ag haya en la muestra menos Ag* se unirá a la enzima limitando la cuantificación y los resultados deseados.

b) *Inmunoensayo no competitivo o tipo sándwich*: En este tipo de inmunoensayo el analito se une con el transductor, inmediatamente después se agrega un segundo anticuerpo marcado por una enzima (Ac*) que se dirige con especificidad a el epítipo del analito, este epítipo debe ser diferente al que permite la formación del complejo inmunológico. Posteriormente se agregará sustrato en exceso y se cuantificará la actividad de la enzima en la superficie del transductor. En otras palabras, se agregará Ac* en exceso a la muestra, el Ag reaccionará con dos Ac diferentes que se fijarán a él en distintas partes (doble reconocimiento). El principal inconveniente de este tipo de inmunoensayo es el efecto Hook en elevadas concentraciones de analito ya que provocará la caída de la radioactividad deseada.²⁻⁴

TECNICAS DE REACCION ANTIGENO – ANTICUERPO DE INTERACCION PRIMARIA

Donde se encuentran:

a) *Radioinmunoanálisis (RIA)*: El RIA es un ensayo de laboratorio de tipo de unión competitiva que va a combinar la inmunoreacción (Ag – Ac) con la sensibilidad de un método radioquímico, de ahí su nombre Radio – Inmuno – análisis.

Esta técnica fue introducida por Rosalind Yalow y Salomón Berson en 1956 con la finalidad de poder cuantificar la cantidad de insulina que se encontraba en el torrente sanguíneo de un paciente con diabetes, ellos intentaban descubrir el grado de degradación y eliminación de la insulina en un paciente diabético, administraron insulina con un radio isotopo y

lograron observar que la insulina quedaba en el plasma un tiempo mucho más prolongado que en un paciente sano, esto debido a la presencia de anticuerpos antiinsulínicos, los cuales se unían a los receptores de la hormona impidiendo que pasara a través de las paredes de los vasos sanguíneos. De esta forma se demostró que la reacción antígeno – anticuerpo podía servir de base para cuantificar los elementos presentes en el plasma.^{2, 4}

- b) *Técnica de inmunofluorescencia*: Las técnicas de inmunofluorescencia son una alternativa a los métodos del enzoinmunoanálisis (EIA), se utilizan para la detección y diagnóstico de enfermedades causadas por bacteria, fúngicas, víricas y parasitarias. En los ensayos de inmunofluorescencia el anticuerpo específico está unido a otro elemento capaz de foto – excitarse, las moléculas que no reaccionan serán eliminadas por el lavado, luego la muestra se seca y es examinado con un microscopio de fluorescencia, los antígenos que forman complejos con los anticuerpos fluorescentes serán observados como elementos verdes o naranjas contra un fondo oscuro.

Existen dos tipos de técnica por inmunofluorescencia:

- *Inmunofluorescencia directa* (IFD). Consiste en la aplicación de un conjugado previamente marcado sobre el tejido o muestra que se quiera examinar, se dejará incubar por un periodo de 35 minutos en un ambiente húmedo a 37° C para que la unión Antígeno – anticuerpo sea el ideal. Pasado el tiempo de incubación se procede a lavar la muestra para eliminar el material que

no reaccionará y se secará para ser montado en el microscopio de fluorescencia.

- *Inmunofluorescencia indirecta* (IFI). El material será impregnado con una sustancia inmune sin ser marcada y luego se dejará incubar por un periodo de 45 minutos en un ambiente húmedo a 35 – 37° C, posteriormente se lava la muestra con una solución de fosfato salino (buffer), se administra un antisuero marcado y posteriormente se elimina el material inespecífico con un nuevo lavado.

Los métodos de inmunofluorescencia ya sean directos o indirectos son de gran utilidad para el diagnóstico y observación de microorganismos como ser el *T. pallidum*, *C. trachomatis*, virus del herpes simple, virus de varicela – zóster, virus de la influenza, virus parainfluenza, *Pneumocystis jiroveci*, *G. lamblia* y *C. parvum*.⁵⁻⁶

- c) *Metodo de inmunoabsorbencia unida a enzimas* (ELISA): La técnica de inmunoabsorbencia unida a enzimas es una de las técnicas más empleadas debido a su gran capacidad de sensibilidad y a su bajo costo, además permite realizar gran número de estudios en un tiempo corto. Este método está basado en la capacidad de detección directa o indirecta de complejos Antígeno – Anticuerpo marcados cuantificables mediante su observación. Utiliza “*transportadores*” las cuales se fijaran a los Ag o Ac.

La forma para realizar y preparación de esta técnica es muy similar al de RIA, la diferencia está en que se utilizará un diferente tipo de ligando, la cual detectará y se unirá covalentemente a una enzima y este anticuerpo se unirá al antígeno,

posteriormente se lavará la muestra para eliminar el material que no conforme el complejo deseado. El ligado formado se observada una vez se añada cromógeno el cual interactuará con la enzima del ligando para poder formar una sustancia con color y cuantificable por espectrofotometría. Las enzimas más usadas son la fosfatasa alcalina, la peróxidasa y la beta-galactosidasa⁶⁻⁷

TECNICAS DE REACCION ANTIGENO – ANTICUERPO DE INTERACCION SECUNDARIAS

Donde se encuentran:

a) *Aglutinación* : Existen dos diferentes tipos de reacciones de aglutinación:

- Reacción de aglutinación simple. Este tipo de aglutinación se presenta en el caso de bacterias, hongos y glóbulos rojos, los cuales entran en contacto directo con el anticuerpo que se administra a la muestra, aglutinándose de manera veloz y formando cúmulos que son fácilmente percibidos por la vista del observador. Esta técnica se utiliza por ejemplo en la aglutinación de cándida y en la determinación de grupo sanguíneo.
- Reacción de aglutinación pasiva. Se utiliza esta técnica para la evidenciar antígenos que son solubles, y por lo tanto al entrar en contacto con el anticuerpo se precipitará. Para revertir o eliminar este proceso el antígeno o anticuerpo se fijará a partículas insolubles. El empleo de esta técnica es apreciable por ejemplo en la

determinación de proteínas víricas, reacciones con látex para PCR y embarazos.⁶

- b) *Prueba de la inhibición de la hemaglutinación:* Este tipo de pruebas se utiliza con mucha frecuencia para la detección y diagnóstico de enfermedades causadas por virus tales como el ortomixovirus, paramixovirus, flavivirus e incluso para el virus de la rubéola, estos virus poseen proteínas codificadas en sus superficies que causarán la aglutinación de los eritrocitos, pudiendo detectarse la presencia de alguno de estos virus en tejidos infectados por la hemaglutinación, la identificación del virus que está presente en el suero del paciente puede determinarse por medio de la inhibición de la hemaglutinación. Las condiciones y reactivos varían según el tipo de virus.

El método para realizar esta prueba es incubar una solución de eritrocitos hasta que se produzca la hemaglutinación, posteriormente se tratará el suero eliminando los inhibidores inespecíficos pudiendo eliminarse por medios físicos, enzimáticos o ambos, dependiendo del virus. Luego se mezcla una disolución del antígeno que contenga 4 UHA, la muestra se incuba para la prueba de hemaglutinación.⁸

- c) *Reacción de precipitación:* La reacción de precipitación se fundamenta en la interacción Ag – Ac pero requiere de más interacciones para lograr evidenciar el complejo, es decir no es una técnica muy sensible. Un factor importante en esta técnica es calcular la concentración de Ag o Ac, los cuales deben estar en cantidades iguales debido a que si existe una mayor

cantidad de Ag no existirá entrecruzamiento (fenómeno de la post-zona) o de lo contrario, si existe una mayor cantidad de Ac tampoco existirá entrecruzamiento (fenómeno de pro-zona) en ninguno de los dos casos se observará la precipitación.^{5,9}

d) *Técnicas inmunolectroforéticas:* En esta técnica se usa la combinación de la electroforesis y la precipitación para la identificación de antígenos o anticuerpos modificando los valores del pH. Para que de esta forma los antígenos migren y los anticuerpos permanezcan inmóviles y se forme el complejo Ag – Ac. Dentro de este grupo de técnicas están :

- Inmunolectroforesis. Este método se basa en la separación de electroforética de los antígenos en un gel seguidos de la administración de antiseros específicos. Luego de un lapso entre 8 – 24 horas se puede observar las bandas de precipitación, una vez identificadas las bandas se puede lavar y colorear la muestra.
- Inmunolectroforesis en cohete. Consiste en el transporte de proteínas antigénicas a través de una lámina agarosa la cual contiene al anticuerpo específico que estará inmóvil gracias a la graduación del pH y el paso de electrones.
- Inmunolectroforesis cruzada. Consiste en la separación de las proteínas séricas y los anticuerpos gracias a una fase de electroforesis en un gel de agarosa, posteriormente se realizará una nueva electroforesis para que los

anticuerpos se fijen y los antígenos migren y conformen el complejo Ac – Ag.⁵

e) *Prueba de neutralización ASTO:* El ASTO se utiliza para lograr evidenciar los anticuerpos en contra de la estreptolisina, la cual es una enzima producida por los estreptococos, la cual produce destrucción de glóbulos rojos. Esta prueba es de gran ayuda para identificar enfermedades tales como la fiebre reumática aguda y la glomerulonefritis.^{5, 10}

BIBLIOGRAFIA

1. Arce V., Catalina P., Mallo F. Endocrinología. Capítulo: metodología en el laboratorio clínico: el inmunoensayo [en línea]. Santiago – Chile. Universidad de Santiago de Compostela. 2006:384 – 394. . [Fecha de acceso 3 de mayo de 2014]. URL disponible en: <http://www.books.google.com.bo/books?id=wXVb4jwwU-oC&pg=PA4&dq=V%C3%ADctor+M.+Arce,+Pablo+F.+Catalina,+Federico+Mallo&hl=es&sa=X&ei=v15pU6i3KlpyAS5z4CwBg&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q=V%C3%ADctor%20M.%20Arce%2C%20Pablo%20F.%20Catalina%2C%20Federico%20Mallo&f=false>
2. Alegret S, Del Valle M., Merkoçi A.. Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y biosensores: curso teórico-práctico[en línea]. Capítulo sensores electroquímicos. Cataluña-España. Universidad autónoma de Barcelona. 2004: 67 – 80. . [Fecha de acceso 3 de mayo de 2014]. URL disponible en: <http://www.books.google.com.bo/books?id=r39got4r0UgC&printsec=frontcover&dq=Salvador+Alegret,+Manel+del+Valle,+Arben+Merko%C3%A7i&>

- hl=es&sa=X&ei=W15pU5nxHIGsyASGsoHYBw&ved=0CDgQ6AEwAA#v=onepage&q=Salvador%20Alegret%20C%20Manel%20del%20Valle%20C%20Arben%20Merko%20C3%A7i&f=false
3. Koneman E.W., Allen S. Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color[en línea]. Capítulo: Diagnóstico de enfermedades causadas por virus, chlamydia, Rickettsia y microorganismos relacionados. Buenos Aires – Argentina. Editorial Médica Panamericana .2008:1271 – 1291. [Fecha de acceso 3 de mayo de 2014]. URL disponible en: <http://www.books.google.com.bo/books?id=jyVQueKro88C&printsec=frontcover&dq=3.%09Elmer+W.+Koneman,+Stephen+Allen&hl=es&sa=X&ei=SF1pU8OKDcm2yASRuoKADw&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q=3.%09Elmer%20W.%20Koneman%20C%20Stephen%20Allen&f=false>
4. Romero Cabello R. Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Capítulo: Diagnostico en enfermedades virales. México D.F. Editorial Médica Panamericana. 2007: 255 – 263.
5. Siachoque. H.O. Inmunología. Diagnóstico e interpretación de pruebas de laboratorio. Capítulo: laboratorio en clínica [en línea]. Colombia. Editorial. Centro Editorial Universidad de Rosario. 2006:17 – 24. [Fecha de acceso 3 de mayo de 2014]. URL disponible en: http://www.books.google.com.bo/books/about/Inmunolog%C3%ADa_Diagn%C3%B3stico_e_interpretaci.html?id=KthmqoNj8Vkc&redir_esc=y
6. Fiorentino Gómez S, Rueda Ardila N.S., Gutiérrez M. F. La inmunología en el diagnóstico clínico. Capítulo: relación antígeno anticuerpo interacción primaria [en línea]. Capítulo: relación antígeno anticuerpo interacción. Bogotá - Colombia. Editorial: CEJA.1994: 73 – 120. . [Fecha de acceso 3 de mayo de 2014]. URL disponible en: <http://www.books.google.com.bo/books?id=R3Hn3NMt0zsC&printsec=frontcover&dq=Susana+Fiorentino+G%C3%B3mez,+Nelly+Susana+Rueda+Ardila,+Mar%C3%ADa+Fernanda+Guti%C3%A9rrez&hl=es&sa=X&ei=j2BpU9HkHoWpyATDiIKYAw&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q=Susana%20Fiorentino%20G%C3%B3mez%20C%20Nelly%20Susana%20Rueda%20Ardila%20C%20Mar%C3%ADa%20Fernanda%20Guti%C3%A9rrez&f=false>
7. Morchón García R. Mecanismos celulares y moleculares de la patología vascular de la dirofilariosis cardiopulmonar. El papel de las filarias y de los endosimbiontes del género Wolbachia[en línea]. Capítulo: Estudio de cultivo de células endoteliales. España. Edición: universidad de Salamanca. 2009: 96 – 111. . [Fecha de acceso 3 de mayo de 2014]. URL disponible en: <http://www.books.google.com.bo/books?id=r1lubn1-cKEC&printsec=frontcover&dq=Rodrigo+Morch%C3%B3n+Garc%C3%ADa&hl=es&sa=X&ei=0mBpU4uKEZKxyAS5loDYBA&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q=Rodrigo%20Morch%C3%B3n%20Garc%C3%ADa&f=false>
8. Montero C. Manual teórico práctico de técnicas inmunohistoquímicas[en línea]. Capítulo: inicio de los métodos inmunoenzimáticos. México.Editorial Universitaria Potosina.1997: 17 – 20. [Fecha de acceso 3 de mayo de 2014]. URL disponible en:http://books.google.es/books?id=OC.qgl8lyBbAC8printsec=frontcover&hl=es&output=html_text&source=gs_ge_summary_r&cad=0