

## CAPÍTULO 12

### Inmunodiagnóstico: pruebas primarias

*Lucía María Campero y María Cecilia Venturini*

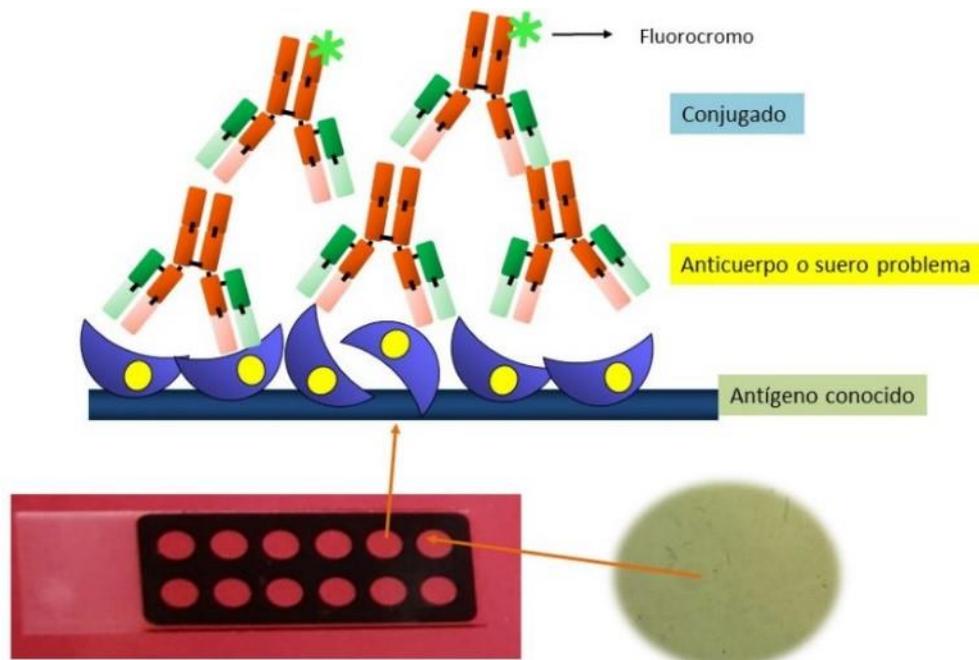
Las pruebas de inmunodiagnóstico se clasifican en: primarias, secundarias y terciarias, según los microgramos de proteínas que sean capaces de detectar. Las pruebas primarias detectan pequeñas cantidades de proteínas y ejemplos de ellas son:

- I. Inmunofluorescencia (IF)
- II. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)
- III. *Immunoblot* (IB)

#### Inmunofluorescencia

Las pruebas de IF se fundamentan en la detección de la unión entre el antígeno con el anticuerpo específico, mediante el uso de un conjugado marcado con un fluorocromo. La lectura de la reacción se realiza con un microscopio de fluorescencia que emite un haz de luz ultravioleta de una determinada longitud de onda, que incide sobre el portaobjeto, excitando al fluorocromo del conjugado, haciendo que éste emita un haz de luz con otra longitud de onda, que será registrada por el ojo del observador. Esta prueba se clasifica en indirecta (IFI) y directa (IFD).

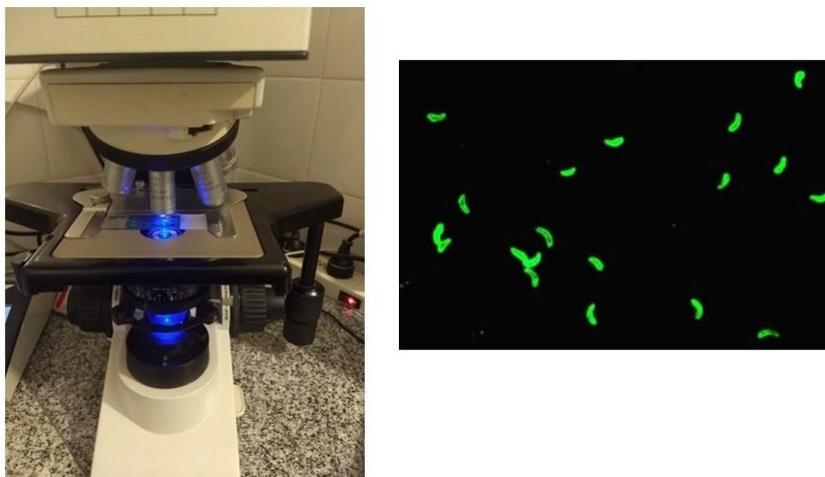
La IFI (Figura 12.1) se fundamenta en la detección de *anticuerpos específicos en sueros problemas* (sueros de animales sospechosos de una determinada enfermedad) utilizando un *antígeno conocido*. El antígeno diagnóstico conocido está ubicado sobre áreas definidas, en un portaobjeto que actúa como soporte. Dicho antígeno es producido en laboratorios especializados, que siguen determinados protocolos para cada agente infeccioso.

**Figura 12.1***Esquema de la Inmunofluorescencia indirecta*

Los pasos de la prueba de IFI se pueden resumir en una primera instancia en que el antígeno diagnóstico conocido se enfrenta al suero problema y se incuba a 37°C durante un período de tiempo, usualmente 30 minutos. Posteriormente, se realiza un lavado, generalmente con una solución bufferada de fosfatos (PBS) en agitación para eliminar todo tipo de unión inespecífica. Si el suero problema tuviera anticuerpos específicos para ese antígeno, quedarán unidos y no serán eliminados mediante el lavado. Como último paso de esta prueba, se adiciona el *conjugado*, formado por la *inmunoglobulina anti-especie* específica marcada con el *fluorocromo*, por ejemplo, *isotiocianato de fluoresceína*. Se incuba nuevamente y se realiza un último lavado. Si en el suero problema había anticuerpos específicos y se produjo la reacción antígeno-anticuerpo, el conjugado anti-especie quedará unido y al observar al microscopio de fluorescencia se detectará fluorescencia periférica completa, identificando al antígeno diagnóstico, lo que se expresará como un resultado *positivo* (Figura 12.2).

**Figura 12.2**

*Derecha: Microscopio de fluorescencia. Izquierda: Microfotografía de un área del portaobjeto con un suero control positivo para Neospora caninum*

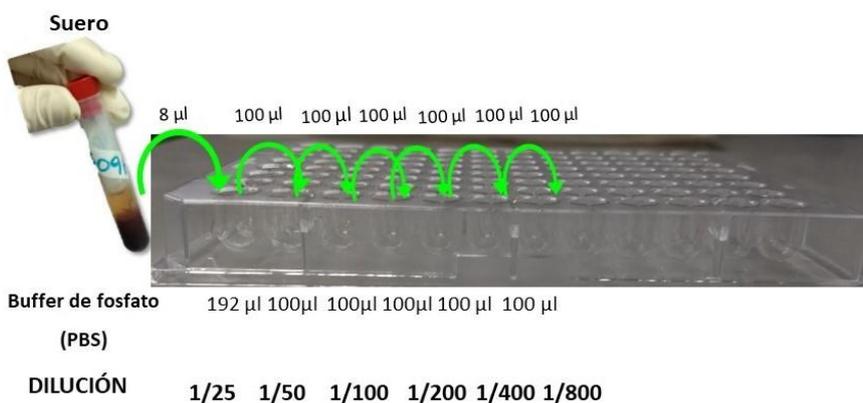


*Nota.* Fotografías: Archivo del Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA), FCV, UNLP

En caso de que no hubiera habido anticuerpos específicos para ese antígeno, al agregar el conjugado anti-especie, éste será eliminado con el lavado. Así, al observar al microscopio no se visualizará fluorescencia, indicando un resultado *negativo*. El suero problema se debe diluir en PBS, según el protocolo de la enfermedad que se desea diagnosticar (Figura 12.3).

**Figura 12.3**

*Demostración de una dilución del suero problema en PBS sobre una placa de dilución*



*Nota.* Fotografías: Archivo del Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA), FCV, UNLP

La *IFD* detecta la presencia de antígenos desconocidos en una muestra biológica problema, utilizando un conjugado *anti-antígeno* específico, que se une al antígeno sospechoso, en el caso de un resultado *positivo*.

**Figura 12.4****Esquema de la Inmunofluorescencia directa****Ej. Diagnóstico de *Campylobacter*: IFD**

Se toma el material sospechoso del abomaso y se coloca sobre el área del portaobjeto.

Los conjugados utilizados en las pruebas primarias indirectas se basan en 1) la obtención y purificación de Igs del suero de diferentes especies y 2) su unión con el fluorocromo, en el caso de IF. Para ello el laboratorio productor, elabora un protocolo de inmunización de un animal receptor, por ejemplo, una cabra, un conejo, un caballo, con Igs purificadas obtenidas de una especie filogenéticamente distante. Las Igs heterólogas, de naturaleza proteica, no son reconocidas por la especie receptora, que como consecuencia generará anticuerpos. Se seguirá un protocolo determinado de inmunización con *Igs de otra especie a un animal receptor* y luego de un tiempo se analizará el título de anticuerpos generados en el animal inoculado. Al corroborar una determinada concentración de Igs producidas de acuerdo con el protocolo de inmunización, se sangra al animal y se procede a la purificación de las Igs. Éstas se unen a un fluorocromo si se tratara de la producción de conjugados para IF o a enzimas si se produjeran conjugados para pruebas inmunoenzimáticas (ELISA e *Immunoblot*).

**Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima. ELISA**

La prueba de *ELISA* o ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima tiene como fundamento la detección de la unión antígeno-anticuerpo mediante el uso de un conjugado que está marcado con una enzima. Esta enzima actuará sobre un sustrato y en presencia de un cromógeno se registrará color (densidad óptica) mediante un lector de ELISA o espectrofotómetro. Las pruebas de ELISA se pueden clasificar en: ELISA directa, indirecta, de captura y de competencia.

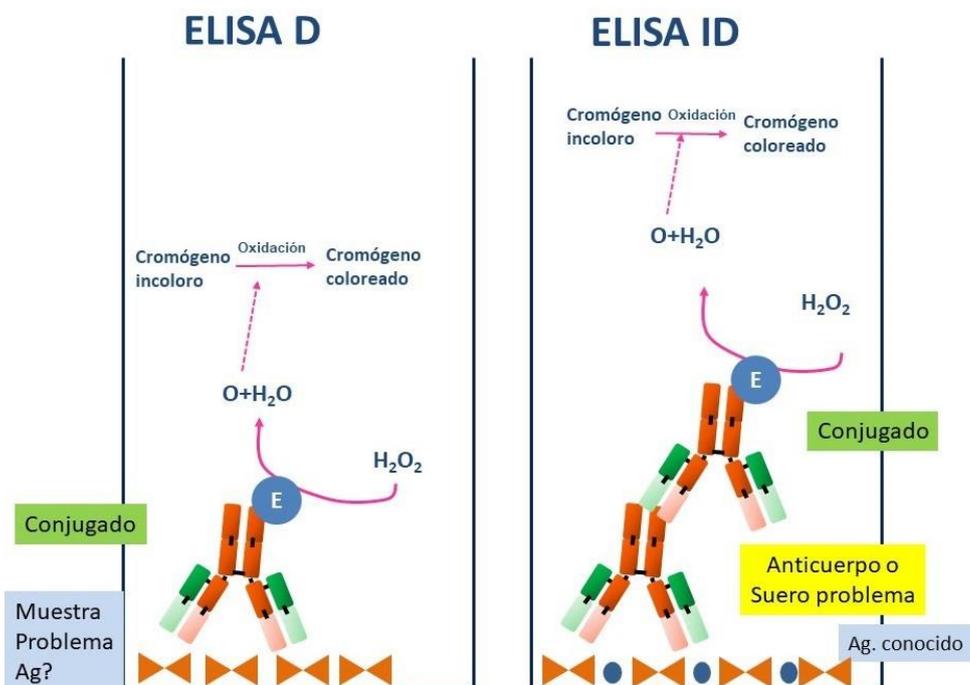
La prueba de *ELISA directa* se utiliza para la búsqueda de *antígenos desconocidos*, mediante el uso de conjugados anti-antígenos marcados con una enzima (Figura 12.5). La muestra biológica (material donde sospechamos puede estar presente el antígeno) se adsorbe en una placa de poliestireno con fondo plano y se enfrenta a un conjugado anti-antígeno marcado con

una enzima, por ejemplo, la enzima peroxidasa. Se realiza una incubación y luego un lavado. Si el antígeno está presente en la muestra biológica, el conjugado quedará unido. Es necesario adicionar en una segunda etapa el sustrato sobre el que actuará la enzima, en este caso, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Junto con el sustrato se adiciona un cromógeno (ej: cloronaftol). El cromógeno es incoloro bajo su forma no oxidada. De modo que, si la enzima contacta con el sustrato, va a escindir al peróxido de hidrógeno en: agua ( $H_2O$ ) + oxígeno (O). Este oxígeno queda libre y al unirse al cromógeno, oxidándolo, se vuelve coloreado. Es esta la coloración que se detecta como densidad óptica, al medir la placa en un espectrofotómetro. Dado que luego de cada incubación se realiza un lavado, en el caso que *no existiera* antígeno en el material biológico, cuando se adiciona el conjugado anti-antígeno marcado con la peroxidasa, no va a tener antígeno para unirse y será eliminado en el lavado. Por eso, al agregar el sustrato con el cromógeno, no se detectará reacción colorimétrica, resultando en una muestra *negativa*.

En la prueba de *ELISA indirecta* el *antígeno diagnóstico es conocido* y se buscan *anticuerpos* específicos en el suero problema (Figura 12.5). Luego de la incubación y lavado se adiciona el conjugado *inmunoglobulina anti-especie específica* unido a una enzima. Se incuba y lava y finalmente se adiciona el sustrato junto con cromógeno y se cuantifica la coloración mediante el espectrofotómetro, como se indicó para el ELISA directo.

**Figura 12.5**

Esquema comparativo de los ELISAS directo e indirecto

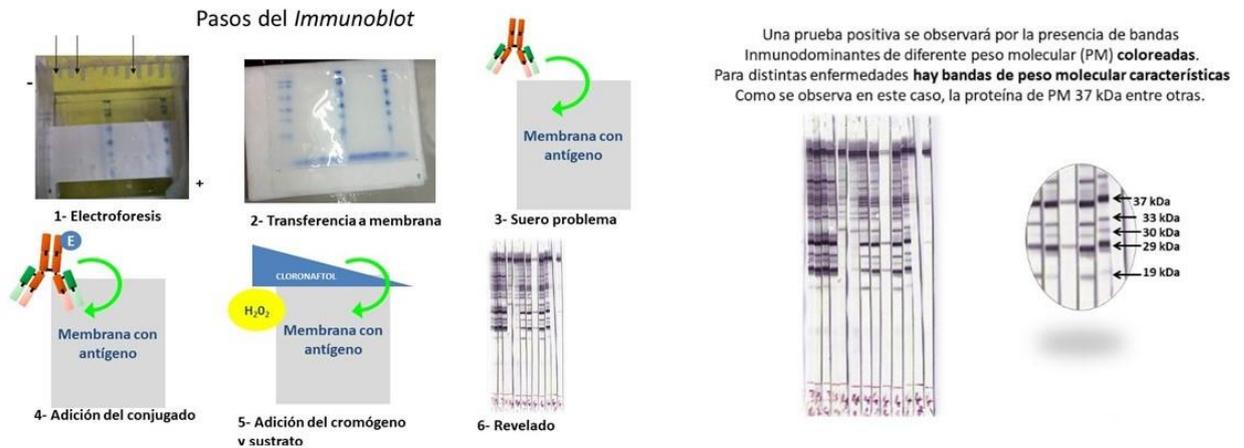


## Immunoblot

La prueba de IB se fundamenta en la detección de inmunoreacciones hacia antígenos inmunodominantes. Para ello, se realiza una corrida electroforética del antígeno en geles de poliacrilamida, con el objetivo de separar el antígeno por tamaño, donde los epitopos más pequeños son los que más migrarán en la corrida. Luego se realiza una inmunotransferencia de esta corrida desde el gel a un soporte más fuerte como membranas de nitrocelulosa o de polivinildifluoreno. Esta membrana con el antígeno separado por peso molecular es lo que actúa como antígeno diagnóstico conocido en la prueba de IB. La membrana será cortada en tiras y cada tira se enfrentará al suero problema. Se realiza una incubación seguida de un lavado, y se adiciona un conjugado anti-especie específico marcado con una enzima. Nuevamente se incubaba y se realiza un lavado y finalmente se adiciona un sustrato y un cromógeno. La detección de inmunoreacciones hacia antígenos inmunodominantes revela un resultado positivo (Figura 12.6).

**Figura 12.6**

*Izquierda: Esquema del inmunoblot. Derecha: revelado final del inmunoblot*



*Nota.* Fotografías: Archivo del Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA), FCV, UNLP