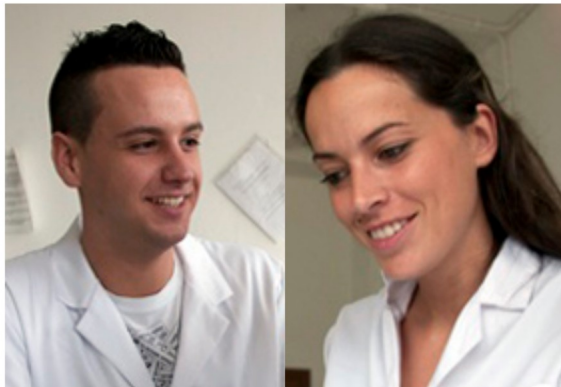


Técnicas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo.

Técnicas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo.

Caso práctico



Carlos y Susana son dos alumnos del ciclo formativo de grado superior, de la especialidad de Laboratorio clínico y biomédico. Los dos empezaron estos estudios pensando que algún día llegarían a trabajar en los laboratorios de un gran hospital. Son buenos compañeros y frecuentemente se encuentran para comentar sus dudas e incluso preparar los exámenes. Desde que iniciaron los estudios, han ido aumentando sus aspiraciones porque con el paso del tiempo ha crecido su interés por los módulos de ciclo.

Carlos es muy ordenado y piensa mucho las cosas cuando ha de tomar una decisión. A menudo Susana le consulta dudas que él le resuelve porque generalmente tiene más estructuradas las nociones sobre un determinado tema. Carlos se está dando cuenta que cada día le gusta más el módulo de Microbiología clínica, en cambio a Susana le están interesando mucho las Técnicas de inmunodiagnóstico.

Susana es completamente diferente, es un poco desordenada y toma las decisiones rápidamente, aunque a veces se equivoca. No obstante dedica bastante tiempo al estudio y para ello utiliza frecuentemente el ordenador. A menudo intenta ampliar

temas utilizando Internet y cuando encuentra algún tipo de material curioso sobre microbiología, siempre se lo comenta a Carlos.

Ahora van a empezar las prácticas, es decir, el módulo de Formación en Centros de Trabajo, en un hospital universitario de su ciudad. Están muy ilusionados porque aunque les han gustado las prácticas y actividades realizadas en su instituto, quieren ver cómo es en realidad el trabajo diario en los laboratorios de un gran hospital.

Casualmente, esta semana, Susana ha pensado ir al hospital en donde van a ir a hacer las prácticas para hacer una donación de sangre. Se lo ha comentado a Carlos para ver si también logra convencerle pero le ha dicho que no está seguro y que ya se lo pensará. En realidad, Carlos cree que, a pesar de todo lo que está aprendiendo en el ciclo, la donación de sangre es aún un proceso que entraña ciertos riesgos, pero sobretodo no ve muy claro cómo se puede disponer de la sangre de donantes anónimos con las debidas garantías para emplearla en transfusiones.

No será la primera vez que Susana hace una donación, así que le explica a Carlos que este tipo de operaciones hoy en día están muy controladas y que, por ejemplo, unos días después de la donación, el donante recibe en su domicilio un informe con una serie de datos sobre la sangre que le han extraído.

En este módulo de Técnicas de inmunodiagnóstico, vas a estudiar las técnicas que se realizan en el laboratorio y que están relacionadas de alguna forma con [antígenos](#) y [anticuerpos](#). Son técnicas que tienen muchas aplicaciones en el diagnóstico de alteraciones patológicas pero también en situaciones no patológicas, piensa por ejemplo en la determinación de grupos sanguíneos o en los tests de embarazo. También vas a estudiar cómo se diagnostican alteraciones que tienen su origen en el propio sistema inmunitario. En esta unidad de trabajo se presentan las técnicas más básicas y habituales que se realizan en el laboratorio de inmunología. Está organizada en dos partes. En el primer apartado estudiarás técnicas de aglutinación y precipitación, y en el segundo apartado estudiarás los diferentes tipos de inmunoensayos.



Materiales formativos de FP Online propiedad del Ministerio de Educación y Formación Profesional.

[Aviso Legal](#)

1.- Técnicas de aglutinación y precipitación.

Caso práctico



Como ya sabes Susana va a dar sangre y se lo ha comentado a Carlos. Como Carlos no tiene muy claros algunos aspectos sobre la cuestión, Susana le enseña el informe que le enviaron después de su última donación.

En realidad Susana nunca ha prestado demasiada atención a este tipo de informes pero ahora Carlos le hace ver que la información puede estar relacionada con el módulo de Técnicas de inmunodiagnóstico que han estudiado.

Susana, que tiene un interés especial por este módulo, le propone a su compañero qué, para empezar, repasen las técnicas de aglutinación y precipitación, y para acabar de convencerlo le recuerda qué algunas de estas técnicas también se utilizan en el laboratorio de microbiología.

Como ya hemos dicho en el apartado anterior, en esta primera parte vas a estudiar las técnicas de aglutinación y precipitación. En su mayor parte son pruebas relativamente sencillas, muchas de ellas llevan mucho tiempo realizándose en el laboratorio pero no por ello han perdido vigencia. Es muy importante que recuerdes todo lo que has aprendido sobre los antígenos y los anticuerpos, particularmente sobre su unión para formar inmunocomplejos, ya que la formación de inmunocomplejos *in vitro*, es la base de todas las técnicas inmunológicas.

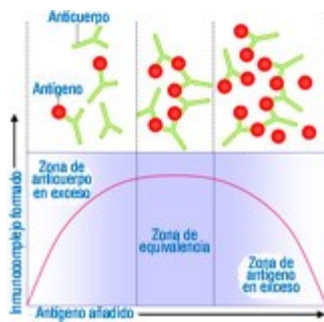
1.1.- La unión del anticuerpo al antígeno.

Seguro que ya has estudiado los conceptos de antígeno y anticuerpo, por ejemplo cuando anteriormente te han hablado del mecanismo de actuación de las vacunas. Pues bien, los antígenos presentes en los tejidos y los [líquidos corporales](#) se pueden detectar y cuantificar mediante técnicas inmunológicas basadas en la gran [especificidad](#) de las reacciones antígeno-anticuerpo. En otras palabras, estas técnicas aplican el gran poder discriminatorio y selectivo de los anticuerpos para unirse a su antígeno cuando éste se encuentra en una muestra con multitud de proteínas. Las técnicas inmunológicas pueden ser primarias o secundarias.

- Las reacciones secundarias son reacciones del antígeno con el anticuerpo, visibles por cambios físicos que se producen en el medio de reacción tras la formación del [inmunocomplejo](#). La aglutinación, la precipitación y la fijación del [complemento](#) constituyen reacciones secundarias.
- Las reacciones primarias son reacciones iniciales del antígeno con el anticuerpo. No son visibles, ya que no inducen cambios físicos en el medio de reacción del antígeno con el anticuerpo, por lo que se precisan marcadores que, unidos al antígeno o al anticuerpo, permiten obtener un inmunocomplejo marcado que hace posible su detección. Estos métodos constituyen los inmunoensayos y los marcadores utilizados son sustancias fácilmente detectables, como por ejemplo [cromógenos](#).

En las reacciones secundarias, cuando una solución de antígeno se mezcla *in vitro* con su [antisuero](#), el antígeno y el anticuerpo se combinan y se forma un agregado (inmunocomplejo o complejo antígeno-anticuerpo). Uno de los factores que influyen en esta reacción es la relación entre la concentración de antígeno y anticuerpo: un exceso de anticuerpo o de antígeno puede retrasar o inhibir la formación de los inmunocomplejos, o incluso redissolverlos y el resultado será un falso negativo.

Cuando aumenta la concentración de antígeno en presencia de una concentración de anticuerpo constante, la cantidad de inmunocomplejos formados aumenta para luego volver a disminuir. La curva obtenida tiene tres zonas:



1. Zona de exceso de anticuerpo o prozona, donde la cantidad de antígeno es insuficiente para saturar todo el anticuerpo presente. Cada molécula de antígeno puede unirse a una sola molécula de anticuerpo. En el [sobrenadante](#) se detecta anticuerpo libre.
2. Zona de equivalencia, en donde el antígeno añadido es suficiente para reaccionar con todo el anticuerpo presente. Las concentraciones de antígeno y anticuerpo no son iguales, pero sí equivalentes, y es la concentración relativa de estas moléculas la que permite la formación de un inmunocomplejo en forma de red tridimensional. En el sobrenadante no se detecta ni antígeno ni anticuerpo libre.
3. Zona de exceso de antígeno, en donde la cantidad de antígeno es superior a la que se necesitaría para reaccionar con todo el anticuerpo. La concentración de anticuerpo es insuficiente para que se produzcan uniones cruzadas con las moléculas de antígeno.

Recuerda que los anticuerpos están constituidos por moléculas de [inmunoglobulina](#), cada una de ellas con zonas de unión para dos [determinantes antigénicos](#) iguales.

Autoevaluación

En la zona de equivalencia:

- Las concentraciones de antígeno y anticuerpo son iguales.
- En el sobrenadante se detecta antígeno y anticuerpo libre.
- Se forma muy poca cantidad de inmunocomplejos.
- No quedan anticuerpos ni antígenos sin reaccionar.

Incorrecta. Una molécula de anticuerpo puede reaccionar con dos moléculas antigénicas. Lo que es determinante es que los dos tipos de molécula estén en una proporción determinada.

Incorrecta. En la zona de equivalencia todas las moléculas de anticuerpo y de antígeno están comprometidas formando inmunocomplejos.

Incorrecta. La cantidad de inmunocomplejos es la máxima posible.

Todos los anticuerpos reaccionan con los antígenos de forma que todos se utilizan para formar inmunocomplejos y no se detectan en el sobrenadante.

Solución

1. Incorrecto
2. Incorrecto
3. Incorrecto
4. Opción correcta

1.2.- Aglutinación directa e indirecta.

Quizá hayas visto que cuando se determina un grupo sanguíneo se puede observar a simple vista una especie de agregado formado por eritrocitos que han reaccionado con un anticuerpo. En realidad lo que se ha producido es una aglutinación. La aglutinación consiste en la formación de un agregado visible de inmunocomplejos en forma de [retículo](#) (lattice formation). La aglutinación se produce cuando las inmunoglobulinas se combinan con antígenos particulados, es decir antígenos que forman parte o que se han unido artificialmente a la superficie de eritrocitos, bacterias o partículas de [látex](#). Las partículas deben de tener un tamaño de entre 100 nm y 10 mm para facilitar su visualización.

La aglutinación es una técnica de detección de reacciones antígeno-anticuerpo que se aplica en diagnóstico clínico. Los anticuerpos que aglutinan antígenos se denominan aglutininas y los antígenos aglutinados, aglutinógenos.

Las aglutininas completas siempre producen aglutinación y las incompletas son las que a pesar de unirse al antígeno no producen aglutinación en situaciones desfavorables, como cuando el antígeno particulado son hematíes suspendidos en solución salina.

Las aglutininas completas son las IgM debido a su tamaño y multivalencia, y las incompletas son las IgG al ser bivalentes.

Hay dos tipos de aglutinación:

En la aglutinación directa, los antígenos forman parte de la superficie de un antígeno particulado (por ejemplo eritrocitos o bacterias). Es útil para el diagnóstico de infecciones cuando es difícil el aislamiento del microorganismo entonces se realizará una [serología](#), en este caso el antígeno particulado empleado es el microorganismo. Cuando se utiliza para identificar grupos sanguíneos, el antígeno particulado es el eritrocito.

Cuando una suspensión antigénica (bacterias o eritrocitos) se enfrentan a un suero que presente los anticuerpos específicos para esos antígenos, se producirá una aglutinación por formación de los inmunocomplejos. La lectura es inmediata, ya que a simple vista se aprecia la formación de los agregados insolubles de inmunocomplejos. La forma de visualizarlos dependerá del soporte sobre el que se realice la determinación:

Soporte plano (porta o tarjeta) donde la reacción positiva se observa por la formación de grumos o Placa de microtitulación donde el positivo se evidencia por la formación de un velo en la superficie del pocillo y el negativo como un botón sedimentario en el fondo.

Son técnicas de aglutinación directa la determinación del grupo sanguíneo ABO y Rh en las que se determina el grupo sanguíneo utilizando sueros con Anticuerpos Anti-A, Anti-B, Anti-AB y Anti-D(para el Rh), estas técnicas al realizarse sobre la superficie del hematíe de denominan tecnicas de hemaglutinación.

Tambien se utiliza la aglutinación directa para detectar la presencia en suero de anticuerpos frente a *Brucella* para el diagnóstico de brucelosis, es la técnica llamada Rosa de Bengala ya que se emplean bacterias del género *Brucella* teñidas con ese colorante.

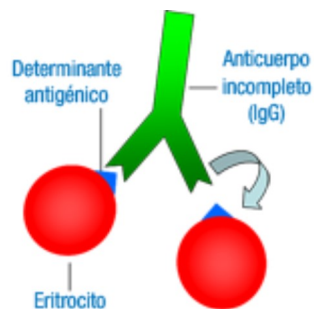
En la aglutinación indirecta, los antígenos se han unido artificialmente a la superficie de ciertos elementos y partículas, como por ejemplo eritrocitos o partículas de látex. El acoplamiento del antígeno se denomina [sensibilización](#) y se realiza por captación espontánea mediante [incubación](#), por modificación de la superficie con [ácido tánico](#) (en el caso de eritrocitos) o a través de uniones químicas mediante reactivos.

Las técnicas más habituales son la aglutinación en látex en placa y la hemaglutinación indirecta(en la que los hematíes son sensibilizados con antígenos que no le son propios) también una variante de esta última la inhibición de la hemaglutinación.

La aglutinación se produce en dos fases: sensibilización y aglutinación propiamente dicha.

Observa que el término sensibilización se utiliza tanto para designar a la unión artificial de antígenos o anticuerpos a la superficie de partículas y elementos celulares, como para designar una de las fases de la aglutinación.





La sensibilización es el proceso por el cual el anticuerpo se une al antígeno de la superficie de la partícula.

- Las IgM son los anticuerpos más eficientes para la aglutinación de partículas por eso también se denominan anticuerpos completos. Fíjate en la imagen, como comprobarás, las IgM son moléculas pentaméricas que permiten la unión de 5 a 10 moléculas antigénicas a cada IgM. La actividad aglutinante de la IgM es entre 10 y 100 veces más alta que la de la IgG.
- Las IgG no suelen provocar la aglutinación de antígenos particulados porque, como puedes ver en la imagen, las moléculas sólo tienen dos puntos de unión con los determinantes antigénicos, por eso también se dice que las IgG constituyen anticuerpos bloqueantes o incompletos, aunque sean moléculas funcionalmente completas.

La aglutinación propiamente dicha consiste en la formación del agregado visible de inmunocomplejos a partir de la unión de partículas inertes o no, previamente sensibilizadas. Los epítomos o determinantes antigénicos aún libres de las moléculas de anticuerpo se unen a otras moléculas de antígeno dando lugar a la formación del retículo.

A veces las dos etapas suceden casi simultáneamente, otras veces sólo hay sensibilización, por ejemplo las IgG son generalmente sensibilizantes pero no aglutinantes. Como medio para detectar anticuerpos, la aglutinación tiene mucha sensibilidad porque el antígeno ya forma parte de una partícula insoluble y se necesitan relativamente pocas moléculas de anticuerpo para visualizar la agregación.

Pregunta Verdadero-Falso

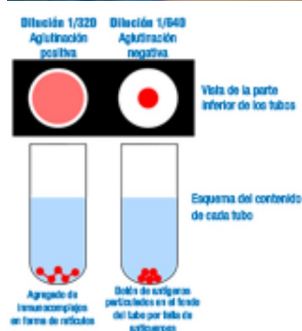
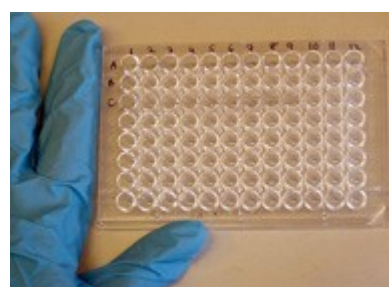
La IgG es denominada también aglutinina incompleta por presentar 4 sitios de unión al

antígeno

- Verdadero Falso

Falso

1.3.- Determinación del título de anticuerpos.



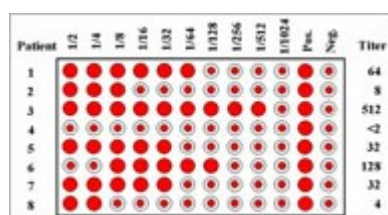
Ya sabes en qué consiste la aglutinación pero, en el laboratorio, ¿cómo se visualiza el resultado? En este apartado estudiarás el aspecto que presenta una aglutinación y vas a ver cómo se interpretan los resultados.

Las técnicas de aglutinación pueden realizarse ,como se ha mencionado anteriormente, sobre portaobjetos, en tubos o en [placas de microtitulación o microplacas](#). Las reacciones positivas se manifiestan según un patrón difuso o un velo en la superficie del pocillo, mientras que las aglutinaciones negativas se caracterizan por la aparición de un anillo o botón en el fondo de los tubos o de los pocillos de la placa de microtitulación, formado porque los antígenos particulados que no se han podido unir a los anticuerpos, caen por las paredes inclinadas del fondo del tubo o del pocillo y se depositan en el fondo formando un punto nítido o botón.

El título de anticuerpos es la inversa de la dilución más elevada de la muestra que resulta aglutinada, observándose que diluciones superiores no aglutinan. Para comprenderlo mejor, en la imagen inferior puedes ver el resultado de una prueba de hemaglutinación cuantitativa realizada para diferentes pacientes en una placa de microtitulación, también se observan los controles positivos y negativos, y finalmente puedes ver la [titulación](#) en cada caso. Para

determinar un título se realiza una [dilución seriada](#) de la muestra en tubos o en una placa de microtitulación, al hacer reaccionar estas diluciones en las que cada vez habrá menos anticuerpos con una cantidad de antígeno constante, llegará un momento en que no se producirá resultado positivo ya que no hay anticuerpos suficientes para la reacción, siendo el título la última dilución con resultado positivo. La aparición de aglutinación se examina después de un período de incubación que depende de los antígenos y de los anticuerpos que reaccionan.

La intensidad máxima de aglutinación se observa en las diluciones de la zona de equivalencia. En diluciones superiores no hay aglutinación por la falta de anticuerpo y en las inferiores a veces tampoco, por el exceso de anticuerpo (prozona).



Las técnicas de aglutinación precisan de [controles](#):

- Control positivo: Se realiza con un suero positivo, un suero que posee los anticuerpos que se quieren determinar en el suero problema. Los controles positivos ponen de manifiesto la correcta [reactividad](#) de las partículas sensibilizadas.
- Control negativo: Se realiza con solución salina, una solución en donde es segura la ausencia de los anticuerpos que se quieren determinar en el suero problema. Los controles negativos ponen de manifiesto la especificidad de la técnica.

Ejercicio resuelto

Determinación del título de anticuerpos en una técnica de aglutinación.

En una técnica de aglutinación se realizan 8 diluciones de un suero con anticuerpos problema (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 y 1/1280). Después de añadir la solución antigénica específica se incuban las soluciones y la aglutinación más intensa se observa para la dilución 1/160. Las diluciones 1/40, 1/80, 1/320 y 1/640 muestran una aglutinación débil y la dilución 1/1280 no muestra aglutinación. Las diluciones 1/10 y 1/20

no muestran aglutinación. ¿Cuál es el título de anticuerpos?

Mostrar retroalimentación

- La máxima aglutinación (1/160) corresponde a la zona de equivalencia y las diluciones 1/10 y 1/20 corresponden a la prozona (exceso de anticuerpo).
- La última dilución positiva es 1/640, por tanto el título de anticuerpos es 640.

Pregunta de Elección Múltiple

Segun la imagen anterior el título de anticuerpos para una determinada enfermedad en el paciente 5 es de 32 porque

- Es la inversa de la última dilución en la que se ha producido aglutinación
- Aparece un botón en la superficie del pocillo donde se ha realizado la dilución 1/32
- Ambas respuestas son falsas
- Ambas respuestas son ciertas

Opción correcta

Incorrecto

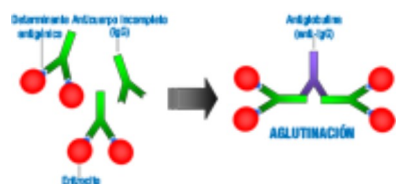
Incorrecto

Incorrecto

Solución

1. Opción correcta
2. Incorrecto
3. Incorrecto
4. Incorrecto

1.4.- Prueba de Coombs.



Como ya sabes, las transfusiones sanguíneas sólo se pueden realizar entre personas con grupos sanguíneos compatibles, pero además deben realizarse una serie de controles para evitar posibles [reacciones transfusionales](#). En este sentido, seguramente habrás oído hablar de las pruebas cruzadas, la prueba de Coombs que estudiarás en este apartado forma parte de estas pruebas.

La prueba de Coombs, también llamada prueba de la [antiglobulina](#), es una prueba que permite detectar la sensibilización de eritrocitos por IgG. Algunos anticuerpos, como por ejemplo los de tipo IgG, no pueden aglutinar eritrocitos de forma eficaz, pero se pueden detectar con pruebas de aglutinación indirecta añadiendo un segundo anticuerpo específico (antiglobulina) contra la IgG fijada previamente sobre la superficie de los eritrocitos.

En la prueba de Coombs, la IgG fijada previamente al eritrocito, actúa como antígeno frente a la antiglobulina.

La prueba de Coombs directa (DAT, direct antiglobulin test) detecta sensibilizaciones in vivo, es decir, la unión de anticuerpos producidos por el propio organismo, a antígenos presentes en eritrocitos del paciente. Se puede utilizar para el diagnóstico de la anemia hemolítica autoinmune o para [detectar la enfermedad hemolítica del recién nacido](#).

Debes conocer

En la siguiente animación podrás ver el desarrollo de una prueba de Coombs directa.



[Resumen textual alternativo](#)

La prueba de Coombs indirecta (IAT, indirect antiglobulin test) detecta sensibilizaciones in vitro que se producen cuando, en el laboratorio, se ponen en contacto anticuerpos circulantes del suero de un paciente con eritrocitos de antigenicidad conocida, es decir con determinados antígenos identificados. Se puede utilizar para la determinación de anticuerpos como la inmunoglobulina Rh en el suero materno y en [pruebas cruzadas](#) (cross-matching tests) antes de realizar transfusiones.

Se incubaba el suero problema con hematíes Rh⁺, si hay IgG anti-Rh se unirán a estos hematíes y al añadir el reactivo de Coombs se producirá la aglutinación de los hematíes.

Debes conocer

En la siguiente animación podrás ver el desarrollo de una prueba de Coombs indirecta.



[Resumen textual alternativo](#)

Autoevaluación

En la prueba de Coombs indirecta se utilizan eritrocitos del propio paciente.

¿Verdadero o falso?

- Verdadero.
- Falso.

Esta afirmación no es correcta.

En esta prueba el paciente aporta su suero que es en donde se pretende detectar la presencia de anticuerpos anti-eritrocito.

Solución

1. Incorrecto
2. Opción correcta

1.5.- Inhibición de la aglutinación.



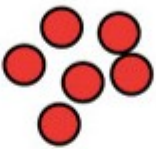

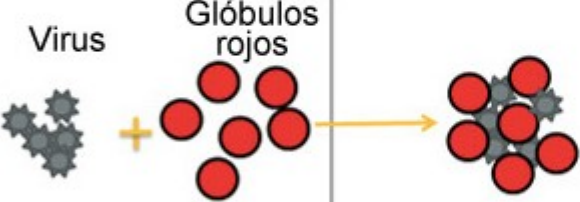

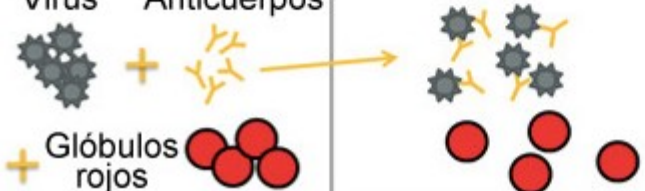

Como verás ésta es una técnica un poco más complicada que las anteriores. Es posible que te resulte un poco más difícil de entender, procura ir avanzando despacio y, sobretodo, presta atención a la imagen.

Una de estas técnicas es una variante de la hemaglutinación indirecta y se denomina inhibición de la hemaglutinación. Uno de sus usos es determinar anticuerpos en suero del paciente frente a virus o bacterias que *in vitro* tienen la capacidad de aglutinar hematíes de mamíferos o aves, al unirse a sus receptores de membrana.

Si el suero del paciente no presenta anticuerpos específicos para el virus o bacteria que estamos determinando, los antígenos del patógeno provocan la aglutinación de los eritrocitos, pero si se incuban esos patógenos (virus o bacterias) con el suero de un paciente que contenga anticuerpos (ejemplo para el virus de la rubeola o el de la gripe), los anticuerpos neutralizarán los antígenos víricos inhibiendo su capacidad de aglutinar hematíes. La lectura es por tanto lo contrario a las pruebas de hemaglutinación. Es decir, en el diagnóstico de la rubeola, si se produce la hemaglutinación el resultado es negativo (se observa como un velo en la superficie del pocillo) ya que esto indica que en el suero del paciente no hay anticuerpos frente a rubeola y si no se produce hemaglutinación, el resultado es positivo, el paciente estará inmunizado frente a rubeola y esto se observará con la formación de un botón en el fondo del pocillo de la placa de microtitulación.

En la siguiente imagen puedes comparar cómo se observa el resultado en una técnica de inhibición de la hemaglutinación en la placa de microtitulación si lo que estamos buscando son anticuerpos frente al virus (ejemplo rubeola), el resultado positivo (presencia de anticuerpos en el suero del paciente) se observa como un botón de hematíes al fondo del

pocillo, el virus(utilizado como antígeno) no ha aglutinado los hematíes porque había anticuerpos en la muestra del paciente y estos se han unido al virus (caso C), en el caso de no haber anticuerpos el virus aglutina los hematíes y se observa como un velo rojo sobre la superficie del pocillo (caso B), es decir el resultado se observa al contrario que con una hemaglutinación normal.

	Componentes	Interacción	Resultados de la microtituladora
A	Glóbulos rojos		Sin reacción 
B	Virus + Glóbulos rojos		Hemaglutinación 
C	Virus + Anticuerpos + Glóbulos rojos		Inhibición de la hemaglutinación 

La inhibición de la aglutinación también es una técnica adecuada para detectar y cuantificar antígenos solubles poco concentrados en sangre u otros fluidos biológicos como orina, como algunas hormonas, por ejemplo la [gonadotropina coriónica humana \(hCG\)](#) en el caso de tests de embarazo. Para llevarla a cabo se utilizan eritrocitos humanos o partículas de látex sensibilizadas con la sustancia que se quiere detectar.

La reacción se desarrolla en dos fases: en la primera, el anticuerpo se incubaba con la muestra en la que se han de determinar antígenos. En una segunda fase se añaden los eritrocitos o las partículas de látex sensibilizadas que aglutinaran con el anticuerpo que no se ha combinado con el antígeno soluble.

- Cuando se añaden anticuerpos específicos y suero de un paciente sin antígeno, hay aglutinación porque los anticuerpos se unen al antígeno que recubre los eritrocitos.
- Si se añaden anticuerpos específicos y suero de un paciente con antígeno, los

anticuerpos se unirán al antígeno soluble libre presente en el suero y no habrá aglutinación porque los anticuerpos, fijados ya a su antígeno, no pueden unirse a los eritrocitos.

La inhibición de la [hemaglutinación](#) es una técnica [cuantitativa](#): el grado de inhibición de la aglutinación refleja la cantidad de antígeno presente en la muestra. Si pasas la primera diapositiva, a continuación encontrarás un esquema general de la técnica y un ejemplo para la determinación de HCG (Hormona corionica Humana) cuya presencia indica que una mujer está embarazada.



Reflexiona

Fíjate en que por su funcionamiento, la inhibición de la aglutinación es una técnica competitiva: Los anticuerpos pueden unirse tanto al antígeno soluble de la muestra, como al antígeno particulado. El resultado final dependerá de la proporción relativa de ambos tipos de antígeno. En el caso de una muestra con poco antígeno soluble, la aglutinación por la unión con el antígeno particulado será máxima. En el caso de una muestra muy rica en antígeno soluble, la aglutinación por la unión con el antígeno particulado será mínima.

Para saber más

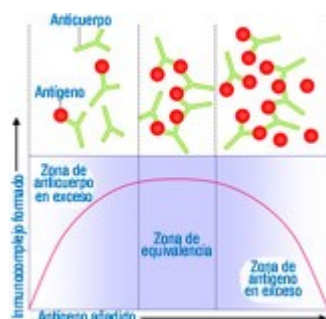
Una de las aplicaciones de las técnicas de inhibición de la aglutinación es el diagnóstico del embarazo. En el siguiente documento puedes consultar el protocolo que se sigue para realizar esta determinación en el laboratorio.

[Test de embarazo.](#) (29.8 KB)

1.6.- Inmunoprecipitación.

En apartados anteriores has estudiado cómo antígenos particulados aglutinan en presencia de anticuerpos específicos. Si son antígenos solubles los que se combinan con sus anticuerpos específicos en proporciones cercanas o iguales a las del punto de equivalencia, se originan precipitados de inmunocomplejos que forman grandes agregados insolubles.

En realidad la aglutinación y la precipitación pueden considerarse como manifestaciones de la misma interacción antígeno-anticuerpo, pero recuerda que en la aglutinación los antígenos eran particulados, en cambio en las técnicas de precipitación los antígenos son solubles. Al igual que la aglutinación las reacciones de precipitación se incluyen dentro de las técnicas secundarias en las que en este caso, la formación del inmunocomplejo se visibiliza por la formación de un precipitado.



Como la aglutinación, la precipitación tiene lugar en dos fases:

1. Reacción del anticuerpo con determinantes antigénicos específicos, dos en el caso de IgG, o con más, en el caso de IgM.
2. Formación de un agregado tridimensional insoluble que precipita por su tamaño. Durante esta fase los puntos de unión de las moléculas de anticuerpo para determinantes antigénicos, que aún no están ocupados por antígenos, se van uniendo a nuevas moléculas de antígeno.

Para que se forme un agregado los reactivos deben estar en una proporción óptima y se

necesita un cierto número de moléculas de anticuerpo. También, como en la aglutinación, es importante el tipo de anticuerpo: las IgG son mejores [precipitinas](#) que las IgM.

Uno de los factores que influyen en esta reacción es la relación entre la concentración de antígeno y la de anticuerpo: un exceso de anticuerpo o de antígeno puede retrasar o inhibir la formación de los inmunocomplejos, o redisolverlos.

Los ensayos de precipitación pueden realizarse en medios líquidos o semisólidos como los [geles de agar](#) o de agarosa. Durante la incubación uno de los constituyentes puede difundir hacia el otro o los dos constituyentes pueden difundir uno hacia el otro.

Cuando la difusión tiene lugar en un gel, se establecen [gradientes](#) de concentración tanto de antígeno como de anticuerpo y cuando se llega a las concentraciones óptimas, se forma un precipitado visible como una banda o línea diferenciada. Las técnicas de inmunoprecipitación en geles se agrupan en dos categorías: técnicas de inmunodifusión y técnicas inmunolectroforéticas.

Tal como estudiarás en el apartado siguiente, las técnicas de inmunoprecipitación en solución son la inmunturbidimetría y la inmunonefelometría.

1.7.- Inmunoturbidimetría e inmunonefelometría.



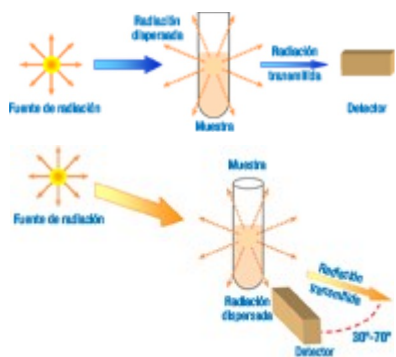
Cuando un haz de luz colimado (sus haces son paralelos) atraviesa una solución homogénea, una parte se absorbe y otra se transmite, pero ¿Qué sucede cuando un haz de luz choca con una partícula en suspensión? Una parte de la luz se dispersa, otra se refleja y otra se absorbe. Recuerda que la radiación dispersada es una pequeña fracción de la radiación que al colisionar con una suspensión de partículas se transmite en todas direcciones. La turbidimetría y la nefelometría son técnicas que se basan en la propiedad que tienen las partículas en suspensión de dispersar la luz

La intensidad de la luz dispersada es:

- Directamente proporcional al peso molecular de las sustancias que forman parte de las partículas y a la concentración de las partículas.
- Inversamente proporcional a la longitud de onda de la luz incidente.

La intensidad de la luz dispersada también depende de la dirección de detección, así, en los nefelómetros el detector se sitúa entre 30° y 70° respecto a la dirección de la luz incidente, mientras que en las técnicas de turbidimetría, la detección de la luz transmitida se efectúa en la misma dirección que la luz incidente.

La turbidimetría detecta partículas en función de la luz transmitida utilizando un [espectrofotómetro](#). La nefelometría detecta partículas en función de la luz dispersada utilizando un [nefelómetro](#).



La inmunoturbidimetría y la inmunonefelometría son técnicas de inmunoprecipitación en medio líquido en donde los inmunocomplejos quedan en suspensión en la muestra dando un aspecto turbio al líquido. La dispersión de la luz que incide sobre una solución de inmunocomplejos es máxima en la zona de equivalencia, debido al mayor tamaño de las partículas.

En la zona de exceso de anticuerpos, la dispersión disminuye a pesar de que la concentración de antígeno es mayor porque los agregados de inmunocomplejos se hacen más pequeños y, por tanto, más solubles. A pesar de todo, en las técnicas de inmunoturbidimetría e inmunonefelometría se trabaja en esta zona de exceso de anticuerpos, porque en esta zona la intensidad de la luz dispersada es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente.

La introducción de micropartículas favorece la formación de un mayor número de inmunocomplejos, ya que cuando el antígeno o el anticuerpo están unidos a una fase sólida, como una partícula de látex, se facilita la unión antígeno-anticuerpo, aumentando la sensibilidad.

Para saber más

En este documento puedes examinar el protocolo que se sigue para realizar una turbidimetría en el laboratorio.

[Determinación de Apolipoproteína B \(Apo B\) por turbidimetría.](#) (86.6 KB)

Autoevaluación

En inmunoturbidimetría:

- Se mide directamente la luz dispersada por inmunocomplejos.
- Se trabaja en la zona de exceso de anticuerpos.
- Se pueden utilizar nefelómetros para efectuar las medidas.
- La intensidad de la luz dispersada es directamente proporcional a la longitud de onda de la luz incidente.

Incorrecta. Se mide la radiación transmitida, la radiación dispersada se mide por inmunonefelometría.

En esta zona la intensidad de la luz dispersada es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente.

Incorrecta. Se utilizan espectrofotómetros. Los nefelómetros se utilizan en nefelometría.

Incorrecta. La intensidad de la luz dispersada es inversamente proporcional a la longitud de onda de la luz incidente.

Solución

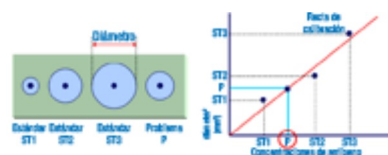
1. Incorrecto
2. Opción correcta
3. Incorrecto
4. Incorrecto

1.8.- Inmunodifusión radial.



En el apartado anterior ya has estudiado las técnicas de inmunoprecipitación en solución. Recuerda que existen otras técnicas de inmunoprecipitación que se realizan en gel. En primer lugar vas a estudiar las técnicas de inmunodifusión que utilizan un gel sobre un soporte tipo [placa de Petri](#) o portaobjetos, en el que difunden el antígeno y el anticuerpo. Como resultado se observa una banda de precipitado en donde se establece el equilibrio entre las concentraciones de antígeno y anticuerpo. La difusión puede realizarse en una dimensión (inmunodifusión radial) o dos dimensiones (doble inmunodifusión).

La inmunodifusión radial es una técnica cuantitativa también denominada inmunodifusión simple o técnica de Mancini. El anticuerpo se incorpora en el gel mientras que el antígeno se deposita en pocillos practicados en el gel. El antígeno difunde radialmente desde los pocillos por el gel, por lo tanto hay un gradiente de concentración para el antígeno mientras que la concentración de anticuerpo en el gel es constante. En aquellos puntos del gel en donde se establece la zona de equivalencia se observa un precipitado en forma de anillo.



Cuanto más lejos del pocillo esté el anillo, mayor es la concentración de antígeno: La superficie y por tanto el diámetro al cuadrado del anillo, es directamente proporcional a la concentración de antígeno. Cuanto mayor sea la concentración del antígeno en la muestra ,

más tiene que difundir para poder reaccionar completamente con el anticuerpo en proporciones equivalentes y por tanto mayor es el área del anillo formado. Observa en la imagen cómo se determina la concentración de las muestras por [interpolación](#) a partir de una recta de calibración con concentraciones de antígeno conocidas.

La inmunodifusión radial también puede emplearse para la cuantificación de anticuerpos, en este caso es el antígeno el que debe incorporarse previamente al gel.

Hay factores que influyen en el diámetro final del anillo formado (volumen de muestra, concentración de anticuerpo o antígeno en el medio, pH del medio y tiempo de incubación), estos han de mantenerse constantes para determinar un valor fiable de concentración. Un aumento de temperatura disminuye el tiempo de difusión sin alterar el diámetro final del anillo.

Para saber más

En este documento puedes examinar el protocolo que se sigue para realizar una inmunodifusión radial en el laboratorio.

[Determinación cuantitativa de C3 por inmunodifusión radial.](#) (60.6 KB)

Autoevaluación

En una placa de inmunodifusión radial se pueden hacer medidas semicuantitativas a simple vista comparando el diámetro de un anillo problema con los diámetros de los estándares utilizados. ¿Verdadero o falso?

- Verdadero.
- Falso.

Los diámetros están relacionados con la concentración de antígeno (o anticuerpo) en los pocillos. Si el diámetro en un pocillo problema es intermedio entre el de dos pocillos estándar, entonces su concentración también será intermedia entre las de

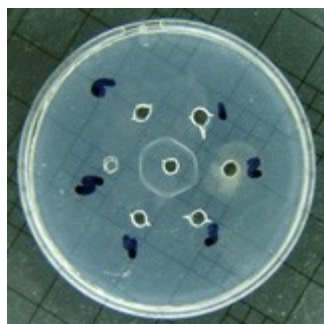
los pocillos estándar.

Esta afirmación es correcta.

Solución

1. Opción correcta
2. Incorrecto

1.9.- Doble inmunodifusión.



En la inmunodifusión radial el antígeno difunde desde un pocillo en el gel mientras que la concentración de anticuerpo depositado previamente en el gel es constante. ¿Qué pasaría si el gel no tuviera anticuerpo y en unos pocillos hubiera sólo anticuerpo y en otros sólo antígeno? Esta es la base de la doble inmunodifusión, también llamada técnica de Ouchterlony, una técnica [cualitativa](#) en la que el gradiente de concentración se establece tanto para el antígeno como para el anticuerpo. Así pues, ambos difunden desde pocillos separados en un gel sin antígeno ni anticuerpo. Si la solución antigénica problema contiene dos o más antígenos reconocidos por el antisuero, se forman dos o más bandas de precipitación. En la inmunodifusión doble bidimensional a veces se colocan muestras distintas en pocillos periféricos adyacentes, estas muestras pueden contener antígenos iguales, parecidos o distintos.

Si el anticuerpo se halla en un pocillo central y alrededor están los pocillos con soluciones antigénicas, pueden observarse diferentes patrones en relación con las bandas de precipitación:

- a. En la reacción de identidad, las dos líneas de precipitación se unen en un solo arco, indicando que los antígenos tienen un determinante antigénico común que reacciona con el antisuero.
- b. En la reacción de identidad parcial, las dos líneas se unen pero se forma un espolón provocado por el antígeno con más determinantes antigénicos reconocidos por el antisuero. Esto sucede cuando los antígenos de las muestras comparten algún determinante antigénico pero no todos.
- c. En la reacción de no identidad o de desigualdad, las dos líneas están cruzadas y los determinantes reconocidos por el antisuero son todos diferentes. Lo que determina que

los antígenos contenidos en las muestras no tienen ningún determinante antigénico en común.

Debes conocer

En la animación siguiente puedes observar las posibles reacciones en una técnica de doble inmunodifusión.

[Resumen textual alternativo](#)

Para saber más

Las posibilidades en relación a la aparición de bandas en una doble inmunodifusión son muchas y su interpretación requerirá tu atención. Te proponemos la visualización de una presentación y de un vídeo, así como la utilización de un simulador.

[Resumen textual alternativo](#)



[Resumen textual alternativo](#)

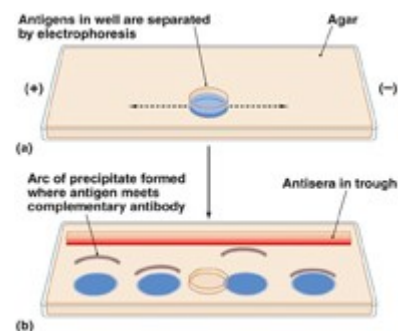
Simulador de la técnica de Ouchterlony.

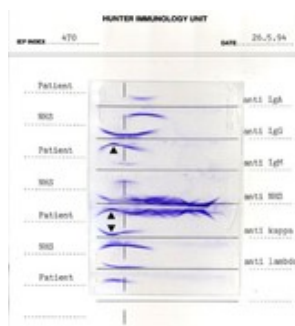
1.10.- Inmunoelectroforesis.

A lo largo de tu formación seguro que has estudiado la técnica de la [electroforesis](#). Recuerda que es una técnica para separar, principalmente, proteínas y [ácidos nucleicos](#), pero que en el caso de la inmunoelectroforesis se utiliza para después realizar una doble inmunodifusión. La inmunoelectroforesis permite detectar sustancias con movilidad eléctrica similar mediante reacciones de precipitación específicas entre antígenos y anticuerpos. Es útil cuando las mezclas de antígenos son demasiado complejas para ser analizadas por difusión y precipitación simples, por ejemplo en el caso de inmunoglobulinas del suero donde sería difícil la identificación de cada banda. La inmunoelectroforesis tiene mucho poder de resolución pero no se considera una técnica de rutina.

Se realiza en agar o agarosa sobre portaobjetos, la muestra es la solución con la mezcla antigénica y se deposita en un pocillo central, mientras que el antisuero se coloca lateralmente en un surco.

La inmunoelectroforesis es una técnica analítica cualitativa y semicuantitativa que combina la electroforesis y la inmunodifusión de antígenos y anticuerpos. Su principal ventaja es la especificidad, puesto que la separación previa permite la obtención de arcos o bandas de precipitación exclusivamente frente a una fracción antigénica.





Como se puede observar en esta imagen, la técnica tiene dos fases bien definidas:

- Electroforesis, para separar los componentes antigénicos de la muestra que se ha depositado en el pocillo central. El [pH](#) del gel se selecciona de forma que las proteínas con carga negativa migren al ánodo o polo positivo. En el caso de muestras séricas, las proteínas suelen separarse en cinco regiones, ordenadas desde el ánodo al cátodo o polo negativo de la siguiente manera: Albúmina, alfa-1-globulinas, alfa-2-globulinas, beta-globulinas y gamma-globulinas. Las gamma-globulinas, por un fenómeno de [electroendósmosis](#), migran hacia el cátodo.
- Doble inmunodifusión de las proteínas separadas previamente por la electroforesis y del antisuero situado en el surco, en el caso anterior el antisuero tendría anti- albumina, anti- alfa2globulina, anti beta globulina además de anti- IgG., anti-IgM y anti-IgA, y se colocaría lateralmente al recorrido electroforético.

Las bandas de precipitación tienen forma de arco, y se pueden teñir y comparar con las de un suero estándar o con el antígeno que se quiera identificar en la muestra.

En la imagen puedes ver una inmunoelectroforesis correspondiente a un caso de [mieloma múltiple](#), una IgG con [cadenas kappa](#). La técnica permite caracterizar la [paraproteína](#) gracias a los arcos de inmunoprecipitación formados contra antisueros específicos de cadenas pesadas y cadenas ligeras.

A la derecha de la inmunoelectroforesis se indican los antisueros utilizados. Para cada antisuero, en la parte superior se analiza una muestra del mismo paciente y, en la parte inferior, un suero control ([NHS](#)).

Se señalan los engrosamientos localizados en los arcos de precipitación correspondientes a los antisueros anti-IgG y anti-kappa. Esta intensa reacción anormal con anti-IgG y anti-kappa, y la falta de reacción con el antisuero contra las [cadenas lambda](#), indican la presencia de una paraproteína [monoclonal](#) (IgG con cadenas kappa) ya que una inmunoglobulina

[policlonal](#) reaccionaría con los dos tipos de antisueros anti-cadenas ligeras (anti-kappa y anti-lambda). La ausencia de una banda para anti-IgM y la presencia de una banda reducida para anti-IgA demuestran la típica reducción de inmunoglobulinas normales en esta enfermedad.

Entre las aplicaciones más importantes de la inmunolectroforesis cabe destacar la caracterización de alteraciones cualitativas de proteínas específicas, por ejemplo, tal como se ha visto en un caso anterior, inmunoglobulinas monoclonales en mielomas, y el análisis de mezclas complejas de proteínas en fluidos biológicos.

Para saber más

Este documento muestra el protocolo que se sigue para realizar una inmunolectroforesis de proteínas séricas en el laboratorio.

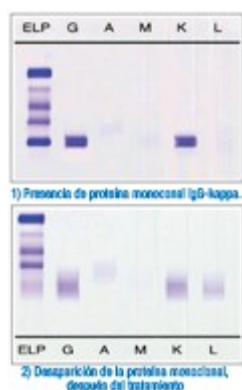
PROTOCOLO DE REALIZACIÓN DE UNA INMUNOELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SÉRICAS

- a) Mezclar 1g de agarosa con 100 ml de tampón veronal
- b) Después de fundir al Baño María y colocar 7 ml sobre el portaobjetos y dejar solidificar.
- c) Realizar los pocillos para el antígeno con un sacabocados y marcar en el canal de 2 mm de ancho (para el suero que estará paralelo a las proteínas separadas).
- d) Llenar ambos compartimientos de la cubeta con 70 ml del buffer
- e) Colocar 15 μ l del antígeno en su pocillo y llevar el portaobjetos sobre el aparato de electroforesis.
- f) Colocar una tira de papel del filtro a modo de puente para que la solución buffer de la cubeta haga contacto con el gel de agar sobre el portaobjetos.
- g) Tapar la cubeta y conectar la fuente eléctrica aplicando una corriente de 10 mA y realizar la electroforesis hasta que la albúmina marcada esté a 2 cm del punto de siembra.

h) Retirar el portaobjetos de la cubeta, extraer el agar del canal con espátula y colocar al ras el antisuero correspondiente (ej: 100 a 200 μ l)

i) Incubar a temperatura ambiente durante 24-48 hs. Dejar difundir y leer los resultados.

1.11.- Inmunofijación.



¿Qué pasaría si una vez se han separado las proteínas de una mezcla, se añadiera un anticuerpo específico contra una de ellas? Como verás ahora, en esto se basa la inmunofijación. Es una técnica de detección de proteínas que consiste en su separación electroforética en gel seguida de la incubación con un antisuero específico. En la zona en donde reaccionan antígeno y anticuerpo se forman bandas de precipitación insolubles. Las proteínas que no han precipitado se eliminan por lavado y las bandas de precipitación se revelan con una tinción para proteínas que permite su visualización.

En la imagen puedes observar una inmunofijación que muestra el componente IgG-kappa monoclonal en un caso de [amiloidosis](#) (1) y su posterior desaparición después de ocho meses de tratamiento (2). El canal ELP corresponde al canal de electroforesis positivo (sin inmunofijación), y los canales G, A, M, K y L corresponden, respectivamente, a la aplicación de antisueros anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa y anti-lambda.

En el apartado anterior se vió como la inmunoelectroforesis puede ser utilizada para el diagnóstico del mieloma múltiple que también es una [gammapatía monoclonal](#) pero actualmente está siendo la inmunofijación la técnica diagnóstica más utilizada para el estudio de esta patología:

El mieloma, como hemos visto es una proliferación anómala de células plasmáticas malignas que producen en exceso una de las cadenas pesadas (de las moléculas de Ig (γ , α , μ ; que se corresponden con inmunoglobulinas G, A o M respectivamente) y en exceso un tipo cadena ligera (κ , λ) (paraproteínas).

- Se sigue el siguiente proceso en la realización de la técnica de inmunofijación:
- El suero problema se dispone en 5 carriles diferentes, y posteriormente se somete a electroforesis en un gel de agarosa.
- En un sexto carril se coloca un suero control, que permite la visualización del perfil completo de las proteínas séricas.
- Cada uno de los carriles restantes se cubre con un antisuero específico frente a las cadenas pesadas y ligeras humanas γ , α , μ , κ , λ .
- Cuando el antisuero con anti- γ , anti- α , anti- μ , anti- κ , o anti- λ reconoce al Ag (cadenas pesadas y ligeras) específico, se forma un precipitado que queda atrapado en el gel.
- Se lava para eliminar las proteínas no precipitadas y se tiñe para revelar las que han formado inmunocomplejos. Así se identifica el tipo de paraproteína.
- En la mayoría de los pacientes con mieloma múltiple se aprecia una producción excesiva de las cadenas ligeras (λ o κ) por parte de las células plasmáticas malignas, cuyo peso molecular es lo suficientemente bajo para permitir su excreción a través de la orina. Estas cadenas ligeras se denominan proteínas de Bence-Jones.

Para saber más

Esta imagen muestra como la Ig monoclonal se manifiesta en los carriles con las cadenas α y λ .

El paciente presenta una paraproteína monoclonal de Ig A tipo λ en mieloma múltiple.



Autoevaluación

Ordena con números las siguientes etapas correspondientes a la realización de una inmunofijación.

Ejercicio de ordenación.

Etapas	Número de orden
Incubación con el antisuero.	<input type="text"/>
Revelado	<input type="text"/>
Precipitado	<input type="text"/>
Electroforesis de la muestra.	<input type="text"/>
Lavado.	<input type="text"/>

Enviar

El orden es el indicado en los contenidos, primero se debe realizar la electroforesis para después efectuar la incubación con el antisuero. Esta técnica es una precipitación.

1.12.- Fijación del complemento.

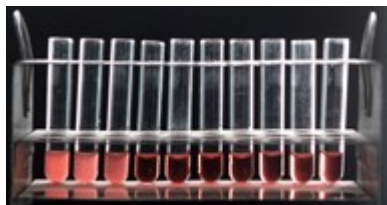
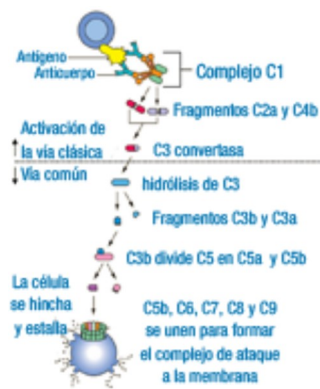
En apartados anteriores has estudiado conceptos en los que continuamente se utilizan los términos anticuerpo y antígeno porque se basan en reacciones específicas entre ellos. Hay otros componentes del sistema inmunitario que no tienen esa especificidad pero que reaccionan en muchas otras situaciones, por ejemplo el complemento, un grupo de proteínas de la fracción globulínica del suero.

El complemento es un grupo de aproximadamente 40 proteínas que forma un sistema enzimático en cascada presente fundamentalmente en el plasma, constituyendo un mecanismo de inmunidad innata. Con la activación de este sistema se produce una respuesta rápida y amplificada frente a un estímulo antigénico. Sus principales funciones son la activación de macrófagos, la opsonización de antígenos y la citólisis. Hay varias rutas que ponen en marcha este sistema : Vía clásica , Vía alternativa y vía de las lectinas. Las tres vías confluyen en un punto común que es la formación de una enzima convertasa C3 y a partir de ese momento se producirá la secuencia enzimática que llevará a la formación del complejo de ataque a membrana que es el causante de la citólisis del antígeno o célula patógena reconocida previamente.

El complemento se activa por la vía clásica cuando un anticuerpo se une a su antígeno específico formándose el inmunocomplejo al que se unirá por la parte Fc de los anticuerpos, principalmente IgG e IgM, es esta característica la que se utiliza en la prueba de fijación del complemento.

Las reacciones antígeno-anticuerpo se pueden cuantificar porque los inmunocomplejos pueden ser medidos por su capacidad para fijar el complemento ya que consumen complemento cuando está presente, mientras que los antígenos o anticuerpos libres no lo hacen.

El principio básico de una prueba de fijación de complemento es la activación y el consumo (fijación) del complemento en presencia de una reacción antígeno-anticuerpo específica.



La prueba de fijación del complemento se puede usar para detectar antígenos o anticuerpos. Se realiza en dos etapas: La fijación del complemento, propiamente dicha, y el revelado de la reacción con el sistema hemolítico.

1. Fijación del complemento, propiamente dicha. El antígeno se mezcla con el suero problema en donde se han de detectar anticuerpos para que se formen inmunocomplejos. Paralelamente también se prepara un tubo control sin antígeno. Si no se han formado inmunocomplejos en el tubo problema, el complemento no se fijará y por tanto no se consumirá, esto mismo es lo que sucederá en el tubo control. Sin embargo, si hay formación inmunocomplejos, (por lo tanto había anticuerpo en el suero problema) se fijará el complemento y entonces disminuirá la cantidad de complemento en el tubo porque una parte se consumirá.
2. Revelado de la reacción. El sistema de detección usado es la [hemólisis](#) ya que se utilizan eritrocitos de carnero y anticuerpos anti-eritrocitos de carnero ([hemolisinas](#)) y añadiendo también complemento.

La lectura de la prueba se puede observar en la imagen:

- Reacción positiva: Si en la primera fase se han formado inmunocomplejos y se ha consumido complemento, la hemólisis es poco intensa. Indica la presencia de anticuerpo en el suero problema.
- Reacción negativa: si en la primera fase no se han formado inmunocomplejos, el complemento no se consume y la hemólisis es total. Indica la ausencia del anticuerpo en el suero problema.

Los inmunocomplejos, y por tanto los anticuerpos, se pueden cuantificar de forma indirecta midiendo la liberación de hemoglobina en el medio procedente de la hemólisis.

Debes conocer

Esta animación y el enlace siguiente te permitirán comprender mejor el desarrollo de una prueba de fijación del complemento.

Download File

[Resumen textual alternativo](#)

[Fijación del complemento.](#)

2.- Inmunoensayos.

Caso práctico



Susana ha recibido una llamada del Banco de sangre informándole que uno de los controles realizados a partir de su última donación es dudoso y que se le tiene que practicar una nueva extracción para repetir los controles.

En el hospital universitario en donde está realizando las prácticas lo comenta con Carlos y juntos vuelven a repasar uno de los informes anteriores para ver qué controles se realizan habitualmente y cuál es su significado. Los dos piensan que así Susana tendrá más información cuando vuelva al Banco de sangre de forma que entienda lo que le expliquen y pueda preguntar aquellas dudas que puedan preocuparle más.

Carlos, que cada día está más entusiasmado con la microbiología, se da cuenta que los controles realizados en el Banco de sangre están relacionados con enfermedades infecciosas y cree que muchos de ellos seguramente se realizan a partir de inmunoensayos, así pues deciden buscar más información, Susana utilizando Internet y la bibliografía que pueda consultar en el laboratorio de inmunología en donde realiza sus prácticas, y Carlos en el de microbiología.

En esta segunda parte vas a estudiar los contenidos relacionados con la realización de inmunoensayos estos están basados en las reacciones antígeno-anticuerpo denominadas primarias, que sólo se pueden detectar cuando o bien el antígeno o bien el anticuerpo están

marcados. Muchas de estas técnicas tienen una base similar, pero lo que sobretodo las diferencia es el tipo de marcador utilizado y la forma de detectarlo. Estudiarás la descripción de los distintos tipos de inmunoensayos y podrás disponer de animaciones, vídeos y protocolos de laboratorio que te ayudarán a entender como funcionan estas técnicas.

2.1.- Inmunoensayos competitivos y no competitivos.



Al principio de esta unidad se vió que las reacciones entre antígenos y anticuerpos pueden ser primarias o secundarias. Recuerda que las reacciones primarias entre antígenos y anticuerpos no son visibles, por lo que se precisa marcar el antígeno o el anticuerpo para obtener un inmunocomplejo que en consecuencia también resultará marcado permitiendo así su detección. Estas técnicas se utilizan para detectar [analitos](#), que pueden ser tanto anticuerpos como antígenos.

Los métodos basados en estas reacciones son los inmunoensayos y los marcadores utilizados pueden ser:

- [Enzimas.](#)
- [Radioisótopos.](#)
- [Fluorocromos.](#)
- Moléculas [quimioluminiscentes.](#)

Los inmunoensayos utilizan uno o más anticuerpos específicos para detectar analitos de interés. Los analitos que se miden pueden estar presentes en el organismo de forma natural (como por ejemplo una hormona tiroidea), o bien pueden ser producidos por el organismo pero no de forma natural (como por ejemplo los antígenos relacionados con el cáncer), o bien pueden hallarse accidentalmente en el organismo (como por ejemplo una [droga de abuso](#)).

Los anticuerpos poseen una alta especificidad y afinidad para un antígeno concreto y esta unión específica entre antígeno y anticuerpo es lo que permite la detección de analitos por medio de una gran variedad de técnicas de inmunoensayo.

Además de la clasificación en función del tipo de marcador , según el diseño de la técnica, los

inmunoensayos pueden ser Competitivos o No competitivos según se establezca o no competencia entre moléculas para la formación del inmunocomplejo:

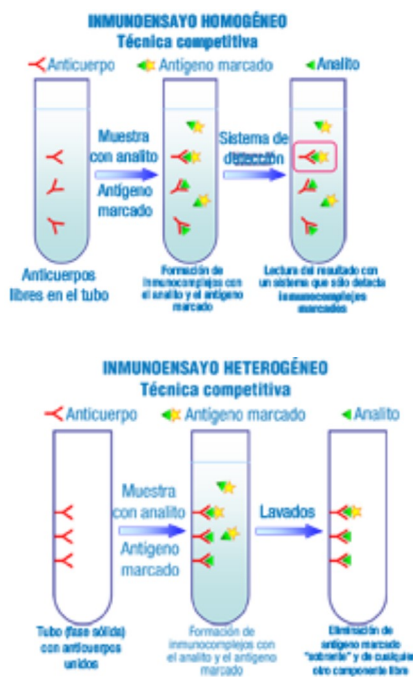
- No competitivos o inmunométricos. En estas técnicas el anticuerpo marcado que se utiliza para determinar un analito(antígeno) se encuentra en exceso, de forma que el anticuerpo no unido sobrante debe ser eliminado. Cuanto mayor sea la cantidad de antígeno presente, más anticuerpos marcados se unirán a él. La cantidad de anticuerpo marcado que ha formado el inmunocomplejo es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra problema.
- Competitivos o de saturación. En estas técnicas, el analito problema sin marcar (antígeno generalmente) se mide por su capacidad para competir con un antígeno igual pero marcado utilizado como reactivo que se añade sobre la muestra . El analito y el antígeno marcado, compiten por un anticuerpo específico que se encuentra en cantidades limitantes. Después se mide la cantidad de antígeno marcado que no se ha conjugado, que será inversamente proporcional a cantidad de antígeno presente en la muestra (cuanto más antígeno marcado se una menos antígeno habra en la muestra para formar e inmunocomplejo)

Clasificación de inmunoensayos.

Marcaje	Técnicas no competitivas	Técnicas competitivas
Enzima	<u>IEMA</u> (immunoenzymometric assay)	<u>EIA</u> (enzyme immunoassay)
Radioisótopo	<u>IRMA</u> (immunoradiometric assay)	<u>RIA</u> (radioimmunoassay)
Fluorocromo	<u>IFMA</u> (immunofluorimetric assay)	<u>FIA</u> (fluoroimmunoassay)
Quimioluminiscente	<u>ICMA</u> (immunochemiluminometric assay)	<u>CLIA</u> (chemiluminescent immunoassay)

A pesar de que según esta terminología se distingue las técnicas no competitivas de las competitivas, denominando a las primeras como ensayos inmunométricos y a las segundas como inmunoensayos, debes tener en cuenta que para referirse a todas ellas se suele emplear el término “inmunoensayo”.

2.2.- Inmunoensayos homogéneos y heterogéneos.



Como ya has observado en el apartado anterior, los inmunoensayos se clasifican, atendiendo al diseño de la técnica, en competitivos y no competitivos. Según la técnica utilizada, el resultado se puede medir de distintas formas: bien directamente (inmunoensayos homogéneos) o retirando las moléculas que no se han conjugado (inmunoensayos heterogéneos).

- En los inmunoensayos homogéneos, el analito se puede determinar sin ninguna separación física previa entre componentes libres o sobrantes e inmunocomplejos, por esta razón las técnicas suelen ser más rápidas.

Se realizan sin necesidad de una fase sólida y generalmente se basan en una inhibición o activación de una reacción enzimática debida a la formación del inmunocomplejo.

Se utilizan principalmente para determinar sustancias en concentraciones elevadas y de bajo peso molecular como pueden ser las drogas.

- En los inmunoensayos heterogéneos, para poder determinar el analito, los componentes libres y los inmunocomplejos formados deben separarse físicamente. Incluyen tanto ensayos inmunométricos (no competitivos) como competitivos. La

separación entre los inmunocomplejos formados y el resto de componentes libres se suele realizar a través de la unión de uno de los reactivos a una fase sólida y realizando lavados para eliminar las moléculas no conjugadas o libres. .

La fase sólida consiste en un soporte sólido, que puede ser la propia pared del tubo o de la placa de microtitulación. La unión de uno de los reactivos del inmunoensayo (antígeno o anticuerpo, según la técnica) a esta fase sólida, posibilita su inmovilización y la posterior separación del resto de reactivos mediante sucesivos lavados.

Autoevaluación

Relaciona los siguientes tipos de inmunoensayo con la característica que los define:

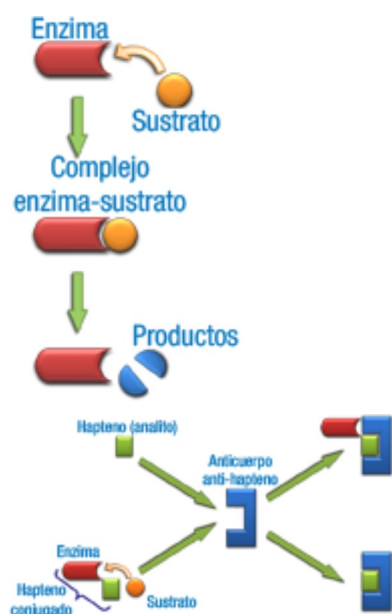
Ejercicio de relacionar

Tipo de inmunoensayo	Relación	Característica
Competitivo.	<input type="checkbox"/>	1. Se utilizan anticuerpos en exceso.
No competitivo.	<input type="checkbox"/>	2. Se utilizan anticuerpos en cantidades limitantes.
Homogéneo.	<input type="checkbox"/>	3. En la determinación los inmunocomplejos se separan del resto de componentes.
Heterogéneo.	<input type="checkbox"/>	4. En la determinación todos los componentes del inmunoensayo están juntos.

Enviar

La distinción entre homogéneo y heterogéneo se basa en la necesidad o no de separar los inmunocomplejos para poder detectarlos. Los competitivos y no competitivos se diferencian por la cantidad de anticuerpo empleado: limitante en el primer caso y en exceso en el segundo.

2.3.- Inmunoensayo enzimático multiplicado (EMIT).



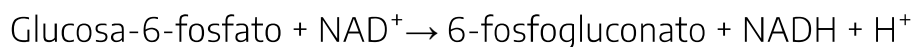
Ahora ya sabes qué es un inmunoensayo homogéneo. Recuerda que en este tipo de técnicas, el analito y todos los demás componentes de la reacción están juntos hasta que finaliza la determinación ya que no se realiza separación de las moléculas no ligadas. El EMIT es un enzimoensayo homogéneo competitivo que se suele aplicar para determinar haptenos. Para ello se utiliza como reactivo el mismo tipo de hapteno que se quiere determinar pero conjugado a un enzima, que puede detectarse a través de una reacción enzimática con un sustrato que da lugar a un producto y a un cambio en la absorbancia.

La técnica se basa en que el hapteno de la muestra y el hapteno conjugado, compiten por el anticuerpo específico que se encuentra en una cantidad limitante, de forma que éste siempre queda saturado por el hapteno.

La unión del conjugado hapteno-enzima con el anticuerpo impide la reacción del enzima con su sustrato porque se dificulta la formación del complejo enzima-sustrato .

Cuanto más hapteno haya en la muestra problema, quedará más conjugado hapteno-enzima libre que no habrá podido reaccionar con el anticuerpo porque la mayor parte de anticuerpo ya habrá reaccionado con el hapteno de la muestra. En estas condiciones predominará la reacción del conjugado hapteno-enzima con el sustrato, es decir habrá más actividad enzimática y aumentará la absorbancia.

En estas técnicas, uno de los enzimas más utilizados en conjugados es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que actúa en presencia de su sustrato, la glucosa-6-fosfato, y del coenzima NAD^+ . La reacción enzimática genera NADH , cuya absorbancia se puede medir a 340 nm:



Debes conocer

En la animación siguiente podrás ver el desarrollo de una prueba EMIT.

[Resumen textual alternativo](#)

El EMIT es menos sensible que los inmunoensayos heterogéneos porque todos los componentes se encuentran juntos y es fácil que los componentes séricos interfieran en la actividad enzimática.

Preferiblemente se utiliza para detectar sustancias de bajo peso molecular (haptenos), porque tiene que haber un contacto estrecho entre el anticuerpo y el enzima para que la actividad enzimática pueda quedar inhibida. Así por ejemplo se puede utilizar para determinar algunas hormonas como la tiroxina, drogas de abuso o en farmacovigilancia para fármacos [inmunosupresores](#).

2.4.- Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).



En el laboratorio clínico, la mayor parte de inmunoensayos realizados son heterogéneos. Muchos de ellos utilizan enzimas como marcadores pues, como ya sabes, aceleran reacciones y si el sustrato es el adecuado pueden generar rápidamente un producto coloreado que permitirá el seguimiento de la molécula marcada con el enzima. El ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) es un tipo de enzimoimmunoensayo, es decir un inmunoensayo heterogéneo que utiliza enzimas como marcadores.

Este tipo de técnicas constan de tres pasos principales:

- a. Reacción entre el antígeno y el anticuerpo específico. Uno de los dos componentes de la reacción está marcado con un enzima, por tanto también lo estará el inmunocomplejo formado.
- b. Revelado, es decir la adición de un sustrato específico del enzima (cromógeno) que generará un producto coloreado.
- c. Lectura por espectrofotometría del producto final coloreado y cálculo de la concentración del analito a partir de los datos obtenidos.

El ELISA es el enzimoimmunoensayo más utilizado. Se desarrolló en 1971 y desde entonces se ha ido perfeccionando y diversificando hasta detectar multitud de antígenos y anticuerpos.

Como en todos los inmunoensayos heterogéneos, para medir el inmunocomplejo marcado hay que separarlo de los otros reactivos. La separación puede efectuarse porque en el transcurso de la técnica los inmunocomplejos, con el antígeno o el anticuerpo marcados con el enzima, quedarán unidos a una fase sólida a la que denominamos soporte que ha de ser inmunoabsorbente.

Las fases sólidas utilizadas se caracterizan por su capacidad para fijar proteínas y pueden ser de diferentes tipos. Las más utilizadas son las microplacas de 96 pocillos, con un volumen aproximado de 300 μL por pocillo, porque son especialmente ventajosas para procesar un elevado número de muestras. Como se puede comprobar en esta imagen, los [kits](#) comerciales utilizados en el laboratorio clínico suelen emplear microplacas de material plástico, ya sea polivinilo (PVC) o poliestireno. Este tipo de soportes, ya preparados, contienen antígenos o anticuerpos previamente adsorbidos por sensibilización

Recuerda que el término sensibilización también se utiliza en técnicas de aglutinación para designar a la unión artificial de antígenos a la superficie de partículas y elementos celulares, y para designar una de las fases de la propia aglutinación.

Soportes sólidos utilizados en ELISA.

Material del soporte	Formas disponibles
Nitrocelulosa	Membranas, láminas
Polivinilo (PVC)	Microplacas, láminas
Poliestireno	Microplacas, láminas, perlas
Látex, nailon y celulosa	Membranas, láminas, perlas

Debes conocer

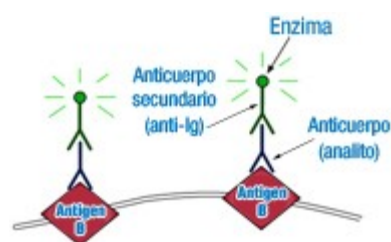
En la siguiente animación podrás ver el desarrollo de una técnica de ELISA directo.

[Resumen textual alternativo](#)

El ELISA directo es el diseño de ELISA más sencillo para determinar un analito, pero no se suele utilizar como método de rutina en diagnóstico clínico porque precisa de la sensibilización de las microplacas con la muestra problema, por ejemplo el suero de un

paciente, proceso que necesita de largos períodos de incubación y de concentraciones elevadas de analito en la muestra.

2.5.- ELISA indirecto.



En el apartado anterior ya has estudiado algunas cuestiones generales sobre las técnicas de ELISA. También has podido ver una animación que muestra cómo funciona un ELISA directo, una técnica muy sencilla pero que ya sabes que no se suele utilizar en diagnóstico clínico. Ahora vas a estudiar el ELISA indirecto, una técnica muy utilizada para detectar anticuerpos en una solución problema, por ejemplo el suero de un paciente.

La técnica se puede realizar sobre una microplaca sensibilizada con el antígeno contra el que va dirigido el anticuerpo (analito) que se quiere determinar en el suero. Este antígeno también se denomina antígeno de captura. Para poder detectar la presencia del anticuerpo (analito), se utiliza una anti-Ig humana, es decir un anticuerpo dirigido contra las inmunoglobulinas humanas obtenido en un animal inmunizado. Este segundo anticuerpo también se denomina anticuerpo secundario y se emplea conjugado a un enzima.

El revelado y la lectura son los habituales en las técnicas de ELISA, tal como se comentará en el apartado de metodología general.

Los anticuerpos dirigidos contra sustancias antigénicas humanas se obtienen a partir de animales de otra especie para los cuales nuestras proteínas son componentes extraños. Por eso para obtener una anti-Ig humana debe inmunizarse un animal con inmunoglobulinas humanas que, en este animal, actuarán como un antígeno.

Debes conocer

En la animación siguiente podrás ver el desarrollo de una técnica de ELISA indirecto.



[Resumen textual alternativo](#)

El ELISA indirecto tiene gran sensibilidad puesto que varias moléculas de anti-Ig pueden reaccionar con una sola de anticuerpo problema (analito) constituyendo así un sistema de amplificación de señal ya que en el revelado actuarán más moléculas enzimáticas y la reacción enzimática implicará más moléculas de sustrato y por tanto más señal (más color). También es una técnica muy versátil puesto que la anti-Ig conjugada con enzima es un reactivo que puede utilizarse en otros inmunoensayos similares para detectar anticuerpos humanos, mientras que en las técnicas directas se precisaba un anticuerpo específico marcado para cada técnica.

Para saber más

En este documento puedes consultar el protocolo que se sigue para realizar un ELISA indirecto en el laboratorio.

[Determinación de anticuerpos anti-cardiolipina por ELISA indirecto.](#) (109.6 KB)

Autoevaluación

Ordena con números las siguientes etapas correspondientes a la realización un ELISA indirecto para determinar anticuerpos anti-toxoplasma en el suero de un paciente. El número de orden 5 corresponde a una etapa que no pertenece a esta técnica:

Ejercicio de ordenación.

Etapa

Número de orden

Anti-Ig conjugada con un enzima.

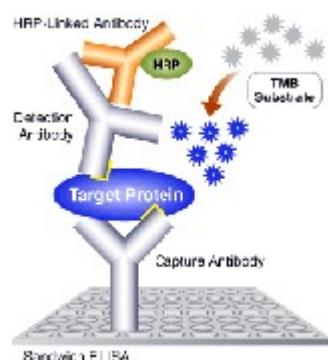
Enviar

Microplaca sensibilizada con un antígeno de Toxoplasma.

Anticuerpos anti-Toxoplasma conjugados con un enzima.

El orden es el indicado en los contenidos, los anticuerpos anti-Toxoplasma marcados se unirían a la microplaca pero impedirían la unión de los anticuerpos del suero del paciente que se quiere analizar.

2.6.- ELISA sándwich.



Como ya sabes, el ELISA indirecto permite detectar anticuerpos ya que las microplacas están sensibilizadas con los correspondientes antígenos. Entonces, ¿cómo se pueden determinar antígenos? Comprenderás que en estos casos las microplacas se deben sensibilizar con los anticuerpos específicos, este es el diseño del ELISA sándwich, una técnica utilizada para detectar antígenos en una solución problema. Se denomina también ELISA sándwich de doble anticuerpo (DAS) porque el antígeno a detectar queda secuestrado entre dos anticuerpos uno de los cuales está marcado con el enzima.

Pasos de la técnica:

1. Incubación de la muestra problema con el antígeno (analito) que se pretende determinar, sobre una microplaca sensibilizada con un anticuerpo monoclonal específico o anticuerpo de captura. La microplacas sensibilizadas con anticuerpos monoclonales aumenta la especificidad de la técnica porque evitan [reacciones cruzadas](#).
2. Lavado para eliminar antígenos no fijados y otras moléculas presentes en la muestra.
3. Incubación con un anticuerpo específico policlonal conjugado con un enzima (anticuerpo de detección). También puede utilizarse un anticuerpo sin marcar, como se ve en la imagen, pero entonces, tal como sucede en las técnicas indirectas, hay que realizar una incubación posterior con una anti-Ig marcada. (En este caso se trata de un ELISA sandwich HADAS, *Heterologic Assays Double Antibody Sandwich*, en este caso se utilizan anticuerpos obtenidos en especies animales distintas al del tapizado y al de captura)

4. Lavado para eliminar el exceso de anticuerpos.
5. Adición de un sustrato cromógeno.
6. Incubación en oscuridad hasta el desarrollo de color.
7. Frenado de la reacción añadiendo solución de frenado
8. Lectura visual o por espectrofotómetro(lector de ELISA) del producto final coloreado.

Los anticuerpos policlonales son heterogéneos, reconocen [epítomos](#) diferentes del antígeno, y están producidos por numerosos [clones](#) de linfocitos B. En cambio los anticuerpos monoclonales son homogéneos, su especificidad es única y están producidos por un único clon de linfocitos B.

En el ELISA sándwich se pueden usar dos anticuerpos monoclonales pero tienen que reconocer epítomos diferentes del mismo antígeno para poder permitir la unión de los dos anticuerpos, el de captura y el de detección, a la misma molécula antigénica.

Para saber más

En la animación siguiente podrás ver la realización de un ELISA sándwich (DAS) y de un ELISA indirecto.

[Resumen textual alternativo](#)

Autoevaluación

Para el diseño de un ELISA sándwich se puede utilizar indistintamente una placa sensibilizada con un anticuerpo monoclonal para después utilizar otro de detección que sea policlonal o bien a la inversa, una placa sensibilizada con un anticuerpo

policlonal para después utilizar otro de detección que sea monoclonal. ¿Verdadero o falso?

- Verdadero.
- Falso.

No es lo mismo, la primera opción es la más correcta.

La segunda opción no tiene mucho sentido, la especificidad de la técnica depende sobretodo del anticuerpo de captura y por esta razón es mejor que sea monoclonal. Utilizar un anticuerpo de detección monoclonal sólo tiene sentido si también se ha utilizado un anticuerpo monoclonal de captura.

Solución

1. Incorrecto
2. Opción correcta

2.7.- ELISA competitivo.



Anteriormente ya has estudiado cómo funciona una técnica competitiva. El ELISA competitivo, entre otras aplicaciones, es útil para detectar antígenos en muestras problema. En este caso se establece una competición entre el antígeno problema y un antígeno de las mismas características que el problema que es añadido como reactivo y estará marcado con un enzima, para unirse a un anticuerpo específico que se encuentra en cantidades limitantes de forma que siempre queda saturado.

Se establecerá una competición entre el antígeno marcado y el del problema para saturar el anticuerpo.

Contrariamente a los otros tipos de ELISA, la intensidad del color después del revelado con el sustrato o cromógeno es inversamente proporcional a la concentración de antígeno de la muestra.

Se pueden aplicar diferentes diseños para el mismo tipo de técnica, así por ejemplo, el ELISA competitivo también se puede utilizar para detectar anticuerpos, en este caso se tapizaría la placa con antígenos específicos del anticuerpo que se quiere detectar y se añadiría después la muestra de suero donde estarían los anticuerpos problema y también anticuerpos específicos del antígeno marcados con una enzima, se establece competencia entre el anticuerpo de la muestra y el del conjugado por unirse al antígeno de la placa, si se forman muchos inmunocomplejos porque se han unido al anticuerpo marcado, será porque no había anticuerpos en la muestra por eso la señal colorimétrica producida al añadir el sustrato es inversamente proporcional al contenido de anticuerpos en la muestra, es decir a mayor color menor anticuerpos habrá en la muestra y más anticuerpos marcados se han unido.

Ejercicio resuelto

Diseño de un ELISA competitivo para la determinación de anticuerpos anti-HBc.

La determinación de anticuerpos anti-HBc dirigidos contra el antígeno [HBcAg](#) presente en la [cápside](#) vírica, es una herramienta muy importante para el diagnóstico y el seguimiento de la [hepatitis B](#).

Para la determinación se utiliza una fase sólida sensibilizada con HBcAg sobre la que se añade suero o plasma del paciente. En una segunda incubación se añade otro anticuerpo.

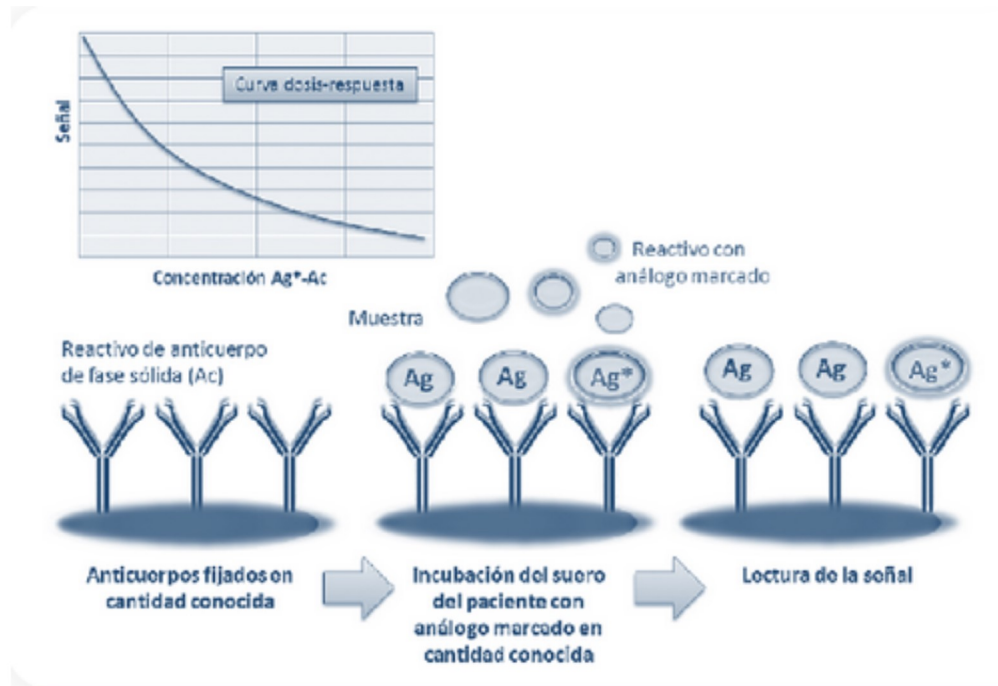
- ¿Cuál es el anticuerpo añadido en la segunda incubación?
- ¿Si no se incorporase ningún otro reactivo, cuál sería el componente conjugado con el enzima?
- Si después del revelado se detectase una intensidad de color muy elevada, ¿qué significaría?

Mostrar retroalimentación

- El anticuerpo es anti-HBc conjugado a la enzima. La competición se establecerá entre este anticuerpo añadido y el que ya estaba presente en el suero del paciente.
- Sería el mismo anticuerpo anti-HBc. El antígeno no puede estar conjugado porque entonces la lectura sería siempre la misma ya que en los lavados no se eliminaría el antígeno adsorbido sobre la fase sólida.
- Indicaría que en la muestra del paciente habrían pocos anticuerpos anti-HBc, de forma que muchas moléculas de anti-HBc conjugado se habrían unido al antígeno que sensibiliza la microplaca y habrían quedado fijadas resistiendo a los lavados, lo cual se traduciría en un color muy intenso después del revelado.

Para saber más

En esta imagen puedes examinar los pasos que se siguen para realizar un ELISA competitivo en el laboratorio. Fíjate en que el diseño corresponde a una técnica competitiva diferente de la descrita anteriormente puesto que la placa se halla sensibilizada con anticuerpos.



2.8.- Metodología general.

En la realización de cualquier técnica de ELISA hay una serie de pasos que siempre se repiten, de forma que se puede hablar de una metodología general que, básicamente, afecta tres fases de un ELISA:

- a. Tapizado de los pocillos con el antígeno o anticuerpo en la [microplaca de poliestireno](#) que es lo que habitualmente se utiliza
- b. Bloqueo de los sitios activos no saturados.
- c. Etapas de lavado.
- d. Reacción con el conjugado enzimático.

En este apartado estudiarás el tapizado de los pocillos y el bloqueo de los sitios activos no saturados y en los siguientes, las etapas de lavado y la reacción con el conjugado enzimático.

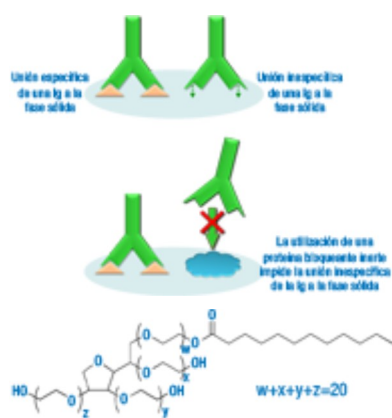
El tapizado de los pocillos se realiza básicamente mediante dos métodos :

- Dilución del antígeno o Anticuerpo en tampón carbonato (pH 9,6) e incubación posterior durante 3h a 37° o 16h a 4°C.
- Tratamiento a 40°-50°C en tampón fosfato PBS o solución salina fisiológica tamponada, a pH entre 7,2 y 7,4 hasta desecación.

Hay que tener en cuenta que este primer paso de tapizado muchas veces se ahorra ya que las casa comerciales tiene los kits preparados ya con las placas recubiertas de antígeno o anticuerpo.

El bloqueo de los sitios activos no saturados se realiza porque los inmunoensayos en fase sólida, como el ELISA, implican la inmovilización de ciertas proteínas a la superficie de la fase sólida (sensibilización). Como a lo largo de la técnica existe el riesgo de que algunas moléculas de las soluciones de [inmunorreactivo](#) también puedan unirse inespecíficamente a puntos no ocupados de la fase sólida influyendo en la especificidad y en la sensibilidad de los resultados, se realizará el bloqueo para que estas uniones inespecíficas se puedan minimizar , saturando los sitios no ocupados con un reactivo bloqueante que no intervenga de activamente en las reacciones del inmunoensayo.

La unión inespecífica del inmunorreactivo a la fase sólida se puede traducir en un aumento del [ruido de fondo \(background\)](#) o incluso en un falso positivo.



Los agentes bloqueantes generalmente se escogen de forma [empírica](#) ya que no hay ningún procedimiento estandarizado que sea útil para todas las técnicas. Se suelen utilizar proteínas inertes y detergentes no iónicos.

Las proteínas son bloqueantes permanentes. Se suele utilizar albúmina bovina sérica ([BSA](#)), leche en polvo descremada (por su contenido en [lactoalbúmina](#) y [caseína](#)) o [gelatina](#).

Los detergentes no iónicos inestabilizan interacciones de tipo iónico o hidrofóbico entre la superficie de la fase sólida y las biomoléculas. A diferencia de las proteínas, son agentes bloqueantes temporales, no impiden la unión de biomoléculas a la superficie de forma permanente porque son eliminados en las fases de lavado, por eso deben estar presentes en todas las fases de lavado. Lo mejor es utilizarlos junto con otros bloqueantes proteicos. El detergente no iónico más utilizado es el polisorbato (Tween).

Para saber más

En este vídeo puedes observar más detalles sobre el bloqueo de los sitios activos no saturados en técnicas de ELISA.

[Video ELISA indirecto](#)

2.9.- Etapas de lavado.



En apartados anteriores ya has estudiado cómo en los inmunoensayos heterogéneos, independientemente de que el antígeno o el anticuerpo estén unidos a la superficie, se requiere una etapa de separación física para eliminar las fracciones libres (exceso de inmunorreactivos marcados). Esta etapa se denomina lavado y también permite eliminar el exceso de analito así como las demás moléculas presentes en la muestra.

Las técnicas de ELISA se realizan mediante la adición secuencial de todos los reactivos necesarios separados por estas etapas de lavado. En el caso de microplacas, el lavado se lleva a cabo llenando consecutivamente los pocillos con solución de lavado para seguidamente vaciarlos por decantación o aspiración.

Cada una de las operaciones puede realizarse manualmente con micropipetas, preferiblemente de tipo [multicanal](#) o con equipamiento para su automatización, lo que permite procesar y analizar un gran número de muestras.

Para ello:

- La solución de lavado debe ser un tampón fisiológico que no interfiera con la actividad inmunológica y enzimática, y debe contener detergente para ayudar en la eliminación de la proteína no unida.
- El volumen de solución de lavado dispensado en cada pocillo ha de ser el necesario para cubrir totalmente la superficie recubierta con antígeno o anticuerpo. Se debe añadir un volumen igual de solución de lavado en cada pocillo, suavemente y con la misma fuerza para evitar la extracción de las proteínas unidas
- Los pocillos deben ser lavados entre tres y cinco veces.
- El mejor método para la eliminación de la solución de lavado es la decantación manual, pero también puede utilizarse la aspiración que debe controlarse para evitar que la superficie se seque.
- Por último, la superficie de los pocillos se debe mantener húmeda en todo momento. Cuando se manipulan varias placas, se deben mantener los pocillos llenos de solución de lavado hasta que se pueda proceder con el siguiente paso o bien dejar las microplacas invertidas sobre papel de celulosa humedecido para así mantener hidratada la superficie en caso de que la técnica se prolongue excesivamente.

Para controlar la [precisión](#) del análisis es esencial la optimización de la etapa de lavado. Lo que parece ser una manipulación simple y segura en microplacas, es en realidad la etapa del inmunoensayo que puede causar más problemas de precisión.

Para saber más

En los inmunoensayos, los lavados son operaciones fácilmente automatizables. En este vídeo puedes ver como funciona un lavador de microplacas.

Asys Atlantis Microplate ...



[Resumen textual alternativo](#)

Autoevaluación

En una técnica ELISA:

- El detergente más utilizado como bloqueante es el polisorbato.
- La solución de lavado NO puede contener detergente.
- Se pueden emplear proteínas como bloqueantes temporales.
- Los falsos negativos pueden ser debidos a un bloqueo deficiente

El detergente no iónico más utilizado es el polisorbato.

Incorrecta. La solución de lavado debe contener detergente para ayudar en la eliminación de la proteína no unida.

Incorrecta. Las proteínas son bloqueantes permanentes.

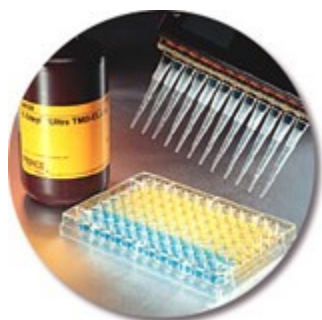
Incorrecta. Un bloqueo deficiente puede originar un falso positivo por un aumento del ruido de fondo pero no un falso negativo.

Solución

1. Opción correcta
2. Incorrecto
3. Incorrecto

4. Incorrecto

2.10.- Reacción con el conjugado enzimático.



Como ya sabes, el conjugado consta de dos partes unidas covalentemente, una parte inmunorreactiva que puede ser un antígeno o un anticuerpo, y un enzima que catalizará la reacción de un sustrato, la cual facilitará la visualización de la reacción que ha tenido lugar en la fase sólida.

Los enzimas más utilizados son:

- La peroxidasa de rábano (HRP), que se obtiene fácilmente y también se conjuga fácilmente con diferentes anticuerpos y antígenos. La principal desventaja es que es incompatible con muchos conservantes, como por ejemplo la azida sódica, que se utilizan para reducir la contaminación microbiana en muchas soluciones tampón.
- La fosfatasa alcalina, procedente de intestino de ternera. Es más cara que la peroxidasa pero más estable aunque se conjuga peor con antígenos o anticuerpos que la anterior y tiene mayor impedimento estérico lo cual también supone una desventaja frente a la HRP.

Para todas las técnicas de ELISA, la etapa final para visualizar la reacción antígeno-anticuerpo, es la adición de un sustrato cromogénico que en presencia del enzima dará lugar a un producto soluble coloreado que se valora con un espectrofotómetro o con un lector de

microplacas de ELISA que, como puedes ver en la imagen es un espectrofotómetro adaptado para la lectura de absorbancias en placas de ELISA. La intensidad de color es proporcional a la cantidad de conjugado enzimático presente.

Para algunos cromógenos, la reacción es progresiva y para detener el desarrollo del color, se suele frenar la reacción cuando el estándar más concentrado tiene una absorbancia determinada. El frenado puede conllevar un cambio de color y, por tanto, de longitud de onda de absorción.

Los cromógenos para la peroxidasa, cuando se oxidan, originan productos coloreados. Los más utilizados son:

- OPD. Su oxidación da un producto de color amarillo que se lee a 450 nm. Cuando se detiene la reacción de oxidación con un ácido se obtiene un producto de color naranja que se lee a 492 nm.
- TMB. Durante la reacción de oxidación produce un color azul que se lee a 370 nm o a 650 nm, y, tal como se observa en la imagen, cuando se bloquea con un ácido se obtiene un producto de color amarillo que se lee a 450 nm.
- ABTS. El producto de reacción es verde-azulado y se lee entre 405 y 410 nm. La reacción se para con SDS, pero no cambia el color del producto.

Los cromógenos para la fosfatasa alcalina, cuando se hidrolizan originan productos coloreados. Los más utilizados son:

- p-NPP. Da lugar a p-nitrofenol amarillo.
- BCIP/NBT. El NBT actúa como oxidante mientras que el BCIP funciona como sustrato de la fosfatasa alcalina. El producto de reacción es azul oscuro.

Para saber más

En todas las técnicas de ELISA, la etapa final es la valoración espectrofotométrica del producto de la reacción enzimática que puede realizarse con un lector de microplacas. En este vídeo puedes ver cómo funciona un lector de microplacas.

FlexStation® 3 Multi-Mod...



[Resumen textual alternativo](#)

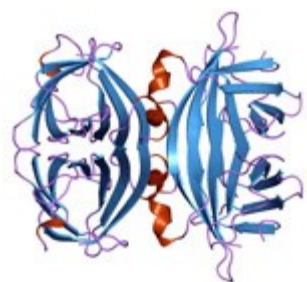
En este vídeo puedes ver cómo se lleva a cabo un ELISA indirecto en el laboratorio. Presta atención porque el ELISA indirecto se suele realizar para determinar anticuerpos problema utilizando microplacas previamente sensibilizadas con el antígeno, sin embargo en esta técnica se sensibiliza la microplaca con un antígeno problema y después se determina con un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario, por lo que en este ejemplo se utiliza para determinar antígeno y no anticuerpo en una muestra problema . Al final se utiliza OPD como cromógeno.

Indirect ELISA

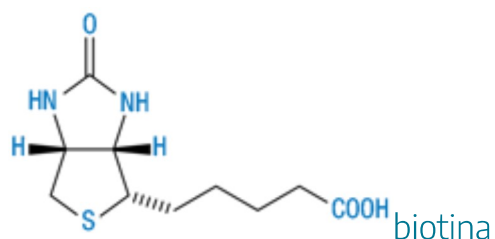


[Resumen textual alternativo](#)

2.11.- Técnicas avidina-biotina.



[avidina](#)



[biotina](#)

En las técnicas indirectas ya has podido observar cómo la utilización de anticuerpos secundarios se traduce en un aumento de señal (amplificación) y por tanto en un incremento de la sensibilidad de la técnica. Actualmente se utilizan otros sistemas de amplificación de señal del marcador, uno de los más empleados es el sistema avidina-biotina.

La avidina es una [glicoproteína](#) presente en la clara de huevo que está formada por cuatro subunidades iguales, cada una de ellas tiene un lugar de unión para la biotina. La biotina es una vitamina que se encuentra en todos los tejidos de los mamíferos y su estructura permite la unión a cada una de las cuatro subunidades de las moléculas de avidina. La afinidad entre las moléculas de avidina y biotina es muy elevada, se unen entre ellas de forma no covalente formando un complejo muy estable: la unión es prácticamente irreversible.

Por otra parte, la avidina se puede conjugar con enzimas y la biotina se puede conjugar fácilmente a anticuerpos (anticuerpos biotinilados) aumentando así la versatilidad de su uso. Este proceso de biotinilización no modifica las propiedades inmunorreactivas de los anticuerpos ni las propiedades de unión de la biotina con la avidina.

Como inconveniente, cabe destacar que en las técnicas avidina-biotina se pueden producir más uniones inespecíficas porque la avidina tiene su [punto isoelectrico](#) a pH básico y, por tanto, cuando se halla a pH neutro, que suele ser el pH de trabajo, tiene carga positiva, lo que puede originar uniones inespecíficas con otros componentes cargados negativamente.

Para evitar este inconveniente se puede utilizar estreptavidina en lugar de avidina, una proteína bacteriana aislada de *Streptomyces avidini*. La estreptavidina está formada por cuatro subunidades que, como en el caso de la avidina, suponen cuatro sitios de unión para la biotina. También se puede conjugar con enzimas pero, a diferencia de la avidina, su punto isoeléctrico es neutro.

Debes conocer

En la animación siguiente podrás observar la estructura de la avidina y la estreptavidina así como el papel que juegan en las técnicas de ELISA que utilizan el sistema avidina/estreptavidina-biotina.

[Resumen textual alternativo](#)

En la animación siguiente podrás ver el desarrollo de un ELISA para determinar proteína A utilizando un sistema estreptavidina-biotina.

[Resumen textual alternativo](#)

Autoevaluación

Ordena con números las siguientes etapas correspondientes a la realización un ELISA para determinar alfa fetoproteína en el suero de un paciente. El número de orden 7 corresponde a una etapa que no pertenece a esta técnica:

Ejercicio de ordenación

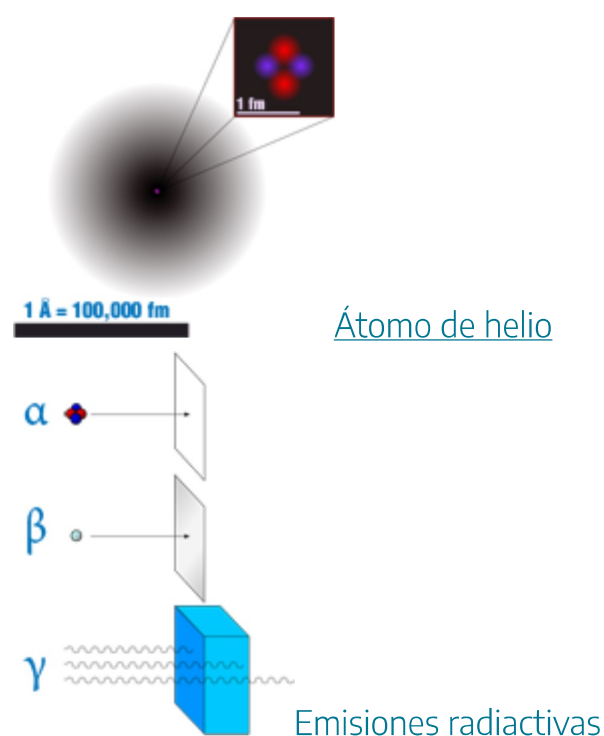
Etapa	Número de orden
Suero del paciente	<input type="checkbox"/>
Enviar	<input type="checkbox"/>
Microplaca sensibilizada con anti-alfa fetoproteína biotinilada.	<input type="checkbox"/>
Complejo avidina-peroxidasa	<input type="checkbox"/>

Retroalimentación: Se trata de una técnica sándwich para detectar alfa fetoproteína. La microplaca tiene que estar sensibilizada con anticuerpos sin marcar. Seguidamente se debe añadir la muestra en donde se busca la alfa fetoproteína y después otro anticuerpo específico que en este caso sólo puede ser la anti alfa-fetoproteína policlonal. Puesto que no está marcada el siguiente paso ha de ser la adición de la anti-Ig biotinilada que se unirá al complejo de avidina-peroxidasa y posteriormente se revelará con su sustrato.

2.12.- Radioinmunoensayos.

En los inmunoensayos la forma de localizar los inmunocomplejos se basa en el marcaje de algún inmunorreactivo, así por ejemplo, ten presente que en las técnicas de ELISA se utilizan enzimas como marcadores. De forma parecida, en los radioinmunoensayos se utilizan [radioisótopos](#) como marcadores. Se trata de técnicas que presentan inconvenientes como por ejemplo la propia manipulación de marcadores radiactivos y los problemas de eliminación de residuos radioactivos. Por tanto, progresivamente van siendo desplazadas por técnicas que utilizan otros marcadores, pero aún son técnicas importantes en [endocrinología](#) para determinar hormonas que se encuentran en bajas concentraciones. Fueron los primeros inmunoensayos utilizados y se describieron por primera vez en 1959 para medir la insulina plasmática.

Los isótopos son átomos con el mismo [número atómico](#) y diferente [número de masa](#), es decir que se diferencian por el número de neutrones en su núcleo.



La mayor parte de elementos naturales están formados por mezclas de isótopos, ahora bien, los isótopos naturales de los elementos más ligeros suelen ser estables pero los de los elementos más pesados suelen ser inestables porque tienen un exceso de [neutrones](#) o de [protones](#), en este último caso se habla de radioisótopos. Los radioisótopos se desintegran espontáneamente transformándose en otros isótopos que pueden ser estables o no, emitiendo:

- Partículas alfa. Son núcleos de átomos de helio, es decir, partículas pesadas con dos cargas positivas y cuatro unidades de masa. Raramente se utilizan en inmunoensayos.
- Partículas beta. Son partículas procedentes de un núcleo con la misma carga y masa que un [electrón](#).
- Rayos gamma. Es una radiación electromagnética similar a los rayos X.

La actividad de una muestra radiactiva se mide por el número de núcleos que se desintegran por unidad de tiempo y se suele expresar en cpm.

- Para medir la emisión de partículas beta se utilizan contadores de centelleo líquido.
- Las radiaciones gamma se miden con contadores gamma (contadores de centelleo sólido).

En la tabla siguiente puedes ver qué isótopos se emplean en inmunoensayos. Entre ellos cabe destacar el [¹²⁵I](#), uno de los más utilizados.

Isótopos usados en
radioinmunoensayos.

Isótopo Tipo de emisión

¹³¹I Beta

[¹²⁵I](#) Gamma

[³H](#) Beta

[⁵⁷Co](#) Gamma

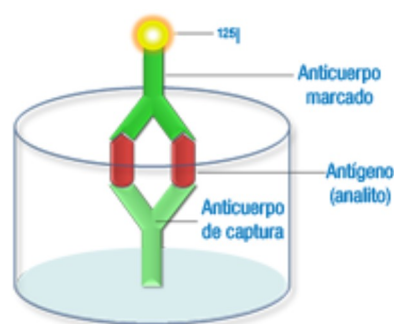
[¹⁴C](#) Beta

En los siguientes apartados vas a estudiar los dos tipos de inmunoensayos que utilizan radioisótopos como marcadores:

- No competitivos (IRMA, ensayos inmunoradiométricos).

- Competitivos (RIA, radioinmunoensayos propiamente dichos).

2.13.- Ensayos inmunoradiométricos (IRMA).



Como verás, los métodos no competitivos (IRMA) más utilizados, son métodos sándwich muy similares a los ELISA. La principal diferencia radica en que al final de la técnica no se mide la absorbancia sino la radiactividad ligada, es decir, la radiactividad que se puede medir después de las fases de lavado originada por la presencia de inmunocomplejos marcados.

En la imagen puedes ver que la técnica para detectar un antígeno consta de tres pasos generales:

1. Fase sólida sensibilizada con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno que se ha de determinar.
2. Adición de la muestra conteniendo el antígeno problema (analito).
3. Incubación con un anticuerpo monoclonal, marcado con un radioisótopo, generalmente ^{125}I , que está dirigido contra otro epítipo del antígeno.

La radiactividad de la fracción ligada como ocurre en los ensayos no competitivos, es directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra y debe compararse, mediante una curva de calibración, con la de los estándares de antígeno para determinar el valor de la concentración de analito.

Para saber más

En la animación siguiente podrás repasar el desarrollo de una técnica IRMA.

Basic principle of immuno...



[Resumen textual alternativo](#)

2.14.- Radioinmunoensayos (RIA).

Recuerda cómo funcionan los métodos competitivos que ya has estudiado en apartados anteriores. Cuando se aplican a técnicas con marcadores radiactivos surgen los radioinmunoensayos propiamente dichos (RIA). En ellos, la muestra con el antígeno a determinar se incuba con un anticuerpo específico y un antígeno marcado con un radioisótopo que se añaden a la vez.

La técnica se basa en la competición entre el antígeno problema (antígeno frío) y un antígeno marcado (antígeno caliente) a una concentración constante, para unirse a un anticuerpo añadido en concentración limitante, tal como puedes observar en el esquema que muestra la imagen.



La cantidad de anticuerpo es inferior a la que sería necesaria para reaccionar con todo el analito, de forma que todo el anticuerpo reacciona con el antígeno frío y con el caliente. Como las concentraciones de antígeno marcado y de anticuerpos son constantes, la radiactividad que se mide corresponde al inmunocomplejo radioactivo y sólo dependerá de una única variable que es la concentración de analito. Cuanto más antígeno haya en la muestra, más inmunocomplejo sin marcar y menos inmunocomplejo marcado habrá, por lo tanto a menor radiactividad más antígeno habrá en la muestra.

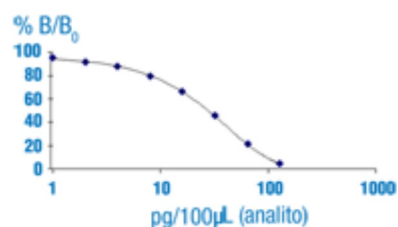
La radiactividad total es la misma antes y después de la reacción, por lo tanto hay que separar la fase ligada (inmunocomplejos marcados y no marcados) de la no ligada (el resto de componentes). La radiactividad ligada B se puede medir directamente como cpm pero en general se mide el % respecto a la radiactividad total:

- Hay un control sin muestra donde la radiactividad será máxima porque todos los sitios

de unión del anticuerpo se unen al antígeno marcado. El valor de esta radiactividad es el ligado máximo B_0 .

- La radiactividad ligada se suele expresar como $\% B/B_0$.

La radiactividad de la fracción ligada es inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra y debe compararse, mediante una curva de calibración, con la de los estándares para poder determinar el valor de la concentración de analito.



Para la realización de este calibrado, los estándares contienen una cantidad fija de anticuerpo y antígeno marcado, y una cantidad variable de antígeno problema. Con ellos se puede construir una curva de calibración radiactividad ligada-concentración que, como puedes ver en la imagen, no es lineal.

La separación de fases se suele realizar mediante una fase sólida, generalmente tubos de plástico o microplacas.

Para saber más

Este documento puedes examinar el protocolo que se sigue para realizar una determinación de testosterona por RIA.

[Determinación de Testosterona por RIA.](#)

Autoevaluación

En una técnica RIA, las moléculas de antígeno marcadas que no llegan a reaccionar

con el anticuerpo se encuentran en la fase no ligada. ¿Verdadero o falso?

- Verdadero.
- Falso.

En la fase no ligada se hallan todos los componentes de la técnica excepto los inmunocomplejos, marcados o no marcados.

Esta afirmación no es correcta.

Solución

1. Opción correcta
2. Incorrecto

2.15.- Inmunoensayos fluorescentes.



En este apartado vas a estudiar aquellos inmunoensayos en los que la detección se efectúa mediante la intervención de una sustancia fluorescente. Todos se basan en el fenómeno de la fluorescencia. En algunos casos el marcador es una molécula fluorescente mientras que en otros el marcador es un enzima que cuando actúa sobre ciertos sustratos genera fluorescencia. Los primeros son verdaderamente fluoroinmunoensayos mientras que los segundos, de hecho, son fluoroenzimoinmunoensayos.

Las moléculas fluorescentes (fluorocromos) son capaces de absorber energía en forma de radiación luminosa y emitirla en forma de radiación luminosa de menor energía y mayor longitud de onda. La luz absorbida excita los electrones de la molécula desde su estado fundamental a un estado excitado pero las moléculas excitadas son poco estables y rápidamente pierden energía para volver a su estado fundamental. El retorno al estado fundamental emitiendo radiación luminosa constituye la fluorescencia.

En la fluorescencia, la radiación de emisión siempre tiene una longitud de onda mayor que la de excitación. Esta diferencia entre las dos longitudes de onda se denomina desplazamiento de Stokes.

Estos inmunoensayos se basan en la medida de la fluorescencia, es decir, de la radiación luminosa emitida por un fluorocromo cuando es excitado por una determinada longitud de onda.

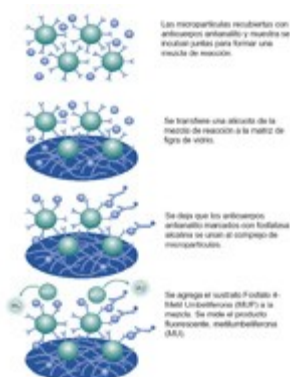
Los fluoroinmunoensayos tradicionales eran poco sensibles por el elevado ruido de fondo o background de las medidas de fluorescencia pero actualmente hay técnicas basadas en la detección de fluorescencia que son tan sensibles como las que utilizan otros tipos de detección porque se han desarrollado nuevos marcadores fluorescentes y porque se han mejorado los instrumentos de medida.

El ruido de fondo está causado por la presencia de compuestos fluorescentes en la muestra biológica, por la dispersión de la radiación provocada por componentes de la muestra, como por ejemplo proteínas y lipoproteínas, por el material de las microplacas o por contaminantes, como por ejemplo partículas de polvo y huellas digitales.



Los marcadores utilizados en estas técnicas pueden ser fluorocromos, como la fluoresceína, o bien fluorógenos, sustratos que se convierten en productos fluorescentes por acción de algún enzima, como por ejemplo ciertos compuestos de umbeliferona.

2.15.1.- Fluoroenzimoimmunoensayos.



En el apartado anterior has estudiado cómo se pueden utilizar fluorógenos como marcadores. En estos casos hay que recurrir a una reacción enzimática para poner de manifiesto la fluorescencia. Los fluoroenzimoimmunoensayos, llamados también ELFIA, son técnicas que utilizan fluorógenos. En realidad son enzimoimmunoensayos un poco más sensibles que los ELISA. La medida, las condiciones de la reacción o la separación de la fracción ligada, se efectúan como en otros inmunoensayos.

Una de las técnicas más utilizadas es el enzimoimmunoensayo por micropartículas MEIA.

Se trata de un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich en el que se utilizan micropartículas de látex recubiertas de un anticuerpo específico para el analito, lo que supone un aumento de superficie efectiva.

Tal como puedes ver en la imagen, estas micropartículas, una vez se han incubado con la muestra, se transfieren a una matriz de fibra de vidrio que actúa como filtro y se incuban con anticuerpos anti-análito marcados con fosfatasa alcalina que cataliza la reacción de revelado.

El sustrato utilizado es un fluorógeno, el fosfato de 4-metilumbeliferona (MUP), que por acción de la enzima fosfatasa alcalina, da lugar a 4-metilumbeliferona (4-MU) fluorescente:



Autoevaluación

Ordena con números las siguientes etapas correspondientes a la realización de un MEIA para determinar cortisol en el suero de un paciente. El número de orden 6 corresponde a una etapa que no pertenece a esta técnica:

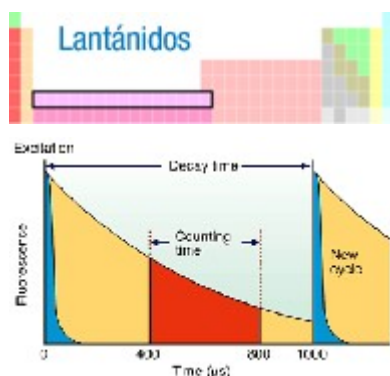
Ejercicio de ordenación.

Etapa	Número de orden
TMB y peróxido de hidrógeno.	<input type="checkbox"/>
Muestra del paciente.	<input type="checkbox"/>
Micropartículas recubiertas de anticuerpos monoclonales anti-cortisol.	<input type="checkbox"/>
Anticuerpos policlonales anti-cortisol.	<input type="checkbox"/>
fosfato de 4-metilumbeliferona.	<input type="checkbox"/>
Anti-Ig conjugada con fosfatasa alcalina.	<input type="checkbox"/>

Enviar

Se trata de una técnica MEIA para detectar cortisol. Los componentes actúan en el mismo orden que en cualquier técnica sándwich. La única etapa que no corresponde a esta técnica es la del TMB porque es un sustrato de la peroxidada y en esta técnica se utiliza fosfatasa alcalina.

2.15.2.- Fluoroimmunoensayo de tiempo resuelto (TRFIA).

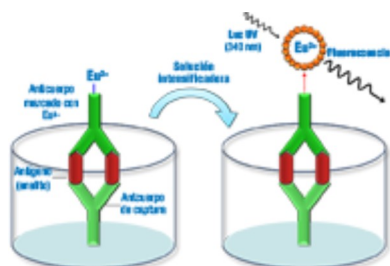


En el apartado de ELISA indirecto y en el de las técnicas avidina-biotina ya estudiaste cómo aumenta la sensibilidad cuando se amplifica la señal. En los inmunoensayos TRFIA, las moléculas fluorescentes utilizadas y una técnica especial de medida de fluorescencia, consiguen el mismo objetivo.

Las moléculas fluorescentes son [quelatos](#) de un metal [lantánido](#), generalmente del ión europio Eu^{3+} . El tiempo de fluorescencia de estos quelatos es mucho mayor que el de los fluorocromos tradicionales, y puede llegar a exceder los 1000 μs .

Se utilizan [fluorímetros](#) especiales en los que los quelatos se excitan unas 1000 veces por segundo a 340 nm. Como puedes ver en el diagrama, en cada ciclo se mide la emisión de fluorescencia después de un corto tiempo de latencia (unos 400 μs) para evitar la fluorescencia inespecífica (ruido de fondo) que suele durar unos 10 ns .

La suma de las medidas repetidas permite llegar a límites de detección muy bajos. El sistema es muy versátil y se puede utilizar en diferentes tipos de técnicas. Una de las más utilizadas es el [DELFA](#). En la imagen puedes ver un esquema de la técnica aplicada a la determinación de un antígeno (analito).





En los ensayos DELFIA, la molécula marcada prácticamente no muestra fluorescencia, pero cuando se añade una solución intensificadora después de producirse la reacción antígeno-anticuerpo, se desarrolla más fluorescencia. En pocos minutos, su bajo pH [disocia](#) el [europio](#) del compuesto marcado y rápidamente, junto con componentes de la solución intensificadora, forma un nuevo quelato altamente fluorescente dentro de una [micela](#) protectora. La solución intensificadora amplifica la fluorescencia del quelato hasta diez millones de veces y esa fluorescencia es proporcional a la concentración del antígeno, es decir, del analito que se quiere determinar.

Los inmunoensayos de fluorescencia DELFIA se realizan en microplacas preparadas y su principal característica es su elevada sensibilidad. Todo el manejo de muestras y reactivos, así como todas las etapas del ensayo pueden realizarse en un sistema de inmunoensayo automático.

El sistema completo, que puedes ver en la imagen, consta de un procesador de muestras que realiza la dilución automática y el pipeteo de muestras de suero, y un procesador de microplacas que lleva a cabo el manejo de reactivos y todas las fases del ensayo, incluyendo la medición.

Para saber más

[Animación del Inmunoensayo DELFIA](#)

En la página siguiente encontrarás más esquemas y detalles generales sobre la técnica DELFIA. Podrás ver esquemas de ensayos competitivos y no competitivos y podrás consultar un protocolo general de aplicación de la técnica.

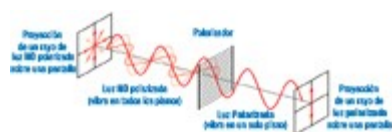
[Inmunoensayos DELFIA.](#)

En el siguiente documento podrás ver el protocolo a seguir para realizar un DELFIA en

el laboratorio.

[Determinación de alfa fetoproteína por una técnica DELFIA.](#) (253 KB)

2.15.3.- Inmunoensayo de fluorescencia polarizada (FPIA).



En un apartado anterior has estudiado un inmunoensayo homogéneo competitivo utilizado para moléculas de bajo peso molecular, es decir para sustancias que pueden considerarse haptenos. ¿Lo recuerdas? Se trata del inmunoensayo enzimático multiplicado (EMIT). Pues bien, el inmunoensayo de fluorescencia polarizada (FPIA) es una técnica parecida pero, en este caso, el sistema de detección implica fenómenos de fluorescencia. La técnica se basa en dos conceptos clave, por una parte la rotación de las moléculas en solución y por otra las características de la luz [polarizada](#).

Las moléculas más grandes rotan más lentamente en la solución que las moléculas más pequeñas. Este principio puede utilizarse para distinguir entre haptenos marcados con fluorocromos ya que se trata de moléculas pequeñas que rotan rápidamente, e inmunocomplejos marcados con fluorocromos, moléculas más grandes que rotan lentamente en la solución.

La luz polarizada describe ondas de luz que solamente están presentes en un plano simple del espacio. Cuando la luz polarizada es absorbida por una molécula pequeña que rota rápidamente, como los haptenos marcados con fluorocromos, se emite fluorescencia en diferentes planos y como resultado se pierde polarización, es decir hay una disminución en la intensidad de luz polarizada.

Cuando la luz polarizada es absorbida por una gran molécula que rota lentamente, como es el caso de los inmunocomplejos marcados con fluorocromos, se mantiene la polarización y, por tanto, se emite luz polarizada en el mismo plano de la luz de excitación.

Debes conocer

En la animación siguiente podrás ver el desarrollo de una prueba FPIA. Como en todas

las técnicas homogéneas, lo más importante es la separación entre la señal producida por la fase ligada, que contiene inmunocomplejos marcados, y la de la fase no ligada, que contiene haptenos marcados.



[Resumen textual alternativo](#)

Los inmunoensayos FPIA se realizan en equipos de inmunoensayo automático. La muestra del paciente se incuba con una cantidad conocida de hapteno marcado con fluoresceína y un anticuerpo específico, de forma que los haptenos marcados y no marcados (los de la muestra) compiten por los sitios de unión en el anticuerpo. La emisión de luz polarizada depende de si el hapteno fluorescente está unido al anticuerpo o no. Puesto que es un inmunoensayo competitivo, cuanto mayor sea la concentración de hapteno, menor será la concentración de inmunocomplejo fluorescente y menor será la intensidad de luz polarizada.

Recuerda que el FPIA se utiliza para moléculas de bajo peso molecular, por tanto es ideal para obtener una determinación exacta y sensible de algunas hormonas de molécula pequeña, como por ejemplo hormonas tiroideas, y de pequeñas moléculas de interés en toxicología, como pueden ser las drogas terapéuticas y las drogas de abuso.

Autoevaluación

Una molécula antigénica marcada con un fluorocromo sería un componente de una técnica:

- DELFIA.
- TRFIA.
- FPIA.
- MEIA.

Incorrecta. Utiliza lantánidos como marcadores, en realidad es una variante del TRFIA.

Incorrecta. Utiliza lantánidos como marcadores.

Se trata de una técnica competitiva en donde se utilizan moléculas antigénicas marcadas con un fluorocromo.

Incorrecta. Utiliza enzimas como marcadores.

Solución

1. Incorrecto
2. Incorrecto
3. Opción correcta
4. Incorrecto

2.16.- Inmunoensayos quimioluminiscentes.

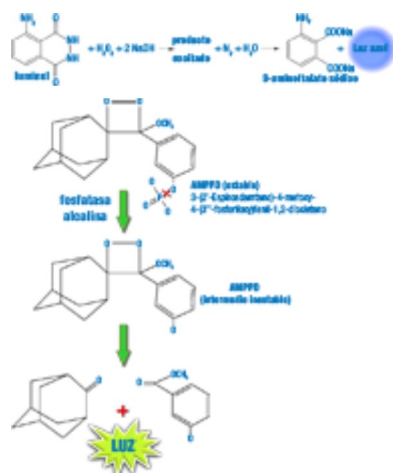


En este apartado vas a estudiar aquellos inmunoensayos en los que la detección del inmunocomplejo se efectúa mediante la intervención de una sustancia quimioluminiscente.

La quimioluminiscencia se podría definir como la producción química de luz visible. Los marcadores quimioluminiscentes emiten luz como resultado de una reacción química en la que uno de los productos intermedios se excita y vuelve al estado fundamental emitiendo luz. En la actualidad los más utilizados para esta técnica son, por ejemplo, el luminol y sus derivados(isoluminol , pirogalol), y los esteres de acridina que se conjugan con el Antígeno o Anticuerpo en presencia de compuestos oxidantes tiene lugar la emisión de luz a partir del producto excitado por la oxidación.

Cuando las reacciones quimioluminiscentes se producen en sistemas biológicos, como es el caso de las luciérnagas , el proceso se denomina bioluminiscencia. Las sustancias bioluminiscentes son derivados de la luciferina (molécula procedente de la luciérnaga) que se oxidan en presencia de un enzima específica, la luciferasa y emiten luz.

Tanto la bioluminiscencia como la quimioluminiscencia son ampliamente utilizadas en inmunoensayos. Los ensayos luminiscentes son muy rápidos y sensibles, actualmente la [luminiscencia](#) es el método de detección más sensible por su capacidad de multiplicación y amplificación de la señal.



Muchas de las reacciones de quimioluminiscencia son de tipo oxidativo y tienen lugar en presencia de oxígeno o peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y un enzima. Uno de los sustratos más utilizados en estas técnicas es el luminol.

En las técnicas de quimioluminiscencia, las emisiones luminosas pueden ser de dos tipos: flash o glow.

- Quimioluminiscencia flash: La adición de los reactivos provoca la emisión inmediata de luz. La señal luminosa es similar a un flash que llega a su máxima intensidad en segundos o milisegundos. Debido a la gran rapidez de la reacción, la mezcla de los reactivos debe ser instantánea: debe hacerse en la posición de la lectura, frente al sistema de detección, para poder registrar la emisión de luz. *La quimioluminiscencia de los ésteres de acridina es de tipo flash.*
- Quimioluminiscencia glow: Es una emisión prolongada de luz intensa, que llega al máximo después de un tiempo de incubación. La luz emitida aumenta poco a poco detectándose en forma de pico de larga duración. Estas reacciones son estables durante un mínimo de 20 minutos. La reacción se puede iniciar fuera del aparato de detección, el procedimiento es más sencillo y más sensible que las técnicas flash. *La*

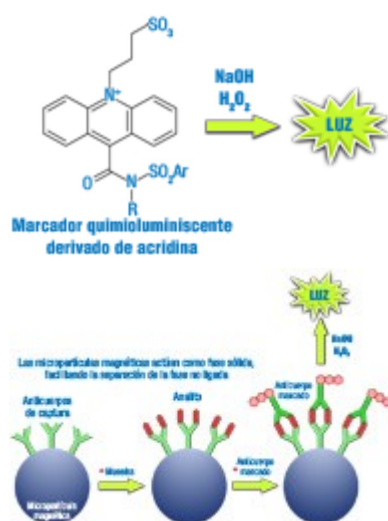
quimioluminiscencia del luminol es de tipo glow.

El esquema de las técnicas se asemeja al de otros inmunoensayos que ya has estudiado, así por ejemplo se pueden realizar técnicas sándwich utilizando un anticuerpo de captura unido a una fase sólida y otro anticuerpo secundario marcado, ambos dirigidos contra el analito que se pretende detectar.

Todas las técnicas se basan en el fenómeno de la quimioluminiscencia pero en algunas, el marcador es una molécula quimioluminiscente mientras que en otras, el marcador es un enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina o beta-galactosidasa) que cuando actúa sobre ciertos sustratos genera quimioluminiscencia. Estas últimas, de hecho, son un tipo de enzimoimmunoensayos porque el inmunorreactivo está marcado con un enzima, pero generalmente se utiliza el término inmunoensayos quimioluminiscentes para referirse a todos ellos.

Para el cálculo de la concentración de analito se compara su luminiscencia con la de un estándar de concentración conocida. La emisión quimioluminiscente se mide en RLUs, para ello se utilizan espectrómetros de quimioluminiscencia molecular, también llamados luminómetros.

2.16.1.- Técnicas quimioluminiscentes automatizadas.



En apartados anteriores has podido comprobar que muchos inmunoensayos pueden realizarse manualmente, pero en los laboratorios, las técnicas se automatizan cada vez más. Actualmente la mayoría de técnicas quimioluminiscentes se realizan en equipos de inmunoensayo automático. Una de estas técnicas es el CMIA que se caracteriza por el empleo de micropartículas magnéticas recubiertas de anticuerpo específico como fase sólida.

Como verás más adelante, el diseño es el de una técnica sándwich y el anticuerpo secundario está conjugado con un marcador quimioluminiscente derivado de la acridina. La emisión de quimioluminiscencia flash está provocada por una base (hidróxido sódico) y un oxidante (peróxido de hidrógeno).

Las características magnéticas de las micropartículas facilitan su separación del resto de componentes cuando quedan retenidas en un campo magnético. En la siguiente imagen puedes visualizar el esquema de la técnica.

Como puedes comprobar, los pasos de la reacción para el CMIA son muy similares a los de MEIA (enzimoinmunoensayo por micropartículas). Ambos utilizan la tecnología de ensayo sándwich no competitiva para medir analitos. Recuerda que en estos dos inmunoensayos no competitivos, la señal medida es directamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra.

Diferencias entre MEIA y CMIA.

Técnica	Fase sólida	Separación	Marcador	Detección
MEIA	Micropartícula de látex	Matriz de fibra de vidrio	Fosfatasa alcalina	Fluorímetro
CMIA	Micropartícula magnética	Imán	Derivados de acridina	Luminómetro

Autoevaluación

Se considera que la luminiscencia es el método de detección más sensible en inmunoensayos. ¿Verdadero o falso?

- Verdadero.
- Falso.

Actualmente la luminiscencia es el método de detección más sensible por su capacidad de multiplicación y amplificación de la señal.

Esta afirmación no es correcta.

Solución

1. Opción correcta
2. Incorrecto

2.17.- Utilización de controles en inmunoensayos.

Como ya sabes, para llevar a cabo un inmunoensayo se necesitan unos reactivos que dependen del tipo de inmunoensayo y del analito que se va a determinar. Los kits de inmunoensayos llevan todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la técnica y esto comprende varios estándares o calibradores, controles negativos y controles positivos. Aunque su utilidad es la misma en cualquier inmunoensayo, vas a seguir una explicación referida a técnicas de ELISA.

Los estándares son soluciones de analito de concentraciones conocidas. Los controles negativos, son muestras libres del analito que se quiere determinar, y los positivos, muestras con una concentración conocida de analito.

Cuando se realiza un ELISA, en cada microplaca deben incluirse duplicados de las muestras y duplicados de los estándares y también de los controles positivo y negativo.

Control positivo: Es una muestra con una concentración conocida de analito. Un resultado positivo en el control positivo, aun cuando las muestras sean negativas, indica la validez de los reactivos y la realización correcta del procedimiento, y verificará que los resultados negativos son válidos.

Reflexiona

Si una muestra contiene analito debería mostrar color después del revelado. Si a pesar de todo no se colorea puede indicar el deterioro de algún reactivo o un error técnico en la realización de la técnica y por tanto otros pocillos no coloreados también podrían contener analito, es decir serían [falsos negativos](#).

Control negativo: Es una muestra libre de analito. Controla la especificidad de la técnica ya que pone de manifiesto uniones no específicas y detecta resultados falsos positivos.

Reflexiona

Si una muestra no contiene analito no debería mostrar color después del revelado. Si se colorea indica que el [inmunorreactivo](#) se ha unido inespecíficamente (no había analito) y por tanto otros pocillos coloreados podrían tener una concentración muy baja de analito o no tener analito, es decir serían [falsos positivos](#).



En esta imagen puedes ver una microplaca de ELISA después del revelado. Observa el color intenso de los pocillos H11 y H12, son controles positivos. Los pocillos F11 y F12 no muestran color, son controles negativos. Los pocillos B7 y B8 muestran resultados positivos, con una coloración que, visualmente, se halla entre la de los controles positivos y la de los controles negativos.

2.18.- Representación de datos y obtención de resultados.

Ahora ya sabes cómo funcionan y cómo se llevan a cabo los inmunoensayos, pero finalmente ¿cómo se consiguen los resultados analíticos?

En las técnicas de ELISA la lectura de los datos que permitirán la obtención de los resultados se efectúa por espectrofotometría, mientras que en otros inmunoensayos se debe recurrir a medidas de radiactividad, fluorescencia o luminiscencia.

Estas lecturas se suelen automatizar y son suministradas por el mismo equipo en el que se lleva a cabo el inmunoensayo, así como los resultados, que se traducen en un número generalmente expresado como una concentración. No obstante, la forma de representar los datos obtenidos y la obtención de resultados, es similar en todos los inmunoensayos aunque vamos a estudiarlo en el caso de las técnicas de ELISA.

Al finalizar un ELISA se pueden obtener resultados cualitativos y cuantitativos:

Resultados cualitativos: permiten determinar si un resultado es positivo o negativo. El aspecto más controvertido es la determinación del punto de corte o valor discriminante (cut-of), un valor límite de absorbancia que diferencia entre un resultado positivo y un resultado negativo.

Existen varios métodos para calcular este punto de corte a partir de los controles positivos y negativos, y en muchos kits se indica cómo obtenerlo o bien qué valor debe tener. Una vez establecido, las muestras con una absorbancia mayor se consideran positivas y aquellas con una absorbancia menor se consideran negativas.

Para saber más

En el siguiente documento puedes consultar un ejemplo sobre el punto de corte y los

resultados cualitativos. Es un resumen de un protocolo de ELISA sándwich para determinar el antígeno “s” del virus de la hepatitis B. Puedes comprobar cómo se calcula el punto de corte en esta técnica, y su utilidad para la determinación del resultado cualitativo.

[Detección del HBsAg en suero o plasma.](#)

Resultados cuantitativos: permiten determinar la concentración de un analito en la muestra. Se debe representar gráficamente la media de los valores de absorbancia obtenidos para cada estándar o calibrador (si se analizan por duplicado) frente a su concentración.

La concentración en la muestra se halla gráficamente por interpolación de la media de absorbancias (si se analizan por duplicado) en la curva de calibración o se calcula matemáticamente a partir de la ecuación de la mejor [curva de regresión](#), calculada con alguna aplicación informática.

Debes conocer

En la siguiente animación podrás ver cómo se calculan resultados en un ELISA.

Cálculo de resultados en un ELISA.

[Resumen textual alternativo](#)



Las representaciones en técnicas no competitivas muestran curvas ascendentes: Los

aumentos de concentración de analito se corresponden con aumentos de absorbancia.

En cambio las representaciones en técnicas competitivas muestran curvas descendentes: Los aumentos de concentración de analito se corresponden con disminuciones de absorbancia.

Autoevaluación

En una técnica ELISA:

- El control negativo controla la especificidad.
- El control positivo pone de manifiesto falsos positivos.
- El cut-off discrimina entre falsos positivos y falsos negativos.
- El cálculo de resultados puede efectuarse prescindiendo de los estándares.

Los resultados en técnicas competitivas muestran curvas descendentes, los aumentos de concentración de analito se corresponden con disminuciones de absorbancia.

Incorrecta. Pone de manifiesto falsos negativos.

Incorrecta. Discrimina entre un resultado positivo y un resultado negativo.

Incorrecta. Tanto el método gráfico como el matemático se efectúan a partir de la curva de calibración, construida a partir de los datos obtenidos con los estándares.

Solución

1. Opción correcta
2. Incorrecto
3. Incorrecto
4. Incorrecto

2.19.- Tests inmunocromatográficos.



Probablemente conoces estas técnicas a través de la publicidad en medios de comunicación porque aunque tienen múltiples aplicaciones, por ejemplo la detección de drogas de abuso o la de antígenos víricos o bacterianos, se han popularizado mucho como tests de embarazo. En realidad son técnicas parecidas a los ELISA sándwich que realizan sobre tiras reactivas de derivados de celulosa (nitrocelulosa normalmente) que contienen anticuerpos específicos para detectar rápidamente la presencia de antígeno en líquidos biológicos y en lugar de utilizar enzimas y sustratos para revelar la formación de los inmunocomplejos, se utilizan nanopartículas coloreadas.

Esta técnica tiene además la ventaja de poder usarse para todo tipo de muestras biológicas y de aparecer el resultado casi de inmediato.

Las tiras de nitrocelulosa tienen tres zonas:

- Zona para la muestra con anticuerpos monoclonales específicos del antígeno buscado, marcados con una nanopartícula de oro coloidal o selenio.
- Zona test con un segundo anticuerpo específico policlonal, dirigido contra otros epítomos del antígeno.
- Zona de control con una anti-Ig policlonal que se unirán a los Ac monoclonales.



Desarrollo del ensayo:

1. Se coloca una gota del líquido biológico donde se determinará el antígeno sobre la zona de la muestra que contiene partículas con anticuerpos monoclonales específicos.
2. La muestra líquida satura el tampón absorbente y moviliza las nanopartículas coloreadas sensibilizadas con anticuerpos.
 - Si la muestra es positiva el antígeno de la muestra se une a los anticuerpos específicos y todas las partículas, las que han reaccionado y las que no, ya que se encuentran en exceso, se empiezan a mover con la muestra, por capilaridad, a lo largo de la tira reactiva.
 - Si la muestra es negativa, la muestra y las partículas con el anticuerpo se empiezan a mover por capilaridad a lo largo de la tira reactiva.
3. La muestra, con las partículas, llega a la zona test que contiene el segundo anticuerpo específico policlonal dirigido contra otros epítomos. Este anticuerpo se halla fijado en la tira a lo largo de una línea recta.
 - Si la muestra es positiva, las nanopartículas quedan unidas por el inmunocomplejo formando una línea de color. En este punto se forma el inmunocomplejo "sándwich".
 - Si la muestra es negativa, no hay ninguna reacción.
4. La muestra, con las partículas, sigue avanzando y llega a la zona de control que contiene la anti-Ig policlonal fijada en la tira a lo largo de una línea recta indicando el final del test:
 - Si la muestra es positiva, el exceso de partículas con inmunocomplejo o con anticuerpo monoclonal libre quedan unidas a la anti-Ig formando una segunda línea de color.
 - Si la muestra es negativa, las partículas con anticuerpo monoclonal libre quedan unidas a la anti-Ig formando una única línea de color.
5. Un resultado positivo se caracteriza por dos líneas de color en la zona de control. Un resultado negativo, por una sola línea de color en la zona de control. La no aparición de esta línea de control puede indicar un error en la determinación, un deterioro de los

reactivos o bien que se ha añadido una cantidad incorrecta de muestra.

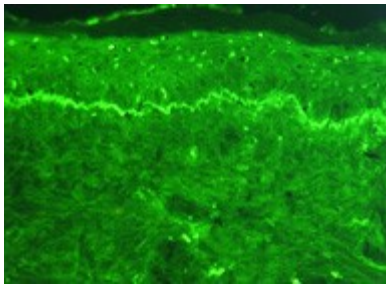
Para saber más

[Imagen de los pasos de una técnica inmunocromatográfica](#)

En la siguiente animación podrás ver el desarrollo de un test inmunocromatográfico para detectar antígenos. La técnica utiliza anticuerpos monoclonales de tipo IgG situados en la zona para la muestra que están marcados una nanopartícula de oro, fijados a la membrana están otros anticuerpos específicos de otro epítipo del antígeno ,éstos se hallan en la en la zona test y en la zona de control hay anti-IgG .

<https://www.youtube.com/embed/z07CK-4JoFo>

2.20.- Inmunofluorescencia (IF).



Hasta ahora has estudiado técnicas cuyos resultados se basan en datos obtenidos por espectrofotometría, o por medidas de radiactividad, de fluorescencia o de luminiscencia. En cambio la inmunofluorescencia (IF) es una técnica empleada en muestras biológicas, que utiliza la especificidad de la unión entre antígenos y anticuerpos marcados con fluorocromos para analizar la distribución de las biomoléculas con la ayuda de un [microscopio de fluorescencia](#). El fluorocromo más utilizado es el FITC.

Hay dos tipos de técnicas:

- En las técnicas directas (IFD), los antígenos de la muestra se detectan, en un solo paso, con anticuerpos específicos conjugados con un fluorocromo.
- Las técnicas indirectas (IFI), son técnicas en dos pasos:
 - Los antígenos para los que se quieren detectar los anticuerpos irán incorporados en el portaobjetos y al añadir la muestra si ésta presenta anticuerpos específicos para esos antígenos se formarán los inmunocomplejos.
 - Posteriormente se añaden anti-Ig marcadas con fluorocromos que detectaran le inmunocomplejo formado en el caso de haber anticuerpos en la muestra.

El método de IF más utilizado es la IFI, pero la IFD es muy útil en el diagnóstico de enfermedades de tipo autoinmunitario, es decir, aquellas en las que se generan autoanticuerpos que atacan algún órgano de nuestro organismo.

Entre las desventajas de la inmunofluorescencia hay que destacar que las reacciones no son permanentes porque los fluorocromos tienden a perder fluorescencia cuando en el microscopio de fluorescencia se iluminan con luz ultravioleta, por ello es necesario fotografiar las reacciones positivas para documentar los casos.

Aplicaciones de la IFD: Resulta de gran utilidad para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes organoespecíficas pero también sistémicas, como el [lupus eritematoso](#), enfermedades ampollosas autoinmunes y [vasculitis](#). Esta técnica se realiza tras la obtención de una biopsia de piel o mucosas.

Aplicaciones de la IFI: Para detectar [ANA](#), autoanticuerpos dirigidos contra diversas proteínas del núcleo celular, y otros anticuerpos en enfermedades del tejido conectivo, como por ejemplo en el lupus eritematoso. También se suelen utilizar en la serología de enfermedades infecciosas y para la identificación de agentes infecciosos.

Ventajas e inconvenientes de la IFD comparada con la IFI.

Ventajas

Más rápida (un solo paso).

Menor posibilidad de reacciones cruzadas (se utiliza un solo tipo de anticuerpo).

Inconvenientes

Menor sensibilidad (un solo paso, menor amplificación).

Coste más elevado (todos los anticuerpos utilizados han de estar marcados).

Menor flexibilidad (para cada técnica se precisa un anticuerpo marcado diferente).

Autoevaluación

Para detectar anticuerpos en el suero de un paciente, las técnicas IFI se efectúan sobre una preparación de tejido del propio paciente. ¿Verdadero o falso?

- Verdadero.
- Falso.

Esta afirmación no es correcta.

La técnica se efectúa sobre una preparación que contiene antígenos contra los que

irían dirigidos los anticuerpos del paciente que quieren detectar. Las preparaciones del propio paciente se utilizarían para detectar en ellas antígenos, con la ayuda de anticuerpos específicos.

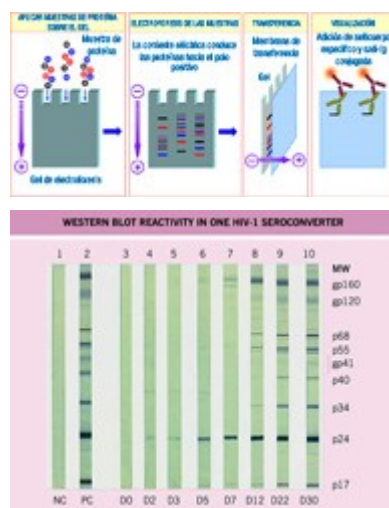
Solución

1. Incorrecto
2. Opción correcta

Para saber más

[Aspectos fundamentales de la Inmunofluorescencia](#)

2.21.- Western blot.



En este apartado estudiarás otro método de detección de proteínas separadas por electroforesis mediante su unión a anticuerpos específicos. La particularidad de esta técnica es que se basa en la transferencia de las proteínas separadas, desde el soporte de la electroforesis a una membrana, generalmente de nitrocelulosa.

La técnica consta de las siguientes fases:

1. Electroforesis de una mezcla de antígenos para separar los componentes por diferencias de carga y peso.
2. Transferencia. Se realiza recubriendo el soporte con una hoja de papel de nitrocelulosa, las proteínas se transfieren del soporte a la membrana de nitrocelulosa en la misma posición y se unen a ella de forma irreversible. La transferencia se puede hacer de dos formas:
 - Por electroforesis, aprovechando las cargas negativas de las proteínas. El electrodo negativo se encuentra bajo el soporte y el positivo sobre la nitrocelulosa.
 - Por capilaridad, a través de un flujo de solución amortiguadora desde unos papeles de filtro húmedos situados bajo el gel a otros secos que se hallan sobre la nitrocelulosa.

3. Bloqueo. Como ya se ha dicho, las proteínas se unen a la nitrocelulosa de forma irreversible, por tanto se debe evitar la unión de los anticuerpos que se utilizan posteriormente a los lugares de la nitrocelulosa que aún no contienen moléculas de proteína unidas. Para ello la nitrocelulosa se trata con soluciones de bloqueo similares a las utilizadas en técnicas de ELISA, es decir, soluciones de proteínas y detergentes que se unen todos los sitios de unión que quedan para minimizar las uniones inespecíficas en la fase siguiente.
4. Incubación con anticuerpo específico. Cuando se añade el anticuerpo, sólo hay lugar en la membrana para que se una a las proteínas que han sido separadas por electroforesis (antígenos). Esto reduce el ruido de fondo en el producto final, lo que conduce a resultados más claros y elimina los falsos positivos. El exceso de anticuerpo se elimina por lavado.
5. Incubación con una anti-Ig marcada. El exceso de anti-Ig se elimina por lavado.
6. Visualización de los resultados a través de diferentes técnicas según el marcador utilizado: revelado enzimático, [autorradiografía](#) (para conjugados radiactivos), detección de quimioluminiscencia o detección de fluorescencia.

El Western blot se puede utilizar para detectar anticuerpos anti-VIH en muestras de suero humano. Para ello, proteínas de células infectadas por el VIH se separan y se transfieren a una membrana y después, en la etapa de incubación con anticuerpo primario, se aplica el suero del paciente. En la imagen se ven los resultados de tests diferentes. El primer canal de la izquierda es un control negativo y el segundo, un control positivo. Los canales del 3 al 10 muestran los cambios en una persona infectada, el 3 corresponde al primer día de la infección y el 10 se considera como concluyente de infección por VIH. Cada banda indica la presencia de anticuerpos anti-VIH en el suero del paciente.

Esta técnica se utiliza también como prueba definitiva para la encefalopatía espongiforme bovina, conocida comúnmente como "enfermedad de las vacas locas". También se puede utilizar como una prueba de confirmación de infección por el virus de la hepatitis B.

Para saber más

En el siguiente vídeo podrás ver y ampliar la información sobre la técnica Western blot.

[Técnica de Western blot.](#)

Autoevaluación

Ordena con números las siguientes etapas correspondientes a la realización de un Western blot:

Ejercicio de ordenación.

Etapas	Número de orden
Transferencia.	<input type="checkbox"/>
Incubación con anti-Ig marcada.	<input type="checkbox"/>
Electroforesis.	<input type="checkbox"/>
Bloqueo.	<input type="checkbox"/>
Incubación con anticuerpos específicos.	<input type="checkbox"/>

Enviar

El orden es el indicado en los contenidos, primero de deber realizar la electroforesis para después efectuar la transferencia y seguir con el bloqueo y la detección.

3.- Diagnóstico y seguimiento serológico de las enfermedades infecciosas.

Caso práctico



Susana ya se ha sometido a una nueva extracción para que el Banco de sangre pueda repetir los controles. Afortunadamente, los resultados, que ya ha recibido, son negativos así que rápidamente se lo comunica a Carlos con el que había estado buscando información sobre las técnicas que se realizan en el laboratorio para efectuar estos controles.

Ambos habían descubierto que la mayor parte de los controles efectuados en las muestras de donantes de sangre son para descartar ciertas infecciones. Como Carlos sigue en el laboratorio de Microbiología y cada día aumentan más sus conocimientos sobre enfermedades infecciosas, ahora, con Susana, se han propuesto buscar historias clínicas de pacientes con alguna enfermedad infecciosa que les permitan estudiar cómo han evolucionado sus procesos y cómo se han seguido los cambios a través de las pruebas realizadas para determinar los principales marcadores serológicos.

En esta tercera parte vas a estudiar los contenidos relacionados con el papel que juegan las técnicas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo en el diagnóstico y el seguimiento del curso de enfermedades infecciosas. Estudiarás nociones generales sobre serología, el papel de las diferentes tipos de inmunoglobulinas y las curvas de evaluación de los marcadores serológicos, así como el diagnóstico serológico de algunas infecciones.

3.1.- Serología.

En los apartados anteriores has estudiado las principales técnicas basadas en reacciones antígeno-anticuerpo. También has ido viendo las aplicaciones más importantes de cada técnica. La serología se ocupa de las reacciones entre antígenos y los anticuerpos puestas de manifiesto a través de estas técnicas que ahora ya conoces. El nombre proviene del hecho de que el suero sanguíneo es el vehículo habitual de los anticuerpos. La serología puede perseguir una finalidad cuantitativa (dosificación y contaje de los anticuerpos presentes en la reacción) o cualitativa (reconocimiento de anticuerpos específicos).

La respuesta de anticuerpos formados ante una infección depende del estado inmunitario del paciente y en general, salvando algunas particularidades para cada infección específica, sigue los siguientes patrones:

1. Cuando la infección se presenta en pacientes que no han sido previamente infectados ni inmunizados con una [vacuna](#), se desarrolla una [respuesta inmune](#) caracterizada por un lento aumento de anticuerpos específicos. Las IgM son el primer tipo de inmunoglobulinas que aparecen. Estos anticuerpos se pueden detectar unos días después del inicio de la infección y van aumentando progresivamente hasta alcanzar un máximo y luego caen a niveles indetectables.
2. Las IgA se producen un poco más tarde que las IgM y desaparecen antes. En muchos casos no se llegan a detectar y en otros persisten durante largos periodos después de la infección.
3. Generalmente, las IgG se pueden detectar en títulos bajos días después del inicio de la infección, aumentan lentamente y todavía se pueden detectar en el suero después de varios meses.
4. Durante una infección secundaria (una infección en un paciente infectado previamente, o algunas veces después de una vacunación), los títulos de anticuerpos se elevan rápidamente. La IgG es el tipo de inmunoglobulina predominante, alcanza niveles elevados, y persiste durante varios meses o incluso toda la vida. Los niveles de IgM son significativamente más bajos en las infecciones secundarias que en las primarias y en algunos casos no se detectan, dependiendo de la prueba empleada.

Para distinguir entre primoinfección e infección secundaria, se evalúa la relación entre IgM e IgG. Teniendo en cuenta los patrones anteriores podrás comprender fácilmente que cuando tanto la IgG como la IgM son negativas, el paciente no ha sufrido la infección. Si sólo se detectan niveles de IgG puede tratarse de una infección pasada o de una [infección crónica](#). Niveles detectables de IgM pueden indicar una [infección aguda](#) sobre todo si paralelamente se detectan aumentos de IgG.

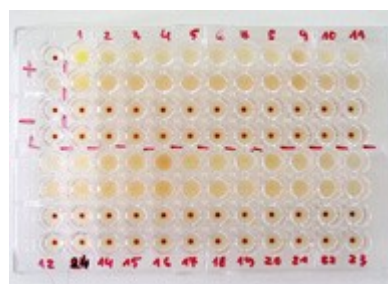


En la imagen puedes ver una curva de evolución en una infección en donde se aprecian las diferencias entre la respuesta inmune que ocurre en la primera exposición al antígeno específico y la respuesta inmune que se presenta después de una segunda exposición al mismo antígeno. Como puedes observar hay un cierto retraso en la aparición de la respuesta en la primera exposición, además los niveles de anticuerpos son bajos y su vida breve. Si la comparas con la respuesta a una segunda exposición verás que ésta empieza rápidamente, es mucho más potente, y forma anticuerpos durante más tiempo

3.2.- Pruebas serológicas para el diagnóstico de la sífilis.

Las técnicas de fluorescencia, que ya se han estudiado en el apartado de inmunofluorescencia, son las que permiten por ejemplo además de otros, el diagnóstico de la [sífilis](#) mediante el examen directo del microorganismo causante (*Treponema pallidum*), pero en la mayoría de las ocasiones no es posible realizar este tipo de técnicas, por lo que el diagnóstico serológico indirecto (determinar los anticuerpos generados frente a esa bacteria en lugar de los antígenos) se ha convertido en el procedimiento más frecuente

Las pruebas serológicas pueden ser de dos tipos: Las pruebas no treponémicas, que detectan anticuerpos inespecíficos (denominados reagentes), y las *pruebas treponémicas*, que detectan anticuerpos específicos contra *Treponema pallidum*.



- Las pruebas no treponémicas, denominadas a veces pruebas de aglutinación, son en realidad pruebas de [floculación](#) ya que el antígeno al ponerse en contacto con el suero del paciente da lugar a inmunocomplejos que forman una especie de agregados. Son pruebas económicas y fáciles de realizar, útiles para el diagnóstico y fundamentales para evaluar la eficacia de los tratamientos, puesto que los niveles de anticuerpos se relacionan con la actividad de la enfermedad y, por tanto, con la respuesta al

tratamiento.

La prueba VDRL (Venereal Research Disease Laboratory) se basa en la utilización del antígeno VDRL, compuesto por cardiolipina, colesterol y lecitina. Esta prueba detecta reaginas, anticuerpos dirigidos contra los componentes del antígeno VDRL que se liberan de los tejidos dañados por el treponema en el transcurso de la enfermedad siilítica. Por lo tanto no son anticuerpos específicos contra *Treponema pallidum* ya que otras enfermedades podrían generar también las reaginas y su positividad no confirma la enfermedad. Los títulos bajos pueden ser falsos positivos y se observan, por ejemplo, en [muestras hemolizadas](#) o [lipémicas](#). También se pueden presentar falsos negativos (fenómenos de prozona) cuando las muestras son muy reactivas, por lo que siempre es conveniente titularlas (hacer diluciones del suero para determinar el título de anticuerpos).

La prueba RPR es otra prueba de floculación (aglutinación) que utiliza antígeno VDRL modificado con partículas de carbón activado que se unen a los agregados formados y facilitan la visualización de la floculación. Tanto el VDRL como el RPR se suelen efectuar sobre placa o sobre tarjetas especialmente preparadas.

- Las pruebas treponémicas se utilizan para confirmar los resultados positivos obtenidos con las pruebas no treponémicas.

La prueba TPHA (*Treponema Pallidum* Haemagglutination Assay) es una prueba de aglutinación para detectar anticuerpos específicos anti-treponema utilizando antígenos treponémicos unidos a eritrocitos.

La prueba TPPA (*Treponema Pallidum* Particle Agglutination) es una modificación del TPHA en la cual el antígeno particulado está formado por partículas de gelatina sensibilizadas. El TPPA es una prueba más sensible y específica que el TPHA.

La prueba FTA-ABS (Fluorescent treponemal antibody absorption), es una técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos específicos anti-treponema. Recuerda que ya has estudiado este tipo de técnicas en un apartado anterior, en esta ocasión el suero del paciente se coloca sobre un portaobjetos en donde hay *Treponema pallidum* en suspensión, posteriormente se incuba con anti-Ig humana marcada con FITC y luego se observa al microscopio de fluorescencia. En la imagen puedes ver un resultado positivo por anticuerpos del paciente fijados sobre los treponemas.

Estas pruebas se positivizan antes y son más específicas que las pruebas no treponémicas ya que tienen menos resultados falsos positivos, pero no son útiles para controlar la respuesta al tratamiento porque a menudo permanecen positivas después de la curación del paciente.

Para saber más

En el documento siguiente puedes examinar el protocolo que se sigue en una técnica RPR

[Prueba RPR.](#)

Determinación de anticuerpos anti-Treponema pallidum por THPA.

[Determinación de anticuerpos anti-Treponema pallidum por THPA.](#) (78,5 KB)

Autoevaluación

Para valorar la respuesta al tratamiento en un caso de sífilis se pueden realizar pruebas:

- TPHA.
- TPPA.
- VDRL.
- De inhibición de la aglutinación.

Incorrecta. Es una prueba treponémica, el resultado sería positivo aún después de la curación.

Incorrecta. Es una prueba treponémica, el resultado sería positivo aún después de la curación.

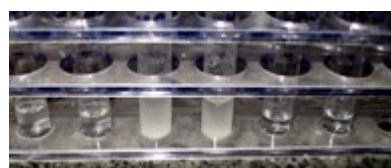
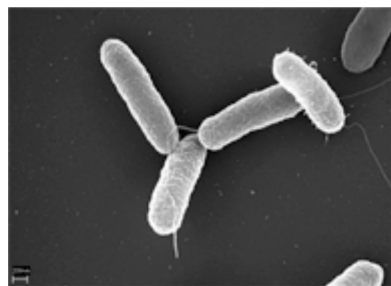
Es una prueba no treponémica y por tanto es útil para controlar la respuesta al tratamiento.

Incorrecta. Es una prueba que sólo está indicada para antígenos solubles.

Solución

1. Incorrecto
2. Incorrecto
3. Opción correcta
4. Incorrecto

3.3.- Prueba de Widal.



En este apartado estudiarás una técnica para detectar y determinar títulos de anticuerpos en algunas infecciones, concretamente en las causadas por microorganismos de especies que producen, entre otros [signos](#) y [síntomas](#), fiebre y por ello son denominados anticuerpos febriles.

Este es el caso, entre otros ejemplos, de la fiebre tifoidea causada por *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*, así como las fiebres paratifoideas causadas por *Salmonella paratyphi* A y B, y la fiebre de malta causada por *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*.

La infección por estos microorganismos induce una respuesta inmune con anticuerpos que pueden ser detectados con antígenos específicos. Para que los resultados tengan un valor diagnóstico el título de anticuerpos debe aumentar, por lo que se deben tomar muestras separadas por un periodo de tiempo para poder ser comparadas.

La prueba o ensayo de Widal es una técnica de aglutinación directa para la detección y titulación de anticuerpos anti-salmonella, anti-brucella y anti-proteus en suero. Los reactivos son suspensiones de [antígenos somáticos O](#) y [antígenos flagelares H](#) que aglutinan en presencia de los anticuerpos específicos en las muestras ensayadas.

La aglutinación somática se caracteriza por ser fina y granular, de formación lenta y difícilmente disgregable. La aglutinación flagelar es algodonosa, de formación rápida y fácilmente disgregable.

El diagnóstico de enfermedades febriles puede establecerse por la demostración del título de anticuerpos somáticos O y anticuerpos flagelares H específicos en el suero del paciente. La prueba de Widal se basa en la determinación de estos anticuerpos y establece que altos niveles de anticuerpos O y H, títulos superiores a 1/100 son indicativos de infección por estos microorganismos.

Para saber más

En el vídeo siguiente puedes ver cómo se realiza la prueba de Widal. Fíjate en que se utilizan soluciones antigénicas O y H, así como los controles correspondientes. También se muestra la realización de diluciones y la lectura para efectuar la titulación.



[Resumen textual alternativo](#)

En el documento siguiente podrás examinar el protocolo que se sigue para realizar una prueba de Widal en el laboratorio.

Determinación de anticuerpos febriles. [Protocolo de la determinación de serodiagnóstico febril.](#)

3.4.- Otras pruebas serológicas.

A lo largo de los apartados anteriores ya has ido viendo ejemplos concretos de pruebas serológicas, pero dada la variedad de infecciones existentes, el campo de aplicaciones es enorme. Seguidamente vas a poder ampliar tus conocimientos estudiando algunas de ellas.

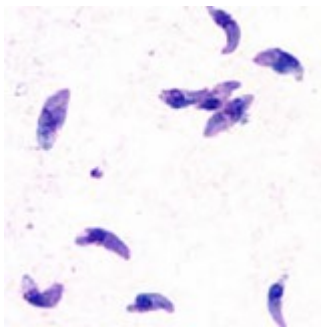
Prueba ASO o ASLO: es una aglutinación indirecta. Se realiza con partículas de látex sensibilizadas con estreptolisina O para detectar anticuerpos [antiestreptolisina O](#) cuando se sospecha fiebre reumática. Un título elevado de antiestreptolisina O indica la reacción del organismo contra una infección estreptocócica reciente.

La estreptolisina O es una toxina producida por la bacteria conocida como [estreptococo](#) del grupo A (*Streptococcus pyogenes*). Los anticuerpos producidos frente a esta toxina ajena reciben el nombre de antiestreptolisinas O (ASO), y aparecen en la sangre después de haber contraído la infección

Para saber más

En el documento siguiente puedes examinar el protocolo que se sigue para realizar una prueba ASO en el laboratorio.

[Prueba ASLO-latex de aglutinacion en porta](#)



Entre otras pruebas serológicas con importancia diagnóstica en el caso del embarazo se realizan

[Marcadores serológicos](#) en la toxoplasmosis: la toxoplasmosis es una enfermedad infecciosa ocasionada por el protozoo parásito *Toxoplasma gondii*. La enfermedad se transmite habitualmente desde los animales a los seres humanos a través de diferentes vías de contagio, siendo el principal [huésped definitivo](#) el gato. La infección humana es frecuente, pero pocas veces produce síntomas. Cuando ocurre en la mujer embarazada existe el riesgo de transmisión al feto con posibilidad de graves consecuencias para el mismo

En la práctica el diagnóstico se basa en métodos serológicos, comprobando la seroconversión a partir de dos muestras extraídas en un intervalo de tiempo determinado. Los marcadores serológicos analizados son IgM e IgG. Las técnicas más empleadas son la inmunofluorescencia indirecta, el ELISA o la hemoaglutinación indirecta.

Para saber más

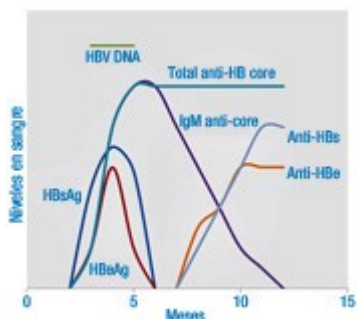


Prueba de la avididad de IgG

La prueba de la avidéz en la determinación de IgG tiene especial relevancia. Al comienzo de la respuesta inmunitaria las uniones antígeno- anticuerpo son débiles, pero durante su transcurso aumenta esa fuerza de unión.

La forma de medir la avidéz es mediante la disociación del inmunocomplejo en presencia de urea, si con la prueba se confirma la separación del antígeno y el anticuerpos, la avidéz es baja y por lo tanto se trata de primoinfección, pero si el inmunocoplejo no se separa porque la unión es sólida y presenta gran avidéz, lo que nos indica infección pasada.

Anexo I.- Detección del HBsAg en suero o plasma.



La hepatitis vírica es una enfermedad infecciosa que la muchas veces es causada por el HBV. La enfermedad puede manifestarse como asintomática, como aguda, o como hepatitis crónica con posible degeneración en cirrosis y/o carcinoma hepatocelular y muerte.

Para evaluar la infección de HBV se determina la presencia del HBsAg en suero. La presencia del HBsAg indica que el paciente es un portador del HBV y la posibilidad de infección. La determinación definitiva del estado infeccioso de un paciente es posible cuando se realiza la prueba de HBsAg en conjunto con los otros marcadores del HBV.

La prueba de HBsAg esta basada en un ELISA tipo sándwich. Con ciertos límites, la absorbancia después del revelado refleja la cantidad del antígeno de superficie del HBV en la muestra.

Una lectura de absorbancia menor del punto de corte se considera negativa para el HBsAg. Una lectura igual o mayor que el punto de corte se considera reactiva para el HBsAg. La muestras que repetidamente dan lecturas reactivas para este método se consideran positivas para la presencia de HBsAg. Estas muestras deben ser confirmadas por otros marcadores del HBV.

El kit de ELISA, entre otros componentes, contiene suero humano libre de marcadores de hepatitis B (control negativo) y suero diluido HBsAg positivo inactivado (control positivo).

Cálculos: la presencia o ausencia de HBsAg se determina por comparación de los valores de absorbancia de la muestra contra el valor del punto de corte. Para este kit concreto, el valor del punto de corte se calcularía a partir de la absorbancia del control negativo:

Valor del punto de corte = absorbancia del control negativo + 0,025

Interpretación de resultados:

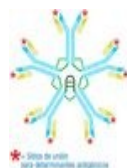
1. Positivo: Muestras con valores de absorbancia iguales o mayores que el valor del punto de corte se consideran reactivas al HBsAg. Si se repite la muestra y es reactiva, se considera positiva.
2. Negativo: Muestras con valores de absorbancia menores que el valor del punto de corte se consideran negativas a HBsAg (o no reactivas).
3. Dudoso: Muestras con valores de absorbancia entre $\pm 10\%$ del valor del punto de corte se deben volver a analizar para confirmar la lectura original.

Anexo.- Licencias de recursos.

Licencias de recursos utilizados en la Unidad de Trabajo.

Recurso
(1)

Datos del recurso (1)

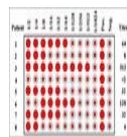


Autoría: Josep Mis Escolá.

Licencia: CC by-sa

Procedencia: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:IgM_scheme.svg

Autoría: University of South Carolina.



Licencia: Copyright (cita).

Procedencia: <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/rx-8.jpg>

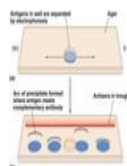
Autoría: Randy Monceaux.



Licencia: CC by-nc-nd.

Procedencia: <http://www.flickr.com/photos/sanofi-pasteur/5283272639/>

Autoría: Pearson Education Inc.

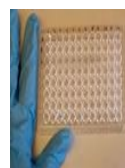


Licencia: Copyright (cita).

Procedencia: <http://faculty.irsc.edu/faculty/sbowen/Micro%20Lecture/Micro%20Ch.%2017.ppt>

Recurso
(2)

Datos del recurso (2)



Autoría: Jeffrey M. Vinocur

Licencia: CC by.

Procedencia: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microtiter_plate.JPG

Autoría: Renée D 'Avila.



Licencia: CC by-nc.

Procedencia: <http://www.flickr.com/photos/reneedavila/5264267490/>

Autoría: Sanofi Pasteur.



Licencia: CC by-nc-nd.

Procedencia: <http://www.flickr.com/photos/sanofi-pasteur/5283272877/>

Autoría: Hunter Area Pathology



Licencia: Copyright (cita).

Procedencia: <http://www.hunterarea.org/userData/img/myeloma2.jpg>