



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA



CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

GARCÍA ÁLVAREZ CARLOS

No. CUENTA 09821390-2

AÑO EN QUE TERMINO LA CARRERA: 2006

ORIENTACIÓN: FARMACIA

MANUAL: TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR GENÉTICAS E
INMUNOLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO
MICROBIOLÓGICO

DIRIGIDO POR:
QFB ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Cuando el corazón esta lleno de amor
La sabiduría fluye en nuestra mente
Busquemos la luz que ilumine el camino
Y el sendero de nuestro destino
Caminemos por el mundo
Caminando sin parar
Aunque las corrientes no te dejen
Ni siquiera respirar
Busquemos una fuerza
Que pueda alentar
La razón y la cordura
De una gran felicidad
Si en el silencio tú la buscas
Con la paz la encontraras
Por que el amor es un susurro
De una sabia inmensidad.

La diferencia entre el ayer y el mañana, Es hoy

El mago de los sueños

A mi madre
La fuerza que me saco adelante
A la cual fui su dolor de cabeza en la escuela
Gracias a mis padres y hermanos
Que me brindaron apoyo incondicional
A mis compañeros y a Elisa
La inspiración que me ayudo a salir
A todos ellos les doy las gracias

ÍNDICE

Introducción	2
Planteamiento del Problema	4
Objetivo	4
Metodología	4
Resultados	5
Discusión de Resultados	181
Conclusiones	182
Propuestas	182

INTRODUCCIÓN

En la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, la carrera de QFB imparte la asignatura de microbiología y en la orientación de bioquímica clínica el módulo de Biología Médica en el cual se prepara a los alumnos para un mejor desarrollo en el campo laboral del diagnóstico microbiológico.

Dentro de estos módulos no se incluye dentro de su programa las técnicas de biología molecular, genéticas e inmunológicas, las cuales son de gran importancia ya que en la actualidad se llevan a cabo en laboratorios de diagnóstico molecular microbiológico, representando a su vez una desventaja para la formación y desarrollo del egresado en dichas áreas de trabajo. Sin embargo no se excluye su conocimiento básico por parte de los alumnos.

Existe una necesidad que conlleva a implementar una nueva fuente de información documentada a cerca de las técnicas de biología molecular, genéticas e inmunológicas. Por lo que se pretende implementar como herramienta el material didáctico que le permita tener el conocimiento elemental de estas técnicas.

En la actualidad, los planes curriculares de la mayor parte de los centros universitarios y facultades de México no incluyen a la biología molecular en la clínica. Es lamentable que a casi 20 años de que se empezó a desarrollar la biología molecular, aún no se considere el establecimiento como una disciplina obligatoria.^{1, 5-7, 9, 15,24}

La biología molecular representa un adelanto científico de gran aplicabilidad en el campo de las ciencias biológicas de manera semejante a como lo han sido la bioquímica, la genética y la biología celular.^{1, 2, 5, 9,12}

Lo interesante de conocer los conceptos generales de la biología molecular, es que estos nos inducen a comprender la estructura y la función de los ácidos nucleicos y el por que de la ingeniería genética, su aplicación a la medicina es una consecuencia de dichos conocimientos.

Al conocer la estructura y propiedades de los ácidos nucleicos y las enzimas que los rompen o los separan, se tienen las bases de las técnicas del DNA recombinante, las cuales se utilizan para conocer mejor la estructura y función celular así como para el diagnóstico molecular.^{1, 8,11}

Como expresión de estos conocimientos, ha surgido una gran cantidad de campos de actividad en las ciencias de la salud (medicina como farmacia y veterinaria) tales como anticuerpos monoclonales, métodos inmunoquímicos, biochips para el diagnóstico, clonación molecular y clonación animal, farmacogenes, proteínas recombinantes de interés diagnóstico y terapéutico, sondas de hibridación, terapia celular y terapia génica.^{1,2,6,8,13,14} Nuestro objetivo no es describir los aspectos concretos de estos campos, si no solo poner de manifiesto las bases moleculares que le sirven de soporte, como punto de partida para un estudio detenido de cada campo en su correspondiente área de conocimiento. Con este fin se presentan las características generales que servirán como fuente de desarrollo para un mejor diagnóstico, así como para la identificación del microorganismo patógeno causante de enfermedad.

Aunado a esto las limitaciones que se tienen en la actualidad para el desarrollo de las investigaciones, y la falta del tema en los planes curriculares

Universitarios, lleva consigo la falta de aplicación de las herramientas diagnósticas más importantes en muchas enfermedades.

Paralelo a esto la evolución de las pruebas inmunológicas se ha caracterizado por un incremento constante en sensibilidad y especificidad. Los primeros ensayos, dentro de los que destacan las pruebas de aglutinación y precipitación, eran capaces de medir en miligramos; más tarde, la inhibición de la hemoaglutinación y la fijación de complemento permitieron detectar hasta microgramos.^{20, 25, 26, 30,31}

Las investigaciones que se realizaron después permitieron el desarrollo de una gran variedad de técnicas de enorme trascendencia en el diagnóstico de laboratorio de diversas enfermedades. En el plano terapéutico se obtuvieron una gran cantidad de sueros (gammaglobulinas) y vacunas, entre ellas, las vacunas contra el tétanos y la difteria.^{4, 25, 26, 30,31}

Desde ese momento, las técnicas de identificación de antígenos o de anticuerpos se basaron en la reacción de ambos elementos y en la medición de sus manifestaciones físicas como fenómenos naturales de la unión de antígeno (Ag) y anticuerpo (Ac) in Vitro (por ejemplo, la aglutinación, la precipitación, fenómenos como la hemólisis, o la inhibición de la toxicidad en la reacción toxina-antitoxina). Más recientemente, se han ido introduciendo ingeniosas modificaciones de las pruebas tradicionales, que al amparo de modernas tecnologías, recursos y conocimientos nuevos permiten disponer de pruebas de gran sensibilidad, especificidad y aplicaciones especializadas, según el objeto de estudio.^{3, 20, 21, 30,31}

Las modificaciones posteriores en las técnicas inmunológicas tradicionales, así como la gestación de otras nuevas, extendieron su uso más allá de la microbiología. Así, diversas disciplinas se beneficiaron con ellas.¹ El número de métodos disponibles se ha incrementado significativamente; en la actualidad se dispone de pruebas de contrainmunolectroforesis, radioinmunoanálisis, inmunofluorescencia y ELISA para detectar bacterias, hongos, parásitos y virus de la más diversa índole.

A partir de fundamentos de métodos inmunológicos, técnicas de DNA y los conceptos elementales de la biología molecular, se pretende proporcionar los más utilizados en la clínica. Esto en apoyo a estudiantes de las ciencias de la salud y en especial en apoyo al módulo de biología médica de la carrera de QFB, con el propósito de integrar de manera práctica el conocimiento de la biología molecular y su aplicabilidad en el diagnóstico microbiológico en la clínica.

En este manual se describirán algunas de las técnicas básicas de biología molecular, genéticas e inmunológicas con la finalidad de contribuir a la difusión y aplicación de estas herramientas moleculares en el módulo de biología médica de la carrera de QFB.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el modulo de Biología Medica de la carrera de QFB, los métodos de Biología Molecular, Genéticos e Inmunológicos para el diagnóstico microbiológico y su aplicación no son impartidos a los alumnos en la actualidad.

Esto implica la necesidad de complementar estos conocimientos con el apoyo de la información y material didáctico que le permita al QFB tener un criterio amplio en el diagnóstico microbiológico y así mismo tener un mayor conocimiento acerca de estas técnicas que en la actualidad ya se llevan a cabo en gran parte del campo laboral.

OBJETIVO:

Generar un Manual como material didáctico que contenga las técnicas de Biología Molecular, Genéticas e inmunológicas para cubrir las necesidades de complementar el conocimiento y las fuentes de información del diagnóstico microbiológico para alumnos del modulo de Biología Medica.

METODOLOGÍA

Se realizó una investigación en diferentes fuentes bibliográficas actuales sobre las Técnicas de Biología Molecular, Genéticas e Inmunológicas para la identificación de bacterias y hongos que causan enfermedades infecciosas, para la elaboración de un manual que sirva de apoyo a los estudiantes modulo de Biología Medica del noveno semestre de la carrera de QFB, Con la finalidad de mejorar su desempeño académico y como herramienta para su desarrollo laboral, tratando de esta manera de implementar las bases teóricas que sirvan de punto de partida para un mejor diagnóstico microbiológico en la clínica.

Se procedió a ordenar y seleccionar la información científica de las distintas fuentes bibliográficas de manera minuciosa para obtener los datos más importantes de cada una de las técnicas, así como la utilidad, empleo y elaboración, esto con el objetivo de mejorar y facilitar su uso y empleo por los estudiantes de la facultad y áreas a fines.

Seleccionada la información el manual se elaborará con un determinado formato para que este sea incluido, en el programa académico y utilizado como apoyo en distintos semestres de la carrera y en apoyo al personal del área de la salud, para su aprovechamiento y mejora continua.

El manual formará parte del material didáctico en apoyo a la docencia y al aprovechamiento académico de la carrera de QFB.

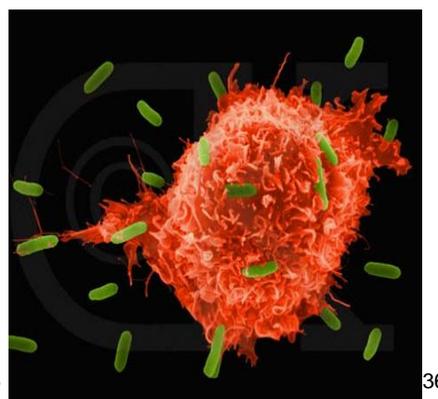
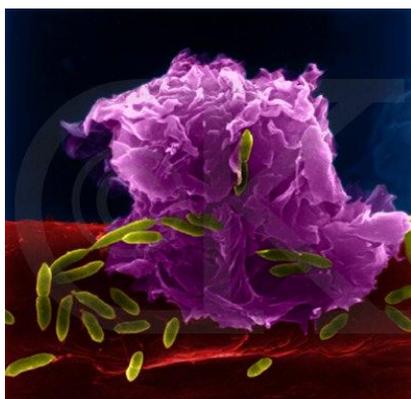
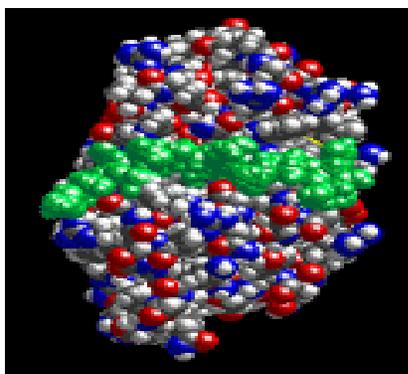


RESULTADOS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA



CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

MANUAL:
TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR GENÉTICAS E
INMUNOLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO



GARCÍA ÁLVAREZ CARLOS

DIRIGIDO POR:
QFB ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR GENÉTICAS E INMUNOLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Resumen

Se llevo a cabo una recopilación bibliográfica de las Técnicas de Biología Molecular, Genéticas e Inmunológicas, para la elaboración de un manual que contenga la información más adecuada para un mejor diagnóstico microbiológico.

El manual está constituido a grandes rasgos de dos partes. Presenta al inicio las propiedades y características del DNA hasta llegar a la identificación del microorganismo por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), pasando por los métodos del aislamiento del DNA, la hibridación y replicación, así como el marcado de la sonda y la identificación.

Posteriormente se presenta la parte inmunológica. La respuesta que se presenta en el huésped con la presencia del microorganismo, y con los diferentes antígenos producto de la patogenicidad del mismo. Los mecanismos de defensa y de eliminación del antígeno a través de anticuerpos o mediada por linfocitos, las reacciones antígenos anticuerpo y las diferentes técnicas inmunológicas para la determinación de antígenos o anticuerpos a consecuencia de la respuesta inmune, pasando desde reacciones de precipitación, con o sin corriente eléctrica, como la Inmunodifusión y la Contrainmunolectroforesis, como de técnicas de aglutinación, fijación de complemento y el inmunomarcado. Así como la prueba de ELISA y de neutralización, sin olvidar la determinación del título de anticuerpos como prueba base.

Obteniendo un manual que incluye la PCR como prueba elemental de la biología molecular, y las diferentes técnicas inmunológicas para la identificación del microorganismo, así como los resultados y pruebas que se deben realizar para una determinación más específica.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	11
A. Biología Molecular	12
1. Concepto	12
B. DNA	12
1. Aislamiento del DNA	14
2. Estructura y propiedades del DNA	15
3. Genes	17
II. TÉCNICAS ELEMENTALES	20
A. DNA Recombinante	20
1. Enzimas de Restricción	20
B. DNA Complementario (Sonda)	24
C. Identificación de Secuencias Específicas	25
D. Desnaturalización y Renaturalización del DNA	26
E. Agentes Desnaturalizantes	26
1. Desnaturalización y Renaturalización por Efecto de la Temperatura	26
2. Desnaturalización por Ácidos y Bases	27
3. Desnaturalización por Agentes químicos	27
F. Métodos de Ensayo de Hibridación	28
1. Hibridación en Fase Líquida	28
2. Hibridación en Soporte Sólido	28
3. Hibridación Dot Blot y Slot Blot	30
4. Hibridación de Southern (DNA)	31
5. Hibridación Northern (DNA, RNA).	31
6. Hibridación In Situ	31
7. Hibridación in Situ Tisular	32
8. Hibridación In Situ Cromosómica	32
9. Técnicas Relacionadas	32
a. Transferencia Western	33
III. PREPARACIÓN Y MARCAJE DE SONDAS	35
A. Preparación de Sondas Genéticas	37
1. Clasificación de las Sondas	37
a. Sondas Convencionales	37
b. Sondas de DNA obtenidas por clonación celular (DNA recombinante).	37
c. Sondas de DNA obtenidas por clonación acelular (Amplificación por PCR)	38
d. Sondas sintéticas	38
e. Síntesis química de oligonucleótidos	38
B. Marcaje de Sondas	39
1. Marcaje directo en la molécula de sonda	41
2. Marcaje con DNA polimerasa	41
a. Método de traslado de la mella.	41
b. Método de iniciación o cebado al azar	42
3. Marcaje Terminal	42

a. Marcaje con polinucleótido quinasa	42
b. Marcaje Terminal por relleno	42
4. Marcaje externo a la sonda	48
5. Marcaje indirecto	49
C. Tipos de grupos marcadores indicadores y su detección	49
1. Marcadores radiactivos	49
2. Marcadores no radiactivos	50
3. Grupos indicadores	50
IV. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	52
A. Reacción estándar	53
1. Polimerasas de DNA	55
2. Enzima polimerasa Taq	55
3. Parámetros de temperatura	55
B. Modalidades de la PCR	57
1. Nested PCR	57
2. PCR Múltiple	57
3. PCR con cebador aleatorio	58
C. Limitaciones de la PCR	58
1. PCR cuantitativa	59
2. PCR a tiempo real	59
D. Otras Técnicas de Amplificación	61
1. Técnica de Amplificación por Desplazamiento de la Cadena (SDA)	63
2. Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR)	63
3. Amplificación de la Señal	66
a. bDNA	66
4. Técnicas Comercializadas	66
V. Aplicación del diagnóstico molecular microbiológico en Enfermedades Infecciosas	68
A. Infecciones cutáneas	68
B. Infecciones gastrointestinales	70
C. Infecciones del sistema respiratorio	72
1. Infecciones Pulmonares	72
D. Infecciones del aparato genitourinario	73
1. Enfermedades de Transmisión Sexual	74
E. Infecciones del sistema circulatorio	75
F. PCR Aplicación del diagnóstico molecular microbiológico	82
VI. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS	96
A. Concepto	96
B. Inmunidad y Resistencia Inespecífica	96
C. Resistencia no específica	97
D. Inmunidad específica	107
1. Inmunidad adquirida	108
2. Inmunidad adquirida natural	108
3. Inmunidad adquirida artificial	108
E. Tipos de inmunidad específica	108

F. Las células Linfoides	109
G. Función de los linfocitos	111
H. Antígenos	115
1. Procesamiento y presentación del antígeno	116
2. Reconocimiento de los fragmentos antigénicos presentados por APC.	117
I. Anticuerpos	119
1. Componentes del sistema Inmune	119
2. Estructura de las Inmunoglobulinas	121
a. Dominios	122
b. Regiones Hipervariables	123
c. Valencia de los anticuerpos	123
3. Función de las inmunoglobulinas	123
a. clases de inmunoglobulinas	124
VII. Técnica elementales	129
A. Reacción Antígeno-anticuerpo	129
B. Técnicas inmunológicas	129
1. Clasificación	129
C. Técnicas Humorales	130
1. Técnicas de precipitación	133
a. Precipitación en fase líquida	135
1) Clásica en tubos	136
2) En placa	137
2. Precipitación en medio sólido	138
a. Sin corriente eléctrica	138
1) Difusión simple unidireccional	138
2) Difusión doble bidireccional	138
a) Técnica cualitativa	138
b) Técnica cuantitativa	139
3) Inmunodifusión radial simple	140
b. Con corriente eléctrica	141
1) Contraelectroforesis (CIEF)	141
2) Electroinmunodifusión	142
3) Inmunoelectroforesis (IEF).	143
3. Técnicas de aglutinación	145
a. Pruebas de aglutinación directa	146
b. Pruebas de aglutinación activa	147
c. Aglutinación pasiva	149
d. Pruebas de aglutinación pasiva	149
e. Hemaglutinación pasiva	150
f. Coaglutinación	151
g. Aglutinación pasiva con partículas inertes	152
h. Aglutinación de partículas de látex	152
i. Test de látex	153
4. Pruebas de fijación de complemento	154
a. Primera etapa	155

b. Segunda etapa	156
5. Inmunomarcado	156
a. Inmunofluorescencia	156
1) Inmunofluorescencia directa	157
2) Inmunofluorescencia indirecta	157
b. Radioinmunoanálisis	159
c. ELISA	160
1) Modalidad sándwich de la técnica de ELISA	162
d. Ensayo indirecto inmunoabsorbido (EIA)	163
e. Pruebas de neutralización	165
1) Neutralización	166
2) Seroneutralización	166
3) Seroprotección	167
D. Aplicación del diagnóstico inmunológico	167

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la biología Molecular es una ciencia que se ha desarrollado con grandes avances en el campo de la medicina, la bioquímica y la ingeniería genética. Debido a que es una herramienta útil e indispensable en el área de la salud, conlleva a cubrir la necesidad e inquietud de conocer y manejar los conocimientos científicos y tecnológicos que se generan día con día. Así mismo nos lleva a conocer la funcionalidad de los ácidos nucleicos, las diferentes enzimas y el por que de la ingeniería genética, con la que se pueden desarrollar una infinidad de técnicas de difícil manejo que poco a poco promete tener un gran utilidad en el diagnóstico clínico.

Con el descubrimiento del DNA, sus características y propiedades, los avances en la Biología Molecular han sido de enormes logros en el área de la medicina.

El objetivo principal es poner de manifiesto las bases moleculares que sirvan de soporte, como punto de partida para un estudio detenido de cada campo en su correspondiente área de conocimiento. Con este fin se presentan las características generales que servirán como fuente de desarrollo para un mejor diagnóstico, así como para la identificación del microorganismo patógeno causante de enfermedad.

Este documento Incluye información útil para personal del área de la salud en la determinación e identificación del microorganismo, para facilitar un mejor diagnóstico microbiológico, con el empleo de las distintas técnicas de biología molecular, Genéticas e inmunológicas, como herramienta útil en el área de la salud. Incluye las mas utilizadas en el campo de la investigación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que es la de mayor utilidad por su facilidad y rapidez, y las diferentes técnicas inmunológicas empleadas para la identificación y cuantificación de antígenos o anticuerpos.

Actualmente, la detección de ácidos nucleicos o anticuerpos tiene aplicación en el diagnóstico en infectología. Donde la biología molecular representa un papel muy importante en la determinación de algunas infecciones de difícil manejo. De esta manera facilita la determinación e identificación del agente patógeno, para poder aplicarlos al bienestar del paciente

A. Biología Molecular y el ADN

1. CONCEPTOS

Para el personal de salud surge la inquietud de manejar los conocimientos científicos y tecnológicos que se generan día con día y que están relacionados con su actividad profesional para poder aplicarlos al bienestar de sus pacientes; mientras que para el científico, es necesario hacer lo mismo para tener una comprensión integral del ser humano. Desde principios de este decenio surgió la inquietud de transmitir los conocimientos más elementales de la biología molecular que se requiere en la clínica.

Lo interesante de entender los conceptos generales de la biología molecular, es que estos nos inducen a comprender la estructura y función de los ácidos nucleicos y las diferentes enzimas que los separan, el por que de la ingeniería genética y sus aplicación a la medicina.

A partir de los conceptos mas elementales de la biología molecular, se proporcionan los fundamentos de las técnicas de DNA recombinante de mas utilidad en la clínica, entre ellos los principios de hibridación de los ácidos nucleicos y de la detección de secuencias específicas de los mismos. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como de sus diferentes modalidades de la misma, es de gran utilidad en el diagnóstico molecular.^{1, 2, 3, 26, 29,30,}

B. Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

Sólo los seres humanos han desarrollado lenguajes complicados que permiten la interacción con sentido y compleja de las ideas y las emociones. Grandes civilizaciones surgieron y cambiaron el entorno de nuestro mundo de maneras inconcebibles para cualquier otra forma de vida. Por consiguiente, siempre hubo una tendencia a creer que algo especial diferencia los seres humanos de todas las demás especies. Hace poco más de un siglo parecía natural pensar que, lo mismo que una vida humana comienza y termina en un momento determinado, la especie humana y todas las formas de vida también tenían que haberse creado en un momento determinado.

Esta hipótesis se cuestiono seriamente por primera vez hace 140 años, cuando Charles Darwin y Alfred R.Wallace propusieron sus teorías sobre la evolución, cuyo fundamento era la selección del más apto. Ellos confirmaron que las diversas formas de vida no son constantes sino que en forma continua dan origen a animales y vegetales apenas diferentes, algunos de los cuales se adaptan por sobrevivir y multiplicarse con más eficacia. En el momento de postular su teoría no conocían el origen de esta variación continua, pero se dieron cuenta de manera correcta de que estas características nuevas tenían que existir en la progenie si es que estas variaciones iban a formar la base de la evolución

Al principio hubo gran furor contra Darwin, en su mayor parte proveniente de aquellos a los que no les agradaba la idea de que los seres humanos y los simios, tuvieran un ancestro común, aunque hubiera vivido hace diez millones de años. No obstante, hacia fines del siglo XIX el argumento científico estaba casi

completo; tanto la distribución geográfica actual de las plantas y los animales como sus aparición selectiva en los registros fósiles del pasado geológico sólo podía explicarse si se postulaba que grupos de organismos en evolución continua habían descendido de un ancestro común.

Una consecuencia inmediata de la teoría Darwiniana es el descubrimiento de que la vida apareció por primera vez hace más de 4 millones de años, en una forma simple, tal vez parecida a una bacteria, la forma más simple de vida que se conoce en el presente. La existencia de estas bacterias pequeñas nos indica que la esencia del estado vivo se halla en organismos muy pequeños. La teoría de la evolución sugiere, que los principios básicos de la vida son aplicables a todas las formas de vida.^{1-3, 8, 26, 29,30}

En 1870 Mendel confirmó lo que por varios siglos había sido evidente pero no elucidado: el parecido físico que los hijos tienen con los padres se debe a características heredadas de diferente manera. Precisamente el análisis de los patrones de herencia a principios de este siglo condujo al estudio de una rama de la ciencia denominada Genética.

El concepto básico de la herencia se origina de entidades que residen en las células germinales (espermatozoides y óvulos), las cuales determinan las características del desarrollo del embrión, del feto y del niño. A estas entidades se les llamó genes. La herencia está regida por las dos copias de cada gen en las células de los hijos: una copia que deriva del padre y otra de la madre. Así, se dice que las células son diploides, es decir, contienen dos copias de todos los genes. Las características finales que presenta cualquier ser humano las determina la interacción de las dos copias de cada gen. Si un niño hereda dos alelos diferentes de sus padres el resultado depende de la naturaleza de los alelos. Si uno es dominante, significa que una copia es suficiente para que su característica particular predomine, o sea que una copia de dicho gen origina el mismo resultado que las dos copias, en cuanto al otro alelo se le denomina recesivo.

Las células germinales poseen sólo una de las dos copias de cada gen, por lo tanto son células haploides (haplos = sencillo, simple, mitad) la selección del alelo que pasa al óvulo o al espermatozoide es al azar. Durante la fecundación, al fusionarse el espermatozoide y el óvulo se forma el complemento diploide normal.

Todos estos conceptos se dedujeron aun antes de entender a nivel molecular las estructuras celulares que generaban la información genética. La primera información acerca de estas estructuras celulares fue el descubrimiento de los cromosomas (cuerpos coloreados), que están presentes en el núcleo de la célula. Estas macromoléculas mostraban algunas propiedades del material genético: se detectaban en pares, se segregaban a las células hijas durante la división celular y, lo más importante, las anomalías cromosómicas (adiciones, rompimientos y rearrreglos) siempre se asociaban con defectos genéticos diferentes. Posteriormente se observó que los genes podían segregarse en grupos, los cuales pasaban a la progenie de manera unida. A tales genes se les llamó unidos o ligados y éstos a su vez forman grupos de genes unidos. La comparación del comportamiento de genes unidos afectados por rearrreglos cromosómicos condujo al descubrimiento de un grupo de genes unidos correspondía a un determinado cromosoma. Por lo tanto, el que un grupo de

genes unidos se transmitiera a la progenie se explicaba por su localización en un cromosoma.

Sin embargo, en ocasiones algunos grupos de genes que se consideraban unidos no se heredaban en la misma forma, se separaban durante la transferencia de información hacia el espermatozoide o hacia el óvulo. Esos eventos son medidos por recombinaciones entre los pares de cromosomas en uno de los padres. Los genes pudieron ser ubicados en sitios particulares del cromosoma y se determinó un tipo de distancia entre ellos con base en la frecuencia con la que se recombinan durante la transmisión a la progenie. Hasta ese momento, la estructura molecular de los cromosomas y la forma de almacenamiento de la información era un misterio. Más tarde se demostró que los cromosomas contenían proteínas y ácidos nucleicos.^{1-3, 8, 29,30}

1. AISLAMIENTO DEL DNA

A finales del siglo XIX se pensaba que la proteína funcionaba como portador del mensaje genético. En 1869, Friedrich Miescher descubrió el núcleo y encontró que en su composición básica, contenía un tipo de ácido nucleico: el ADN, el cual fue aislado por primera vez de células con pus y del espermatozoide del salmón.

Su estructura es simple: pentosas (desoxirribosa), fosfato y cuatro bases nitrogenadas: (adenina y guanina) y pirimidinas (citosina y timina) a lo que le llamo nucleína.

En 1928 Frederick Griffith, bacteriólogo inglés halló que algunas cepas no patógenas de neumococos, provocaban la muerte de ratones cuando se las inyectaban junto con un cultivo inactivado por calor de neumococos patógenos. De alguna manera, la bacteria no patógena se había transformado en una cepa virulenta. En 1944 Oswald Avery y Maclyn McCarty, investigadores del Rockefeller Institute demostraron que el ADN puro aislado del *pneumococcus*, tenía capacidad de transformación, con lo cual se confirmó que el ADN es el material genético. Las variedades virulentas de esta bacteria tienen una capsula extracelular de polisacáridos que les confiere resistencia a la reacción inmunológica del ratón. Dicha capsula no está presente en las variedades no patógenas. En el experimento de Avery el ADN transfirió el gen que codifica para la enzima UDP-Glucosa-Deshidrogenasa, necesaria para la síntesis de la capsula de polisacáridos: este gen se incorpora en el cromosoma de la cepa no virulenta y lo transforma, una acción indicativa de que tanto la patogenicidad como el gen para la enzima de la capsula habían sido transferidos a la cepa no patógena. El componente activo en el extracto fue denominado principio transformador.

Purificaciones exhaustivas y la caracterización del principio transformador de estos extractos condujeron finalmente a su determinación como DNA. Ahora se sabe que estas bacterias pueden incorporar DNA exógeno en sus propios cromosomas, es decir, las bacterias pueden ser transformadas por el DNA. Este proceso de transformación es una etapa clave en el aislamiento de los genes y de su análisis. De igual forma, las células animales o células eucarióticas también pueden incorporar material genético exógeno en sus cromosomas, un proceso conocido como transfección. Desde el punto de vista químico el DNA es un

polímero de nucleótidos unidos entre sí por enlaces fosfodiéstericos. Cada nucleótido está formado por una base nitrogenada, una azúcar (desoxirribosa) y grupos fosfatos unidos a la desoxirribosa. El DNA contiene una mezcla de cuatro bases nitrogenadas: adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G).

Se propuso que el material genético debería de poseer las siguientes propiedades:

1. Apego a las reglas de la ploidía. La mayor parte de las células deberían contener dos copias de cada gen. Mientras que las células germinales deberían de tener sólo una.
2. Mucha estabilidad física. Si la información se almacenaba desde el punto de vista químico para formar estructuras místicas renovables (cabello, hemoglobina, etc.), se debería de retener la información durante el desarrollo de la vida humana, además de retenerla por generaciones.
3. Duplicarse por completo. Si las células se dividen durante el desarrollo el material químico también debería de autoduplicarse.
4. Aunque estable de ordinario, tendría que presentar variaciones (mutaciones); éstas tendrían que producirse en el material genético y pasar a la progenie.
5. Especificar las características de las células, es decir, debería de existir un mecanismo par expresar la información contenida en los genes.^{1-3, 8, 26, 29,30}

2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DEL DNA

Si el DNA contenía la información genética, debería de exhibir las propiedades específicas propuestas para el material genético. Watson y Crick hicieron este razonamiento y lo demostraron al determinar la estructura y propiedades del DNA, que se resumen a continuación:

1. La estructura del DNA costa de una doble hebra con un giro helicoidal orientado hacia el lado derecho. Ambas hebras giran al rededor de un eje central común. El diámetro de la hélice es de unos 20 angstroms (Å), con dos hendiduras o surcos deslizándose alrededor de la hélice: una mayor y una menor. Su estructura es abierta, de tal forma que las enzimas leen la secuencia del DNA acoplándose entre las hendiduras.
2. Las dos hebras tienen los dos grupos fosfato orientados hacia la parte exterior de la hélice y las bases nitrogenadas hacia la parte interior. Ambas cadenas se unen entre sí a través de los puentes de hidrógeno formados entre las bases nitrogenadas. Estas uniones no son al azar, si no que hay una gran especificidad la adenina (A) se une siempre con la timina (T) y la guanina (G) con la citosina (C). Los pares de bases A-T se forman por medio de dos uniones no covalentes o puentes de hidrógeno, en tanto que tres de estos puentes forman los pares G-C (Fig. 1-1).
3. Los pares de bases inciden en un plano perpendicular al eje de la hélice, al igual que los escalones en una escalera circular. Los pares de bases se ubican en planos uno sobre el otro.
4. Hay 10 pares de bases en cada giro de 360° de la hélice. Las bases están separadas por 3.4 Å, es decir, hay 34 Å por giro de la hélice (fig. 1-2).
5. Cada cadena tiene una direccionalidad o polaridad: los grupos fosfato se unen a los grupos hidroxilo localizados en la posición 3' de una desoxirribosa con el

grupo hidroxilo de la posición 5' de la desoxirribosa adyacente. Así, la dirección de una cadena es de 3'-5' y la de la otra cadena es de 5'-3': las dos hebras complementarias tienen direcciones opuestas, es decir, son antiparalelas.

6. Cualquier secuencia arbitraria de bases en una hebra puede tener una parte complementaria, esto es, una A en una hebra siempre tendrá una T en la hebra complementaria, y así sucesivamente.^{1-3, 8, 26, 29,30}

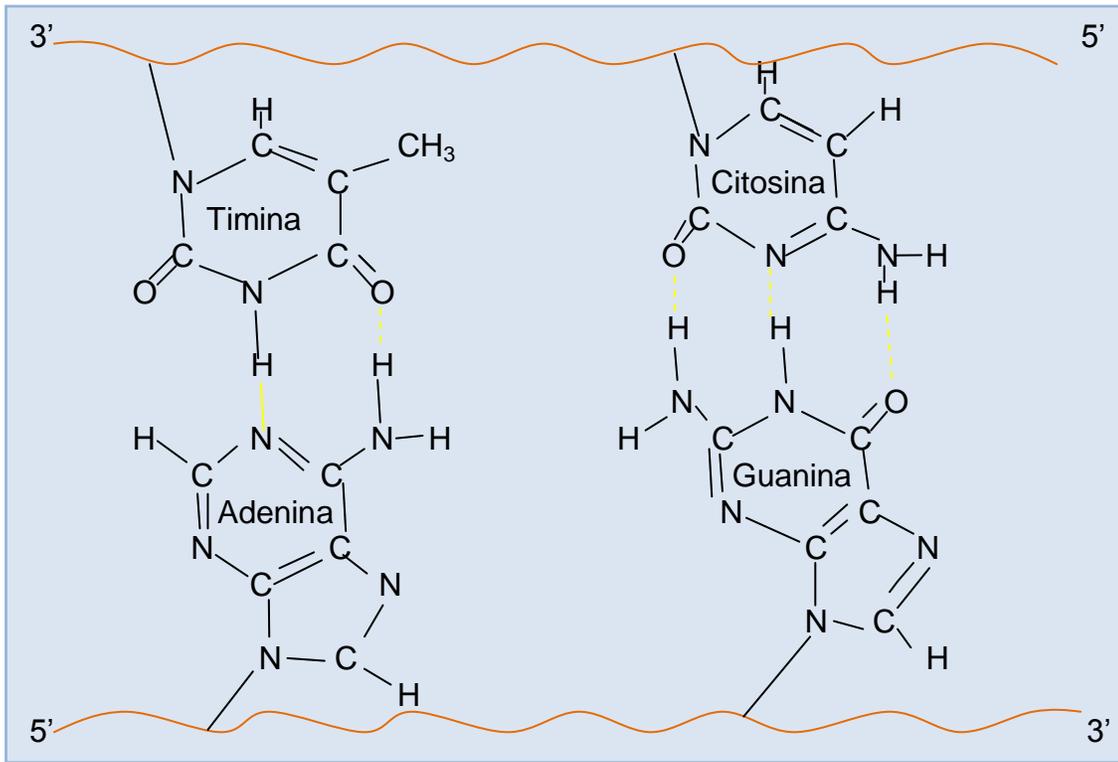


Fig. 1-1. Unión de bases complementarias a través de puentes de hidrógeno. Modificado de: Panduro, 2000¹

Después de estas deducciones, se logró un avance extraordinario en el conocimiento a nivel molecular que condujo a la comprensión del funcionamiento de la información genética. Por lo que se establecieron los conceptos siguientes:

- El contenido de DNA en la célula coincide con las demandas de la ploidía. El espermatozoide y el óvulo poseen 50% (haploidía) de la cantidad de DNA que contienen las células somáticas. Desde el punto de vista químico el DNA es extraordinariamente estable, sus uniones covalentes resisten la temperatura de ebullición y la exposición a los álcalis fuerte (pH=13). El DNA tiene una gran capacidad de almacenamiento de información debido a que ésta se guarda en el orden de las bases a través de la cadena, de tal forma que la dirección para construir una característica específica de la célula reside en la secuencia de nucleótidos del ácido Desoxirribonucleico.
- La doble hebra de DNA puede autorreplicarse, se puede desenrollar y separar para que una nueva hebra se copie de la hebra original incorporando las bases apareadas apropiadamente. Por lo tanto, las dos hélices hijas serán idénticas y tendrán las mismas secuencias de bases que la hebra original. Respecto a la

división celular, una de las dos copias de la hebra original se puede transmitir a cada célula hija.

La naturaleza de la mutación también se explica en forma sencilla, un error en el ensamble de la molécula en la célula hija puede alterar la secuencia de nucleótidos y esa alteración se transmite tal cual a todas las células subsecuentes.

Es posible separar las dos hebras complementarias de DNA y repartirlas en un tubo de ensayo. Por ejemplo, al mezclar fragmentos de DNA con secuencias homólogas pero de origen diferente, la doble hebra de DNA se puede desenrollar (desnaturalizar) y aparear de nuevo (hibridar) en forma muy específica, obteniéndose un híbrido con una actividad especial que está dada por la complementariedad de bases de ambas hebras de ácido Desoxirribonucleico.^{1-3, 8,26, 29,30}

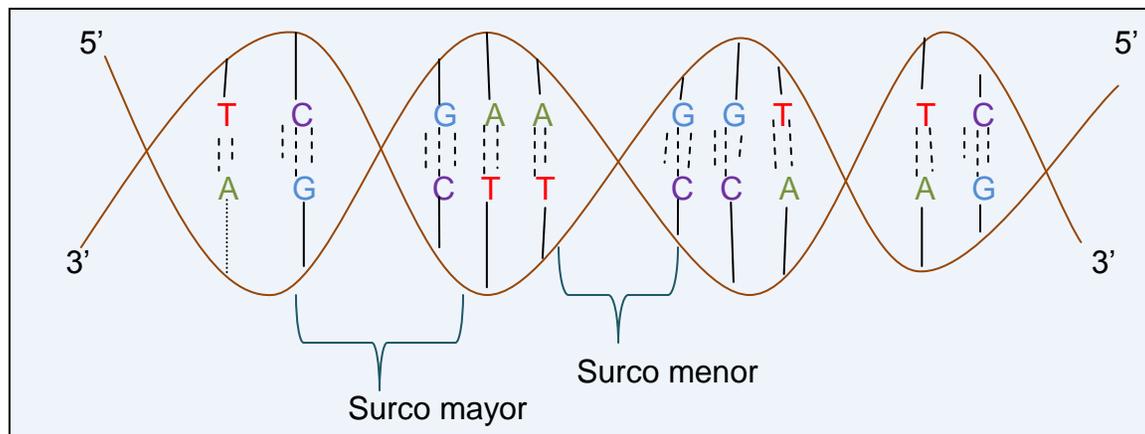


Figura 1-2. Representación esquemática de la doble hebra de DNA según el modelo de Watson y Crick. (----. Puente de hidrógeno; A, T, G y C [adenina, timina, guanina, citosina], bases nitrogenadas unidas al esqueleto de fosfatos y desoxirribosa). Modificado de: Panduro, 2000¹

3. GENES

Una vez conocida la estructura del DNA fue más aparente el mecanismo de almacenamiento de la información genética. Así mismo, se pudieron conocer claramente las reglas que dictan la manera en que dicha información se transmite y hereda de generación en generación. Sin embargo, aún no estaba claro el proceso de especificación de las propiedades de la célula mediante la secuencia de un nucleótido de DNA. La respuesta llegó pronto, la secuencia de bases determina la secuencia de aminoácidos en las proteínas sintetizadas por la célula. El proceso de expresión de genes incluye la síntesis de una molécula intermediaria: El RNA mensajero (mRNA). Desde el punto de vista químico este es similar al DNA y su secuencia de bases es idéntica, al menos en una región importante del DNA. Al proceso de formación del RNA a partir de una secuencia específica de DNA se le llama transcripción.

A su vez, el mRNA dirige la síntesis de proteínas y a este proceso se le llama traducción. Durante la traducción las bases se leen en tripletes (de tres en tres bases), a través de un código genético en el que cada triplete de bases

codifica para un aminoácido particular; así, una secuencia específica de nucleótidos determina una secuencia específica de aminoácidos. Las mutaciones en la secuencia de DNA producen un cambio en la secuencia de aminoácidos, lo cual puede alterar o inactivar la función de la proteína. La integración del modelo de la expresión de genes constituye el dogma central de la biología molecular.

En términos moleculares un gen es una región de DNA que dirige la síntesis de un producto génico, el RNA mensajero y la proteína, un concepto que se ejemplifica como: un gen, una proteína. La secuencia específica de DNA que constituye un gen tiene señales importantes para su expresión, las cuales pueden localizarse en regiones diferentes y distantes de la región que codifica para el producto génico.

La longitud de un gen típico de mamífero puede ser de 10 000 a 100 000 pares de bases de DNA, de manera que abarca cientos de nucleosomas en el cromosoma condensado. A su vez, los genes están separados por regiones de DNA sin una función aparente, aunque al aparecer estas secuencias espaciadoras tienen una función estructural muy importante en el enrollamiento del DNA en el cromosoma o en su replicación. Se estima que hay casi 100 000 genes en el genoma, sin embargo no todos se expresan al mismo tiempo durante la vida de una célula eucariótica; las evidencias experimentales indican que sólo unos 10 000 genes se están expresando en forma simultánea.

Las regiones estructurales más sobresalientes que incluye un gen son:

- El inductor y el promotor localizado en la región que reconoce la polimerasa de RNA para iniciar la transcripción.
- La región de DNA cuya copia produce el mRNA (exones) y las secuencias de RNA que se liberan (intrones) durante el proceso de corte y unión.
- Los sitios de iniciación, terminación y poliadenilación, que también son importantes para la transcripción.¹

En la figura 1.3 se muestran las características estructurales más sobresalientes de un gen eucariótico.^{1, 2, 29,30}

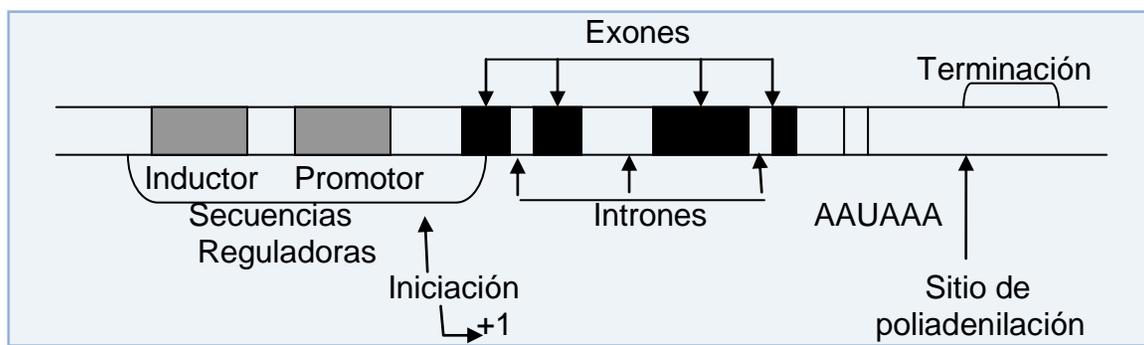


Figura 1-3. Características estructurales de un gen eucariote. Secuencias reguladoras, región que se transcribe (intrones y exones), señal de terminación de la transcripción y sitios de adición de la cola de poliadeninas. Modificado de: Panduro, 2000¹

Resumen

La estructura y propiedades de los ácidos nucleicos y el DNA, sirve de punto de partida para la identificación de los microorganismos, ya que debido a que el DNA está presente en cada una de las células (procarionte y eucarionte) y es específico para cada una de ellas (genotipo), se puede obtener con facilidad para identificar específicamente a cada uno de ellos.

El código genético que es la parte importante del DNA, presenta características especiales como es el uso de bases puricas o pirimidicas en forma de tripletes que codifican a cada una de las diferentes características o partes estructurales de cada célula, por decirlo así cada triplete que se presenta en el DNA, representa una parte constitutiva, la estructura de la pared celular, proteínas específicas, patogenicidad en el caso de los microorganismos, etc.

Debido a esta característica importante se puede determinar una codificación de bases llamada oligonucleótidos que nos permitan la identificación específica de bacterias u hongos,

II. TÉCNICAS ELEMENTALES

El DNA se puede romper y unir (recombinar) con fragmentos de una misma especie o de una diferente. Así mismo, una secuencia determinada de DNA se puede aparear con otra secuencia complementaria ya sea de DNA o de RNA (hibridar). Estos conceptos elementales sirvieron de base para el desarrollo de métodos de biología molecular que varios autores denominaron técnicas de DNA recombinante. De éstas, que surgieron inicialmente basadas en el principio de hibridación fueron la técnica de Southern y la técnica de Northern; la primera permite identificar fragmentos específicos de DNA y la segunda fragmentos de RNA. Con posterioridad, estas técnicas se simplificaron y se les denominó dot blot y slot blot.

Con el mismo principio de hibridación, se crearía poco tiempo después la técnica de hibridación in situ, que permite identificar secuencias específicas de DNA o de RNA en células de fragmentos de tejido fijado en una laminilla.

Para identificar secuencias específicas de DNA o de RNA con estas técnicas se requiere de una sonda o DNA complementario.^{1, 3, 9, 11, 13, 20, 26, 28, 30}

A. DNA recombinante

El concepto de DNA recombinante implica crear a voluntad moléculas de DNA constituidas a su vez por fragmentos de DNA provenientes de diversas fuentes. Para llevar a cabo esta combinación fue necesario aprender a cortar y después unir específicamente el DNA; romperlo y unirlo en el lugar deseado facilitó la identificación y obtención de secuencias específicas de DNA correspondientes principalmente a un gran número de genes. Esta manipulación genética se efectuó en gran parte utilizando enzimas que actúan sobre el DNA, de las que se mencionarán las endonucleasas de restricción, las ligasas y las polimerasas.

1. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las endonucleasas o enzimas de restricción rompen la doble hebra del DNA al reconocer una secuencia específica de bases (sitios de restricción). Este rompimiento, además de específico es reproducible y consiste en deshacer la unión que forma el grupo fosfato entre dos moléculas de desoxirribosa de la hebra de DNA. Por ejemplo, en la figura 2.1, la hebra de DNA (arriba) tiene la secuencia de bases CTTAAG, la enzima de restricción Eco RI reconoce esta secuencia y rompe la unión fosfodiésterica entre las bases A y G. se observa que la hebra complementaria (abajo) tiene la misma secuencia y por lo tanto la enzima romperá en el mismo sitio (entre A y G). Como resultado, la unión entre ambas hebras dependerá únicamente de los puentes de hidrógeno, y se separarán, quedando sólo las bases CTTAA en la punta de cada hebra.^{1, 3, 5, 9, 26, 30}

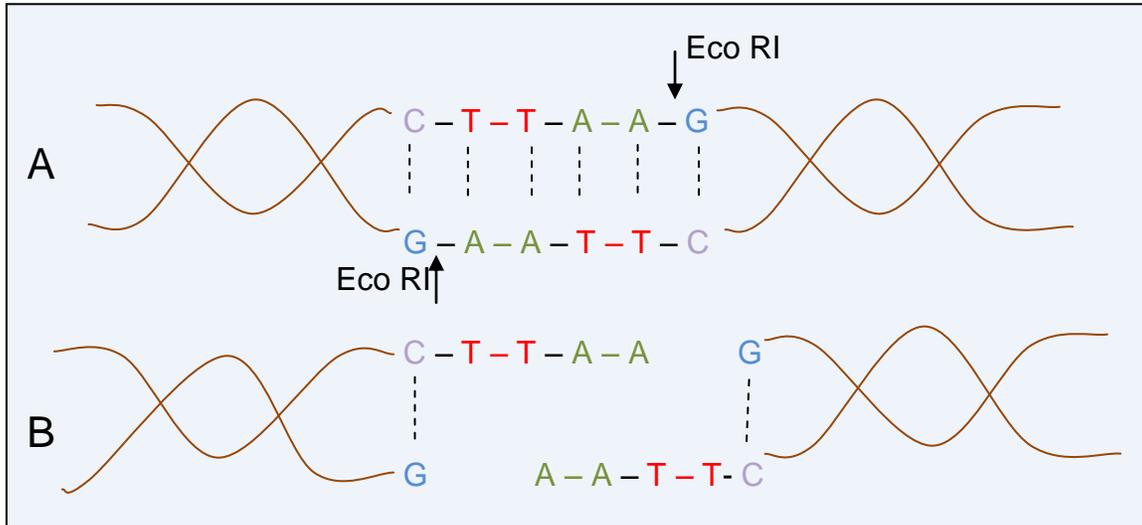


Figura 2-1. A, rompimiento y B, separación de la doble hebra de DNA después de la acción de la enzima de restricción Eco RI. Modificado de: Panduro, 2000¹

Las enzimas de restricción se obtienen de bacterias y pueden reconocer muy bien secuencias específicas en el DNA de cualquier especie debido a que este contiene los mismos constituyentes en toda la biosfera. El genoma humano presenta miles de secuencias que la enzima Eco RI reconocerá específicamente, es decir, tiene miles de sitios de restricción para la Eco RI, lo mismo que para la acción de otras enzimas de restricción diferentes, de las cuales existen más de cien en la actualidad. El nombre de cada enzima se compone de las siglas del microorganismo a partir del cual fue aislada. Por ejemplo, la Eco RI indica que proviene de *Escherichia coli* (Eco), R indica el tipo de cepa y I que esta fue la primer enzima que se aisló de dicha bacteria.

En el cuadro 2-1 se mencionan algunas de las enzimas de restricción más comunes que se emplean en el laboratorio de biología molecular. Se observa que cada una de ellas corta secuencias idénticas de cuatro a ocho pares de bases en cada una de las hebras de DNA. Precisamente ese rompimiento en dichas secuencias origina que el DNA, una vez cortado o digerido, genere extremos cohesivos o romos.

Otras enzimas importantes en biología molecular son las ligasas y la polimerasa de DNA. Las ligasas, como su nombre indica, ligan o unen dos hebras de DNA punta con punta; por ejemplo, si se rompe una hebra de DNA con una enzima de restricción, esa misma hebra se puede unir de nuevo a su forma original con una ligasa.

Por otra parte, la función de la polimerasa de DNA es copiar con exactitud una secuencia específica de DNA. Esta enzima cataliza la formación de una unión fosfodiésterica sólo si la base que se agregara es complementaria a la base de la hebra que sirve como molde. Lo anterior indica que la enzima sólo actúa si están presentes los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados dATP, dGTP, dTTP y dCTP, y una hebra de DNA que sirve de molde o plantilla (template). De hecho, la utilidad de esta enzima es muy común para marcar con material radiactivo (por lo

general ^{32}P -dCTP) el DNA complementario (cDNA) o las sondas, como se mencionará más adelante.^{1,3, 5, 9, 26, 30}

Cuadro 2-1. Enzimas de Restricción¹

Microorganismo	Enzima	Sitio de Restricción	Representación Esquemática del corte
<i>Escherichia coli</i> R	Eco RI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{GAATTC} 3' \\ 3' \text{CTTAAG} 5' \end{array}$	
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	Hind III	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{AAGCTT} 3' \\ 3' \text{TTCGAA} 5' \end{array}$	
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae III	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{GGCC} 3' \\ 3' \text{CCGG} 5' \end{array}$	
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{GTTAAC} 3' \\ 3' \text{CAATTG} 5' \end{array}$	
	Hpa II	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{CCGG} 3' \\ 3' \text{GGCC} 5' \end{array}$	

El descubrimiento de esta enzima hizo merecedor del Premio Nobel a Arthur Kornberg, cuyas investigaciones inició en 1955. En la actualidad se conocen varias polimerasas que copian el DNA o el RNA, por lo que se denomina polimerasa I de DNA a la descrita inicialmente por Kornberg.

Las polimerasas de DNA agregan desoxirribonucleótidos a un iniciador (primer) (fig. 2-2), pero no pueden catalizar la unión de dos cadenas de DNA o juntar punta con punta una cadena sencilla de éste. Así, la existencia de DNA circular (en bacterias) indicaba que debería existir una enzima con dichas características. Esta enzima, ligasa de DNA, descubierta en forma simultanea en los laboratorios de varios investigadores en el año de 1967, cataliza la formación de uniones fosfodiéstericas entre dos cadenas de DNA; requiere de un grupo libre hidroxilo (OH) en la terminación 3' de una de las cadenas y un grupo fosfato (PO_4^{3-}) en la parte Terminal 5' de la otra cadena (fig. 2-3)^{1,3, 5, 9, 26, 30}

B. DNA complementario (sonda)

Conocer una secuencia específica de DNA y poder manipularla con estas enzimas permitió recombinar secuencias de DNA de especies diferentes. La ventaja es que si una secuencia específica de DNA se recombina con un vector de origen bacteriano, éste se puede reproducir precisamente en la bacteria y así es posible obtener una cantidad determinada de las secuencias específicas de DNA, o bien, del producto génico. Existen miles de genes dispersos en todo el genoma humano; debido a que cada gen tiene una secuencia única, identificar un gen específico es como encontrar una aguja en un pajar, por eso la herramienta que se comenzó a utilizar desde el decenio de 1970 para la identificación de genes o de mRNA específicos se le denominó sonda (probe) o DNA complementario (cDNA). Como su nombre indica, es una secuencia de DNA complementaria a la secuencia del gen o del mRNA que se pretende identificar. Si la secuencias de bases del fragmento de DNA es complementaria a los exones, a una secuencia de mRNA, o ambos, se dice que se tiene un DNA complementario, y se le llama DNA genómico si la secuencia es complementaria tanto a intrones como a exones. Las secuencias de cDNA y DNA genómico se pueden marcar con compuestos radiactivos (o químicos) para que se hibriden con la secuencia específica y así poder identificarla y distinguirla del resto del DNA total.

En forma breve se mencionará que el cDNA se puede obtener a partir del mRNA, de una secuencia conocida de aminoácidos o de nucleótidos, o bien, directamente del DNA genómico (de los exones) (fig. 2-4). Estas tres estrategias se han empleado ampliamente para obtener cDNA diferentes y se han podido identificar hasta la fecha varios cientos de genes o de mRNA específico. Hubo gran avance en este tema con el conocimiento previo del código genético que permitió deducir secuencias de genes a partir de proteínas o de mRNA específicos, así como tener las herramientas necesarias para romper el DNA en el lugar deseado y separar los fragmentos de tamaño diferente en un gel de agarosa a través de electroforesis.

Por otra parte, también se pueden obtener secuencias específicas de DNA (oligonucleótidos) utilizando un sintetizador automático de DNA, Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o bien moléculas de RNA marcadas, obtenidas a partir de vectores de expresión. Algo característico de estos vectores de expresión es que el cDNA que se inserta en ellos se transcribe y genera un RNA y no un DNA, de tal forma que el RNA recién transcrito también se utiliza para la identificación de secuencias específicas. Una ventaja de los vectores de expresión es que el inserto se puede transcribir en la dirección 5'– 3' (sentido), o bien, en la dirección 3'-5' (antisentido), una característica que debe considerarse si las secuencias a identificar son DNA o mRNA.^{1, 3, 5, 9, 13, 20, 26, 30}

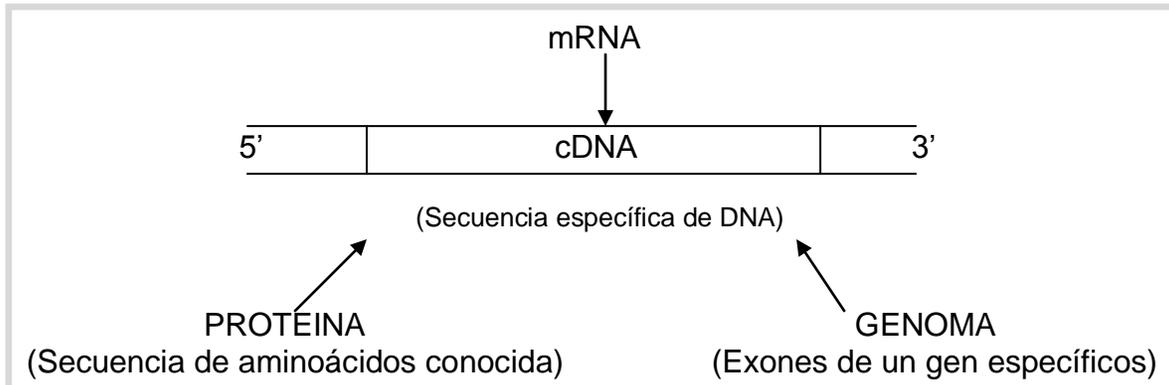


Fig. 2-4. Estrategias para obtener un DNA complementario (cDNA). Modificado de: Panduro, 2000¹

C. Identificación de secuencias específicas

La hibridación es un fenómeno de importante aplicación práctica en todas las áreas de la biología molecular e ingeniería genética, y en especial en la patología molecular. Para comprender estas aplicaciones es preciso estudiar la base molecular que fundamenta este proceso.

La hibridación está basada en el proceso de renaturalización de dos cadenas sencillas de un DNA, que se observa, por ejemplo, al enfriar lentamente una solución de DNA dúplex previamente desnaturalizado por calor. La sensibilidad del apareamiento por puentes de hidrógeno entre bases complementarias (A-T, A-U o C-G), presentes en cadenas sencillas contiguas, da lugar a estructuras de doble hebra, de gran estabilidad. Estas pueden ser híbridos DNA-DNA, híbridos RNA-RNA (ambos homodúplex) o híbridos DNA-RNA (heterodúplex).²

Lo anterior conduce a que en condiciones estrictas de hibridación (condiciones precisas de sales y temperatura), la secuencia de bases complementarias que se identifica debe ser idéntica en ambas hebras y, por lo tanto, la doble hebra debe ser estable. El caso contrario es que en cuanto menor homología haya entre las dos hebras de ácidos nucleicos, menor estabilidad tendrá su doble hebra.

Con apego a estos principios es posible hibridar y por lo tanto identificar una doble hebra de ácidos nucleicos, en donde la única diferencia entre ambas hebras complementarias sea la sustitución de una sola base en una de las dos hebras. Este es el caso típico para la identificación de mutaciones puntuales, en las que se emplean las técnicas de hibridación alelo específica, de gran importancia para los estudios de diagnóstico molecular.^{1, 3, 9, 13, 26}

D. Desnaturalización y renaturalización del DNA

Puesto que la hibridación surge de la observación del proceso de renaturalización de un DNA previamente desnaturalizado, se estudian como introducción los procesos de desnaturalización y renaturalización del DNA.

Al igual que las proteínas, los ácidos nucleicos se desnaturalizan por efecto de agentes químicos o físicos, perdiendo su conformación tridimensional, en especial la forma duplohelicoidal del DNA. La desnaturalización se debe tanto a la rotura de los puentes de hidrogeno entre pares de base con las interacciones hidrofóbicas entre bases apiladas. Al desnaturalizarse, las dos hebras de DNA se separan y pasan a una conformación al azar (o de ovillo aleatorio), sin que se altere la estructura primaria, pues no hay ruptura de enlaces covalentes. En el caso de los RNAs, con muy distinta conformación tridimensional a pesar de su analogía en estructura primaria, la desnaturalización afecta fundamentalmente a los tRNAs (RNA de transferencia) y rRNAs (RNA ribosomal) ya que son los que presentan regiones en doble hélice al no dar lugar a aplicaciones experimentales, la desnaturalización del RNA no se considera de forma particular en este tema.^{1, 3, 5, 12, 13, 26}

E. Agentes desnaturalizantes

Aunque considerarse desnaturalizantes los mismos factores que actúan sobre las proteínas, solo se citaran brevemente, los ácidos y bases y ciertos agentes químicos, para centrar la atención en el efecto de la temperatura, como factor representativo. Aunque cada uno de ellos tiene un mecanismo particular de actuación, todos debilitan las interacciones por puente de hidrogeno y/o apilamiento de bases, conduciendo a un mismo proceso de desnaturalización y de separación de las hebras.^{1, 3, 5, 8, 26, 28}

1. DESNATURALIZACIÓN Y RENATURALIZACIÓN POR EFECTO DE LA TEMPERATURA

La temperatura, el agente más representativo, actúa de la forma siguiente:

El calentamiento gradual del DNA debilita las fuerzas estabilizadoras de la doble hélice de forma que las dos hebras se desenrollan hasta su separación total. En este proceso de desnaturalización se pierden la estructura secundaria y superior, obteniéndose dos moléculas de DNA de hebra sencilla.

Si después del aumento gradual de temperatura, se enfría rápidamente el sistema (mezcla de DNAs de hebra sencilla) las cadenas quedan disociadas: la desnaturalización es irreversible y se ha perdido la funcionalidad.

Si el enfriamiento se hace lentamente y sin llegar a bajas temperaturas (hasta 20-30°C), hay posibilidad que las secuencias complementarias se encuentren y se formen de nuevo los puentes de hidrogeno entre las hebras ("templado"). La mayor parte de las cadenas sencillas forman el mismo DNA doble original: se produce la renaturalización del DNA, es decir, la desnaturalización es reversible. (fig. 2-5)

En general, se emplea el proceso de desnaturalización para el estudio de la estructura del DNA, mientras que la renaturalización es útil como base de las técnicas de hibridación, de enorme trascendencia en biología molecular e ingeniería genética. La desnaturalización/renaturalización es especialmente crítica en la técnica de PCR.^{1, 3, 5, 8, 26, 28}

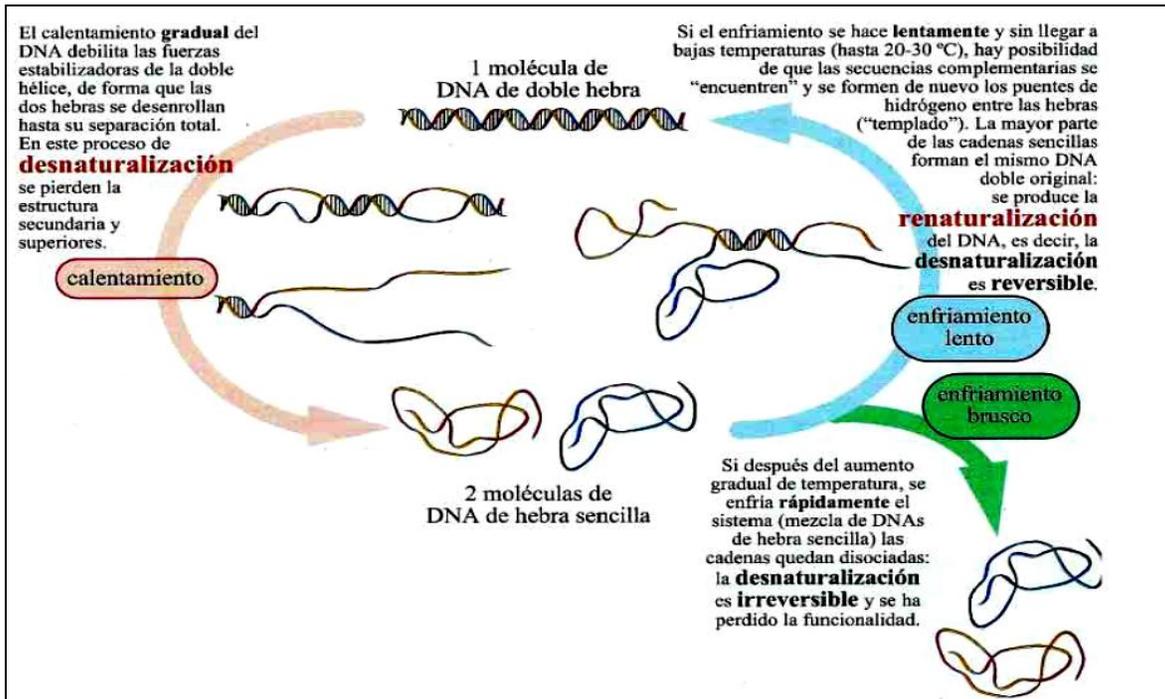


Figura 2-5. Desnaturalización y renaturalización del DNA por efecto de la temperatura.³

2. DESNATURALIZACIÓN POR ÁCIDOS Y BASES

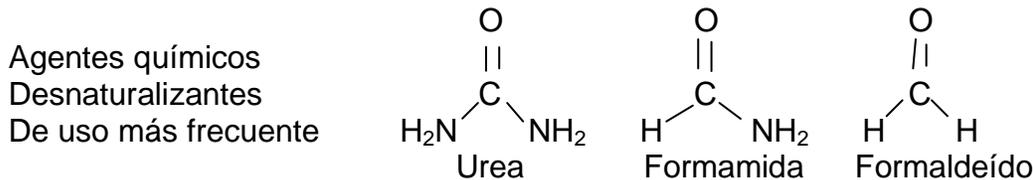
Como ya se ha estudiado el apareamiento de las bases disminuye o se debilita por valores de pH alejados de la neutralidad, con la consiguiente desnaturalización del DNA. Sin embargo, un medio ácido puede conducir también a la ruptura de la estructura primaria de los ácidos nucleicos (recuérdese que el medio ácido fuerte rompe los enlaces fosfodiéster y N-glucosídicos, mientras que en condiciones más suaves, por ejemplo, a pH alrededor de 3 se separan las purinas). Por ello, para la desnaturalización del DNA es más habitual emplear condiciones alcalinas (a las cuales el DNA, a diferencia del RNA, es estable). La neutralización del medio puede permitir la recuperación de la estructura de partida, es decir, la renaturalización del DNA (con consideraciones similares a las de la desnaturalización por calor).³

3. DESNATURALIZACIÓN POR AGENTES QUÍMICOS

Algunos de los compuestos empleados con frecuencia para desnaturalizar el DNA son moléculas sencillas, altamente polares, con grupos amino y carbonilo estos les permiten competir en la formación de enlaces de hidrógeno con los

grupos amino y carbonilo propios de las bases facilitando así la ruptura de sus apareamientos y la consiguiente separación de las hebras.

Dependiendo del tipo de acción del agente desnaturalizante y de la forma como ese agente se elimine, se puede conseguir la renaturalización del DNA, de modo análogo a los casos anteriores.^{2,3}



F. Métodos de ensayos de hibridación

Todos los ensayos de hibridación se basan en la mezcla de hebras sencillas de ácido nucleico muestra o diana, no marcado, con una sonda de secuencia conocida, marcada, bajo condiciones experimentales que permitan el apareamiento de bases complementarias. Si la sonda o el DNA diana son de doble hebra, han de ser previamente desnaturalizados, generalmente por calor o tratamiento alcalino. Una vez mezcladas, se permite la renaturalización en la cual, como ya se ha comentado, se pueden formar híbridos, sonda: diana. Se ha de disponer, además, de un método para detectar los híbridos formados, que viene determinado por el tipo de marcaje empleado en la sonda.

Los ensayos de hibridación se pueden clasificar en tres:

- a. Hibridación en fase líquida
- b. Hibridación en soporte sólido:
 - 1 - "Dot-blot" y "spot-blot"
 - 2 - Hibridación de Southern o "Southern blot"
 - 3 - Hibridación de Northern o "Northern blot"
- c. Hibridación in situ.^{1, 3, 5, 11, 13, 20, 26, 28}

1. HIBRIDACIÓN EN FASE LIQUIDA

Este fue el método inicialmente empleado. Utilizando una muestra de DNA o RNA en disolución, se realiza su hibridación con la sonda; al estar ambas disueltas, la cinética es más rápida. Además, todas las moléculas diana son igualmente accesibles, por lo que la técnica es más cuantitativa que la hibridación en soporte sólido. Sin embargo, es el método que menos se utiliza actualmente, habiendo sido desplazado por otros más convenientes. Se aplica, por ejemplo, en el estudio de la estructura de los mRNAs empleando nucleasa S1. Figura 2-6.^{1, 3, 5, 11, 13, 20, 26, 28}

2. HIBRIDACIÓN EN SOPORTE SÓLIDO

Se trata de un tipo de ensayo más simple, que permite procesar varias muestras simultáneamente y facilita el control de la hibridación. Aunque la cinética de la hibridación es más lenta y el proceso menos eficiente, se utiliza mucho más que la hibridación en disolución, por ser más sencillo de realizar y más versátil.³

Estos métodos han adquirido hoy día un interés particular como herramientas muy validas para el análisis de ácidos nucleicos y el diagnóstico de enfermedades moleculares con base genética. Como antecedentes, pueden citarse la inmovilización del DNA en nitrocelulosa, su detección por primera vez por hibridación y el descubrimiento de un método para la lisis in situ de colonias bacterianas en filtros de celulosa.

El esquema general de este tipo de ensayos se puede ilustrar con el método comúnmente empleado para identificar, de entre varias colonias bacterianas en placas de cultivo con agar, aquellas que contienen un gen o fragmento de DNA de interés bajo la forma de plasmido recombinante. Figura 2-7 1, 3, 5, 11, 13, 20, 26, 28

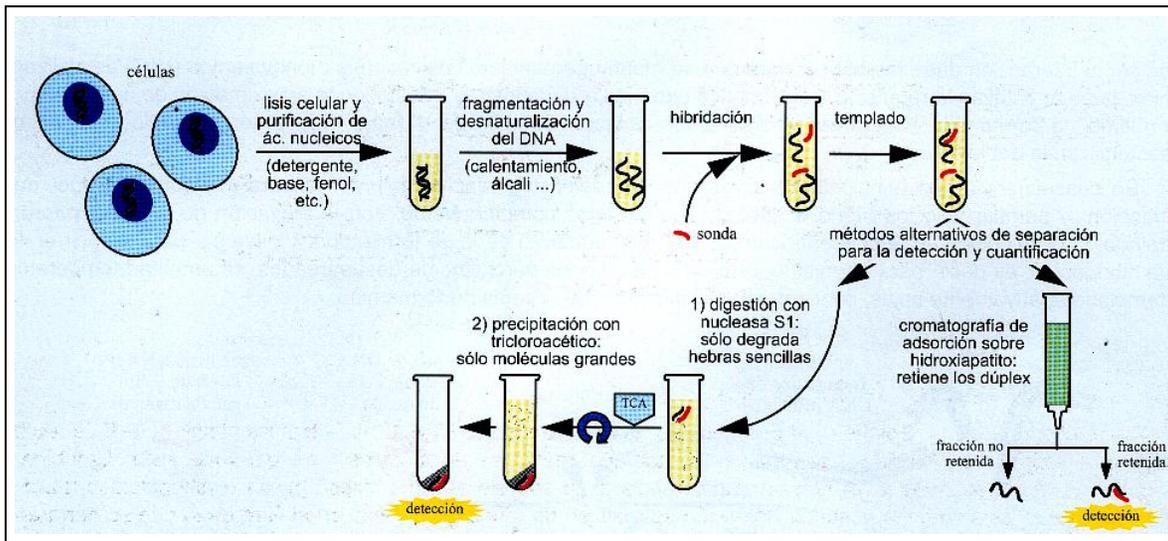


Figura 2-6. Hibridación en fase líquida. ³

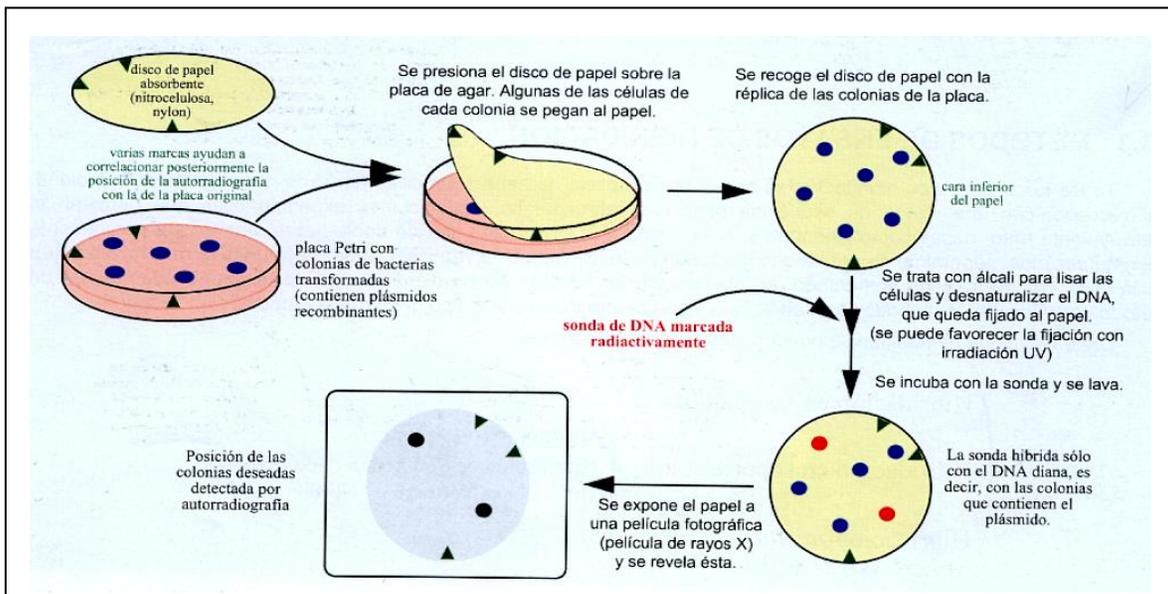


Figura 2-7. Hibridación en soporte sólido. ³

3. HIBRIDACIÓN “DOT BLOT” Y “SLOT BLOT”

Este es el método más simple y común, gracias a su posibilidad de empleo con muestras de ácido nucleico sin purificar (por ejemplo sangre, heces o esputos). La muestra se aplica, bien gota a gota (dot blot) o en manchas alargadas (slot blot), sobre un “filtro” de nylon o nitrocelulosa, cuyas propiedades de adsorción fijan las moléculas de ácido nucleico y proteína. Figura 2-8^{1, 3, 5, 11, 13, 20, 26, 28}

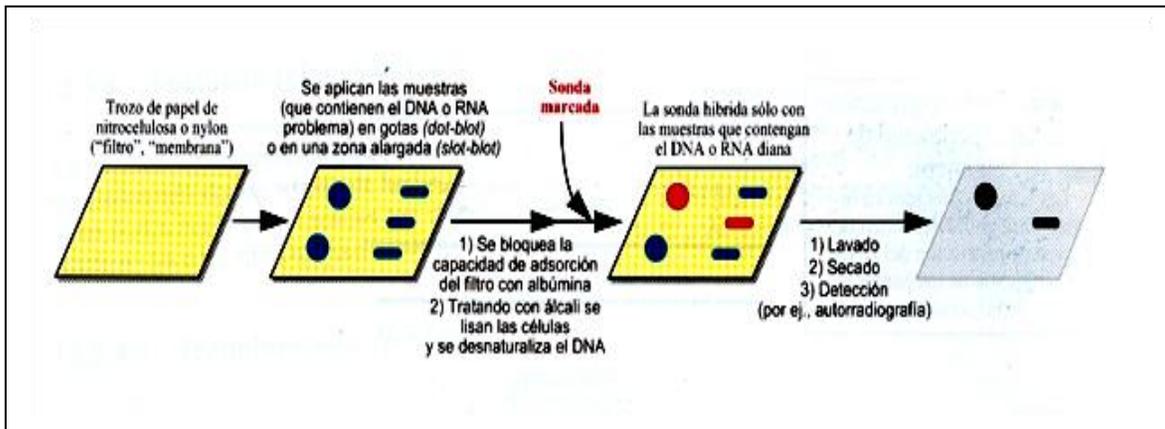


Figura 2-8 Hibridación “Dot-Blot” y “Slot-Blot”.³

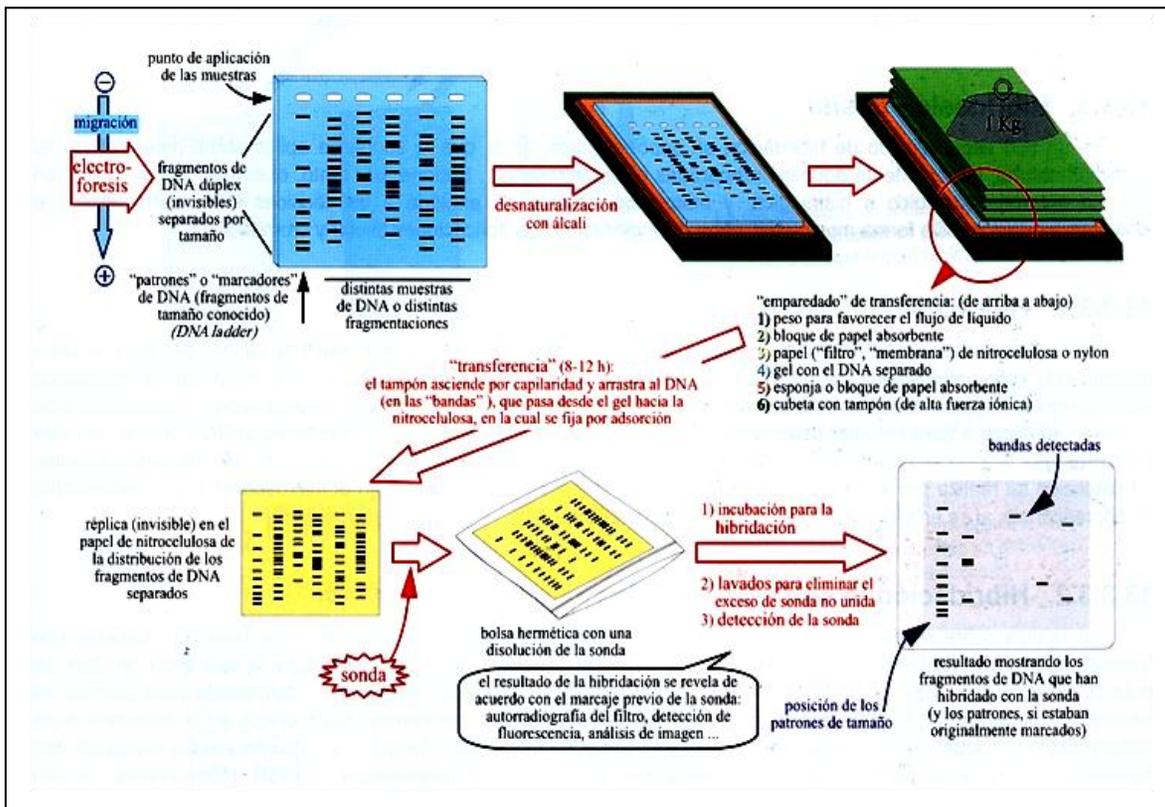


Figura 2-9. Hibridación Southern.³

4. HIBRIDACIÓN DE SOUTHERN

Desarrollada por E.M. Southern, al que debe su nombre (Southern blot). Es una técnica simple y fácil de realizar que detecta fragmentos de DNA, separados por tamaños mediante electroforesis en gel. Combina la separación electroforética del DNA con su transferencia a un soporte sólido o filtro (nylon o nitrocelulosa) para su hibridación. Tanto esta como la posterior detección se realizan de forma más eficaz en el filtro de lo que se haría en el gel. Esta técnica ha contribuido de manera notable a aumentar la potencialidad de la hibridación como herramienta analítica, constituyendo hoy día en bioquímica clínica el método habitual de análisis de DNA extraído de muestras de sangre, esputos, tejido y células (linfocitos, amniocitos...).

Metodológicamente, implica cinco etapas bien diferenciadas: separación electroforética, desnaturalización, transferencia, hibridación y detección. Figura 2-9
1, 3, 5, 13, 20,26

5. HIBRIDACIÓN NORTHERN

A diferencia del caso anterior, su nombre (northern blot) no corresponde al de ningún investigador, sino a un simple juego de palabras (southern = del sur, northern = del norte). El procedimiento es idéntico, pero el ácido nucleico analizado es RNA. Por su menor tamaño, no es necesaria su fragmentación con endonucleasas, pero debe tenerse especial cuidado para evitar la acción de RNasas, tanto endógenas como exógenas (contaminación muy común, incluso por las manos del analista, y muy difíciles de inactivar). El uso de agentes desnaturalizantes sigue siendo necesario para evitar apareamientos intracatenarios, que alterarían el patrón de separación por tamaño.

La técnica de hibridación Northern se emplea principalmente para obtener información sobre el tamaño de RNAs y sobre el modelo de expresión de genes específicos. Estos, una vez clonados, pueden ser utilizados como sondas para hibridar muestras de RNA aisladas de una variedad de tejidos diferentes, y así conocer los tipos celulares en los que se expresa el gen, la abundancia relativa y el tamaño de los transcritos, y diversos detalles de su procesamiento posterior.^{1, 3, 5, 13, 20,26}

6. HIBRIDACIÓN IN SITU

Es un tipo especializado de hibridación en soporte sólido, en la que la sonda se aplica sobre muestras en su ubicación natural, generalmente aquellas preparadas para microscopía. Supone, por tanto, el empleo de la hibridación bajo el abordaje citológico e histológico, y metodológicamente es análoga a las técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas. De forma muy global, cabe distinguir entre su aplicación tisular y cromosómica.^{1, 3, 5, 13, 20,26, 28}

7. HIBRIDACIÓN IN SITU TISULAR

Se realiza sobre cortes de tejido, células intactas, núcleos aislados... en muchos casos, se lleva a cabo directamente sobre tejidos fijados con formalina, incluidos en parafina, congelados, etc. Es una modalidad de hibridación particularmente importante para detectar virus patógenos, para diagnosticar células cancerosas como consecuencia de cambios genéticos o para estudiar cambios en la expresión genética, detectando secuencias en el RNA celular. En este caso, tras una fijación suave de la preparación, se añaden sondas de DNA complementario (cDNA), de hebra sencilla. La detección se realiza por autorradiografía y examen de la película fotográfica bajo el microscopio, o por microscopia de fluorescencia, si se emplea este marcaje para la sonda. ^{1, 3, 5, 13, 26}

8. HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOSÓMICA

Se realiza sobre preparaciones en porta de cromosomas metafásicos o prometafásicos, tratadas con fijadores para preservar las características morfológicas del cromosoma. Para hacer accesible la secuencia de DNA, se trata la muestra con enzimas proteolíticas y se desnaturaliza el DNA por calor, álcali o formamida para permitir su hibridación con la sonda. Inicialmente se emplearon sondas radiactivas, pero problemas técnicos en la detección de la señal limitan su utilidad. Se ha conseguido aumentar la sensibilidad y resolución con el empleo de sondas marcadas con fluorescencia. En esta técnica, llamada hibridación in situ por fluorescencia o FISH (fluorescence in situ hybridization), la detección se hace bajo microscopio de fluorescencia, bien de forma directa o por un método indirecto.

En cuanto a sus aplicaciones, dada la gran detectabilidad de los fluorocromos actuales se puede emplear la FISH con fines muy diversos y se ha convertido en una técnica con un elevado potencial diagnóstico en cromosopatías, genes tumorales, virología, trasplantes, etc.

Uno de los métodos surgidos de la hibridación in situ cromosómica es el denominado pintado de cromosomas (chromosome painting), donde se usa como sonda una mezcla de fragmentos de DNA procedentes de un mismo cromosoma, con lo cual se observa fluorescencia en el cromosoma completo. Se facilita así la identificación visual de cada cromosoma (o varios simultáneamente, si se emplean sondas con distintos fluorocromos), en lo que se ha llamado un "cariotipo molecular". Esto es útil para estudiar grandes reorganizaciones de los cromosomas, que tienen lugar por ejemplo en procesos cancerosos. ^{1, 3, 13}

9. TÉCNICAS RELACIONADAS.

Se comenta finalmente una técnica de análisis que, aún no estando basada en los principios de hibridación, posee una similitud en los planteamientos que hace interesante su exposición en este lugar. Han surgido también otros numerosos métodos de análisis de ácidos nucleicos, variantes de los aquí de los expuestos, que combinan el reconocimiento de los ácidos nucleicos por sondas

con la interacción específica entre aquellos y proteínas, tales como los ensayos de retardo en gel o los métodos Southwestern y Far-western.^{1, 3, 5, 13, 26, 28}

a. Transferencia Western

A pesar que en este caso no existe hibridación entre ácidos nucleicos, se describe aquí este método por su similitud técnica y mecánica con las hibridaciones Southern y Northern. El ensayo Western (western = del oeste) se emplea para detectar las proteínas presentes en una muestra. Para ello, son sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida (separándose en función de tamaño y carga, salvo en el caso frecuente de electroforesis en presencia de SDS, que separa sólo en función de tamaño) y transferidas a una membrana (Western blot). La detección de las bandas proteicas en la membrana o filtro se realiza gracias a la unión específica de un anticuerpo contra la proteína o región proteicas que se quiere estudiar. De forma similar al marcaje y detección de sondas de ácido nucleico, se puede marcar directamente el anticuerpo o detectarlo mediante la unión de una proteína ligante marcada a su vez, tanto empleando isótopos como técnicas no radiactivas. El paralelismo (y las diferencias) entre los tres métodos se resumen en la Figura 2-10.^{1, 3, 13, 26, 28}

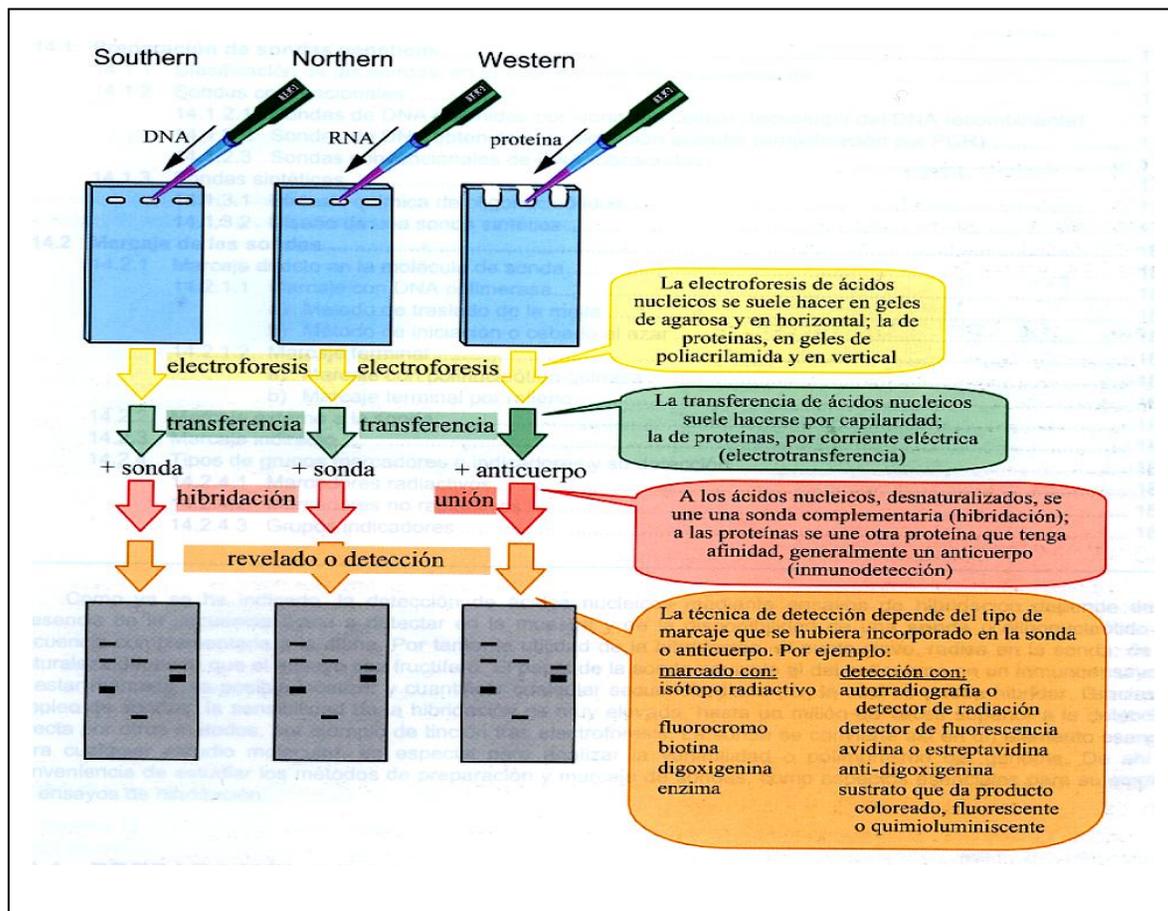


Figura 2-10 Transferencia de Western, en relación con la hibridación de Southern y Northern.³

Resumen.

Las propiedades fisicoquímicas del DNA es un herramienta importante en el proceso de replicación del DNA, la estabilidad que presenta debido a sus fuertes enlaces covalentes le permiten resistir la temperatura de ebullición del agua y algunas reacciones de hidrólisis que son utilizadas para la manipulación de este. Estas propiedades en donde el DNA se puede romper y unir con fragmentos de su misma especie o de otra, con la ayuda de enzimas, se les llama DNA recombinante.

De esta manera se pudo identificar y crear oligonucleótidos, secuencias de DNA para la identificación específica de microorganismos debido a los principios de hibridación del DNA, el cual se puede llevar cabo por efectos de la temperatura, por ácidos y bases y por agentes químicos. Dando punto de partida para los métodos de ensayos de hibridación que permiten principalmente la identificación de secuencias específicas.

III. PREPARACIÓN Y MARCAJE DE SONDAS

La detección de ácidos nucleicos mediante ensayos de hibridación depende de la presencia de la secuencia diana a detectar en la muestra y de la disponibilidad de una sonda u oligonucleótido de secuencia complementaria a la diana. Por tanto, la utilidad de la hibridación, el punto clave, radica en la sonda; de su naturaleza depende que el ensayo sea fructífero. El papel de la sonda equivale al del anticuerpo en un inmunoensayo y, al estar marcada, es posible localizar y cuantificar cualquier secuencia diana con la cual se pueda hibridar. Gracias al empleo de sondas, la sensibilidad de la hibridación es muy elevada, hasta un millón de veces superior a la detección directa por otros métodos, por ejemplo la tinción tras electroforesis la sonda se convierte así en un elemento esencial para cualquier estudio molecular, en especial para analizar la variabilidad o polimorfismo del genoma. De ahí la conveniencia de estudiar los métodos de preparación y marcaje de sondas, como aspectos esenciales para su empleo en ensayos de hibridación.³

Por ejemplo, si una sonda será usada sólo para reconocer bacterias Gram positivas, la secuencia de la sonda de ácido nucleico necesita ser específicamente complementaria a una secuencia de ácido nucleico común sólo a las bacterias Gram positivas y no a las Gram negativas. Pueden diseñarse sondas aún más específicas para identificar un género o una especie bacterianos en particular, un factor de virulencia o un gen de resistencia a antibióticos que pueden estar presentes sólo en ciertas cepas dentro de una especie dada.

En el pasado, las sondas se producían mediante un proceso laborioso que incluían técnicas de recombinación y clonación de DNA con la porción de ácido nucleico de interés. En época más reciente, las sondas comenzaron a sintetizarse por medios químicos mediante instrumentos servicio ampliamente disponible en el comercio. Esto facilita mucho el desarrollo de la sonda, porque el usuario sólo necesita suministrar al fabricante la secuencia de bases de nucleótidos de la sonda deseada.

La secuencia de bases de los posibles genes blanco o de los fragmentos de genes para el diseño de la sonda también se obtiene con facilidad por medio de servicios en computación on line que proporcionan información acerca de la secuencia de genes (p.ej; GENBANK, National Center For Biological Information). En resumen, en el presente el diseño y la producción de sondas de ácidos nucleicos son relativamente sencillos. Aunque las sondas pueden tener cientos a miles de bases de longitud, las sondas con oligonucleótido (es decir de 20 a 50 bases de longitud) suelen ser suficientes para la detección de la mayoría de los blancos clínicamente importantes.

Todas las pruebas de hibridación deben contar con un medio para detectarla. Esto se logra mediante el uso de una molécula indicadora que forma químicamente un complejo con la sonda monocatenaria de DNA. Las sondas pueden marcarse con varias de estas moléculas, pero con mayor frecuencia se usan marcadores radiactivos (p.ej; ^{32}P , ^{125}I ó ^{35}S), biotina-avidina, digoxigenina o quimioluminiscentes. (Figura 3-1)^{26,28}

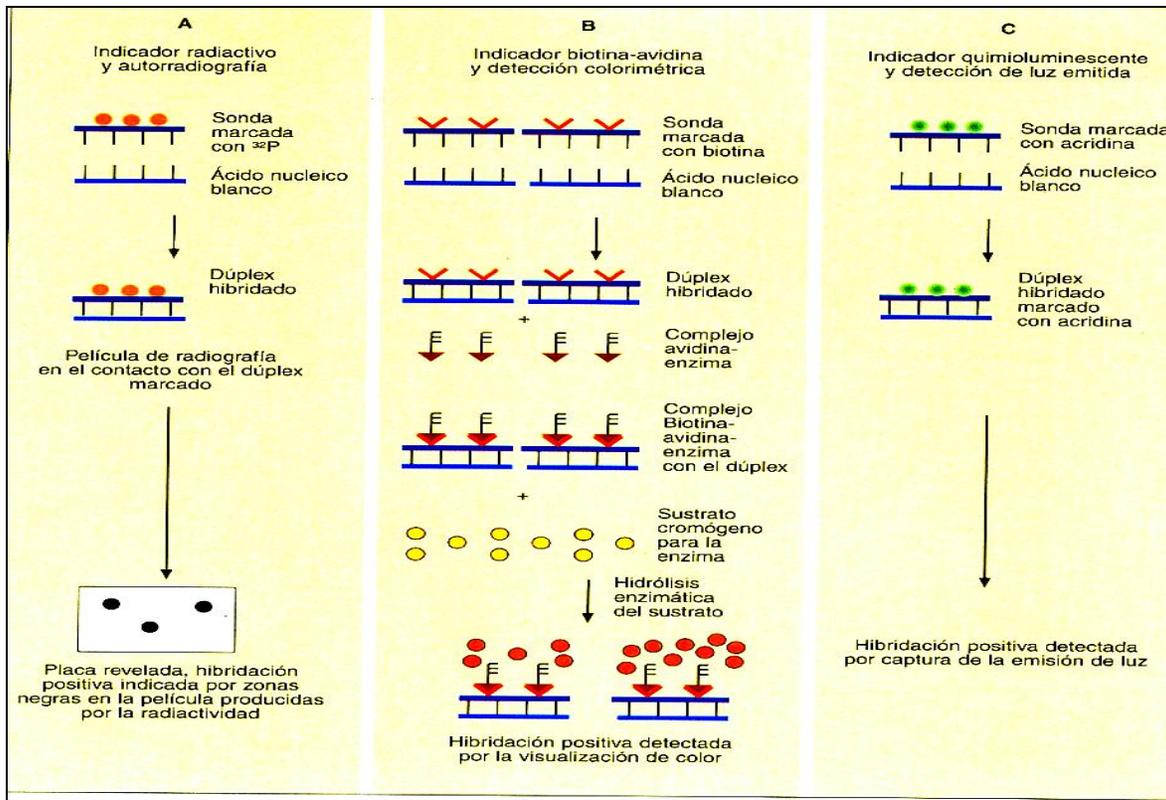


Figura: 3-1. A. Uso de sondas marcadas con un indicador radiactivo, e hibridación detectada por autorradiografía. B. Sondas marcadas con un indicador de biotina-avidina, con hibridación detectada por un ensayo colorimétrico. C. Sondas marcadas con un indicador quimioluminiscente (acridina), e hibridación detectada por medio de un luminómetro para detectar luz emitida. ²⁶

Con el uso de sondas de manera radiactiva, la hibridación se detecta por la emisión de radiactividad por el complejo sonda-blanco. (Figura 3-1A). Aunque este es un método muy sensible para detectar la hibridación las dificultades inherentes al trabajo con radiactividad en un laboratorio de microbiología clínica limitaron el uso de este tipo de marcadores y los métodos diagnósticos.

La biotilación es una alternativa no radiactiva el marcar sondas en la cual se incorpora biotina en la sonda de DNA mediante un proceso químico. Los dúplex de ácido nucleico sonda-blanco marcados con biotina se detectan mediante avidina, una proteína ligadora de biotina conjugada con una enzima como la peroxidasa de rábano picante. Cuando se agrega un sustrato cromógeno, la peroxidasa forma un producto coloreado que puede detectarse en forma visual o por espectrofotometría (Figura 3-1B).

Otras marcas no radiactivas se basan en principios similares a la biotilación. P.ej; con las sondas marcadas con digoxigenina, la hibridación se detecta mediante anticuerpo antidigoxigenina conjugados con un enzima. La formación de dúplex implica que la enzima está presente, de manera que la producción de color al agregarse un sustrato cromógeno se interpreta como una hibridación positiva. Como alternativa, el anticuerpo puede conjugarse con colorantes fluorescentes que pueden detectarse en forma directa, sin necesidad de que haya una reacción enzimática para generar un producto final coloreado o

fluorescente. Las moléculas indicadoras quimoluminiscentes pueden unirse de manera directa por medios químicos a la sonda de ácido nucleico sin usar un anticuerpo conjugado. Estas moléculas (la acridina) emiten luz, de forma que la hibridación entre una sonda quimoluminiscente y el ácido nucleico blanco pueda detectarse con un luminómetro (Figura 3-1C). El método quimoluminiscente se usa en un sistema de hibridación disponible en el comercio (Gen-Probe; San Diego, California).^{3, 26, 28}

A. Preparación de sondas genéticas.

Se utiliza una gran variedad de métodos para obtener sondas, tanto de DNA (en hebra doble y hebra sencilla) como de RNA. Obviamente, para su empleo en el ensayo de hibridación la sonda siempre ha de encontrarse en forma de hebra sencilla, para lo cual se acude a la simple desnaturalización de la sonda de doble hebra.^{3, 28}

1. CLASIFICACIÓN DE LAS SONDAS

Las sondas se pueden clasificar según varios criterios: longitud o tamaño de la secuencia diana, método de marcaje y detección, tamaño de la sonda, método de preparación, etc. Este último criterio es el más utilizado distinguiéndose entre sondas preparadas por métodos convencionales (por clonación celular o acelular y por métodos de síntesis química).^{3, 26}

a. Sondas convencionales.

También llamadas sondas genómicas, clonadas o biológicas, fueron las primeras utilizadas y han contribuido especialmente al progreso de la biología molecular.³

b. Sondas de DNA obtenidas por clonación celular (DNA recombinante).

Son de tamaño (longitud) variable, entre 100 bases y cientos de Kb. El objetivo central de esta clonación es la producción de un gran número de copias de una región de DNA (fragmentos o genes) o de cDNA (formado a partir de un mRNA). Se trata, por tanto, de un proceso de clonación de tipo celular (pues se consigue gracias al empleo de células), que por contraposición a la clonación acelular por PCR, in Vitro, se puede considerar que se realizan in vivo (estrictamente hablando, en cultivo). Se basa esta clonación, al igual que la PCR, en la realización de múltiples rondas de replicación pero en este caso catalizadas por la DNA polimerasa propia de la célula en la que se lleva a cabo el proceso, célula anfitriona. Para ello, el fragmento de DNA o cDNA a clonar (llamado inserto) se une a otro DNA (vector de clonación), y la molécula de DNA recombinante (rDNA) formada se incorpora a la célula anfitriona donde tiene lugar la amplificación por replicación. Una vez detectada la presencia de DNA de interés y seleccionados los clones que lo han amplificado, se aísla el gen o fragmento de

DNA o cDNA, que se emplea con distintos fines esencialmente el estudio de características.^{3, 26}

c. Sondas de DNA obtenidas por clonación acelular (amplificación por PCR)

Estas sondas son de menor tamaño que las obtenidas por clonación celular, entre 0.1 y 20Kb. El método de preparación también consta de un número de fases, por lo que las sondas se obtiene de forma más rápida y sencilla. En general, partiendo de DNA de doble hebra se preparan sondas de la misma naturaleza, salvo en la PCR asimétrica, que conduce a DNA de hebra sencilla, y en la RT-PCR, que permite obtener sondas de DNA de doble hebra partiendo de un RNA.^{3, 13, 26, 28}

d. Sondas sintéticas.

La capacidad de síntesis química es esencial en la ingeniería genética no sólo para separar sondas sino también para modificar parcial o gradualmente un producto génico o para sintetizar genes completos. En general se obtiene sondas de DNA más cortas que por clonación. El método más popular es la síntesis de sondas cortas de DNA (de 15 a 45 nucleótidos) monocatenarias llamadas oligonucleótidos o simplemente oligos. Estos pueden ser también de RNA, aunque se sintetizan con mayor dificultad.^{3, 13, 26, 28}

e. Síntesis química de oligonucleótidos.

El aspecto básico de la síntesis de la formación repetitiva de un enlace éster entre el grupo 3'-fosfato de un nucleótido y el grupo 5'-OH de otro, para dar un enlace fosfodiéster. Es decir, se parte de 3'-NMPs y se avanza en sentido 3' a 5', a diferencia de la síntesis de ácidos nucleicos en las células (tanto replicación como transcripción emplean 5'-NTPs y avanzan de 5' a 3') Los NMPs se añade uno a uno partiendo del primer nucleósido que está unido a su posición 3' a un soporte sólido que constituirá el extremo 3' del ácido nucleico una vez sintetizado.

El principal problema es la reactividad de los dNMPs, con grupos-OH primario y secundario, un -NH₂, y un grupo fosfato y un grupo amino y/o carbonilo en la base nitrogenada, por lo que se requiere métodos de bloque y desbloqueo que no afecten irreversiblemente ninguno de los componentes de la molécula de los nucleótidos. Por otro lado, el grupo fosfato (en 3') ha de activarse para que reaccione con el -OH (en 5' del nucleótido anterior).

Estos procesos están ya en día automatizados, son eficientes y de bajo costo. Debido a que la longitud de estos oligos se ve limitada por el rendimiento de las reacciones de síntesis, la sensibilidad alcanzada con ello es, en general, menor que con las sondas obtenidas por clonación. Sin embargo, la continua mejora en los métodos de síntesis química permite la obtención de oligos cada vez mayores.

Respecto a la química de síntesis de oligonucleótidos de RNA está más atrasada debido a la dificultad de proteger el grupo OH 2' sin afectar al 3'.^{3, 13, 26, 28}

B. Marcaje de sondas

El empleo de sondas de DNA o RNA como herramientas analíticas para localizar secuencias diana por ensayos de hibridación requiere obligatoriamente un proceso de marcaje de la sonda que permita su detección. La molécula o grupo marcador puede tener diversa naturaleza siempre y cuando se pueda detectar su presencia de forma directa o indirecta; los marcadores más utilizados son isótopos radiactivos, fluorocromos y enzimas. En general, dan lugar a métodos sencillos de realizar, que detectan concentraciones muy bajas de la sonda. El marcaje debe ser estable bajo diversas condiciones de temperatura, detergentes, disolventes, etc.; y no afectar a la reacción de hibridación. Los métodos radiactivos son empleados clásicamente, mientras que los otros marcadores surgen principalmente para evitar los riesgos derivados de la radiación, para aprovechar la vida media de sus reactivos de marcaje y, en algunos casos, para mejorar el límite de detección.

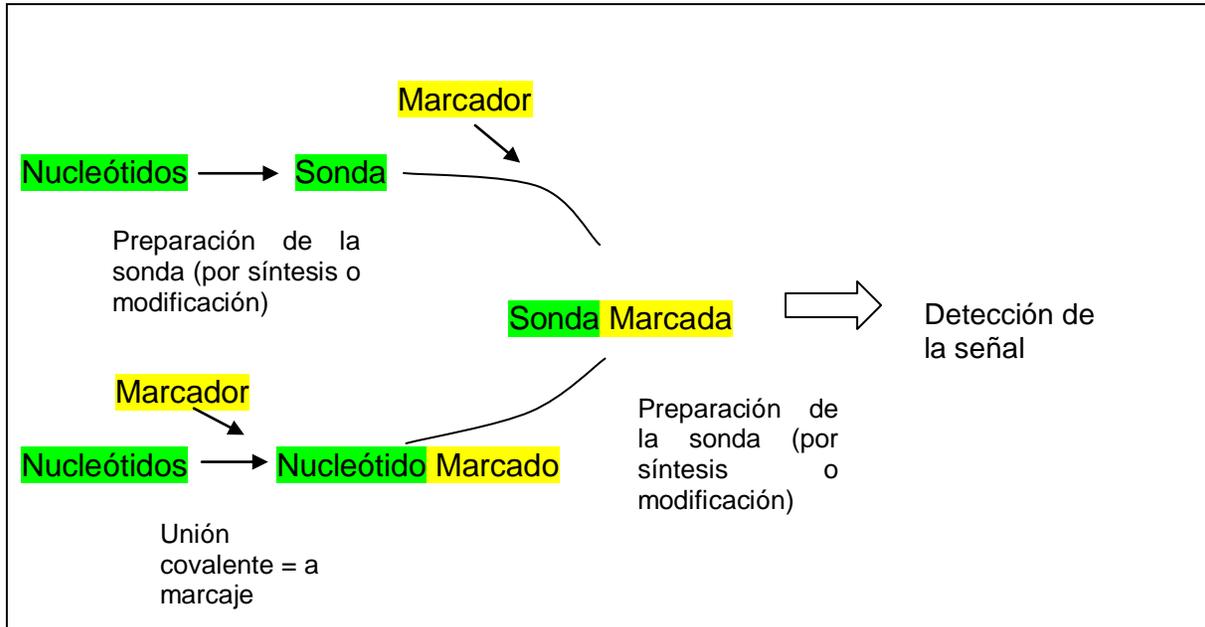
De forma genérica pueden plantearse dos tipos de marcaje:

- In vivo (más correctamente en cultivo): se hace suministrando nucleótidos radiactivos a células en cultivo, que los incorporan a sus ácidos nucleicos de nuevas síntesis. Su uso es muy limitado, por ejemplo, para preparar DNA viral marcado en células infectadas por virus.
- In Vitro: Es más versátil. Puede hacerse empleando isótopos radiactivos o por otros métodos alternativos. Se describen a continuación algunas de las diversas variantes metodológicas.

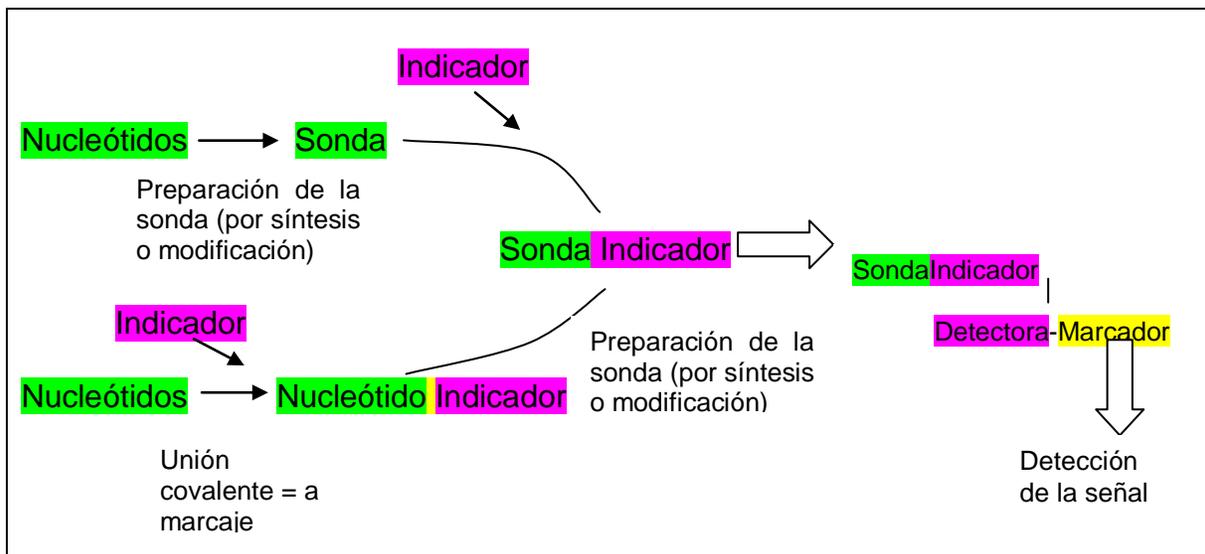
En muchas ocasiones, en especial con ribosondas y sondas sintéticas, las sondas se marcan al mismo tiempo que se prepara incluyendo, con los NTPs que hay que suministrar a la reacción de síntesis, alguno de ellos marcado (con un isótopo radiactivo, un fluorocromo o cualquier tipo de grupo indicador) mientras que en otras el marcaje se realiza tras haber completado la síntesis de la sonda.

El principio básico del marcaje es la unión química o conjugación del marcador a la sonda (en el caso radiactivo, en realidad el isótopo forma parte de la molécula de sonda, no se une a ella). Como se acaba de indicar esto puede hacerse uniendo el marcador a la sonda ya preparada o a un nucleótido que se incorpora durante la preparación de aquella. Por otra parte, la sonda puede llevar unido el marcador detectable, o bien otra molécula no detectable o grupo indicador (en inglés, reporter), con la capacidad de ser reconocido posteriormente por una proteína detectora, que es la que va marcada.^{3, 13, 26, 28}

Marcaje directo; el marcador, que se puede detectar, va unido a la sonda. Dos alternativas, después de la síntesis de la sonda o durante ella.³

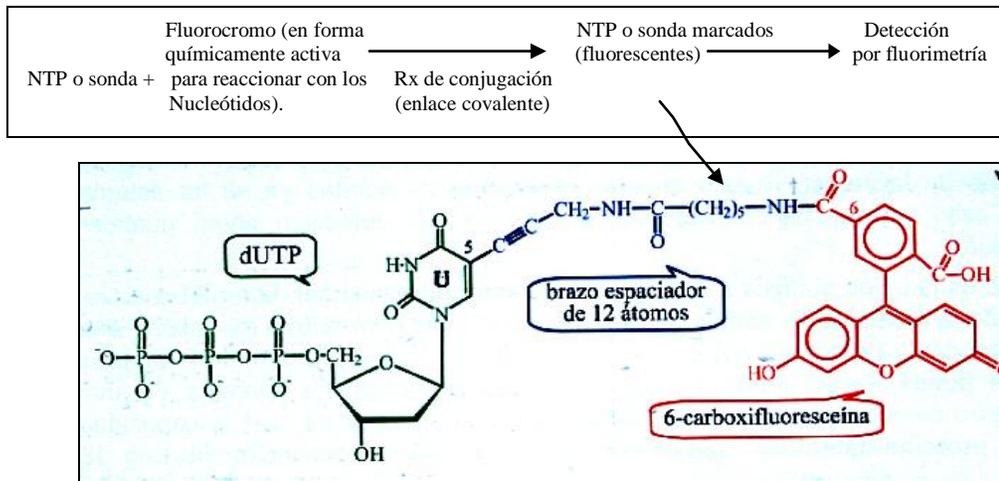


Marcaje indirecto; el marcador unido a la sonda no es detectable directamente; se le llama indicador. Para la detección el indicador se une a una proteína detectora, que lleva el marcaje. Dos alternativas, después de la síntesis de la sonda o durante ella.³



1. MARCAJE DIRECTO EN LA MOLÉCULA DE SONDA.

El grupo marcador se puede unir covalentemente a grupos funcionales específicos o formar enlaces covalentes en forma inespecífica. Los ácidos nucleicos muestran menos grupos funcionales adecuados para este fin que las proteínas; básicamente, algunos átomos de las bases nitrogenadas (especialmente, aquellos no implicados en el apareamiento con la base complementaria) y los grupos terminales 3'-OH y 5'-P.³



Ejemplo de nucleótido fluorescente: un derivado de dUTP y carboxifluoresceína. El brazo espaciador es importante para reducir la interacción fluorocromo con el ácido nucleico (por ej.; interferencia con la formación de la doble hélice).³

2. MARCAJE CON DNA POLIMERASA

Se trata de métodos de síntesis enzimática, los más comunes: los cuatro tipos de nucleótido (al menos uno de ellos marcado) se incorporan durante la reacción de síntesis de una cadena de DNA. Existen dos variantes: traslado de la mella (nick translation) e iniciación o cebado al azar (random priming).³

a. Método de traslado de la mella.

Es un método fácil y rápido, considerando el ejemplo clásico de incorporación enzimática de un marcaje, sin necesidad de desnaturalización de la sonda de DNA doble. Requiere dos enzimas distintas: una desoxirribonucleasa (DNasa I pancreática) y una DNA polimerasa (DNApol-I de *E. coli*) el resultado del marcaje es la sustitución de una gran parte (30-60%) de los nucleótidos originales de cada hebra de DNA por otros marcados radiactivamente en su posición α -5'-p.³

b. Método de iniciación o cebado al azar

Esta alternativa, a diferencia de la anterior requiere de la desnaturalización inicial del DNA doble, para que hibride un oligonucleótido que actúa como cebador de la replicación por DNApol-I de *E. coli*. Ahora bien, en este caso solo se requiere la actividad polimerasa, por lo que se prescinde del fragmento pequeño y se suele utilizar el fragmento de Klenow. Esta técnica ofrece una serie de ventajas de carácter técnico respecto a la anterior cuya consideración escapa a nuestros objetivos de carácter esencialmente conceptual.³

3. MARCAJE TERMINAL.

En este caso se aplica, en lugar de una síntesis una modificación enzimática, de las hebras de ácido nucleico existentes, mediante la incorporación de uno o unos pocos nucleótidos marcados a uno o ambos extremos de la sonda de DNA o RNA. Aunque se utilizan menos que los anteriores son métodos útiles en ciertos casos, por ejemplo, para marcar oligos de hebra sencilla. Se utilizan dos planteamientos: el marcaje con polinucleótido quinasa y el marcaje Terminal por relleno (fill-in end-labeling).³

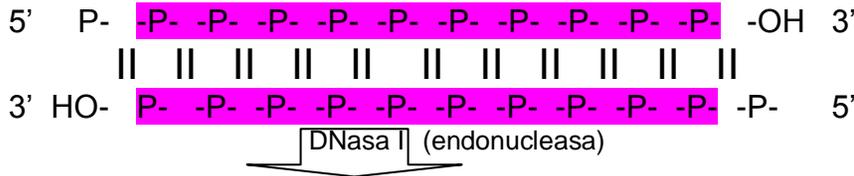
a. Marcaje con polinucleótido quinasa

Este método no depende de la existencia de una hebra molde y, por tanto, puede emplearse para cualquier tipo de sonda de DNA sencillo o doble o de RNA. Consiste, en esencia en un intercambio del 5'-p Terminal de cualquier hebra por el fosfato (marcado) en posición y de un dNTP, con la intervención de polinucleótido quinasa y, opcionalmente fosfatasa alcalina.³

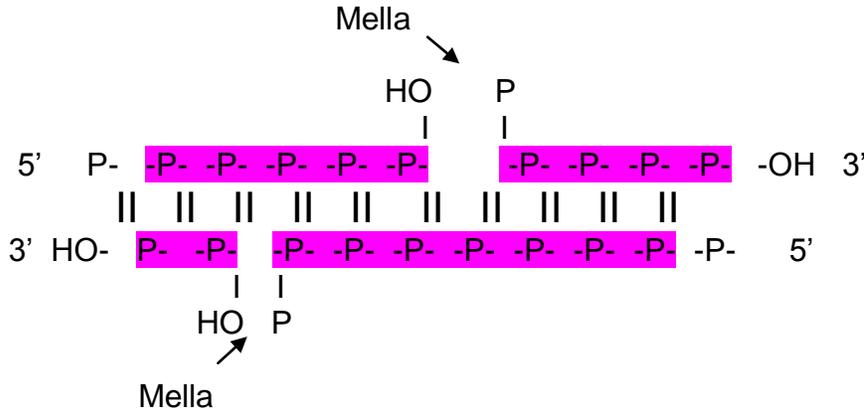
b. Marcaje Terminal por relleno.

Este método se caracteriza por ser el único que utiliza una enzima de restricción específica para formar dos extremos cohesivos, que luego son rellenados por la DNApol-I.

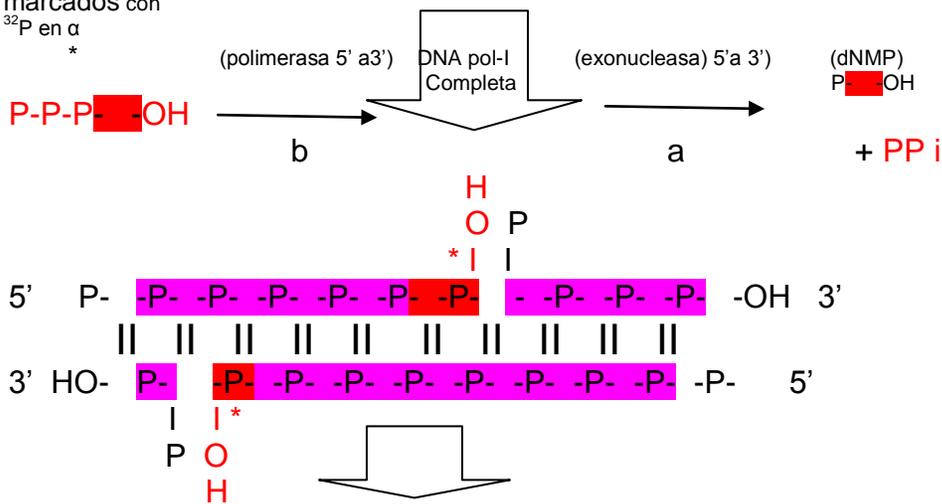
a) Método de traslado de la mella ³



La DNasa I pancreática produce cortes internos al azar en ambas hebras del DNA. Rompe enlaces fosfodiéster, dando lugar a mellas (nicks) en las que existen grupos 3' –OH y 5' –P libres.

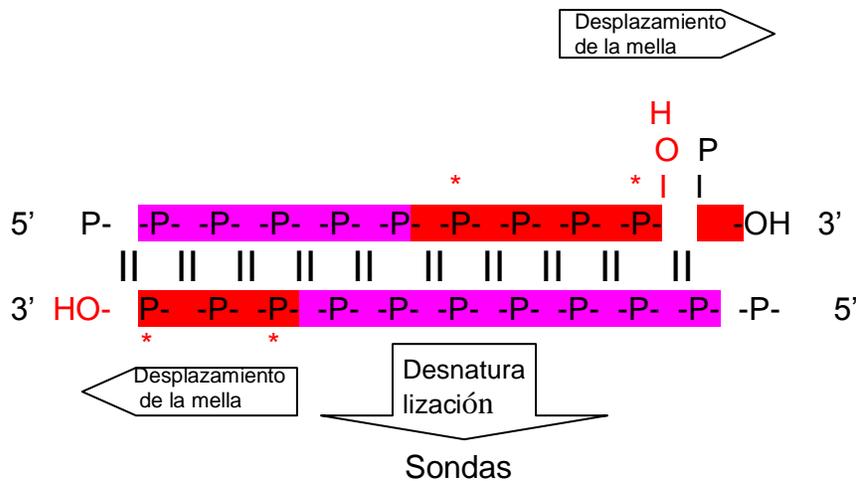


Mezcla de dNTPs, algunos marcados con ³²P en α *



La DNA polimerasa I de E. coli, la mas versátil de las DNA polimerasas, posee tres actividades enzimáticas: polimerasa, 3' –exonucleasa y 5' – exonucleasa, de las cuales se aprovechan aquí dos.

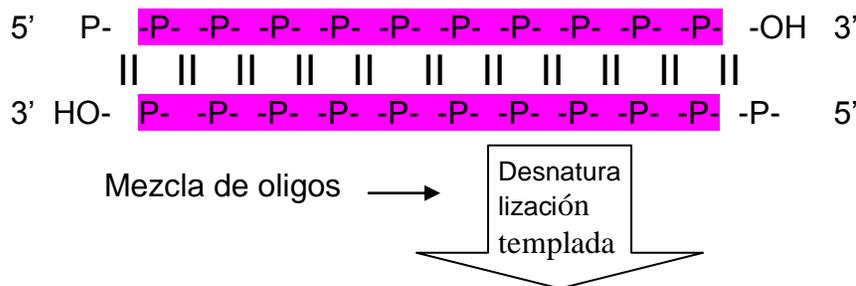
- La actividad exonucleasa 5' → 3' actúa sobre el grupo 5' –P de cada mella con eliminación secuencial de dNMPs.
- Simultáneamente, la actividad polimerasa renueva los nucleótidos, incorporando otros nuevos sobre el grupo 3' –OH de la mella, a partir de dNTPs marcados, en la dirección habitual de la síntesis de DNA (5'→ 3') el proceso es idéntico en todas las mellas y, obviamente, ocurre en sentido opuesto en cada hebra.



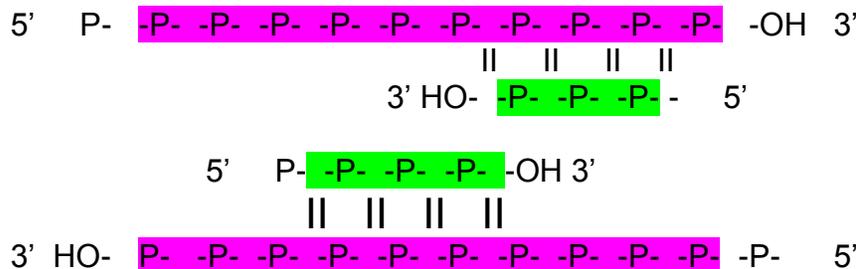
Como resultado, las mellas se desplazan a lo largo de la cadena. Sigue habiendo DNA doble, pero aparecen en ambas hebras regiones marcadas (que servirán como sondas). Su tamaño puede controlarse a través de la proporción de enzimas en la mezcla de reacción. Una vez parada la reacción con calor y EDTA, se separan las sondas de los nucleótidos no incorporados por ejemplo, por cromatografía de filtración en gel.

Puesto que el nucleótido marcado se incorpora a la sonda, en lugar del marcaje radiactivo, pueden emplearse nucleótidos marcados con fluorocromos o con grupos indicadores:

b) Método de iniciación o cebador al azar³

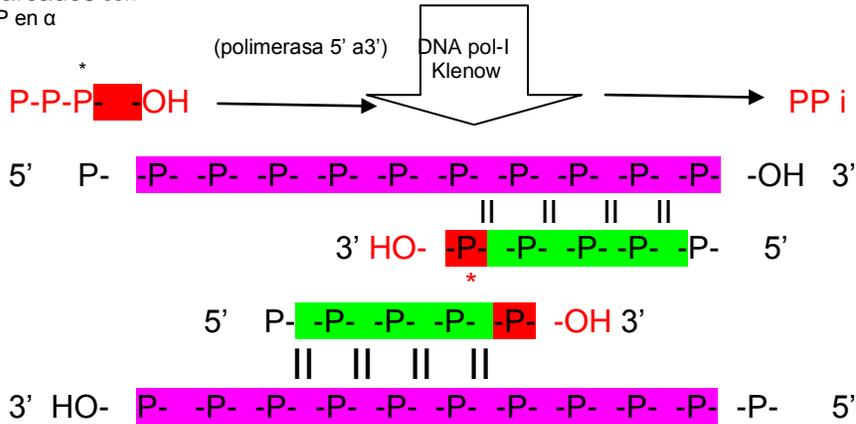


Una vez desnaturalizado por calor el DNA doble, se hibrida lentamente con una mezcla de oligonucleótidos sintéticos (comúnmente hexanucleótidos; en la figura tetranucleótidos) con todas las secuencias posibles al azar algunos de ellos hibridaran en distintos puntos de las hebras sencillas de DNA.

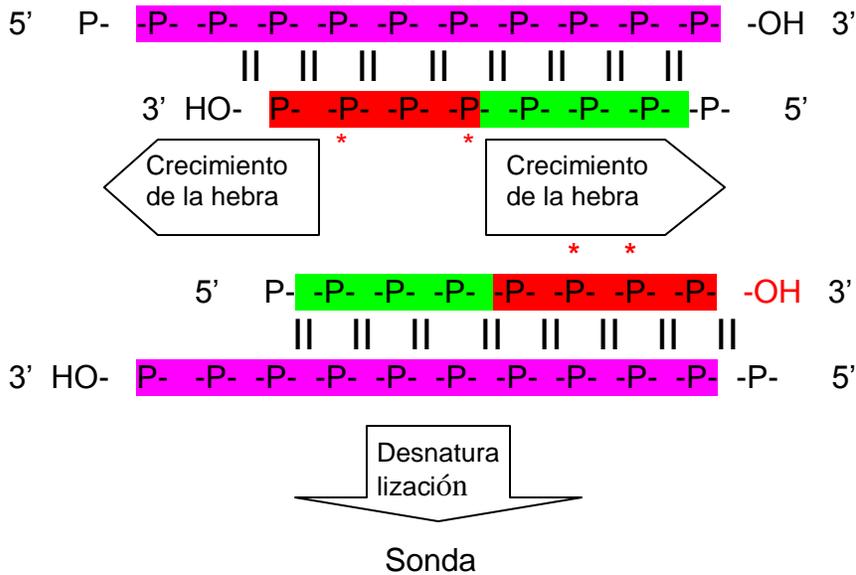


Los extremos 3' -OH de los oligos hibridados actúan entonces como cebadores para el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de E. coli (con actividades polimerasa y 3' - exonucleasa, pero no 5' exonucleasa) por lo que se incorporan sucesivos nucleótidos.

Mezcla de dNTPs,
algunos
marcados con
³²P en α

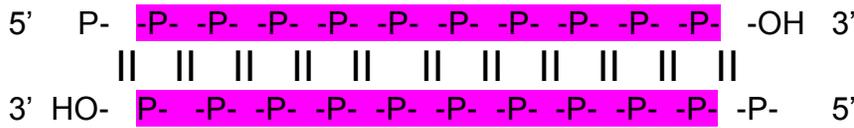


Se sintetizan así extensiones de los cebadores, complementarias a las hebras del DNA, de unos 200 a 400 nucleótidos de longitud, marcadas con elevada actividad específica. La sonda ha de ser, como siempre, desnaturizada posteriormente para su empleo en ensayos de hibridación.

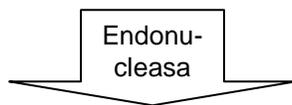
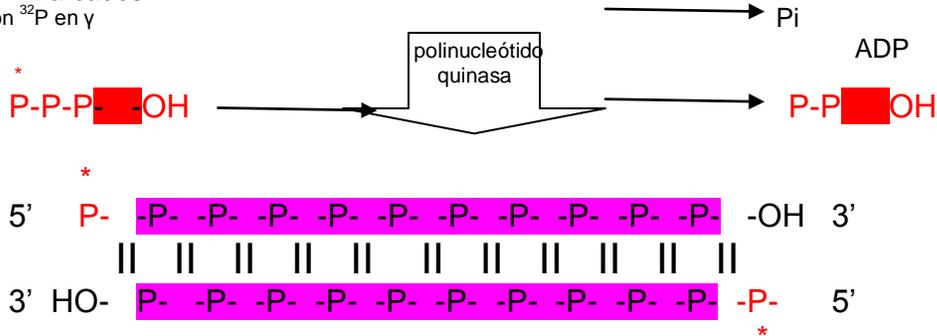


Al igual que el método anterior, admite también nucleótidos marcados con fluorocromos o con grupos indicadores.³

a) Marcaje con polinucleótido quinasa ³



ATP marcados con ³²P en γ

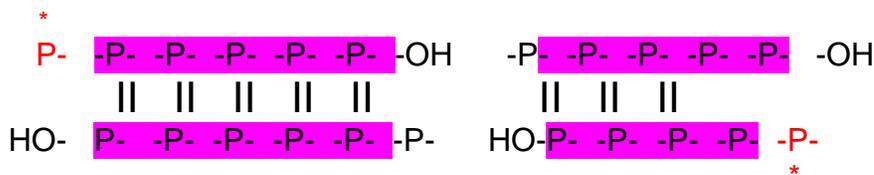


Se elimina el 5'P con fosfatasa alcalina y luego la polinucleótido quinasa del fago T4 hidroliza el ATP, incorporando su grupo γ- fosfato al -OH libre en 5' del DNA:



La polinucleótido quinasa puede también catalizar el intercambio directo del fosfato 5'-terminal del DNA por el fosfato γ del ATP (sin necesidad de fosfatasa): γ-(³²P)-ATP + 5' P-DNA → ATP + 5' ³²P-DNA.

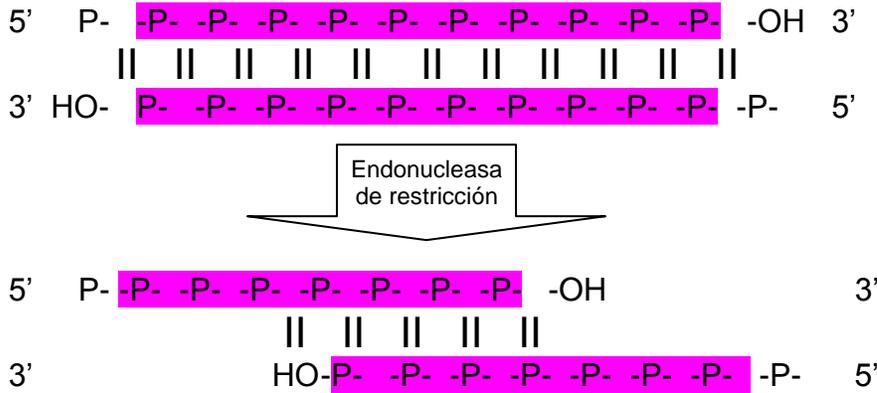
Si se desean sondas marcadas en un sólo extremo se trata el producto con una endonucleasa de restricción.



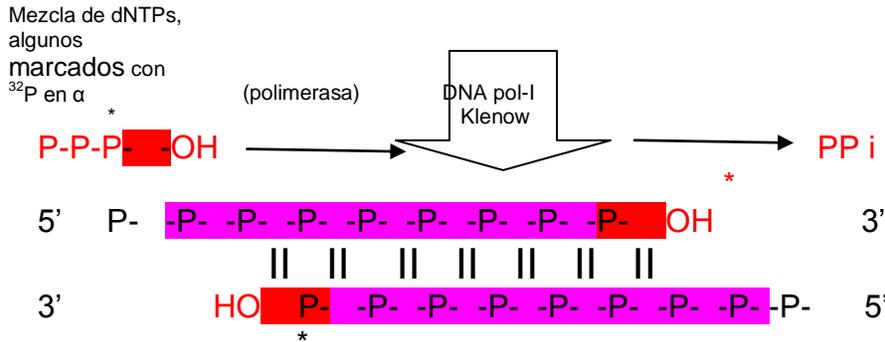
Fragmentos marcados en un sólo extremo (5'); uso como sondas

En este caso sólo pueden utilizarse marcajes radiactivos, pues lo único que se incorpora a la sonda es el fosfato γ del ATP. ³

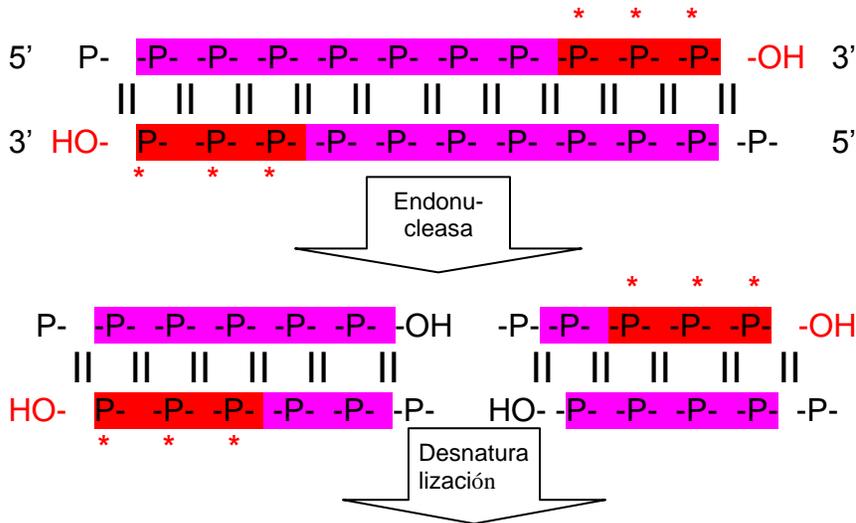
b) Marcaje terminal por relleno ³



El DNA dúplex se corta previamente con una endonucleasa de restricción adecuada para generar dos extremos cohesivos o escalonados



Los salientes 5' actúan como molde para que el fragmento de Klenow del ADN polimerasa I añada nucleótidos marcados a los extremos 3'.

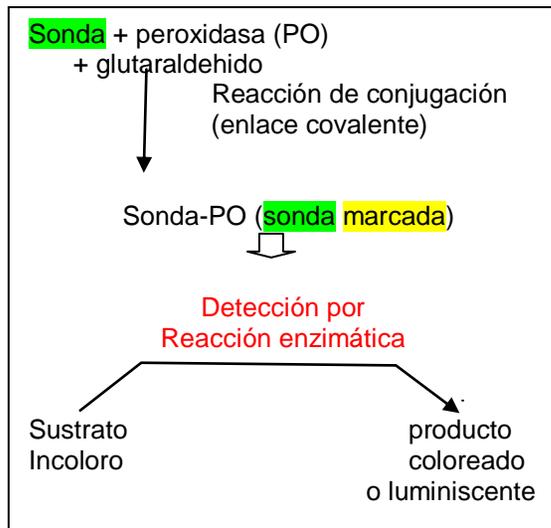


Fragmentos marcados en un sólo extremo (5'): uso como sonda
 Si se desean sondas marcadas en un solo extremo se trata el producto con una endonucleasa de restricción. Este método permite el uso de nucleótidos radiactivos como de aquellos marcados con fluorocromos o con grupos indicadores. ³

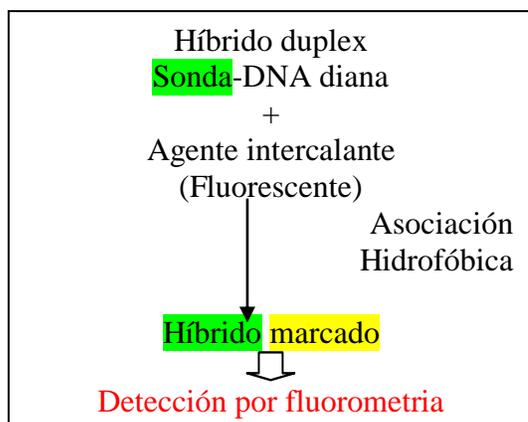
4. MARCAJE EXTERNO A LA SONDA.

En lugar de marcar sus propios nucleótidos, la sonda se puede unir con otra molécula que a su vez lleva el marcador. Otra posibilidad es la unión de proteínas mediante reactivos entrecruzantes (crosslinkers: formaldehído, glutaraldehído, etc.). También puede unirse el marcador por interacción electrostática con el DNA o emplearse agentes intercalantes, que se insertan entre los pares de bases de la doble hélice (híbrido sonda: DNA) de forma no covalente.³

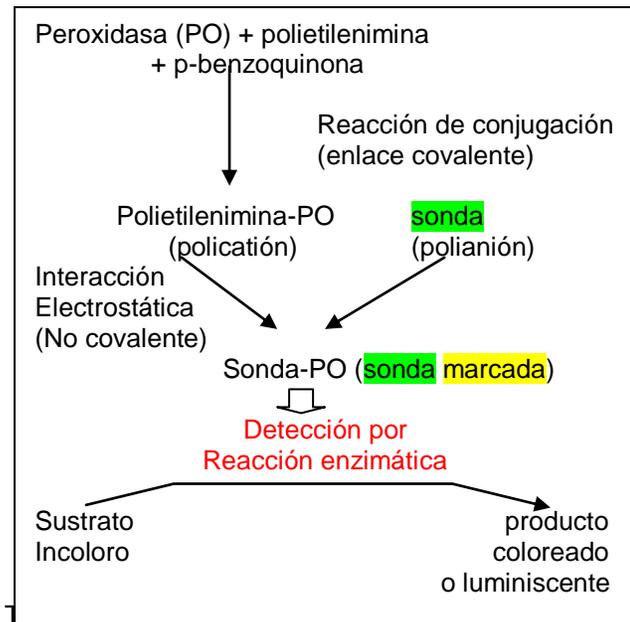
Unión de una enzima a la sonda con Reactivos entrecruzantes³



Marcaje de los híbridos con Agentes intercalantes³

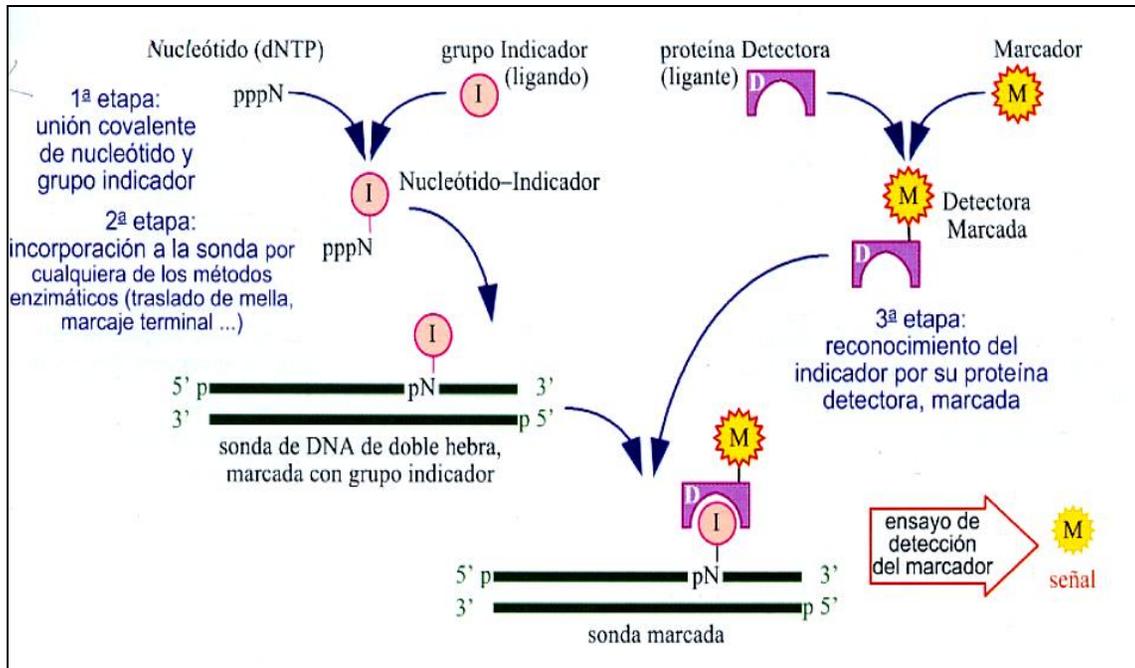


Unión electrostática a la sonda de un polication conjugado con enzima³



5. MARCAJE INDIRECTO

Como se ha indicado, puede convenir que a la sonda se una un grupo no detectable o indicador, el cual en una segunda etapa es reconocido por otra molécula, generalmente una proteína, que incorpora el marcador detectable. Para la unión del indicador son aplicables las consideraciones ya realizadas respecto a la unión del marcador en los métodos directos.³



C. Tipos de grupos marcadores indicadores y su detección

1. MARCADORES RADIATIVOS

El marcaje radiactivo o isotópico es el que se ha empleado con más frecuencia, aunque va siendo desplazado progresivamente por los métodos no radiactivos. Aunque no existe consenso del marcaje ideal, en la mayoría de los casos se hace con ^{32}P . Puesto que la corta vida media de este isótopo (14,2 días) crea dificultades en la preparación, comercialización y uso rutinario de los ensayos, se utilizan también otros alternativos (^{35}S , ^3H , ^{125}I o ^{14}C).

La detección y registro de la hibridación se hace por autoradiografía: el soporte con el material hibridado se pone en contacto con una película fotográfica (del tipo empleado para las radiografías), la cual queda impresionada con una imagen que muestra la presencia de la radiactividad (método de Southern). La intensidad de la señal depende de la intensidad de la radiación emitida por el isótopo y del tiempo de exposición.^{3, 13, 26, 28}

2. MARCADORES NO RADIACTIVOS

En función del marcador empleado, la detección se hace por fluorimetría o añadiendo un sustrato específico cuya transformación enzimática por la enzima marcadora pueda detectarse por alguno de los siguientes principios.

Espectrofotometría: medida de la absorción de la luz por los productos de la reacción bien solubles o insolubles, en el ultravioleta o el visible (colorimetría).

Fluorimetría medida de la luz emitida por productos de la reacción que poseen un fluoruro.

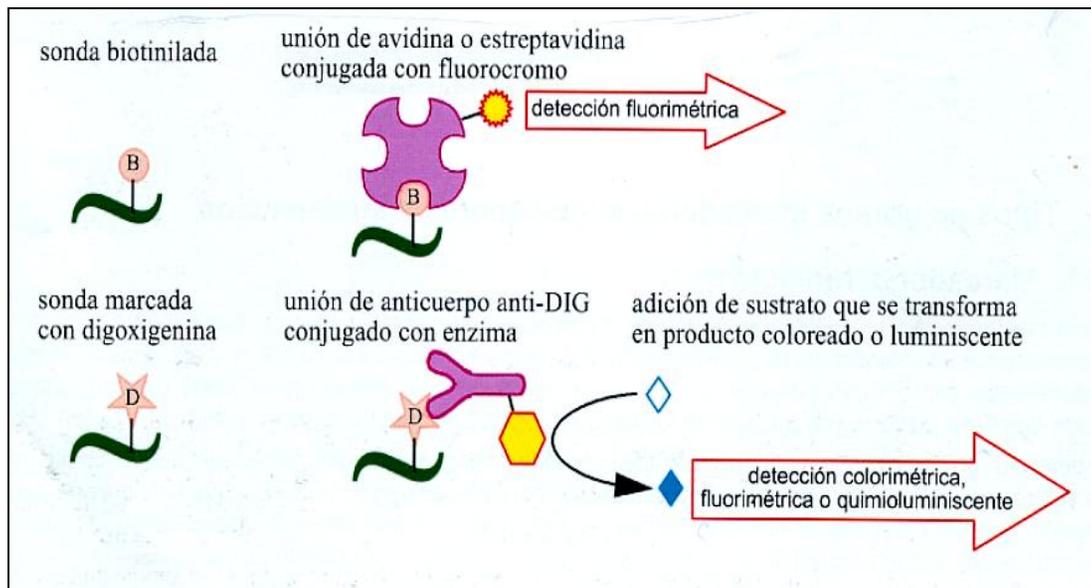
Quimioluminiscencia: medida de la luz emitida como consecuencia de reacciones con esta característica (por ejemplo, la transformación de las luciferinas, catalizada por luciferasa, o la oxidación de luminol).

Debe señalarse que estos y otros procedimientos no son exclusivos del marcaje de sondas sino que se aplican igualmente en la detección de proteínas, antígenos, pequeños ligandos, etc.^{3, 13, 26, 28}

3. GRUPOS INDICADORES.

Los grupos mas comúnmente usados son la biotina (vitamina natural) y la digoxigenina (esteroide de la planta Digitalis). Ambos son fácilmente conjugables a los nucleótidos y se unen con gran afinidad, respectivamente, a las proteínas avidina o estreptavidina y a anticuerpos anti-digoxigenina. Al igual que para los derivados fluorescentes se dispone comercialmente de dNTPs ya unidos a biotina como a digoxigenina.

La detección de las sondas que llevan biotina o digoxigenina se realiza mediante ensayos de unión, similares a los empleados para el inmunoensayo. A este fin, la proteína detectora, con afinidad por el grupo indicador, se marca previamente con un isótopo radiactivo, un fluorescente o una enzima.^{3, 13, 26, 28}



Resumen.

La determinación de los ácidos nucleicos dependen de la sonda a identificar en la muestra y de la sonda complementaria, por lo que para detectarla es necesario el uso y empleo de moléculas quimioluminiscentes, y marcadores radiactivos que en unión con la sonda, se pueden detectar por la formación de productos coloreados o con emisión de luz.

La detección de las sondas marcada nos permite con mayor claridad detectar los productos coloreados e identificar la secuencia específica que denote una de las características genotípicas, ya sea de una especie específica de una bacteria o de un hongo de difícil diagnóstico o manejo.

Los tipos de sonda son clasificados principalmente por su método de preparación, sondas obtenidas por clonación celular (DNA recombinante), clonación acelular (PCR), sondas sintéticas y síntesis química. Actualmente existen empresas que se encargan de la elaboración de oligonucleótidos; se hace referencia al surgimiento de la ingeniería genética, que expone en el mercado varios tipos de sondas de uso comercial.

IV. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Aunque los métodos de hibridación son específicos para la detección y la identificación de microorganismos, están limitados por su sensibilidad, es decir, si no hay ácido nucleico blanco suficiente en la reacción, se obtienen resultados falsos negativos.

Por consiguiente muchos métodos de hibridación requieren amplificar el ácido nucleico blanco mediante la multiplicación de los microorganismos blanco a cantidades mayores en el cultivo. El requisito para el cultivo disminuye la ventaja que pueden ofrecer los métodos moleculares con respecto a la velocidad. Sin embargo, el desarrollo de técnicas de amplificación molecular no dependientes de la multiplicación del microorganismo contribuyó mucho para superar el problema de la velocidad, lo que incrementó la sensibilidad y mantuvo la especificidad en forma simultánea. Las tres estrategias para la amplificación molecular son las amplificaciones del ácido nucleico blanco, del ácido nucleico sonda y de la señal de la sonda.²⁶

A principios del decenio de 1980 ya se utilizaba en varios laboratorios las técnicas de Southern y de Northern para la identificación de secuencias específicas de DNA o RNA, así como sus formas simplificadas dot-blot y spot-blot. Esto ofrecía amplias expectativas de investigación en dos áreas de la biología molecular en medicina: diagnóstico molecular y estudio de la expresión de genes. No obstante, pronto se vieron las limitaciones de esos métodos.

La cantidad ideal de DNA o RNA para realizar las técnicas de Southern o Northern es de unos 10 mg; obtenerla requiere considerable tejido o muestra biológica limitante que debe advertirse en la toma de muestra del paciente; por ejemplo una biopsia de tejido no necesariamente garantiza la calidad para la realización del estudio.

Por otra parte la sensibilidad de dichas técnicas está en estrecha relación con la cantidad de DNA o RNA, es decir, en cuanto menor cantidad de muestras biológicas halla para el estudio molecular, menor será la sensibilidad. Así mismo el tiempo requerido para concluir las diferentes etapas de cada una de estas técnicas es de dos a tres días. Estas limitaciones se superaron al diseñarse e implementarse la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita por el investigador Kary Mullis en 1985, por cuyo trabajo recibió el premio nobel.

El conocimiento de los pasos esenciales de la división celular marco la pauta para implementar la técnica, ya que la PCR consiste en efectuar una replicación repetitiva in Vitro de una secuencia específica de DNA.

Al amplificar o copiar varias veces una misma secuencia específica de DNA, aumenta en forma proporcional la sensibilidad de la misma, a tal nivel que si el producto amplificado se analiza en un gel de agarosa y se tiñe con bromuro de etidio, la secuencia amplificada o producto de PCR se detecta visualmente al iluminar el gel con luz ultravioleta. Así, la sensibilidad de la técnica deja de ser un obstáculo para el diagnóstico molecular y estudio de la expresión de genes; además, el tiempo para la realización del estudio se reduce considerablemente, así como la cantidad de muestra biológica o tejido por analizar.^{1, 3, 8, 13, 14, 26, 28}

En condiciones naturales, el DNA se replica mediante DNA-polimerasas. Para ello, la doble hélice debe desnaturalizarse (abrirse) para que la DNA-polimerasa puede iniciar su actividad copiando sobre cada una de las cadenas separadas una nueva cadena complementaria. Esto se consigue a medida que la DNA polimerasa va incorporando consecutivamente los nuevos nucleótidos frente a los de la cadena molde, según el conocido apareamiento $G \equiv C$; $T = A$, uniendo covalentemente mediante un enlace fosfato (5'.3'-P-5'.3') cada nucleótido incorporado a la cadena creciente.

Sin embargo, paradójicamente, la enzima no puede iniciar su actuación sobre un fragmento monocatenario, sino a partir de un fragmento bicatenario.

La idea de Mullis de aplicar este principio para amplificar el DNA in Vitro ha resultado extraordinariamente fructífero. En un tubo de ensayo se pone el DNA extraído de una célula, un virus, etc. Se desnaturaliza calentando y se añaden dos cortos fragmentos de DNA monocatenario de unos 20 nucleótidos, sintetizados artificialmente, llamados cebadores (o iniciadores del inglés primers), que son complementarios uno de ellos de un fragmento de una cadena y el otro de un fragmento de la otra cadena situado entre 100 y 2000 bases de distancia del primero. Al bajar la temperatura (renaturalización), los cebadores se fijan a sus dianas, uno en una cadena y el otro en otra cadena, delimitando un fragmento entre ellos. Simultáneamente, se añaden los cuatro nucleótidos (G, C, T, A) y una polimerasa termorresistente, como la Taq-polimerasa, obtenida de una bacteria termofila, *Thermus aquaticus*.

La amplificación del fragmento delimitado entre los dos cebadores se consigue mediante el siguiente proceso (Figura 4-1):

- 1) Desnaturalización: las dos cadenas de la cadena original de DNA se separan por el calor a 95° C durante 15 segundos a un minuto.
- 2) Hibridación: la mezcla se enfría a una temperatura entre 30°C y 65°C durante unos 30 segundos, temperatura que permite la hibridación, por lo que los cebadores se unen a sus secuencias complementarias, uno en cada hebra, ya que la renaturalización del DNA original entre si es mínima por que los cebadores están en gran exceso.
- 3) Polimerización o extensión: se lleva a cabo durante 30 segundos a 5 minutos a 72°C, que es la temperatura óptima para la actividad de la Taq-polimerasa que se ha unido a cada uno de los fragmentos bicatenarios DNA-cebador, produciéndose las copias de ambas cadenas.

Ahora por cada dos cadenas iniciales, ya existen cuatro. Se inicia un nuevo ciclo calentando a 95°C, para separar las cadenas recién formadas, bajando la temperatura entre 30° y 65°C para fijar los cebadores (siempre en gran exceso en la solución) y subiendo a 72°C para que actuara la nueva Taq-polimerasa.^{1, 3, 8, 13, 14, 26, 28}

A. Reacción estándar

Debido a las múltiples aplicaciones de la PCR es difícil establecer condiciones que se cumplan en forma adecuada y general, sin embargo, a continuación se describen algunos parámetros que se ha comprobado funcionan en la mayor parte de los casos y que sirven de punto de partida en aquellas situaciones especiales. La PCR estándar se realiza típicamente en un volumen de

20 a 100µL que contiene la muestra molde de DNA, 0.25µM de cada iniciador, 200µM de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y 2.5U de polimerasa Taq en un amortiguador con 50mM de KCl, 10mM de tris-HCl (pH = 8.4), 1.5mM de MgCl₂, 10µg/ml de gelatina. El programa de temperaturas estándar consta de 35 ciclos de desnaturalización de DNA a 94° C durante 1 minuto, alineación e hibridación de los iniciadores a 55°C por 1minuto, y extensión de los iniciadores a 72°C por 1 minuto.

A estos ciclos se agrega un ciclo inicial de 5 minutos a 94°C y uno final de 5 a 10 minutos a 72°C.¹

Este proceso que tiene lugar en un instrumento automático, denominado termociclador que va variando la temperatura según el programa señalado, se repite automáticamente a lo largo de 20 a 30 ciclos durante unas dos o tres horas hasta llegar a conseguir millones de copias.

Para la optimización de las reacciones de PCR ha de tenerse en cuenta numerosos factores, entre los que destacan diseño de los cebadores y la selección de una temperatura de renaturalización óptima para conseguir una buena especificidad de hibridación de los cebadores con su diana, así como la concentración óptima de determinados elementos químicos de la solución, como el MgCl₂ y el pH adecuado.^{1, 3, 8, 13, 26, 28}

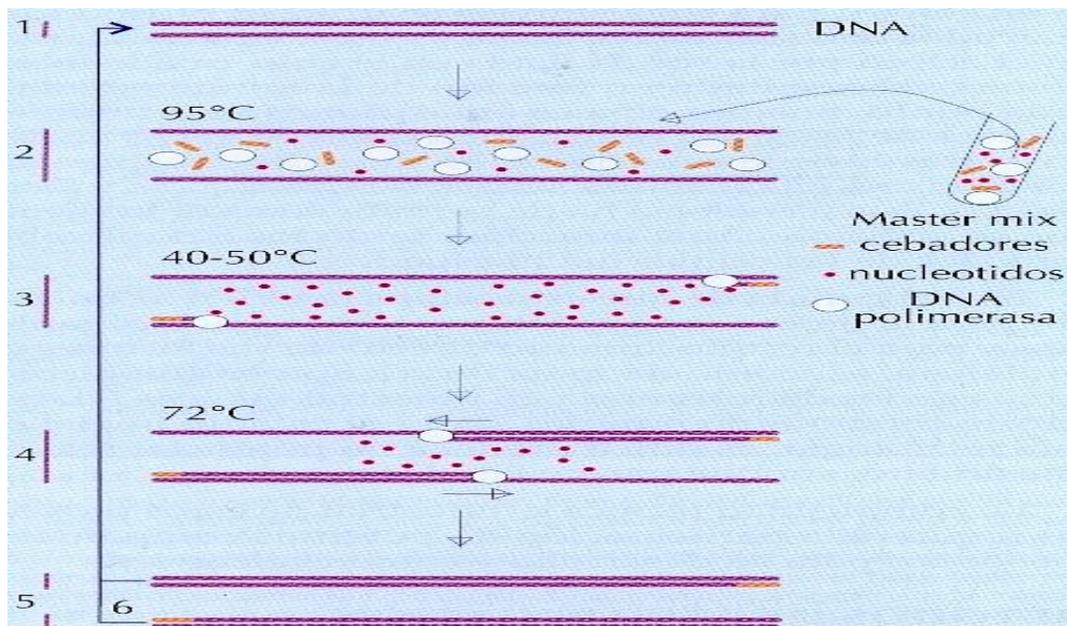


Figura 4-1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción procede según el siguiente protocolo: 1) Se extrae el DNA a amplificar del microorganismo y se incorpora a un tubo con la mastermix, 2) Se lleva al termociclador donde se eleva la temperatura para conseguir la desnaturalización de las dos cadenas de DNA, 3) Se baja la temperatura hasta alcanzar la óptima para la unión de los cebadores a cada cadena, 4) se sube la temperatura a nivel óptimo para la acción de la Taq polimerasa, 5) al final de la extensión, en lugar de la molécula de DNA bicatenaria inicial, hay dos moléculas bicatenarias, 6) se inicia un nuevo ciclo que dará lugar a 4 moléculas bicatenarias el siguiente a ocho, después a 30 hasta obtener millones de copias.²⁸

1. POLIMERASAS DE DNA

Al inicio de aplicación de la técnica de PCR, se había utilizado ampliamente el fragmento Klenow de la polimerasa-1 de DNA de *Escherichia coli*; sin embargo, esta enzima se inactiva a temperaturas altas, por lo que obligada a incluir porciones adicionales de enzima en cada ciclo de la reacción. Esta dificultad se supero con el uso de la polimerasa Taq, una enzima termoestable de DNA que puede replicarse a 70 a 75°C; tiene actividad de 5'-3'-exonucleasa pero es inactiva en dirección 3'-5'; su termoestabilidad permitió transformar el método de PCR en una reacción simple e incluso automatizar el procedimiento con un termociclador. Otra ventaja de la polimerasa Taq es que aumenta la especificidad de la reacción. Su temperatura óptima de síntesis es de 72° a 75°C, con una tasa de incorporación de 150 nucleótidos por segundo.

En la actualidad existen otras enzimas termoestables con actividad de polimerasa de DNA que también son de utilidad para la PCR. Una diferencia entre estas enzimas es el grado mínimo de error en la incorporación de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP) por cada 10000 nucleótidos.^{1, 3, 4, 8, 9, 13, 26, 28.}

2. ENZIMA POLIMERASA Taq.

La concentración típica de la enzima en una reacción de 100 µl es de 2.5 U con una variación de 1 a 4 U/100µl. Cantidades mayores pueden producir una amplificación inespecífica. Algunos protocolos incluyen un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), que aun cuando disminuye la actividad de la polimerasa Taq, reduce en forma importante las estructuras secundarias de DNA molde.

Un elemento esencial con gran efecto sobre la actividad y la especificidad de la enzima es la concentración de cloruro de magnesio en la reacción. Para calcular la concentración adecuada de MgCl₂ se debe tomar en cuenta que los dNTP unen Mg²⁺. Por lo tanto, la cantidad de este ion disponible para la enzima es igual a la concentración de MgCl₂ menos la concentración total de dNTP. Así en una reacción normal la concentración de MgCl₂ es de 1.5mM y la de los dNTP es de 0.5 a 2.5 mM. En el caso de muestras de DNA genómico disueltas en un amortiguador con 1mM de EDTA, se recomienda usar una concentración de MgCl₂ de 2.5 milimoles.

Otros compuestos que se utilizan a menudo en el laboratorio de biología molecular y que afectan la actividad de la enzima son etanol, urea, DMSO, dimetilformaamida (DMF), dodecilsulfato de sodio (SDS) y hemoglobina (Hb).^{1, 3, 8, 13, 26}

3. PARÁMETROS DE TEMPERATURA

La reacción en la cadena de la polimerasa se lleva a cabo sometiendo las muestras a tres temperaturas diferentes, que corresponden a las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión (polimerización), en un ciclo de amplificación. De ordinario el DNA se desnaturaliza calentando brevemente a 95°C. La desnaturalización incompleta de DNA es uno de los errores más

frecuentes que conduce al fracaso. Es importante que la reacción alcance temperaturas altas para que la separación de las hebras sea completa.

La etapa de alineación y acoplamiento también es determinante para la especificidad de la reacción. El intervalo de temperatura varía de 50 a 60°C y depende del número de bases G-C y del tamaño de los iniciadores.

La extensión del DNA a partir de la hibridación de los iniciadores se produce a 70 a 75°C y el tiempo varía según la longitud del fragmento deseado. Se estima que la tasa de incorporación a 72°C varía de 100 a 150 nucleótidos por segundo, y depende de varios factores (amortiguador, pH, concentración de sal, etc.); 1 minuto a 72°C se considera suficiente para productos de hasta 2 Kbases (Kb) de largo. Al final de la PCR se sugiere dejar la mezcla de reacción a 72°C durante 5 a 10 minutos para permitir la elongación total de cadenas que hayan quedado incompletas.¹

Cuando el ácido nucleico inicial es RNA, como el genoma de algunos virus, la PCR requiere un paso previo consistente en la transformación del RNA en su cDNA mediante una transcriptasa inversa (DNA-polimerasa RNA-dependiente). Después puede aplicarse la técnica convencional de PCR.

Estas pruebas se desarrollan bajo formatos comercializados, en los que los fragmentos de DNA o RNA formados (amplicones) se transfieren a pocillos de placas tipo microtiter en los que hay fijadas sondas específicas disponiéndose de sistemas de revelado de estos híbridos. Estas pruebas comercializadas comportan la utilización de instrumentos con un elevado nivel de automatización tanto para la extracción del ácido nucleico, como para su replicación en el termociclador y la lectura y para posterior cuantificación de los amplicones.

La enorme utilidad y versatilidad de la PCR hace que sea también muy utilizada en forma artesanal (PCR caseras) en los laboratorios de diagnóstico; en este caso, los cebadores pueden encargarse y obtenerse en el comercio, así como el resto de reactivos. Los amplicones obtenidos son los fragmentos deseados por que los cebadores son específicos y se unen al lugar programado, pero puede obtenerse una confirmación adicional determinando su tamaño después de una electroforesis en gel de agarosa. En ocasiones antes de la electroforesis, el DNA amplificado se corta mediante enzimas de restricción formándose fragmentos que pueden observarse en el gel, lo que mejora la identificación del DNA amplificado. Otra alternativa más rigurosa es el Southern blot, consistente en transferir tras la electroforesis, el DNA desde el gel a una membrana de nitrocelulosa, donde el DNA puede hibridarse con sondas marcadas que permiten la identificación precisa de los amplicones.

Esta técnica es larga y laboriosa; por ello, una alternativa más sencilla es captar el DNA amplificado mediante una sonda que se ha fijado a los pocillos de una placa de poliestireno tipo microtiter mediante un tampón de fijación, con o sin irradiación. Su revelado es inmediato cuando el DNA se ha amplificado con cebadores marcados, ya que los amplicones queden marcados. Alternativamente, sino se utilizan cebadores marcados para detectar los amplicones captados por la sonda fijada en la placa puede utilizarse otra sonda marcada. Hay compañías que disponen de micropocillos con estreptavidina fijada que permite captar sondas o amplicones marcados con biotina.^{1, 3, 8, 13, 26, 28}

B. Modalidades de la PCR

1. NESTED PCR.

Para incrementar la sensibilidad de la reacción la cadena de la Polimerasa puede practicarse una PCR anidada (Nested-PCR), consistente en amplificación de un fragmento de DNA seguido de la amplificación, mediante otros cebadores, de un fragmento anterior del primer fragmento amplificado. El desarrollo de esta PCR comporta efectuar una primera PCR en un tubo y pasar el producto de la amplificación a otro tubo a los que se incorporan los nuevos cebadores para el fragmento interno que desea amplificarse junto al resto de reactivos y se procede a la segunda amplificación. La Nested presenta algunas ventajas, como:

1. Gran sensibilidad.
2. El control de la especificidad de la primera PCR, que se confirma cuando la segunda amplificación es positiva, ya que los cebadores de esta actúan como sondas de identificación de la primera.
3. La dilución de los productos de inhibición que pueden existir en la muestra inicial. Sin embargo, hay que señalar que este protocolo comporta un gran peligro de contaminación del laboratorio por los amplicones de la primera PCR al abrir el tubo.

Por otra parte una PCR convencional bien optimizada, en muchos casos, presenta una sensibilidad equivalente a una anidada.

Se han propuesto diferentes protocolos para realizar la PCR anidada en un sólo tubo sin abrir; uno de ellos se basa en la diferencia de temperatura óptima de hibridación de los dos juegos de cebadores que se incorporan simultáneamente a un único tubo, desarrollándose el primer ciclo de amplificación a una temperatura de hibridación óptima para los primeros cebadores y el segundo ciclo a otra temperatura diferente, óptima para los segundos cebadores. ^{1, 3, 8, 13, 26, 28}

2. PCR MÚLTIPLE.

En algunas ocasiones se introducen simultáneamente en la máster mix varios juegos de cebadores diferentes para distintos fragmento de DNA, amplificándose simultáneamente diferentes dianas del DNA de un microorganismo.

Por ejemplo, en una bacteria puede detectarse simultáneamente un fragmento genómico específico de especie y un fragmento del gen de resistencia a un antibiótico con dos juegos de cebadores determinando en una sola PCR la especie y la resistencia al antibiótico del microorganismo. Para realizar este tipo de PCR, debe asegurarse la compatibilidad de la temperatura de hibridación de los diferentes cebadores, así como la ausencia de hibridación entre ellos. De todas maneras, ha de tenerse en cuenta que las reacciones inespecíficas suelen ser más frecuentes que en la PCR simple. ^{1, 3, 8, 13, 26, 28}

3. La PCR con cebador Aleatorio

La PCR con cebador aleatorio emplea cebadores cortos que no son específicamente complementarios a una secuencia determinada de un DNA blanco.

Aunque no están dirigidos de manera específica, su secuencia corta (alrededor de 10 nucleótidos) asegura que se unirán al azar a numerosos sitios en una secuencia cromosómica. Durante los ciclos, los múltiples sitios de unión producen la amplificación de numerosos fragmentos de tamaños diferentes. En teoría las cepas que tienen secuencias de nucleótidos similares tendrán sitios de unión similares y así producirán fragmentos amplificados (es decir, amplicones) de tamaños similares. Por consiguiente, al comparar los patrones de migración de los fragmentos después de una electroforesis en gel de agarosa es posible evaluar si las sepsas o los aislamientos son los mismos, similares o no se relacionan.²⁶

C. Limitaciones de la PCR

Entre los problemas que plantea la reacción en cadena de la polimerasa, está la presencia de inhibidores en las muestras. Diversos productos orgánicos que se hallan naturalmente en las muestras clínicas pueden inhibir la reacción. Entre ellos cabe destacar la sangre (heme), los ácidos biliares, polisacáridos del esputo incluso sustancias como la heparina, el dodecil sulfato sódico o el cloruro de guanidina, que se utilizan en diferentes procesos de manipulación de los ácidos nucleicos, sin embargo, muchos inhibidores no han sido identificados.

También hay que tener en cuenta que sólo se pueden amplificar fragmentos de DNA de una determinada longitud mas allá de la cual la polimerasa deja de actuar. El tipo de polimerasa, entre otros parámetros, condiciona la longitud del fragmento que puede sintetizarse eficazmente.

Otro problema importante son las contaminaciones que pueden ser de dos tipos diferentes: la contaminación puntual de una muestra negativa por otra positiva durante el proceso inicial de extracción del DNA y la contaminación general del laboratorio con los amplicones de una PCR previa.

Para evitar el primer tipo de contaminación, que sólo suele afectar a una muestra, basta con manipular las muestras con cuidado en la fase inicial de extracción de los ácidos nucleicos.

Para evitar el segundo tipo de contaminación la PCR debe realizarse en dos áreas diferentes de laboratorio que estén alejadas entre si. En la primera, el área de pre-PCR, se efectúa la extracción de los ácidos nucleicos de las muestras y se prepara la máster mix, y en la otra la de post-PCR, se realiza la amplificación en el termociclador y se leen los resultados.

Existen otros métodos complementarios para evitar las contaminaciones, entre los que se destaca la utilización de la uracil-N-glicosidasa, que no excluye la recomendación de utilizar dos áreas diferenciadas (pre y post-PCR) para desarrollar la reacción. El método consiste en emplear una mezcla de nucleótidos (T, C, G y A) en la que el desoxitimidin-trifosfato (dTTP) se sustituye por el desoxiuridil-trifosfato (dUTP), conservándose los otros nucleótidos, dCTP, dGTP y dATP, añadiéndose una cantidad adecuada de la enzima uracil-N-glucosidasa

antes de la reacción. Durante la amplificación se irán agregando los nucleótidos adecuados; sin embargo, en lugar del dTTP, se insertará el dUTP, que no se halla en ningún DNA en forma natural. Si de manera fortuita este DNA amplificado llegará a la zona de PCR y contaminara algún tubo o reactivo de alguna prueba en el que se ha añadido la uracil-N-glicosidasa, este enzima reconocería las cadenas de DNA contaminante con un uracilo de la amplificación previa, pero no el DNA natural con timina que va a amplificarse, de forma que a 50°C la enzima cataliza la escisión del uracilo, degradando el DNA contaminante sintetizado con dUTP impidiendo que actúe como molde para una nueva amplificación. A continuación, la enzima se inactiva con la temperatura de desnaturalización a 95°C del primer ciclo, de forma que no puede actuar sobre las nuevas cadenas amplificadas. Con este método se han podido inactivar hasta 10^6 moléculas de DNA.

También se pueden inactivar los amplicones mediante radiaciones ultravioletas o por acción fotoquímica son isopsoralen.^{1, 3, 8, 13, 26, 28}

1. PCR CUANTITATIVA

En ocasiones no sólo interesa la detección específica del DNA o el RNA amplificado de forma cualitativa, sino también cuantificar el número de copias que existía inicialmente en la muestra clínica. Para la cuantificación suele utilizarse una técnica competitiva que consiste en incorporar a la reacción un DNA o RNA competidor, según el tipo de ácido nucleico diana a amplificar, que tenga la misma longitud y utilice los mismos cebadores que el DNA o el RNA diana (problema). La cantidad del competidor incorporada debe ser conocida, de modo que pueda determinarse al final de la amplificación las cantidades respectivas de amplicones producidos por el competidor y el problema. Dada la igualdad de condiciones de reactivos y del proceso de amplificación, así como la relación lineal entre los cocientes competidor diagonal-problema iniciales y finales, puede determinarse la cantidad inicial de ácido nucleico problema en la muestra. Las infecciones por citomegalovirus en el SIDA o la hepatitis C, la determinación del número de viriones existente, (número de copias del genoma) permite efectuar un seguimiento secuencial de la concentración plasmáticas del virus, lo que ayuda a establecer un pronóstico sobre la enfermedad, determinar la eficacia de la terapéutica o sospechar de la aparición de resistencias a los antiviricos a lo largo del tratamiento, según incremente o disminuya el número de copias en los sucesivos controles.^{1, 3, 8, 13, 26, 28}

2. PCR A TIEMPO REAL

A esta clase de PCR permite la ejecución de la técnica en un tiempo muy reducido, alrededor de 30 minutos, y la cuantificación precisa y continua del DNA que se va formando, ya que, tal como indica su nombre, al mismo tiempo que va teniendo lugar la PCR se va detectando una señal que aumenta en proporción directa a la cantidad de producto formado en cada ciclo de la reacción.

El sistema utiliza los mismos ingredientes que una PCR convencional; sin embargo, a diferencia de aquella, la muestra no se coloca en un tubo convencional, si no en un tubo o en un capilar, que permite cambiar de

temperatura en un tiempo muy inferior al de los instrumentos convencionales. El fragmento amplificado suele ser más corto que en la técnica convencional. Todo ello acelera la reacción. El termociclador y el lector han de ser específicos para esta prueba.

Existen diversos métodos para la detección en cada ciclo de los amplicones formados. Uno de ellos se basa en la utilización de colorantes intercalados, como el SYBRgreen I, que es una molécula fluorescente que se une al DNA bicatenario (no al monocatenario, al igual que el bromuro de etilo). Este colorante no emite fluorescencia cuando se encuentra en solución, pero si cuando se une al DNA de doble cadena, evaluándose en cada ciclo al final de la elongación la intensidad de la fluorescencia que será mayor cuando más producto de amplificación se halla formado.

Otro método de marcado son las sondas fluorescentes tipo molecular beacons, TaqMan y otras basadas en la tecnología FRET (fluorescente resonance energy transfer system) esta tecnología se basa en la interacción entre sustancias fluorescentes, estimulando una la producción de luz por la otra bloqueando la emisión lumínica de la otra.

En las sondas denominadas molecular beacons, su extremo 5' está unido a un compuesto fluorescente marcador, reporter), y el 3' a una molécula denominada extintora (quencher).

Cuando la sonda está libre la molécula hibrida con ella misma armando una estructura de plegamiento en orquilla que acerca al extremo 5' al 3' por lo que la molécula extintora bloquea la fluorescencia del marcador situado en 5'. En el momento del ciclo de PCR en que se produce la hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias, la sonda también hibrida en una región central del DNA adaptando una forma alargada que aleja su extremo 5' del 3'. Entonces la fluorescencia no bloqueada por la molécula extintora es captada por la unidad óptica del aparato con un filtro de longitud de onda adecuada. La fluorescencia se ira incrementado con el número de ciclos y será proporcional al número de copias específicas que se vayan formando.

Otro tipo de sonda son las TaqMan, que consisten en un oligonucleótido similar a las molecular beacons, aunque su forma natural es lineal, sin plegamiento, pero, al ser más corta, la molécula extintora actúa continuamente sobre el marcador bloqueando la fluorescencia. Durante el desarrollo de la PCR en el estadio de unión de los cebadores, esta se unirá a las cadenas de DNA sin emitir fluorescencia. Durante el periodo de elongación, la Taq polimerasa, al alcanzar la sonda, elimina los nucleótidos uno a uno (acción exonucleasa) para incorporar los nuevos, por lo que el nucleótido marcado queda libre en solución. Entonces el marcador libre de la acción del extintor emite la señal que es captada por la unidad óptica del aparato de forma similar a la sondas molecular beacons.

Otra variación del sistema FRET se basa en el empleo de dos sondas para detectar los amplicones. Una de ellas está marcada en su extremo 3' por fluoróforo, y la otra en 5' por un marcador fluorescente, excitable por el fluoróforo ambas sondas son complementarias al DNA molde e hibridan con éste muy cerca una de otra, separadas como máximo por cinco bases. Al hallarse tan próximas entre si, el fluoróforo excitado por la luz azul excita a su vez al marcador de la

segunda sonda que emite a una longitud de onda más larga captada por el filtro adecuado.

El SYBRgreen FRET es un sistema sencillo. Este producto (SYBRgreen) se intercala en el fragmento bicatenario formado por el DNA y la sonda la cual lleva un marcador fluorescente que se excita por el SYBRgreen, que se activa al unirse a la doble cadena de DNA/sonda. Las moléculas que se unen a la pareja sonda-diana al estar próximas al marcador, lo excitan.

Al igual que en los otros diseños en la técnica la intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la amplificación producida. La computadora del instrumento registra en un gráfico la dinámica de la reacción en relación al número de ciclos, y un programa informático traduce la cinética de la emisión de fluorescencia en copias de DNA/ml tras compararla con patrones estándar.^{1, 3, 8, 13, 26, 28}

D. Otras técnicas de amplificación.

Otros métodos de amplificación de los ácidos nucleicos blanco son los sistemas de amplificación basados en la transcripción (TAS), la amplificación del desplazamiento de cadenas (SDA) y la replicación de secuencias autosuficiente (3SR). Aunque estos métodos son ejemplos de las intrincadas maneras en que pueden manipularse los métodos moleculares para la amplificación de ácidos nucleicos blanco (Tabla 4-1), su aplicación en la microbiología diagnóstica todavía no ha logrado el mismo nivel de atención que la PCR.²⁶

Desde la descripción de la PCR se han descrito otras estrategias refinadas para la amplificación de ácidos nucleicos blanco. Kwok y col. Describieron un método denominado amplificación basada sobre la transcripción, que ha sido llamado NASBA (amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico) o 3SR (Replicación autosustentable de secuencias). La técnica de 3SR tiene su máxima utilidad en la amplificación de RNA más que en la de DNA. La técnica utiliza varias enzimas y se basa en la síntesis de cDNA mediante una transcriptasa inversa (TI) copiando el RNA diana, al que previamente se ha unido un cebador, dando lugar a un híbrido RNA-cDNA. El RNA es degradado por una RNAasa quedando una única cadena de cDNA, a la que se une un segundo cebador y sobre la que la TI copia su complementaria de DNA, formándose una doble cadena de DNA que es apta para que la tercera enzima que es la T7 RNA-polimerasa (obtenida del bacteriófago T7) reconociendo una señal iniciadora de los cebadores transcriben numerosísimas copias de RNA que podrán reiniciar el ciclo. La reacción comporta dos cebadores que marcan el inicio de la acción de la TI, además de la T7 RNA-polimerasa (Figura 4-2). Esta reacción se desarrolla a temperatura de entre 37-42°C de modo isotérmico, por lo que no requiere termocicladores.

A continuación la detección del material amplificado se puede efectuar de muy distintas maneras mediante un sistema de protección de la hibridación (HPA; hybridization protection assay) o sondas específicas marcadas con diferentes sustancias. También se están utilizando las sondas empleadas en la PCR a tiempo real, especialmente los molecular beacons, con el fin de realizar una amplificación isotérmica con lectura en tiempo real.^{13, 26, 28}

Tabla 4-1. Técnicas de Amplificación²⁸

Método de amplificación	Tiempo de amplificación	Enzimas utilizadas	Temperatura de reacción	Ácidos nucleicos amplificados
PCR	Secuencia diana	Taq	Cambios cíclicos	DNA
TMA, NASBA	Secuencia diana	Ti, RNA Pol, RNasa H	Isotérmica	RNA (DNA)
SDA	Secuencia diana	Enzimas de restricción DNA polimerasa	Isotérmica	DNA
LCR	Sonda	DNA ligasa	Cambios cíclicos	DNA
bDNA	Señal	Ninguno	Isotérmica	DNA y RNA

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, TMA: amplificación basada en la transcripción, NASBA es una técnica de TMA, SDA: amplificación basada en el desplazamiento de la cadena, LCR: reacción en cadena de la ligasa, bDNA: DNA ramificado.

Taq: DNA polimerasa termorresistente de *Thermus aquaticus*, Ti: transcriptasa inversa, RNapol: RNA polimerasa.²⁸

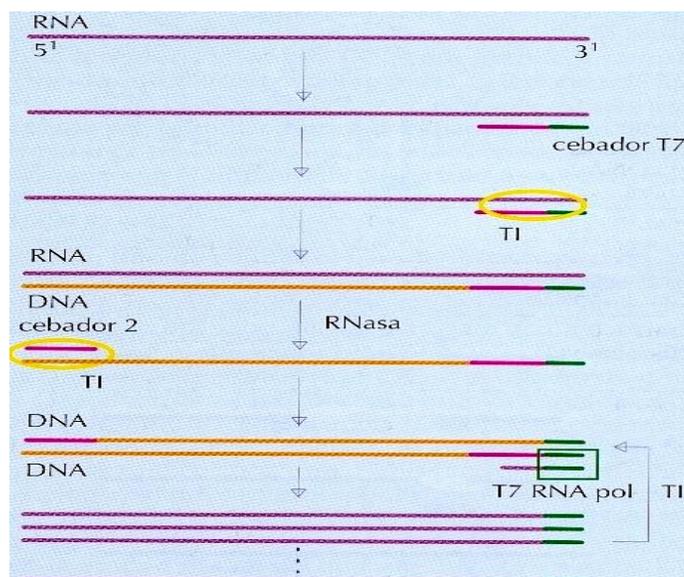


Figura 4-2. Técnicas de amplificación basadas en la transcripción

El proceso se inicia con la unión al RNA diana de un cebador (Cebador T7), que posee en un extremo una secuencia que será reconocida por la T7 RNA polimerasa contenida del bacteriófago T7. Una transcriptasa inversa (T1), a partir de ese cebador, sintetiza DNA formando un híbrido RNA/DNA. Una RNasa destruye el RNA y la transcriptasa inversa con un nuevo cebador (cebador 2), crea una doble cadena de DNA/DNA, ya que la TI también tiene función de DNA polimerasa. Si la transcriptasa inversa es la del virus de la mieloblastosis aviar no se requiere la RNasa ya que esa enzima posee también esa acción.

La T7 RNA polimerasa reconoce su extremo específico en el DNA, que ha sido introducido con los cebadores y a partir de él efectúa numerosísimas copias de RNA que reinician el ciclo.²⁸

1. LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN POR DESPLAZAMIENTO DE LA CADENA (SDA)

Explota el hecho de que, luego de un corte en una de las cadenas de DNA por una endonucleasa de restricción específica de sitio la DNA polimerasa puede unirse y sintetizar una copia complementaria del DNA; la cadena cortada es desplazada por la cadena que se copia durante el proceso de síntesis de DNA la incorporación de nucleótidos α -tio sustituidos (por ejemplo 5'- α -tio-trifosfato desoxiadenosina) en la mezcla de reacción vuelve a las cadenas recién sintetizadas resistentes al los cortes por endonucleasa de restricción. Moléculas de DNA cadena doble que poseen una cadena α -tio sustituta sólo pueden ser cortadas por enzimas de restricción en la cadena nativa de modo que el DNA que es desplazada durante el proceso de copia puede actuar luego como molde para la unión de un iniciador y la extensión de cadenas de nucleótidos. El corte de una cadena simple, la polimerización siguiente y el desplazamiento de la cadena siguen ocurriendo debido a la regeneración continua de sitios de corte inalterados en las moléculas duplex. Las técnicas de SDA han sido comunicadas para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de esputo.

La reacción de cadena de la polimerasa, y la 3SR y la SDA involucra la amplificación de una secuencia blanco que es detectada después con otro tipo de sonda. Otros métodos de amplificación no amplifican el número de moléculas blanco pero amplifican la sonda utilizada par detectar la secuencia genética de interés. Dos tipos de ensayos emplean la estrategia de amplificación de la sonda: la amplificación por la replicasa Qbeta y la reacción en cadena de la ligasa (LCR).

El método de la replicasa Qbeta utiliza una enzima replicaza capaz de sintetizar el RNA genómico del bacteriografo Qbeta. El genoma RNA de fago Qbeta tiene muchos rulos de RNA y regiones parcialmente doble-cadena (como una molécula de tRNA). En el ensayo de amplificación se utiliza una variante natural de la partícula fágica denominada MDV-1; esta variante se comporta como un sustrato para la enzima replicasa del fago Qbeta y puede ser manipulada de modo que una secuencia de oligonucleótidos sonda puede ser insertada en uno de los rulos. La sonda MDV-1 se adiciona a la mezcla de reacción y se une a su secuencia blanco (si el blanco es dsDNA, se utiliza calor Para desnaturalizar el DNA que permite la hibridación de la sonda). Una vez que la región de la sonda en el rulo se une a su secuencia de reconocimiento, se vuelve resistente la hidrólisis por RNAasa; el tratamiento con RNAasa hidroliza a la sonda no unida y luego un paso de lavado remueve a estas moléculas de la mezcla de reacción. La adición de la enzima replicasa Qbeta al complejo sonda-blanco y a la incubación siguiente da como resultado la amplificación específica de la sonda. El método de amplificación por la replicasa Qbeta puede ser utilizado para detectar tanto blancos de DNA como de RNA.^{13, 26, 28}

2. LA REACCIÓN EN CADENA DE LA LIGASA O LCR,

La prueba de amplificación de la ligasa o ligase Chain reaction se basa en ligar y amplificar los cebadores. Se utilizan cuatro cebadores: dos para cada cadena del DNA. Los dos cebadores de una cadena son contiguos, de modo que

se alinean un junto al otro. Los cebadores de la segunda cadena se han diseñado para el fragmento de DNA complementario, al que se unen los cebadores en la primera cadena; por lo tanto también son contiguos. Al subir la temperatura, se separan ambas cadenas de DNA; y al bajar a temperatura de hibridación, los cebadores se unen a una diana sin que apenas se produzca la renaturalización del DNA por el gran exceso de cebadores existente.

Mediante la DNA-ligasa, los cebadores contiguos de una cadena por un lado, y los de la otra cadena por otro lado, quedan unidos. Cuando de nuevo se sube a la temperatura de desnaturalización, se liberan los fragmentos de DNA ligados, de manera que ahora no sólo el DNA inicial es diana para los cebadores sino que además los cebadores unidos son diana para nuevos cebadores.

La reacción se efectúa en un termociclador para alcanzar secuencialmente las temperaturas de desnaturalización, hibridación y de acción de la ligasa (Figura 4-3).

En esta técnica, que esta comercializada y automatizada, es fácil que se produzcan contaminaciones, y los amplicones al ser cortos, resultan de difícil inactivación física o química.

La detección de las sondas amplificadas, se puede realizar usando sondas marcadas por cualquiera de los métodos descritos previamente.^{13, 26, 28}

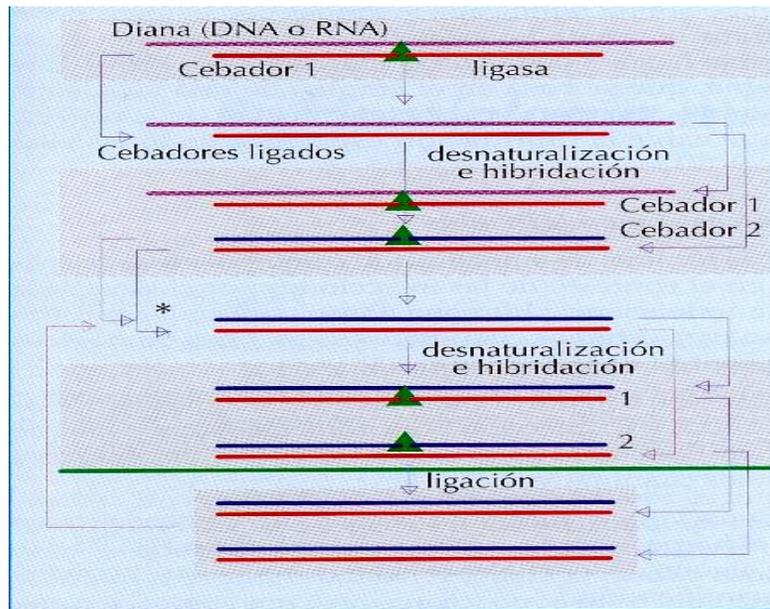


Figura 4-3. Técnicas de amplificación de la sonda.

Las principales técnicas de la sonda son la reacción en cadena de la ligasa, la técnica de las sondas invasoras y la de reciclado de hibridación de las sondas.

En la reacción en cadena de la ligasa cuatro sondas (cebadores), dos por cada cadena, después de fijarse en las sondas diana que se hayan muy próximas, se unen con una ligasa y sirven de dianas las nuevas sondas que prosiguen el proceso.²⁸

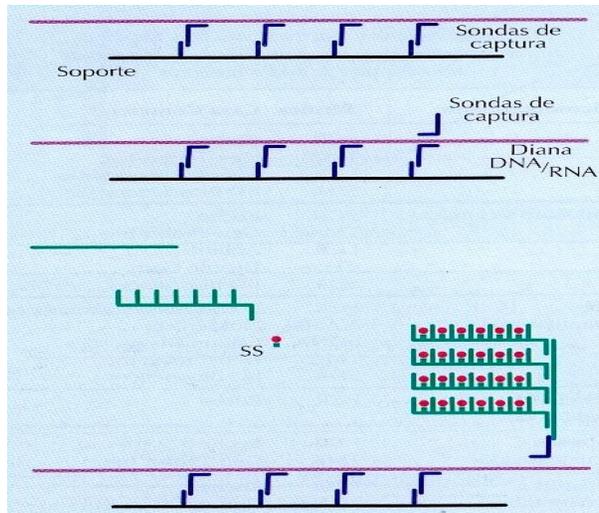


Figura 4-4. Técnicas de amplificación de la señal.

Las técnicas de amplificación de la señal como la bDNA (branched DNA), unas sondas fijadas a un soporte captan al DNA (o RNA) diana. Otra sonda se une al ácido nucleico captado, y a ésta una tercera sonda a la que se unen numerosas sondas ramificadas y a cada rama se unen pequeñas sondas de señal (SS), marcadas con fosfatasa alcalina, que al actuar sobre el adamanil dioxetano aril fosfato, emite la señal lumínica.²⁸

3. AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL

a. bDNA

Los métodos de amplificación de señal se basan en el hecho de captar varias sondas marcadas; como el sistema de sondas compuestas o el que utiliza sondas ramificadas. Este último (branched DNA; bDNA) ha sido comercializado, y probablemente es el más utilizado dentro de esta categoría (Figura 4-4).

La técnica se basa en fijar sobre un soporte una sonda de captura del DNA diana. Cuando este ha sido capturado (si está presente), a él se unen otras sondas, y a estas, otras que están ramificadas, uniéndose finalmente a cada una de las ramas una pequeña sonda marcada con una enzima como la fosfatasa alcalina, que activará la quimioluminiscencia de un sustrato añadido, como el dioxetano (soporte=sonda=DNA diana=sonda ramificada= a sondas con el marcador > sustrato→señal). En estas condiciones pueden llegar a fijarse hasta 3000 sondas marcadas por diana. Este sistema, que se basa en el empleo de una larga serie de sondas, incrementa la especificidad de la prueba, ya que exige la hibridación específica de todas ellas.^{13, 28}

4. TÉCNICAS COMERCIALIZADAS

Las técnicas de amplificación comercializadas se aplican en el contexto de las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana, tanto para su diagnóstico como para estudios cuantitativos con fines pronósticos y de control de tratamiento.

Entre las bacterias se hallan sistemas comercializados para el sistema de las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*.

El paso progresivo de los métodos tradicionales de amplificación a los de tiempo real se acompaña de la oferta de equipos y reactivos para la amplificación y cuantificación del genoma nuevos microorganismos, como citomegalovirus y virus de Epstein-Barr y otros.

Es previsible la inmediata oferta de reactivos para PCR en tiempo real, para la detección de muy diversos microorganismos, genes de virulencia y de resistencia.^{13, 26, 28}

Resumen

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más empleada en la actualidad en el campo de la medicina debido a la rapidez y fácil elaboración que se requiere para llevar a cabo un diagnóstico microbiológico a demás que es una ventaja para la identificación ya que algunos microorganismos para su desarrollo y aislamiento son de difícil manejo, condiciones estrictas y complicadas. Una de la principal ventaja es que no es necesaria una gran cantidad de muestra para la elaboración de la PCR, en lo que algunas técnicas requieren de hasta 10mg de muestra o tejido que en muchos de los casos no es posible obtener.

El conocimiento de los pasos esenciales de la división celular dio la pauta para la implementación de la técnica, con una pequeña muestra se pueden obtener series repetitivas para la obtención de una cantidad considerable de material genético para la identificación específica del microorganismo. Así la sensibilidad de la técnica deja de ser un problema y se reducen la cantidad de tiempo para un diagnóstico, como la cantidad de muestra biológica o tejido por analizar. Haciendo más fácil el empleo de la técnica por PCR, ya que con el empleo de un termociclador se pueden obtener millones de copias de DNA en solo 30 minutos (PCR a tiempo real).

V. APLICACIONES DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR MICROBIOLÓGICO EN LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Los principios de cultivo e identificación bacterianos son el fundamento de la bacteriología diagnóstica, existen importantes limitaciones con el uso de los métodos fenotípicos:

1. La incapacidad del desarrollo de algunos patógenos resistentes.
2. La incapacidad de mantener la viabilidad de ciertos patógenos en las muestras durante el transporte de laboratorio.
3. El tiempo que demora el cultivo y la identificación de los patógenos de desarrollo lento.
4. La falta de métodos confiables para identificar ciertos microorganismos desarrollados *in vitro*.
5. Necesidad del uso de tiempo y recursos para establecer la presencia y la identidad del patógeno en las muestras.

La explosión de la biología molecular durante los últimos 20 años proporciona alternativas a las estrategias basadas en el fenotipo usadas en microbiología clínica. Estas alternativas tienen la posibilidad de eliminar algunas de las limitaciones mencionadas. La detección y la manipulación de ácidos nucleicos (DNA y RNA) permite examinar en forma directa los genes microbianos (es decir, por métodos fenotípicos). Además se desarrollaron métodos analíticos no basados en los ácidos nucleicos que detectan rasgos fenotípicos no detectables con las estrategias convencionales (p.ej, componentes de la pared celular) para mejorar la detección, la identificación y las características bacterianas. Para que el diagnóstico del laboratorio de las enfermedades infecciosas siga siendo oportuno y eficaz las estrategias que integran las técnicas convencionales, las basadas en ácidos nucleicos y las analíticas deben continuar en evolución ²⁶

A. Infecciones cutáneas

Las infecciones cutáneas suelen estar causadas en su mayoría por bacterias como *Staphylococcus aureus*, el estreptococo β -hemolítico del grupo A (*Streptococcus pyogenes*), *Pseudomonas aeruginosa* o por hongos como las candidas y los dermatofitos.

Las infecciones estafilocócicas se inician en el folículo piloso dando lugar a una foliculitis o forúnculo, que es una lesión piógena que puede extenderse localmente produciendo un pequeño absceso multiloculado (ántrax). A veces estas lesiones están causadas por *Pseudomonas* (foliculitis de las piscinas o tras depilación con cera contaminada) Tabla 5-1. Los estafilococos y estreptococos, a través de microlesiones de la piel, causan el impétigo, que es una infección superficial difusa, de aspecto eritematoso y con pequeñas vesículas, que en ocasiones forman ampollas con exudado seroso que dan lugar a costras meláceas. Las infecciones dérmicas por estreptococo del grupo A también dan lugar a una forma de dermatitis pápulo-eritematosa, la erisipela, clínicamente característica. Estas infecciones superficiales pueden profundizar causando linfangitis o celulitis (Tabla 5-2 y 5-3.)

Tabla 5-1. Infecciones que afectan a los folículos pilosos.²⁶

Infección	Manifestaciones cutáneas
Foliculitis, infección leve de los folículos pilosos	Pápulas o pústulas atravesadas por un pelo y rodeadas por eritema.
Forúnculo	Absceso que comienza como un nódulo rojo en un folículo piloso que por último se torna doloroso y lleno de pus.
Carbunco	Forúnculos que se extienden más en profundidad a la dermis y los tejidos subcutáneos; estas infecciones pueden asociarse con fiebre y malestar general

Tabla 5-2. Manifestaciones de las infecciones cutáneas.²⁶

Término	Descripción	Agentes etiológicos posibles
Mácula	Un cambio coloración de la piel, plana, circunscripta (limitada)	Dermatofitos <i>Treponema Pallidum</i> (sífilis secundaria) Virus, como enterovirus (exantemas virales (erupciones))
Pápula	Una lesión elevada, sólida, de hasta 0,5cm de diámetro. Las pápulas múltiples pueden tornarse con fluentes y formar placas	Poxvirus (infección, molusco contagioso) <i>Sarcoptes scabiei</i> (infección, sarna) Papilomavirus humano tipo 3 y 10 (infección, verruga planas) <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , etc. (infección, foliculitis)
Nódulo	Una lesión sólida, sobre elevada, circunscripta, mayor que 0.5cm de diámetro	<i>Sporothrix schenckii</i> <i>Staphylococcus aureus</i> (infección, forúnculo) Varios hongos (infección, micosis subcutáneas) <i>Mycobacterium marinum</i> Especies de <i>Nocardia</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Pústula	Una colección circunscripta de leucocitos y líquido que varía de tamaño	Especies de <i>Candida</i> Dermatófitos <i>S. aureus</i> (infección, foliculitis) Virus herpes simple (HSV) Virus varicela zoster (VZV) <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (infección gonococcemia) <i>S. aureus</i> o estreptococos grupo A (<i>Streptococcus pyogenes</i> [infección, impétigo])
Vesícula	Una lesión circunscripta, de líquido de hasta 0,5 cm de diámetro (similar a flictena)	HSV VZV Herpes zoster
Escamas	Exceso de células epidérmicas muertas	Dermatófitos (infección, tiña) Estreptococos grupo A (<i>Streptococcus pyogenes</i> [infección, escarlatina])
Úlcera	Perdida de epidermis y dermis	<i>Haemophilus ducreyi</i> (infección, cancroide) Flora intestinal (infección, decúbito) <i>T. pallidum</i> (infección, chancro de sífilis primaria) <i>Bacillus anthracis</i> (infección, carbunco)
Ampolla	Lesión circunscripta de líquido de más de 0,5 cm de diámetro	Especies de clostridios (infección, gangrena gaseosa necrosante) <i>Staphylococcus aureus</i> (infección, síndrome de la piel escaldada estafilocócico; impétigo ampollar) HSV <i>Vibrio vulnificus</i> y otros vibrios Estreptococos grupo A (<i>Streptococcus pyogenes</i>) Otros bacilos gramnegativos

Las toxinas liberadas por *Staphylococcus aureus* desde una infección focal pueden producir diversos procesos patológicos. Las enterotoxinas actuando como superantígenos pueden causar un cuadro grave de shock tóxico y las toxinas exfoliativas pueden ocasionar el síndrome de la piel escaldada

Las lesiones eritematosas de la piel causadas por *Candida albicans* y otras especies de *Candida* se producen en zonas de roce y humedad, como el pliegue submamario, la ingule (eritema del pañal en los niños y ancianos con incontinencia) o en las zonas periungueales

Los dermatofitos causan tiñas, particularmente en los pies, en las zonas interdigitales y plantar (pie de atleta) y en otras áreas de la piel lampiña; así como en el cabello y las uñas. La expresión clínica de estas infecciones es extraordinariamente variada, dependiendo de la zona afectada y el dermatofito infectante. En los pies forman grietas interdigitales, en las plantas lesiones eritematosas, vesiculares o hiperqueratósicas, en el cuerpo o extremidades lesiones papuloeritematosas o secas e hiperqueratósicas; las lesiones causadas por dermatofitos zoofílicos que afectan al cuero cabelludo dan lugar al querion, que es una lesión pseudotumoral con supuración melicérica y afectación del cabello.

Las infecciones cutáneas tras una mordedura humana o animal son polimicrobianas y están causadas por la flora aerobia y anaerobia de la boca; sin embargo, a veces las infecciones consecuentes a mordeduras por animales son monomicrobianas y están causadas por *Pasteurella multocida*, en el caso de mordedura por felinos o cánidos, y *Eikenella corrodens* en el caso de mordedura humana. Estos microorganismos se aíslan por cultivo convencional en agar sangre.

Las celulitis necrotizantes de rápida evolución con afectación del tejido celular subcutáneo, de las fascias y/o el músculo subyacente (gangrena) se dan en tejidos con mala vascularización, particularmente en las extremidades en ancianos con arteriosclerosis y diabéticos, y están causadas por *Clostridium perfringens* y otros clostridios necrotizantes, pero también por *Escherichia coli* o asociaciones de *S. aureus* y *S. pyogenes* (grupo A). En estas lesiones la puerta de entrada cutánea puede ser evidente o pasar desapercibida. La tinción del Gram es muy orientadora y los cultivos deben efectuarse en aerobiosis y anaerobiosis.

17,19, 20, 24, 26,28, 31,

B. Infecciones gastrointestinales

Diversas bacterias, protozoos y virus con capacidad enteropatógena causan infecciones intestinales, denominadas enteritis, cuyo síntoma cardinal es la diarrea.

Aunque la mayoría de las enteritis son autolimitadas, cuando la diarrea es intensa produce deshidratación y trastornos electrolíticos, que en niños pequeños, ancianos y personas desnutridas comportan un pronóstico grave.

Los microorganismos enteropatógenos actúan por invasión de la mucosa intestinal (mecanismo invasor) o por producción de enterotoxinas (mecanismo toxigénico).

Tabla 5-3. Infecciones de las capas epidérmicas y dérmicas de la piel.²⁶

Infección	Características principales de la infección	Etiología	Comentarios
Erisipela	Afecta sobre todo la dermis y partes más superficiales del tejido subcutáneo. Las lesiones son dolorosas, eritematosas, tumefactas e induradas. Los pacientes están febriles y a menudo hay linfadenopatía regional (ganglios inflamados). La lesión tiene un borde nítido, bien delimitado, sobreelevado.	Estreptococos grupo A (<i>Streptococcus pyogenes</i> (algunas veces estreptococos grupos B, C o G))	Lactantes, niños y ancianos son los más afectados. Sobre todo diagnóstico clínico.
Eritrasma	Infección crónica de la capa queratinizada de la epidermis. Las lesiones son secas y escamosas.	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	Común en diabéticos. Se asemeja a la infección por dermatofitos.
Erisipetoide	Lesión cutánea no vesiculosa, de color rojo-púrpura, con un borde irregular, sobreelevado. Las lesiones son pruriginosas y producen sensación de quemazón. La fiebre y otros síntomas sistémicos son raros.	<i>Erysipelothrix rhusio pathiae</i>	Infrecuente. Se considera una enfermedad ocupacional.
Impétigo	Lesiones eritematosas (rojas) que pueden ser ampollares (menos común) o no ampollares.	No ampollar: estreptococos grupo A, <i>Streptococcus pyogenes</i> Ampollar: <i>Staphylococcus aureus</i>	
Celulitis	Infección difusa, que se disemina para afectar las capas más profundas de la dermis. Las lesiones están mal definidas, son planas, dolorosas, rojas y tumefactas. Los pacientes tienen fiebre, escalofríos y linfadenopatía regional.	Estreptococos grupo A, <i>Staphylococcus aureus</i> Menos común: <i>Aeromonas</i> , especies de <i>Vibrio</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> (afecta de manera característica a los niños pequeños)	Sobre todo diagnóstico clínico.
Dermatofitosis	Infecciones superficiales de la piel y faneras (tiñas, pie de atleta, prurito inguinal (tiña cruris) así como infecciones de uñas y pelos).	Microsporum, Trichophyton y Epidermophyton.	
Hidradenitis	Infección crónica de glándulas apocrinas obstruidas (sudoripáras) en áreas de axilas, genital o periáanal con drenaje intermitente, a menudo con pus maloliente.	<i>Staphylococcus aureus</i> , grupo Streptococcus <i>millerii</i> estreptococos anaerobios y especies de Bacteroides.	
Quiste pilonidal de mechón o pelos infectados	Dolor y tumefacción, eritematoso	Anaerobios, como grupo <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Fusobacterium</i> , cocos grampositivos anaerobios y especies de <i>Clostridium</i>	

En las enteritis causadas por bacterias invasoras, como las salmonelas, los campilobacter, las shigelas y las yersinias, las heces diarreicas pueden presentar sangre y leucocitos, y el cuadro clínico se acompaña de dolor abdominal y fiebre.

En las enteritis toxigénicas, como las causadas por *Vibrio cholerae* 01 y 0139 o *Escherichia coli* enterotoxigénica, predomina un cuadro de diarrea líquida abundante, con escaso dolor abdominal, generalmente afebril, de pronóstico grave cuando la diarrea es intensa y persistente. Sin embargo, las toxinas de *E. coli* enterohemorrágica y de *Clostridium difficile* son necrotizantes y pueden causar desde un cuadro de diarrea indiferenciada benigna hasta un cuadro muy grave de diarrea sanguinolenta por la producción de úlceras y necrosis en el colon (colitis hemorrágica y colitis pseudomembranosa, respectivamente). Además, *E. coli* 0157:H7 y otros serotipos enterohemorrágicos de *E. coli* pueden causar complicaciones muy graves, como el síndrome hemolítico urémico o la púrpura trombótica trombocitopénica. Por el contrario, el cuadro clínico producido por las toxinas de *Staphylococcus aureus* preformadas en los alimentos y por *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* es leve y autolimitado, caracterizado por náuseas vómitos y en menor medida diarrea, tras un período de incubación corto, inferior a seis horas.

A pesar de lo dicho, en la mayoría de los casos, la clínica de las enteritis es indiferenciada e insignificante y hace difícil deducir el agente causal.

La participación de *Helicobacter pylori* en la patogenia de la úlcera duodenal y la gastritis antral parece incuestionable, recomendándose la erradicación del microorganismo mediante antibióticos.^{17,19, 20, 24, 26,28, 31,}

C. Infecciones del sistema respiratorio

Las infecciones de boca y vías respiratorias superiores son comunes en todos los grupos de edades. La infección puede deberse a bacterias, virus (incluyendo los causantes de infecciones tan bien conocidas como catarro común y el mal de garganta infeccioso) u hongos.

1. INFECCIONES PULMONARES

Para que se produzca una infección pulmonar los microorganismos deben alcanzar el pulmón a través de la vía respiratoria o por vía hemática a partir de un foco séptico distante. La mayoría de las neumonías se producen por el primer mecanismo.

En la etiología de las infecciones pulmonares influye la edad, la epidemiología regional, estacional y la naturaleza de los factores predisponentes del paciente, que incluyen desde enfermedades respiratorias locales, como las bronquiectasias, hasta enfermedades generales, como la inmunodepresión.

En los lactantes la bronquiolitis y la bronconeumonía están causadas por virus como el respiratorio sincitial y otros virus respiratorios y enterovirus, pero también pueden estar causadas por bacterias como el neumococo y los hemófilos.

El neumococo causa neumonía con mayor frecuencia en los niños y los ancianos. Son infecciones de curso agudo caracterizadas por un cuadro de neumonía típica con dolor en punta de costado, tos seca, fiebre elevada,

obnubilación y leucocitosis, con pronóstico grave. En ocasiones la clínica puede resultar atípica debutando en el anciano con un cuadro de desorientación.

Aunque la gripe es fundamentalmente una infección del árbol traqueobronquial, en un porcentaje de casos puede ocasionar neumonía, que suele ser grave en el anciano y sobreinfectarse con neumococo.

Las infecciones en los adultos jóvenes están causadas por *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae* y poseen en general buen pronóstico. Las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* afectan inicialmente al pulmón y pueden difundir por contigüidad a los ganglios linfáticos y por vía hemática al riñón, las meninges y los huesos. Tras la curación del episodio de primoinfección pulmonar, la enfermedad puede reactivarse meses o años después. *Mycobacterium kansasii* es una micobacteria ambiental que puede causar infecciones pulmonares difíciles de diferenciar de la tuberculosis en personas previamente sanas o con patología local respiratoria.

Las infecciones por legionela se producen mediante aerosoles desde su reservorio acuático, afectan principalmente a personas mayores con broncopatías crónicas y poseen un pronóstico grave.

En pacientes inmunodeprimidos, especialmente con el SIDA, es muy frecuente que la tuberculosis se presente con forma atípica (formas extrapulmonares, diseminadas, etc.). En estos pacientes también son frecuentes las infecciones respiratorias por *Mycobacterium avium* y *Pneumocystis jiroveci* así como por nocardia.

En los enfermos intubados, las infecciones de aparición precoz están causadas por *S. aureus* y *H. influenzae* y las tardías por bacilos gramnegativos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *R aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos aerobios. Los hongos dimórficos, como histoplasma, blastomices, coccidioides, paracoccidioides y otros, son de distribución restringida a algunas áreas geográficas. Cuando sus esporas son inhaladas causan infección pulmonar que puede diseminarse produciendo metástasis. El cuadro clínico recuerda a la tuberculosis.^{17,19, 20, 24, 26,28, 31,}

D. Infecciones del aparato genitourinario

Las infecciones del tracto urinario están causadas en su mayoría por bacterias de la flora intestinal que, ascendiendo por la uretra, alcanzan la vejiga urinaria y en algunos casos progresan afectando a los uréteres y los riñones.

Las infecciones de la vejiga urinaria, denominadas cistitis, dan lugar a un síndrome caracterizado por micción dolorosa y frecuente (disuria y polaquiuria) con sensación continua de necesidad de orinar (tenesmo) y escasa sintomatología general, ya que no suelen ocasionar fiebre o astenia intensa. Las infecciones que afectan a los uréteres y riñones (pielonefritis) se manifiestan por fiebre, dolor lumbar y afectación del estado general, asociadas a disuria, polaquiuria y tenesmo urinario cuando existe una cistitis concomitante.

En la orina, además de las bacterias (bacteriuria), como respuesta a la infección, hay leucocitos (piuria) por lo que su aspecto es generalmente turbio y con frecuencia maloliente. El estudio microscópico del sedimento del centrifugado

de la orina permite constatar la infección urinaria al visualizar la bacteriuria y la piuria.

Las infecciones urinarias suelen darse con mayor frecuencia en las mujeres debido a la cortedad de la uretra que, además, desemboca en el introito vaginal que está colonizado por la flora intestinal. Estas infecciones, a menudo están relacionadas con el coito y también son más frecuentes durante el embarazo. En general son monomicrobianas, siendo *Escherichia coli* el microorganismo que las causa con mayor frecuencia, seguido por otras enterobacterias y enterococos. Aunque poco frecuente, es característica la infección por *Staphylococcus saprophyticus* en la mujer joven sexualmente activa.

Los riñones pueden infectarse por vía hematógena, como sucede en la tuberculosis o en la bacteriemia estafilocócica; pero la patogenia, la clínica y la evolución de estas infecciones son diferentes de las que se producen por vía ascendente y por ello no se incluyen en el concepto convencional de infección urinaria.^{17,19, 20, 24, 26,28, 31,}

1. ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

Existe un conjunto de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas del aparato genital que se transmiten por contacto sexual. Estas enfermedades de transmisión sexual se manifiestan típicamente por dos cuadros clínicos diferentes, 1) la exudación o supuración y 2) la formación de vesículas o úlceras. En la mujer puede producirse exudación en la vulva y vagina, en el cérvix uterino o en la uretra y aunque puede predominar en una de estas localizaciones suelen estar afectadas simultáneamente. Las lesiones vesiculosas y/o ulceradas se producen en los genitales, pero pueden presentar otras localizaciones. Los condilomas son lesiones verrucosas que constituyen una patología frecuente de origen vírico.

Los agentes que con mayor frecuencia producen vulvovaginitis inflamatorio exudativa son las candidas y las tricomonas. En la candidiasis se observa una secreción blanca, cremosa como yogur en la vulva y vagina; en tanto que en la tricomoniasis la secreción en la vagina y en el cérvix es amarillada y espumosa. Estas infecciones producen intenso prurito vulvovaginal.

La vaginosis es un proceso discretamente exudativo, caracterizado por la desaparición de los lactobacilos de la flora vaginal normal y la aparición de una abundante flora mixta en la que predominan la gardenerela y los micoplasmas, así como mobiluncus y otras bacterias anaerobias; en realidad, se trata de un desequilibrio de la flora vaginal sin componente inflamatorio (disbacteriosis). Clínicamente, el proceso se caracteriza por la aparición de un exudado de olor inconfundible y molestias vulvovaginales inespecíficas. En el Gram del exudado se observan los microorganismos adheridos a las células epiteliales vaginales de aspecto característico (*clue cells*) en ausencia de leucocitos, ofreciendo una imagen muy típica que posee gran valor diagnóstico.

Aunque la candidiasis y la vaginosis pueden transmitirse por contacto sexual, probablemente la mayoría de los casos no tienen ese origen, sino que se originan de la propia flora intestinal.

Las infecciones exudativas o supuradas del cérvix uterino están causadas por las tricomonas, el gonococo y las clamidias como se ha señalado anteriormente, las tricomonas también pueden causar vaginitis. En el varón las candidas causan balanitis, pero no uretritis y la tricomoniasis uretral sintomático, exudativa o purulento, es muy infrecuente. Por el contrario, el gonococo y la clamidia producen uretritis supurada que se acompaña de importante disuria. *Ureaplasma urealyticum* se ha asociado a uretritis no gonocócica.

Las lesiones vesiculares o ulceradas, que en la mujer se dan en la vulva y el cérvix y en el hombre en el glande y el prepucio, están causadas con mayor frecuencia por los virus del herpes simple y suelen ser clínicamente características y dolorosas.

La úlcera sifilítica (chancro), que es indolora, puede localizarse en cualquier lugar de los genitales, pero también en lugares diferentes del aparato genital, como la boca o el recto, como consecuencia de actividades sexuales que comportan contacto con estas zonas.

Debe pensarse también en la existencia de infecciones réctales (proctitis) causadas por los microorganismos de transmisión sexual, en particular el gonococo.

Algunos papilomavirus causan en las zonas genitales y perianales eflorescencias cutáneas verrucoides características, denominadas condilomas acuminados, que se transmiten por contacto sexual.

Las shigelas y otros agentes causales de enteritis, así como el virus de la hepatitis A pueden transmitirse a través de prácticas sexuales orales.

Algunas enfermedades sistémicas, como las hepatitis B y C, la infección por el citomegalovirus y el virus de la inmunodeficiencia humana, que se transmiten a través de la sangre o líquidos corporales, también pueden transmitirse por contacto sexual, aunque generalmente con menor eficacia que a través de la sangre.

Por otra parte, en la mujer se dan infecciones genitales como endometritis, salpingitis, ooforitis y pelviperitonitis que suelen producirse por vía ascendente y están causadas por agentes de transmisión sexual, como el gonococo o la clamidia, o por asociaciones polimicrobianas de la flora autóctona (*Escherichia coli*, estreptococos, bacteroides, etc.). Dan lugar a un cuadro clínico de intensidad, evolución y pronóstico variable conocido como enfermedad inflamatorio pélvica.

En el varón puede producirse epididimitis y orquitis causadas por agentes de transmisión sexual, principalmente el gonococo, así como por bacterias que progresan desde las vías urinarias como *E. coli* o por microorganismos de origen sistémico como *Mycobacterium tuberculosis* o la brúcela que llegan por vía hemática.

17,19, 20, 24, 26,28, 31,

E. Infecciones del sistema circulatorio

La corriente sanguínea es el principal mecanismo de transporte que conecta diferentes partes del cuerpo y lleva a muchos microorganismos a esas partes. Sin embargo, carece de una "flora normal" y la presencia de microorganismos en ella siempre representa una falla en los mecanismos de defensa que mantienen su esterilidad. Aun cuando en muchos casos tal falla es transitoria y carece de importancia clínica, en otros casos es un asunto grave y

puede poner en riesgo la vida. El tejido linfoide, es parte importante del sistema de defensa, y es a la vez un complicado filtro que intercepta organismos patógenos potencialmente invasores y el “cuartel general” de los linfocitos de los que depende en gran medida la inmunidad. Sin embargo, la función filtradora significa que el sistema linfático es susceptible de una infección clínica importante producida por los microorganismos interceptados; también es el primer blanco específico para algunas formas de infección. La afección de la sangre, el sistema linfático o ambos ocurre en muchas infecciones. Aquí se tratan las infecciones en las que dicha participación es la característica principal de manera que es más apropiado incluirlas en esta parte; también se tratan las infecciones del corazón por su obvia relación con la sangre, aun cuando en algunas de las infecciones del corazón incluidas aquí no haya afección de la corriente sanguínea.

En nuestro medio suele denominarse septicemia a la invasión persistente del torrente circulatorio por bacterias u hongos que da lugar a manifestaciones clínicas de infección sistémica, como fiebre, taquicardia, leucocitosis y otras. El diagnóstico etiológico de las septicemias se efectúa mediante el cultivo de la sangre (hemocultivo).

La entrada al torrente circulatorio de una bacteria o de un hongo se produce a partir de una infección local, que puede estar localizada en la piel, en el tracto urinario, en el pulmón, en el tubo digestivo o en otro lugar que constituye la puerta de entrada (o foco de sepsis). Los catéteres y otros instrumentos intravasculares colonizados también son un foco de sepsis frecuente. La bacteriemia o la fungemia se establecen cuando la multiplicación de los microorganismos en la sangre supera la capacidad del sistema fagocitario para eliminarlos.

En ocasiones el foco de sepsis es asintomático, por lo que no puede detectarse la puerta de entrada, denominándose sepsis primaria o criptogénica. Esto sucede en las sepsis que se originan a partir de un absceso abdominal silente o de un catéter infectado sin flebitis aparente y también puede tener lugar en pacientes con enfermedades de base graves, como cirrosis, inmunodepresión o granulopenia, en los que desde el tubo digestivo se produce una bacteriemia o fungemia primaria por un microorganismo de la flora normal (*Escherichia coli*, *estreptococo viridans*, *Candida albicans*, etc.) que atraviesa la pared intestinal sin producir síntomas locales por un proceso denominado translocación.

En infecciones como la fiebre tifoidea, la brucelosis, la sepsis meningocócica y la fiebre botonosa, en que la bacteriemia constituye un estadio persistente y fundamental de la infección tampoco suelen existir síntomas en la puerta de entrada. Sin embargo, en alguno de estos procesos pueden presentarse signos de su etiología, como el exantema evanescente de la tifoidea, la sudoración en la brucelosis, las petequias en la meningococemia.^{17,19, 20, 24, 26,28, 31,}

Tabla 5-4 Microorganismos Presentes En Diversas Localizaciones³²

Localización	Flora Normal	Patógeno
Oído externo	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Estreptococos alfa hemolíticos <i>Corynebacteria</i> aeróbicas Enterobacteriáceas <i>Corynebacterium acnes</i> <i>Candida</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> Bacilos coliformes Estreptococos alfa hemolíticos <i>Proteus</i> sp. <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Aspergillus</i> sp. <i>Candida</i> sp. <i>Molluscum contagiosum</i>
Oído medio	Estéril	Otitis media aguda <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> Estreptococos beta hemolíticos
Conductos nasales	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Difteroides <i>Streptococcus pneumoniae</i> Estreptococos alfa hemolíticos <i>Neisseria</i> sp. no patógena <i>Corynebacteria</i> aeróbica	Sinusitis aguda <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Klebsiella-Enterobacter</i> sp Estreptococos alfa hemolíticos Estreptococos beta hemolíticos <i>Moraxella catarrhalis</i> Sinusitis crónica <i>Staphylococcus aureus</i> Estreptococos alfa hemolíticos <i>Streptococcus pneumoniae</i> Estreptococos beta hemolíticos <i>Mucor</i> y <i>Aspergillus</i> sp. (en especial, en diabéticos)
Faringe y Amígdalas	Estreptococos alfa hemolíticos <i>Neisseria</i> sp. <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> (en número reducido) <i>Streptococcus pneumoniae</i> Estreptococos no hemolíticos (gamma) Difteroides Coliformes Estreptococos beta hemolíticos <i>Actinomyces israelii</i> <i>Haemophilus</i> sp. El predominio destacado de un microorganismo puede ser clínicamente significativo incluso si forma parte de la flora normal.	Estreptococos beta hemolíticos <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Bordetella pertussis</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i>
Epiglotis laringe		<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Candida albicans</i>
Bronquiolos y bronquios		<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>

Pulmones		<p>Bacterias: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Bordetella pertussis</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Chlamydia psittaci</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Pneumocystis carinii</i> Bacilos tuberculosos <i>Francisella tularensis</i> <i>Yersinia pestis</i></p> <p>Hongos (p. ej., <i>Histoplasma</i>, en especial <i>Coccidioides</i>; <i>Blastomyces sp.</i>, <i>Aspergillus sp.</i>) <i>Candida albicans</i> <i>Borrelia vincentii</i> con <i>Fusobacterium fusiforme</i></p>
Tracto gastrointestinal	<i>Streptococos alfa hemolíticos</i>	
Boca	<i>Enterococos</i> <i>Lactobacilos</i> Estafilococos Fusobacterias <i>Bacteroides sp.</i> Difteroides <i>Neisseria sp.</i> (excepto <i>N. gonorrhoeae</i>)	
Esófago		<i>Candida albicans</i>
Estómago	Estéril	<i>Helicobacter pylori</i>
Intestino delgado	Estéril en un tercio Bacterias escasas en dos tercios <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella-Enterobacter</i> Enterococos Estreptococos alfa hemolíticos <i>Staphylococcus epidermidis</i> Difteroides	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Campylobacter jejuni</i>
Colon	Abundantes bacterias <i>Bacteroides sp</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella-Enterobacter</i> Paracolónicas <i>Proteus sp.</i> Enterococos (estreptococos grupo D) Levaduras	<i>Escherichia coli enteropatógena</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aeromonas sp.</i> <i>Salmonella sp.</i> <i>Shigella sp.</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Recto		<i>Chlamydia sp.</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Treponema pallidum</i> Linfogranuloma venéreo

Vesícula biliar	Estéril	<p><i>Escherichia coli</i> Enterococos <i>Klebsiella-Enterobacter-Serratia</i> Ocasionalmente, cóliformes <i>Proteus sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Salmonella sp.</i></p>
Sangre	Estéril	<p><i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> Enterococos <i>Pseudomonas sp.</i> Estreptococos alfa y betahemolíticos <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Proteus sp.</i> Bacteroides y anaerobios relacionados <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Brucella sp.</i> <i>Pasteurella tularensis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Achromobacter (Herellae)</i> <i>Streptobacillus moniliformis</i> <i>Leptospira sp.</i> <i>Vibrio fetus</i> <i>Salmonella sp.</i></p> <p>Hongos oportunistas: <i>Candida sp.</i> <i>Nocardia sp.</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Histoplasma capsulatum</i></p>
ojo	Habitualmente estéril En ocasiones, reducido número de difteroides y estafilococos coagulasa negativos	<p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus sp.</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Estreptococos alfa y beta hemolíticos <i>Achromobacter (Herellae) sp.</i> Bacilos conformes <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Otros bacilos entéricos Bacilo de Morax-Axenfeld <i>Bacillus subtilis</i> (ocasionalmente) <i>Chlamydia sp</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Estafilococos, Estreptococos <i>Cryptococcus neoformans</i> Bacilos coliformes <i>Pseudomonas y Proteus sp</i> <i>Bacteroides sp</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Leptospira</i> <i>Treponema</i></p>
Líquido cefaloraquídeo	Estéril	<p><i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Estafilococos, Estreptococos <i>Cryptococcus neoformans</i> Bacilos coliformes <i>Pseudomonas y Proteus sp</i> <i>Bacteroides sp</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Leptospira</i> <i>Treponema</i></p>

Uretra masculina	<p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> Enterococos Difteroides <i>Achromobacter wolffi</i> (Mima) <i>Bacillus subtilis</i></p>	<p><i>Borrelia burgdorferi</i> Hongos (p. ej; <i>Histoplasma capsulatum</i>, <i>Cryptococcus neoformans</i>, <i>Coccidioides immitis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Chlamydia sp.</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> Enterococos <i>Gardnerella vaginalis</i> Estreptococos betahemolíticos (habitualmente grupo B) Estreptococos anaerobios y microaerófilos <i>Haemophilus ducreyi</i> Bacteroides sp. <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella-Enterobacter</i> <i>Staphylococcus aureus</i></p>
Uretra femenina y vagina	<p>Lactobacilos (número elevado) Coli aerógenos Estafilococos Estreptococos (aerobios y anaerobios) <i>Candida albicans</i> <i>Bacteroides sp.</i> <i>Achromobacter wolffi</i> (Mima)</p>	<p>Levaduras y <i>Candida albicans</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Trichomonas vaginalis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Chlamydia sp.</i> (v. también Uretra masculina) <i>Ureaplasma urealyticum</i></p>
Próstata	<p>Estéril</p>	<p><i>Streptococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Klebsiella sp.</i> Estreptococos anaerobios y microanaerófilos (alfa, beta y gamma) <i>Bacteroides sp.</i> Enterococos Estreptococos betahemolíticos (habitualmente grupo B) Estafilococos <i>Proteus sp.</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella-Enterobacter-Serratia</i> <i>Listeria monocytogenes</i></p>
Orina	<p>Estafilococos, coagulase negativos Difteroides Bacilos coliformes Enterococos <i>Proteus sp.</i> Lactobacilos Estreptococos alfa y betahemolíticos</p>	<p><i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella- Enterobacter- Serratia</i> <i>Proteus sp</i> <i>Pseudomonas sp</i> Enterococos Estafilococos, coagulase positivos y negativos <i>Providencia sp.</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Alcaligenes sp</i> <i>Achromobacter (Herellea) sp.</i> <i>Candida albicans</i> Estreptococos betahemolíticos <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p>

Heridas		<p><i>Salmonella y Shigella sp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> Bacilos coliformes <i>Pseudomonas sp.</i> Enterococos <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Clostridium sp.</i> <i>Bacteroides sp.</i>; otros bacilos Gram-negativos <i>Proteus sp.</i></p>
Pleura	Estéril	<p><i>Achromobacter (Herellea) sp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Estreptococos anaerobios <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Actinomyces sp.</i> <i>Nocardia sp.</i></p>
Pericardio	Estéril	<p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> Enterobacteriaceae <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus s p.</i> Bacterias anaerobias <i>Coccidioides immitis</i> <i>Actinomyces sp.</i> <i>Candida sp.</i></p>
Peritoneo	Estéril	<p><i>Escherichia coli</i> Enterococos <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Bacteroides sp.</i>; otros bacilos Gram-negativos Estreptococos anaerobios <i>Clostridium sp.</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas sp.</i> Estreptococos alfa hemolíticos <i>Klebsiella pneumoniae</i></p>
Huesos	Estéril	<p>Hematógenos agudos <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> Estreptococos (grupos A y B) <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Bacilos gramnegativos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Salmonella sp.</i> en la enfermedad drepanocítica</p>

Articulaciones	Estéril	<p>Contiguos Bacterias anaerobias (p. ej., <i>bacteroides</i>, fusobacterias, cocos anaerobios) <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> Estreptococos betahemolíticos <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> Patógenos gramnegativos en recién nacidos <i>Salmonella</i> sp. en la enfermedad drepanocítica <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium kansasii</i> <i>Mycobacterium intracellulare</i> <i>Borrelia burgdorferi</i></p>
Piel	<p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i></p>	<p>Hongos <i>Candida</i> <i>Sporotrix schenckii</i> <i>Coccidioides immitis</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> (impétigo, foliculitis, furunculosis) Estreptococos del grupo A (impétigo, erisipela) <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Francisella tularensis</i> <i>Mycobacterium ulcerans</i> <i>Mycobacterium marinum</i> Bacterias anaerobias Hongos <i>Trichophyton</i> <i>Microsporum</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Actinomyces</i> <i>Nocardia</i></p>

F. PCR Aplicación del diagnóstico molecular microbiológico

Las aplicaciones del diagnóstico molecular microbiológico se basan plenamente, en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica que actualmente es muy empleada por su facilidad y rapidez para la obtención de miles de copia de DNA. A continuación se muestran los oligonucleótidos (primer, sondas) para ayudar a la identificación de los microorganismos causantes de infección.

Tabla 5-5 Identificación y detección de microorganismos patógenos por la técnica de PCR³³

Bacterias Oligonucleótido			Condiciones (master mix)	Controles (Quality control)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>			Iniciador: 50 µM de cada primer (T4, T5) Desoxirribonucleótidos trifosfatados: 10mM de cada Desoxirribonucleótido Polimerasa : 5U AmplyTaq (Perkin Elmer Cetus) Amortiguador: 10 X (100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 0.01L%(p/v) gelatina) 120µl 25 mM MgCl ₂ Iniciador: 50 pmol de cada primer (TZ15 y TZ16) Desoxirribonucleótidos trifosfatados: 200µM de cada Desoxirribonucleótido Polimerasa: 2.5U de AmplyTaq (Perkin Elmer Cetus) Amortiguador: 10mM Tris (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂	Amplificación positiva 100 pg de <i>M. tuberculosis</i> DNA. Amplificación Negativa Mezcla reactiva sin muestra Amplificación Interna 200 fg de control interno de DNA Proceso positivo (Lysis) 10 ³ <i>M. tuberculosis</i> becillo Proceso negativo (reactivo) TE buffer en el procedimiento de lisis y agua destilada estéril del proceso de limpiado del gen Amplificación positiva 1ng y 10 pg de <i>R. rickettsii</i> DNA. Amplificación Negativa 10 µl de diluyente de PCR Paciente positivo (opcional) Sangre completa de pacientes infectados con <i>R. rickettsii</i> Paciente negativo Sangre completa de pacientes no infectados Control específico Para <i>R. rickettsii</i> PCR, 100ng de DNA de <i>Rickettsia prowazekii</i> Amplificación positiva 1ng y 10 pg de <i>E. chaffeensis</i> (ATCC CRL10679) DNA. Amplificación Negativa 10 µl de diluyente de PCR Paciente positivo (opcional) Sangre completa de pacientes infectados con <i>E. chaffeensis</i> Paciente negativo Sangre completa de pacientes no infectados Control específico Para <i>E. chaffeensis</i> PCR, 100 ng de DNA de <i>Ehrlichia canis</i> .
Primer, secuencia de detección de <i>M. tuberculosis</i>				
Blanco	Nombre	Nucleótido secuencia, 5' a 3'		
1S6110	T4	CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG		
1S6110	T5	CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG		
<i>Rickettsia rickettsii</i>				
Oligonucleótidos para la detección de <i>R. rickettsii</i>				
Función	Nombre	Nucleótido secuencia, 5' a 3'		
Primer	TZ15	TTC TCA ATT CGG TAA GGC		
Sonda	SF1	GAC TTG CAG AGC TTA CCT CAC AG		
Primer	TZ16	ATA TTG ACC AGT GCT ATT TC		
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>				
Oligonucleótidos para la detección de <i>E. chaffeensis</i>				
Función	Nombre	Nucleótido secuencia, 5' a 3'		
Primer	HE1	CAA TTG CTT ATA ACC TTT TGG TTA TAA AT		
Sonda	HE4	TTA GAA ATG ATG GGT AAT ACT G		
Primer	HE3	TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT		

Borrelia burgdorferiOligonucleótidos para la detección de *B. burgdorferi*

Blanco	Nombre	Función	Nucleótido secuencia, 5' a 3'
OSPAs	OSPAs2	Primer	GTTTTG TAA TTT CAA CTG CTG ACC
	OSPAs4	Primer	CTG CAG CTT GGA ATT CAG GCA CTT C
	OSPAs3	Sonda	GCC ATT TGA GTC GTA TTG TTG TAC TG
OSPAs	OSPAs149	Primer	TTA TGA AAA AAT ATT TAT TGG GAA T
	OSPAs319	Primer	CTT TAA GCT CAA GCT TGT CTA CTG T
	OSPAs6	Sonda	ATT GGG AAT AGG TCT AAT ATT AGC CT
Flagellin	FLA1	Primer	GAT GAT GCT GCT GGC ATG GGA GTT TCT... GG
	FLA3	Primer	CTG TCT GCA TCT GAA TAT GTG CCG TTA... CCT G
	FLA2	Sonda	ATT CAG ACA ACA GAA GGG AAT TTA AAT... GAA GTA G
16SrDNA	DD02	Primer	CCC TCA CTA AAC ATA CCT
	DD06	Primer	ATC TGT TAC CAG CAT GTA AT
	DD04	Sonda	CCC GTA AGG GAG GAA GGT AT

Iniciador: 50 pmol de cada primer
Desoxirribonucleótidos**trifosfatados:** 200µM de cada
Desoxirribonucleótido**Polimerasa:** 1.25U de AmplyTaq
(Perkin Elmer Cetus)**Amortiguador:** 10mM Tris HCl (pH
8.3), 50mM KCl,
1.75 mM MgCl₂**Amplificación positiva y sensibilidad control**

Se emplea DNA de *B. burgdorferi* B31 hervido (ATCC35210) el uso de reacciones alto-positivas y bajo-positivas proporciona la información útil del control. La concentración del DNA de la prueba puede ser determinada como a continuación. Prepare una serie de 10 diluciones de DNA de *B. burgdorferi*. Amplifique alícuota de 5µl de cada dilución. Escogido dos de las últimas diluciones del DNA que hallan producido reacción de amplificación positiva para los controles de rutina

Control específico

1ng de cada uno de *Borrelia hermsii* ATCC35209 y *Treponema pallidum* ATCC27087

Amplificación negativa

5 µl de agua adicionada directamente a la mezcla maestra (triplicada) de PCR

***Yersinia pestis* en pulga**Oligonucleótidos para la detección de *Y. pestis* en pulga

Función	Nombre	Nucleótido secuencia, 5' a 3'
Primer	Yp1	ATC TTA CTT TCC GTG AGA AG
Primer	Yp2	CTT GGA TGT TGA GCT TCC TA
primer	Yp3	ATA CTG TGA CGG CGG GTC TG

Treponema pallidumOligonucleótidos para la detección de *T. pallidum*

primer	Código std	localización	Nucleótido secuencia, 5' a 3'
47-1	+	627 a 648	GAC AAT GCT CAC TGA GGA TAG T
47-2	-	1263 a 1284	ACG CAC AGA ACC GAA TTC CTT G
47-3	+	692 a 713	TTG TGG TAG ACA AGG TGG GTA C
47-4	-	1166 a 1187	TGA TCG CTG ACA AGC TTA GGC T
Bg-1 ^b	-	54 a 73	GAA CTT CAT CCA CGT TCA CC
Bg-1 ^b	+	-195 a - 176	GAA GAC CCA AGG ACA GGT AC

Iniciador: 0.6µM de cada primer
Desoxirribonucleótidos**trifosfatados:** 400µM de cada
Desoxirribonucleótido**Polimerasa:** 0.5 µl de AmplyTaq
(Perkin Elmer Cetus)**Amortiguador:** 2x, 10mM Tris (pH
8.3), 100mM KCl, 3 mM MgCl₂**Iniciador:** 1µl de los primers (47-1,
47-2, Bg-1, Bg-2)**Desoxirribonucleótidos**
trifosfatados: 1.25 dNTPs
(farmacéutico)**Polimerasa:** 1µl de Taq (2.5U)**Amortiguador:** 10x (100 mM Tris
(pH 8.3), 500mM KCl, 1mg de
gelatina, 30 mM MgCl₂)**Amplificación positiva**10 pg de *Y. pestis* DNA (ATCC23053).**Amplificación negativa**45 µl de la solución buffer de PCR
adicionada como plantilla**Control positivo Pulga**Una pulga infectada con *X. cheopis* (o
otra especie) triturar en 50 µl de caldo
BHI y 100 células de *Y. pestis*.**Lisis alcalina****Control negativo**108 µl de suero normal, líquido amniótico,
o CSF**Control positivo**108 µl de suero normal, líquido amniótico
con 10³ organismos de *T. pallidum***Único Hervor****Control negativo**

50 µl de CSF normal u orina

Control positivo50 µl de CSF normal u orina con 10³
organismos de *T. pallidum***Método de vuelta****Control negativo**

200 µl de CSF normal u orina

Control positivo200 µl de CSF normal u orina con 10³
organismos de *T. pallidum***Reactivos control PCR****Control negativo**

Sin DNA (50µl de agua)

Control positivo2 ng de plásmido conteniendo el gen
duplicado y codificado de *T. pallidum* 47-
kDa proteína de la membrana en 50 µl de
agua o *T. pallidum* aislado de las pruebas
de inoculación en conejo

Chlamydia trachomatisOligonucleótidos para la detección de *C. trachomatis*

Función	Nombre	Nucleótido secuencia, 5' a 3'
Primer	Ct.0005	GAT AGC GAG CAC AAA GAG AGC TAA
Primer	Ct.06	TTC ACA TCT GTT TGC AAA ACA CGG TCG AAA ACA AAG
Primer	Ct.03t7	TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG TCT GCT TCC TCC TTG... CAA GCA AGT ATG CC
Primer 3SR	Ct.04	CCA TAG TAA CCC ATA CGC ATG CTG
Primer	CT220	ACC TTT CGG TTG AGG GAG AGT CTA
	CT447	AAT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG ACC AAT... TCT TAT TCC CAA GCG A
Detector PCR	CT321	AAC ACT GGG ACT GAG ACA CTG CCC A
primer	CT35T	AAT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGC TGG... CGG CGT GGA TGA GGC
	CT771	CCT GTT TGC TCC CTT GCT TTC GC

Mycoplasma pneumoniaeOligonucleótidos por PCR para la detección de *M. pneumoniae*

Función	Nombre	Nucleótido secuencia, 5' a 3'
Primer	MP5-1	GAA GCT TAT GGT ACA GGT TGG
Primer	MP5-2	ATT ACC ATC CTT GTT GTA AG
sonda	MP5-4	CGT AAG CTA TCA GCT ACA TGG AGG

Iniciador: 0.5 μ de cada primer (Ct.0005/06)**Desoxirribonucleótidos trifosfatados:** 0.2mM de cada dNTP**Polimerasa:** 2.5U de Taq polimerasa**Amortiguador:** 1x (10mM Tris (pH 8.3), 50mM KCl, 0.01% de gelatina), 2.5 mM MgCl₂**Iniciador:** 5 μ M de cada primer MP-1 y MP-2Desoxirribonucleótidos trifosfatados: **Polimerasa:** 100 U de Taq polimerasa (Perkin Elmer Cetus)**Amortiguador:** 5X 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 250mM KCl, 12.5 mM MgCl₂**Control negativo**

Se empleo agua como blanco en cada uno de los especímenes durante el proceso

Control positivoSe empleo *C. trachomatis* L2 (ATCC434) en diluciones de 100, 10, 1 y 0. usando una sonda control la sonda sin blanco para checar en segundo plano en el EIA**Amplificación positiva**De una transcripción Vitro-generada. La transcripción es sintetizada de un producto generado por PCR de RNA de *Chlamydia* para usar primers CT35T (que contiene un sitio de iniciación de la transcripción T7) y CT771 en un PCR de RNA**Amplificación negativa**10 μ l de agua destilada**Muestra control positiva**10 pg de RNA total de células McCoy infectadas con *C. trachomatis***Muestra control negativa**

10 pg de RNA de células McCoy no infectadas.

Amplificación control positiva.1ng de *M. pneumoniae* DNA. (FH ó PI 1428 en exceso)**Amplificación Control negativa** 45 μ l de agua destilada adicionada a la mezcla maestra de PCR**Control específico**100ng de DNA de *Escherichia coli* y 100ng de DNA humano.**Control positivo**La muestra es obtenida por diluciones secuenciales de *M. pneumoniae*.

Chlamydia PneumoniaePrimer para la detección de *C. pneumoniae*

Nombre	Nucleótido secuencia, 5' a 3'
HL-1	GTT GTT CAT GAA GGC CTA CT
HM-1	GTG TCA TTC GCC AAG GTT AA
HR-1	TGC ATA ACCTAC GGT GTG TT

Mycoplasma spOligonucleótidos por PCR para la detección de *Mycoplasma sp**

Función	Nombre	Nucleótido 5' a 3'
Primer universal Mycoplasma	Primer A	GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG
Primer universal Mycoplasma	Primer B	CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G
Primer universal Mycoplasma-RI	Primer A-RI	GAA TTC GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG
Primer universal Mycoplasma-RI	Primer B-RI	CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT GCT TAA G

*Este juego universal de primer es usado para la creación de un control positivo. Los nucleótidos en negritas son la secuencia de las enzimas de EcoRI reconocidas y cortadas.

Iniciador: 0.5mM de cada primer**Desoxirribonucleótidos****trifosfatados:** 100µM de cada
Desoxirribonucleótidos**Polimerasa:** 1.0U Taq polimerasa
(Perkin Elmer Cetus)**Amortiguador:** 10mM Tris (pH 7.4),
1mM EDTA, 3 mM MgCl₂**Amplificación positiva**

C. pneumoniae es desarrollada en células humanas, y es purificado con metilglucamina ditriazol. O bien pueden ser usados 10ng y 10pg de *C. pneumoniae* DNA. *C. pneumoniae* tipo TW-183 (ATCCVR2282) o AR-39 (ATCC53592).

Amplificación Negativa

Todos los componentes usados en la reacción, con adición o con agua estéril en lugar de la muestra.

Control Específico100ng de *Chlamydia trachomatis*.**Paciente Control Positivo**

Un espécimen disponible del paciente positivo.

Paciente Control Negativo

Muestra de un paciente negativo.

Iniciador: 2.5µl del primer A y B
(concentración final, 1.0µM), 2.0µl
de control positivo**Desoxirribonucleótidos****trifosfatados:** 1µl de cada dNTP
(concentración final de 200µM de
cada uno)**Polimerasa:** 0.25 µl de Taq
polimerasa (concentración final,
2.5U)**Amortiguador:** 10mM Tris-HCl, 50
mM KCL, 0.001% (p/V) de gelatina,
1.5 mM MgCl₂**Amplificación control positiva y
muestras**Adicionar de 300-500 moléculas de
control positivo por reacción.**Amplificación control negativa**2µl de *Mycoplasma* libre de agua.**Control negativo muestra**

2µl de medio de cultivo puro de tejido.

Legionella pneumophila.
***L. dumoffii* en agua**

Oligonucleótidos por PCR para la detección de *Legionella spp.*
Legionella pneumophila

Función	Nombre	Nucleótido secuencia, 5' a 3'
Primer	LEG1	GTC ATG AGG AAT CTC GCT G
Primer	LEG2	CTG GCT TCT TCC AGC TTC A
Probe	LEG3	GTC CGT TAT GGG GTA TTG ATC ACC A

L. dumoffii

Función	Nombre	Nucleótido secuencia, 5' a 3'
Primer	LDBKS1	ATA CAC GTG GTG GAG GTA C
Primer	LDBSK3	GCG GGC AAT ATC TTG CAT C
Probe	LDBKS4	GGA CAA TGC ACA GAA AAT CCT TGC C

Vibrio cholerae

Primer para la amplificación de la toxina subunidad A del cholera

Función	Nucleótido secuencia, 5' a 3'	Localización
CTX2	CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G	73-94
CTX3	CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC	614-636

Iniciador: 0.2µl de cada primer LEG1 y LEG2 (*L. pneumophila*) ó LDBKS1 y LDBK3 (*L. dumoffii*) (500181l por reacción)

Desoxirribonucleótidos trifosfatados: 200µM de cada Desoxirribonucleótidos

Polimerasa: 1.25U de Taq polimerasa (Perkin Elmer Cetus)

Amortiguador: 10mM Tris (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5 mM MgCl₂

Amplificación control positiva

1ng de *Legionella pneumophila* ó *Legionella pneumophila* DNA (una reacción)

Amplificación control negativa

10µl de agua destilada adicionada al buffer de la PCR.

Sensibilidad control

1ml de agua muestra un decrecimiento de concentración (10⁴ a 1 CFU/ml) de *Legionella pneumophila* y *L. dumoffii*

Iniciador: 100µM de cada primer CTX2 y CTX3

Desoxirribonucleótidos trifosfatados: 12.5x (2.5mM de cada nucleótido en agua destilada)

Polimerasa: 5U/ µl de AmplyTaq (The Perkin-Elmer Corp.)

Amortiguador: 10x 100mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0.1%(p/v) de gelatina, 15 mM MgCl₂

El control específico es *V. cholerae* 01ATCC14035 (Toxina positiva clásica, Ogawa) *V. cholerae* 01ATCC14033 (toxina negativa Inaba)

Escherichia coliPrimer designados para la detección de toxinas de *E.coli*

Toxina	Primer	Nucleótido secuencia, 5' a 3'	Localización
STI	STI-1	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG	243-266 127-144
	STI-2	CTT GAC TCT TCA AAA GAG AAA ATT AC	
STIa	STI-3ab	GAT TAC AAC AAA GTT CAC AGC AGT	220-243 141-167
	STIIa-1	ATT ACA TTA GAG ACT AAA AAG TGT GAT	
STIb	STI-3ab	GAT TAC AAC AAA GTT CAC AGC AGT	220-243 141-167
	STIb-1	ATC ACA CTA GAA TCA AAA AAA TGT AAC	
LTIa(p)	LTIa-1	TCT CTA TAT GCA CAC GGA GC	46-65 349-367
	LTI-2	CCA TAC TGA TTG CCG CAA T	
LTIb(h)	LTIb-1	TCT CTA TGT GCA TAC GGA GC	46-65 349-367
	LTI-2	CCA TAC TGA TTG CCG CAA T	
SLT-I	SLTI-1	CAG TTA ATG TTG TGG CGA AG	215-234 1089-1109
	SLTI-3	CTG CTA ATA GTT CTG CGC ATC	
SLT-II	SLTII-1	CTT CGG TAT CCT ATT CCC GG	288-307 747-766
	SLTII-2	GGA TGC ATC TCT GGT CAT TG	

Iniciador: 0.5µl de cada primer
Desoxirribonucleótidos trifosfatados: 5µl de 10x dNTPS
Polimerasa: 0.25µl Taq polimerasa
Amortiguador: 10X 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl 0.1%(p/v) de gelatina, 15 mM MgCl₂

E. coli STIa (STp) control positivo ATCC35401
 E. coli STIb (STh) control positivo ATCC43896
 E. coli LTIa (LTh) control positivo ATCC43886
 E. coli LTIb (LTb) control positivo HB101(Pew299)
 E. coli SLT-1 control positivo ATCC43890
 E. coli SLT-II control positivo ATCC43894
 E. coli SLT-I Y SLT-II control positivo ATCC43895
 E. coli control negativo sobre la mencionada toxina ATCC25922
 V.cholerae 01 clásico Ogawa, control positivo de la toxina cholerae ATCC14035

Shigella**Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC)**Oligonucleótidos para la detección de *shigella sp* y EIEC

Función n	Nombr e	Nucleótido secuencia, 5' a 3'
Primer	Sh-1	CTG GAT GGT ATG GTG AGG
Primer	Sh-2	GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC
Probe	Sh-AP	CCA TCT ATT AGA ATA CCT GTG

Iniciador: 0.2µg de cada primer SH-1 y Sh-2(100-µl por reacción)**Desoxirribonucleótidos****trifosfatados:** 0.4 mol de cada Desoxirribonucleótidos**Polimerasa:** 2.5U de Taq polimerasa**Amortiguador:** 10 mM Tris HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA**Amplificación control positiva**1ng y1 pg de DNA de *E. coli* HB101 conteniendo pBR325 o también con 2.5-kbp del fragmento HindIII de la invasión del plásmido de EIEC 140-MDa. El fragmento es duplicado conteniendo una asociación del invasor y *Shigella sp* del cual los primers (Sh-1 y Sh-2) y la sonda Sh-AP es usada de esta derivación.**Amplificación control negativa**

10µl de agua destilada adicionado al buffer de la PCR.

Espécimen fecal control positivo100 CFU de *E. coli* HB101 control positivo homogenizado con 1mL de un congelado. Con un espécimen de excremento no infectado.**Espécimen fecal control negativo**

El mismo espécimen no infectado homogéneo sin adición del control positivo.

Control específico

Shigella avirulenta. 140-MDa de un plásmido invadido a falta del locus correspondiente de primers de PCR Sh-1 y Sh-2 y la sonda usada Sh-AP.

Helicobacter pyloriOligonucleótidos por PCR para la detección de *H. pylori*

Función	Nombre	Nucleótido secuencia, 5' a 3'
Primer	CAM-2	TAA CAA ACC GAT AAT GGC GC
Primer	CAM-4	CAT CTT GTT AGA GGG ATT GG
Sonda	CAM-3	CGC TCT TTA GTT TTG GAG CG

Iniciador: 0.5µM de cada primer CAM-2 y CAM-4 (por 50-µl de reacción)**Desoxirribonucleótidos trifosfatados:** 200µM de cada Desoxirribonucleótidos**Polimerasa:** 1.25U de Taq Polimerasa (Perkin-Elmer Corp.)**Amortiguador:** 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8.3)0.01% (p/v)de gelatina, 1.5 mM MgCl₂**Amplificación control positiva**10pg de pCPY202(en cada reacción) 10 pg de DNA de *H. pylori* ATCC43504 (en cada reacción)**Amplificación control negativa**

Agua destilada 10 pg de DNA de placenta humana

Control específico10 pg de DNA de *Wolinella succinogenes* ATCC29543 (en cada reacción)

Staphylococcus aureus

Oligonucleótidos para la detección de toxinas génicas de *Staphylococcus*

Función	Nombre	Nucleótido 5' a 3'	Blanco
Primer	SEA1	TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA	Enterotoxina A
Primer	SEA2	GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA	Enterotoxina A
Primer	SEB1	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	Enterotoxina B
Primer	SEB2	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	Enterotoxina B
Primer	SEC1	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	Enterotoxina C
Primer	SEC2	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	Enterotoxina C
Primer	SED1	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	Enterotoxina D
Primer	SED2	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	Enterotoxina D
Primer	SEE1	TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC	Enterotoxina E
Primer	SEE2	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	Enterotoxina E
Primer	TSST1	ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA	Toxina del síndrome de shock toxico
Primer	TSST2	TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT	Toxina del síndrome de shock toxico
Primer	ETA1	CTA GTG CAT TTG TTA TTC AA	Toxina exfoliativa A
Primer	ETA2	TGC ATT GAC ACC ATA GTA CT	Toxina exfoliativa A
Primer	ETB1	ACG GCT ATA TAC ATT CAA TT	Toxina exfoliativa B
Primer	ETB2	TCC ATC GAT AAT ATA CCT AA	Toxina exfoliativa B

Iniciador: 1µM de cada dos primer específicos con respecto a su blanco genético

Desoxirribonucleótidos

trifosfatados: 200µM de cada dNTP

Polimerasa: 2.5 µl Taq polimerasa

Amortiguador: 5x TBE, 54g de Tris base sigma, 27.5g de ácido Bórico sigma y 20 ml de 0.5M de EDTA di sódico

Amplificación positiva y controles específicos

S. aureus ATCC13565 o LCDC88-0009 (SEA/sea); ATCC14458 (SEB/seb); ATCC19095 (SEC-1/sec-1); ATCC23235 (sed/sed); ATCC27664 (SEE/see);

LCDC82-615 (TSST-1/tst); LCDC88-8902(ETA/eta); LCDC88-8620 (ETB/etb).

Amplificación negativa y control específico.

5µl de agua destilada

Streptococcus pyogenes ATCC12351 (NY-5) (speA+ speB+speC).

Hongos***Cryptococcus neoformans***

Primer fúngicos

Tipo	Nombre	Nucleótido secuencia, 5' a 3'	Localización en blanco
<i>C.neoformans</i> identificación general.	NS1	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	5'
	NS8	TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA	3'
	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG A	5'
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	3'
<i>C.neoformans</i> específico	CN4	ATC ACC TTC CCA CTA ACA CAT T GAA GGG CAT GCC	3'
	CN5	TGT TTG AGA G TTT AAG GCG AGC CGA CGT CCT T	5'
	CN6	(GTG) ₅ (GACA) ₄ GAG GGT GGC GGT TCT	3'
PCR ----- fingerprin t g			Random ^b Random ^b Random ^b

Pneumocystis carinniPrimer oligonucleótidos para la amplificación de *Pneumocystis carinni* 5S rDNA.

Nombre	Función	Nucleótido secuencia, 5' a 3'
5S-sense	Primer	AGT TAC GGC CAT ACC TCA GA
5S-antisense	Primer	AAA GCT ACA GCA CGT CGT AT

Iniciador: 0.5µl de cada primer de 50µM**Desoxirribonucleótidos****trifosfatados:** 2mM de cada dNTP
Polimerasa: 0.2µl de Taq polimerasa (5U/µl Perkin-Elmer Corp.)**Amortiguador:** 5.0 µl de 10x Taq polimerasa buffer (Perkin-Elmer Corp.)**Amplificación positiva control de identificación***C.neoformans* DNA

Reacción entubo con un primers fúngico universal its1-its4, el cual debe rendir 600-bp de producto en todo el año, provisto de suficiente DNA.

Amplificación positiva Control del PCR digital.Muestra de DNA de ambas variedades de *C.neoformans***Amplificación Control negativa**

Agua destilada en lugar del DNA.

Iniciador: 50pmol de cada primer 5S-sense y 5S-antisense**Desoxirribonucleótidos****trifosfatados:** 200µM de cada desoxirribonucleótido triposfato
Polimerasa: 2.5U de Taq DNA polimerasa**Amortiguador:** 10 mM Tris(pH9.0), 50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂

Resumen

Las infecciones que se producen en diferentes partes del cuerpo humano son producidas por diferentes microorganismos como bacterias y hongos causantes de enfermedades, y otros más que se presentan como flora normal no patógena, que en casos de pacientes inmunosuprimidos, con cáncer, VIH y diabetes se pueden manifestar infecciones producidas por el crecimiento desmoderado de estos microorganismos, sin contar las infecciones obtenidas de diferentes formas debidas a alimentos, por contacto directo en el caso de las enfermedades de transmisión sexual y algunos centros de concentración de gente, como baños, albercas y hospitales.

Debido a esto es necesario conocer los distintos microorganismos que existen como flora normal y los posibles contaminantes patógenos en el individuo, para facilitar un mejor diagnóstico.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es la técnica más empleada por la sensibilidad que presenta la facilidad y rapidez para obtener millones de copias en cuestión de minutos, además de que la cantidad de muestra para su realización es menor que la cantidad que se emplea en otras técnicas como Southern y Northern que emplean hasta 10 mg de muestra, que en la mayoría de los casos no garantiza la calidad para la realización del estudio.

Debido a que en algunos de los casos es difícil el diagnóstico de algunos de los microorganismos, debido a sus exigencias de crecimiento y desarrollo, con la PCR se puede llevar a cabo de una manera más fácil y sencilla.

Lo importante de esta técnica para el diagnóstico microbiológico es que el fundamento es el mismo en todas, el conocimiento de los pasos esenciales de la división celular, la replicación del DNA y su estructura y propiedades. Generaliza la técnica para todo tipo de aplicaciones en cuanto a material genético, pero la principal desventaja es que para la identificación de la especie de un microorganismo, es específica en el uso y empleo de: blancos sondas y primers lo que lo hace complejo, específico y selectivo a la vez, es decir que para cada especie el método es específico, aunque tome punto de partida de una secuencia genética en común, género o familia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Panduro Arturo. Biología Molecular en la Clínica. 1ª ED. México: McGraw-Hill Interamericana; 2000.
2. Watson D James, A. Baker Tania. Biología Molecular del Gen. 5ª ED. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2006.
3. Luque Cabrera J, Herráez Sánchez A. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Madrid, España: Harcourt; 2001
4. Passarge Eberhard MD. Genética Texto y Atlas. Segunda Edición. Buenos Aires Argentina. Editorial Médica Panamericana S.A. enero del 2004.
5. Liébana Ureña José. Microbiología Oral. 2ª ED. Madrid España: McGraw-Hill Interamericana; 2002.
6. Negroni Marta. Microbiología Estomatología Fundamentos y Guía Práctica. Argentina: Editorial Medica Panamericana; 2006.
7. Jiménez C Enedina. Biología Molecular en el Diagnóstico Clínico. México, DF: McGraw-Hill Interamericana; 1998.
8. Jiménez Cardoso Enedina. Manual de Técnicas de Biología Molecular Básica. México: Editorial prado, S.A. de C.V; 2004.
9. Karp Gerald. Biología celular y molecular. 1ª ED. México DF: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V; 1998.
10. Ausina Ruiz Vicente, Moreno Guillén Santiago. Tratado Seimic de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid España: Editorial Panamericana; 2006.
11. Brock Thomas. Microbiology. Edición sexta. Estado de México: Editorial. Prentice Hall, 1991.
12. Hatful Graham F. Molecular Genetics of Mycobacteria. EUA: Editorial. ASM press Washington DC; 2000.
13. Koneman, Elmer W.K, Diagnóstico Microbiológico. Edición Quinta. España: Editorial Panamericana; 1999.
14. Persing David H. Diagnostic Molecular Microbiology. Washington: Editorial. American society for Microbiology, 1993.
15. Arambarre Reyna Gloria, López Mendoza Rosario y otros. Paquete Didáctico de Genética Para Biología. Primera Edición. Editorial Biotegen. 1998.
16. García J A. Rodríguez J J Picazo. Microbiología Médica. Madrid España: Editorial Harcourtbrace: 1998.
17. Sánchez Vega José Trinidad. Tay Zavala Jorge. Fundamentos de Microbiología y parasitología Médicas. México: Editorial Méndez Editores; 2003.
18. Brook Geo F. Batel Janets. A. Morse Stephen. Microbiología Médica de Jawetz Menick Adelbergg. 17ª ED. México DF: Editorial El Manual Moderno; 2002.
19. Pumarda A. Rodríguez Torres A. García Rodríguez J.A. Microbiología y parasitología Médica. 2ª ED. España: Ediciones Científicas y Técnicas S A; 1994.
20. Murray PR. Kobayaski GS. Pfaller MA. Rosental KS. MicroBiología Medica. 4ª ed. Madrid España: Elsevier Mosby inc; 2002.
21. Diaz R. Gamazo C. López Goñi I. Manual Practico de Microbiologia. 2ª ed. España: Editorial Masson S A; 2000.
22. Davis BD. Dulbecco R. Eisen HN. Tratado de Microbiologia. 4ª ed. México: Salvat Editores S A; 1996.
23. García Del Valle Araceli. Zamudio Durán Maria de las Mercedes. Manual de Biología Médica 9º semestre. Carrera Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México: publicación Elaborada por el departamento de impresión de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 1998
24. Prescott Lansing M., Harley John P, Klein Donald A. Microbiología. 4ª ED. España: McGraw-Hill Interamericana; 1999
25. Diaz Ramon. Gamazo Carlos. Lopez-Goñi Ignacio. Manual practico de microbiologia. 2ª Edición. Barcelona Espana: editorial Masson; 1999

26. Betty A. Forbes. Daniel. F. Sahm. Alice S. Weissfeld. Bailey y Scott. Diagnóstico microbiológico. Undécima edición. Buenos Aires Argentina: Editorial medica panamericana; 2004
27. Kolman Jan. Klaus-Heinrich Rohm. Bioquímica. 3ª edición. Madrid España: editorial panamericana; 2004
28. Guillem Prats. microbiología clínica. España; Editorial médica panamericana.2006.
29. Lehninger Albert L. Principios de Bioquímica. 4ª edición. New York: Editorial W.H. Freemanand company; 2005
30. Lodish. Berk. Matsudaira. Kaiser. Krieger. Scutt. Biología Celular y Molecular. 5ª edición. Buenos Aires Argentina: Editorial Medica Panamericana;2005
31. Duerden B. I. Microbiología de las enfermedades infecciosas. 1ª edición. México: Editorial Limusa Editores,1993
32. Wallach Jacques. Interpretación clínica de las pruebas de Laboratorio. 4ª edición. Barcelona España: Editorial Masson, S. A.:2003.
33. David H. persing. Thomas F. Smith. Fred C. Tenover. Thomas J. White. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. Washington, D.C: Editorial American Society for Microbiology: 1993.
34. Sachse Konrad. Frey Joachim. Methods in Molecular Biology. PCR Detection of Microbial Pathogens. USA. Editorial Humana Press, Totowa, New Jersey. 2003.
35. Woodford Neil. Alan P. Jonson. Methods in molecular Medicine. Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications. USA. Editorial Humana Press, Totowa, New Jersey: 1998.

VI. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

A. concepto

La inmunidad (del latín, *immunis*, libre de carga) alude a la capacidad general de un huésped de resistir a una determinada infección o enfermedad. La respuesta inmunitaria resultante, tiene como consecuencia una serie de acciones defensivas específicas y complejas, extensamente distribuidas por todo el cuerpo del animal. Cada respuesta inmunitaria concreta es una secuencia local peculiar de sucesos, configurada por la naturaleza del estímulo. La inmunología es la ciencia que se ocupa de las respuestas inmunitarias a los estímulos antigénicos y como se emplean en la resistencia frente a las infecciones. Comprende el estudio de la distinción entre los antígenos propios y extraños, y todos los aspectos biológicos, químicos y físicos de la respuesta inmunitaria. Algunos aspectos de interés es la estructura y función del sistema inmunitario y sus componentes, el crecimiento y diferenciación de las células y órganos del sistema inmunitario, la inmunización, el desarrollo y naturaleza de las hipersensibilidades y enfermedades autoinmunes, cáncer, reacciones frente a los trasplantes, así como el empleo de la reacciones inmunológicas en pruebas y procedimientos el laboratorio.^{1,2}

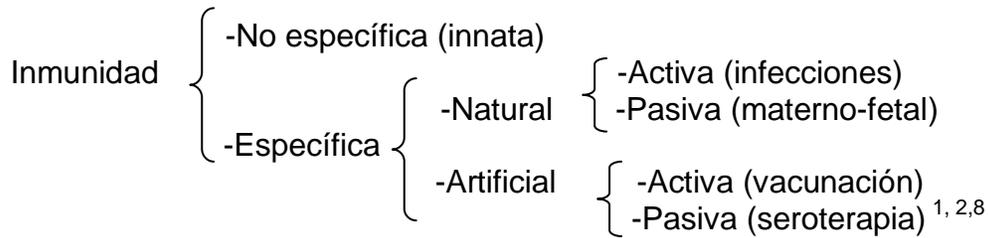
B. Inmunidad y Resistencia inespecífica

La capacidad de un individuo para mantenerse libre de infecciones depende tanto de su resistencia natural (inmunidad innata) como de la resistencia que pueda desarrollar o adquirir durante su vida (inmunidad adquirida). La inmunidad innata no depende del contacto previo con el agente infectante; la inmunidad adquirida se genera después del contacto con dicho agente y es específica para el mismo.

Los determinantes de la inmunidad innata o no específica involucran factores genéticos, raciales, hormonales, celulares y humorales, además de otros factores como la edad y las barreras de protección mecánica.

Por otro lado, la inmunidad específica puede adquirirse en forma activa (por infección natural) y en forma pasiva (por tratamiento con antisueros o sueros inmunes). También puede adquirirse pasivamente y de manera natural (como el caso de la inmunidad materno-fetal, donde los anticuerpos producidos por la madre atraviesan la barrera placentaria y se vierten a la circulación fetal), o puede inducirse de manera artificial (por vacunación).

La inmunidad adquirida depende de la existencia y función de un sistema celular altamente especializado y que los efectores de esta forma de inmunidad incluyen tanto elementos celulares como materiales solubles (de aquí los términos de inmunidad celular e inmunidad humoral). Una manera de agrupar y clasificar las diferentes formas de la inmunidad es:



C. Resistencia no específica

A lo largo del tiempo se ha ido recopilando una serie de observaciones, la mayor parte de las veces como resultado del conocimiento empírico, que señala la participación de mecanismos de inmunidad o resistencia no específica en la protección de los individuos contra los efectos adversos de los posibles agresores presentes en su medio ambiente. Puesto que estos mecanismos son muy variados y heterogéneos, se ha hecho el intento de agruparlos en diversas categorías dentro de las cuales podemos enumerar las siguientes:

1. Factores genéticos. Algunas especies de animales son naturalmente resistentes a la infección por ciertos microorganismos, otras son altamente susceptibles: los hombres y los cobayos son susceptibles a la difteria, la rata es una especie resistente. Los humanos son susceptibles a la lepra, los ratones son resistentes. Los borregos de Argelia son resistentes al ántrax, los borregos europeos son susceptibles.

2. Factores raciales y genéticos. En una época se considero que los indios americanos y los individuos de raza negra eran más susceptibles a la tuberculosis que los anglosajones, de raza blanca. Aun cuando todos los individuos se llegan a enfermar, en los blancos la enfermedad es localizada y autolimitante, en tanto que en los negros esta es diseminada y con mayor índice de mortalidad. La diferencia observada puede representar un fenómeno de selección natural conformado a lo largo de muchos años. Los estudios con gemelos han dado apoyo a la participación de factores genéticos (raciales) en la resistencia o susceptibilidad a la tuberculosis. Cuando dentro de una familia hay un hijo con tuberculosis, la posibilidad de que un hermano desarrolle la enfermedad es del 87% en el caso de los gemelos idénticos (univitelinos), del 26% en el caso de los gemelos no idénticos (heterocigóticos), del 26% cuando se trata de hermanos no gemelares, la posibilidad de que cualquiera de los padres enferme de tuberculosis es tan solo del 7%, aunque aquí participan otros factores adicionales.

2. Edad. La susceptibilidad de los animales a los agentes infecciosos está modificada de manera muy importante por la edad del individuo. Como regla general, la mayoría de las infecciones son más severas cuando ocurren durante las etapas extremas de la vida: en los muy jóvenes y en los muy viejos. Muchas enfermedades evolucionan con un curso moderado durante la edad adulta, pero son severas y muchas veces resultan mortales si ocurre durante la vida fetal. Tal es el caso de la toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) y de la rubéola, entre otras enfermedades. La toxoplasmosis puede adquirirse a cualquier edad, con consecuencias variables; si se adquiere en la etapa embrionaria, las lesiones que

causa son severas e irreversibles. Lo mismo ocurre con la rubéola cuyos efectos incluyen cataratas, sordera, lesiones cardiacas e incluso muerte fetal.

3. Factores humorales. Es bien conocido que en la diabetes mellitus existe una incapacidad para producir insulina, una hormona importante en el metabolismo de carbohidratos. En esta enfermedad es común encontrar infecciones asociadas al defecto hormonal (tuberculosis, afecciones de la piel, del tracto urinario, etc.), y muchas infecciones banales para el individuo sano resultan severas y persistentes en los pacientes diabéticos.^{2,1}

Por otro lado, se ha señalado que en las mujeres pre-púberes las infecciones vaginales por el gonococo (*Neisseria gonorrhoeae*) son frecuentes. En la etapa prepuberal, las niñas tienen bajos niveles de estrógenos y esto impide o limita la acumulación de glucógeno y los eventos metabólicos relacionados: la glucogenólisis, la glucólisis y la fermentación láctica llevada a cabo por el *Lactobacillus acidophilus* a partir del piruvato. El pH de la mucosa vaginal tiende a ser alcalino y esto favorece la proliferación del gonococo. Con la edad, se producen los niveles adecuados de los estrógenos que estimulan la acumulación de glucógeno en las células del epitelio vaginal y entonces las infecciones por el gonococo desaparecen.

4. Factores humorales en la superficie del cuerpo. La piel y las mucosas, aparte de funcionar como barreras físicas, poseen potentes mecanismos bactericidas y fungicidas.

- Piel. El ácido láctico en el sudor y los ácidos grasos en las secreciones sebáceas son algunos de los factores responsables de esta actividad microbicida. En los niños, sobre todo en aquellos con hábitos higiénicos deficientes, son comunes las infecciones de la piel y del cuero cabelludo por diversos tipos de hongos (*Microsporum*, *Epidermophyton*, etc.), y estas infecciones son resistentes a todo tipo de tratamiento. Sin embargo, la mayoría de las veces las infecciones desaparecen la época de la pubertad para no volver a aparecer después. Se postula que los cambios en la composición de las secreciones sebáceas (regulados por cambios hormonales) son los responsables de este efecto antifúngico. Antes de la pubertad los niveles de los ácidos grasos saturados de 8 (caprílico) a 11 (undecílico) carbonos son más bajos que durante y después de la pubertad. Estos ácidos muestran actividad fungicida in Vitro. Aparte de estos ácidos, el sebo contiene ácido oleico, un ácido graso no saturado con actividad bactericida.

La capacidad de las secreciones sebáceas para inhibir y matar a diversos hongos también explica el por que el hongo *Trichophyton* (causante del pie de atleta) ataca exclusivamente a los espacios interdigitales, las plantas y los lados del pie, ya que estas áreas carecen de glándulas sebáceas.

- Mucosas. El moco de las mucosas genital, respiratoria, ocular y oral, posee actividad bactericida y viricida. Por un lado. El moco superficial, funcionando como adhesivo, atrapa todo tipo de partículas (incluyendo microorganismos) y facilita su eliminación. En el tracto respiratorio, la presencia de cilios y su movimiento ciliar barre constantemente el moco (y las partículas atrapadas) hacia el tracto digestivo donde el material es deglutido y posteriormente digerido por el jugo gástrico. Por otro lado, el moco contiene mucoproteínas las cuales interaccionan con diversos microorganismos e impiden

sus absorción a las células epiteliales. En el caso de la influenza, la infección se establece cuando una enzima viral (una neuroaminidasa) hidroliza un oligosacárido presente en las células del epitelio del tracto respiratorio, permitiendo así la entrada del virus. En el moco, las mucoproteínas presentes interaccionan con el virus e impiden el contacto de este con las células epiteliales, evitándose la infección. El moco contiene además lisozima, una enzima capaz de lisar microorganismos que contienen ácido murámico en sus pared (la mayoría de los microorganismos Gram+ tienen este componente y son susceptibles a la acción de la lisozima).

5. pH. La importancia del pH en la resistencia no específica se infiere de observaciones como las siguientes: aunque se han podido aislar los microorganismos del contenido estomacal, el estómago mantiene su carga microbiana extremadamente baja debido a su alta acidez; no obstante, en el caso de aclorhidria los individuos suelen desarrollar infecciones gastrointestinales severas por patógenos, como el *Vibrio cholerae*, ingerido por la vía oral. Del duodeno y del yeyuno ya se puede aislar un mayor número de microorganismos, aunque este es todavía limitado si se compara con la flora microbiana del intestino grueso. El intestino grueso está saturado de microorganismos de diversos tipos, pero debido a los diferentes mecanismos de antibiosis operantes, esto usualmente no resulta en enfermedad.

6. Tensión de oxígeno. La importancia de este factor se visualiza claramente en el caso del tétanos (causado por *Clostridium tetani*) y en el de la gangrena gaseosa (*C. welchii*). Estos microorganismos son anaerobios y esporulado, y son incapaces de proliferar en los tejidos normales. Un animal sano puede resistir la inyección de cientos de esporas inoculadas intravenosamente; las esporas pueden persistir por años en los tejidos sin replicarse y sin causar enfermedad. Cualquier lesión que ocurra en estos animales, que entorpezca o bloquee la circulación sanguínea, conducirá a la caída en la tensión de oxígeno y facilitará la proliferación del microorganismo y el establecimiento de la enfermedad. En el caso del tétanos el bacilo al multiplicarse produce y libera una neurotoxina que difunde en los tejidos hasta alcanzar el sistema nervioso donde produce daño.

En el caso de la tuberculosis, el bacilo requiere para proliferar una concentración de oxígeno elevada. Quizá la alta concentración de oxígeno en el pulmón explique el porqué la tuberculosis es más frecuente en este órgano que en cualquier otro.

7. Temperatura corporal. Muchas enfermedades infecciosas se acompañan de fiebre. Los microorganismos pueden ser sensibles al incremento en la temperatura o este incremento puede alterar su fisiología y metabolismo impidiendo la producción de toxinas. La incapacidad de muchos microorganismos para sobrevivir a las temperaturas alcanzadas durante los estados febriles (38-39°C) se puede explicar, en parte, en función de dos observaciones: por un lado, en los animales ocurre una disminución en la concentración de hierro circulante durante el periodo febril, por el otro, en los microorganismos las temperaturas elevadas suprime la producción de proteínas que fijan ese metal estas dos circunstancias sugieren que la fiebre deprime la capacidad de los microorganismos para obtener o utilizar el hierro que necesitan para vivir.

8. Factores humorales al interior del cuerpo. Poco después de que un microbio se implanta en los tejidos ocurre una serie de cambios que modifican el medio ambiente (fisiológico) tisular. Estos cambios son originados por efecto de la reacción inflamatoria que sigue a la infección. La acumulación de células inflamatorias en el sitio de la lesión trae como resultado muchos cambios bioquímicos, entre ellos, la acumulación del ácido láctico con la consecuente caída en el pH tisular. El ácido láctico tiene efecto bacteriostático sobre muchas bacterias in Vitro. En los pacientes diabéticos, el mecanismo de los carbohidratos está alterado y las células inflamatorias obtienen su energía a partir del metabolismo de sus grasas; el metabolismo de las grasas también condiciona en las zonas de inflamación un medio tisular de pH ácido debido a la producción y acumulación de los ácidos alfa-cetoglutarico y beta- hidroxibutírico. Sin embargo el poder bacteriostático de estos ácidos es comparativamente menor que el efecto bacteriostático del ácido láctico.

Las estructuras químicas de estos ácidos se muestran a continuación:

$\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$	ácido láctico
$\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-COOH}$	ácido β -(OH) butírico
$\text{HOOC-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	ácido α -cetoglutarico

- Lisozima. La lisozima o muramidasa es una enzima que hidroliza la pared de diversos microorganismos Gram+ que tienen ácido murámico (figura 6-1).

Esta enzima está presente en grandes concentraciones en los gránulos de las células fagocíticas de donde se libera en los sitios de inflamación. Puesto que también existe en las secreciones de las mucosas conjuntivales (en las lagrimas), nasales, intestinales y en la saliva, esta enzima es de gran utilidad para el control de la multiplicación de multitud de microorganismos, tanto en el interior como en el exterior del cuerpo.

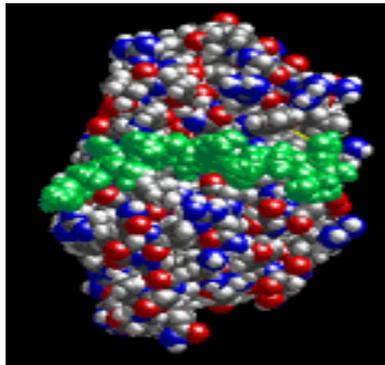


Fig. 6-1. La enzima lisozima se muestra con una molécula de carbohidrato unida en el centro activo. El sustrato se muestra color verde, y está ocupando el centro activo.³⁷

- Interferón. Cuando un animal sufre de una infección por un virus es muy raro que al mismo tiempo desarrolle otra infección por otro virus. Esto también se ha observado en cultivos de tejidos infectados en el laboratorio con diversos virus. Este fenómeno se le conoce como interferencia viral. En 1957, Isaacs y Lindenmann, trabajando con embriones de pollo infectados con el virus de la

influenza, encontraron una sustancia que llamaron interferón la cual se liberaba a los tejidos alantoideo y coriovitelino del embrión y era capaz de autolimitar la replicación del virus y de conferir resistencia a la infección viral cuando se transfería a animales sanos.

El interferón se libera de las células infectadas casi tan pronto como se producen los virus, esto es, mucho antes que los anticuerpos. El interferón impide la replicación viral en forma indirecta al estimular, en las células aún no parasitadas, la síntesis de proteínas antivirales. Estas interfieren con la replicación del genoma viral cualquiera que sea el nuevo virus infectante (figura 6-2).

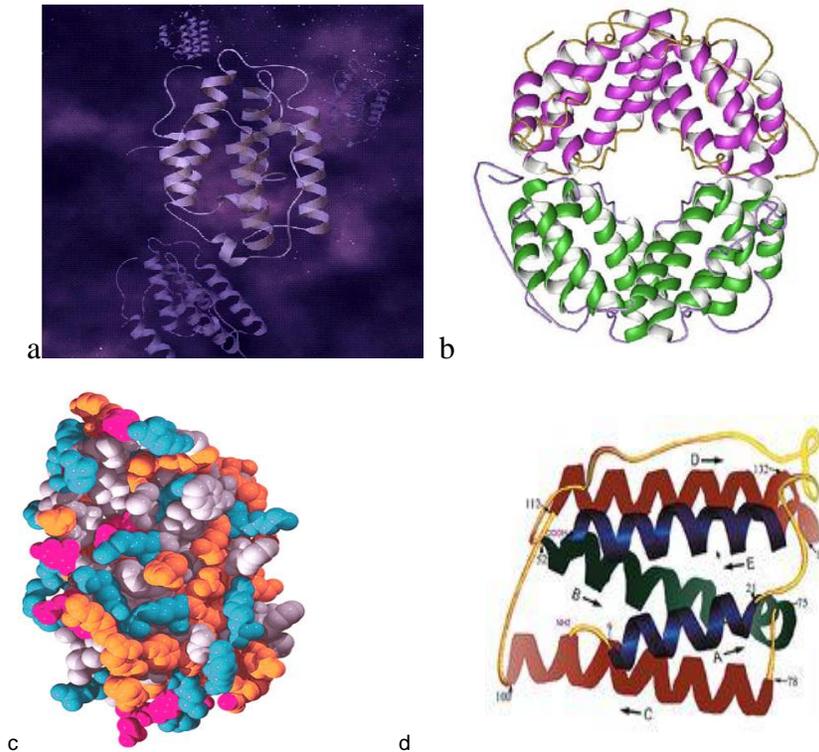


Fig. 6-2. a) Interferón estándar⁴¹, b) gamma³⁹, c) beta⁴⁰ y d) alfa³⁸.

Cuando las células huésped se infectan por virus, pueden producir interferón. Distintos tipos de células producen interferón. Se producen algunos tipos de linfocitos (Th) después de su activación por el antígeno. Los interferones actúan sobre otras células huéspedes para inducir un estado de resistencia frente a la infección vírica. Modificado de: Goldsby³²

- Complemento. El descubrimiento de Pfeiffer primero (1894), y de Bordet después, de un factor presente en el suero de los animales inmunes o convalecientes, capaz de destruir a los microorganismos, dio origen al estudio intensivo de lo que ahora llamamos complemento. El complemento no es un sólo factor, sino un conjunto de proteínas, muchas con actividad enzimática, cuando se activan en secuencia dan origen a las diversas manifestaciones de la reacción inflamatoria (figura 6-3). El sistema del complemento puede activarse de manera específica a través de la llamada vía clásica, o inespecíficamente a través de la llamada vía alterna o vía de la properdina. En el primer caso, se requiere de la presencia de anticuerpos reaccionando específicamente con su antígeno

homologo; en el segundo, los anticuerpos no participan. Los efectos inflamatorios y la lisis de células resultantes de la activación del complemento son totalmente inespecíficos, de aquí que el complemento se considere como un factor (de resistencia o de daño) inespecífico.

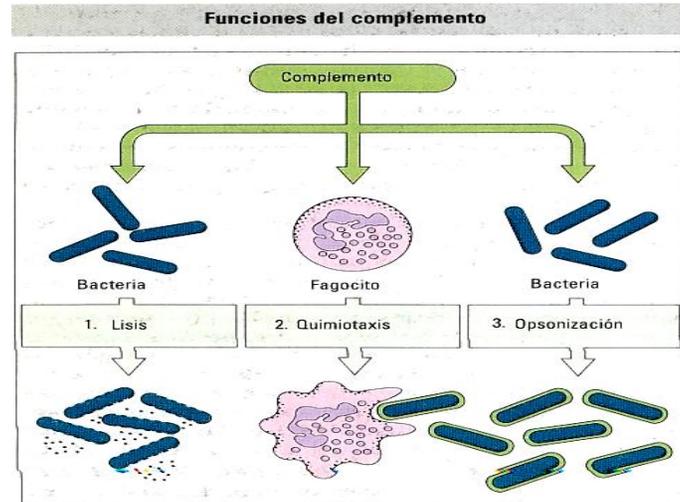


Fig. 6-3. Funciones del complemento.

1) El sistema de complemento posee una capacidad intrínseca para lisis las membranas celulares de muchas especies de bacterias. 2) Los productos del complemento liberados en esta reacción atraen los fagocitos hacia el lugar de aquella (quimiotaxis). 3) Los componentes del complemento revisten la superficie bacteriana (opsonización), lo cual permite que los fagocitos reconozcan a la bacteria y las engloben.³³

9. Factores celulares de resistencia no específica.

Fagocitosis. La afición de Metchnikoff por el estudio de animales acuáticos simples lo llevó a descubrir a las células fagocíticas (pronto supo que estas se encontraban en todos los animales, incluyendo al hombre) y al proponer la teoría fagocítica de la inmunidad (figura 6-4).

Los microorganismos, patógenos o no, que llegan a implantarse en los tejidos son ingeridos y posteriormente destruidos por un grupo de células llamadas fagocitos (figuras 6-5 y 6-6). Aunque son varias las células que pueden ingerir materiales solubles y micropartículas (por pinocitosis), la ingestión de macropartículas y de células es una función limitada a los llamados fagocitos profesionales. Estos incluyen fundamentalmente a los macrófagos y a los leucocitos polimorfonucleares (PMN) neutrófilos. En la sangre, los macrófagos circulan en un estado inmaduro y reciben el nombre de monocitos. Los monocitos pasan de la sangre a los tejidos donde se establecen por periodos prolongados y maduran hasta el estado de macrófagos. Los PMN neutrófilos, en cambio, circulan en la sangre como células maduras terminales y tienen una vida media corta (unas seis horas en circulación). Mientras que los fagocitos predominantes en la sangre son los neutrófilos PMN, en los tejidos los fagocitos predominantes son los macrófagos, también llamados histiocitos.

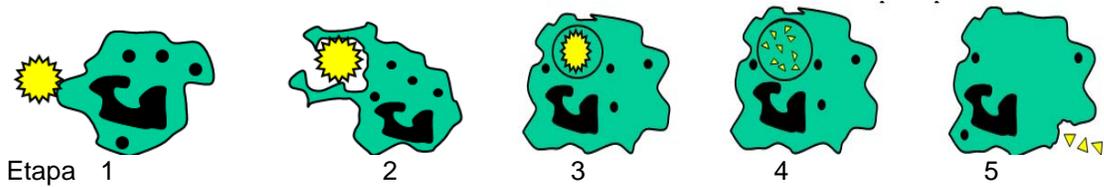


Fig. 6-4. Fagocitosis, Etapa 1) Reconocimiento de la adhesión, 2) Formación de pseudópodos, 3) Formación de un fagosoma, 4) Digestión intracelular y 5) exocitosis de los fragmentos.³⁵

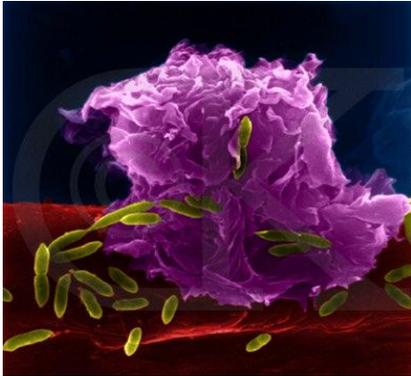


Fig. 6-5. Macrófago alveolar atacando a *E. coli*³⁶

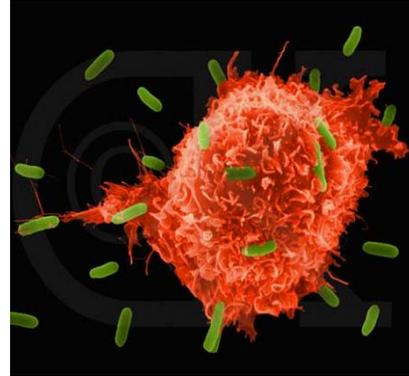
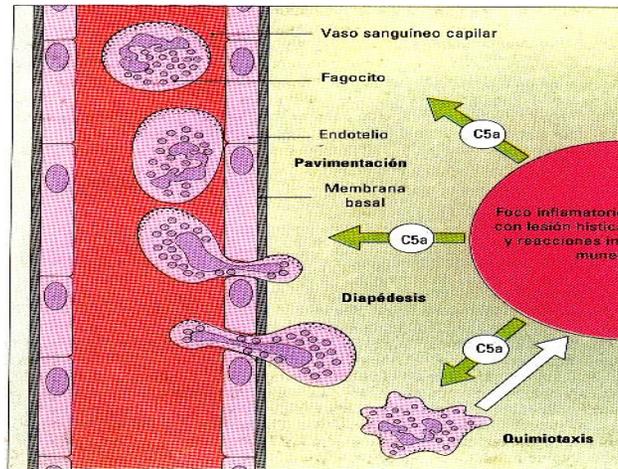


Fig. 6-6 Macrófago atacando a *E. coli*³⁶

En conjunto, las células fagocíticas poseen potentes mecanismos bactericidas, algunos son dependientes del metabolismo del oxígeno, otros son independientes del mismo. Podemos considerar que el proceso de la fagocitosis consta de la siguiente serie de etapas secuenciales que culminan con la muerte de los microorganismos ingeridos:

a) Quimiotaxis. Este es el proceso por el cual las células son atraídas hacia el sitio de lesión donde se han implantado los microorganismos. La atracción es mediada por materiales solubles denominados factores quimiotácticos, éstos son producidos por los microorganismos o bien son derivados de los tejidos del huésped. Los factores quimiotácticos (muchos de los cuales son pequeños polipéptidos) difunden a través del tejido y, en muy baja concentración, hacen contacto con receptores presentes en la membrana de las células fagocíticas. Este contacto se transmite como una señal al interior de la célula y esta responde con cambios bioquímicos diversos y con movimiento (figura 6-7).

Las funciones móviles de una célula dependen del buen funcionamiento del citoesqueleto. El citoesqueleto es una compleja red de estructuras fibrilares formadas por los microtúbulos y los microfilamentos. Los primeros están constituidos por una proteína llamada tubulina y los segundos por una proteína llamada actina.

Fig.6-7. Quimiotaxis³³

En lugar de la inflamación, la lesión histica y la activación del complemento por el agente infeccioso causan la liberación de péptidos quimiotácticos (por ej. el C5a, un fragmento del complemento y uno de los más importantes de esos péptidos). Tales péptidos se difunden hacia los capilares adyacentes y hacen que los fagocitos se adhieran al endotelio, dando lugar así al fenómeno de pavimentación. Seguidamente, los fagocitos introducen pseudópodos entre las células endoteliales y disuelven la membrana basal (diapédesis). A continuación, una vez que se hallan fuera del vaso Sanguíneo, comienza adquirir movimiento (quimiotaxis), encaminándose, dirigidos por el gradiente de concentración de los péptidos quimiotácticos, hacia el lugar de la inflamación.

b) Adherencia y opsonización. Una vez que las células fagocíticas circulantes hacen contacto con los factores quimiotácticos se adhieren a la superficie de los endotelios vasculares para buscar una salida entre las uniones de las células endoteliales. De aquí se desplazan hasta los sitios de lesión. En estos sitios los fagocitos se adhieren a los microorganismos. Este proceso de adherencia se hace más eficiente cuando previamente los microorganismos han interactuado con anticuerpos específicos y con el complemento. Al proceso de interacción de los microorganismos con factores del suero, que traen como consecuencia una mejoría en la función fagocítica de las células se le denomina opsonización (figura6-8) y a los factores solubles del suero responsables de este fenómeno se les llama opsoninas. Algunos anticuerpos (IgG) y componentes de complemento (C3b) tienen actividad opsonizante. La actividad opsonizante de los anticuerpos IgG y del complemento C3b se explica en función de que las células fagocíticas tienen receptores en su superficie, específicos para estos componentes.

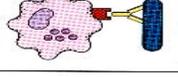
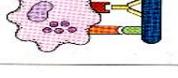
Opsonización		
Fagocito	Opsonina	Unión
1 	-	±
2 	C3b del complemento	++
3 	Anticuerpo	++
4 	Anticuerpo y C3b del complemento	++++

Fig. 6-8. Opsonización³³

Los fagocitos poseen una cierta capacidad intrínseca para unirse a las bacterias y a otros microorganismos (1), pero este fenómeno queda considerablemente reforzado si las bacterias son portadoras de complemento activado. En este caso tiene C3b unido, de modo que las células pueden fijarse a la bacteria por medio de los recetores C3b (2). Los microorganismos que activan poco o nada el complemento son opsonizados por el anticuerpo (Ab) que puede unirse al receptor Fc sobre el fagocito (3). Además el anticuerpo puede activar el complemento, y cuando el anticuerpo como el C3b opsonizan el microbio se refuerzan considerablemente la unión a los fagocitos (4).³³

c) Ingestión o endocitosis. La etapa que sigue a la adherencia de los microorganismos sobre la superficie de las células fagocíticas es la ingestión. Las células fagocíticas responden al contacto, extendiendo su membrana y emitiendo prolongaciones a manera de pseudópodos que terminan por rodear y englobar a los microorganismos (está actividad celular también depende de la funcionalidad del citoesqueleto) (figura 6-9). En este momento los microorganismos se encuentran en el interior de la célula, aunque contenidos en estructuras conocidas como vacuolas fagocíticas o fagosomas.

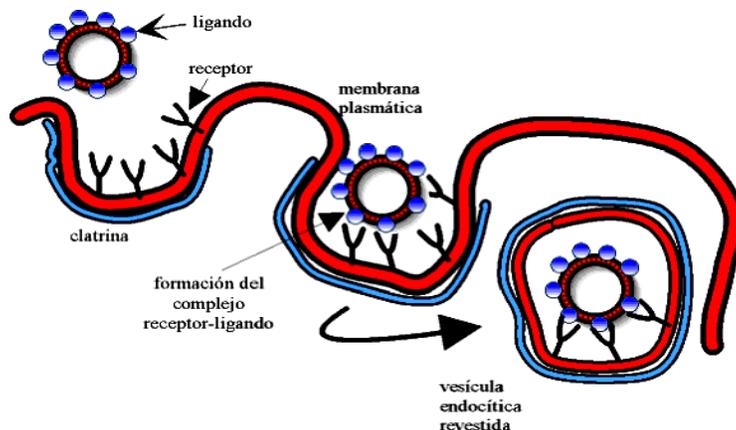


Fig. 6-9. Endocitosis.⁴²

Las células fagocíticas extienden su membrana y emiten prolongaciones a manera que terminan por rodear y englobar a los microorganismos

d) Cambios bioquímicos. El contacto entre agentes quimiotácticos o microorganismos (sobre todo si estos están opsonizados) y las células fagocíticas a través de sus receptores membranales dispara en la célula una serie de señales que finalmente se traducen en cambios bioquímicos diversos. Dentro de estos cambios bioquímicos se incluyen los siguientes:

- 1) Aumento en el consumo de oxígeno
- 2) incremento en el consumo de glucosa
- 3) aumento en la actividad del ciclo de las pentosas
- 4) incremento en la biosíntesis de lípidos
- 5) incremento en la producción de peróxido de hidrogeno y de varios metabolitos del oxígeno: radicales hidroxilo (OH), anión superóxido (O_2^-) y “siglote de oxígeno” (1O_2); todos ellos altamente tóxicos para la mayoría de las células
- 6) Caída en el pH, sobre todo dentro de la vacuola fagocítica,
- 7) activación de muchas enzimas hidrolíticas (proteasas, glicosidasas, DNA- y RNA-nucleasas, y lipasas).

e) Fusión fagosoma-lisosoma (fisión fagolisosomal). Las células fagocíticas poseen una gran diversidad de gránulos citoplásmicos. Aquellos relacionados con la función destructiva de las células reciben el nombre de lisosomas y son básicamente de dos tipos: los lisosomas primarios o gránulos azurófilos, y los lisosomas secundarios o gránulos específicos (figura 6-10). Estos gránulos contienen una gran diversidad de enzimas hidrolíticas las cuales están como zimógenos (enzimas no activas) en las células que se encuentran en reposo. Casi inmediatamente después de la formación de la vacuola fagocítica ocurre su contacto con los gránulos lisosomales y las membranas de ambas estructuras se fusionan permitiendo que el contenido lisosomal se vierta al fagosoma. En este momento se constituye la vacuola digestiva o fagolisosoma, en ella los microorganismos quedan expuestos al efecto tanto de los metabolitos del oxígeno como al de las enzimas lisosomales.

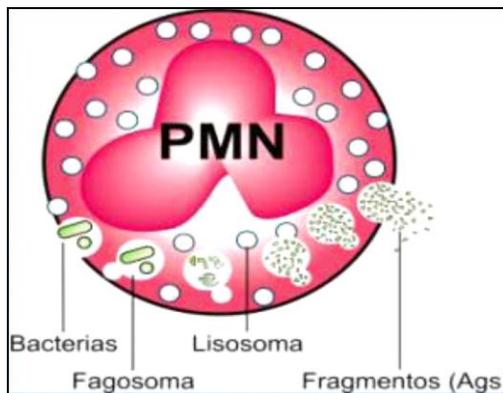


Fig. 6-10 .Función fagosoma-lisosoma.

Después de la formación de la vacuola fagocítica ocurre su contacto con los gránulos lisosomales y las membranas se fusionan permitiendo que el contenido lisosomal se vierta al fagosoma. Modificado de: Rojas; 2001²

f) Actividad microbicida. En conjunto, todos los cambios antes señalados son los responsables del efecto bactericida y citocida de las células fagocíticas; los radicales del oxígeno son intermediarios altamente reactivos que interactúan con diversos componentes de los microorganismos modificando su estructura o su función. Uno de los productos del metabolismo oxidativo de los fagocitos estimulado durante la fagocitosis es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este material, al ser hidrolizado por la mieloperoxidasa (una enzima lisosomal) genera intermediarios inestables que interactúan con haluros (principalmente Cl^- y I^-) y se convierten en poderosos agentes halogenantes ($HOCl$ y HOI) extremadamente tóxicos para los microorganismos ingeridos. Por su parte las enzimas hidrolíticas destruyen a los componentes microbianos y los degradan hasta sus unidades esenciales (aminoácidos, azúcares, lípidos, nucleósidos y nucleótidos) algunas de las cuales son reincorporadas por la célula en beneficio de su propio metabolismo; otros componentes son desechados a través de un mecanismo esencialmente inverso al de la endocitosis que se denomina exocitosis.

Mientras más evolucionados la fagocitosis forma parte de un conjunto de mecanismos defensivos del individuo, en los animales más primitivos la actividad fagocítica es quizá el único mecanismo de supervivencia que poseen. Las amibas, por ejemplo, obtienen su alimento a través del proceso de la fagocitosis y son capaces de ingerir grandes partículas (bacterias, levaduras y otros microorganismos) e incluso células como en el caso de las amibas patógenas que ingieren eritrocitos. Además de su capacidad para ingerir partículas por fagocitosis, las amibas también ingieren materiales solubles por pinocitosis.

En las especies evolucionadas, la actividad fagocítica de los macrófagos no sólo está relacionada con protección; juega además un papel importante en la inducción de las respuestas inmunes específicas. A través de la fagocitosis, los macrófagos atrapan e ingieren materiales antigénicos, los inactivan y los descomponen en sus constituyentes macromoleculares. La degradación posterior de los componentes macromoleculares genera fragmentos, algunos de los cuales resultan antigénicos. De esta manera son presentados a las células inmunocompetentes del individuo.^{2,1}

D. Inmunidad específica

Si se superan las barreras inespecíficas, se acude a la inmunidad específica, adquirida o adaptativa (la respuesta inmunitaria) para proteger al huésped. Este sistema consiste en diversos mecanismos inmunológicos en los cuales los linfocitos reconocen la presencia de determinados agentes o sustancias extraños denominados antígenos (inmunógenos) y actúan para eliminarlos. La eliminación se puede producir por destrucción directa del antígeno por los linfocitos o a través de proteínas especializadas, denominadas anticuerpos (inmunoglobulinas), que neutralizan la función del antígeno o lo marcan para su destrucción por otras células.^{1, 2, 3, 16,22}

1. INMUNIDAD ADQUIRIDA

La inmunidad adquirida alude al tipo de inmunidad específica que se produce después de la exposición a un antígeno adecuado, o después de la transferencia de anticuerpos o linfocitos precedentes de un donante inmune. La inmunidad adquirida se puede obtener de forma activa o pasiva, por métodos naturales o artificiales.^{1, 2, 3, 8, 16 22}

2. INMUNIDAD ADQUIRIDA NATURAL

La inmunidad activa adquirida natural se da cuando el sistema inmunitario de un individuo entra en contacto con un estímulo antigénico como, por ejemplo, una infección natural. El sistema inmunitario responde produciendo anticuerpos y linfocitos sensibilizados que inactivan o destruyen el antígeno. La inmunidad producida puede durar de por vida, como en el caso del sarampión y la varicela, o tan sólo unos pocos años, en el caso del tétanos.

La inmunidad pasiva adquirida natural implica la transferencia de anticuerpos de un huésped a otro. Por ejemplo, algunos de los anticuerpos de una madre gestante atraviesan la placenta y pasan al feto. Si la madre es inmune a las enfermedades como la polio o la difteria, esta transferencia placentaria proporciona también al feto y al recién nacido inmunidad contra estas enfermedades. Algunos otros anticuerpos pueden pasar de la madre a la descendencia con las primeras secreciones de la glándula mamaria (denominadas calostro). Desgraciadamente, la inmunidad pasiva adquirida de forma natural dura sólo un corto periodo de tiempo (semanas o meses).^{1, 2, 3, 8, 16 22}

3. INMUNIDAD ADQUIRIDA ARTIFICIAL

La inmunidad activa adquirida artificial se produce cuando a un animal se le administra una preparación de antígeno para inducir la formación de anticuerpos y linfocitos activados. Una vacuna consiste, por ejemplo, en una preparación de microorganismos muertos; de microorganismos vivos, debilitados (atenuados); o de toxinas bacterianas inactivadas (toxoides), que se administran a un animal para inducir su inmunidad artificialmente.

La inmunidad pasiva adquirida artificial se da cuando los anticuerpos que se han producido en un animal o in Vitro, por métodos específicos, se introducen en un huésped. Es de corta duración y sólo se mantienen unas pocas semanas. Un ejemplo sería la antitoxina botulínica producida en el cobayo y es administrada a un ser humano afectado por intoxicación alimentaria botulínica.^{1, 2, 3, 8, 16 22}

E. Tipos de inmunidad específica

La inmunidad específica se divide en dos subtipos: la inmunidad humoral y la inmunidad celular. Éstas trabajan en conjunto, permitiendo así una respuesta coordinada. A continuación se explica brevemente cada una de ellas:

1. Inmunidad Humoral: Mediada por *anticuerpos* (linfocitos B), orientada al control de microorganismos *extracelulares* y *toxinas*.
2. Inmunidad Celular: Mediada por linfocitos T, los cuales al sensibilizarse producen citotoxicidad por un lado y linfoquinas por otro, induciendo a un sistema macrofágico orientado al control de *microorganismos intracelulares* (*virus*).

Características de la respuesta inmune específica
Presenta 6 características de gran importancia:

-Especificidad: Se refiere a que la respuesta es *específica* para distintos antígenos. Esto se logra mediante el reconocimiento de que una porción particular del antígeno (epítipo) por parte de un receptor de membrana específico para dicho epítipo en la superficie de un linfocito.

-Diversidad: El número total de linfocitos específicos para cada antígeno, llamado repertorio antigénico, es extremadamente enorme. Se ha estimado que un individuo puede discriminar entre 10^7 y 10^9 distintos determinantes antigénicos. Este gran número depende de la variabilidad en la estructura de los sitios de unión de los receptores de los linfocitos.

-Memoria: Respuesta a subsecuentes exposiciones del mismo antígeno (respuesta secundaria). La memoria inmunológica se produce por *expansión clonal* de linfocitos específicos para un antígeno determinado. Esta respuesta secundaria es más rápida, más eficiente y de mayor magnitud que la respuesta primaria.

-Especialización: Se refiere al carácter especial y diferente de la respuesta inmune para cada antígeno. Además, tanto la inmunidad humoral como la celular son inducidas por diferentes clases de microorganismos o por el mismo pero en diferentes etapas de la infección.

-Autolimitación: Después de todas las respuestas inmunes normales, el sistema vuelve a su estado de reposo basal, también llamado homeostasis. Esto se logra eliminando el antígeno, que es el principal estímulo para la activación linfocitaria. Por otro lado, se estimulan mecanismos de regulación feedback negativo (o retroalimentación negativa) que inhiben la respuesta al antígeno.

-Tolerancia: Una de las propiedades más interesantes del sistema inmune. Corresponde a la capacidad de reconocer lo "propio" de lo "ajeno", respondiendo contra los antígenos externos y no contra el propio organismo. Así, el organismo no se ataca a sí mismo. Esto resulta gracias a la eliminación o inactivación funcional de linfocitos autorreactivos (linfocitos que expresen receptores para autoantígenos). La pérdida de auto-tolerancia conduce a las llamadas enfermedades autoinmunes.^{1, 2, 3, 8, 16 22}

F. Las células linfoides

Las células linfoides son las células que tienen alguna participación en la expresión de las respuestas inmunes específicas e incluyen, a los linfocitos y a los monocitos-macrófagos, aunque algunos consideran dentro del grupo a las células

presentadoras del antígeno o células accesorias (dendríticas, interdigitales y veladas), a las células K (killer) y las células NK (natural killer).

Los linfocitos, las células K y las células NK, son células redondas parecidas entre sí. Su tamaño oscila entre ocho y diez micras, tiene núcleo prominente y escasos organelos citoplásmicos. Los macrófagos y las células accesorias son células grandes, mayores de 12 micras, de forma que podría catalogarse de irregular a estrellada, con abundante citoplasma y núcleo proporcionalmente pequeño, y con múltiples organelos y vacuolas.

Los linfocitos son leucocitos pequeños, no fagocíticos, mononucleares, inmunológicamente competentes, o son precursores de este tipo de células. Carecen de gránulos citoplasmáticos susceptibles de tensión y se forman en los tejidos linfoides. Debido a que los linfocitos son las células clave de la respuesta inmunitaria específica, resumimos aquí su origen, circulación, procesamiento y funciones generales. Los linfocitos indiferenciados se originan de las células madre (stem cells) hematopoyéticas de la médula ósea. Son producidos en la médula ósea a gran velocidad (10^9 células al día). En los seres humanos, la médula ósea y el timo son los tejidos linfoides primarios. Es aquí donde se produce la maduración de los linfocitos. Algunos linfocitos emigran a través de los sistemas circulatorio y linfático al tejido linfoide secundario (bazo, tejido linfoide asociado a mucosas y ganglios linfáticos), donde producen colonias de linfocitos. Estos tejidos linfoides secundarios son los lugares en donde se produce la interacción entre los linfocitos y los antígenos.

Los linfocitos indiferenciados que emigran al timo experimentan un procesamiento especial y se convierte en linfocitos o células T (la letra T representa al timo). Algunos linfocitos T son transportados fuera del timo y penetran en el torrente sanguíneo, donde constituyen entre el 70 y el 80% de los linfocitos circulantes. Las células T que permanecen en el timo reciben el nombre de timocitos. Otras células T tienden a residir en diversos órganos del sistema linfático, como los ganglios linfáticos y el bazo. Esta diferenciación de las células T dependiente del timo se produce en la parte inicial de la niñez, en la adolescencia los órganos linfoides secundarios del organismo contienen generalmente un equipamiento completo de células T.^{1, 2, 3}

Los linfocitos B o células B se diferencian en el hígado fetal y en la médula ósea del adulto (la letra B deriva inicialmente de la bolsa de Fabricio). Las células B se distribuyen en la sangre y constituyen entre el 20 y 30 % de los linfocitos circulantes. También se alojan, junto con los linfocitos T, en los diferentes órganos linfoides.

Existe una población de células linfoides denominadas células citocidas naturales (o células NK del inglés Natural Killer) que carecen de características T o B. Las células NK no poseen los marcadores de superficie específicos de las células B o T, y se distinguen de ellas por la presencia de gránulos citoplasmáticos. Las células NK parecen desarrollarse a partir de linfocitos pretimicos.^{2, 8}

G. Función de los linfocitos

Las células plasmáticas son linfocitos completamente diferenciados. Son las principales células sintetizadoras de anticuerpos del organismo. Una vez producida la activación, las células plasmáticas responden secretando anticuerpos en la sangre y en la linfa. Los anticuerpos son glucoproteínas producidas por las células plasmáticas después de que las células B de su estirpe hayan sido expuestas a antígenos. Los anticuerpos se dirigen específicamente contra el antígeno que provocó su formación. Debido a que los anticuerpos son solubles en la sangre, la linfa y otros líquidos extracelulares, brindan la inmunidad humoral o inmunidad mediada por anticuerpos. La respuesta inmunitaria humoral defiende fundamentalmente contra bacterias, toxinas bacterianas y virus que penetran en los diversos sistemas de líquidos corporales.

Las células T no secretan anticuerpos. En su lugar, atacan: 1) a células del huésped parasitadas por virus o microorganismos, 2) a células tisulares trasplantadas de huésped a otro, y 3) a células cancerosas. También producen citocinas, mediadores químicos cuyo papel es potenciar y regular de manera específica el sistema inmunitario. Debido a que las células T deben establecer contacto físico con células dañadas o infectadas para destruirlas, se dice que proporciona inmunidad mediada por células (figura 6-11).

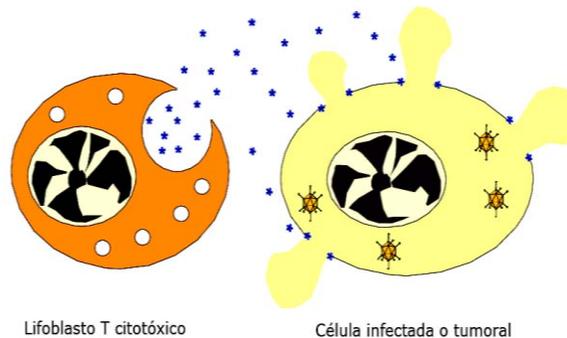


Fig. 6-11. Células T

Las células T o linfoblastos T citotóxicos son capaces de destruir a células infectadas por el virus y a células tumorales, mediante la producción de proteínas que se instalan en las membranas produciendo agujeros en ellas.³⁴

Las células NK, destruyen células tumorales y células infectadas por virus y otros parásitos (figura 6-12). Las células NK a menudo muestran citotoxicidad dependiente de anticuerpos. (Tabla 6-1)^{1, 2, 8}

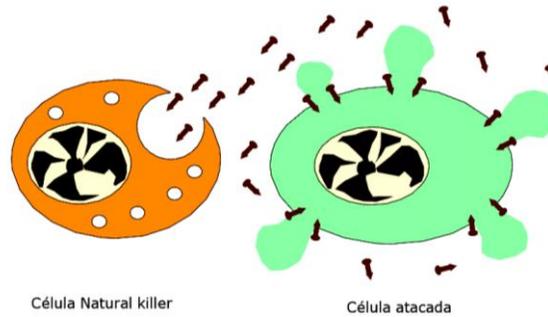


Fig. 6-12. Células asesinas naturales (Natural Killer NK).

Son células linfoides que se parecen a los linfocitos y que provocan la muerte de los microorganismos, células infectadas, células tumorales o células ajenas. No se sabe cómo las reconocen. Las destruyen uniéndose a ellas y fabricando "perforina" una proteína que, como su propio nombre indica, crea agujeros en la membrana de las células atacadas matándolas. Son pues células citolíticas.³⁴

Las células B se activan cuando se encuentra con alguno de sus antígenos específicos, es decir con uno cuyos epitopos encajen con los puntos de reconocimiento de ligandos de los anticuerpos situados en la membrana de esta célula. La unión antígeno-anticuerpo activa la célula B desencadenando una rápida serie de divisiones mitóticas (figura 6-13). De esta manera, una única célula B puede originar un gran número de clones o células idénticas. Algunas de estas células se diferencian y pasan a ser células plasmáticas que sintetizan y excretan gran cantidad de anticuerpos. Otras, por el contrario no se diferencian sino que permanecen en el tejido linfático, constituyendo las llamadas células B de memoria. La misión de estas células de memoria no es sintetizar anticuerpos sino permanecer como reserva por si en otra ocasión se ven expuestas al antígeno que provocó su formación, en cuyo caso producirán nuevamente células plasmáticas. Las células plasmáticas viven pocos días pero son capaces de sintetizar y segregar unas 2.000 moléculas de anticuerpos por segundo.^{2, 1}

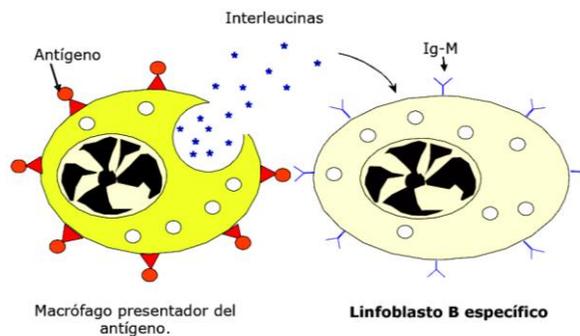


Fig. 6-13, Linfocito B

Si un linfocito B que lleve en su membrana un anticuerpo (Ig-M) que se pueda acoplar al antígeno del macrófago establece contacto con este, las interleucinas, lo transformarán en linfoblasto B que se divide activamente y en poco tiempo alcanza un elevado número de clones.³⁴

Tabla 6-1. Tipos y clases de linfocitos ¹

<i>Tipo de linfocito</i>	<i>Función</i>
Células T	Inmunidad mediada por células e inmunidad humoral
Clase citocida	
Células T _c (citotóxicas); llamadas también células CD8 ⁺ ²	Causan citólisis y muerte celular de células diana—células infectadas por virus y células tumorales—; importantes en la defensa del huésped contra patógenos intracelulares.
Clase que regula a otras células	
Células T _H (colaboradoras); llamadas también células CD4 ⁺	Ayudan a las células B a formar anticuerpos en respuesta al estímulo antigénico; estimulan la inmunidad mediada por células.
Células T _s (supresoras); llamadas también células CD8 ⁺	Cuando se mezclan con células T vírgenes, sin contacto previo con el antígeno o con células T efectoras, suprimen su actividad.
Células T _D o T _{DTH} (hipersensibilidad de tipo retardado)	Reclutan y regulan a diversos tipos de células sanguíneas inespecíficas y macrófagos durante la expresión de las reacciones de hipersensibilidad retardada (tipo IV)
Células B	Inmunidad mediada por anticuerpos (inmunidad humoral)
Clase	
Linfocito B	Tras la activación por el antígeno, las células B se diferencian en células que producen anticuerpo de la misma especificidad que su propio receptor. El receptor del antígeno de los linfocitos B (receptor de células B) es una molécula de inmunoglobulina de la superficie celular.
Células plasmáticas	Linfocitos B con diferenciación Terminal; principal célula secretora de anticuerpos del organismo. Se encuentra en los ganglios linfáticos, bazo y médula ósea.
Células NK (células citocidas naturales)	Citotoxicidad medida por células dependiente de anticuerpos e independiente de anticuerpos
Células	Células no B no T, que habitualmente tienen morfología granular; matan ciertas células tumorales, infectadas por virus y otros patógenos intracelulares; también participan en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

* CD quiere decir grupo de diferenciación (cluster differentiation), antígenos de diferenciación asociados a células.¹

Las citocinas son pequeños polipéptidos con actividad hormonal que son sintetizadas y excretadas por numerosas células (linfocitos, monocitos, fibroblastos, células endoteliales, etc). Muchas de ellas son autocrinas, aunque la mayoría son endocrinas. Cuando son producidas por los linfocitos, se llaman interleucinas, monocinas cuando son producidas por los monocitos y factores de crecimiento o de inhibición según actúen (Tabla 6-2).¹

Tabla 6-2. Subpoblaciones de linfocitos T y citocinas²

<i>Subpoblación de linfocito T predominante</i>	<i>Citocinas</i>	<i>Función</i>
CD4+ tipo 1	IFN γ IL-2	Hipersensibilidad retardada (respuesta inmune celular)
CD4+ tipo 2	IL-4 IL-5	Cooperación T:B
CD8+ tipo 1	IFN γ IL-2	Citotoxicidad
CD8+ tipo 2	IL-4	Regulación, ¿supresión?

Al igual que los linfocitos B, las células T disponen en su membrana celular de lugares de reconocimiento de antígeno (o receptores de las células T). A través de ellos, se unen a los antígenos que llegan al organismo, rechazando cualquier otro fragmento proteico que lleve unido un complejo antigénico principal de histocompatibilidad (MHC). El reconocimiento del antígeno representa el primer paso en esta inmunidad mediada por células. Además, las células T necesitan de un co-estimulador para ponerse en marcha. Este puede ser una de las citocinas antes descritas. En este momento, el linfocito T queda activado y comienza a proliferar rápidamente produciéndose un gran número de clones y otras células afines, entre las que se encuentran las células colaboradoras (T helpers), las células citotóxicas, las células de memoria y las células supresoras

- Células colaboradoras (T helper o T_H): también llamadas T₄ estas células llevan una proteína CD4. Al ser activadas segregan una variedad de citocinas que ayudan a la proliferación de los linfocitos B y T. Una de las más importantes es la interleucina IL-2 que es fundamental para poner en marcha la multiplicación de las células T. Además, la IL-2 actúa como cofactor para activar más células T_H, las células citotóxicas y las NK.
- Células citotóxicas T (C_T): estas células llevan la proteína CD8 y actúan como células citolíticas. Para lisar las células extrañas requieren de la activación por IL-2 u otras citocinas producidas por las T_H.
- Células T supresoras (T_S): estas células no son bien conocidas pero se cree que producen sustancias como el TGF- β que inhibe la proliferación de las células T y B y actuarían para contrarrestar la activación producida por las otras
- Células de memoria: están programadas para reconocer el antígeno invasor original. Si el mismo tipo de patógeno vuelve a invadir el organismo, las células de memoria son capaces de reaccionar con enorme rapidez de modo que el invasor es destruido antes de que comience a causar cualquier daño y antes de que aparezca cualquier síntoma²

Otras células derivadas de los linfocitos T son las llamadas de hipersensibilidad retardada que llevan en su membrana proteínas CD4 ó CD8 y que segregan interferones cuando son activadas. El interferón activa a los macrófagos los cuales, a su vez, destruyen al invasor.

Las células T citotóxicas son, quizás, las más importantes en la lucha contra los invasores. Tan pronto estos son reconocidos, dejan el tejido linfoide y emigran al lugar de la infección o de la inflamación. Allí, se unen a las células invasoras

que llevan el mismo antígeno que "disparó" su proliferación y las eliminan mediante dos mecanismos:

- segregando una citocina, la perforina capaz de hacer agujeros en las membranas de los invasores produciendo la lisis
- segregando la citotoxina, una proteína capaz de fijarse a algunas enzimas que regulan la síntesis del DNA del invasor.

Además las células citotóxicas producen interferón γ que, a su vez, activa neutrófilos y macrófagos, actuando en particular sobre sus efectos fagocíticos.^{1,2}

H. Antígenos

El sistema inmunitario distingue entre lo propio y lo extraño a través de un elaborado proceso de reconocimiento. Antes del nacimiento, el organismo de alguna forma realiza un inventario de las proteínas y otras diversas moléculas grandes presentes (lo propio), y elimina la mayoría de las células T específicas de los determinantes propios. Posteriormente, las sustancias propias pueden ser diferenciadas de las sustancias extrañas, y los linfocitos pueden producir reacciones inmunológicas específicas contra estas, que llevan a su eliminación.

Las sustancias extrañas no propias, como proteínas, nucleoproteínas, polisacáridos y algunos glucolípidos a las que responden los linfocitos, reciben el nombre de antígenos (del inglés antibody generators, generadores de anticuerpos). La mayoría de los antígenos son moléculas grandes, complejas, cuyo peso molecular supera en general los 10 000 dalton. La capacidad de una molécula de funcionar como antígeno depende de su tamaño y complejidad estructural.

En la mayoría de los contextos el término inmunógeno es sinónimo de antígeno. A veces se emplea inmunógeno para definir una sustancia capaz de inducir una respuesta inmunitaria, diferenciándola de un tolerágeno. Una forma que induce tolerancia una vez señalada esta distinción, el término inmunógeno se emplea como sinónimo de antígeno.

Cada antígeno puede tener varios determinantes antigénicos o epitopos (figura. 6-14). Estas zonas de la molécula estimulan la producción de anticuerpos específicos y se combinan con ellos. Los anticuerpos se forman con más facilidad en respuesta a determinantes que se proyectan hacia el exterior de una molécula extraña o a residuos terminales de una cadena polimérica específica. Desde el punto de vista químico, los determinantes incluyen azúcares, ácidos orgánicos y bases, cadenas laterales de aminoácidos, hidratos de carbono y grupos aromáticos.

El número de determinantes antigénicos sobre la superficie de un antígeno es su valencia. La valencia determina el número de moléculas de anticuerpo que se pueden combinar a la vez con el antígeno. Si existe un determinante, el antígeno es monovalente, sin embargo, la mayoría de los antígenos poseen más de un determinante y se denominan multivalentes. Los antígenos multivalentes desencadenan en general una respuesta inmunitaria más energética que los monovalentes.

Muchas moléculas orgánicas pequeñas no son inmunógenas por sí solas, pero pueden volverse inmunógenas si se ligan a una molécula portadora "carrier"

de mayor tamaño, como una proteína. No pueden estimular por sí mismas la formación de anticuerpos, pero pueden reaccionar con anticuerpos una vez formados estas pequeñas moléculas se denominan haptenos (del latín haptēin, agarrar). Cuando los linfocitos son estimulados por la molécula combinada, pueden reaccionar con el hapteno o con la molécula portadora. Un ejemplo de hapteno es la penicilina. Por sí misma, la penicilina no es inmunógena. Sin embargo, cuando se combina con ciertas proteínas del suero de los individuos hipersensibles, la molécula resultante inicia una respuesta inmunitaria alérgica grave y a veces mortal. En estos casos, el hapteno está actuando como determinante antigénico sobre la molécula portadora.^{1, 2, 8}

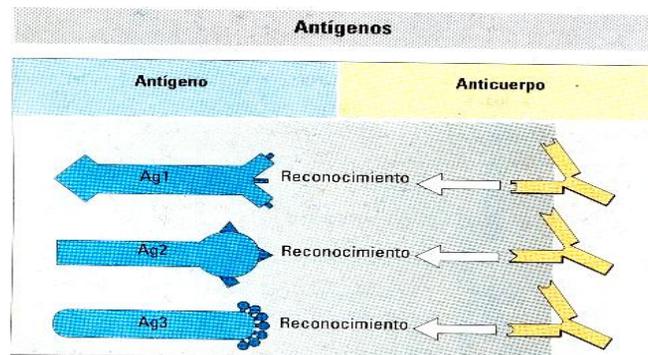


Fig. 6-14. Las moléculas que generan anticuerpos se llaman antígenos. Cada molécula antigénica tiene un conjunto de determinantes antigénicos, también llamados epitopos. Los epitopos de un antígeno (Ag1) suelen ser diferentes de los de otro (Ag2). Algunos antígenos (Ag3) tienen epitopos repetidos. Los epitopos son formas moleculares reconocidas por los anticuerpos y las células receptoras del sistema inmunitario adaptativo específico. Cada anticuerpo receptor reconoce un epitopo y no el antígeno completo. Incluso los microorganismos simples tienen muchos antígenos diferentes.

1. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS

Las células APC (del inglés antigen presenting cells, células presentadoras de antígenos) manejan a los antígenos en diferente forma, según se trate de antígenos de origen endógeno o de antígenos de origen exógeno. El esquema simplificado, y aun incompleto, que se tiene para cada caso podría describirse de la manera siguiente:

Antígenos exógenos. Los antígenos exógenos (figura 6-15), solubles o particulados, son atrapados primero por los macrófagos y otras células procesadoras de antígeno, y aquí son confinados en vesículas endocíticas o endosomas, donde posteriormente son inactivados (si se trata de microorganismos) y degradados hasta sus componentes moleculares al formarse el fagolisosoma. La participación de las hidrolasas membranales y citosólicas de los lisosomas resulta esencial en esta etapa del procesamiento del antígeno. Al disociarse el fagolisosoma, los productos de degradación que muestren mayor afinidad por los componentes de la membrana endosomal quedarán firmemente asociados a esta estructura y así serán posteriormente transportados a la superficie celular al reciclarse el material membranal del endosoma. Esta sería la situación de los péptidos antigénicos (epitopos) que, asociados a los antígenos

membranales de clase II, son expresados en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC). Un tercer tipo de materiales sin afinidad particular por los componentes lisosomales o endosomales, serán desechados por las células APC durante el proceso de la exocitosis.

Antígenos endógenos. En el caso de los antígenos que se originan intracelularmente (antígenos endógenos), como la mayoría de los antígenos de diferenciación y los neoantígenos que aparecen cuando una célula se transforma en tumoral, los antígenos resultantes de la replicación intracelular de los virus, y los antígenos liberados al citosol a partir de microorganismos que rompiendo la pared fagosomal escapan al citoplasma celular, donde ellos son degradados por proteasas citoplásmicas (proteosomas), y los fragmentos son acarreados por proteínas transportadoras (Tap) hasta las cisternas del retículo endoplasmático donde se asocian con moléculas de la clase I (codificadas por genes del complejo principal de histocompatibilidad, MHC), antes de ser conducidos a la superficie celular. Así, asociados a otras proteínas membranales, los fragmentos antigénicos son expuestos a los linfocitos. A esto se le llama “presentación de antígeno”, y a las células capaces de efectuar esta función (aunque no sean células procesadoras) se les denomina células presentadoras de antígeno. Los proteosomas son complejos proteínicos macromoleculares que tienen la capacidad de interactuar con moléculas antigénicas, las que, de alguna manera, son reconocidas como extrañas o como anormales. La interacción entre proteosomas y antígenos endógenos, conduce a la degeneración de los últimos y a la consecuente liberación de pequeños péptidos (de unos nueve aminoácidos), algunos de los cuales son portadores de los determinantes antigénicos de los antígenos macromoleculares originales. La figura 6-16 ilustra el procesamiento de los antígenos endógenos, su transporte a las cisternas del retículo endoplasmático, su asociación con antígenos de la clase I, y su transporte hasta la membrana celular externa de las APC.^{1, 2, 3, 8, 16 22}

2. RECONOCIMIENTO DE LOS FRAGMENTOS ANTIGÉNICOS PRESENTADOS POR APC.

Los fragmentos del antígeno apropiadamente presentados por los macrófagos y otras células presentadoras de antígenos, estimulan ahora a los linfocitos, pero no a todos los linfocitos, ni a cualquiera, sólo a aquellos que portan en su membrana un receptor específico para ese antígeno. Para la mayoría de los antígenos, los linfocitos primariamente estimulados son de la estirpe T (LcT). Los cambios metabólicos ocurridos durante el procesamiento de los antígenos por los macrófagos conducen a la síntesis de diversos factores con distintas actividades biológicas. Uno de los factores producidos por los macrófagos y la interleucina 1 (IL-1). La IL-1 liberada por los macrófagos estimula a los LcT vecinos y los induce a sintetizar, entre otras moléculas, un receptor membranal para otra interleucina, la interleucina 2 o IL-2. La IL-2 es producida por los linfocitos T y opera como un factor autocrino de proliferación para estas células. Los LcT estimulados por antígeno sufre un proceso de transformación blastoide que culmina con su división celular; este proceso proliferativo requiere de la continua presencia de IL-2 y de otros factores producidos por las células presentadoras de antígeno. Puesto que

hay varias subpoblaciones de linfocitos T, la respuesta inmune dependerá de la subpoblación preferencialmente activa. Por ejemplo, si el LcT estimulado es un linfocito mediador de respuesta inmune celular (LcTh1), la respuesta inmune resultante será fundamentalmente de tipo celular, con escasa o nula producción de anticuerpos. Los linfocitos estimulados producen, durante su etapa de proliferación y diferenciación, diferentes factores solubles (polipéptidos o proteínas de bajo peso molecular) originalmente conocidos como linfocinas y ahora englobados dentro del término más genérico de citocinas. Estas citocinas operan sobre diversas células y tienen diversos efectos. Si la célula estimulada es un linfocito T cooperador (LcTh2), el resultado preferencial será la producción de anticuerpos ya que estas células estimulan la actividad biosintética de los linfocitos B; si las células estimuladas corresponden al subgrupo de los LcT citotóxicos (LcTCD8+ tipo 1 de Bloom), la consecuencia será la expresión de su actividad citotóxica sobre las células blanco correspondientes; finalmente, si la población celular estimulada es una estirpe netamente reguladora (como la células T CD+ tipo 2 de Bloom), el efecto será la regulación (supresión/potenciación) de la respuesta inmunitaria global. En realidad la respuesta inmunitaria integral será el resultado de la suma algebraica de los efectos de las respuestas individuales inducidas al estimular el sistema inmunológico de un animal inmunocompetente.^{1, 2, 3, 8, 16 22}

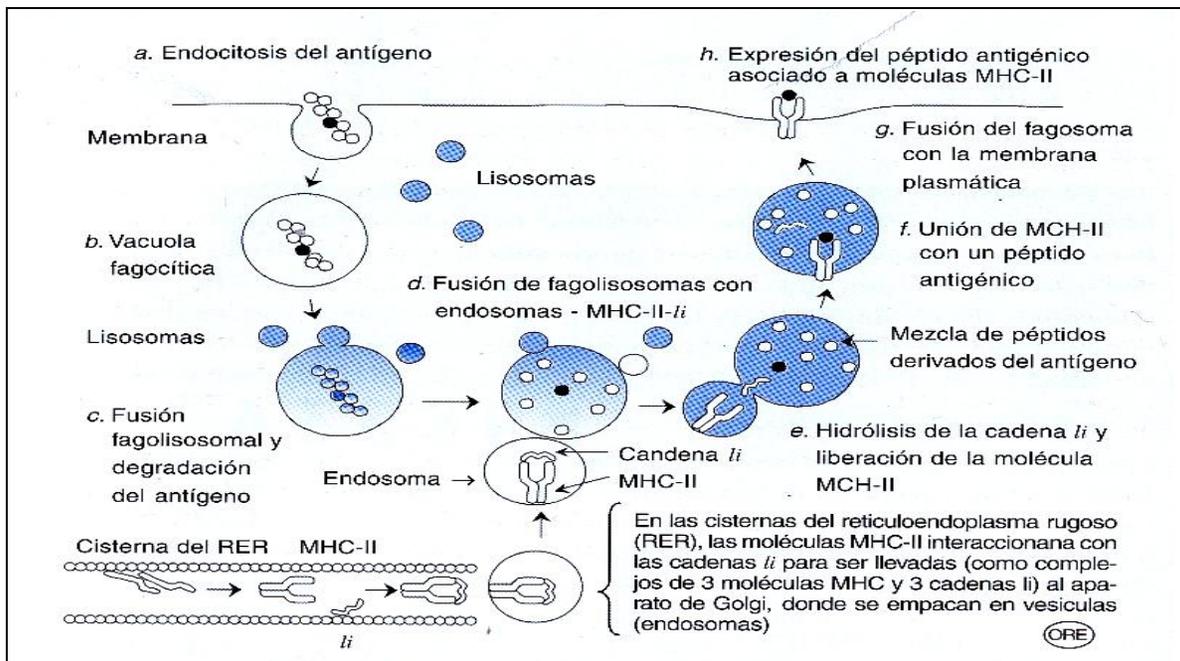


Figura 6-15. Presentación de Antígenos exógenos.²

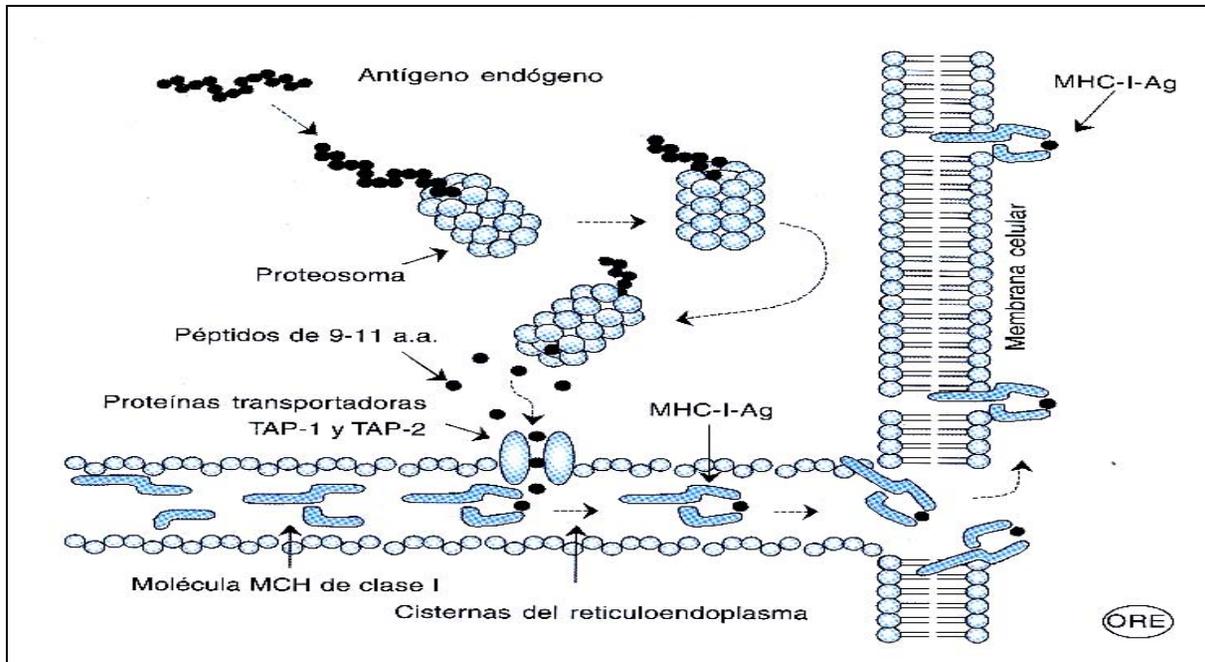


Figura 6-16. Presentación de antígenos endógenos.²

I. Anticuerpos

1. COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE

La molécula central de la respuesta inmune es el anticuerpo. Los anticuerpos también denominados inmunoglobulinas son proteínas específicas producidas por ciertas células como respuesta a la presencia de moléculas extrañas conocidas como antígenos. En el caso de las enfermedades infecciosas los antígenos son los componentes de la estructura del microorganismo invasor, que por lo general son proteínas o polisacáridos.

Los anticuerpos circulan en el suero del huésped y están presentes en las secreciones como la saliva. Estas moléculas tienen dos áreas activas: el sitio de unión al antígeno y el sitio de unión al fagocito.

Hay cinco clases diferentes de anticuerpo (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE). Cada una presenta configuraciones moleculares típicas. IgG, IgM, IgA e IgE, están más involucradas en combatir las infecciones. IgM es el primer anticuerpo producido luego del encuentro inicial con un microorganismo invasor. Con posterioridad sigue la producción del anticuerpo más abundante, IgG. La IgA se segrega en varios líquidos corporales y sobre todo protege las superficies corporales recubiertas por membranas mucosas. El aumento de IgE se asocia con varias infecciones parasitarias. Nuestra capacidad de medir la producción del anticuerpo específico es una herramienta valiosa para el diagnóstico de laboratorio de las enfermedades infecciosas.

Con respecto a los componentes celulares de la respuesta inmune, hay tres tipos principales de células: linfocitos B, T, y células Natural Killer. Los linfocitos B se originan de las células madre y se desarrollan en células B en la médula ósea antes de distribuirse con amplitud en los tejidos linfoides en todo el organismo. La

función principal de estas células es la producción de anticuerpos. Los linfocitos T también se originan en las células troncales de la médula ósea, pero maduran en el timo y se destruyen las células en forma directa o colaboran con las células B para regular la producción de anticuerpos. El desarrollo de las células Natural Killer que destruyen las células del huésped infectadas o malignas, es incierto. Cada uno de los tipos celulares se ubica de manera estratégica dentro del tejido linfoide en todo el organismo para aumentar al máximo las oportunidades de encontrar a los microorganismos invasores que drena el sistema linfático provenientes del sitio de infección.

La inmunidad mediada por anticuerpos se centra en las actividades de las células B y la producción de anticuerpos. Cuando las células B encuentran el antígeno microbiano se activan y comienzan una serie de acontecimientos mediados por las actividades de las células T Helper y la liberación de citocinas. Estas últimas median una explosión en la cantidad de células B que reconocen el antígeno y la maduración de las células B en células plasmáticas que producen grandes cantidades de anticuerpos específicos para el antígeno. El proceso también genera la producción de células B de memoria.

Los anticuerpos protegen al huésped de varias maneras:

- Ayudan a los fagocitos a ingerir y destruir los microorganismos
- Neutralizan las toxinas microbianas perjudiciales para las células y tejidos del huésped
- Estimulan la agrupación bacteriana (aglutinación) que facilita su eliminación del sitio de infección
- Inhiben la movilidad bacteriana
- Se combina con los microorganismos para activar el sistema complemento y la respuesta inflamatoria.

Debido a que por lo general una población de células B específicas activadas no está disponible con rapidez para todos los antígenos microbianos, la producción de anticuerpos se retrasa cuando el huésped se expone por primera vez a un agente infeccioso. Este retraso en la respuesta primaria de anticuerpos subraya la impotencia de las respuestas defensivas inespecíficas, como la inflamación, que actúan para contener los microorganismos invasores mientras comienza la producción de anticuerpos. Estos también destacan la importancia de la producción de las células B de memoria. En virtud de esta memoria, cualquier exposición adicional al mismo microorganismo provocará una producción rápida y abrumadora de anticuerpos protectores para que el organismo evite los retrasos característicos de la exposición primaria.

Algunos antígenos como las capsulas bacterianas y las membranas externas, activan las células B para producir los anticuerpos sin la intervención de las células T helper. Sin embargo esta activación no origina la producción de células B de memoria, de modo que frente a una reexposición a los mismos antígenos bacterianos, no habrá una respuesta de memoria rápida por parte del huésped.

Las células primarias que median la inmunidad mediada por células son los linfocitos T que reconocen y destruyen las células del huésped infectadas por microorganismos. Esta función es muy importante para la destrucción y eliminación de los microorganismos infectantes (por ejemplo; virus, tuberculosis,

algunos parásitos y hongos) que pueden sobrevivir dentro de las células del huésped donde están ocultos por acción de los anticuerpos. Por consiguiente, la inmunidad mediada por anticuerpos está dirigida a los microorganismos que se encuentran fuera de las células humanas, mientras que la mediada por células está dirigida a los que se encuentran dentro de las células humanas. Sin embargo, en muchos casos estas dos ramas del sistema inmune se superponen y actúan juntas.

Como en el caso de las células B las T deben activarse. La activación se lleva a cabo por interacciones de la célula T con otras que procesan los antígenos microbianos y los presentan en su superficie (por ejemplo macrófagos y células B). Las respuestas de las células T activadas son muy diferentes y depende del subtipo de célula. Las T helper activadas colaboran con las B para la producción de anticuerpos y facilitan la inflamación mediante la liberación de citocinas. Las células T citotóxicas interactúan con las del huésped que contienen los microorganismos y los destruyen. La subpoblación de células T helper o citotóxicas, activada es controlada por una serie muy compleja de acontecimientos moleculares y genéticos conocidos como complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que es una parte de las células que presentan los antígenos a las células T^{1,2,8, 16}

2. ESTRUCTURAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Los estudios de interacción de los diferentes fragmentos generados por hidrólisis enzimática con el antígeno permitieron establecer que los sitios de combinación (con el antígeno) de los anticuerpos se encuentran en el extremo amino-Terminal de las cadenas y que en cada sitio de combinación participa tanto una cadena pesada como una ligera. A cada fragmento producido por hidrólisis enzimática (papaína) que porta un sitio de combinación se le conoce como fragmento Fab (del inglés antígeno binding fragment). Al fragmento producido por hidrólisis con papaína, que no porta ningún sitio de combinación con el antígeno se le llama fragmento Fc (por que al purificarse adquiere una estructura cristalina).

El tratamiento de la unidad monomérica básica de los anticuerpos con la enzima pepsina genera un fragmento de alto peso molecular capaz aun de reaccionar y precipitar o aglutinar con el antígeno homólogo. Es decir, este fragmento mantiene los dos sitios de combinación del anticuerpo y, por esto, se denomina fragmento F (ab)₂.

El tratamiento de la misma unidad monomérica con 2-mercaptoetanol y su alquilación posterior con yodoacetamida, separa al monómero en cuatro cadenas polipeptídicas, dos de alto peso molecular (50-70 kD y 420-440 aminoácidos) llamadas por esto cadenas H (del inglés heavy, pesado), y dos de bajo peso molecular (22-25kD y 210-230 aminoácidos) o cadenas L (del inglés Light, ligero), ninguna de las cuales interacciona en forma estable con el antígeno.

Los estudios de secuencias de las cadenas pesadas y sus propiedades antigénicas llevaron a establecer que hay cinco clases fundamentales de cadenas pesadas (y de aquí, cinco clases o familias de anticuerpos o inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE). El término inmunoglobulina hace referencia a dos propiedades de los anticuerpos: una se refiere a que tiene relación con la

respuesta inmune, y la otra a que fisicoquímicamente son proteínas (la mayoría gama-globulinas).

Otra proteína estructural o antigénicamente relacionada con los anticuerpos, también se clasifican como inmunoglobulinas. Tal es el caso de las proteínas del mieloma. Las proteínas del mieloma son inmunoglobulinas producidas en grandes cantidades por células plasmáticas transformadas en malignas. Puesto que un tumor de células plasmáticas (plasmacitoma) deriva originalmente de una sola célula plasmática, las inmunoglobulinas producidas por el plasmacitoma son todas homogéneas, es decir, son proteínas monoclonales. Esta anomalía se le conoce como mieloma múltiple. Aunque las proteínas de mieloma producidas pueden ser de cualquier clase, los mielomas secretores son aquellos de la clase IgA e IgG. Además es frecuente encontrar que los pacientes eliminan por orina grandes cantidades de cadenas ligeras (originalmente descritas como proteínas de Bence-Jones) del mismo isotipo que el encontrado en las cadenas ligeras de la proteína de mieloma.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras también ha permitido hacer una agrupación de las mismas en dos clases llamadas kappa y lambda, y dentro de las clases aun se han podido reconocer subclases (Kappa-I, kappa-II y kappa-III; y lambda-I, lambda-II, lambda-III, lambda-IV y lambda-V).

En realidad, fue gracias a las proteínas de mieloma que se pudieron hacer los primeros estudios fisicoquímicos e inmunoquímicos de las inmunoglobulinas; de los estudios de secuenciación de los aminoácidos de las proteínas de mieloma surgió la división en clases y luego en subclases de las inmunoglobulinas, así como el reconocimiento de los primeros marcadores alotípicos.^{1, 2, 8, 16}

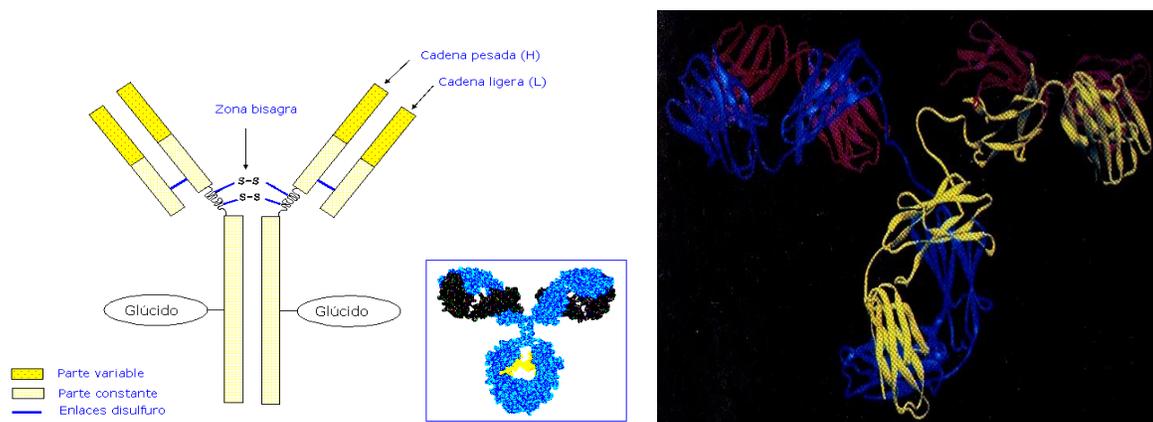


Figura 6-17. Figura Izquierda. Estructura de la unidad básica que forma los anticuerpos.³⁴ Figura central. Modelo de Inmunoglobulina generado por un ordenador.³³ Figura derecha. Representación en cinta de un anticuerpo monoclonal.³²

a. Dominios

El estudio de la secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas, tanto de las proteínas del mieloma como de algunas moléculas de anticuerpo, indicó que tanto las cadenas ligeras como las pesadas tienen una región más o menos constante (que abarca aproximadamente 3/4 de la cadena pesada y una mitad de la ligera) y que termina en el extremo carboxilo-Terminal de

ambas cadenas, además de una región muy variable hacia el extremo amino-Terminal, designada como región variable. También es notorio que a lo largo de las cadenas pesadas se repiten secuencias a manera de bloques que se designan con el nombre de dominios así, mientras que en las cadenas H de las inmunoglobulinas G, A y D se encuentran tres dominios (dominios C1H, C2H y C3H), en las cadenas H de las inmunoglobulinas M y E existen cuatro (C1H, C2H, C3H y C4H). Todas las inmunoglobulinas contienen un oligosacárido insertado básicamente en el dominio C2H (aunque algunas inmunoglobulinas como la IgE también tienen carbohidratos en el C3H); este oligosacárido parece ser el remanente de un polisacárido que, al parecer, juega un papel importante en el transporte de las inmunoglobulinas hacia el exterior de las células que las producen.^{1, 2}

b. Regiones Hipervariables

No obstante que la estructura primaria de las regiones hipervariables, tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras, es de por sí variable, en determinadas regiones más o menos fijas la variabilidad estructural es todavía mayor. Estas regiones son Hipervariables y están localizadas alrededor de los residuos 30, 60 y 100 en las cadenas ligeras, y 30, 60, 80 y 100 en las cadenas pesadas.

Si consideramos a las cadenas ligeras y pesadas ensambladas como se encuentran en los anticuerpos, y si tuviéramos una forma de identificar las regiones hipervariables, podríamos ver que son precisamente esas regiones las que hacen el contacto más estrecho con los determinantes antígenos de un antígeno. Son regiones hipervariables por que contribuyen grandemente a la especificidad de los anticuerpos. Recordemos que, para cada anticuerpo, el conjunto de características estructurales que definen su sitio de combinación constituye su idiotipo.^{1, 2}

c. Valencia de los anticuerpos

Las moléculas de anticuerpos nativas tienen dos sitios de combinación por unidad monomérica de cuatro cadenas, de tal manera que la valencia en las inmunoglobulinas IgG, IgD, IgE e IgA monomérica, es de 2, mientras que la valencia de la IgA dimérica es de 4 y la valencia de la IgM de 10, aunque por razones de impedimento estérico la IgM funciona como un anticuerpo pentavalente^{1, 2}

3. FUNCIÓN DE LAS INMUNOGLOBULINAS

La unión de un anticuerpo a un antígeno no suele causar la destrucción del antígeno ni la del microorganismo, la célula o el agente al que está unido. El anticuerpo sirve más bien para identificar la diana del ataque inmunológico y para activar respuestas inmunitarias no específicas que pueden destruir la diana. Por ejemplo, las bacterias revestidas de anticuerpos son blancos más fáciles para la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos. La alteración de la superficie de las

bacterias, virus y otras partículas, de forma que su fagocitosis sea más fácil, recibe el nombre de opsonización.

La destrucción inmunitaria se promueve también por la activación del sistema del complemento inducida por anticuerpo.²

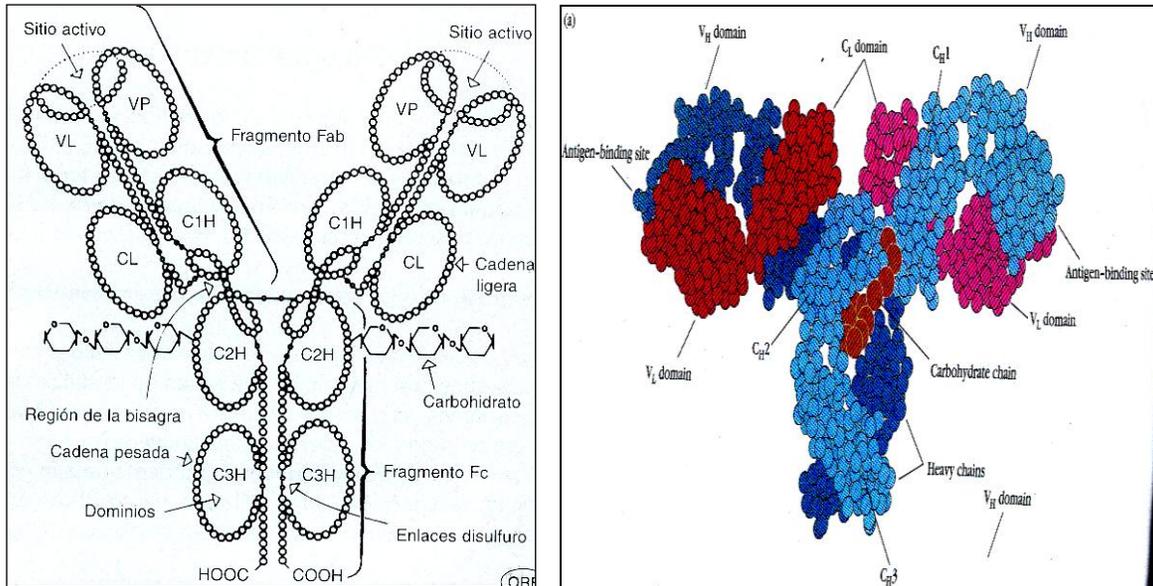


Figura.6-18. Lado izquierdo. Estructura del anticuerpo, que muestra la disposición de las cuatro cadenas polipeptídicas. La molécula consta de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas que se mantienen unidas por puentes disulfuro. Dentro de la estructura unitaria, los puentes disulfuro crean bucles que forman dominios. Todas las cadenas ligeras contienen un único dominio variable (V_L) y un único dominio constante (C_L). Las cadenas pesadas tienen un dominio variable y tres a cuatro dominios constantes. Los sitios de combinación con el antígeno, fragmento de combinación (Fab) y fragmento (Fc)². Lado derecho.² Modelo de inmunoglobulina IgG Molecular basado en un análisis de rayos X y cristalografía.³²

a. Clases de inmunoglobulinas

La IgG es la principal inmunoglobulina del suero humano y supone el 80% del conjunto de inmunoglobulinas. La IgG está presente en el plasma sanguíneo y en los líquidos tisulares. Actúa contra las bacterias y virus opsonizando los invasores y neutralizando toxinas. También es una de las dos inmunoglobulinas que activan la vía clásica del complemento. La IgG es la única inmunoglobulina capaz de atravesar la placenta y de brindar inmunidad pasiva adquirida natural intrauterino al recién nacido.

Existen cuatro subclases de IgG humanas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) que varía químicamente en la composición de sus cadenas y en el número y disposición de los puentes disulfuro entre cadenas. Aproximadamente el 65% de las IgG sérica total es IgG1, el 23% IgG2. Se han observado diferencias de función biológica entre las subclases de inmunoglobulinas. Por ejemplo, los anticuerpos IgG2 son opsonizantes y se desarrollan en respuesta a antitoxinas. Los anticuerpos anti-Rh son de subclase IgG1 o IgG3. La IgG1 e IgG3 se unen mejor a

los monocitos y macrófagos, y son las activadoras del complemento más eficaz. Los anticuerpos IgG4 funcionan como inmunoglobulinas sensibilizantes cutáneas.

La IgM supone aproximadamente el 10% del total de Inmunoglobulinas. Habitualmente es un polímero (pentámero) de cinco monómeros, cada uno de los cuales está compuesto por dos cadenas pesadas y dos ligeras.

Los monómeros están dispuestos en molinete con los extremos Fc hacia el centro y se mantienen unidos por puentes disulfuro y por una cadena J de unión. La IgM es la primera inmunoglobulina que se forma durante la maduración de las Células B y la primera que se secreta al suero en el transcurso de una respuesta primaria de anticuerpos.

Debido a su gran tamaño la IgM (Figura 6-19) no sale del suero ni atraviesa la placenta. La IgM aglutina bacterias activa el complemento por vía clásica y facilita la ingestión de patógenos por los fagocitos. A esta clase pertenecen los especiales anticuerpos aglutinantes de eritrocitos.

Aunque la mayor parte de la IgG (figura 6-21) parece ser pentamérica en torno al 5% de la IgM sérica humana se da en forma hexamérica. Esta molécula contiene seis monómeros pero parece carecer de cadena J. la IgM hexamérica activa el complemento de una forma 20 veces mas eficaz que la forma pentamerita habitual. Se ha sugerido que los antígenos de la pared celular bacteriana, como los lipopolisacaridos de los gram negativos, pueden estimular directamente la producción de IgM hexamérica sin cadena J por la células B. Si esto es así las inmunoglobulinas que se forman durante la respuesta inmunitaria primaria son menos homogéneas de lo que se creía.^{1, 2, 8, 16}

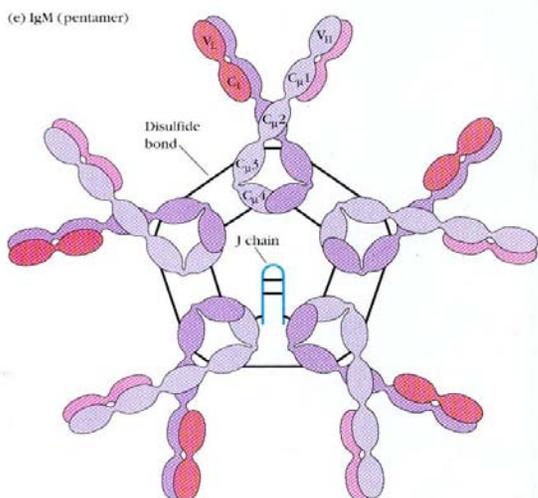


Figura. 6-19 Estructura de una inmunoglobulina M humana³²

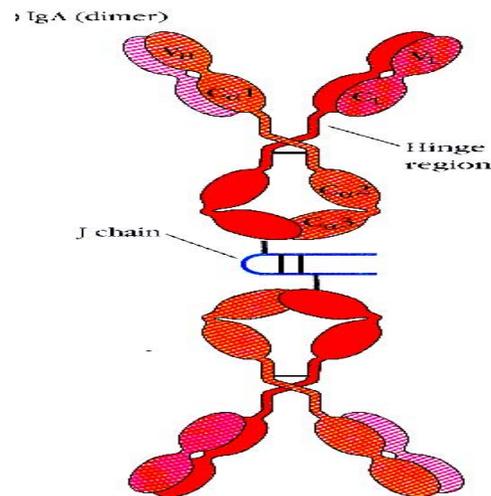


Figura.6-20 Estructura básica de una inmunoglobulina A humana.³²

La IgA supone aproximadamente el 15% del total de inmunoglobulinas. Parte de la IgA está presente en el suero en forma de monómero compuesto por dos cadenas pesadas y dos ligera S (Figura 6-20). Sin embargo, la mayor parte de la IgA sérica está en forma de dímero polimérico que se mantiene unido por una cadena J. La IgA posee características especiales relacionadas con las superficies mucosas secretorias. La IgA cuando es transportada del tejido linfoide asociado a

mucosas a la superficie de las mucosas, adquiere una proteína llamada pieza secretora, La IgA secretora (sIgA), denominación de esta molécula modificada, es la inmunoglobulina primaria del sistema inmunitario secretor. Este sistema se encuentra en el tracto digestivo, las vías respiratorias superiores e inferiores y el sistema genitourinario. También se encuentra IgA secretora en la saliva, las lagrimas y la leche materna. En estos líquidos y en las zonas del cuerpo relacionadas las sIgA desempeña un papel importante en la protección de los tejidos superficiales contra los microorganismos infecciosos, formando una barrera inmunitaria. Por ejemplo, en la leche materna la sIgA ayuda a proteger a los recién nacidos lactantes. En el intestino la sIgA se une a los virus, bacterias y parásitos protozoarios como *Entamoeba histolytica*. Esto impide que el patógeno se adhiera a las superficies de las mucosas y que invada los tejidos del huésped, un fenómeno que se conoce como exclusión inmunitaria. La sIgA se une además a antígenos en el interior de la lamina propia de la mucosa, y los complejos de antígeno-sIgA se excretan a través del epitelio adyacente a la luz intestinal. De esta forma el organismo evita la acumulación de estos inmunocomplejos formados localmente, que podría producir graves problemas. La IgA secretora puede neutralizar también virus y otros patógenos intracelulares que residen en el interior de las células epiteliales. La IgA secretora desempeña así mismo un papel en la vía alterna del complemento.^{1, 2, 8, 16}

La IgD (Figura 6-21) es una inmunoglobulina que se encuentra en pequeñas cantidades en el suero sanguíneo. Su estructura es monomérica similar a la de la IgG. Los anticuerpos IgD no fijan el complemento y no puede atravesar la placenta, pero abundan sobre la superficie de las células B y ligan antígenos, dando la señal a las células B para iniciar su diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos.

La IgE (Figura 6-21) constituye un pequeño porcentaje de la cantidad total de inmunoglobulinas. Las reacciones de sensibilización cutánea clásicas y los anticuerpos anafilácticos pertenecen a este grupo. Las moléculas de IgE poseen cuatro dominios en la región constante (C_{E1} , C_{E2} , C_{E3} , y C_{E4}) y dos cadenas ligeras. La porción Fc del dominio C_{E4} puede ligarse a receptores especiales de FC_E en la superficie de mastocitos y basófilos. Cuando dos moléculas de IgE de la superficie de estas células se entrecruzan como consecuencia de la unión al mismo antígeno, las células se degranulan. Esta degranulación libera histamina y otros farmacológicos de la anafilaxia. También estimula la eosinofilia y la hipermotilidad intestinal (aumento del movimiento del contenido intestinal) y ayuda a eliminar los helmintos parásitos. Por lo tanto, aunque la cantidad de IgE es escasa, esta clase de anticuerpos tiene capacidades biológicas de gran potencia.^{1, 2, 22,8}

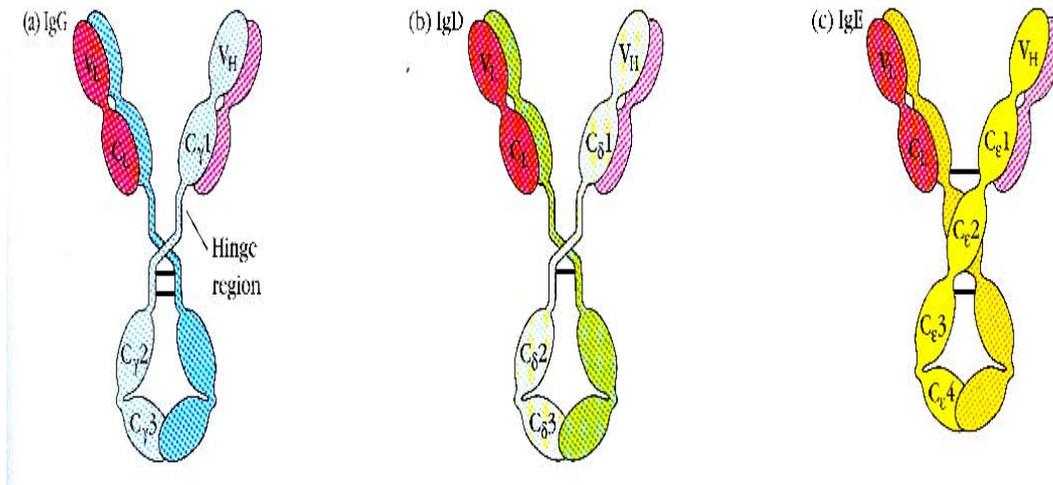


Figura.6-21 Estructuras básica de las inmunoglobulinas: a) IgG, b) IgD, c) IgE Humanas.³²

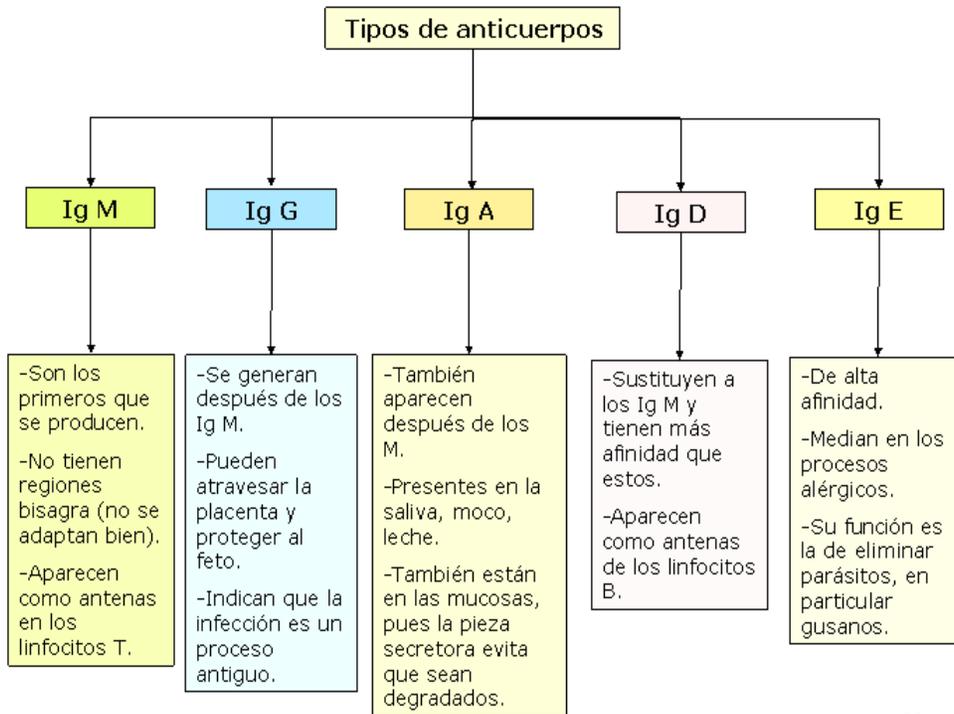


Figura.6-22 Comparación de los diferentes tipos de inmunoglobulinas y su función.³⁴

Resumen

La inmunidad es la capacidad que tiene un individuo de resistir a una determinada infección o enfermedad, tiene como consecuencia una serie de reacciones defensivas específicas y complejas, que van desde la resistencia no específica, hasta los tipos de inmunidad específica, ya sea la inmunidad humoral (mediada por anticuerpos), o la inmunidad celular (mediada por linfocitos T). La función de cada uno de ellos, la estructura y propiedades de los anticuerpos. Los más indicados e importantes en el estudio microbiológico, debido a que es la

principal herramienta para el estudio e identificación de los distintos antígenos que presentan los microorganismos en la invasión al huésped. Estos al manifestarse de manera diferente, presentan características particulares en el individuo debido a la patogenicidad y virulencia de estos. La elevación de la temperatura corporal, producción de cebo, lisozima en el moco, saliva y lagrimas, tensión de oxígeno, endocitosis y opsonización, son factores que inicialmente presenta la resistencia inmunológica no específica para la eliminación y destrucción del microorganismo,

La estructura y propiedades de los anticuerpos es la base fundamental para la identificación del microorganismo, debido a que cada anticuerpo tiene funciones específicas. La unión de un anticuerpo a un antígeno no suele causar la destrucción del antígeno ni la del microorganismo, el anticuerpo sirve más bien para identificar la diana del ataque inmunológico y para activar respuestas inmunitarias no específicas que pueden destruir la diana. Por ejemplo, las bacterias revestidas de anticuerpos son blancos más fáciles para la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos.

VII. TÉCNICAS ELEMENTALES

A. Reacciones Antígeno-Anticuerpo

Existen innumerables anticuerpos capaces de reaccionar específicamente con innumerables antígenos. Los resultados de las reacciones antígeno-anticuerpo, no obstante, caen dentro de relativamente pocos tipos o categorías. Estos efectos se derivan de las características físicas y espaciales de la molécula de antígeno, y de las propiedades físicas y biológicas de la molécula de anticuerpo. Puede sacarse provecho en el laboratorio de estas propiedades para crear puntos finales de reacción rápidamente detectables para estudios in Vitro.

Los anticuerpos son proteínas hidrosolubles, pero pueden unirse o ser unidos a membranas u otras superficies. Pueden ser incorporados a medios sólidos o semisólidos. Pueden marcarse con marcadores radiactivos, fluorescentes o con gran densidad de electrones. En forma purificada pueden servir como antígenos para inducir la formación de sueros antiinmunoglobulina si se introducen en un huésped no humano. Los antígenos se presentan en muy variadas formas: proteína, carbohidratos, lipoproteína, o lipopolisacárido soluble o articulado isotópicamente inerte o marcado con elementos radiactivos; unido a membranas o partículas o existiendo independientemente en forma de moléculas grandes o pequeñas. Las características del antígeno y del anticuerpo determinan la forma física en que tendrá lugar la reacción antígeno-anticuerpo. Los puntos finales invisibles más utilizados en las pruebas de laboratorio incluyen la precipitación, aglutinación, formación de inmunocomplejos e iniciación o inhibición de actividades biológicas.^{5, 19,10}

B. Técnicas Inmunológicas

Las técnicas inmunológicas son procedimientos de laboratorio que permiten cualificar y cuantificar una sustancia que cumple el papel de antígeno, o el efector inmunológico que se formó en respuesta a dicha sustancia, sea éste un anticuerpo o un linfocito T efector.⁵

1. CLASIFICACIÓN

Con un fin puramente didáctico y sobre la base de diferentes criterios es posible clasificar y cualificar las distintas Técnicas en:

Humorales (también llamadas serológicas): son aquellas en las cuales el efector inmunológico que interacciona con el antígeno es un anticuerpo.

Celulares: cuando el efector es una célula, más concretamente un linfocito T efector.

In Vitro: cuando la interacción antígeno-efector se lleva a cabo en un soporte de vidrio, por ejemplo en un tubo de ensayo.

In vivo: cuando la reacción antígeno-efector se produce en un ser vivo, sea este humano o animal.

Cualitativa: en caso de que se detecte sólo la presencia de la incógnita, sea el antígeno o el efector.

Semicuantitativa: cuando la titulación se realiza en unidades relativas (diluciones).

Cuantitativa: cuando aparte de identificar la incógnita ésta es cuantificada en unidades absolutas (sistema métrico decimal).

De diagnóstico directo: cuando la incógnita a demostrar es el antígeno.

De diagnóstico indirecto: si la incógnita a determinar es el efector inmunológico.

De lectura directa: cuando la reacción antígeno-efector da lugar a un fenómeno evidenciable por sí mismo.

De lectura indirecta: cuando la interacción antígeno-efector no es evidente por sí misma y es necesario agregar, por ejemplo, una sustancia fluorescente para ponerla en evidencia.

Método directo: cuando en la reacción participa un único anticuerpo.

Método indirecto: cuando en la reacción intervienen dos o más anticuerpos. ⁵

C. Técnicas humorales

En una técnica inmunológica humoral intervienen el antígeno y los anticuerpos. Los anticuerpos se unen al antígeno a través de sus dominios variables ubicados en las fracciones denominadas Fab. La mayor parte de los anticuerpos incluyen dos fracciones Fab, de modo que poseen dos sitios de unión con el antígeno, por lo que se considera que los anticuerpos son bivalentes. Un caso particular es el de la IgM, que por ser de estructura pentamérica posee una valencia de diez, aunque por razones estéricas utilice habitualmente sólo cinco de ellas. En todos los casos un anticuerpo es monoespecífico, es decir que sus Fab están dirigidos a un único epítotope o determinante antigénico.

En cuanto al antígeno, es una molécula generalmente compleja. Los sitios o zonas de la molécula a las que va dirigida la respuesta se denominan epítotes o determinantes antigénicos. Cuando un antígeno posee un mismo determinante repetido n veces decimos que es multivalente; si en cambio encontramos varios epítotes diferentes lo llamamos polivalente. En este último caso es seguro que algunos determinantes serán más inmunogénicos que otros y ellos reciben el nombre de inmunodominantes; obviamente, éstos serán más importantes en la reacción antígeno-anticuerpo.

La unión antígeno-anticuerpo es no covalente y reversible. En forma esquemática podemos decir que entre ambos hay un encastre similar al de una llave y una cerradura. Las fuerzas que intervienen en la unión son de tipo enlace de hidrógeno, electrostáticas (de Coulomb), hidrófobas y de Van Der Waals.

La fuerza de unión entre el antígeno y el anticuerpo se denomina afinidad; más específicamente ésta define a la fuerza de unión entre el Fab del anticuerpo y el epítotope del antígeno. En cambio, el término avidéz define la fuerza de unión resultante de la suma de todas las interacciones entre los diferentes epítotes del antígeno y sus correspondientes anticuerpos. Habitualmente la avidéz resulta mayor que la suma de las afinidades individuales.

La interacción inicial entre el antígeno y el anticuerpo se denomina interacción primaria y es rápida e independiente de factores como la temperatura y la concentración de electrólitos. Como esta interacción no es visible por sí misma se han ideado métodos para hacerla evidente, por ejemplo, si se une una

sustancia fluorescente al anticuerpo. La interacción primaria puede ser seguida por una interacción denominada secundaria. Ésta es más lenta y como consecuencia de ella puede generarse un fenómeno visible: tal es el caso de la precipitación y la aglutinación.

Si la reacción antígeno-anticuerpo se produce in vivo pueden manifestarse fenómenos biológicos tales como vasodilatación, edema, necrosis y otros que definimos con el nombre de reacciones terciarias.

Es común e importante que al hablar de una determinada técnica se haga referencia a su sensibilidad y especificidad; veamos qué significa cada uno de estos términos.

La sensibilidad es una medida que indica cuán eficaz es una técnica para poner de manifiesto pequeñas cantidades de la incógnita (ya sea un antígeno o un anticuerpo). Las diferencias en este sentido son significativas; así, la técnica de RIA (radioinmunoanálisis) es 5.000 veces más sensible que la de precipitación. Por ejemplo, si se trata de detectar en el suero de un paciente el virus de la hepatitis B, el cual puede encontrarse en escasa cantidad, es necesario utilizar una técnica muy sensible pues de lo contrario podría obtenerse un resultado falso-negativo.

La especificidad define la capacidad de una técnica, para discriminar entre dos antígenos diferentes. Cuando se dice que una técnica es poco específica lo que se quiere decir es que puede dar un resultado falso-positivo por reacción de los anticuerpos con un antígeno diferente del que originó la respuesta. Esto puede ocurrir básicamente por dos razones: a) que los dos antígenos compartan por lo menos un epítotope o b) que posean al menos un epítotope estructuralmente similar. Este fenómeno por el cual los anticuerpos formados en respuesta a un antígeno pueden unirse a otro diferente se conoce con el nombre de reacción cruzada.

Si bien en algunos casos este fenómeno se aprovecha para montar determinadas técnicas diagnosticas, por ejemplo la VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) para diagnóstico inicial de la sífilis, representa un problema potencial que debe atenderse muy especialmente porque podría haber un resultado falso-positivo, con error en el diagnóstico de una enfermedad inexistente. Por este motivo se utilizan como prueba tamiz para luego confirmar con otra técnica.

Cuando desarrollamos una técnica en forma cuantitativa puede que el elemento a cuantificar sea el antígeno o el anticuerpo. Es poco frecuente que en el diagnóstico clínico sea necesario cuantificar el antígeno, aunque para algunas enfermedades se usa este método (p.ej; la criptococosis). Empero, en otras circunstancias esto es absolutamente indispensable, por ejemplo en la elaboración de vacunas. Como contrapartida, habitualmente es menester cuantificar el anticuerpo, lo que puede realizarse de diferentes formas: en unidades del sistema métrico decimal (gammaglobulinas homólogas), en unidades internacionales (gammaglobulinas heterólogas), en unidades de dilución (las más utilizadas en el diagnóstico asistencial) y en otras a las que no haremos referencia por su carácter infrecuente. La cantidad de anticuerpo que una persona posee contra un determinado antígeno se define con el nombre de título. Dicha cantidad o título se expresa como la máxima dilución del suero del paciente que da un resultado positivo de la técnica inmunológica realizada. Por ejemplo, si se desea determinar

la cantidad de anticuerpos (título) de un paciente contra la bacteria X por la técnica de aglutinación (Fig.7-1) la secuencia es la siguiente:

1. En un sistema de tubos o pocillos se coloca (en cada uno de ellos) 1 ml de la solución que servirá para efectuar las diluciones (A).
2. Se agrega al primer tubo (el del extremo izquierdo) 1 ml del suero del paciente y se mezcla (B).
3. Se pasa 1 ml del tubo 1 al 2 y se mezcla. Luego se transfiere 1 ml del tubo 2 al 3 y así sucesivamente hasta el último tubo (el del extremo derecho) y finalmente se descarta 1 ml del último tubo. El suero del paciente ha quedado diluido de izquierda a derecha a: $1/2$, $1/4$, $1/8$,... $1/n$ (C).
4. Se añade a cada tubo una cantidad constante de una suspensión de la bacteria X (el antígeno) (D).
5. Se incuba la reacción según las condiciones estipuladas de temperatura y tiempo.
6. Se observa el resultado: si el paciente tiene anticuerpos éstos, unidos a la bacteria X, constituyen una red que sedimenta con forma estrellada; si no hay anticuerpos porque el paciente no los tiene o porque ya son muy escasos (debido a la dilución) la bacteria X sedimenta individualmente y forma un botón compacto. El título de anticuerpos es igual a la máxima dilución que da una aglutinación visible, para nuestro ejemplo el tubo nº 5, cuya dilución es $1/32$. En consecuencia, el título es $1/32$ (E).⁵

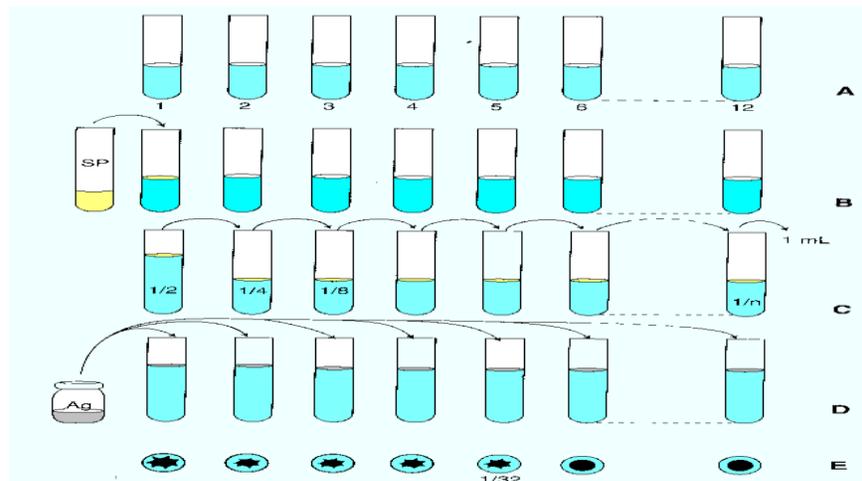


Fig.7-1 Titulación de anticuerpos por dilución.

SP: suero del paciente, Ag: antígeno. Modificado de: Negroni, 2006⁵

Obsérvese que cuantos más anticuerpos tenga el paciente más a la derecha se desplazará la reacción y mayor será la dilución con resultado positivo; el denominador del quebrado será un número mayor. Así $1/512$ es un título mayor que $1/32$.

En el ejemplo anterior hemos medido los anticuerpos contra la bacteria X sin considerar si eran de la clase IgG, IgM o IgA. Un título muy bajo puede tener dos significados: uno es que se trate de una reacción cruzada y el otro es que se deba a una infección pasada, de la que estamos midiendo la IgG residual.

Los títulos elevados deben interpretarse, al menos inicialmente, como primoinfección, reinfección o reactivación.

Una forma alternativa de titulación es la denominada "muestra pareada o par serológico", que consiste en titular los anticuerpos específicos de dos muestras de suero del paciente, la primera obtenida dentro de los 5 días de iniciada la enfermedad y la segunda tres semanas más tarde (muestras de fase aguda y de la fase de la convalecencia respectivamente). Un aumento del título de 4 veces o más entre la primera y la segunda toma indica enfermedad. El inconveniente de esta técnica es que en el caso de las enfermedades de evolución aguda (pocas semanas) el diagnóstico es retrospectivo.

Otra variante es la titulación de anticuerpos específicos de la clase IgM, cuyo dosaje es conveniente al menos en dos situaciones.

La primera situación es aquella en la cual es necesario establecer el diagnóstico de enfermedad infecciosa congénita en un recién nacido. En este caso el fundamento es que si el feto se infectó responderá al microorganismo casi exclusivamente con la formación de anticuerpos de la clase IgM. Recordemos que la IgM de la madre no atraviesa la placenta (sólo lo hace la IgG).

En consecuencia, la presencia de IgM específica contra un microorganismo en un recién nacido sólo puede deberse a la infección del feto y su respuesta.

La segunda situación es aquella en la cual es preciso establecer el diagnóstico de una enfermedad actual. Si una persona se infecta o se enferma a causa de un microorganismo responderá específicamente con las diferentes clases de anticuerpos y una vez superado el episodio sólo mantendrá en circulación anticuerpos de la clase IgG (nivel residual). Por lo tanto, la demostración de IgM específica es índice de infección/enfermedad actual.

Por último, puede ser necesario demostrar anticuerpos específicos contra los diferentes epítopes de un antígeno en forma discriminada, como sucede en el caso del diagnóstico de certeza de la infección por HIV mediante la técnica de Western-blot.⁵

1. TÉCNICAS DE PRECIPITACIÓN

La reacción de precipitación (Kraus, 1897) fue una de las utilizadas con mayor frecuencia en el diagnóstico serológico. Con ella se pueden identificar Acs si se conocen los Acs y, a la inversa, identificar y cuantificar Acs, si se enfrentan a una serie de Acs conocidos. Sin embargo, es más eficaz para detectar Acs que Acs.

Normalmente, la reacción de precipitación se investiga añadiendo un Ag en solución a una dilución, o serie de diluciones, del suero problema, para comprobar la presencia de Acs específicos; o, a la inversa, utilizando diluciones progresivas del Ag y un volumen constante del suero. Tras un período de incubación de la mezcla, se observa el último tubo que presenta precipitación, y la evaluación se hace convencionalmente por el título de la dilución de dicho tubo. En esta serie de diluciones debe tenerse en cuenta tres fenómenos importantes: a) que en los primeros tubos de la serie no se produzca precipitación cuando se añade el Ag, en tanto que en los tubos centrales se observa precipitación. Este fenómeno se conoce como prozona, y está en relación con un exceso de Acs en el sistema; b)

la precipitación más intensa y precoz se produce en el tubo donde se encuentran las proporciones óptimas de Ags y Acs; es decir, en la zona de equivalencia; y c) en los últimos tubos de la serie es posible, a veces, detectar Ag libre sin que se produzca la precipitación, lo que se debe a un exceso de Ags, que da lugar al fenómeno de postzona. Los fenómenos de zona están en relación con la teoría del retículo de Marrack y la ley de las proporciones múltiples (fig.7-3), ya que la reacción de precipitación tiene lugar cuando un Ag en solución se une a su Ac específico, y la aparición de un precipitado visible depende de factores críticos como las proporciones de Ags y Acs en el sistema.⁴

En las reacciones de precipitación la unión antígeno-anticuerpo ocurre en dos pasos:

La primera etapa es rápida (poco influida por la temperatura y los electrólitos) y en ella se forman (en segundos) complejos primarios entre el antígeno y el anticuerpo, que no son visibles.

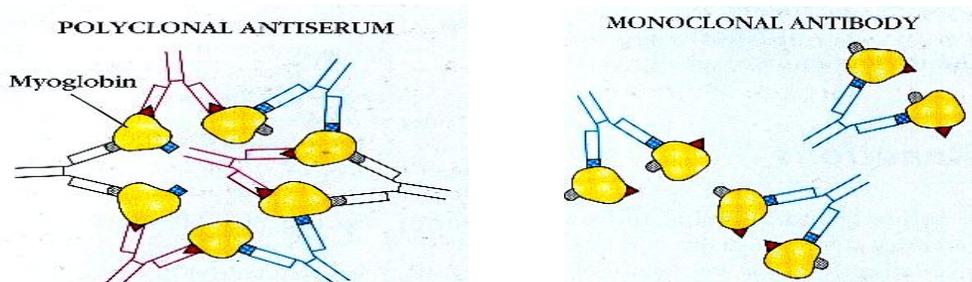


Fig. 7-2. Formación de la malla. O: Antígenos, Y: anticuerpos³²

La segunda etapa es más lenta (puede durar minutos e incluso horas). Los complejos primarios se agregan y se forma un reticulado que precipita (Fig. 7-2). La forma de este reticulado depende del pH, de la fuerza iónica y de la temperatura de la solución. Por lo tanto, en todas las reacciones de precipitación deben considerarse las condiciones de temperatura y de concentración de electrólitos (cloruro de sodio al 0,85% o 0,15 M). La velocidad de la precipitación es proporcional al tamaño y la densidad de las partículas.

La máxima cantidad de precipitado se formará cuando el antígeno y el anticuerpo se encuentren en concentraciones equivalentes, es decir cuando la mayoría de las moléculas de antígeno y anticuerpo estén unidas formando una red. Los tubos en los cuales se cumple esta relación se incluyen en la denominada zona de equivalencia.^{4, 5, 6, 17}

En el cuadro 7-1 se presentan las técnicas de precipitación más utilizadas.
Cuadro 7-1. Clasificación de las técnicas de precipitación ⁵

Medio líquido	Clásica en tubos	
	En placa	
	Prueba del anillo	
Medio sólido	Sin corriente eléctrica	Difusión simple unidireccional (T. de Oudin) Difusión doble unidireccional Difusión doble bidireccional (T. de Oudin-Ouchterlony)
	Con corriente eléctrica	Contrainmunolectroforesis (CIEF) Electroinmunodifusión Inmunolectroforesis (IEF)

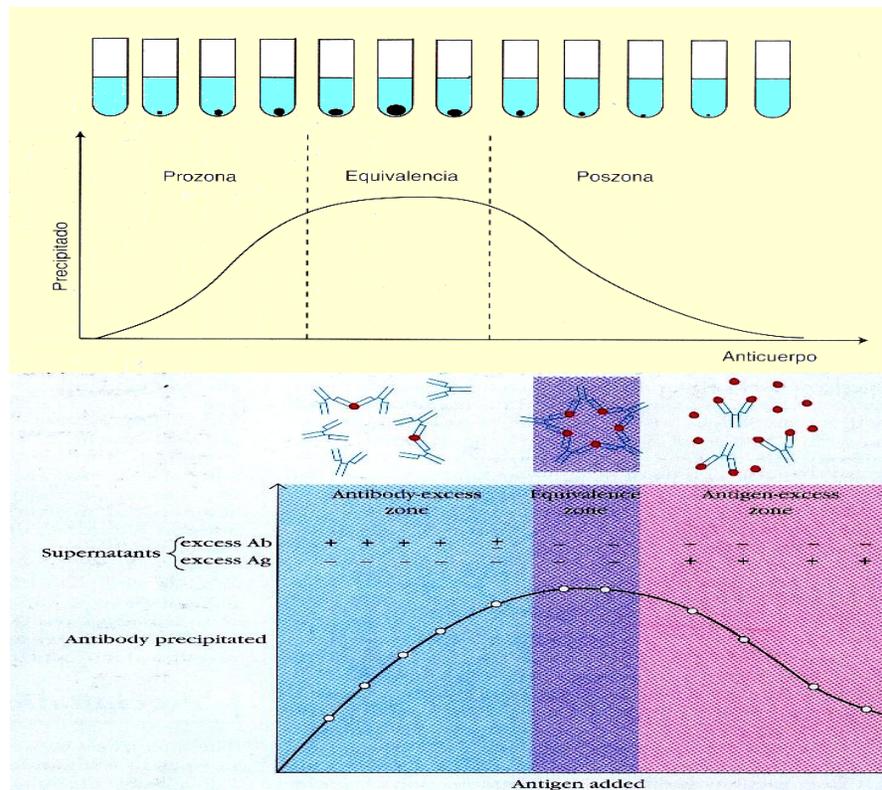


Figura. 7-3. Curva de precipitación según la relación Antígeno-Anticuerpo. Modificado de: Negroni, 2006 ^{6, 32}

a. Precipitación en fase líquida.

Ya hemos señalado que la mezcla de un anticuerpo con su antígeno homólogo, estando ambos en solución, conduce a la formación de un precipitado (frecuentemente referido como "precipitado inmune" sólo para distinguirlo de precipitados de otra naturaleza).

Los precipitados inmunes son susceptibles de separarse por centrifugación, de lavarse con solución salina fisiológica fría, y de cuantificarse en función de la naturaleza de alguno de sus componentes. Utilizando como antígenos aquellos

polisacáridos de neumococo carentes de proteína y de aminoazúcares (como el polisacárido del neumococo tipo VI) ^{2,8}

1) Clásica en tubos

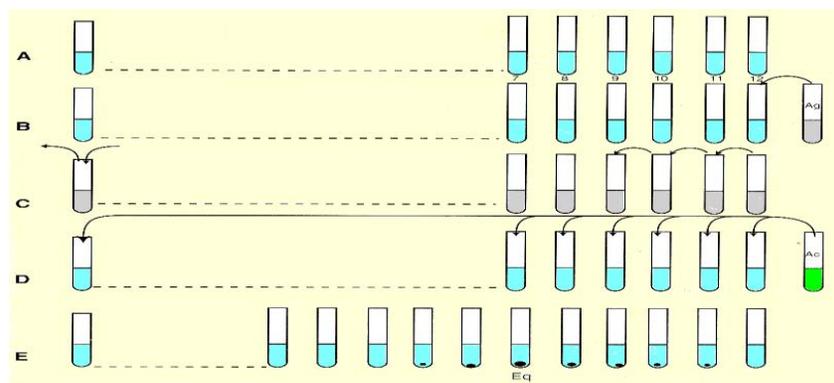
Es una técnica cuantitativa de aplicación habitual en la industria (fabricación de vacunas) y la investigación.

Técnica: desarrollaremos como ejemplo la titulación del toxoide diftérico (Fig. 7-4).

1. En una serie de tubos se coloca un volumen constante de solución salina que servirá para hacer las diluciones del antígeno (A).
2. Se añade un volumen x de la solución de antígeno al último tubo (el del extremo derecho) (B).
3. Se realiza la dilución del antígeno de derecha a izquierda (C).
4. Se agrega una cantidad constante de anticuerpo a cada uno de los tubos (D).
5. Se incuba en las condiciones que corresponda (temperatura y tiempo) y se observan los precipitados formados.
6. En el tubo en el cual hay equivalencia entre el antígeno y el anticuerpo observaremos el máximo de precipitado (E).

Después de definir en dicho tubo la cantidad de antígeno como igual a 1 es posible calcular la cantidad del antígeno en la solución original. Se puede proceder en forma inversa si la incógnita a cuantificar es, el anticuerpo.

Floculación.- un caso particular de precipitación en medio líquido es la floculación, en la cual una escasa diferencia en la relación antígeno-anticuerpo origina una gran diferencia en la cantidad de precipitado (Fig. 7-5). En última instancia, que la reacción se comporte como precipitación o floculación depende de la especie en la cual se formó el anticuerpo. Los sueros equinos floculan, mientras que los de conejo precipitan. ^{5, 6}



Precipitación en medio líquido

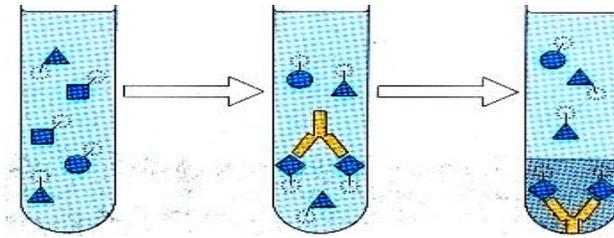


Fig. 7-4. Técnica de precipitación en medio líquido clásica en tubo (cuantitativa). Ag: antígeno, Ac: anticuerpo, Eq: equivalencia. Modificado de: Negroni, 2006⁵ y Modificado de: Roitt, 1994³³

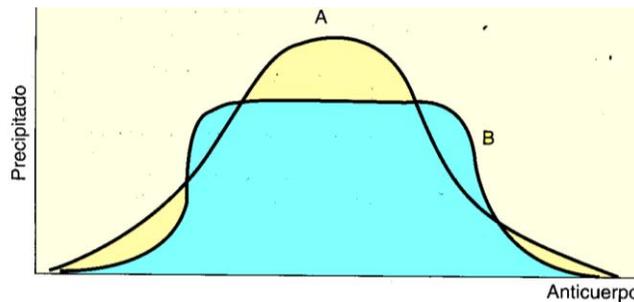


Fig. 7-5. curvas de precipitación y floculación. A: precipitación, B: Floculación. Modificado de: Negroni, 2006⁵

2) En placa

Esta técnica, que se utiliza para el diagnóstico de la sífilis, emplea un antígeno no treponémico capaz de detectar anticuerpos por reacción cruzada (Fig. 7-6).

Técnica:

1. En una serie de tubos se realizan diferentes diluciones del suero del paciente (anticuerpos).
2. De cada una de las diluciones se lleva un determinado volumen a sus respectivos pocillos de una placa para VDRL.
3. A cada pocillo se le agrega una concentración constante del antígeno.
4. Se coloca la placa para VDRL en un agitador durante 10 minutos.
5. Se observa la formación de grumos, primero en forma macroscópica y luego en forma microscópica.

En este caso el título se expresa como la inversa de la máxima dilución del anticuerpo que da positiva la reacción (32 diluciones o dils).^{5, 6}

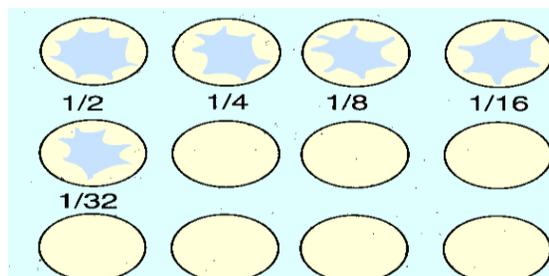


Fig. 7-6. placa con técnica de VDRL. Modificado de: Negroni, 2006⁵

2. PRECIPITACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

En estas técnicas el antígeno, el anticuerpo o ambos pueden difundir en un gel de agarosa (polisacárido extraído de las algas) e interactuar formando bandas de precipitación. Estas reacciones tienen la ventaja de que los resultados pueden conservarse durante un tiempo prolongado con fines docentes o documentales.^{5, 8,15}

a. Sin corriente eléctrica

1) Difusión simple unidireccional o técnica de Oudin y difusión doble unidireccional: estas técnicas son de uso poco frecuente y en la actualidad no se utilizan en el ámbito existencial

2) Difusión doble bidireccional o técnica de Oudin-Ouchterlony: esta técnica, que se utiliza para el diagnóstico de diversas enfermedades microbianas, fue descrita por Ouchterlony y puede desarrollarse sobre caja de Petri o un portaobjeto.

La doble difusión en agar (inmunodifusión doble, técnica de Ouchterlony) se basa en el principio de que la difusión tanto del anticuerpo como del antígeno (de ahí el término de doble difusión) por el agar puede formar inmunocomplejos estables y fácilmente observables. Las soluciones difunden hacia fuera y cuando se encuentran el antígeno y el anticuerpo adecuados, se combinan y precipitan en la zona de equivalencia, produciendo una línea (o líneas) indicadora. La línea de precipitación visible permite comparar los antígenos buscando identidad (mismos determinantes antigénicos), identidad parcial (reactividad cruzada) o ausencia de identidad frente a determinado anticuerpo seleccionado. Por ejemplo, si se forma una línea en forma de «V», esto demuestra que los anticuerpos se unen a los mismos determinantes antigénicos en cada muestra de antígeno; es decir, hay identidad total. Si un pocillo contiene un antígeno que comparte algunos determinantes, pero no todos, con el primero, se forma una línea de precipitación en forma de «Y», demostrando la identidad parcial. En esta reacción el tronco de la «Y», llamado espolón, se forma si el antígeno o los determinantes antigénicos están ausentes en el primer pocillo, pero presentes en el segundo, reaccionan con los anticuerpos que difunden. Si se añaden a los pocillos dos antígenos sin relación, se forma una línea recta de precipitación entre los dos pocillos, o se forman dos líneas separadas de precipitación, que dan lugar a un patrón en «X», es una reacción de ausencia de identidad. Existen dos variantes, una cualitativa y otra cuantitativa.^{5, 17,18, 22}

a) Técnica cualitativa:

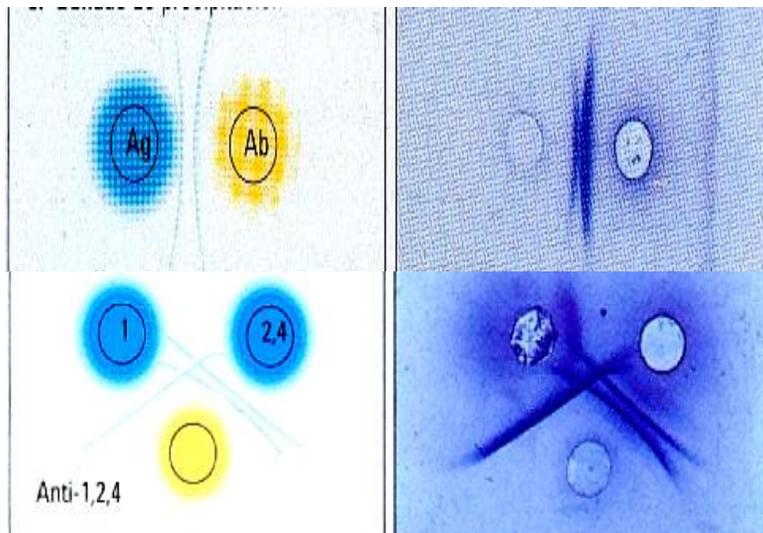
1. En una caja de Petri o un portaobjeto con agarosa se efectúan dos orificios de tamaño y a distancia definidos (Fig. 7-7).
2. En uno de ellos se coloca, el suero del paciente en el cual queremos demostrar la presencia del anticuerpo anti X (B) y en el otro una solución del antígeno X (A).
3. Se incuba durante 18 a 24 horas en cámara húmeda.
4. Si la reacción es positiva se observará una banda de precipitación ligeramente curva situada entre ambos orificios. Si hay dudas respecto de la presencia de la

banda puede efectuarse una desproteínización, coloración (azul de Coomassie), decoloración y posterior desecación, lo cual aumenta así su visualización.

A partir de esta técnica cualitativa es posible implementar variantes muy útiles para definir si dos antígenos son iguales o comparten epítopes.

b) Técnica cuantitativa: Esta variante se utiliza para el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas, incluidas las micosis profundas. Tomemos como ejemplo para el desarrollo de la técnica la determinación de anticuerpos en la histoplasmosis.

1. En una caja de Petri que contenga una capa de agarosa se realizan n perforaciones periféricas y concéntricas en cada una de las cuales se colocan diluciones crecientes del suero del paciente (Fig. 7-8).
2. En una perforación central se agrega la solución del antígeno (histoplasmina).
3. Se incuba 2 días en cámara húmeda a temperatura ambiente.
4. Si hay anticuerpos en el suero se formarán bandas de precipitación visibles hasta una determinada dilución, la cual constituirá el título, por ejemplo 1/16.^{5,6}



Técnica en portaobjetos. Modificado de: Roitt, 1994³³

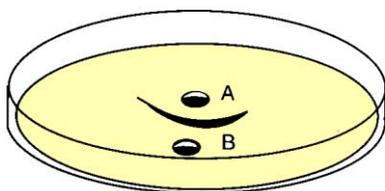


Fig. 7-7. Técnica de Oudin-Ouchterlony (cualitativa). A: pocillo con el antígeno, B: pocillo con el anticuerpo Modificado de: Negroni, 2006⁵

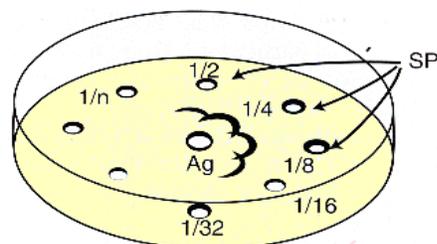


Fig.7-8 Técnica de Oudin-Ouchterlony (cuantitativa). SP: suero del paciente, Ag: antígeno Modificado de: Negroni, 2006⁵

3) Inmunodifusión radial simple

La inmunodifusión radial simple o técnica de Mancini cuantifica antígenos. Se añade al agar el anticuerpo monoespecífico después la mezcla se vierte en placas y se permite que se gelifique. Se excavan pocillos en el agar y se añaden cantidades conocidas de antígeno estándar. El antígeno desconocido de prueba se añade a un pocillo diferente. Se deja la placa durante 24 horas o hasta que se alcance el equilibrio; durante este tiempo, el antígeno difunde fuera de los pocillos para formar complejos insolubles. El tamaño del anillo de precipitación resultante que rodea a las diferentes diluciones del antígeno es proporcional a la cantidad de antígeno existente en el pocillo (cuanto más amplio es el arco, mayor es la concentración de antígeno). Esto es debido a que la concentración de antígeno disminuye gradualmente a medida que difunde alejándose del pocillo. El antígeno forma el anillo de precipitina cuando su concentración ha decrecido lo suficiente como para alcanzar la equivalencia con el anticuerpo para producir una red grande insoluble. Este método se emplea frecuentemente para cuantificar inmunoglobulinas séricas proteínas del complemento y otras sustancias.²⁴

Tomaremos como ejemplo para su explicación la determinación en el suero de la fracción C3 del complemento.^{1, 4, 17, 18, 19}

Técnica:

1. Se utiliza una caja Petri que contenga una capa de agarosa que incluya el anticuerpo específico anti-C3 (Fig. 7-9).
2. En el centro de la capa se efectúa una perforación en la cual se coloca el suero del paciente (en el que el C3 desempeña el papel de antígeno), el cual difundirá radialmente.
3. Se incuba durante 24-48 horas en las condiciones que corresponda.
4. En el lugar donde el C3 del paciente esté en equivalencia con el anticuerpo incluido en la agarosa se formará un precipitado con forma de anillo.

La superficie delimitada por el anillo es directamente proporcional a la cantidad de C3. Para efectuar la titulación se consulta una tabla en la cual se puede encontrar la correlación entre el diámetro del halo y la concentración de C3 en diferentes unidades.⁵

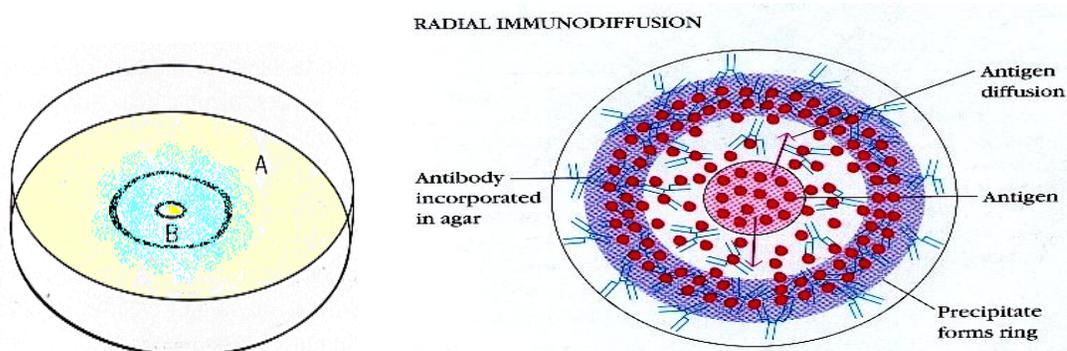


Fig. 7-9 Inmunodifusión radial. A: agarosa mas anticuerpo anti-C3, B: pocillo con suero del paciente. Modificado de: Negroni, 2006^{5, 32}

b. Con Corriente Eléctrica

Son técnicas en las cuales el sistema antígeno-anticuerpo se expone a un campo eléctrico (en una cuba electroforética).

1) Contrainmunolectroforesis (CIEF)

La técnica se efectúa en placas de vidrio con geles de agarosa preparados en un regulador de pH alcalino (8.4-8.8). En los geles se hace una serie de perforaciones (usualmente de 3 mm de diámetro) alineadas a lo ancho del gel y frente a ellas una serie de perforaciones coincidentes de tal manera que una de las series quede orientada hacia el extremo catódico de la placa y la otra hacia el extremo anódico de la misma. La separación entre cada serie de perforaciones generalmente es de 1 cm, medido a partir del centro de cada perforación. En la serie de perforaciones orientada hacia el cátodo (-) se depositan las muestras de antígeno, mientras que en la serie de perforaciones orientada hacia el ánodo se colocan los antisueros o anticuerpos correspondientes. Siempre es recomendable efectuar una pre-electroforesis del sistema "cargado" sólo con los antisueros/anticuerpos y completar la electroforesis después de colocar las muestras de antígeno. Durante la electroforesis a pH de 8.4-8.8, las moléculas de antígeno migrarán hacia el ánodo (+), dependiendo de su intensidad de carga (predominantemente negativa); mientras que las moléculas de anticuerpo (prácticamente sin carga a ese pH) se desplazarán hacia el cátodo (-), principalmente arrastrados por los cationes de la solución electrolítica, esto es, por reoforesis. Los resultados positivos se observan como bandas de precipitación entre los pares de perforaciones confrontadas ²

Esta prueba se propone para detectar antígenos bacterianos en líquidos orgánicos; por ejemplo, antígenos de meningococo o neumococo en LCR, cuando no se observan estos agentes en la tinción de Gram. ⁵

Si se les compara con las anteriores estas técnicas tienen la desventaja de que son más laboriosas y con muchas variables a definir para obtener un buen resultado; como contrapartida, son más rápidas (horas) y aproximadamente diez veces más sensibles ⁶.

La CIEF es una técnica cualitativa que se utiliza para el diagnóstico rápido de enfermedades microbianas como la meningitis. Para la descripción de la técnica utilizaremos el diagnóstico de una meningitis producida por *Haemophilus influenzae b*.

Técnica:

1. En un portaobjeto con una capa de agarosa se realizan dos perforaciones enfrentadas de tamaño establecido y a distancia definida (Fig. 7-10).
2. En una se coloca el líquido cefalorraquídeo en el cual se intenta detectar la presencia del antígeno capsular de *Haemophilus influenzae b*.
3. En la otra perforación se colocan los anticuerpos anti-*Haemophilus influenzae b*.
4. Luego se somete a una corriente eléctrica continua durante aproximadamente 40 minutos.

5. Si el líquido cefalorraquídeo contiene el antígeno bacteriano migrará hacia el polo positivo, mientras que los anticuerpos (neutros) serán arrastrados en el gel por el movimiento del sodio y el agua hacia el polo negativo (electroendósmosis). En la zona de equivalencia aparecerá una banda de precipitación que confirmará la presencia del antígeno.^{5, 6, 19,22}

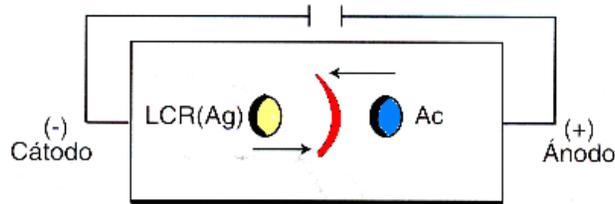


Fig. 7-10. Contrainmuno-electroforesis. LCR; líquido Cefalorraquídeo, Ag: Antígeno, Ac: Anticuerpo. Modificado de: Negroni, 2006⁵

2) Electroinmunodifusión.

En esta técnica los antígenos se depositan en perforaciones practicadas en el extremo catiónico (-) de un gel de agarosa en el que previamente se han incluido los anticuerpos correspondientes. Los antígenos se hacen migrar en el gel, aplicando una corriente eléctrica; aquellos antígenos con mayor carga negativa (aniones) migrarán más rápido hacia el ánodo (+) que aquellos con menor carga.

En este sistema, la separación electroforética de los diferentes componentes antigénicos se hace utilizando soluciones electrolíticas de pH básico (8.4-8.8), pH en el cual los anticuerpos prácticamente no se mueven por encontrarse en su punto isoeléctrico o cerca de él. Los resultados se observan como "picos" de precipitación, cuya altura estará en relación directa a la concentración del antígeno (Fig. 7-11).^{2, 4,5}

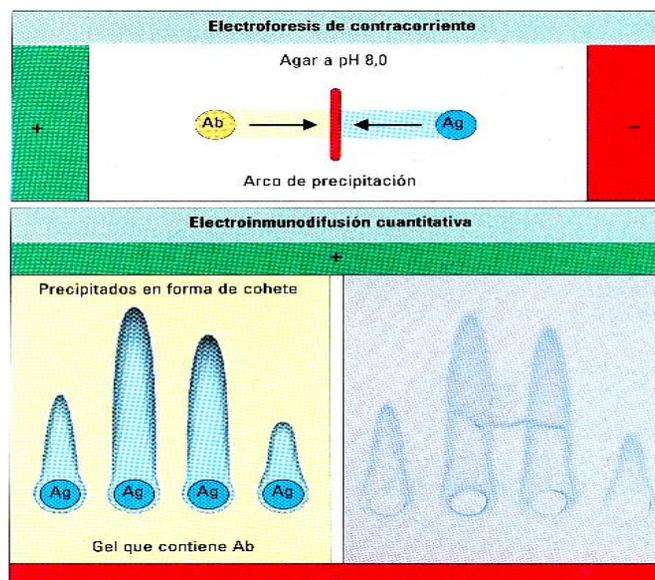


Fig. 7-11. Electroinmunodifusión con anticuerpos incluidos en el gel.³³

Electroinmunodifusión en dos dimensiones

Esta técnica se conoce también con el nombre de "rocket" (cohete); para su ejecución es necesario contar con una cuba refrigerada y su tiempo de ejecución es más prolongado (varias horas); Los Ags son sometidos a un campo electroforético en un gel que contiene el Ac. Técnicamente se consigue que el Ac permanezca fijo y el Ags emigre en el gel. Por este método se consigue que se formen precipitados en forma de «cohetes» o «rockets». La altura de estos precipitados es proporcional a la concentración del Ag. Con un pH adecuado, se puede inmovilizar el Ag y determinar los Acs (Fig. 7-12).^{5,6}

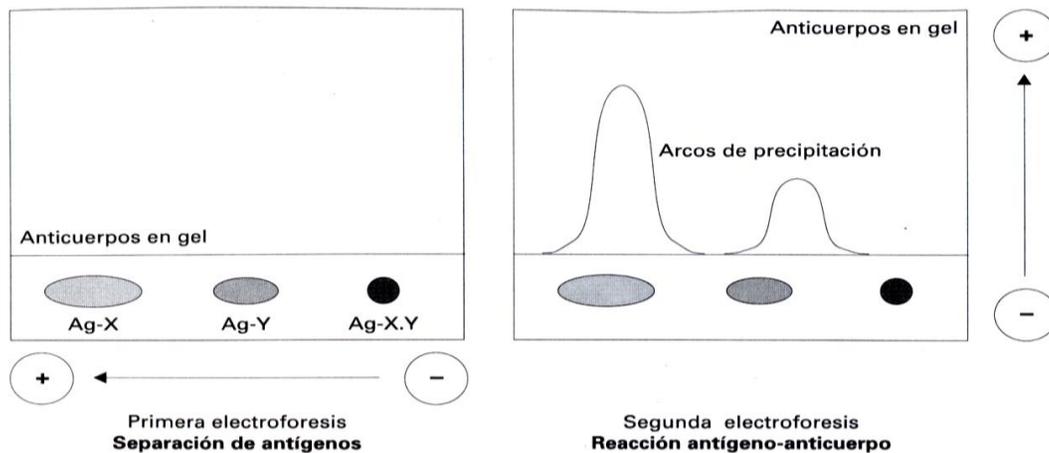


Fig. 7-12. Electroinmunodifusión en dos dimensiones. Consta de una primera etapa de separación electroforética de los antígenos y una segunda electroforesis para facilitar la reacción de precipitación con los anticuerpos presentes en el gel.⁴

3) Inmunolectroforesis (IEF).

Esta técnica, tan antigua como las anteriores, resulta de gran utilidad cuando se trata de probar la pureza o la monoespecificidad de los reactantes. Se utilizan placas de agar o agarosa en las que se han hecho pequeñas perforaciones desplazadas hacia uno de los extremos de la placa (el extremo que será conectado al cátodo [-], el otro extremo se conectará al ánodo [+]). En estas perforaciones se colocan los antígenos o mezclas antigénicas por analizar y entonces se aplica la corriente eléctrica. Como en la electroinmunodifusión, aquellos componentes que posean una carga negativa migrarán hacia el ánodo (+), en tanto que aquellos con una carga positiva lo harán hacia el cátodo (-). Habrá componentes antigénicos que se muevan más rápido o más lento hacia alguno de los dos electrodos, dependiendo de su carga y de la intensidad de la misma. Al suspender la corriente eléctrica (esto lo decide el operador) se hacen canales adyacentes a las perforaciones y paralelos al sentido de la corriente eléctrica (normalmente cada canal queda franqueado por dos perforaciones en las que antes se depositaron las preparaciones antigénicas). En estos canales se depositan alícuotas de los antiseros correspondientes (de reactividad conocida o por determinar) y el sistema de reacción se deja en reposo varias horas, generalmente de un día para otro, hasta que aparecen los arcos de precipitación correspondientes a los sistemas probados.^{1, 2, 5, 8, 18}

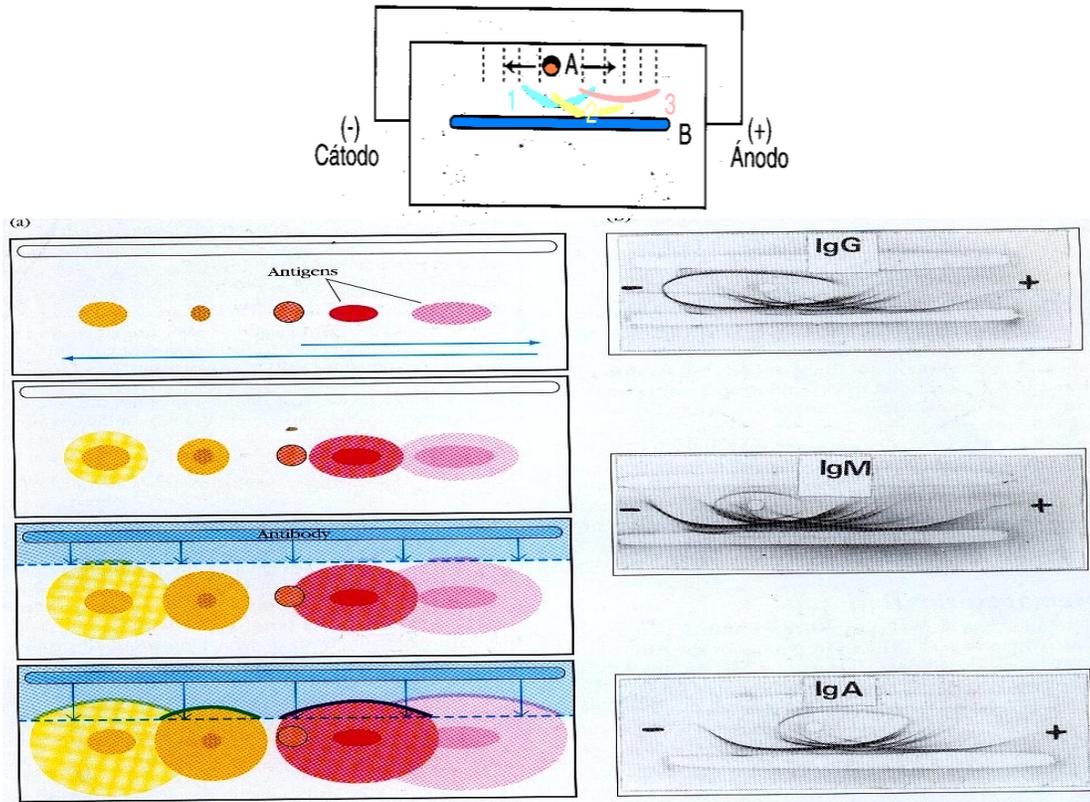


Fig. 7-13. Inmunolectroforesis. Figura superior A: pocillo con suero del paciente, B: anticuerpos anti- μ , α , γ , Modificado de: Negroni, 2006⁵. (Figura inferior) 1, 2 y 3: bandas de precipitación de IgM, IgA e IgG, respectivamente.³²

La IEF es una técnica en la que se combina la separación electroforética de las proteínas que actuarán como antígenos con una inmunodifusión secundaria posterior, es muy útil para detectar proteínas en el plasma, la orina u otros líquidos biológicos y también puede usarse para la detección de anticuerpos, por ejemplo en el diagnóstico de la hidatidosis (enfermedad parasitaria).

Como ejemplo para explicar esta técnica utilizaremos la detección de IgG, IgM e IgA en el suero.⁵

Técnica:

1. En un portaobjeto con una capa de agarosa se efectúa una perforación próxima al borde y en la parte media del portaobjeto, (A); en ella se coloca el suero del paciente (Fig. 7-13).
2. A continuación, se coloca el portaobjeto en una cuba electroforética durante cierto tiempo para separar cada uno de los componentes del suero según su movilidad electroforética. Las proteínas con carga positiva migrarán hacia el electrodo negativo y viceversa.
3. Posteriormente se efectúa una canaleta a lo largo de todo el portaobjetos (B) y en ella se colocan anticuerpos anti-IgG, anti-IgM y anti-IgA (más exactamente anti cadenas γ , μ y α).

4. Se incuba durante 18 a 24 horas para permitir que las proteínas del suero se unan con los anticuerpos que difunden en esta etapa.
5. Si el suero del paciente contiene IgG, IgM e IgA se observarán tres arcos de precipitación diferentes en la zona de equivalencia.⁵

3. TÉCNICAS DE AGLUTINACIÓN

Cuando un anticuerpo es puesto en contacto con su antígeno específico y éste es particulado (suspensión) al producirse la unión antígeno-anticuerpo se formará una malla o red que dará lugar a un sedimento con forma estrellada.

Los principios que regulan esta reacción son similares a los de la precipitación.

Antes se pensaba que este tipo de fenómeno se debía a un anticuerpo especial, al que se le dio el nombre de aglutinina, pero luego se descubrió que un mismo anticuerpo puede dar tanto una aglutinación como una precipitación según las características del antígeno.

Las ventajas más importantes de estas técnicas consisten en su mayor grado de sensibilidad (son hasta mil veces más sensibles que la precipitación), su sencillez y su bajo costo. Al igual que en el caso de la precipitación puede evaluarse visualmente el punto final (prueba de lectura directa).⁶

En la reacción de aglutinación se producen también los fenómenos de zona y de equilibrio o de equivalencia, como se ha observado al hablar de la precipitación (retículo de Marrack). La aglutinación se puede utilizar como técnica cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa. Un ejemplo de aglutinación cualitativa sería la realizada sobre portaobjetos; de la semicuantitativa, sería la aglutinación, sobre porta, de partículas de látex sensibilizadas, utilizando diluciones del suero; y como cuantitativa, la que se efectúa en tubos, con largas series de diluciones dobles del suero y cantidad constante de Ag. La elección de la técnica depende de sus objetivos, de la rapidez requerida y de la economía en reactivos. Al igual que ocurre en la precipitación, puede determinarse el título de la reacción como la mayor dilución en la que aparece el fenómeno visible de la aglutinación.⁵

Las aglutinaciones se clasifican en directas o activas, indirectas o pasivas (hemaglutinación, aglutinación con partículas, aglutinación de látex, aglutinación de la bentonita y coaglutinación) y de Coombs.

Las aglutinaciones activas son aquellas en las cuales el antígeno es naturalmente particulado o corpuscular, por ejemplo la suspensión de una bacteria.

Las aglutinaciones pasivas son aquellas en las cuales el antígeno interviniente originalmente era soluble pero se le convierte en particulado al adsorberlo a una partícula inerte. Por ejemplo, se pueden utilizar glóbulos rojos adsorbidos con lo que se obtiene una hemaglutinación pasiva; cuando el antígeno se adhiere a una partícula de látex, la reacción se conoce como prueba de látex y, si se trata de bentonita, el test de la bentonita. También se incluyen entre las aglutinaciones pasivas aquellas en las cuales se hace corpuscular el anticuerpo, por ejemplo, si se utilizan glóbulos rojos hemaglutinación inversa pasiva, si se usan partículas de látex prueba del látex y si se emplea *Staphylococcus aureus* (cepa Cowan) como partícula, coaglutinación.^{1,3, 4, 5, 6, 10, 13,18}

a. Pruebas de aglutinación directa

En estas pruebas se utilizan antígenos particulados; es decir, el antígeno forma parte de la superficie de microorganismos de gran tamaño (bacterias y protozoos). El antígeno se prepara como una suspensión del microorganismo, la cual tiene un aspecto lechoso y homogéneo. Al enfrentarla al suero del paciente, si en él hay anticuerpos frente a los antígenos las partículas microbianas aglutinan. Cuando la prueba se realiza en un tubo de ensayo, se produce un patrón de aglutinación característico (con el sobrenadante transparente) y al resuspender el sedimento se forman abundantes grumos. Cuando la reacción se ha practicado en micropocillos (placas tipo «microtiter»), el patrón de aglutinación es diferente: un sedimento amplio y granulado significa reacción positiva (aglutinación) y un botón puntiforme central, reacción negativa. Estas pruebas pueden requerir hasta 18 horas de incubación.

Para cuantificar los anticuerpos del suero, las reacciones de aglutinación se practican en una serie de tubos o micropocillos, en cada uno de los cuales se pone la misma cantidad de suspensión antigénica, pero en el primero se añade suero puro, en el segundo, el suero diluido a la mitad en solución salina (1/2), en el tercero, diluido a la cuarta parte (1/4), y así sucesivamente hasta diluciones elevadas, de 1/5.000 o más, para determinar la mayor dilución (menor cantidad de suero) en la que aún se evidencia aglutinación. El título de anticuerpos es la dilución más alta del suero en la que se detecta la aglutinación. Algunas pruebas de aglutinación, como las utilizadas para el diagnóstico de la brucelosis o la toxoplasmosis, son muy sensibles y específicas (Fig. 7-14).

La aglutinación también puede realizarse directamente sobre un portaobjetos, enfrentando la suspensión bacteriana al suero del enfermo; para facilitar la lectura, las bacterias pueden colorearse como en el rosa de Bengala, método empleado para el diagnóstico serológico de la brucelosis. Esta técnica en concreto resulta sencilla, rápida (minutos), sensible y específica.

Algunos anticuerpos de la clase IgG son poco aglutinantes porque tienen un pequeño tamaño y las partículas (antígenos) que se unen a cada uno de los brazos reactivos (Fab) quedan muy próximas entre sí. Si estas partículas poseen una carga eléctrica elevada, se repelen enérgicamente debido a su proximidad, impidiendo la aglutinación; lo que no sucede con la IgM por su mayor tamaño. Las IgG también pueden ser no aglutinantes cuando tienen las ramas Fab cerradas, y no pueden hacer de puente entre las partículas antigénicas. Como en los dos casos anteriores, los anticuerpos se unen al antígeno, pero no forman puentes; una Ig de cabra anti-IgG humana permite establecer el puente y producir la aglutinación. Esta técnica es la prueba de Coombs.^{3, 4, 5, 19, 22,28}

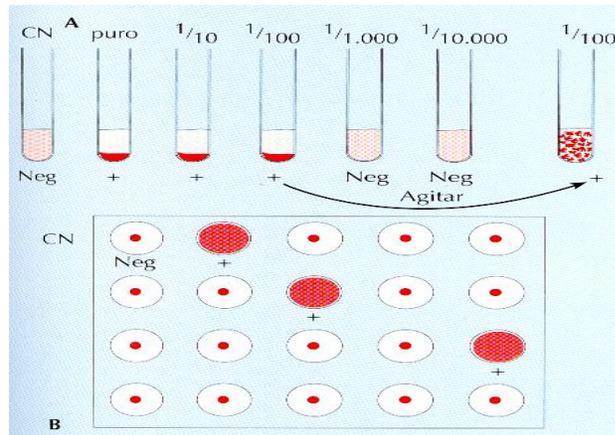


Figura 7-14. Serología. Aglutinación directa.³

Al enfrentar en un tubo una suspensión microbiana al suero de un paciente, si en el suero hay anticuerpos contra los antígenos de los microorganismos, estos quedan unidos entre sí por los anticuerpos formando grumos que aglutinan en el fondo del tubo. Esta reacción puede realizarse en tubos de ensayo convencionales y en micropocillos.

Para conocer la cantidad de anticuerpos existentes en el suero se enfrenta la suspensión antigénica a diversas diluciones del suero en solución salina (suero puro, diluido al 1/10, al 1/100, 1/1000, etcétera).

A. Aglutinación en tubo: el primer tubo de control, sin suero, es negativo (CN); en él la suspensión es homogénea. Los tres tubos siguientes son positivos y se observa la aglutinación (sedimentación) de las bacterias. Los dos siguientes son negativos. El último tubo es el positivo al 1/100 que se ha agitado para visualizar la suspensión de los grumos.

B. Aglutinación en micropocillo. En cada pocillo se ha puesto un suero diferente, por tanto, cada suero se estudia a una única dilución. Obsérvese el patrón de aglutinación positivo y negativo.

Neg: negativo. +: Positivo.³

b. Pruebas de aglutinación activa

Estas pruebas pueden ser utilizadas para identificar el antígeno (p. ej., bacterias, antígenos de glóbulos rojos [grupo sanguíneo]) o para detectar el anticuerpo.

Como ejemplo de aglutinación para identificar el antígeno utilizaremos la determinación de grupo sanguíneo.

Técnica:

1. En un portaobjeto se colocan 3 gotas de sangre (por separado) obtenidas por punción de la yema del dedo (Fig. 7-15).
2. A cada una de las gotas se le agregan, respectivamente, anticuerpos anti-A, anti-B y anti-D (Rh +)
3. Se mezcla con un palillo diferente cada una.
4. La aglutinación se hará visible en alrededor de un minuto.

En el ejemplo desarrollado el paciente corresponde a un grupo A Rh +

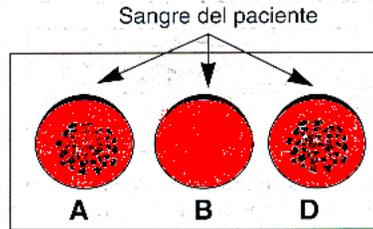


Fig. 7-15. Técnica de aglutinación activa. A: pocillo con anticuerpo anti-A. B: pocillo con anticuerpo anti-B. D: pocillo con anticuerpo anti-D. (Rh +). Modificado de: Negroni, 2006⁵

De la misma manera se pueden identificar bacterias a través de sus antígenos de superficie (p. ej., *Shigella*).

Es importante aclarar que en las reacciones de aglutinación sólo interaccionan antígenos superficiales y no los citoplasmáticos, dado que es imposible que los anticuerpos penetren en el interior de las células.

Como dijimos anteriormente la aglutinación activa también puede utilizarse para detectar anticuerpos como ejemplo describiremos la prueba utilizada para el diagnóstico de la brucelosis (reacción de Huddleson) (Fig. 7-16).

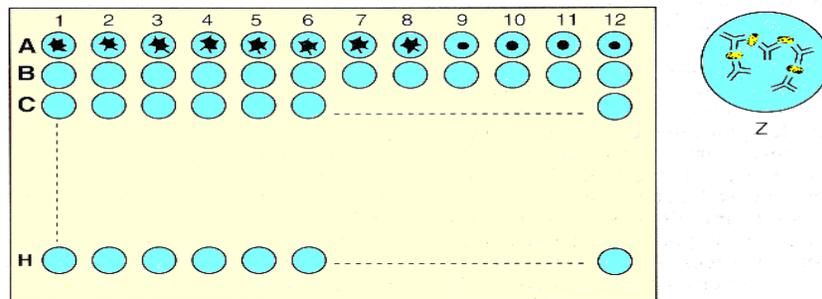


Fig. 7-16. Técnica de aglutinación activa para anticuerpos (cuantitativa). A, B y C...H: filas en las que se efectúan las diluciones del suero de cada paciente. Modificado de: Negroni, 2006⁵

Técnica:

1. En los pocillos de una policubeta se realizan las diluciones del suero del paciente (véase Diluciones en este capítulo). (Fila A.)
2. A cada pocillo se le agrega un volumen constante de la suspensión del antígeno (brucelas muertas).
3. Se incuba en las condiciones que corresponda.

Se procede a la lectura. Si el paciente tiene anticuerpos éstos (hasta una determinada dilución) serán capaces de aglutinar el antígeno y producir un sedimento de imagen estrellada (Z). Esa máxima dilución con resultado positivo se define como el título de anticuerpos, para nuestro ejemplo 1/256 (pocillo 8).

En ausencia de anticuerpos o ante una concentración muy baja de éstos la bacteria (antígeno) no se aglutina y sedimenta en la forma de un botón compacto (pocillo 9 en adelante).

Debe tenerse en cuenta que en las reacciones de aglutinación puede observarse el fenómeno de prozona.^{3, 4, 5, 6, 19, 22,28}

c. Aglutinación pasiva

Esta técnica transforma una reacción de precipitación en una de aglutinación, mediante el recubrimiento de partículas de látex, bentonita o glóbulos rojos que se emplean como soporte aumentando, de esta manera la sensibilidad de la prueba.

A los eritrocitos frescos (entre una semana y un mes de obtenidos, conservados en soluciones adecuadas como la de Alsolver) o momificados (con formaldehído o con glutaraldehído, se pueden conservar indefinidamente en congelación o liofilizados), se les pueden acoplar moléculas pequeñas o macromoléculas. Para antígenos de bajo peso molecular se utilizan compuestos que establecen enlaces covalentes con los grupos químicos del eritrocito. La mayoría de polisacáridos se absorben espontáneamente y las proteínas se pueden unir por medio de enlaces químicos usando compuestos como la carbodimina, glutaraldehído, bencidina bis-diazotizada o por el tratamiento previo del eritrocito con ácido tánico o cloruro de cromo. Los eritrocitos recubiertos con antígeno se denominan sensibilizados.

Con la aglutinación pasiva se pueden determinar cantidades muy pequeñas de anticuerpo de 0.02 a 0.04 μg (Tabla 7-1) y se pueden obtener títulos de 1:100,000 a 1:1, 000,000.^{3, 4, 5, 6, 17,19, 22,28}

Lo que se consigue mediante la adsorción de Ags solubles sobre la superficie de una célula, o de una partícula sintética. En el primer caso, el soporte suelen ser hematíes, que son recubiertos por el Ag soluble, convirtiéndose así en una prueba de «hemaglutinación pasiva», con «hematíes sensibilizados». Los mejores hematíes para realizar esta prueba son los humanos, generalmente 0 Rh.^{3, 4, 5, 6, 19, 22,28}

Tabla 7-1. Sensibilidad de algunas técnicas empleadas en la determinación de Antígenos y Anticuerpos¹⁷

<i>Método</i>	<i>Sensibilidad aproximada (por 100 ml)</i>
Inmunolectroforesis	5-10 mg
Difusión radial (Mancini)	1-2 mg
Doble difusión (Ouchterlony)	< 1 mg
Fijación de Complemento	1 μg
Aglutinación	1 μg
ELISA	100 ng
Inmunofluorescencia	< 1 pg
Radioinmunoensayo	< 1 pg

d. Pruebas de aglutinación pasiva

Estas pruebas son más sensibles que las de aglutinación activa debido al tamaño de las partículas que intervienen, al número de anticuerpos necesarios para que la reacción sea positiva o debido a ambas cosas.

Como ejemplo de ellas desarrollaremos una hemaglutinación pasiva (búsqueda del anticuerpo) y un test del látex (búsqueda del antígeno).^{3, 4, 5, 6, 19, 22,28}

e. Hemaglutinación pasiva

Esta técnica fue ideada por Boyden (1951), quien utilizó la taniación previa de los hematíes para su posterior sensibilización con el Ag sensibilizante. Un tratamiento final con formol permite la conservación de los hematíes sensibilizados durante varios meses. La unión pasiva del Ag al soporte hematíe puede hacerse también mediante unión química, utilizando, por ejemplo, bis-diazo-benzidina (BDB), aunque los hematíes así tratados se hemolizan precozmente. Otros puentes químicos para la unión de Ags proteicos a la superficie de los hematíes son el 2,2-diisocianato (Shick y Singer, 1961), la carbodimida (Johnson y cols. 1966), el cloruro de cromo (Gold y Fudenberg, 1967), y otros. En ciertos casos, no es necesaria la preparación previa de los hematíes, como ocurre con los Ags de naturaleza lipopolisacárida, que se adsorben a la superficie del eritrocito directamente. La membrana celular no sufre daño, y los hematíes pueden ser utilizados también para la prueba de Acs no aglutinantes, y para pruebas en las que interviene el complemento.^{3, 4, 5, 6, 19, 22,28}

Hemaglutinación Pasiva

Para el desarrollo de la técnica emplearemos la detección de anticuerpos en la enfermedad de Chagas (Fig. 7-17).

Técnica:

- En los pocillos de una policubeta se realizara dilución del suero del paciente (fila A).
- A cada pocillo se le agrega un volumen constante de una suspensión de glóbulos rojos que tienen el antígeno de *Trypanosoma cruzi* adsorbido de (X) en su superficie.
- Se deja incubar a la temperatura y el tiempo que corresponda.
- Se procede a la lectura.
- Si el paciente tiene anticuerpos éstos (hasta una determinada dilución) serán capaces de aglutinar el antígeno y producir un sedimento de imagen estrellada (Z).

Esa máxima dilución con resultado positivo se define como el título de anticuerpos, para nuestro ejemplo 1/32 (pocillo 5, dilución 32). En ausencia de anticuerpos o frente a una concentración muy baja de éstos los glóbulos rojos que tienen el antígeno adsorbido no se aglutinan y sedimentan en la forma de un botón compacto (pocillo 6 en adelante).^{3, 4, 5, 6, 19, 22,28}

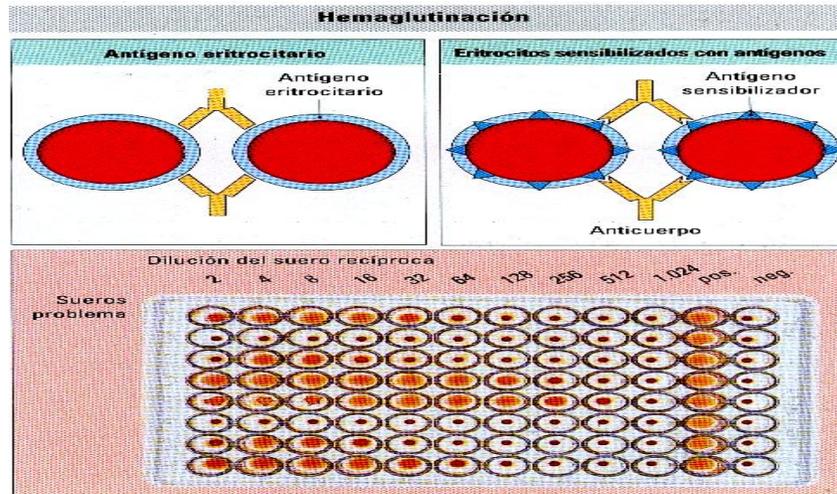
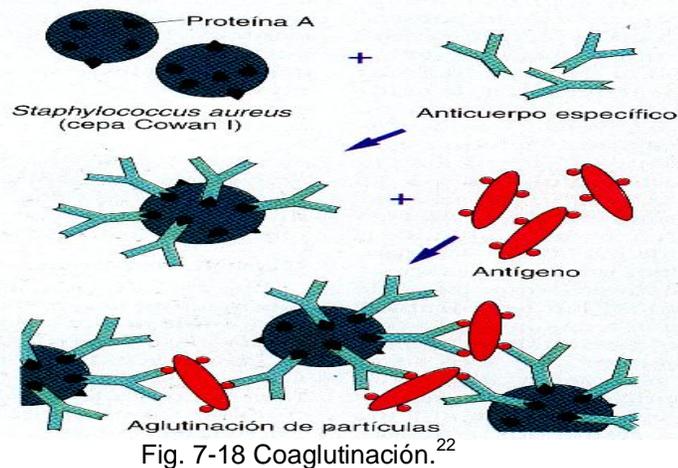


Fig. 7-17. Prueba de hemaglutinación con controles positivos y negativos en la fila 11 y 12.³³

f. Coaglutinación

La coaglutinación usa anticuerpos ligados a una partícula para intensificar la visibilidad de la reacción de aglutinación entre el antígeno y el anticuerpo. En este caso las partículas son microorganismos *S. aureus* (cepa Cowan 1) muertos y tratados, que en sus paredes celulares contienen gran cantidad de una proteína ligadora de anticuerpos, la proteína A. Al contrario de las partículas de látex, estos estafilococos se ligan solo a la base de la porción de la cadena pesada del anticuerpo y dejan ambos extremos fijadores de antígeno libres para formar complejos con el antígeno específico (fig. 7-18). Varios proveedores comerciales han preparado reactivos de coaglutinación para la identificación de estreptococos, entre los que se incluyen los grupos de Lancefield A, B, C, D, F, G y N; *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* tipos A a F desarrollados, en cultivo. La reacción de coaglutinación es muy específica, pero puede que no sea tan sensible como la aglutinación del látex para detectar cantidades pequeñas de antígeno. Por lo tanto, en general no se usa para la detección directa del antígeno.^{3, 4, 5, 6, 19, 22, 26,28}



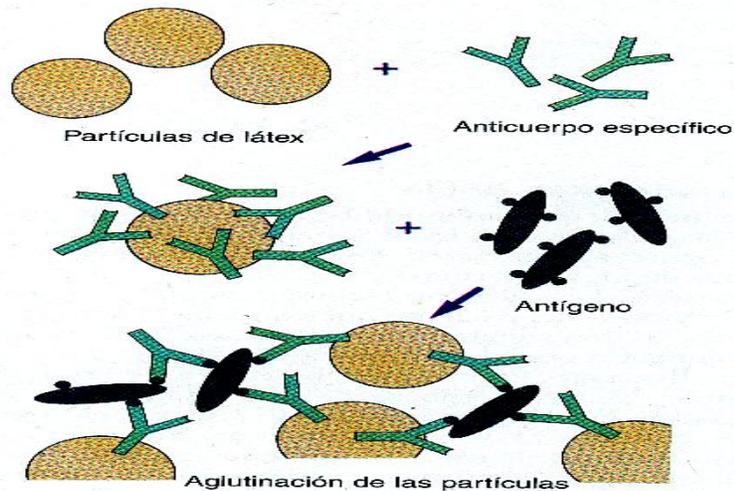


Fig.7-19. Disposición de las moléculas de anticuerpo unidas a la superficie de una partícula de látex y reacción de aglutinación de látex.²²

g. Aglutinación pasiva con partículas inertes

En este caso, las partículas portadoras pasivas del Ag son inertes, naturales o de síntesis, representadas básicamente, por orden cronológico, por: la bentonita (un tipo de arcilla), empleada por primera vez por Bozicevich y cols. (1951); partículas de colodión, que no tuvieron mucho éxito; partículas esféricas de látex (poliestireno), uno de los soportes más eficaces y utilizados en la actualidad, que tiene la propiedad de adsorber en su superficie antígenos proteicos y polisacáridos. Estas partículas sensibilizadas, puestas en presencia del suero problema, permitirán observar si se produce o no aglutinación, e incluso hacer una evaluación semicuantitativa de la tasa de Acs específicos presentes, según la intensidad del fenómeno. Esta prueba se realiza habitualmente sobre porta, requiere poca cantidad de suero y su sensibilidad es alta. Las partículas de soporte pueden ser teñidas con azul de metileno y estabilizadas con Tween 80, como mejora para la conservación y la lectura.^{3, 4, 5, 6, 19, 22,28}

h. Aglutinación de partículas de látex

Las moléculas de anticuerpo pueden unirse a la superficie de partículas de látex (poliestireno) con una distribución al azar (Fig. 7-19). Debido a que el número de moléculas de anticuerpo unidas a cada partícula de látex es muy grande, también lo es el número posible de sitios ligadores de antígeno expuestos. El antígeno presente en una muestra a probar se une a los sitios de combinación del anticuerpo expuestos sobre las superficies de las partículas de látex, formando agregados cruzados de partículas de látex y antígeno. El tamaño de la partícula de látex facilita la visualización de la reacción de aglutinación. Se ha demostrado que la aglutinación de partículas de látex puede detectar niveles de polisacáridos bacterianos de apenas 0,1 ng/ml. Debido a que el pH, la osmolaridad y la concentración iónica de la solución influyen en la cantidad de uniones que se producen, las condiciones en las cuales se llevan a cabo los procedimientos de

aglutinación de partículas de látex deben estandarizarse en forma cuidadosa. Además, algunos componentes de los líquidos corporales, como el factor reumatoide, producen reacciones falsas positivas en los sistemas disponibles de aglutinación de partículas de látex. Para neutralizar este problema se recomienda que todas las muestras se hiervan o se traten con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) antes de realizar la prueba. Los sistemas comerciales por lo general se llevan a cabo sobre tarjetas de cartón o placas de vidrio; las recomendaciones del fabricante deben seguirse estrictamente para asegurar la obtención de resultados precisos. Las reacciones se gradúan en una escala de 1+ a 4+, pero en general 2+ es la cantidad mínima de aglutinación observada en una muestra positiva. Junto con las partículas de látex de la reacción, se prueban partículas de látex control (recubiertas con anticuerpos de la misma especie animal en la que se han obtenido los anticuerpos específicos). Si la muestra del paciente o el aislamiento del cultivo reaccionan con las partículas de látex prueba y control, la prueba se considera inespecífica y, por consiguiente, no interpretable.

Las pruebas de látex son muy populares en los laboratorios clínicos para detectar el antígeno de *Cryptococcus neoformans*, en líquido cefalorraquídeo o en suero (Fig. 7-20), y para confirmar la presencia de *Streptococcus beta-hemolítico* en placas de cultivo (Fig. 7-21). Las pruebas de látex también están disponibles para detectar *Streptococcus agalactiae*, toxinas A y B de *Clostridium difficile* y rotavirus.^{3, 4, 5, 6, 19, 22, 26, 28,}

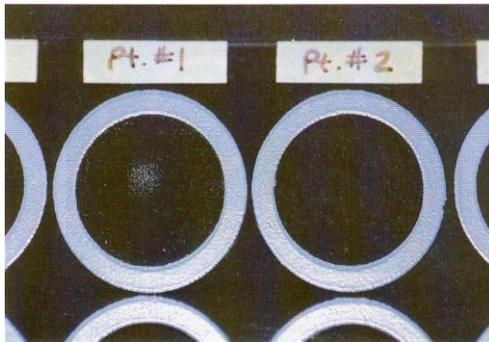


Fig.7-20. Cryptococcal Antigen Latex Agglutination System. El paciente 1 tiene Aglutinación; el paciente 2 es negativo.²²

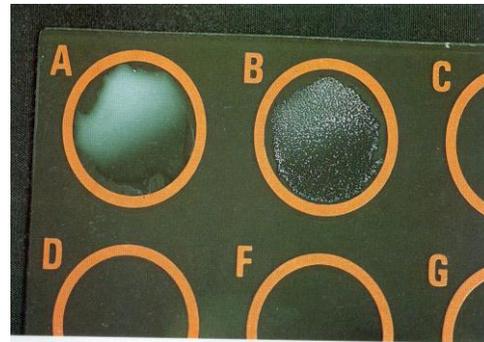


Fig.7-21. Una colonia de streptococcus beta-hemolítico se aglutina con una suspensión de látex con streptococcus grupo B (streptococcus agalactiae).²²

i. Test del Látex

Para el desarrollo de la técnica utilizaremos la detección de estreptococos β -hemolíticos del grupo A.

Técnica:

1. Se toma una muestra de la faringe del paciente por medio de un hisopo.
2. Se sumerge el hisopo en una solución de pronasa (enzima) a fin de exponer el carbohidrato de la pared que identifica al grupo (N-acetilglucosamina y ramnosa).

3. Se coloca en un portaobjeto una gota de la muestra ya procesada y una gota del reactivo de látex (partículas de látex con anticuerpos anti-estreptococos del grupo A adsorbidos en su superficie).
4. Se mezcla con un palillo y a los 2 minutos se observa.
5. La presencia de aglutinación indica que hay estreptococos β -hemolíticos del grupo A en la faringe.^{3, 4, 5, 6, 19, 22,28}

4. PRUEBAS DE FIJACIÓN DE COMPLEMENTO

El complemento fue originalmente descrito por Pfeiffer como un factor presente en el suero de los animales convalecientes, el cual era capaz de causar la lisis de los microorganismos infectantes (las primeras observaciones fueron con *Vibrio cholerae*). Posteriormente, en 1899, Bordet encontró que la capacidad lítica del suero dependía no de uno, sino de dos factores, uno termolábil y otro termoestable. Bordet llamó "alexina" al factor termolábil cuyo efecto desaparecía al calentar el suero a 56°C durante una hora. Puesto que el efecto lítico del suero no se observaba cuando faltaba alguno de los dos factores, Ehrlich propuso el término de complemento (en lugar del de alexina) para describir la actividad complementaria del factor termolábil en la lisis de microorganismos.

Actualmente se sabe que el complemento es un sistema constituido por un conjunto de proteínas presentes en el suero de todos los animales y que su presencia es independiente del estado inmune del animal, esto es, que sus niveles no se incrementan por inmunización. Muchas de las proteínas que conforman el sistema del complemento tienen actividad enzimática, aunque circulan como zimógenos o enzimas no activadas. Cuando se activan *in vivo*, estas proteínas ejercen diversos efectos sobre otras proteínas, y sobre células alterando su fisiología y la homeostasis tisular. Estos cambios promovidos por la activación del sistema del complemento son los responsables de la reacción inflamatoria cuyas manifestaciones son: dolor, calor, rubor (enrojecimiento) y pérdida de la función. El complemento es, así, un mediador muy importante de inflamación.²

Uno de los métodos clásicos para demostrar la presencia de anticuerpos en el suero de un paciente ha sido la prueba de fijación de complemento (CF). Esta prueba consta de dos sistemas separados. El primero (sistema de prueba) consiste en el antígeno sospechoso de causar la enfermedad y el suero del paciente. El segundo (sistema indicador) consiste en una combinación de eritrocitos de oveja, anticuerpos (IgG) fijadores de complemento, fabricados contra los eritrocitos de oveja en otro animal, y una fuente exógena de complemento (habitualmente suero de cobayo). Cuando estos tres componentes se mezclan en concentraciones óptimas, el anticuerpo antieritrocito de oveja se unirá a la superficie de los glóbulos rojos y el complemento se unirá después al complejo antígeno-anticuerpo; al final produce la lisis (estallido) de los eritrocitos. Por esta razón el anticuerpo antieritrocito de oveja también se llama hemolisina. En la prueba de CF estos dos sistemas se prueban en sucesión (Fig. 7-22). El suero del paciente se agrega primero al antígeno sospechoso; luego a la solución se agrega una cantidad limitante de complemento. Si el suero del paciente contiene el anticuerpo contra el antígeno, los complejos antígeno-anticuerpo resultantes ligarán todo el complemento agregado. En el siguiente paso se agregan los

eritrocitos de oveja y la hemolisina (el sistema indicador). El complemento estará disponible para unirse a los complejos eritrocitos de oveja-hemolisina y producir su lisis sólo si no ha sido captado por los complejos formados con el anticuerpo del suero del paciente. Un resultado positivo significa que el paciente posee anticuerpos fijadores de complemento y se manifiesta por la ausencia de lisis de los glóbulos rojos en el sistema de prueba final. La lisis de las células del indicador indica ausencia de anticuerpos y una prueba de CF negativa. Aunque requiere muchas manipulaciones, por lo menos 48 horas para completar ambos pasos y a menudo da resultados inespecíficos, esta prueba se ha usado durante años para detectar muchos tipos de anticuerpos, en particular antivirales y antifúngicos.^{1, 3, 4, 17, 18, 22,26}

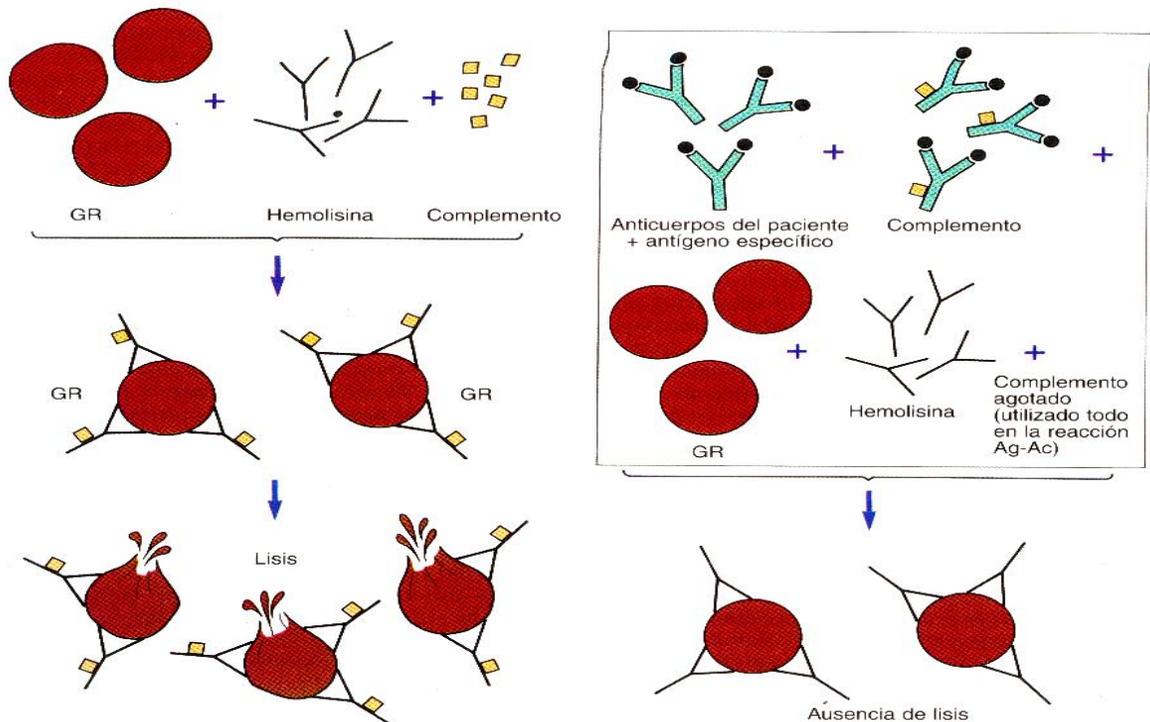


Fig. 7-22 Prueba de fijación de complemento.²²

Técnica:

La ejecución de esta técnica se lleva a cabo en dos etapas (Fig. 7-23).

a. Primera etapa

1. Se calienta el suero obtenido del paciente durante 30 minutos a 56°C para inactivar su complemento y se efectúan diluciones de dicho suero en una policubeta. (Sólo se esquematiza un pocillo de la policubeta para cada tipo de respuesta).
2. Se agrega a cada pocillo una cantidad conocida de antígeno y complemento obtenido de suero de cobayo y previamente titulado para comprobar que produzca a la hemólisis deseada.
3. Se incuba en las condiciones que correspondan.

La observación de la policubeta en esta etapa no nos permite detectar la reacción antígeno-anticuerpo. Para poder averiguar si se ha producido la reacción será necesario realizar la segunda etapa, que agrega el sistema indicador (lectura indirecta) o mezcla hemolítica.

b. Segunda etapa

1. Se agrega en cada tubo el sistema indicador para, determinar si el complemento se consumió o no en la primera etapa. El sistema indicador consiste en glóbulos rojos de carnero y suero de conejo antiglóbulos rojos de carnero (de modo que es otro sistema Ag-Ac).
2. Luego de la incubación en condiciones óptimas se procede a la lectura.
3. Si el suero del paciente tenía anticuerpos se habrá unido al antígeno y esto habrá activado y consumido al complemento. En consecuencia, el sistema indicador no habrá sido hemolizado; estos eritrocitos, simplemente precipitan y forman un botón rojo en el fondo de los pocillos.

Conclusión: SI hay anticuerpos. NO hay hemólisis.

- Por el contrario, si el suero no tenía anticuerpos el complemento habrá, quedado libre y en consecuencia se habrá consumido por la reacción antígeno-anticuerpo representada por el sistema indicador, lo que habrá producido la hemólisis de los glóbulos rojos de carnero.

Conclusión: Si NO hay anticuerpos. SÍ hay hemólisis.

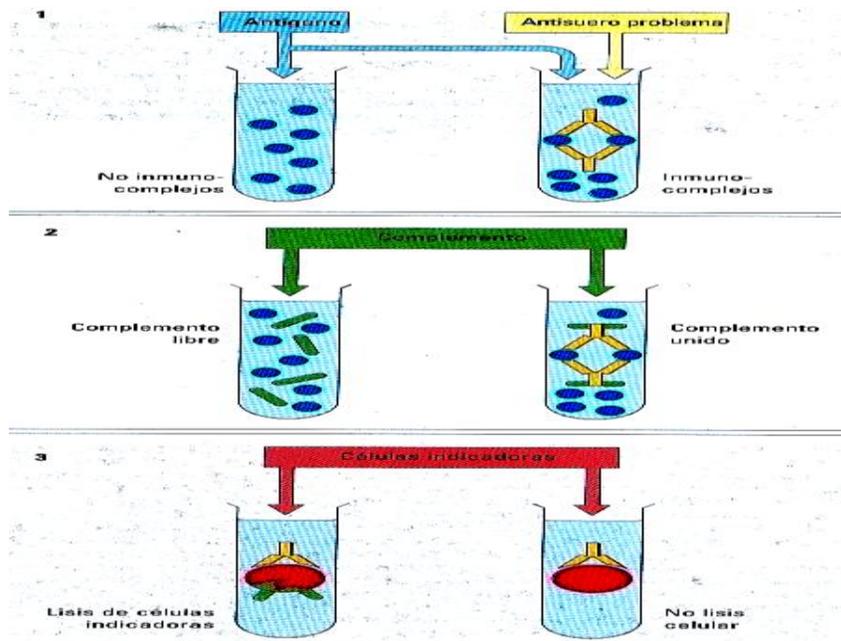
El título de anticuerpos es indicado por la máxima dilución que inhibe la hemólisis en un 100% (0% de hemólisis) o que la inhibe en un 50%. Como vemos, para esta técnica existen dos variantes para la titulación del anticuerpo. Según se tome como parámetro el 100% o el 50% de hemólisis. ^{1, 3, 4, 6, 17, 18, 22,26}

5. INMUNOMARCADO

Las pruebas para detección de anticuerpo o antígeno en muestras de pacientes sirven para realizar el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de trastornos clínicos o de procesos infecciosos. Este tipo de ensayos reciben el nombre de pruebas serológicas. Entre las pruebas serológicas, empleadas más comúnmente, sensibles o específicas podemos enumerar las siguientes:

a. Inmunofluorescencia

Esta técnica se puede utilizar para detectar anticuerpos circulantes o como una técnica histoquímica o citoquímica para detectar y localizar antígenos en tejido. Esta técnica puede ser directa o indirecta.

Fig. 7-23 Técnica de fijación de complemento.³³

1) Inmunofluorescencia directa

Fundamento: Para identificar un antígeno en circulación o en tejidos se utiliza un anticuerpo monoclonal o policlonal específico para dicho antígeno, conjugado a un fluorocromo como la fluoresceína o la rodamina. El isotiosionato de fluoresceína (emite un color verde a 517 nm) y el isotiosionato de tetrametil rodamina (emite un color rojo entre 550 y 580 nm), se une covalentemente a las proteínas en un pH adecuado para cada una de ellas. El tejido o las células donde se va a buscar el antígeno, previamente fijados a un portaobjetos se cubren con el anticuerpo conjugado y se incuban a temperatura ambiente o a 37°C durante media hora o una hora, a 4°C toda la noche si nuestro conjugado tiene baja afinidad por nuestro antígeno. Después de la incubación se lava la muestra con un amortiguador salino, se contrasta la preparación con azul de Evan a la concentración adecuada durante 10 minutos, se deja secar y se monta en glicerol con propilgalato. La muestra se observa bajo el microscopio de luz ultravioleta.

Si se usan dos anticuerpos con especificidad para antígenos diferentes, uno conjugado con fluoresceína y otro con rodamina, se pueden identificar y localizar en una preparación más de un antígeno diferente.

2) Inmunofluorescencia indirecta

Se emplea para la detección de anticuerpos en suero. Se coloca el antígeno, en un portaobjeto, se fija y se coloca el suero problema. Se incuba 30-60 minutos a temperatura ambiente, se lava la preparación con amortiguador, se coloca el antisuero fluoresceínado (antisuero total o anti alguna inmunoglobulina en especial), se incuba, se lava, se monta y se observa bajo el microscopio con una lámpara de luz ultravioleta (Fig. 7- 24).¹⁷

La principal ventaja de los ensayos de inmunofluorescencia es que permiten la evaluación visual de la suficiencia de una muestra. Éste es un factor importante cuando se usan pruebas para cuerpos elementales de clamidias o antígenos del virus sincitial respiratorio (RSV). Los microscopistas pueden ver si la muestra fue tomada de las células epiteliales cilíndricas del orificio cervical, en el caso de la DFA para clamidias, o de las células basales del epitelio nasal, en el caso del RSV. Sin embargo, muchos consideran un problema que la lectura de los preparados sea totalmente subjetiva y que los microbiólogos deban tener un gran entrenamiento para realizar la prueba. Muchos otros consideran el requisito de un microscopio de fluorescencia como un lujo. Además la fluorescencia se desvanece rápido, lo que hace difícil conservar los preparados. Por consiguiente, los anticuerpos se han conjugado con otros marcadores, además de los colorantes fluorescentes. Estas nuevas marcas colorimétricas usan enzimas, como la peroxidasa del rábano picante, la fosfatasa alcalina y la avidina-biotina, para detectar la presencia de antígeno por conversión de un sustrato incoloro en un producto final coloreado. Las ventajas de estas marcas son que permiten la realización de preparados permanentes, porque las reacciones no se deterioran con el almacenamiento y pueden detectarse con un microscopio óptico simple.

Las pruebas de inmunofluorescencia se usan habitualmente para detectar *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Pneumocystis*, *Trichomonas*, virus del herpes simple, citomegalovirus, virus varicela zoster, RSV, adenovirus, virus de la influenza y virus parainfluenza en muestras clínicas.

En la actualidad en el comercio están disponibles pruebas de IFA para anticuerpos contra especies de *Legionella*, *B. burgdorferi*, *T. gondii*, virus de la varicela zoster, citomegalovirus, antígeno de cápside, antígeno temprano y antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr, virus del herpes simple tipos 1 y 2, virus de la rubéola, *M. pneumoniae*, *T. pallidum* (prueba treponémica fluorescente de absorción de anticuerpos [FTA-ABS]) y varias rickettsias.²²

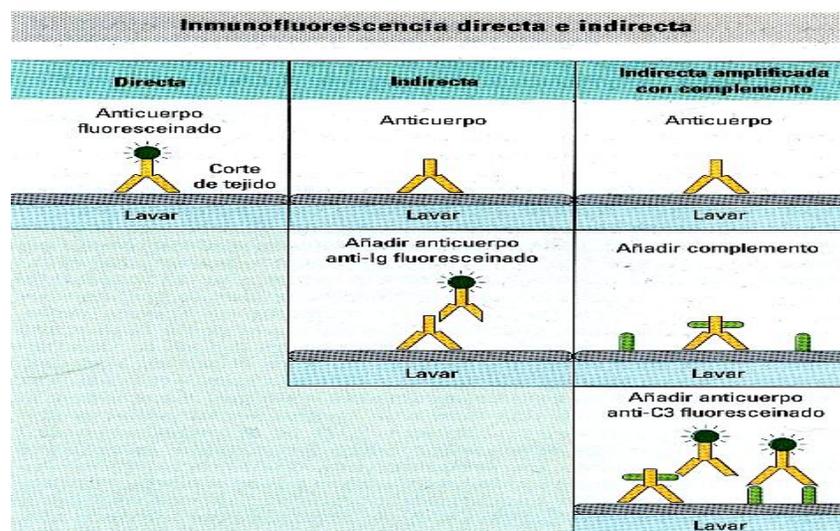


Figura 7-24. Inmunofluorescencia directa e indirecta.³³

b. Radioinmunoanálisis

La técnica del radioinmunoanálisis (RIA) se ha convertido en un instrumento extremadamente importante en la investigación biomédica y en la práctica clínica (p. ej. en cardiología, banco de sangre, diagnóstico de alergias y endocrinología). De hecho, Rosalyn Yalow ganó el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1977 por desarrollarlo. EL RIA emplea un antígeno purificado, que se marca con un radioisótopo y que compite con un antígeno estándar no marcado o con él un antígeno de la muestra experimental. Evidentemente, la competición se establece entre ambos antígenos por unirse con los anticuerpos. La radiactividad asociada al anticuerpo se detecta después por medio de analizadores de radioisótopos y autorradiografía (emulsiones fotográficas que muestran zonas de radiactividad). Si existe mucho antígeno en la muestra experimental, competirá con el antígeno marcado con radioisótopos por los paratopos del anticuerpo, y se ligará poca radiactividad. Una gran cantidad de radiactividad ligada indica que en la muestra experimental había poco antígeno.²²

Radioinmunoanálisis (RIA)

Esta técnica fue desarrollada por Yalow y Berson en 1959 para la determinación de la insulina en suero y su cualidad más importante es su extremada sensibilidad, que permite detectar cantidades pequeñísimas del antígeno o del anticuerpo. Entre sus desventajas mencionaremos las inherentes a la utilización de radioisótopos como sustancia marcadora.

En la actualidad esta técnica es aplicable no sólo a la determinación de una gran variedad de hormonas sino también a cualquier otra molécula capaz de comportarse como antígenos, sean éstos microbianos, tumorales, etcétera.

Una variante del RIA está dada por las técnicas basadas en el marcado con isótopos radiactivos, como las denominadas radioinmunométricas, cuyos pasos son similares a los del EIA.

A modo de ejemplo explicaremos la determinación de IgE específica para la procaína (anestésico) (RAST/radioalergosorbent test) (Fig.7-25).⁵

Técnica:

1. Se toma un disco de papel impregnado con procaína y se le agrega el suero del paciente (A).
2. Si el paciente posee anticuerpos, éstos se unirán a la procaína (B).
3. Se lava.
4. Se agrega un anticuerpo anti-IgE (anti E) marcado con el isótopo radiactivo, el cual de estar presente la IgE del paciente, se unirá (C).
5. Se incuba y se lava.
6. La presencia de radiactividad medida en un contador de centelleo nos indicará que el paciente posee anticuerpos IgE antiprocaína (D).⁵

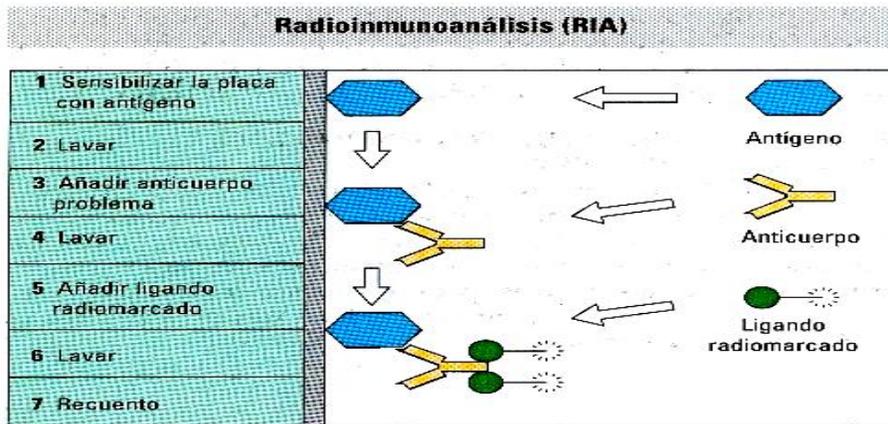
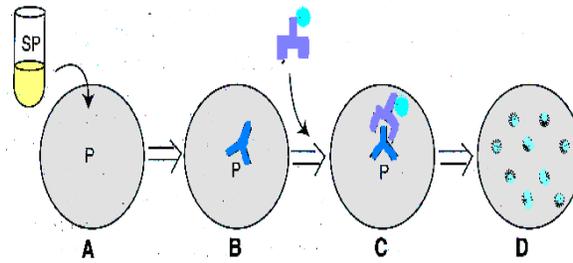


Fig.7-25. RAST: SP: suero del paciente. P: procaina, Y: anticuerpo del paciente Y●: gammaglobulina de conejo anti-Ig E marcada. *: Elemento radiactivo. Modificado de: Negroni, 2006^o Radioinmunoanálisis (RIA)³³.

c. ELISA

Las pruebas de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) utilizadas en serología se basan en el mismo principio de las de detección de antígeno. En el ELISA indirecto se fija en el fondo de un pocillo el antígeno microbiano y se añade el suero de un paciente, lavándose después el pocillo; si el suero poseía anticuerpos contra ese antígeno, éstos se habrán fijado a él, arrastrándose mediante lavado el resto de las inmunoglobulinas existentes en el suero.

A continuación se añaden anticuerpos dirigidos contra la IgG humana, que se han obtenido en el conejo y se han marcado con una enzima (anti-IgG^E). Si las IgG del suero del paciente se han fijado al antígeno, los anticuerpos de conejo marcados (anti-IgG^E) se unirán a ellas. Si el suero del paciente carece de anticuerpos contra el antígeno, los anti-IgG^E no podrán fijarse y serán arrastrados y eliminados por el lavado. Al añadir el sustrato incoloro, si se ha producido la reacción antígeno-anticuerpo, aparecerá color. (Ag-IgG-anti-IgG^E → sustrato incoloro = producto coloreado). Si el paciente carecía de anticuerpos contra el microbio, no se puede producir la reacción coloreada (Ag + sustrato incoloro) (Fig. 7.26).

Los antígenos pueden fijarse sobre membranas de nitrocelulosa para detectar la presencia de anticuerpos por una técnica rápida, consistente en bañar la membrana con el suero del paciente y revelar los anticuerpos fijados mediante anticuerpos marcados con una enzima, añadiendo posteriormente un sustrato. Se

trata por tanto de una reacción de ELISA convencional, practicada sobre una membrana cuyo desarrollo puede completarse en un breve período de tiempo (Fig. 7-27).

Otra manera de desarrollar la reacción es la técnica del ELISA competitivo. (Fig. 7-28c). El antígeno se fija a la fase sólida (pocillos, bolas de plástico, etc.), como en el caso anterior, y se añade el suero del paciente y una cantidad conocida de anticuerpos contra el antígeno marcados con una enzima. La cantidad de anticuerpos marcados que se fijarán al antígeno (y que por tanto no serán arrastrados por el lavado) será proporcionalmente inversa a la cantidad de anticuerpos restantes en el suero del paciente, ya que éstos también se fijarán al antígeno compitiendo con los anticuerpos marcados para unirse a él. Esta prueba suele tener mayor sensibilidad que su equivalente ELISA indirecto.³

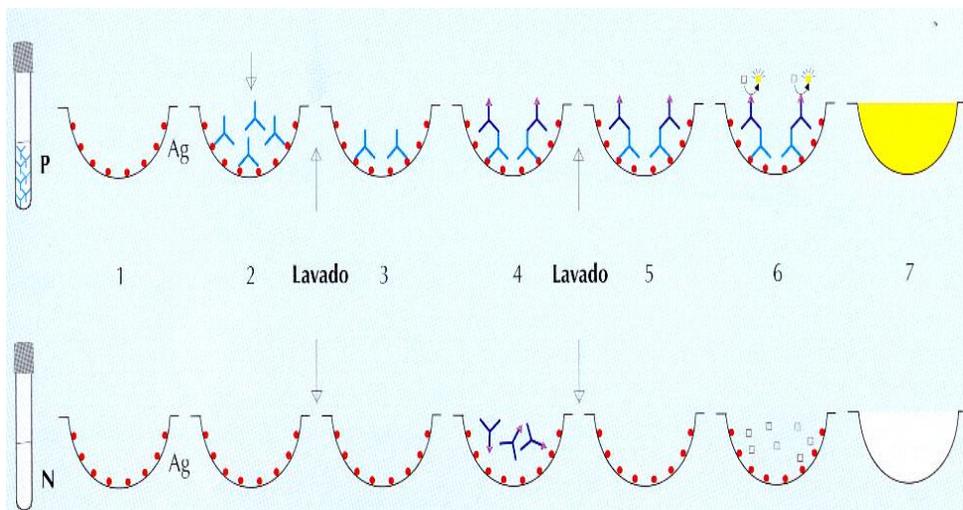


Figura 7-26. Serología. Técnica de enzimoanálisis (EIA).

Las técnicas de EIA se hallan entre las más utilizadas en serología y, en general, poseen un desarrollo semejante a las utilizadas para la detección de antígeno. Habitualmente estas pruebas se diseñan para detectar los anticuerpos de la clase IgG, ya que los resultados obtenidos con estos anticuerpos, desde el punto de vista cuantitativo, en la práctica, son equivalentes a la determinación de anticuerpos totales.

Arriba se muestra un suero positivo (P) para un determinado antígeno y abajo un suero negativo (N). 1) El pocillo lleva fijado el antígeno (Ag). 2) Se añade el suero del paciente. Arriba los anticuerpos se unen al antígeno, abajo no hay anticuerpos para ese antígeno. 3) Al lavar se eliminan todos los anticuerpos excepto los fijados al antígeno. 4) Se añade una anti-IgG humana marcada con una enzima (Δ), que arriba se fija a los anticuerpos unidos al antígeno que son en su gran mayoría IgG. Abajo no hay anticuerpos a los que unirse. 5) La anti-IgG no fijada es eliminada por el lavado. 6) Al añadir el sustrato, la enzima lo transforma en un compuesto coloreado. 7) La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos del suero.

La detección de los anticuerpos de la clase IgG, en la práctica y desde el punto de vista cuantitativo, tiene el mismo significado que la detección de «anticuerpos totales».³

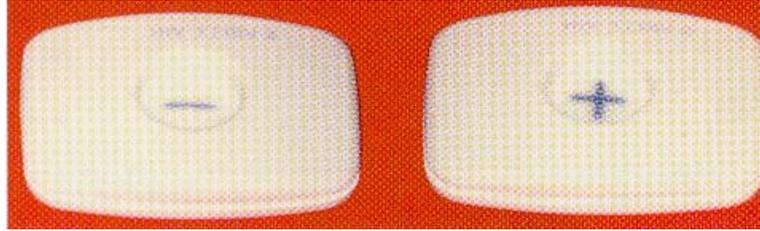


Figura 7-27. Serología. EIA en membrana.

Se han comercializado pruebas de EIA para estudio serológico (detección de anticuerpos). En ellas el antígeno está fijado a una membrana de nitrocelulosa. La prueba es sencilla de realizar y rápida, pudiendo obtenerse resultados en 15-30 minutos.

El control negativo (izquierda) se evidencia al añadir el suero del paciente, ya que en la línea horizontal hay anticuerpos antiglobulina humana, que captan las del paciente. En la línea vertical está fijado el antígeno que capta las Ig del suero específicas para él, si están presentes (derecha). Los anticuerpos captados se revelan con una anti-IgG-marcada con una enzima y la posterior adición de un sustrato. Por tanto, la línea horizontal aparece siempre y la vertical sólo si el suero es positivo. El desarrollo de la reacción es idéntico al señalado en la figura 7-25.³

1) Modalidad sandwich de la técnica de ELISA

La prueba de doble anticuerpo en sandwich se emplea para la detección de antígenos. En esta prueba, se coloca el anticuerpo específico en los pocillos de una placa de microtitulación (o sobre una membrana). El anticuerpo se adsorbe en las paredes, sensibilizando la placa. Después se añade a cada pocillo un antígeno de prueba. Si el antígeno reacciona con el anticuerpo, el antígeno es retenido al lavar el pocillo para eliminar el antígeno libre. Después se añade a cada pocillo un conjugado de enzima-anticuerpo específico del antígeno. El complejo final está formado por un anticuerpo-enzima externo, un antígeno en medio, y un anticuerpo interno, es decir, un sandwich en capas (Ac-Ág-Ac). Después se añade un sustrato que la enzima convertirá en un producto de color, y el producto resultante se cuantifica mediante la determinación de la densidad óptica de los pocillos de la placa. Si el antígeno ha reaccionado con los anticuerpos adsorbidos en el primer paso, la prueba de ELISA es positiva. Si el antígeno no es reconocido por el anticuerpo adsorbido, la prueba de ELISA es negativa, porque el antígeno no ligado es eliminado con el lavado, y no se liga el conjugado anticuerpo-enzima. Esta prueba se emplea en la actualidad para la detección de infecciones por *Helicobacter pylori* de los agentes que causan la sífilis, brucelosis, salmonelosis y cólera. Muchos otros antígenos pueden detectarse también con el método de sandwich. Por ejemplo, existen kits de ELISA en el mercado que pueden estudiar más de 90 alérgenos alimentarios diferentes.²⁴

Enzimoinmunoensayo (EIA) o ensayo inmunoabsorbido ligado a enzimas (ELISA)

Esta técnica, que fue desarrollada por Engvall y Pesce (1978), es una de las más ampliamente utilizadas en la actualidad debido a su simplicidad, su rapidez, su bajo costo y de ser conveniente, la posibilidad de automatizarla. Existen dos métodos básicos:

- Técnica sándwich de doble anticuerpo. (Fig. 7-28b).
- Ensayo indirecto inmunoabsorbido ligado a enzimas (Fig. 7-28a).

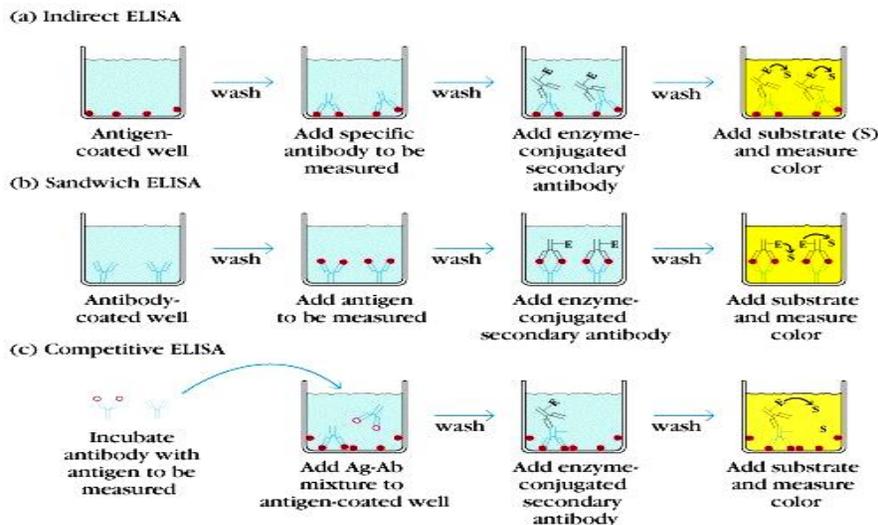


Figura 7-28. Modalidades de la técnica de Enzimoimmunoensayo (EIA) o ensayo inmunoabsorbido ligado a enzimas (ELISA).³²

Técnica sandwich de doble anticuerpo

Como ejemplo desarrollaremos la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBs) (Fig. 7-29).

Técnica:

1. En una placa de microtitulación con anticuerpo anti-HBs adsorbido se agrega suero del paciente (A), se incuba y se lava.
2. Si el suero del paciente contiene el antígeno HBs éste se unirá al anticuerpo adsorbido en el pocillo (B).
3. Se efectúan varios lavados.
4. Luego se añade un anticuerpo anti-antígeno HBs marcado con la enzima (C).
5. Si ambos anticuerpos han reaccionado con el antígeno se habrá formado un sandwich: Ac-Ag-Ac (D).
6. Se realizan varios lavados y se agrega el sustrato de la enzima; la actividad enzimática sobre el sustrato (E) se visualiza por un cambio de color que se puede detectar a simple vista o por medio de un espectrofotómetro (F).⁵

d. Ensayo indirecto inmunoabsorbido (EIA)

Usaremos la determinación de anticuerpos anti-HIV (Fig. 7-30).

Técnica:

1. Sobre un soporte de plástico con antígeno HIV adsorbido se coloca el suero del paciente.
2. Si dicho suero contiene anticuerpos éstos se unirán al antígeno.
3. Se incuba y se lava.
4. Se agrega una gammaglobulina de conejo anti-gammaglobulina humana marcada con la enzima que finalmente se unirá al anticuerpo del paciente.

5. Se incuba y se lava.
6. Se agrega la solución de sustrato; en este caso el sustrato no sólo modifica su color, por acción de la enzima, sino que además se precipita sobre la zona de la reacción antígeno anticuerpo.
7. Se lava, se deja secar y se observa.

La presencia de color en el soporte en la zona donde se encuentra adsorbido el antígeno indica una reacción positiva.⁵

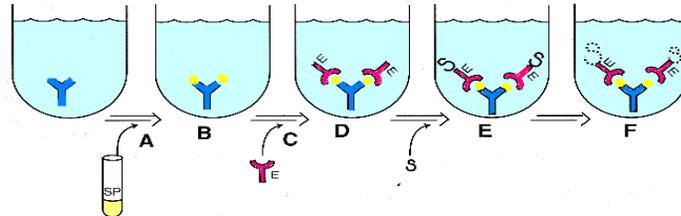


Fig. 7-29. Técnica ELISA Sandwich de doble anticuerpo. SP: suero del paciente Y: Anticuerpo antiantígeno HBs. ●: Antígeno HBs. YE: Anticuerpo anti-HBs marcado. S: Sustrato. (Fig. 7-27b). Modificado de: Negroni, 2006⁵

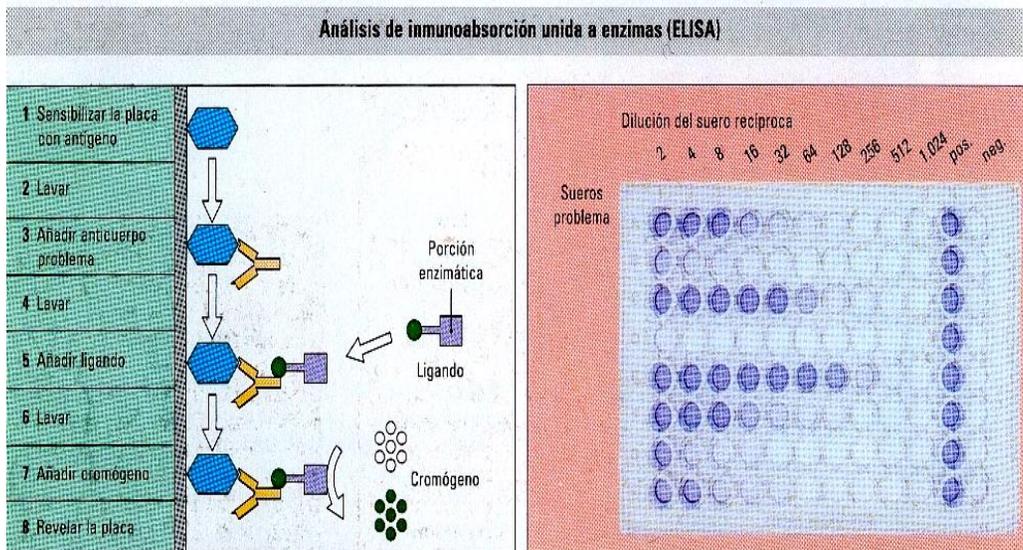


Fig. 7-30. Técnica del ensayo indirecto inmunoabsorbido (EIA).³³

Las enzimas más utilizadas para conjugar con el Ac son la peroxidasa de rábano, la betagalactosidasa, la fosfatasa alcalina y la ureasa. Las pruebas son fáciles de realizar, normalmente pueden ser automatizados y realizarse un gran número de ellas en poco tiempo, con escaso consumo de reactivos, con lectura cuantitativa y registro de los resultados.

Algunas modificaciones de las técnicas ELISA que mejoran su sensibilidad están basadas en la extraordinariamente alta afinidad de la avidina, una proteína de la clara de huevo o la estreptavidina, una proteína de *Streptomyces avidinii*, para unirse a la biotina, una vitamina. La biotina se fija fácilmente de forma covalente a los Acs y enzimas, tal como la peroxidasa, sin perjudicar su reactividad con los Ags o con el sustrato. Para detectar la unión específica de un Ac a un Ag fijado a un sustrato de plástico (fig. 7-31, a) puede añadirse a este sistema Ag-Ac un complejo avidina-biotina-enzima, así como el sustrato para el

enzima correspondiente. La presencia de cuatro moléculas de biotina marcada con enzima (peroxidasa), aumenta la sensibilidad por cada unidad Ag-Ac. Otra alternativa se representa en la figura 7-31, b, en cuyo sistema se detecta la unión Ag-Ac mediante la adición de biotina, unida a avidina marcada con el enzima utilizado. (La biotina puede utilizarse no sólo con un marcador enzimático, sino también con otro isotópico.) (En la figura 7-31 no se representa la reacción con streptavidina pero la secuencia sería igual a cuando se utiliza avidina).⁴

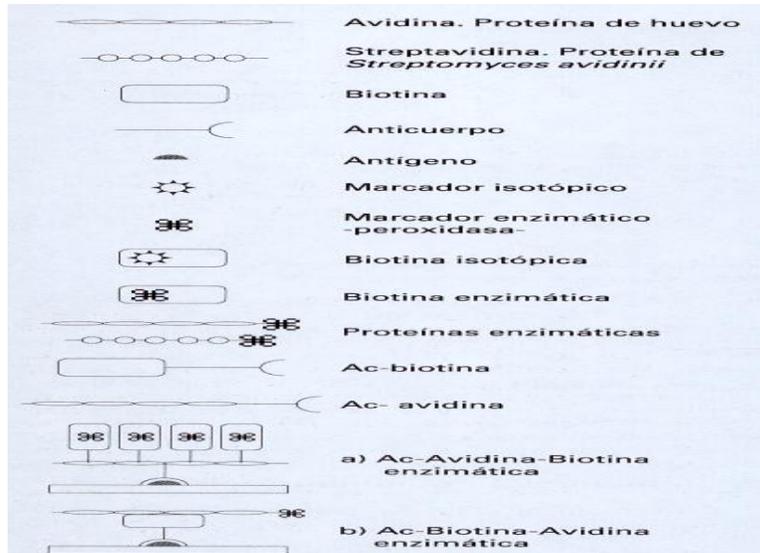


Fig. 7-31. Utilización de la Biotina-Avidina en la técnica de ELISA.⁴

e. Pruebas de neutralización

Los anticuerpos que inhiben la infectividad de un virus por el bloqueo de su receptor de las células del huésped se denominan anticuerpos neutralizantes. El suero a evaluar se mezcla con una suspensión de partículas virales infecciosas del mismo tipo de las que se sospecha que está infectado el paciente. Una suspensión control de virus se mezcla con suero normal. Las suspensiones virales se inoculan luego en un sistema de cultivo celular que soporte el crecimiento del virus. Las células control mostrarán infección viral. Si el suero del paciente contiene anticuerpos contra el virus, el anticuerpo se unirá a las partículas vitales y les impedirá invadir las células del cultivo. El anticuerpo ha neutralizado la "infectividad" del virus. Estas pruebas requieren habilidad técnica, son prolongadas y solo se realizan en laboratorios de referencia.

Los anticuerpos contra toxinas bacterianas y otros productos extracelulares con actividades mensurables pueden evaluarse de la misma manera. La capacidad del suero de un paciente, para neutralizar la propiedad de lisar eritrocitos de la estreptolisina O, una enzima extracelular producida por *S. pyogenes* durante la infección, se ha usado durante muchos años para demostrar infección estreptocócica previa. Después de una faringitis por cepas productoras de estreptolisina O la mayoría de los pacientes presenta un título alto de anticuerpos contra ésta, o sea anticuerpos antiestreptolisina O (ASTO). Los estreptococos también producen la enzima desoxirribonucleasa B (DNasa B)

durante las infecciones de fauces, piel u otros tejidos. La prueba de antiDNasa B, que es una prueba de neutralización que impide la actividad de esta enzima, también se ha usado extensamente como indicador de enfermedad estreptocócica reciente o previa. Sin embargo, las pruebas de aglutinación de partículas (látex o hemaglutinación indirecta) para detectar la presencia de anticuerpos contra muchas de las enzimas estreptocócicas han reemplazado a estas pruebas de neutralización en muchos laboratorios.²⁶

1) Neutralización

Las técnicas de neutralización fueron descritas por primera vez en 1890 cuando se observó que un suero inmune era capaz de neutralizar la toxina diftérica producida por *Corynebacterium diphtheriae*.

Estas técnicas se fundamentan en el bloqueo de una determinada actividad del antígeno por parte del anticuerpo. Para su lectura es necesario utilizar un sistema lábil a la acción del antígeno (lectura indirecta). Se trata de técnicas sensibles cuya principal desventaja radica en la dificultad para disponer del sistema, sensible al antígeno.

Estas técnicas, que pueden utilizarse para la detección/cuantificación del antígeno o del anticuerpo, siempre y cuando se trate de una toxina, de *Chlamydia*, de *Rickettsia* o de virus, pueden ser clasificados en:

- Seroneutralización.
- Seroprotección.
- Inhibición de la hemaglutinación.

2) Seroneutralización

A modo de ejemplo desarrollaremos la titulación de anticuerpos anti-estreptolisina O, denominada ASTO o ALO (apócope de antiestreptolisina O) (Fig. 7-32).

Técnica:

1. En una serie de tubos se realiza la dilución del suero del paciente, en la forma habitual.
2. Se agrega a cada tubo una cantidad constante de estreptolisina O (hemolisina producida principalmente por los estreptococos β -hemolíticos del grupo A) (A).
3. Se incuba.
4. Si el anticuerpo está presente se combinará con la estreptolisina y la bloqueará (B).
5. Se agrega a cada tubo una cantidad constante de una suspensión de glóbulos rojos grupo O Rh - (C).
6. Se incuba.
7. Si había anticuerpos en el suero del paciente la estreptolisina O se habrá bloqueado y en consecuencia los glóbulos rojos sedimentarán (D).
8. Si no había anticuerpos la estreptolisina O habrá actuado sobre los glóbulos rojos (E) hemolisándolos (F).⁵

Interpretación:

En cualquier caso el título de anticuerpos se expresa como la inversa de la máxima dilución que inhibe la hemólisis en unidades TOOD (p. ej., $1/250 = 250$ U TOOD).

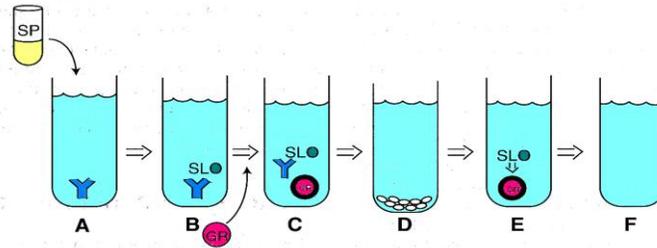


Fig. 7-32 Técnica de neutralización. Y: anticuerpo anti-estreptolisina. "O". SLO: estreptolisina "O". GR: glóbulos rojos. Modificado de: Negroni, 2006⁵

3) Seroprotección.

Como esta técnica se utiliza rara vez, no la explicaremos.

Inhibición de la hemaglutinación

Esta técnica sólo puede ser utilizada cuando el antígeno es un virus que posee hemaglutinina en su estructura.

En el pasado se utilizaba mucho para la detección de anticuerpos contra los virus responsables de la rubéola, la parotiditis epidémica y el sarampión pero en la actualidad ha sido reemplazada por las técnicas de IF y ELISA.⁵

D. Aplicación del diagnóstico inmunológico

El examen serológico en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas generalmente consiste en diversas pruebas del tipo antígeno-anticuerpo practicadas con suero o con líquido cefalorraquídeo. En las condiciones técnicas adecuadas estos exámenes se basan en las reacciones *in Vitro* entre antígenos y diversos anticuerpos en las pruebas de aglutinación, fijación del complemento, hemoaglutinación, inhibición de la hemoaglutinación, opsonocitofágicas, de precipitación, de neutralización de virus, y otras pruebas diversas que se emplean para el diagnóstico de las enfermedades parasitarias. Sin embargo, en relación con las pruebas opsonocitofágicas, debe señalarse que la opsonina no es un anticuerpo separado; el término designa simplemente cualquier anticuerpo estable a las variaciones de temperatura (antiguamente designado con el nombre de "bacteriotropina") que prepara o sensibiliza a diversas bacterias para la fagocitosis, sin ayuda del complemento. Indudablemente el consenso actual es en el sentido de que los resultados de las pruebas opsonocitofágicas no son decisivos, si no débiles y de dudoso valor clínico en relación con el diagnóstico serológico de la brucelosis, de la tos ferina, de la tuberculosis y de la tularemia.

Este capítulo está dedicado al estudio de las pruebas serológicas para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas o bacterianas, así como de las micológicas. Comprende también las pruebas de aglutinación, fijación de complemento para el diagnóstico de la neumonía, así como las pruebas de aglutinación del látex y la contraelectroforesis para el diagnóstico de la influenza.

De los millares de especies de hongos conocidas, sólo pocos son potencialmente patógenos para los seres humanos; todos ellos son hongos que pertenecen a los talofitos que están compuestos de ficomicetos, ascomicetos, basidiomicetos y hongos imperfectos. De éstos, los hongos imperfectos son los que tienen mayor importancia, por que generan todas las enfermedades producidas por hongos, excepto las mucormicosis, producidas por los ficomicetos, y las maduromicosis, producidas por los ascomicetos; a pesar de que los basidiomicetos producen venenos extraordinariamente tóxicos, ninguno de ellos es capaz de iniciar alguna infección,

Las enfermedades o infecciones producidas por los hongos genuinos se dividen en: a) micosis superficiales, que atacan piel, pelo, uñas y las mucosas de la nariz, boca y vagina, y b) las micosis generales o profundas; sin embargo, algunos hongos, tales como *Actinomyces bovis*, *Aspergillus fumigatus* y *niger*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, y ciertas especies de *Penicillium*, pueden producir tanto infecciones generales como superficiales. Debe señalarse que las enfermedades por hongos están tan extendidas que merecen la atención de *todos los médicos* por la frecuencia con que las micosis profundas, diseminadas o generales exigen que se les tome en consideración para el diagnóstico diferencial no sólo de diversas infecciones crónicas muy obscuras en su aspecto clínico, sino también en el caso de las infecciones agudas.

A continuación se presentan en las tablas 7-2 y 7-3, las infecciones mas frecuentes producidas por hongos y bacterias, que afectan a diferentes partes del organismo, así como las pruebas que se realizan para el diagnóstico del agente etiológico que la provoca y la interpretación de los resultados de las pruebas de laboratorio para su mejor determinación.^{3, 10, 13, 22, 31}

Tabla 7-2. Pruebas serológicas fúngicas.¹⁰

<i>Infeción</i>	<i>Antígenos</i>	<i>Pruebas</i>	<i>Interpretación</i>
Aspergilosis	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i>	Inmunodifusión	Una o varias bandas de precipitación sugieren una infección activa. Las bandas de precipitación parecen estar relacionadas con los títulos de fijación de complemento: cuantas más bandas, mayor título. Cuando se presenta la prueba del cultivo en presencia de una prueba positiva, aquella aporta el diagnóstico de infección activa. En el 95 % de los casos de bola fúngica y en el 50 % de los casos broncopulmonares alérgicos se encuentran precipitinas. A veces, la prueba es positiva en la infección invasora, según el estado inmunológico del paciente.
Blastomicosis	<i>Blastomyces dermatitidis</i> Forma de levadura	Fijación de Complemento (FC) Inmunodifusión	Los títulos de 1:8 a 1:16 sugieren una infección activa; los títulos de 1:32 o superiores son indicativos. En los pacientes con coccidioidomicosis o histoplasmosis pueden presentarse reacciones cruzadas; de todos modos, los títulos suelen ser más bajos. Una disminución de la titulación es indicativa de regresión. La mayoría de los pacientes con blastomicosis (75 %) presentan pruebas negativas
	Filtrado de cultivo de levaduras		Los resultados preliminares muestran que es más sensible que la fijación de complemento: 80 % tasa de detección.
Candidiasis	<i>Candida albicans</i> (Hollister-Stier Laboratories)	Inmunodifusión Contrainmunolectroforesis (CIE) Aglutinación del látex Enzoinmunoanálisis (EIA)	Es una prueba difícil de interpretar porque las precipitinas se encuentran en el 20-30 % de la población normal y las comunicaciones en la literatura son conflictivas. Para que la prueba sea útil debe existir una correlación en los signos clínicos. Para el diagnóstico de la candidiasis en individuos inmunocompetentes se han utilizado aglutinación del látex, inmunodifusión (ID) y contrainmunolectroforesis (CIE). Los resultados negativos en huéspedes inmunodeprimidos no son concluyentes. Las técnicas EIA para la detección de antígenos circulantes de <i>Candida</i> han demostrado ser útiles para diagnosticar candidiasis invasivas en individuos inmunodeprimidos. Los métodos actuales para el serodiagnóstico de candidiasis son en general poco satisfactorios.
Coccidioidomicosis	Coccidioidina	Fijación de complemento	En la infección activa se han visto títulos de 1:2 a 1:4. Los títulos bajos deben seguirse de pruebas repetidas intervalos de 2-3 semanas. Los títulos superiores a 1:16 suelen indicar una infección activa. Las histoplasmosis suelen presentar reacciones cruzadas y las lesiones pulmonares solitarias muestran resultados negativos falsos. Los títulos discurren paralelos con la gravedad de la infección
	Coccidioidina	Inmunodifusión	Los resultados se corresponden con la prueba de fijación del complemento y puede utilizarse como prueba selectiva: debe confirmarse realizando una prueba de fijación de complemento

	Coccidioidina	Aglutinación del látex	Las precipitinas aparecen durante las primeras 3 semanas de la infección y tienen valor diagnóstico, pero no pronóstico. Es útil una prueba selectiva de precipitinas en el inicio de la infección. Las pruebas falsas positivas son frecuentes cuando se utiliza suero diluido o especímenes de líquido cefalorraquídeo
Criptococosis	Ningún antígeno: partículas de látex recubiertas con globulina hiperinmune anticriptocócica	Aglutinación del látex para el antígeno criptocócico	La presencia de polisacáridos criptocócicos en los líquidos orgánicos es indicativa de criptococosis. El factor reumatoide presenta reacciones positivas falsas y debe realizarse una prueba de la artritis reumatoide como control. La disminución de los títulos de antígeno indica regresión. Se han visto pruebas positivas en el LCR en el 95 % de las meningitis criptocócicas y en el 30 % de casos sin meningitis. El suero es menos a menudo positivo que el LCR. Las infecciones diseminadas presentan generalmente resultados positivos en el suero. La prueba ha de efectuarse con suero, LCR y orina y es más sensible que la preparación con tinta china para detectar infección activa en pacientes no portadores de SIDA
Histoplasmosis	Histoplasmina y levadura <i>Histoplasma capsulatum</i>	Fijación del complemento	Los títulos de 1:8 a 1:16 son sospechosos de infección; sin embargo, títulos de 1:32 o más elevados son indicativos de infección activa. En los pacientes con aspergilosis, blastomicosis o coccidioidomicosis aparecen reacciones cruzadas, pero los títulos son generalmente más bajos. Se deben analizar distintas muestras de suero: extraídas a intervalos de 2-3 semanas. El aumento de las titulaciones indica el progreso de la enfermedad, y títulos decrecientes, su remisión. Algunas infecciones diseminadas no reaccionan con la prueba de fijación del complemento Las pruebas cutáneas recientes en personas que han sufrido una exposición previa al <i>H. capsulatum</i> provocarán una elevación del título de fijación del complemento. Esto ocurre en el 17-20 % de las personas analizadas. El antígeno de la levadura da reacciones positivas en el 75-80 % de los casos y la histoplasmina proporciona reacciones positivas en el 10-15 % de los casos. En el 10 % de los casos ambas son simultáneamente positivas
	Histoplasmina	Inmunodifusión	Las bandas H y M de aparición simultánea son indicativas de infección activa. La banda M puede aparecer sola e indicar una inicial o crónica. También puede aparecer la banda M a continuación de una prueba cutánea reciente. La banda H aparece más tarde que la M y desaparece antes, y su desaparición puede indicar la remisión de la infección
	Histoplasmina	Aglutinación del látex	La prueba no es fiable. Se observan muchas pruebas positivas y negativas falsas. Cada análisis positivo debe confirmarse mediante la prueba de fijación del complemento

Esporotricosis	Levadura de <i>Sporothrix schenckii</i>	Aglutinación	Los títulos de 1:80 o superiores suelen indicar una infección activa. Algunas infecciones cutáneas presentan pruebas negativas. Sin embargo, las infecciones extracutáneas presentan pruebas positivas. No existen pruebas inmunológicas que sean valiosas en el diagnóstico de las dermatofitosis.
Dermatofitosis			
- <i>Microsporum audouinii</i>	-	-	
<i>Epidermophyton floccosum</i>	-	-	
- <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	-	-	
- <i>Microsporum canis</i>	-	-	
- <i>Microsporum gypseum</i>	-	-	
- <i>Trichophyton tonsurans</i>	-	-	
Cromoblastomycosis			En la actualidad no se dispone de pruebas inmunológicas que permitan realizar el diagnóstico de la cromoblastomycosis
-Fonsecae pedrosoi	-	-	
-Fonsecae compacta	-	-	
-Phialophora verrucosa	-	-	
-Cladosporium carrionii	-	-	
Paracoccidioidomycosis	Paracoccidioidinosis	Inmunodifusión en agar-gel	La presencia de bandas de precipitina, denominadas 1 y 2 en la prueba de inmunodifusión en agar-gel es indicativa de enfermedad en el 95 % de los casos, aunque no determina su estado de actividad. La prueba de fijación cuantitativa del complemento, que es de difícil manejo, proporciona una valoración mejor del éxito del tratamiento; una disminución del título indica una respuesta favorable
Paracoccidioides brasiliensis		Fijación del complemento	En la actualidad no existen pruebas serológicas fiables para el diagnóstico de la cigomicosis invasiva. Los estudios que utilizan pruebas para detectar antígenos específicos péptido-L-fucosmanano en muestras séricas de pacientes con cigomicosis invasiva han demostrado una sensibilidad alrededor del 70 %. Entre los géneros de cigomicetos se producen reacciones cruzadas.
Cigomicosis			
- <i>Rhizopus</i> sp			
- <i>Mucor</i> sp			
- <i>Absidia</i> sp (poco frecuente)			

Tabla 7-3. Pruebas serológicas para bacterias³¹

<i>Infección</i>	<i>Pruebas</i>	<i>Interpretación</i>
<i>Bartonella quintana</i>	Inmunofluorescencia directa, inmunohistoquímica	Aumento del título serológico de IgG frente a <i>B. quintana</i> . Con frecuencia, reacciona de forma cruzada con <i>Chlamydia sp</i>
<i>Bartonella henselae</i>	Enzimoanálisis (EIA) Inmunofluorescencia (IF) Aglutinación	Para la detección de anticuerpos IgG a <i>B. henselae</i> ; la sensibilidad puede ser más elevada si se emplea un test para IgM o sueros pareados. IF \geq (1:64) La reacción de aglutinación se hace positiva durante la segunda a la tercera semana de la enfermedad un 90% de pacientes tienen títulos de \geq 1:160. Un título creciente tiene una significación diagnóstica. Son raros los resultados falsos negativos. Pueden producirse resultados de la prueba falsos positivos con la tularemia o el cólera, con la vacuna del cólera o después de la prueba cutánea de la brucelina. En la brucelosis localizada crónica, los títulos pueden ser negativos o \leq 1:200. Pueden seguir siendo positivos mucho tiempo después de la curación de la infección. Los anticuerpos debidos al <i>B. canis</i> no se detectan con los antígenos habituales; es preciso utilizar el antígeno de <i>B. canis</i> .
<i>Brucelosis</i> <i>Brucella melitensis</i> <i>Brucella suis</i> <i>Brucella abortus</i>	EIA	El EIA es el método de elección para detectar los anticuerpos específicos IgM e IgG. Las pruebas opsonofagocítica y de fijación de complemento no son de utilidad Títulos de anticuerpos de 1: 1.600 – 6.400 en la fase aguda y de 1:40 – 320 seis meses después de la curación.
Campilobacteriosis <i>Campilobacter jejuni</i> <i>C. coli</i> <i>C. fetu</i> Carbunco <i>Bacillus anthracis</i>	Hemaglutinación indirecta Fijación de complemento EIA ELISA Microhemaglutinación	Fijación de complemento y EIA tiene buena sensibilidad y especificidad; se utilizan epidemiológicamente. Un título EIA elevado puede indicar infección reciente o en curso. Una prueba de ELISA que pone en manifiesto un aumento de cuatro veces del título normal de anticuerpos frente a los antígenos capsulares, o la exótoxina es diagnóstica de infección previa o vacunación. La microhemaglutinación indirecta es similar. En la infección sistémica no pueden detectarse anticuerpos hasta más adelante en el curso de la enfermedad, momento que puede ser demasiado tarde para iniciar el tratamiento. En la infección tratada no se observa un aumento de los anticuerpos antitoxinas. En la actualidad no se disponen de pruebas serológicas. La PCR podría ser una de ellas.
Chancroide <i>Haemophilus ducreyi</i> Cólera <i>Vibrio cholerae</i>	EIA Aglutinación directa	El enzimoanálisis en busca de anticuerpos antitoxina pone de manifiesto un aumento del título \geq 4 veces en dos sueros obtenidos en momentos diferentes. Aumenta a los 12 días; puede persistir durante meses. La vacunación no produce elevación del título. Puede presentar reacción cruzada con algunas enterotoxinas de <i>Escherichia coli</i> . No es positivo con no toxigénicas de <i>Vibrio cholerae</i> . La aglutinación directa y las pruebas de anticuerpos vibriocidas muestran un aumento del título \geq 4 veces en >90% de pacientes; la vacunación también produce anticuerpos vibriocidas. La aglutinación detecta cepas no toxigénicas.
Colitis pseudomembranosa <i>Clostridium difficile</i>	EIA	El EIA tiene una sensibilidad del 72-84%. El análisis de cultivo tisular es un 10% más sensible

Difteria <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	EIA	Las pruebas serológicas (EIA) se utilizan para los estudios epidemiológicos o para evaluar la función inmunitaria, comparando el suero de preinmunización con el postinmunización. Un título de anticuerpos toxoides mediante EIA ≥ 0.1 U/ml indica inmunidad y elimina la necesidad de administrar una antitoxina; los títulos disminuyen con la edad. No pueden emplearse con fines diagnósticos.
Disentería bacilar <i>Shigella sp.</i>		Las pruebas serológicas no son de utilidad. No se dispone de técnicas de enzoinmunoanálisis y de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
Enfermedad de Lyme <i>Borrelia burgdorferi</i>	ELISA IF	ELISA (sensibilidad 89% y especificidad (72%) o IF que debe confirmarse mediante un western blot. Análisis en busca de IgM o IgG o ambas. Solo debe solicitarse las pruebas para respaldar un diagnóstico y no para síntomas inespecíficos. No es útil clínicamente si la probabilidad preprueba es $< a 0.20$ o $> a 0.80$. Si la probabilidad es $< a 0.20$ es más probable que una prueba ELISA positiva sea falsa. Si la probabilidad es $> a 0.20$ una prueba ELISA positiva descarta el diagnóstico de la enfermedad de Lyme. Los anticuerpos IgM específicos suelen aparecer a las 2-4 semanas después del eritema migratorio. Los valores son máximos de 3-6 semanas y se normalizan después de 4-6 meses. Sólo son positivos en un 40%-60% de casos en estadio 1. Se considera positivo un título de IgM 1:200. Se considera indeterminado 1:100. Un título de IgM $< 1:100$ se considera negativo. Los títulos de IgG aumentan más lentamente (aparecen de 4-8 semanas después del exantema, los valores son máximos después de 4-6 meses, y pueden detectarse valores altos durante meses o años. Los estadios 2 y 3 se detectan resultados positivos de IgG en la primera muestra. Se considera positivo un título de IgG $\geq 1:800$; un título de 1:200-1:400 es indeterminado y un título $< a 1:100$ se considera negativo. La presencia de FR puede dar un resultado falso positivo de IgM. Los falsos positivos de IgG en títulos elevados pueden deberse a enfermedades producidas por espiroquetas.
Enfermedad del Legionario. <i>Legionella y pneumophila</i>	IF indirecta ELISA	IF (Permite la detección de IgM comparado con IgG) Se consideran negativos títulos $< 1:64$. Unos títulos aislados de 1:64-1:256 sugieren una infección previa en un momento no determinado. Un solo título de IF $> 1:256$ es una evidencia convincente. Los títulos de anticuerpo
Granuloma inguinal <i>Calymmatobacterium granulomatis</i>		No se disponen de pruebas serológicas. Las pruebas serológicas y el examen en campo oscuro para la sífilis son negativas, a menos que exista una infección concomitante.
<i>Helicobacter pylori</i> antes <i>Campilobacter pylori</i>	ELISA	Las pruebas serológicas en busca de anticuerpos IgG frente a <i>H. pylori</i> mediante ELISA (sensibilidad y especificidad $< 95\%$) indica infección a menos que se halla administrado tratamiento antibiótico. Los títulos disminuyen lentamente y no pueden utilizarse para determinar la curación. No se recomiendan las pruebas en busca de IgA o IgM.
Infección gonocócica	EIA rápida Fluorescencia EIA	Los antígenos en heces (prueba EIA rápida) detectan una infección activa Prueba con anticuerpos mediante fluorescencia en el frotis del material sospechoso La detección del antígeno (EIA) en el sedimento centrifugado de la orina tiene una sensibilidad $> 80\%$ y una especificidad $> 97\%$. La detección del antígeno es sensible y específica para la infección uretral en los hombres, pero es menos sensible que el cultivo en las mujeres.
Infección genital		

Artritis	Fijación de complemento	En uretritis no es un prueba fidedigna, pero excepcionalmente puede ser de utilidad en la artritis, prostatitis y epididimitis. Se vuelve positiva de 2-6 semanas del inicio de la infección. Sigue siendo positiva durante 3 meses después de la curación. Si la prueba es negativa, repetirla, dos pruebas negativas contribuyen a descartar una infección gonocócica.
Infecciones meningocócicas	Aglutinación del látex	Una prueba negativa no excluye de forma clara una infección debida a dicho microorganismo. Unos mayores títulos de antígenos se relacionan con un mayor número de complicaciones y un peor pronóstico.
	Contrainmunolectroforesis	En la actualidad, la CIE ha sido reemplazada por la aglutinación de látex. Otras pruebas inmunológicas sensibles para la detección rápida de antígenos específicos incluyen la coaglutinación de <i>Staphylococcus aureus</i> , inmunofluorescencia y ELISA.
	EIA	La detección del antígeno mediante enzimoimmunoanálisis tiene una sensibilidad > a 80% y una especificidad > 95% es especialmente útil si se ha iniciado la antibioterapia antes de obtener el LCR.
Infecciones por Chlamydia	Microinmunofluorescencia Fijación de complemento	No son útiles para las infecciones superficiales; un aumento de 4 veces del título de anticuerpos entre el suero de la fase aguda y el de la convaleciente puede ser útil en el diagnóstico de las infecciones invasivas y sistémicas (neumonía infantil, enfermedad inflamatoria pélvica, linfogranuloma venéreo). La microinmunofluorescencia no esta ampliamente disponible. Como alternativas se utiliza la fijación del complemento; se utiliza, principalmente, para el diagnóstico del linfogranuloma venéreo y la psitacosis. No resulta útil para un diagnóstico definitivo de la mayoría de las infecciones oculogenitales. En los recién nacidos los anticuerpos pueden proceder de la madre más que deberse a una infección neonatal, en la que los niveles elevados de IgM son diagnósticos
Infecciones genitales <i>Chlamydia trachomatis</i>	EIA Inmunofluorescencia Directa	La detección antigénica ofrece sensibilidad y especificidad elevadas mediante EIA de las secreciones (>79% y >95%) o la tinción de los frotis mediante inmunofluorescencia directa (>90 y >95%). En los grupos sintomáticos o con una prevalencia elevada; los valores predictivos positivos y negativos son >80, 90% para la EIA, >87 y >97% para la inmunofluorescencia directa. La perihepatitis puede indicar datos de una enfermedad pélvica inflamatoria y un título elevado de anticuerpos IgM (44% de casos) o IgG frente a <i>C. trachomatis</i> . Detección del antígeno en las secreciones o mediante EIA o tinción por IF directa de los frotis.
Tracoma <i>Chlamydia trachomatis</i> Serotipos A, B y C	EIA FC	El método de elección para el diagnóstico es la presencia de IgM sérica o un aumento de la IgG (EIA); es más sensible que la FC, que en estos momentos ya no debe utilizarse. La presencia de IgM en lactantes con neumonía es diagnóstica de neumonía por Chlamydia. Es de creciente utilidad la detección del antígeno de Chlamydia (EIA, anticuerpos fluorescentes directos).
Psitacosis <i>Chlamydia psittaci</i>	FC EIA Crioaglutinación	Aumento de anticuerpos ≥ 4 veces (hasta $\geq 1:32$) mediante fijación de complemento o microinmunofluorescencia en dos muestra obtenidas con un intervalo de dos semanas o IgM detectada mediante título de microinmunofluorescencia $\geq 1:16$. Con una enfermedad clínica compatible, un solo título de anticuerpos mediante FC o microinmunofluorescencia $\geq 1:32$.

Linfogranuloma venéreo <i>C. tracomatis</i> Serotipos L1, L2 y L3	FC Microinmunofluorescencia	Una prueba positiva de FC en estadio precoz es presuntiva; también es positiva en otras especies de <i>Chlamydia</i> . Un título creciente (≥ 4 veces) entre el suero de la fase aguda y el de la convaleciente es diagnóstico pero no específico para especies. La microinmunofluorescencia es específica para especies. La detección de IgM o un título creciente de IgG (EIA, IF) indica una infección reciente. Puede presentar una reacción cruzada con <i>C. tracomatis</i> y el linfogranuloma venéreo. La Crioaglutinación es negativa. Unos títulos elevados ($\geq 1:32$) crecientes (≥ 4 veces) de la FC o la conversión de un título negativo en positivo puede indicar una infección reciente. La disminución del título sigue la eficacia terapéutica en estadio agudo. Detección del anticuerpo mediante el complejo B de <i>C. tracomatis</i> mediante microinmunofluorescencia.
<i>Haemophilus influenzae</i> Cepas: Tipo B encapsulado Lepra <i>Mycobacterium leprae</i>	Aglutinación con látex CIE	La prueba de Aglutinación con látex puede detectar el antígeno capsular bacteriano de tipo B en LCR y orina. Ha reemplazado a la CIE porque es de realización sencilla, una prueba rápida y tiene elevada especificidad. En $\leq 40\%$ de pacientes se documenta una prueba serológica falsa positiva para la sífilis.
Leptospirosis <i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i> <i>Leptospira canicola</i> <i>Leptospira pomona</i>	ELISA Aglutinación FC	El ELISA para detectar IgM puede ser positivo a cabo de 4-5 días. Un título creciente (≥ 4 veces en 2 semanas) es diagnóstico. La prueba de aglutinación microscópica pone de manifiesto un aumento de 4 veces entre el suero de la fase aguda y el de la convalecencia. Un resultado positivo probable es un título $\geq 200:1$. Es el estándar para el diagnóstico serológico pero es difícil llevar a cabo y no está ampliamente disponible. La fijación de complemento se ha utilizado para el cribado; puede ser positivo al cabo de 10-21 días; es preciso confirmar los resultados positivos mediante aglutinación debido a la reacción cruzada con anticuerpos anti-VHA, CMV, tífus skrub y <i>Mycoplasma</i> .
Listeriosis <i>Listeria monocytogenes</i>	FC	FC que muestra un aumento ≥ 4 veces del título después de la absorción de sueros reactivos con <i>Staphylococcus aureus</i> para eliminar las aglutininas de reacción cruzada. Un título $< 1:8$ tiene un valor predictivo elevado. Se está desarrollando un EIA para los anticuerpos específicos y la detección antigénica en el LCR
Melioidosis <i>Pseudomonas pseudomallei</i>	EIA Aglutinación	El EIA para los anticuerpos IgG tiene una sensibilidad y especificidad $> 90\%$. El EIA para la IgM tiene una sensibilidad del 92% para la enfermedad activa y puede utilizarse para monitorizar el tratamiento. La prueba de aglutinación es positiva en la enfermedad crónica; la infección puede ser inactiva durante muchos años. Puede ser negativa en la forma septicémica fulminante. En la enfermedad crónica, la aglutinación y la fijación del complemento son positivas
Muermo <i>Malleomyces mallei</i> Fiebre recurrente <i>Borrelia hermsii</i>	Aglutinación FC	Aumento de 4 veces el título entre el suero de la fase aguda y el de la convaleciente. Se ha descrito un análisis fluorescente utilizando anticuerpos monoclonales. En $\leq 25\%$ del paciente se obtienen pruebas serológicas biológicas falsas positivas para la sífilis.

Infecciones estafilococicas endocarditis		En dos tercios de pacientes con endocarditis o bacteriemia por <i>S. aureus</i> con infección metastásica y en la mitad de pacientes con infecciones estafilocócicas no bacteriemicas se documentan anticuerpos antiácido teicoico con un título $\leq 1:4$ pueden documentarse en 10% de otras infecciones o de individuos sanos. Se dice que un título $\leq 1:4$ sugiere una infección estafilocócica grave actual o reciente. Su valor principal es determinar la duración del tratamiento de la bacteriemia.
Infecciones por salmonella Fiebre tifoidea <i>Salmonella typhi</i>		Los criterios serológicos para el diagnóstico de ≥ 4 veces un aumento del título O en pacientes no vacunados y en áreas no endémicas rara vez resulta de utilidad. El aumento del título O puede reflejar una infección por cualquier microorganismo de la salmonella del tipo D (<i>S. enteritis</i> , <i>S. panama</i>) y no solamente <i>S. Typha</i> . El título H es muy variable y puede mostrar una respuesta inespecífica a otras infecciones. $>10\%$ de casos en áreas endémicas son seronegativos. Continúa desarrollándose EIA y sondas de DNA.
Neumonía <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	EIA FC	La IgM (EIA) aumenta al cabo de una semana, empieza a disminuir a los 4-6 meses y puede persistir ≤ 1 año; sensibilidad = 75 -80% y especificidad = 80-90%. La IgG indica una exposición previa. La presencia de IgM ($>1:64$) o una aumento de 4 veces de la IgG indica una infección reciente. Son pruebas de elección; es preciso llevarlas a cabo en sueros en fase aguda y convaleciente. En 50% de pacientes tiene lugar un aumento de 4 veces el título de FC; el aumento se inicia a los 7-9 días; es máximo las 3-4 semanas y persiste durante 4-6 meses, después disminuye durante 2-3 años; si solo se dispone de un suero en fase convaleciente, un título $\geq 1:32$ es sugestivo de un diagnóstico de infección.
Peste <i>Yersinia pestis</i>	Anticuerpos con fluorescencia	Identificar las bacterias mediante frotis, cultivo, técnica de anticuerpos con fluorescencia o inoculación animal del material sospechosos a partir del lugar adecuado (aspiración de un ganglio linfático, sangre, esputos).
Sífilis <i>Treponema pallidum</i>	Primaria: IF VDRL	La tinción mediante IF directa de las extensiones del la lesión ha sido reemplazada por el examen en campo oscuro. Si el examen inmunofluorescente de una lesión genital es negativo, puede utilizarse la exploración de un ganglio linfático regional. Es de especial utilidad en las lesiones orales.
	Sífilis secundaria: IF Directa.	Las pruebas serológicas muestran un título creciente con o sin examen positivo en campo oscuro. La VDRL no se vuelve positiva hasta 7-10 días después de la aparición del chancro.
	Sífilis Latente Sífilis congénita: IF	La tinción mediante IF directa o el examen en campo oscuro de las lesiones mucocutaneas son positivos. Las pruebas serológicas casi siempre son positivas con títulos elevados ($>1:32$). El único método de diagnóstico es una prueba serológica positiva. El examen mediante IF de las lesiones mucocutaneas y el rascado del cordón umbilical húmedo son positivos. Las pruebas serológicas son positivas y muestran un título cada vez mayor (4 veces o muy elevado, a un título estable a los tres meses de edad. La prueba puede ser positiva debido a la presencia de anticuerpos maternos sin infección sifilítica congénita.

	Sífilis tardía SNC: VDRL Meningitis Meningovascular Tabes dorsal Parálisis general Lúes asintomática del - SNC Cardiovascular VDRL Sífilomas VDRL	Para el diagnóstico de la sífilis congénita solo se recomienda la VDRL cuantitativa en forma seriada para detectar un aumento o disminución de los títulos. La VDRL del LCR es muy específica carece de sensibilidad (20-60%) debe utilizarse para confirmar y no para descartar la neurosífilis, la VDRL no puede utilizarse para seguir la respuesta a tratamiento. Pruebas serológica positiva en sangre y en LCR. Pruebas serológica positiva en sangre y en LCR. Pruebas serológica positiva en sangre y en LCR (el título puede ser bajo). Pruebas serológica positiva (el título puede ser elevado). Puede ser una prueba serológicas negativa en sangre y positiva en LCR. La VDRL, suele ser reactiva, pero el título a menudo es bajo. La VDRL, suele casi siempre es reactiva, habitualmente el título a menudo es elevado.
Tétanos <i>Clostridium tetani</i>	EIA	EIA se utilizan para evaluar la inmunidad y comprobar la función inmunitaria mediante el análisis de los sueros pre y postinmunización. Un nivel de anticuerpos ≥ 0.1 U/ml es protector.
Tos Ferina <i>Bordetella pertussii/parapertussis</i>	EIA Aglutinación directa IF	La IgM y la IgG séricas (EIA) establecen el diagnóstico a partir de la primera muestra en el 75% de casos; antes de los seis meses de edad se requiere la obtención de los sueros en momentos diferentes del proceso. La IgM puede persistir durante meses después de la infección o la vacunación. La aglutinación directa correlaciona la IgG suele requerir un suero obtenido durante la fase aguda y otro de la fase convaleciente con 2-4 semanas de diferencia, persiste después de la enfermedad, no es sensible en niños menores a 6 meses. Es posible la detección del antígeno en extensiones nasofaríngeas o suero mediante anticuerpos con Fluorescencia directa o CIE. Estas pruebas tienen escasa sensibilidad diagnóstica.
Tuberculosis <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ELISA	Recientemente, se ha documentado la detección de IgG anti-BCG mediante ELISA o células secretoras de anticuerpos mediante análisis inmunospot sólido. La detección de antígeno y anticuerpo micobacterianos mediante ELISA ofrece una rápida identificación.
Tularemia <i>Francisella tularensis</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	EIA Aglutinación ELISA Radioinmunoanálisis (RIA)	El EIA que muestra un aumento específico de la IgM y un título creciente de la IgG es diagnóstico; es más sensible que la aglutinación; puede persistir durante años. El título mediante aglutinación en tubo, ELISA y RIA aumenta una semana después del inicio de los síntomas, con valores máximos en la segunda semana. En la mayor parte de los casos el título es $\geq 1:200$ pero los incrementos de 4 veces son excepcionales. Un título $\geq 1:128$ en el momento de las complicaciones es un indicio de presunción de Yersiniosis. Pueden detectarse anticuerpos durante años después de la infección. Puede producir reacciones cruzadas con <i>Brucella abortus</i> , <i>Rickettsia sp.</i> <i>Salmonella sp.</i> , <i>Morganella morganii</i> . En ≥ 1.5 % de individuos sanos sin historia previa de infección puede documentarse títulos $\geq 1:32$.

Resumen.

Estas características y propiedades de los anticuerpos son las herramientas fundamentales en la determinación de la enfermedad. Se usan en diferentes maneras para determinar con mayor exactitud a través de la respuesta antígeno-anticuerpo, la presencia de un agente patógeno en el huésped.

La interacción inicial entre el antígeno y el anticuerpo se denomina interacción primaria y es rápida e independiente de factores como la temperatura y la concentración de electrólitos. Como no es visible por si misma se han ideado métodos para hacerla evidente, por ejemplo, si se une una sustancia fluorescente al anticuerpo. La interacción primaria puede ser seguida por una interacción denominada secundaria. Ésta es más lenta y como consecuencia de ella puede generarse un fenómeno visible: tal es el caso de la precipitación y la aglutinación.

Es importante que al hablar de una determinada técnica se haga referencia a su sensibilidad y especificidad, La sensibilidad es una medida que indica cuán eficaz es una técnica para poner de manifiesto pequeñas cantidades de la incógnita (ya sea un antígeno o un anticuerpo). La especificidad define la capacidad de una técnica, para discriminar entre dos antígenos diferentes. Pero la parte importante es que este estudio de las pruebas serológicas está dedicado al diagnóstico de las enfermedades infecciosas, bacterianas y las producidas por hongos. En él se encuentran las pruebas que se pueden realizar y los resultados obtenidos para su fácil diagnóstico y monitoreo de la evolución de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Prescott Lansing M., Harley John P, Klein Donald A. Microbiología. 4ª ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 1999
2. Rojas Espinosa Oscar. Inmunología. 2ª ED. México DF: Editorial Médica Panamericana; 2001.
3. Guillem Prats. microbiología clínica. España; Editorial médica panamericana.2006.
4. Liébana Ureña José. Microbiología Oral. 2ª ED. Madrid España: McGraw-Hill Interamericana; 2002.
5. Negroni Marta. Microbiología Estomatologica Fundamentos y Guía Práctica. Argentina: Editorial Medica Panamericana; 2006.
6. Karp Gerald. Biología celular y molecular. 1ª ED. México DF: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V; 1998.
7. Ausina Ruiz Vicente, Moreno Guillén Santiago. Tratado Seimic de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid España: Editorial Panamericana; 2006.
8. Brock Thomas. Microbiology. Edición sexta. Estado de México: Editorial. Prentice Hall, 1991.
9. Hatful Graham F. Molecular Genetics of Mycobacteria. EUA: Editorial. ASM press Washington DC; 2000.
10. Koneman, Elmer W.K, Diagnóstico Microbiológico. Edición Quinta. España: Editorial Panamericana; 2003.
11. Persing David H. Diagnostic Molecular Microbiology. Washington: Editorial. American society for Microbiology, 1993.
12. García J A. Rodríguez J J Picazo. Microbiología Médica. Madrid España: Editorial Harcourtbrace: 1998.
13. Sánchez Vega José Trinidad. Tay Zavala Jorge. Fundamentos de Microbiología y parasitología Médicas. México: Editorial Méndez Editores; 2003.
14. Brook Geo F. Batel Janets. A. Morse Stephen. Microbiología Médica de Jawetz Menick Adelbergg. 17ª ED. México DF: Editorial El Manual Moderno; 2002.

15. Pumarda A. Rodríguez Torres A. García Rodríguez J.A. Microbiología y parasitología Médica. 2ª ED. España: Ediciones Científicas y Técnicas S A; 1994.
16. Weir Donald M. Stewart John. Inmunología. 3ª ED. México: El Manual Moderno; 1999.
17. Murray PR. Kobayaski GS. Pfaller MA. Rosental KS. MicroBiología Medica. 4ª ed. Madrid España: Elsevier Mosby inc; 2002.
18. Diaz R. Gamazo C. López Goñi I. Manual Practico de Microbiología. 2ª ed. España: Editorial Masson S A; 2000.
19. Davis BD. Dulbecco R. Eisen HN. Tratado de Microbiología. 4ª ed. México: Salvat Editores S A; 1996.
20. García Del Valle Araceli. Zamudio Durán Maria de las Mercedes. Manual de Biología Médica 9º semestre. Carrera Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México: publicación Elaborada por el departamento de impresión de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 1998
21. Diaz Ramon. Gamazo Carlos. Lopez-Goñi Ignacio. Manual practico de microbiologia. 2ª edición. Barcelona Espana: editorial Masson; 1999
22. Betty A. Forbes. Daniel. F. Sahn. Alice S. Weissfeld. Bailey y Scott. Diagnóstico microbiológico. Undécima edición. Buenos Aires Argentina: Editorial medica panamericana; 2004
23. Kolman Jan. Klaus-Heinrich Rohm. Bioquímica. 3ª edición. Madrid España: editorial panamericana; 2004
24. John G. Keltom. Transfusión sanguínea bases teóricas y aplicación clínica. Barcelona España Editorial Doyma.1999.
25. John A. Kolmer. Diagnóstico Clínico para los Análisis de Laboratorio. 3ª edición. México, DF. Nueva Editorial Interamericana; 1981.
26. Widmann Frances K. Interpretación clínica de las pruebas de Laboratorio. 2ª edición. Barcelona España: Editorial Jims; 1981.
27. Mandell. Enfermedades Infecciosas, principios y práctica. 3ª edición. Buenos Aires Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.; 1991.
28. Bernard Herry John. Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio. 9ª edición. Barcelona: Ediciones Científicas y Técnicas S.A.; 1994.
29. Frances Talaska Fischbach. Manual de pruebas diagnosticas.3ª edición. México DF.: Interamericana McGraw-hill; 1989.
30. Norbert. W. Tietz. Guía Clínica de Pruebas de Laboratorio.1ª edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1998.
31. Wallach Jacques. Interpretación clínica de las pruebas de Laboratorio. 4ª edición. Barcelona España: Editorial Masson, S. A.:2003.
32. Goldsby Richard A. Kindt Thomas J. Inmunology Kuby. 4ª Ed. USA: Editorial Freeman and company; 2000.
33. Roitt Ivan M. Brostoff Jonathan. Male David K. Inmunología. 3ª Edición. Barcelona: Ediciones científicas y Técnicas, S.A.;1994
34. José Luís Sánchez Guillén. Biología de 2º de bachillerato [sede web] Febrero 2005. [Acceso 31 de Mayo 2007]; [pg.22]. Disponible en: http://web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo_ov/2BCH/INDICES/apuntes_pdf.htm
35. Departamento de biología y geología **Inmunología** [sede web] [Acceso 22 de Febrero 2008]; [pg.4]. Disponible en: http://www.juntadeandalucia.es/averroes/manuales/materiales_tic/INMUNOLOGIA/inmunologia.htm
36. Dr. Fernando Enríquez. Inmunidad innata (no-específica). Escuela de la medicina de Carolina del Sur, Instituto Politécnico Nacional-México [sede web] February 26, 2007. [Acceso 22 de Febrero 2008].Disponible en: <http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish-immuno/imm-chapter1.htm>
37. Recursos interactivos “online” para aprender Biología, The University of Arizona, Problema de Energía, Enzimas y Catálisis [sede web] Mayo 2004. [Acceso 22 de Febrero 2008].Disponible en: www.biologia.arizona.edu/.../15t.html
38. Patricio Garrahan. Proyecto biológico. Revista Ciencia hoy en línea. [sede web] Diciembre 2002. [Acceso 22 de Febrero 2008]; Volumen (12): Disponible: www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy72/index.htm

39. Flickr, fotos [sede web] 6 de noviembre 2007. [Acceso 22 de Febrero 2008]. Disponible en: www.flickr.com/photos/ajc1/1888714439/
40. **Dr Alan Cann. MicrobiologyBytes.** Interferón - 50 years on (sede web) November 7, 2007, [Acceso 22 de Febrero 2008]; [pg.22]. Disponible en: microbiologybytes.wordpress.com/.../page/2/
41. . www.roche.com/pages/facets/10/pegasyse.htm
42. Transporte a través de la membrana. usuarios.lycos.es/valeryx/mtranspor.htm

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El apogeo de la biología molecular es ahora y el manejo adecuado de los conocimientos elementales de ésta, como la estructura y propiedades de los ácidos nucleicos y el DNA, así como la respuesta inmunológica, la interacción entre antígenos y anticuerpos, y las técnicas relacionadas con estas propiedades nos permiten llevar a cabo un mejor desempeño y desarrollo en el diagnóstico microbiológico.

Con la aplicación de estos nuevos conocimientos en las ciencias de la salud como la medicina, la farmacia, la bioquímica, y la infectología. Se han llegado a desarrollar métodos inmunoquímicos, chips, anticuerpos monoclonales, clonación molecular, proteínas recombinantes de interés diagnóstico y terapéutico, sondas de hibridación y terapia celular y génica, para personas que lo requieren.

En tiempo atrás se proyectaban como técnicas de difícil manejo, pero desempeña un papel importante en las infecciones de difícil diagnóstico, enfermedades genéticas y hereditarias que se pueden identificar y prevenir con la ayuda de marcadores radiactivos, fluorescentes e isótopos, identificaciones microbianas que requerían de por lo menos una semana, con las técnicas de biología molecular se realizan hasta en 24 horas, Reduciendo así la demanda que se presenta en algunos hospitales, en infecciones crónicas y de urgente diagnóstico.

De estos conocimientos, ha surgido la necesidad de complementar los conocimientos de la Biología Molecular en los planes curriculares de las universidades para poner de manifiesto las bases moleculares que sirvan como punto de partida para un mejoramiento en las áreas de la salud y como fuente de desarrollo para un mejor diagnóstico, así como para la identificación del microorganismo causante de la enfermedad

Aunado a esto las limitaciones que se tienen en la actualidad para el desarrollo de las investigaciones lleva consigo la falta de aplicación de las herramientas diagnósticas más importantes en muchas enfermedades.

Las pruebas inmunológicas se han caracterizado por un incremento constante en sensibilidad y especificidad, extendiendo su uso más allá de la microbiología.

A partir de fundamentos de métodos inmunológicos, técnicas de DNA y los conceptos elementales de la biología molecular, se pretende proporcionar los más utilizados en la clínica con el propósito de integrar de manera práctica el conocimiento de la biología molecular y su aplicabilidad en el diagnóstico microbiológico en la clínica

CONCLUSIÓN.

Con la elaboración del manual de las Técnicas de Biología Molecular, Genéticas e Inmunológicas, se obtiene un material didáctico que incluye la PCR como prueba elemental de la biología molecular, y las diferentes técnicas inmunológicas para la identificación del microorganismo, así como los resultados y pruebas que se deben realizar para una determinación más específica. Esto, para complementar el conocimiento de los alumnos del modulo de Biología Medica y areas a fines, para con ello colaborar con una nueva fuente de información que pueda utilizar y emplear para un mejor diagnóstico Microbiológico.

Obteniendo de esta manera las bases moleculares que sirvan de punto de partida para un estudio detallado y meticuloso, con la finalidad de que sirva como fuente de desarrollo para un mejor diagnóstico microbiológico en la clínica, así como para la identificación de microorganismos patógenos causantes de la enfermedad, y con esto reducir las limitaciones que se tienen en la actualidad en el desarrollo de las investigaciones, en la falta del tema en el plan curricular y contribuir a la difusión y aplicación de las herramientas moleculares más importantes utilizadas en la actualidad

PROPUESTAS

Este manual está constituido de dos partes fundamentales que es la parte genética y la parte inmunológica lo que nos permite manejar dos grandes áreas de conocimiento, así mismo nos ayuda a poder aplicarlo en diferentes ramas de las ciencias de la salud, principalmente en la medicina, la ingeniería genética y la clínica.

La recopilación de información es basada principalmente en el diagnóstico microbiológico con el fin de despertar la inquietud del químico clínico por el mejoramiento hacia esta rama. Para esto es conveniente implementarlo en el plan curricular para alumnos que desde que comiencen a estudiar el ADN y alguna parte inmunológica, para conocerlo y ponerlo en práctica.

A pesar de que su punto central es el diagnóstico microbiológico se puede manejar desde cuarto semestre de la carrera de QFB, en el modulo de Bioquímica Celular y de los Tejidos (BCT I), donde se manejaría la parte genética, para el estudio de los ácidos nucleicos, las características y propiedades del ADN.

Otra aplicación es en el modulo de BCT II en la parte inmunológica que es en la prueba de embarazo (técnica de aglutinación de látex), la respuesta inmune (celular, fagocitosis, lisis de eritrocitos, hemólisis, etc.). Y la mas importante de las áreas y a la que está destinada, el área microbiológica, (microbiología I y II, y el Modulo de Biología Medica de noveno semestre)

Con el apoyo de una presentación en multimedia se pretende que este proyecto se lleve a cabo con mayor facilidad, ayudando al estudiante a conocerlo de una manera mas divertida, didáctica y de fácil manejo y comprensión. Obteniendo resultados inmediatos con la contestación de un cuestionario elaborado al final de la presentación donde ellos mismo medirán su nivel de aprovechamiento de la información transmitida de este material.