



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

METODOS INMUNOLOGICOS UTILIZADOS
PARA LA DETECCION E IDENTIFICACION
RAPIDA DE MICROORGANISMOS
PATOGENOS

TRABAJO ESCRITO VIA DE
EDUCACION CONTINUA

Que para obtener el Título de
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

p r e s e n t a:

JOSEFINA GARCIA ROJAS



México, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Jurado asignado:

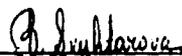
Presidente	Prof. Biserka Sveshtarova Pekarkova
Vocal	Prof. Ana Esther Aguilar Cárdenas
Secretario	Prof. Fernando García Tamayo
1er. suplente	Prof. Patricia Elvira Berrón Ruíz
2do. suplente	Prof. Rosana Pelayo Camacho

Sitio donde se desarrolló el tema:

Biblioteca de la Facultad de Química. UNAM.

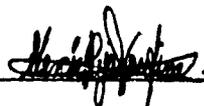
Asesor del tema:

M. en C. Biserka Sveshtarova Pekarkova



Sustentante:

Josefina García Rojas



**A mis padres:
Guadalupe Rojas R. y Luis García R.,
con amor y gratitud.**

Con amor a mi hijo Javier

A Mario Nápoles R.

**Con afecto a mis hermanos:
Luis, Guadalupe, Carmen,
Celia y Jorge.**

**Agradezco sinceramente a la M. en C.
Biserka Sveshtarova P., por su valiosa
ayuda para la elaboración de este
trabajo.**

**Mi gratitud inmensa a mis maestros,
amigos y compañeros, que contribuyeron
en la realización de este trabajo,
especialmente al Q.F.B. Juan Moreno Gutiérrez.**

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	3
1. GENERALIDADES	4
2. METODOS INMUNOLOGICOS UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACION DE ALGUNOS MICROORGANISMOS PATOGENOS.....	12
2.1 PRECIPITACION.....	12
2.2 AGLUTINACION	17
2.3 FIJACION DEL COMPLEMENTO	20
2.4 NEUTRALIZACION.....	21
2.5 ENSAYO INMUNOENZIMATICO	22
2.6 INMUNOFLUORESCENCIA	29
2.7 RADIOINMUNOANALISIS.....	32
3. METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR QUE DETECTAN CIERTOS MICROORGANISMOS PATOGENOS.....	38
3.1 SONDAS DE DNA	39
3.2 PCR.....	41
4. DETECCION INMUNOLOGICA DE MICROORGANISMOS PATOGENOS, EN EL BANCO DE SANGRE	43
4.1 DETECCION DEL VIRUS DE LA HEPATITIS TIPO A.....	45
4.2 DETECCION DEL VIRUS DE LA HEPATITIS TIPO B.....	48
4.3 DETECCION DEL VIRUS DE LA HEPATITIS TIPO C.....	50
4.4 DETECCION DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA	

HUMANA (VIH)	53
4.5 DETECCION DE <i>Treponema pallidum</i>	55
4.6 DETECCION DE CITOMEGALOVIRUS	58
5. DISCUSION	62
6. CONCLUSIONES	66
BIBLIOGRAFIA	68

INTRODUCCION

La detección de microorganismos que causan enfermedades infecciosas es de gran importancia en medicina, debido a la gravedad y a los riesgos a los que son sometidos los individuos que las padecen. La identificación rápida de microorganismos patógenos, puede ser realizada mediante métodos inmunológicos, basados en la interacción antígeno-anticuerpo.

Los métodos inmunológicos poseen gran sensibilidad y especificidad, por lo cual son bastante utilizados para la detección de productos enzimáticos o de determinantes antigénicos, utilizando anticuerpos monoclonales.

Los procedimientos inmunológicos de identificación de microorganismos que causan enfermedades, han sido mejorados para disminuir el tiempo de realización y sus costos. La obtención rápida de los resultados en muestras de pacientes, es un medio muy valioso para establecer el diagnóstico y dar el tratamiento adecuado.

Los métodos inmunológicos presentan un desarrollo continuo y constantemente se modifican, para aumentar su sensibilidad y su especificidad, así como para simplificar la técnica y obtener los resultados lo más rápidamente posible. Los avances tecnológicos en instrumentos y equipos automatizados, permiten detectar antígenos específicos y anticuerpos, en unas horas. (9)

En los últimos años, la detección de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas tales como los virus de la hepatitis, *Treponema*

pallidum, el virus de inmunodeficiencia humana, citomegalovirus, *Brucella abortus*, *Plasmodium sp.*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma cruzi* y otros, por medio de métodos inmunológicos, ha aumentado extensamente.

Existe una gran variedad de métodos inmunológicos que permiten la determinación de agentes infecciosos, algunos de los usados más frecuentemente, se abordan en este trabajo y son: precipitación, aglutinación, fijación del complemento, neutralización, ensayo inmunoenzimático, radioinmunoanálisis e inmunofluorescencia. (16)

La determinación de los microorganismos que producen hepatitis, sífilis, SIDA, brucelosis e infección por citomegalovirus, se efectúa por medio de métodos inmunológicos en la mayoría de los bancos de sangre. La detección rápida de estos agentes infecciosos, es muy útil para eliminar unidades de sangre potencialmente infecciosas y para prevenir su uso en transfusión.

Los métodos de biología molecular se han utilizado para conocer las secuencias de moléculas inmunológicas importantes. Estas técnicas se usan ampliamente en la identificación de microorganismos patógenos, debido a que son muy específicas y rápidas. Han reducido el tiempo de identificación de estos microorganismos, de semanas a varias horas.

OBJETIVOS

1. Describir algunos métodos inmunológicos utilizados para detectar rápidamente, los microorganismos causantes de ciertas enfermedades infecciosas.
2. Detectar a los virus de la hepatitis tipos A, B y C, a los virus de inmunodeficiencia humana, a *Treponema pallidum* y a citomegalovirus, en el banco de sangre.

1. GENERALIDADES

Los exámenes de rutina en el laboratorio clínico, dependen de un factor muy importante, que es el tiempo, ya que los resultados se deben obtener de preferencia, el mismo día. Las técnicas inmunológicas y de biología molecular permiten detectar microorganismos patógenos o microorganismos indicadores, en poco tiempo.

Los métodos inmunoenzimáticos son muy útiles, para la identificación de los antígenos específicos o los anticuerpos de ciertos microorganismos patógenos, de manera rápida, por lo que son preferidos, en el banco de sangre.

El creciente desarrollo tecnológico en el campo de la Inmunología, ha propiciado el surgimiento de numerosos métodos, por lo cual, se deben elegir los más adecuados. (14)

Entre las principales aplicaciones de los métodos inmunológicos se encuentra la detección de antígenos y anticuerpos de agentes causantes de enfermedades infecciosas.

A continuación se describen los métodos más comunmente usados para detectar algunos microorganismos patógenos.

Precipitación. La precipitación se determina por medio de pruebas que detectan la reacción antígeno-anticuerpo, en la cual el antígeno es soluble y al

ponerse en contacto, con el anticuerpo, en cantidades equivalentes, forman un precipitado. Los métodos de precipitación incluyen: inmunodifusión doble en gel, inmunodifusión radial simple, inmunoelectroforesis y electroinmunodifusión. (16)

Aglutinación. Esta técnica consiste en la unión de antígenos de la superficie de células, con anticuerpos, que se manifiesta en forma de conglomerados visibles.

Entre los métodos de aglutinación se encuentran: aglutinación directa de bacterias, aglutinación indirecta o pasiva, hemaglutinación indirecta, inhibición de la aglutinación y coaglutinación con *Staphylococcus aureus*.

Las pruebas para las reacciones febriles se basan en la reacción de aglutinación y detectan a los microorganismos: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Brucella abortus* y *Proteus OX-19*.

La prueba rápida de reaginas en plasma (RPR), consiste en una reacción de floculación, y se emplea rutinariamente para determinar anticuerpos contra *Treponema pallidum*.

La prueba de coaglutinación de *Staphylococcus aureus*, se utiliza para la determinación de rotavirus, *Escherichia coli*, *Streptococcus A, B, C y D*, *Salmonella* y de antígenos de otros microorganismos patógenos. (16)

Fijación del complemento. Mediante ésta prueba se puede cuantificar la reacción entre antígenos y anticuerpos, la cual se manifiesta en forma de complejos inmunes. (5)

La interacción antígeno-anticuerpo forma complejos inmunes, que fijan el complemento por la vía clásica y esto permite cuantificar el antígeno o anticuerpo, que está presente en una muestra. (14)

Las determinaciones de los microorganismos causantes de hepatitis y sífilis, utilizan esta técnica. (16)

Neutralización. La técnica de neutralización detecta antígenos enzimáticos, cuando los anticuerpos producidos contra la misma enzima, inhiben su acción. Por ejemplo, la enzima hemolítica estreptolisina "O", se combina con los anticuerpos antiestreptolisina, los cuales neutralizan su actividad.

La prueba de neutralización se aplica frecuentemente en la determinación de antiestreptolisinas y en la tipificación de virus patógenos. (5)

Ensayo inmunoenzimático (EIA). Este método utiliza una enzima unida a un anticuerpo o a un antígeno, que actúa como una marca que se detecta, al medir la actividad enzimática.

El EIA se divide en homogéneo y heterogéneo. En este trabajo sólo se aborda el ensayo inmunoenzimático heterogéneo, que comprende pasos de separación del compuesto marcado con una enzima, del material que no reaccionó, por medio de lavados.

Esta técnica permite determinar rápidamente antígenos y anticuerpos, en enfermedades causadas por microorganismos. La determinación del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, la identificación de anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humana, contra citomegalovirus y contra *Toxoplasma gondii*, son las aplicaciones más frecuentes del ensayo inmunoenzimático, en el diagnóstico microbiológico. (18)

Inmunofluorescencia. Esta prueba se emplea para cuantificar antígenos o anticuerpos, o para localizarlos en fragmentos de tejidos. La inmunofluorescencia contribuye a la detección de anticuerpos contra agentes infecciosos, como *Treponema pallidum* y *Toxoplasma gondii*, y a la determinación de anticuerpos contra parásitos y contra anticuerpos anti-nucleares. (16)

Radioinmunoanálisis. Esta técnica inmunológica consiste en la competencia de varios antígenos, por un anticuerpo, algunos de los antígenos están marcados con un compuesto radiactivo. El radioinmunoanálisis se usa frecuentemente para cuantificar el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y las hormonas triyodotironina T₃ y tiroxina T₄. (16)

Debido a la gravedad de ciertas infecciones, tales como hepatitis, SIDA, sífilis, brucelosis y por citomegalovirus, es necesario determinar la presencia de sus agentes etiológicos, en el banco de sangre, para evitar su transmisión en los receptores de sangre o de sus componentes.

CARACTERISTICAS DE LOS MICROORGANISMOS RESPONSABLES DE LAS ENFERMEDADES MENCIONADAS:

Virus de la hepatitis tipo A (VHA): Este virus es una partícula icosaédrica, no envuelta, de 27 nm. Es un virus de ácido ribonucleico, con un genoma lineal de una sola cadena, de aproximadamente 1.9×10^6 daltons. Pertenece al grupo picornavirus y está clasificado como enterovirus 72. Se localiza exclusivamente en el citoplasma de hepatocitos, es estable al tratamiento con éter, ácido y calor (56 °C durante 30 minutos). No tiene reacción cruzada con el virus B de la hepatitis; y sus huéspedes son el hombre, el mono "tití" y el chimpancé.

Virus de la hepatitis B (VHB). Este virus presenta tres entidades morfológicas de diferentes proporciones. Las formas más numerosas son pequeñas partículas esféricas, pleomórficas, que miden de 17 a 25 nm de diámetro. También se observan formas tubulares o filamentosas de diferente longitud. Las otras formas son partículas más complejas de 42 nm de diámetro, conocidas como partículas de Dane, que consisten de un centro de 27 nm, rodeado de una capa proteica viral de 7 a 8 nm.

La partícula Dane es el virus completo de la hepatitis tipo B. El determinante antigénico que se encuentra en la superficie del virus se llama antígeno de superficie de la hepatitis B (AgHBs). Otros nombres anteriores son antígeno Australia o Au y antígeno asociado a la hepatitis. El AgHBs en el VHB es idéntico al detectado en las partículas más pequeñas y en las formas filamentosas, y se compone de proteínas, carbohidratos y lípidos.

El centro interno de 27 nm del VHB contiene el antígeno central del virus de la hepatitis B (AgHBc), una pequeña molécula circular de DNA de doble cadena, y también contiene el antígeno e (AgHBe), que es una subunidad proteica del antígeno central.

El VHB es estable a 37 °C, durante 60 minutos, pero no lo es a 6 °C, durante 10 horas. (3)

Virus de la hepatitis tipo C. En 1988 Houghton y colaboradores identificaron y clonaron el genoma viral, que está relacionado al agente de la hepatitis no-A, no-B, transmitida parenteralmente. Llamaron a este agente, virus de la hepatitis C (VHC).

La hepatitis no-A, no-B es una forma de hepatitis viral aguda o crónica, y es la causa más común de hepatitis post-transfusión.

El agente de la hepatitis no-A, no-B, (VHC), es un virus de RNA, de tamaño de 30 a 60 nm, que está presente en la sangre en infecciones agudas y

crónicas en bajo título. Esta partícula viral no ha sido visualizada, pero el genoma ha sido caracterizado como un RNA de una cadena de 10.5 Kilobases de longitud. (3)

Virus de inmunodeficiencia humana. Los agentes etiológicos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), son retrovirus conocidos como virus de inmunodeficiencia humana Tipo 1 (VIH-1) y virus de inmunodeficiencia humana Tipo 2 (VIH-2). El virus VIH-1, fue aislado en Francia y en Estados Unidos. Las infecciones con VIH-2 fueron encontradas originalmente en Africa occidental.

El VIH tiene un tamaño de 80-100 nm, presenta una cubierta lipídica y pertenece a la subfamilia Oncoviridae, tipo 1 y 2. Su hábitat natural son los humanos y su distribución es universal. Se transmite por transfusión, por agujas contaminadas, por vía sexual o por vía materno-fetal.

El aislamiento del VIH en cultivos celulares es difícil y no se obtiene rápidamente, debido a esto, se emplean pruebas serológicas, para estudiar al virus. (9)

Treponema pallidum. Es un organismo delgado, en forma de espiral, mide de 6 a 15 μ de longitud, y 0.2 μ de grosor. El número de espirales oscila entre 4 y 14, y presenta una apariencia uniforme. Es el agente etiológico de la sífilis.

Todos los treponemas son morfológicamente indistinguibles entre sí y presentan la imposibilidad de cultivar cualquier clase de treponema *in vitro*. Son microorganismos anaerobios. (8)

Citomegalovirus. El citomegalovirus humano (CMV), es un miembro de la familia Herpesviridae. La partícula completa de CMV consiste en un centro que contiene ácido desoxirribonucleico, de doble cadena, de una cápside icosaédrica y de una envoltura circundante. Presenta partículas esféricas llamadas cuerpos densos.

CMV tiene heterogeneidad antigénica, pero la evidencia de serotipos definidos es limitada. El CMV es inactivado por tratamientos físicos y químicos, que incluyen calor (56 °C durante 30 minutos), pH bajo, éter y ciclos de congelación. (15)

La bacteria *Brucella abortus* tiene nueve biotipos, es un cocobacilo gram-negativo, pequeño, aerobio. Es inmóvil y no forma espora.

Es un patógeno del hombre y de animales. Es un parásito intracelular obligado. Requiere CO₂ suplementario para su crecimiento, particularmente para un aislamiento primario, y tiende a tener crecimiento lento y delicado. Produce catalasa, ureasa y fermenta lentamente los azúcares. (3)

2. METODOS INMUNOLOGICOS UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACION DE ALGUNOS MICROORGANISMOS PATOGENOS

Los métodos inmunológicos que se abordan en este trabajo, son algunos de los más empleados para la determinación de ciertos microorganismos causantes de enfermedades infecciosas e incluyen: Precipitación, Aglutinación, Fijación del complemento, Neutralización, Ensayo inmunoenzimático, Inmunofluorescencia y Radioinmunoanálisis.

2.1 PRECIPITACION

Las reacciones antígeno-anticuerpo cuando se combinan en concentraciones equivalentes, en un gel de agar, producen un precipitado (14). La precipitación manifiesta la reacción antígeno-anticuerpo y se emplea para el estudio de antígenos de microorganismos.

La formación de complejos antígeno-anticuerpo depende principalmente de las concentraciones de antígeno y anticuerpo, del pH, temperatura y de los electrolitos del amortiguador.

INMUNODIFUSION DOBLE

Ouchterlony describió la técnica de inmunodifusión doble en agar, que consiste en la difusión del antígeno y del anticuerpo, en un medio semisólido y en la formación de complejos antígeno-anticuerpo.

Esta prueba se efectúa en pozos separados, colocando en cada uno, una solución de antígeno y una solución del anticuerpo en estudio. Las soluciones se difunden hacia afuera en los pozos, y en el punto en que se encuentran el antígeno y el anticuerpo, se unen entre sí, se entrecruzan y precipitan, formando una línea de precipitación. (14)

La difusión doble se aplica bastante en la detección de antígenos y de anticuerpos. En esta técnica se pueden distinguir diferentes interacciones antígeno-anticuerpo, producidas por distintos anticuerpos presentes en el antisuero y también permite conocer la relación inmunológica entre diferentes antígenos y un determinado anticuerpo.

Para análisis comparativos la doble difusión se efectúa, colocando los pozos de antígeno y de anticuerpo en diversos ángulos. Existen tres formas básicas de estas reacciones, que se muestran en la figura 1. Estos análisis son muy utilizados para conocer la identidad de reacciones de antígenos de agentes infecciosos con anticuerpos conocidos.

INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE

La técnica de inmunodifusión radial descrita por Mancini, utiliza la técnica de difusión lineal para la cuantificación de antígenos. Se basa en la relación cuantitativa que existe entre la cantidad de antígeno depositado en un pozo, de una placa de agar con anticuerpo incorporado, y el anillo de precipitación resultante.

REACCION DE IDENTIDAD

REACCION DE NO IDENTIDAD

REACCION DE IDENTIDAD PARCIAL

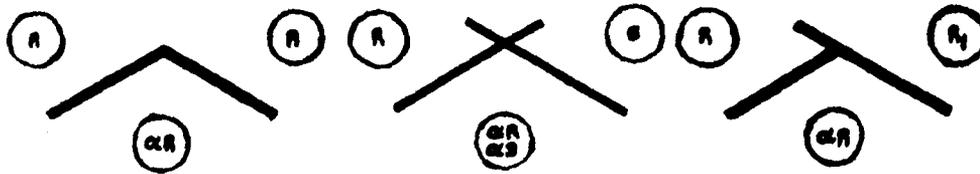


Figura 1. Inmunodifusión doble angular (Ouchterlony). R = antígeno R, S= antígeno S, R1 = antígeno R1, α R= anticuerpo contra R, α S = anticuerpo contra S. Reacción de identidad: Líneas de precipitina iguales se forman en la reacción de R con α R. Reacción de no identidad: Interacción separada de α R con R y α S con S cuando R y S son antígenos de reacción no cruzada. Reacción de identidad parcial: α R reacciona con R y R1. Tomada de Stites (16).

El método de Fahey, mide los anillos de precipitación antes de que la difusión termine. Para esto el logaritmo de la concentración del antígeno es proporcional al diámetro del anillo, figura 2. En una curva estándar de antígeno conocido se puede determinar por interpolación, la concentración de antígeno que corresponde a cualquier diámetro de un anillo, por el método de intervalo de tiempo de Fahey.

La inmunodifusión radial tiene una sensibilidad de 1-3 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno, y se emplea para medir la concentración de inmunoglobulinas y para cuantificar antígenos.

En las enfermedades infecciosas como SIDA, tuberculosis y hepatitis entre otras, ocurren cambios en las concentraciones de las inmunoglobulinas, que se pueden medir por el método de inmunodifusión radial. (16)

INMUNOELECTROFORESIS

La inmunoelectroforesis se emplea para separar mezclas de antígenos muy complejas. Los antígenos se separan en base a su carga eléctrica y después precipitan por interacción con su anticuerpo.

En esta técnica se efectúan la electroforesis y la inmunodifusión doble, en la misma placa de agar. Sirve para identificar y cuantificar proteínas presentes en el suero, o en otros líquidos biológicos.

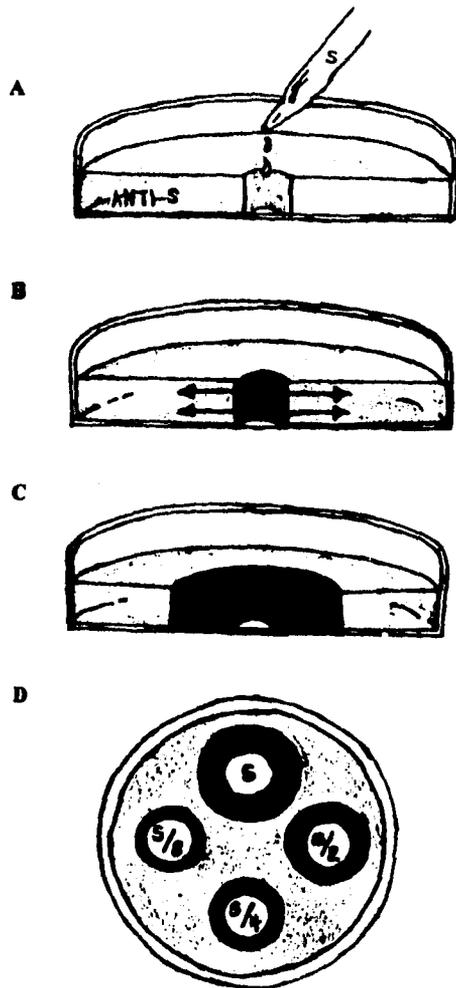


Figura 2. Difusión radial simple. A. Al agar que contiene anticuerpo contra el antígeno S, se le adiciona una cantidad determinada del antígeno S. **B.** El antígeno S se difunde radialmente durante 24 a 48 horas. **C.** En el sitio en que el antígeno S se encuentra con su anticuerpo correspondiente, se forma un anillo de precipitación de bordes nítidos. **D.** Mediante la dilución seriada de una cantidad conocida estándar de antígeno S -S/1, S/2, S/4, S/8- se forman anillos de magnitud creciente progresiva. Tomada de Stites (16)

En un gel de agar se perforan un pozo y un canal. Se coloca la muestra de suero en el pozo y se separan los antígenos, pasando una corriente eléctrica a través del gel de agar. En seguida se coloca el antisuero en el canal y se permite que los antígenos y los anticuerpos se difundan. Las interacciones antígeno-anticuerpo forman arcos de precipitación. (14)

Esta prueba se emplea para comparar mezclas de antígenos, presentes en el suero humano y para demostrar la identidad de las paraproteinemias.

ELECTROINMUNODIFUSION

La electroimmunodifusión combina la electroforesis con la difusión, y puede ser efectuada de dos formas diferentes denominadas, Electroimmunodifusión doble unidimensional y Electroimmunodifusión simple unidimensional.

En este método el encuentro entre un anticuerpo y un antígeno se puede acelerar por medio de electricidad, aplicada a través del gel de agar, para que el antígeno y el anticuerpo se muevan juntos.

Esta técnica se utiliza en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

ELECTROINMUNODIFUSION DOBLE UNIDIMENSIONAL

Este método también es conocido como Contrainmunolectroforesis. Se efectúa en un gel de agar, colocando el antígeno en un pozo frente a otro pozo

que contiene el anticuerpo. Se realiza la electroforesis simultánea del antígeno y del anticuerpo en direcciones opuestas, y en el punto donde se encuentran se produce una línea de precipitación, figura 3.

La electroinmunodifusión doble en una dimensión produce líneas de precipitación en 30 minutos y es de 10 a 20 veces más sensible que la inmunodifusión doble.

Esta técnica es semicuantitativa. Se aplica en la determinación de: antígeno de *Cryptococcus* y de antígeno de *Haemophilus* en líquido cefalorraquídeo, antígeno carcinoembrionario (CEA), α 1-fetoproteína, entre otras.

ELECTROINMUNODIFUSION SIMPLE UNIDIMENSIONAL

Esta técnica también tiene los siguientes nombres: Electroforesis en cohete y Técnica de Laurel. La prueba consiste en la incorporación de un anticuerpo contra el antígeno que se desea cuantificar, en un gel de agar. El pH del gel mantiene inmóviles a los anticuerpos y le da al antígeno una carga negativa. La muestra que contiene los antígenos se coloca en un pozo de la placa de agar y se somete a la electroforesis.

La forma de inmunoprecipitación resultante tiene forma de la punta de un cohete. La distancia de la migración del antígeno es directamente proporcional a la concentración de antígeno, figura 4.

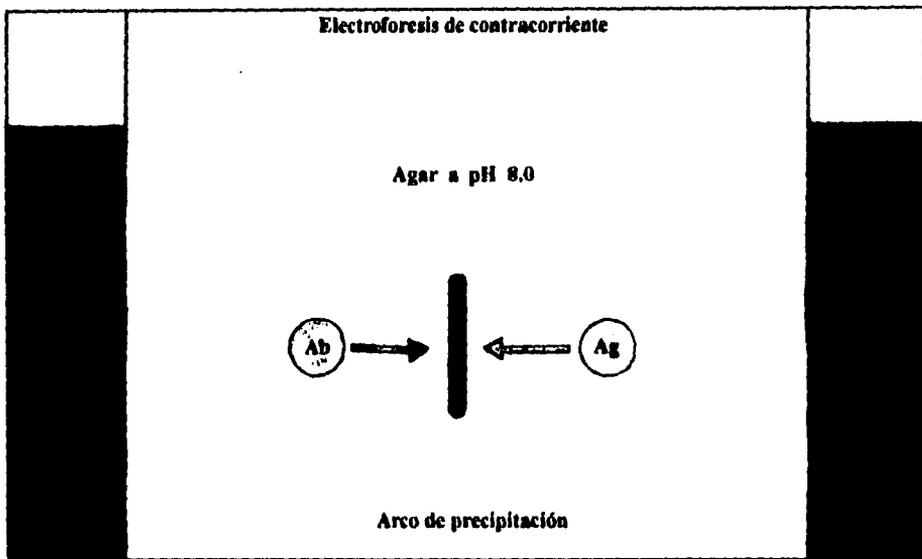


Figura 3. Electroinmunodifusión doble unidimensional. Tomada de Roitt (14).

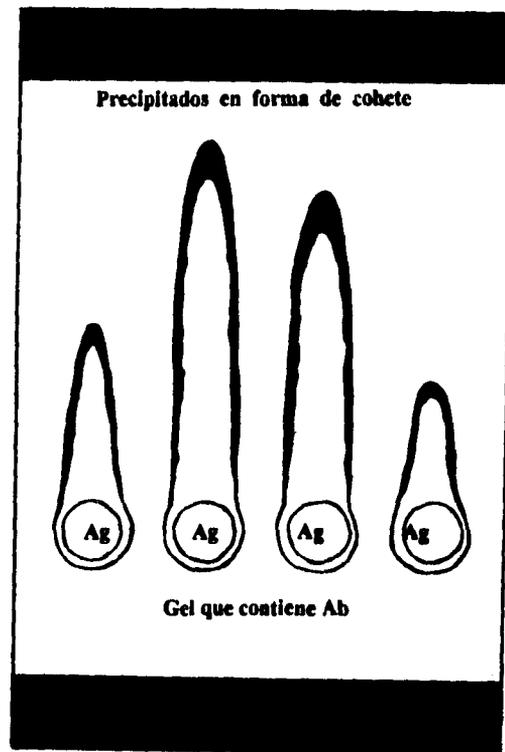


Figura 4. Electroimmunodifusión simple unidimensional. Tomada de Roitt (14)

La sensibilidad de esta prueba para proteínas es de 0.5 µg/ml. La principal aplicación de esta técnica es en la cuantificación de los diferentes antígenos de las inmunoglobulinas. (16)

2.2 AGLUTINACION

La aglutinación se produce por el enlace de los antígenos de superficie de células o de partículas, con anticuerpos. Tiene una gran sensibilidad para evaluar las interacciones antígeno-anticuerpo visualmente.

Las reacciones de aglutinación requieren de una suspensión estable de células o partículas, de la presencia de uno o más antígenos de superficie y del conocimiento de que se pueden detectar anticuerpos no aglutinantes, mediante reacciones con antiglobulina.

Las reacciones de aglutinación se clasifican como directas e indirectas. La aglutinación directa requiere de una célula o de un antígeno particulado insoluble, que es aglutinado directamente por el anticuerpo. La aglutinación indirecta (pasiva) se efectúa con células o partículas inertes recubiertas de antígenos, que hacen a estos insolubles.

La aglutinación espontánea de eritrocitos por ciertos virus es una clase de aglutinación, que se usa para cuantificar virus.

La inhibición de la hemaglutinación que utiliza reacciones de hemaglutinación pasiva, es sensible para medir concentraciones de antígeno de 0.1 a 10 $\mu\text{g/ml}$. La hemaglutinación pasiva con células sensibilizadas con proteína, puede detectar concentraciones de anticuerpo de 0.01 $\mu\text{g/ml}$.

AGLUTINACION DIRECTA

En esta prueba, por medio de un anticuerpo, eritrocitos, bacterias, hongos y otros microorganismos, pueden aglutinarse directamente. La detección de anticuerpos se realiza por medio de titulación seriada de un antisuero, en diluciones duplicadas y en presencia de una cantidad constante de antígeno. Después de la incubación, las partículas se examinan directamente o al microscopio, para buscar aglutinación. Los resultados se reportan como el título de antisuero, el cual indica la dilución más alta a la cual se presenta aglutinación.

AGLUTINACION INDIRECTA

Para esta prueba se utilizan antígenos solubles absorbidos pasivamente o acoplados químicamente a eritrocitos o a partículas inertes, como el látex o la bentonita. Muchos antígenos se acoplan espontáneamente con eritrocitos, y forman reactivos estables para la detección de anticuerpos. Los eritrocitos recubiertos con antígenos tienen gran sensibilidad como indicadores.

El tratamiento de los eritrocitos con ácido tánico, aumenta la cantidad de antígenos proteicos que se absorben después. Esto eleva la sensibilidad de la reacción de aglutinación. Los antígenos utilizados deben estar muy purificados para la especificidad inmunitaria.

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

El método de inhibición de la hemaglutinación permite detectar cantidades bajas de antígeno soluble en la sangre o en otros líquidos corporales. Consiste en la inhibición de la aglutinación de eritrocitos recubiertos de antígeno, causada por un anticuerpo sensibilizado con antígenos homólogos solubles, evitando que el antígeno de la muestra se una a los eritrocitos y aglutinen. El grado de inhibición de la aglutinación representa la cantidad de antígeno presente en la muestra problema. Este método se ha empleado en la detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis tipo B.

La aglutinación de látex se utiliza frecuentemente, en el diagnóstico rápido de microorganismos infecciosos. Las esferas microscópicas de látex recubiertas con anticuerpos, en presencia del antígeno correspondiente, producen una aglutinación visible.

Las reacciones de aglutinación son semicuantitativas, y poseen una sensibilidad elevada para la determinación de anticuerpos. (16)

2.3 FIJACION DEL COMPLEMENTO

La interacción de antígenos y anticuerpos, produce complejos antígeno-anticuerpo que fijan el complemento. El consumo del complemento *in vitro* se puede utilizar para medir y detectar anticuerpos, antígenos o ambos. La prueba comprende un sistema de reacción de dos etapas. (5)

Primera etapa: Se efectúan diluciones dobles del suero problema, y a cada dilución se adiciona una cantidad fija de antígeno. Si existe anticuerpo en el suero, reaccionará con el antígeno y producen la formación de complejos antígeno-anticuerpo. En seguida se añade una cantidad conocida de complemento a la mezcla. Los complejos inmunes fijan al complemento, figura 5.

Segunda etapa: La cantidad de actividad hemolítica residual del complemento, se titula con una mezcla de células indicadoras (E, eritrocitos de carnero), junto con una cantidad subaglutinante de anticuerpo de conejo anti-eritrocito de carnero (A). Si quedan restos del complemento, las células serán lisadas, si el complemento fue consumido por los complejos antígeno-anticuerpo, no habrá lisis de eritrocitos. (14)

La actividad hemolítica del complemento depende de los factores siguientes: la concentración del complemento, de la concentración de los eritrocitos de cordero, de la concentración de anticuerpo anti-eritrocito de

Fijación del complemento

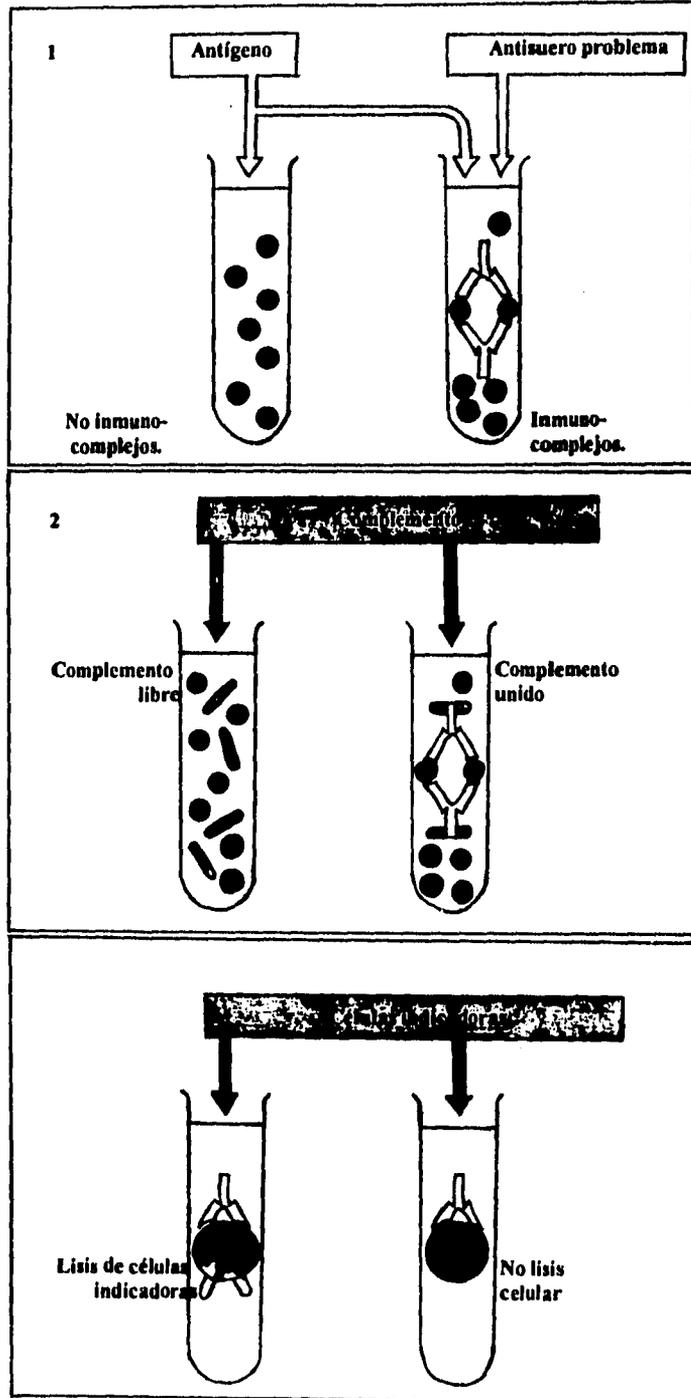


Figura 5. Fijación del complemento. 1. A diluciones dobles del suero problema se añade una cantidad fija de antígeno, si hay anticuerpo se formarán inmunocomplejos. 2. Se añade complemento a la mezcla, si hay complejos, fijarán el complemento y lo consumirán. 3. Se añaden a la mezcla células indicadoras (eritrocitos) junto con anticuerpo (EA, anticuerpo anti-eritrocito). Si quedan restos de complemento, las células serán lisadas: si el complemento fue consumido, no quedará el suficiente para lisar los eritrocitos. Tomada de Roitt (14).

carnero, de la concentración de los iones magnesio y calcio, fuerza iónica, volumen, temperatura, tiempo y pH. (16)

Los resultados de esta prueba se expresan como, la mayor dilución de suero que muestra fijación, para la medición del anticuerpo presente en la mezcla inicial.

La prueba de fijación del complemento se emplea en las determinaciones de microorganismos patógenos, como son:

- Antígeno de superficie de la hepatitis tipo B (AgHBs)
- Pruebas de Wasserman para sífilis
- Antígeno de *Coccidioides immitis*

Algunos anticuerpos fijan el complemento, sin la presencia del antígeno y algunos antígenos tienen actividad anticomplementaria. (14)

2.4 NEUTRALIZACION

La neutralización implica, la pérdida de actividad biológica por interacción con el anticuerpo, por ejemplo la pérdida de infectividad de un microorganismo, o la pérdida de toxicidad del producto de un microorganismo.

Dos de las aplicaciones de la técnica de neutralización, para identificar microorganismos patógenos son: la determinación de antiestreptolisinas del grupo A de estreptococos β -hemolíticos, y la determinación cuantitativa de anticuerpos contra una amplia variedad de virus. (5)

2.5 ENSAYO INMUNOENZIMATICO

Engvall y Perlman iniciaron los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) y establecieron el término ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Las técnicas de ELISA se basan en la unión de antígenos o de anticuerpos solubles, a una fase sólida insoluble, reteniendo la reactividad del componente inmunológico. (18)

Los métodos inmunoenzimáticos usan antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, que actúa sobre su sustrato, para dar un producto de reacción colorido, que manifiesta la presencia de un antígeno o de un anticuerpo. Este producto se puede medir en un espectrofotómetro. (1)

Existen dos tipos de ensayo inmunoenzimático (EIA), el homogéneo y el heterogéneo.

En el EIA homogéneo, la interacción antígeno-anticuerpo altera la actividad de la enzima y no hay necesidad del paso de separación. Estos ensayos están ejemplificados por el EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique), en el cual un hapteno se une a una enzima, de manera que, la actividad enzimática se altera cuando el hapteno se une al anticuerpo.

Los ensayos inmunoenzimáticos heterogéneos se basan en el principio de que, cualquiera de los dos, el antígeno o el anticuerpo, se puede unir a una enzima, al mismo tiempo que retienen las actividades inmunológica y enzimática, en el conjugado resultante.

Los ensayos heterogéneos incluyen un paso de separación del componente marcado con enzima, del material que no reaccionó, mediante lavado. Estos ensayos son muy sensibles, debido al efecto amplificador de las enzimas y los resultados se obtienen visualmente o con un espectrofotómetro.

Los ensayos inmunoenzimáticos utilizan anticuerpos monoclonales, para obtener reacciones más específicas.

Nakamura señala varios tipos de ensayo inmunoenzimático EIA, que se clasifican según: a) el reactivo que hay que determinar, es decir, el antígeno o el anticuerpo. b) el reactivo marcado. c) la naturaleza competitiva o no del análisis y d) el método de separación de los reactivos unidos o libres. (13)

Los EIA heterogéneos se abarcan más extensamente en este trabajo, por ser los que se emplean más en la identificación de microorganismos que causan enfermedades infecciosas.

Los tipos de EIA heterogéneos más comunes son: 1) Método del sandwich ó de doble anticuerpo, para medir antígeno. 2) Método indirecto para detectar anticuerpo. 3) Método competitivo para determinar antígeno. 4) Método de inhibición, para detectar antígeno y 5) Método del sandwich o de doble anticuerpo modificado, para determinar antígeno. (18)

Los ensayos heterogéneos utilizan antígenos o anticuerpos unidos a una fase sólida, o libres en solución. La reacción antígeno-anticuerpo se puede

detectar por diferentes métodos, en los cuales el material unido se separa del libre, mediante lavados.

La fase sólida más utilizada en estos ensayos, es el poliestireno en forma de perlas, de tubo o de placas con pozos.

Los EIA heterogéneos están dirigidos a la detección y cuantificación de antígenos y de anticuerpos e incluyen los siguientes:

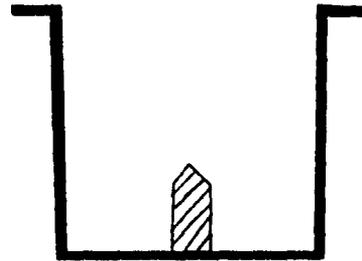
ENSAYO INMUNOENZIMATICO INDIRECTO (ELISA)

Este método detecta anticuerpos presentes en una muestra, el antígeno conocido se encuentra inmovilizado, en una fase sólida. El anticuerpo que se desea determinar se une al antígeno. Luego de la reacción antígeno-anticuerpo, se elimina el exceso de anticuerpo mediante lavados, se adiciona una anti-inmunoglobulina marcada con una enzima, que demuestra la presencia del anticuerpo unido. Después de otro lavado se añade el sustrato de la enzima y se obtiene un producto colorido. La actividad enzimática se mide espectrofotométricamente y la intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de anticuerpo buscado. (1)

Los pasos del método indirecto esquematizados en la figura 6, son los siguientes:

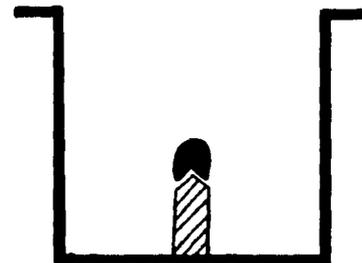
1. El antígeno apropiado está fijo a la fase sólida, la cual luego se lava.
2. El suero problema diluido se añade, se incuba, y después se efectúa otro lavado.

1. El antígeno está adsorbido a la placa



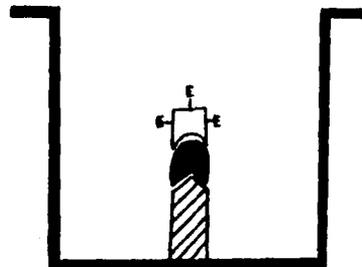
Lavar

2. Adicionar suero: cualquier anticuerpo específico se fija a el antígeno.



Lavar

3. Adicionar antiglobulina marcada con una enzima, que se fija a el anticuerpo.



Lavar

4. Adicionar el sustrato

Cantidad de hidrolizado \equiv cantidad de anticuerpo presente

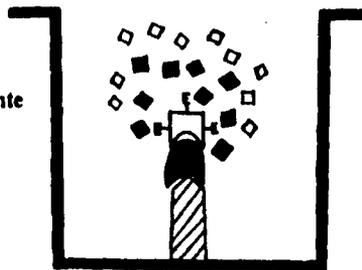


Figura 6. Método inmunoenzimático indirecto para ensayo de anticuerpo. Tomada de Voller (18).

3. Se añade un anticuerpo anti-globulina marcado con enzima, y se deja reaccionar, luego se repite el lavado.
 4. Se adiciona el sustrato enzimático. La degradación del sustrato da como resultado un cambio de color. La proporción del cambio de color, está relacionada a la cantidad de anticuerpo presente en el suero problema.
- (18)

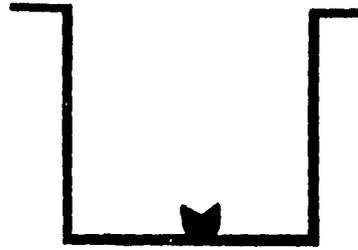
METODO DEL SANDWICH O DE DOBLE ANTICUERPO

Por medio de este método se detectan antígenos, para lo cual se recubre una fase sólida con un anticuerpo, que se une al antígeno de la muestra. Después de un lavado para eliminar el antígeno no unido, se añade un segundo anticuerpo que está dirigido a un epítoto diferente del antígeno, conjugado a una enzima. El exceso del conjugado se desecha, y luego se añade el sustrato. Se mide la intensidad de color producida, que es directamente proporcional a la concentración del antígeno. (1)

Los pasos del método del sandwich, que se describen a continuación son los que se muestran en la figura 7.

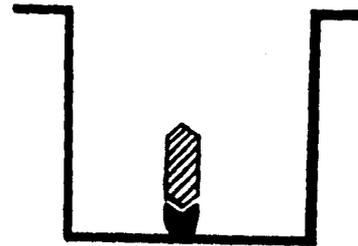
1. Una inmunoglobulina o un anticuerpo purificado (contra el antígeno que se va a medir), se encuentra fijada a la fase sólida, la cual se lava después.
2. La solución problema propuesta a contener antígeno, se incuba con la fase sólida sensibilizada, que luego se lava.

1. Anticuerpo adsorbido a la placa



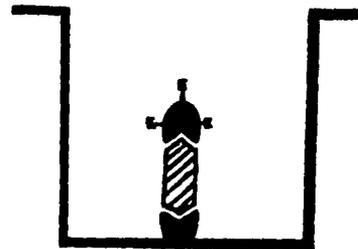
Lavar

2. La solución problema conteniendo el antígeno, es adicionada



Lavar

3. Adicionar un anticuerpo específico marcado con una enzima



Lavar

4. Adicionar el sustrato enzimático



Cantidad de hidrólisis \equiv cantidad de antígeno presente

Figura 7. Método del sandwich o de doble anticuerpo para la medición de antígeno.
Tomada de Voller (18).

3. El anticuerpo específico marcado con enzima contra el antígeno, se incuba con la fase sólida y posteriormente se efectúa otro lavado.
4. Se añade el sustrato enzimático. El cambio de color es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la solución problema. (18)

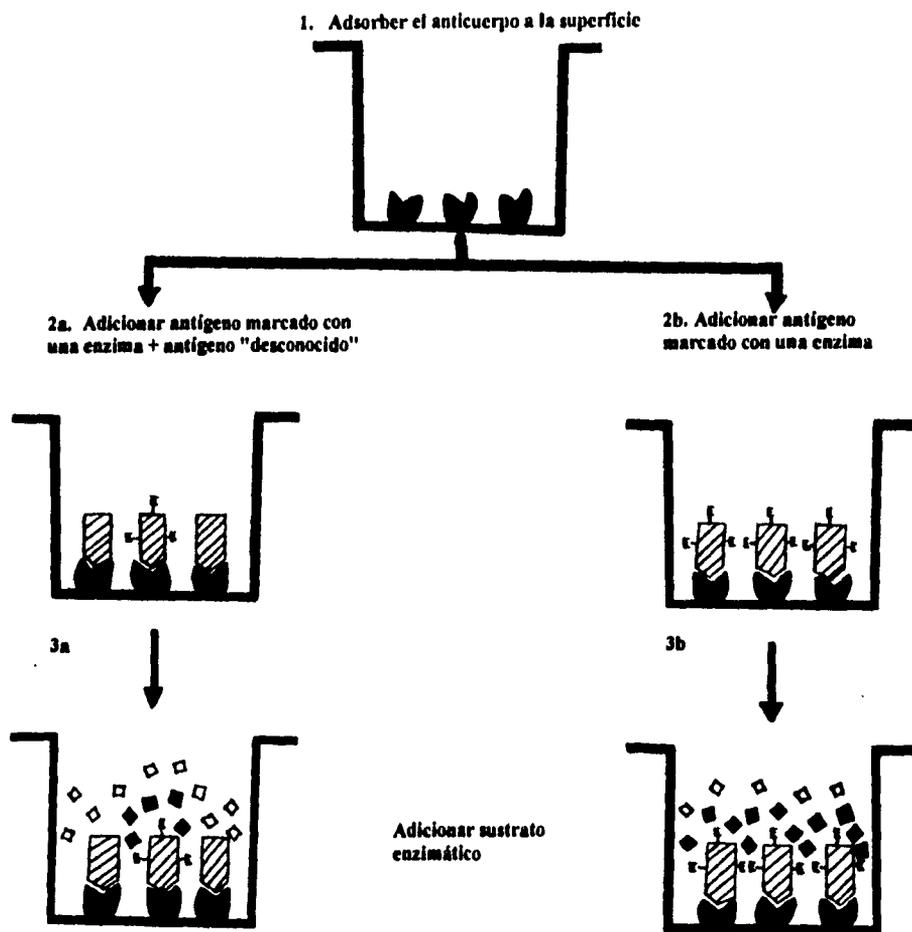
EIA COMPETITIVO

Esta técnica permite cuantificar antígenos o anticuerpos y consiste en hacer reaccionar cantidades constantes y limitadas de conjugado, para saturar sus sitios de unión absorbidos a la fase sólida. Si se encuentra en la muestra la misma especie molecular del conjugado, las dos compiten por unirse a la fase sólida. Una parte del conjugado está libre y se elimina mediante lavado, por lo cual, hay menos desarrollo de color. (1)

Se necesita una curva patrón para obtener la cantidad de antígeno o de anticuerpo, presente en la muestra.

Los pasos del método competitivo se ilustran en la figura 8, y se resumen como sigue:

1. Un anticuerpo se fija a la fase sólida y luego se efectúa un lavado.
2. Se adiciona la solución problema propuesta a contener el antígeno buscado. Luego se añade antígeno marcado con enzima y se mezclan. Las placas se incuban y luego se lavan.



Hidrólisis del sustrato = marcado (antígeno)
 Diferencia entre 3a & 3b = "desconocido" (antígeno)

Figura 8. Método inmunoenzimático competitivo para la medición de antígeno. Tomada de Voller (18).

3. Se añade el sustrato enzimático. Los pozos de referencia como contienen sólo antígeno marcado con enzima, muestran una coloración. Los pozos con muestras problema muestran inhibición del cambio de color, que es proporcional a la cantidad de antígeno en las muestras.

(18)

Los EIA se emplean ampliamente para determinar antígenos y anticuerpos, en diversas áreas. Dentro del área clínica, son muy utilizados en el banco de sangre, para la identificación de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas.

La preferencia por los ensayos inmunoenzimáticos EIA se debe a la estabilidad de sus reactivos, a la obtención rápida de los resultados y a que se pueden procesar un gran número de muestras a la vez. (1)

Las enzimas más empleadas en el EIA heterogéneo son: Peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y β -D-Galactosidasa. En el EIA homogéneo se utilizan más frecuentemente: lisozima, malato-deshidrogenasa y Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. (13)

Las enzimas anteriores presentan las siguientes características:

- a) Tienen actividad enzimática elevada a concentraciones bajas de sustrato.
- b) Poseen actividad y estabilidad elevadas, al pH óptimo para la unión antígeno-anticuerpo.

- c) Miden la actividad enzimática de forma económica y sensible.
- d) Conservan su actividad enzimática al acoplarse al antígeno o al anticuerpo, para formar el conjugado.
- e) Estabilidad en el conjugado al almacenarse.
- f) Pura a bajo costo.
- g) Deben ser solubles.
- h) Ausencia en los fluidos biológicos.
- i) Que no forme compuestos de alto riesgo para la salud. (1)

Aplicaciones del EIA heterogéneo en la detección de agentes infecciosos.

El ensayo inmunoenzimático se ha utilizado para identificar bacterias patógenas como son: *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Brucella abortus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium tuberculosis*, entre otras.

En las infecciones virales el EIA puede detectar virus como *Herpes simplex*, virus *Epstein Barr*, el virus de la rubeola, citomegalovirus, el antígeno de superficie del virus de la hepatitis tipo B, los virus de la hepatitis tipos A, C, y D, el virus de inmunodeficiencia humana y otros.

Algunas aplicaciones de esta técnica en enfermedades parasitarias, son las determinaciones de: *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii*. (18)

VENTAJAS DE LOS ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS

1. Sensibilidad elevada debido al efecto amplificador de la enzima, que puede actuar sobre numerosas moléculas de sustrato.
2. Tiempo de vida prolongado.
3. Seguridad en su uso.

Existen otras pruebas inmunoenzimáticas con sensibilidad aumentada, como son: ensayos de inhibición, RELIA (Release Enzyme Linked Immunosorbent), EASIA (Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay), y ACMIA (Affinity Column Mediated Immunoenzymometric), entre otras. (1)

2.6 INMUNOFLUORESCENCIA

La Inmunofluorescencia es una técnica inmunocitoquímica que utiliza anticuerpos o antígenos conjugados con un compuesto fluorescente. Esta técnica se emplea para detectar antígenos en tejidos o en células.

El anticuerpo se conjuga con un compuesto fluorescente, que se agrega a los tejidos y se fija a sus antígenos, formando un complejo inmune estable. El anticuerpo libre se elimina por lavado y la preparación se examina en un microscopio de fluorescencia.

Las preparaciones se pueden observar en un microscopio adaptado con una lámpara de luz excitadora (UV), la cual es absorbida por el fluorocromo

que emite una luz de menor intensidad (luz fluorescente). La fluorescencia se observa por medio de luz incidente, que produce la máxima emisión de luz. (1)

El isotiocianato de fluoresceína que emite un color verde a 517 nm, y el isotiocianato de tetrametil rodamina que emite un color rojo a 580 nm, son los dos fluorocromos más utilizados para marcar antígenos o anticuerpos.

La inmunofluorescencia consta de tres pasos: 1. Preparación de anticuerpos purificados. 2. Conjugación con tinción fluorescente y 3. El procedimiento de tinción.

El antisuero para el antígeno que se busca, se obtiene de especies heterólogas o de anticuerpos monoclonales. Se separa la fracción γ -globulina y se conjuga con el fluorocromo.

El método de inmunofluorescencia directa, utiliza un anticuerpo marcado con un fluorocromo, que reacciona directamente con el antígeno.

En el método de inmunofluorescencia indirecta, un primer anticuerpo no marcado reacciona con el antígeno, en seguida reacciona con una anti-inmunoglobulina conjugada con un fluorocromo. El uso del segundo anticuerpo proporciona una mayor sensibilidad, figura 9.

Algunas aplicaciones de la inmunofluorescencia son: Detección de antígenos y anticuerpos en la superficie y dentro de las células. Detección de

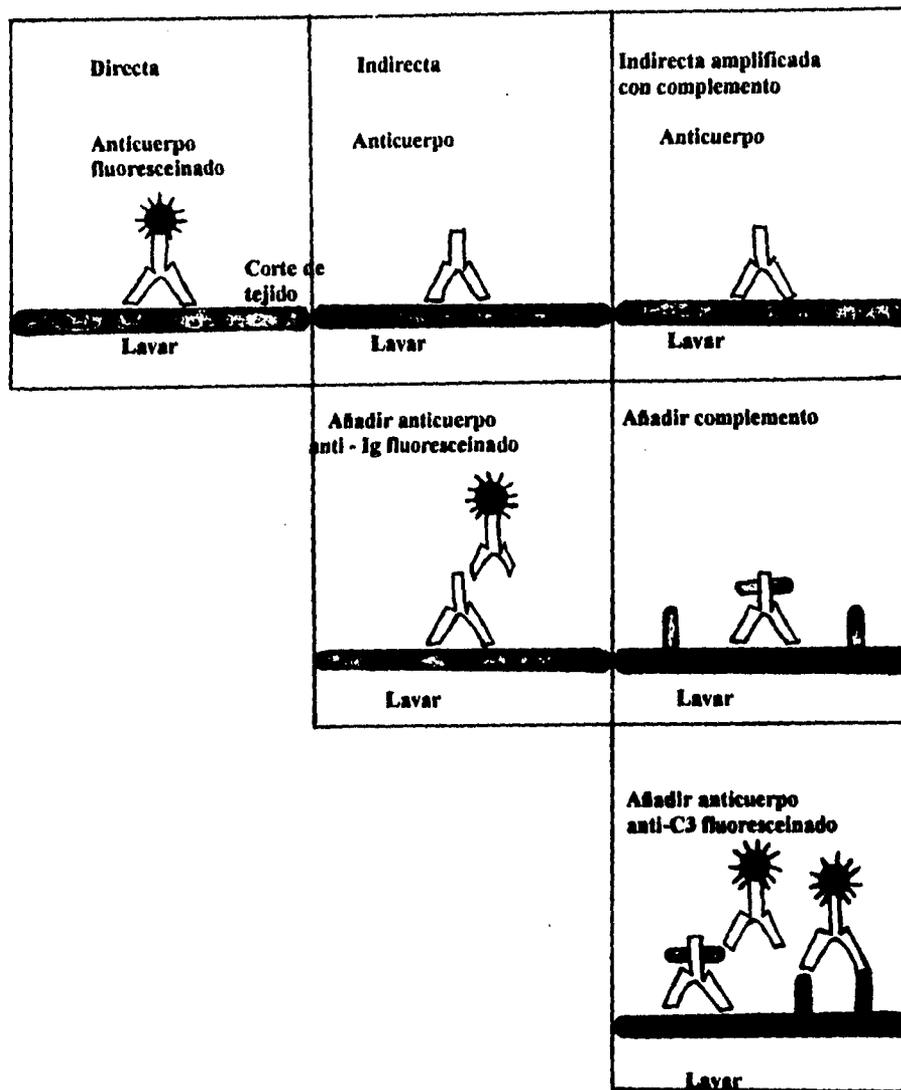


Figura 9. Inmunofluorescencia Directa, Indirecta e Indirecta amplificada con complemento.

Directa. Los anticuerpos fluoresceinados se aplican sobre el corte de tejido, se incuban y se lavan.

Indirecta. El anticuerpo se aplica sobre el corte y luego, después de lavarlo, se añade un segundo anticuerpo fluoresceinado contra la inmunoglobulina del primero.

Indirecta amplificada por el complemento. Se aplica el anticuerpo y después de lavar, se añade complemento fresco, que se fija alrededor del lugar donde se han unido los anticuerpos. Las moléculas de C_3b fijadas al corte, se visualizan después con un anticuerpo anti-C3 fluoresceinado. Tomada de Roitt (14).

depósitos de complejos inmunes y de autoanticuerpos en suero (ANA).
Identificación rápida de microorganismos en tejidos o en cultivos.
Identificación de antígenos específicos de tumor en tejidos neoplásicos.
Identificación de células en suspensión, es decir, antígenos en la membrana de células vivas. (16).

La sensibilidad de la inmunofluorescencia es mayor que con la técnica de fijación de complemento, y menor que con la Inhibición de la hemaglutinación.

Otro tipo de prueba es la Fluorescencia cuantitativa, que utiliza antígenos marcados con fluorocromo. Mediante un microfluorómetro se mide la cantidad de luz emitida por una muestra fluorescente. Esta técnica mide IgG, IgA e IgM, C3 y C4, y anticuerpos antinucleares y anti-DNA.

Una técnica que también utiliza la fluorescencia, es la denominada Sistema de biotina y avidina. La biotina se une en forma covalente a un anticuerpo, y después reacciona con la avidina acoplada al fluorocromo.

El inmunoensayo fluorescente (FIA) se emplea para detectar la presencia de anticuerpos contra rubeola, contra toxoplasmosis y contra varios virus. Esta técnica efectúa la medición cinética de las reacciones antígeno-anticuerpo, al disminuir la interferencia de la fluorescencia de fondo. (12)

La modificación de la técnica de inmunofluorescencia indirecta, produjo la prueba Indirecta amplificada por el complemento, que detecta anticuerpos

fijadores del complemento. Después de adicionar el anticuerpo se añade complemento, que se fija alrededor del lugar donde se unieron los anticuerpos. Una molécula de anticuerpo puede causar la fijación de varias moléculas de C3b al tejido, las cuales se visualizan con antisuero anti-C3 fluoresceinado, figura 9. (14)

2.7 RADIOINMUNOANALISIS

El análisis de captador y ligando es un importante método desarrollado recientemente. Este análisis cuantifica hormonas, medicamentos, marcadores tumorales y alérgenos. También permite la detección rápida de antígenos bacterianos y virales, y de anticuerpos en enfermedades infecciosas como hepatitis y SIDA.

Los análisis de captador y ligando tienen las siguientes características: emplean estándares para comparar los resultados de las muestras, los reactivos inmunológicos se separan en fase sólida o líquida, y utilizan una forma de detección para medir la interacción entre el ligando y el captador.

En este método el analito (molécula de interés), reacciona con una proteína captadora, que frecuentemente, es un anticuerpo. Por su función al reaccionar con el captador, el analito se denomina ligando.

El Radioinmunoanálisis es uno de los más importantes métodos de análisis de ligando, que comprende las etapas de calibración, interpolación y control de calidad.

CALIBRACION

La calibración incluye los eventos de: 1. Reacción entre el captador y el ligando. 2. La partición y separación. 3. Medida de la respuesta. y 4. Creación de una curva de calibración.

En la reacción de captador y ligando, la calibración requiere de estándares o calibradores, los cuales son diluciones del analito de concentración conocida. En seguida se adicionan diferentes cantidades de calibrador a una serie de mezclas de anticuerpo con marca.

El paso más importante en el RIA, es la competencia entre el analito marcado y el no marcado, por los sitios de captación del anticuerpo. La marca que está unida al anticuerpo se denomina fracción unida y la marca que está libre en la solución es la fracción libre.

La partición utiliza métodos que secuestran al captador y a los complejos captador-ligando. Estos métodos pueden ser:

- a) Extracción salina de proteína, usando sulfato de sodio o de amonio.
- b) Desnaturalización y precipitación de proteínas por solvente, mediante metanol, etanol o acetona.

- c) **Precipitación, con polietilenglicol o con un anticuerpo dirigido contra el primero.**

La separación rápida de la marca unida o libre, se logra inmovilizando el captador a una fase sólida tal como una partícula macroscópica o al tubo de ensaye de reacción. El método de adsorción de ligando libre permite eliminar la fracción libre, usando carbón, resina de intercambio iónico, celulosa o sephadex.

La separación física de las fracciones unida y libre, se efectúa por centrifugación y filtrado.

La medida de la respuesta se efectúa por el método de la cuenta radiactiva. Para un emisor alfa o beta se utiliza un contador de centelleo y para un emisor gamma se usa un contador gamma de cristal sólido.

La creación de una curva de calibración permite obtener la relación entre la concentración del calibrador y la respuesta de la muestra.

INTERPOLACION

La respuesta se utiliza junto a la curva de calibración, para estimar la concentración de un analito.

CONTROL DE CALIDAD

Los resultados deberán estar entre límites de confianza determinados estadísticamente.

El análisis de ligando se divide en base al método de marcación con radioisótopos, en:

- 1) Análisis inmunoradiométrico (IRMA). En este método, el captador (un anticuerpo), es el que está marcado, en lugar del ligando.
- 2) Análisis de emparedado. El ligando reacciona con un anticuerpo inmovilizado sobre una fase sólida. En seguida, se adiciona un segundo anticuerpo radiomarcado, que reacciona con el ligando en un sitio distinto. Este método tiene especificidad química aumentada, debido al uso de dos sitios antigénicos diferentes.

Los métodos de análisis se comparan también de acuerdo al método de marcación y se denominan: Métodos de reactivo limitado (o competitivo) y Métodos de exceso de reactivo (o no competitivo).

El RIA es un método de reactivo limitado, donde el ligando marcado y el no marcado compiten por una cantidad limitada de captador. La sensibilidad del RIA es de 10^{-14} mol/L.

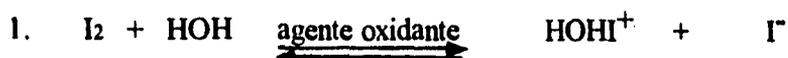
El análisis de ligando mide la reactividad inmunoquímica de un analito.

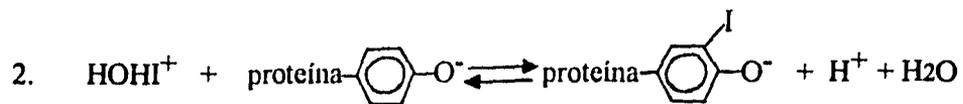
(16)

Para la radiomarca se usan diversos radioisótopos, el ^{125}I es el más usado para marcar péptidos, proteínas y tironinas, y el ^3H es usado más frecuentemente para esteroides. Para sustancias tales como drogas en la sangre, pueden ser usados isótopos de más larga vida, tales como ^{14}C .

El ^{125}I es el más usado para la radioyodación de péptidos u hormonas proteicas. Este isótopo tiene una vida media de 60 días y es un emisor gamma poco penetrante. Esta última propiedad lo hace proteger los efectos iniciales de la radiación.

Para la reacción de radiomarcado, la técnica usada proporciona una combinación adecuada de ^{125}I con la proteína o el péptido a ser marcado, y minimiza el daño a la hormona o al péptido (a través de la oxidación). El yodo puede ser introducido dentro del residuo tirosilo, por medio de una reacción que produce un ión catiónico (I^+) del yoduro (I^-), disponible del Na^{125}I comercial a través de oxidación. Esta forma activa interactúa con la mitad hidroxilo fenólico cargada, en el residuo tirosilo de una proteína o péptido.





El método de radioinmunoanálisis posee sensibilidad elevada, en la detección de antígenos y anticuerpos, y permite efectuar una gran cantidad de pruebas en poco tiempo, figura 10.

Los reactivos usados en el RIA son de bajo costo, y los resultados están dados en términos de alguna referencia o material estándar.

Las técnicas de RIA tienen habilidad para medir cantidades extremadamente pequeñas de proteínas y hormonas en líquidos corporales. (10)

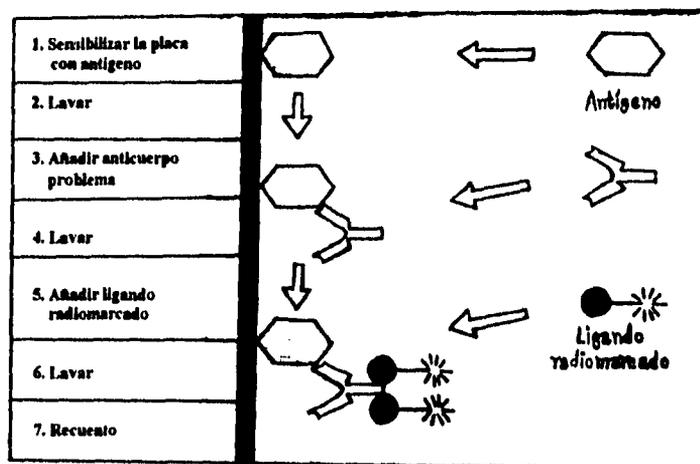


Figura 10. Radioinmunoanálisis. 1. El antígeno, se adsorbe a la placa de plástico. 2. El antígeno libre se elimina por lavado. 3. El anticuerpo se une al antígeno 4. Los anticuerpos no unidos se eliminan por lavado. 5. El anticuerpo se detecta mediante un ligando radiomarcado (otro anticuerpo contra el primer anticuerpo). 6. El ligando no unido se elimina mediante lavado. 7. La radiactividad de la placa se cuenta en un contador γ . Tomada de Roitt (14).

3. METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR QUE DETECTAN CIERTOS MICROORGANISMOS PATOGENOS

Las técnicas basadas en hibridación de ácido nucleico han aumentado bastante últimamente. Existen diversas pruebas con DNA, que se usan rutinariamente en muchos laboratorios de diagnóstico, para la confirmación del cultivo y para la detección directa de patógenos en muestras clínicas.

Las pruebas basadas en la hibridación y en la amplificación de ácidos nucleicos, contribuyen al entendimiento de la patogénesis de muchas enfermedades infecciosas.

Las pruebas con ácidos nucleicos usan segmentos de DNA o RNA, que se pueden investigar afuera y unirlos a sus secuencias complementarias, para formar una nueva molécula doble. Los segmentos se marcan con enzimas, radioisótopos o moléculas quimioluminiscentes, para detectar fácilmente la formación de moléculas dobles.

Como todos los microorganismos tienen alguna secuencia de nucleótidos única en sus genomas, ésta puede ser utilizada como huellas digitales para su identificación rápida. La gran especificidad de esta técnica y la rapidez de las reacciones de hibridación, disminuyen el tiempo para obtener los resultados.

Las pruebas moleculares para identificar microorganismos pueden usarse en dos formatos:

1. Se usan para la Confirmación del cultivo, identificando microorganismos de un medio semisólido o en caldo. Principalmente se han identificado a *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* y *M. intracellulare*, creciendo en medios sólidos, y se ha disminuido el tiempo para identificar estos microorganismos, de semanas a horas.

También se usan para identificar virus creciendo en cultivo celular, como son los virus *Herpes simplex*, citomegalovirus y adenovirus.

2. Detección directa de patógenos en muestras clínicas. Este procedimiento utiliza sondas de DNA, es rápido y específico. Las sondas de ácidos nucleicos tienen habilidad para detectar agentes infecciosos directamente en muestras clínicas, evitando la necesidad del cultivo. Las sondas para los microorganismos *Chlamydia trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* y sondas de toxinas estables al calor de *E. coli*, están disponibles comercialmente. (17)

3.1 SONDAS DE DNA

Para la detección más rápida y precisa de microorganismos, en muestras clínicas, se han desarrollado técnicas genéticas. Las sondas de DNA son una de estas técnicas.

Una sonda es una secuencia de ácidos nucleicos de una sola cadena, que hibrida específicamente con su cadena complementaria. La técnica para obtener una sonda requiere la desnaturalización del DNA, mediante el proceso de separación de las cadenas de DNA, cuando se somete a una temperatura suficiente para romper los puentes de hidrógeno, que unen a las bases apareadas.

Una solución que contiene cadenas individuales de DNA, puede ser utilizada para reconstituir el DNA nativo. La renaturalización se utiliza para demostrar la relación genética, de fragmentos de DNA obtenidos de diferentes microorganismos, para detectar una especie complementaria particular de RNA o para localizar secuencias de bases específicas, en un segundo fragmento de DNA. La última aplicación es la base del proceso conocido como hibridación del DNA.

La enzima DNA polimerasa I (Pol I), corta sólo una de las cadenas de la molécula de DNA de doble hélice. Luego puede sintetizarse una cadena de nucleótidos complementaria a la cadena no cortada, comenzando por el punto de corte. Esta cadena única, marcada, del DNA, pasa a ser la sonda específica para detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos, en microorganismos o en muestras clínicas.

Ciertas sondas de DNA se encuentran disponibles comercialmente, y algunas de sus aplicaciones son:

1. Procesamiento de un gran número de muestras en estudios epidemiológicos, como se hace en el estudio del origen de especies bacterianas, implicadas en brotes de enfermedades infecciosas.
2. Detección de agentes patógenos en muestras clínicas, como citomegalovirus, rotavirus y otros.

Las sondas de DNA pueden detectar partículas microbianas aún después de que el microorganismo no está vivo. La detección de secuencias específicas de genes, se puede realizar con gran sensibilidad, en presencia de grandes concentraciones de DNA heterólogo. (9).

3.2 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica molecular que efectúa el aumento en la cantidad de una secuencia de nucleótidos específica, contenida dentro de un microorganismo, por un proceso de síntesis de DNA dirigida.

La técnica de PCR se usa para encontrar cantidades muy bajas de un agente infeccioso presentes en muestras clínicas. Consiste de tres pasos:

1. Desnaturalización del DNA presente en la muestra.
2. Unión de los primers (segmentos cortos de DNA complementario a los extremos 5' y 3', de la secuencia que va a ser amplificada).

3. Extensión de los primers por la DNA polimerasa, para producir dos cadenas de DNA que son copias idénticas de la cadena blanco original. De esta forma, se amplifica el DNA localizado entre los dos primers.

La mayor parte del DNA producido consiste de productos pequeños, que representan sólo el área entre los primers oligonucleótidos.

El proceso de ciclado involucra alternativamente calentamiento de la mezcla de reacción a 95 °C y luego enfriamiento a 50 °C, y el uso de una DNA polimerasa termorresistente obtenida del microorganismo *Thermus acuaticus*. La reacción continúa en un tubo sellado, para evitar la contaminación.

La técnica de PCR se puede utilizar para detectar microorganismos patógenos, como los virus de inmunodeficiencia humana, citomegalovirus, virus de la hepatitis B, papilomavirus humano, poliomavirus, *E. coli* enterotoxigénica y muchos otros agentes infecciosos.

Tres puntos clave, en el uso de la técnica de PCR para detectar un microorganismo en una muestra, son: 1) Deben ser construidos primers específicos, lo que significa que, los datos de la secuencia de nucleótidos, está disponible para el organismo en cuestión. 2) La prueba de PCR debe ser conducida bajo condiciones de fuerza iónica, temperatura, y concentraciones del primer y del nucleótido, estrictamente controladas. 3) Los ensayos deben ser conducidos controlando la contaminación por DNA extraño a la muestra.

La técnica de PCR es un procedimiento muy específico y efectivo. (17)

4. DETECCION INMUNOLOGICA DE MICROORGANISMOS PATOGENOS, EN EL BANCO DE SANGRE

En este capítulo se describe la detección de los microorganismos que causan hepatitis, SIDA, sífilis e infección por citomegalovirus, mediante métodos inmunológicos, en el banco de sangre.

Los microorganismos patógenos que se detectan rutinariamente en los bancos de sangre son: los virus de la hepatitis tipos B y C, *Treponema pallidum*, y el virus de inmunodeficiencia humana. Otros microorganismos que también se detectan, en la mayoría de los bancos de sangre son: *Brucella abortus*, el virus de la hepatitis tipo A y citomegalovirus.

El método utilizado en el banco de sangre del Instituto Nacional de Cancerología, para la identificación de los virus de la hepatitis tipos A, B, y C, del virus de inmunodeficiencia humana y de citomegalovirus, es el Ensayo inmunoenzimático (EIA). Para la determinación de *Treponema pallidum*, se emplea la prueba rápida de reagina en plasma. (RPR).

La determinación de los microorganismos mencionados, se realiza en cumplimiento a la norma que regula la utilización de sangre humana y sus componentes, con fines terapéuticos, publicada en el Diario Oficial de la Federación, por la Secretaría de Salud. (4)

En relación a la identificación de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas, la Secretaría de salud exige que se efectúen obligatoriamente, a todas las unidades de sangre para uso en transfusión, las siguientes pruebas:

- Ensayo inmunoenzimático o prueba de aglutinación pasiva, para la identificación del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.
- Ensayo inmunoenzimático para la determinación de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C.
- Ensayo inmunoenzimático o prueba de aglutinación pasiva, para la detección de anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humana.
- Aglutinación de partículas para la identificación de reagentes contra sífilis.

Otras pruebas que se deben aplicar a las unidades de sangre, dependiendo de cada caso, son:

Pruebas para donadores de sangre con antecedentes de haber padecido paludismo, que puede ser cualquiera de las siguientes:

- Búsqueda microscópica de *Plasmodium*, mediante extendidos de sangre teñidos, examen de gota gruesa o con microtubo con naranja de acridina.
- Inmunofluorescencia o ensayo inmunoenzimático.

Para los donantes que hayan padecido o que residan en zonas de riesgo para brucelosis, se practicará cualquiera de las siguientes pruebas:

- Aglutinación en placa con antígeno teñido con rosa de bengala.
- Aglutinación con 2-mercapto-etanol.

Para los donadores que residan o procedan de zonas endémicas de Tripanosomiasis americana, se aplicará cualquiera de las pruebas siguientes:

- Ensayo inmunoenzimático
- Fijación del complemento
- Hemaglutinación indirecta
- Aglutinación directa
- Inmunofluorescencia indirecta

Los métodos inmunológicos empleados, son los de las casas comerciales que ganan el concurso establecido por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE), y la Secretaría de Salud, dispone que se efectúen en sus instituciones.

La identificación de los microorganismos causantes de hepatitis, SIDA, sífilis, y de infección por citomegalovirus, en el banco de sangre, se resume a continuación.

4.1 DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS TIPO A

La determinación de anticuerpos contra el virus de la hepatitis tipo A en suero, se efectúa por medio de un Ensayo inmunoenzimático indirecto

(HAVAB EIA, 83-2449/R 7), que presenta sensibilidad elevada y un costo bajo.

FUNDAMENTO

El antígeno del virus de la hepatitis A fijado a la superficie de una esfera de plástico, se une al anticuerpo anti-VHA de la muestra problema, o al conjugado que está formado por anti-VHA y peroxidasa de rábano (anti-VHA:HRPO), si no están presentes anticuerpos anti-VHA en el suero. Luego se adiciona la solución sustrato de o-fenilendiamina conteniendo H₂O₂, y se produce una reacción colorida. La intensidad del color se cuantifica en un espectrofotómetro. La cantidad mayor de anticuerpo anti-VHA, posee el valor más bajo de absorbancia.

PROCEDIMIENTO.

- a) Se diluye cada muestra en solución amortiguadora de fosfato.
- b) El control negativo (plasma humano no reactivo para anticuerpo anti-VHA), el control positivo (plasma humano reactivo para anticuerpo anti-VHA) y los sueros problema, se colocan en los pozos de una placa de reacción.
- c) El antígeno del virus (humano) de la hepatitis A se encuentra unido a esferas de poliestireno. Se adiciona una esfera a cada pozo con muestra o con un control.
- d) El conjugado constituido por anticuerpo contra virus (humano) y peroxidasa de rábano, se adiciona a cada pozo y se incuba la placa durante tres horas a 40° C.

- e) Las esferas se lavan tres veces, con agua destilada.
- f) Se adiciona la solución sustrato de o-fenilendiamina, diluida en amortiguador de citrato-fosfato y peróxido de hidrógeno al 0.02 %. La placa se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos.
- g) La reacción de la peroxidasa se detiene con H_2SO_4 1 N. Para la lectura de los resultados se miden las absorbancias de los controles y de las muestras problema, en un espectrofotómetro para placas, a una longitud de onda de 492 nm.

EVALUACION DE LOS RESULTADOS

El punto de corte es la absorbancia media del control negativo más un factor. La presencia de anticuerpos anti-VHA se determina al comparar el valor de la absorbancia de la muestra con el punto de corte.

Los resultados se obtienen por medio de cálculos, efectuados automáticamente. Las muestras con valores de absorbancia menores que o iguales al punto de corte, son inicialmente positivas para el anticuerpo anti-VHA. Estas muestras se deben probar de nuevo, si vuelven a dar reacción, se consideran positivas.

Las muestras con valores de absorbancia mayores que el punto de corte, son negativas para el anticuerpo anti-VHA.

Este procedimiento posee gran sensibilidad. La cantidad de anticuerpo anti-VHA en una muestra, es inversamente proporcional a su absorbancia.

La especificidad de esta prueba se demuestra en la determinación de una gran elevación de anticuerpos, en las muestras de los pacientes que presentan una infección reciente con virus de la hepatitis tipo A.

4.2 DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS TIPO B

El antígeno de superficie del virus de la hepatitis tipo B (AgHBs), en suero o plasma humanos, se detecta por medio de un ensayo inmunoenzimático tipo sandwich o doble anticuerpo, (MONOLISA AgHBs, 72204).

FUNDAMENTO

La técnica utiliza tres anticuerpos monoclonales, que se unen a los diferentes subtipos del AgHBs. Un anticuerpo monoclonal recubre la fase sólida, la cual es una microplaca de poliestireno. Los otros dos anticuerpos monoclonales se encuentran unidos a la enzima peroxidasa, y forman el conjugado enzimático.

Los controles y las muestras se distribuyen en la placa, y se les adiciona el conjugado. Después de la incubación se lavan los pozos y se adiciona el sustrato, para producir la actividad de la enzima, unida a la fase sólida. La reacción se suspende con ácido sulfúrico y en seguida se lee la absorbancia en cada pozo.

PROCEDIMIENTO

- a) A la placa que está recubierta por un anticuerpo monoclonal anti-AgHBs, se le adiciona control negativo (suero humano sin anticuerpos contra el AgHBs), control positivo (suero humano con los subtipos *ad* y *ay* del AgHBs) y las muestras.
- b) Se le adiciona el conjugado (dos anticuerpos monoclonales anti-HBs y peroxidasa), a cada pozo y se incuba la microplaca 45 minutos a 40° C, con agitación.
- c) Se lava la placa con solución de lavado (amortiguador con NaCl, Tris, pH = 7.4), cinco veces.
- d) Luego se adiciona solución de o-fenilendiamina, 2HCl (diluida en amortiguador de citrato de sodio y H₂O₂), y se incuba la microplaca durante 30 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad.
- e) Se detiene la reacción con H₂SO₄ 4N.
- f) Se leen las absorbancias a 492 nm, antes de que transcurran 30 minutos.

EVALUACION DE LOS RESULTADOS

Las muestras con absorbancia menor que el punto de corte, son negativas para el AgHBs.

Las muestras con absorbancia mayor o igual al punto de corte, son inicialmente positivas para el AgHBs. Estas muestras se deben volver a probar y si dan nuevamente reacción, se consideran positivas.

Esta técnica permite la determinación cuantitativa del AgHBs, con una sensibilidad elevada y gran especificidad.

4.3 DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS TIPO C

La identificación de anticuerpos contra el virus de la hepatitis tipo C (VHC), se efectúa mediante un método inmunoenzimático indirecto cualitativo (ABBOTT HCV EIA, 82-5260/R 5).

La mayoría de los casos de hepatitis post-transfusión, son causados por un virus identificado como tipo C. El virus de la hepatitis tipo C se ha determinado en pacientes que no presentan anticuerpos contra los virus de la hepatitis tipos A y B, contra citomegalovirus o contra el virus Epstein Barr, y que tampoco tienen otras causas de hepatitis.

FUNDAMENTO

El suero se diluye y se incuba con una esfera de poliestireno, recubierta con antígeno del VHC. Si el anticuerpo anti-virus de la hepatitis C está presente en la muestra, se une al antígeno. Después se lava la esfera para eliminar los anticuerpos no unidos. El complejo esfera-antígeno-anticuerpo se incuba con una solución de conjugado enzimático, formado por anticuerpos anti-IgG humana, marcados con peroxidasa de rábano. Las inmunoglobulinas humanas unidas a la fase sólida, se detectan al unirse al conjugado.

Las esferas se lavan nuevamente para remover el conjugado no unido. Luego, se adiciona solución de o-fenilendiamina que contiene peróxido de hidrógeno, la cual después de la incubación, desarrolla un color amarillo-anaranjado, proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-VHC unidos a la fase sólida.

Los reactivos empleados son los mismos que los usados para la determinación del virus de la hepatitis A, excepto los siguientes:

1. Antígeno de VHC (rDNA) (*E. coli*, levadura).
2. Conjugado de anticuerpo anti-IgG humana (cabra) y peroxidasa de rábano.
3. El diluyente de conjugado contiene sueros bovino y de cabra, y tampón TRIS.
4. El control positivo consiste de plasma humano con anticuerpos contra el VHC.
5. El control negativo contiene plasma humano sin anticuerpos contra el virus de la hepatitis C.
6. El diluyente de muestras está formado por tampón TRIS, Tritón X-100, lisado de *E. coli*/CKS, extracto de levadura/SOD y sueros bovino y de cabra.

El procedimiento que se emplea para detectar al virus de la hepatitis C, es similar al descrito para la detección del virus de la hepatitis tipo A. Los resultados también se obtienen por medio de un espectrofotómetro.

EVALUACION DE LOS RESULTADOS

La presencia de anticuerpos contra el VHC, se determina al comparar la absorbancia de la muestra con el punto de corte.

Las muestras con valores de absorbancia menores que el punto de corte, son negativas. Las muestras con absorbancias mayores o iguales al punto de corte, son reactivas. Si al repetirse vuelven a dar reacción, son positivas para anticuerpos contra el VHC.

Esta técnica proporciona la detección cualitativa de anticuerpos contra proteínas de las regiones del genoma del VHC.

La sensibilidad de este método se demostró en la detección de muestras positivas, en personas infectadas con el VHC. La especificidad del ensayo también se comprobó en la detección de muestras negativas, en donadores de sangre.

Debido a que ciertos donadores de sangre pueden ser portadores del virus de la hepatitis tipo C y transmitirlo a receptores, esta prueba es obligatoria en el banco de sangre.

4.4 DETECCIÓN DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

La determinación del anticuerpo contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) en suero, se realiza por medio de un ensayo inmunoenzimático indirecto, (ABBOTT HIV-1 EIA RECOMBINANTE, 82-2454/R 6).

Los agentes etiológicos del SIDA son retrovirus, pertenecientes a los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que los han designado conjuntamente como HIV-1. Estos virus se transmiten por contacto sexual o por transfusión de sangre.

FUNDAMENTO

Las esferas recubiertas de antígenos HIV-1 *core* y *env* derivados del DNA recombinante, se incuban con las muestras y con los controles, junto con el diluyente de muestras. Los anticuerpos anti-HIV-1 *core* y anti-HIV-1 *env*, presentes en la muestra, se unen a los antígenos de los HIV-1. Después de lavar las esferas, se incuba el complejo antígeno-anticuerpo unido a ellas, con anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa de rábano.

Después se elimina el conjugado enzimático no unido, por medio de lavados, y se añade una solución de o-fenilendiamina. La reacción de la solución sustrato de o-fenilendiamina con la peroxidasa, produce una coloración, cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-HIV-1, presentes en la muestra.

Los reactivos requeridos para este procedimiento, diferentes a los utilizados en la detección del virus de la hepatitis tipo A, son:

1. Antígeno HIV-1 (rDNA) fijado a esferas de poliestireno.
2. Conjugado de anticuerpo anti-IgG humana (cabra) y peroxidasa de rábano.
3. Diluyentes de muestras y del conjugado constituidos por sueros bovino y de cabra.
4. Control positivo compuesto por plasma humano inactivado, reactivo para el anticuerpo anti-HIV-1.
5. Control negativo que contiene plasma humano no reactivo para el anticuerpo anti-HIV-1.

El procedimiento para la detección de anticuerpos contra las proteínas de la envoltura y del cuerpo viral del HIV-1, es semejante al efectuado para identificar al virus de la hepatitis tipo A. Los resultados también se obtienen automáticamente.

EVALUACION DE LOS RESULTADOS

Las muestras con valores de absorbancia inferiores que el punto de corte, son negativas para el anticuerpo anti-HIV-1.

Las muestras con valores de absorbancia iguales o superiores al punto de corte, y que ya fueron repetidas, se consideran positivas para el anticuerpo contra el HIV-1.

Las muestras inicialmente positivas, que después de repetir la prueba, son negativas, se deben volver a analizar.

Una de las principales aplicaciones de la determinación de anticuerpo anti-HIV-1, es la selección de donadores de sangre, para poder eliminar las unidades que contengan al anticuerpo. La presencia del anticuerpo anti-HIV-1 no determina el diagnóstico de SIDA, el cual requiere de pruebas confirmatorias.

La sensibilidad de esta técnica fue igual al 100%, en base a la determinación de anticuerpos contra el HIV-1, en pacientes con SIDA.

Este ensayo reveló una especificidad de 99.84%, en base a una prevalencia del anticuerpo contra el HIV-1, igual a cero, en donadores de sangre.

4.5 DETECCION DE *Treponema pallidum*

La detección de reaginas contra *Treponema pallidum* en suero o plasma, se realiza por medio de la prueba rápida de reagina en plasma (Licon, RPR, 0257R85).

Las pruebas para el diagnóstico de sífilis se dividen en dos:

1. Pruebas treponémicas. Estas técnicas utilizan antígenos de *Treponema pallidum* para detectar anticuerpos. Las pruebas que se usan más frecuentemente son la Inmovilización de *Treponema pallidum*, la Absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes y la Hemaglutinación indirecta.
2. Pruebas no treponémicas. Estas pruebas usan un antígeno homólogo a *Treponema pallidum*, que se extrae de lípidos de tejido cardíaco bovino (cardiolipina). La prueba más conocida es la de floculación llamada VDRL (Venereal Diseases Research Laboratory). La modificación de ésta prueba, originó la RPR (Rapid Plasma Reagin), que es una prueba más sensible y rápida.

Los anticuerpos que se producen en respuesta a la infección por *T. pallidum*, son de dos clases: 1. Anticuerpos reagínicos, biológicamente inespecíficos. 2. Anticuerpos contra *T. pallidum*, que producen aglutinación, adherencia inmune, fijación de complemento e inmovilización.

Los reactivos y el material utilizado en esta prueba, son los siguientes:

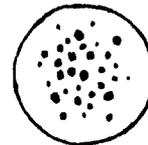
1. Antígeno de *T. pallidum* es una solución alcohólica-cardiolipina-colesterol-lecitina.
2. Tarjetas con 10 círculos de 18 mm cada una.
3. Tubos gotero de poliestireno.
4. Aguja No. 18 sin bisel.

PROCEDIMIENTO CUALITATIVO

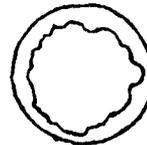
- a) Se deposita una gota de suero problema, en un círculo de la tarjeta con un tubo gotero, y se extiende sobre el área de reacción.
- b) Se añade una gota de suspensión de antígeno homogenizada, a cada muestra, utilizando el frasco gotero al que se le ha insertado la aguja.
- c) Se coloca la tarjeta sobre un rotador a 100 rpm, durante 8 minutos.
- d) Se leen los resultados visualmente, antes de que transcurra 1 minuto, después del término de la rotación.

INTERPRETACION

Prueba positiva: Aparición de acúmulos definidos.



Prueba negativa: Ausencia de acúmulos.



PROCEDIMIENTO CUANTITATIVO

Este procedimiento se efectúa con las muestras positivas, obtenidas en la prueba cualitativa.

- a) Se enumeran cuatro tubos y se les agrega 0.5 ml de solución salina al 0.9% a cada uno.
- b) Se añade 0.5 ml de suero problema al tubo número 1 (dilución 1:2) y se mezclan bien. De este mismo tubo, añadir 0.5 ml al tubo número 2 y

mezclar, y así sucesivamente, a los siguientes tubos para diluir el suero 1:4, 1:8 y 1:16.

- c) Se deposita una gota de cada dilución sobre un círculo diferente de una tarjeta. Se extiende la muestra sobre el área de reacción.
- d) Se agrega una gota de suspensión de antígeno, a cada dilución.
- e) Se coloca la tarjeta sobre un rotador a 100 rpm, durante 8 minutos.
- f) Se lee la prueba visualmente, antes de que transcurra un minuto.

INTERPRETACION

El título del suero problema será, la dilución más alta en la cual todavía hay acúmulos.

La técnica rápida para la detección de reagina, no necesita complemento inactivado, y requiere poco tiempo y equipo. Esta prueba posee una sensibilidad elevada y es confiable.

4.6 DETECCION DE CITOMEGALOVIRUS

La detección de anticuerpos contra Citomegalovirus, se realiza por medio de un ensayo inmunoenzimático indirecto (ABBOTT CMV Total AB EIA, 83-5289/R 5).

Los citomegalovirus (CMV) causan infecciones virales congénitas y han sido asociados con infecciones transmitidas por transfusiones de sangre, y por

transplantes renales y de médula ósea. La exclusión de donadores de sangre positivos para CMV, disminuye la infección por CMV en los receptores.

FUNDAMENTO

Las muestras de suero y los controles se incuban con el antígeno de CMV, inmovilizado en esferas de poliestireno. Si está presente anticuerpo contra CMV se une al antígeno. El material no unido se desecha y las esferas se lavan. Después se adiciona un conjugado de anti-inmunoglobulina humana y peroxidasa de rábano, que reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo unido a las esferas. El conjugado enzimático no unido se elimina y las esferas se lavan.

En seguida, se añade la solución de o-fenilendiamina conteniendo peróxido de hidrógeno, a cada pozo y después de la incubación, se produce una coloración amarillo-anaranjada en proporción a la cantidad de anticuerpos contra CMV unidos a las esferas. La reacción enzimática se detiene con ácido sulfúrico.

Los resultados se obtienen midiendo la intensidad de color desarrollado, en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm.

Los reactivos requeridos para esta técnica, diferentes a los usados en la detección del virus de la hepatitis tipo A son:

1. Antígeno de CMV, fijado a esferas de poliestireno.

2. Conjugado enzimático, compuesto por anticuerpo contra Inmunoglobulina humana (cabra) y peroxidasa de rábano.
3. Control positivo, formado por suero humano con anticuerpos contra CMV.
4. Control negativo, constituido por suero humano carente de anticuerpos contra CMV.
5. Amortiguador diluyente de muestras, que contiene suero de ternera.

El procedimiento para la determinación de citomegalovirus también es similar, al descrito para la detección del virus de la hepatitis tipo A.

EVALUACION DE LOS RESULTADOS

Las muestras con valores de absorbancia iguales o superiores que el punto de corte, son positivas para anticuerpos contra CMV.

Las muestras con absorbancias menores que el punto de corte, son negativas para anticuerpos contra CMV.

Este ensayo debe ser usado sólo para rastreo de anticuerpos, contra CMV en muestras de suero, y no constituye un diagnóstico de la infección por CMV.

La detección de anticuerpos contra CMV por este método, es más sensible y más específica, que la ejecutada por el método de Hemaglutinación indirecta. Este ensayo tiene gran sensibilidad, especificidad y reproducibilidad.

Algunos métodos que también detectan anticuerpos contra CMV, son: Anticuerpo fluorescente indirecto, Fijación del complemento, Hemaglutinación indirecta e Inmunoensayo fluorescente.

5. DISCUSION

Los métodos inmunológicos requieren de un antígeno purificado o de un anticuerpo, para poder identificar un microorganismo patógeno. No requieren del aislamiento del microorganismo en un medio cultivo, por lo cual se consideran como pruebas rápidas.

Las técnicas de radioinmunoanálisis, inmunofluorescencia y ensayo inmunoenzimático, tienen un mayor grado de sensibilidad para detectar antígenos y anticuerpos de microorganismos. Se emplean frecuentemente para cuantificar anticuerpos en padecimientos patológicos.

El radioinmunoanálisis se puede automatizar para efectuar procesos a gran escala y requiere de medidas de seguridad especiales para utilizar los reactivos.

La inmunofluorescencia no es fácil de ejecutar en forma automatizada y se requiere de personal experto para leer los resultados.

El ensayo inmunoenzimático posee diversas aplicaciones en el diagnóstico de enfermedades, principalmente las infecciosas, y en especial en las enfermedades virales, para la detección de antígenos, como el antígeno de superficie de la hepatitis tipo B, y como los antígenos de los virus del SIDA.

Las pruebas de precipitación, aglutinación, fijación del complemento y neutralización, se usan en la determinación de antígenos o de anticuerpos de microorganismos, que causan enfermedades. (2)

La sensibilidad de algunos métodos inmunológicos cuantitativos, para la detección de antígenos o de anticuerpos, varía con: la avidéz, la concentración, los lotes de antisuero, la temperatura, la duración de la reacción y con otros factores. La sensibilidad de las técnicas tratadas en este trabajo, se considera en la Tabla 1.

Tabla 1. Sensibilidad de diversos métodos que cuantifican antígenos y anticuerpos.	
Métodos	Sensibilidad (por dl)
Radioinmunoanálisis (RIA)	< 1 pg
Inmunofluorescencia cuantitativa	< 1 pg
Inmunoanálisis enzimático (ELISA)	< 1 µg
Aglutinación	1 µg
Fijación de complemento	1 µg
Electroinmunodifusión doble unidimensional (contraimmunoelectroforesis)	< 0.1 mg
Electroinmunodifusión (electroforesis rocket)	< 0.5 mg
Difusión doble en agar (Ouchterlony)	< 1 mg
Difusión radial simple	< 1 a 2 mg
Inmunoelectroforesis	5 a 10 mg

Obtenida de Stites (16)

El aislamiento de ciertos virus requiere mucho tiempo, pero por medio de métodos físicos y químicos, se han detectado antígenos virales en varias horas.

Los virus Epstein-Barr, citomegalovirus, los virus de la hepatitis A, B, C, D y E, los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), rotavirus, adenovirus entéricos y papilomavirus, entre otros, son difíciles de aislar en cultivos de células.

La centrifugación, agitación, rotación, temperatura, pH, O₂, la presencia de iones y ciertas enzimas, mejoran el aislamiento, la replicación y la detección de virus, en cultivos de células. También reducen los tiempos de detección viral y mejoran la propagación viral. (7)

Existen diversos métodos para la determinación del VIH, entre los que se incluyen: Técnicas de citometría de flujo, Genelavia mixt, Vidas HIV 1+2, y Abbott Recombinant HIV-1/HIV-2 3rd. Generation EIA. La técnica Western blot es un método confirmativo para el anticuerpo contra el VIH.

Tres métodos automatizados que determinan anticuerpos anti-HIV 1 y anti-HIV 2, y que poseen una sensibilidad elevada son: Behring Opus/Opus HIV 1+2, Boehringer Mannheim ES 300/Enzymun-test Anti-HIV 1+2 y BioMerieux Vidas HIV 1+2 ELFA.

La técnica VIDAS HIV 1+2 detecta anticuerpos anti-HIV 1 y anti-HIV 2, simultáneamente, y utiliza el compuesto 4 MUP (4 metilumbelifosfato),

como sustrato de la fosfatasa alcalina, el cual produce un compuesto fluorescente (4 metilumbeliferona). Esta técnica se denomina ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). (11)

Las técnicas que se abordaron en este trabajo, se enfocaron en base a su capacidad de detección e identificación rápida, de antígenos o de anticuerpos de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas.

La detección rápida de los virus de la hepatitis tipo A, B y C, de los virus de inmunodeficiencia humana y de citomegalovirus, se efectúa por medio del ensayo inmunoenzimático (EIA), y la detección de *Treponema pallidum* se realiza mediante la prueba rápida de reagentes (RPR), en el banco de sangre del Instituto Nacional de Cancerología. Esta búsqueda se debe a que son los microorganismos más potencialmente infecciosos y los que se transmiten por transfusión sanguínea, más frecuentemente.

Las técnicas moleculares son muy específicas y rápidas, por lo cual juegan un papel importante en la detección e identificación de microorganismos patógenos.

6. CONCLUSIONES

Los métodos inmunológicos permiten identificar antígenos o anticuerpos de microorganismos patógenos, en varias horas.

Los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) poseen sensibilidad y especificidad elevadas, y sus procedimientos son sencillos y rápidos. Lo anterior, los hace convenientes para usarse como pruebas de rutina, en el banco de sangre.

Dos de las principales aplicaciones de los métodos inmunológicos son, el diagnóstico de enfermedades infecciosas y la selección de donadores de sangre.

La transfusión puede ser un vehículo de transmisión de microorganismos infecciosos, y producir enfermedades mortales como el SIDA o fatales como la hepatitis u otras. Debido a esto es de primordial importancia detectar estos microorganismos, en las unidades de sangre para evitar su transmisión, en los receptores.

Los métodos inmunológicos son muy empleados en el banco de sangre, para la detección e identificación rápida de los siguientes microorganismos: virus de la hepatitis tipos A, B y C, virus de inmunodeficiencia humana, *Treponema pallidum*, y citomegalovirus, en las muestras de los donadores de sangre.

Las técnicas inmunológicas descritas son algunas de las más frecuentemente usadas, para la detección cualitativa o cuantitativa de antígenos o de anticuerpos de microorganismos patógenos. Estas técnicas proporcionan resultados confiables y precisos en poco tiempo, ya que algunas pruebas se concluyen antes de cuatro horas, después de recibir la muestra.

El método inmunoenzimático indirecto (ELISA) puede cuantificar concentraciones muy bajas de anticuerpos contra microorganismos infecciosos y permite efectuar un gran número de pruebas en poco tiempo.

Las técnicas de biología molecular detectan rápidamente, cantidades muy bajas de microorganismos patógenos, en muestras de pacientes. Estos métodos son muy específicos.

BIBLIOGRAFIA

1. **Aguilar, Ana E., M. D. Lastra y J. S. López. 1992.** Manual de prácticas de inmunología aplicada. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
2. **Bellanti, Joseph A. 1986.** Inmunología. Nueva editorial interamericana, 3ª. edición. México, D.F.
3. **Bennett, John E., G. L. Mandell and D. Jr. R. Gordon. 1990.** Principles and practice of infectious diseases. Third edition. Churchill Livingstone. New York.
4. **Diario Oficial de la Federación. 1994.** Norma oficial mexicana para la disposición de sangre humana y sus componentes, con fines terapéuticos. Secretaría de salud.
5. **Escobar, Mario R. 1991.** Hemolytic assays: Complement fixation and Antistreptolysin O. p. 73-77. En Balows, A. W. J. Husler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg and H. J. Shadomy (ed.). Manual of clinical microbiology. Fifth edition. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
6. **Hollinger, E. Blaine y J. L. Dienstag. 1982.** Virus de la hepatitis. p. 1080-1083. En Lennette, E. H. Microbiología clínica. 3ª. edición. Editorial Médica Panamericana, S.A. Buenos Aires, Argentina.

7. **Hughes, John H. 1993.** Physical and chemical methods for enhancing rapid detection of viruses and other agents. *Clinical Microbiology Reviews* 6:150-175. American Society for Microbiology.
8. **Kelly, Richard, T. 1991.** Espiroquetas y bacterias espirales. p. 1395-1399. En Todd-Sanford-Davidsohn. *Diagnóstico y tratamientos clínicos por el laboratorio. Tomo II.* 8ª edición. Salvat Editores, S.A.
9. **Koneman, E. W., S. D. Allen y V. R. Dowell. 1992.** *Diagnóstico Microbiológico.* p. 857-877. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
10. **Larsen, Jennifer and W. D. Odell. 1986.** General principles of radioimmunoassay. p. 110-115. En Rose, N. R., H. Friedman, Third Edition. American Society for Microbiology. Washington, D. C.
11. **McAlpine, L., J. V. Parry and P. P. Mortimer. 1993.** Anti-HIV testing by automated systems. *Clinical and Diagnostic Virology* 1:225 - 232. Elsevier Science Publishers B. V.
12. **Nakamura, Robert M. and B. A. Robbins. 1986.** Analytical fluid-phase fluorescence immunoassays. p. 116-122. En Rose, N. R., H. Friedman and J. L. Fahey, (ed.). *Manual of clinical laboratory immunology.* Third edition. American Society for Microbiology. Washington, D. C.

13. **Nakamura, Robert M. y E. S. Tucker, III, 1991.** El anticuerpo como reactivo p. 1110-1120. En Todd-Sanford-Davidsolm. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. Tomo II. 8ª. edición. Salvat editores, S. A.
14. **Roitt, Ivan M., J. Brostoff y D. K. Male. 1993.** Inmunología. Capítulo 25. 3ª. edición. Ediciones Científicas y Técnicas, S. A. Barcelona, España.
15. **Starr, Stuart E. y H. M. Friedman. 1982.** Citomegalovirus humano. p. 945-953. En Lennette, E. H., Microbiología clínica, 3ª. edición. Editorial Médica Panamericana, S. A. Buenos Aires, Argentina.
16. **Stites, Daniel P. y A. I. Terr. 1993.** Inmunología básica y clínica. p. 243-292. 7ª. edición. Editorial El Manual Moderno, México, D.F.
17. **Tenover, Fred C. 1991.** Molecular methods for the clinical microbiology laboratory. p. 119-127. En Balows, A., W. J. Husler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg and H. J. Shadomy. (ed.). Manual of clinical microbiology. Fifth edition. American Society for Microbiology. Washington, D. C.

18. **Voller, A., D. E. Bidwell and A. Bartlett. 1979.** The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. Nuffield Laboratories of Comparative Medicine. The Zoological Society of London. Regent's Park, London, NW 1.