



Las pruebas serológicas en el diagnóstico de la enfermedad infecciosa

Miguel A. Guzmán Urrego, MD. Profesor Asociado. Departamento de Microbiología. Maye Bernal Rivera BC. Profesora Asistente. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

Las pruebas serológicas basadas en la reacción antígeno anticuerpo constituyen una valiosa herramienta en el diagnóstico y manejo de la enfermedad infecciosa. Su introducción como ayudas diagnósticas se inició a finales del siglo pasado y tuvo uno de sus momentos estelares hacia 1905 cuando August Von Wassermann (1), adaptó la fijación de complemento desarrollada por Jules Bordet (2,3) al diagnóstico de la sífilis (4), convirtiéndola en un procedimiento clásico que hasta hace pocos años constituía el pilar fundamental de laboratorio para el diagnóstico de esta enfermedad, fue la famosa reacción de Wassermann. De entonces a nuestros días las pruebas serológicas han recorrido un largo camino buscando la precisión del diagnóstico de la enfermedad infecciosa. Cientos de investigaciones han contribuido al desarrollo y perfeccionamiento de estos procedimientos procurando siempre conseguir que tengan una gran sensibilidad y una gran especificidad, cualidades muy difíciles de alcanzar. En los últimos años, se pretende además, que los procedimientos sean simples de realizar y que el resultado se produzca rápidamente; la medicina contemporánea parece estar llegando a esta deseada meta.

CLASES DE PRUEBAS SEROLÓGICAS

Desde el punto de vista de aquello que investigan, se dividen en dos grandes categorías, pruebas directas y pruebas indirectas.

PRUEBAS DIRECTAS

Son aquellas que basadas en el principio de la reacción antígeno anticuerpo investigan la presencia del antígeno. En el caso de la enfermedad infecciosa equivale a decir que investigan la presencia del agente etiológico o, uno de sus componentes.

PRUEBAS INDIRECTAS

Son aquellas que basadas en la reacción antígeno anticuerpo, investigan no ya, el agente en sí, sino la huella que dejó éste al pasar por su huésped en términos de una respuesta inmune puesta en evidencia por el hallazgo de anticuerpos específicos contra el agente o alguno de sus componentes y que, indirectamente permite suponer que el agente en cuestión estuvo presente en el huésped en algún momento.

Las pruebas serológicas de acuerdo con el procedimiento que utilicen para evidenciar la reacción antígeno anticuerpo se dividen también en dos grandes grupos: primarias y secundarias.

PRUEBAS SECUNDARIAS

Son aquellas en las cuales la reacción antígeno-anticuerpo da lugar a una manifestación visible lo cual permite una lectura visual macroscópica. Su realización usualmente es simple. Este tipo de pruebas incluyen la precipitación y la aglutinación.

PRUEBAS DE PRECIPITACIÓN

Las pruebas de precipitación, cuya dinámica fue estudiada por Heildelberger hacia 1.930 (5), constituyen una de las pruebas secundarias más versátiles. La característica fundamental de ésta, es que el antígeno está siempre en dilución en una solución tampón la cual generalmente es solución salina. Heildelberger (5) encontró que el fundamento visible de la reacción antígeno-anticuerpo ocurre en las reacciones de precipitación solamente cuando los dos componentes están en proporciones óptimas y que este fenómeno puede evidenciarse claramente en la llamada curva de precipitación; cuando se coloca una serie de capilares con concentraciones descendentes de anticuerpos dirigidos contra una concentración constante del antígeno homólogo en dilución, se produce, luego de un período de incubación, el fenómeno visible y se puede determinar la presencia de tres zonas claramente diferenciables: en los tubos iniciales en donde la concentración de anticuerpos predomina sobre la concentración de antígeno no se observa ningún fenómeno visible, a medida que la dilución de los anticuerpos progresa se llega a una zona en que la concentración de anticuerpo y antígeno es óptima produciéndose una precipitación franca, cuando la concentración de anticuerpos continúa disminuyendo predomina, entonces, la concentración de antígeno y en esta zona tampoco hay ningún fenómeno visible. La primera zona recibe el nombre de prozona, la segunda

en donde el fenómeno es visible se denomina zona de proporciones óptimas y la tercera zona se llama postzona. La dinámica de las reacciones de precipitación es siempre la misma. En el pasado la reacción de precipitación fue adaptada como recurso diagnóstico utilizando sistemas de tubo capilar para observar el fenómeno, ejemplo de esa aplicación fue la determinación de la proteína C reactiva. La reacción de VDRL y sus modificaciones son típicas reacciones de precipitación (4).

Una modificación al sistema de precipitación en tubo consistió en colocar entre el suero que contenía los anticuerpos y la dilución del antígeno una capa de agarosa fundida que al solidificarse forma un tapón que separa los dos reactivos los cuales difunden a través de la agarosa en forma tal que al encontrarse en proporciones óptimas forman un anillo de precipitación claramente visible en la agarosa, sin embargo, técnicamente este tipo de reacción era difícil y Oudin la modificó en el sentido de fundir la agarosa mezclándole una determinada cantidad de antisuero y colocándolo en un tubo de ensayo para dejarla solidificar y luego colocar el antígeno en dilución en la parte superior; esta modificación permitió conocer que cuando el antígeno es una mezcla de compuestos antigénicos al difundirse unidireccionalmente en la agarosa estos se difunden a mayor o menor velocidad según su peso molecular y reaccionan con su anticuerpo homólogo formándose tantos anillos de precipitación cuantas fracciones antigénicas existan lo cual puso de manifiesto que la reacción de precipitación era una valiosa herramienta de análisis inmunológico.

Un gran desarrollo de esta idea lo constituyó el sistema propuesto por Öuchterlony (6), de utilizar la agarosa fundida en caja de Petri, colocar los reactivos anticuerpo y antígeno en orificios equidistantes en forma tal que difundieran en la agarosa en una doble difusión y la zona de proporciones ópti-

mas apareciera en forma de un precipitado lineal en el espacio entre el orificio que contiene el antígeno y el orificio que contiene el antisuero, esta reacción conocida como doble inmunodifusión de Öuchterlony ganó gran aceptación como herramienta de análisis inmunoquímico y se adaptó para diagnóstico de algunas entidades clínicas, siendo particularmente útil en el diagnóstico serológico de algunas entidades micóticas sistémicas como Histoplasmosis, Coccidioidomicosis y Paracoccidioidomicosis entre otras (7); otra de las grandes aplicaciones de la reacción de precipitación en agarosa lo constituyó la elegante reacción desarrollada por Mancini, Carbonara y Heremans (8) para cuantificación de proteínas plasmáticas conocida como inmunodifusión radial, estos autores demostraron que diluyendo un anticuerpo homólogo en agarosa y colocándose en un orificio hecho en la agarosa una mezcla de antígenos en donde esté presente aquella proteína para la cual esta presente el anticuerpo homólogo, la difusión se hace en forma radial dando un franco anillo de precipitación alrededor del orificio, con la circunstancia, de que el diámetro de este anillo es directamente proporcional a la concentración de la proteína en estudio; el procedimiento ganó rápida aceptación y es en la actualidad ampliamente utilizado en todo el mundo para la cuantificación de proteínas plasmáticas tales como albúmina, IgG, IgA, IgM, C3, C5, ceruloplasmina, inhibidor de C1 esterasa y haptoglobinas, entre otras.

Un sistema de cuantificación similar pero combinando un procedimiento electroforético fue el desarrollado por Laurell (9) conocido como técnica del "Rocket" por la forma que la precipitación asume en el agar, simulando un cohete espacial. La técnica de Laurell utiliza una fina capa de agarosa fundida mezclada con un antisuero que contiene anticuerpos contra una determinada fracción del suero humano, esta capa de agarosa fundida se coloca en una lámina de vidrio y esta

se dispone en una cámara electroforética, en la parte central se hacen orificios en línea para colocar los controles de concentración conocida de la proteína en estudio y en los otros los sueros humanos en los cuales se desea cuantificar la proteína, se somete a separación electroforética en forma que la proteína por su carga eléctrica relativa migra hacia el ánodo o, hacia el cátodo y en esta migración ira reaccionando con su anticuerpo homólogo dando una precipitación en forma de cohete, al término del tiempo de corrido se mide la distancia entre el vértice del cohete y el centro del orificio correspondiente, esta distancia es directamente proporcional a la concentración de la proteína en estudio. Aunque esta técnica es sumamente exacta, es muy dispendiosa y requiere una cámara de electroforesis; por tales razones no tuvo mucha aceptación como recurso diagnóstico.

La combinación de electroforesis e inmunodifusión en agarosa permitió a Williams y Grabar desarrollar el sistema denominado inmunoelectroforesis como una herramienta muy útil para el estudio de mezclas antigénicas tal como ocurre en el suero humano. El sistema desarrollado por Williams y Grabar (10) consiste en realizar un fraccionamiento electroforético de suero humano en una capa de agarosa colocada en un portaobjeto microscópico, colocando el suero humano en un pequeño orificio hecho en la capa de agarosa y que puede contener entre 5-10 microlitros de suero humano, la placa se coloca en cámara electroforética de manera que un extremo esté en contacto con el ánodo y el otro extremo con el cátodo y se aplica una corriente continua de 150 voltios por 20 minutos, las proteínas plasmáticas se separan electroforéticamente según su carga eléctrica relativa de modo que aquella proteína electronegativa marcha al ánodo y aquellas menos electronegativas marchan al cátodo; terminando el tiempo de separación electroforética se hace una pequeña zanja frente al orifi-

cio donde se colocó la muestra en forma tal que la zanja tenga la longitud casi del porta objeto, esta zanja se llena con un antisuero antihumano, obtenido usualmente en cabra o en conejo y se deja incubar por 18 horas para que ocurra la doble difusión, por cada proteína presente en el suero se producirá un arco de precipitación muy definido, permitiendo un análisis de la mezcla antigénica; la aplicación al diagnóstico clínico de esta técnica es muy limitada reduciéndose al estudio del mieloma múltiple, y a unas pocas situaciones neurológicas en que el estudio inmunoelectroforético del LCR puede arrojar alguna luz.

Una adaptación de la inmunoelectroforesis es la llamada contra inmunoelectroforesis (CIE) o electroforesis de contracorriente; inicialmente introducida por Culford para estudios médico legales, prontamente se vio que podría convenientemente aplicarse a estudio de situaciones clínicas, particularmente a la investigación de infecciones de sistema nervioso central causadas por microorganismos capsulados cuyo polisacárido capsular hidrosoluble pueda investigarse en el LCR, constituyendo su presencia allí, prueba irrefutable de la etiología del proceso infeccioso; procesos tales como meningitis por *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* Serotipo b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* serotipos A y C, *Cryptococcus neoformans* pueden ser convenientemente diagnosticados. Básicamente el procedimiento consiste en colocar una capa de agarosa fundida en un porta objeto, hacer dos orificios que puedan contener 5-10 microlitros separados por una distancia no mayor de 5mm, colocar el porta objeto contactando un extremo al ánodo y un extremo al cátodo, colocar el LCR que se supone contiene el polisacárido en el orificio cercano al cátodo así que al migrar el polisacárido, que es electronegativo, lo traerá dirigiéndose hacia el ánodo, el suero antipolisacárido se coloca en el orificio cerca al ánodo para que los

anticuerpos que son relativamente poco electronegativos migren hacia el cátodo y reaccionen dando una línea de precipitación, la prueba se realiza en un tiempo de 10 a 20 minutos, puede hacerse en sangre, orina o suero. Esta técnica es altamente específica pero poco sensible, de suerte que si la prueba es positiva tiene un valor diagnóstico incuestionable, pero si es negativa no excluye el diagnóstico, debiéndose utilizar otro procedimiento; las técnicas de precipitación pueden ser leídas muy rápido y con un alto grado de precisión por procedimientos de turbidimetría utilizando un nefelómetro, existen casas comerciales que producen reactivos de óptima calidad para la cuantificación de proteínas plasmáticas, apolipoproteínas, polisacáridos, etc.; pero el costo de tales reactivos y la necesidad de un Nefelómetro son limitantes frente a los otros procedimientos descritos.

PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN

La reacción de aglutinación fue desarrollada hacia finales del siglo pasado por Durham en esta reacción el antígeno siempre esta en suspensión (11), pues se trata de partículas; para que la reacción de aglutinación ocurra se requiere los siguientes componentes:

- 1- Antígeno en suspensión
- 2- Sistema buffer
- 3- Dilución de anticuerpos

La reacción puede utilizarse como prueba directa o indirecta El mecanismo de esta reacción es simple: si en un sistema buffer, usualmente solución salina buffer, se coloca una apropiada dilución de un suero que contenga anticuerpos específicos contra determinados grupos antigénicos del antígeno en suspensión, las moléculas de anticuerpos reaccionan con los grupos antigénicos de las partículas del antígeno y actúan como puente produciendo grumos fácilmente visibles. Las técnicas directas de aglutinación son ampliamente utilizadas en Bacteriología para la identificación serológica de los

microorganismos género y especie. utilizan sueros monoespecíficos producidos comercialmente. Las pruebas de hemoclasificación son típicas pruebas de aglutinación directa.

Las técnicas indirectas de aglutinación fueron introducidas como herramientas diagnósticas para investigar la presencia de anticuerpos dirigidos contra un determinado agente, el hallazgo de tales anticuerpos, visualizado por una reacción de aglutinación, frente a una suspensión pura del microorganismo sospechoso de ser el agente causal del cuadro clínico en estudio, confirma indirectamente que ese microorganismo estuvo presente en el huésped y estimuló una respuesta inmune en términos de anticuerpos circulantes; las técnicas indirectas de aglutinación han sido ampliamente utilizadas como recurso diagnóstico en entidades como las fiebres entéricas: fiebre tifoidea y fiebre paratifoidea, tifus y brucelosis ; grupo de reacciones de aglutinación que se conocen como prueba de los "Antígenos Febriles" (12-13) ; este tipo de reacciones, adecuadamente estandarizadas, con controles apropiados son de utilidad clínica, permiten hacer una cuantificación con base en la aglutinación presente en un suero diluido progresivamente, el inverso de la dilución que presente franca aglutinación se llama "Titulo de aglutinación"; para cada antígeno investigado hay un título de referencia por encima del cual un resultado empieza a tener significación clínica; como todas las pruebas de laboratorio estas aglutinaciones tienen su utilidad y sus limitaciones las cuales deben ser conocidas por quien las usan como recurso diagnóstico.

MODALIDADES DE AGLUTINACIÓN

Las técnicas de aglutinación son muy versátiles y se han podido modificar para permitir la investigación de anticuerpos contra grupos antigénicos que pueden ser solubles y por tanto no darían una manifestación visible de aglutinación ;

sin embargo, muchas de estas sustancias son componentes de los microorganismos que pueden adherirse por manipulación química sobre partículas inertes, el reactivo así obtenido se suspende en un sistema buffer el cual se puede hacer reaccionar con un suero que contenga anticuerpos contra los grupos adheridos a la partícula inerte sirviendo de puente entre las partículas y presentando el fenómeno visible de la aglutinación. Dos tipos de partículas han sido ampliamente utilizadas, los glóbulos rojos humanos o de algunas especies animales y partículas de látex de un diámetro muy regular 0.85 micras, a estas partículas se les puede adherir proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y hormonas, produciendo variados tipos de antígeno con fines diagnóstico, como la partícula cumple un papel de portador pasivo de los grupos antigénicos el tipo de aglutinación, se llama aglutinación pasiva, si la partícula usada es un glóbulo rojo la reacción recibe el nombre de hemoaglutinación pasiva, si la partícula es látex la reacción recibe el nombre de aglutinación de látex. Por la facilidad de su realización y la interpretación éstas pruebas juegan un destacado papel como recurso diagnóstico, no solo de enfermedades infecciosas, sino en otras condiciones; ejemplo de estas técnicas son la investigación de factor reumatoideo, la cuantificación de anticuerpos antitiroglobulina, antimicrosomales, entre otros. Las pruebas de aglutinación han sido modificadas para la investigación directa de antígenos bacterianos, micóticos, parasitarios y aún virales, cuyo hallazgo en un paciente tiene el mismo valor del aislamiento del agente etiológico, en este caso, la partícula inerte glóbulo rojo o partícula de látex se recubre con un anticuerpo monoespecífico que se adhiere por su fracción Fc sobre la superficie de la partícula dejando libres los grupos de combinación específica del anticuerpo en forma tal, que el antígeno investigado sirve de puente y el fenómeno visible es una aglutinación, este tipo de aglutinación recibe el nombre de aglutinación pasiva reversa.

Pruebas tales Como investigación de antígenos de hepatitis B, proteína C reactiva, polisacáridos bacterianos y micóticos en LCR, pruebas de embarazo, investigación de *Streptococcus pyogenes*, tipificación de grupos del género *Streptococcus* utilizan este tipo de reacciones. Son herramientas sencillas, rápidas, y en su mayoría de una alta especificidad.

COAGLUTINACIÓN

La coaglutinación es una modalidad de la aglutinación pasiva reserva en la cual la partícula indicadora utilizada es una cepa de *Staphylococcus aureus*, particularmente la cepa Cowan (14). Esta cepa tiene dentro de los componentes de su pared bacteriana una proteína denominada proteína A, la cual tiene la propiedad biológica de unirse químicamente a la fracción Fc de la molécula de IgG humana y de conejo de forma que el *Staphylococcus* queda convertido en una partícula recubierta de moléculas específicas de anticuerpos contra aquellos antígenos bacterianos, parasitarios o micóticos que se desean investigar. El reactivo así obtenido es un reactivo de gran especificidad, muy estable y muy económico, que puede ser utilizado comercialmente para diagnóstico.

PRUEBAS PRIMARIAS

Son aquellas en las cuales la reacción antígeno anticuerpo no da lugar a ninguna manifestación visible, requiriéndose, para evidenciar que la reacción ha ocurrido, procedimientos técnicos complejos y en ocasiones equipos sofisticados y costosos. Las pruebas primarias pueden ser directas o indirectas y de gran sensibilidad y especificidad, que las acercan al ideal de una prueba diagnóstica. Dentro de esta categoría tenemos:

- 1- Fijación de complemento
- 2- Inmunofluorescencia
- 3- Radioinmunoensayo
- 4- Pruebas Inmunoenzimáticas
- 5- Inmunolectrotransferencia
- 6- Inmuncromatografía

FIJACIÓN DE COMPLEMENTO

Esta técnica fue desarrollada por Bordet (2) a principios de siglo y tiene como fundamento la utilización de una cantidad precisa de complemento sérico, usualmente obtenido del curí, el cual se utiliza de manera total en presencia de la reacción de un antígeno con su anticuerpo homólogo. Bordet decidió introducir en la reacción una segunda fase utilizando un sistema indicador que permitiera determinar que el complemento había sido utilizado en la primera fase de la reacción indicando que evidentemente en la primera fase un anticuerpo había reaccionado con el antígeno, la segunda fase o sistema indicador que Bordet utilizó fue una suspensión de glóbulos rojos de carnero sensibilizados con un anticuerpo anti - glóbulo rojo de carnero los cuales con el complemento producen la hemólisis del glóbulo rojo dando un fenómeno claramente visible, en esta forma, si en la primera fase de la reacción el complemento presente se utiliza, en la segunda fase no hay complemento y el fenómeno hemolítico no ocurre; a su turno, si en la primera fase el complemento no se utiliza porque no hay reacción antígeno anticuerpo el complemento queda libre y se utiliza en la segunda fase dando un fenómeno visible de hemólisis. Esta reacción por su exquisita sensibilidad y especificidad fue rápidamente incorporada como recurso diagnóstico por August Von Wassermann (1), para el diagnóstico de la sífilis. De entonces a nuestros días la técnica ha sido perfectamente valorada y estandarizada como prueba cuantitativa en el diagnóstico de la infección viral, parasitaria, bacteriana y micótica. Es una técnica dispendiosa, requiere una perfecta evaluación de los reactivos utilizados y este hecho hace que quede confinada a los laboratorios de referencia para estudios muy específicos. A nivel de enfermedades infecciosas es muy útil en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas (Reacción de Guerrero Machado), en el diagnóstico de micosis sistémicas, como la histoplasmosis,

coccidioidomycosis y paracoccidioidomycosis, entidades en las cuales permite hacer un diagnóstico, controlar el tratamiento y establecer un pronóstico.

INMUNOFLUORESCENCIA

El desarrollo de la técnica de inmunofluorescencia se debe a Albert Coons de la Universidad de Harvard (15). La posibilidad de marcar un anticuerpo con una sustancia química para poder seguir el curso de este anticuerpo y así poder también poner de manifiesto un antígeno fue un deseo largamente acariciado por los investigadores; varios intentos se hicieron con distintos compuestos y colorantes; en 1940 Coons utilizó un compuesto fluorescente, la fluoresceína, compuesto que podía conjugarse químicamente con los grupos NH₂ de las moléculas de anticuerpo sin afectar la especificidad del anticuerpo; este compuesto podía ser excitado por la luz ultravioleta presentando el fenómeno de la fluorescencia, es decir que al ser excitado por la luz ultravioleta, estas radiaciones de onda muy corta activan los electrones del compuesto fluorescente, emitiendo una radiación de onda más larga dentro del espectro visible, en esta forma un anticuerpo marcado al fijarse específicamente al antígeno, por ejemplo una bacteria, se verá fluorescente. Desde su inicio se vislumbró la gran posibilidad de este procedimiento como herramienta en investigación y en diagnóstico, posteriormente, se encontró que un isómero de la fluoresceína, el Isotiocianato (16), era superior como marcador fluorescente, desde entonces este fluorocromo se viene utilizando para marcar los anticuerpos.

Las técnicas de inmunofluorescencia pueden aplicarse como técnicas directas para investigar la presencia de antígenos virales, parasitarios, bacterianos o micóticos en muestras clínicas; tiene una amplia aplicación clínica en diagnóstico de Rabia, infección por Cytomegalovirus, Herpes simplex 1 y 2, Epstein Bar y virus Sincicial Respiratorio, entre

otros. Las técnicas de inmunofluorescencia también se utilizan en su modalidad indirecta, es decir, para investigar la presencia de anticuerpos contra determinado antígeno, esta técnica, de gran versatilidad y aplicación al diagnóstico presupone contar con un anticuerpo marcado con fluoresceína, anticuerpo dirigido contra la inmunoglobulina humana, este anticuerpo marcado recibe el nombre de conjugado y puede unirse a la inmunoglobulina humana independientemente de la especificidad de esta. Las técnicas de inmunofluorescencia indirecta requieren que para su ejecución se cuente con el sustrato, cuyos anticuerpos específicos se desean investigar en un suero problema; esta técnica tiene una gran aplicación en diagnóstico, las técnicas más usadas son la investigación de anticuerpos antinucleares, anticuerpos anti-Toxoplasma, anticuerpos anti-Treponema pallidum, anticuerpos anti-VIH; estas técnicas correctamente estandarizadas constituyen valiosas herramientas de diagnóstico. Infortunadamente los reactivos son costosos y se requiere un microscopio de fluorescencia que es un equipo muy costoso por la combinación de filtros necesarios y por la fuente de luz que es una lámpara de vapores de mercurio (17). A pesar de estas limitaciones las pruebas de inmunofluorescencia tienen un lugar importante como prueba diagnóstica.

RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

Un avance muy grande en las pruebas primarias lo constituyó el desarrollo del Radioinmunoensayo hecho hacia 1958 por Yalow y Berson (19), desarrollo por el cual se le otorgó el premio Nobel de Medicina; básicamente este procedimiento basado en la exquisita especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo introdujo para rastrear la reacción una sustancia radioactiva que pudiera convenientemente combinarse químicamente con la molécula de anticuerpo en forma tal que este pudiera ser fácilmente rastreado por la radiación emitida por el marcador radioactivo utilizado. La sus-

tancia radiactiva que mostró mayor facilidad para marcar los anticuerpos fue un isótopo de Iodo, inicialmente, Iodo 131 y posteriormente Iodo 125. La técnica fue introducida básicamente como una técnica directa para la cuantificación particularmente de hormonas ya que su especificidad y sensibilidad permitía cuantificar éstos compuestos en concentraciones tan bajas del orden de los picogramos; la endocrinología ganó con este desarrollo una poderosa arma de diagnóstico. Posteriormente se desarrollaron técnicas de radioinmunoensayo para investigación de marcadores tumorales tales como alfafetoproteína, antígeno carcinoembrionario, antígeno prostático específico. La aplicación del Radioinmunoensayo en el diagnóstico de la enfermedad infecciosa fue realmente muy pobre, limitándose a la investigación de anticuerpos contra el virus de la Hepatitis y VIH entre otros.

La necesidad de utilizar isótopos radioactivos constituyó siempre una gran limitante toda vez que se trataba de reactivos muy costosos con una vida media muy corta y además la lectura requería necesariamente un contador de radiaciones gamma. El advenimiento de las técnicas Inmunoenzimáticas fue gradualmente limitando su radio de acción, quedando en la actualidad reducido al campo de la investigación y apenas sí, algunas pruebas de diagnóstico.

PRUEBAS INMUNOENZIMÁTICAS

Las pruebas inmunoenzimáticas fueron desarrolladas hacia 1975 por Engvall y Perlmann (19), quienes decidieron marcar los anticuerpos con una enzima, de forma tal, que al usar el sustrato específico de la enzima se pudiera determinar la presencia del anticuerpo; varios tipos de enzimas fueron utilizados siendo las más usadas, ureasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa. La prueba inicialmente conocida por la sigla ELISA por Enzyme Linked Immunosorbent Assay y ahora simplemente como EIA (Enzyme

Immune Assay), mostró la posibilidad de ser utilizada como técnica directa para investigar la presencia de antígenos particulares o como prueba indirecta para investigar anticuerpos específicos. Muy precozmente se vio que ésta era una técnica ideal por la posibilidad de utilizar reactivos de gran estabilidad y vida útil larga, además de estandarizar los sistemas en microprocedimientos de fácil lectura visual o fotocolorimétrica, con equipos sencillos. En la historia del desarrollo de las pruebas serológicas ninguna ha producido tan gran impacto como estas pruebas inmunoenzimáticas, ellas introdujeron una revolución en los recursos diagnósticos tanto de la enfermedad infecciosa como de las enfermedades autoinmunes, endocrinas y en la investigación de marcadores tumorales. Fueron rápidamente estandarizadas como procedimientos directos cualitativos y cuantitativos y como procedimientos indirectos cualitativos y cuantitativos.

En el campo de las enfermedades infecciosas uno de los grandes impactos ha sido el diagnóstico de la enfermedad viral; hasta su aparición, eran bien limitados los recursos que el clínico tenía para comprobar el diagnóstico, a partir del desarrollo de las técnicas inmunoenzimáticas el panorama cambió radicalmente permitiendo la investigación directa de agentes etiológicos tales como, rotavirus, adenovirus, virus sincicial respiratorio, componentes antigénicos de virus de hepatitis B. Las técnicas indirectas abrieron toda una serie de posibilidades para diagnóstico de infecciones tales como sarampión, rubeola, varicelazoster infección por Epstein Bar, cutomegalovirus, herpes 1 y 2 y VIH 1 y 2; el hecho de poder investigar la respuesta inmune en términos de IgG e IgM convirtió esta técnica en una poderosa herramienta para definir la situación de infección aguda o infección pasada, definición de la mayor trascendencia en situaciones como rubeola y embarazo y toxoplasmosis y embarazo. En el campo de la enfermedad parasitaria las pruebas inmunoenzimáticas

han tenido también un gran impacto en el diagnóstico de entidades tales como toxoplasmosis, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, amebiasis, giardiasis, neurocisticercosis, *toxocara canis*.

Como prueba de tan amplia aplicación clínica y tan universalmente empleadas cientos de casas comerciales se han lanzado a la producción de los reactivos en estuches que contienen todo lo necesario para realizar las pruebas con un estricto control de calidad interno asegurando un grado de confiabilidad alto. Las técnicas inmunoenzimáticas han sido adaptadas en múltiples procedimientos tales como técnicas de captura, técnicas competitivas y técnicas indirectas; cada casa comercial tiene sus protocolos que deben seguirse en forma rigurosa.

En el campo de las enfermedades infecciosas los procedimientos más comunes son la técnica de captura para la investigación de antígeno y la técnica indirecta para investigación de anticuerpos.

Técnicas de Captura: Son utilizadas para la investigación de un agente etiológico por ejemplo, si se desea saber si un paciente tiene circulante el AgsHB (antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B) el sistema trae entonces, una placa de poliestireno con una serie de pozos, cada pozo es en realidad un pequeño tubo de ensayo, en cada pozo se ha colocado un anticuerpo monoclonal específico contra el AgsHB, este anticuerpo se adhiere muy intensamente por su fracción Fc al poliestireno dejando libre los grupos de combinación del anticuerpo, el suero del paciente que presuntamente contiene el AgsHB se coloca, adecuadamente diluido en el pozo, y se incuba por un tiempo determinado, para permitir que el anticuerpo "capture" el AgsHB, si realmente está presente; luego de lavar intensamente todos los componentes séricos son removidos, se coloca entonces un segundo anticuerpo producido en otra especie animal el cual viene marcado con la en-

zima, es el llamado conjugado, este anticuerpo es específico contra AgsHB, por tanto se unirá a las partículas capturadas en la primera reacción, luego de un período de incubación apropiado se lavan los pozos para remover todo aquello que no haya reaccionado; en el pozo no permanecerá más que el primer anticuerpo, el AgsHB capturado y el conjugado adherido al AgsHB; para poder saber que ello es así, es la enzima que está marcando el conjugado quien revelará ese hecho, para ello, será necesario colocar el substrato correspondiente, si suponemos que la enzima marcadora es peroxidasa el substrato es agua oxigenada, la cual al ser interactuada por la peroxidasa producirá una reacción sobre un compuesto que se adiciona a la reacción dando un color cuya intensidad se mide en un fotocolorímetro para obtener una lectura de la densidad óptica. Las lecturas de los controles positivos y negativos y los sueros problemas permitirán establecer un índice de lectura para establecer la positividad o negatividad de la reacción.

Técnicas indirectas: Estas investigan la presencia de anticuerpos IgG, IgM o Ig A para un determinado antígeno sea este un virus, parásito, bacteria u hongo; para ello, los sistemas traen las placas de poliestireno sensibilizadas con los antígenos respectivos. Por ejemplo, si deseamos investigar anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), para establecer un diagnóstico de infección por VIH, el sistema comercial trae la placa de poliestireno en cada uno de cuyos pozos tiene adheridos los componentes antigénicos del VIH; en los pozos respectivos se colocan los controles y los sueros en estudio y después de la incubación apropiada, se lavan intensamente. Si el suero en estudio contiene anticuerpos anti-VIH estos se fijan específica e intensamente sobre el antígeno, luego se coloca el conjugado que es un anticuerpo antigama globulina humana obtenido usualmente en cabra y además marcado con una enzima, este anticuerpo se une

específicamente con la Inmunoglobulina humana fija a su vez sobre el antígeno, luego de los lavados, se agrega el sustrato y se revela el color por la reacción de la enzima sobre el sustrato. La reacción se lee fotocolorimétricamente para determinar la densidad óptica y establecer los índices que determinarán la positividad o negatividad de la reacción.

Las distintas casas comerciales han desarrollado sistemas muy variados desde equipos de lectura manuales, semi automatizados y automatizados simples, hasta equipos de la más alta sofisticación. En materia de procedimientos inmunoenzimáticos se podría decir que hay para todos los gustos (20). Estas pruebas también han sido adaptadas en sistemas rápidos para investigación de *Streptococcus pyogenes*, Ags IHB, Anticuerpos anti-VIH y pruebas de embarazo, entre otras.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

En 1980 Southern (21), desarrolló un procedimiento para estudio de DNA, para lo cual después de someter a hidrólisis selectiva el DNA procedía a someter la muestra a una electroforesis en gel de poliacrilamida para separar la fracción de acuerdo a su peso molecular; como los geles de acrilamida son muy frágiles y difíciles de manipular considero posible transferir a un papel de nitrocelulosa todas aquellas bandas separadas en el gel de poliacrilamida y hacerlo mediante una electroforesis en la cual el gel colocado cerca al cátodo y el papel de nitrocelulosa cerca al ánodo al recibir la corriente continua permitía que cada banda que está presente en el gel fuera transferida al papel, ocupando la misma posición, a la manera de lo que en fotografía un negativo se transfiere a un positivo; en esta forma el papel de nitrocelulosa podía cortarse en pequeñas tiras, cada una de las cuales contenía exactamente el mismo patrón de distribución de bandas del gel original. Este procedimiento fue considerado como

una poderosa herramienta de análisis con una gran potencialidad en su ampliación al diagnóstico en el campo de infectología. La primera aplicación masiva de esta técnica se introdujo para demostrar anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana VIH, siguiendo exactamente el desarrollo de Southern, el virus era sometido a una digestión enzimática, sus componentes separados electroforéticamente en un gel de poliacrilamida, transferidos a un papel de nitrocelulosa y cortado en pequeñas tiras, cada tira al ponerse a reaccionar con el suero de personas supuestamente infectadas con el VIH cuyo suero contiene anticuerpos específicos contra cada una de los componentes del virus, reacciona específicamente, al lavarse las tiras, todos aquellos componentes séricos que no hayan reaccionado se lavan, quedando solo los anticuerpos específicos; para saber que ellos están allí fijados se utiliza un anticuerpo antigamaglobulina humana marcada por una enzima, usualmente peroxidasa, luego de la reacción se coloca el sustrato respectivo desarrollándose una banda nítida de color por cada fracción del virus, para la cual el suero en estudio tenga anticuerpos. Usualmente los componentes visualizados son Glucoproteína 160-120-41 y proteína 66-55-31-24-17.

El CDC (Centro para el Control de enfermedades de USA) considera como criterio para confirmar un diagnóstico de infección por VIH la presencia de las bandas 160/120 o 41/24 Esta técnica por su alta especificidad y sensibilidad se convirtió en la prueba de referencia confirmatoria de diagnóstico de infección por VIH y recibió el nombre de "Westernblot" por similitud a la técnica de Southern, conocido como "Southernblot" y no porque tuviera algo que ver con los puntos cardinales (22). También hay técnicas "Easternblot" y "Northernblot" En síntesis el Westernblot es una prueba inmuno-enzimática sobre papel y de tipo indirecto. Técnicas similares se han desarrollado para el diagnóstico indirecto de otras infecciones virales, tales como las paraparesia espástica tropical causa-

da por virus HTLV-1, bacterianas, como fiebre tifoidea, parasitarias como neurocisticercosis y micóticas como la paracoccidioidomicosis. Una de sus limitaciones es el alto costo de los reactivos comerciales.

INMUNOCROMATOGRAFÍA

En los últimos años se han desarrollado una serie de pruebas serológicas rápidas que combinan el principio de la separación cromatográfica con la reacción específica antígeno-anticuerpo, permitiendo visualizar la reacción mediante la utilización de un marcador de oro coloidal (23).

Estas reacciones se han estandarizado como pruebas directas o indirectas y en algunas ocasiones como pruebas semicuantitativas. Las reacciones inmunocromatográficas han sido comercializadas en sistemas miniaturizados para ser utilizadas inclusive a nivel de consultorio médico, la lectura es visual macroscópica constituyendo ayudas diagnósticas simples.

La prueba ha sido ensamblada en una placa plástica del tamaño de un portaobjeto, en su interior la placa tiene hacia un extremo una pequeña almohadilla y hacia el otro extremo una pequeña tira de papel de celulosa que hace contacto directo con la almohadilla; al mirar la placa por su cara superior se observa tres ventanas; la primera se abre directamente sobre la almohadilla absorbente y es el sitio en donde se coloca la muestra clínica, la segunda se abre sobre una zona de la membrana cromatográfica y es el sitio donde se lee el resultado positivo o negativo de la prueba y la tercera se abre sobre una zona de la membrana cromatográfica en donde se lee el control interno de la reacción. Debido al hecho que los reactivos colocados en la zona de lectura de la prueba y en la zona de lectura del control interno han sido colocados en forma lineal, la reacción se evidencia en una y otra ventana como una banda intensamente rosada.

Estas técnicas se han estandarizado para investigación de la hormona gonado-

tropina coriónica humana como prueba de embarazo con una sensibilidad de 20 mUI/ml, para investigación de antígeno prostático específico con una sensibilidad de 5 ng/ml, para la investigación de AgsHB (Antígeno de superficie del Virus de Hepatitis B), para la investigación de la hormona Luteinizante LH como prueba de ovulación, como prueba para identificación de *Streptococcus pyogenes* en muestras clínicas o en cultivos y como pruebas para drogas de abuso como cocaína, morfina, heroína, marihuana y anfetamina.

Hay varios tipos de pruebas inmunocromatográficas entre las cuales tenemos:

- 1- Prueba de Captura
- 2- Prueba de Bloqueo
- 3- Prueba indirecta

Prueba de Captura: En pruebas de tipo directo la disposición de los reactivos es la siguiente: en la almohadilla viene absorbido un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno que se desea investigar este anticuerpo además viene marcando con oro coloidal (23); en la zona de la prueba, sobre la membrana cromatográfica, ésta colocado en forma lineal un anticuerpo policlonal contra el antígeno que se desea investigar y en la zona del control interno, sobre la membrana cromatográfica, esta colocado en forma lineal un anticuerpo obtenido en conejo dirigido contra el anticuerpo monoclonal.

Si suponemos que se desea investigar en un paciente el AgsHB, se toma la sangre del paciente, se obtiene el suero, con dispensador se colocan 4 a 5 gotas del suero y 4 a 5 gotas de un diluyente (Buffer) provisto dentro del estuche de reactivo; estos sueros y diluyente, se colocan en la ventana de la muestra, rápidamente ellos son absorbidos y allí encuentran el anticuerpo monoclonal anti-AgsHB, marcado con oro coloidal, si realmente hay AgsHB este se une a los grupos de combinación específico del anticuerpo monoclonal y continúan migrando hacia la membrana cromatográfica en la zona

de prueba encuentran fijados un anticuerpo policlonal contra AgsHB, el cual captura el AgsHB que tiene pegado al conjugado (anticuerpo monoclonal, marcado con oro coloidal) dando una línea aparente rosada, el conjugado que no reacciona continúa migrando hacia la zona del control interno, en donde encuentra un anticuerpo, policlonal dirigido contra el anticuerpo monoclonal marcado dando una banda rosada indicando que el sistema funcionó bien, la reacción en este ejemplo es positiva: tendremos banda en la zona de la prueba y banda en la zona de control. En caso de que la prueba sea negativa, el conjugado migra sin ser capturado en la banda de prueba y será atrapado en la banda de control, esta debe aparecer siempre, en caso de no aparecer indica que el sistema no funcionó porque el reactivo esta alterado y deberá hacerse una nueva prueba.

Prueba de Bloqueo: Es la más utilizada para la investigación de drogas de abuso. En esta prueba, en la almohadilla se encuentra un anticuerpo monoclonal dirigido contra la droga que se investiga y que tiene ya copados los sitios de combinación con dicha droga; además, está marcado con oro coloidal; al colocarse la muestra clínica en la ventana para la muestra si la droga está presente pasa muy rápidamente a la membrana cromatográfica y llega a la zona de la prueba en donde la membrana cromatográfica tiene fijos una banda de anticuerpos monoclonales contra la droga en cuestión, copando todos los grupos específicos de combinación, el conjugado que es una molécula más pesada migra más lentamente, llega a la zona de la prueba y encuentra que todos los grupos de combinación específica del anticuerpo allí fijado están copados por la droga capturada de la muestra clínica y pasa derecho continuando hacia la zona de control en donde la membrana cromatográfica tiene una banda de anticuerpos policlonales antigamaglobulina monoclonal conjugada reaccionando con ella dando una banda intensamente rosada indicando que el siste-

ma funcionó bien. La prueba se llama de bloqueo porque la droga presente en la muestra clínica bloquea la reacción con la droga ligada al conjugado. La reacción positiva no dará, entonces, ninguna banda en la zona de la prueba, sólo dará una banda en la ventana de control. En el caso contrario, cuando en la muestra no hay la droga que se investiga, el conjugado es atrapado por los anticuerpos libres en la zona de la prueba dando una banda rosada de reacción las moléculas no captadas continúan migrando siendo captadas en la zona de control dando una banda nítida de reacción, en este caso la presencia de banda en la ventana de la prueba y la presencia de banda en la ventana de control indican que la prueba es negativa.

Prueba indirecta: Las pruebas inmunocromatográficas han sido también adaptadas para la investigación de anticuerpos específicos contra determinados antígenos microbianos y así poder establecer un diagnóstico indirecto, pruebas para VIH, *Trypanosoma cruzi*, Dengue y *Brucella*, han sido ya estandarizadas y comercializadas. En este tipo de pruebas indirectas se tiene en la almohadilla un suero monoclonal específico contra la IgG humana además conjugado con oro coloidal; en la zona de la prueba están fijos sobre la membrana cromatográfica grupos antigénicos del microorganismo cuyos anticuerpos específicos se desean investigar, en la zona de control se encuentra una banda de un anticuerpo policlonal dirigido contra el anticuerpo monoclonal conjugado. Pongamos por ejemplo que deseamos investigar si el suero de un paciente tiene anticuerpos contra el VIH, entonces, se toma la muestra de sangre, se obtiene el suero, 4 a 5 gotas de este se colocan en la ventana de la muestra y luego se coloca una cantidad similar de buffer; en la almohadilla el anticuerpo monoclonal conjugado antigamaglobulina humana captura una apreciable cantidad de moléculas de la IgG contenida en el suero, este gran complejo migra a la membrana cromatográfica y llegará a la zona

donde se encuentra el antígeno y allí los anticuerpos específicos dirigidos contra el VIH, si los hay, y que vienen captadas en el conjugado reaccionarán dando una banda de reacción intensamente coloreada, el exceso de conjugado continúa migrando hacia la zona de control en donde el suero policlonal anticonjugado está fijo, reaccionando con el conjugado para dar una banda intensamente coloreada indicando que la prueba funcionó bien y el reactivo esta bien.

En consecuencia si la prueba es positiva tendremos 2 bandas, una en la ventana de la prueba y otra en la ventana del control, si la prueba es negativa tendremos una banda única en la ventana de control, si la prueba es inválida la banda en la ventana de control no aparece.

CALIDAD DE LOS SUEROS

Los sueros que deban ser sometidos a estudios serológicos deben ser obtenidos a partir de una muestra de sangre tomada con todas las normas de asepsia y antisepsia en pacientes preferiblemente en ayunas. Únicamente los sueros lípidos, transparentes y no hemolizados, deben ser utilizados para la realización de las pruebas serológicas. Para conservar los sueros lo ideal es repartir las muestras en alícuotas de 0.5 ml, identificar correctamente y congelar a 20°C, dejando una alícuota a 4°C para realizar las pruebas. Nunca se debe congelar y descongelar y volver a congelar porque ese procedimiento altera la reactividad de los sueros.

CONCLUSIÓN

Las pruebas serológicas han tenido un gran desarrollo en las últimas décadas, constituyen poderosas herramientas de diagnóstico; en el campo de la infectología son insustituibles. Se debe, sin embargo, tener en cuenta que como todo procedimiento de laboratorio tienen una utilidad y una limitación, pueden dar resultados falsos positivos o negativos y por tanto los resultados deben ser valorados dentro del contexto de una correlación clínica.

Como la mayoría de los procedimientos serológicos están disponibles comercialmente, los protocolos de la realización de las pruebas deben ceñirse estrictamente a lo indicado por el productor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Denté CC.** A history of Syphilis. Springfield, Ill Charles Thomas 1962.
2. **Bordet J.** Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le serum d'animaux injectés de sang defibriné. *Ann Inst Pasteur* 1898, 12:688-695.
3. **Bordet J, Gengou D.** Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérum antimicrobiens *Ann Inst Pasteur.* 1901; 15:289-302.
4. **Guzmán MA.** Sífilis. Diagnóstico y Manejo Serológico. Instituto Nacional de Salud. Bogotá 1991 4° Ed.
5. **Heidelberger M, Kendall FF.** A Quantitative study of the precipitation reaction between type III pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody. *J Exp Med* 1919; 50:809-823
6. **Ouchterlony O.** In vitro methods for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria. *Act Path Microbiol Scand* 1948; 25:186-191
7. **Palmer DF, Kauffman L, Kaplan W, et al .** Serodiagnosis of Mycotic Diseases. Charles Thomas. Springfield Ill 1977.
8. **Mancini G, Carbonara AD, Heremans JF.** Immunochemical quantitation of antigen by single radial immunodiffusion. *Immunochem* 1965; 2:235-237
9. **Laurell CB.** Electroimmunoassay *Scand J Clin Lab Invest* 1972; 29:(Suppl 124) 21-37
10. **Grabar P, Williams CA, Courcon J.** Méthode Immunoelectrophoretique d'analyse de melanges de substances antigeniques. *Biochem Biophys Acta* 1955; 17: 67-74
11. **Durham HE.** On a special action of sérum of highly immunized animals, and its use for diagnostic and other purposes. *Proc Roy Soc London* 1896; 59:224-226
12. **Widal F.** Serodiagnostico de la fiebre tyfoide *Bull Med Hop Paris* 1896; 13:561-566
13. **Lazowski ES, Matulewicz S.** Serendipitous discovery of artificial positive Weil-Felix reaction use in "Private Immunological War" *ASM News* 1977; 43:300-302
14. **Forsgren A, Sjoquist J.** "Protein A" from *S. aureus.* *J. Immunol* 1966; 67:822-827.
15. **Coons AH, Creech HJ, Jones RN.** Immunological properties of an antibody containing fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941; 47:200-202
16. **Riggs JL, Seiwald RJ, et al.** Isothiocyanate compounds fluorescent labeling agents for immune serum. *Ann J Path* 1958; 34: 1081-1097
17. **Guzmán MA.** Inmunofluorescencia. Fundamentos. Instituto Nacional de Salud. Series de notas e Informes técnicos No. 1 2° Ed. Bogotá 1996.
18. **Yalow RS, Berson SA.** Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 1960; 39:1157-1175
19. **Engvall E, Perlman P.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8:871-879
20. **Voller A, Bidwell DE, Bartle A.** The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): A guide with abstracts of microplate applications. Dynatech Laboratories. Alexandria, Virginia 1979.
21. **Southern EM.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98:503-517.
22. **Towin H, Staelin T, et al.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354
23. **Hsu YH.** Immunogold for detection of antigen on nitrocellulose paper. *Ann Biochem* 1984; 142: 221-225