

CAPÍTULO 13

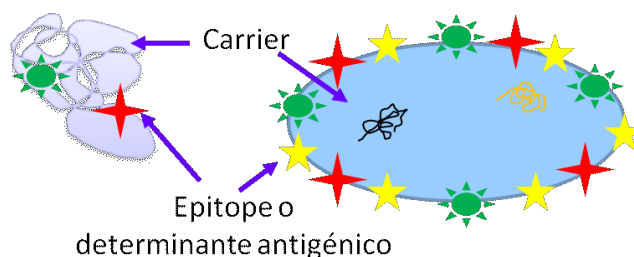
Inmunodiagnóstico: *pruebas secundarias y terciarias*

María Laura Gos y Graciela Miceli

En las reacciones observables *in vitro*, las uniones antígeno-anticuerpo dependen de la polivalencia del antígeno y de la bivalencia del anticuerpo. Los antígenos están formados por una molécula portadora o *carrier*, y los epitopos o determinantes antigénicos que determinan su especificidad (Figura 13.1). La unión antígeno-anticuerpo presenta dos etapas. En la etapa primaria participan fuerzas no covalentes y lábiles como los puentes de hidrógeno, uniones electrostáticas, de van der Waals y los enlaces hidrofóbicos, y sus fuerzas son inversamente proporcionales a la distancia entre los grupos reaccionantes. En la etapa secundaria ocurre la ley de oclusión de *Boyd* donde los enlaces pasan de ser hidrofílicos a hidrofóbicos y se excluye el agua, ocurre la unión por acercamiento entre el determinante antigénico y el sitio de unión del anticuerpo y se forman redes tridimensionales que forman el denominado enrejado de Marrack.

Figura 13.1

Estructura de los antígenos



Las pruebas inmunoserológicas secundarias son aquellas donde la consecuencia de la unión antígeno-anticuerpo se hace visible por sí sola con la aparición de grumos o aglutinados, bandas de precipitado o entramados, dependiendo del tipo de antígeno, del medio y del soporte. Las pruebas secundarias son la aglutinación, la precipitación, la inhibición de la hemoaglutinación y la fijación del complemento.

Pruebas secundarias

Aglutinación

La reacción de aglutinación se produce cuando un *antígeno particulado* o *forme* se une a su anticuerpo específico. La consecuencia de esta unión se hace visible con la aparición de grumos, aglutinado o entramado en un medio líquido. La inmunoglobulina más eficiente para esta prueba es la IgM. En esta prueba pueden utilizarse distintos soportes como portaobjetos, tubos con medio líquido bufferado o placas de poliestireno. La aglutinación se clasifica como directa o indirecta. La aglutinación es directa cuando el antígeno es naturalmente particulado, como en la prueba de Angus y Barton (BPA) para brucelosis bovina, donde el antígeno es una suspensión de bacterias (*Brucella abortus*) que se enfrenta a un suero problema donde se encuentran los anticuerpos específicos (Figura 13.2). Cuando la prueba se realiza en tubos se observa la aparición de un aglutinado en el fondo de los mismos, y con una leve agitación se observarán los grumos suspendidos en el líquido. La prueba de anillo en leche es una prueba que se utiliza para determinar la presencia de anticuerpos para brucelosis en animales de tambo. En la prueba positiva se forma un anillo coloreado que representa la unión antígeno-anticuerpo que queda adherida a los glóbulos de grasa (Figura 13.3). En la prueba de aglutinación en placa, como en la prueba de aglutinación para toxoplasmosis, se utiliza como antígeno el parásito *Toxoplasma gondii* completo, evidenciándose un entramado cuando ocurre la reacción antígeno-anticuerpo, mientras que la aparición de un botón en el fondo del pocillo indica un resultado negativo, ya que el antígeno sin aglutinar sedimenta en el fondo del mismo.

Figura 13.2

Pasos de la aglutinación directa

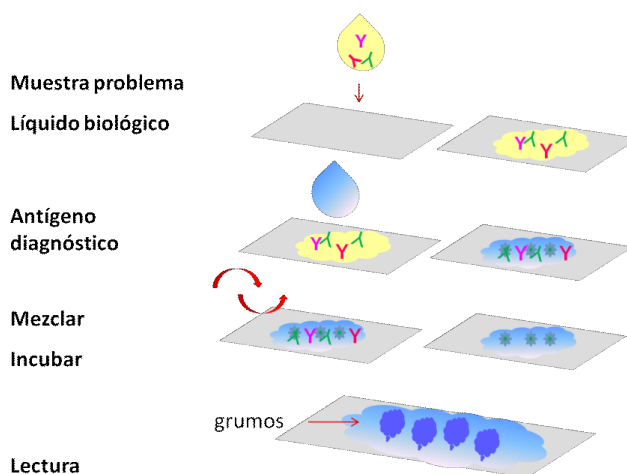
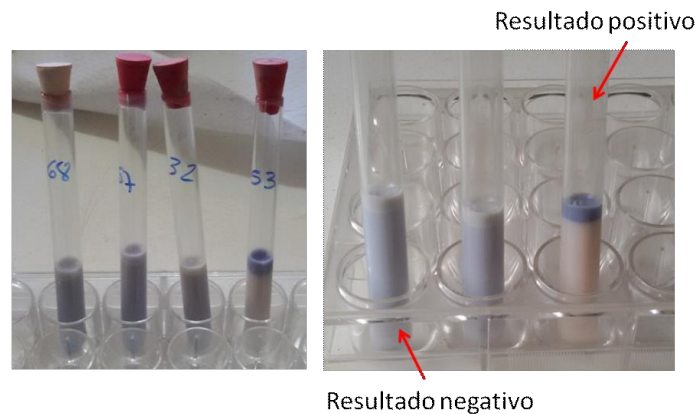


Figura 13.3

Prueba del anillo en leche para brucelosis bovina (Aglutinación en tubo)



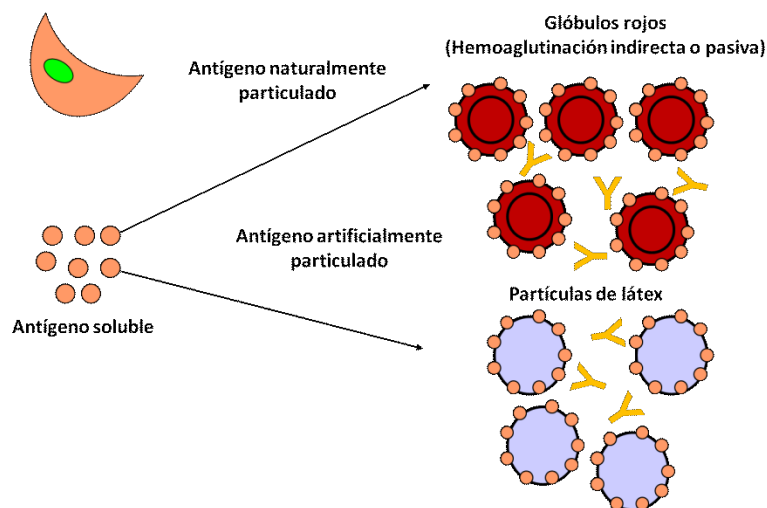
Nota. Fotografías: Archivo del Laboratorio de Inmunología, FCV, UNLP

En la aglutinación indirecta se utiliza un antígeno originalmente soluble unido a partículas como eritrocitos o partículas de látex, que funcionan de soporte, para hacerlo particulado (Figura 13.4). Cuando los antígenos solubles se unen a eritrocitos, la prueba se denomina hemoaglutinación indirecta o pasiva.

En todas las pruebas de aglutinación, puede aparecer el denominado efecto de zona o prozona, el cual se produce cuando existe un exceso de anticuerpos que cubren al antígeno y no se visualiza la reacción. En este caso, cuando se realizan diluciones del suero, la concentración de antígeno y anticuerpo comienzan a encontrarse en proporción óptima que permite la observación del entramado de Marrack. Por lo tanto, en los sueros en que se observa el efecto de zona, las primeras diluciones del suero se observan como negativas, y las siguientes se observan positivas.

Figura 13.4

Aglutinación indirecta

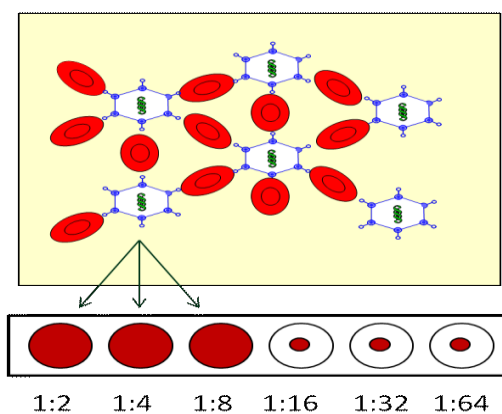


Inhibición de la hemoaglutinación

La inhibición de la hemoaglutinación (IHA) es una prueba inmunoserológica que se basa en la inhibición de la capacidad que tienen algunas familias de virus de aglutinar glóbulos rojos de diversas especies de animales (hemoaglutinación). Esto se logra mediante la presencia de glicoproteínas de superficie denominadas hemoaglutininas, las cuales se unen a receptores glicoproteicos de los glóbulos rojos que contienen ácido siálico con residuos terminales de ácido N-acetil neuramínico. La hemoaglutinación no es una reacción inmunológica; permite determinar la presencia y titulación de virus hemoaglutinantes, debido a que determinar el título del virus que va a ser usado en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Para realizar la prueba de hemoaglutinación, se incubaba una muestra que contiene virus y glóbulos rojos. Cuando la reacción es positiva se forma en suspensión un enrejado de glóbulos rojos-virus y cuando la concentración del virus no es suficiente para unirse a los glóbulos rojos el entramado desaparece y la reacción aparece como un botón debido a que los glóbulos rojos sedimentan en el fondo del pocillo. Se considera que el último pocillo donde aparece el entramado es donde existe una unidad hemoaglutinante. Para realizar la prueba de inhibición de la hemoaglutinación se utiliza como antígeno una concentración viral de 4 a 8 unidades hemoaglutinantes (Figura 13.5).

Figura 13.5

Resultado de una hemoaglutinación

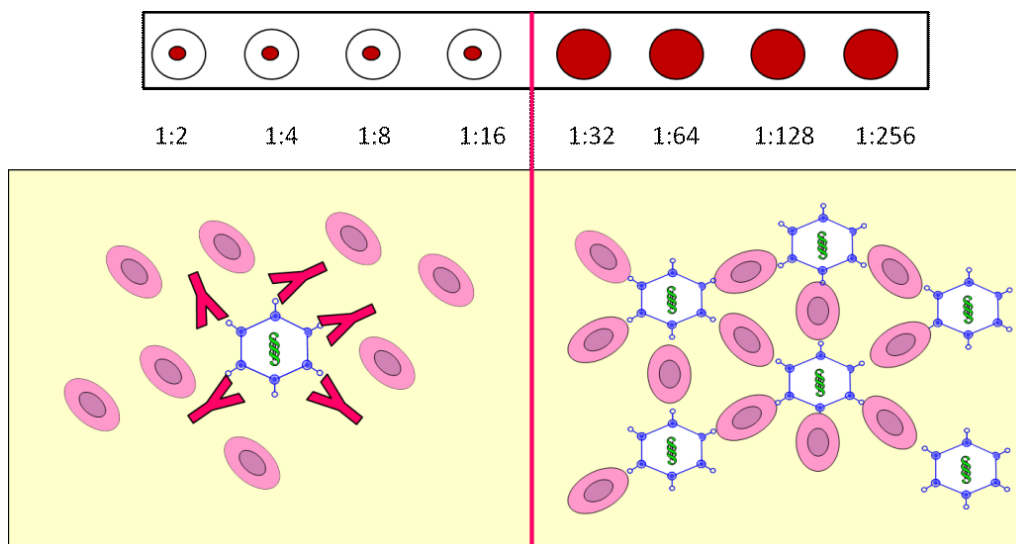


La prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA) se fundamenta en que los anticuerpos específicos inhiben la capacidad hemoaglutinante de ciertos virus. Se utiliza para la titulación de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación en sueros problemas, por lo que es una reacción inmunológica. La lectura de la IHA se realiza de forma inversa a la de la hemoaglutinación. En una reacción positiva, los anticuerpos del suero se unen con los virus, formando una reacción antígeno-anticuerpo, y los glóbulos rojos decantan formando un botón. Cuando desaparece el botón y aparece el entramado significa que el virus comenzó a unirse a los glóbulos rojos porque ya no existen más anticuerpos disponibles para unirse con el virus. La última dilución donde aparece un botón es la última dilución donde aparece la IHA, y para determinar un título se

multiplica la última dilución por 4 u 8 unidades de hemoaglutinación que fueron determinadas en las pruebas de hemoaglutinación (Figura 13.6).

Figura 13.6

Resultados de una prueba de Inhibición de la hemoaglutinación

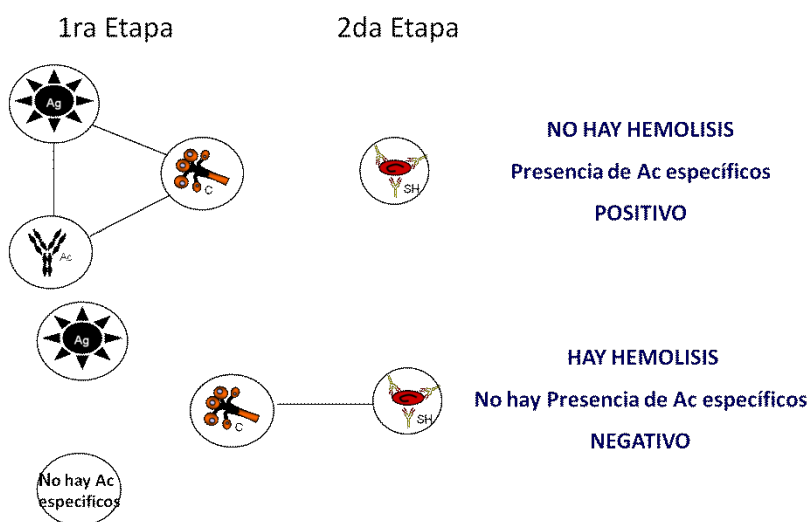


Fijación del complemento

La activación del sistema del complemento debido a la unión antígeno-anticuerpo, produce la formación del complejo de ataque de membrana capaz de romper las membranas celulares. La prueba de fijación del complemento se fundamenta en la capacidad del complemento para unirse a complejos antígeno-anticuerpo y la lisis de los eritrocitos sensibilizados del sistema hemolítico revelador. Para realizar esta prueba se necesita un sistema indicador o revelador en el cual se utilizan glóbulos rojos de oveja que se combinan con un suero hiperinmune con anticuerpos anti-glóbulos rojos de oveja producido en conejos (glóbulos rojos sensibilizados) y también complemento que se obtiene de suero de cobayos. La reacción se realiza en dos etapas: en una primera etapa se incuba el suero problema con el antígeno conocido en presencia del complemento y en una segunda etapa se agrega el sistema hemolítico. Si no hay hemólisis significa que existían anticuerpos específicos y el resultado de la prueba es positivo, lo que se atribuye a que en la primera etapa los anticuerpos del suero se unieron al antígeno y el complemento se unió a esa unión antígeno-anticuerpo, quedando en la segunda etapa el sistema hemolítico libre, por lo tanto, no ocurre hemólisis. Si el resultado fuera una hemólisis significa que en la primera etapa en el suero problema no había anticuerpos específicos, no ocurrió la unión antígeno-anticuerpo y el complemento quedó libre, así en la segunda etapa al agregar el sistema hemolítico el complemento actuó sobre el sistema hemolítico, siendo la hemólisis el resultado de una prueba negativa (Figura 13.7)

Figura 13.7

Resultados de una prueba de Fijación del Complemento



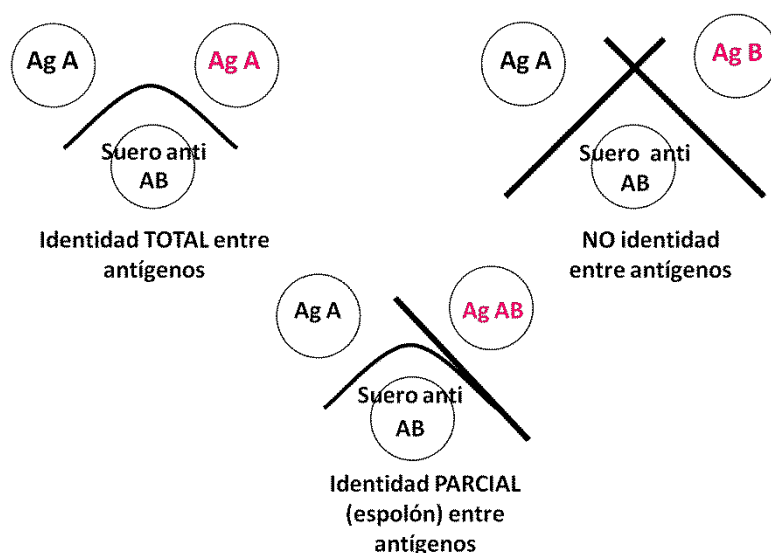
Precipitación

Es una prueba en la cual el antígeno se encuentra soluble y al unirse al anticuerpo específico se forma un precipitado, que se observa como una banda en un medio semisólido. El anticuerpo más activo en esta prueba es la IgG dado a que por su pequeño tamaño puede difundir a través de los medios de soporte como el agar noble o la agarosa. Estos medios son transparentes y permiten así visualizar las bandas de precipitación como líneas blancas. Los antígenos solubles que se utilizan para la precipitación pueden ser proteínas nativas (proteínas bacterianas citoplasmáticas o de membrana, proteínas virales estructurales o no estructurales, proteínas cárnicas, toxinas, proteínas séricas) o proteínas recombinantes, polisacáridos o polímeros de ácidos nucleicos. Las muestras pueden ser antígenos desconocidos (extractos cárnicos, gliadina) o anticuerpos problemas de líquidos biológicos como el suero. El antígeno y el anticuerpo difunden en la matriz gelificada y se unen formando inmunocomplejos antígeno-anticuerpo, que en la zona de equivalencia (enrejado de Marrack) producen una banda de precipitado. Este fenómeno se encuentra regido por las leyes de la inmunodifusión que determinan que la difusión se produce desde gradientes de mayor concentración hacia los de menor concentración, que la velocidad de difusión es directamente proporcional a la cantidad del reactante e inversamente proporcional a su peso molecular, y que la velocidad de difusión es inversamente proporcional a la concentración del gel, es decir, cuanto más concentrado está el gel, más lenta será la difusión. Un ejemplo de estas pruebas es la Prueba de Ouchterlony o doble difusión bidireccional en placa, donde se encuentra un pocillo central con el suero anti-antígeno y pocillos laterales con las muestras problemas que son antígenos. Los antígenos y anticuerpos difunden uno hacia el otro hasta que aparece una banda de precipitado en el lugar de unión.

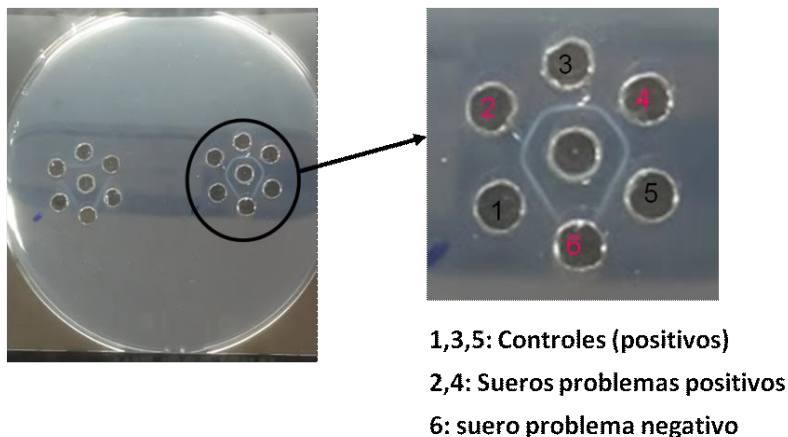
Cuando la concentración de los reactivos es equilibrada la banda de precipitación aparece en el centro entre el pocillo del anticuerpo y el antígeno, cuando la banda aparece más cercana al pocillo central del anticuerpo significa que la concentración de antígeno es muy alta y no permite difundir al anticuerpo, y si en cambio la banda de precipitación está más cercana a los pocillos laterales del antígeno significa que hay alta concentración de anticuerpo y baja de antígeno. Existen tres interpretaciones de resultados de esta prueba: identidad total (cuando aparece la coalescencia de los arcos, lo que determina que existe identidad inmunológica entre las muestras), no identidad entre antígenos (cuando los arcos o bandas se cruzan, lo que significa que no comparten ningún determinante antigénico) e identidad parcial entre antígenos (cuando aparece un espolón, lo que significa que comparten sólo algunos determinantes antigénicos) (Figura 13.8).

Figura 13.8

Interpretación de resultados de la Prueba de Ouchterlony



En el test de Coggins, que es una prueba de inmunodifusión doble bidireccional en placa para el diagnóstico de la anemia infecciosa equina, en el pocillo central se coloca el antígeno conocido y en los pocillos laterales los sueros con anticuerpos, donde en tres pocillos se colocan controles positivos y en otros tres los sueros problemas en forma alternada. En las reacciones positivas se observa una banda de precipitación que va a unir el pocillo del suero problema con el del control. Cuando las bandas de precipitación de los controles van hacia un pocillo donde se encuentra un suero problema, pero no forman una banda para ese pocillo, significa que ese suero problema es negativo (Figura 13.9).

Figura 13.9*Test de Coggins para el diagnóstico de la anemia infecciosa equina*

Nota. Fotografías: Archivo del Laboratorio de Inmunología, FCV, UNLP

Pruebas terciarias

Las pruebas terciarias son pruebas que detectan la unión antígeno-anticuerpo en sistemas vivos, ya sean cultivos celulares o animales de laboratorio, donde se puede observar la variación sobre el cultivo o la muerte o enfermedad del animal. Dentro de las pruebas terciarias se encuentran la seroneutralización y la seroprotección.

Seroneutralización

Consiste en la neutralización de un microorganismo o producto del mismo (toxina) por acción de anticuerpos específicos presentes en un suero problema. Presenta una fase que se realiza *in vitro* y otra *in vivo*. Se utiliza para identificar virus desconocidos o para medir la actividad específica de los anticuerpos. *In vitro* se realizan las distintas diluciones del suero problema y se agrega el antígeno conocido y posteriormente se incuban a 37° para permitir la unión antígeno-anticuerpo. Luego se inoculan cultivos celulares o animales de laboratorio. Como resultado se observa que, si el anticuerpo específico se unió al antígeno, este último quedó neutralizado y el cultivo queda sin alteraciones por inhibición del efecto citopático del antígeno (ausencia de efecto lítico, vacuolización, agregación celular, cuerpos de inclusión, sincitios), y en animales hay ausencia de lesiones, enfermedad o muerte.

Seroprotección

Esta prueba se realiza completamente *in vivo*. Se inoculan los animales con las distintas diluciones del suero y luego se lo desafía con dosis determinadas de microorganismos o toxinas, y se observan los efectos sobre los animales. Se utiliza para determinar títulos protectores de sueros o tipificación de antígenos.

Bibliografía

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2014). *Inmunología Básica. Funciones y trastornos del sistema inmunitario*. Elsevier Saunders, Barcelona.
- Akkaya, M., Kwak, K., Pierce, S.K. 2020. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat. Rev. Immunol.*, 20(4):229-238. doi: 10.1038/s41577-019-0244-2.
- Barbeito, C.G. y Diessler, M.E. (2022). *Introducción a la Histología Veterinaria*. EDULP, La Plata.
- Campos de Souza, D., da Silva, D.G., Coelho Fonseca L.C., de Castro Fiori, L., Moura Monteiro, B., Bernardes, O., Batista Viana, R., Fagliari, J.J. (2020). Passive Immunity Transfer in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Front. Vet. Sci.* 7:247. doi: 10.3389/fvets.2020.00247
- Campero, L.M., Minke, L., Moré, G., Rambeaud, M., Bacigalupe, D., Moore, D.P., Hecker, Y., Campero, C.M., Schares, G, Venturini, M.C. (2015). Evaluation and comparison of serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina. *Rev Argent Microbiol.*, 47(4):295-301. doi: 10.1016/j.ram.2015.07.002.
- Chastant, S., Mila, H. (2019). Passive immune transfer in puppies. *An. Rep. Sci.*, 207: 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.012>
- Day, M. J., Shultz, R. D. (2014) *Veterinary Immunology: Principles and Practice*. CRC Press, Boca Raton.
- Delves, P., Martin, S., Burton, D., Roitt, I. (2014). *Roitt- Inmunología. Fundamentos*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Fainboim, L., Geffner, J. (2011). *Introducción a la Inmunología humana*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Fariñas Guerrero, F. (2015). *Casos clínicos de Inmunología*. Editorial Inter-Médica: Buenos Aires. <https://www.stem.org.uk/resources/elibrary/resource/35694/immune-system>
- Mesin, L., Ersching, J., Victora, G.D. 2016. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*, 45(3):471-482. doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.001.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2010). *Inmunobiología de Janeway*. Mc Graw-Hill/ Interamericana, México.
- Pennimpepe, E. F. F., Gómez, C., Stanchi, N. O. (2004). *Introducción a la Inmunobiología*. EDULP, La Plata.
- Tizard, I. (2019). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Elsevier, Barcelona.
- Venturini, M.C., Bacigalupe, D., Miceli, G., Larsen, A., Rambeaud, M., Pardini, L, Dellarupe, A., Serena, S., Campero, L.M., Gos, M.L., Bernstein, M. (2012). *Manual de Inmunodiagnóstico*. Curso Inmunobiología Animal Básica, FCV-UNLP.