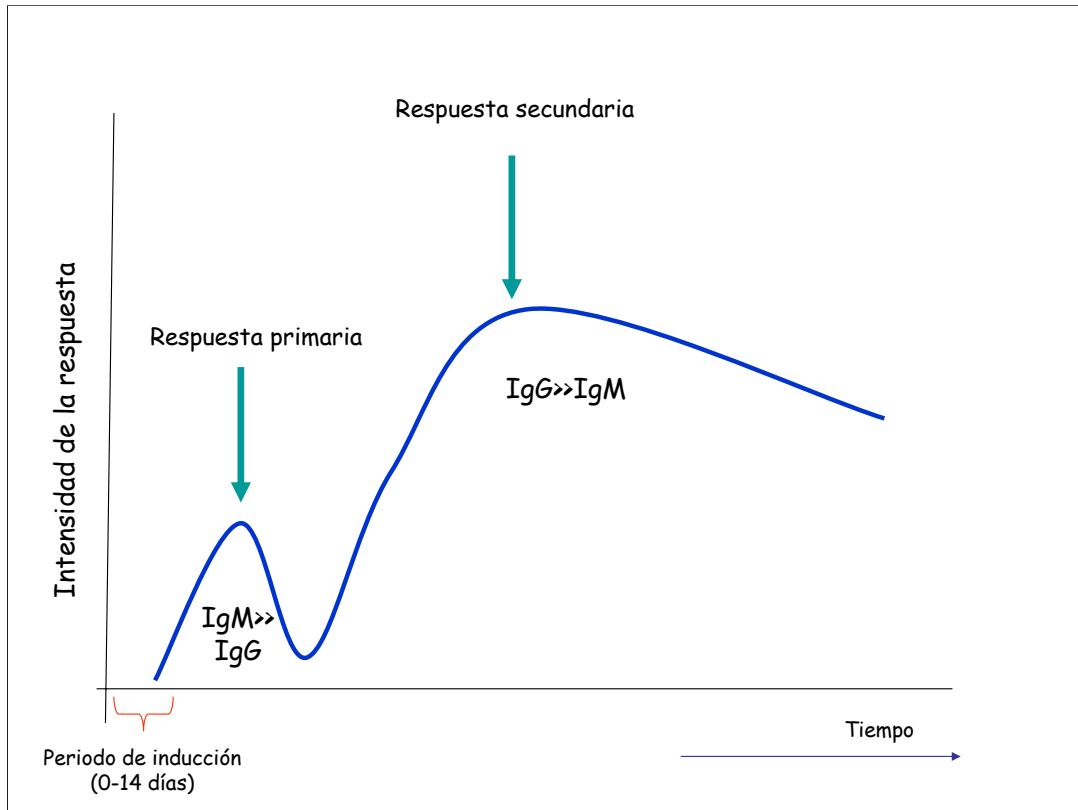


# Pruebas diagnósticas basadas en la respuesta inmunitaria

## ¿Por qué utilizamos el diagnóstico inmunológico?

- El diagnóstico clínico no suele ser definitivo.
- Las lesiones histológicas pueden ser indicativas pero pocas veces son patognomónicas
- A veces, el diagnóstico microbiológico es lento, complicado o imposible

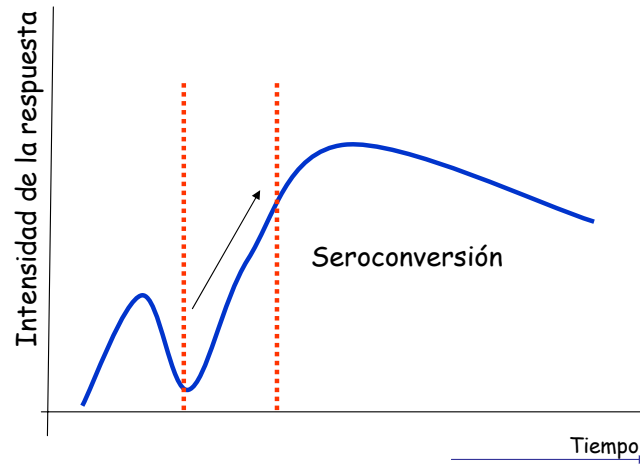
Principales motivos de utilización del diagnóstico inmunológico



Esquema de la respuesta inmune primaria y secundaria

**Título:** Máxima dilución a la cual un suero continúa siendo positivo en una prueba serológica determinada

**Seroconversión:** Aumento del título de anticuerpos x4 o paso de negativo a positivo



Conceptos de título de anticuerpos y seroconversión

## Conceptos básicos

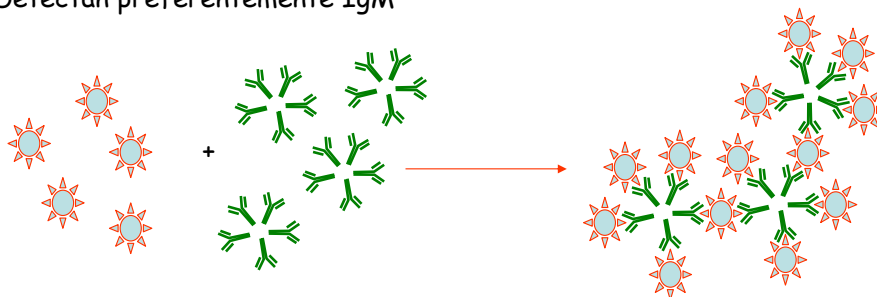
- Las IgM normalmente reflejan una infección reciente
- El aumento del título de anticuerpos indica una infección reciente
- A veces, simplemente con determinar un título elevado podemos suponer que se ha producido una infección reciente
- Los títulos de IgG por sí solos suelen indicar una infección pasada

Conceptos básicos de interpretación de resultados

## 1. Pruebas basadas en la detección de anticuerpos

## Pruebas de aglutinación

Se utilizan con antígenos particulados tales como una suspensión bacteriana. Detectan preferentemente IgM



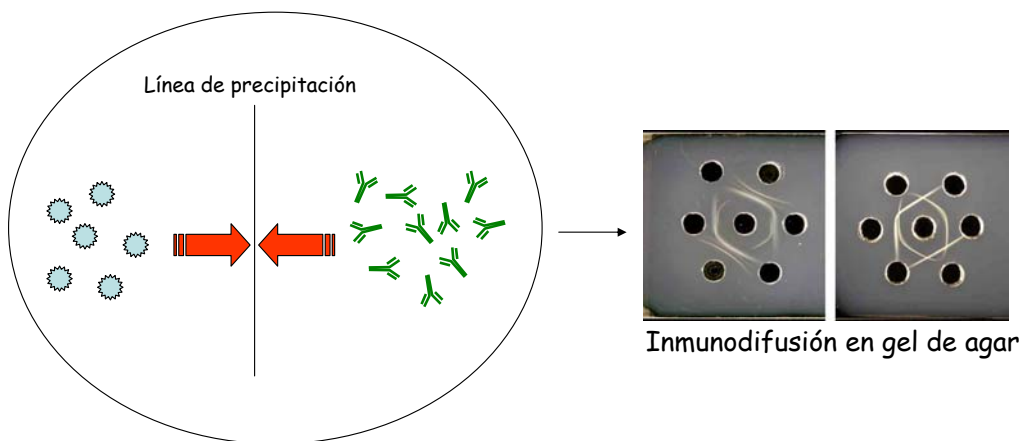
Rosa de Bengala (brucelosis)

Este tipo de pruebas suele ser extremadamente sensible pero, al mismo tiempo suele padecer de falta de especificidad por el hecho de ser mayoritariamente IgMs lo que se detecta

Pruebas de aglutinación: Se basan en la unión de antígenos particulados a los anticuerpos, preferentemente de clase IgM. Suele tratarse de pruebas muy sensibles pero con poca especificidad. Ejemplos de este tipo de pruebas es la aglutinación con rosa de Bengala empleada en el diagnóstico de la brucelosis.

## Pruebas de precipitación

Se utilizan con antígenos solubles a los que se permite difundir en una matriz semisólida



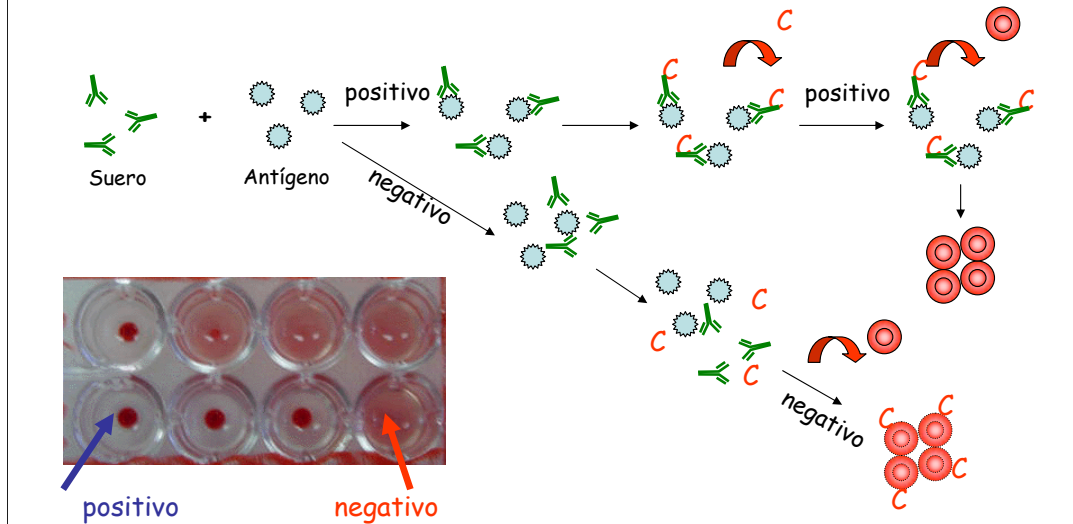
Se trata de pruebas relativamente sensibles y específicas pero con un elevado componente subjetivo y muy engorrosas

Pruebas de precipitación: En este caso se utilización antígenos solubles que se difunden frente a los anticuerpos. La unión antígeno-anticuerpo precipita de forma visible y permite establecer la presencia de anticuerpos específicos. Un ejemplo clásico de este tipo de pruebas es la inmunodifusión en gel de agar utilizada históricamente en el diagnóstico de la leucosis bovina.



## Fijación del complemento

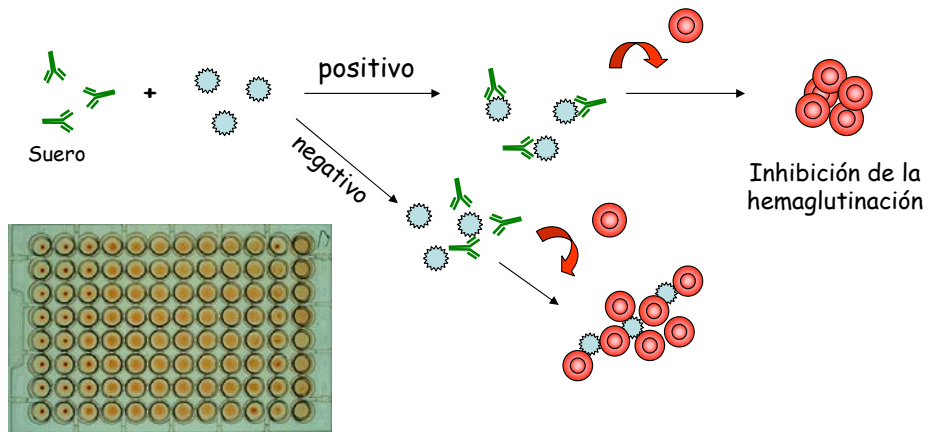
La fijación del complemento se basa en la capacidad del complemento para unirse a los complejos antígeno-anticuerpo. La prueba incluye la adición de eritrocitos sensibilizados con una hemolisina. Si el suero posee anticuerpos específicos, se fija el complemento y no puede unirse a la hemolisina para lisar los eritrocitos. Se trata de una prueba muy específica.



Fijación del complemento: Como hemos visto en capítulos anteriores, el complemento posee la capacidad de unirse a los complejos antígeno anticuerpo (fijación). Esta capacidad es aprovechada en la prueba de fijación del complemento. Metodológicamente, la prueba se desarrolla en dos fases, una primera que es una reacción antígeno anticuerpo en un medio líquido y una segunda consistente en la adición de complemento, una hemolisina dependiente de complemento y eritrocitos. Si se ha producido reacción antígeno-anticuerpo, es decir, si el suero analizado contenía anticuerpos frente al antígeno, el complemento queda fijado y no puede activar la hemólisis de los glóbulos rojos. Un ejemplo clásico de utilización de esta prueba es la perineumonía bovina o la pleuroneumonía porcina.

## Pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación

Estas pruebas se basan en la capacidad de algunos patógenos (p.ej. el virus de la influenza) para causar la aglutinación de los eritrocitos. Pueden utilizarse para detectar el patógeno (pruebas de hemaglutinación) o los anticuerpos dirigidos contra las hemaglutininas del microorganismo (inhibición de la hemaglutinación). Suelen ser pruebas específicas de serotipo o subtipo y bastante sensibles.



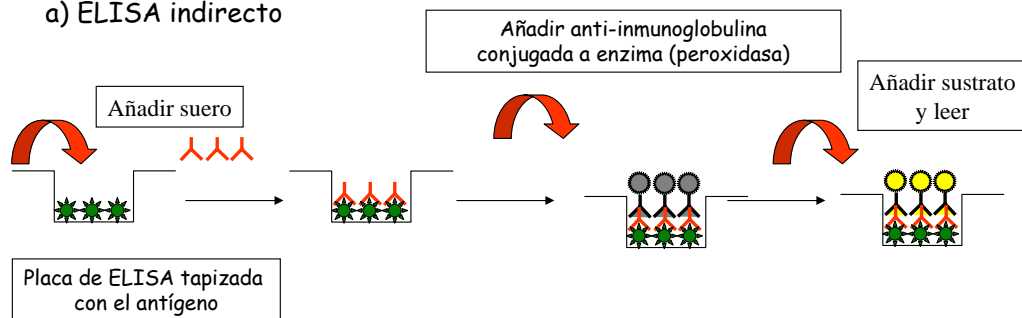
Las pruebas de hemaglutinación se utilizan con patógenos que poseen esta capacidad, generalmente virus. El ejemplo más clásico es el diagnóstico de la influenza.

## ELISA

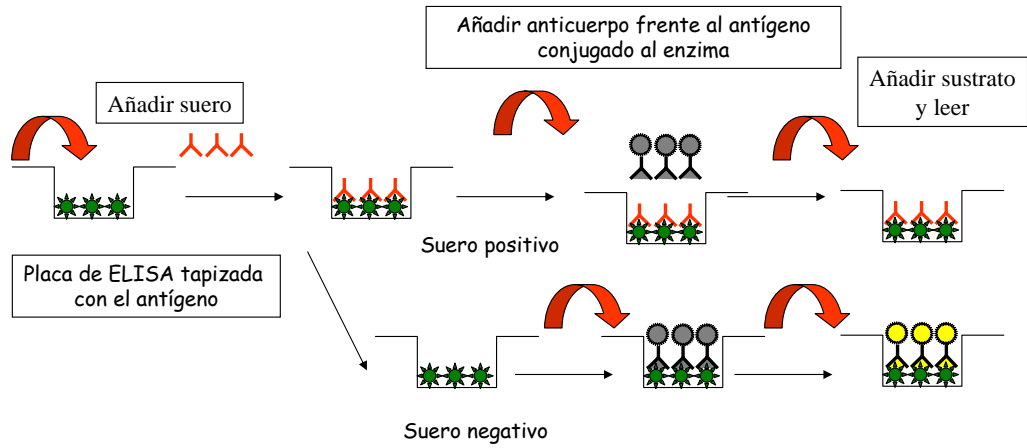
Las pruebas inmunoenzimáticas se basan en una reacción antígeno anticuerpo que tiene lugar sobre un soporte sólido (normalmente una microplaca de plástico) a la que se ha adsorbido un antígeno o un anticuerpo.

La prueba puede desarrollarse en diferentes modalidades pero en todas ellas la reacción final se revela mediante un enzima que modifica un sustrato que adquiere color. Se trata de pruebas muy sensibles y específicas

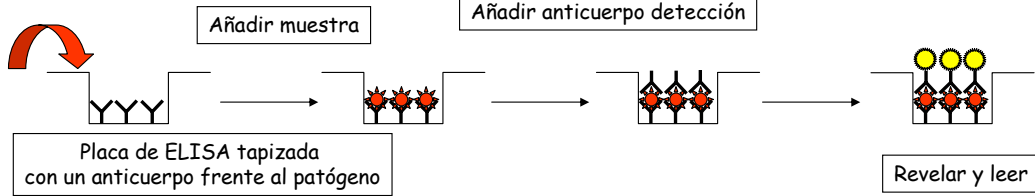
### a) ELISA indirecto



b) ELISA de competición



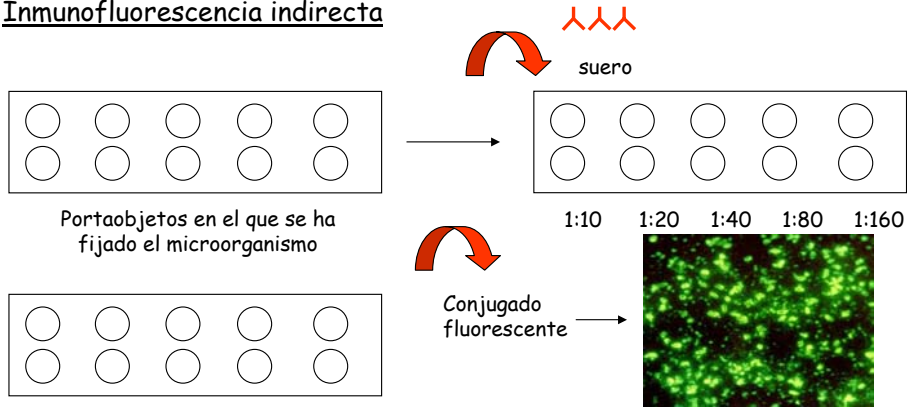
b) ELISA de captura



## Pruebas de inmunofluorescencia

Las pruebas de inmunofluorescencia pueden utilizarse para detectar anticuerpos o para detectar la presencia de un patógeno. En ambos casos la reacción finaliza mediante la adición de un anticuerpo conjugado a una sustancia fluorescente, habitualmente fluoresceína. Estas pruebas son muy sensibles pero su interpretación tiene un alto grado de subjetividad

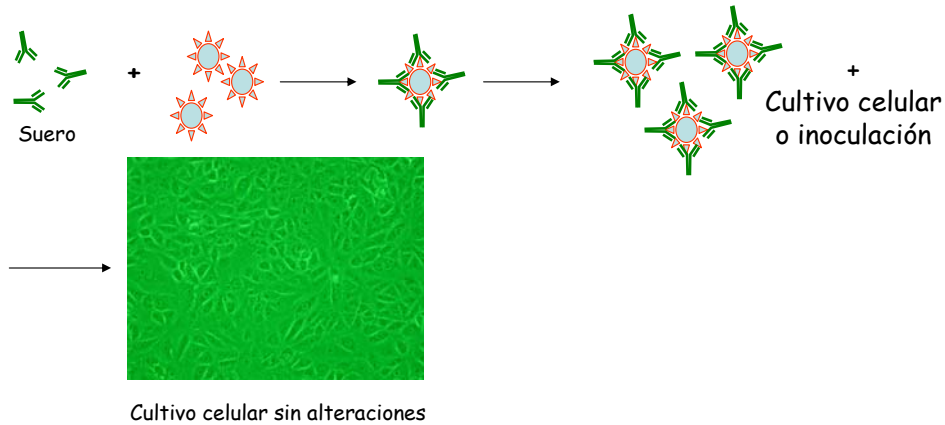
### Inmunofluorescencia indirecta



Las pruebas de inmunofluorescencia, en sus dos variantes, directa e indirecta, han sido muy utilizadas durante el siglo pasado aunque hoy en día han caído bastante en desuso debido al desarrollo de otros sistemas diagnósticos como el ELISA o las técnicas de biología molecular. La técnica se basa en una reacción antígeno-anticuerpo que se revela con la ayuda de un anticuerpo marcado con una sustancia fluorescente. Ejemplos de este tipo de pruebas los encontramos en el diagnóstico directo de la mayoría de virus del síndrome respiratorio bovino.

## Pruebas de neutralización

Las pruebas de neutralización van dirigidas a la detección de anticuerpos capaces de bloquear los epítomos críticos del patógeno. Normalmente suelen tener una interpretación biológica correlacionada con la protección. Sin embargo, no suelen ser útiles para diferenciar respuestas entre animales infectados y vacunados ya que la mayoría de vacunas inducen anticuerpos neutralizantes



Las pruebas de neutralización y en particular las de neutralización vírica, son uno de los estándares habituales para medir los niveles de inmunidad protectora frente a un patógeno. Normalmente la prueba se realiza en dos pasos, uno primero de incubación del patógeno con el suero del animal a analizar y un segundo consistente en la inoculación del patógeno en un cultivo celular o en un animal. Si el suero contenía anticuerpos neutralizantes, se bloquea la capacidad infectiva del patógeno y; por lo tanto, no produce la infección del animal o del cultivo. Este mismo sistema puede utilizarse con toxinas o bacterias. A pesar de su utilidad, este método ha caído en desuso fuera de la investigación debido al tiempo que requiere y a la dificultad de trabajar con animales experimentales o cultivos celulares.