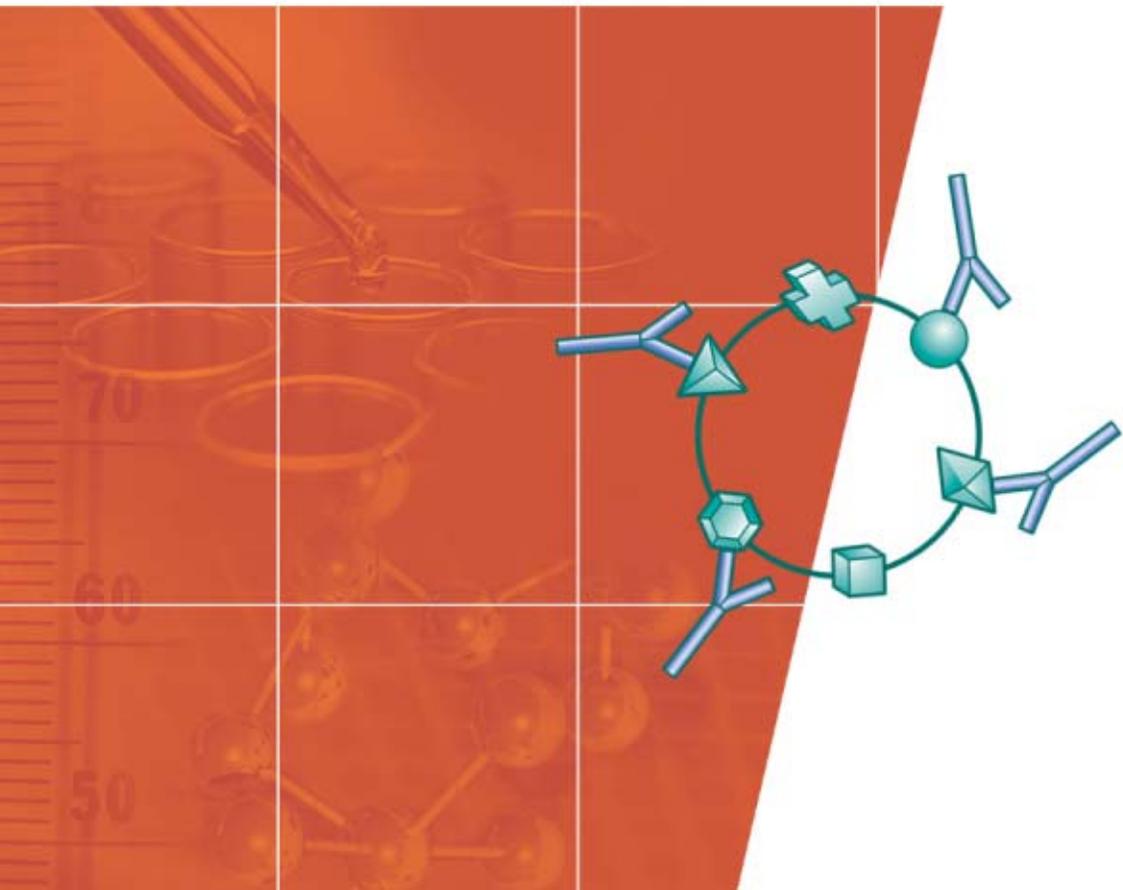


Introducción a los Inmunoensayos





Introducción a los Inmunoensayos

Objetivos del Entrenamiento

- Una vez finalizado este capítulo, usted podrá:
 - Definir inmunoensayo
 - Describir la estructura y preparación de los anticuerpos
 - Definir cuatro categorías de metodologías de inmunoensayos (competitiva y no competitiva, y homogénea y heterogénea).



Introducción a los Inmunoensayos

Introducción

- Inmunoensayo es una prueba que usa complejos de anticuerpo y antígeno como medio para generar un resultado perceptible. Un complejo anticuerpo:antígeno también es conocido como inmuno-complejo. “Inmuno” se refiere a una respuesta inmunológica que hace que el cuerpo genere anticuerpos, y “ensayo” se refiere a una prueba. Entonces, un inmunoensayo es una prueba que utiliza inmunocomplejos cuando se unen los anticuerpos y los antígenos.
- Los Inmunoensayos se diferencian de otros tipos de pruebas de laboratorio, como las pruebas colorimétricas, ya que usan complejos anticuerpo:antígeno para generar una señal que pueda medirse. En oposición, la mayoría de las pruebas de rutina de química clínica utilizan reacciones químicas entre el reactivo (solución de sustancias químicas u otros agentes) y la muestra del paciente para generar un resultado de la prueba.



Introducción a los Inmunoensayos

Inmunoensayo: Anticuerpos, Antígenos y Analitos

- Anticuerpo es una proteína producida por el cuerpo en respuesta a una sustancia “invasora” (extraña)¹. Los anticuerpos se producen como parte de la respuesta inmunológica del cuerpo para protegerse. Es también el caso, por ejemplo, de algunos test de inmunoensayos para determinar la presencia de anticuerpos contra las moléculas de cáncer. Así, si los anticuerpos están presentes, significa que las células invasoras de cáncer también lo están.
- Antígeno es la sustancia que el cuerpo está tratando de “combatir” (eliminar o reducir) preparando una respuesta inmunológica. Algunos test de inmunoensayos determinan la presencia de antígenos directamente, en vez de buscar anticuerpos. En un análisis para medir la concentración de una droga terapéutica, por ejemplo, la droga es el antígeno que se une al anticuerpo.

¹ Una excepción es el caso de las enfermedades autoinmunes, donde el cuerpo produce anticuerpos para proteínas que existen naturalmente en vez de sustancias extrañas.



Introducción a los Inmunoensayos

Inmunoensayo: Anticuerpos, Antígenos y Analitos

- Analito es todo lo que se mide en una prueba de laboratorio. En el inmunoensayo, el analito puede ser tanto un anticuerpo como un antígeno.



Resumen de Técnicas del Inmunoensayo

- Los inmunoensayos utilizan un anticuerpo selecto o más para detectar analitos de interés. Los analitos que se miden pueden ser aquellos que están presentes en el cuerpo naturalmente (como por ejemplo una hormona tiroidea), aquellos que el cuerpo produce pero no están típicamente presentes (como por ejemplo un antígeno de cáncer), o aquellos que naturalmente no existen en el cuerpo (como por ejemplo una droga de abuso).
- Los anticuerpos poseen una alta especificidad y afinidad para un antígeno específico. Es la unión específica de un anticuerpo a un antígeno lo que permite la detección de analitos por medio de una variedad de técnicas de inmunoensayo.



Estructura de los Anticuerpos

- Los anticuerpos (Ab) son un tipo de proteínas denominado inmunoglobulinas. La más común es la inmunoglobulina G (IgG). IgG es una proteína compuesta por dos regiones principales, estructural y funcional:

- **Región Fab:**
Contiene el punto de unión del antígeno (Ag) que varía entre diferentes anticuerpos.
- **Región Fc:**
Región de estructura constante dentro de una clase de anticuerpo.

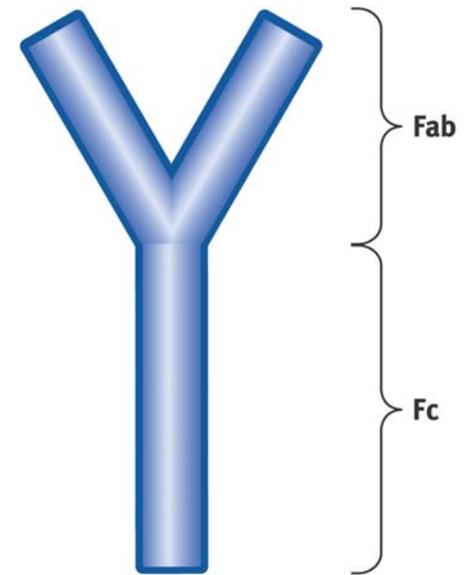


Figura 1-1 Estructura del anticuerpo y puntos funcionales



Preparación de Anticuerpos Policlonales y Monoclonales

- Los reactivos para anticuerpo se desarrollan a partir de anticuerpos policlonales como monoclonales. El antisuero policlonal (suero sanguíneo que contiene los anticuerpos deseados) se genera en animales, siendo los más comunes ovejas, conejos, o cabras. Los animales producen el antisuero – igual que un ser humano – como mecanismo de defensa al ser expuestos a un antígeno. El antisuero contiene una mezcla de anticuerpos, cada uno de los cuales puede unirse a diferentes puntos de unión del antígeno o epítope.



Preparación de Anticuerpos Policlonales y Monoclonales

- El proceso de preparación de un anticuerpo comienza cuando le se inyecta a un animal una solución que contenga el antígeno de interés. A este antígeno de interés a veces se lo denomina sustancia inmunógena, debido a que puede estimular una respuesta inmunológica. Transcurrido un tiempo, y en algunos casos con múltiples inyecciones, el sistema inmunológico del animal produce anticuerpos para el antígeno que fue inyectado. Se toma sangre del animal, y se separa el suero. Este suero generalmente es rico en anticuerpos que reconocen el antígeno y se lo denomina antisuero.



Preparación de Anticuerpos Policlonales y Monoclonales

- El antisuero por lo general contiene una mezcla de anticuerpos que reconocen y se unen al mismo antígeno, pero pueden combinarse con diferentes epítopes (ver Figura 1-2). Un antígeno que contenga múltiples puntos de unión para los anticuerpos se denomina antígeno multivalente. Estos tipos de anticuerpos, presentes como una mezcla diversa, se denominan anticuerpos policlonales.

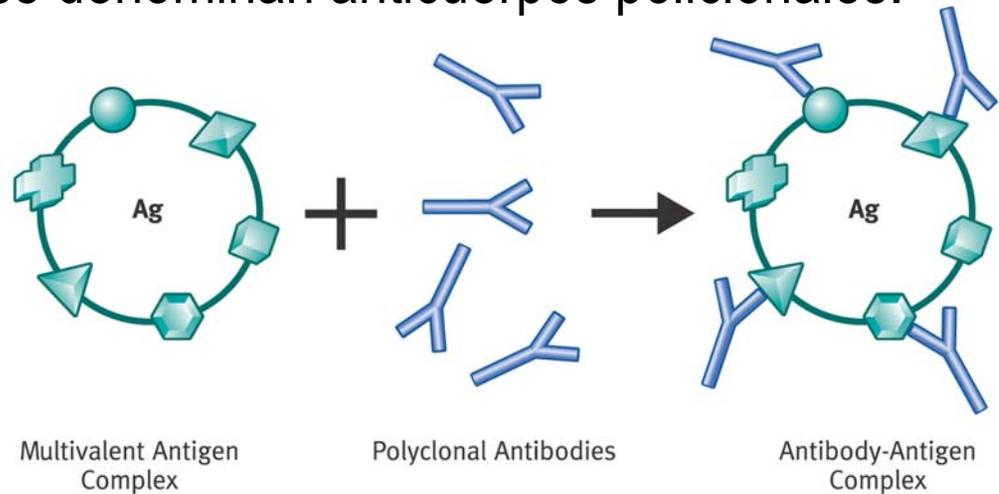


Figura 1-2 Especificidades del antígeno múltiple de anticuerpos policlonales



Preparación de Anticuerpos Policlonales y Monoclonales

- Los anticuerpos monoclonales se diferencian de los anticuerpos policlonales en que son muy específicos para un epítoto simple en un antígeno multivalente (ver Figura 1-3). Se producen a partir de una línea celular simple usando tecnología para hibridomas y líneas celulares de mieloma de ratón. Las hibridomas son células tumorales productoras de anticuerpos que producen varias copias del mismo anticuerpo y se desarrollan fácilmente en poblaciones celulares de laboratorio.

Preparación de Anticuerpos Policlonales y Monoclonales

- Una ventaja de los anticuerpos monoclonales es que la línea celular hibridoma que los produce es potencialmente “inmortal” y que puede producir los mismos anticuerpos en forma constante e indefinida. Un antisuero policlonal producido por inmunización de animales puede variar de un animal a otro, y un antisuero útil puede ya no estar más disponible si el único animal que lo produce muere.

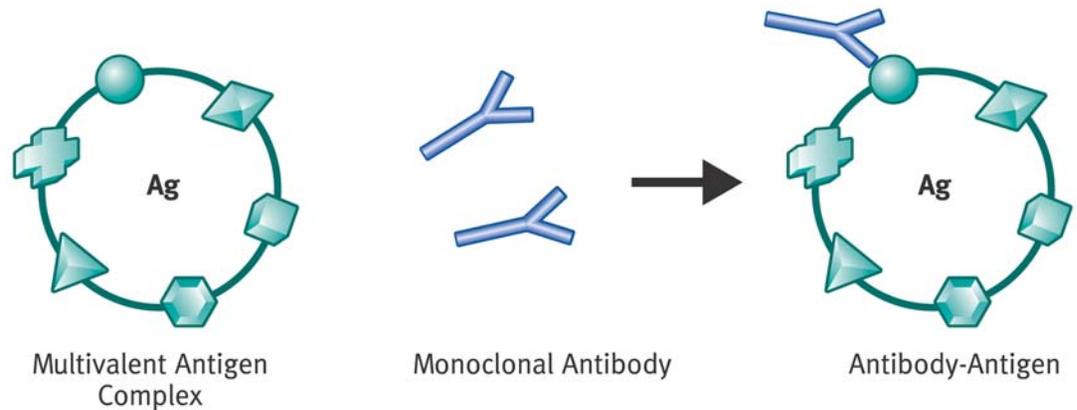


Figura 1-3 Especificidades uniformes de anticuerpos monoclonales



Preparación de Anticuerpos Policlonales y Monoclonales

- Las hibridomas se producen en múltiples etapas (ver Figura 1-4) :
 - Inyectando un antígeno específico en un animal huésped (típicamente un ratón)
 - Aislando células productoras de anticuerpos (células B) del bazo del ratón
 - Fusionando estas células B con un tipo específico de célula tumoral que se desarrolla fácilmente en poblaciones y produce anticuerpos
 - Aislando hibridomas logrados (células fusionadas) que produzcan anticuerpos específicos para el antígeno de interés



Preparación de Anticuerpos Policlonales y Monoclonales

- En los inmunoensayos, ambos anticuerpos monoclonales y policlonales se usan para detectar antígenos, cada uno con fortalezas específicas para aplicaciones particulares. Es probable que los inmunoensayos que detectan anticuerpos en sueros de pacientes supongan la detección de anticuerpos policlonales generados por el sistema inmunológico del paciente.

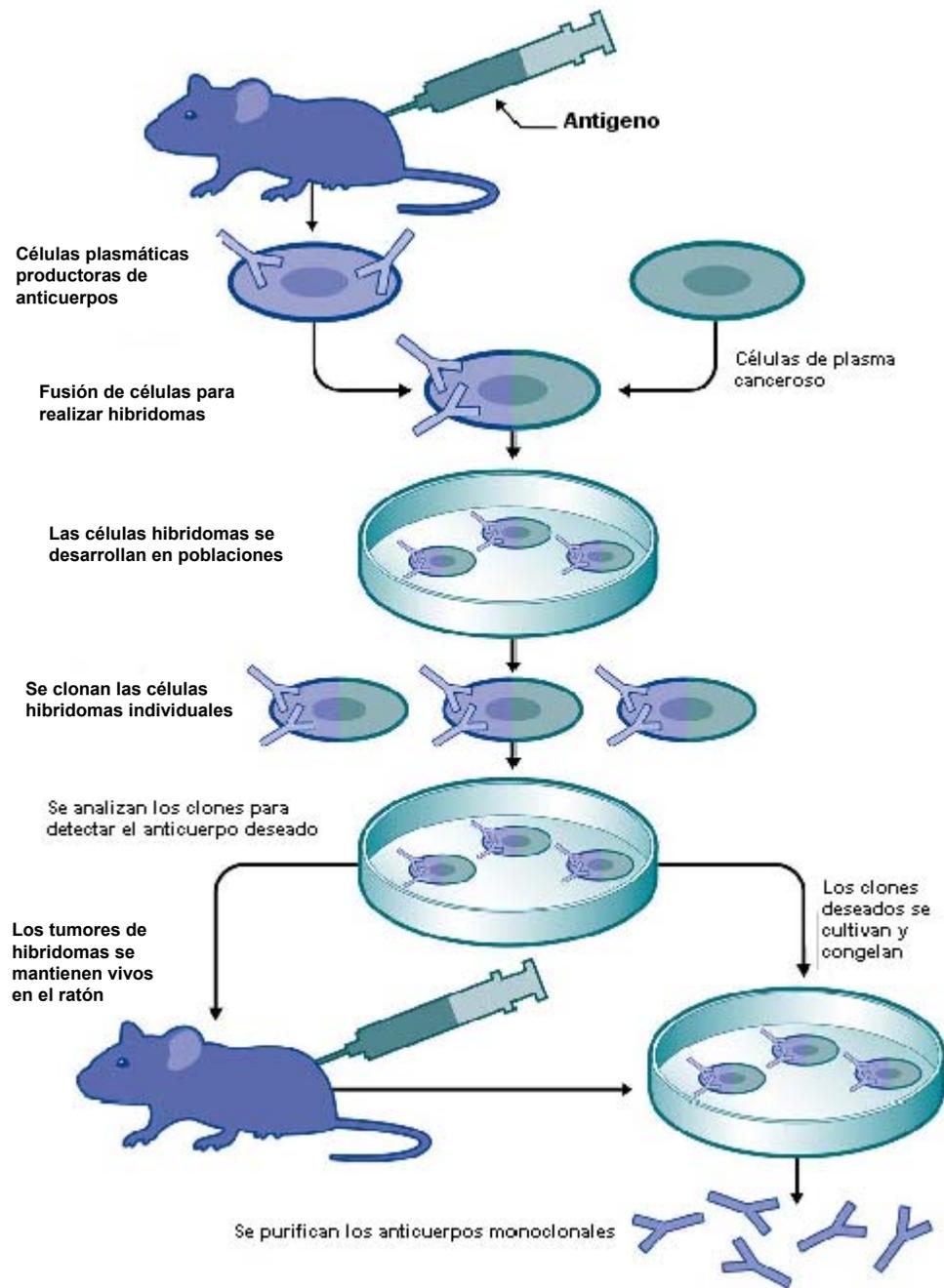


Figura 1-4
Procedimiento para
generar anticuerpos
monoclonales



Categorías de las Técnicas de Inmunoensayo

- En este capítulo, se tratarán cuatro categorías de técnicas de inmunoensayo. Ellas son: inmunoensayos no competitivos y competitivos, e inmunoensayos homogéneos y heterogéneos.



Categorías de las Técnicas de Inmunoensayo

- Todos los inmunoensayos requieren el uso de material marcado para medir la concentración de antígeno o anticuerpo presente. Una marca es una molécula que reacciona como parte del ensayo, por lo tanto un cambio en la señal puede medirse en la sangre-reactivo.
- Los ejemplos de marcas incluyen un compuesto radioactivo, una enzima que hace que cambie el color de una solución, o una sustancia que produzca luz. La marca puede aplicarse durante la fabricación del reactivo tanto al anticuerpo (Ab^* , ver Figura 1-5) como al antígeno (Ag^* , ver Figura 1-6). Las tecnologías de inmunoensayo utilizan diferentes formatos para distinguir el complejo antígeno-anticuerpo de la marca libre no unida.

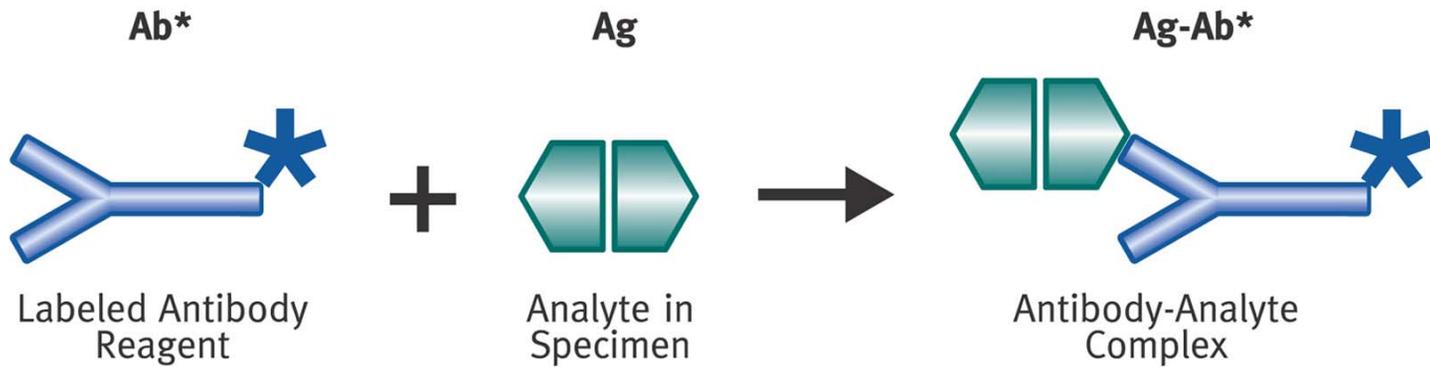


Figura 1-5 Los anticuerpos marcados permiten la detección de complejos antígeno/anticuerpo en los inmunoensayos

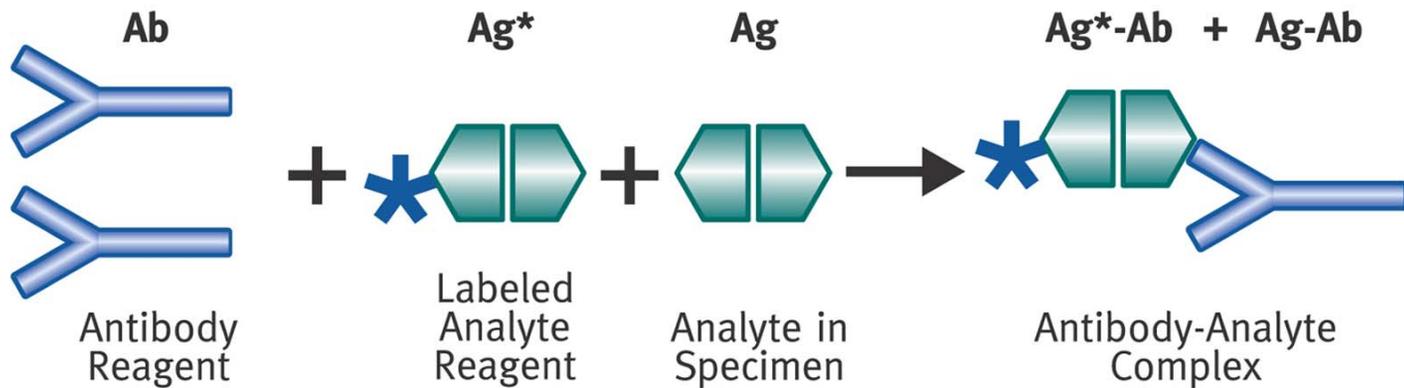


Figura 1-6 El antígeno marcado también permite la detección de complejos antígeno/anticuerpo en los inmunoensayos



Inmunoensayos Competitivos y no Competitivos

- La medición del analito en un inmunoensayo se logra usando tanto un formato competitivo como uno no competitivo
- En los formatos competitivos, el analito sin marcar (generalmente antígeno) en la muestra se mide por su capacidad para competir con un antígeno marcado en el inmunoensayo. El antígeno sin marcar bloquea la capacidad del antígeno marcado de unirse puesto que ese punto de unión en el anticuerpo ya se encuentra ocupado.



Formato Competitivo

- Así, en un inmunoensayo competitivo, el hecho de que se mida menos marca en el ensayo significa que hay más antígeno marcado (muestra) presente. La concentración de antígeno en la muestra está inversamente relacionada a la concentración de marca que se mide en el formato competitivo (Figura 1-7).

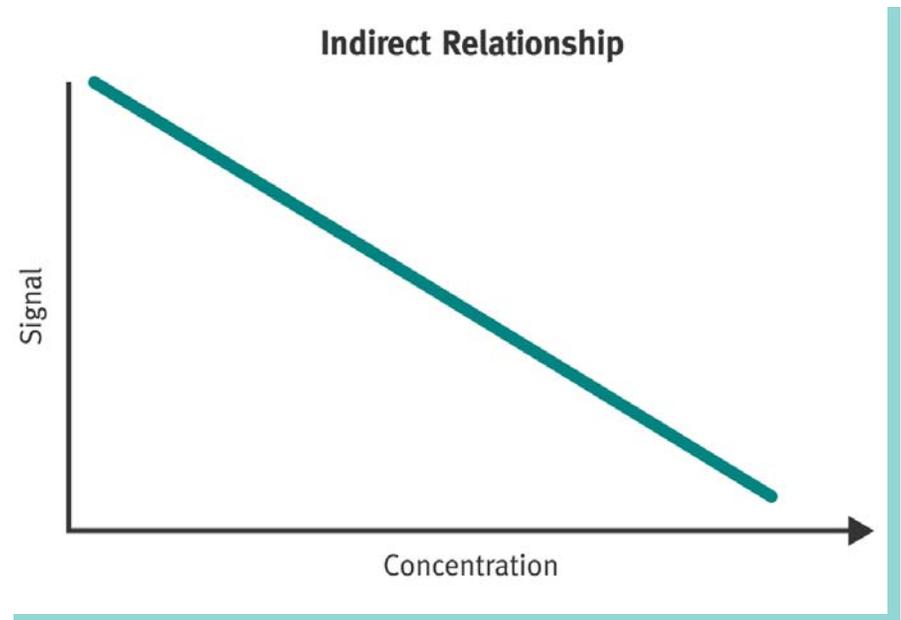


Figura 1-7 La concentración de antígeno está inversamente relacionada a la concentración de marca (señal) en formatos competitivos



Formato Competitivo

- En el formato competitivo de un solo paso (ver Figura 1-8), tanto el reactivo del antígeno marcado (Ag^*) como la muestra sin marcar (o analito de la muestra) compiten por una cantidad limitada de anticuerpo.

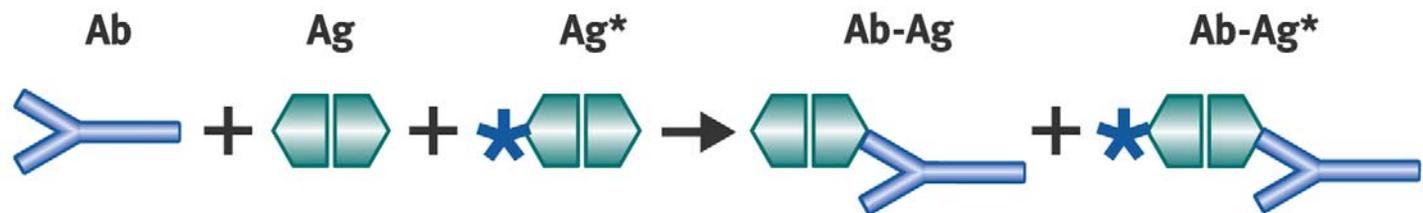


Figura 1-8 Inmunoensayo competitivo de un solo paso



Formato Competitivo

- En el formato competitivo de dos pasos, la concentración de anticuerpo del reactivo se encuentra presente en exceso comparada con la concentración de antígeno. El reactivo del anticuerpo primero se incuba con una muestra que contenga antígenos de interés, luego en el segundo paso, se agrega el antígeno marcado.

Formato Competitivo

- Recuerde que en el formato competitivo, menor concentración de antígeno marcado unido indica mayor concentración de antígeno presente en la muestra.
Los formatos de ensayos competitivos de dos pasos proporcionan una sensibilidad mejorada, comparados con los formatos de ensayos de un solo paso.

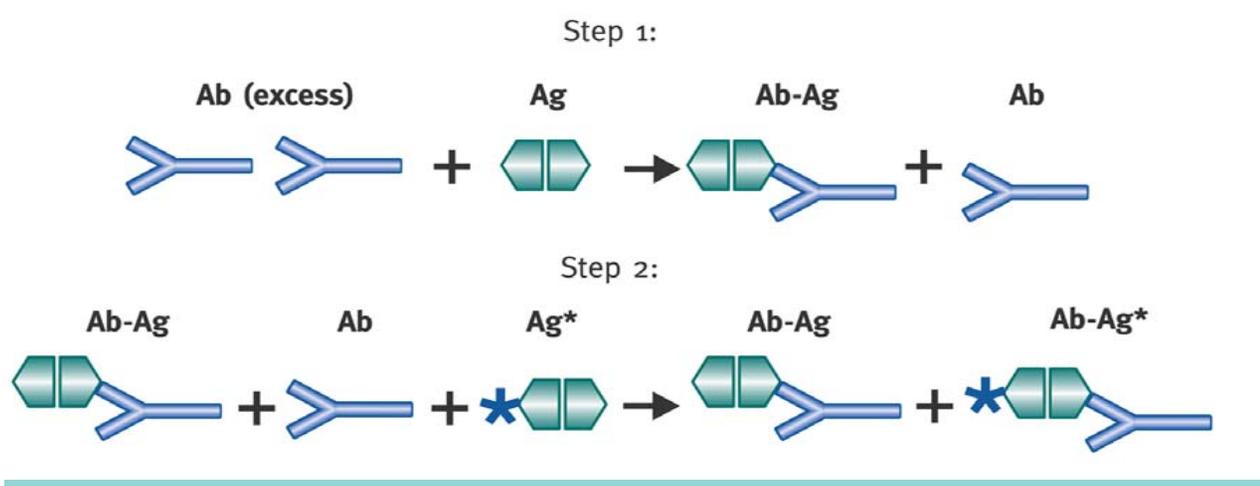


Figura 1-9 Inmunoensayo competitivo de dos pasos



Técnica No Competitiva (sándwich)

- Los formatos de ensayo no competitivos generalmente proporcionan el nivel más alto de sensibilidad y especificidad del ensayo (ver Glosario para la definición de estos términos) y se aplican a la medición de analitos críticos como pueden ser los marcadores cardíacos y de hepatitis (ver Capítulo 3). A este formato se lo conoce como ensayo “sandwich” ya que el analito está unido (como un sandwich) entre dos reactivos de anticuerpo muy específicos (Figura 1-10).

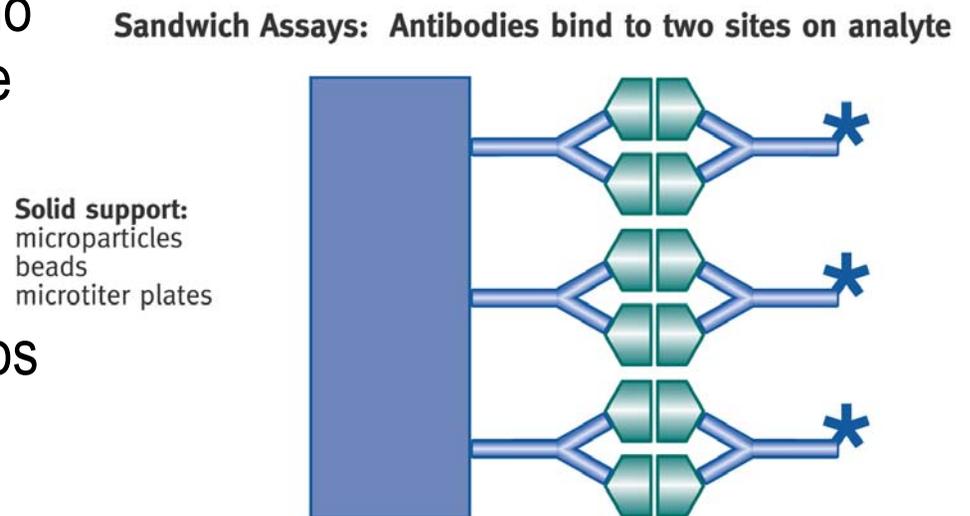


Figura 1-10 Técnica sándwich no competitiva de inmunoensayo



Técnica No Competitiva (sandwich)

- Los formatos de ensayo no competitivo también pueden utilizar las técnicas de un paso o de dos pasos, como en el ensayo competitivo. El formato del ensayo de dos pasos emplea etapas de lavado en el que se aísla y se lava el complejo sándwich para quitar el exceso del reactivo marcado no unido y cualquier otra sustancia que interfiera.
- El formato no competitivo de dos pasos generalmente ofrece la mayor especificidad y sensibilidad de todos los formatos de ensayo que se tratan en la presente guía.



Técnica No Competitiva (sandwich)

- En los ensayos no competitivos, la medición del analito marcado, generalmente un anticuerpo, es directamente proporcional a la concentración de antígeno presente en la muestra. Esto puede representarse por medio de una curva de respuesta a la concentración. (Figura 1-11).
- El eje X traza la concentración de un antígeno. El eje Y traza la respuesta, que en este caso se trata de la señal. Así, cuanto mayor sea la cantidad de antígeno presente, más anticuerpos marcados se unirán. Esta proporción directa contrasta con la indirecta de los inmunoensayos competitivos tratados anteriormente.

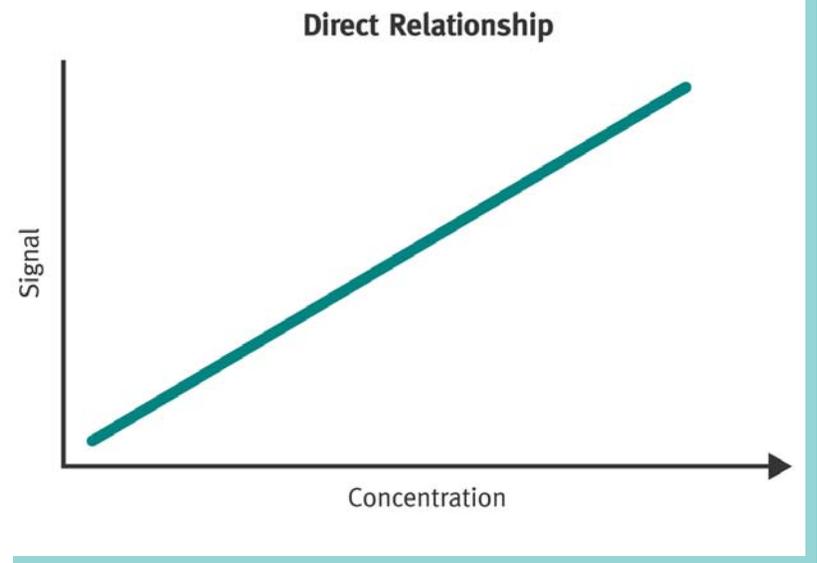


Figura 1-11 La concentración de antígeno es directamente proporcional a la concentración de marca (señal) en los formatos no competitivos



Técnicas de Inmunoensayo Homogéneas y Heterogéneas

- A las técnicas de inmunoensayo que requieren la separación del complejo unido $Ab-Ag^*$ se las conoce como inmunoensayos heterogéneos. Aquellas que no requieren separación se denominan inmunoensayos homogéneos.



Técnicas de Inmunoensayo Homogéneas y Heterogéneas

- Las técnicas homogéneas generalmente se han aplicado a la medición de pequeños analitos como por ejemplo las drogas de abuso y terapéuticas. Debido a que las técnicas homogéneas no requieren la separación de la unión $Ab-Ag^*$ del Ag^* libre, generalmente son más fáciles y más rápidas de realizar.

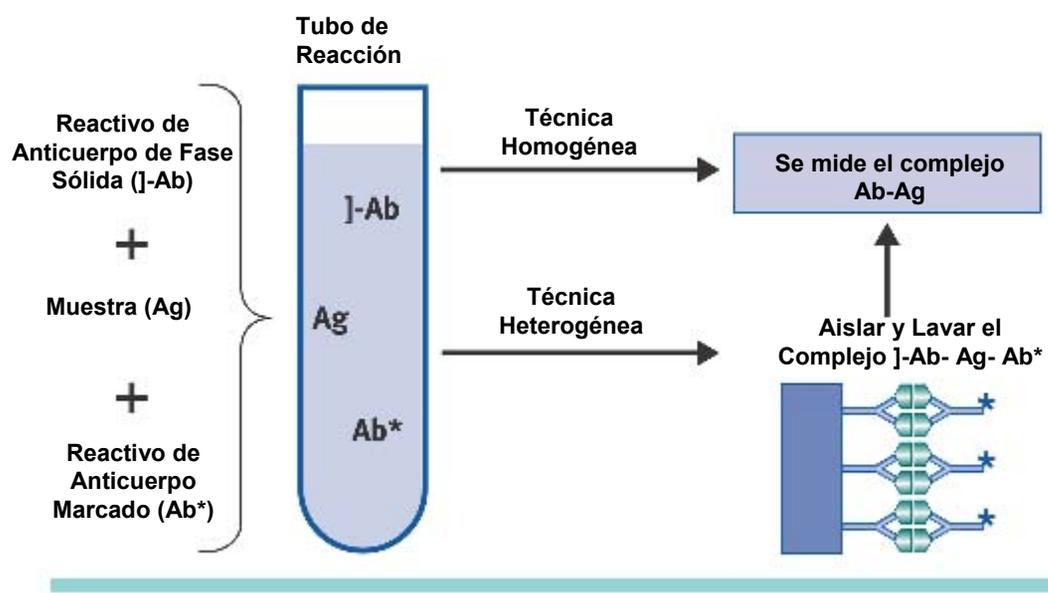


Figura 1-12
Inmunoensayos homogéneos y heterogéneos



Resumen

- **Inmunoensayos** son pruebas que usan complejos de anticuerpo y antígeno (también denominados inmunocomplejos) para medir la presencia de un analito específico en una muestra.
- **Anticuerpos** son proteínas que normalmente produce el sistema inmunológico en respuesta a una sustancia extraña.
- **Antígenos** son las moléculas a las que se unen los anticuerpos, que en el cuerpo podrían ser un agente patógeno invasor, o las moléculas extrañas inyectadas a un animal con el fin de provocar la respuesta inmunológica.
- **Anticuerpos** se componen de dos regiones principales, la región Fab (antígeno específico) y la región Fc.



Resumen

- Las preparaciones de anticuerpo son **antisueros policlonales**, que reconocen múltiples puntos en los antígenos, o **anticuerpos monoclonales**, que reconocen puntos simples en los antígenos.
- En los inmunoensayos, se **marca** el anticuerpo o antígeno con el fin de obtener una **señal** perceptible que corresponda a la concentración del analito.
- Los inmunoensayos pueden ser competitivos o no competitivos. En **los inmunoensayos competitivos**, la concentración de antígeno es inversamente proporcional a la concentración de la señal. En **los inmunoensayos no competitivos**, la concentración de antígeno es directamente proporcional a la concentración de la señal.



Resumen

- **Inmunoensayos homogéneos** no requieren la separación de los complejos no unidos de los complejos unidos y de ahí que sean más rápidos y más fáciles de llevar a cabo que los inmunoensayos heterogéneos.
- **Inmunoensayos heterogéneos** requieren la separación de los complejos no unidos, a menudo utilizando un reactivo de fase sólida como una partícula magnética o una esfera plástica.



Revisión

- Los anticuerpos monoclonales y los anticuerpos policlonales:
 - A. Pueden proveer especificidad y sensibilidad para medir los analitos
 - B. Son inmunoglobulinas
 - C. Se unen al antígeno a través de la región de unión Fab
 - D. Todas las opciones anteriores



Revisión

- Los anticuerpos monoclonales y los anticuerpos policlonales:
 - A. Pueden proveer especificidad y sensibilidad para medir los analitos
 - B. Son inmunoglobulinas
 - C. Se unen al antígeno a través de la región de unión Fab
 - D. Todas las opciones anteriores**



Revisión

- Enumere tres clases de marcas usados en las técnicas de inmunoensayo:

1. _____

2. _____

3. _____



Revisión

- Enumere tres clases de marcas usados en las técnicas de inmunoensayo :
 1. **Enzimas**
 2. **Compuesto radioactivo**
 3. **Compuestos generadores de luz**



Revisión

- Un anticuerpo monoclonal individual se une a varios puntos diferentes (epítopes) en un analito.
 - Verdadero
 - Falso



Revisión

- Un anticuerpo monoclonal individual se une a varios puntos diferentes (epítopes) en un analito.

Verdadero

Falso



Revisión

- En los formatos de inmunoensayos no competitivos, la señal medida es típicamente _____ a la concentración de analito de la muestra.
 - A. Proporcional
 - B. Inversamente proporcional



Revisión

- En los formatos de inmunoensayos no competitivos, la señal medida es típicamente _____ a la concentración de analito de la muestra.

A. Proporcional

B. Inversamente proporcional



Revisión

- ¿Qué técnica de inmunoensayo se prefiere para proporcionar la mayor sensibilidad y la mayor especificidad?
 - A. Competitiva de un paso
 - B. No competitiva de dos pasos
 - C. Competitiva de dos pasos
 - D. No competitiva de un paso

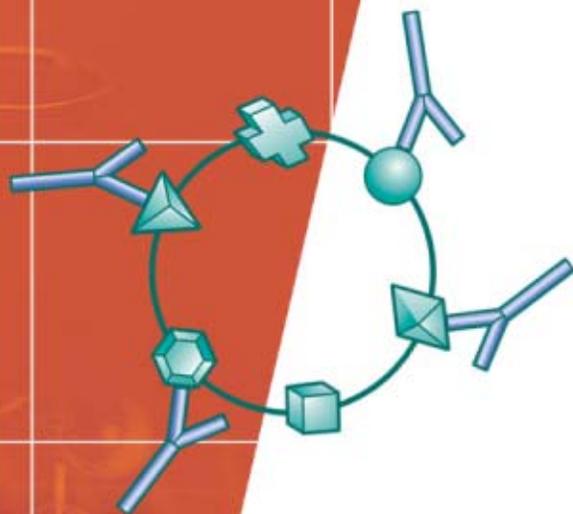


Revisión

- ¿Qué técnica de inmunoensayo se prefiere para proporcionar la mayor sensibilidad y la mayor especificidad?
 - A. Competitiva de un paso
 - B. No competitiva de dos pasos**
 - C. Competitiva de dos pasos
 - D. No competitiva de un paso



Tecnologías de Detección del Inmunoensayo





Tecnologías de Detección del Inmunoensayo

Objetivos del Entrenamiento

- Una vez finalizado este capítulo, usted podrá :
 - Describir las técnicas de RIA, EIA, FPIA, MEIA y CMIA
 - Identificar ensayos que utilizan técnicas



Tecnologías de Detección del Inmunoensayo

Primeras Técnicas de Inmunoensayo: RIA y EIA

- El desarrollo de los inmunoensayos prácticos comenzó en los años '60 con la aplicación de radioinmunoensayos (RIA). RIA utilizan isótopos radioactivos como marca (Figura 2-1), y la concentración de radioactividad medida indica la concentración de analito presente. Recuerde que en el formato sándwich no competitivo, a la izquierda en la Figura 2-1, la concentración de marca tiene relación directa con la concentración de antígeno presente; mientras que en el formato competitivo, a la derecha en la Figura 2-1, la concentración de antígeno tiene relación inversa con la concentración de antígeno.

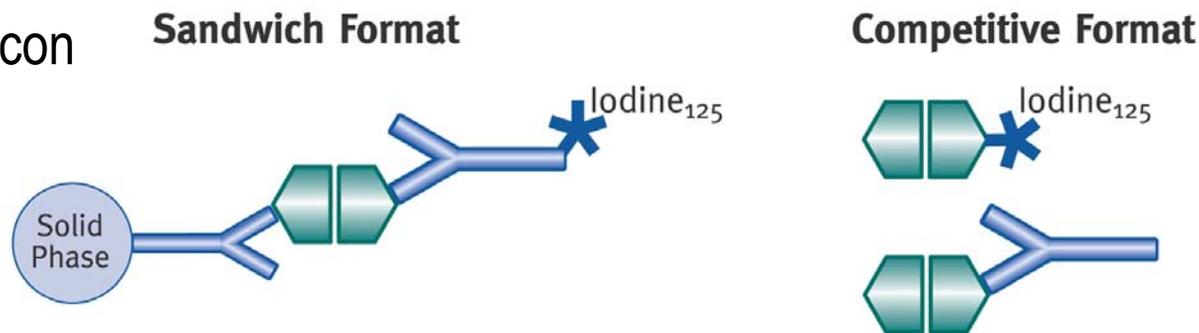


Figura 2-1 Los radioinmunoensayos (RIA) utilizan una marca de isótopo radioactivo



Tecnologías de Detección del Inmunoensayo

- RIA: aún se usan en la actualidad, particularmente para la detección de cantidades muy bajas de analitos. Sin embargo, debido a las complicaciones inherentes al manipuleo y desecho de los materiales radioactivos en el laboratorio clínico, RIA se usa con menos frecuencia que otro tipo diferente de inmunoensayo, denominado inmunoensayo enzimático (EIA).
- En EIA, las marcas de las enzimas se usan en lugar de las marcas radioactivas. Las marcas típicas de enzimas son la fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, y la galactosidasa B. Mientras que RIA usa radioactividad para medir la concentración de analito, EIA típicamente usa un cambio de color, emisión de luz, u otra señal. Se requiere un equipo específico para obtener la concentración de enzimas presentes midiendo el cambio específico que ocurrió.



Tecnologías de Detección del Inmunoensayo

- ELISA, o Enzimo-inmunoensayo, representa una aplicación popular del inmunoensayo sándwich heterogéneo de fase sólida que combina un reactivo marcado enzima-anticuerpo con un anticuerpo unido a una fase sólida. Un ensayo ELISA es un tipo de EIA. Inicialmente, se utilizaban como material de base sólida tanto las placas de microtítulo como las esferas de 1/4 de pulgada. Una placa de microtítulo es simplemente una placa plástica cuadrada con pocillos de poca profundidad recubiertos con un analito.



Tecnologías de Detección del Inmunoensayo

- Hacia fines de la década del '70 y durante los años '80 y '90, se lograron importantes avances en lo que se refiere a la automatización y sensibilidad de los inmunoensayos, y EIA en particular. Las tecnologías de inmunoensayos por polarización de fluorescencia (FPIA) e inmunoensayo por micropartícula (MEIA) representaron a las tecnologías predominantes durante algunos años. Más recientemente, la tecnología del inmunoensayo magnético quimioluminiscente (CMIA) se ha aplicado como rutina debido al significativo aumento de sensibilidad. Cada una de estas técnicas será tratada más detalladamente.



Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia – FPIA

- Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia (FPIA) es un tipo de inmunoensayo homogéneo competitivo por fluorescencia. Con la unión competitiva, el antígeno de una muestra y el reactivo marcado antígeno-fluoresceína (AgF) compiten por los puntos de unión en el anticuerpo. Como inmunoensayo homogéneo, la reacción se lleva a cabo en una solución de reacción simple, y el complejo Ab-AgF no requiere un paso de lavado para separarlo de la marca AgF “libre”.

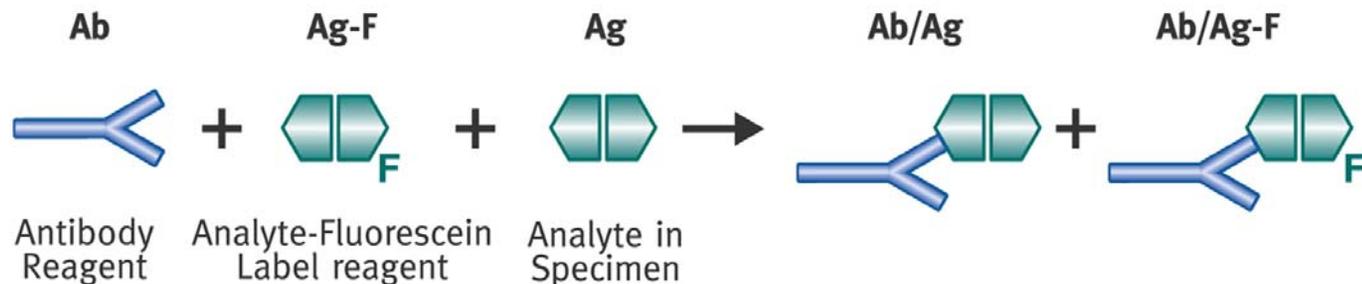


Figura 2-2 Inmunoensayo competitivo por polarización de fluorescencia (FPIA)



Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia – FPIA

- FPIA se utiliza para proporcionar una medición exacta y sensible de pequeños analitos de toxicología como pueden ser las drogas terapéuticas, y las drogas de abuso, toxicología y algunas hormonas. La aplicación de FPIA al sistema TDx[®] de Abbott automatizó en gran medida los inmunoensayos manuales de otros tiempos que requerían mucha mano de obra.
- El reactivo FPIA incluye:
 - **S**: Reactivo para anticuerpo: Antisuero para analito
 - **T**: Indicador radioactivo (Tracer): analito marcado fluoresceína
 - **P**: Detergente para pretratamiento:
facilita la liberación de la droga de las proteínas del suero



Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia – FPIA

- FPIA utiliza tres conceptos claves para medir analitos específicos en un formato homogéneo: fluorescencia, rotación de moléculas en la solución y luz polarizada.
- Fluorescencia: La fluoresceína es una marca fluorescente. Absorbe la energía de la luz a 490nm y libera esta energía a una longitud de onda superior (520nm) como luz fluorescente (Figura 2-3).

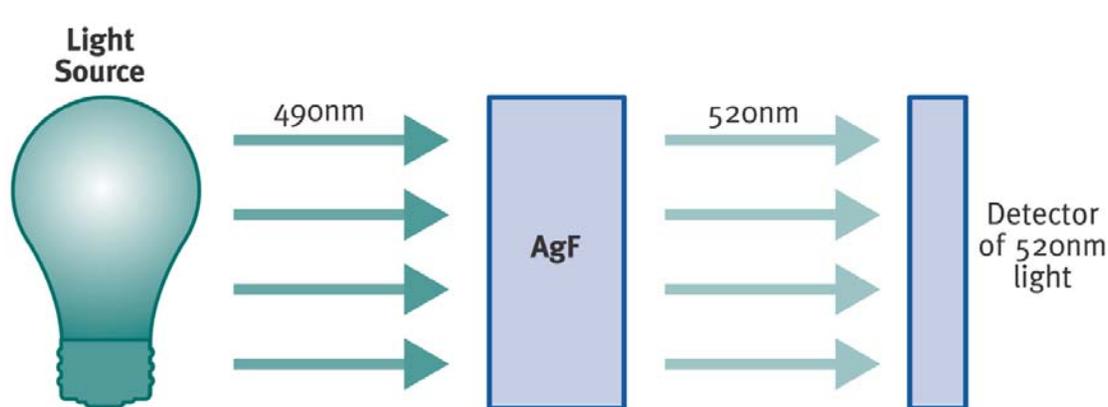


Figura 2-3
Detección de fluorescencia en complejos de conjugado de fluoresceína



Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia – FPIA

- Rotación de Moléculas en la Solución: Las moléculas más grandes rotan más lentamente en la solución que las moléculas más pequeñas. Este principio puede utilizarse para distinguir entre la molécula más pequeña antígeno-fluoresceína: AgF, que rota rápidamente, y los complejos Ab-AgF más grandes, que rotan lentamente en la solución.

Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia – FPIA

- Luz Polarizada: La tecnología de polarización por fluorescencia distingue la marca antígeno-fluoresceína (AgF) del antígeno-fluoresceína (Ab-AgF) unido al anticuerpo por sus diferentes propiedades de polarización por fluorescencia cuando son expuestos a la luz polarizada (Figura 2-4).

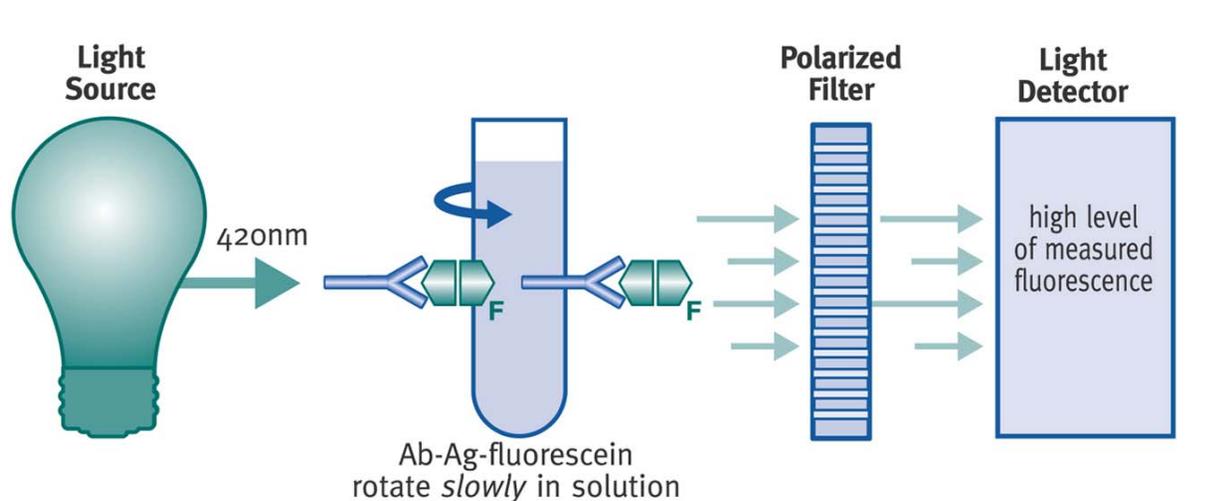


Figura 2-4 Medición de grandes complejos usando fluorescencia, rotación, y luz polarizada en FPIA



Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia – FPIA

- La luz polarizada describe ondas de luz que solamente están presentes en un plano simple del espacio. Cuando la luz polarizada es absorbida por la molécula más pequeña AgF, la AgF tiene la capacidad de rotar su posición en la solución rápidamente antes de que la luz sea emitida como fluorescencia.

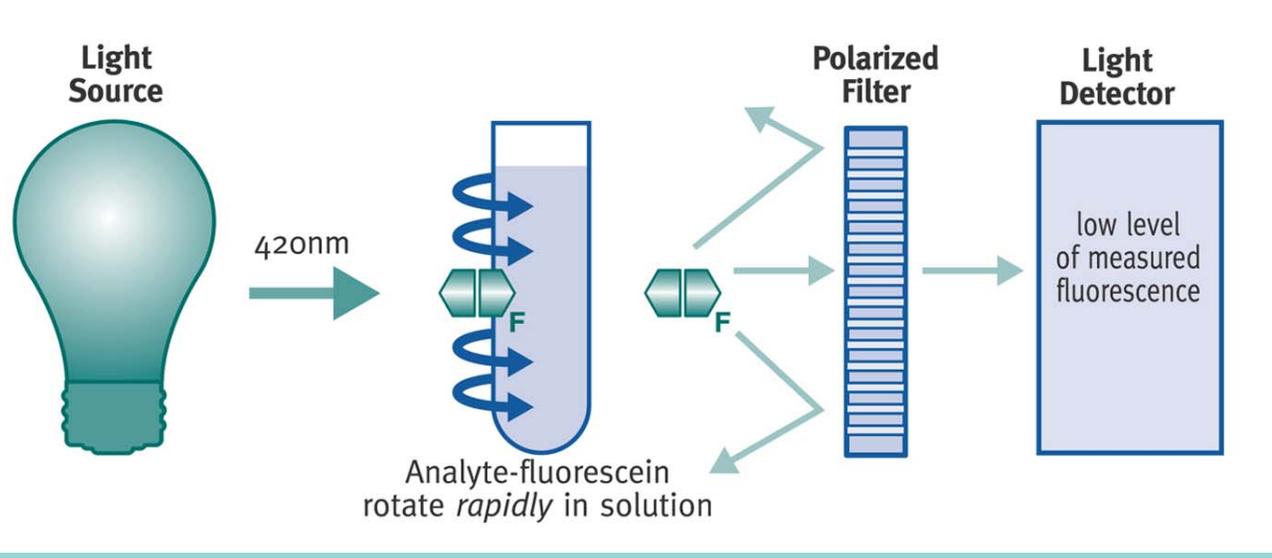


Figura 2-5 Los complejos más pequeños en FPIA dan como resultado una señal de fluorescencia más baja



Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia – FPIA

- La luz emitida se liberará en un plano diferente del espacio de donde fue absorbido y por consiguiente se la denomina luz no polarizada. Con el complejo Ab-AgF de mayor tamaño, la misma luz polarizada absorbida se libera como fluorescencia polarizada ya que cuanto más grande sea el complejo Ab-AgF no rota tan rápidamente en la solución. La luz es liberada en el mismo plano del espacio como energía de la luz absorbida, y el detector puede medirla.



Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia – FPIA

- Los resultados de FPIA se muestran como una curva inversa por cuanto a valores bajos de analito del paciente producen una señal más alta (en este caso, la señal es luz polarizada). Una señal alta a niveles bajos de analitos del paciente dan como resultado un ensayo muy sensible (Figura 2-6).

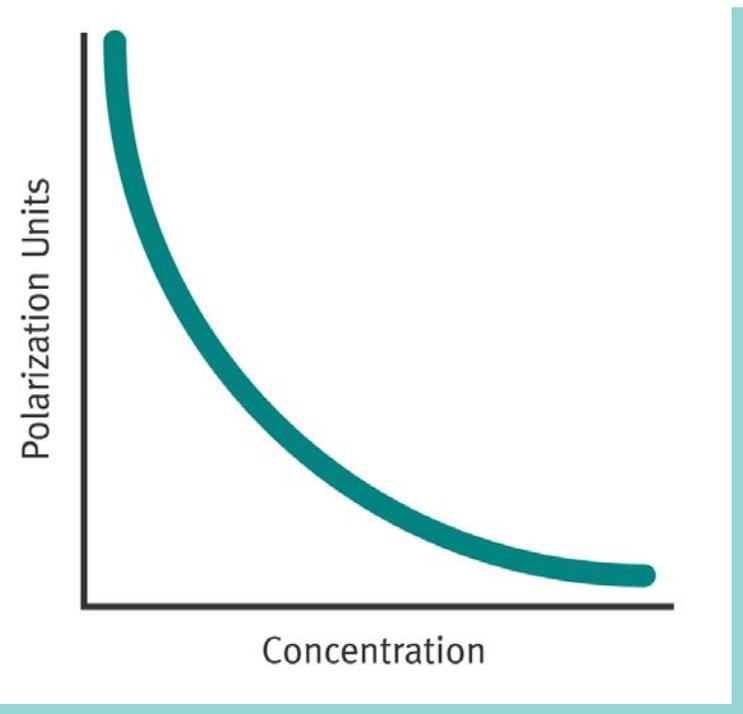


Figura 2-6 FPIA da como resultado una relación inversa inferior entre la señal y la concentración de analito



Inmunoensayo por Micropartícula – MEIA

- El Inmunoensayo por micropartícula (MEIA) es una técnica de inmunoensayo que utiliza el aislamiento de complejos anticuerpo/antígeno en una superficie de fase sólida de pequeñas esferas denominadas micropartículas.
MEIA se ha adaptado ampliamente para automatizar la medición de moléculas grandes como por ejemplo marcadores asociados al análisis cardíaco, de fertilidad, de cáncer, metabólico, de hepatitis, y de tiroides.

Inmunoensayo por Micropartícula – MEIA

- Los componentes de MEIA incluyen ,en suspensión en un buffer específico optimizado para el ensayo, lo siguiente: (Figura 2-7):
 - **Fase Sólida Micropartícula-Anticuerpo** : Micropartículas de látex que están recubiertas con un anticuerpo para unirse al analito específico que está siendo medido
 - **Conjugado Anticuerpo-Enzima**: Enzima Fosfatasa Alcalina unida al anticuerpo
 - **Sustrato de Enzima**: Fosfatasa 4-Metil Umbelliferona Fluorescente (MUP) en solución, la que está disponible para una reacción con la enzima en el anticuerpo.

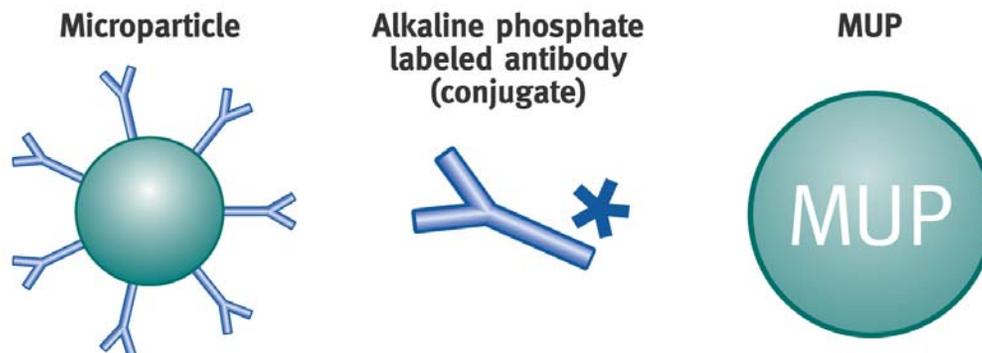
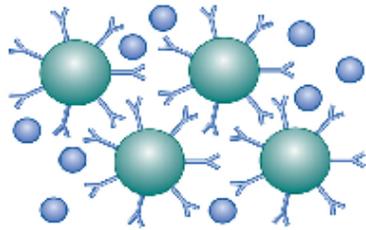


Figura 2-7
Componentes
de MEIA

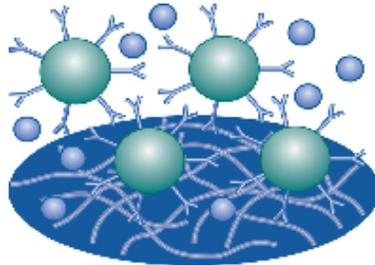


Inmunoensayo por Micropartícula – MEIA

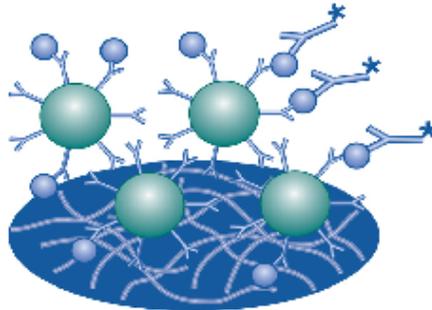
- En la figura 2-8 se puede ver un resumen de la forma en que los componentes trabajan en combinación con la muestra para producir una señal y el correspondiente resultado de la prueba.
- Observe cómo la matriz de fibra de vidrio sirve para fijar los complejos. También note que esta técnica usa un formato no competitivo, de modo que la concentración de analito es directamente proporcional a la concentración de señal.



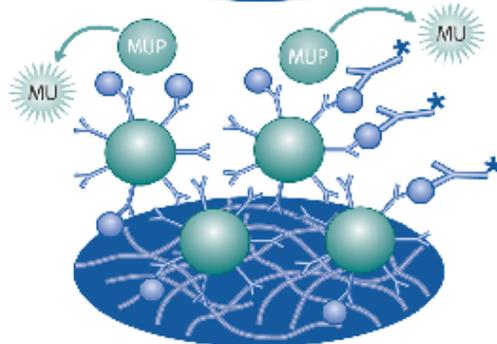
Las micropartículas recubiertas con anticuerpos antianalito y muestra se incuban juntas para formar una mezcla de reacción.



Se transfiere una alícuota de la mezcla de reacción a la matriz de fibra de vidrio.



Se deja que los anticuerpos antianalito marcados con fosfatasa alcalina se unan al complejo de micropartículas.



Se agrega el sustrato Fosfato 4-Metil Umbeliferona (MUP) a la mezcla. Se mide el producto fluorescente, metilumbeliferona (MU).

Figura 2-8
Proceso de la técnica MEIA



Inmunoensayo Magnético Quimioluminiscente – CMIA

- Los compuestos quimioluminiscentes también pueden usarse para marcar analitos. Los compuestos quimioluminiscentes son distintos de los marcados radioactivos, fluorescentes, y enzimáticos. Una marca quimioluminiscente produce luz cuando se lo combina con un reactivo “trigger”. Aunque muchos instrumentos en el laboratorio clínico se basan en la tecnología quimioluminiscente, el tipo específico de marca varía y a menudo está patentado, y por ello puede variar la performance.



Inmunoensayo Magnético Quimioluminiscente CMIA

- En el caso de Abbott ARCHITECT[®] (de Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, Estados Unidos), por ejemplo, la marca es un derivado de acridina patentado. Esta marca produce una alta emisión de luz, y por consiguiente alta sensibilidad (es más fácil medir una gran concentración de luz). El principio químico se ilustra en la Figura 2-9.

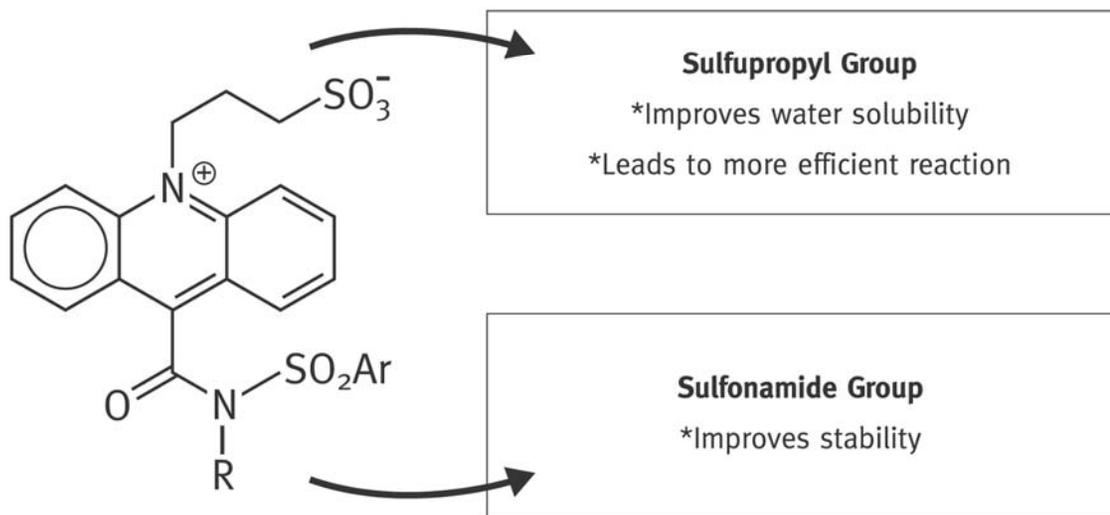


Figura 2-9
marca de
quimioluminiscencia
para CMIA de
Abbott ARCHITECT[™]

Inmunoensayo Magnético Quimioluminiscente – CMIA

- Los pasos de la reacción para ChemiFlex[®] (marca comercial de la versión de CMIA de Abbott) son muy similares a los de MEIA descritos anteriormente, y se los compara en la Figura 2-10. Ambos utilizan la tecnología de ensayo sándwich no competitiva para medir analitos. Recuerde que en estos dos inmunoensayos no competitivos, la concentración de señal medida es directamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra.

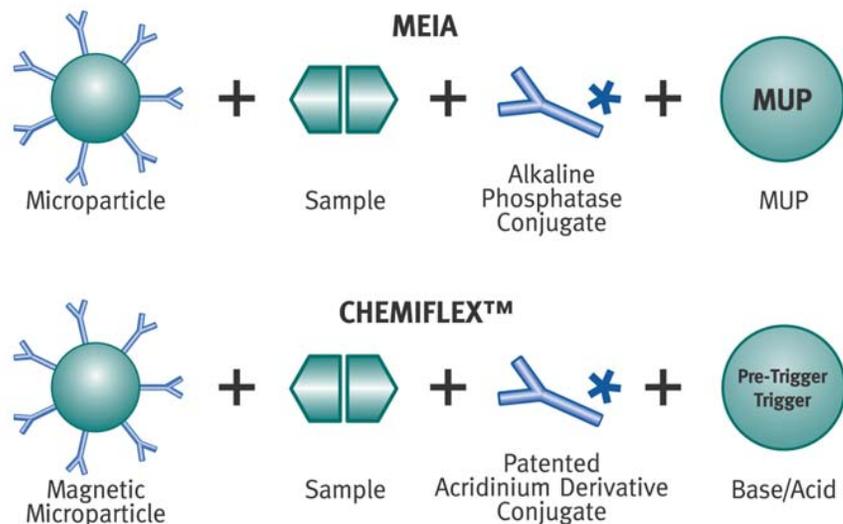


Figura 2-10 Comparación de las técnicas MEIA y CHEMIFLEX™



Inmunoensayo Magnético Quimioluminiscente – CMIA

- Las técnicas de MEIA y CMIA usan micropartículas para fijar anticuerpos, pero existen otras similitudes y diferencias también (Tabla 2-11). La marca, la etapa de separación y la tecnología de medición difieren entre estas dos técnicas.

Tecnología	Fase Sólida	Etapa de Separación	Marca	Tecnología de Detección
MEIA	Micropartícula de Látex	Matriz de Fibra de Vidrio	Enzima Fosfatasa Alcalina	Detector de Fluorescencia
CMIA	Micropartícula Magnética	Imán	Compuesto Quimioluminiscente	Tubo Fotomultiplicador de Quimioluminiscencia

Figura 2-11 Comparación de los pasos en las técnicas MEIA y CMIA



Resumen

- Existen cinco técnicas de inmunoensayo que se resumieron en este capítulo.
 - **Radioinmunoensayo (RIA):** El anticuerpo o el antígeno se marcan con radioactividad, y se usan en un formato no competitivo o competitivo.
 - **Inmunoensayo enzimático (EIA):** El anticuerpo o el antígeno se marcan con una enzima que convierte un sustrato en un producto con una señal resultante que se mide, como por ejemplo cambio de color.



Resumen (cont.)

- **Inmunoensayo por Polarización de Fluorescencia (FPIA):** Típicamente se marca el antígeno con una marca fluorescente y compite con el antígeno sin marcar de la muestra. La rotación relativamente lenta de las moléculas grandes, como también la capacidad de las partículas de movimientos lentos de polarizar la luz se utilizan para obtener una medición del número de partículas grandes de anticuerpo-antígeno-fluoresceína en la solución. En este formato competitivo, la concentración de analito presente es indirectamente proporcional a la concentración de señal medida.
- **Inmunoensayo por Micropartícula (MEIA):** Se cubre una micropartícula de fase sólida con anticuerpos en contra de un antígeno de interés, y se usa para capturar el analito. Se marca el anticuerpo para la detección con un enzima al igual que en EIA. La concentración de analito es proporcional a la cantidad de señal medida. Un formato sándwich no competitivo produce resultados que son directamente proporcionales a la cantidad de analito presente.



Resumen (cont.)

- **Inmunoensayo Magnético Quimioluminiscente (CMIA):**
Una marca quimioluminiscente se conjuga con el anticuerpo o antígeno, y produce luz cuando se lo combina con su sustrato. Esta técnica es muy similar a MEIA, aunque la reacción quimioluminiscente ofrece alta sensibilidad y facilidad para la medición. Un formato sándwich no competitivo produce resultados que son directamente proporcionales a la cantidad de analito presente.



Revisión

- Enumere cuatro tecnologías de detección del inmunoensayo (5 posibles)

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____



Revisión

- Enumere cuatro tecnologías de detección del inmunoensayo (5 posibles)
 1. Radioinmunoensayo
 2. Inmunoensayo enzimático
 3. Inmunoensayo por polarización de fluorescencia
 4. Inmunoensayo por micropartícula
 5. Inmunoensayo magnético quimioluminiscente



Revisión

- En la tecnología FPIA:
 - A. La señal medida es directamente proporcional a la concentración de analito
 - B. La molécula Ag-Fluoresceína rota rápidamente y emite luz polarizada
 - C. Tanto el analito marcado como el analito sin marcar de la muestra compiten por los puntos de unión del anticuerpo
 - D. Todas las opciones anteriores



Revisión

- En la tecnología FPIA:
 - A. La señal medida es directamente proporcional a la concentración de analito
 - B. La molécula Ag-Fluoresceína rota rápidamente y emite luz polarizada
 - C. Tanto el analito marcado como el analito sin marcar de la muestra compiten por los puntos de unión del anticuerpo**
 - D. Todas las opciones anteriores



Revisión

- La tecnología FPIA se aplica usando cuál de las siguientes opciones?:
 - A. Ensayo homogéneo
 - B. Formato no competitivo
 - C. MEIA
 - D. Ensayo heterogéneo



Revisión

- La tecnología FPIA se aplica usando cuál de las siguientes opciones?:

A. Ensayo homogéneo

B. Formato no competitivo

C. MEIA

D. Ensayo heterogéneo



Revisión

- ¿Qué tipo de fase sólida utiliza MEIA?:
 - A. Micropartículas magnéticas
 - B. Placas de microtítulo
 - C. Micropartículas de látex
 - D. Esferas de 1/4 pulgada



Revisión

- ¿Qué tipo de fase sólida utiliza MEIA?:
 - A. Micropartículas magnéticas
 - B. Placas de microtítulo
 - C. Micropartículas de látex**
 - D. Esferas de 1/4 pulgada



Revisión

- ¿Cuál de las siguientes opciones típicamente representa la marca más sensible?
 - A. Quimioluminiscencia
 - B. Enzima
 - C. Fluorescencia
 - D. Micropartícula



Revisión

- ¿Cuál de las siguientes opciones típicamente representa la marca más sensible?

A. Quimioluminiscencia

B. Enzima

C. Fluorescencia

D. Micropartícula



Factores de Impacto en el Rendimiento Analítico del Inmunoensayo

Objetivos del Entrenamiento

- Una vez finalizado este capítulo, usted podrá:
 - Describir la exactitud y la precisión en lo que se refiere a inmunoensayos
 - Discutir el uso de calibradores y controles en estos ensayos
 - Comprender los riesgos potenciales para las pruebas de inmunoensayo, particularmente interferencias del efecto “hook” “en concentraciones elevadas y los anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA)



Factores de Impacto en el Rendimiento Analítico del Inmunoensayo

Introducción

- Los fabricantes de inmunoensayos pasan un tiempo importante determinando qué técnica de inmunoensayo es la más apropiada para un analito específico con el fin de asegurar resultados de calidad superior. En muchas instancias, se modifica una técnica particular, quizás con el agregado de un componente especial del reactivo, para combatir algunos obstáculos comunes y así obtener resultados óptimos.
- A veces estos desafíos se deben a sustancias que interfieren, presentes en la sangre, problemas inherentes a la tecnología de medición y/o a técnicas de laboratorio. Este capítulo tratará la forma en que se optimizan los inmunoensayos para asegurar resultados de alta calidad que dan como resultado un óptimo cuidado del paciente. En este capítulo se trata el impacto de la calibración, material de control, interferencias, y los efectos “hook” en concentraciones elevadas.



Factores de Impacto en el Rendimiento Analítico del Inmunoensayo

Los Inmunoensayos Deben Ser Exactos y Precisos

- La exactitud y la precisión en los inmunoensayos son fundamentales para la utilidad de los mismos (Figura 3-1). Exactitud significa que el ensayo le está dando la respuesta correcta tanto al bioquímico como al médico, y está describiendo la cantidad de analito realmente presente. A menudo se lo ilustra con una flecha dando en el blanco.

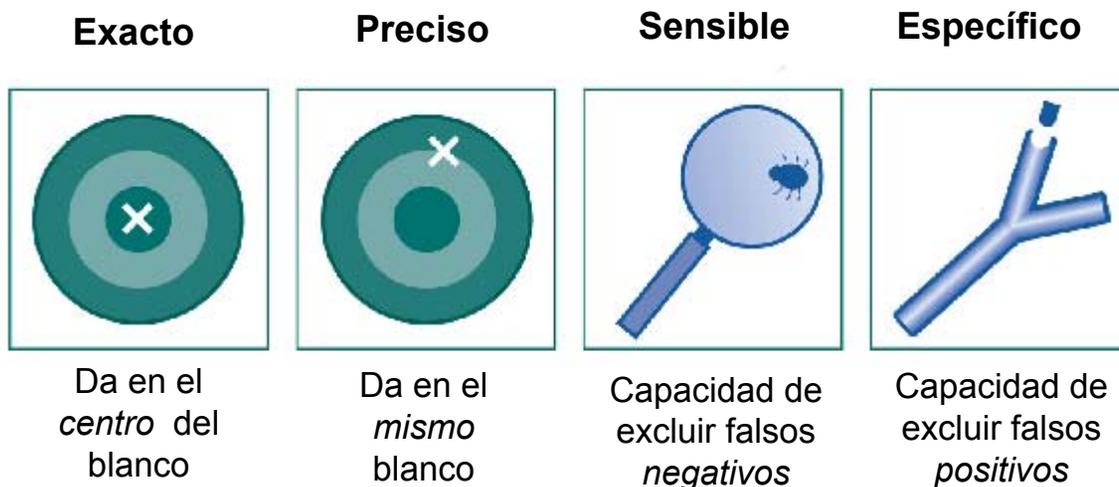


Figura 3-1
Exactitud, precisión, sensibilidad, especificidad en los inmunoensayos



Factores de Impacto en el Rendimiento Analítico del Inmunoensayo

Los Inmunoensayos Deben Ser Exactos y Precisos

- Precisión en los inmunoensayos significa que la combinación de reactivos, analizador, y otros factores de influencia puede proporcionar resultados reproducibles. Puede compararse con la flecha dando en el mismo punto del blanco, una y otra vez, aunque no necesariamente en el centro.
- Exactitud es la capacidad de medir la concentración correcta de analito en una muestra. Los inmunoensayos pueden ser exactos pero imprecisos, precisos pero inexactos, o ambas cosas, exactos y precisos.



Factores de Impacto en el Rendimiento Analítico del Inmunoensayo

- Típicamente se cree que la sensibilidad y la especificidad clínicas son subconjuntos de la exactitud y la precisión. Si un ensayo tiene la capacidad de generar resultados con exactitud y en forma reproducible que no produzcan falsos positivos, entonces se lo considera específico. Un falso positivo significa que un resultado puede indicar erróneamente que existe una cierta condición de un paciente (el resultado “positivo” realmente no identifica a un paciente que es positivo).



Factores de Impacto en el Rendimiento Analítico del Inmunoensayo

- En un análisis de hepatitis, por ejemplo, un falso positivo significa que el ensayo indicó que un paciente es positivo para hepatitis, cuando no lo es. Esto puede ocurrir por muchas razones, pero en la mayoría de los casos se debe a que la metodología del ensayo no puede distinguir entre el analito deseado que se está midiendo y uno que se comporta igual que ese (tal vez comparten estructuras moleculares similares, pero fisiológicamente tienen un efecto diferente sobre el organismo).



Factores de Impacto en el Rendimiento Analítico del Inmunoensayo

- Se considera que un ensayo muestra sensibilidad clínica cuando en forma exacta y reproducible puede asegurar que no ocurren falsos negativos. Volviendo al ejemplo del análisis de hepatitis, el bioquímico no quiere entregarle al médico un resultado que erróneamente indique que un paciente no tiene hepatitis cuando sí la tiene. Si el paciente es realmente positivo para hepatitis, un ensayo con sensibilidad clínica deficiente que no pueda detectar niveles muy bajos de hepatitis (no es lo suficientemente sensible) puede indicar falsamente que el paciente es negativo para hepatitis (no tiene hepatitis).



Calibración y Controles en los Inmunoensayos

Impacto del Calibrador en los Inmunoensayos

- Los calibradores son soluciones con valores conocidos que establecen la relación entre la cantidad de señal producida en el ensayo y la concentración de analito. Al “correr” un set de calibradores, en el software del instrumento se produce una “curva de calibración” (Figura 3-2) (básicamente una curva de respuesta a la concentración como se tratara anteriormente) y se establece una correlación entre ciertos valores de la señal para las concentraciones de analito conocidas.

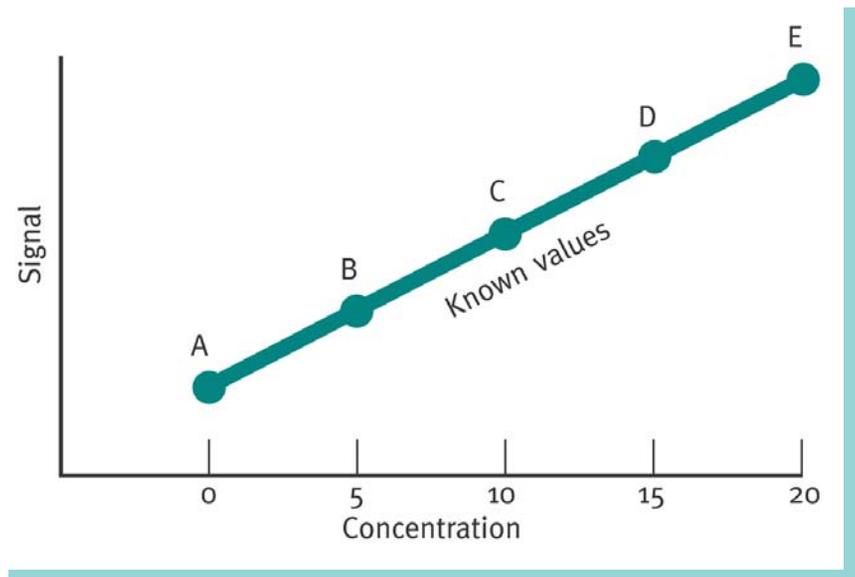


Figura 3-2 Curva de calibración de una muestra



Calibración y Controles en los Inmunoensayos

Impacto del Calibrador en los Inmunoensayos

- Al comparar con esta curva de calibración los niveles de señal producidos por las muestras de un paciente, se puede determinar el valor de concentración de analito de un paciente, o el resultado. Es muy importante que se trate adecuadamente el material de calibración de acuerdo con el inserto de fabricación, y que el criterio de aceptación sea el apropiado, así se puede establecer una correcta curva de calibración.
- Si la calibración no es correcta, los resultados del paciente correspondiente no serán correctos. La mayoría de los aspectos de la calibración están automatizados en los analizadores para inmunoensayos actuales, aunque los calibradores líquidos, refrigerados y listos para usar aseguran menos posibles errores por parte del operador comparados con aquellos que necesitan ser reconstituidos o descongelados manualmente.



Calibración y Controles en los Inmunoensayos

Impacto del Calibrador en los Inmunoensayos

- También es importante que el fabricante elija la matriz correcta para los calibradores. La matriz es el solvente que contiene al analito en el calibrador (o control). Es para asegurar que la respuesta de la señal de la curva de calibración sea idéntica a la señal de las muestras de los pacientes. Las matrices pueden ser a base de suero animal, acuosas, o derivadas de otros materiales.



Impacto del Control en los Inmunoensayos

- Los controles son muestras que contienen concentraciones conocidas de analito. Se utilizan para monitorear la exactitud y la precisión del rendimiento de un ensayo y de un analizador. Si el control se encuentra “dentro del rango”, se supone que el rendimiento de los reactivos y del analizador es correcto y que el análisis del paciente puede comenzar. Es típico hacer un ensayo de los controles en cada corrida, turno o día, dependiendo del analito y/o del analizador y del inserto de fábrica. Típicamente se lleva a cabo el análisis usando una Tabla de Levey Jenning (Figura 3-3).



Impacto del Control en los Inmunoensayos

- Este tipo de gráfico traza los valores del control e indica si se están desarrollando posibles tendencias al respecto. Si los controles tienden a subir o bajar (o por el contrario se comportan de una manera no aceptable), probablemente indica algún problema del reactivo, la calibración, o el analizador que puede estar afectando los resultados de un paciente de una manera similar.

Muchas de las mismas consideraciones que se discutieron anteriormente para Calibración también son relevantes para los controles, como asegurar el mínimo error por parte del operador y usar una matriz base apropiada que sea idéntica a las muestras de los pacientes.

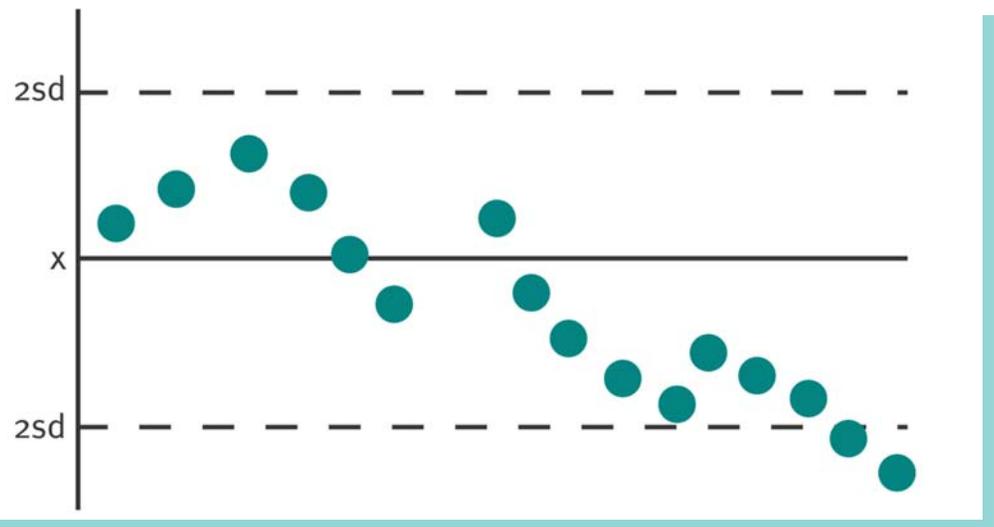


Figura 3-3 Tabla de Levey Jenning para análisis y seguimiento de controles



Interferencias en los Ensayos

- Los inmunoensayos de un paso pueden tener tendencia a las interferencias que afectan tanto la sensibilidad como la especificidad. En la mayoría de los casos las interferencias se deben a agentes que interfieren en la unión de anticuerpos con antígenos por varias razones.



Interferencias en los Ensayos

- En este capítulo, nos ocuparemos de las interferencias que se deben al efecto “hook” en concentraciones elevadas y a anticuerpos humanos anti-ratón. En general, es más probable que los ensayos en secuencia (de dos pasos) proporcionen resultados exactos eliminando la contribución adversa de las proteínas de unión, sustancias endógenas de interferencia y efectos generales de la matriz, debido al paso extra de lavado (Figura 3-4).

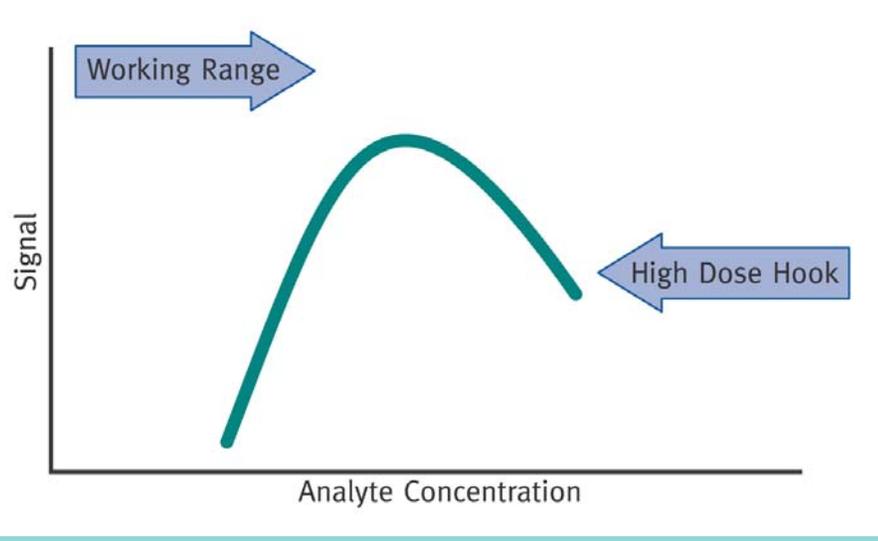


Figura 3-4
Efecto hook en concentraciones elevadas



Efecto “Hook” en Concentraciones Elevadas : Exceso de Antígeno (Fenómeno Prozona)

- La posibilidad de que exista un efecto “hook” en concentraciones elevadas es un fenómeno inherente a los diseños de los ensayos “sándwich” de un paso. Las concentraciones muy elevadas de antígeno en la muestra del paciente se unen a todos los sitios disponibles saturándolos, tanto en el **anticuerpo- fase sólida** como en el **anticuerpo- conjugado** marcado y así evitar la formación “sándwich”.
- Bajo estas condiciones, el nivel medido de analito puede ser significativamente más bajo que el nivel real presente en la muestra. El efecto “hook” en concentraciones elevadas se refiere al “gancho” que se observa en la curva de respuesta a la concentración cuando la información se traza como una señal versus la concentración de analito (Figura 3-4). Este efecto “hook” en concentraciones elevadas también se denomina efecto prozona.



Anticuerpos Humanos Anti-Ratón (HAMA)

- Otra forma de interferencia en los inmunoensayos es la presencia de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA). Estos anticuerpos pueden estar presentes en la sangre humana como consecuencia de la respuesta inmunológica del cuerpo al estar expuesto a antígenos de ratón.
- Existen varias razones para que un sistema inmunológico humano produzca anticuerpos para “combatir” antígenos invasores que derivan de la exposición a ratones. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales del ratón se usan en algunos tratamientos para el cáncer. Un sistema inmunológico humano también puede producir una respuesta a los ratones si el paciente está en contacto con ellos. También es común la exposición ambiental a los ratones.



Anticuerpos Humanos Anti-Ratón (HAMA)

- Las muestras de pacientes que contienen HAMA pueden producir resultados falsamente elevados (falso positivo) o reprimidos (falso negativo) en los inmunoensayos que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón. Los ensayos sándwich por lo general son los más susceptibles a la interferencia HAMA.

Para evitar los efectos prozone (efectos “hook” en concentraciones elevadas), se pueden diseñar los ensayos usando un formato de ensayo de dos pasos, el cual usa pasos de lavado para eliminar el exceso de antígeno.



Anticuerpos Humanos Anti-Ratón (HAMA)

- Falsos Positivos Debidos a HAMA: En el caso de falsos positivos, se forma un ensayo sándwich y así se produce la señal, aunque no haya presente analito del paciente (Figura 3-5). HAMA se une tanto al anticuerpo de captura de fase sólida como al reactivo de anticuerpo marcado. Por lo tanto parece como si el analito estuviese presente en la muestra del paciente, causando el complejo.

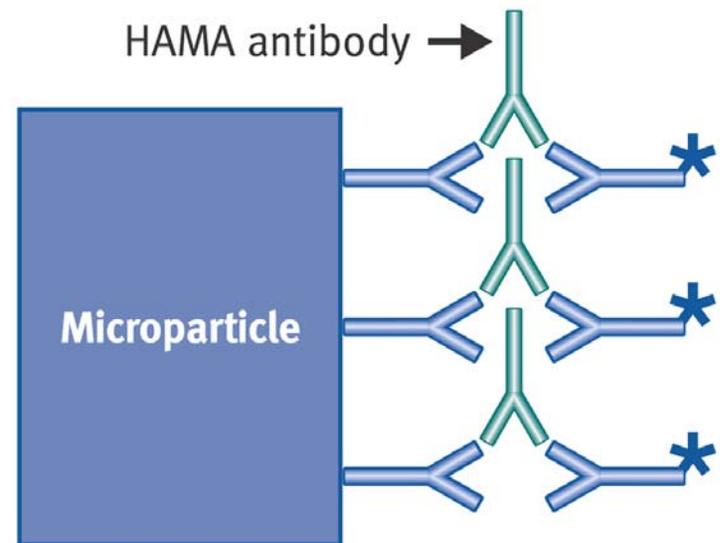


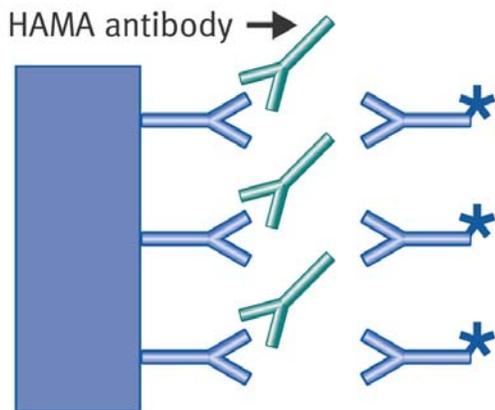
Figura 3-5 Cómo HAMA genera un falso positivo



Anticuerpos Humanos Anti-Ratón (HAMA)

- Falsos Negativos Debidos a HAMA: HAMA puede provocar resultados del ensayo falsos negativos por medio de dos mecanismos: uniéndose y bloqueando al anticuerpo de captura de fase sólida, o uniéndose y bloqueando al reactivo de anticuerpo marcado.

Capture antibody is blocked



Detection antibody is blocked

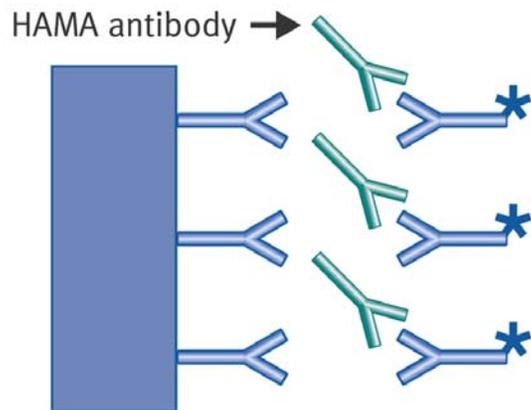


Figura 3-6
Cómo HAMA genera un falso negativo



Anticuerpos Humanos Anti-Ratón (HAMA)

- Los fabricantes utilizan varias técnicas para minimizar el impacto de HAMA incluyendo:
 - Diseño real de dos pasos para eliminar las interferencias
 - Bloqueadores para reducir o eliminar las interferencias ocupando los puntos de unión en los anticuerpos HAMA.

Los bloqueadores son únicos para la formulación de cada ensayo y algunos ejemplos pueden ser detergentes, proteínas depuradas y suero animal.



Resumen

- **Exactitud** significa que el ensayo está dando la respuesta correcta, midiendo la cantidad de analito realmente presente en la muestra.
- **Precisión** significa que el ensayo mide la cantidad de analito de una manera reproducible cada vez.
- **Sensibilidad clínica y especificidad clínica** se refieren a la capacidad del ensayo de generar resultados exactos y reproducibles que minimicen la cantidad de falsos positivos y falsos negativos que ocurran.
- **Calibradores** son muestras de concentración conocida usados para establecer los parámetros del analizador o instrumentos.



Resumen

- **Controles** son muestras de concentración conocida que se usan para monitorear la exactitud y la precisión de un analizador y un ensayo.
- **El efecto “hook” en concentraciones elevadas**, también denominado efecto prozona es un tipo de interferencia que puede reducir la exactitud y la precisión de los inmunoensayos. Bajo condiciones de exceso de antígeno, el ensayo lee una concentración de antígeno inferior a la que realmente se encuentra presente.



Resumen

- Otro tipo de interferencia se debe a la presencia de **anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA)** que pueden estar presentes en el suero de pacientes que hayan sido tratados con anticuerpos de ratón para alguna terapia, o se hayan expuesto a ratones de alguna otra manera.
- **Los inmunoensayos de dos pasos** pueden reducir la interferencia de un efecto “hook” en **concentraciones elevadas** o la presencia de anticuerpos **HAMA**.



Revisión

- La capacidad de un ensayo de dar en forma reproducible con una concentración fijada se denomina:
 - A. Especificidad
 - B. Sensibilidad
 - C. Precisión
 - D. Exactitud



Revisión

- La capacidad de un ensayo de dar en forma reproducible con una concentración fijada se denomina:
 - A. Especificidad
 - B. Sensibilidad
 - C. Precisión**
 - D. Exactitud



Revisión

- Con cuál de las siguientes opciones puede eliminarse la interferencia de “efecto hook” por exceso de antígeno?:
 - A. Metodología de inmunoensayo de dos pasos
 - B. Metodología de inmunoensayo de un paso
 - C. Disminución del reactivo de anticuerpo
 - D. Disminución del reactivo de soporte sólido



Revisión

- Con cuál de las siguientes opciones puede eliminarse la interferencia de “efecto hook” por exceso de antígeno?:

- A. Metodología de inmunoensayo de dos pasos**
- B. Metodología de inmunoensayo de un paso
- C. Disminución del reactivo de anticuerpo
- D. Disminución del reactivo de soporte sólido



Revisión

- La interferencia de HAMA puede eliminarse metodologías de inmunoensayo de dos pasos.
 - Verdadero
 - Falso



Revisión

- La interferencia de HAMA puede eliminarse metodologías de inmunoensayo de dos pasos.

Verdadero

Falso



Revisión

- Los anticuerpos HAMA se producen como resultado de:
 - A. Exposición del paciente a ratones o a proteínas de ratón
 - B. Contaminación de la muestra con proteínas de ratón
 - C. Inmunización
 - D. Alergias a los alimentos



Revisión

- Los anticuerpos HAMA se producen como resultado de :
 - A. Exposición del paciente a ratones o a proteínas de ratón**
 - B. Contaminación de la muestra con proteínas de ratón
 - C. Inmunización
 - D. Alergias a los alimentos



Revisión

- Los calibradores son muestras de individuos que se sabe que están dentro del rango normal usados para verificar el funcionamiento del instrumento.
 - Verdadero
 - Falso



Revisión

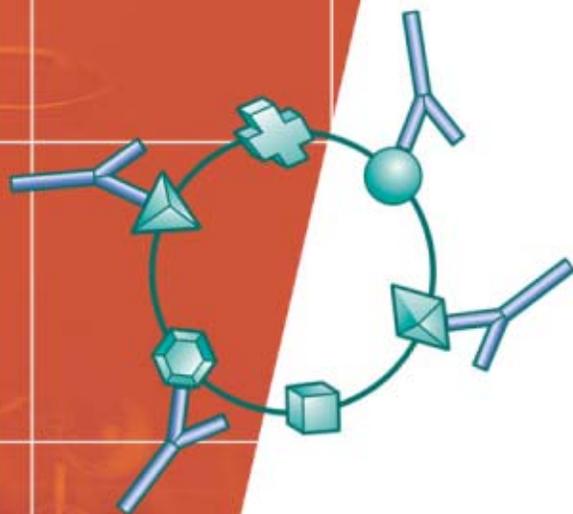
- Los calibradores son muestras de individuos que se sabe que están dentro del rango normal usados para verificar el funcionamiento del instrumento.

Verdadero

Falso



Ejemplos de Pruebas que Utilizan Inmunoensayos





Ejemplos de Pruebas que Utilizan Inmunoensayos

Objetivos del Entrenamiento

- Una vez finalizado este capítulo, usted podrá :
 - Nombrar varias clases de pruebas que utilizan tecnología de inmunoensayo.
 - Describir el uso de pruebas especializadas para hormonas endocrinas, daño cardiovascular, antígenos de hepatitis, y antígenos tumorales.²

² El auspiciante de esta Guía educativa, Abbott Laboratories, no hace representaciones de este u otros productos dentro o fuera de los Estados Unidos.



Ejemplos de Pruebas que Utilizan Inmunoensayos

Introducción

- Al concluir los capítulos uno al tres de esta Guía de Entrenamiento, usted habrá aprendido varias tecnologías y técnicas utilizadas en la aplicación de inmunoensayos.
El presente capítulo tratará sobre la aplicación de estas distintas técnicas de inmunoensayo para pruebas de laboratorio específicas. Existen cuatro clases principales de inmunoensayos especializados que serán tratados: hormonas endocrinas, marcadores cardíacos, antígenos de hepatitis y antígenos tumorales.



Ejemplos de Pruebas que Utilizan Inmunoensayos

Tipos de Pruebas Especializadas – Hormonas Endocrinas

- Las hormonas generalmente son producidas en glándulas endocrinas específicas y se transportan a las células a través del sistema circulatorio. Los ejemplos de glándulas endocrinas incluyen hipotálamo, lóbulo pituitario anterior, glándula tiroidea, ovario, testículo, corteza suprarrenal, placenta, y páncreas. Las hormonas juegan varios roles para mantener el funcionamiento normal del cuerpo y medir los niveles de estas hormonas puede ser crucial para diagnosticar una enfermedad o para monitorear el tratamiento. Varias hormonas claves se miden típicamente a través de la tecnología de inmunoensayo (ver Tabla 4-1).



Hormona	Categoría de Análisis	Punto Primario de Acción	Función
Tirotrófina (TSH)	Tiroides	Glándula Tiroidea	Estimulación de la secreción de la hormona tiroidea
Tiroxina (T4) y Triyodotironina (T3)	Tiroides	Tejido Corporal General	Estimulación del consumo de oxígeno y de la tasa del metabolismo del tejido
Tiroxina Libre (fT4) y Triyodotironina Libre (fT3)	Tiroides	Tejido Corporal General	Formas libres de las hormonas tiroideas que se encuentran en el suero, no unidas a otras proteínas, de ahí, "libre"; se cree que son la medida más exacta del estado tiroideo.
Cortisol	Metabólico	Tejido Corporal General	Metabolismo de hidratos de carbono, proteínas, y grasas
Hormona Foliculoestimulante (FSH)	Fertilidad	Ovarios, Testículos	Crecimiento de folículos y secreción de estrógeno, y ovulación
Hormona Luteinizante (LH)	Fertilidad	Ovarios, Testículos	Ovulación, secreción de progesterona
Prolactina	Fertilidad	Glándula Mamaria	Crecimiento de la glándula mamaria, iniciación de la producción de leche
Estrógeno	Fertilidad	Órganos Sexuales Femeninos. Auxiliar.	Desarrollo de características sexuales secundarias
Progesterona	Fertilidad	Estructura Reproductiva Femenina. Auxiliar.	Preparación del útero para la implantación del óvulo, mantenimiento del embarazo
Testosterona	Fertilidad	Órgano Sexual Masculino. Auxiliar.	Desarrollo de características sexuales secundarias
Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG)	Embarazo/ Fertilidad	Ovarios, Testículos	Mantenimiento de la función del cuerpo lúteo, ovulación, secreción de progesterona

Tabla 4-1 Hormonas Endocrinas Medidas a través del Inmunoensayo



Indicadores de Lesión Cardiovascular

- El análisis de inmunoensayo es de gran ayuda para evaluar el daño cardíaco durante o después de un infarto de miocardio (o ataque al corazón). A menudo se llevan a cabo análisis de inmunoensayo para proteínas específicas liberadas durante y después de un ataque cardíaco, para un diagnóstico y monitoreo de la condición del corazón. Tales marcadores incluyen troponina, mioglobina, CK-MB, y más recientemente Péptido Natriurético del tipo B y Proteína Reactiva C de alta sensibilidad (hsCRP). Los marcadores se enumeran en la Tabla 4-2.



Marcador de Lesión Cardíaca	Descripción	Cómo se Correlacionan los Niveles con la Lesión Cardiovascular
Troponina-I	Proteína que se libera de las células musculares muertas o dañadas del corazón	Los niveles aumentan a las 4 horas después del infarto de miocardio; solo o mejor aún cuando se lo combina con pruebas para CK-MB (ver abajo), es un análisis de diagnóstico muy confiable; permanece elevado hasta 8 días posteriores a la lesión.
Mioglobina	Proteína que se encuentra en el corazón y otros músculos, importante para transportar el oxígeno a las células musculares	Se libera ante el daño de algún músculo; los niveles aumentan a las 2 horas después del infarto de miocardio; los niveles vuelven a los rangos de referencia a las 24 horas aproximadamente; se lo considera un análisis de diagnóstico prematuro muy sensible, especialmente junto con otros marcadores de infarto de miocardio.
Creatinine Kinase-MB (CK-MB)	Una forma de la enzima que se encuentra principalmente en los músculos del corazón y que se libera ante algún daño	Los niveles aumentan a las 4 o 6 horas después del infarto de miocardio; los inmunoensayos rápidos son útiles para los diagnósticos de emergencia; se lo considera una prueba estándar en el diagnóstico de infarto de miocardio.
Péptido Natriurético del tipo B (BNP)	Hormona de la proteína que se libera del ventrículo izquierdo del corazón cuando está dañado	Los niveles elevados indican lesión o stress en el ventrículo izquierdo del corazón, lo que incluye infarto de miocardio, hipotensión (presión sanguínea baja), o stress del músculo ventricular por la acumulación de sangre y fluido como en un ataque cardíaco congestivo.
CRP de Alta Sensibilidad (hsCRP)	Proteína liberada en el suero en respuesta a una lesión, infección, e inflamación	Puede ser útil para predecir riesgo de otro infarto de miocardio, en el caso de que ya haya ocurrido uno; sin embargo, deben considerarse múltiples “disparadores” para la producción de CRP al interpretar los resultados.

Tabla 4-2 Marcadores de Daño Cardiovascular



Hepatitis

- La hepatitis es la inflamación del hígado, y pueden causarla virus, bacterias, fármacos, toxinas o la ingestión excesiva de alcohol. En parte, debido al desarrollo de los inmunoensayos, se han identificado cinco virus distintos que causan hepatitis: Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis D, y Hepatitis E. Cada virus puede ser individualizado usando técnicas de inmunoensayo (ver Tabla 4-3).



Familia del Virus	Vías de Transmisión	Aparición	Incubación	Mortalidad
Virus de la Hepatitis A (HAV): Picornaviridae; enterovirus pequeño, ARN de una sola hebra	Vía Fecal Oral	Generalmente abrupto	15 – 45 días	Alrededor del 0.3%
Virus de la Hepatitis B (HBV): Hepadnaviridae; virus ADN de cadena doble parcialmente	Agujas contaminadas, transfusiones con sangre no analizada, tatuajes, contacto sexual	Generalmente insidioso	Promedio de 60 – 90 días Extensión 45 – 180 días	0.5 – 1.0%
Virus de la Hepatitis C (HCV): Flaviviridae; virus ARN de una sola hebra	Similar a HBV	Insidioso	2 – 26 semanas	0.2 – 0.4%; proceso crónico a menudo sin síntomas que puede producir cirrosis hasta en un 30% de los pacientes infectados
Virus de la Hepatitis D (HDV): virus ARN de una sola hebra	Similar a HBV	Generalmente abrupto	21 – 90 días	2 – 20% con coinfección, hasta un 30% con sobreinfección
Virus de la Hepatitis E (HEV): Apariencia de calicivirus; virus ARN de una sola hebra	Ingestión de agua contaminada, higiene personal deficiente	Generalmente abrupto	Promedio de 40 días Extensión 15 – 60 días	Alrededor del 1 – 2%, 15 – 20% en mujeres embarazadas

Table 4-3 Tipos de Hepatitis detectados por Inmonoensayos



Hepatitis

- Todos los tipos de hepatitis virales afectan las células hepáticas. Los individuos infectados con un virus de hepatitis tienden a padecer síntomas generalizados, que en la primera etapa son similares a la gripe. Los síntomas incluyen fatiga, dolor muscular/articular, pérdida del apetito, náuseas, diarrea, fiebre e ictericia.
- Debido a que los síntomas no son específicos, se requieren inmunoensayos para distinguir entre los virus específicos. Las pruebas de hepatitis se utilizan tanto para “screening” como para monitoreo. Por favor consulte la Guía de Entrenamiento sobre Hepatitis de Abbott Diagnóstico para obtener más detalles.



Marcadores Tumoraes

- Las células tumorales pueden producir proteínas que se detectan en suero por medio del inmunoensayo, y estas proteínas se conocen como marcadores tumorales. Los marcadores tumorales generalmente son específicos para un cierto tipo de cáncer. La medición de los marcadores tumorales puede ser útil para el diagnóstico y monitoreo de diferentes tipos de cáncer, y estas pruebas pueden usarse para detectar cáncer y monitorear la progresión del tratamiento (ver Tabla 4-4).



Clases	Ejemplo	Localizaciones del Cáncer
Hormonas	Gonadotropina Coriónica Humana (hGC)	Testicular, Mama, Tracto GI , Pulmón, Ovario
Antígenos Oncofetales	Alfafetoproteína (AFP)	Test Síndrome de Down, Estómago. Esófago, Ovario
	Antígeno Carcinoembrionario (CEA)	Colon rectal, Tracto GI , Pulmón, Mama
	Antígeno Prostático Específico (PSA)	Próstata
Marcadores de Carbohidratos	CA 15-3, CA 549, CA 27-29	Cáncer de Mama
	Ca 125	Carcinoma de Ovario y Endometrio
Antígenos del Grupo Sanguíneo	CA 19-9	Páncreas, Tracto GI
	Ca 50	Páncreas, Tracto GI
	Ca 72-4	Ovario, Tracto GI
	CA 242	Páncreas, Tracto GI
Proteínas	Monoclonal IgA, Monoclonal IgG	Mieloma Múltiple
	Monoclonal IgM, B2-Microglobulina	Macroglobulinemia Waldenstrom

Tabla 4-4 Marcadores Tumorales Detectados por inmunoensayo

Nota: no todos los inmunoensayos del mercado están aprobados por normas gubernamentales para todas las indicaciones mencionadas arriba.



Marcadores Tumorales

- Idealmente, los marcadores tumorales serían 1) específicos para el órgano objetivo, y 2) producidos en una concentración lo suficientemente grande como para ser detectados con exactitud en pacientes con cáncer pero no en una población normal. Desafortunadamente, con la posible excepción de PSA (marcador común usado para indicar la presencia de cáncer de próstata), rara vez se logran ambas características.
- Por lo tanto, en la práctica clínica, los marcadores tumorales se usan más como ayuda en el diagnóstico en combinación con otras pruebas de diagnóstico (p. ej., MRI), y para monitorear la progresión de la enfermedad después de su detección y tratamiento.



Marcadores Tumorales

- El porcentaje y la magnitud de la reducción de los marcadores tumorales se usa para evaluar la eficacia del tratamiento. Después del tratamiento, el marcador tumoral debería reflejar si aquel ha sido exitoso.
Un descenso del nivel del marcador tumoral reflejaría una respuesta positiva al tratamiento mientras que un mínimo cambio en el nivel del marcador tumoral reflejaría una respuesta pobre al tratamiento.
- Si el tratamiento es exitoso, entonces una vez que el nivel del marcador tumoral se ha estabilizado en un nuevo nivel inferior, las mediciones de seguimiento del marcador programadas en forma regular son de ayuda para determinar la estabilidad de la enfermedad.



Pruebas Congénitas

- También se encuentran disponibles los inmunoensayos que miden ciertos agentes infecciosos que son especialmente perjudiciales si un feto está expuesto. Estos ayudan a diagnosticar proactivamente alguna infección de la paciente y a prevenir un daño en ella o en el feto (Tabla 4-5).

Prueba	Factor que se Mide	Condición Médica que Puede ser Causa de la Infección
Rub IgG y Rub IgM	Anticuerpos IgG o IgM para Rubeola	Causa una erupción que generalmente es leve en niños y adultos; la infección durante el embarazo puede ser perjudicial para el feto y provocar aborto, muerte, y deficiencias de nacimiento
Toxo G y Toxo M	Anticuerpos IgG o IgM para Toxoplasmosis	Defectos del sistema nervioso central, especialmente si la infección tiene lugar en el primer trimestre del embarazo; causa principal de muerte en paciente con SIDA
CMV G y CMV M	Anticuerpos IgG o IgM para Citomegalovirus	Neumonía intersticial, mononucleosis, deficiencias congénitas de nacimiento, aborto, retraso mental, ceguera y sordera

Tabla 4-5 Pruebas para Factores Congénitos



Pruebas Congénitas

- Las pruebas para exposición a la Rubeola, Toxoplasmosis, y CMV son de especial importancia para el “screening” de embarazadas y gente con inmunosupresión. Los recién nacidos, pacientes con SIDA, pacientes con cáncer, y quienes hayan recibido un transplante de órgano son susceptibles de enfermarse si se exponen a estas enfermedades, mientras que las personas con sistemas inmunológicos normales luchan contra las infecciones en forma exitosa. Los recién nacidos pueden padecer alguna infección si sus madres están expuestas durante el embarazo.



Pruebas Congénitas

- Existen pruebas para detectar anticuerpos IgM e IgG que son específicos para virus particulares en los pacientes. Si un paciente es positivo en anticuerpos IgM, recientemente ha estado expuesto al virus y se encuentra preparando una pronta respuesta inmunológica. Si un paciente es positivo en anticuerpos IgG, estuvo expuesto por lo menos varios meses antes de la prueba, y puede ser un infectado crónico.
- El tipo de anticuerpo que se encuentra en los recién nacidos también puede ayudar al médico a descubrir si el infante adquirió en forma pasiva anticuerpos de la madre, o si él se infectó con el virus. Estas pruebas proporcionan información importante acerca de infecciones actuales y pasadas en poblaciones susceptibles.



Pruebas Metabólicas

- Los inmunoensayos también están disponibles para una amplia variedad de indicadores de funciones metabólicas y deficiencias nutricionales. Las deficiencias específicas pueden surgir como resultado de dietas inadecuadas, o como indicio de alguna enfermedad fisiológica, como la anemia. Existen múltiples formas de anemia que requieren un cuidadoso diagnóstico y tratamiento. Algunos ejemplos de estos tipos de pruebas y sus indicaciones se detallan en la Tabla 4-6.



Pruebas Metabólicas

Prueba	Factor que se Mide	Condición Médica que Puede ser Causada por una Infección
Ferritina	Proteína que almacena hierro para ser usado posteriormente por múltiples tejidos del cuerpo	Los niveles de ferritina en suero se correlacionan con la cantidad de hierro almacenado; niveles bajos indican anemia o dieta deficiente
Vitamina B12	Vitamina, cobalamina, que ayuda a formar glóbulos rojos que llevan oxígeno a los tejidos del cuerpo	Las deficiencias pueden causar anemia macrocítica, enfermedades neurológicas, y pueden ser un indicio de enfermedades autoinmunes y otros desórdenes del tracto digestivo
Folato	Vitamina que es cofactor en diversas rutas metabólicas	Las deficiencias durante el embarazo pueden causar defectos de nacimiento en la columna vertebral; la deficiencia de la vitamina B12 y del folato pueden llevar a una anemia megaloblástica

Tabla 4-6 Pruebas para Factores Metabólicos



Otras Pruebas y Tecnologías de Inmunoensayo

- Muchos otros analitos se analizan usando inmunoensayos. Un ejemplo es el uso de ensayos turbidimétricos para las pruebas de proteínas específicas en analizadores de química clínica. Los inmunoensayos también se usan para analizar los niveles de drogas terapéuticas en suero, lo que puede ser de utilidad para asegurar la dosis adecuada de medicamentos para un paciente individual.
Las pruebas para drogas de abuso son otra aplicación de los inmunoensayos.



Resumen

- Este capítulo se centró en ejemplos de inmunoensayos comúnmente usados en el entorno clínico. Se describieron seis categorías de pruebas.
 - **Hormonas Endócrinas:** Entre los ensayos para una variedad de hormonas tiroideas, de fertilidad, y de embarazo se incluyen las pruebas para tirotrófina, hormona foliculoestimulante, testosterona, y otras.
 - **Indicadores de Daño Cardiovascular:** Los ensayos para las proteínas liberadas por el músculo dañado del corazón tras un ataque cardíaco son útiles para el diagnóstico y tratamiento de esta condición. Entre las pruebas se incluyen aquellas para medir troponina, mioglobina, Creatinine Kinase-MB, Péptido Natriurético del tipo B , y otros marcadores cardíacos.
 - **Antígenos de Hepatitis:** Los ensayos para cada una de las cinco cepas de virus de Hepatitis se utilizan con fines de diagnóstico y monitoreo.



Resumen

- **Antígenos Tumorales:** Los ensayos para antígenos específicos producidos por células cancerígenas pueden usarse para diagnóstico y monitoreo, e incluyen antígeno específico de próstata (PSA) para cáncer de próstata y alfa fetoproteína (AFP) para cáncer testicular, entre otros ejemplos.
- **Agentes Infecciosos Congénitos:** Los ensayos de suero para los anticuerpos IgM e IgG en personas expuestas a agentes infecciosos como la Rubéola, Toxoplasmosis, y Citomegalovirus (CMV) son útiles para diagnosticar y monitorear la posible infección, particularmente en mujeres embarazadas para determinar el riesgo de defectos de nacimiento de sus hijos.
- **Metabólicos:** Los ensayos para proteínas y vitaminas que intervienen en el metabolismo pueden medirse, incluyendo la ferritina como medida de los niveles de almacenamiento de hierro, y las vitaminas B12 y folato.



Revisión

- Las pruebas para cuál de las siguientes opciones no se cuantifican rutinariamente usando inmunoensayos:
 - A. TSH
 - B. AFP
 - C. Glucosa
 - D. Folato



Revisión

- Las pruebas para cuál de las siguientes opciones no se cuantifican rutinariamente usando inmunoensayos :
 - A. TSH
 - B. AFP
 - C. Glucosa**
 - D. Folato



Revisión

- Una prueba para hCG se clasificaría como:
 - A. Ensayo para tiroides
 - B. Marcador de hepatitis
 - C. Marcador de embarazo
 - D. Marcador de cáncer



Revisión

- Una prueba para hCG se clasificaría como :
 - A. Ensayo para tiroides
 - B. Marcador de hepatitis
 - C. Marcador de embarazo**
 - D. Marcador de cáncer



Revisión

- Cuál de los siguientes son los cinco virus principales que causan hepatitis viral:
 - A. HBV1, HBV2, HBV3, HBV4, y Virus de Epstein-Barr
 - B. HAV, HBV, HCV, HDV, HEV
 - C. Ictericia y sus cuatro subtipos
 - D. Ninguna de las opciones anteriores



Revisión

- Cuál de los siguientes son los cinco virus principales que causan hepatitis viral :
 - A. HBV1, HBV2, HBV3, HBV4, y Virus de Epstein-Barr
 - B. HAV, HBV, HCV, HDV, HEV**
 - C. Ictericia y sus cuatro subtipos
 - D. Ninguna de las opciones anteriores



Revisión

- Los paneles de la hepatitis viral se usan para:
 - A. Diagnóstico
 - B. Monitoreo
 - C. Screening
 - D. Todas las opciones anteriores



Revisión

- Los paneles de la hepatitis viral se usan para:
 - A. Diagnóstico
 - B. Monitoreo
 - C. Screening**
 - D. Todas las opciones anteriores



Revisión

- Un paciente que es positivo por anticuerpos IgG para Rubéola estuvo expuesto recientemente al virus y está preparando una respuesta inmunológica temprana.
 - Verdadero
 - Falso



Revisión

- Un paciente que es positivo por anticuerpos IgG para Rubeola estuvo expuesto recientemente al virus y está preparando una respuesta inmunológica temprana.
 - Verdadero
 - Falso**



Bibliografía y Sugerencias para una Estudio más Profundo

- Harlow E, Land D, eds. *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.
- Wild D, editor. *The Immunoassay Book*. New York: Stockton Press; 1994.
- Moore WT, Eastman RC, eds. *Diagnostic Endocrinology*. Toronto: BC Decker; 1990.
- Kricka L. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem*. 1999; 45:942-956.



Glosario

- **Afinidad** – medida de la atracción entre un punto simple del antígeno y un anticuerpo simple con ese punto.
- **Analito** – sustancia, conjunto de sustancias, o “factor” que se analizará.
- **Anticuerpo** – glicoproteína producida por los linfocitos B en respuesta a la exposición a un antígeno y se une específicamente a ese antígeno.
- **Antígeno** – sustancia que es capaz, bajo condiciones apropiadas, de inducir una respuesta inmune específica y de reaccionar con el producto de esa respuesta (anticuerpo o específicamente linfocitos T sensibilizados).



Glosario

- **Exceso de antígeno** – la presencia de exceso de antígeno en relación con la concentración de anticuerpo, provoca una desestimación de la concentración de antígeno (a veces denominado “efecto prozona”).
- **Antisuero** – suero que contiene anticuerpos.
- **Avidez** – la intensidad combinada de reactividades de un anticuerpo y un antígeno, representando la afinidad neta de todos los puntos de unión en el antisuero.
- **Calibrador** – material de características conocidas (concentración, actividad, reactividad) usado para calibrar o ajustar un procedimiento de ensayo. El material debería tener las mismas características de rendimiento que las muestras para la prueba en ese procedimiento.



Glosario

- **Quimioluminiscencia** – emisión de luz a través de una reacción química que incluye la oxidación de un compuesto orgánico por medio de un oxidante (por ejemplo peróxido de hidrógeno).
- **Sensibilidad clínica** – la capacidad de una prueba para clasificar correctamente a los pacientes que padecen una enfermedad produciendo un resultado de la prueba verdadero positivo.
- **Especificidad clínica** – la capacidad de una prueba para clasificar correctamente a los pacientes que no padecen una enfermedad produciendo un resultado de la prueba verdadero negativo.
- **Curva de respuesta de concentración** – describe la relación entre la señal del ensayo y la concentración de analito.



Glosario

- **Epítotope** – región única en un antígeno que se une a un anticuerpo específico.
- **ELISA** (Enzimo-inmunoensayo) – inmunoensayo que utiliza un anticuerpo marcado con un marcador enzimático. El cambio en la actividad enzimática como resultado de la reacción enzima-anticuerpo-antígeno es proporcional a la concentración de antígeno y se puede medir.
- **Resultado falso positivo de un ensayo** – resultado positivo de una prueba que se obtiene de una muestra realmente negativa.
- **Resultado falso negativo de un ensayo**– resultado negativo de una prueba que se obtiene de una muestra que realmente contiene un analito.
- **Polarización por fluorescencia** – ocurre cuando una molécula absorbe luz a una longitud de onda y reemite luz a una longitud de onda mayor.



Glosario

- **HAMA** (Anticuerpo Human Anti Ratón) – producido en los seres humanos como respuesta inmune luego de una exposición a anticuerpos de ratón.
- **Inmunocomplejos** – complejos formados por la unión de moléculas de antígenos y anticuerpos, con o sin fijación del complemento.
- **Inmunoglobulina** – proteína compuesta por cadenas pesadas y livianas y que funciona como un anticuerpo.
- **Anticuerpos monoclonales** – anticuerpos que se producen *in vitro* por una línea celular que se origina en una célula simple. Todas las moléculas son de tipo y subtipo simple y poseen una especificidad antigénica simple.



Glosario

- **Inmunoensayo no competitivo** – inmunoensayo en el cual el analito de la muestra y el analito marcado se presentan en forma consecutiva al anticuerpo de la reacción.
- **Precisión** – punto hasta el cual los análisis de replicación de una muestra concuerdan entre sí. Estadísticamente, es lo contrario de la varianza de una medición o cálculo.
- **Radioinmunoensayo (RIA)** – ensayo cuantitativo para la detección de reacciones antígeno-anticuerpo usando sustancia marcada radioactivamente para medir la unión de sustancia sin marcar a un anticuerpo específico o receptor.
- **Ensayo sándwich**– se usa para describir un inmunoensayo, que combina analitos entre dos anticuerpos específicos.



Gracias

Abbott División Diagnóstico
Global Marketing: Inmunoquímica

