

## Compendio de guiones para clases teóricas en la asignatura Inmunología en Veterinaria III: técnicas inmunológicas

**Esperanza Gómez-Lucía Duato. Gustavo Domínguez Bernal.  
Ana Doménech Gómez. M<sup>a</sup> del Mar Blanco Gutiérrez.  
Alicia Gibello Prieto. Joaquín Goyache Goñi.  
José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez. Mónica Suárez Rodríguez.  
M<sup>a</sup> Teresa Cutuli de Simón<sup>1</sup>.**

Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense.  
[duato@vet.ucm.es](mailto:duato@vet.ucm.es) [gdbernal@vet.ucm.es](mailto:gdbernal@vet.ucm.es) [domenech@vet.ucm.es](mailto:domenech@vet.ucm.es)  
[mablanca@vet.ucm.es](mailto:mablanca@vet.ucm.es) [gibelloa@vet.ucm.es](mailto:gibelloa@vet.ucm.es) [jgoyache@vet.ucm.es](mailto:jgoyache@vet.ucm.es)  
[jmvizcaino@vet.ucm.es](mailto:jmvizcaino@vet.ucm.es) [msuarez@vet.ucm.es](mailto:msuarez@vet.ucm.es) [mtcutuli@vet.ucm.es](mailto:mtcutuli@vet.ucm.es)

**Resumen:** En este artículo III, que incluye cinco temas, se introducen las diferentes técnicas inmunológicas que se pueden emplear para valorar la respuesta inmunitaria, tanto humoral como celular. Los cuatro primeros temas incluyen la valoración de la respuesta inmunitaria humoral, comenzando con los términos generales de sensibilidad y especificidad y progresando hacia las técnicas primarias y las secundarias. El quinto tema trata de la valoración de la respuesta inmune de base celular.

**Palabras clave:** Técnicas inmunológicas. ELISA. Western blot. RIA. Inmunofluorescencia. Aglutinación. Precipitación. Fijación del complemento. Seroneutralización. Citometría de flujo. Pruebas de funcionalidad de linfocitos. Ensayos de citotoxicidad. Ensayos de fagocitosis.

### PRÓLOGO

La valoración de la respuesta inmunitaria es muy importante en veterinaria, una profesión eminentemente aplicada en la que es necesario conocer si los animales están protegidos y hasta qué grado. En este artículo se incluyen temas que tratan sobre la valoración de la respuesta inmunitaria humoral y celular.

Los primeros guiones describen las técnicas inmunológicas que valoran el primero de los dos aspectos, que se basan en el reconocimiento específico y en la estabilidad de la unión antígeno-anticuerpo. Estas técnicas son de gran aplicación en

---

<sup>1</sup> Coordinadora de la asignatura

Medicina Veterinaria, pues suponen una herramienta esencial del denominado diagnóstico serológico individual o de colectividades, que evalúa la respuesta humoral frente a un antígeno determinado.

Se describen técnicas que permiten el análisis de grandes colectividades de animales, como son el ELISA, otras que se emplean para animales individuales, como la inmunomigración, o que permiten conocer aspectos concretos de la respuesta inmune, como la inmunolectroforesis o Western Blot. Así mismo, se incluyen otras, que no por haber sido descritas con anterioridad, han dejado de estar vigentes, como la aglutinación o la inmunodifusión en gel de agar. Algunas aplicaciones de estas técnicas son para la elaboración de los denominados “seroperfiles”, estudios serológicos seriados realizados en colectividades animales para conocer su perfil inmunológico y sanitario.

Por último, se presenta un guion que describe las técnicas inmunológicas que permiten la valoración de la respuesta inmunitaria celular, incluyendo cómo se separan las células que intervienen en la respuesta inmunitaria del resto de componentes de la sangre y las técnicas que valoran la funcionalidad de las mismas.

#### TEMAS Y CONTENIDOS DEL ARTÍCULO

- **Tema 13.** Anticuerpos monoclonales y sus aplicaciones. **Valoración de la respuesta inmunitaria de base humoral.** Reacciones antígeno-anticuerpo *in vitro*: tipos de inmunorreacciones. Concepto de sensibilidad y especificidad. Reacciones cruzadas. Título sérico.
- **Tema 14. Reacciones primarias.** Inmunofluorescencia. Citometría de flujo. Radioinmunoanálisis.
- **Tema 15:** .Enzimoimmunoanálisis. Seroperfiles y su aplicación en veterinaria. *Western blot*. Inmunomigración. Inmunohistoquímica.
- **Tema 16: Reacciones secundarias.** Precipitación. Inmunodifusión. Aglutinación. Inhibición de la hemaglutinación. Fijación del complemento. Neutralización y seroneutralización.
- **Tema 17: Valoración de la respuesta inmunitaria de base celular.** Separación de células en la respuesta inmunitaria. Pruebas de funcionalidad.

**TEMA 13. ANTICUERPOS MONOCLONALES Y SUS APLICACIONES. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA DE BASE HUMORAL. REACCIONES ANTÍGENO-ANTICUERPO *IN VITRO*: TIPOS DE INMUNORREACCIONES. CONCEPTO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD. REACCIONES CRUZADAS. TÍTULO SÉRICO.**

**Objetivos**

- Saber qué son y cómo se producen los anticuerpos monoclonales.
- Conocer las aplicaciones que se ven mejoradas con el empleo de anticuerpos monoclonales.
- Comprender y diferenciar los conceptos de sensibilidad y especificidad.
- Conocer el significado de la especificidad del anticuerpo y los mecanismos responsables de la reacción cruzada de los anticuerpos.
- Comprender el significado del título de un suero.

**Obtención de anticuerpos para las técnicas inmunológicas**

- **Policlonales (Sueros):** por inmunización de animales de experimentación (conejos, cabras, équidos, etc.) con el antígeno deseado, siguiendo un protocolo adecuado, tras el que se extrae sangre y se obtiene el suero. En este suero estarán los anticuerpos dirigidos frente al antígeno con el que se ha realizado la inmunización (frente a todos sus determinantes antigénicos) y frente a otros antígenos a los que se haya enfrentado el animal (Tabla 1).
- **Monoclonales (Köhler y Milstein, P.N. Medicina 1984):** son los anticuerpos producidos por un clon, es decir, por un grupo de células derivadas de una única célula y, por lo tanto, con características idénticas (todas producen el mismo anticuerpo) (Tabla 1).

Ac POLICLONALES	Ac. MONOCLONALES
Mezcla heterogénea	Químicamente puros
Variación entre los lotes (impredecibles)	Invariables (predecibles)
Irrepetibles	Producción limitada
Es preferible utilizar Ag puros para su obtención	No se necesitan Ag puros
Reconocen varios epítomos	Muy específicos (pueden no reconocer variantes antigénicas)
Multitud de isotipos (plasticidad funcional y efectora)	Un solo isotipo
Fácil producción	Producción compleja y larga
<b>Baratos</b>	<b>Caros</b>

**Tabla 1. Ventajas y desventajas de los anticuerpos policlonales y monoclonales.**

### Protocolo de producción de anticuerpos monoclonales (AcMo)

- Inmunizar un ratón con el Ag deseado.
- Tras un tiempo (varias semanas), extraer el bazo y disgregar para obtener linfocitos B, que tienen una cortísima viabilidad en cultivo.
- Fusionar los linfocitos B con células de mieloma, que tienen la característica de ser deficientes en la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa, HGPRT), implicada en la síntesis exógena de ADN, por lo que sólo pueden seguir la vía endógena.
- Cultivar los productos de la fusión (**hibridomas** linfocito-mieloma), en medio selectivo HAT (hipoxantina-aminopterin-timidina) en placas de 96 pocillos (o de pocillos múltiples). La aminopterin bloquea la vía endógena, y sólo las células que puedan sintetizar ácidos nucleicos por la vía exógena (que sean HGPRT+) sobrevivirán. Los hibridomas formados por la fusión entre un linfocito y una célula de mieloma son capaces de crecer en este medio.
- Analizar los sobrenadantes de los pocillos por ELISA.
- Clonar los pocillos que contengan híbridos productores de anticuerpos de interés, realizando diluciones para intentar tener una célula por pocillo, por lo que todas las que se deriven de ella secretarán el mismo anticuerpo.
- Caracterizar los AcMo.
- Producir en gran escala:
  - ✓ Cultivo *in vitro*: los clones se cultivan en botellas o en biorreactores, encontrándose los AcMo en el medio de cultivo.
  - ✓ Producción *in vivo*: los clones se inoculan en la cavidad abdominal de ratones para producir ascitis en donde se encuentran los AcMo mucho más concentrados que en el caso anterior (Fig. 1).

Actualmente las grandes empresas obtienen los AcMo por ingeniería genética.

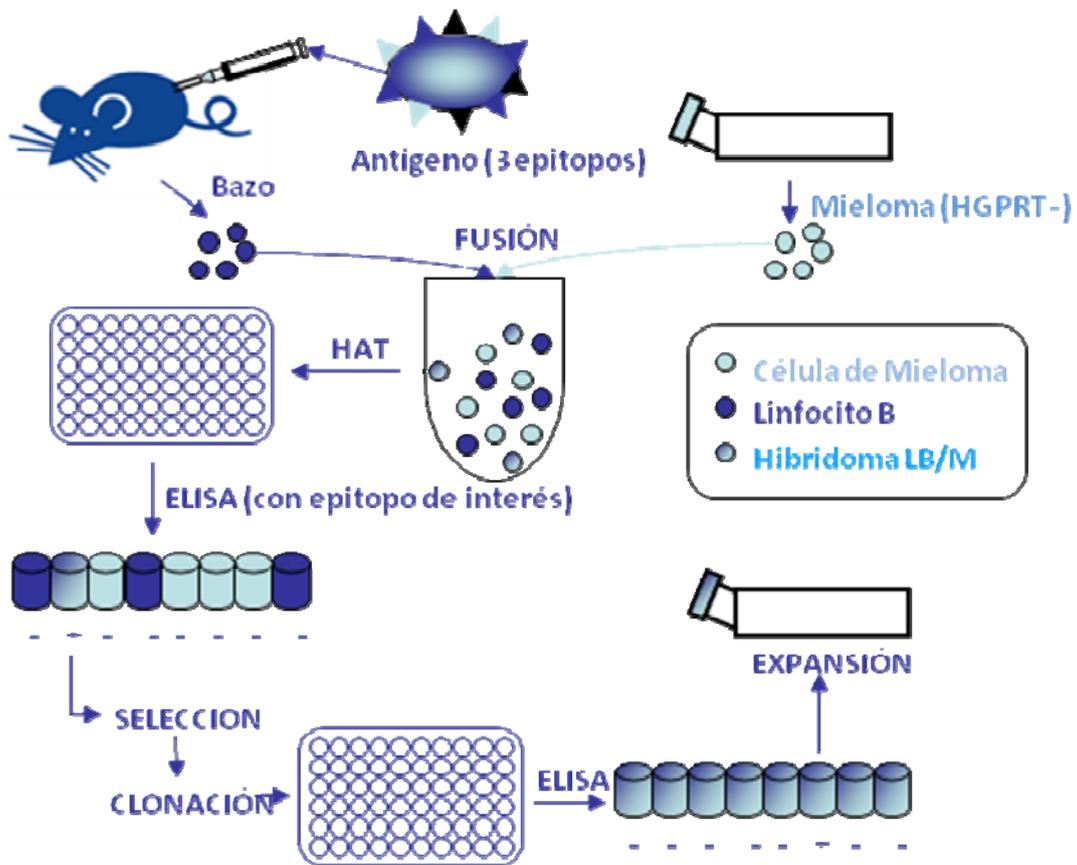


Figura 1. Esquema del protocolo de producción de Ac monoclonales.

### Aplicaciones de los anticuerpos monoclonales

En principio, en todo lo que se base en una reacción antígeno-anticuerpo:

- Sistemas de detección de base inmunológica.
- Estudios en microbiología y parasitología.
- Inmunohistoquímica.
- Terapia frente al cáncer (Inconveniente: Falta de AcMo de origen humano).

### Conceptos y naturaleza de la interacción Ag-Ac

La interacción Ag-Ac se caracteriza por:

- **Unión "reversible" por enlaces no covalentes.**
- **Unión específica: Interacción complementaria** entre Ag-Ac (en ocasiones, puede darse reactividad cruzada con otro Ag).

- ✓ **Especificidad:** Capacidad del Ac para discriminar e interaccionar diferencialmente con Ag de estructura similar. Cuando un Ac frente a un determinado Ag se une a otro Ag diferente pero estructuralmente relacionado se habla de **reacción cruzada**.
- **Formación de inmunocomplejos Ag-Ac “estables”**
  - ✓ **Afinidad:** Fuerza o intensidad de la unión entre un determinante antigénico y su sitio de unión al Ac.
  - ✓ **Avidez:** Fuerza total de la unión entre Ag-Ac (suma de fuerzas de atracción y de repulsión).

### Concepto de título sérico

Se suele calcular haciendo diluciones del suero y determinando **cuál es la máxima dilución de un suero que da una reacción positiva** por la prueba evaluada. Es una estimación de la concentración de anticuerpos que hay en el suero.

### Concepto de sensibilidad y especificidad de las técnicas inmunológicas

- **Sensibilidad:** capacidad de un método para detectar positivos. Permite que todos los positivos sean detectados.
- **Especificidad:** capacidad para diferenciar positivos de los negativos. Capacidad para detectar negativos. Evita resultados falsos positivos (ningún negativo debe considerarse como positivo).

En general, para clasificar a los animales en positivos o negativos se establece un **punto de corte**. Los individuos cuyos valores sean mayores que el establecido por el punto de corte se considerarán positivos y los que son inferiores, negativos (Fig. 2).

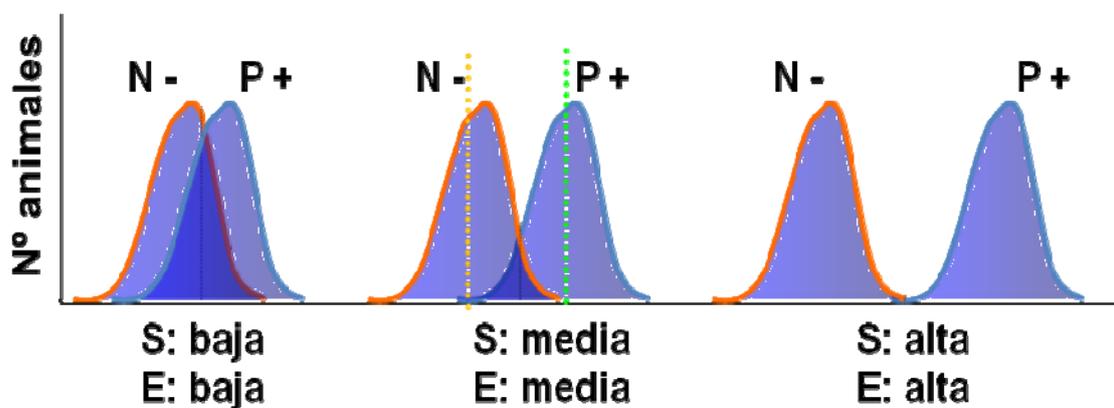


Figura 2. Representación gráfica de la relación entre sensibilidad (S) y especificidad (E) de una técnica diagnóstica. Clasificación de animales por el punto de corte. N-: animales negativos, P+: animales positivos.

## Tipos de técnicas inmunológicas

Las inmunorreacciones se aplican al diagnóstico para medir la respuesta inmunitaria:

- Humoral (anticuerpos y complemento).
- Celular (funcionalidad de fagocitos y linfocitos, producción de citoquinas).

## Detección de la respuesta humoral

**Técnicas SEROLÓGICAS:** detectan la interacción Ag-Ac *in vitro*. Pueden clasificarse en 3 tipos:

- **Pruebas de unión primaria:** Miden directamente la unión Ag-Ac.
- **Pruebas de unión secundaria:** Miden los cambios físicos de la interacción Ag-Ac tras la formación del inmunocomplejo.
- **Pruebas terciarias:** Miden el efecto protector real de la respuesta inmunitaria en un animal.

## Preguntas tema 13

1. ¿Qué es un anticuerpo monoclonal?
2. ¿Por qué las células de mieloma empleadas para la obtención de hibridomas son HGPRT-?
3. ¿Por qué es necesario clonar?
4. ¿Por qué existen problemas para el empleo de anticuerpos monoclonales con fines terapéuticos en medicina humana y veterinaria?
5. ¿Qué es más indicativo de la capacidad efectiva de unión de un anticuerpo a un microorganismo, su afinidad o su avidéz?

## TEMA 14. REACCIONES PRIMARIAS. INMUNOFLUORESCENCIA. CITOMETRÍA DE FLUJO. RADIOINMUNOANÁLISIS

### Objetivos

- Comprender los fundamentos de las técnicas inmunológicas basadas en reacciones primarias y su aplicación en el diagnóstico veterinario.

## Reacciones primarias

La unión Ag-Ac se detecta midiendo [la formación de inmunocomplejos](#).

Utilizan un [SISTEMA INDICADOR](#) (o “marcador”) de la unión Ag-Ac:

- Fluorescencia: [inmunofluorescencia](#).
- Radiactividad: [radioinmunoanálisis](#).
- Enzimas: [enzimoinmunoanálisis](#), [Western Blot \(WB\)](#), [inmunohistoquímica](#), etc.
- Metales pesados: [Inmunocromatografía](#), [inmunomicroscopía electrónica](#), etc.  
La combinación del Ag o del Ac con el indicador se denomina [conjugado](#).

El [diagnóstico](#) que se consigue por las distintas técnicas de la reacción Ag-Ac *in vitro* puede considerarse:

- **Directo:** Detección de Ag en la muestra.
- **Indirecto:** Detección de Ac en el suero, calostro, leche, fluidos, etc.

Las técnicas primarias se desarrollan en pasos o etapas con incubaciones intermedias en las que se produce la reacción Ag-Ac. Entre ellos es fundamental LAVAR concienzudamente para arrastrar los reactivos que no hayan reaccionado.

A su vez, las [técnicas](#) pueden ser (Fig. 3):

- **Directas:** sólo emplean un reactivo.
- **Indirectas:** los anticuerpos se detectan por Ig anti-especie (Ac secundario), que son las Ig obtenidas al inocular Ig de una especie en otra, en la que se comportan como extrañas.
- **Tipo sandwich:** el Ag queda atrapado entre dos capas de Ac. Puede ser DAS (cuando el segundo Ac está marcado) o HADAS (cuando el segundo Ac no está marcado y se emplea Ig anti-especie marcado para detectarlo).
- **De competición:** De Ac o de Ag (Ac problema y marcado compiten por el Ag) o de Ag (Ag problema y marcado compiten por los Ac).

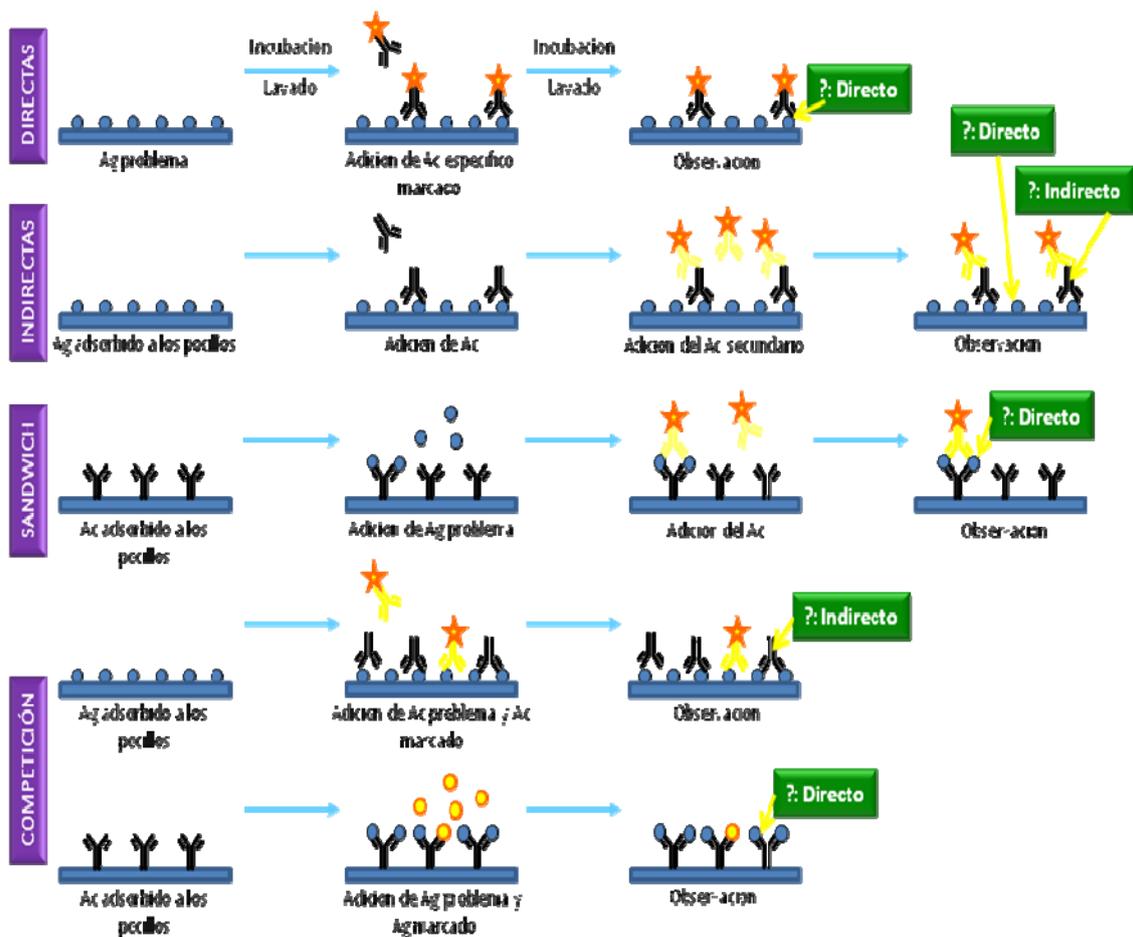


Figura 3. Esquema de los tipos de técnicas inmunológicas basadas en reacciones primarias. En los recuadros verdes, el interrogante significa si el diagnóstico es directo o indirecto en base a que se detecte Ag o Ac, respectivamente.

### Inmunofluorescencia

Utiliza Ac marcados (“Conjugados”) con colorantes fluorescentes o fluorocromos (fluoresceína [FITC] o rodamina, entre otros) como sistema indicador. Cuando se aplica luz ultravioleta en el microscopio de fluorescencia, el fluorocromo emite luz visible verde o naranja/rojo (o azul, dependiendo del fluorocromo, por ejemplo, DAPI).

- **Inmunofluorescencia Directa:** Se detecta antígenos en células, bacterias, tejidos, heces o cultivos celulares, etc.
- **Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):** Se utiliza un conjugado anti-especie marcado con fluorocromo para detectar los Ac específicos unidos al Ag (Fig. 4). Es más sensible que la técnica directa. Se utiliza en el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas y parasitarias.

- ✓ Permite titular el suero, haciendo diluciones del mismo y determinando qué dilución es la última en la que se aprecia fluorescencia.

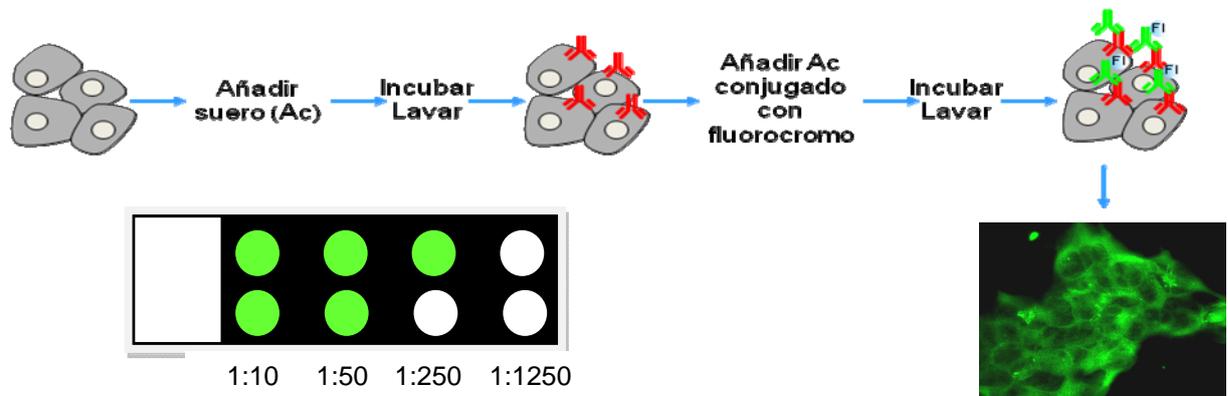


Figura 4. Esquema del protocolo correspondiente a la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

- **Citometría de flujo:** Utiliza Ac monoclonales fluorescentes para la detección de Ag de superficie celular mediante un láser de luz que identifica específicamente las células marcadas.

### Radioinmunoanálisis (RIA)

Marcadores: radioisótopos (se cuantifica en contador de centelleo).

Ventajas: muy sensible, rápido y fácil.

Desventajas: instalaciones costosas, corta vida media de isótopos.

- **Radioinmunoanálisis directo o RIA competitivo:** Se emplea Ag marcado que es desplazado por el Ag no marcado de la muestra (Fig. 5).
- **Radioinmunoanálisis indirecto o RIA no competitivo:** Se utiliza un Ac anti-inmunoglobulina marcado con radiactividad. Ej. Se utiliza para medir IgE específicas de Ag en animales alérgicos (Fig. 6).

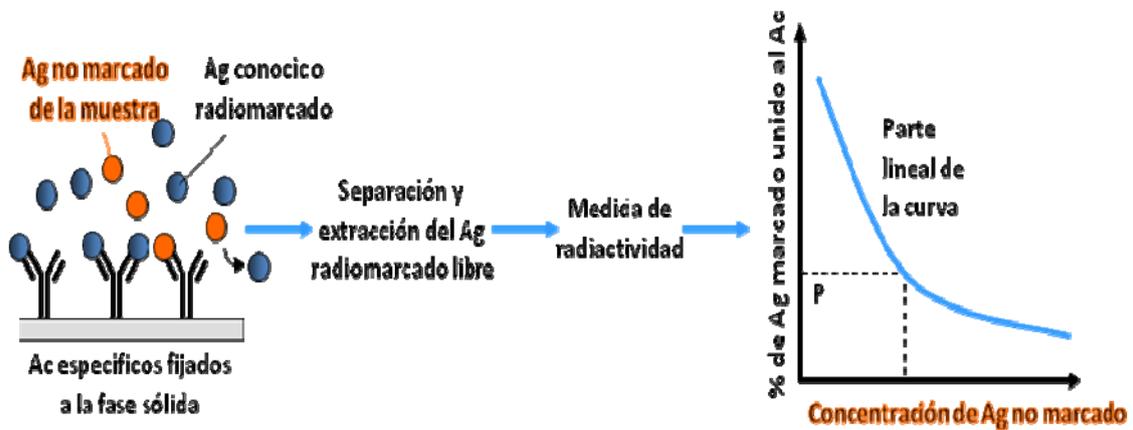


Figura 5. Técnica de radioinmunoanálisis (RIA) competitivo.

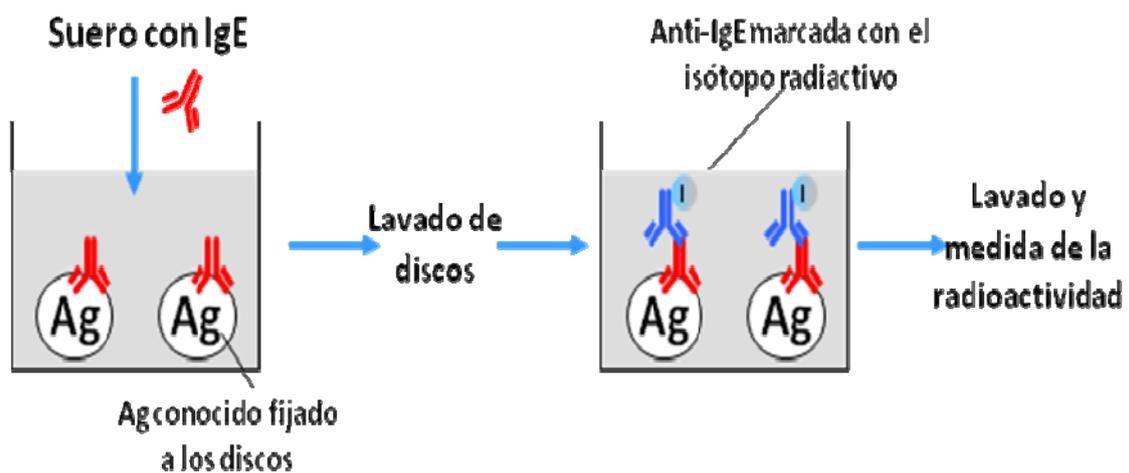


Figura 6. Técnica de radioinmunoanálisis (RIA) no competitivo.

#### Preguntas tema 14

1. ¿Por qué en la citometría de flujo se emplean anticuerpos monoclonales y no policlonales?
2. ¿La inmunofluorescencia indirecta es más sensible que la directa? ¿Por qué?
3. ¿Por qué se emplea el RIA para detectar IgE sérica y no se usan otros métodos empleados con la IgG?
4. ¿Es lo mismo un título de 1:50 por inmunofluorescencia y por RIA? ¿Por qué?
5. ¿Qué son los anticuerpos secundarios y cómo se obtienen?

## TEMA 15: ENZIMOINMUNOANÁLISIS. SEROPERFILES Y SU APLICACIÓN EN VETERINARIA. WESTERN BLOT. INMUNOMIGRACIÓN. INMUNOHISTOQUÍMICA.

### Objetivos

- Comprender los fundamentos de las técnicas inmunológicas basadas en la participación de una enzima y su sustrato y su aplicación en el diagnóstico veterinario.
- Comprender la aplicación de los seroperfiles en veterinaria.

### Técnicas que emplean enzimas

**Marcadores:** enzimas que actúan sobre un sustrato para desarrollar color visible, luz o fluorescencia.

**Enzimas** más utilizadas: peroxidasa, fosfatasa alcalina, luciferasa, glucosa-6-P-deshidrogenasa, etc.

- **ELISA** (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (**ENZIMOINMUNOANÁLISIS**): Se utiliza para detectar y cuantificar tanto Ac como Ag. Utiliza placas de poliestireno con múltiples pocillos que se “tapizan” con el Ag o con el Ac. La reacción se revela añadiendo el sustrato que al actuar sobre la enzima del conjugado da lugar a un color visible (amarillo, azul, etc) que es cuantificable mediante un colorímetro especial (“Lector de ELISA”). Es muy utilizada en diagnóstico de numerosas enfermedades humanas (ej. SIDA) y animales (ej: Herpes virus bovino-1, aspergilosis canina, etc.). Existen diversas modalidades (Fig. 7):

✓ **Para la detección de anticuerpos específicos en el suero problema:**

- **ELISA indirecto:** emplea placas tapizadas con el Ag; Ac anti-Ig o anti-especie (secundario) unido a la enzima (conjugado).
- **ELISA de competición:** emplea placas tapizadas con Ac específico. El suero problema se incuba previamente con el Ag antes de añadirlo a la placa, y por tanto, compite con él. La ausencia de color es resultado positivo.

✓ **Para la detección de antígeno:**

- **ELISA directo:** Detección de Ag, que se fija a la placa, con el Ac específico “marcado”.
- **ELISA EN SANDWICH de Ac:** Aunque sirve tanto para detectar Ac como Ag, es la modalidad más empleada para detección de Ag. Emplea placas tapizadas con el Ac específico; Ac específicos marcados o sin marcar.

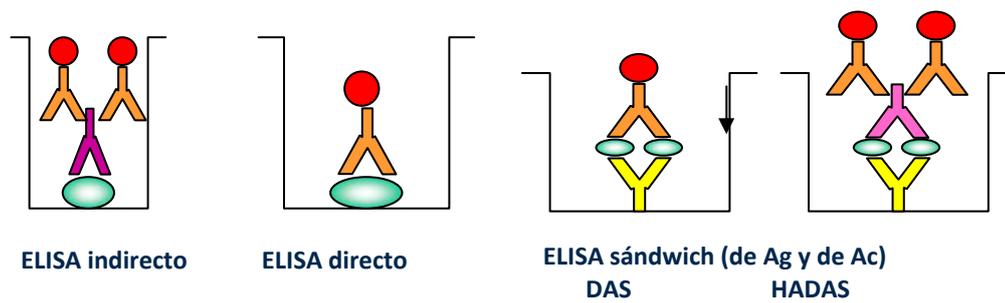


Fig. 7. Tipos de ELISA.

- **Inmunoblotting, inmunoelectrotransferencia o Western blot (WB):** Se utiliza para detectar la presencia de Ac frente a mezclas complejas de Ag. Primero se separa la mezcla de Ag mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfiere a papel de nitrocelulosa. Se utiliza un Ac (anti-Ig o anti-especie) unido a la enzima (conjugado), para detectar los inmunocomplejos. Tras añadir el sustrato se observan una o varias líneas de precipitación según existan Ac frente a una o varias proteínas (Fig. 8).

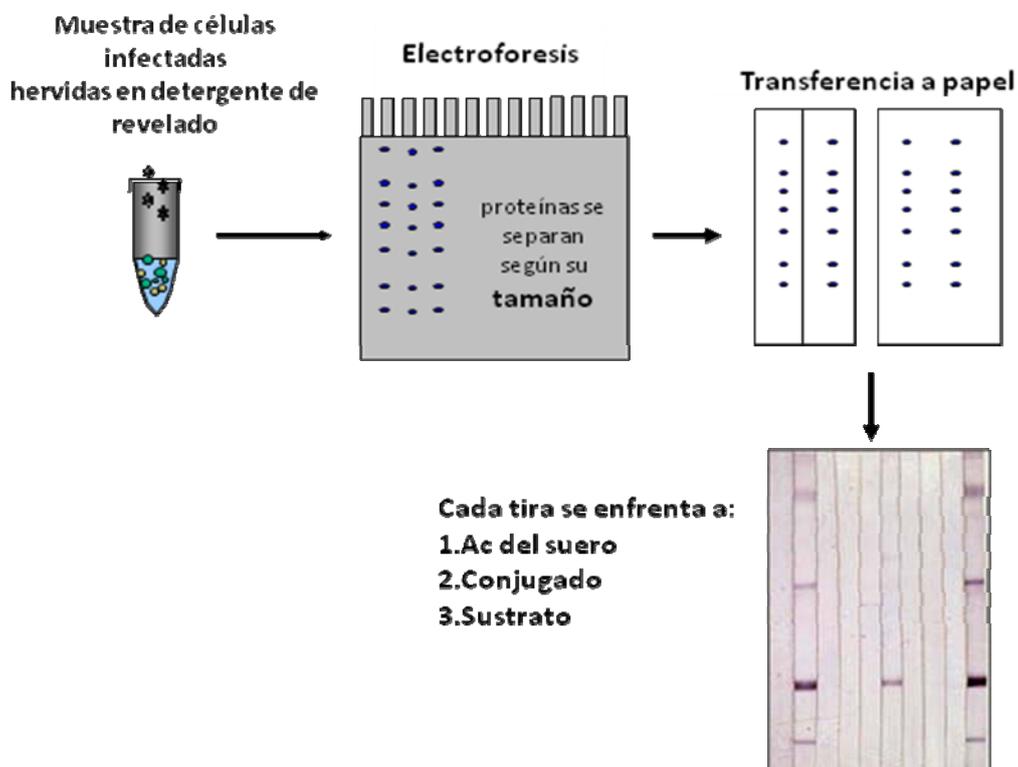


Figura 8. Protocolo de la técnica Inmunoelectrotransferencia.

Pasos:

- ✓ Electroforesis de la mezcla de Ag en geles de poliacrilamida → separación de proteínas.
  - ✓ Transferencia a papel de nitrocelulosa.
  - ✓ Inmunodetección: adición de suero, adición de conjugado, adición de sustrato de revelado.
- **Inmunohistoquímica:** Se utiliza para detectar la presencia de Ag en tejidos. Puede ser directa o indirecta. Generalmente se emplea la peroxidasa (Inmunoperoxidasa) y puede implicar un complejo de amplificación: avidina-biotina, estreptavidina, etc (Fig. 9).

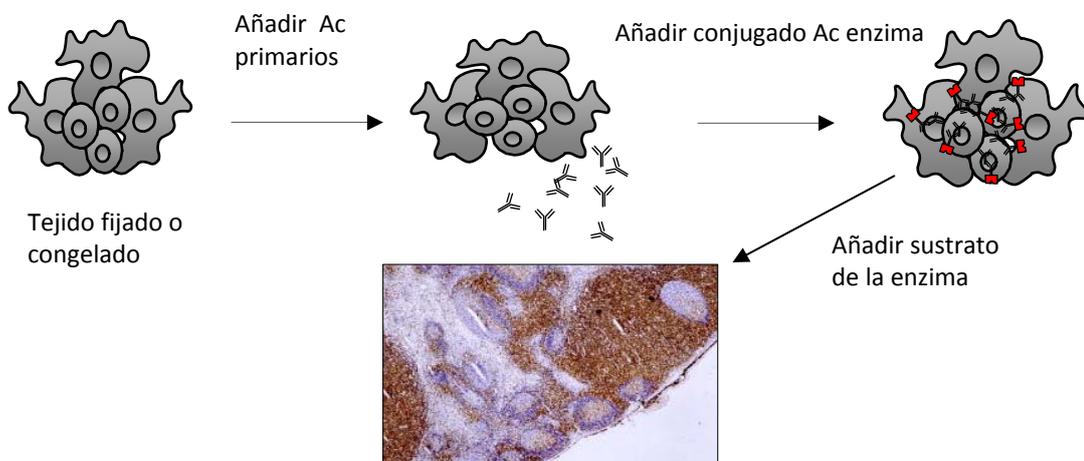


Figura 9 Protocolo de la técnica Inmunohistoquímica.

- **Inmunomigración:** Utiliza Ac marcados con **metales pesados**: selenio (color azul) y oro (color rosa). La muestra (saliva, orina, sangre, etc.) fluye a través de una tira porosa reaccionando con el Ac marcado, al que solubiliza y con el cual forma inmunocomplejos, y después con un Ac frente al antígeno inmovilizado, que captura los inmunocomplejos y reacciona con el sustrato dando color. Es el método empleado en muchos de los kits rápidos de diagnóstico, como por ejemplo la detección de Ag del virus de la leucemia felina (Fig. 10 y Fig. 11):

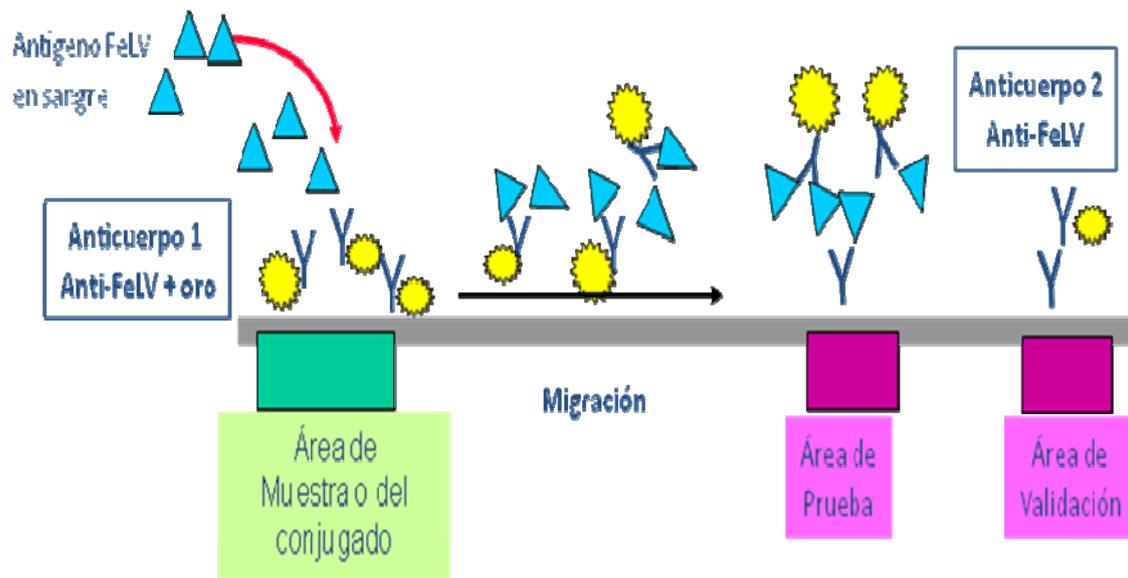


Figura 10. Protocolo de la técnica Inmunomigración.

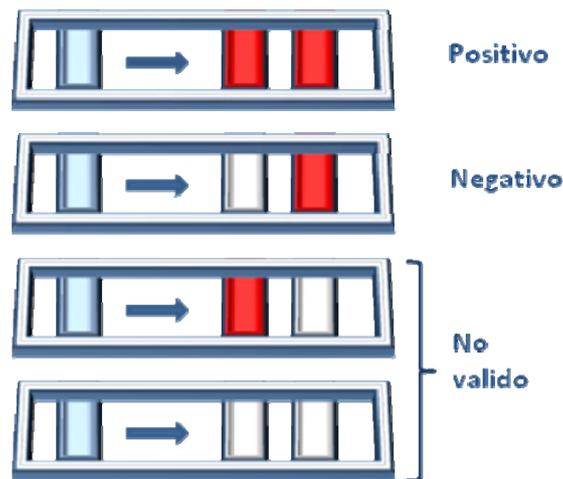


Figura 11. Validación de la técnica Inmunomigración.

### Seroperfiles y su aplicación en veterinaria

Estudios serológicos seriados realizados en una explotación para conocer su perfil inmunológico y sanitario. Se basan en la detección de los anticuerpos circulantes mediante cualquiera de las técnicas inmunitarias disponibles, con el fin de obtener información sobre la situación inmunitaria de la población en ese momento o en estados previos.

Permiten, entre otros, conocer la situación sanitaria de la explotación, elegir el mejor momento para vacunar y prevenir la entrada de enfermedades en la explotación. Se aplica fundamentalmente en explotaciones porcinas.

### Preguntas tema 15

1. Los Ag-1 y el Ag-2 pueden dar lugar a complejos inmunitarios “estables” y son de distinto tamaño. ¿Qué técnica inmunológica basada en una reacción primaria Ag-Ac elegirías para distinguir la unión del Ac a cada uno de estos Ag?
2. Enumera cinco razones por las que la técnica de ELISA es la más utilizada en el diagnóstico clínico.
3. La formación de Ac frente a los ácidos nucleicos de las células es característico del Lupus eritematoso sistémico. ¿Qué técnica podrías utilizar para el diagnóstico de esta enfermedad autoinmunitaria?
4. Al realizar una prueba de ELISA de sándwich se añaden por este orden: solución de antígenos, suero bovino problema y Ac-anti Ig bovina marcado con fluoresceína. Al añadir el sustrato no se desarrolla color. Explica qué ha sucedido.

### TEMA 16: REACCIONES SECUNDARIAS. PRECIPITACIÓN. INMUNODIFUSIÓN. AGLUTINACIÓN. INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN. FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO. NEUTRALIZACIÓN Y SERONEUTRALIZACIÓN.

#### Objetivos

- Distinguir las reacciones Ag-Ac primarias y secundarias.
- Conocer los factores que influyen en la interacción Ag-Ac en las reacciones secundarias.
- Comprender los fundamentos de las técnicas inmunológicas basadas en reacciones secundarias y su aplicación en el diagnóstico veterinario.

#### Reacciones secundarias

Las reacciones secundarias [valoran los cambios físicos de la interacción Ag-Ac tras la formación del inmunocomplejo.](#)

#### Precipitación

Se produce [cuando el Ag es soluble.](#) Se emplea como [ensayo cualitativo o semicuantitativo](#) para medir la cantidad de Ac.

Tipos:

- Inmunoprecipitación en medio líquido.

- Inmunoprecipitación en medio sólido.

- ✓ Inmunodifusión
  - Simple en tubo.
  - Doble en placa.
  - Simple en placa.

**Inmunoprecipitación en medio líquido:** técnica clásica, de uso infrecuente en la actualidad, detecta la presencia de antígenos o anticuerpos en una muestra, cuando se mezclan en fase líquida. Se denomina también **precipitina**, y su reacción se estudia gráficamente “curva de precipitación cuantitativa” (Fig. 12).

**Efecto prozona:** Ausencia de reacción inmunitaria cuando hay altas concentraciones de Ac.

**Zona de equivalencia:** Todo el Ag y Ac se encuentra formando complejos macromoleculares insolubles (teoría del retículo). Consecuencias biológicas: sólo se dan determinadas actividades (p.ej. fagocitosis) cuando hay un equilibrio entre las concentraciones de Ag y de Ac (en la zona de equivalencia).

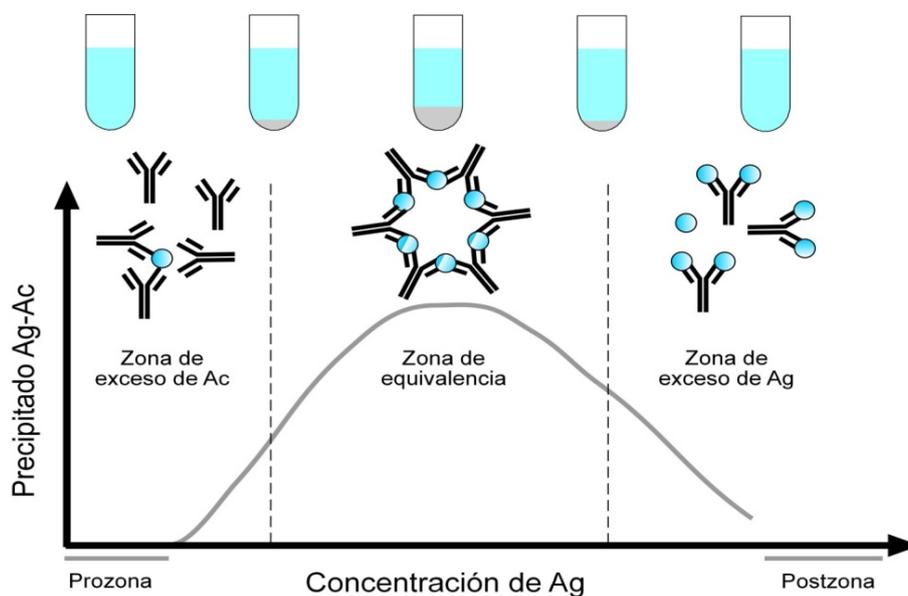


Figura 12. Curva de precipitación cuantitativa.

**Inmunoprecipitación en medio sólido:** utiliza un soporte sólido gelificado en el que difunden el Ag y Ac. Se agrupan dentro de dos categorías: inmunodifusión y técnicas inmunolectroforéticas.

- ✓ **Inmunodifusión:** utiliza un soporte de agar en el que difunden el Ag y Ac. Donde se establece el equilibrio entre las concentraciones de Ag y de Ac se

observa una banda de precipitado. La difusión puede realizarse en una o dos dimensiones y además en tubo y en placa:

- **Doble en placa:** Ac y Ag difunden en el gel. Pueden observarse 3 patrones (Fig. 13):

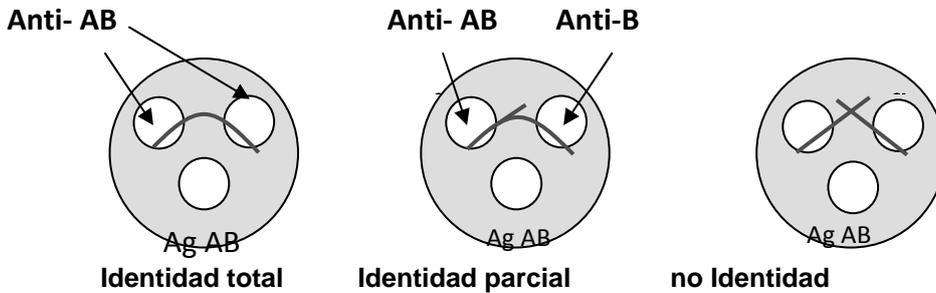


Figura 13. Interpretación de los distintos resultados obtenidos por el método de inmunodifusión doble placa.

- **Inmunodifusión simple en placa (radial):** El Ac es incorporado en el gel de agar. El Ag de los pocillos difunde formando “anillos” de precipitación (Fig. 14 y Fig. 15):



Figura 14. Inmunodifusión simple en placa (radial).

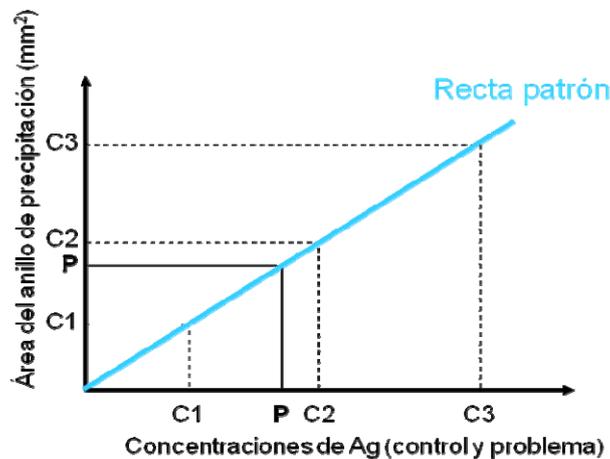


Figura 15. Curva estándar para determinar la concentración de la solución antigénica problema.

- **Difusión simple en tubo:** Se establece un gradiente de concentración sólo para uno de los reactivos (Ej. Ac).
- **Difusión doble en tubo:** El gradiente de concentraciones es para el Ac y el Ag.

### Aglutinación

Más sensible que la precipitación. Se utiliza cuando el Ag es particulado (ej. bacteria). En el caso concreto de Ag ligados a eritrocitos, se habla de **hemoaglutinación**. Además, algunos virus pueden aglutinar específicamente eritrocitos de mamíferos y aves, lo que puede usarse para su identificación. La aglutinación puede utilizarse como **ensayo cualitativo o semicuantitativo** de la cantidad de Ac.

- **Test de aglutinación cualitativa (aglutinación rápida):** Consiste en mezclar Ag y Ac y observar la aglutinación. Ej. Prueba de aglutinación rápida para la brucelosis, test de determinación de grupos sanguíneos, test de Coombs para la anemia hemolítica autoinmune, etc.
- **Test de aglutinación cuantitativa (aglutinación lenta):** Para la "titulación" de un suero: se diluye el suero y se enfrenta a una cantidad fija de Ag (Fig. 16).

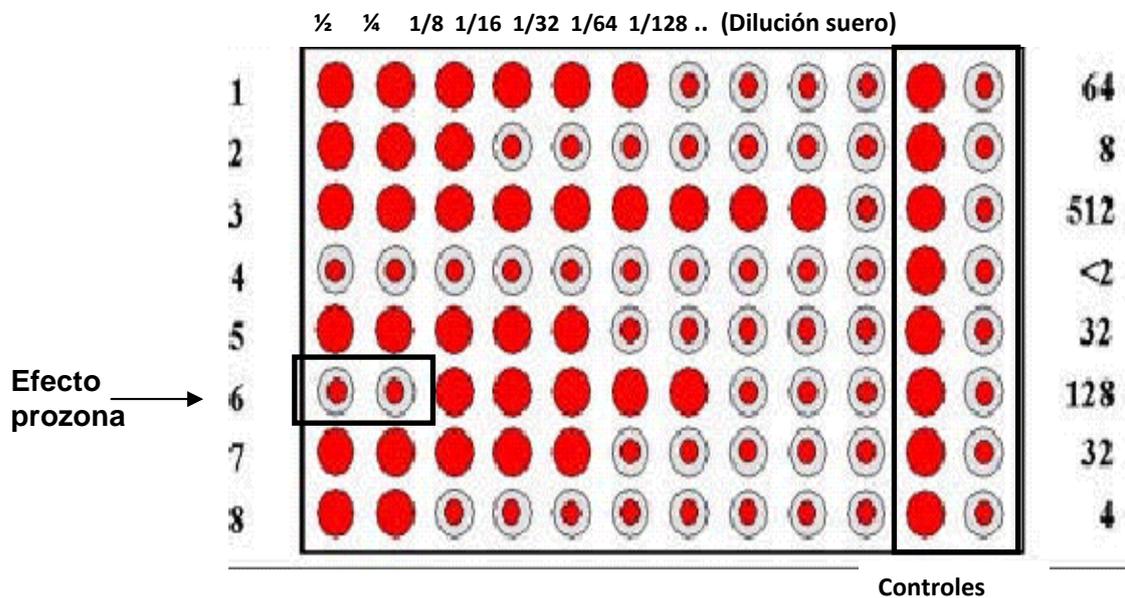


Figura 16. Resultados de la técnica de microaglutinación en placa. Efecto prozona.

**Titulo:** corresponde a la máxima dilución del suero en el que la aglutinación es positiva.

**Efecto Prozona:** Debido al exceso de Ac no se forma la red que permite la aglutinación. Puede también deberse a la presencia de Ac “no aglutinantes”.

- **Aglutinación pasiva:** conversión de una prueba de precipitación en una de aglutinación, uniendo químicamente Ag solubles a partículas inertes como bacterias, látex o eritrocitos (se habla de hemaglutinación pasiva).
- **Inhibición de la hemaglutinación:** algunos virus pueden aglutinar glóbulos rojos (p.ej. los de la gripe o el de Newcastle). Para evidenciar su presencia se añaden Ac específicos para los mismos y se determina la inhibición de la hemaglutinación por bloqueo de los virus. También se pueden emplear para titular sueros.

### Pruebas de fijación del complemento

Medida indirecta de Ac que no dan reacciones visibles. Se basan en que la unión Ag-Ac y formación del inmunocomplejo **activa el complemento** y produce complejos que lesionan membranas celulares (eritrocitos y otras células). Exige que todos los reactivos estén bien cuantificados y usar controles de cada uno. Son pruebas que se realizan en dos fases:

- Se incuba el suero problema con el Ag y el complemento.
- Se añade un sistema indicador, como eritrocitos de oveja recubiertos de Ac específicos (hemolisinas).

Si se lisan los eritrocitos indica que hay complemento libre que no se fijó en la 1ª reacción y, por tanto, no hay Ac en el suero. Ej: diagnóstico serológico de brucelosis y perineumonía contagiosa bovina (micoplasma), coccidioidomicosis, histoplasmosis, etc.

### Reacciones de neutralización

Reacciones Ag-Ac que inactivan una exotoxina bacteriana o un microorganismo (generalmente un virus). Ej. anti-toxina de *Clostridium perfringens* o anti-toxina de *Staphylococcus aureus*.

Se emplean frecuentemente para la identificación de virus desconocidos y medir el título de Ac específicos en sueros (“Seroneutralización vírica”) mediante diluciones.

### Preguntas tema 16

1. ¿Crees que el resultado de las pruebas de aglutinación rápida (o cualitativa) puede ser siempre determinante en el diagnóstico de una enfermedad infecciosa? Razona tu respuesta.

2. ¿Con qué criterios elegirías una técnica inmunológica sobre otras, como test de diagnóstico?
3. ¿Qué tipo de ensayo podrías emplear en la valoración de la eficacia de una vacuna frente a una bacteria toxigénica?
4. Sabemos que un virus determinado aglutina hematíes (hemaglutinación) y queremos determinar el título de Ac específicos frente a ese virus en un animal. ¿Crees que podríamos hacerlo mediante una técnica de aglutinación cuantitativa? Razona tu respuesta.
5. ¿Por qué se necesita realizar la técnica de fijación de complemento en 2 fases?

#### **TEMA 17: VALORACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA DE BASE CELULAR. SEPARACIÓN DE CÉLULAS EN LA RESPUESTA INMUNITARIA. PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD.**

##### **Objetivos**

- Conocer la importancia de la valoración de la respuesta inmunitaria de base celular
- Aprender los métodos más frecuentes de separación de células inmunitarias.
- Utilización de las técnicas inmunológicas *in vivo* e *in vitro* basadas en la respuesta inmunitaria de base celular en el diagnóstico clínico.

##### **Valoración de la respuesta inmunitaria de base celular**

Esta respuesta está mediada por distintas células del sistema inmunitario, fundamentalmente por **linfocitos T y macrófagos** y, en menor medida, células NK, neutrófilos y basófilos.

La valoración de la respuesta celular se emplea para conocer el estado inmunitario de los individuos, tanto sanos como con procesos en los que la respuesta inmunitaria de base celular esté implicada (enfermedades infecciosas producidas por virus, bacterias intracelulares, hongos, helmintos y protozoos; inmunodeficiencias, reacciones de hipersensibilidad retardada, tumores o rechazo de injertos).

##### **¿Cómo se estudia la respuesta inmunitaria de base celular?**

Se puede determinar con técnicas:

- *In vivo*: estudian la función de los de los linfocitos T, responsables de la hipersensibilidad retardada o de tipo IV. Incluyen pruebas como la reacción de la Tuberculina (Tema 21).
- *In vitro*: estudian la funcionalidad de los distintos tipos celulares implicados en la inmunidad celular: linfocitos T, células NK, macrófagos y neutrófilos.

### **Técnicas *in vitro***

Material:

- Sangre periférica entera con anticoagulante (de elección).
- Órganos y tejidos linfoides (*post mortem*).

Las técnicas *in vitro* que emplean células sanguíneas requieren en primer lugar el aislamiento e identificación de las células cuya función se quiere averiguar.

- **Separación de las células de la respuesta inmunitaria** Las células inmunitarias se pueden separar por varios métodos.

#### ✓ **Métodos físicos**

- **Aislamiento por centrifugación en gradiente de densidad** (Ficoll-Hypaque): Con esta técnica podemos obtener de forma separada las células mononucleares (linfocitos y monocitos) de los granulocitos.

- **Separación por adhesión selectiva:**

- ❖ Los monocitos se adhieren a superficies de vidrio o plástico y se separan de los linfocitos.
- ❖ Los linfocitos B se fijan a lana de nylon o algodón en columnas o jeringas (se obtienen poblaciones separadas de LB y LT).

#### ✓ **Estudio de marcadores y antígenos de membrana** (diferencia poblaciones y subpoblaciones de células). Las técnicas más empleadas son:

- Citometría de flujo con FACS (separador celular activado por fluorescencia).
- Separación por sus antígenos de membrana:
  - ❖ Separación magnética.
  - ❖ Separación por afinidad en columnas.

- Formación de rosetas por linfocitos B y T.
- **Pruebas que miden la funcionalidad de las células inmunitarias**
  - ✓ **Para los linfocitos T:**
    - **Pruebas de proliferación celular:**

Se basan en que los linfocitos que reconocen un Ag determinado se estimulan y proliferan. Hay dos ensayos fundamentales:

      - ❖ **Ensayo de linfoproliferación:**

Se realiza sobre linfocitos purificados (capa blanca) o sangre entera. Se basa en que los linfocitos proliferan tras su estimulación con un mitógeno (inespecífico) o con un antígeno específico (Fig. 17). Se emplea con dos fines:

        - Medir el estado global de la respuesta celular de un animal.
        - Diagnosticar si un animal ha estado expuesto previamente a un microorganismo intracelular (por vacunación o infección natural).
      - ❖ **Reacción linfocitaria mixta:**

Se basa en que los linfocitos proliferan cuando se incuban en presencia de otras células con antígenos CMH-II diferentes. Se emplea para determinar la histocompatibilidad en trasplantes.

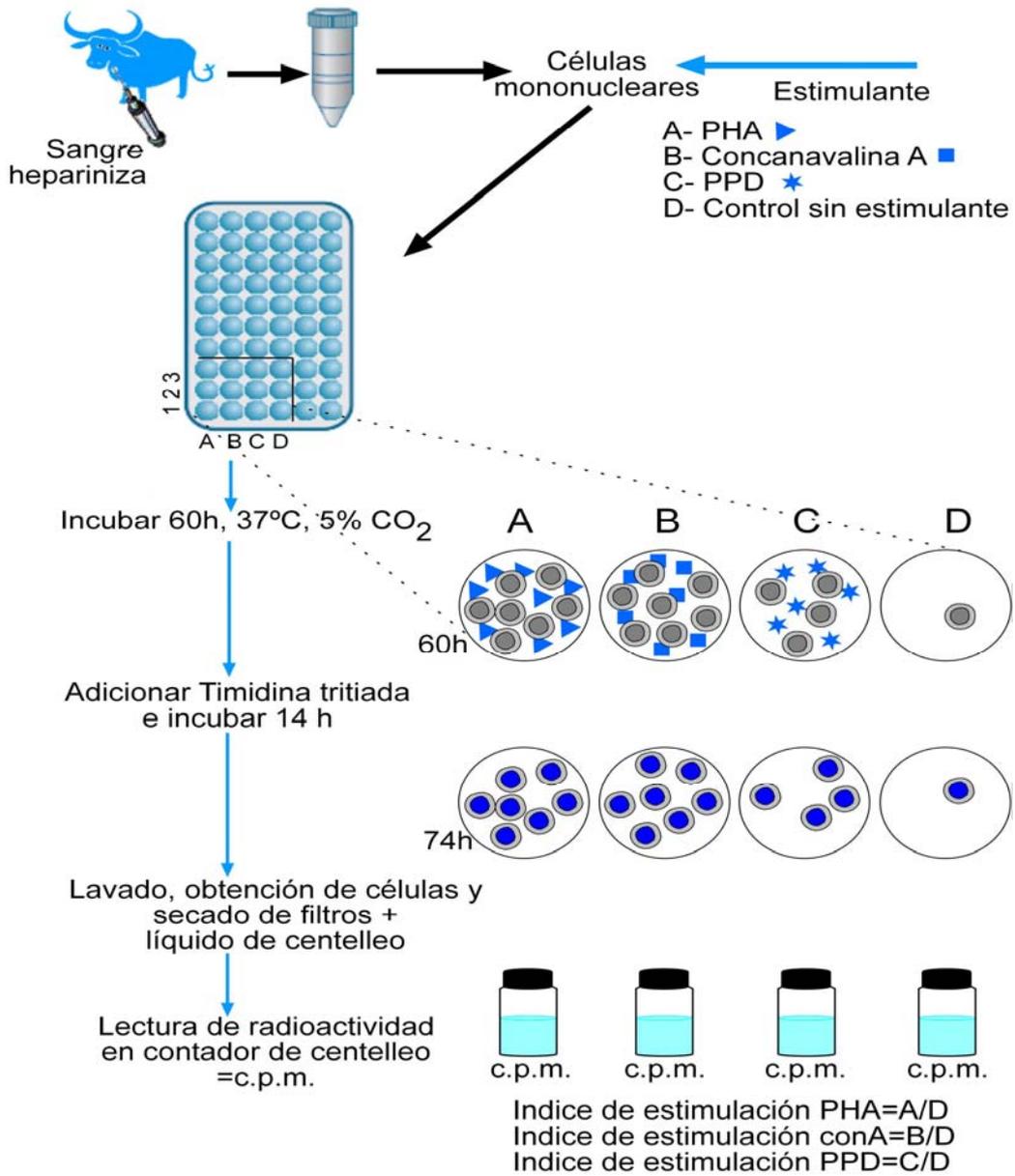


Figura 17. Evaluación de la respuesta a PPD (derivado proteico purificado de *Mycobacterium tuberculosis*) y mitógenos inespecíficos (PHA y Con-A) en bovinos sospechosos de padecer tuberculosis.

○ **Determinación de la producción de citoquinas (IFN- $\gamma$ ): valoración de la funcionalidad de linfocitos T CD4+**

La producción de citoquinas evidencia la funcionalidad de los linfocitos Th, e incluso puede identificar la subpoblación (Th1 o Th2).

- ❖ **Prueba del Interferón-  $\gamma$ :** detección por un ELISA tipo sándwich del IFN- $\gamma$  producido por linfocitos Th1 tras su estimulación con el antígeno. Sólo se estimulan los linfocitos con contacto previo con el mismo antígeno. Se realiza en sangre entera con heparina y es una prueba complementaria a la “tuberculina” para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (Fig. 18).

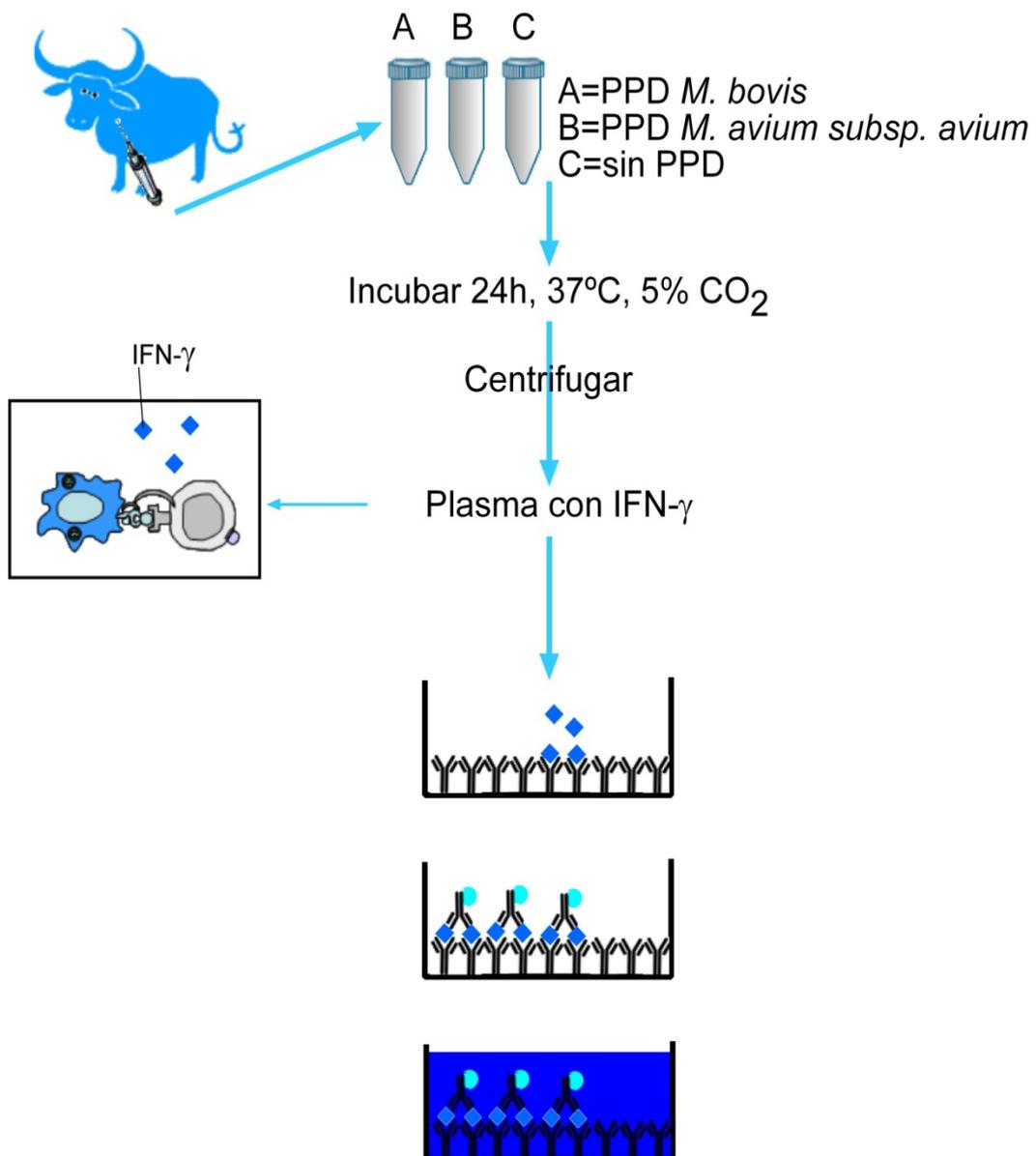


Figura 18. Prueba de interferón- $\gamma$  para linfocitos Th1.

- ❖ **ELISPOT:** Sirve para medir los linfocitos T secretores de una determinada citoquina mediante una modificación del ELISA de captura.
- ❖ **Detección de citoquinas intracelulares por citometría de flujo:** Permite determinar el perfil de citoquinas producidas por un tipo celular mediante una citometría de flujo especial que permite la entrada de los anticuerpos al interior de la célula.
- **Ensayos de citotoxicidad: valoración de la funcionalidad de los linfocitos T CD8+ o citotóxicos y de las células NK.**

Determinan la capacidad del linfocito Tc para lisar células diana que presenten el complejo péptido-CMH I específico que reconocen. Estas células diana, al haber sido cultivadas previamente con cromo radiactivo ( $Cr^{51}$ ), cuando se lisan liberan radiactividad que puede medirse. Se realiza con linfocitos aislados de sangre periférica.

Un ensayo similar se emplea para valorar la actividad citotóxica de las células NK de sangre periférica, generalmente empleando líneas celulares tumorales sensibles (ya que las células NK no están restringidas por el CMH-I).

✓ **Evaluación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)**

Es un ensayo similar al descrito para linfocitos Tc y células NK, en el que se incluye un paso previo de incubación de las células con anticuerpos específicos frente a ellas. Posteriormente se añaden las células implicadas en esta respuesta inmunitaria (monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células NK) que se unen a la fracción Fc de los Ac fijados a las células activando así los mecanismos citotóxicos propios de cada tipo celular.

✓ **Para los macrófagos y neutrófilos**

Aunque hay grandes diferencias entre estos tipos de células, la metodología de estudio es coincidente, puesto que ambos son responsables de la fagocitosis en la respuesta inmunológica innata. Por tanto, las técnicas que valoran la funcionalidad de macrófagos y neutrófilos más utilizadas son los [test de actividad fagocítica](#), que determinan la capacidad de fagocitosis de estas células, destacando las pruebas que valoran: capacidad de migración o quimiotaxis, ingestión y destrucción intracelular de un microorganismo o agente extraño (Fig. 19).

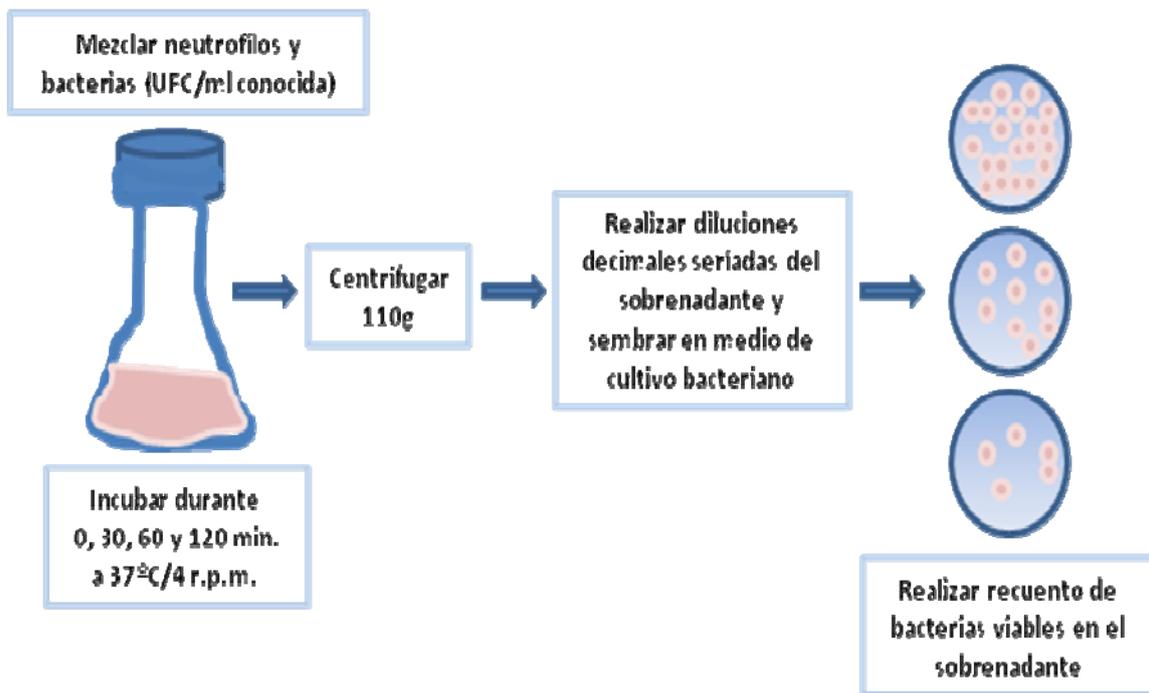


Figura 19. Prueba de la ingestión por neutrófilos.

### Preguntas tema 17

1. Explica dos métodos por los que podemos estudiar la inmunidad innata frente a un patógeno.
2. ¿Cómo se puede valorar *in vitro* la funcionalidad de los linfocitos colaboradores.
3. ¿Qué prueba se puede usar para conocer el estado global de la respuesta celular de un animal?
4. La prueba del IFN- $\gamma$  para el diagnóstico de la tuberculosis bovina se realiza en muestras de sangre entera mediante una técnica ELISA. ¿Por qué no se emplea suero o plasma sanguíneo?
5. ¿Se puede usar el mismo ensayo para determinar la actividad citotóxica directa de los linfocitos T CD8+ y las células NK? ¿Por qué?

### BIBLIOGRAFIA DE CONSULTA

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pilla, S.; 2008. Inmunología Celular y Molecular. 6ª ed. Elsevier. Amsterdam.

- Delves, P.; Martin, S.; Burton, D.; Roitt, I.; 2008. Roitt - Inmunología. 11ª ed. Paramericana, Méjico.
- Goldsby, RA.; Kindt T.J.; Osborne, B.A.; Kuby, J.; 2006. Inmunología. 5ª ed. Macgraw-Hill Interamericana, Méjico.
- Gómez-Lucía, E.; Blanco, M.M.; Doménech, A.; 2007. Manual de Inmunología Veterinaria. Pearson Educación, S.A., Madrid.
- Janeway, Ch.A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlochik, M.; 2003. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 2ª ed. Masson, S. A., Barcelona.
- Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M.; 2010. Inmunobiología de Janeway. 7ª ed. Macgraw-Hill, New York.
- Tizard, I-R.; 2009. Introducción a la Inmunología Veterinaria. 8ª ed. Elsevier-Saunders España, S.L., Barcelona.

#### RECURSOS ELECTRÓNICOS

Blanco, M.M.; Cutuli, M.T.; Doménech, A.; Domínguez, G.; Gibello, A.; Gómez-Lucía, E.; 2009. Inmunotrivial. CD-Rom. Ed. Universidad Complutense de Madrid. ISBN 978-84-693-7827-4

Microbiología e Inmunología *on line*. Consultado en septiembre 2011. Disponible en:  
<http://pathmicro.med.sc.edu/Spanish/intro-span.htm>

Recibido: 16 junio 2011.  
Aceptado: 12 octubre 2011.