



DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES PERIODONTALES MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS ELISA y LUMINEX

Descripción

Estudio de marcadores bioquímicos relacionados con las enfermedades odontológicas. La técnica de ELISA o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (en inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*), permite la identificación de antígenos o anticuerpos en muestras tanto de saliva como de fluido crevicular gingival o sangre, que ayudan a determinar el estado inmunológico del individuo y por tanto estudiar el grado de desarrollo de la enfermedad. Esta tecnología permite estudiar un analito en cada ensayo, muy útil por tanto, cuando el número de parámetros a estudiar no es elevado. Si se precisa un estudio más amplio, es posible utilizar la técnica de Luminex. El Luminex® 100/200™, es un analizador flexible, basado en los principios de la citometría de flujo que posibilita el análisis simultáneo de hasta 100 analitos diferentes en el mismo volumen de muestra. Esta técnica permite además realizar bioensayos no solo inmunoquímicos sino ensayos enzimáticos, de receptor-ligando y ensayos con ácidos nucleicos.

Tanto la técnica de ELISA como la de LUMINEX son muy utilizadas en estudios dentro del campo de la biología, la bioquímica o la medicina. Estas dos técnicas han demostrado, así mismo, su importancia en el área de la odontología, siendo imprescindibles para estudiar el tipo de respuesta inmune desencadenada por las diferentes infecciones bacterianas y conocer los mecanismos implicados en los procesos de remodelación ósea.



El equipo de Luminex consta de un analizador con tecnología basada en citometría de flujo y un software XONENT.

Cómo funciona

La técnica de ELISA está basada en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, haciendo que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al reaccionar la enzima producirá un color observable o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

En la técnica de Luminex® 100/200™ los reactivos (anticuerpos, oligonucleótidos, sustratos...) están anclados a la superficie de microesferas de poliestireno. El espectro de emisión de cada una de estas microesferas es único, lo que posibilita la identificación simultánea de todas ellas y por tanto, de la reacción o ensayo que se está llevando a cabo en la superficie de cada una de ellas al mismo tiempo. Estas esferas son partículas de poliestireno que se han sometido a la acción del crosslinker durante su polimerización para conseguir una elevada estabilidad física. Para asegurar la estabilidad de estas microesferas es esencial protegerlas de la luz y de elevadas temperaturas. Existen diferentes tipos de reactivos para su uso con el sistema Luminex 100 IS. Hay desde microesferas de calibración con ratios conocidas de fluoróforos hasta microesferas de control, pasando por aquellas que presentan en su superficie desde grupos carboxilo hasta Avidina para la unión covalente de diferentes biomoléculas y ligandos biotinilados respectivamente, para que cada usuario pueda hibridar lo que necesite sobre la superficie de las microesferas.

Toma de muestras:

Las muestras de fluido crevicular gingival habitualmente son recogidas utilizando un periopaper por localización, que se mantendrá alrededor de 30 segundos dentro del surco gingival facilitando la toma de la muestra por capilaridad. Las muestras manchadas con sangre deben ser descartadas ya que pueden producirse interferencias en el desarrollo del inmunoensayo. Una vez recogidas, han de conservarse a -80°C hasta su posterior análisis. Se utilizará un buffer tampón especial para la extracción de la muestra desde el periopaper previamente a la realización del análisis.

Si las muestras que se desea estudiar son de saliva, deberá estimularse la secreción de la misma y se recogerá en viales de capacidad variable en función del estudio. Estas muestras serán centrifugadas y se conservará la parte precipitada a -80°C hasta su análisis por la técnica de inmunoensayo escogida.

Las muestras de sangre, habitualmente son recogidas en tubos especialmente preparados para ello, que variarán en función de los parámetros que quieran ser estudiados. Estos viales serán centrifugados para poder recoger el plasma o el suero que se congelará a -80°C hasta su posterior análisis. La congelación de las muestras permite la recopilación de mismas para ser analizadas al mismo tiempo, favoreciendo que todas sean estudiadas bajo las mismas condiciones experimentales.



Muestras tomadas de pacientes para analizar por las técnicas de inmunoanálisis. De izquierda a derecha: muestra de saliva, muestra tomada con periopaper, muestra de plasma sanguíneo.

Ventajas



Los análisis realizados con Luminex requieren un elevado grado de control en cuanto a calibración y verificación del equipo asegurando la precisión de las medidas.

Se trata de dos técnicas de alta precisión que pueden ser útiles en el diagnóstico y tratamiento de ciertas periodontitis y enfermedades sistémicas relacionadas. Entre los beneficios del uso de estas técnicas cabría destacar:

-Volumen de la muestra. Si los volúmenes de muestra tomados son elevados cualquiera de las dos técnicas puede ser válida. En caso de que el volumen de muestra sea limitada como por ejemplo muestras de fluido cerebroespinal, líquido sinovial, lágrimas, suero de ratón, etc, el sistema Luminex® 100/200™ permite el análisis de varios parámetros empleando un volumen de muestra muy pequeño.

-Tiempo de análisis: El tiempo total es el mismo para las dos técnicas si se analiza un solo parámetro. En caso de querer analizar varios parámetros el sistema Luminex permite ahorrar gran cantidad de tiempo ya que los analiza todos al mismo tiempo.

¿Dónde se ha desarrollado?

Estas técnicas han sido desarrolladas en la **Sección de Periodoncia** del departamento de **Estomatología III** de la Facultad de Odontología. El laboratorio de Investigación participa en proyectos relacionados con el estudio de marcadores inmunológicos con resultados satisfactorios. Además, representa una ayuda muy útil para el diagnóstico y tratamiento de los pacientes atendidos en el Máster de Periodoncia de la misma Facultad. Se ofrece a los investigadores ayuda técnica de personal altamente cualificado y asesoramiento en el análisis de los resultados.

Y además

Con estas tecnologías se pueden aportar ayudas en investigación y en odontología clínica en varios sentidos:

- **Añadir** el análisis de variables inmunológicas en investigaciones dentro del campo de la odontología.
- **Ayudar** en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes a la clínica odontológica, mediante la obtención de consejo basado en el análisis de la respuesta y estado inmunológico de los pacientes.
- **Ayudar** en la investigación de los mecanismos de remodelación ósea implicados en el desarrollo de la periodontitis a través de estudios "in vitro".
- **Ayudar** en la investigación de otras enfermedades sistémicas relacionadas con el desarrollo de patologías orales.

Investigador responsable

Mariano Sanz Alonso: marianosanz@odon.ucm.es
Dpto. de Estomatología III
Facultad de Odontología