

4.2 The most widely used method for viral diagnosis

4.2 La técnica más empleada para el diagnóstico vírico

Bienvenidos. Hay técnicas serológicas en las que la cantidad de anticuerpos se cuantifica más rápidamente que en la neutralización vírica que vimos en el video anterior, aunque eso sí, sin valorar la capacidad protectora de los mismos. Estas técnicas tienen en común que uno de los dos reactivos, el antígeno o, más frecuentemente, el anticuerpo, están **marcados** con una molécula, que puede ser fluorescente, un isótopo radiactivo, un metal pesado, o una enzima. Dependiendo del marcador se llaman de una u otra forma, aunque el fundamento es siempre el mismo. En este video vamos a ver las pruebas que emplean enzimas como marcadores, en concreto una que se llama ELISA, y no vayas a pensar que es porque alguien con ese nombre la inventó.

En todas las pruebas que emplean marcadores, primero hay que adsorber o unir los anticuerpos o los antígenos a una superficie de la que no deben desprenderse, llamada **fase sólida**, y el proceso de adsorción o fijación se llama “**tapizado**”. En el caso del ELISA, la fase sólida puede ser una placa de poliestireno, típicamente de 96 pocillos con el fondo plano. Tras haber tapizado y lavado, se añade por duplicado, es decir, en dos pocillos, la muestra problema, que será antígeno vírico, si la placa está tapizada con anticuerpos, o suero si lo está con antígeno vírico. Tras la incubación a la temperatura adecuada para favorecer la unión Ag-Ac, generalmente a 37°C, se lava con cuidado, pero a conciencia para eliminar los reactivos que no hayan quedado fijados a la fase sólida. Se continúan añadiendo reactivos, incubando y lavando tantas veces como requiera el protocolo de cada tipo concreto de ELISA. El penúltimo reactivo suele ser el “**conjugado**”, que son anticuerpos unidos a una enzima, es decir “**marcados**”, para tras la incubación y lavado correspondiente, añadir el sustrato de la enzima.

Las enzimas más utilizadas son la peroxidasa, la fosfatasa alcalina y la luciferasa. En todos los casos se va a producir una reacción coloreada o no, cuya intensidad depende de la cantidad de enzima presente en el pocillo, lo que se cuantifica con el instrumento correspondiente.

Como siempre, no debemos olvidarnos de poner controles positivos y negativos. Vamos a ver algunos tipos de ELISA.

ELISA indirecto

Consiste en tapizar el pocillo con antígeno, añadir el suero problema, es decir, la muestra, y el conjugado, que en este caso son anticuerpos anti-inmunoglobulina de la especie de la muestra, marcados con la enzima. Este anticuerpo se llama **anticuerpo secundario**. Ya sabes que hay que incubar y lavar entre cada paso. Si hay anticuerpos específicos, al añadir el sustrato de la enzima se observará color.

ELISA competitivo

El ELISA competitivo es una técnica de ELISA que se puede adaptar para detectar anticuerpos o antígenos. Veamos primero cómo es para cuantificar anticuerpos. El primer paso consiste en añadir el suero problema a una cantidad constante de virus, que actúa como antígeno. Tras incubar, se añade la mezcla a los pocillos tapizados con anticuerpos. Si había muchos

anticuerpos en la muestra habrá poco virus libre para unirse a los anticuerpos de la placa. El último paso consiste en añadir un conjugado anti-virus, y obviamente, el sustrato de la enzima. En el caso de una muestra positiva con alto título, habrá poca señal luminosa en el pocillo, por eso se llama competitivo.

También podríamos hacer esta prueba de otra manera, como si fuera un ELISA indirecto, en el que tapizáramos con el antígeno, en vez de con anticuerpos. En este caso, añadiríamos simultáneamente la muestra problema y un conjugado anti-virus marcado con la enzima. Ambos tipos de anticuerpos compiten por unirse con el virus, por lo que, si el título del suero problema es alto, no hay espacio para el conjugado y no se desarrollará color, o este será muy tenue como podemos observar en esta imagen.

Seguro que tú sabes hacer las modificaciones adecuadas para detectar el antígeno vírico en vez de los anticuerpos del suero.

ELISA sandwich

El último tipo de ELISA del que vamos a hablar es el sándwich. Los pocillos se tapizan con anticuerpos y la muestra es el virus problema, que si se corresponde con los anticuerpos, se quedará fijado al pocillo. La detección se realiza mediante un conjugado anti-virus, habiendo más color en los pocillos en los que más virus haya.

Antes de finalizar este video, es conveniente que sepas que hay sistemas que permiten diferenciar animales vacunados de animales infectados, lo que es muy importante en veterinaria. Para ello, la vacuna ha de estar diseñada de forma que no contenga todos los antígenos víricos, aunque por supuesto debe contener los que estimulan una respuesta neutralizante que vimos en el video anterior. Estos sistemas se llaman DIVA, y emplean dos tipos diferentes de ELISA. Detén el video para ver en qué consisten.

¡Gracias por tu atención!