

MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES

Luz Marina Mantilla
Programa Epidemiología Vegetal
CORPOICA

1. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico acertado y temprano de las enfermedades de plantas es un componente crucial para su manejo. Las enfermedades pueden ser controladas efectivamente, si las medidas de control son implementadas en estados tempranos de desarrollo de la enfermedad.

Confiar en los síntomas no es adecuado, ya que la enfermedad puede desarrollarse, sin que exista una manifestación de estos y su expresión puede ser altamente variable.

Dentro de los métodos convencionales de diagnóstico de las enfermedades, se pueden relacionar los siguientes: observación de síntomas, pruebas con plantas indicadoras (virus), examen microscópico de las partes afectadas, caracterización morfológica del agente etiológico, determinación de propiedades bioquímicas de los aislamientos bacterianos, entre otros.

Recientemente los avances de la biología molecular y la biotecnología, son aplicados para el desarrollo de pruebas rápidas específicas y sensibles en la detección de patógenos de plantas, especialmente virus y bacterias, desarrollándose pruebas para inmunodiagnóstico y técnicas moleculares de detección de ácidos nucleicos. Dichas tecnologías son aplicadas en los últimos años para hongos, micoplasmas y nemátodos; se considera entonces que la complementación de las técnicas convencionales con los nuevos avances tecnológicos generan más precisión y permiten el manejo acertado de las plagas.

El objetivo del presente escrito radica en dar a conocer algunos métodos, incluidos en las nuevas tecnologías, y generar expectativas para su uso de acuerdo con el objeto de estudio y las condiciones de trabajo.

Dentro de los inmunoensayos se tendrán en cuenta los métodos que implican detecciones cualitativas, como en el caso de la aglutinación por látex y la inmunodifusión; y cuantitativas, como el ensayo sobre inmunoabsorbente con enzima unido (ELISA) cuya denominación proviene del inglés "Enzyme-linked immunoabsorbent assay"; ensayos con inmunofluorescencia y una herramienta de diagnóstico novedosa, tal como la tecnología de los anticuerpos monoclonales.

Dentro de la detección de los ácidos nucleicos, se presentan los métodos de hibridación tales como: Dot-Blot, marcapos no radiactivos, fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2. REACCION ANTIGENO - ANTICUERPO

El sistema inmunitario funciona de dos formas diferentes, mediante la inmunidad HUMORAL y la inmunidad CELULAR.

La inmunidad Humoral, hace referencia a la proporcionada por moléculas en disolución en el organismo. Las moléculas responsables de esta inmunidad son las proteínas llamadas en su conjunto INMUNOGLOBULINAS (Ig). Cada molécula individual es un anticuerpo, término que también se puede referir a las inmunoglobulinas, que reaccionan con determinado material. La inmunidad Celular, esta dada por células.

La inyección de cualquier sustancia extraña al organismo de un animal, promueve la formación de anticuerpos y células inmunes capaces de unirse a dicha sustancia. La sustancia que produce la formación de anticuerpos o células inmunes se le conoce con el nombre de ANTIGENO.

La función de una molécula de anticuerpo es la de unirse con alta afinidad a una región limitada de un antígeno. En tal unión intervienen fuerzas de van der Waals, fuerzas iónicas e hidrofóbicas, sin que se forme ningún enlace covalente entre el anticuerpo y el antígeno.

El sitio de un antígeno al que se une un anticuerpo dado es el determinante. La superficie de una molécula proteica presenta muchos determinantes posibles, a los que se pueden unir los anticuerpos. Algunos antígenos tienen estructuras repetitivas, de forma que el mismo determinante puede darse muchas veces. Este tipo de antígeno se denomina multivalente. Un buen ejemplo de esto lo constituye una partícula viral (Figura 1).

La molécula del anticuerpo está dividida en dos regiones análogas: dominios de unión, que interaccionan con el antígeno, y dominios efectores, que constituyen la señal para el inicio de procesos, tales como la fagocitosis. También cada molécula del anticuerpo está constituida por dos tipos de cadenas polipeptídicas de distinto tamaño: cadenas ligeras (L) y cadenas pesadas (H); el anticuerpo es bivalente y posee dos sitios de reconocimiento (Figura 2).

3. REACCIONES DE PRECIPITACIÓN

Las reacciones de precipitación ó precipitinas, son las reacciones que mas han contribuido al desarrollo de la inmunquímica. El nombre de la reacción es derivado de la formación de un precipitado visible, el cual es formado cuando cantidades adecuadas de antígeno y anticuerpo son adicionadas para su combinación tales reacciones se pueden realizar en medios líquidos o en geles de agar.

La precipitación es un término utilizado para describir la insolubilización de macromoléculas y partículas virales; mientras que la aglutinación se refiere al agrupamiento de células o de partículas de tamaño similar

El tamaño del antígeno reaccionante influencia la interacción del número de moléculas requeridas de anticuerpo, para producir una agregación visible.

En la curva de precipitina puede notarse que en la medida en que se agrega más antígeno, se alcanza un estado óptimo, tras el cual se forma menos precipitado.

En estas reacciones se presentan dos estados: el primero es el reconocimiento inmune específico, que lleva a la formación del complejo antígeno-anticuerpo; el segundo, en el cual se da la reacción de precipitación, que consiste en la formación de una fase hidrofóbica e insoluble en ciertas condiciones iónicas y de pH.

Los agregados que se forman mediante esta reacción, pueden ser cuantificados por nefelometría, dada por la turbidez presentada en cada tubo, la cual es medida a través de la dispersión de una fuente luminosa.

4. INMUNODIFUSIÓN SIMPLE: DIFUSIÓN SENCILLA O SIMPLE

Esta técnica también conocida como el método de Oudin, requiere que un reactante externo, usualmente en una fase líquida, migre dentro de un gel que contiene el otro reactante. Esto significa que el reactante que se difunde debe estar presente en un exceso considerable en comparación con el reactante interno.

La difusión de una mezcla compleja de antígenos en un gel, dará lugar a múltiples líneas de precipitación, que traslapan parcialmente unas con otras. Si se usa un anticuerpo monoespecífico, el antígeno correspondiente se suele identificar fácilmente en diferentes muestras, por la presencia o ausencia del inmunoprecipitado en el gel. Con anticuerpo específico, es también posible revelar grupos específicos antigénicos en proteínas similares de diferente origen biológico.

Esta técnica puede ser utilizada para evaluación cualitativa de mezclas de antígenos, pero su aplicación principal ha sido en el campo de la determinación de antígenos proteicos en líquidos biológicos.

5. DOBLE INMUNODIFUSIÓN O INMUNODIFUSIÓN DOBLE

Técnica descrita por Ouchterlony en 1958, es el método más empleado para la identificación y estudio de virus, bacterias y hongos fitopatógenos.

En esta técnica el antígeno y el anticuerpo se difunden en el gel y al unirse, forman líneas de precipitación que permanecen estacionarias, si las concentraciones de antígeno y anticuerpo empleadas corresponden a su punto de equivalencia.

Este es un método muy aceptado pues puede diferenciar mezclas de antígenos y determinar, mediante los patrones de las líneas de precipitación definidas, las reacciones de identidad parcial o no identidad entre antígenos.

En virología vegetal, esta técnica fue introducida por Van Regenmortel y Engelbrecht en 1962, para la determinación rápida de virus isométricos. También se ha empleado con la gran mayoría de virus y ha dado apoyo a los programas de control fitosanitario, evaluación y control de la calidad de semillas de papa, tabaco y leguminosas en algunos países del mundo.

En la parte de bacteriología se ha empleado en el diagnóstico de especies fitopatógenas y ha permitido establecer la presencia de serotipos en especies como: *Pseudomonas phaseolicola*, *Erwinia carotovora*, *E. chrysanthemi* y *Xanthomonas campestris*, entre otras.

6. INMUNODIFUSIÓN RADIAL

Este método está basado en el principio de la difusión en dos dimensiones. Usualmente se realiza en cajas petri, con una concentración de anticuerpos que están contenidos en el agar. El antígeno es colocado en pequeños pozos que difunden radialmente en el medio. Se forma entonces un halo de precipitación alrededor del pozo, hasta que todo el antígeno es consumido, incrementándose así el tamaño de este. Cuando el halo no se incrementa más en diámetro, se puede encontrar una medida cuantitativa de la concentración del antígeno; cuanto mayor sea la concentración de este, mayor será el diámetro del halo. Si se incorporan por ejemplo tres patrones de concentración conocida del antígeno, puede obtenerse una curva de calibración que pueda utilizarse para determinar la cantidad de antígeno que se encuentra en muestras conocidas.

La principal área de aplicación de este método ha sido el estudio de virus de plantas, lo cual ha llevado a un diagnóstico rápido, mediante la disociación química de las proteínas de las cápsidas de estos.

Esta prueba es más sensible que la de procedimientos de doble difusión. Ha sido utilizada para el diagnóstico masivo en cultivos de importancia como la papa, para la titulación de anticuerpos contra virus y bacterias fitopatógenas y en la evaluación de su especificidad.

7. INMUNOELECTROFORESIS

Esta técnica es una herramienta analítica importante para separar mezclas complejas de antígenos. Esta diferenciación se establece partiendo de dos criterios: la movilidad electroforética y la especificidad antigénica.

La mezcla de antígenos es primero separada en sus componentes en los geles de agar. El anticuerpo es colocado en un canal paralelo a la ruta de la migración electroforética y así las líneas de precipitación (inmunodifusión), son desarrolladas.

Dentro de sus aplicaciones se incluye la caracterización de los virus de plantas, diferenciación entre cepas de virus y viriones y las disociaciones de sus unidades proteicas; se ha empleado para caracterizar detalladamente patovarietades de *Xanthomonas campestris*, y en la determinación de las relaciones entre diferentes aislamientos de *Diplodia natalensis*, procedentes de distintos hospederos.

8. AGLUTINACIÓN POR LÁTEX

Este fenómeno de aglutinación, conocido desde principios de siglo, es una de las reacciones antígeno anticuerpo más empleada en la práctica serológica.

En esta técnica, el anticuerpo es absorbido o pegado a partículas comerciales de poliestireno, luego de la determinación de la concentración a utilizarse, sea de antisuero ó inmunoglobulina purificada. Al enfrentar las partículas de látex sensibilizadas al antígeno específico, se produce la reacción de las esferas magnificando de esta forma la reacción inmune.

El mecanismo de aglutinación no solo está influenciado por la unión antígeno-anticuerpo; también influyen factores como la heterogeneidad de las clases de inmunoglobulinas presentes, diferencias intrínsecas en la afinidad de los anticuerpos involucrados y la constante dieléctrica del medio.

Los ensayos de aglutinación son sencillos y sensibles y requieren poca cantidad de reactivos.

En fitopatología esta técnica, se ha utilizado para el diagnóstico de rutina de virus alargados e isométricos; así como, para el estudio de relaciones antigénicas. En bacteriología se ha usado para detectar bacterias tales como: *Clavibacter michiganensis* y *Pseudomonas solanacearum*

9. TÉCNICAS DE ANTICUERPOS MARCADOS

La sensibilidad de las reacciones antígeno-anticuerpo, pueden ser incrementadas mediante la unión de marcadores, dentro de las cuales se encuentran: enzimas, colorantes fluorescentes y materiales radiactivos.

El uso de enzimas para marcar anticuerpos fue primero reportada en 1966 y originalmente desarrolla para localizar antígenos en preparaciones histológicas. A nivel óptico y de microscopía electrónica se encontró que cuando los reactantes estaban unidos a una fase sólida, los ensayos inmunoenzimáticos eran apropiados para mediciones cuantitativas de antígenos y de anticuerpos. Como resultado se obtuvo el método conocido como ELISA.

Este método ha sido empleado satisfactoriamente para detectar diferentes tipos de antígenos como: virus, bacterias, hongos, micoplasmas, ácidos nucleicos y pequeñas proteína o los anticuerpos inducidos por ellas.

La presencia de la reacción antígeno-anticuerpo se revela, mediante la adición del sustrato específico de la enzima y la consiguiente formación de hidrolizados coloreados, que permiten la evaluación visual de los resultados. Dado que la retención de enzima es proporcional a la cantidad de antígeno o anticuerpo inmovilizado, es posible realizar la evaluación cuantitativa por colorimetría.

Para la utilización de este método se deben tener en cuenta algunos aspectos importantes:

La fase sólida que generalmente son microplacas de poliestireno, donde se realiza la absorción pasiva del antígeno o del anticuerpo en presencia de una solución alcalina o buffer de cobertura. En este proceso juegan papel importante las fuerzas electrostáticas. Otro inmunoabsorbente utilizado, son las membranas de nitrocelulosa.

La calidad del antisuero es una variable muy importante. Estos se producen en animales, generalmente conejos jóvenes. Se debe adoptar un esquema de inmunización, que depende de las características del antígeno y de la utilización que se dará a los antisueros.

Debe tenerse siempre en cuenta la dinámica de la respuesta inmune humoral, para tomar el suero en el momento de mayor producción de las inmunoglobulinas G.

Las inmunoglobulinas deben ser sometidas a procesos de separación y purificación mediante filtración en gradientes de densidad, ultrafiltración o cromatografía de intercambio iónico. Luego de estos procedimientos se deben almacenar a temperaturas bajas.

9.1. Tecnología de los ácidos nucleicos para el diagnóstico

Las técnicas de hibridación de los ácidos nucleicos son herramientas bien establecidas en la biología molecular. Dependen en alto grado, de la especificidad inherente a la secuencia de los pares de bases que existen en los nucleótidos. Como resultado de dicha especificidad, se están aplicando con propósitos de diagnóstico, incluyendo la detección de patógenos.

Las pruebas de los ácidos nucleicos ofrecen una ventaja sobre los métodos serológicos, ya que, pueden hacerse para un set completo de genes con un patógeno dado.

Un sistema de detección de patógenos de plantas a gran escala, puede ser realizado utilizando CDNA clonado o DNA prueba, en un ensayo denominado Dot-Blot. Estas pruebas tienen un potencial para detectar diferencias individuales de nucleótidos. Este grado de especificidad puede ser esencial para diferenciar entre virus severos o atenuados; y con el fin de determinar razas de hongos, nemátodos, bacterias y mycoplasmas.

9.2. Ensayo dot-blot

Un reciente desarrollo en hibridación es el ensayo dot-blot y representa un potencial considerable para el estudio y diagnóstico de patógenos de plantas.

En términos generales, el ácido nucleico blando, procedente de una planta, hongo o insecto vector, es colocado sobre una matriz sólida, comúnmente nitrocelulosa, y enlazado mediante calor. Los sitios libres ligados sobre esta matriz, son bloqueados con un DNA no homólogo, procedente de esperma de salmón ó DNA de timo de ternera y una fuente de proteína, usualmente leche descremada en polvo o BSA. Después de esto, la hibridación con un DNA prueba, marcado con fósforo ³² (P), es llevada a cabo. El DNA marcado es detectado por autorradiografía; o por una reacción colorimétrica, si una enzima marcada es utilizada. Los pasos siguientes son

similares a los del ELISA, sin embargo, la base del enlace es diferente, ya que mientras el ELISA está basado en la reacción antígeno-anticuerpo, la hibridización está basada sobre la alineación de bandas complementarias de ácidos nucleicos.

Se debe recordar que hibridizar significa complementariedad de secuencias de nucleótidos (bases nitrogenadas). Para ajustar estas condiciones se debe tener en cuenta: temperatura, concentración de sales, concentración de formamida y la cantidad de pares de bases.

9.3. Fragmentos de restricción de longitud polimórfica

Esta técnica utiliza enzimas de restricción para fragmentar el DNA, el cual es entonces separado en geles de agarosa mediante la técnica de electroforesis.

Cada enzima de restricción reconoce una secuencia específica de nucleótidos y corta el DNA en un sitio determinado, siempre que la secuencia aparezca. El fragmento DNA es separado mediante geles de electroforesis y los patrones de bandeamiento son visibles mediante tinción con bromuro de etidio o por autorradiografía. Cuando el DNA mitocondrial (mt DNA), el cual tiene un rango de 10 a 200 pares de kilobases en longitud, procedente de diferentes especies, es examinado, diferencias en el tamaño y número de fragmentos de restricción pueden ser detectados. Estas diferencias pueden resultar, de insertos o deleciones entre los sitios de restricción. Las diferencias observadas en los fragmentos de restricción son conocidos como RFLPs.

Estas pruebas ayudan a identificar regiones del genoma o del DNA mitocondrial, que pueden ser usadas en el desarrollo de pruebas de razas específicas.

9.4. MÉTODOS DE HIBRIDIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

La hibridización de los ácidos nucleicos depende en alto grado de la especificidad inherente a las secuencias de los pares de nucleótidos. Es una herramienta establecida en la biología molecular.

Como resultado de esta especificidad la técnica esta siendo aplicada para propósitos de diagnóstico, incluyendo la detección de patógenos.

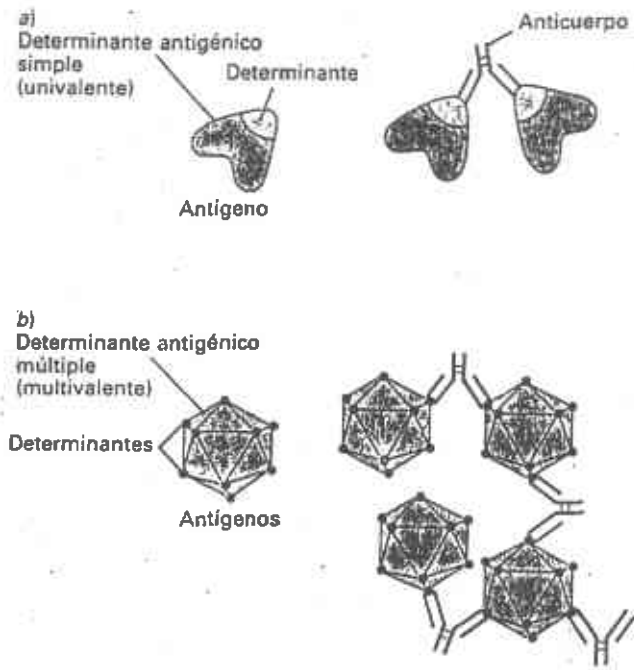


Figura 1. Los anticuerpos se unen a determinantes simples o múltiples de un antígeno. a) Unión de un anticuerpo a una proteína con un determinante único. Los dos sitios del anticuerpo pueden ser ocupados, pero el complejo no puede continuar creciendo. Los anticuerpos naturales son mezclas de moléculas que pueden unirse a muchos determinantes de un antígeno, siendo potencialmente capaces de formar amplios agregados. b) Algunos antígenos, especialmente los virus, presentan múltiples determinantes idénticos en una única partícula. Incluso una población pura de anticuerpos es capaz de formar grandes agregados al reaccionar con este tipo de antígenos.

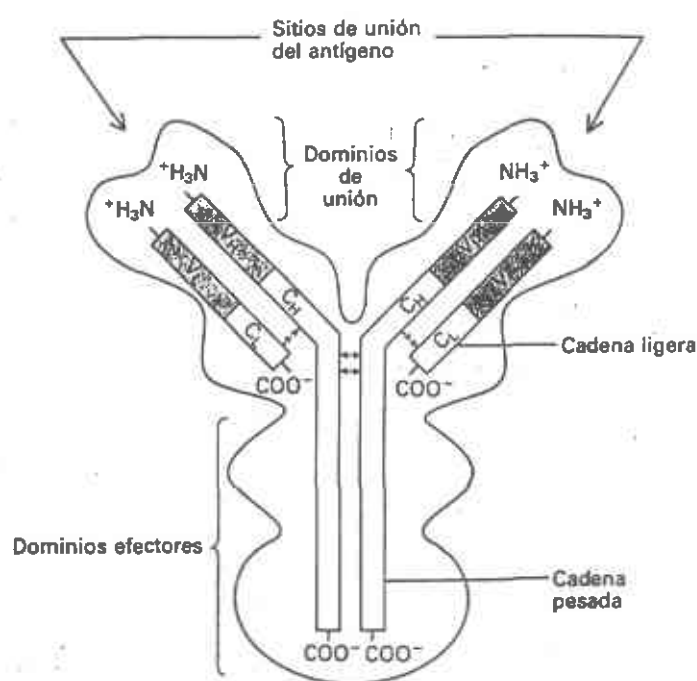


Figura 2. Representación esquemática de una molécula de anticuerpo. La fijación del antígeno se produce en los dos extremos superiores de la Y que forma la molécula, donde las cadenas ligera y pesada están en íntimo contacto. La porción inferior de la Y contiene la región efectora, formada únicamente por dominios de las cadenas pesadas. Se indican los extremos N terminal (NH_3^+) y C terminal (COO^-) de las cadenas ligeras y pesadas. Puentes disulfuro (S-S) unen las distintas cadenas entre sí.