

Diagnóstico por detección de antígenos

John J. Estrada

La demostración del agente causal constituye el diagnóstico definitivo. En los últimos años se han desarrollado técnicas de diagnóstico por medio de las cuales es posible la detección de antígenos producidos por los agentes causales. Dichos antígenos pueden encontrarse circulando en los fluidos corporales o pueden detectarse en los tejidos del huésped. En el presente artículo se discuten varias de las aplicaciones de esta metodología para el diagnóstico y se hacen comparaciones con métodos tradicionales tales como la histopatología, el cultivo y la detección de anticuerpos específicos. Se discuten también las ventajas y dificultades técnicas de los métodos para la detección y cuantificación de antígenos circulantes. Se da particular importancia al enzimo-inmunoensayo (ELISA) ya que éste se ha impuesto como método de diagnóstico. Además se presentan algunas experiencias adquiridas en nuestro laboratorio en la detección de antígenos parasitarios circulantes.

INTRODUCCION

Indudablemente, el diagnóstico más seguro es la demostración del agente causal. Para tal efecto, se han desarrollado diferentes métodos, siendo los más clásicos el cultivo de los agentes infecciosos a partir de las lesiones o de los fluidos corporales y los métodos histológicos. Ambos tienen grandes limitaciones; por ejemplo, en la mayoría de los casos los cultivos requieren de mucho tiempo para lograr la demostración del agente causal o muchos de los patógenos de importancia médica

no permiten su cultivo en los medios desarrollados hasta hoy. Igualmente, las técnicas tradicionales de cultivo o tinción no son efectivas cuando los agentes bacterianos tienen períodos de replicación largos o cuando se pretende hacer el diagnóstico a partir de fluidos corporales en pacientes que han sido previamente tratados con antibióticos. En muchos de los casos el diagnóstico histopatológico requiere de la obtención de los tejidos por métodos invasivos, el procesamiento de las muestras es lento y los resultados están sujetos a diferentes interpretaciones.

Los métodos serológicos tradicionales se basan en la detección y cuantificación de anticuerpos contra los agentes etiológicos. Para que el sistema inmune produzca anticuerpos específicos contra un agente se requiere que el mismo entre al organismo y desencadene una serie de eventos. Después de dicha entrada hay un período de latencia antes de que se puedan detectar los anticuerpos específicos contra el agente. Estos anticuerpos pueden persistir por muchos años, aun después de la cura o del tratamiento exitoso. La presencia de anticuerpos es indicativo de la exposición al agente causal pero, en muchos casos, no diferencia entre un proceso actual o pasado. En personas inmunosuprimidas la producción de anticuerpos está afectada y por lo tanto éstos no podrán detectarse. A lo anterior se agrega el hecho que los agentes patógenos pueden causar la inmunosupresión como uno de los mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped.

Muchos son los "agentes extraños" causantes de patología en el hombre. Estos agentes se valen de mecanismos para no ser reconocidos y atacados por el sistema inmune, pero, afortunadamente para nosotros, ellos se delatan cuando dejan tra-

Dr. John J. Estrada Mesa: Inmunólogo, Profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, Medellín.
Solicitud de separatas al Dr. Estrada.

zas o evidencias de su presencia. Las trazas deladoras producidas por los agentes pueden ser productos metabólicos, ADN u otros componentes. Cuando esos componentes pueden ser reconocidos por anticuerpos o por otros elementos del sistema inmune, se les denomina antígenos. Es posible aislar esos componentes y producir anticuerpos monoclonales o policlonales en otra especie diferente a la humana, por ejemplo, ratones o conejos. Esos anticuerpos obtenidos en otra especie animal contra los antígenos deladores pueden utilizarse *in vitro* como identificadores de tales antígenos. Tomemos, por ejemplo, el caso de una bacteria X la cual puede liberar proteínas en el plasma de un individuo. Si disponemos de un anticuerpo identificador de esas proteínas, podemos ponerlo en contacto con el plasma del individuo infectado utilizando un método de laboratorio. El reconocimiento de las proteínas de la bacteria X por parte de los anticuerpos identificadores sería indicativo de infección. El método de laboratorio no implica el cultivo de la bacteria ni su tinción ni la detección de anticuerpos específicos contra la misma en el plasma del individuo. Además, este método puede ser bastante sensible y específico, dependiendo de la afinidad del anticuerpo identificador por el antígeno y de las condiciones que permitan la detección del mismo.

Debido al avance de la inmunología y ciencias afines como la biología molecular y la bioquímica es posible hoy en día hacer una caracterización bastante precisa de los componentes antigénicos de cualquier molécula. De tal manera que se pueden encontrar aquellas porciones "exclusivas" de las moléculas antigénicas, que no tienen repetición en otras moléculas. Los anticuerpos son capaces de discriminar entre pequeñas diferencias, aun diferencias de un aminoácido. Los anticuerpos son entonces herramientas muy poderosas que pueden utilizarse como marcadores. A esa capacidad discriminatoria, conocida como especificidad, se agrega la afinidad que puede entenderse como la fuerza de unión del anticuerpo con su antígeno. Las reacciones antígeno-anticuerpo no pueden verse, a no ser que la cantidad de antígenos y anticuerpos sea lo suficientemente grande para que

los complejos antígeno-anticuerpo se precipiten y puedan verse. En el caso que nos ocupa, los antígenos producidos por los agentes invasores no se encuentran en grandes cantidades en los fluidos corporales o en los tejidos del huésped. Se requiere entonces de métodos de visualización de la reacción antígeno-anticuerpo. Por ejemplo, partículas de látex con anticuerpos unidos a su superficie pueden aglutinar en presencia de un antígeno que se encuentre en un fluido corporal y que sea reconocido por tales anticuerpos (1,2).

Los anticuerpos identificadores pueden también marcarse con radioisótopos; en tal caso el indicativo de la reacción antígeno-anticuerpo en una prueba de diagnóstico serológico sería la detección de radioactividad, la cual puede cuantificarse, dándonos una idea de la cantidad de antígeno presente. En los últimos años las pruebas inmunoenzimáticas tipo ELISA han desplazado a las pruebas radioinmunológicas ya que las primeras ofrecen igual o mayor sensibilidad, son menos costosas, más fáciles de cuantificar, la vida media de las enzimas es más larga que muchos de los radioisótopos utilizados y el operador no se expone a sustancias radioactivas. En estas pruebas los antígenos o los anticuerpos son marcados generalmente con enzimas. Después de la reacción antígeno-anticuerpo se adiciona un sustrato específico para la enzima. La reacción enzima-sustrato produce un color, el cual puede determinarse macroscópicamente, microscópicamente o con el uso de un espectrofotómetro. Las variaciones colorimétricas son indicativo de la cantidad de antígeno circulante (3).

El objetivo del presente artículo no es el de dar información sobre las diferentes posibilidades técnicas para la detección de antígenos. Es más importante discutir las ventajas y las desventajas de esta tecnología y dar algunos ejemplos concretos sobre su uso. Además se discutirá en detalle la utilización de las técnicas inmunoenzimáticas y se darán algunos ejemplos de su uso en nuestro laboratorio para la detección de antígenos. Las técnicas inmunoenzimáticas se han impuesto sobre otras en la detección de los agentes invasores (4, 5).

Ventajas del enzimo-inmunoensayo (ELISA) en la detección de antígenos

Mayor sensibilidad, ya que antígenos o anticuerpos marcados con enzimas u otros marcadores dan un poder de magnificación. Una molécula de la enzima puede catalizar muchas moléculas del sustrato, favoreciendo la reacción colorimétrica la cual es detectable a simple vista y cuantificable con la ayuda de colorímetros.

Los componentes de los sistemas de ELISA son estables y pueden guardarse por un tiempo largo.

Automatización. Con el desarrollo de microtécnicas se permite el diagnóstico en muchas muestras. Cada muestra puede ser estudiada para la búsqueda de antígenos de varios microorganismos. Lo anterior se facilita con el uso de espectrofotómetros adecuados para tales microtécnicas.

Más rapidez y menos costo, comparado con los cultivos in vitro para la identificación de los agentes patógenos.

Debido a que estas técnicas detectan antígenos en vez de organismos vivos, el diagnóstico específico puede hacerse aun cuando el paciente ha recibido antibióticos. En los métodos de cultivo, la terapia con antibióticos hace que los cultivos sean negativos.

La detección de antígenos tiene valor para el diagnóstico, el seguimiento durante y después del tratamiento médico y el pronóstico.

La detección directa de los antígenos es indicativo de infección activa, en oposición a la detección de anticuerpos.

La detección del antígeno puede hacerse mucho antes de la seroconversión, cuando los anticuerpos son positivos, lo cual puede presentarse en meses o años después de la infección con el microorganismo.

La detección y cuantificación de cantidades muy pequeñas de antígeno, no detectables por otros métodos.

Dificultades

Los anticuerpos preformados en el organismo del individuo pueden formar complejos antígeno-anticuerpo en los fluidos corporales o en los tejidos en los cuales se pretende demostrar la pres-

encia del antígeno. Estos anticuerpos inhibirían la unión del antígeno con el anticuerpo identificador. Además, los complejos antígeno-anticuerpo son removidos de la circulación por las células fagocíticas. Este inconveniente ha sido resuelto en parte con el desarrollo de técnicas que permiten el tratamiento de la muestra con agentes que disocian los complejos preformados, permitiendo así que los antígenos sean identificados. Otro problema es el de las reacciones cruzadas entre el anticuerpo identificador y antígenos de diferentes especies u organismos; por ejemplo, anticuerpos identificadores contra *N. meningitidis* pueden reaccionar en forma cruzada con *E. coli* y *H. parainfluenzae*. Esto no estaría a favor de la especificidad de la prueba diagnóstica. Con el avance de los métodos de caracterización antigénica y de producción de anticuerpos monoclonales y policlonales específicos se está obviando este último problema.

Detección de antígenos en fluidos corporales

Plasma o suero sanguíneo. Antígenos de bacterias (6, 7), virus (8-10), hongos (11) o parásitos (12-14) pueden ser detectados usando una variedad de técnicas inmunoenzimáticas. Dichas técnicas se han ido refinando con el fin de aumentar su sensibilidad y de acortar el tiempo de realización de las mismas. Además, ya se consiguen en el mercado gabinetes que permiten un diagnóstico fácil.

Líquido cefalorraquídeo. La detección de antígenos en este fluido corporal ha mejorado grandemente el diagnóstico de las afecciones del sistema nervioso (15). Debido a que en muchas de las enfermedades que afectan al sistema nervioso se requiere de un diagnóstico preciso y rápido, la detección de antígenos es una alternativa promisoría. El diagnóstico al momento del ingreso del paciente permite el establecimiento de la terapia correcta, el seguimiento y el pronóstico. En este campo se han desarrollado técnicas inmunoenzimáticas para la detección de *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* (16), y tuberculosis (17).

En nuestro laboratorio hemos desarrollado

métodos inmunoenzimáticos para la detección de antígenos de *C. cellulosae*, el estadio larvario de la tenia del cerdo, causante de la neurocisticercosis. La detección y cuantificación de antígenos del parásito en líquido cefalorraquídeo es un diagnóstico preciso. La especificidad y sensibilidad son altas (18, 19). Hemos encontrado correlación entre el estado clínico-radiológico y la cantidad de antígeno circulante; además, la cuantificación de los antígenos durante y después del tratamiento médico permite vigilar la efectividad del tratamiento y la aparición de recaídas.

Orina. La facilidad de obtención de una muestra de orina para el diagnóstico y seguimiento es una gran ventaja. En algunos casos se requiere de la concentración de la orina, lo cual puede hacerse fácilmente. La detección de antígenos en orina se ha realizado para virus, bacterias y hongos (7, 9, 20-24). Hay también algunos métodos inmunoenzimáticos de detección de antígenos en orina para el diagnóstico de enfermedades parasitarias (25,26).

Materias fecales. Antígenos de los microorganismos y parásitos entéricos, tales como giardias y amibas, pueden encontrarse en las heces (27). Además, la detección de toxinas puede hacer el diagnóstico de diarreas producidas por *E. coli* y *V. cholerae* (28).

Detección de antígenos en otros fluidos corporales y en tejidos

Aparte de las técnicas mencionadas, se están desarrollando métodos que permiten la detección de antígenos de agentes patógenos en saliva, esputo, secreciones bronquiales, exudados vaginales, líquido pericárdico, líquido sinovial y líquido pleural (29, 30). Por métodos inmunoenzimáticos puede hacerse la identificación de microorganismos en cortes de tejidos, tomando ventajas de la sensibilidad de estos métodos. La disponibilidad de anticuerpos específicos permite la identificación de antígenos en extractos de tejidos tomados de los pacientes.

ABSTRACT

Despite many diagnostic techniques, demonstration of the causative agent still constitutes the

definite diagnostic proof. In the last few years several laboratory procedures have been developed by which the antigens of etiologic agents can be detected and quantified. These antigens can be found in body fluids or in tissues of the compromised host. This paper deals with the various applications of antigen detection as a diagnostic tool; its advantages and technical difficulties are also discussed. Particular attention is given to Enzyme-Linked Immunoassays (ELISA) which have acquired widespread use. Some of the author experience in detection of parasite antigens by ELISA is also discussed.

REFERENCIAS

1. **Galvin JP.** Particle-enhanced immunoassays. En: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. Manual of clinical laboratory immunology. Washington, D.C., USA. *Am Soc for Microbiol* 1986:38-42.
2. **Nichols WS, Nakamura RM.** Agglutination and agglutination inhibition assays. En: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. Manual of clinical laboratory immunology. Washington, D.C., USA. *Am Soc for Microbiol* 1986:49-56.
3. **Ngo TT.** Enzyme mediated immunoassay: An overview. En: Ngo TT, Lenhoff HM, eds. *Enzyme-mediated, immunoassays*. New York, USA: Plenum Press 1985:3-32.
4. **Kaplan SL, Feigin RD.** Rapid identification of the invading microorganism. *Pediatr Clin North Am* 1980; **27**:783-803.
5. **Yolken RH.** Enzyme immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluids: Current limitations and future prospects. *Rev Infect Dis* 1982; **4**:35-68.
6. **Lenthe-Eboa S, Brighthouse G, Auckenthaler R, et al.** Comparison of immunological methods for diagnosis of pneumococcal pneumonia in biological fluids. *Eur J Clin Microbiol* 1987; **6**:28-34.
7. **Ramsey BW, Marcuse EK, Foy HM, et al.** Use of bacterial antigen detection in the diagnosis of pediatric lower respiratory tract infections. *Pediatrics* 1986; **78**:1-9.
8. **Goudsmit J, Lange JMA, Paul Da, Dawson GJ.** Antigenemia and antibody titers to core and envelope antigens in AIDS, AIDS-related complex, and subclinical human immunodeficiency virus infections. *J Infect Dis* 1987; **155**:558-560.
9. **Henne G, Tiller FW, Diener E.** Quantitation of *Haemophilus influenzae* serotype B capsular polysaccharide antigen in body fluids by enzyme immunoassay. *Biomed Biochim Acta* 1984; **43**:381-388.
10. **Wolters G, Kuijpers LPC, Kacaki J, Schuur AHWM.** Enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1977; **136S**:311-317.
11. **Segal E, Berg RA, Pizzo PA, Bennett JE.** Detection of *Candida* antigen in sera of patients with candidiasis by an enzyme-linked immunosorbent assay-inhibition technique. *J Clin Microbiol* 1979; **10**:116-118.
12. **Dissanayake S, Forsyth KP, Ismail MM, Mitchell GF.** Detection of circulating antigen in bancroftian filariasis by using a monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg* 1984; **33**:1130-1140.
13. **Madwar MA, Hassan MM, Strickland GT.** Circulating antigens for assessing cure in schistosomiasis mansoni. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; **82**:881-884.
14. **Mackey L, Leemans LP, Lambert PH.** The diagnosis of malaria infections using a solid-phase radioimmunoassay for the detection of malaria antigens. *Parasitology* 1980; **80**:171-182.

15. **Conly JM, Ronald AR.** Cerebrospinal fluid: a diagnostic body fluid. *Am J Med* 1983; **28**:102-108.
16. **Kaplan SL.** Antigen detection in cerebrospinal fluid - pros and cons. *Am J Med* 1983; **28**:109-118.
17. **Sada E, Ruiz GM, López Y, Ponce de León S.** Detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet* 1983; **17**:651-652.
18. **Estrada JJ, Kuhn RE.** Immunochemical detection of antigens of larval *Taenia solium* and anti-larval antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. *J Neurol Sci* 1985; **71**:39-48.
19. **Estrada JJ, Almon J, Kuhn RE.** Identification of *Taenia solium* antigens in cerebrospinal fluid and larval antigens from patients with neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 1989; **41**:50-55.
20. **Balmaaza A, Hamel J, Mousseau S, Montplaisir S, Brodeur BR.** Rapid diagnosis of severe *Haemophilus influenzae* serotype B infections by monoclonal antibody enzyme immunoassay for outer membrane proteins. *J Clin Microbiol* 1986; **24**:440-445.
21. **Naqvi SH, Blair LI.** Detection of cytomegalovirus antigen and antibodies in the urine of small infants and children. *J Med Virol* 1986; **18**:139-148.
22. **Schachter J, Pang F, Parks RM, Smith RF, Armstrong AS.** Use of Gonozyme on urine for diagnosis of gonorrhea in males. *J Clin Microbiol* 1986; **23**:124-125.
23. **Kaldany RRJ, Maasho K, Ohman R, et al.** Methods for the detection of a specific *Mycobacterium leprae* antigen in the urine of leprosy patients. *Scand J Immunol* 1987; **25**:37-44.
24. **Robert R, Gauthey N, Chabasse D.** Evaluation of 4 techniques for determining mannan antigens for the immunological diagnosis of septicemic, urinary and vaginal candidiasis. *Bull Soc Franc Mycol Med* 1982; **11**:97-100.
25. **Huijun Z, Zhenghou T, Reddy MVR, Harinath BC, Pessen WF.** Parasite antigens in sera and urine of patients with bancroftian and brugian filariasis detected by sandwich ELISA with monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1987; **36**:554-560.
26. **Freilij HL, Corral RS, Katzin AM, Grinstein S.** Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas disease. *J Clin Microbiol* 1987; **25**:133-137.
27. **Green EL.** Immunological detection of parasite antigens in faeces. *Parasitology Today* 1986; **2**:198-200.
28. **Honda T, Sato M, Miwatani T.** Differential detection of cholera enterotoxin and *E. coli* heat-labile enterotoxin by enzyme-linked immunosorbent assay with antibodies specific to the two toxins. *J Clin Microbiol* 1984; **20**:664-667.
29. **Deluca PA, Gutman LT, Ruderman RJ.** Counterimmunoelectrophoresis of synovial fluid in the diagnosis of septic arthritis. *J Pediatr Orthop* 1985; **5**:167-170.
30. **Lisi PJ, Dondero RS, Kwiatkoski D.** Monoclonal-antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1988; **26**:1684-1686.