



## INMUNODIFUSIÓN RADIAL

### Práctica 4

#### 1. Introducción

La inmunodifusión radial (IDR) es una técnica que puede determinar cuantitativamente la concentración de un antígeno. Es una técnica sensible que es usada clínicamente para detectar niveles de proteínas plasmáticas.

Principio: Un anticuerpo es incorporado en agarosa fundida, la cual es vertida dentro de una caja de Petri la cual se deja solidificar. Se cortan pequeños pozos dentro de la agarosa y estos son llenados con concentraciones conocidas de antígeno correspondientes al anticuerpo, con el objeto de construir una curva de calibración. Las muestras desconocidas se colocan dentro de los pozos. Los antígenos en solución difundirán hacia fuera del pozo en un patrón circular rodeando al pozo. El anticuerpo está presente en exceso y la difusión del antígeno continuará hasta que se forme un precipitado antígeno-anticuerpo en forma de anillo estable. Habrá complejo Ag-Ac en toda la zona circundante al pozo dentro de la línea de precipitación. En esta línea es donde está presente el mayor número de complejos, ya que en ese punto el antígeno y el anticuerpo están en proporciones iguales. Esta es conocida como la zona de equivalencia.

Generalmente toma de 24 a 48 horas para que ocurra la difusión óptima y la precipitación se haga evidente. Para cada antígeno, se formará una precipitación final en anillo de cierto diámetro. De las concentraciones conocidas estándar, se traza una curva de calibración, colocando en los ejes: concentración de antígeno vs mediciones de diámetro cuadrado de los anillos. A partir de esta curva de calibración lineal, la presencia y cantidad de antígeno en las muestras desconocidas pueden ser determinadas.

#### 2. Objetivos

- Comprender la naturaleza de la reacción antígeno-anticuerpo *in vitro*.
- Conocer los factores que intervienen en la reacción Ag-Ac y la forma en que afectan el resultado final.
- Conocer la diferencia entre la reacción primaria y las reacciones secundarias.
- Conocer los diferentes tipos de reacciones secundarias, sus ventajas, desventajas y sus aplicaciones.

#### 3. Alcance

Al final de la práctica el estudiante podrá visualizar los tipos de reacción Ag-Ac *in vitro* que existen así como la aplicación de cada una de ellas de acuerdo a sus características individuales en el diagnóstico serológico.



#### 4. Antecedentes

La reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) es una unión molecular entre el epitopo (antígeno) y la región hipervariable del anticuerpo, mediante interacciones no covalentes o secundarias. Estas uniones son débiles tales como: puentes de hidrógeno, fuerzas iónicas y fuerzas de van der Waals. Estas fuerzas sólo se convierten en agentes de unión efectivos cuando ocurren a distancias muy cercanas. Las interacciones hidrofóbicas intervienen también y constituyen el 50% de la fuerza total. De tal manera que debe ocurrir una combinación de moléculas complementarias entre el sitio de unión del anticuerpo y el determinante antigénico o epitopo. Mientras más se complementan las configuraciones moleculares, más uniones secundarias se forman entre el antígeno y el anticuerpo, y es más difícil que ese complejo sea alterado por fuerzas tales como la agitación térmica.

La asociación Ag-Ac está determinada por la ley de acción de masas, es reversible y está definida por una constante de equilibrio  $K = \frac{AcAg}{(Ac)(Ag)}$ .

La velocidad de la reacción depende de tres factores: la afinidad, la avidéz y la especificidad:

Aunque estos dos términos a menudo son usados indistintamente, no son exactamente lo mismo. La avidéz se refiere a la fuerza de unión mostrada por los anticuerpos a un antígeno complejo (antígeno que contiene una variedad de epitopos), y la afinidad se refiere a la fuerza de unión entre el anticuerpo y un epitopo; es la suma de las fuerzas de atracción sobre las de repulsión.

En la unión Ag-Ac ocurren dos reacciones: la reacción primaria y la secundaria. La reacción primaria es la formación del complejo Ag-Ac y la secundaria es la evidencia de esos complejos mediante la observación de un fenómeno, el cual depende de la naturaleza del antígeno, las propiedades de los anticuerpos y la presencia de otros factores en el medio de reacción.

La mayor aplicación de estas reacciones *in vitro* son las pruebas serológicas. Son llamadas así porque es el suero el vehículo habitual de los anticuerpos. Sin embargo, pueden realizarse en otros fluidos corporales tales como plasma, orina o líquido cefalorraquídeo, en busca de antígenos o anticuerpos específicos.

Una prueba serológica para un antígeno específico idealmente es realizada usando un reactivo de anticuerpo monoespecífico (que contenga anticuerpos reactivos con una sola clase de epitopo). No siempre es posible obtener anticuerpos monoespecíficos, por lo que en estos casos son usados los antisueros polivalentes (que contienen anticuerpos de más de una especificidad).

Existen dos términos importantes en los métodos serológicos:

Idealmente, las pruebas serológicas debieran ser 100% específicas y 100% sensibles. La especificidad se refiere a la relativa ausencia de reacción cruzada de los anticuerpos con sustancias que están químicamente relacionadas (pero no idénticas) al antígeno contra el que se produjeron, y la sensibilidad se refiere a la cantidad más pequeña de sustancia desconocida (antígeno o anticuerpo) que pueda ser detectada por la prueba. Si una muestra reacciona cruzadamente con sustancias naturales diferentes a las que se intentan determinar en la prueba, decimos que se obtiene un resultado biológico falso positivo (BFP). Si una prueba serológica no detecta la sustancia que se está buscando y que realmente sí está contenida en la muestra, se obtiene un resultado biológico falso negativo (BFN). Si en cien muestras de suero que contienen todos los mismos antígenos, la prueba produce cinco BFN, se dice que tiene una sensibilidad del 95%.



**Universidad Mariano Gálvez**  
**Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud**  
**Carrera de Médico y Cirujano**

Existen otros factores, tales como los errores técnicos, que producen resultados falsos positivos y negativos, pero no son considerados de origen biológico.

**5. Materiales**

- Agarosa al 3%
- Alcohol al 70%
- Algodón
- Antiglobulina humana
- Beaker con cloro al 5%
- Cámara húmeda
- Cloro al 5%
- Lámina porta objetos de vidrio
- Laminas con muestras positivas y negativas para inmunodifusión radial
- Muestras de suero desconocidas
- Pipetas automáticas de 20 uL
- Pipetas serológicas de 10 mL
- Pipetores o bulbos
- Puntas amarillas para pipeta automática
- Rosetones para perforar las laminas de agarosa

**6. Procedimiento**

Preparación de una lámina con agarosa:

- Colocar la lámina horizontalmente y con la ayuda de un hisopo estéril embadurnar con agarosa al 3% toda la superficie. Dejar secar por unos minutos.
- Con la ayuda de una pipeta serológica verter el contenido del tubo con agarosa 12 % fundida a una temperatura de unos 37-40C.
- Dejar enfriar. Horadar los pozos sobre el agar como se indica en la plantilla. Marcar la esquina superior derecha haciendo un corte sobre el agar.
- Colocar en cámara húmeda y refrigerar hasta que se vaya a utilizar.
- Abrir con la ayuda de la plantilla cinco agujeros en el centro de la lamina
- Colocar en el centro el antígeno a utilizar (antiglobulina humana) y en los agujeros del la periferia suero desconocido (Anticuerpos)
- Observar la reacción

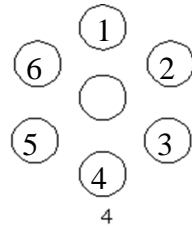
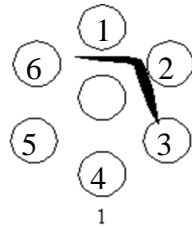


**7. Interpretación de resultados**

Interpretar las laminas de difusión en agar, determinando en que pozos hay reacción Ag-Ac  
 Interpretación:

Rosetón 1

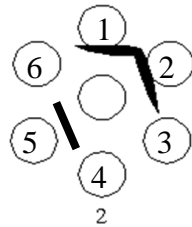
1. Positivo
2. Positivo
3. Negativo
4. Negativo
5. Negativo
6. Negativo



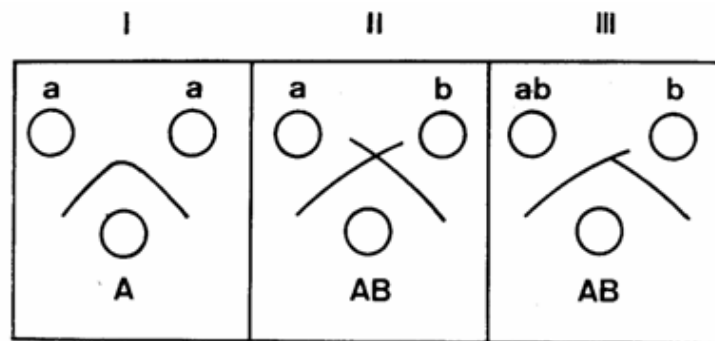
Rosetón 4  
 Todos negativos

Rosetón 2

1. Positivo
2. Positivo
3. Negativo
4. Negativo
5. Positivo
6. Negativo



La reacción de identidad (I), corresponde a los Ag. que comparten todos los determinantes antigénicos, es decir que estamos ante la misma molécula, en la de no identidad (II), ningún determinante es compartido y por lo tanto son Ag. distintos mientras que en la identidad parcial (III), hay determinantes en común, o sea que hablamos de Ag. emparentados, esto se ve como un espolón dirigido hacia el pocillo con menos determinantes reactivos. Notese que en este caso último, **ab** es una sola molécula



Esquemas de reacciones de Ouchterlony. a y b, antígenos. A y B, anticuerpos de identidad. II, reacción de no identidad. III, reacción de identidad parcial.

**8. Cuidados y otros aspectos relevantes de seguridad**

Observar todas las normas de bioseguridad. Debe tomarse en cuenta que todo el tiempo se está trabajando con muestras potencialmente infectivas.



**Universidad Mariano Gálvez**  
**Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud**  
**Carrera de Médico y Cirujano**

**9. Formato de presentación de resultados**

Entregar un informe completo sobre sus resultados obtenidos.

**10. Bibliografía**

1. Rose NR *et al.* Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6<sup>th</sup> ed. Washington, ASM, 2000.
2. Stites D *et al.* Inmunología Clínica. México, El Manual Moderno, 1998.

**11. Cuestionario**

1. ¿Cuál es el principio de la prueba de precipitación inmunológica?, explique
2. ¿Qué aplicaciones tiene la inmunodifusión radial en el diagnóstico de enfermedades?