

NOTA TÉCNICA N°19

Septiembre 2025



ELISA e inmunodetección aplicada

Área de Laboratorio & Asistencia Técnica

Inmunología en teleósteos

La inmunología es la especialidad que estudia el sistema inmune, sus componentes, funciones y las alteraciones que pueden ocurrir en él. Este sistema es responsable de defender al organismo de agentes patógenos y mantener la homeostasis.

A pesar de la divergencia que ocurrió hace 320-350 millones de años, el sistema inmunitario de los teleósteos contiene muchos componentes comparables a los conocidos en mamíferos. Al igual que el modelo mamífero, el sistema inmunitario de los teleósteos se divide en dos ramas principales: el sistema inmunitario innato y el adaptativo (Shawna *and* Dixon, *et al.*, 2020).

El sistema inmunitario adaptativo es notablemente flexible, capaz de reconocer e iniciar respuestas protectoras contra agentes extraños específicos. Tras exposiciones sucesivas, el sistema inmunitario adaptativo recordará los antígenos de un invasor extraño, lo que permite generar una respuesta inmunitaria más fuerte y eficiente (Flajnik *et al.*, 2010). Aunque más tardía en comparación con sus homólogos mamíferos, la especificidad del sistema inmunitario adaptativo de los teleósteos es esencial para una memoria inmunológica duradera. Por lo tanto, esta rama del sistema inmunitario es crucial para el diseño de vacunas, una tarea que está en constante mejora en el rubro acuícola.

Anticuerpos en teleósteos

El desarrollo y la producción de anticuerpos es de suma importancia en la respuesta inmunitaria adaptativa humoral. Esta defensa es particularmente importante al enfrentarse a amenazas extracelulares, como ocurre con la mayoría de los patógenos bacterianos. Los anticuerpos previenen el crecimiento y la colonización de patógenos bacterianos mediante neutralización, activación del complemento y/o opsonización para mejorar la fagocitosis (Forthal *et al.*, 2014).

Hasta la fecha, se han estudiado principalmente tres clases de anticuerpos en teleósteos: IgM, IgD e IgT (Sunyer *et al.*, 2013). La IgM fue el primer isotipo descubierto y se puede encontrar en las células B, así como secretarse al suero o mucus en forma de tetrámero (figura 1). La IgM es, por mucho, la inmunoglobulina más prevalente en el suero y es responsable de la inmunidad sistémica en peces óseos (Parra *et al.*, 2015).

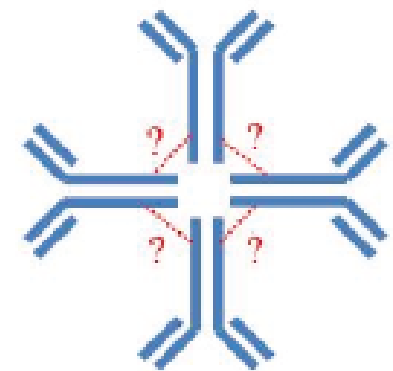


Figura 1. Esquema IgM de salmón secretada al suero.

Inmunodetección

La inmunodetección se basa en la interacción específica entre un anticuerpo y su antígeno correspondiente, permitiendo su identificación y cuantificación. A través de diversas técnicas, como ELISA, Western Blot, Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia, la inmunodetección se utiliza en el diagnóstico clínico, investigación, desarrollo y evaluación de fármacos, como, por ejemplo, vacunas.

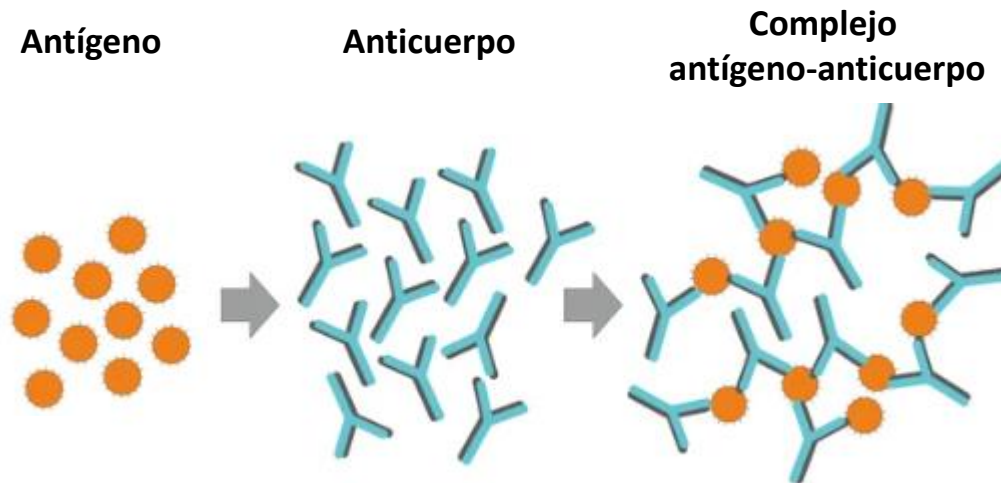


Figura 2. Esquema interacción antígeno – anticuerpo.

ELISA

La técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), o enzimoimmunoanálisis de adsorción, es un método de laboratorio que detecta y cuantifica la presencia de sustancias como anticuerpos, antígenos, proteínas y hormonas en muestras de fluidos corporales. Según su funcionamiento, la prueba ELISA se puede dividir en cuatro tipos principales: directa, indirecta, sándwich y competitiva (figura 3).

1. **ELISA Directo:** Solo utiliza un anticuerpo primario marcado con enzima. El antígeno se inmoviliza en la placa.
2. **ELISA indirecto:** Utiliza tanto un anticuerpo primario como un anticuerpo secundario. El segundo está marcado con enzima. El antígeno se inmoviliza en la placa.
3. **ELISA Sándwich:** Su principal característica es que un anticuerpo de captura se inmoviliza en la placa.
4. **ELISA Competitivo:** Es relativamente complejo, ya que implica el uso de un antígeno inhibidor, por lo que también se conoce como ELISA de inhibición.

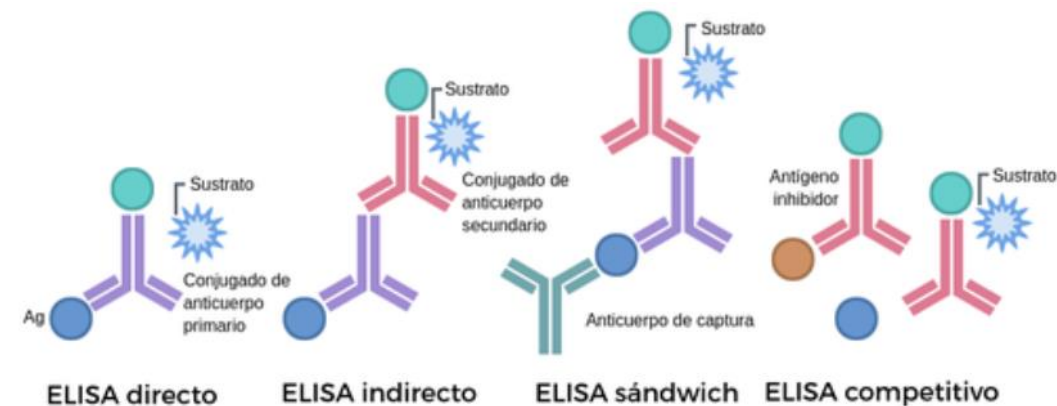


Figura 3. Representación tipos de ELISA

ELISA

Un ELISA estándar se ejecuta en cuatro etapas principales, con reiterados lavados entre cada una de ellas:

1. **Recubrimiento:** Etapa en que la placa de ELISA (típicamente de 96 pocillos) se trata con una solución de recubrimiento de antígeno o anticuerpo creando la primera capa.
2. **Bloqueo:** Todos los sitios de unión libres se bloquean usando un tampón que contiene proteínas no relacionadas con la proteína de interés.
3. **Detección:** Es la etapa más compleja del procedimiento, ya que se pueden usar múltiples capas de anticuerpos para amplificar la señal. La placa se incuba con una solución que contiene anticuerpo de detección conjugado con enzima que se une específicamente al antígeno o anticuerpo diana.
4. **Adición del sustrato y análisis:** En la etapa final, se añade un sustrato colorimétrico a los pocillos que forma una solución coloreada en una reacción catalizada por enzima. El resultado se obtiene usando un lector de microplacas.

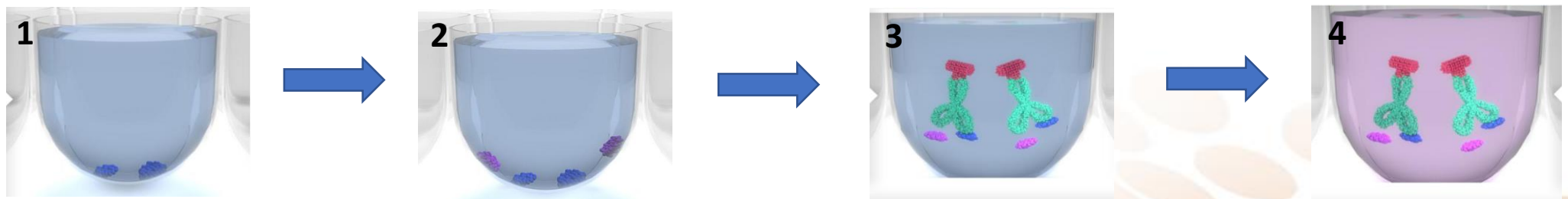


Figura 4. Etapas del procedimiento de ELISA

ELISA



Figura 5. Esquema de análisis ELISA realizado en ADL.

El análisis ofrecido por ADL Diagnostic Chile es un **ELISA indirecto** que permite medir la cantidad de **IgM** específico contra un patógeno de interés presente en la muestra. **Se utiliza, como antígeno de captura, proteínas totales de un aislado bacteriano o proteínas recombinantes generadas en el laboratorio.** Las proteínas del patógeno son reconocidas por los anticuerpos (IgM) presentes en el suero del pez y luego se utiliza un anticuerpo secundario monoclonal anti-IgM de salmón conjugado que permite, mediante una reacción colorimétrica, detectar la cantidad de IgM específico. Ello a través del valor de absorbancia corregida a 450 nm.

Esta metodología nos permite detectar en suero de peces la cantidad relativa de IgM específica de diversos patógenos bacterianos presentes en la industria, ya sea para evaluar la respuesta del huésped o monitorear la eficacia de vacunas.

Ejemplos de monitoreos realizados en ADL mediante la técnica ELISA

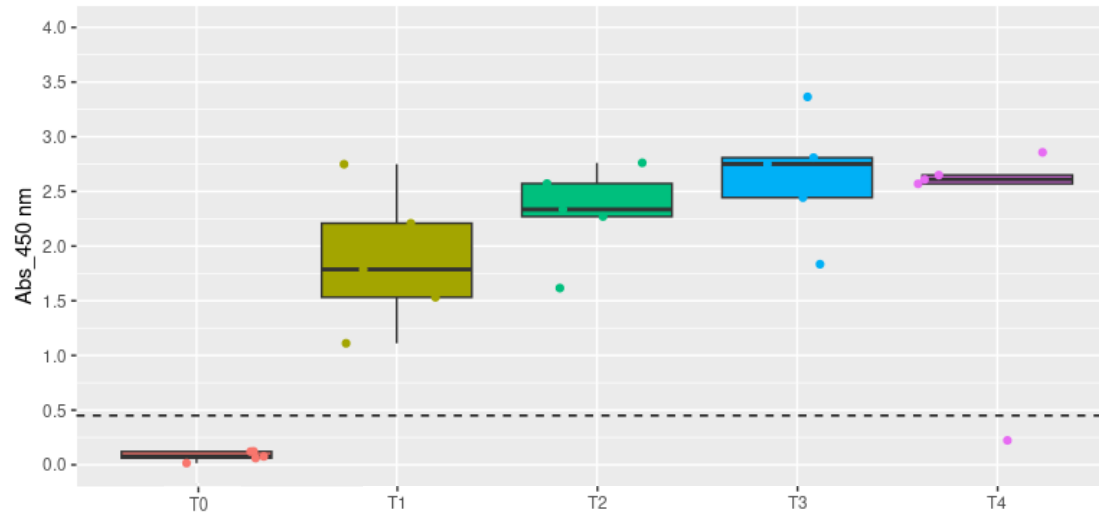
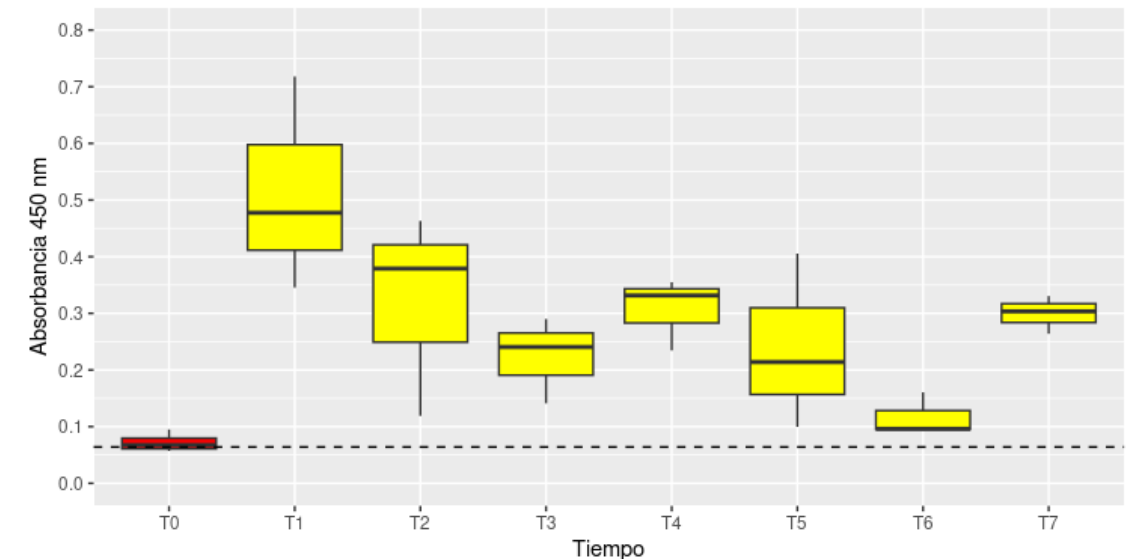


Figura 6. Respuesta serológica IgM anti - *A. salmonicida* a través del valor de absorbancia corregida a 450 nm en sueros de *salmo salar* post vacunación, fórmula comercial hasta 815 UTA (Unidades Térmicas Acumuladas).

Figura 7. Respuesta serológica de IgM anti- *P. salmonis* a través del valor de absorbancia corregida a 450 nm en sueros cohabitantes (*Salmo salar*) durante ensayo con aislado tipo EM90. Se analizaron muestras periódicamente, durante 49 días.



Western Blot

El Western Blot (WB), también conocido como inmunotransferencia, es un método de biología molecular bien conocido que los biólogos suelen utilizar para investigar diversas características de las proteínas, desde el análisis proteico básico hasta la detección de enfermedades. El WB es una herramienta sencilla, única, rápida y de uso generalizado, de fácil interpretación y con resultados precisos. Se utiliza en diversos campos de la ciencia, la investigación y el desarrollo, laboratorios de diagnóstico y hospitales (figura 8).

Se basa en la separación de proteínas por tamaño mediante electroforesis en gel, seguida de su transferencia a un soporte sólido (membrana) y marcaje de la proteína diana mediante anticuerpo primario y secundario adecuados para su visualización (Mahmood *et al.*, 2012).



Figura 8. Aplicaciones del Western Blot. El diagrama muestra diversas aplicaciones en los campos científico y clínico. Imagen obtenida de Begum *et al.*, 2022.

Western Blot

Como ya se indicó, para realizar la técnica WB primero se separan las proteínas presentes en el lisado (etapa 1) por tamaño y/o carga mediante una electroforesis en condiciones denaturantes SDS-PAGE, generalmente en gel de poliacrilamida (etapa 2). Se realiza inmunotransferencia a soporte sólido, por lo general membrana de nitrocelulosa o PVDF, según la polaridad de la molécula de interés. La membrana se bloquea (etapa 4) usando un tampón que contiene proteínas no relacionadas con la molécula de interés, se detecta con anticuerpos (etapas 5 y 6) y, finalmente, se añade un sustrato colorimétrico que marca la molécula de interés (etapa 7).

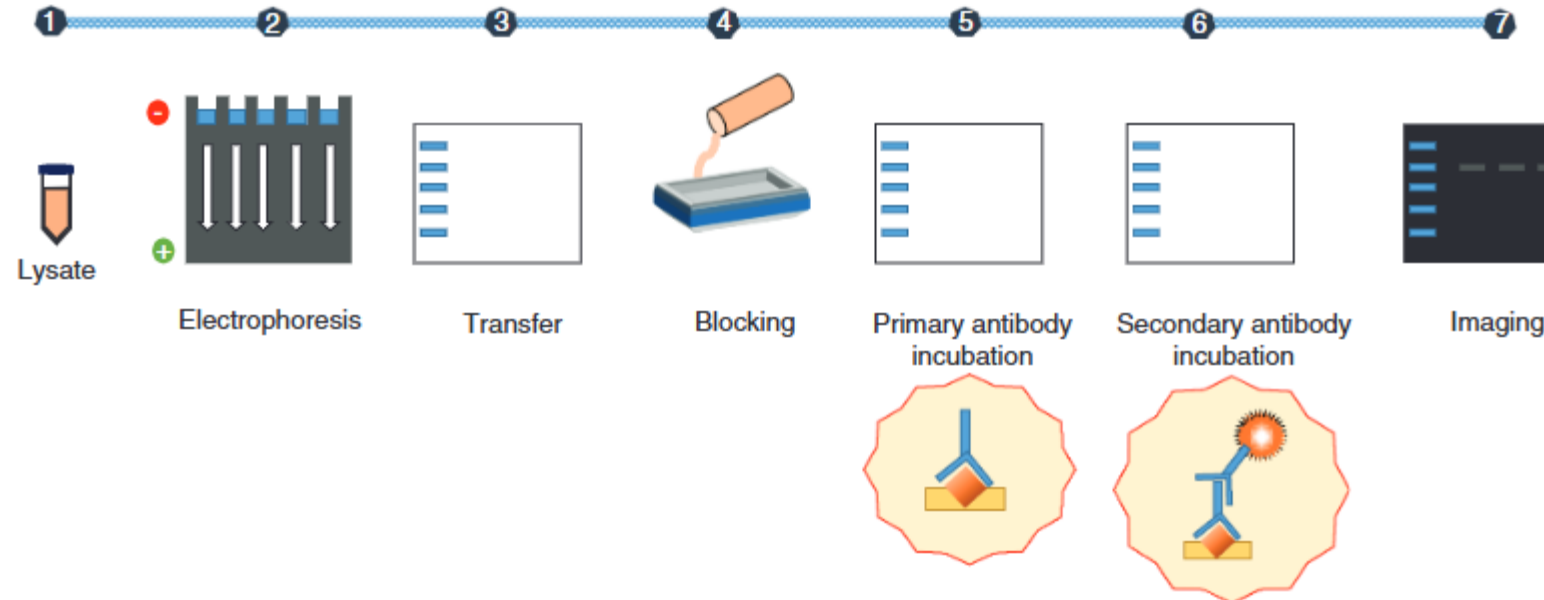


Figura 9. Etapas del procedimiento Western Blot. Imagen obtenida de Begum, 2022.

Ejemplos uso de WB en ADL

Nuestro laboratorio utiliza la técnica WB, principalmente, en el área de Investigación y Desarrollo para comparar antígenos de membranas de patógenos, genogrupos o variantes fenotípicas. Se puede utilizar suero extraído de peces infectados o, para mayor sensibilidad, suero obtenido de conejo hiperinmunizado con especificidad por un patógeno en particular.

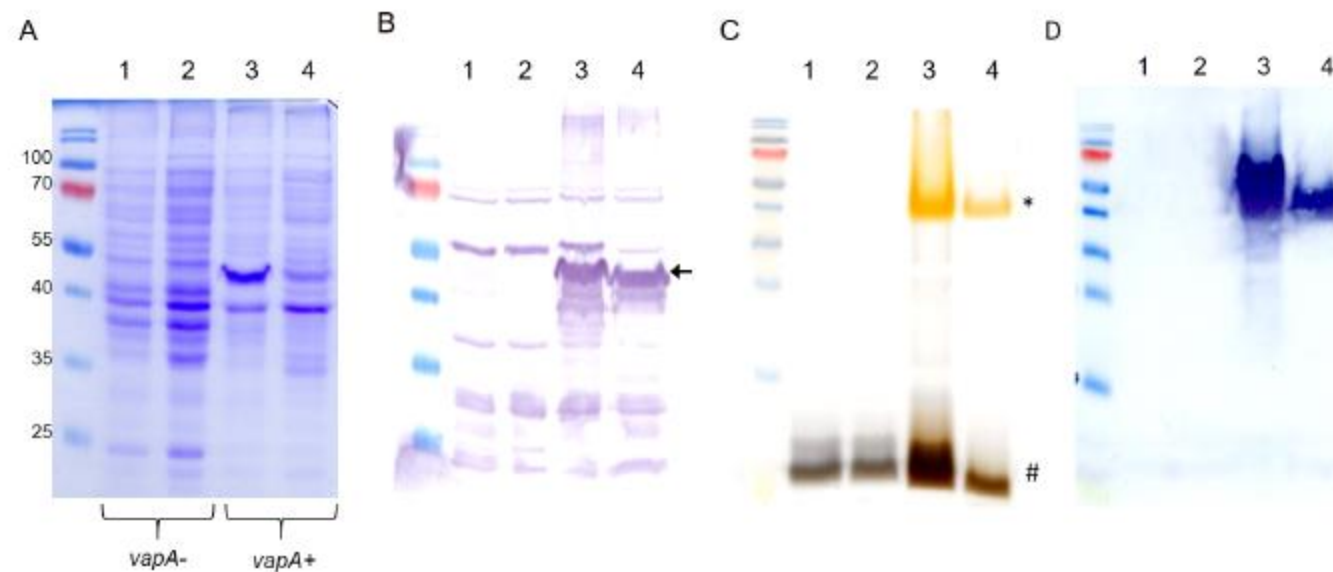


Figura 10. Perfiles de componentes de la membrana externa de aislados de *A. salmonicida*. (A) Perfiles de OMP. (B) **Western Blot de OMP** con suero de un conejo hiperinmunizado contra *A. salmonicida*. (C) Patrones de LPS en SDS-PAGE con tinción de plata. Las especies con bajo y alto peso molecular de LPS se indican con # y *, respectivamente. (D) **Western Blot de LPS** revelado con el mismo anticuerpo utilizado en (B). Los carriles 1 y 2 corresponden a aislados variante nueva, carriles 3 y 4 a aislados clásicos.

Referencias

1. Begum H, Murugesan P, Tangutur AD. Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *Biotechniques*. 2022 Jun;73(1):58-69. doi: 10.2144/btn-2022-0003. Epub 2022 Jul 1. PMID: 35775367.
2. Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet*. 2010 Jan;11(1):47-59. doi: 10.1038/nrg2703. Epub 2009 Dec 8. PMID: 19997068; PMCID: PMC3805090.
3. Forthal DN. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr*. 2014 Aug;2(4):AID-0019-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.AID-0019-2014. PMID: 26104200.
4. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012 Sep;4(9):429-34. doi: 10.4103/1947-2714.100998. PMID: 23050259; PMCID: PMC3456489.
5. Parra D, Reyes-Lopez FE, Tort L. Mucosal Immunity and B Cells in Teleosts: Effect of Vaccination and Stress. *Front Immunol*. 2015 Jul 15;6:354. doi: 10.3389/fimmu.2015.00354. PMID: 26236311; PMCID: PMC4502357.
6. Shawna L., and Brian Dixon. "Salmonid Antibacterial Immunity: An Aquaculture Perspective." *Biology (Basel, Switzerland)*, vol. 9, no. 10, 2020, pp. 331-, <https://doi.org/10.3390/biology9100331>.
7. Sunyer JO. Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nat Immunol*. 2013 Apr;14(4):320-6. doi: 10.1038/ni.2549. PMID: 23507645; PMCID: PMC4203445.