



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Medicina
Escuela de Medicina "José María Vargas"
Cátedra de Inmunología



Reacciones Antígeno-Anticuerpo y sus Aplicaciones Diagnósticas

Tema 4
2017

Prof. Edwin Escobar
edscoabar@gmail.com

Contenido

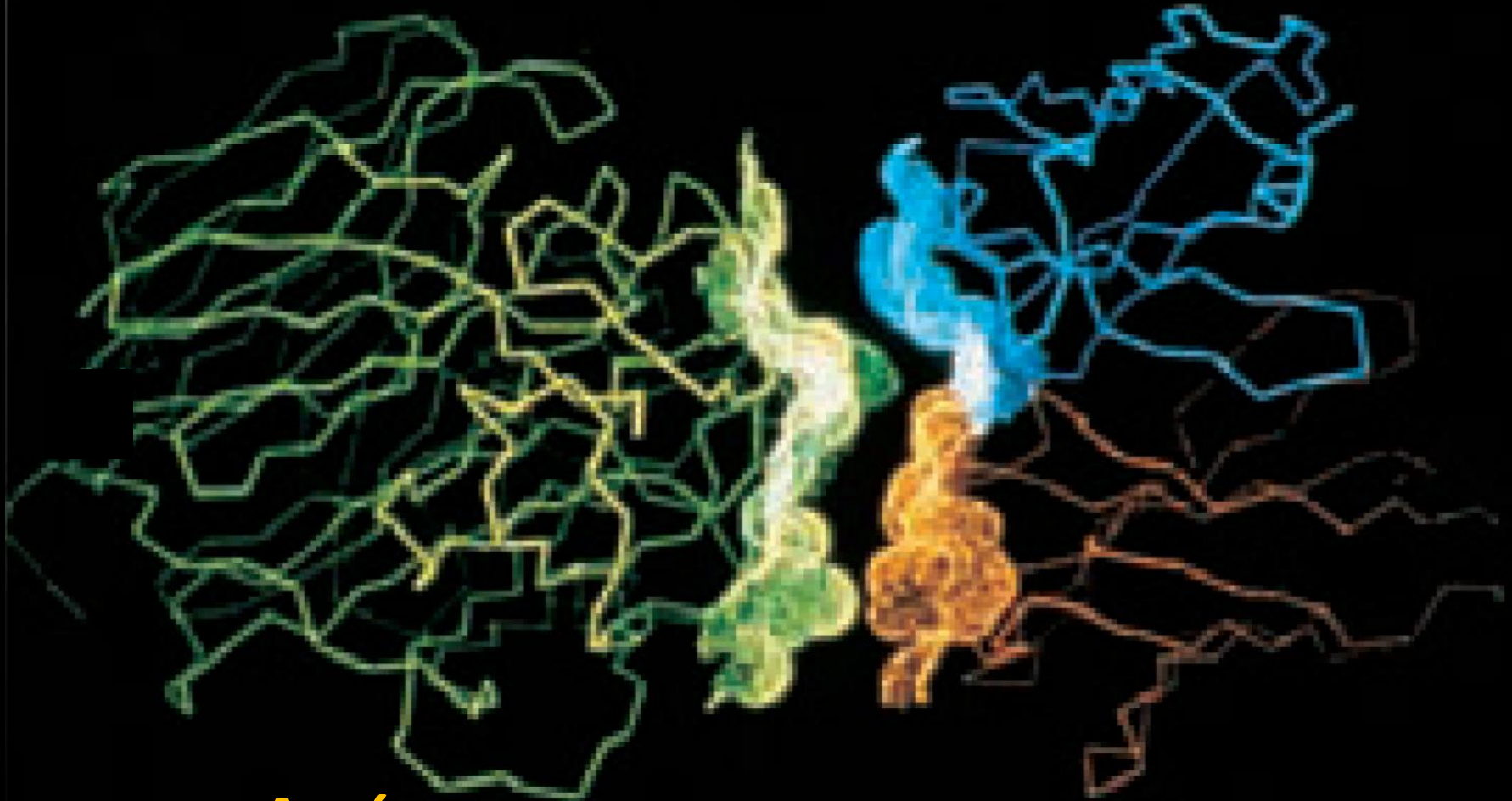
- **Características de la unión Ag/Ac**
 - Interacción No Covalente
 - Afinidad y Avidéz
 - Flexibilidad de la Molécula de Ig
- **Aplicaciones Diagnósticas**
 - Serología
 - Técnicas Serológicas de Unión Primaria
 - ELISA, Radioinmunoensayo, Inmunofluorescencia
 - Técnicas Serológicas de Unión Secundaria
 - Aglutinación, Inmunoprecipitación
 - Otras Aplicaciones
 - Inmunohemólisis, Citometría de Flujo

Interacciones Ag/Ac

Unión No Covalente

Interacción Antígeno/Anticuerpo

No Covalente / Reversible / Específica



Antígeno

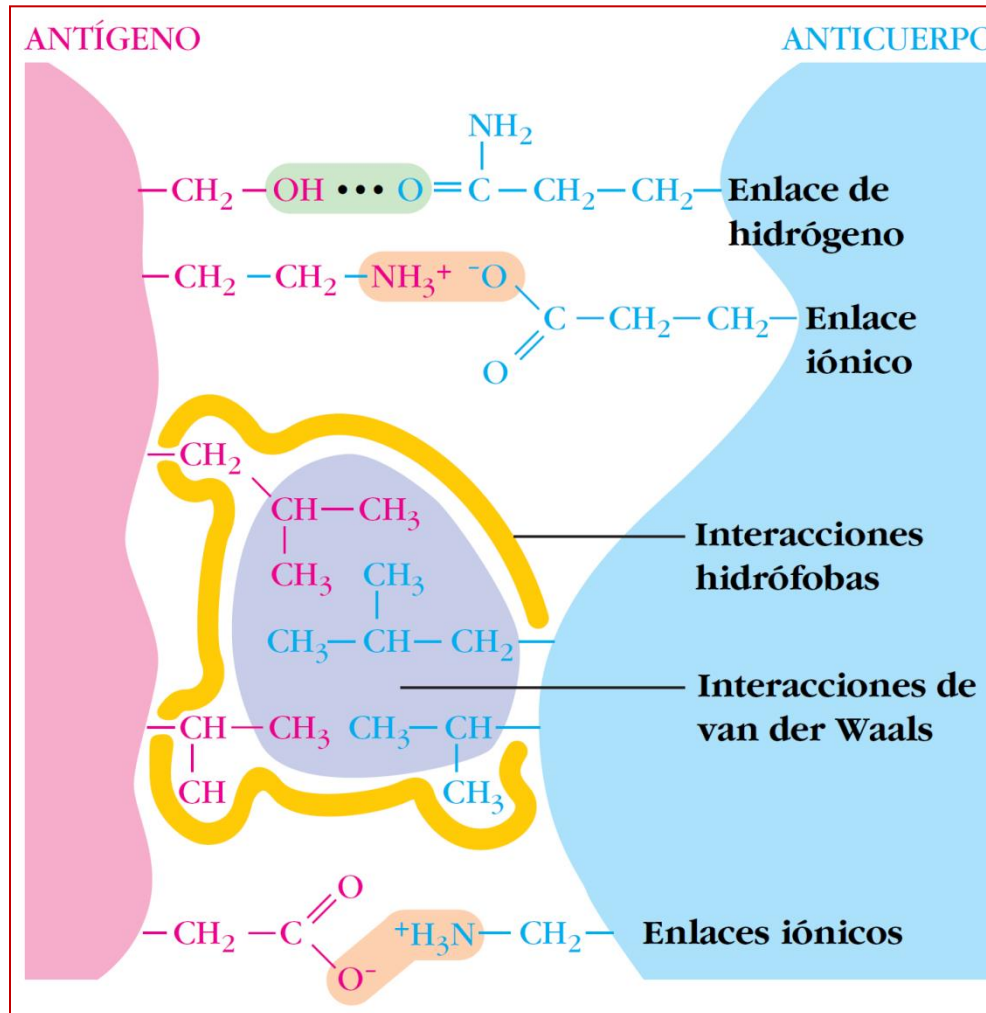
Hemagglutinina del Virus de la Influenza

Anticuerpo

Región V_H y Región V_L

Interacción Antígeno/Anticuerpo

- Enlaces No Covalentes
- Muchas Interacciones Débiles = Unión Fuerte
- Grupos Moleculares en Posiciones Precisas



- Puentes de Hidrógeno
- Enlaces Iónicos
- Interacciones Hidrofóbicas
- Fuerzas de van der Waals

Interacciones Ag/Ac

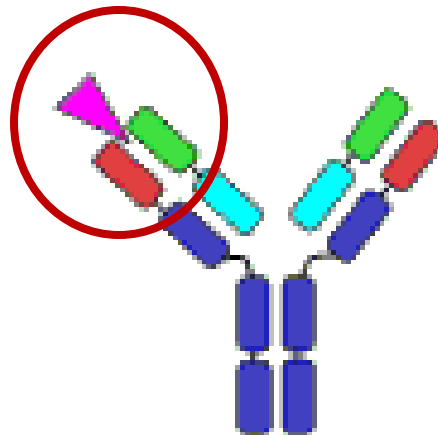
Afinidad y Avidéz

Interacción Ag/Ac

Afinidad

Interacción Monovalente

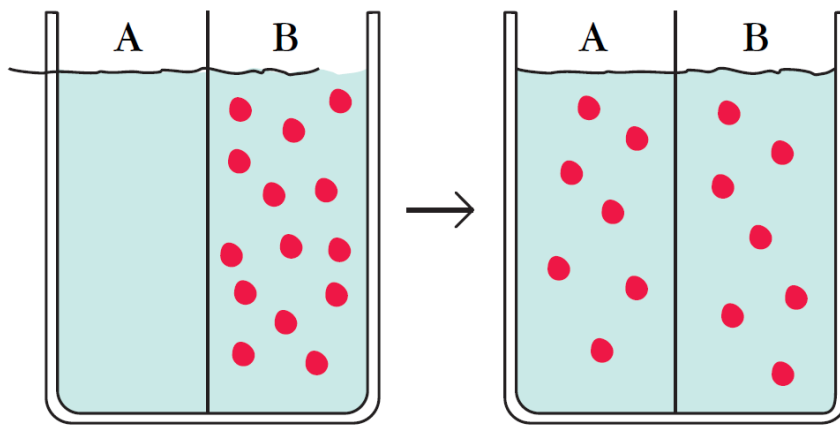
- Es una medida termodinámica de la **fuerza de interacción entre un sitio de unión de un anticuerpo y un único epítipo**



Afinidad del Anticuerpo

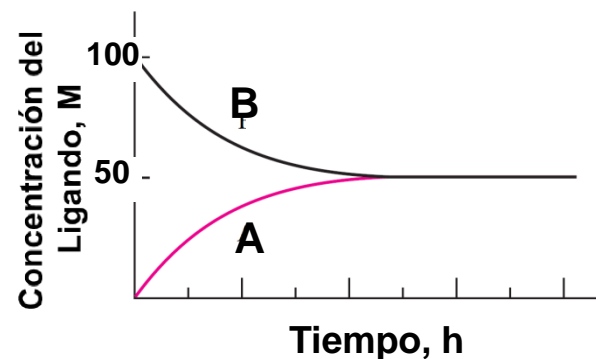
Diálisis de Equilibrio

A) En Ausencia de Anticuerpo

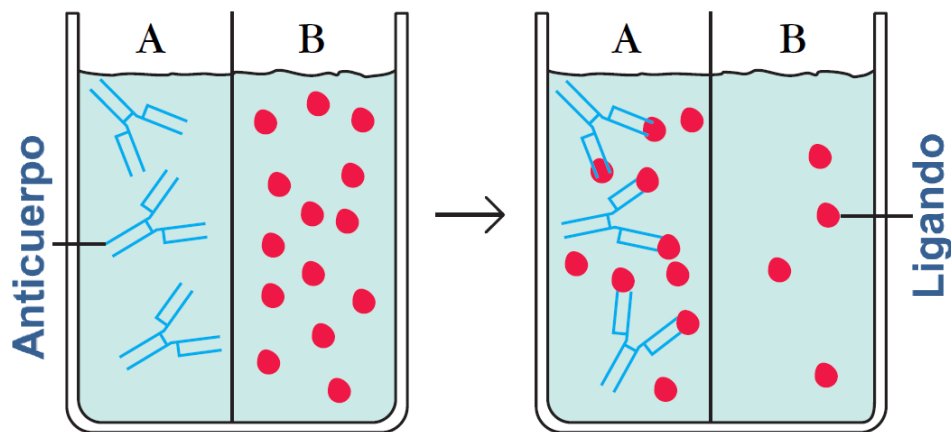


Estado inicial

Equilibrio

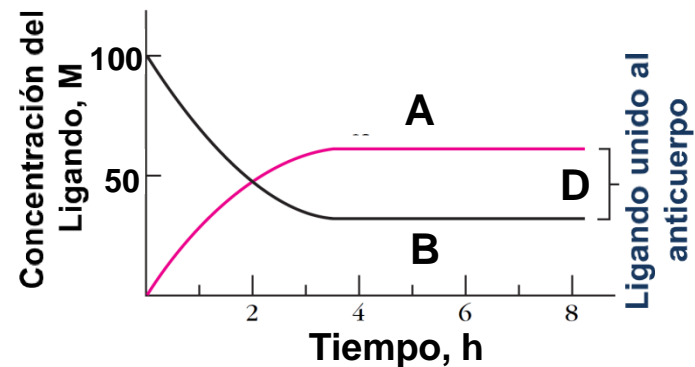


B) En Presencia de Anticuerpo



Estado inicial

Equilibrio

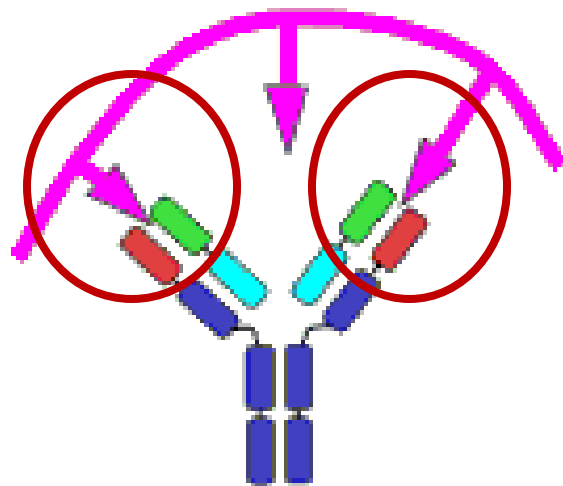


Interacción Ag/Ac

Avidéz

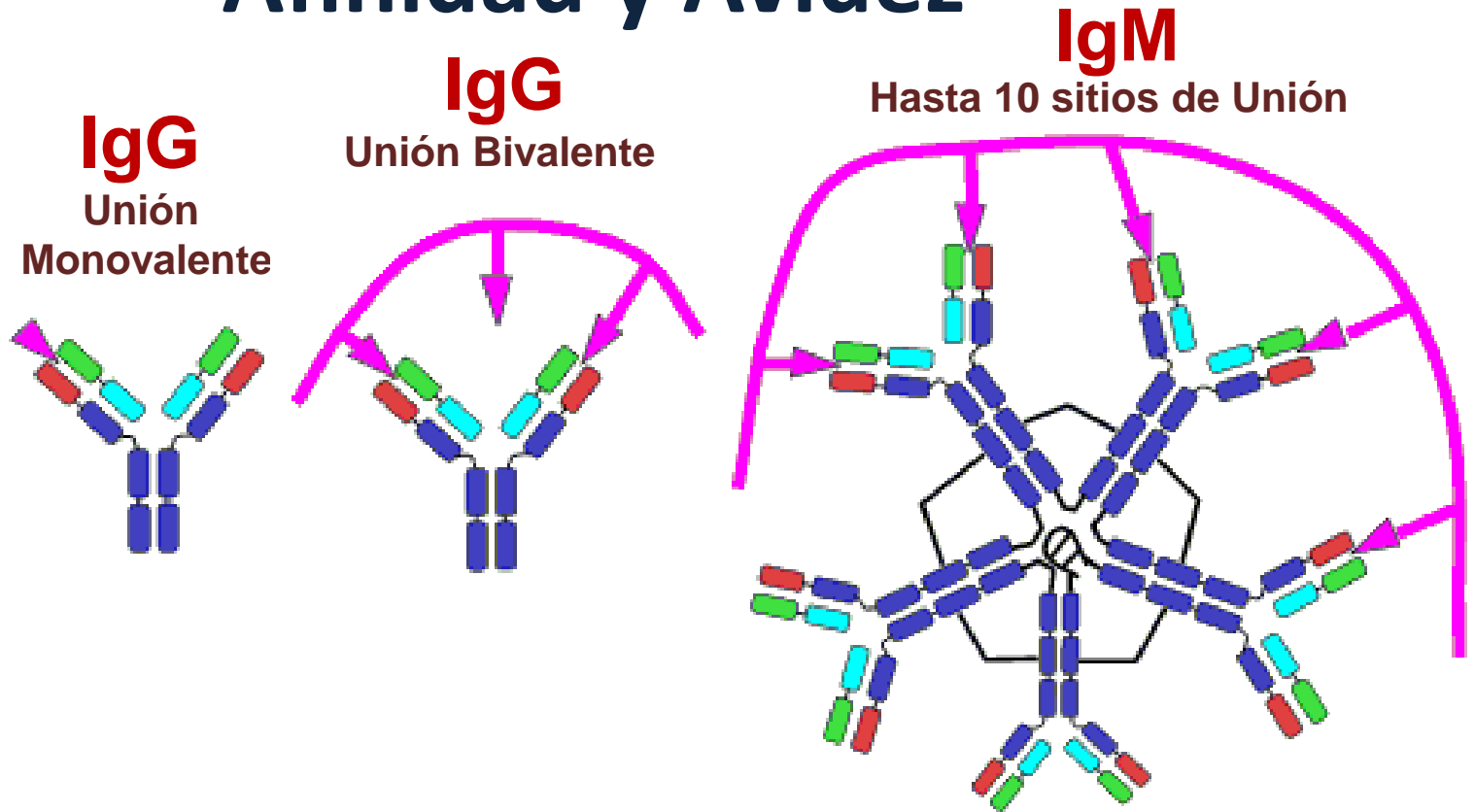
Interacción Polivalente

- Es una medida de la fuerza de interacción entre múltiples sitios de unión de una molécula de anticuerpo y múltiples epítopos repetitivos en un antígeno polivalente



Anticuerpos

Afinidad y Avidez



Constante de Equilibrio

10^4
Afinidad

10^7
Avidéz

10^{11}
Avidéz

Aumento de la Energía de Unión

10^3

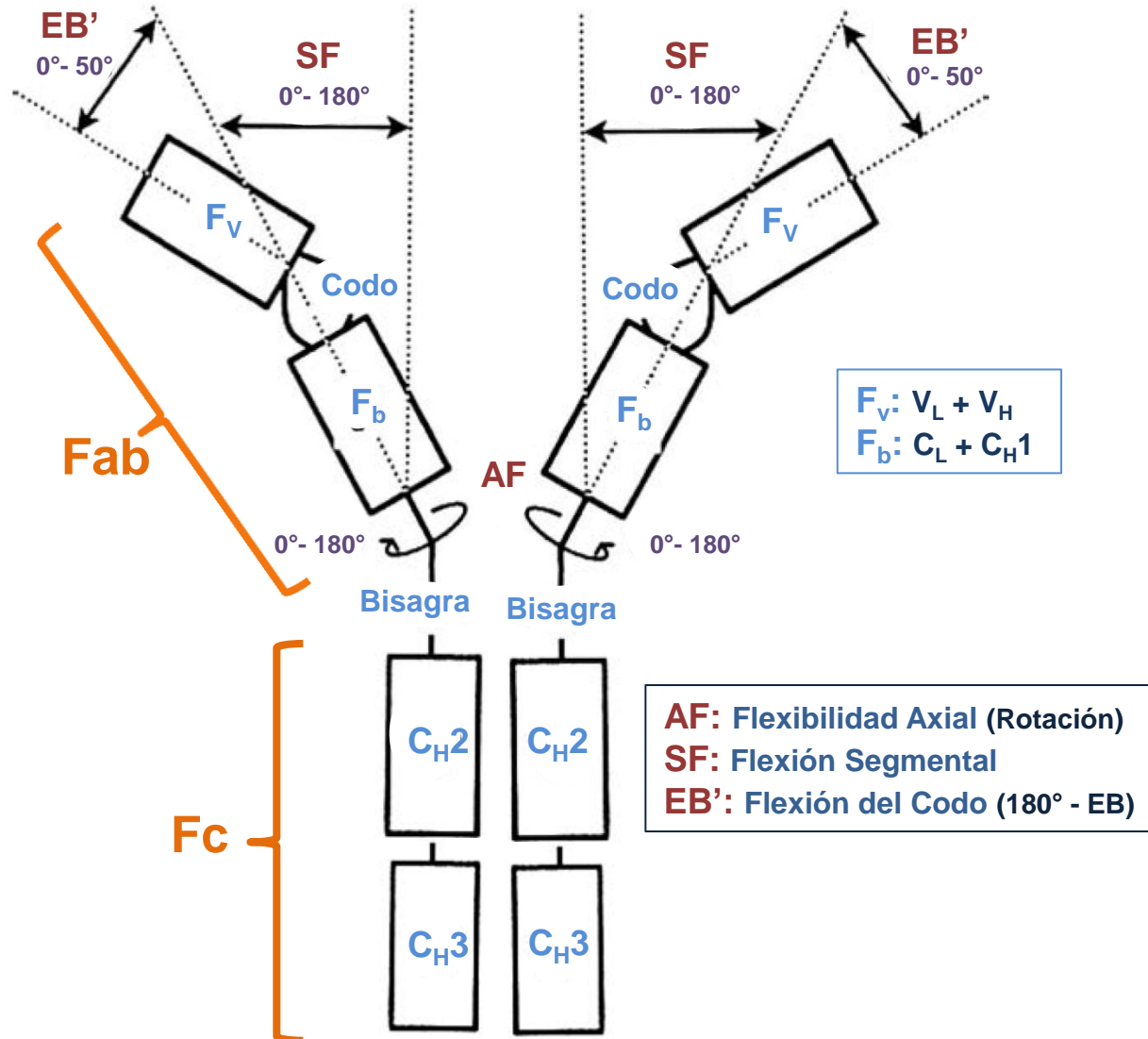
10^7

Avidéz = Afinidad Funcional

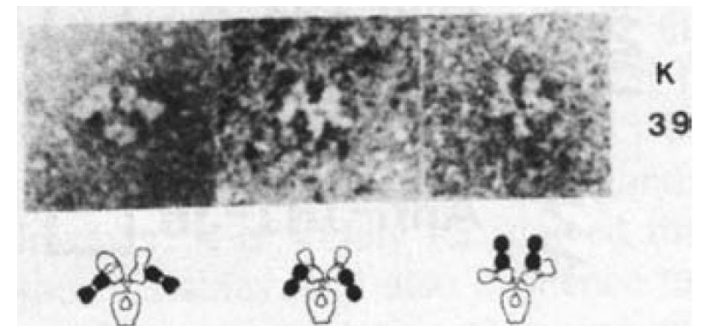
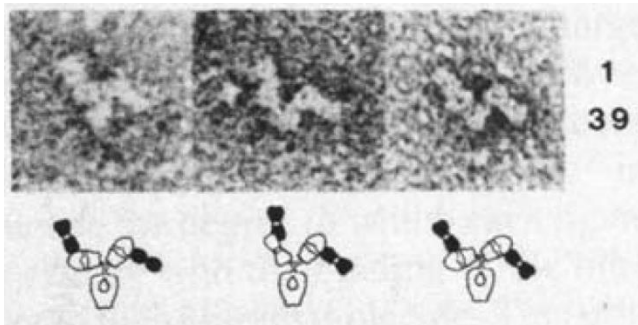
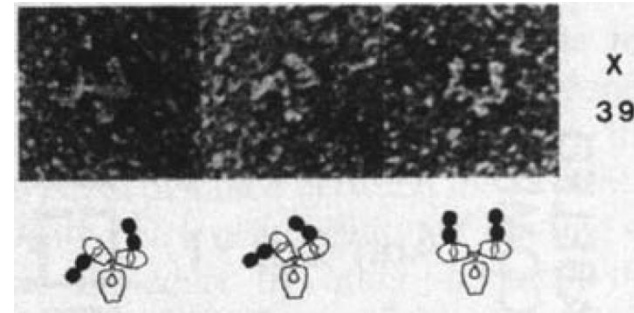
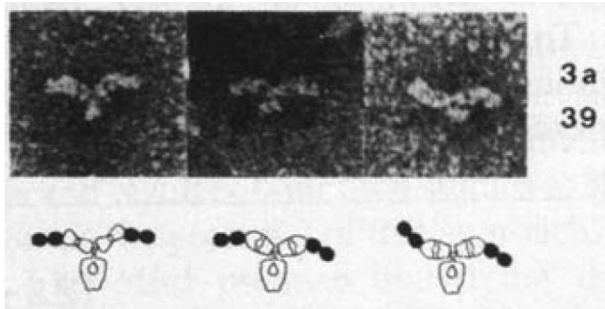
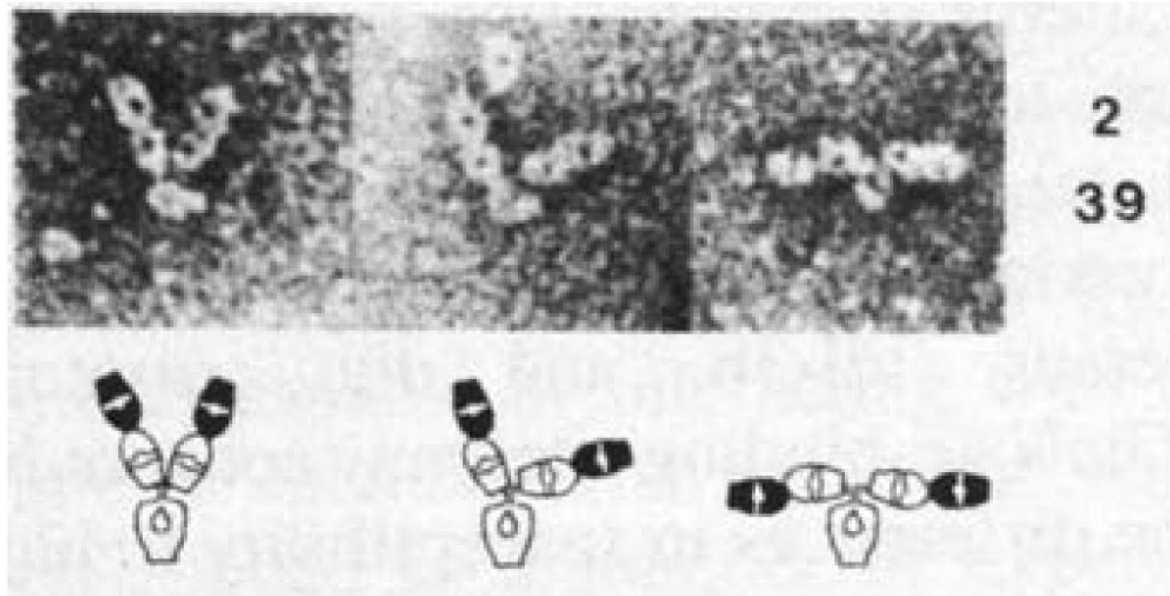
Interacciones Ag/Ac

Flexibilidad de la Ig

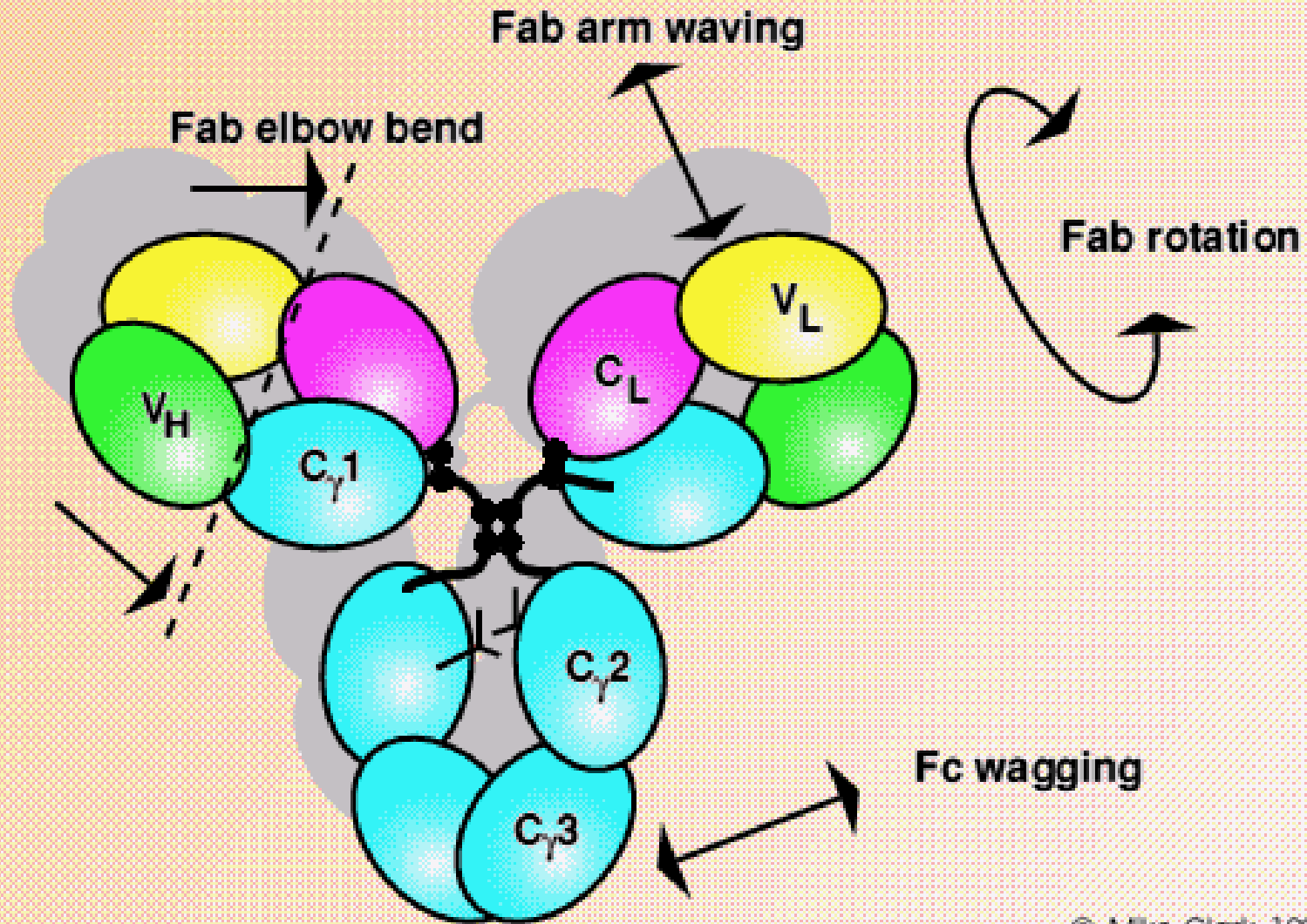
Flexibilidad de la Molécula de Ig



Flexibilidad de la Molécula de Ig

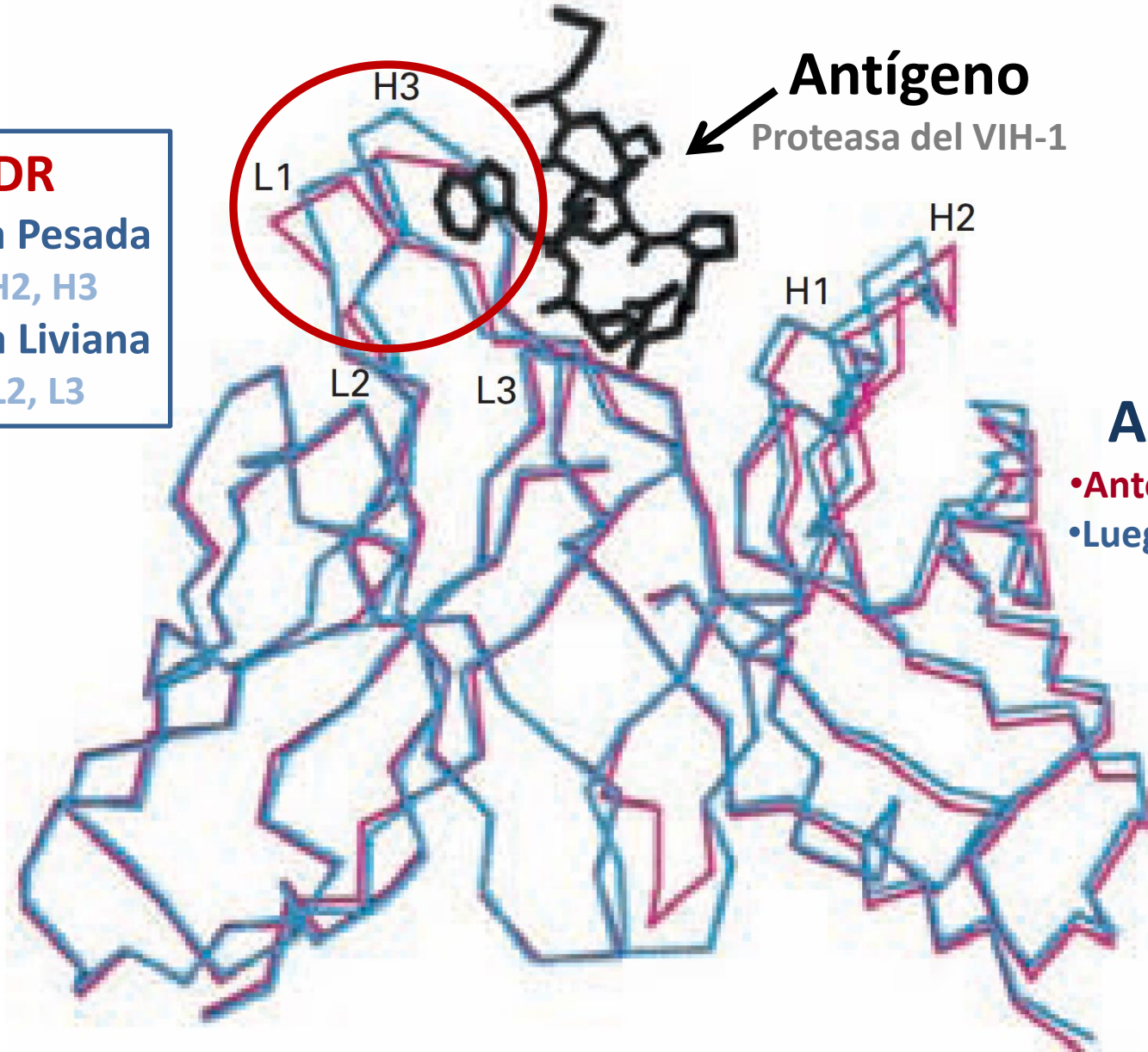


Flexibilidad de la Molécula de Ig



© Mike Clark 1994

Cambio conformacional al unirse el antígeno y el anticuerpo



CDR

Cadena Pesada

H1, H2, H3

Cadena Liviana

L1, L2, L3

Antígeno

Proteasa del VIH-1

Anticuerpo

- Antes de unirse al Ag
- Luego de unirse al Ag

Interacciones Ag/Ac

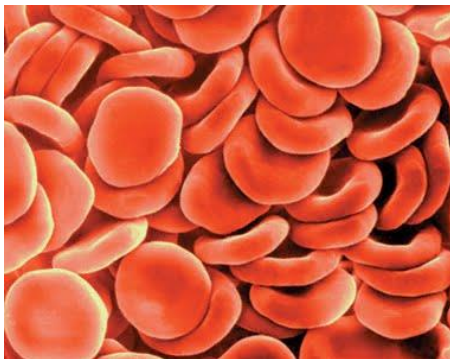
Reactividad Cruzada

Reacciones Cruzadas

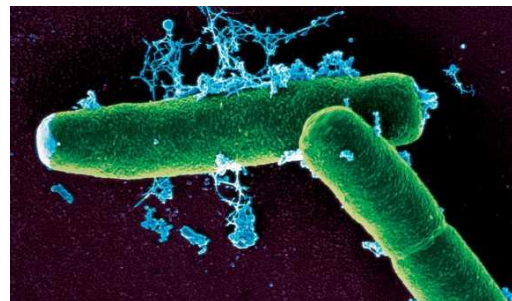
- Si dos antígenos diferentes comparten un epítipo idéntico o muy similar, los anticuerpos específicos contra uno de los antígenos podría **reaccionar en forma cruzada** con el otro antígeno, aunque generalmente con menor afinidad.

Grupos Sanguíneos “ABO” Polisacáridos

Membrana de Eritrocitos



Pared Celular de Bacterias



**Aplicaciones Diagnósticas
de las Interacciones Ag/Ac**

Serología

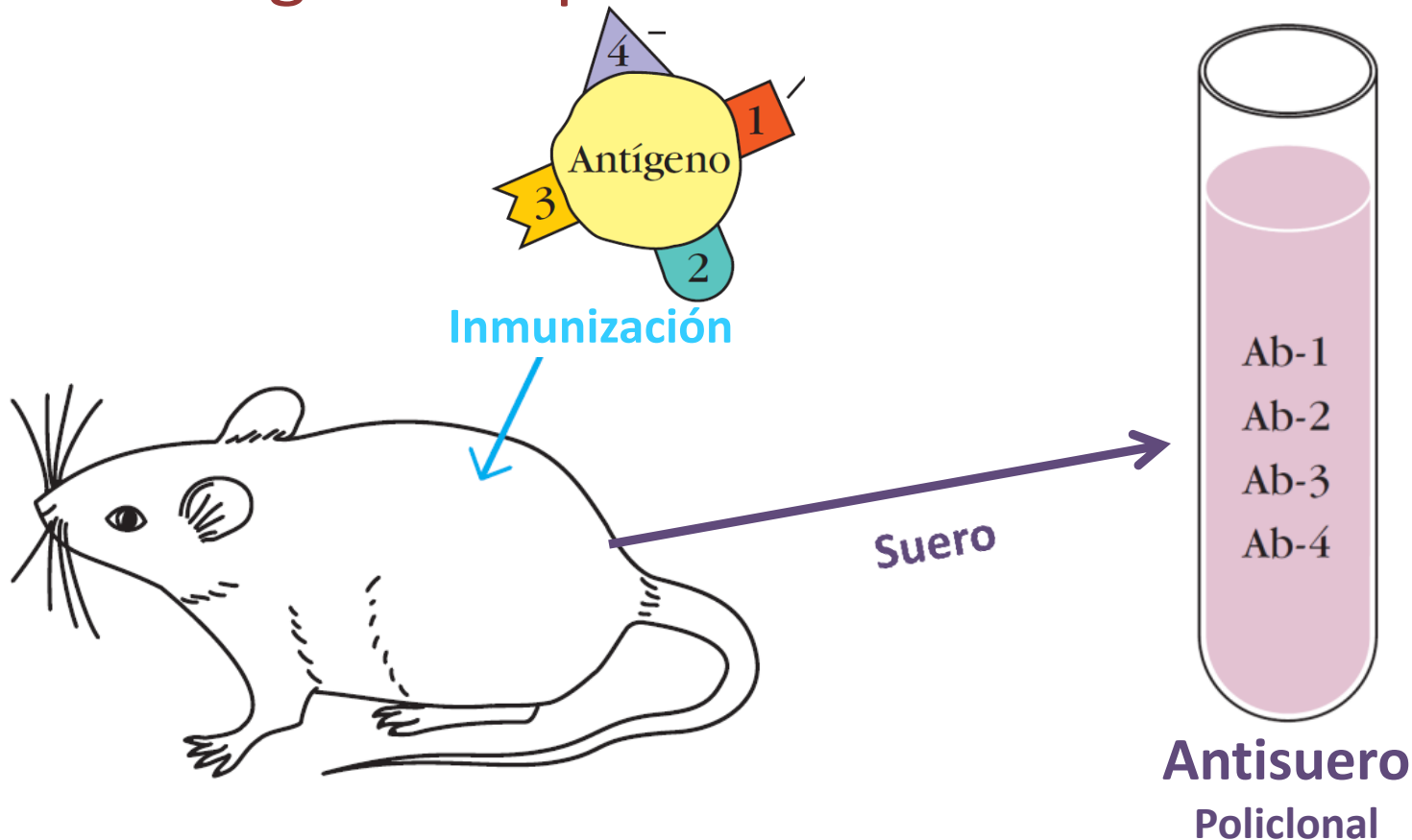
Suero

- **Suero:** es el líquido residual de la sangre, después que la sangre o el plasma se han coagulado. En el Suero se encuentran los anticuerpos



Antisuero

- **Antisuero:** es una muestra de Suero que tiene anticuerpos detectables específicos para un antígeno en particular

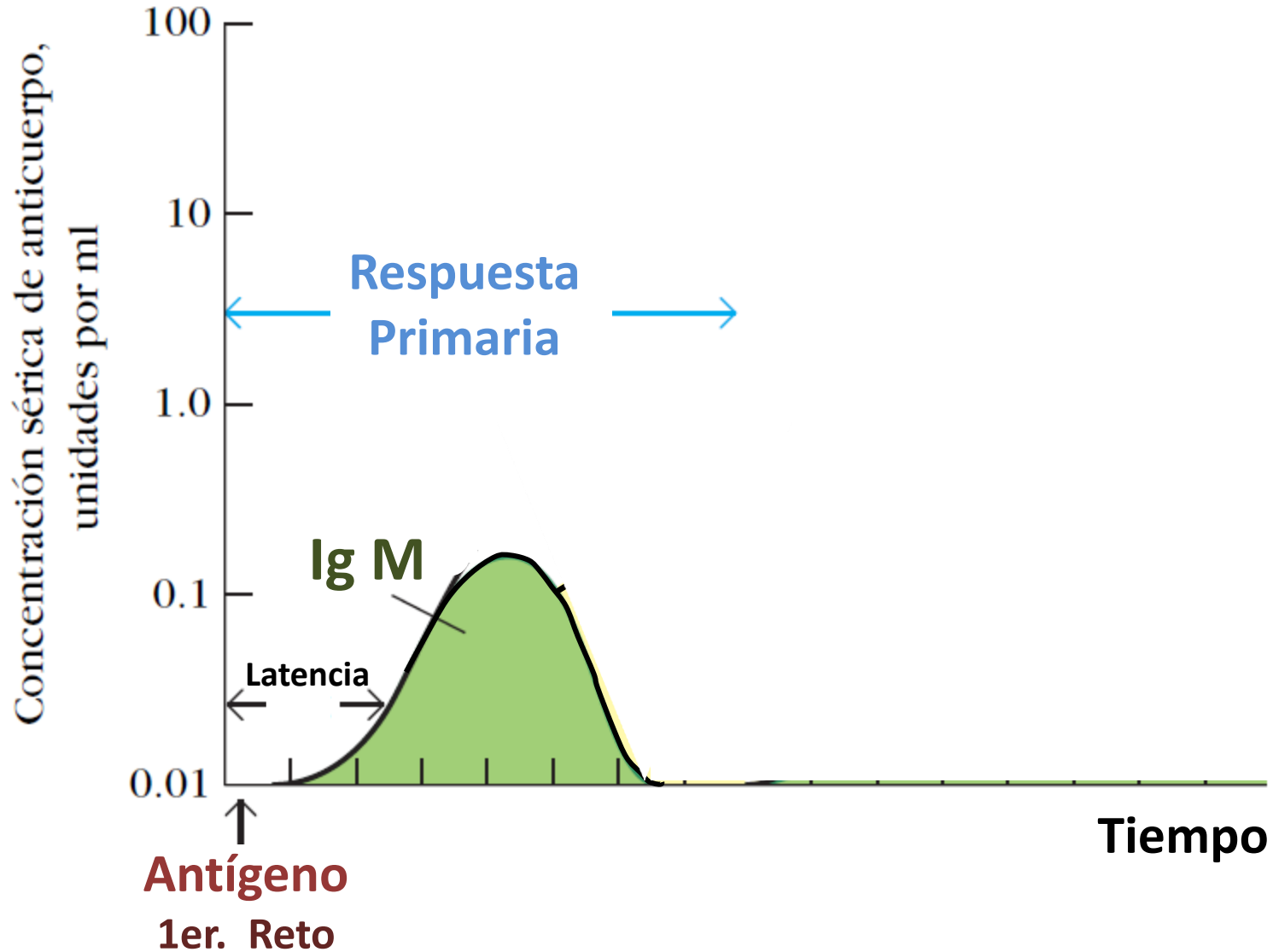


Serología

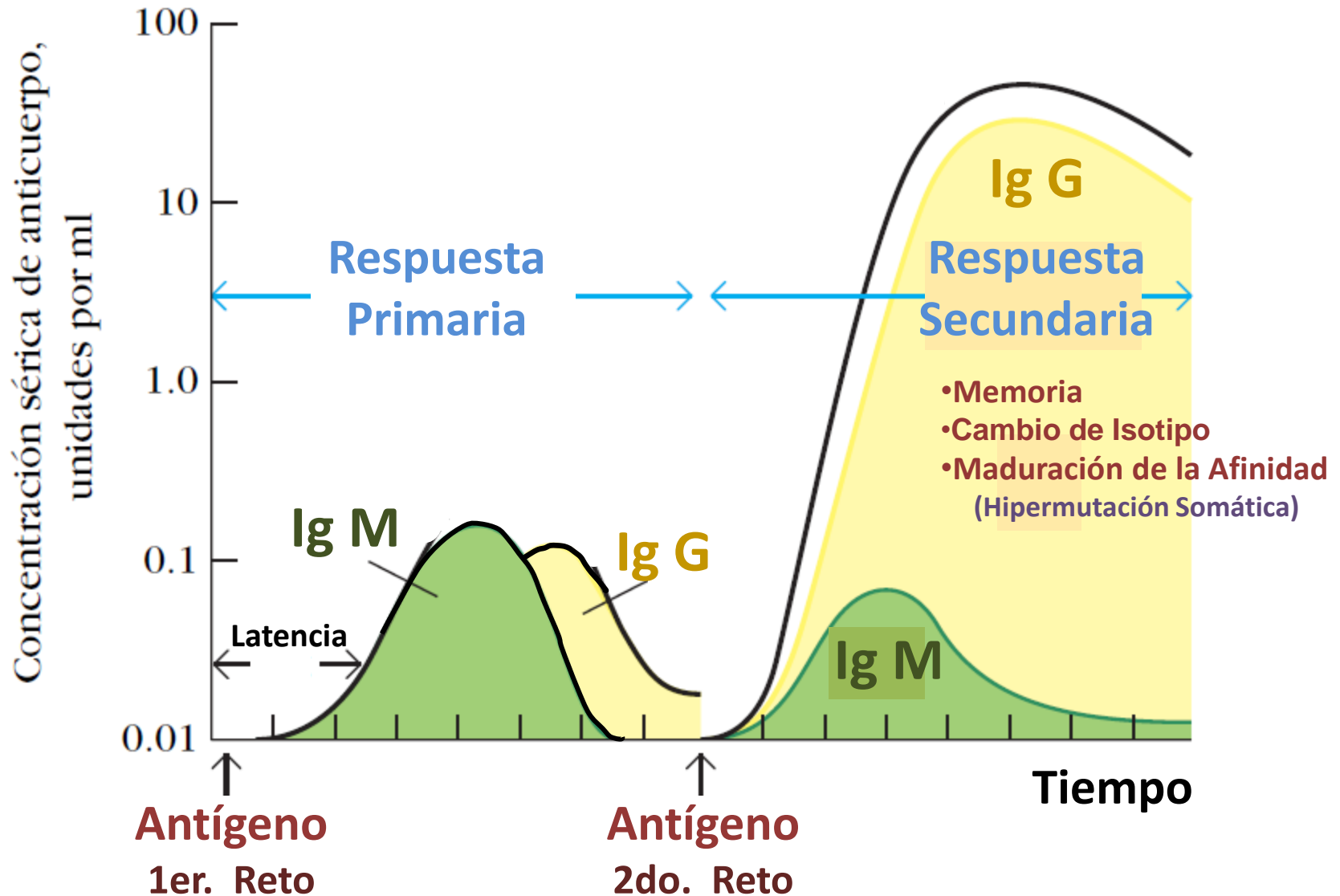
- **Serología:** es el estudio, a partir de una muestra de suero, de los anticuerpos y sus reacciones con los antígenos



Respuesta Primaria y Secundaria

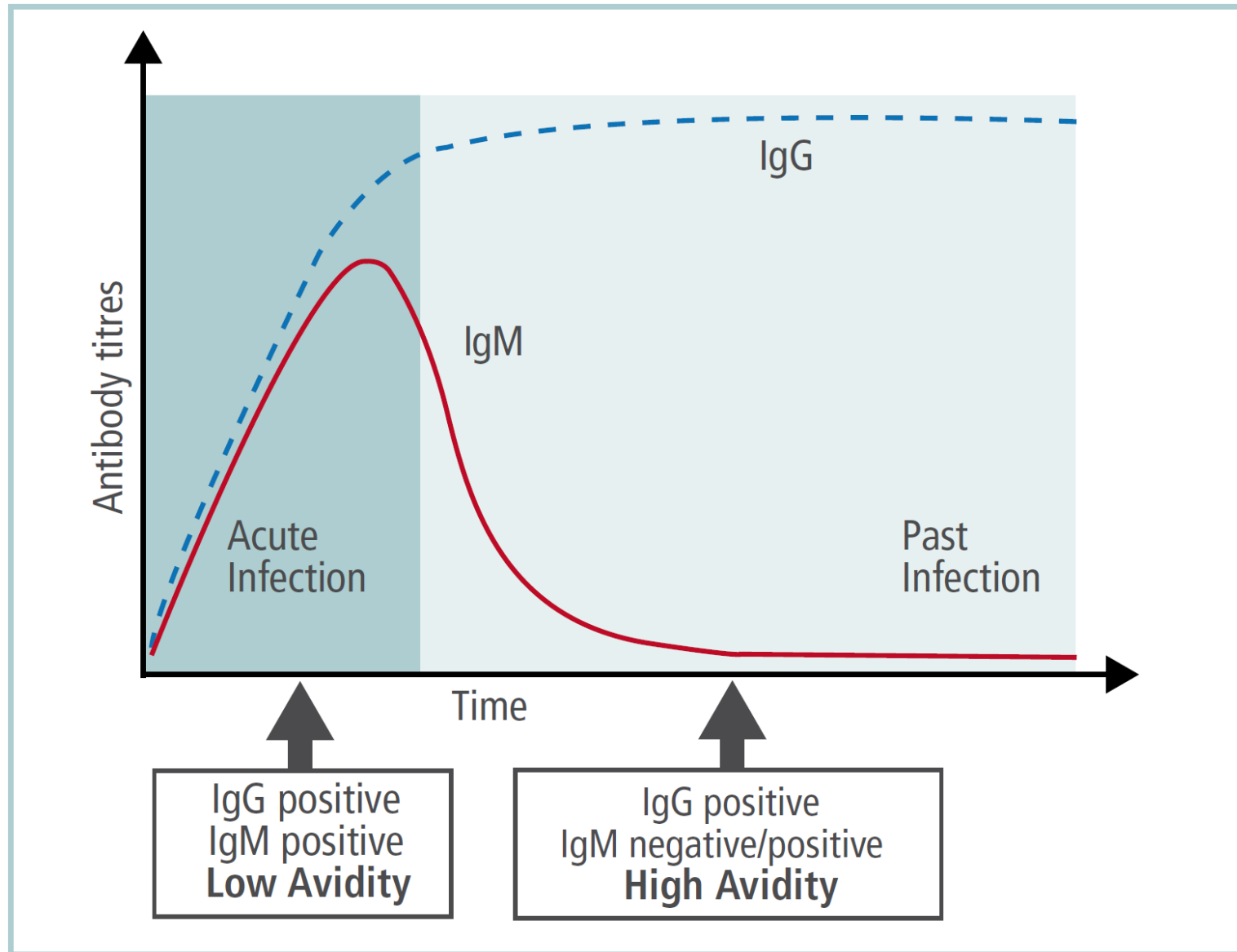


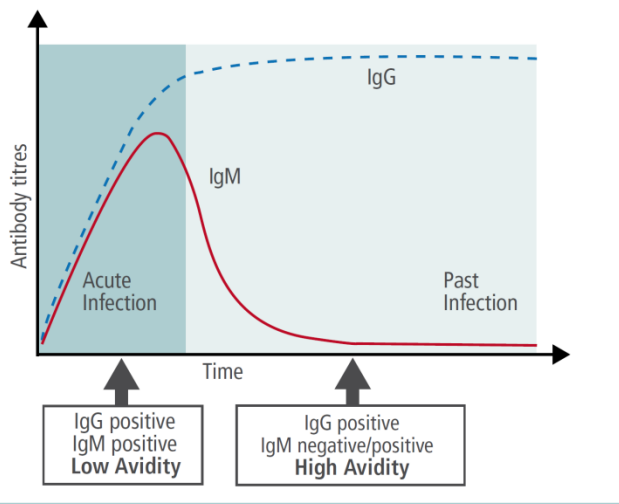
Respuesta Primaria y Secundaria



Respuesta Primaria y Secundaria

Toxoplasma gondii





Respuesta Primaria y Secundaria **Toxoplasma gondii**

IgG	IgM	Avidity	Diagnosis
Negative	Negative		No infection
Positive	Positive	Low	Possible Acute infection
Positive	Positive	High	Past infection
Positive	Negative		Past infection

**Aplicaciones Diagnósticas
de las Interacciones Ag/Ac**

**Técnicas Serológicas
de Unión Primaria y Secundaria**

Técnicas Serológicas

- **De Unión Primaria:** mide directamente la cantidad de complejo Ag/Ac formado.
Mayor sensibilidad (pg/mL), requiere sistema revelador
 - **ELISA** (Reacción Colorimétrica – Enzima/Sustrato)
 - **Radioinmunoensayo** (Isótopos Radioactivos)
 - **Inmunofluorescencia** (Fluorocromos conjugados)
- **De Unión Secundaria:** mide la consecuencia o efecto de la unión Ag/Ac.
Menor sensibilidad (µg/mL), observación “directa”
 - **Aglutinación**
 - **Inmunoprecipitación**

Aplicaciones Diagnósticas de las Interacciones Ag/Ac

ELISA

ELISA

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

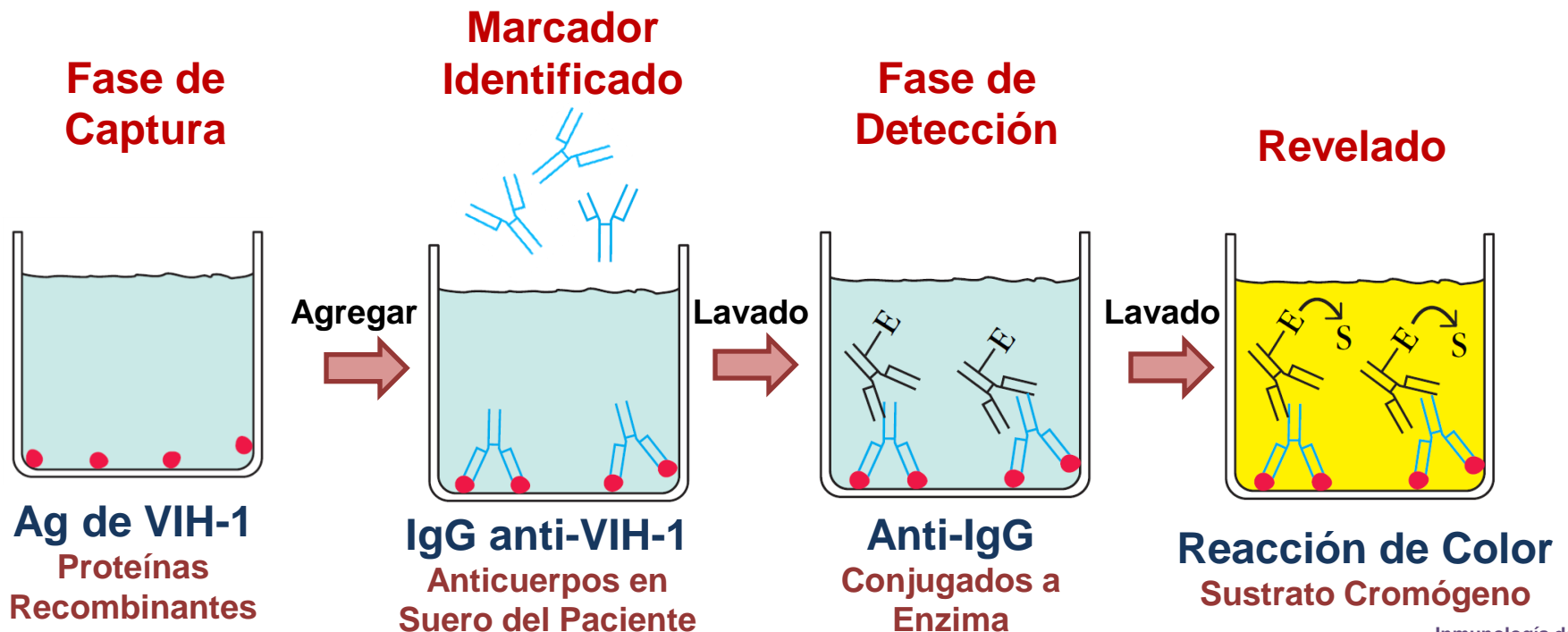
- Permite medir la cantidad de complejo Ag/Ac formado, utilizando un reactivo detector conjugado a una enzima, que en presencia de un sustrato cromógeno resultará en una reacción colorimétrica.
- La intensidad de color será directamente proporcional a la cantidad de complejo Ag/Ac



ELISA Indirecto

- Detección de anticuerpos específicos en el suero del paciente
- Aplicaciones:
 - Diagnóstico de Infección o exposición a microorganismos
 - Detección de Autoanticuerpos
 - Respuesta a Inmunizaciones/Vacunas

Diagnóstico de Infección por VIH-1



ELISA Tipo Sándwich

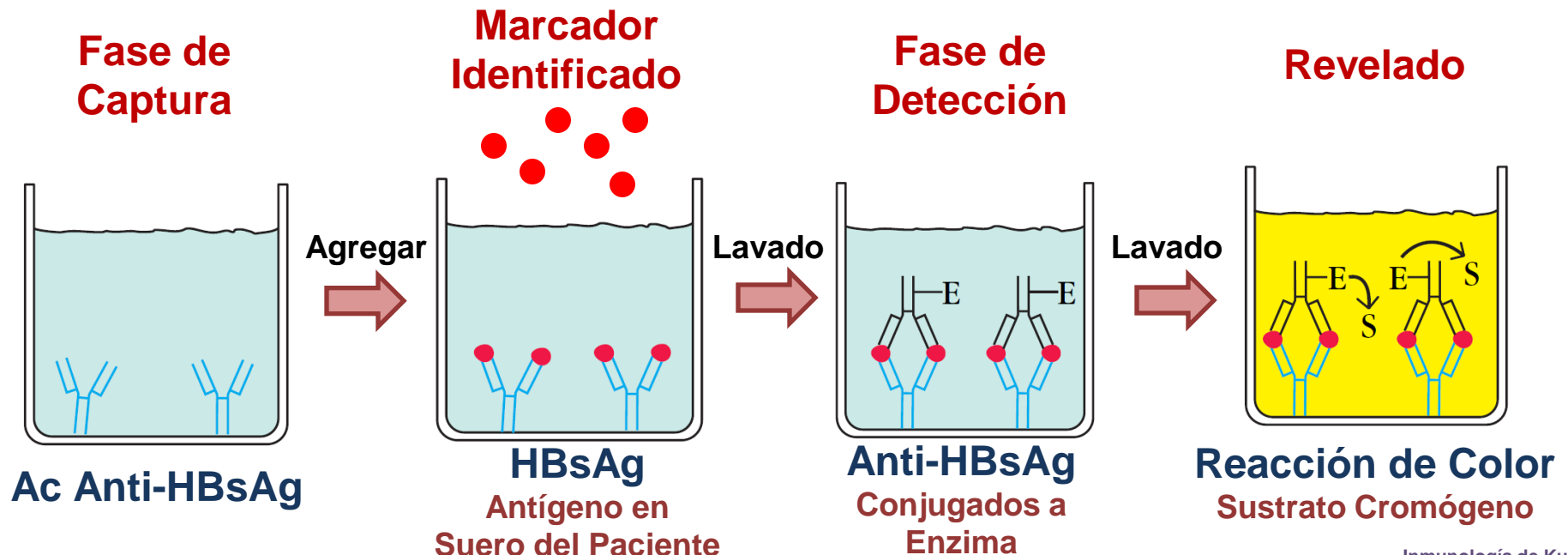
• Detección de antígenos específicos en el suero del paciente

• Aplicaciones:

• Detección de Ag microbianos

• Determinación de Hormonas, Citoquinas, Drogas, Marcadores Tumorales, etc.

Determinación de Antígeno de Superficie del Virus de Hepatitis B



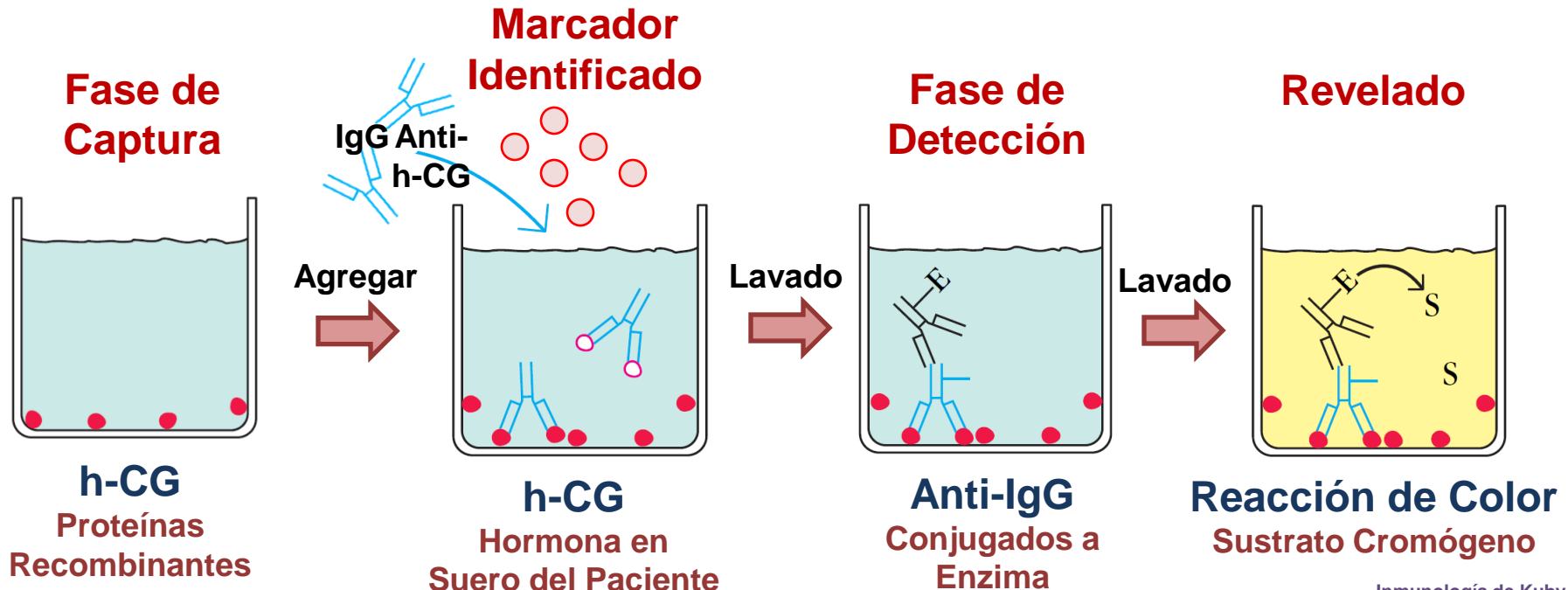
ELISA Competitivo

•El antígenos específico en el suero del paciente compite con el antígeno unido a la fase sólida para unirse al anticuerpo. La intensidad de color es inversamente proporcional a la cantidad de Ag en la muestra

•Aplicaciones:

•Determinación de Hormonas, Citoquinas, Drogas, Marcadores Tumorales, etc.

Determinación de Gonadotropina Coriónica Humana (h-CG)



**Aplicaciones Diagnósticas
de las Interacciones Ag/Ac**

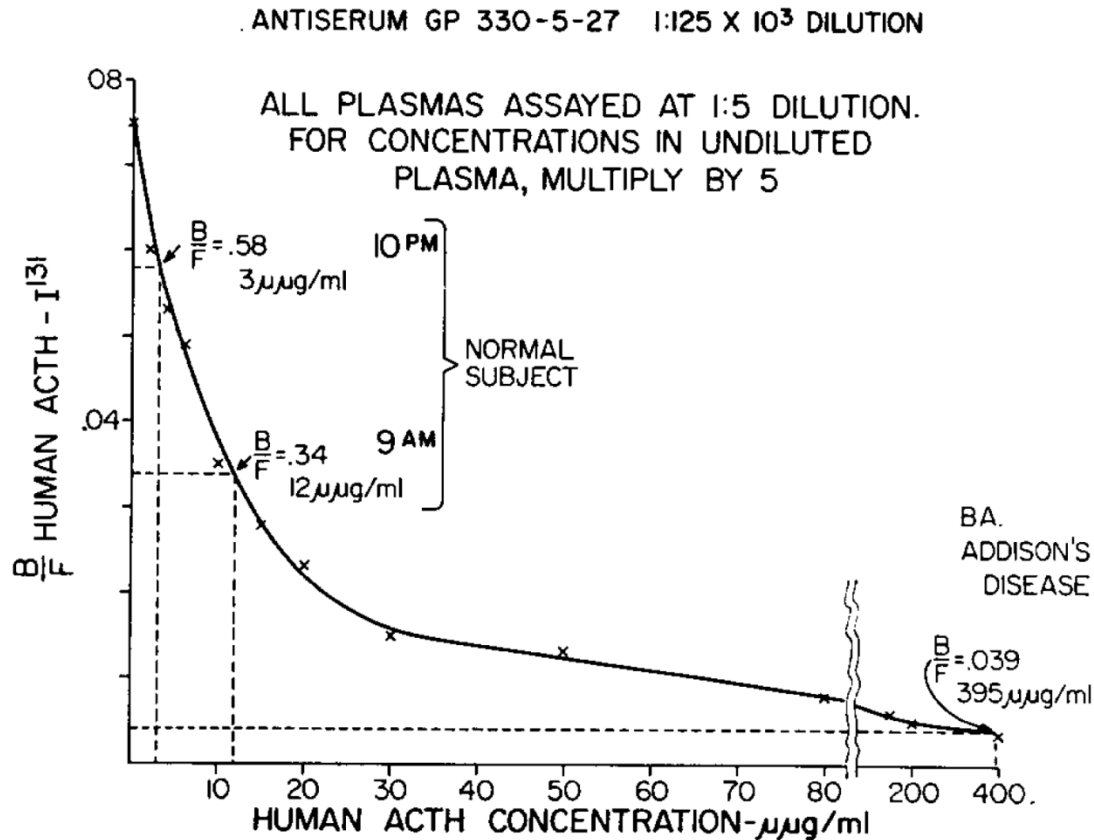
Radioinmunoensayo - RIA

Radioinmunoensayo – RIA

Rosalyn Yalow* y Solomon Berson

* Premio Nobel 1977

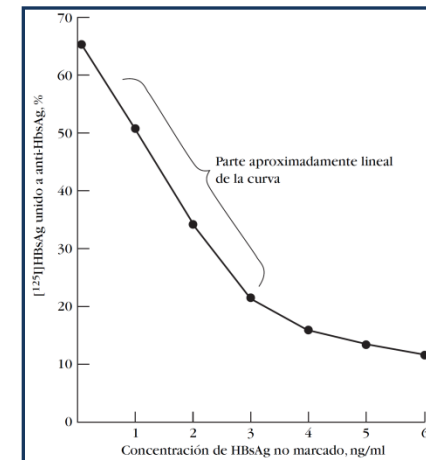
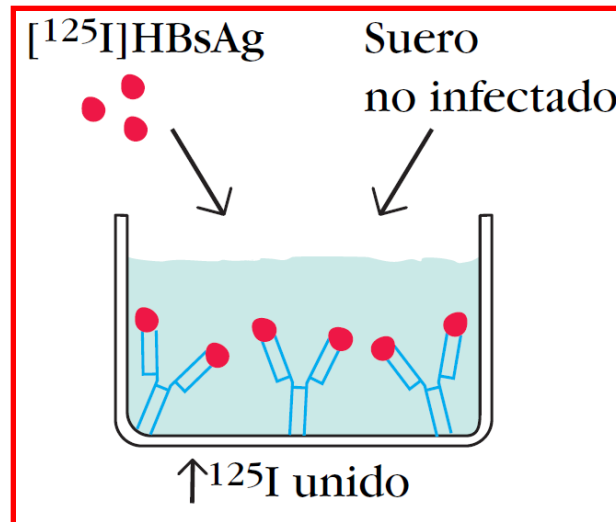
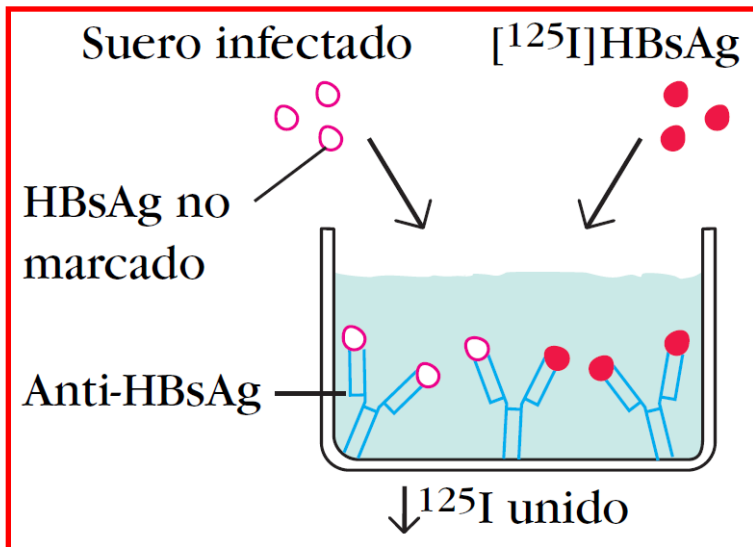
El RIA explota la habilidad de hormonas no marcadas presentes en plasma u otras soluciones, de competir por su unión al anticuerpo con hormonas marcadas radioactivamente, inhibiendo su unión.



Radioinmunoensayo - RIA

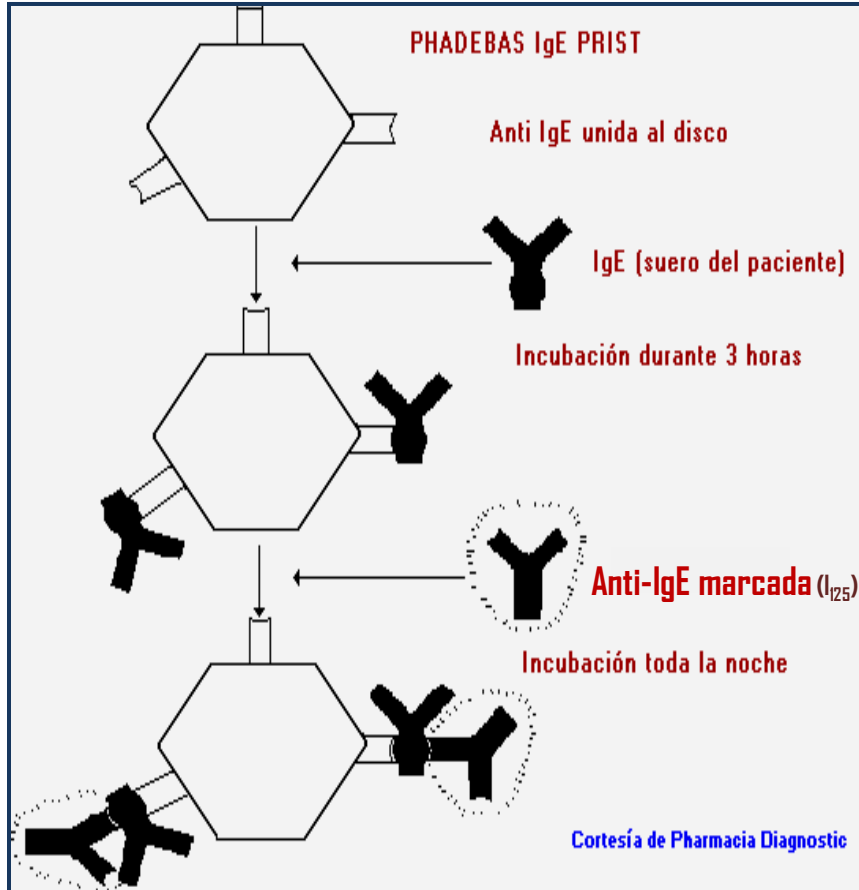
- **Unión competitiva de antígenos radiomarcados y antígenos no marcados a anticuerpos de alta afinidad.** Ag marcado a concentraciones que saturan sitios de unión del Ac.
- **Aplicaciones:**
 - **Detección de Hormonas, Proteínas séricas, Vitaminas, Ag Microbianos**

Diagnóstico de Infección por Virus de Hepatitis B



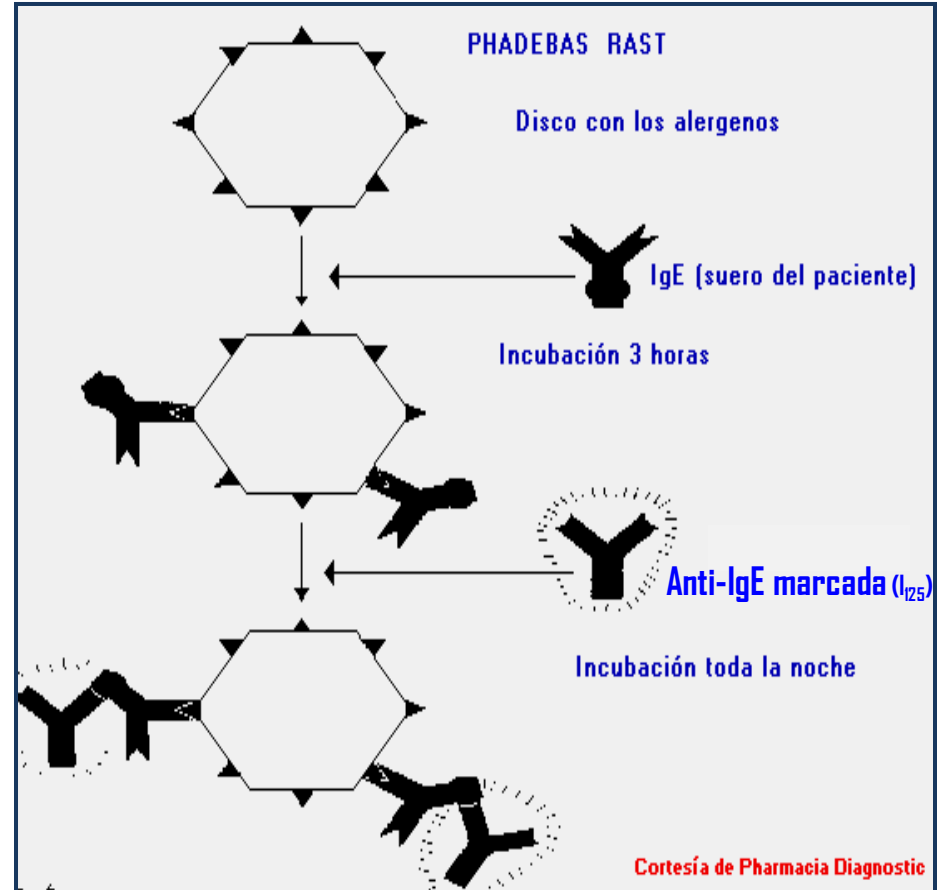
Radioinmunoensayo - RIA

IgE Total PRIST



PRIST: *Paper Radio Immuno Sorbent Test*

IgE Específico RAST



RAST: *Radio Allergo Sorbent Test*

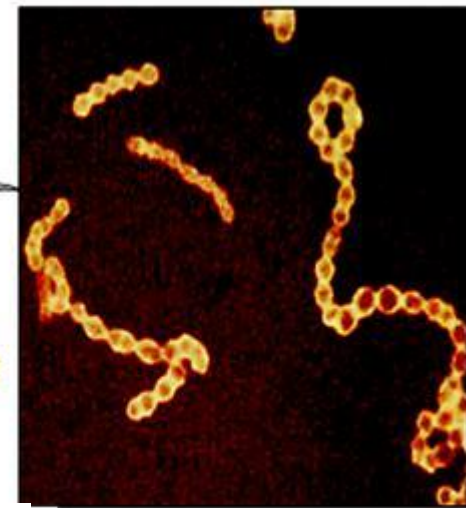
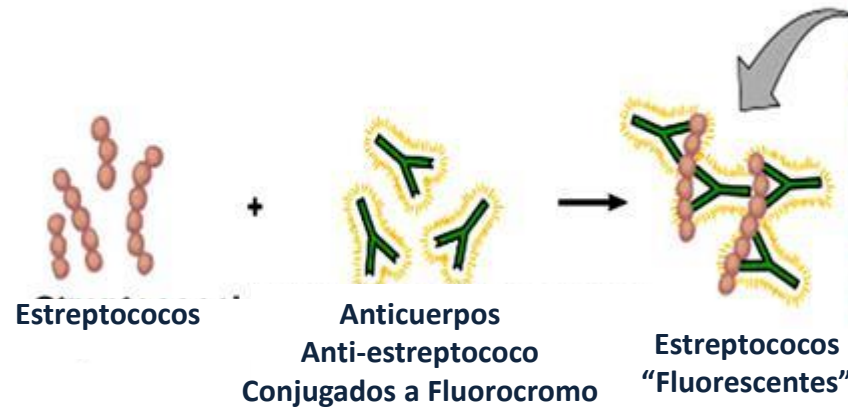


Imagen microscópica de Estreptococos Marcados con Anticuerpos + Fluocromo

Aplicaciones Diagnósticas de las Interacciones Ag/Ac

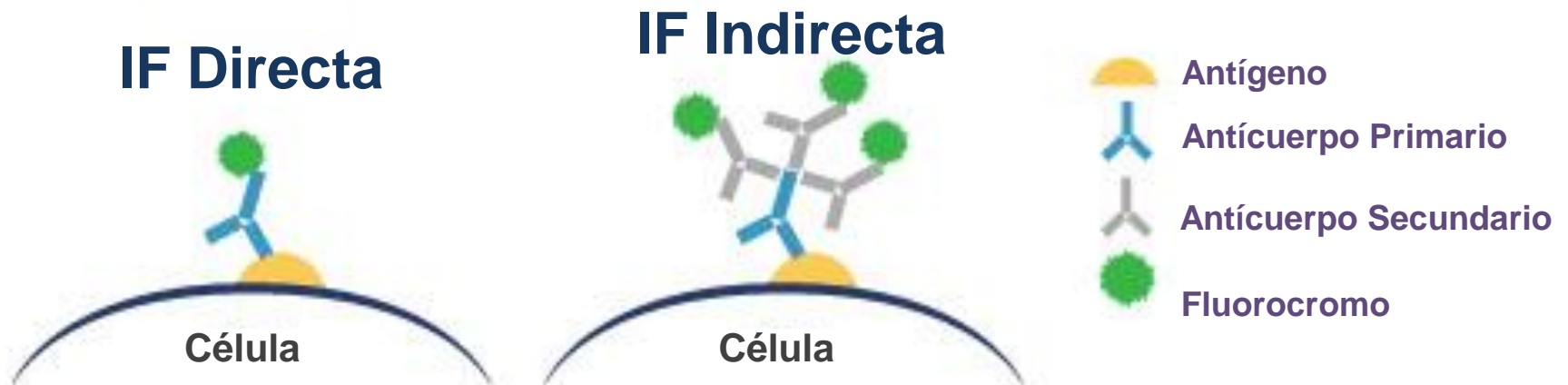
Inmunofluorescencia - IF

Inmunofluorescencia

La Inmunofluorescencia (IF) permite evaluar la presencia de antígenos en células y tejidos; y la detección y titulación de anticuerpos específicos, utilizando fluorocromos conjugados a anticuerpos

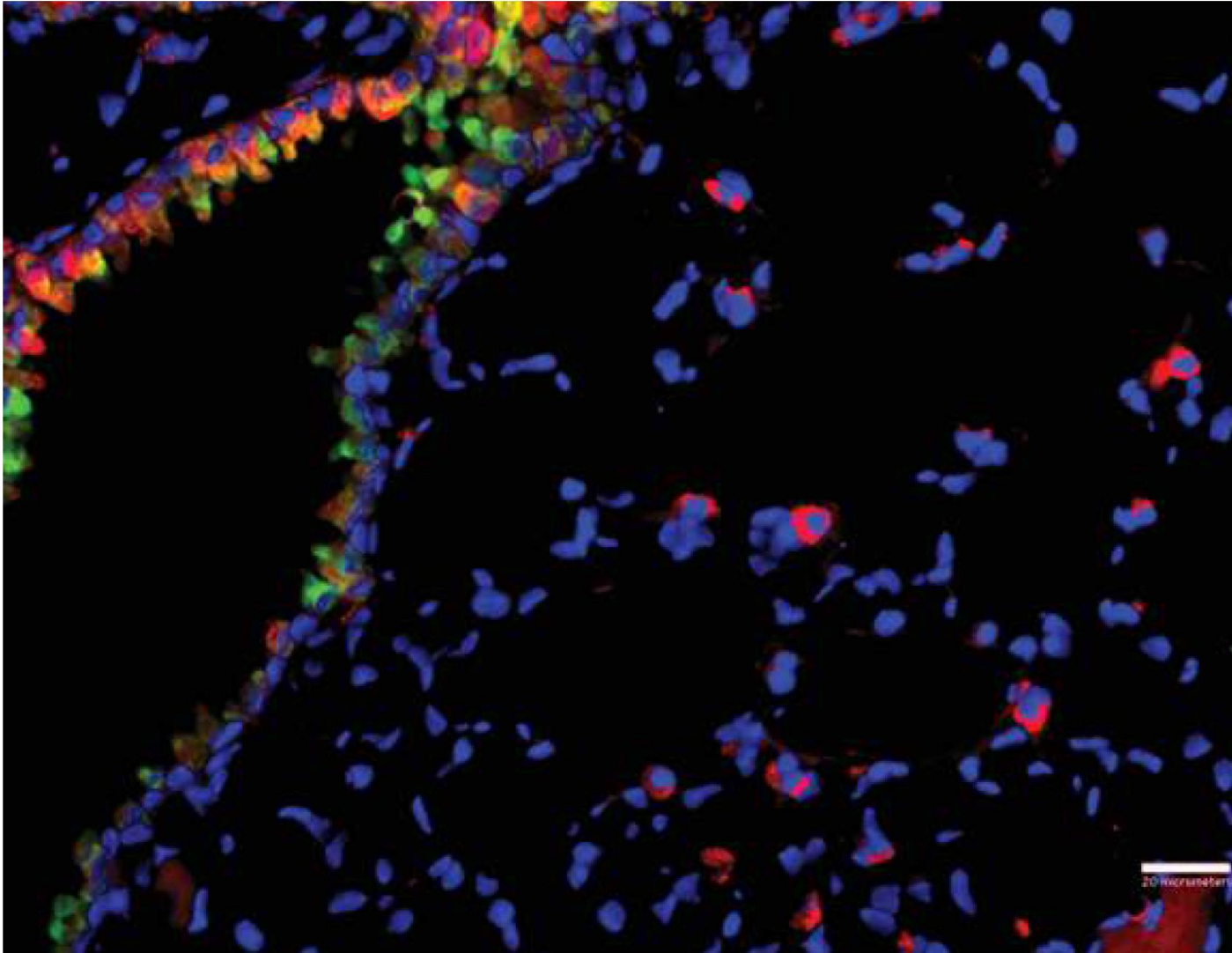
•**Inmunofluorescencia Directa:** un anticuerpo primario específico conjugado con el fluorocromo se aplica directamente sobre la muestra (tejido, célula, u otro) permitiendo identificar la estructura responsable de la especificidad. **Aplicaciones:** identificar microorganismos y tipificar células (por ejemplo: linfocitos).

•**Inmunofluorescencia Indirecta:** un anticuerpos primario no marcado se aplica directamente sobre el sustrato (tejido, célula, u otro) y se visualiza la reactividad con un conjugado anti-inmunoglobulinas-fluorocromo. **Aplicaciones:** detección de autoanticuerpos.



Inmunofluorescencia

Tejido Pulmonar de Ratón Inflamado



Tejido pulmonar de ratón Inflamado, teñido por inmunofluorescencia para evidenciar
Células Epiteliales activadas, Macrófagos infiltrantes y Núcleos celulares

Inmunofluorescencia

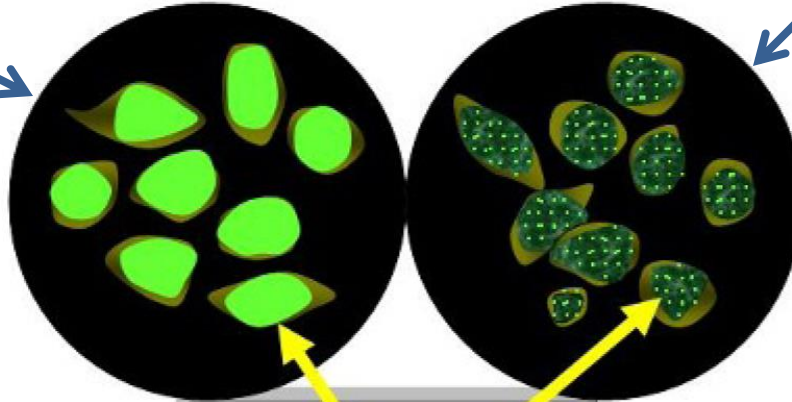
Anticuerpos Antinucleares – ANA

Patrones Asociados a Enfermedades Autoinmunes

Patrón Homogéneo

(ADN-dc, Histonas)

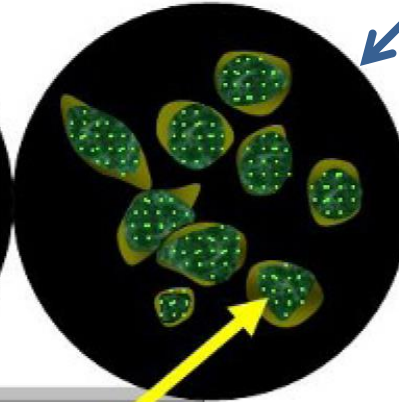
- Lupus Eritematoso Sistémico
- LES inducido por Drogas



Patrón Punteado

(ENA, RNP, Sm, SSA/Ro, SSB/La, Scl-70)

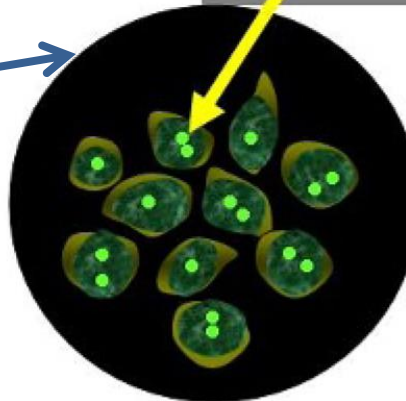
- Lupus Eritematoso Sistémico
- Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo
- Esclerosis Sistémica
- Síndrome de Sjogren
- Polimiositis



Patrón Nucleolar

(PM-Scl, ARN Polimerasa I-III, U3-RNP)

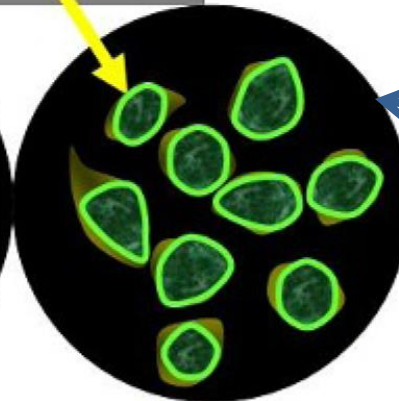
- Esclerosis Sistémica
- Polimiositis



Patrón Periférico

(RNP, Sm, SSA/Ro)

- Lupus Eritematoso Sistémico
- Esclerosis Sistémica

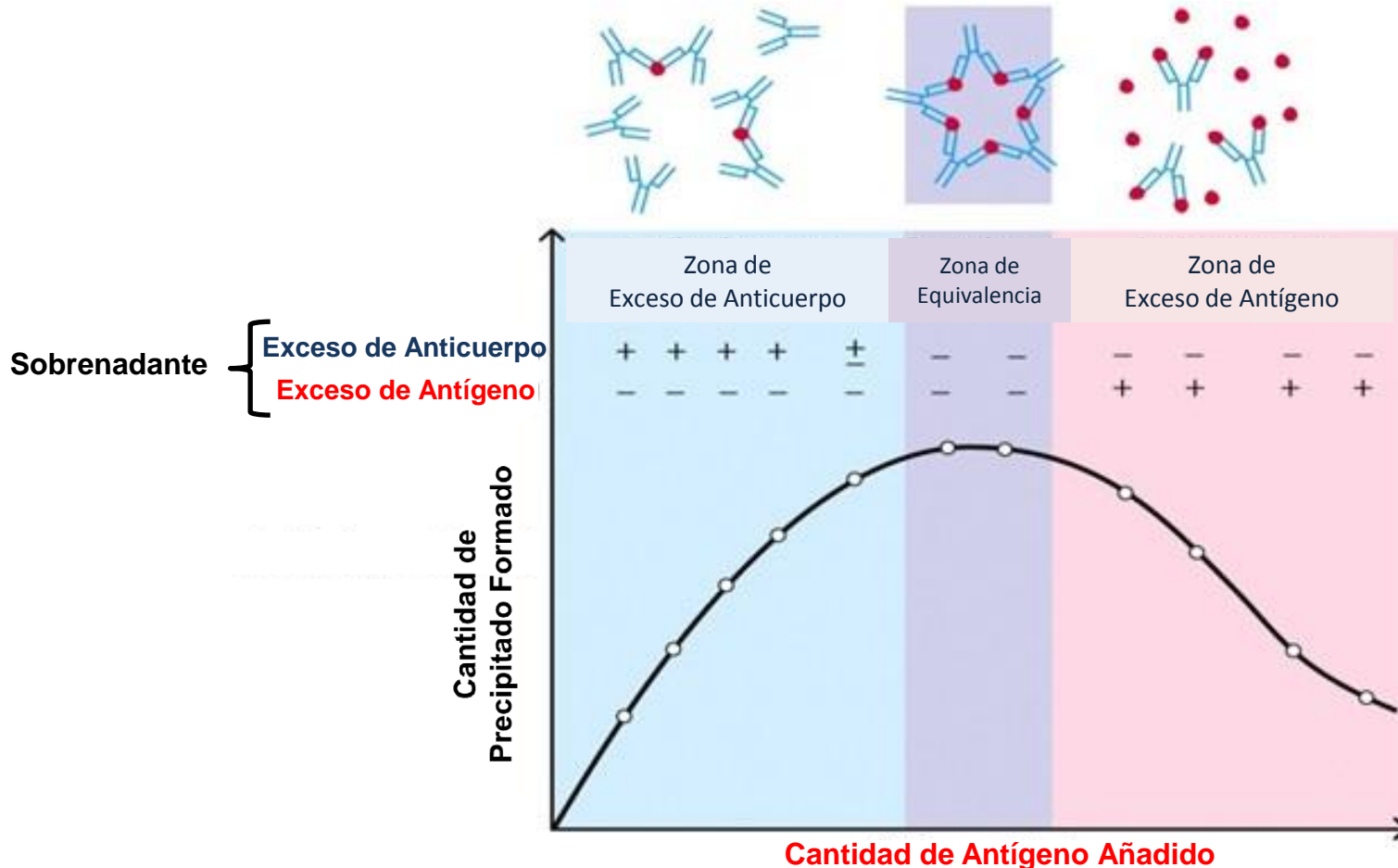


Aplicaciones Diagnósticas de las Interacciones Ag/Ac

Reacciones de Precipitación

Reacciones de Precipitación

- El anticuerpo y el antígeno en solución interactúan formando complejos inmunes en forma de retículos, haciéndose insolubles y precipitando
 - El anticuerpo debe ser por lo menos bivalente
 - El antígeno debe ser bivalente o polivalente
 - La relación entre las concentraciones de Ac y Ag deben ser óptimas (Zona de Equivalencia)



Aplicaciones Diagnósticas de las Interacciones Ag/Ac

Reacciones de Precipitación en Gel

Reacciones de

Inmunoprecipitación en Gel

- Permiten detectar la presencia y/o concentración de antígenos y/o anticuerpos presentes, por la formación de bandas opacas de precipitado que corresponden a complejos antígenos-anticuerpos en la zona de equivalencia.



Aplicaciones Diagnósticas de las Interacciones Ag/Ac

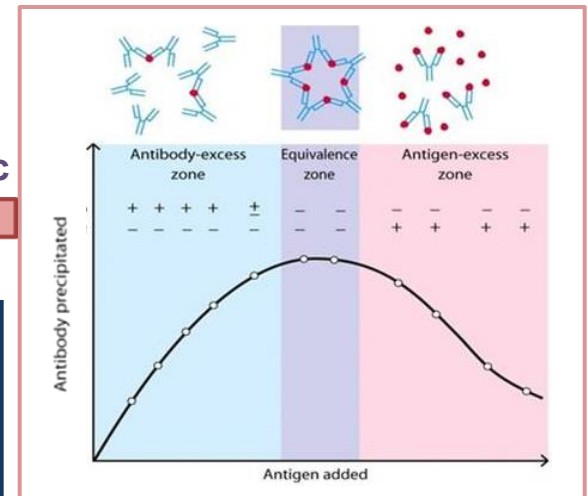
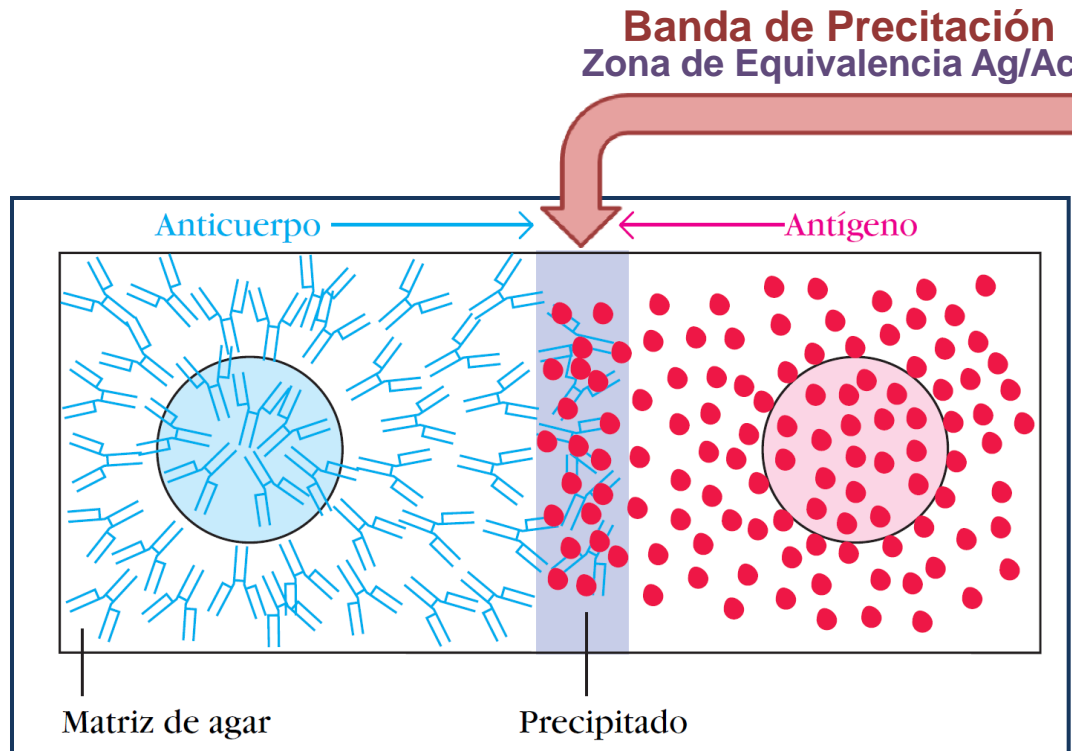
Reacciones de Precipitación en Gel

Inmunodifusión Doble (Ouchterlony)

Inmunodifusión Doble

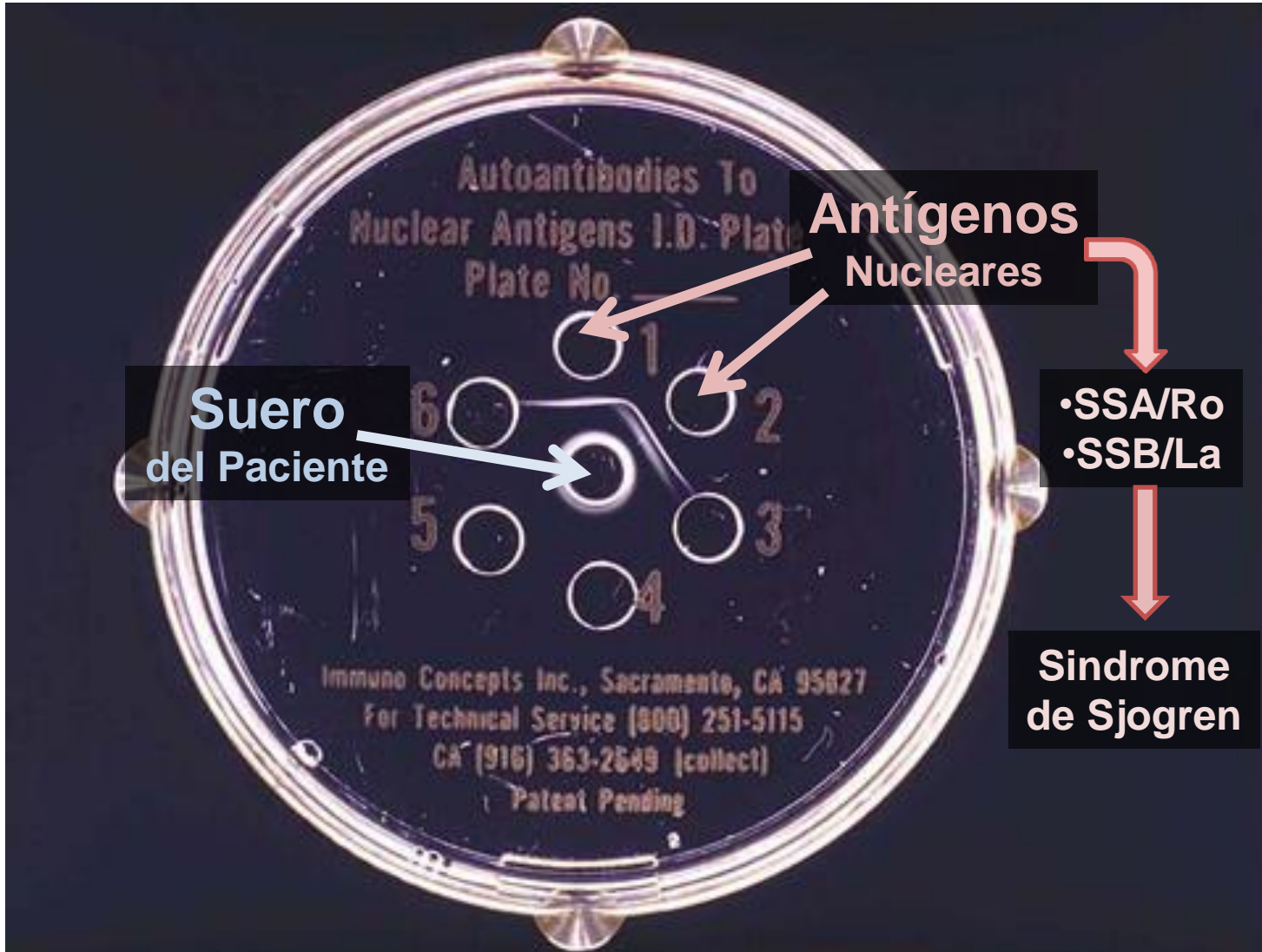
Outchterlony

- Se basa en la difusión del Ag y el Ac en un medio semisólido (gel de agar), formando bandas de precipitación en el punto donde los reactantes alcanzan proporciones equivalentes.



Inmunodifusión Doble

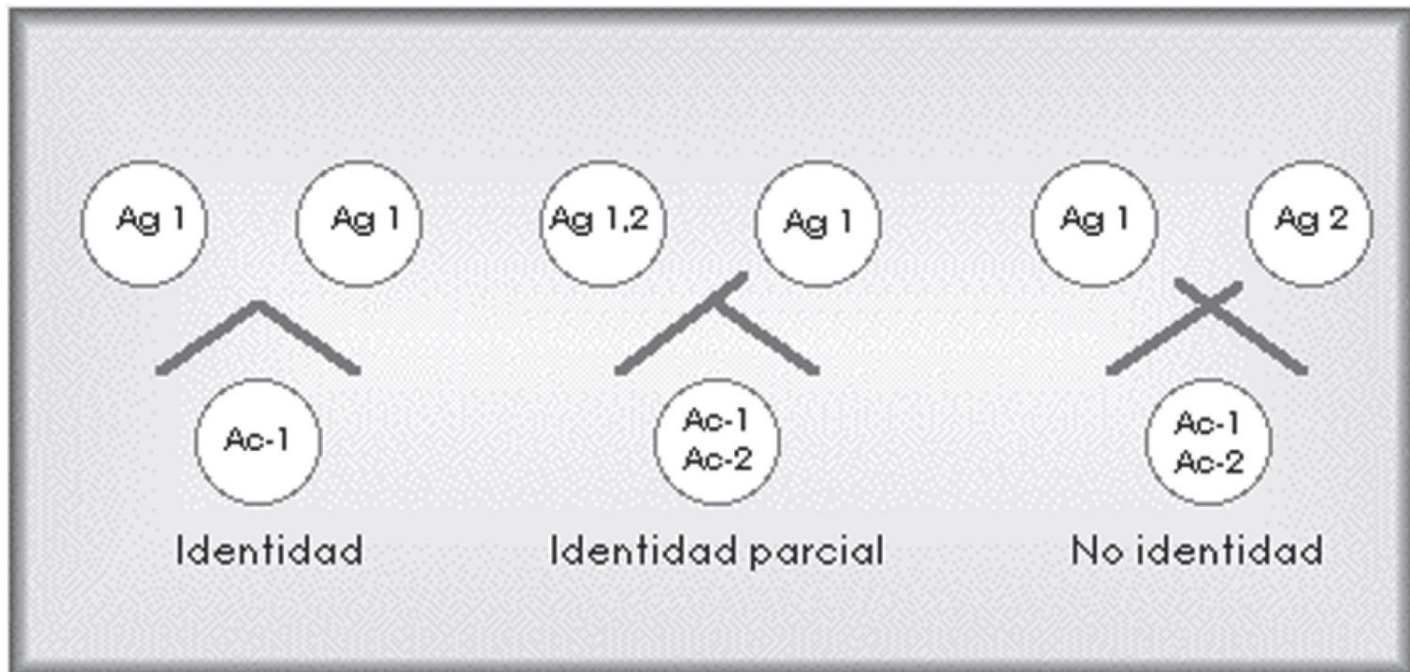
Outchterlony



Inmunodifusión Doble

Aplicaciones

- Análisis de Ag y Ac
- Determinar la relación inmunoquímica entre dos Ag (**Identidad, No Identidad e Identidad Parcial**)
- Determinar monoespecificidad de un antisuero
- Conocer el título de los anticuerpos..



Aplicaciones Diagnósticas de las Interacciones Ag/Ac

**Reacciones de Precipitación en Gel
Inmunoelectroforesis**

Inmunolectroforesis

- Combina la electroforesis en una dimensión en un primer paso, con la inmunodifusión en dirección perpendicular en un segundo paso.
- Permite la identificación de diferentes antígenos en mezclas complejas
- Se utiliza en el diagnóstico de cierto tipo de Inmunodeficiencias y de Mieloma Múltiple

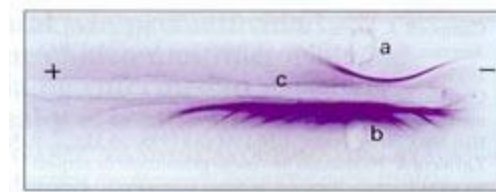
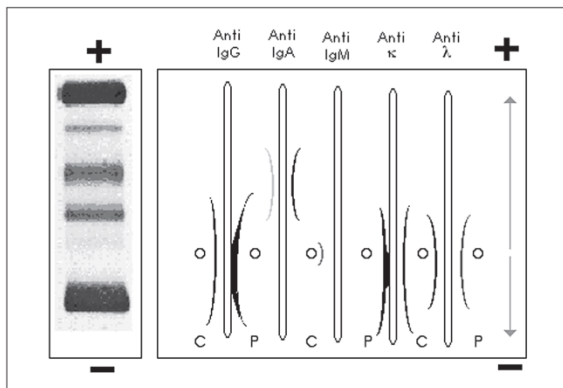
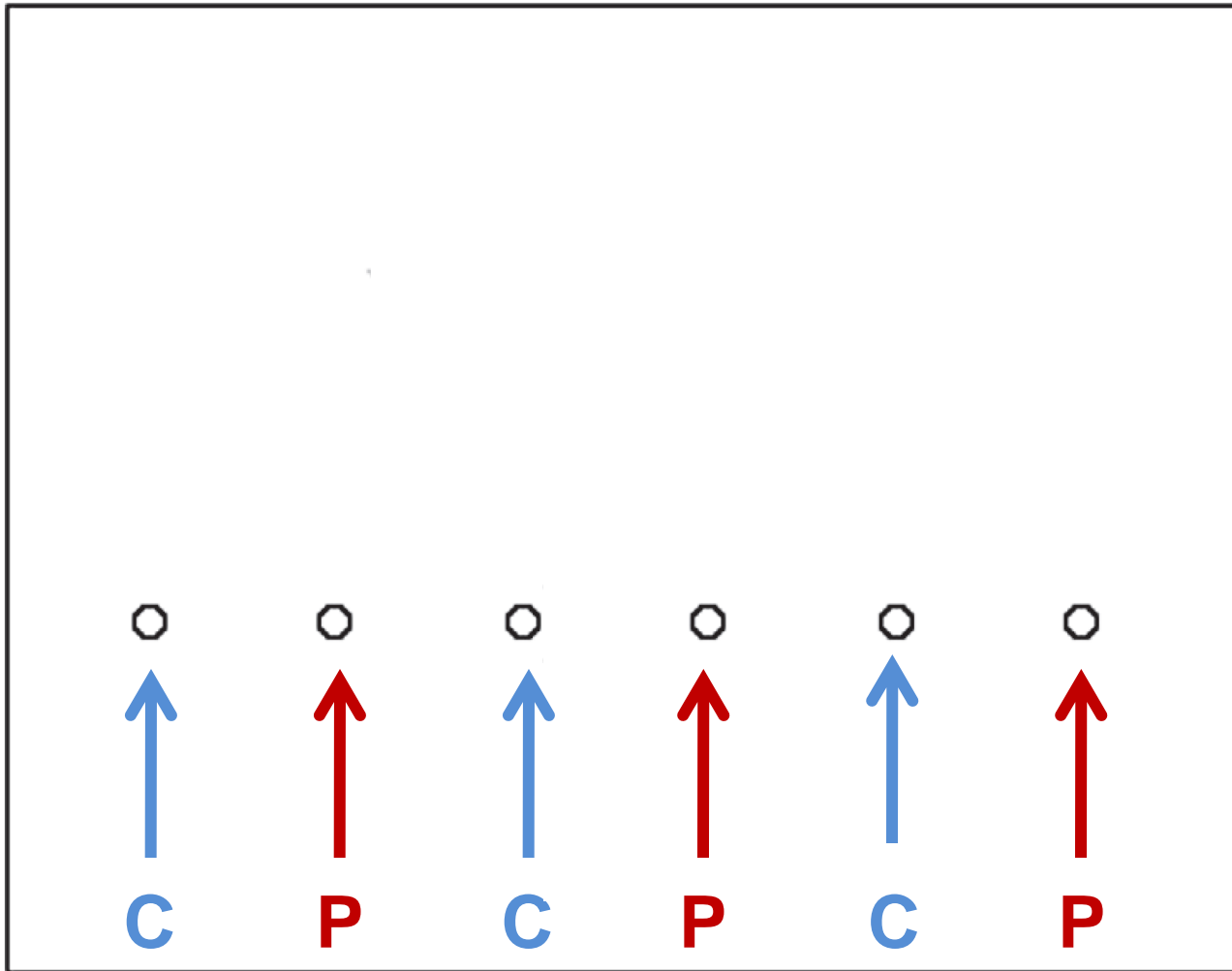


Figura 4.- Prueba de inmunolectroforesis.
(a) Hemorragina purificada (0,225 mg/mL).
(b) Veneno erudo (10 mg/mL).
(c) Suero antibotrópico (sin diluir).

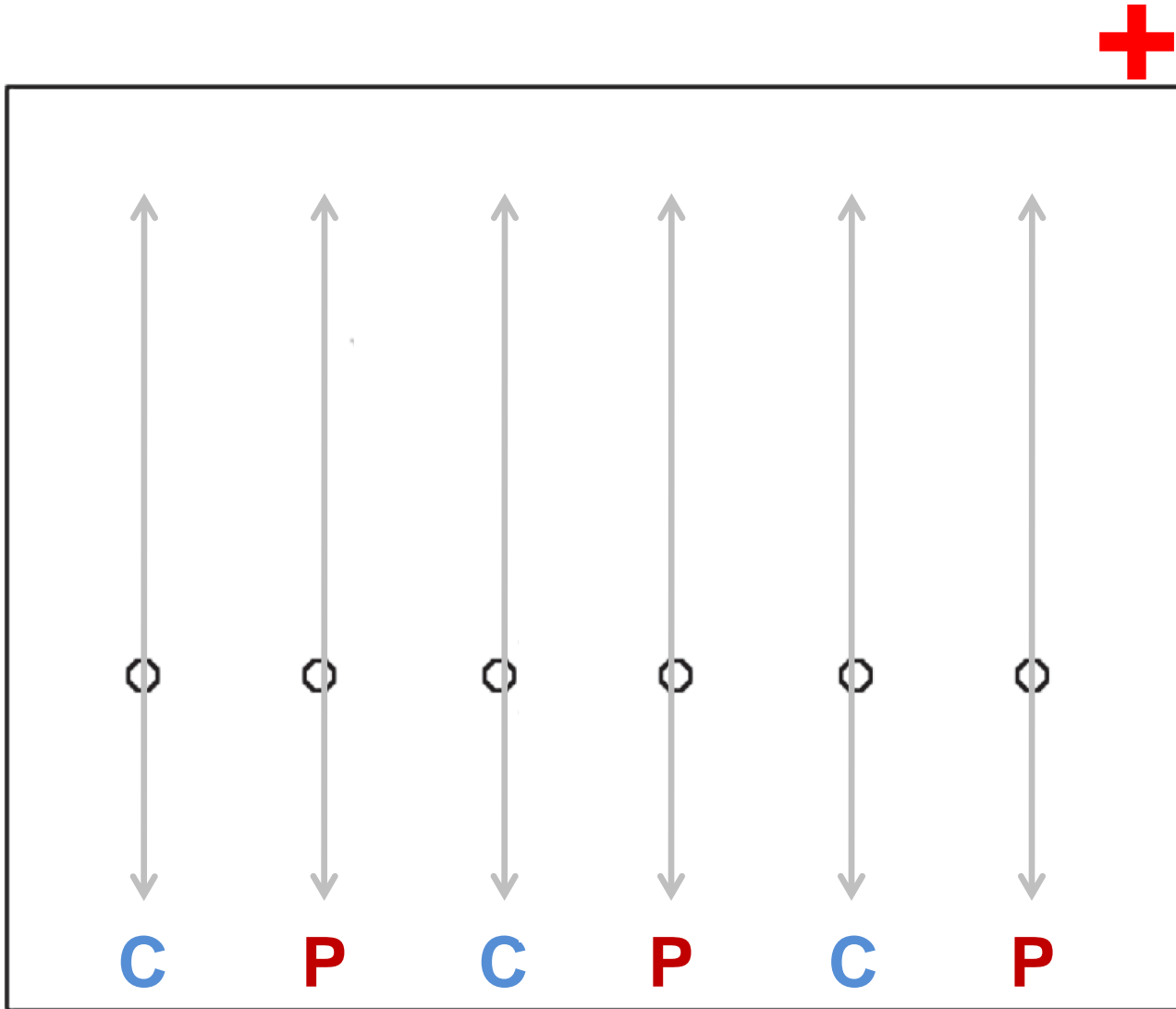
Inmunoelectroforesis

1. Colocar en pozos de gel de agarosa sueros de **Paciente (P)** y **Control (C)** apropiado



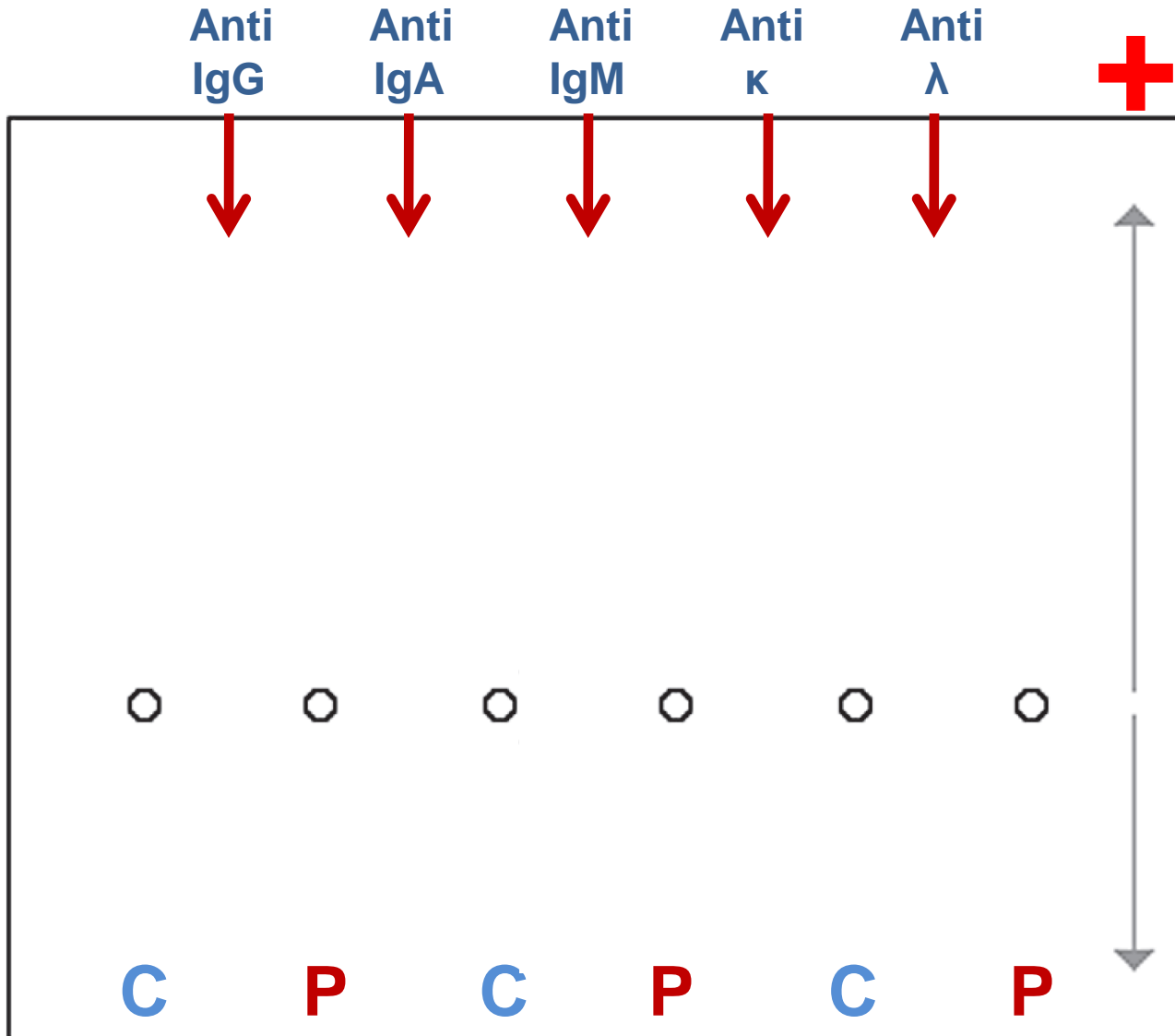
Inmunolectroforesis

2. Someter las muestras a un **campo eléctrico** para separar por **Electroforesis**



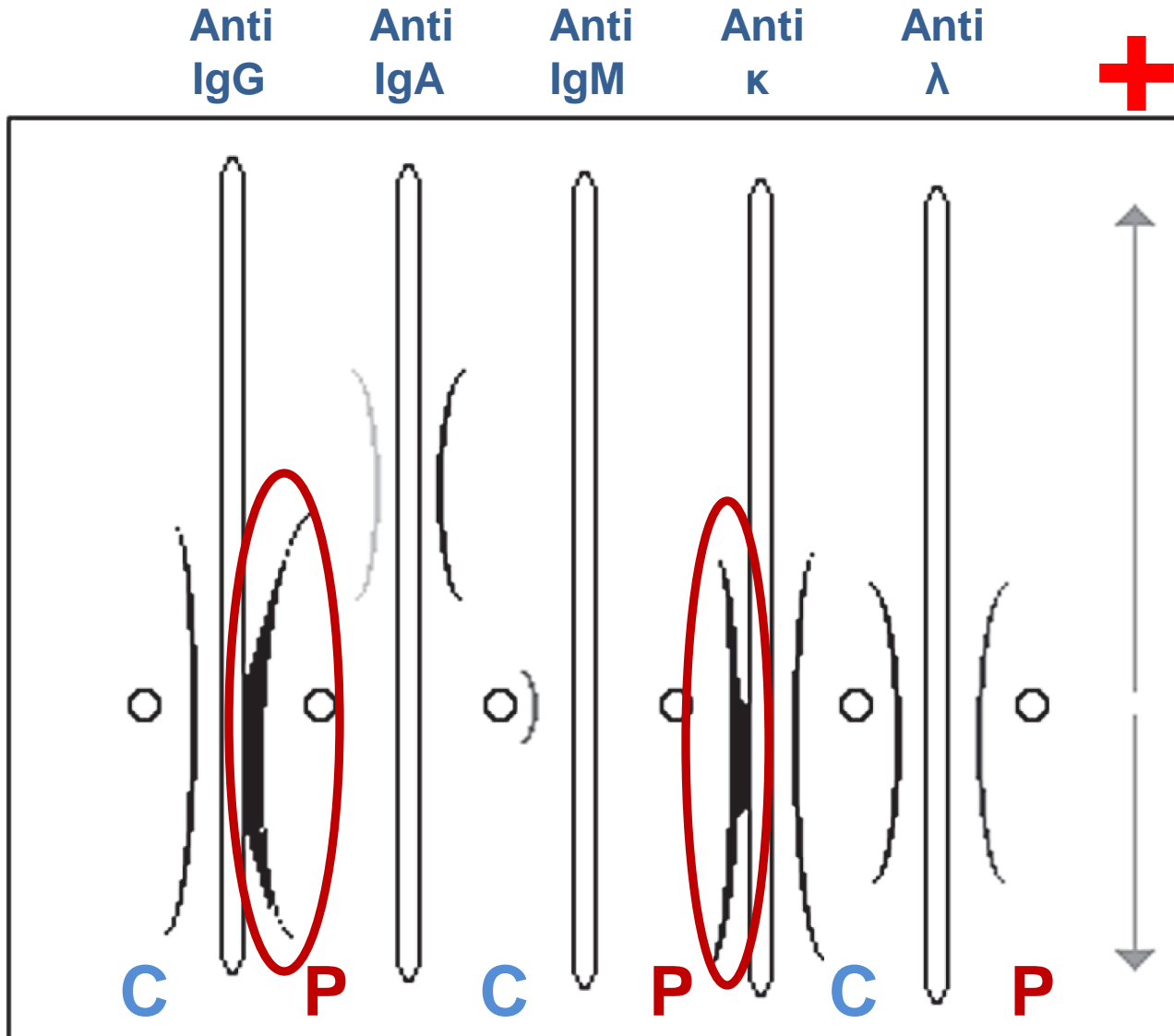
Inmunoelectroforesis

3. Abrir canales en la placa de agarosa y colocar **antisueros** apropiados. Incubar para **difusión**



Inmunolectroforesis

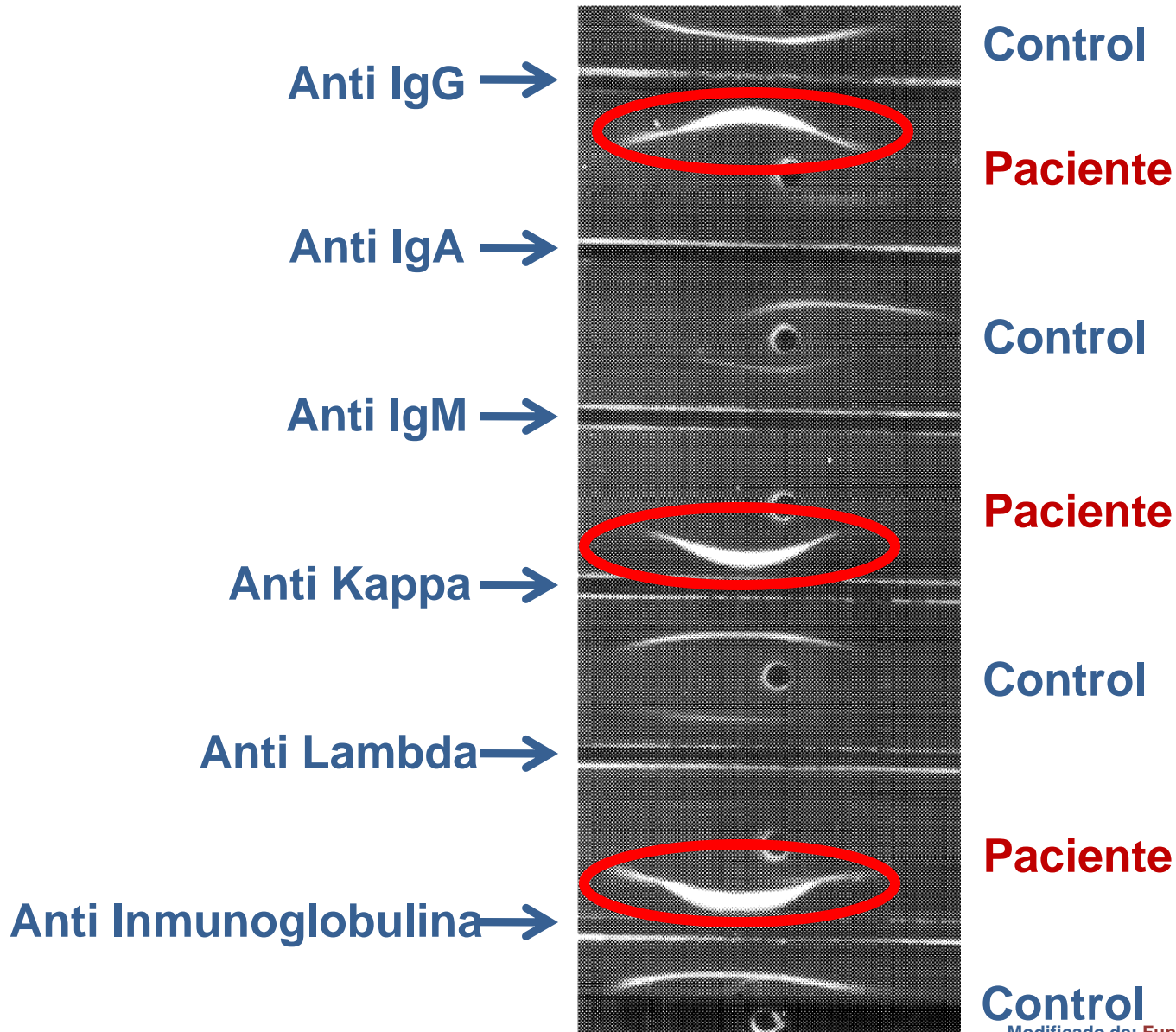
4. Evaluar arcos de precipitación



Conclusión: Paciente con **Gammapatía Monoclonal IgG-Kappa**

Inmunoelectroforesis

Paciente con Gammapatía Monoclonal IgG-Kappa

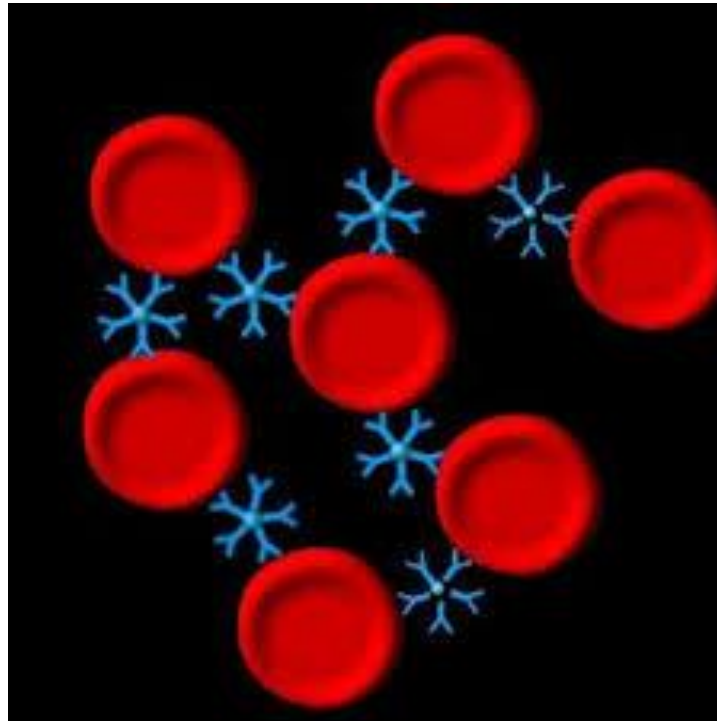


**Aplicaciones Diagnósticas
de las Interacciones Ag/Ac**

Reacciones de Aglutinación

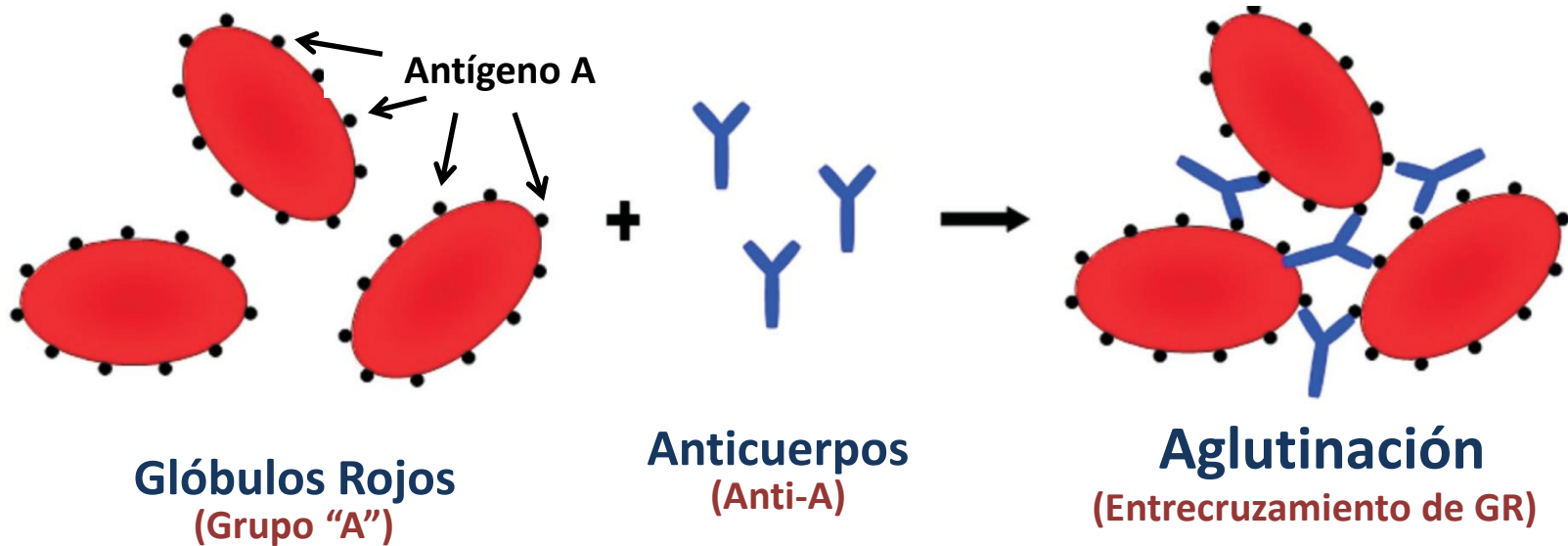
Reacciones de Aglutinación

Un **antígeno particulado (bacterias, eritrocitos)**, al interactuar con su anticuerpo específico en proporciones óptimas, **se une por medio de enlaces cruzados**. Este complejo de unión forma **Agregados**, produciendo una **reacción de aglutinación**.



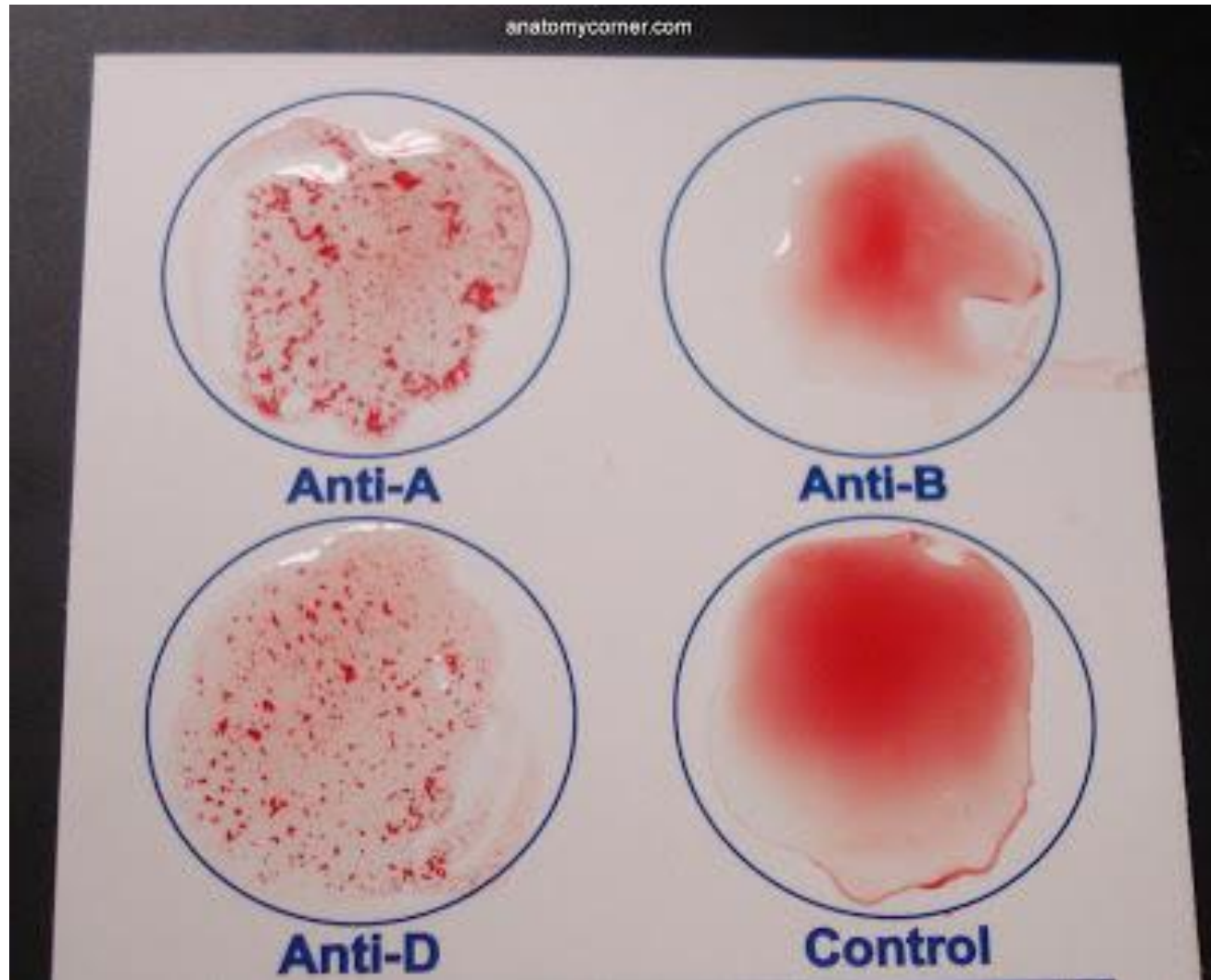
Hemaglutinación

Aglutinación de Glóbulos Rojos



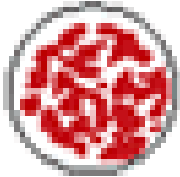
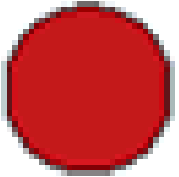
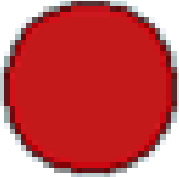

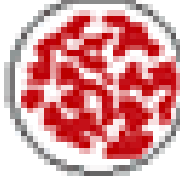
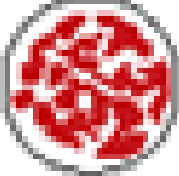
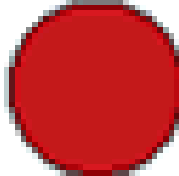
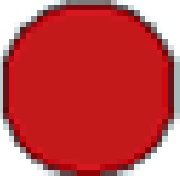
Pruebas de Aglutinación

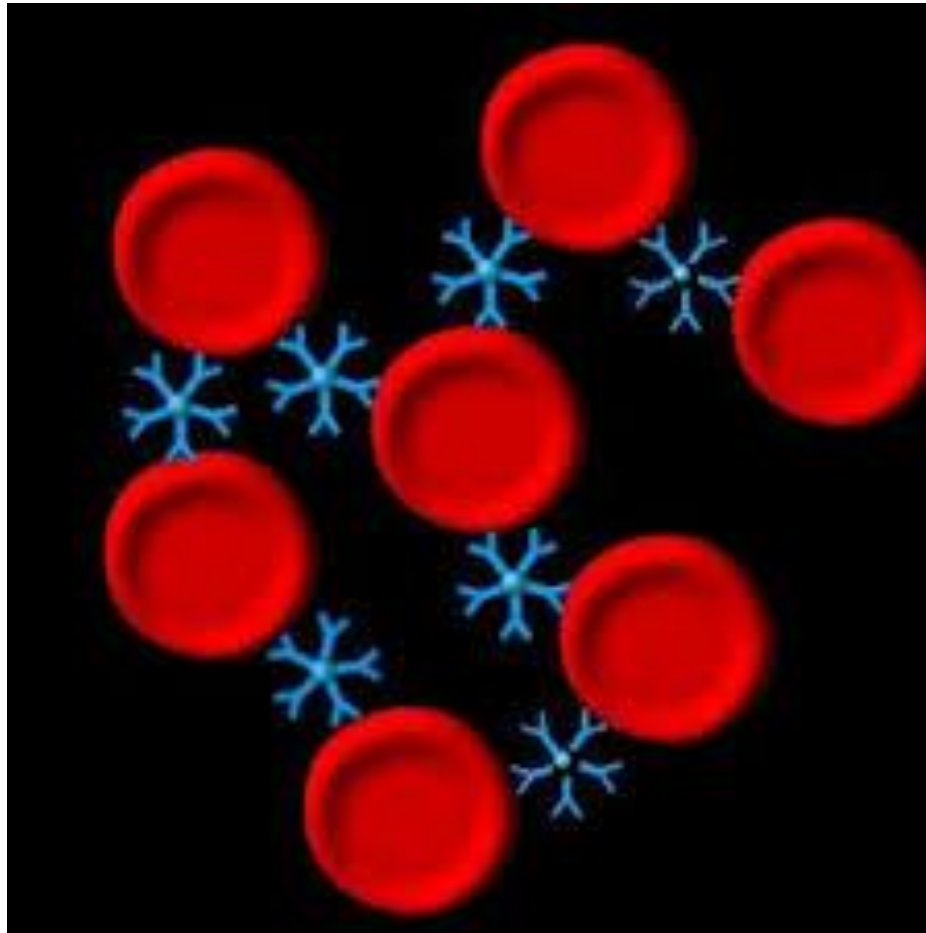
Determinación del Grupo Sanguíneo "ABO"



Pruebas de Aglutinación

Determinación del Grupo Sanguíneo "ABO"

	Suero Anti-A	Suero Anti-B
Grupo "A"		
Grupo "B"		
Grupo "AB"		
Grupo "O"		



¡GRACIAS!

Para estudiar por su cuenta

- Inmunodifusión Radial
- Aglutinación: Inhibición de la Aglutinación
- Pruebas de Inmunohemólisis: Fijación de Complemento