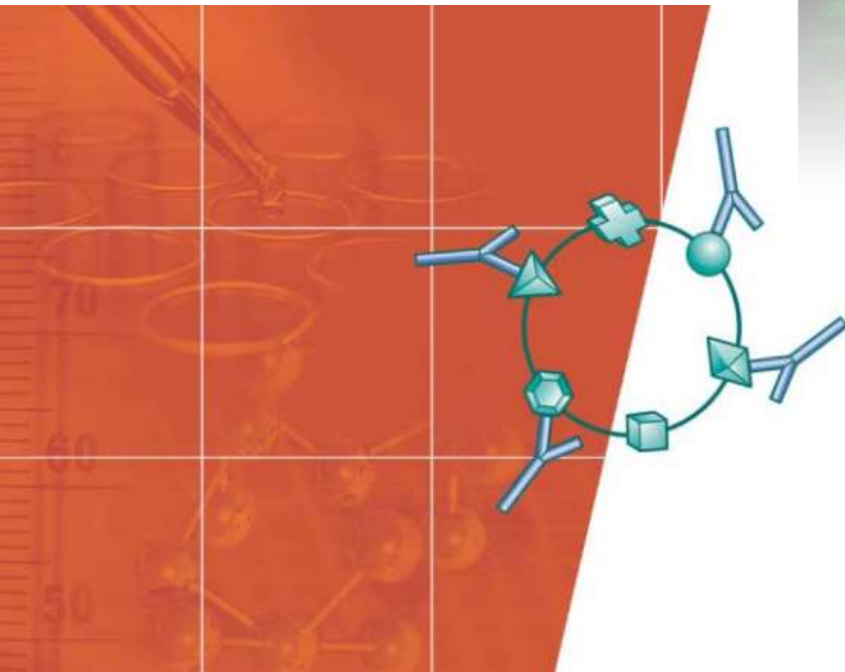


Herramientas para el inmunodiagnóstico

Universidad de Los Andes
Facultad de Medicina
Instituto de Inmunología Clínica

Luisa Elena Barboza



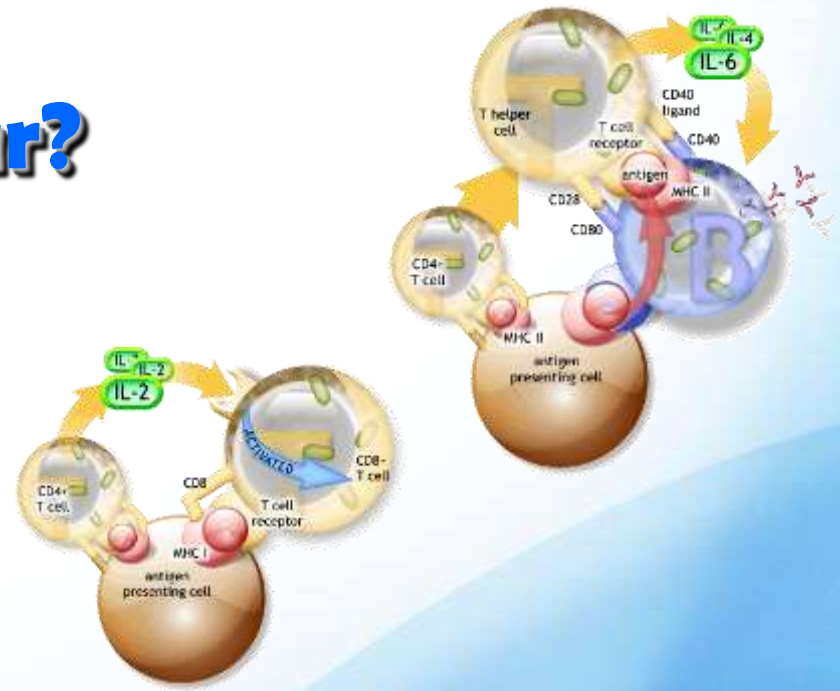
¿Qué se puede evaluar?

Poblaciones celulares

- Células T
- Células B
- Células fagocíticas
- Células citotóxicas

Productos de la respuesta

- Citoquinas
- Inmunoglobulinas/anticuerpos
- Complemento



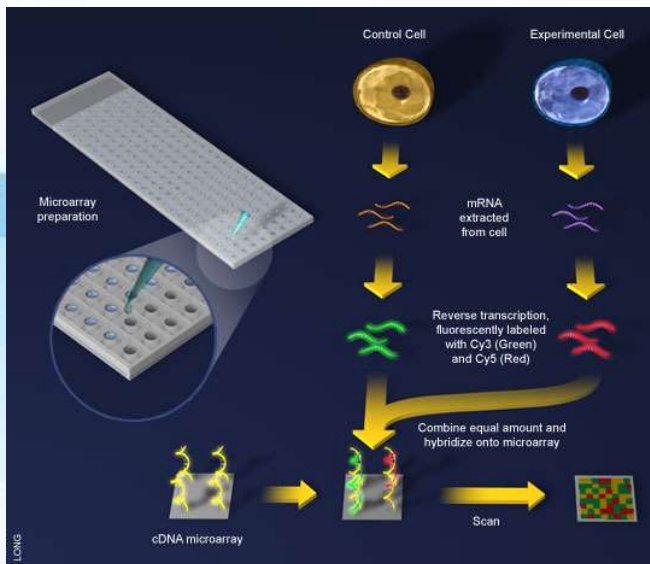
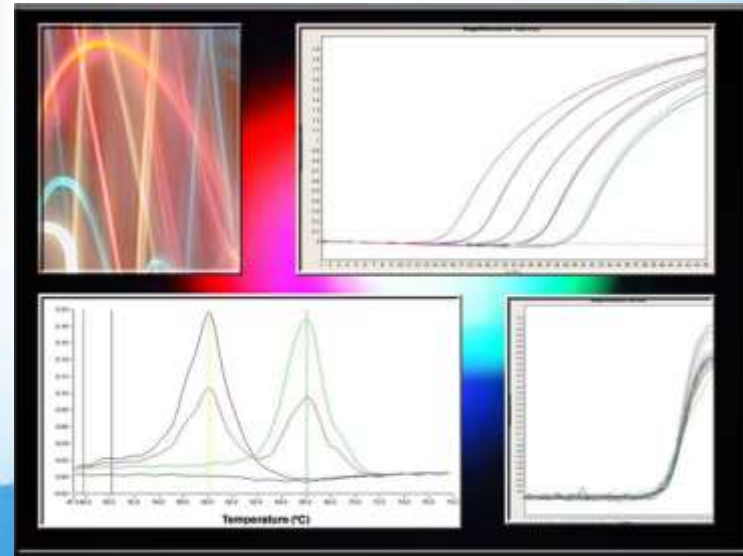
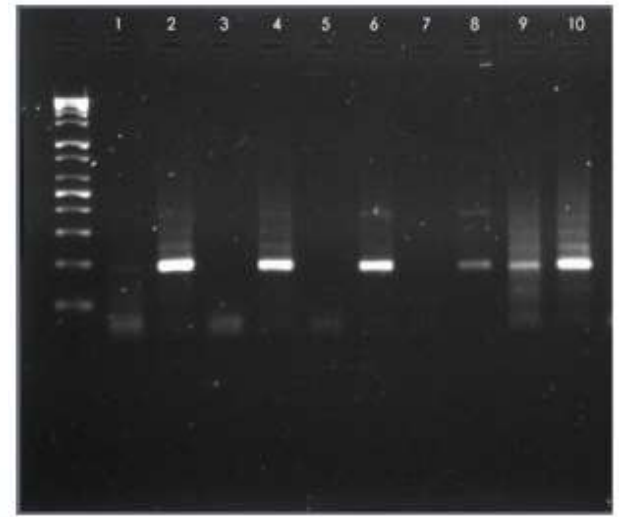
¿Para qué?

Diagnóstico

- Patologías inmunes
- Procesos infecciosos

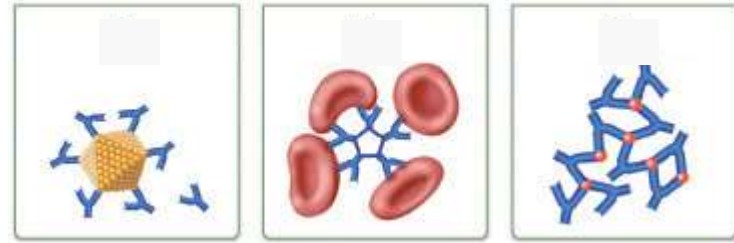
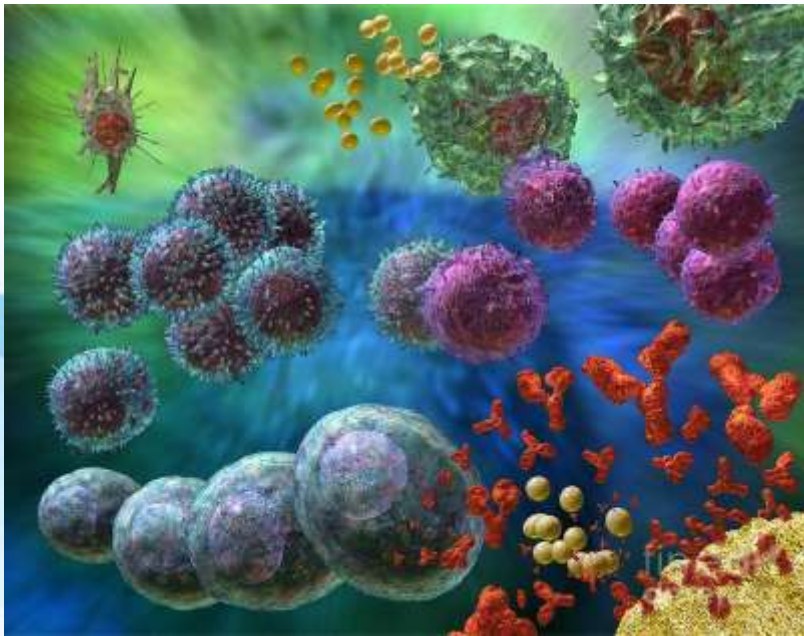
Técnicas para evaluar la respuesta inmune

- **Inmunoensayos**
- **PCR**
- **PCR en tiempo real**
- **Microarreglos (microarray)**
- **Otros**



Inmunoensayos:

Métodos analíticos basados en la interacción antígeno-anticuerpo



Tipos:

- **Enzimoinmunoensayos (ELISA)**
- **Western blot**
- **Inmunoprecipitación**
- **Inmunohistoquímica**
- **Inmunofluorescencia**

Cómo pueden ser los inmunoensayos:








Directos:

- Se mide directamente la reacción **Ag-Ac**

- **Dispersión de luz**
- **Visualización directa**

Ejemplos:

- **Aglutinación**
- **Precipitación**

Eritrocitos de individuos de tipo					
					
Expresan las estructuras de carbohidratos					
	R-GlcNAc-Gal Fuc	R-GlcNAc-Gal-GalNAc Fuc	R-GlcNAc-Gal-Gal Fuc	R-GlcNAc-Gal-GalNAc Fuc + R-GlcNAc-Gal-Gal Fuc	
Suero de individuos de tipo	 Anticuerpos anti-A y anti-B	sin aglutinación	aglutinación	aglutinación	aglutinación
 Anticuerpos anti-B	sin aglutinación	sin aglutinación	aglutinación	aglutinación	
 Anticuerpos anti-A	sin aglutinación	aglutinación	sin aglutinación	aglutinación	
AB Sin anticuerpos contra A o B	sin aglutinación	sin aglutinación	sin aglutinación	sin aglutinación	

Cómo pueden ser los inmunoensayos:

Indirectos o con reactivos marcados:

- **Uno de los componentes de la reacción antígeno-anticuerpo es conjugado a una molécula que emite una señal detectable**

Pueden ser:

- **Radioinmunoensayo (RIA)**
- **Fluoroinmunoensayo (FIA)**
- **Enzimoinmunoensayo (EIA, ELISA)**
- **ELFA (ELISA+ Fluorescencia)**
- **Quimioluminiscencia**

¿Cuál inmunoensayo emplear?

CUADRO 6-3 Sensibilidad de diversos inmunoensayos	
Prueba	Sensibilidad* (μg de anticuerpo/ml)
Reacción de precipitación en líquidos	20–200
Reacciones de precipitación en gel	
Inmunodifusión radial de Mancini	10–50
Doble inmunodifusión de Ouchterlony	20–200
Inmunoelectroforesis	20–200
Electroforesis en cohete	2
Reacciones de aglutinación	
Directa	0.3
Aglutinación pasiva	0.006–0.06
Inhibición de la aglutinación	0.006–0.06
Radioinmunoensayo	0.0006–0.006
Ensayo de inmunosorbente ligado a enzima (ELISA)	~0.0001–0.01
ELISA con quimioluminiscencia	~0.00001–0.01 [†]
Inmunofluorescencia	1.0
Citometría de flujo	0.006–0.06

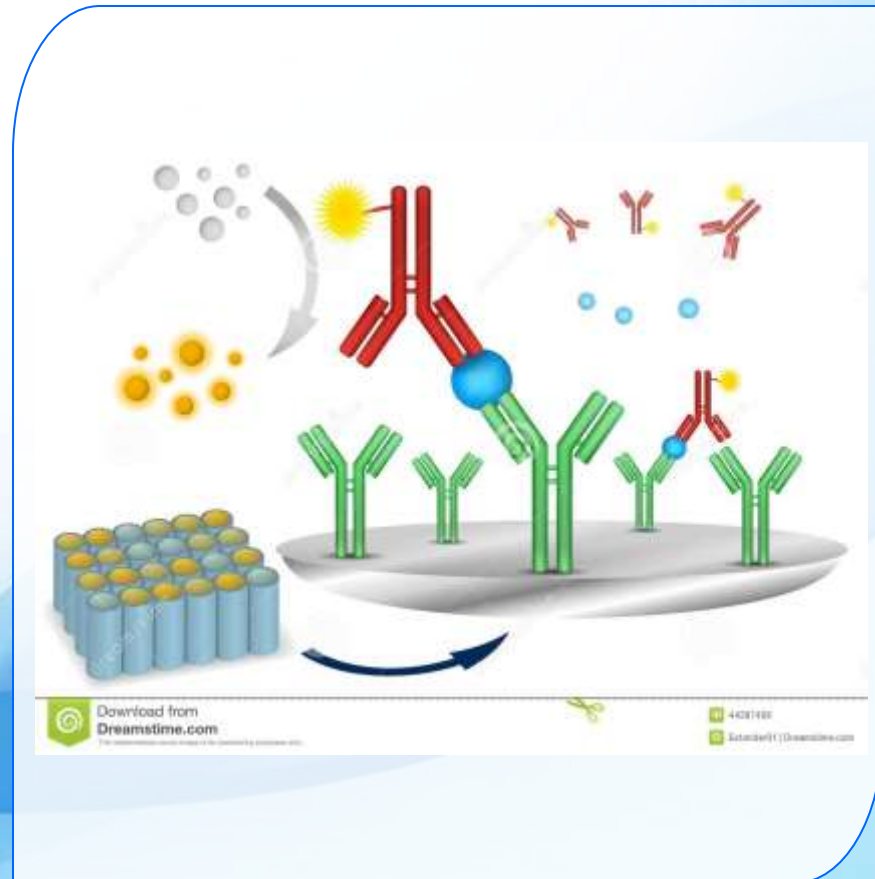
*La sensibilidad depende tanto de la afinidad del anticuerpo usado para el ensayo como de la densidad de epítopos y la distribución del antígeno.

[†]Obsérvese que la sensibilidad de las pruebas ELISA basadas en quimioluminiscencia puede equipararse a la de RIA.

FUENTE: Adaptado de N. R. Rose et al., eds., 1997, *Manual of Clinical Laboratory Immunology*; 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

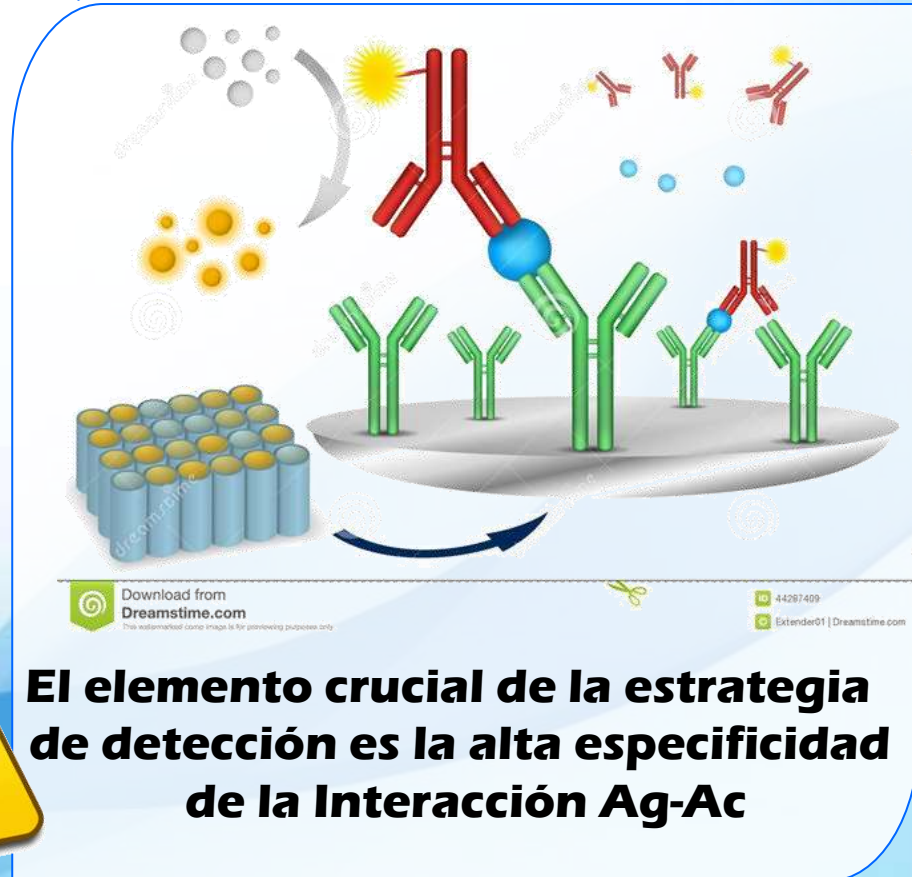
ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay):

La prueba de ELISA se basa en la formación de inmunocomplejos, (reacción antígeno-anticuerpo). Es una técnica en placas diseñada para detectar y/o cuantificar sustancias como proteínas, péptidos, anticuerpos, hormonas etc.



ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay):

Uno de los componentes de la reacción antígeno-anticuerpo es inmobilizado en una superficie sólida y luego acoplado al otro que esta ligado de forma covalente a una enzima. La detección se realiza activando el conjugado enzimático mediante la incubación con su sustrato para generar un producto medible.

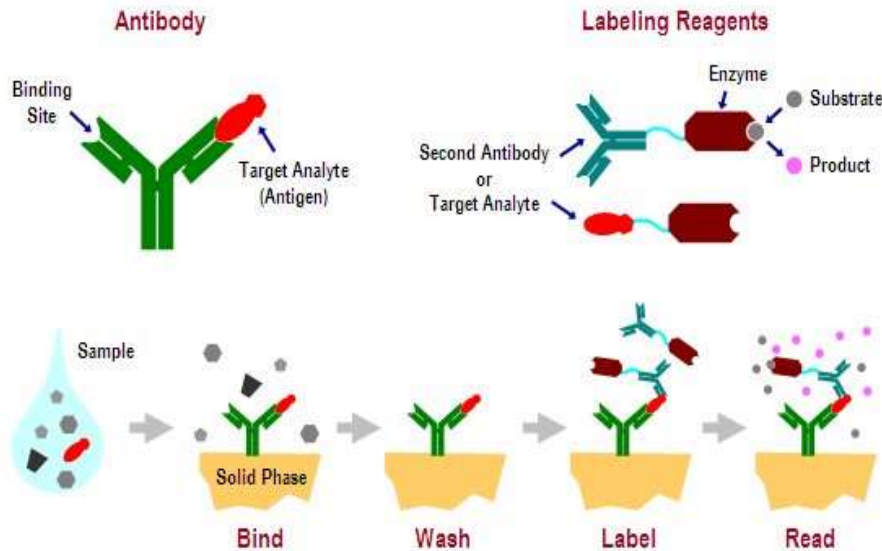


El elemento crucial de la estrategia de detección es la alta especificidad de la Interacción Ag-Ac

ELISA

Fases

ELISA



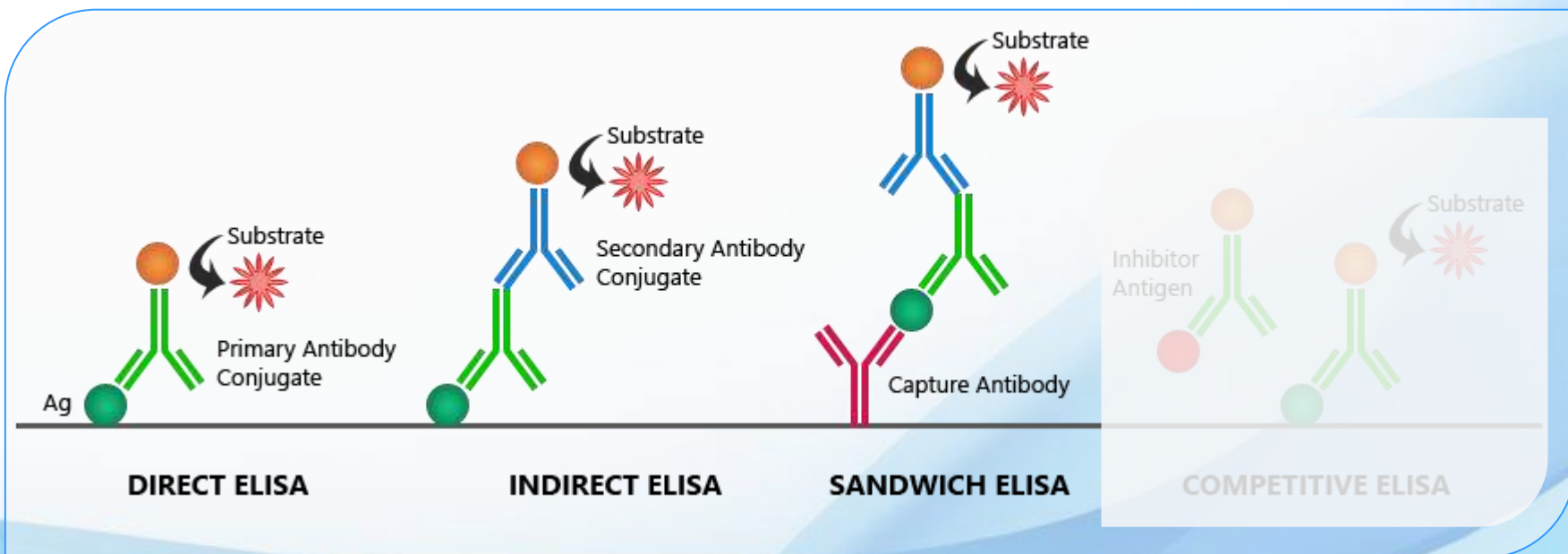
- ✓ **Conjugación del anticuerpo o antígeno a una enzima**
- ✓ **Unión del antígeno (o del anticuerpo) al soporte.**
- ✓ **Formación de los inmunocomplejos.**
- ✓ **Revelado de la reacción enzimática.**
- ✓ **Lectura (espectrofotómetro)**



- ✓ **Lavados entre cada paso**

Tipos de ELISA:

- **No competitivos:** La muestra se enfrenta con el Ag o Ac



Se detectan
antígenos



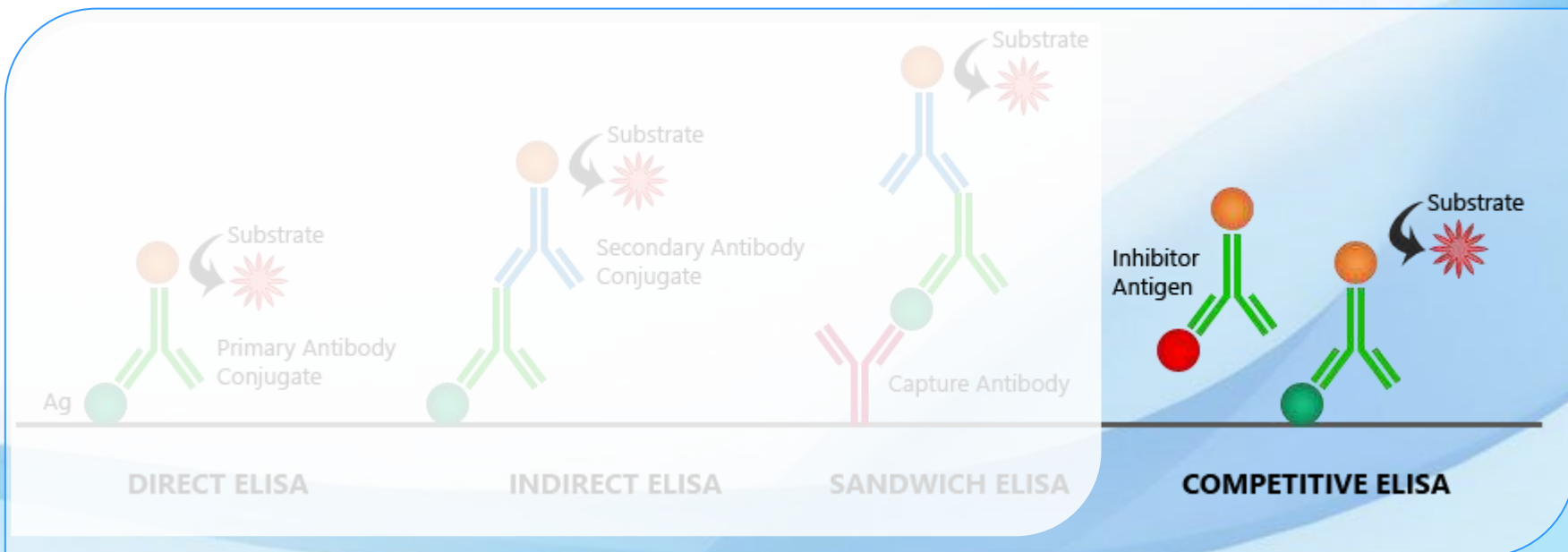
Se detectan
anticuerpos



Se detectan
antígenos usando
dos anticuerpos

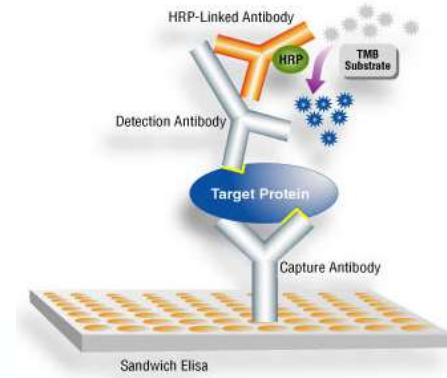
Tipos de ELISA:

- **Competitivos:** El anticuerpo o el antígeno de la muestra compiten por sus sitios de unión



Al igual que en los ELISA no competitivos pueden ser: directos, indirectos, sandwich

Utilidad



Detección de Ag y Ac:

- Bacterias
- Parásitos
- Hongos
- Virus

Detección de clases y sub-clases de Ig

Detección de complejos autoinmunes:

- Anti- DNA (Antígenos nucleares extractables: Sm - Ro - La - RNP)
- Anti-Histonas (H1, H2A, H2B, H3, H4)
- LES

Detección de Acs contra antígenos de tejido

Anti-tiroglobulina

Anti-microsomal

Anticuerpos Antifosfolípidos (Cardiolipina IgG-M)

Detección de Ags asociados a tumores:

Ag prostático

Ag ovario (Ca125)

ACE, alfafetoproteína

Detección de hormonas, metabolitos, fármacos, toxinas, citoquinas.....

ELISAs y Generaciones:

Ejemplo: Dx de infección por HIV

Generation	1st	2nd	3rd	4th
Antigen	Lysate		Recombinant & synthetic	
Sample	Lysate		Recombinant & synthetic	
Conjugate	Lysate		Recombinant & synthetic	
Signal	Lysate		Recombinant & synthetic	
Antigen	Lysate		Recombinant & synthetic	
Specificity	95–98%	>99%	>99.5%	99.5%
Sensitivity	99%	>99.5%	>99.5%	>99.8%
Window period	8–10 weeks	4–6 weeks	2–3 weeks	2 weeks
Immunoglobulin class detection	IgG	IgG	All	All
Approximate year of first release	1985	1987	1991	1997
Platforms	Plate assays Particle agglutination	Plate assays Automated generic platforms Particle agglutination Rapid assays	Plate assays Dedicated instruments Rapid assays	Plate assays Dedicated instruments Rapid assays in development

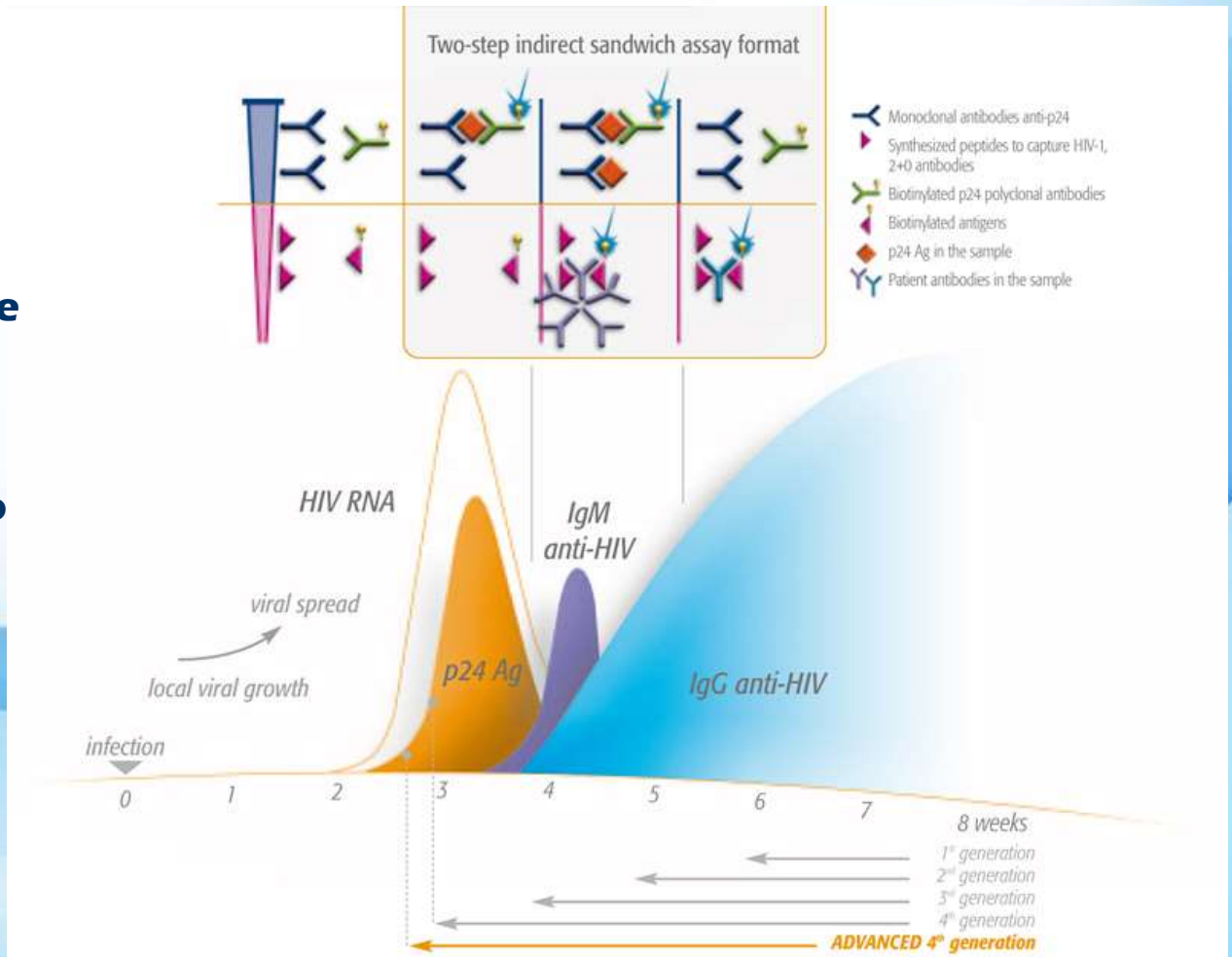
ELISA: Generaciones:

Ejemplo: Dx de infección por HIV



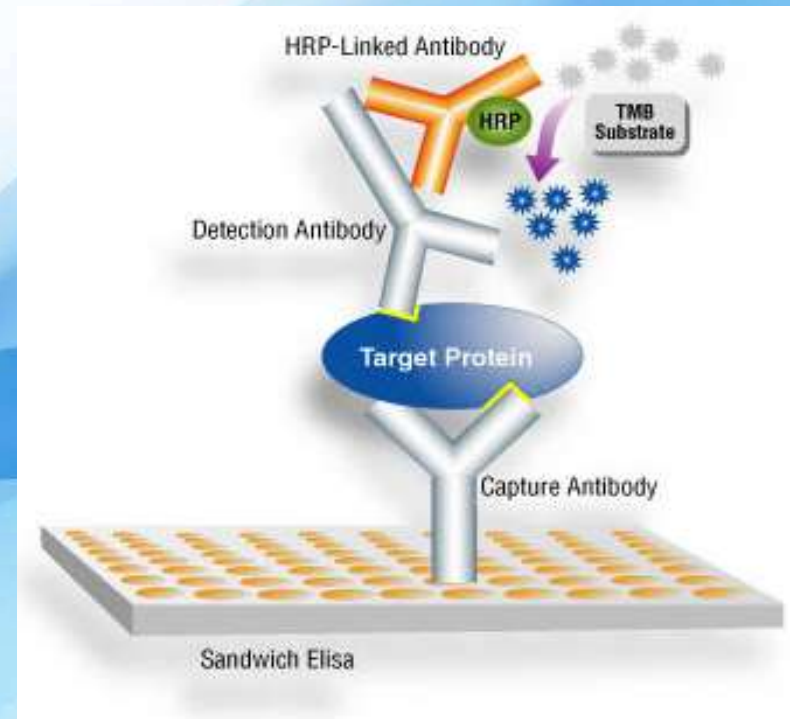
Ventaja del ELISA de 4ta generación:

✓ **Acorta el período de ventana**

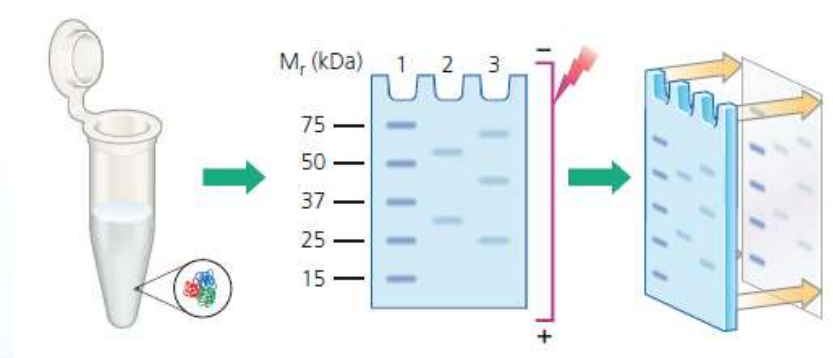
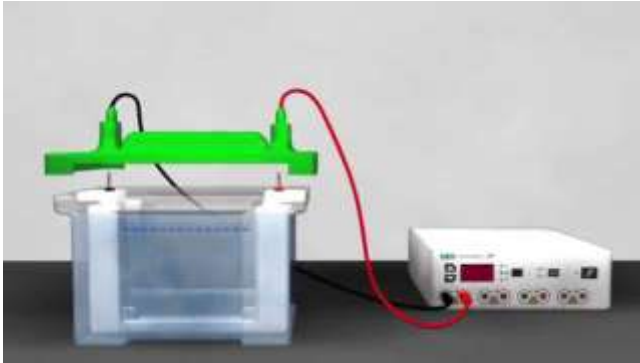


Ventajas del ELISA:

- **Muy sensible**
- **Gran número de muestras procesadas simultáneamente.**
- **Resultados rápidos**
- **Utilización de reactivos menos tóxicos**
- **Menor costo**
- **Cuantificación de sustancias diversas: hormonas, metabolitos, fármacos, toxinas, citoquinas...**

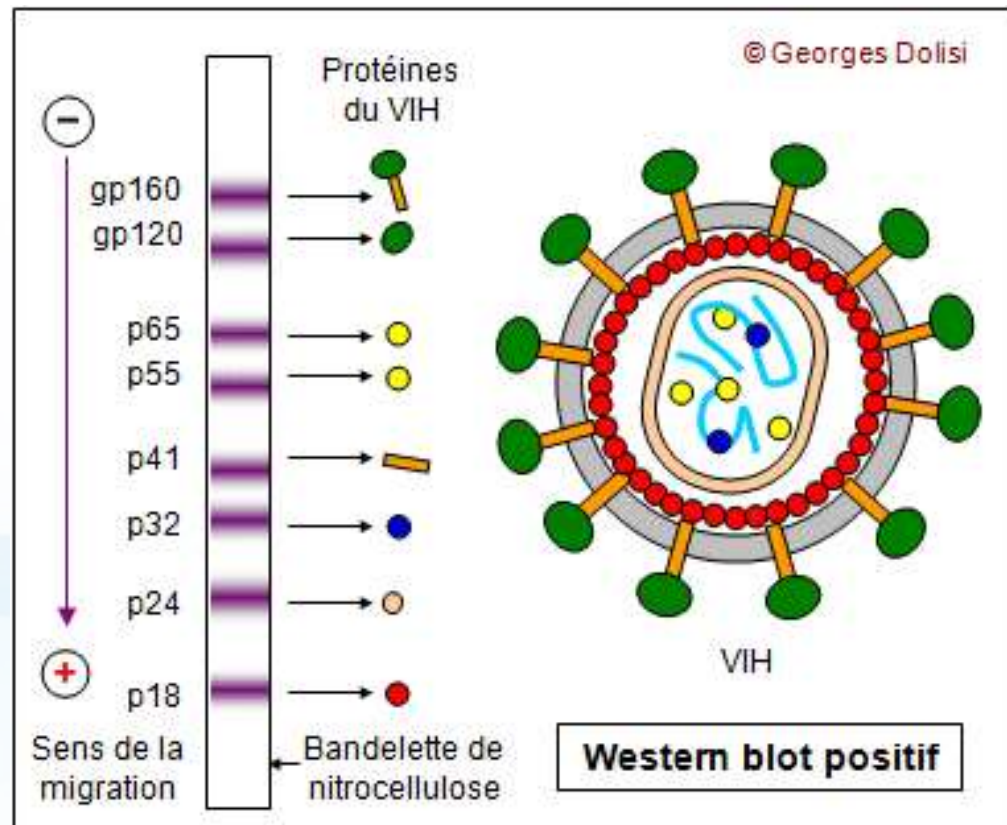


Electrophoresis/ Western Blotting



WESTERN BLOTTING

Técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada (una mezcla compleja de proteínas, como un extracto tisular).



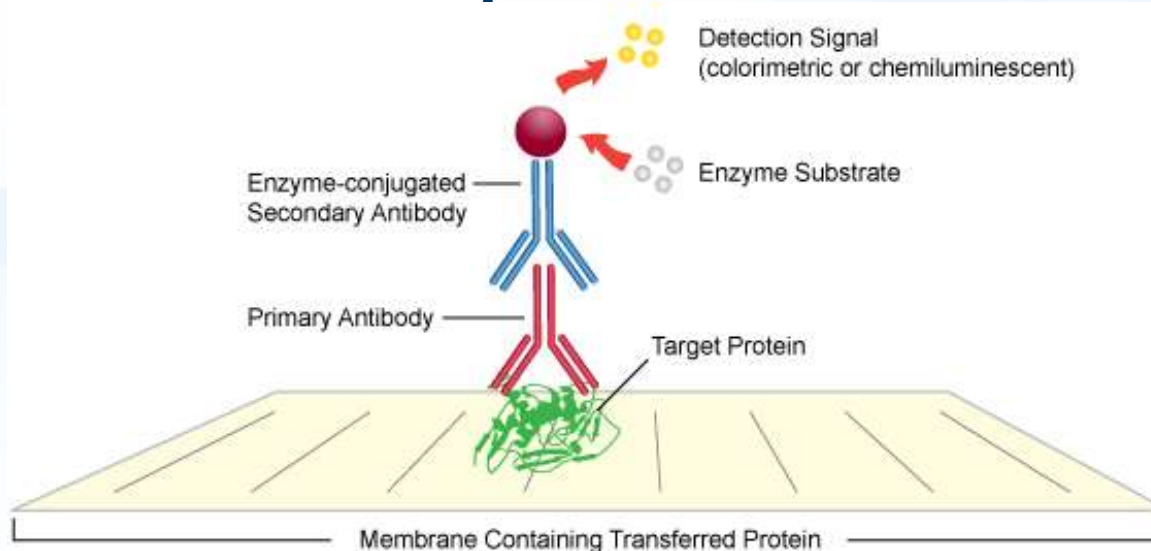
WESTERN BLOTTING

Pasos:

Electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc.

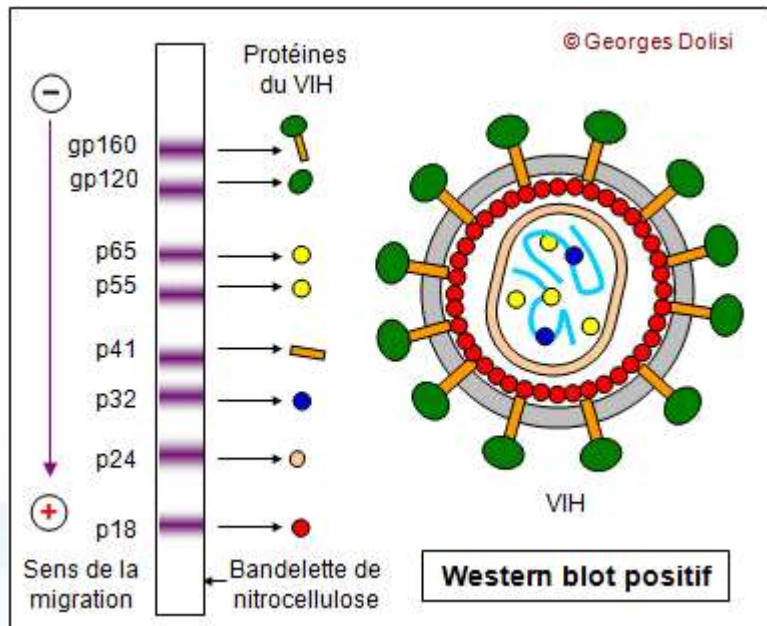
Transferencia a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella

Detección de la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática, fluorescencia, quimioluminiscencia, entre otros.



WESTERN BLOTTING

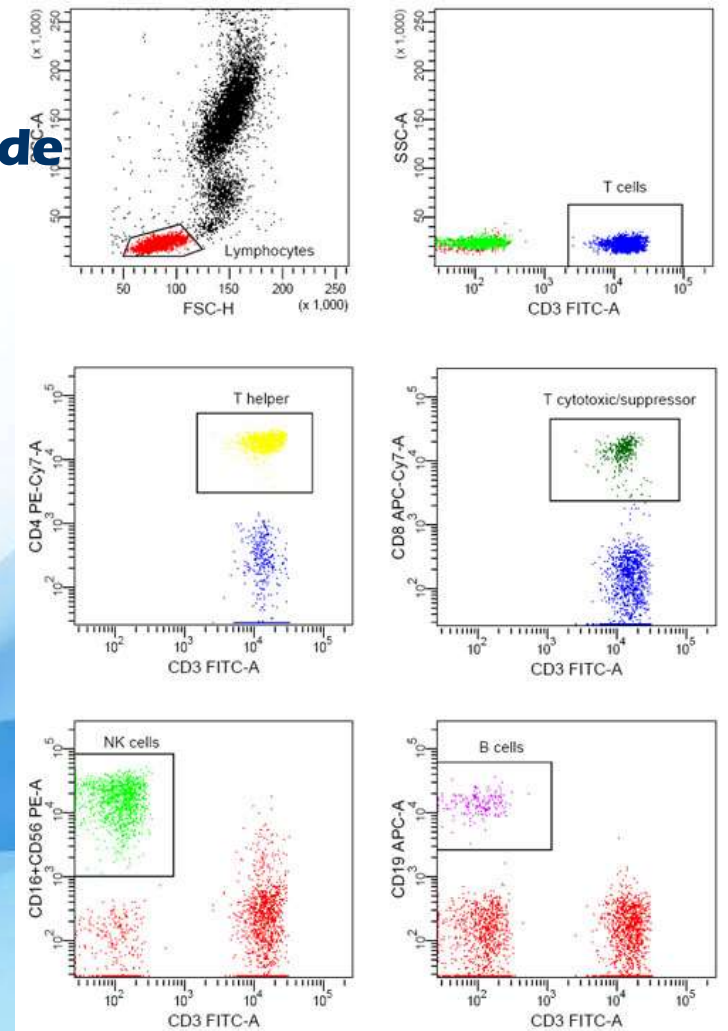
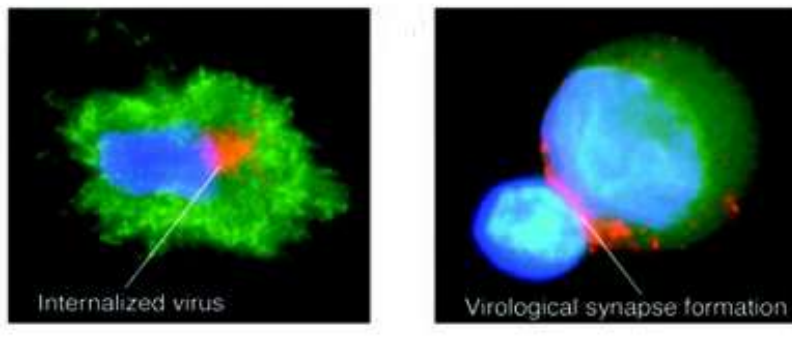
Diagnóstico de HIV: Prueba confirmatoria



Criterios mínimos de positividad del Western blot	
FDA	Existencia por lo menos de tres bandas: p24, p31 y gp41 u otra glucoproteína
ARC	Existencia de al menos 3 bandas una por cada uno de los 3 genes estructurales
CDC	Al menos dos bandas: p24, gp41 y gp160/120
CRSS	Al menos una banda del core (gag/pol) y otra de envoltura (env)
OMS	Al menos dos bandas de envoltura

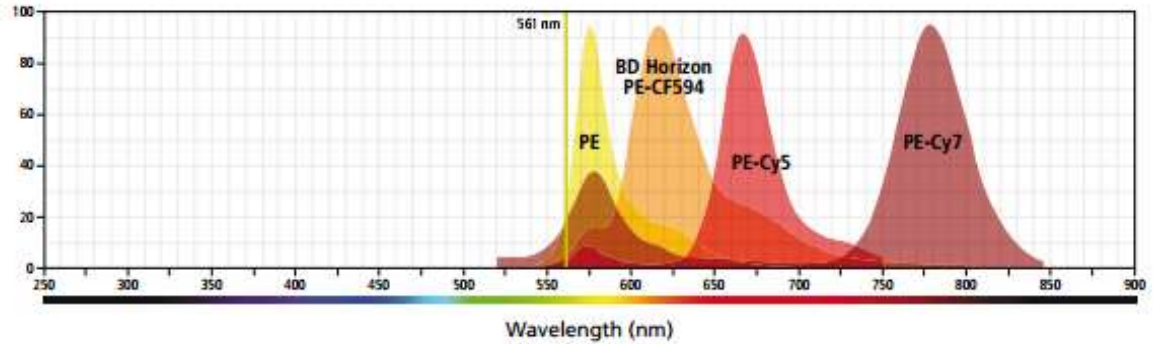
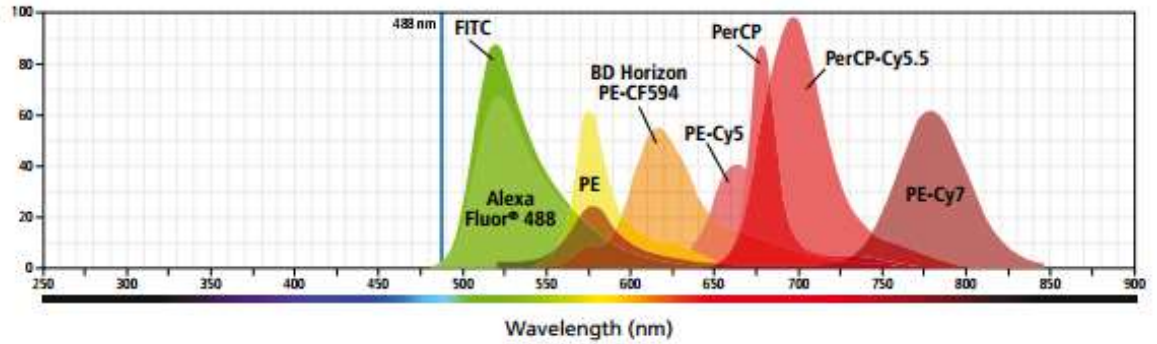
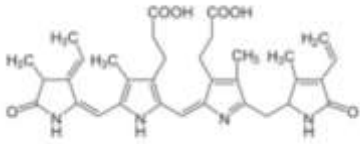
Técnicas basadas en fluorescencia

- Citometría de flujo
- Inmunofluorescencia-microscopia de fluorescencia
- Microscopia confocal



Fluorocromos

Ficoeritrina



Es un **grupo funcional** de la molécula que absorberá energía de una longitud de onda específica y la volverá a emitir en otra determinada de mayor longitud de onda (es decir, con menor energía)

Pruebas basadas en fluorescencia

Muestras

Tejidos

Sangre periférica

Suero

LCR

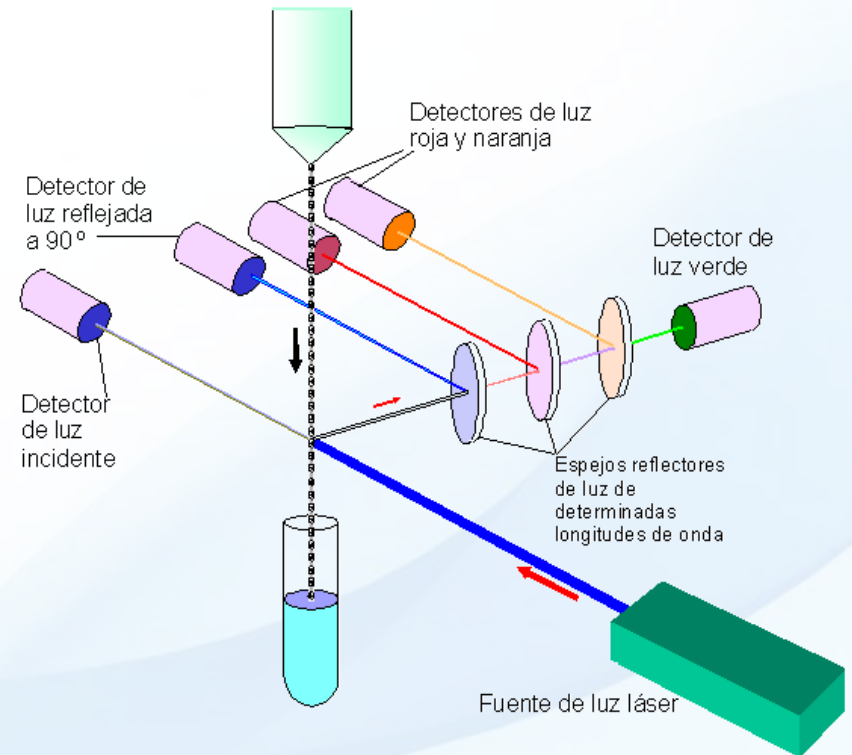
Requisito indispensable para la citometría de flujo:

✓ **La muestra debe estar en suspensión**



Citometría de flujo

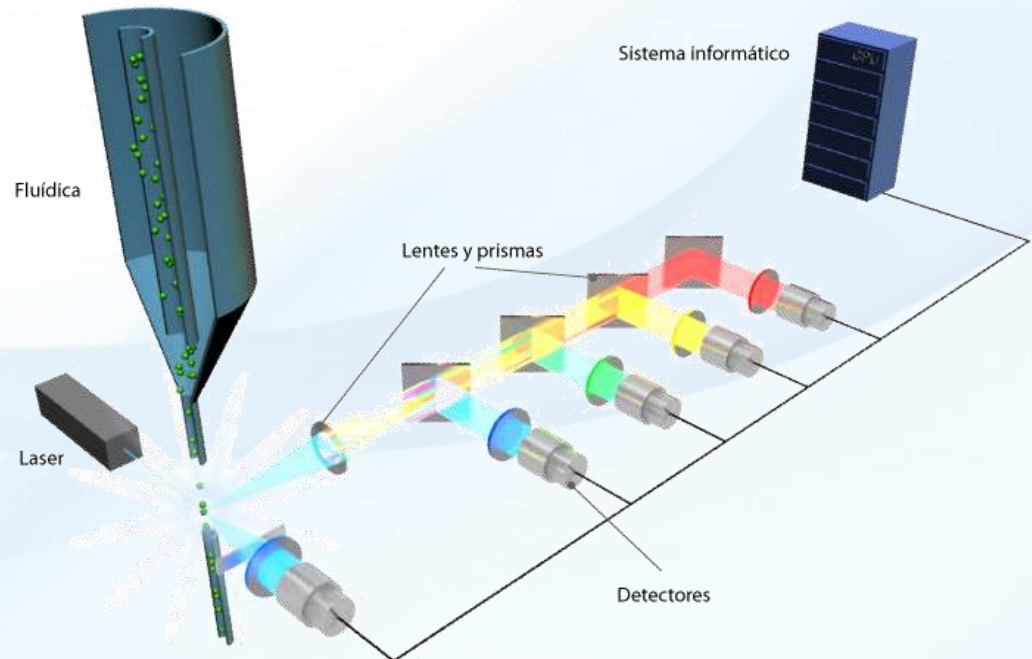
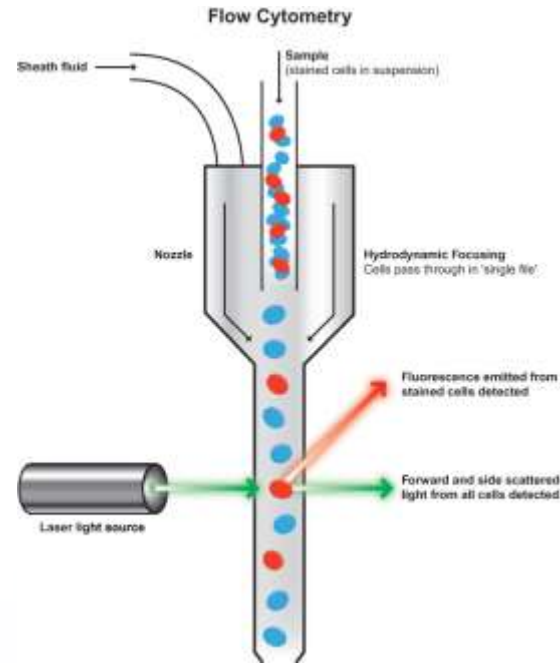
La Citometría de Flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula.



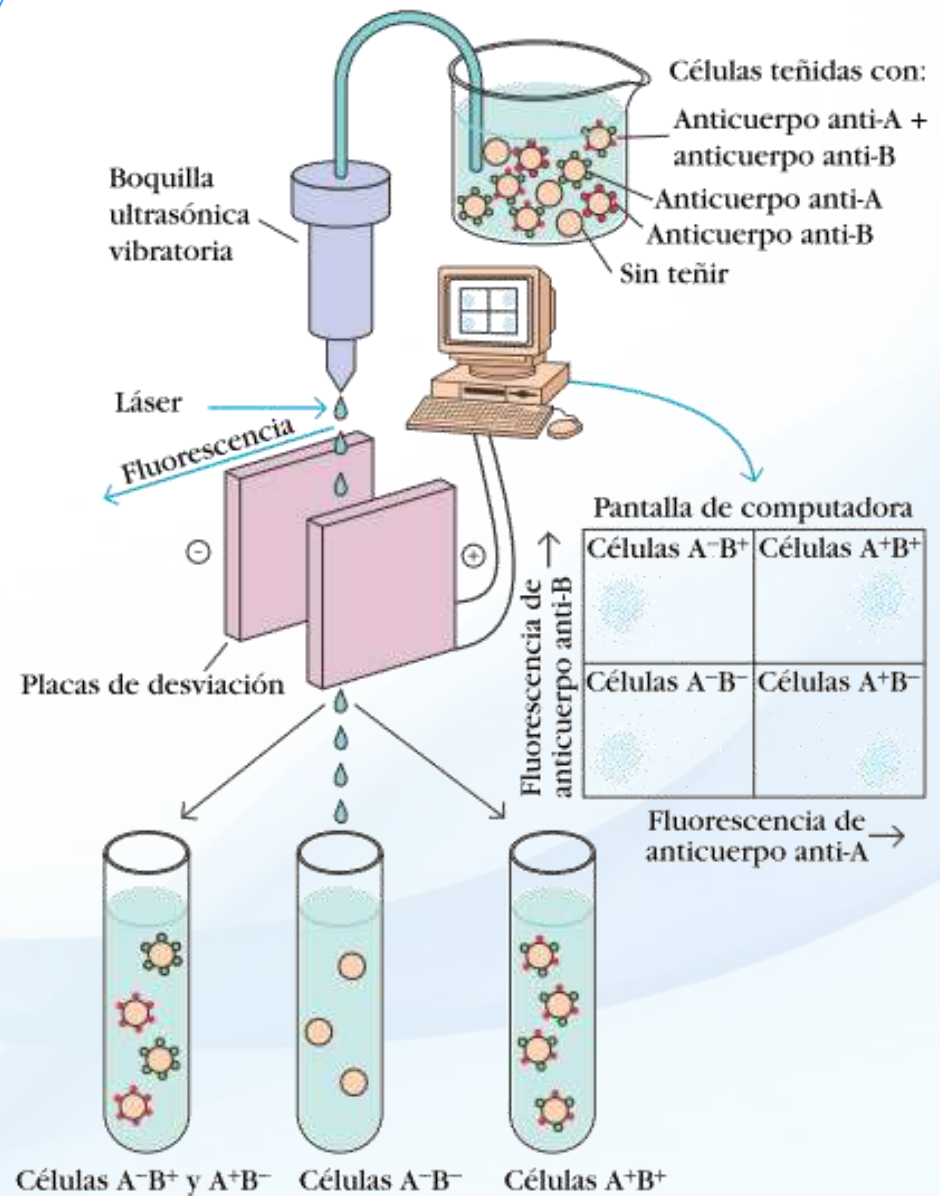
Citometría de flujo

**El citómetro de flujo
esta formado por tres
sistemas complejos:**

- ✓ **Fluídico
(hidrodinámico)**
- ✓ **Óptico**
- ✓ **Electrónico**



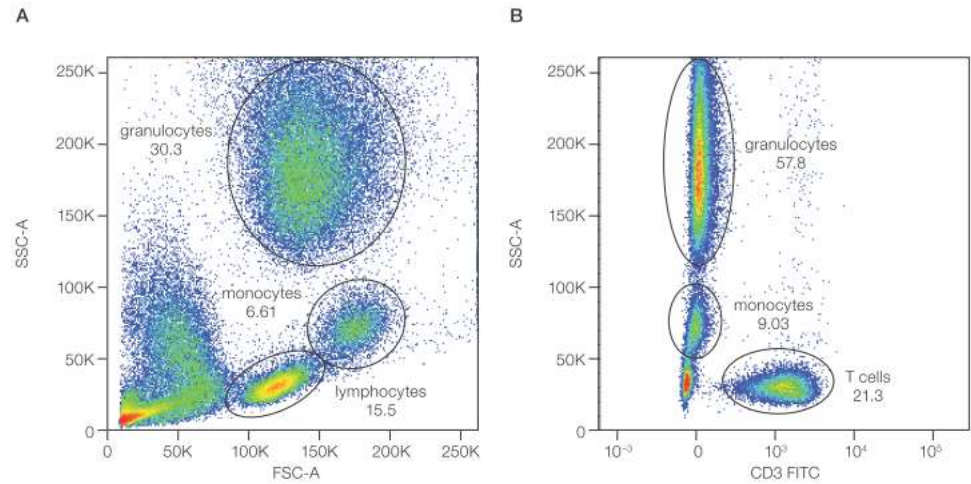
Funcionamiento:



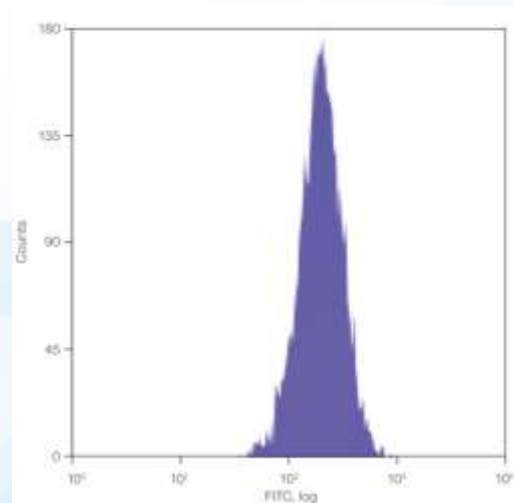
Citometría de flujo

Análisis de datos

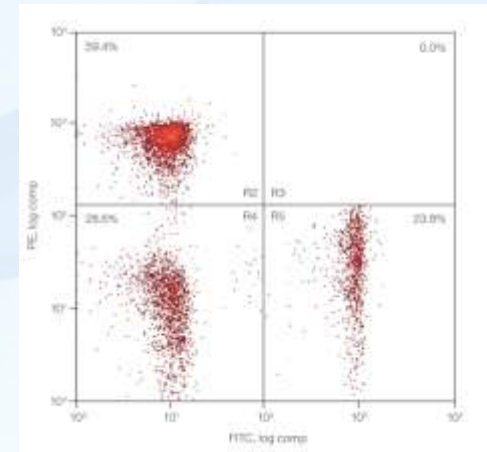
Gates y regiones



Histogramas



Gráficos de punto/ Dot Plot



Utilidad:

Desordenes

hematológicos:

- ✓ **Tipificación de las leucemias y los linfomas que permite alcanzar un diagnóstico preciso, permitiendo un tratamiento y seguimiento más adecuado y eficaz.**

Table 1. Clinical applications of flow cytometric immunophenotyping in the diagnosis and management of patients with clonal haematological disorders.*

<i>Type of medical indication</i>	<i>Disease category</i>
Diagnostic screening	B- and T-cell chronic lymphoproliferative disorders (CLPD) Myelodysplastic syndromes (MDS) Plasma cell dyscrasias (PCD) Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria Systemic mastocytosis
Immunophenotypic classification	Lineage commitment and maturation stage of blast cells in acute leukaemias Immunologic classification of acute lymphoblastic leukaemias Identification of AML-M0 and AML-M7 Identification of biphenotypic leukaemias New subtypes of acute non lymphoblastic leukaemias B, T and NK-cell chronic lymphoproliferative disorders Plasma cell dyscrasias
Screening for genetic abnormalities	Acute myeloblastic leukaemia Acute lymphoblastic leukaemias (childhood and adult) B-cell chronic lymphoproliferative disorders
Others	Prognostic stratification (e.g. CLPD, MDS) Staging and evaluation of disease extension (e.g. CLPD) Minimal residual disease detection (e.g.: AL, CLPD, PCD) Prediction/monitoring of response to therapy (e.g.: CLPD, AML)

* For further information please see references 2, 3 and 4.

Utilidad:

Sub-poblaciones

linfocitarias:

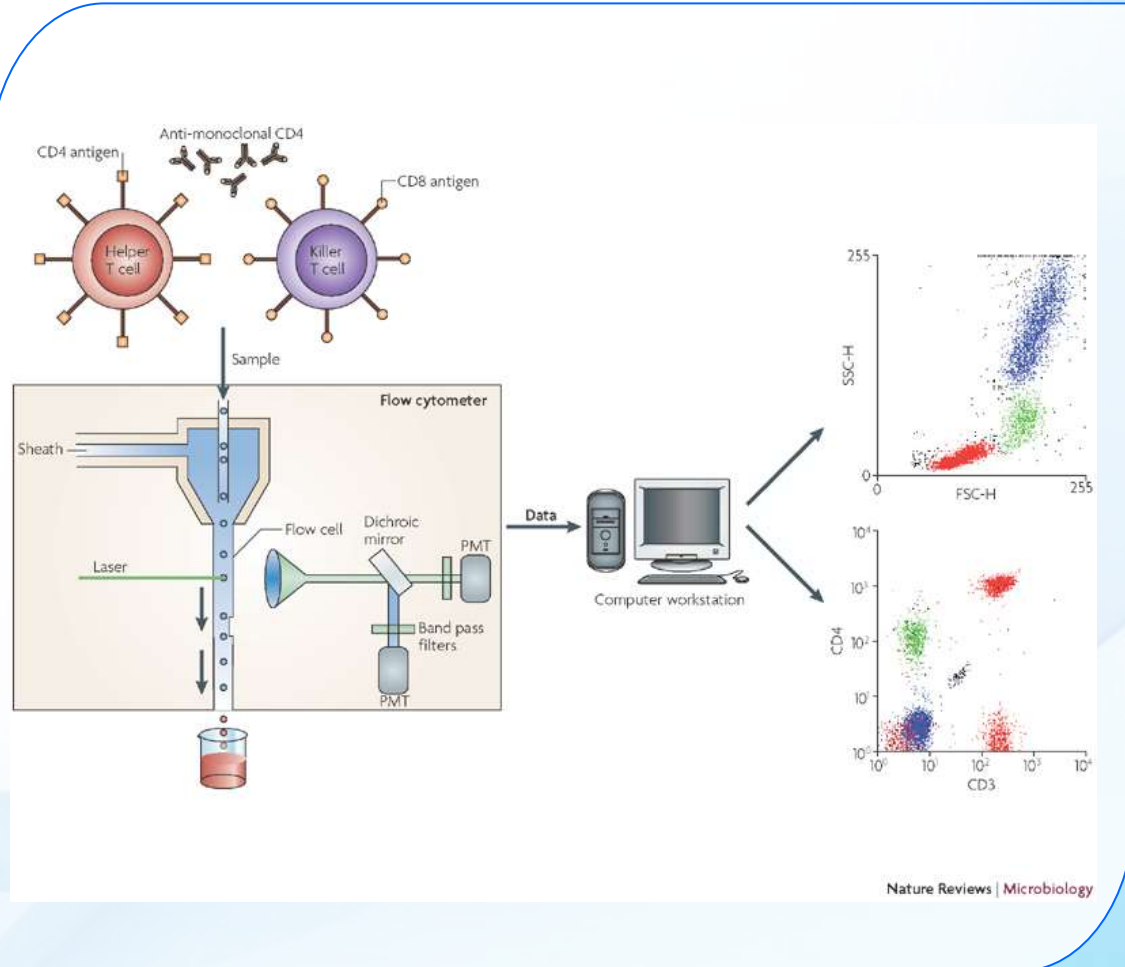
✓ **Estudio de inmunodeficiencias primarias y secundarias**

Marcadores intracelulares

Análisis del contenido de

ADN

Otras



Citometría de flujo

Ventajas:

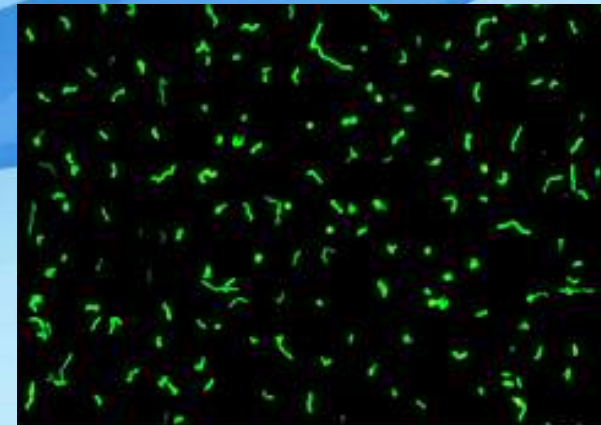
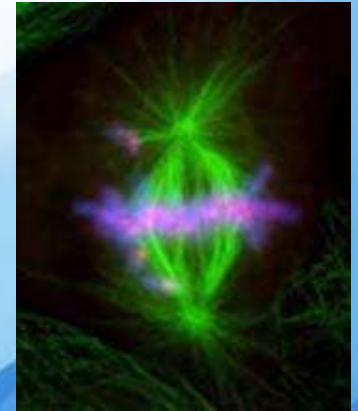
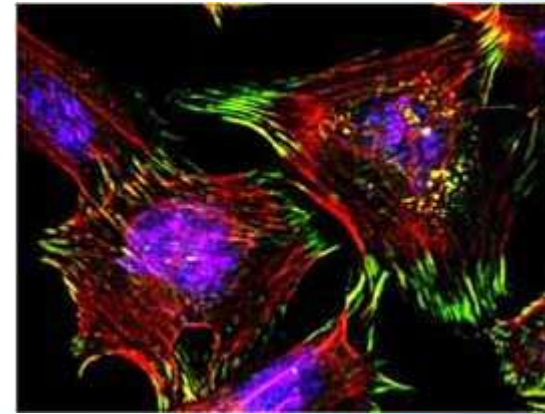
- Análisis de un número estadísticamente significativo de células**
- Múltiples marcajes de una sola célula.**
- Análisis de alto número de partículas en corto tiempo (5.000 eventos /seg.).**
- Alta sensibilidad y objetividad.**
- Medidas separadas de cada célula (no sólo el promedio).**
- Medidas cuantitativas : discriminación de las células según la cantidad de marcador.**
- Múltiples parámetros : define subpoblaciones complejas.**

Desventajas:

- Poca información morfológica de la célula**
- No proporciona información de la localización celular en un tejido**
- Costos de la tecnología**
- Incapacidad de visualizar las células que se analizan.**

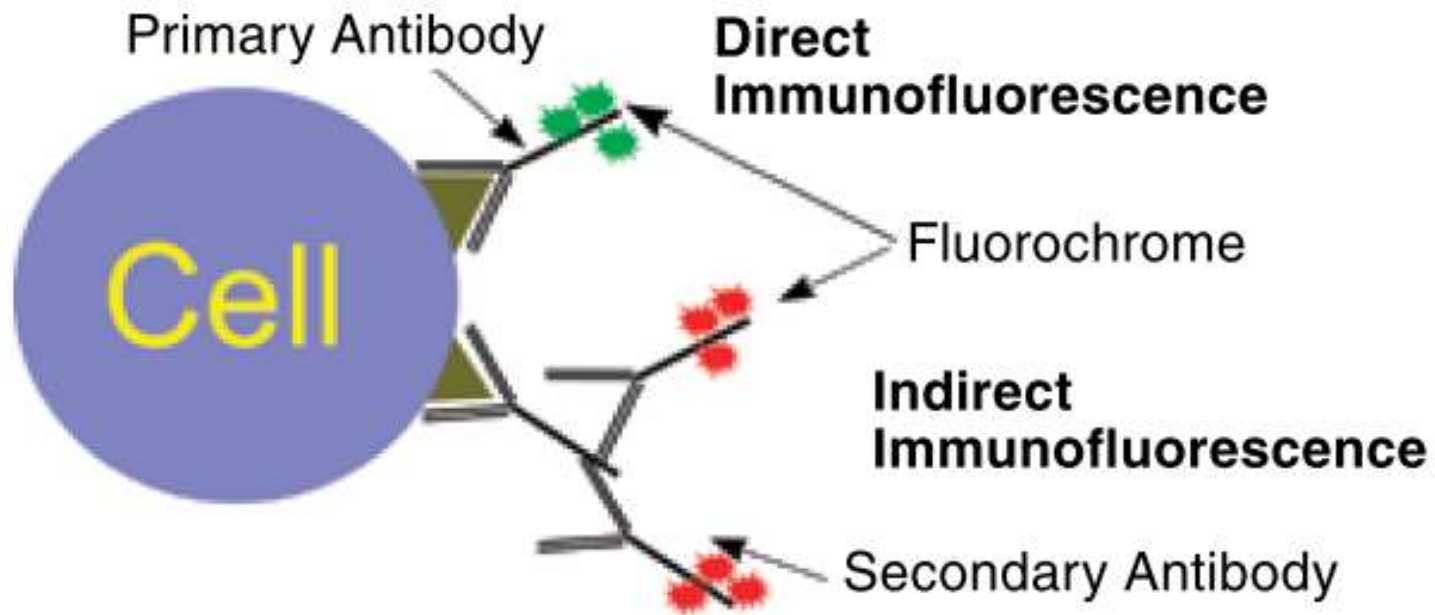
Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcado que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula



Inmunofluorescencia

Tipos



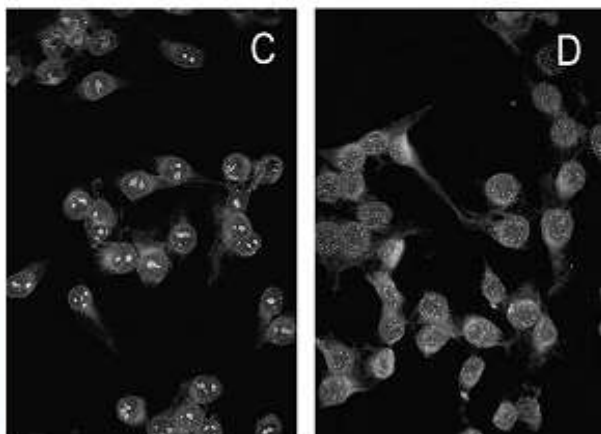
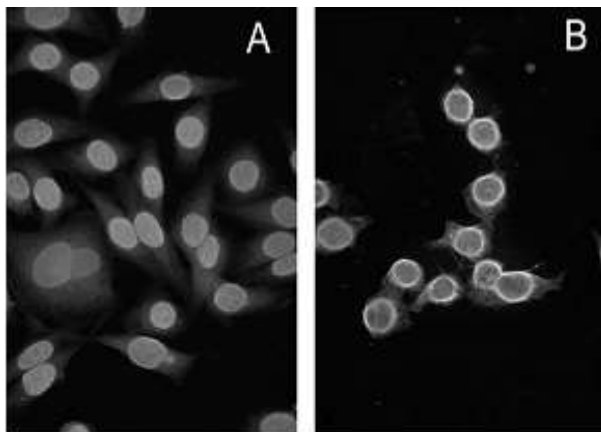
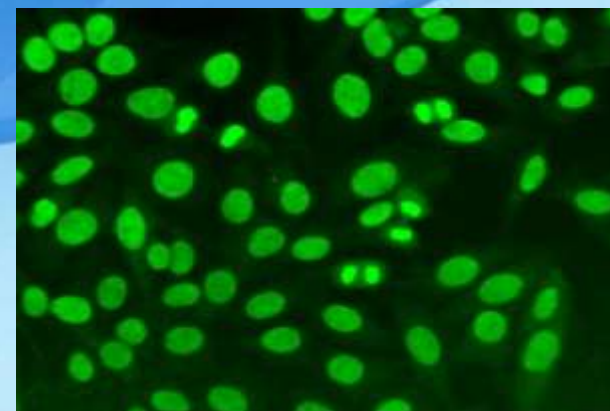


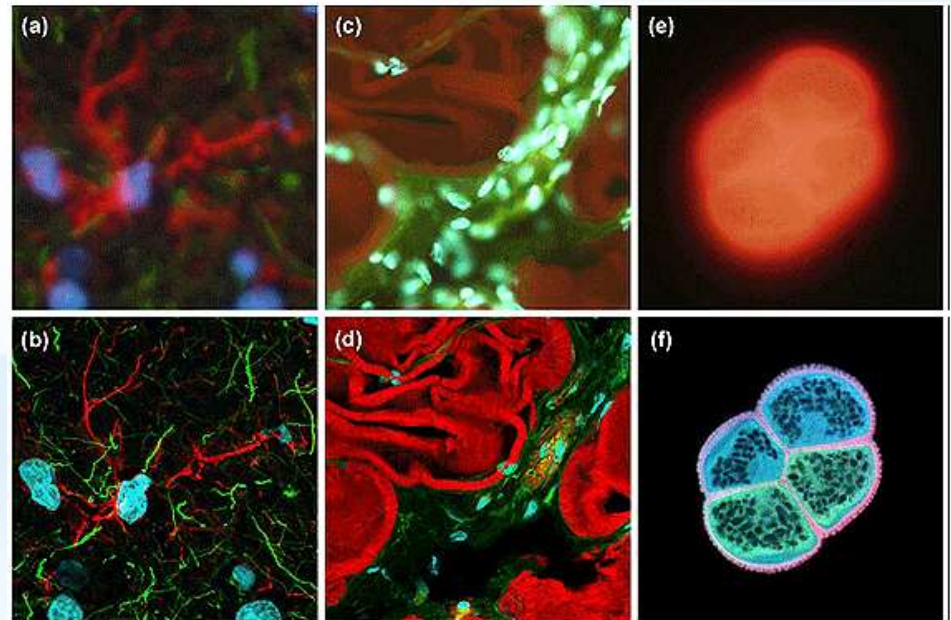
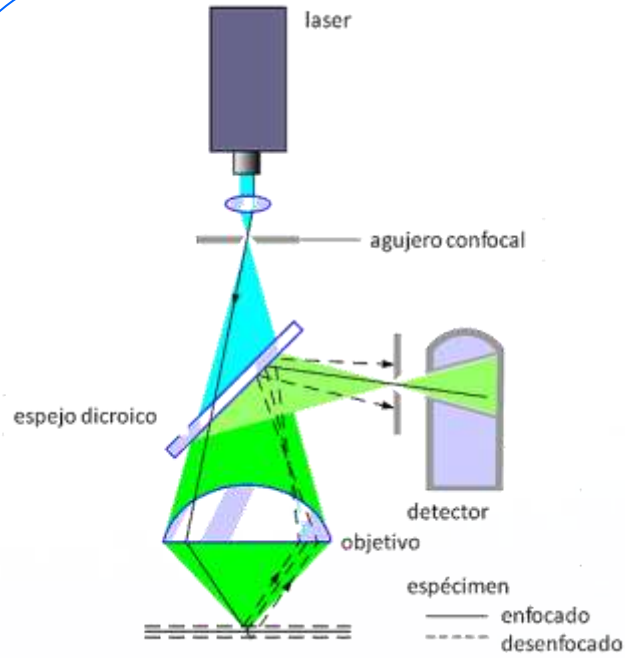
Figura 12.3: Patrones de inmunofluorescencia en la determinación de anticuerpos antinucleares. (A) patrón difuso; (B) patrón periférico; (C) patrón nucleolar; (D) patrón moteado.

Inmunofluorescencia

- ✓ **Anticuerpos Antinucleares (IFI Hep-2)**
- ✓ **Anticuerpos Anti DNA**
- ✓ **Anticuerpos Antimitocondria**
- ✓ **Anticuerpos Antimúsculo Liso**
- ✓ **Anticuerpos contra Polimorfonuclear Neutrófilo (ANCA)**
- ✓ **Anti-FTA**



Microscopía confocal

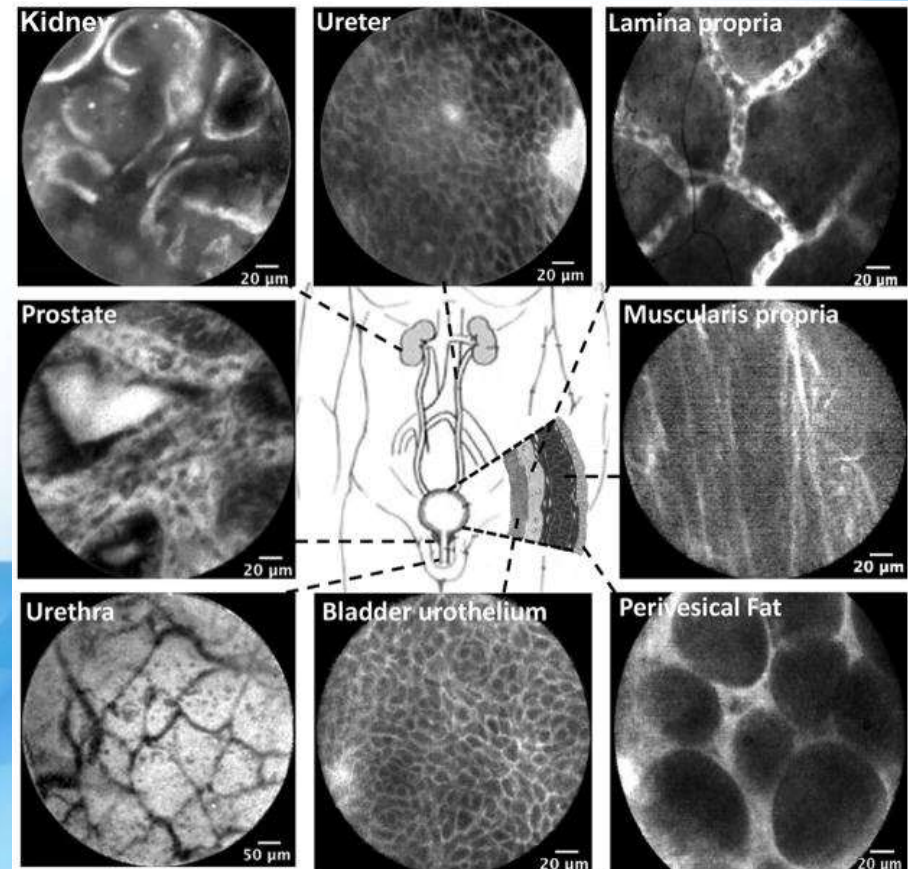
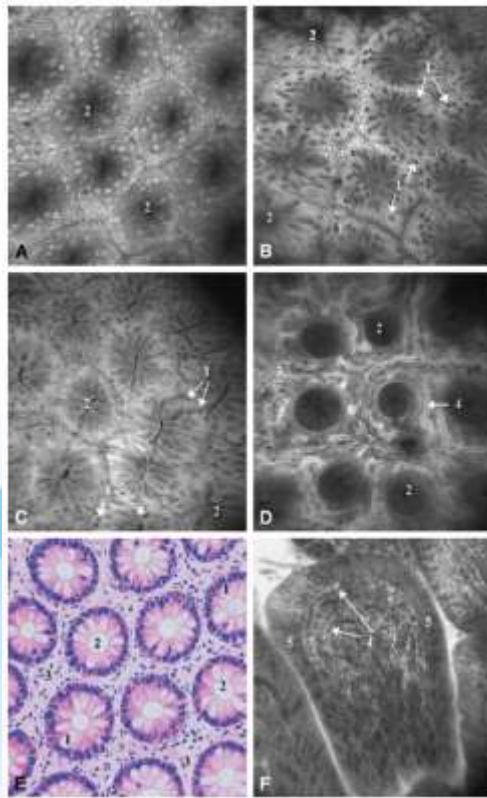


Microscopía confocal

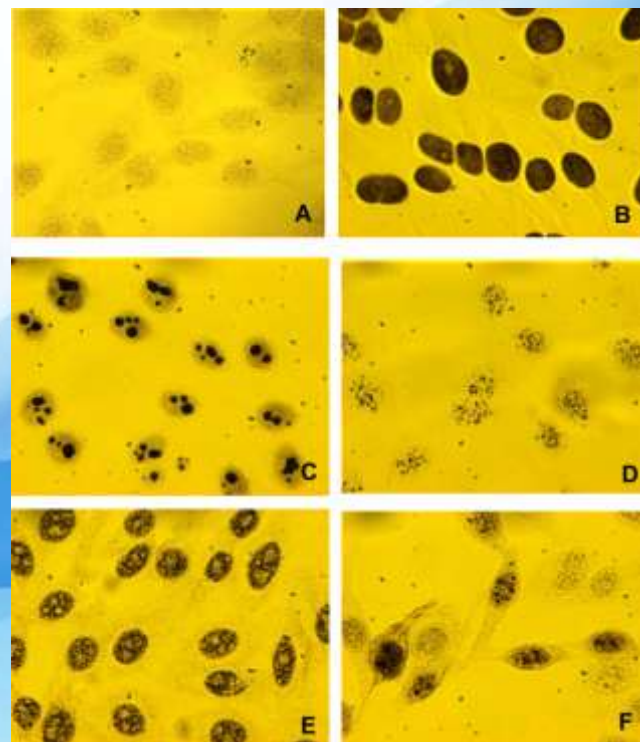
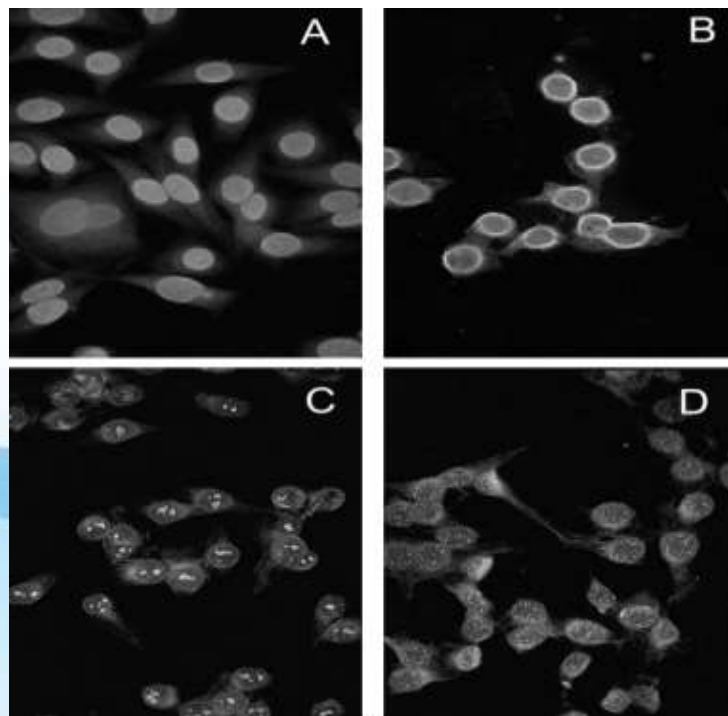
Aplicaciones!!!

Estudio de diversos órganos y tejidos:

- ✓ Tracto gastrointestinal
- ✓ Tracto genito-urinario



Inmunohistoquímica



Inmunohistoquímica

Algunos usos

TABLE 1: Immunohistochemical studies useful in the differential diagnosis of carcinoma vs another neoplasm

Tumor type	Immunoperoxidase stains			
	Pan-keratin	CD45 and other markers	S-100 protein, HMB-45	Vimentin
Carcinoma	+	-	-	-/+
Malignant lymphoma	-	+	-	-/+
Malignant melanoma	-	-	+	+
Sarcoma	-	-	-	+

Inmunohistoquímica

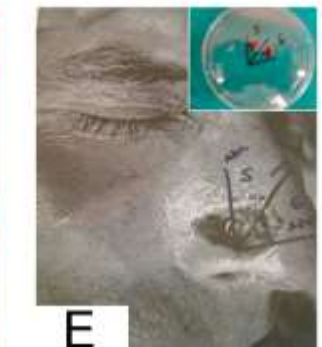
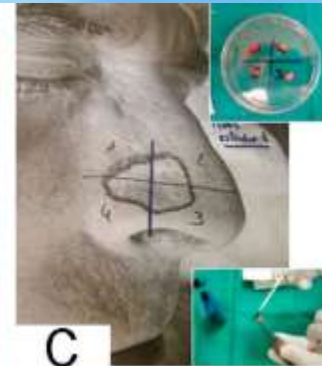
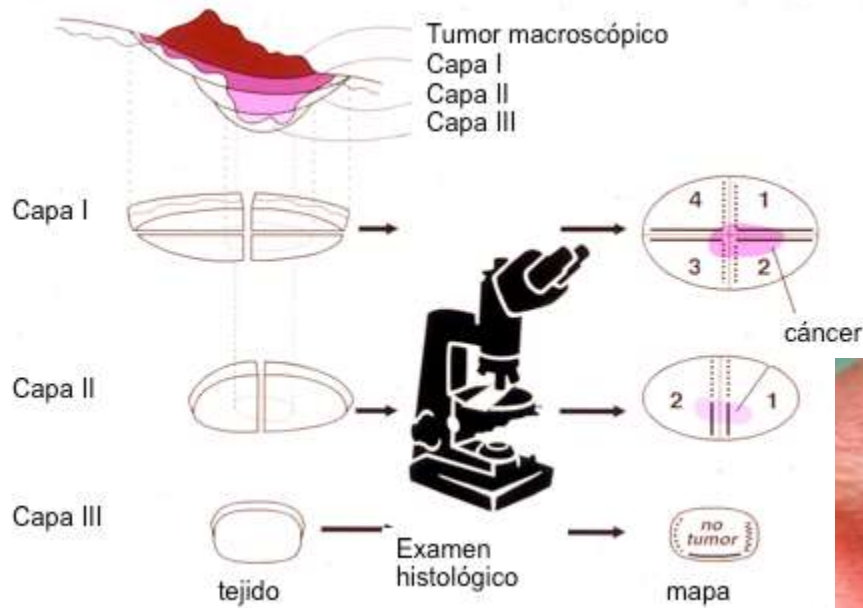
Algunos usos

Histology	Positive Immunohistochemical Markers
Squamous cell carcinoma	Cytokeratin (CK) cocktail, e.g., AE1/AE3 CK5/6 , CK7 rare
Adenocarcinoma	Cytokeratin cocktail, e.g., AE1/AE3 CK7 , TTF-1 Neuroendocrine markers rare, e.g., CD56, NSE
Large cell carcinoma	Cytokeratin , TTF-1 rare Neuroendocrine markers rare (e.g., CD56, NSE)
Large cell neuroendocrine carcinoma	Cytokeratin cocktail, e.g., AE1/AE3 TTF-1 , CD56 , Chromogranin Synaptophysin
Small cell carcinoma	Cytokeratin cocktail (tends to be patchy) TTF-1 , CD56 , Chromogranin Synaptophysin

Inmunohistoquímica

Algunos usos

Cirugía de Mohs



Inmunohistoquímica

Aplicaciones!!!

CIRUGÍA DE MOHS

✓ Es una técnica que **preserva** al máximo el **tejido sano**.



Generalmente se realiza mediante **intervención ambulatoria** con anestesia local.



99% El **índice de curación** en carcinomas primarios es del **99%**.



Paciente diagnosticado por biopsia o D.I.C. de un carcinoma.

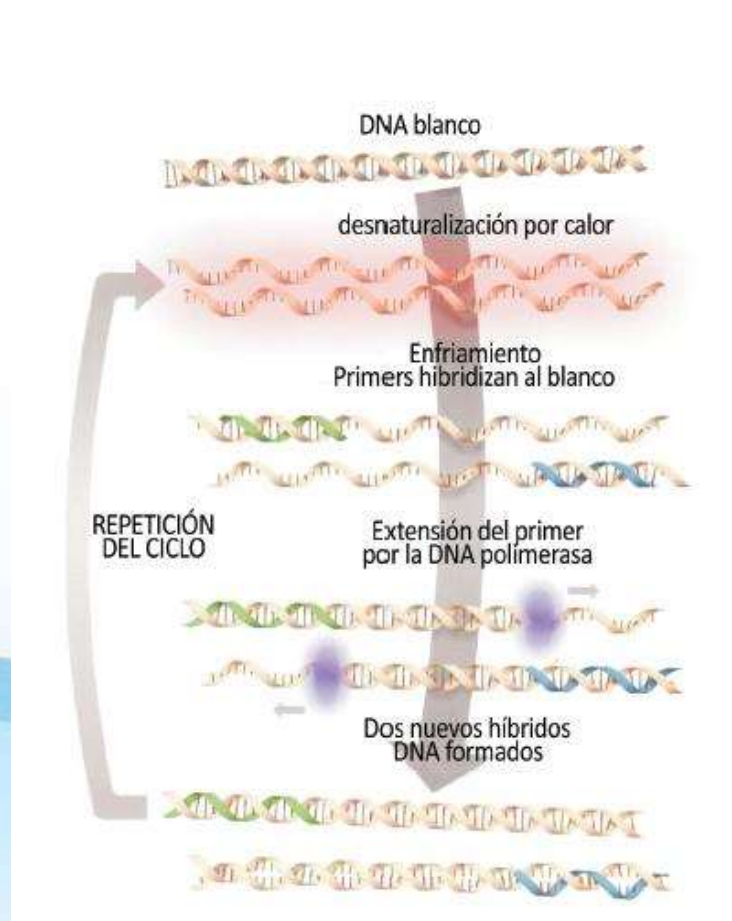


En la mayoría de casos iniciamos la **reconstrucción seguido de la cirugía**.

TASAS DE RECURRENCIA COMPARATIVA

Tipo de carcinoma	Tasa de recurrencia a 5 años	
	Cirugía de Mohs	Cirugía convencional
Carcinoma basocelular primario	1- 1.4%	10.1%
Carcinoma basocelular recurrente	4-5.6%	17.4%
Carcinoma espinocelular primario	1.8-2.6%	5.7-18.7%
Carcinoma espinocelular recurrente	3.4-5.9%	23.3%

PCR (Polymerase Chain Reaction)



Desarrollada en 1986 por Kary Mullis
Obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una cantidad muy pequeña

Amplificar un fragmento de ADN o ARN (RT-PCR)

Identificación de:

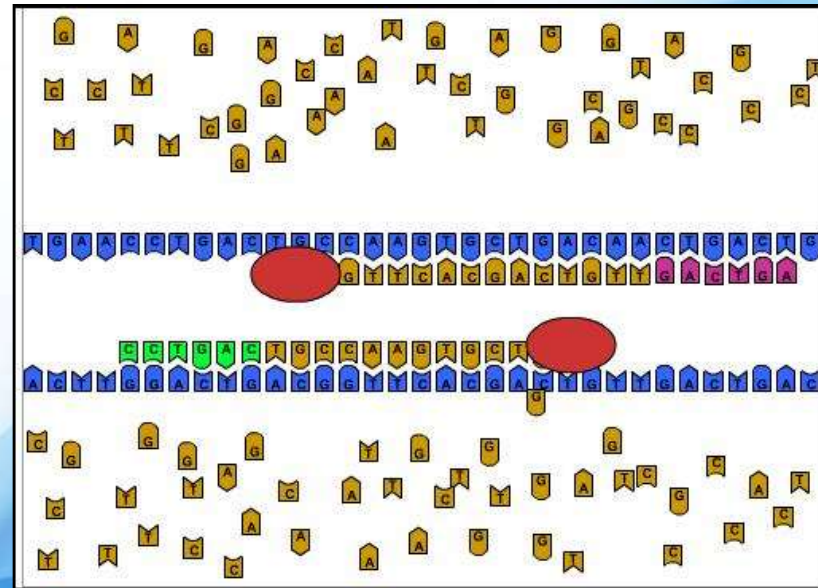
- ✓ **Microorganismos**
- ✓ **Personas (cadáveres)**

Investigación

PCR

¿Qué se necesita?

- Los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfatos (dNTP).
- Dos cebadores o iniciadores (*primers*), oligonucleótidos, cada uno es complementario a una de las dos hebras del ADN.
- Iones: cloruro de magnesio ($MgCl_2$), manganeso (Mn^{2+}), potasio.
- Una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Taq polimerasa)
- ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.
- Termociclador

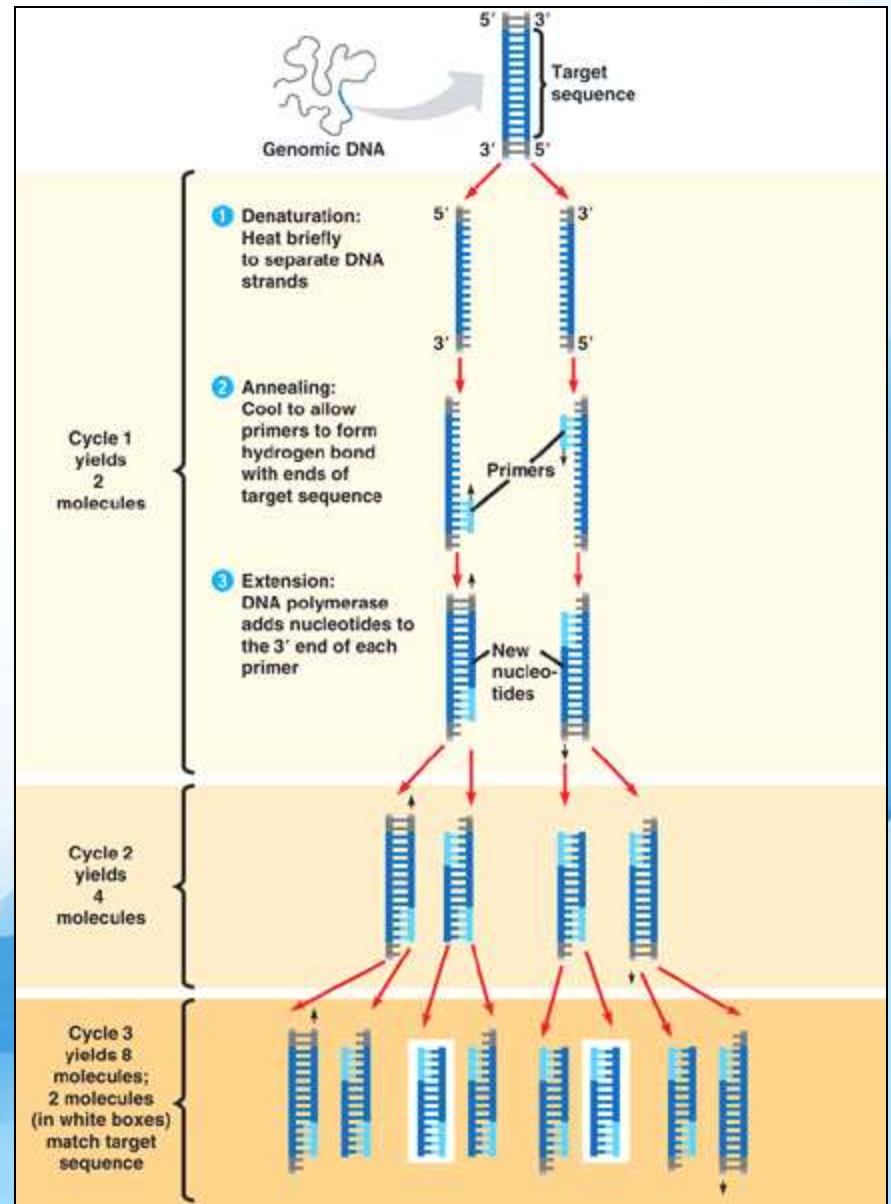


Pasos de la PCR

❖ El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos

❖ Cada ciclo consta de 3 pasos:

- Desnaturalización
- Alineación
- Extensión



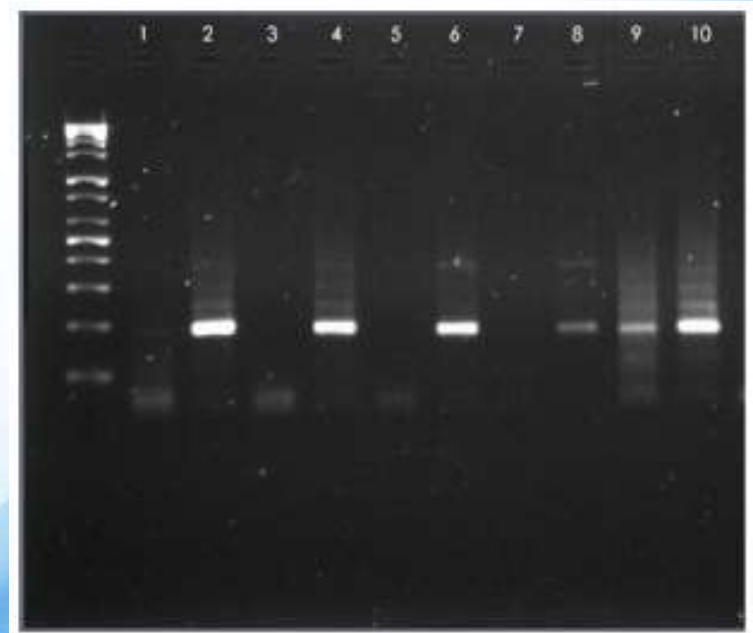
PCR

❖ Visualización de la reacción

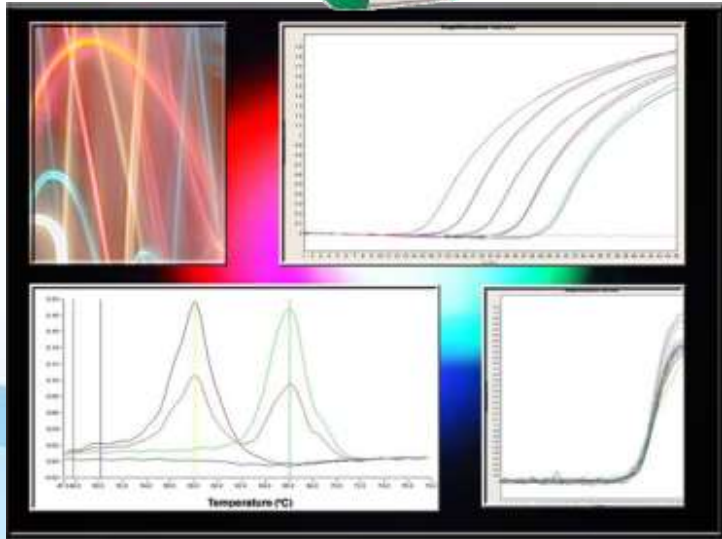
- Electroforesis en geles de agarosa

❖ Tipos de PCR:

- PCR anidada
- PCR in situ
- PCR múltiplex
- PCR con transcripción inversa (RT-PCR)
- PCR en tiempo real o cuantitativo (qPCR)



PCR en tiempo Real



- ➡ **La amplificación y detección se producen de manera simultánea**
- ➡ **La detección por fluorescencia permite medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento.**
- ➡ **Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación.**

PCR en tiempo Real

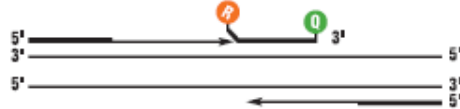
Marcadores fluorescentes

TAQMAN® PROBE-BASED ASSAY CHEMISTRY

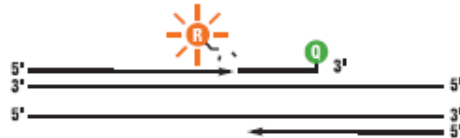
1. **Polymerization:** A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan® probe, respectively.



2. **Strand displacement:** When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. **Cleavage:** During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. **Polymerization completed:** Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.



SYBR® GREEN I DYE ASSAY CHEMISTRY

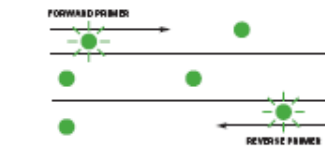
1. **Reaction setup:** The SYBR® Green I Dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



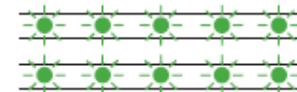
2. **Denaturation:** When the DNA is denatured, the SYBR® Green I Dye is released and the fluorescence is drastically reduced.

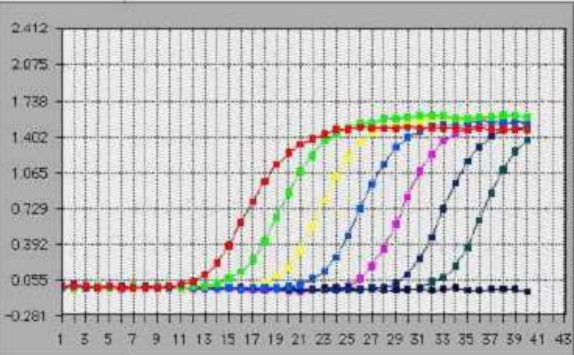


3. **Polymerization:** During extension, primers anneal and PCR product is generated.



4. **Polymerization completed:** When polymerization is complete, SYBR® Green I Dye binds to the double-stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected by the 7900HT system.

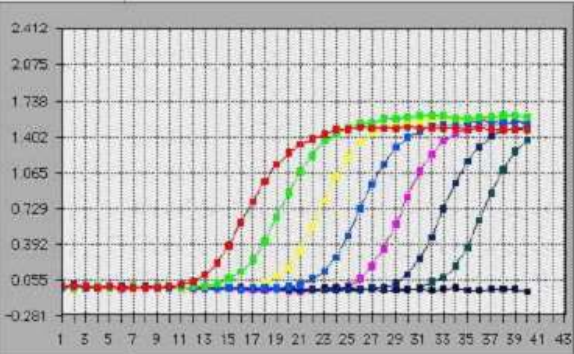




PCR en tiempo real

Utilidad

- ❖ **Identificación de microorganismos**
- ❖ **Cuantificación**
- ❖ **Monitoreo de resistencia a tto.**
- ❖ **Expresión de genes**



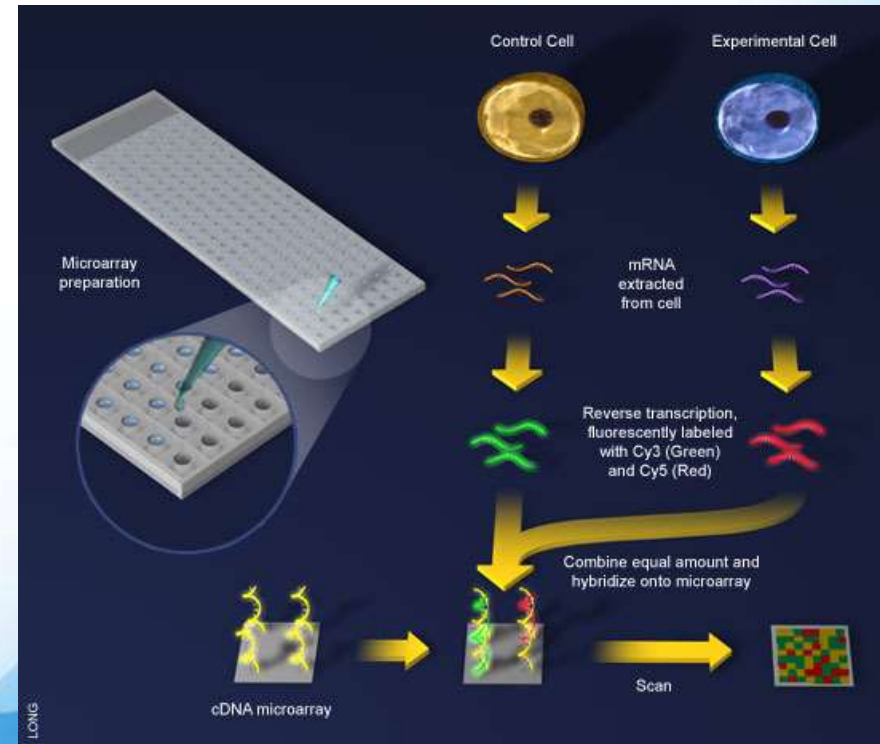
PCR en tiempo real

Ventajas

- ❖ **Mayor precisión, exactitud y sensibilidad**
- ❖ **Permite hacer detecciones múltiples**
- ❖ **No requiere procesamiento post-PCR.**
 - ❖ **Evita la contaminación**
 - ❖ **Mayor rapidez en la obtención de los resultados**
- ❖ **Cuantificación del contenido del material genético (ADN, ARN)**

Microarray

- **Un chip de ADN (*DNA microarray*) es una superficie sólida a la cual se une una colección de fragmentos de ADN**
- **Los chips de ADN se usan para analizar la expresión diferencial de genes.**
- **Se mide el nivel de hibridación entre la sonda específica (*probe*), y la molécula diana (*target*), indicándose generalmente mediante fluorescencia y analizándose por análisis de imagen, lo cual nos indicará el nivel de expresión del gen**



Utilidad:

- ✓ Monitorización de la expresión génica
- ✓ Diagnóstico molecular y prognosis de enfermedades
- ✓ Detección de mutaciones y polimorfismos
- ✓ Detección de agentes infecciosos
- ✓ Farmacogenómica. Medicina personalizada
- ✓ Toxicología de fármacos

