



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA



# HERRAMIENTAS MODERNAS PARA EL DIAGNÓSTICO

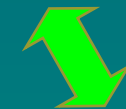
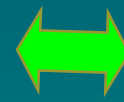
*Dra. Haydeé Urdaneta Romero.*

Junio 2007

# ABORDAJES DIAGNÓSTICOS

IDENTIFICACIÓN  
MORFOLÓGICA

PRESENTACIONES  
CLÍNICAS



EVALUACIÓN DE  
ANTICUERPOS

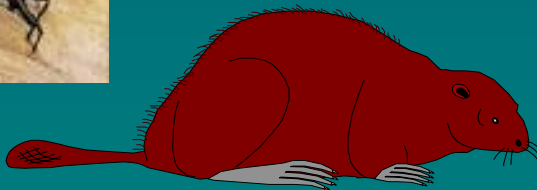
DIAGNOSTICO

DETECCIÓN DE  
ANTÍGENOS

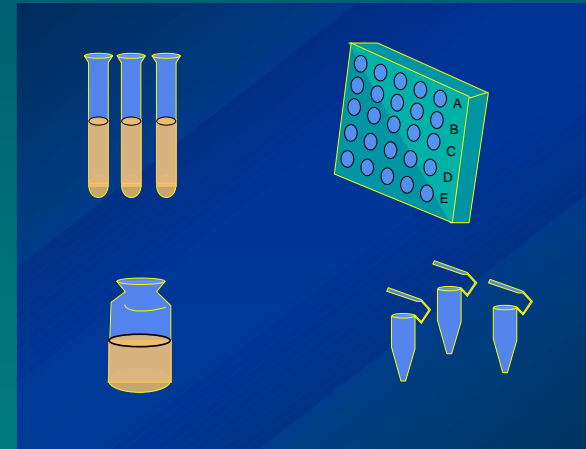
HALLAZGOS  
HISTOPATOLÓGICOS

# CULTIVOS

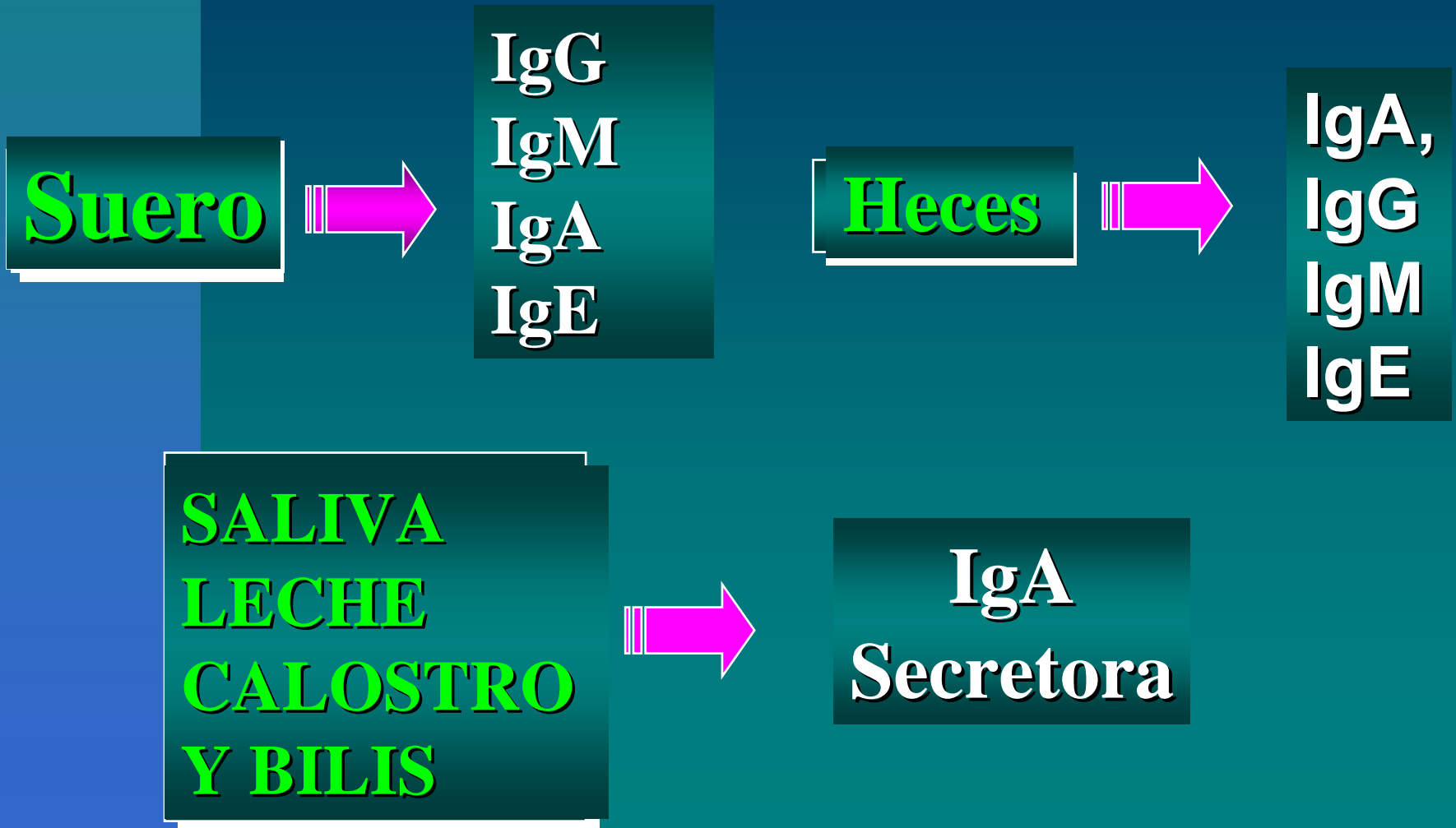
*in vivo*



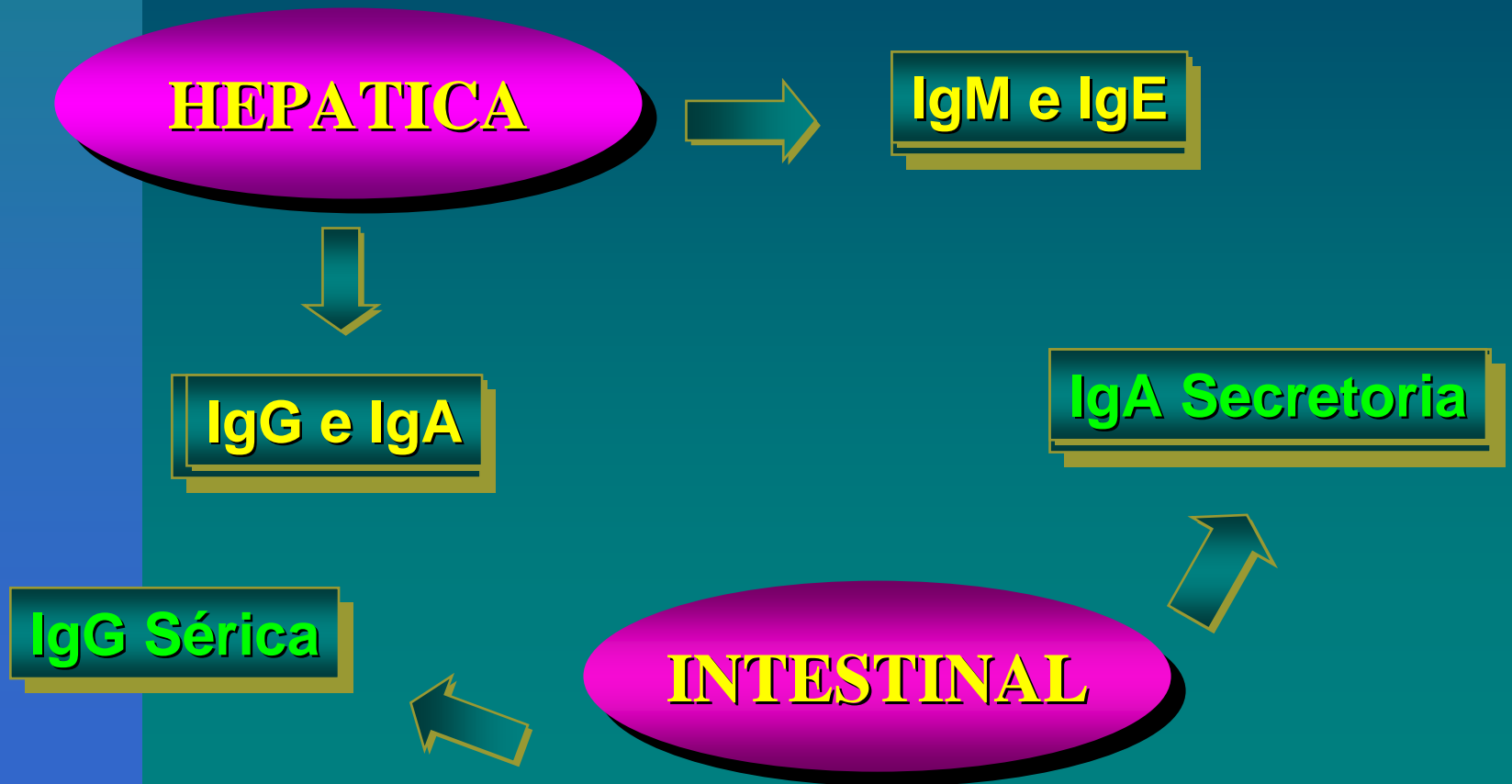
*in vitro*



# Evaluación de la Respuesta Humoral



# DETECCION DE ANTICUERPOS: Amibiasis



# TÉCNICAS INMUNODIAGNÓSTICAS

---

- ✓ Dye test
- ✓ Fijación del complemento
- ✓ Inmunofluorescencia indirecta
- ✓ Aglutinación directa
- ✓ Hemaglutina. indirecta
- ✓ Reacción intradérmica
- ✓ RIA
- ✓ ELISA
- ✓ Inmunoblot

# Métodos de Aglutinación

Ag o Ac adsorbidos a la superficie de partículas

## ✓ Aglutinación con látex

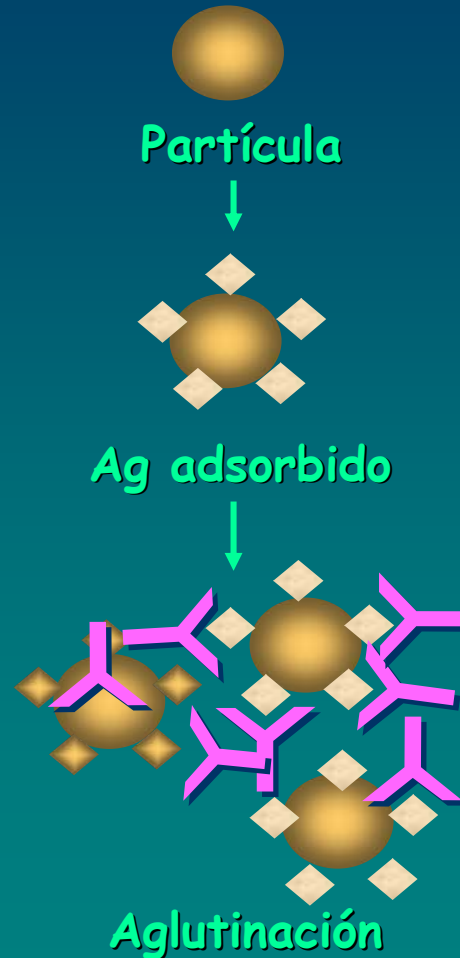
Partículas de látex

## ✓ Co-aglutinación

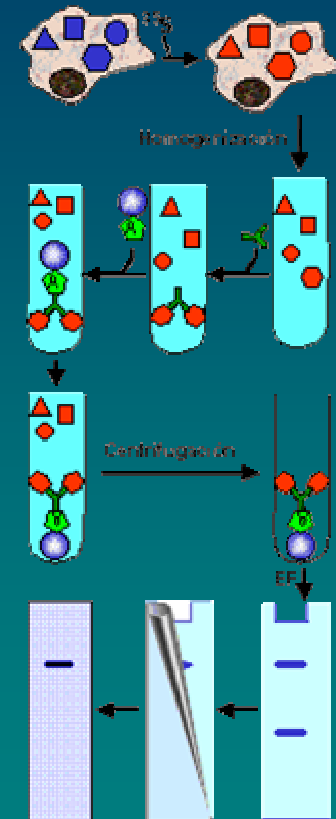
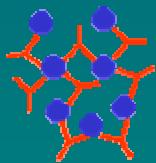
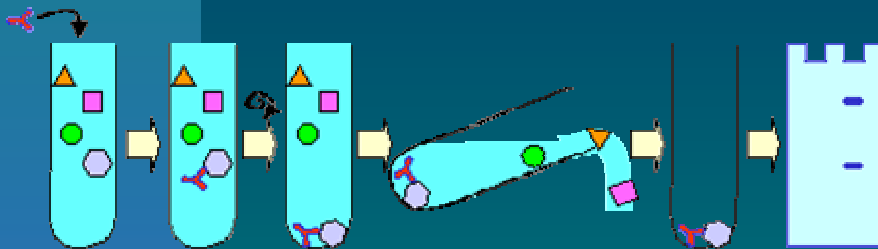
Proteína A → fragmento Fc

## ✓ Hemaglutinación

Glóbulos rojos



# INMUNOPRECIPITACIÓN





# Enzyme linked Inmunosorbent Assay ELISA

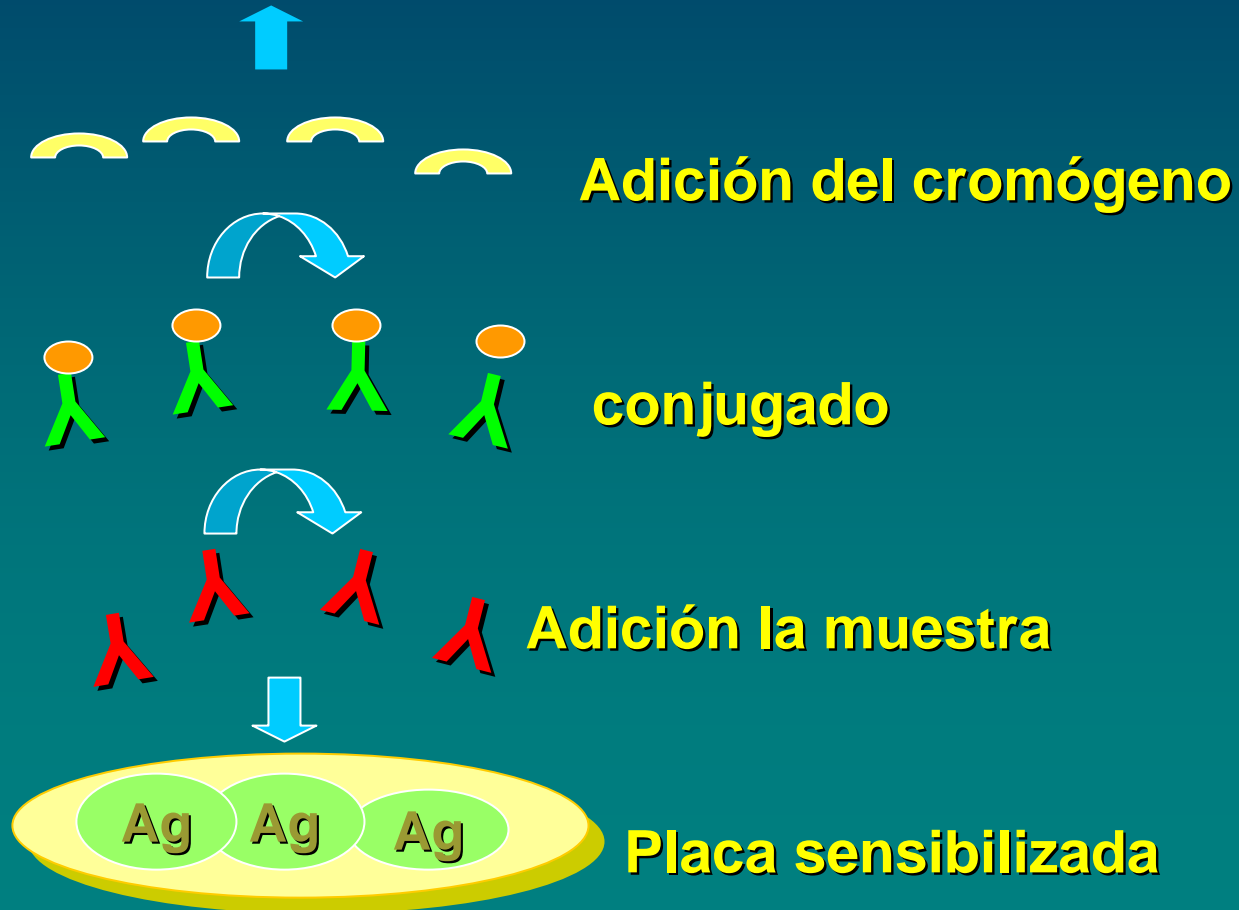


En ELISA, uno de los reactivos se conjuga con una enzima formando un complejo con actividad inmunológica y enzimática.

Engvall y Perlman 1971

# Método Indirecto

Reacción de color



# COPROELISA-Eh

Urdaneta H, Rangel A, Martins S, Muñoz JF & Hernandez M.

Ac. Monoclonal  
96 kDa

Ac. Policlonal  
(Inmunofinidad)

COPROELISA-Eh

Sensibilidad  
94.4%

Especificidad  
98.3%

31 ng

V.P.P.: 96.2%

V.P.N.: 97.6%

# ELISA, Usos:

---

## Detección de Ag y Ac

Bacterias

Párasitos

Hongos

Virus

## Detección de Complejos autoinmunes anti-DNA

anti-desoxinucleoproteína

anti-histona (H1, H2A, H2B, H3, H4)

Lupus Eritematoso sistémico

# ELISA, Usos:...

---

**Detección de Acs contra Ags del  
tejido endocrino**

**Anti - tiroglobulina  
anti-microsomal células de tiroides**

**Detección de Ags asociados a  
tumores**

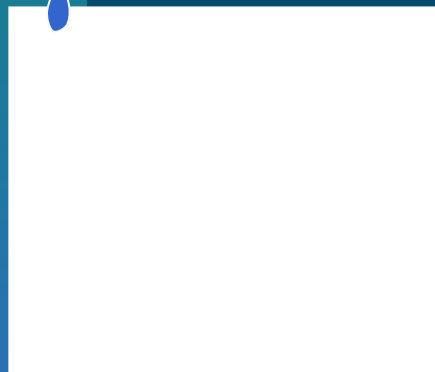
**Ag prostático específico  
Antígeno del ovario (Ca 125)  
ACE, alfa-fetoproteína**



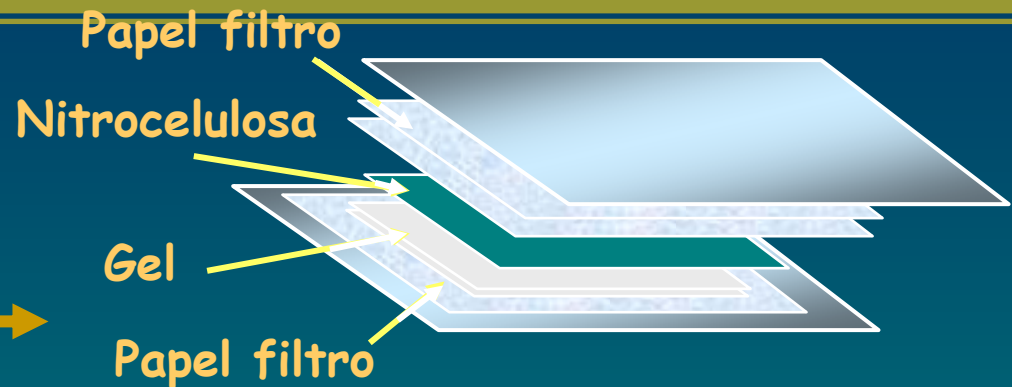
# Inmunoblotting (Western blotting)

Muestras

-



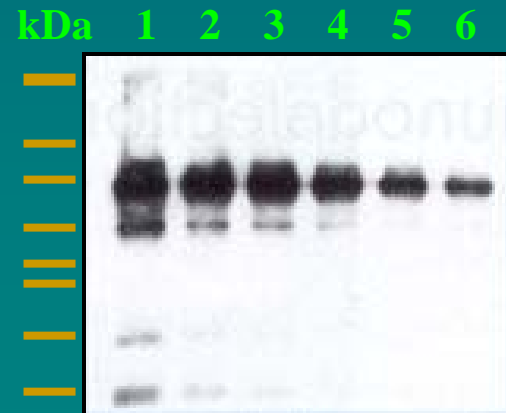
Separación de proteínas por electroforesis en gel



Transferencia de proteínas separadas a membrana

Inmunodetección con Ac marcados

Identificación de proteínas específicas



# INMUNOBLOTTING

PERFIL  
PROTEICO



ANTICUERPO

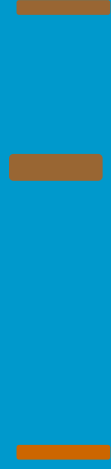


CONJUGADO



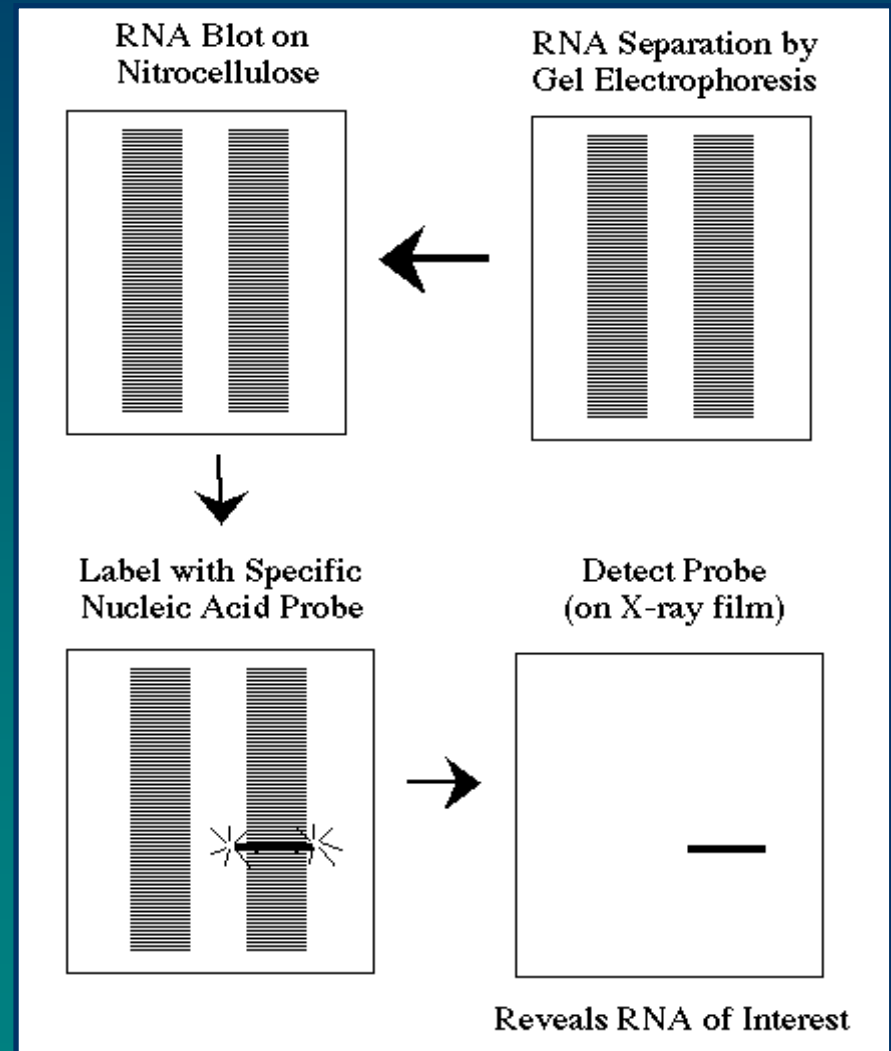
SUBSTRATO

OPORTUNIDAD



# NORTHERN BLOT

- Determinar del PM de ARN
- Medir cantidades relativas de ARNm presente en diferentes muestras





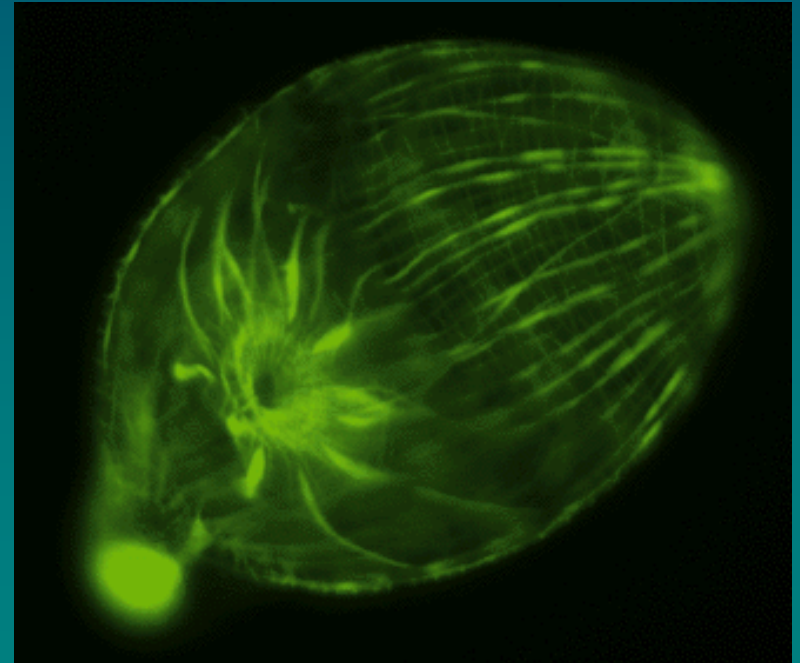
# Tecnicas basadas en fluorescencia

---

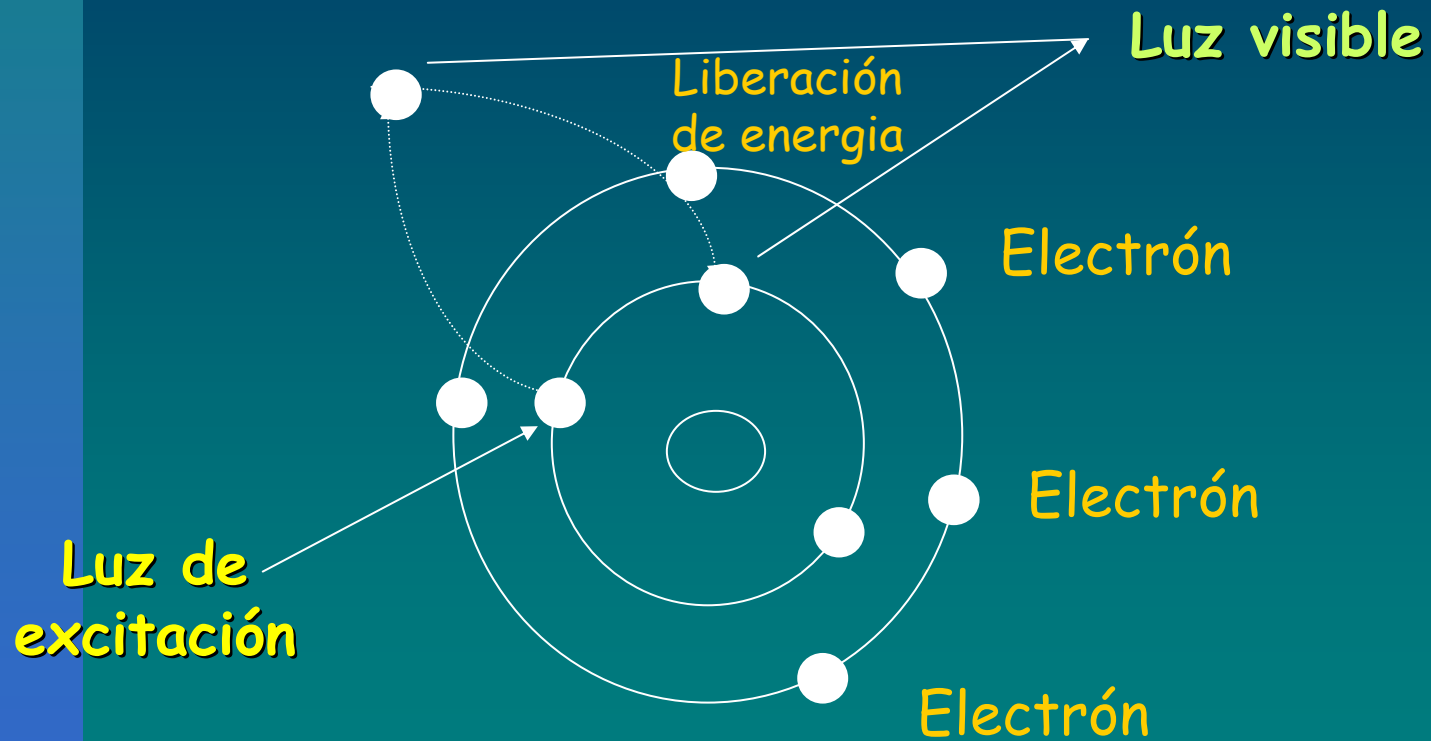
Fluorescencia

✿ Inmunofluorescencia

✿ Citometría



# Fluorescencia



# Microscopios de fluorescencia

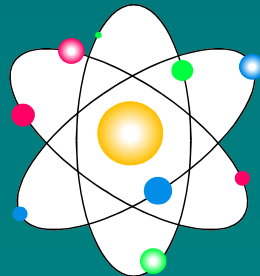
- Microscopio de luz de trasmisión
- Microscopio de incidencia
- Microscopio optico de barrido o confocal



# Otras técnicas

---

- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).
- QUIMIOLUMINISCENCIA
- CITOMETRÍA
- PCR-SHELA
- LUMINOMETRÍA
- AUTORADIOGRAFIA



# Técnicas moleculares

---

## ✓ Sondas moleculares

Hibridación en fase sólida

Hibridación en fase líquida

Hibridación *in situ*

## ✓ Amplificación de ácidos nucleicos

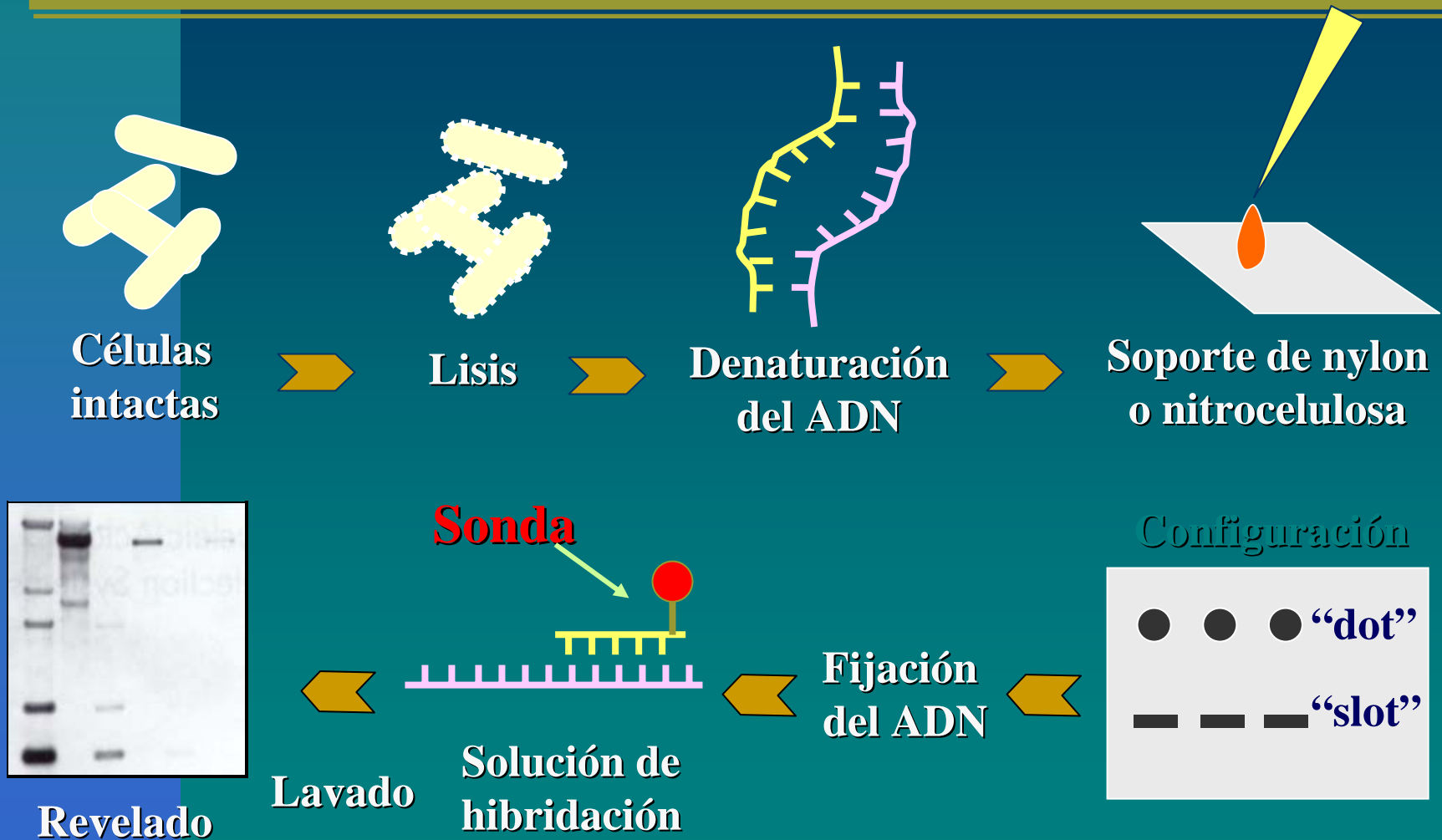
Amplificación del blanco

Amplificación de la sonda

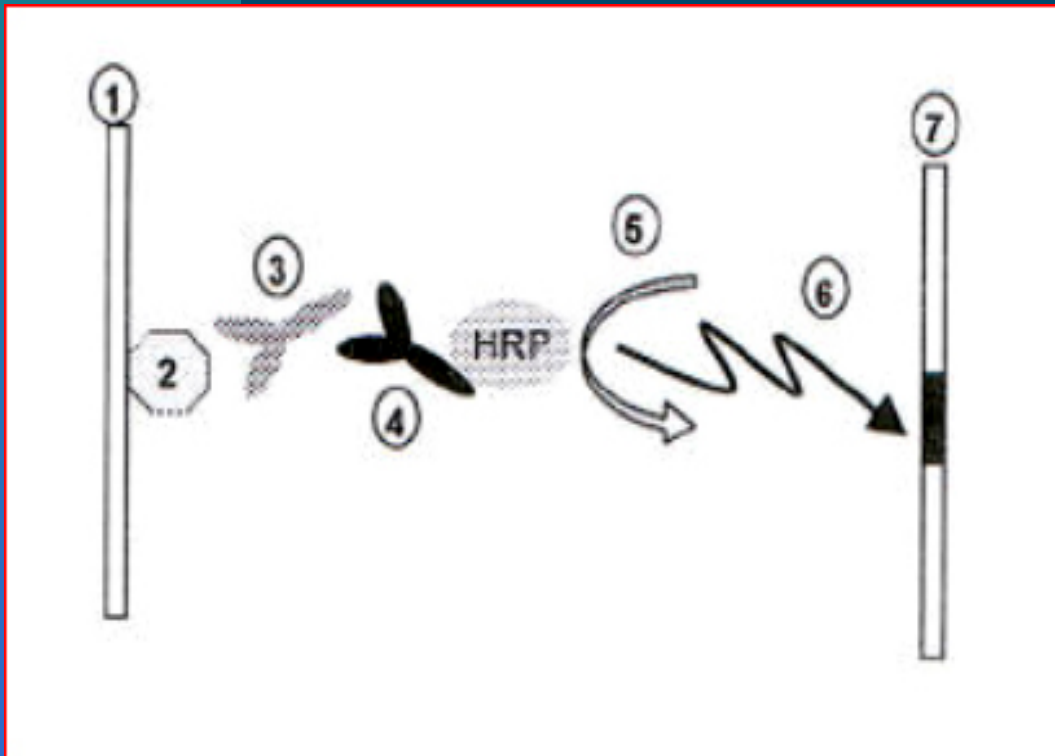
Amplificación de la señal

# Técnicas moleculares...

## Hibridación en fase sólida



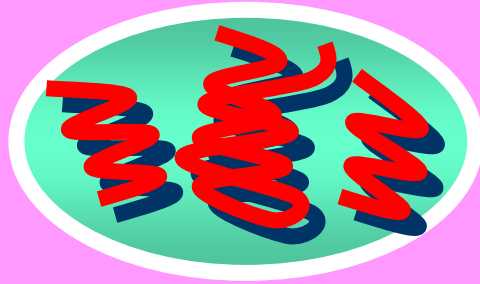
# La Quimioluminiscencia



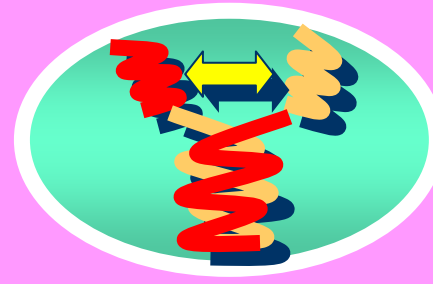
1. Membrana
2. Proteína / Ag
3. Anticuerpo primario
4. Anticuerpo secundario
5. Reactivo Covalight
6. Luz
7. Filtro

# QUIMIOLUMINISCENCIA

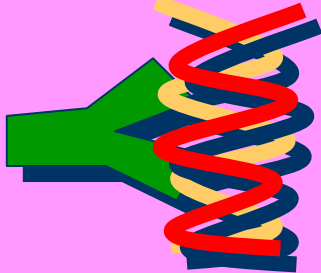
1 DESNATURALIZACIÓN



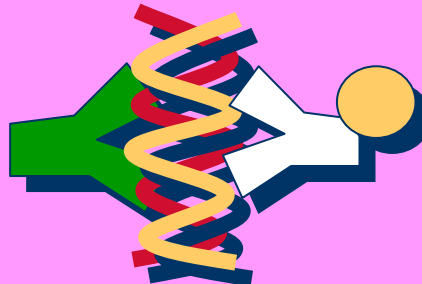
2 HIBRIDACIÓN



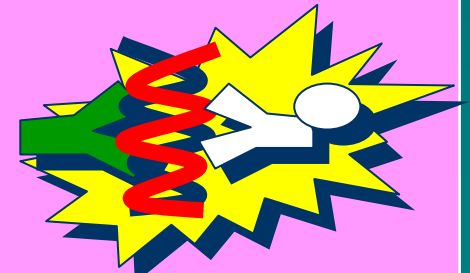
3 CAPTURA



4 MARCAJE



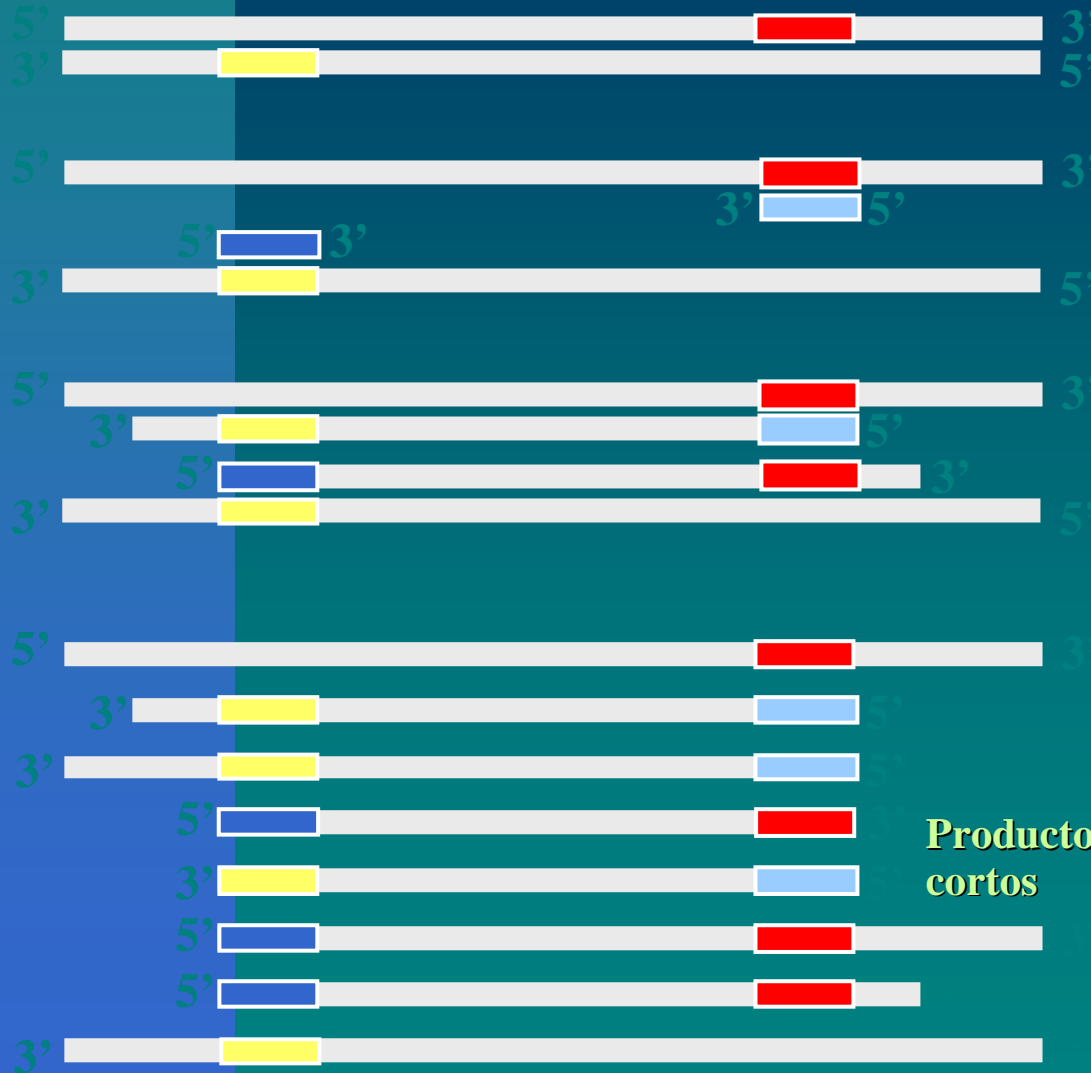
5 DETECCIÓN





# Técnicas moleculares: Amplificación del blanco

## PCR: Polymerase Chain Reaction



A. ADN doble hebra (molde)

B. Denaturación: 94 °C  
Hibridación de oligos  
(annealing): 52 °C

C. Extensión: 72 °C (ADN polimerasa). Primer ciclo.

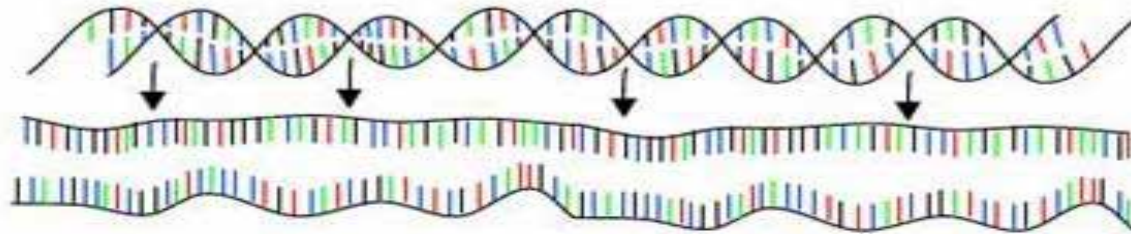
D. Segundo ciclo:  
Hibridación de los oligos  
(en exceso) con los  
productos de C y  
acumulación exponencial  
de productos cortos en  
ciclos sucesivos.

# PCR : Polymerase Chain Reaction

30-40 ciclos de 3 pasos:

## Paso 1: Desnaturalización

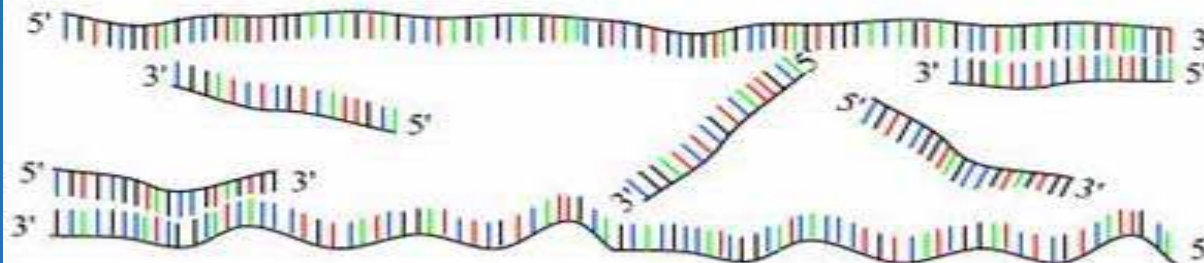
1 minuto a 94°C



## Paso 2: Hibridación

45 segundos a 54 °C

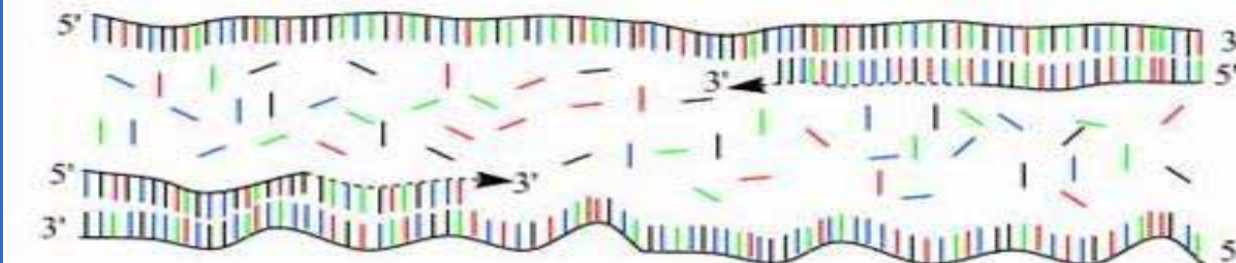
!!!Cebadores sentido y antisentido!!!



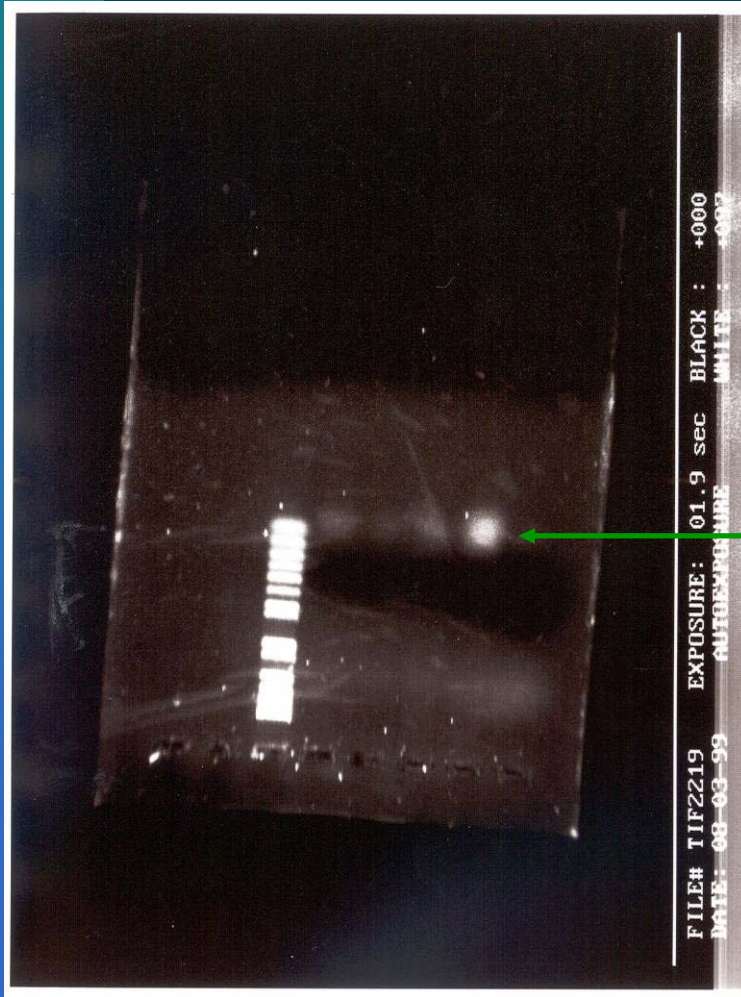
## Paso 3: Extensión

2 minutos a 72 °C

solo dNTPs

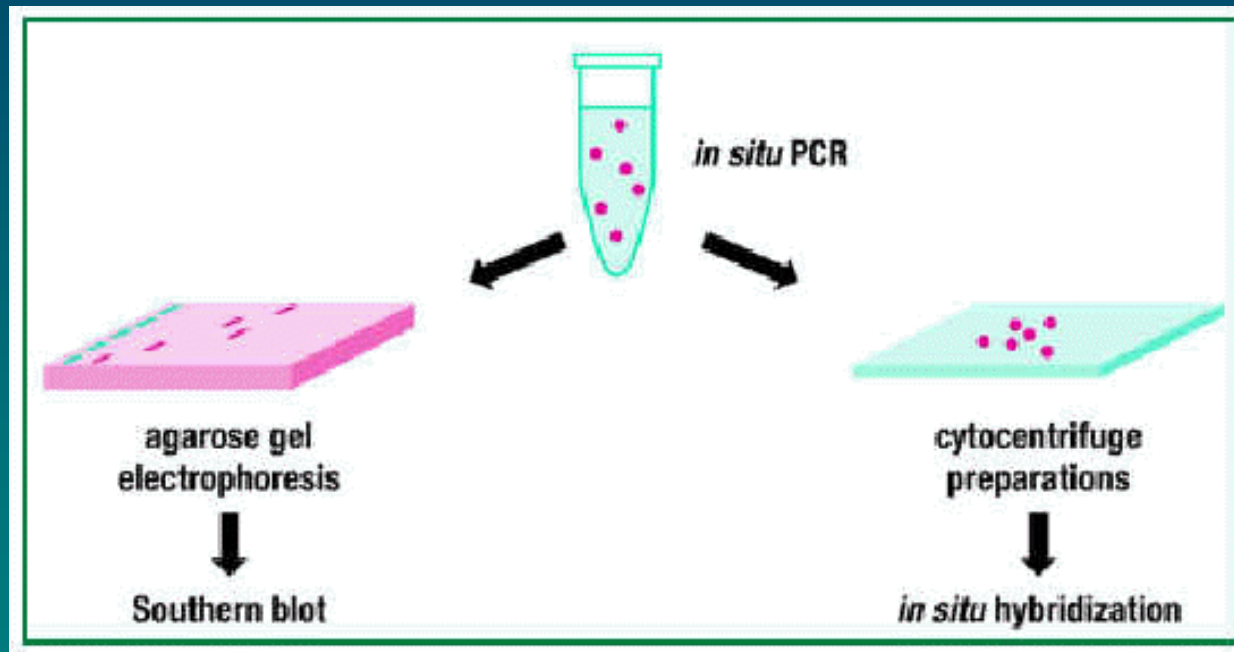


# REVELACIÓN



PRIMER-DIMERS

# Principles of *in situ* PCR performed in cells in suspension



# VARIACIONES DE LA PCR

---

---

PCR MÚLTIPLE

Q-PCR

PCR NESTED

PCR *in situ*

RT-PCR

# RT-PCR

- ✓ Técnica sensible para la detección de ARNm y para su cuantificación.
- ✓ Usos: clonación, construcción de bibliotecas de ADNc, identificación de mutaciones y polimorfismo
- ✓ Fases: \*Síntesis de ADNc a partir de ARN por RT y  
\*Amplificación de un ADNc por PCR
- ✓ Consideraciones: - Aislamiento del ARN
  - Uso de Primers específicos: Secuencias conocidas
  - Adición de tallo poli A al 3' terminal. Cuando se conoce sólo un extremo.

# Evaluation of newer diagnostic methods for the detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* in an endemic area. A. K. Sharma et al 2003.

**Table. Comparative efficacy of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR)-based methods for detection and differentiation of *Entamoeba* spp. in stool samples**

	ELISA-based detection		PCR-based colorimetric assay <i>Entamoeba</i> spp. differentiation		
	Antigen detection	Antibody detection	<i>E. histolytica</i>	<i>E. dispar</i>	Total
Microscopy-positive (n = 33)	1.489 ± 0.183 <sup>a</sup> (30/33, 90.9%)	0.598 ± 0.180 <sup>a</sup> (17/33, 51.51%)	18	15	33
Microscopy-negative (n = 10)	0.206 ± 0.134 <sup>a</sup> (10/10, 100%)	0.033 ± 0.011 <sup>a</sup> (10/10, 100%)	-	2	2

<sup>a</sup>Positive optical density (mean ± SD).

# Comparison of Real-Time PCR Protocols for Differential Laboratory Diagnosis of Amebiasis

Qvarnstrom et al 2005

TABLE 4. Performance characteristics of assays

Assay	Limit of detection (cells/ml [ $\pm$ SD])	Linear range	Slope (efficiency)	Relative cost <sup>a</sup>	Time <sup>b</sup> (h)
Conventional PCR	119 ( $\pm$ 890)	NA <sup>c</sup>	NA	+	7
SYBR Green	17 ( $\pm$ 57)	10 <sup>5</sup> -10 <sup>1</sup>	-4.2 (72%)	++	7
LightCycler	4 ( $\pm$ 14)	10 <sup>6</sup> -10 <sup>2</sup>	-3.5 (90%)	++++	4
TaqMan 1	1 ( $\pm$ 4)	10 <sup>6</sup> -10 <sup>-1</sup>	-3.3 (100%)	+++	4
TaqMan 2	0.5 ( $\pm$ 1.2)	10 <sup>6</sup> -10 <sup>-1</sup>	-3.5 (91%)	+++	4

<sup>a</sup> Cost for equipment not included. The LightCycler assay requires a LightCycler thermocycler. The other real-time assays can be performed on less expensive real-time thermocyclers.

<sup>b</sup> Estimated time from reception of specimen to final result (2 h for DNA extraction is included).

<sup>c</sup> NA, not applicable.



# BIOLOGÍA MOLECULAR...

---

- ❖ LA PCR PERMITE, LA AMPLIFICACION DEL DNA O RNA DEL AGENTE INFECCIOSO Y SU IDENTIFICACION.
- ❖ ES HASTA 100 VECES MAS SENSIBLE QUE OTRAS.

# PCR

## Aplicaciones Clínicas

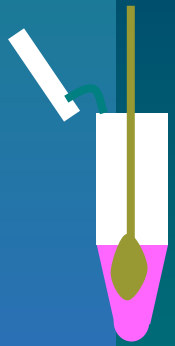
---

- ▶ En infecciones congénitas
- ▶ En pacientes Inmunosuprimidos
- ▶ Durante la fase aguda
- ▶ Prueba de elección en la evaluación de pacientes con SIDA

# Técnicas moleculares...

## Hacia la automatización...

Extracción del  
ADN/ARN

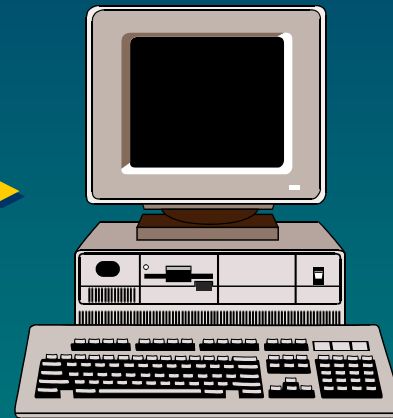


Muestra

Amplificación/  
secuencia  
de genes  
universales



Separación  
electroforética



Análisis de  
banco de  
datos  
(secuencias  
conocidas)

Identificación



# GRACIAS

¿Preguntas ?

