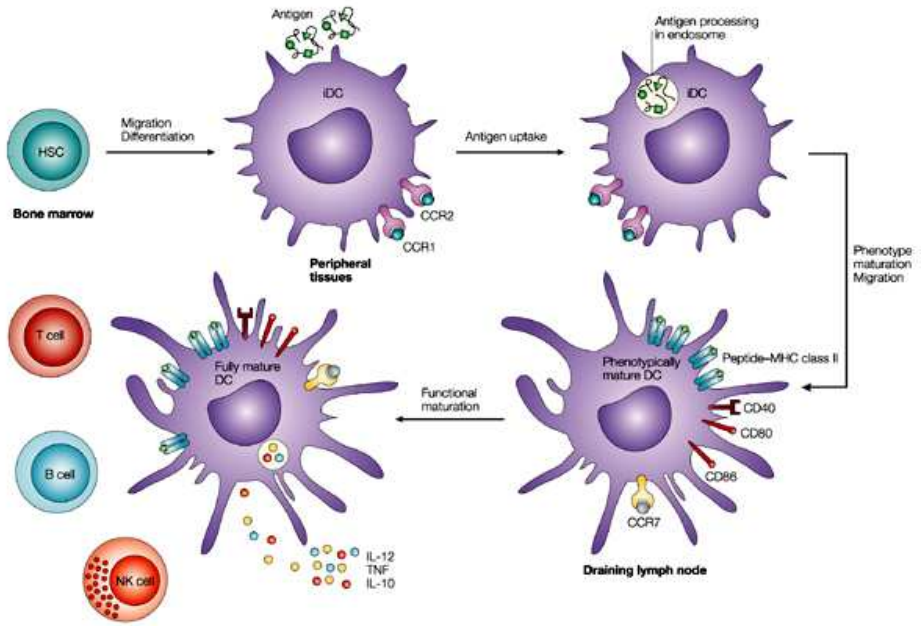
MÉTODOS PARA EVALUAR LA RESPUESTA INMUNE

DRA. LUISA BARBOZA

RESPUESTA INMUNE

Poblaciones celulares

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

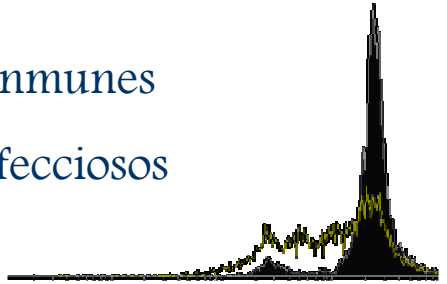


Productos de la respuesta

- Citoquinas
- Inmunoglobulinas/anticuerpos
- Complemento

Diagnóstico

- Patologías inmunes
- Procesos infecciosos



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Técnicas basadas en interacción antígeno-anticuerpo

- Inmunoensayos
- Western blot
- Inmunoprecipitación
- Inmunohistoquímica
- Inmunofluorescencia

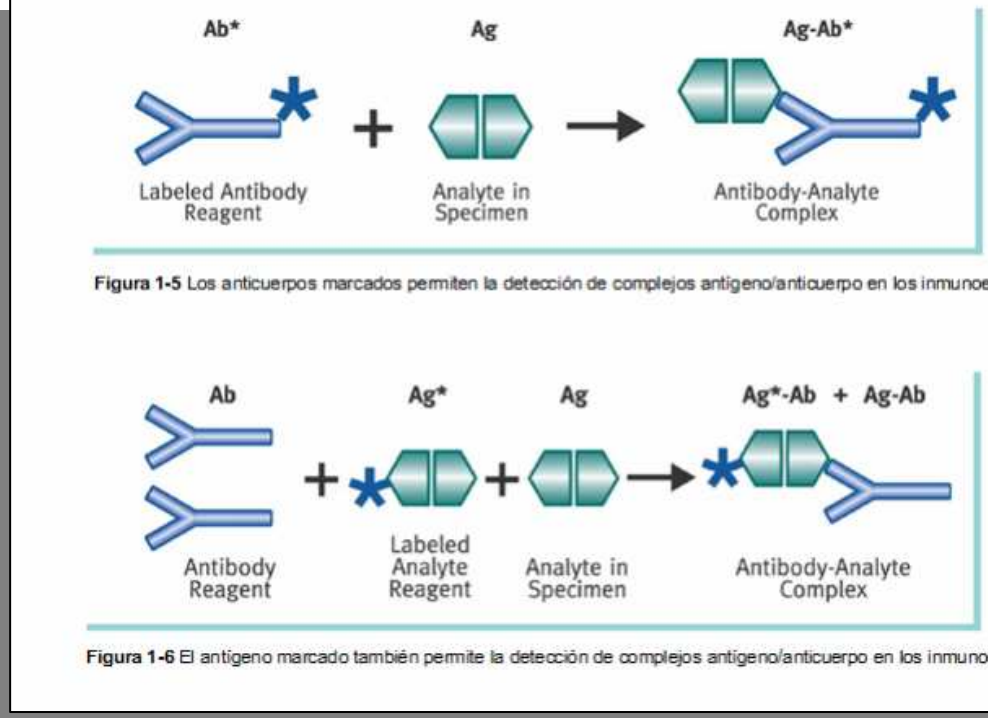


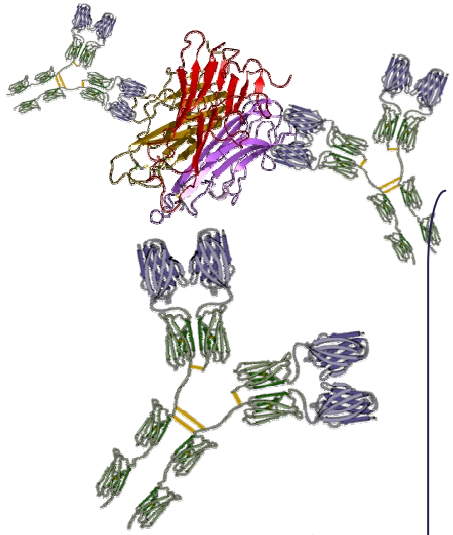
Figura 1-5 Los anticuerpos marcados permiten la detección de complejos antígeno/anticuerpo en los inmunoensayos

Figura 1-6 El antígeno marcado también permite la detección de complejos antígeno/anticuerpo en los inmunoensayos

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Tipos de inmunoensayo:



Inmunoensayo: Formación de inmunocomplejos (antígeno/anticuerpo)

Marcados: Conjugados a moléculas que emiten señales detectables

- Radioinmunoensayo (RIA): El marcador es un isótopo radioactivo.
- Análisis inmunoenzimáticos (EIA): El marcador es una enzima.
- Fluoroinmunoanálisis: El marcador es una partícula fluorescente.
- Ensayos inmunoquimioluminiscente: La marca es una sustancia quimioluminiscente.

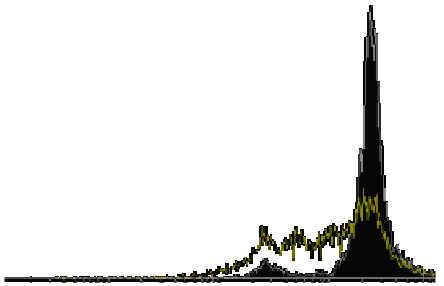
No marcados: Son medidos por dispersión de luz o por visualización directa

- Precipitación
- Aglutinación

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

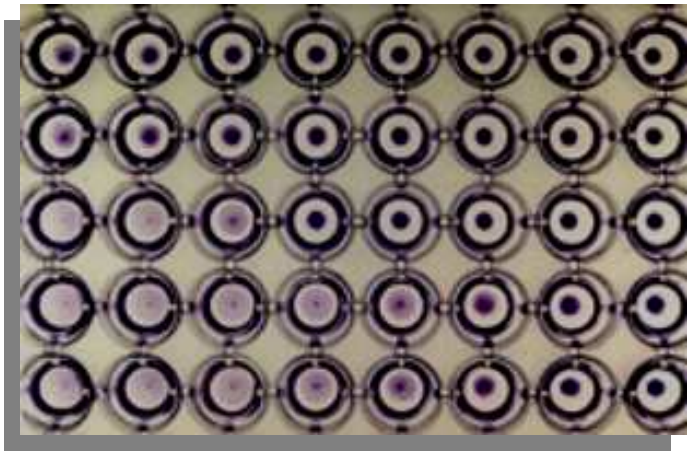
idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

J Immunol Methods. 1992; 150: 5-21

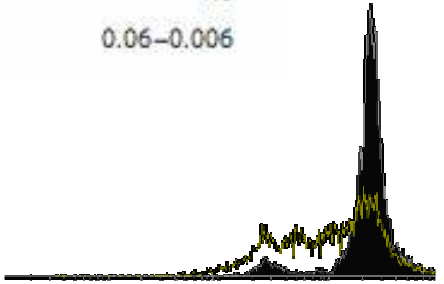


Inmunoensayos:

✓Comparación



Assay	Sensitivity* (μg antibody/ml)
Precipitation reaction in fluids	20–200
Precipitation reactions in gels	
Mancini radial immunodiffusion	10–50
Ouchterlony double immunodiffusion	20–200
Immunoelectrophoresis	20–200
Rocket electrophoresis	2
Agglutination reactions	
Direct	0.3
Passive agglutination	0.006–0.06
Agglutination inhibition	0.006–0.06
Radioimmunoassay	0.0006–0.006
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	<0.0001–0.01
ELISA using chemiluminescence	<0.0001–0.01†
Immunofluorescence	1.0
Flow cytometry	0.06–0.006

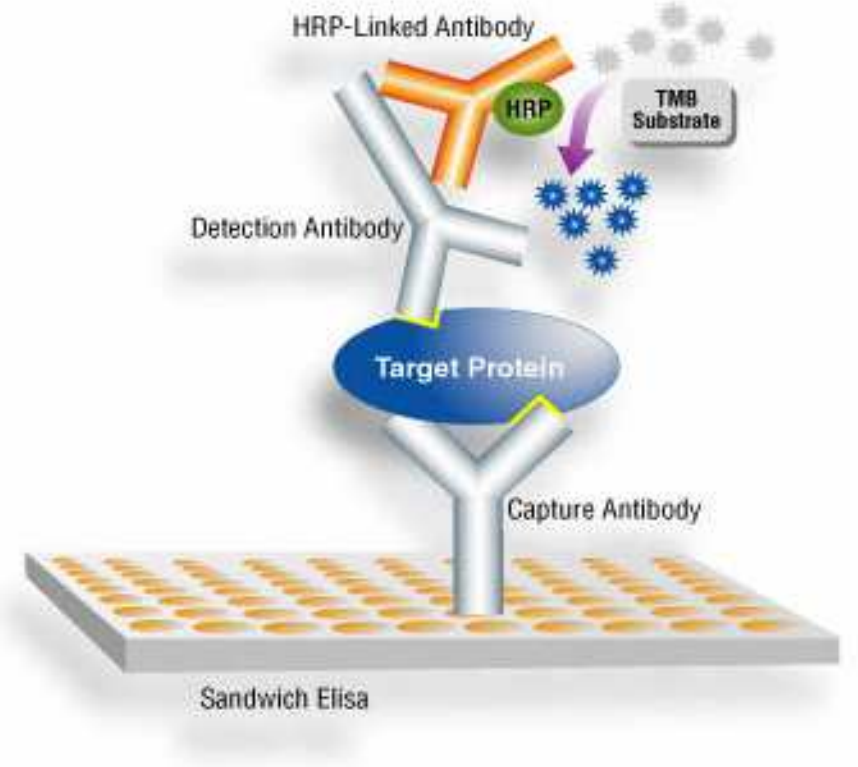


UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay):

La detección se realiza colorimétricamente por la interacción de un sustrato cromogénico y una enzima que ha sido acoplada a un anticuerpo detector La prueba de ELISA se basa en la formación de inmunocomplejos, (reacción antígeno-anticuerpo, uno de los cuales debe ser de reactividad conocida), para detectar la presencia de un analito de interés.
La detección se realiza colorimétricamente por la interacción de un sustrato cromogénico y una enzima que ha sido acoplada a un anticuerpo detector.
En el ELISA, uno de los reactivos se conjuga con una enzima formando un complejo con actividad inmunológica y enzimática.

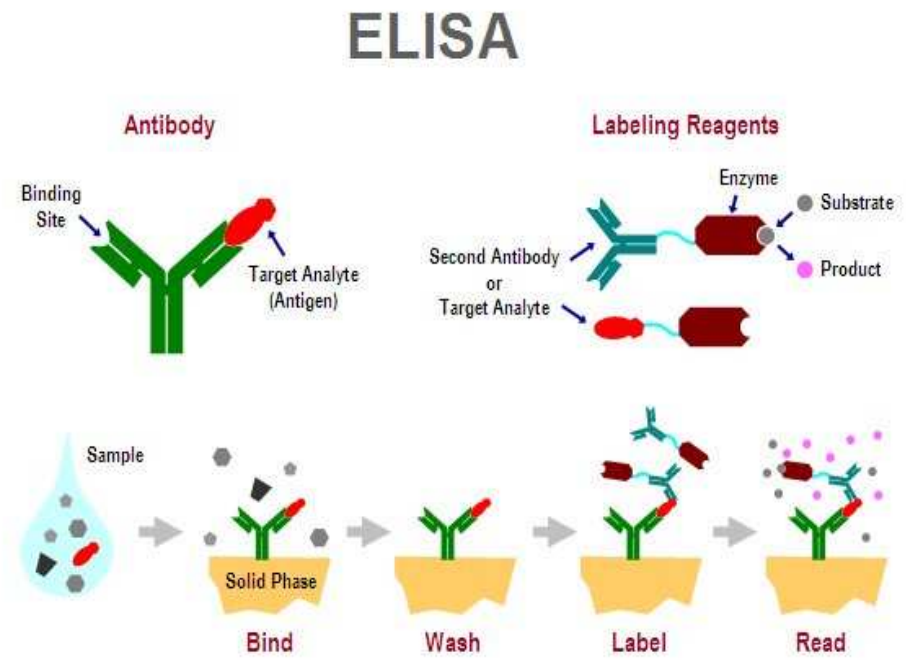


UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic
INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Engvall y Perlman 1971

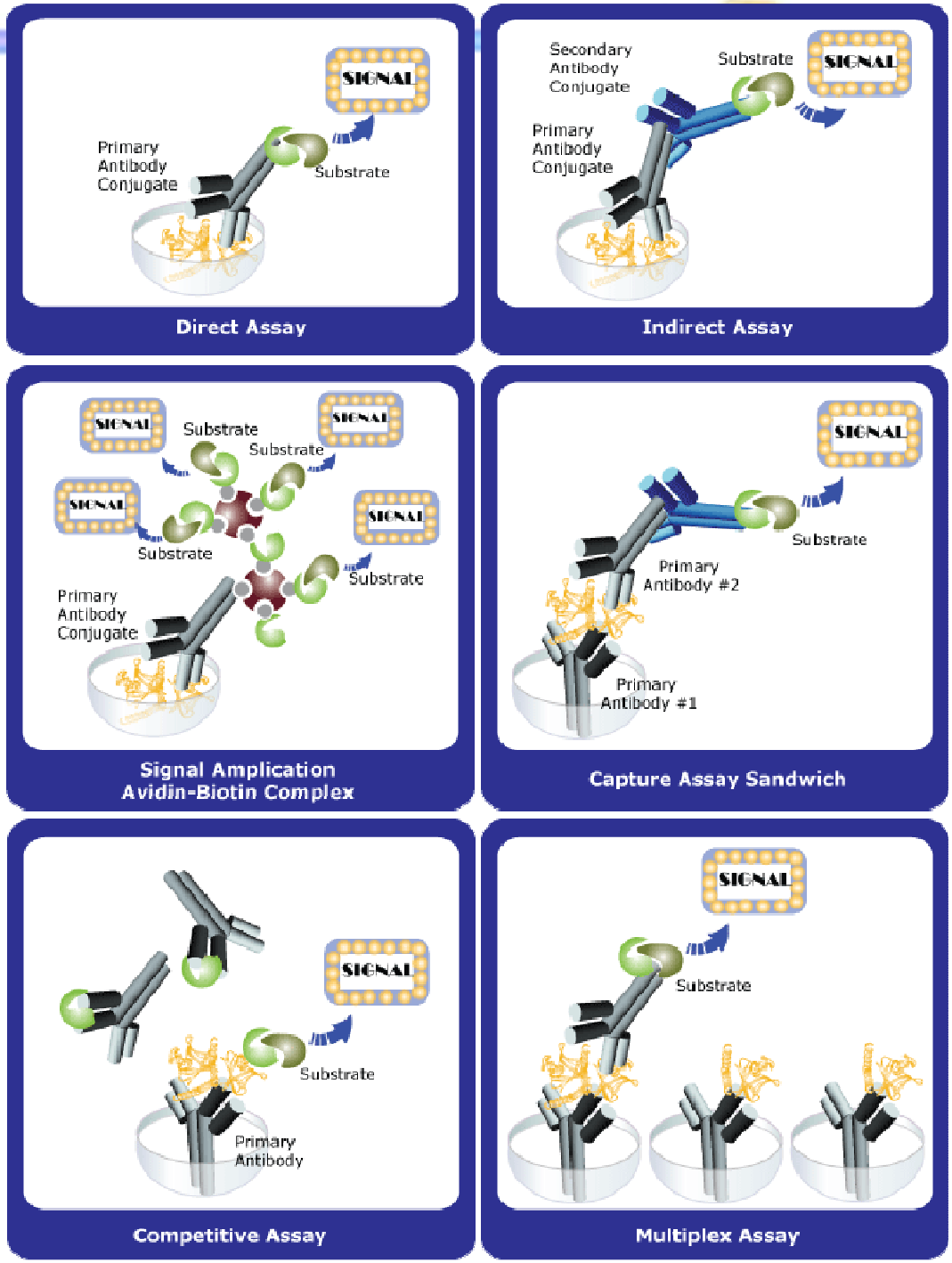
ELISA. Pasos



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Tipos de ELISA:

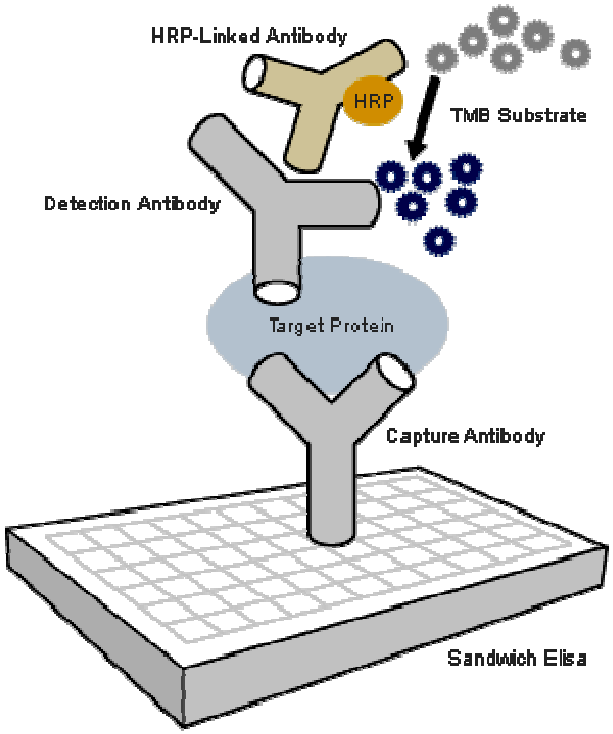


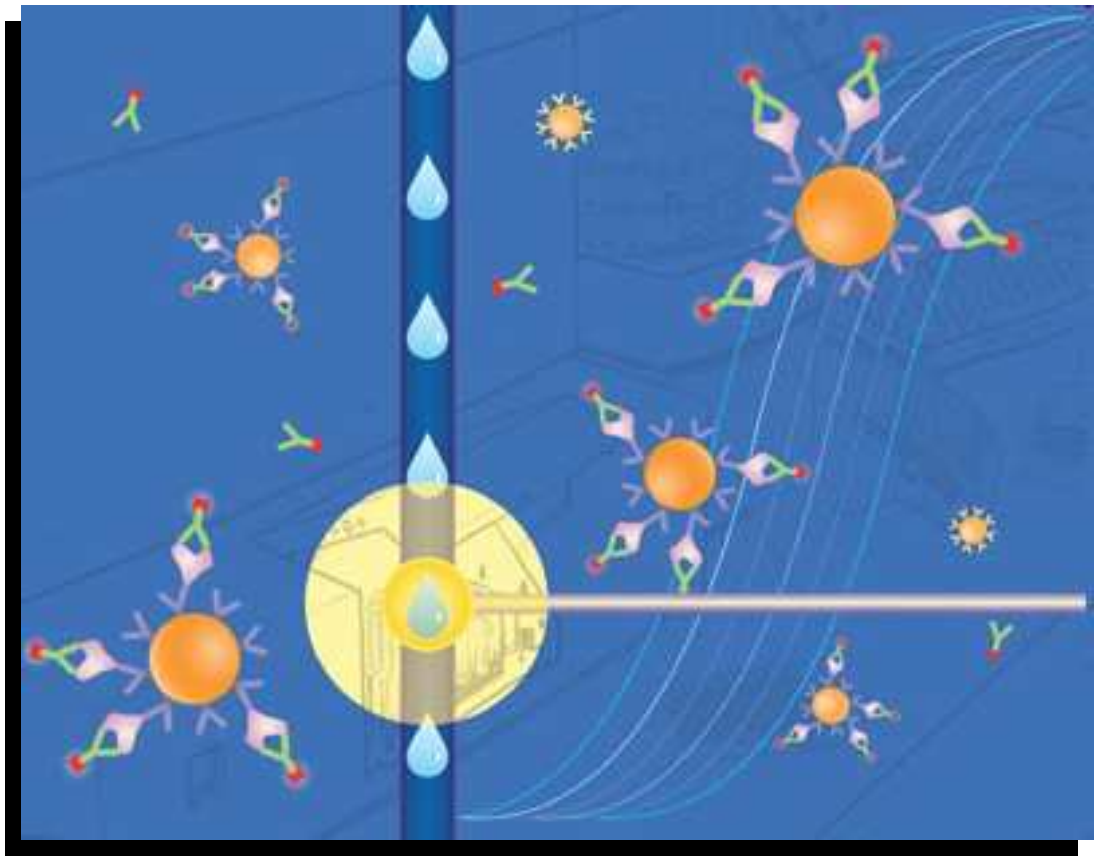
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

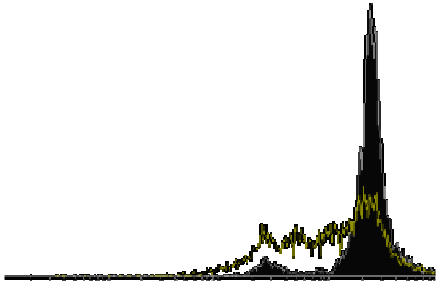
idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Evaluación de células B

Anticuerpos / ELISA & CBA

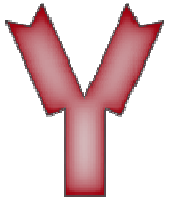


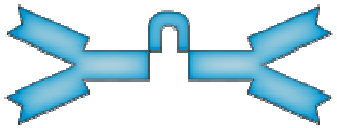


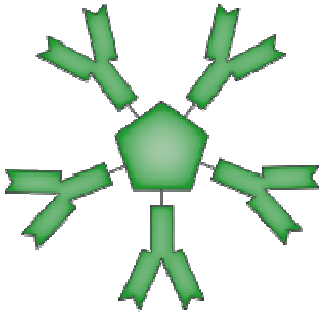


Utilidad

Clases y subclases de Ig







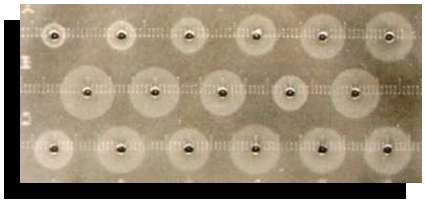


TABLE 4-2 Properties and biological activities* of classes and subclasses of human serum immunoglobulins

Property/Activity	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	IgM‡	IgE	IgD
Molecular weight†	150,000	150,000	150,000	150,000	150,000–600,000	150,000–600,000	900,000	190,000	150,000
Heavy-chain component	γ1	γ2	γ3	γ4	α1	α2	μ	ε	δ
Normal serum level (mg/ml)	9	3	1	0.5	3.0	0.5	1.5	0.0003	0.03
In vivo serum half life (days)	23	23	8	23	6	6	5	2.5	3
Activates classical complement pathway	+	+/−	++	−	−	−	+++	−	−
Crosses placenta	+	+/−	+	+	−	−	−	−	−
Present on membrane of mature B cells	−	−	−	−	−	−	+	−	+
Binds to Fc receptors of phagocytes	++	+/−	++	+	−	−	?	−	−
Mucosal transport	−	−	−	−	++	++	+	−	−
Induces mast-cell degranulation	−	−	−	−	−	−	−	+	−

*Activity levels indicated as follows: ++ = high; + = moderate; +/− = minimal; − = none; ? = questionable.

†IgG, IgE, and IgD always exist as monomers; IgA can exist as a monomer, dimer, trimer, or tetramer. Membrane-bound IgM is a monomer, but secreted IgM in serum is a pentamer.

‡IgM is the first isotype produced by the neonate and during a primary immune response.

Utilidad

Detección de Ag y Ac

•Bacterias

•Parásitos

•Hongos

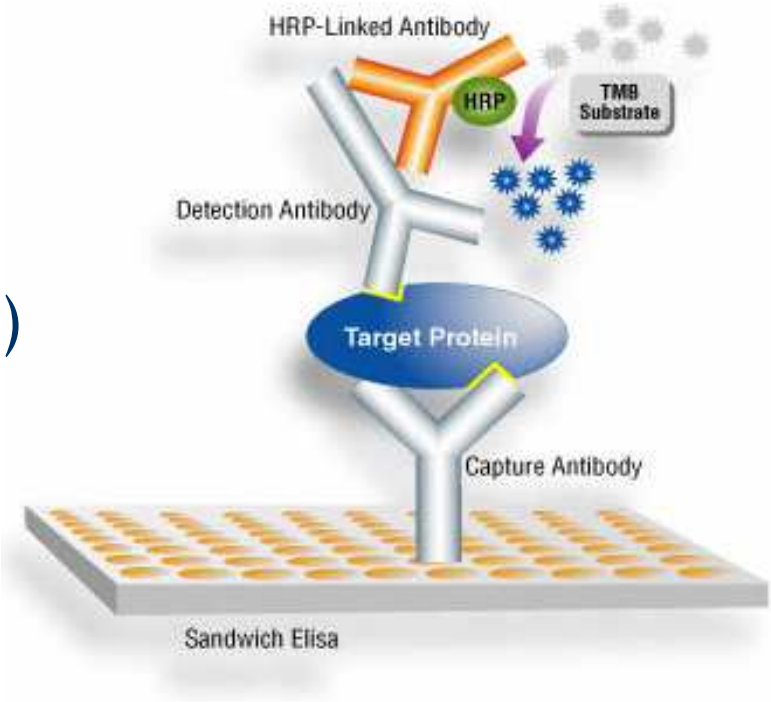
•Virus

Detección de complejos autoinmunes

•Anti- DNA (Antígenos nucleares extractables: **Sm – Ro – La – RNP)**

•Anti-Histonas (H1, H2A, H2B, H3, H4)

LES



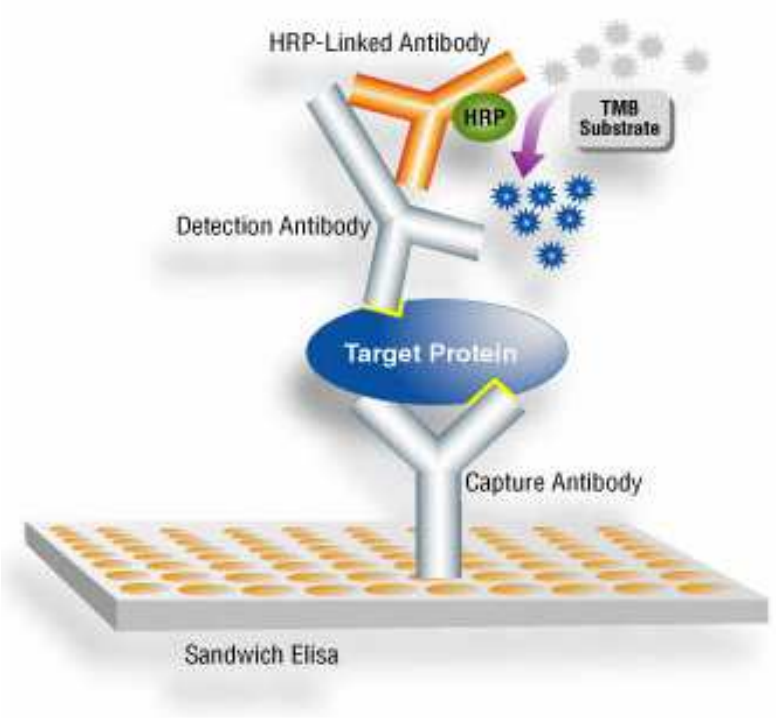
Utilidad

Detección de Acs contra antígenos de tejido

- Anti-tiroglobulina
- Anti-microsomal
- Anticuerpos Antifosfolípidos (**Cardiolipina IgG-M**)

Deteción de Ags asociados a tumores:

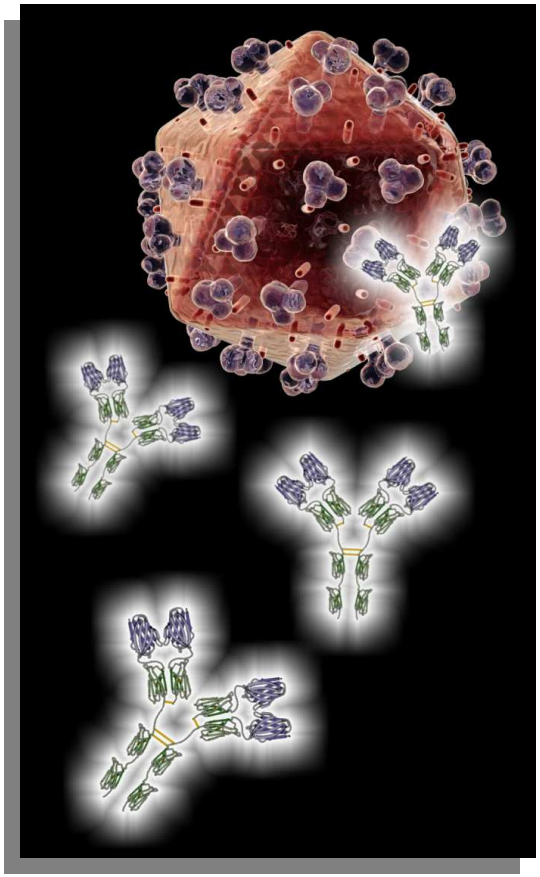
- Ag prostático
- Ag ovario (Ca125)
- ACE, alfafetoproteína



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

ELISA$_s$ y Generaciones:



1ra generación

- Ag: lisado purificado de VIH
- Pocas sensibilidad y especificidad

2da generación

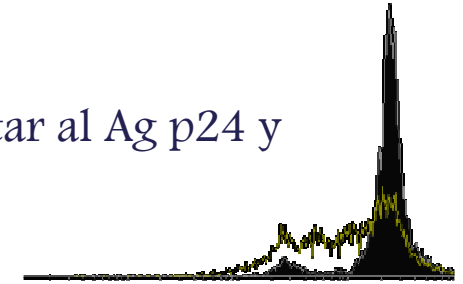
- Ag: proteínas recombinantes de VIH. Detección de VIH-1 y VIH-2
- Poca sensibilidad, mejora la especificidad

3ra generación

- Ag: proteínas recombinantes de VIH. Detección del grupo O del VIH. IgM e IgG
- Mejora la sensibilidad

4ta generación

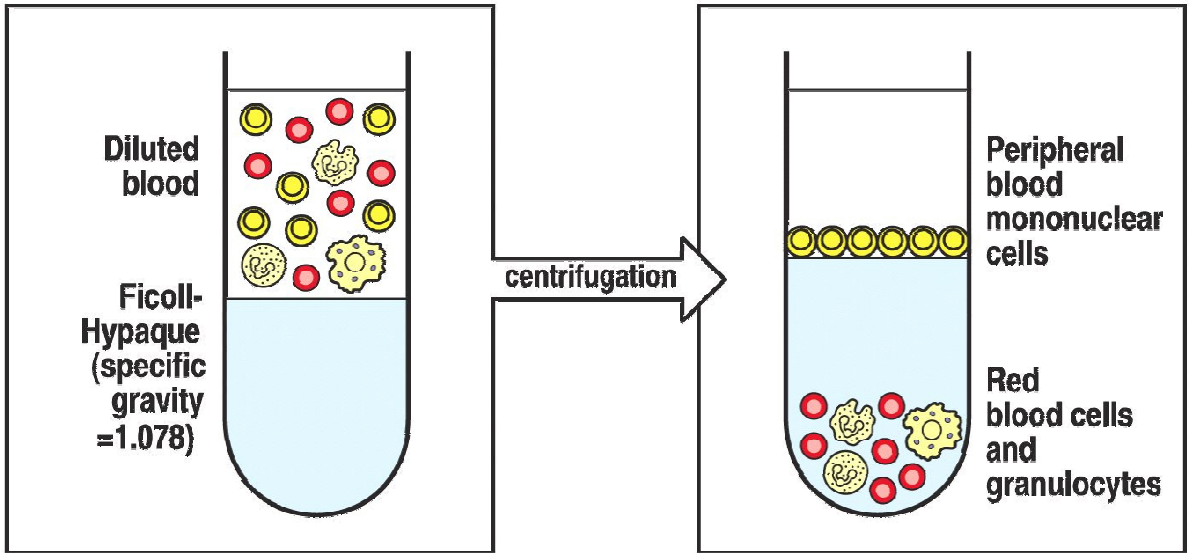
- Capacidad para detectar al Ag p24 y anticuerpos

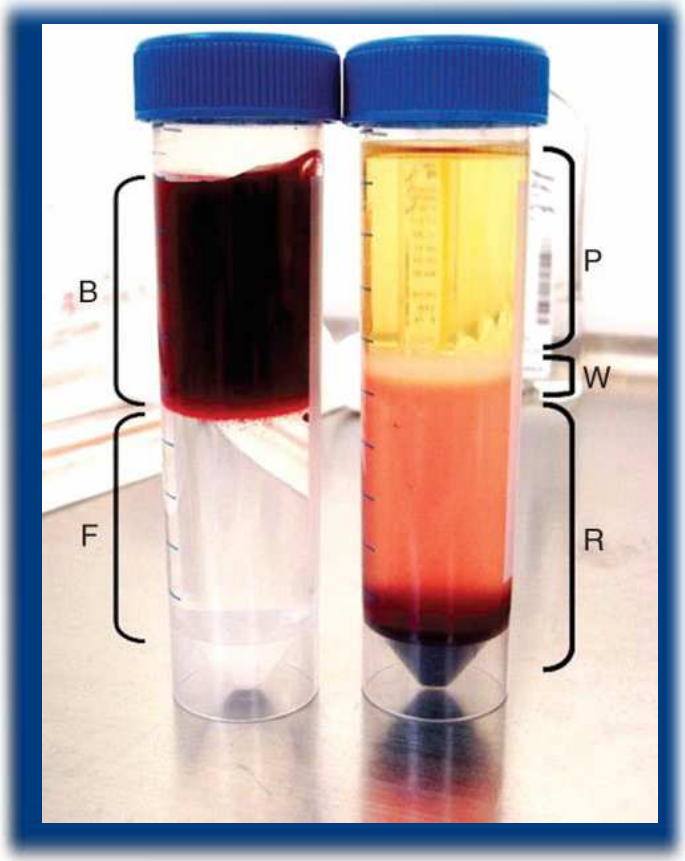


UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA

Separación Celular





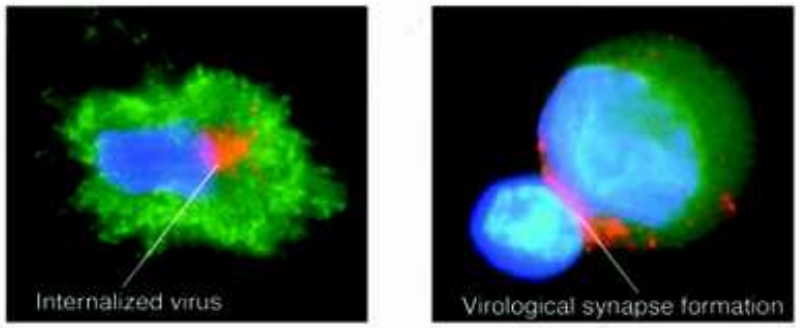
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

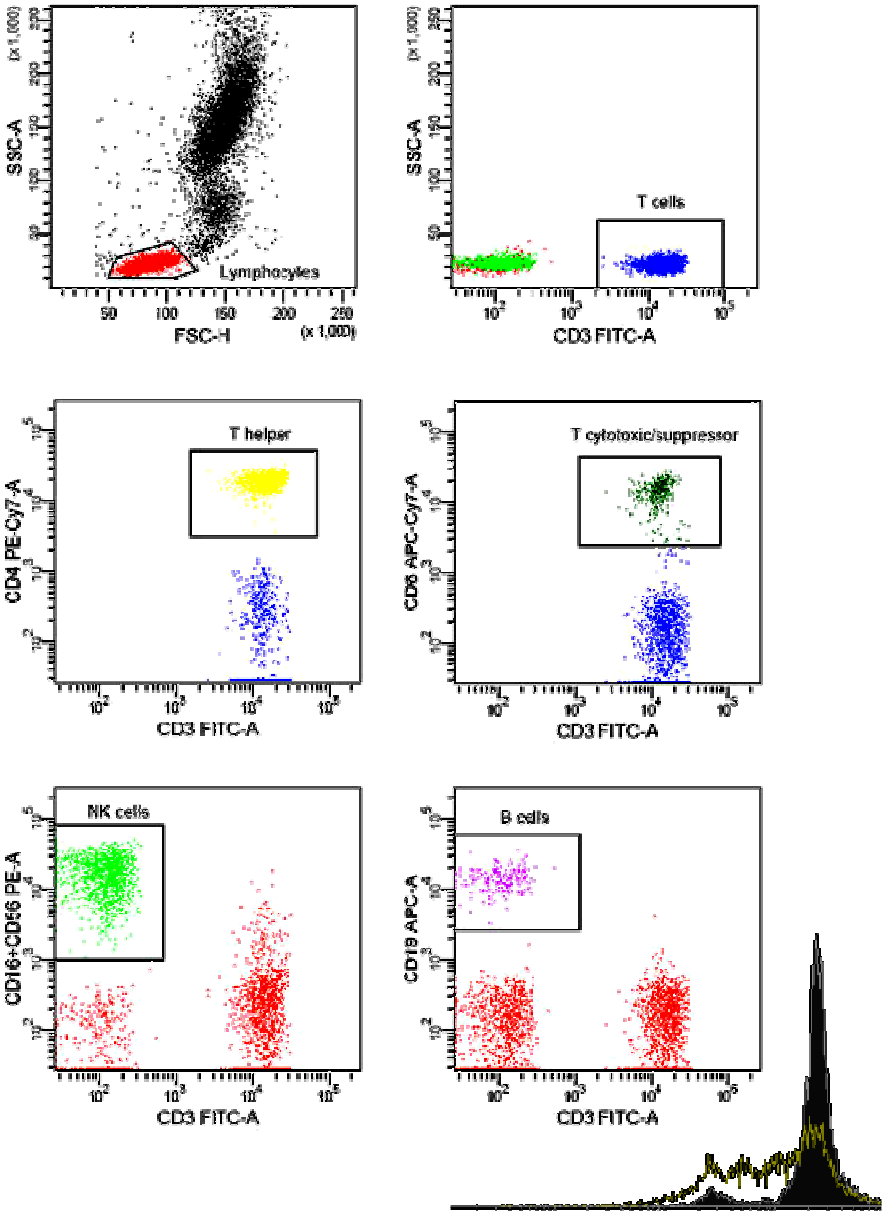
idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21**(Suppl. 97):77-89, 1968.

Técnicas basadas en fluorescencia

- Citometría de flujo
- Inmunofluorescia-Microscopia de fluorescencia





UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

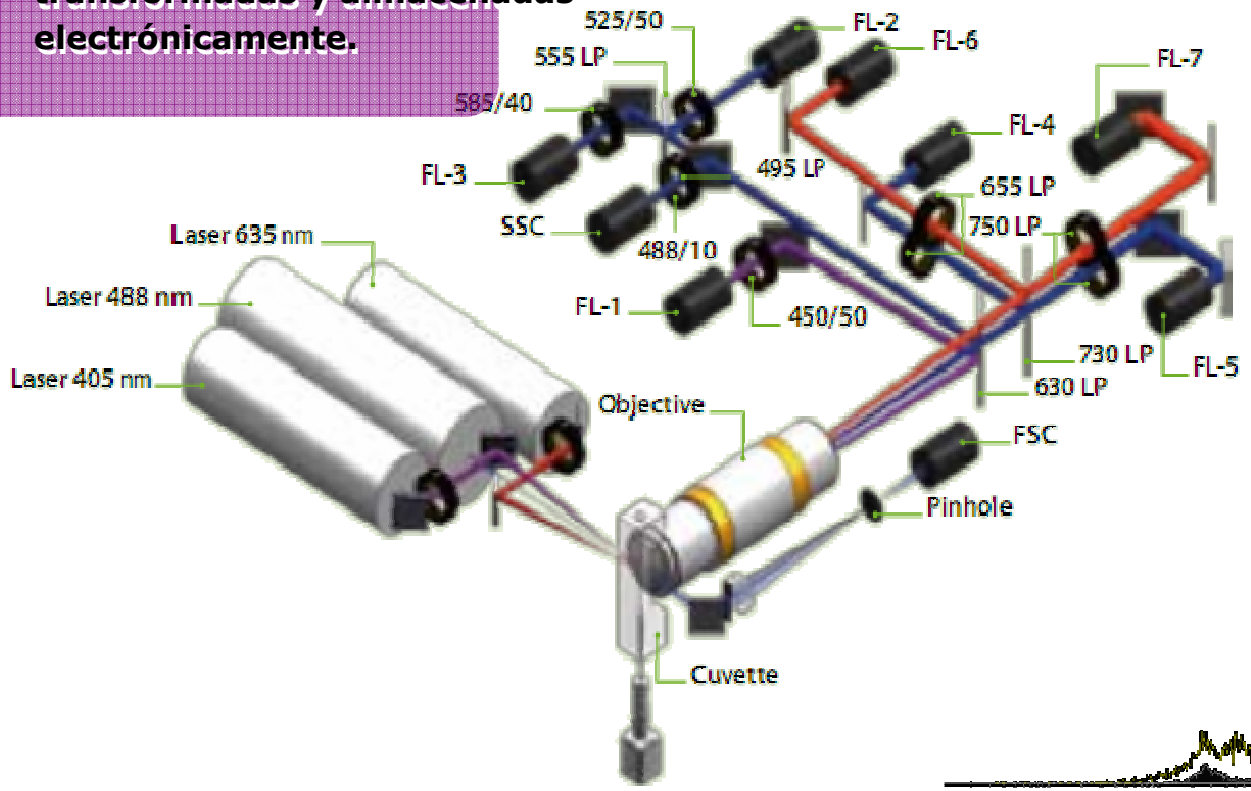
Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Hidrodinámica

Óptica

Electrónica

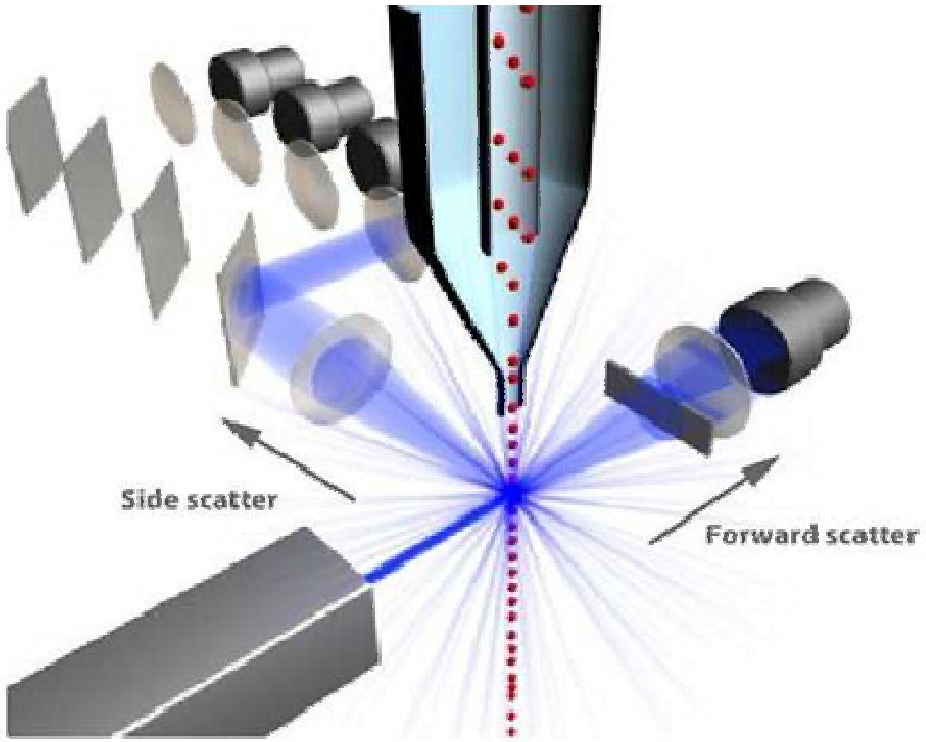
Técnica que permite analizar partículas en suspensión que se hacen fluir a través de un rayo de luz, las partículas interactúan dispersando este haz de luz y emitiendo fluorescencia, estas señales ópticas son detectadas, transformadas y almacenadas electrónicamente.

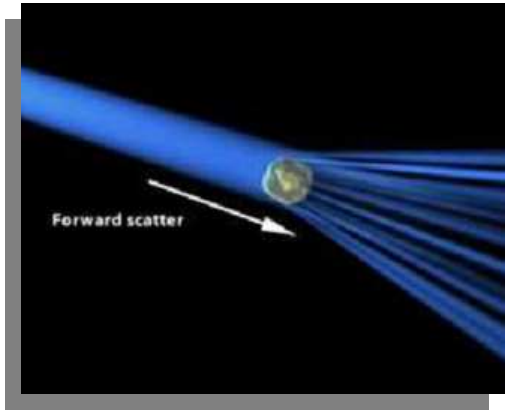


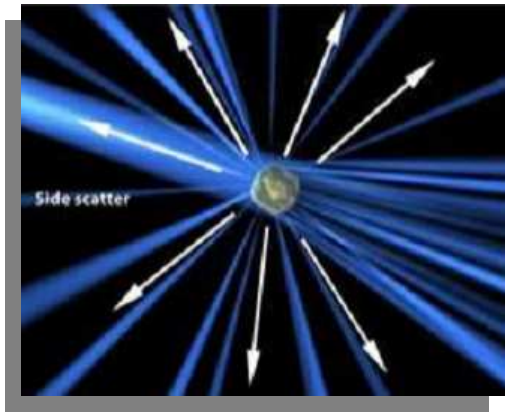
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

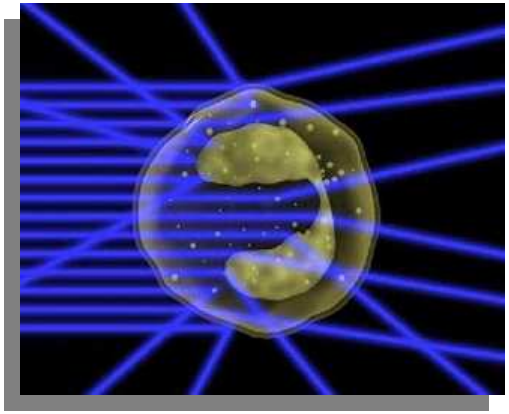
idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

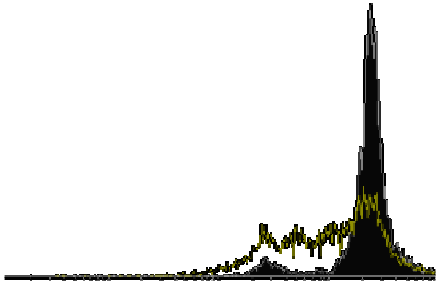
Óptica







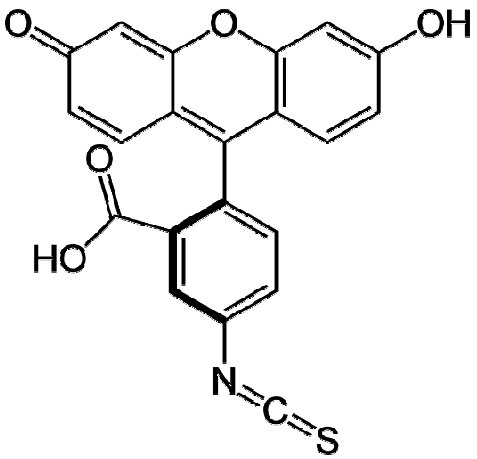


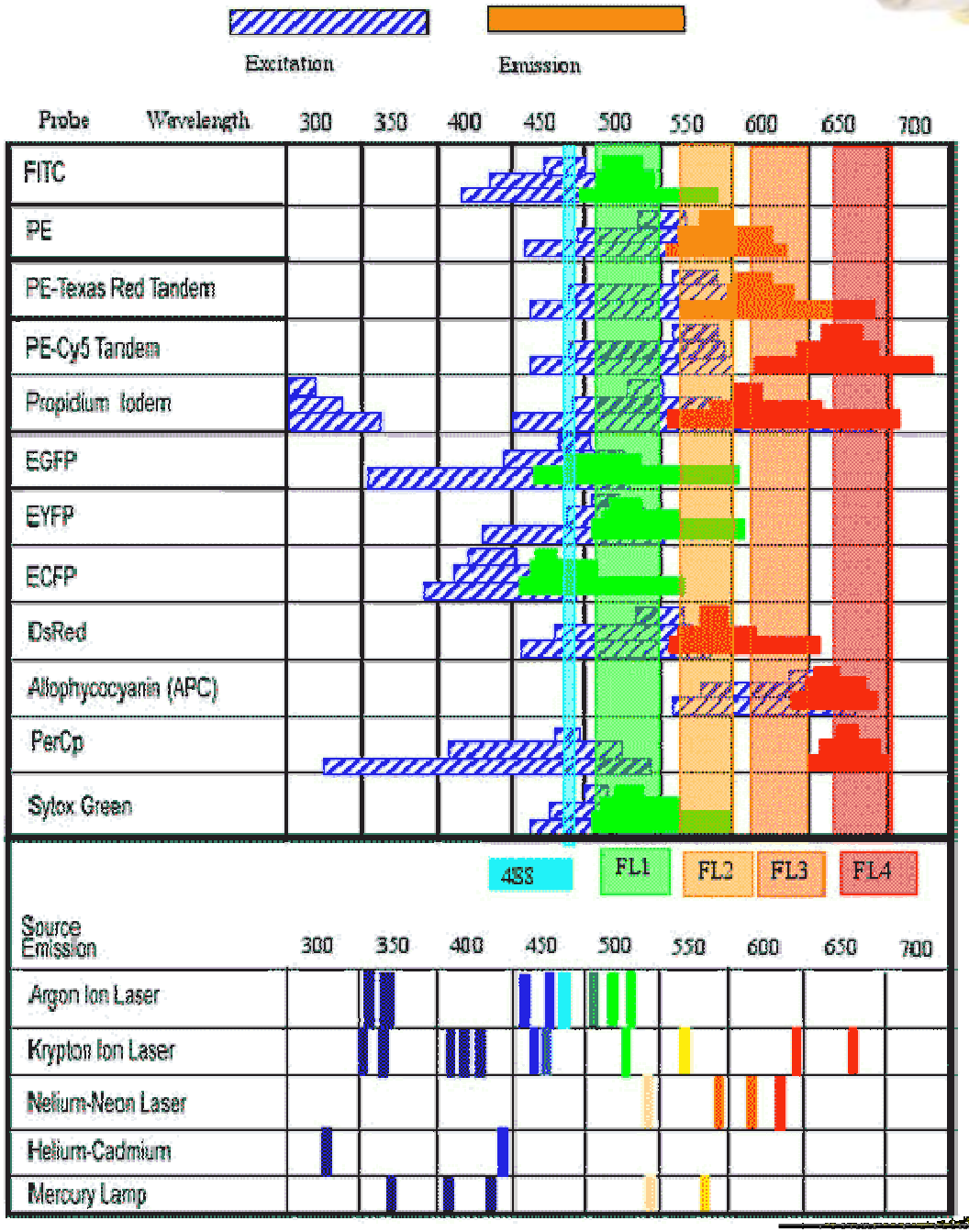


UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Fluorocromos

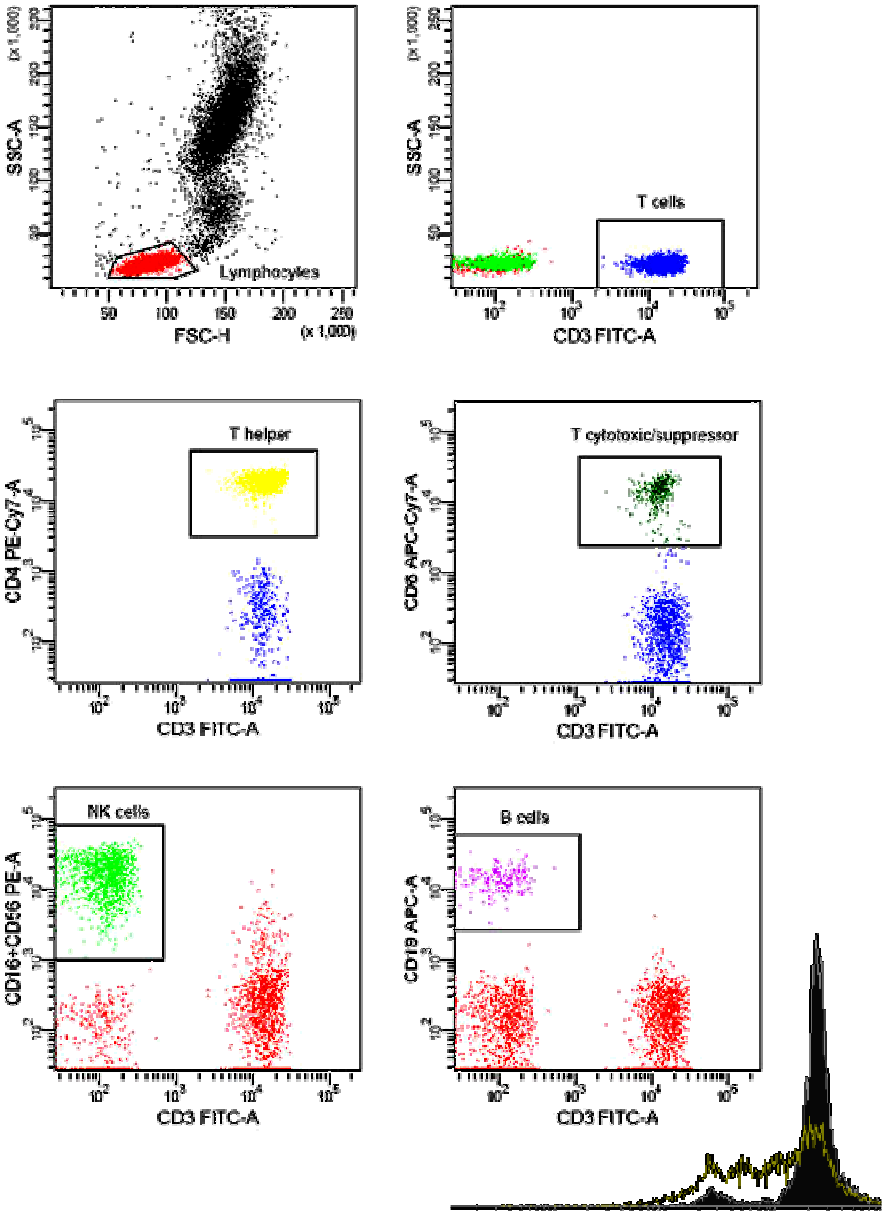




UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

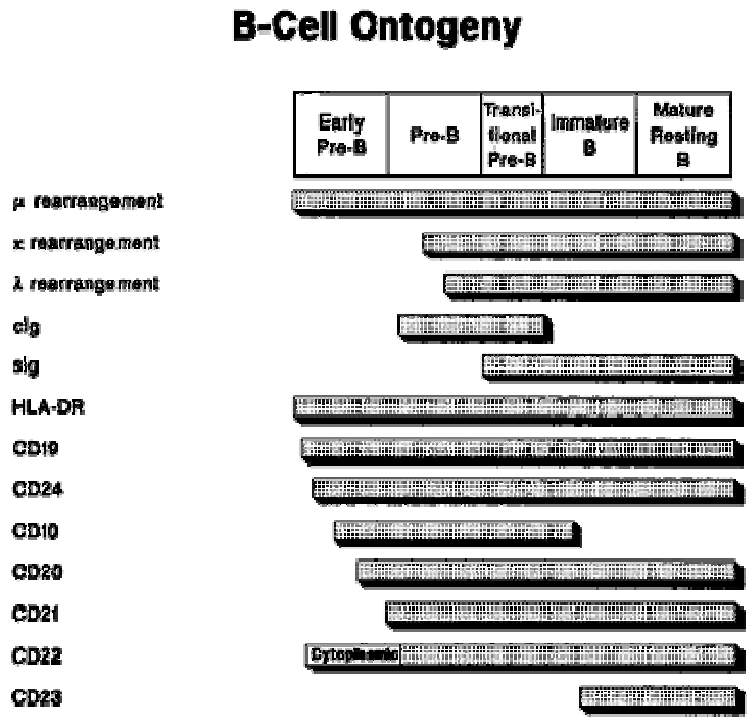
- Citometría de flujo

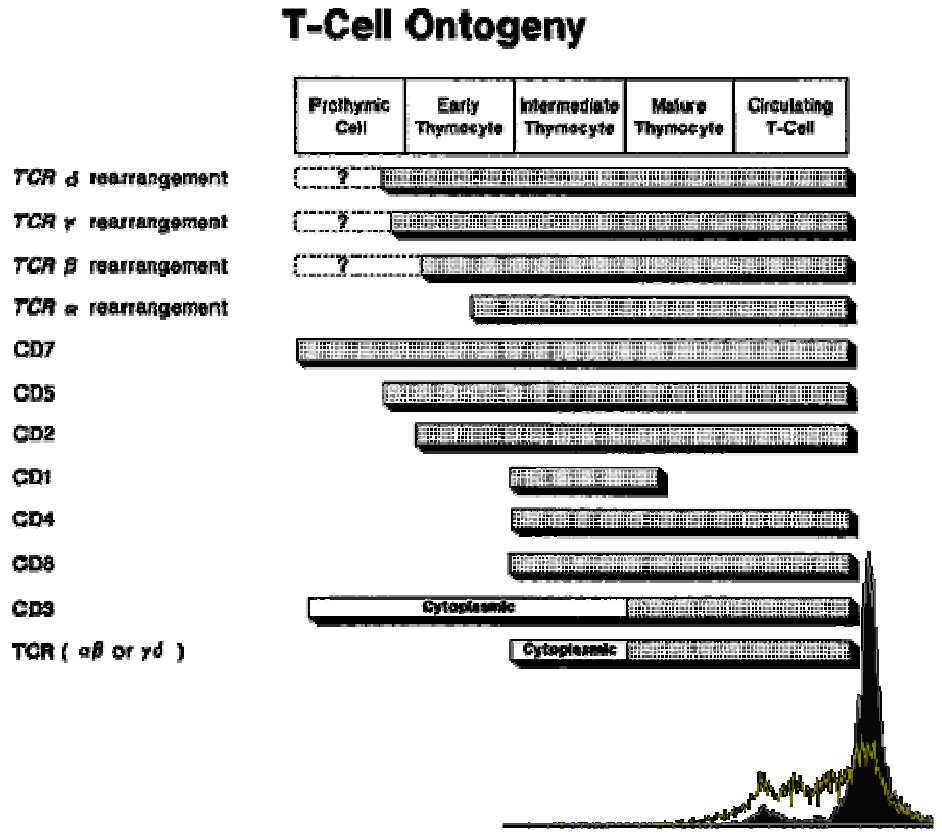


UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Utilidad: Evaluación de la función hematopoyética

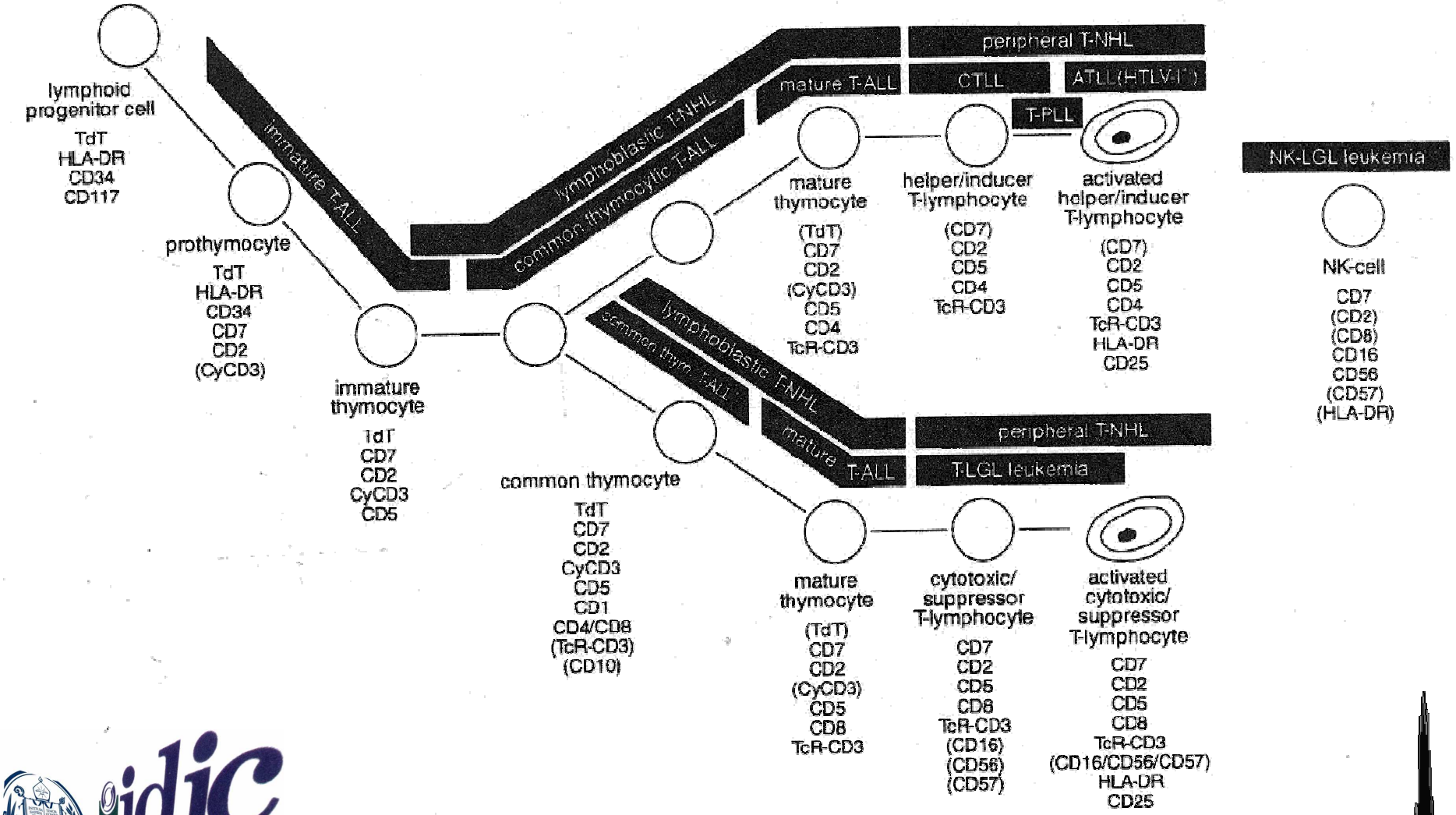




UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic
INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Utilidad: Leucemias linfoblásticas

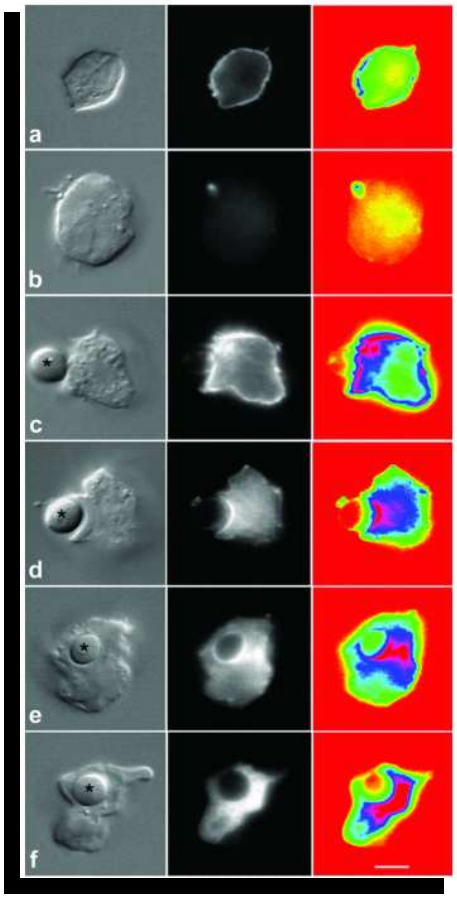


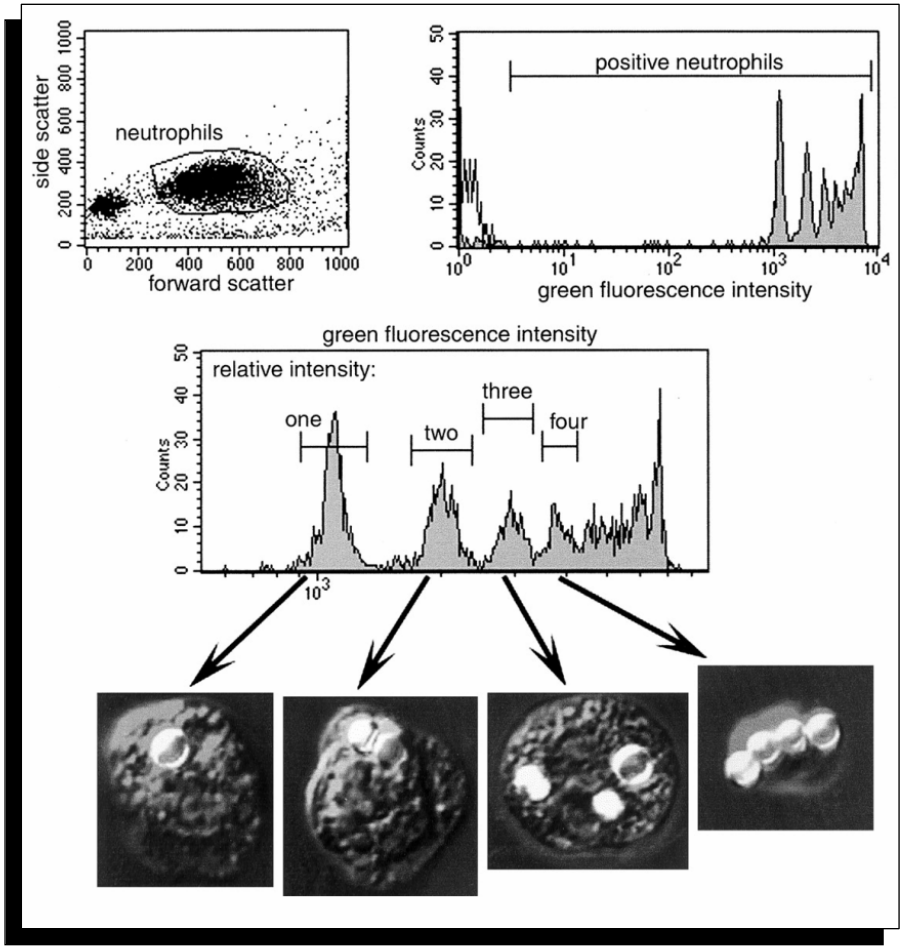
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

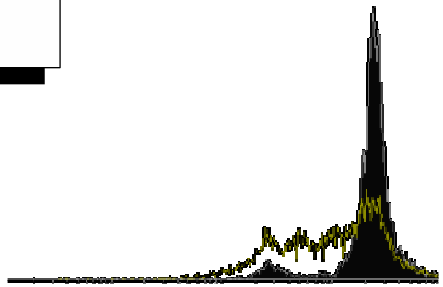
Evaluación de células fagocíticas

Fagocitosis





- **Látex**
- **Marcajes específicos**

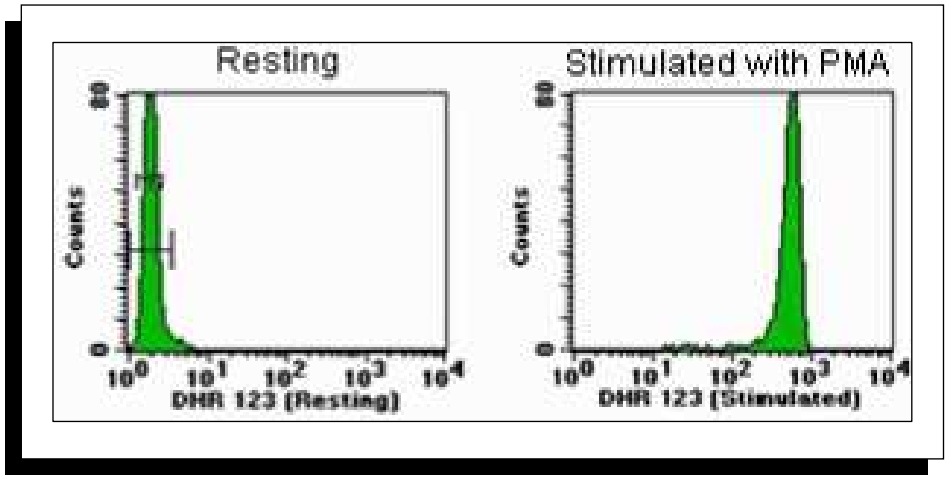


UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

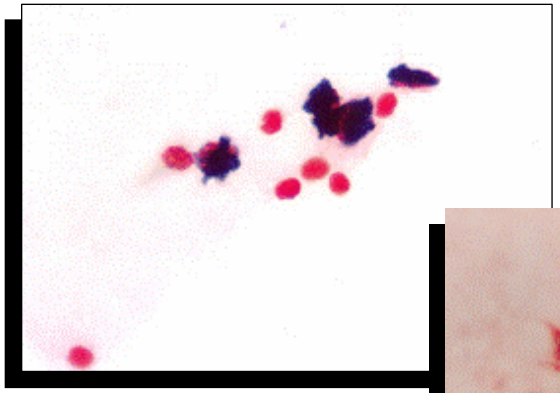
idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Evaluación de células fagocíticas

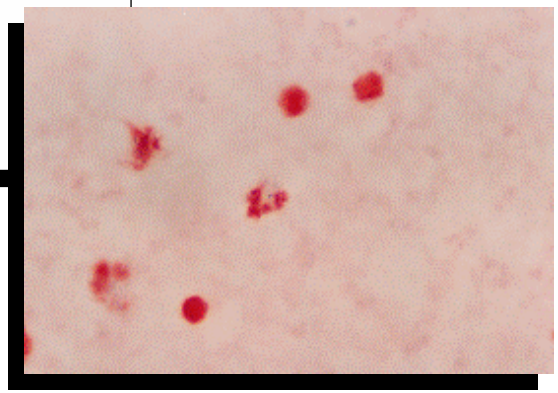
Estrés oxidativo

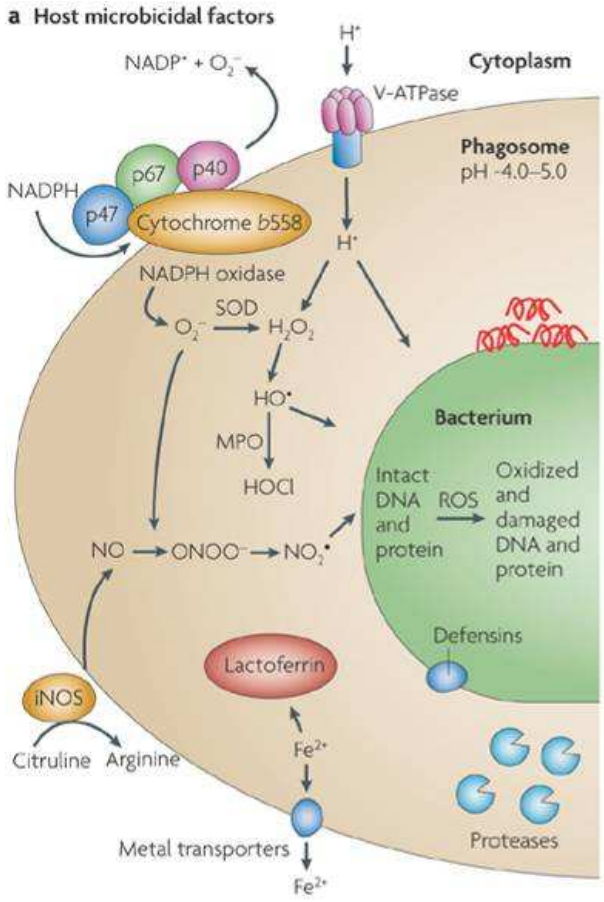


- **DHR / DHE**



- **NBT**





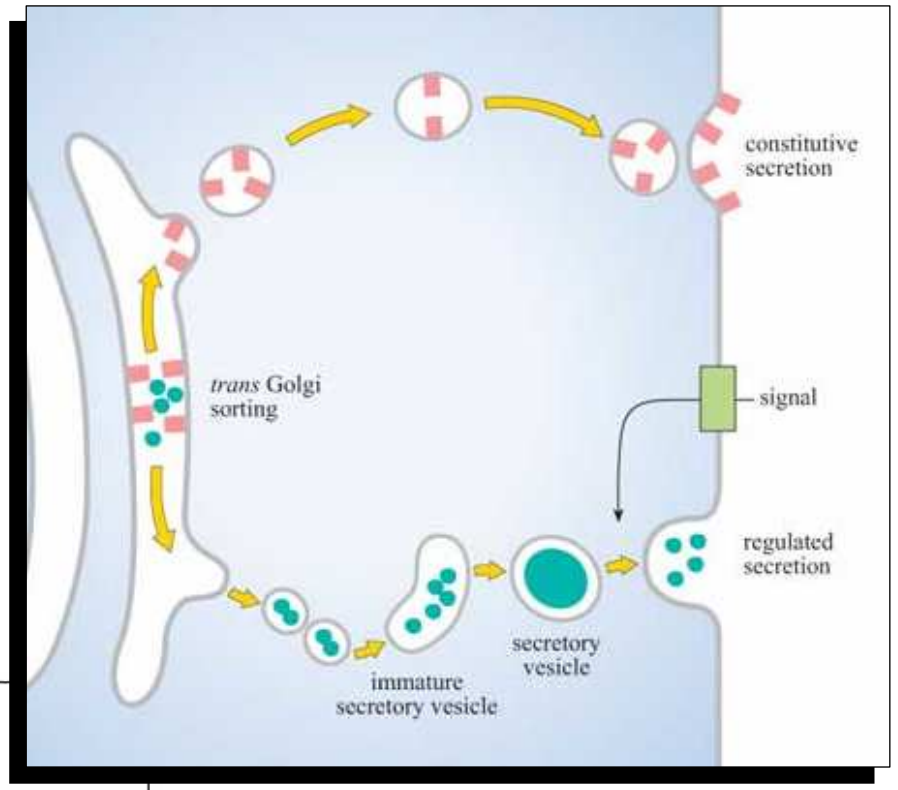
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

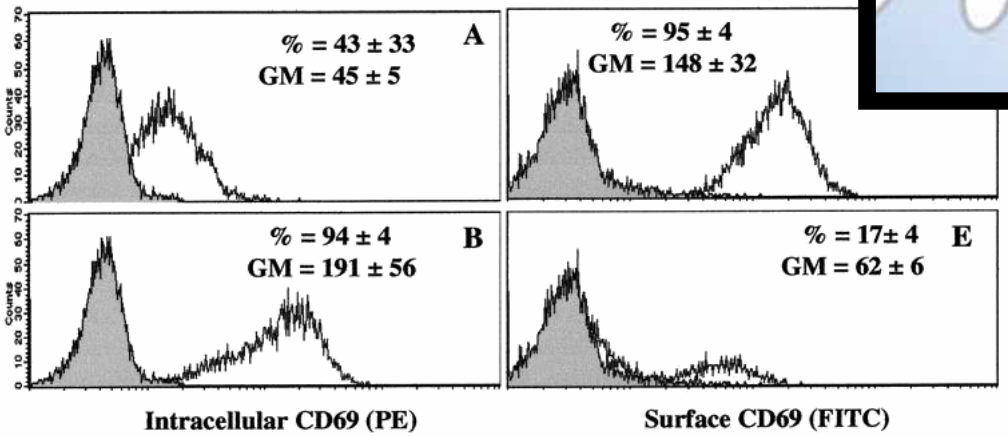
idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

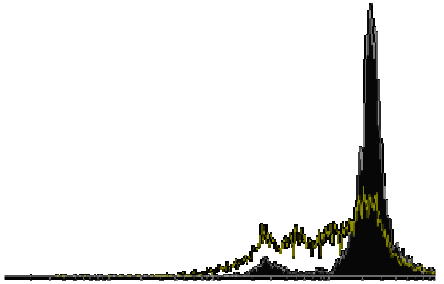
Evaluación de células T

Producción de citocinas/ marcadores intracelulares

- **Ionomicina / Brefeldina A**





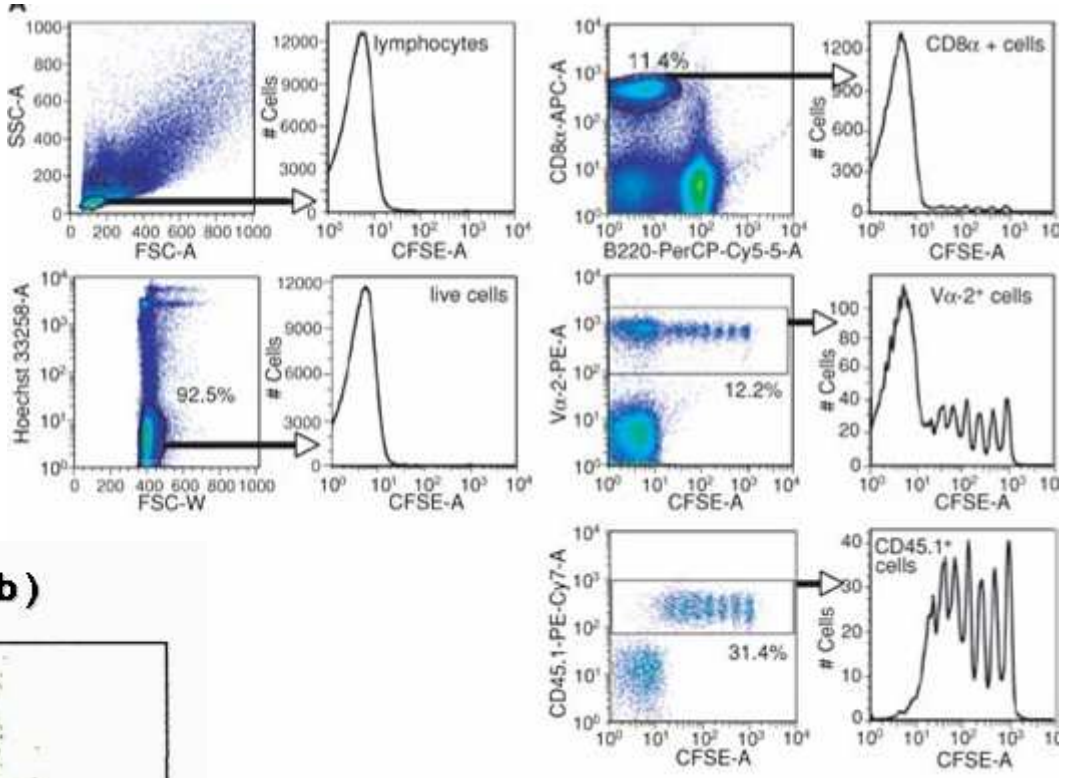


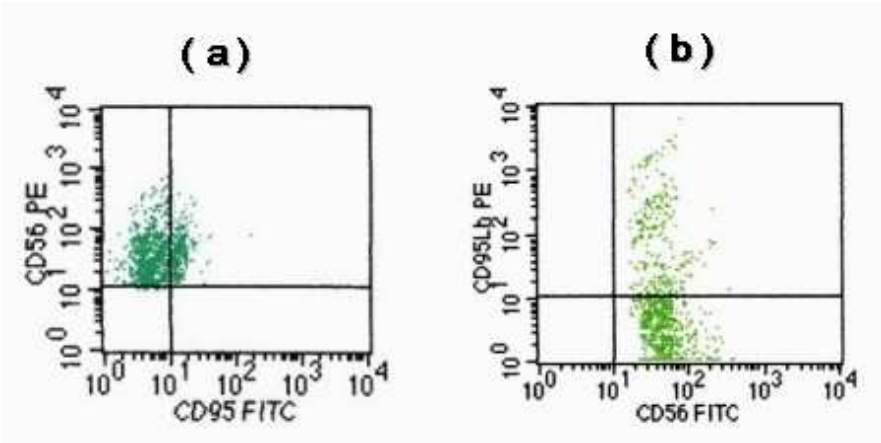
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

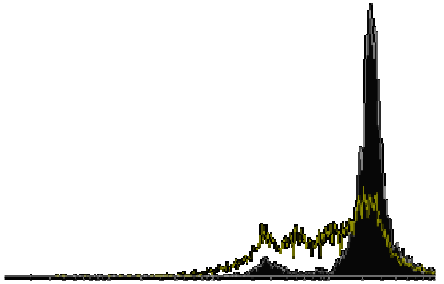
Evaluación de células T

Marcadores varios / FACS

FASTIMMUNE CD4/CD69/CD3
FASTIMMUNE CD8/CD69/CD3
FASTIMMUNE CD69/CD3
FASTIMMUNE γ_1/γ_1/CD3 Isotype Control
FASTIMMUNE CD2/CD2R Activation Control
FASTIMMUNE CD19/CD69/CD45
FASTIMMUNE CD56/CD69/CD45
FASTIMMUNE γ_1/CD45 Isotype Control







UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

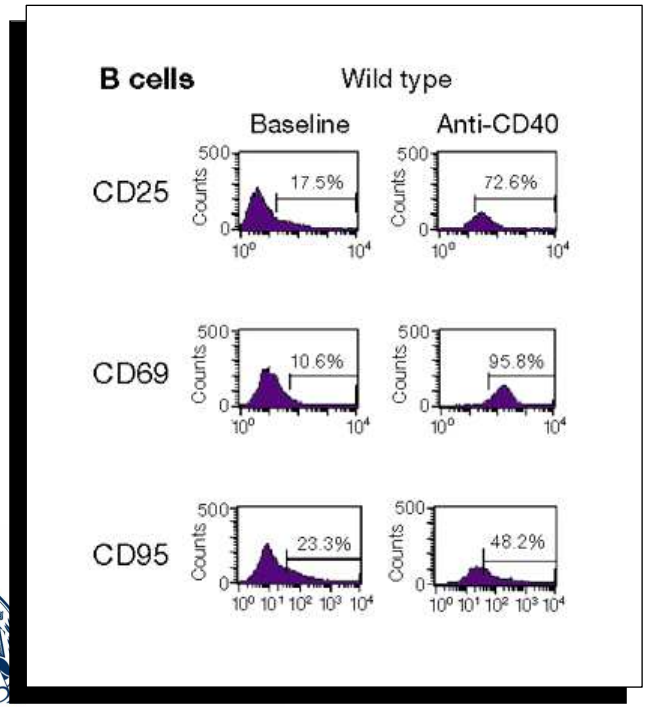
INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Evaluación de células B

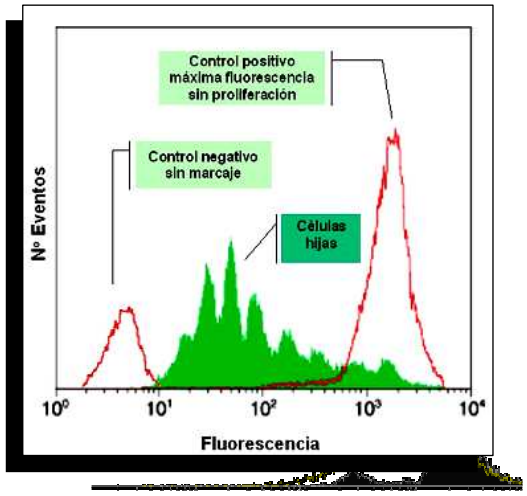
Marcadores varios / FACS

Becton Dickinson
Procedures

Flow Cytometric Procedure for Assessing Lymphocyte Activation

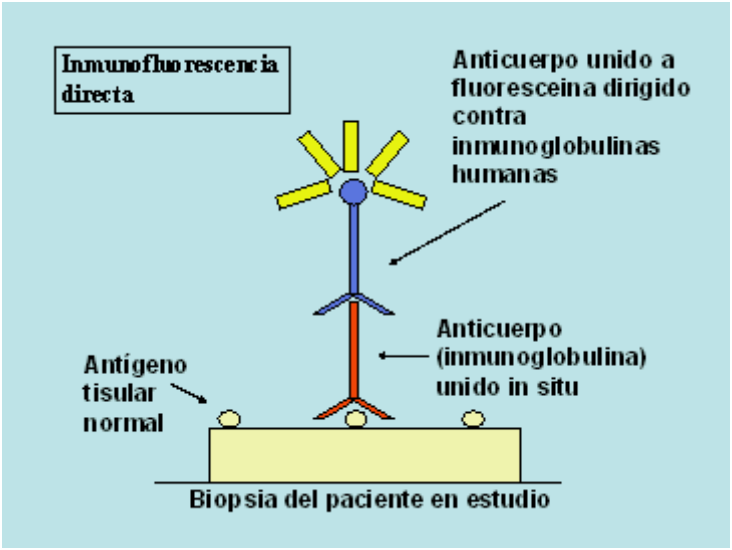


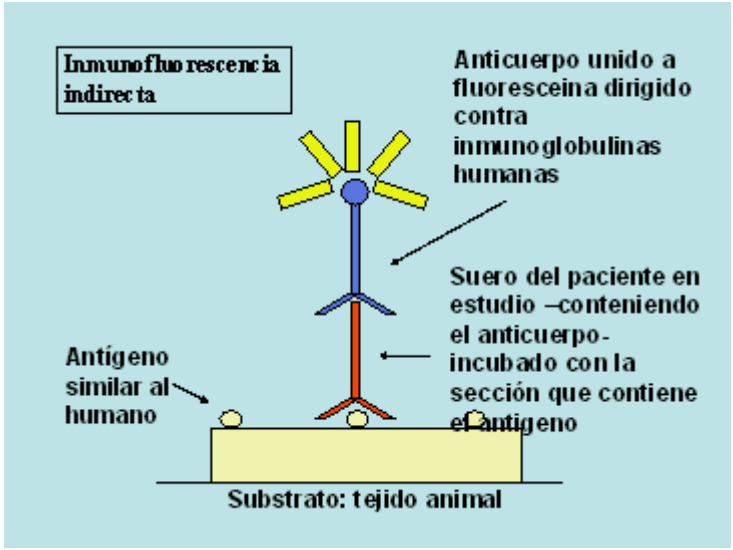
FASTIMMUNE CD4/CD69/CD3
FASTIMMUNE CD8/CD69/CD3
FASTIMMUNE CD69/CD3
FASTIMMUNE γ_1/γ_1/CD3 Isotype Control
FASTIMMUNE CD2/CD2R Activation Control
FASTIMMUNE CD19/CD69/CD45
FASTIMMUNE CD56/CD69/CD45
FASTIMMUNE γ_1/CD45 Isotype Control



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

Inmunofluorescencia





UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

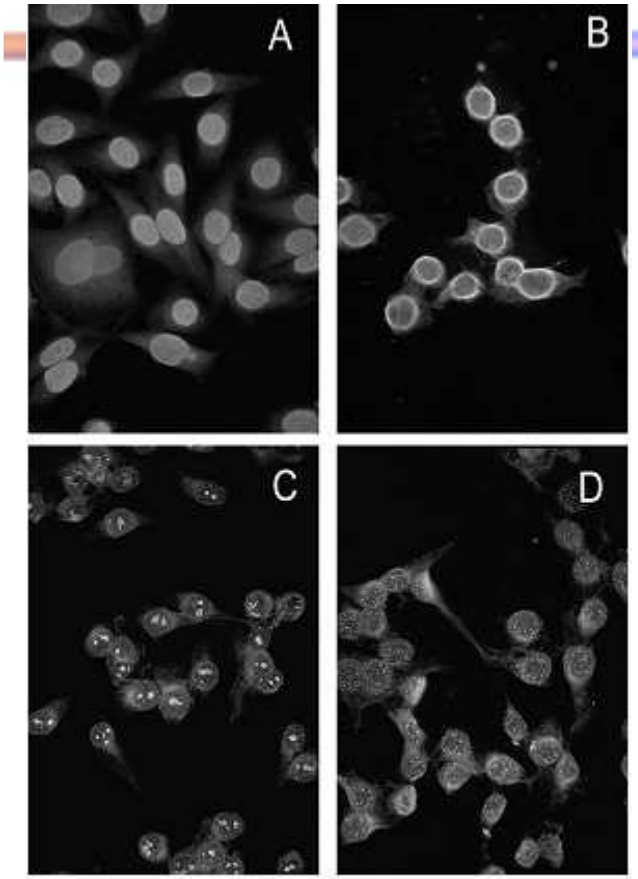
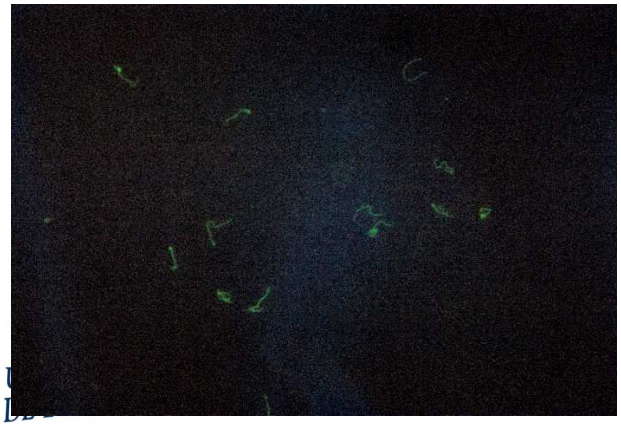
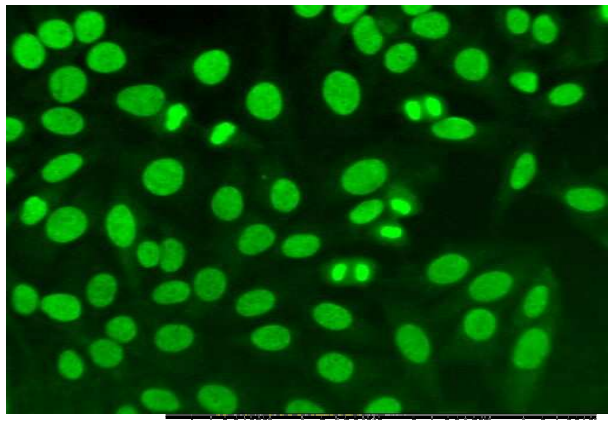


Figura 12.3: Patrones de inmunofluorescencia en la determinación de anticuerpos antinucleares. (A) patrón difuso; (B) patrón periférico; (C) patrón nucleolar; (D) patrón moteado.

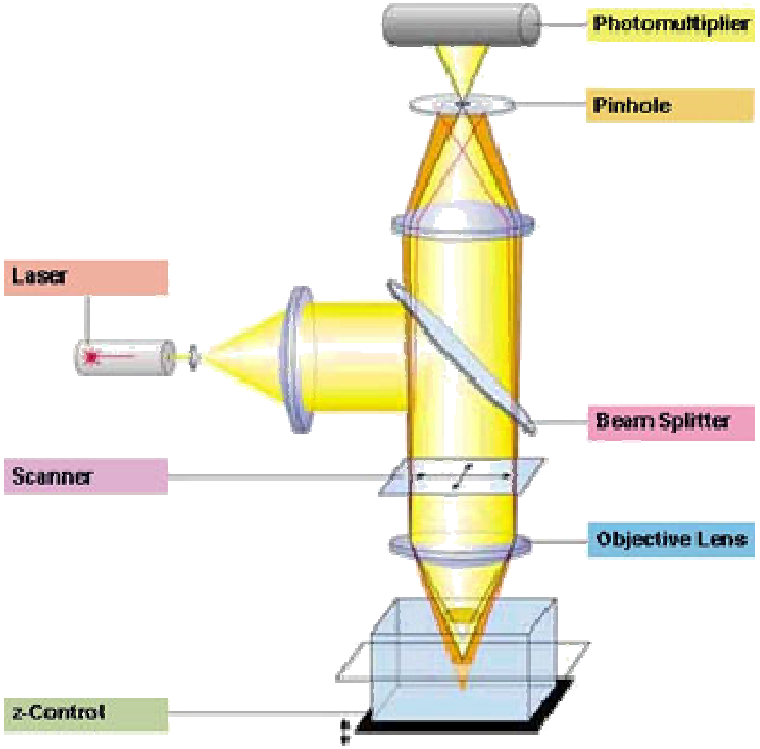
Inmunofluorescencia

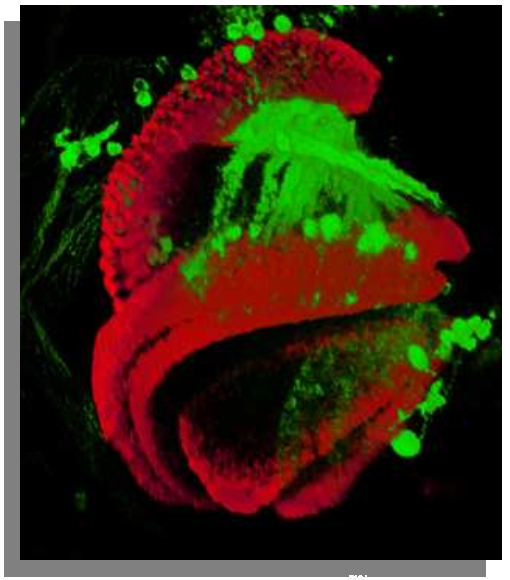
- ✓Anticuerpos Antinucleares (IFI Hep-2)
- ✓Anticuerpos Anti DNA
- ✓Anticuerpos Antimitocondria
- ✓Anticuerpos Antimúsculo Liso
- ✓Anticuerpos contra Polimorfonuclear Neutrófilo (ANCAS)
- ✓Anti-FTA

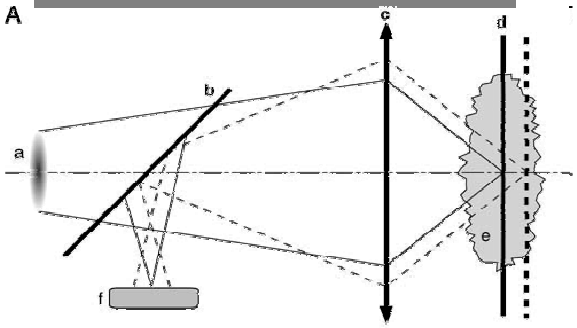


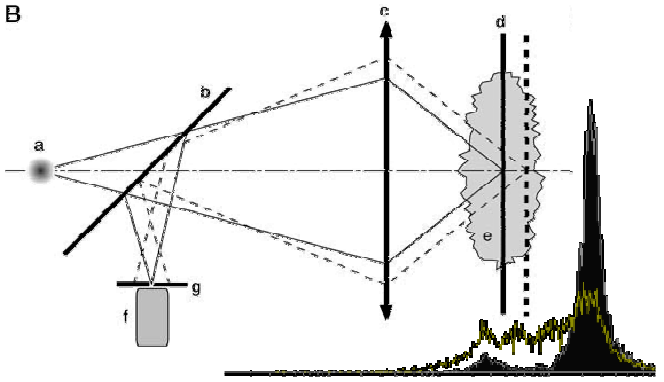


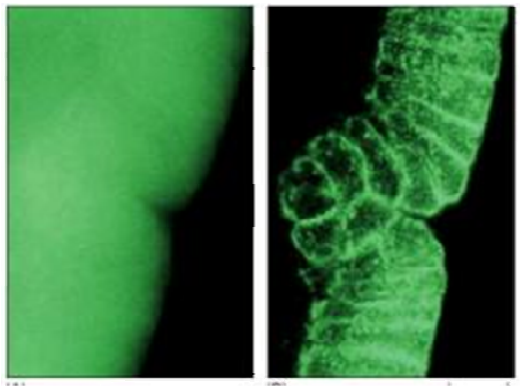
Microscopía confocal









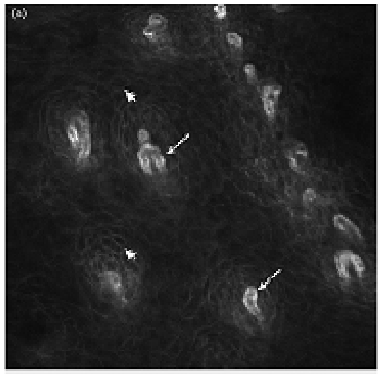


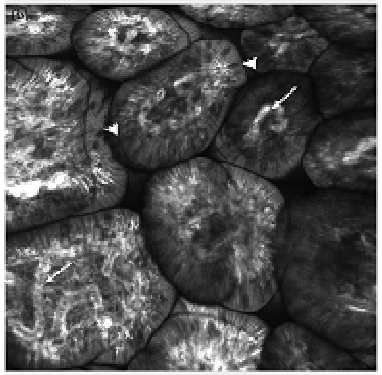
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

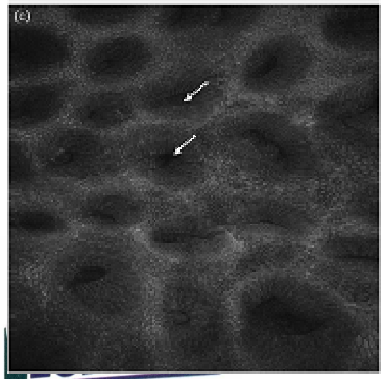
idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Microscopía confocal

Aplicaciones!!!







Confocal endomicroscopy

Kerry Dunbar and Marcia Canto

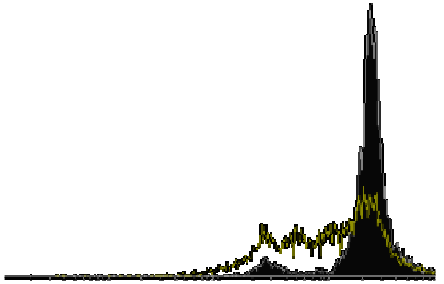
Current Opinion in Gastroenterology 2008, 24:631–637

Table 2 Comparison of reported performance characteristics in endomicroscopy studies

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
CLE pattern classification for colorectal pathology [5]	97.4	99.4	99.2
GI neoplasia–miniprobe CLE [4•]	93.1	92.1	92.4
Chromoendoscopy-guided CLE in UC [7••]	94.7	98.3	97.8
Chromoendoscopy-guided CLE in UC [8•]	94	92	–
CLE for DALM and ALM [9••]	100	96.6	97
Chromoendoscopy-guided CLE for polyps [10]	97.4	99.3	99.1
CLE for distinguishing adenoma vs. hyperplastic polyps [11]	83	100	89
Confocal Barrett's esophagus classification [12]	92.3	98.4	97.4
CLE-guided EMR [13]	94	50	–
Esophageal squamous cell carcinoma [14•]	100	87	95
Gastric pit pattern			
Neoplasia	90	99.4	97.1
Atrophy	83.6	99.6	97.5
Gastritis [15••]	81.9	99.3	95.8
Confocal celiac criteria [16]	70	95	80
Fluorescent peptide for colon dysplasia–confocal miniprobe [17••]	81	82	

ALM, adenoma-like masses; CLE, confocal laser endomicroscopy; DALM, dysplasia-associated lesional masses; EMR, endoscopic mucosal resection; GI, gastrointestinal; UC, ulcerative colitis.

- ✓ FITC sódica
- ✓ Violeta de Cresilo
- ✓ Acriflavina HCL



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

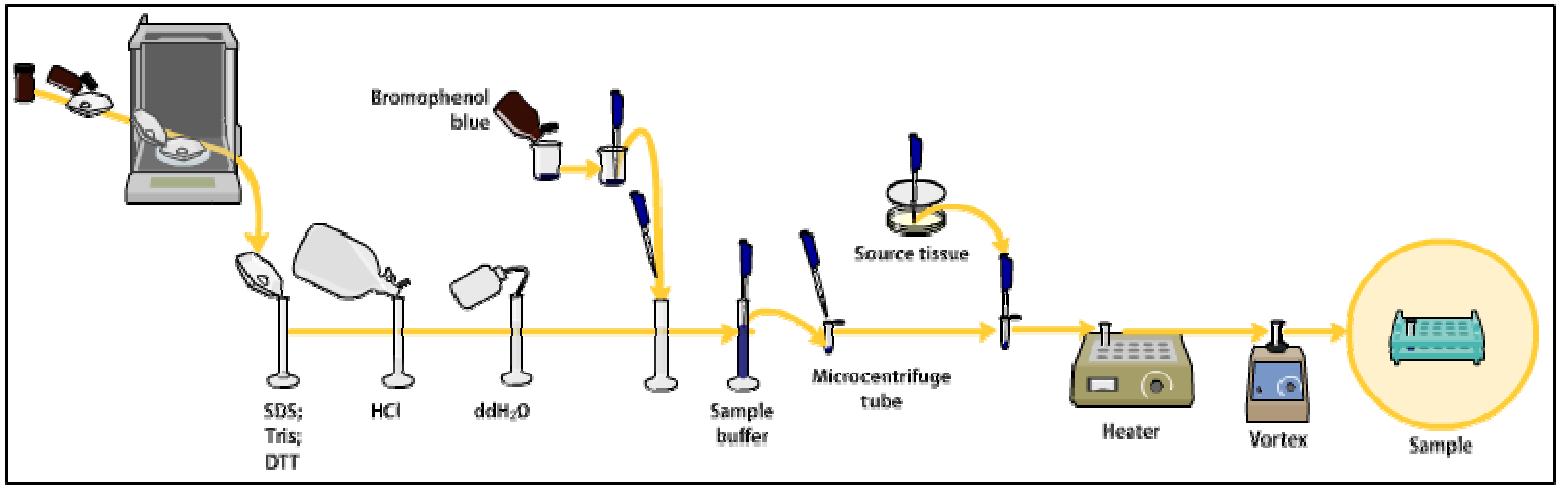
Electroforesis de proteínas

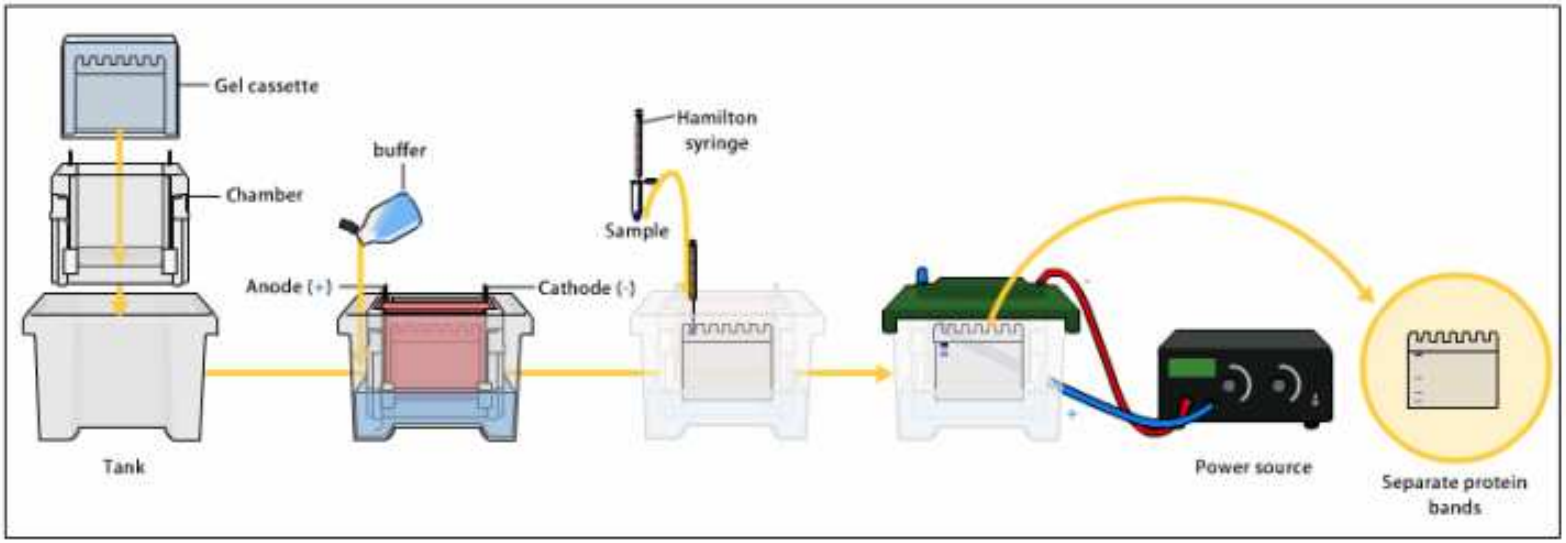
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

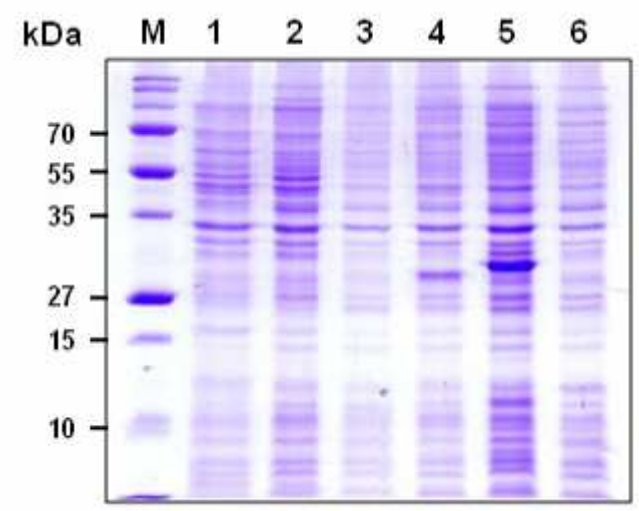
ELECTROFORESIS

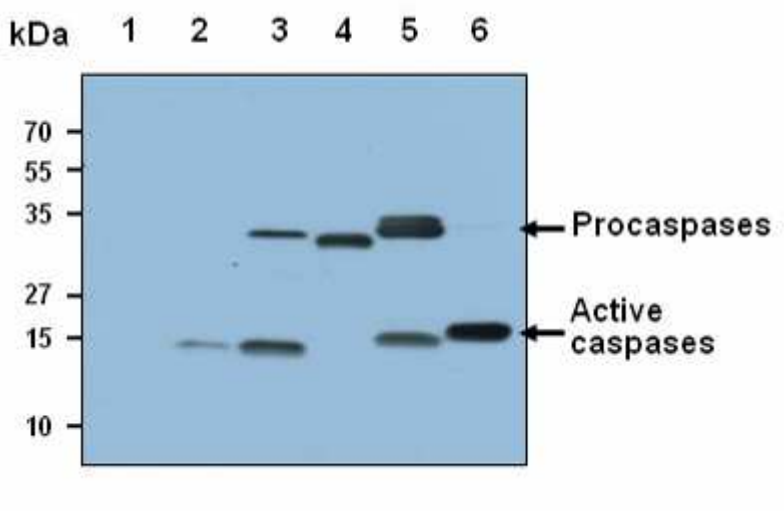
Pasos básicos





WESTERN BLOTTING





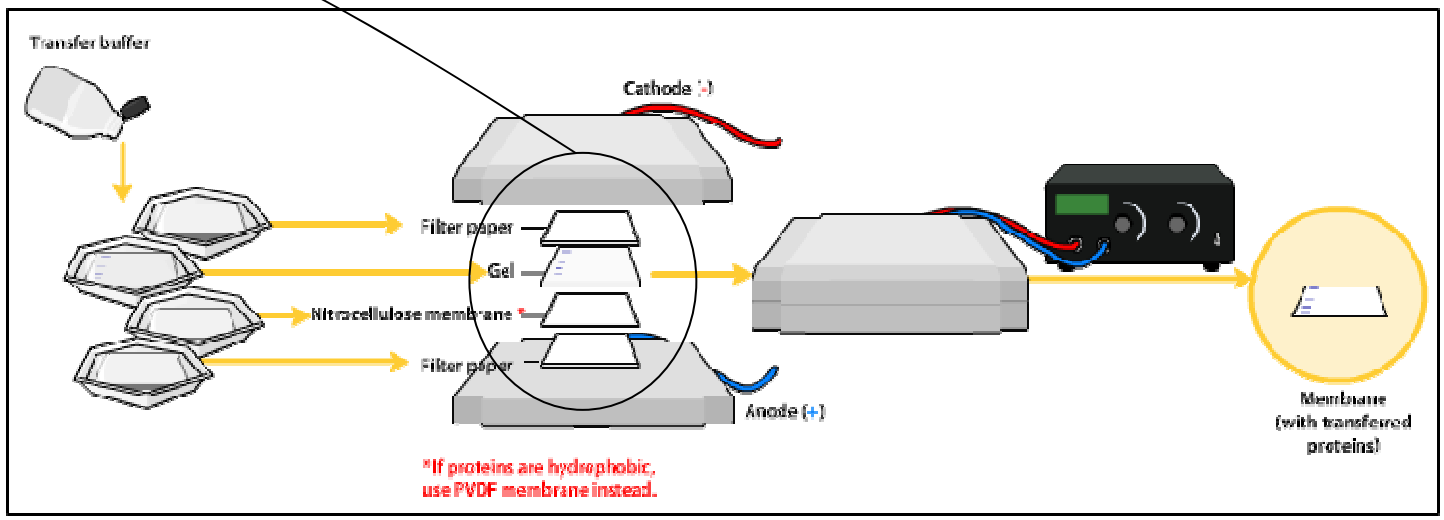
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

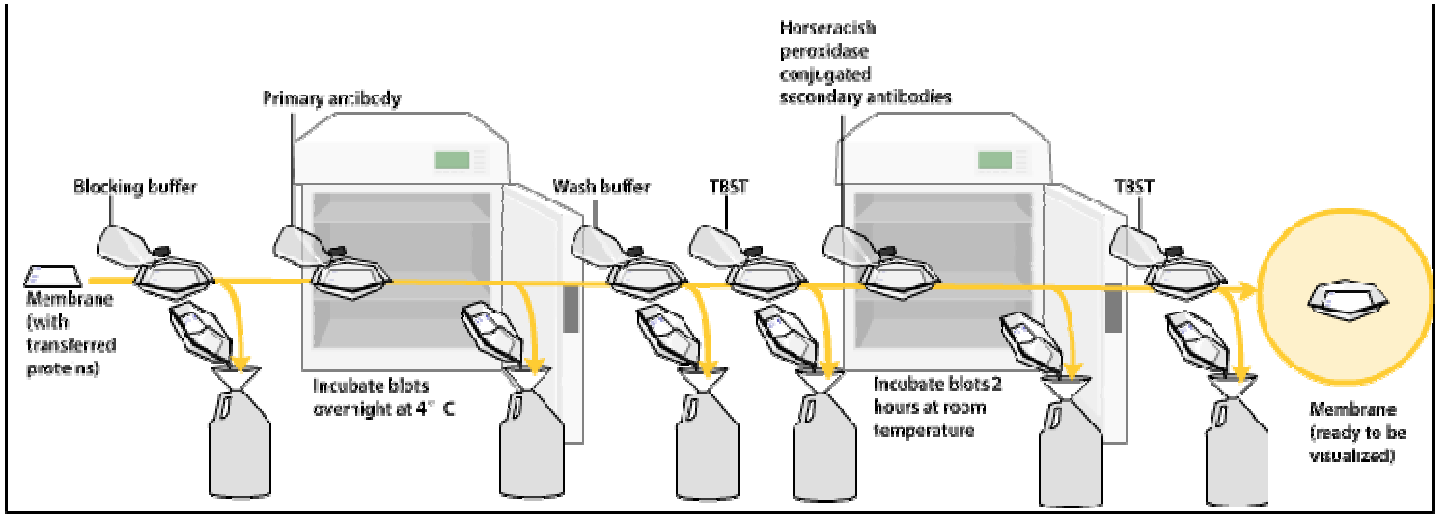
idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

WESTERN BLOTTING

Pasos básicos

- Difusión.
- Capilaridad (southern like).
- Electroforética.



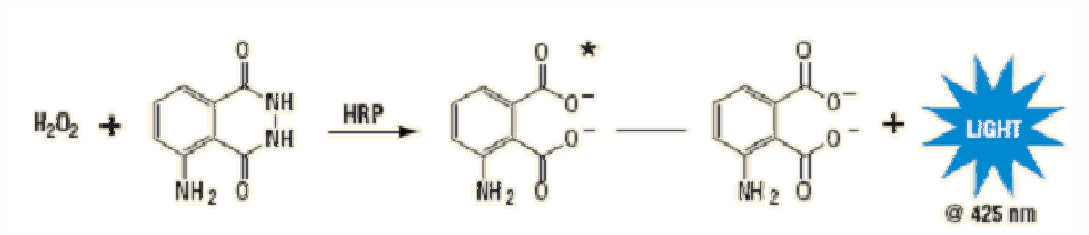


UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

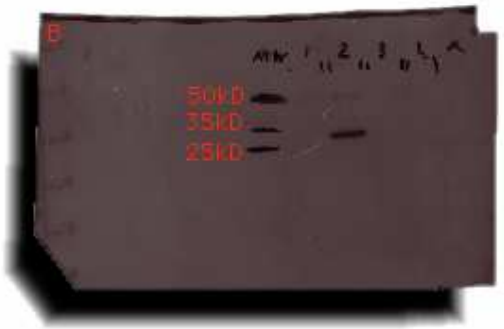
idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

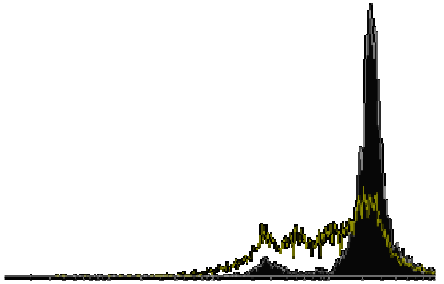
WESTERN BLOTTING

Luminol



- Múltiples exposiciones de la membrana hasta conseguir la mejor imagen.
- Permite la detección cualitativa y cuantitativa en un mayor rango de concentraciones
- Los sustratos quimioluminiscentes proporcionan la mayor sensibilidad.



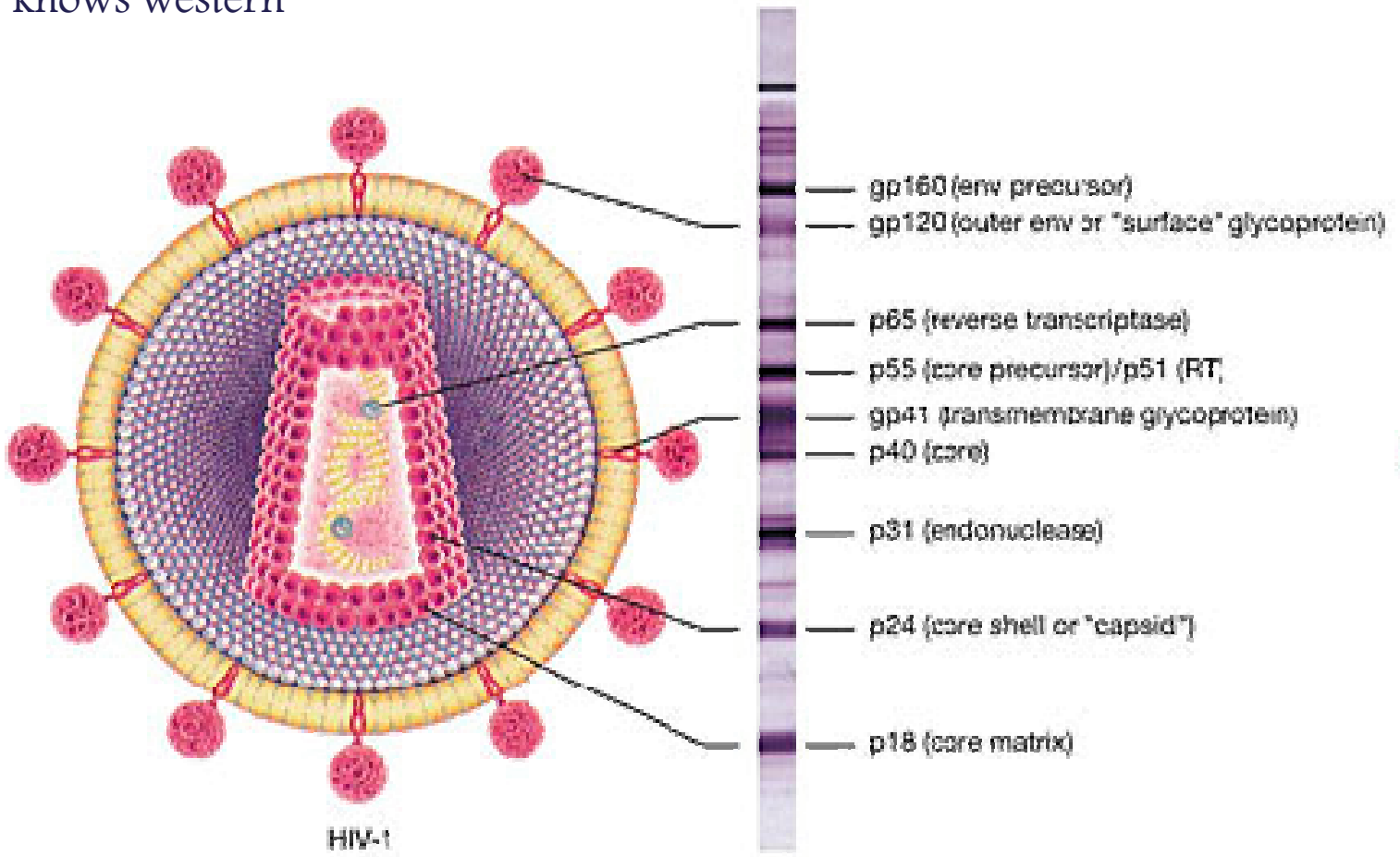


UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

WESTERN BLOTTING

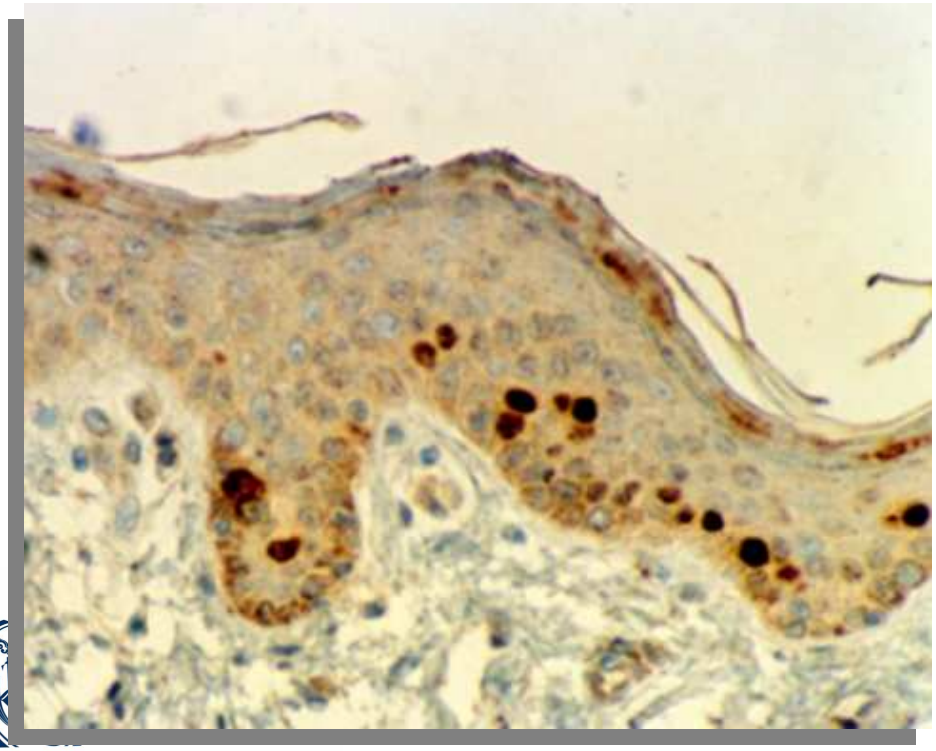
Everybody knows western

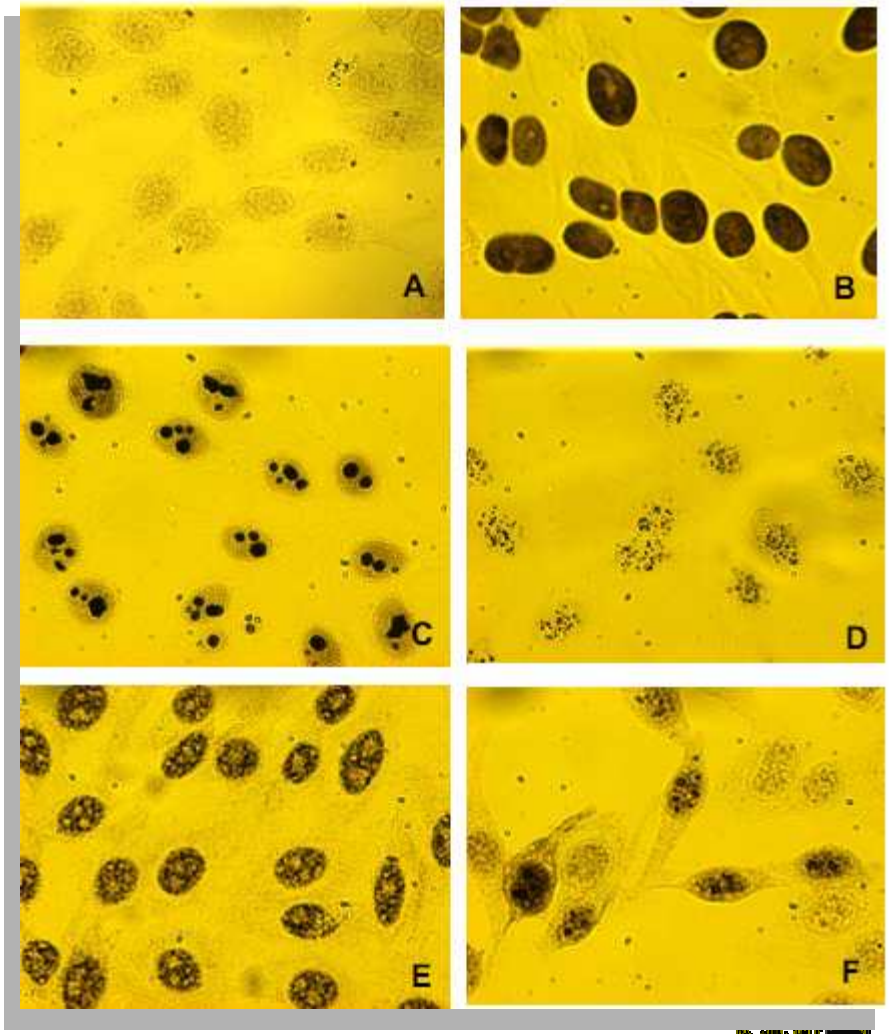


UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Inmunohistoquímica



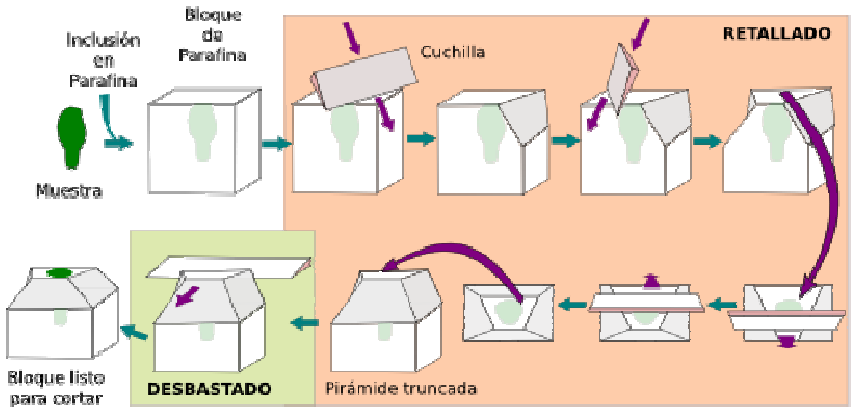


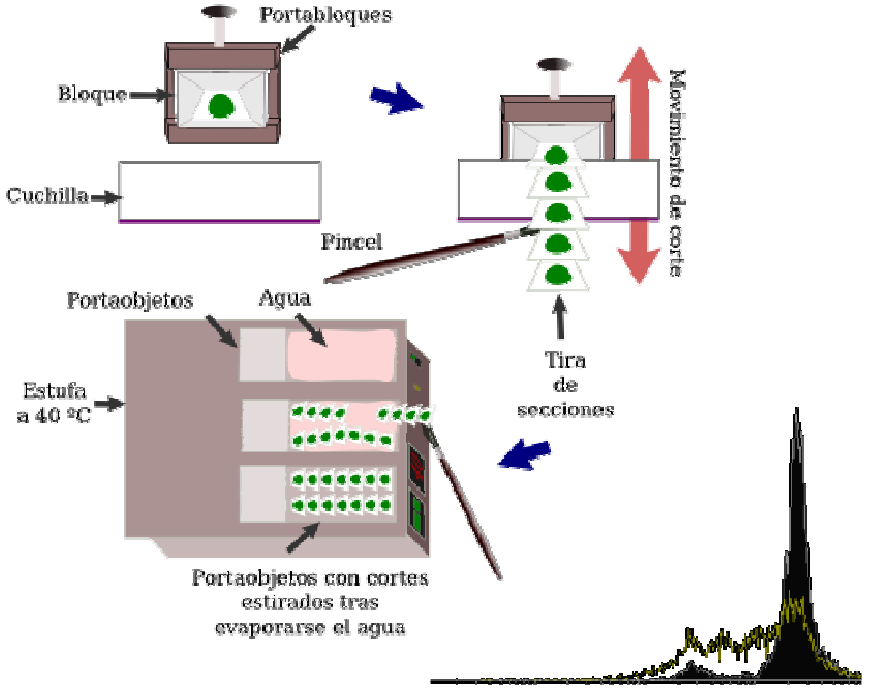
UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES

Inmunohistoquímica

Montaje de la muestra

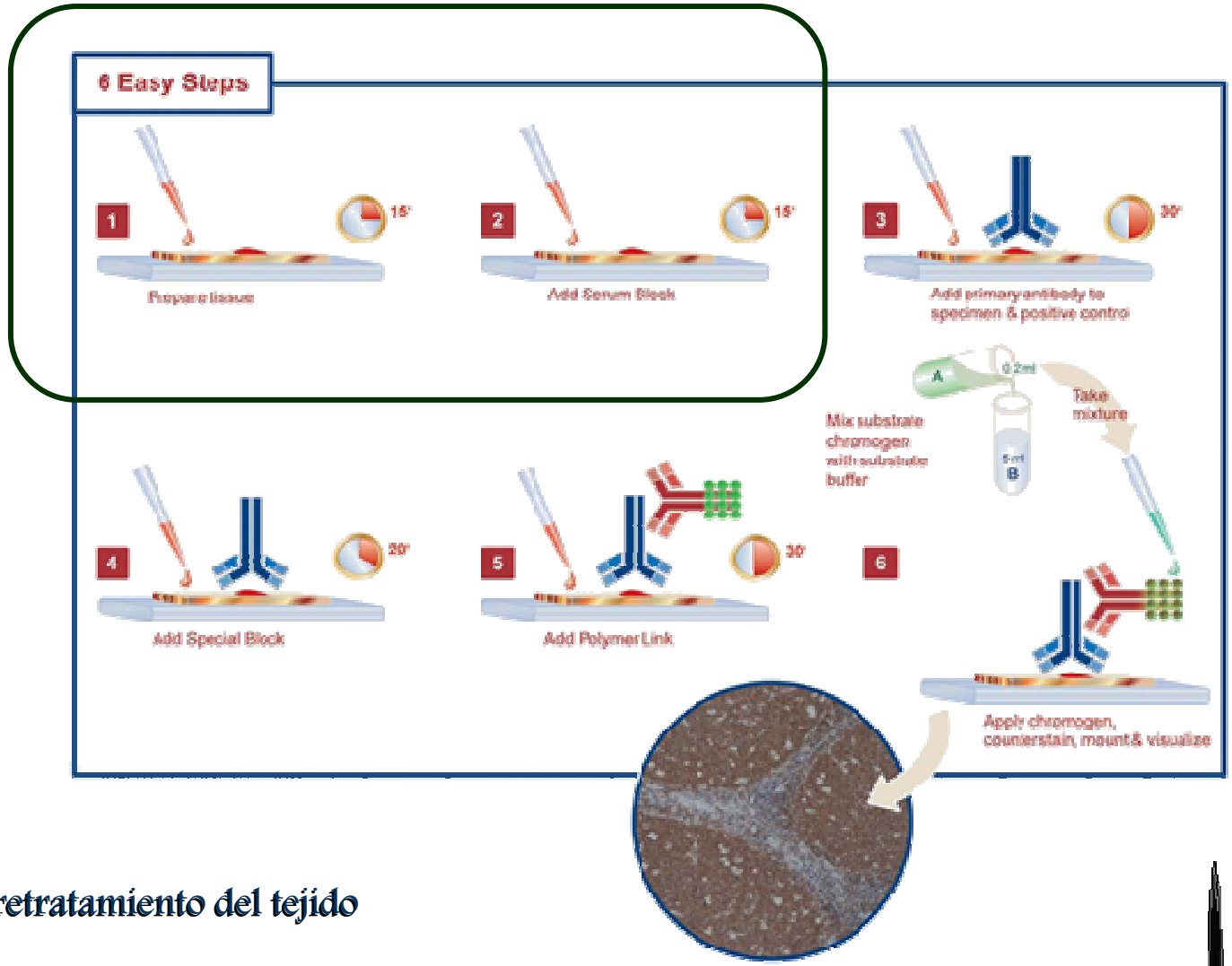
- ✓ Fijado e inclusión en parafina
- ✓ Cortado ultrafino
- ✓ Montaje en laminas





UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Inmunohistoquímica



Pretratamiento del tejido

- ✓ Tratamientos proteolíticos o por calentamiento
- ✓ Inhibición de actividades endógenas indebidas
- ✓ Bloqueo

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

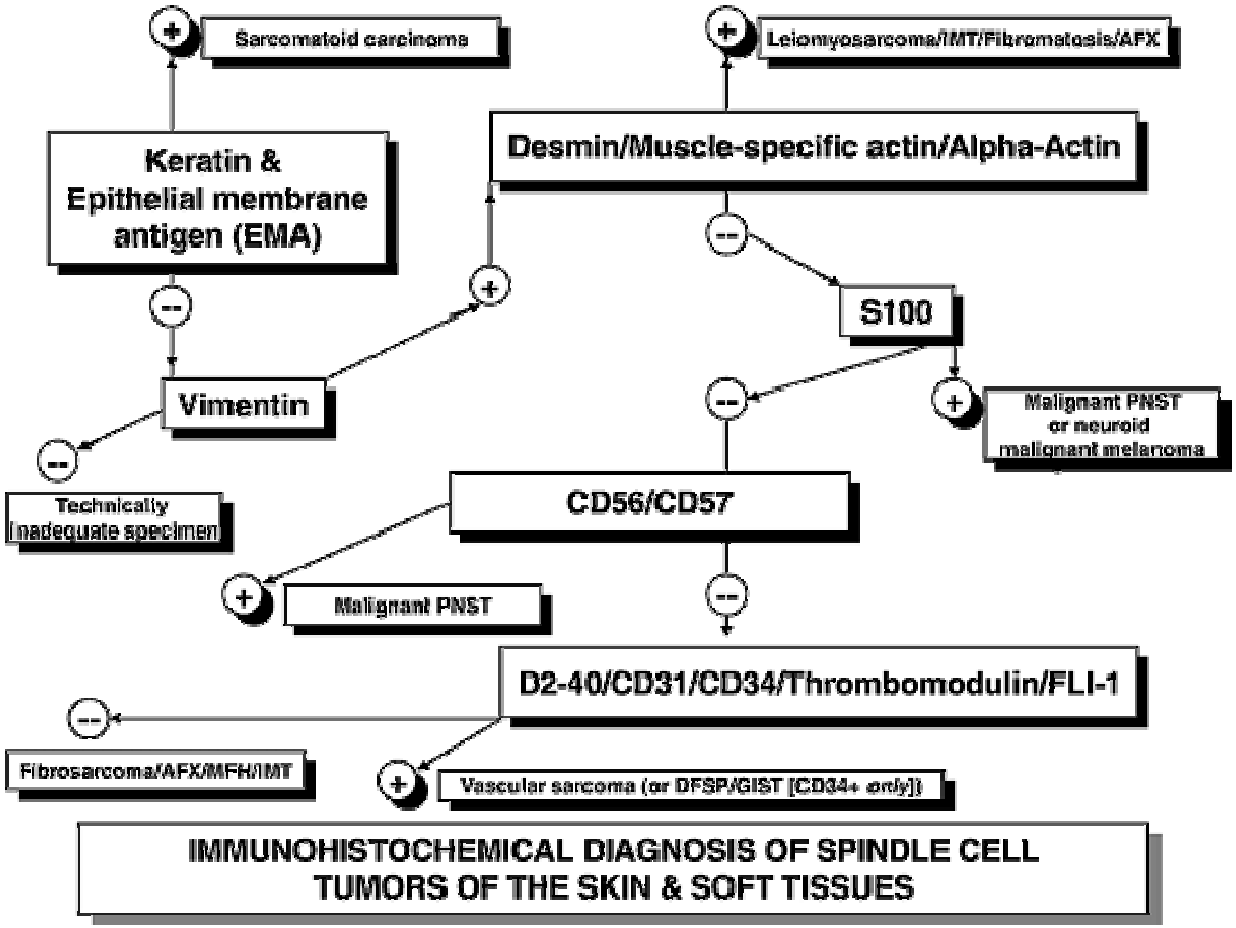
idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Inmunohistoquímica

Aplicaciones!!!

Immunohistochemical approaches to the diagnosis of undifferentiated malignant tumors

Annals of Diagnostic Pathology 12 (2008) 72–84



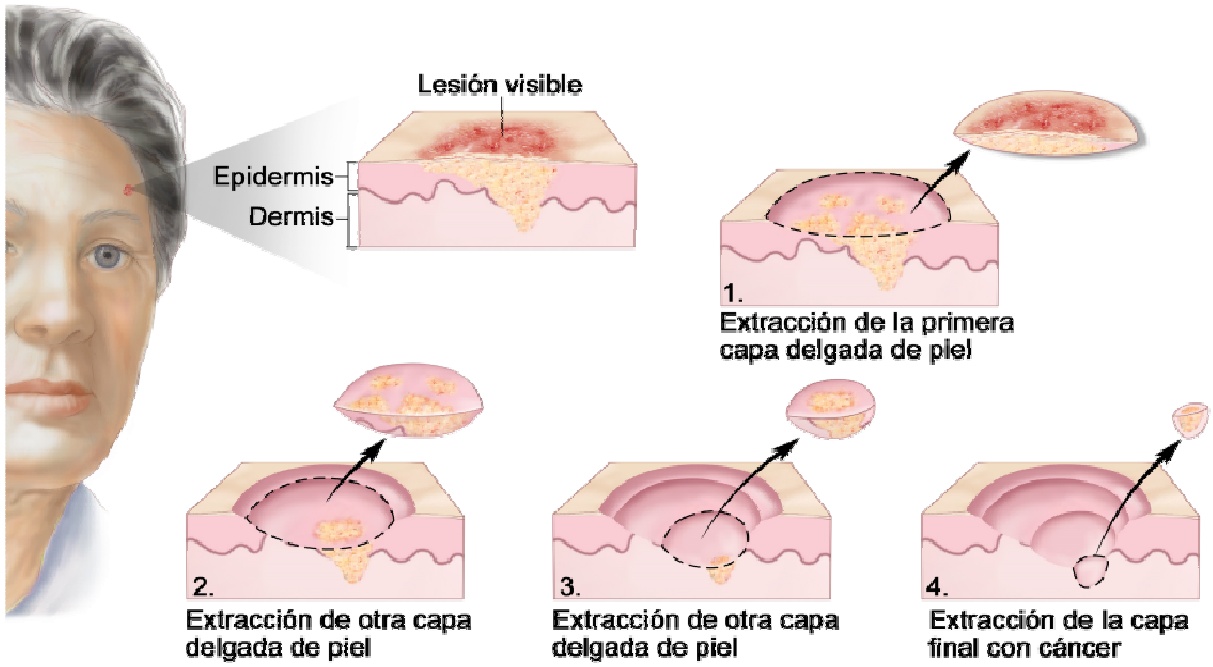
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

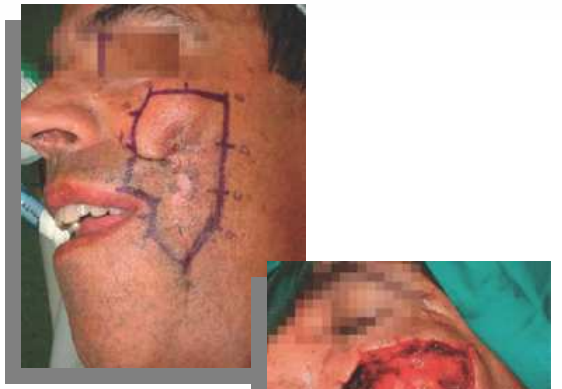
idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

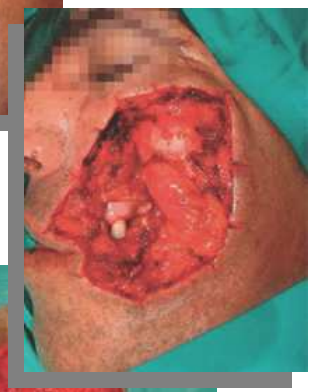
Inmunohistoquímica

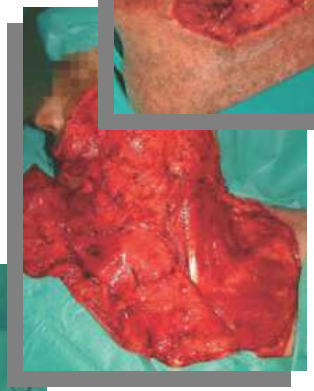
Aplicaciones!!!

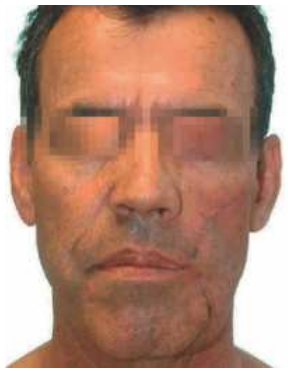
Current Progress of Immunostains in Mohs Micrographic Surgery: A Review

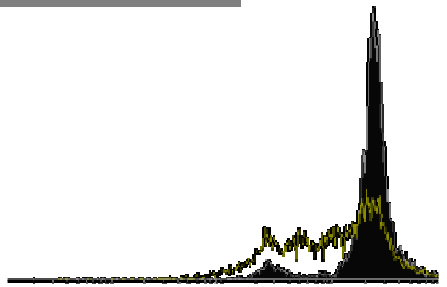












UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic
INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA

Inmunohistoquímica

Aplicaciones!!!

Current Progress of Immunostains in Mohs Micrographic Surgery: A Review

Dermatol Surg 2008;34:1621–1636

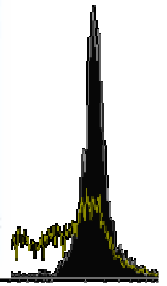
TABLE 1. Tumor Types Treated with Mohs Micrographic Surgery and Immunohistochemistry

Tumor	*Immunostain*
Melanoma, lentigo maligna, lentigo maligna melanoma	Mel-5, human melanoma black-45, Melan-A/melanoma antigen recognized by T-cells, S100
Desmoplastic melanoma, spindle cell melanoma	S100
Basal cell carcinoma	(+) stains = cytokeratins (AE1/AE3), Ki67, Ber-EP4, proliferating cell nuclear antigen (–) stains = desmogleins, CD34
Squamous cell carcinoma	(+) stains = cytokeratins (AE1/AE3) (–) stains = desmogleins
Microcystic adnexal carcinoma	(+) stains = CK1, AE1/AE3, CK19, EMA, CEA (–) stain = CK20
Dermatofibrosarcoma protuberans	(+) stain = CD34 (–) stains = factor XIIIa, tenascin (negative at DEJ only), HMGA1, HMGA2, CD163
Mucinous carcinoma[116]	Low molecular weight cytokeratin (Cam 5.2)
Extramammary Paget's disease	CK7
Atypical fibroxanthoma	(+) stain = CD10 (–) stain = S100, CD34
Malignant nodular hidradenoma[117,118]	(+) stains = estrogen receptor, cytokeratin, EMA, CEA (–) stain = progesterone receptor
Sebaceous carcinoma	(+) stains = AE1/AE3, Cam 5.2, p53, Ki67, EMA, BRST-1 (–) stains = p21, bcl-2
Merkel cell carcinoma	(+) stains = CK20, synaptophysin (–) stains = thyroid transcription factor 1
Atypical cellular neurothekeoma[119]	(+) stains = nonspecific esterase, vimentin (–) stain = S100
Syringomatous carcinoma[120]	(+) stains = high- and low-molecular-weight cytokeratins, CEA (–) stain = patchy S100
Trichilemmal carcinoma[121]	(+) stains = CK17, c-erb-B2 (–) stain = CK15
Embryonal rhabdomyosarcoma[122]	Vimentin, S100, MyoD1
Granular cell tumor[123–125]	S100
Infantile digital fibroma[126]	Actin

EMA = epithelial membrane antigen; CEA = carcinoembryonic antigen; HMG = high mobility group; DEJ = dermo-epidermal junction.

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA



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

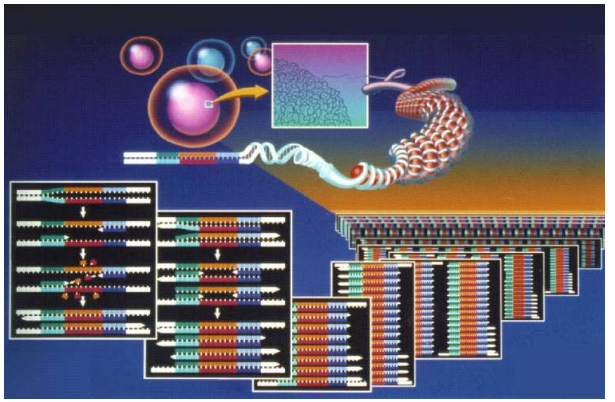
Amplificar un fragmento de ADN o ARN (RT-PCR)

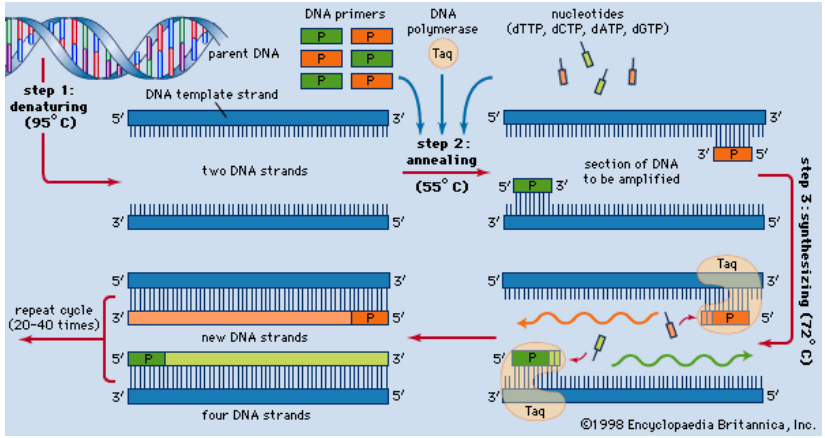
Identificación de:

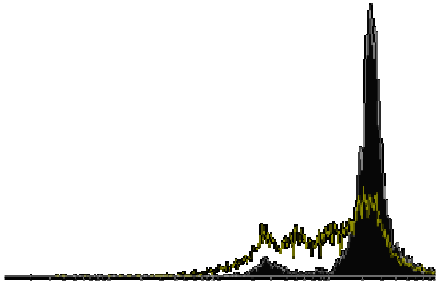
✓Microorganismos

✓Personas (cadáveres)

Investigación



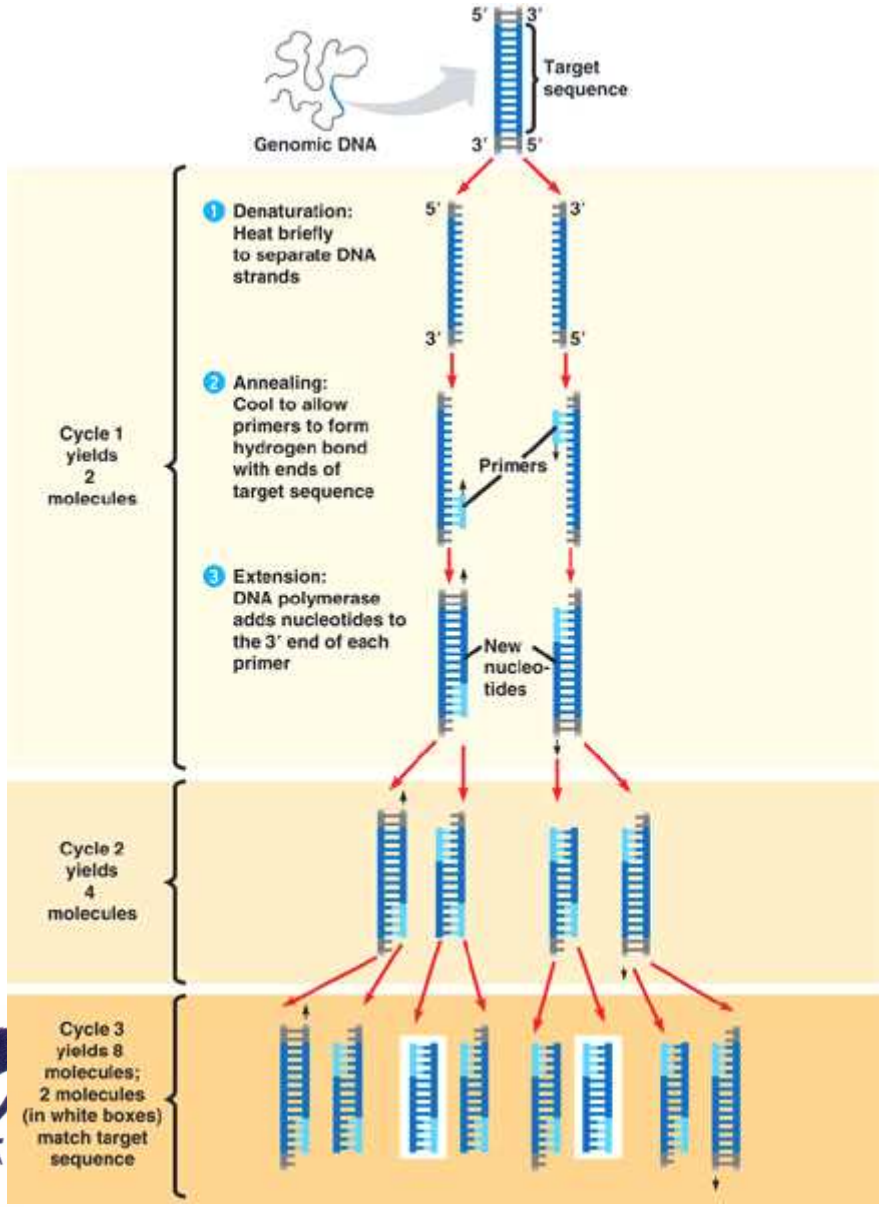


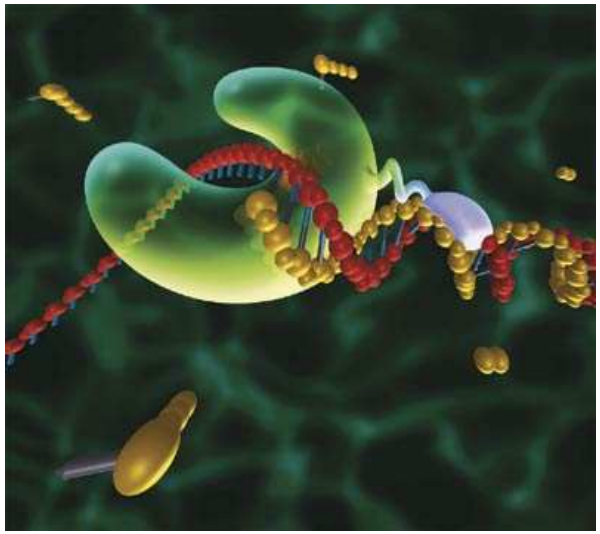


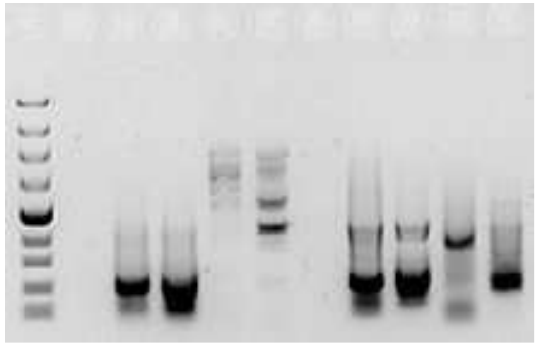
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

Pasos de la PCR







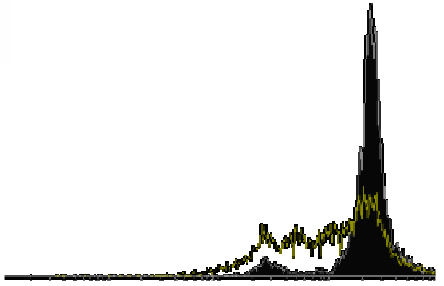
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

PCR en tiempo Real

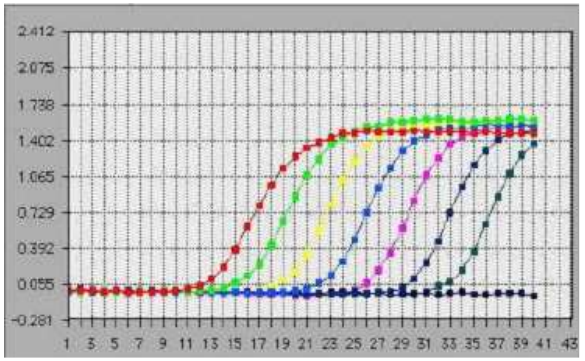
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic
INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA



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)

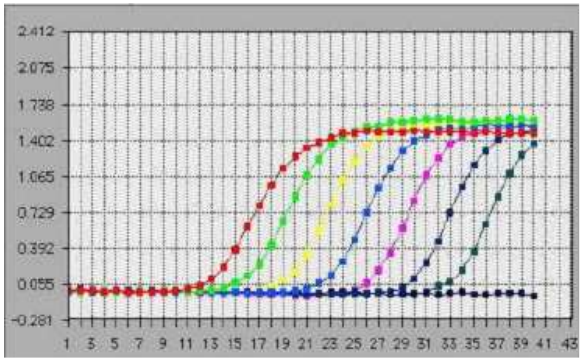


UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

PCR en tiempo Real. Utilidad

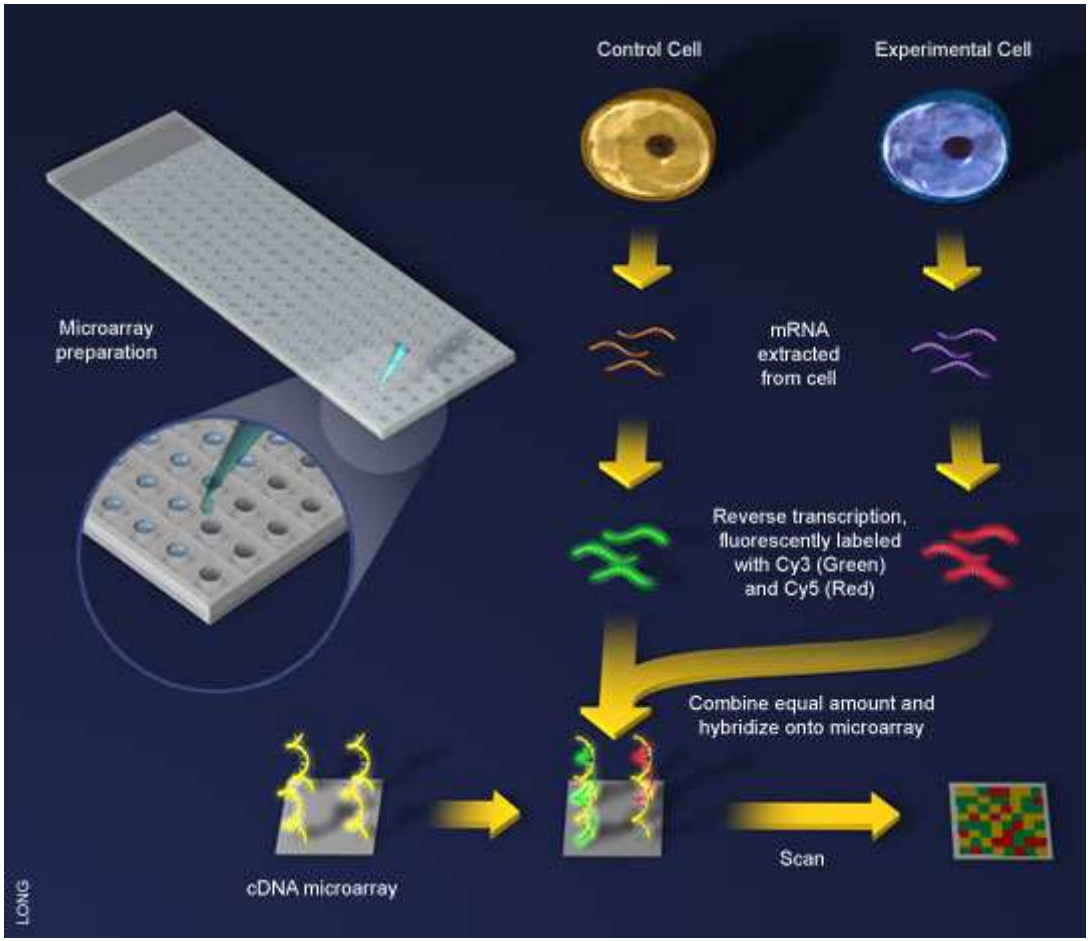
- Ídentificación de microorganismos
  - Cuantificación
  - Monitoreo de resistencia a tto.
- Expresión de genes



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

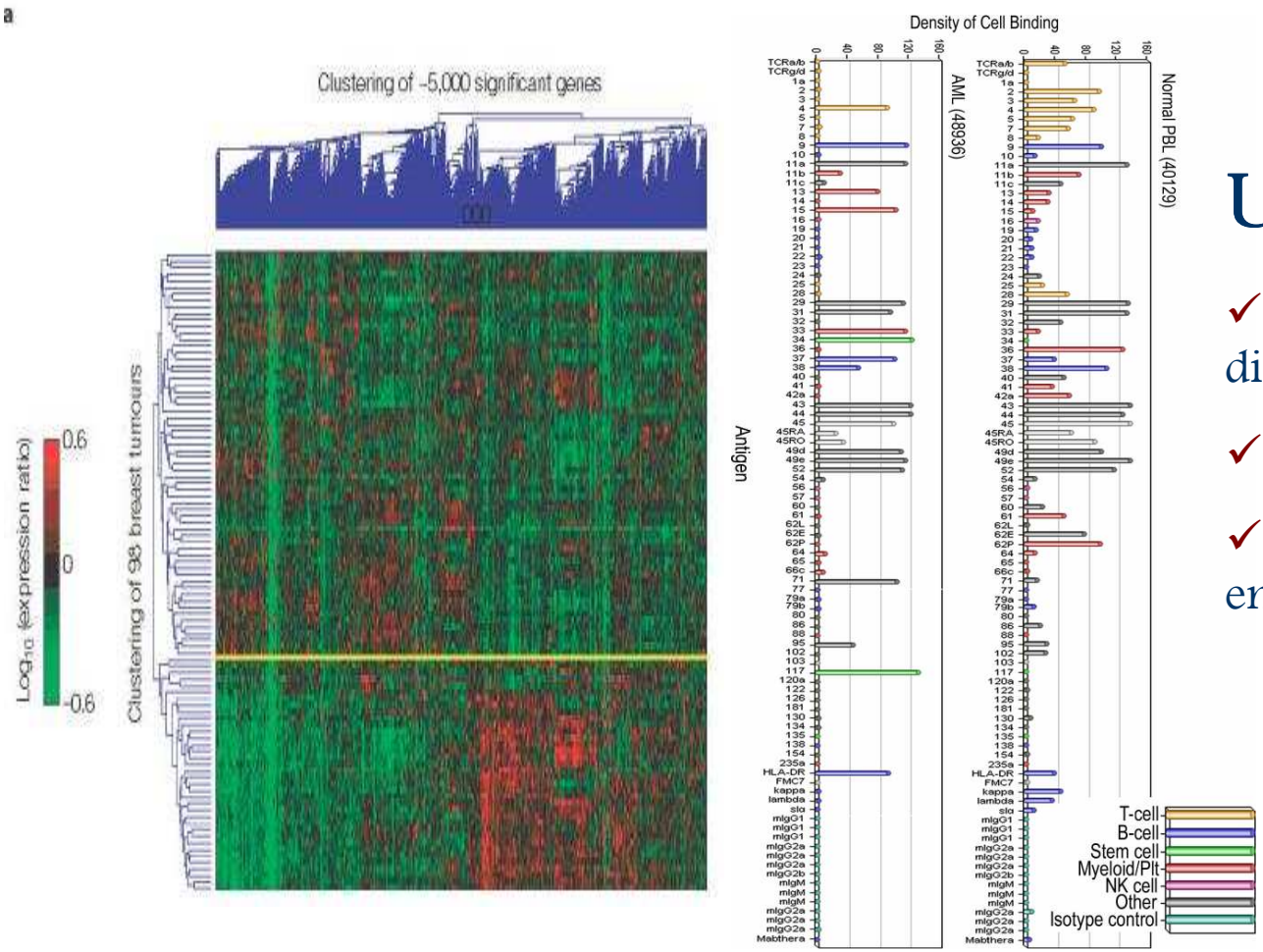
Microarray



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

idic INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA

http://www.columbia.edu/~bo8/undergraduate_research/projects/sahil_mehta_project/work.htm



Utilidad:

- ✓Expresión de genes en diferentes patologías
- ✓Valor pronóstico- Cáncer
- ✓Susceptibilidad a enfermedad
  - ✓Infecciones
  - ✓Alergias

Analytica Chimica Acta. 2007, 601: 26