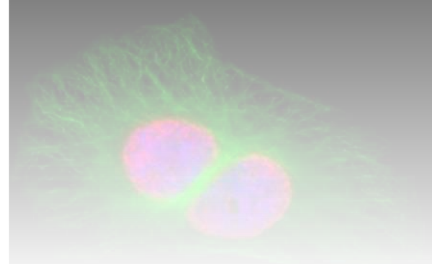
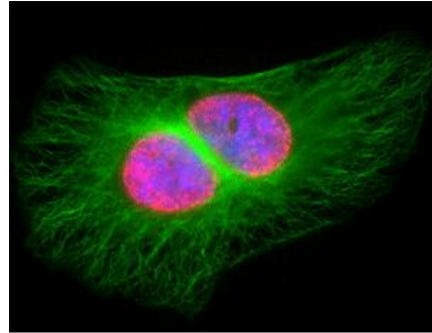




UNIVERSIDAD  
DE LOS ANDES

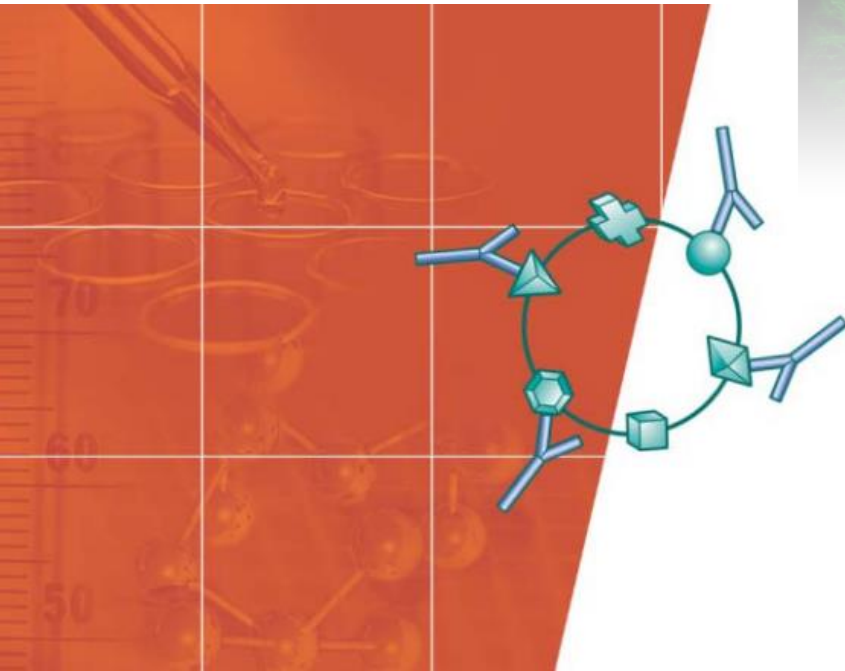
**idic**  
INSTITUTO DE INMUNOLOGIA CLINICA



# Herramientas para el inmunodiagnóstico

Universidad de Los Andes  
Facultad de Medicina  
Instituto de Inmunología Clínica

Luisa Barboza Carrillo



# Respuesta Inmune

## ¿qué valorar?

Poblaciones celulares

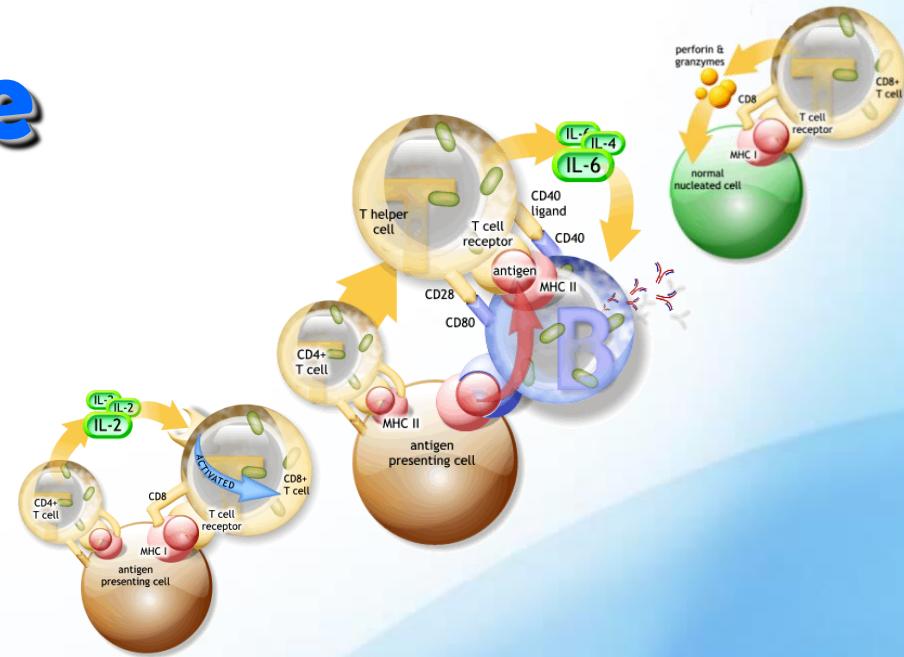
- Células T
- Células B
- Células fagocíticas
- Células citotóxicas

Productos de la respuesta

- Citoquinas
- Inmunoglobulinas/anticuerpos
- Complemento

Diagnóstico

- Patologías inmunes
- Procesos infecciosos



# Técnicas basadas en interacción antígeno-anticuerpo

- Inmunoensayos
- Western blot
- Inmunoprecipitación
- Inmunohistoquímica
- Inmunofluorescencia

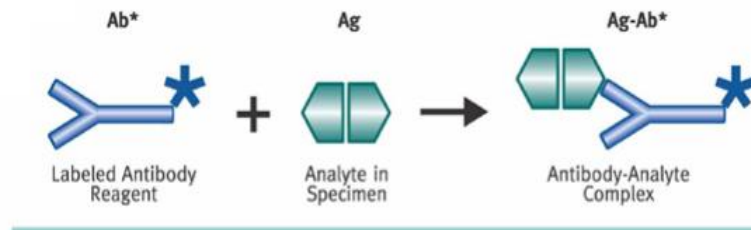


Figura 1-5 Los anticuerpos marcados permiten la detección de complejos antígeno/anticuerpo en los inmunoensayos

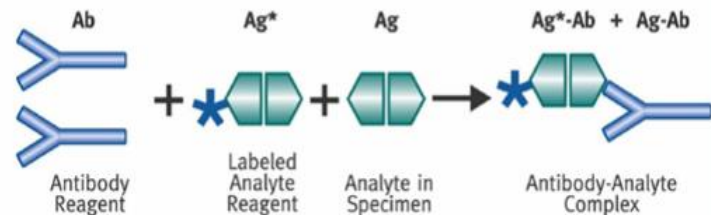
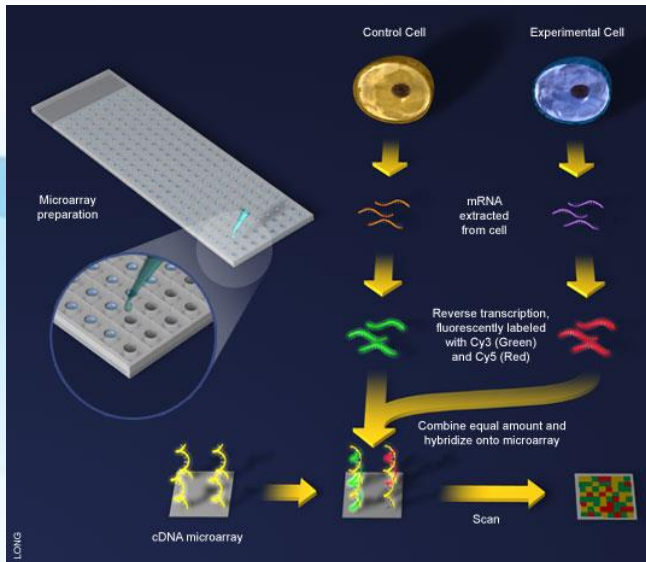
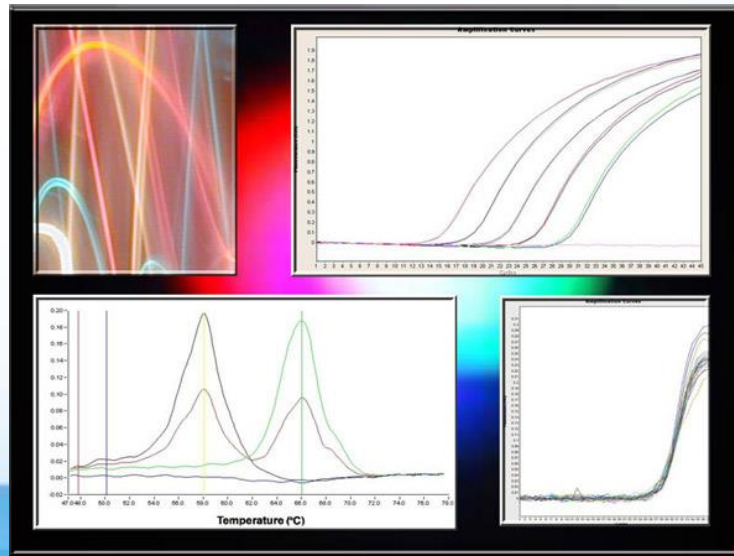
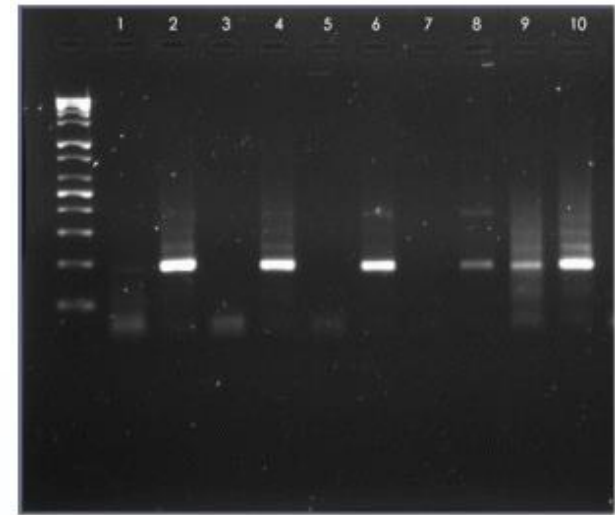


Figura 1-6 El antígeno marcado también permite la detección de complejos antígeno/anticuerpo en los inmunoensayos

# Otras técnicas para valorar respuesta inmune

- PCR
- PCR en tiempo real
- Microarray



# Tipos de inmunoensayo:



Inmunoensayo:  
Formación de  
inmunocomplejos  
(antígeno/anticuerpo)

Marcados:  
Conjugados a moléculas  
que emiten señales  
detectables

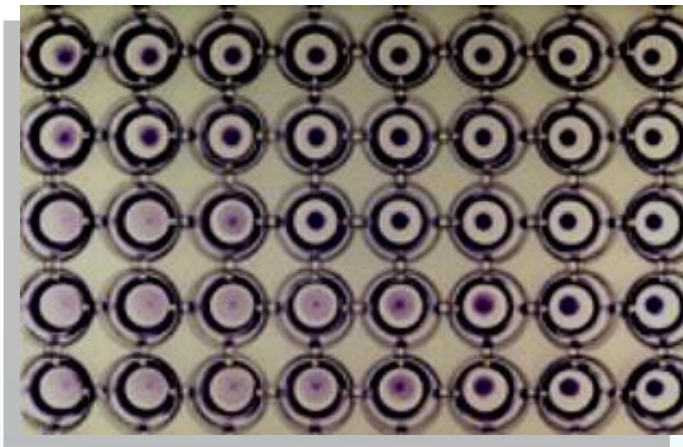
- Radioinmunoensayo (RIA): El marcador es un isótopo radioactivo.
- Análisis inmunoenzimáticos (EIA): El marcador es una enzima.
- Fluoroinmunoanálisis. El marcador es una partícula fluorescente.
- Ensayos inmunoquimioluminiscente. La marca es una sustancia quimioluminiscente.

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

- Precipitación
- Aglutinación

# Inmunoensayos:

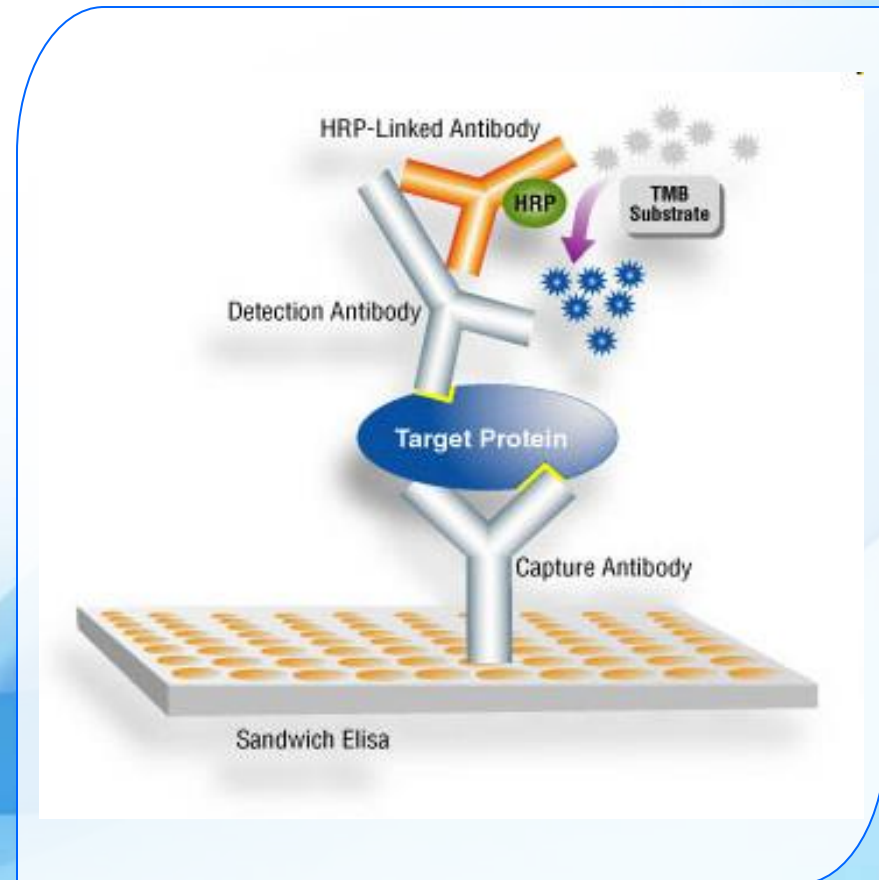
## ✓ Comparación



Assay	Sensitivity* ( $\mu\text{g}$ antibody/ml)
Precipitation reaction in fluids	20–200
Precipitation reactions in gels	
Mancini radial immunodiffusion	10–50
Ouchterlony double immunodiffusion	20–200
Immunelectrophoresis	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 <sup>†</sup>
Immunofluorescence	1.0
Flow cytometry	0.06–0.006

# ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay):

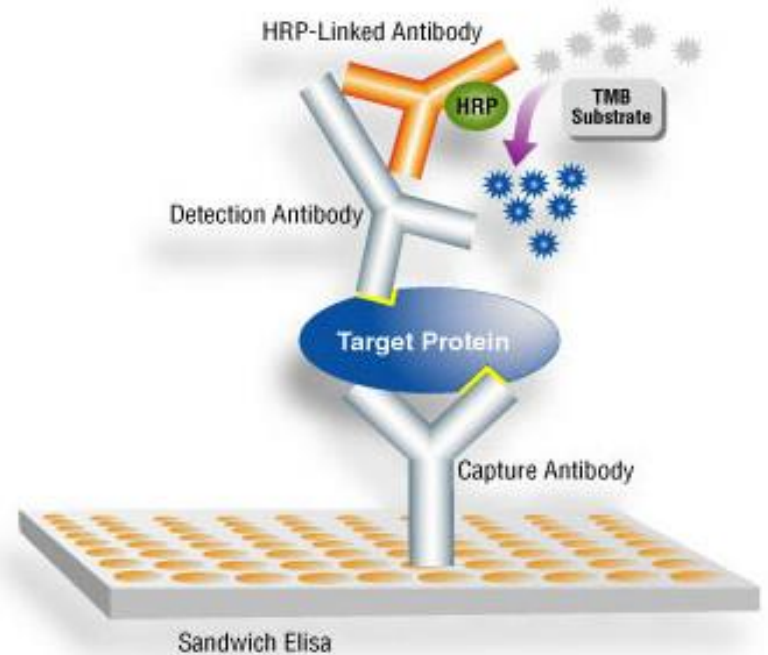
La prueba de ELISA se basa en la formación de inmunocomplejos, (reacción antígeno-anticuerpo, uno de los cuales debe ser de reactividad conocida), para detectar la presencia de un analito de interés.



# 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.

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

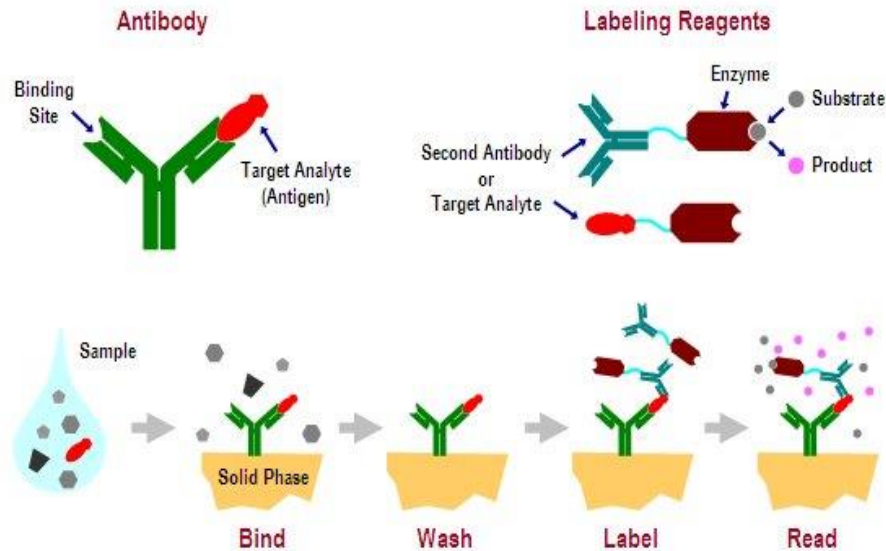




# ELISA

## Fases

### ELISA



✓ Unión del antígeno (o del anticuerpo) al soporte.

✓ Formación de los inmunocomplejos.

✓ Revelado de la reacción enzimática.

✓ Lectura (espectrofotometro)



Lavados entre cada paso

# E.L.I.S.A.

## Componentes

Antígenos

Purificados.

Producidos con tecnología de proteínas recombinantes.

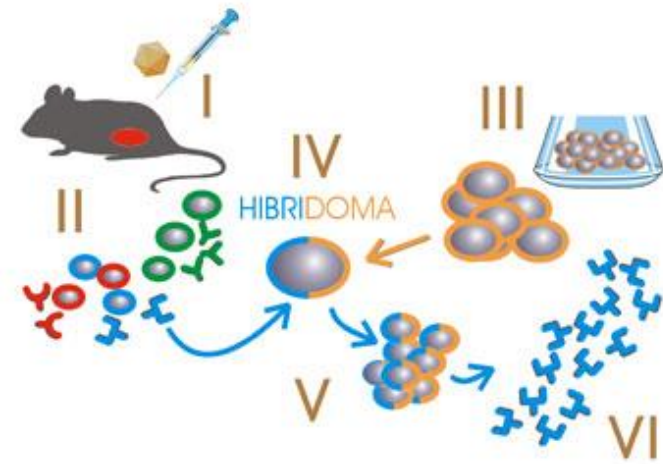
Pueden ser móviles o insolubles.

Anticuerpos

Monoclonales: Homogéneos y de especificidad única.

Policlonales: Heterogéneos y reconocen epítopes diferentes del antígeno.

Pueden ser móviles o insolubles.



# Tipos de ELISA:

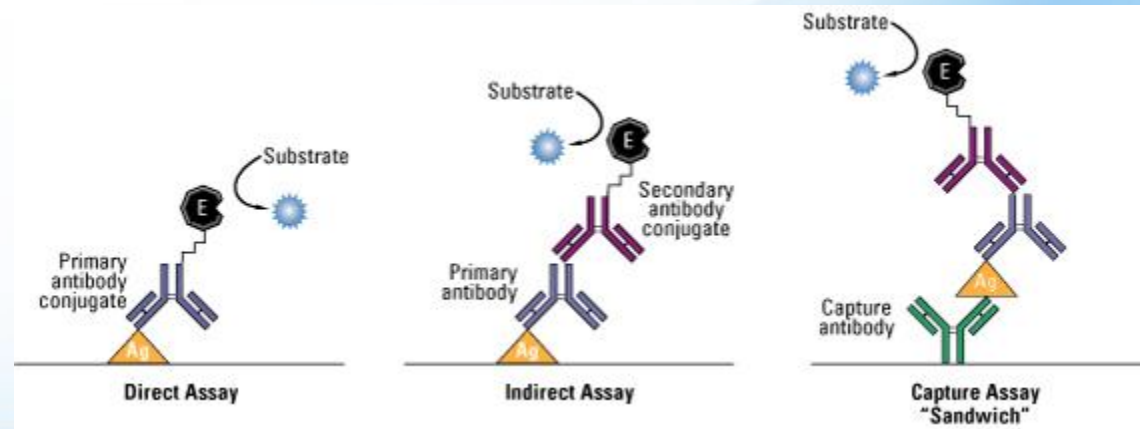
Enzyme-Linked  
ImmunoSorbent Assay  
(ELISA)  
Ensayo inmunoenzimático

No competitivo:  
La muestra se  
enfrenta contra el Ag o  
el Ab

Directo: Se detectan antígenos

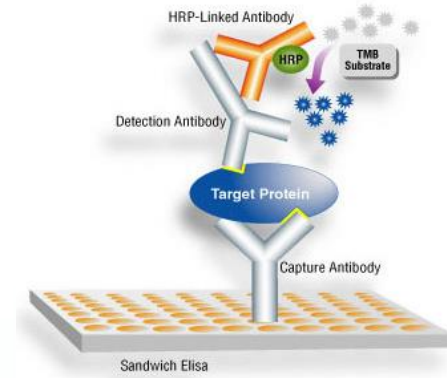
Indirecto: Se detectan anticuerpos

Sandwich: Se detectan antígenos usando  
dos Ab



Competitivo:  
Ab<sub>x</sub> compete con el Ab<sub>conjugado</sub> por sitios de unión del Ag

# 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-mitosomal

Anticuerpos Antifosfolípidos  
(Cardiolipina IgG-M)

Detección de Acs asociados a tumores:

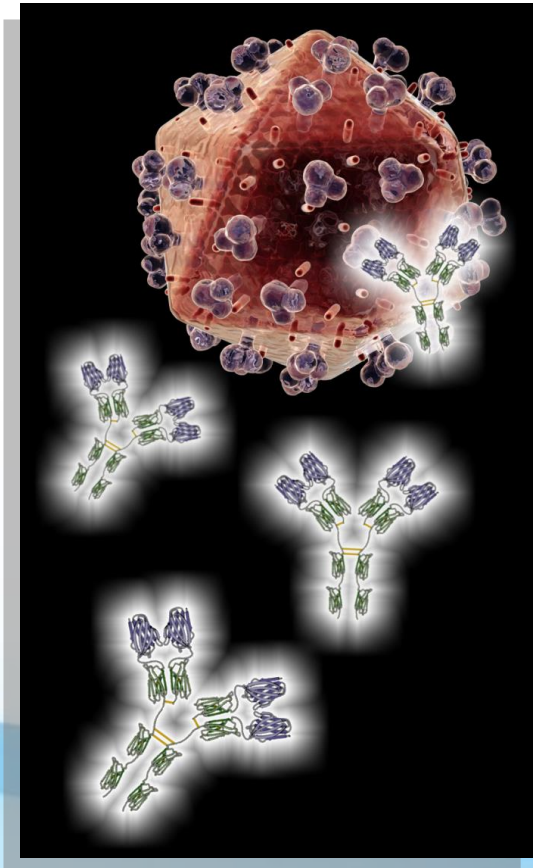
Ag prostático

Ag ovario (Ca125)

ACE, alfafetoproteína

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

# ELISAs 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



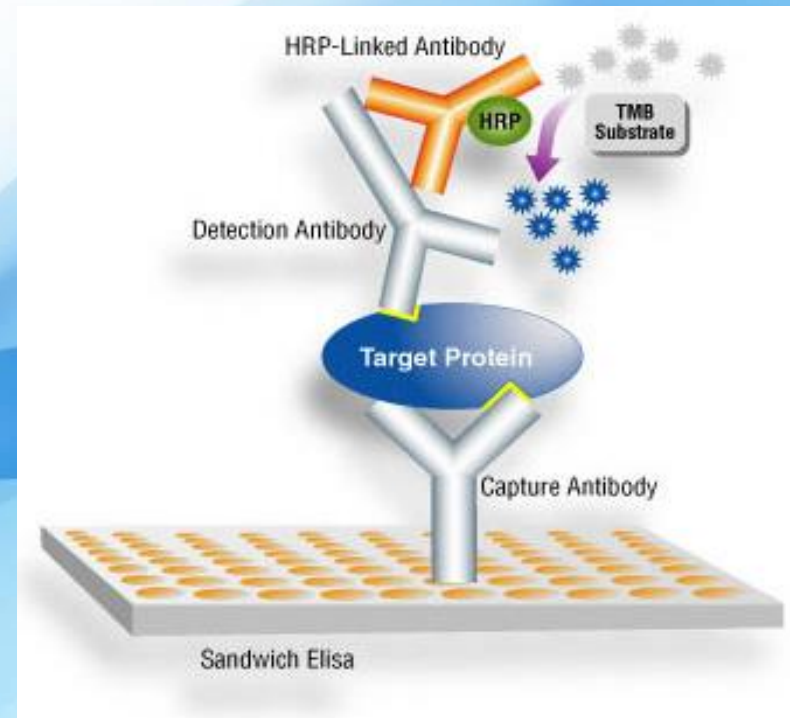
# ELISAs y Generaciones:

Generation	1st	2nd	3rd	4th
Antigen	[Diagram: Two Y-shaped antibodies (one purple, one red) bound to a black bar representing the antigen]		[Diagram: One Y-shaped antibody (red) bound to a black bar representing the antigen]	
Sample	[Diagram: Two Y-shaped antibodies (one purple, one red) bound to a black bar representing the antigen]		[Diagram: One Y-shaped antibody (red) bound to a black bar representing the antigen]	
Conjugate	[Diagram: Two Y-shaped antibodies (one purple, one red) bound to a black bar representing the antigen]		[Diagram: One Y-shaped antibody (red) bound to a black bar representing the antigen]	
Signal	[Diagram: Two Y-shaped antibodies (one purple, one red) bound to a black bar representing the antigen]		[Diagram: One Y-shaped antibody (red) bound to a black bar representing the antigen]	
<b>Antigen</b>	<b>Lysate</b>		<b>Recombinant &amp; synthetic</b>	
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



# Ventajas del ELISA:

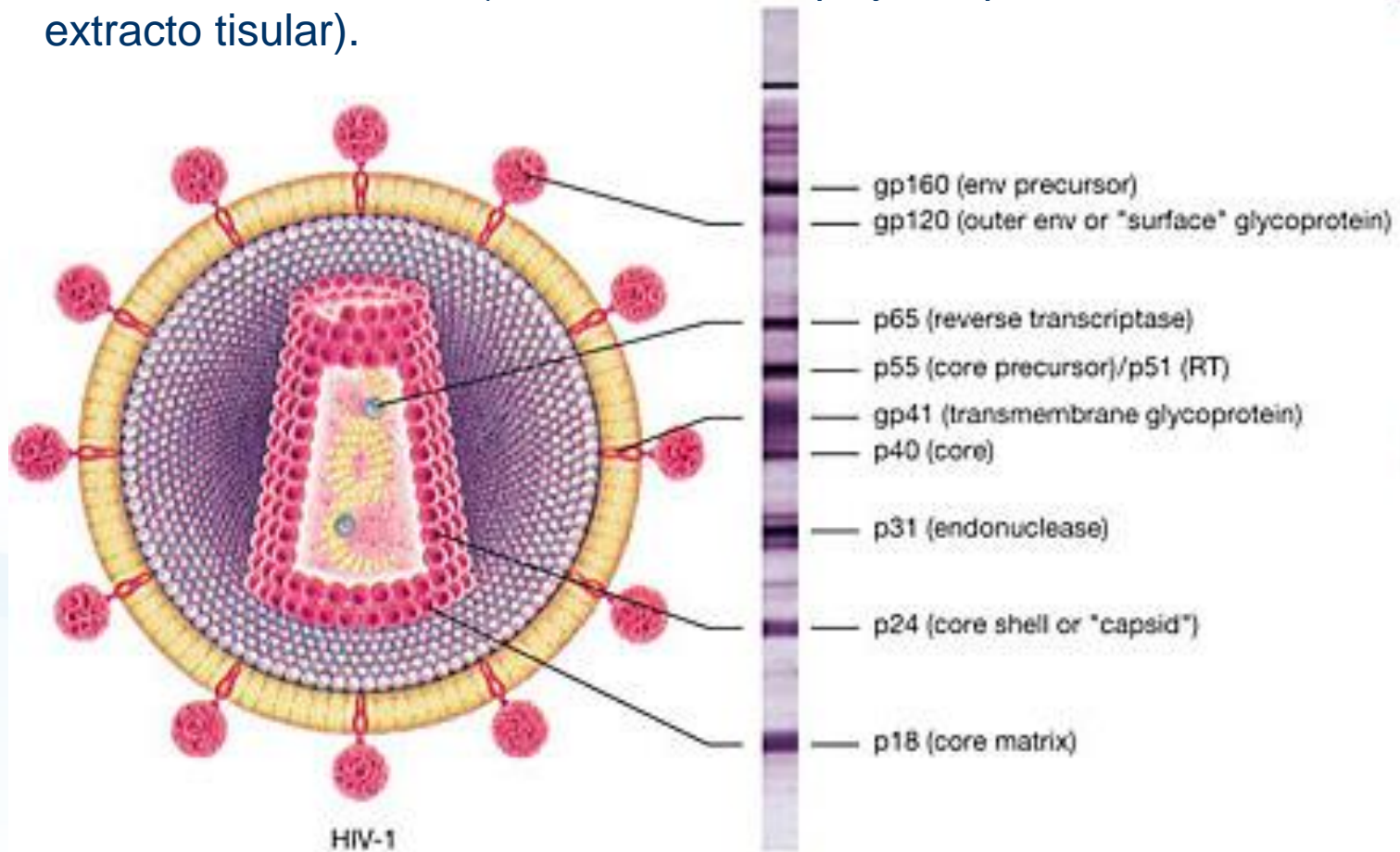
- Muy sensible
- Gran número de muestras procesadas simultáneamente.
- Resultados rápidos
- Utilización de reactivos menos tóxicos
- Menor costo
- Cuantificación de sustancias diversas: hormonas, metabolitos, fármacos, toxinas, citoquinas...



# WESTERN BLOTTING

## Everybody knows western

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





# WESTERN BLOTTING

## Everybody knows western

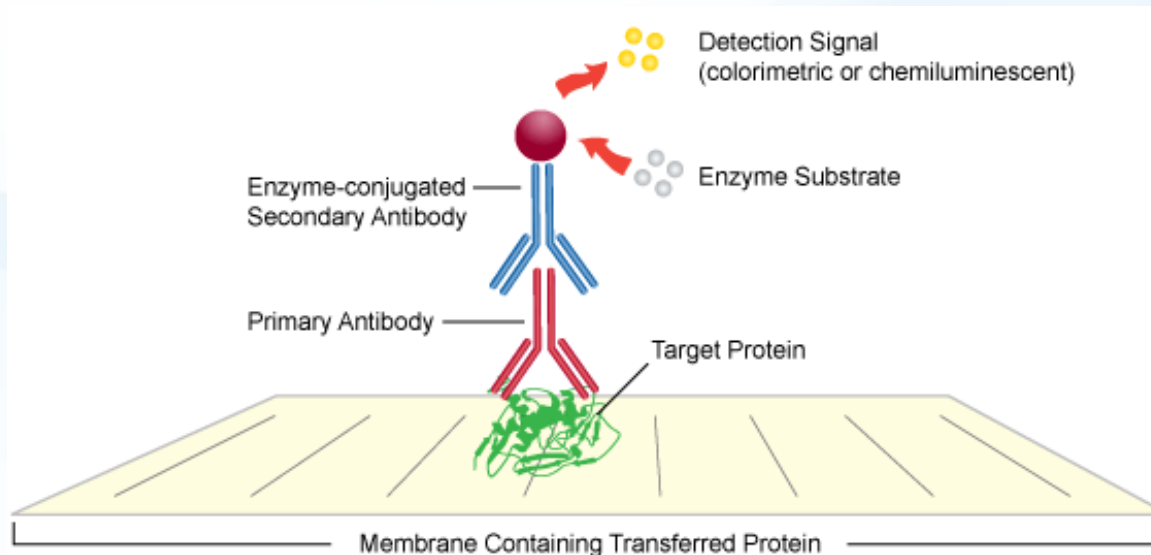


Pasos:

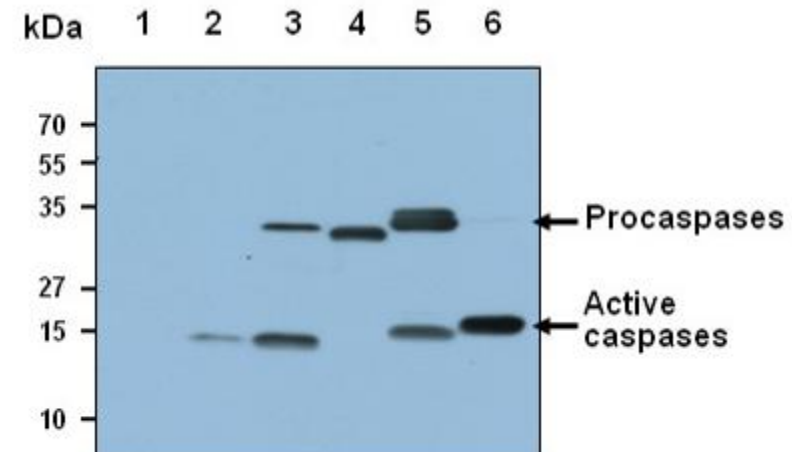
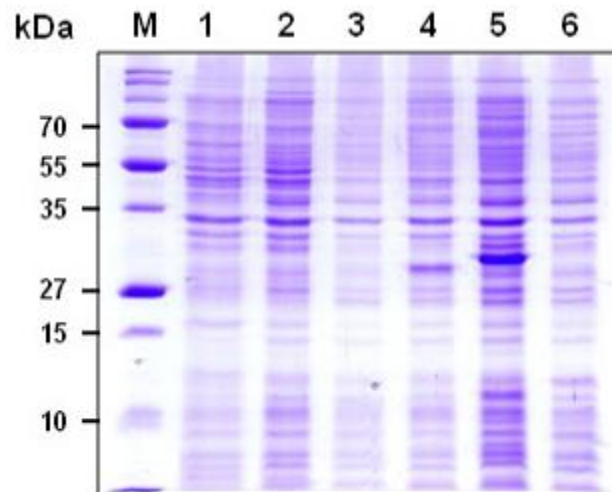
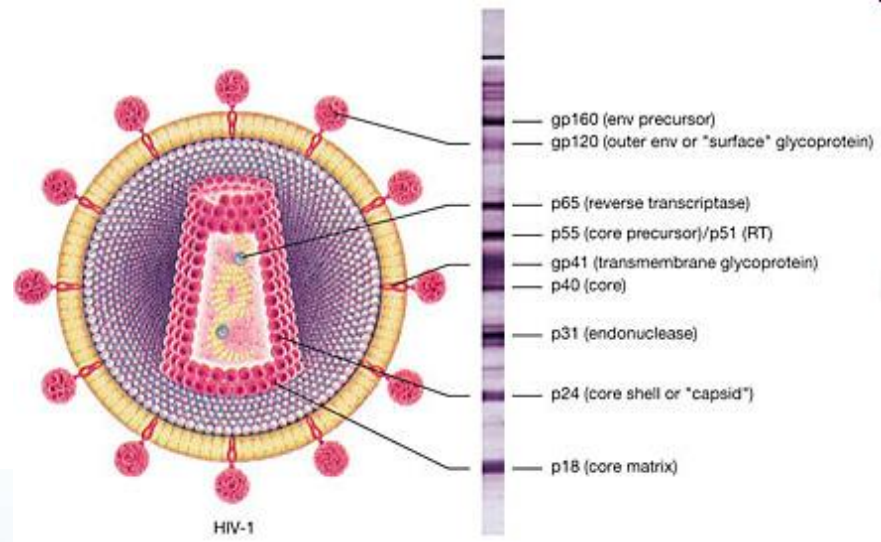
Electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc.

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.

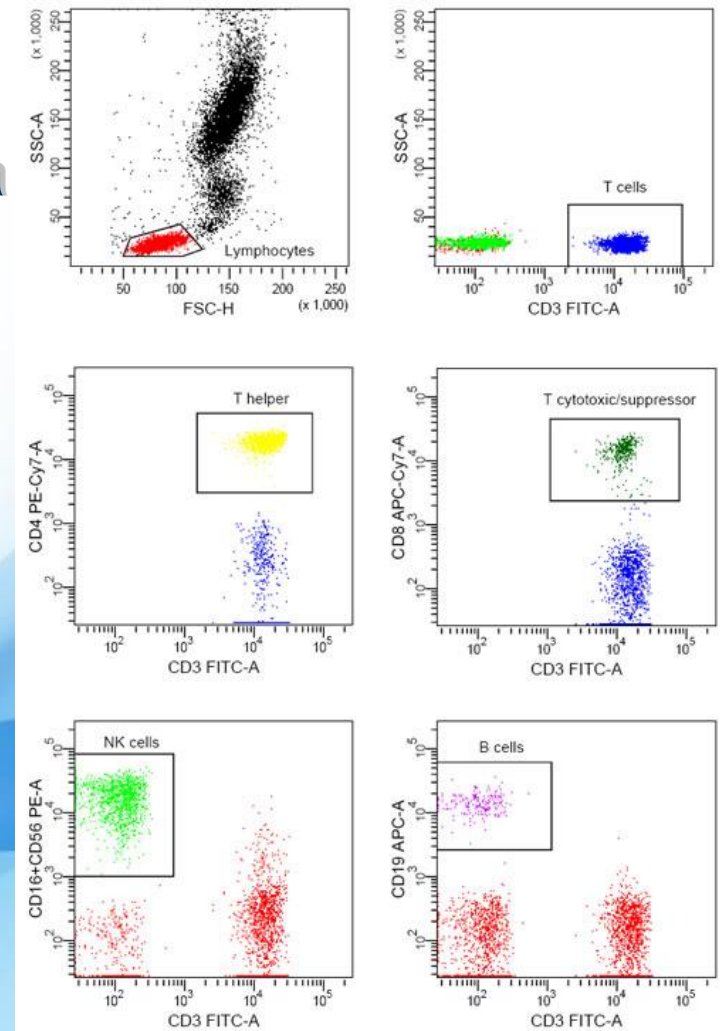
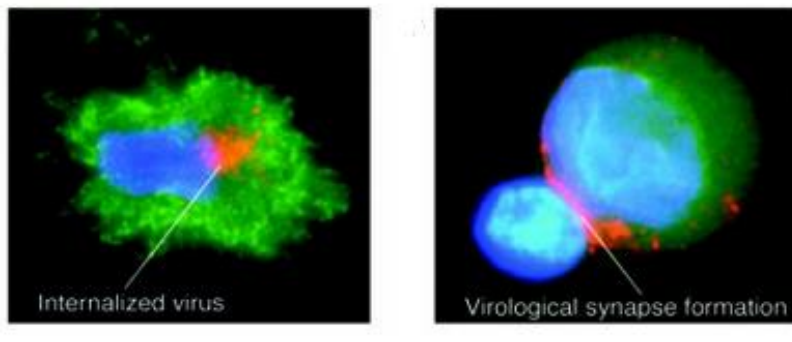


# Electrophoresis/ Western Blotting

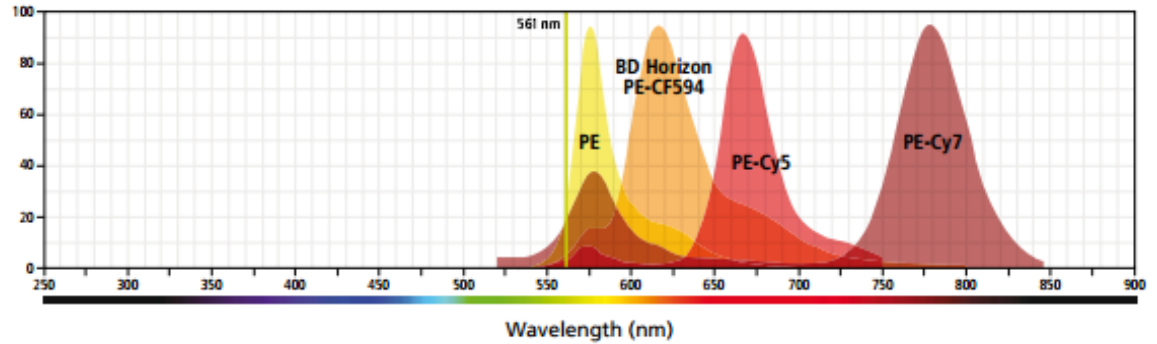
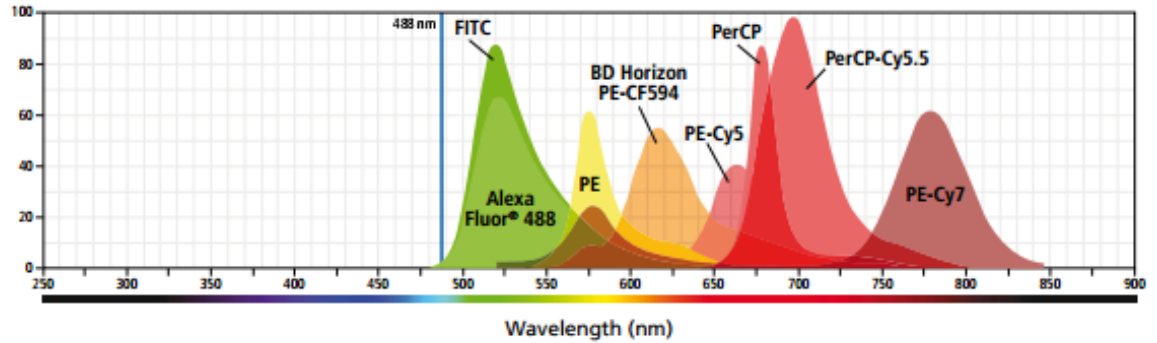
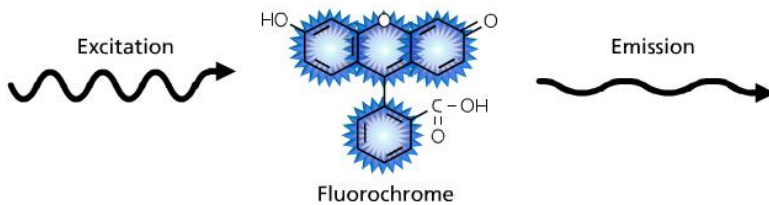
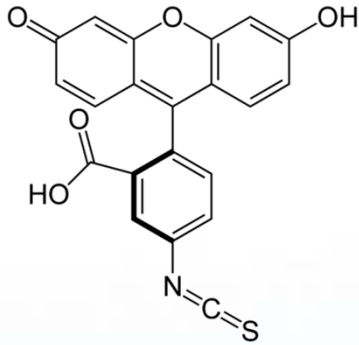


# Técnicas basadas en fluorescencia

- Citometría de flujo
- Inmunofluorescencia- Microscopia de fluorescencia



# Fluorocromos



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)

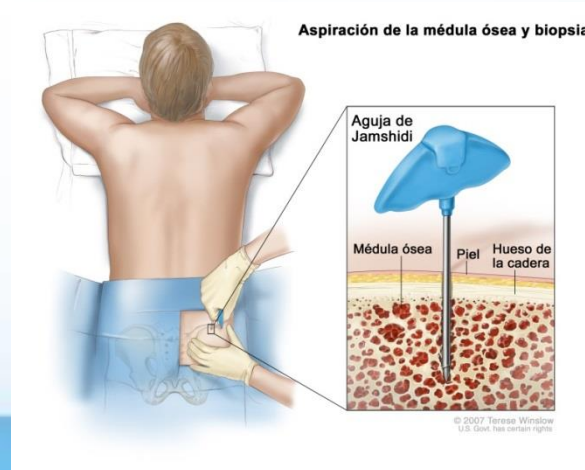
# Pruebas basadas en fluorescencia

## Muestras

Tejidos

Suero

LCR



Requisito indispensable para la citometría:

✓ La muestra debe estar en suspensión

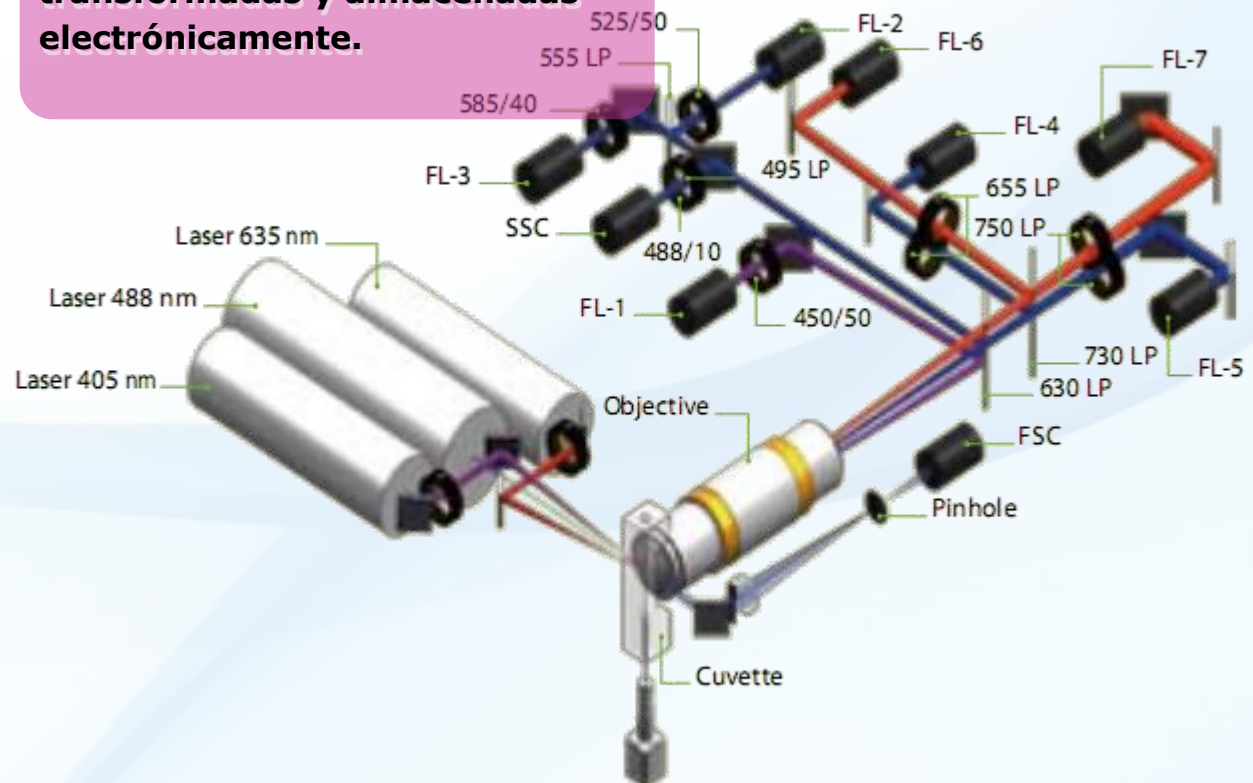
# Citometría de flujo

Hidrodinámica

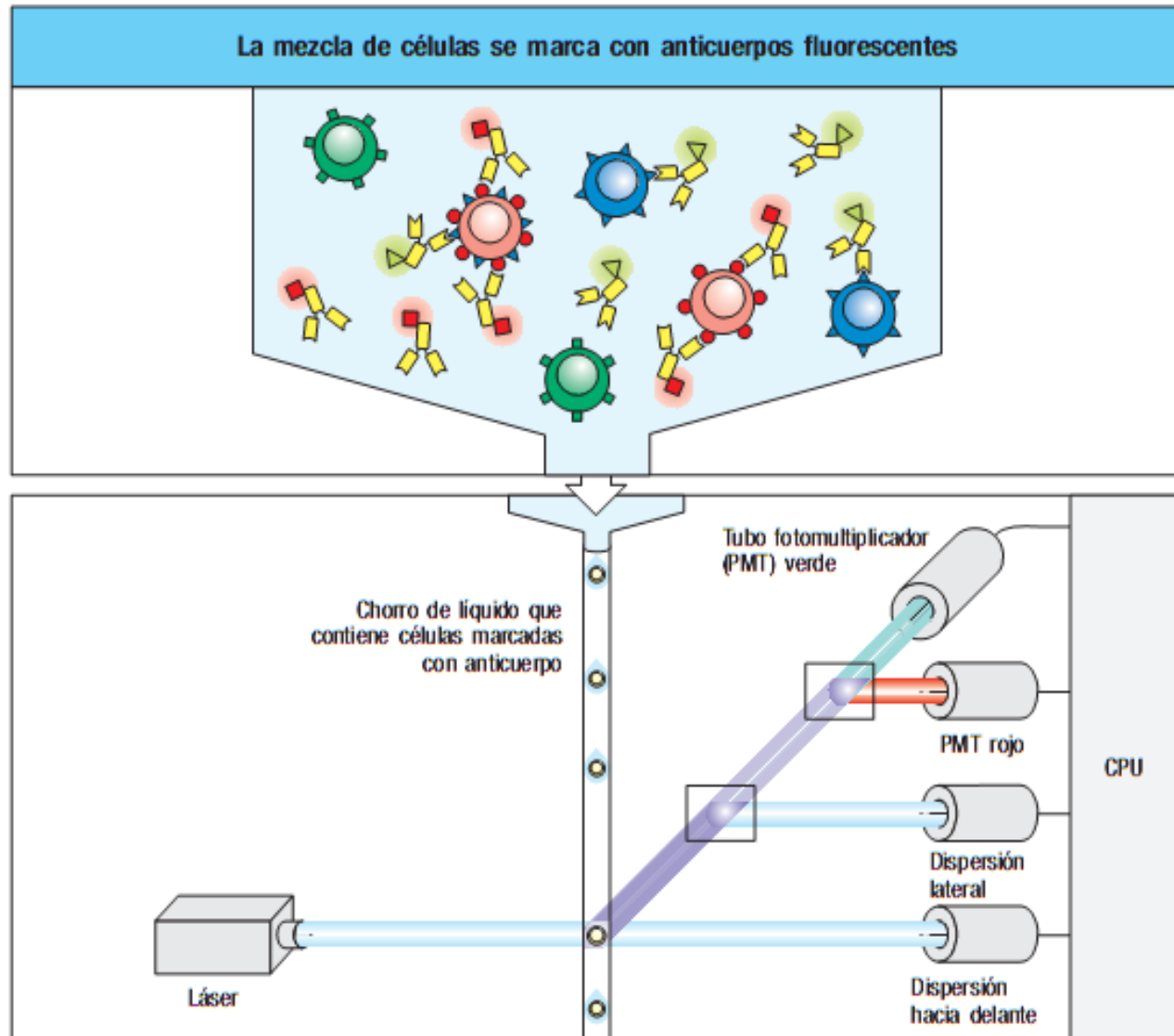
Óptica

Electrónica

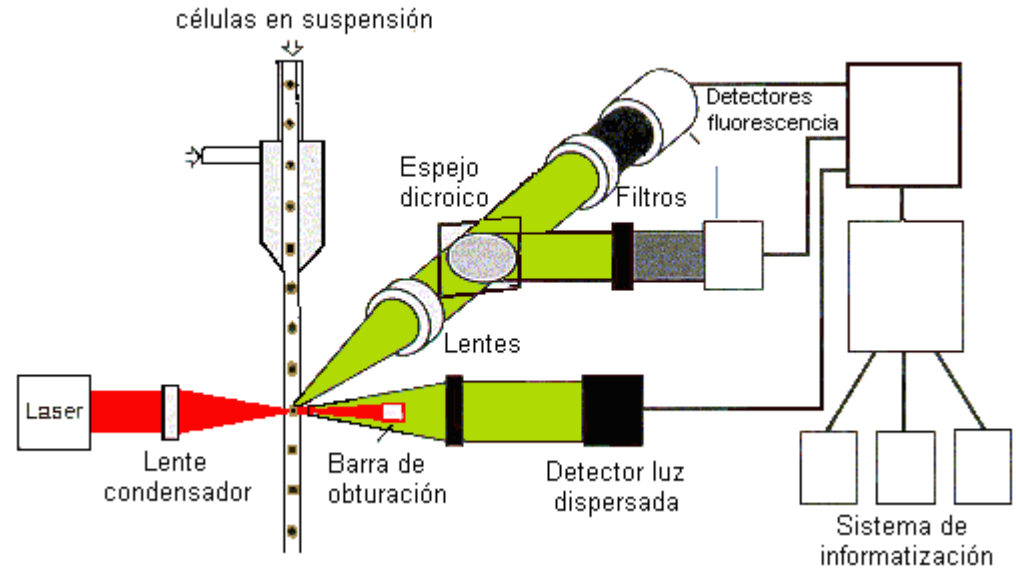
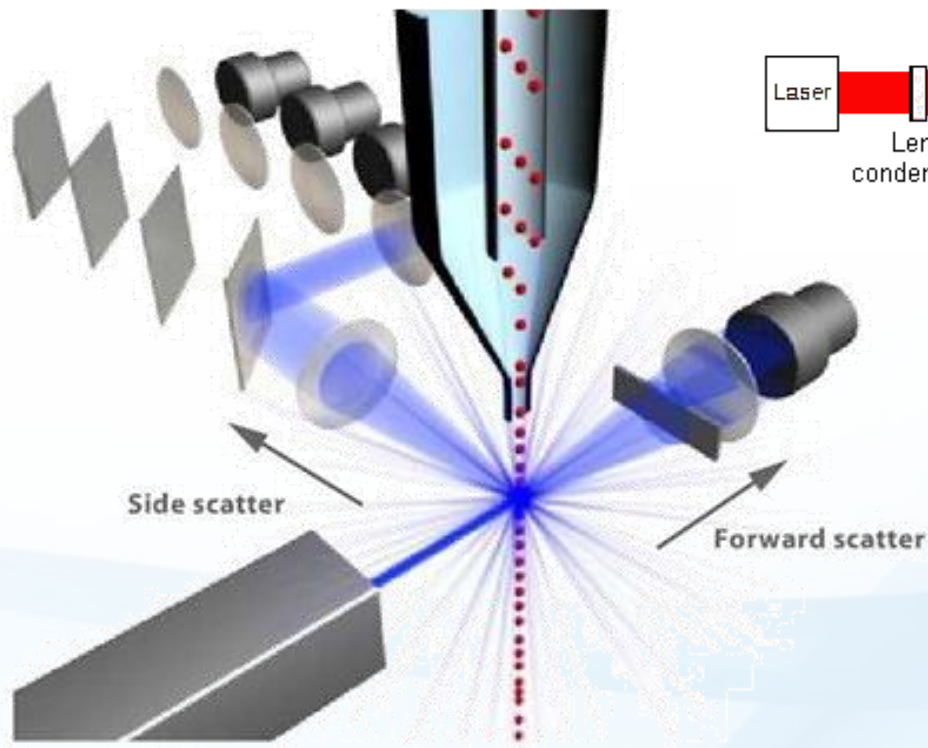
Técnica que permite analizar partículas en suspensión que se hacen fluir a través de un rayo de luz, las partículas interactúan dispersando este haz de luz y emitiendo fluorescencia, estas señales ópticas son detectadas, transformadas y almacenadas electrónicamente.



# Citometría de flujo



# Funcionamiento:

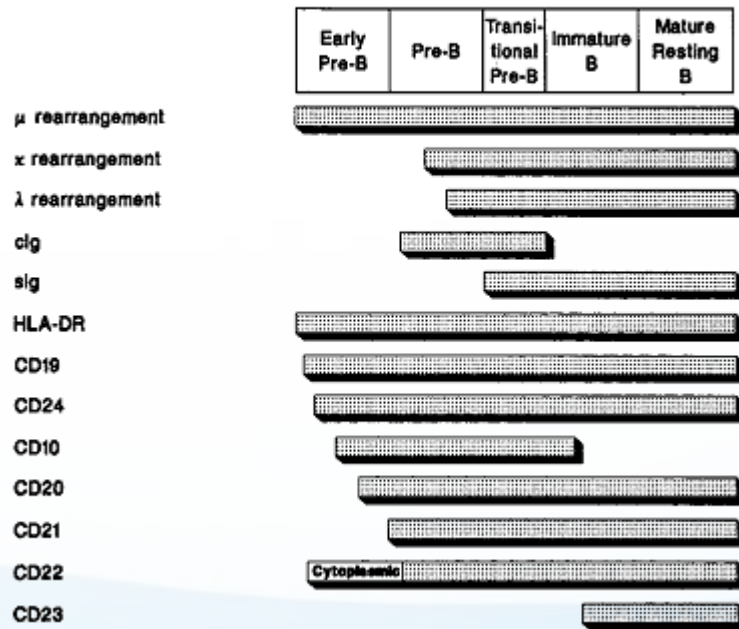




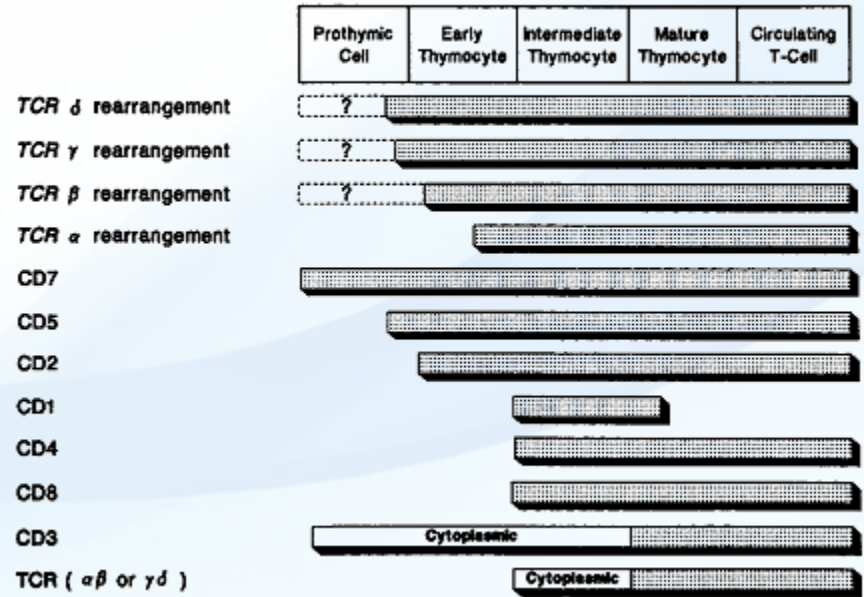
# Utilidad:

## Evaluación de la función hematopoyética

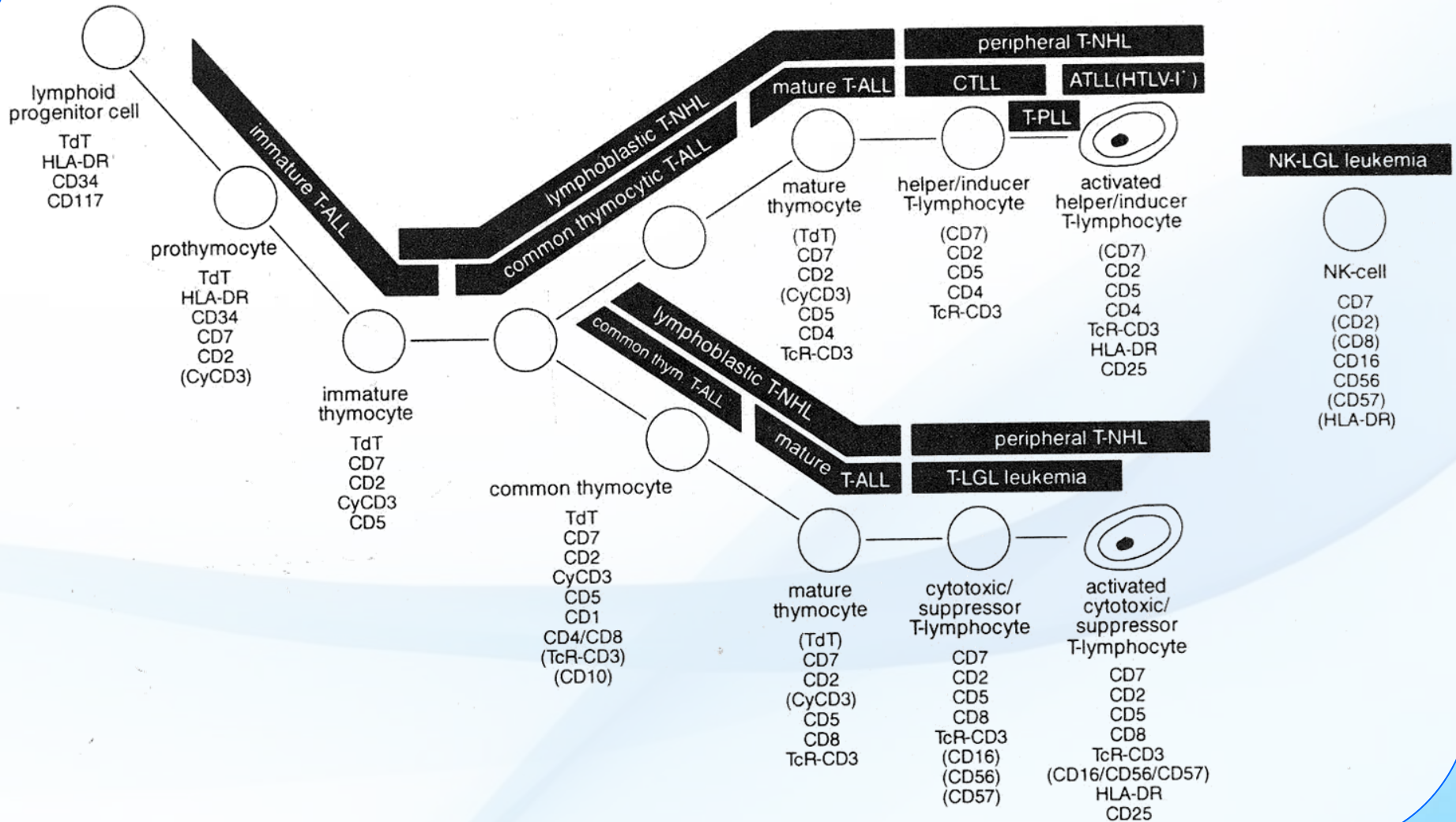
### B-Cell Ontogeny



### T-Cell Ontogeny

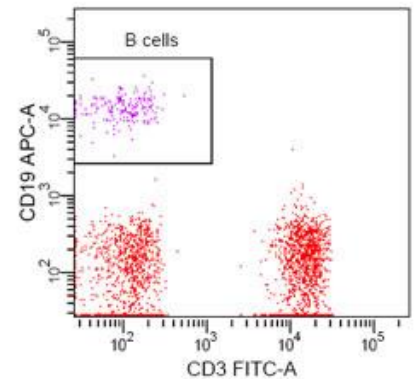
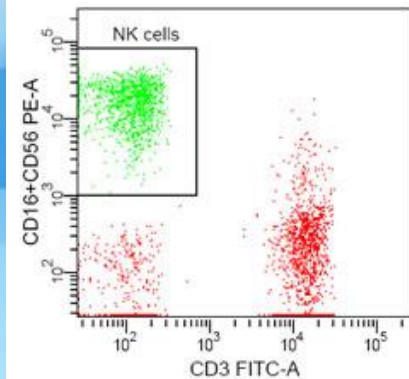
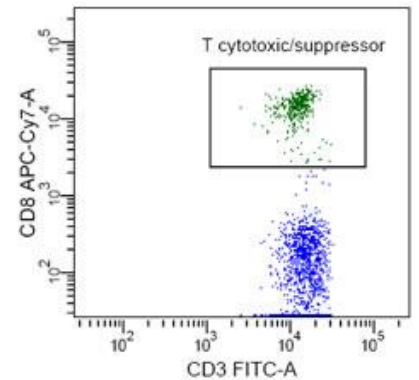
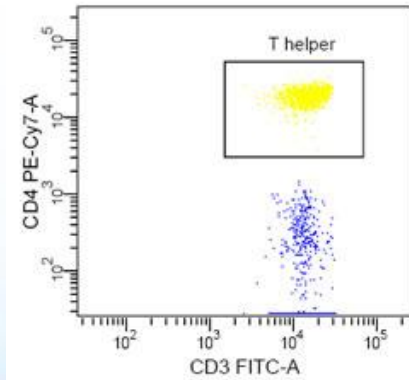
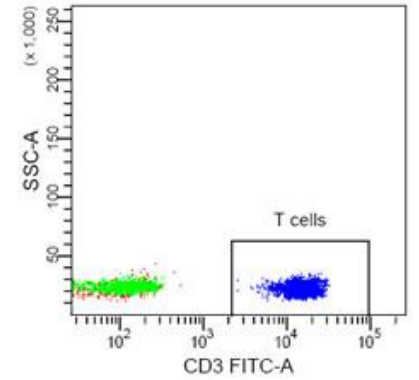
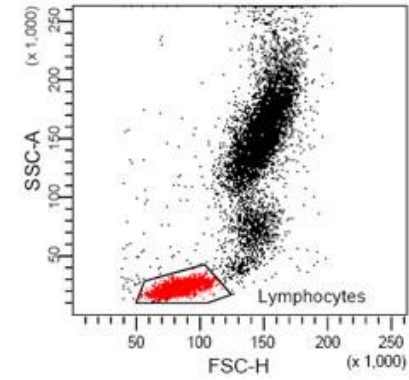
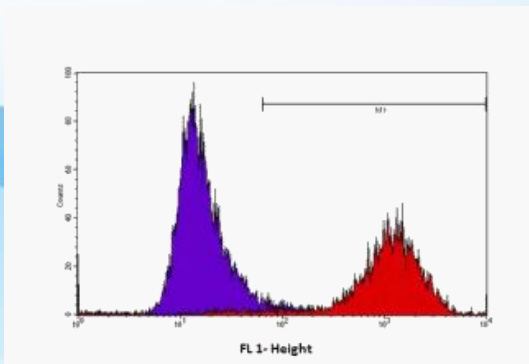
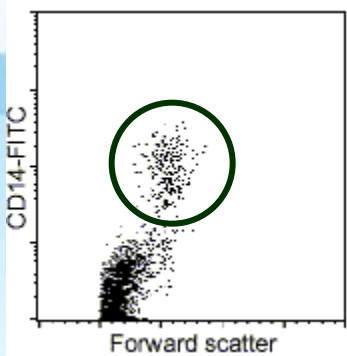
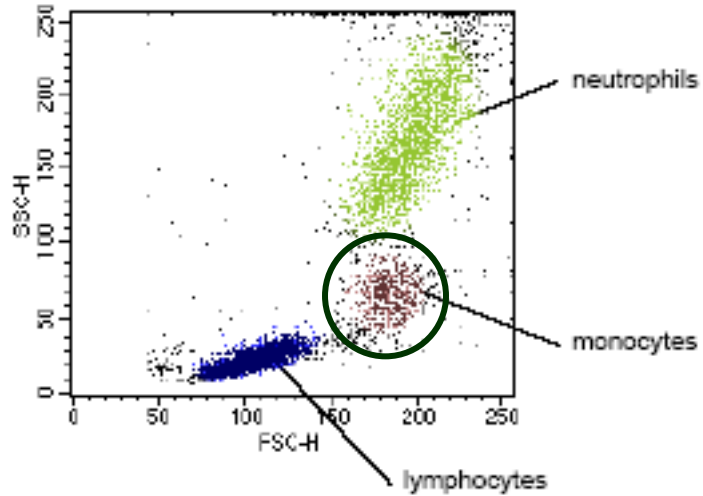


## Leucemias linfoblásticas



# Utilidad:

## Sub-poblaciones linfocitarias



# Citometría de flujo

## Ventajas:

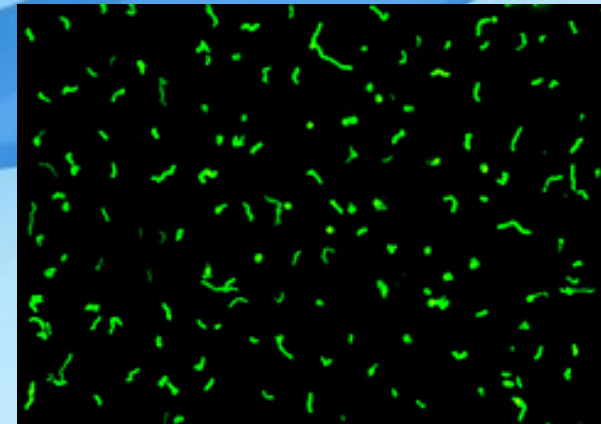
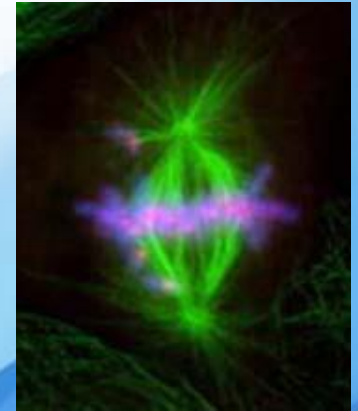
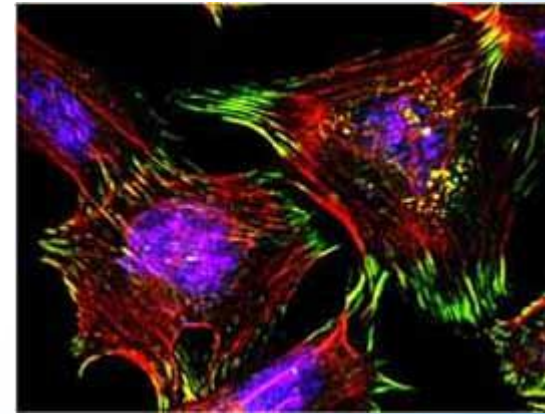
- Análisis de un número estadísticamente significativo de células
- Múltiples marcajes de una sola célula.
- Análisis de alto número de partículas en corto tiempo (5.000 eventos /seg. ).
- Alta sensibilidad y objetividad.
- Medidas separadas de cada célula (no sólo el promedio).
- Medidas cuantitativas : 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.

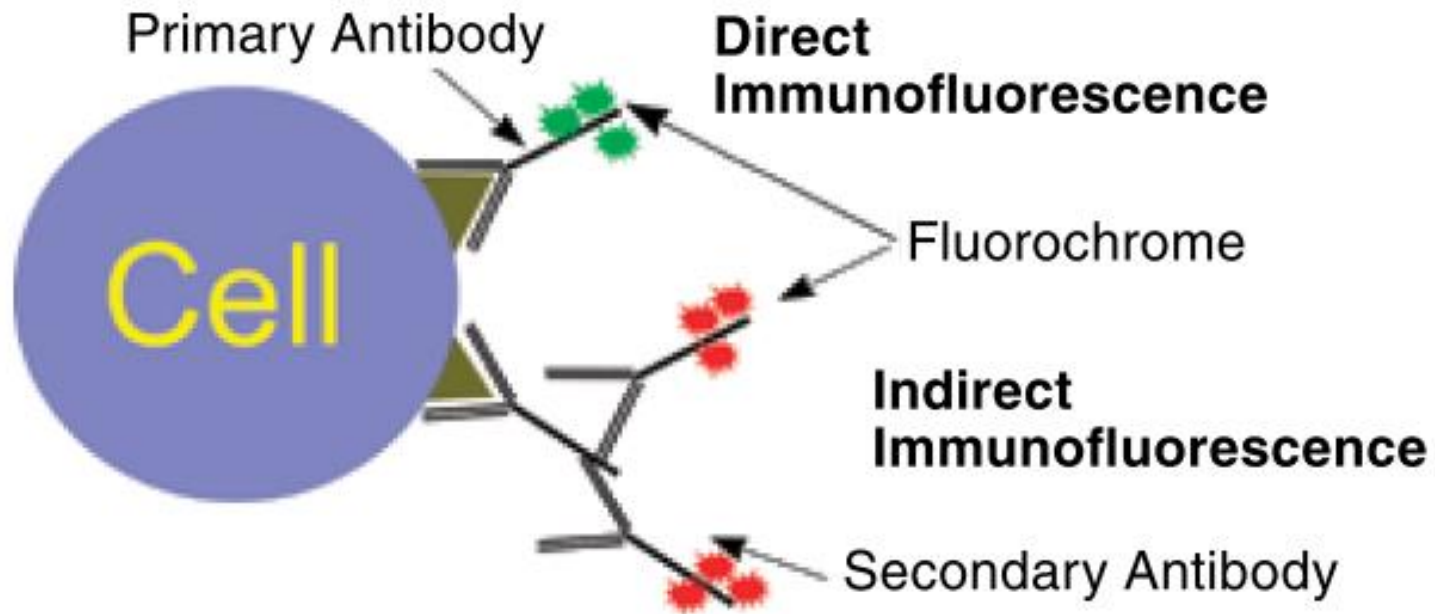
# Inmunofluorescencia

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



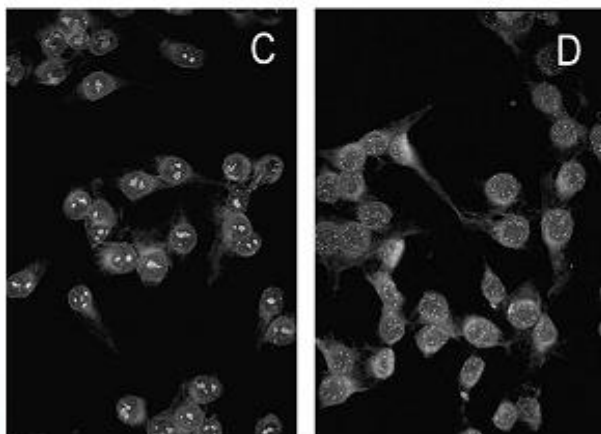
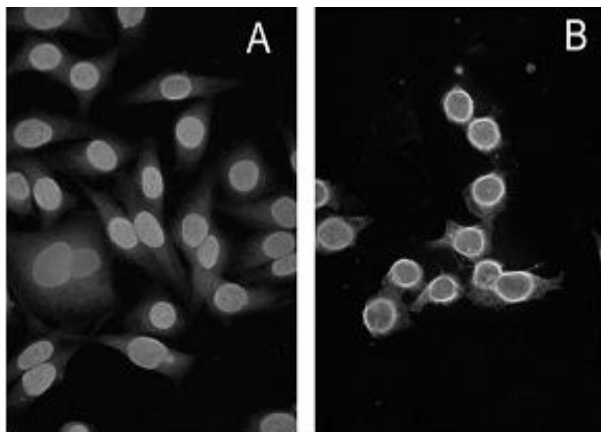
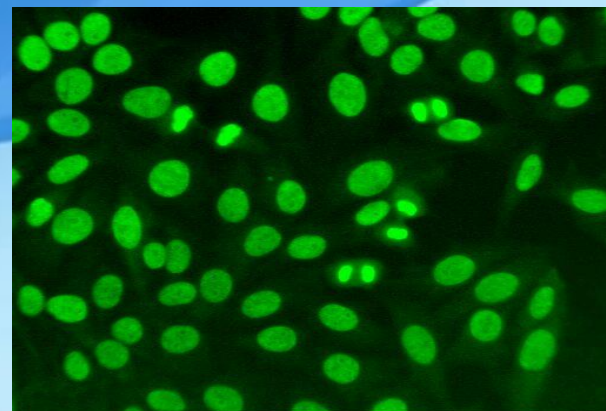


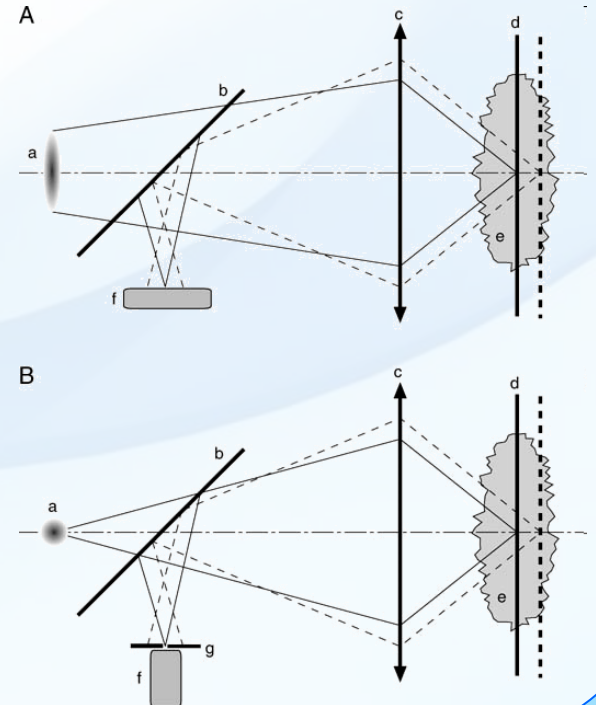
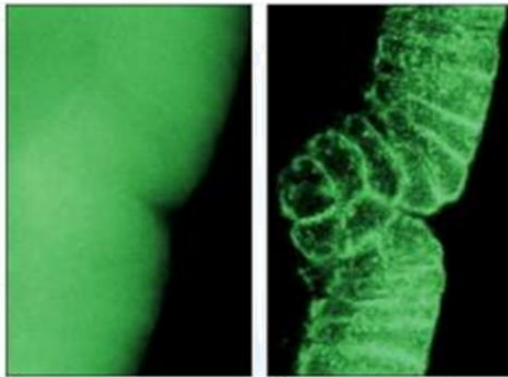
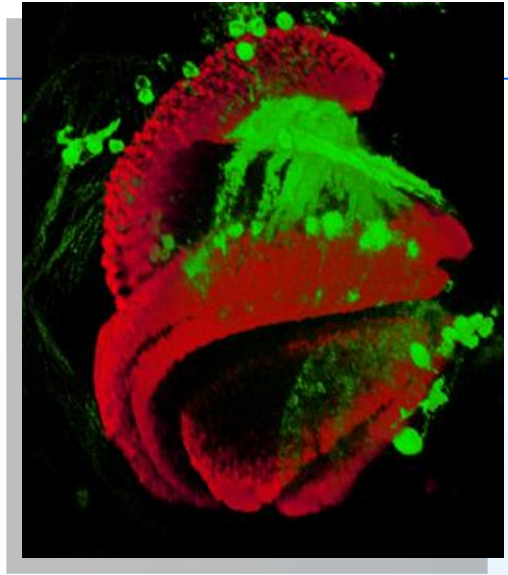
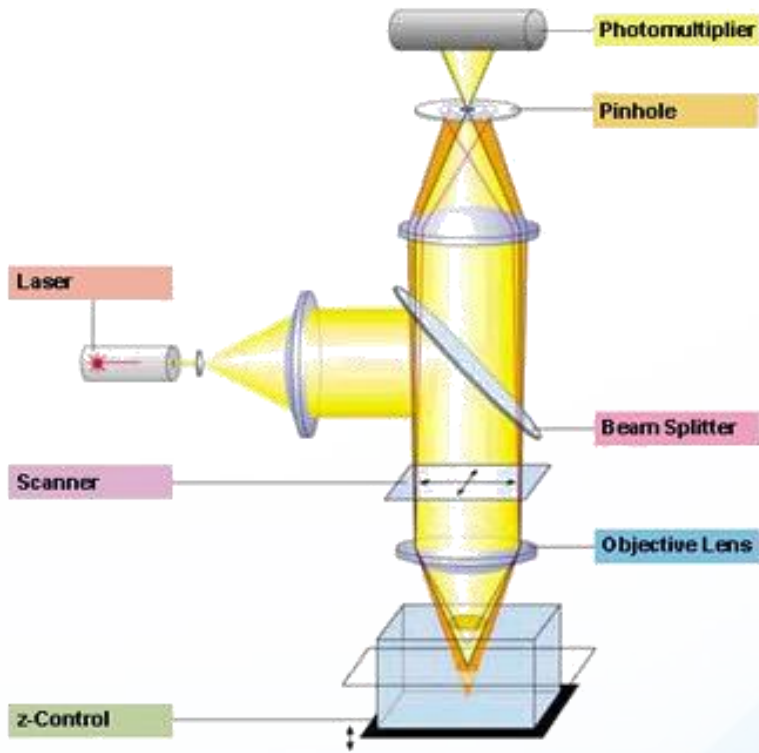
Figura 12.3: Patrones de inmunofluorescencia en la determinación de anticuerpos antinucleares. (A) patrón difuso; (B) patrón periférico; (C) patrón nucleolar; (D) patrón moteado.

# Inmunofluorescencia

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



# Microscopía confocal



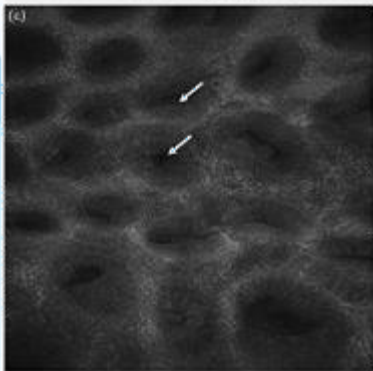
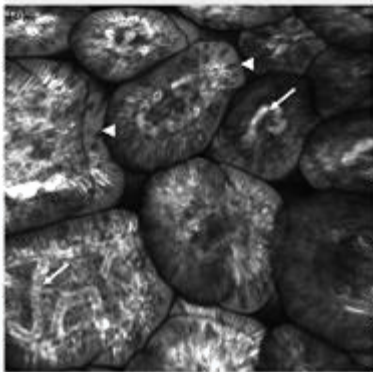
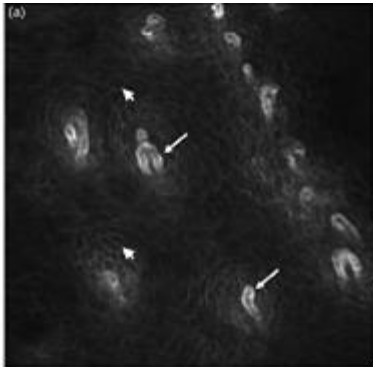


# Microscopía confocal

## Aplicaciones!!!

## Confocal endomicroscopy Kerry Dunbar and Marcia Canto

Current Opinion in Gastroenterology 2008,  
24:631–637



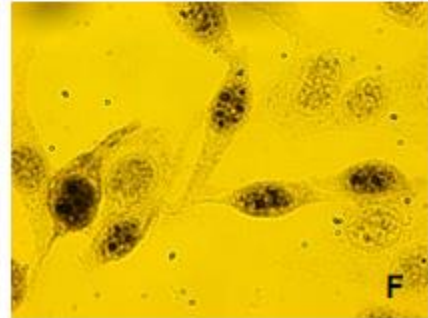
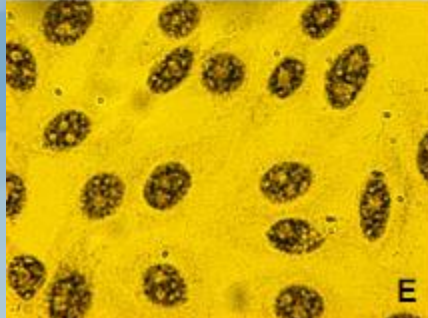
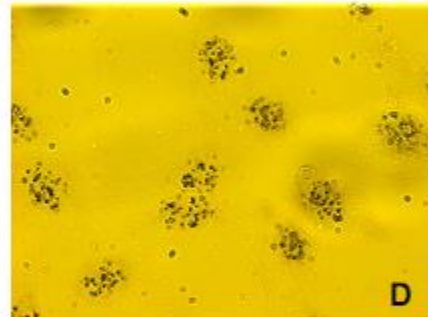
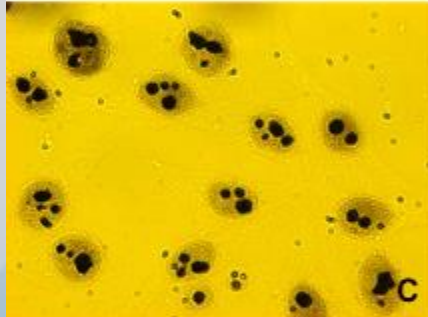
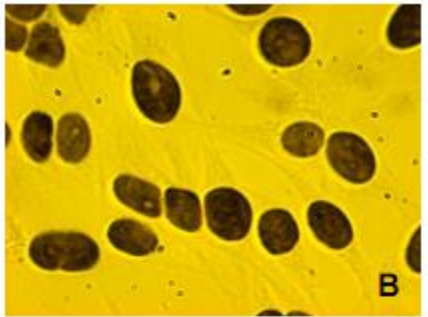
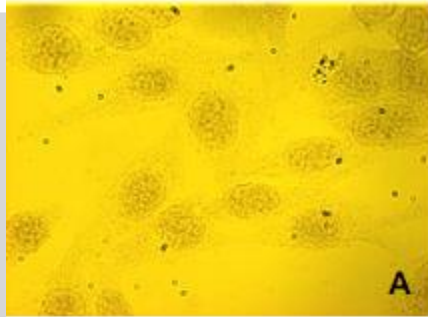
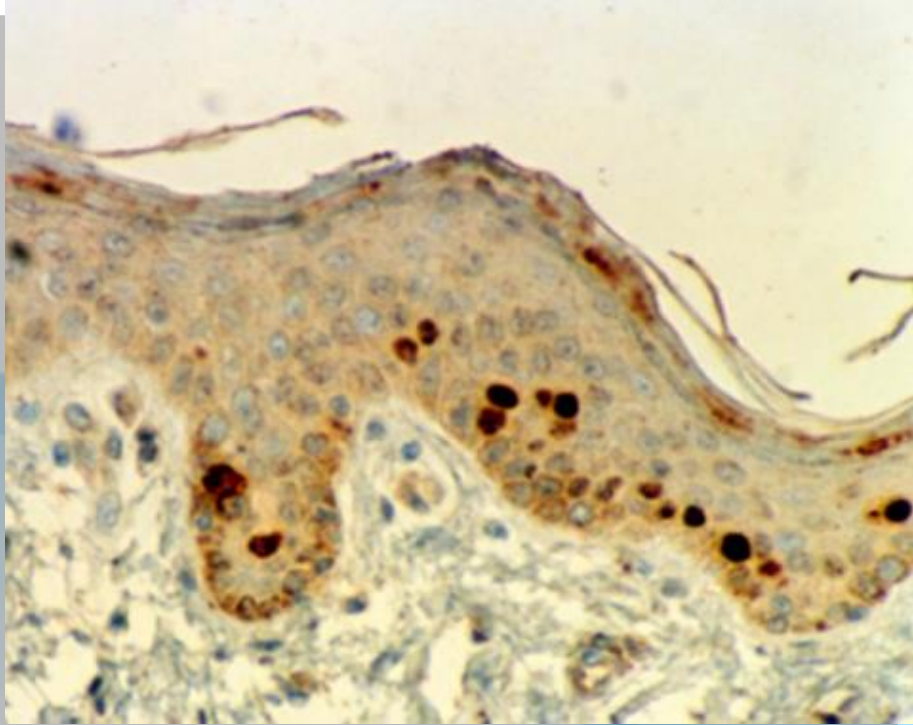
**Table 2 Comparison of reported performance characteristics in endomicroscopy studies**

	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

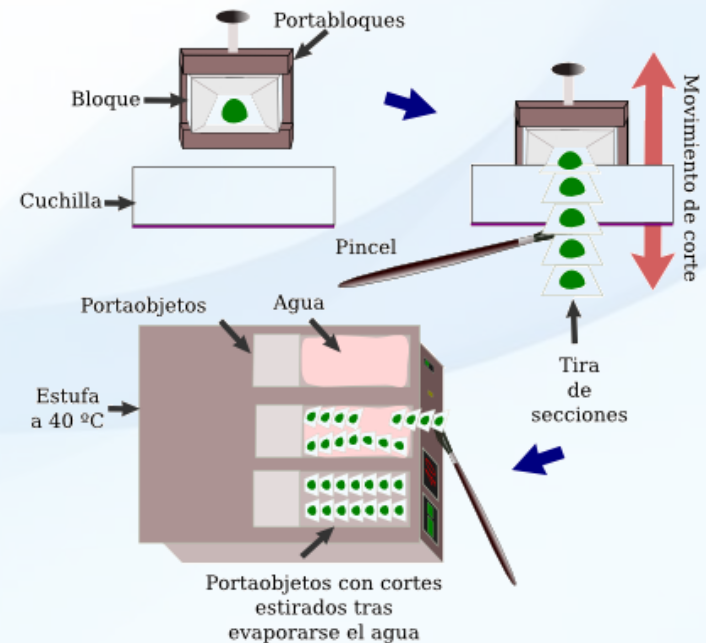
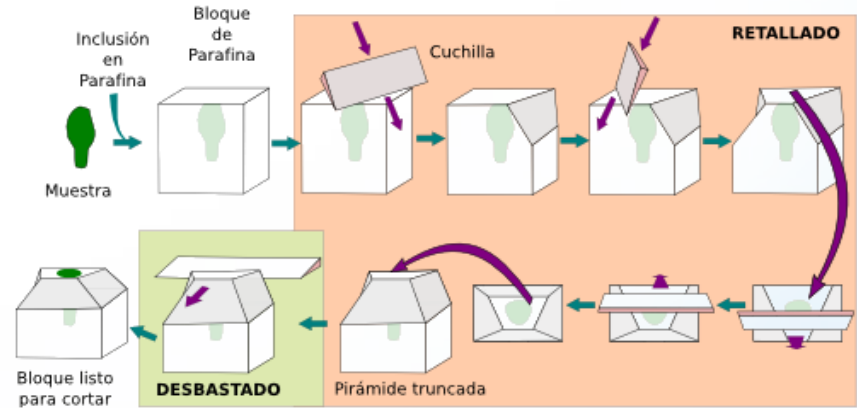
# Inmunohistoquímica



# Inmunohistoquímica

## Montaje de la muestra

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

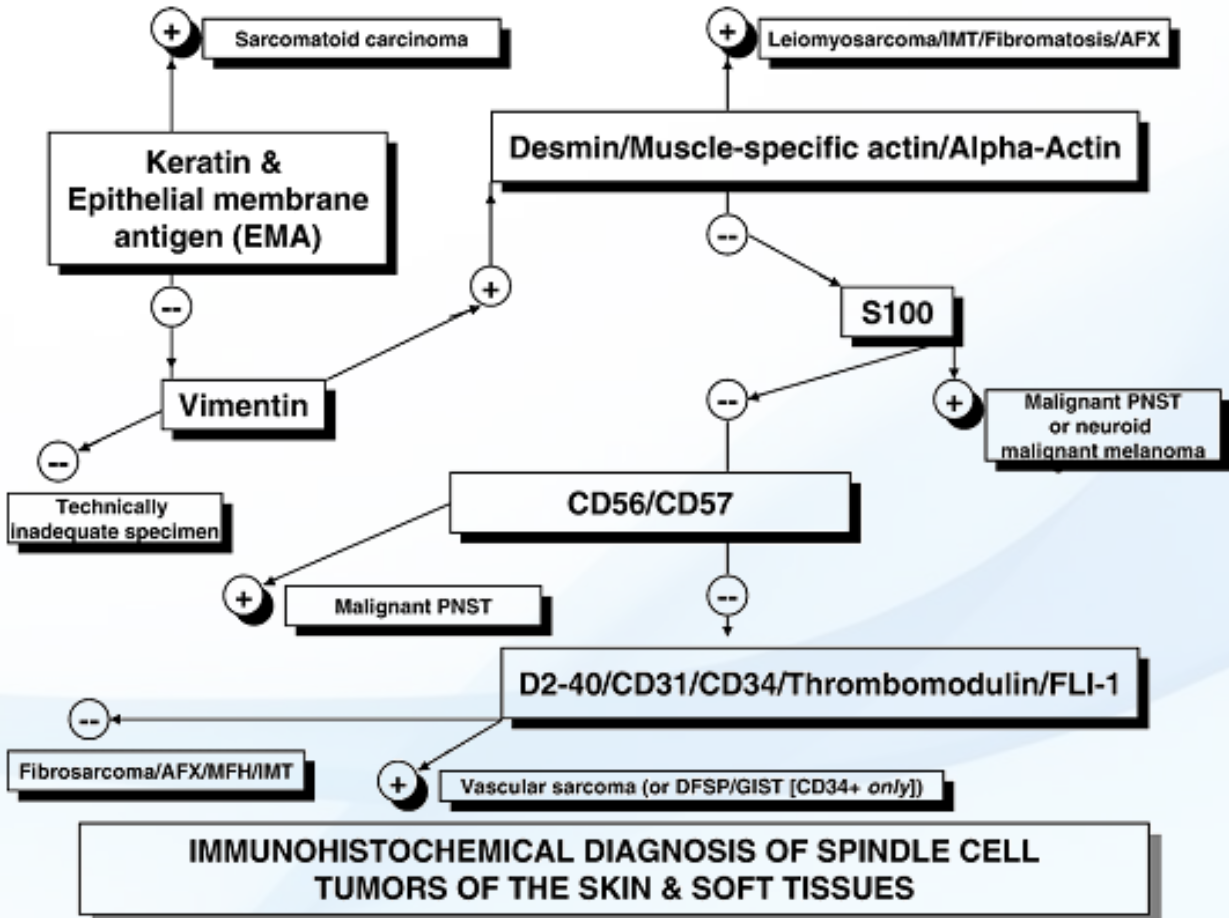


# Inmunohistoquímica

## Aplicaciones!!!

Immunohistochemical approaches to the diagnosis of undifferentiated malignant tumors

Annals of Diagnostic Pathology 12 (2008) 72–84



# Inmunohistoquímica

**Aplicaciones!!!**

**Current Progress of Immunostains in Mohs Micrographic Surgery: A Review**



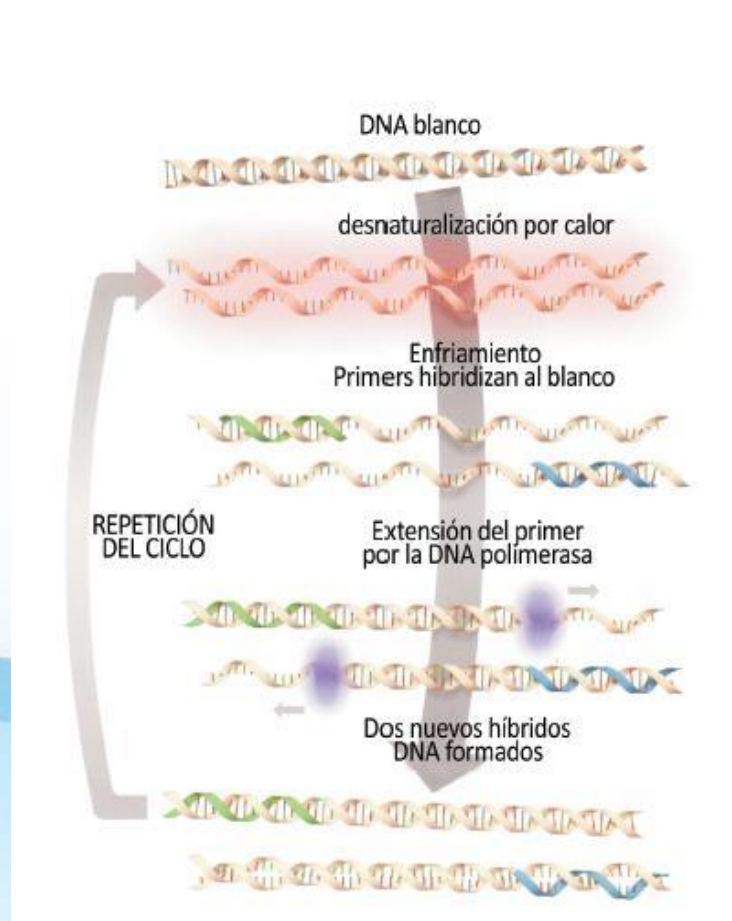
*Dermatol Surg* 2008;34:1621–1636

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

<i>Tumor</i>	<i>Immunostain</i>
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 <sup>116</sup>	Low molecular weight cytokeratin (Cam 5.2)
Extramammary Paget's disease	CK7
Atypical fibroxanthoma	(+) stain = CD10 (-) stain = S100, CD34
Malignant nodular hidradenoma <sup>117,118</sup>	(+) 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 <sup>119</sup>	(+) stains = nonspecific esterase, vimentin (-) stain = S100
Syringomatous carcinoma <sup>120</sup>	(+) stains = high- and low-molecular-weight cytokeratins, CEA (-) stain = patchy S100
Trichilemmal carcinoma <sup>121</sup>	(+) stains = CK17, c-erb-B2 (-) stain = CK15
Embryonal rhabdomyosarcoma <sup>122</sup>	Vimentin, S100, MyoD1
Granular cell tumor <sup>123-125</sup>	S100
Infantile digital fibroma <sup>126</sup>	Actin

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

# 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:

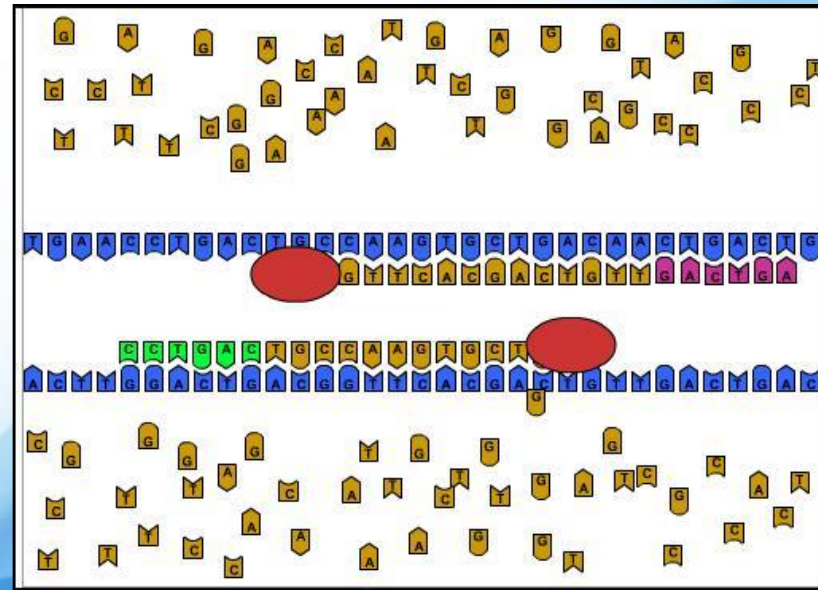
- ✓ Microorganismos
- ✓ Personas (cadáveres)

Investigación

# PCR

## ¿Qué se necesita?

- Los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfos (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



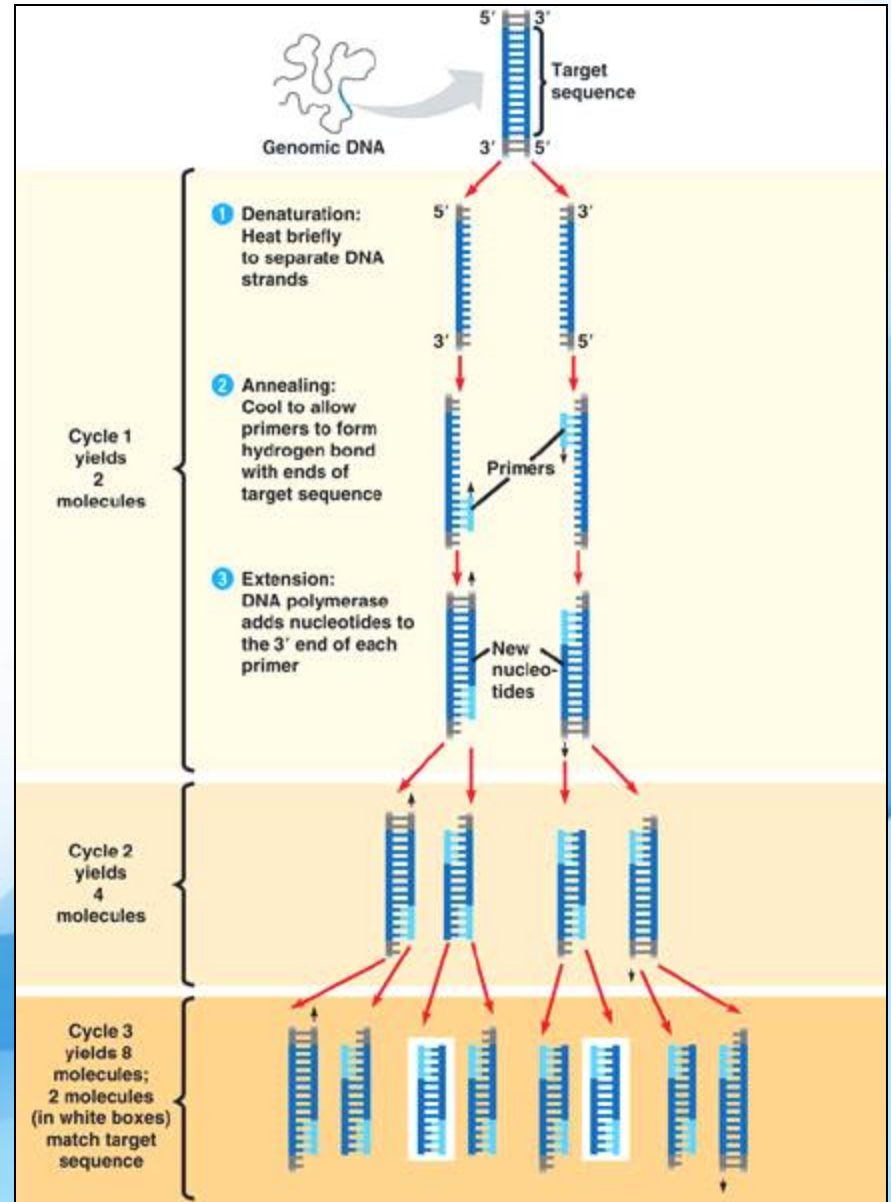


# Pasos de la PCR

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

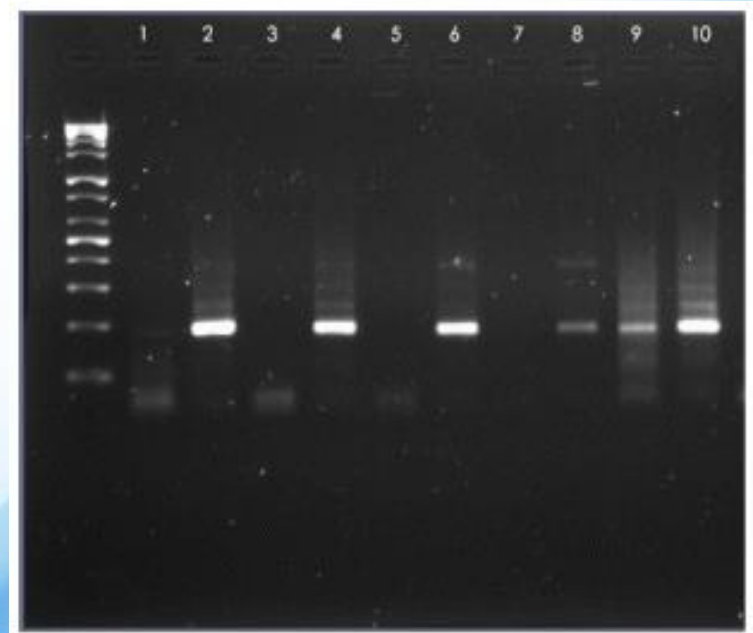
❖ Cada ciclo consta de 3 pasos:

- Desnaturalización
- Alineación
- Extensión

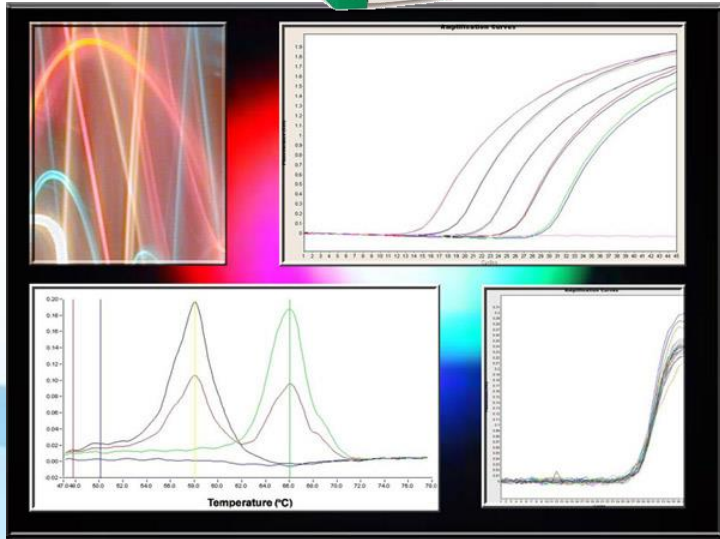


# PCR

- ❖ 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 fluorescente

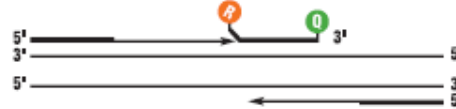
S

### TAQMAN® PROBE-BASED ASSAY CHEMISTRY

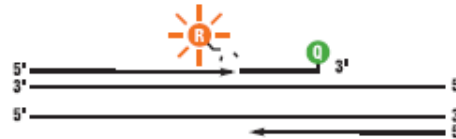
1. **Polymerization:** A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan® probe, respectively.



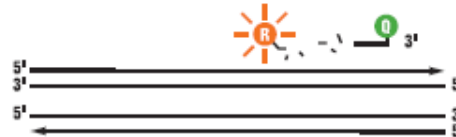
2. **Strand displacement:** When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



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

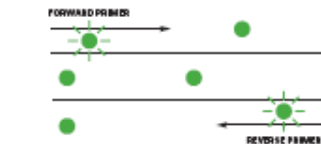
1. **Reaction setup:** The SYBR® Green I Dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



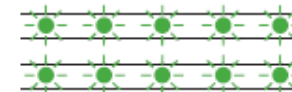
2. **Denaturation:** When the DNA is denatured, the SYBR® Green I Dye is released and the fluorescence is drastically reduced.

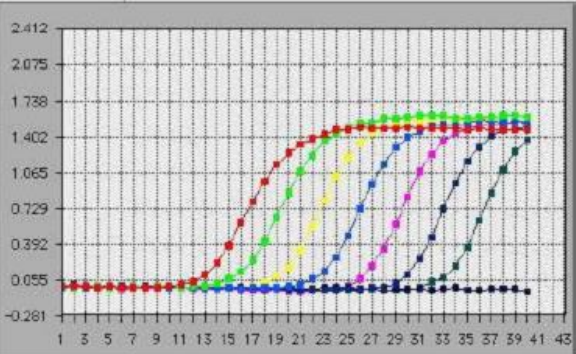


3. **Polymerization:** During extension, primers anneal and PCR product is generated.



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.

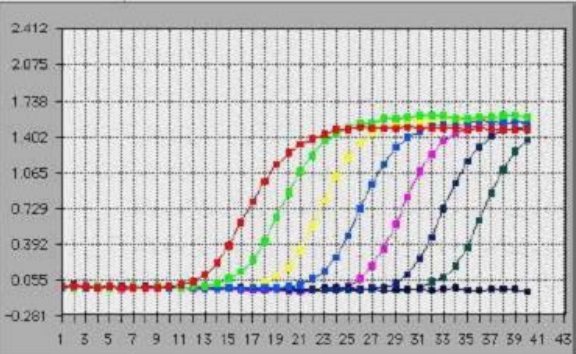




# PCR en tiempo real

## Utilidad

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



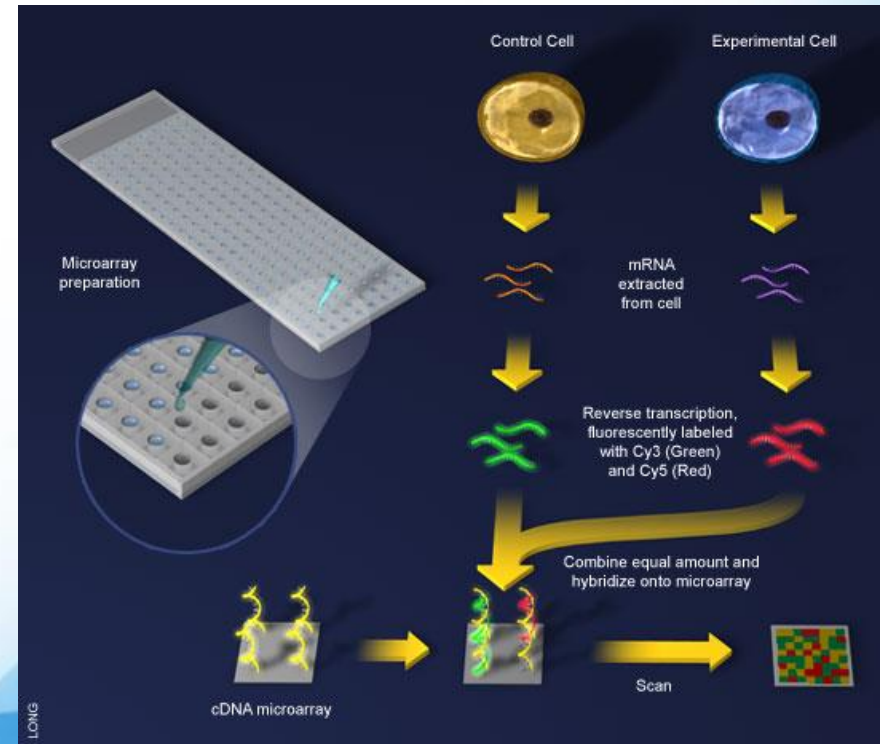
# PCR en tiempo real

## *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

