



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

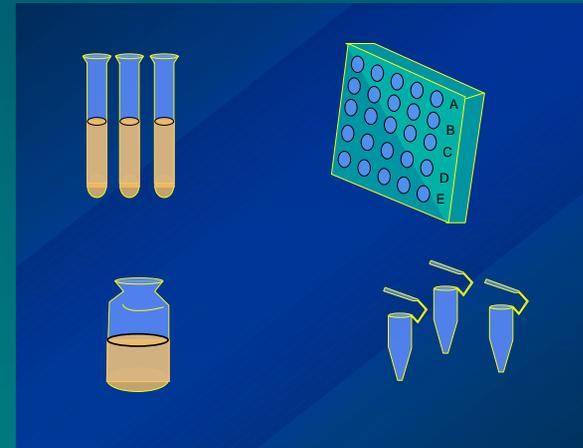


CULTIVOS

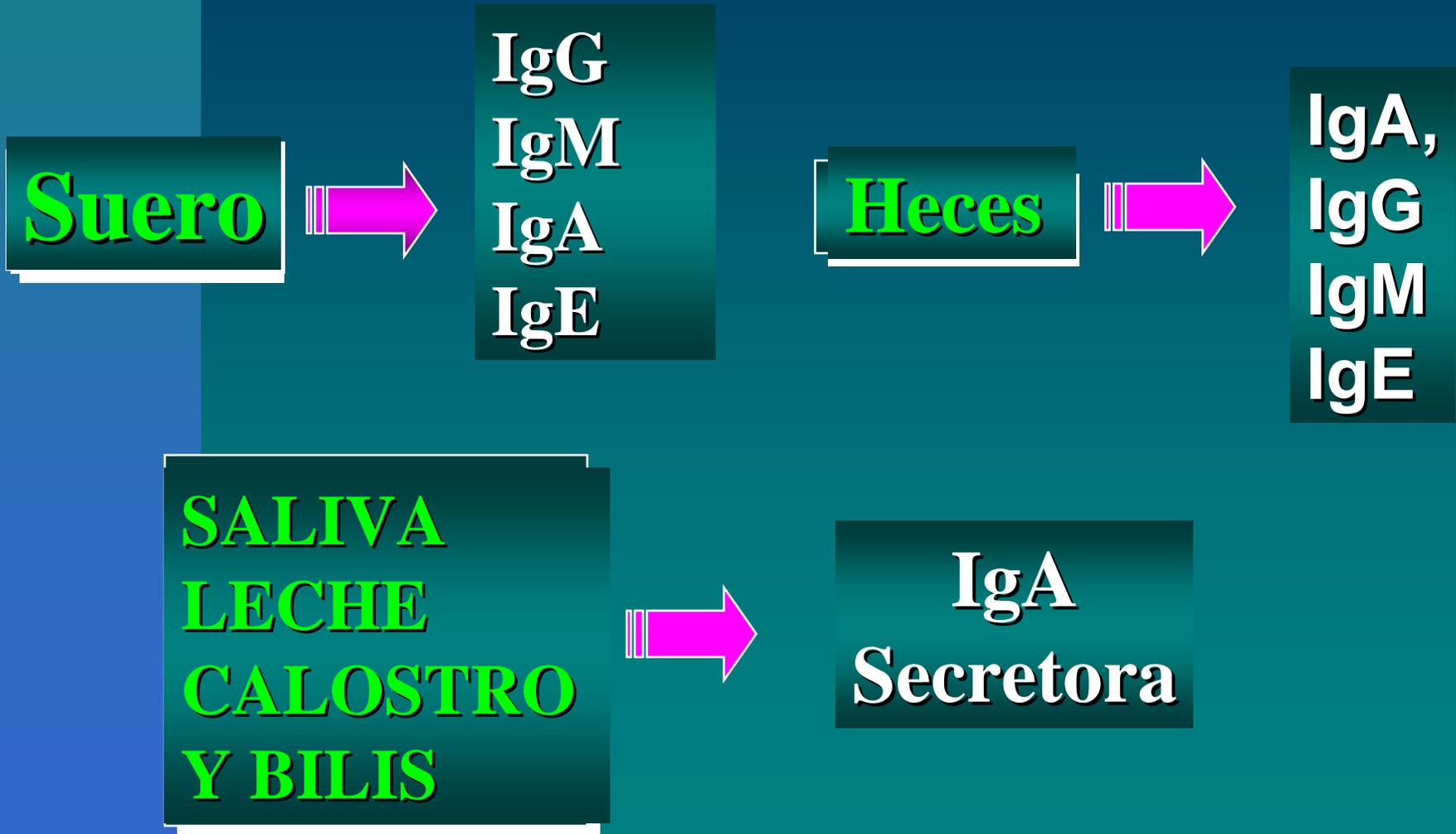
in vivo



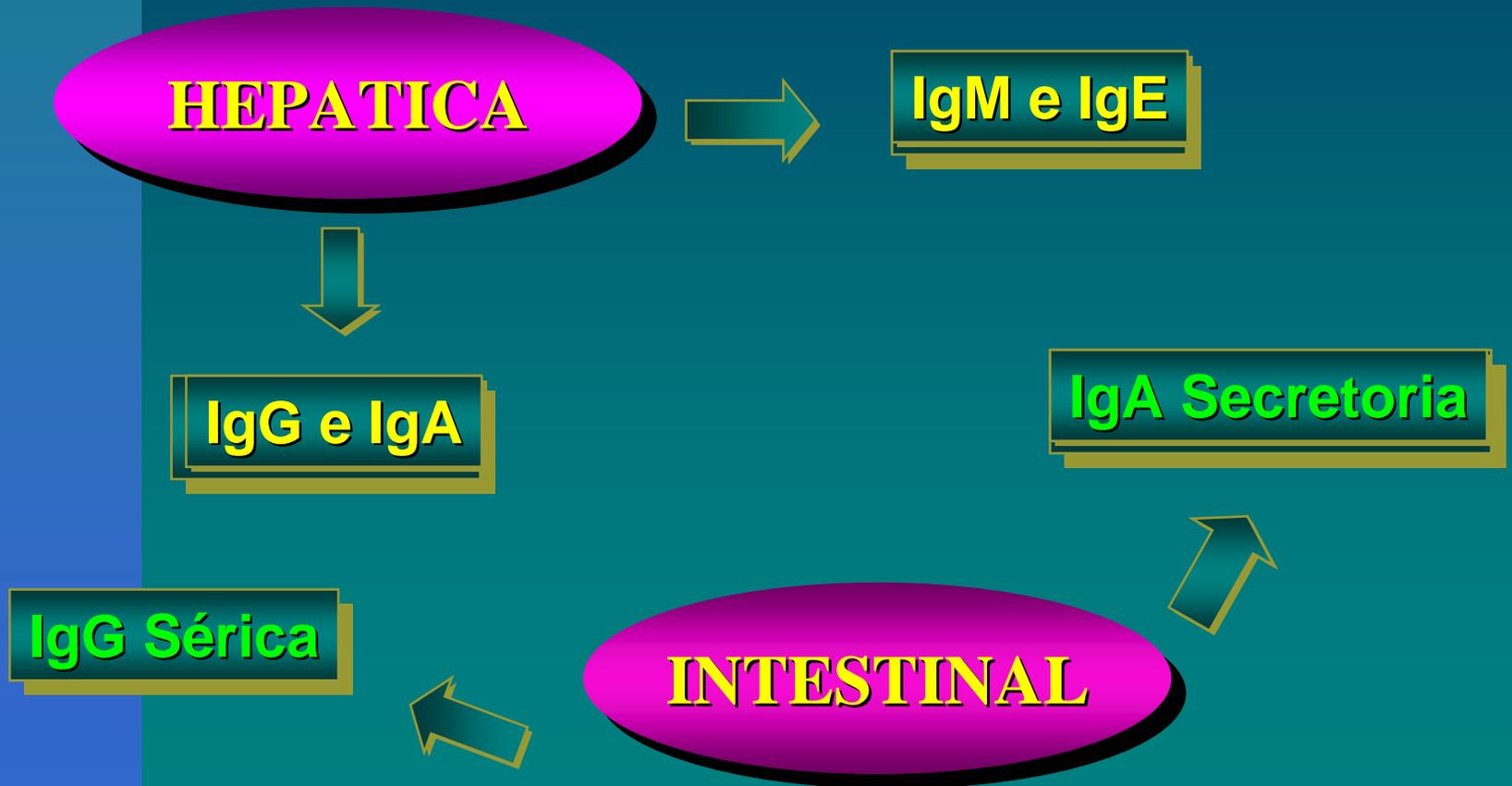
in vitro



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

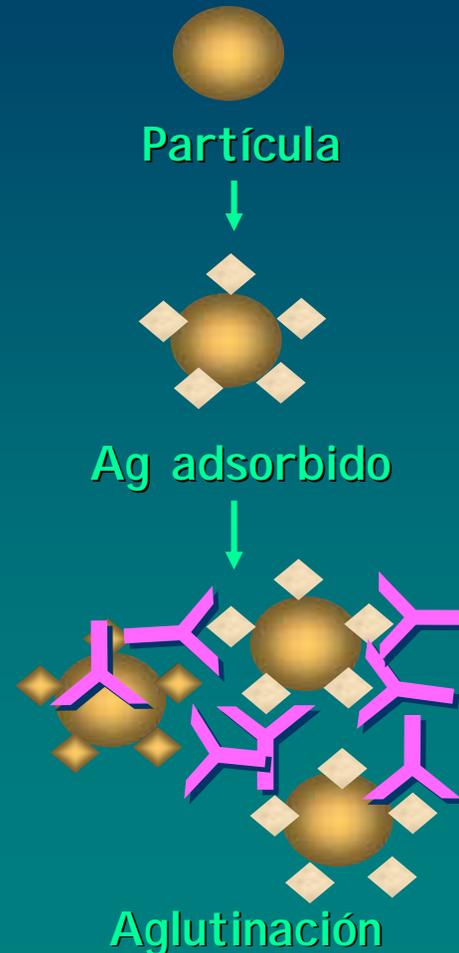
Partículas de latex

✓ Co-aglutinación

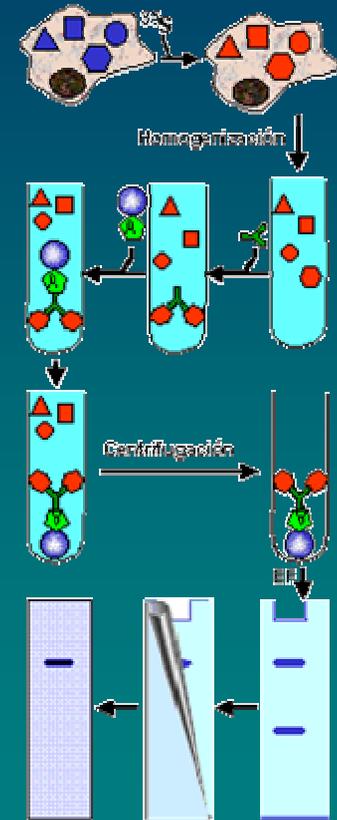
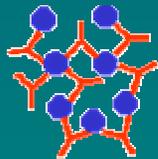
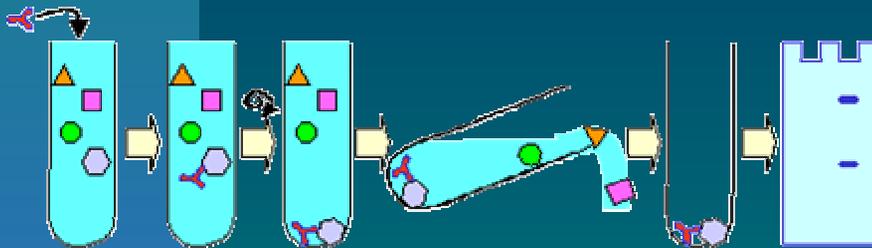
Proteína A → fragmento Fc

✓ Hemaglutinación

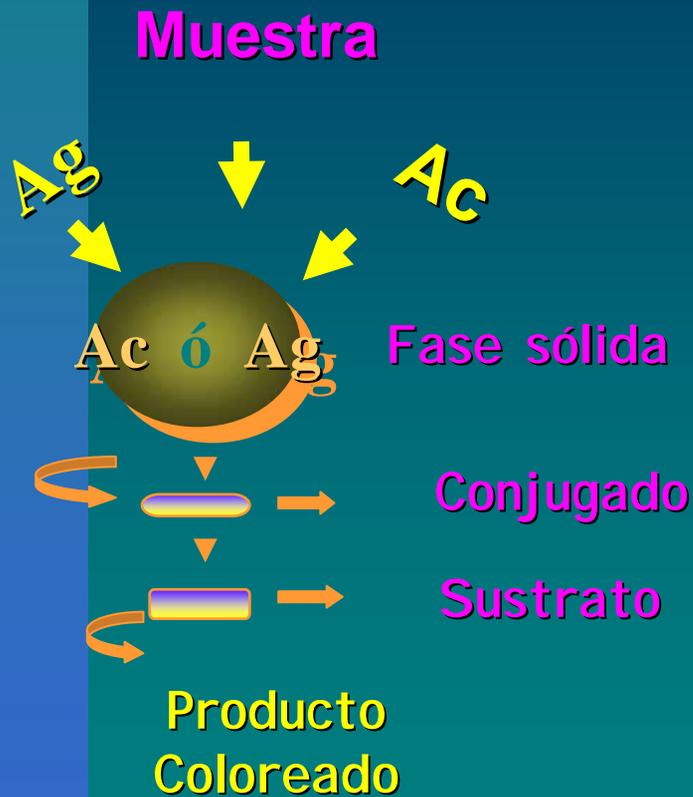
Glóbulos rojos



INMUNOPRECIPITACIÓN



Enzyme linked Inmunosorbent Assay ELISA

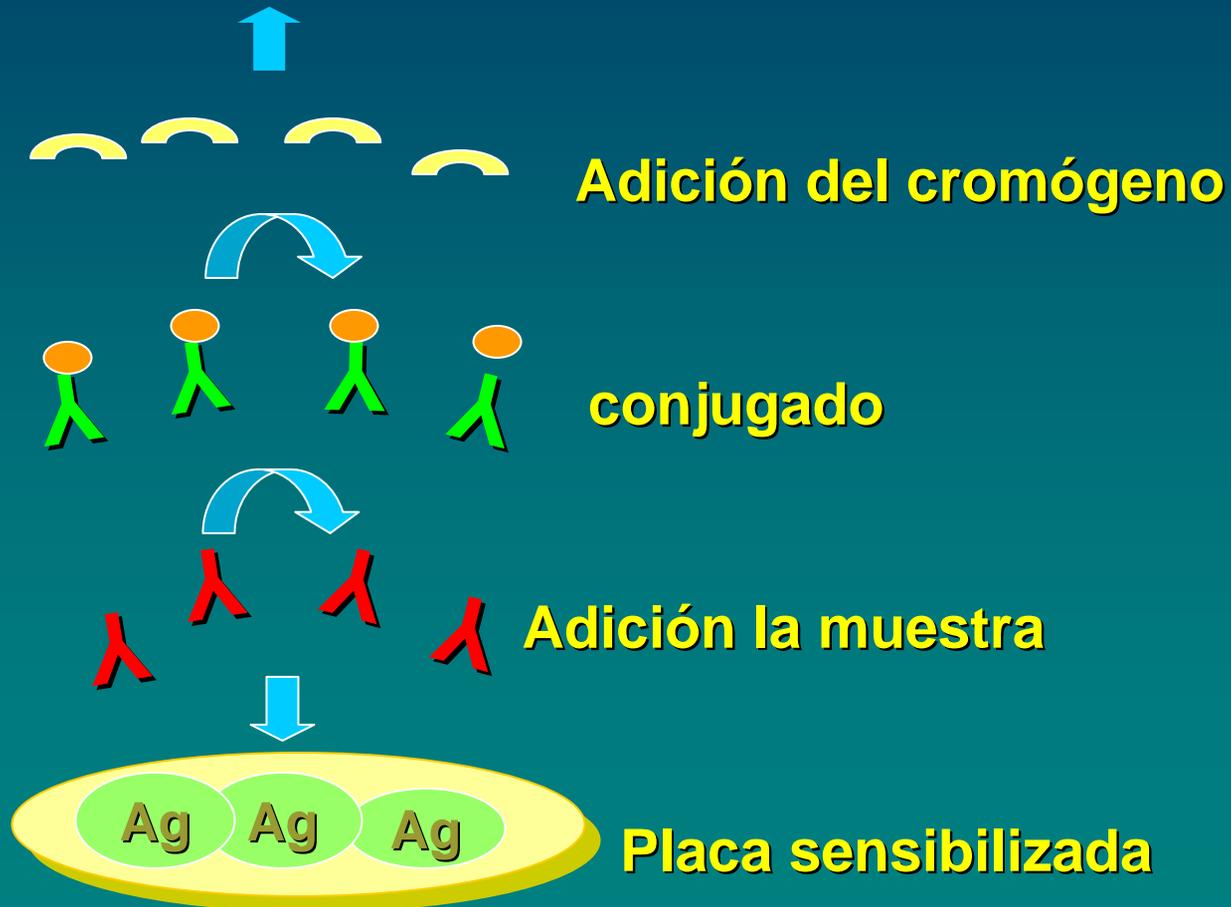


En ELISA, uno de los reactivos se conjuga con una enzima formando un complejo con actividad inmunológica y enzimática.

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)



IMMUNOBLOTTING

PERFIL

PROTEICO



ANTICUERPO



CONJUGADO



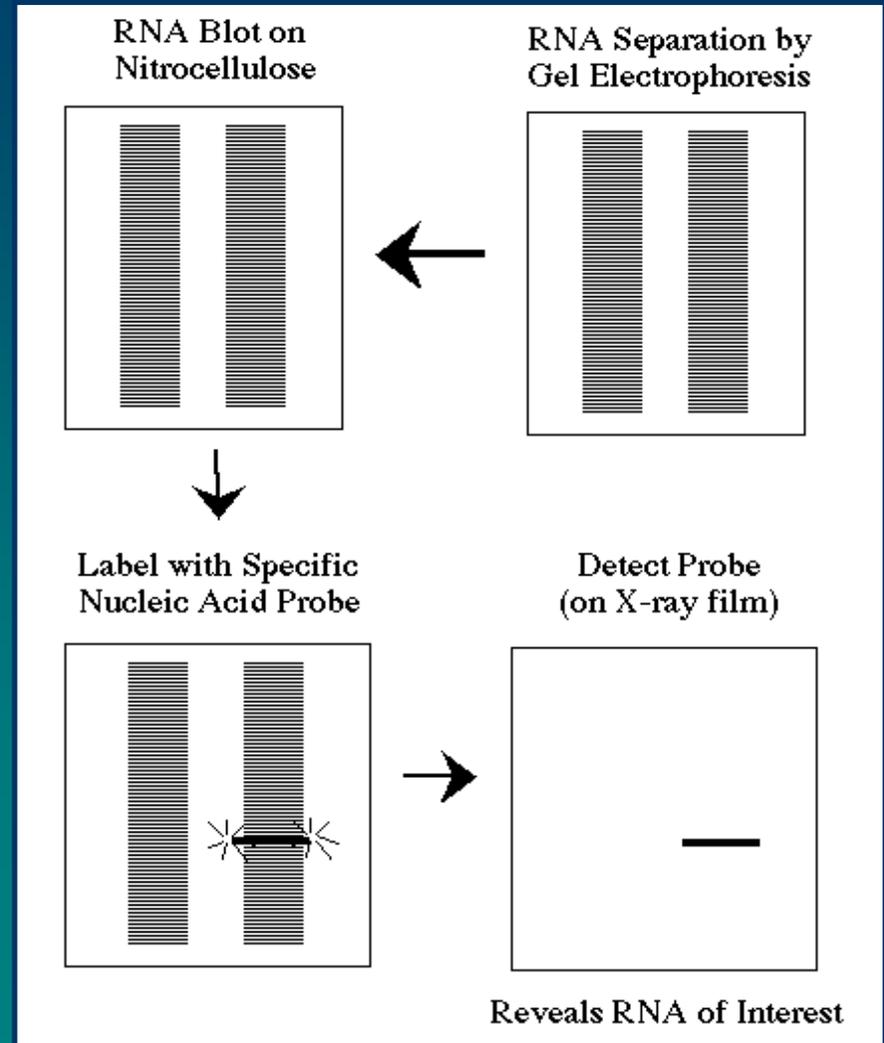
SUBSTRATO

OPORTUNIDAD



NORTHERN BLOT

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



Tecnicas basadas en fluorescencia

Fluorescencia



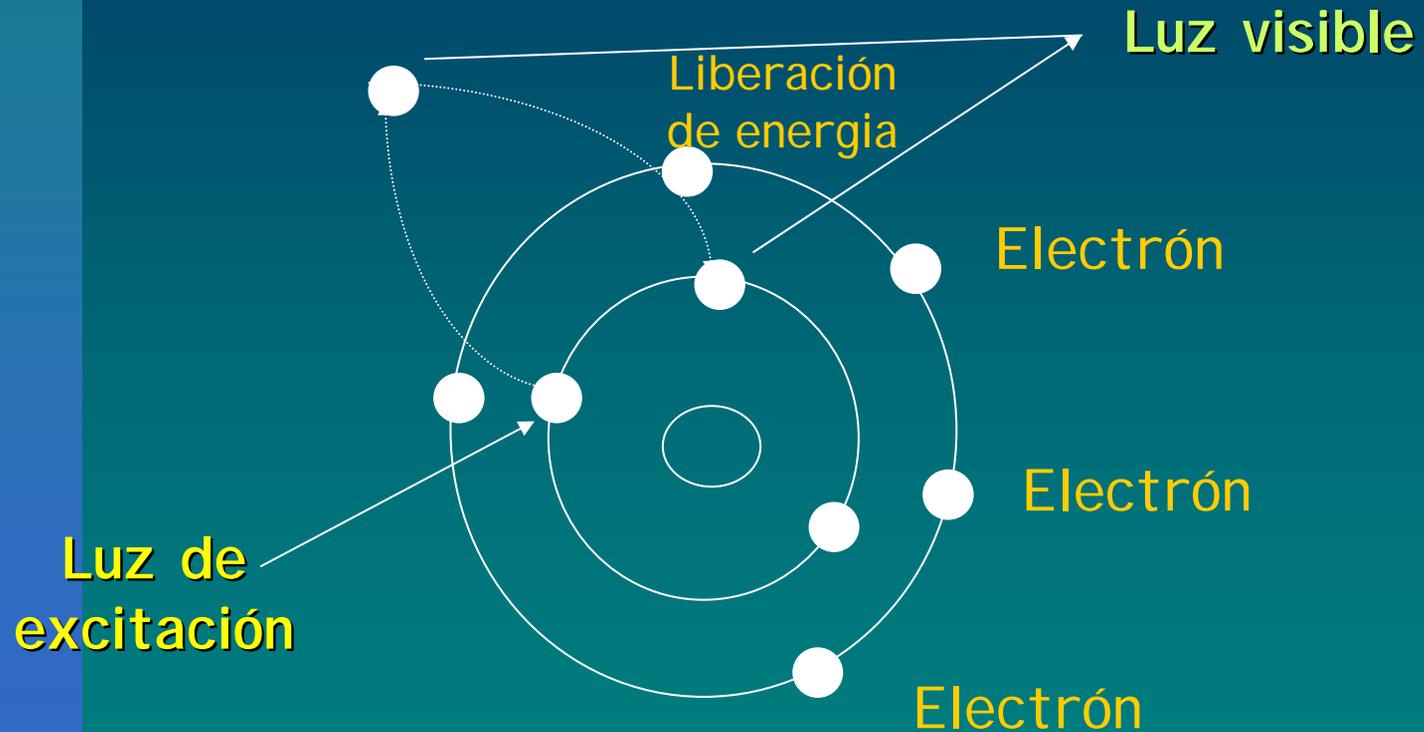
Inmunofluorescencia



Citometría



Fuorescencia



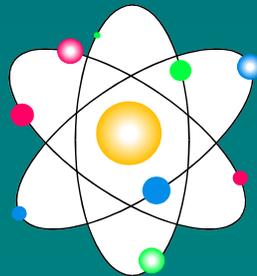
Microscopios de fluorescencia

- 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

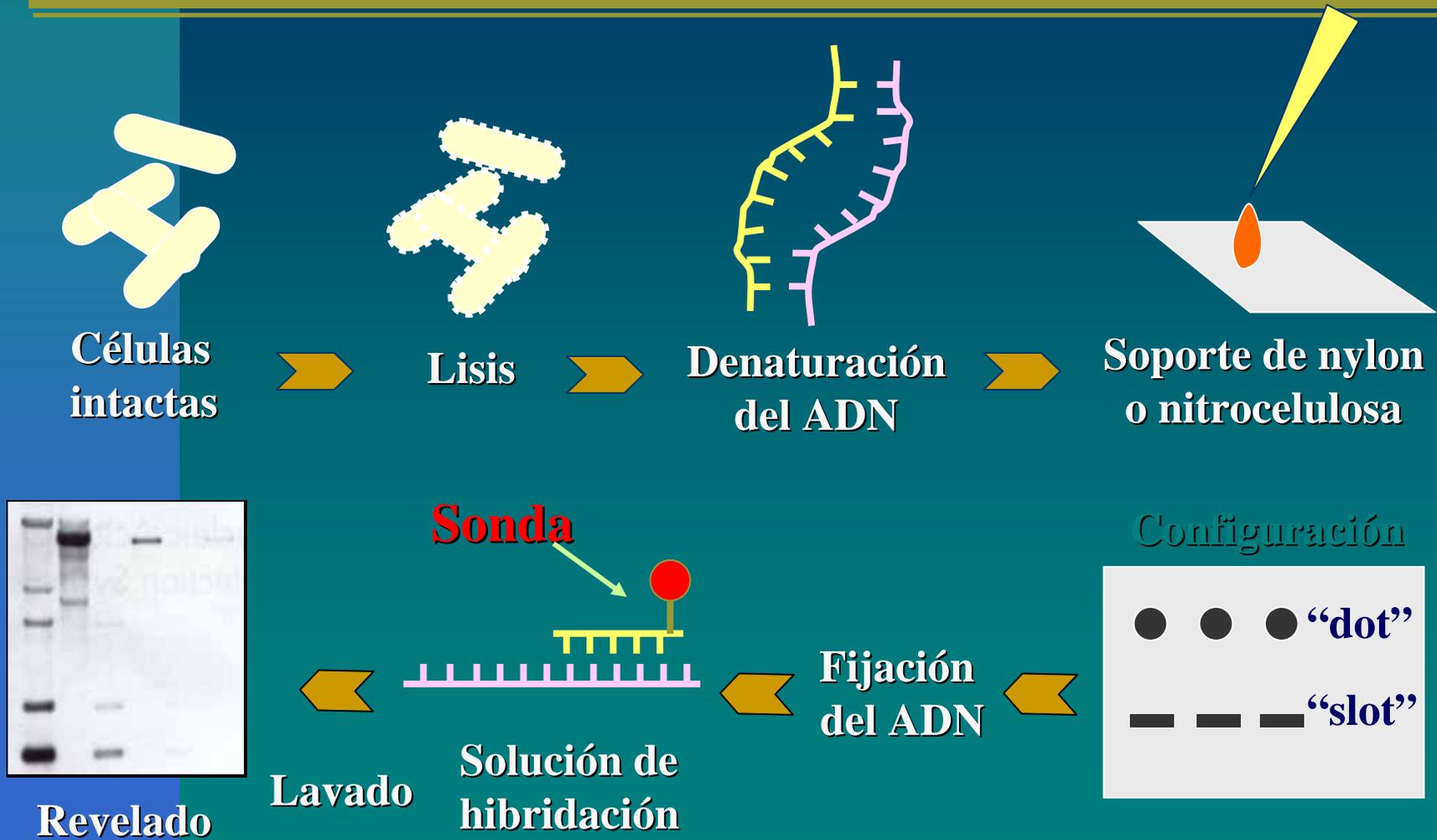
Amplificación del blanco

Amplificación de la sonda

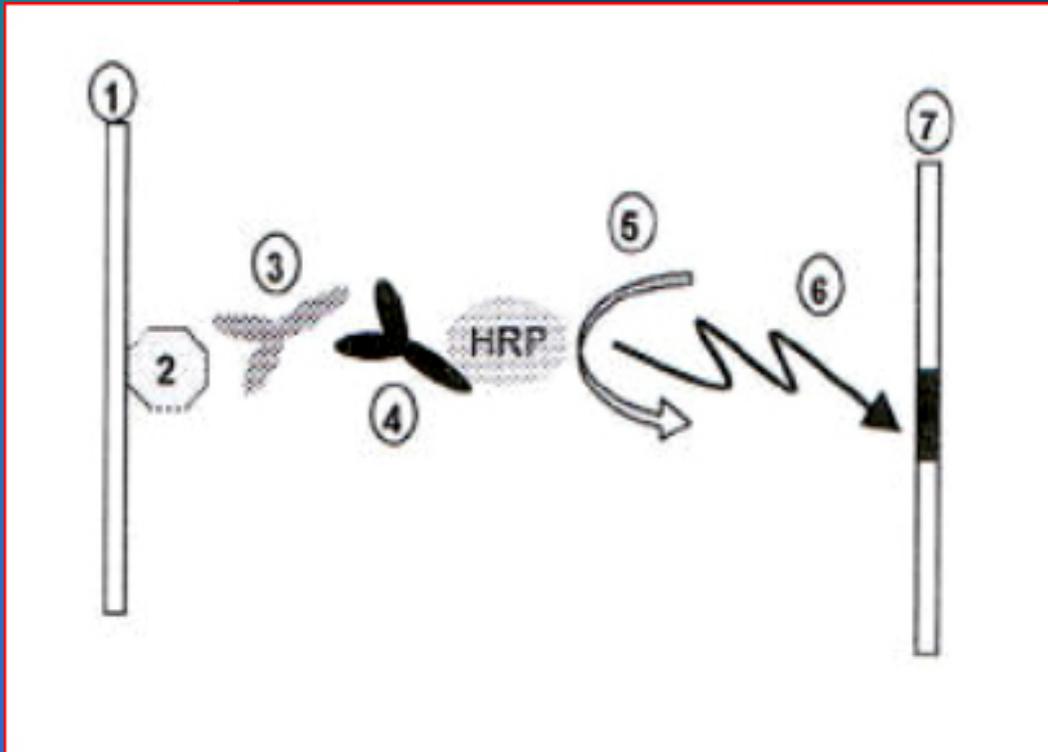
Amplificación de la señal

Técnicas moleculares...

Hibridación en fase sólida



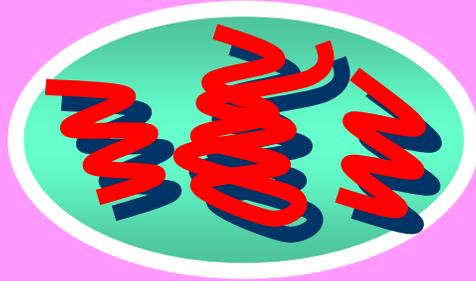
La Quimioluminiscencia



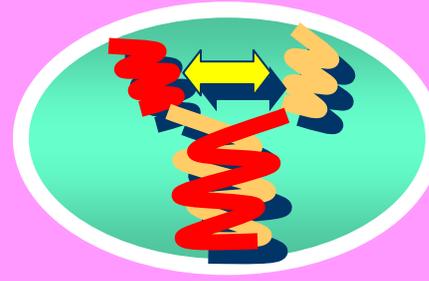
1. Membrana
2. Proteína / Ag
3. Anticuerpo primario
4. Anticuerpo secundario
5. Reactivo Covalight
6. Luz
7. Filtro

QUIMIOLUMINISCENCIA

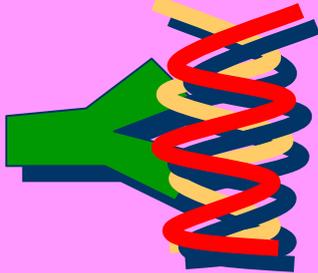
1 DESNATURALIZACIÓN



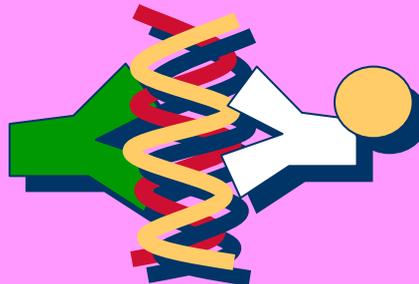
2 HIBRIDACIÓN



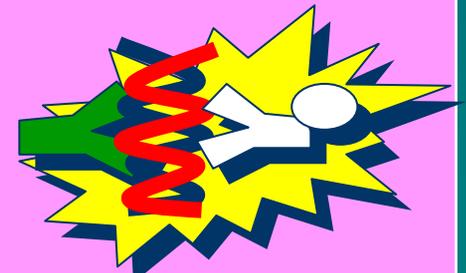
3 CAPTURA



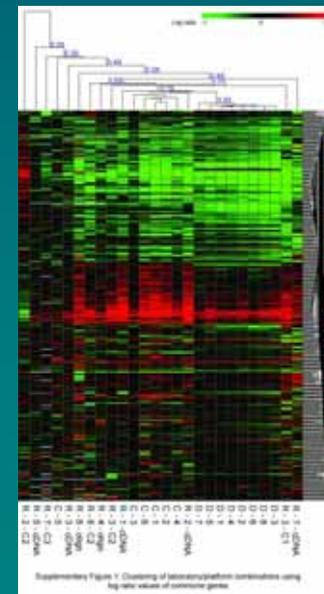
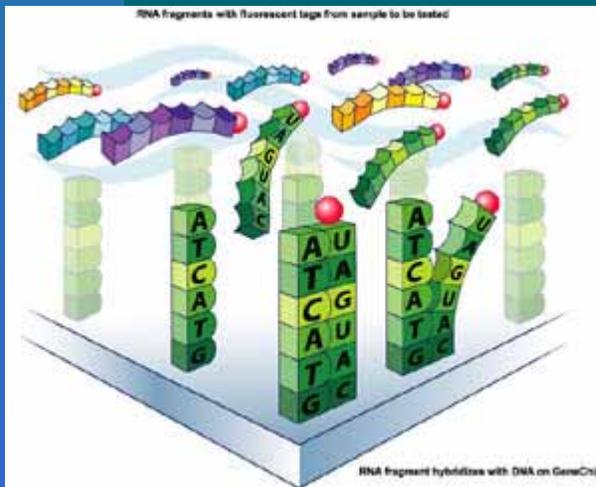
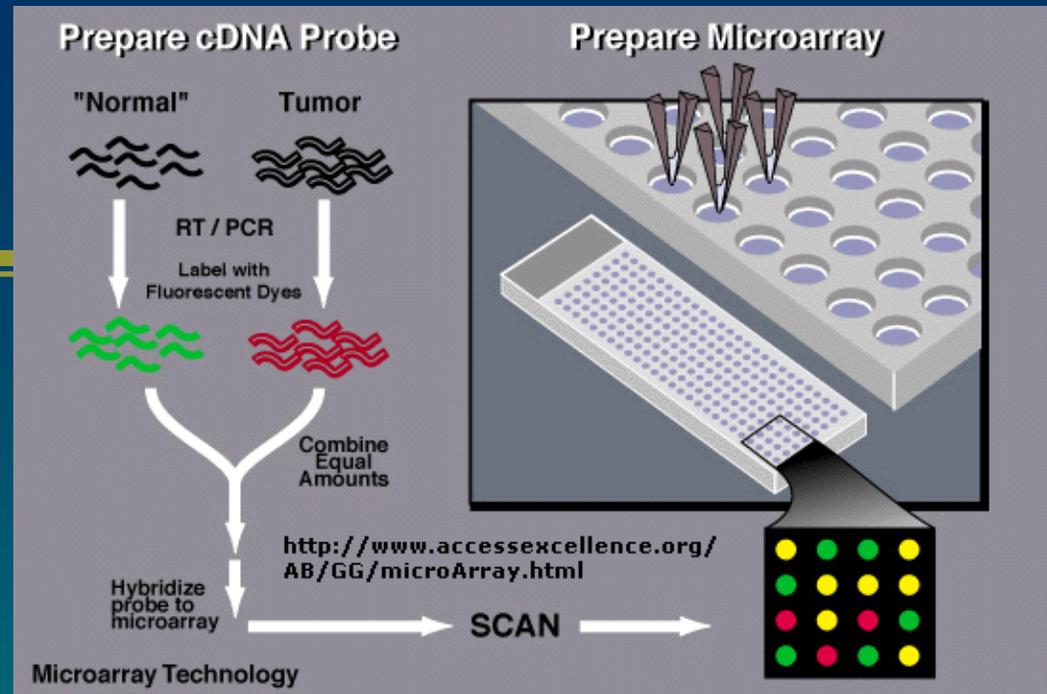
4 MARCAJE

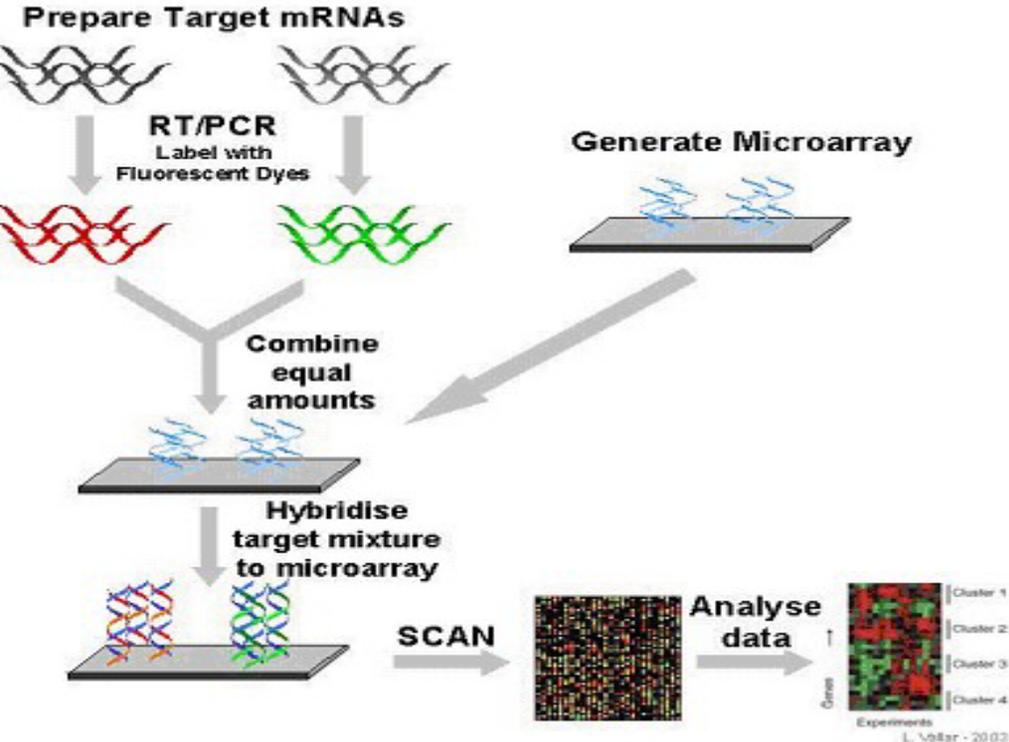


5 DETECCIÓN



Microarray





Microarray

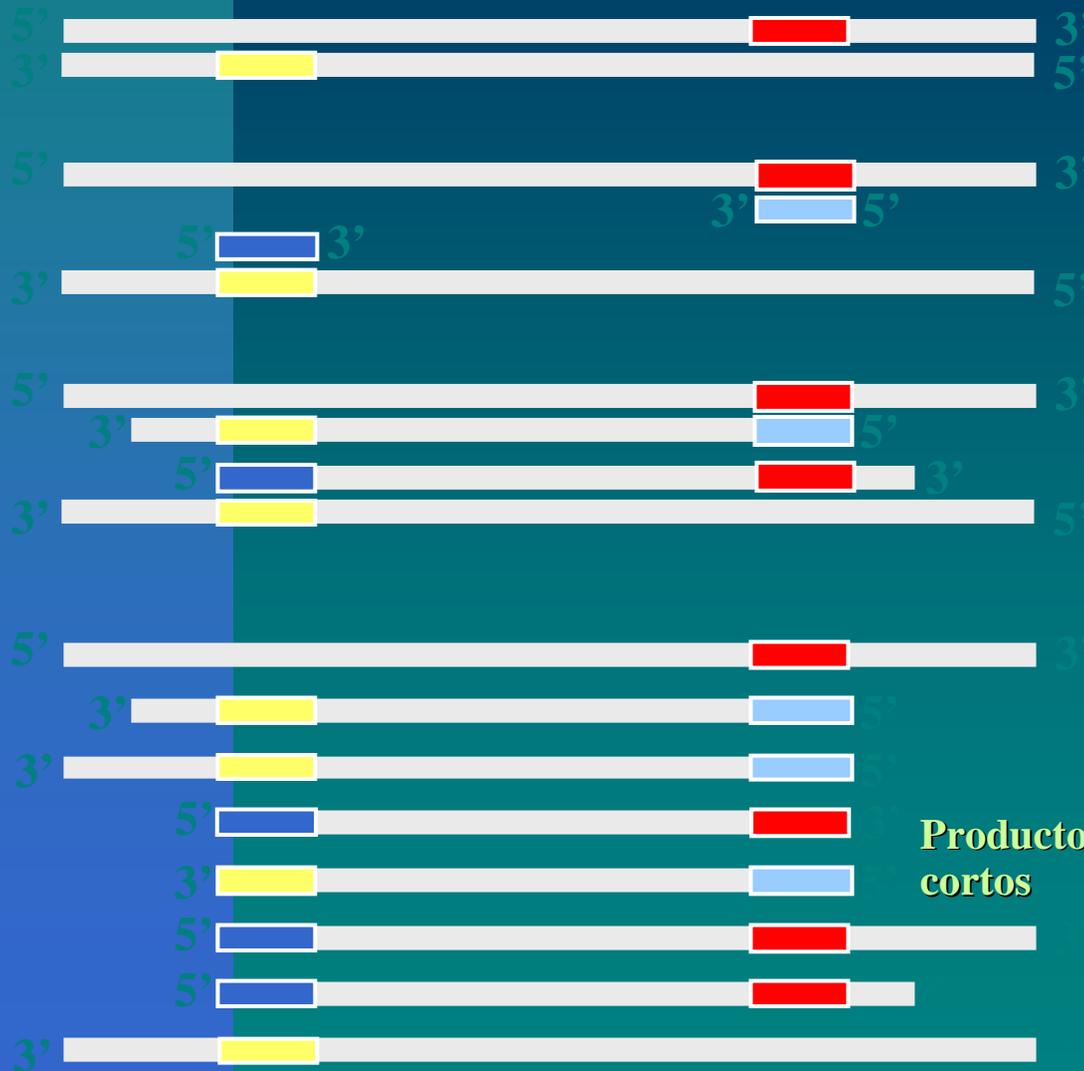


Microarray

- Es una herramienta desarrollada para estudiar gran número de genes que interactúan entre sí regulando la función celular.
- La tecnología de Microarray se usa actualmente para medir los genes cuya actividad es mayor o menor en una determinada enfermedad.
- Con ella los investigadores pueden descubrir algunas proteínas reguladoras de la función genética.
- Útil en la investigación de las enfermedades toxicogenéticas.

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.

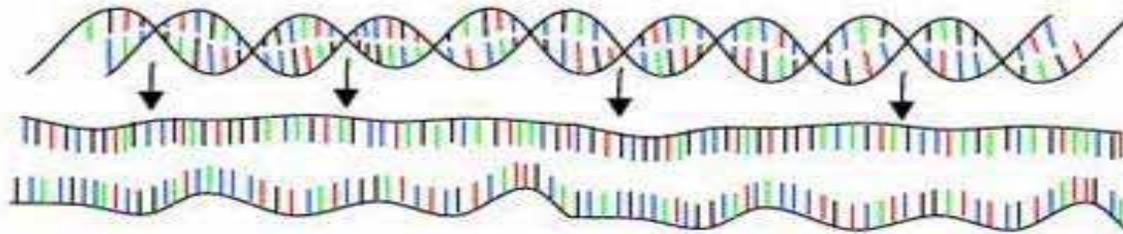
D. Segundo ciclo:
Hibridación de los oligos
(en exceso) con los
productos de C y
acumulación exponencial
de productos cortos en
ciclos sucesivos.

PCR : Polymerase Chain Reaction

30-40 ciclos de 3 pasos:

Paso 1: Desnaturalización

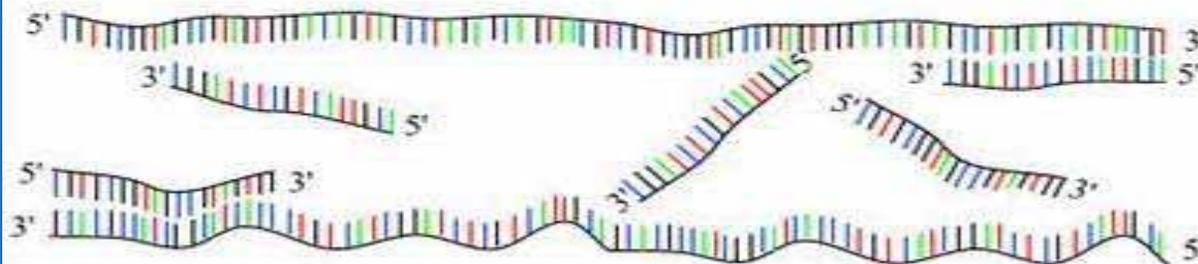
1 minuto a 94 °C



Paso 2: Hibridación

45 segundos a 54 °C

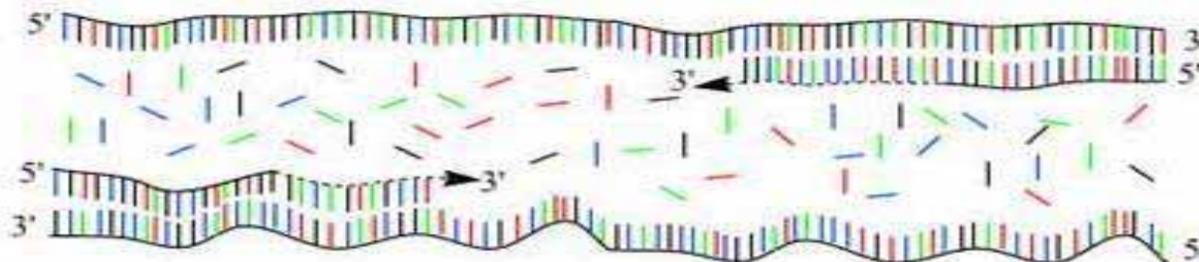
!!!Cebadores sentido y antisentido!!!



Paso 3: Extensión

2 minutos a 72 °C

solo dNTPs

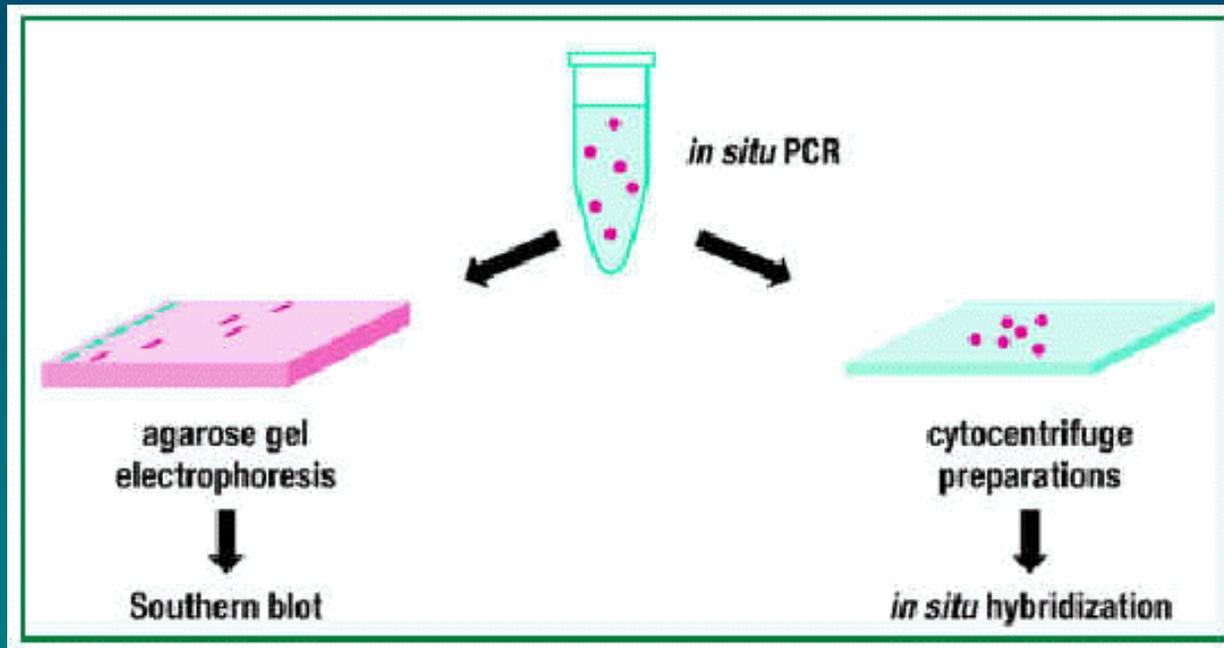


REVELACIÓN



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 ^a (30/33, 90.9%)	0.598 ± 0.180 ^a (17/33, 51.51%)	18	15	33
Microscopy-negative (n = 10)	0.206 ± 0.134 ^a (10/10, 100%)	0.033 ± 0.011 ^a (10/10, 100%)	-	2	2

^aPositive 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 ^a	Time ^b (h)
Conventional PCR	119 (\pm 890)	NA ^c	NA	+	7
SYBR Green	17 (\pm 57)	10 ⁵ -10 ¹	-4.2 (72%)	++	7
LightCycler	4 (\pm 14)	10 ⁶ -10 ²	-3.5 (90%)	++++	4
TaqMan 1	1 (\pm 4)	10 ⁶ -10 ⁻¹	-3.3 (100%)	+++	4
TaqMan 2	0.5 (\pm 1.2)	10 ⁶ -10 ⁻¹	-3.5 (91%)	+++	4

^a 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.

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

^c 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

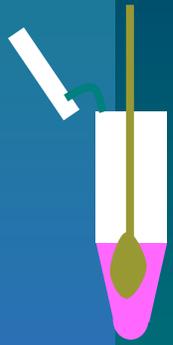
Aplicaciones Clínicas

- ▶ 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...

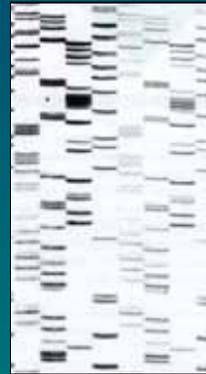
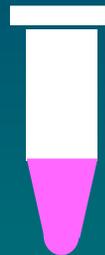
Extracción del
ADN/ARN



Muestra



Amplificación/
secuencia
de genes
universales



Separación
electroforética



Análisis de
banco de
datos
(secuencias
conocidas)

Identificación



Gracias

¿Preguntas ?

