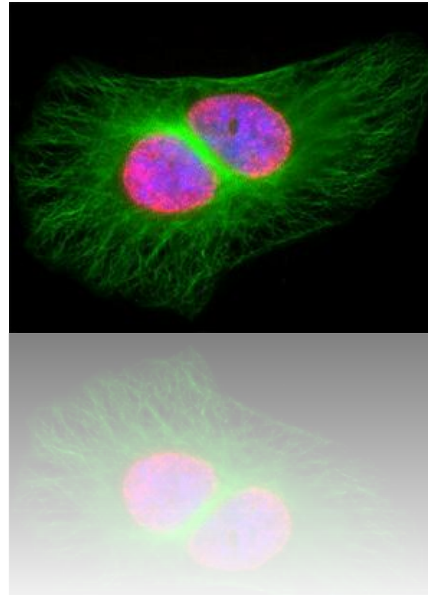
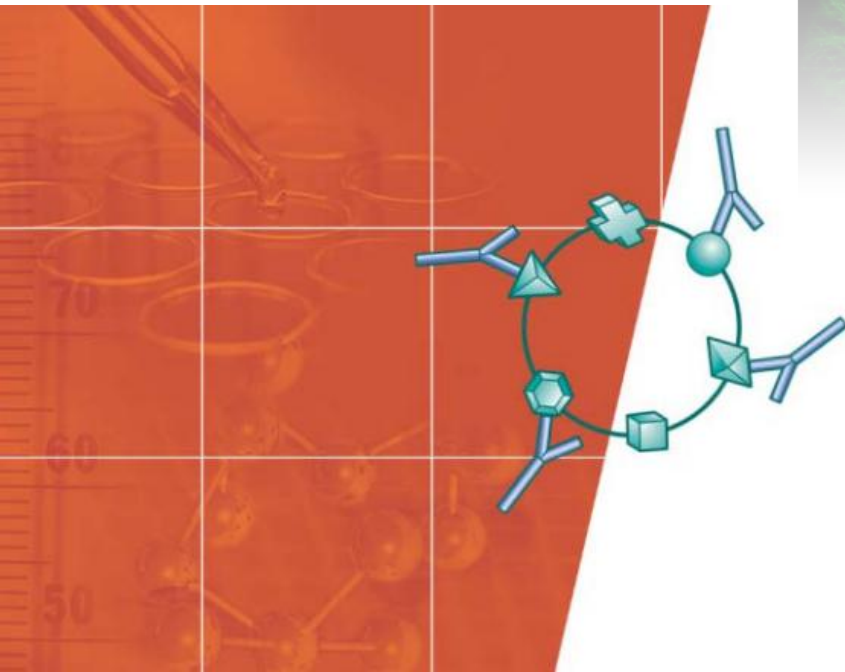




Herramientas para el inmunodiagnóstico

Universidad de Los Andes
Facultad de Medicina
Instituto de Inmunología Clínica

Luisa Barboza Carrillo



Técnicas basadas en interacción antígeno-anticuerpo

- **Inmunoensayos**
- **Western blot**
- **Inmunoprecipitación**
- **Inmunohistoquímica**
- **Inmunofluorescencia**

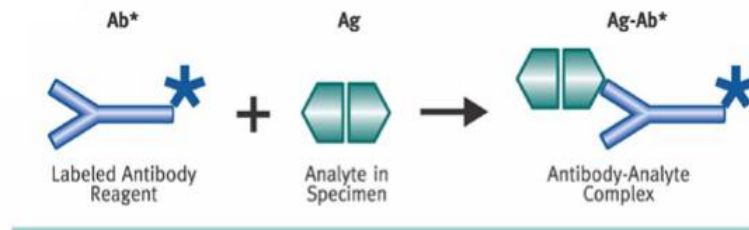


Figura 1-5 Los anticuerpos marcados permiten la detección de complejos antígeno/anticuerpo en los inmunoensayos

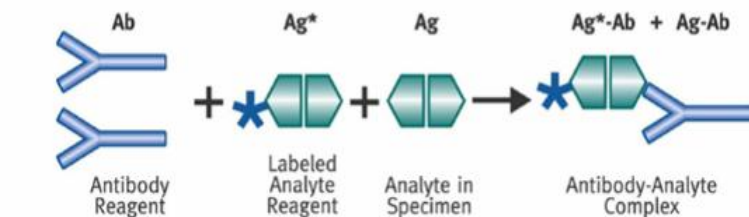
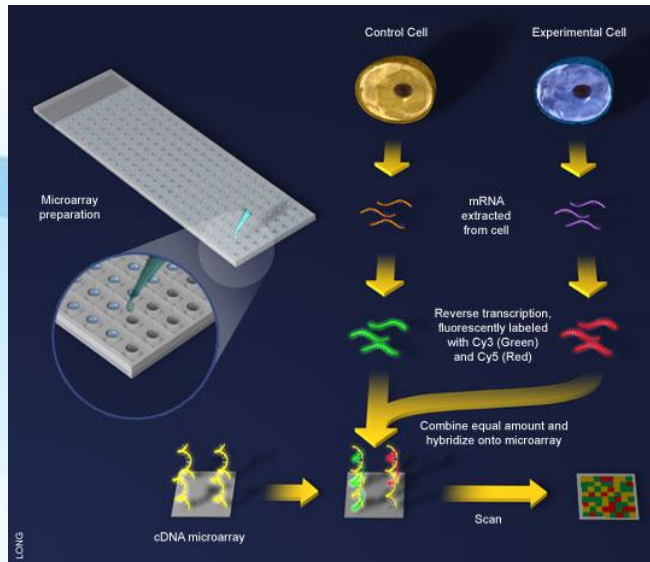
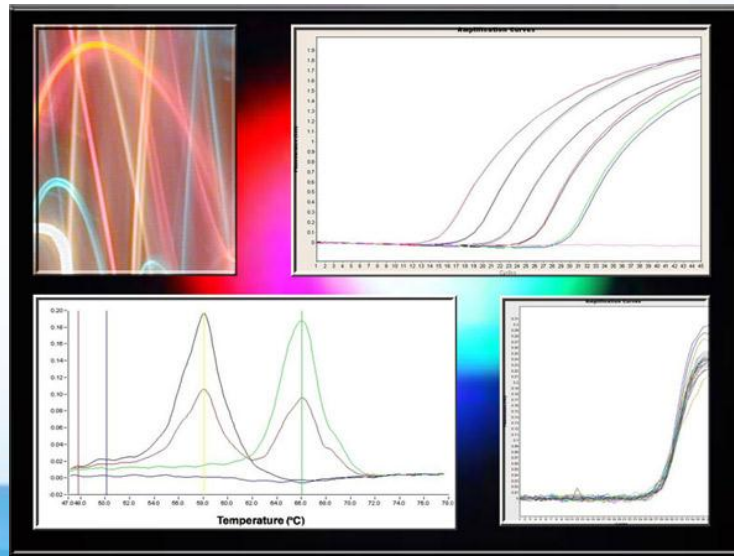
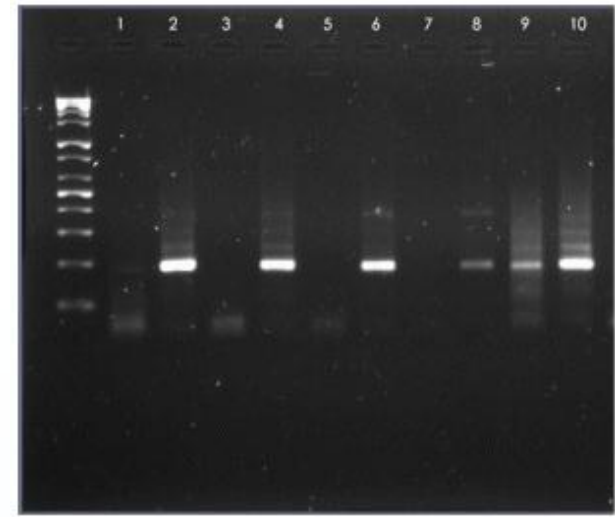


Figura 1-6 El antígeno marcado también permite la detección de complejos antígeno/anticuerpo en los inmunoensayos

Otras técnicas para valorar respuesta inmune

- **PCR**
- **PCR en tiempo real**
- **Microarray**



Respuesta Inmune

¿qué valorar?

Poblaciones celulares

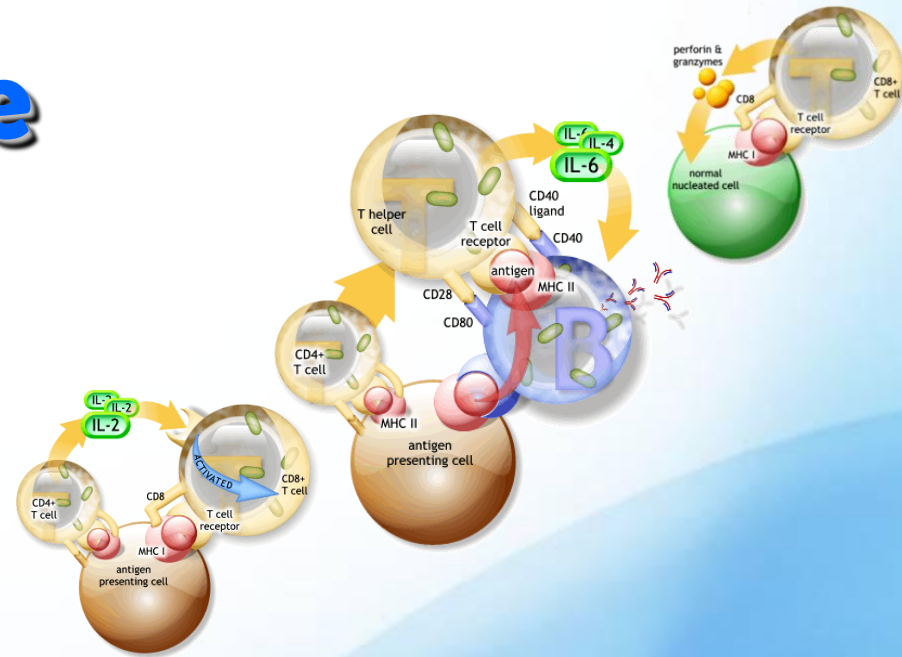
- Células T
- Células B
- Células fagocíticas
- Células citotóxicas

Productos de la respuesta

- Citoquinas
- Inmunoglobulinas/anticuerpos
- Complemento

Diagnóstico

- Patologías inmunes
- Procesos infecciosos



Tipos de inmunoensayo:



Inmunoensayo:
Formación de
inmunocomplejos
(antígeno/anticuerpo)

Marcados.
Conjugados a moléculas
que emiten señales
detectables

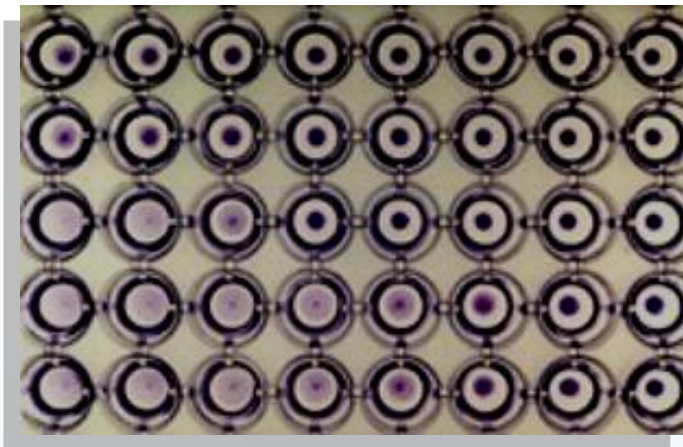
- Radioinmunoensayo (RIA): El marcador es un isótopo radioactivo.
- Análisis inmunoenzimáticos (EIA): El marcador es una enzima.
- Fluoroinmunoanálisis. El marcador es una partícula fluorescente.
- Ensayos inmunoquimioluminiscente. La marca es una sustancia quimioluminiscente.

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

- Precipitación
- Aglutinación

Inmunoensayos:

✓ Comparación



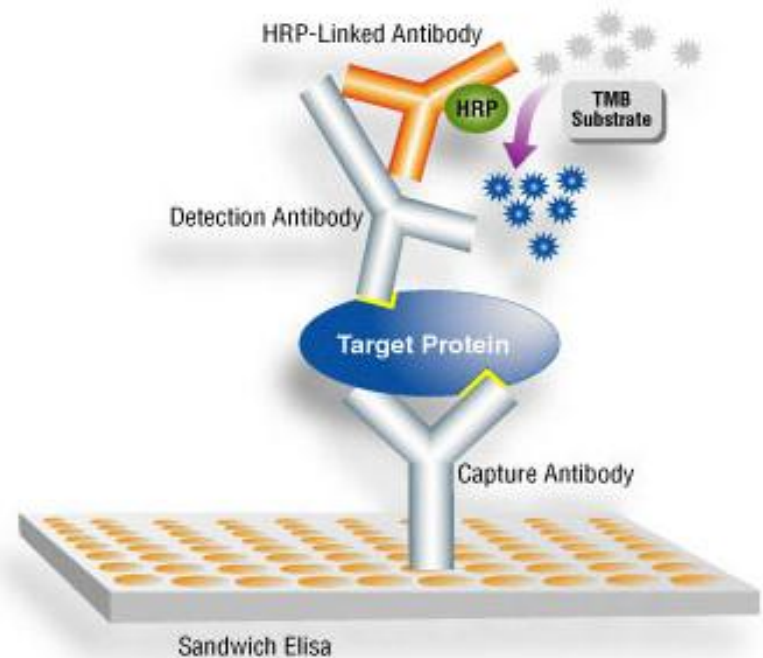
Assay	Sensitivity* ($\mu\text{g antibody/ml}$)
Precipitation reaction in fluids	20–200
Precipitation reactions in gels	
Mancini radial immunodiffusion	10–50
Ouchterlony double immunodiffusion	20–200
Immunoelectrophoresis	20–200
Rocket electrophoresis	2
Agglutination reactions	
Direct	0.3
Passive agglutination	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

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.

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

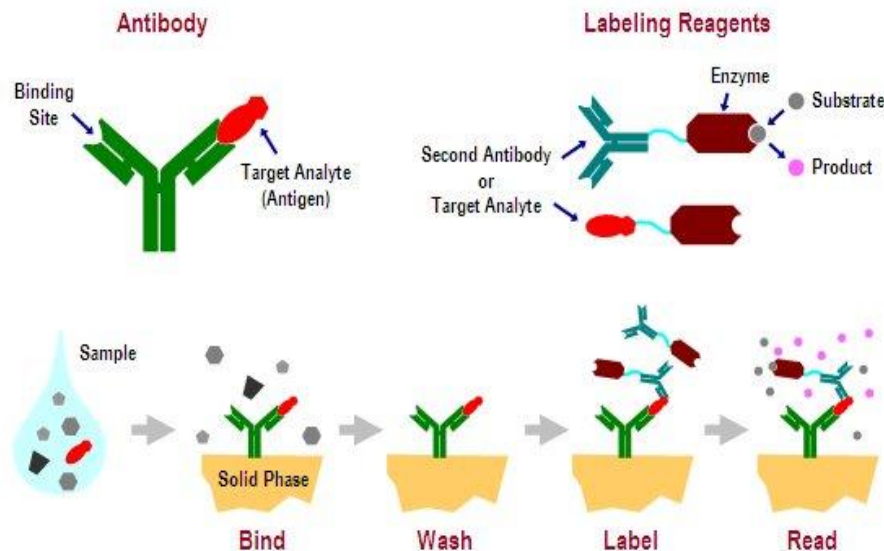
✓ **Conjugación del anticuerpo o del antígeno con la enzima.**

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

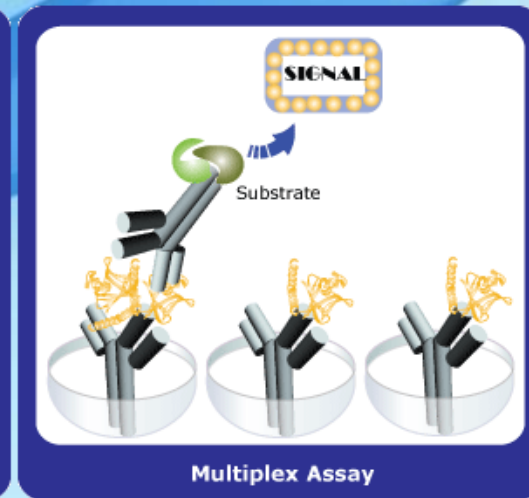
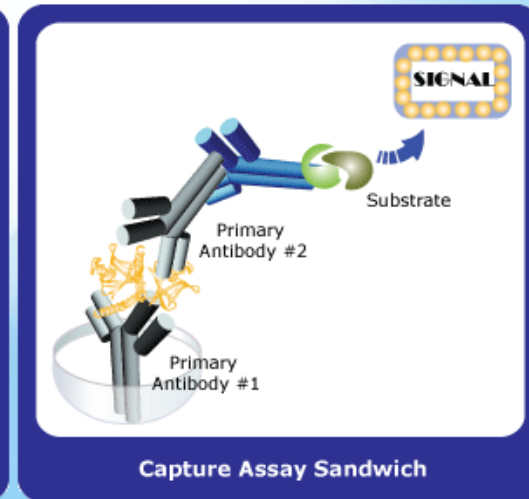
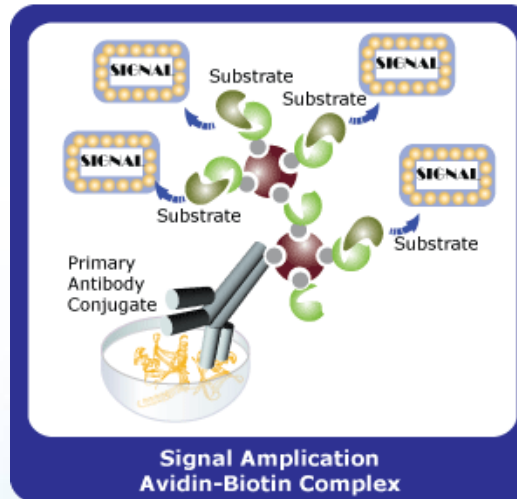
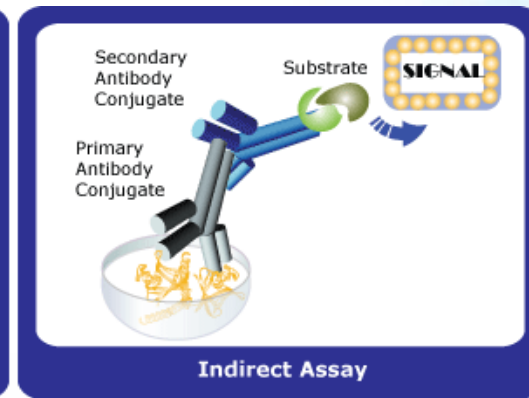
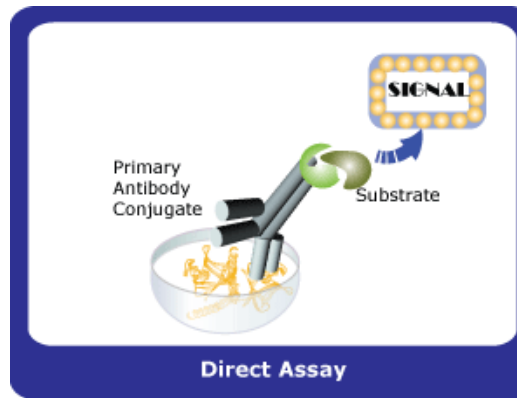
✓ **Formación de los inmunocomplejos.**

✓ **Revelado de la reacción enzimática.**

ELISA



Tipos de ELISA:



Utilidad

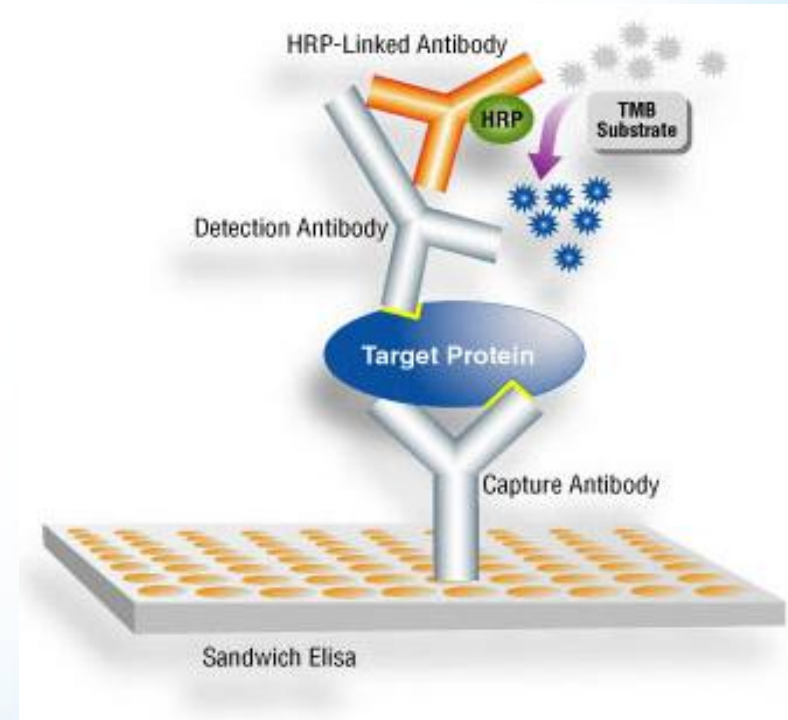
Detección de Ag y Ac:

- Bacterias
- Parásitos
- Hongos
- Virus

Detección de clases y sub-clases de Ig

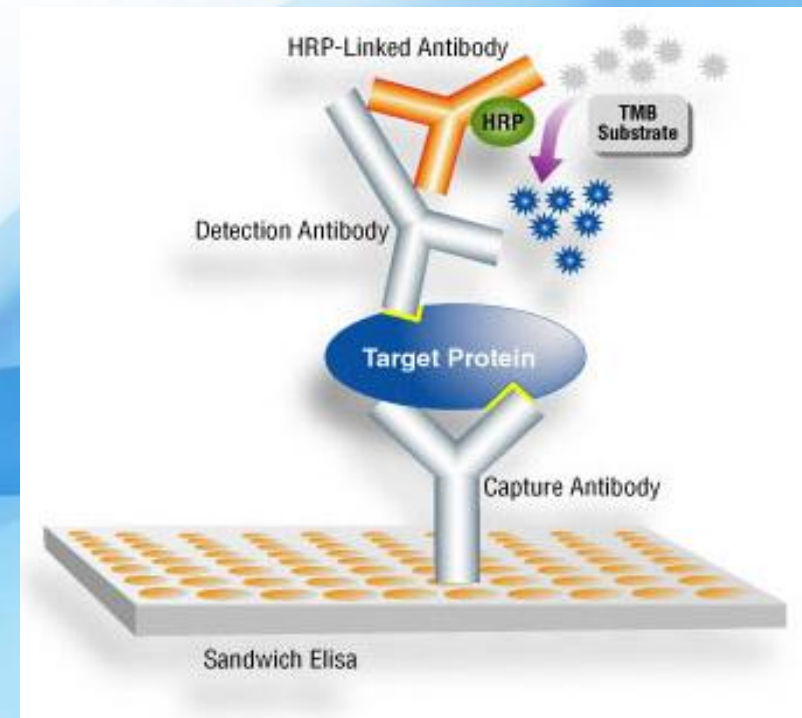
Detección de complejos autoinmunes:

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

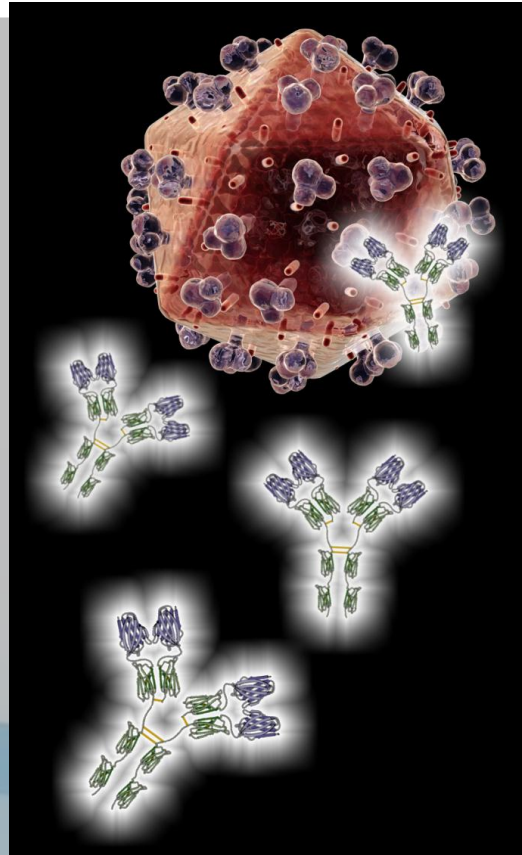


Utilidad

- **Detección de Acs contra antígenos de tejido**
 - **Anti-tiroglobulina**
 - **Anti-microsomal**
 - **Anticuerpos Antifosfolípidos (Cardiolipina IgG-M)**
-
- **Detección de Ags asociados a tumores:**
 - **Ag prostático**
 - **Ag ovario (Ca125)**
 - **ACE, alfafetoproteína**



ELISAs y Generaciones:

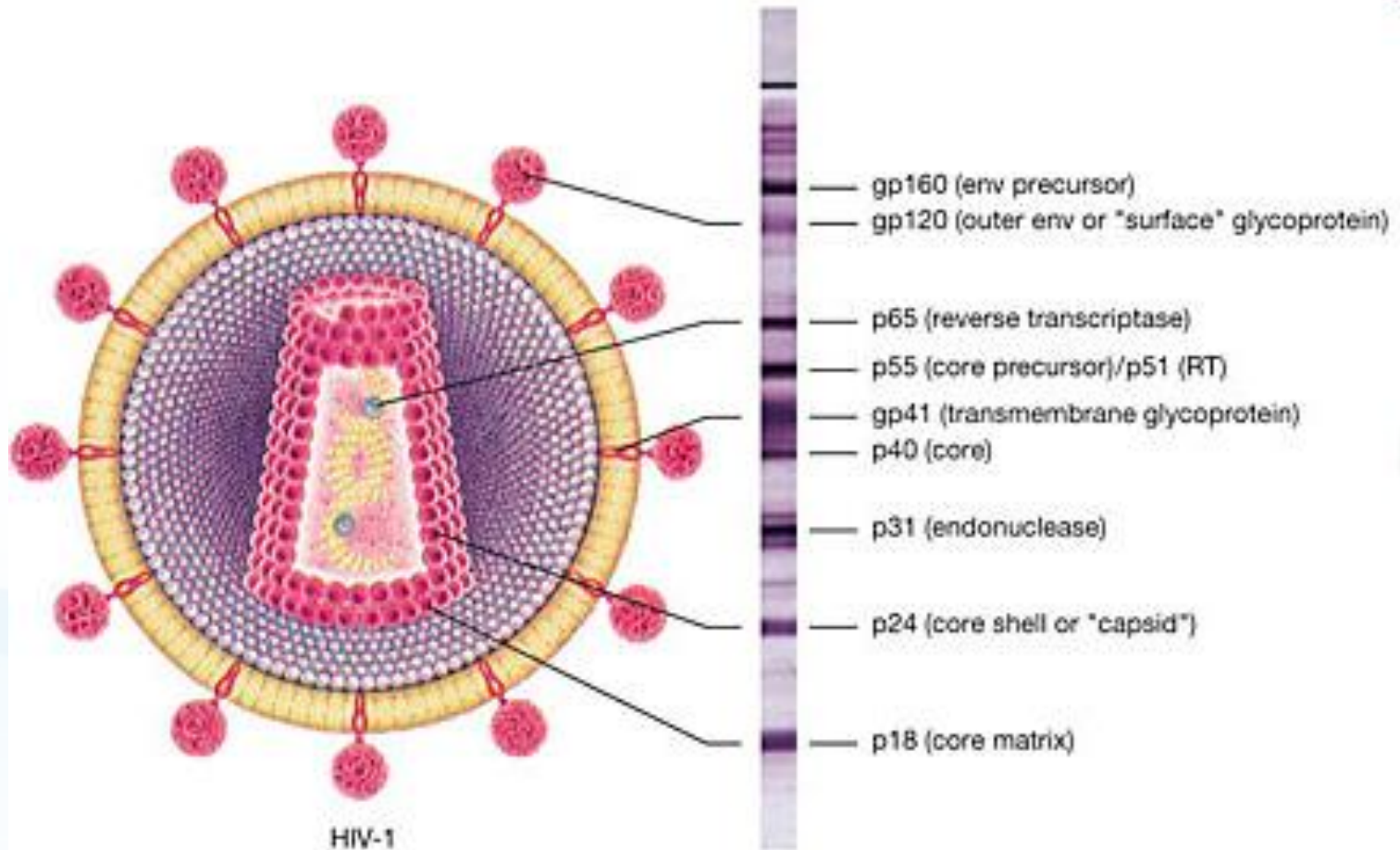


- **1ra generación**
 - **Ag: lisado purificado de VIH**
 - **Pocas sensibilidad y especificidad**
- **2da generación**
 - **Ag: proteínas recombinantes de VIH. Detección de VIH-1 y VIH-2**
- **3ra generación**
 - **Ag: proteínas recombinantes de VIH. Detección del grupo O del VIH. IgM e IgG**
- **4ta generación**
 - **Capacidad para detectar al Ag p24 y anticuerpos**

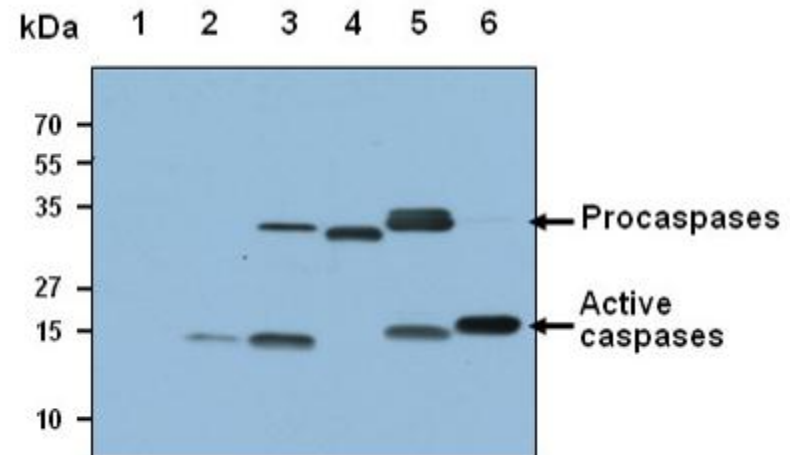
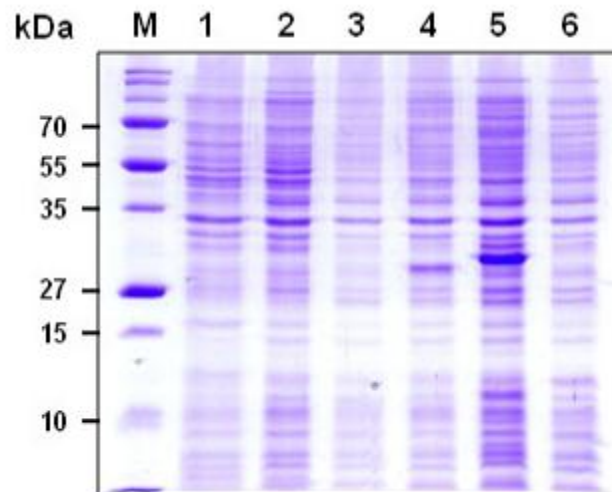


WESTERN BLOTTING

Everybody knows western



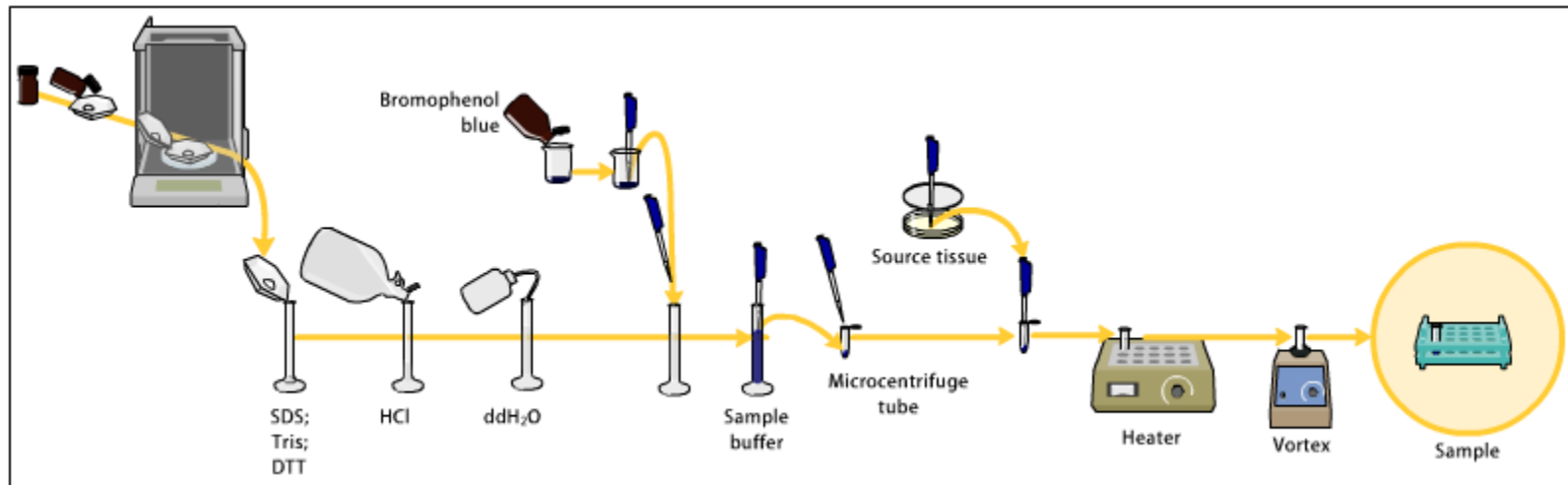
Electrophoresis/ Western Blotting



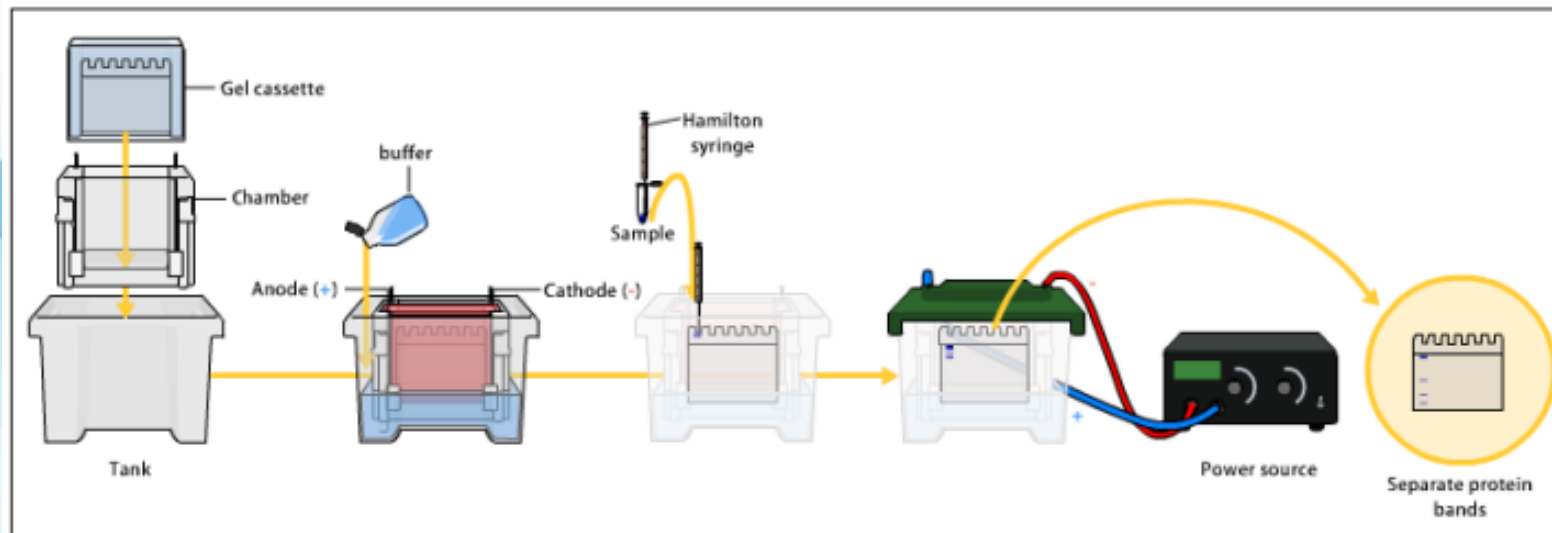
ELECTROFORESIS

Pasos básicos

Preparación de la muestra:



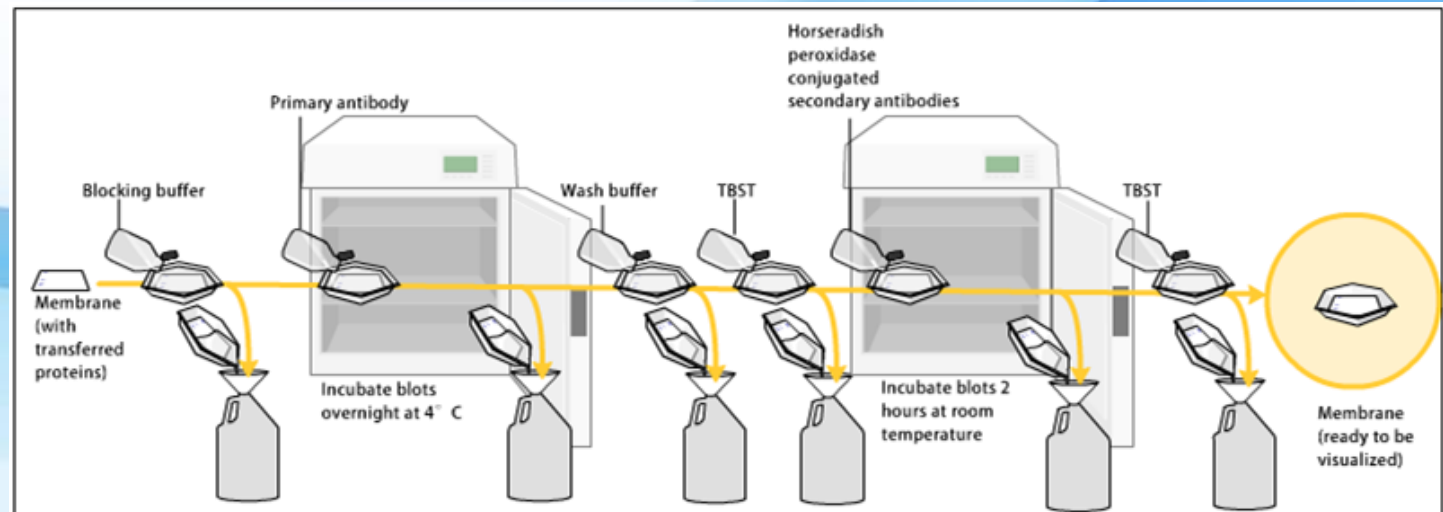
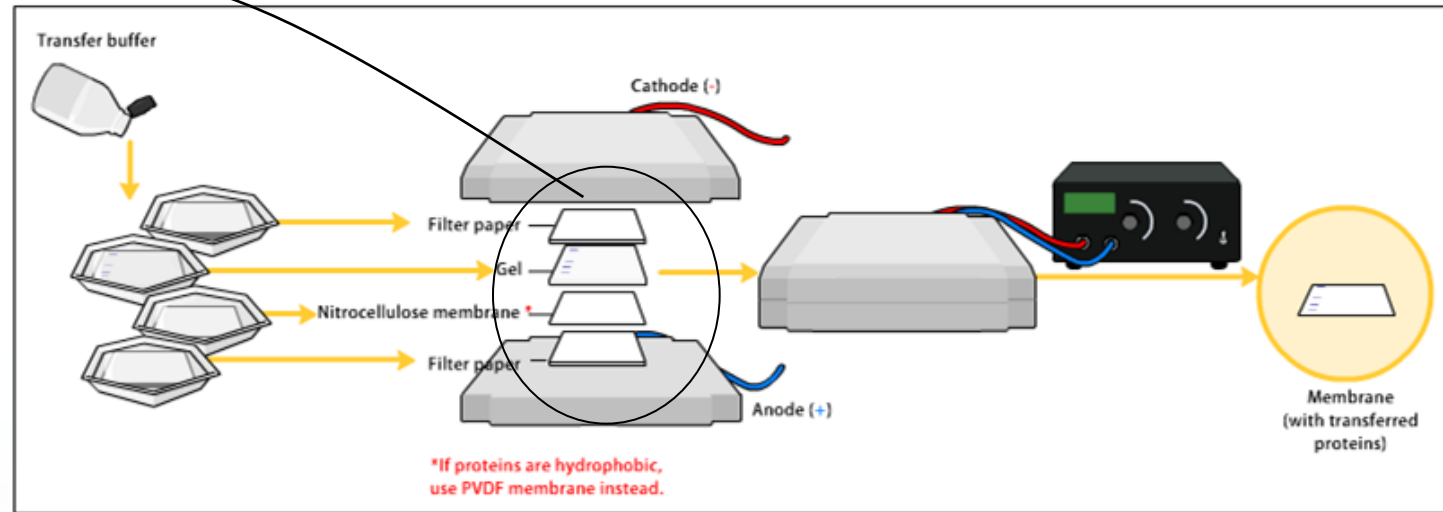
Corrida electroforética:



WESTERN BLOTTING

Pasos básicos

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



WESTERN BLOTTING

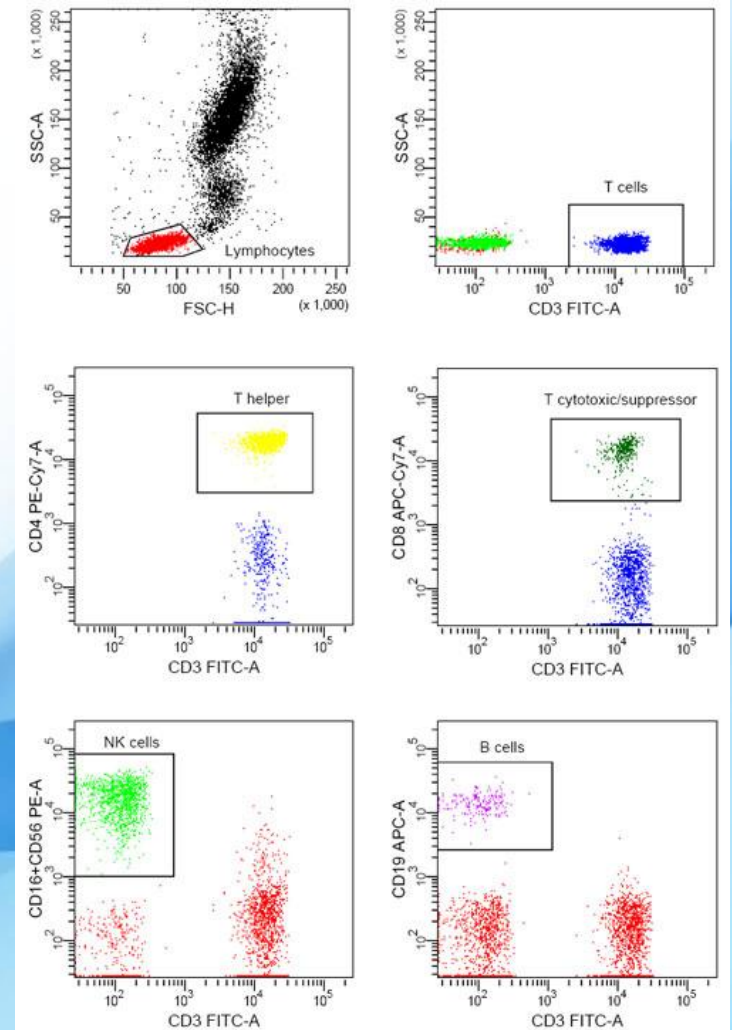
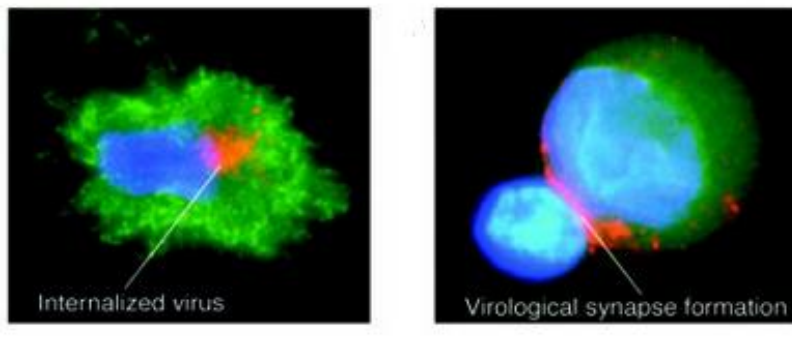
Pasos básicos



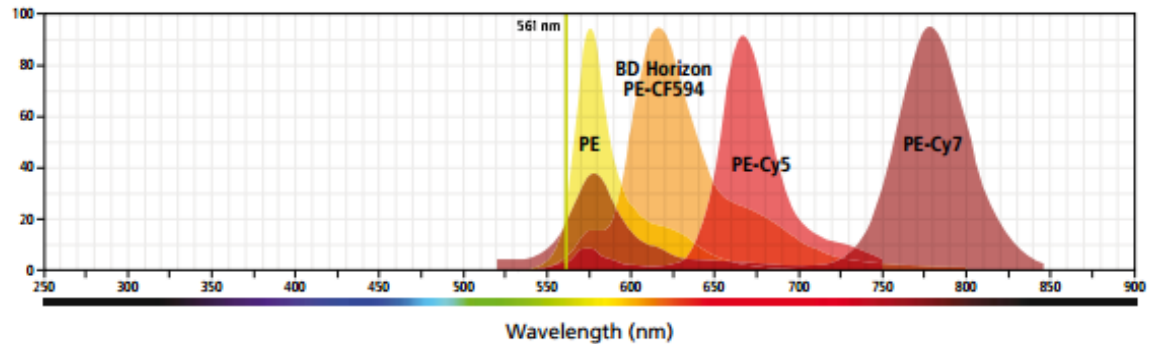
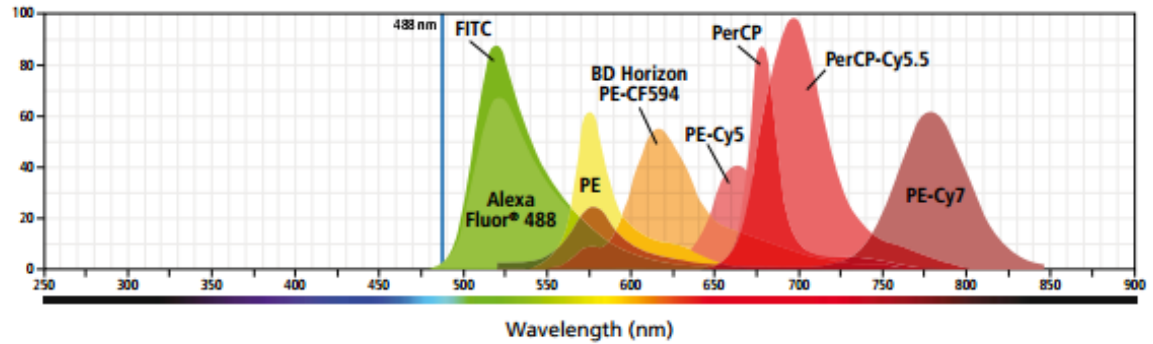
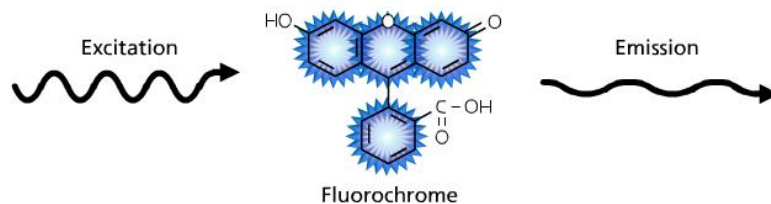
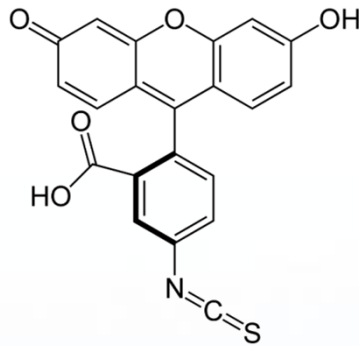
Sustrato	Medida ó color	Dilución del Ac (Sol. stock 1mg/mL)	Sensibilidad	Enzima
SuperSignal West Pico	425nm/quimioluminiscencia	1º: 1:1000 – 1:5000 2º: 1:20000 1:100000	1 pg	HRP
SuperSignal West Dura	425nm/quimioluminiscencia	1º: 1:1000 – 1:5000 2º: 1:50000 1:250000	250 fg	HRP
SuperSignal West Femto	425nm/quimioluminiscencia	1º: 1:5000 2º: 1:100000 1:500000	60 fg	HRP
1-Step TMB Blotting	Precipitado azul oscuro	1º: 1:500 2º: 1:2000 – 1:20000	1 ng	HRP
1-Step 4-CN	Precipitado azul púrpura	1º: 1:500 2º: 1:2000 – 1:20000	1 ng	HRP
CN/DAB	Precipitado negro	1º: 1:500 2º: 1:2000 – 1:20000	1 ng	HRP
Metal enhanced DAB	Precipitado marrón negruzco	1º: 1:500 2º: 1:2000 – 1:20000	20 pg	HRP
1-Step NBT/BCIP	Precipitado negro púrpura	1º: 1:500 2º: 1:2500	30 pg	AP
1-Step NBT/BCIP + Supresor	Precipitado negro púrpura	1º: 1:500 2º: 1:2500	30 pg	AP
NBT	Precipitado azul púrpura	1º: 1:250 2º: 1:2500	100 pg	AP
BCIP	Precipitado azul púrpura	1º: 1:250 2º: 1:2500	100 pg	AP
Fast Red	Precipitado rojo	1º: 1:250 2º: 1:2500	320 pg	AP
Lumi – Phos	440nm/quimioluminiscente	1º: 1:5000 2º: 1:25000	15 pg	AP

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)

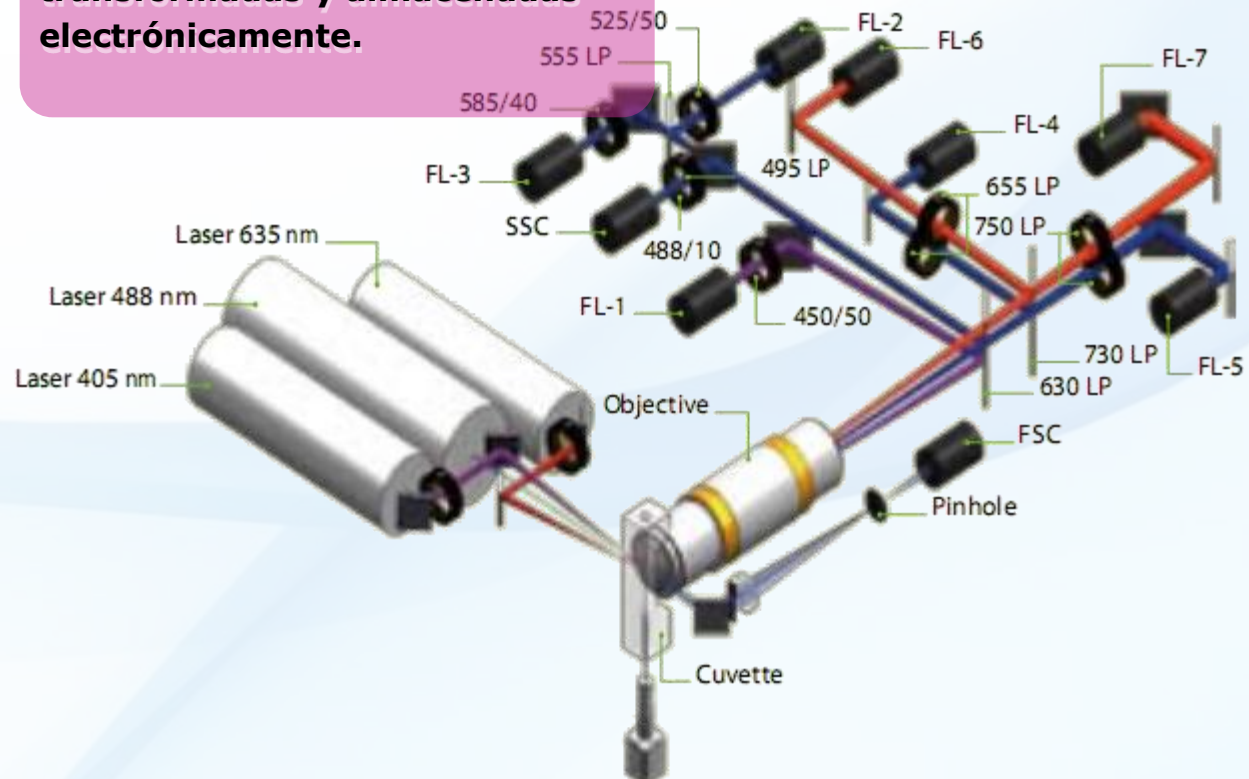
Citometría de flujo

Hidrodinámica

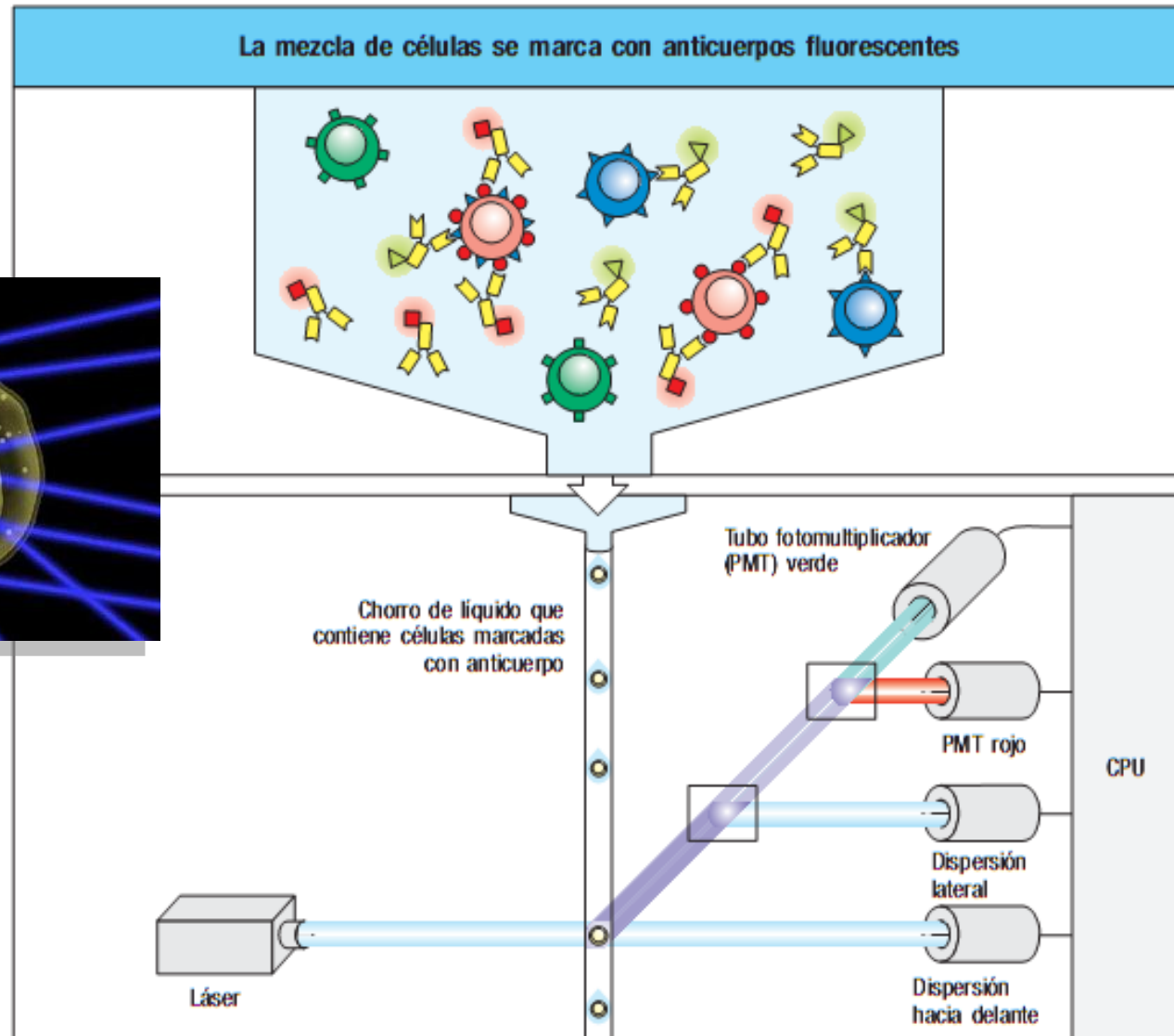
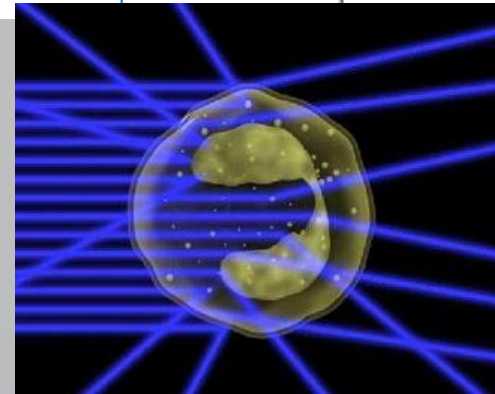
Óptica

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.



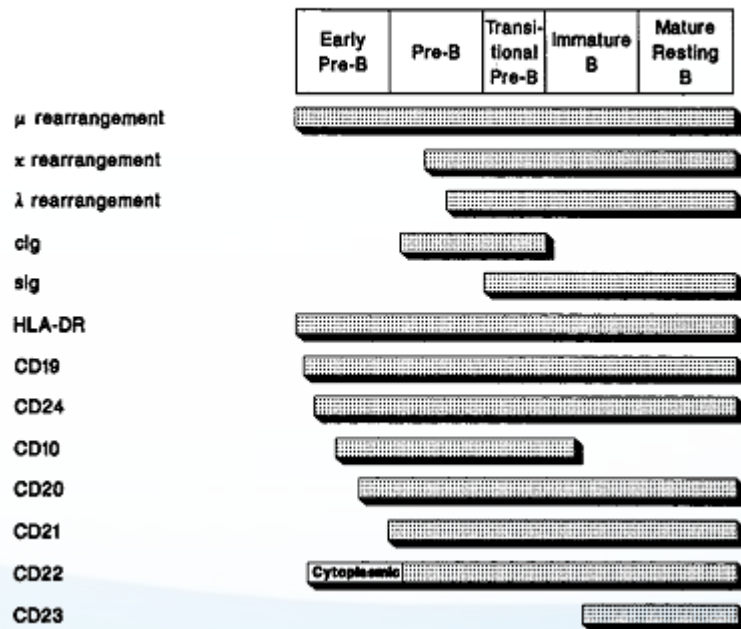
Citometría de flujo



Utilidad:

Evaluación de la función hematopoyética

B-Cell Ontogeny



TCR δ rearrangement

TCR γ rearrangement

TCR β rearrangement

TCR α rearrangement

CD7

CD5

CD2

CD1

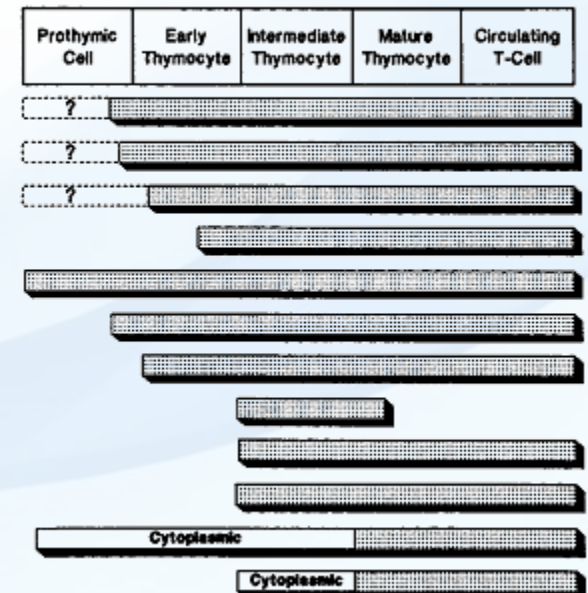
CD4

CD8

CD3

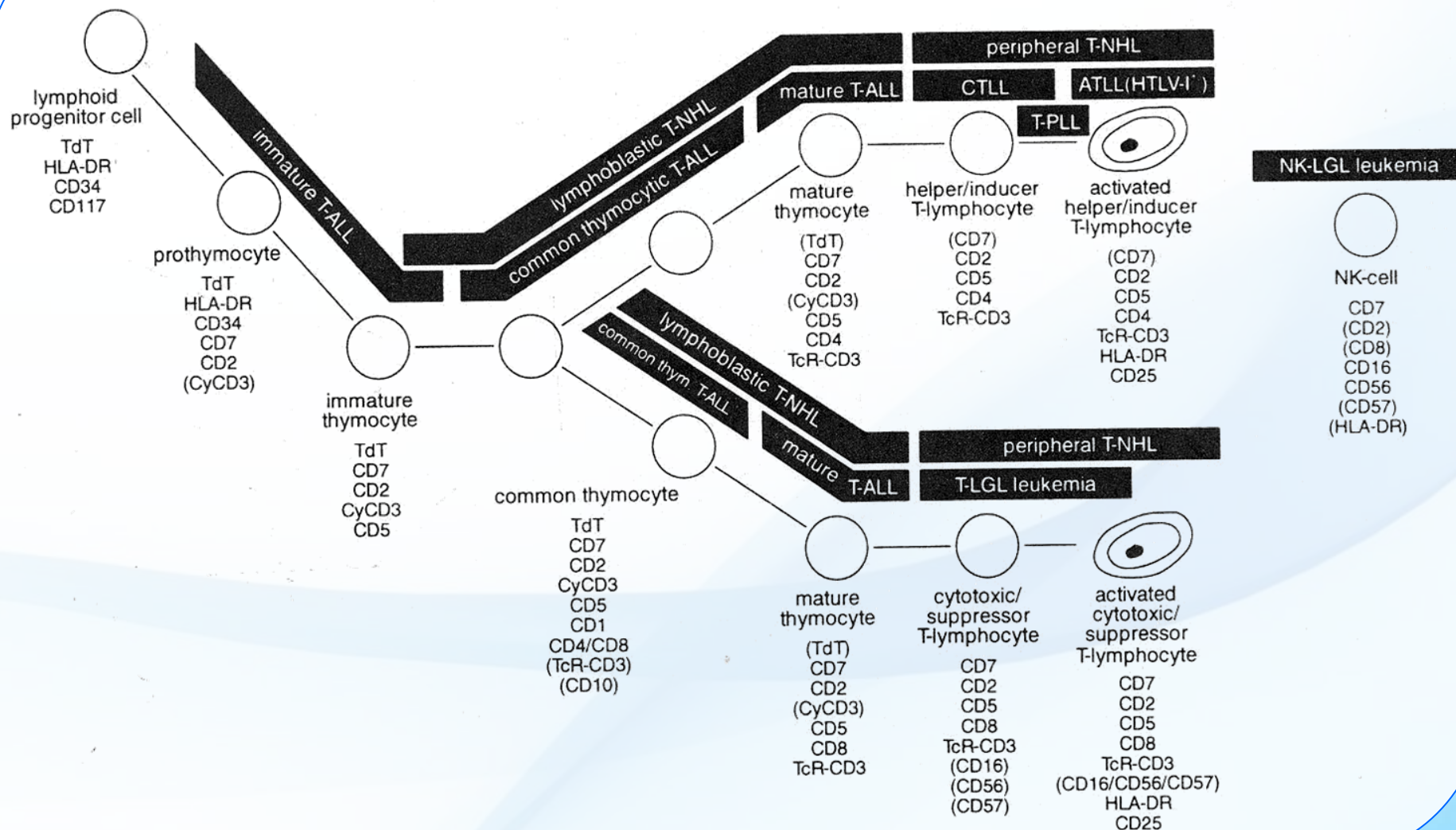
TCR ($\alpha\beta$ or $\gamma\delta$)

T-Cell Ontogeny



Utilidad:

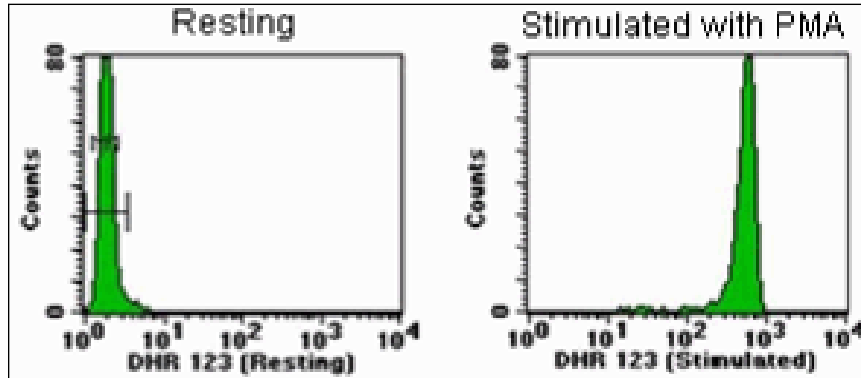
Leucemias linfoblásticas



Evaluación de células fagocíticas

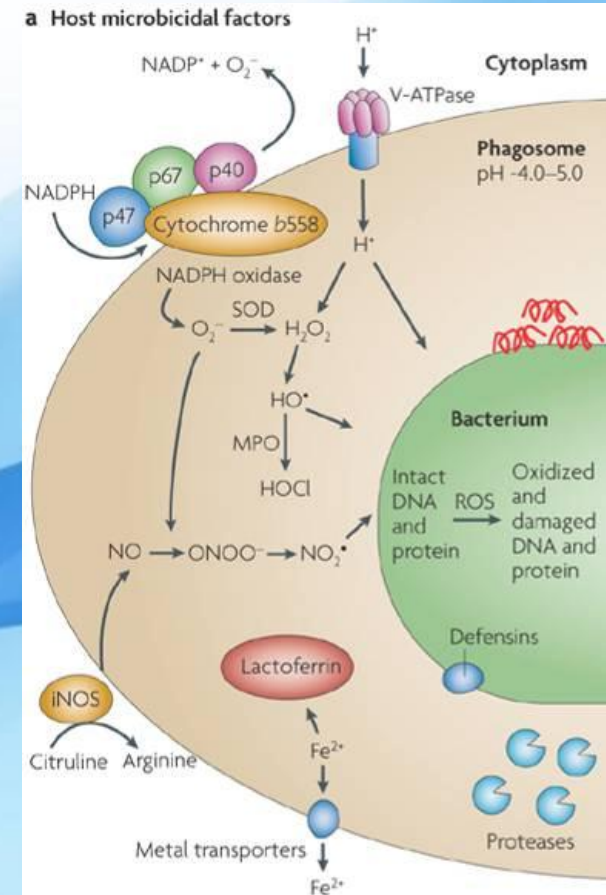
Fagocitosis

Estrés oxidativo



DHR / DHE

NBT



Immunofluorescencia

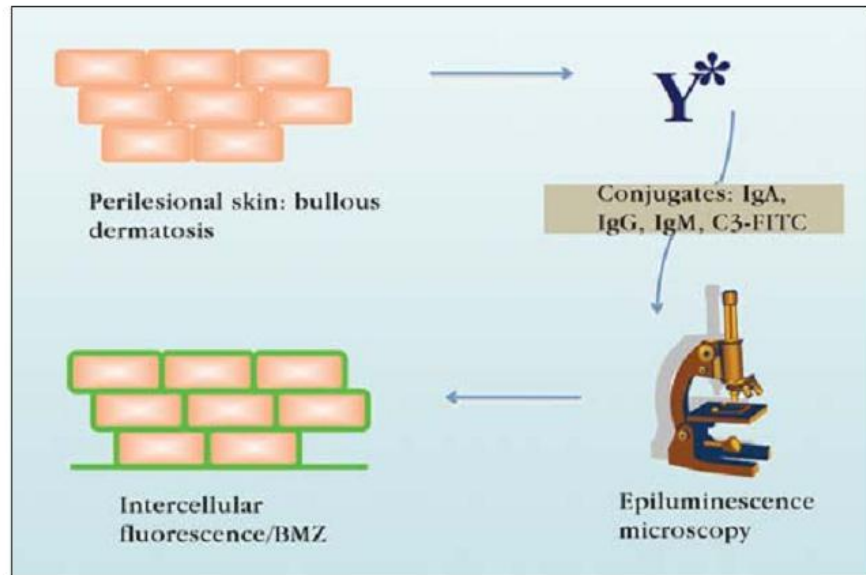


FIGURE 1: Direct immunofluorescence

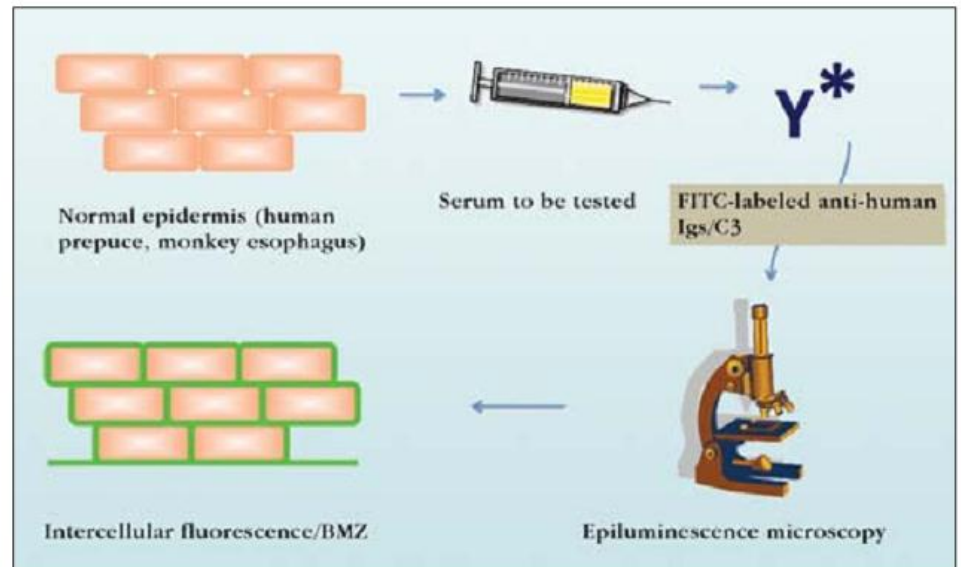


FIGURE 7: Indirect immunofluorescence

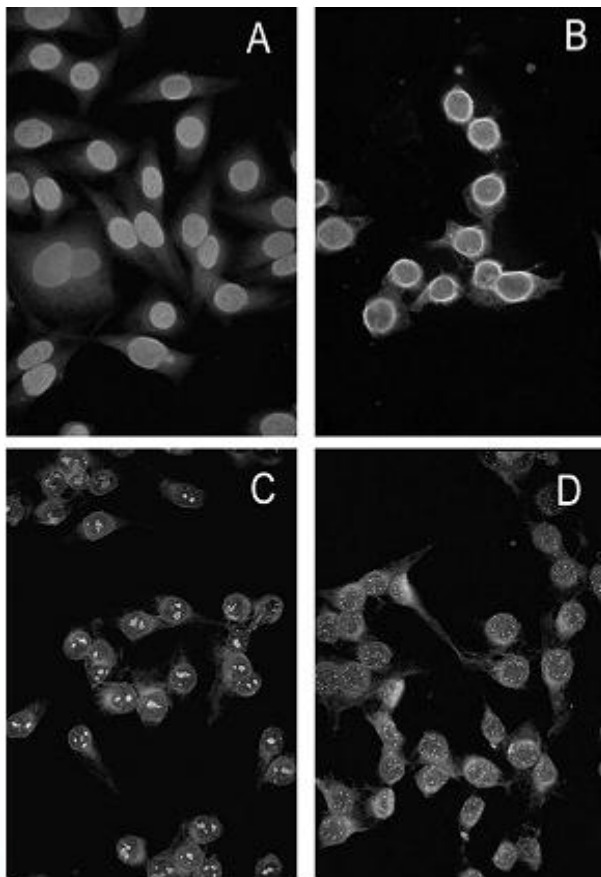
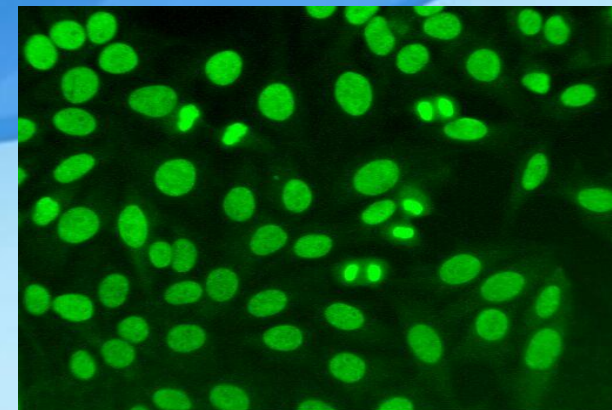


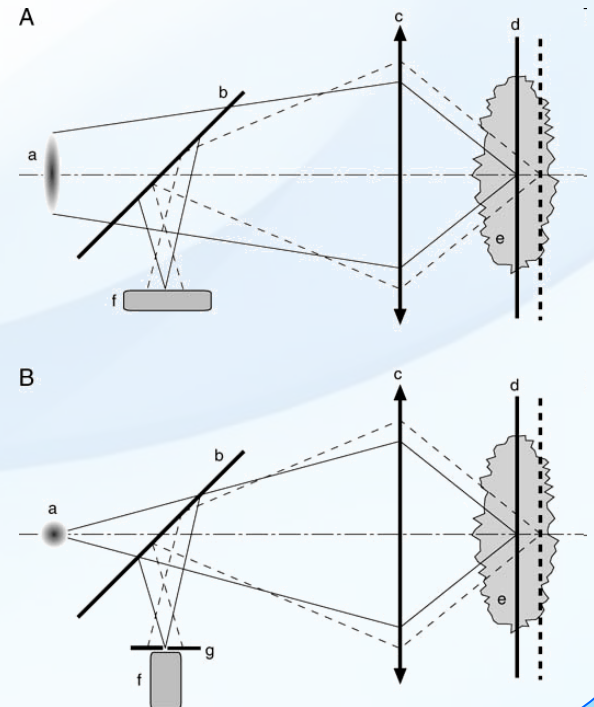
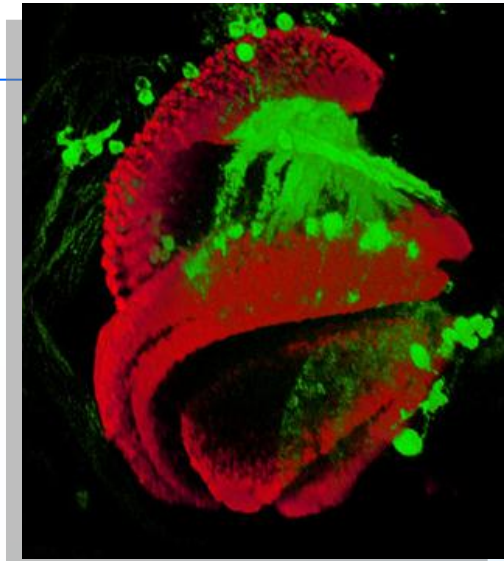
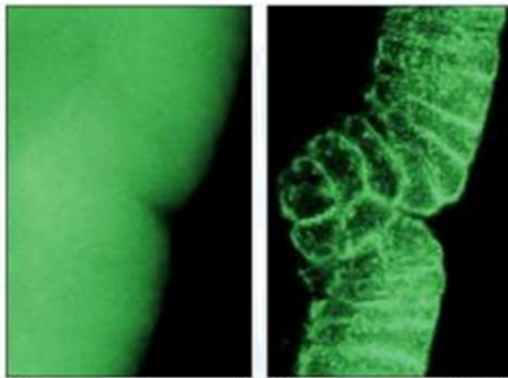
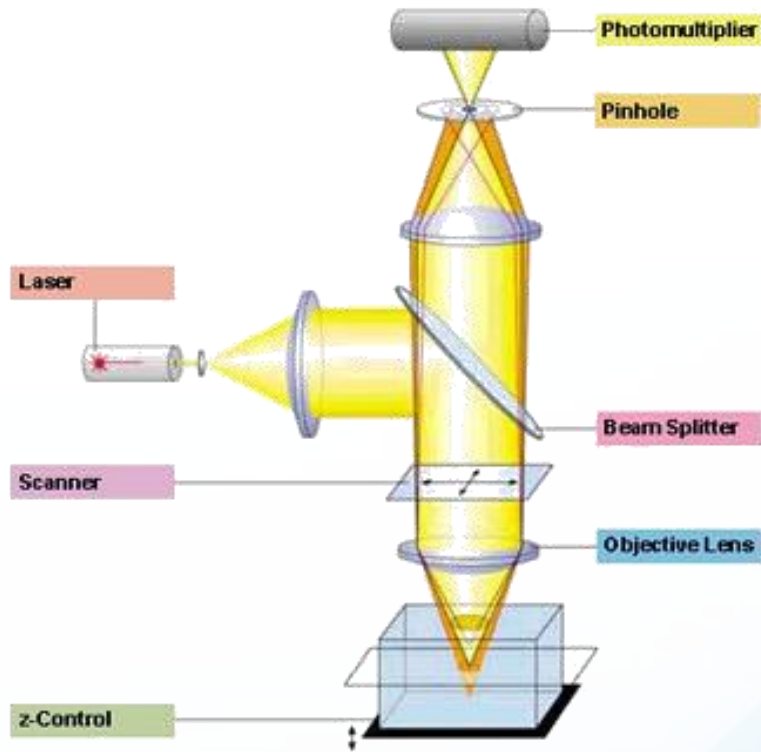
Figura 12.3: Patrones de inmunofluorescencia en la determinación de anticuerpos antinucleares. (A) patrón difuso; (B) patrón periférico; (C) patrón nucleolar; (D) patrón moteado.

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

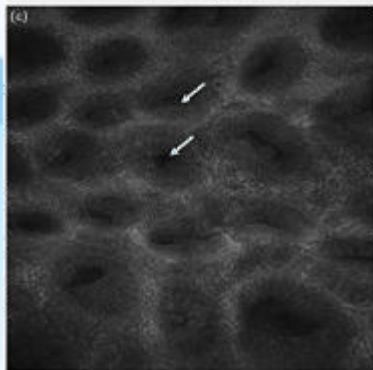
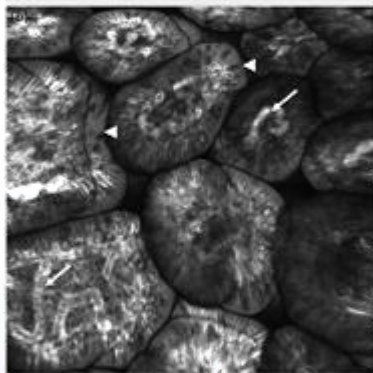
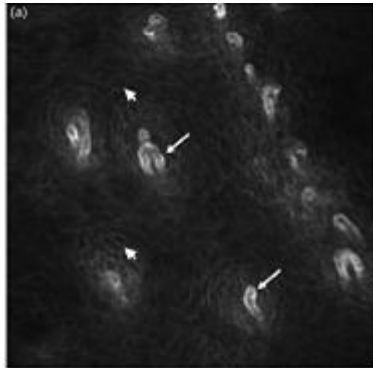


Table 2 Comparison of reported performance characteristics in endomicroscopy studies

	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	—

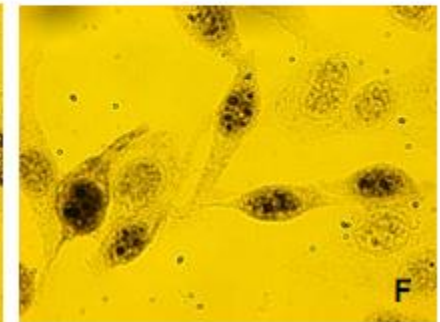
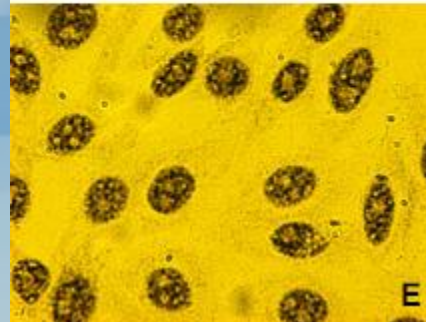
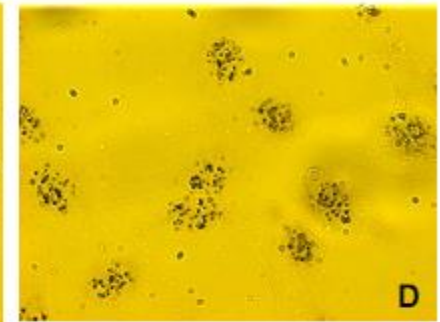
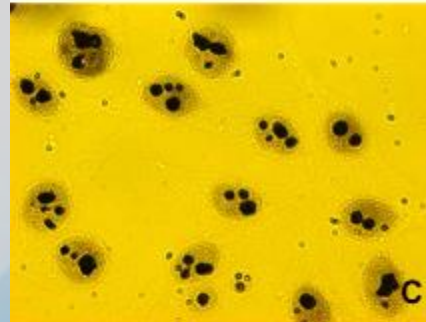
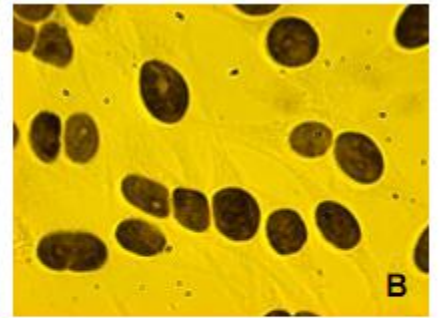
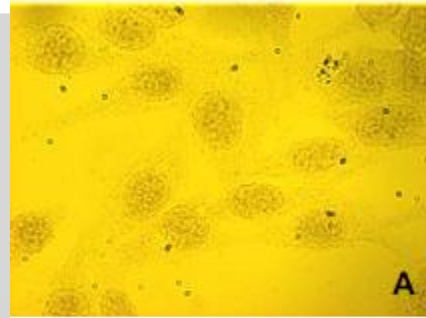
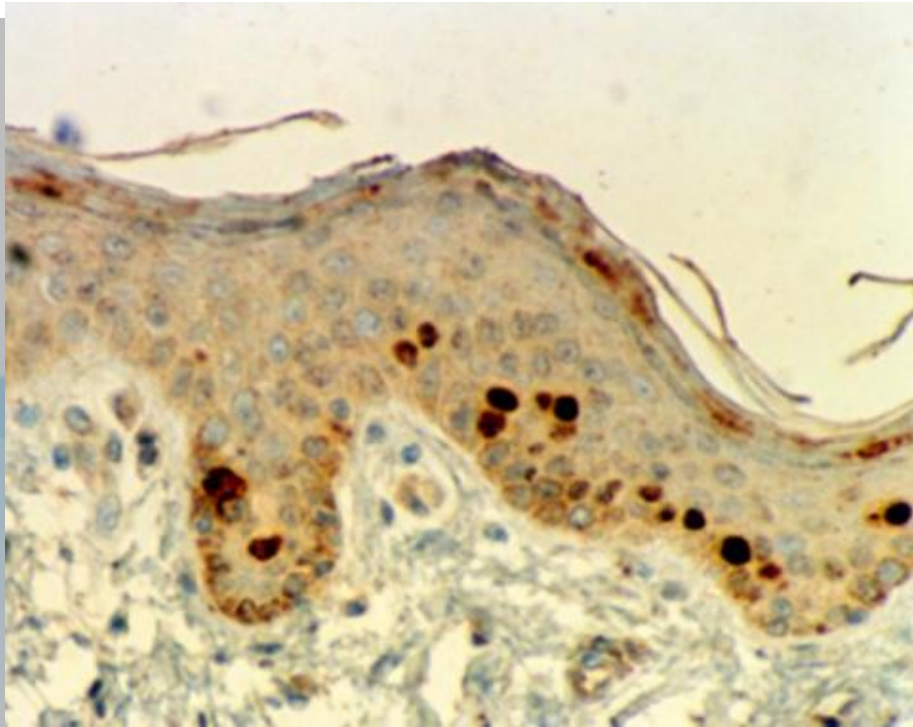
ALM, adenoma-like masses; CLE, confocal laser endomicroscopy; DALM, dysplasia-associated lesional masses; EMR, endoscopic mucosal resection; GI, gastrointestinal; UC, ulcerative colitis.

✓ **FITC sódica**

✓ **Violeta de Cresilo**

✓ **Acriflavina HCL**

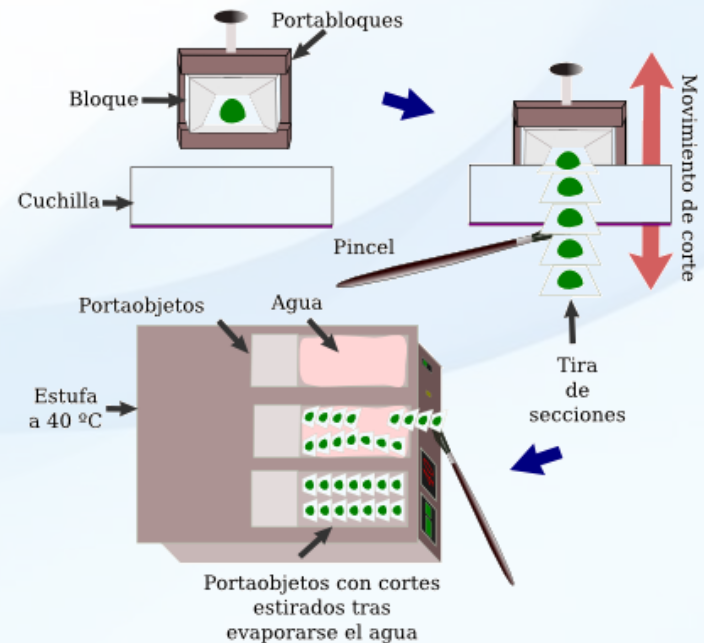
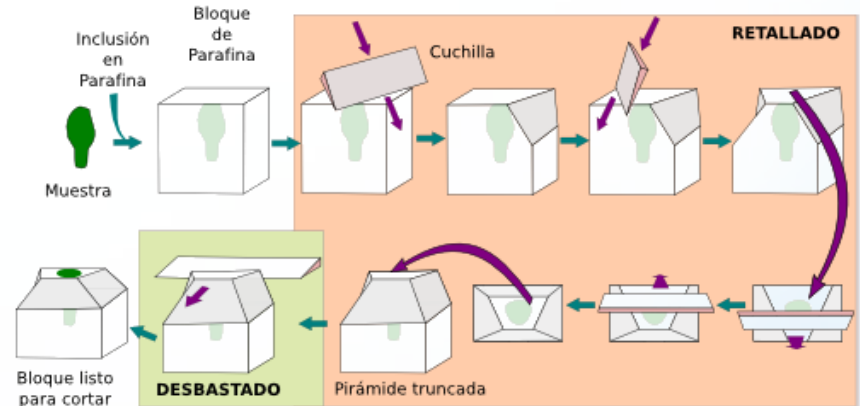
Inmunohistoquímica



Inmunohistoquímica

Montaje de la muestra

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

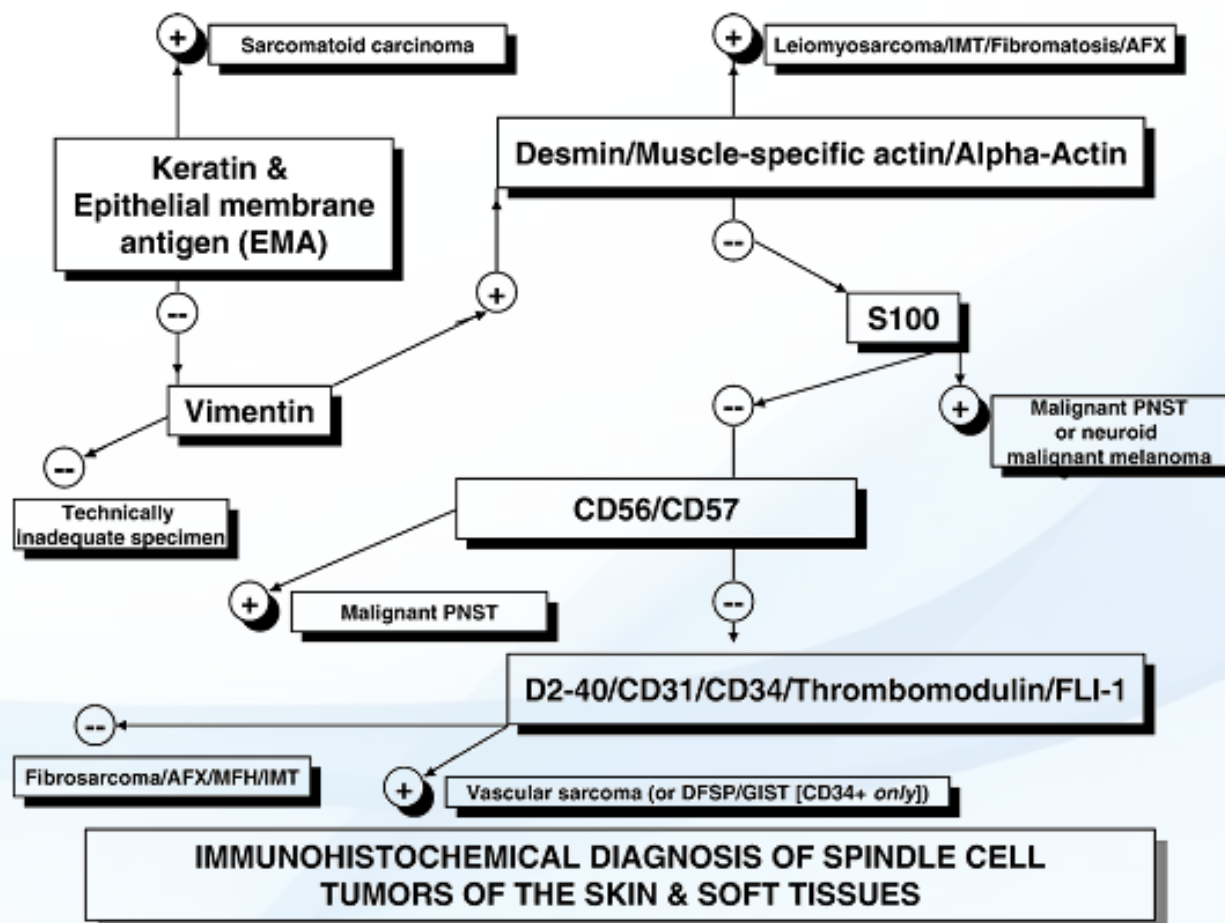


Inmunohistoquímica

Aplicaciones!!!

Immunohistochemical approaches to the diagnosis of undifferentiated malignant tumors

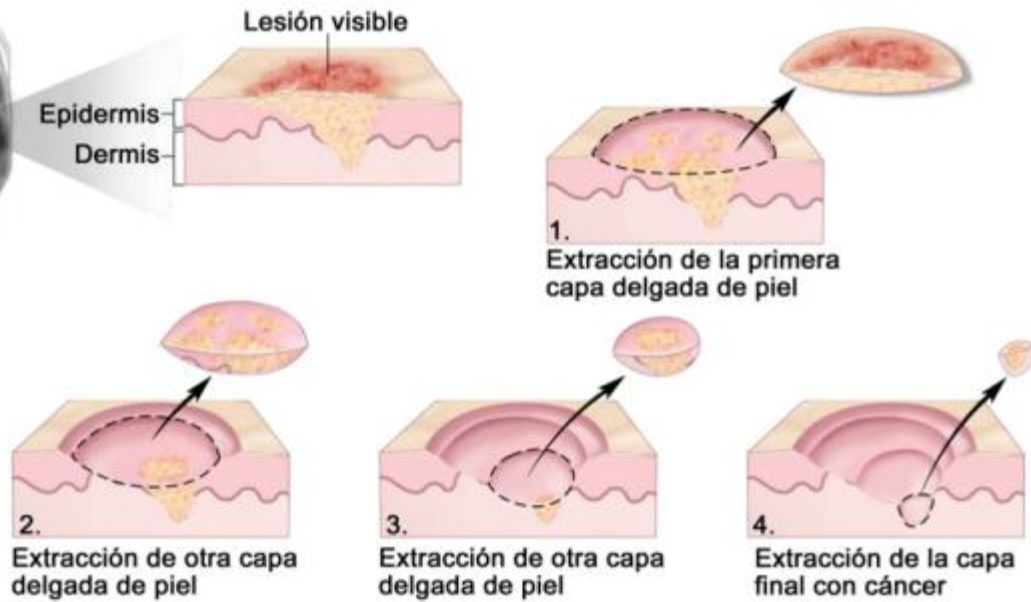
Annals of Diagnostic Pathology 12 (2008) 72–84



Inmunohistoquímica

Aplicaciones!!!

Current Progress of Immunostains in Mohs Micrographic Surgery: A Review



Inmunohistoquímica

Aplicaciones!!!

Current Progress of Immunostains in Mohs Micrographic Surgery: A Review

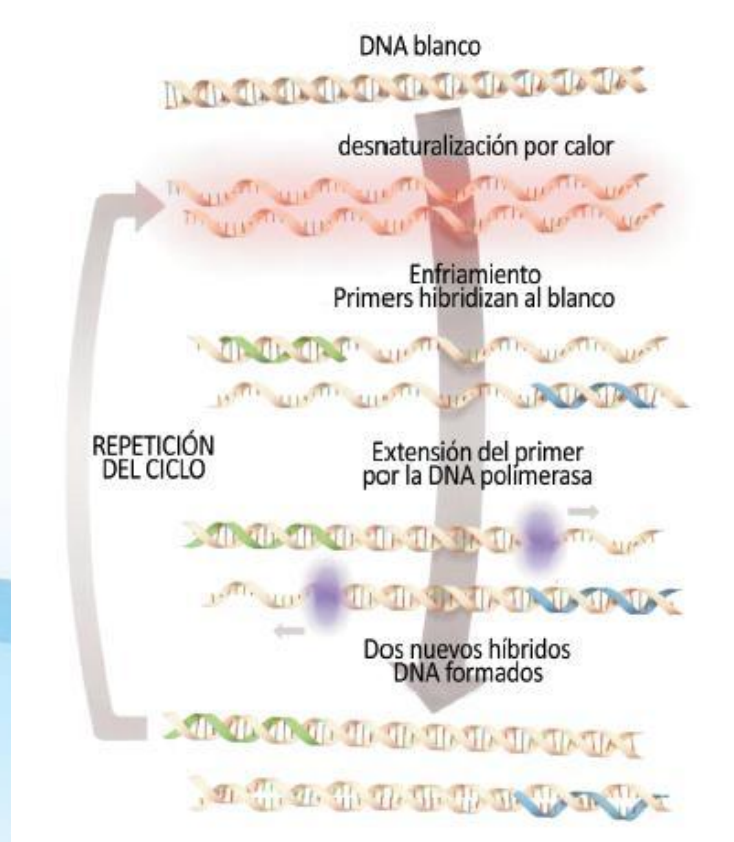
Dermatol Surg 2008;34:1621–1636

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.

PCR (Polymerase Chain Reaction)



Desarrollada en 1986 por Kary Mullis

Obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una cantidad muy pequeña

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

Identificación de:

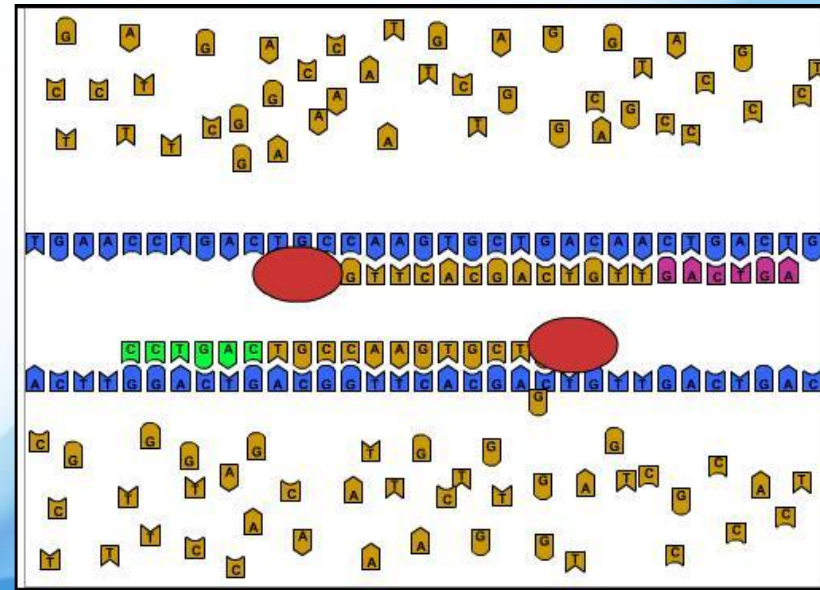
- ✓ **Microorganismos**
- ✓ **Personas (cadáveres)**

Investigación

PCR

¿Qué se necesita?

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

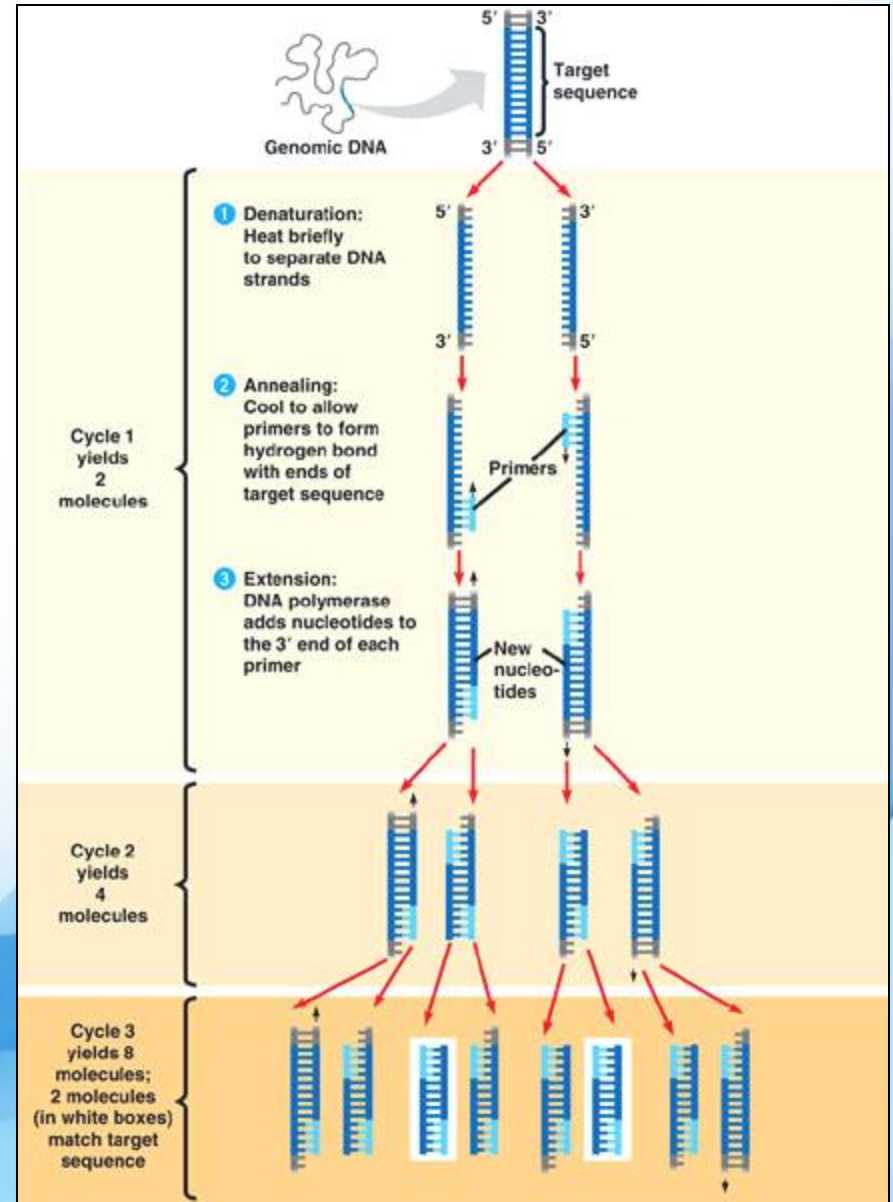


Pasos de la PCR

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

❖ Cada ciclo consta de 3 pasos:

- Desnaturalización
- Alineación
- Extensión



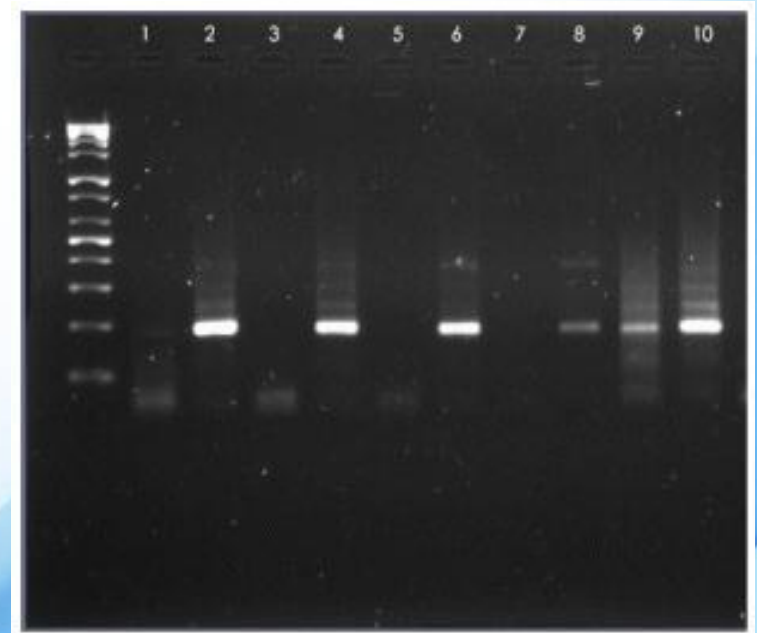
PCR

❖ Visualización de la reacción

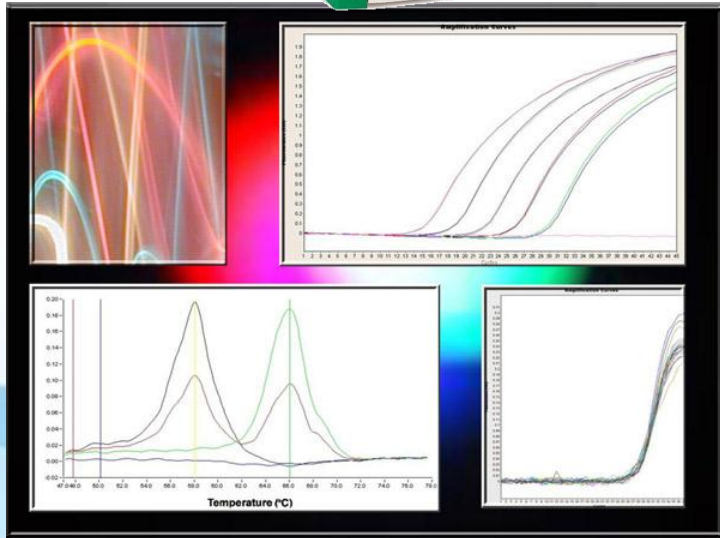
- Electroforesis en geles de agarosa

❖ Tipos de PCR:

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



PCR en tiempo Real



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

PCR en tiempo Real

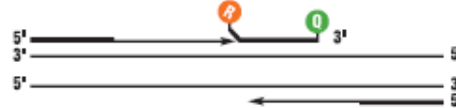
Marcadores fluorescentes

TAQMAN® PROBE-BASED ASSAY CHEMISTRY

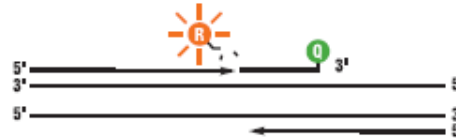
1. **Polymerization:** A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan® probe, respectively.



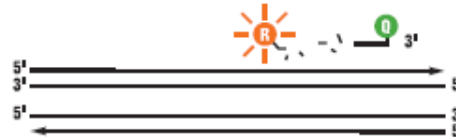
2. **Strand displacement:** When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



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



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

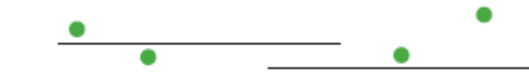


SYBR® GREEN I DYE ASSAY CHEMISTRY

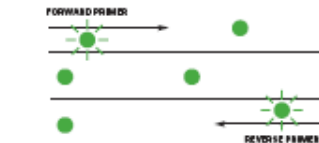
1. **Reaction setup:** The SYBR® Green I Dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



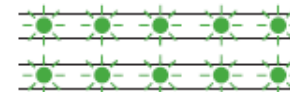
2. **Denaturation:** When the DNA is denatured, the SYBR® Green I Dye is released and the fluorescence is drastically reduced.

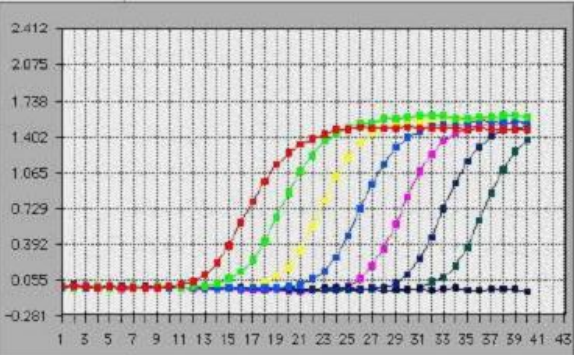


3. **Polymerization:** During extension, primers anneal and PCR product is generated.



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

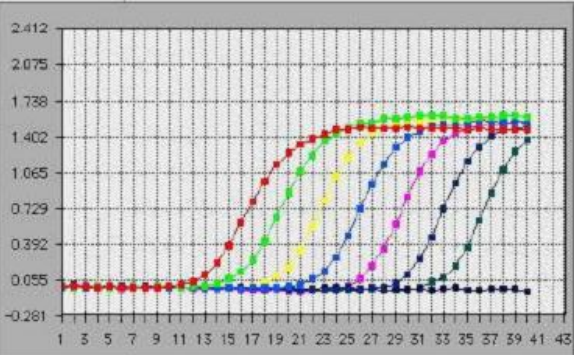




PCR en tiempo real

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)**



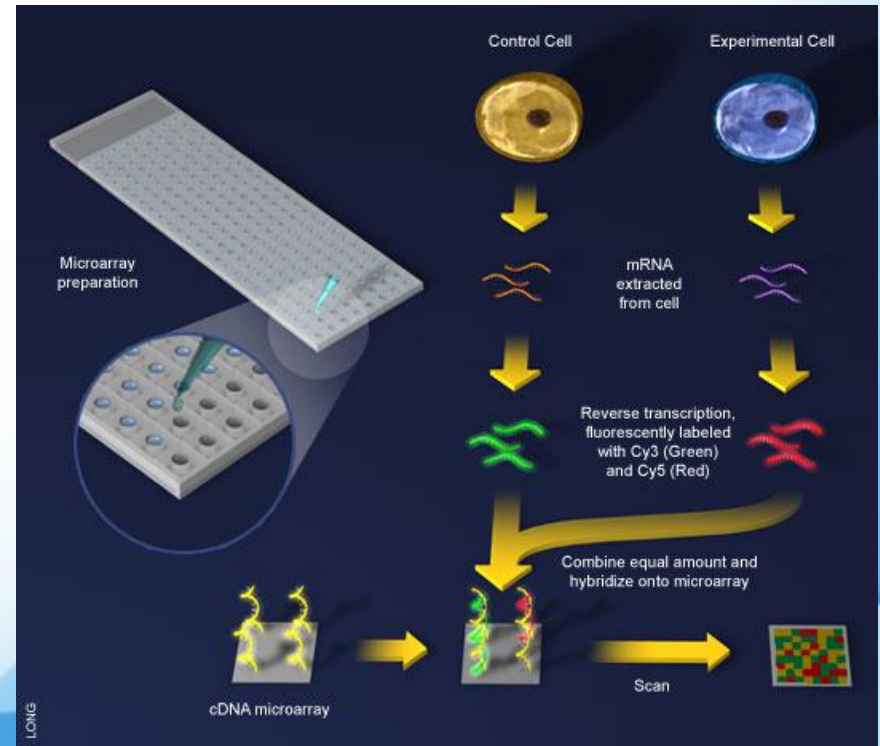
PCR en tiempo real

Utilidad

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

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**

