



MÉTODOS PARA EVALUAR LA RESPUESTA INMUNE

DRA. LUISA BARBOZA

RESPUESTA INMUNE

Poblaciones celulares

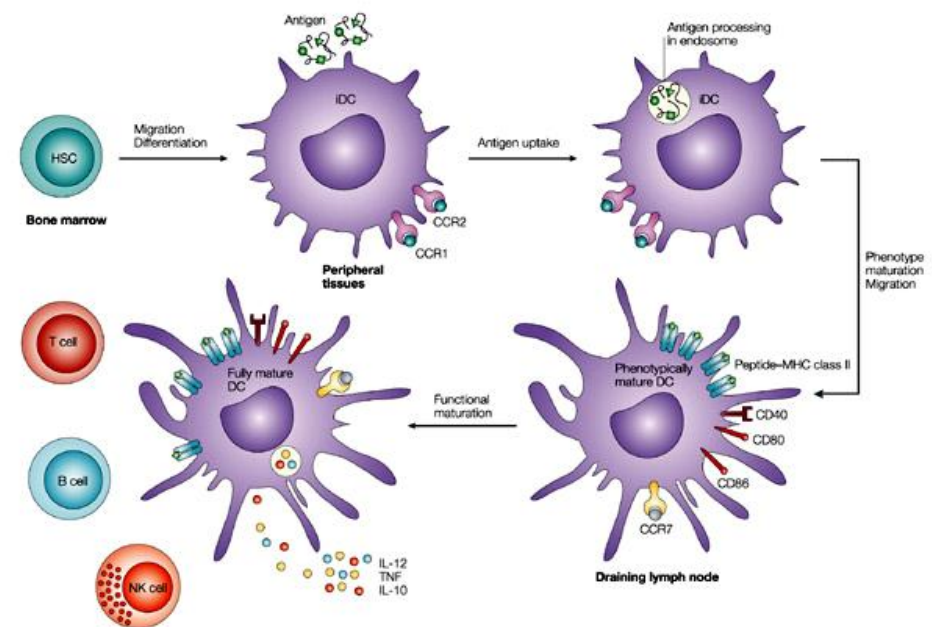
- Células T
- Células B
- Células fagocíticas
- Células citotóxicas

Productos de la respuesta

- Citoquinas
- Inmunoglobulinas/anticuerpos
- Complemento

Diagnóstico

- Patologías inmunes
- Procesos infecciosos



Nature Reviews | Immunology



Técnicas basadas en interacción antígeno-anticuerpo

- Inmunoensayos
- Western blot
- Inmunoprecipitación
- Inmunohistoquímica
- Inmunofluorescencia

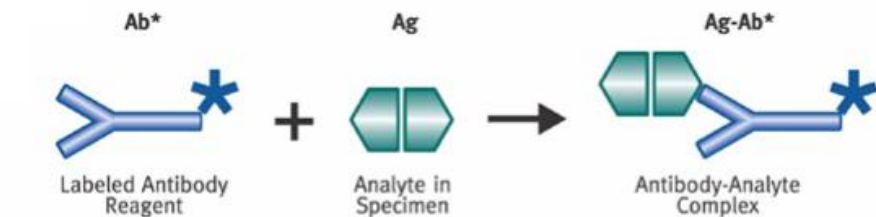


Figura 1-5 Los anticuerpos marcados permiten la detección de complejos antígeno/anticuerpo en los inmunoensayos

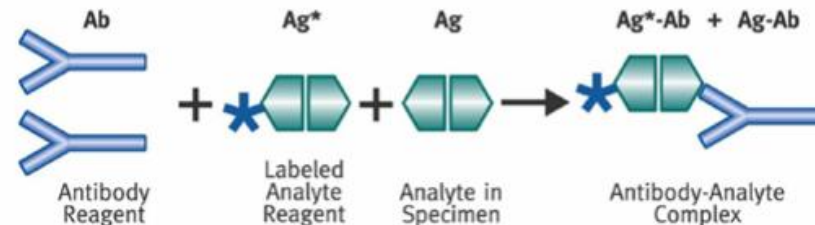
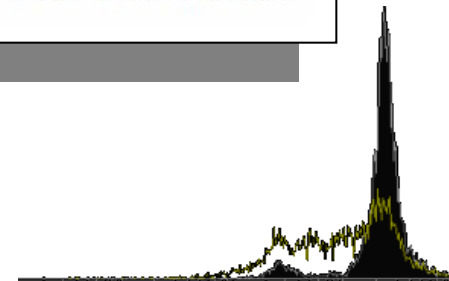


Figura 1-6 El antígeno marcado también permite la detección de complejos antígeno/anticuerpo en los inmunoensayos



Tipos de inmunoensayo:



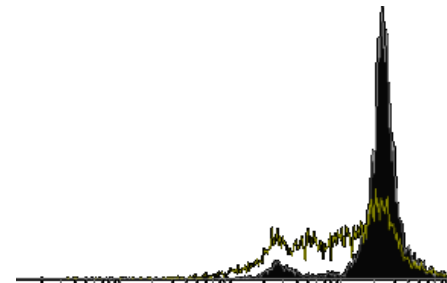
Inmunoensayo:
Formación de
inmunocomplejos
(antígeno/anticuerpo)

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.

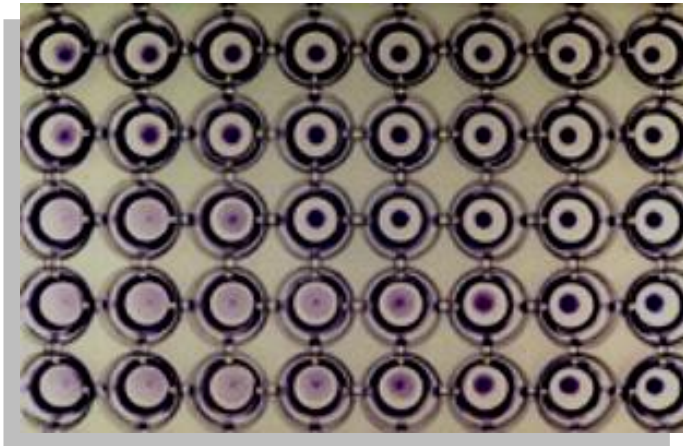
No marcados:
Son medidos por dispersión
de luz o por visualización
directa

- **Precipitación**
- **Aglutinación**

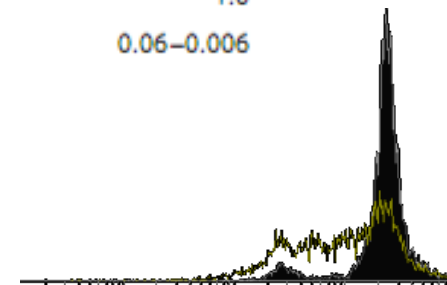


Inmunoensayos:

✓ Comparación



Assay	Sensitivity* (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

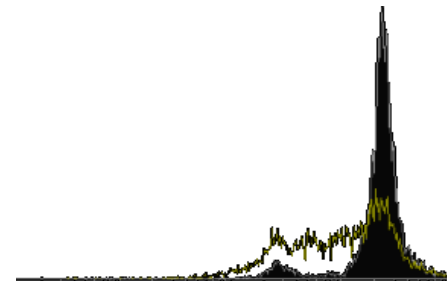
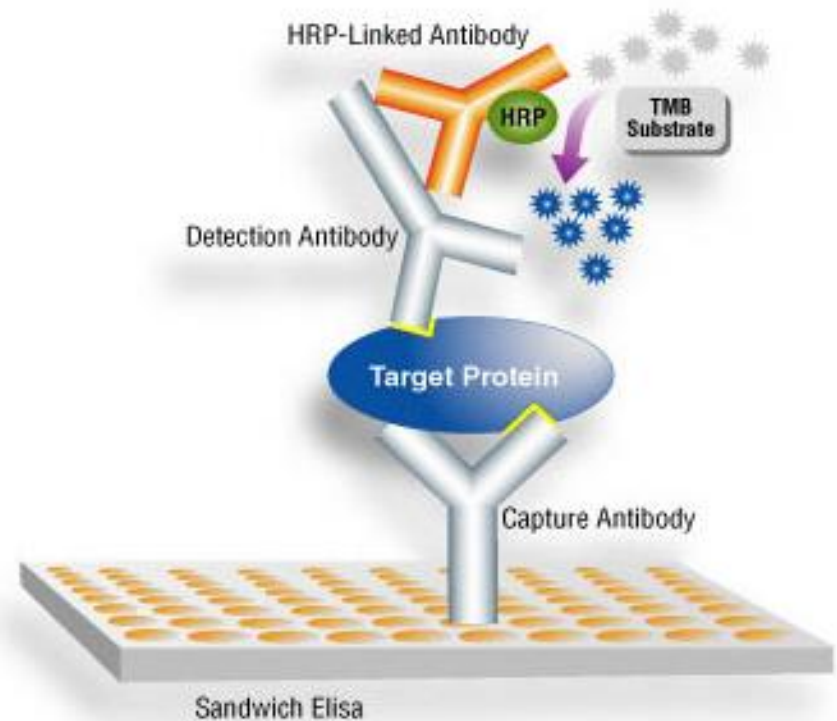


ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay):

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.



ELISA. Pasos

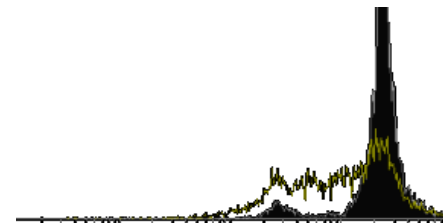
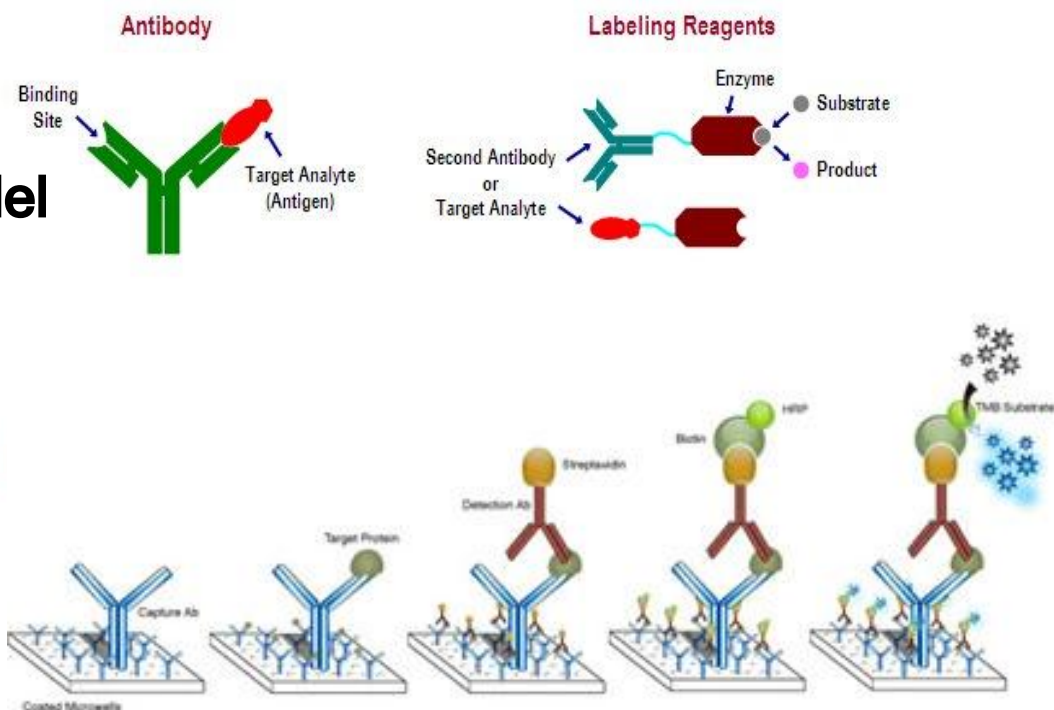
✓ Conjugación del anticuerpo o del antígeno con la enzima.

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

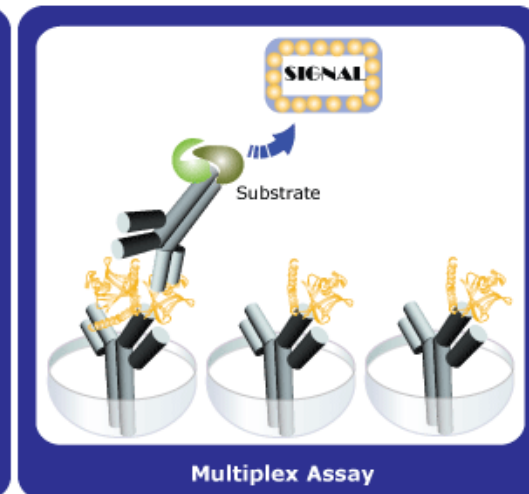
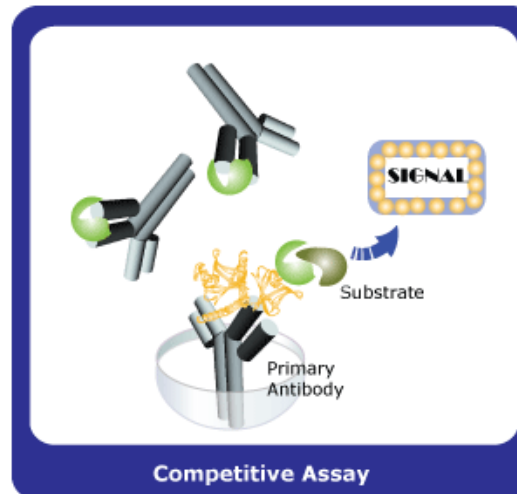
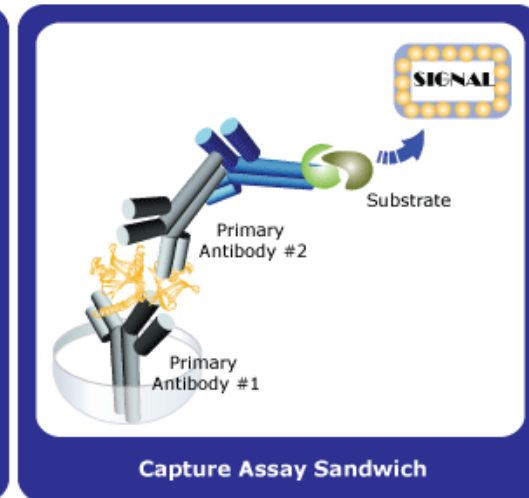
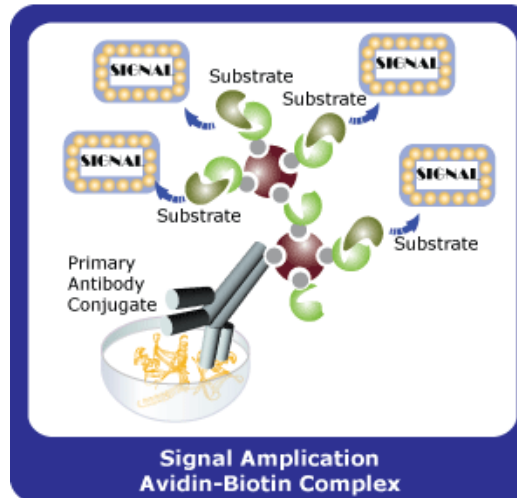
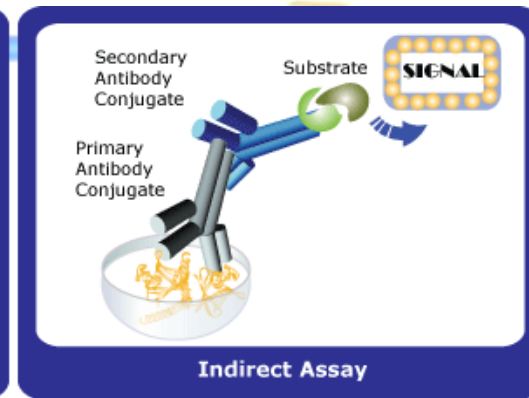
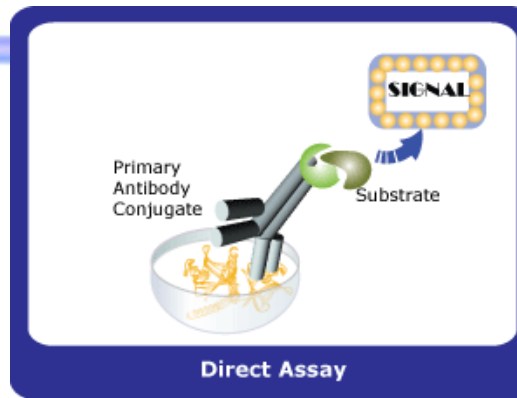
✓ Formación de los inmunocomplejos.

✓ Revelado de la reacción enzimática.

ELISA

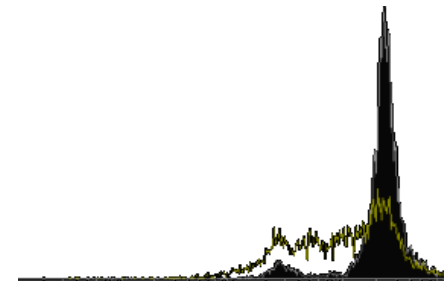
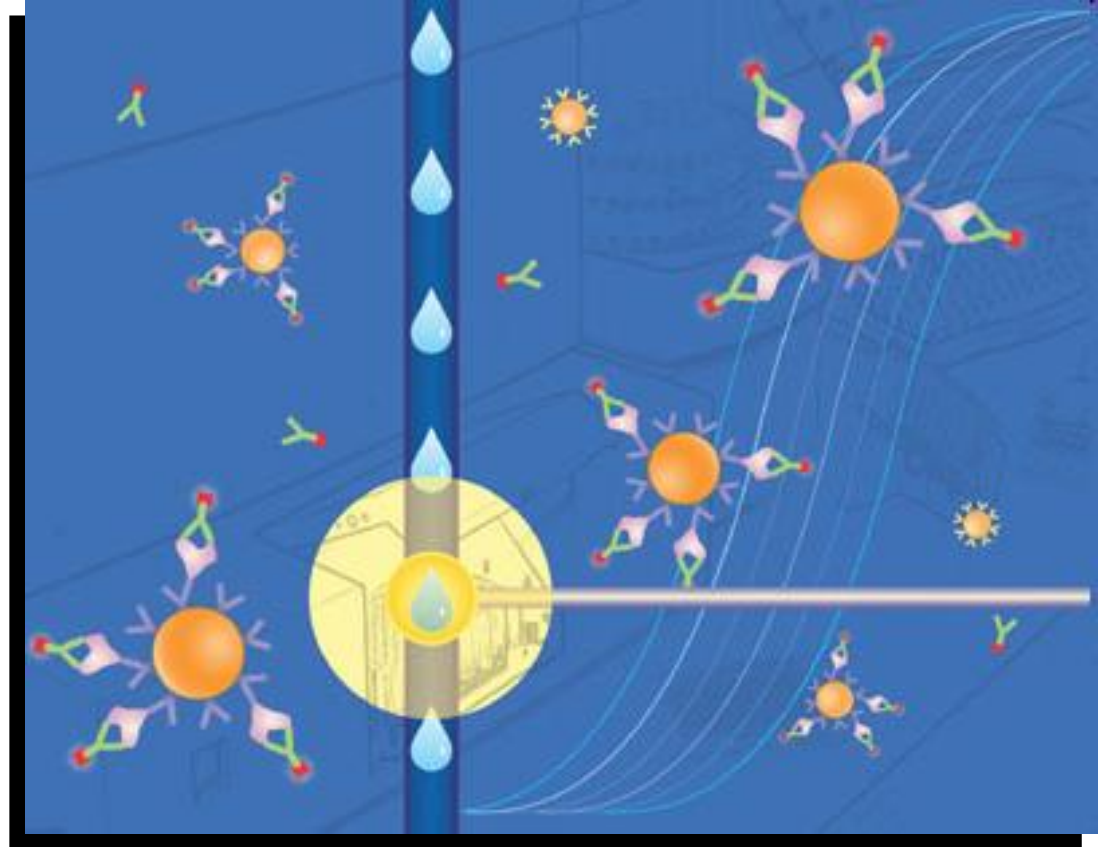
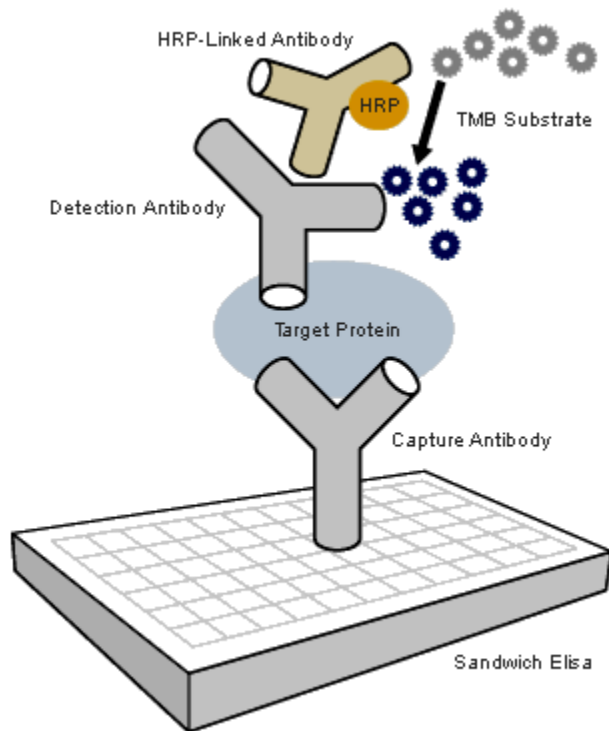


Tipos de ELISA:



Evaluación de células B

Anticuerpos / ELISA & CBA



Utilidad

Clases y subclases de Ig

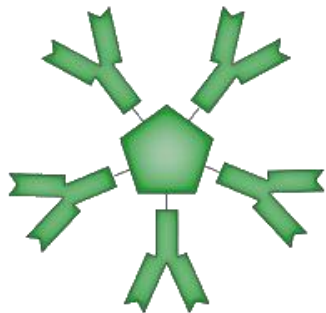
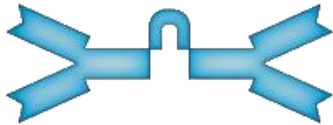


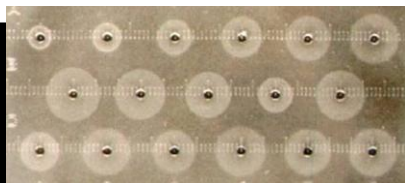
TABLE 4-2 Properties and biological activities* of classes and subclasses of human serum immunoglobulins

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

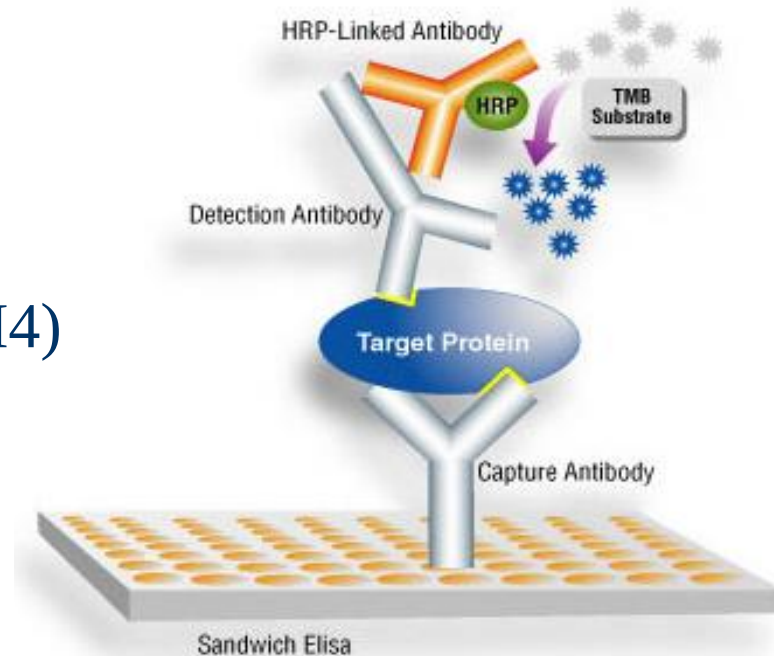
Detección de Ag y Ac

- 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



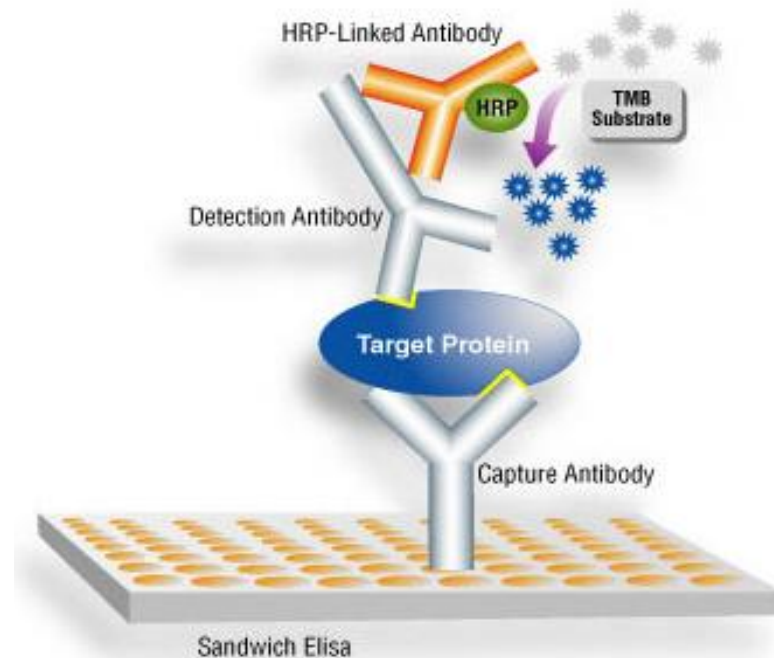
Utilidad

Detección de Acs contra antígenos de tejido

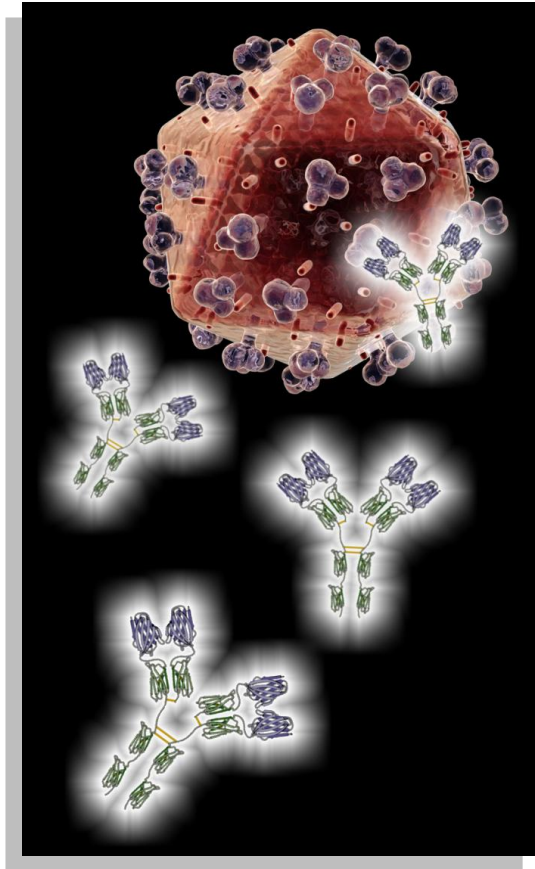
- Anti-tiroglobulina
- Anti-microsomal
- Anticuerpos Antifosfolípidos (**Cardiolipina IgG-M**)

Detección de Ags asociados a tumores:

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



ELISA_s y Generaciones:



1^{ra} generación

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

2^{da} generación

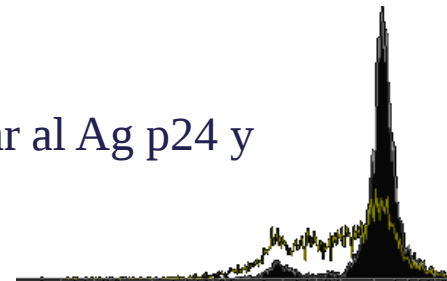
- Ag: proteínas recombinantes de VIH. Detección de VIH-1 y VIH-2
- Poca sensibilidad, mejora la especificidad

3^{ra} generación

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

4^{ta} generación

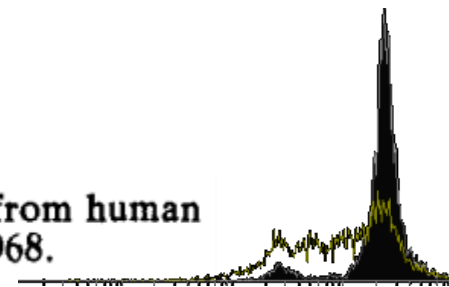
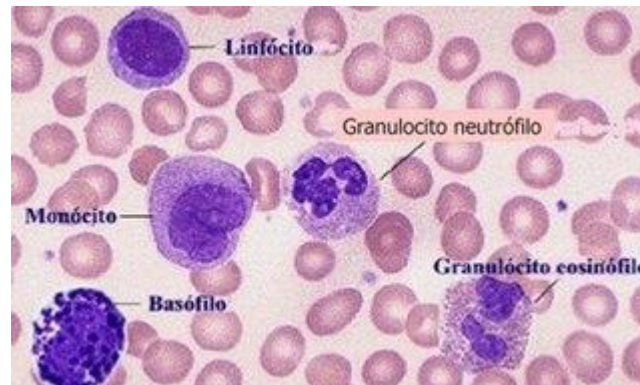
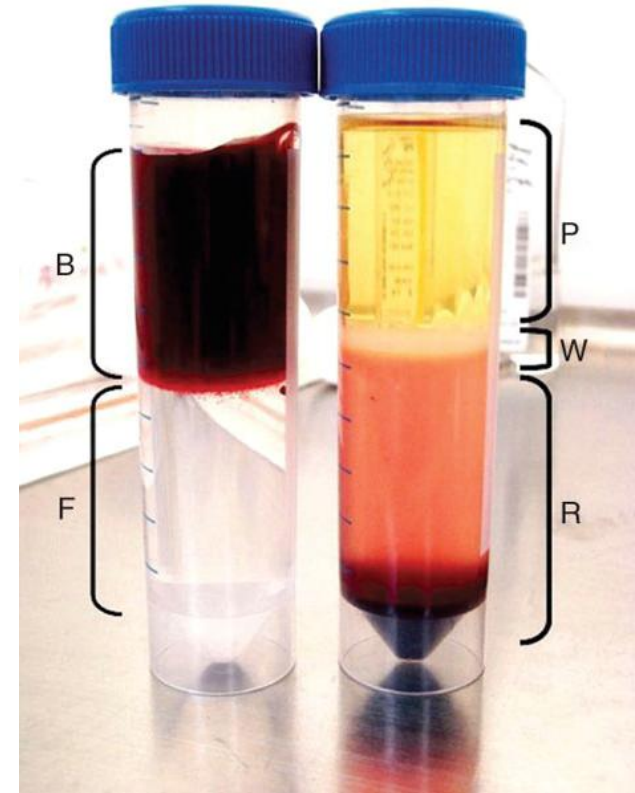
- Capacidad para detectar al Ag p24 y anticuerpos



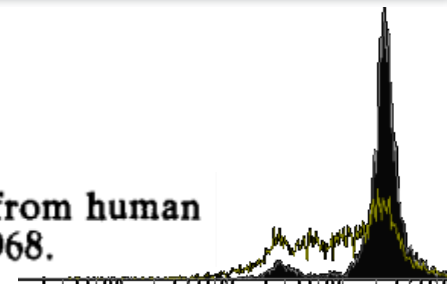
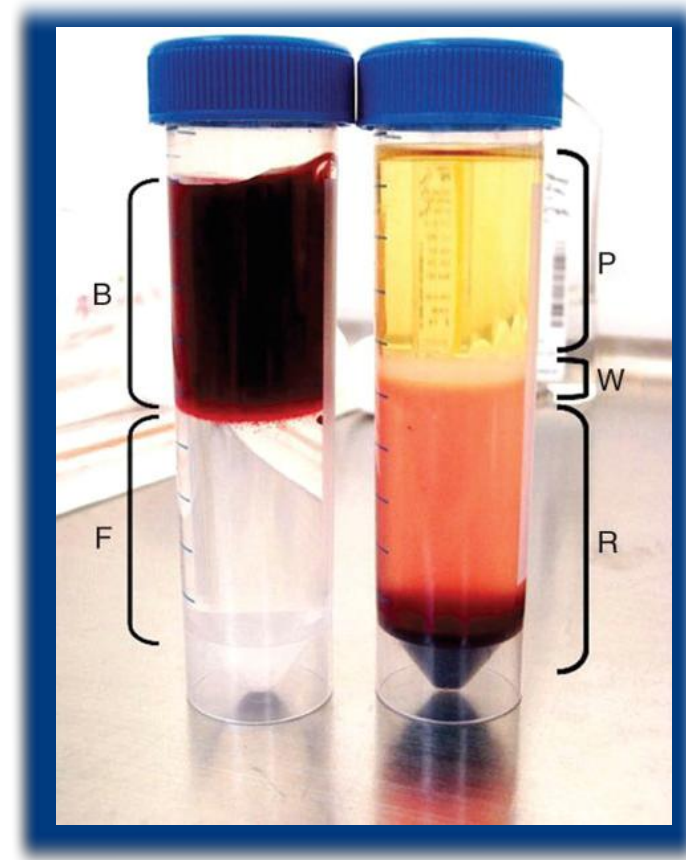
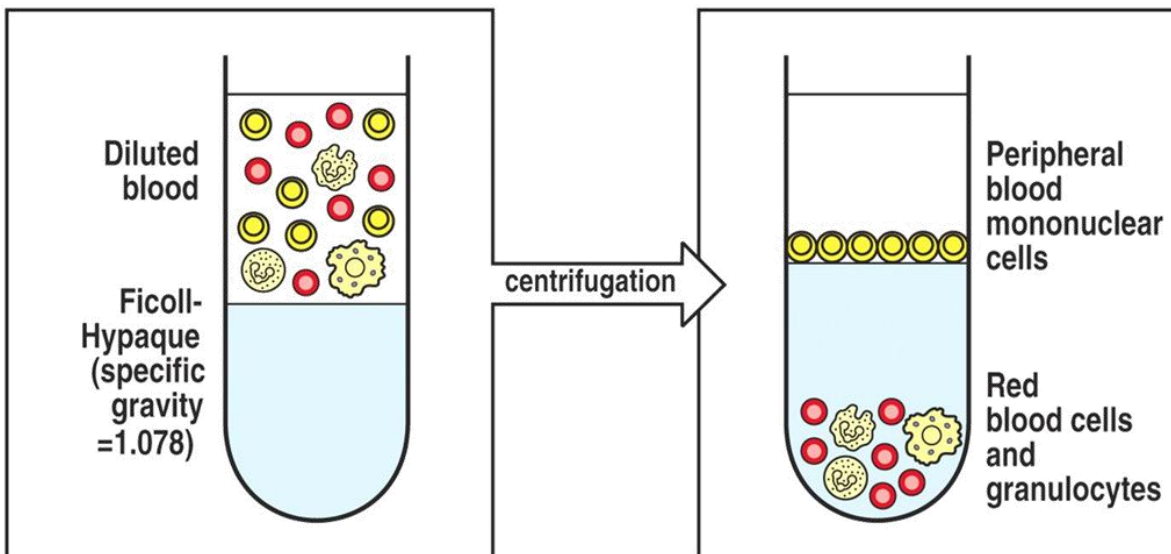
Separación Celular.

Utilidad

- ✓ Recuento de linfocitos T y B (diferenciación)
- ✓ Respuesta proliferativa hacia mitógenos
- ✓ Determinación de antígenos HLA
- ✓ Cultivo mixto de linfocitos

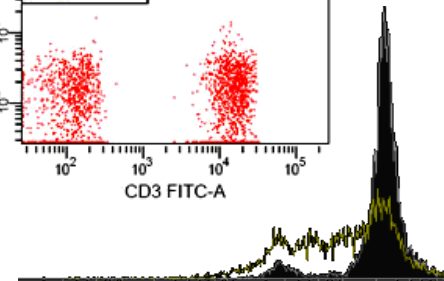
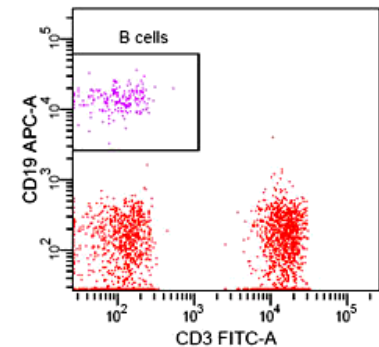
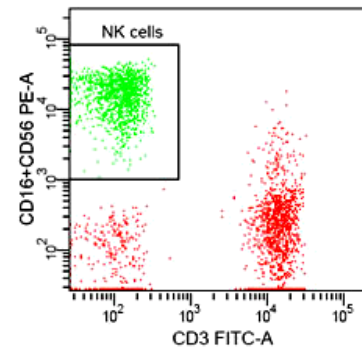
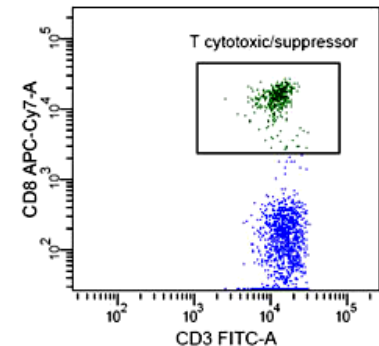
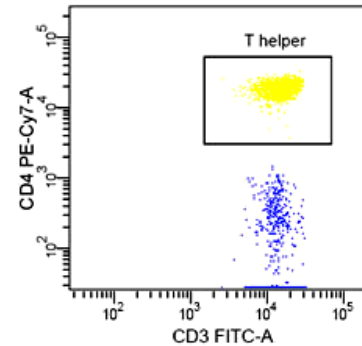
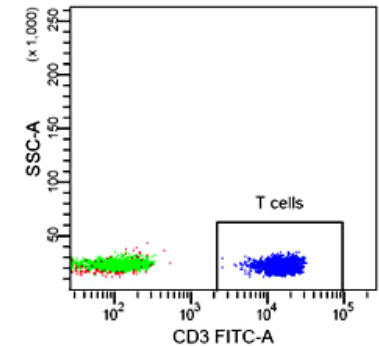
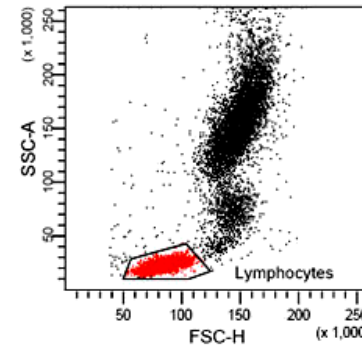
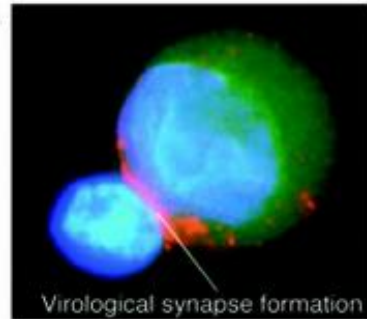
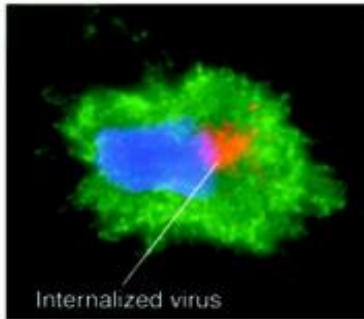


Separación Celular



Técnicas basadas en fluorescencia

- Citometría de flujo
- Inmunofluorescencia-
Microscopia de
fluorescencia



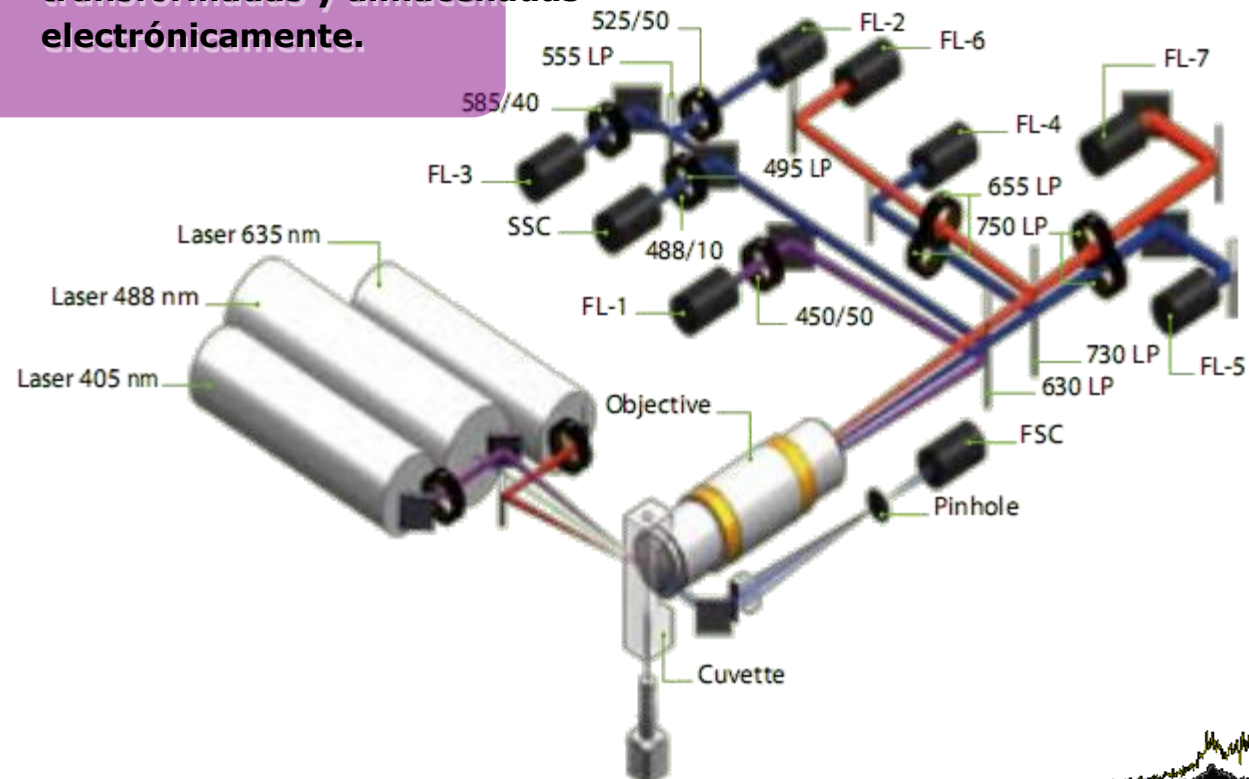
Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Hidrodinámica

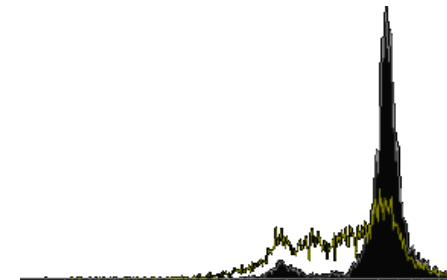
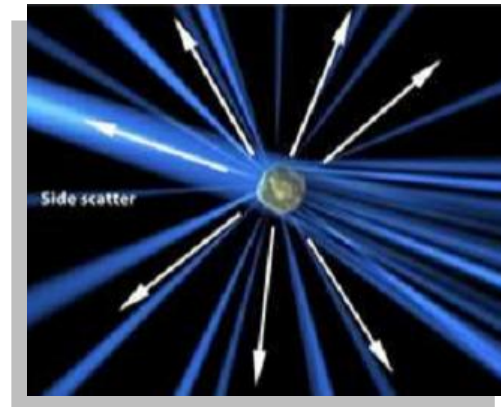
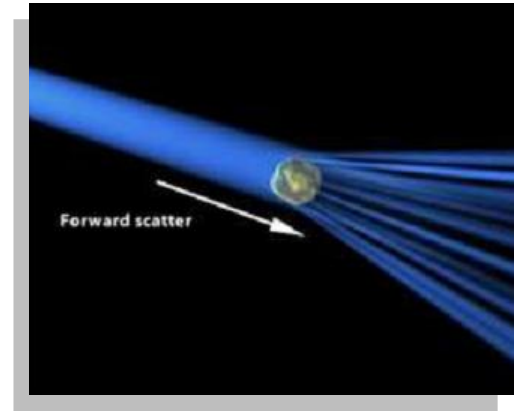
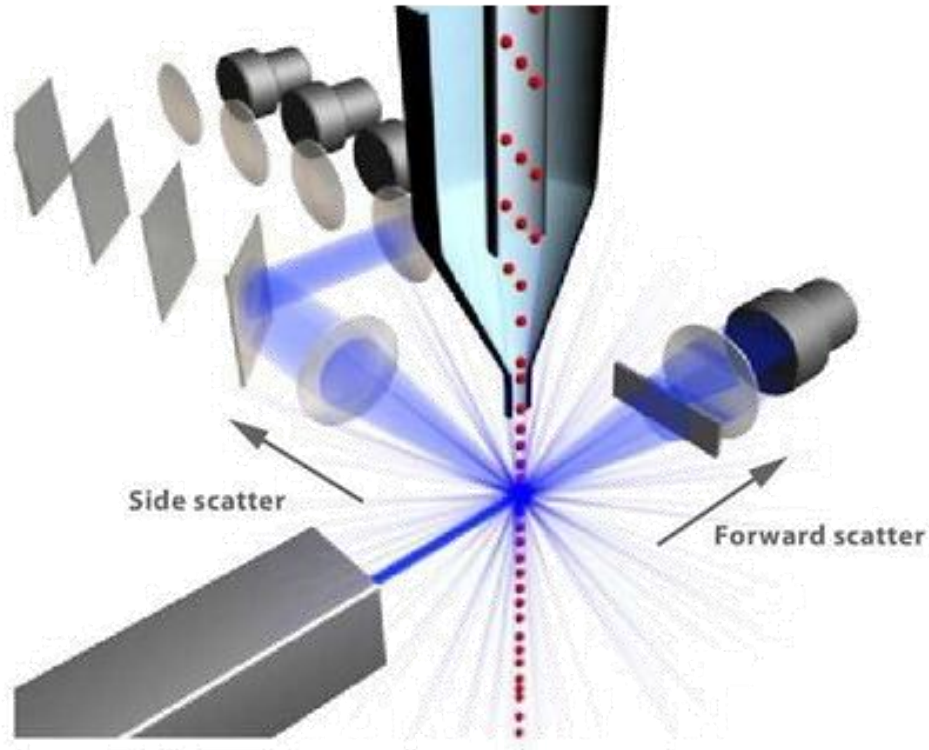
Óptica

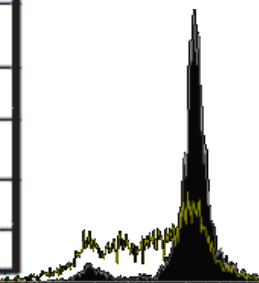
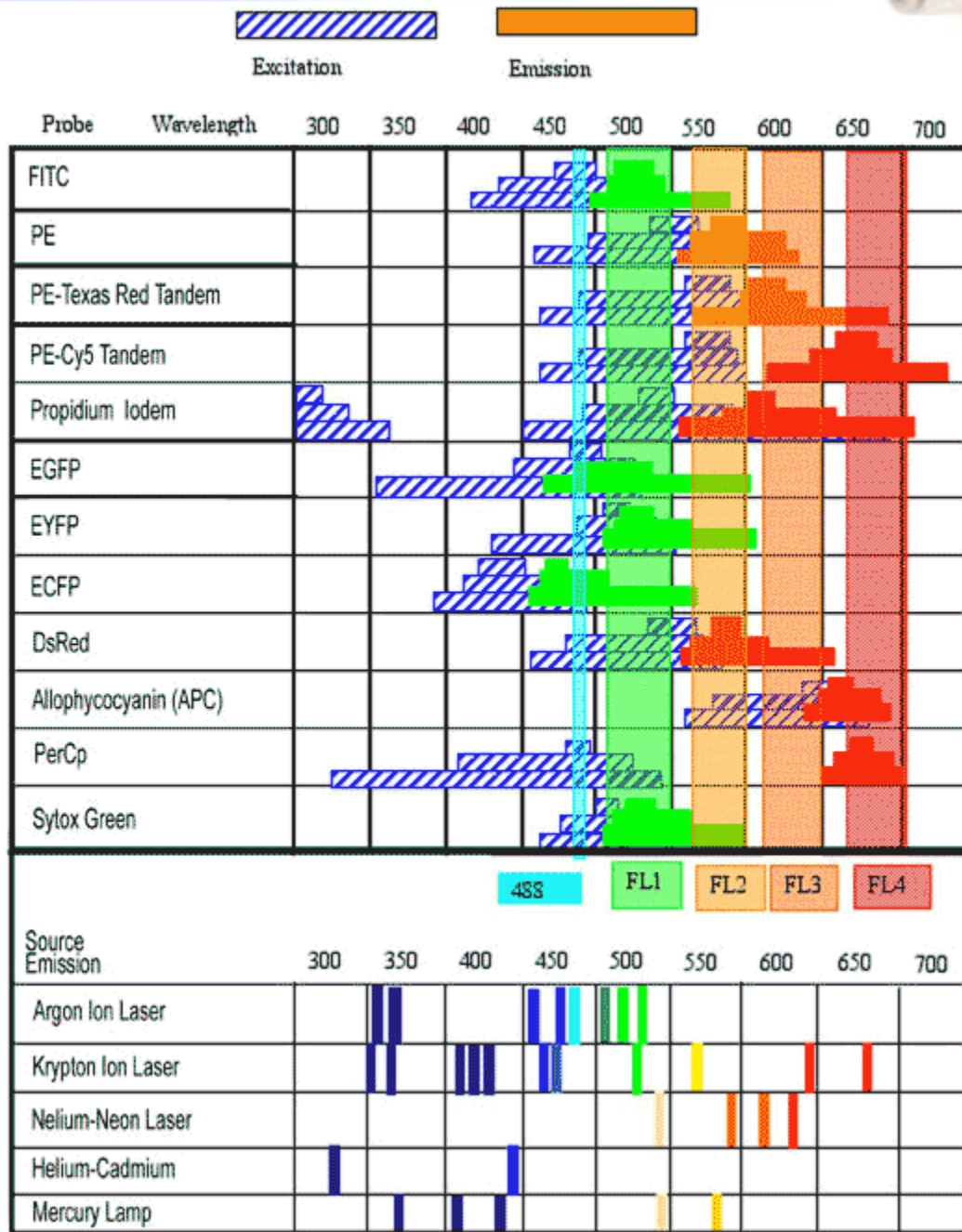
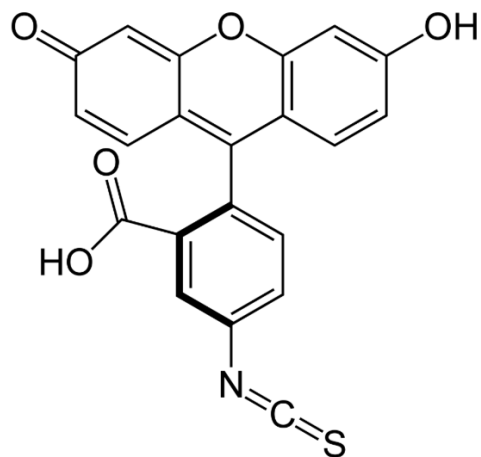
Electrónica

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.

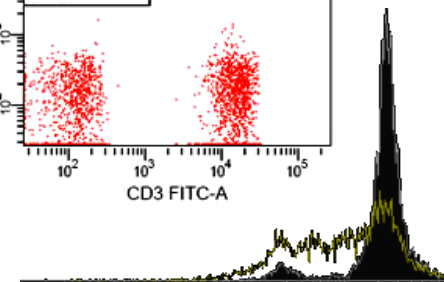
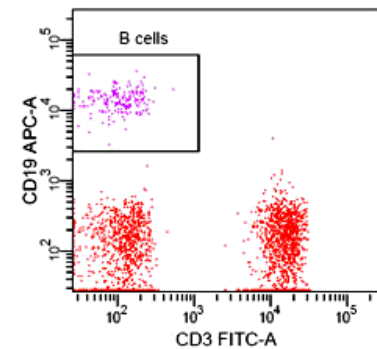
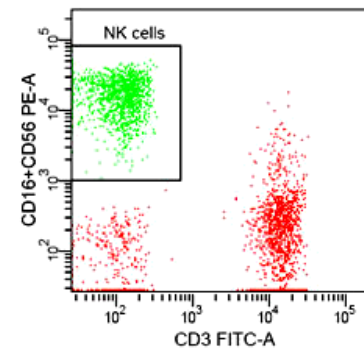
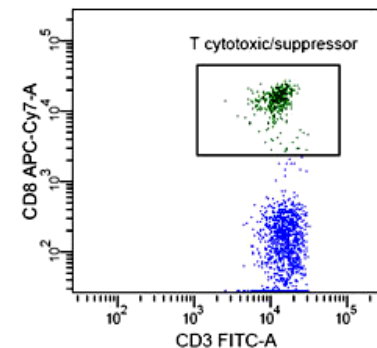
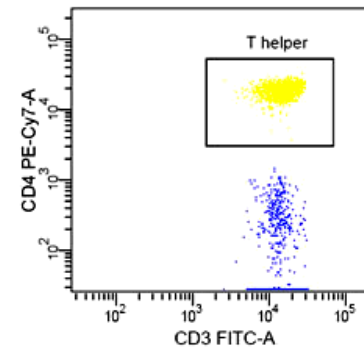
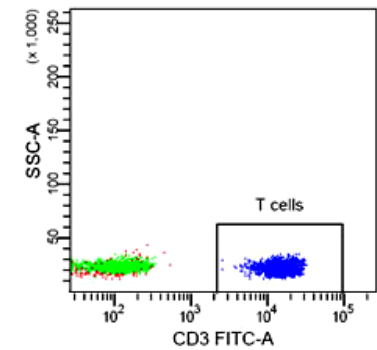
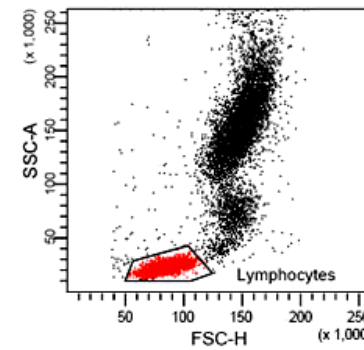


Óptica



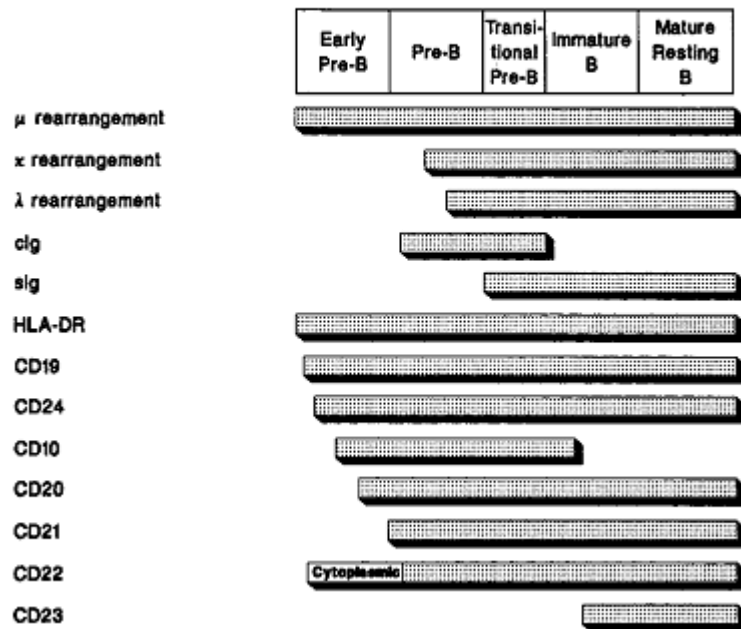


• Citometría de flujo

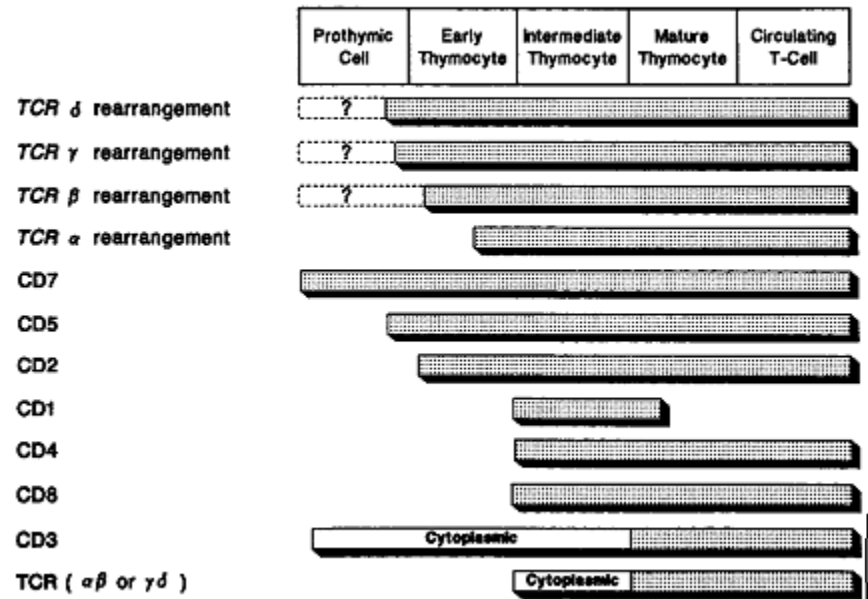


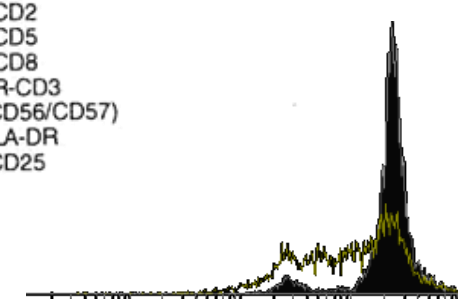
Utilidad: Evaluación de la función hematopoyética

B-Cell Ontogeny



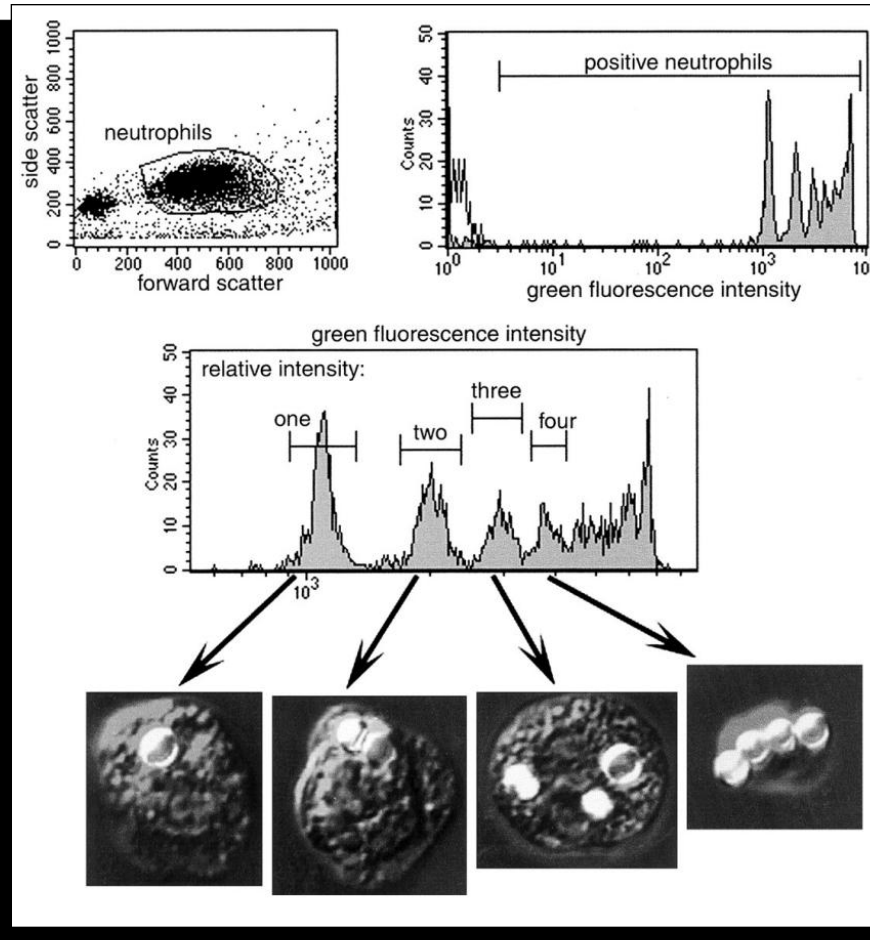
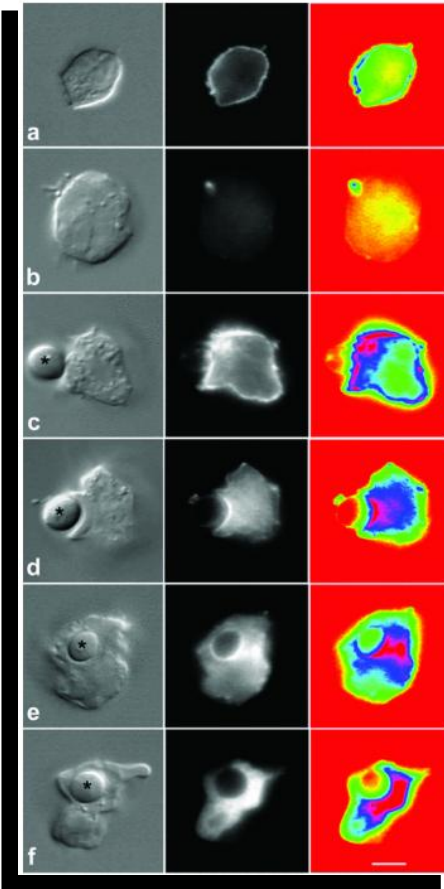
T-Cell Ontogeny



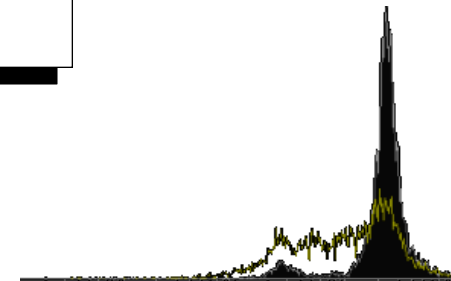


Evaluación de células fagocíticas

Fagocitosis

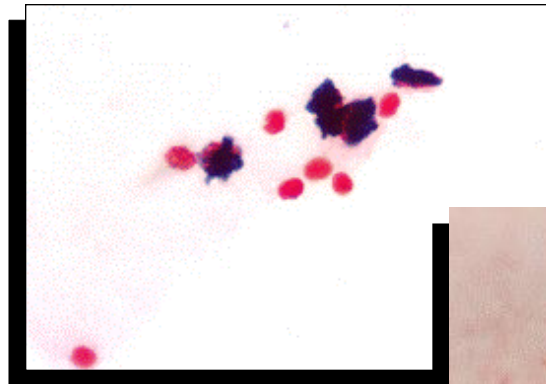
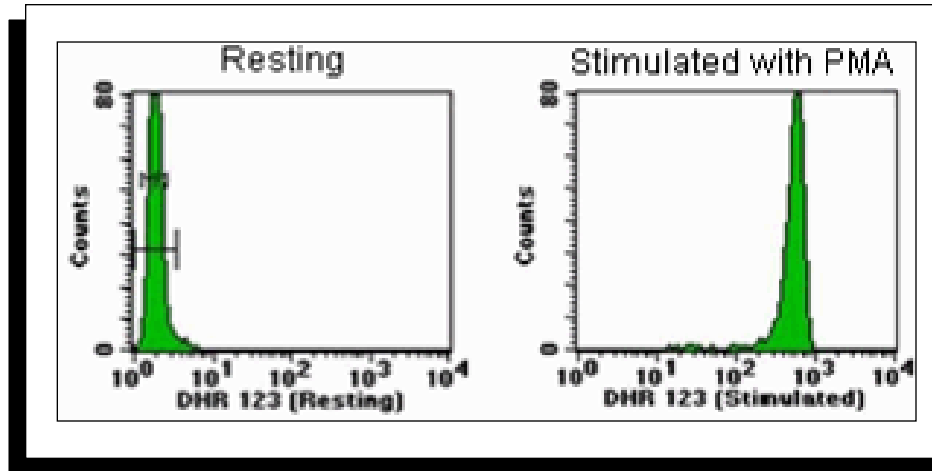


- Látex
- Marcajes específicos



Evaluación de células fagocíticas

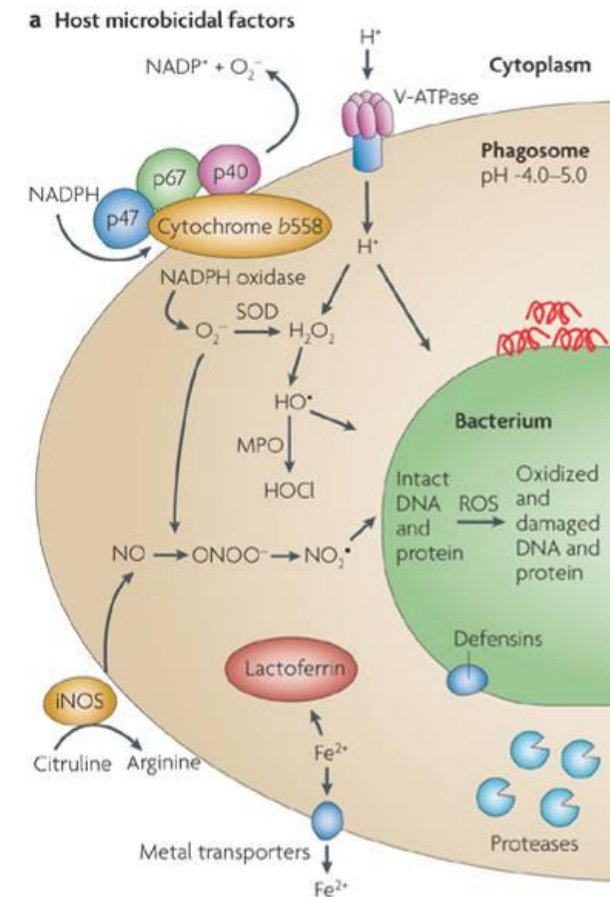
Estrés oxidativo



- NBT



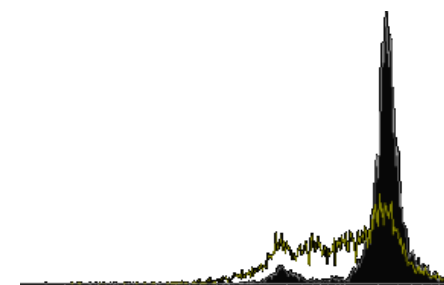
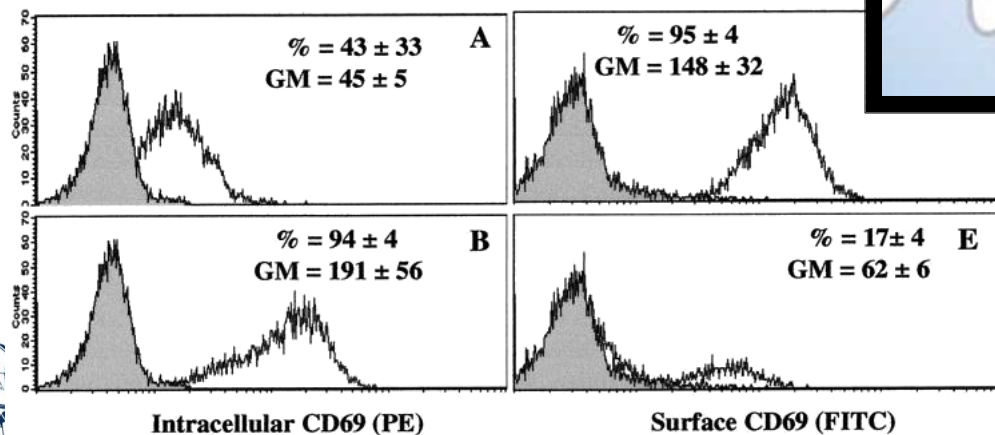
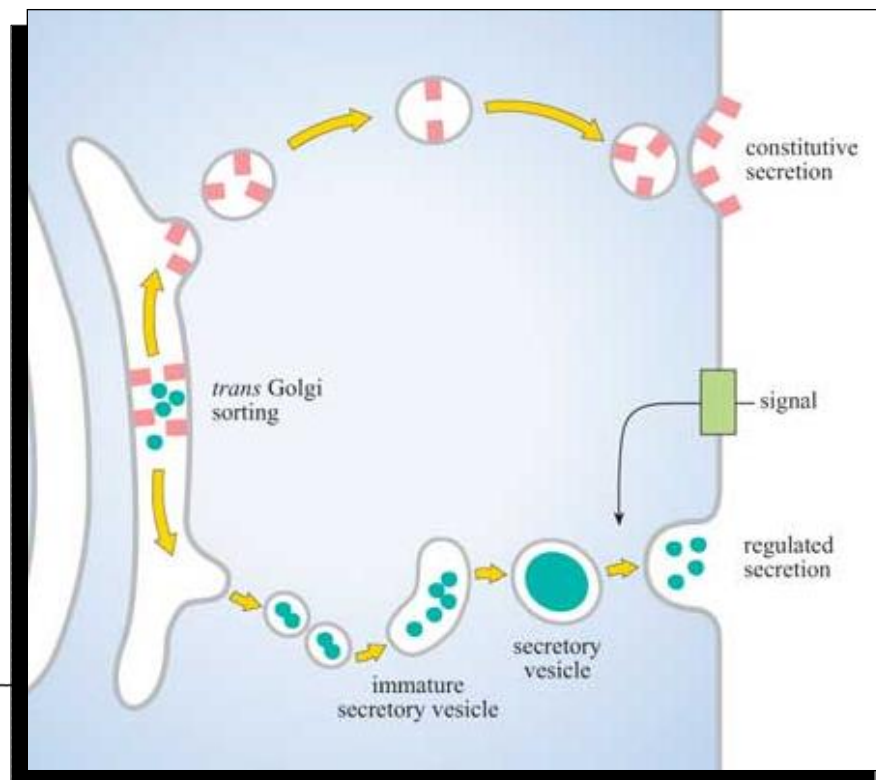
- DHR / DHE



Evaluación de células T

Producción de citocinas/ marcadores intracelulares

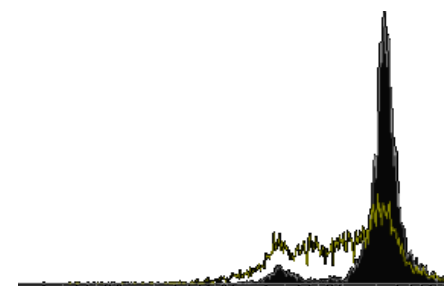
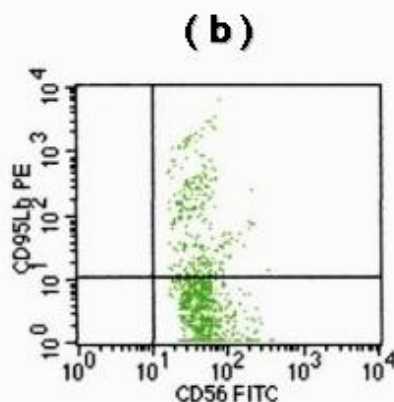
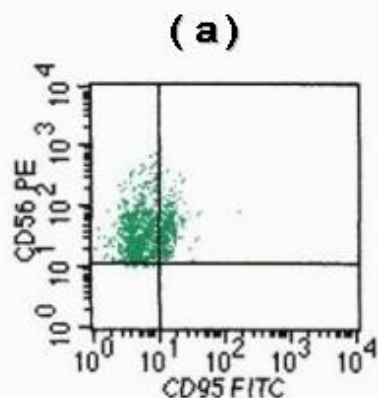
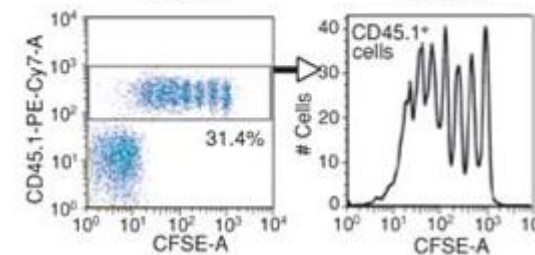
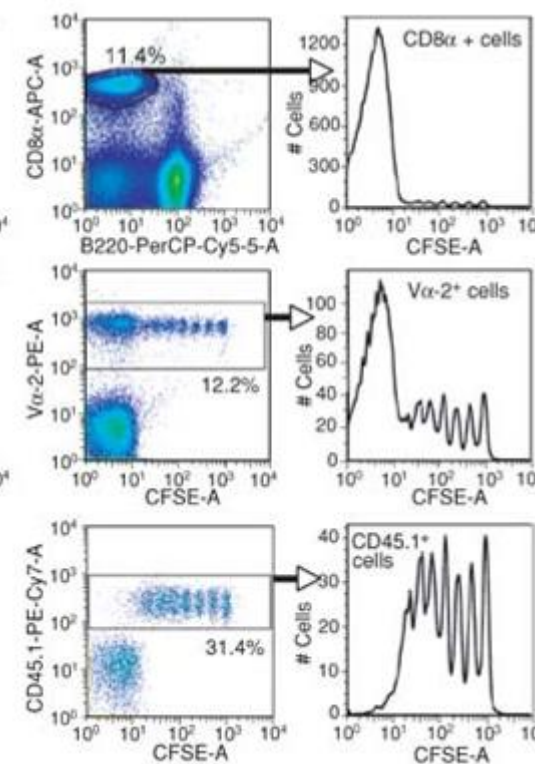
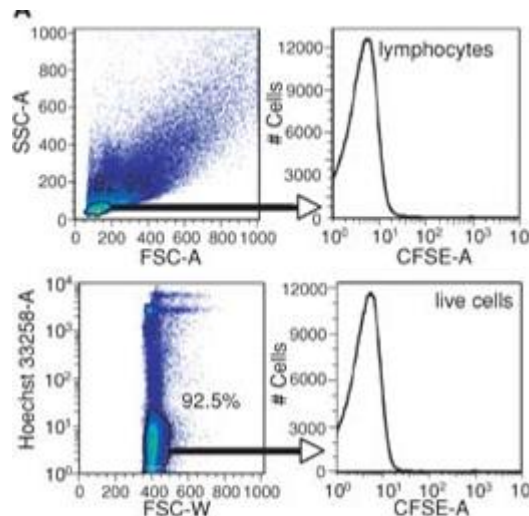
- Ionomicina / Brefeldina A



Evaluación de células T

Marcadores varios / FACS

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



Evaluación de células B

Marcadores varios / FACS

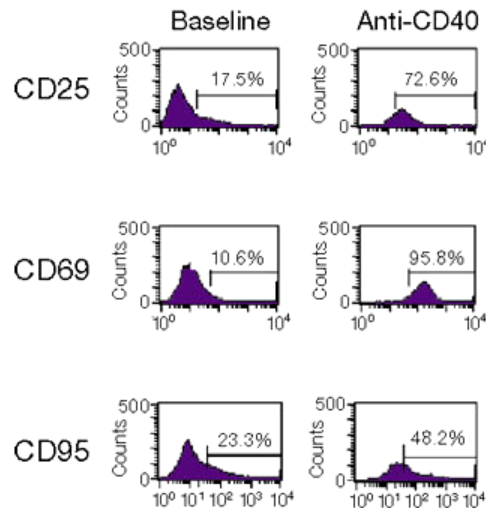
Becton Dickinson
Procedures

B-D®

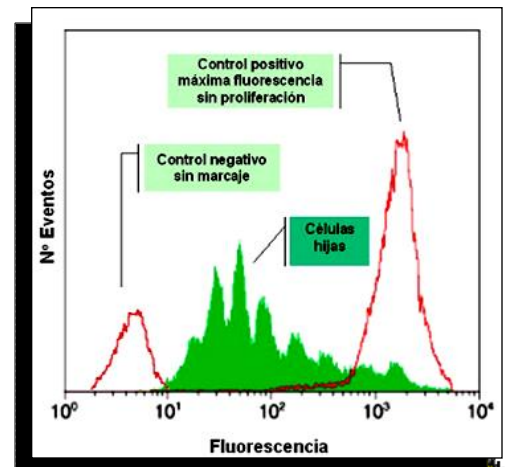
Flow Cytometric Procedure for Assessing Lymphocyte Activation

B cells

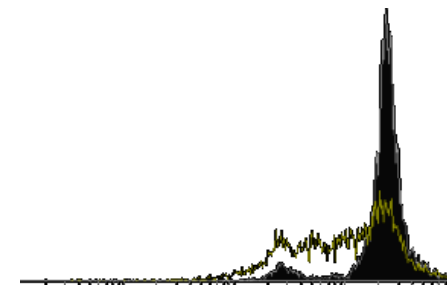
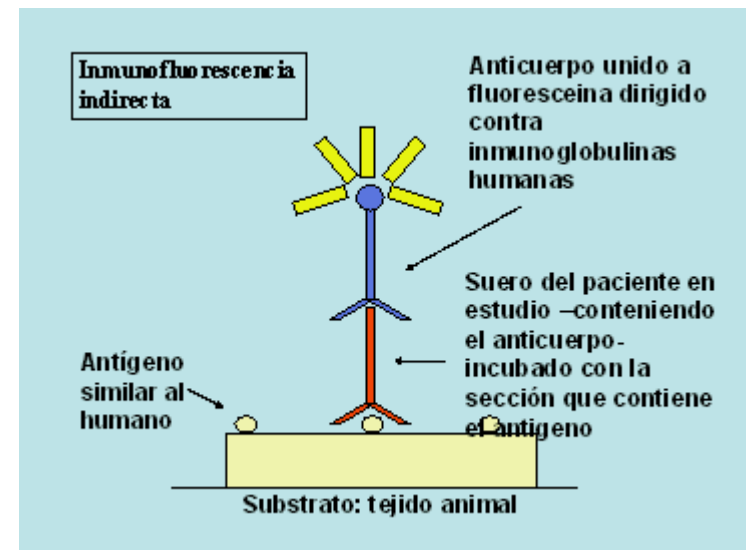
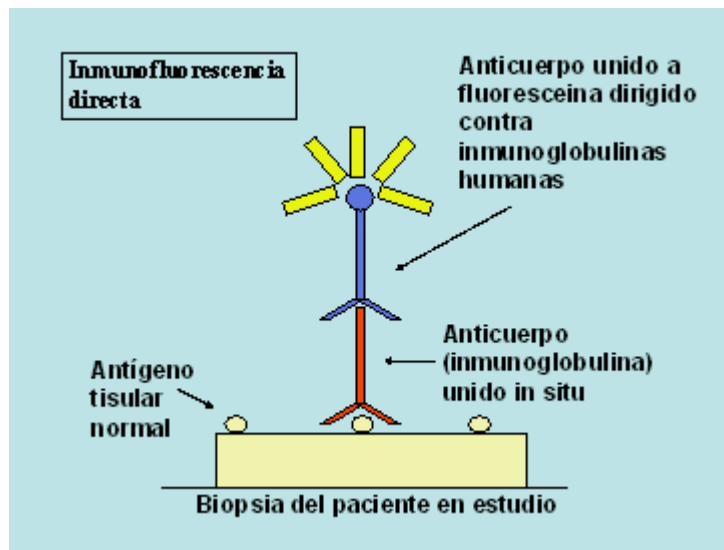
Wild type



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



Inmunofluorescencia



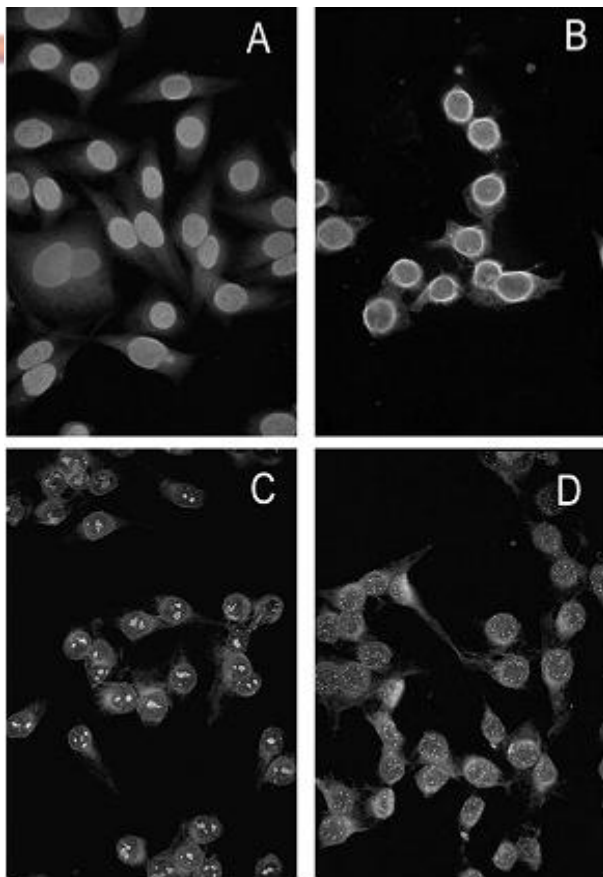
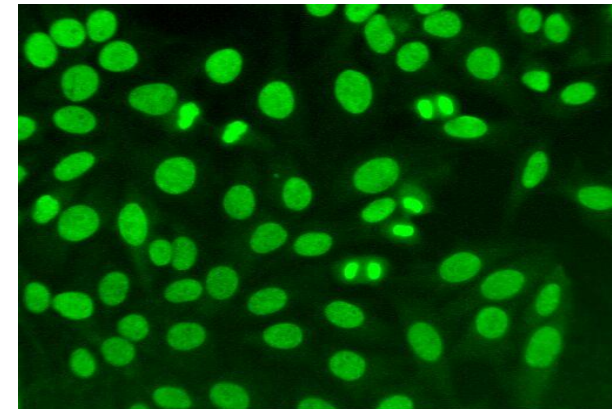


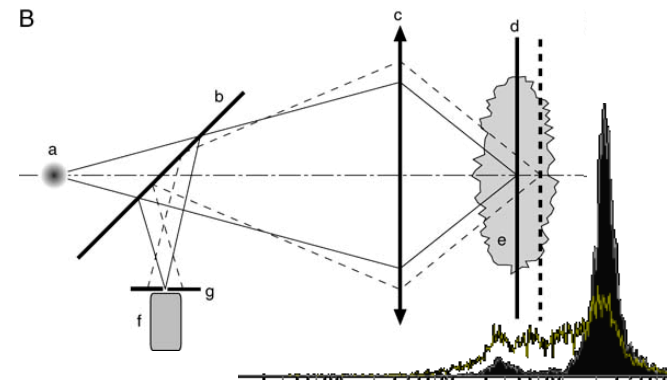
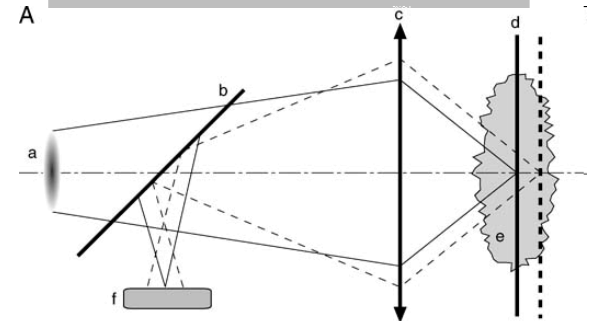
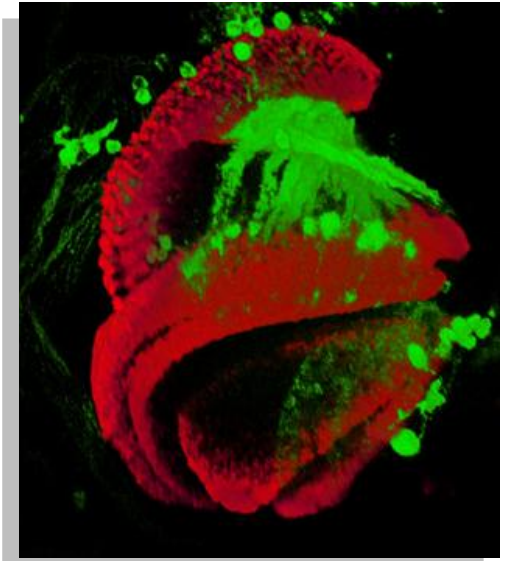
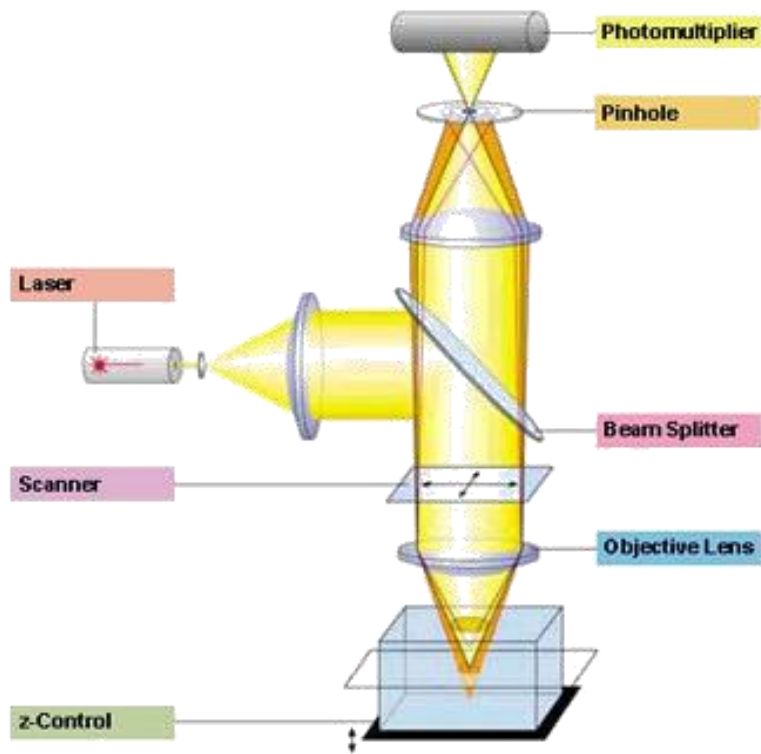
Figura 12.3: Patrones de inmunofluorescencia en la determinación de anticuerpos antinucleares. (A) patrón difuso; (B) patrón periférico; (C) patrón nucleolar; (D) patrón moteado.

Inmunofluorescencia

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



Microscopía confocal



Microscopía confocal

Aplicaciones!!!

Confocal endomicroscopy

Kerry Dunbar and Marcia Canto

Current Opinion in Gastroenterology 2008,
24:631–637

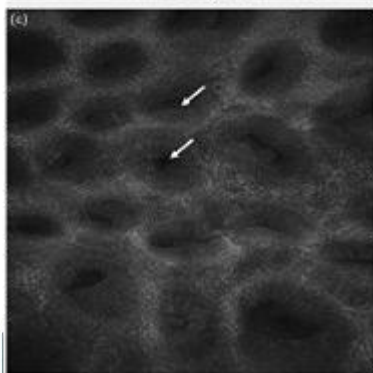
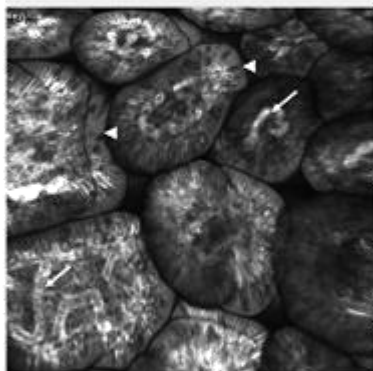
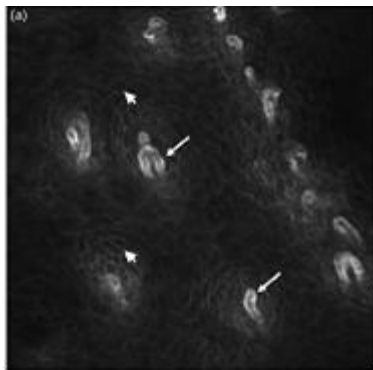


Table 2 Comparison of reported performance characteristics in endomicroscopy studies

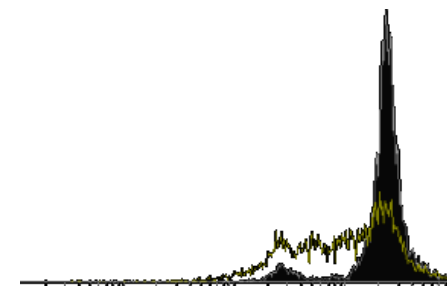
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
CLE pattern classification for colorectal pathology [5]	97.4	99.4	99.2
GI neoplasia—miniprobe CLE [4*]	93.1	92.1	92.4
Chromoendoscopy-guided CLE in UC [7**]	94.7	98.3	97.8
Chromoendoscopy-guided CLE in UC [8*]	94	92	—
CLE for DALM and ALM [9**]	100	96.6	97
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.

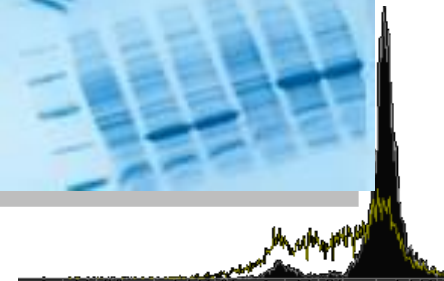
✓ FITC sódica

✓ Violeta de Cresilo

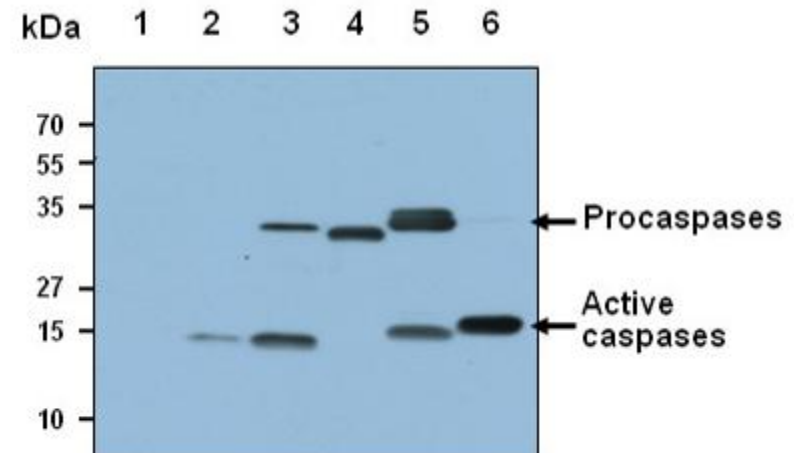
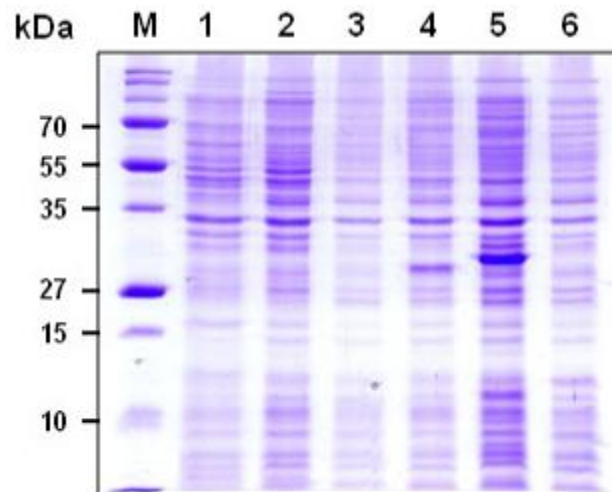
✓ Acriflavina HCL



Electroforesis de proteínas



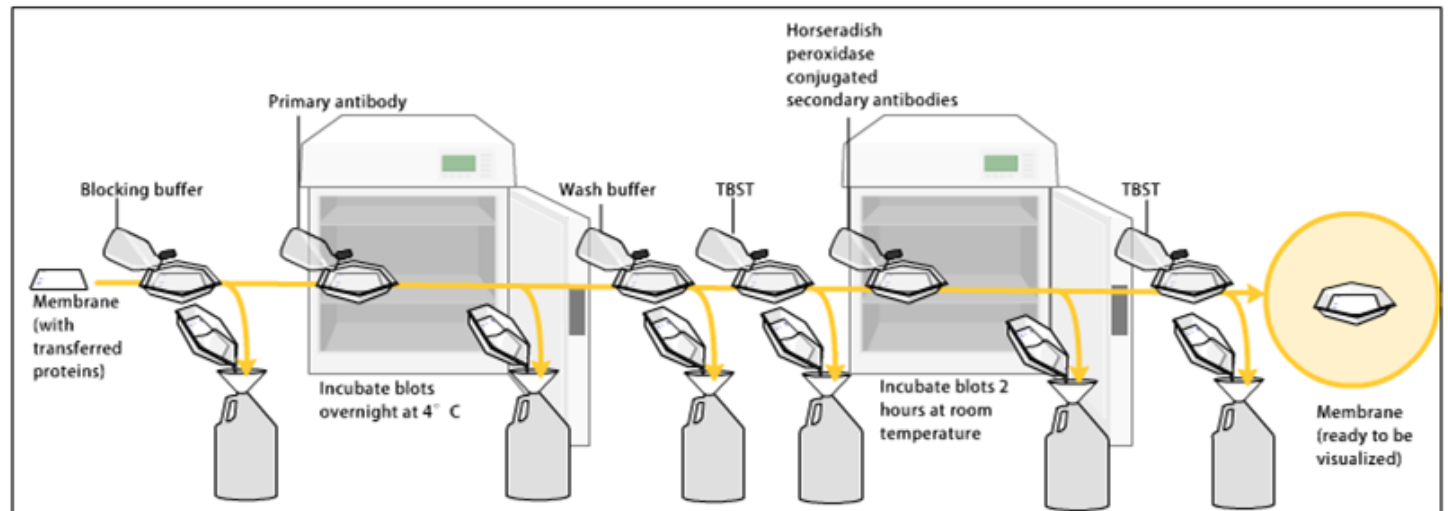
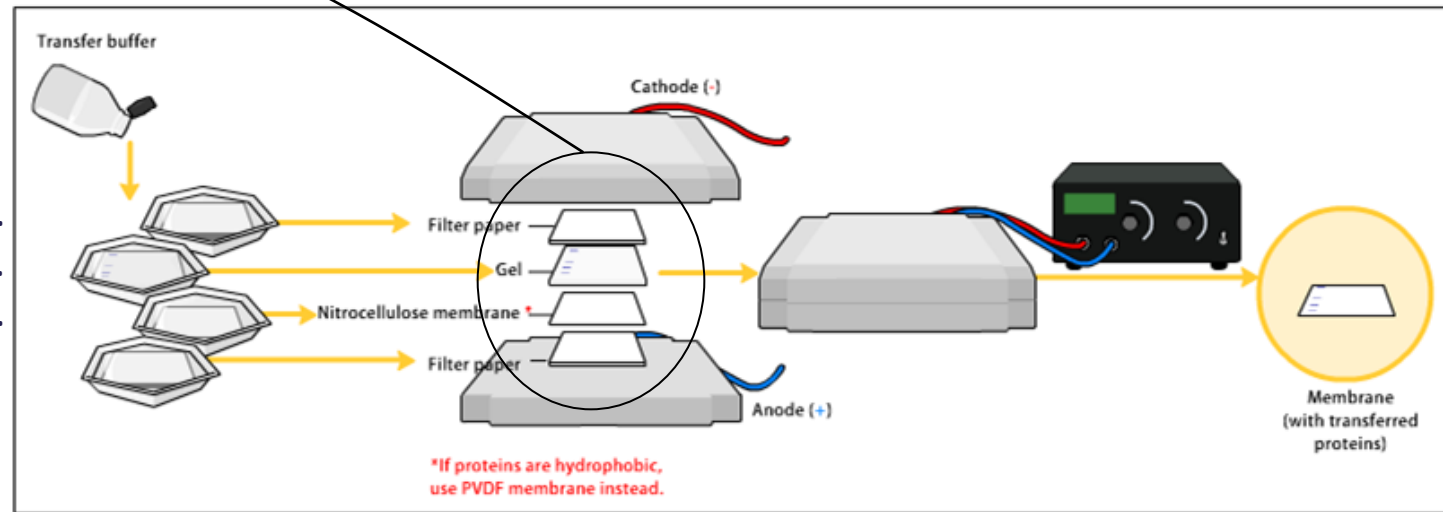
WESTERN BLOTTING



WESTERN BLOTTING

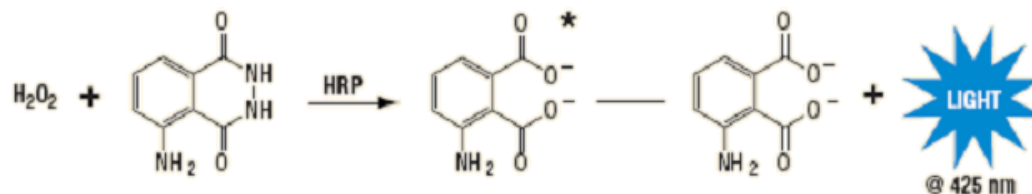
Pasos básicos

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

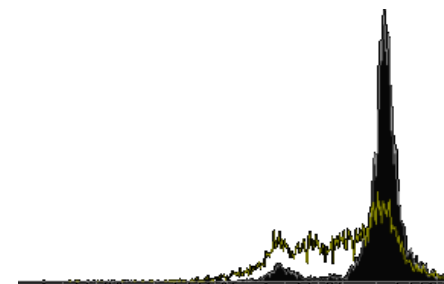
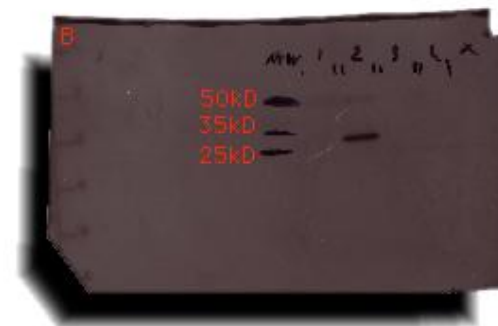


WESTERN BLOTTING

Luminol

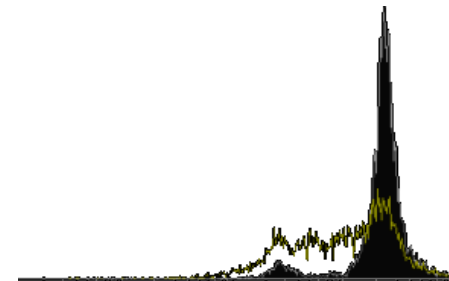
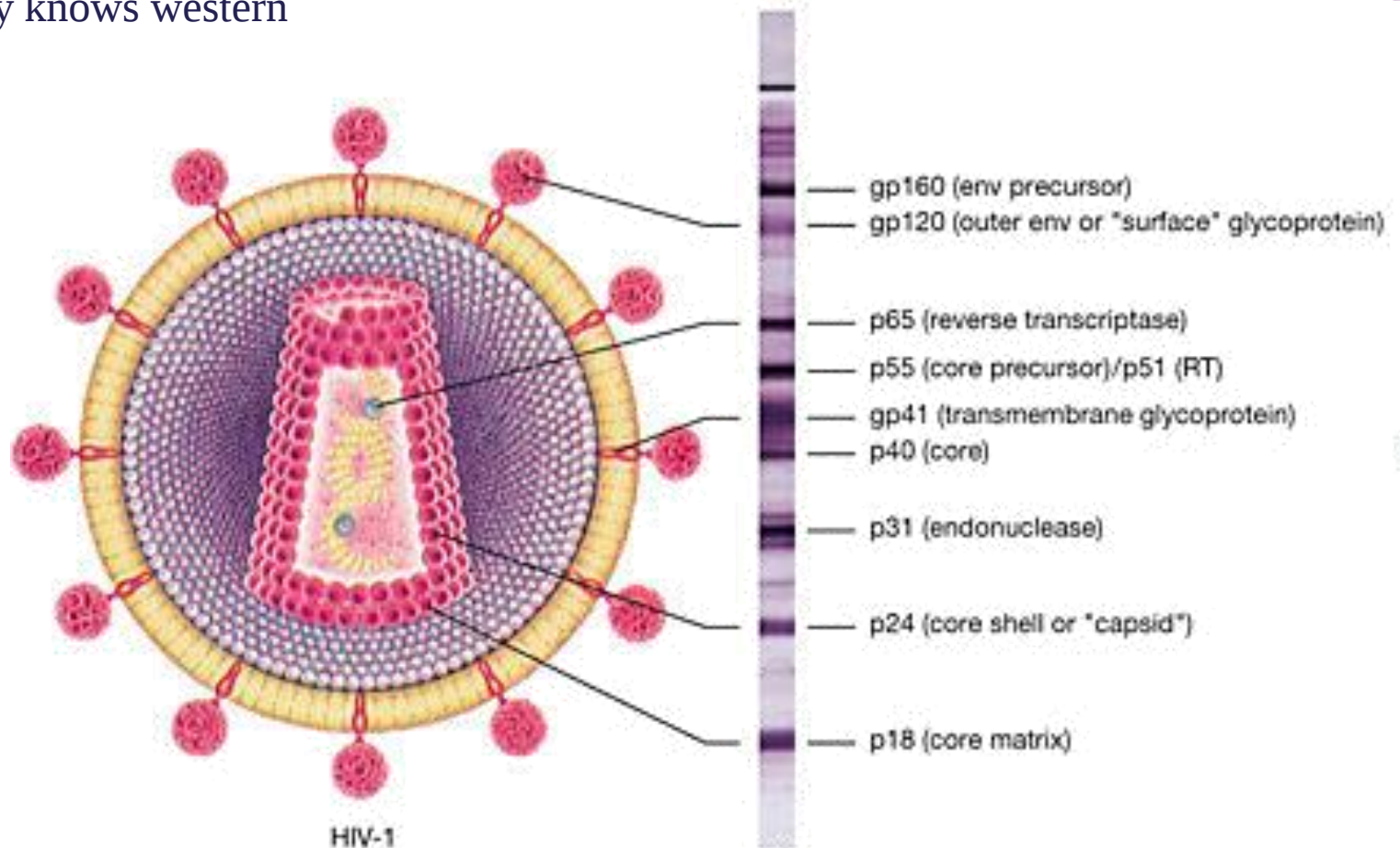


- Múltiples exposiciones de la membrana hasta conseguir la mejor imagen.
- Permite la detección cualitativa y cuantitativa en un mayor rango de concentraciones
 - Los sustratos quimioluminiscentes proporcionan la mayor sensibilidad.

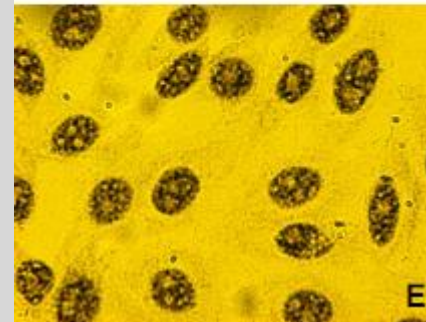
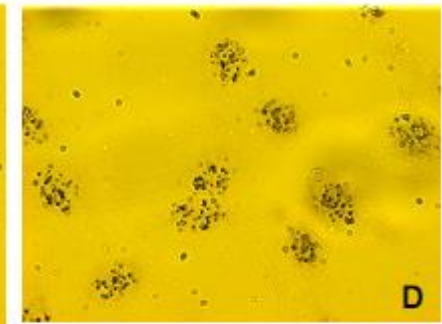
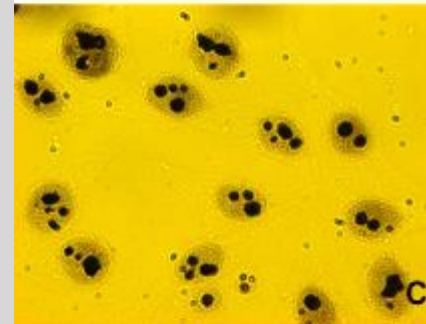
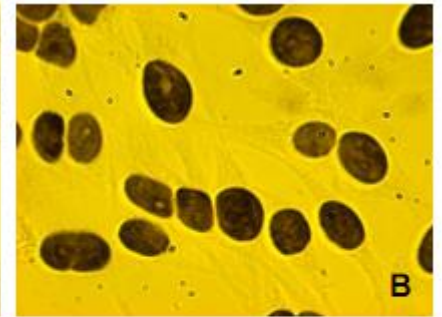
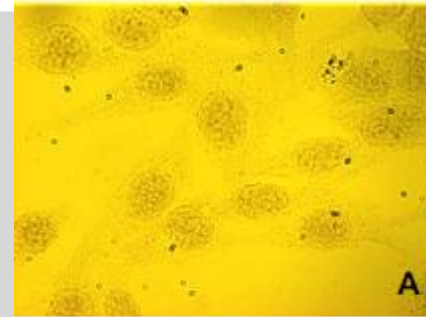
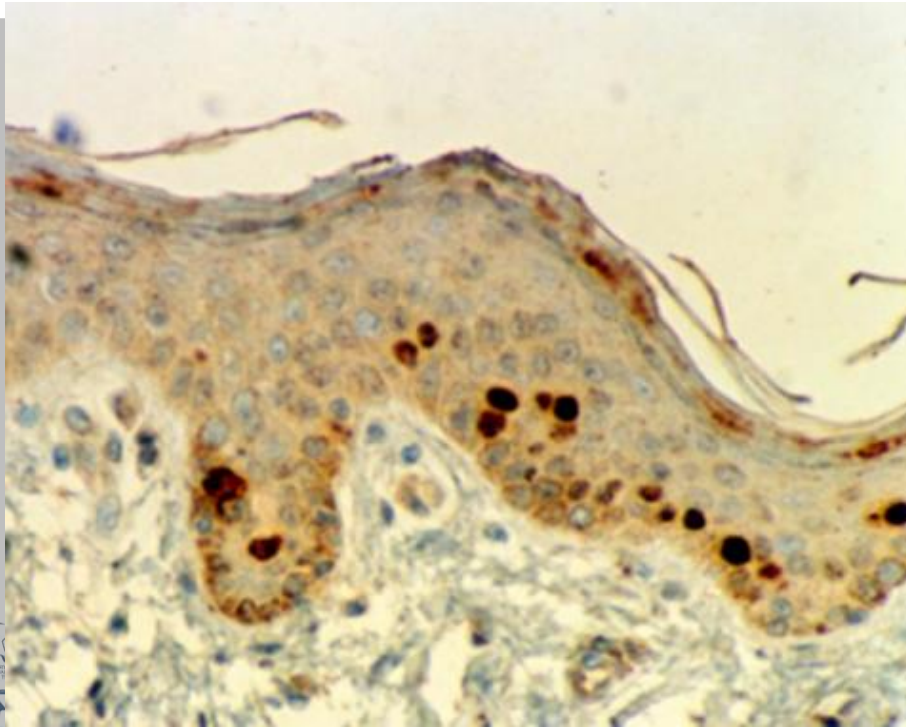


WESTERN BLOTTING

Everybody knows western



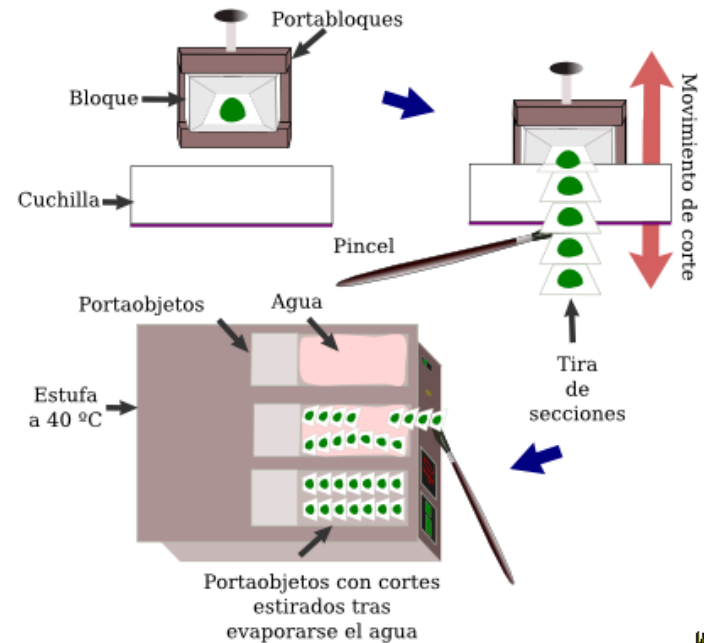
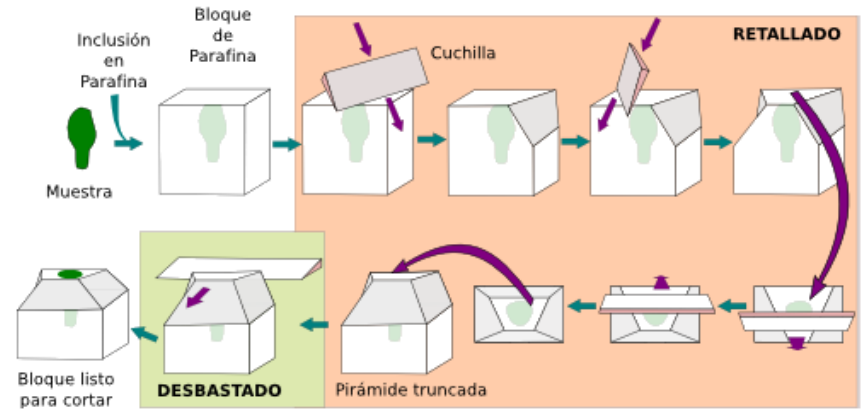
Inmunohistoquímica



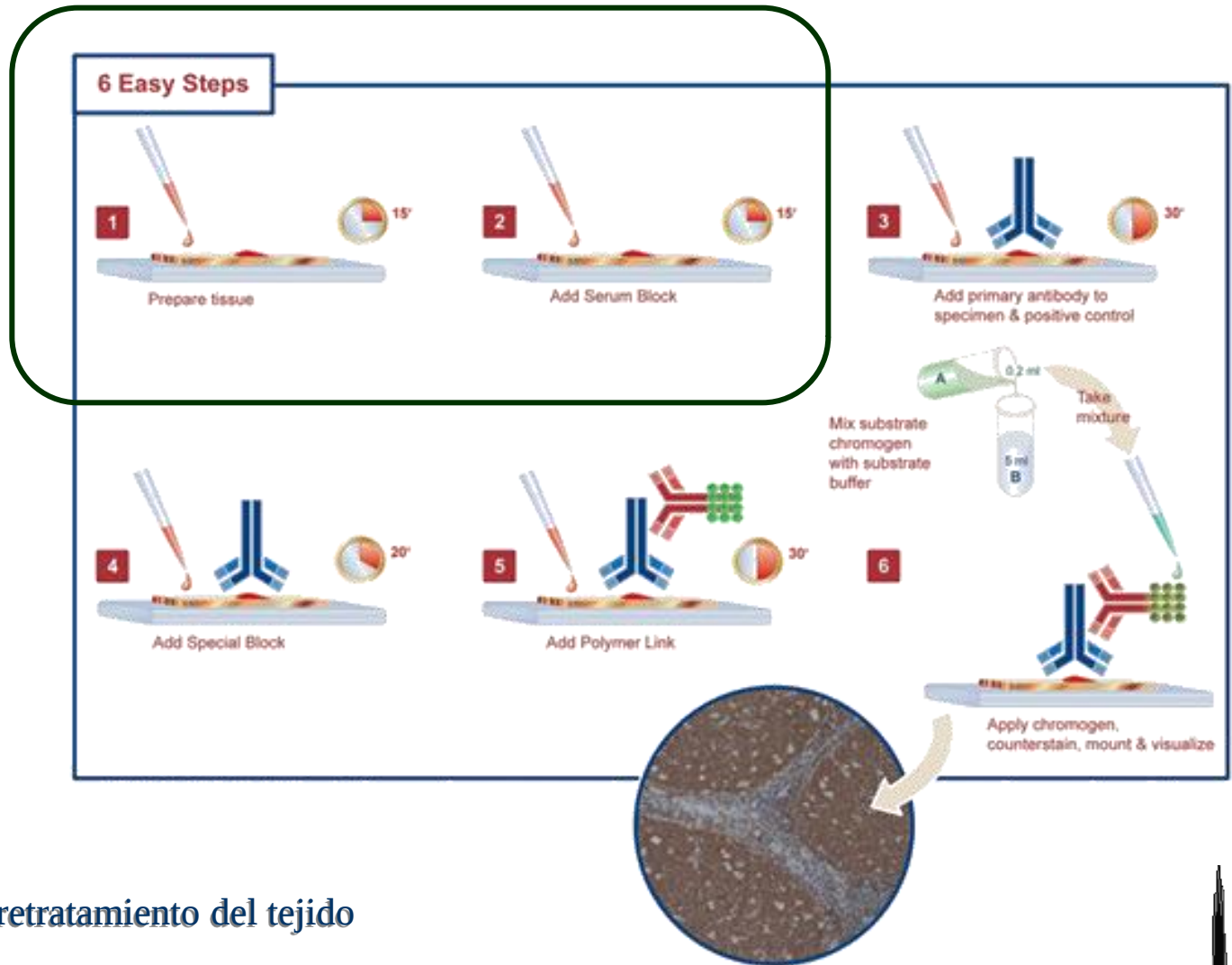
Inmunohistoquímica

Montaje de la muestra

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

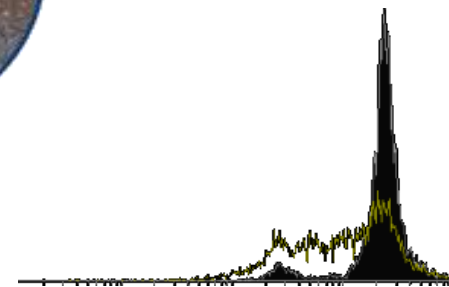


Inmunohistoquímica



Pretratamiento del tejido

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

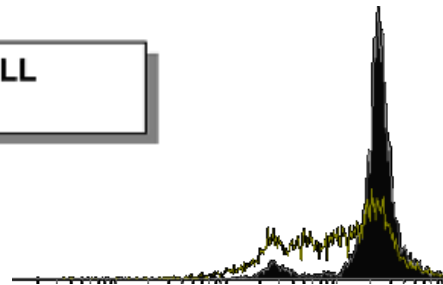
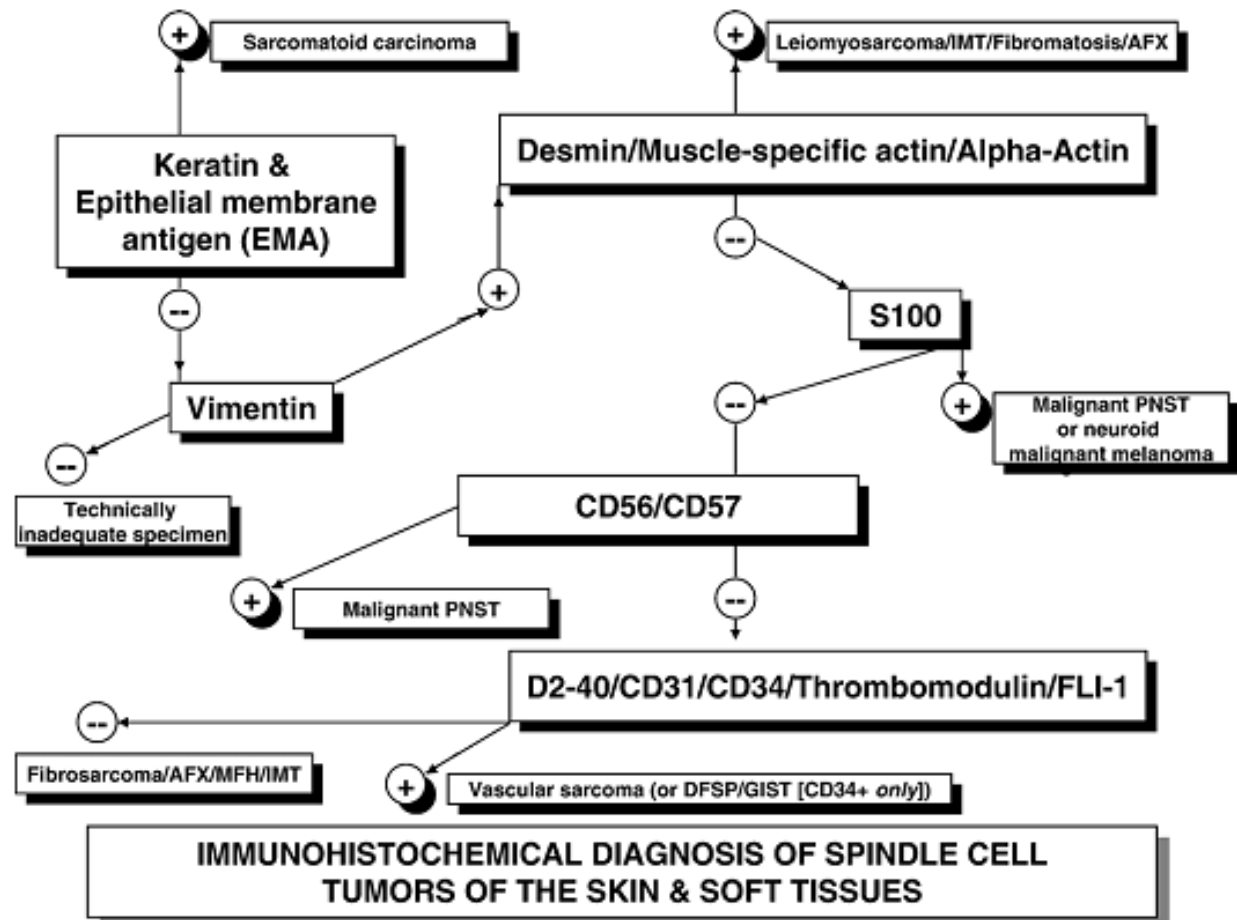


Inmunohistoquímica

Aplicaciones!!!

Immunohistochemical approaches to the diagnosis of undifferentiated malignant tumors

Annals of Diagnostic Pathology 12 (2008) 72–84

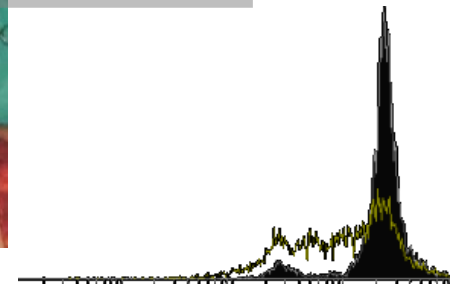
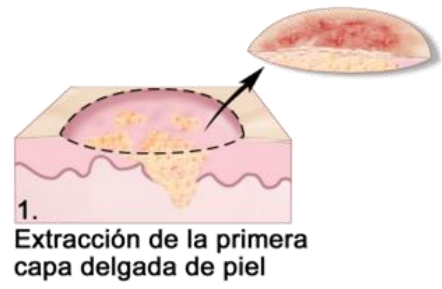
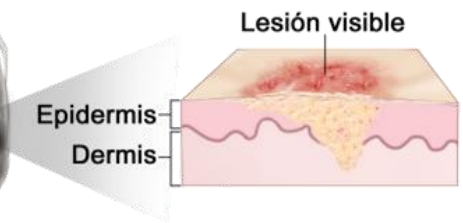




Inmunohistoquímica

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

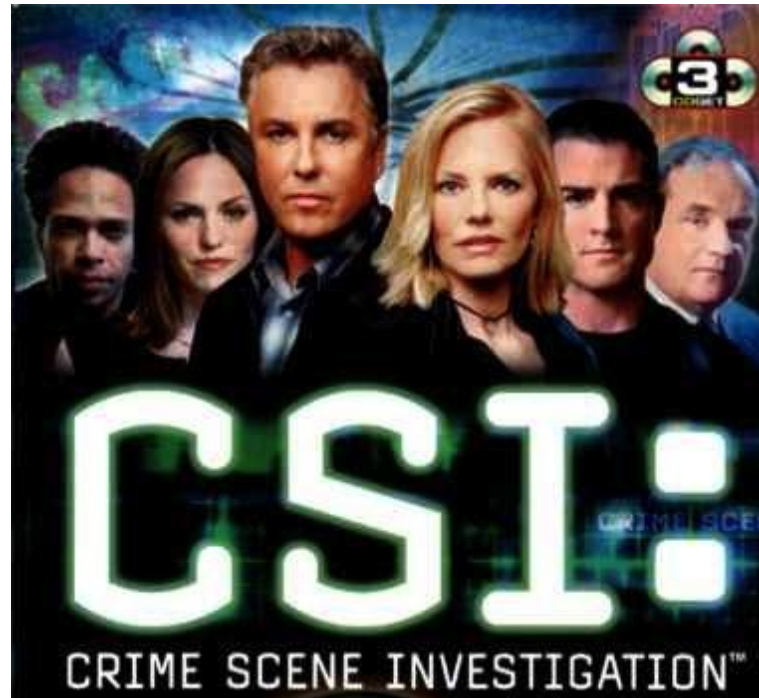
Obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una cantidad muy pequeña

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

Identificación de:

- ✓ Microorganismos
- ✓ Personas (cadáveres)

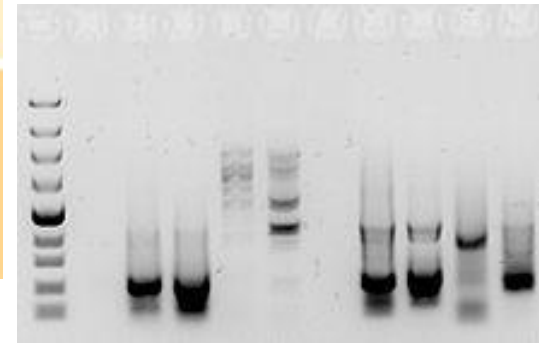
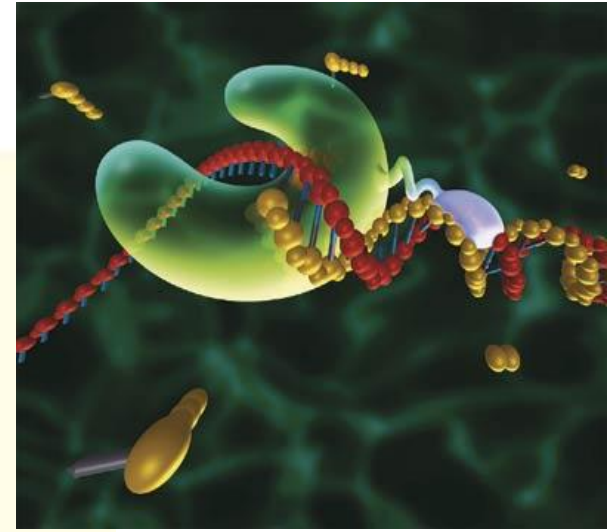
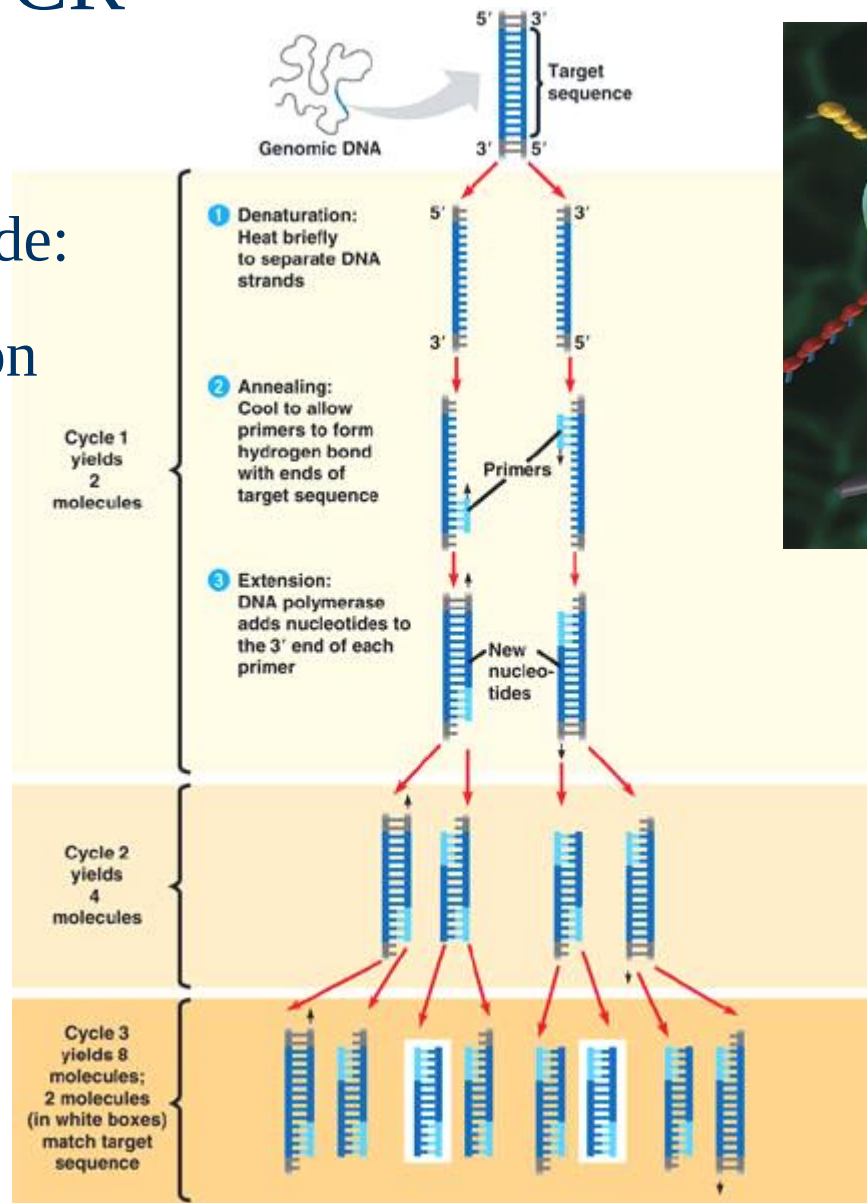
Investigación



Pasos de la PCR

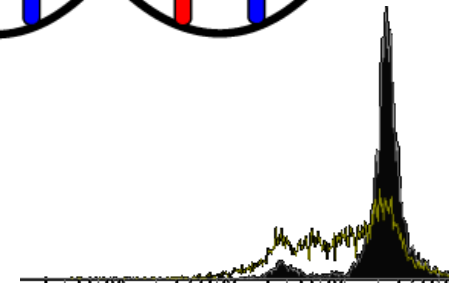
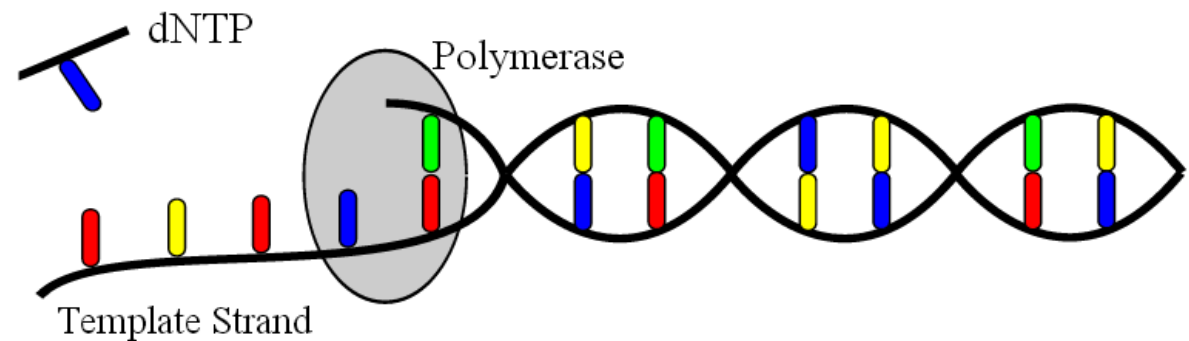
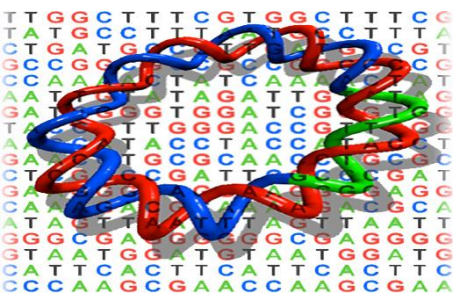
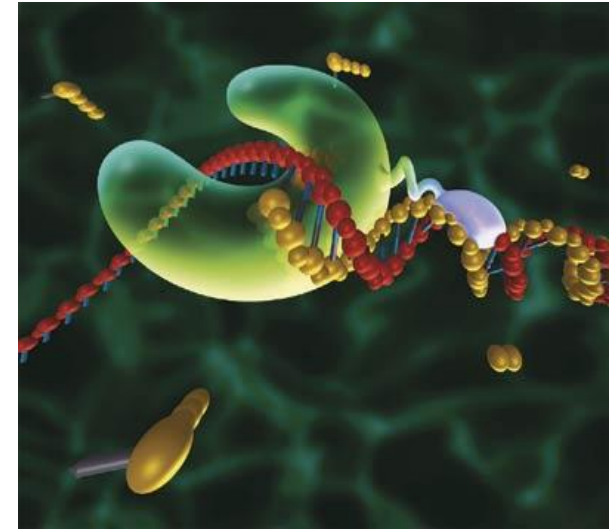
Cada ciclo consta de:

- ✓ Desnaturalización
- ✓ Alineación
- ✓ Extensión

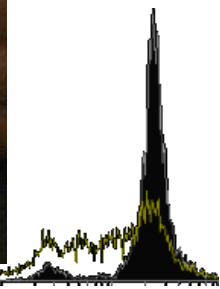
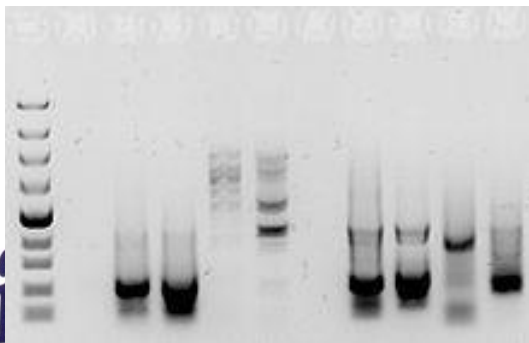


¿Qué necesitamos en una PCR?

- ✓ Primers o cebadores
- ✓ Tampón
- ✓ Taq polimerasa
- ✓ dNTP
- ✓ Molde (DNA o RNA)

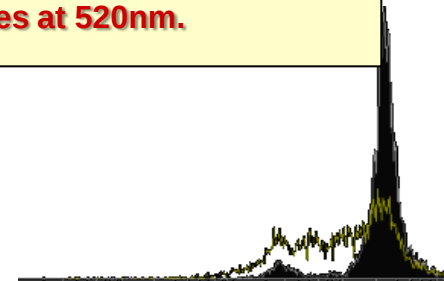
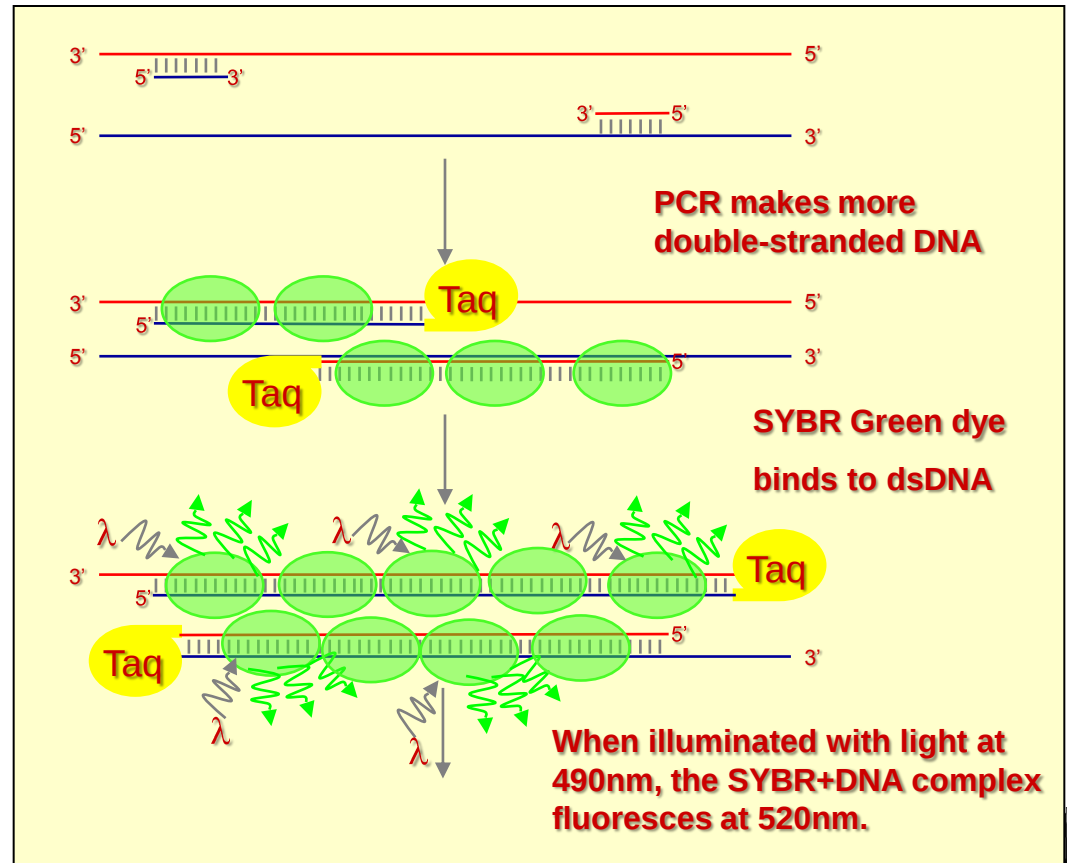


Procedimiento



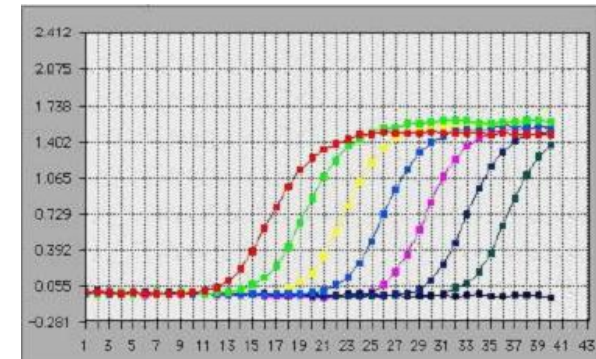
PCR en tiempo Real

- ❖ Permite visualizar “en tiempo real” el progreso de la reacción
- ❖ Se puede medir en poco tiempo la cantidad de DNA o RNA presente en una muestra



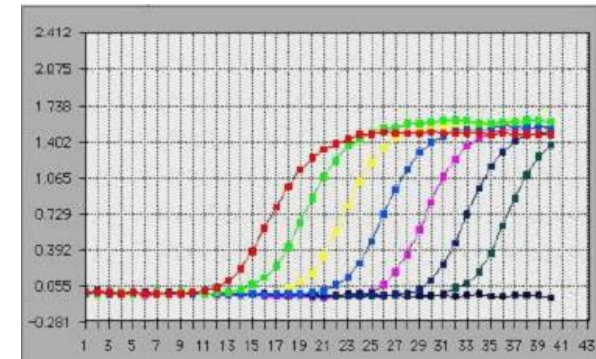
PCR en tiempo Real. Ventajas

- ❖ 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)

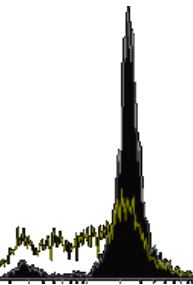
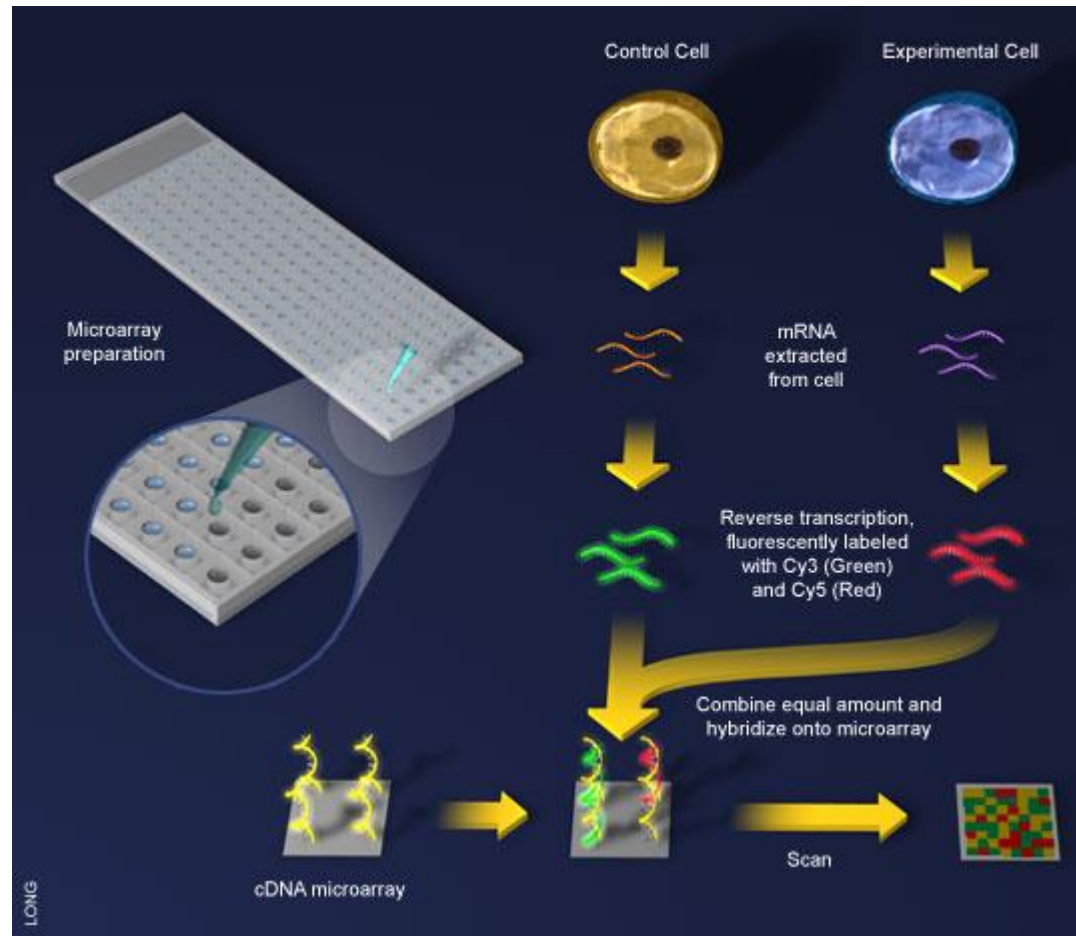


PCR en tiempo Real. Utilidad

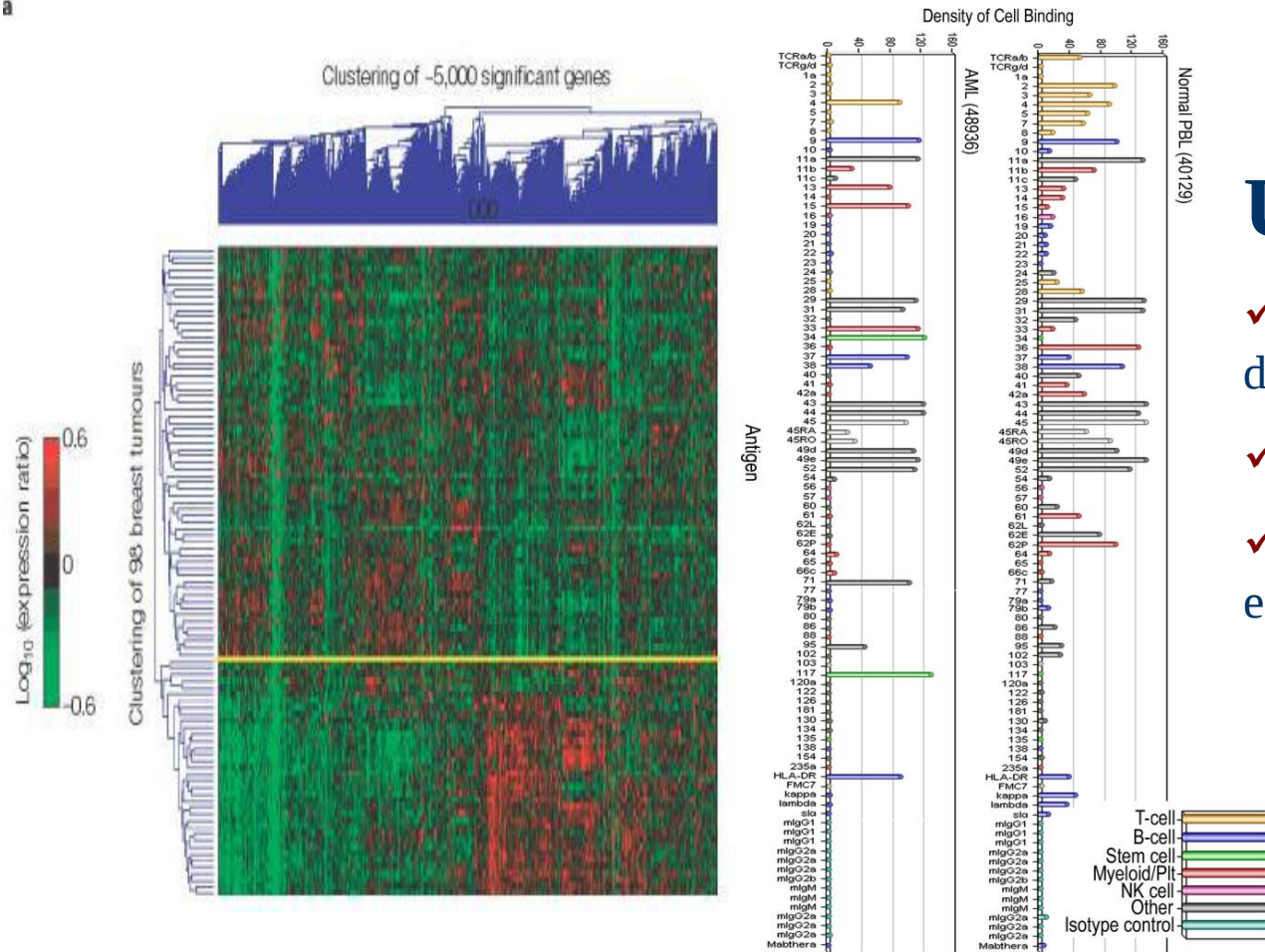
- ❖ Diagnóstico y manejo de enfermedades infecciosas
 - ❖ Cuantificación de cargas
 - ❖ Monitoreo de resistencia a tto.
- ❖ Análisis de la expresión de genes
 - ❖ Cáncer
 - ❖ Diseño de drogas



Microarray



a



Utilidad:

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



Pregunta

Un joven de 24 años se expone a una situación de riesgo de infección por VIH:

- ❖ A) Ud como médico ¿qué le recomendaría al paciente?
- ❖ B) Por otra parte, el individuo decide ir a la semana a un laboratorio ha hacerse una prueba de ELISA para evaluarse su estatus serológico, en el laboratorio le informan que ellos realizarán un ELISA de 4ta generación, dicha prueba resulta positiva. Así mismo, acude a un segundo laboratorio donde le realizan un ELISA de segunda generación, que arroja un resultado negativo. Explique cual es la diferencia entre ambos tipos de ELISA y el porque de la disparidad de los resultados.
- ❖ C) En vista de los resultados obtenidos se le realiza una carga viral de VIH, la cual da un resultado de 500.000 copias/ml. Explique en que consiste la cuantificación de carga viral por PCR real time, que sistemas de detección fluorescente se pueden emplear para llevar a cabo dicha cuantificación.
- ❖ D) Luego de todas estas pruebas, explique cuál es el estado serológico de dicho paciente
- ❖ ¿Qué estudios adicionales le recomendaría ud. a dicho joven?

