

MICROBIOLOGÍA GENERAL

***Inmunología y técnicas
inmunológicas
(serología)***

***Guía de conceptos básicos para su
estudio***

BIBLIOGRAFÍA

Tortora G., Funke B., Case C. Introducción a la microbiología;
Zaragoza : Acribia, 1993. **3° Ed.** Código de Biblioteca: 576.8/T714/

Capítulo 15 (Defensas inespecíficas del huésped): hasta pág. 402
(mecanismo de fagocitosis ya no).

Capítulo 16 (Defensas específicas del huésped): pág. 415 hasta pág. 426
(anticuerpos monoclonales).

Capítulo 17 (Aplicaciones de la inmunología) : hasta pág. 449 (técnica
ELISA inclusive).

9° Ed. Bs. As. Ed. Médica Panamericana, 2007

Capítulo 16 Inmunidad innata: defensas inespecíficas del huésped: hasta
pág. 482 (fagocitosis ya no).

Capítulo 17 Inmunidad adquirida: defensas específicas del huésped: hasta
pág. 511 (linfocitos T e inmunidad celular).

Capítulo 18 Aplicaciones prácticas de la inmunología: completo. Error en
figura 18.14.b (elisa indirecto paso 1).

Ver edición 12 – 2017.

Madigan M., Martinko J., Parker J. Brock, Biología de los
microorganismos, desde 8ª ed. Código Biblioteca: 579 MAD BRO 8A
1998. **Cap. 20 y 21 – 12° Ed.:** Unidad 7: cap. 29 a **32**

TEMARIO

- Inmunología - Tipos de inmunidad
- Antígenos y Anticuerpos
- Aplicaciones prácticas de la inmunología:
 - Vacunas
 - Técnicas inmunodiagnósticas: reacciones de precipitación, aglutinación, ELISA, inmunofluorescencia.

Mecanismos de patogenicidad ...

a evitar a través del sistema inmune ...



Virus de la gripe H1N1

MEB 60 nm



Inmunología

Rama de la Biología, que estudia los mecanismos de defensa de los organismos superiores, frente a microorganismos patógenos y a estructuras moleculares que no son reconocidas como propias.

- **Sistema inmunitario:** Células y moléculas responsables de la inmunidad

RESPUESTA COORDINADA Y GLOBAL A LA INTRODUCCIÓN DE SUSTANCIAS EXTRAÑAS



RESPUESTA INMUNE

Respuesta desencadenada por la presencia en el organismo de agentes extraños o antígenos encaminada a neutralizarlos o destruirlos

- Distingue lo PROPIO de lo AJENO (normalmente).
- Conjunto de procesos muy complejos en los que participan varios tipos de células y sustancias, y las relaciones entre ellos.
- Se desencadena por:
 - Invasión microorganismos patógenos,
 - introducción de sustancias extrañas al organismo (heterólogo)
 - introducción de sustancias extrañas ligadas a células de tipo homólogo (injertos, trasplantes)
 - sustancias propias reconocidas como extrañas (enfermedad autoinmunes)

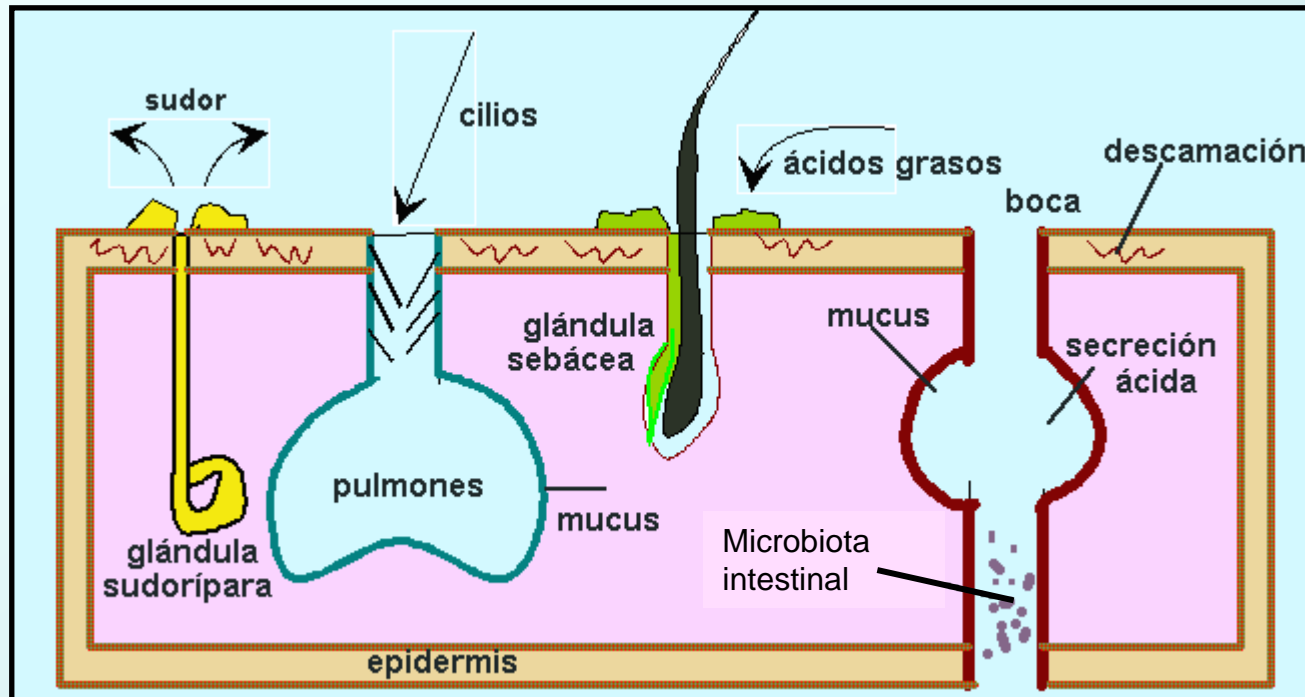
Inmunología

Rama de la Biología, que estudia los mecanismos de defensa de los organismos superiores, frente a microorganismos patógenos y a estructuras moleculares que no son reconocidas como propias.

Inmunidad innata (<u>defensa inespecífica</u>)		Inmunidad adquirida (<u>defensa específica</u>) 3° línea de defensa (linfocitos T y B - <u>anticuerpos</u>)
1° Línea de defensa	2° Línea de defensa	
Piel Mucosas Microbiota normal	Leucocitos <i>fagocíticos</i> Inflamación Fiebre Sustancias antimicrobianas	

Mecanismos de defensas inespecíficos

1º barrera



2º barrera


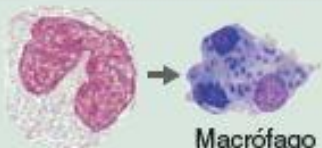






Sangre: Plasma - Elementos corpusculares

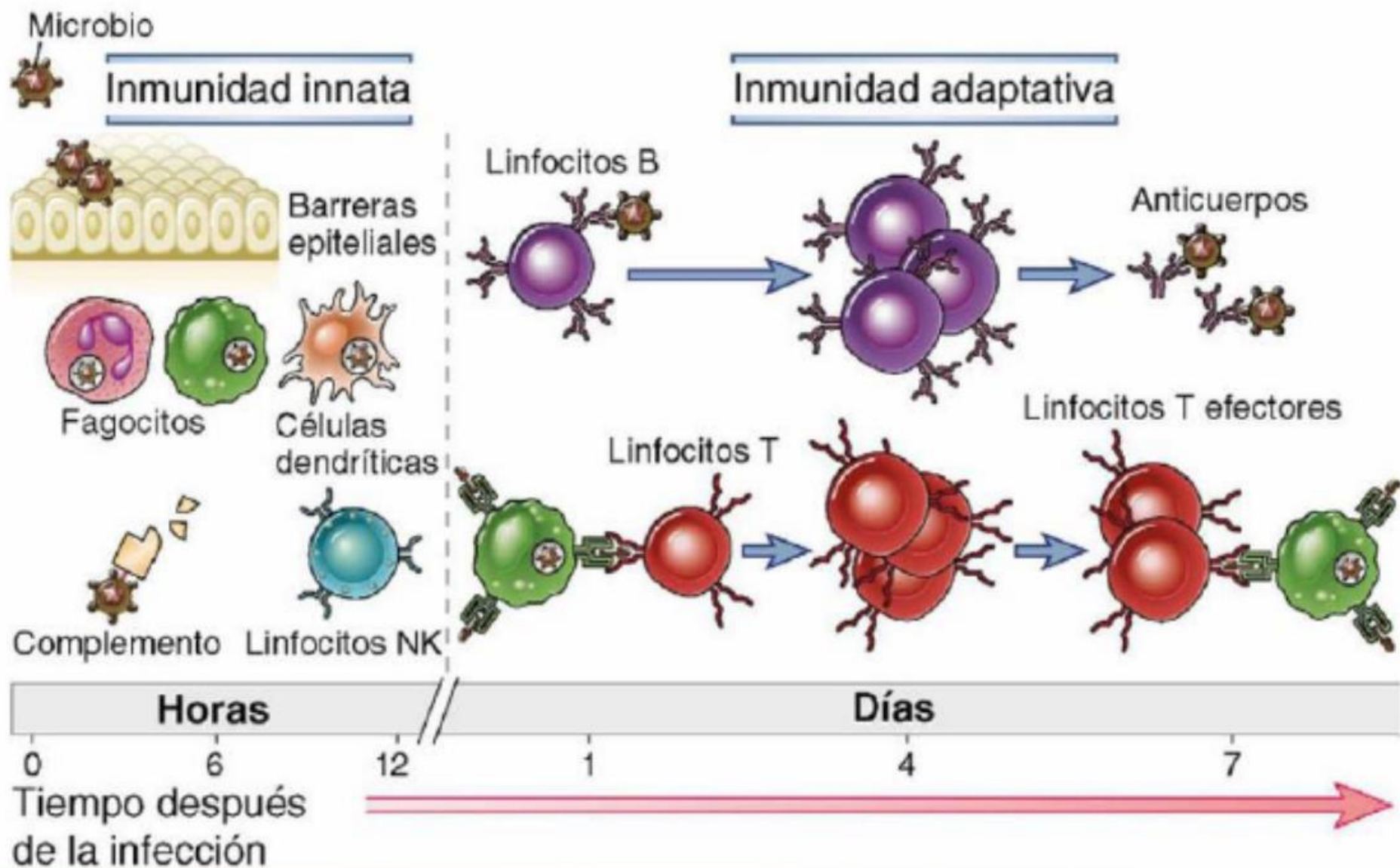
Plaquetas - glóbulos rojos – **glóbulos blancos (leucocitos)**

GRANULOCITOS: neutrófilos-basófilos-eosinófilos

AGRANULOCITOS: monocitos – células dendríticas - linfocitos

CUADRO 16.1 Leucocitos (glóbulos blancos)

Granulocitos	Agranulocitos	
<p>Neutrófilos (PMN) (60-70% de los leucocitos)</p> <p>Función: fagocitosis</p>	 <p>MO 5 μm</p>	<p>Monocitos (3-8% del total)</p> <p>Función: fagocitosis (cuando maduran a macrófagos)</p>  <p>MO 7 μm MO 10 μm</p> <p>Macrófago</p>
<p>Basófilos (0,5-1%)</p> <p>Función: producción de histamina</p>	 <p>MO 5 μm</p>	<p>Células dendríticas</p> <p>Funciones: fagocitosis e iniciación de respuestas inmunitarias adaptativas</p>  <p>MO</p>
<p>Eosinófilos (2-4%)</p> <p>Funciones: producción de proteínas tóxicas contra ciertos parásitos; algunos, fagocitosis</p>	 <p>MO 5 μm</p>	<p>Linfocitos (20-25%)</p> <ul style="list-style-type: none">• Células <i>natural killer</i> (NK) Función: destruir células diana por citólisis y apoptosis• Células T Función: inmunidad mediada por células• Células B Función: producir anticuerpos  <p>MO 9 μm</p>  <p>MO 9 μm</p>  <p>MO 9 μm</p>



Inmunología

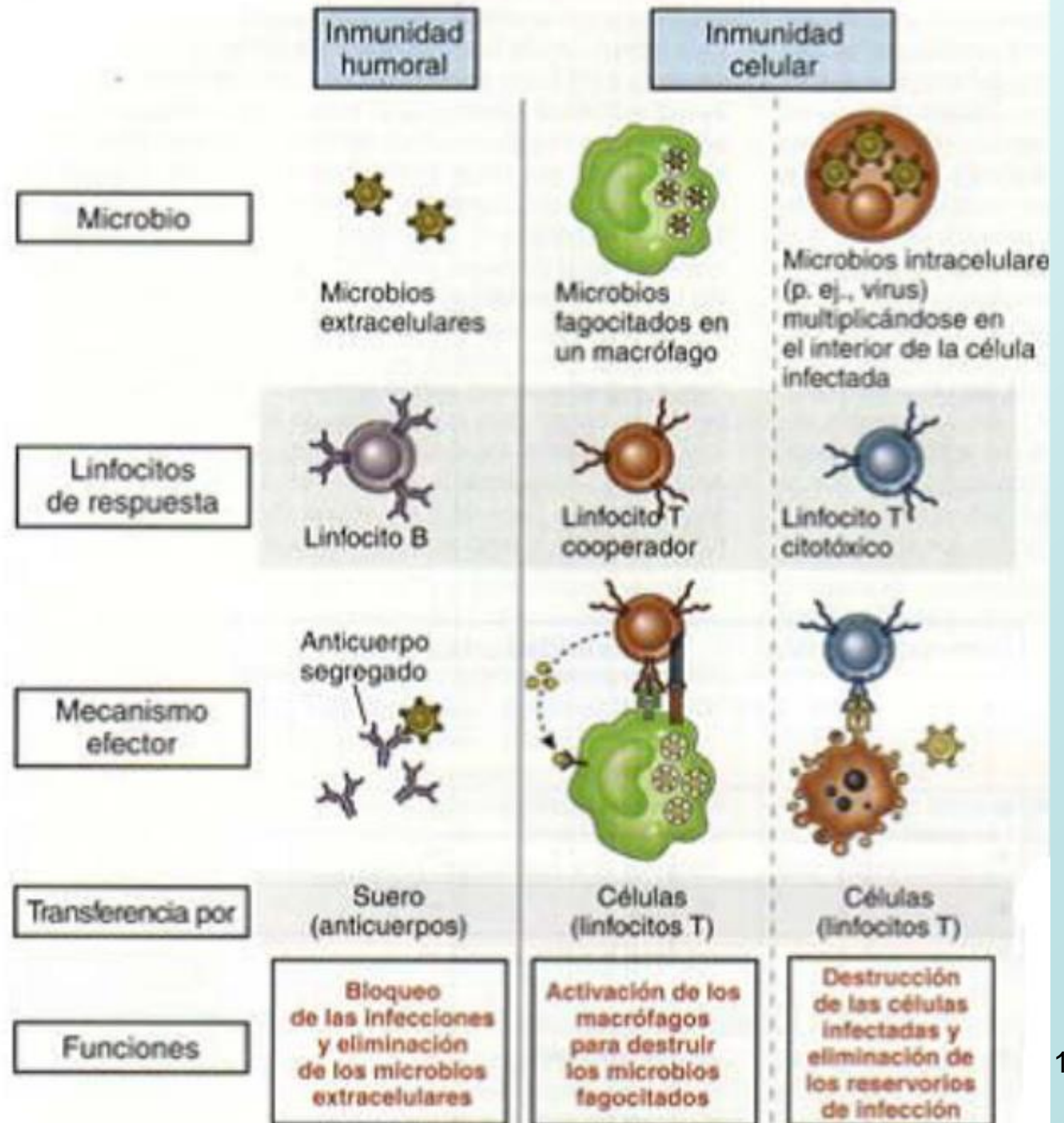
Rama de la Biología, que estudia los mecanismos de defensa de los organismos superiores, frente a microorganismos patógenos y a estructuras moleculares que no son reconocidas como propias.

Inmunidad innata (<u>defensa inespecífica</u>)		Inmunidad adquirida (<u>defensa específica</u>) 3° línea de defensa (linfocitos T y B - <u>anticuerpos</u>)			
1° Línea de defensa	2° Línea de defensa	ACTIVA El individuo genera linfocitos especializados y anticuerpos (Ac)		PASIVA Los Ac se generan en otro organismo	
Piel Mucosas Microbiota normal	Leucocitos <i>fagocíticos</i> Inflamación Fiebre Sustancias antimicrobianas	Natural	Artificial	Natural	Artificial
		Soportar con éxito una infección	Inducida mediante vacunas (moo o toxinas inactivados)	Ac de madre a hijo (placenta – calostro)	Ac se obtienen a partir del suero de persona o animal inmunizado

Inmunidad adquirida (específica, adaptativa)

Humoral

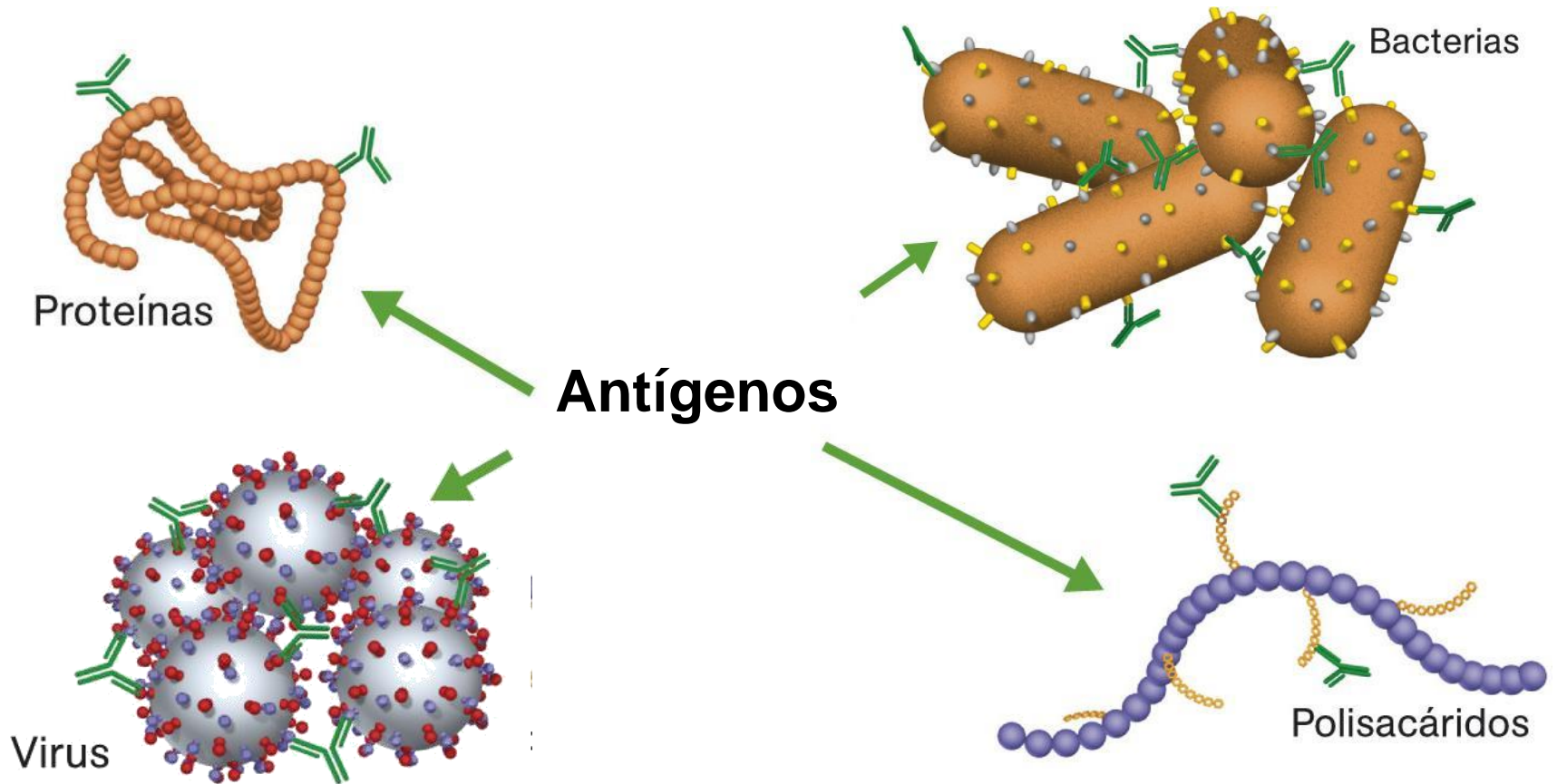
Celular



Antígeno

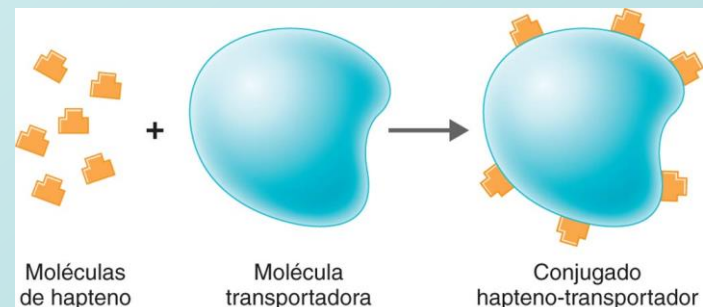
Toda sustancia ajena al organismo capaz de desencadenar la respuesta inmune de generación de anticuerpos

La región inmunológicamente activa de un antígeno (por donde se une al Ac) se denomina **determinante antigénico** o **epítipo**.



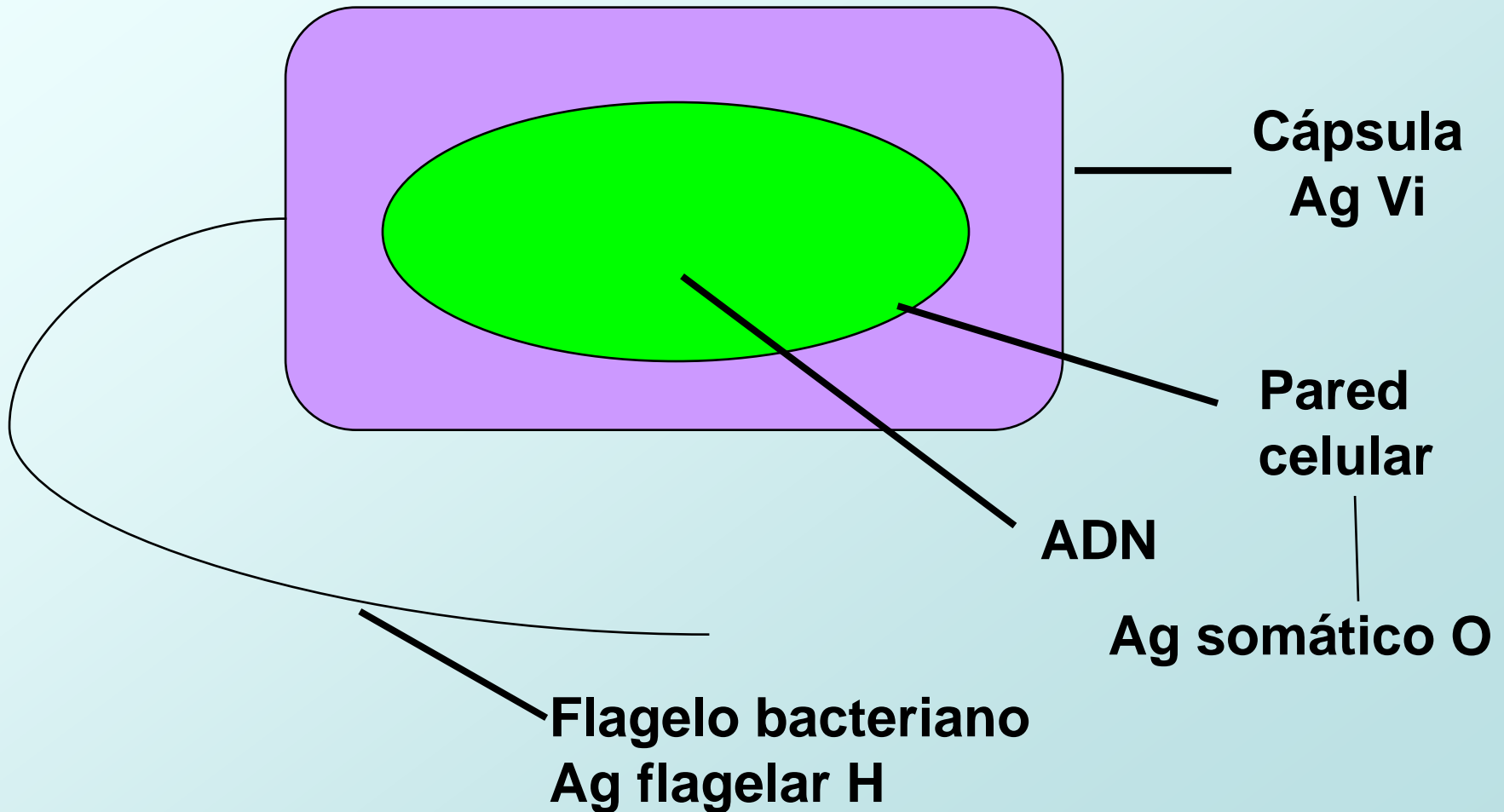
CONCEPTO Y NATURALEZA DE LOS ANTÍGENOS

- **Antígeno**= cualquier sustancia que es reconocida como extraña y que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria.
- **Macromoléculas**
 - **Naturaleza** $\begin{cases} \text{Proteica (unidos a glúcidos o lípidos)} \\ \text{Polisacáridos complejos} \end{cases}$
 - **Estado** $\begin{cases} \text{Libres} \\ \text{Forman parte de} \\ \text{estructuras biológicas} \end{cases}$
 - Membrana plasmática
 - Glicocalix
 - Flagelos (flagelina) – fimbrias (pilina)
 - Pared y cápsula bacteriana
 - Cápsida y envuelta viral
- **Haptenos**= sustancias de bajo PM no inmunogénicas, que pero unidas a ciertas proteínas portadoras, activan a las células productoras de Ac. Ej.: Penicilina



LOCALIZACIÓN DE ANTÍGENOS DE *Salmonella* spp.

Esquema de Kaufmann-White



Estructura de anticuerpos

Proteínas globulares: Inmunoglobulinas (Ig)

Región variable

Sitio de unión al antígeno (**parátopo**), se puede unir al menos a dos moléculas de un mismo antígeno.

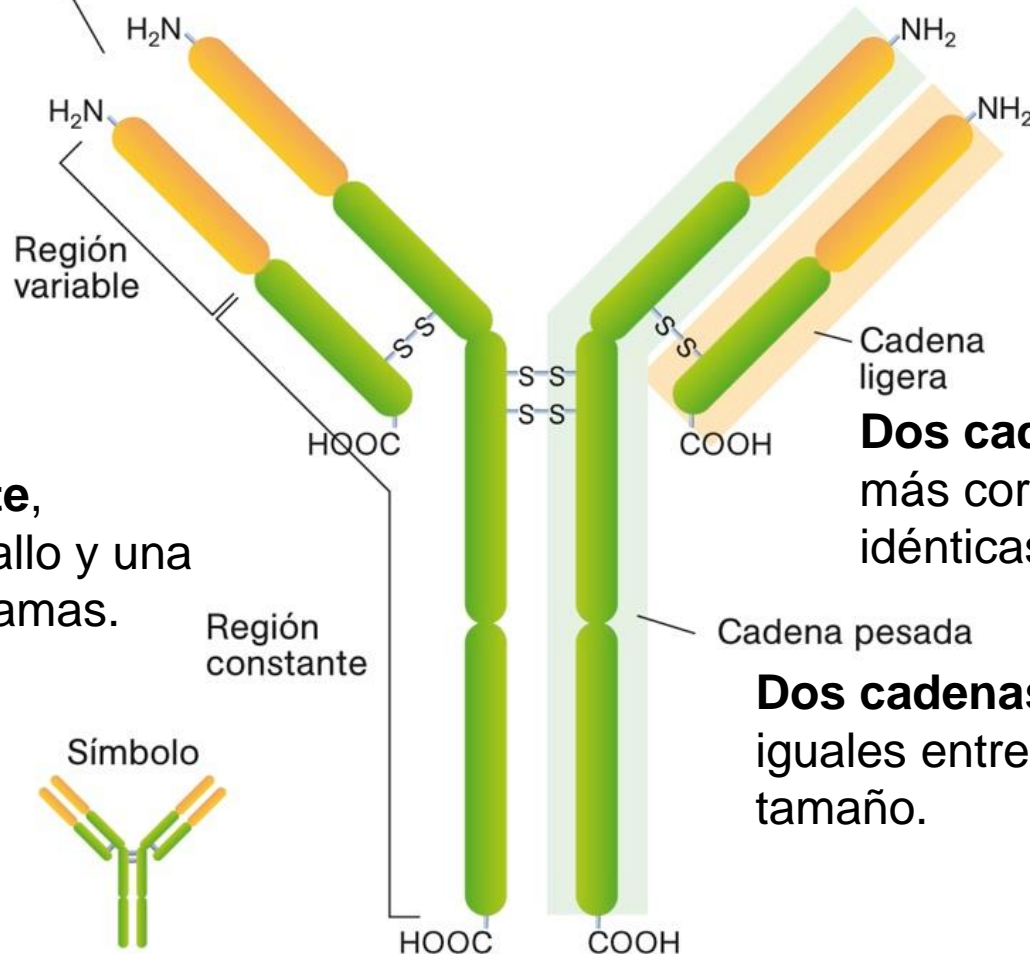
Paratopo

Región variable

Región constante, integrada por el tallo y una parte de ambas ramas.

Región constante

Símbolo



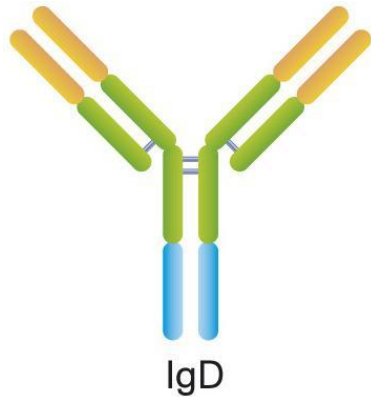
Dos cadenas L (ligeras)
más cortas y también idénticas entre sí.

Cadena pesada

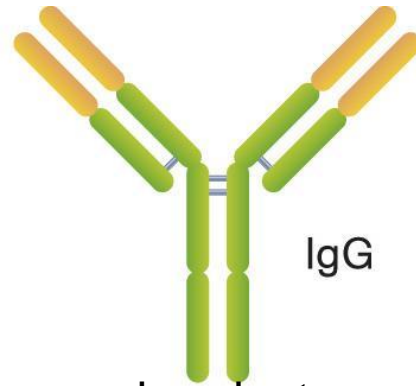
Dos cadenas H (pesadas)
iguales entre sí, y de gran tamaño.

Tipos de Inmunoglobulinas

En mamíferos, 5 tipos (según cadenas H): **G-D-E-A-M**

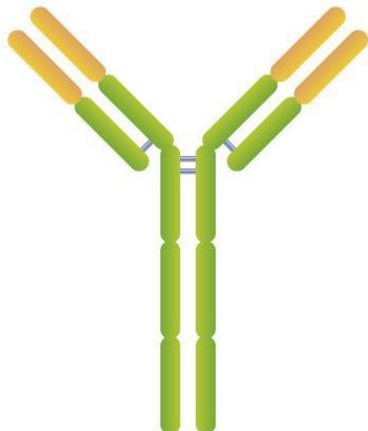


IgD



IgG

- + abundantes
- 1° defensas del recién nacido.



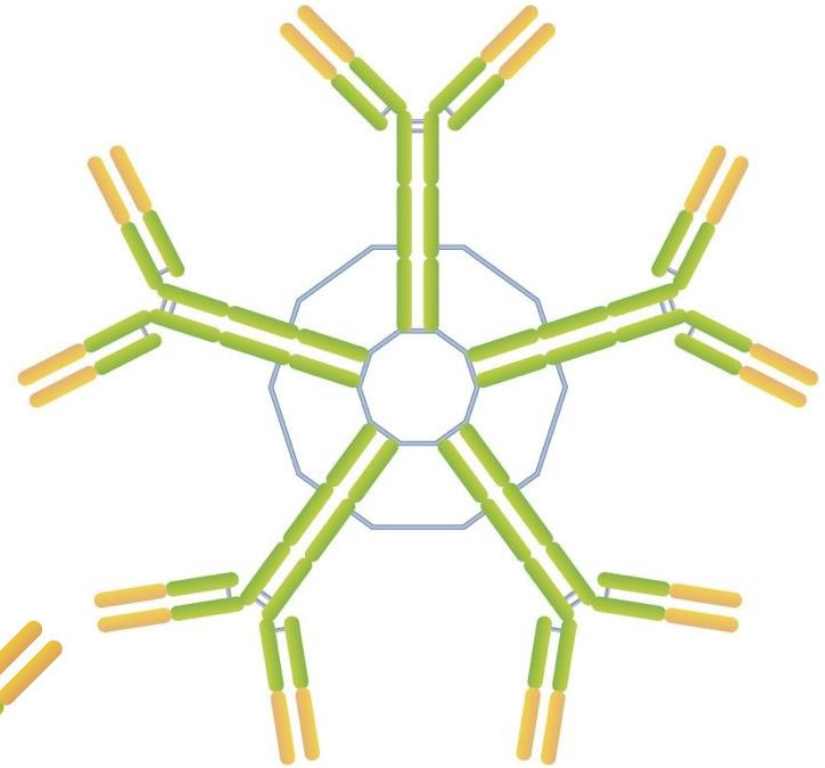
IgE

Alergias



IgA

Secreciones
(Calostro)
Mucosas

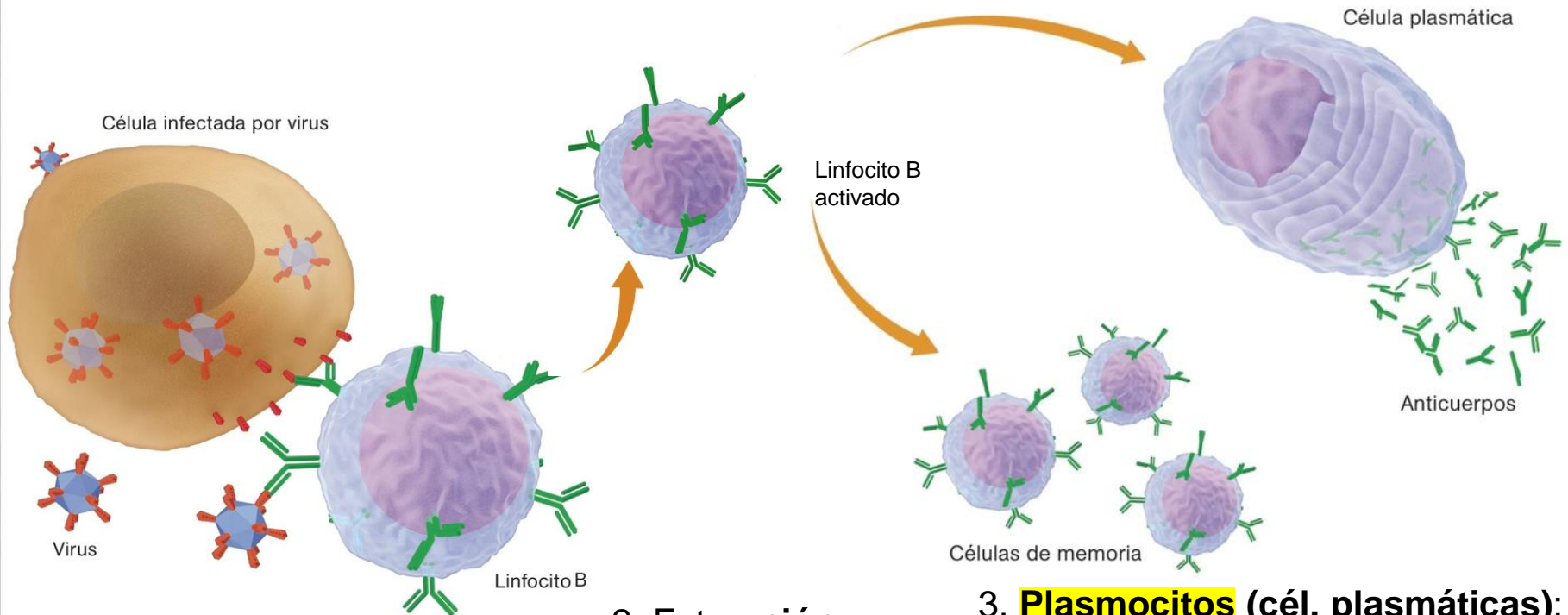


IgM

Son las primeras
que se forman
como respuesta a
un antígeno.

Linfocitos B y generación de anticuerpos

Adaptado de Bueno R., s.f.



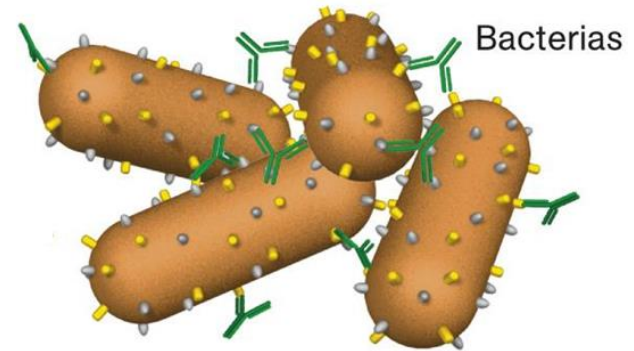
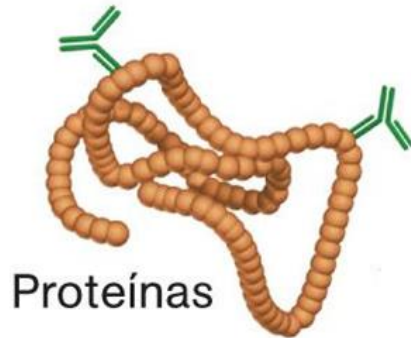
1. Cuando un **antígeno** penetra en el organismo, acaba por encontrar al **linfocito** que muestra en su superficie el **anticuerpo** con el que se puede acoplar.

2. Esta **unión estimula y activa al linfocito**, que **prolifera rápidamente generando dos estirpes celulares**.

3. **Plasmocitos** (cél. plasmáticas): en ganglios linfáticos; producen los anticuerpos que salen de los ganglios. **Células de memoria**: en la sangre y fabrican pequeñas cantidades de anticuerpos durante mucho tiempo después de superada la infección.

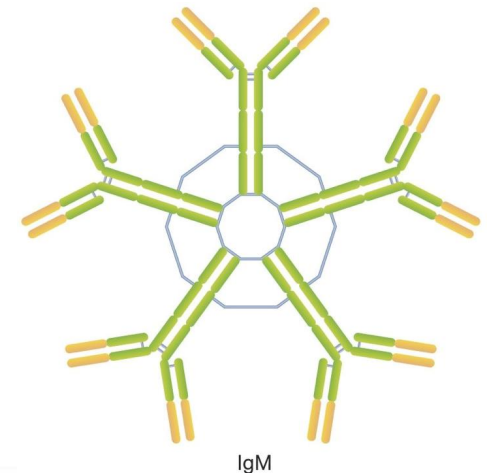
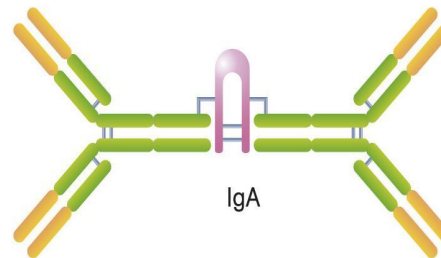
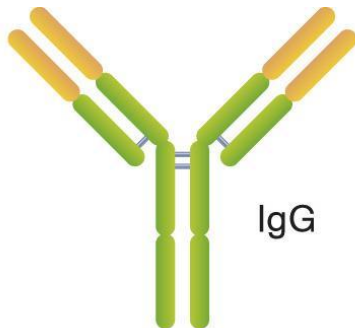
Antígeno

Toda sustancia ajena al organismo capaz de desencadenar la respuesta inmune de generación de anticuerpos



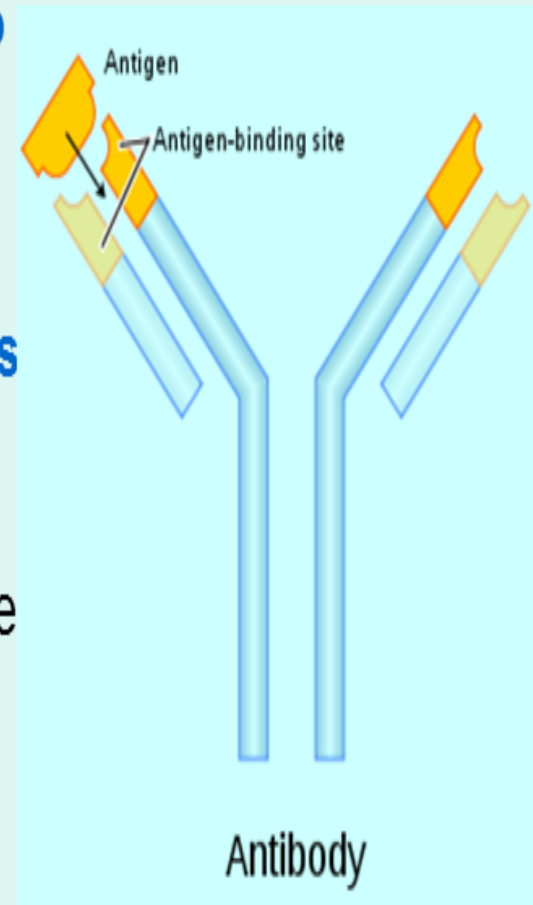
Anticuerpos

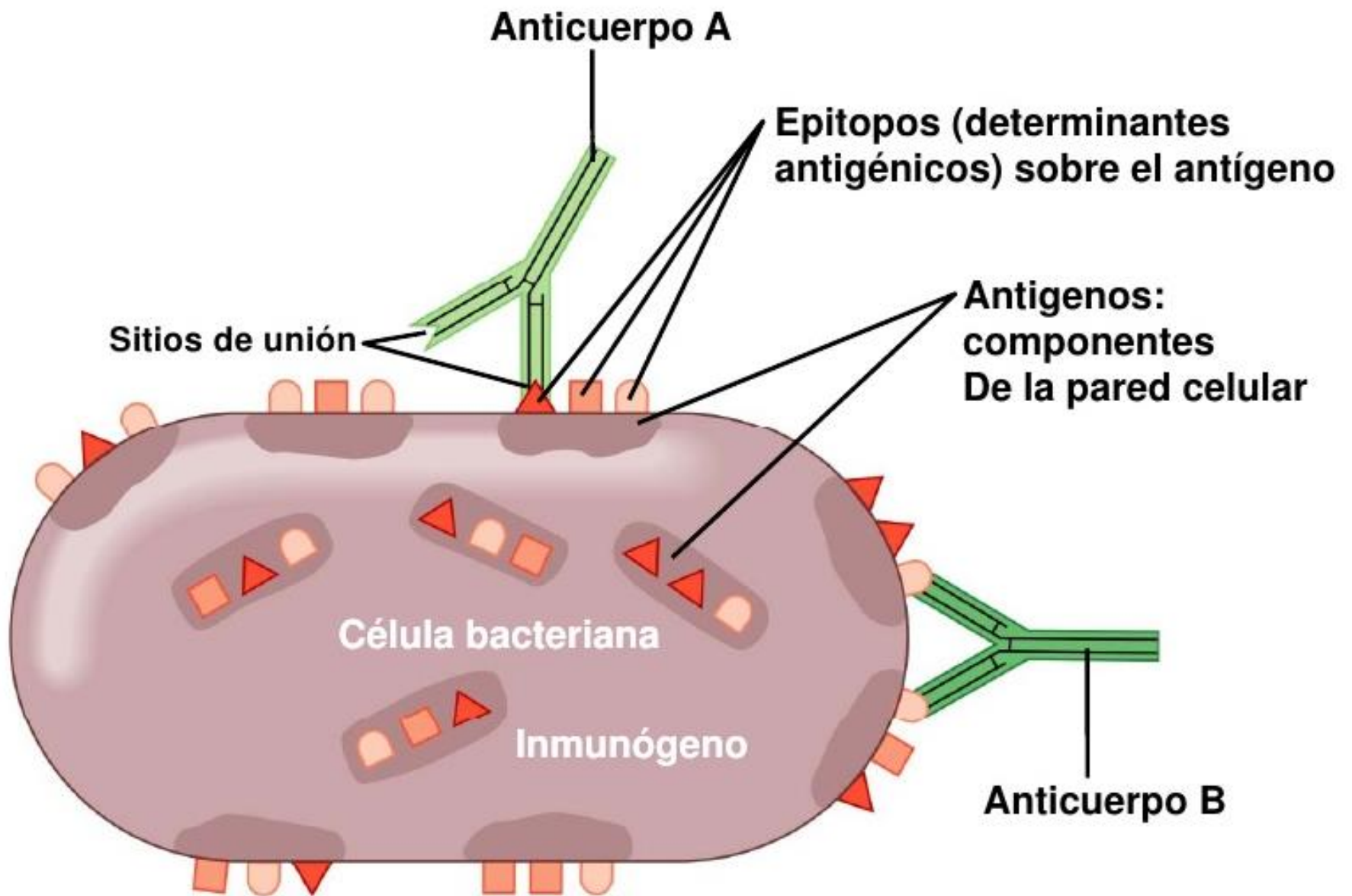
Proteínas globulares producidas por linfocitos B que reconocen en forma específica epítopos (determinantes antigénicos) localizados en antígenos.



Reacciones Antígeno-Anticuerpo

- Los anticuerpos, al reconocer a los antígenos, se unen a ellos mediante **enlaces de Van der Waals, fuerzas hidrofóbicas o iónicas**, en una reacción denominada antígeno-anticuerpo.
- La unión se lleva a cabo entre las **porciones variables** de las cadenas H y L del anticuerpo y los **determinantes antigénicos** del antígeno
- Es extraordinariamente **específica**: el anticuerpo sólo reconoce los determinantes antigénicos que son complementarios
- No se establece ningún enlace covalente entre antígeno anticuerpo, por lo que la reacción es **reversible**





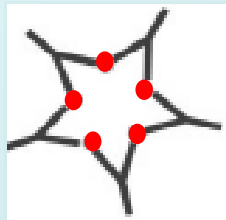
Reacciones Antígeno-Anticuerpo

Útiles por su aplicación práctica
Vacunación - Diagnóstico

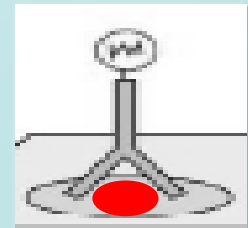
Anticuerpos en suero sanguíneo
Antisero
Serología

Detección de antígenos (bacteria) en muestras
Detección de anticuerpos en suero sanguíneo

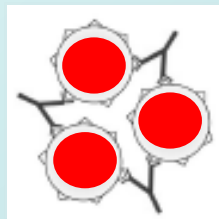
Precipitación



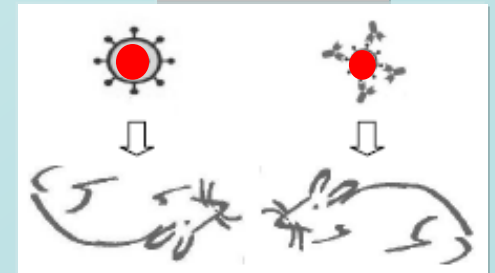
Inmunomarcación



Aglutinación

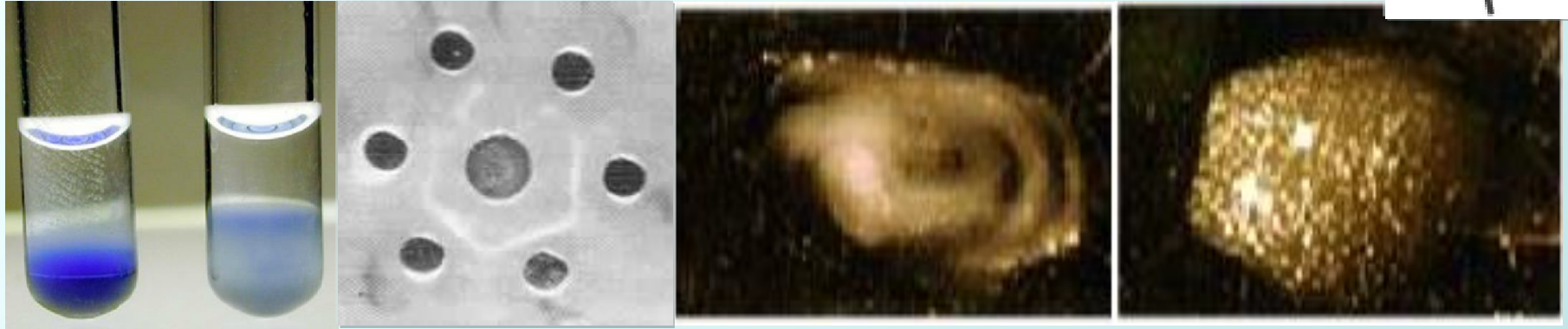
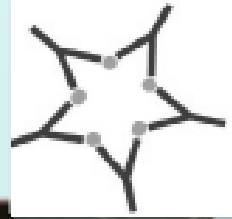


Neutralización

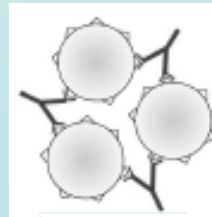


Reacciones Antígeno-Anticuerpo

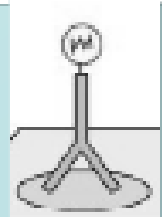
- **Precipitación.** Cuando se unen antígenos solubles con varios determinantes anticuerpos solubles forman un precipitado insoluble.



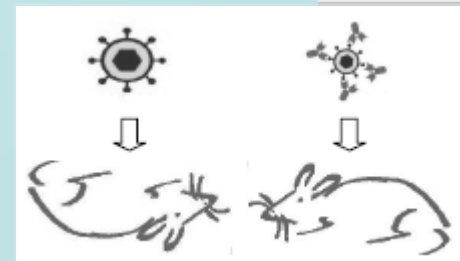
- **Agglutinación (directa o indirecta).** Los anticuerpos se unen a antígenos presentes en la superficie de ciertas células (microorganismos, «**antígenos particulados**»). Se forman así aglomerados de células. Antígenos «**aglutinógenos**» y anticuerpos «**aglutininas**».

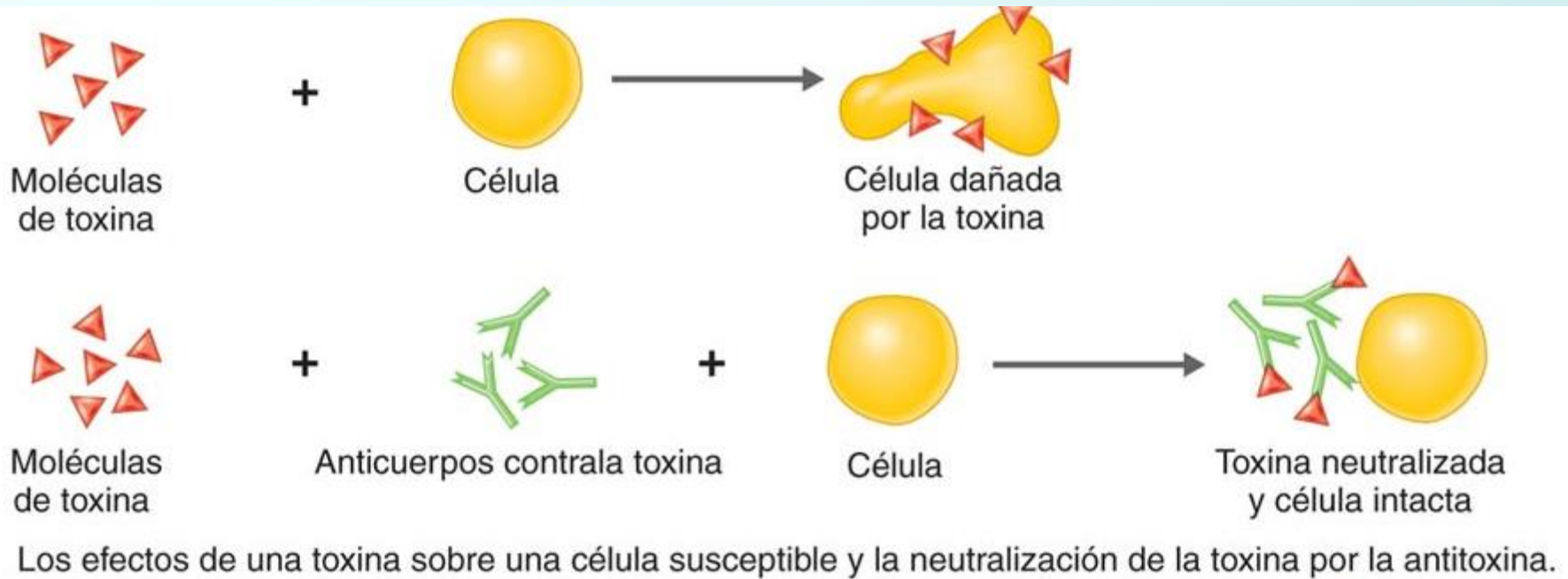


- **Inmunomarcación.** Se une los anticuerpos a determinadas moléculas (enzimas, fluoróforos, isótopos radioactivos, etc.), que permiten evidenciar la presencia del anticuerpo sobre un antígeno.



- **Neutralización.** La unión del anticuerpo al antígeno provoca que éste no pueda realizar alguna función o actividad vital (se bloquea la acción).





Caso SARS-CoV2

Bloqueo de sitio de proteína S (envuelta del virus) que se une al receptor celular ACE2

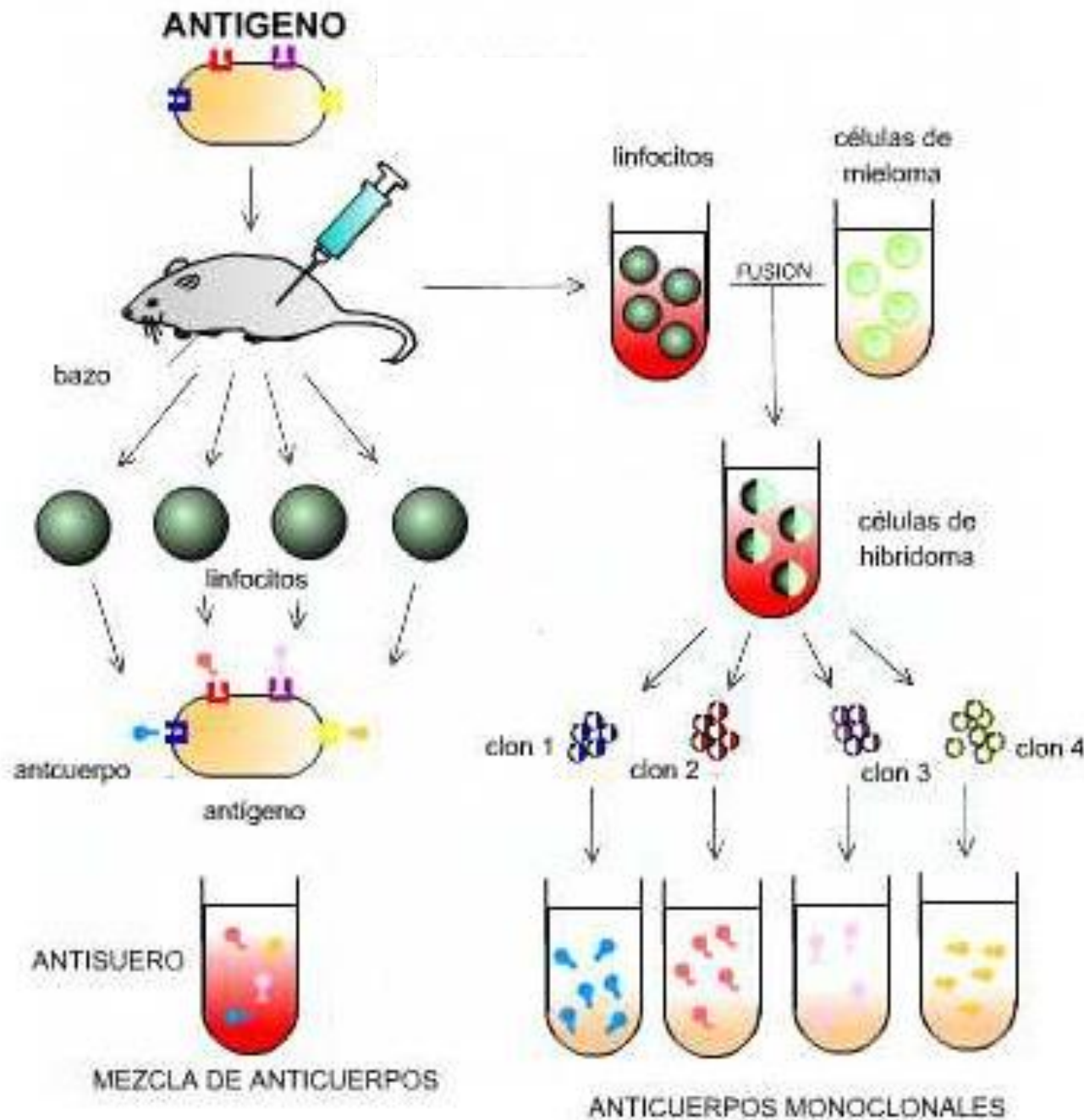
El virus no se puede unir a la célula, por lo tanto es neutralizado

Anticuerpos monoclonales

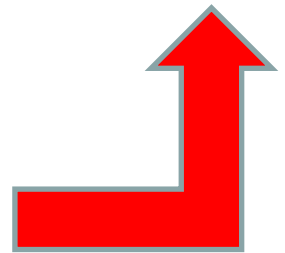
Son anticuerpos producidos en el laboratorio por cultivo de un clon celular que produce un anticuerpo específico.

Obtención

- 1. Inmunización de animales contra el antígeno para el que se desea producir anticuerpos. —→ Linfocitos B específicos**
- 2. Aislamiento y fusión de los linfocitos con células de mieloma formando hibridomas**
- 3. Selección de aquellos hibridomas que sean productores de las inmunoglobulinas específicas deseadas**
- 4. Clonación**



Células productoras de Ac que se mantienen por cultivo celular y producen gran cantidad de Ac puro



Obtención de Anticuerpos Monoclonales

<https://www.youtube.com/watch?v=FOXQFpG4GoQ>

Técnicas inmunodiagnósticas basadas en inmunomarcación

ENZIMAS

ELISA

Directa (detección de antígeno)

Indirecta (detección de anticuerpo)

<http://www.ehu.eus/immunologia/elisa.php>

FLUORÓFOROS

INMUNOFLUORESCENCIA

Directa (detección de antígeno)

Indirecta (detección de anticuerpo)

TEST ELISA

(“Enzyme linked immunoabsorbent assay”) Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

Inmunomarcación enzimática

Barato, preciso, rápido.

CUALITATIVO - CUANTITATIVO

Utiliza placas polipropileno (se adhieren firmemente las proteínas).

Directa e indirecta

Directa (sandwich) para detectar antígenos

1) Se coloca antisuero con **anticuerpos** primero **en los pocillos**

2) Se agrega los **antígenos** (bacterias que se aislaron, por ejemplo)

Si la bacteria se reconoce con anticuerpo (a través de los determinantes), se fijará al anticuerpo

3) Lavado con buffer para eliminar el exceso de antígeno que no se ha fijado

4) Se agrega otro **anticuerpo específico para el microorganismo ligado a una enzima** (peroxidasa, beta galactosidasa, fosfatasa alcalina)

5) Lavado que elimina el exceso de anticuerpos ligados a enzimas que no fueron fijados

6) **Agregado de sustrato de la enzima:** enzima actúa sobre sustrato y se produce coloración positiva. Se puede medir intensidad de color

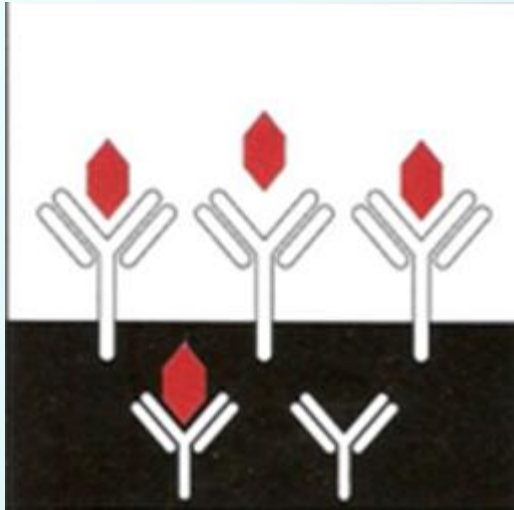
Detección de enterotoxinas de *S. aureus*

TEST ELISA

(“Enzyme linked immunoabsorbent assay”)

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

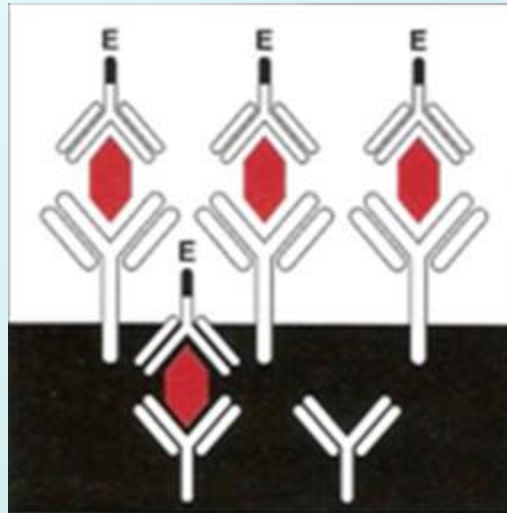
Etapla I: Adición de la muestra



-P. de microtitulación + anticuerpos específicos *S. aureus*

- **Muestra (antígeno)**

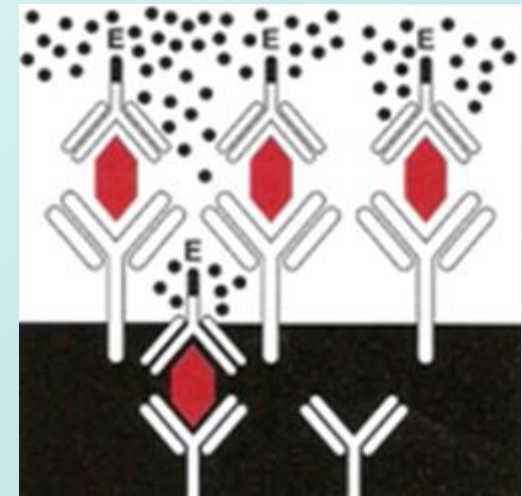
Etapla II: Formación de “sandwich”



- Anticuerpo específico *S. aureus* conjugado con enzima

- **Complejo “sandwich”**

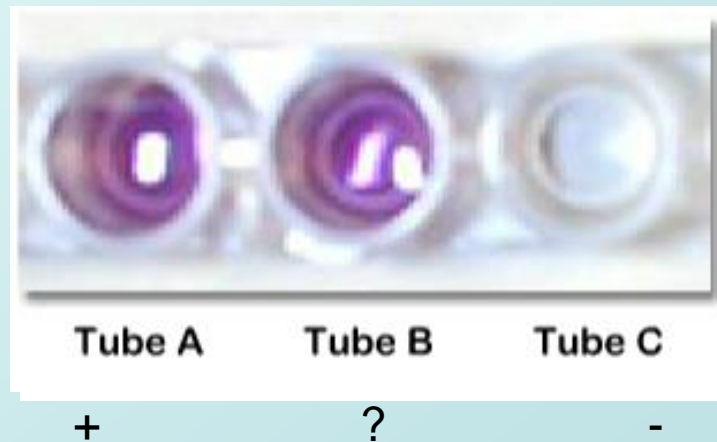
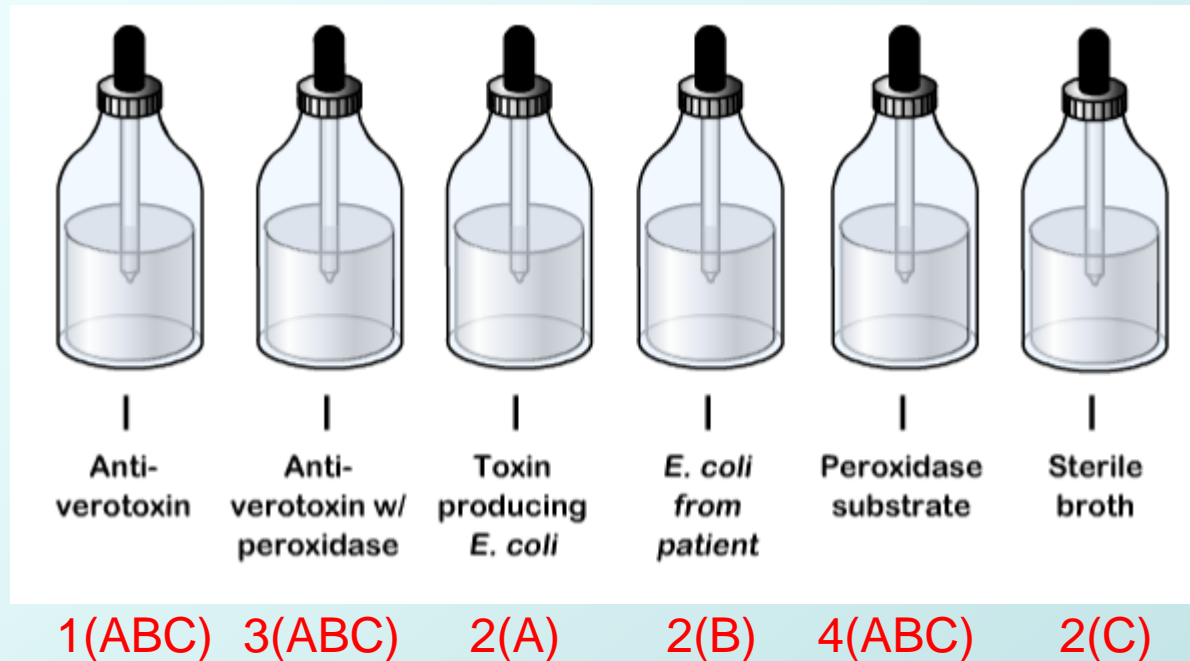
Etapla III: Visualización de punto final (color)



-Sustrato químico + complejo enzima-anticuerpo-antígeno

- **COLOR**

ELISA DIRECTO para detectar probable verotoxina de *E. coli* O157:H7

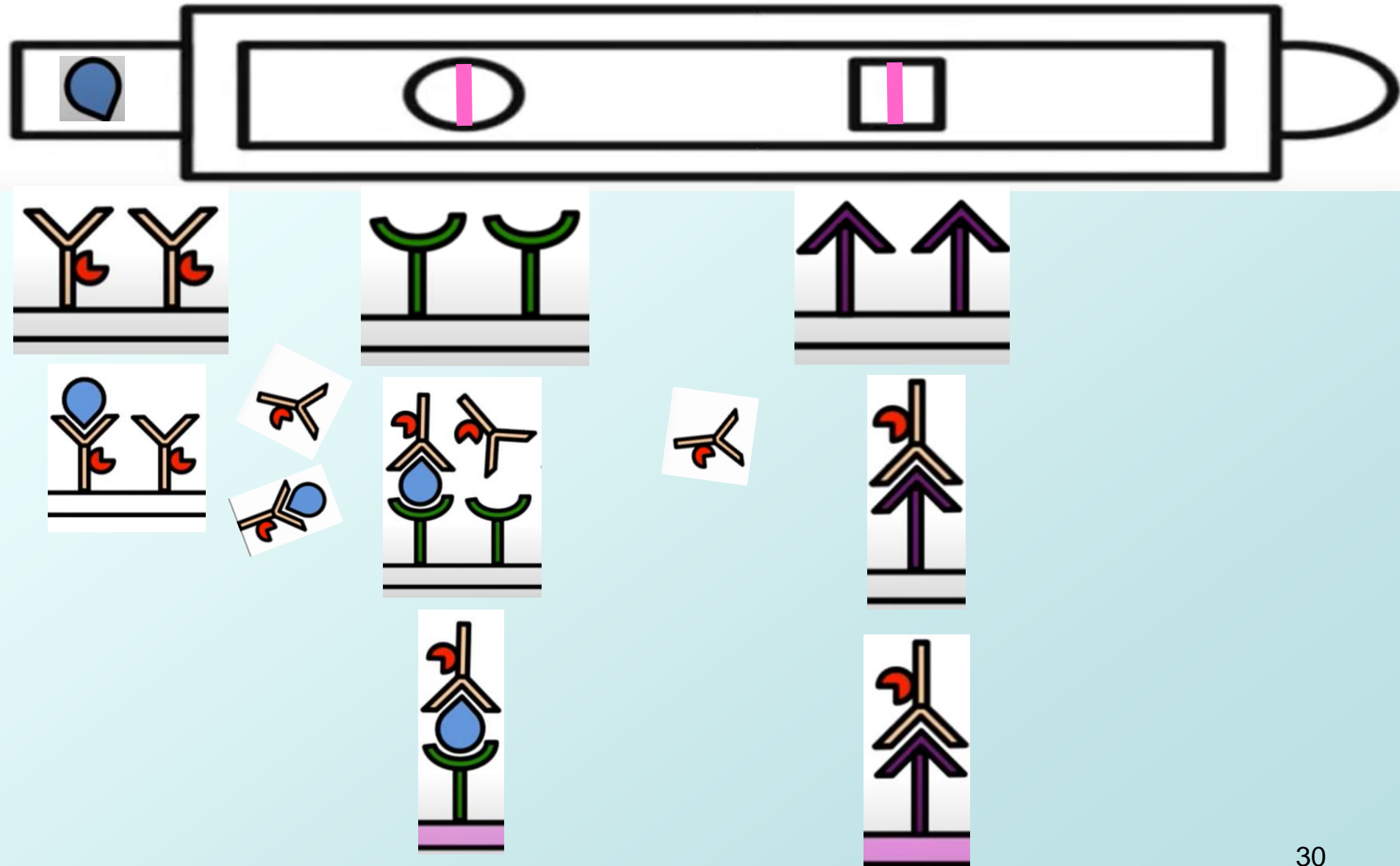


Test de embarazo: detección de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG)

orina

prueba

control

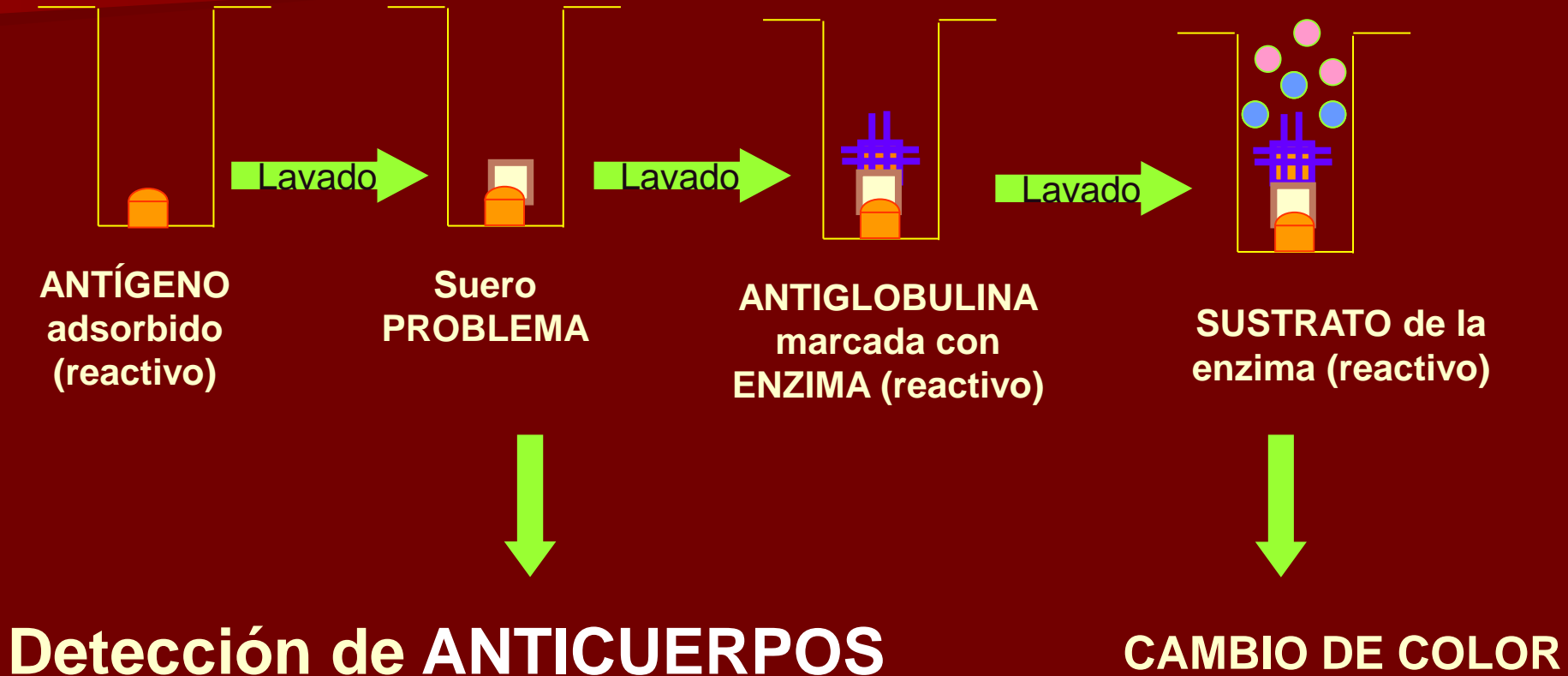


ELISA Indirecto

(para detectar HIV en pacientes: se detecta anticuerpos)

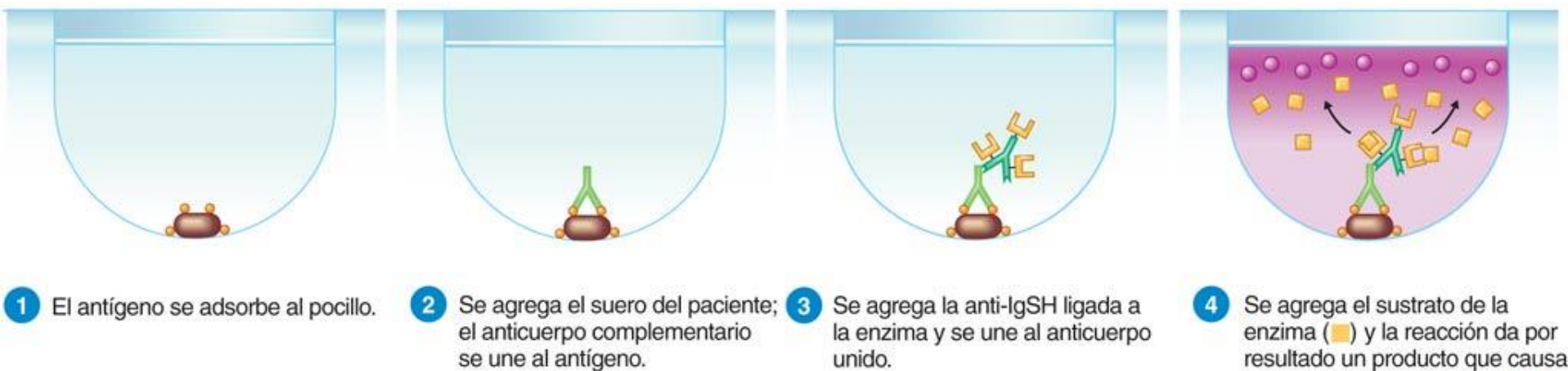
- 1) Se coloca el **antígeno pegado al pocillo** (estructuras que tiene el virus, que ha sido lisado)
- 2) Se agrega **el suero del paciente** (que puede tener anticuerpos si estuvo en contacto con HIV, que quedarán fijados al antígeno)
- 3) Lavado con buffer para eliminar el exceso de suero que no se ha fijado
- 4) **Agregar gammaglobulina anti suero humana ligada a una enzima** (peroxidasa, beta galactosidasa, fosfatasa alcalina)- reconoce al anticuerpo como antígeno.
- 5) Lavado que elimina el exceso de gamma ligados a enzimas que no fueron fijados
- 6) Agregado de **sustrato de la enzima**: enzima actúa sobre sustrato y se produce coloración positiva. Se puede medir intensidad de color

ELISA INDIRECTO





(a) Prueba positiva de ELISA **directo** para detectar antígenos.

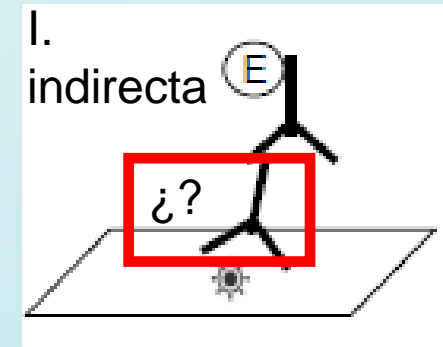
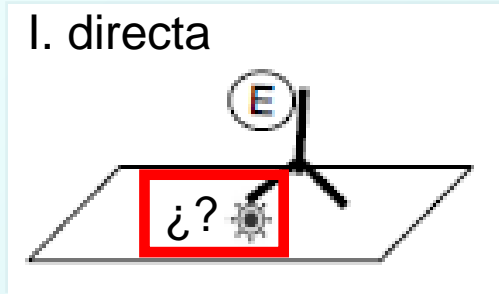


(b) Prueba positiva de ELISA **indirecta** para detectar anticuerpos.

INMUNOFLUORESCENCIA

(Inmunomarcación)

- Identificar microorganismos (Ag: **directa**) en muestras o anticuerpos específicos en suero (Ac: **indirecta**) usando colorantes fluorescentes como marcadores.



- Microscopio de luz UV. - Cualitativo

COLORANTE UTILIZADO: **ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA (FITC)**

DIRECTA

- RABIA
- *CAMPYLOBACTER*
- *LISTERIA*
- *CLOSTRIDIUM*
- *MICOBACTERIUM*

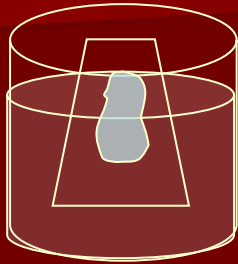
INDIRECTA

- RABIA
- Virales respiratorias
- Sífilis (*Treponema pallidum*)

INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (Detectar antígeno)

1. Microorganismo

(Ag desconocido problema)

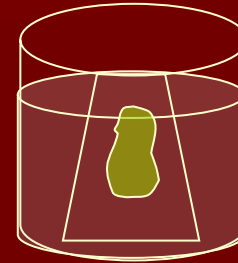


2. Fijado

3. Anticuerpo conjugado con FITC (reactivo)



Incubación



4. Lavado

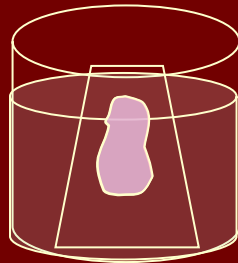
5. OBSERVACIÓN

Microscopio fondo oscuro-Luz UV



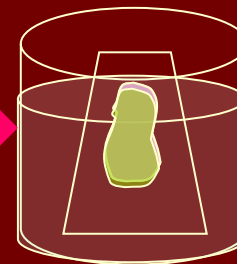
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (Detectar Anticuerpo)

2. Suero problema (anticuerpo??)



3. Lavado

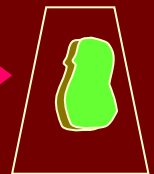
4. Antiglobulina conjugada con FITC (reactivo)



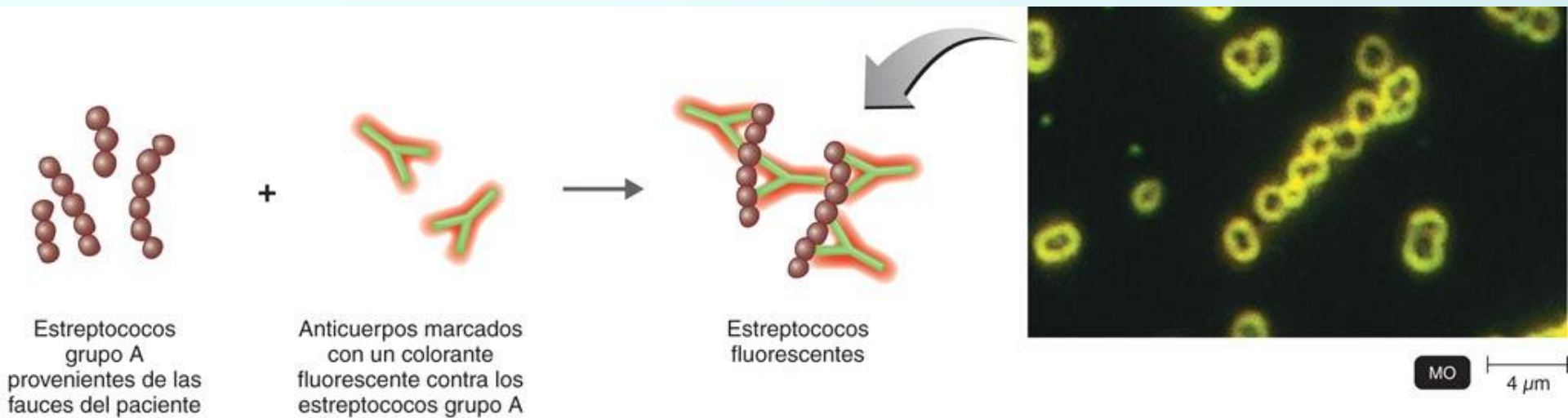
5. Lavado

6. OBSERVACIÓN

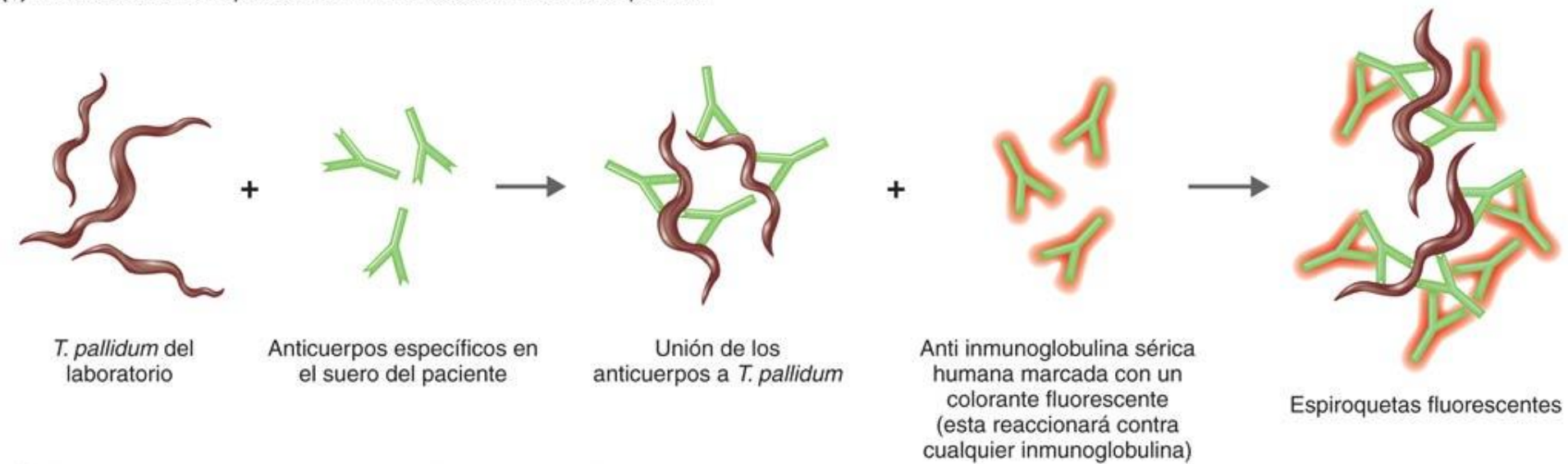
Microscopio fondo oscuro-Luz UV



1. Extendido de cultivo celular

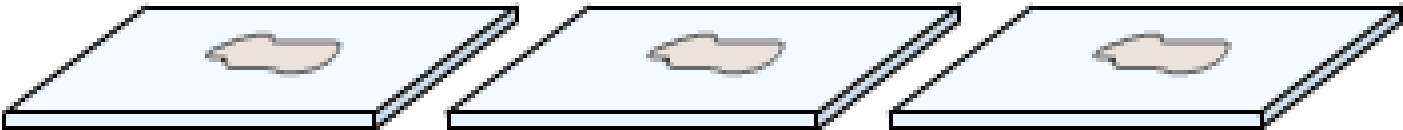
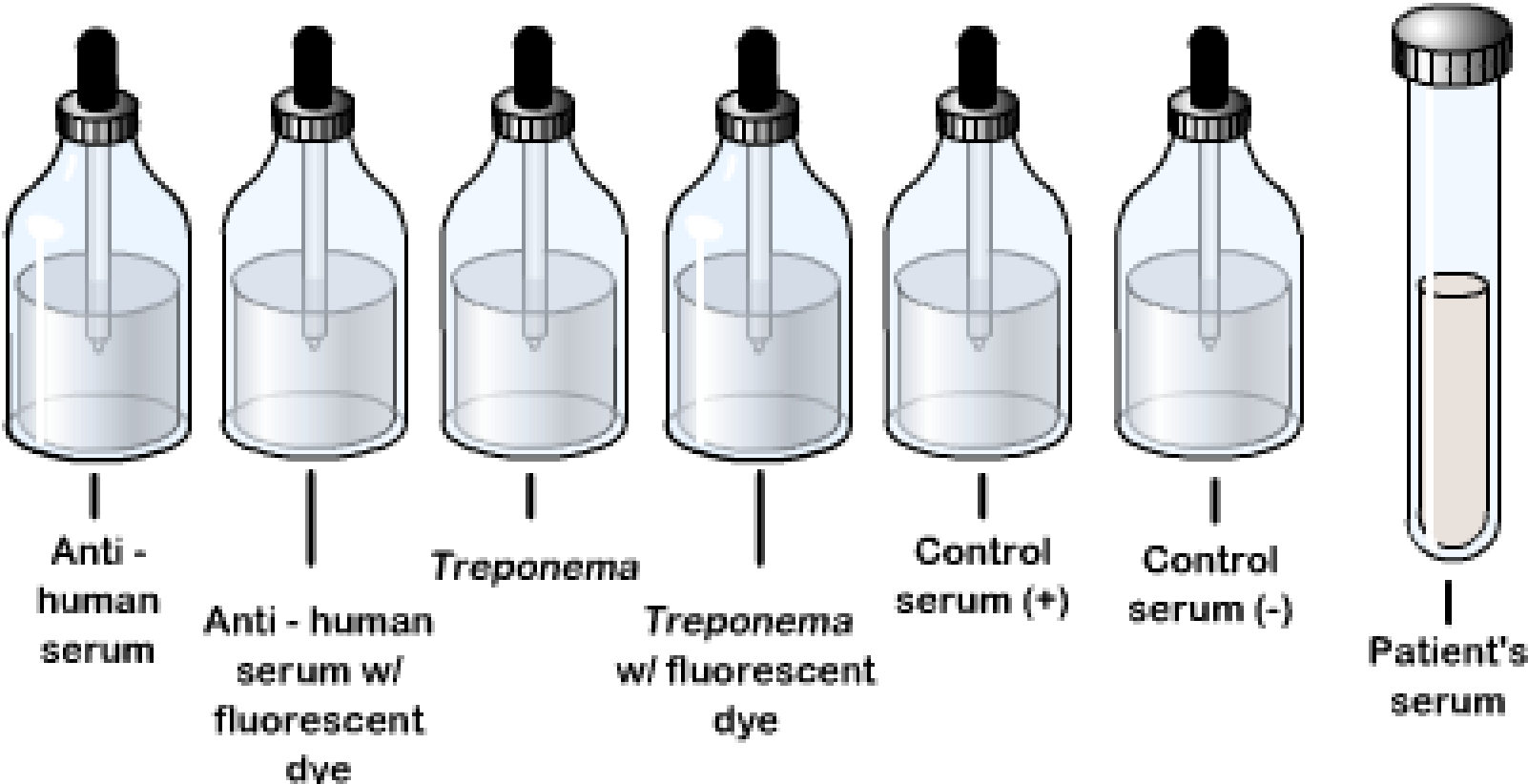


(a) Reacciones en una prueba de inmunofluorescencia directa positiva



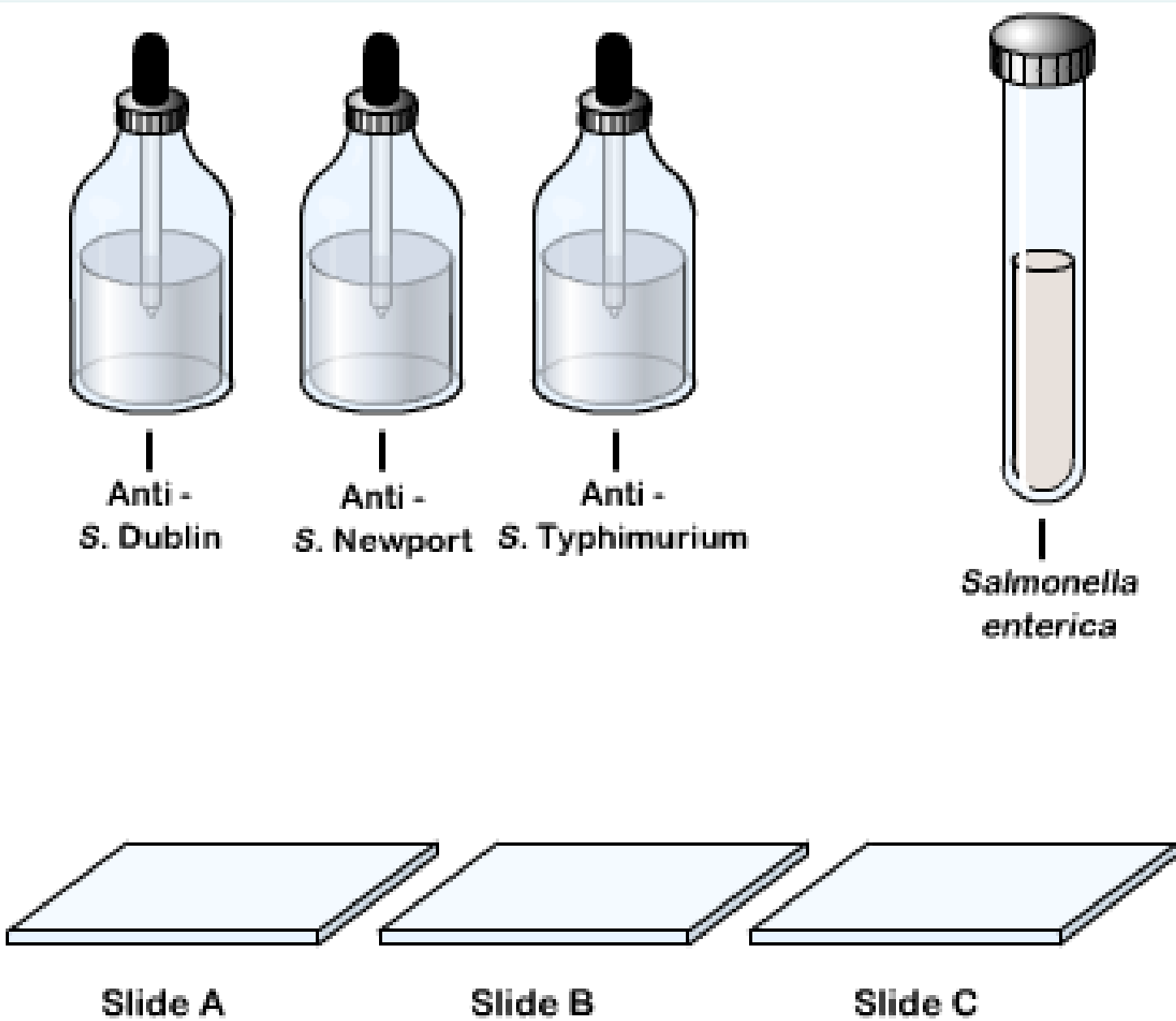
(b) Reacciones en una prueba de inmunofluorescencia indirecta positiva

Investigación de ANTICUERPOS de *Treponema* en paciente (I. Indirecta)



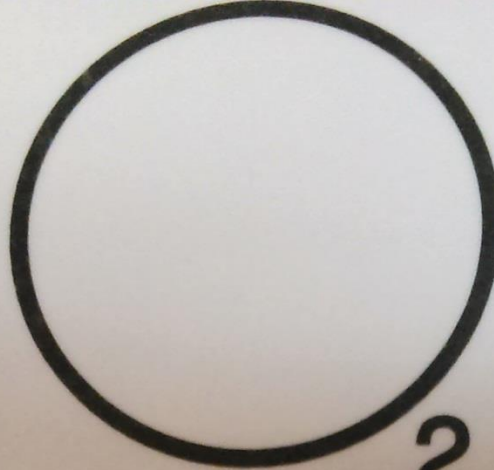
TREPONEMA EN LOS 3 PORTAOBJETOS

Investigación de serotipo de *Salmonella enterica* (**Aglutinación**)

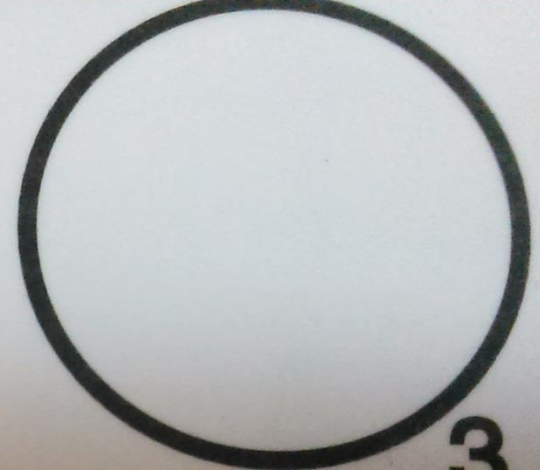




1



2



3



4



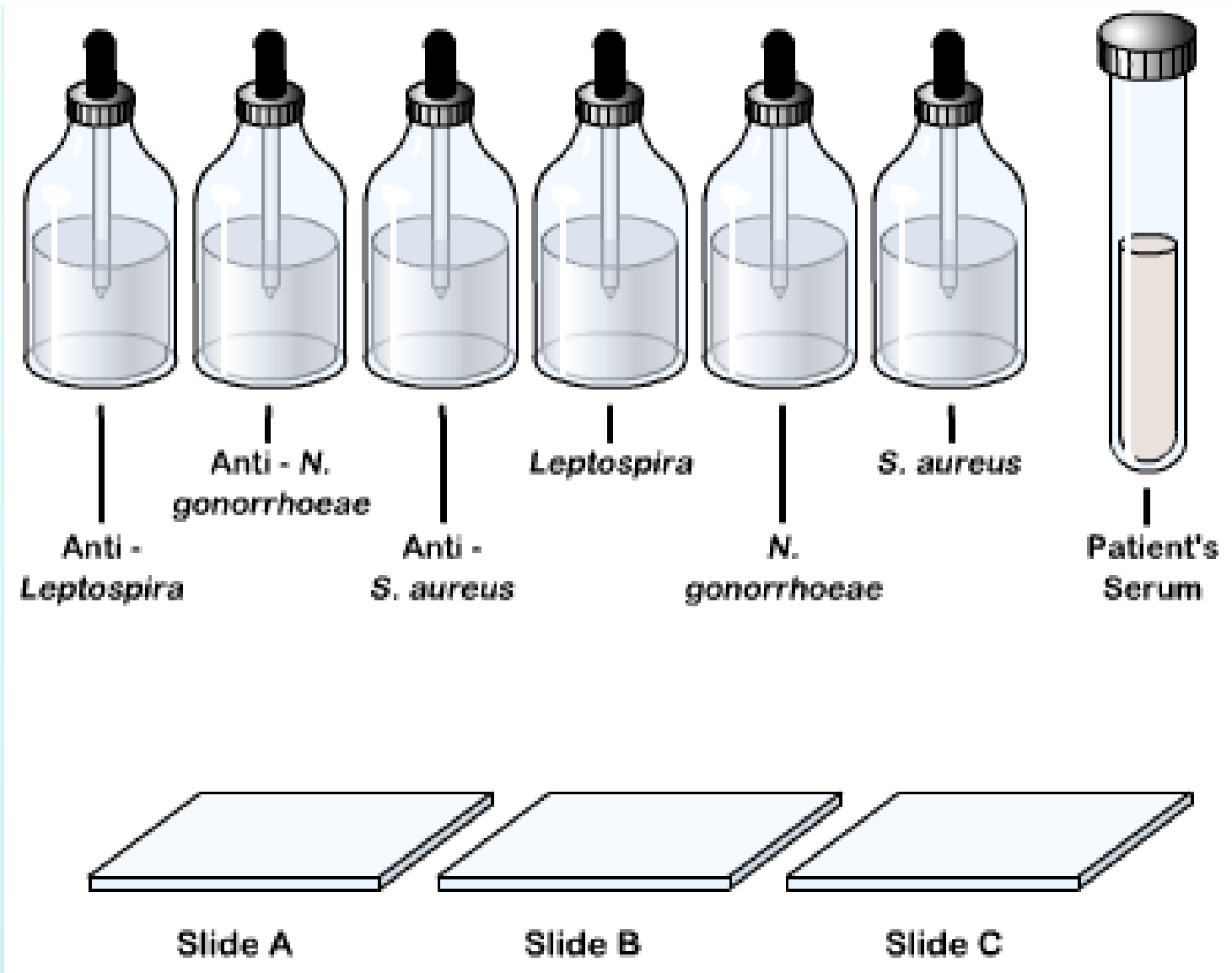
5



6

Investigación de *Salmonella* sp.
(Aglutinación)

Investigación de agente causal de enfermedad (Aglutinación)



Sistemas comerciales rápidos para detección y confirmación de *Listeria*

Basados en reacciones inmunológicas

Prueba	Nivel ID	Principio	Tiempo aproximado de la prueba ²	Compañía	Utilización principal
MICRO-ID <i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i> /innocua complejo	Reacción enzimática	24 horas	Organon Teknika	Confirmación
Vitek System	<i>L. monocytogenes</i> /innocua complejo	Pruebas bioquímicas	24 horas	bioMérieux	Confirmación
API <i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Pruebas bioquímicas	24 horas	bioMérieux	Confirmación
MicroLog System	<i>L. monocytogenes</i>	Uso de sustratos como fuente de carbono	4 o 24 horas	Biolog	Confirmación
MICROBACT 12L	<i>L. monocytogenes</i>	Utilización de carbohidratos y prueba de microhemólisis	4-6 o 24 horas	Microgen	Confirmación
Sherlock Microbial Identification System (MIS)	<i>L. monocytogenes</i> /innocua complejo	Patrones de ácidos grasos	90 minutos	Microbial ID	Confirmación
Gen-Probe (AccuProbe)	<i>L. monocytogenes</i>	Hibridación de ácidos nucleicos con sondas	30 minutos	Gen Probe	Confirmación
Microscreen	<i>Listeria</i> spp.	Aglutinación con latex	1 minuto	Microgen BioProducts	Confirmación
<i>Listeria</i> Tek	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	Organon Teknika	Detección
TECRA <i>Listeria</i> Visual Immunoassay (TLVIA)	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	TECRA	Detección
Assurance <i>Listeria</i> EIA	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	BioControl Systems	Detección
VIP <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	Inmuno-cromatografía	2 minutos (después del enriquecimiento)	BioControl Systems	Detección
VIDAS <i>Listeria</i> (LIS)	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	bioMérieux	Detección
VIDAS <i>Listeria monocytogenes</i> (LMO)	<i>L. monocytogenes</i>	ELISA	50 horas	bioMérieux	Detección
Foodproof <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	PCR	48 horas	Biotecon Diagnostics	Detección
Transia Plate <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	Diffchamb	Detección
Transia Plate <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	ELISA	50 horas	Diffchamb	Detección
Dynabeads anti- <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	Separación inmunomagnética	48-72 horas	Dynal	Detección
EIAFOSS <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	ELISA automatizado	48 horas	Foss Electric	Detección