

Seminario 8 2017

Exploración del estado inmunitario

¿QUÉ PODEMOS EVALUAR?

- Mediadores solubles: anticuerpos, componentes del sistema complemento, citocinas, etc.
- Presencia de diferentes tipos celulares en una muestra biológica
- Moléculas expresadas en la superficie celular o moléculas intracelulares
- Respuestas inmunes a través de ensayos realizados *in vitro*
- Respuestas inmunes *in vivo*

¿PARA QUÉ QUEREMOS EVALUAR PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS?

- ¿Un individuo está inmunizado contra un patógeno?
- ¿Un bebé recién nacido de una madre infectada ha sido también infectado?
- ¿Una vacuna aplicada a un individuo fue efectiva?
- ¿Una muestra de sangre de un potencial donante es apta para transfusión?
- ¿Cuál es el defecto que presenta un paciente con una inmunodeficiencia?
- ¿Una inmunodeficiencia es primaria o secundaria a otra condición?
- ¿Un cuadro clínico determinado se debe a una enfermedad autoinmune?
- ¿Un paciente trasplantado de médula ósea presenta reconstitución inmune?

... y la lista continúa

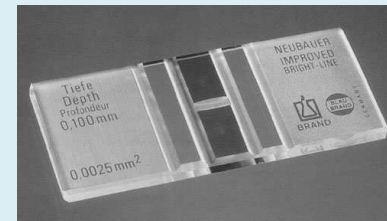
ERITROSEDIMENTACIÓN , HEMOGRAMA, RECUESTO, FÓRMULA LEUCOCITARIA Y PROTEINOGRAMA

Eritrosedimentación

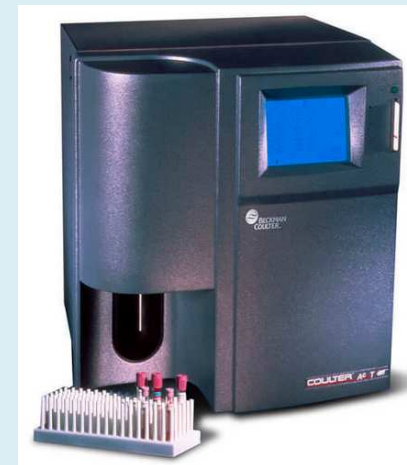


Hemograma con recuento y fórmula leucocitaria

Recuento manual:
cámara de Neubauer

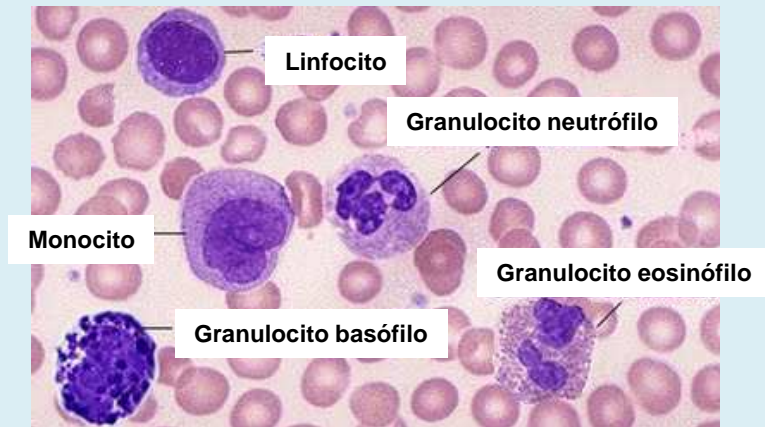


Recuento automatizado:
autoanalizadores
(también calculan
fórmula leucocitaria)

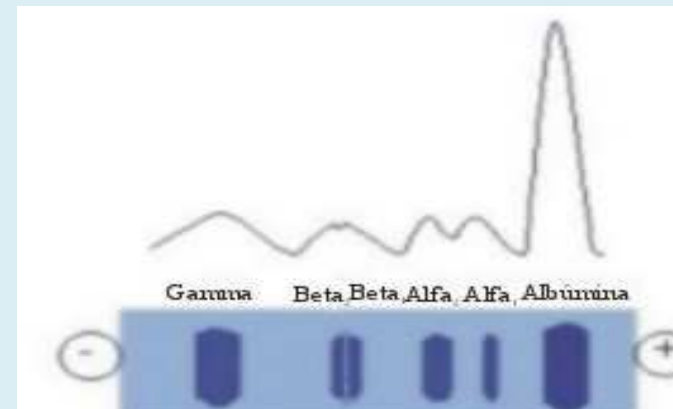


ERITROSEDIMENTACIÓN , HEMOGRAMA, RECuento, FÓRMULA LEUCOCITARIA Y PROTEINOGRAMA

**Fórmula leucocitaria:
Tinción May Grünwald Giemsa**



Proteinograma electroforético



Grupo de leucocitos	Valor %	Valor absoluto
Neutrófilos	55 a 70 %	2.500 a 8.000 mil/mm ³
Linfocitos	20 a 40 %	1.000 a 4.000 mil/mm ³
Monocitos	2 a 8 %	100 a 700 mil/mm ³
Eosinófilos	1 a 4 %	50 a 500 mil/mm ³
Basófilos	0 a 1 %	25 a 100 mil/mm ³

ANTICUERPOS

¿Qué solemos medir?

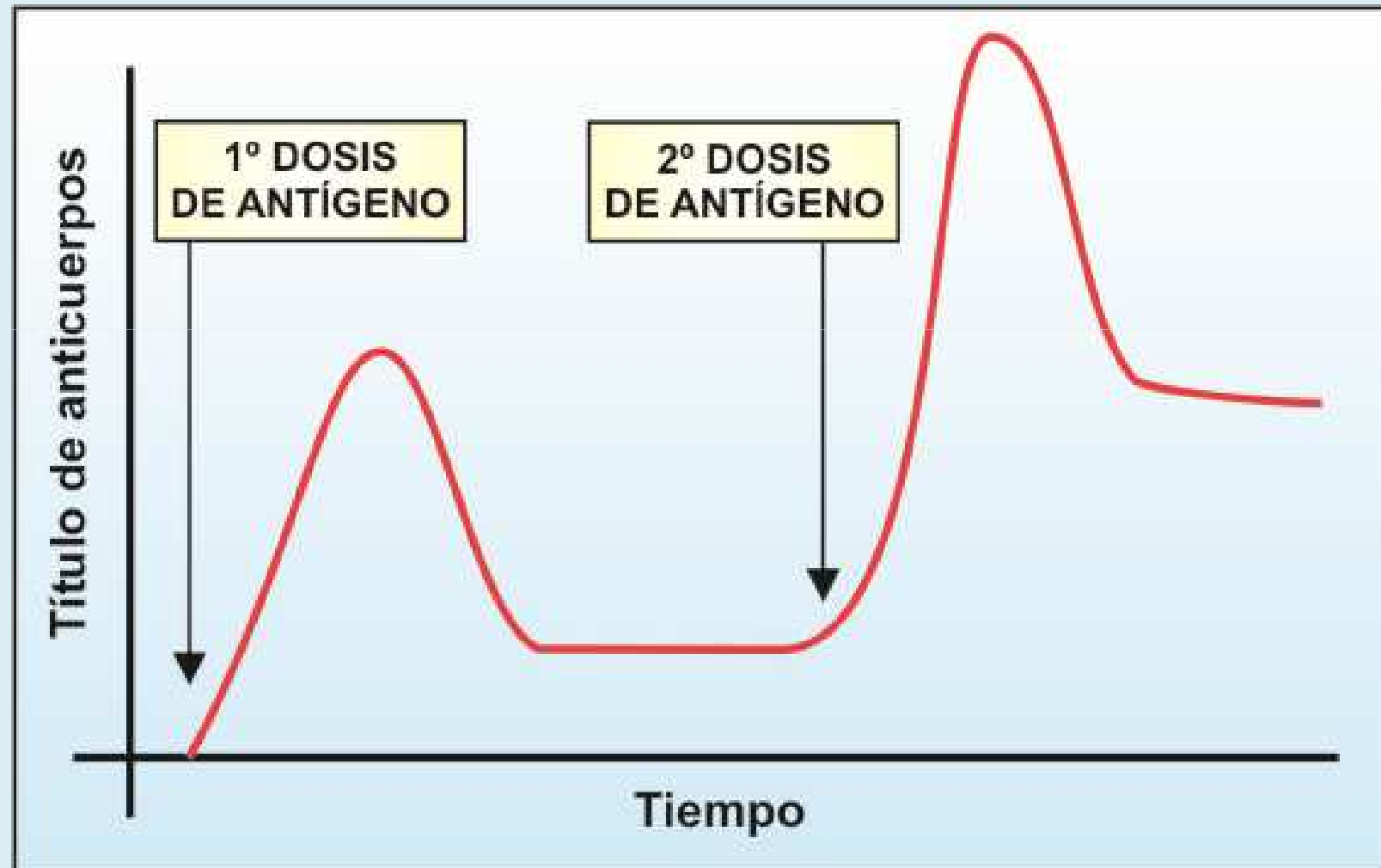
- **Concentración total de anticuerpos IgG, IgM, IgA o IgE en una muestra biológica**
- **Concentración de anticuerpos pertenecientes a un isotipo, específicos frente a un antígeno.**

¿En qué pacientes solicitamos la determinación?

- **Paciente con sospecha de inmunodeficiencia humoral**
- **Individuo vacunado**
- **Paciente infectado**
- **Paciente con enfermedad autoinmune**
- **Otros**

CONSIDERACIONES A TENER EN CUENTA PARA LA CORRECTA VALORACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL

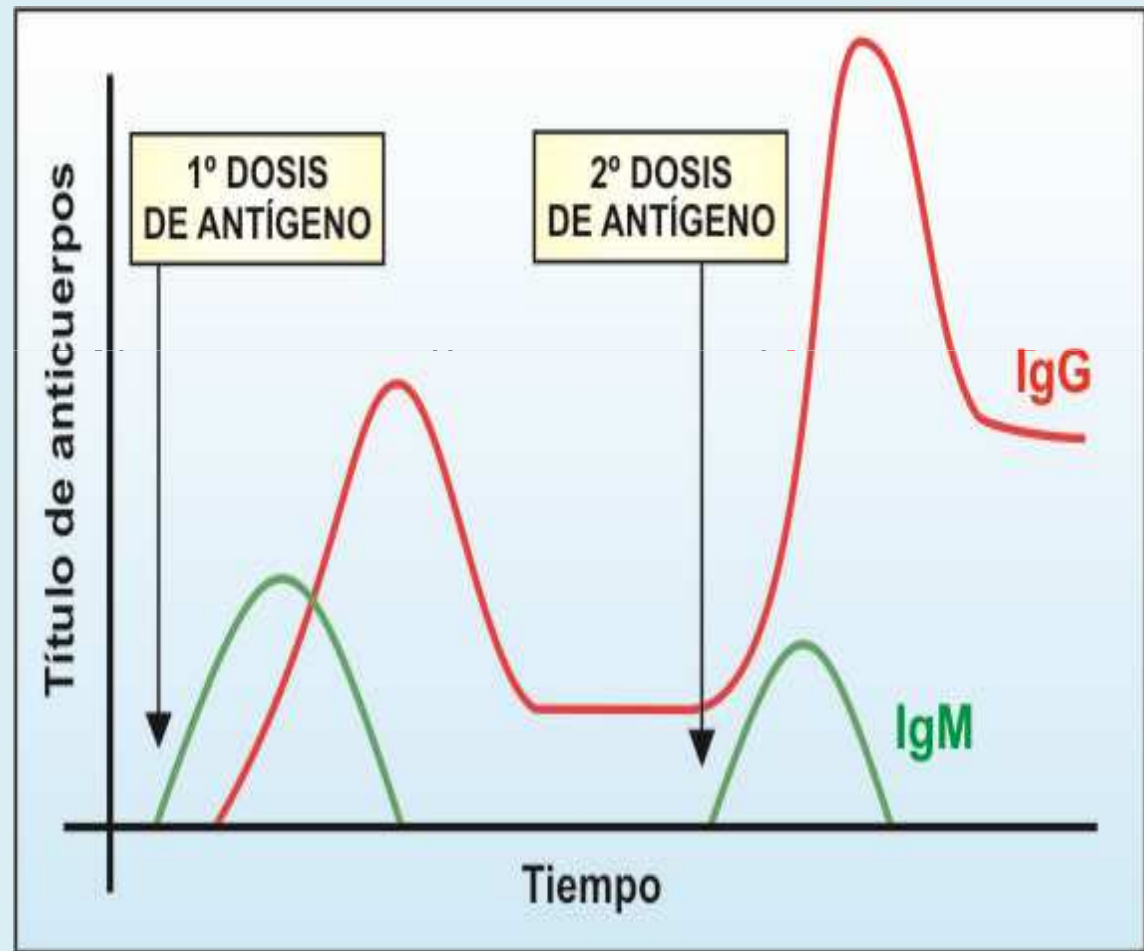
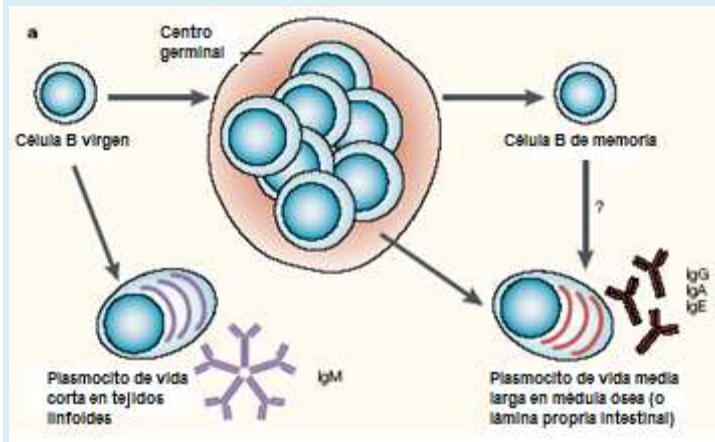
Cinética de la respuesta humoral frente a Ag T-dependientes



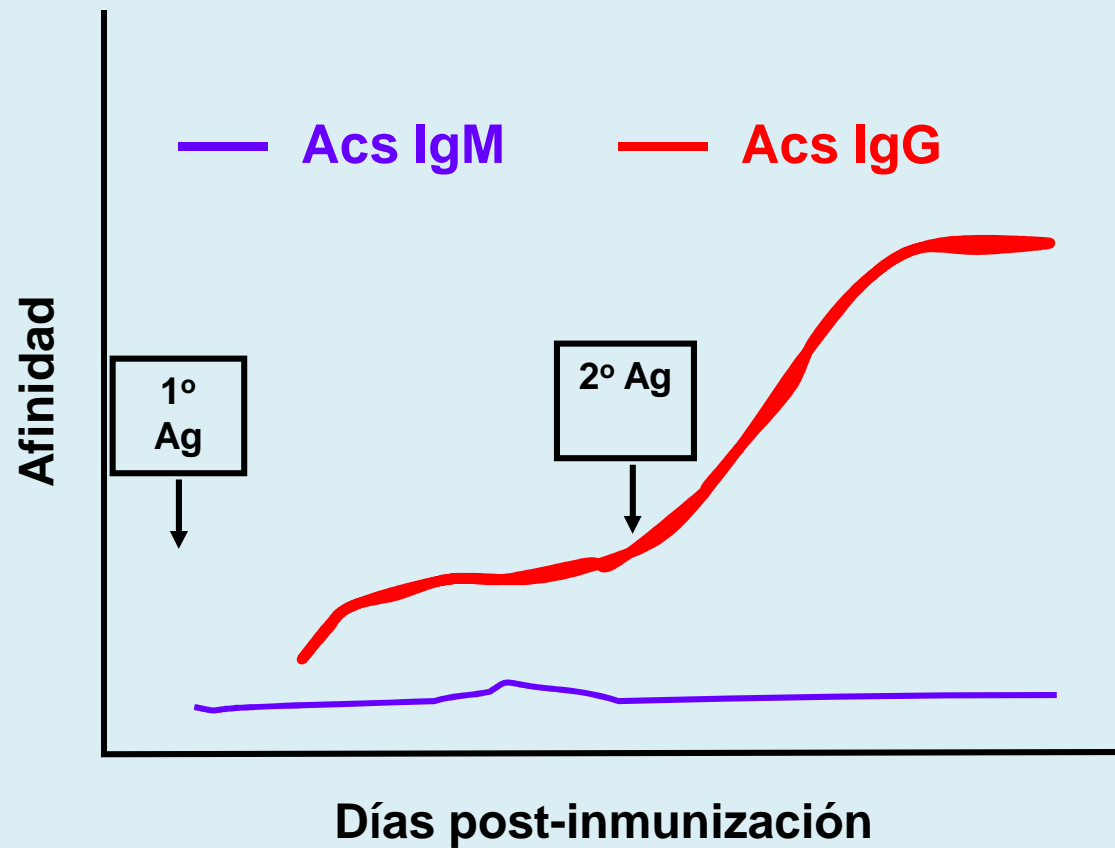
Cambios cualitativos en los Ac Rta 1° y 2°: Switch isotópico

- Switch isotópico

- 1° - IgM
- 2° - IgG, IgA or IgE



Cambios cualitativos en los Ac Rta 1° y 2°: Incremento en la afinidad



Diferencias en la respuesta humoral primaria y secundaria

	Primaria	Secundaria
Tiempo requerido	5-10 días	1-3 días
Intensidad	menor	mayor
Isotipos	IgM > IgG	IgG, IgA, IgE
Afinidad Ac	Baja	Alta
Inmunogéno	Hidratos de carbono, lípidos, proteínas, glico- y lipoproteínas	Proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas

**Concentración de inmunoglobulinas en suero adulto
normal (mg/100ml)**

Ig	Concentración	Nivel inferior	Nivel superior
IgG	1.250	950	1.550
IgM	90	70	110
IgA	210	160	260
IgE	0.0004	0.0002	0.0006
IgD	0.2	0.1	0.3

**Todas las metodologías empleadas a
fin de determinar la presencia de
anticuerpos se basan en la interacción
que éstos establecen con antígenos**

INTERACCIÓN Antígeno-Anticuerpo

Interacción primaria

(No visualizable)

Interacción secundaria

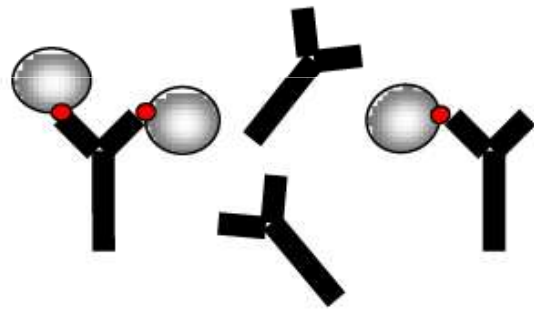
(Sigue a la anterior. Aparición de un fenómeno visible: aglutinación o precipitación)

Metodologías basadas en interacciones primarias Ag/Ac:

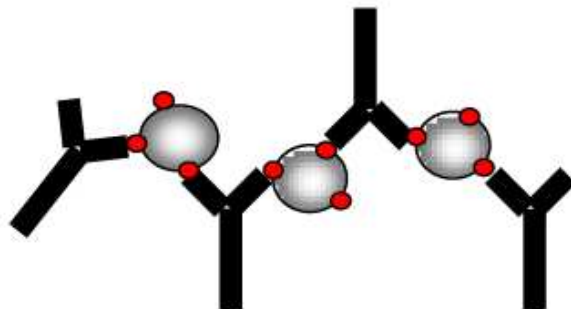
ELISA, RIA, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia.

Metodologías basadas en interacciones secundarias Ag/Ac:

IDR, IEF, Aglutinación.

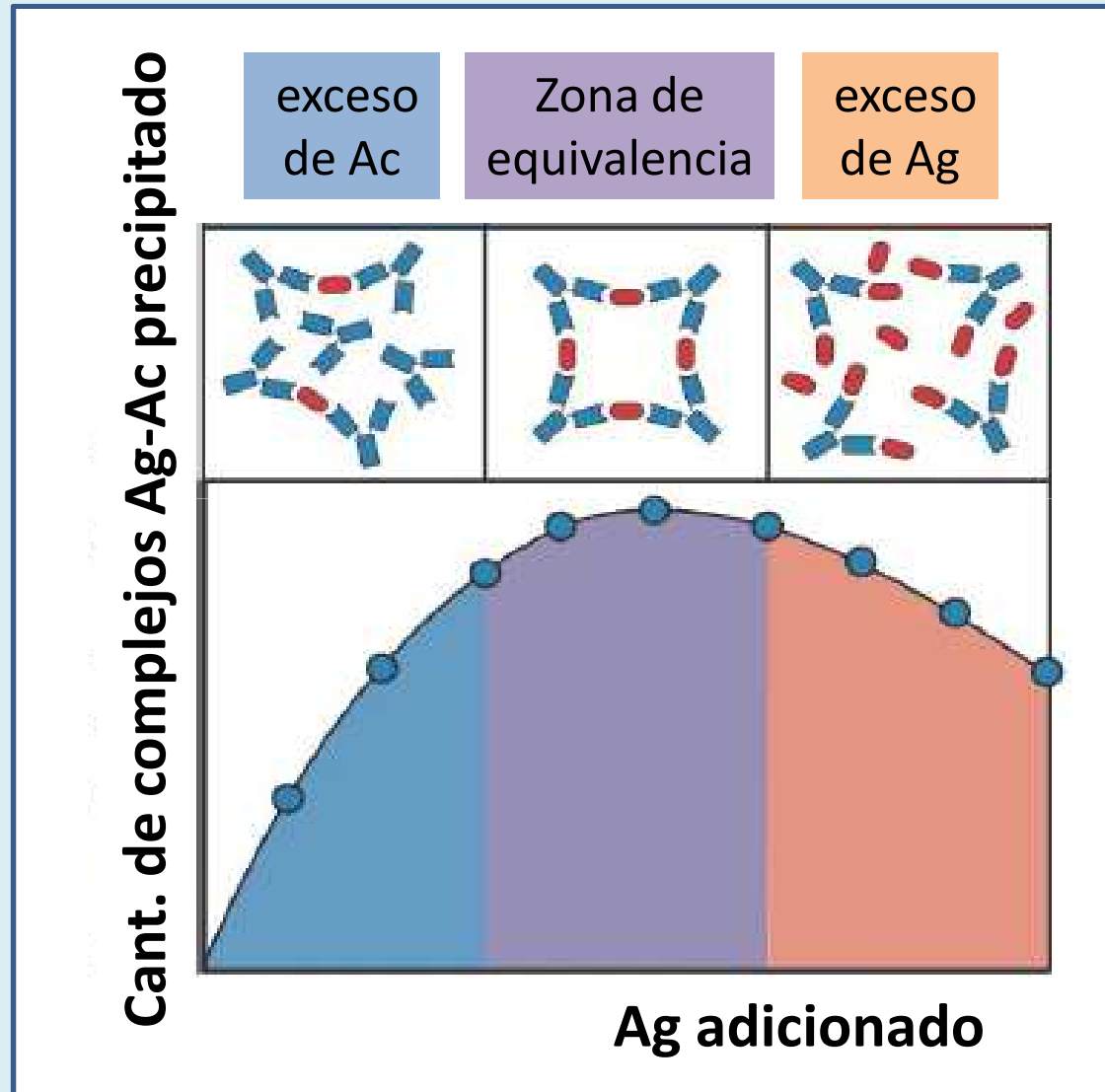


La asociación entre Ac bivalentes y Ag monovalentes NO permite la interacción secundaria Ag-Ac.

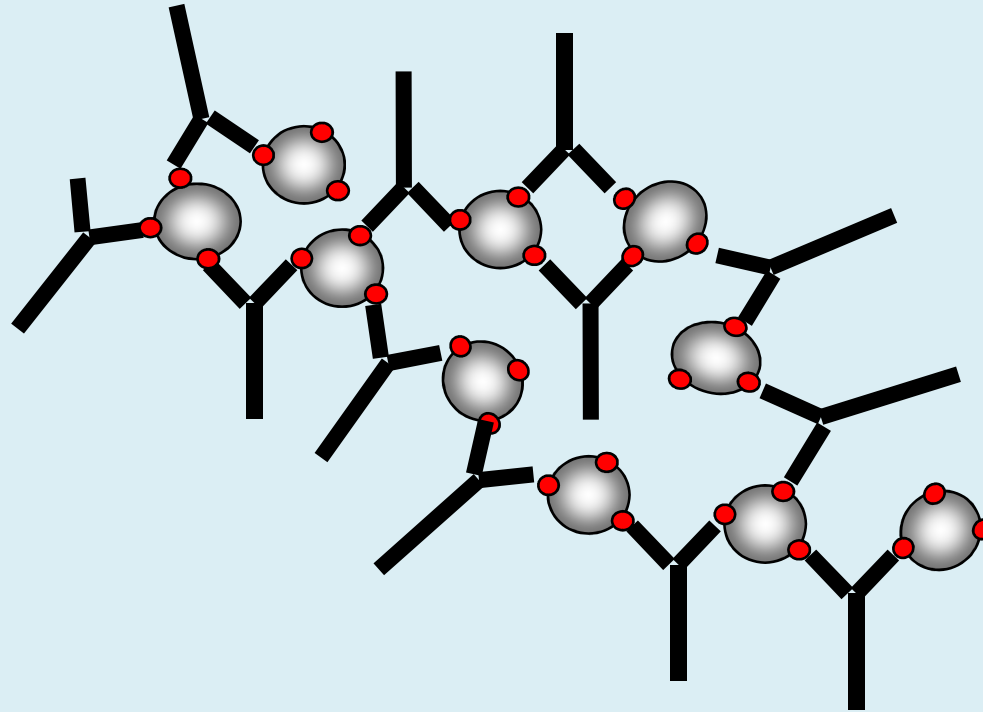


La asociación entre Ac bivalentes y Ag multivalentes permite la interacción secundaria Ag-Ac. El Ag puede presentar un único epítopo repetido o varios epítopos distintos.

INTERACCIÓN secundaria Ag-Ac



Formación de la red Ag-Ac



Ag particulados: aglutinación

Ag solubles: precipitación

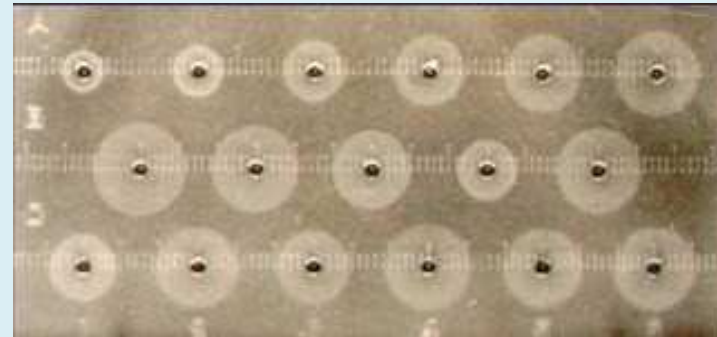
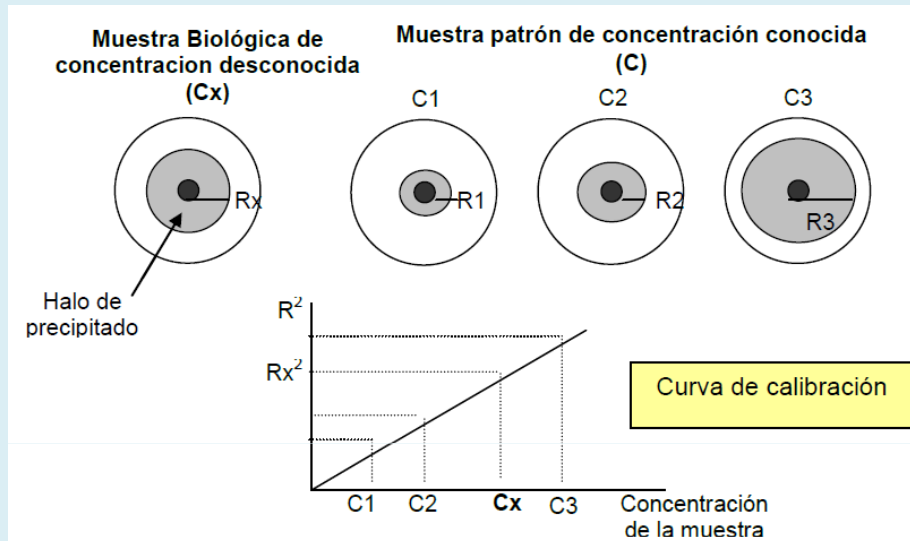
Ag y Ac deben ser al menos bivalentes y deben estar en concentraciones del orden de mg/ml a fin de poder visualizar el fenómeno. Suelen ser técnicas de baja sensibilidad.

Propiedades genéricas de las Técnicas Inmunológicas

- **Sensibilidad**
- **Especificidad**
- **Técnicas cuantitativas**
- **Técnicas cualitativas**
- **Técnicas semi-cuantitativas**

INMUNODIFUSIÓN RADIAL (IDR)

Reacción de precipitación en medio gelosado



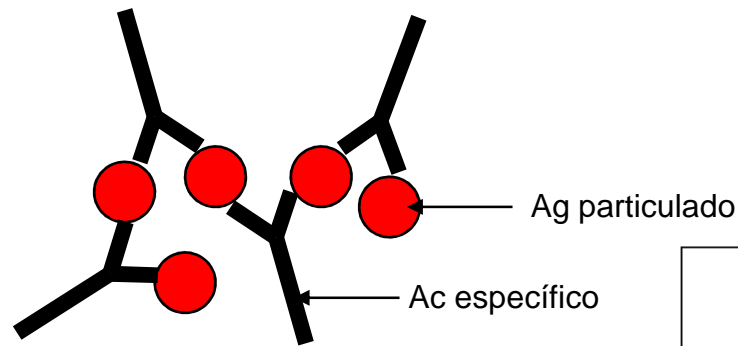
TÉCNICA CUANTITATIVA

¿PARA QUÉ SE EMPLEA?

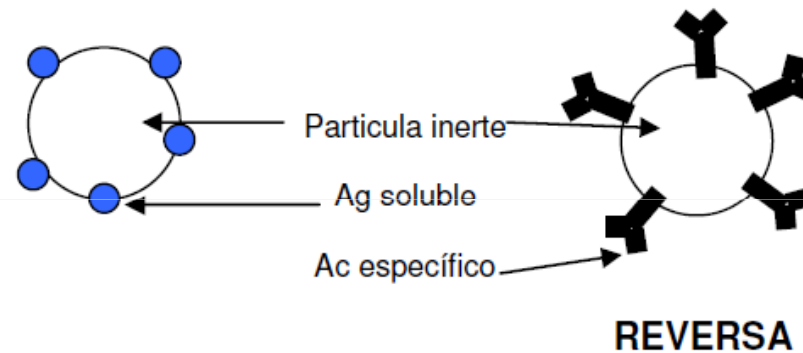
- Determinar la concentración sérica de IgG, IgA o IgM
- Determinar la concentración sérica de los componentes del sistema del complemento: C1-C9, factor H, factor I, factor B y C1 inhibidor.

Aglutinación (interacción secundaria)

Aglutinación activa o directa



Aglutinación pasiva o indirecta



¿PARA QUÉ SE
EMPLEAN ?



- Detección/titulación de Ac específicos o antígenos
- Cuantificación de Ag (IHA)

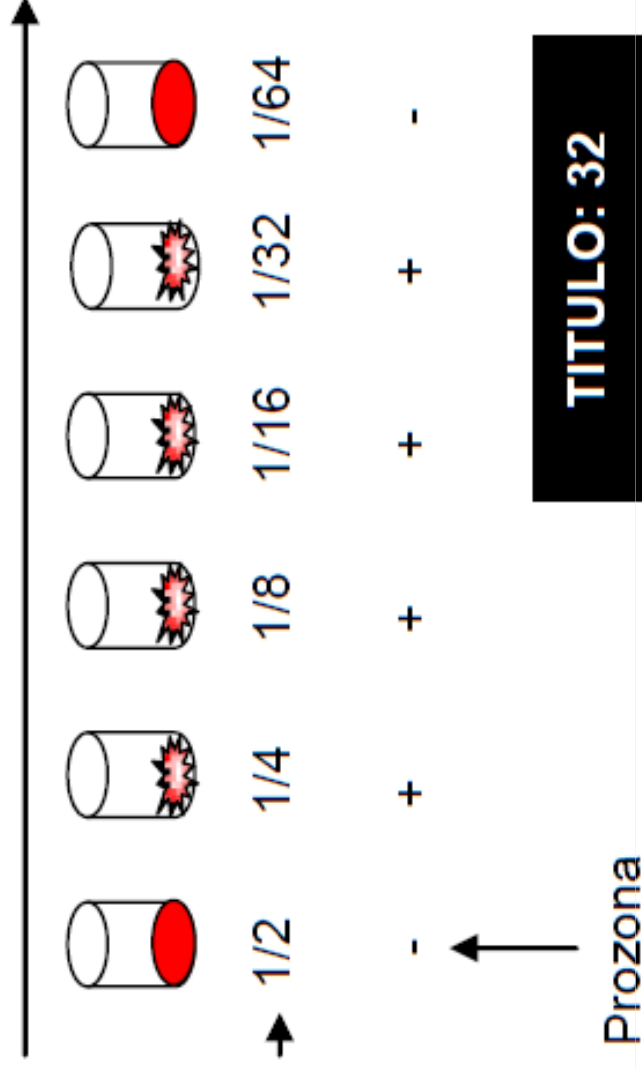
TÉCNICA CUALITATIVA O SEMI-CUANTITATIVA (cuando se determinan Ac)

TÉCNICA CUALITATIVA O CUANTITATIVA (cuando se determinan Ag por IHA o aglutinación reversa)

Ag particulado:
cantidades constante

Suero:
Diluciones crecientes

AGLUTINACION



TITULO: 32

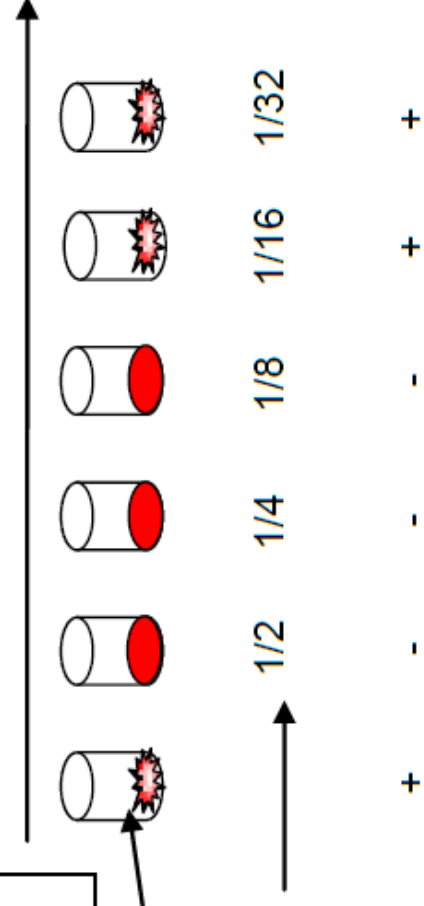
Inhibición de la hemaglutinación

Globo rojo con Ag + Ac
(relación aqlutinante)

Sin Ag libre

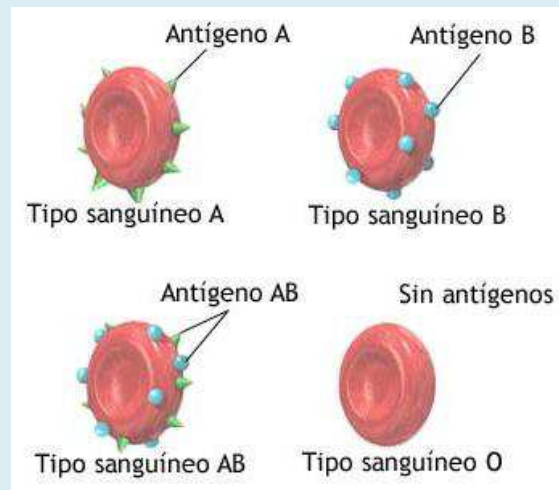
Ag libre:
Diluciones crecientes

AGLUTINACION



Ejemplo 1: Determinación de grupos sanguíneos sistema ABO

TÉCNICA CUALITATIVA



	Anti A	Anti B	Anti AB
A			
B			
AB			
O			

Ejemplo 2: Hemaglutinación indirecta (HAI): Chagas

FUNDAMENTOS DEL METODO:

- El suero del paciente contiene Ac anti-*T.cruzi* que inducen la aglutinación de glóbulos rojos recubiertos o sensibilizados con antígenos del parásito

INTERPRETACION DE RESULTADOS

DILUCIÓN
DEL SUERO

2 4 8 16 32 64 128 256 512

Paciente 1

Paciente 2

Paciente 3



Detección de Ac anti *T cruzi*

Titulación de Ac anti *T cruzi*

¿Podemos diferenciar IgG e IgM por aglutinación?

- **CONSIDERACIONES:**

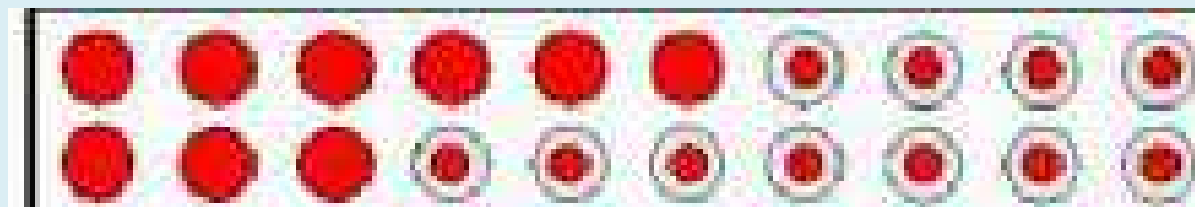
- Tanto la IgG como la IgM son Ac con actividad aglutinante.
- El tratamiento de la muestra de suero con 2-mercaptoetanol (2ME) reduce la IgM a su forma monomérica.
- La forma monomérica de la IgM es monovalente.
- La realización de la prueba de aglutinación en presencia de 2ME permitirá obtener un título que corresponde a IgG.
- La diferencia en el título obtenido en la prueba sin 2ME y con 2ME permitirá inferir la presencia de IgM específica contra el Ag en la muestra.

DILUCIÓN

2 4 8 16 32 64 128 256 512

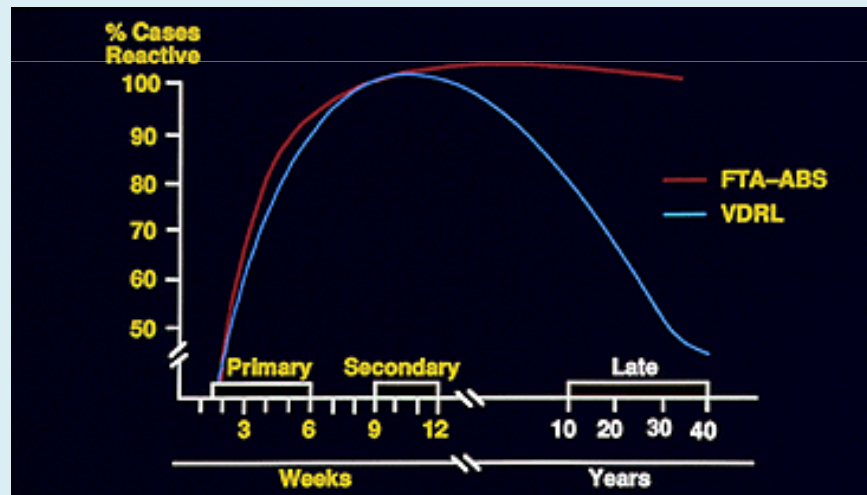
Sin 2ME

Con 2ME



Ejemplo 3: diagnóstico/seguimiento en pacientes con sífilis

En la infección por *T. pallidum* se generan Ac específicos contra la bacteria que perduran toda la vida aún cuando el paciente haya resuelto la infección y Ac no específicos que indican actividad de la enfermedad (Ac anticardiolipina). Ambos tipos de anticuerpos son evidenciados a través de ensayos de aglutinación. **La titulación de ambos es muy útil en el seguimiento y evaluación de la respuesta al tratamiento.**



FTA-Abs: detecta anticuerpos específicos dirigidos contra *T. pallidum*, empleando antígenos de la cepa Nichols de *T. pallidum*. Se informa reactivo o no reactivo.

VDRL: emplea como antígeno cardiolipina. Se informa la dilución máxima positiva de la aglutinación.

¿Infección activa?

¿Infección crónica?

¿Reactivación de proceso infeccioso?

¿Transmisión materno-fetal?

- Teniendo dos muestras de suero de un mismo paciente tomadas a diferentes tiempos, es posible comparar el título de Ac en ambas muestras.
- Se denomina **SEROCONVERSIÓN** a la aparición de Ac o al aumento del título de Ac en 4 veces* a lo largo de un período de 3-4 semanas.

*aumento del título en “4 veces” representa “2 diluciones”.

Por ejemplo: título de 1ª muestra de suero = 16; título de 2ª muestra de suero = 64.

$$64/16 = 4$$

Criterios para establecer presencia de infección reciente basados en el concepto de “Seroconversión”

Primera muestra	Segunda muestra	
IgM + IgG -		Infección aguda
IgM - IgG -	IgM - IgG +	Infección aguda
IgM - IgG +	IgM - IgG + (aumento 4 veces)	Infección aguda
IgM- IgG +	IgM - IgG + (sin aumento)	Infección ya resuelta o crónica

¿Cuál es el “título” de los sueros de individuos no infectados o no expuestos al Ag o expuestos pero no enfermos?

Contra muchos patógenos existe un “título” basal bajo de Ac en sueros de individuos sanos de la población (en general, < 8) que debe ser tenido en cuenta para decidir si una muestra es “REACTIVA” o “NO REACTIVA”.

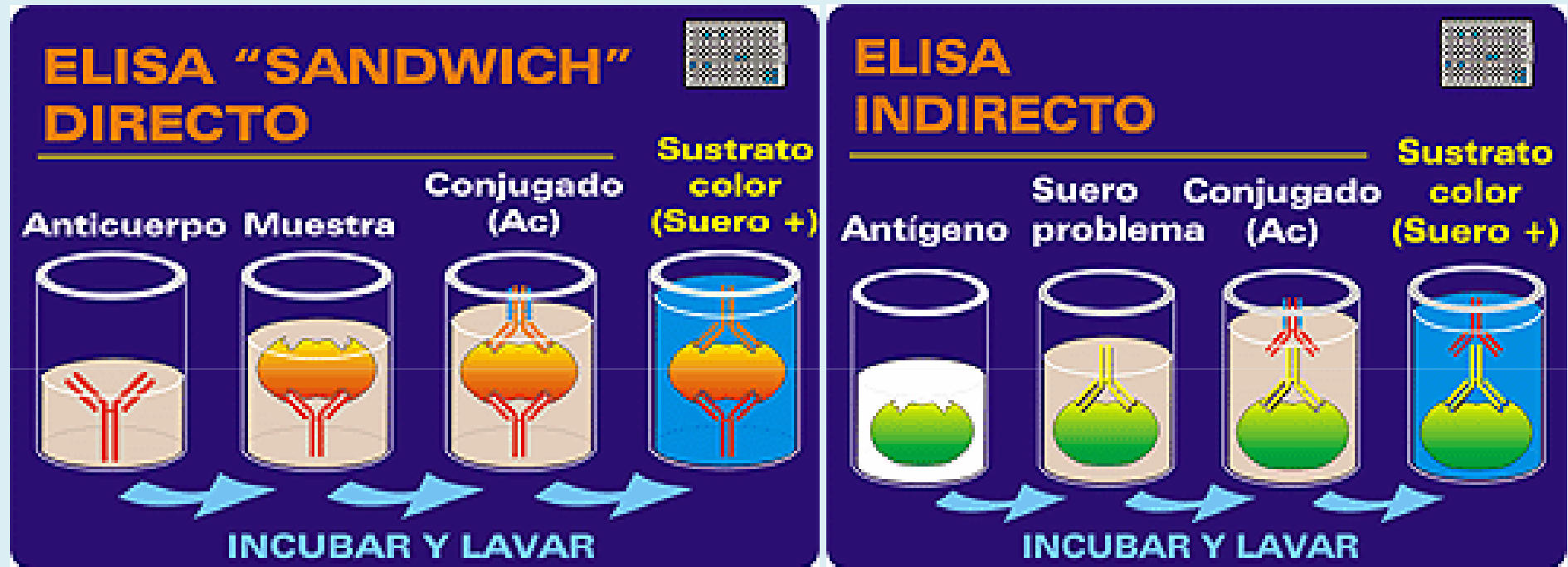
INTERACCIÓN PRIMARIA ANTÍGENO-ANTICUERPO

interacción no visible

Distintas estrategias hacen posible visualizarla:
“marcar” al Ac o al Ag mediante una unión covalente
(conjugación) con determinadas moléculas, tales
como **FLUOROCROMOS, ISOTOPOS
RADIOACTIVOS o ENZIMAS.**

ELISA

(interacción primaria)



¿PARA QUÉ SIRVEN?

Determinación de Ag

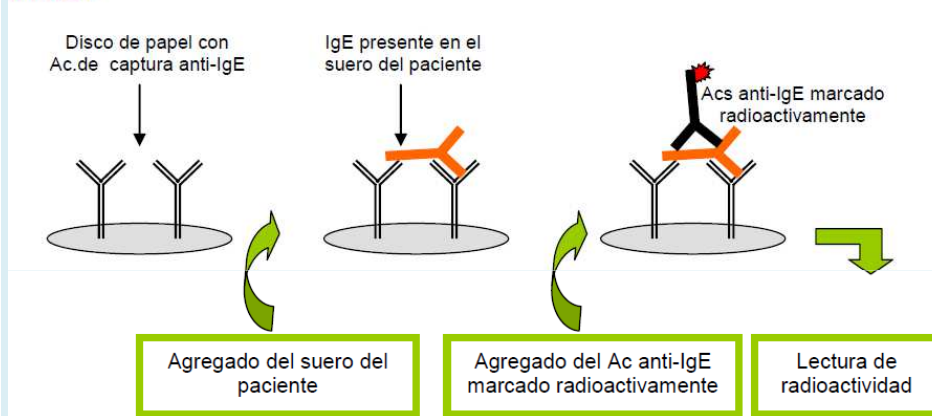
**TÉCNICA CUALITATIVA O
CUANTITATIVA**

Detección o titulación de Ac

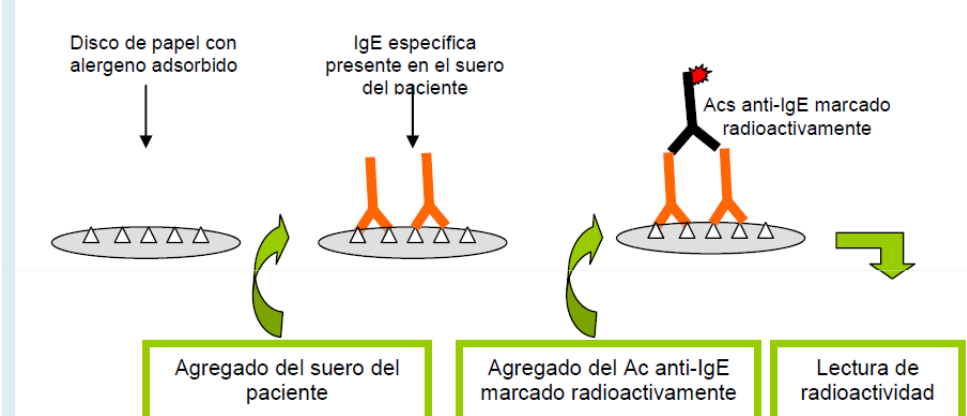
**TÉCNICA CUALITATIVA O
SEMI-CUANTITATIVA**

¿Cómo determinamos la concentración de anticuerpos IgE en pacientes alérgicos?

PRIST



RAST



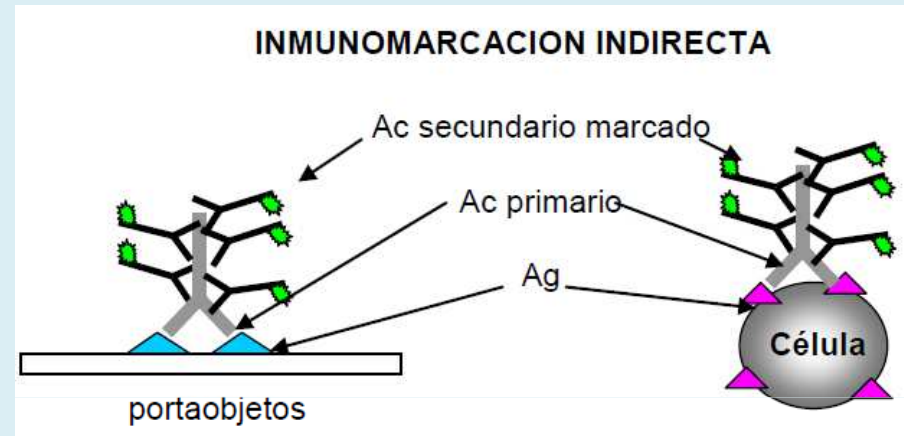
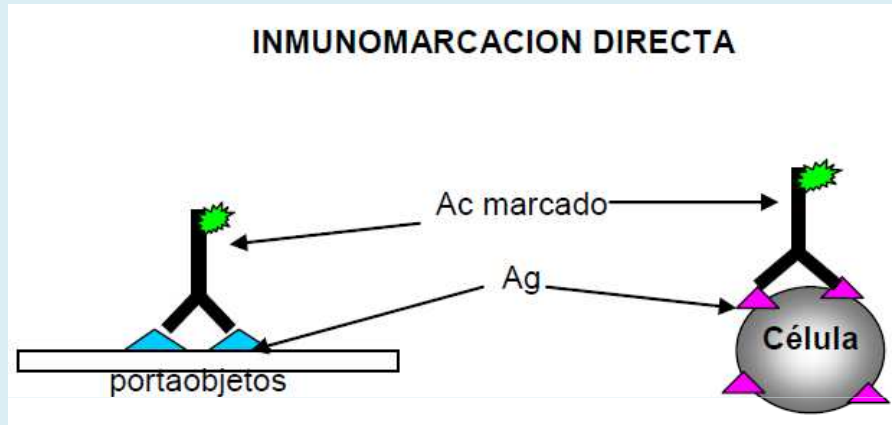
¿PARA QUÉ SIRVEN?

Cuantificación de IgE total

Titulación de IgE específica de Ag

Las concentraciones de Ac IgE, totales y específica para un alérgeno, pueden también determinarse por ELISA (semi-cuantitativas).

INMUNOMARCACIÓN (interacción primaria)



¿PARA QUÉ SIRVEN? →

- Detección de Ac
- Titulación de Ac
- Detección de Ag de superficie o intracelulares
- Detección de poblaciones celulares

TÉCNICA CUALITATIVA O SEMI-CUANTITATIVA

Inmunomarcación en portaobjetos

Depósito de complejos inmunes

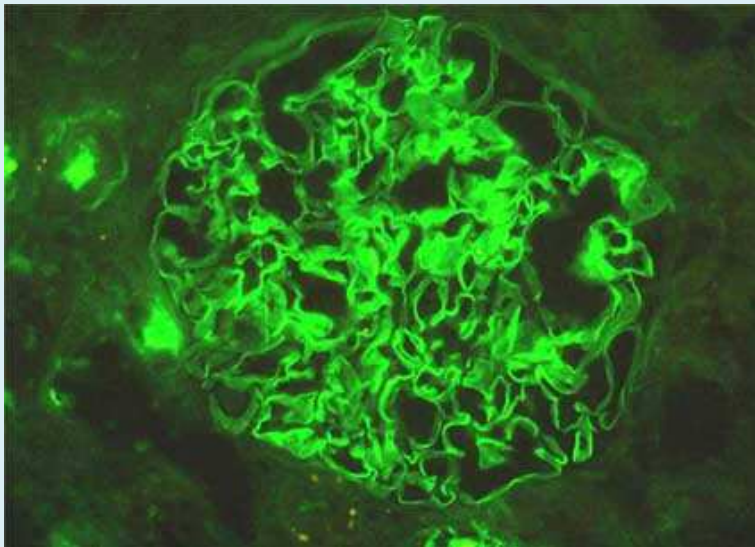
Determinación cualitativa de los complejos inmunes depositados en piel, riñón u otros tejidos.

Muestra: BIOPSIA.

Determinación de presencia de IgG.

Determinación de presencia de C3a y/o C5a.

Método: inmunofluorescencia indirecta.

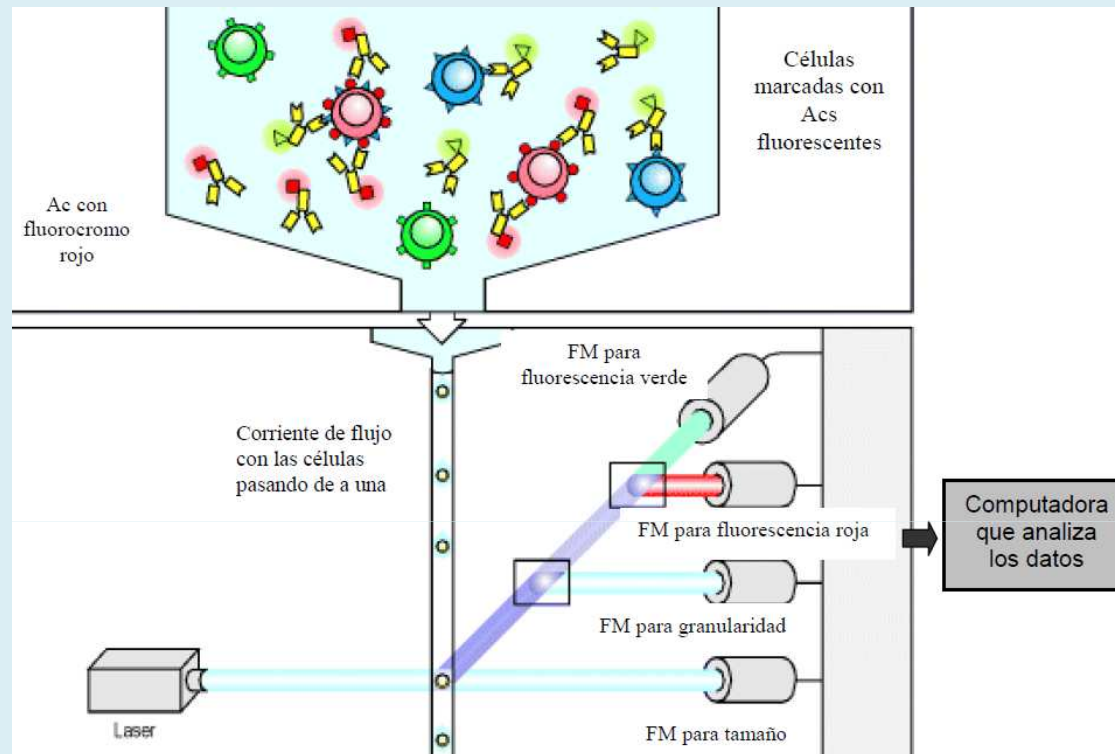


Inmunomarcación en cortes de riñón

Detección de IgG con anti-IgG humana marcada con FITC

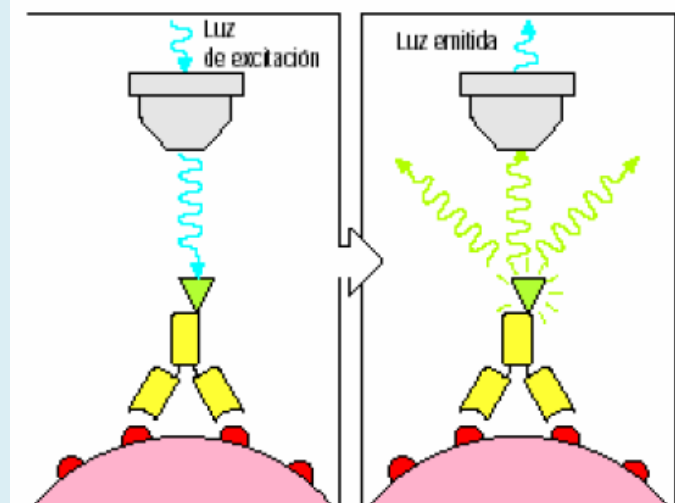
Paciente con Síndrome de Goodpasture

Citometría de flujo



¿Qué información de una célula nos da el citómetro?

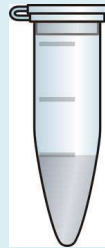
- Su tamaño
- Su granularidad
- La presencia de moléculas de superficie celular e intracelulares (mediante el uso de fluorocromos)
- otras



Citometría de flujo: protocolo de marcación



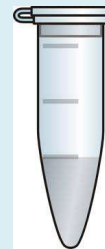
+ Ac control/es de isotipo*



Incubar, lavar, resuspender



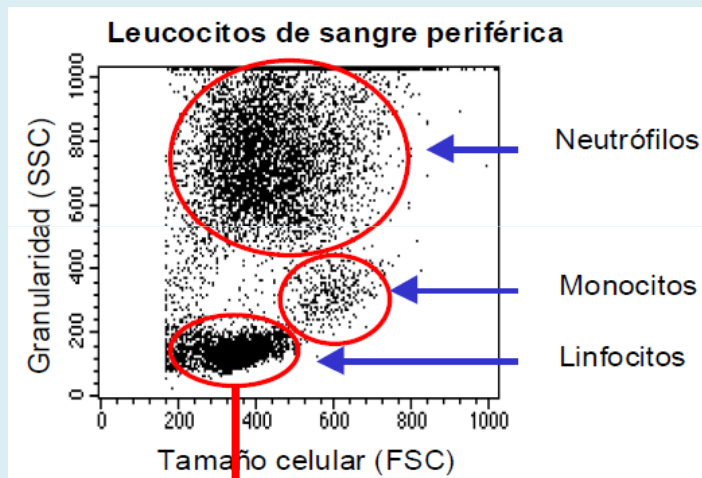
+ Ac contra Ag a analizar



Incubar, lavar, resuspender

* ¿Qué es un “control de isotipo”? Es una inmunoglobulina de la misma especie y del mismo isotipo que el Ac que se está empleando para el análisis, marcado con el mismo fluorocromo, que carece de reactividad contra las células en estudio. De esta manera, la “marcación” con este Ac control de isotipo permite establecer cuál es el nivel basal “background” de fluorescencia que produce cualquier Ig en las células a estudiar y descontar esa fluorescencia basal de la fluorescencia producida por el Ac que se está empleando para el análisis.

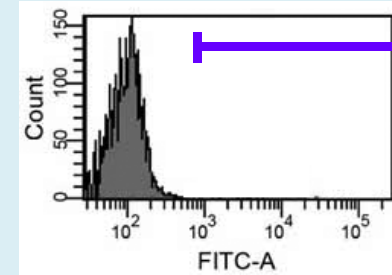
Citometría de flujo: ANÁLISIS (marcaciones simples)



Selección de una población mediante la determinación de una región o “gate” para posterior análisis (*por ejemplo, células linfoides*).

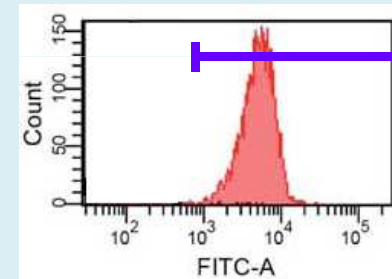
Control de isotipo

Elección de marcador

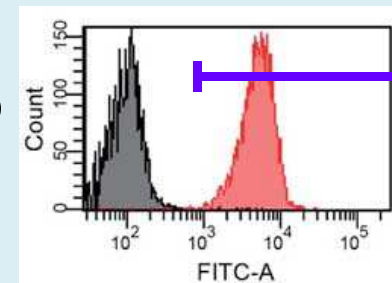


Seteo de posición basal del histograma

Ac específico

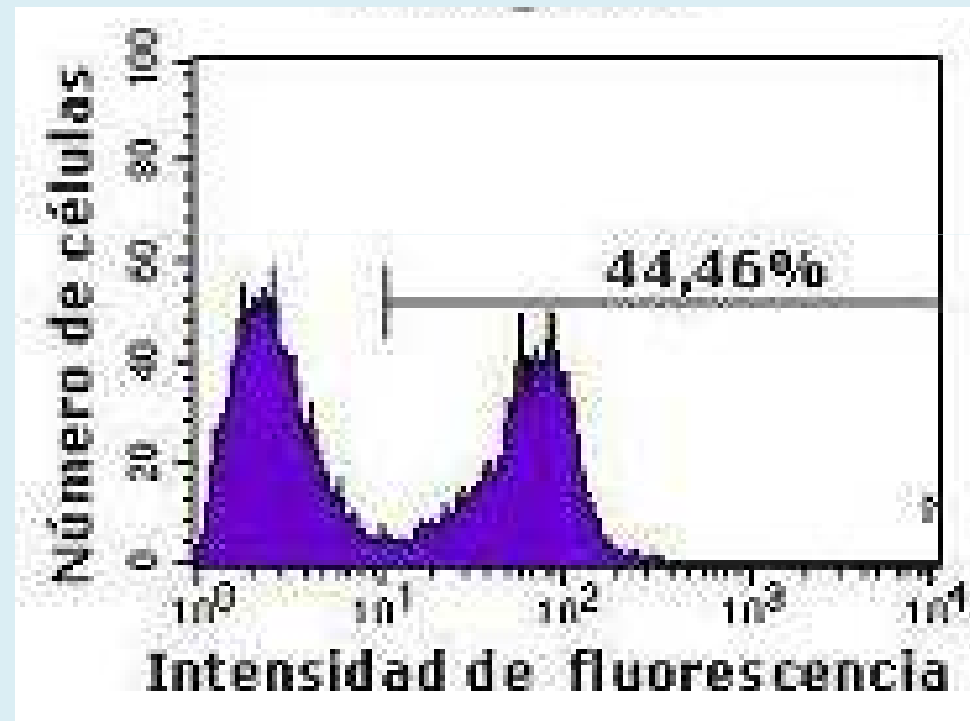


Solapamiento

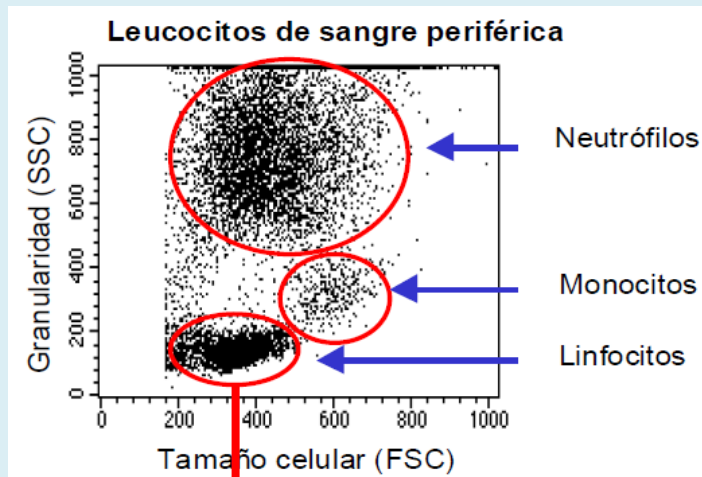


Citometría de flujo: ANÁLISIS (marcaciones simples)

¿histogramas bimodales?



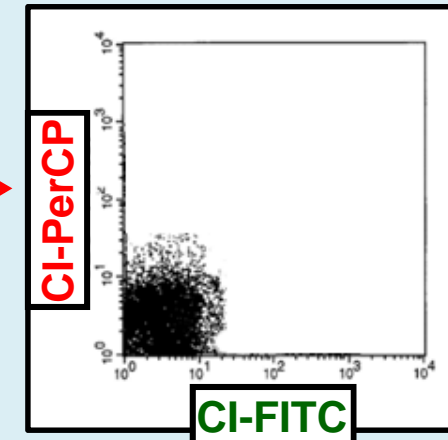
Citometría de flujo: ANÁLISIS (marcaciones dobles)



Selección de una población mediante la determinación de una región o “gate” para posterior análisis (*por ejemplo, células linfoides*).

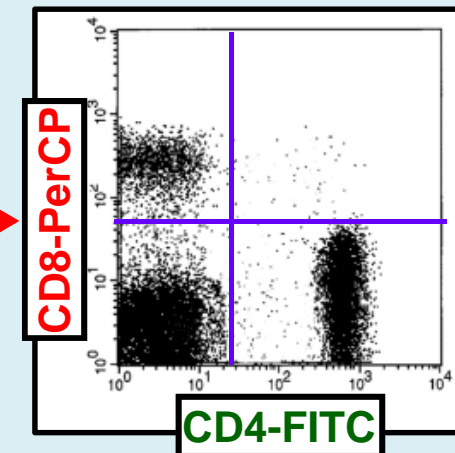
Determinación del porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ simultáneamente en la misma muestra

Controles de isotipo



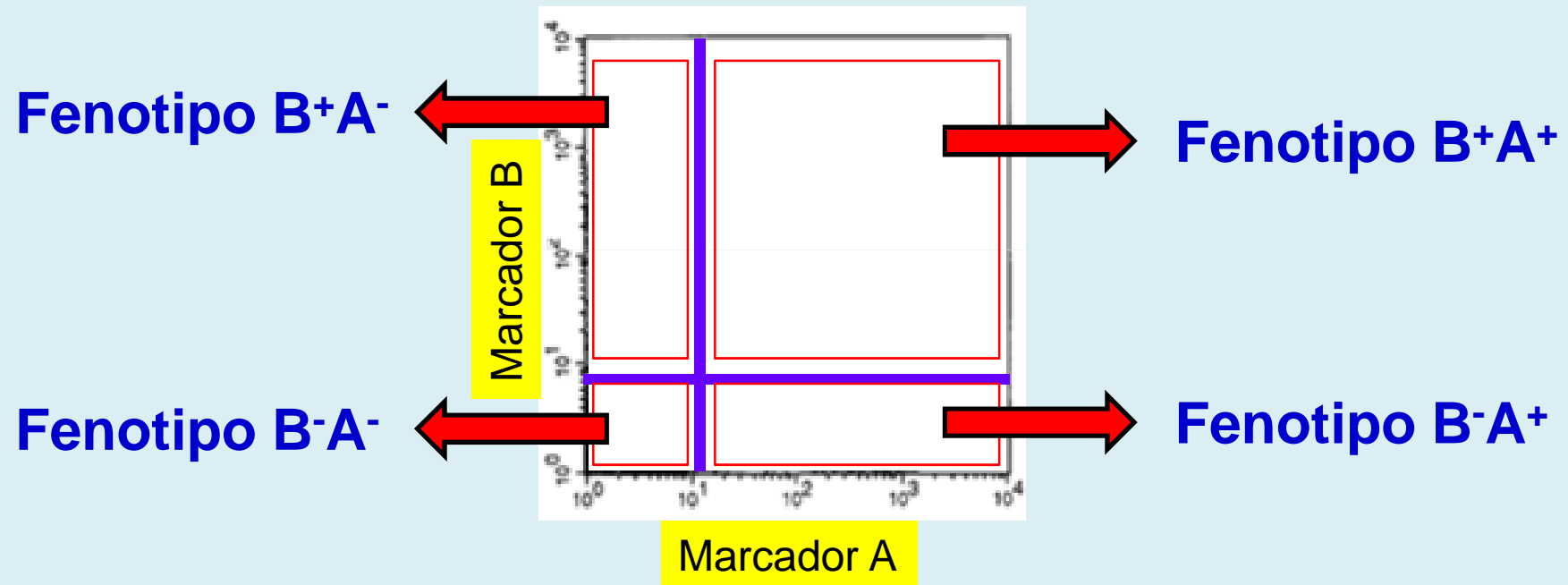
Seteo de cuadrantes

anti-CD4 y anti-CD8

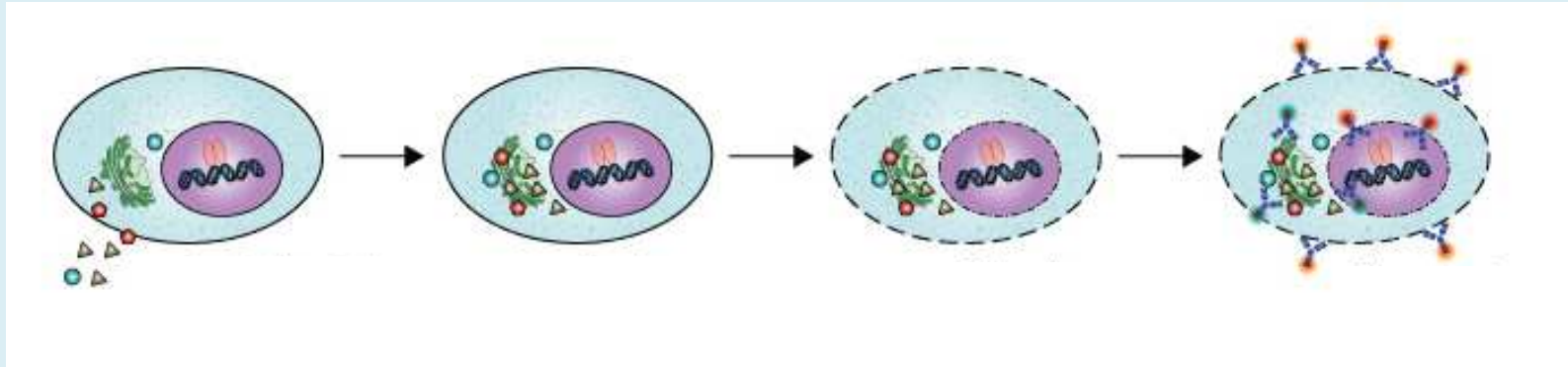


Citometría de flujo: ANÁLISIS (marcaciones dobles)

Criterio general para interpretar dobles marcaciones y *dot plots* en citometría de flujo



Citometría de flujo: ¿podemos detectar Ag intracelulares tales como citoquinas, factores de transcripción, etc?

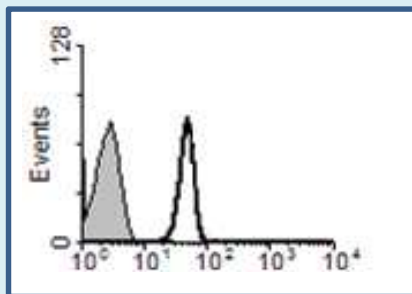


Tratar células con inhibidor/es del transporte intracelular

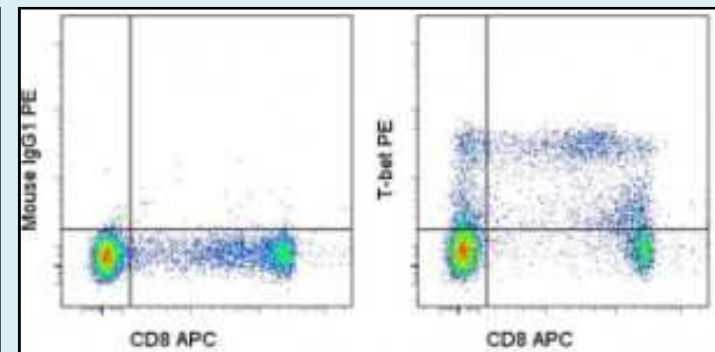
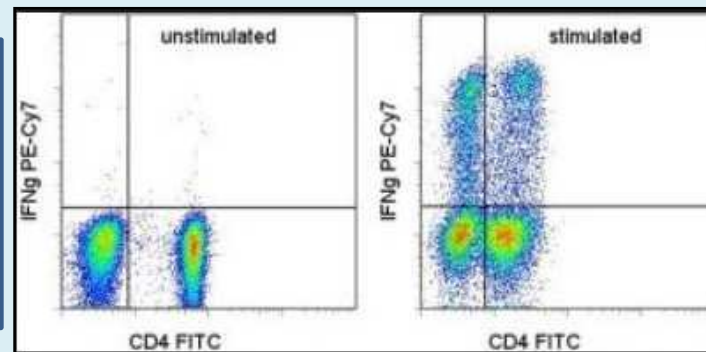
Fijar y permeabilizar las células

Realizar la inmunomarcación (incluyendo el control de isotipo)

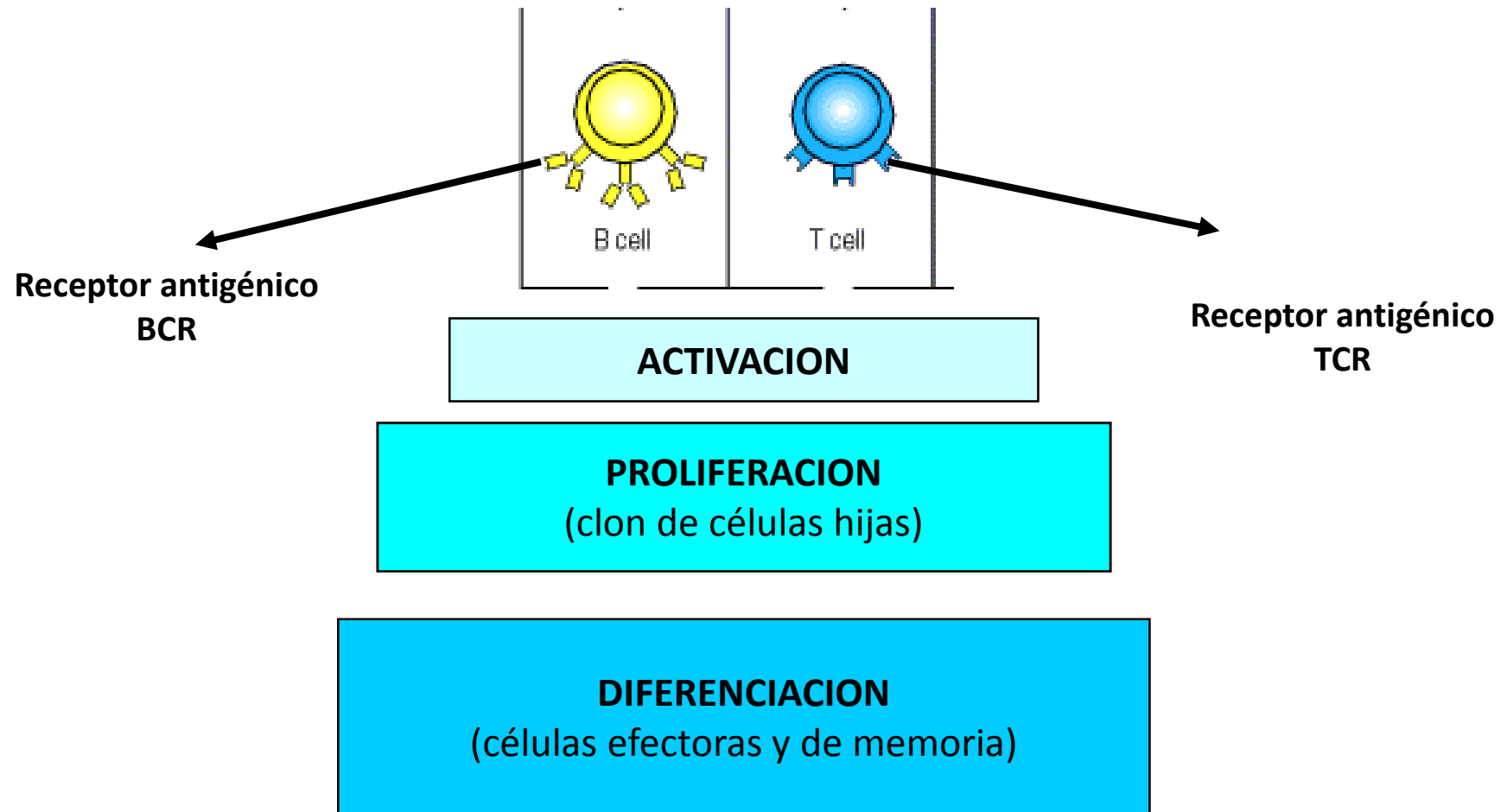
Analizar



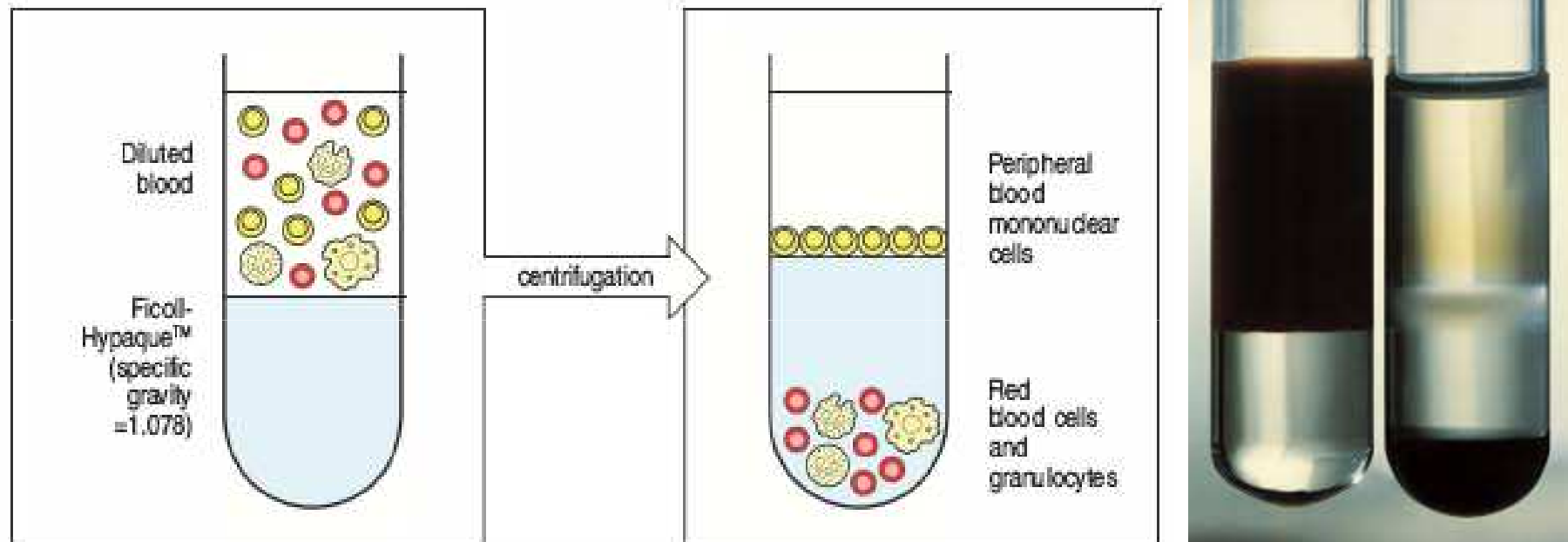
TLR3 en Células NK



¿QUÉ PODEMOS EVALUAR FUNCIONALMENTE?

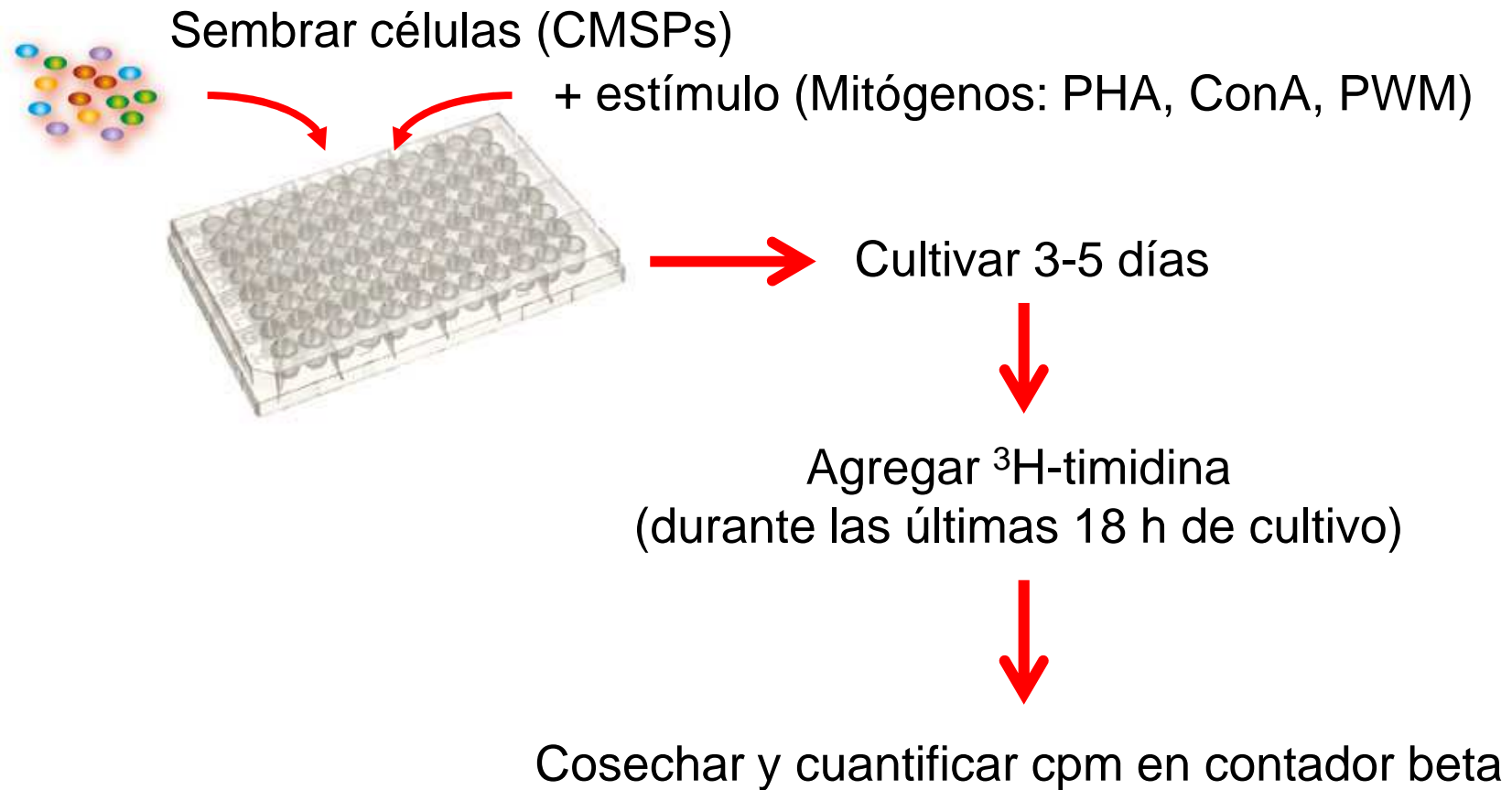


Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

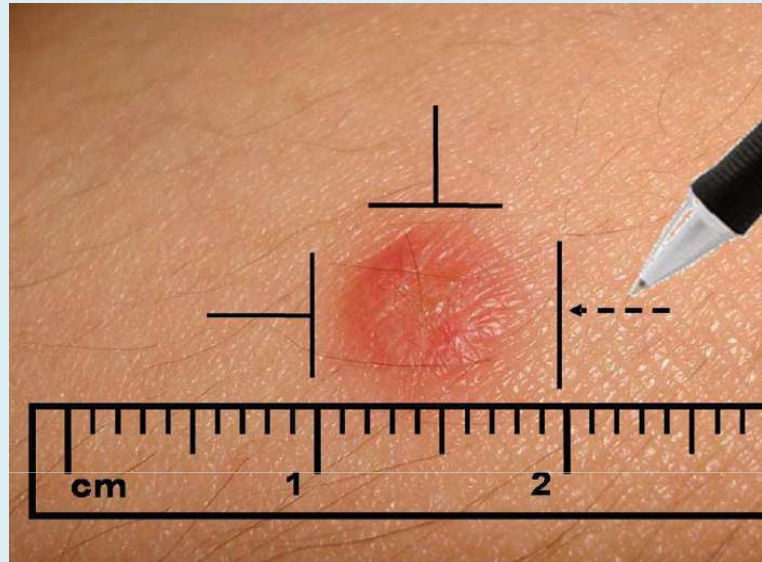


Evaluación de la capacidad proliferativa linfocitaria

Estudio funcional en respuesta a estimulación *in vitro* con mitógenos



Reacción Mantoux – intradermoreacción (PPD)



- ¿PARA QUÉ SIRVE?
- Respuesta a vacuna BCG en niño
 - Evaluación de contacto reciente con TBC en adultos
 - Estudio de la respuesta inmune celular *in vivo* (pacientes sospechados de padecer IDP)
 - Estudio de pacientes con hipersensibilidad

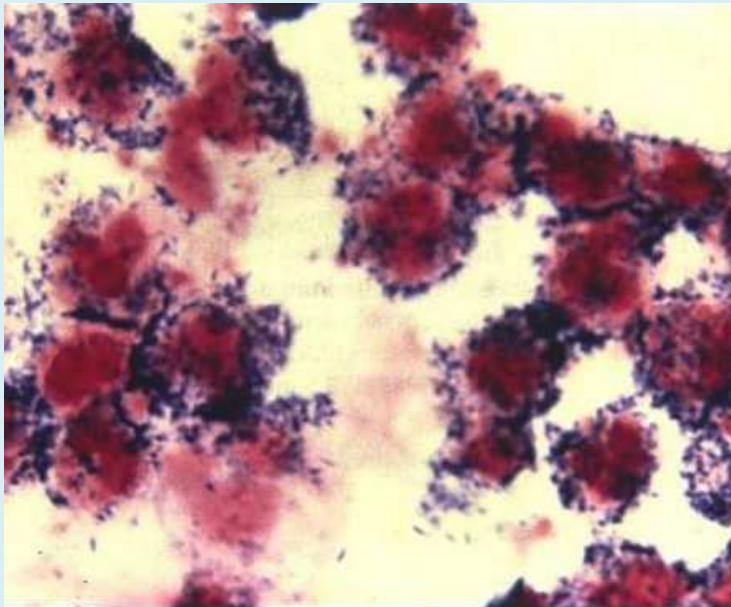
Evaluación de estallido respiratorio

Reducción NBT

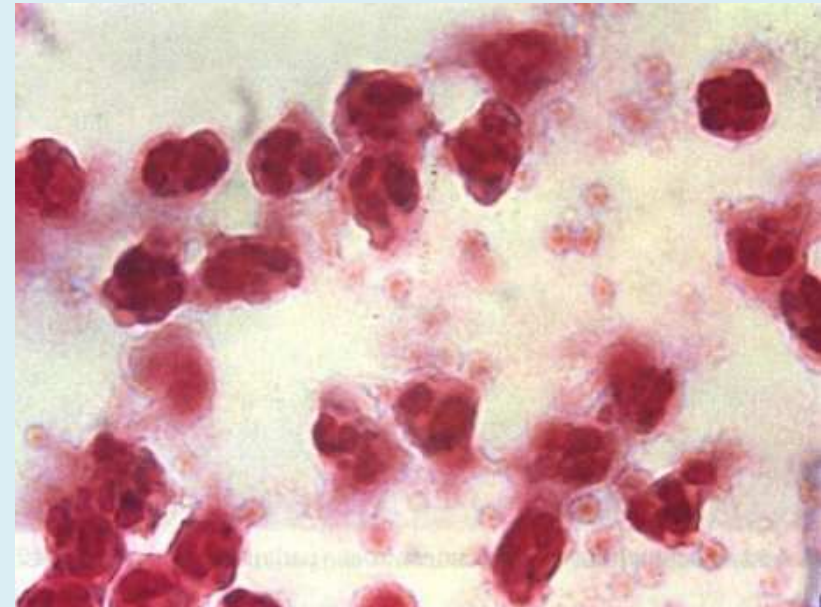


95% azules: SANO
20-80% azules: Enf. Granul. Crónica

Individuo normal



Paciente con EGC



TÉCNICA CUALITATIVA

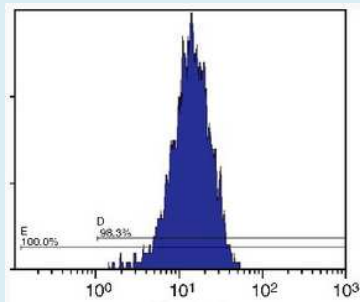
Evaluación de estallido respiratorio

Reducción de la 1,2,3 Dihidrorodamina (DHR)

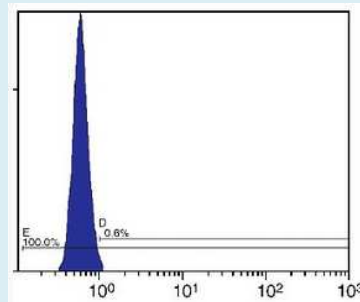


Análisis por citometría de flujo

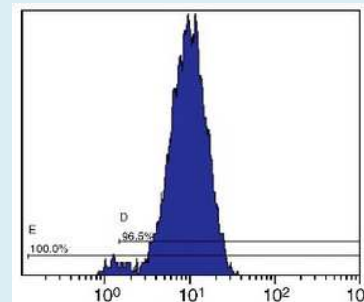
Normal



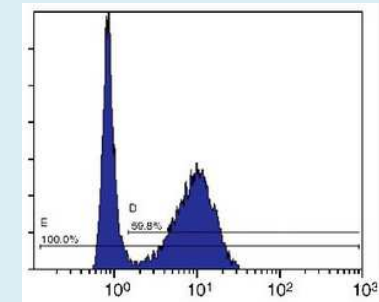
Paciente con EGC



Padre

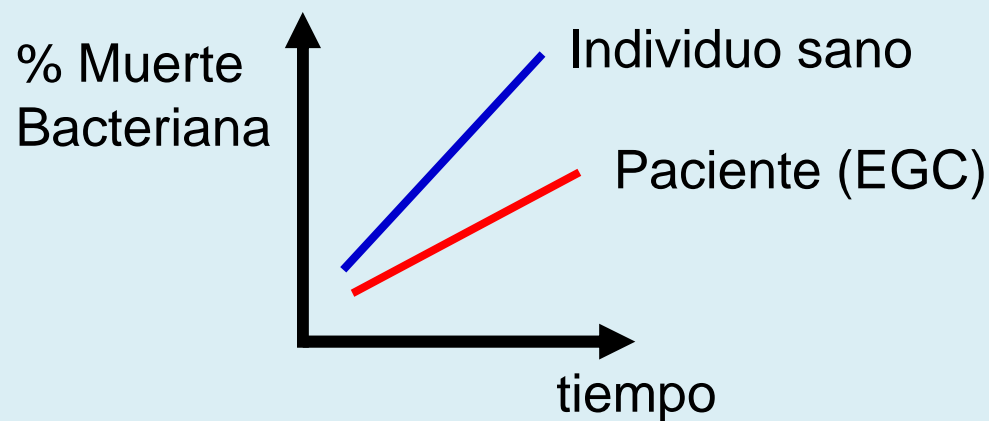
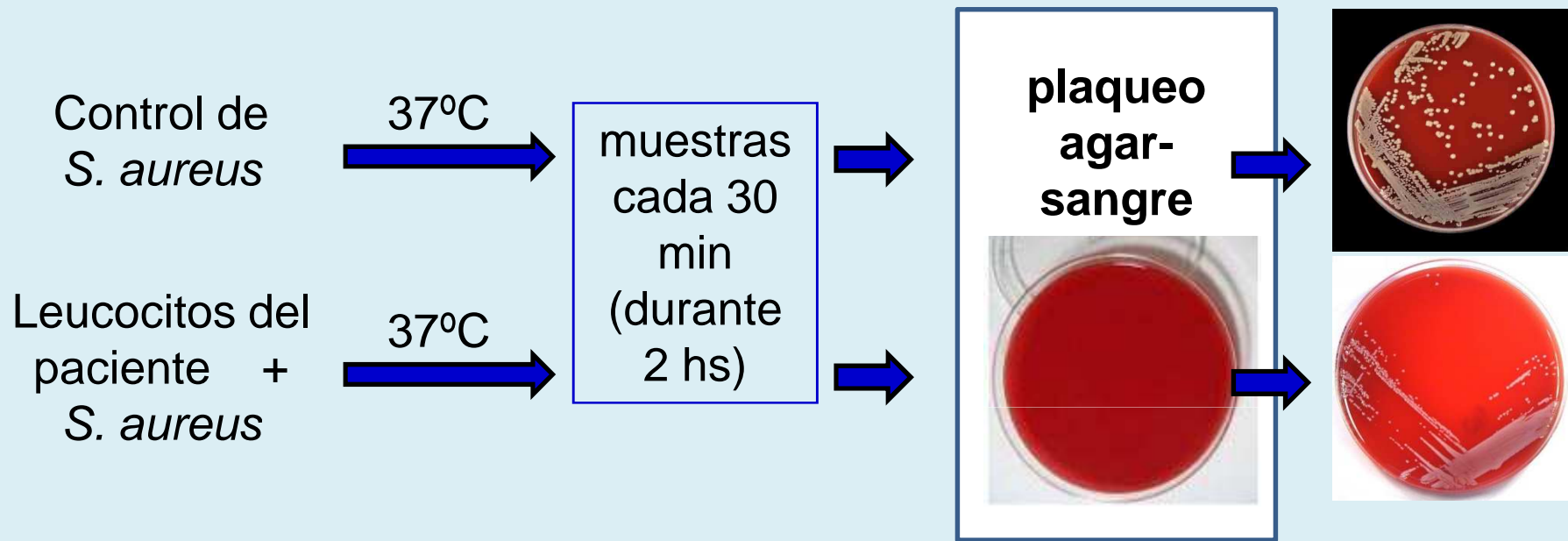


Madre



TÉCNICA CUANTITATIVA

Actividad bactericida mediada por leucocitos

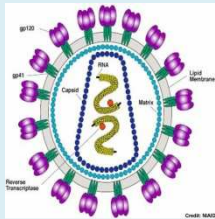


Recuento de colonias a cada tiempo y cálculo del % de muerte bacteriana basado en el control

TÉCNICA CUANTITATIVA

Western Blot

TÉCNICA CUALITATIVA ALTAMENTE ESPECÍFICA QUE PERMITE
DETECTAR Ac O Ag. **EN DIAGNÓSTICO SE EMPLEA EXCLUSIVAMENTE
COMO TÉCNICA CONFIRMATORIA PARA INFECCIÓN POR HIV**



Extracción de
proteínas
SDS-PAGE
Transferencia
a membranas
(reactivo
comercial)



Tiras de
nitrocelulosa
con Ag virales



+ sueros de
pacientes

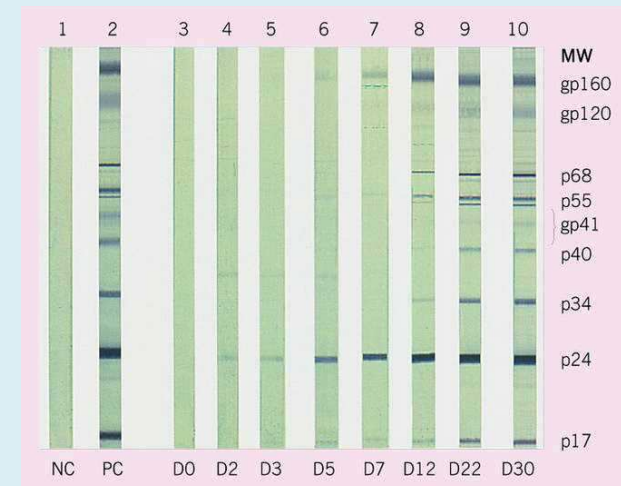


+ anti-IgG
humana
marcada
con enzima

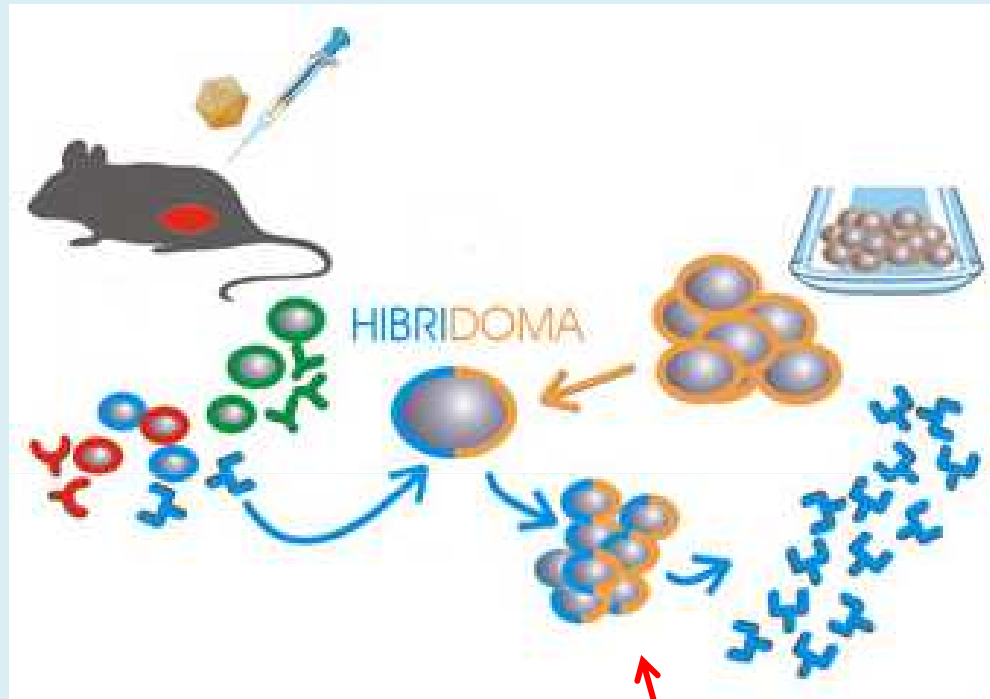


revelado

**DETECCIÓN DE Ac EN PACIENTES
SOSPECHADOS DE TENER INFECCIÓN POR HIV
DE ACUERDO A LOS RESULTADOS DEL ELISA**



Anticuerpos monoclonales



Cultivo
Selección
Clonación
Selección de clones positivos
Scaling up