



Programa de Inmunología. ICBM.
Facultad de Medicina.
Universidad de Chile

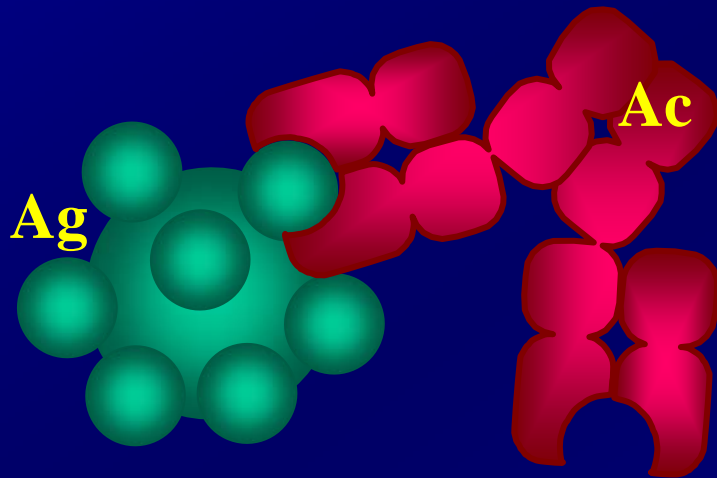
METODOLOGIA INMUNOLOGICA

MARIA CARMEN MOLINA
Q. Farmacéutico, Ph.D.

Junio 2006

Metodología inmunológica

USOS: detección, identificación y diferenciación de diversos microorganismos, biomoléculas (hormonas, metabolitos, anticuerpos), fármacos, etc.



VISUAL

**AGLUTINACION O
PRECIPITACION**

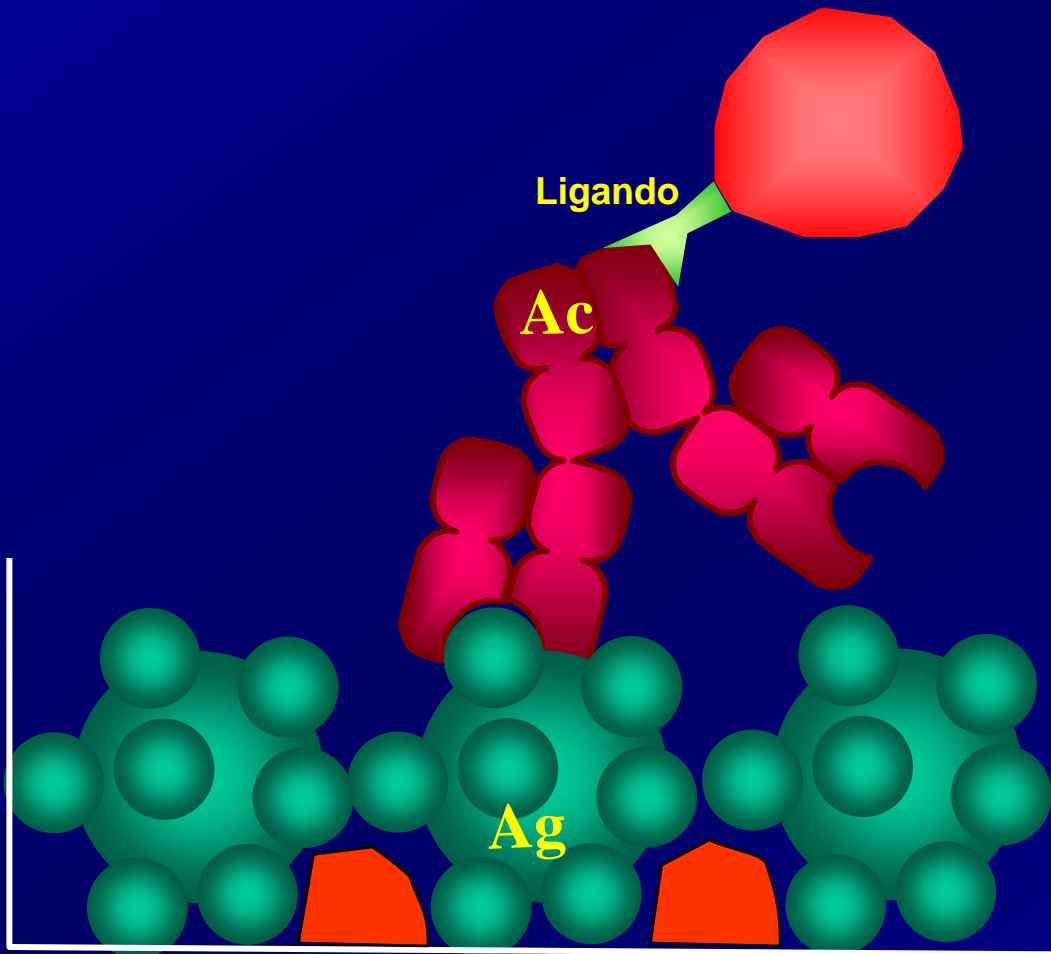
**NO
VISUAL**

**USAR MOLECULAS
MARCADORAS
(Ej. RADIOISOTOPO,
FLUORESCENCIA,
ENZIMA, ETC.)**

REACCION Ac-Ag PRIMARIA *IN VITRO* EN LA QUE SE EMPLEAN INMUNOSONDAS E INSTRUMENTOS (Espectrofotómetro, Lector ELISA, Contador Gamma, ect.)

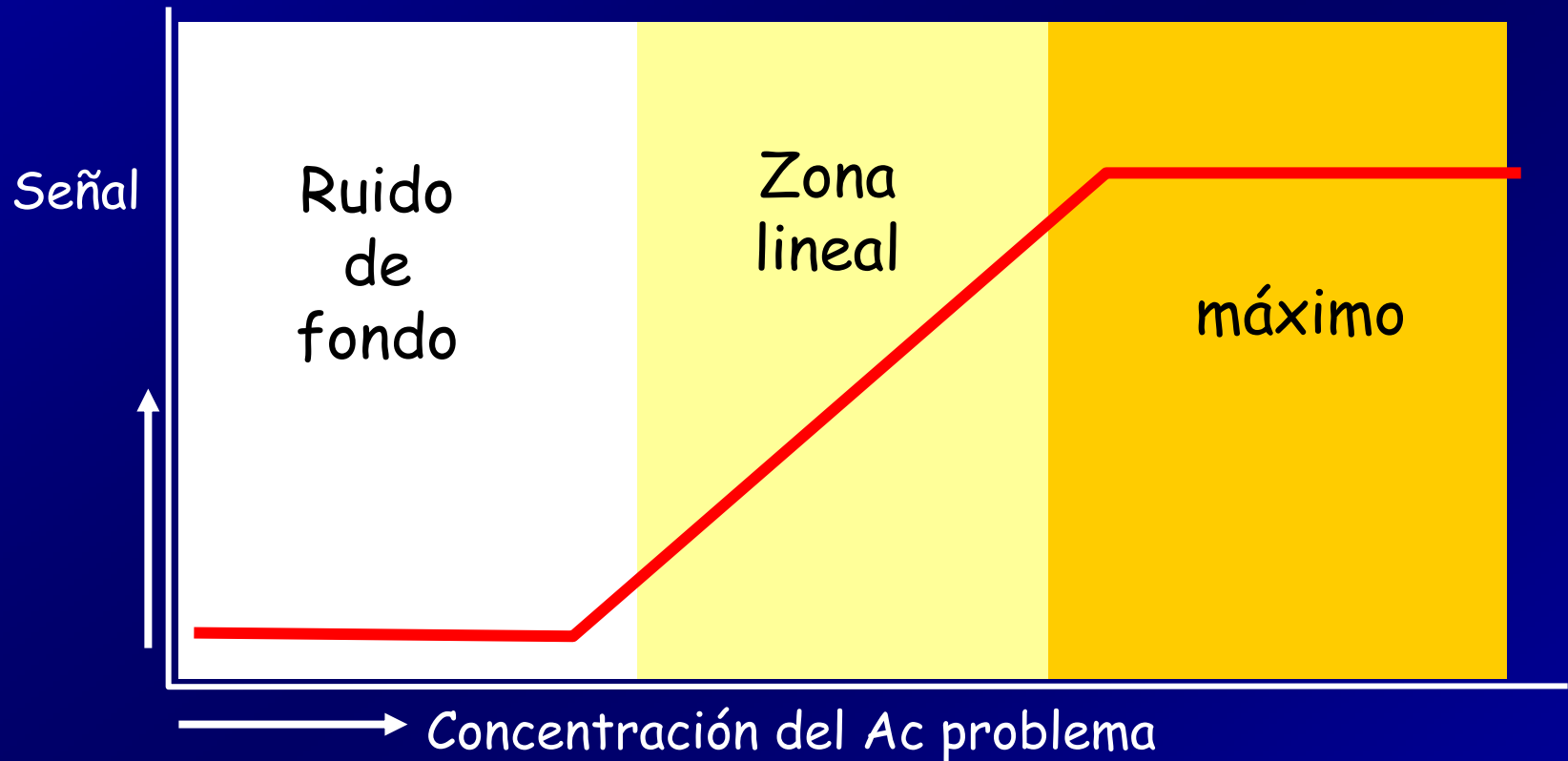
1. Ensayo inmunoenzimatico (ELISA)
2. Ensayo inmunoradiométrico (RIA, IRMA)
3. Inmunoeletrotransferencia
4. Inmunofluorescencia: directa e indirecta

Inmunoanálisis

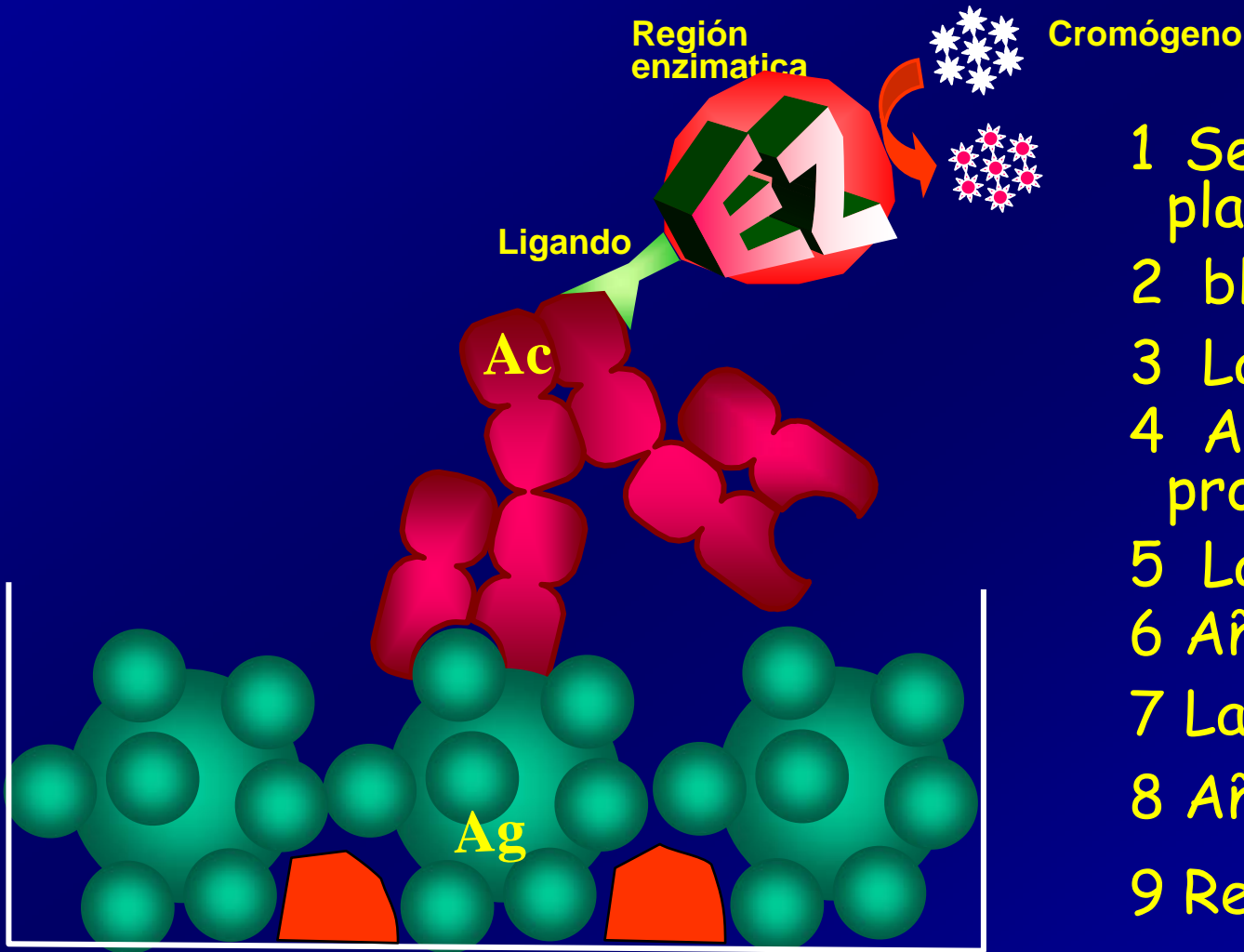


- 1 Sensibilizar la placa con el Ag
- 2 bloqueo
- 3 Lavado
- 4 Añadir el Ac problema
- 5 Lavar
- 6 Añadir el ligando marcado
- 7 Lavado
- 8 medir la cantidad de marcador

Curva de calibración típica

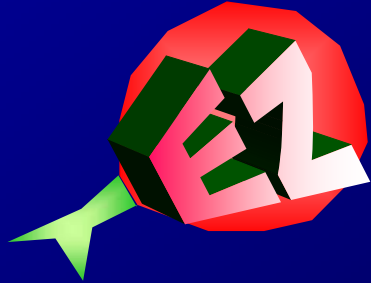


1.- ELISA (prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas)



- 1 Sensibilizar la placa con el Ag
- 2 bloqueo
- 3 Lavado
- 4 Añadir el Ac problema
- 5 Lavar
- 6 Añadir el ligando
- 7 Lavado
- 8 Añadir cromógeno
- 9 Revelar la placa

1.- ELISA (prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas)



Ligando:

- Anticuerpos anti Ig conjugados a enzima
- Anticuerpos anti Ig conjugados a biotina + streptavidina conjugada a enzima



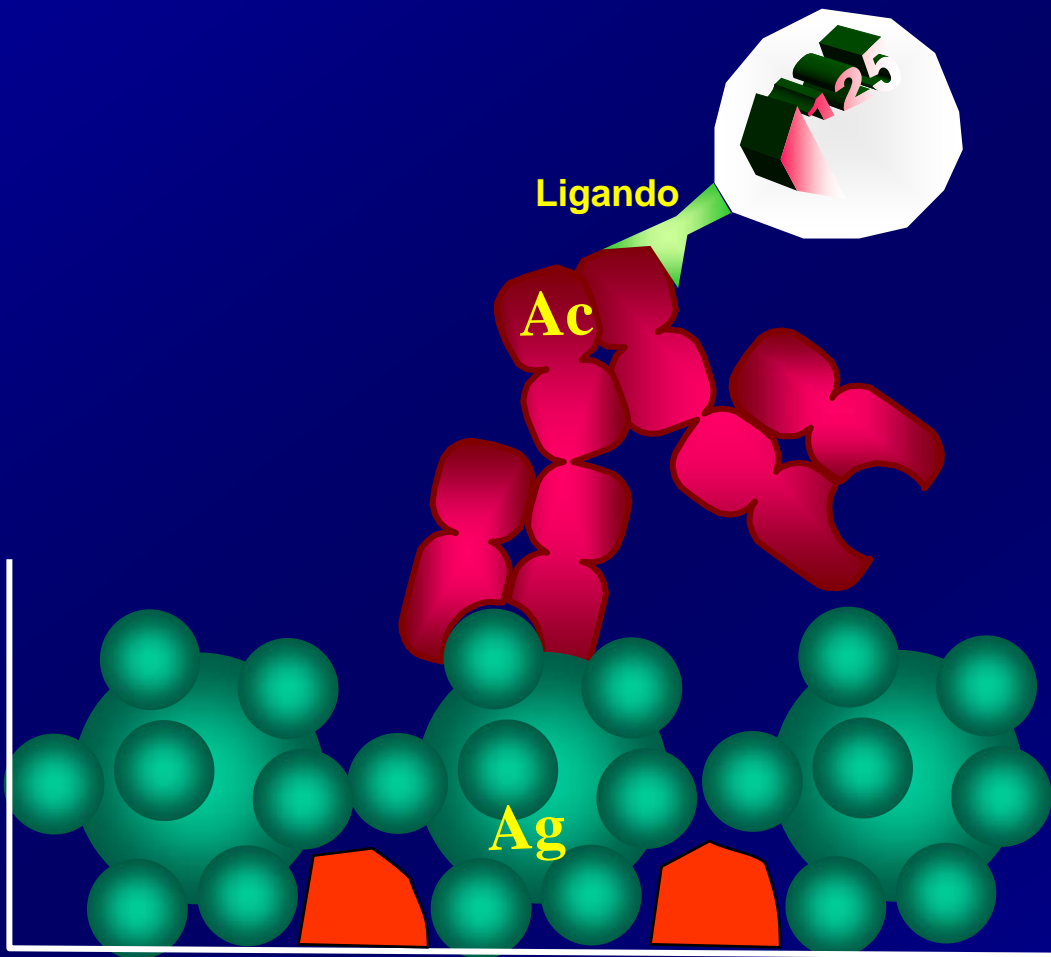
valor recíproco de la dilución del suero

2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024 pos. neg.

sueros
problema



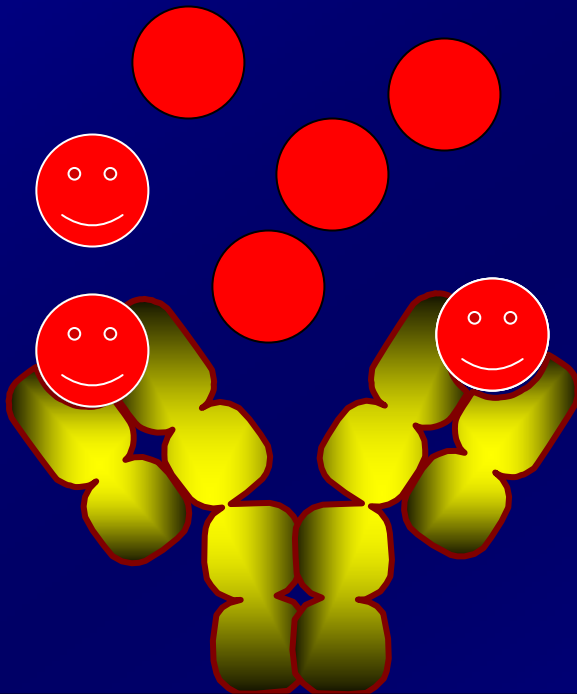
2. IRMA (ensayo inmunoradiométrico)



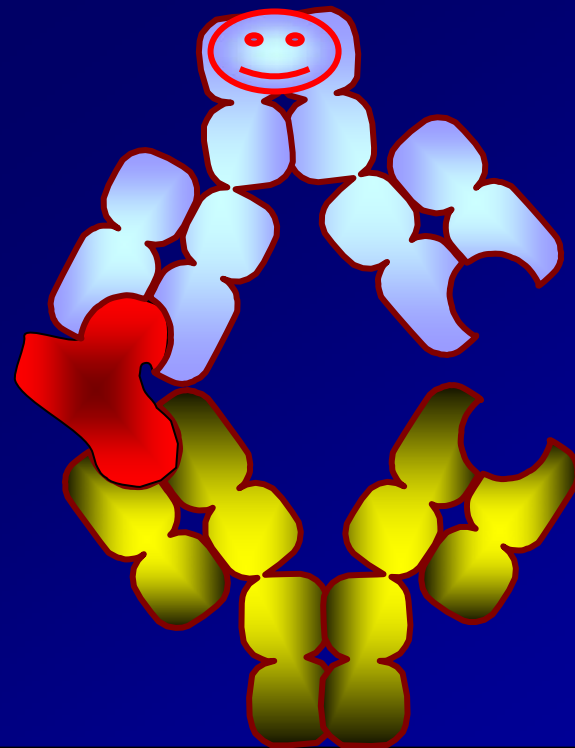
- 1 Sensibilizar la placa con el Ag
- 2 bloqueo
- 3 Lavado
- 4 Añadir el Ac problema
- 5 Lavar
- 6 Añadir el ligando
- 7 Lavado
- 8 Medir radioactividad asociada

Determinación de Ag

Inmunoanálisis competitivo



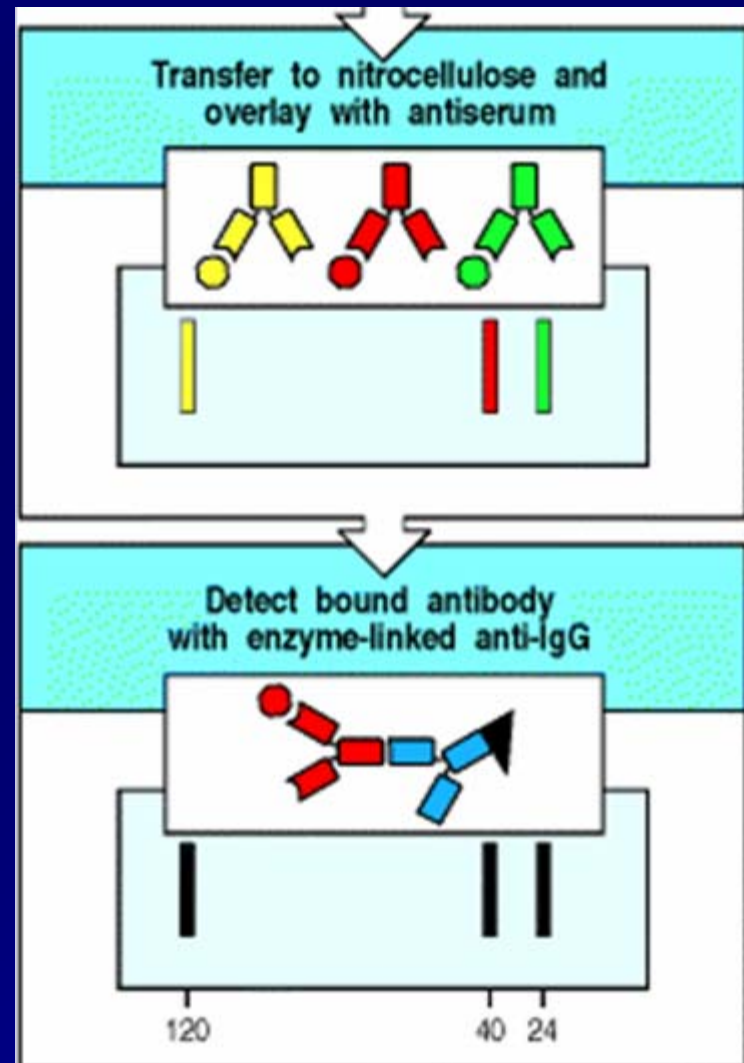
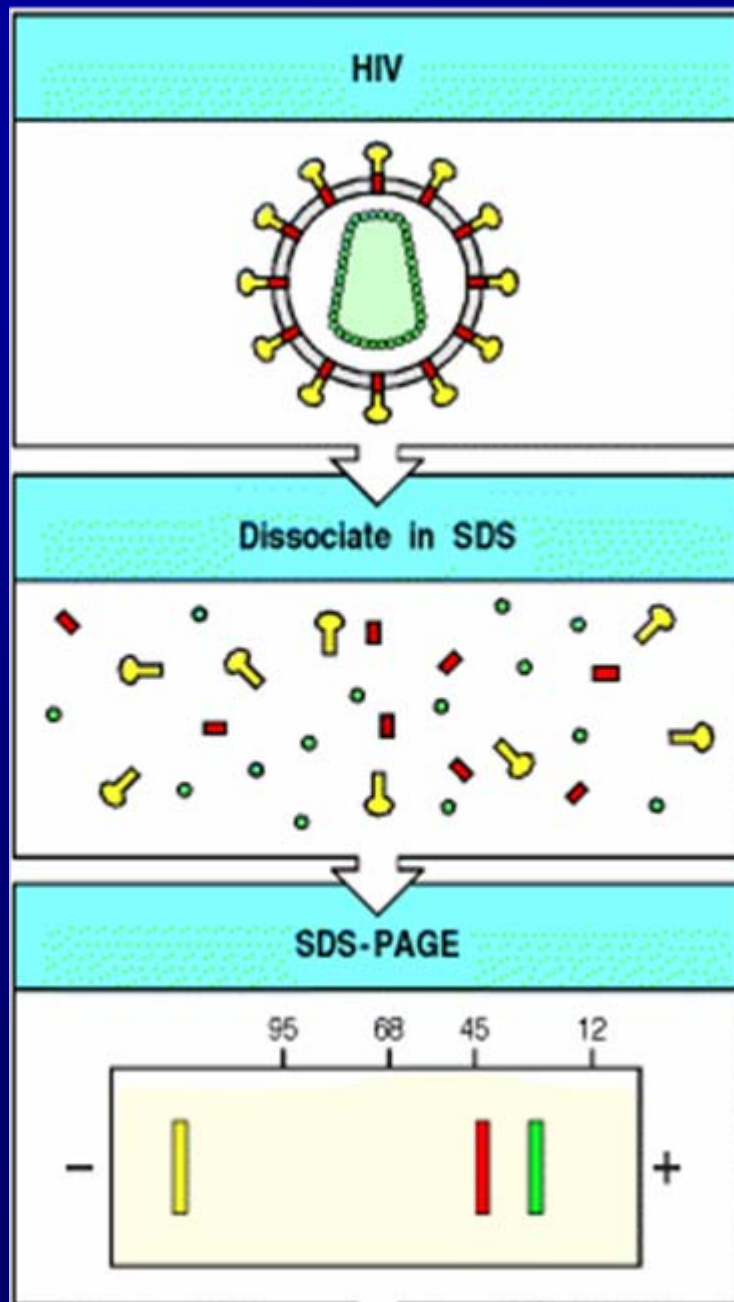
Inmunoanálisis de tipo "sandwich"



INMUNOANALISIS

- ↓ Sensibilidad; 1 - 50 ng/ml
- ↓ Necesidad de instrumento para cuantificar la señal
- ↓ Utiliza inmunosondas (Enzimática, radioactiva)
- ↓ Permite cuantificar Ag o Ac conocidos

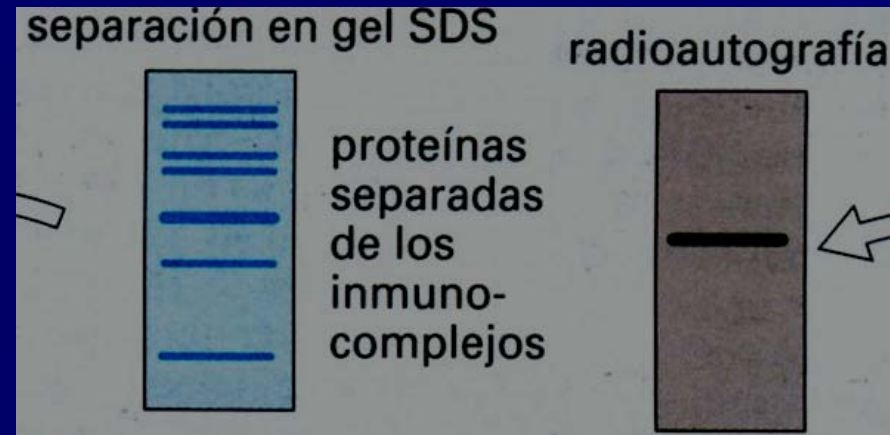
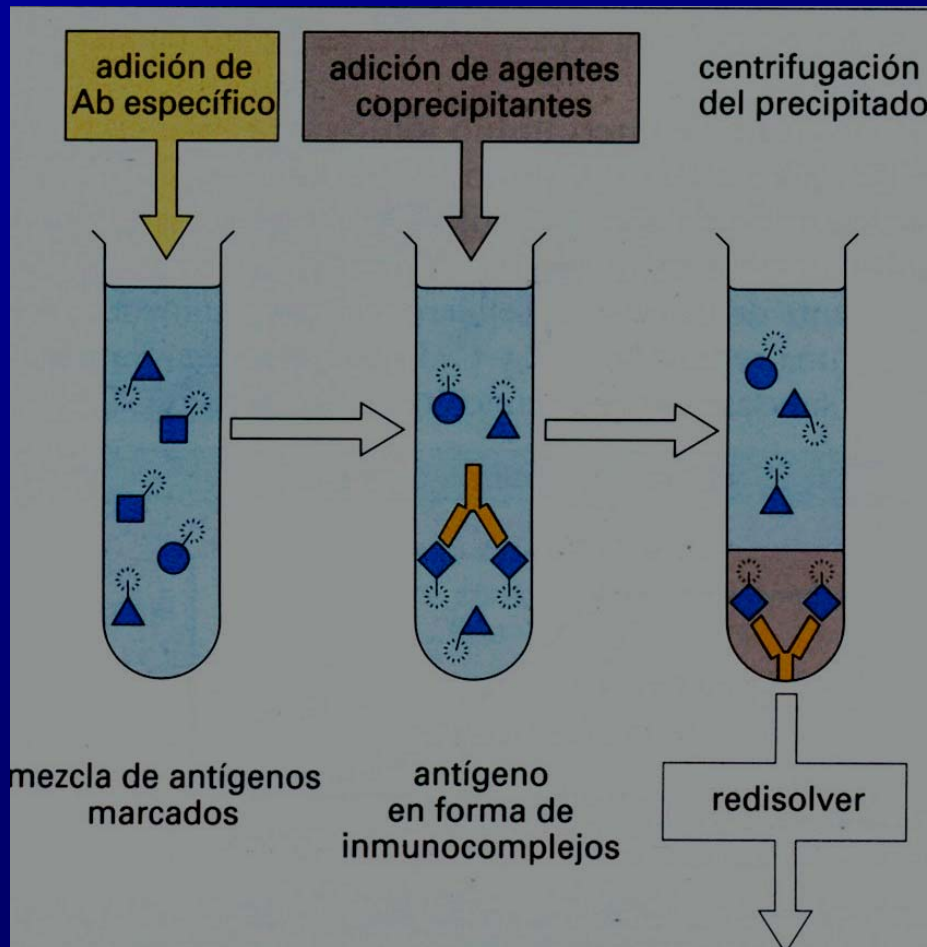
3. Immuno-electrotransferencia



Inmunoelectro transferencia (Immunoblott)

- ↓ Permite detectar e identificar Ag a partir de mezclas complejas
- ↓ Se puede obtener datos de:
 - ↓ Tamaño,
 - ↓ Punto isoeléctrico,
 - ↓ Relación molecular de los Ag

Inmunoprecipitación

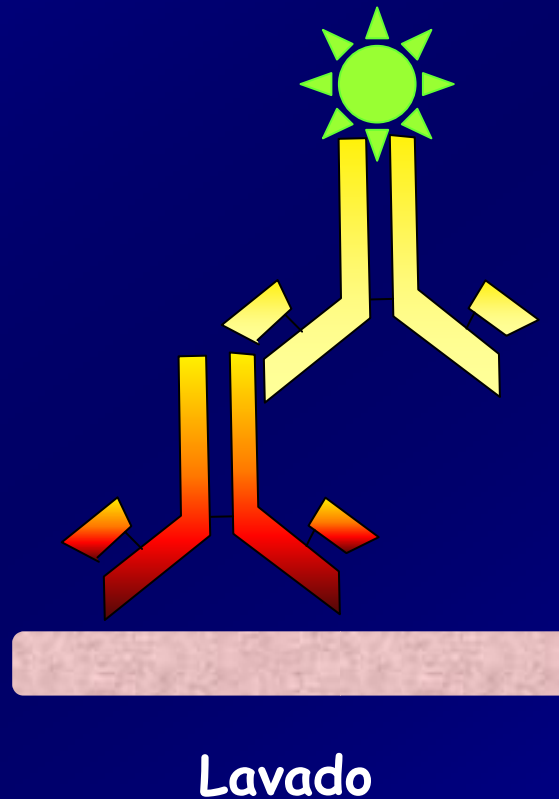


4. Inmunofluorescencia directa e indirecta

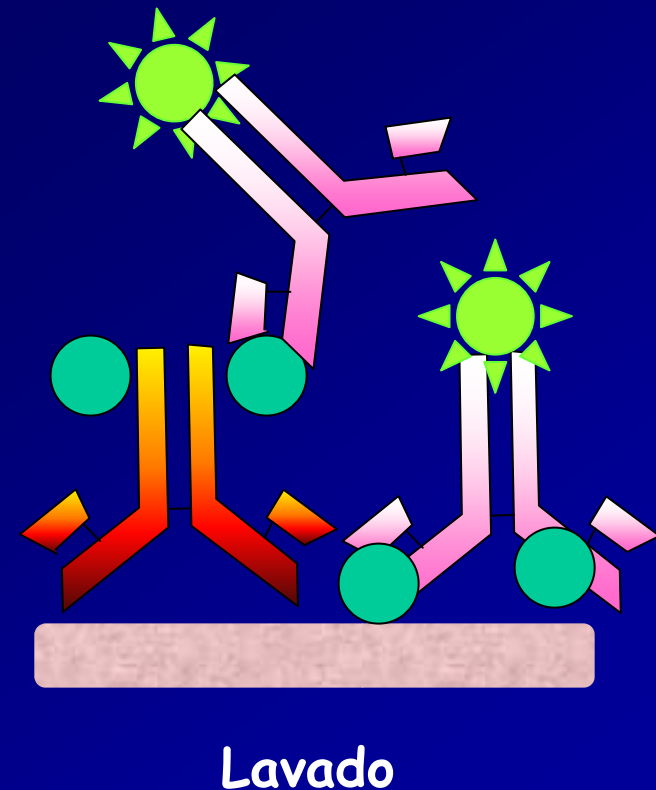
directa



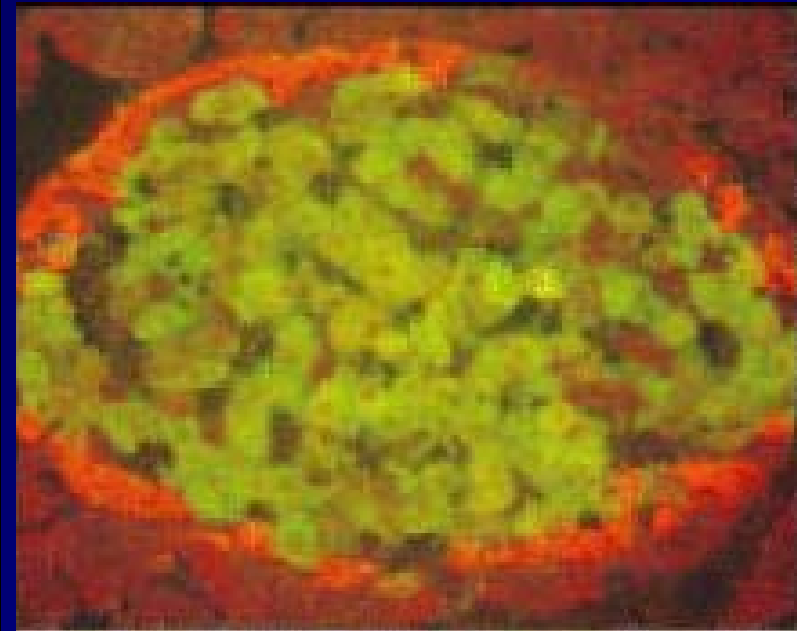
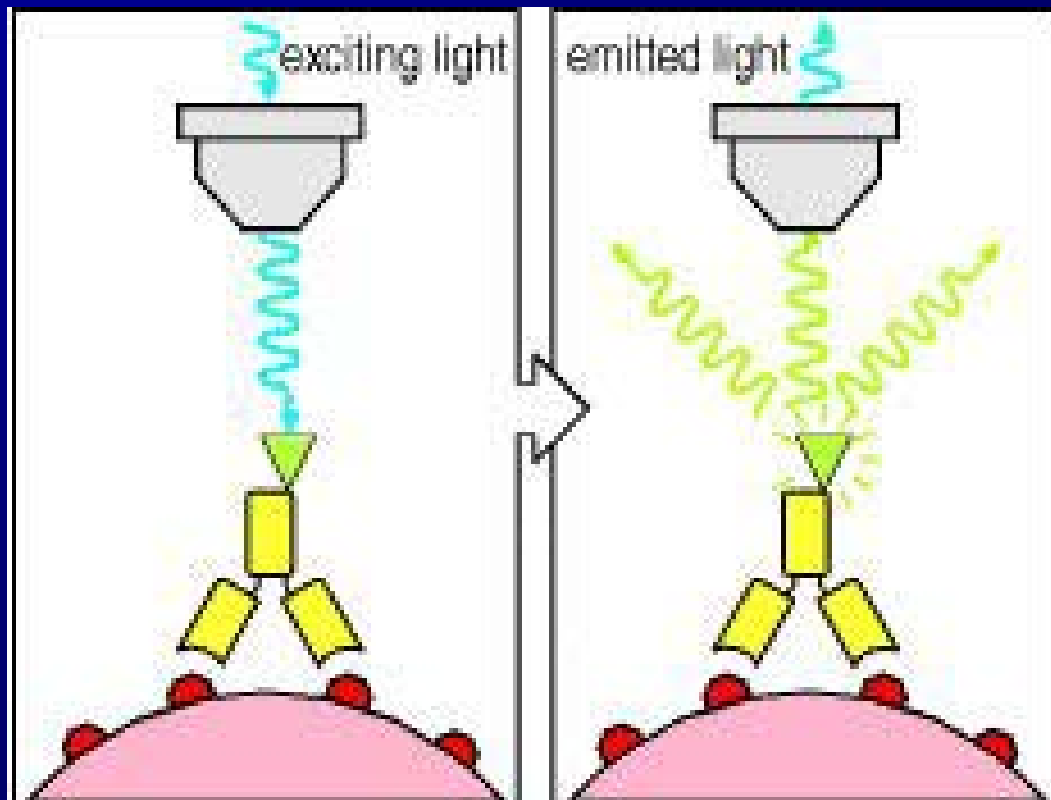
indirecta



Indirecta amplificada por el complemento

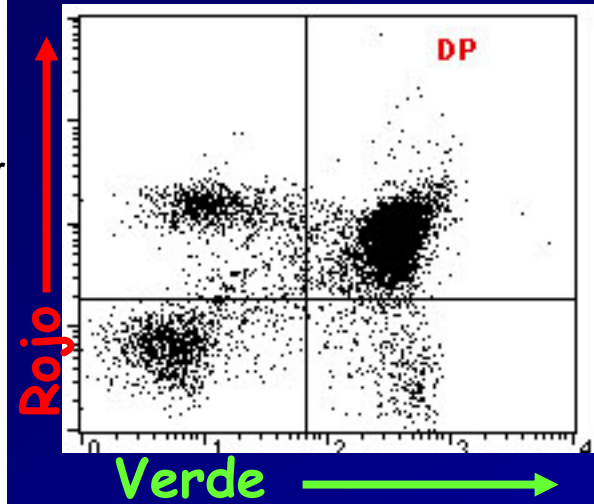
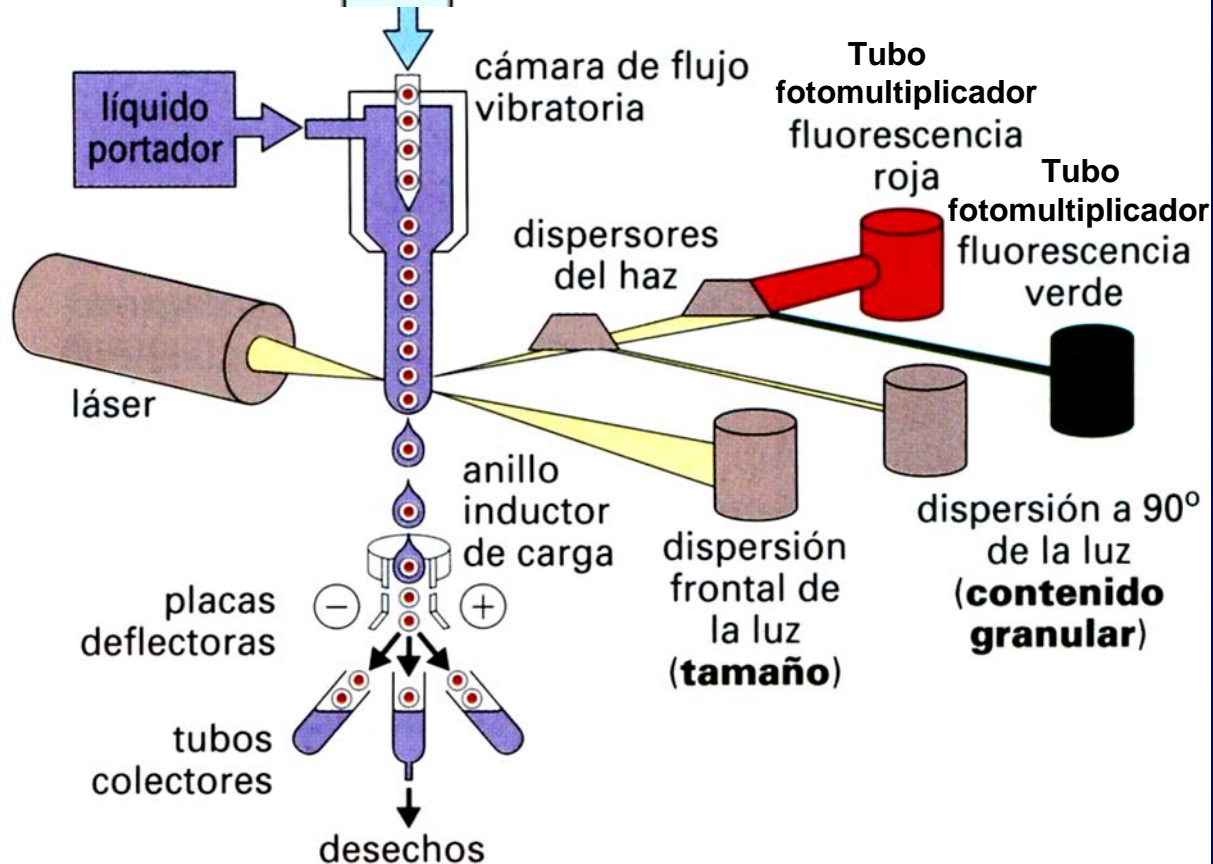
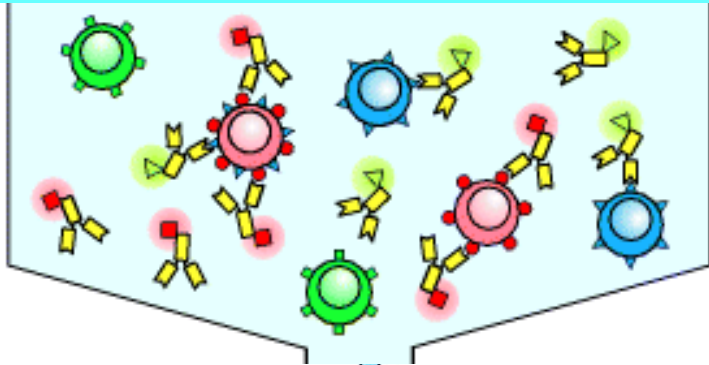


IFI



Citómetro de fluorescencia (FACS)

Mezcla de células marcadas con Ac fluorescentes



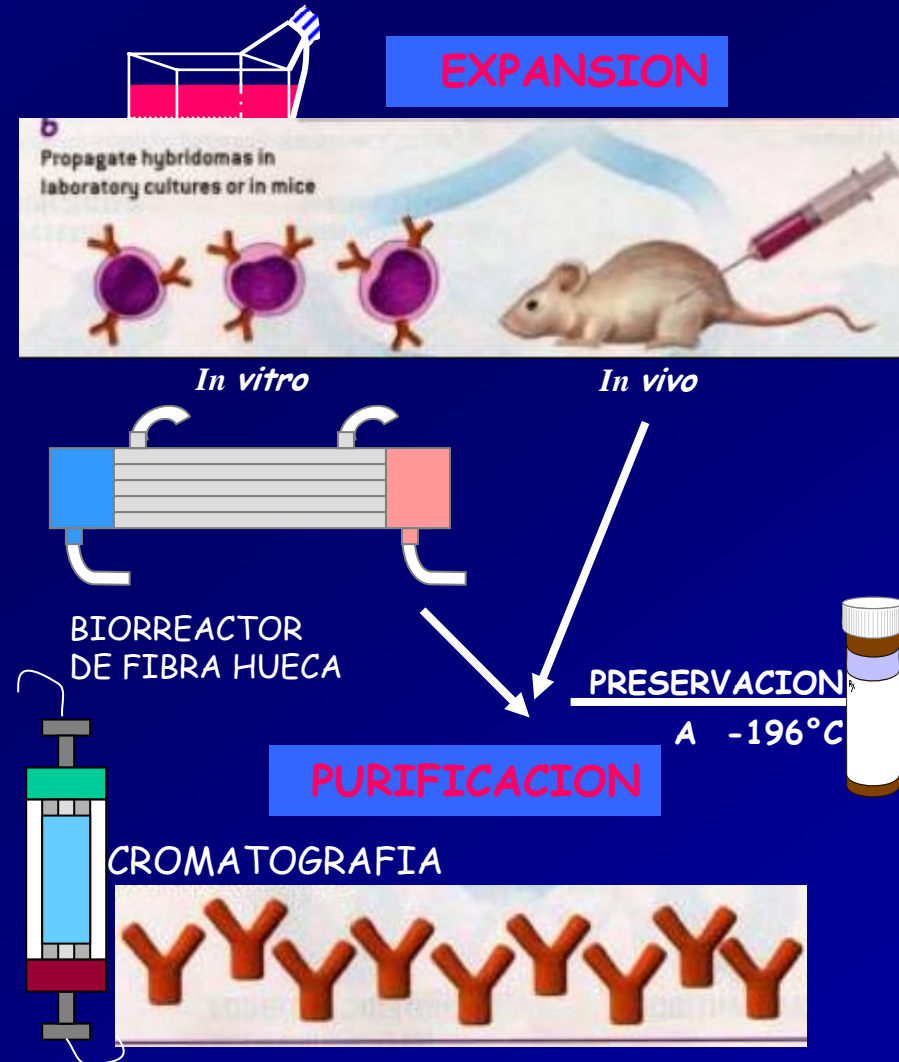
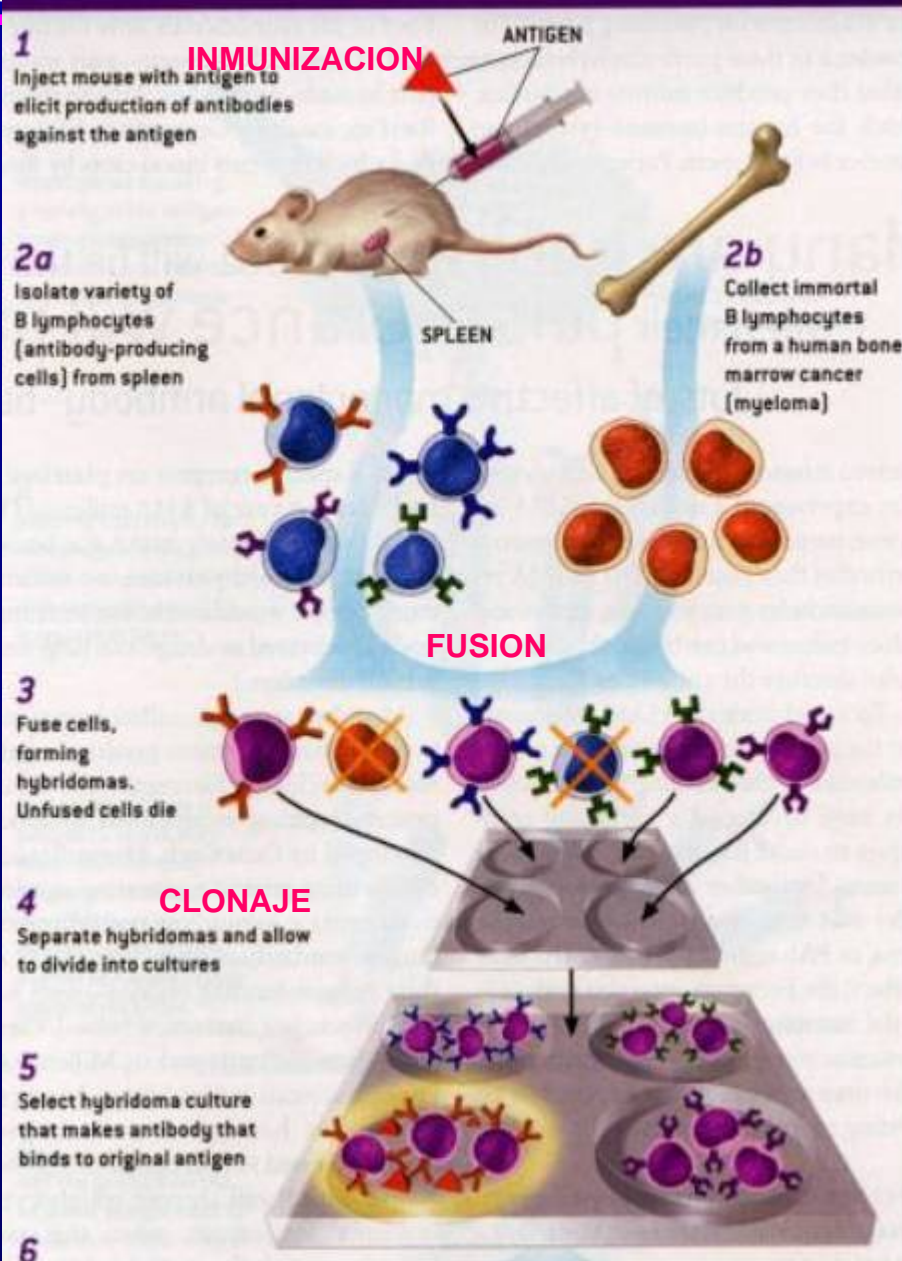
FACS



Inmunofluorescencia

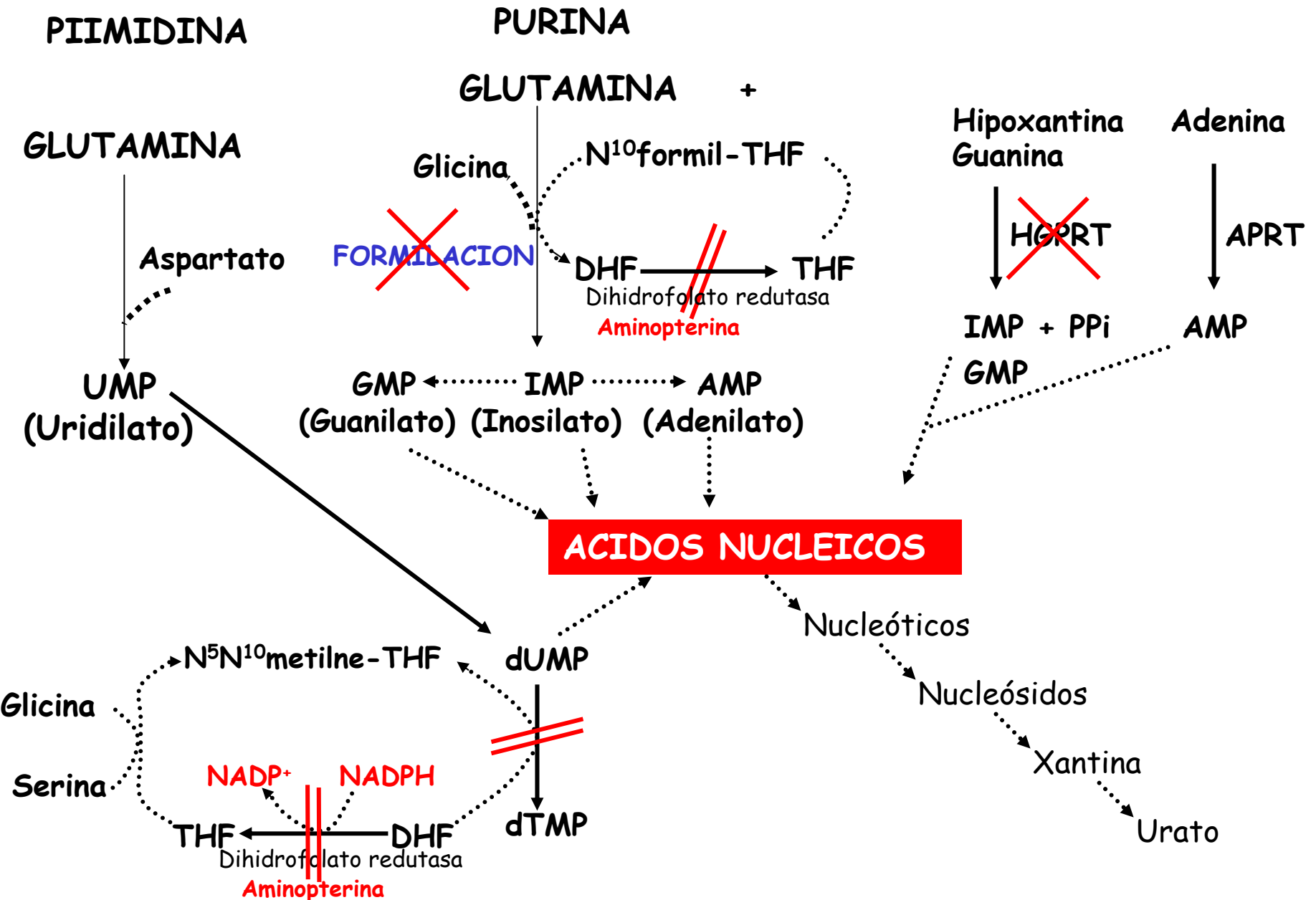
- ↓ Técnica usada para detectar Autoanticuerpos
- ↓ Ac frente a Ag tisulares y celulares sobre tejidos
- ↓ Identificar células en suspensión (células vivas)

REPRESENTACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

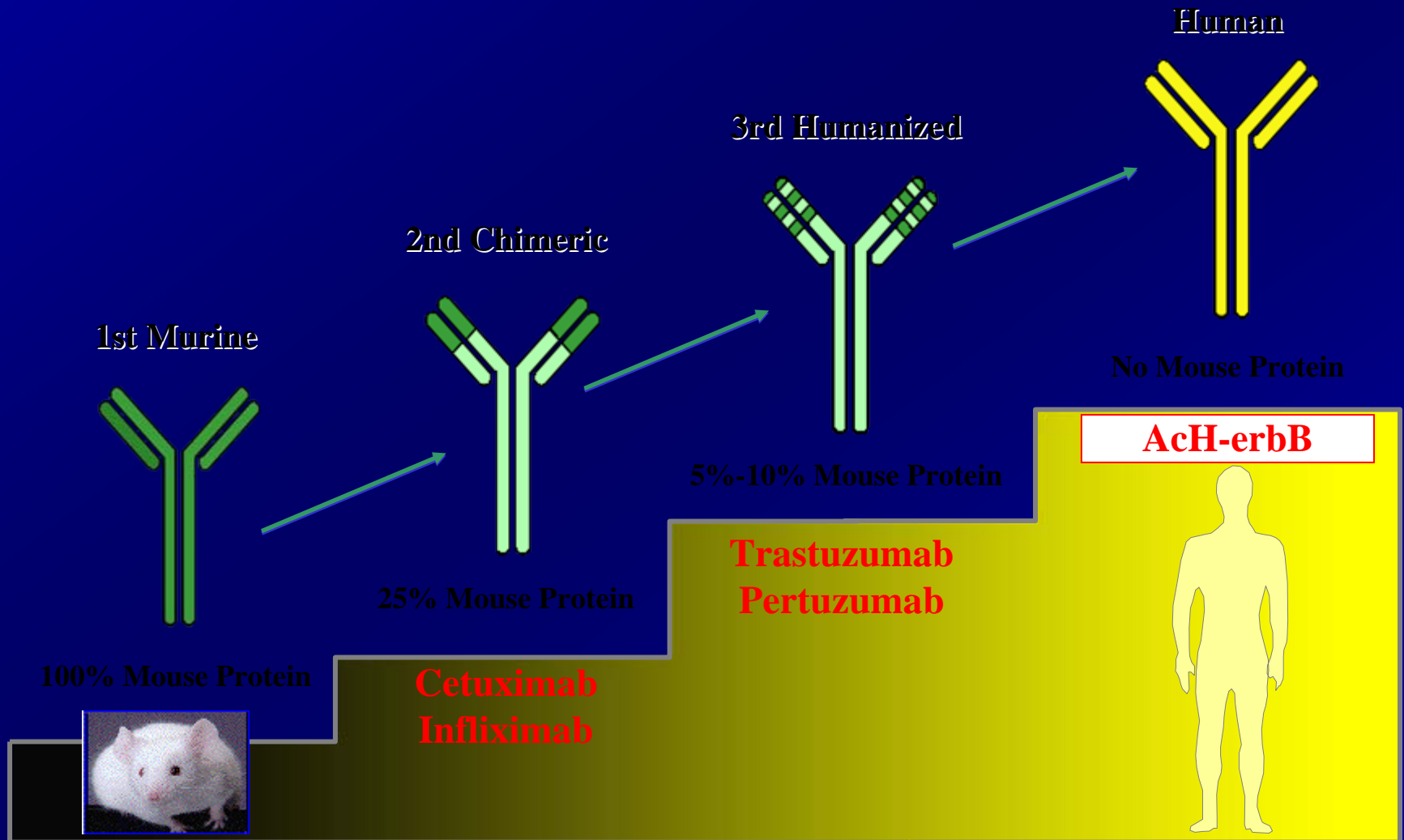


VIA DE NOVO

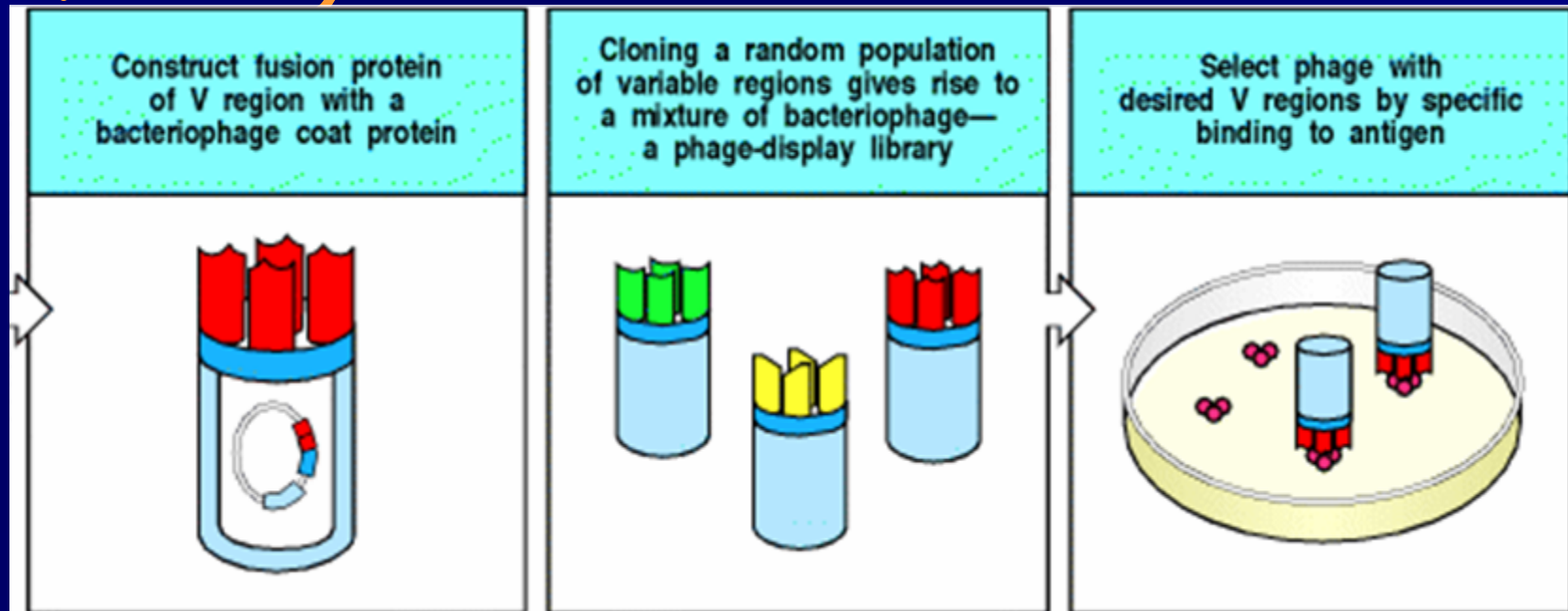
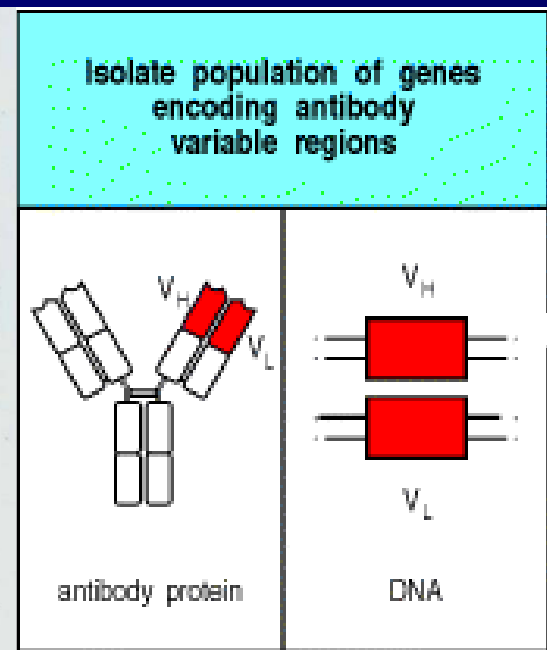
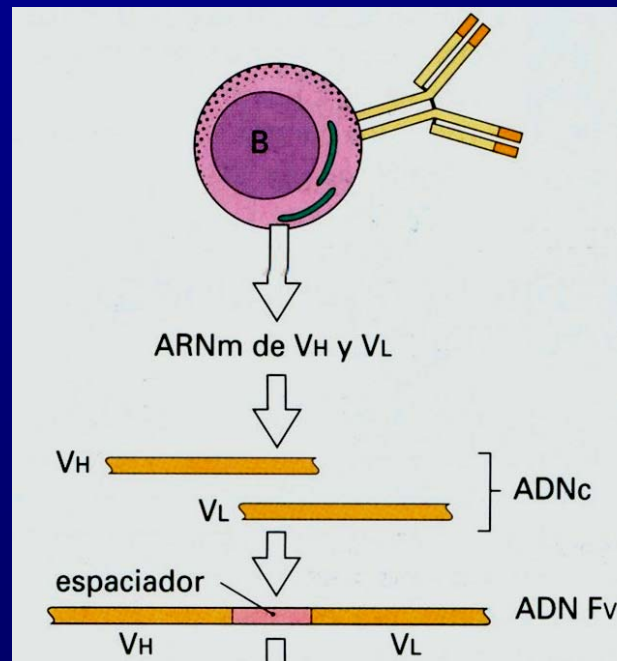
VIA DE RESCATE



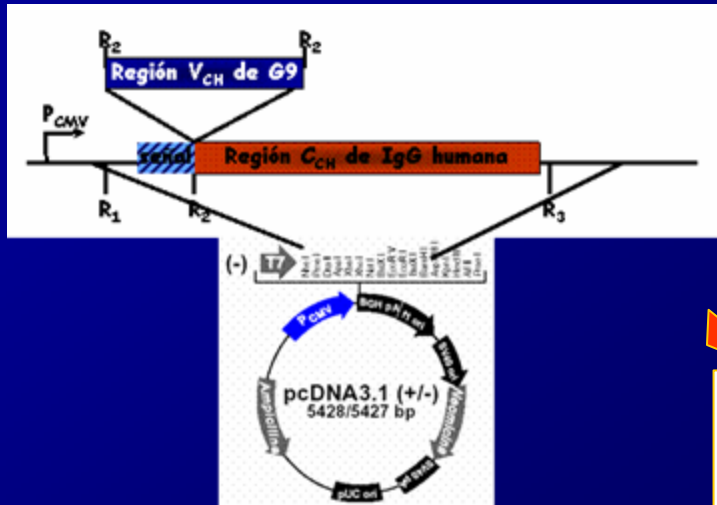
Evolution of Antibodies



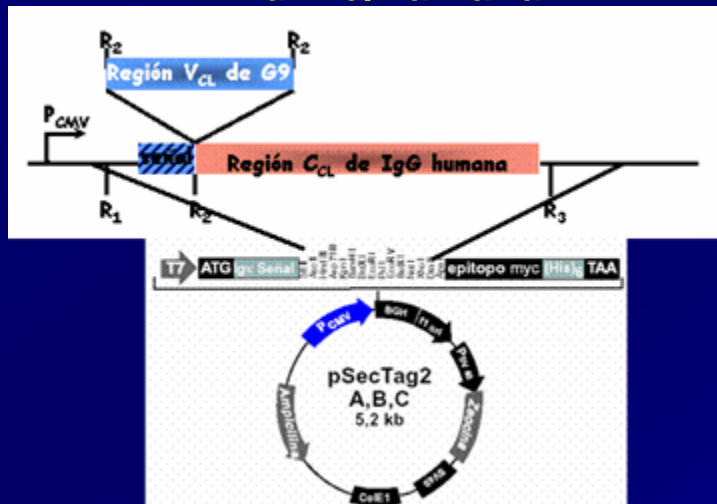
Producción de Ac Fv mediante selección de fagos, (AcMo humanos).



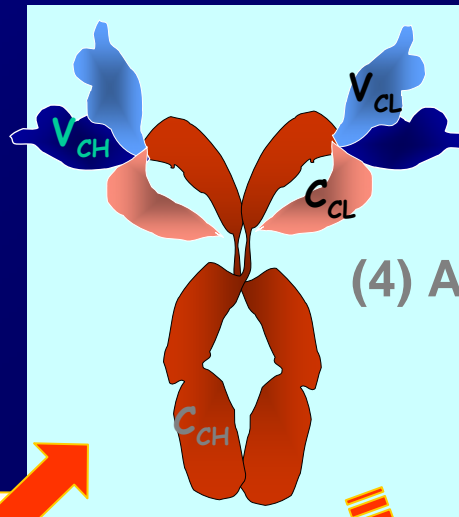
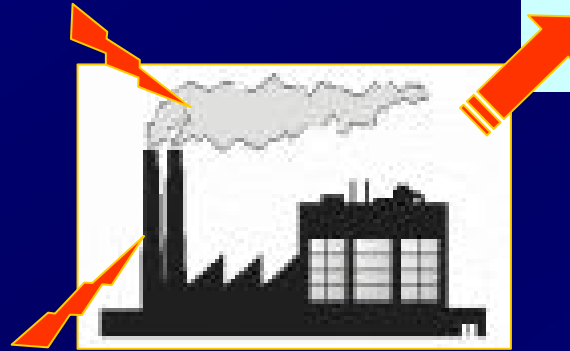
(1) Vector de expresión de CH murina/humana



(2) Vector de expresión de CL murina/humana

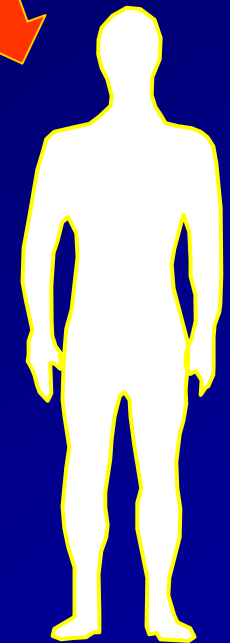


(3) Célula



(4) AcmQ-TNF

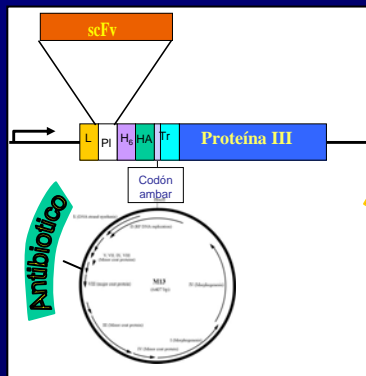
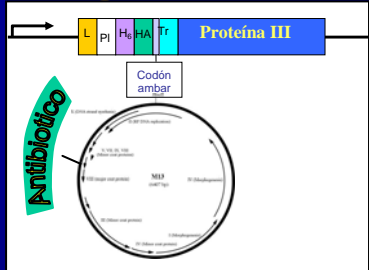
(5) Ensayos clínico



PROYECTO AcmH-ErbB para CG

AÑO 1

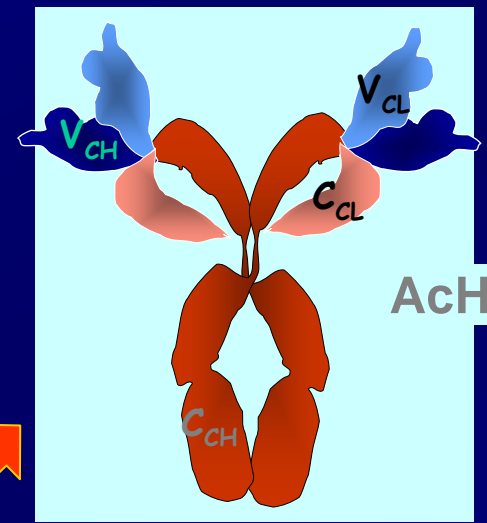
Construir un vector de bacteriófago filamentososo



AÑO 2

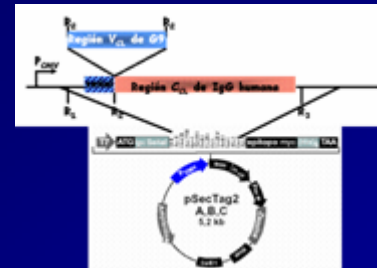
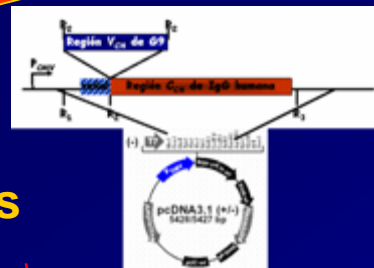
Librería de fagos filamentosos con scFv

AÑO 3 y 4
Células y AcH-erbB



AÑO 4
Ensayos pre-clínicos

AÑO 5 Ensayos clínicos Fase I/II



Producto intermedio de propiedad de U. Chile