



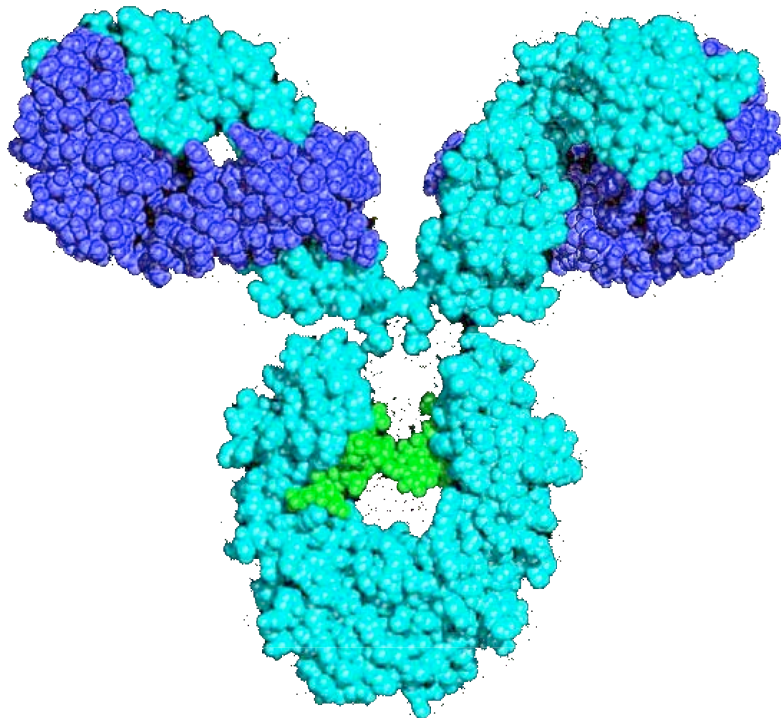
L'Acadèmia

FUNDACIÓ ACADÈMIA DE CIÈNCIES MÈDIQUES
I DE LA SALUT DE CATALUNYA I DE BALEARS



II Jornada Tècnica Societat Catalana d'Immunologia Programa

Barcelona, 26 de novembre 2009



Dijous, 26 de novembre

08:00 –08:10

Registre.

Registre.

08:10 -08:30

Benvinguda i inauguració de la Jornada per part de la Comissió organitzadora i la Junta de la Societat.

**Inauguració
de la Jornada**

08:30 -09:15

“Determinació de monoclonalitat de les Immunoglobulines ”

Dr. Manel Juan. Servei d'Immunologia - CBD.
Hospital Clínic.

Conferència

09:15 –10:15

Presentacions 1: **comunicacions orals** pels tècnics i infermers de laboratori

VIDEOCONFERENCIA:

CReSA: Recerca, patògens i biocontenció

PRESENTACIONS IMMUNOLOGIA VETERINÀRIA

M. Perez Simó. CReSA

Lorena Cordoba. CReSA

Moderadors: Daniel Benitez (HCP)

Raquel Riba (CReSA)

**Comunicacions
Orals**

10:15 –10:45

Descans: Café

Visita de Pòsters.

Mar López. HCP.

Sandra Salgado VALL D'HEBRO.

Olga Bernaus. LIRAD.

Pepi Caro. LIRAD.

Rosa M^a Valle. CReSA.

Mónica Pérez. CReSA.

Visita pòsters

10:45 -11:30

“La Immunoquímica en el Servei d'Immunologia del segle XXI.”

Dr. Cándido Juárez.

Servei d'Immunologia. Hospital de Sant Pau.

Conferència

11:30 -12:30

Presentacions 2: **comunicacions orals** pels tècnics i infermers de laboratori.

BIOBANC: Banc de teixits. Anna Morales.

Lucia Millán. HCP

Carolina España. Fundació clínic.

Rosa Maria Lopez Jimenez. CReSA

Moderadors: Mariona Pascal

Lorena Córdoba

**Comunicacions
orals**

**12:30- 13:30 Descans:
Visita de Pòsters. (Catering opcional)**

Descans

13:30 -14:15 *“Malalties que presenten monoclonalitat de les immunoglobulines”*
Dr. Joan Bladé. Servei d’Hematologia. Hospital Clínic.
Presenta i modera: Dra. MJ Rodrigo

Conferència

14:15 –15:15 TAULA COLOQUI :
Futur professional dels tècnics de Laboratori a Europa.
- José Joaquín Durán. Vicepresident Unió Professional de Tècnics Superiors Sanitaris de Catalunya- FETESS Catalunya.
- Juanjo Barceló Vidal. Secretari General Sindicat Català de Tècnics SICTECS.
- XXX (pendent de confirmar)
ALTRES TEMES D’INTERÉS:
Intercanvis nacionals i europeus
Beques de pràctiques i/o projectes

Taula Coloqui

15:15 –15:30 Cloenda – Pròxima Jornada

1. REVERSE VACCINOLOGY”: IDENTIFICACIÓN DE DETERMINANTES ANTIGÉNICOS EN HAEMOPHILUS PARASUIS PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA

M.Pérez-Simó¹, S.Pina^{1,2}, A.Olvera¹, A.Bensaid¹

¹ Centre de Recerca en Sanitat Animal. (CReSA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona – Edifici CReSA, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. ² Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Barcelona, Spain.

Haemophilus parasuis, es un colonizador del tracto respiratorio de los cerdos que puede provocar la enfermedad de Glässer (caracterizada por poliserositis fibrinosa y meningitis). En los últimos años la prevalencia de esta enfermedad ha aumentado en la industria porcina. Las vacunas disponibles están basadas en bacterinas, las cuales presentan una eficacia parcial al no ofrecer protección cruzada frente a diferentes cepas virulentas.

En el presente estudio se pretendió identificar proteínas immuno-protectoras propias de cepas virulentas con el objetivo de utilizarlas en la elaboración de una vacuna recombinante.

Se secuenció el genoma de la cepa H.parasuis Nagasaki y mediante programas de predicción in silico se seleccionaron genes candidatos, a partir de los cuales se hicieron estudios de genómica comparativa por microarrays. Se identificaron 13 proteínas de membrana, autotransportadores triméricos, presentes en cepas virulentas, y ausentes o altamente divergentes en avirulentas. De las 13 proteínas, 6 presentaron una inmunoreactividad frente a sueros de animales privados de calostro y que habían sufrido una infección subclínica.

Tras producción en forma recombinante, se inmunizaron un grupo de cerdos privados de calostro con un pool de dichas proteínas con adyuvante de Freund, y posteriormente se desafiaron con la cepa Nagasaki. Se mostró una fuerte inmunogenicidad de estas proteínas asociada a una inmunidad parcial de los animales vacunados.

2. SECUENCIACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS EUROPEO H1N1 DE INFLUENZA PORCINA Y DEL NUEVO A(H1N1)V HUMANO EN CERDOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE: EVIDENCIA DE PROTECCIÓN CRUZADA.

L. Córdoba; N. Busquets; J. Segalés; T. Mussá; E. Crisci; M. Muñoz; M. Pérez; J.I. Nuñez; F.X. Abad; L. Fraile; S. Pina; N. Majó; A. Bensaid; M. Domingo; M. Montoya
Centre de Recerca en Sanitat Animal.

Desde abril de 2009, un nuevo virus de la gripe perteneciente al subtipo h1n1 (a(h1n1)v) y de origen porcino, ha causado brotes de infección en todo el mundo dando lugar a la declaración de pandemia por la oms. La aparición de este nuevo virus supone una amenaza global a nivel humano, y se sospecha que el cerdo podría llegar a actuar como reservorio de la infección. Además, la importancia del estudio y caracterización del virus en el cerdo es debida a que éste contiene receptores tanto para la gripe humana como para la aviar. Es por ello que el cerdo se considera un vehículo de recombinación de los virus (“mixing vessel”) que puede llevar a nuevas reordenaciones del material genético dando lugar a un nuevo virus con tropismo para los humanos.

El objetivo de este trabajo ha sido investigar en un modelo experimental la posible existencia de una inmunidad protectora en cerdos producida por una infección previa con el virus porcino circulante

a/swine/spain/53207/2004/h1n1 (v1) frente a un desafío posterior con el actual virus humano cepa a/catalonia/63/2009/ h1n1 (v2).

Para ello, se han usado 22 cerdos privados de calostro, divididos en 4 grupos (c/c, controles; v1/c, inoculados con v1; c/v2, inoculados con v2 y v1/v2 que se inocularon con v1 y posteriormente con v2 con tres semanas de diferencia). Se han realizado entre otras técnicas, la secuenciación completa del genoma del v2 y del v2 aislado de un cerdo del grupo c/v2 y la cuantificación de rna viral mediante rt-pcr cuantitativa con cebadores diseñados específicamente a partir de hisopo nasal, para la detección de la excreción viral de los animales así como la replicación viral a nivel del tracto respiratorio inferior (pulmón y líquido bronco-alveolar). Los resultados de cuantificación de la excreción viral y de la secuenciación de los diferentes virus avalan la protección cruzada encontrada.

3. DETERMINACIÓ DE IgE ESPECÍFICA PER MICROARRAYS EN PACIENTS AL·LÈRGICS

Lucia Millán; Mariona Pascal; Jordi Milà; Ramon Vilella

ImmunoCAP ISAC és un test in vitro per la determinació semiquantitativa d'anticossos IgE específics en sèrum o plasma humà en pacients al·lèrgics. És un immunoassaig de fase sòlida. Consta de 103 components al·lèrgics immobilitzats per triplicat en un chip. El sèrum o plasma del pacient és incubat sobre el chip per a la detecció d'anticossos IgE específics contra els components al·lèrgics. La unió dels anticossos IgE específics als components al·lèrgics immobilitzats és detectada mitjançant l'addició d'un anticòs anti-IgE humà marcat amb fluorescència. El procediment segueix amb l'adquisició de la imatge mitjançant un escàner de microarrays, amb la qual es pot detectar la fluorescència sobre els components al·lèrgics en els quals l'anticòs de detecció ha reconegut la presència d'anticòs IgE específic procedent del sèrum o plasma del pacient. Aquesta fluorescència és expressada mitjançant Unitats d'Estandarització ISAC (ISU) i els resultats són analitzats mitjançant el propi software d'anàlisi de l'ImmunoCAP ISAC (MIA-Microarray Image Analysis Software). El seu ús en el laboratori està especialment indicat per a l'estudi dels pacients al·lèrgics polisensibilitzats donat que permet la determinació simultània d'anticossos IgE específics contra 103 components al·lèrgics utilitzant un reduït volum de mostra de sèrum o plasma del pacient (25 microlitres), mentre que mitjançant els mètodes convencionals aquests haurien de ser determinats de forma individual.

4. GENERACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÉNICAS EN CONDICIONES GMP

Carolina España, Julián Panés, Elena Ricart, Daniel Benítez

Las células dendríticas participan en la respuesta inmune. Son potentes presentadoras de antígeno y juegan un papel muy importante en la iniciación de la respuesta inmune activando linfocitos T. Se han identificado dos estados de diferenciación: una forma inmadura, antes de entrar en contacto con el antígeno y la otra madura, después de entrar en contacto con éste.

El objetivo es utilizar las propias células dendríticas de pacientes con una enfermedad autoinmune como es la enfermedad de Crohn y conseguir que presenten un fenotipo tolerogénico, es decir “semi-maduro”, para volver a inyectarlas. Las células adquieren, además, una capacidad reguladora sobre los linfocitos T y por lo tanto no se producirá una respuesta autoinmune a un antígeno desconocido. Todo este proceso debe ser en condiciones GMP (good manufacturing practise) ya que las células volverán a ser inyectadas en el paciente.

La técnica consiste en:

A partir de sangre periférica del paciente se realiza un ficoll, una técnica de separación por gradiente de densidad. Del ficoll se obtienen diferentes capas, en nuestro caso nos interesa el anillo blanco donde están las células mononucleares. Después de varios lavados para eliminar plaquetas y el ficoll, se cuentan las células y se resuspenden en medio de cultivo en función de la cantidad obtenida. Se siembran en frascos y se incuban a 37°C durante 2 horas para que los monocitos se adhieran a la placa.

A las 2 horas se lava la placa y se recogen las células no adheridas, principalmente linfocitos. Se vuelve a poner medio de cultivo y se añaden factores de crecimiento para estimular la diferenciación de los monocitos a células dendríticas.

Al tercer día lo que se obtiene son células dendríticas inmaduras. Se levantan de la placa, se lavan y se vuelven a sembrar en placa con factores de crecimiento nuevamente. Se dividen en diferentes pozos para aplicar distintos tratamientos. Para inducir tolerancia, al quinto día ponemos dexametasona (el factor tolerogénico) y al sexto día cóctel madurativo (mezcla de citoquinas que induce la maduración de dendríticas). Con esto se obtienen células con un fenotipo tolerogénico que se inyectarán en pacientes. Esto es posible por haberlas tratado en condiciones GMP, es decir, en salas limpias y con reactivos en grado clínico.

5. TÉCNICA PARA DISPONER DE TONSILA PALATINA EN CERDOS PARA SU APLICACIÓN EN ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS, FARMACOLÓGICOS.

Rosa Maria López Jiménez; Carles Vilalta Sans; Sergio López Soria; Ana Maria Perez de Rozas; Núria Aloy Escudero; Judith Gonzalez Oliver; Lorenzo José Fraile Sauce.

Fundació Centre de recerca en sanitat animal.

La pleuroneumonía porcina es una de las enfermedades bacterianas más significativas dado que es altamente contagiosa, ocasiona una alta mortalidad y el coste de su tratamiento es elevado. Se transmite por contacto directo o por aerosol. La bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), entra por la cavidad nasal y se adhiere al epitelio tonsilar, se inflama y se transmite al resto del tejido respiratorio. Esta bacteria se acantona en la tonsila palatina en animales aparentemente sanos que pueden actuar como portadores a nivel de población. Para realizar estudios microbiológicos y farmacológicos (penetración del antibiótico en el órgano) y controlar la infección de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) se consideró oportuno disponer de una técnica para extraer las tonsilas palatinas de estos animales. Las tonsilas forman parte de los órganos linfoides secundarios, se hallan en el velo del paladar, entre el sistema respiratorio y el digestivo. Tienen una gran importancia en los mecanismos de defensa en cerdos frente a los agentes infecciosos.

Existen dos posibilidades técnicas para obtener tonsila palatina en cerdo; biopsia en animal vivo o extracción quirúrgica en animal sacrificado. En este caso vamos a describir la extracción quirúrgica. Para ello, se seleccionaron animales, aparentemente sanos, procedentes de una explotación con casos clínicos de actinobacilosis porcina.. A estos animales se les administraron diferentes dosis de un mismo antibiótico. Posteriormente, se realizó la técnica de extracción quirúrgica en animal sacrificado, dado que nuestro protocolo exigía la eutanasia para poder tomar toda la tonsila palatina. Este punto era crítico porque era necesario cuantificar el antibiótico en el tejido y la técnica analítica requiere una cantidad mínima de tejido. Una vez obtuvimos las muestras, se conservaron congeladas en nieve carbónica en granja y a -80°C en el laboratorio. Es importante destacar que con la tonsila palatina podemos realizar; además de estudios para determinar la presencia de bacterias, estudios farmacológicos y estudios inmunológicos tales como la tipificación de subpoblaciones celulares.

6. METODOLOGIES CITOMETRIQUES PER A L'ESTUDI DE LA FUNCIONALITAT DE LA RESPOSTA INNATA.

M. del Mar López, Mariona Pascal, Juan J. Barceló, Manel Juan.
HOSPITAL CLÍNIC DE BARCELONA

En la valoració de les immunodeficiències (ID) la citometria està aportant noves eines per a la valoració dels dèficits de funció. Dins de la resposta immune innata dues funcions defineixen dos grups de ID: 1) la capacitat oxidativa granulocitària que quan es deficitària defineix la malaltia granulomatosa crònica; 2) el reconeixement de patrons de patògens (PAMPs) a través dels TLR que quan es troba afectat provoca dèficits en la via TIR (MyD88, IRAK4,...).

Per a l'estudi de la capacitat oxidativa granulocitària a nivell de citometria existeixen aproximacions basades en canvis fluorescents en determinats substrats, sent la Dihidrorodamina (DHR) 123 la substància més habitualment emprada. Per portar a terme aquesta reacció hem de fer servir una substància per a estimular els leucòcits (E.Coli, FMA, fMLP).

D'altra banda s'ha descrit la valoració en la pèrdua de l'expressió de CD62L post-estimulació específica amb PAMPs (Pam3CSK4, HKLM, Poly (I: C), LPS-EK, ST-FLA, FSL1, Imiquimod, ssRNA40, ODN2006, C-, PMA, IL-1) com a assaig útil en la valoració de la via TIR. Aquest treball presenta la nostra experiència en la utilització d'aquestes metodologies.

7. ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS B DE MEMORIA EN LA INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN

Sandra Salgado Perandrés; Susana Urbán Giral; Encarnación Oliveros González; Isabel Caragol Urgelles; Drahomíra Detková Jancigová
Hospital Vall hebron

INTRODUCCION: La inmunodeficiencia variable común (IDVC) es una inmunodeficiencia primaria relativamente frecuente, caracterizada por un defecto en la producción de anticuerpos y una mayor predisposición a las infecciones de tipo respiratorio y digestivo, y al desarrollo de enfermedades autoinmunes y tumorales. Es extremadamente variable en cuanto al fenotipo inmunológico y al fenotipo clínico. El diagnóstico se basa en el historial clínico y un bajo nivel de Ig's en suero, descartando siempre otras causas que produzcan hipogammaglobulinemia. Las IDVC se pueden clasificar, según el inmunofenotipo de linfocitos B, con la ayuda de la citometría de flujo.

OBJETIVOS: Presentación de las técnicas empleadas en el laboratorio para el estudio de los linfocitos B de memoria (LBM) y su aplicación en el estudio de la IDVC.

MATERIAL Y MÉTODOS: Hacer una separación de las células mononucleadas a partir de sangre total anticoagulada diluida con PBS, utilizando el ficoll, recoger el anillo de linfocitos y lavarlo con PBS, decantar el sobrenadante y resuspender el pellet con RPMI completo. A partir de aquí trabajar en frío. Colocar los ac. monoclonales en un tubo de citómetro con 50 microlitros de muestra, dejar incubando 20 minutos, lisar durante 5 minutos, centrifugar (5 minutos a 1200 r.p.m.), decantar y resuspender con PBS. Adquirir y analizar en un citómetro de flujo.

RESULTADOS: El método descrito para el estudio de los LB de memoria nos permite clasificar a los pacientes con IDVC en 3 grupos, según la clasificación de París, que relaciona el inmunofenotipo con la gravedad clínica: MB2: CD27+>13%, CD27+ IgD->6% (sintomatología leve), MB1: CD27+>13%, CD27+ IgD-<6% (sintomatología moderada) y MBO: CD27+<13% (sintomatología más grave)

CONCLUSIONES: Demostrada la utilidad de esta técnica en el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con IDVC, hemos empezado a obtener valores normales por grupos de edad en población infantil, para conocer si esta clasificación es aplicable a los niños con IDVC.

8. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS RELACIONADOS CON MIOPATIA INFLAMATORIA IDIOPÁTICA.

Olga Bernaus; Albert Briega; Estibaliz Ruíz; Iñaki Salvador, Ricardo Pujol-Borrell; Eva Martínez- Cáceres.

LIRAD- BANC DE SANG I TEIXITS

Las miopatías inflamatorias idiopáticas (MII) constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por inflamación crónica, difusa o local, de la musculatura estriada. Se clasifican en tres grandes grupos: dermatomiositis (DM), polimiositis (PM) y miositis por cuerpos de inclusión (MCI). La incidencia de esta enfermedad es de 0.2-0.7 casos por 100.000 habitantes.

Recientemente se ha introducido en el laboratorio un perfil de inmunoblot que incluye la determinación de los principales autoanticuerpos asociados con estas patologías (PM/Scl, Jo-1, RO-52, KU, MI-2, PL-7, PL-12). Ante una sospecha clínica es el facultativo especialista el que solicita la determinación de este perfil, pero también puede ocurrir que éste no sospeche específicamente una miopatía inflamatoria idiopática pero sí una enfermedad autoinmune sistémica, solicitando la determinación de anticuerpos anti-Nucleares (ANAS) por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

La identificación de patrones de inmunofluorescencia indirecta (IFI) no habituales (nucleolares o/y punteados citoplasmáticos) relacionados con estas patologías es importante para ampliar el estudio y realizar este perfil, con el objetivo de confirmar la presencia de anticuerpos asociados a miositis.

MATERIAL Y MÉTODOS: Muestras de 45 pacientes del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona que llegaron al laboratorio de inmunología (LIRAD) entre Abril 2008 y Mayo del 2009. Portas Kallestad Hep-2 Cell Line Slide (BioRad). Euroline Myositis antigens Profile (IgG), (Euroimmun)

RESULTADOS: Se ha realizado la determinación de 45 perfiles miositis, de estos, 35 dieron negativos y 10 muestras fueron positivas para una o más de las especificidades presentes en el perfil. De los 10 sueros positivos, 3 fueron pedidos directamente por el facultativo especialista, y 7 solicitados directamente desde el Laboratorio de Inmunología ante la existencia de una reactividad sugestiva de estas especificidades en el análisis, por Inmunofluorescencia Indirecta, del patrón de anticuerpos anti-Nucleares.

CONCLUSIONES: Es importante la detección por el Laboratorio de Inmunología de patrones nucleolares y citoplasmáticos poco comunes, con el fin de ampliar el estudio a la identificación de especificidades asociadas a miositis inflamatorias idiopáticas.

9. .NUEVA ESTRATEGIA PARA LA SELECCIÓN DE HERMANOS HLA IDÉNTICOS COMO DONANTES EN TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS: ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES MHC.

Pepi Caro, Eva Campos, Rosa Faner, Laia Freixa, Justina Gil, Ricardo Pujol-Borrell, Manel Juan, Eduard Palou. LIRAD (Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i Aplicacions Diagnòstiques)

Introducción: Una de las terapias cada vez más extendida en el tratamiento de algunas enfermedades raras como ciertas leucemias (Tricoleucemia), ciertas Inmunodeficiencias (Síndrome Wiskott-Aldrich) y ciertos trastornos metabólicos/almacenamiento (Síndrome de Hurler); es el Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos (TPH). Para que el trasplante tenga el mayor éxito posible, es muy importante la máxima compatibilidad posible del sistema HLA (Antígenos leucocitarios humanos) entre el receptor y el donante. El MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) es una región situada en el brazo corto del cromosoma 6. Esta región contiene una familia de genes encargados de codificar los antígenos que formarán el sistema HLA. Están divididos principalmente en dos grupos: Clase I: se encuentran en las células de todo el cuerpo salvo eritrocitos. Hay varias subclases: HLA-A, HLA-B y HLA-Cw. Clase II: están presentes sólo en células del sistema inmune. Hay varias subclases: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP.

Objetivos: A la región del MHC humana (HLA) se ha descrito un gran número de polimorfismos de repetición en tándem o STRs, mayoritariamente de 2 a 6 nucleótidos, que también son conocidos con el nombre de microsatélites. Debido a el elevado desequilibrio de ligamiento que hay entre los diferentes loci HLA y estos STRs, unos y otros se heredan en bloque haplotídico. Por consiguiente, el uso de las STRs-HLA en estudios familiares ha de permitir identificar los haplotipos de los padres que han sido transmitidos a la descendencia. Siguiendo esta hipótesis, describimos un método basado en el análisis de 8 STRs ubicadas a lo largo del MHC que permite la selección de donantes relacionados HLA-idénticos en trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). Dicho método podría ser utilizado en los casos donde la tipificación de baja resolución no es suficiente para definir los haplotipos HLA familiares, simplificando tiempo y costes.

Material y Métodos: Las STRs a analizar fueron seleccionadas en base a su proximidad a los genes HLA, polimorfismo e idoneidad para la amplificación múltiple por PCR. El ensayo involucra la amplificación simultánea de 8

STRs, utilizando cebadores conjugados con fluorocromos. Posteriormente el análisis de la longitud de los fragmentos se hace por electroforesis capilar.

Resultados: La comparación de los perfiles STR en 17 familias, en las que había más de un hermano HLA idéntico al paciente, permitió la validación del método con una concordancia del 100% con los resultados obtenidos mediante tipificación basada en la secuencia (SBT). Además, en todos los casos, el análisis de las STRs permitió identificar los hermanos HLA diferentes y definir los haplotipos de STRs en las familias, obteniendo de 78 individuos un total de 34 patrones de tipificación STR. Asimismo, en 8 casos hermanos HLA idénticos para los loci HLA analizados (HLA-A, B, Cw y DRB1) eran dispares en loci STR centroméricos a HLA-DPB1, y en 5 casos la disparidad se encontró telomérica a HLA-F. Todas estas discrepancias reflejan recombinaciones, algunas de ellas involucrando la región de clase II extendida (1) o de clase I (2). La localización de las recombinaciones fue ubicada con el análisis de más STRs adyacentes.

Conclusión: El uso del análisis de las STRs-HLA es un método rápido y barato para confirmar la identidad de los haplotipos en donantes potenciales emparentados en TPH, sin tener que recurrir a la confirmación por SBT, y además proporciona la información de hasta que extremo el haplotipo HLA extenso es idéntico en la pareja de donante-receptor. STUDIO DE LOS LINFOCITOS B DE MEMORIA EN LA INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN

10. EXPRESIÓN DE RECEPTORES FRENTE A VIRUS DE INFLUENZA EN TRACTO RESPIRATORIO DE MAMÍFEROS Y AVES MEDIANTE UNA TÉCNICA HISTOQUÍMICA CON LECTINAS

Rosa Valle¹, Aida J. Chaves¹, Antonio Ramis^{1,2}, Natàlia Majó^{1,2}, Ayub Darji¹.

¹Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Esfera UAB, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

²Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Barcelona, Spain.

Se conoce desde hace tiempo que el ácido siálico (SA), presente en la membrana celular de gran variedad de células, funciona como receptor para el virus de la influenza. El SA que presenta una unión en la posición $\alpha 2-3$ es específico para los virus de la influenza aviar, y el que presenta la unión en posición $\alpha 2-6$ está vinculado a los virus humanos. El objetivo de este estudio es comparar la distribución de estos dos receptores en el tracto respiratorio de diferentes especies animales: mamíferos (cerdos, humanos y ratón) y aves (pollos, pato y codorniz).

Se utilizaron muestras de tráquea, pulmón y cornetes nasales de las diferentes especies anteriormente mencionadas. Todos los tejidos estaban fijados en formol al 10% durante tiempos variables e incluidos en parafina. La detección de los receptores se realizó mediante una técnica de histoquímica, usando las lectinas Maackia amurensis hemagglutinin, para la detección del receptor SA $\alpha 2-3$ y la lectina Sambucus nigra para el SA $\alpha 2-6$. La técnica es similar a una inmuno-peroxidasa, usando la lectina SA $\alpha 2-3$ a una concentración de 15 $\mu\text{g/ml}$ y la SA $\alpha 2-6$ a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. Para amplificar la señal utilizamos el kit TSA Biotin System siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Como control de la especificidad de la técnica, para cada preparación se utilizó un control negativo tratado con neuraminidasa previamente a la aplicación de la lectina, ya que esta enzima cataliza la hidrólisis de los residuos del ácido neuramínico de glicoproteínas y oligosacáridos, incubando los cortes durante un periodo de 24h en incubador a 37° y a una concentración de 12.5 u/l. También de cada preparación se utilizó otro control negativo que no fue incubado con la lectina.

Como resultados se observó que ambos receptores se expresan en el pulmón de humanos y cerdos, específicamente a nivel de los bronquiolos y

neumocitos tipo II. Adicionalmente, los ratones sólo muestran los dos receptores en los neumocitos tipo II.

En los tejidos de pollo y codorniz, se detectaron los dos tipos de receptores en células de la cavidad nasal, mientras que en el pulmón se localizaron en el bronquio y parabronquio. Los patos expresaron únicamente el receptor de tipo aviar en cavidad nasal, tráquea, bronquio y bronquiolo.

En conclusión, hemos determinado que no solamente el cerdo puede ser un “mixing vessel” donde los virus aviares y humanos de influenza pueden recombinarse, sino que también especies aviares como el pollo y las codornices pueden producir virus con potencial pandémico.

11. DESARROLLO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA

Mónica Pérez¹, Joaquim Segalés^{1,2}, Miquel Nofraries¹, Iván Galindo^{1,2}, Jordi Marqués¹, Fernando Rodríguez¹, María Ballester¹

¹Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Esfera UAB, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

²Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Barcelona, Spain.

La Peste Porcina Africana (PPA) sigue siendo considerada por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) como una de las enfermedades más importantes que afecta al ganado porcino. A pesar de que nuestro país se encuentra oficialmente libre de la PPA, existe un claro riesgo de entrada del virus desde otras zonas del mundo donde la enfermedad se ha establecido de forma endémica. Así, en 2007, se detectó un nuevo brote de PPA en Georgia que ha alcanzado recientemente Rusia, produciéndose importantes pérdidas económicas en el sector porcino. Actualmente no existe ninguna vacuna eficaz frente al virus, basándose el control de la enfermedad en un diagnóstico laboratorial rápido y fiable y en el sacrificio de los animales infectados.

El objetivo del presente trabajo consistió en poner a punto diferentes protocolos de inmunohistoquímica (IHQ) e hibridación in situ (HIS), con la finalidad de estudiar la distribución y replicación del virus de la PPA (VPPA). Para ello, se utilizaron diferentes tejidos fijados en formol e incluidos en parafina obtenidos a partir de cerdos infectados experimentalmente con el virus de la PPA. La detección de antígenos se realizó utilizando diferentes anticuerpos que reconocen 3 proteínas estructurales del virus (p30, p54 y p73). Para la detección del material genético del virus se utilizó una sonda marcada con digoxigenina obtenida a partir del genoma completo del VPPA (~170 Kb) previamente digerido con la enzima de restricción Mbol.

Los resultados obtenidos para ambas técnicas mostraron un marcaje específico en distintas células del sistema mononuclear-fagocítico y células endoteliales, en una localización peri-nuclear que corresponde con las factorías víricas. Para la técnica de IHQ se obtuvo un marcaje específico con los 3 anticuerpos utilizados. No obstante, el anticuerpo p30 presentó un marcaje más intenso y con menos reacción de fondo que el resto de anticuerpos. Los protocolos de ISH e IHQ puestos a punto en este trabajo han demostrado ser de gran utilidad para estudiar de forma rápida y sencilla la patogenia del VPPA.

plànol de situació



Lloc: Sala 3
c/ Major de Can Caralleu 1
08017 Barcelona.

www.sci.cat i www.academia.cat/

Accés:

- **Cotxe:** Ronda de Dalt, sortida 9
- **Autobusos:**
 - Línia 34 (Sarrià-Virrei Amat)
 - Línia 66 (PI Catalunya –Sarrià)
 - Línia 60 (PI Glòries – Zona Universitària)

Aparcament: petita zona lliure entre l'Acadèmia i la Ronda de Dalt. (només per a socis de l' Acadèmia: Parking de pagament).



L'Acadèmia

FUNDACIÓ ACADÈMIA DE CIÈNCIES MÈDIQUES
I DE LA SALUT DE CATALUNYA I DE BALEARIS



Per a properas edicions esperem que contacteu amb nosaltres:

Comité organitzador:

Eva Campos (ecampos@bstcat.net)

Lorena Córdoba (lorena.cordoba@cresa.uab.cat)

M. Angeles Martinez (nenuca.martinez@gmail.com)

Elena Pérez (elenaperezranz@yahoo.es)

Rosa Rodriguez (RRODRI@clinic.ub.es)

o amb la presidència de la SCI:

president@sci.cat

II Jornada per a Tècnics i Infermers de Laboratori Societat Catalana d'Immunologia

Barcelona, 26 de novembre 2009