



Grado en Bioquímica

MANUAL DE PRÁCTICAS DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA

Profesor: Gonzalo Rubio Pedraza

- Normas de seguridad en el laboratorio de inmunología.
- Detección, caracterización y titulación de isohemaglutininas.
- Enzimoimmunoensayo (ELISA) para la cuantificación de IgA en saliva.
- Tipaje HLA de clase I.
- Citometría de flujo. Guía rápida de WinMDI.

NORMAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA

Resumen: El material del laboratorio puede ser peligroso, en consecuencia, nos informamos antes de usarlo, lo manipulamos protegidos y desechamos los residuos sin exponer a otros.

- 1) Todo **material biológico humano** se manipula como si fuera **potencialmente infeccioso**.
- 2) Protección personal: **bata y guantes** (hay en el laboratorio y se cambian si se manchan). Las heridas se traen cubiertas con apósitos impermeables. La ropa de calle es un elemento adicional de protección, se desaconseja el pantalón corto o el calzado abierto. Son recomendables las gafas de protección de plástico.
- 3) Para trabajar, se colocan las muestras, reactivos etc. en la **parte delantera de la zona de trabajo**, así se evita golpearlos con los brazos en un descuido. El material punzante no debe sobresalir de la mesa.
- 4) Para abrir tubos de vidrio (ej. los de sangre) o tubos eppendorf, se sujetan **envueltos en varias capas de papel secante**. Esto protege en caso de rotura o salpicadura.
- 5) Antes de utilizar un reactivo, se observa si tiene **símbolos y avisos sobre su toxicidad y riesgo** de manejo (generalmente en recuadros de color naranja).
- 6) En el laboratorio **no se pipetea con la boca**. En su lugar se emplean micropipetas de mano y/o pipeteadores eléctricos. Tampoco se debe comer, beber, aplicarse cosméticos u oler reactivos o muestras directamente.
- 7) **Nunca** se quita una **punta** de pipeta usada **con los dedos**, o se reencapucha una aguja, aunque se usen guantes.
- 8) No arrojar a la papelería o desagüe material usado sin consultar al profesor. Los **residuos** y el material punzante (puntas de pipeta, agujas, hojas de bisturí, cubreobjetos y similares) se desechan en los **contenedores repartidos por las mesas** para evitar la exposición de los compañeros.
- 9) **Evitar que se manchen las mesas**. En caso de salpicadura o vertido: recoger con secante y descontaminar la superficie con hipoclorito sódico (lejía común) al 10% v/v en agua del grifo (se aplica con un papel desechable y no se aclara).
- 10) En general, a las personas que se exponen a muestras de origen humano, entre los que se incluyen los estudiantes de Bioquímica, se les recomienda vacunarse contra **hepatitis B**. Es muy probable que a usted le vacunaran a los 11-12 años, si no es el caso, debe saber que se recomienda que inicie la vacunación.

ACCIDENTES:

- 1) Las salpicaduras o derrames en la piel intacta se deben lavar inmediatamente con jabón y agua abundantes.
- 2) Las salpicaduras a mucosas (ej. a la boca), deben lavarse con agua corriente durante 15 minutos. Las salpicaduras a los ojos se lavarán de inmediato con frasco lavaojos o con agua corriente manteniendo los ojos muy abiertos con los dedos.
- 3) Las inoculaciones percutáneas (ej. arañazo o corte con instrumental usado) deben lavarse con agua y jabón, dejar, en su caso, fluir la sangre libremente 3 minutos, desinfectar con povidona yodada o gluconato de clorhexidina y cubrir con un apósito impermeable. En todos los casos se comunicará el incidente al profesor.

DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y TITULACIÓN DE ISOHEMAGLUTININAS

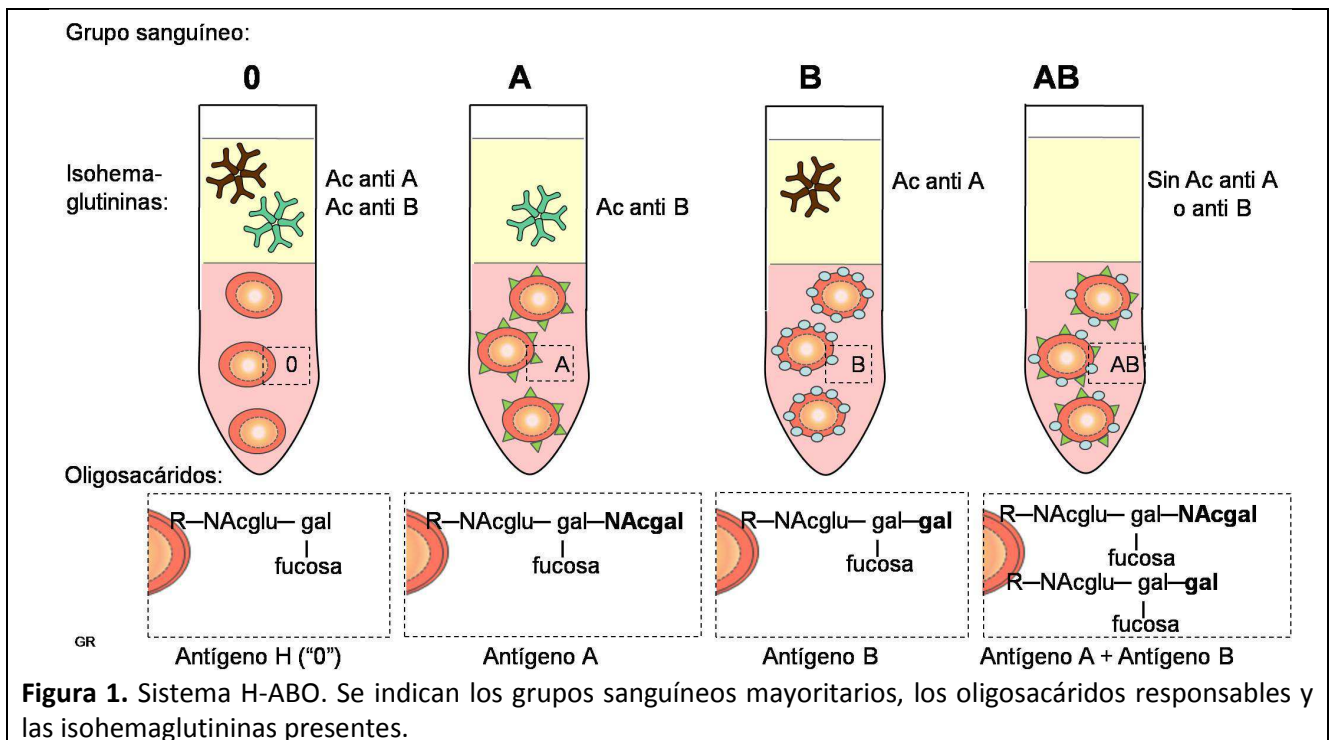
Al finalizar la práctica, el alumno debe ser capaz de:

- Manejar con seguridad muestras de sangre potencialmente infecciosas.
- Interpretar reacciones de aglutinación de Ag particulados.
- Preparar suspensiones de hematíes fenotipados A, B, AB y O.
- Llevar a cabo pruebas cruzadas y caracterizar isohemaglutininas.
- Preparar y titular antisueros para determinar el grupo hemático.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS:

La determinación del grupo sanguíneo es una técnica habitual en la transfusión de hemoderivados. Es necesaria porque sistema inmunitario de algunos individuos rechaza los hematíes de otros. Esta reacción inmunológica está mediada por las **isohemaglutininas**, que son anticuerpos (Ac) fácilmente detectables y cuantificables ya que forman aglutinados visibles cuando se enfrentan a hematíes específicos. La detección de isohemaglutininas en el suero o plasma de un individuo tiene un interés triple. Por una parte, se requiere para determinar correctamente el grupo sanguíneo y evitar **reacciones transfusionales** graves. Por otra, sirve para evaluar la capacidad de producir Ac de una persona, algo muy útil para el **diagnóstico de inmunodeficiencias**. Finalmente, sirve para obtener **reactivos** para tipaje de grupos sanguíneos.

Se pueden determinar al menos 27 sistemas antigénicos hemáticos con sus correspondientes variantes alélicas. Los más importantes en transfusión sanguínea, por su alta inmunogenicidad, son los sistemas H - ABO y Rhesus (Rh).



Sistema H – ABO:

Los epítomos responsables son **carbohidratos** presentes en glicoesfingolípidos y glicoproteínas de membrana (Figura 1), que están codificados por dos loci génicos. El locus H, en el cromosoma 19, codifica una enzima fucosil transferasa que adiciona fucosa a un oligosacárido precursor, formando el denominado “**antígeno**” H. Sobre éste actúa el producto del locus ABO, en el cromosoma 9, que tiene tres alelos: los **alelos A y B** son codominantes y codifican dos glicosil transferasas que unen, respectivamente, N-Acetil galactosamina y galactosa. El **alelo 0** es un gen deletado sin actividad enzimática, de modo que en homocigosis deja la secuencia H intacta. Los genotipos responsables de los cuatro grupos mayoritarios son: OO, *grupo O*; AA y AO, *grupo A*; BB y BO, *grupo B* y el AB, *grupo AB*. En este último, los hematíes tendrán oligosacáridos con una y otra modificación.

La importancia inmunológica de los antígenos H-ABO está en el hecho de que las personas toleran sus propios oligosacáridos pero **sintetizan en gran cantidad Ac frente a los otros grupos**. Como se producen espontáneamente, es decir sin contacto previo con hematíes de dichos grupos, se consideran “Ac naturales”. En el recién nacido alcanzan un nivel detectable en plasma a las pocas semanas de edad. Hay evidencias que indican que en realidad se sintetizan en respuesta a bacterias de la flora intestinal, pólenes y/o a sustancias presentes en alimentos de origen animal, que contendrían oligosacáridos con reactividad cruzada.

Sistema Rhesus:

Los epítomos responsables están en dos proteínas integrales de membrana, codificadas en tándem el cromosoma 1, denominadas **RhCE (gen RHCE)** y **RhD (gen RHD)**, y que resultan de la duplicación de un gen ancestral. La proteína RhD es la más importante a efectos transfusionales. Las personas que expresan RhD se caracterizan como “Rh positivas”, mientras que si carecen de RhD por delección parcial o completa del gen RHD, serán “Rh negativas”. Se utiliza también la letra “d” para indicar la carencia de D o fenotipo D-negativo. Como RhD se diferencia de RhCE en 30-35 aminoácidos, la proteína RhD resulta muy inmunogénica para las personas Rh negativas. La carencia de RhCE, por su parte, es muy infrecuente.

Los anticuerpos anti RhD, que son IgM e IgG, no aparecen espontáneamente en las personas Rh negativas, sino que son consecuencia de la exposición a hematíes D, por ejemplo tras una transfusión incorrecta o en el embarazo si la madre gesta un feto que expresa RhD.

Determinación de antígenos eritrocitarios e isohemaglutininas:

La determinación correcta del grupo sanguíneo requiere el análisis de los eritrocitos para ABO y D mediante Ac específicos anti-A, anti-B y anti-D. Esto se denomina **grupo hemático** y suele llevarse a cabo en sangre completa, sin que interfiera la presencia de plasma, leucocitos o plaquetas. Después se analiza el suero o el plasma para detectar la presencia de isohemaglutininas, lo que se denomina **grupo sérico** o plasmático, utilizando para ello hematíes fenotipados A, B y O lavados y un paso de centrifugación y resuspensión. En ambas pruebas, el resultado positivo será la aglutinación clara de los hematíes. La asignación del grupo sanguíneo definitivo se hace con ambos resultados, que deben ser **coherentes**. Los resultados discrepantes deben analizarse con extremo cuidado por su

importancia sanitaria y porque pueden dar información nueva sobre el polimorfismo de los grupos sanguíneos.

Para titular las isohemaglutininas, se diluye seriadamente la muestra de suero o plasma y se añade una cantidad fija de los hematíes fenotipados adecuados. Tras procesar adecuadamente, se determina si hay aglutinación de manera visual (Figura 2). El **título** será la **dilución máxima aglutinante**. Las personas con deficiencias en la producción de Ac mostrarán títulos más bajos de lo normal o incluso carecerán de isohemaglutininas.

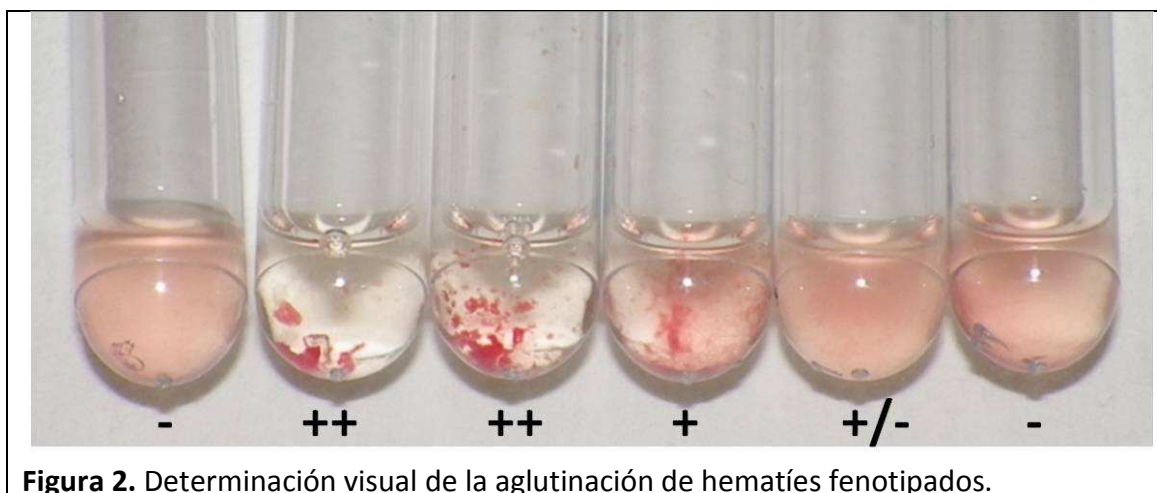


Figura 2. Determinación visual de la aglutinación de hematíes fenotipados.

Otra de las pruebas de laboratorio que se suele llevar a cabo antes de una transfusión, dependiendo de la urgencia del caso, es la **prueba cruzada**, que examina la compatibilidad entre suero del receptor con las células, hematíes en este caso, del/los donantes que va a recibir. Se realiza mezclando una muestra de suero del receptor con hematíes lavados de la/s bolsa/s de donación. Tras incubar y centrifugar se examinan para hemólisis y aglutinación. Cuando estas últimas no se presentan se dice que la prueba cruzada es compatible y la transfusión es posible.

EQUIPAMIENTO, REACTIVOS Y MUESTRAS:

- Centrífuga para tubos Eppendorf (tipo Minifuge).
- Centrífuga para tubos de 12x75mm.
- Microscopio.
- Portaobjetos.
- Tubos Eppendorf.
- Tubos de poliestireno de 6.5x38mm o, en su lugar, tubos de 12x75 o similares.
- Pipetas de 5-40, 40-200 y 200-1000µl y puntas.
- Lancetas de un solo uso.
- Algodón y alcohol etílico de 70°.
- Anticuerpos monoclonales anti-A, anti-B y anti-D.
- Suero salino fisiológico (NaCl 0.85%).
- Muestras de sangre anticoagulada con heparina o EDTA (un tubo por pareja).
- Muestras de plasma para titulación de isohemaglutininas (una por pareja).

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (por parejas):

Determinación del grupo hemático:

- 1) Cada pareja recibe un tubo de sangre anticoagulada con heparina o EDTA *[si algún alumno desconoce su grupo sanguíneo puede utilizar su propia sangre siguiendo las anotaciones de cada paso]*.
- 2) Centrifugar 5 minutos a 400xg.
- 3) Tomar 1 ml de plasma y depositarlo en un tubo Eppendorf rotulado con el número de la muestra o iniciales del alumno.
- 4) Tapar el tubo con su tapón o con un trozo de parafilm y resuspender por agitación suave.
- 5) Preparar un portaobjetos y otro tubo Eppendorf rotulados con el número de la muestra o las iniciales del alumno. En este último se pipetea 1 ml de suero salino fisiológico.
- 6) Sobre el porta se pipetean tres gotas de 20 μ l de sangre bien separadas. *[Masajear enérgicamente la yema de un dedo y limpiar con algodón humedecido en alcohol. Dejar unos segundos que evapore y pinchar con la lanceta estéril. Sobre el portaobjetos, depositar tres gotas de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, bien separadas]*.
- 7) Antes de continuar con el portaobjetos, tomar 30 μ l de sangre del tubo, o de las gotas del dedo puestas sobre el porta, y pipetearlos en el segundo tubo Eppendorf (el del suero fisiológico). Guardar a temperatura ambiente, se procesará más adelante.
- 8) Sobre cada gota de sangre del porta se pipetean 10 μ l de los Ac correspondiente. El orden recomendable es (de izquierda a derecha): anti-A, anti-B, anti-D.
- 9) Mezclar bien la sangre y el Ac con una punta de pipeta limpia para cada gota.
- 10) Casi instantáneamente podrá ver los resultados de A y B. Para D, espere al menos tres minutos moviendo el porta ligeramente. En caso de duda, visualice con transiluminador o microscopio.
- 11) Anote el número de su muestra de sangre.....y el resultado AB0.....RhD.....

Represente 8 portas con los resultados posibles e indique el AB0 y RhD correspondiente:

Lavado y preparación de hematíes al 2%:

- 12) Anotar en el tubo Eppendorf de los 30 μ l de sangre el grupo hemático obtenido (A; B; AB y O (indicar el RhD en el caso del O) y el nº de la muestra.
- 13) Centrifugar 1 minuto en la Minifuge.
- 14) Aspirar y descartar el sobrenadante (preferentemente con bomba de vacío).
- 15) Resuspender enérgicamente el pellet y añadir 1 ml de suero fisiológico.
- 16) Repetir los pasos 13 y 14.
- 17) Resuspender en 1485 μ l de suero fisiológico. A esto se denomina *hematíes fenotipados y lavados al 2% (v/v)*, y serán compartidos por el grupo.

Detección y caracterización de isohemaglutininas en suero o plasma:

- 18) Tomar tres tubos de poliestireno de 6.5x38 y rotular A, B y O respectivamente. Colocarlos sobre una placa microtiter de 96 pocillos, que hará de gradilla.
- 19) Pipetear 50 μ l del plasma de nuestra sangre, el que tomamos en el paso 3, en cada uno de los tubos.
- 20) Pipetear 25 μ l de hematíes al 2% A en un tubo, hematíes B en otro y hematíes O en el último.
- 21) Mezclar y centrifugar 15 segundos en la Minifuge.
- 22) Dispersar el pellet, si es necesario con el vortex lento, y determinar aglutinación (ver Figura 2).

Resultados de la muestra número: de grupo hemático AB0: y RhD:.....

Represente los resultados obtenidos en los tres tubos:

Isohemaglutininas (indique + o -): anti-A:..... anti-B:..... anti-O:.....

Razone si hay coherencia entre el grupo hemático y el grupo plasmático:

Titulación de isohemaglutininas:

- 23) Tomar 8 tubos de 6.5x38 y rotularlos: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 y 1/256. Colocar en una placa-gradilla.

- 24) Pipetear 50 µl de suero fisiológico en todos los tubos excepto en el rotulado 1/2.

- 25) Pipetear 50 µl de plasma problema en el primer y segundo tubo y mezclar. NOTA: si su tubo de sangre ha resultado ser AB, pida plasma de otro grupo al profesor.

- 26) Del segundo tubo tomar 50 µl y pasarlos al siguiente. Mezclar y tomar 50 µl y pasarlos al siguiente y así hasta el último tubo. Esto se denomina dilución seriada. Tomar 50 µl del último tubo y descartar.

- 27) Pipetear 50 µl de los hematíes al 2% que correspondan: A o B (elija uno de ellos si titula un plasma de individuo O).

- 28) Mezclar por agitación suave e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

- 29) Centrifugar 15 segundos en la Minifuge.

- 30) Dispersar el pellet, con vortex lento si es necesario, y determinar aglutinación tal y como se indica en la Figura 2. Anote sus resultados en la tabla siguiente:

Titulación del plasma nº.....con hematíes lavados de fenotipo..... y nº.....								
Dilución final:	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Aglutinación (marcar ++, +, +/-, -)
Este plasma podríamos utilizarlo como reactivo de laboratorio para determinar:								

Tabule los resultados medios de los plasmas analizados en el grupo de prácticas:

Resultados del grupo de prácticas: titulación de isohemaglutininas en plasma			
Plasmas de individuos	Hematíes al 2% usados	Rango	Título medio
A (n=.....)			
B (n=.....)			
O (n=.....)			
O (n=.....)			

Para finalizar, recoja el lugar de trabajo, desechando el material de un solo uso al contenedor de material infeccioso y complete el cuestionario de actividades grupales que le ha facilitado el profesor.

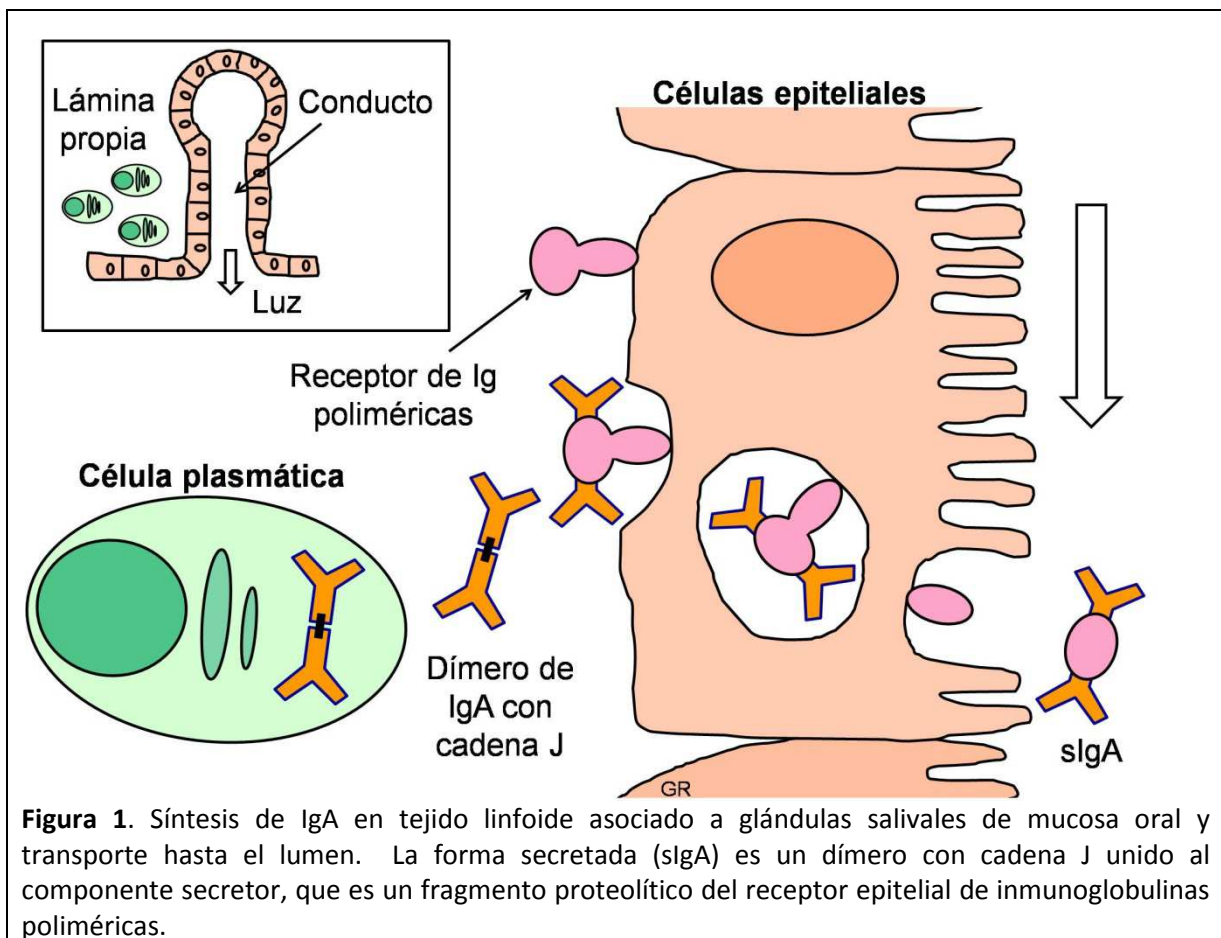
ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE IgA EN SALIVA

Al finalizar la práctica, el alumno debe ser capaz de:

- Diseñar un enzoinmunoensayo cualitativo o cuantitativo para Ac o cualquier otra proteína diana.
- Inmovilizar Ac o Ag a un soporte sólido.
- Llevar a cabo todas las fases de un ELISA.
- Determinar concentraciones en el tramo adecuado de una gráfica patrón.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS:

La IgA es una inmunoglobulina presente en suero y se caracteriza por ser la predominante en las **secreciones** (lágrimas, saliva, leche materna y, en general, secreciones mucosas de los tractos digestivo, respiratorio y genitourinario). La forma secretada se sintetiza como un dímero por células plasmáticas del tejido linfoide asociado a la mucosa (Figura 1) y se secreta a la cara luminal del epitelio acomplejada a un polipéptido denominado *componente secretor*, que da resistencia a proteasas. Una función esencial de la IgA en las secreciones es el bloqueo de la interacción de virus y otros microorganismos con las células epiteliales para así evitar la infección.



La **deficiencia selectiva de IgA** es la inmunodeficiencia primaria más frecuente y afecta a uno de cada 700 individuos de origen europeo. En estos casos, los niveles de IgA en suero y secreciones

son muy bajos pero detectables. Aunque en algunos afectados aumenta la incidencia de infecciones digestivas y respiratorias, a veces graves, la mayoría parecen sanos.

La cuantificación de IgA en líquidos biológicos se realiza por diversas técnicas, pero siempre utilizando **anticuerpos anti IgA obtenidos en animales de experimentación**. Este tipo de “reactivos” son, en general, la única herramienta para distinguir de manera rápida y fiable unas proteínas de otras. Se obtienen vacunando repetidamente al animal (normalmente cabra, oveja conejo o ratón) con la proteína humana. Al cabo de unas semanas, el animal sintetiza una gran cantidad de Ac frente a dicha proteína. Estos Ac pueden purificarse de su suero o bien generar un Ac monoclonal a partir de sus linfocitos B. En ambos casos, se obtendrá un reactivo específico frente a la proteína humana de interés.

Por otra parte, la técnica o procedimiento denominado **ELISA** (acrónimo de Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay o enzimoimmunoensayo en castellano), es la técnica inmunológica más empleada en los laboratorios clínicos. El nombre de la técnica viene de que aprovecha tanto la especificidad de unión de los Ac como la amplificación de señal que producen las enzimas al catalizar una reacción. Además, todo el proceso ocurre adsorbido a una superficie, generalmente plástica, bañada por líquidos. El ELISA se utiliza habitualmente para cuantificar o detectar la presencia de muchas sustancias de interés, generalmente proteínas, como son Ag microbianos, Ac frente a esos Ag, hormonas proteicas o marcadores tumorales. En cada caso, se utilizan Ac específicos para la proteína diana obtenidos de animales de experimentación como se ha indicado antes. En esta práctica cuantificaremos IgA de saliva utilizando un ELISA que nos dará la información que buscamos en pocas horas, aunque por conveniencia lo dividiremos en varias jornadas.

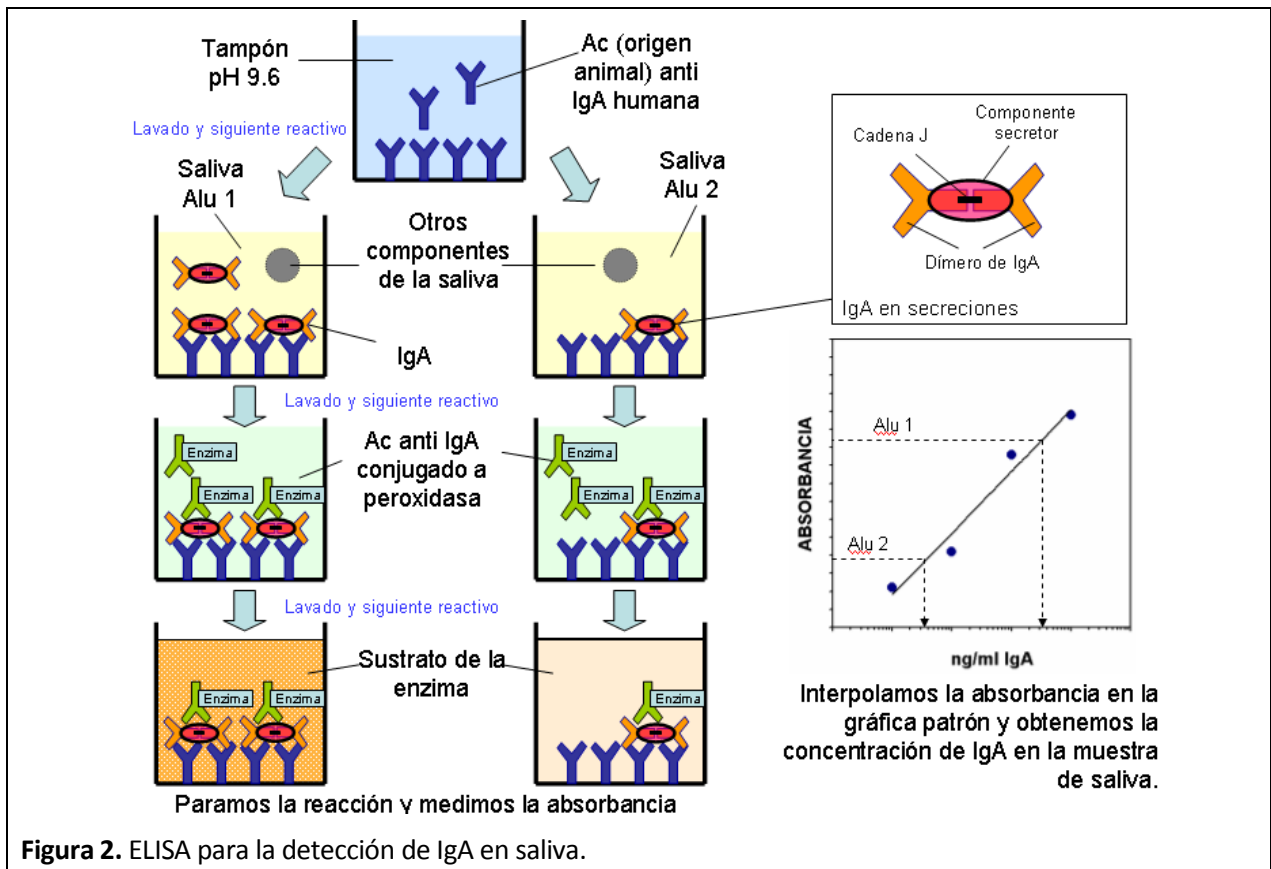


Figura 2. ELISA para la detección de IgA en saliva.

Nuestro ELISA, como la mayoría de estos ensayos, sigue un patrón de **tres “capas”** (Figura 2). Comienza con la inmovilización a pocillos de poliestireno de Ac anti IgA humana. Esta primera capa se suele poner uno o varios días antes y se denomina capa de **captura**. Después de lavar los Ac no unidos, añadiremos las muestras de saliva a los pocillos (capa **problema**) e incubaremos. Si contienen IgA ésta será capturada por la primera capa. Después de lavar para eliminar los componentes de la saliva no unidos, se añadirá un Ac anti IgA humana conjugado a la enzima peroxidasa. Esta capa se denomina capa de **detección**. Los Ac de la capa de detección, con su enzima, se unirán en una cantidad proporcional a la IgA presente. Después de incubar y lavar, se añadirá el/los sustratos de la enzima. El sustrato se elige para que el producto de la reacción sea una sustancia coloreada que se pueda medir con un espectrofotómetro especial. La absorbancia medida estará en relación directa con la cantidad de enzima, y ésta a su vez con la cantidad de IgA. Para saber qué concentración de IgA tiene cada saliva problema, compararemos sus absorbancias con las de unos **patrones** que tienen una **cantidad conocida de IgA** y que procesaremos en paralelo.

Cada estudiante determinará la concentración de IgA en su saliva. Recogeremos los datos de todo el grupo y estableceremos un rango de normalidad. Eventualmente podremos detectar alguna deficiencia de IgA.

EQUIPAMIENTO, REACTIVOS Y MUESTRAS:

Cada pareja:

- Papel secante.
- 3 tubos de ensayo de 5ml y gradilla.
- 7 tubos Eppendorf.
- Micropipetas para 10-100 μ l y 200-1000 μ l y sus puntas (amarillas y azules).
- 2 módulos MaxiSorp de 8 pocillos y 1 marco.
- 2 tubos Salivette® estériles (Sarstedt).
- Tubo Eppendorf rotulado “10³”: Patrón de referencia conteniendo 10³ ng/ml de IgA.
- Tubo de 50 ml rotulado “PBS-Tween”: PBS - 0.05% v/v de Tween-20 (detergente no iónico).
- Tubo de 10 ml rotulado “PBS-BSA”: contiene PBS con 1g/100 ml (=1% p/v) de albúmina bovina sérica (BSA).
- Contenedor de residuos sólidos.

Cada mesa:

- Tubo Eppendorf rotulado “400”: Ac anti IgA humana obtenido en cabra y purificado por cromatografía de afinidad, a 400 μ g/ml.
- Tubo Eppendorf rotulado “0.8”: Ac anti IgA humana conjugado a peroxidasa, a 0.8 μ g/ml.
- Tubo con tampón bicarbonato pH 9.6.
- Tubo de 50 ml con H₂SO₄ 2N.

Para todo el grupo:

- Tubo de 50 ml con tampón citrato pH 5.5.
- H₂O₂ al 3% v/v (guardado a 4°C).
- 1,2 fenilendiamina (OPD), 1 comprimido de 20 mg (guardado a 4°C).
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro para microplacas.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (por parejas):

1) Adsorción del Ac de captura (Ac anti IgA) al pocillo:

1.1. Rotular un tubo de ensayo “Ac de captura” y añadir los siguientes reactivos en el orden indicado:

REACTIVO \ TUBO	Ac de captura
Tampón bicarbonato pH 9.6	1625 μ l
Ac anti IgA (400 ng/ml)	25 μ l (agitar bien)

- 1.2. Ajustar dos tiras de 8 pocillos MaxiSorp a un marco blanco en las columnas 1 y 2. En cada pocillo pipetear 100 μl del Ac de captura preparado (agitar antes el tubo).
- 1.3. Rotular en las solapas las iniciales de los alumnos y tapar con parafilm.
- 1.4. Incubar a 4°C de 12 a 72h.

2) Recogida de saliva (Figura 3) :

- 2.1. Cada alumno rotula un tubo Salivette estéril en la tapa y el lateral para identificarlo (si un estudiante no desea analizar su saliva, el profesor le proporcionará una congelada).
- 2.2. Extraer el tubo interior pequeño, quitar la tapa e introducir la torunda en la boca, mejor sin tocarla con los dedos.
- 2.3. Masticar sin apretar 1 minuto.
- 2.4. Retornar la torunda al tubo pequeño y tapar. Insertarlo en el tubo grande.
- 2.5. Centrifugar 3 minutos a 1000xg (equilibrar bien la centrifuga enfrentando los tubos).



Figura 3. Utilización de los tubos Salivette®.

3) Dilución de la saliva:

- 3.1. Cada alumno rotula dos tubos eppendorf "1/50" y "1/1000", además de sus iniciales, y añade los siguientes reactivos en el orden indicado:

TUBO	Alu 1		Alu 2	
	1/50	1/1000	1/50	1/1000
PBS-BSA	980 μl	380 μl	980 μl	380 μl
Saliva del tubo Salivette	20 μl (mezclar)	-	20 μl (mezclar)	-
OJO: Del tubo eppendorf 1/50 bien mezclado	-	20 μl (mezclar)	-	20 μl (mezclar)

4) Dilución seriada del patrón de referencia concentrado (10^3 ng/ml):

- 4.1. Cada pareja rotula tres tubos eppendorf como se indica en la tabla y añade los reactivos en el orden indicado:

REACTIVO \ TUBO	10^2 ng/ml	10 ng/ml	1 ng/ml
PBS-BSA	450 μl	450 μl	450 μl
Tubo 10^3 ng/ml	50 μl (mezclar)	-	-
Tubo 10^2 ng/ml	-	50 μl (mezclar)	-
Tubo 10 ng/ml	-	-	50 μl (mezclar)
Tubo 1 ng/ml	-	-	-

En este momento tendremos cuatro tubos patrón con 10^3 , 10^2 , 10 y 1 ng/ml de IgA.

5) Lavado de los pocillos con la primera capa:

En este paso se elimina el tampón y el exceso de Ac anti IgA que permanece en la fase líquida.

- 5.1. Sujetar firmemente el marco por su parte estrecha y decantar de un golpe sobre el recipiente de recogida de líquidos. Golpear varias veces sobre un secante para no dejar gotas en el interior de los pocillos.
- 5.2. Pipetear 250 µl de PBS-Tween en cada uno de los 16 ó 24 pocillos.
- 5.3. Repetir los dos pasos anteriores. En total, hay que pipetear 3 veces PBS-Tween y decantar 4 veces.
- 5.4. Finalizar golpeando los pocillos sobre el secante (el pocillo queda vacío, con una película de humedad, no debe secarse)

6) Pipeteo de patrones y muestras:

6.1. En los pocillos lavados, pipetear 100 µl del patrón o muestra correspondiente, según la plantilla inferior. Todo va por duplicado. En caso de pipetear en el pocillo erróneo, debe dejarse como está (no intentar lavar) y reorganizar la distribución sin olvidar reflejarlo en la plantilla inferior.

A B C D E F G H	10^3 ng/ml	10^3 ng/ml
	10^2 ng/ml	10^2 ng/ml
	10 ng/ml	10 ng/ml
	1 ng/ml	1 ng/ml
	Alu 1 saliva 1/50	Alu 1 saliva 1/50
	Alu 1 saliva 1/1000	Alu 1 saliva 1/1000
	Alu 2 saliva 1/50	Alu 2 saliva 1/50
	Alu 2 saliva 1/1000	Alu 2 saliva 1/1000
	1	2

6.2. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente con unos segundos de agitación suave cada 5 minutos. Aprovechar esta incubación para preparar el reactivo siguiente.

7) Preparación del Ac de detección (anti IgA conjugado a peroxidasa):

7.1. Cada pareja rotula un tubo de ensayo limpio y prepara 1.7 ml de Ac de detección a concentración final 0.16 µg/ml. El Ac concentrado de partida está a 0.8 µg/ml y debe usar como diluyente PBS-BSA. Calcule y anote los las cantidades en la tabla antes de pipetearlas:

REACTIVO	TUBO	Ac de detección
PBS-BSA	
Ac anti IgA conjugado a peroxidasa (0.8 µg/ml)	

8) Lavado de los pocillos:

8.1. Al finalizar la incubación del paso 6, lavar los pocillos como en el paso (5), añadiendo, en total, cuatro veces PBS-Tween y decantando cinco veces.

9) Pipeteo del Ac de detección:

9.1. Sobre todos los pocillos lavados, pipetear 100 μ l/pocillo del "Ac de detección" preparado anteriormente. Incubar 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave cada 5 minutos. ALTERNATIVAMENTE: incubar hasta el día siguiente a 4° C.

10) Preparación de la mezcla sustrato-cromógeno (para todo el grupo):

10.1. En un tubo cónico graduado preparar una disolución que quede a 0.5 mg/ml final de 1,2 fenilendiamina y 0.05% v/v final de H₂O₂, usando como diluyente tampón citrato. La 1,2 fenilendiamina está prepesada en comprimidos de 20 mg (desprecie el volumen) y el H₂O₂ concentrado está al 3% v/v. Todos los estudiantes deben realizar los cálculos:

REACTIVO	TUBO	Sustrato - Cromógeno
Comprimido de 1,2 fenilendiamina		20mg
Tampón citrato pH 5.5	
H ₂ O ₂ 3% v/v (añadir cuando el comprimido esté disuelto)	

10.2. Repartir esta mezcla sustrato-cromógeno: 2ml/pareja en un tubo de ensayo limpio.

11) Lavado de los pocillos:

11.1. Al finalizar los 20 minutos de incubación del paso 10, lavar los pocillos como en el paso (5), añadiendo, en total, 4 veces PBS-Tween y decantando 5 veces.

12) Disparo de la reacción:

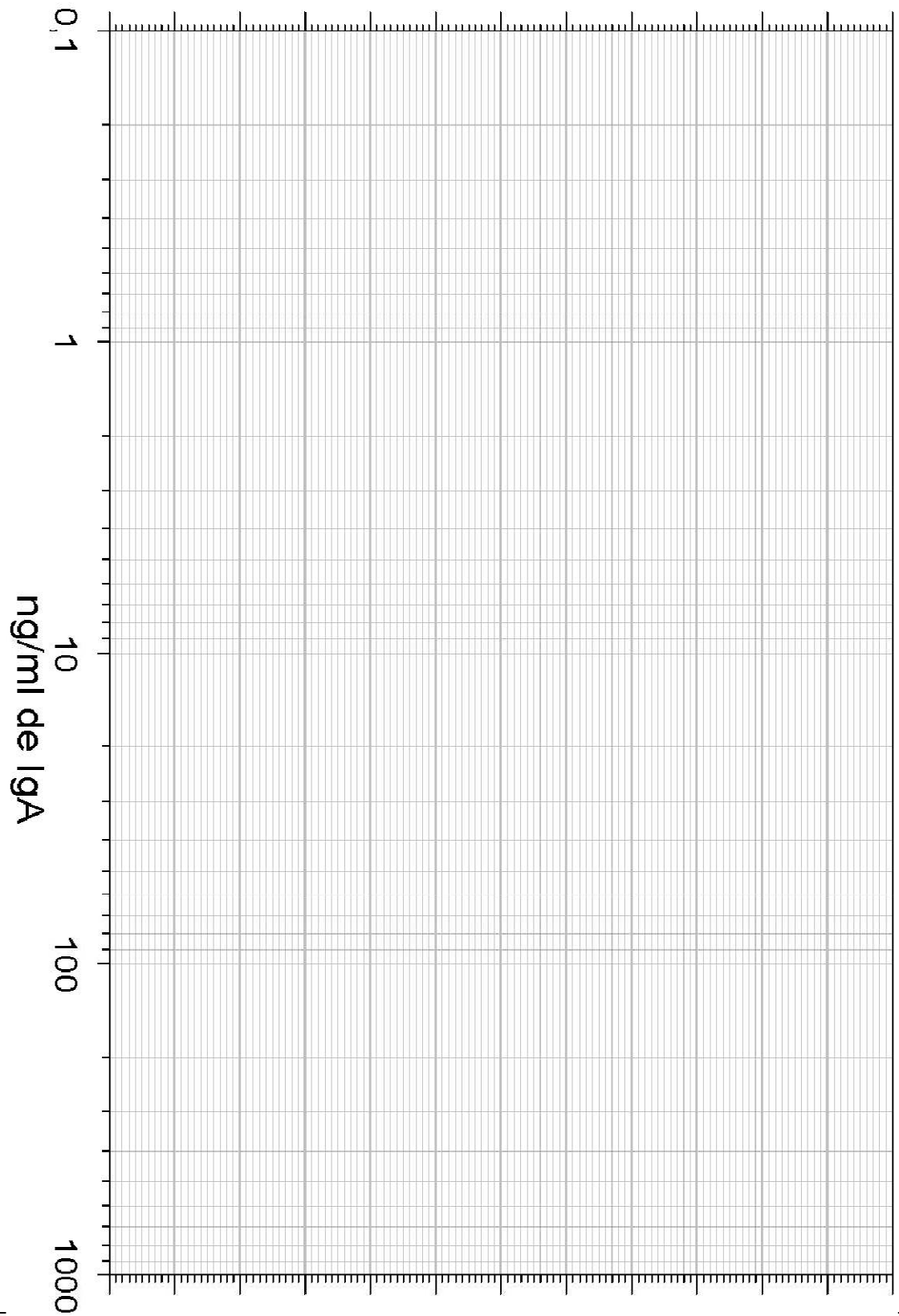
- 12.1. Pipetear 100 μ l/pocillo de la mezcla sustrato-cromógeno preparada antes.
- 12.2. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- 12.3. Detener la reacción con 100 μ l/pocillo de H₂SO₄ 2N.

13) Lectura y cálculos:

- 13.1. Agrupar las tiras de una mesa en mismo marco y leer absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas.
- 13.2. Calcular la media de los duplicados y representar en el papel semilogarítmico adjunto: *ng/ml de IgA* (eje log) vs *Absorbancia de los patrones* y unir los puntos.
- 13.3. Sobre la gráfica obtenida, interpolar las absorbancias de las muestras de saliva diluida de cada alumno de la pareja. Calcular la concentración en la muestra de saliva original teniendo en cuenta las diluciones empleadas (1/50 y 1/1000).

Para finalizar, recoja el lugar de trabajo, sin olvidar descartar los tubos usados al contenedor de desechos y completar el cuestionario que entrega el profesor.

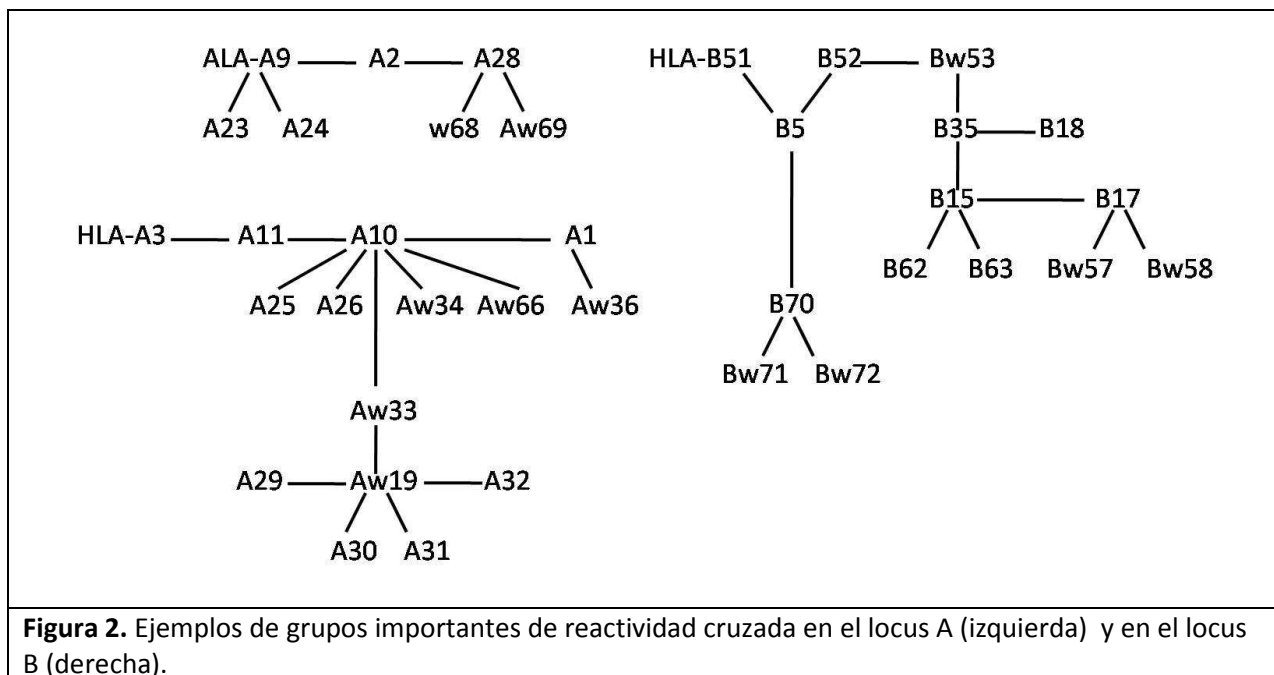
ABSORBANCIA



El fundamento de la técnica es: en una placa con múltiples pocillos (placa Terasaki) incubaremos **linfocitos** del paciente a tipar (en este caso Fuensanta), con un **panel de anticuerpos frente a moléculas HLA específicas** (Figura 1). Los Ac se unirán a las moléculas HLA de la superficie de las células, en caso de reacción positiva. En un paso posterior, se añade **complemento** a todos los pocillos. En aquellos pocillos donde se haya producido reacción entre anticuerpos y moléculas HLA se activará el complemento sobre la membrana de las células y éstas se lisarán. Para determinar si las células están **lisadas** (reacción +) o **vivas** (reacción -), se añade un **colorante de exclusión**, denominado Azul Tripano, que sólo es capaz de penetrar en las células muertas. Al observar los pocillos con un microscopio de contraste de fase, se podrá determinar en cada caso si las células están lisadas (coloreadas de azul = reacción positiva) o vivas (claras y refringentes = reacción negativa).

Las células que se emplean habitualmente en los estudios de histocompatibilidad son los linfocitos. La razón es que se aíslan fácilmente de sangre periférica, o de bazo y ganglios linfáticos si se trata de donantes cadáveres, y mantienen su viabilidad varios días in vitro. Los Ac para el tipaje son monoclonales o proceden de sueros de múltiparas y con frecuencia son una **mezcla de Ac** que reconocen más de una especificidad HLA (ver las plantillas de la última página). Debido al alto polimorfismo alélico de las moléculas de histocompatibilidad, para determinar el tipaje HLA de un individuo, se suelen utilizar 200 Ac distintos o incluso más, empleando siempre más de un Ac para cada especificidad.

A la hora de interpretar los resultados, hay que tener en cuenta que algunas moléculas comparten epítomos con otras, formando grupos de **reactividad cruzada**. Así, por ejemplo, los anticuerpos anti HLA-A3, pueden reconocer también epítomos en HLA-A11 (Figura 2).



EQUIPAMIENTO, REACTIVOS Y MUESTRAS:

- Linfocitos a tipar aislados por Ficoll-Hypaque.
- Tubos de poliestireno de 5ml y gradilla.
- Centrífuga para tubos eppendorff
- Placas Terasaki
- Pipetas de 2-20 μ l y puntas (alternativamente, dispensador Hamilton)
- Aceite mineral (Merck 7174)
- Batería de anticuerpos anti moléculas HLA de clase I, control negativo (suero AB diluido en medio de cultivo) y control positivo poliespecífico.
- Complemento.
- Azul tripano 1/5 en PBS.
- Microscopio invertido.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (por parejas):

Las plantillas de más abajo representan tres placas Terasaki con los Ac a pipetear. Cada pareja utilizará una, la que le asigne el profesor. En las columnas vacías anotarán, al final de la práctica, sus resultados y los de sus compañeros.

Ac anti productos alélicos **HLA-A**

Ac anti productos alélicos **HLA-B**

Ac anti productos alélicos **HLA-C**

1	Control -					
2	Control +					
3	A1					
4	A2					
5	A3					
6	A11					
7	A23					
8	A23+24					
9	A25					
10	A30+31+74					
11	A34+66					
12	A68+69					

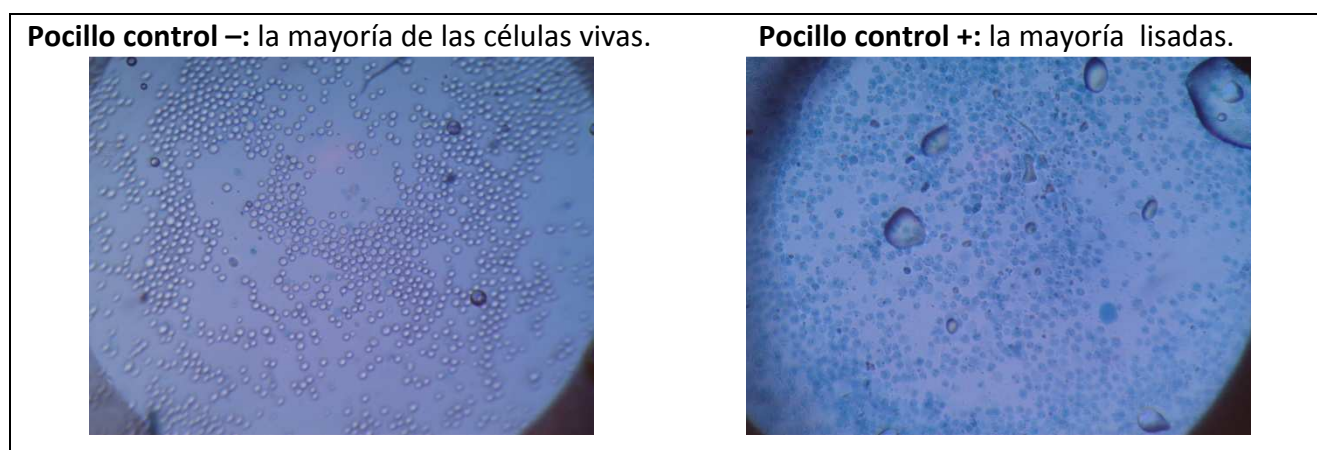
1	Control -					
2	Control +					
3	B7					
4	B8+59					
5	B13					
6	B18					
7	B27+57+A3					
8	B35					
9	B44+45					
10	B51+52					
11	B57+58					
12	B60+61+48					

1	Control -					
2	Control +					
3	Cw1					
4	Cw2+B70					
5	Cw2+6					
6	Cw3					
7	Cw4+2					
8	Cw4					
9	Cw5					
10	Cw6+4					
11	Cw7+A1					
12	Cw5+8					

- 1) Comprueben que tiene todos los Ac necesarios para completar la plantilla asignada.
- 2) En una placa Terasaki, seleccionar una columna limpia de 12 pocillos y pipetear 6 μ l de parafina líquida en cada uno de ellos.
- 3) Pipetear 3.5 μ l (*) de cada Ac en su pocillo respectivo. La punta de la pipeta debe tocar el fondo del pocillo. Si cambian el orden de los Ac con respecto a lo indicado en la plantilla, anótenlo claramente.

(*) Nota: Este pipeteo y los siguientes se realizan hasta el primer tope para evitar burbujas.

- 4) Pipetear 4 μ l de las células de Fuensanta por pocillo cuidando de que se mezclen con la "gota" de Ac pipeteada antes.
- 5) Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Pipetear 6 μ l de complemento por pocillo, cerciorándose de que se mezcla con las células y Ac.
- 7) Incubar 1 hora a temperatura ambiente o 20 minutos a 37°C.
- 8) Pipetear 3 μ l/pocillo de Azul Tripano, previamente diluido a 1/5 (preguntar si está ya diluido).
- 9) Dejar sedimentar las células 5 minutos y leer en el microscopio invertido a 200x.
- 10) Lectura al microscopio: si la técnica se ha realizado correctamente, observaremos:



Ahora leeremos el resto de los pocillos y les anotaremos un resultado – o + según el criterio anterior. Cuando observemos cantidades similares de vivas y muertas, anotaremos + \downarrow .

- 11) Anote sus resultados en la pizarra y copie los de sus compañeros. Con los datos de todo el grupo, obtenga el **Tipaje HLA-I completo** de las células tipadas:

HLA-A ,	B ,	Cw ,
---------	-----	------

Para finalizar, descarte en el contenedor el material sucio, deje el lugar de trabajo ordenado y complete los ejercicios de emparejamiento donante-receptor que les proporcione el profesor.

MICROAULA DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Al finalizar la práctica, el alumno debe ser capaz de:

- Representar células en dot plots e histogramas.
- Seleccionar células por sus propiedades morfológicas mediante regiones.
- Analizar múltiples fluorescencias sobre las células de interés.
- Establecer correctamente marcadores de umbral de fluorescencia.
- Interpretar los resultados de la función Estadística.

En esta práctica se analizarán datos obtenidos por citometría de flujo a partir de muestras de sangre periférica de individuos sanos y de pacientes con distintas patologías que afectan al Sistema Inmunitario. Se utilizará el programa WinMDI (*Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry*) que es software libre para analizar datos de la mayoría de los citómetros de flujo en cualquier PC. Su única limitación es que los datos que puede manejar no pueden exceder de 6 parámetros simultáneamente (F SC, SSC y cuatro fluorescencias). Para utilizarlo por su cuenta tiene varias opciones: A) Descargarlo de <http://facs.scripps.edu/software.html> . B) La mejor opción es acceder vía EVA: <https://eva.um.es> con su acceso identificado. C) Directamente en las ADLAS Merla (Aulario), Marabú y Mirasol (Fac. Medicina).

Guía rápida de WinMDI:

1. Si está en un **ADLA**: Introduzca la tarjeta inteligente y pulse Inicio, Prácticas, WinMDI, WinMDI versión 2.8 (o WinMDI 2.9).
 - 1.1 Si el programa está instalado en un **PC** pulse en el icono del programa o siga la secuencia: Inicio, Programas, WinMDI, WinMDI 2.8 (ó 2.9).
 - 1.2 Si accede vía **EVA**: Seleccione “Aula Virtual Biología”, abrir conexión. Cuando aparezca la pantalla principal: Inicio, Biología, WinMDI2.9, WinMDI2.9.
2. Seleccionar **Dot Plot** (alternativamente, hacer click en **Display** y seleccionar **Dot Plot**)
3. Seleccionar archivo (todo en unidad P: (prácticas) carpeta CITOMETR) y pulsar **OK**
4. Seleccionar **X-axis** (La primera vez **FSC**: tamaño)
5. Seleccionar **Y-axis** (la primera vez **SSC**: granularidad)
6. Seleccionar el número de célula (events): En **Plot number of events** seleccionar **todas**. Pulsar **OK**.
7. Para seleccionar las células de interés, en primera instancia linfocitos: Hacer click con el ratón (botón izquierdo o derecho según la versión) sobre el dot-plot.
8. Seleccionar **Regions**
9. Seleccionar tipo rectangular: **sortrect**
10. Hacer click en **Create**
11. Situar el ratón sobre el dot plot, clickar y SIN SOLTAR dibujar el rectángulo que encuadra los linfocitos o la población de interés (esta será autonumerada como la Región R1)
12. Soltar el botón y **OK**.
13. Crear un dot plot de las células de interés: hacer click en **Display** y seleccionar **Dot Plot**
14. Seleccionar archivo o pulsar **OK**
15. Seleccionar **X-axis** (Esta vez alguna fluorescencia, ej. **FL2**)
16. Seleccionar **Y-axis** (otra fluorescencia, ej. **FL3**)

17. Seleccionar el número de célula (events): En **Plot number of events** seleccionar **todas**.
18. Para indicar que queremos las células antes seleccionadas: clickamos **Gates, R1** (o la que nos interese) y logic **and**. OK. Pulsar de nuevo OK.
19. Colocar los cuadrantes: Situar el ratón sobre el dot plot, clickar y seleccionar **Quadrant**. Se pueden dejar donde aparecen por defecto o ajustarlos clickando en el punto de cruce y moviendo. Pulsar OK.
20. Estadística: Situar el ratón sobre el dot plot, clickar y seleccionar **Stats**. Tome de la ventana que se abre los datos de interés.
21. Para crear un histograma: Seleccionar **Display > Histogram**
22. Seleccionar **file > OK**
23. Seleccionar el **parámetro** que se desea mostrar (Ej. **FL1**)
24. Seleccionar **Gate** como en el paso (19).
25. Hacer click en **READ** y agrandar la ventana.
26. Clickar con el ratón y seleccionar **Markers** para hacer luego la estadística.
27. Pulsar **Set**.
28. Clicar sobre el histograma y desplazar el ratón de derecha a izquierda para marcar las células positivas.
29. Cerrar con OK.
30. Estadística: Situar el ratón sobre el histograma, clickar y seleccionar **Stats**. Tome los datos de interés.
31. Superposición de histogramas (**histogram overlay**)
32. Abrir el primer histograma como en el paso 21.
33. Situar el ratón sobre el histograma, clickar y seleccionar **Format**.
34. Pulsar **New file**
35. Seleccionar el archivo de interés y OK.
36. Elegir el Gate de el segundo histograma.
37. Pulsar ahora, en lugar de Read, **OVERLAY**.
38. Puede superponer más histogramas siguiendo el proceso anterior.
39. Si sobre el histograma selecciona **Format**, puede cambiar las escalas, colores y otros atributos de los histogramas superpuestos.
40. Para crear una vista **3D** de histogramas:
41. Superponer histogramas como anteriormente.
42. Hacer click en el histograma
43. Seleccionar **Format**
44. Seleccionar **3D view**
45. Para rotar: hacer click en el histograma, seleccionar **Rotate**, usar **ctrl + botón izquierdo** sobre la ventana para cambiar la orientación, Cerrar
46. Ensayar otras formas de representación: Display > Density plot, Contour.