

Clases Prácticas de Inmunología

Grado en Biología

Práctica 1. Cuantificación de la capacidad microbicida y de la capacidad fagocítica (medida por citometría de flujo) de sangre humana.

Práctica 2. Técnica de Doble Inmunodifusión u Ouchterlony: técnica cualitativa o semicuantitativa utilizada para el estudio poblacional de anticuerpos específicos y antígenos presentes en un suero.

Práctica 3. ELISA indirecto (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas), para cuantificar anticuerpos específicos en un suero, y ELISA competitivo para cuantificar un antígeno.

PRÁCTICA 1

Cuantificación de la capacidad fagocítica y microbicida de sangre humana.

Introducción y objetivos

La fagocitosis y destrucción de microorganismos por leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos (fagocitos profesionales) es el mecanismo de defensa más importante de todas las *filae* del reino animal. A pesar de los componentes defensivos que han desarrollado los vertebrados y que han culminado en los complejos sistemas inmunológicos de los mamíferos, la fagocitosis permanece como el mecanismo efector principal para la eliminación de microorganismos invasores, o partículas y células innecesarias. Es evidente que las funciones fagocíticas han evolucionado con otros sistemas de la inmunidad adaptativa e inespecífica como son los anticuerpos y el complemento, formando un conjunto fuertemente interdependiente entre sus respectivos componentes.

Las técnicas utilizadas para medir la fagocitosis emplean generalmente bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, etc.) u hongos (*Candida albicans*), y los resultados registran bastante variabilidad entre diferentes laboratorios. No obstante, los que emplean *C. albicans* como microorganismo fagocitable son los que ofrecen valores más concordantes. Además, la medida de la capacidad de fagocitar y destruir a *C. albicans* resulta de interés ya que la incidencia de las infecciones fúngicas invasivas ha aumentado notablemente en las últimas décadas debido a la concurrencia de una serie de factores, como la utilización de pautas inmunosupresoras intensivas en pacientes neoplásicos y trasplantados. Hay que indicar que *C. albicans* es un microorganismo patógeno oportunista que causa diferentes tipos de infecciones, siendo las candidiasis invasivas (en las que el hongo pasa a sangre e invade los órganos internos), una de las principales causas de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos.

El protocolo experimental que vamos a realizar pretende evaluar la capacidad de las células sanguíneas para ingerir levaduras por una parte y para destruir las células del hongo por otra. Para ello vamos a utilizar sangre periférica completa de dos donantes sanos, que vamos a cocultivar durante un tiempo determinado con levaduras vivas.

Para medir la fagocitosis utilizaremos levaduras inactivadas por fijación una cepa de *C. albicans* que expresa la GFP ("Green Fluorescent Protein"), de forma que podremos detectar las levaduras midiendo la emisión de fluorescencia, analizando los cocultivos mediante citometría de flujo, tras lisar los eritrocitos y fijar las muestras.

Para medir la capacidad fungicida de la sangre, utilizaremos levaduras vivas de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo (ya que para trabajar con *C. albicans* viva se necesita disponer de un laboratorio con nivel de bioseguridad 2). Tras el cocultivo determinaremos el número de levaduras viables cuantificando el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por recuento en placa. Como control, se cocultivaran las levaduras en presencia del plasma sanguíneo correspondiente.

NOTA IMPORTANTE* La utilización de muestras de sangre humana implica su manipulación como si se tratase de material infeccioso. Los estudiantes deben cumplir las medidas de seguridad generales que ya conocen. Además deben portar en todo momento bata de laboratorio y guantes. Todo el material contaminado de sangre se depositará en los contenedores dispuestos a tal efecto.

PRÁCTICA 1-A. Estudio de la capacidad fungicida de células sanguíneas humanas.**Materiales y reactivos**

- Cultivo crecido en medio líquido YPD de *S. cerevisiae*
- Muestras de sangre periférica recogida por punción venosa con el anticoagulante heparina de litio (n = 2)
- Placas de medio agar dextrosa sabouraud
- Medio RPMI 1640 (Gibco)
- Tampón fosfato salino (PBS) estéril
- Agua estéril
- Micropipetas y puntas de 2 a 1000 µl
- Tubos de ensayo y gradillas para preparar diluciones
- Asas de Digradlsky y botes con alcohol
- Microcentrífuga
- Microscopios
- Cámaras de Neubauer
- Agitadores mecánicos

Protocolo experimental**1. Preparación de plasma:**

- Centrifugar 1,5 ml de sangre completa 5 min a 3000 x g.
- Recuperar el sobrenadante de la centrifugación = plasma, trasvasándolo a un tubo eppendorf limpio.
- Centrifugar el plasma 5 min a 3000 x g.
- Recuperar el sobrenadante (plasma libre de células) y trasvasarlo a un tubo limpio.

2. Preparación y recuento de las levaduras:

- Centrifuga 1,5 ml del cultivo microbiano para recuperar las levaduras 5 min a 3000 x g.
- Lavar las levaduras con PBS.
- Resuspenderlas en PBS y hacer un recuento microscópico utilizando la cámara de Neubauer (ver anexo).
- Preparar una suspensión con 50×10^6 levaduras en 1 ml de PBS.

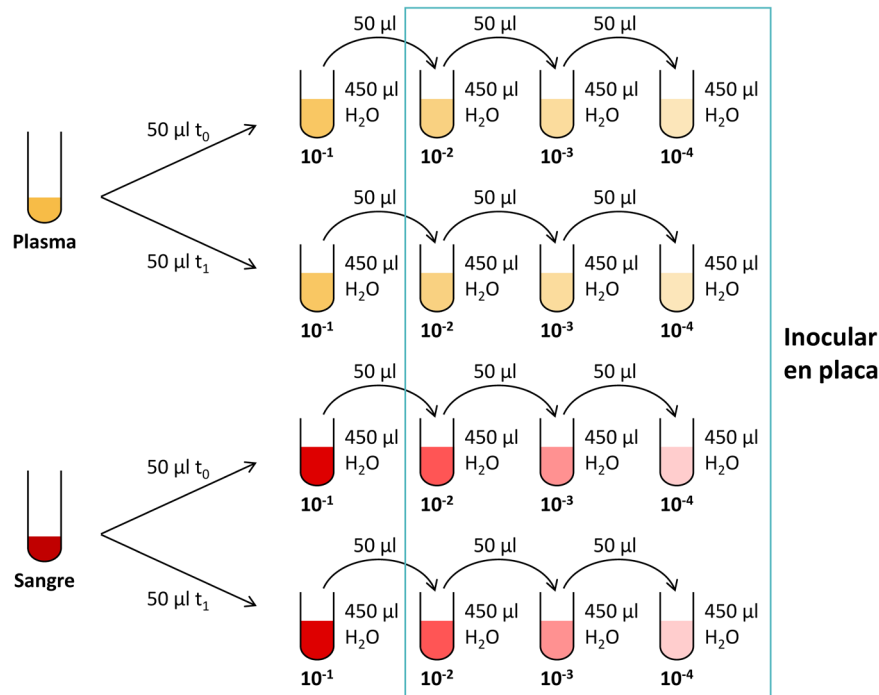
3. Preparar las mezclas siguientes (volumen final en el tubo 200 µl):

Tubo nº	RPMI (µl)	Sangre (µl)	Plasma (µl)	Levaduras (µl)
1 - Plasma	90	-	100	10
2- Sangre	90	100	-	10

El número de levaduras añadido ($0,5 \times 10^6$ levaduras para 100 µl de sangre) corresponde, en individuos con un recuento leucocitario normal, a una ratio 1:1 (levadura: leucocito).

- Mezclar bien y tomar una alícuota a $t = 0$ h de cada tubo. Hacer diluciones seriadas en agua estéril de cada muestra 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} (mezclar 50 µl de la muestra con 450 µl de agua para hacer la primera dilución 10^{-1}).
- Incubar las mezclas 1h a 37°C.

- Volver a mezclar bien y hacer a $t = 1$ h las mismas diluciones seriadas en agua estéril de cada muestra.
- Inocular 100 μ l por placa de agar dextrosa sabouraud, de cada una de las diluciones 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} , extendiendo el inóculo con ayuda del asa de Digradlsky.



- Incubar las placas toda la noche a $37^\circ C$ hasta aparición de las colonias.

Interpretación de los resultados

- Contar el número de UFCs en las diluciones cuyas placas tengan 30-300 colonias y determinar el número de UFCs en el cocultivo con plasma y con sangre a t_0 y t_1 .

$$\frac{UFCs}{ml} = UFCs \text{ contadas} \times \frac{1}{\text{dilución}} \times \boxed{5} \times \boxed{0,4}$$

partimos de un $V_i = 200 \mu l$
se han inoculado 100 μl

- Calcular el porcentaje de supervivencia del hongo en presencia de células sanguíneas y el porcentaje de muerte de levaduras por las células sanguíneas de la siguiente manera:

$$\% \text{ UFC sangre} = \frac{UFC \text{ sangre } t_1}{UFC \text{ sangre } t_0} \times 100 \quad \% \text{ UFC plasma} = \frac{UFC \text{ plasma } t_1}{UFC \text{ plasma } t_0} \times 100$$

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{\% \text{ UFC sangre}}{\% \text{ UFC plasma}} \times 100 \quad \% \text{ muerte} = 100 - \% \text{ supervivencia}$$

- Completar la tabla siguiente con los resultados obtenidos.

Supervivencia de *S. cerevisiae* en plasma y sangre de los dos donantes.

<i>S. cerevisiae</i>	UFCs a 0h plasma	UFCs a 1h plasma	UFCs a 0h sangre	UFCs a 1h sangre	% UFC plasma	% UFC sangre	% supervivencia	% muerte
Donante 1								
Donante 2								

Tareas

- Analizar y discutir los resultados de todos los estudiantes del grupo globalmente.
- Comparar los resultados para las dos muestras de sangre y plasma.
- Discutir para qué tipo de estudios sería de aplicación esta técnica.
- Explicar por qué es importante hacer los recuentos a tiempo 0 h.

PRÁCTICA 1-B. Cuantificación de la capacidad fagocítica de células sanguíneas humanas.**Materiales y reactivos**

- Levaduras fijadas de la cepa de *C. albicans* que expresa GFP
- Muestras de sangre periférica recogida por punción venosa con el anticoagulante heparina de litio (n = 2)
- Tampón fosfato salino (PBS) estéril
- Agua estéril
- Medio RPMI 1640 (Gibco)
- Micropipetas y puntas de 2 a 1000 μ l
- Tubos de ensayo y gradillas para preparar diluciones
- BD FACS Lysing solution 1X
- Microcentrífuga
- Microscopios
- Cámaras de Neubauer
- Citómetro de flujo

Protocolo experimental**1. Preparar la suspensión de las levaduras:**

- Partimos de un tubo con 100×10^6 levaduras fijadas de *C. albicans*-GFP previamente congeladas a -80°C en pellet seco.
- Resuspender las levaduras en 1 ml de RPMI.

2. Preparar las mezclas siguientes (volumen final en el tubo 100 μ l) en tubos eppendorf de 2 ml:

Tubo nº	RPMI (μ l)	Sangre (μ l)	Levadura (μ l)
1	10	90	-
2	90	-	10
3	5	90	5
4	-	90	10

El número de levaduras añadido (0.5×10^6 levaduras en tubo 3 y 1×10^6 en tubo 4) corresponde, en individuos con un recuento leucocitario normal, a aproximadamente una ratio 1:1 y 2:1, respectivamente (levadura: leucocito).

- Incubar a 37°C durante 20 min, para que tenga lugar la fagocitosis de las levaduras por los fagocitos de la sangre.
- Añadir 1,9 ml de solución lisante 1X (para lisar los eritrocitos sanguíneos y fijar las células).
- Mezclar bien y dejar 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 5 min a $3000 \times g$.
- Resuspender el pellet celular en 0,5 ml de PBS.
- Mantener los tubos a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo que se hará al día siguiente.

Interpretación de los resultados: cuantificación de la fagocitosis por Citometría de flujo.

Utilizaremos el citómetro **BD FACSVERSE 3L 8C** (BECKTON DICKINSON). Este aparato se encuentra en el servicio de cultivos celulares y citometría de flujo del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València. El servicio está en la 5ª planta del Edificio de Investigación “Jerónimo Muñoz”, en el campus de Burjassot.

Este citómetro está equipado con un láser azul (488nm) y un láser rojo (633nm), y permite trabajar con seis fluorescencias y dos parámetros de dispersión de la luz “Forward Scatter” y “Side Scatter” (FS y SS). Además, posee un sistema de procesamiento de señales digital con software FACSDiva.

-Antes de adquirir las muestras estas deben agitarse suavemente para eliminar los posibles agregados celulares.

-De cada una de las muestras se analizará la luz dispersada hacia delante o dispersión frontal (FS) que es una medida proporcional al tamaño relativo de la partícula que produce la dispersión frontal del láser; la luz dispersada lateralmente (SS), que es proporcional a la granularidad y complejidad relativa de la estructura interna de la partícula que produce la dispersión lateral del láser y la emisión de fluorescencia verde (emitida por la GFP), como consecuencia de la excitación de la muestra por el láser azul.

Muestra 1. Sangre sola. Debemos ser capaces de identificar las diferentes poblaciones de leucocitos (linfocitos, monocitos y granulocitos), en base a sus propiedades de FSC y SSC, en histogramas biparamétricos de FSC frente al SSC.

Muestra 2. Levaduras solas. Debemos identificar las levaduras, en base a sus propiedades de FSC y SSC. Además, detectaremos la emisión de fluorescencia verde emitida utilizando histogramas monoparamétricos donde se representará la intensidad de la fluorescencia verde frente al número de células. La GFP es excitada por el láser azul, y tiene su pico de emisión a 509nm, de forma que en el citómetro detectaremos la fluorescencia emitida con el filtro de 510/520nm.

Muestras 3 y 4. Sangre coincubada con dos cantidades diferentes de levaduras (0,5 y 1 millón de levaduras). Detectaremos la fluorescencia verde asociada a los granulocitos, utilizando histogramas biparamétricos de FSC o SSC frente a intensidad de fluorescencia.

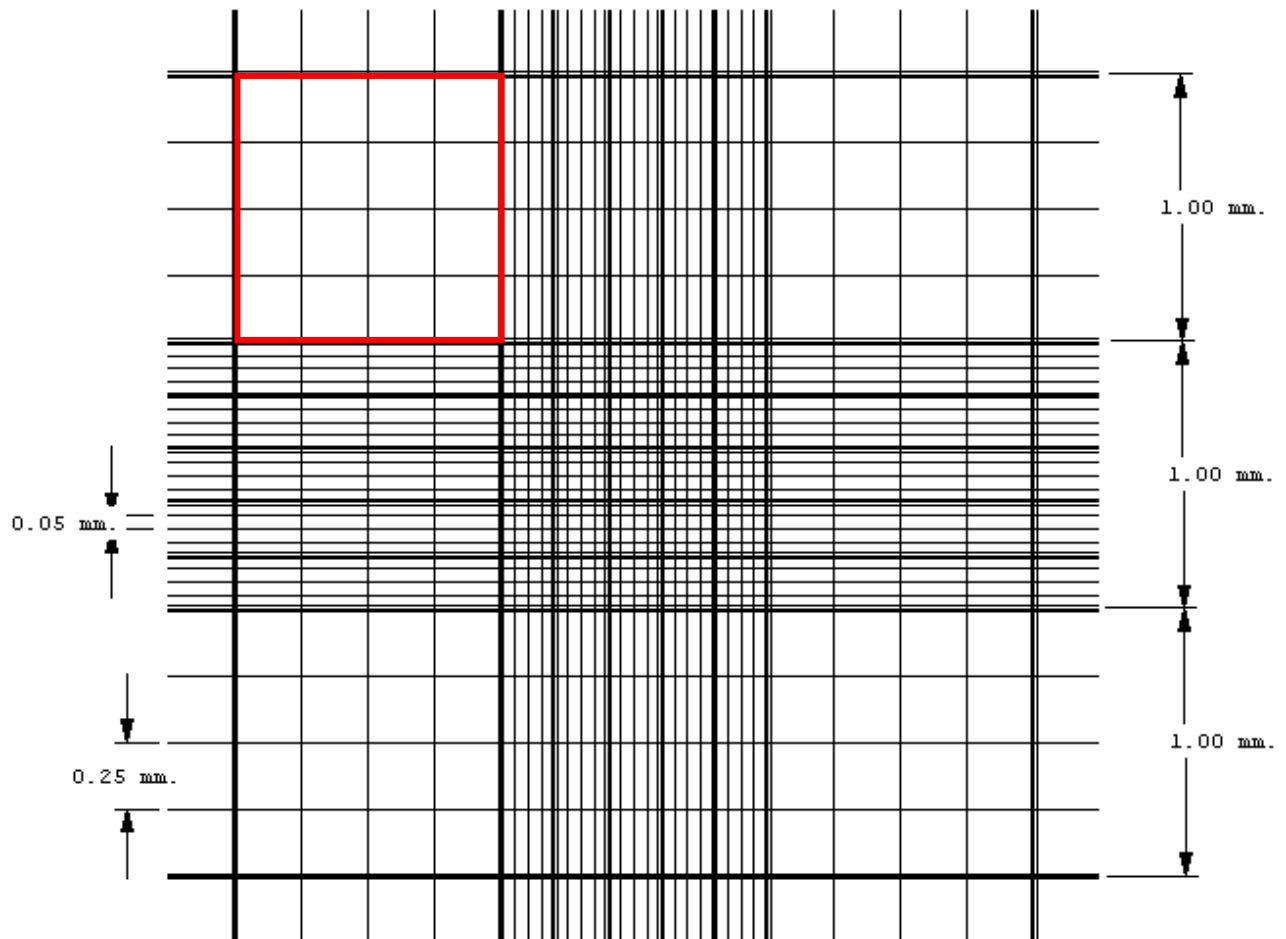
De esta forma debemos poder determinar el porcentaje de granulocitos que han fagocitado levaduras, para cada una de las dos ratios.

Tareas

- Observar los histogramas obtenidos en el análisis de las muestras adquiridas en el citómetro, así como la estadística.
- Comentar el significado biológico de las observaciones.
- Proponer mejoras al protocolo experimental utilizado.

ANEXO**Contaje de células en cámara Neubauer.**

- Preparar y limpiar la cámara Neubauer
- Colocar un cubreobjetos sobre la cámara Neubauer
- Con una pipeta colocar 10 μ l de la suspensión celular entre la cámara y el cubreobjetos
- Dejar reposar las células durante un par de minutos
- Observar al microscopio con un objetivo de 40x
- Contar el número de células (levaduras en este caso) observadas en los cuatro cuadros grandes (16 cuadrados pequeños x 4). Hacer la media de los cuatro. (Un cuadro grande corresponde al cuadro marcado en rojo).
- Multiplicar el número obtenido por 10^4 (ya que el volumen comprendido entre un cuadrado grande y el cubreobjetos es 1/10000 ml).
- Multiplicar por el factor de dilución para obtener la concentración celular por ml.



INTRODUCCIÓN A LA PRÁCTICA

Inmunoensayos: Técnicas de detección basadas en la reacción antígeno-anticuerpo

Todas aquellas técnicas que emplean anticuerpos y se basan en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo reciben el nombre de inmunoensayos.

La propiedad que tienen las inmunoglobulinas de unirse a un antígeno, la especificidad de la unión, y el hecho de que pueda ser visualizable por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluorocromos, con radioisótopos o con enzimas) hacen que estos métodos se empleen ampliamente.

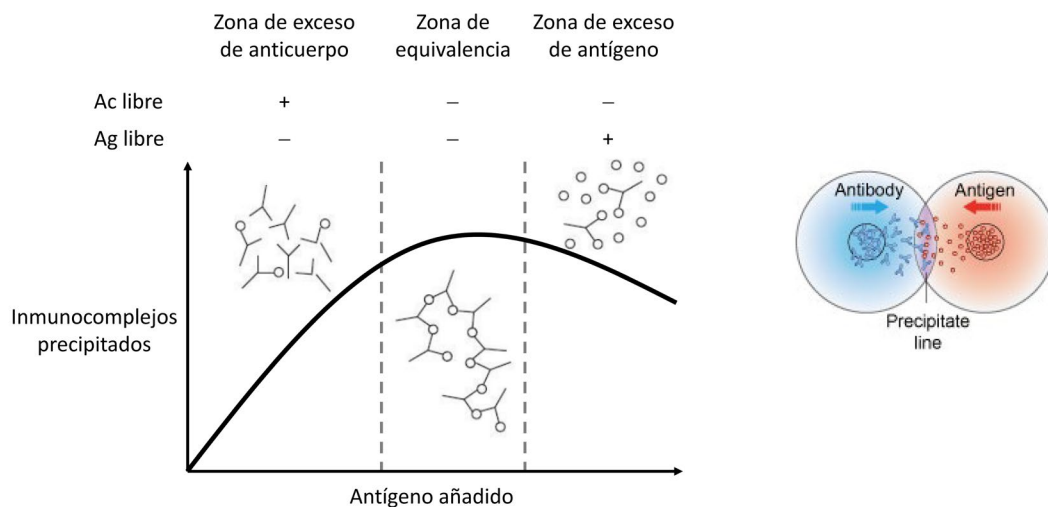
Los inmunoensayos son de gran importancia para el diagnóstico de enfermedades, estimar el grado de respuesta inmunitaria humoral y la identificación y purificación de moléculas y células de interés.

PRÁCTICA 2

Técnica de doble difusión en gel u Ouchterlony

1.-Introducción y objetivos

Reacciones de Inmunoprecipitación: cuando un antígeno soluble interacciona con su anticuerpo específico se forman complejos antígeno-anticuerpo o inmunocomplejos, que precipitan para cierta relación molecular entre antígeno y anticuerpo. Cuando hacemos crecer la cantidad de antígeno, manteniendo constante la cantidad de anticuerpo, la cantidad de proteínas precipitadas aumenta al principio, alcanza un valor máximo y luego decrece.

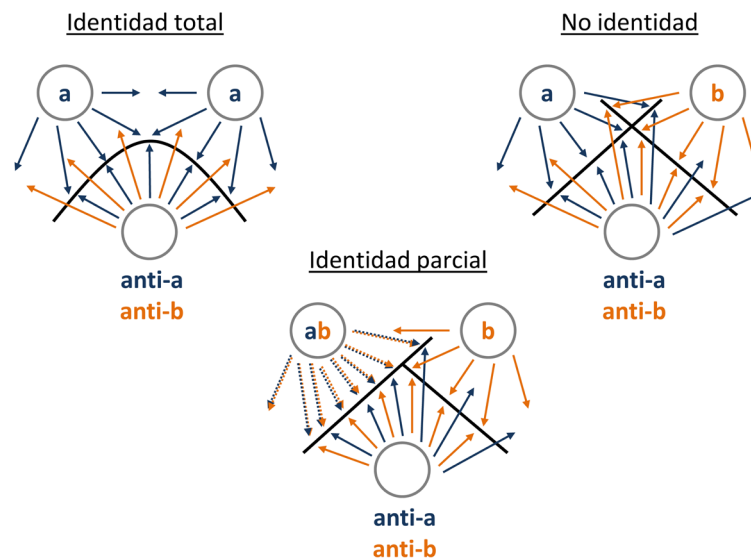


La **Técnica de Doble Inmunodifusión u Ouchterlony**, es una técnica de **inmunoprecipitación realizada en medio sólido**.

Se basa en la difusión de antígenos y anticuerpos en medio sólido (gel de agarosa) a partir de pocillos enfrentados. Cuando difunden, se encontrarán las moléculas de antígenos y anticuerpo, de forma que, si hay reconocimiento, precipitarán los complejos inmunes, en la zona de equivalencia. Es decir, en la zona donde las concentraciones de las dos soluciones son óptimas, para que la cantidad de anticuerpo sature los sitios antigénicos. Los precipitados se presentan como un arco blanquecino visible al ojo desnudo. Cada arco corresponde a un único sistema antígeno-anticuerpo. Es decir, si un anticuerpo reconoce a dos antígenos diferentes, aparecerán dos arcos de precipitación.

Se pueden observar tres patrones de precipitación diferentes:

- **Identidad total:** los antígenos de las muestras comparten el determinante contra el que está dirigido el anticuerpo.
- **Identidad parcial:** los antígenos de las muestras comparten algún determinante antigénico común, pero no todos ellos.
- **No identidad:** los antígenos de las muestras no contienen ningún determinante antigénico común.



Utilidad clínica: esta técnica puede utilizarse para detectar la presencia de anticuerpos específicos en un suero, para poner en evidencia un antígeno presente en un líquido biológico, para determinar la zona de equivalencia, o para evaluar el grado de identidad (total, parcial o nula) entre diferentes antígenos. Además, al depender la posición del precipitado de la concentración relativa de antígenos y anticuerpos, se trata de un método semicuantitativo.

Esta técnica puede realizarse en el fondo de pequeñas placas Petri (de 60 mm de diámetro) o sobre un portaobjetos de vidrio, donde se prepara un gel de agarosa. Se excavan pocillos equidistantes con la ayuda de una plantilla en los que se depositan el inmunosero y las soluciones antigénicas y tras 12-24 horas de difusión, se analizan los arcos de precipitación.

En nuestro caso, las soluciones de anticuerpo que vamos a utilizar son sueros de conejo hiperinmunizados frente a dos antígenos (albúmina de suero de ternera, o BSA y albúmina de huevo de gallina, u OVA), y las soluciones antigénicas son soluciones de albúminas, o bien sueros de diferentes animales que contienen las albúminas séricas correspondientes.

2.- Materiales, reactivos y disoluciones

- Tampón PBS (tampón fosfato salino)
- Placas Petri de 60 mm de diámetro con gel de agarosa.
- Micropipetas y puntas de 2 a 1000 µl
- Pipetas de 10 ml
- Plantillas y perforadores
- Soluciones antigénicas (BSA y OVA a 1 mg/ml, en PBS)
- Sueros de animales (suero de caballo, suero de conejo, suero de cabra, suero de ternera,) y anticuerpos primarios (suero anti-BSA y suero anti-OVA)
- Tubos de ensayo y gradillas para preparar diluciones

3.- Protocolo experimental

*Preparación de placas de agarosa (al 0,5%) (lo hará el personal técnico)

- Mezclar 3g gramos de agarosa y 200 ml de tampón PBS en un frasco (para 4 parejas se necesita 144 ml). Calentar al horno microondas removiendo de vez en cuando, hasta que la solución sea transparente.
- Cuando el agar está completamente líquido, y el frasco ya no quema en la mano (60°C aproximadamente) se pipetea unos 6 ml y se vierten inmediatamente sobre el fondo de pequeñas placas Petri (de 60 mm de diámetro), lo que dará un gel de 1 a 1,5 mm de espesor. Las placas deben estar en un plano perfectamente horizontal.
- Se deja enfriar hasta que se solidifica (unos minutos).

* Se os darán ya preparadas las placas con agarosa. El estudiante empieza el protocolo experimental en este punto.

- Con la ayuda de los “perforadores” y de unas plantillas se realizan los pocillos sobre el agar a la distancia adecuada.
- Se depositan los antígenos y los anticuerpos. Hay que evitar que éstos se desborden.
- Los antígenos y los anticuerpos se dejan difundir a temperatura ambiente durante 24 h para permitir que se formen los inmunocomplejos.
- Transcurrido este tiempo se observa el agar a contraluz para ver los arcos de precipitación de un color blanco opalescente.

Cada pareja de estudiantes preparará 4 placas de agar, y enfrentará las soluciones de antígenos y anticuerpos indicados más abajo, para las placas 1, 2, 3 y 4, o bien, 1, 2, 5 y 6. (El profesor indicará a cada pareja las placas a preparar).

Se depositará 4 microlitros por pocillo en todos los casos, y los pocillos periféricos se rellenarán empezando por el pocillo situado arriba del central, y después girando en el sentido de las agujas del reloj.

Placa 1:

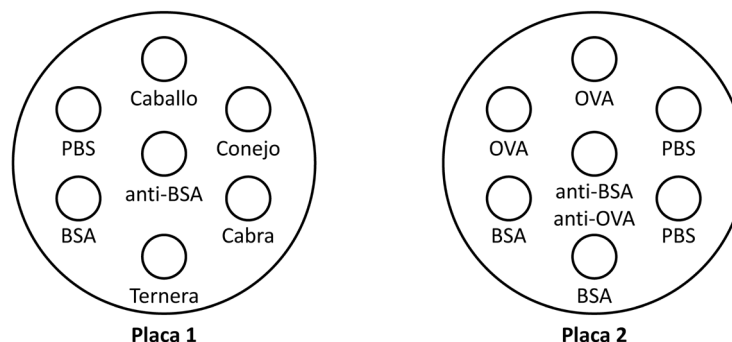
Pocillo central: antisuero anti-BSA

Pocillos periféricos: suero de caballo, suero de conejo, suero de cabra, suero de ternera, BSA, PBS

Placa 2:

Pocillo central: antisueros anti-BSA y anti-OVA (4µl de cada uno).

Pocillos periféricos: OVA, PBS, PBS, BSA, BSA, OVA



Placa 3:

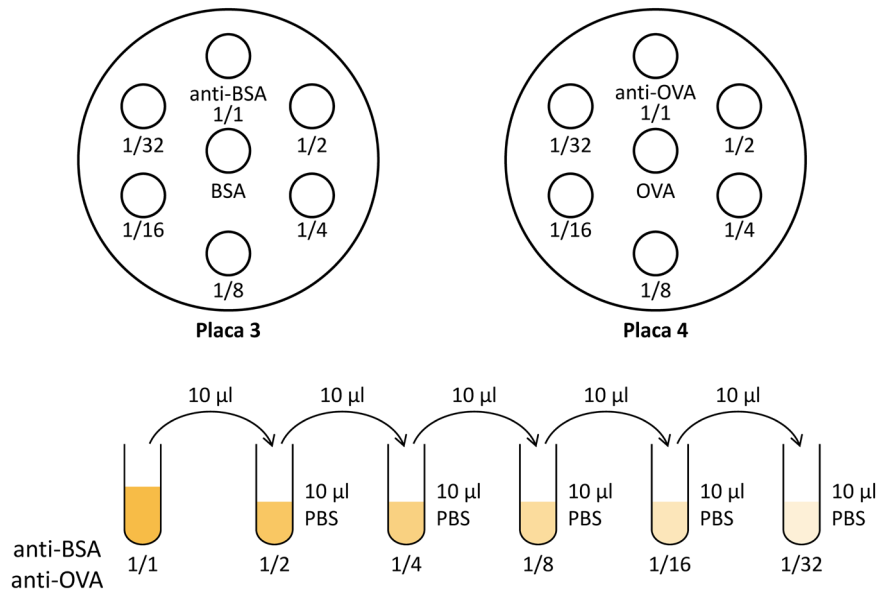
Pocillo central: BSA

Pocillos periféricos: antisero anti-BSA 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32

(nota: hacer las diluciones en 10 μ l)**Placa 4:**

Pocillo central: OVA

Pocillos periféricos: antisero anti-OVA 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32

**Placa 5:**

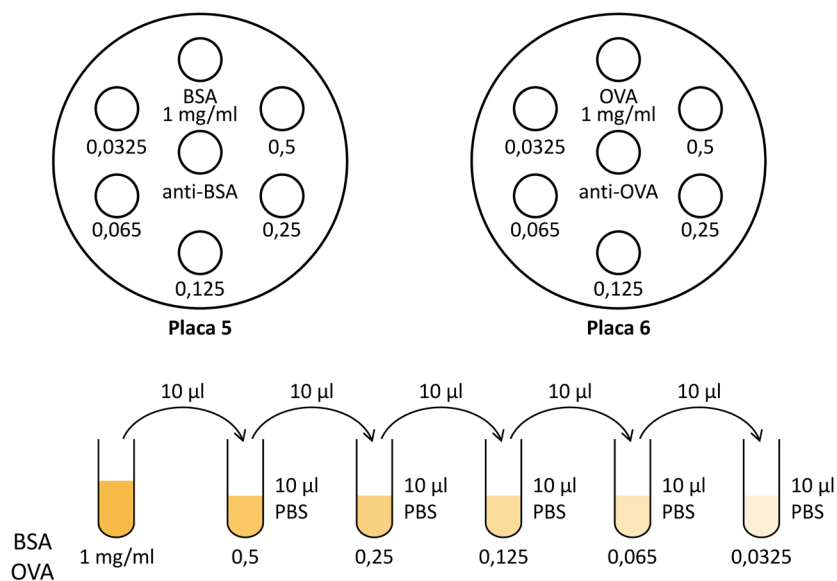
Pocillo central: antisero anti-BSA

Pocillos periféricos: BSA a 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,065 mg/ml, 0,0325 mg/ml

Placa 6:

Pocillo central: antisero anti-OVA

Pocillos periféricos: OVA a 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,065 mg/ml, 0,0325 mg/ml





Guía para realizar los pocillos.

Aspecto de los pocillos.

Ejemplo de un arco de precipitación

Interpretación de los resultados:

- Deducir la especificidad de los antisueros a partir de los resultados de las placas 1 y 2. Determinar si BSA y OVA contienen algún determinante antigénico común.
- Determinar el título de ambos antisueros, a partir de los resultados de las placas 3 y 4.
- Determinar la zona de equivalencia a partir de los resultados de las placas 5 y 6. Observar la distancia de los arcos con respecto al pocillo central en función de la concentración del antígeno, a partir de las placas 5 y 6.

Recordar que:

“Título de anticuerpo”, indica cuanto puede diluirse el suero antes de que la prueba se torne negativa (es por lo tanto la última dilución que da lugar a la aparición de arco de precipitación). El título depende tanto de la concentración de anticuerpos en el suero, como de la afinidad, y variará de acuerdo con la sensibilidad de la prueba.

La zona de equivalencia corresponde al precipitado más fino y más claro.

PRÁCTICA 3

El ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas)

1.- Introducción y objetivos

El Enzimo-Inmuno-Ensayo denominado ELISA es la técnica más utilizada en la actualidad para cuantificar casi cualquier proteína soluble en la mayor parte de los fluidos corporales o medios de cultivo en el laboratorio. Es un inmunoensayo en medio líquido, donde uno de los componentes (Ag o Ac) está adsorbido sobre plástico. La técnica se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los inmunocomplejos serán revelados mediante la adición de un sustrato específico de la enzima que dará un producto coloreado, fácilmente cuantificable con un espectrofotómetro. El método combina la especificidad de la unión de los anticuerpos con la amplificación de señal que brindan las reacciones enzimáticas, por lo que en la práctica clínica es la técnica inmunológica más empleada por su sencillez y sensibilidad.

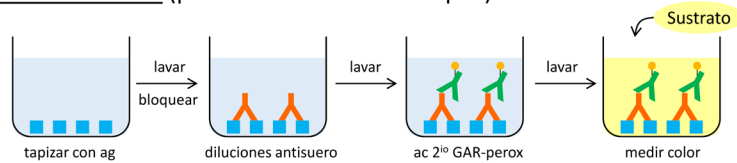
Existen múltiples variantes de la técnica, aunque las más habituales son las llamadas ELISA indirecto, ELISA competitivo y ELISA en sándwich.

1.- El **ELISA indirecto** es la modalidad a utilizar cuando queremos cuantificar anticuerpos específicos en un suero (por ejemplo, para diagnosticar una enfermedad infecciosa, o autoinmunitaria). El Ag se adsorbe al soporte (pocillos de una placa de microtitulación), y se adiciona una dilución del suero del paciente en estudio. Si hay anticuerpos se unirán a los antígenos. Para revelar la unión se adiciona un anticuerpo frente a inmunoglobulinas humanas marcado con una enzima (anticuerpo secundario). Finalmente se añade el sustrato de la enzima y se mide la aparición del producto coloreado. Podemos hacer una estimación cuantitativa de anticuerpos determinándose el “Título de anticuerpos”, es decir, cuanto puede diluirse el suero antes de que la prueba se torne negativa. Obsérvese que el título de un suero dado variará de acuerdo a la sensibilidad de la prueba.

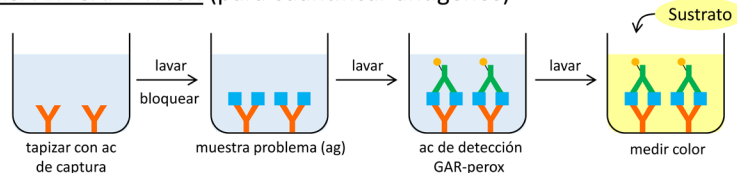
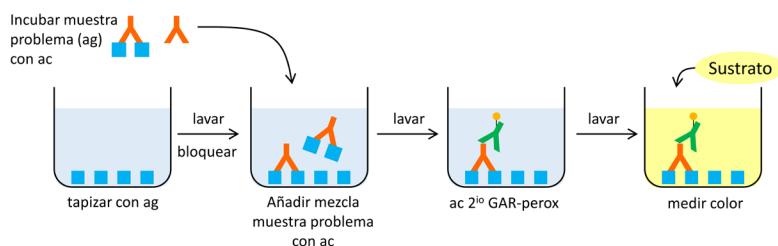
2.- Cuando lo que se va a cuantificar es una proteína sérica (por ejemplo, una citocina, una hormona o una toxina bacteriana), se utiliza el ELISA competitivo o el ELISA en sándwich.

ELISA en sándwich. En este caso se pega al plástico un anticuerpo. Después se añade la muestra problema, que si contienen la proteína se unirá al anticuerpo. Posteriormente se añade un segundo anticuerpo frente a la proteína marcado con una enzima. De este modo el antígeno se encuentra “emparedado” entre los dos anticuerpos. Finalmente se añade el sustrato de la enzima y se mide la aparición del producto coloreado. Utilizando dos anticuerpos monoclonales frente a dos epítomos diferentes del mismo antígeno el sistema tiene mayor poder para discriminar entre antígenos diferentes. La comparación con un rango de estándares hace posible la cuantificación del antígeno.

ELISA competitivo. Se incuba en solución el anticuerpo específico del antígeno con la disolución que contiene el antígeno. La mezcla se añade a pocillos recubiertos previamente con antígeno en exceso. Tras su lavado se añade un anticuerpo secundario y conjugado con una enzima que se une al anticuerpo primario que no había unido antígeno originalmente. Finalmente se añade el sustrato de la enzima. La concentración de antígeno, en el fluido biológico, es inversamente proporcional al color que se produce. La comparación con un rango de estándares hace posible la cuantificación del antígeno.

➤ **ELISA INDIRECTO** (para cuantificar anticuerpos)

Titular antisueros anti-OVA y anti-BSA ensayándolos frente a soluciones antigénicas de OVA y BSA, respectivamente.

➤ **ELISA EN SÁNDWICH** (para cuantificar antígenos)➤ **ELISA COMPETITIVO** (para cuantificar antígenos)

Determinar la concentración de BSA en una muestra problema interpolando el valor de absorbancia en una recta patrón.

En la práctica vamos a realizar un **ELISA indirecto** y un **ELISA competitivo**. Las soluciones de anticuerpo que vamos a utilizar son sueros de conejo hiperinmunizados (antisueros policlonales) frente a dos antígenos (albúmina de suero de ternera: BSA y albúmina de huevo de gallina: OVA), es decir, anti-BSA y anti-OVA.

ELISA indirecto

El antisuero anti-BSA, se ensayará frente a la solución de BSA y el antisuero anti-OVA se ensayará frente a la solución de OVA. De esta forma podremos titular ambos antisueros.

ELISA competitivo.

Determinaremos la concentración de un antígeno (BSA) en una muestra problema, interpolando el valor de absorbancia en una recta patrón.

2.- Materiales, reactivos y disoluciones

- Soluciones antigénicas (BSA y OVA a 1 mg/ml, en PBS)
- Muestra problema: solución de BSA de concentración desconocida.
- Anticuerpos primarios (antisueros anti-BSA y anti-OVA)
- Anticuerpo secundario (GAR-perox, antisuero de cabra frente a inmunoglobulinas de conejo, marcado con peroxidasa)
- Placas de microtitulación para ELISA de 96 pocillos
- Tampón PBS
- Tampón PBS con Tween 20 al 0,1% para los lavados

- Tampón carbonato/bicarbonato 60 mM a pH 9,6
- Solución de saturación (1% de gelatina en PBS)
- Solución del sustrato de la enzima (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) junto con peróxido de hidrógeno)
- Solución de parado (ácido sulfúrico 0,5 M)
- Micropipetas y puntas de 2 a 1000 μ l
- Lector de ELISA de lectura automática.
- Matraces, tubos de ensayo y gradillas para preparar diluciones

3.- Protocolo experimental

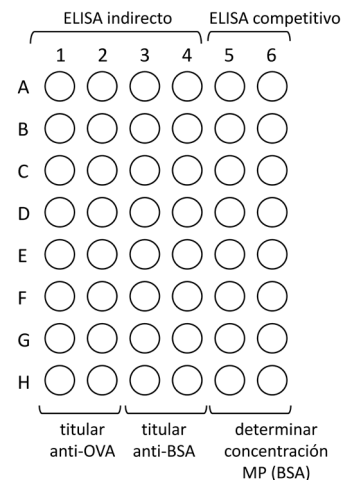
Primer día

- Realizar el tapizado de la placa con 50 μ l/pocillo de la solución antigénica disuelta en el tampón carbonato sódico. OVA (columnas 1 y 2) y BSA (columnas 3-6) a 25 μ g por ml e incubar las placas a 4°C durante toda la noche.

Disposición de los dos ELISAS en la placa de microtitulación →

Segundo día

- Para el ELISA competitivo se prepara una serie de **tubos** para la incubación previa del antígeno (patrón y problema) con el anticuerpo, con las siguientes cantidades. Incubar a temperatura ambiente durante dos horas con agitación ocasional.



Tubo	BSA a 1mg/ml (μ l)	PBS (μ l)	Muestra problema (μ l)	Antisuero anti-BSA (1:2500) (μ l)	Posición en la placa
1	-	100	-	100	A
2	2,5	97,5	-	100	B
3	5	95	-	100	C
4	10	90	-	100	D
5	20	80	-	100	E
6	30	70	-	100	F
7	40	60	-	100	G
8	-	-	100	100	H

- Realizar tres lavados de los pocillos de la placa con PBS con tween 20 al 0,1% (100 μ l/pocillo)
- Saturar las placas con 100 μ l/pocillo de una solución de gelatina al 1% en PBS, durante 45 min a 37°C.
- Realizar tres lavados de los pocillos de la placa con PBS con tween 20 al 0,1% (100 μ l/pocillo)

- Para el ELISA indirecto adicionar a los pocillos 50 μ l de las distintas diluciones de los anticuerpos primarios en PBS. Los anticuerpos primarios se ensayarán a diferentes diluciones (que se realizarán en la misma placa), empezando a 1/5000.
- Para el ELISA competitivo cargar 50 μ l de cada tubo en los pocillos correspondientes (por duplicado).
- Incubar toda la noche a 4°C.

Tercer día

- Realizar tres lavados de los pocillos con PBS con tween 20 al 0,1% (100 μ l/pocillo)
- Adicionar a los pocillos 50 μ l del anticuerpo secundario (GAR-peroxidasa) diluido 1/10000 en PBS, e incubar 45 min a 37°C.
- Realizar cuatro lavados de los pocillos con PBS con tween 20 al 0,1% (100 μ l/pocillo)
- Adicionar a los pocillos 50 μ l del sustrato de la peroxidasa e incubar hasta la aparición de color. La reacción se para adicionando 25 μ l de la solución de parado.
- Leer el color desarrollado a 450 nm en lector microtitulador de ELISA de lectura automática.

Interpretación de los resultados:

- ELISA indirecto. Tras la lectura de la absorbancia para cada dilución del antisuero (para cada sistema antígeno anticuerpo). Determinar el título de ambos antisueros y compararlo con el obtenido mediante Ouchterlony.
- ELISA competitivo. Representar los valores de Absorbancia a 450 nm frente a la concentración de BSA (mg/ml) en la curva patrón. Averiguar la concentración de BSA de la muestra problema.

