eman ta zabal zazu

Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

Immunologiako praktika-gidaliburua

Rosario San Millán Gutiérrez eta
Joseba Bikandi Bikandi

ISBN/ISSN: 978-84-9082-199-2

EUSKARAREN ARLOKO ERREKTOREORDETZAREN SARE ARGITALPENA

Liburu honek UPV/EHUko Euskararen Arloko Errektoreordetzaren dirulaguntza jaso du

Immunologia- eta mikrobiologia-laborategian jarraitu beharreko arau orokorrak

---

1. **Lan egin behar da mantala jantzita eta ondo lotuta,** gu eta gure arropak babesteko (kutsadura, koloratzaile eta substantzia kimikoetatik). Ez da irten behar laborategitik laborategiko mantalarekin (kafea hartzera, hitz egitera, klasera...).

2. Lan-eremua beti egon behar da ahal bezain **garbi**, txukun eta huts (bai praktika hasterakoan, bai amaitutakoan). Lan-eremutik kanpo egon behar dira liburu, poltsa eta arropa guztiak. **Lan-eremuan** soilik egon daitezke lanerako beharrezko gauzak (koadernoak, protokoloak, materialak).

3. **Debekatuta dago** laborategian **jatea** (txiklea mastekatzea barne), **edatea edo erretzea**. Ekidin ahoratzea eskuak zein beste edozein objektu. Ez haginka egin boligrafoari, eta ez ukitu aurpegia, begiak eta abar.

4. Ez hasi lanean azalpenak adi entzun eta **protokoloa ondo irakurri** baino lehen. **Galdetu irakasleari** metodoa edo esperimentuaren helburua ulertzen ez duzunean. Zer egin behar den eta nola egin behar den aurrez ezagutzeak istripuak gutxitzen ditu eta denbora hobeto erabiltzea ahalbidetzen du**.**
   Idatzi laborategiko koadernoan praktiketan egindakoari buruzko informazio esanguratsu guztia.

5. Ondo identifikatu erabilitako gauza guztiak beharrezko datuekin (adibidez, Petri kutxetan, portetan eta saiodietan adierazi izena, taldea, data edota esperimentua). Era horretan, materialaren erabilera ez-zuzena saihestuko da.

6. Lanean zehar, **ekidin** kutsadura eragin dezaketen **aire-korronteak**. Eduki saiodi esterilak edo kultibodunak bertikalki euskarrietan, sekula ez mahai gainean etzanda.

7. **Kontuz metxeroekin**, batez ere metxeroaren atzeko aldean dagoen zerbait hartu nahi denean. Istripuak ekiditeko, itzali metxeroa beharrezkoa ez denean.

8. **Utzi kutsatutako material guztia dagokion lekuan** (begiratu kartelak).
   Paperak, pospoloak eta kutsakorrak ez diren materialak zakarrontzira botako dira. Inoiz ere ez harraskara edo beste edukiontzi batera.

9. **Edozein istripuren edo arazoren aurrean (ebaketak, erredurak, kultiboen isurketak...), jakinarazi berehala irakasleari** beharrezko neurriak har daitezen**.**

10. **Laborategitik atera baino lehen,** bai aldi batez edo behin betiko**, garbitu eskuak xaboi germizidaz.**

1. Saguen zelula mononukleatuak lortzeko prozedura

SARRERA

Immunitate-sistemaren funtzionamendua ikertzeko, hainbat lan esperimental egin behar dira. Horretarako, maiz, zelula-populazio edo zelula talde egokiak behar dira, eta zelula horien funtzionamendua baldintza zehatzetan ikertu beharko da.

Posible da zelula-populazio horiek izaki bizi batetik lortzea, gizaki batetik zein esperimentazio-animalia batetik. Giza zelulak lortzea ez da erraza eta, kasu gehienetan, kokapen hauetatik lortzen dira: odol periferikotik, linfa-gongoiletik, pleuraren likidotik eta bronkioen ikuzketatik. Esperimentazio-animalien artean, immunitate-sistemako zelulak lortzeko, sagua erabiltzen da gehien. Kasu horretan, zelulak lortzen dira, batez ere, baretik, timotik, linfa-gongoiletik eta peritoneo-barrunbetik.

Maiz, lortutako zelula-populazio horien purifikazio-prozesua egin behar da, ahalik eta populazio homogeneoenak lortzeko.

Praktika honetan saguak erabiltzen direnez, saguak kontuz manipulatu behar dira, eta, aldi berean, erabakitasunez jokatu behar da animaliaren kaltea edo estresa ekiditeko.

HELBURUAK

1. Sagua manipulatzen ikastea.
2. Saguaren peritoneoko makrofagoak lortzea.
3. Saguaren bareko linfozitoak lortzea.
4. Makrofagoak eta linfozitoak purifikatzea eta purifikatzeko tekniketan trebatzea.

Praktikaren lehenengo zatia

Peritoneoko eta bareko zelulak lortzea.

MATERIALA

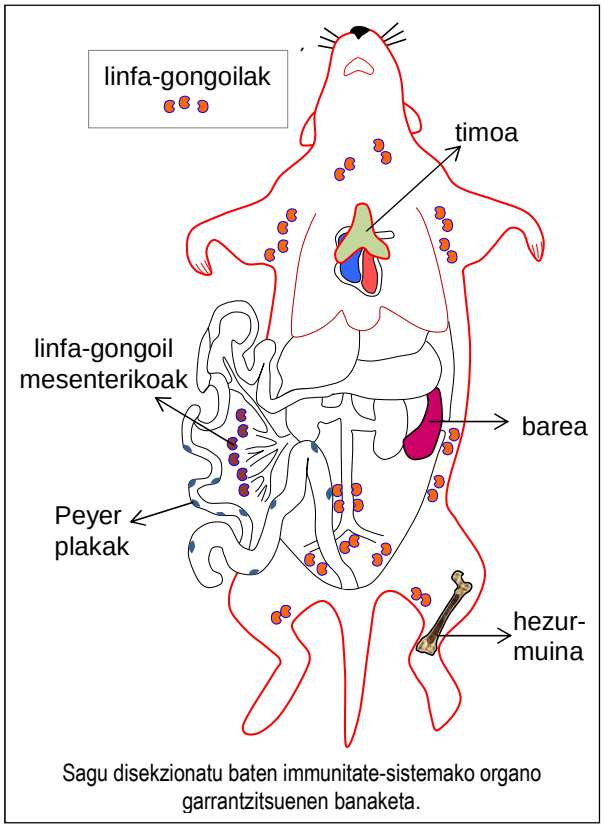
- sagua
- latexeko eskularruak
- sagua disekzionatzeko taula eta orratzak
- disekzio-artaziak eta pintzak
- kloroformo-ganbara
- Pasteur pipetak eta tetinak
- intsulina-xiringa eta orratza
- Petri kutxak
- saiodiak (10 mililitrokoak)
- RPMI (pH 7,2)
- heparina duen gatz-soluzioa (% 0,85 NaCl eta heparina sodikoaren 50 UI/ml), pH 7,2
- PBS tanpoia (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7,2

PRAKTIKAREN GARAPENA

1. Prestatu honako hau: sagua disekzionatzeko taula, disekzio-materiala, Pasteur pipeta tetinarekin, gatz-soluzioa heparinarekin, intsulina-xiringa bat, Petri kutxa bat, RPMI 37 ºC-tan, saiodiak (ez da ahaztu behar egokiro errotulatzea) eta sagua hiltzeko kloroformo-ganbara.
2. Sartu sagua kloroformo-ganbaran, sagua hil arte.
3. Sagua hilda dagoenean, lotu lau hankatxoetatik orratz hipodermikoekin disekzio-taularen gainean.
4. Sartu saiodi huts bat izotzetan.

A. Peritoneotik zelulak lortzeko metodoa

1. Kendu saguaren sabeleko azala, pintzen eta artazien laguntzaz.
2. Ipini sabela tente pintzekin lagunduta, eta, poliki-poliki, ziztatu heparina duen gatz-soluzioa peritoneo barnean, berau gogor ipini arte (hestea edo puxika ziztatu gabe). Eman masaje leun bat sabelari, 10 segundoz.
3. Pintzekin eutsiz, zabaldu zulo txiki bat peritoneo barnean. Jaso likidoa poliki-poliki Pasteur pipetarekin, eta pasatu likidoa izotzean dagoen saiodira (errepikatu behin eta berriz, likido guztia jaso arte).



Sagu disekzionatu baten immunitate-sistemako organo garrantzitsuenen banaketa.

4. Bete saiodia PBSrekin zelulak ikuzteko eta, ondoren, zentrifugatu (10 min x 1500 rpm).
5. Dekantatu gainjalkina eta gehitu 0,5 ml RPMI. Lortutako zelula-esekidura berehala erabil daiteke, edo saiodia hozkailuan gorde daiteke erabili arte.

B. <u>Baretik zelulak lortzeko metodoa</u>

1. Zabaldu saguaren peritoneo barnea eta disekzionatu barea.
2. Kokatu barea Petri kutxa batean. Sarrarazi RPMI epela barean, xiringa batekin eta pintzaz lagunduta. Egin prozedura hori behin eta berriz, barea zurixka gelditu arte.
3. Jaso likidoa Petri kutxatik Pasteur pipeta batekin eta pasatu likidoa saiodi batera (zelulak berehala erabiltzen badira, pasatu zuzenean Ficoll-Paque soluzioa daukan saiodira).
4. Bete saiodia PBSrekin zelulak ikuzteko eta, ondoren, zentrifugatu (10 min x 1500 rpm).
5. Dekantatu gainjalkina eta gehitu 2 ml RPMI. Lortutako zelula-esekidura berehala erabil daiteke, edo saiodia hozkailuan gorde daiteke erabili arte.

<u>Praktikaren bigarren zatia</u>

Zelula mononukleatuen isolatzea Ficoll-Paque soluzioan.

<u>Ficoll-Paque gradientean linfozito-banaketaren oinarria</u>

Ficoll-a da polisakarido hidrofiliko adarduna, neutroa eta pisu handikoa. Oso erraz disolbatzen da soluzio akuosoetan. Ficoll-a Ficoll-Paque soluzioaren osagaia da eta odoleko zelulak banatzeko erabiltzen da.

Ficoll-aren dentsitatea 1,077 gr/cm^3 da. Zelula-populazioak haien dentsitateen arabera banandu ahal izateko, zelulak Ficoll-Paque soluzioaren gainean ipintzen dira. Zentrifugatzean, dentsitate-gradientea sortzen da eta esekiduraren barruan dauden partikulak abiadura desberdinez mugitzen dira. Prozesuaren formula orokorra honako hau da:

$$V = \frac{d^2 (\rho_p - \rho_m)\, g}{18\eta}$$

V = sedimentazio-abiadura;
d = partikularen diametroa; g = indar zentrifugoa;
ρ = ingurumenaren (m) eta partikularen (p) dentsitatea;
η = ingurumenaren biskositatea

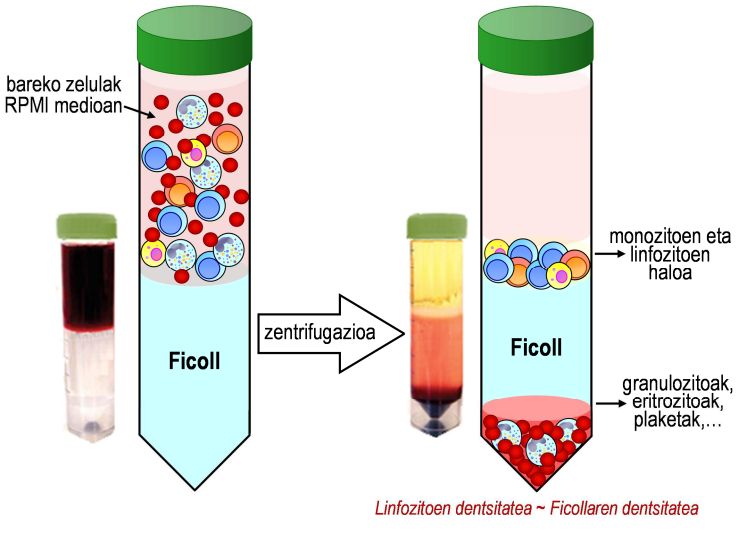
Formula horren arabera, ingurumenaren eta partikularen dentsitatea berdinak direnean V = 0 da, hau da, partikulak gelditzen dira. Beraz, zentrifugatzerakoan, zelulek Ficoll-a baino dentsitate handiagoa badute, eritrozitoak eta PMNak esaterako, hondoratu egiten dira. Aldiz, Ficoll-aren dentsitate bera edo baxuagoa duten zelulak, adibidez zelula mononukleatuak, Ficoll-aren gainean (interfasean) gelditzen dira eta eraztun bat eratzen dute.

MATERIALAK

- Pasteur pipeta tetinarekin
- mikropipetak eta puntak
- saiodiak
- 2 ml Ficoll-Paque duen saiodia
- RPMI (pH 7,2), antibiotikoekin eta % 10 behien fetu-serumarekin aberastua

PRAKTIKAREN GARAPENA

1. Hartu aurreko egunean hozkailuan gordetako zelulak, zentrifugatu behin eta kendu gainjalkina.
2. Gehitu RPMI epelaren 0,5 ml eta berreseki zelulak Pasteur pipetarekin.
3. Hartu bareko zelula-esekidura Pasteur pipetarekin eta, poliki-poliki, bota zelulak Ficoll-Paque soluzioaren gainean, saiodia 45 ºC-tan mantenduz. Zelula-esekidura guztia Ficoll-Paque soluzioaren gainean dagoenean, zentrifugatu saiodia (10 min x 1500 rpm).
4. Hartu saiodia kontu handiz (astindu gabe), eta jaso zelula mononukleatuen eraztuna Pasteur pipetarekin. Pasatu zelulak beste saiodi batera, gehitu 3 ml RPMI zelulak ikuzteko, eta zentrifugatu (10 min x 1900 rpm). Kendu gainjalkina eta berreseki zelulak 1 ml RPMI aberastuan.
5. Kendu gainjalkina eta berreseki zelulak 1 ml RPMI aberastuan.



Zelulen banaketa Ficoll-Paque soluzioan

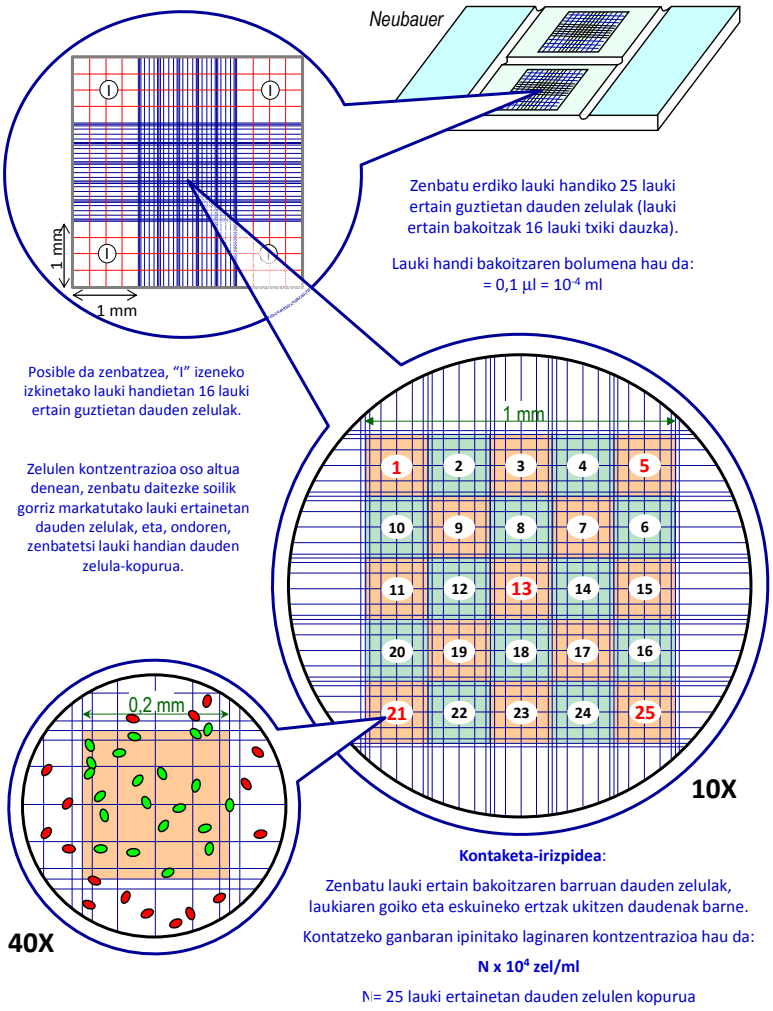
2. Zelula-esekiduren kontzentrazioaren kalkulua kontatzeko ganbaretan

SARRERA

Zelulak erabiltzen dituen edozein lan esperimentalean, immunologiarekin erlazionatutako hainbat ikerketatan gertatzen den bezalaxe, zelulak bizirik edota kopuru zehatzetan egon behar dira.

Hainbat metodo daude zelula-esekidura baten kontzentrazioa kalkulatzeko. Horietariko bat da lagina zuzenean mikroskopioan behatzea eta zelulak zenbatzea kontatzeko ganbara batean. Oso metodo erabilgarria da, erraza eta merkea izateagatik. Nahiz eta kontatzeko ganbara mota asko egon, funtzionamenduaren oinarria berdina da kasu guztietan. Ganbara horiek porta bereziak dira, eta haien arteko desberdintasun nagusia da ganbara bakoitzak landuta daukan saretxoa. Azalera ezaguna duen sare hori da, hain zuzen, zelulak zenbatzeko lekua, eta horrelako bi gune daude kontatzeko ganbara bakoitzean. Estalkia jarri ondoren, finkoa eta ezaguna da sare horren gainean kokatzen den laginaren bolumena (gehienetan 0,1 µl). Beraz, bolumen txiki horretan dauden zelulak zenbatuz gero, laginaren kontzentrazioa kalkula daiteke.

Horrelako ganbarak sortu zirenean odol-zelulak zenbatzeko erabili zirenez "hemozitometroak" zeritzen eta gaur egun, nahiz eta beste zelula mota batzuk zenbatzeko ere erabili, izen hori mantentzen da.



Neubauer kontatzeko ganbara

HELBURUAK

1. Kontatzeko ganbara batean (Neubauer edo Thoma) zelulen kontzentrazioa kalkulatzea.
2. Zelula-esekidura kontzentrazio egokira doitzea (kontzentratzea edo diluitzea).

MATERIALA

- zelula-esekidurak, adibidez, makrofago- edota legamia-esekidurak
- PBS tanpoia (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7,2
- plastikozko 1,5 ml-ko hodiak (mikrozentrifugagailu-hodiak)
- mikropipetak eta mikropipetentzako puntak
- mikroskopio optikoa
- kontatzeko ganbara (Thoma edo Neubauer *improved*) eta estalkiak
- xukapapera

PRAKTIKAREN GARAPENA

Eskuragai dugun kontatzeko ganbararen arabera (Neubauer *improved* edo Thoma), honako protokoloetariko bat jarraituko da:

A) <u>Neubauer *improved* kontatzeko ganbararen erabilera</u> (ikus ezkerreko irudia)

Ganbara honen kontatzeko lauki-sarea 9 lauki handiz osatuta dago, bakoitza 1 mm^2-ko azalerarekin.

Erdiko lauki handia 25 lauki ertainetan bananduta dago, eta horietariko bakoitzak 16 lauki txiki dauzka barruan.

Izkinetako 4 lauki handiak (irudian "I" hizkiarekin markatuta) 16 lauki ertainez osatuta daude.

Kontaketa egin daiteke erdiko lauki handian zein izkinetakoetan, ikertzen diren zelulen tamainaren arabera.

Lagina estalkiaren azpian jartzen dugunean, zelula-esekidurak 0,1 mm-ko altuera izango du. Datu horiek guztiak kontuan izanik, lauki handi baten gainean kokatutako bolumena honako hau da:

$$1 \times 1 \times 0{,}1 = 0{,}1\ mm^3 = 10^{-4}\ ml$$

Mikroskopioaren 10X objektiboarekin, bilatzen da kontatzeko ganbararen zenbatzeko aldea (lauki handi bat). Ondoren, 40X objektibora pasatzen da zelulak zenbatzeko. Kontatzen dira lauki ertain guztietan dauden zelulak (25 lauki ertain, erdiko lauki handian zenbatu nahi bada; edo 16, izkinetako laukiren bat aukeratuz gero) irizpidea hau jarraituz:

Zenbatzen dira lauki ertainaren barruan dauden zelula guztiak, goiko eta eskuineko aldea ukitzen daudenak barne (nahiz eta zelularen erdia edo

gehiago laukitik kanpo egon). Irizpide horren arabera, irudian agertzen diren zelula berdeak zenbatu behar dira eta ez dira zenbatzen zelula gorriak.

Zenbaketa errepikatu behar da 25 lauki ertainetan, lauki handian dauden zelula guztiak zenbatu arte, eta, azkenean, zenbatutako zelula guztien batuketa egin behar da.

"N" zelula zenbatzen badira erdiko lauki handian, laginaren kontzentrazioa honako hau da:

$$N \times 10^4 \text{ zel/ml}$$

Emaitza fidagarria izateko, zenbatu behar den zelula-kopuru aproposa lauki handian 25-250 artekoa da (hau da, 0,25-2,5 x 10^6 zel/ml). Kontzentrazio aproposena ~10^6 zel/ml da. Jatorrizko esekiduran zelula gehiegi edo gutxiegi daudenean, zelulak kontatu baino lehen, esekidura hori diluitu edo kontzentratu egin behar da. Horrelako kasuetan, ez dira berdinak kontatzeko ganbaran kokatutako laginaren kontzentrazioa eta jatorrizko esekidurarena. Beraz, kontutan izan behar da "f" diluzio-faktorea (edo kontzentrazio-faktorea) jatorrizko esekiduraren kontzentrazioa estimatzeko:

$$N \times 10^4 \times f \text{ zel/ml}$$

[Hasierako zelula-esekidura] = [diluitutako zelula-esekidura] x diluzio-faktorea

---

B) <u>Thoma kontatzeko ganbararen erabilera</u> (ikus eskumako irudia)

Thoma ganbararen kontatzeko lauki-sarea osatuta dago 1 mm-ko aldea duen erdiko lauki handi bakar batez (10X objektiboarekin osorik ikus daiteke; ikus irudia).

Erdiko lauki handi hori 16 lauki ertainetan banatuta dago. 40X objektiboarekin lauki ertain bat osorik ikus daiteke. Lauki ertain bakoitzak 25 lauki txiki dauzka barruan (eta horietariko lauki handiaren bi aldeak osatzen duten 8 laukiak erditik banatuta daude eta izkinetako bat 4 zatitan) (ikus irudia).

Estalkiaren azpian jartzen denean, laginak 0,1 mm-ko altuera du. Datu horiek guztiak kontuan izanik, lauki handi baten gainean kokatutako laginaren bolumena hau da:

$$1 \times 1 \times 0{,}1 = 0{,}1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$$

Mikroskopioaren 10X objektiboarekin bilatzen da kontatzeko ganbararen zenbatzeko aldea (erdiko lauki handia). Ondoren, 40X objektibora pasatzen da zelulak zenbatzeko. 40X objektiboarekin lauki ertain bakarra ikusten da eta bertan dauden zelulak zenbatzeko irizpide hau jarraitzen da:

Zenbatzen dira lauki ertainaren barruan dauden zelula guztiak, goiko eta eskuineko ertzak ukitzen daudenak barne (nahiz eta zelularen erdia edo gehiago laukitik kanpo egon). Irizpide horren arabera, irudian agertzen diren zelula berdeak zenbatu behar dira eta ez dira zenbatzen zelula gorriak.

Zenbaketa errepikatu behar da 16 lauki ertainetan, lauki handian dauden zelula guztiak zenbatu arte. Amaieran, zenbatutako zelula guztien batuketa egin behar da.

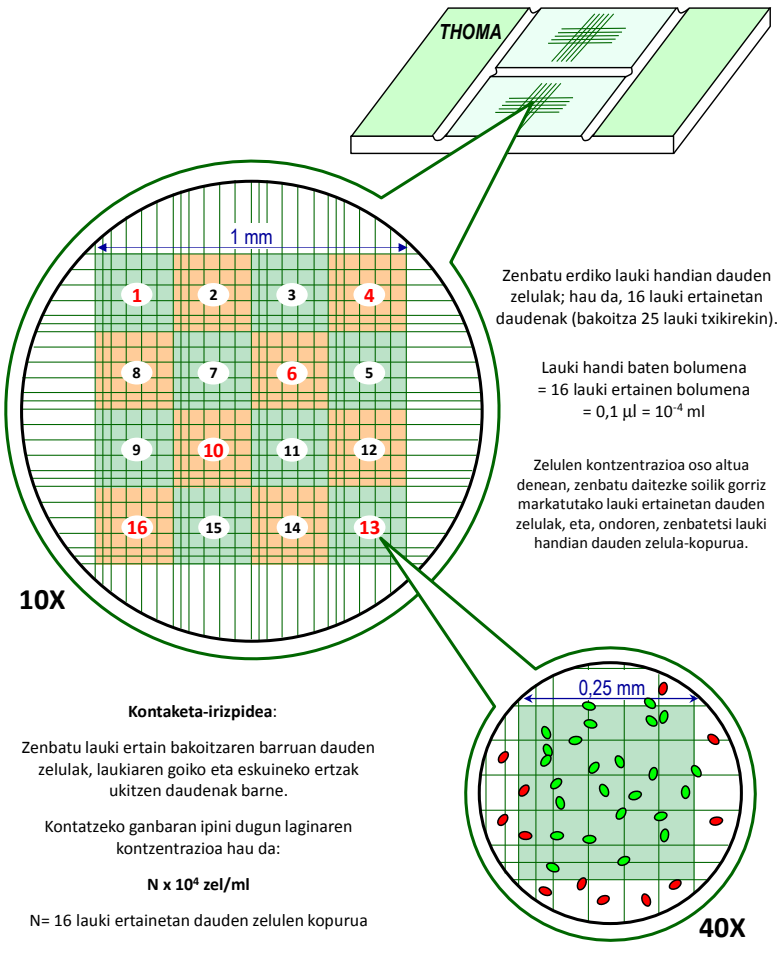
"N" zelula zenbatzen badira erdiko lauki handian, laginaren kontzentrazioa honako hau da:

$$N \times 10^4 \text{ zel/ml}$$

Emaitza fidagarria izateko, zenbatu behar den zelula-kopuru aproposa lauki handian 25-250 artekoa da (hau da, 0,25-2,5 x 10^6 zel/ml). Kontzentrazio aproposena ~10^6 zel/ml da. Jatorrizko esekiduran zelula gehiegi edo gutxiegi daudenean, zelulak kontatu baino lehen, esekidura hori diluitu edo kontzentratu egin behar da. Horrelako kasuetan, ez dira berdinak kontatzeko ganbaran kokatutako laginaren kontzentrazioa eta jatorrizko esekidurarena. Beraz, kontutan izan behar da "f" diluzio-faktorea (edo kontzentrazio-faktorea) jatorrizko esekiduraren kontzentrazioa estimatzeko:

$$N \times 10^4 \times f \text{ zel/ml}$$

[Hasierako zelula-esekidura] = [diluitutako zelula-esekidura] x diluzio-faktorea



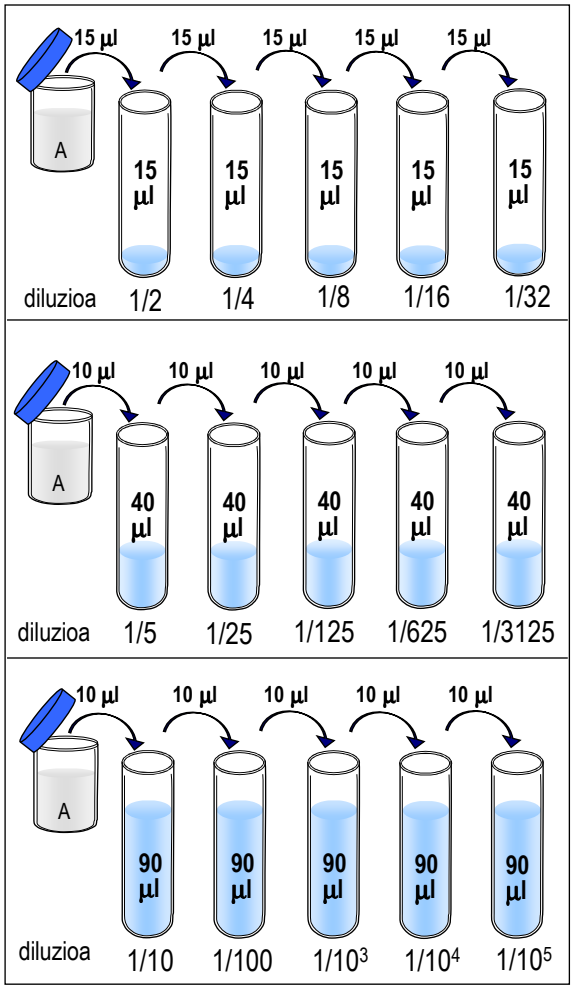
Thoma kontatzeko ganbara

D) <u>Zelula-kontaketa:</u>

1. Garbitu urarekin kontatzeko ganbara, eta sikatu ondo xukapaperarekin.
2. Ipini beirazko estalki bat kontatzeko ganbarak dituen gune berezien gainean.
3. Homogeneizatu lagina eta jarri kontatzeko ganbaran ikertzen ari den zelula-esekiduratik bolumen txiki bat (10 µl). Horretarako, ukitu leunki mikropipetaren puntarekin porta, eta utzi sartzen lagina, kapilaritatez, portaren eta estalkiaren artean.
4. Fokatu lauki handi bat 10X objektiboarekin, eta, gero, behatu 40X objektiboarekin lauki ertain bat.

   Zenbatu, banan-banan eta ordenan, lauki handi bateko lauki ertain guztietan dauden zelulak. Jarraitu "kontatzeko ganbararen erabilera" atalean azaldutako irizpideak (Neubauer ganbaran 25 lauki ertain eta Thoma ganbaran 16 lauki ertain).

   Nahiz eta zelula-kopurua kontagarria izan, gerta daiteke oso altua izatea. Kasu horietan, posible da aukeratzea lauki handiko ondo bananduta dauden zenbait lauki ertain bakarrik, eta zenbatzea bertan dauden zelulak (esaterako, Neubauer *improved* ganbaran 5 lauki ertainetan edo Thoma ganbaran 6 lauki ertainetan dauden zelulak). Datu horietatik estrapolazio bat egin daiteke lauki ertain guztietan zenbat zelula dauden kalkulatzeko (hiruko erregela eginez, 16 edo 25 lauki ertainetan zenbat zelula dauden kalkulatzen da).
5. Kalkulatu jatorrizko zelula-esekiduraren kontzentrazioa.



Diluzioak egiteko prozeduren ereduak

E) <u>Kontzentrazioaren doitzea:</u>

Kontzentrazio jakin batera doiketa egiteko, kontutan hartu behar da jatorrizko zelula-esekiduraren kontzentrazioa zein den (aurrez kalkulatua):

A. Jatorrizko esekiduraren zelula-kontzentrazioa behar dena baino handiagoa bada, lagina diluitu behar da diluzio-faktore egokia erabiliz. Horretarako, medioaren edo tanpoiaren bolumen egokiak erabili behar dira.

B. Jatorrizko esekiduraren zelula-kontzentrazioa behar dena baino txikiagoa bada, lagina kontzentratu behar da. Horretarako, lagina zentrifugatu (edo kasu batzuetan filtratu) behar da. Laginaren bolumen guztia edo bolumenaren zati bat kendu ondoren, esekidura berria bolumen egokian doitu.

Esekidurako zelula-kopurua = esekiduraren kontzentrazioa x esekiduraren bolumena

3. Zelulen bideragarritasunaren kalkulua: bizi-tindaketa Trypan urdinarekin

SARRERA

Zelulen zenbaketa egiteaz gain, komenigarria edo beharrezkoa izaten da zelulen bideragarritasuna kalkulatzea. Horretarako, metodo desberdinak daude; adibidez, bizi-tindaketa. Hainbat bizi-tindatzaile daude, eta odoleko zelulentzako erabilienetariko bat Trypan urdina da. Bizirik eta osasuntsu dauden zelulen mintza osorik dago, eta hainbat substantziaren sarrera oztopatzen du. Hori gertatzen da, hain zuzen, Trypan urdinarekin; bizirik dauden zeluletatik baztertzen da eta zelulek ez dute kolorerik hartzen. Hildako zeluletan (mintzaren osotasuna galdu dutenak), aldiz, tindatzailea barrura sartu ondoren bertan gelditzen da, eta zelulak urdinez tindatzen dira. Trypan urdinarekin ezin dira zelula apoptotikoak eta nekrotikoak desberdindu. Metodo horri ere “koloratzailearen baztertze-metodoa” deritzo. Trypan urdinarekin zelulak tindatu ondoren, berehala egin behar da kontaketa, tindatzailea bera toxikoa delako zelulentzako. Ordu erdi baino gehiago ematen bada zenbaketa egiten, emaitza ez da fidagarria izango.

HELBURUA

Zelulen bideragarritasuna kalkulatzea Trypan urdinarekin egindako bizi-tindaketaren bidez.

MATERIALA

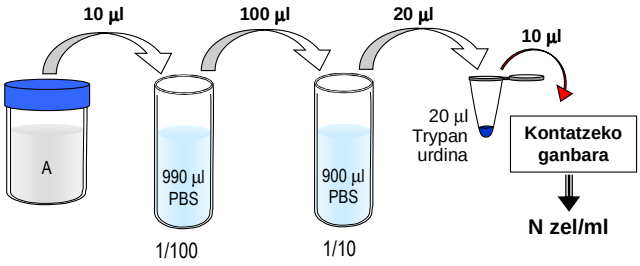
- sagua disekzionatzeko taula eta orratzak
- disekzio-artaziak eta pintzak
- makrofagoen esekidura
- PBS tanpoia (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7,2
- Trypan urdin tindatzailea (% 0,4 *Trypan blue* PBS tanpoian eta iragazitakoa beharrezkoa izanez gero)
- plastikozko 1,5 ml-ko hodiak (mikrozentrifugagailu-hodiak)
- mikropipetak eta mikropipetentzako puntak
- mikroskopio optikoa
- zelulak kontatzeko ganbara (Thoma edo Neubauer *improved*) eta estalkiak
- xukapapera

PRAKTIKAREN GARAPENA

1. Hartu zelula-esekiduraren 10 µl pipetarekin, eta nahastu, poliki-poliki, Trypan urdin koloratzailearen bolumen berdinarekin (1:1 proportzioan) 1,5 ml-ko hodi batean.
2. Homogeneizatu nahastea mikropipetarekin (poliki-poliki, hartu bolumen osoa bost bider eta askatu). Egin prozedura hori kontu handiz, makrofagoak ez kaltetzeko.
3. Jarri lagina kontatzeko ganbaran eta mikroskopioan behatu (40X objektiboarekin; ikus aurreko protokoloa).
4. Kontatu zelula guztiak, eta, horietatik, bereizi zenbat dauden hilda; hau da, zenbat tindatu diren urdinez eta zenbat ez (bizirik daudenak). Egin irakurketa berehala (lagina prestatu eta hurrengo bost minututan), koloratzaile berak denborarekin bideragarritasuna gutxitzen duelako.
5. Kalkulatu bideragarritasuna formula honekin:

$$\text{Bideragarritasunaren ehunekoa} = \frac{\text{Zelula biziak}}{\text{Zelula-kopuru osoa}} \times 100$$

Zelula bideragarriekin lan egiteko gutxieneko bideragarritasunak % 86 izan behar du.



Laginaren (A) kontzentrazioa = N x 10^4 x 100 x 10 x 2 = 2N x 10^7 zel/ml

Trypan urdinarekin egindako bizi-tindaketaren ondorengo zelulen kontzentrazioaren kalkulua. Kontzentrazioa kalkulatzeko metodoa aurreko protokoloan dago azalduta.

4. Makrofagoen fagozitosi-ahalmenaren balorazioa

SARRERA

Fagozitoak dira odolean eta ehunean hainbat material irentsi eta suntsitzen dituzten zelulak. Material hori jatorri desberdinekoa izan daiteke: mikroorganismoak, hondakinak, partikula kaltegarriak eta zelula hilak, besteak beste. Izan ere, fagozitosia da immunitate-sistemak patogenoak ezabatzeko erabiltzen duen mekanismo nagusietarikoa. Hori dela eta, erlazionatuta daude zelulen ekintza fagozitikoa eta ostalariaren immunitate-sistema innatoaren eraginkortasuna. Beste alde batetik, makrofagoek egindako fagozitosia funtsezkoa da linfozitoei antigenoen aurkezpena egiteko, eta, horrekin batera, patogenoaren kontrako erantzun immune espezifiko aproposa lortzeko. Beraz, fagozitosiaren eskasiek eragina dute zenbait mikroorganismoren kontrako erantzun immune espezifikoetan (bakterioak eta onddoak, besteak beste), eta baita immunokonplexuen ezabaketan eta erantzun immune espezifiko eraginkorraren beste akats batzuetan ere.

Fagozitoetan agertzen diren akatsek gaixotasun larriak sorrarazten dituzte; adibidez, Chediak-Higashi sindromea eta gaixotasun granulomatoso kronikoa. Gaixotasun horiek dituzten pertsonak sentikor bihurtzen dira birulentzia gutxiko mikroorganismoekiko.

Odolean, neutrofiloa da zelula fagozitiko nagusia, eta ehunetan, makrofagoa. Makrofagoak sakabanatuta daude ehun konektiboetan eta zenbait organoetan (gibela, barea, birika edo linfa-gongoiletan), non astetan edo hilabetetan bizirauten baitute.

Infekzio bat hasten denean, hainbat seinale sortzen dira infekzio-gunean. Seinale horiek fagozitoak kaltetutako ehunera joanarazten dituzte (kimiotaxia) agente infekziosoa suntsitzeko. Odoleko fagozitoek, odol-hodien pareta zeharkatu behar dute (diapedesia) infekzio-fokura heltzeko.

Fagozitoa eta suntsitu behar den materiala topatzen direnean, fagozitosia gertatzen da. Fagozitosian, mintzak partikula solidoak bildu eta barneratu ondoren, partikula horiek degradatu egiten dira fagosoma baten barruan.

Fagozitosia lau urratsetan banatu daiteke:

1. Atxikidura
2. Irenstea edo ingestioa
3. Digestioa
4. Exozitosia

Klinikan, ekintza fagozitikoa ebaluatzeko, prozesu horren urratsak neurtzen dituzten laborategiko probak egiten dira. Maiz, zenbait gaixotasun dituzten indibiduoen zelula fagozitikoak ikertzen dira. Kasu horietan, fagozitosiaren zein urratsetan egon daitekeen akatsa ikertzen da.

Gaur egun, zenbait teknikaren bidez iker daiteke zelulen fagozitosi-ahalmena, besteak beste, isotopo erradioaktiboak erabiltzen dituen fluxu-zitometriaz. Honako hau da ekintza fagozitikoa ebaluatzeko metodo erraz eta erabilgarria: porta baten gainean fagozitoek irentsitako partikulen behaketa mikroskopikoa, lagina tindatu ondoren. Fagozitosiaren azkenengo urratsak (digestioa) partikulen irenste arrakastatsuaren menpekoak dira. Hori dela eta, fagozitosi-prozesua ebaluatzeko, irenstearen ikerketa metodo arin eta nahiko sinplea da.

Praktika honetan, “fagozitosi” hitza erabiliko da, soilik, fagozitosi-prozesuaren atxikidura eta irenstea urratsak definitzeko. Sagu-makrofagoen fagozitosi-ahalmenaren honako urrats hauek ikertuko dira: legamiak atxikitzeko eta irensteko ahalmena. Horretarako, batera jartzen dira J774 A.1 lerro zelularreko sagu-makrofagoak eta *Candida* (*C. albicans* edo *C. guilliermondii*) legamiak, behien serum fetala (FBS: *Fetal Bovine Serum*) duen kultibo-medio aproposean.

HELBURUAK

1. Makrofagoekin (zelula fagozitikoak) eta legamiekin (fagozitatzen den antigenoa) *in vitro* fagozitosia egitea.
2. Makrofagoek egindako *Candida* legamien fagozitosia mikroskopioan behatzea eta ebaluatzea.
3. Praktikan erabilitako makrofagoen fagozitosi-indizea eta irensteko ahalmena kalkulatzea.

MATERIALA

- saguen makrofagoak: J774 A.1 zelula-lerroa
- legamiak*: C. albicans* edo *C. guilliermondii*
- RPMI (pH 7,2), % 10 FBS-rekin aberastuta.
- PBS tanpoia (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7,2
- Trypan urdin tindatzailea (% 0,4 Trypan blue PBS tanpoian, eta iragazitakoa beharrezkoa izanez gero)
- Giemsa tindatzailea 1/20 diluitua ur distilatuan
- alkohol metilikoa
- murgil-olioa
- mikropipetak eta pipetentzako puntak
- mikroskopio optikoa
- kontatzeko ganbara
- portak eta estalkiak
- plastikozko 1,5 µl-ko hodiak (mikrozentrifugagailu-hodiak)
- mikrozentrifugagailua
- tindatzeko euskarria eta kubeta
- bainua 37 ºC-tan
- xukapapera

METODOLOGIA

A) *Candida* legamien prestaketa

1. Hazi legamiak glukosadun Sabouraud agarrean 37 ºC-etan, 24 orduz.
2. Bildu zelulak eta ikuzi PBSrekin: zentrifugatu 2500 rpm-tara, 5 minutuz eta kendu gainjalkina. Errepikatu ikuzketa.
3. Berreseki RPMI medioan, zenbatu kontatzeko ganbaran eta doitu 2 x 10^7 zel/ml kontzentraziora (ikus 2. praktikaren protokoloa).

B) Makrofagoen prestaketa

1. Inokulatu J774 A.1 saguen makrofagoak (5 x 10^5 zel/ml) 25 cm^2 azalerako zelula-hazkuntzarako ontzian, RPMI 1640 medioan, 10 U/ml antibiotikorekin eta % 10 FBS-rekin batera. Inkubatu 37 ºC-tan eta % 5 CO_2-rekin.
2. Askatu makrofagoak zelula-tapizetik. Ikuzi RPMI-FBS medioarekin: zentrifugatu 1200 rpm-tara, 5 minutuz eta kendu gainjalkina.
3. Berreseki makrofagoak RPMI-FBS medioan.
4. Egin bizi-tindaketa Trypan urdinarekin, eta, kontatzeko ganbara erabiliz, kalkulatu bideragarritasuna eta zelulen kontzentrazioa (ikus 2. praktikaren protokoloan).
5. Doitu kontzentrazio honetara: 2 x 10^6 makrofago bideragarri/ml (ikus 2. praktikaren protokoloa).

C) Fagozitosiaren proba:

1. Jarri batera, plastikozko 1,5 µl-ko hodi batean, 10^6 makrofago eta 10^7 legamia 1 ml-ko azken bolumenean (makrofago/legamia ratioa = 1/10).
2. Zentrifugatu lagina mikrozentrifugagailuan 500 rpm-tara, 2 minutuz, eta kendu gainjalkina.
3. Gehitu 200 µl RPMI-BFS medioa makrofagoei, eta, poliki-poliki, berreseki zelulak.
4. Inkubatu, mugimenduarekin, bainu batean 37 ºC-tan 40 minutuz. Fagozitosiaren zinetika ikertu nahi izanez gero, erabil daitezke hainbat inkubaldi; adibidez 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 eta 60 minututakoak.
5. Inkubazioaren ondoren, kokatu laginaren bolumen guztia porta garbi eta siku baten ezkerraldean.
6. Hedatu lagina mikropipetaren puntarekin, lagina dagoen lekutik portaren beste aldera arte, (**prozedura egin behar da behin bakarrik, makrofagoei kalte ez egiteko**).
7. Utzi portak sikatzen ingurumen-tenperaturan.

D) Zelulen Giemsa tindaketa

1. Jarri portak euskarri finko baten gainean, eta kokatu tindaketa-kubetaren gainean (identifikatu egin behar da lagina dagoen aldea eta kokatu gorantz begira).
2. Fixatu prestakina alkohol metilikoarekin: estali porta alkohol metilikoz eta lurrintzen utzi ingurumen-tenperaturan.
3. Estali porta Giemsa tindatzailez (1/20 diluitua uretan) eta itxaron bi minutu.
4. Dekantatu, eta ondo garbitu ur destilatuarekin.
5. Utzi portak lehortzen (portaren gehiegizko ura xurga daiteke kontu handiz xukapaper batekin, baina ezin da igurtzi porta sikatzeko).

IRAKURKETA ETA EMAITZEN INTERPRETAZIOA

1. Jarri murgil-olioaren tanta bat lagin gainean. **Ez da estalkirik jarri behar.**
2. Behatu lagina mikroskopio optikoan X1000 handipenarekin.
3. Legamiak tindatuta egon behar dira urdin iluna-moreaz, eta makrofagoak kolore berdintsuarekin, baina argiagoa. Makrofagoetan nukleoa ilunago ikusten da eta zitoplasma urdin-arrosa argia. Zenbait kasutan, mikroskopioaren mikrometroa mugitzean, makrofagoen mintzak argi ikusten dira, eta bereiz daiteke makrofagoak fagozitatzen ari diren edo fagozitatu gabeko legamien ondoan dauden.
4. Zenbatu gutxienez 100 makrofago. Aztertu zenbat makrofagok duten atxikitako edota irentsitako legamiak, eta baita, zenbatu atxikita edota irentsitako legamien kopurua (ikus 1. irudia).

Lorturiko datuekin honako parametro hauek kalkula daitezke:

Fagozitosi-indizea da fagozitatzen ari diren makrofagoen ehunekoa. Estimazio fidagarria lortzeko kontatu behar dira, gutxienez, 600 makrofago.

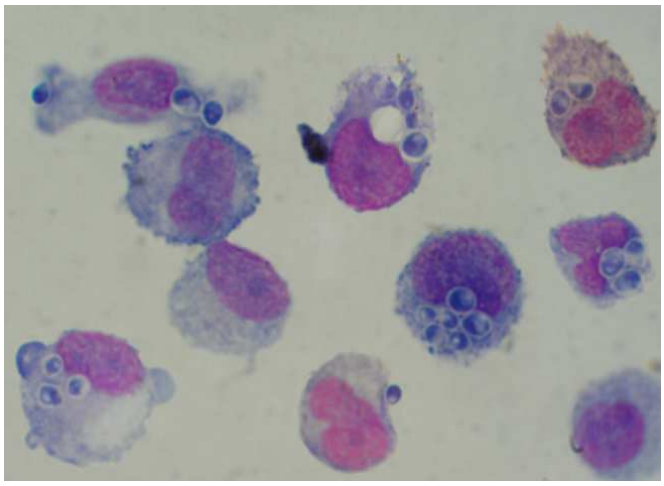
$$\text{Fagozitosi-indizea} = \frac{\text{fagozitatzen dauden makrofago-kopurua}}{\text{kontaturiko makrofago-kopuru osoa}} \times 100$$

Makrofagoen **irensteko ahalmena edo ingestio-ahalmena** da makrofago batek fagozitatzen dituen legamien batezbestekoa. Estimazio fidagarria lortzeko kontatu behar dira, gutxienez, fagozitatzen dauden 100 makrofago.

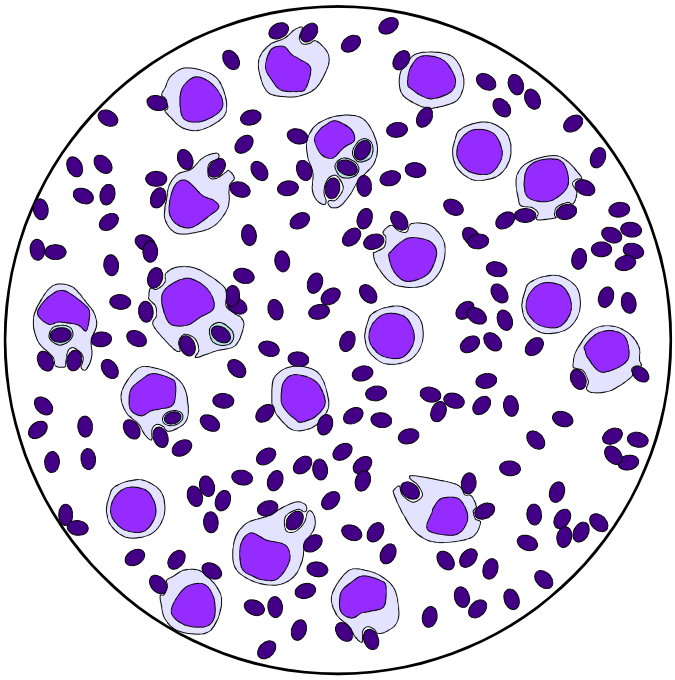
$$\text{Makrofagoen irensteko ahalmena edo ingestio-ahalmena} = \frac{\text{N makrofagoek irentsitako zelula-kopurua}}{\text{N makrofago}}$$

Non N ≥ 100 den

Sagu-makrofagoek *Candida albicans* legamiak fagozitatzen. Ikus daiteke legamien fagozitosia zenbait urratsetan.



Mikroskopioan ikus daitekeen fagozitosi baten irudikapen eskematikoa, eta adibide honetan oinarritutako problema sinplifikatu baten ebazpena.



- Irudian agertzen diren 20 makrofagoetatik, 16 makrofago fagozitatzen daude.

  Beraz, **"fagozitosi-indizea"** hau da:

  (16/20) x 100= % 80

- Fagozitatzen dauden 16 makrofagoek 48 legamia harrapatu dituzte:

  Beraz, makrofagoaren **"irensteko ahalmena"** hau da:

  48/16= 3

Antigeno-antigorputz interakzioak: aglutinazioa, immunodifusioa eta prezipitazioa

Antigeno-antigorputz arteko interakzioak (Ag–Ab) afinitate eta espezifizitate altuko elkarketa bimolekularrak dira. Nahiz eta entzima-substratuen arteko elkarketaren antzekoak izan, Ag-Ab elkarketetan ez da aldaketa kimiko itzulezinik gertatzen.

Antigorputzaren eta dagokion antigenoaren arteko interakzioan, hainbat lotura ez-kobalente sortzen dira antigenoaren epitopoaren edo determinante antigenikoaren eta antigorputzaren alde aldakorraren (V_H/V_L) edo paratopoaren artean. Interakzio horiek itzulgarriak direnez, hainbat baldintzatan disozia daitezke antigenoaren eta antigorputzaren arteko elkarketak.

Honako hau izan daiteke antigeno-antigorputz sistema sinplifikatu bat: molekula bakoitzeko epitopo bakarra duen antigeno baten soluzioa eta epitopo horrekiko espezifikoa den antigorputz “monobalente” mota bakarra duen soluzioa. Antigenoaren eta antigorputzaren arteko kontaktuaren ondoren, antigeno-antigorputz konplexuen eraketa eta haien disoziazioa oreka dinamiko batera heltzen dira. Interakzio ikusezin horri **interakzio primarioa** deritzo.

$$Ag + Ab \leftrightarrow AgAb$$

Dena den, antigorputzak gutxienez bibalenteak izaten dira eta antigenoak askotan multibalenteak (molekula bakoitzean epitopo bat edo gehiago errepikatuta). Antigenoen eta antigorputz multibalenteen kontzentrazioak mg/ml mailakoak badira, gertatzen diren erreakzioak ikusgai izan daitezke **“aldaketa”** makroskopikoa sortzen delako. Erreakzio ikusgai horiek **interakzio sekundario** izeneko fenomenoren ondorioz sortzen dira. Prozesu horietan, immunokonplexu primarioak haien artean asoziatzen dira, eta tamaina handiagoko konplexuak sortzen dira. Hori guztia gertatzeko, ez da bakarrik epitopo-paratopo interakzioa gertatu behar, baizik eta egitura konplexuaren eraketa (sarea). Sare hori, aldi berean, hainbat antigorputz-molekulez eta hainbat epitopo dituzten antigeno-molekulez osatuta dago. Egitura horiek soilik lor daitezke zenbait baldintzetan; adibidez, Ag/Ab erlazio egokiekin lan egiten denean eta soluzio fisiologikoetan. Gatz-kontzentrazio altuak, muturreko pH-ek eta 37 ºC-ko tenperatura baino altuagoek immunokonplexuen disgregazioa eragiten dute, eta ikusezin bihurtzen dira. Muturreko baldintza horiek erreakzioa oker interpretatzea eragin dezakete, prezipitaturik ez badago, antigeno eta antigorputzen arteko interakzioa ez dela egon ondorioztatzen baita. Beraz, kasu guztietan, kontrol egokiak egin behar dira, lortutako emaitzen interpretazio fidagarriak egin ahal izateko.

5. Aglutinazioa portan: odol-taldeen identifikazioa

SARRERA

Odol-taldearen determinazioa eritrozitoen mintzean adieraz daitezkeen zenbait antigenotan oinarritzen da. Antigeno horiek izaera desberdinekoak izan daitezke eta, gainera, beste zelula motetan ere adieraz daitezke.

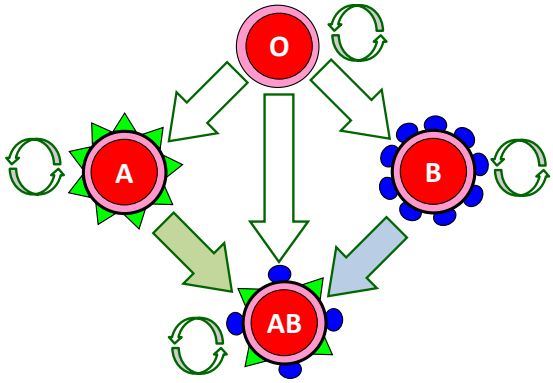
Odolaren funtzioak ezezagunak izan ziren mendeetan zehar. Dena den, medikuek aspalditik susmatzen zuten oso garrantzitsua zela, eta, horregatik, hainbat aldiz saiatu ziren odol-transfusioak egiten zenbait gaixotasun sendatzeko asmoz. Zoritzarrez, ezagutza falta dela eta, kasu gehienetan transfusioak txarrak izan ziren pazienteentzako, eta debekatu egin ziren. 1900ean Karl Landsteiner konturatu zen odol-talde desberdinak zeudela. Aurkikuntza horri esker, odol transfusioetan gertatzen ziren inkonpatibilitateen zergatia ulertu zen, eta odol-inkonpatibilitateen ondorioak prebenitu ahal izan ziren. Odol-taldeak sailkatzeko ABO sistema da klasikoena. Zenbait antigenoren (polisakaridikoren) presentziaren edo gabeziaren arabera hiru eritrozito mota daudela ondorioztatu zen: A, B eta O eritrozitoak. Gene bakarrak kontrolatzen du ABO sistemaren herentzia, eta genearen adierazpena kodominantea da. Horren ondorioz, lau odol-talde mota daude:

- **A odol-taldea:** eritrozitoen azalean A motako antigenoak (oligosakaridoak) adierazten dira, eta serumean B antigenoen kontrako antigorputzak (anti-B antigorputzak) daude.
- **B odol-taldea:** eritrozitoen azalean B motako antigenoak (oligosakaridoak) adierazten dira, eta serumean A antigenoen kontrako antigorputzak (anti-A antigorputzak) daude.
- **AB odol-taldea:** eritrozitoen azalean A eta B motako antigenoak adierazten dira, eta serumean ez dago ez anti-A, ez anti-B antigorputzik.
- **O edo 0 (zero) odol-taldea:** eritrozitoek ez dute adierazten ez A ez B antigenorik, eta, aldiz, serumean bi antigeno mota horien aurkako antigorputzak daude (anti-A eta anti-B antigorputzak).

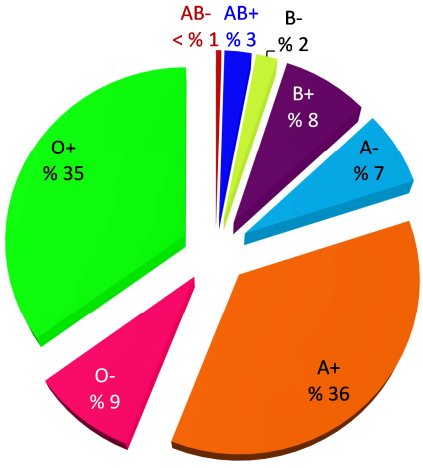
Rh sistemaren aurkikuntza Philip Levine-k 1937an egindako ikerketen emaitza izan zen; jaioberri baten gaixotasun hemolitikoa ikertzean, hain zuzen. 1940an, Landsteiner doktoreak izaera proteikoa zuen Rh odol-antigenoen taldea aurkitu zuen. Rhesus faktorearen edo Rh faktorearen izena dator odolari buruzko ikerketetan erabili ziren Rhesus tximinoetatik. Odolean Rhesus faktorea duten pertsonak Rh positiboak (Rh+) dira; ordea, faktorerik gabekoak Rh negatiboak (Rh-) dira. Rh negatiboak diren pertsonak Rh faktorearen aurkako antigorputzak garatzen dituzte, Rh positiboa den odolarekin kontaktuan izan ondoren. Rh sistemak hainbat antigeno barneratzen ditu, baina antigeno horien artean D antigenoak du ahalmen antigeniko altuena. Populazioaren % 85ek D faktorea duenez, Rh+ da; gainerako % 15ek, aldiz, ez du D faktorerik, eta Rh- da.

1980an *International Society of Blood Transfusion (ISBT)* lanean hasi zen ezartzeko odol-taldeen definizioa eta eta sailkapena. Ordudanik, odol-taldeak definitzen dituzten hainbat sistema eta antigeno deskribatu dira.

ABO eta Rh antigenoak dira giza odol-taldeak deskribatzeko erabiltzen diren antigeno nagusiak. Odol-taldea ezagutzea beharrezkoa da, besteak beste, odol-transfusioak eta transplante gehienak egin baino lehen. Horrela, ekidin egiten dira histoinkonpatibilitateak edo horiekin batera gerta daitezkeen erreakzio immunologiko kaltegarriak (hemolisia, anemia, *shock*a eta abar).
Odol-taldearen determinaziorako, odola aztertu behar da espezifikotasun ezaguneko erreaktiboekin (anti-A, anti-B edo anti-D). Erreaktiboetariko bakoitzarekin aztertutako hematien aglutinazioak edo aglutinazio ezak adierazten du antigeno bakoitzaren agerpena edo gabezia odol-zeluletan.



Emaileen eta hartzaileen arteko erlazioa odol-transfusioetan: odol-talde konkretua duen emaileak odol-talde berdineko hartzaileari eman diezaioke odola, edota geziak adierazten duen norabidea jarraituz.



Odol taldeen proportzioa estatu mailan.

HELBURUAK

1. Hemaglutinazio-prozesua ulertzea eta ikustea.
2. Odol-taldea determinatzea.

MATERIALA

- kotoia
- etanola
- erabilera bakarreko lantzetak
- azuleju zuriak
- odol-taldeak determinatzeko erreaktiboak: anti-A, anti-B, anti-AB eta anti-D

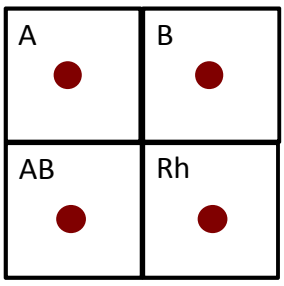
METODOLOGIA

A. Odol tanten lorpena

Odol-taldeen determinaziorako odol tanta batzuk atera behar dira. Horretarako, erabilera bakarreko lantzetak erabiliko dira. Garrantzitsua da lantzeta bat pertsona batek baino gehiagok EZ erabiltzea. **Ikasle bakoitzak soilik bere odola manipulatuko du** (badira odol-bidetik transmititzen diren gaixotasun larriak).

1. Erlaxatu besoa eta, atzamarretan odol-zirkulazioa laguntzeko, luzatu besoa lurrerantz eta mugitu.
2. Garbitu atzamar baten amaiera eta igurtzi alkoholetan bustitako kotoiarekin.
3. Egin ziztada bat atzamarrean lantzetarekin.
4. Egin masajea eskumuturretik esku-ahurrera, odola ziztadaren lekurantz joan dadin (kontuz, atzamarra estutuz gero, odolaren irteera oztopa dezakegu).
5. Odol-taldeen determinaziorako, jarri lau odol tanta aldez aurretik lau zatitan banatutako azuleju zuriaren koadranteetariko bakoitzean (jarri odol tanta bana koadrante bakoitzaren erdian; begiratu beheko eskema).

Odol-taldeen determinazioa egin ahal izateko, proba egin behar da odola atera eta berehala (odola koagulatu baino lehen).

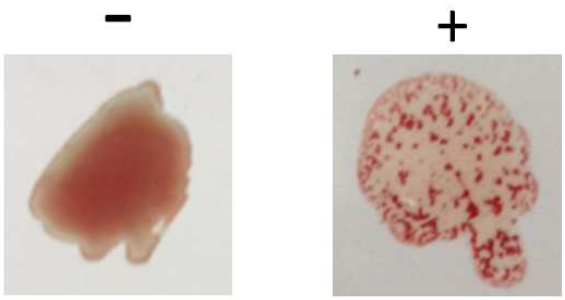


B. Odol-taldeen identifikazioa

1. Markatu azulejua irudian agertzen den bezala.
2. Atera odola, aurreko atalean azaltzen den bezala.
3. Jarri odol tanta bana koadranteetariko bakoitzean (elkarrengandik ondo bereizita).
4. Jaurti antiserum espezifikoen tanta bana odol tanta bakoitzaren gainean (azulejuan markatutakoaren arabera).
5. Egin ~2 cm-ko diametroa duten zirkuluak zotz batekin (edo pipetaren punta batekin), odola eta erreaktiboak nahasteko. Erabili zotz bat lagin bakoitzarentzat.

IRAKURKETA ETA EMAITZEN INTERPRETAZIOA

Aztertu aglutinazioa gertatzen den. Bi minutu igaro ondoren ez bada aglutinaziorik nabaritzen, emaitza negatibotzat joko da.



Irudian, eredu moduan, ikus daitezke aglutinazio negatibo eta positibo bana.

6. Aglutinazio ez-zuzena hodian:
Brucella abortus bakterioaren aurkako serumeko aglutininen detekzioa

SARRERA

Aglutinazioa da antigeno **partikulatu** baten eta bere antigorputz espezifikoen arteko *in vitro* gertatzen den interakzio sekundarioa. Aglutinazioa gertatzeko, bai antigenoa bai antigorputza, funtzionalki gutxienez bibalenteak izan behar dira. Antigenoa (proteina, karbohidratoa, eta abar) zelulen, bakterioen edo beste partikula naturalen azalean badago, fenomenoari **aglutinazio zuzena** deritzo. Antigorputz espezifikoarekin elkartzen den antigenoa ez bada partikularen egitura natiboaren zatia, baizik eta bere

azalean artifizialki kokatuta badago, gertatzen den aglutinazioari, oro har, **aglutunazio pasiboa edo ez-zuzena** deritzo. Euskarri gisa erabiltzen diren partikulak inerteak izan daitezke (latexko partikuluak) edo globulu gorriak. Azken kasu horretan, metodoari **hemoaglutinazio pasiboa edo ez-zuzena** deritzo. Serumaren diluzio baxuetan, antigorputz-molekulen kontzentrazio gehiegizkoak eraginda, posible da aglutinaziorik ez gertatzea. Fenomeno horri **prozona efektua** deritzo.

Laborategi klinikoetan, antigorputzen detekzio serologikorako patologia infekziosoetan eta odol-taldeen tipifikaziorako, oso erabiliak dira aglutinazio-metodoak.

Kasu batzuetan, teknika erabiltzen da soilik detekziorako (kualitatiboa), baina beste kasu batzuetan laginaren diluzioak iker badaitezke, metodo semikuantitatiboa edota kuantitatiboa izan daiteke. Semikuantitatiboa izateko laginaren hainbat diluzio bikoitz ikertu behar dira antigenoaren kopuru konstantearekin, eta, inkubaldiaren ondoren, laginaren titulua atera daiteke emaitzetatik, hau da, azken diluzio positiboa (aglutinazioa ikusten den antiserumaren diluzio handiena)*.

* *Batzuetan titulua adierazten da azken diluzio positibo moduan, baina beste batzuetan azken diluzio positiboaren alderantzizko moduan adierazten da.*

HELBURUAK

1. Aglutinazio-teknikaren oinarriak ulertzea.
2. Serum batean anti-*Brucella* antigorputz aglutinatzaileak dauden ikertzea.
3. Serum bat aglutinazioaren bidez titulatzea.

MATERIALA

- zortzi saiodi 3-5 ml-koak (proba serologikoetarako erabiltzen diren motakoak)
- *Brucella* bakterioen esekidura (antigenoen iturria)
- lagina: antigorputzen iturria den seruma
- mikropipetak eta mikropipetentzako puntak
- PBS tanpoia (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7,2
- berogailua 37 ºC-tan

PRAKTIKAREN GARAPENA

1. Jarri zortzi saiodi euskarri batetan eta markatu 1etik 8ra. Jarraitu taulan eta irudian agertzen den eskema.
2. Gehitu PBSren bolumen egokiak saiodietara.
3. Egin serumaren diluzioak.
4. Gehitu antigeno-soluzioaren 50 µl saiodi bakoitzean.
5. Irabiatu saiodiak
6. Inkubatu 48 orduz 37 ºC-tan.

EMAITZEN IRAKURKETA ETA INTERPRETAZIOA

Lehenengo, behatu kontrol negatiboari dagokion saiodia eta, ondoren, hurrengoak.

Aztertu saiodiak argiaren kontra: egiaztatu gainjalkina argitu den, eta begiratu sedimentuaren agerpena eta itxura.

Ondoren, irabiatu saiodia.

Honako hauek dira lagina negatibotzat ala positibotzat hartzeko irizpideak:

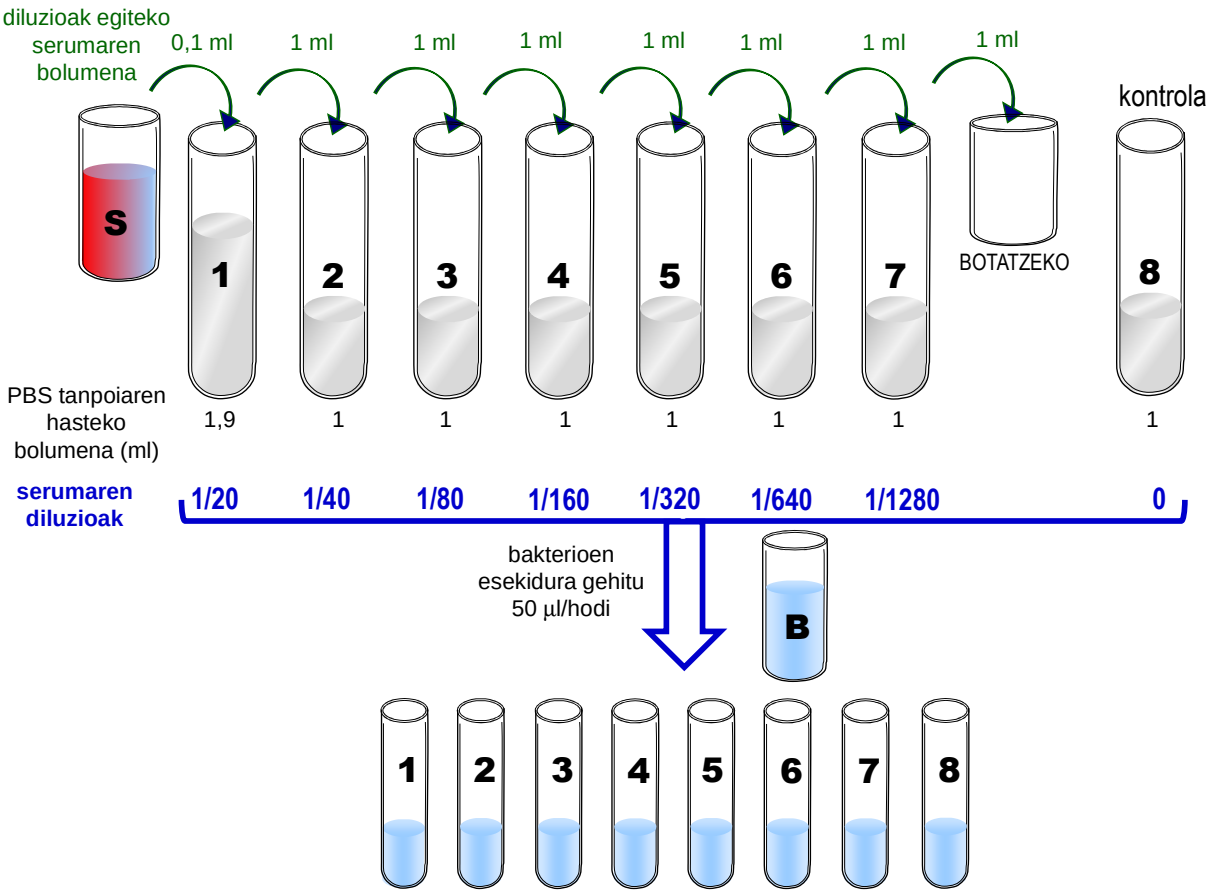
- Erreakzio negatiboa:

Sedimentua puntu bat da. Saiodia irabiatzean opakutasuna ez da aldatzen; zurrunbiloa balitz bezala biratzen du.

- Erreakzio positiboa:

Gainjalkina argitu da eta aglutinatutako sedimentuak saiodiaren hondoa betetzen du. Positiboa izango da oinarriaren > 2/3 betetzen baditu. Titulua dagokio aglutinazioa azaltzen duen azken diluzioari. Hurrengo diluzioa negatiboa izan behar da.

Hodia	1	2	3	4	5	6	7	8 kontrola
PBS (ml)	1,9	1	1	1	1	1	1	1
Lagina (seruma, ml)	0,1	-	-	-	-	-	-	-
Aurreko diluzioetatik (ml)	-	1	1	1	1	1	1	-
Diluzioa	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	



Aglutinazio-testa hodian

7. Prezipitazioa agarosazko gelean: immunodifusio bikoitza (Outchterlony)

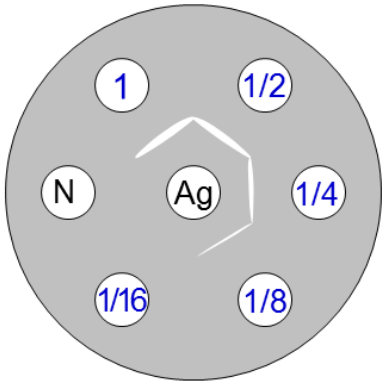
SARRERA

Prezipitazio-teknikak oinarritzen dira antigeno eta antigorputzen arteko lotura espezifikoetan eta erreakzio horietan sortutako immunokonplexuen ezaugarrietan. Immunoprezipitazioan, antigenoa molekula disolbagarria da. Baldintza eta proportzio egokietan biltzen direnean, zenbait antigenok eta antigorputzek eratzen dituzte prezipitatzen diren immunokonplexuak. Antigenoen eta antigorputzen kontzentrazioen araberakoa izaten da prezipitatutako konplexuen tamaina, eta detekta daitezke hainbat metodoren bidez. Outchterlony immunodifuzio bikoitza dago metodo horien artean.

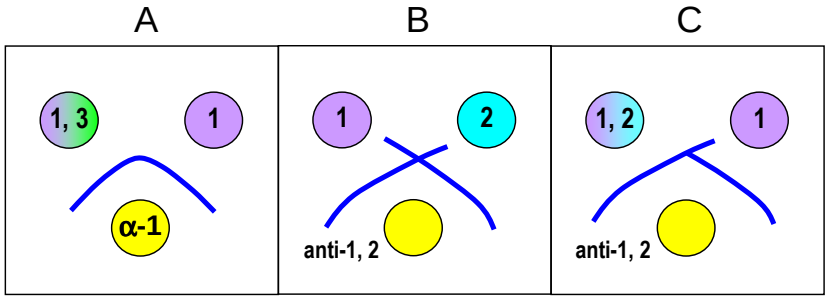
Immunodifuzio bikoitza egiten denean, antigeno eta antigorputza kokatzen dira agarosan egindako zulotxo desberdinetan. Zulotxoetatik abiatuta, erradialki hedatzen dira, eta kontzentrazio-gradientea sortzen da zulotxoaren inguruan. Antigenoa eta antigorputza topatzean, eta haien artean lotura espezifikoa gertatzen bada, immunokonplexuak eratzen dira topagunean. Immunokonplexu horiek prezipitatzen badira ikusgaiak izango dira. Immunokonplexuak hobeto ikusteko proteinen tindaketa egin daiteke.

Banda horien kokapena eta itxura alda daiteke erreaktibo bien kontzentrazioen eta ezaugarrien arabera. Antigeno-soluzio desberdinek eta antigeno horiek ezagutzen dituzten antigorputz-soluzio batek sortutako prezipitazio-bandak konparatzean, antigenoen arteko desberdintasunak eta antzekotasunak iker daitezke (ikus beheko irudia).

Antigeno disolbagarrien prezipitazioa ere erabil daiteke serum baten titulua kalkulatzeko. Horretarako, antigenoaren kontzentrazio zehatza jartzen da agarosazko erdiko putzu batean, eta horren inguruan egindako putzuetan, serum baten ondoz ondoko diluzioak (gauza bera egin daiteke paraleloan; hau da, lerro batean kokatutako putzuetan jartzen dira serumaren diluzioak, eta antigenoa jartzen da horien aurrean dagoen beste zulo zabal batean, eta kasu horretan, bi serum desberdin iker daitezke). Antigenoak eta serumak hedatu ondoren, prezipitazio-erreakzioak gerta daitezke kontaktu gunean, eta prezipitazio-lerroa ikusgarria izan daiteke. Prezipitazioa eragin duen serumaren diluzio handienak definitzen du serumaren titulua.



Goiko irudian ikusten dira Ag-Ab prezipitatuak. Markatuta daude urdinez aztertu diren serumaren diluzioak. Adibide honetan 1/8 da serumaren titulua.



Antigeno-soluzio desberdinek eta antigeno horiek ezagutzen dituzten antigorputz-soluzio batek sortutako prezipitazio-banden eskema.

A. Prezipitazio-banden identitatea.
B. Ag desberdinen ezagutza.
C. Identifikatutako Ag-en identitate partziala.

HELBURUAK

1. Immunodifusio bikoitzaren oinarriak ulertzea eta interpretatzea.
2. Lagin batean BSA ezagutzen duten antigorputzak dauden ikertzea.
3. Antigorputzen kontzentrazioaren araberako immunokonplexuen tamaina eta kokapena behatzea.

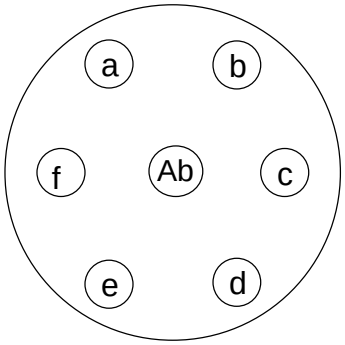
MATERIALA

- A soluzioa: behi-serumeko albumina (BSA: *bovine serum albumine*) % 10ean PBS-AS tanpoian
- antigorputzak: anti behi-serumeko albuminen kontrako antigorputzak (anti-BSA) PBS-AS tanpoian 1:1 diluituak
- % 2 agarosa ur distilatuan
- azida sodikoa (NaN_2)
- PBS tanpoia (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7,2
- PBS-AS tanpoia: PBS tanpoia % 0,05 azida sodikoarekin
- polietilenglicola (PGE)
- tindatzeko Coomassie soluzioa: % 10 azido azetiko glaziala; % 40 etanola; % 50 ur distilatua; % 0,5 Coomassie Brilliant Blue R-250
- tindagaia ikuzteko soluzioa: % 5 azido azetiko glaziala; % 15 etanola; % 80 ur distilatua
- 15 ml-ko saiodiak
- plastikozko 1,5 µl-ko hodiak (mikrozentrifugagailu-hodiak)
- Pasteur pipetak
- 10 ml-ko pipetak eta gomazko txupeteak
- mikropipetak eta mikropipetentzako puntak
- Petri kutxak
- bainua 45 ºC-tan

PRAKTIKAREN GARAPENA

Agarosazko gelaren prestaketa %1 kontzentrazioan:

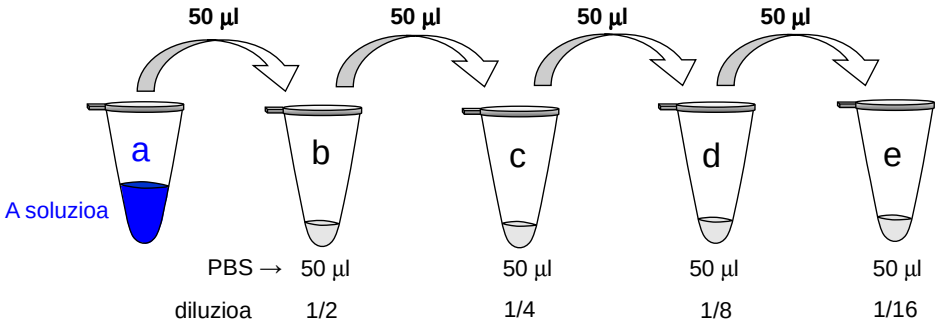
1. Prestatu agarosaren 250 ml: % 1 agarosa PBS tanpoian (pH 7,2) eta % 2 PEGarekin eta % 0,05 azida sodikoarekin. Agarosa disolbatzeko, soluzioa irakin behar da. Iraki ondoren, jarri soluzioa bainu batean 45 ºC-tan.
2. Hartu prestatutako % 1 agarosaren 15 ml bero dagoen pipetarekin, eta pasatu Petri kutxa batera (Petri kutxa guztiz horizontalean egon behar da agarra posizio egokian gogortzeko).
3. Hoztu 4 ºC-tan 10-15 minutuz agarosa gogortu dadin.
4. Egin zazpi zulotxo gel bakoitzean Pasteur pipetaren alde lodiarekin: zulo bat erdian eta beste seiak antigorputza duen putzuaren inguruan (denak erdiko zuloarekiko distantzia berean), beheko irudian agertzen den moduan.



5. Errotulatu Petri kutxaren hondoa jakiteko non dauden kokatuta laginak.

Laginen prestaketa:

1. Markatu 1,5 ml-ko hodiak b-e letrekin. Gehitu 50 µl PBS horietako hodi bakoitzean.
2. Prestatu % 10 albumina-soluzioaren diluzio bikoitzak honako eskema hau jarraituz:



Diluzioak egiteko eredua

Putzuen betetzea laginekin:

1. Kokatu erdiko zulotxoan anti-albumina serumaren 40 µl (ez da zulotxotik irten behar).
2. Gainerako zulotxoetan, gehitu dagokion laginaren 40 µl, plaka-antolaketaren irudiaren irudian agertzen den eskema jarraituz:

   Ab: anti-BSA seruma PBS-AS tanpoian 1:1 diluitua
   a. A soluzioa (% 10 albumina-soluzioa)
   b. A soluzioaren 1/2 diluzioa
   c. A soluzioaren 1/4 diluzioa
   d. A soluzioaren 1/8 diluzioa
   e. A soluzioaren 1/16 diluzioa
   f. Kontrol negatiboa: PBS tanpoia
3. Itxaron agarosak jarritako laginak xurgatu arte.

Plakaren inkubazioa:

Laginekin prestatutako agarosazko Petri kutxa sikatu ez dadin, itxi zinta itsaskor batekin (parafilmarekin, adibidez) eta inkubatu 37ºC-tan 48 orduz.

Plakaren tindaketa Coomasie urdinarekin:

Prezipitazio lerroak hobeto ikusteko, agarosa tindatu daiteke Coomasie urdinarekin.

Horretarako protokolo hau jarraitzen da:

1. Ikuzi plaka PBSrekin 48 orduz, giro-tenperaturan eta irabiaketarekin (erreakzionatu gabeko proteina guztiak kentzeko).
2. Ikuzi plaka ur distilatuarekin 4 orduz.
3. Ipini filtrozko papera agarraren gainean, agarra lehortzeko; utzi gau guztia giro-tenperaturan.
4. Murgildu gelak 5 minutuz tindatzeko Coomasie soluzioan.
5. Egin bost minutuko 2-3 ikuzketa, tindagaia ikuzteko soluzioan.

EMAITZEN IRAKURKETA

Antigenoak eta antigorputzak erradialki hedatuko dira. Haien arteko lotura espezifikoa gertatzen bada, immunoprezipitazio-lerro bat eratuko da topo egiten duten gunean. Tindatu gabe, lerro zurixka izango da. Agarosa tindatuz gero, kontrastea gehitzen zaio prezipitazio-lerroari eta emaitza errazago ikusten da.

Zulotxo bakoitzean antigenoaren kontzentrazio desberdinak jarri direnez, loditasun edota kolore-intentsitate desberdineko prezipitazio-lerroak agertuko dira (antigenoaren kontzentrazioa txikiagoa izanik, lerro meheagoa).

Antigorputzen detekzioa immunofluoreszentzia ez-zuzenaren eta entzimoimmunoprobaren bidez

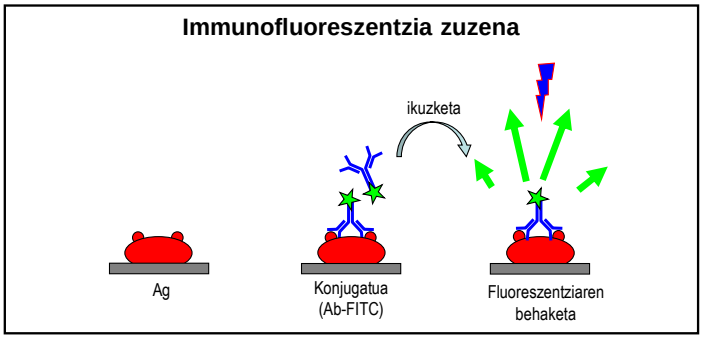
Antigorputzei kobalenteki markatzaile kimiko mota ugari (*tags*) lot dakizkieke. Lotura horrek ez du oztopatzen antigorputzen eta antigenoen artean lotzeko gaitasuna, eta, aldiz, guztiz erabilgarria da antigenoen edota antigorputzen detekzio espezifikorako. Markatzaile horiek izaten dira isotopo erradioaktiboak, entzimak edo osagai fluoreszenteak. Markatutako antigorputzari "konjugatua" deritzo. Posiblea da konjugatua eta antigenoa/antigorputza lotzean sortutako immunokonplexuaren detekzioa, seinale erradioaktibo, kolorimetriko edo fluoreszenteen bidez, konjugatuaren izaeraren arabera, hurrenez hurren.

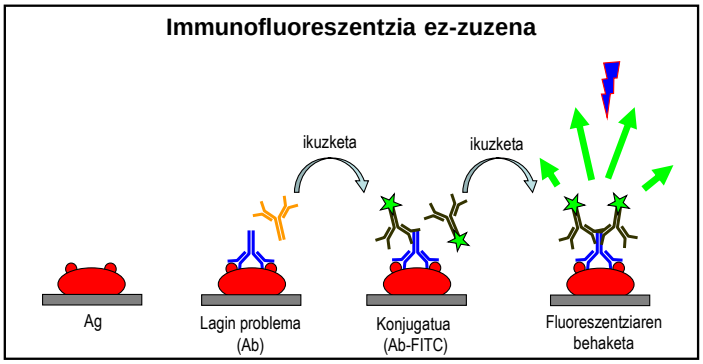
8. Immunofluoreszentzia ez-zuzena (*Indirect ImmunoFluorescence: IIF*): *Candida albicans* legamien kontrako antigorputz espezifikoen detekzioa

SARRERA

Immunofluoreszentzia teknikan, konjugatua deritzo fluorokromo bati kobalenteki lotutako antigorputzari. Maiz erabiltzen diren fluorokromoak fluoreszeinaren isotiozianatoa eta errodamina dira. Argi ultramoreak fluorokromoak estimulatzen dituenean, fluoreszentzia-mikroskopioan beha daitekeen espektro ikusgaiko argi berdea (fluoreszeinaren isotiozianatoaren kasuan) edo gorria (errodaminaren kasuan) igortzen da.

Beste detekzio-sistema batzuetan bezala, immunofluoreszentzia metodo zuzena edo ez-zuzena izan daiteke (ikus beheko irudia). Teknika zuzenean, konjugatuak ezagutzen du zuzenean laginean bilatzen den antigenoa, eta, horretarako, antigeno "partikulatuak" (zelula eukariotoak, bakterioak edo beste partikula natural batzuk) atxikita egon behar dira porta batean edo ebaketa histologikoetan.





Immunofluoreszentzia motak

Immunofluoreszentzia ez-zuzenean (IIF edo *Indirect ImmunoFluorescence*), lehenengo inkubazioan immunokonplexuak osatzen dira antigenoaren eta antigorputz espezifikoaren artean, eta bigarren inkubazioan, konjugatuaren bidez detekta daitezke aurrez sortutako immunokonplexuak. Zelulen inguruko fluoreszentzia detektatzeak adierazten du proba positiboa dela, eta, beraz, emaitza kualitatiboa da. Laginaren zenbait diluzio ikertzen badira (adibidez, serumaren edo listuaren diluzioak), laginaren **antigorputz-titulua** kalkula daiteke, eta teknikak izaera semikuantitatiboa hartzen du. Titulua da antigeno konkretu baten aurkako antigorputz espezifikoen kontzentrazio erlatiboa lagin batean. Laginaren azken diluzio positiboa erabiltzen da titulua estimatzeko. Zenbait kasutan, titulua adierazten da diluzio gisa, eta beste kasuren batzuetan, dagokion diluzioaren alderantzizko moduan.

Immunofluoreszentzia asko erabiltzen da autoantigorputzak eta ehunetako antigenoak detektatzeko. Teknika aukeratzeko orduan, hainbat abantaila eta desabantaila aipa daitezke. Adibidez, teknikaren arazo bat da irakurketaren subjektibitatea; aldiz, abantaila bat da lagin berean zenbait antigeno desberdin detektatzeko aukera.

Immunofluoreszentziaren aplikazio interesgarri bat da esekidura bateko zelulen antigenoak detektatzea. Horretarako, fluxu-zitometroa edo fluoreszentzia-zitometroa izeneko aparailua erabiltzen da (FACS: *Fluorescence Analizer Cell Sorter*). Fluxu-zitometroek partikulak analiza ditzakete fluoreszentziaren eta tamainaren arabera, eta banatzaile edo *sorter*sen kasuan, ezaugarri konkretuak dituzten populazioak banandu edo purifikatu daitezke.

Immunofluoreszentzia ez-zuzena erabiltzen da lagin biologiko batean antigeno konkretu baten kontrako antigorputzak dauden jakiteko.

Teknika horretan hemen aipatzen diren urratsak jarraitzen dira (ikus beheko irudia):

1. **Antigenoaren adsortzioa portan**. Kasu honetan, antigenoak zelulak dira. Antigenoa duen lagina sikatzen uzten da portaren gainean. Proba egiteko erabiltzen diren portak tefloidunak dira maiz (portan leku mugatuak daude laginak kokatzeko) eta hainbat putzu dauzkate (lagin desberdinak edo diluzioak porta berean aztertzeko aukera).

2. **Inkubazioa lagin-problemarekin.** Portan jarritako antigenoaren kontrako antigorputzak eduki ditzaketen lagin-problemak gehitzen dira putzuetan (adibidez, seruma edo listua). Laginean, antigenoarekiko antigorputz espezifikoak badaude, antigenoa eta antigorputza lotu, immunokonplexuak osatu, eta portan adsorbatuta gelditzen dira.

Lagin-problema eta honekin batera lotuta ez dauden antigorputz guztiak kentzeko, portak ikuzten dira.

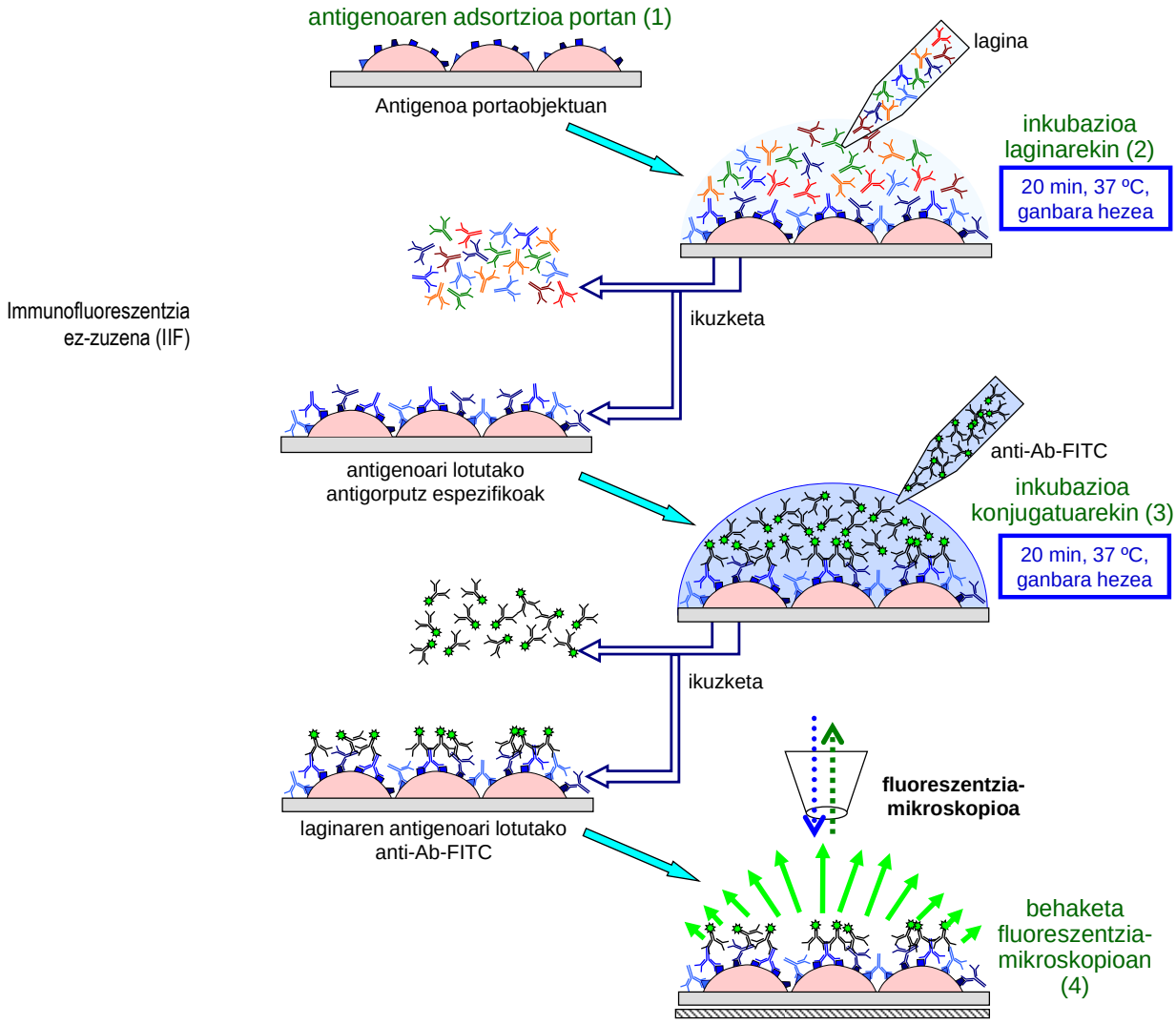
3. **Inkubazioa konjugatuarekin**. Immunokonplexuak detektatzeko, gehitzen da fluorokromo bati kobalenteki lotutako bigarren antigorputza (konjugatua). Ondoren, portak ikuzten dira lotuta ez dagoen konjugatua kentzeko.

4. **Emaitzen irakurketa eta interpretazioa.** Putzuak fluoreszentzia-mikroskopioan behatzen dira. Lagina positiboa bada, zelulak (antigenoa) fluoreszente ikusten dira (intentsitate handiagorekin edo gutxiagorekin; zenbat eta antigorputz espezifiko gehiago laginean, orduan eta fluoreszentzia biziagoa). Lagina negatiboa bada, zelulak guztiz gorri ikusiko dira hondo ilunaren gainean.

Proba ondo eginda dagoela frogatzeko, beti kontrolak behatu behar dira lehenengo. Positiboak ondo irteten badira, erreaktiboak ondo daudela frogatzen da. Negatiboak ondo irteten badira, erreaktiboak ez daudela kutsatuta pentsa daiteke, eta, ondorioz, ez dute positibo faltsurik ematen.

Ezin da lagineko antigorputzen kontzentrazioa kalkulatu edo kuantifikatu, baina laginaren diluzioak aztertzen badira, “titulua” kalkula daiteke eta, ondorioz, emaitzen balorazio semikuantitatiboa egin. Antigorputzen titulua laginaren azken diluzio positiboarekin kalkulatzen da, hau da, antigenoaren inguruan fluoreszentzia (nahiz eta ahula izan) erakusten duen laginaren azken diluzioarekin.

Praktika honetan, immunofluoreszentzia ez-zuzenaren bidez, *Candida albicans* legamien kontrako antigorputz espezifikoen presentzia ikertuko da, kualitatiboki eta semikuantitatiboki, giza listuen edo animalia baten serumaren laginetan (untxiena edo saguena).



HELBURUAK

1. Antigenoa duten portak prestatzea immunofluoreszentzia egiteko.
2. Immunofluoreszentzia ez-zuzenaren oinarria ulertzea.
3. Immunofluoreszentzia ez-zuzenaren bidez, antigorputzak detektatzea hainbat laginetan.

MATERIALA

- Pasteur pipetak eta tetinak
- intsulina-xiringa eta orratza
- antigenoa: formaldehidoz edo beroaz hildako *Candida albicans*en legamiak
- ikertu behar den lagina (bata edo bestea):
  A. giza listua
  B. untxi baten seruma
- PBS tanpoia (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7,2
- PBS-Tween-EU: % 0,05 Tween 20 eta % 0,05 Evans urdina PBS tanpoian
- fluoreszeinarekin markatutako konjugatu aproposa PBS-Tween-EU soluzioan 1/500 diluituta:
  A. anti-giza IgA-FITC (IgA detektatzeko giza listuan)
  B. anti-untxi IgG-FITC (IgG detektatzeko untxi-serumean)
- glizerina tanponatua
- plastikozko 1,5 µl-ko hodiak (mikrozentrifugagailu-hodiak)
- mikroentrifugagailua
- mikropipetak eta mikropipetentzako puntak
- zelulak kontatzeko ganbara (Thoma edo Neubauer *improved*)
- tefloiarekin estalitako portak, 12 zulotxodunak
- beirazko ontziak porten ikuzketak egiteko
- ganbara hezea (Petri kutxa batean prestatuta)
- estalkiak (txikiak eta handiak)
- mikroskopio optikoa
- fluoreszentzia-mikroskopioa
- xukapapera

PRAKTIKAREN GARAPENA

1. *Candida albicans* legamien (antigenoaren) adsortzioa tefloidun portan

1.1. Antigenoaren prestaketa

Beroaz edo formaldehidoz hildako *C. albicans* legamia-esekiduraren kontaketa egin kontaketa-ganbara erabiliz.

Prestatu legamia-esekiduraren kontzentrazio egokia **ur destilatuan**: 2 x 10^6 legamia/ml (ikus zelula-esekiduren prestaketarako protokoloa).

1.2. Portaren prestaketa:

Jarri legamia-esekiduraren 10 µl portaren zulotxo bakoitzean (2 x 10^6 legamia/ml-ko esekidurarenak edo 2 x 10^4 legamia/putzu).

Utzi airean lehortzen (siku daudenean, erabili arte gorde daitezke).

2. Inkubazioa laginarekin

2.1. Laginen lorpena eta prestaketa

A. Lagina giza listua bada:

Ikasle bakoitzak bildu behar du bere listua (~ 0,5 ml) plastikozko 1,5 µl-ko hodi batean. Oso garrantzitsua da praktikan zehar ikasle bakoitzak soilik bere lagina manipulatzea.

Ondoren, zentrifugatu lortutako listua (13000 rpm x 5 min), eta pasatu gainjalkinaren ~ 0,25 ml beste plastikozko hodi berri batera. Lortutako gainjalkina erabili behar da lagin moduan, eta gainerakoa bota egin behar da esterilizatzeko poltsara.

B. Lagina untxi baten seruma bada:

Untxiaren serumak prest egongo dira erabiltzeko.

2.1.1. Laginaren diluzioak**:**

Egin laginarekin (X1) lau diluzio bikoitz (X2-X5) PBS tanpoian.

Lagina	X1	X2	X3	X4	X5
Diluzioa	1	1/2	1/4	1/8	1/16

2.1.2**.** Kontrolak**:**

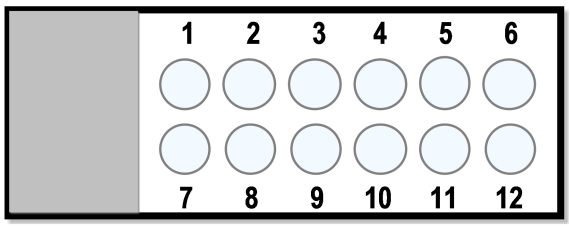
Beti erabili behar dira kontrolak. Kontrol horiei esker, jakin dezakegu proba ondo eginda dagoen eta emaitzak fidagarriak diren.

Kontrol positiboan (P) bilatzen den antigorputz mota dago. Aurrez ikertutako lagina izan daiteke (adibidez, listu/serum positibo bat).

Kontrol negatiboa (N) erabiltzen da erreaktiboak eta erabilitako materiala kutsatuta ez daudela frogatzeko. Kontrol negatibo moduan erabiltzen da lehen inkubazioan diluzioak egiteko erabiltzen den tanpoia (PBS).

2.2. Putzuen betetzea laginekin eta kontrolekin**:**

Eskeman agertzen den moduan, porta batean jarriko dira bi ikasleen laginak, azken horien diluzioak eta kontrolak (P eta N). Goiko putzuetan (1-5), ikasle baten lagina eta horren diluzioak, eta beheko putzuetan (7-11), bigarren ikaslearen lagina eta dagozkion diluzioak. Kontrolak jarriko dira 6 (P) eta 12 (N) putzuetan. Putzu bakoitzean 10 µl gehitzen dira.



Tefloidun portaren putzu bakoitzean jarritako laginak.

1. a lagina diluitu gabe
2. a laginaren ½ diluzioa
3. a laginaren 1/4 diluzioa
4. a laginaren 1/8 diluzioa
5. a laginaren 1/16 diluzioa
6. kontrol positiboa (P)
7. b lagina diluitu gabe
8. b laginaren ½ diluzioa
9. b laginaren 1/4 diluzioa
10. b laginaren 1/8 diluzioa
11. b laginaren 1/16 diluzioa
12. kontrol negatiboa (N)

Inkubatu portak 15-20 minutuz 37 ºC-tan, ganbara hezean (laginak sikatu ez daitezen).

2.3. Portaren lehenengo ikuzketa

Sartu portak PBS tanpoia duten ontzitxoetan, eta ikuzi birritan mugimenduarekin.

Ikuzketa amaitu eta gero, utzi portak airean lehortzen (lehorketa-prozesua arintzeko erabil daiteke haize-korronte ahula eta epela porten gainetik).

3. Inkubazioa konjugatuarekin

3.1. Putzuen betetzea konjugatuarekin

Jarri putzu bakoitzean dagokion konjugatuaren 10 µl:

A. anti-giza IgA-FITC, giza listuen laginen kasuan
B. anti-untxi IgG-FITC, untxi-serumekin

Inkubatu portak 15-20 minutuz 37 ºC-tan, ganbara hezean.

3.2. Portaren bigarren ikuzketa

Sartu portak PBS tanpoia duten ontzitxoetan, eta ikuzi birritan mugimenduarekin.

Ikuzketa amaitu eta gero, utzi portak airean lehortzen.

4. Fluoreszentziaren behaketa mikroskopioan:

Prestatu portak fluoreszentzia-mikroskopioan behatzeko: gehitu glizerina tanponatua putzuen gainean (10 µl/putzu), eta, ondoren, jarri estalkia. Ez erabili glizerina gehiegi; gehiegi erabiltzen bada, kanpora irten eta dena zikintzen du.

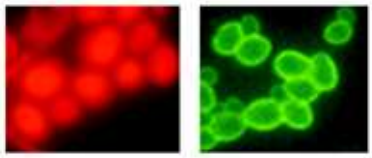
Fluoreszentzia dagoen jakiteko (lagina positiboa den) eta laginaren titulua kalkulatzeko (proban egindako diluzio positiborik handiena ezagutzeko), behatu putzuak fluoreszentzia-mikroskopioan.

Lagina 40X edo 100X objektiboarekin beha daiteke.

IRAKURKETA ETA EMAITZEN INTERPRETAZIOA

- Frogatu kontrolak ondo daudela; hau da, kontrol positiboan zelulak fluoreszente ikusi behar dira (fluoreszentziaren intentsitatea aldakorra izan daiteke), eta kontrol negatiboan zelula guztiak gorri ikusi behar dira (fluoreszentziarik gabe). Kontrol positiboarekin (P), frogatzen da erabilitako erreaktiboak ondo daudela eta prozedura egokia izan dela. Kontrol negatiboarekin (N), aldiz, frogatzen da erreaktiboak kutsatuta ez daudela, eta ikusitako fluoreszentzia espero ez ziren erreakzioengatik ez dela agertzen.
- Ikertzen den lagina negatiboa bada (portan kokatutako antigenoa ezagutzen duten antigorputz espezifikorik ez badago), zelulak guztiz gorri ikusi behar dira, eta hondoa berde iluna edo beltza.
- Ikertzen den lagina positiboa bada (portan kokatutako antigenoa ezagutzen duten antigorputz espezifikoak badaude), zelulen inguruan fluoreszentzia berdea ikusi behar da. Fluoreszentziaren intentsitatea hainbat eta altuagoa, orduan eta antigorputz espezifiko gehiago egongo dira laginean. Zenbat eta antigorputz antigeno-espezifiko gutxiago laginean, orduan eta intentsitate baxuagoko fluoreszentzia eta zelula (antigeno) gorrien ehuneko altuagoa ikusten da. Dena den, metodo honekin ezin da kalkulatu antigorputzen kontzentrazio zehatza.
- Laginaren diluzioak ikertzen badira, antigorputz-titulua kalkula daiteke, hots, lagineko antigorputzen neurri semikuantitatiboa lortzen da. Titulua estimatzen da laginaren azken diluzio positiboarekin. Azken diluzio positiboa zenbat eta altuagoa, orduan eta antigorputz-kontzentrazio altuagoa laginean.

Fluoreszentzia-mikroskopioan legamia negatiboak eta positiboak.



9. Immunofluoreszentzia zuzena:
giza odol periferikoan dauden B eta T linfozitoen detekzioa eta kontaketa

SARRERA

Gizakian gertatzen diren immunoeskasien artean, T edota B linfozitoen eskasiak daude. Aipaturiko linfozitoen kontaketa espezifikoak egitea beharrezkoa da immunoeskasia horiek detektatzeko.

Linfozito zirkulatzaileen % 5-15 B linfozitoak dira eta bereizten dira mintzeko immunoglobulinak adierazteagatik. B linfozito bakoitzak ekoizten dituen mintzeko immunoglobulinak edo BCRak (*B cell receptor*) espezifizitate bakarrekoak dira, eta funtzionatzen dute B linfozito horren antigenoarentzako errezeptore espezifiko moduan. Immunofluoreszentziaren bidez, fluorokromoz markaturiko antigorputzekin, detekta daitezke B zelula helduen azalean adierazten diren immunoglobulinen kate astunak, kate horien zati aldaezina erabiltzen bada itu moduan (immunoglobulinen klasea edo isotipoa).

B zelulen azaleko molekulak, adibidez BCRak, antigorputz fluoreszenteen bidez markatzean, B zelulen inguruan detekta daiteke “eraztun” edo “eraztun moteatu” antzeko fluoreszentzia: anti-immunoglobulina (antigorputz dibalentea) mintz-immunoglobulinetara lotzen da, eta, ondorioz, zelula gainazalaren zehar sorrarazten dira marka edo orbain fluoreszenteak.

Linfozito zirkulatzaileen % 70-85 T linfozitoak dira. T linfozito helduen artean hainbat mota bereizten dira funtzioen eta jariatzen dituzten zitokinen arabera, baina fenotipikoki mota guztien mintzean CD3/TCR konplexua adierazi behar da. CD3/TCR konplexuak parte hartzen du antigenoaren ezagutze espezifikoan eta zelulen barnerako aktibazio-seinaleen transdukzioan. Aipaturiko konplexuan CD3 molekula beti berdina da, eta TCR (*T cell receptor*), aldiz, egituraz berdina baina espezifizitate klon-espezifikoa. CD3/TCR konplexua detekta daiteke bere osagaien kontra bideraturiko edozein antigorputz erabiliz. Beraz, anti-CD3 antigorputz fluoreszenteak erabiltzen badira, T linfozitoak fluoreszente bilakatzen dira eta detekta daitezke fluoreszentzia-mikroskopioan.

Ondorioz, immunofluoreszentzia zuzenaren bidez posible da B eta T linfozitoak detektatzea. Kasu horretan, konjugatuak ezagutzen du populazio konkretu baten antigenoa eta zuzenean lotzen zaie populazio hori osatzen duten zelulen antigenoei. Immunofluoreszentzia zuzenaren abantaila nagusia da azkarragoa izatea. Immunofluoreszentzia ez-zuzenak, aldiz, denbora gehiago behar du egiteko, baina sentikorragoa eta merkeagoa da.

HELBURUAK

1. Zelula mononukleatuak isolatzea.
2. B eta T zelulak detektatzeko mintz-markatzaileen garrantzia ulertzea.
3. Immunofluorezentzia zuzena eta ez-zuzena ondo bereiztea.
4. Zelula positiboak identifikatzea eta zenbatzea fluoreszentzia-mikroskopioan.

MATERIALA

- PBS tanpoia (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7,2
- heparina duen odolaren 3 ml (heparinizatutako odolaren 3 ml)
- FITCrekin markatutako anti-BCR antigorputz monoklonalak
- FITCrekin markatutako anti-CD3 antigorputz monoklonalak
- Evans urdina (% 0,65 w/v, PBS tanpoian)
- 1,5 ml Ficoll-Paque duen saiodia
- plastikozko 1,5 ml-ko hodiak (mikrozentrifugagailu-hodiak)
- 5 ml-ko pipeta eta gomazko txupeteak
- Pasteur pipetak gomazko txupeteekin
- 50 eta 10 µl-ko mikropipetak eta plastikozko puntak
- saiodiak
- portak eta estalkiak
- mikrozentrifugagailua
- kontatzeko ganbara
- fluoreszentzia-mikroskopioa

PRAKTIKAREN GARAPENA

Zelula mononukleatuak banatzeko metodoa

1. Hartu odola Pasteur pipetarekin eta gehitu, poliki-poliki, Ficoll-Paque soluzioaren gainean (Ficolla daukan saiodia 45 º inklinatuta dagoela, gehitu odola saiodiko paretatik).
2. Zentrifugatu lagina (1500 rpm x 10 min).
3. Hartu saiodia kontu handiz (mugitu barik), eta jaso zelula mononukleatuen eraztuna (Ficollaren gainean dagoena), Pasteur pipetarekin. Pasatu lortutako “eraztuna” beste saiodi batera, eta zelulak ikuzteko, gehitu 5 ml PBS.
4. Zentrifugatu (1900 rpm x 10 min).
5. Kendu gainjalkina, eta berreseki berriro pelleta 5 ml PBS tanpoian zelulak ikuzteko.

6. Zentrifugatu (1900 rpm x 10 min).
7. Dekantatu gainjalkina eta berreseki 200 µl PBS tanpoian.
8. Zenbatu zelulak eta doitu 10^7 zelula/ml kontzentraziora (ikus dagokion protokoloa).

<u>B eta T zelulak markatzeko metodoa:</u>

1. Errotulatu 1,5 ml-ko hodiak B eta T letrekin.
2. Gehitu zelula-esekiduraren 100 µl errotulatutako hodi bakoitzean.
3. B saiodian, ipini batera eta nahastu ondo honako hauek:
   a. FITCrekin markatutako anti-BCR antigorputz monoklonalen 10 µl
   b. Evans urdinaren 10 µl
4. T saiodian, ipini batera eta nahastu ondo honako hauek:
   a. FITCrekin markatutako anti-CD3 antigorputz monoklonalen 10 µl,
   b. Evans urdinaren 10 µl.
5. Inkubatu hodiak ilunpean, 4 ºC-tan, 20 minutuz.
6. Gehitu saiodi bakoitzera 1,2 ml PBS eta zentrifugatu (1700 rpm x 10 min).
7. Kendu gainjalkina, eta berrezeki pelleta 1,5 ml PBS tanpoian zelulak ikuzteko.
8. Zentrifugatu (1700 rpm x 10 min).
9. Kendu gainjalkina, berreseki zelulak 100 µl PBS-glizerolan eta mantendu saiodiak ilunpean.
10. Markatu bi porta: idatzi batean B eta bestean T letrak.
11. Porta bakoitzean, gehitu dagokion odol-esekiduratik (B edo T) 50 µl eta jarri estalki bat gainean.

<u>Fluoreszentzia-mikroskopioan B eta T zelulen zenbaketa:</u>

1. Argi normalarekin, behatu mikroskopiaren eremu bateko zelula mononukleatuak, eta zenbatu.
2. Aztertu lagina argi ultramorearekin, eta dagokion portan bilatu eta zenbatu B (edo T) linfozitoak; hau da, eremu berean fluoreszentzia berde duten zelulak. Fluoreszeinaz markatuta ez dauden beste zelula guztiak gorri agertu behar dira (Evans urdina kontraste-koloratzailearekin markatuta).
3. Behatu eta zenbatu beste eremu batzuk, eta kalkulatu B (eta T) zelulen ehunekoa.

10. ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*): *Candida albicans* legamien kontrako antigorputz espezifikoen detekzioa

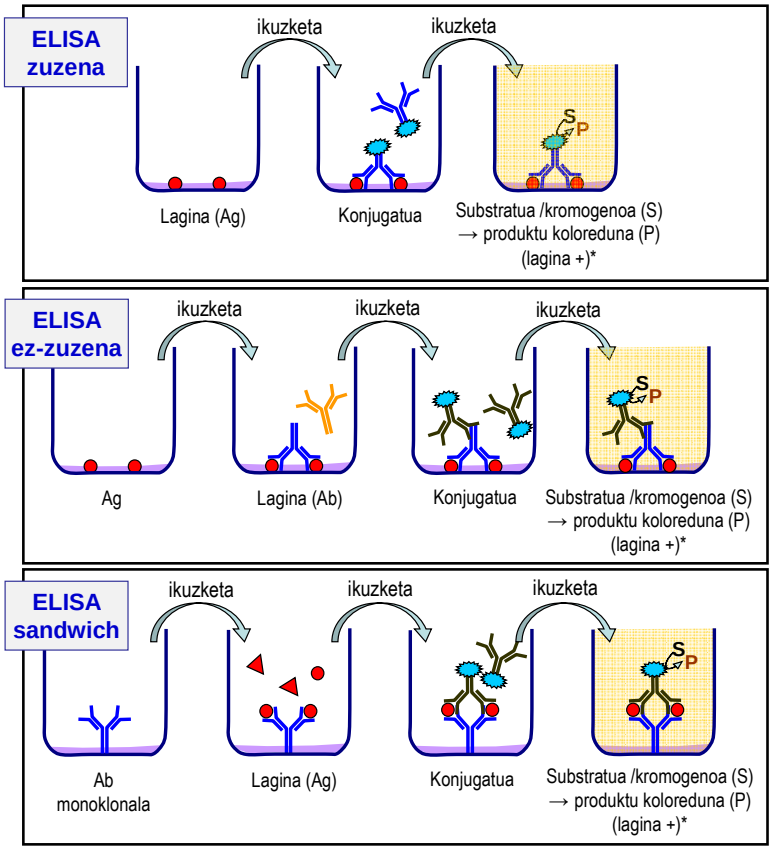
SARRERA

Entzimekin loturiko antigorputzen bidez immunokonplexuak detektatzen dituzten hainbat teknika daude. Entzimekin markatutako antigorputzak (konjugatu entzimatikoak) erabil daitezke hainbat antigeno edo antigorputz era zuzenean edo ez-zuzenean detektatzeko. Aztertzen diren antigenoak disolbagarriak edo partikulatuak izan daitezke, eta egon daitezke **ehunetan** edo hainbat euskarri inerte motatara atxikita. ELISA teknika da immunoreaktiboak geldiarazteko euskarri solidoa (mikrotitulazio-plaka) erabiltzen duen EIA (entzimoimmunoentsaiua) mota bat. Antigenoak, antigorputzak edota horiekin osatutako immunokonplexuak plastikozko euskarrian adsorbatzen dira, eta, ondoren, ikuzketak eta hainbat erreaktiboren ondoz ondoko gehitze sekuentziala egiten da. Teknikan erabiltzen diren kromogenoekin, emaitzen ikus-irakurketa zein espektrofotometro bidezkoa egin daitezke.

ELISA teknika oso teknika **sentikorra eta espezifikoa da** edozein substantzia antigenikoa detektatzeko. Detektatzen diren substantziak batez ere proteinak dira (antigorputzak barne) eta, normalean, kontzentrazio baxuetan daude fluido biologikoetan. **Oso kopuru txikiak detekta daitezke**, adibidez 1 nanogramo proteina/ml. Gainera, analisi horiek hainbat abantaila dituzte: azkar eta erraz egiten dira, beharrezko ekipamendua ez da oso konplexua, eta erraz automatizatzen dira. Desabantailen edo erabileraren mugen artean dago **antigeno, antigorputz edo bien purifikazio maila oso altuaren beharra** teknikaren sentikortasuna oso altua izan dadin. Maiz, antigorputz monoklonalak erabiltzen dira prozeduran. Entzimen erabilerak hainbat abantaila azaltzen ditu beste markatzaile batzuekin konparatuz (osagai fluoreszenteak edo erradioaktiboak). Konjugatu fluoreszenteekin egiten den interpretazioa subjektiboagoa da, eta ekipamendua garestiagoa. Aldiz, konjugatu erradioaktiboak arriskutsuak dira.

Horregatik guztiagatik, ELISA da gaixotasun infekzioso, alergia eta autoimmunitatearen diagnostikoa egiteko **klinikan gehien erabiltzen den laborategiko teknika immunologikoa**. Bere erabilgarritasunaren adibide batzuk dira honako elementu hauen detekzioa/kuantifikazioa: hormona, zitokina eta tumore-markatzaileak, mikroorganismoen antigenoak, antigeno konkretuen kontrako antigorputzak (adibidez anti-GIB), eta, autoantigorputzak (gaixotasun autoimmuneak dituzten pazientengan).

ELISA teknikaren aldaera asko daude: zuzena, ez-zuzena, lehiakorra (*competitive*), inhibizioarena, *sandwich* motakoa, eta abar (ikus irudia). Detektatu behar denaren arabera, aldaera konkretua erabiliko da. Metodo ez-zuzena erabiltzen da lagin biologiko batean antigeno baten kontrako antigorputz espezifikoak bilatzeko. Kuantifikatu behar dena serumeko proteina bada (antigorputz ez dena), normalean, sandwich motako ELISA aukeratzen da.



ELISA mota

* Kolorearen agerpena, lagineko Ab espezifikoaren kopuruarekiko zuzenki proportzionala da.

ELISA ez-zuzenarekin posible da detektatzea antigeno konkretu baten kontrako antigorputz espezifikoak laginean (serumean, listuan). Horretarako, normalean, urrats hauek jarraitzen dira (2. irudia):

1. **Antigenoaren adsortzioa.** Poliestirenozko plakako putzuen hondoan antigenoak (edo antigorputzak) adsorbatzean (geldiaraztean) datza. Plastikoarekin lotura ez-espezifiko eta ez-kobalenteak mantentzeko proteinek duten ahalmenean oinarritzen da. Lotura gertatu ondoren, gehiegizko antigenoa kendu egiten da ikuzketen bidez.

2. **Plakaren blokeoa.** Putzuaren hondoan antigenoarekin estali ez den plastikoa, proteina blokeatzaile batekin estali behar da (probarekin erlazionatuta ez dagoen proteinaren bat, behien serumaren albumina edo BSA, adibidez). Horrela, hurrengo urratsetan, beste proteina batzuen lotura ez-espezifikoak ekiditen dira.

3. **Inkubazioa lagin-problemarekin.** Lagin-problema (seruma, listua) gehitzen da putzuetara. Laginean, plakan kokatutako antigenoaren kontrako antigorputzak badaude, antigorputzak antigenoari lotu, immunokonplexuak osatu, eta euskarri solidoari atxikita gelditzen dira. Ondoren, plakak ikuzten dira, lagin-problema eta lotuta ez dauden antigorputz guztiak kentzeko.

4. **Inkubazioa konjugatuarekin**. Immunokonplexuak detektatzeko, entzima bati kobalenteki lotutako bigarren antigorputza gehitzen da (konjugatua). ELISAn konjugatua da entzima bati lotutako anti-immunoglobulina. Normalean, erabiltzen den entzima peroxidasa edo fosfatasa alkalinoa izaten da. Mikrotitulazio plakan immunokonplexu egokia badago, konjugatua immunokonplexuari lotzen zaio. Plakak ikuzten dira gehiegizko konjugatua kentzeko (lotu ez dena).

5. **Entzimaren substratua gehitzea.** Bigarren antigorputzari lotutako entzimaren substratu egokia eta dagokien kromogenoa gehitzen dira putxuetara. Entzimak katalizatzen duen erreakzioan, koloregabeko substratua osagai koloredun bihurtzen da. Beraz, kolorea agertzen bada putzuetan, erreakzioa positiboa da, eta, bestela, negatiboa.

6. **Emaitzen irakurketa.** Putzuetan kolore-aldaketa balora daiteke begiz zein espektrofotometro baten bidez (azken kasu horretan, absorbantzia-balioak lortzen dira).

Lagin bakoitzarentzat lortutako absorbantzia-balioa eta aldez aurretik ezarritako *cut-off* balioa alderatu behar dira (*cut-off* balioa: kontrol negatiboen absorbantziaren batezbestekoa gehi hiru aldiz **desbideratze estandarra edo SD**). Lagina positibotzat edo negatibotzat hartzen da bere absorbantzia *cut-off* balioa baino handiagoa edo txikiagoa denean. Irakurketa horrekin probaren interpretazio kualitatiboa egin daiteke.

Lagina titulatzean, emaitzen balorazio semikuantitatiboa egin daiteke. Laginaren azken diluzio positiboak definitzen du antigorputzen titulua. Lagina positiboa izateko *cut-off* balioa baino absorbantzia handiagoa izan behar du.

Laginean dagoen antigorputz-kontzentrazioa kuantifikatzeko, antigorputz-kontzentrazio ezaguna duten hainbat kontrol sartu behar dira proban (lagin estandarrak). Estandarren balioekin zuzen-patroia egiten da. Zuzen-patroia lortu ondoren, erlazionatzen dira antigorputz-kontzentrazioak eta absorbantzia-balioak. Laginekin lortutako **absorbantzia-datuak zuzen-patroira eraman ondoren, laginetan dauden antigorputz-kontzentrazioak** kalkula daitezke (U/mL edo mg/ml).

Listuko *Candida albicans* legamiaren kontrako antigorputzen detekzioa ELISA ez-zuzenaren bidez

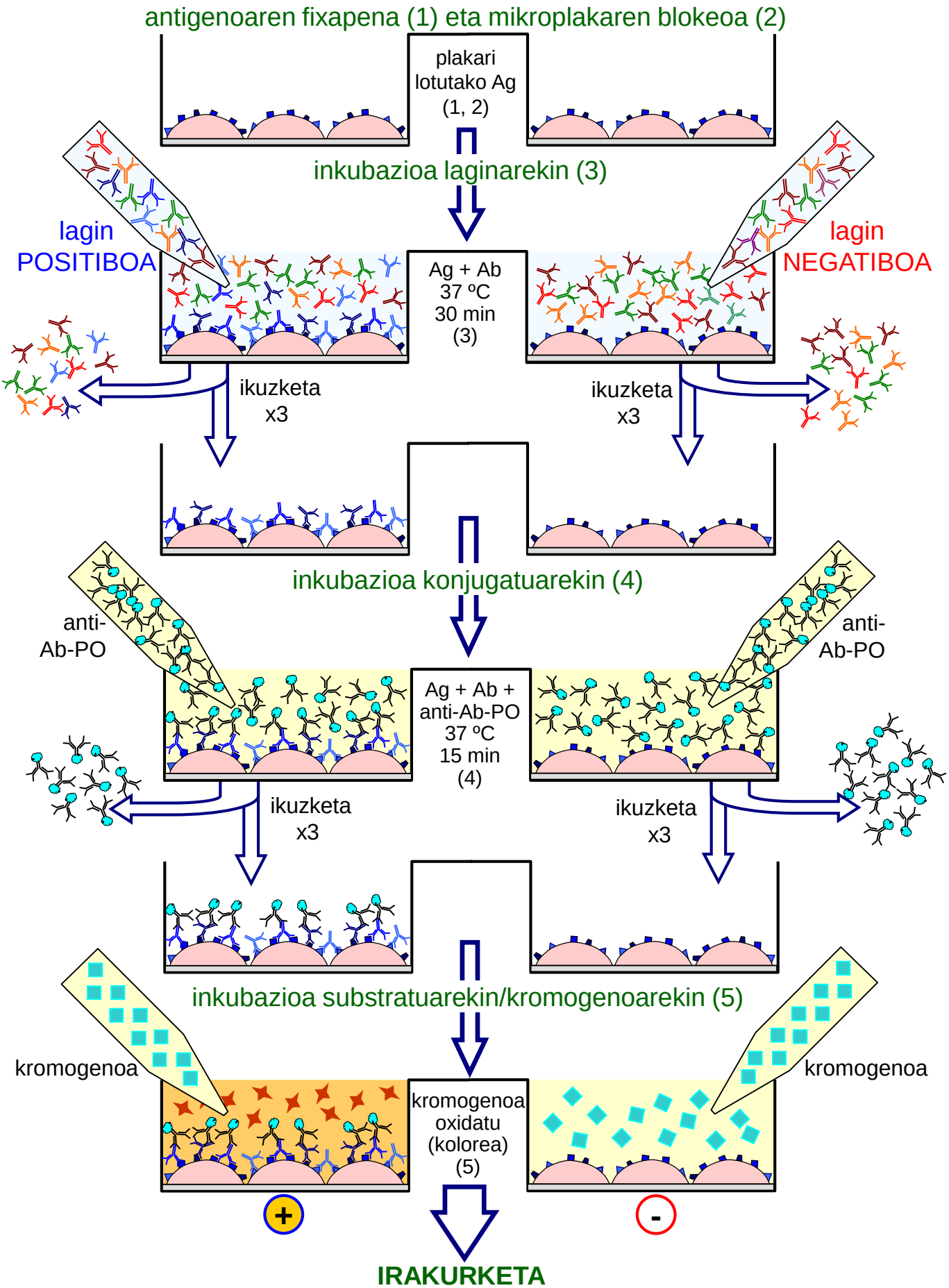
HELBURUAK

1. Antigenoa duten ELISA plakak prestatzea proba egiteko.
2. ELISA teknikaren oinarriak ulertzea.
3. ELISAren bidez, *Candida albicans* legamiaren kontrako antigorputz espezifikoak detektatzea laginetan (listuan edo serumean), era kualitatiboan eta semikuantitatiboan (eta kuantitatiboan estandarra badugu).

MATERIALA

- antigenoa: formaldehidoz edo beroaz hildako *Candida albicans* legamiak
- ikertu behar den lagina hauetariko bat izango da:
  A. giza listua
  B. untxi baten seruma
- kontrolak: positiboa eta negatiboa
- ikuzteko tanpoiak:
  - ✓ PBS tanpoia (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7,2
  - ✓ PBST tanpoia: PBS + % 0,05 Tween 20

ELISA egiteko prozedura.



- blokeatzeko tanpoia (edo diluzioak egitekoa): PBS + % 1 BSA (PBS-BSA)
- peroxidasa (PO) lotuta duen konjugatu aproposa:
  A. untxian lortutako anti-giza IgA peroxidasarekin markatua (anti-giza IgA-PO 1/1000 diluitua blokeatzeko tanpoian)
  B. anti-untxi IgG peroxidasarekin markatua (anti-untxi IgG-PO 1/1000 diluitua blokeatzeko tanpoian) edo anti-untxi IgM peroxidasarekin markatua (anti-untxi IgM-PO 1/1000 diluitua blokeatzeko tanpoian)
- kromogenoa: OPD (ortofenilendiaminaren 20 mg)
- fosfato-zitrato tanpoia
- ur oxigenatua (H_2O_2) % 33 kontzentrazioan
- erreakzioa geldiarazteko erreaktiboa: 0,5 M sulfuriko
- ELISA egiteko plastikozko plakak edo putzu-taldeak
- plastikozko 1,5 µl-ko hodiak (mikrozentrifugagailu-hodiak)
- mikrozentrifugagailua
- mikropipetak eta mikropipetentzako puntak
- zelulak kontatzeko ganbara (Thoma edo Neubauer) eta estalkiak
- ELISA irakurgailua (450 edota 490 nm)
- xukapapera

PRAKTIKAREN GARAPENA

1. Antigenoen adsortzioa mikroplakara

1.1. Antigenoaren prestaketa

Kalkulatu beroaz edo formaldehidoz hildako legamia-esekiduraren zelulen kontzentrazioa.

Doitu kontzentrazioa 6 x 10^6 zelula/ml-ra PBS tanpoian.

Jarraitu aurrez azaldutako zelula-kontaketaren protokoloa.

1.2. Plakaren sentsibilizazioa (antigenoaren adsortzioa)

Jarri 6 x 10^6 legamia/ml esekiduretatik 100 µl (~ 600.000 zel/putzu) putzu bakoitzean.

Inkubatu putzuak gau osoan (12-24 h) 4 ºC-tan. Estali putzuak sikatu ez daitezen, adibidez, aluminiozko paperarekin.

Gogoratu behar da kontrol negatibo mota batean, NA kontrolean hain zuzen, ez dagoela antigenorik adsorbatuta plakan; beraz, putzuren batzuetan ez da legamiarik jarri behar.

1.3. Putzuen ikuzketa

Antigenoak putzuen hondoan itsatsita daudenean, ikuzi putzuak honako prozedura hau hiru aldiz errepikatuz. Ikuzketa egiten den bakoitzean, utzi putzuak ahalik eta sikuen.

a. Hustu putzuak bortizki. Jarri putzuak buruz behera eta, sikatu guztiz xukapaper baten gainean kolpeak emanez.

b. Bete putzuak PBS tanpoiarekin (200 µl/putzu). Kendu aire burbuilak, itxaron 1-5 minutu eta hustu berriro guztiz.

Ikuzketak egin ondoren eta edozein erreaktibo gehitu baino lehen, oso garrantzitsua da plaka ahalik eta sikuen uztea.

2. Plakaren blokeoa

2.1. Blokeoa

Gehitu blokeatzeko tanpoiaren 200 µl (PBS-BSA) putzu bakoitzera, eta inkubatu 37 ºC-tan 30 minutuz (edo gau osoan 4 ºC-tan). Estali putzuak sikatu ez daitezen, adibidez, aluminiozko paperarekin.

Hustu putzuak.

2.2. Putzuen ikuzketa (aukerakoa)

Jarraitu 1.3 urratsean azaltzen den prozedura.

Putzuak berehala erabil daitezke, edo, erabili arte, gorde -20 ºC-tan aluminiozko paperean bilduta.

3. Inkubazioa laginarekin

3.1. Laginaren lorpena eta prestaketa

A. Lagina giza listua denean:

Ikasle bakoitzak bildu behar du bere listua (~ 1 ml) plastikozko 1,5 µl-ko hodi batean. Oso garrantzitsua da praktikan zehar ikasle bakoitzak soilik bere lagina manipulatzea.

Ondoren, zentrifugatu lortutako listua (13000 rpm x 5 min), eta pasatu gainjalkinaren ~ 0,5 ml beste plastikozko hodi berri batera. Lortutako gainjalkina erabili behar da lagin moduan, eta gainerakoa bota egin behar da esterilizatzeko poltsara.

B. Lagina untxi baten seruma denean:

Irakasleak prest izango ditu untxien serumak (0,2 ml) erabiltzeko.

3.1.1. Laginaren diluzioak

Egin laginarekin (X1) bost diluzio bikoitz (X2-X6) PBS-BSA tanpoian.

Lagina	X1	X2	X3	X4	X5	X6
Diluzioa	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32

3.1.2. Kontrol positiboa (P) eta Lagin estandarra (S)

(Baldin eta S badago, irakasleak prestatuko du eta edozein kasutan berak emango du kontrol positiboa).

Egin zazpi diluzio bikoitz (S2tik S8ra) soluzio estandarretik hasita (S1), PBS-BSA tanpoian.

Lagin estandarra, aldi berean, kontrol positibotzat erabil daiteke (badakigu aldez aurretik probarentzako egokiak diren antigorputzak dituela, hau da, giza IgA, edo untxien IgG edo IgM probaren arabera).

L	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
D	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128

L: lagina; D: diluzioa

3.1.3. Kontrol negatiboa (N)

Hainbat kontrol negatibo mota egin daitezke. Kontrol bakoitzean, teknikan egindako urrats/inkubazio konkretuan erabiltzen den erreaktibo nagusia kentzen da.

NA: antigenorik gabeko putzua

NB: Ab espezifikorik gabeko putzua (laginik gabekoa)

NC: konjugaturik gabeko putzua

ND: substraturik/kromogenorik gabeko putzua (ez OPD, ez H_2O_2)

Kontrol negatibo horietan guztietan, NB kontrolean izan ezik, antigorputz-iturria da estandarreko 1/4 diluzioa edo S3 (antigorputzak dituen kontrola) (ikus aurreko taula).

NB kontrolean, laginaren ordez, erabili bakarrik diluitzeko tanpoia (PBS-BSA).

3.2. Putzuen betetzea eta inkubazioa:

Putzu bakoitzean dagokion laginaren 100 µl jarri behar dira, adibidez, beheko taulan azaldutako eskemari jarraituz*. Hasi putzuak betetzen, beti, lagin diluituenetatik kontzentratuenetara.

*Putzu solteekin lan egiten bada, kokatu putzuak ELISArentzako euskarri batean eskemari jarraituz.

Putzu guztiak beteta daudenean, estali ondo plaka putzuak sikatu ez daitezen (adibidez, aluminiozko paperarekin).

Inkubatu plaka 15-20 min 37 ºC-tan.

3.3. Putzuen ikuzketa

Jarraitu 1.3 atalean azaltzen den prozedura, baina erabili ikuzketarako PBS-Tween 20 tanpoia (200 µl/ putzu).

Putzuak berehala erabil daitezke, edo hurrengo urratsa egin arte, gorde -20 ºC-tan aluminiozko paperarekin estalita.

4. Inkubazioa konjugatuarekin

4.1. Inkubazioa konjugatuarekin

Prestatu dagokion peroxidasadun konjugatuaren 1/1000 diluzioa blokeatzeko tanpoian (PBS-BSA). Konjugatu aproposa aukeratu/erabili behar da laginaren arabera eta bilatzen den immunoglobulinaren arabera.

Gehitu putzu bakoitzean konjugatuaren diluzioaren 100 µl (NC putzuetan izan ezik; horietan gehitu 100 µl PBS-BSA).

Estali putzuak eta inkubatu 15-45 min, 37 ºC-tan.

4.2. Putzuen ikuzketa

Jarraitu 1.3 atalean azaltzen den prozedura; baina, kasu honetan, erabili ikuzketarako PBS-Tween 20 tanpoia (200 µl/ putzu).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Xa1	Xb1	Xc1	Xd1	Xe1	Xf1	Xg1	Xh1	Xi1	Xj1	NA	S1
B	Xa2	Xb2	Xc2	Xd2	Xe2	Xf2	Xg2	Xh2	Xi2	Xj2	NA	S2
C	Xa3	Xb3	Xc3	Xd3	Xe3	Xf3	Xg3	Xh3	Xi3	Xj3	zuria*	S3
D	Xa4	Xb4	Xc4	Xd4	Xe4	Xf4	Xg4	Xh4	Xi4	Xj4	zuria*	S4
E	Xa5	Xb5	Xc5	Xd5	Xe5	Xf5	Xg5	Xh5	Xi5	Xj5	NC	S5
F	Xa6	Xb6	Xc6	Xd6	Xe6	Xf6	Xg6	Xh6	Xi6	Xj6	NC	S6
G	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	ND	S7
H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	ND	S8

* zuria: diluitzeko tanpoia bakarrik duen putzua (PBS-BSA bakarrik)

Xa, Xb... ikasleen laginak dira.

Emaitza fidagarriagoak izateko, lagin bakoitzaren bi edo hiru irakurketa lortu beharko lirateke (duplikatuak edo triplikatuak) eta beren batezbestekoa kalkulatu.

5. Entzimaren substratuaren/kromogenoaren gehitzea eta erreakzioaren errebelatua

5.1. Substratu/kromogeno soluzioaren prestaketa

Substratu/kromogeno soluzioa behar den unean prestatu behar da: 30 ml zitriko-fosfato disodiko soluzioan OPD pastilla bat disolbatu (20 mg), eta azken unean (plakak bete baino lehen), gehitu 15 µl ur oxigenatu.

5.2. Substratu/kromogeno soluzioaren gehitzea eta inkubazioa

Gehitu substratu/kromogeno soluzioaren 100 µl putzu bakoitzera. Gogoratu putzuak betetzeko erabiltzen den ordena.

Inkubatu giro-tenperaturan 10-15 minutuz ilunpean (kolorea agertu arte).

5.3. Erreakzioaren geldiera (aukerazkoa)

Gehitu erreakzioa geldiarazteko erreaktiboaren 50 µl putzu bakoitzari. Azido sulfurikoa gehitzean, jarraitu substratu/kromogeno soluzioa gehitzeko erabili den ordena bera.

IRAKURKETA ETA EMAITZEN INTERPRETAZIOA

Aztertu kolore aldaketak edota putzuen arteko desberdintasunak dauden putzuetan.

Putzuak begiekin soilik aztertzen badira, irakurketa subjektiboagoa izango da. Batez ere positiboak eta negatiboak argi eta garbi bereizten direnean da erabilgarria.

Irakurketa erabilgarriagoa eta guztiz objektiboa egiteko, espektrofotometro bat edo ELISA irakurgailu bat behar da. Mikroplaka espektrofotometro batean irakur daiteke, 450 nm-tan erreakzioa ez bada aldez aurretik gelditu, eta 490 nm-tan erreakzioak geldiarazi ondoren. Irakurketa egin behar da ordubete pasatu baino lehen.

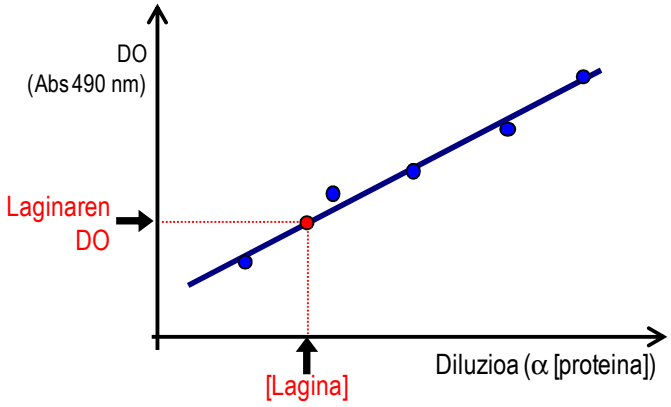
Espektrofotometroan lortutako emaitzen tratamendua

1. *Cut off* balioaren determinazioa: *cutt-off* kalkulatu N kontrol negatiboetan lorturiko absorbantzia-balioekin.

   N balioen batezbestekoa + 3 SD

2. Lagin positiboen eta negatiboen determinazioa: *cut off* balioa gainditzen duten laginak positibotzat joko dira eta, aldiz, negatibotzat joko dira *cut off* baino absorbantzia txikiagoa duten laginak.

3. Laginaren tituluaren determinazioa: *cut-off* balioa baino absortzio-balioa handiagoa duen diluziorik altuenak definitzen du titulua.

4. Zuzen-patroia: eratu erregresio-kurba soluzio estandarrekin lortutako datuekin eta horrekin egin kalibrazio-zuzena edo zuzen-patroia; horretarako, ordenatu-ardatzean (Y) jartzen dira estandarren diluzioekin lorturiko absorbantzia-balioak edo dentsitate optikoa (DO), eta abzisa-ardatzean (X) estandar bakoitzari dagokion kontzentrazioa edo diluzioa.

5. Laginean dagoen *Candida*ren kontrako IgA-kontzentrazioaren determinazioa: jarri zuzen-patroiaren gainean laginen absorbantzia-balioak (1/10 diluzioa erabili), egin estrapolazioa, eta kalkulatu immunoglobulinen kontzentrazioa (UI/ml edo mg/ml).