

ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE IgA EN SALIVA

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

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

FUNDAMENTOS TEÓRICOS:

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

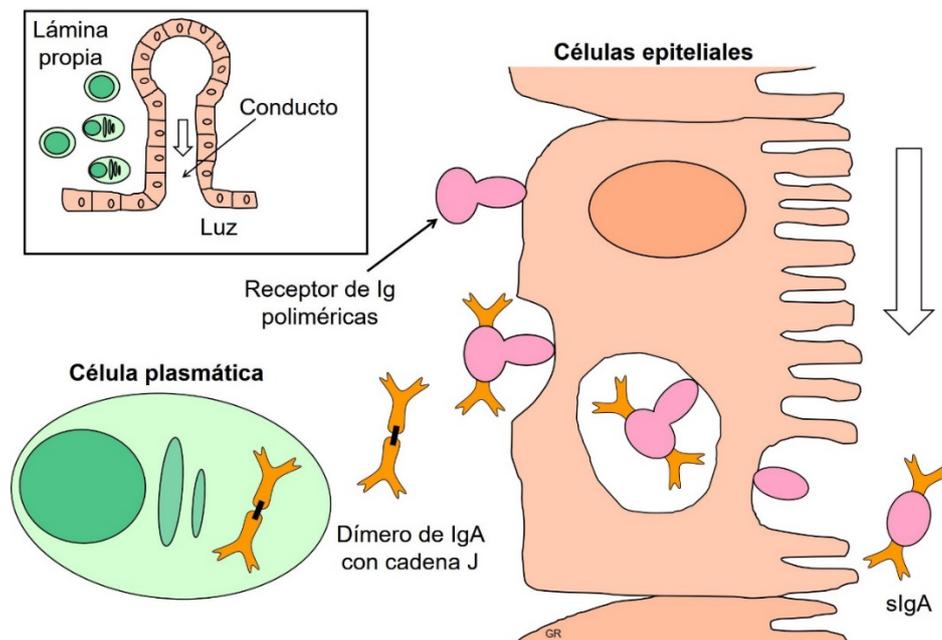


Figura 1. Síntesis de IgA en tejido linfoide asociado a glándulas salivales de mucosa oral y transporte hasta el lumen. La forma secretada (sIgA) es un dímero con cadena J unido al componente secretor, que es un fragmento proteolítico del receptor epitelial de inmunoglobulinas poliméricas.

La **deficiencia selectiva de IgA** es la inmunodeficiencia primaria más frecuente y afecta a uno de cada 700 individuos de origen europeo. En estos casos, los niveles de IgA en suero y secreciones son muy bajos pero detectables. Aunque en algunos afectados aumenta la incidencia de infecciones digestivas y respiratorias, a veces graves, la mayoría parecen sanos.

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

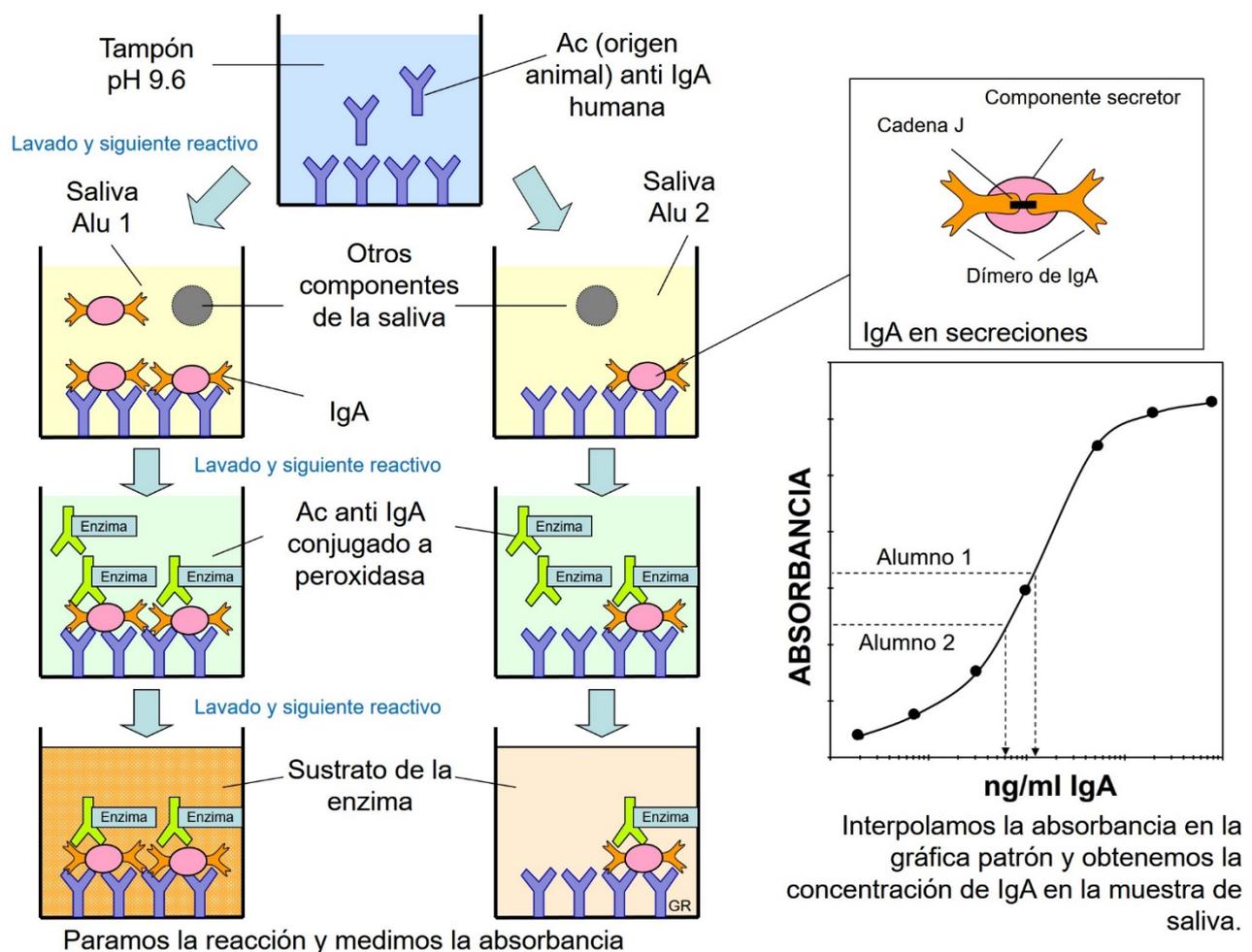


Figura 2. ELISA para la detección de IgA en saliva.

Por otra parte, la técnica o procedimiento denominado **ELISA** (acrónimo de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* o enzoinmunoensayo en castellano), es la técnica inmunológica más empleada en los laboratorios clínicos. El nombre de la técnica viene de que aprovecha tanto la especificidad de unión de los Ac como la amplificación de señal que producen las enzimas al catalizar una reacción. Además, todo el proceso ocurre adsorbido a una superficie, generalmente plástica, bañada por líquidos. El ELISA se utiliza habitualmente para cuantificar o detectar la presencia de muchas sustancias

de interés, generalmente proteínas, como son Ag microbianos, Ac frente a esos Ag, hormonas proteicas o marcadores tumorales. En cada caso, se utilizan Ac específicos para la proteína diana obtenidos de animales de experimentación como se ha indicado antes. En esta práctica cuantificaremos IgA de saliva utilizando un ELISA que nos dará la información que buscamos en pocas horas, aunque por conveniencia lo dividiremos en varias jornadas. Nuestro ELISA, como la mayoría de estos ensayos, sigue un patrón de **tres “capas”** (Figura 2). Comienza con la inmovilización a pocillos de poliestireno de Ac anti IgA humana. Esta primera capa se suele poner uno o varios días antes y se denomina capa de **captura**. Después de lavar los Ac no unidos, añadiremos las muestras de saliva a los pocillos (capa **problema**) e incubaremos. Si contienen IgA ésta será capturada por la primera capa. Después de lavar para eliminar los componentes de la saliva no unidos, se añadirá un Ac anti IgA humana conjugado a la enzima peroxidasa. Esta capa se denomina capa de **detección**. Los Ac de la capa de detección, con su enzima, se unirán en una cantidad proporcional a la IgA presente. Después de incubar y lavar, se añadirá el/los sustratos de la enzima. El sustrato se elige para que el producto de la reacción sea una sustancia coloreada que se pueda medir con un espectrofotómetro especial. La absorbancia medida estará en relación directa con la cantidad de enzima, y ésta a su vez con la cantidad de IgA. Para saber qué concentración de IgA tiene cada saliva problema, compararemos sus absorbancias con las de unos **patrones** que tienen una **cantidad conocida de IgA** y que procesaremos en paralelo.

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

EQUIPAMIENTO Y REACTIVOS:

<ul style="list-style-type: none"> - Espectrofotómetro para microplacas con filtro para 490 nm. - Centrifuga para tubos de 10 ml con rotor basculante. - Sistema de aspiración por vacío (opcional). - Módulos MaxiSorp de 8 pocillos (Nunc-Immuno-Module Cat. 469949 Thermo Scientific) y sus marcos (Cat. 460348 Thermo Scientific). - Tubos Salivette® estériles (Cat. 51.1534 Sarstedt). - Papel secante. - Tubos de ensayo de 5ml y gradillas. - Tubos Eppendorf. - Micropipetas para 10-100 µl y 200-1000 µl y sus puntas (amarillas y azules). - PBS (tampón fosfato salino) pH 7.2. Para 1L: <table style="margin-left: 20px; border: none;"> <tr><td>NaCl</td><td>8.00g</td></tr> <tr><td>H₂KPO₄</td><td>0.20g</td></tr> <tr><td>HNa₂PO₄</td><td>1.15g</td></tr> <tr><td>KCl</td><td>0.20</td></tr> </table> <p style="margin-left: 20px;">Disolver en agua destilada. Ajustar a pH 7.2 con HCl o NaOH</p> 	NaCl	8.00g	H ₂ KPO ₄	0.20g	HNa ₂ PO ₄	1.15g	KCl	0.20	<ul style="list-style-type: none"> - Tampón citrato pH 5.5 Para 1L: Citrato trisódico dihidrato 29.4 g Disolver en agua destilada. Ajustar a pH 5.5 con ácido cítrico 1M - Ac de cabra anti IgA humana (Cat. I0884 Sigma). Diluir en PBS a 400 µg/ml, alicuotar y congelar a -20°C. - Detergente no iónico Tween 20 (Cat. P1379, Sigma). Preparar 0.5 L de PBS al 0.05% v/v de Tween-20. - Albúmina sérica bovina (BSA) (Cat. 11930.03 Serva). Preparar 100 ml de PBS al 1% p/v de BSA. - Ac de cabra anti IgA humana conjugado a peroxidasa (Cat. A0295 Sigma). Diluir una parte a 0.8 µg/ml, alicuotar y congelar a -20°C. - 1,2 fenilendiamina (OPD) en comprimidos (Cat. P5412 Sigma). - H₂O₂ al 3% v/v (=p/p) (sirve el uso habitual como antiséptico, tener en cuenta su concentración en el paso 10). - H₂SO₄ diluido 2N.
NaCl	8.00g								
H ₂ KPO ₄	0.20g								
HNa ₂ PO ₄	1.15g								
KCl	0.20								

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (por parejas):

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

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

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

1.2. Ajustar dos tiras de 8 pocillos MaxiSorp a un marco blanco en las columnas 1 y 2. En cada pocillo pipetear 100 µl del Ac de captura preparado (agitar antes el tubo).

1.3. Rotular en las solapas las iniciales de los estudiantes y tapar con parafilm.

1.4. Incubar a 4°C de 12 a 72h.

2) Recogida de saliva (Figura 3):

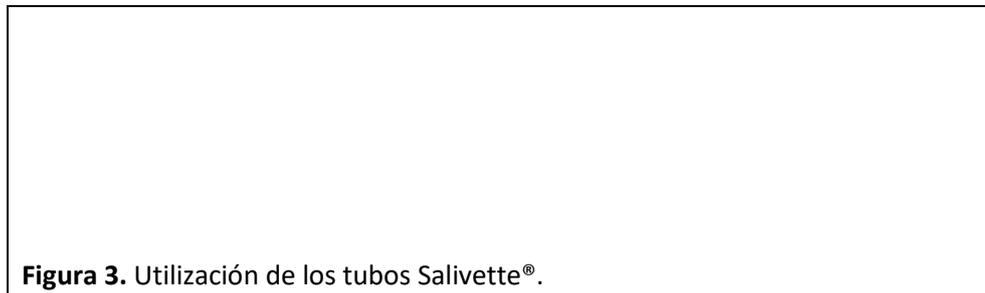
2.1. Cada estudiante rotula un tubo Salivette estéril en la tapa y el lateral para identificarlo (si un estudiante no desea analizar su saliva, el profesor le proporcionará una congelada).

2.2. Extraer el tubo interior pequeño, quitar la tapa e introducir la torunda en la boca, mejor sin tocarla con los dedos.

2.3. Masticar sin apretar 1 minuto.

2.4. Retornar la torunda al tubo pequeño y tapar. Insertarlo en el tubo grande.

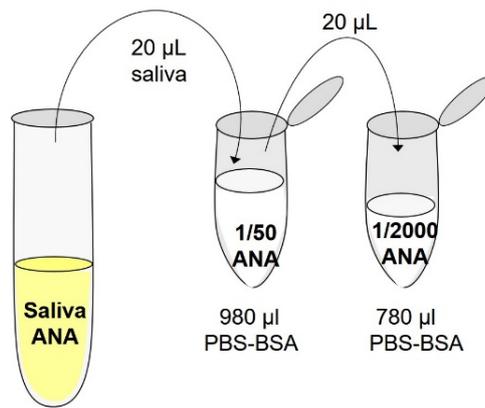
2.5. Centrifugar 3 minutos a 600xg (equilibrar bien la centrifuga enfrentando los tubos).



3) Dilución de la saliva:

3.1. Cada estudiante rotula dos tubos Eppendorf "1/50" y "1/2000", además de sus iniciales, y añade los siguientes reactivos en el orden indicado (es muy importante mezclar bien):

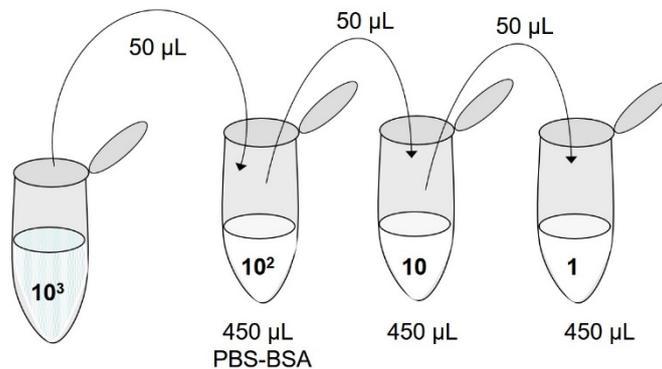
REACTIVO	TUBO	Estudiante 1		Estudiante 2	
		1/50	1/2000	1/50	1/2000
PBS-BSA		980 µl	780 µl	980 µl	780 µl
Saliva del tubo Salivette		20 µl (mezclar)	-	20 µl (mezclar)	-
OJO: Del tubo Eppendorf 1/50 bien mezclado		-	20 µl (mezclar)	-	20 µl (mezclar)



4) Dilución seriada del patrón de referencia concentrado (10³ ng/ml):

4.1. Cada pareja rotula tres tubos Eppendorf como se indica en la tabla y añade los reactivos en el orden indicado (es muy importante mezclar bien):

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



En este momento tendremos cuatro tubos patrón con 10³, 10², 10 y 1 ng/ml de IgA.

5) Lavado de los pocillos con la primera capa:

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

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

6) Pipeteo de patrones y muestras:

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

A	10 ³ ng/ml	10 ³ ng/ml
B	10 ² ng/ml	10 ² ng/ml
C	10 ng/ml	10 ng/ml
D	1 ng/ml	1 ng/ml
E	Alu 1 saliva 1/50	Alu 1 saliva 1/50
F	Alu 1 saliva 1/2000	Alu 1 saliva 1/2000
G	Alu 2 saliva 1/50	Alu 2 saliva 1/50
H	Alu 2 saliva 1/2000	Alu 2 saliva 1/2000
	1	2

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

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

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

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

8) Lavado de los pocillos:

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

9) Pipeteo del Ac de detección:

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

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

10.1. En un tubo cónico graduado preparar una disolución que quede a 0.5 mg/ml final de 1,2 fenilendiamina y 0.05% v/v final de H₂O₂, usando como diluyente tampón citrato. La 1,2 fenilendiamina viene en comprimidos de 20 mg (desprecie su volumen) y el H₂O₂ está a la concentración que indica el envase (generalmente 3% o 4.9% p/p (=v/v)). Todos los estudiantes deben realizar los cálculos:

REACTIVO	TUBO	Sustrato - Cromógeno
Comprimido de 1,2 fenilendiamina		20mg
Tampón citrato pH 5.5	
H ₂ O ₂ 3% (o a la concentración que esté) v/v (=p/p). Añadir cuando el comprimido esté disuelto	

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

11) Lavado de los pocillos:

11.1. Al finalizar la incubación del paso 9, lavar los pocillos como en el paso (5), añadiendo, en total, 4 veces PBS-Tween y decantando 5 veces.

12) Disparo de la reacción:

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

13) Lectura y cálculos:

- 13.1. Agrupar las tiras de una mesa en mismo marco y leer absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas.
- 13.2. Calcular la media de los duplicados y representar *log ng/ml de IgA vs Absorbancia de los patrones* y unir los puntos. Puede utilizar el papel semilogarítmico adjunto (represente ng/ml en el eje log vs Absorbancia en lineal). Puede ajustar por mínimos cuadrados si ve que los cuatro puntos caen en el tramo recto de la gráfica.
- 13.3. Sobre la gráfica obtenida, interpolar las absorbancias de las muestras de saliva diluida de cada estudiante de la pareja. Calcular la concentración en la muestra de saliva original teniendo en cuenta las diluciones empleadas (1/50 y 1/2000).

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

ABSORBANCIA

