# TÈCNICA DE LES CÈL·LULES FORMADORES DE PLAQUES. PFC

Comunicació presentada el dia 27 d'abril de 1974
per la doctora

**MARIA ROSA CASTRO**

del Departament d'Investigació de l'Hospital
de Ntra. Sra. del Mar. Barcelona

Els anticossos són sintetitzats per cèl·lules del teixit limfoide localitzat a la melsa i teixits limfàtics. La tècnica de les cèl·lules formadores de plaques descrita per JERNE i NORDIN [10] i INGRAHAM [8, 9] ens permet determinar, en una suspensió de cèl·lules limfoides aïllades, el nombre de cèl·lules que sintetitzen i segreguen anticossos a l'exterior, i són aquestes cèl·lules les responsables de l'aparició d'anticossos a nivell circulant.

Passats uns quants dies d'haver inoculat, per via intraperitoneal, els ratolins amb $10^8$ glòbuls de be, són determinades les cèl·lules que formen anticossos. Sacrificat el ratolí, es fa una suspensió amb les cèl·lules de la melsa. Per a obtenir-la cal tallar primerament la melsa a trossos petits, triturar-la suaument en un homogenitzador, filtrar-la a través d'un tamís de 0,05 mm i, seguidament, suspendre les cèl·lules en mitjà de Hanks. Cal rentar-les dues vegades a centrifugació lenta, 500 g, i passar-les diverses vegades a través d'una agulla fina, per desfer tots els possibles grumolls que s'hi puguin formar durant les rentades. Hom controla, tanmateix, a través del microscopi, si les cèl·lules es veuen ben separades les unes de les altres, i procedeix a comptar-les. La suspensió de cèl·lules són diluïdes més o menys segons els dies d'immunització de l'animal experimentat; val més, però, treballar amb diverses dilucions. Totes aquestes operacions descrites fins ara són realitzades en fred.

Hom renta glòbuls de be amb mitjà de Hanks, a 3.500 r.p.m. i prepara una sopa de concentració al 25 %.

Posteriorment, és mantingut el material a 45 °C i, en un portaobjectes, hom barreja 3 c.c. d'agarosa al 1 % (1,13), 10 lambdes de suspensió de cèl·lules i 10 lambdes d'hematies de be, fins a obtenir una capa comple-

tament homogènia. Cal mantenir aquestes preparacions a 37 °C en cambra humida, durant una hora com a mínim i addicionar-hi, seguidament, complement de conill d'Índies absorbit amb glòbuls de be. Passat un temps de 30 a 45 minuts, hom pot fer la lectura de les plaques mitjançant un projector o un microscopi a pocs augments. Les plaques poden ésser també detectades tenyint-les amb una solució de benzidina en àcid acètic i $H_2O_2$, però no és recomanable, ja que aquesta substància és carcinògena [3].

Les plaques obtingudes corresponen a cèl·lules formadores d'anticossos hemolítics, predominantment del tipus Ig M, i són conegudes amb el nom de plaques directes. Per obtenir les plaques de cèl·lules formadores d'anticossos poc hemolítics o no gens, a les quals, hom dóna el nom de plaques indirectes, cal cobrir la preparació amb antiglobulina de ratolí obtinguda en conill, després de la incubació d'una hora a 37 °C i deixar-les una hora més abans d'afegir-hi el complement [2]. Les plaques indirectes així determinades ens donen el nombre de cèl·lules formadores d'anticossos dels tipus Ig M i Ig G. L'obtenció de les cèl·lules formadores d'anticossos del tipus Ig A solament és possible, si augmenta la dosi d'antigen [14] en la inoculació a $10^{10}$. Uns altres autors [13] addicionen l'antiglobulina a l'agarosa al començament del procés i queda disminuït el temps d'incubació. També, per a observar la resposta en cada tipus d'anticòs, hom treballa amb antiglobulina específica [11, 14]. Wortis i col·laboradors [14] utilitzen anticadenes pesades com $\gamma_1$, $\gamma_{2a}$, $\gamma_{2b}$, per a detectar les plaques indirectes.

Hem dit que és millor treballar amb més d'una dilució, i és interessant obttenir dues preparacions de cada una. La dilució correcta és la que ens permet de comptar, per portaobjectes, de 20 a 80 plaques, ja que un nombre més gran ens pot portar a error en la lectura. En el ratolí de cinc dies d'immunització, el nombre de leucòcits per ml que cal comptar en les dilucions oscil·la entre $1 \times 10^8$ i $4 \times 10^7$ per a les plaques directes, i de $5 \times 10^7$ a $1 \times 10^7$ per a les indirectes.

Aquesta tècnica no té una validesa quantitativa absoluta, i els resultats obtinguts no poden ésser comparats més que dintre de la mateixa experiència on tots els paràmetres es mantenen constants, ja que en els diversos processos de manipulació es presenta alguna pèrdua de cèl·lules.

No tots els anticossos hemolítics detectats en les plaques directes són del tipus Ig M, ja que hom ha vist que alguna subclasse de les Ig G també és hemolítica, com ho és la $\gamma_2$, i pot ésser observada enttre les PFC directes, i també ha vist que existeix una Ig M no hemolítica, que és detectada solament amb presència d'anti-Ig M [11]. La segregació d'aquesta macroglobulina no hemolítica sembla que no es produeix els primers dies després de la immunització, sinó en dies posteriors.

Aquesta tècnica és utilitzada també per a detectar la resposta a d'altres antígens, com ara proteïnes solubles, polisacàrids, o haptens, sempre que l'antigen sigui fixat sobre els hematies de be.

Al nostre departament, hem estudiat, en una sola dosi d'antigen, la resposta en cèl·lules formadores de plaques directes i indirectes, en el ratolí, i hem utilitzat, com a antigen, els hematies de be. Hem observat que les PFC directes es presenten en gran nombre els primers dies després de la immunització, i donen un màxim al quart dia, mentre que la resposta en PFC indirectes és més tardana. Actualment estem estudiant la resposta en una estimulació continuada i persistent de glòbuls de be, fenòmens que han estat estudiats amb anterioritat per GRAS i col·l. [4, 5, 6, 7] en el conill, amb diferents antígens per valoracions d'anticossos a nivell sèric.

## BIBLIOGRAFIA


1. BERNOVSKA, J., KOSTKA, J. i STEZL, J. — *Haemolytic reaction in gels.* «Folia Microbiol», *8,* 376 (1963).
2. DRESSER, D. W. i WORTIS, H. H. — *A localized hemolysis in gel method for the detection of cells producing 7S antibody: Use of an Antiglobulin Serum to detect Cells producing Antibody with Low Haemolytic Efficiency.* «Nature», *208,* 859 (1965).
3. DRESSER, D. W. i WORTIS, H. H. — *Localized Haemolysis in gel.* «Weir D. M. Handbook of Experimental Immunology»: 1054. Blackwell. 1967.
4. GRAS, J. — *Le phénomène de l'inhibition d'anticorps circulants par hyperimmunisation.* «Rev. Immunology», *24,* 354 (1960).
5. GRAS, J. i DALMAU, M. — *Antibody inhibition by a minimal dose of antigen and response to a sudden increase of the dose.* «Nature», *210,* 430 (1966).
6. GRAS, J. — *«L'equilibre immunologique» entre la stimulation antigénique persistente à niveau constant et la réponse en anticorps.* «Rev. Franç. Et. Clin. Biol.», *14,* 520 (1969).
7. GRAS, J. — *Homéostase et tolérance immunitaire.* «Ann. Ints. Pasteur», *118,* 442 (1970).
8. INGRAHAM, J. — *Identification individuelle des cellules productrices d'anticorps par une reaction hemolytique locale.* «C. R. Acad. Sci.», *256,* 5005 (1963).
9. INGRAHAM, J. i BUSSARD, A. — *Application of localized hemolysin reaction for specific detection of individual antibody forming cells.* «J. Exp. Med.», *119,* 667 (1964).
10. JERNE, N. K. i NORDIN, A. A. — *Plaque formation in agar by single antibody producing cells.* «Science», *140,* 405 (1963).
11. PLOTZ, P. H., TALAL, N. i ASOFSKY, R. — *Assignment of direct and facilitated hemolytic plaques in mice to specifig immunoglobulin classes.* «J. Immunol.», *100,* 744 (1968).
12. PLOTZ, P. H., COLTEN, H. i TALAL, N. — *Mouse macroglobulin antibody to sheep erythrocytes a non-complement fixing type.* «J. Of. Immunol.», *100,* 752 (1968).
13. STERZL, J. i RIHA, J. — *Detection of cells producing 7S antibodies by the plaques technique.* «Nature», *208,* 858 (1965).
14. WORTIS, H. H., DRESSER, D. W. i ANDERSON, H. R. — *Antibody production of the localized haemolysis in gel (LHG) assay III. Mouse cells. producing five different classes of antibody.* «Immunol.», *17,* 93 (1969).