

# Técnicas de aglutinación



ANALIA PEREZ

# OBJETIVOS

- Comprender los distintos tipos de técnicas de aglutinación.
- Conocer su fundamento.
- Informar e interpretar en el contexto de una situación clínica.



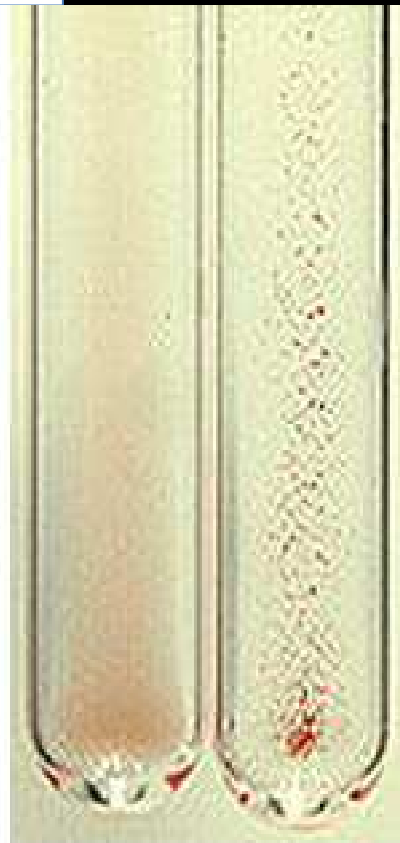
# ***INTRODUCCIÓN***

- ☺ **Es la detección de anticuerpos empleando antígeno en estado particulado. También es útil para la detección de antígenos.**
- ☺ **Los principios que la rigen son los mismos que para precipitación.**
- ☺ **En ambos tipos de ensayos (directa e indirecta) el análisis puede ser cuali o semicuantitativo, aunque en algunos kits comerciales a partir del límite de detección del inserto se puede hacer una estimación cuantitativa.**
- ☺ **Son técnicas poco costosas, requieren poco materiales y son rápidas.**
- ☺ **Es una herramienta útil en el laboratorio de inmunología para la detección y hallazgo de diferentes patologías.**

# Recordando...

## AGLUTINACIÓN

- Interacción Ag-Ac → malla → precipitado.
- Ac → divalente y Ag → di-polivalente, distintos epítopes.

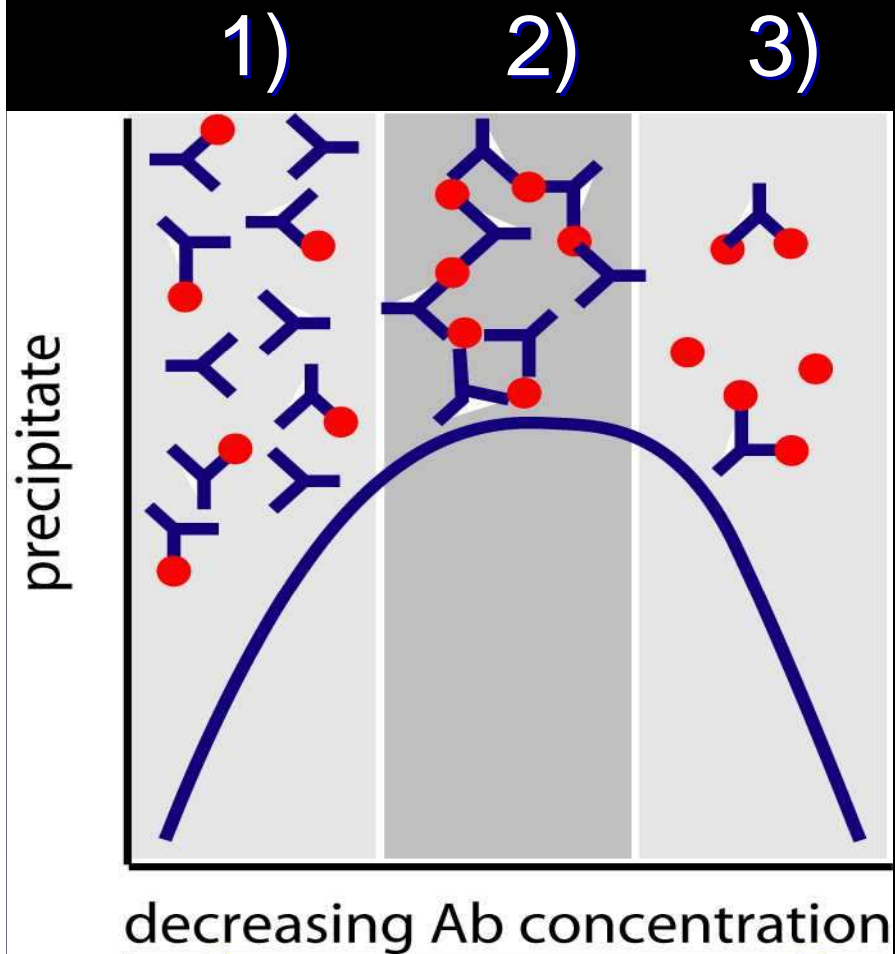


DAT negative positive

## FLOCULACIÓN

No se forman precipitados hasta que la cantidad de Ag añadido no exceda ciertos límites. Los floculos se agregan y sedimentan en rango estrecho de Ag/Ac.

# AGLUTINACIÓN

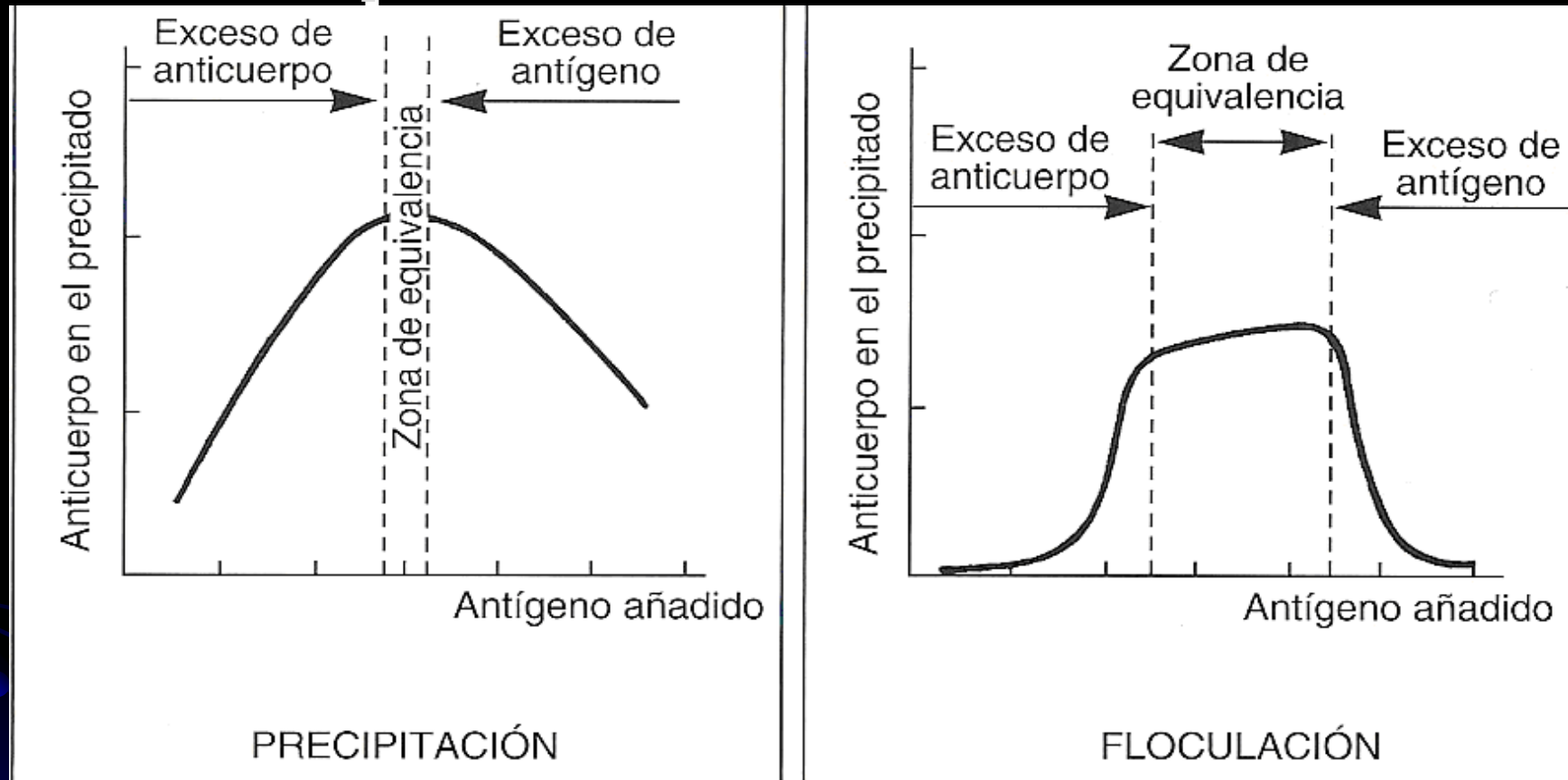


**1) Prozona** se da en la zona donde existe exceso de Ac frente al Ag, donde no se produce precipitación, originando falsos (-) por altas [ ] de Ac. Esta dificultad se elimina con diluciones seriadas estándar del suero.

## **2) Equivalencia**

**3) Postzona**, se da en la zona de exceso de Ag, donde tampoco se da la precipitación, dando tb falsos (-).

# Comparando...



- Los complejos se agregan y sedimentan en un rango muy estrecho de la relación Ag/Ac

## DIRECTAS



El **antígeno** es por sí mismo **particulado**, por lo que no requiere fijación a soportes inertes.

Son aglutinadas directamente por los Acs.

- Rápida: en placas
- Lenta: en tubos o microplacas

## INDIRECTAS o PASIVAS



**Antígenos solubles** unidos a glóbulos rojos o partículas inertes como el poliestireno, látex y bentonita. También pueden utilizarse bacterias como soporte (*Micrococcus lysodeikticus*).

- Rápida: en placas
- Lenta: en tubos o microplacas

# Aglutinación Directa

## Aglutinación directa:

- **Antígenos febriles: Salmonella y Brucella**
- **Grupo sanguíneo y Factor Rh**

## Aglutinación directa en tubos:

- **Determinación de isohemaglutininas en suero / plasma**
- **Prueba de Coombs directa e indirecta**



# Test de aglutinación directa en tubos

## Cuantificación de isohemaglutininas

Las isohemaglutininas (Anti A y Anti B) son Acs naturales clase IgM y menos frecuente IgG. Están presentes en todos los individuos, excepto en los del grupo AB.

El Anti H se presenta en individuos A, B, AB dirigidos contra grupo sanguíneo A y B.

Sus títulos son superiores a 1/8

### UTILIDAD:

\*Inmunodeficiencias de Acs.

\*Tx de MO:

— **Prueba mayor:** GR donante-suero Rc












— **Prueba menor:** GR Rc + suero donante.

La primera es más importante por que los GR que van a ser transfundidos se enfrenta a la totalidad del plasma del Rc in vivo.

ANALIA PEREZ

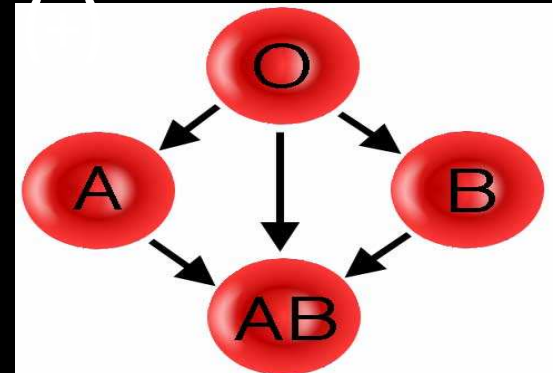
# PROCEDIMIENTO

- ❑ **Muestra** : suero o plasma libre de hemólisis
- ❑ **Reactivo** : G.R. tipificados de humano (A, B o AB)
- ❑ **Lavar** con S.F.y luego resuspender en SF
- ❑ **Se agregan** los G.R. se homogeniza, centrifuga, agita suavemente y se **observa** la aglutinación.
- ❑ **Se informa** el título de isohemaglutininas de la muestra.
- ❑ **Título de antisuero** es la mayor dilución a la cual presenta aglutinación.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SF (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Suero o plasma (µl)	100										----
											
											descartar
GR 3-5% (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Título	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	0

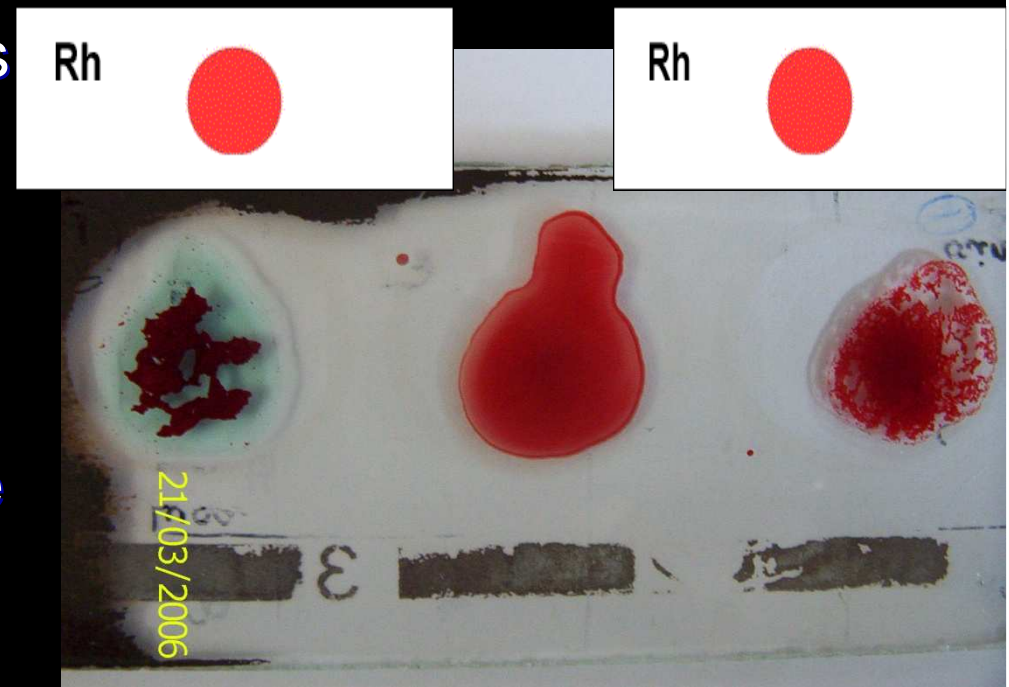
# Grupo Sanguíneo y Factor Rh

- Prueba cualitativa para la determinación del grupo ABO y Rh.
- El tipo sanguíneo dependerá del Ag presente en la superficie del GR y el suero del paciente.
- Los Ags del sistema Rh son de naturaleza proteica. El antígeno D posee la mayor capacidad antigénica.
- **Quienes posean el factor Rh serán: Rh (+)**
- **Quienes NO lo posean: Rh (-)**



# PROCEDIMIENTO

Se enfrenta una gota de sangre entera del paciente con los reactivos compuesto por anticuerpos monoclonales dirigidos a los polisacáridos del GR y al factor Rh. Se utiliza antiA, antiB y anti Rh. es una prueba rápida que se realiza en placa y antes de los 2 minutos se observa si hay aglutinación observable directamente o al MO.



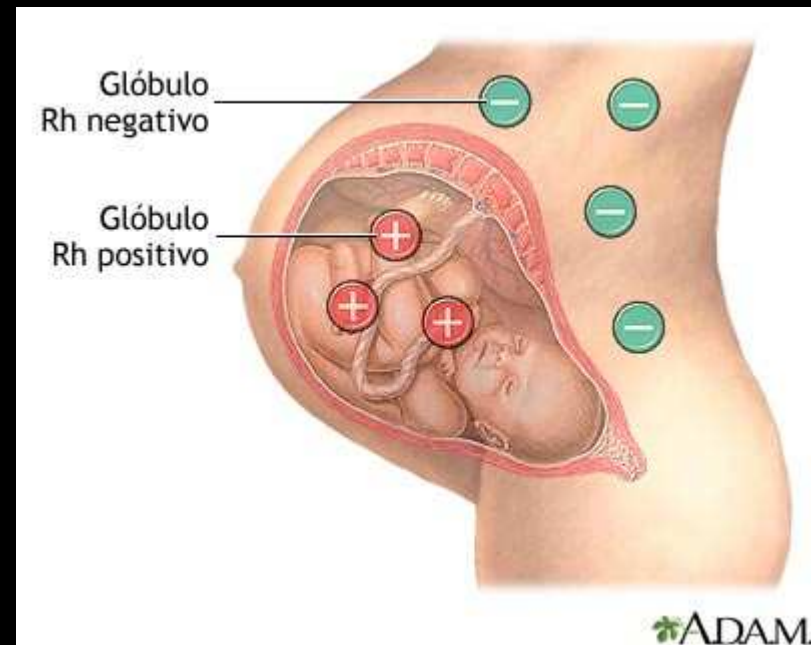
# GRUPO ABO

Grupo Sanguíneo	Reacciona contra...	Puede dar sangre a...	Puede recibir sangre de...
			
			
	Ninguno		
			

## UTILIDAD:

- La forma más común de eritroblastosis fetal es la incompatibilidad ABO, que puede variar en su severidad.
- La forma menos común se denomina incompatibilidad Rh, que muy a menudo causa una anemia muy grave en el bebé.
- Los síntomas en un RN pueden abarcar:
- Anemia, Hepatomegalia o esplenomegalia, Edema generalizado, Ictericia del recién nacido, etc.

# Incompatibilidad Rh





# Técnica de aglutinación directa/indirecta en tubo:

- **Coombs directa**

Para detectar IgG y/o fracciones de C' que se encuentran fijados *in vivo* a la superficie del GR.

Su positividad significa que la persona tiene Acs contra sus GR.

- **Coombs indirecta**

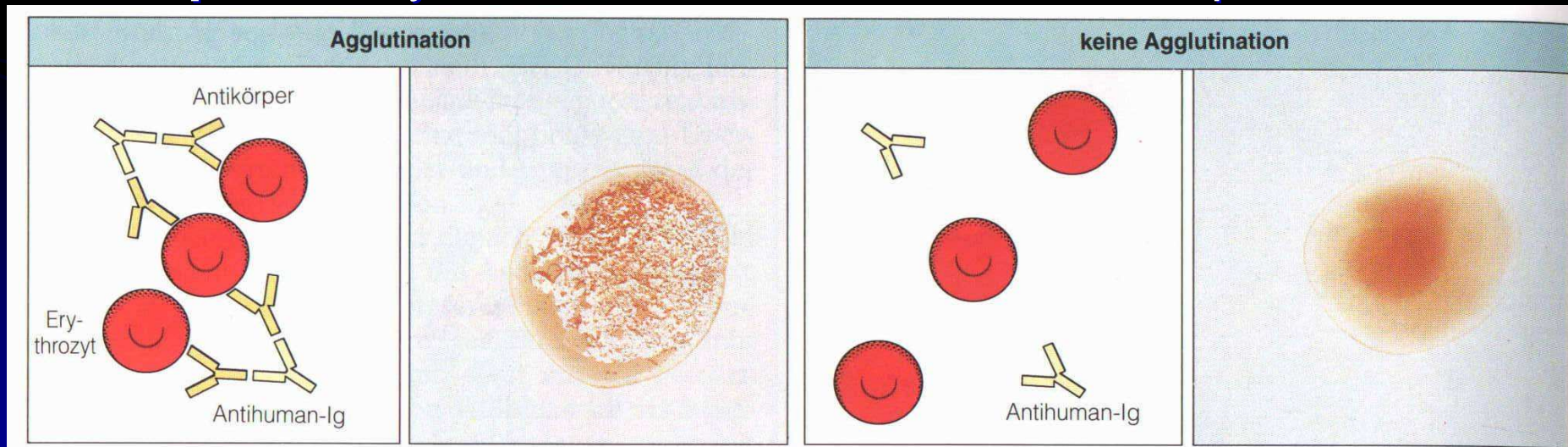
Se busca autoAcs contra GR presentes en suero.

Una prueba positiva indica que hay Acs contra Ags de Gr.



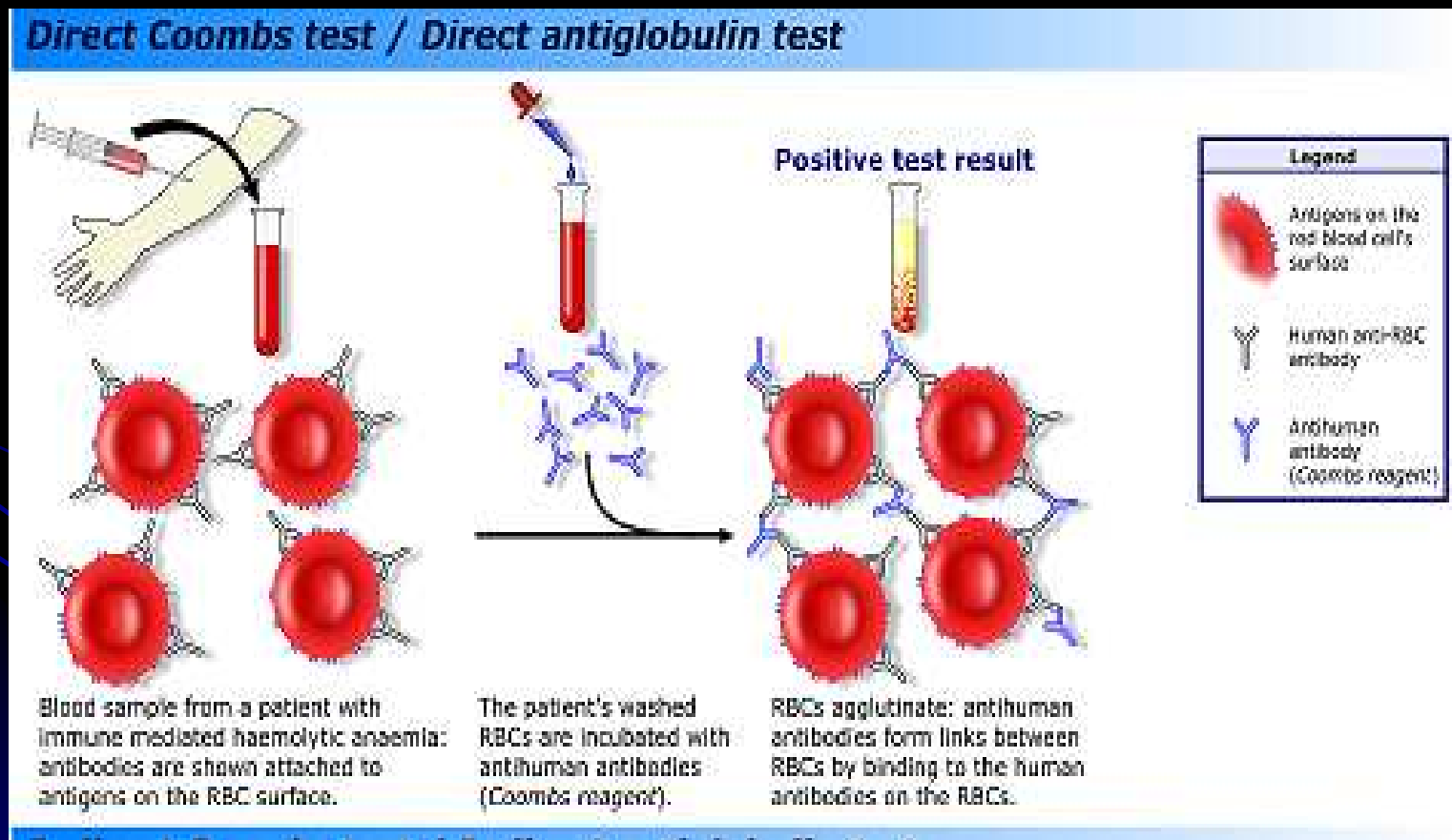
# Prueba de Coombs

- Se detectan Acs Antic-D u otros Acs que atacan la membrana del GR., mediante el agregado del suero de Coombs (antiglobulina).
- Se puede emplear Suero monoclonal-poli específico (**Antic-IgG-c3d**) o Antic IgG monoclonal **Mono específico** y **Antic-c3d** Monoclonal Mono específico



# Coombs Directa

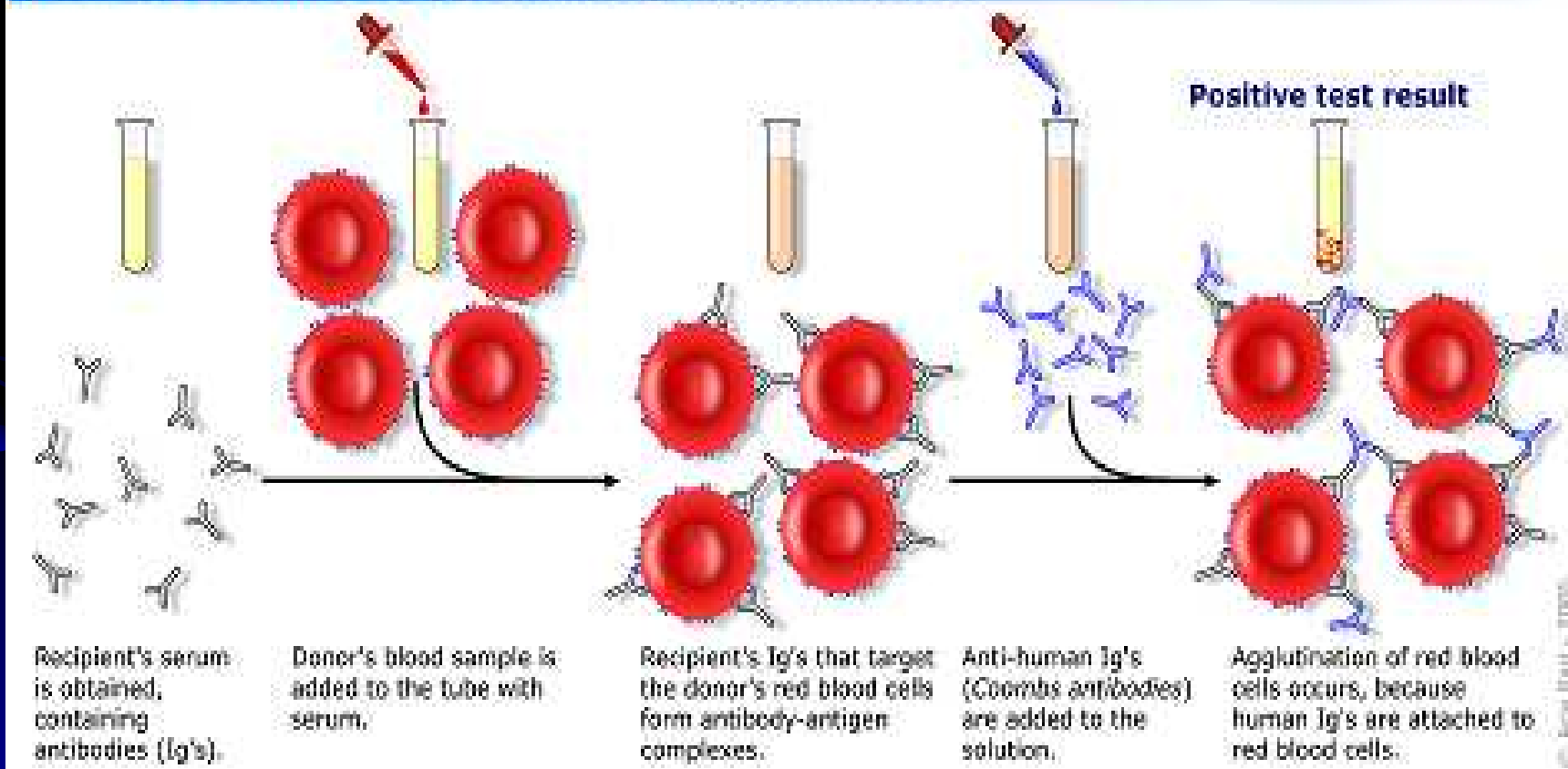
- Anticoagulantes: EDTA, heparina, ACD, CPD



# Coombs Indirecta

No se emplea anticoagulante, dejar exudar el suero 37° C

*Indirect Coombs test / Indirect antiglobulin test*



# Test coombs directa

- La positividad de la prueba puede deberse a:

- ➔ AHA
- ➔ AH inducida por drogas
- ➔ Eritroblastosis fetal
- ➔ Mononucleosis infecciosas
- ➔ LES
- ➔ Sífilis
- ➔ Transfusiones
- ➔ Otras

# Coombs Indirecta

## UTILIDAD

- ☺ **Screening de suero de donantes y receptores para Acs.**
- ☺ **Pruebas de compatibilidad sanguínea transfusionales.**
- ☺ **Fenotipo de GR.**
- ☺ **Identificación y titulación de Acs encontrados en suero.**

# Antígenos Febriles –Reacción de Widal- Hudlesson

- **Antígenos Febriles** es un término referido a un grupo de suspensiones bacterianas patógenas para la especie humana y responsables de la aparición de infecciones (**brucelosis, salmonelosis** y ciertas **rickettsiosis**) que cursan con un cuadro febril en el huésped infectado.
- En el diagnóstico clínico, los resultados obtenidos con el uso de los Antígenos Febriles deben ser considerados siempre en relación a los hallazgos clínicos y otras pruebas de laboratorio.
- Puede dar reacción cruzada, inespecífica, el Ag O y D (salmonella) en pacientes con Influenza; en enfermedades hepáticas crónicas y consumidores de narcóticos, y otros.

# PROCEDIMIENTO

1. Depositar en la placa las cantidades del suero a analizar (EL SUERO DEBE ESTAR TOTALMENTE CLARO).
2. Agitar el Ag a utilizar para tener una suspensión uniforme. Ej.: Tífico "O" - Salmonella typhi; Antígeno somático.
3. Añadir suspensión de antígeno a las cantidades de suero.
4. Mezclar el antígeno y el suero (Acs) utilizando un aplicador.
5. Girar la placa manualmente o utilizando un agitador mecánico (120 rpm) durante 2 minutos.
6. Realizar la lectura utilizando una fuente de luz directa y observar la aglutinación macroscópica.
7. Incluir controles Positivo y Negativo.



# Pruebas no treponémicas

- Técnica: Floculación de liposomas
- Antígeno: Solución alcohólica de cardiolipina, colesterol y lecitina
- Detectan: “Reaginas” IgG e IgM anti material lipídico
- Método: Cualitativo (pesquisa) y semicuantitativo (seguimiento)

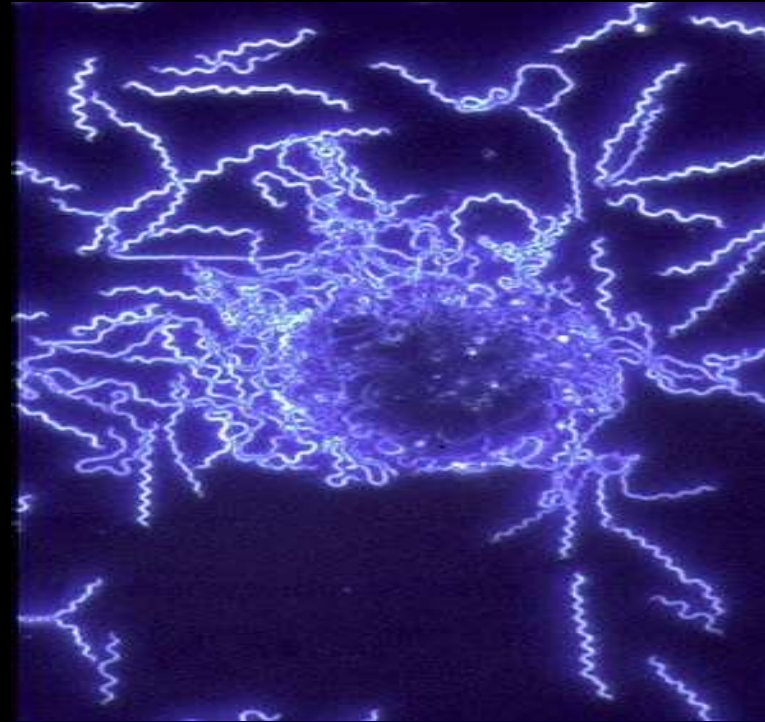
Suero y LCR	<b>VDRL (Venereal Disease Research Laboratory)</b> Inactivación del suero a 56°C	Microscópica
		Placa
Plasma y Suero	<b>USR (Unheated Serum Reagin).</b> Sin inactivación del suero (cloruro de colina). Estable (EDTA)	
	<b>RPR (Rapid Plasma Reagin)</b> Con partículas de carbón. Tarjetas con círculos de 18mm	Macroscópica
	<b>TRUST (Toluidine Red Unheated Serum Test)</b>	Tarjeta



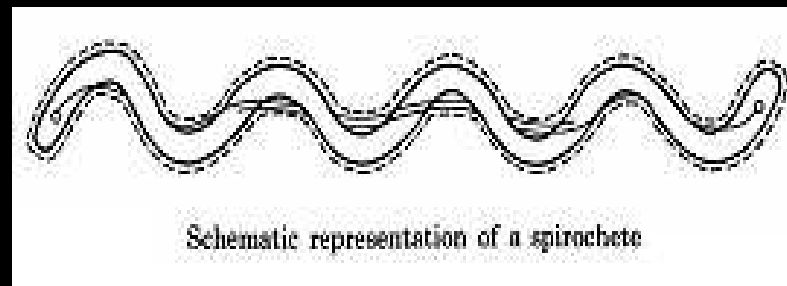
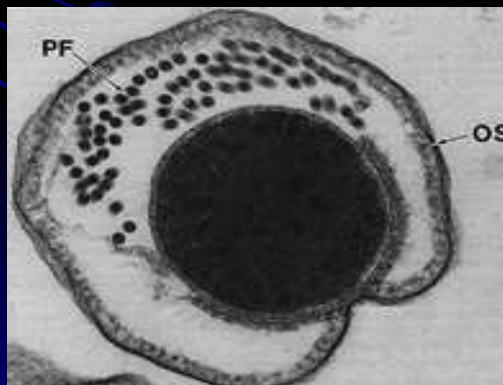
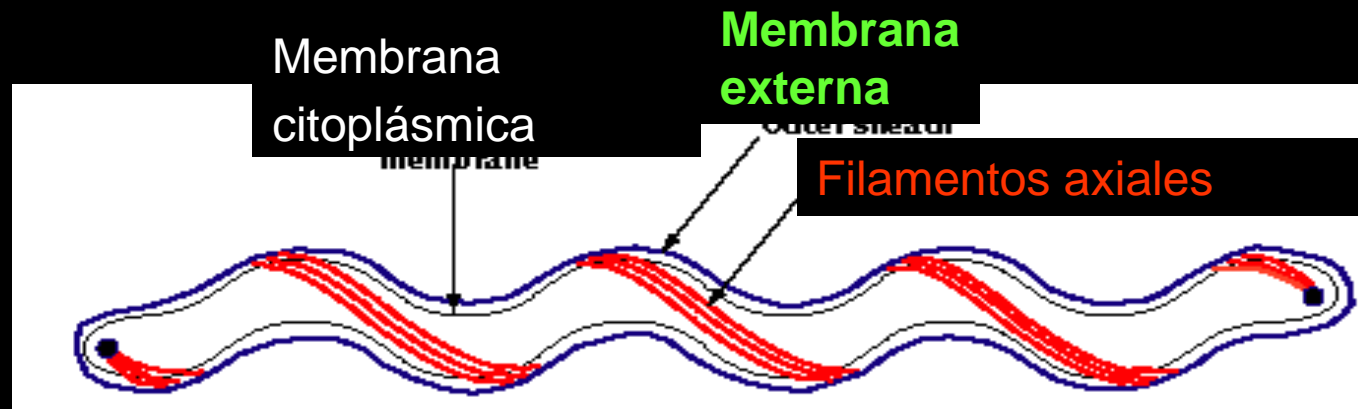
# T. Pallidum

➡ Bacterias helicoidales

➡ muy móviles



# Estructura: Espiroqueta



# Tipos de Acs

- **Anticuerpos inespecíficos o reaginas:**
  - Frente a los lípidos que se liberan de los tejidos.
  - Aparecen 1-3 semanas tras la lesión primaria.
  - Se correlacionan con multiplicación activa.
- **Anticuerpos específicos o treponémicos:**
  - Aparecen rápidamente.
  - Suelen ser positivos toda la vida.

# PROCEDIMIENTO

- Tanto los reactivos como la muestra deben estar a temperatura ambiente antes de realizar la prueba.

## I- PRUEBA CUALITATIVA EN SUERO O PLASMA

- En cada uno de los sectores delimitados de la placa
- colocar:

**Muestra o Controles 50 ul**

Con gotero colocar:

**Antígeno: 1 gota**

Agitar horizontalmente la placa a 180 rpm durante 4 minutos.

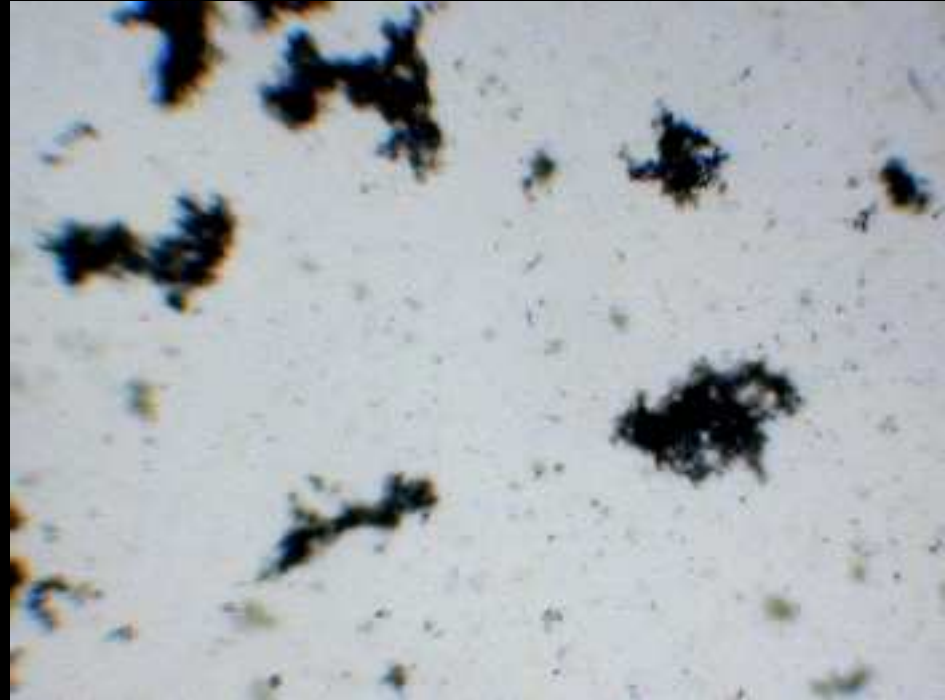
- Observar inmediatamente en microscopio con poco aumento (10X)



21/03/2006



21/03/2006



ANALIA PEREZ

# Clínica

## **PERÍODO PRIMARIO**

- ✓ Aparece el *chancro solitario e indoloro*
- ✓ Dura de 10-14 días curando en 6 semanas



ANALIA PEREZ



# Clínica

## ***PERÍODO SECUNDARIO***

- Comienza a las 6-8 semanas de la lesión primaria
- Fiebre, rinorrea, mialgias, linfadenopatías generalizadas.
- En el **80 % de los casos** ***afectación cutánea*** con exantema maculopapulosos no pruriginoso desde tronco a extremidades. Dura más de 2 semanas. Predomina en palmas y plantas donde puede indurarse ( clavos sifilíticos ). Sin tto puede durar hasta un año.
- Tras 2-12 semanas se resuelve este período y comienza el ***período de latencia***
- Latencia: Presenta serologías ya positivas pero es paucisintomática.



# UTILIDAD

- Respuesta al tratamiento.
- Complementar el diagnóstico de sífilis
- Banco de sangre
- Embarazo
- Prenupcial
- Estudio de ETS en grandes masas de población
- Ocupacional



# Desventajas

- La Prueba VDRL tiene como limitante los falsos positivos (hepatitis, brucelosis, lepra, malaria, asma, tuberculosis, diabetes, LES, S. Antifosfolipidico, etc.)
- Sus datos solo constituyen un dato auxiliar que se debe correlacionar con la clínica del paciente, es decir para complementar el diagnostico de sífilis y analizar rta al tratamiento específico.
- También da falsos negativos por el fenómeno de prozona.
- Cuando no es reactiva en un paciente con sífilis?!!

**¡¡GRACIAS!!**



ANALIA PEREZ