

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.



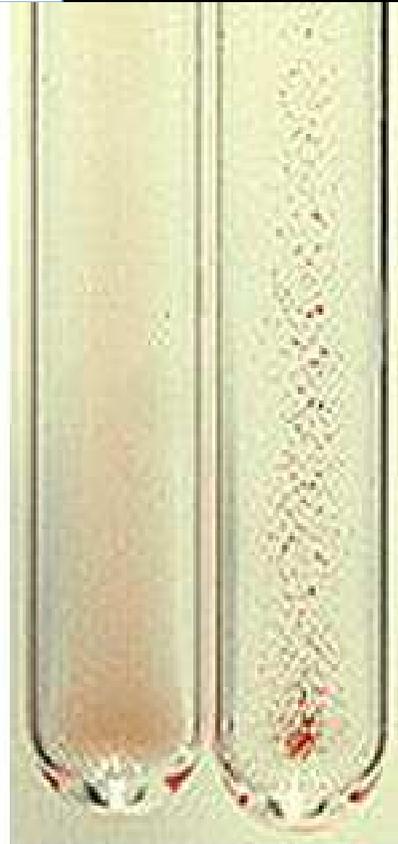
INTRODUCCIÓN

- ☺ **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.

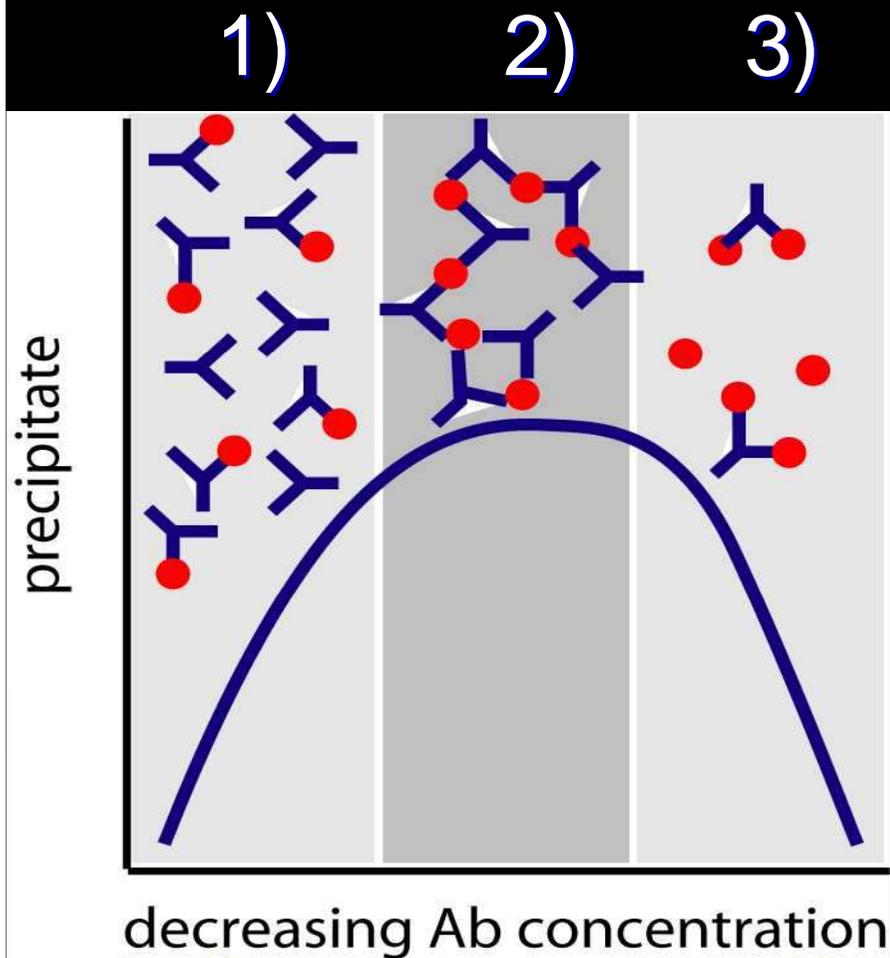


DAT negative positive

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

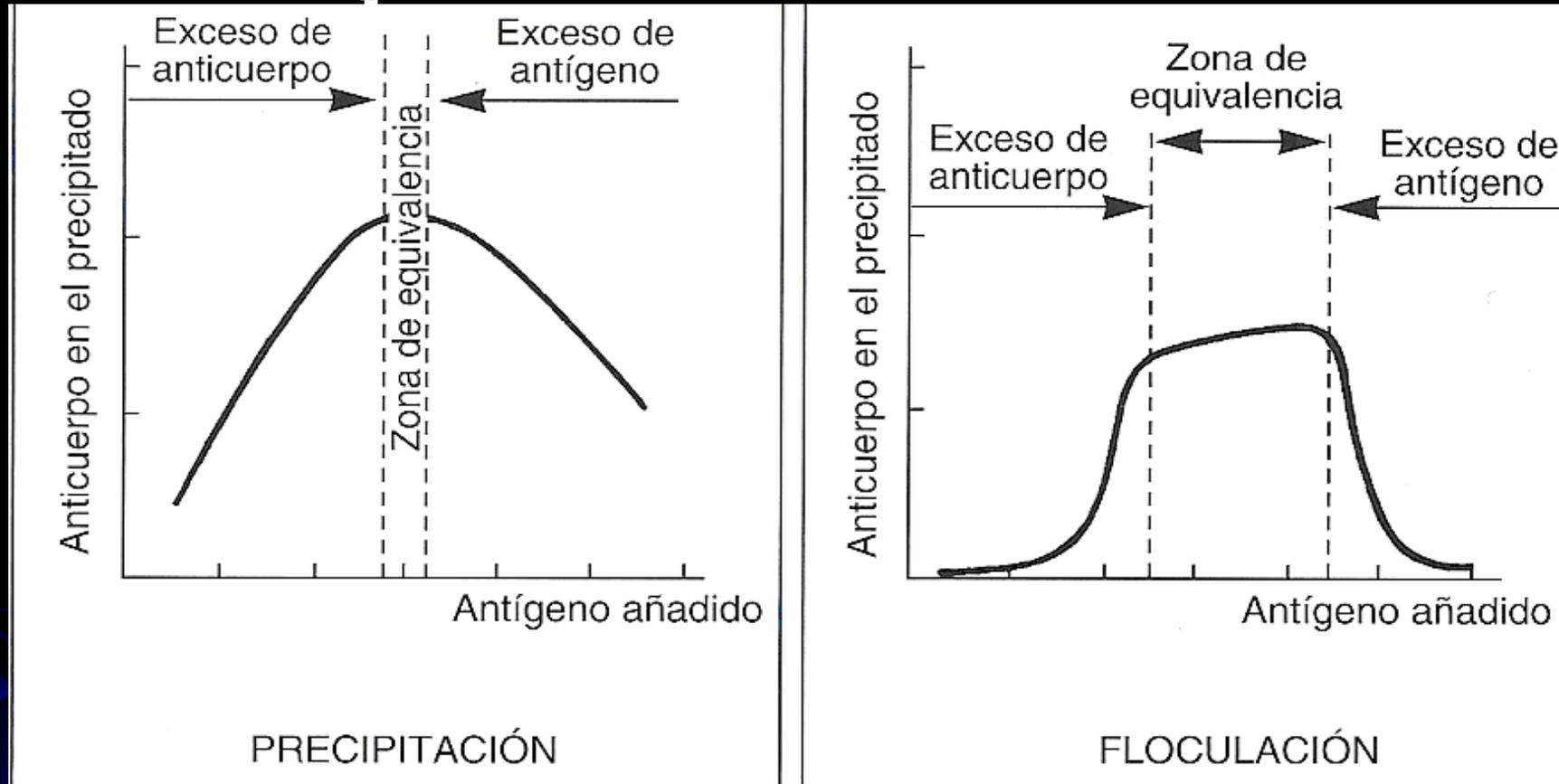


1) Prozona se da en la zona donde existe exceso de Ac frente al Ag, donde no se produce precipitación, originando falsos (-) por altas [] de Ac. Esta dificultad se elimina con diluciones seriadas estándar del suero.

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

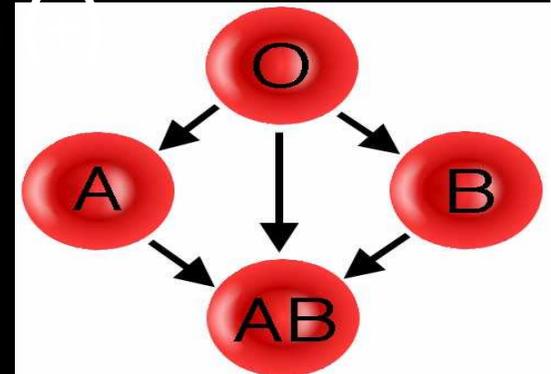
PROCEDIMIENTO

- ❑ **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

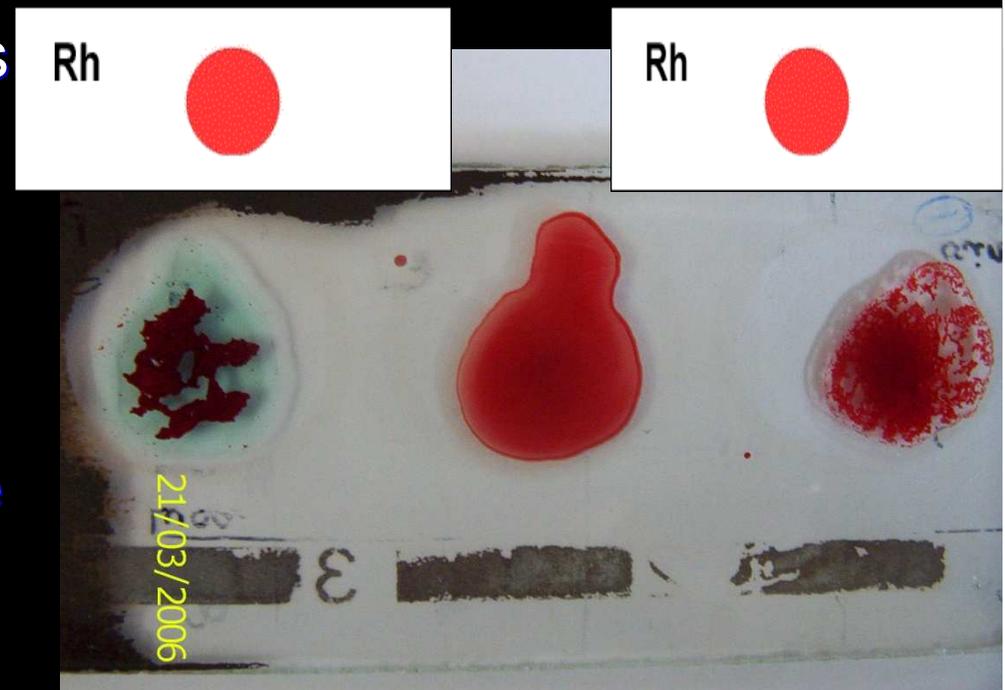
Grupo Sanguíneo y Factor Rh

- 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 (-)**

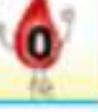


PROCEDIMIENTO

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.



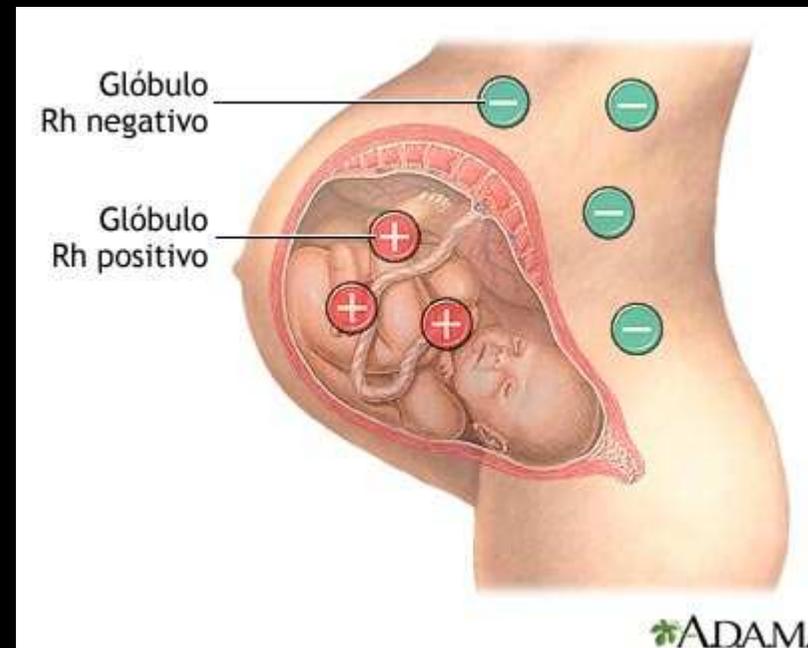
GRUPO ABO

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.

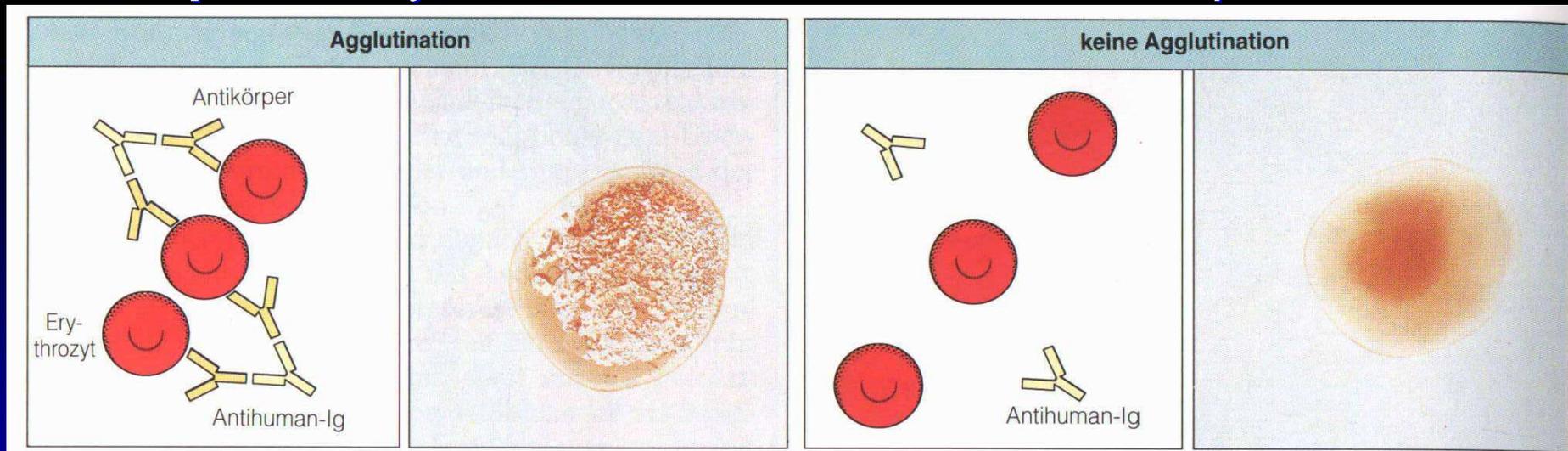
- **Coombs indirecta**

Se busca autoAcs contra GR presentes en suero.

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

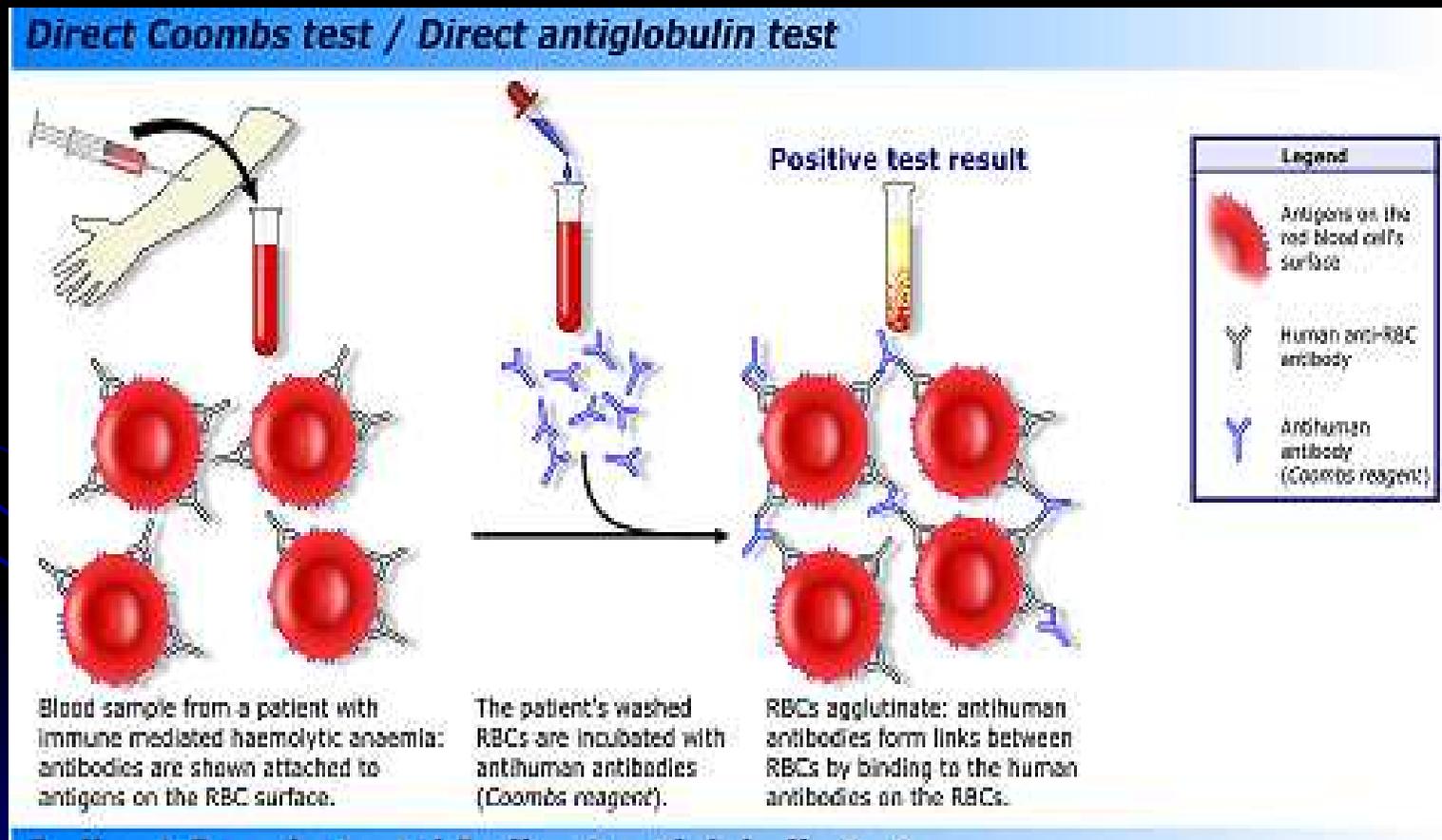
Prueba de Coombs

- 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

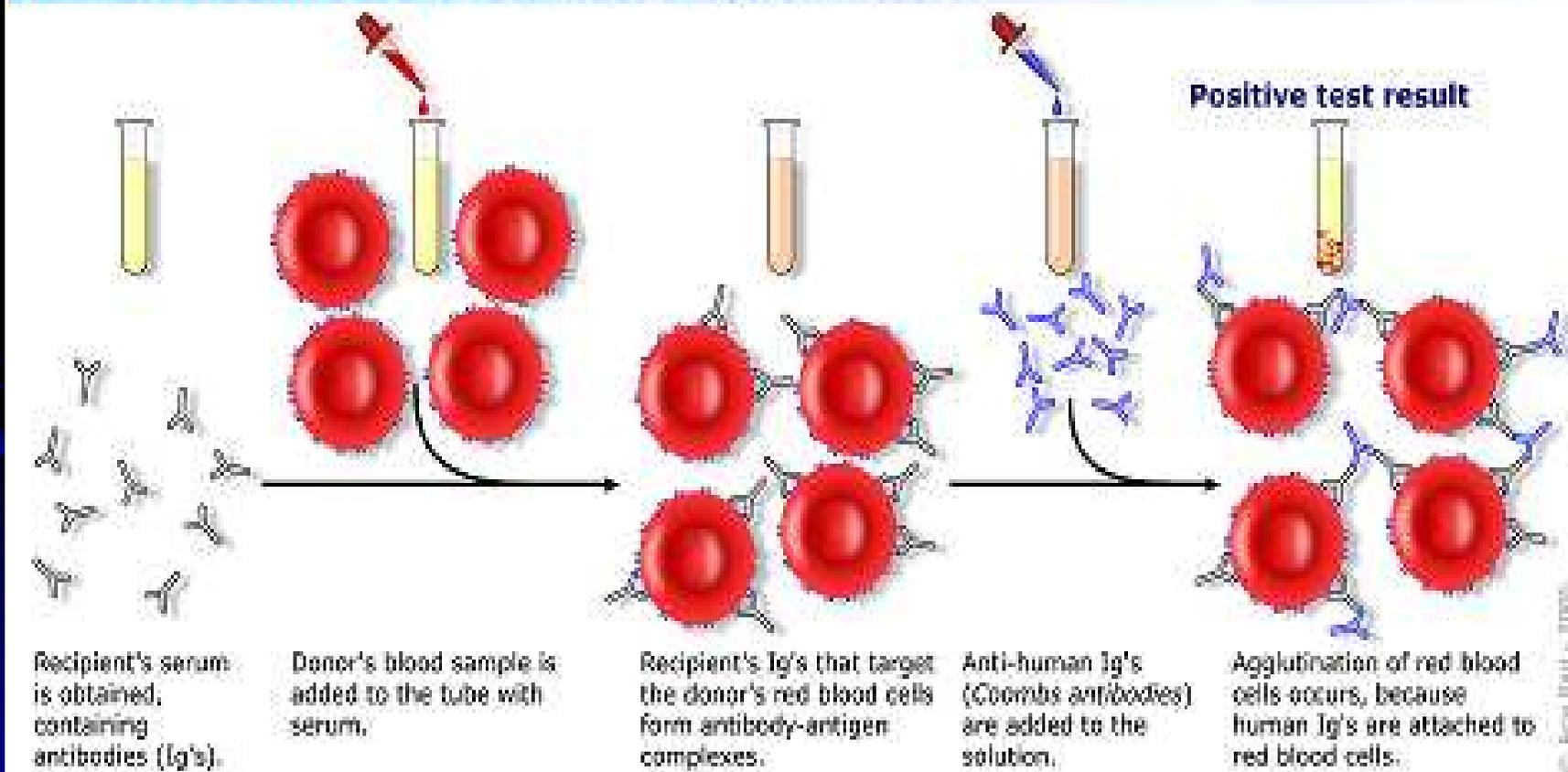
- Anticoagulantes: EDTA, heparina, ACD, CPD



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

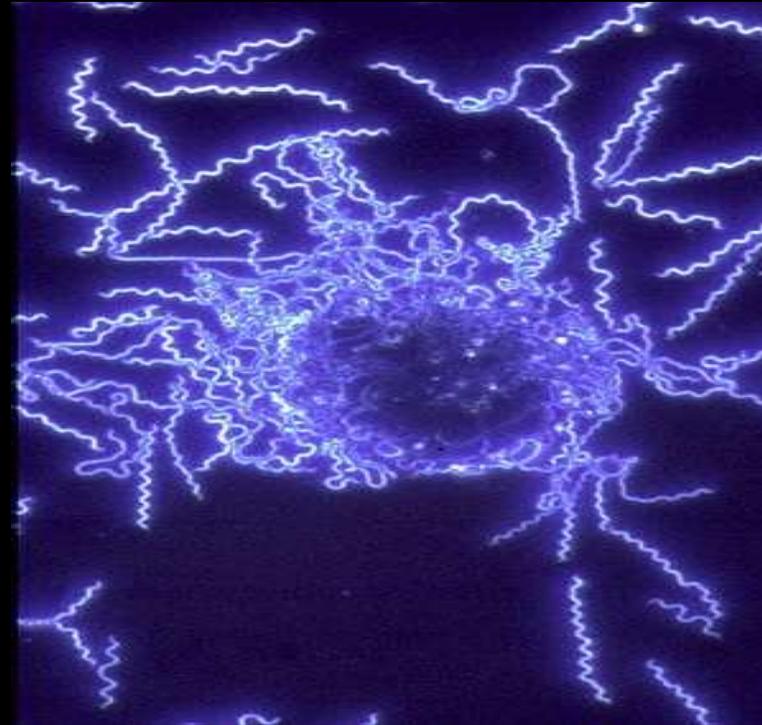
- Técnica: Floculación de liposomas
- Antígeno: Solución alcohólica de cardiolipina, colesterol y lecitina
- Detectan: “Reaginas” IgG e IgM anti material lipídico
- Método: Cualitativo (pesquisa) y semicuantitativo (seguimiento)

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

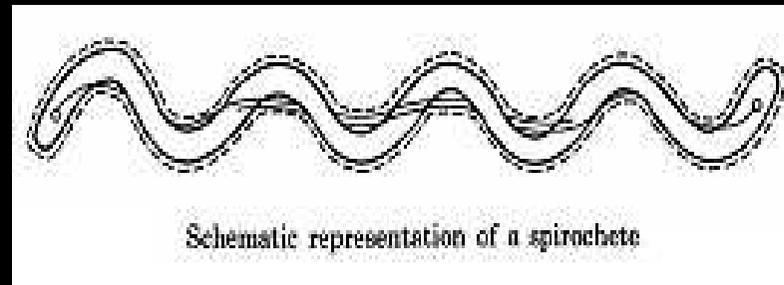
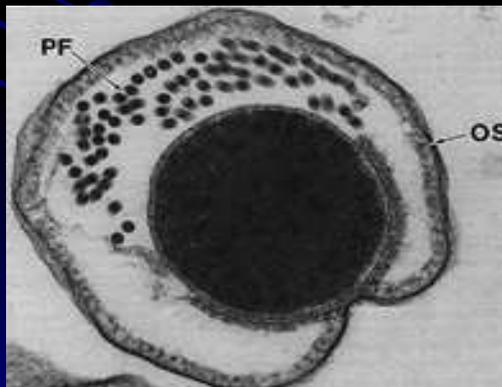
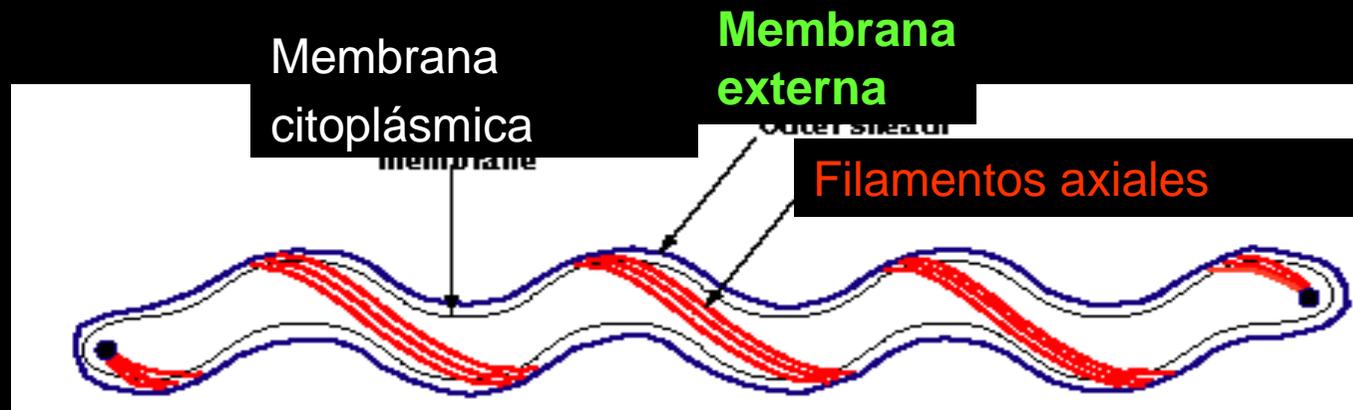
T. Pallidum

➡ 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.

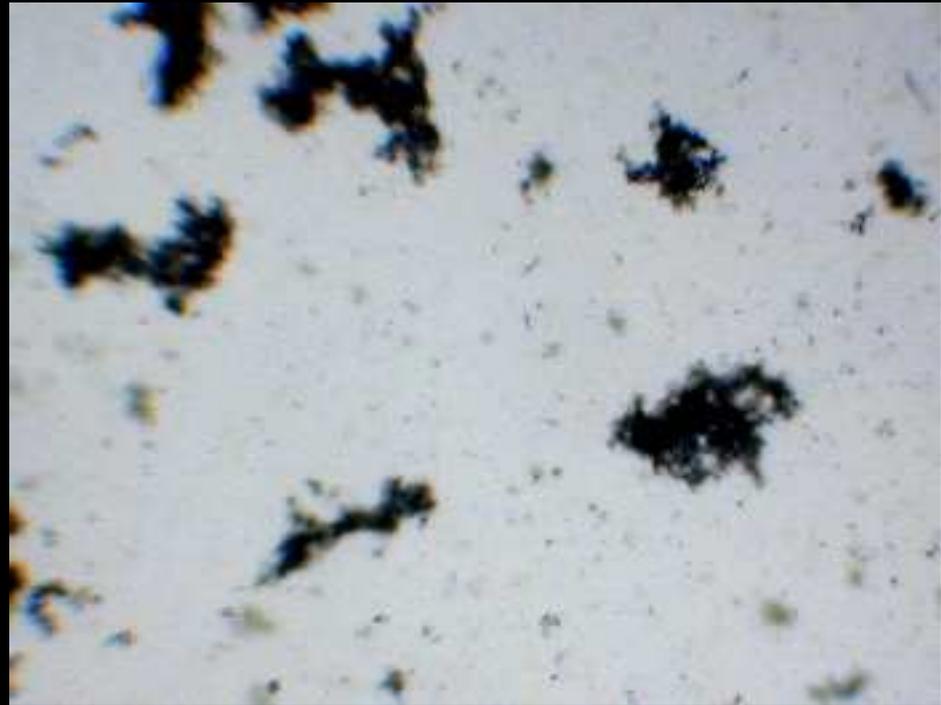
- Observar inmediatamente en microscopio con poco aumento (10X)



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