

Tema 6: Las reacciones de aglutinación

1. Las técnicas secundarias de inmunodiagnóstico

Las técnicas secundarias son aquellas que no valoran directamente los complejos inmunes, sino que lo hacen de manera indirecta, basadas en cambios físicos visibles que ocurren en el medio. Las uniones antígeno-anticuerpo pueden producir dos reacciones principales que inducen cambios físicos visibles (la aglutinación y la precipitación) que son la base de muchas de estas técnicas:

- **Reacciones de aglutinación:** Cada Ac puede unirse a varios antígenos, y cada uno de ellos a varios Ac. Como consecuencia, se forma una red de Ag-Ac que provocan una aglutinación en el medio.

- **Reacciones de precipitación:** Algunas uniones Ag-Ac son complejos muy grandes como para mantenerse en disolución y precipitan en el medio.

- **Técnicas de fijación del complemento:** Son otro grupo de técnicas secundarias que utilizan los hematíes como sistema revelador. Lo que se observa en el medio es la lisis de los hematíes.

2. Reacciones de aglutinación:

Se basan en la capacidad de los Ag particulados multivalentes para unirse a sus Ac complementarios, formando inmunocomplejos o agregados visibles a simple vista. Los Ag multivalentes son los que tienen varios epítomos.

Las reacciones de aglutinación se producen entre partículas que están en suspensión. Generalmente, es el antígeno el que está presente en la superficie de las partículas (**aglutinógeno**) y se enfrenta a un anticuerpo específico de él (**aglutinina**).

Las partículas pueden ser vitales o inertes. Como **partículas vitales** se suelen emplear hematíes y bacterias. Las **partículas inertes** pueden ser de carbón vegetal, látex (polímero de poliestireno), bentonita (arcilla), gelatina, etcétera.

Si la partícula utilizada en la aglutinación es un hematíe, se dice que es una reacción de **hemaglutinación**.

El aglutinógeno ha de estar presente en la partícula de una forma apreciable y tiene que estar situado superficialmente. Además, debe poseer múltiples epítomos, es decir, varios sitios de unión del anticuerpo.

Las **aglutininas completas** son las que siempre producen aglutinación, mientras que las **incompletas** son las que, a pesar de reaccionar con el antígeno, no producen

U.D. 6 LAS REACCIONES DE AGLUTINACIÓN

aglutinación cuando están en una situación desfavorable (por ejemplo, cuando el antígeno particulado es una suspensión de hematíes en disolución salina).

Debido a su tamaño y a su multivalencia, las aglutininas completas son las IgM, mientras que las aglutininas incompletas son IgG, al ser solo bivalentes. El isotipo de mayor poder aglutinante es IgM, ya que su estructura es pentamérica y, por tanto, tiene 10 puntos de unión al Ag.

Para que la reacción de aglutinación se produzca correctamente, es preciso que la concentración del aglutinógeno no sea excesiva con respecto a la de la aglutinina, y viceversa. En caso contrario, se verificará el llamado **fenómeno de zona o postzona** y se obtendrá un resultado falsamente negativo.

Cuando existe un exceso de anticuerpos respecto a la concentración de antígeno, se suele producir el fenómeno de **prozona**, en el que no hay una aglutinación visible. Para evitar este error, conviene diluir los sueros convenientemente para alcanzar una concentración de aglutinógeno y aglutinina equivalentes y apreciar una reacción positiva correcta.

Otro factor que influye en la reacción de aglutinación es la temperatura. Aunque la mayoría de estas reacciones se efectúan correctamente a temperatura ambiente (unos 20 °C), los aglutinógenos bacterianos suelen reaccionar mejor con su aglutinina correspondiente a 37 °C, e incluso, algunas aglutininas reaccionan de una forma óptima con su aglutinógeno a 4 °C (aglutininas frías o crioaglutininas).

2.1. Tipos de reacciones de aglutinación:

Hay dos formas de realizar las técnicas de aglutinación, de manera directa o indirecta.

•Directa:

Las pruebas de aglutinación directa o activa son aquellas en las que la aglutinina reacciona con un aglutinógeno presente de una forma natural en la superficie de un tipo de células. Tras esta reacción se forma una especie de puente de unión entre las células, produciéndose la aglutinación. Un ejemplo de este tipo de pruebas es la aglutinación que se origina al poner en contacto hematíes del grupo A con suero anti-A. También se emplea mucho este tipo de técnicas para la serotipificación bacteriana.

Hay tres formas de facilitar la aglutinación cuando la aglutinina es un anticuerpo incompleto:

1. Aumentar la viscosidad del medio en el que se encuentran las células. Esto se consigue si se le añaden sustancias como la seroalbúmina bovina al 30%, el dextranso o la polivinilpirrolidina.

U.D. 6 LAS REACCIONES DE AGLUTINACIÓN

2. Eliminar los residuos negativos de ácido siálico de la membrana celular. Esto se alcanza exponiendo las células a la acción de enzimas como la tripsina, la papaína, la bromelina o la ficina.

3. Producir la disminución de la fuerza iónica del medio que circunda los hematíes, haciendo que este contenga alguna sustancia del tipo de la solución de baja fuerza iónica (por ejemplo, glicinato sódico en solución salina), que en sus siglas inglesas se conoce como LISS (low ionic strength solution).

•Indirecta:

Las pruebas de aglutinación indirecta o pasiva son aquellas en las que la aglutinina reacciona con un aglutinógeno que ha sido transferido pasivamente a la superficie de una partícula vital o inerte. Un ejemplo de este tipo de pruebas es la aglutinación que se genera al poner en contacto un suero problema, que contiene aglutininas antitoxoplasma, con hematíes de cordero que han sido recubiertos con aglutinógenos procedentes de un lisado de toxoplasma. Al proceso mediante el cual las partículas son recubiertas con aglutinógenos que no les son propios se le denomina **sensibilización**.

Si las partículas utilizadas son vitales, es decir, son células, pueden ser fijadas mediante sustancias como la formalina (disolución de formaldehído en agua) para su almacenamiento durante largos periodos de tiempo. Además, hay varios sistemas que facilitan la sensibilización de las células:

1. Exponer las células a la acción de algunas sustancias, como el ácido tánico, para favorecer la adsorción del aglutinógeno a la superficie celular.
2. Emplear moléculas bifuncionales, como la bencidina binitrogenada, que primero se fijan a la superficie celular y luego fijan el aglutinógeno mediante una unión covalente.

Hay una clase especial de prueba de aglutinación indirecta, llamada **inversa**, en la que el aglutinógeno está libre en la muestra problema y reacciona con la aglutinina que está fijada a la superficie de la partícula. Un ejemplo de aglutinación indirecta inversa es la originada al hacer reaccionar el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBs Ag), contenido en un suero problema, con una suspensión de partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-HBsAg.

3. Formas de realizar una prueba de aglutinación:

Las reacciones de aglutinación pueden llevarse a cabo sobre portaobjetos de cristal, en la superficie de tarjetas visualizadoras, en placas de microtitulación y en el interior de tubos de ensayo.

Como ejemplo de **aglutinación en portaobjetos** tenemos la determinación de los grupos sanguíneos en un porta. El resultado positivo se observa con la aparición de

grumos en la zona de mezcla del reactivo y los hematíes del paciente.

Las **tarjetas visualizadoras** suelen ser de material plástico y en ellas hay impresos unos círculos coloreados. El color de estos círculos está directamente relacionado con el de la partícula empleada. Así pues, si la partícula es blanca, el color de los círculos es negro, y si la partícula es de color oscuro, los círculos son blancos.

El resultado positivo se observa por la formación de grumos en alguno de los círculos, mientras que el resultado negativo produce una mezcla homogénea de los reactivos.

Las **placas de microtitulación** también son de plástico y constan de una serie de pocillos cuyo fondo es cónico (en «V») o redondeado (en «U»). En el caso de la placa, el resultado positivo aparece como un velo que cubre todo el pocillo, mientras que el resultado negativo se observa como un botón formado por la sedimentación sin aglutinar de las partículas empleadas.

4. Valoración de la aglutinación:

Las reacciones de aglutinación presentan las ventajas de su alto grado de sensibilidad y de la gran cantidad de antígenos y anticuerpos que se pueden detectar mediante estas pruebas, pero tienen el inconveniente de que, con ellas, es difícil cuantificar, es decir, determinar la concentración de la sustancia investigada en la muestra problema.

Así pues, la mayoría de las veces las pruebas de aglutinación son meramente cualitativas, sólo establecen la presencia o la ausencia de la sustancia buscada en la muestra problema.

Una forma de dar una idea aproximada de la cantidad de sustancia problema que hay en la muestra utilizada consiste en asignar un mayor o un menor número de cruces (+) a la aglutinación, dependiendo del número de agregados que aparecen y del tamaño de estos.

Otra forma más exacta de establecer de una forma aproximada la concentración de la sustancia buscada en la muestra problema (**semicuantificar**) consiste en preparar diluciones seriadas de la muestra problema, de forma que se disponga de una batería de diluciones en la que la sustancia investigada esté en concentraciones decrecientes. El paso siguiente consiste en practicar el ensayo de aglutinación con cada una de las diluciones preparadas. De esta forma, aunque con las primeras diluciones la prueba nos dé positiva (haya una aglutinación distinguible), llegará un momento en el que la concentración de la sustancia problema en una dilución sea lo suficientemente pequeña como para que la prueba se torne negativa (no aparezca aglutinación).

En este caso, se llama **título** de la prueba a la inversa de la máxima dilución con la que la reacción ha dado positiva.

U.D. 6 LAS REACCIONES DE AGLUTINACIÓN

La **sensibilidad** es la cantidad mínima o máxima de sustancia problema que es capaz de detectar la prueba utilizada para hacer la determinación.

La **unidad mínima detectable (UMD) o sensibilidad mínima** es la cantidad mínima de sustancia problema que es capaz de detectar la prueba utilizada para hacer la determinación.

Concentración o tasa: Multiplicando el título por la UMD se calcula, de forma aproximada, la concentración de la sustancia investigada en la muestra problema (tasa): $\text{Concentración o tasa} = \text{título} \times \text{UMD}$