

VI. Reacciones de aglutinación

Vicente Aguilar-García*

Las reacciones de aglutinación y de precipitación son la base de la mayor parte de las técnicas inmunológicas. Su principio se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Para comprenderlo anterior es necesario definir qué es un antígeno y un anticuerpo.

Antígeno es una sustancia de alto peso molecular, con cierta rigidez estructural y que tiene la particularidad de ser parcialmente "metabolizado" por células especializadas llamadas macrófagos, por lo tanto es capaz de generar una respuesta inmune en un organismo que la detecte como un agente extraño. Mientras que un anticuerpo es una glicoproteína, producida por linfocitos B activados, llamados células plasmáticas, como respuesta a la presencia de un antígeno en el organismo, a su vez los anticuerpos pueden ser producidos por líneas celulares *in vitro*, como es el caso de la producción de anticuerpos monoclonales. Dichos anticuerpos llamados también inmunoglobulinas, se presentan en cinco clases principales, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, que se diferencian entre sí por sus características físicas, químicas y biológicas.^{1,2,3}

La capacidad inmunogénica de distintas partículas, es en orden decreciente la siguiente: proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, lípidos y azúcares.

Las reacciones de precipitación son medibles en cantidad y son fáciles de ejecutar. Las técnicas de aglutinación son sólo semicuantitativas y algo más difíciles. La aglutinación de los antígenos nativos insolubles o de las partículas recubiertas por el antígeno puede evaluarse a simple vista con o sin la ayuda del microscopio. Entre las ventajas de las reacciones de aglutinación están su alto grado de sensibilidad y la enorme variedad de substancias identificables a través del uso de partículas que están recubiertas por antígeno o por anticuerpo.

Según Coombs existen 3 requerimientos principales en las pruebas de aglutinación:

1. Disponibilidad de una suspensión estable de células o de partículas.
2. Presencia de uno o más antígenos cercanos a la superficie.
3. Conocimiento de que los anticuerpos "incompletos" o no aglutinables no son localizables sin modificación (reacciones antiglobulina).

Clasificación de las reacciones de aglutinación

Aglutinación directa

Un antígeno celular o de partículas insolubles es aglutinado directamente por el anticuerpo. Un ejemplo de esto es la aglutinación de los eritrocitos del grupo A por antisueros anti-A, la aglutinación de los eritrocitos RH positivos por el antisuero anti-D o la aglutinación del antígeno brucelar por anticuerpos anti-*Brucella*. Gran cantidad de partículas como pueden ser eritrocitos, bacterias, hongos y virus pueden ser aglutinados por anticuerpos séricos, algunas veces de manera inespecífica y otras muy específica, siendo ésta última, respuesta a una previa inmunización del organismo productor de los anticuerpos séricos. Las pruebas para identificar anticuerpos específicos son llevadas a cabo titulando seriadamente antisueros en diluciones al doble en presencia de una cantidad constante de antígeno.

Aglutinación indirecta

Se refiere a la aglutinación de las células recubiertas de antígeno o a las partículas inertes que son portadoras pasivas de antígenos solubles. Se tienen ejemplos de lo anterior en la utilización de partículas de gelatina en la búsqueda de anticuerpos contra *Treponema pallidum* por aglutinación pasiva (TPPA), la fijación del látex para VDRL en la sífilis y en la utilización de eritrocitos en la prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) en la búsqueda de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. De manera alterna, el antígeno puede ser localizado recubriendo partículas de látex o eritrocitos con anticuerpo purificado y practicando la llamada aglutinación inversa.

Hemaglutinación viral

Otra categoría de aglutinación que involucra la aglutinación espontánea de los eritrocitos por ciertos virus, es la reacción de hemaglutinación viral, la cual puede inhibirse de manera específica en presencia de anticuerpos

* Químico fármaco-biólogo

antivirales. Por lo tanto, la hemaglutinación viral puede emplearse para medir la cantidad de virus o para determinar, por inhibición homóloga, el título de los anticuerpos dirigidos en contra de los virus hemaglutinantes.

Inhibición de la aglutinación

La inhibición de la aglutinación, si se arregla de manera cuidadosa con antígenos altamente purificados, puede ser usada como un indicador sensible de la cantidad del antígeno en diversos líquidos de los tejidos.

Hemaglutinación indirecta (pasiva)

Este tipo de aglutinación se lleva a cabo utilizando eritrocitos recubiertos de antígenos, o anticuerpos acoplados de manera espontánea (adsorción pasiva) o mediante un acoplamiento químico, utilizando diversas sustancias para este fin, tales como Acido tónico Bencidina bisdiazoad (BDB), Cloruro crómico (CrCl₃), Glutaraldehído, clorurocianúrico entre otros.

Algunas de las substancias que se absorben para la hemaglutinación:

- Antígenos de Escherichia coli.
- Antígenos de Yersinia.
- Lipopolisacáridos de Neisseria meningitidis.
- Antígenos de Toxoplasma.
- Derivado proteico purificado (DPP).
- Endotoxina de especies de Micoplasma.
- Virus.
- Antibióticos, especialmente penicilina.
- Ovalbúmina.
- Albúmina sérica bovina.
- Haptenos.
- Antígenos de polen.
- Gonadotrofina coriónica.

Al realizar esta técnica se debe poner especial atención en la posible interferencia de anticuerpos heterófilos, los cuales pueden aglutinar inespecíficamente a los eritrocitos. Estos son anticuerpos naturales, no adquiridos por inmunización a los glóbulos rojos utilizados, pero capaces de aglutinarlos. Generalmente son del tipo IgM. Cuando dicha interferencia se presenta, se deben absorber las muestras de suero a menudo con eritrocitos lavados no cubiertos por antígeno, para eliminar los anticuerpos heterófilos o ser tratados con 2-Mercaptoetanol, el cual actúa sobre la cadena J de las IgM inactivándolas.

Las ventajas de emplear eritrocitos para recubrirlos con antígeno son su disponibilidad inmediata, la sensibilidad como indicadores y la posibilidad de almacenamiento prolongado a 4°C.

Capacidad de detección

La inhibición de la hemaglutinación empleando reacciones de hemaglutinación pasiva mediante placas de microtitulación es sensible para medir antígenos a concentraciones de 0.2-9 µg/ml. La hemaglutinación indirecta o pasiva con células sensibilizadas a las proteínas puede identificar anticuerpos a concentraciones tan bajas como 0.03 µg/ml.

En los antisueros con títulos muy altos de aglutinación un fenómeno de prozona puede obscurecer los resultados. El fenómeno de prozona produce reacciones falsas negativas de aglutinación a concentraciones elevadas de anticuerpo como resultante de la mala formación de estructuras de enrejado molecular y por el bloqueo estérico por el exceso de anticuerpo, el uso de diluciones seriadas estándar elimina esta dificultad. Debido a que el anticuerpo IgM es aproximadamente 750 veces más eficiente que la IgG en la aglutinación, la presencia de altas cantidades de IgM puede influir notoriamente sobre los resultados de la prueba.

En el banco de sangre la Hemaglutinación indirecta es comúnmente usada para la detección de anticuerpos Anti-*Tripanosoma cruzi*.

Inhibición de la hemaglutinación

La inhibición de la aglutinación de los eritrocitos recubiertos con antígeno por el antígeno homólogo es un método sensible y específico para la identificación de pequeñas cantidades de antígeno soluble en la sangre o en otros líquidos de los tejidos. El principio de este análisis es que, el anticuerpo incubado previamente con antígenos homólogos solubles o de reacción cruzada, es «inactivada» cuando se incuba con eritrocitos recubiertos de antígeno.

Este método de inhibición de la hemaglutinación ha resultado muy útil para la identificación de HBsAg en la hepatitis y para la identificación del antígeno factor VIII en la hemofilia y trastornos afines de la coagulación.

Prueba de ELISA

La prueba de ELISA (enzyme linked imunosorbent assay) se describió en 1971 por Engvall y Perlman, se fundamenta en la reacción antígeno anticuerpo, utilizando una superficie o fase sólida que pueden ser micropozos o esferas, sobre las cuales se encuentran fijos antígenos o anticuerpos, contra los que actúa un anticuerpo conjugado a una enzima, la cual es capaz de catalizar una reacción con un sustrato que en presencia de un indicador de oxido-reducción se transforma en un producto colorido, para la detección de anticuerpos o antígenos correspondientemente. Existe una amplia variedad de pruebas de ELISA, como son: pruebas directas, indirectas, inhibitorias, y a su vez, las empresas

dedicadas a la fabricación e investigación de reactivos serológicos para bancos de sangre, innovan constantemente en la búsqueda de reactivos más sensibles y específicos, por lo que a cada cambio significativo en los reactivos, que coadyuva a la detección más temprana de los anticuerpos o antígenos buscados se le conoce como una nueva generación de los mismos, de tal manera que existen pruebas de ELISA de primera, segunda, tercera y cuarta generación actualmente.^{4,5,6}

En banco de sangre en México, las pruebas de ELISA se utilizan comúnmente para la detección de anticuerpos contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, el Virus de la Hepatitis C, *Tripanosoma cruzi*, protozoario causante de la enfermedad de Chagas, de antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B.

Referencias

1. Inmunología Básica y Clínica, autor Daniel P: Stites y H. Hugh Fuden 9^a Edición 1998.
2. Engvall E, Perlmann, P. (1971). Immunochemistry 8:871
3. The antiglobulin test. Technical manual. 12^a. Ed. AABB. cap. 11. US. 1996.
4. Raichle TL, Paranto ME. Compatibility testing. En: Hardening MD. Modern blood banking and transfusion practices. Philadelphia: FA Davis; 1994. p.256-75.
5. Radillo González A. Medicina Transfusional. Editorial Prado. México. 1999.
6. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA-1993, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. México: Secretaría de Salud, 1994. p.1-75.