



Activitat 9: Tècniques immunològiques de tipus secundari

Activitat

Heu d'entregar un document amb el recull d'informació de les tècniques secundàries enumerades a sota. En cada una de les tècniques que teniu marcades en **negreta** s'ha d'explicar el següent:

1. Per a que serveix la tècnica.
2. Quan utilitzem aquesta tècnica.
3. Quin és funcionament la tècnica
4. Heu de afegir una imatge com exemple i explicar quins son els resultats d'aquella tècnica.

-De cada de bloc de tècniques ha d'haver una introducció.

-A part heu de triar una tècnica (aglutinació, precipitació i fixació) i escriure un protocol de d'aquesta.

Júlia

Marina

Mikel

Gemma

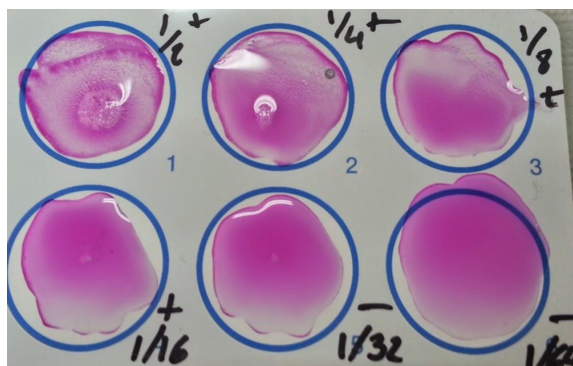


Tècniques secundàries:

Son aquelles tècniques on la reacció antigen i anticòs primària condueix a una reacció secundària que es caracteritza per l'aparició d'un fenomen visible. Aquestes tècniques ens donaran un resultat de forma qualitativa, quantitativa o semiquantitativa.

1. **Tècniques d'aglutinació:** és una tècnica d'immunologia que consisteix en la capacitat que tenen els antigens amb diferents epítops per unir-se als seus anticossos complementaris donen lloc a immunocomplexes visibles a simple vista. Sabem que l'aglutinació és un aglomeració de cèl·lules o partícules a causa d'una formació entrelaçada. El fonament de l'aglutinació és una reacció immunoquímica que produeix l'agregació de partícules o cèl·lules recobertes d'antigen o anticòs.
 - a. **Tècniques d'aglutinació directa:** és una tècnica que consisteix en què un antigen cel·lular o de partícules insolubles s'aglutini directament per l'anticòs. Quan la suspensió antigènica es presentada als anticossos específics aquests formen uns agregats insolubles que es veuen a simple vista.

Prova ràpida d'aglutinació en placa: és una prova d'aglutinació directa per diagnosticar malalties infeccioses on es detecta de forma qualitativa anticossos infecciosos a la sang, sèrum i plasma.



1. Hemaglutinació directa :

És una tècnica d'aglutinació directa es produeix en base dels eritròcits en els quals s'utilitza per determinar el grup sanguini del sistema ABO i Rh.

Aquesta tècnica es basa en una reacció entre l'antigen i l'anticòs de manera que el nostre sèrum que conté anticossos contra antígens A i B fa que els eritròcits que

tenen aquests antígens a la seva superfície aglutinin). Aquesta aglutinació es pot veure a simple vista.

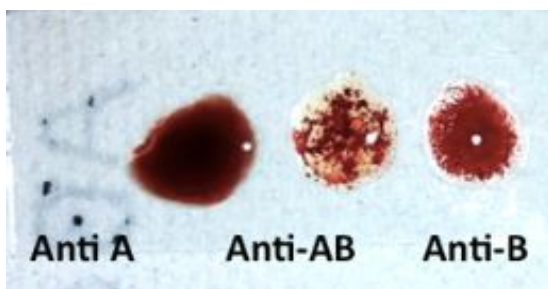
a. Antígens ABO

És una tècnica d'aglutinació directe basada amb els antígens i anticossos dels eritròcits.

Aquesta tècnica s'utilitza per descobrir el grup sanguini dels humans. És una prova senzilla de realitzar ja que consisteix en treure unes gotes de sang mitjançant llencetes i col·locar-les en el portaobjectes, posteriorment afegir unes gotes de sèrum Anti-A, a un altre Anti-B i per últim una barreja dels sèrum Anti-A i Anti-B.

Previament, cal saber les reaccions antígen-anticòs per poder determinar quin grup sanguini és cada pacient. Per tant, cal tenir clar:

- Persones amb grup A → contenen eritròcits amb antígen A, i s'aglutinen en els grups A i AB.
- Persones amb grup B → contenen eritròcits amb antígen B, i s'aglutinen en els grups B i AB.
- Persones amb grup AB → contenen eritròcits amb antígen A i antígen B, i s'aglutinen en els grups A, B i AB.
- Persones grup O → contenen eritròcits amb antígen O, i no s'aglutinen en cap grup.



En aquesta imatge podem extreure el següent resultat. Com podem observar hi ha aglutinació en Anti-AB i Anti-B, per tant això ens determina que aquesta mostra és un pacient del grup sanguini B.

b. Rh

Aquesta tècnica és d'aglutinació directa es basa en una reacció antígen-anticòs. Això és degut a la presència/absència de l'antígen denominat Rh (proteïna de membrana) o antígen D (dominant) a la membrana dels hematies i s'utilitza per determinar a quin grup Rh pertany una persona. És una tècnica complementària a la tècnica d'aglutinació de grup sanguini ABO.

Referent al sistema Rh hi ha dos tipus de grups sanguinis:

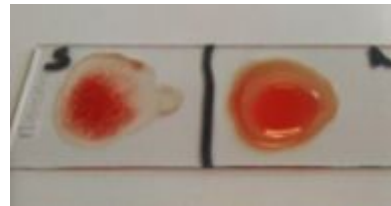
- Rh+: els eritròcits posseeixen l'antígen Rh
- Rh-: els eritròcits no posseeixen el genotip Rh



Per realitzar aquesta prova es posa una gota de mostra sanguínia sobre un portaobjectes. Tot seguit es posa una gota de reactiu anti-Rh (conté anticossos anti-Rh) i es barreja amb l'ajuda d'un capil·lar. Els resultats que obtindrem són en forma d'aglutinació, és a dir després de realitzar aquesta tècnica la mostra aglutinarà (o no).

Els resultats obtinguts poden ser:

- Persona Rh+: hi ha aglutinació
- Persona Rh-: no hi ha aglutinació



L'aglutinació es produeix degut a que la unió entre l'anticòs i l'antigen forma un complex antigen-anticòs que es pot veure a simple vista. Aquesta és una tècnica directa perquè la reacció antigen-anticòs no necessita la presència de cap altra partícula per produir-se. A més és secundària ja que la reacció es veu a simple vista i és qualificativa perquè els resultats són positius o negatius.

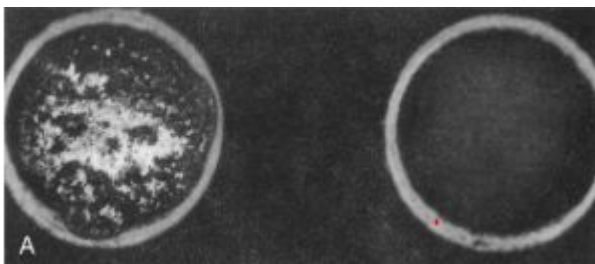
b. Tècniques d'aglutinació indirecte: Tècnica de diagnòstic clínic in vitro que utilitza eritròcits com a partícules marcadors.

1. Aglutinació de làtex en placa

És una tècnica d'aglutinació indirecte secundària ja que la unió antigen-anticòs és transformada i es pot observar la reacció a simple vista.

Aquesta tècnica consisteix en examinar la presència de fluids corporals com ara l'orina, saliva i sang, mitjançant la unió dels antígens i anticossos en la mostra per mitjà de les interaccions hidrofòbiques quedant sensibilitzades.

També cal remarcar que és una tècnica qualitativa ja que ens ajuda a determinar si hi ha aglutinació o no en diferents antígens i anticossos, per altra banda també pot ser semiquantitativa si les solucions se'n fan dilucions per determinar concentracions. S'utilitza per determinar malalties infeccioses o víriques i per realitzar estudis epidemiològics.



Com podem observar en aquesta imatge es veu clarament que en la primera hi ha una aglutinació és a dir unió entre antígens i anticossos, en canvi en la següent no hi ha unió.



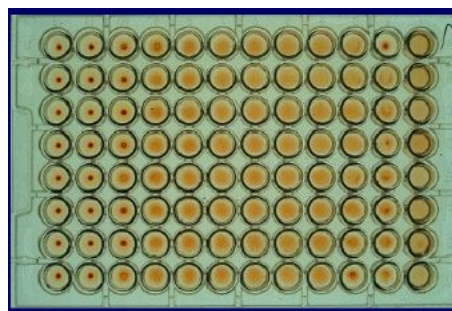
2. Hemaglutinació indirecte (HAI)

Aquesta és una tècnica indirecta i per realitzar-la s'utilitzen glòbuls vermells com a suport. Al ser una tècnica indirecta no es treballa amb els antígens dels glòbuls vermells, sinó que se li uneixen en la membrana cel·lular antígens de diferent procedència.

Unes de les principals finalitats de la tècnica d'hemaglutinació indirecta (HAI) és detectar malalties a través de la detecció d'anticossos en una mostra de sèrum del pacient. El que es busca és detectar la presència de immunoglobulines G (Ig G) en el sèrum sanguini. Una de les malalties que es diagnostiquen per HAI és la malaltia de Chagas.

Aquesta tècnica es realitza en una placa amb múltiples pous. Es realitza una dissolució seriada de la mostra sèrum i a cada un d'aquests pous es posa una concentració de mostra diferent. Per realitzar la HAI s'ha de realitzar sempre un control negatiu per comprovar que no hi hagi hemaglutinina perquè la presència d'aquesta proteïna provoca aglutinació i el resultat seria un fals positiu.

Per interpretar aquesta prova hem de saber que l'aparició d'un vel rosaci-groguenc en els pouets suposa una prova positiva, en canvi, l'observació d'un "botó" vermell indica un resultat negatiu ja que els hematies no aglutinen (ja que no hi ha anticossos específics) o encara no passat suficient temps per a que els eritròcits sedimentin.



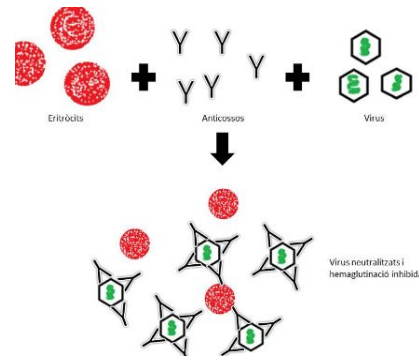
3. Inhibició de la hemaglutinació (IHA)

La tècnica d'inhibició de la hemaglutinació (IHA) serveix per detectar l'absència d'anticossos específics en el sèrum del pacient. La detecció/aglutinació de la mostra es deu a la capacitat d'alguns microorganismes com els virus d'unir-se als receptors de membrana presents als eritròcits. Aquesta capacitat d'unió s'aprofita per detectar els anticossos específics que actuen sobre els antígens d'aquests. La IHA també es



realitza sobre una placa amb múltiples pous com la AHI i les dues tècniques són molt semblants.

En aquest cas, l'absència dels anticossos en el sèrum problema, provocarà l'aglutinació dels eritròcits de la mostra i es formarà un vel al pouet (resultat negatiu), però si no hi ha aglutinació això vol dir que el resultat obtingut és positiu. Això és degut al fet que els anticossos neutralitzen l'antigen (virus) i inhibeixen la capacitat d'aglutinació dels hematies.



A l'hora de interpretar els resultats obtinguts s'ha d'anar en compte ja que en aquest cas la interpretació és la contrària a l'HAI.

4. Prova de coombs

És un examen sanguini utilitzat en hematologia i immunologia. Aquest anàlisi permet detectar la presència d'anticossos en sèrum que reaccionaran amb antígens presents a la superfície dels glòbuls vermells. S'utilitza en el diagnòstic de reaccions adverses després de transfusions sanguínies (quan hi pot haver anticossos propis reconeixement antígens dels eritròcits que s'han transfós i fent que es destrueixin per part del sistema immunitari)

Existeixen dos tipus de prova:

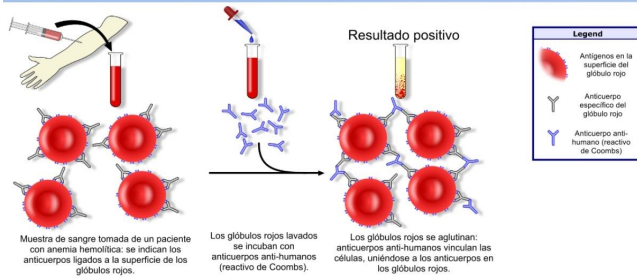
a) Prova de coombs directe

És una tècnica d'aglutinació per detectar anticossos que estiguin units a eritròcits. A través d'una extracció sanguínia i un posterior rentat cel·lular, s'afegeix el reactiu de Coombs. Els anticossos del reactiu s'uneixen a les IgGs, IgMs o al complement que es troba unit a la membrana dels glòbuls vermells i l'aglutinació d'aquests dona un resultat positiu.

Aquesta tècnica ens serveix per detectar patologies com anèmies hemolítiques induïda per fàrmacs, anèmies hemolítiques autoimmunes, reaccions transfusionals o mononucleosis infecciosa.



Prueba de Coombs directa



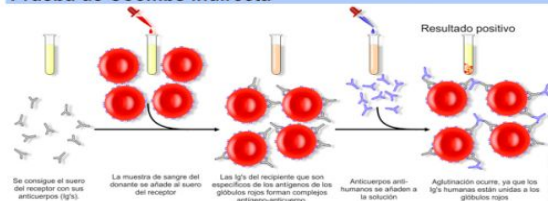
b) Prova de coombs indirecte

És una tècnica d'aglutinació indirecte que serveix per detectar anticossos Anti-Rh. Aquesta consisteix en incubar el sèrum de la mostra problema amb eritròcits amb RH positiu, sabem que si hi ha presència d'immunoglobulines G Anti-Rh, s'unirà a aquests eritròcits i a afegirem el reactiu de Coombs, es produirà aglutinació dels glòbuls vermells. En cas de que la persona receptora o la mare no continguin Anti-Rh, no hi haurà aglutinació i, per tant, es podrà fer la realització de la transfusió sanguínia i en cas de l'embaràs el fetus no patirà cap dany intern.

Com a conseqüència d'això pot aparèixer una hipersensibilitat de tipus II.

Es realitza aquesta tècnica per prevenir danys abans d'una transfusió sanguínia, durant l'embaràs i en el moment del part.

Prueba de Coombs indirecta



En aquesta imatge podem veure el procés i el resultat final positiu. Per tant, si es realitza una transfusió, pot danyar ja que hi conté Anti-Rh.

2. Tècniques de precipitació

La unió específica entre antigen-anticòs fa que es creïn complexos que precipiten i que es poden observar a ull nu. Aquests complexos es poden crear en medi sòlid, en gel i en medi líquid. Aquestes tècniques són generalment utilitzades per identificar i quantificar proteïnes plasmàtiques.

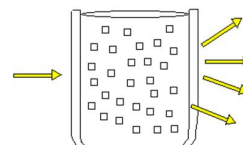


a. Tècniques de precipitació en medi líquid:

La reacció antigen-anticòs té lloc en un medi líquid, una solució aquosa.

Els complexos antigen-anticòs queden en suspensió i donen a la solució un aspecte tèrbol.

Les tècniques es basen en el fenomen de **dispersió de la llum** que té lloc quan un feix de llum travessa un medi líquid transparent que conté partícules en suspensió (en aquest cas, immunocomplexos)



1. Immunoturbidimetria

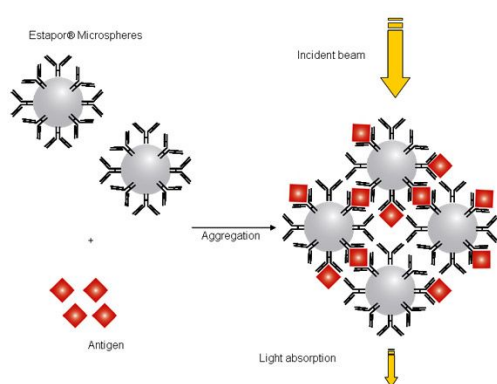
Aquesta tècnica és una tècnica de química analítica quantitativa basada en la dispersió de la llum de les nostres mostres.

Aquesta tècnica l'utilitzem per mostres amb grans quantitats de partícules dispersants, per mostres amb concentracions grans.

També s'aplica per la determinació quantitativa de IgA, IgG i IgM utilitzen els antisèrums corresponents. Això produeix immunocomplexos que genera la terbolesa mesurable per la fotometria a 365nm, per tant la quantitat de immunocomplexos és proporcional a la concentració de Ig presents a la mostra.

És útil per la dispersió de llum no uniforme.

Fan passar un feix de raigs lluminosos a través d'una suspensió, l'energia radiant incident es dispersa en totes direccions, la qual cosa dona un aspecte tèrbol a la mescla.



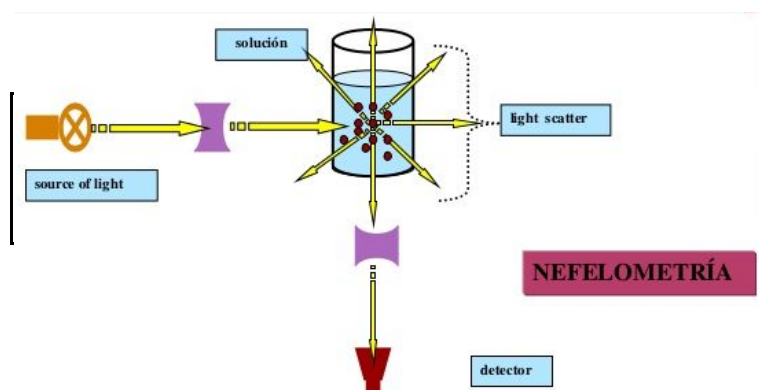
Imatge 1: Podem observar els immunocomplexos i com la llum travessa a 180°.



2. Immunofelometria (nefelometria)

Aquesta tècnica analitza la llum que és dispersada en un angle concret (normalment entre 15° i 90°). El que ens permet detectar són concentracions molt baixes de partícules per mesurar concentracions de colònies en dispersió lluminosa a diferència de la turbidimetria.

S'utilitza per mostres amb dispersió de llum uniforme o amb poca dispersió.



Imatge 2: observem com la llum travessa en diferents angles.

b. Tècniques de precipitació en gel

Les tècniques de precipitació en gel són més freqüents ja que s'utilitza més el suport semisòlid, que no pas el medi líquid. El suport en aquest cas és un gel d'agar o agarosa. I trobem diferents tipus de tècniques.

1. Doble difusió o reacció de Ouchterlony:

És una tècnica de precipitació en medi sòlid on tenim dues mostres que poden contenir diferents epítops, es pot detectar per immunodifusió doble utilitzant una mescla de diferents anticossos contra els diferents epítops.

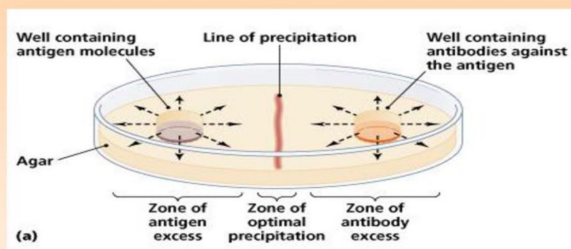
Aquesta tècnica es realitza amb gel d'agarosa on s'hi fan dos pouets i es disposa l'anticòs a un pou i l'antigen a l'altre (una de les dues és la mostra problema i l'altra és el reactiu conegut). Tant l'antigen com l'anticòs difonen de manera passiva i radial al voltant del pou, de manera que com més lluny del pou menys concentració



d'antigen o anticòs hi ha. En el lloc on la concentració d'antigen i d'anticòs corresponen a la zona d'equivalència, es forma la línia de precipitació.

INMUNODIFUSIÓN RADIAL DOBLE (IDRD)

En este método el AC y el AG se siembran en pocillos separados realizado en el agar. El AC y el AG difunden por el agar y cuando encuentra su zona de equivalencia forman una línea de precipitación.



Este método se utiliza para evidenciar la presencia de un antígeno en una muestra o para analizar el grado de relación entre antígenos

2. Immunodifusió radial o tècnica de Mancini

Serveix per detectar una quantitat de Ac IgG, IgM i IgA que hi ha al sèrum d'un individu. Aquesta tècnica és lenta i poc sensible ja que es necessita molta quantitat d'anticossos (o antígens) per a que es formin els complexos.

Mitjançant les mostres patró amb concentració coneguda, s'elabora una recta de calibració amb el diàmetre. Amb aquesta recta i la seva equació es pot trobar els valors de concentració de les mostres problema.

Es fa a partir del medi, on tu afegeixes els anticossos. Això fa que la placa estigui plena d'anticossos. Se li fan 5 forats on a cada un se li posa una mostra patró diferent. Al pouet del mig serà on posem la nostre mostra problema. Si la nostre mostra és positiva es crearà un halo al voltant. La concentració de antígens i el halo són proporcionals.



Imatge 2: podem observar que el pou de dalt té més halo; per tant té més concentració d'antigen. Si té menys, en tindrà menys.

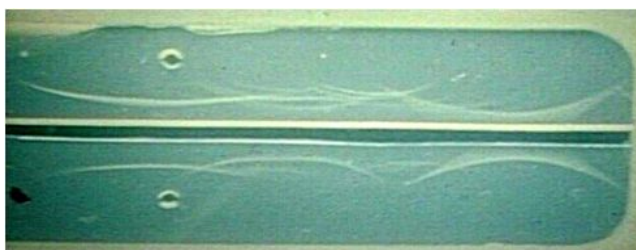


3. Immunelectroforesis

La immunelectroforesis és una tècnica que s'utilitza per a separar proteïnes plasmàtiques en base al seu comportament electroforètic i a les seves propietats immunològiques.

Per realitzar la immunelectroforesi s'utilitza un gel d'agarosa amb pous i canals. Es col·loquen les mostres diferents en els pous i es fa una electroforesi per tal de separar les proteïnes. Després de l'electroforesi es diposita l'anticòs al canal i es deixa el gel en una cambra humida per tal que difonguin, tant els antígens com els anticossos i es puguin formar les línies de precipitació. En el lloc on la concentració d'antigen i d'anticòs corresponen a la zona d'equivalència, es forma la línia de precipitació. Permet fer una anàlisi qualitativa, comparant un plasma de pacient amb un plasma control.

L'ús principal de la immunelectroforesi és detectar anomalies en el patró d'expressió de diferents proteïnes plasmàtiques.
(Sobretot usat per casos de mieloma)



4. Immunofixació

S'utilitzen gels d'agarosa amb pous allargats.

L'ús principal és detectar anomalies en el patró d'expressió de diferents proteïnes plasmàtiques.

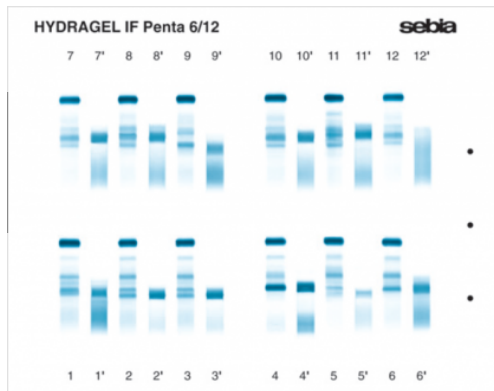
És una tècnica més ràpida i més fàcil d'interpretar.

Es col·loquen les mostres en els pous i se'ls hi fa una electroforesi per separar les diferents proteïnes segons la mida i la càrrega que tenen. Després es diposita a sobre de cada carril els diferents anticossos per detectar les diferents proteïnes. Per



últim es renta el gel per eliminar les proteïnes que no han precipitat i es tenyeixen amb un colorant de proteïnes per poder-les veure.

Es posa la mateixa mostra del pacient en tots els pous i a cada carril es mirarà una proteïna diferent.



Imatge4: podem observar els diferents carrils amb les diferents proteïnes.

5. Contrainmunolectroforesis:

La contrainmunolectroforesis (CIEF) és una tècnica qualitativa que s'utilitza per la detecció ràpida de la presència en una mostra d'un determinat tipus d'antigen o anticòs.

S'utilitza freqüentment per al diagnòstic precoç d'infeccions bacterianes greus com la meningitis.

Les mostres que normalment s'utilitzen són líquid cefalorraquidi u orina. Aquest anàlisi pot ser útil quan un frotis o un cultiu tenyit per Gram no ha sigut eficient, però és una prova presumptiva i no ha de substituir la tinció de Gram i el cultiu. A més, les proves negatives no descarten la possibilitat d'una infecció amb un organisme el qual l'antigen no s'ha detectat.

El funcionament d'aquesta tècnica consisteix en col·locar els antígens i anticossos en extrems oposats en un gel d'agarosa. A continuació s'aplica un corrent elèctric i l'antigen i l'anticòs es desplacen un cap a l'altre. La prova es positiva si es forma en alguna part de la zona equatorial del gel una línia de precipitació ja que això significa que la mostra conté l'antigen o anticòs en qüestió. Aquesta prova és de gran utilitat per al diagnòstic clínic ja que els resultats s'obtenen després d'una hora.



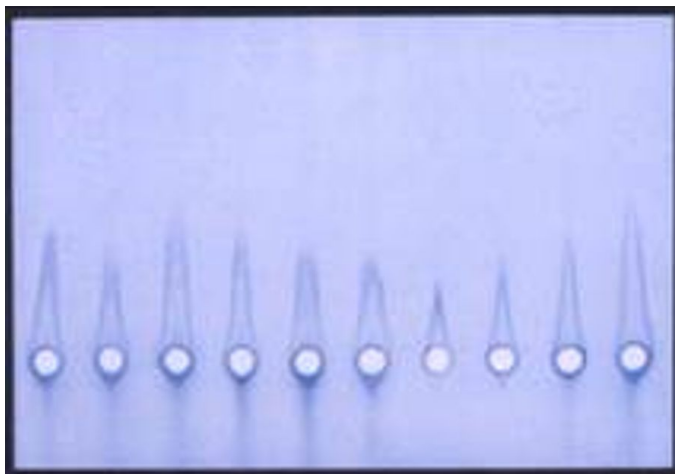
6. Electroimmunodifusió

És una tècnica utilitzada per identificar i quantificar qualsevol tipus d'Ig o altres proteïnes basat en la formació d'un precipitat visible degut a la reacció ag-ac.

El funcionament d'aquesta tècnica s'aplica a la mostra problema, amb l'antigen o proteïnes d'interès, en pous perforats d'un gel d'agar que conté l'antisèrum específic corresponent.

Es realitza una electroforesi i es forma un precipitat en forma de coet degut a la interacció antigen (mostra)-anticòs (gel d'agar). La quantificació es basa en mesurar l'altura del pic de precipitat ja que aquest és proporcional a la concentració d'antigen, tot i que també s'ha de tenir en compte la durada de l'electroforesi.

El mètode és per al mesurament d'Ig en petites mostres de fluids biològics diluïts i no concentrats.



Imatge 6: Es mostren els forats del gel d'agarosa i podem veure que el de la dreta és el que més té.

3. Tècniques de fixació del complement

Es fa servir per determinar la presència o absència d'anticossos en sèrum, quan són anticossos que no es poden detectar per altres tècniques perquè no mostren reaccions visibles.

Consisteix en determinar la capacitat que tenen les proteïnes del complement per unir-se a complexos antigen/anticòs o unir-se a anticossos units a cèl·lules i lliurar-les.



Normalment s'utilitza per el diagnòstic serològic de la Brucelosis, la Coccidiomicosis i la histoplasmosis.

És una tècnica qualitativa.

a. El sistema del complement (explicació del sistema del complement per entendre la prova)

El sistema del complement és una cascada bioquímica que contribueix a eliminar els patògens d'un organisme. És una part del sistema immunitari inespecífic és a dir que no és adaptable i que no canvia al llarg de la vida d'un individu; per tant, pertany al sistema immunitari innat. Tanmateix, pot ser reclutat i portat a l'acció pel sistema immunitari adaptatiu.

És un conjunt de proteïnes plasmàtiques que són part de la resposta immunitària inespecífica.

Fan les funcions de cobrir els patògens, neutralització de virus, lisar patògens i cèl·lules infectades a partir de la formació de porus en les seves membranes, iniciar respostes inflamatòries i promoure reclutament de cèl·lules immunitàries.

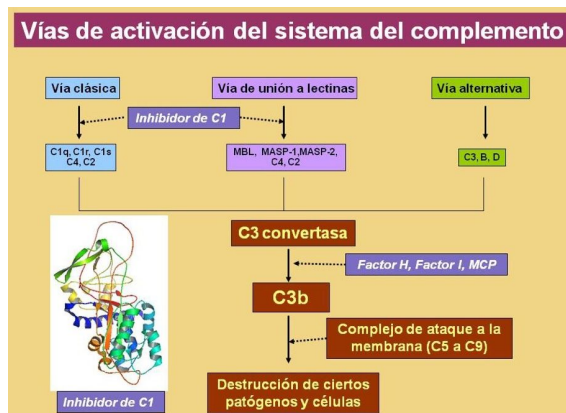
S'han descrit tres vies d'activació del sistema del complement: la via clàssica, l'alternativa, i la de les lectines, que es diferencien tant en el mecanisme desencadenant de l'activació com en els seus components inicials. En general, els integrants d'aquest sistema s'anomenen amb una C seguida d'un nombre que indica l'ordre de participació a la cascada (de l'1 a l'9). Les tres vies tenen un esdeveniment comú que consisteix en la formació de la C3 convertasa, enzim capaç de convertir C3 en C3b i C3a.

La via clàssica s'activa fonamentalment per complexos antigen-anticòs. És un procés espontani, que ocorre contínuament en la circulació i és controlat pel principal regulador d'aquesta via, l'inhibidor de C1, una proteïna altament glicosilada que actua com un inhibidor de diferents proteases que pertanyen als diferents sistemes d'activació. La via de les lectines s'activa per la presència de certs sucres que apareixen a la superfície dels bacteris. La via alternativa no necessita anticossos per activar-se, pel que és un mecanisme innat de defensa molt important en els estadis inicials d'una infecció.

Quan l'activació arriba fins al final té lloc la lisi cel·lular (destrucció de la cèl·lula), procés en el qual intervenen els components de C5 fins C9. Aquesta fase final de la cascada té com a resultat la formació de grans porus a la membrana, alterant l'equilibri osmòtic i destruint l'agent patògen o la cèl·lula afectada.

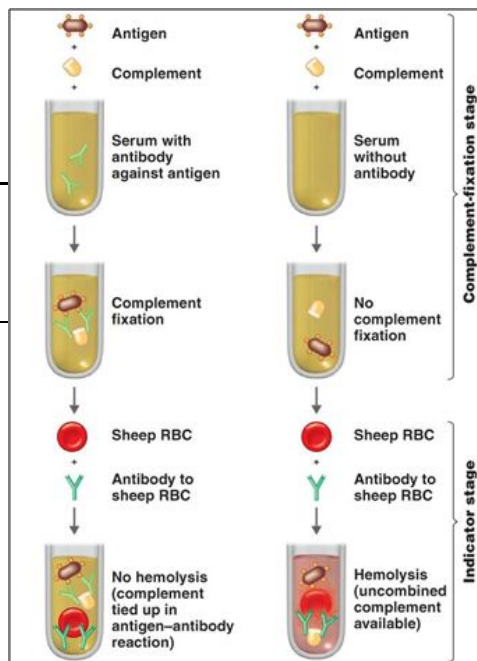


Tota l'activació del sistema del complement està regulada de forma molt precisa. A més de l'inhibidor de C1 intervien també altres reguladors, com diversos factors (H, I, MCP).



b. Reacció de fixació del complement

S'elimina el sistema de complement del sèrum del pacient. Un cop tenim el sèrum "sol", afegim l'antigen amb un sistema de complement. Si hi ha presència es crearà una triple unió entre Ac-Ag-S.C.. Si no hi ha, cadascun estarà separat, al seu aire. Aquesta part de la tècnica no la podem veure a primera vista, per això s'ha de fer un segon pas: li afegirem eritròcits amb Ac que reconeixen l'eritròcit. Al afegir-ho, el que veurem en el negatiu serà el color vermell, ja que al tenir el S.C. lliure per allà, s'afegirà en aquesta unió i veurem el vermell de l'hemoglobina i en canvi en el positiu no canviarà de color ja que el S.C. no s'unirà als eritròcits perquè ja estan units a la triple unió.



Imatge 1: Podem observar el positiu i el negatiu. El negatiu el veiem de color vermell (com he explicat abans) i el positiu no observem res.

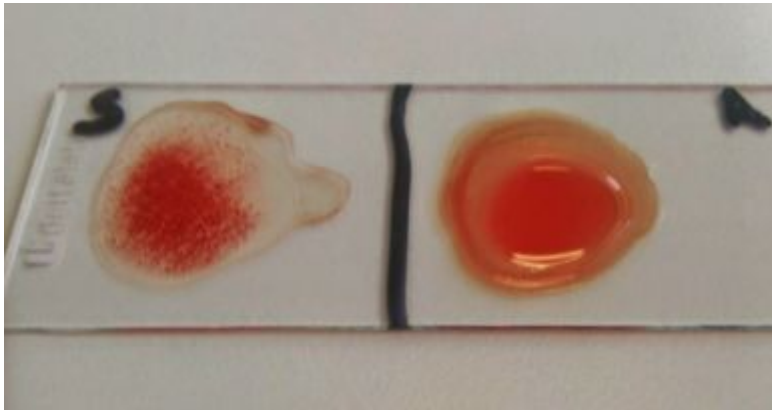


Protocol tècnica d'aglutinació RH

1. Posar-se la bata, recollir-se el cabell i rentar-se les mans.
 2. Col·locar-se els guants.
 3. Netejar la zona de treball i col·locar un paper de filtre.
 4. Agafar un portaobjectes i rotular-lo.
 5. Amb una micropipeta/capil·lar col·locar 1 o 2 gotes del tub de sang.
 6. Afegir 1 o 2 gotes d'Anti-sèrum D (Rh) a les gotes de sang.
 7. Esperar 1 minut. Utilitzant un capil·lar, barrejar les gotes de sang amb les de Anti-sèrum D durant 20 segons.
 8. Examinar les mescles, si es formen grànuls, l'aglutinació ha tingut lloc. Si per contra la barreja és homogènia, no hi ha aglutinació.
- La reacció d'aglutinació Rh + és diferent a la que observem en els grups A i B, es formen grumolls però es manté el color vermell en tota la barreja que pot portar a error.

Els resultats obtinguts poden ser:

- Persona Rh+: hi ha aglutinació
- Persona Rh-: no hi ha aglutinació



Imatge: podem observar que el de l'esquerra ha aglutinat i per tant sabem que és positiu. El de la dreta és negatiu.