

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los métodos utilizados para la detección de antígenos de rubeola es el de **Hemaglutinación**. Se denomina así el efecto aglutinante de los eritrocitos ejercido por ciertos microorganismos, especialmente virus y productos tóxicos de origen bacteriano, animal o vegetal.

Algunos virus tienen la capacidad de combinarse y aglutinarse con los hematíes. Estos virus contienen una proteína –hemoaglutinina– en su envoltura externa. El resultado de la hemaglutinación se puede observar bajo la forma de «escudos» de los hematíes en el fondo de un vaso de reacción, en tanto que en ausencia de antígeno vírico los glóbulos rojos se amontonan a modo de «botón». Esta propiedad de hemaglutinación puede emplearse para la detección de virus aglutinadores, para titular una suspensión de virus o más frecuentemente para determinar la presencia de anticuerpos específicos. Los anticuerpos presentes en una muestra de suero se combinarán con sus antígenos homólogos y puesto que los hematíes entonces quedan libres no se producirá la hemaglutinación. La prueba se denomina **inhibición de la hemaglutinación**.

II. REALIZACIÓN DE LA PRÁCTICA

• Tratamiento de los sueros

– Introducir en un tubo de hemolisis:

Suero 0.1 ml

Tampón RUBABS 0.4 ml

Suspensión de caolín 0.5 ml

Suspensión de hematíes de gallina al 50 % 4gotas

- Homogeneizar.
- Dejar a temperatura de 15–25 °C, 20 minutos, agitando 1 ó 2 veces durante este tiempo.
- Centrifugar a 2000 vueltas/minuto durante 15 minutos y decantar el sobrenadante (=dilución 1/10 del suero tratado) que podrá ser conservado si fuera necesario, durante 4 a 5 días a 2–8 °C.

• Reacción de inhibición de la hemaglutinación

• Preparación del antígeno pretitulado

Reconstruir el antígeno con 1 ml de agua destilada. Diluirlo extemporáneamente en tampón RUBABS (preveer, para cada suero problema alrededor de 0.3 ml de dilución del antígeno) de manera que haya 4 unidades de hemaglutinantes (uHA); el título de antígeno indicado en el frasco dividido por cuatro da la dilución a emplear (ejemplo: si el título indicado en el frasco es 128; diluir en tampón RUBABS a 1/32).

• Repartición de los reactivos

En cada serie incluir sueros testigo: positivo de título conocido y negativo

Repartir en ml:

N° P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

A partir del pocillo nº3, y tras añadir el suero, se tomarán 0.025ml de dicho pocillo y se añadirán al nº4 y así sucesivamente hasta el nº11, del cuál tomaremos 0.025ml y lo desecharemos, para así tener un total de 0.05ml en cada uno.

Dejar 1 hora a temperatura ambiente (15–25°).

Homogeneizamos. Dejamos 1 hora a 15–25°C protegido de vibraciones y choques.

C. Lectura de resultados esperados

Se puede observar en el fondo de los pocillos:

- Sedimentación de los hematíes en forma de «botón» de bordes netos: no hay hemaglutinación.
- Formación de un velo uniforme: hemaglutinación.
- Presencia de un velo periférico y de «botón».
- Suero testigo: no hay hemaglutinación.
- Testigo hematíes: no hay hemaglutinación.
- Reacción negativa: hemaglutinación total o parcial.
- Reacción positiva: no hay hemaglutinación.

El nivel de anticuerpos en un suero: inversa de la última dilución que produce una inhibición completa de la hemaglutinación. Verificar que el suero testigo no inhibe la hemaglutinación y que el título del suero testigo es el mismo que el indicado en el frasco (± 1 de dilución); en lo contrario, es necesario comprobar el título del antígeno.

• Resultados obtenidos

Control positivo ! no hay hemaglutinación y los eritrocito precipitan al fondo dando un punto rojo a modo de botón.

Control negativo ! hay hemaglutinación

Hallamos el título ! corresponde a la inversa de la máxima dilución, donde no se observa ese punto rojo claramente. En nuestro caso es en el pocillo nº7 (1/320), por lo que el título es 320.

Resultados ! título: 320

N°P: N° de pocillo

D.S: Diluciones de los sueros

T.S: Testigo suero

T.H: Testigo hematíes

Antígeno 4 u HA

H.E: Hematíes estabilizados de pollito al 25%