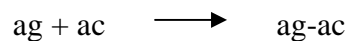




Reacții antigen – anticorp

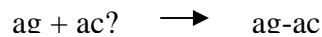
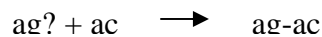
Componentele structurale ale virusurilor joacă rol de antigen, provoacă răspuns imun din partea organismului infectat, ceea ce rezultă în producere de anticorpi.

Reacția antigen – anticorp este **specifică**, antigenul poate fi legat numai de anticorpul ce s-a produs ca răspuns la stimulul antigenic respectiv.



Aceste reacții pot fi folosite pentru:

- detectarea unui antigen necunoscut cu ajutorul unui anticorp cunoscut (metode de diagnostic directe)
- detectarea anticorpilor din serul bolnavilor cu antigene cunoscute (serodiagnostic, metode de diagnostic indirecte).



În cazul în care antigenul corespunde anticorpului, se formează complexul imun antigen-anticorp.

În funcție de cum se vizualizează/detectează formarea complexului imun există mai multe metode bazate pe reacții antigen-anticorp:

- reacții de precipitare: complexe imune formează precipitat
- reacții de aglutinare: complexe imune formează aglutinat
- RFC – se detectează consumarea complementului (acesta se leagă de complexe imune)
- reacții în care elementul cunoscut este marcat – se detectează elementul marcat din complexul imun format



1. Reacții de precipitare

Pot avea loc în medii lichide (metode folosite în bacteriologie) sau în medii solide (metode folosite în virusologie)

Reacții de precipitare în mediu lichid

Reacții de precipitare în amestec (în toată masa lichidului)

- testul Ramon – titrarea toxinei difterice
 - o se pun în contact, în amestec în tuburi, cantități egale din componenta care trebuie titrată (toxina difterică, Ag) cu cantități variabile de Ac la care titrul este cunoscut
 - o cantitatea maximă de precipitat se găsește în tubul unde există echivalență între titruri
 - o cunoscând titrul Ac, se poate afla titrul toxinei
- testul VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), RPR (Rapid Plasma Reagin) + în diagnosticul sifilisului

Reacții de precipitare în inel

- reacția Ascoli – diagnosticul retrospectiv al infecției carbunoase
 - o se pun în contact suspensia preparată din fragmentul de organ (conține Ag) cu serul anticărbunos (conține Ac), în așa fel încât să nu se amestece
 - o precipitatul se formează la zona de contact dintre cele 2 coloane de lichid
- stabilirea grupelor Lancefield la streptococi beta hemolitici

2. Reacții de aglutinare

Antigenele: de natură corpusculară, aglutinogene, Anticorpilor: aglutinine

Antigenele corespund cu anticorpilor + sunt prezente în cantități echivalente: se formează aglutinatul (rețea tridimensională de complexe imune), vizibil cu ochiul liber sub forma de grunji.

Reacții de aglutinare pe lamă

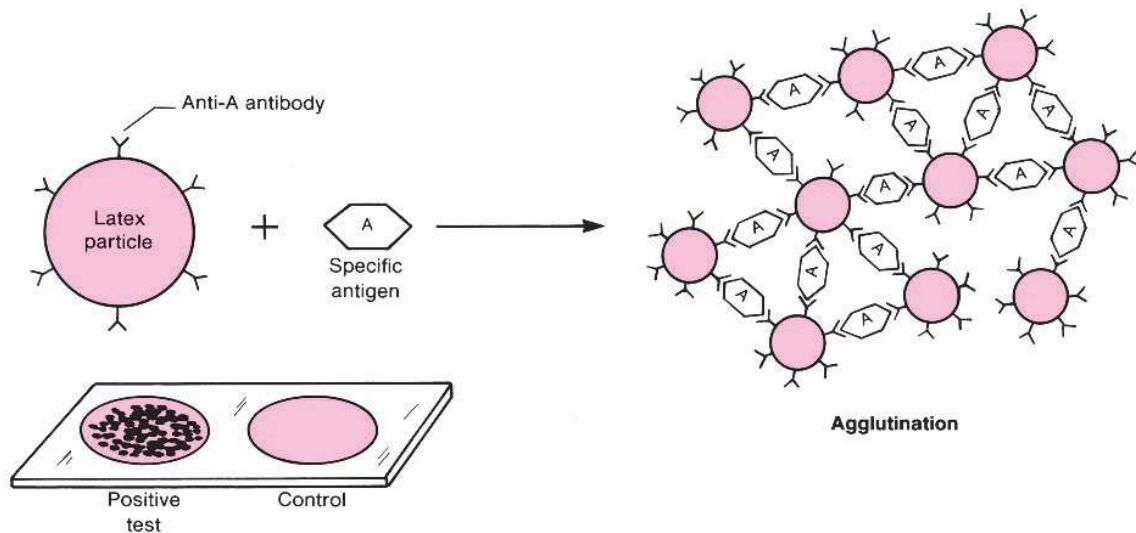
- se aplică pentru stabilirea structurii antigenice a speciei bacteriene izolate, includerea acestora în serogrupuri, serotipuri
- se folosesc seruri aglutinante specifice

- pe o lamă de microscop curată și degresată se pun:
 - o la o extremitate a lamei – o picătură de ser fiziologic steril, în care suspensionăm o cantitate mică din colonia de cercetat; va rezulta o suspensie omogenă
 - o la cealaltă extremitate – o picătură de ser aglutinant (conține Ac cunoscut)
 - reacție pozitivă – în picătură vor apărea grunji
 - reacție negativă – picătura rămâne omogenă

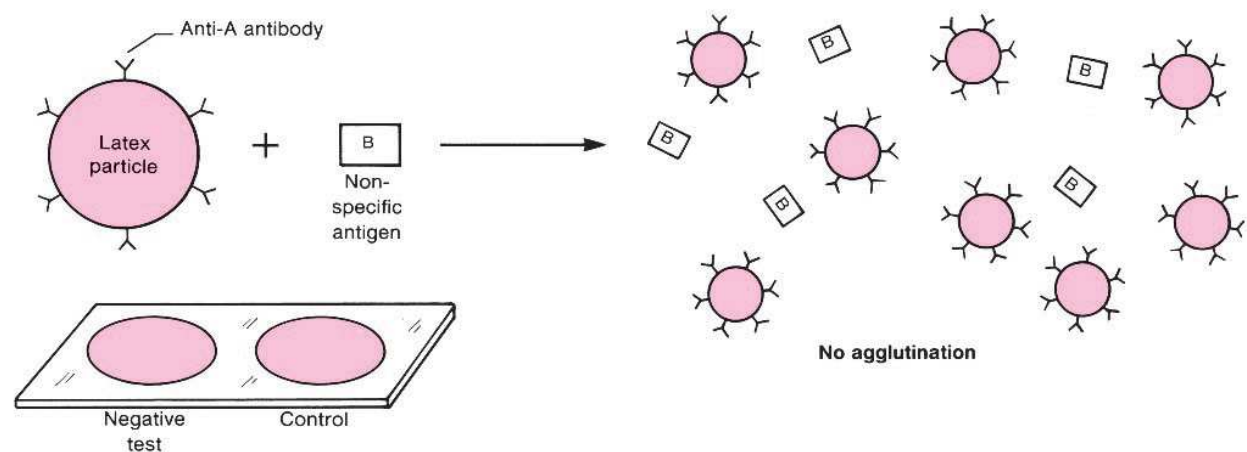
Reacții de aglutinare pe suport

Elementul cunoscut al reacției imune este atașat de un suport:

- hematie – hemaglutinare pasivă (hematia nu participă direct în reacția ag-ac)
- particulă latex - latexaglutinare
- proteina A extrasă din tulpina de stafilococ Cowan – coaglutinare



(a)



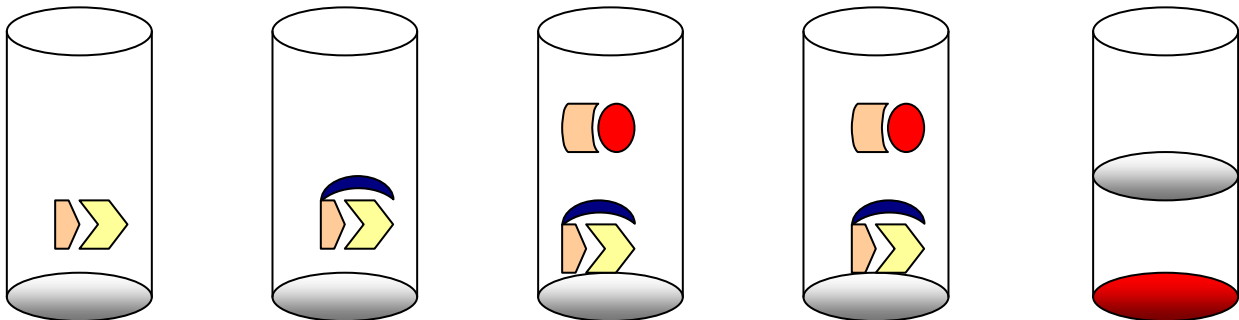
(b)



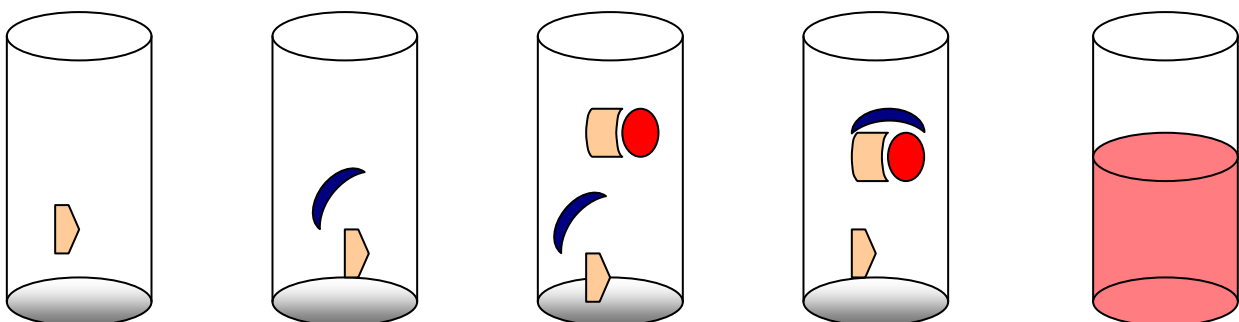
3. Reacția de fixare a complementului (RFC)

Complementul:

se leagă de complexul imun
lizează hematiile din complexul imun



Reacție pozitivă: lipsa hemolizei – hematiile se depun la fundul eprubetei



Reacție negativă: hemoliză



ac?



ag



sistem hemolitic (eritrocit + ac = CI)



complement



4. Metode imunoenzimatic (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay)

Permit detectarea antigenelor libere și a anticorpilor. Este posibilă determinare cantitativă.

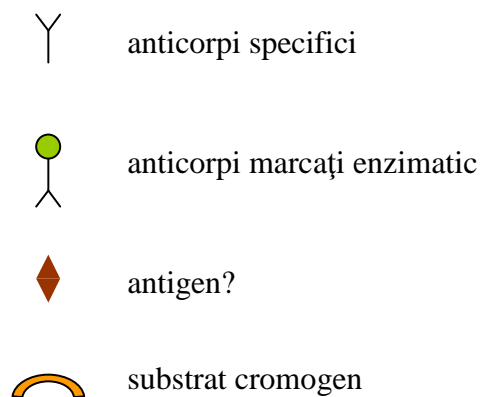
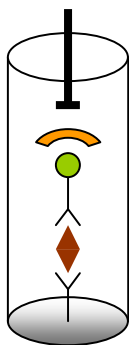
La reacții participă:

- un reactant imunologic cunoscut atașat de un suport solid (plăci cu godeuri, lame, baghete). Se pot folosi antigene, anticorpi, anticorpi monoclonali, proteina A)
- un reactant imunologic marcat enzimatic - peroxidaza
- substrat specific (cromogenic). Se produce o modificare de culoare detectabilă spectrofotometric (determinare cantitativă)
- substanțe pentru stoparea reacției (baze sau acizi puternici)

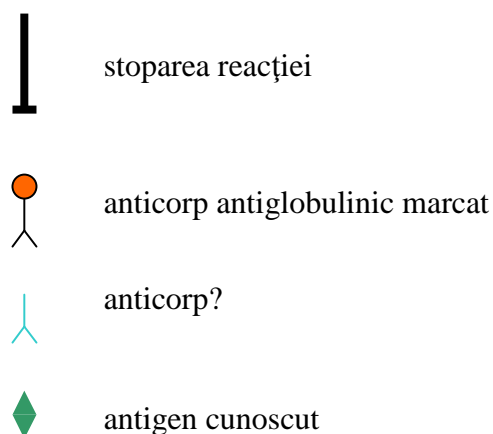
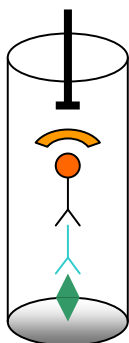
Reacțiile au loc în aparate automate, semiautomate.

Între reacții – spălare cu soluții tampon

Detectarea antigenelor



Detectarea anticorpilor





5. Reacția de imunofluorescență (RIF)

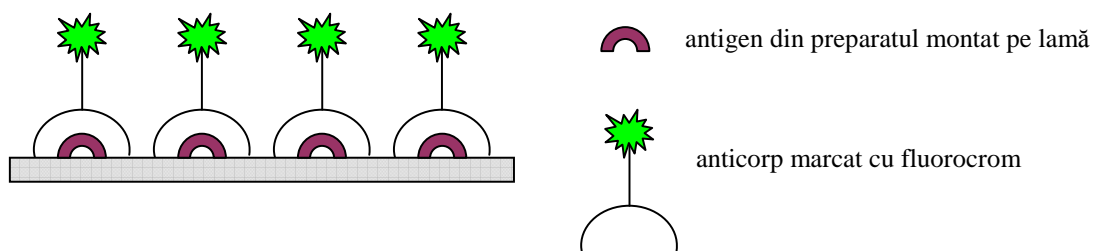
Fluorocromii:

- se leagă covalent de proteine (imunoglobuline) = conjugat
- emit fluorescență dacă se expun la raze UV
- izotiocianatul de fluoresceină (galben-verzui), rodamina (portocalie)
- nu sunt stabili în timp

Metoda directă

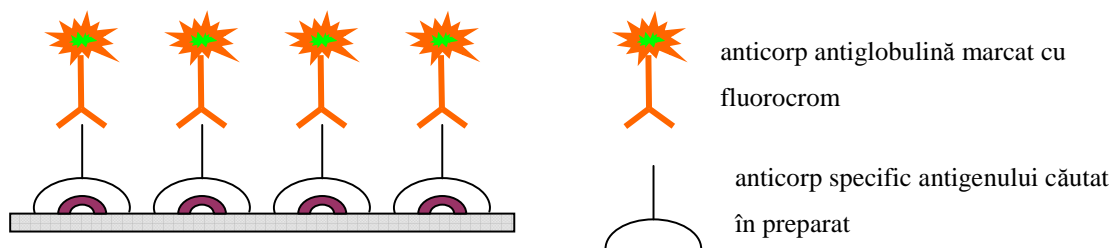
Preparatul de examinat se montează pe lamă. Se adaugă conjugatele. În cazul în care se găsesc ag corespunzătoare anticorpilor marcați, se formează complexe imune. Prin spălare se îndepărtează conjugatele nelegate. Preparatul se examinează la microscopul cu fluorescență. Puncte fluorescente pe fond întunecat: în preparatul examinat au fost prezente antigenele căutate (rezultat pozitiv).

Absența punctelor fluorescente: în preparat nu au fost prezente antigenele căutate (rezultat negativ).



Metoda indirectă

La preparatul montat pe lamă se adaugă anticorpi specifici nemarcați. În cazul în care există antigene corespunzătoare anticorpilor, se formează complexe imune. Prin spălare se îndepărtează ac nelegați. Se adaugă anticorpi antiglobulinici marcați cu fluorocrom. Dacă există în preparat complexe imune, conjugatele se vor lega de imunoglobuline. Examinarea: la fel ca la metoda directă.



Identificarea microorganismelor prin detectarea acizilor nucleici

Genomul conține secvențe specifice pentru fiecare microorganism, detectarea prezenței acestora într-un produs patologic sau în culturi celulare are valoare diagnostică.

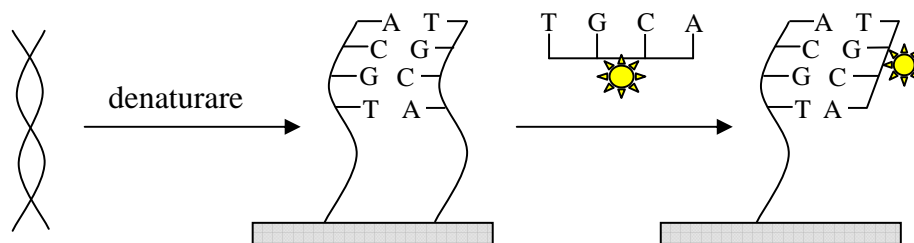
1. Metode de hibridizare

Principiu: fragmente monocatenare de oligonucleotide marcate (sonde), având secvență cunoscută (caracteristică unui virus) se vor atașa pe baza complementarității de secvențe complementare situate pe acizii nucleici ale microorganismului de identificat.

Etape de lucru:

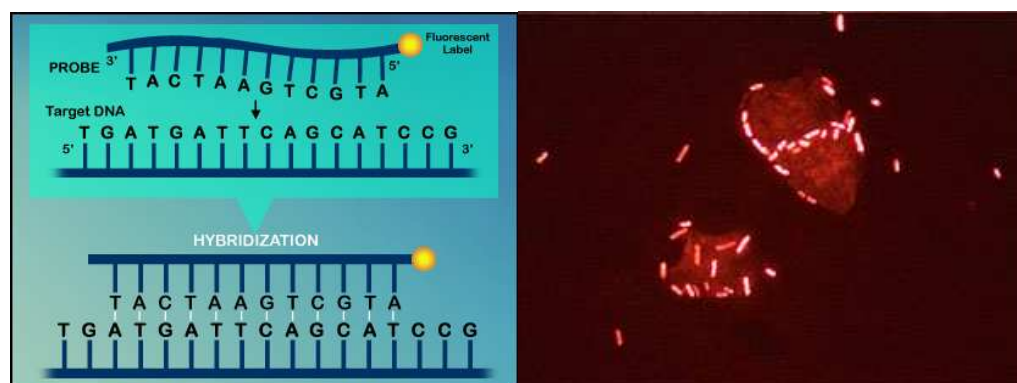
- extragerea acizilor nucleici
- denaturarea acizilor nucleici și fixarea acestora pe un suport
- hibridizare: adăugarea sondelor (marcate enzymatic, cu fluorocrom sau cu substanțe radioactive) și atașarea acestora de secvențele omoloage
- eliminarea sondelor nefixate
- vizualizarea hibridizării

Vizualizarea se face în funcție de tipul marcajului folosit.



a. FISH (Fluorescent in situ hybridization)

Marcajul folosit este element fluorescent



FISH pentru 16S rRNA bacterian

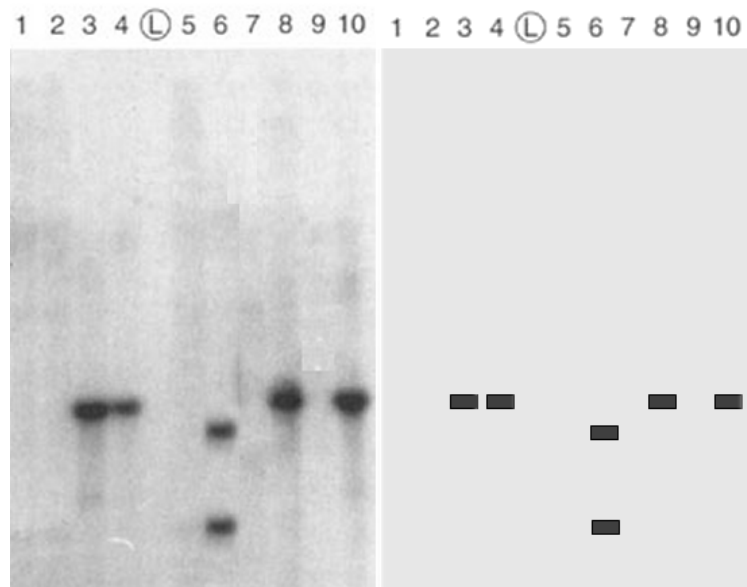


b. Metoda Southern blot

Se detectează secvențe specifice de nucleotide de ADN.

Etape:

- extragerea ADN-ului
- denaturarea ADN-ului – se obțin lanțuri monocatenare
- fragmentarea lanțurilor cu enzime de restricție (acestea acționează în locusuri determinate, rezultând fragmente de lungime diferită, caracteristice)
- separarea electroforetică a fragmentelor în gel de agaroză (separarea se face în funcție de mărimea fragmentelor)
- transferarea pe membrană de nitroceluloză
- adăugarea sondelor marcate cu substanțe radioactive – atașarea de secvențele omoloage
- se îndepărtează sondele în exces, nelegate
- vizualizare prin autoradiografie



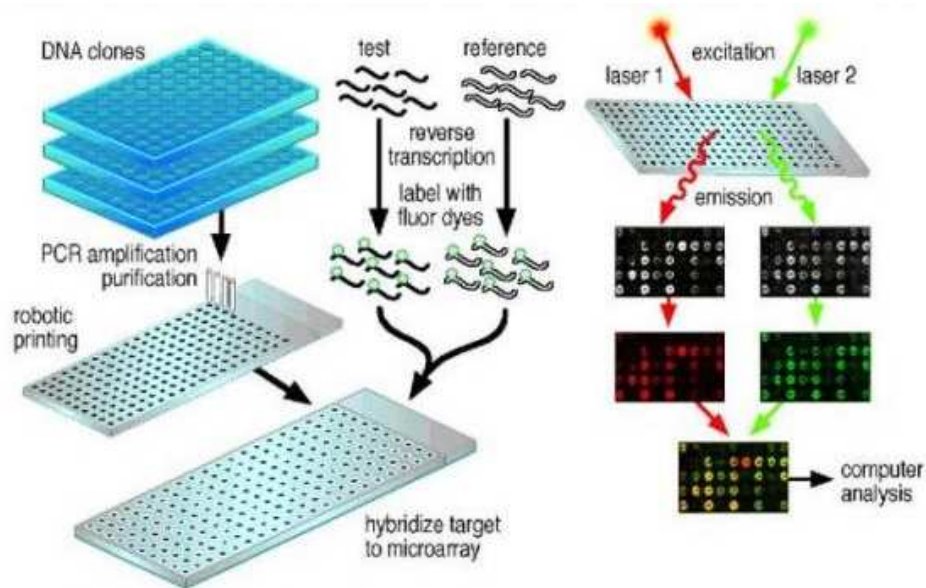
Probele 3,4,8,10 – secvențe de ADN prezente

Proba 6 – secvență de ADN prezentă, dar clivată de enzima de restricție în 2 componente de greutate moleculară mai mică

Probele 1,2,5 nu prezintă secvența de ADN căutată

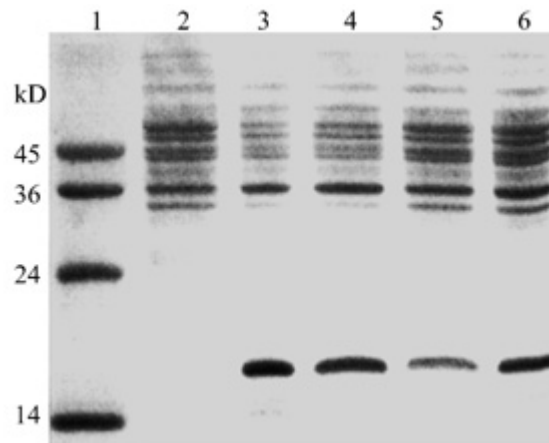
c. DNA microarray

- Folosește principiul hibridizării
- Poate detecta expresia a mii de gene simultan
- Aplicabilitate: determinarea nivelului de expresie a genelor, determinarea secvențelor de acizi nucleici



Pe principiu similar se bazează metodele:

- Northern blot – se detectează ARN, este necesară revers-transcriptaza
- Western blot (protein immunoblot)– se detectează proteine



1 – markeri proteici

2-6 probe

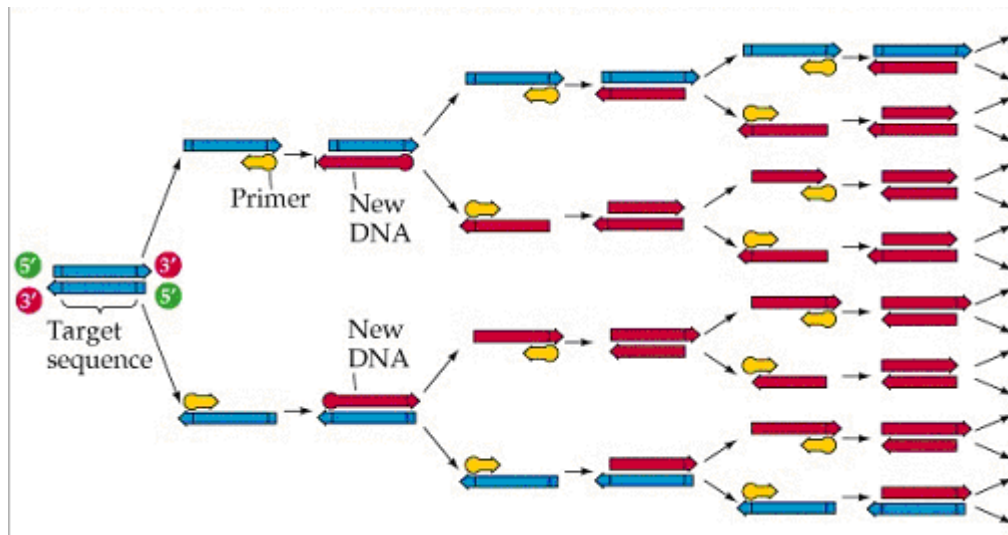


2. Reacția în lanț a polimerazei (PCR – polimerase chain reaction)

Se detectează secvențe specifice de acid nucleic după o prealabilă amplificare.

Etapele de lucru - detectarea ADN-ului

- extragerea ADN-ului
- amplificare: se realizează în aparatul PCR și constă din mai multe cicluri identice
 - denaturare (94°C)
 - alinierea primerilor (50°C) – 2 secvențe de oligonucleotide care se leagă prin complementaritate pe cele două catene la o anumită distanță între ele.
 - sinteza lanțurilor complementare (72°C) – elongație; este necesară prezența enzimei polimerază (Taq) și a nucleotidelor – se formează lanțurile complementare astfel se dublează cantitatea de ADN
 - reluarea ciclului de n ori – se obțin 2^n copii ale secvenței de identificat



- vizualizarea produșilor de amplificare
 - produșii de amplificare obținuți se separă electroforetic
 - colorare cu bromură de etidiu
 - vizualizare cu raze UV – prelucrare computerizată

Multiplex PCR – se amplifică mai multe gene odată

Real time PCR

RT-PCR - este necesară revers-transcriptaza



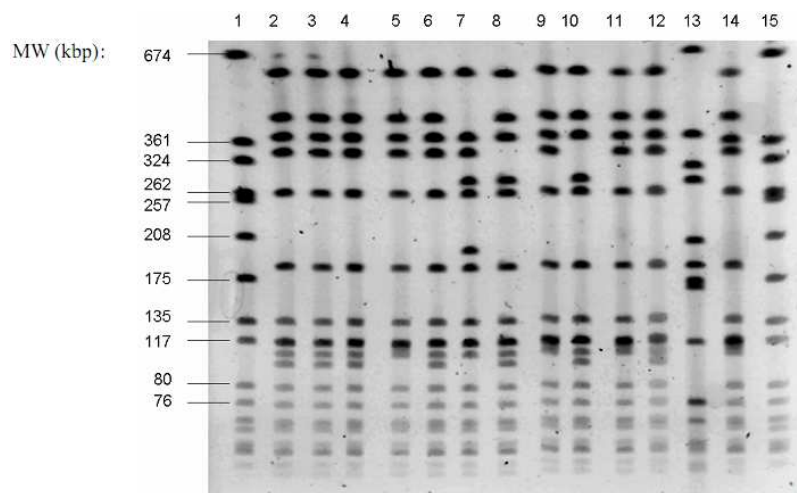
3. Metode de tipizare moleculară (genotipare)

Metodele sunt folosite pentru diferențierea diferitelor tulpini bacteriene din cadrul aceleiași specii, având utilitate practică de exemplu în stabilirea clonalității tulpinilor izolate în context de epidemie și identificarea sursei de infecție (anchetă epidemiologică).

Metodele au putere discriminatorie mare.

a. PFGE – pulse field gel electrophoresis

- Extracția ADN-ului și înglobarea în gel de agaroză (discuri)
- Digestia ADN-ului cu enzima de restricție
- Electroforeza fragmentelor de macrorestricție în gel de agaroză
- Colorare cu bromură de etidiu
- Vizualizarea fragmentelor în lumină ultravioletă



b. MLST- multilocus sequence typing

- permite tipizarea la nivelul mai multor locusuri genetice odată.
- are putere discriminatorie foarte mare
- permite evidențierea variațiilor genetice la nivel de specie
- baze de date cu evidența geografică a diferitelor tulpini <http://www.mlst.net/>

```
<dataroot>
<strain_sequences>
<strainid>STRAIN1</strainid>
<locus1>...GCCAGTGA...</locus1>
<locus2>...CCGAGTGA...</locus2>
<locus3>...GCCAGTGA...</locus3>
<locus4>...ACGGGTGA...</locus4>
<locus5>...TCGAGGGA...</locus5>
<locus6>...CCGAGTGA...</locus6>
<locus7>...CCGTGAGA...</locus7>
</strain_sequences>
<strain_sequences>
<strainid>STRAIN2</strainid>
<locus1>...GCCAGTGA...</locus1>
<locus2>...CCGAGTGA...</locus2>
<locus3>...GCCAGTGA...</locus3>
<locus4>...ACGGGTGA...</locus4>
<locus5>...TCGAGGGA...</locus5>
<locus6>...CCGAGTGA...</locus6>
<locus7>...CCGTGAGA...</locus7>
</strain_sequences>
etc.....
</dataroot>
```