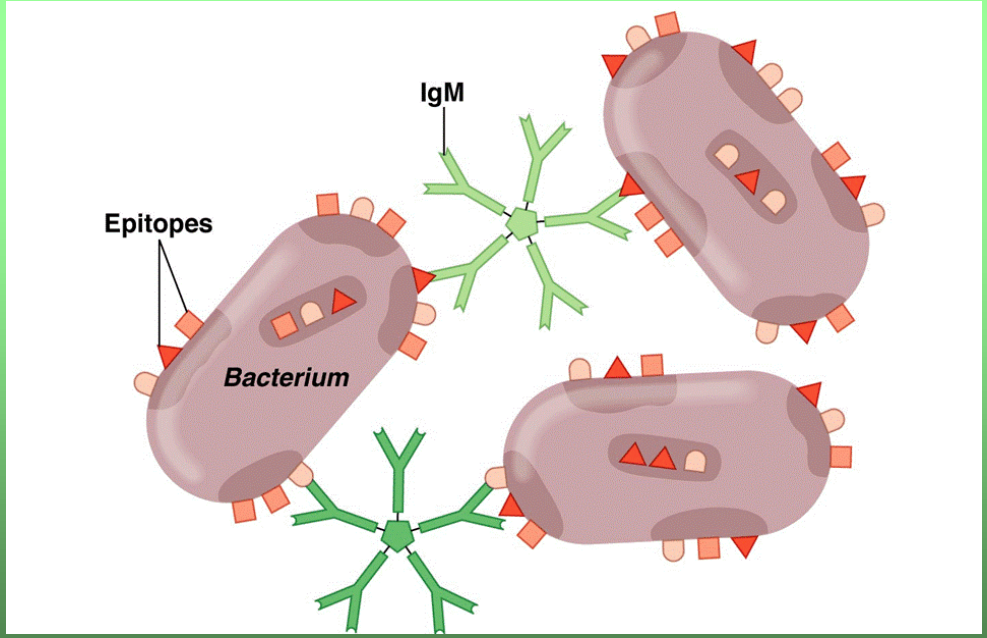
PROVE DI AGGLUTINAZIONE

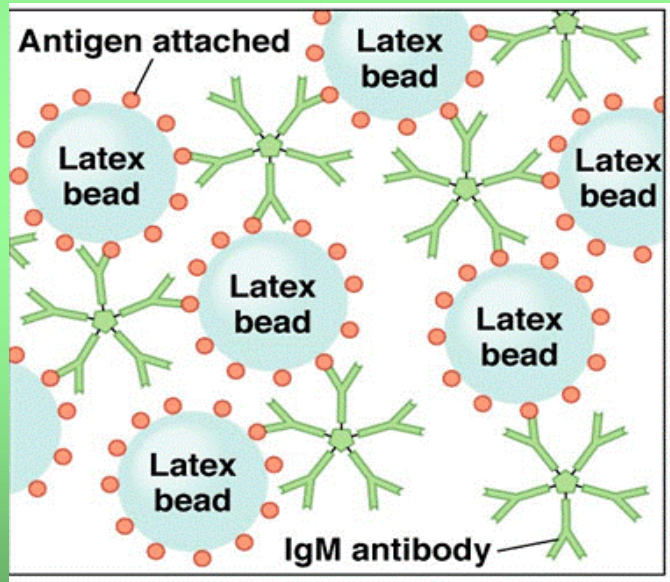
- Azione precipitante o agglutinante dell'Ab in funzione dello stato fisico-chimico dell'Ag
- Ags corpuscolati (es: globuli rossi, batteri): <u>reazione di agglutinazione</u>



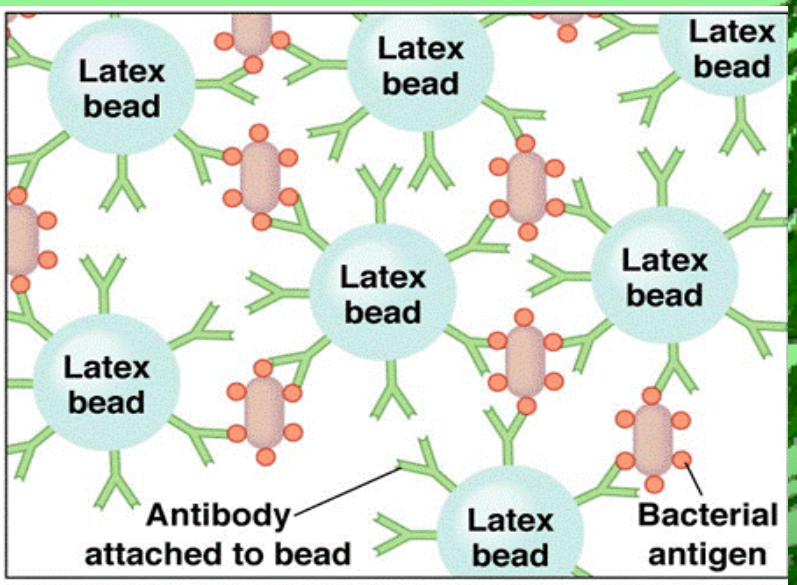
…è possibile usare la reazione di agglutinazione per Ags solubili?????

Utilizzo di sfere di lattice

AGGLUTINAZIONE INDIRETTA



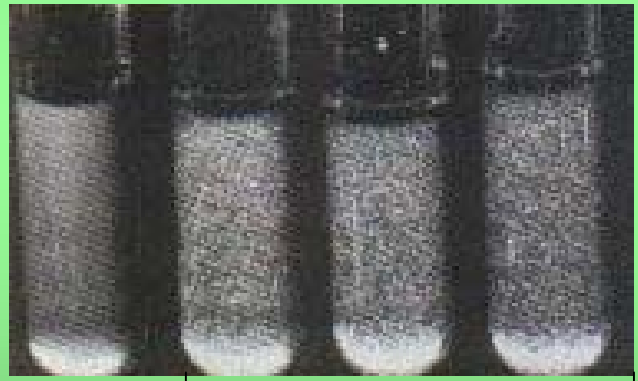
(a) Reaction in a positive indirect test for antibodies. When particles are coated with antigens, agglutination indicates the presence of antibodies, such as the IgM shown here.



(b) Reaction in a positive indirect test for antigens. When particles are coated with monoclonal antibodies, agglutination indicates the presence of antigens.

Tipologie di prove di agglutinazione

- In provetta
- Su vetrino (prova rapida)

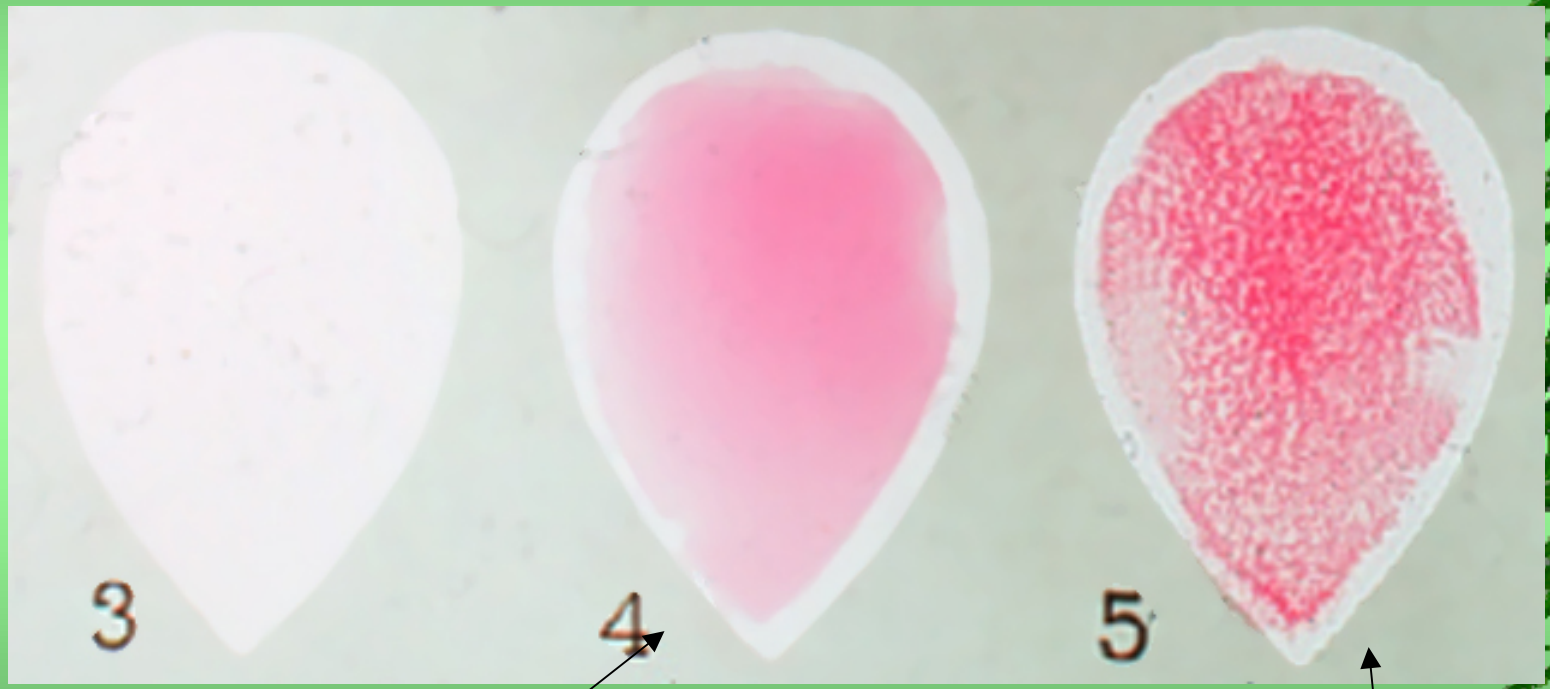


Controllo: batteri sospesi in soluzione fisiologica senza siero immune

Agglutinazione: sospensione batterica + siero immune

Brucella abortus card test

(particelle batteriche uccise e colorate per rendere visibile l'agglutinazione)



Test negativo

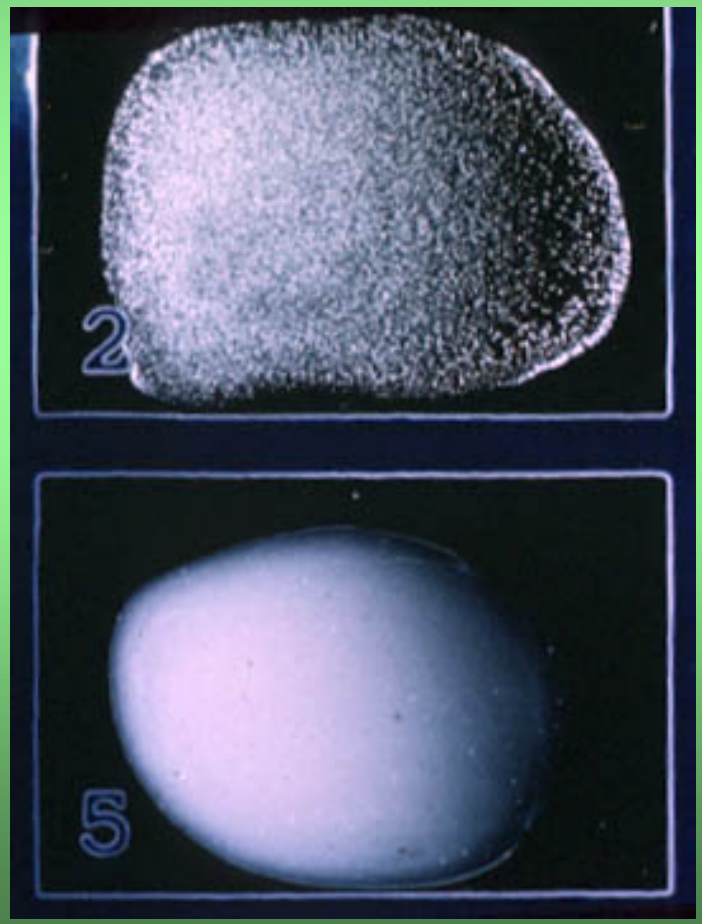
Test positivo
(agglutinazione delle particelle batteriche)

Latex agglutination test per il fattore reumatoide

Molecole di IgG adese tramite legami covalenti alle particelle di lattice; presenza del fattore reumatoide (Abs diretti contro le IgG) rilevata dall'agglutinazione delle particelle di lattice

Test positivo

Test negativo



Prova di agglutinazione su vetrino: *applicazioni*

- Identificazione di varie specie batteriche
- Identificazione dei gruppi sanguigni
- Diagnosi di patologie autoimmuni (artrite reumatoide, eritroblastosi fetale)

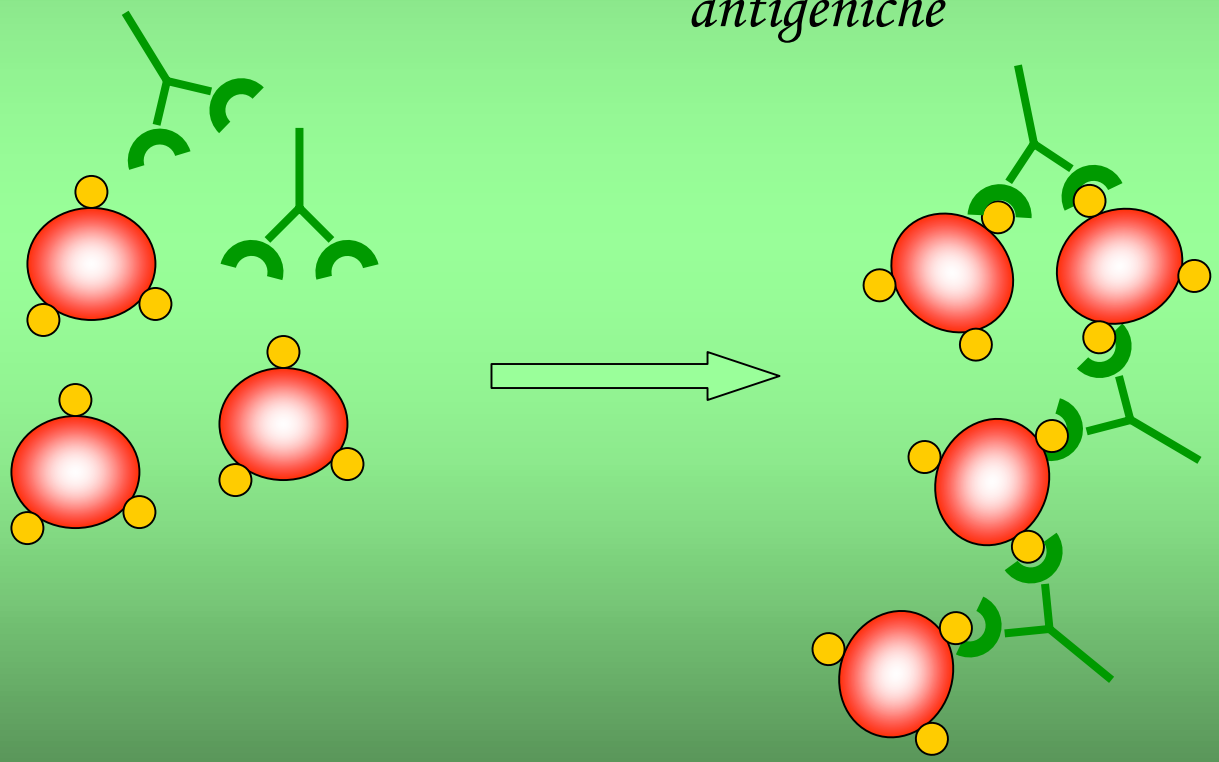
Assenza di fenomeni visibili

- Caratteristiche dell'Ag: non disponibilità in esso di un numero sufficiente di valenze
- Ags plurivalente, ma Abs incompleti (determinano la formazione di piccoli aggregati non evidenti ad occhio nudo)

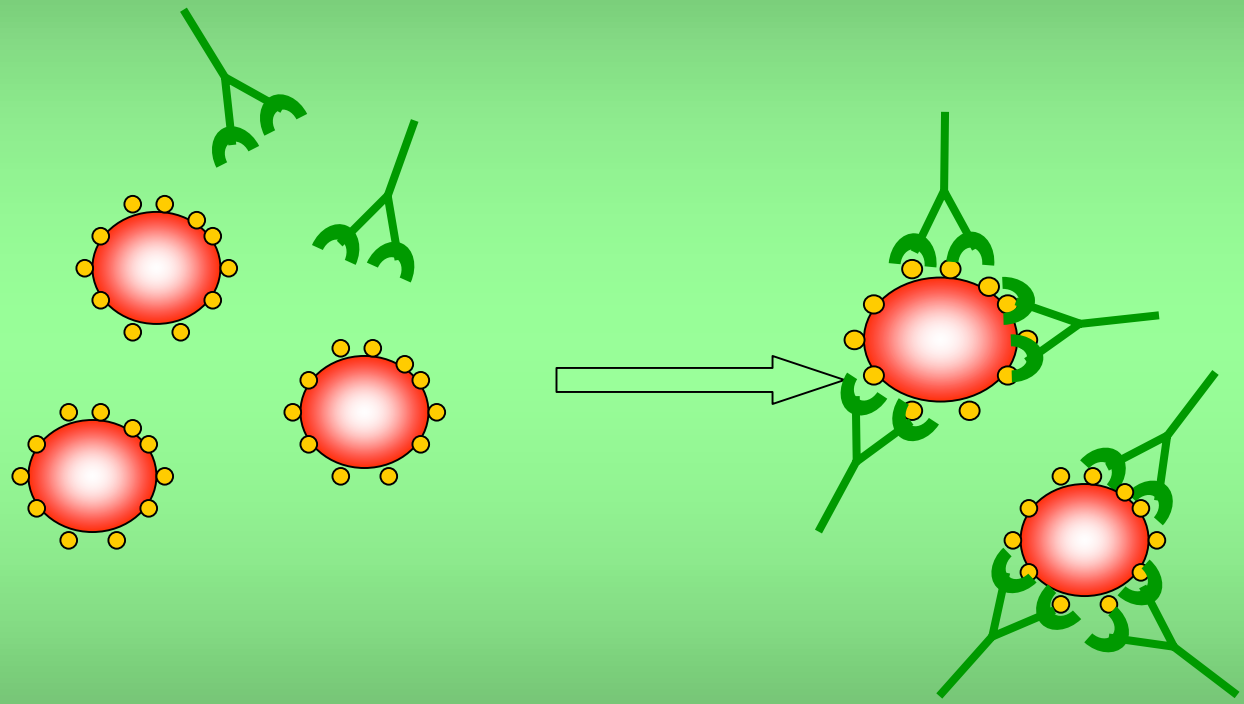
INCAPACITÀ DI FORMARE IL RETICOLO

Abs "incompleti"

Legame crociato → *Ogni Ab si combina con due distinte unità antigeniche*



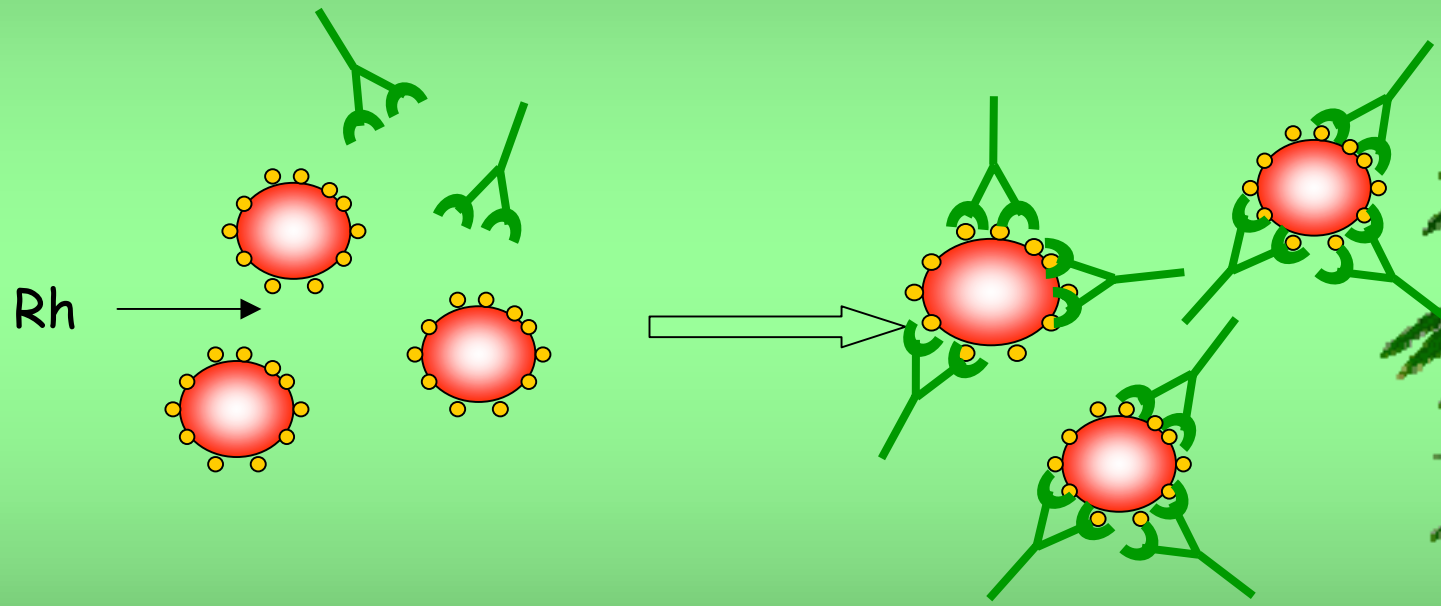
Legame monogamo → *Ogni Ab si lega con due epitopi di una stessa unità antigenica, formando complessi non visibili di piccole dimensioni*



Solo con particolari Ags (fattore Rh): determinante antigenico che si ripete sulla sup. cellulare a distanza adatta a incontrare i due siti reattivi dell'Ab

REAZIONE DI COOMBS

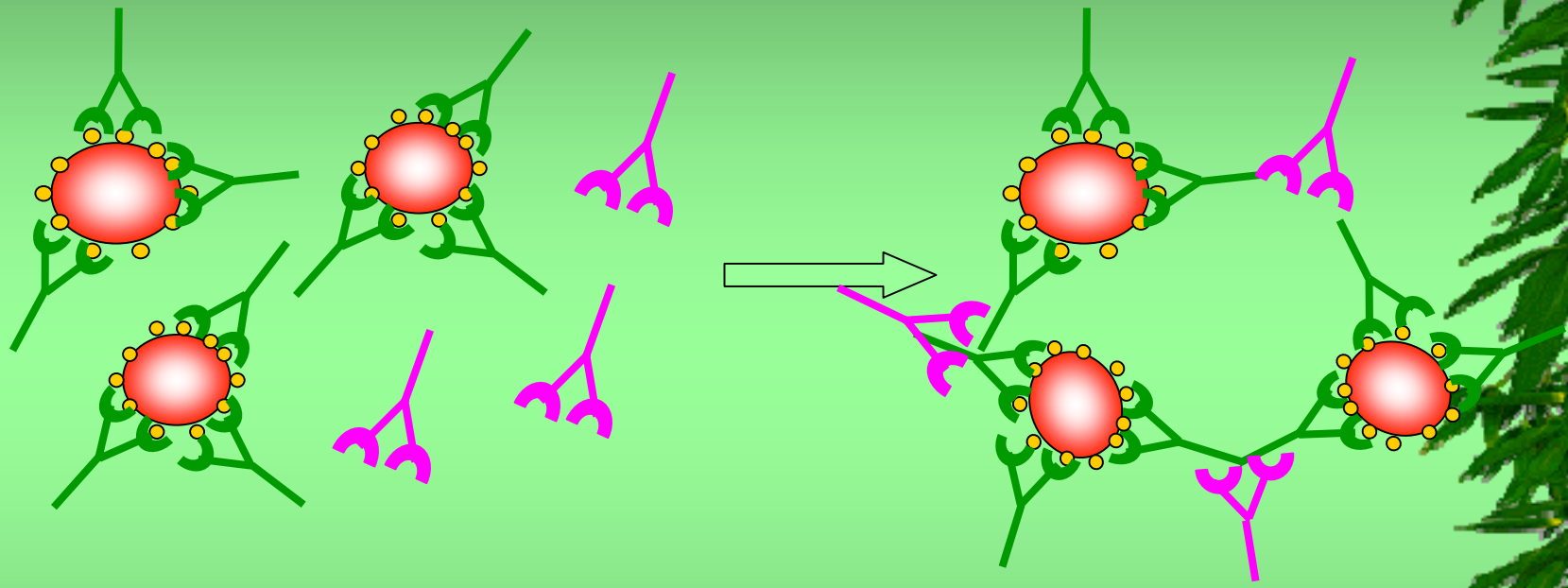
Siero umano contenente Abs incompleti anti-Rh



Ag: globuli rossi Rh+

Gli Abs non agglutinano l'Ag, ma comunque si adsorbono alla superficie dei GR

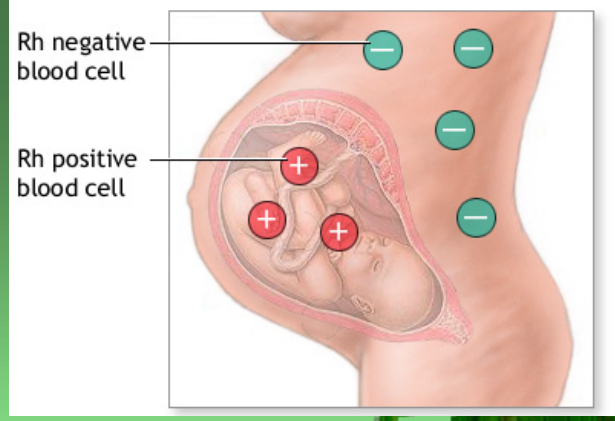
Aggiunta di un siero anti-globuline



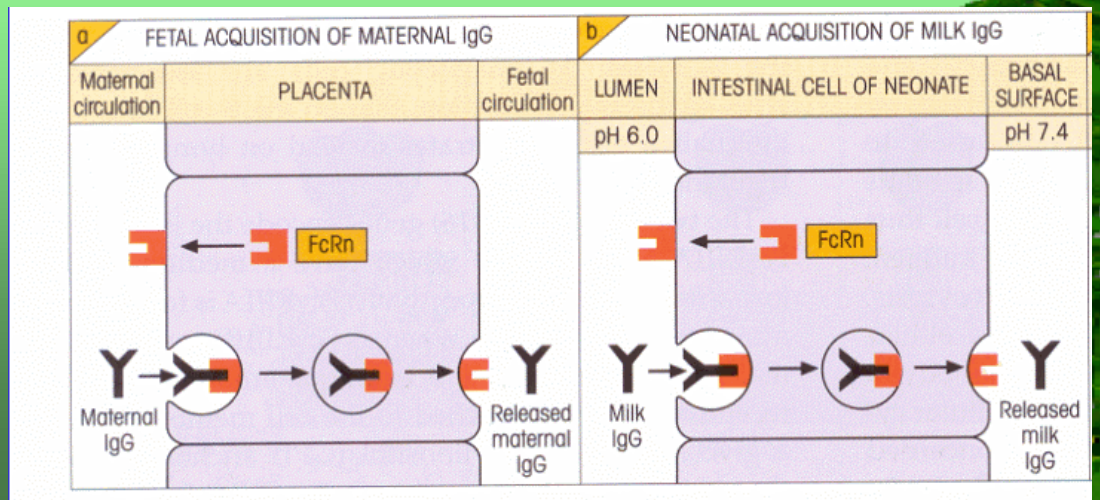
Comparsa dell'emoagglutinazione

Reazione di Coombs = test dell'antiglobulina

Fattore Rh

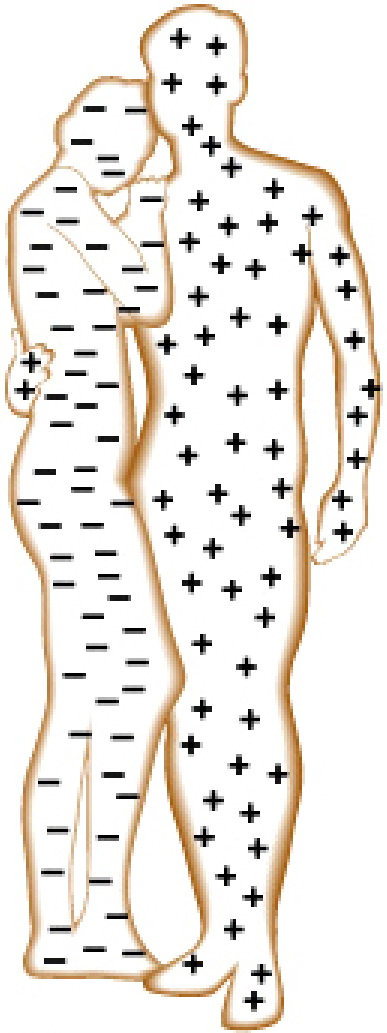


- Malattia emolitica del neonato (eritroblastosi fetale): produzione da parte della madre di IgG specifiche per l'Ag del gruppo sanguigno Rh (Rhesus) espresso sui GR del feto
- Madri Rh- con feto Rh+ (di origine paterna)
- IgG anti-Rh legate alla superficie dei GR fetali: distruzione dalle cellule fagocitarie del fegato

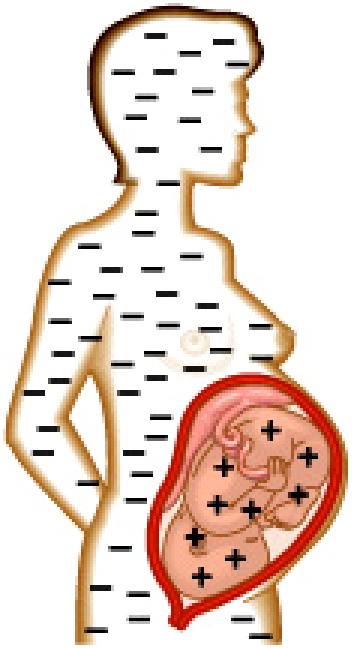


Population data for the Rh D factor and the RhD neg allele

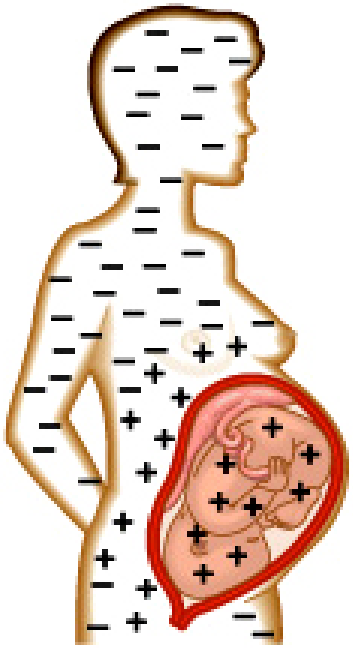
Population	Rh(D) Neg	Rh(D) Pos	Rh(D) Neg alleles
European Basque	approx 35%	65%	approx 60%
other Europeans	16%	84%	40%
African American	approx 7%	93%	approx 26%
Native Americans	approx 1%	99%	approx 10%
African descent	less 1%	over 99%	3%
Asian	less 1%	over 99%	1%



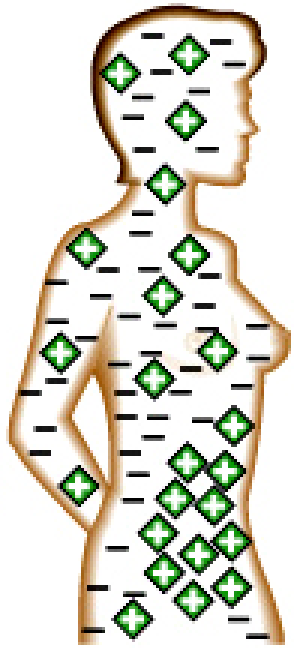
Rh-negative woman and Rh-positive man conceive a child



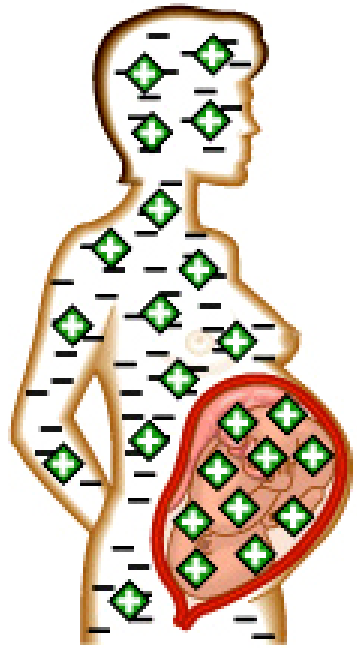
Rh-negative woman with Rh-positive fetus



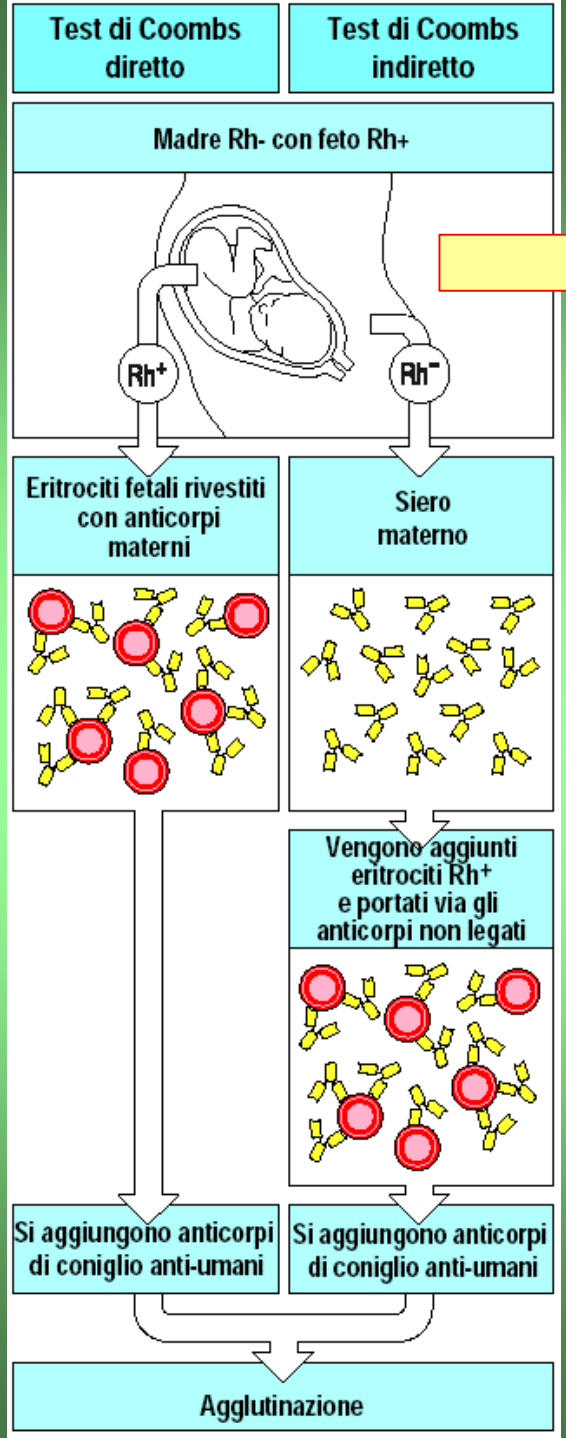
Cells from Rh-positive fetus enter woman's bloodstream



Woman becomes sensitized—antibodies (◇) form to fight Rh-positive blood cells

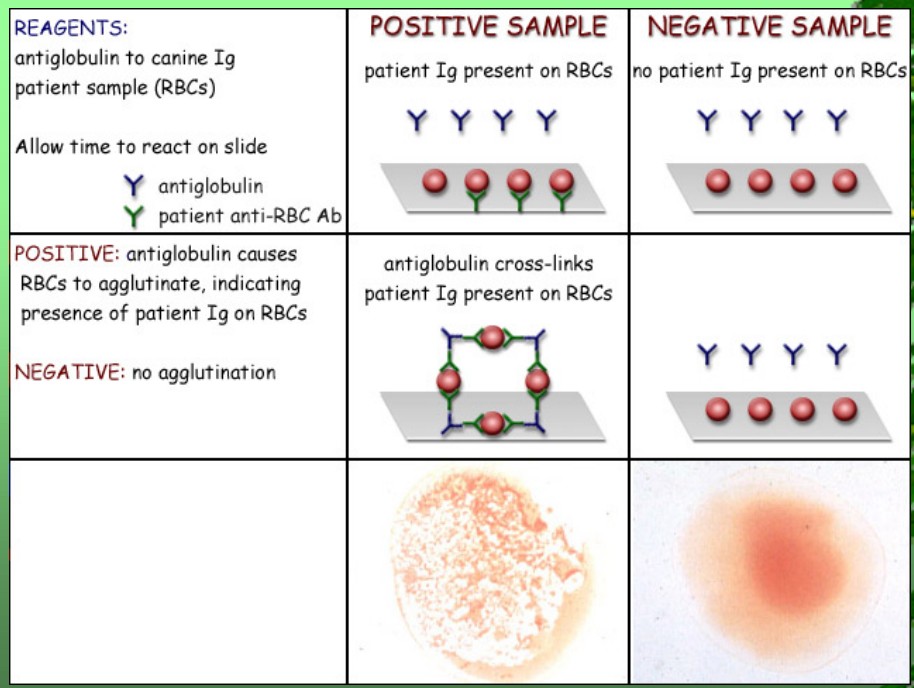


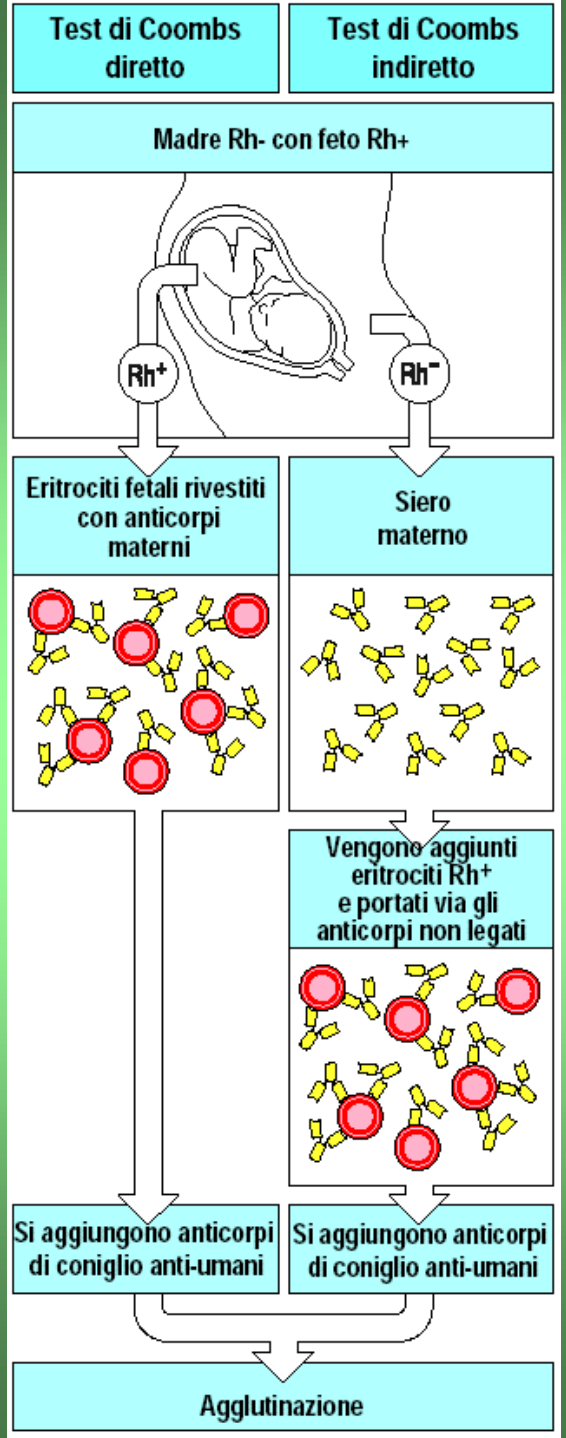
In the next Rh-positive pregnancy, maternal antibodies attack fetal red blood cells



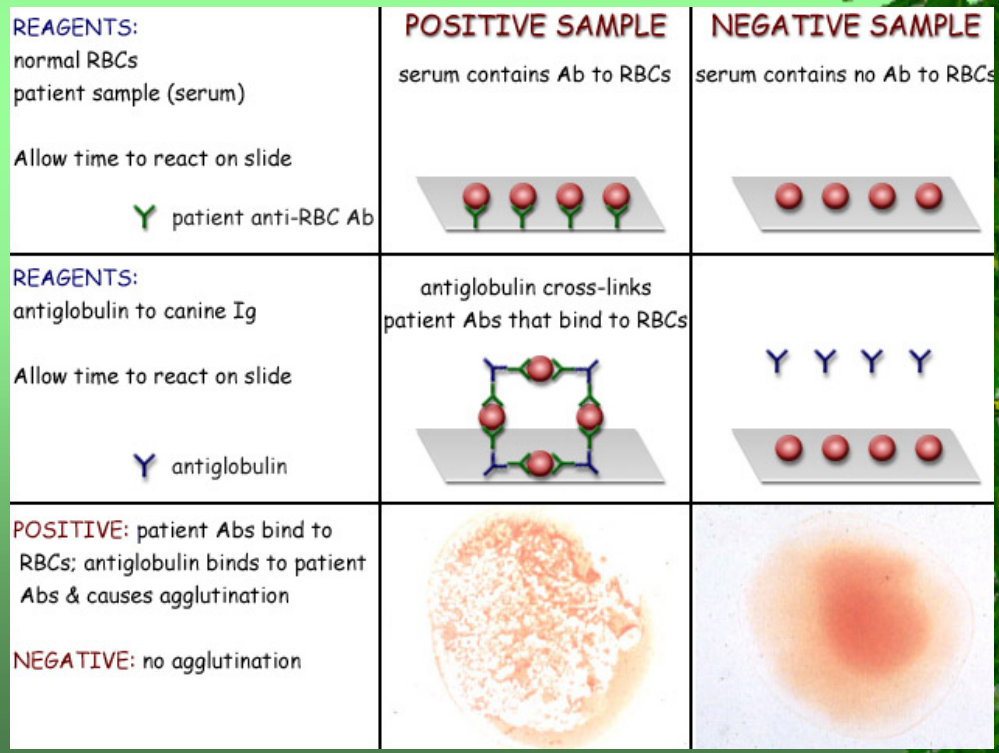
Immunizzazione della madre verso i GR fetali che entrano nel circolo materno al parto…problema nella seconda gravidanza con feto Rh+: passaggio di Abs IgG anti-Rh dalla madre al feto

- **Test diretto:** identificazione diretta degli Abs legati sulla superficie cellulare dei GR





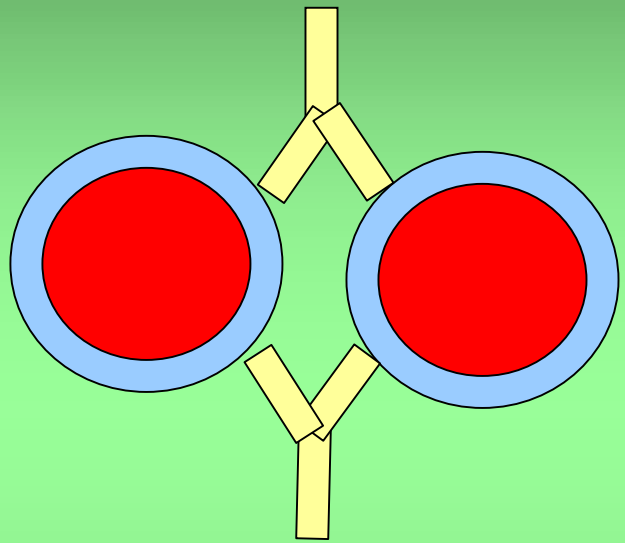
- **Test indiretto:** isolamento di Abs anti-Rh non agglutinati presenti nel siero materno
- Individuazione incompatibilità Rh (prevenzione)



AGGLUTINAZIONE PASSIVA

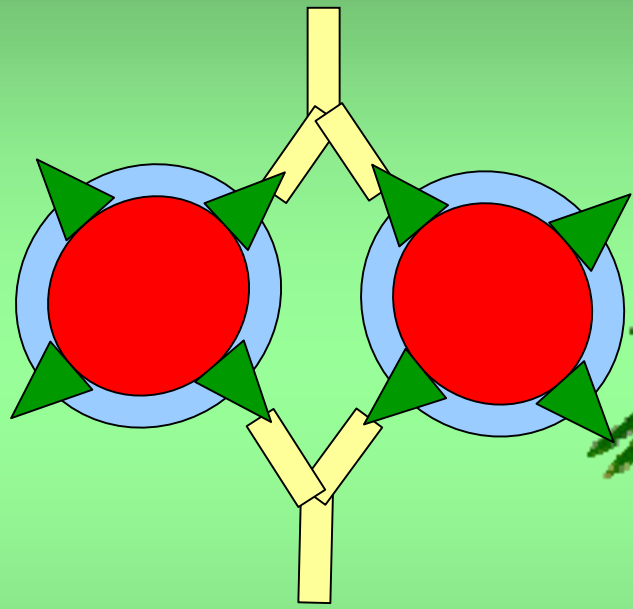
- Fissazione di determinati antigeni alla superficie di GR o particelle inerti (colloidi, lattice)
- Ags agglutinabili da Abs specifici
- Fissazione con *acido tannico, glutaraldeide, cromo cloruro*

Emoagglutinazione diretta

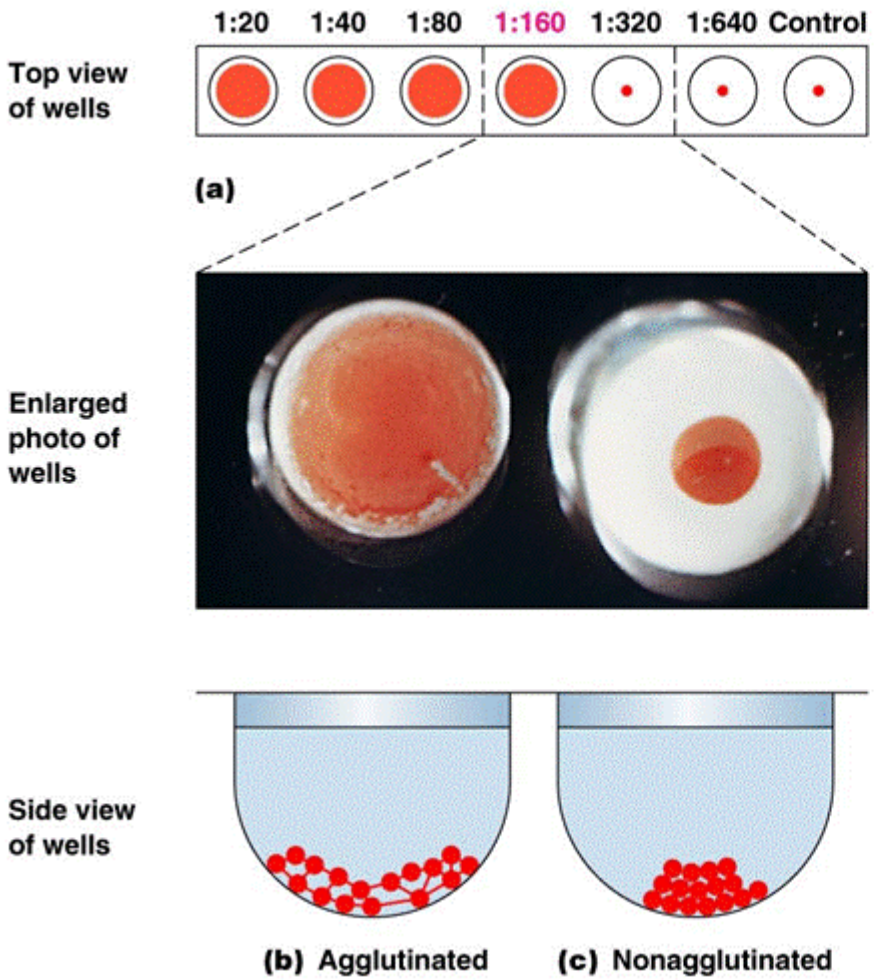


Reazione degli Abs anti-GR con i determinanti antigenici esposti naturalmente sulla superficie dei GR (es.: Ags di gruppo sanguigno)

Emoagglutinazione passiva



GR precedentemente sensibilizzati verso l'Ag verso cui si cerccano gli Abs



(a) Each well in this microtiter plate contains, from left to right, only half the concentration of serum that is contained in the preceding well. Each well contains the same concentration of particulate antigens, in this instance red blood cells.

(b) In a positive (agglutinated) reaction, sufficient antibodies are present in the serum to link the antigens together, forming a mat of antigen–antibody complexes on the bottom of the well.

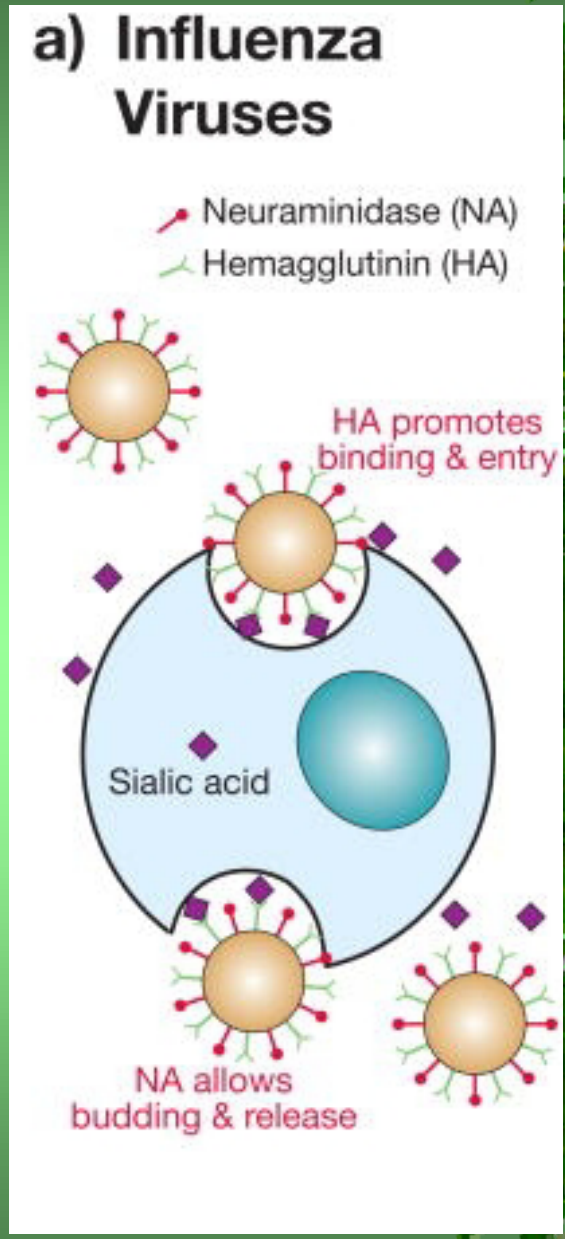
(c) In a negative (nonagglutinated) reaction, not enough antibodies are present to cause the linking of antigens. The particulate antigens roll down the sloping sides of the well, forming a pellet at the bottom. In this example, the antibody titer is 160 because the well with a 1:160 concentration is the most dilute concentration that produces a positive reaction.

Applicazione

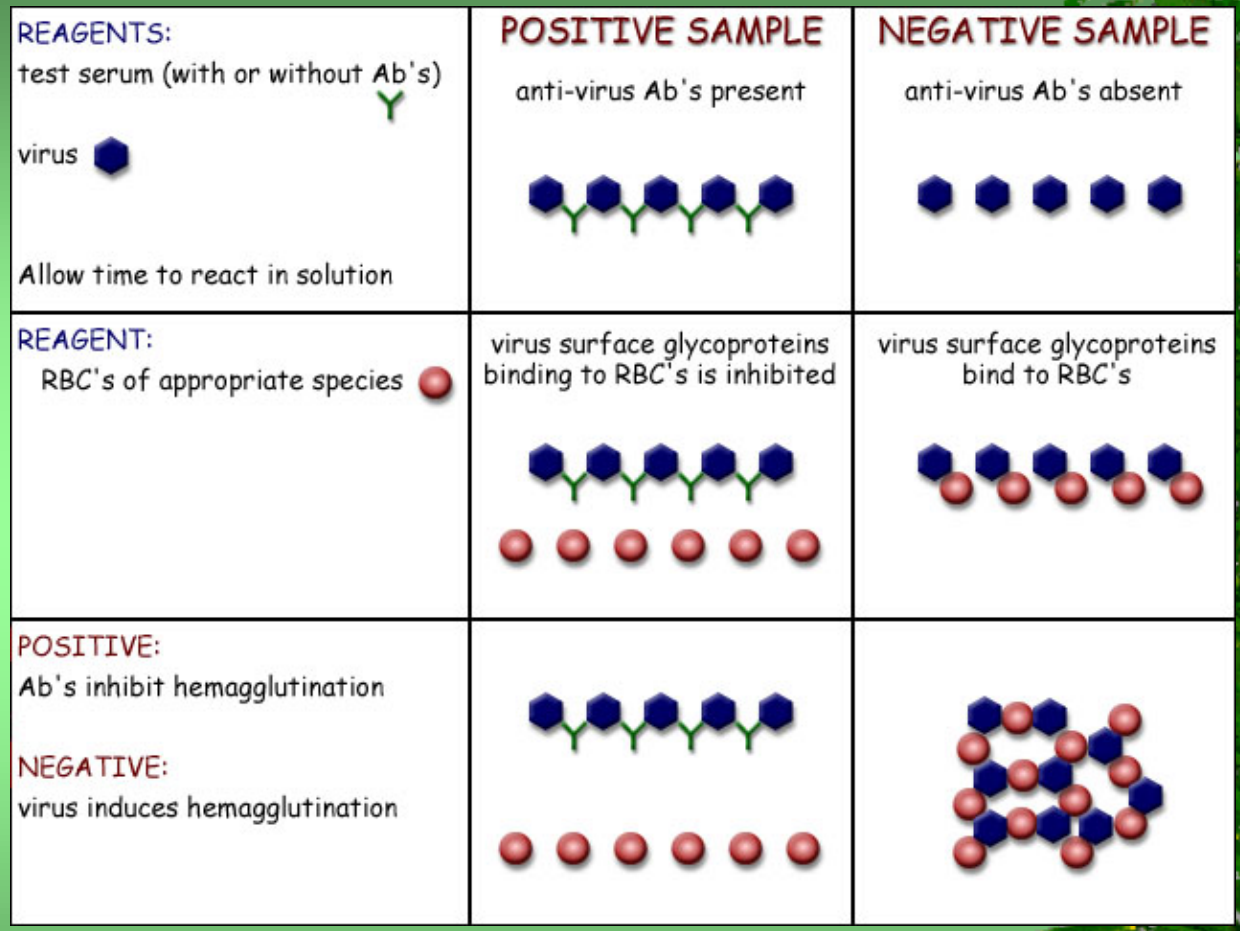
- Diagnosi di malattie infettive o infestive (Toxoplasmosi)
- Identificazione Abs diretti verso certi apteni
- identificare soggetti allergici alla penicillina (siero in esame + GR sensibilizzati con penicillina)
- Primo esempio di emoagglutinazione passiva: reazione di Middlebrook-Dubos (siero di soggetti con TBC + GR sensibilizzati da Ags tubercolari)

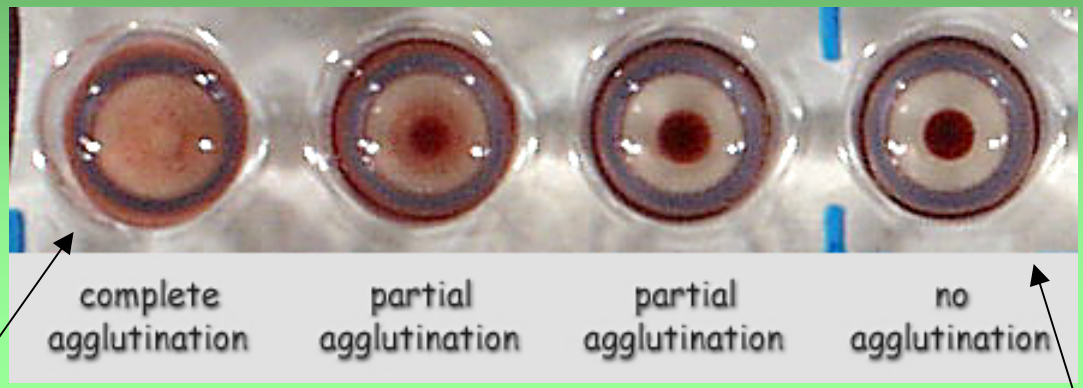
INIBIZIONE DELL'EMOAGGLUTINAZIONE DA VIRUS

- Virus dotati di emoagglutinine: legame e agglutinazione di globuli rossi
- Presenza di Abs virus-specifici: inibizione emoagglutinazione



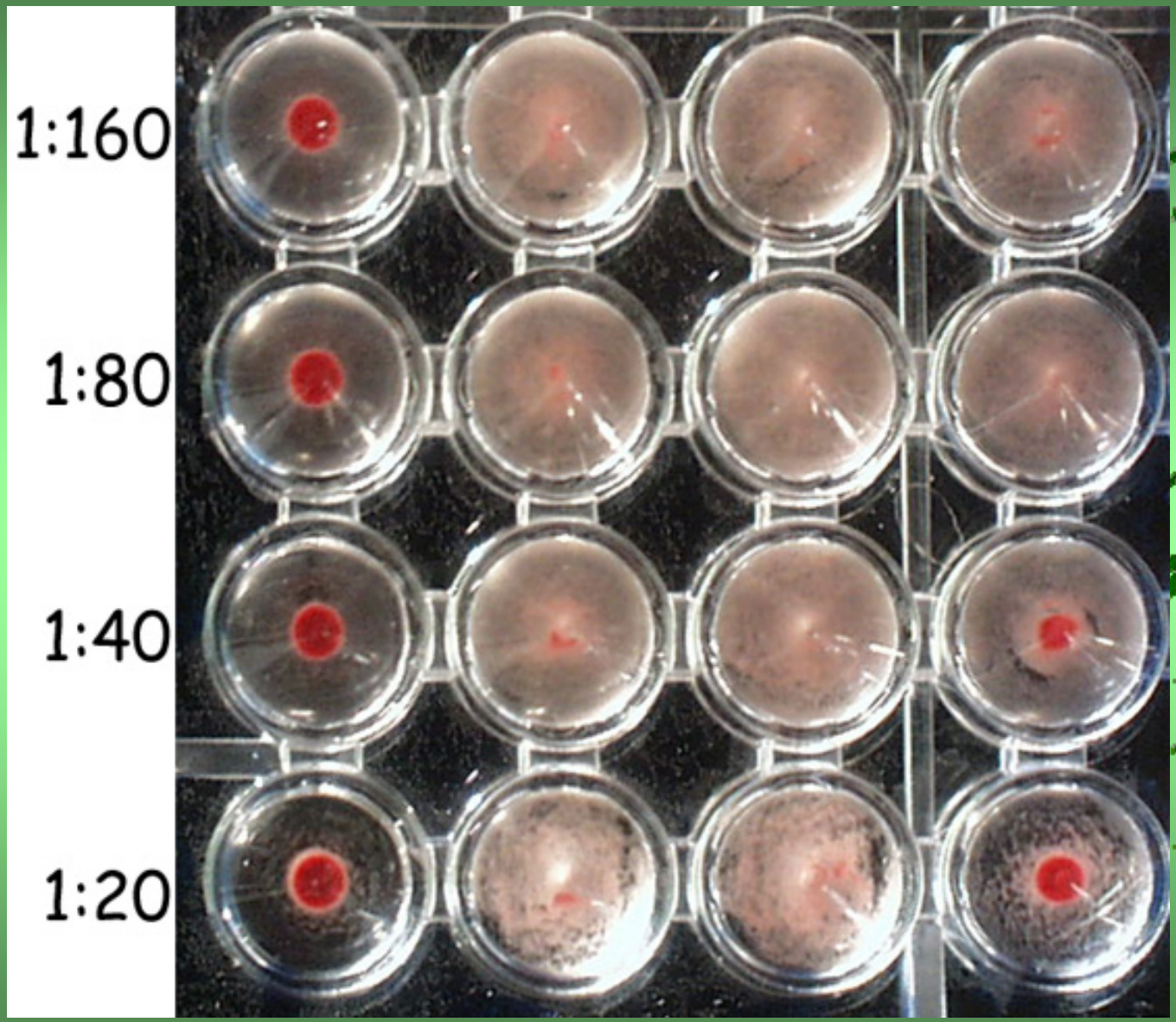
- Sospensione di GR + diluizioni per raddoppio del siero in esame + quantità standardizzata di virus
- Lettura dei risultati:
  - agglutinazione: GR disposti in un sottile strato granulare a margini irregolari che ricopre tutto il fondo
  - no agglutinazione: bottone sul fondo





Assenza di Abs inibenti

Presenza di Abs inibenti


1:160
1:80
1:40
1:20

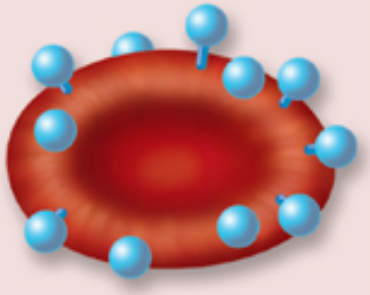
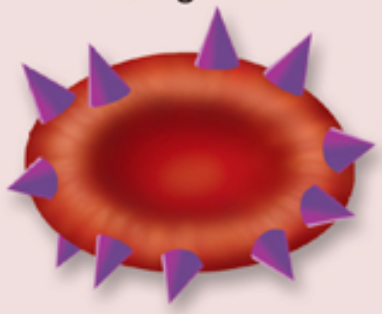
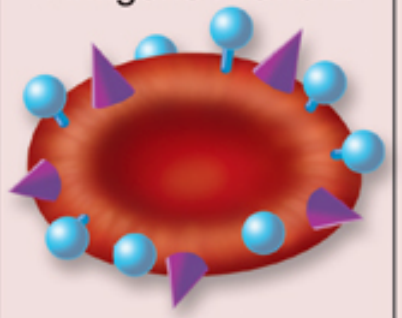
Problemi

- **Inibitori aspecifici dell'emoagglutinazione:** sostanze proteiche, mucoproteiche, lipidiche che si adsorbono al virus
- simulazione del comportamento degli Abs inibenti l'emoagglutinazione
- rimozione degli inibitori aspecifici: trattamento del siero a 56°C per 30 min

Emoagglutinazione e tipizzazione del sangue

- Scopo: determinare il gruppo sanguigno ABO dei donatori e dei pazienti che ricevono la trasfusione

ABO Blood Types

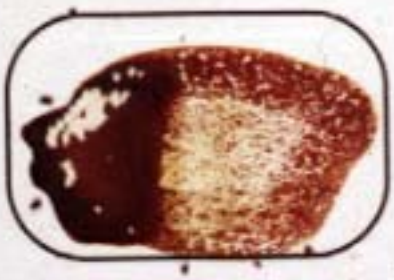
Erythrocytes	Antigen A 	Antigen B 	Antigens A and B 	Neither antigen A nor B 
Plasma	Anti-B antibodies 	Anti-A antibodies 	Neither anti-A nor anti-B antibodies	Both anti-A and anti-B antibodies 
Blood type	**Type A** Erythrocytes with type A surface antigens and plasma with anti-B antibodies	**Type B** Erythrocytes with type B surface antigens and plasma with anti-A antibodies	**Type AB** Erythrocytes with both type A and type B surface antigens, and plasma with neither anti-A nor anti-B antibodies	**Type O** Erythrocytes with neither type A nor type B surface antigens, but plasma with both anti-A and anti-B antibodies

Rapid Vet-H
(Canine 1.1)

Dog _____ Test Date _____

Positive Control

Negative Control



Patient

dmslaboratories, inc.
2 Darts Mill Road, Flemington, NJ 08822
RapidVet is a trademark of dmslaboratories, inc.
Tel. (908) 782-3353 Fax (908) 782-0832

RV-HC-001