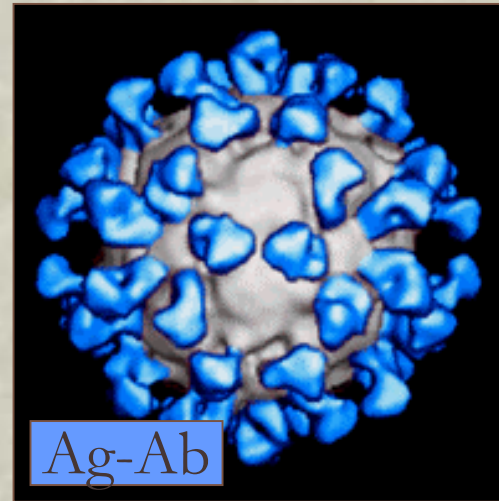
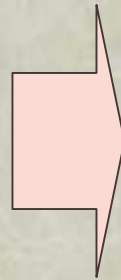
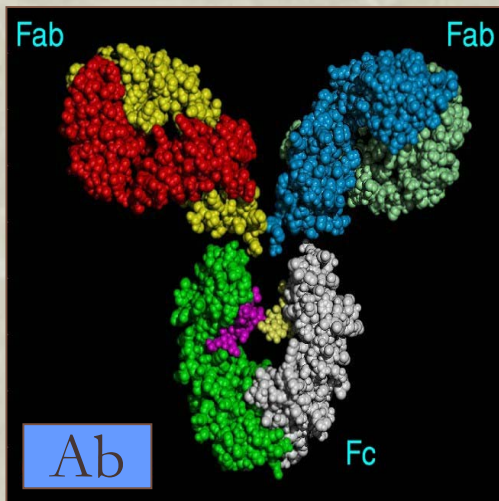
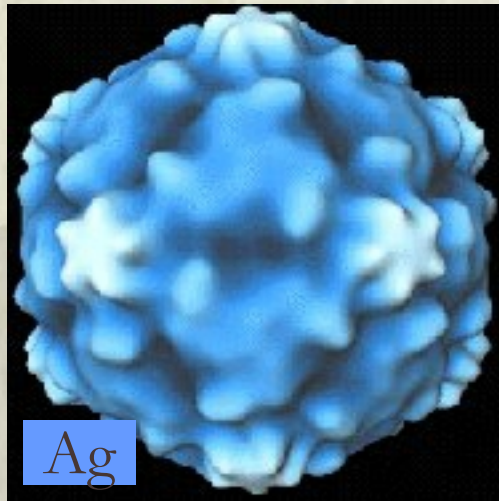


*REAZIONE ANTIGENE-
ANTICORPO
E
TECNICHE IMMUNOLOGICHE*

Tecniche immunologiche



- identificazione dell'antigene
- rilevazione di anticorpi specifici

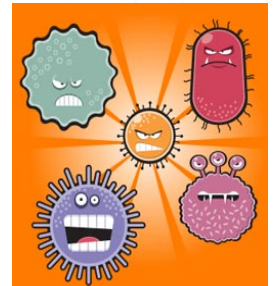
Antigene

Qualsiasi sostanza in grado di reagire specificamente con i prodotti della reazione immunitaria umorale o cellulo-mediata

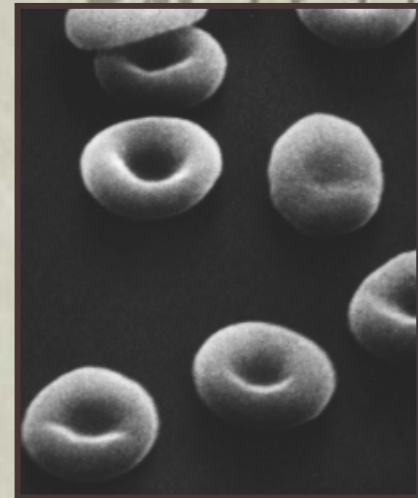
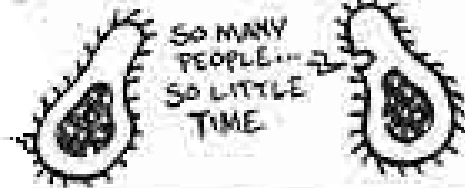
foreign
molecules



bacteria

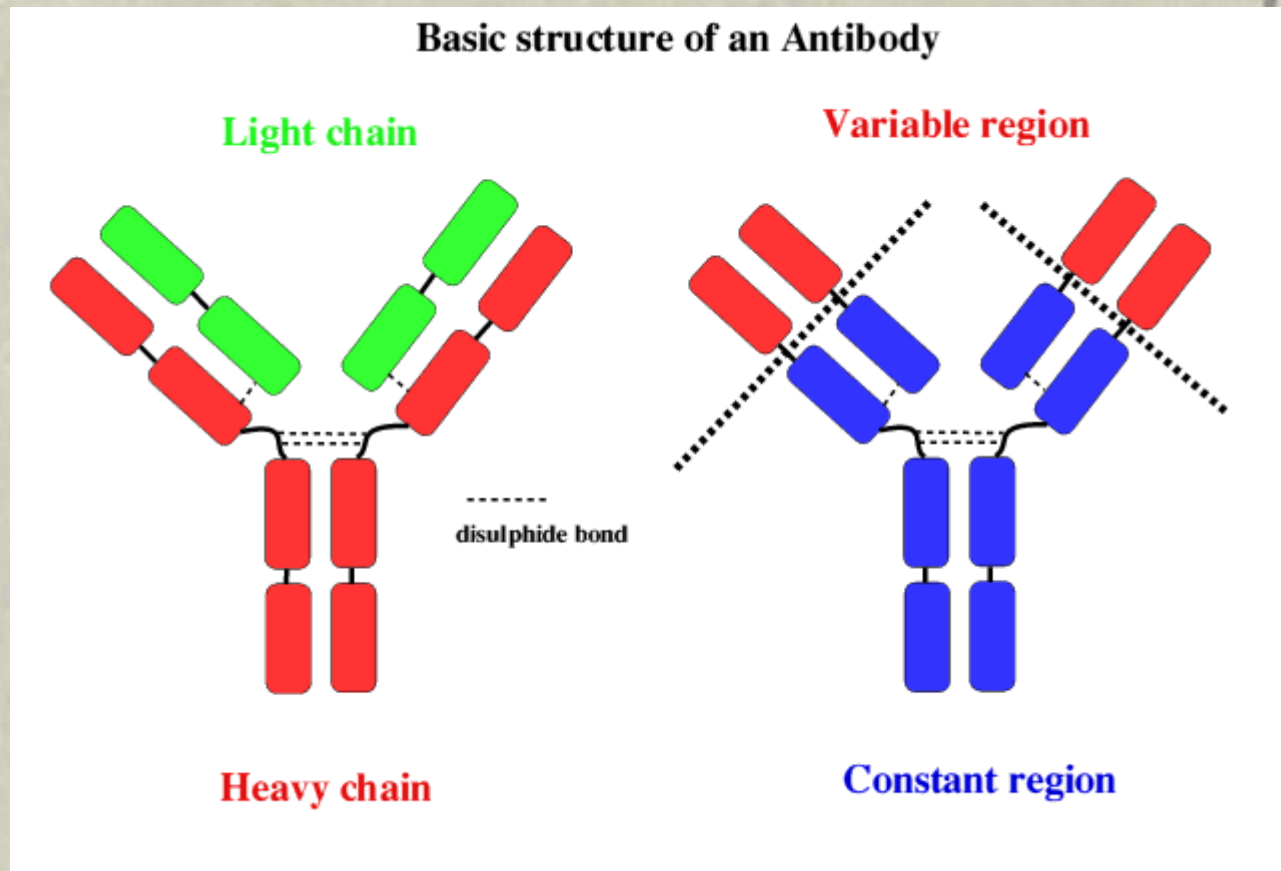


TYPICAL VIRAL CONVERSATION



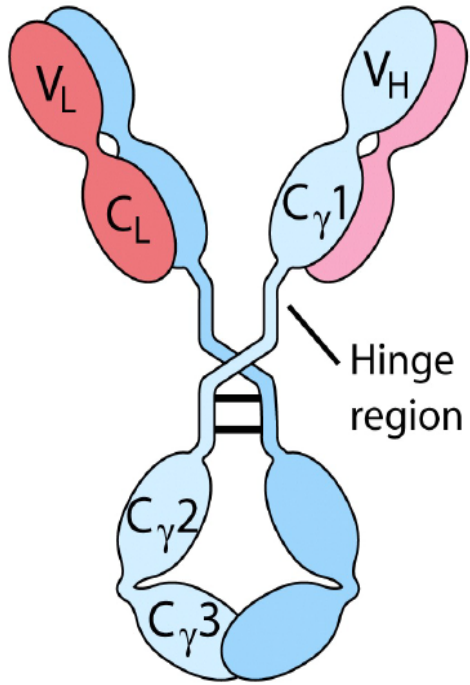
Anticorpi

Glicoproteine prodotte dalle cellule del sistema immunitario che si legano a sostanze riconosciute come *non-self*

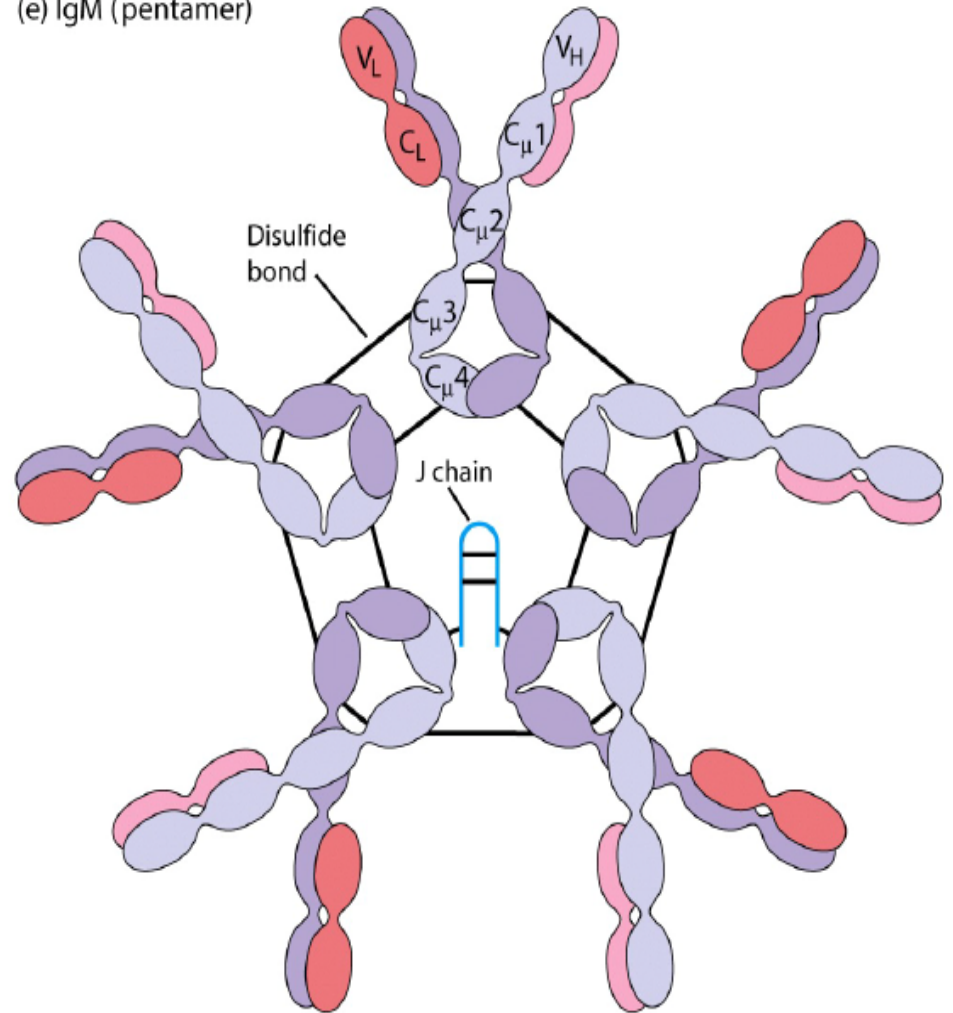


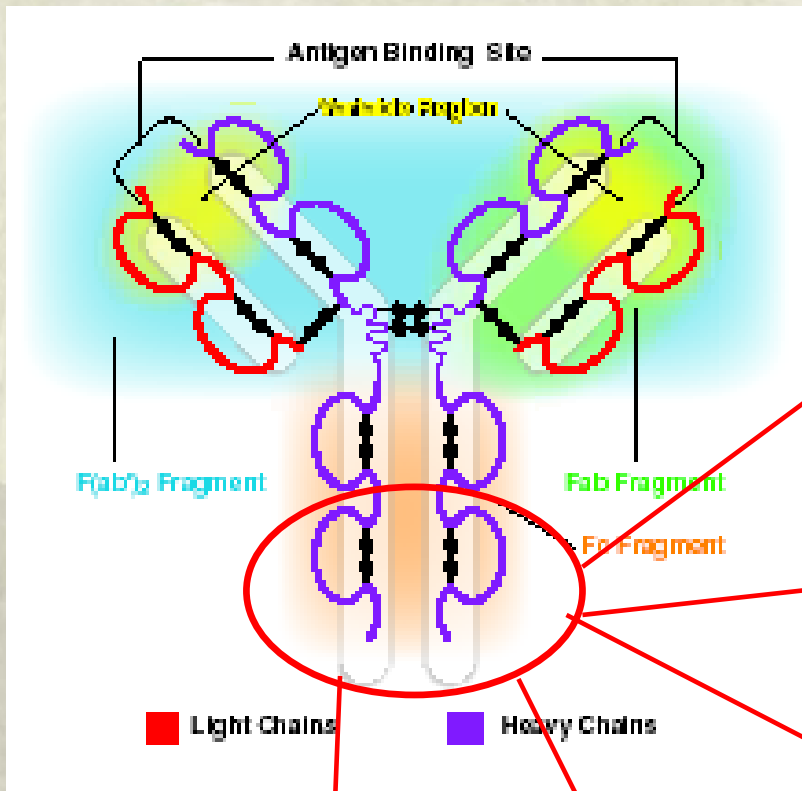
<i>Class/ sub class</i>	<i>Heavy chain</i>	<i>Light chain</i>	<i>Molecular weight (kDa)</i>	<i>Structure</i>	<i>Function</i>
IgA ₁ IgA ₂	α1 α2	λ or κ	150 to 600	Monomer to tetramer	Most produced Ig; protects mucosal surfaces; Resistant to digestion; secreted in milk
IgD	δ	λ or κ	150	Monomer	Function unclear; Works with IgM in B-cell development; mostly B cell bound
IgE	ε	λ or κ	190	Monomer	Defends against parasites; causes allergic reactions
IgG ₁ IgG _{2a} IgG _{2b} IgG ₃ IgG ₄	γ1 γ2 γ2 γ3 γ4	λ or κ	150	Monomer	Major Ig in serum; good opsonizer; moderate complement fixer (IgG ₃); can cross placenta
IgM	μ	λ or κ	900	Pentamer	First response antibody; Strong complement fixer; Good opsonizer

(a) IgG

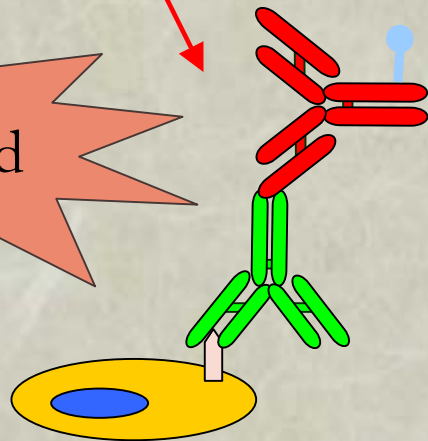


(e) IgM (pentamer)





ELISA catching



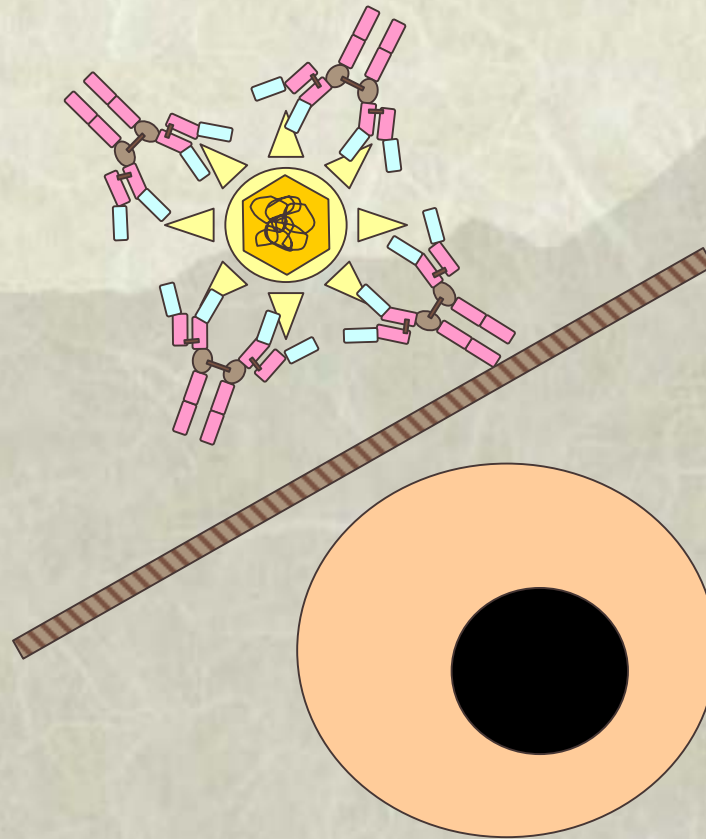
R
U
O
I
O
d
e
l
l
a
p
o
r
z
i
o
n
e
F
c

Meccanismi di azione degli anticorpi

- ❖ Attività neutralizzante
- ❖ Attività agglutinante
- ❖ Attività precipitante
- ❖ Attività opsonizzante
- ❖ Fissazione del complemento

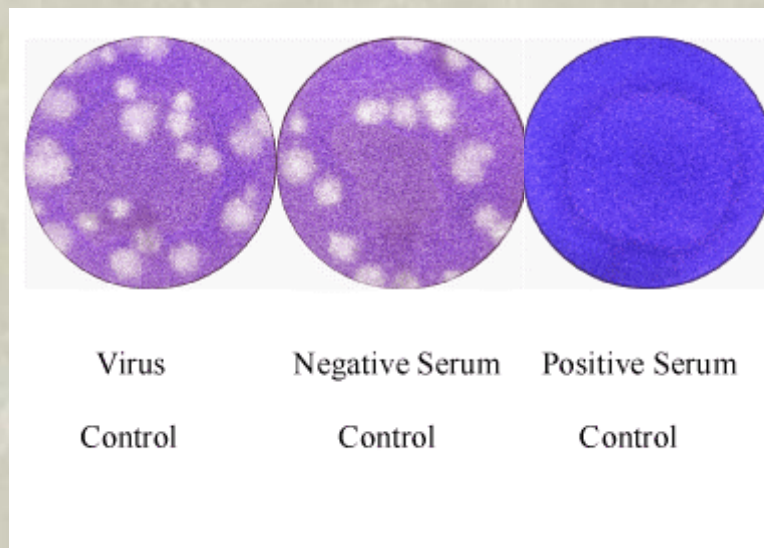
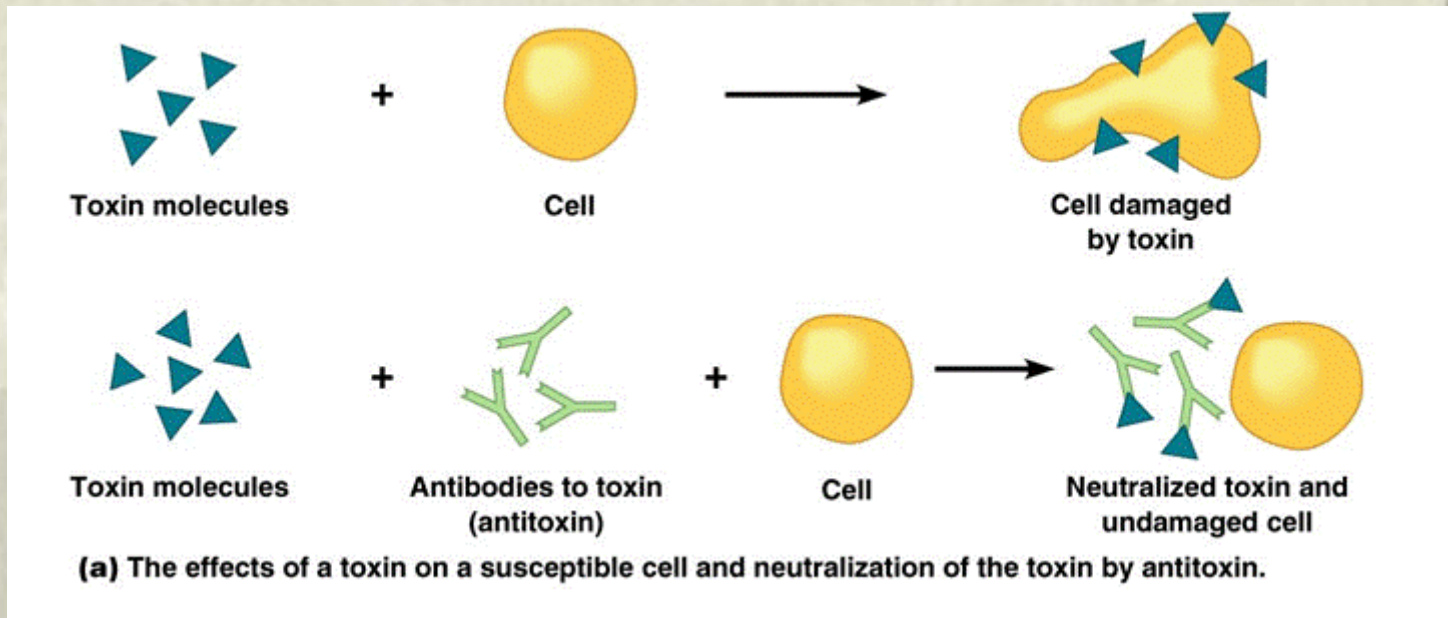


Neutralizzazione



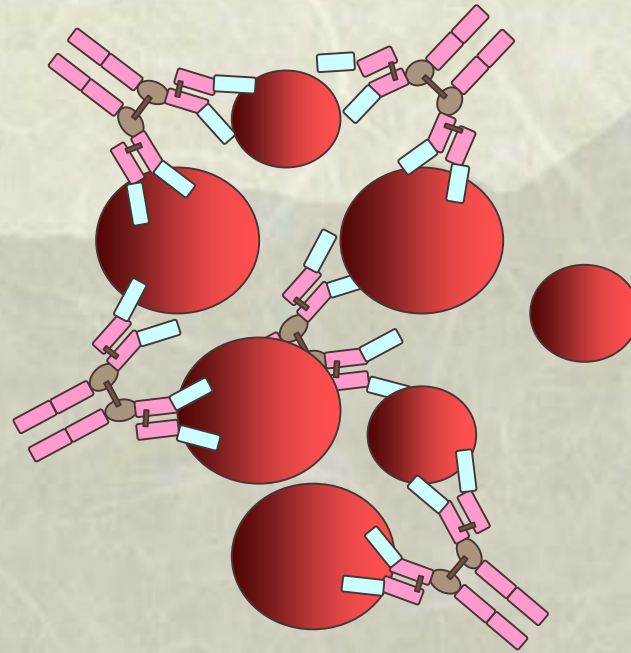
Es.: legame degli Abs alle strutture di superficie dei virus, mancato adsorbimento ai recettori cellulari, mancata penetrazione

TEST IMMUNOLOGICO DI SIERONEUTRALIZZAZIONE





Agglutinazione



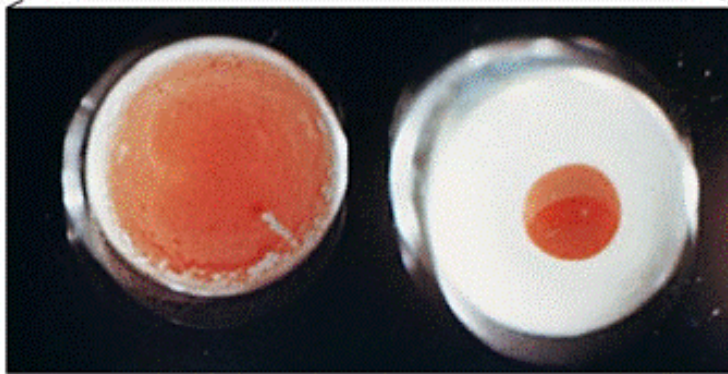
Reazione con Ags particolati
(batteri, cellule eucariote) e
stimolazione fagocitosi

TEST IMMUNOLOGICO DI AGGLUTINAZIONE

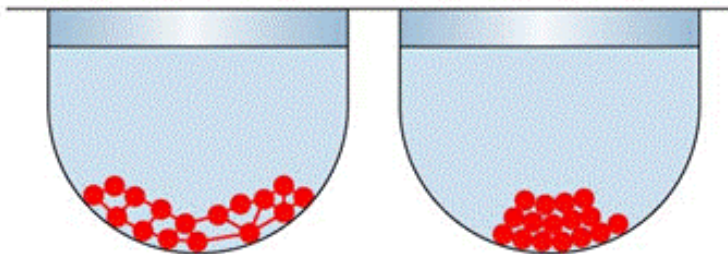


(a)

Enlarged photo of wells



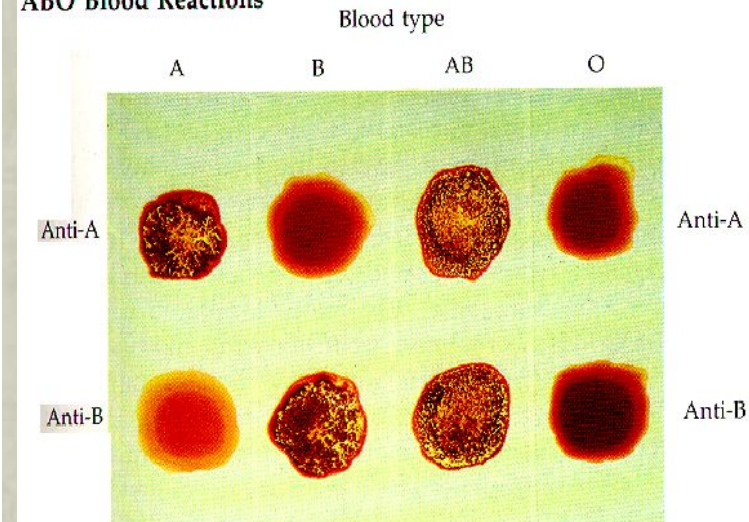
Side view of wells



(b) Agglutinated

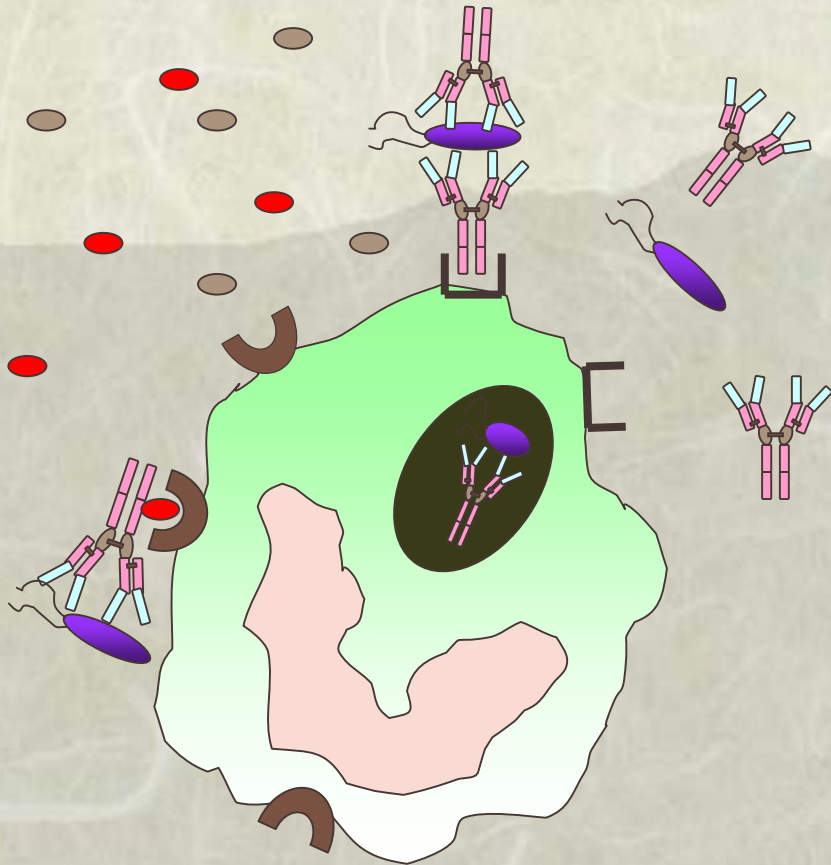
(c) Nonagglutinated

ABO Blood Reactions





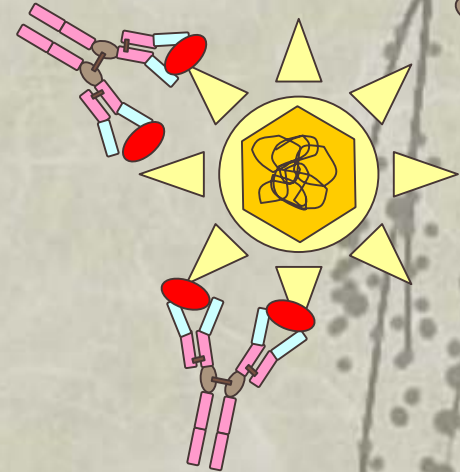
Opsonizzazione



Induzione della fagocitosi
attraverso la formazione di
complessi Ag/Ab

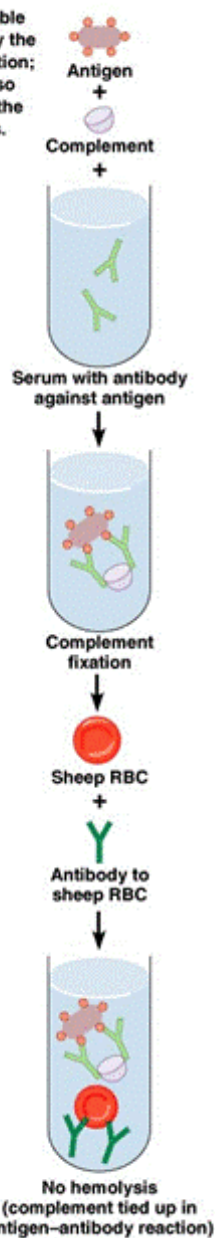


Fissazione del complemento

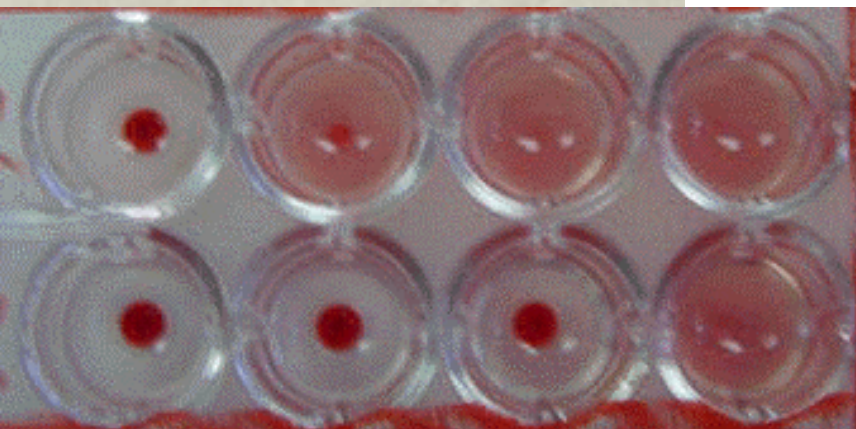
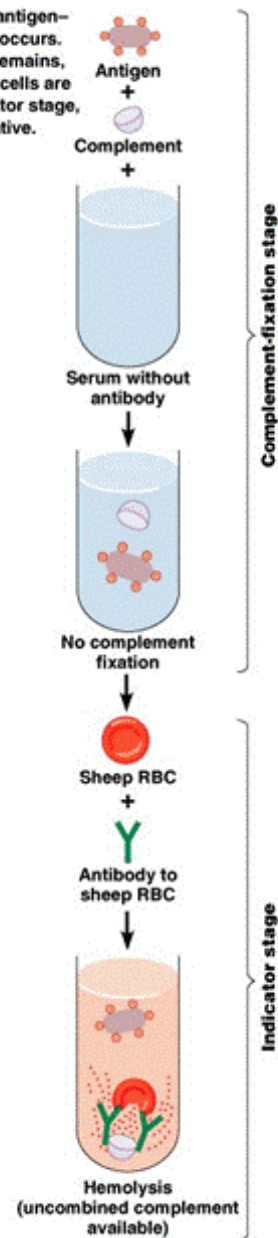


TEST IMMUNOLOGICO DI FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO

(a) Positive test. All available complement is fixed by the antigen-antibody reaction; no hemolysis occurs, so the test is positive for the presence of antibodies.

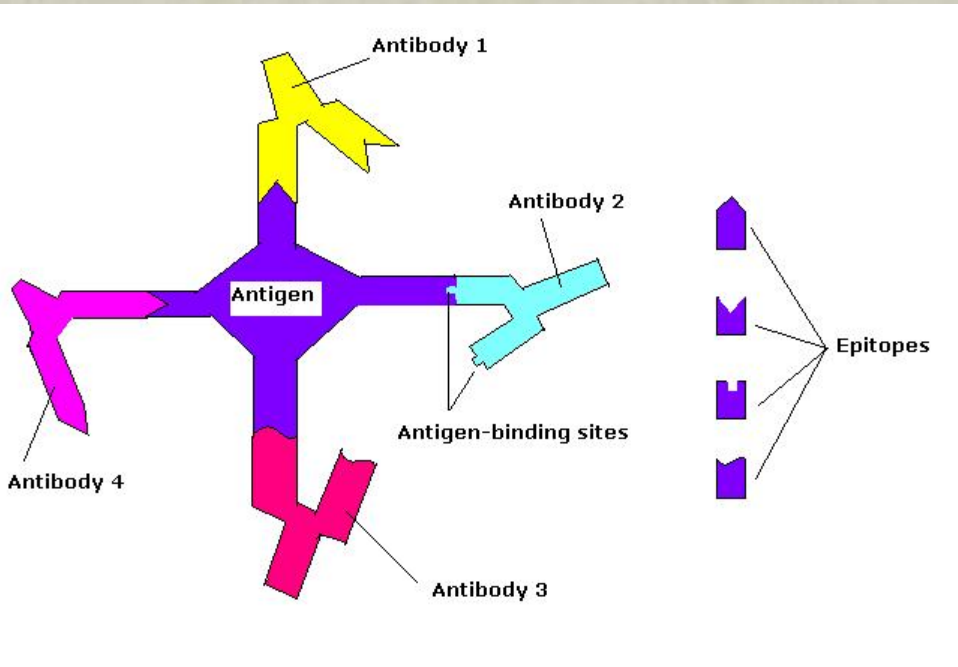


(b) Negative test. No antigen-antibody reaction occurs. The complement remains, and the red blood cells are lysed in the indicator stage, so the test is negative.



Reazione antigene-anticorpo

Interazione tra il determinante antigenico (epitopo) dell'antigene e i domini delle regioni variabili (VH/VL) dell'anticorpo



Caratteristiche:

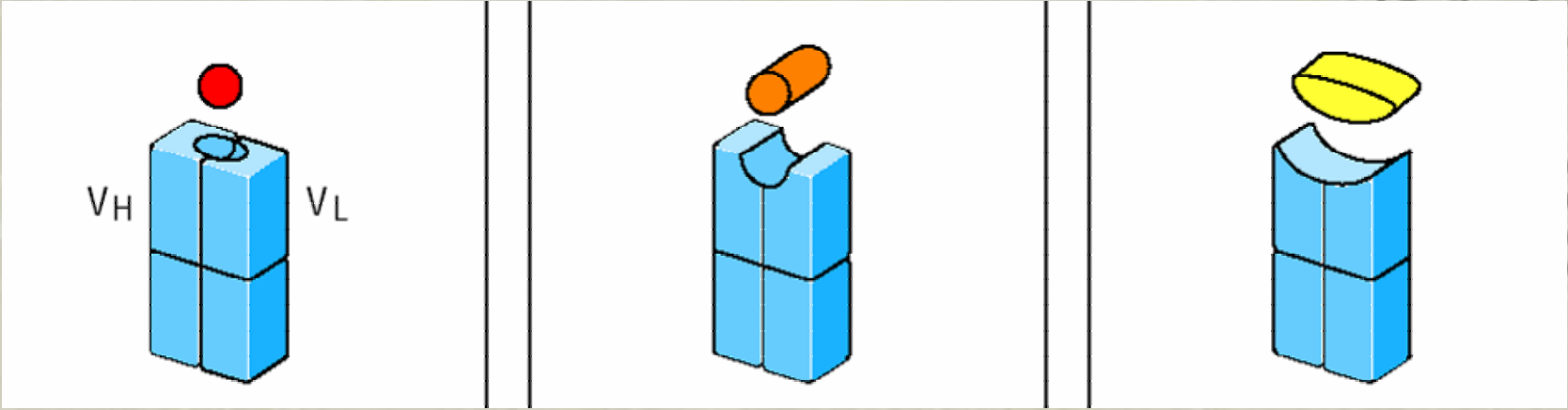
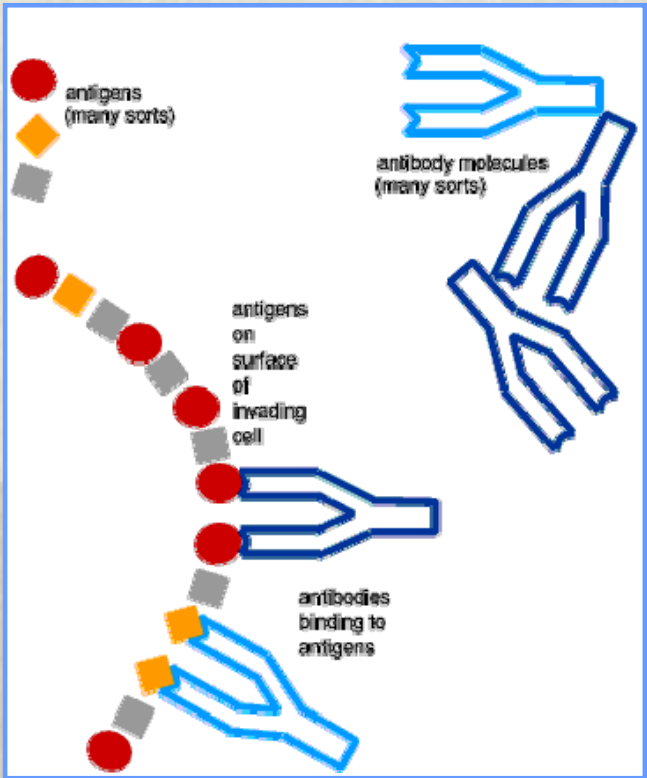
Specifica

Reversibile

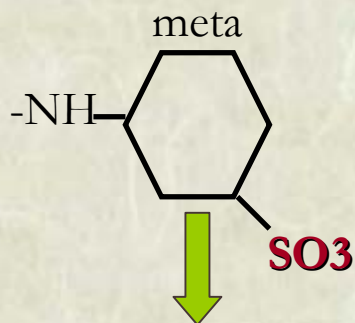
Legami non covalenti

Specificità

Capacità di un singolo sito combinatorio dell'Ab di reagire con un solo determinante antigenico o capacità di una popolazione di molecole anticorpali di reagire con un solo antigene

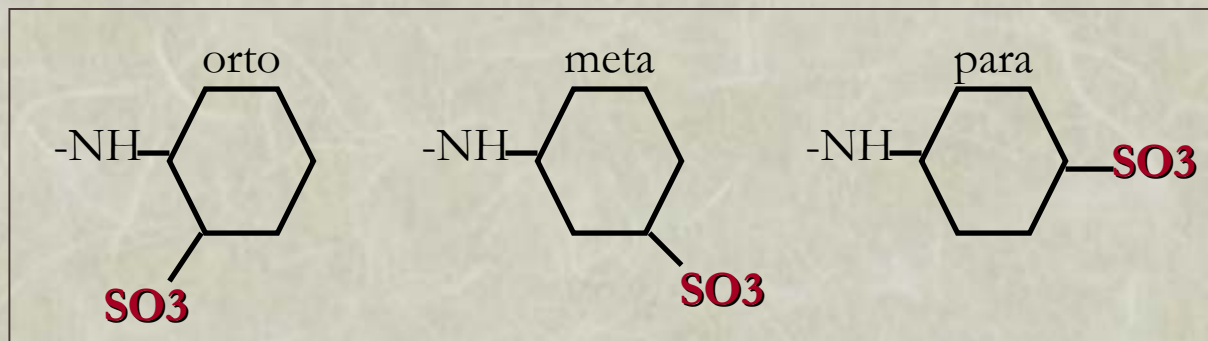


Capacità di distinguere minime differenze nella struttura chimica dell'antigene!!!



Prelievo di siero

Incubazione del siero con



+/-

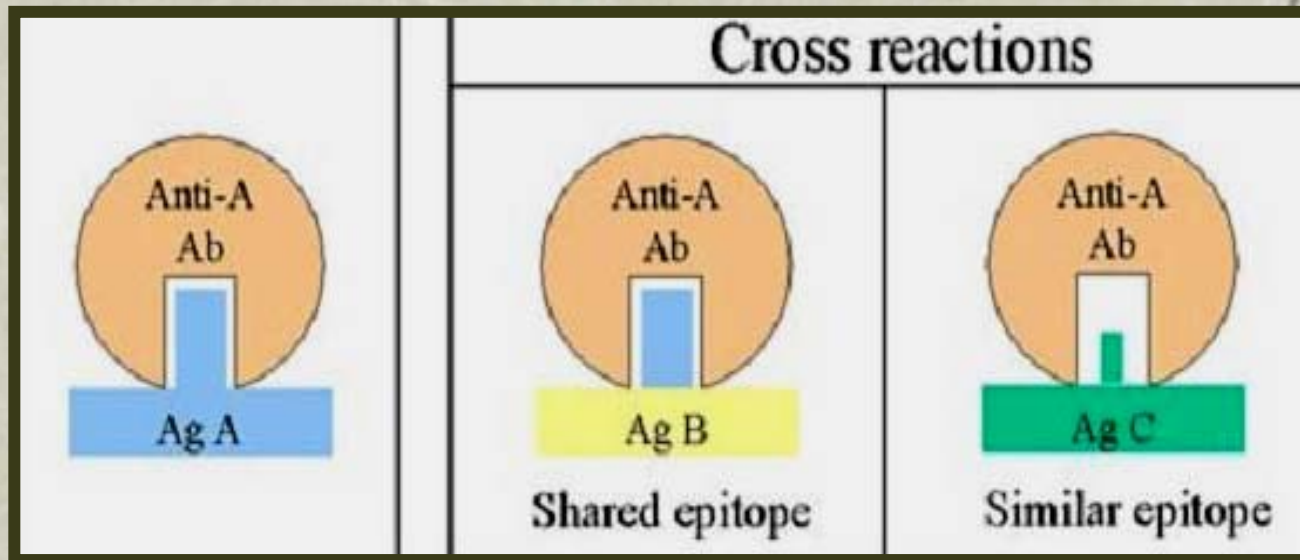
+++

+/-

Legame
dell'anticorpo
all'aptene

MA... Cross-reattività

Tra un anticorpo e due o più antigeni
o tra un antigene e diversi anticorpi



*Gli Ags possiedono determinanti antigenici comuni o
strutturalmente simili!!!!*

Implicazioni....

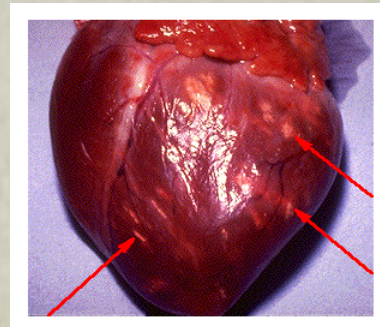
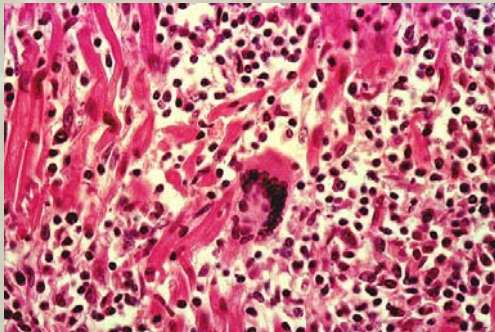
- 1) Malattie infettive
- 2) Malattie autoimmuni
- 3) Scopi diagnostici

Cross-reattività tra gli antigeni di **BRUCELLA ABORTUS** e gli antigeni di alcuni ceppi di **YERSINIA ENTEROCOLITICA**



Cross-reattività tra un antigene di **STREPTOCOCCHI**

beta-emolitici e le **CELLULE MIOCARDICHE**



- 1) Malattie infettive
- 2) Malattie autoimmuni
- 3) Scopi diagnostici



Utilizzo della cross-reattività a fini diagnostici:
Peritonite infettiva del gatto (FIP) e Gastroenterite trasmissibile del suino (TGE)

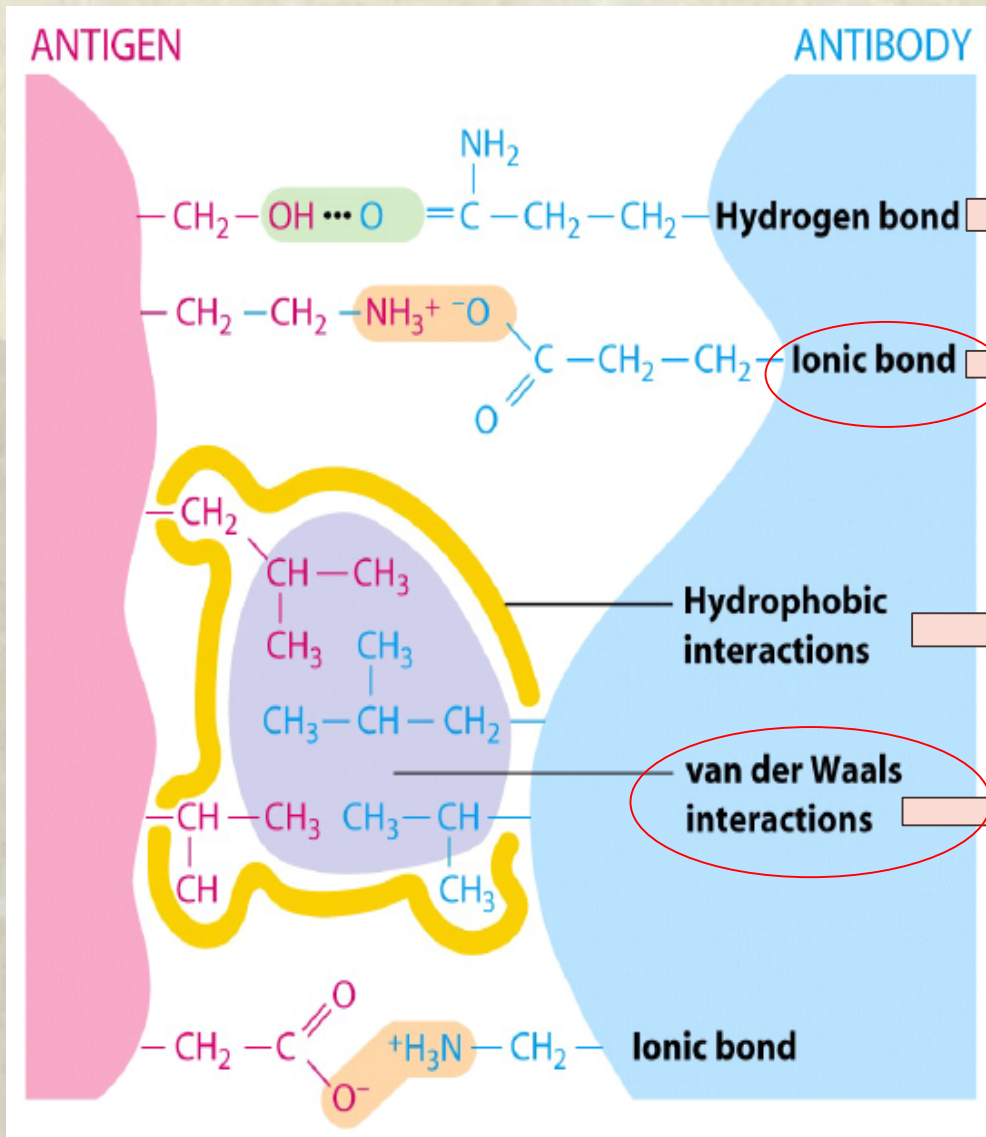


NB: cross-reattività di Abs anti-Ags umani nei confronti di Ags simili o uguali di altre specie (scarsità di Abs animale-specifici!!!)

Monoclonal Mouse
Anti-Human Cytokeratin 5/6
Clone D5/16 B4

FLEX
Polyclonal Rabbit
Anti-Human
Carcinoembryonic Antigen
Ready-to-Use
(Link)

Legami non covalenti



Formazione di ponti a H tra atomi

Forze di attrazione tra gruppi di carica opposta

Legame tra molecole non polari

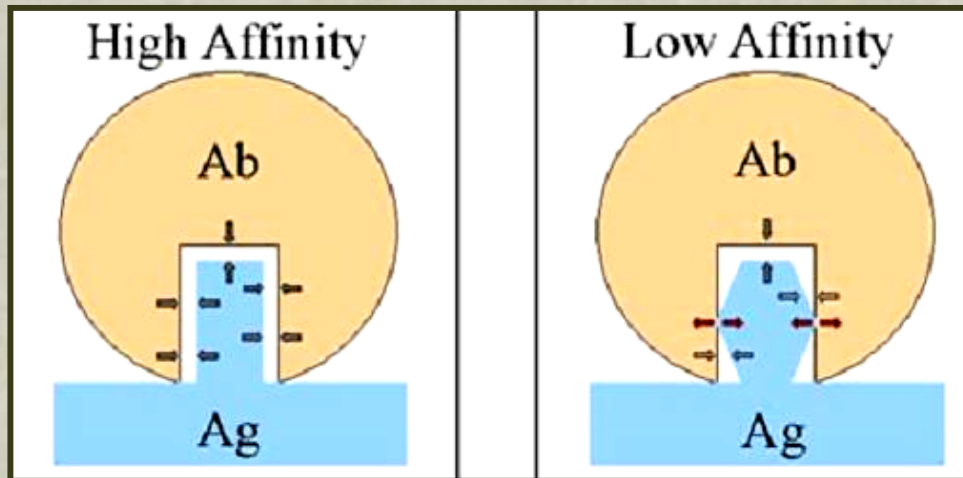
Interazione tra le nuvole elettroniche

Fattori che influenzano la reazione Ag/Ab

- ⌘ Affinità
- ⌘ Avidità
- ⌘ Forma fisica dell'Ag
- ⌘ Rapporto quantitativo Ag/Ab

Affinità

Forza del legame
tra un singolo
determinante antigenico
ed una specifica regione dell'anticorpo



> affinità = interazione più stabile

(> facilità di evidenziare l'interazione)

Risvolto pratico dell'affinità

- 1) Abs ad alta affinità = legame di un maggior numero di Ags in un tempo di incubazione più breve
- 2) > affinità = > diluzione dell'Ab

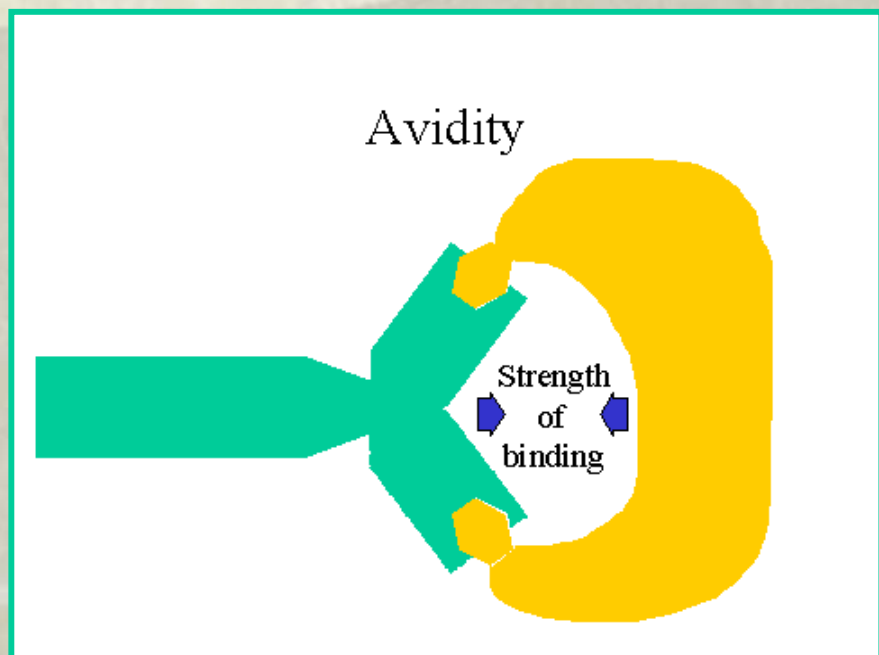
Reazioni Ag-Ab reversibili: possibile dissociazione degli immunocomplessi durante le fasi di lavaggio

-usare Abs monoclonali ad alta affinità

-evitare alte concentrazioni di sali, alte T°, basso pH

Avidità

Forza complessiva del legame

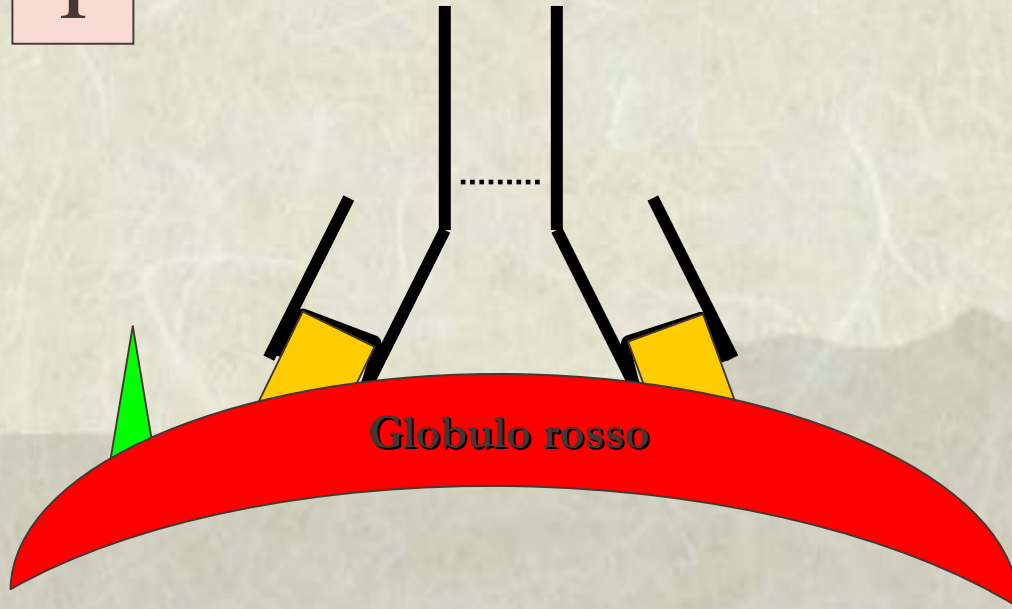


Dipende da....

- 1) Affinità dell'Ab per l'epitopo
- 2) Valenza di Ag e Ab
- 3) Disposizione strutturale delle parti interagenti

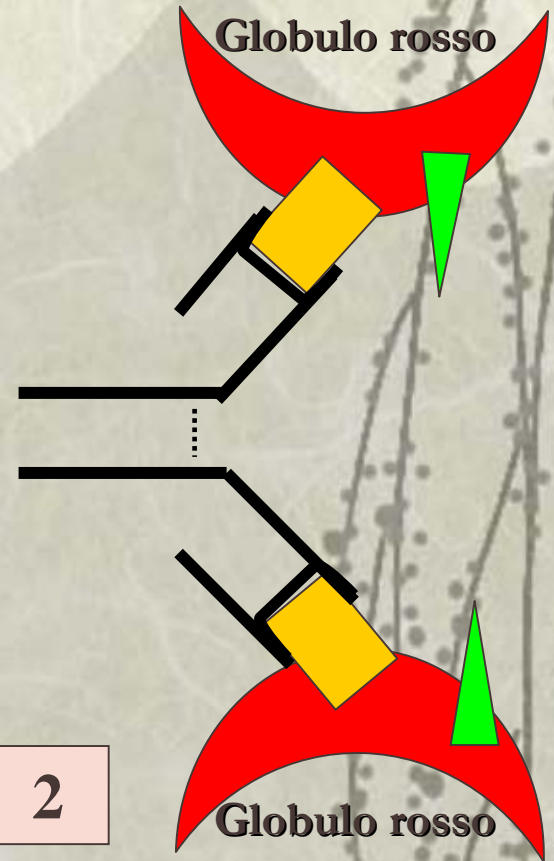
Forza di attrazione tra un Ab e un Ag multivalente (con copie multiple dello stesso epitopo)

1

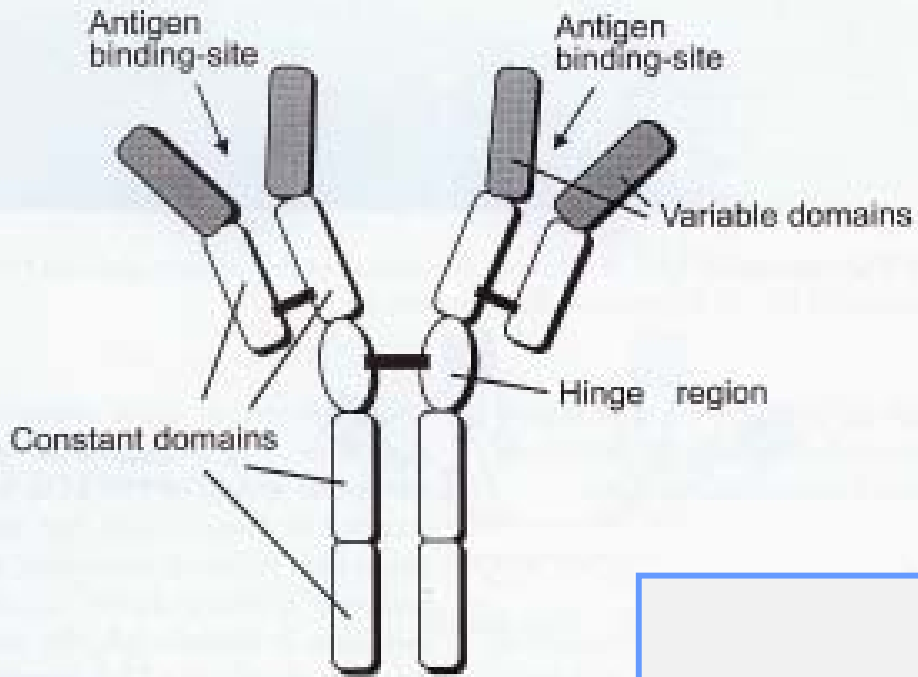


determinante X

2



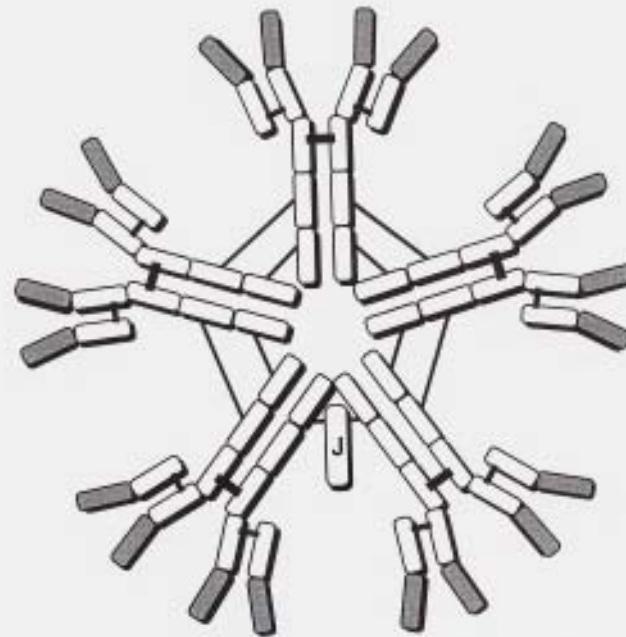
Caso 1: Il tipo di legame aumenta,
a parità di affinità,
l'avidità dell'Ab perché ↓ probabilità
che l'Ab si "stacchi" dall'Ag



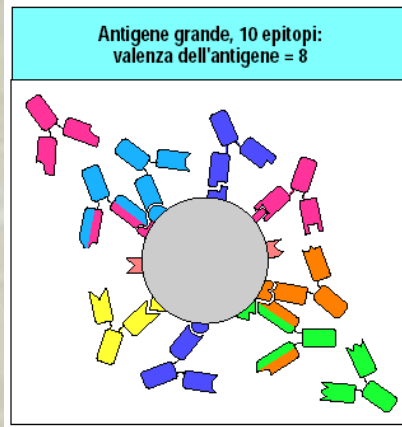
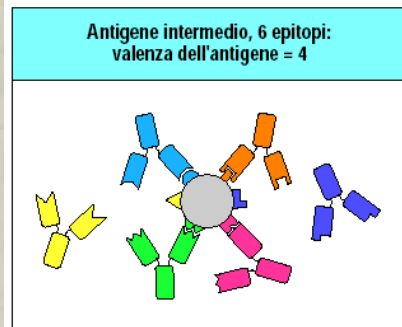
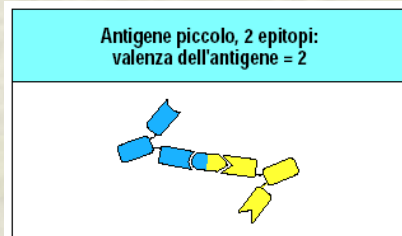
- ✓ > avidità per gli Ags
- ✓ Importanza nella risposta immunitaria...perché?

IgM

IgG

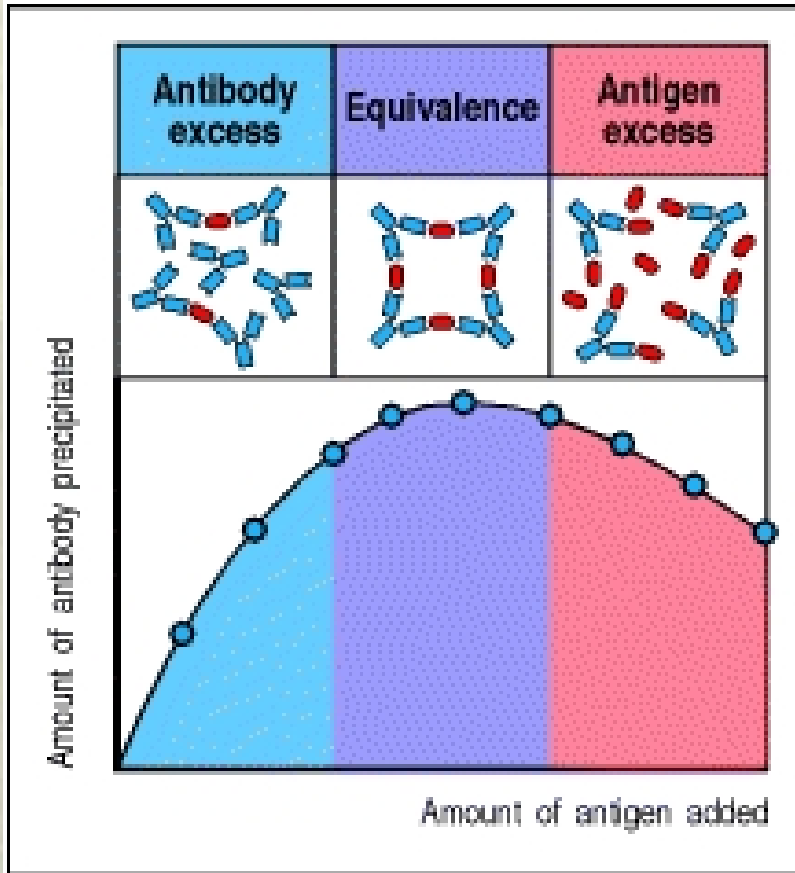


VALENZA dell'antigene: numero di Abs che si può legare ad una molecola antigenica nello stesso momento



VALENZA dell'anticorpo: numero di epitopi antigenici che si possono legare ai siti combinatori dell'Ab nello stesso momento

**IMPORTANZA DELLA VALENZA
NELLE REAZIONI DI
PRECIPITAZIONE....**

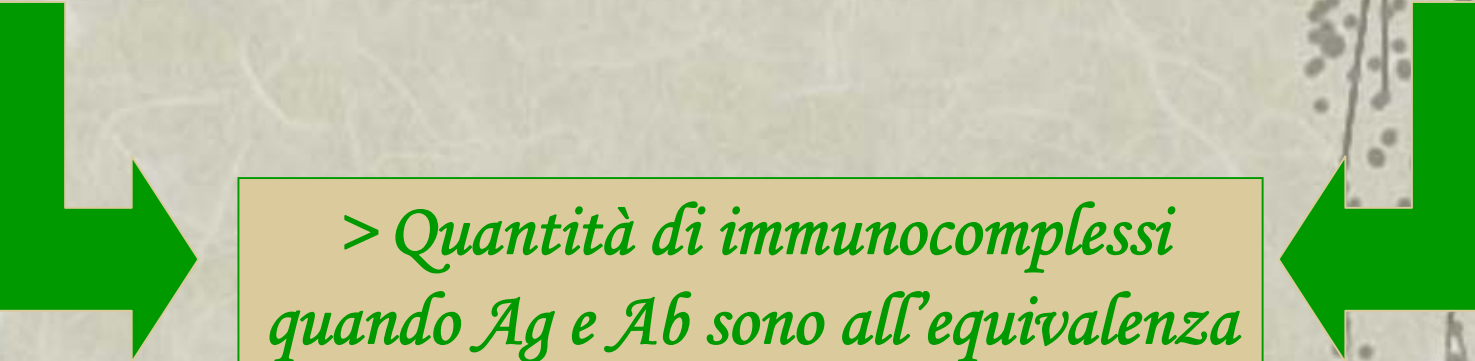


**Reazione di precipitazione
dipendente da.....**

- a. NUMERO DI SITI DI LEGAME DI OGNI Ab PER L'Ag**
- b. NUMERO MASSIMO DI Abs CHE POSSONO ESSERE LEGATI DA UNA MOLECOLA ANTIGENICA**

Rapporto quantitativo Ag/Ab

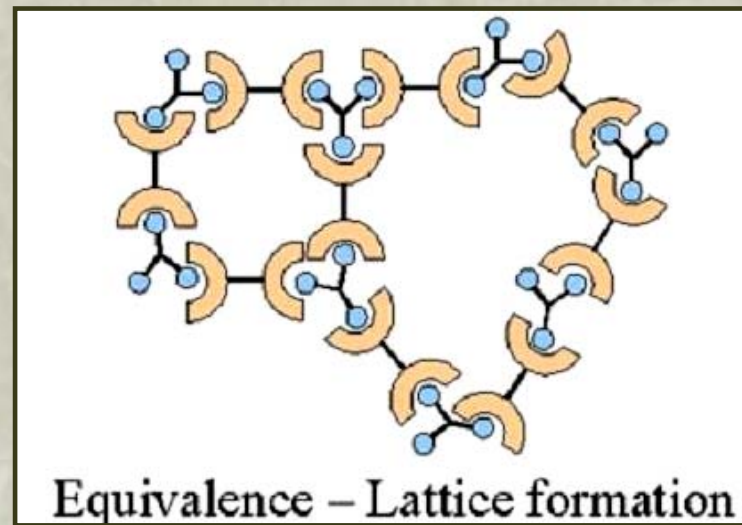
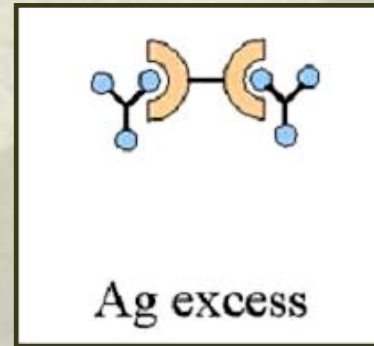
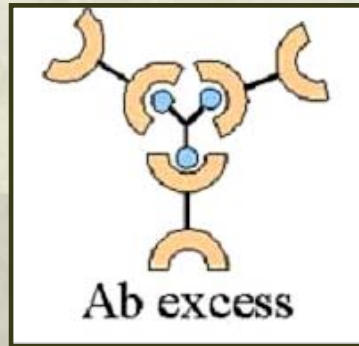
Il rapporto Ag/Ab influenza la rilevazione dei complessi Ag/Ab dato che le dimensioni dei complessi sono correlate alla concentrazione di Ag e Ab



*> Quantità di immunocomplessi
quando Ag e Ab sono all'equivalenza
(saturazione Ab, no Ags o Abs liberi)*

-Complessi di piccole dimensioni (restano in soluzione)

-Un Ag che tiene insieme poche molecole di Ab



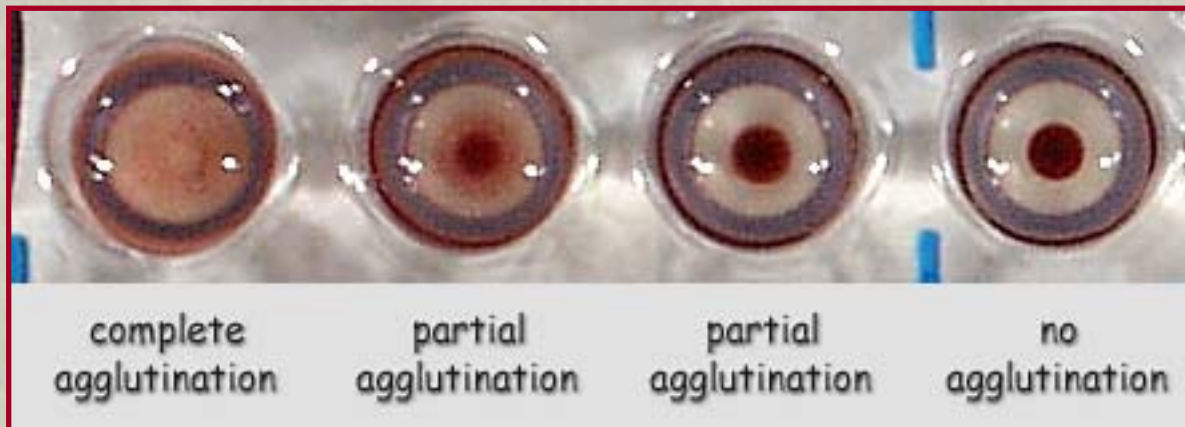
-Complessi di piccole dimensioni

-Un Ab con 2 Ags

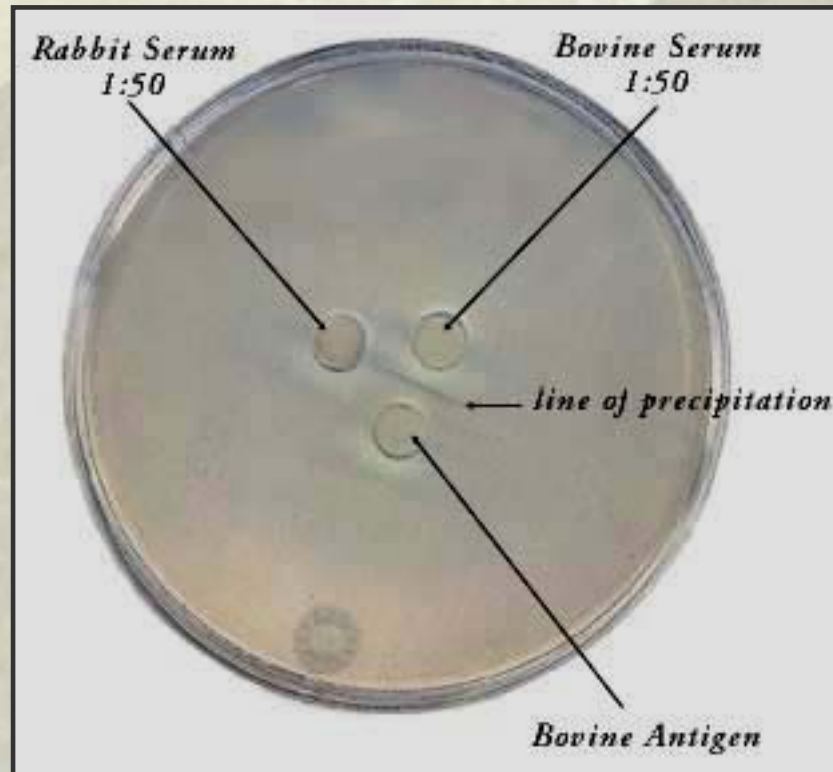
-Complessi lineari, tridimensionali, di grandi dimensioni (facile precipitazione)

Forma fisica dell'Ag

- Antigene particolato in sospensione (eritrociti, batteri, cellule eucariote, parassiti): reazione di agglutinazione



- Antigene solubile in soluzione (es.: tossine batteriche): reazione di precipitazione (formazione di complessi insolubili)



Reagenti comunemente utilizzati nei tests sierologici

- ↳ *Siero* (plasma privo di fibrinogeno)
- ↳ *Complemento*
- ↳ *Antiglobuline*
- ↳ *Anticorpi (monoclonali, policlonali)
coniugati o non coniugati*

Siero

Il sangue prelevato viene lasciato
“a riposo” per almeno 2 h (T° : 10-20°C)

Dopo la formazione del coagulo,
questo viene “scollato” dalle
delicatamente
pareti della provetta,
con una pipetta Pasteur

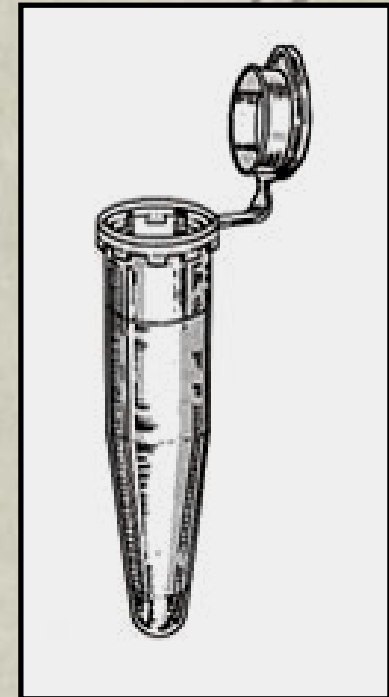


Centrifugazione a 500-1000 g, per allontanare gli eventuali GR rimasti

Se sottoposto subito ad esame, lo si può conservare fino a 2 h a T° ambiente, o fino a 48 h a +4°C

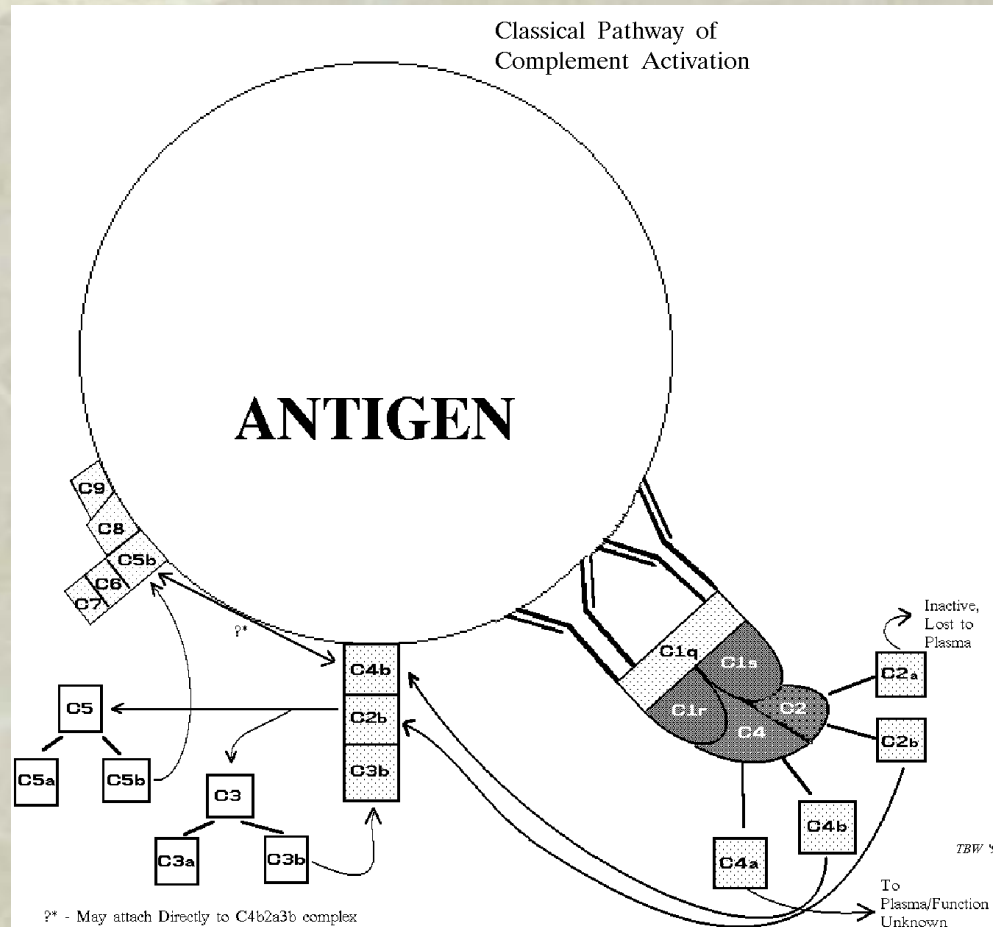
Per il trasporto bisogna utilizzare contenitori termici a +4°C

Per usi successivi,
il siero viene aliquotato
in piccole quantità e
conservato in congelatore a -20°C



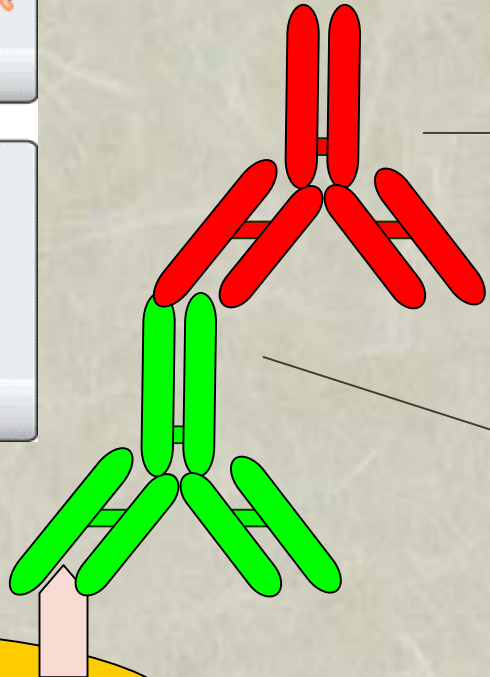
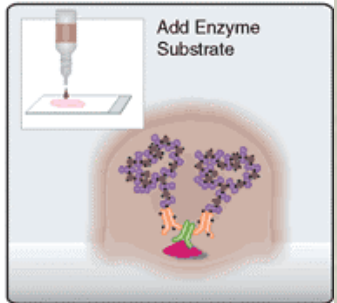
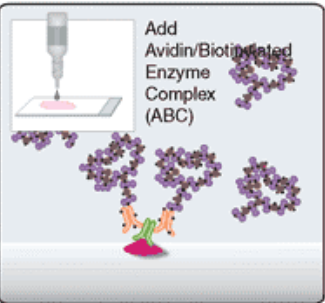
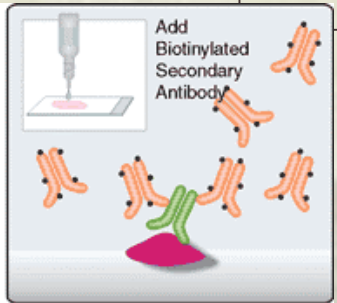
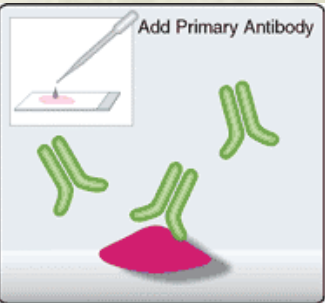
Complemento

- Normale costituente del siero fresco
- Scomplementazione
- Per i tests emolitici, il migliore è quello del siero fresco di cavia (ma anche di uomo e suino)

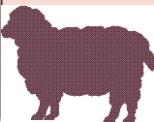


Antiglobuline

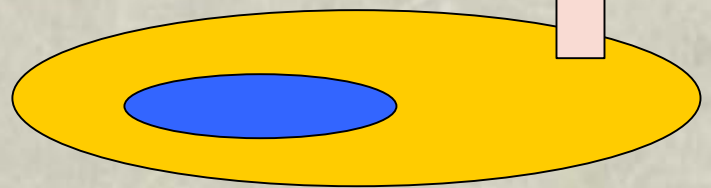

Anticorpi prodotti nei confronti di immunoglobuline di una specie animale inoculate in una specie diversa



sheep anti-mouse IgG



Mouse monoclonal IgG anti-human Ag

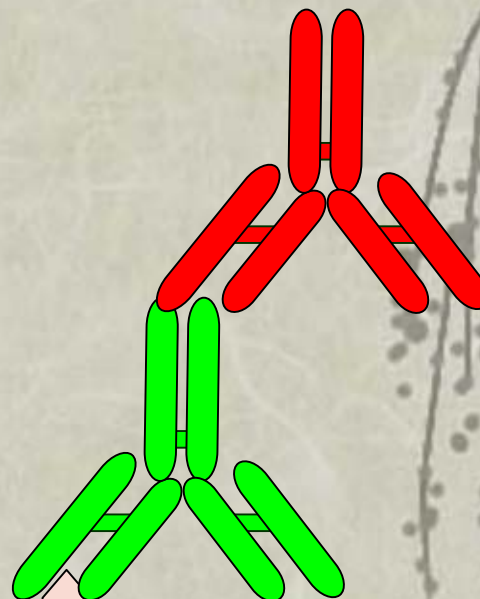
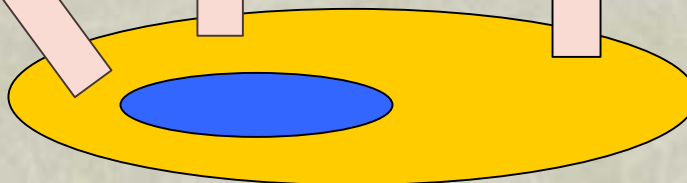


IMPORTANZA DELLA SCELTA DI ANTICORPI SECONDARI NELLE METODICHE INDIRETTE A SECONDA DELLA SPECIE ANIMALE OGGETTO DI STUDIO.....

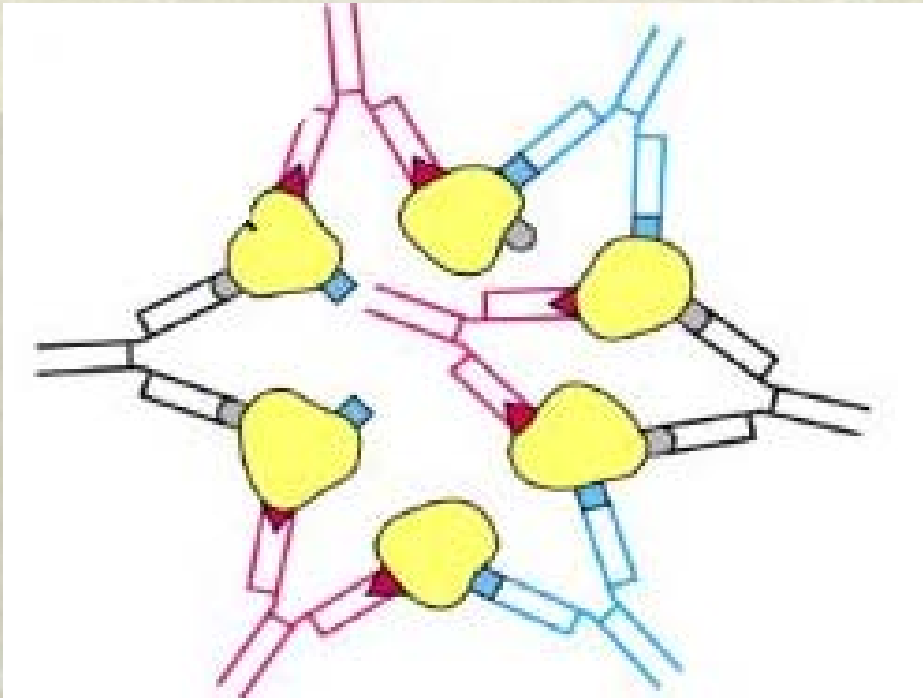


**Caso
B**

**Caso
A**



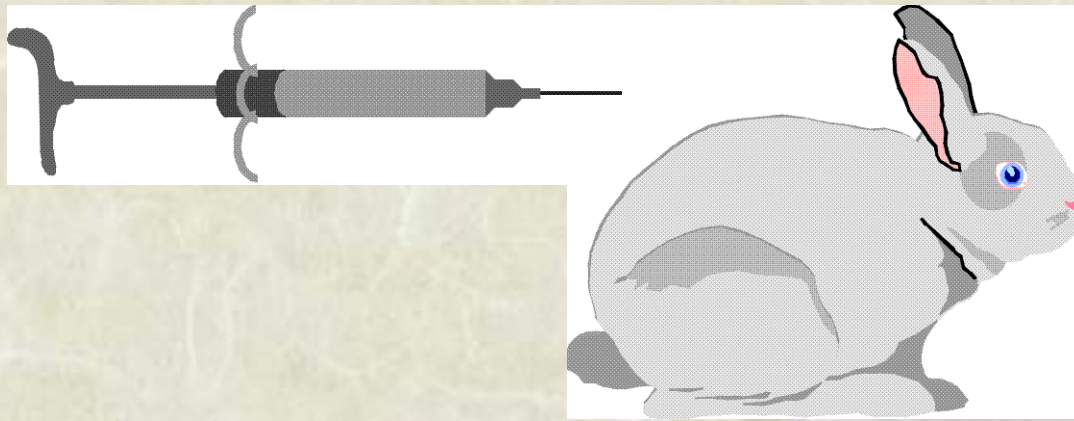
Anticorpi



Anticorpi policlonali

Reagiscono contro i diversi epitopi dell'antigene verso cui sono prodotti (verso tutti gli antigeni presenti nel microrganismo o nel preparato immunizzante)

- ❖ Coniglio, capra, suino, pecora, cavallo, cavia



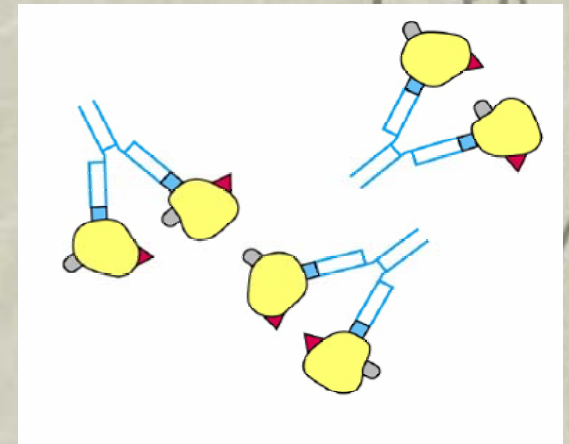
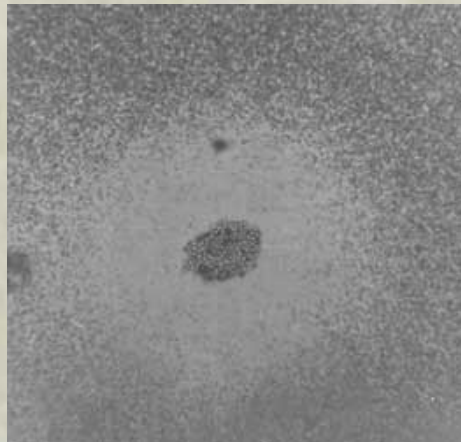
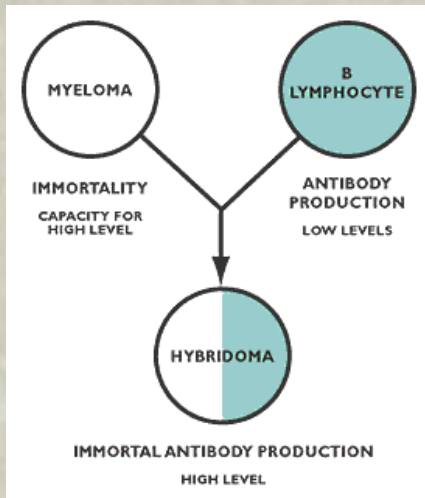
- ❖ Risospensione dell'antigene in una soluzione di adiuvante
- ❖ Inoculazione per via intradermica, s.c., cavità peritoneale
- ❖ Inoculazioni mensili (effetto Booster)
- ❖ Prelievo di sangue dal padiglione auricolare (coniglio), dalla vena giugulare (GA) o dal cuore
- ❖ Purificazione degli anticorpi (cromatografia di affinità)



Anticorpi monoclonali

Anticorpi monospecifici puri,
prodotti da un singolo clone cellulare
immunocompetente

*Milstein e Kohler (1975): tecnica dell'ibridoma per
la produzione di Abs monoclonali*



“Immortalizzazione” di cellule produttrici di Abs
facendole reagire con le cellule neoplastiche

- Alta omogeneità
- Assenza di Abs aspecifici
- Facile caratterizzazione
- Assenza di variabilità (> riproducibilità dei risultati)

Mouse is immunized with antigen X.



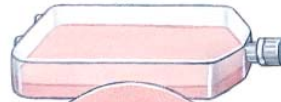
Spleen lymphocytes are removed from mouse.



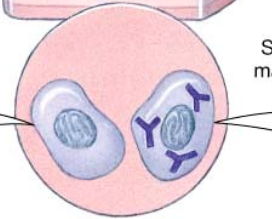
Mouse myeloma cells in tissue culture



Cells are mixed and fused to make hybridomas.



Hybridoma cells are grown in tissue culture.



Select for hybridomas that make antibody to antigen X.

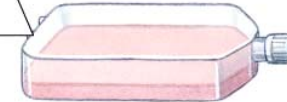


Individual hybridoma cells are cloned.



Desired antibodies are not found.

Specimen is discarded.

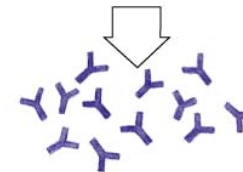


Individual hybridoma cells are cloned.



Antibodies to antigen X are present.

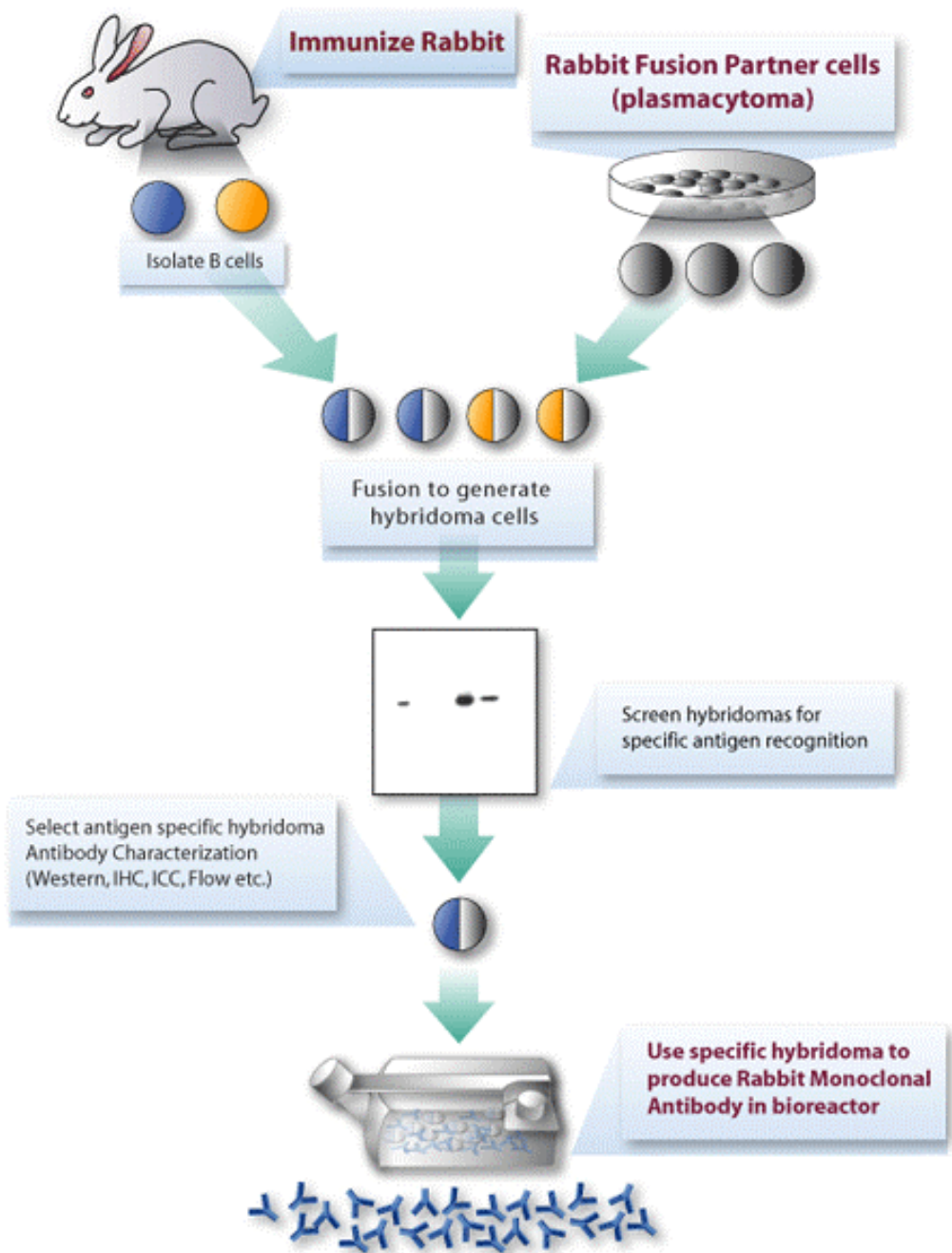
Specimen is saved.



Monoclonal antibodies are purified.

Cloned hybridoma cells are cultured in bulk.

Cellule ibride: capaci di crescere illimitatamente in vitro (mieloma) e di produrre Abs specifici (cellule spleniche)



Vantaggi degli Anticorpi Monoclonali di Coniglio:

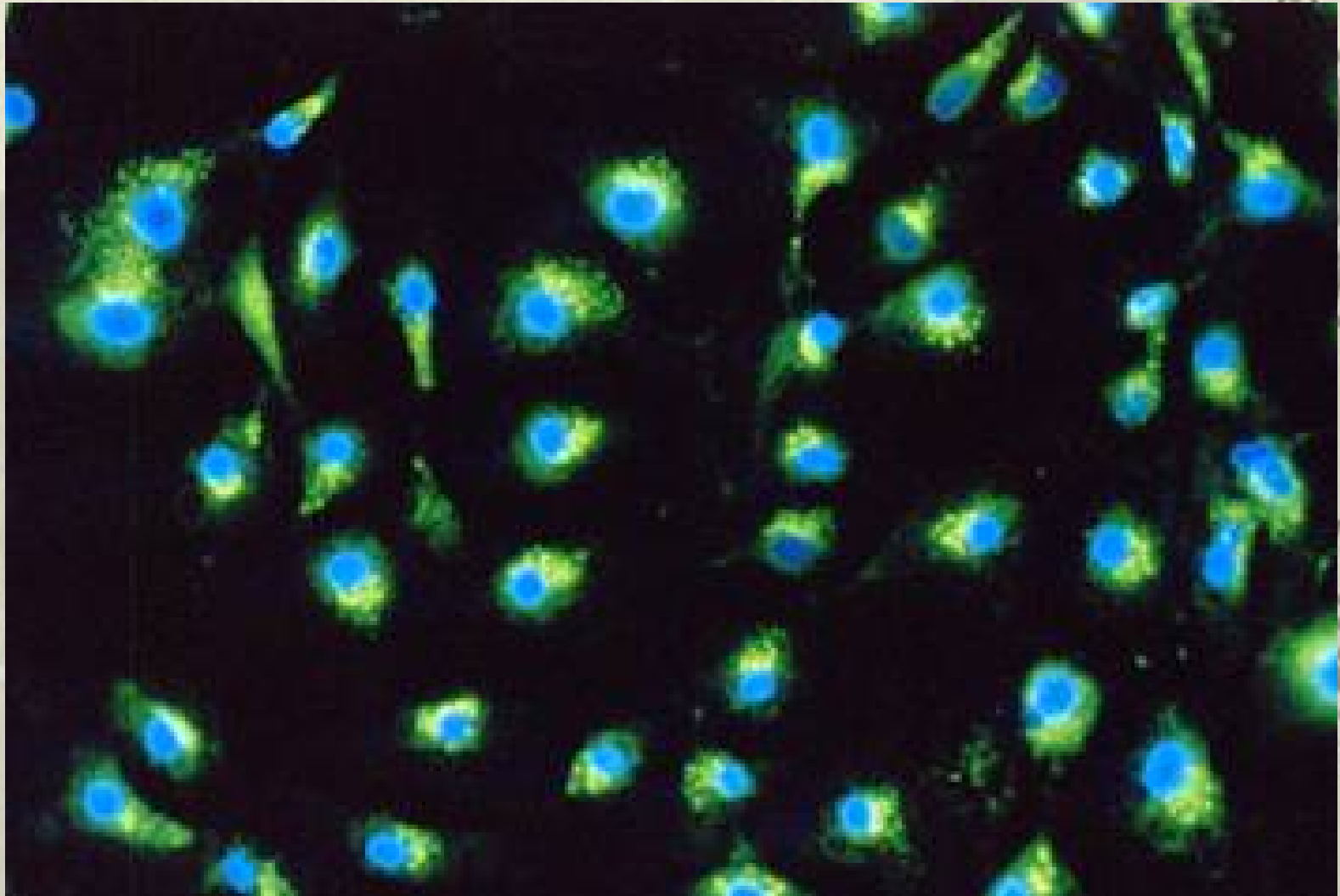
- 1) Affinità superiori
- 2) Maggior sensibilità
- 3) Elevata specificità
- 4) Migliore risposta agli antigeni meno immunogenici
- 5) Miglior segnale con campioni di roditori

Sistema immunitario di coniglio → generazione di una risposta anticorpale diversificata e con maggiore affinità rispetto a topi e ratti

	Ab policlonali	Ab monoclonali
Origine	Varie specie animali (coniglio, cavallo, capra)	+++ topo
Affinità	Variabile	Nessuna variazione
Sensibilità	Alta (identificazione epitopi multipli dello stesso Ag)	Bassa-moderata
specificità	Bassa-alta	Alta
Esigenze di fissazione	ampie	ristrette
Tolleranza alla fissazione	Alta	Bassa
Omogeneità	Variazioni della partita	Nessuna variazione tra le partite
costi	moderata	alti

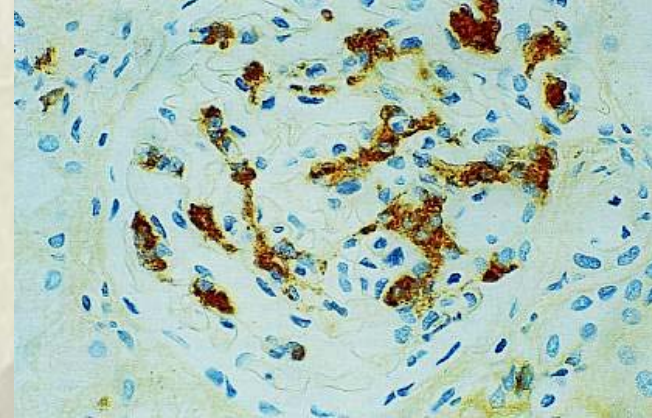
Anticorpi coniugati

Abs coniugati con fluorocromi



Abs coniugati con enzimi

HRP+DAB



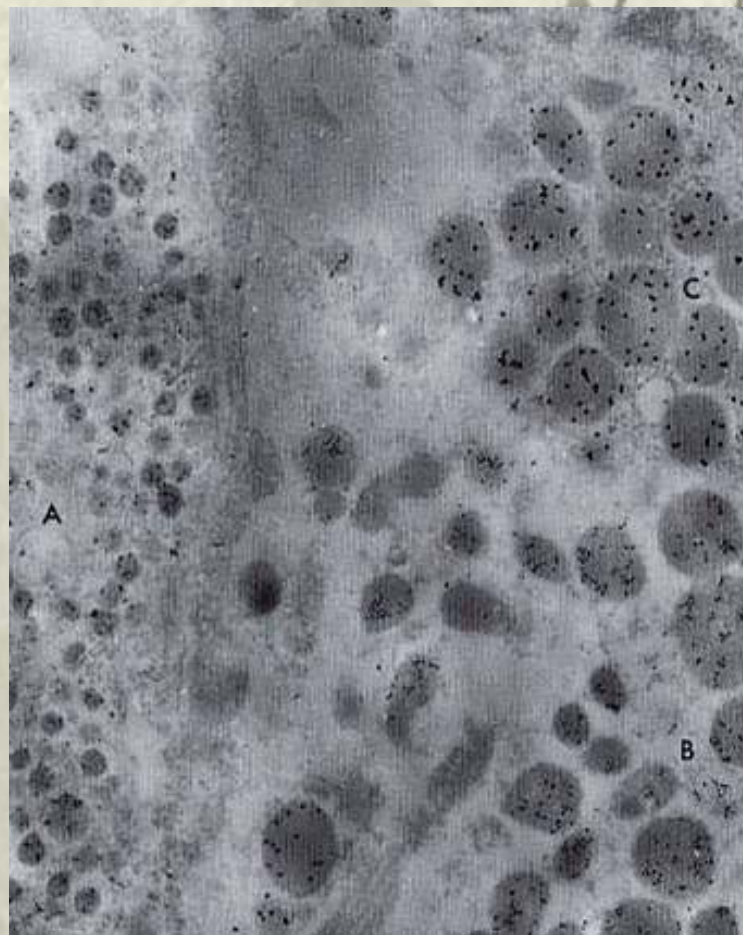
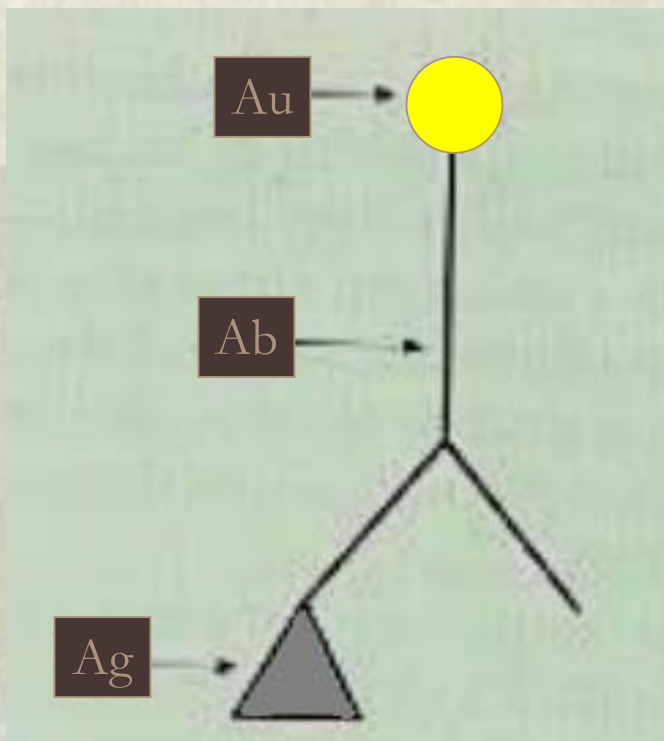
- Perossidasi di rafano (horseradish peroxidase, HRP): scissione di H_2O_2
- Fosfatasi alcalina (AP): rimozione di fosfato da molecole fosforilate

AP+Fast Red

*immunoistochimica,,
ELISA, immunoblotting*

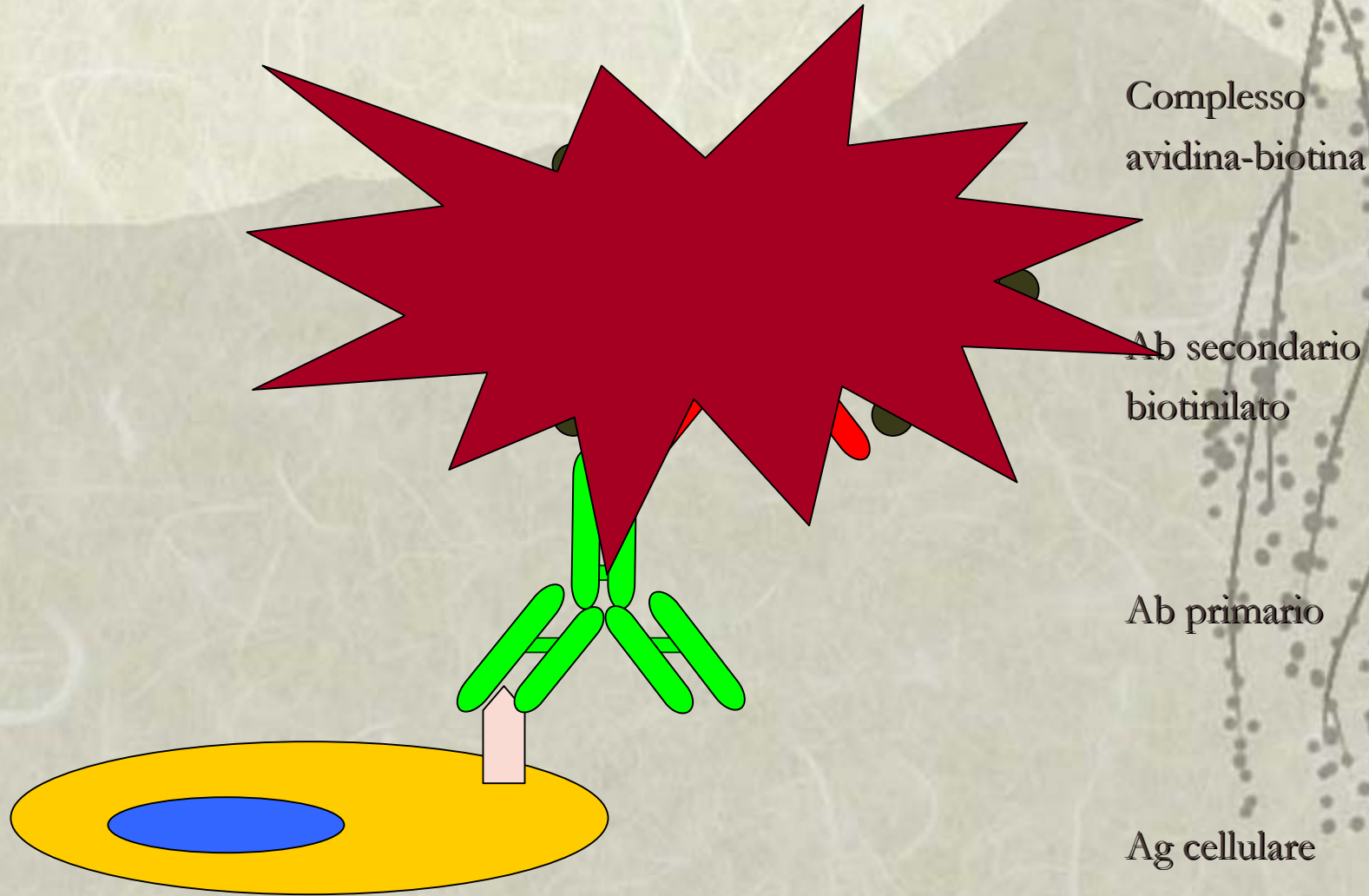


Abs coniugati ad oro colloidale



Abs biotinilati

Substrato cromogeno



Complesso
avidina-biotina

Ab secondario
biotinilato

Ab primario

Ag cellulare

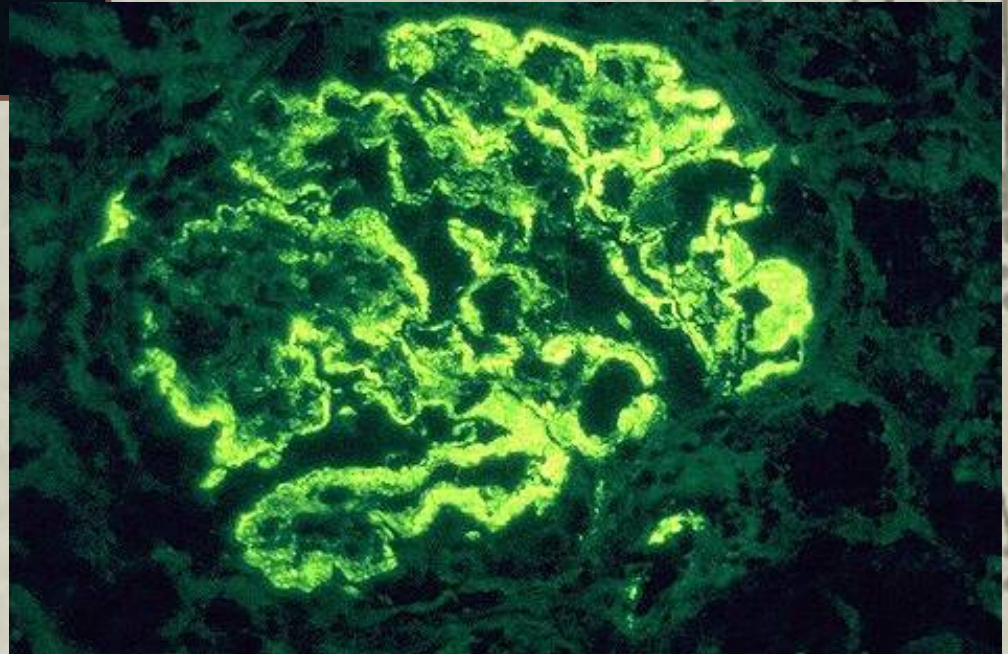
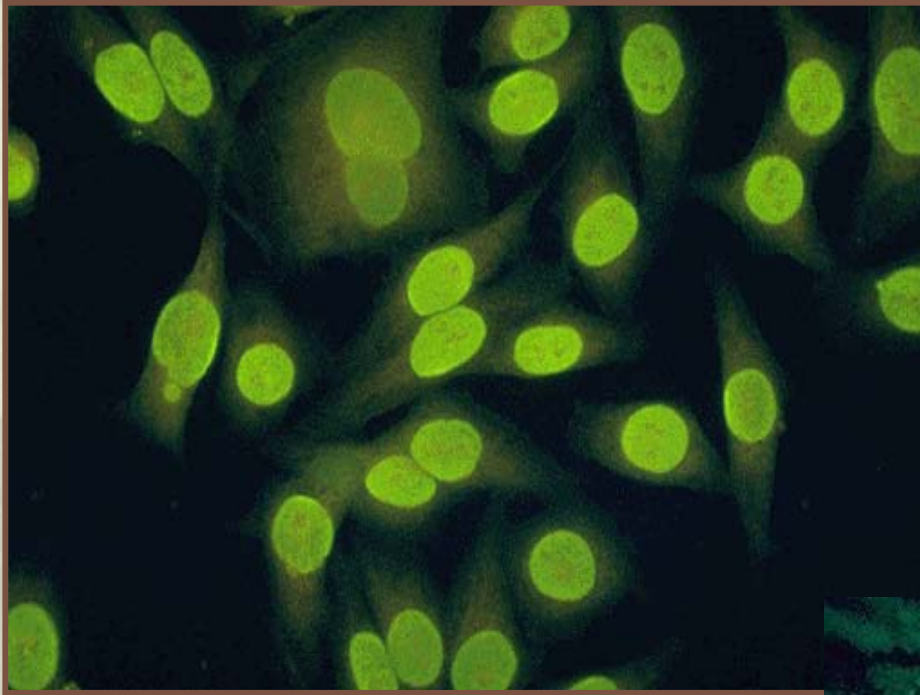
Conservazione degli abs

- ❖ Prodotti liofilizzati o in forma liquida
- ❖ Prodotti liofilizzati mai aperti: conservati a 2-8°C
- ❖ Prodotti liofilizzati ricostituiti: conservazione a 2-8°C per alcune settimane (con l'aggiunta di sodio azide) o alcuni giorni (senza antimicrobico)
- ❖ Divisione in aliquote stoccate a -20°C o -80°C

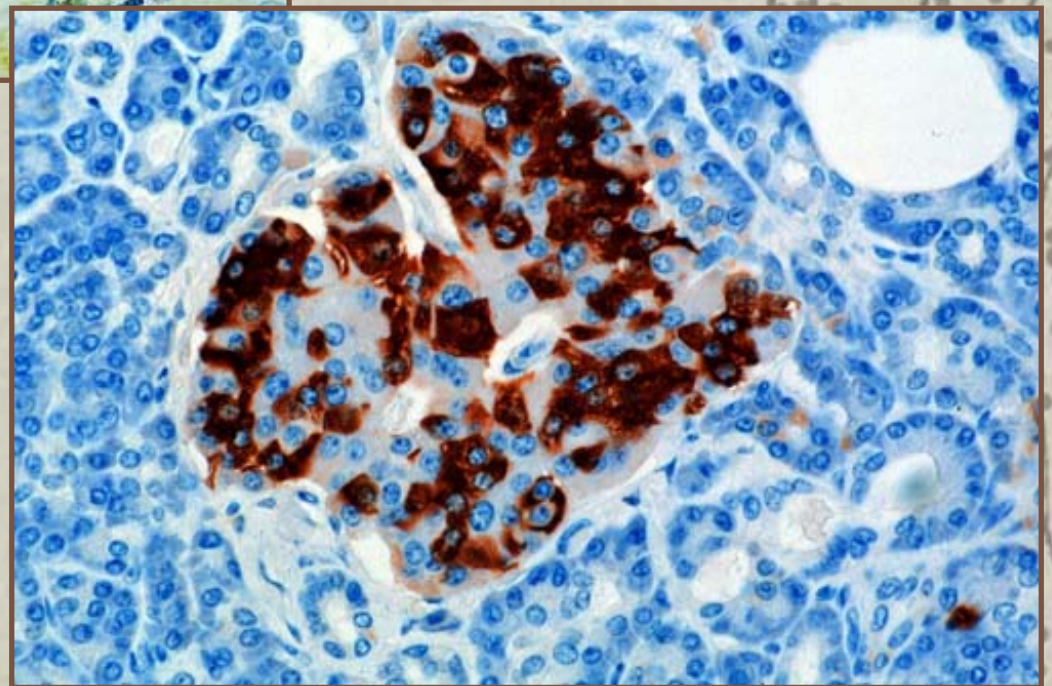
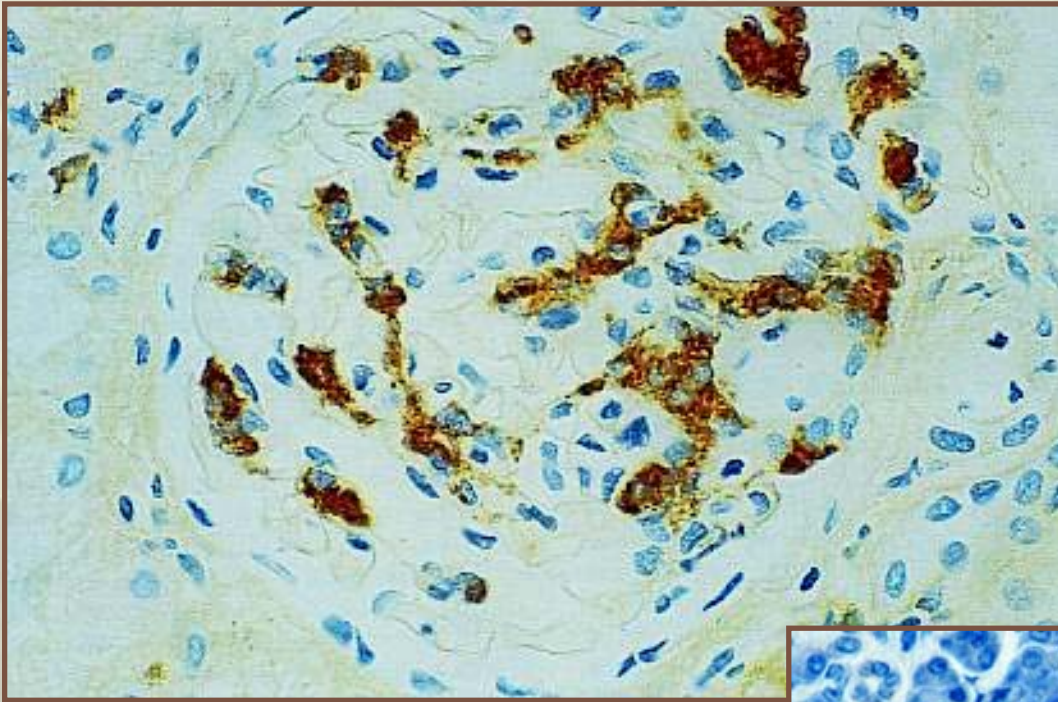
Tests immunologici (sierologici)

- Immunofluorescenza (diretta e indiretta)
- ELISA
- Citofluorimetria
- RIA (RadioImmunoAssay)
- Tecniche immunoistochimiche
- Western Blotting
- Immunolettromicroscopia
- Test di precipitazione: immunodiffusione, immunoelettroforesi
- Tests di agglutinazione
- Test di Fissazione del complemento
- Sieroneutralizzazione

Immunofluorescenza

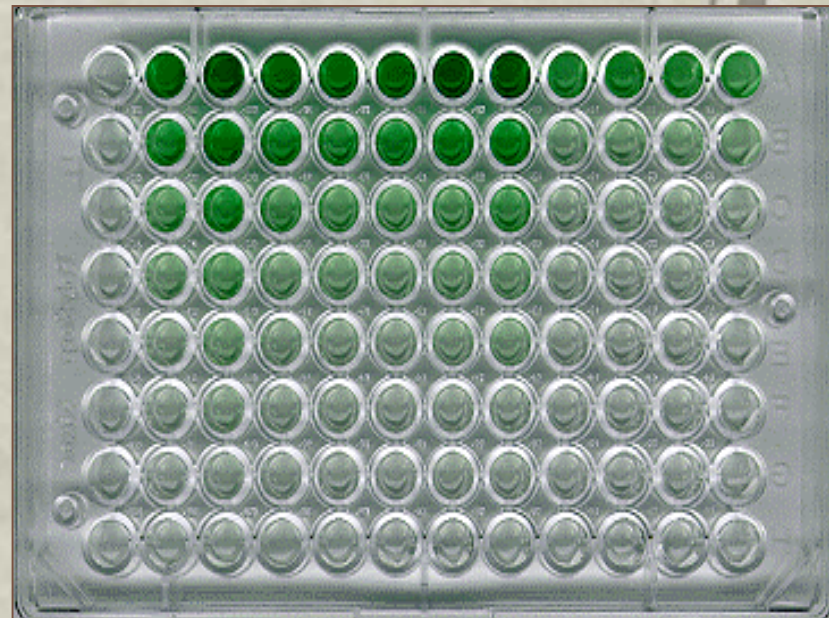


Immunohistochemica

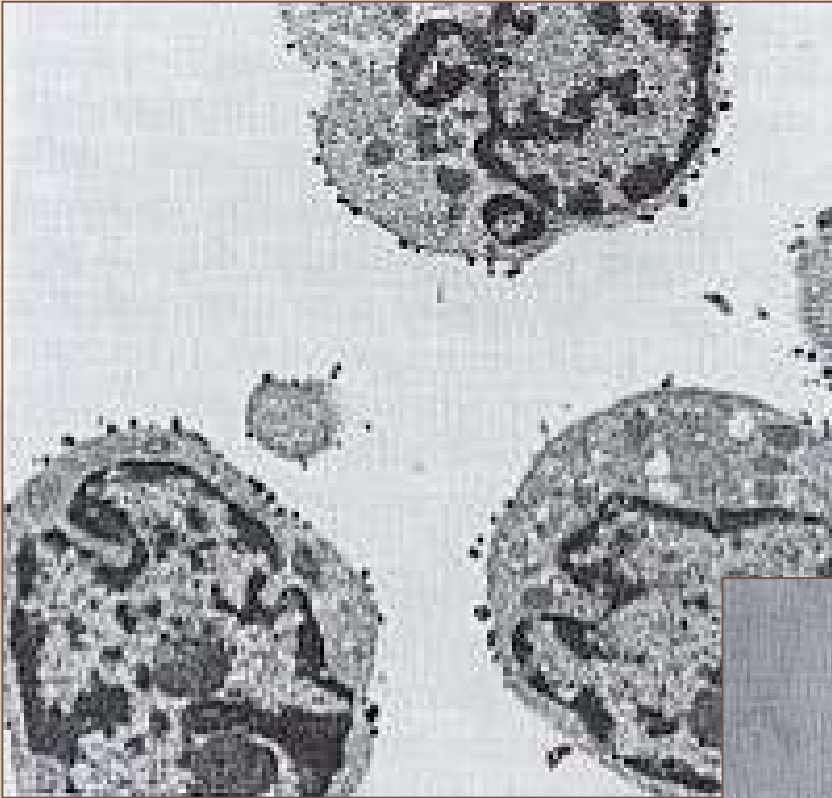


ELISA

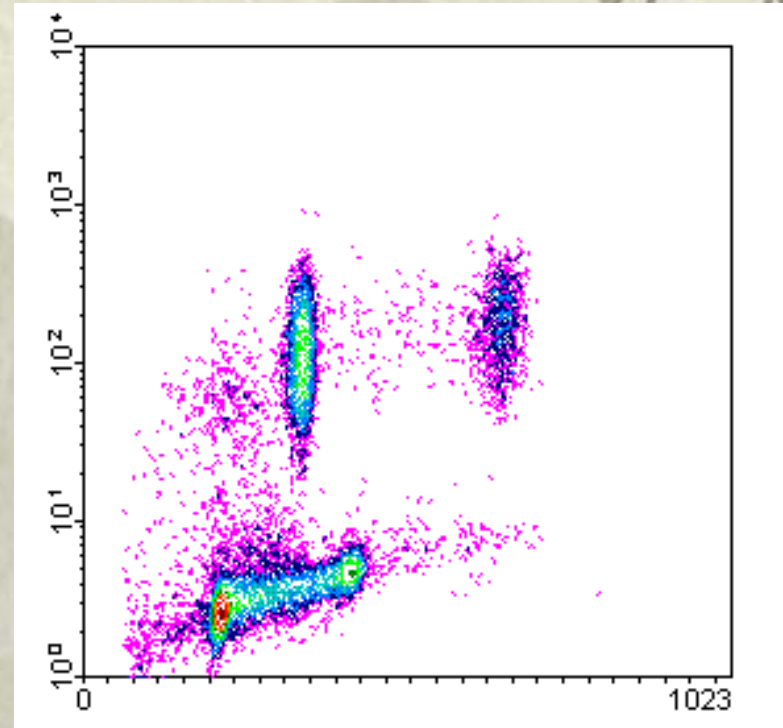
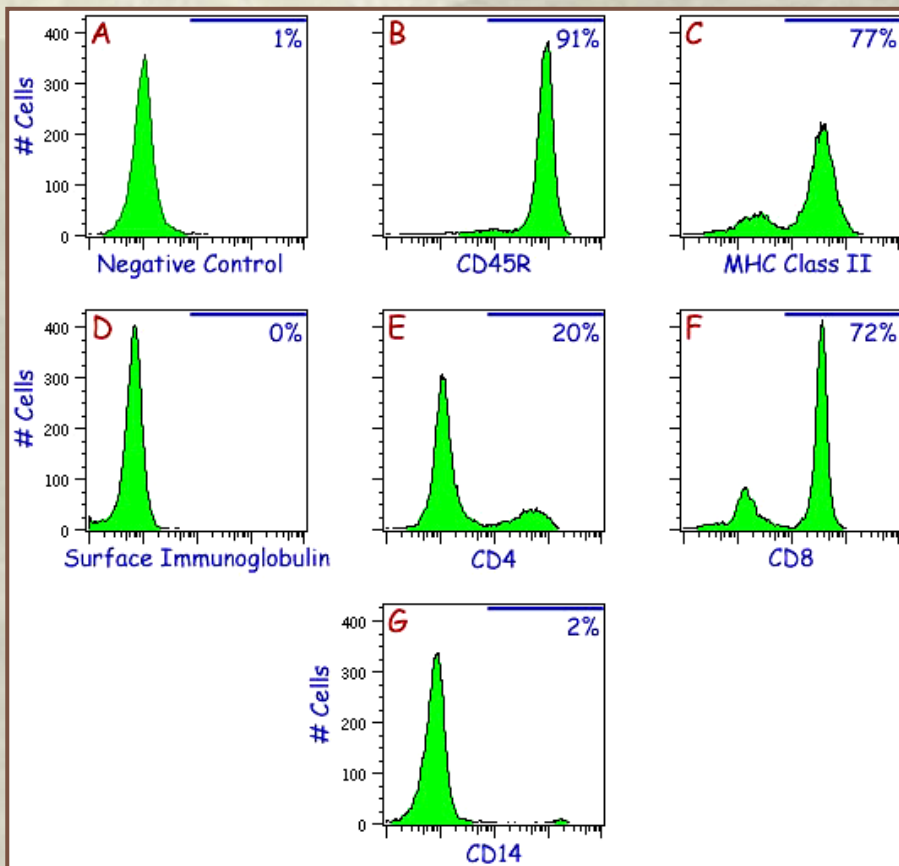
(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)



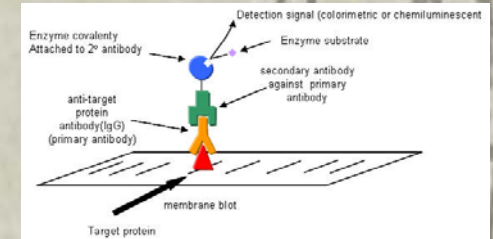
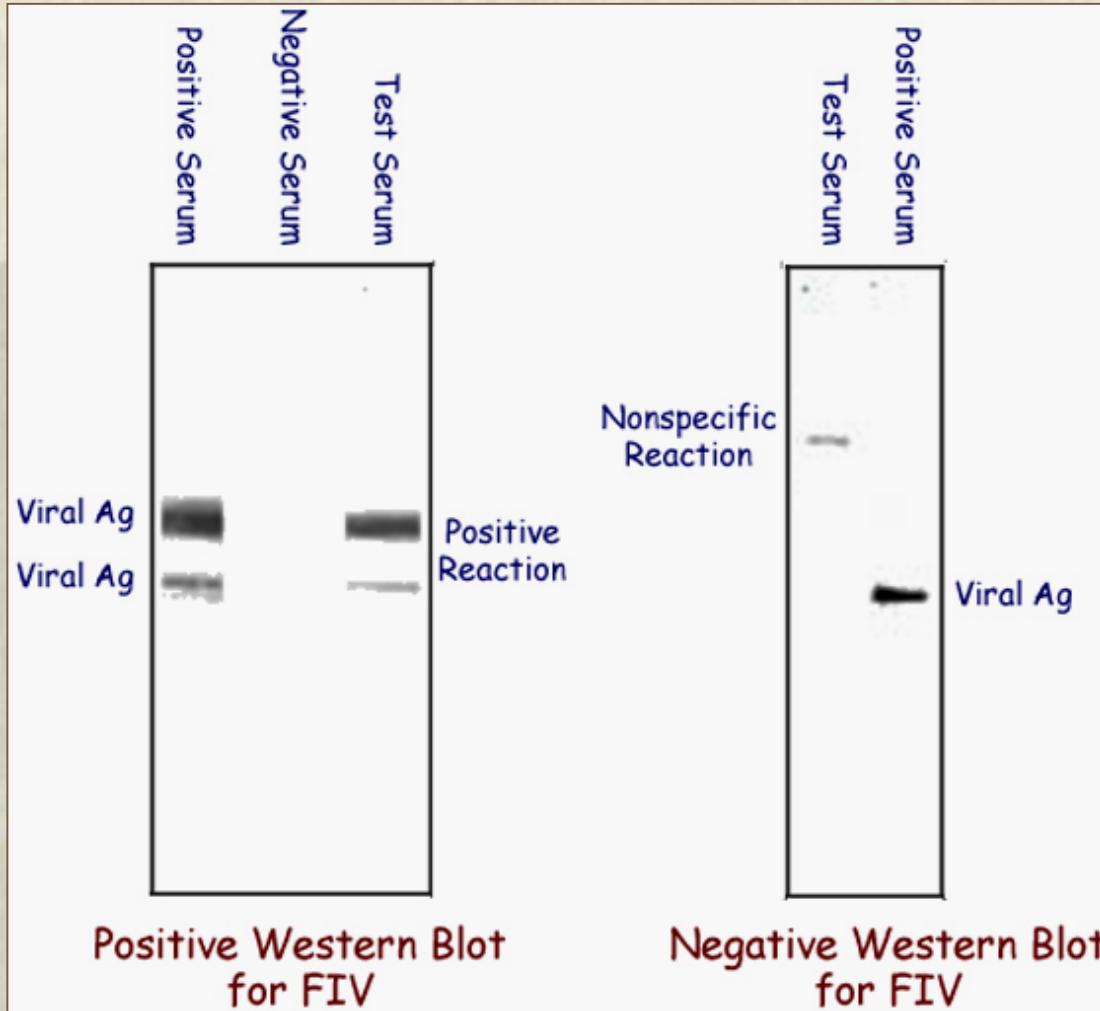
Immunolettronmicroscopia



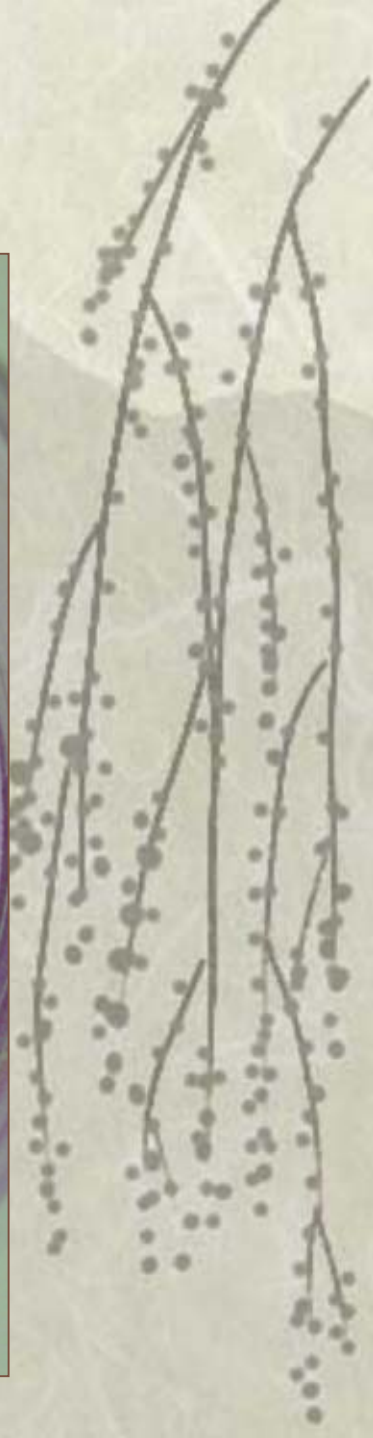
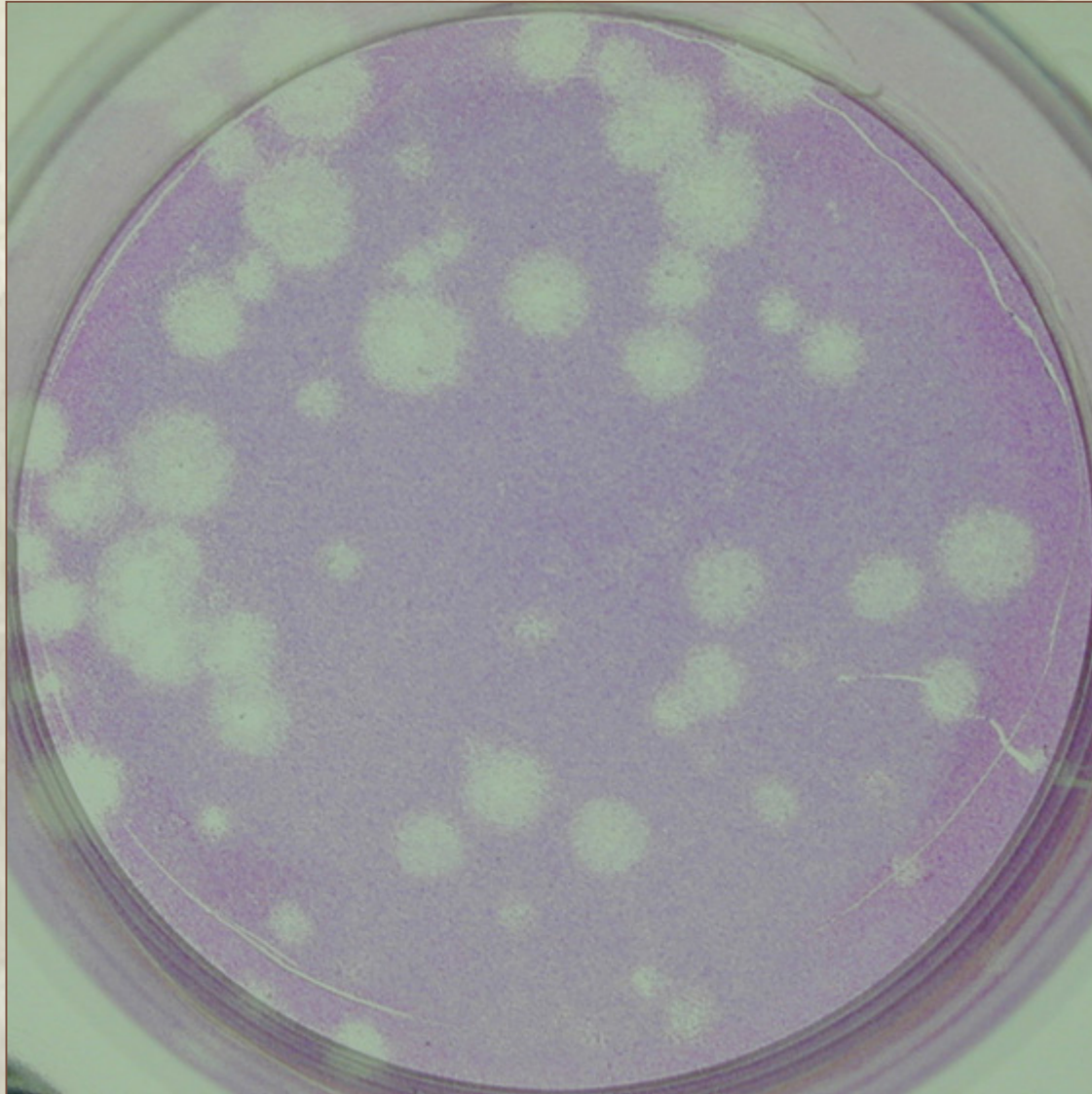
Citofluorimetria



Western blotting



Sieroneutralizzazione



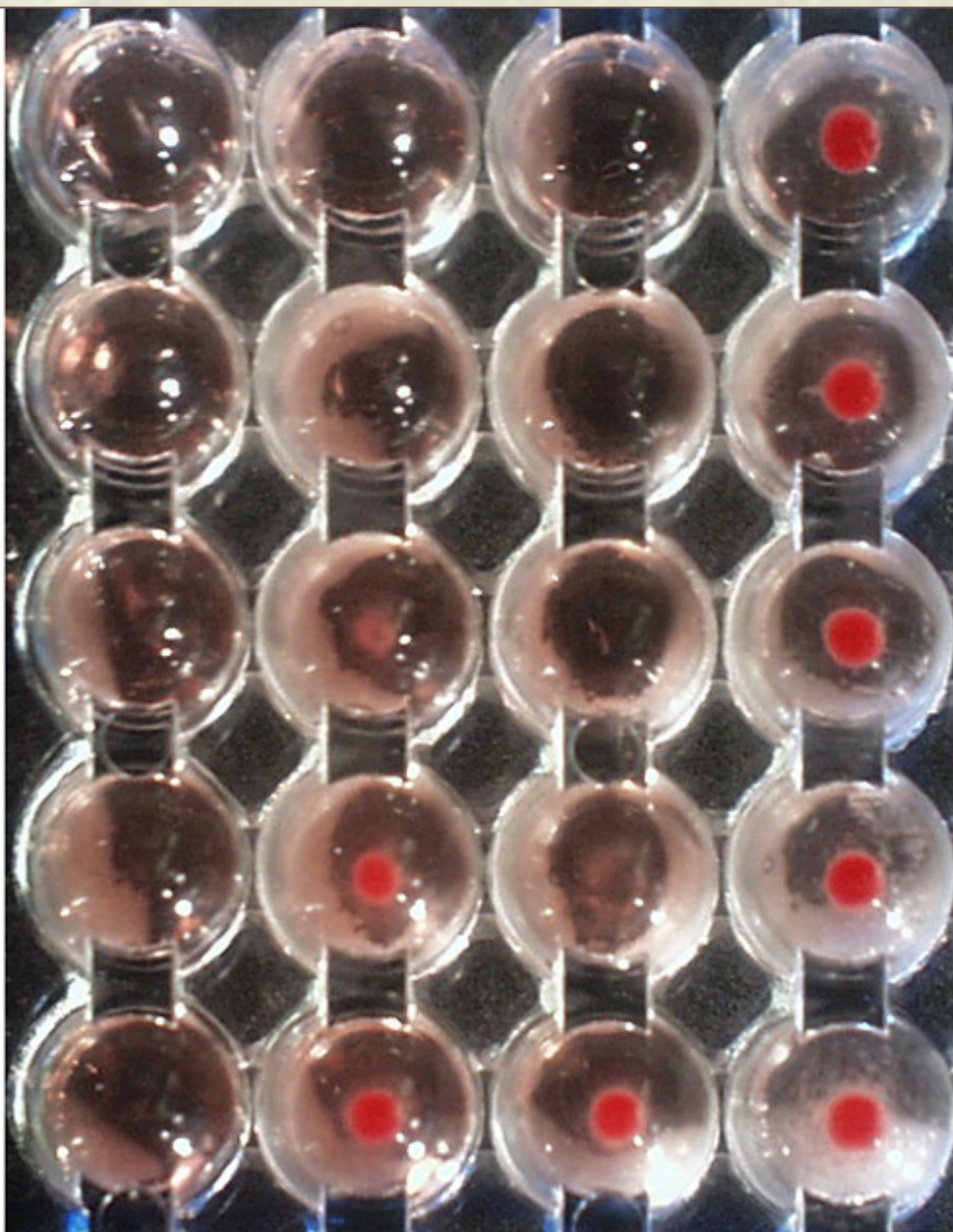
1:64

1:32

1:16

1:8

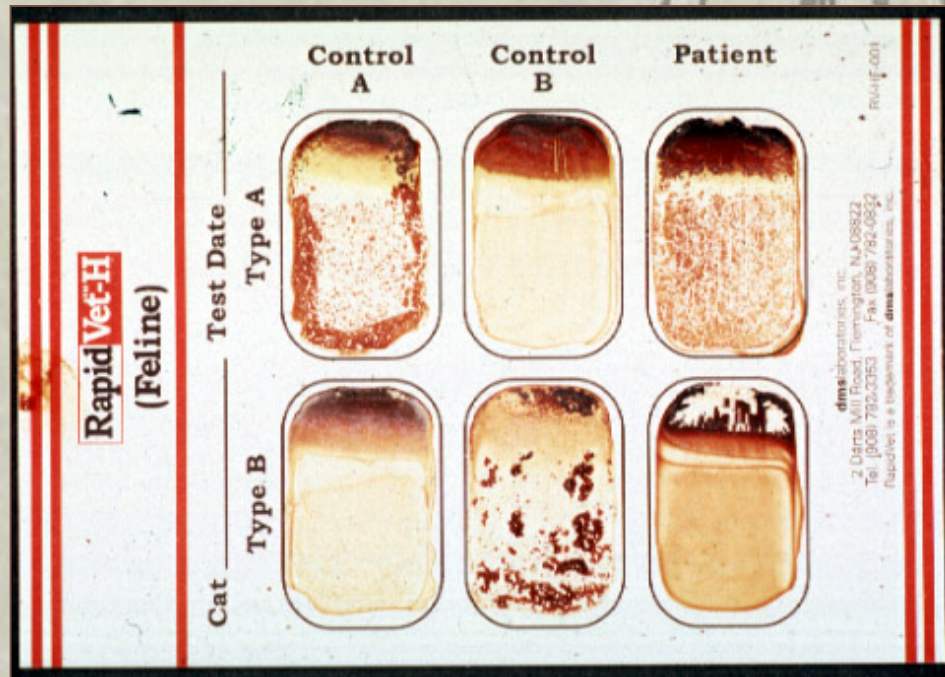
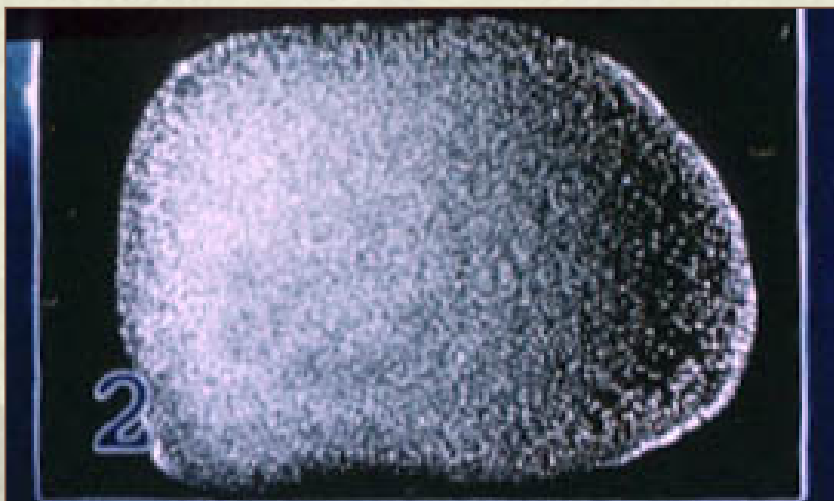
1:4

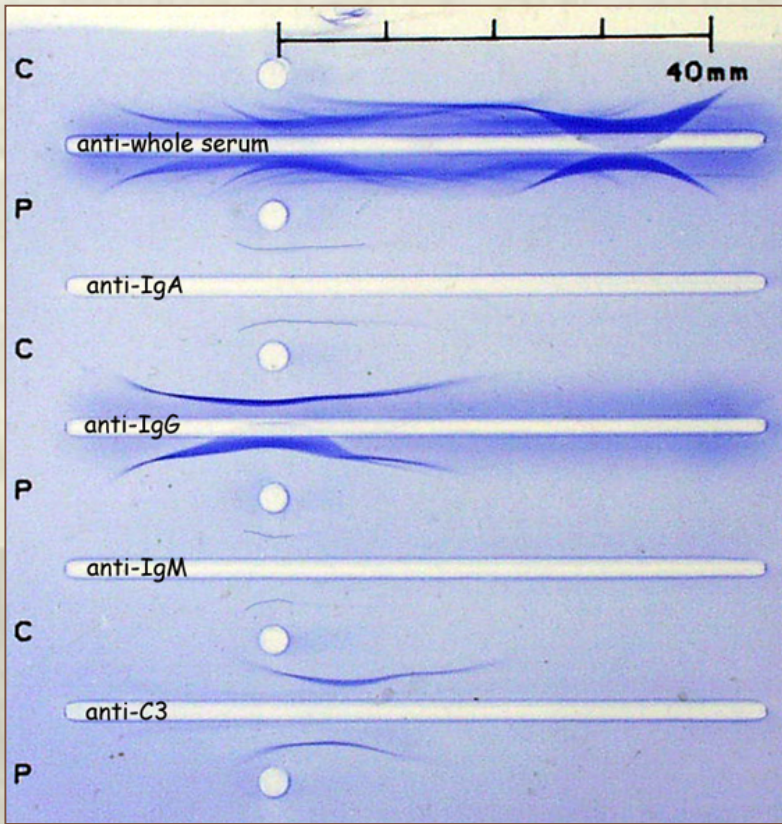


*Fissazione
del complemento*

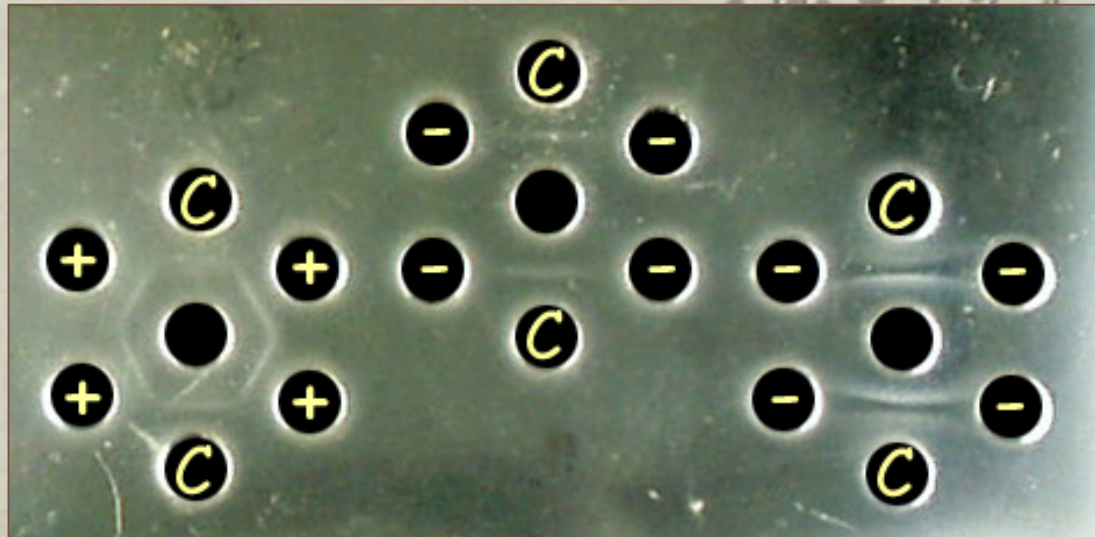


Tests di agglutinazione





Tests di precipitazione

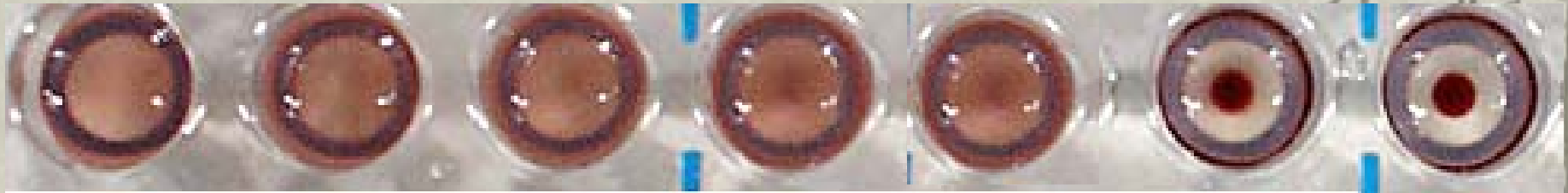


Applicazione delle tecniche sierologiche

- ❖ Ricerca dell'antigene
- ❖ Ricerca degli anticorpi
- ❖ Sieroconversione (siero acuto subito dopo la comparsa dei sintomi e siero convalescente dopo 2-3 settimane) →
- ❖ Dati quantitativi sul contenuto di anticorpi

Aumento del titolo di almeno 4 volte = infezione recente!!!

Titolo anticorpale = ultima diluizione di anticorpo che provoca ancora la reazione con una concentrazione fissa del corrispondente antigene



1:20

1:40

1:80

1:160

1:320

1:640

1:1280



...Altre applicazioni...

❖ Esami scientifici per spiegare eventi “miracolosi”



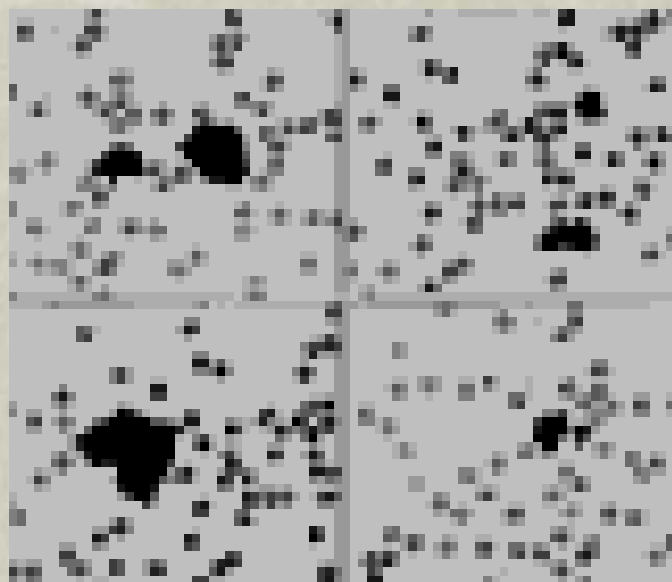
Miracolo eucaristico di Lanciano (VIII secolo): trasformazione dell'ostia in un pezzo di carne e del vino in sangue coagulato)



Esame istologico della “carne miracolosa” (vero cuore!!!)

Test di emoagglutinazione

Esame istologico del “sangue miracoloso”



SIERO ANTI-A

SIERO ANTI-B

Gruppo sanguigno AB

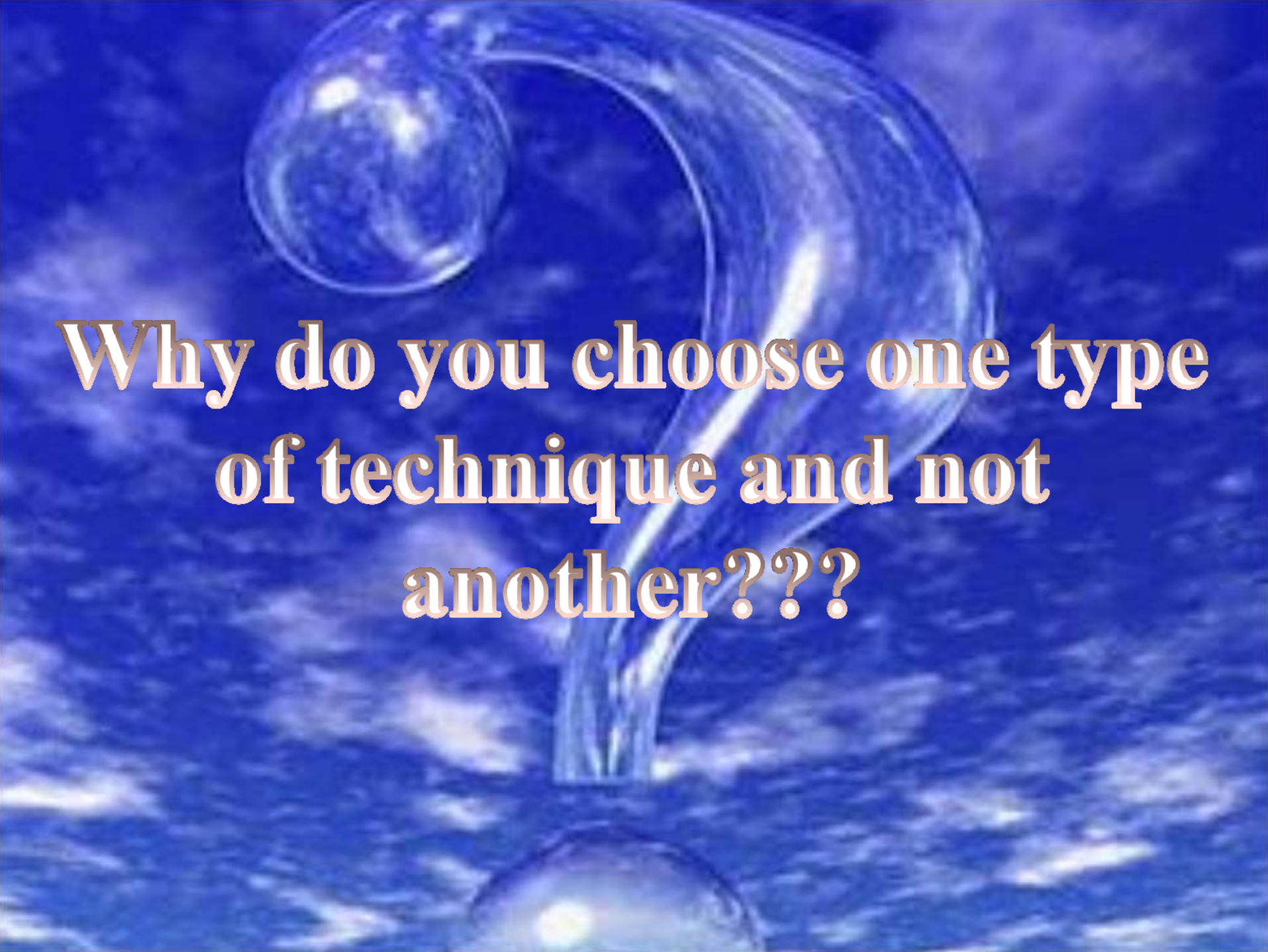


❖ Analisi di reperti archeologici:

- determinazione del gruppo sanguigno in reperti di ossa
- rilevazione di Hb in ossa di 4500 anni

❖ studi di medicina legale

- ❖ analisi degli alimenti (rilevazione di microrganismi patogeni)



**Why do you choose one type
of technique and not
another???**

WB **IF** **ELISA** **IHC**

Espressione di proteine???

X

X

X

X

Down- o up-regulation delle
proteine???

X

X

X

X

Localizzazione cellulare???

X

X

X

Modificazioni post-
traslazionali???

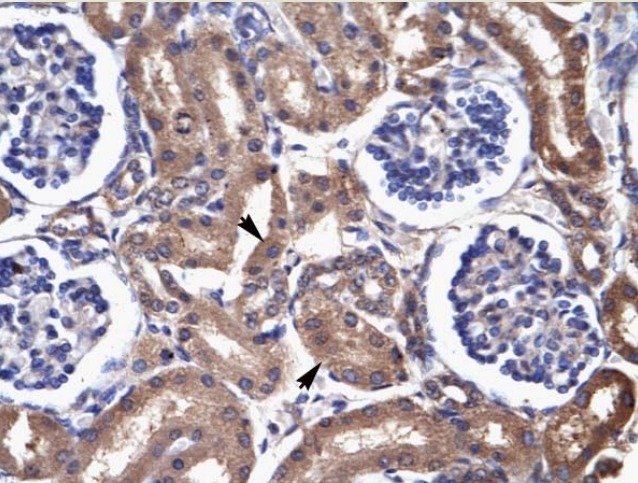
X

Profilo proteico/metabolico???

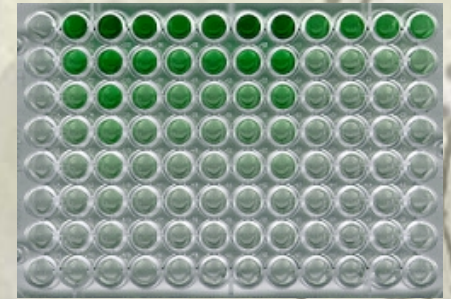
X

	WB	IF	ELISA	IHC
Espressione di proteine???	X	X	X	X
Down- o up-regulation delle proteine???	X	X	X	X
Localizzazione cellulare???		X	X	X
Modificazioni post- traslazionali???	X			
Profilo proteico/metabolico???	X			

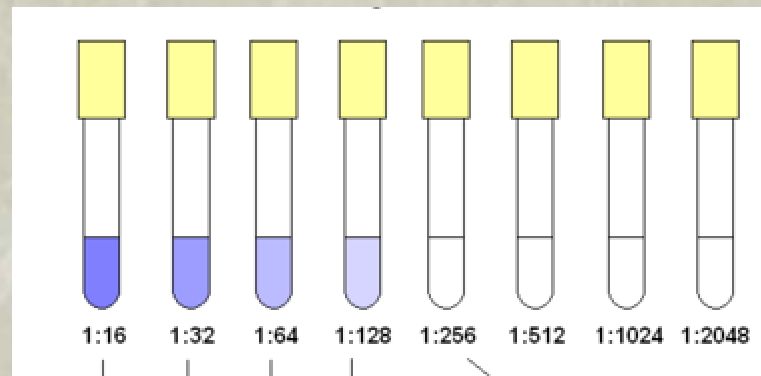
Qualitativa?



Quantitativa?



semiquantitativa?



SENSITIVITY

PROPORZIONE DEI +
IDENTIFICATI COME TALII

$$\frac{\text{number of True Positives}}{\text{number of True Positives} + \text{number of False Negatives}}$$

SPECIFICITY

PROPORZIONE DEI -
IDENTIFICATI COME TALII

$$\frac{\text{number of True Negatives}}{\text{number of True Negatives} + \text{number of False Positives}}$$

		CONDIZIONE	
		positivo	negativo
TEST OUTCOME	positivo	TRUE POSITIVE	FALSE POSITIVE
	negativo	FALSE NEGATIVE	TRUE NEGATIVE

TEST DIAGNOSTICO
CONSIDERATO
DEFINITIVO

The Gold Standard



Test “gold standard”
ideale: **sensibilità e
specificità del 100%**