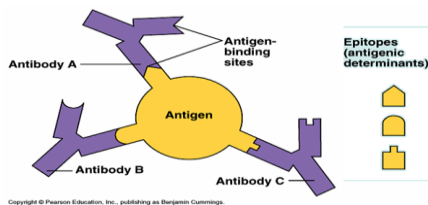


REAȚIILE IMUNOLOGICE. REAȚIILE AG-AC *in vitro*

• REAȚIILE ANTIGEN-ANTICORP *in vitro* (REAȚIILE SEROLOGICE)

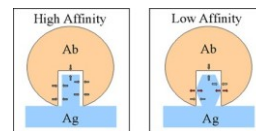
- Reacția Ag-Ac este determinată de interacțiunea specifică dintre epitopii Antigenului și paratopii Anticorpilor. În acest proces intervin patru tipuri de legături: legături de hidrogen, legături electrostatice, forțele Van der Waals și legături hidrofobe.
- Legătura Ag-Ac are trei caracteristici: este exotermică, specifică și reversibilă.



- **Aviditatea** unui Ac pentru un Ag specific reprezintă *rapiditatea apariției manifestării reacției Ag-Ac* (precipitare, aglutinare, etc.). Ea depinde de constanta de asociere, de valența Ac, de numărul de epitopi, de temperatură, de pH, de forța ionică a mediului.
- Un paratop se poate combina cu un singur epitop, numit "specific". Astfel, dacă este cunoscut unul din elementele reacției - Ag sau Ac, poate fi identificat celălalt

- Studiul și aprecierea imunității poate fi efectuată prin intermediul diferitor teste realizate *in vitro* sau *in vivo* (reacții imunologice).
- Pentru aprecierea răspunsului imun umoral se studiază interacțiunea dintre Ag și Ac, iar pentru aprecierea imunității celulare se determină numărul total de limfocite, subclasele limfocitelor T, se evaluează citokinele, etc.

- **Afinitatea** unui Ac pentru un Ag specific caracterizează *intensitatea forțelor de legătură a complexului Ag-Ac*. Ea depinde de complementaritatea sterică dintre paratop și epitop.



- Reacțiile Ac-Ac (reacțiile serologice) au două direcții de aplicare practică:

I. **Seroidentificare:** Detectarea și dozarea Ag (element necunoscut - tulpini microbiene izolate din diferite prelevate) cu ajutorul Ac specifici cunoscuți.

Pot fi utilizate două surse de Ac: Ac *monoclonali*, absolut omogeni, dar care recunosc doar un singur epitop și Ac *policonali*, ce se conțin în seruri imune (antiseruri), care permit legături de aviditate înaltă cu Ag.

Serurile imune se obțin prin injectarea la un animal de laborator a antigenelor cunoscute. După o perioadă de timp, serul animalului va conține anticorpi contra acestor antigene. Dar natura exactă a Ac din acest ser nu poate fi cunoscută cu exactitate (Ac policlonali). Specificitatea serului trebuie să fie permanent controlată și Ac nedorți trebuie să fie eliminați prin adsorbție.

- Alte reacții Ag-Ac nu se vizualizează “spontan” in vitro. În acest caz se va recurge la niște artificii experimentale, cum ar fi utilizarea Ac “marcați”:
- Ac marcați cu un fluorocrom: *imunofluorescența*.
- Ac marcați cu un izotop radioactiv: *analiza radio-imună*.
- Ac marcați cu o enzimă: *analiza imunoenzimatică*.

REAȚIA DE AGLUTINARE

Din latină – *agglutinatio - înclieiere*

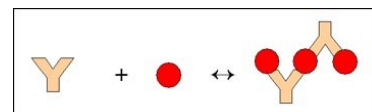
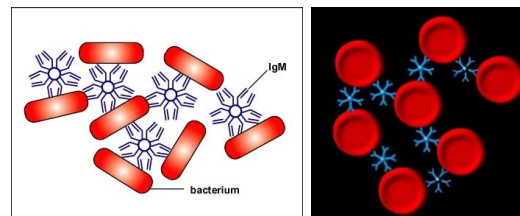
- Reacția Ag-Ac se poate manifesta prin *aglutinare* atunci când determinatele antigenice sunt purtate de **particule figurate** (Ag insolubile, corpusculare), iar **Ac** specifici sunt **compleți** (cel puțin bivalenți).
- Aglutinarea este determinată de formarea unei rețele între Ag și Ac, ce permite apropierea unui număr suficient de particule figurate pentru a constitui aglutinate vizibile cu ochiul liber. Ac IgM cu 10 epitopi potențiali aglutinează mai activ decât Ac IgG.

II. Serodiagnostic: Detectarea și titrarea Ac din serul bolnavilor (component necunoscut) față de un Ag specific cunoscut (conținut în diagnosticuri).

Unele reacții Ag-Ac se manifestă direct și pot fi observate de experimentator: de exemplu *precipitarea* sau *aglutinarea* complexelor Ag-Ac, *liza* unor celule purtătoare de Ag pe membrana lor (hemoliză, bacterioliză, etc).

INTERACȚIUNEA ANTIGEN-ANTICORP

- I. Faza specifică:** are loc interacțiunea dintre Ag și Ac specific corespunzător. Este un fenomen rapid, invizibil, comun pentru toate reacțiile Ag-Ac. Decurge la temperatura de 37 C, în prezența unui electrolit (sol. fiziologică).
- II. Faza nespecifică,** vizibilă a uniunii Ag-Ac, se manifestă prin precipitare, aglutinare, liză, etc - fenomene determinate de anumite condiții (valența Ac, dimensiunile Ag, etc).



- **Clasificarea reacțiilor de aglutinare**

1. Aglutinare "**activă**" sau "**directă**", în care particula figurată (Ag corpuscular) este el însuși purtător de determinante antigenice specifice (hematii, leucocite, trombocite, spermatozoizi, bacterii)
2. Aglutinare "**pasivă**" sau "**indirectă**", în care particula servește doar de suport pentru un determinant antigenic solubil fixat artificial pe suprafața sa. Frecvent sunt utilizate ca suport hematii formolate, particule de latex sau microcristale de colesterol.



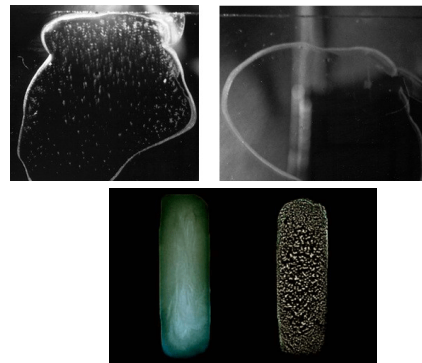
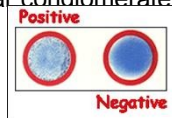
- **Reacții de aglutinare activă (directă)**

- *Aspect calitativ*

Reacția poate fi efectuată pe lama de sticlă sau în tuburi.

Reacția pe lama

Se amestecă o picătură de ser și o picătură de suspensie bacteriană (Ag). Lectura se face la microscop sau cu ochiul liber. În caz de reacție pozitivă apar condlomerate, iar lichidul se clarifică; în caz de reacție negativă, lichidul rămâne tulbure.



Reacția în tuburi

În eprubeta se amestecă serul și Ag figurate (hematii, bacterii).

Reacția pozitivă se manifestă prin formarea unui sediment cu aspect de umbrelă inversată la fundul tuburilor (peste 20-24 ore) și clarificarea lichidului. Aprecierea intensității reacției se efectuează după sistemul de 4 plusuri (++++).

Celulele neaglutinate se sedimentează la fundul tuburilor sub formă de buton sau inel (reacție negativă). Lectura se face cu ochiul liber sau folosind oglinda concavă a microscopului.



- *Aspect cantitativ*

- *Metoda dilutiilor succesive*

Initial se efectueaza dilutiile succesive ale serului (1/50, 1/100, 1/200, etc) in care se introduc ulterior cantitati egale de Ag. Termostat – 2 ore, apoi la t camerei 18-20 ore.

Aprecierea: cea mai mare dilutie a serului in care se manifesta aglutinare de cel puțin 3 "+" (+++) se numeste **titrul anticorpilor aglutinanti (titrul serului aglutinant)**.

- Aglutinarea directa este utilizata pentru determinarea grupelor sangvine sau in diagnosticul unor maladii infectioase (seroidentificarea Ag sau depistarea și titrarea Ac din serul bolnavilor) .

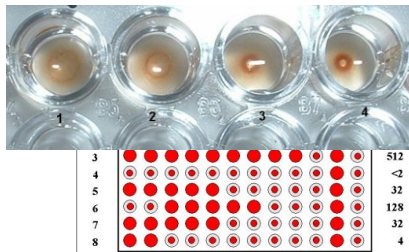
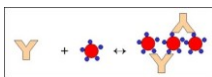


- **Reactiile de aglutinare pasiva (indirecta)**

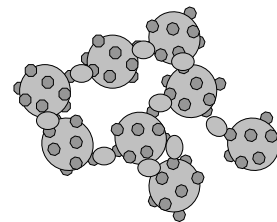
- Aglutinarea pasiva consta in fixarea unui Ag solubil (sau al unui Ac) pe un suport corpuscular inert, care nu intervine in reactia Ag-Ac. In calitate de suport inert pot servi hematiile, particule de latex, cristale de colesterol. Suspensia de particule sensibilizate cu Ag sau Ac este pusa in contact cu serul imun (respectiv cu Ag), ca si in cazul aglutinarii directe.
- Avantajele reactiilor indirecte: facilitatea lecturii si sensibilitatea inalta.

- **Reactia de hemaglutinare indirecta (pasiva) – RHAI / RHAP**

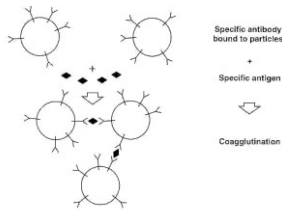
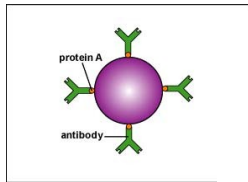
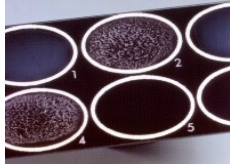
- Unele antigene de origine polizaharidica se fixeaza practic spontan, dupa o scurta incubatie, pe suprafata hematiilor. Antigenele proteice se fixeaza doar dupa o pregatire prealabila a hematiilor (de ex.: tratarea cu tanina, formol).
- RHAI se efectueaza in godeurile unei placi din polistiren. Reactia pozitiva se manifesta prin aglutinarea eritrocitelor sensibilizate (umbrela inversata de culoare bruna la fundul godeurilor).



- În **reactia de latex-aglutinare** Ac sau Ag sunt fixați pe particule de latex. Reactia se efectueaza pe lama de sticla.



- Reacția de latex-aglutinare este utilizată în identificarea factorului reumatoid la bolnavi suspecti de poliartrita reumatoidă, în bacteriologie pentru identificarea rapidă a mi/o sau Ag lor în prelevate, sau identificarea tulpinilor izolate, de asemenea pentru serodiagnosticul unor infecții.



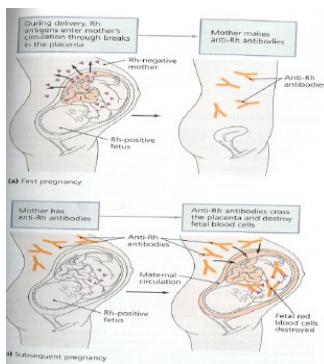
- **Reacția de Co-aglutinare.**

La baza acestei reacții se află proprietatea unei bacterii – *Staphylococcus aureus* (tulpina *Cowan*) - ce are în componența peretelui celular proteina A - să fixeze Ig G prin intermediul fragmentului Fc. Astfel se formează diagnosticuri cu Ac, cu ajutorul cărora pot fi identificate Ag respective necunoscute. Reacția se efectuează pe lamă.

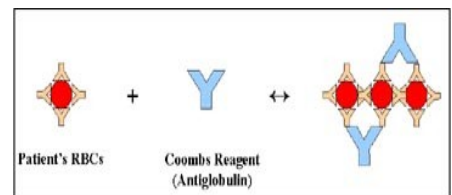
- **REAȚIA COOMBS**

Unii Ac (monovalenți) nu sunt aglutinanți în condiții normale, fiind monovalenți (ex.: anticorpii anti-Rh, responsabili de incompatibilitatea materno-fetală în sistemul Rh). Ei pot fi depistați grație testelor Coombs.

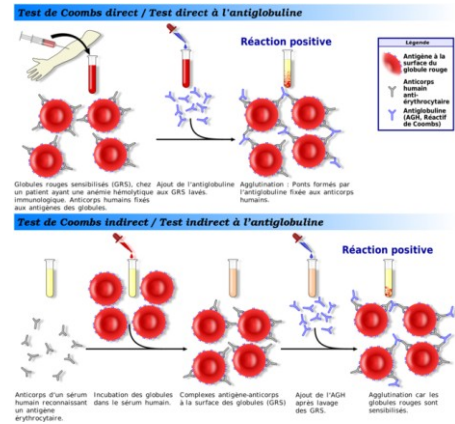
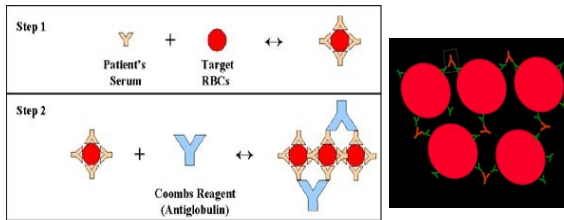
Sunt posibile 2 tehnici, în funcție de prelevat: sânge de la nou-născut sau de la femeia gravidă.



- **Tehnica Coombs directă.** La un nou-născut se caută prezența Ac materni anti-Rh fixați pe hematii, dacă mama este Rh-. La aceste hematii suspecte se adaugă un ser anti-Ig umană. Acest ser nu aglutinează hematiile normale, din contra, el provoacă aglutinarea hematiilor pe care sunt fixați Ac anti-Rh.



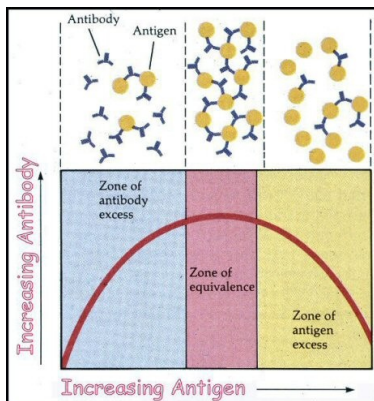
- **Tehnica Coombs indirectă.** La o femeie gravidă Rh-Ac anti-Rh sunt prezenți în ser. Inițial la acest ser se agaugă hematii Rh+ (pentru formarea complexului Ag-Ac), apoi se aplică serul anti-Ig.



- **REACTIILE DE PRECIPITARE**
- Imunoprecipitarea se manifesta doar atunci cand **Ag solubil** este amestecat cu Ac corespunzator. Ea poate fi observata sau in mediu lichid, sau solid, fiind sau calitativa, sau cantitativa. Acestea sunt reactii specifice dar putin sensibile, ce necesita cantitati importante de anticorpi.
- Precipitarea complexelor moleculare rezultate din uniunea Ag-Ac este determinata de formarea unei retele tridimensionale de Ag reunite prin Ac.

Condițiile de formare a rețelei de precipitare:

- Ac sa fie cel puțin bivalent (Ac completi)
- Ag sa fie multivalent (haptenele nu pot fi precipitate)
- Precipitarea maxima corespunde cu zona de echivalentă, unde Ac si Ag sunt in raport optimal de concentrație, ce permite precipitarea tuturor moleculelor de Ac cu Ag corespunzator. În exces de Ag sau de Ac precipitatul nu se formează.
- **Utilizare:** în medicina legala (determinarea apartenenței de specie a diferitor proteine: sânge, spermă, etc), în igiena alimentară (depistarea falsificării alimentelor), în diagnosticul maladiilor infectioase, etc



PRECIPITAREA IN MEDIU LICHID

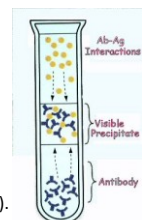
• **Reactia de precipitare inelara**

Intr-un tub cu diametrul de cinci millimetri se introduce serul imun; pipeta se inclina si pe peretii ei se lasa sa se prelinga incet solutia de Ag, ca sa nu se amestece cu serul. Daca Ac din ser corespund cu Ag, in zona de separare a celor doua lichide se formeaza un inel alb, ceea ce

semnifica precipitarea complexului Ag-Ac.

Avantajul metodei – rapiditatea si simplitatea.

Utilizarea practica: identificarea petelor de sange, depistarea falsificarilor produselor alimentare, depistarea antigenului polizaharidic al agentului antraxului in omogenat de organe (reactia Ascoli).



- **Reacția de floclurare (tehnica Ramon)**

Se efectuează diluția succesivă a serului imun (Ac) la care se adaugă cantități egale de Ag. Se introduc probele în termostat și periodic se examinează pentru depistarea tubului în care apare *precipitatul inițial (zona de echivalență)*.

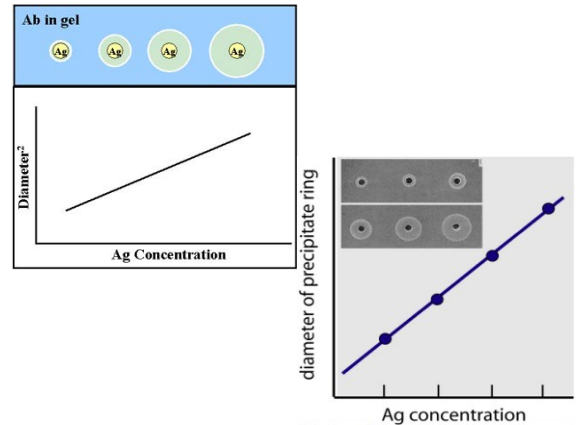
Utilizare: pentru determinarea cantității de toxină, antitoxină sau anatoxină.

- **PRECIPITAREA ÎN MEDIU SOLID (ÎN GEL)**

În aceste reacții Ag și Ac difuzează unul spre altul prin geloză și în zona de concentrație optimă a acestor două reactieve se produce precipitarea sub formă de linii albe-cenușii. Dacă există mai multe sisteme Ag-Ac, se vor forma linii de precipitare distincte. Poate fi utilizată în analiza calitativă a unui amestec de Ag într-o soluție.

- **Imunodifuzia simplă radială (tehnica Mancini)**

Se efectuează pe o placă acoperită cu geloză, în care sunt încorporați Ac specifici. Ag este depus în godeurile din stratul de geloză. Ag difuzează radial în geloză pe parcursul a 48 ore. Dacă Ag corespunde Ac, atunci are loc formarea de discuri de precipitare, cu suprafața proporțională concentrației Ag din godeu. Se utilizează pentru depistarea și cuantificarea Ig, hormonilor, enzimelor, etc.



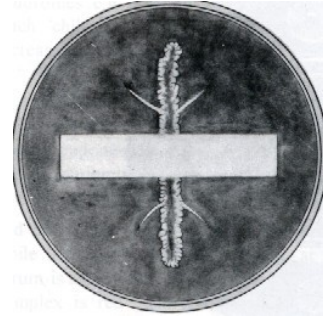
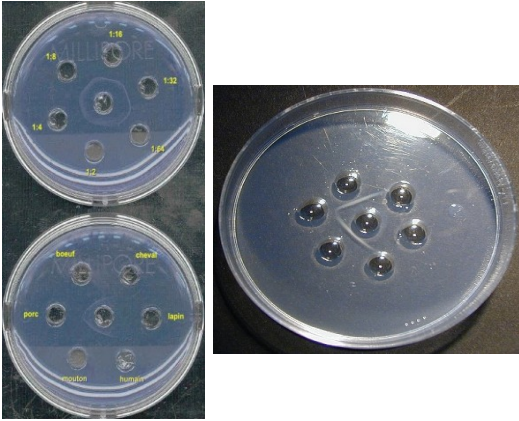
- **Imunodifuzie dublă**

- **(tehnicile Ouchterlony și Elek)**

Se acoperă cu geloză o placă de sticlă sau se toarnă geloză în cutia Petri.

- În tehnica Ouchterlony Ag și Ac difuzează din godeurile situate la o distanță de 15 mm unul de altul.
 - În tehnica Elek cele 2 reactieve difuzează din benzile de hârtie plasate pe suprafața gelozei.
 - Moleculele difuzează în gel în funcție de greutatea lor și formează *linii de precipitare* pentru fiecare sistem Ag-Ac ce corespund în zona lor de echivalență. Dacă două Ag sunt identice, liniile lor se unesc, dacă sunt diferite – se intersectează.
- Utilizarea** – determinarea toxinelor (toxigenaza), antitoxinelor, Ag proteice

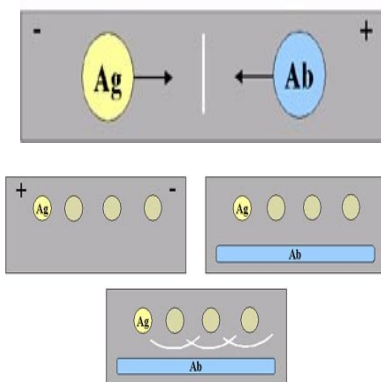
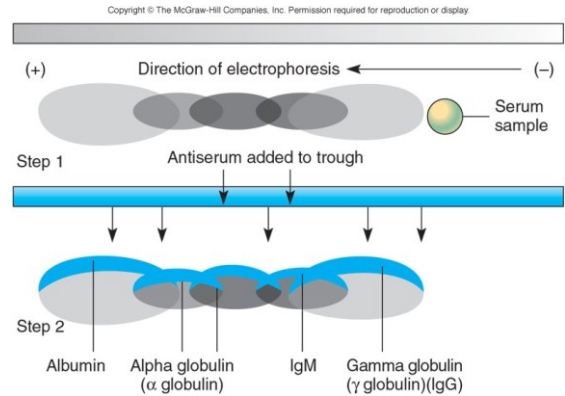




• **Contraimuno-electroforeza (CIEF)**

Este utilă la examinarea amestecurilor antigenice complexe. Lectura este posibilă peste 90 minute.

Geloză este turnată pe o placă de sticlă, Ag și Ac sunt dispuși în rezervoare circulare de 2 mm diametru, la o distanță de 10 mm. În timpul electroforezei Ag, încărcat negativ, migrează spre polul pozitiv, întâlnind Ac care migrează spre catod. La interacțiunea Ag și Ac omologi are loc formarea liniei de precipitare. CIEF servește la examinarea componentelor Ag din lichide biologice: LCR, urină, lichid pleural, ascitic, etc.

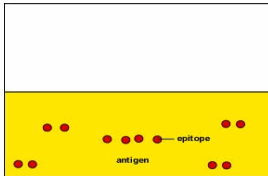


- **REAȚII DE CITOLIZĂ IMUNĂ** (cu participarea complementului)
- Activarea fracțiilor complementului (C) duce la liza particulei purtătoare de Ag (hematii, bacterii, diverse celule...)
- **Activarea complementului**
 - Calea clasică
 - Calea alternativă
 - Calea lectinică

• Activarea C pe cale clasică

Activatorul îl constituie *complex Ag-Ac* (IgG, IgM)

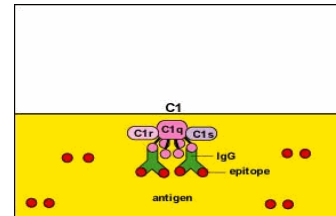
Consecutivitatea activării C: *Ag-Ac* fixează fracția *C1qrs*, care capătă ulterior activitate esterazică (în prezența obligatorie a Ca^{++})



C1 activează *C4*, cu formarea complexului

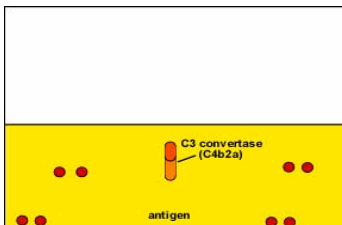
AgAcC1C4b. Este apoi activat *C2*

(*AgAcC1C4bC2a*), complexul *C4bC2a* devenind convertază ce acționează asupra *C3*

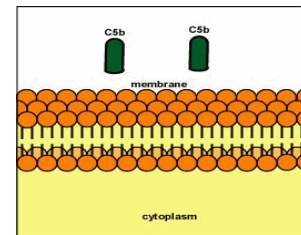


Urmează clivarea *C3* în *C3a* (anafilotoxină) și

C3b, care se unește de complex (*AgAcC1C4bC2aC3b*), formând *C5-convertaza*, care clivează *C5* în *C5a* și *C5b*

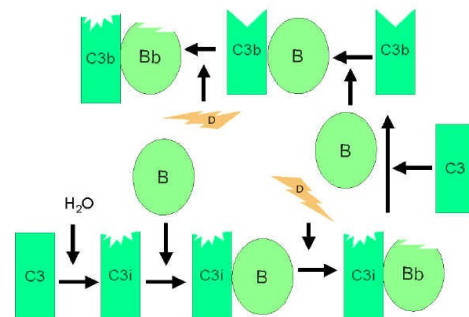


C5b se leagă de membrana celulei-țintă. Urmează fixarea simultană a *C6,7*. La final se fixează *C8*, apoi *C9*, formând "complexul de atac membranar". Fixarea lor produce leziuni ireversibile – liza celulei.

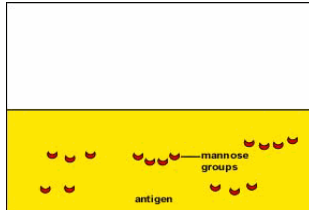


Calea alternativă de activare a C

Activatori: *endotoxine, celule infectate cu virus, levuri, paraziți, venin de cobră, agregate de IgA sau IgE*. *C1,4 și 2* nu intervin și reacția începe cu *C3*. Properdina, factorul B și ionii de Mg^{++} sunt obligatorii în procesul de activare pe cale alternativă.



- **Calea lectinică** de activare a C este determinată de legarea unor lectine pe unele grupări de manoză, carbohidrat prezent în componența multor mi/o și absentă la ma/o. Lectina este echivalentă fracției C1q. Alte 2 molecule se asociază, formând o enzimă similară C1, ceea ce duce la formarea complexului C4bC2a (C3-convertaza)



• RBL in vitro

- Se efectuează diluția succesivă a serului
 - Se adaugă suspensie microbiană vie
 - Se adaugă complement
- (martor: Ag+ser fiziologic+C)
- Incubare 2 h la 37°C
 - Reînsămânțare pe cutii cu geloză câte 0,1 ml din fiecare diluție (24h – 37° C)
 - *Lectura* – se compară nr coloniilor crescute din martor și probele studiate
 - *Titrul* – cea mai mare diluție a serului în care au fost lizate cel puțin 50% din celule

Reacția de hemoliză (RHL)

- **Ag** – hematii de berbec, suspensie de 3%
- **Ac** – ser imun de iepure anti-hematii de berbec (serul hemolitic)
- **Complement**

Principiul reacției: complexe Ag-Ac formate fixează C și-l activează pe cale clasică, provocând hemoliza. Intensitatea hemolizei se apreciază vizual (++++) sau prin măsurarea densității optice a hemoglobinei eliberate.

Utilizarea practică a RHL: pentru dozarea C, precum și în montarea reacției de fixare a complementului.

Componentele reacțiilor de liză:

- Ag (celule bacteriene, hematii, etc)
- Ac (lizine - IgG și IgM)
- Complement – ser proaspăt de cobai sau ser de cobai liofilizat

Reacția de bacterioliză (RBL)

- Ag – suspensie de bacterii vii (vibrioni, leptospire...)
- Ac – serul imun sau serul bolnavului
- Complement

• RBL in vivo

- Amestecul dintre Ag și Ac se inoculează intra-peritoneal la animale de laborator (ex.: șoareci albi)
- Peste fiecare 10 min, timp de o oră, se extrage lichidul peritoneal, se pregătește un preparat nativ și se examinează pe fond negru sau cu contrast de fază.
- Rezultat pozitiv – numărul bacteriilor scade treptat până la dispariție.

Utilizarea RBL – diagnosticul holerei (RVL), leptospirozelor (RALL)

• REACȚIA DE FIXARE A COMPLEMENTULUI (RFC)

- Este o reacție complexă, constituită din 2 sisteme Ag-Ac și cu participarea C.
- În RFC participă Ig capabile să fixeze C – IgM și IgG.
- RFC se utilizează în diagnosticul virozelor, infecțiilor bacteriene, etc
- Toate componentele RFC sunt utilizate în același volum fiind titrate în prealabil pentru aprecierea dozelor de lucru.
- Reacția este însoțită de martori ai tuturor componentelor

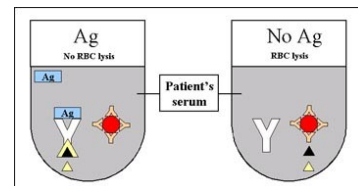
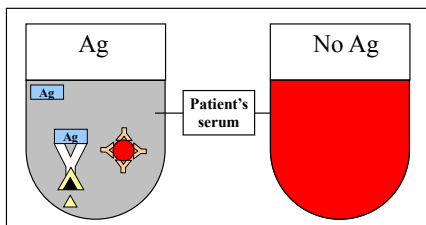
- Reacția se efectuează în 2 etape utilizând 2 sisteme.

I etapă – *Sistemul de bază* este constituit din **Ag1** (diagnosticuri sau Ag necunoscute), **Ac1** (serul bolnavului sau serul imun) și **complement** în doza de lucru. Amestecul este incubat 1h la 37° C sau menținut 16-18 ore la 4° C. Dacă Ac se combină cu Ag omolog va avea loc și fixarea C (efect frecvent invizibil).

II etapă – la sistemul de bază se adaugă *sistemul indicator (hemolitic)*, constituit din hematii de berbec (**Ag2**) combinate cu Ac specifici – serul hemolitic (**Ac2**). Peste 1h incubare la 37° C reacția este terminată.

Evaluarea rezultatelor – dacă complementul a fost fixat de primul sistem Ag-Ac **hemoliza nu se observă (rezultat pozitiv)**. Dacă Ag1 nu corespunde cu Ac1, complementul rămâne disponibil pentru fixare pe sistemul indicator Ag2-Ac2, provocând **hemoliza (rezultat negativ)**

Complement Fixation



• Tehnici serologice cu utilizarea Ac marcați

În unele cazuri este imposibil de a detecta o reacție Ag-Ac: unii Ac nu precipitează, alții nici nu precipitează, nici nu aglutinează, există complexe Ag-Ac care nu fixează C. În aceste cazuri pot fi utilizați Ac marcați pentru a vizualiza Ag respectiv. Conjugarea Ac cu marcați nu afectează proprietățile lor imunologice.

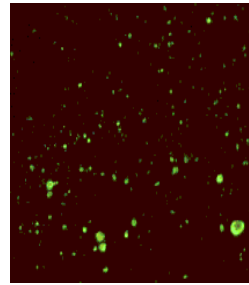
Aceste reacții se montează pe suport solid (lamă, plăci din plastic)

• Marcații utilizați uzual:

- **Fluorocromi** (rodamina, fluoresceina), care emit respectiv o lumină roșu-oranj sau verde-galbenă la tratarea lor cu raze UV (**Reacția de Imuno-Fluorescență**)
- **Enzime** (fosfataza alcalină, peroxidaza), capabile să modifice culoarea unui substrat (**Reacția Imuno-enzimatică**)
- **Radio-izotopi** (^{125}J sau ^3H), care emit respectiv raze gamma și beta (**Analiza Radio-Imună**)

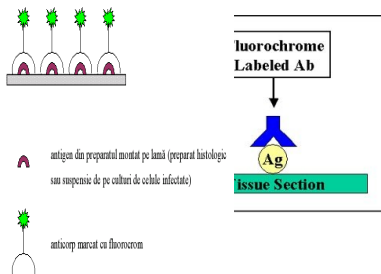
- **Reacția de imunofluorescență (RIF, reacția COONS)**

Metoda directă (numai în scop de seroidentificare). Din materialul ce conține **Ag** (material nativ, cultură pură, biopsie tisulară) se prepară un frotiu, peste care se aplică serul imun specific cu **Ac marcați cu fluorocrom**. Peste 20 min de incubare într-o cameră umedă preparatul este studiat la microscopul luminiscent. În caz de reacție pozitivă se observă luminiscentă locală. *Inconvenient* – necesitatea de a avea seruri imune marcate specifice pentru fiecare Ag.



- positive test for rabies

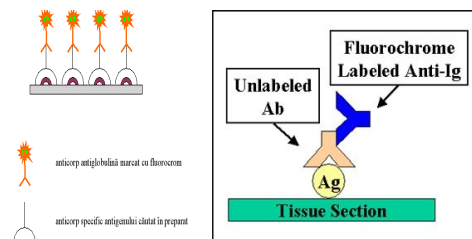
- negative test for rabies



- **Metoda indirectă.** Poate fi utilizată pentru sero-identificare și sero-diagnostic.

Pe frotiul ce conține **Ag** se aplică **Ac** corespunzători **nemarcați**. Peste 20 min se spală minuțios preparatul, apoi se adaugă **anti-Ig fluorescentă**, care se va combina cu **Ac** din complex. Acest reactiv poate fi utilizat în numeroase reacții.

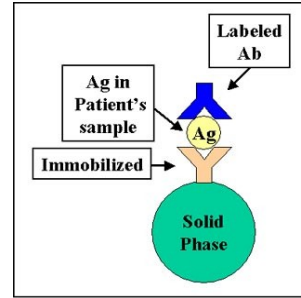
Anti-Ig se obține prin imunizarea iepurilor (sau altor animale) cu Ig umane.



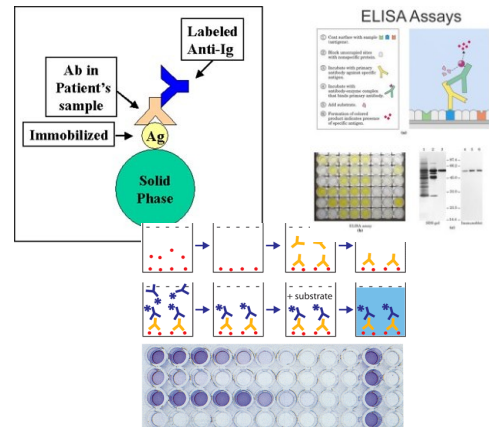
- **Tehnica fondată pe fixarea C:** Markerul fluorescent este un ser anti-complement care se va lega de complementul fixat pe complexul Ag-Ac.

- RIF se utilizează pentru identificarea rapidă a Ag din biosubstrate sau pentru serodiagnostic.

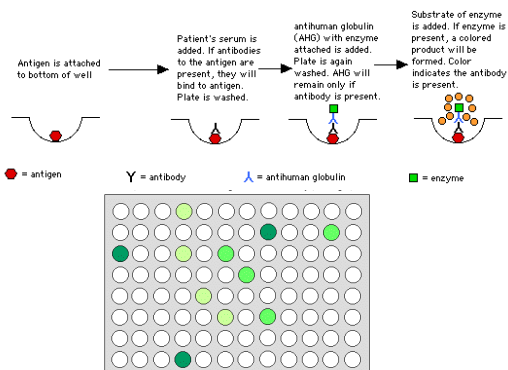
- **Reacția Imuno-Enzimatică (RIE, ELISA -Enzyme Linked Immunosorbent Assays).**
- **RIE directă (metoda sandwich).** Utilizată doar în sero-identificarea Ag. În godeurile din placa de polistiren în care sunt fixați **Ac cunoscuți** se toarnă soluția de **Ag necunoscut**. Se incubează 1h. După o spălare minuțioasă a godeurilor se adaugă **Ac marcați cu enzime**, care se fixează pe epitopii liberi ai Ag polivalent. După incubare de 30 min-1h se spală iarăși godeurile. Prezența complexului **Ac-Ag-Ac-marcat** se depistează cu ajutorul **substratului cromogen** (substanță inițial incoloră, dar care se colorează sub acțiunea enzimei, ex. apa oxigenată și orthofenilendiamina).



- **RIE indirectă.** Utilizată în serodiagnostic. **Ag cunoscut** este fixat la fundul godeurilor. **Ac (serul testat)** se introduce în godeu, după 1h se spală totul și se adaugă **ligandul marcat cu enzimă** (anti-Ig sau proteina A cuplate cu enzimă). Acest ligand se fixează pe Ac testați. Se adaugă apoi **substratul cromogen**. Cantitatea de Ac se măsoară după densitatea optică a lichidului din godeuri.



Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA):

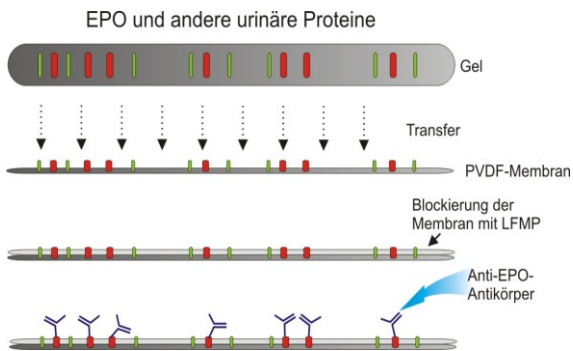


- **Tehnica imunoblot (western blot) permite identificarea Ag sau ai Ac dintr-un amestec.**

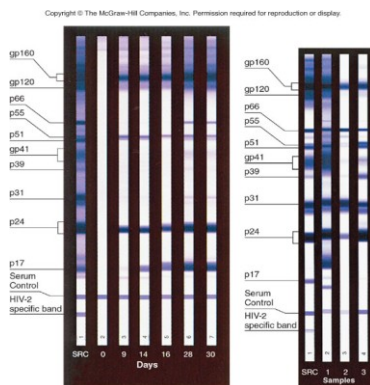
I etapă – electroforeza în gel a probei de Ag

II etapă – transferul electric al Ag pe membrana de nitroceluloză

III etapă – pe membrană sunt aplicați succesiv Ac dirijați contra Ag, apoi conjugatul marcat cu enzimă, care permite depistarea Ac fixați. După o spălare se adaugă substratul cromogen. Fiecare complex Ag-Ac formează zone colorate distincte. *Utilizare:* depistarea Ac anti-HIV, caracterizarea Ac monoclonali...



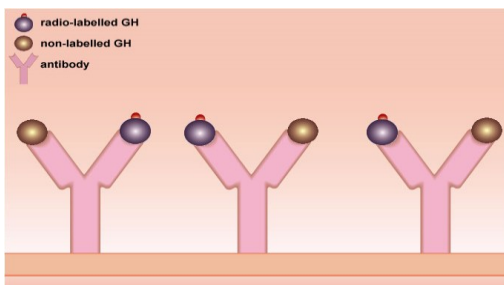
- Proteinele sunt separate electroforetic în gel poliacrilamid. Sub acțiunea câmpului electric are loc difuzia proteinelor conform greutății moleculare, aranjându-se în zone liniare subțiri diferite: mai aproape de start se aranjează proteinele cu masă moleculară mare (120-150 kDa), la final se aranjează proteinele cu masă moleculară mică (5-10kDa).
- Apoi lamela de gel este transferată pe o foaie de nitroceluloză amplasată între electrozii unei surse de curent continuu. Sub acțiunea câmpului electric are loc trecerea proteinelor din gel pe nitroceluloză, unde se fixează foarte bine pe hârtie.
- Proteinele fixate sunt marcate cu o enzimă (e.g. alkaline phosphatase sau peroxidase) în coloră.
- Procedura ulterioară de montare a reacției este similară tehnicii ELISA.



• Analiza radioimună (ARI)

Principiul este identic cu cel al RIE

Ag se fixează la fundul godeurilor din placa de plastic. Se adaugă Ac testați care se vor combina cu Ag omolog. După spălarea godeurilor, se adaugă un ligand radiomarcant (anti-Ig). După eliminarea excesului de izotopi prin spălare, se măsoară radio-activitatea: ea este proporțională cu concentrația Ac dozați.



- **Reacția de neutralizare (RN):** formarea complexelor Ag-Ac duce la neutralizarea efectului biologic al Ag (neutralizarea toxinelor, enzimelor, virusurilor).

• Reacția de imobilizare

Unii anticorpi anti-bacterieni pot provoca imobilizarea bacteriilor mobile (vibrioni, spirochete)