

The background features a light blue and green color palette. On the left, there are several large, textured, light blue spherical structures resembling cells or antibodies. On the right, there is a large, detailed green virus particle with numerous spike-like protrusions. Smaller, fainter versions of these structures are scattered throughout the background.

# **Interação Ag-AC**

## **Testes sorológicos primário e secundário**

Disciplina: Imunologia

Discente: Priscila Diniz Lopes

Docente: Hélio J. Montassier

2016

# Antígeno e anticorpo

- **Anticorpos:** formas secretadas dos receptores de antígenos das células B. Por serem produzidos em grande quantidade em resposta ao antígeno, os anticorpos podem ser estudados através de testes imunológicos
- Corpo humano: dois trilhões ( $2 \times 10^{12}$ )
- **Antígenos** são as moléculas reconhecidas pela resposta imune, enquanto os **epítomos** são sítios nos antígenos aos quais os receptores das cél. B ou anticorpos se ligam

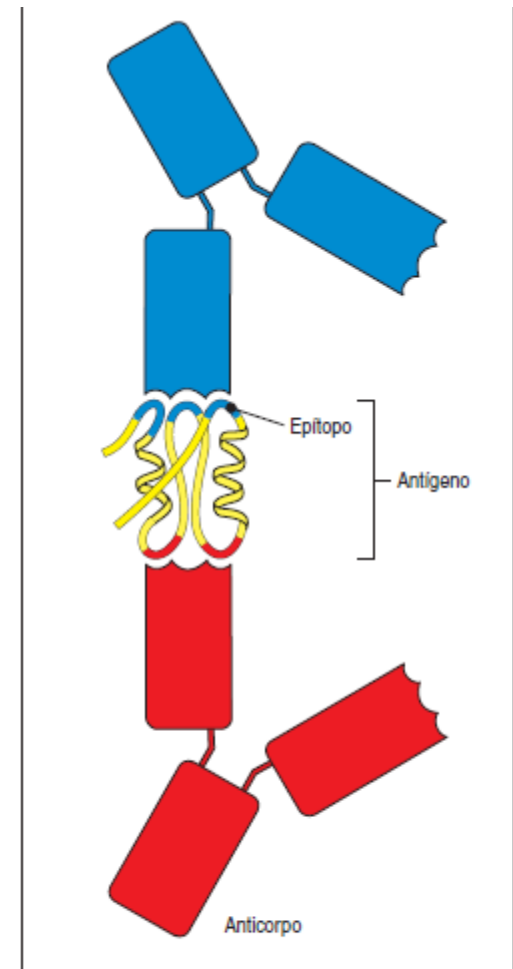
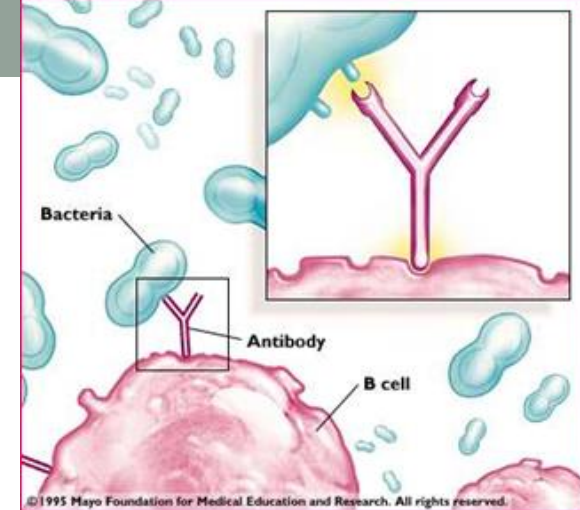


Figura 1.15 Os antígenos são as moléculas reconhecidas pela resposta imune enquanto os epítomos são sítios nos antígenos aos quais os receptores de antígenos se ligam. Os antígenos

# Antígeno e anticorpo



- É uma associação biomolecular semelhante à interação de enzimas com seus substratos ou de hormônios com seus receptores, com uma distinção bem evidente o Ac não provoca nenhuma alteração química irreversível na molécula de Ag, podendo, portanto, o produto formado (Ag-Ac) se dissociar nos seus 2 componentes; isto é, Ag e Ac livres na solução.



# Interações AgAc

- Os antígenos possuem estruturas químicas que favorecem a complementaridade com o anticorpo, através de ligações não-covalentes.
- São reversíveis e possuem afinidades diferentes com diversas substâncias.
- Como um anticorpo pode se relacionar com antígenos com afinidades diversas, ele pode ligar-se com um que não seja o seu antígeno de melhor complementariedade através de ligações mais fracas com regiões semelhantes, mas não idênticas, àquele que o induziu.
- Essa ligação é chamada de **reação cruzada**.

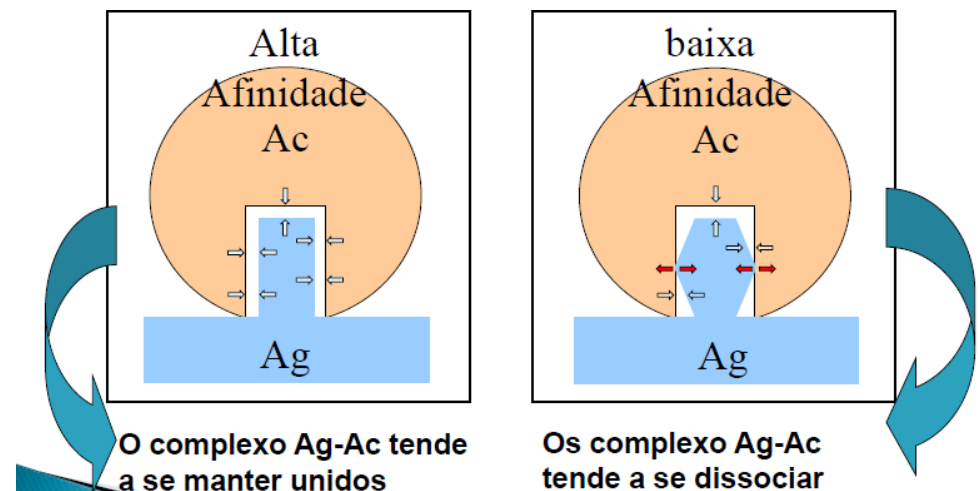
# Interação AgAc

- A interação entre um anticorpo e seu antígeno pode ser rompida por altas concentrações de sal, pH extremo, detergentes e, algumas vezes, por competição com altas concentrações do próprio epítipo puro. A ligação é, portanto, uma interação não-covalente reversível.

Forças não-covalentes	Origem	
Forças eletrostáticas	Atração entre cargas opostas	$-\text{NH}_3^+ \quad \ominus \text{OOC}-$
Pontes de hidrogênio	Hidrogênio compartilhado entre átomos eletronegativos (N, O)	$\begin{array}{c} \diagup \text{N} - \text{H} \cdots \text{O} = \text{C} \diagdown \\ \delta^- \quad \delta^+ \quad \delta^- \end{array}$
Forças de van der Waals	Flutuações nas nuvens de elétrons ao redor das moléculas polarizam de maneira oposta os átomos vizinhos	
Forças hidrofóbicas	Grupos hidrofóbicos interagem desfavoravelmente com a água e tendem a se agrupar para exclusão de moléculas de água. A atração também envolve forças de van der Waals.	

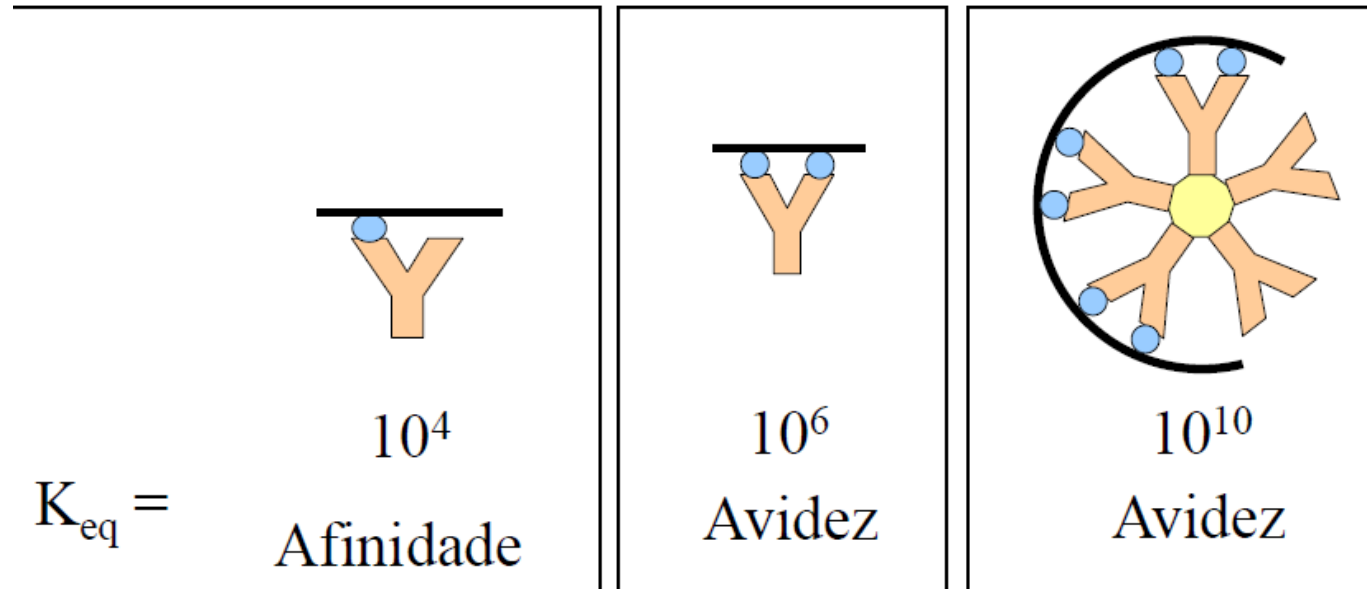
# Característica da interação AgAc

- **Afinidade:** Força de ligação resultante do total de forças não-covalentes entre um único sítio de ligação do Ac e um único epítipo do antígeno. Depende do grau de complementariedade entre as duas moléculas.
- Ac de baixa afinidade ligam-se de modo fraco e tendem a se dissociar com facilidade. Ac de alta afinidade estabelecem ligações fortes e mais duradouras.



# Característica da interação AgAc

- **Avidez:** Força resultante de interações múltiplas entre uma molécula de anticorpo e os epítomos de um antígeno complexo.
- Quanto maior a avides, melhor seu efeito biológico final (ex. reconhecimento de antígenos complexos sobre a superfície de patógenos)
- A baixa afinidade de um Ac pode ser compensada por sua elevada avides





# Característica da interação AgAc

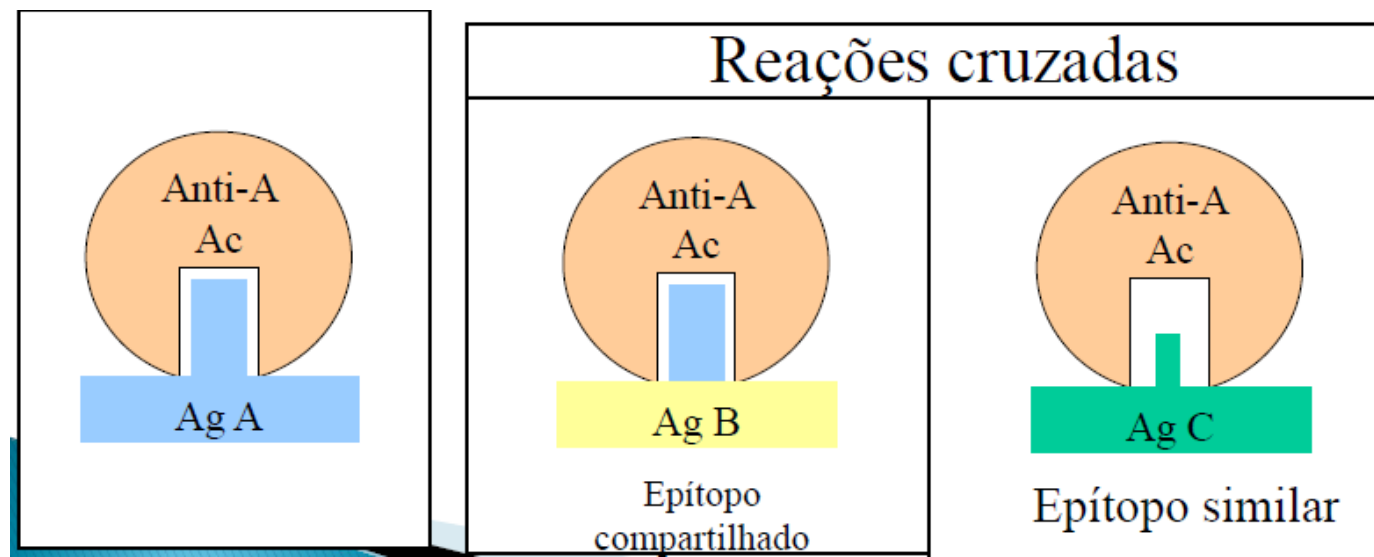
- **Especificidade:** É a habilidade do anticorpo em distinguir seu imunógeno de outros antígenos.
- Conceito de chave e fechadura
- 1) Estrutura primária de um antígeno
- 2) Formas isoméricas de um antígeno
- 3) Estrutura secundária e terciária de um antígeno





# Reatividade cruzada

- Habilidade de um anticorpo interagir com mais de um determinante antigênico
- Dois antígenos diferentes apresentam epítomos estruturalmente semelhantes
- Anticorpos específicos para um epítopo se ligam a um epítopo não relacionado, mas com propriedade química similares



# Reatividade cruzada

- Exemplos
- A) **Tipagem sanguínea:** glicoproteínas das hemácias
- **Bactérias intestinais** possuem substâncias quimicamente semelhantes, e portanto possuem reatividade antigênica cruzada com A e/ou B. Anticorpos dirigidos contra os antígenos A ou B, ou ambos, são detectados pela primeira vez em crianças com 3-6 meses e atingem um pico com 5-10 anos, declinando posteriormente com a idade e em alguns estados de imunodeficiência

# Reatividade cruzada

- B) Vários vírus e bactérias possuem determinantes antigênicos idênticos ou similares a componentes normais da célula hospedeira
- Antígenos microbianos estimulam anticorpos que reagem de maneira cruzada com os componentes da célula hospedeira e resultam em uma reação autoimune que lesiona o tecido
- *Streptococcus pyogenes* expressam proteínas na parede celular chamados de antígenos M
- Anticorpos produzidos contra antígenos M reagem de forma cruzada com várias proteínas do miocárdio e do músculo esquelético, causando lesões cardíacas e renais

# Fatores que afetam a relação AgAc

- **Afinidade:** Quanto maior a afinidade do anticorpo pelo antígeno, mais estável será a interação.
- **Avidez:** Reações entre antígenos multivalentes e anticorpos multivalentes são mais estáveis e portanto mais fáceis de detectar
- **Relação [Ag]:[Ac]:** influencia a detecção dos complexos antígeno-anticorpo porque o tamanho dos complexos está relacionado com a concentração do antígeno e do anticorpo
- **Forma física do Ag (solúvel ou particulado):** Se o antígeno é particulado, geralmente se observa a aglutinação do antígeno pelo anticorpo. Se o antígeno é solúvel, geralmente se pesquisa a precipitação de um antígeno após a produção de grandes complexos antígeno-anticorpo insolúveis

# Fatores que afetam a relação AgAc

- Concentração dos anticorpos (equilíbrio entre concentração de Ag e Ac)
- pH do meio de reação
- Temperatura de reação
- Tempo de reação

# Imunodiagnóstico

- Testes realizados para a detecção de anticorpos ou antígenos
- Qualquer molécula que se comporte como um antígeno pode ser identificada (ex: agente infecciosa, drogas)
- Primários: detectam a interação direta entre antígeno e anticorpo. Ex: Radioimnoensaio, Imunofluorescência, ELISA
- Secundários: detectam consequências da interação entre antígeno e anticorpo – mudanças no estado físico do antígeno. Ex: Imunodifusão, Aglutinação, Precipitação, Fixação de Complemento

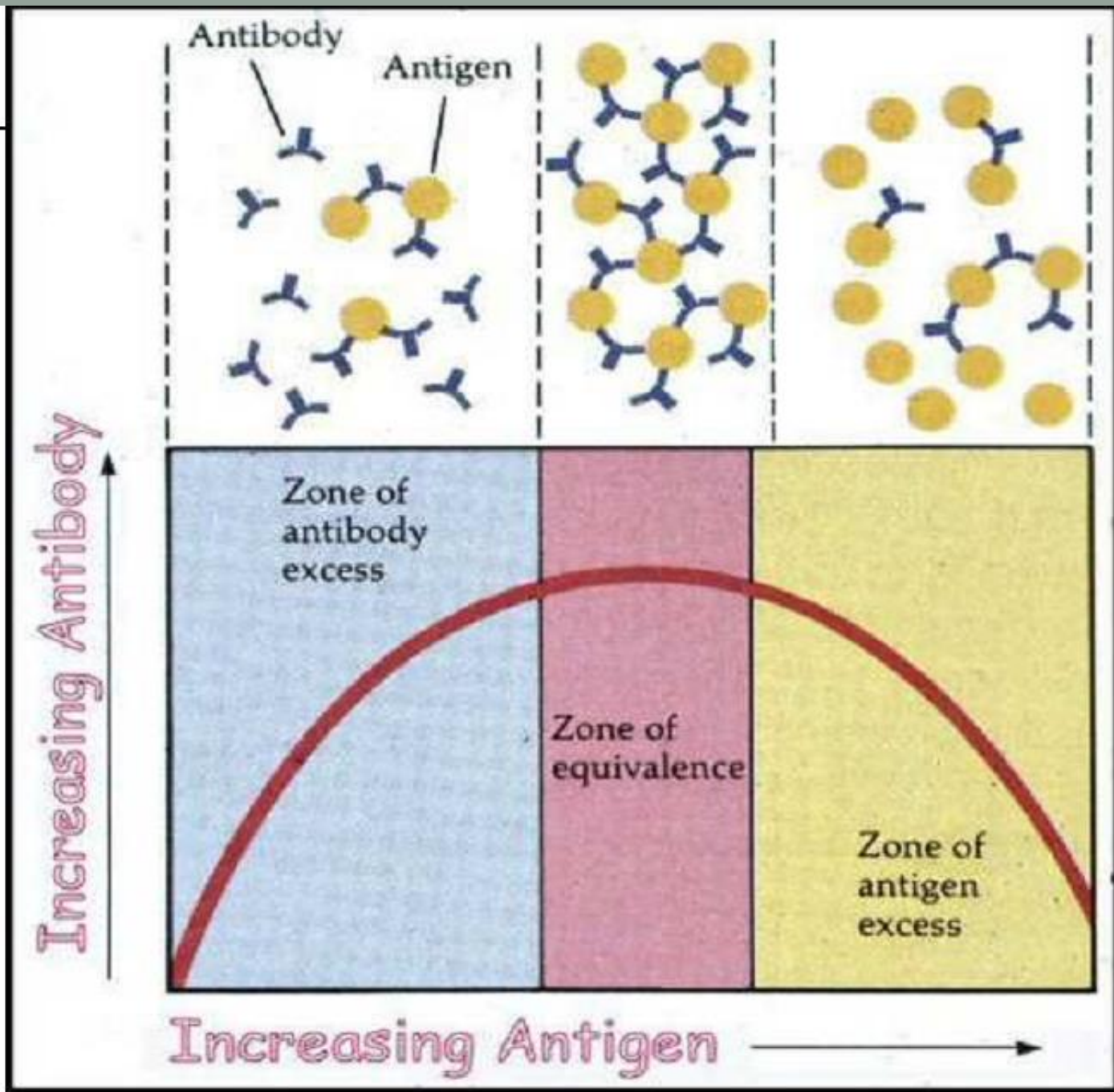
# Imunodiagnóstico

- Anticorpos monoclonais (mAb): investiga um epítopo antigênico, e a formação do complexo é monitorada pela ocorrência de precipitação do complexo ou pela presença de um marcador no anticorpo (fluorescente, radioativo ou enzimático)
- Proteínas moleculares clonadas como antígenos-modelo: investiga anticorpos específicos
- Misturas mais complexas de AgAc: anticorpos de soros policlonais ou um agente infeccioso (proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos)



# Imunodiagnóstico

- Concentrações relativas de antígeno e anticorpo: constituem os determinantes na formação dos complexos
- Zona de equivalência: precipitação máxima
- Zonas de excesso de Ag ou Ac: formam quantidades decrescente de precipitado (ou complexos muito pequenos)
- Fenômeno pró-zona: formação subótima de imunocomplexos quando os anticorpos ou antígenos estão presentes em excesso.
  - Interpretação incorreta dos testes quando exigem grandes quantidades de Acs ou quando os antígenos estão inapropriadamente diluídos



# Vantagens do Imunodiagnóstico

- Rapidez
- Simplicidade
- Possibilidade de automação
- Armazenamento de material biológico
- Baixo custo operacional
- Oferta de kits comerciais padronizados

# Aplicações do Imunodiagnóstico

- 1 – Diagnóstico presuntivo e diferencial
- 2 – Diferenciação de fases da doença
- 3 – Diagnóstico de alergias
- 4 – Diagnóstico de doenças autoimunes
- 5 – Diagnóstico de imunodeficiências congênitas
- 6 – Seleção de doadores de sangue
- 7 – Seleção de doadores de órgãos para enxertos
- 8 – Dosagens hormonais
- 9 - Prognóstico da doença
- 10 – Avaliação da eficácia da terapêutica instituída
- 11 – Avaliação da imunidade específica (vacinação)
- 12 – Pesquisa de antígenos em células ou tecidos
- 13 – Pesquisas epidemiológicas
- 14 - Pesquisa básica e aplicada

# Áreas de conhecimento que utilizam Imunodiagnóstico

- Imunologia
- Patologia
- Alergologia
- Microbiologia (bact., vírus, fungos)
- Morfologia
- Hematologia
- Endocrinologia
- Oncologia

# Teste de aglutinação

- É caracterizada pela formação de agregados visíveis como resultado da interação de anticorpos específicos e partículas insolúveis que contêm determinantes antigênicos na superfície
- Sensível, de fácil execução e baixo custo
- Boa especificidade e reprodutibilidade
- Baixa sensibilidade e pouca estabilidade Ag-Ac
- Diagnóstico de vírus, bactérias, protozoários e fungos; doenças auto-imunes; detecção de hormônios e tipagem de grupos sanguíneos

# Teste de aglutinação

- Reações de aglutinação ocorrem entre um antígeno particulado e seu anticorpo específico (**aglutinação direta**) ou entre uma partícula inerte e recoberta de antígeno solúvel e seu anticorpo específico (**aglutinação indireta**).
- Quando as partículas usadas forem hemácias com antígeno adsorvido em sua superfície, fala-se de **hemaglutinação**

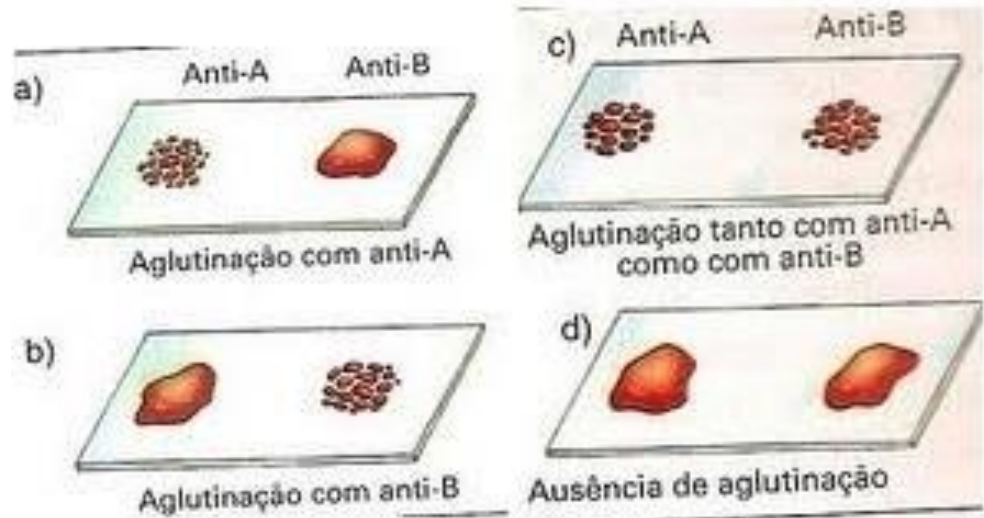
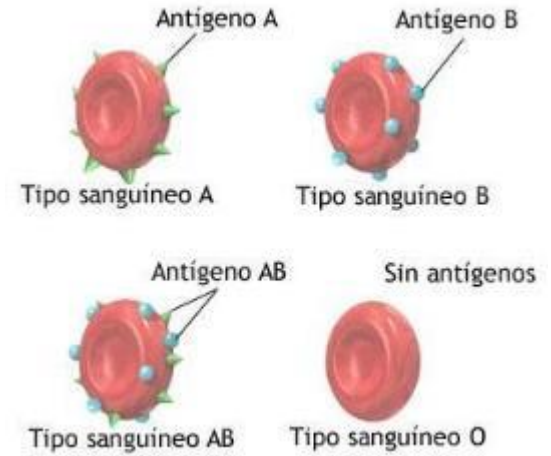


# Reação de aglutinação direta

- **Detecta anticorpos** específicos mediante o emprego de antígenos conhecidos; ou **detecta antígenos** específicos por meio de sua reação com anticorpos conhecidos
- Partículas antigênicas insolúveis são utilizadas em sua forma íntegra ou fragmentada (Ex: bactérias, vírus, fungos e protozoários).
- São realizadas diluições seriadas do anticorpo em relação a uma quantidade constante do antígeno. Após incubação, a aglutinação se completa e o resultado é geralmente expresso com a máxima diluição em que ocorre a aglutinação
- Ex: toxoplasmose, tripanossomíase, tipagem de grupos sanguíneos (antígenos específicos), reação de Paul-Bunnell-Davidson (antígenos heterófilos), teste de Widal para salmoneloses



Teste de antígenos de *Salmonella*:  
LPS, flagelo



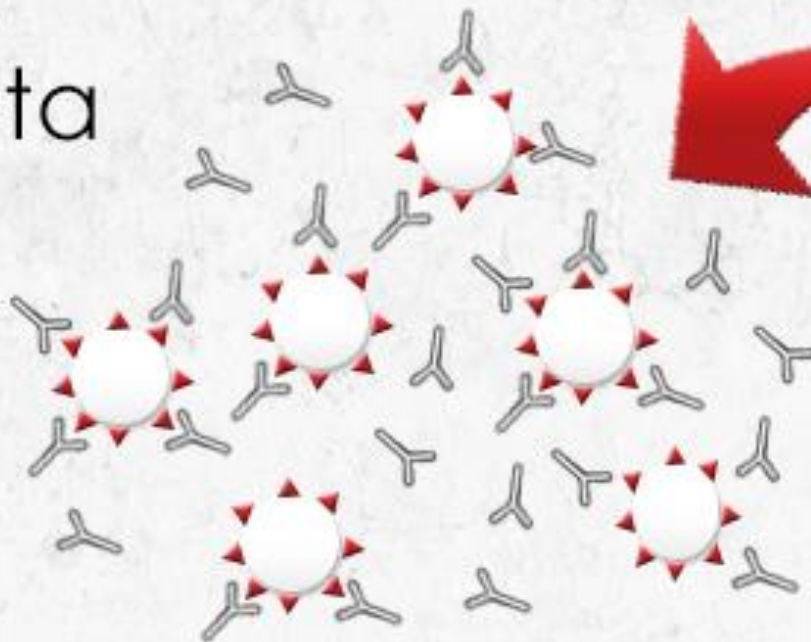
Teste de tipagem sanguínea

# Reação de aglutinação indireta

- Mais sensível método utilizado na imunologia clínica
- Adsorção de anticorpos ou antígenos solúveis proteicos ou polissacarídeos na superfície de micropartículas inertes (suportes) que não interferem na interação antígeno-anticorpo
- Ex. de partículas: hemácias (hemaglutinação) ou látex, mas podem ser utilizadas também partículas de bentonita e colóide

# Aglutinação indireta

- látex
- ▲ antígeno
- Y anticorpo



soro/  
plasma

# Reação de Hemaglutinação

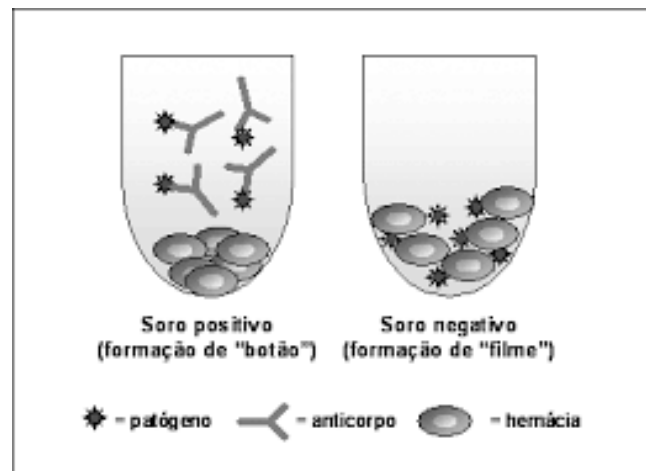
- Detecção de anticorpos específicos que, quando presentes, reconhecerão antígenos na superfície de eritrócitos, causando aglutinação
- Direto: determinantes antigênicos fazem parte da própria hemácia
- Indireto: antígenos são adsorvidos à superfície da hemácia
- Ex.: detectar anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*, anticorpos treponêmicos da sífilis (MHA.TP\_ micro-hemaglutinação para *Treponema pallidum*) e na detecção de anticorpos contra antígenos nucleares

- Efeito prozona no paciente 6

Paciente	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Pos.	Neg.	Titulo
1													64
2													8
3													512
4													<2
5													32
6													128
7													32
8													4

# Inibição de hemaglutinação

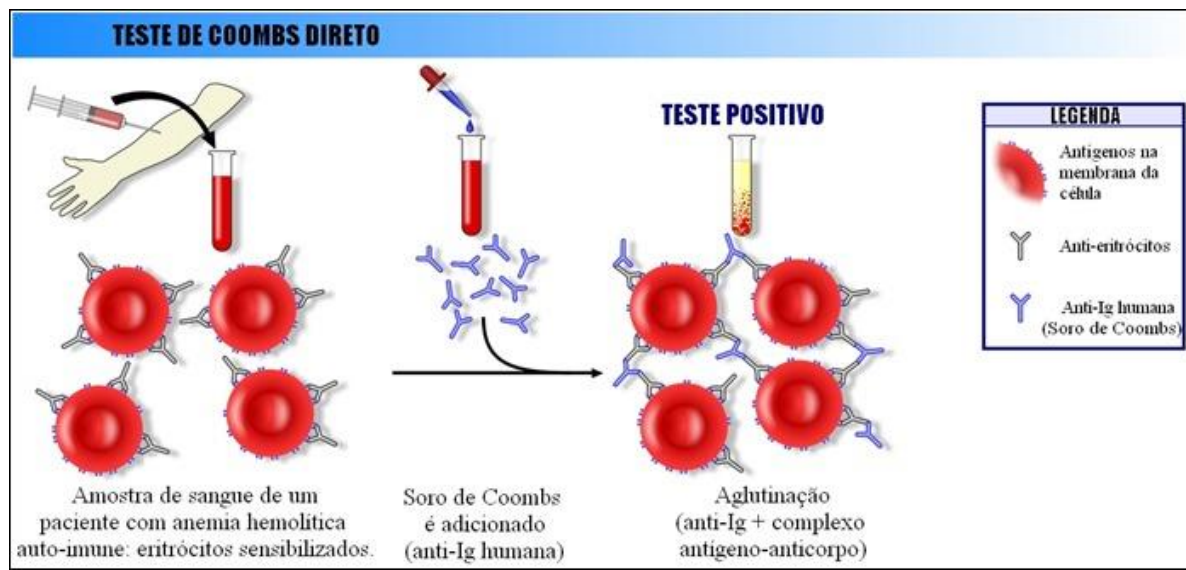
- Capacidade de hemaglutinação de um antígeno é bloqueada quando este reage com o anticorpo específico
- O teste de HI é executado em dois estágios:
- O antígeno hemaglutinante é misturado com o anticorpo
- São adicionadas hemácias à mistura do primeiro estágio
- A reação de HI detecta anticorpos totais (IgM e IgG)





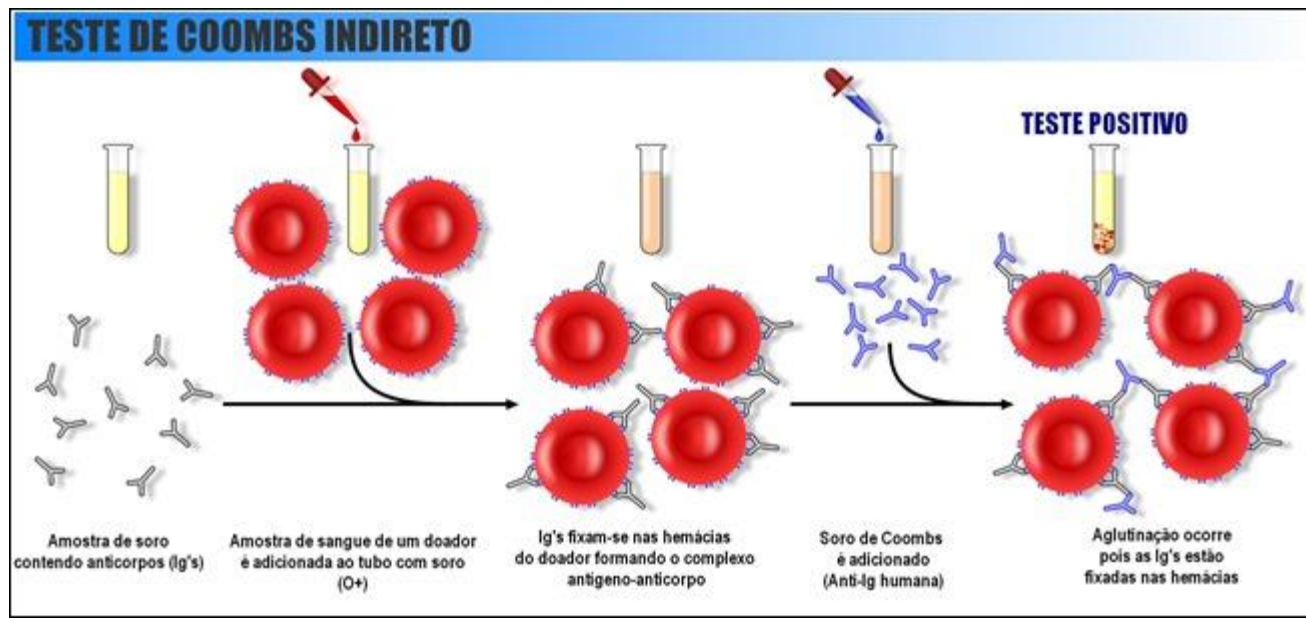
# TESTE DE COOMBS DIRETO

- Este teste é empregado na pesquisa de anticorpos (gamaglobulinas) já fixados às hemácias
- O teste de Coombs direto é usado no diagnóstico de doenças auto-imunes e doença hemolítica do recém-nascido. Ele detecta anticorpos ligados à superfície das hemácias.



# TESTE DE COOMBS INDIRETO

- Um soro que contenha anticorpos incompletos é incubado com hemácias que contenham o antígeno correspondente
- As hemácias assim bloqueadas (sensibilizadas) serão reveladas pelo soro de Coombs (soro antiglobulina humana). Pesquisa-se a presença de anticorpos incompletos ou imunes presentes no soro.



# Ensaio de imunossorvente ligado a enzima (ELISA)

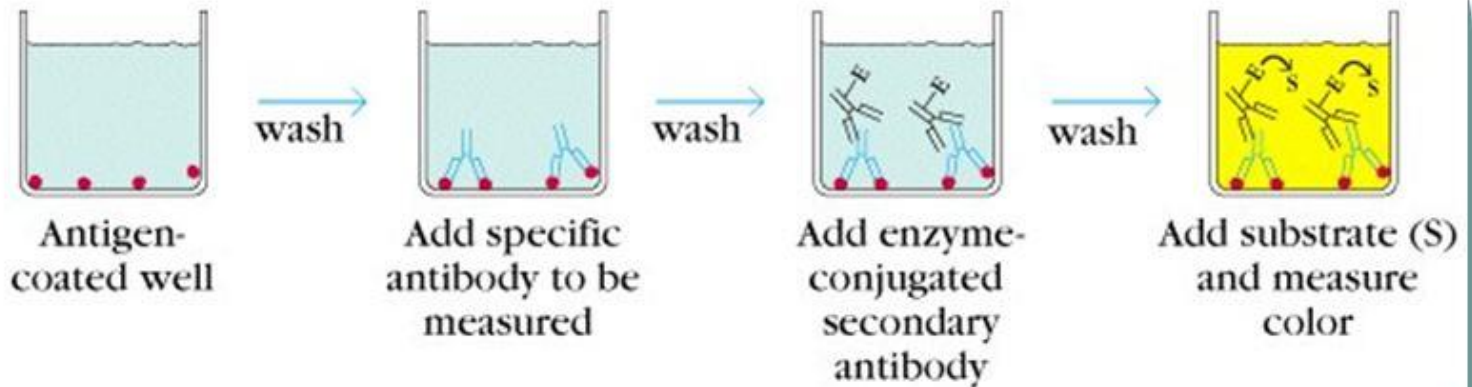
- Ac ou Ag é fixado a uma superfície de uma placa. A amostra do teste é aplicada, e o material ligado é detectado por um segundo anticorpo marcado enzimaticamente.
- Rápido, simples, baixo custo e facilmente adaptáveis a analisadores automáticos
- Anticorpos monoclonais ou antígenos recombinantes

# Ensaio de imunossorvente ligado a enzima (ELISA)

- Elisa direto: detecção de antígeno presente na amostra analisada
- Elisa indireto: detecção de anticorpo presente na amostra
- Resultados:
  - **Qualitativo:** positivo ou negativo
  - **Quantitativo:** utiliza-se equipamentos (Espectrofotômetro ou Leitora de microplacas por absorvância) para medir a concentração do antígeno ou anticorpo

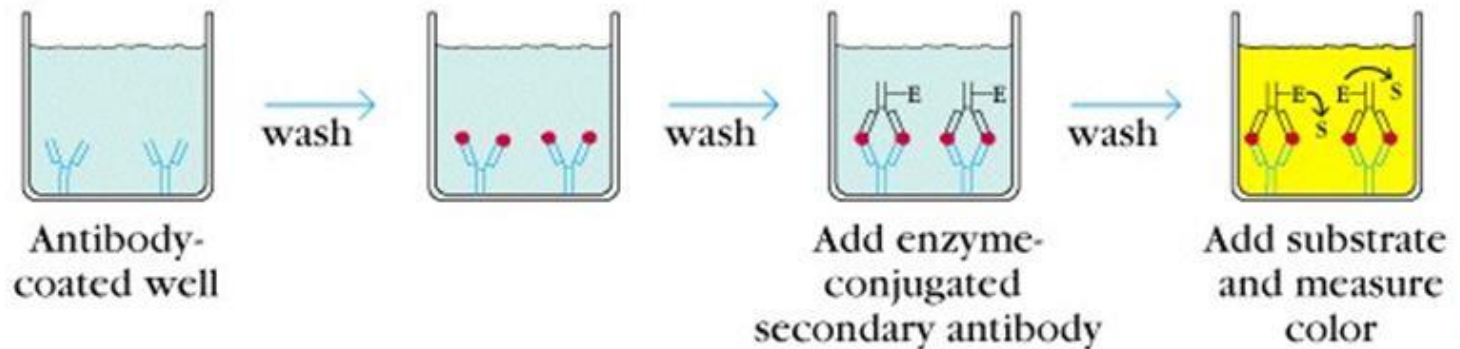
# ELISA Indireto

(a) Indirect ELISA



# ELISA Direto ou Sanduíche

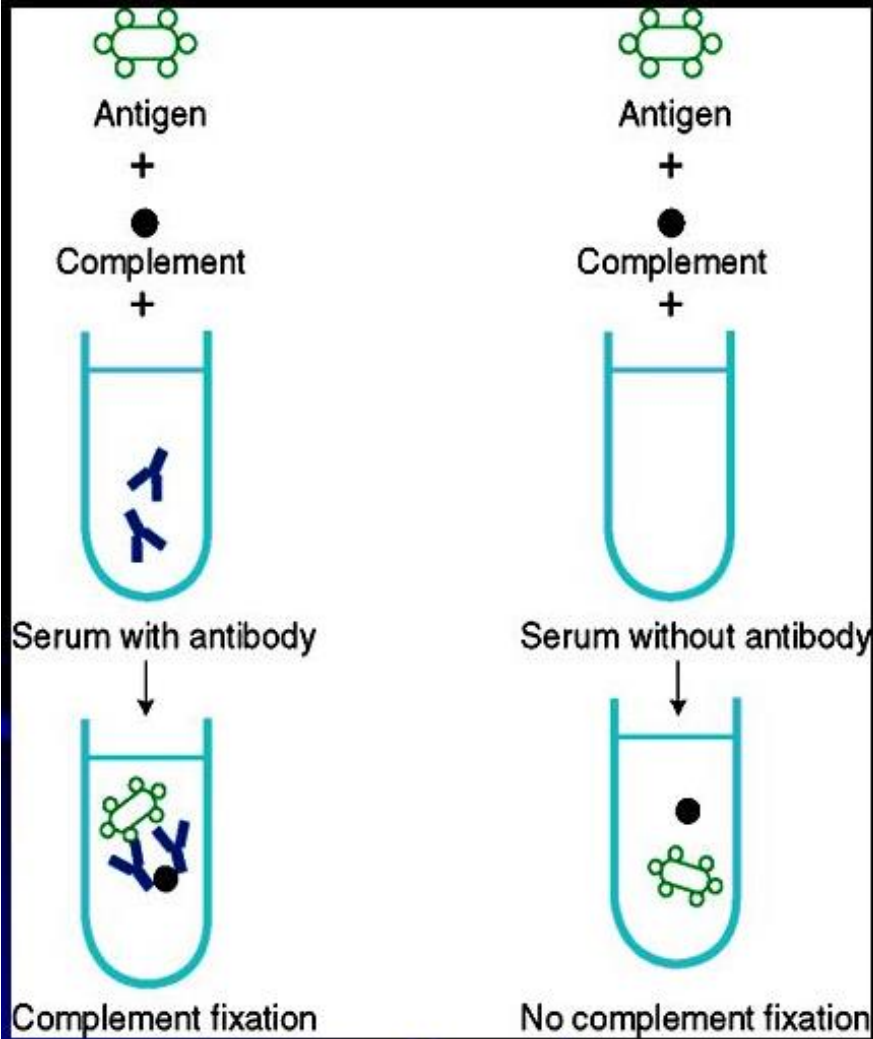
(b) Sandwich ELISA



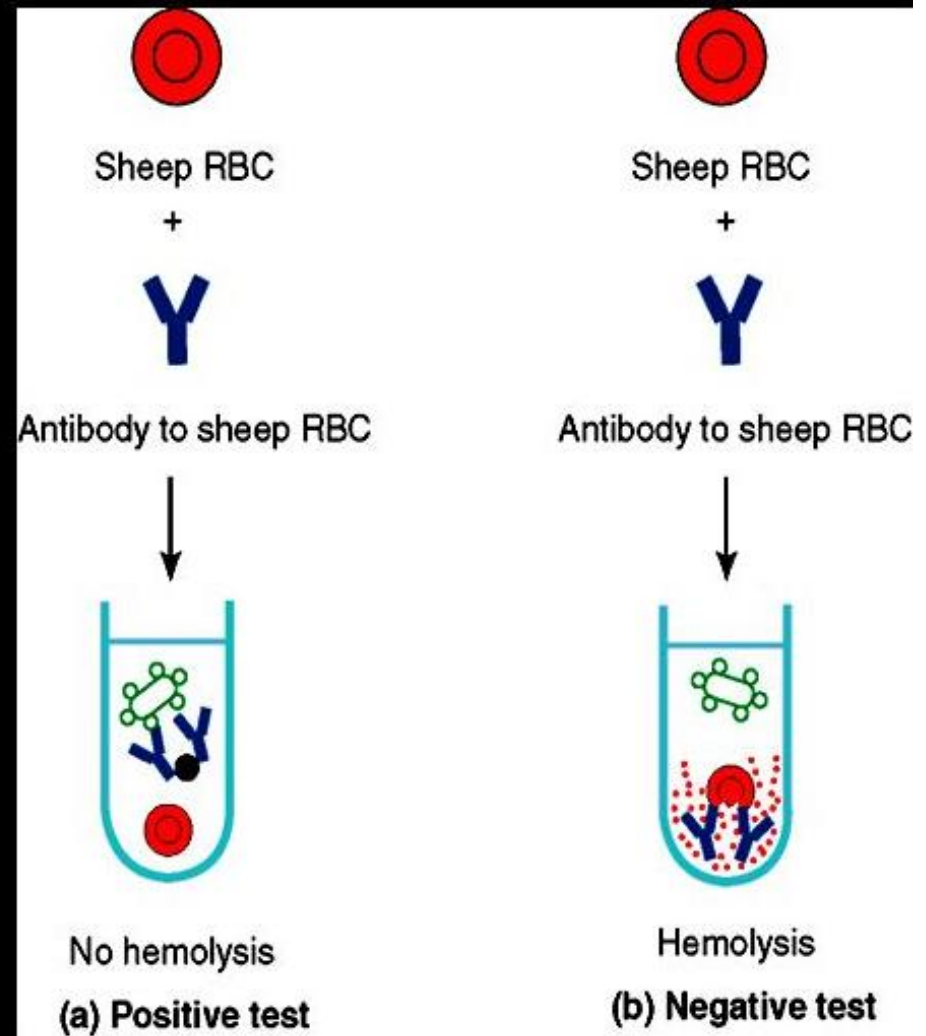
# Fixação do complemento

- Formação de imunocomplexos em soluções também pode ser monitorizada pela capacidade desses complexos de fixar e consumir as proteínas do complemento
- Fácil e de baixo custo
- Utilizados para a detecção de respostas imunológicas contra agentes infecciosos (Ex. histoplasmose e coccidioidomicose)
- Estão sendo substituídos por métodos mais sensíveis baseados em enzimas, e por isso são utilizados mais como testes de confirmação
- São realizados em duas fases

## 1. fixação do complemento



## 2. revelação da reação





# Imunodifusão

- Técnica simples que consiste em colocar antígenos e anticorpos em orifícios separados em um suporte semi-sólido (ex: ágar). Em seguida, os Ags e Acs misturam-se através do suporte por difusão
- Quando se atinge uma zona de equivalência, forma-se uma linha de precipitação, que pode ser visível quando a luz atravessa o gel
  - Dupla difusão em ágar: diferentes antígenos
- Falta de sensibilidade e da necessidade de utilizar alta quantidade de Ag e Ac
- Tempo para a precipitação pode tornar o teste demorado

# Imunodifusão dupla de Ouchterlony

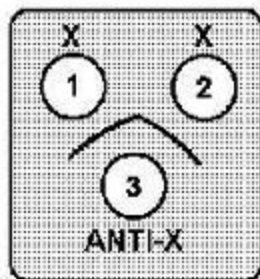
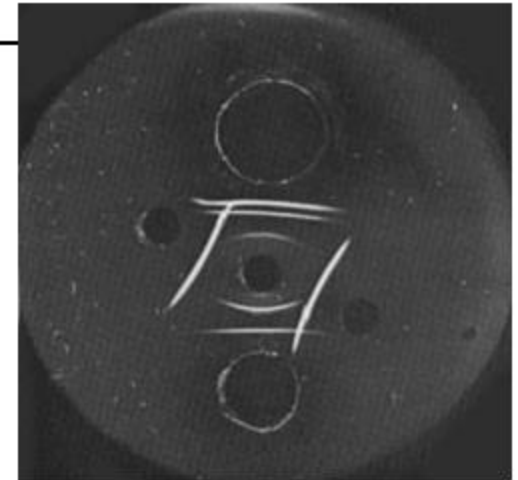
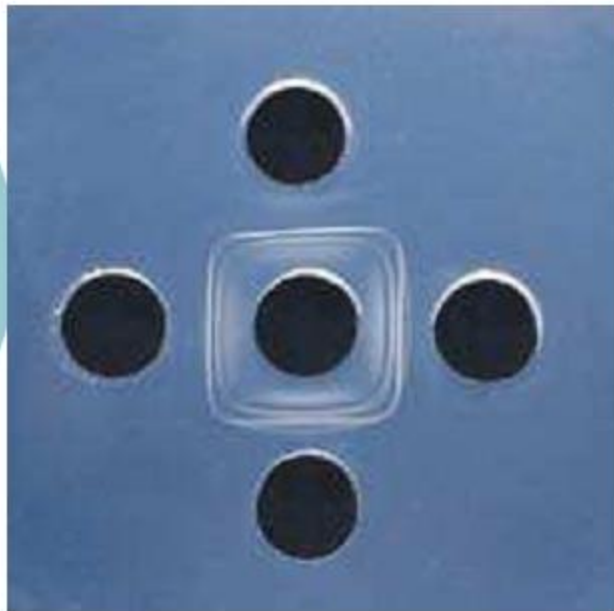


Figure 1: Reaction of Identity

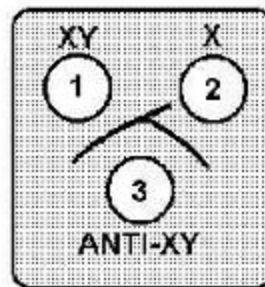


Fig. 2: Reaction of Partial Identity

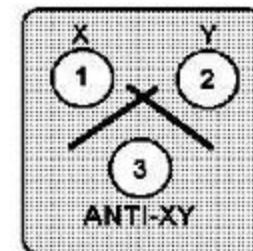


Fig. 3: Reaction of Non-Identity

# Métodos de eletroforese

- Separação de proteínas séricas em campos elétricos
- Eletroforese de zona: separa as proteínas com base em sua carga elétrica superficial
- Eletroforese de desnaturação: separa as proteínas com base em seu peso molecular
- Amostras de soro são aplicadas em meio de suporte e submetidas a um campo elétrico para induzir a migração das proteínas
- Suportes: fitas de géis de agarose, acetato de celulose ou gel de poliacrilamida

# Eletrforese das proteínas séricas

- Aplica-se uma pequena quantidade do soro do paciente (ou outro líquido biológico) no centro do orifício em uma fita de acetato de celulose
- Submete-se a um campo elétrico para que as proteínas migrem de acordo com sua carga
- Fita é corada para localizar as bandas
- Analisada em um densitômetro para obter uma representação analítica do padrão eletroforético
- Soro normal humano: albumina,  $\alpha_1$  globulina,  $\alpha_2$  globulina,  $\beta$  globulina e  $\gamma$  globulina
- Ex. exames: mieloma múltiplo e macroglobulinemia de Waldstrom

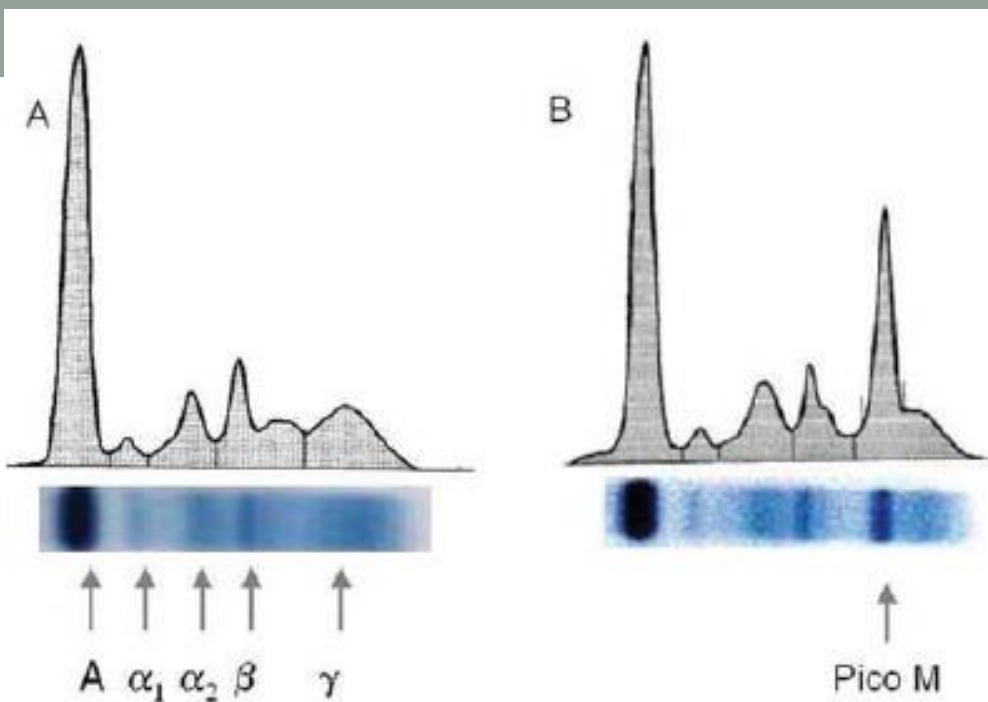


Figura 1. Eletroforese sérica em gel de agarose. A: Perfil normal. B: mieloma múltiplo

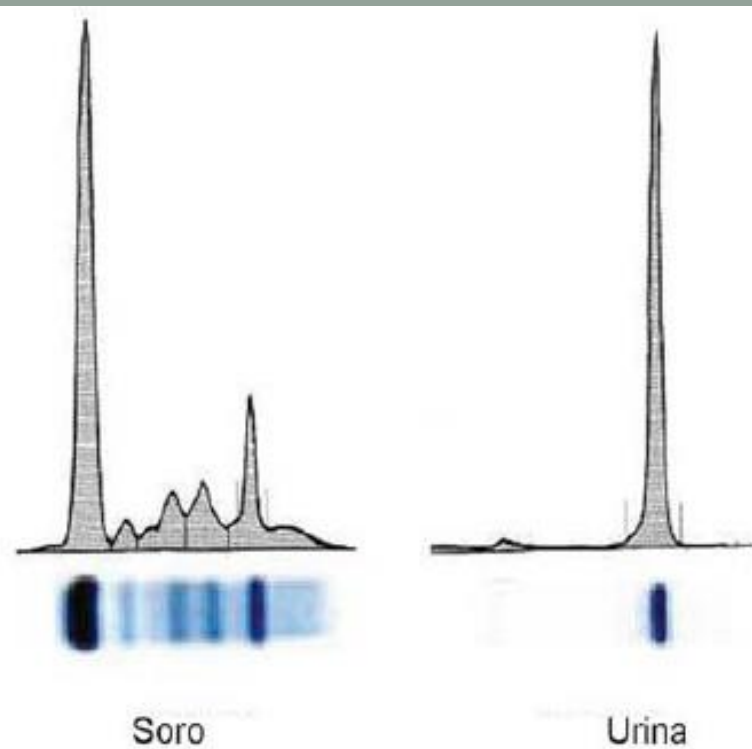


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose de paciente com mieloma múltiplo

imunoglobulina monoclonal é reconhecida como uma banda de migração restrita na eletroforese de soro ou de urina (componente M)

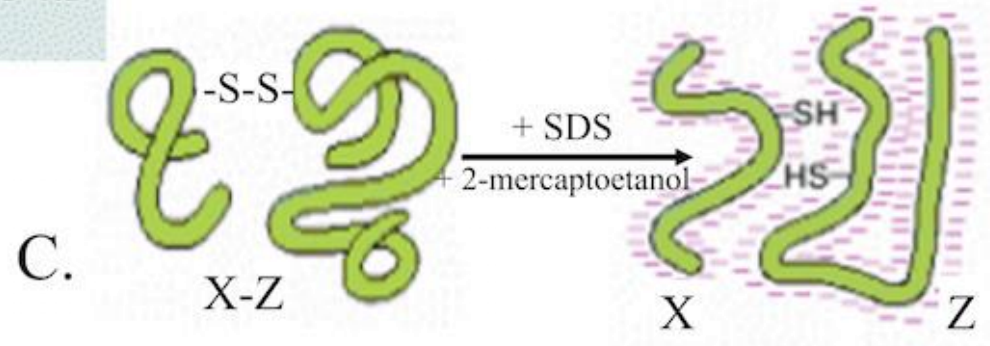
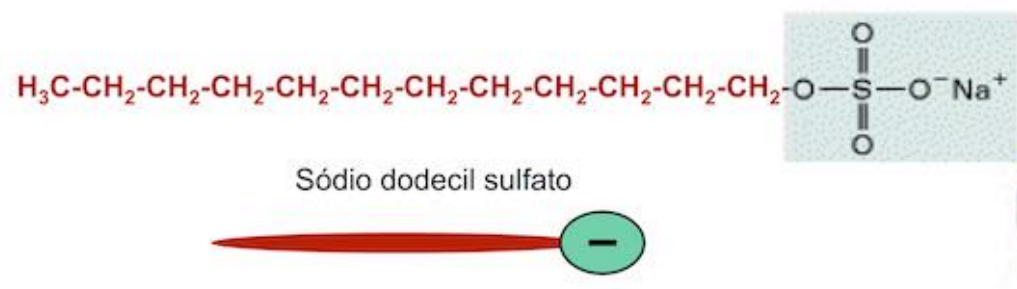
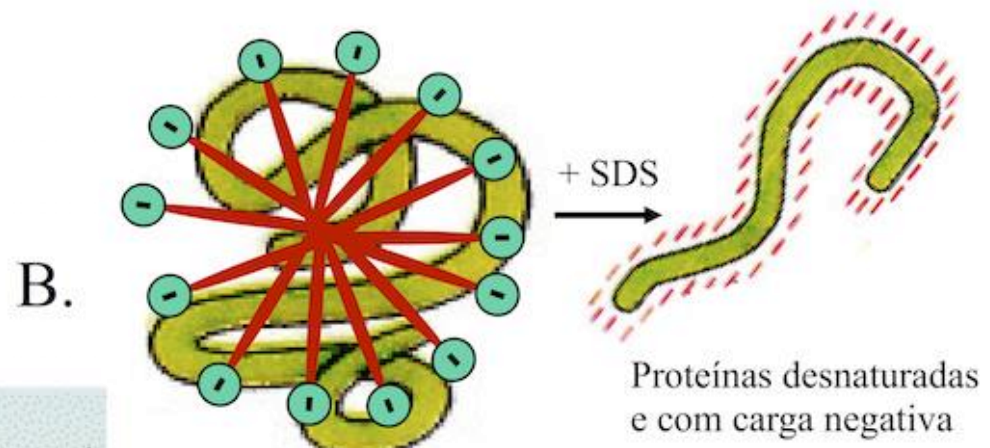
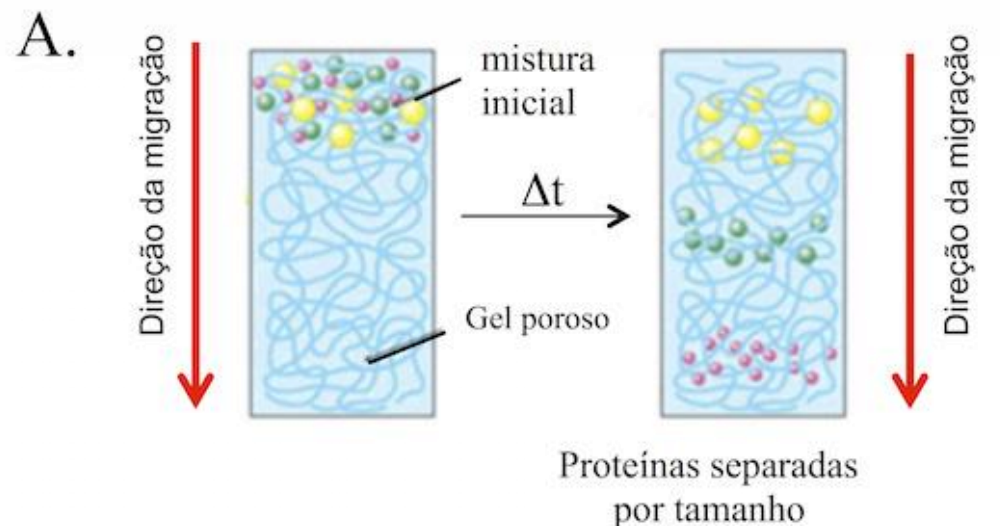
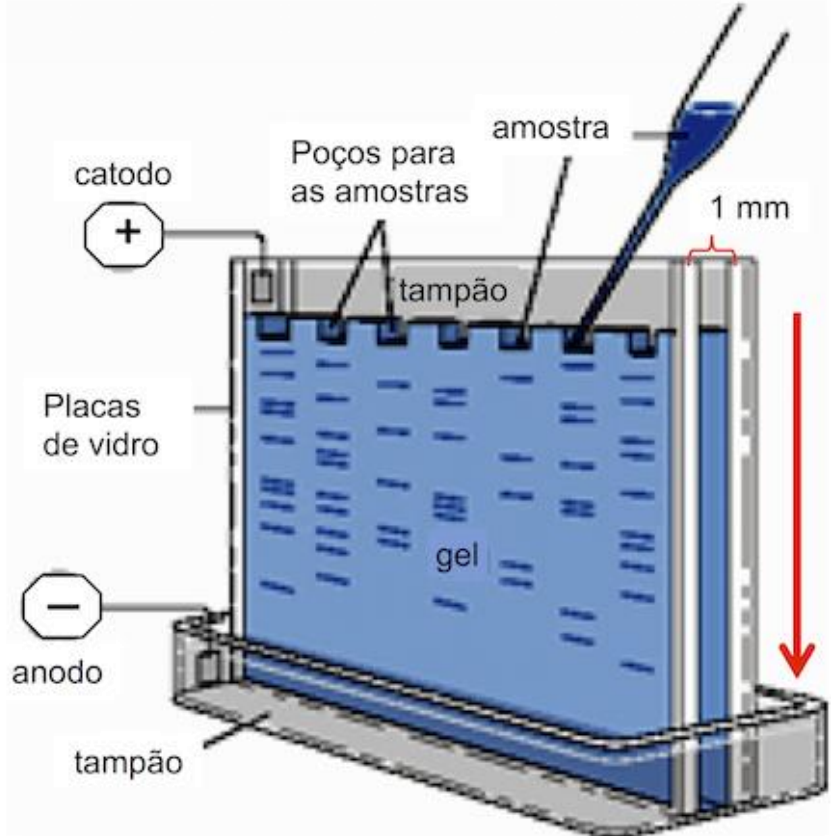
# Eletrforese em gel de desnaturação e Western Blotting

- Proteínas são desnaturadas por incubação com detergente iônico (SDS) a 100°C, seguida de eletrforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page)
- O detergente recobre a proteína, tornando a carga superficialmente negativa
- As proteínas migram dentro do campo elétrico de acordo com a quantidade de moléculas de SDS ligadas, que por sua vez é influenciada pelo tamanho da proteína
- Separa as proteínas por peso molecular
- SDS-Page combinada com imunoblotting ou Western Blotting para a identificação específica de determinadas proteínas em uma amostra

# Eletroforese em gel de desnaturação e Western Blotting

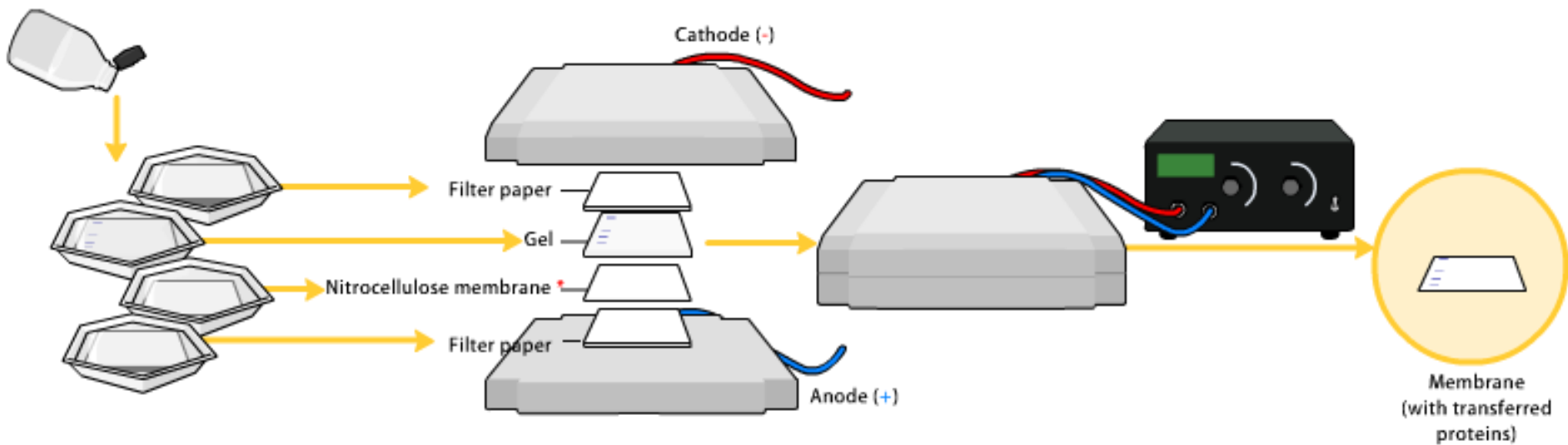
- Após a eletroforese, as proteínas são eletroforeticamente transferidas para um papel de filtro (Nitrocelulose), ao qual aderem por interação não-polares
- O papel filtro é incubado com anti-soros específicos para revelar as proteínas relativas
- Defini o padrão de reatividade dos anticorpos de pacientes a certos patógenos
- Ex: HIV



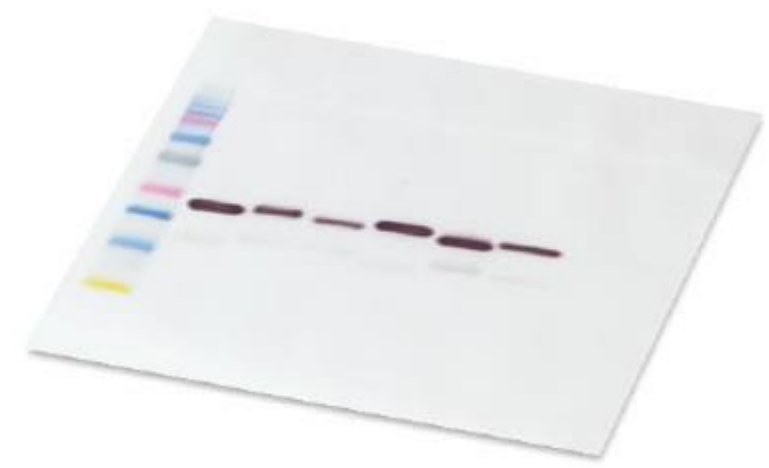
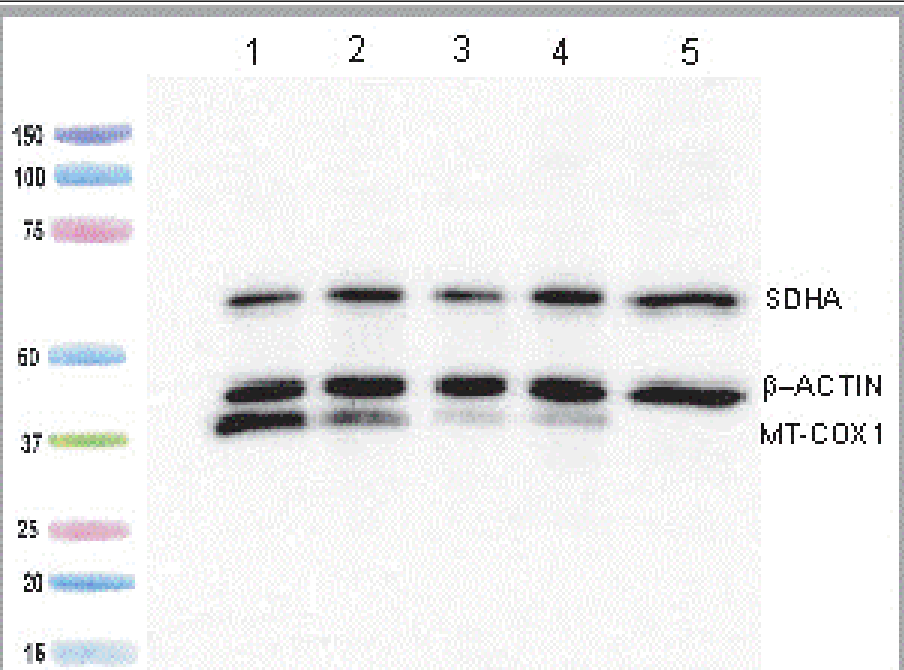




Transfer buffer



**\*If proteins are hydrophobic, use PVDF membrane instead.**

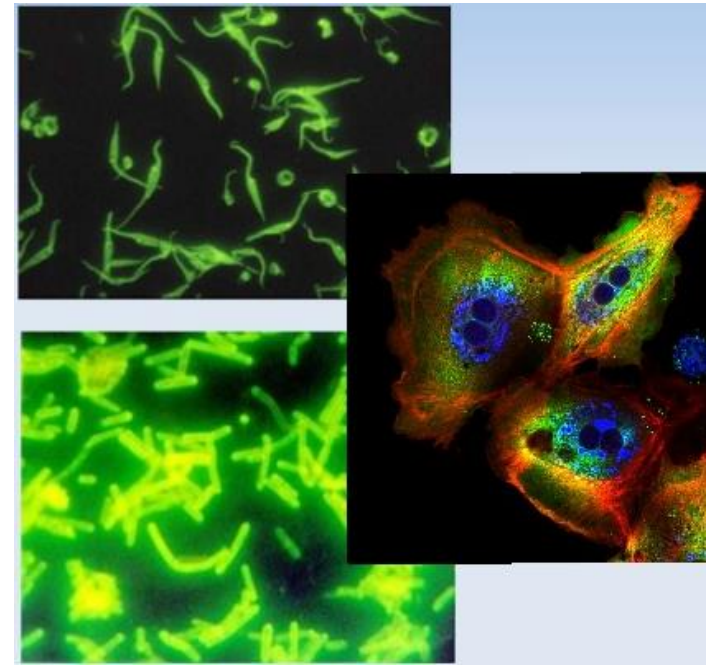


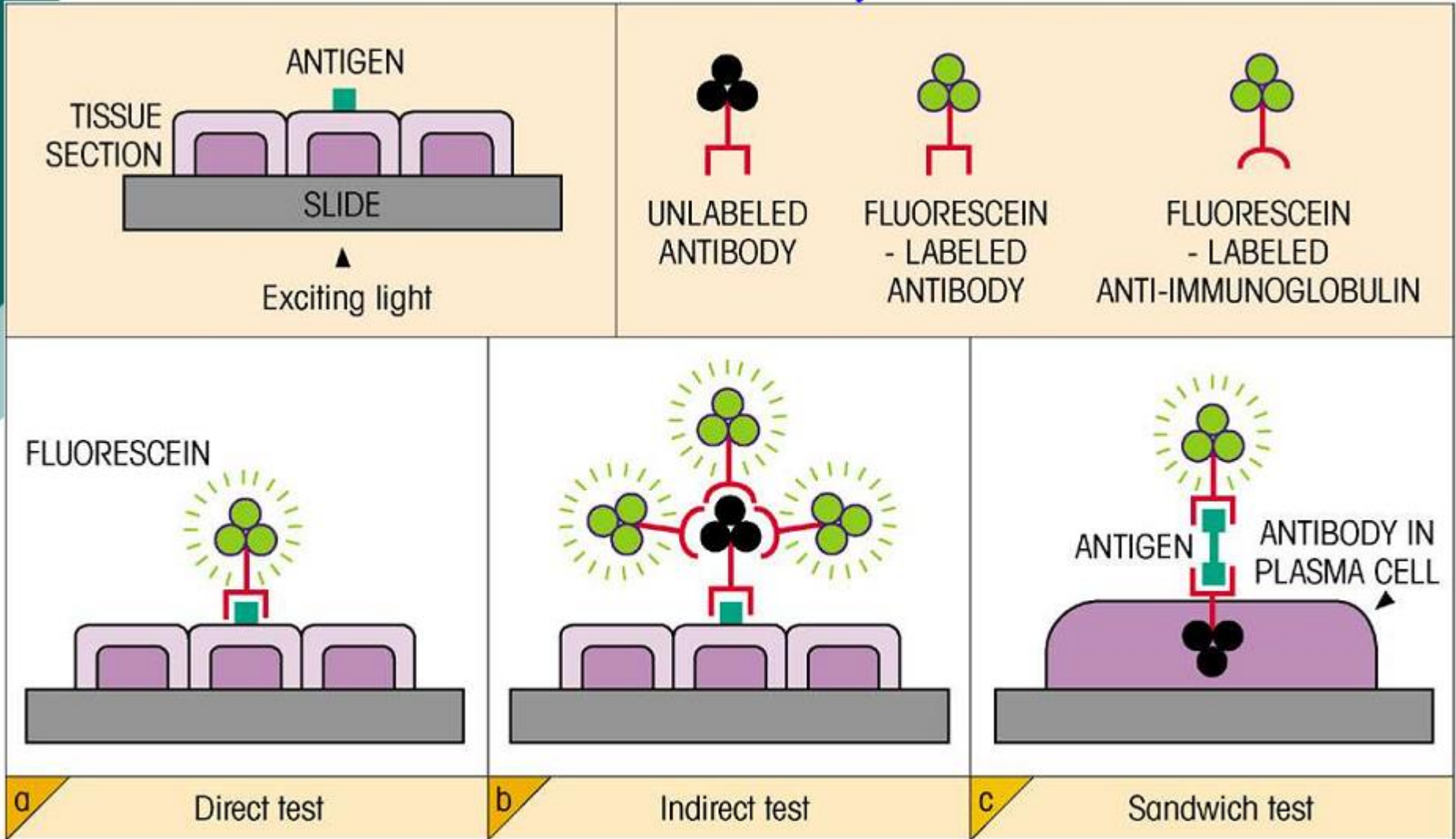
# Imunofluorescência

- São utilizados anticorpos específicos conjugados com marcadores fluorescentes, como sondas para a detecção de antígenos em amostras de tecidos ou em células do paciente
- Os anticorpos não ligados são removidos mediante lavagens e os Acs especificamente ligados são visualizados com anti-soros Anti-Ig marcados de modo fluorescente
  - Ex. teste: detecção do herpes vírus e o vírus Epstein-Barr
- **Fluorescência:** emissão de luz de uma cor (comprimento de onda) enquanto uma substância é irradiada com luz de uma cor diferente
  - Fluorocromos mais utilizados: fluoresceína e a rodamina

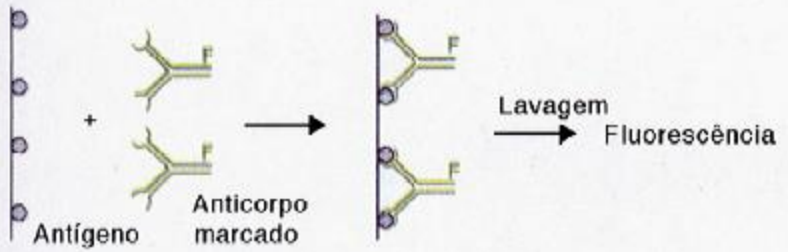
# IFA indireto

- Detecção de anticorpos reativos no soro do paciente utilizando um segundo anticorpo anti-Ig marcado
- Utilizado para detectar a presença de auto-anticorpos que reagem inapropriadamente contra tipos celulares específicos ou contra estruturas subcelulares

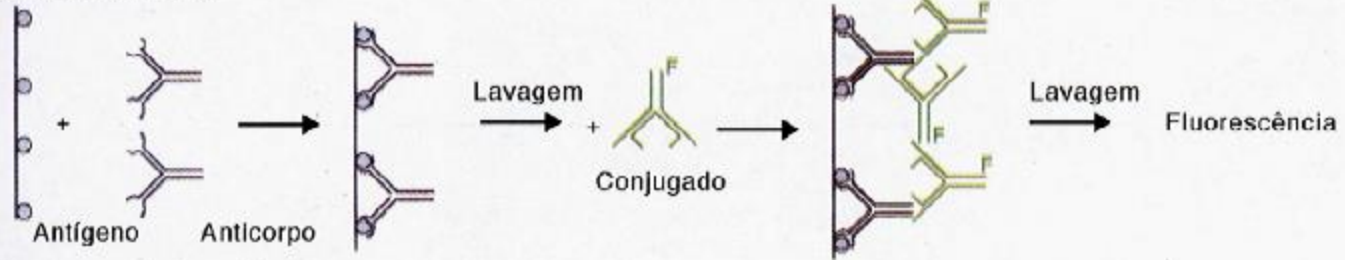




Método direto



Método indireto



Sistema avidina-biotina

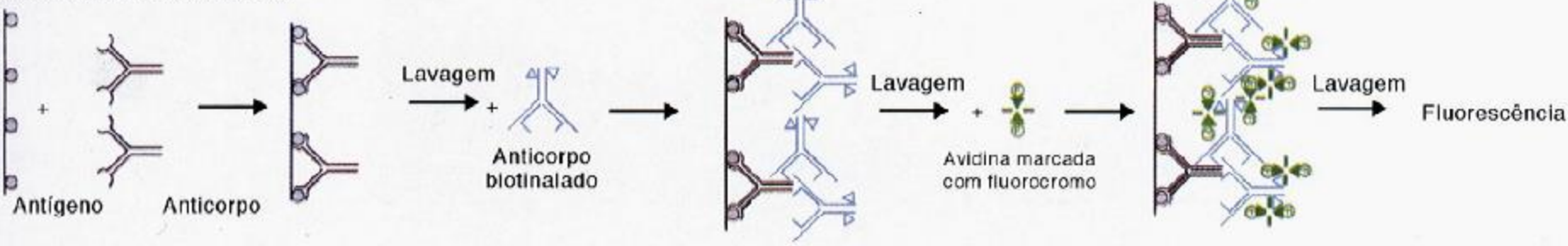


Fig. 2.11 Teste de imunofluorescência. Esquema dos métodos direto, indireto e com o sistema avidina-biotina.



# Fluorescence Microscope

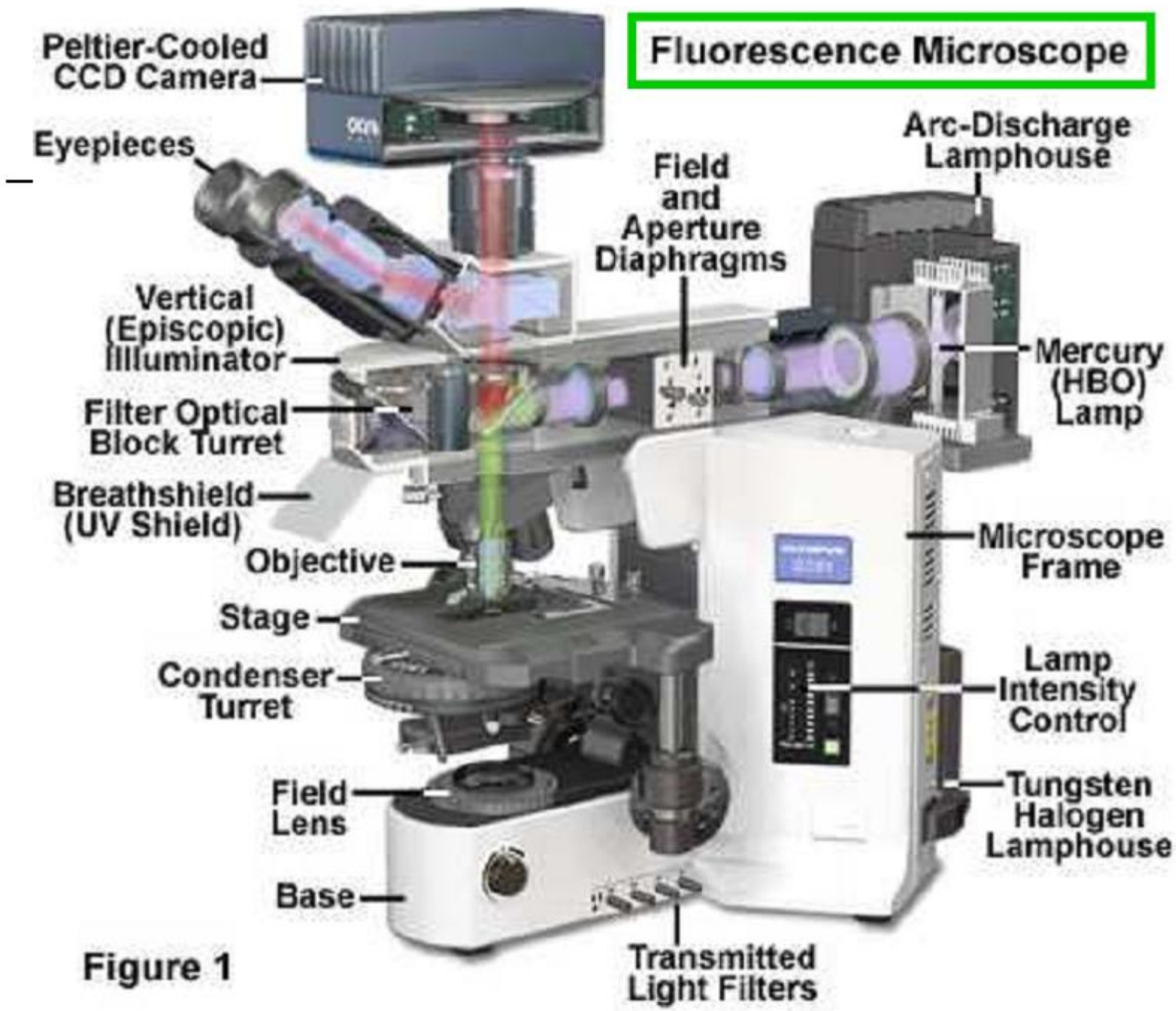
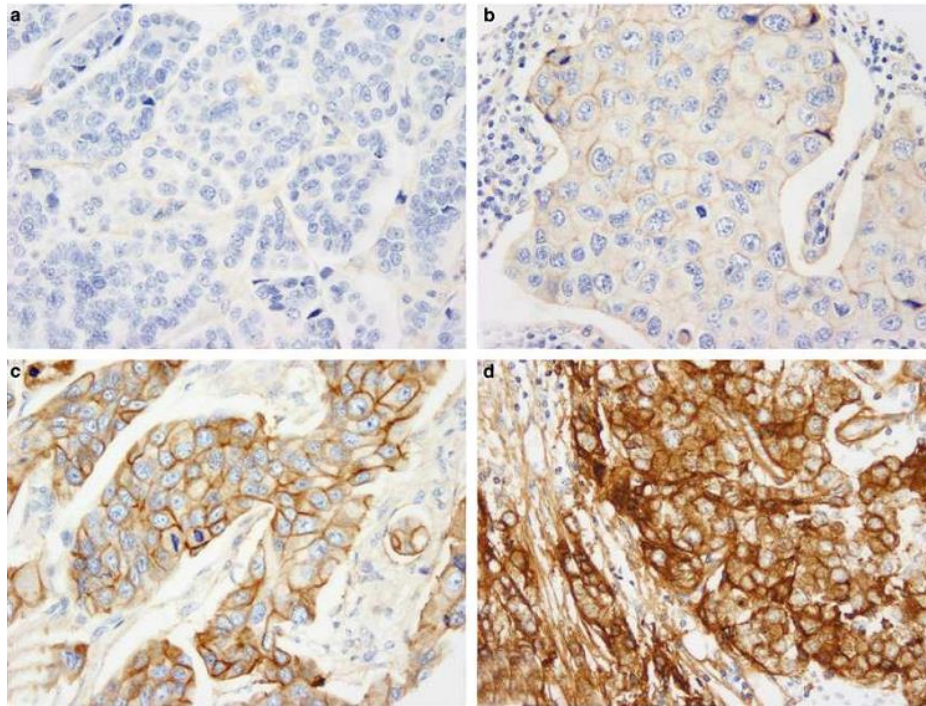
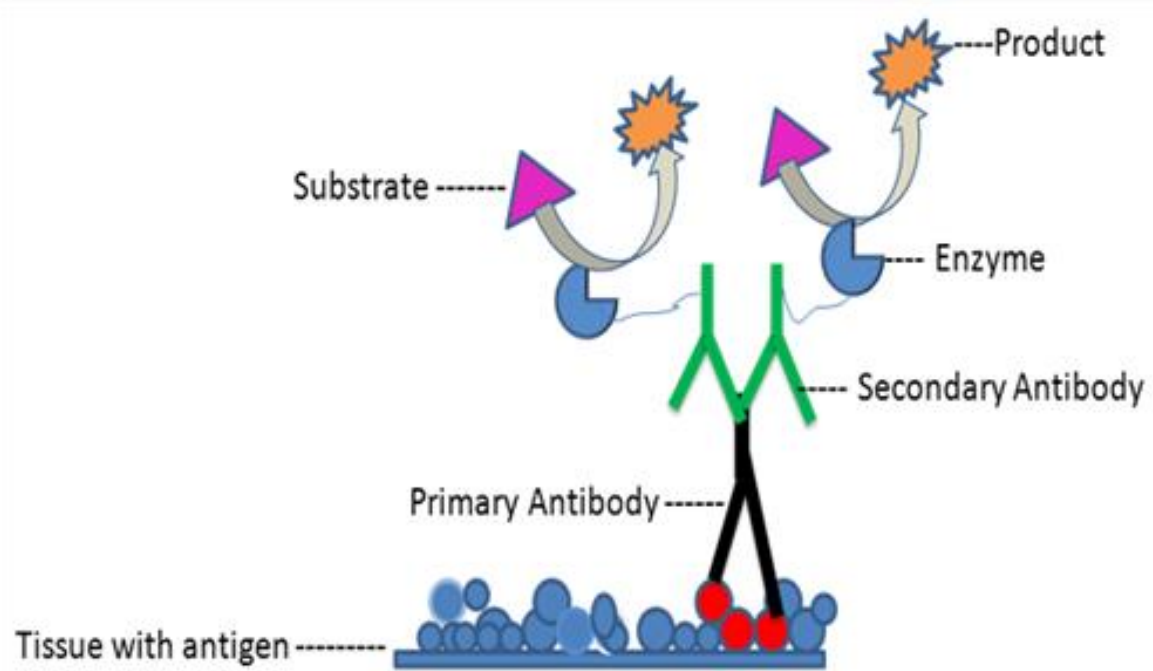


Figure 1

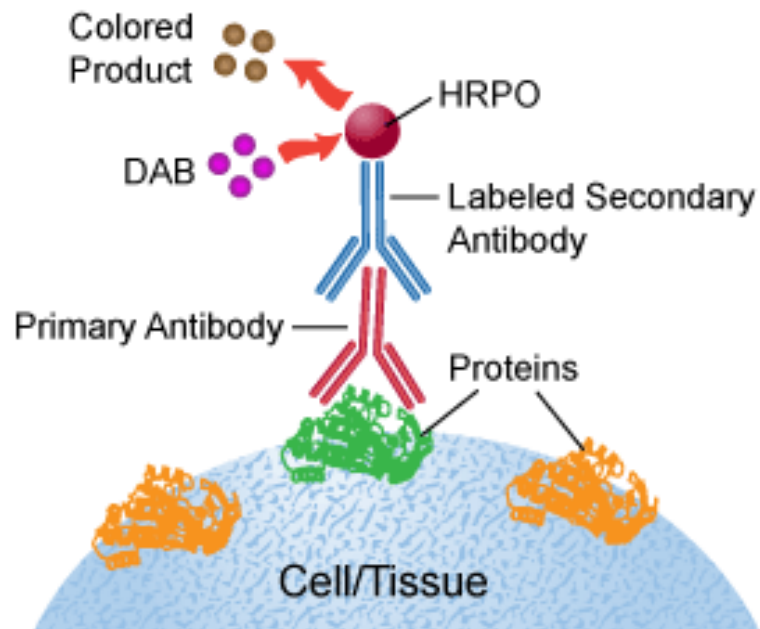
# Imunohistoquímica

- Anticorpos primários empregados são marcados com enzimas, sendo a sua ligação detectada pela presença de atividade enzimática
- Amostras são incubadas com substratos enzimáticos que produzem um produto que sofre precipitação direta no corte histológico
- Anticorpo secundário: utilizado para intensificar a produção de sinal (ensaios indiretos)
- Marcados com peroxidase de raiz forte ou um anticorpo associado a biotina/avidina
- Ex. teste: detectar antígenos tumorais ou para classificar tipos de linfócitos com cortes cirúrgicos patológicos

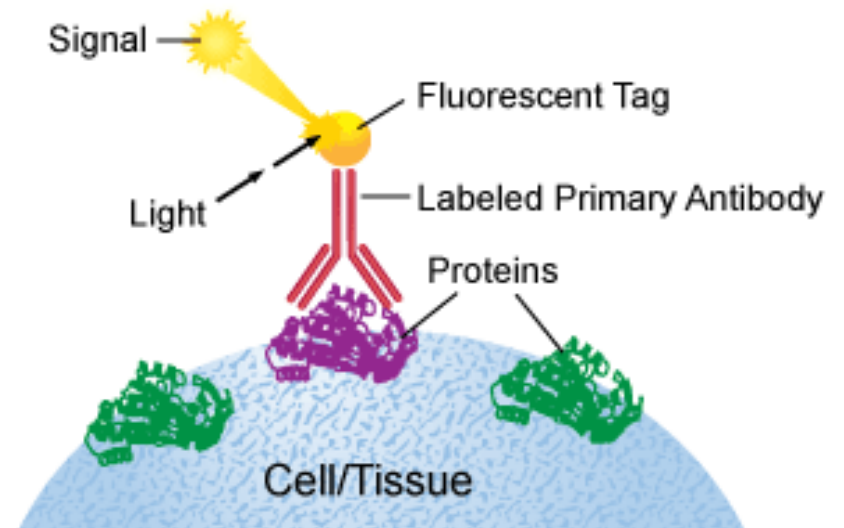




## Indirect Immunohistochemistry



## Immunofluorescence



**Diagram 1:** Illustration of Indirect Immunohistochemistry and Immunofluorescence methods.

