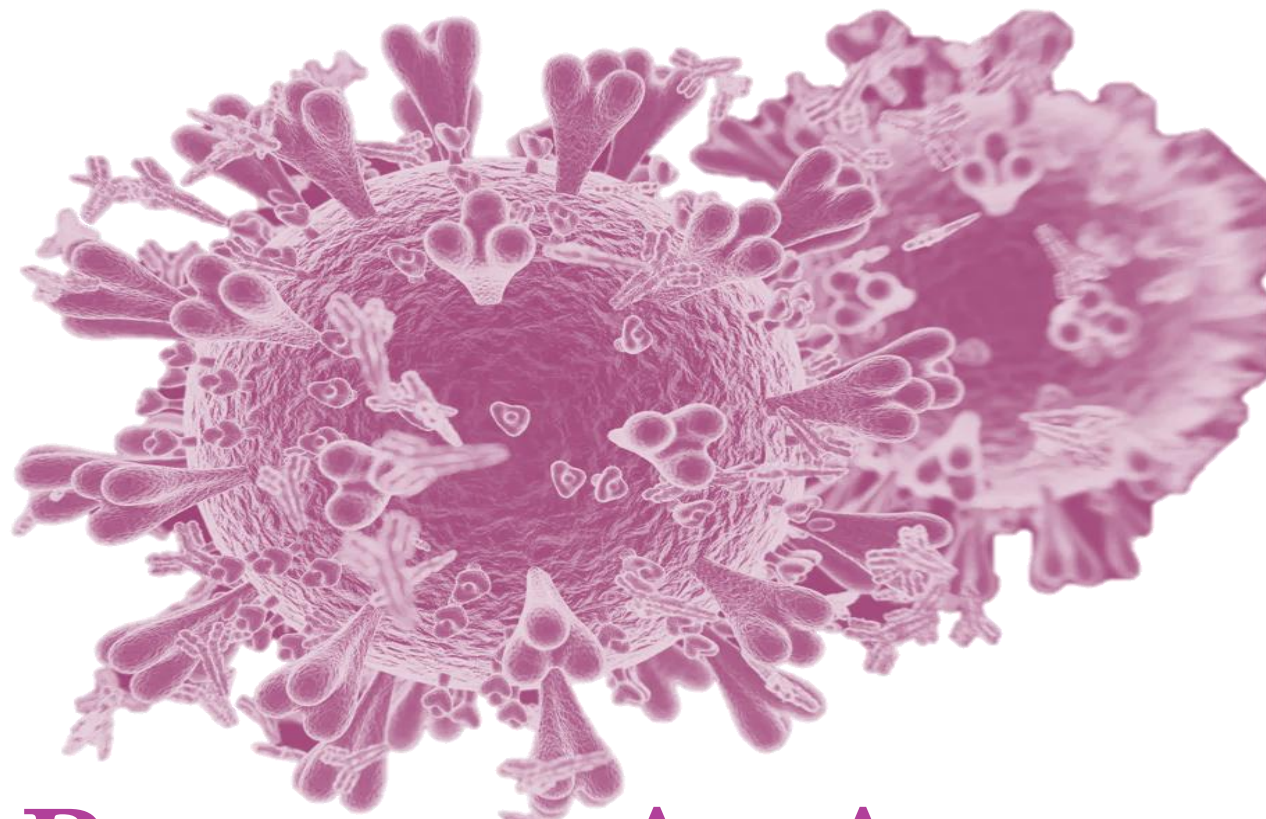
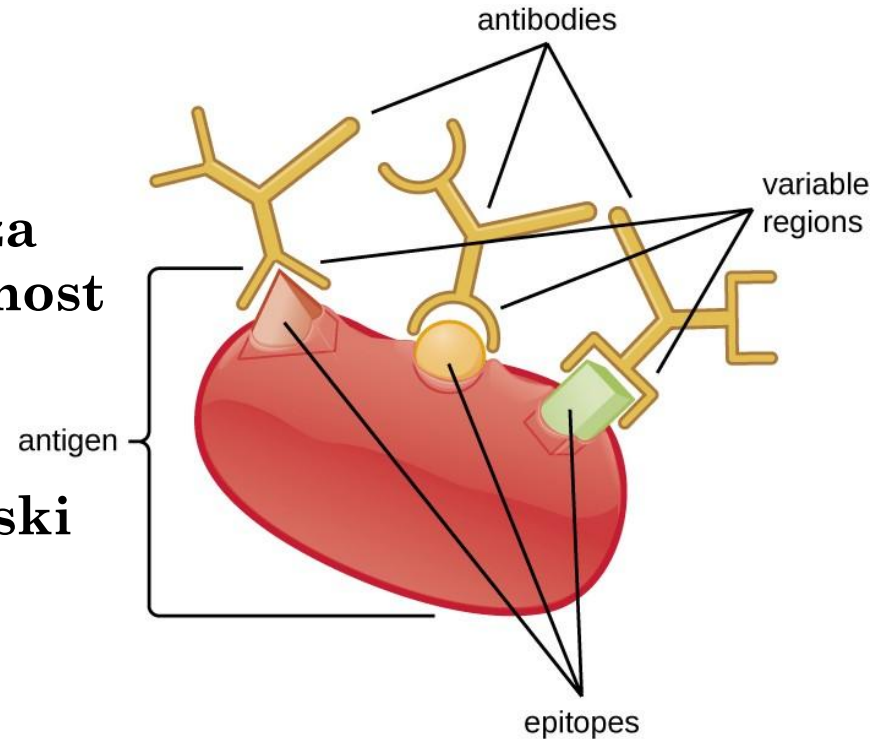




● REAKCIJE AG-AT

SPECIFIČNOST ANTITELA

- Specifičnost antitela – Fab fragment, varijabilni region
- Jedinствена sekvenca aminokiselina koja se vezuje za ciljni antigen – komplementarnost
- Antigen – epitop + antitelo – paratop
- Unakrsna reaktivnost – hemijski slični ciljni antigeni
- Unakrsna reaktivnost – antitela niskog afiniteta ili aviditeta + antigeni



SPECIFIČNOST ANTITELA

- **Afinitet** - mera jačine veze između paratopa i epitopa
- Prvi susret sa Ag – nizak nivo afiniteta At

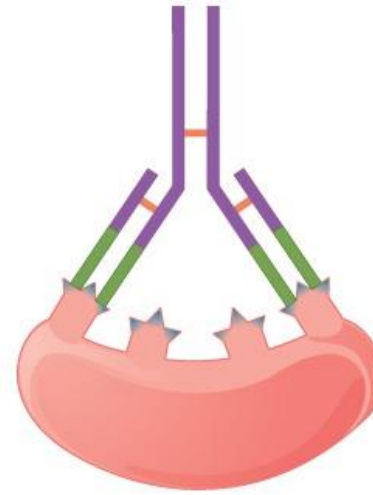
Svaki sledeći susret – pojačanje afiniteta – adaptacija imunog sistema

- **Aviditet** - ukupna jačina formiranih veza antigena i antitela kojih može biti više

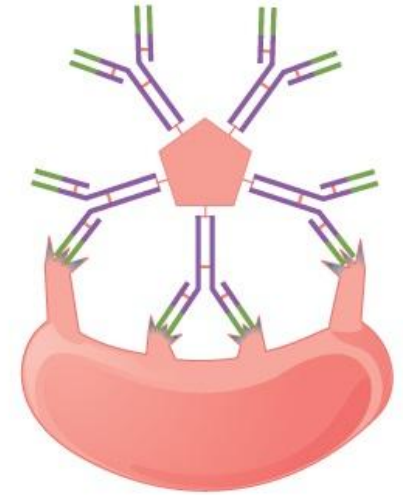
Određuju ga 3 faktora:

1. **Afinitet** (jačina pojedinačnih veza)
2. **Valenca** (broj aktivnih mesta)
3. **Struktura Ag i At**

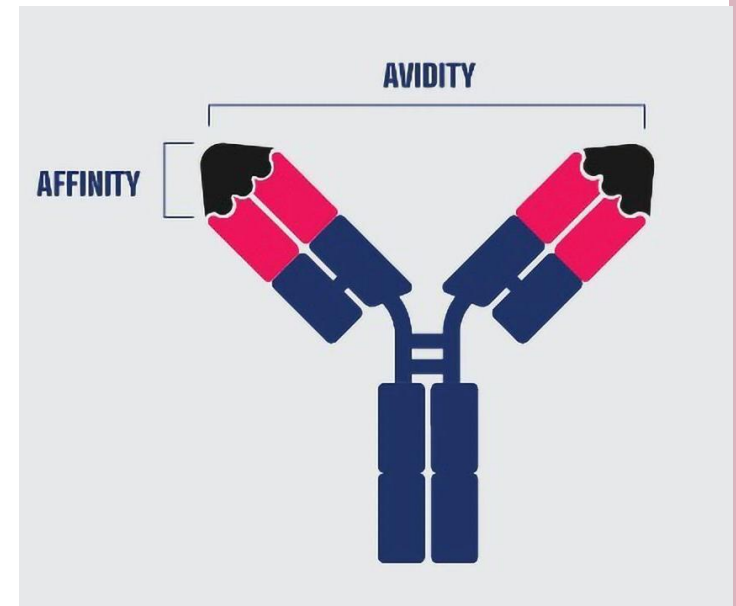
(a) Affinity versus avidity



Affinity refers to the strength of a single antibody–antigen interaction. Each IgG antigen binding site typically has high affinity for its target.

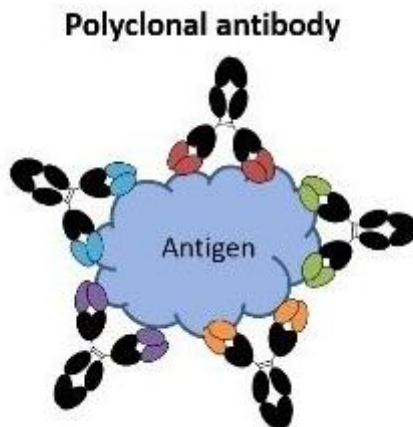


Avidity refers to the strength of all interactions combined. IgM typically has low affinity antigen binding sites, but there are ten of them, so avidity is high.



POLIKLONSKA ANTITELA

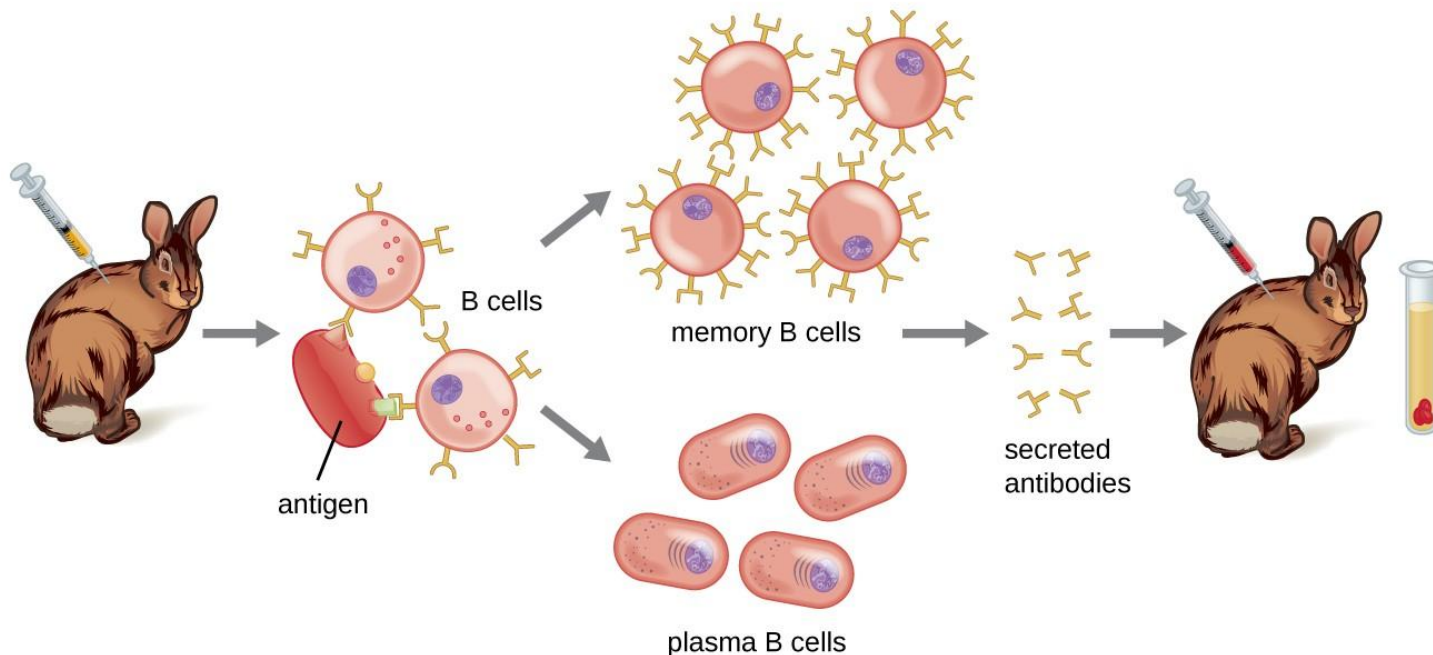
- Inokulacija lab. životinja specifičnim Ag
- Istraživanja, dijagnostika..terapija..
- Prikupljanje seruma – visok titar At specifičnih za Ag (**antiserum**)
- Antigeni kompleksni!!
- Antiserum sadrži antitela poreklom od više klonova B limfocita – svaki kao odgovor na drugi epitop



POLIKLONSKA ANTITELA

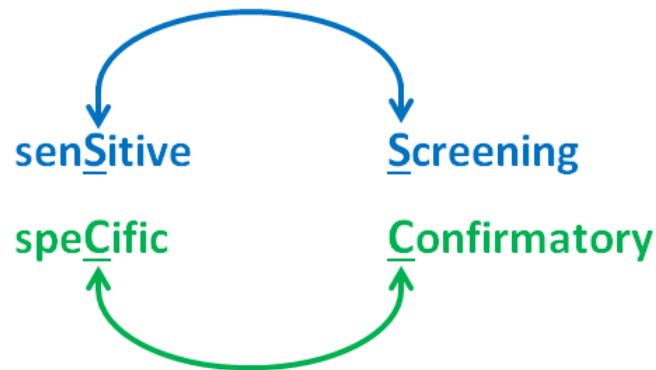
- Proizvodnja antiseruma – najmanje 2x se inokuliše Ag + adjuvans – stimulacija imuniteta – IgG višeg afiniteta

- 1 Inject antigen into rabbit.
- 2 Antigen activates B cells.
- 3 Plasma B cells produce polyclonal antibodies.
- 4 Obtain antiserum from rabbit containing polyclonal antibodies.



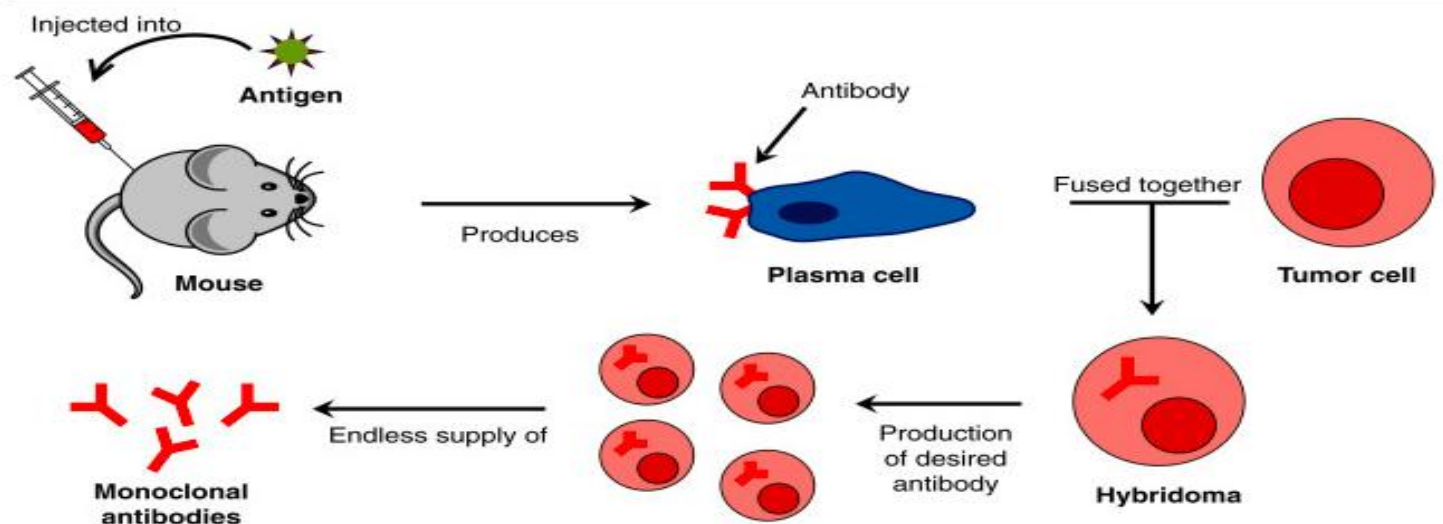
SPECIFIČNOST I OSETLJIVOST

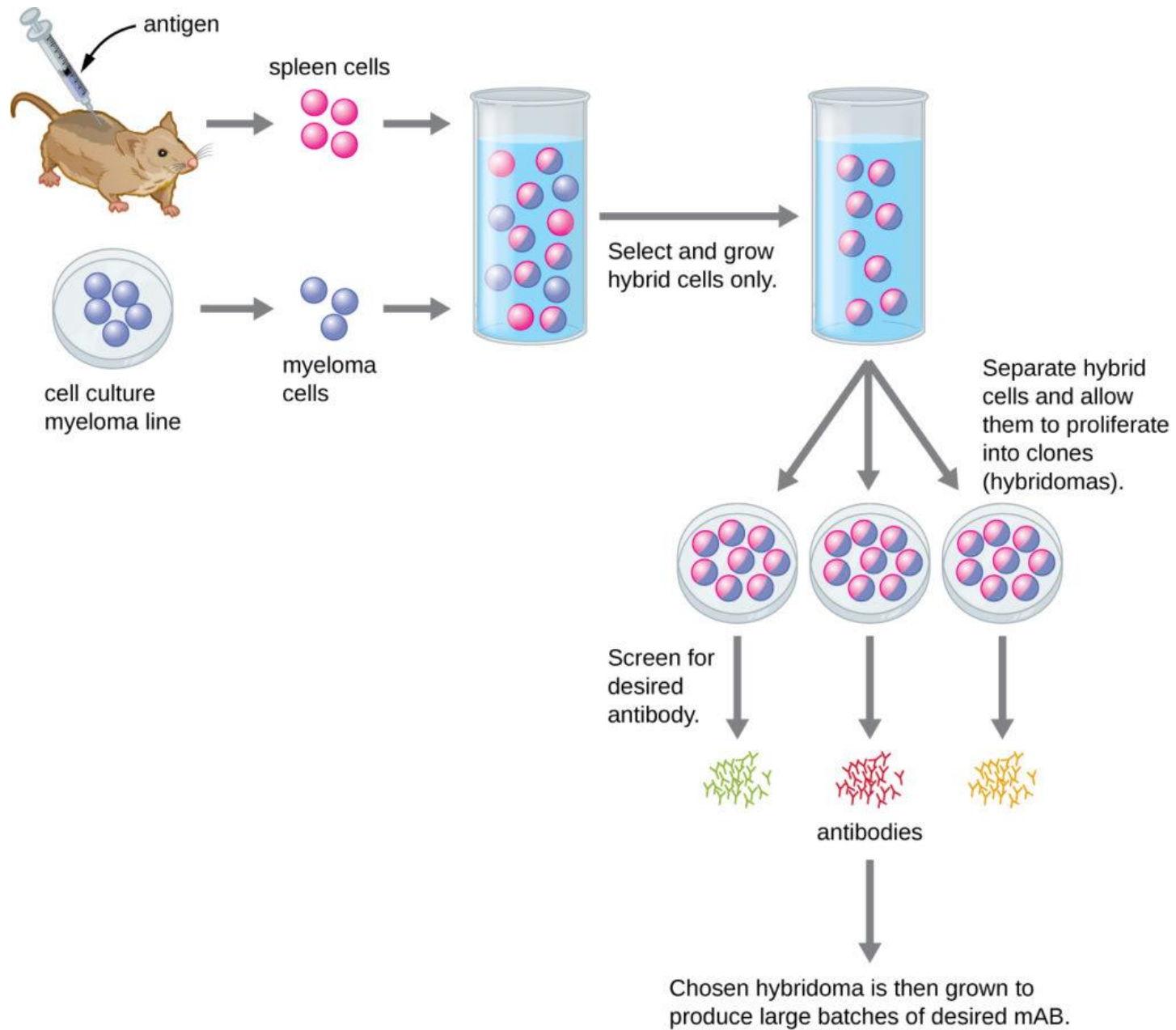
- **Osetljivost** – verovatnoća dobijanja + kada je jedinka inficirana; mala verovatnoća lažno -
- **Specifičnost** – verovatnoća dobijanja – kada jednika nije inficirana; mala verovatnoća lažno +
- Poliklonski serum – visoka osetljivost ALI veća mogućnost unakrsnih reakcija
- U nekim slučajevima – potrebna antitela visoke specifičnosti – visokog afiniteta za pojedinačni epitop – monoklonski serum



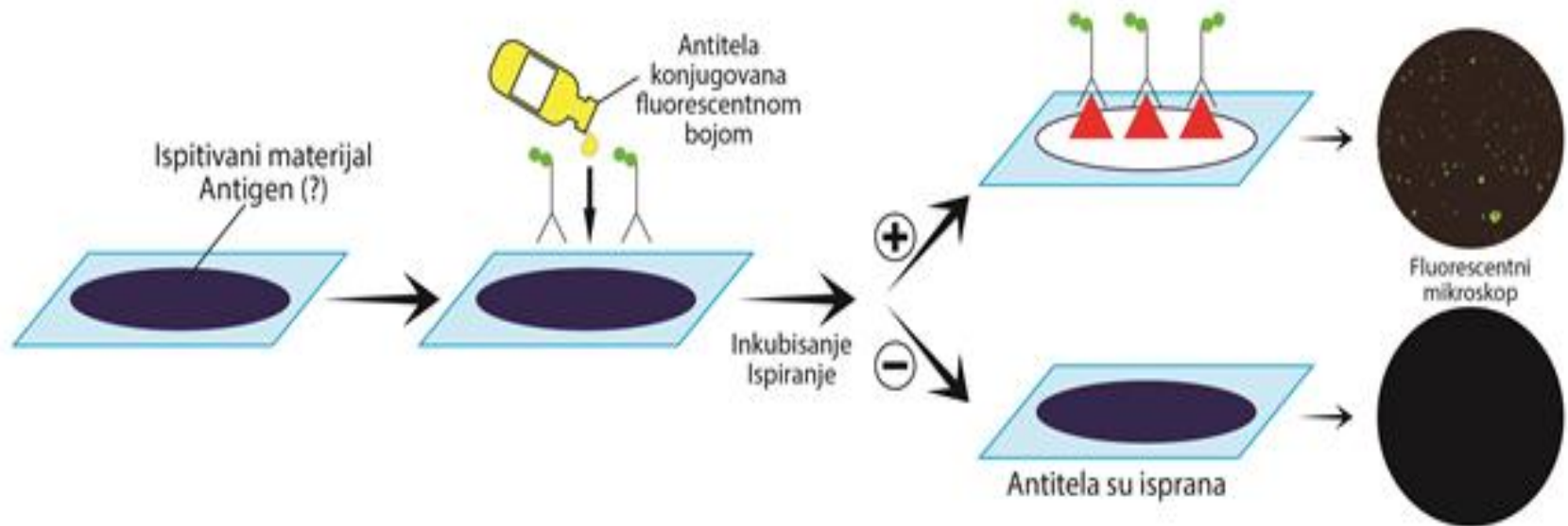
MONOKLONSKA ANTITELA

- Monoklonska antitela se proizvode *in vitro* primenom tehnike kulture tkiva
- Imunizacija miševa spec. Ag više puta – izolacija B limfocita iz slezine – fuzija sa B ćelijama mijeloma u selektivnoj podlozi – hibridoma ćelije koje proizvode antitela – selekcija ćelija koje proizvode željena antitela - prečišćavanje antitela iz podoge

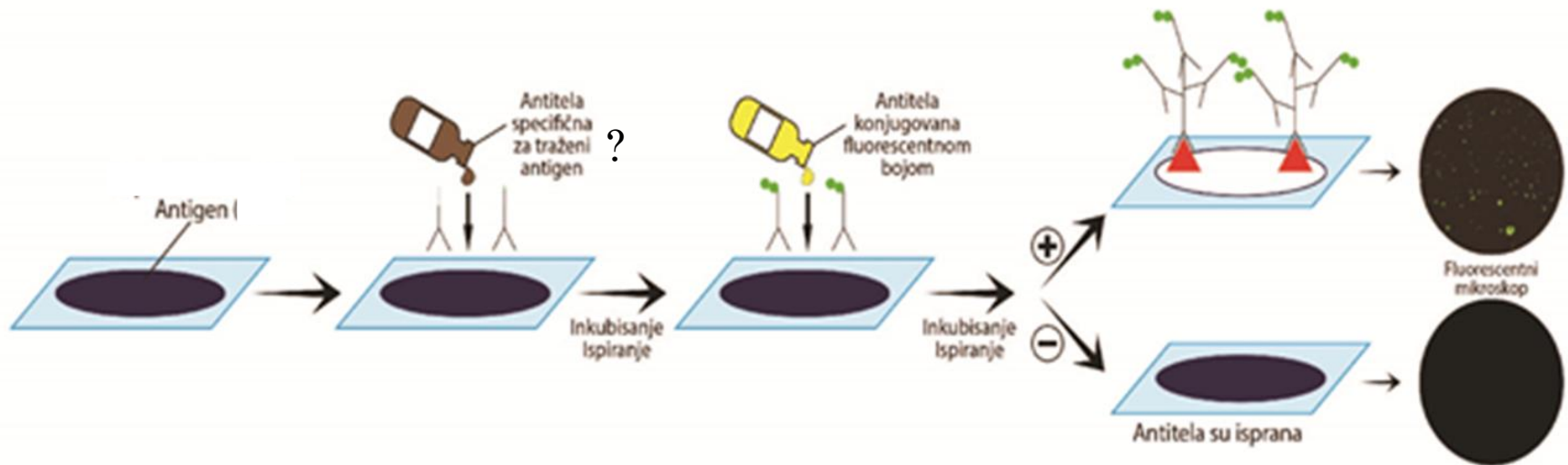




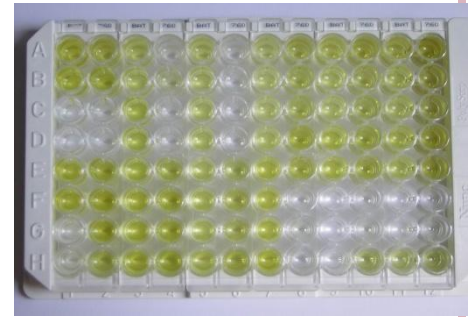
DIREKтна IMUNOFLOURESCENCIJA



INDIREKTNA IMUNOFLUORESCENCIJA



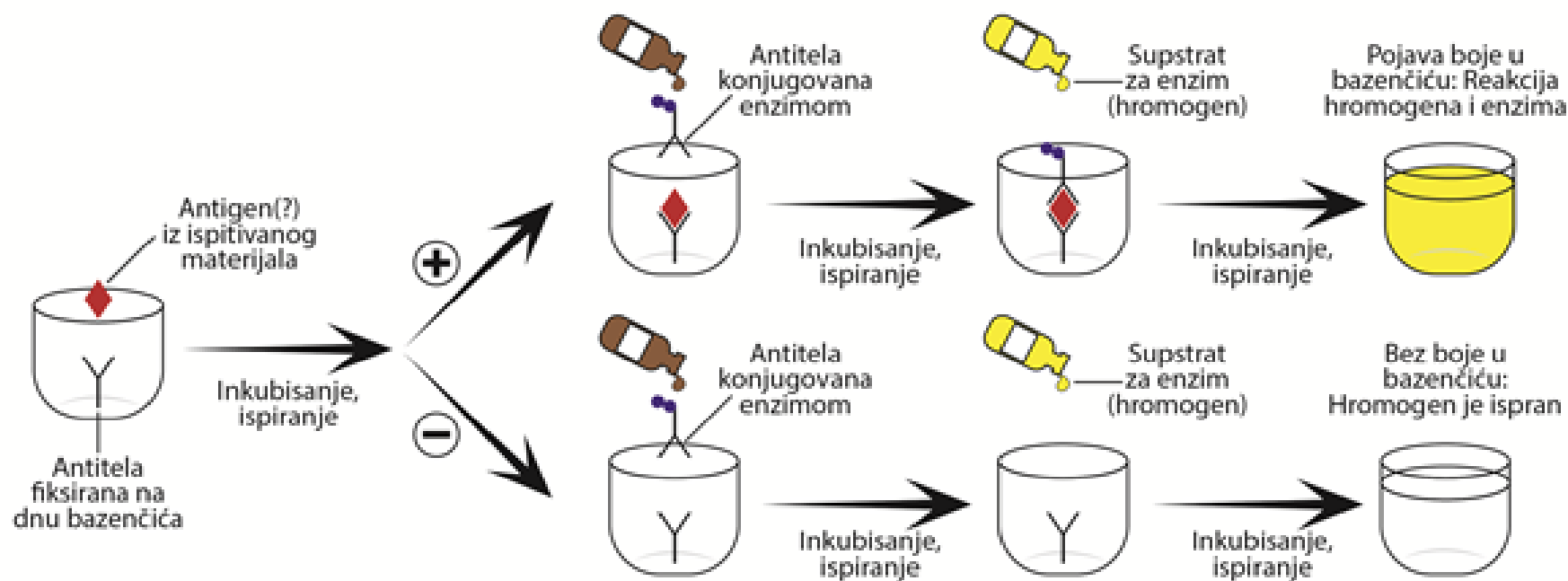
IMUNOENZIMSKE METODE - ELISA



- Imunoenzimske metode (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) se zasnivaju na primeni Ag ili At koji se obeležavaju enzimima.
- Za izvođenje imunoenzimskih metoda se najčešće koriste Ag ili At. adsorbovani na čvrstim površinama, odnosno na dnu mikrotitracionih ploča.
- ELISA se koriste za detekciju Ag ili At na osnovu promene boje do koje dovodi prisustvo enzima posle dodavanja supstrata u udubljenja mikrotitracionih ploča.
- Mogu se podeliti na tri vrste:
 1. Direktna (sendvič) ELISA
 2. Indirektna ELISA (iELISA)
 3. Kompetitivna ELISA (cELISA)

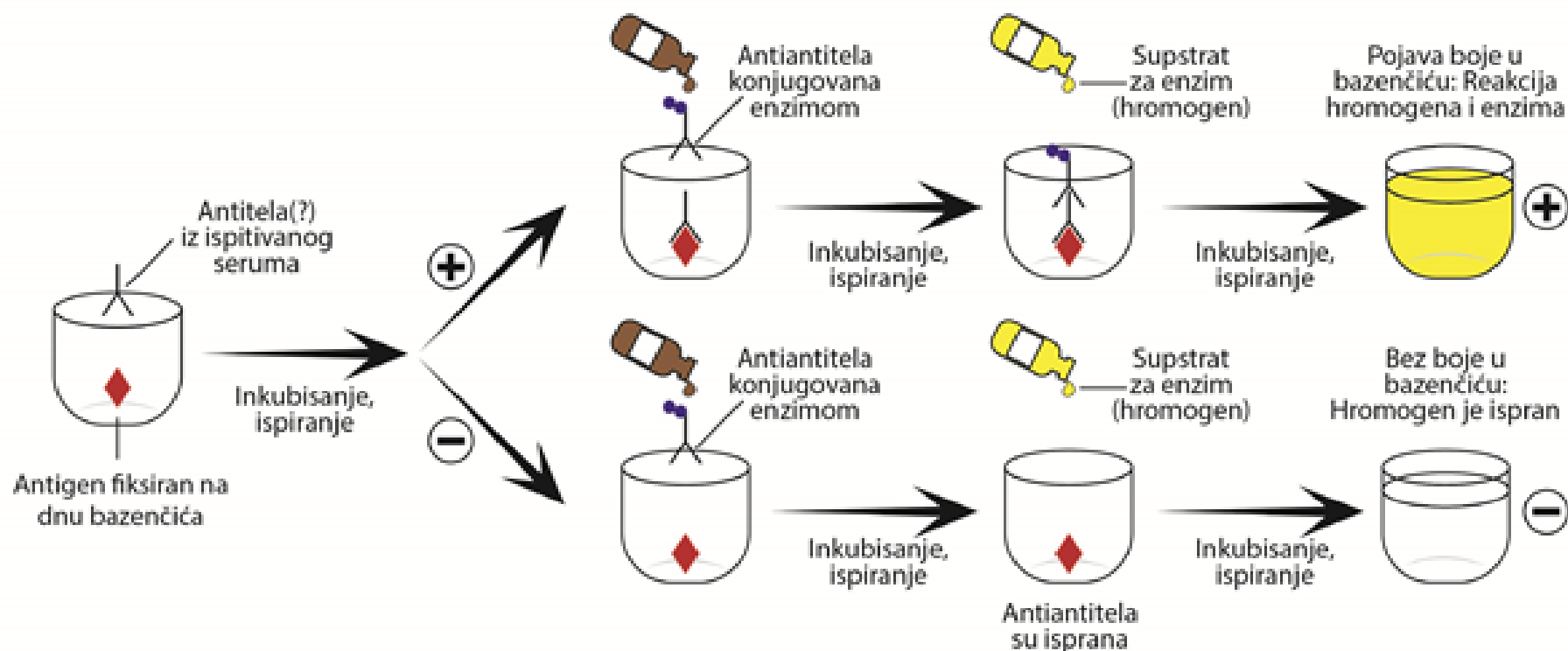


DIREKтна ELISA



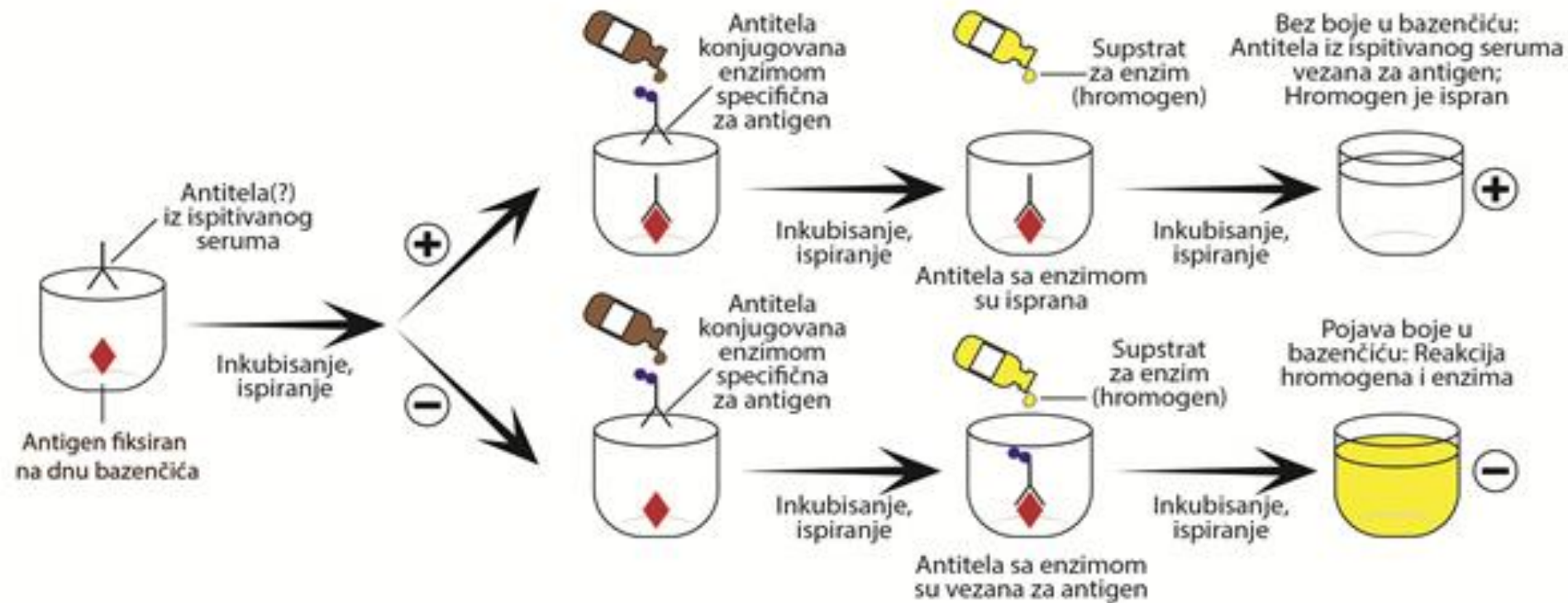
Naziva se sendvič ELISA jer se Ag nalazi u „sendviču“ između antitela

INDIREKTNA ELISA



*razlikuje se od direktne i indirektna ELISA jer se kod negativne reakcije javlja boja.

KOMPETITIVNA ELISA



PRECIPITACIJA

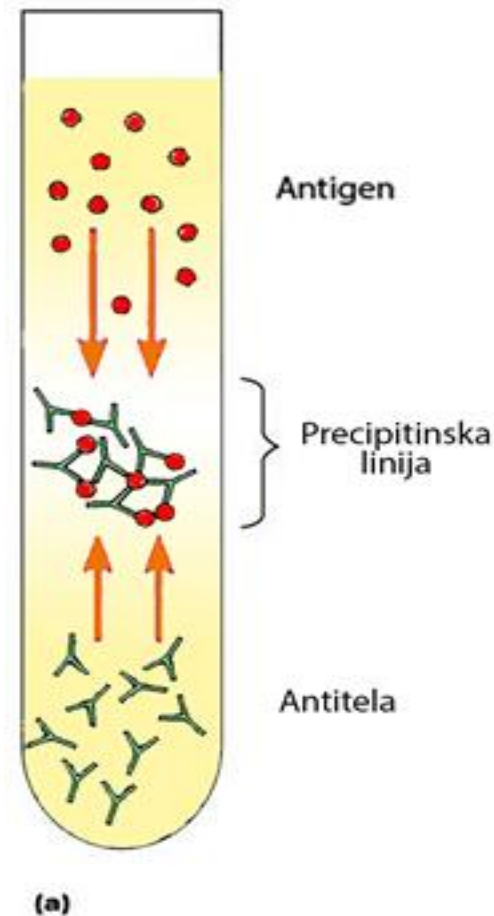
Precipitacija predstavlja reakciju između rastvorljivog (neuobličnog) antigena (**precipitinogena**) i antitela (**precipitina**) pri čemu se stvara kompleks – **precipitat**. **Precipitat se vidi kao zamagljenje na dodirnom sloju Ag i At.**

Primer – Ascoli precipitacija (dg. antraksa)

Dokazivanje prisustva somatskog Ag *B. anthracis* u prethodno obrađenom materijalu.

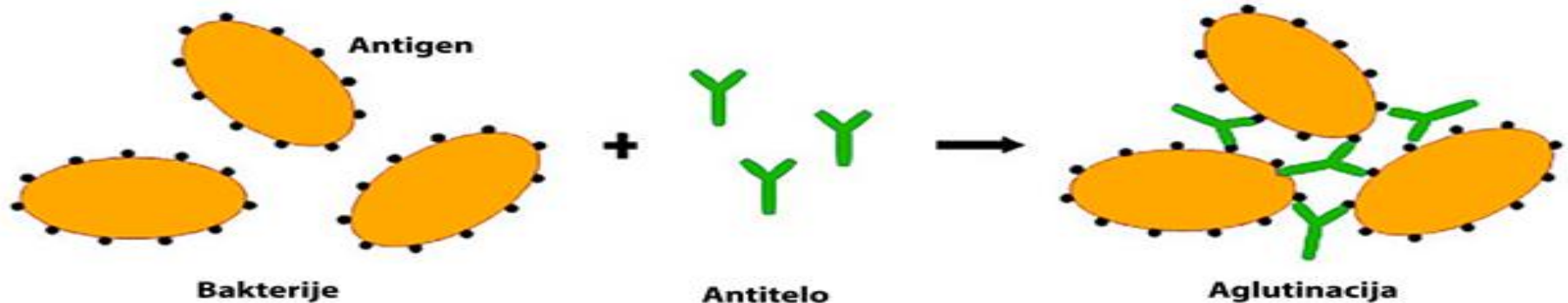
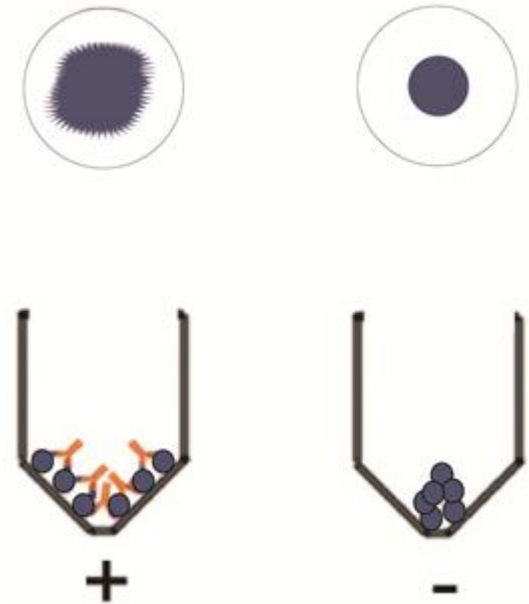
Tečni ekstrakt sumnjivog ispitujućeg materijala se meša sa hiperimunim serumom u kome se nalaze specifična At protiv Ag *B. anthracis*.

U slučaju pozitivne reakcije, stvara se precipitat na dodirnom sloju Ag i At.



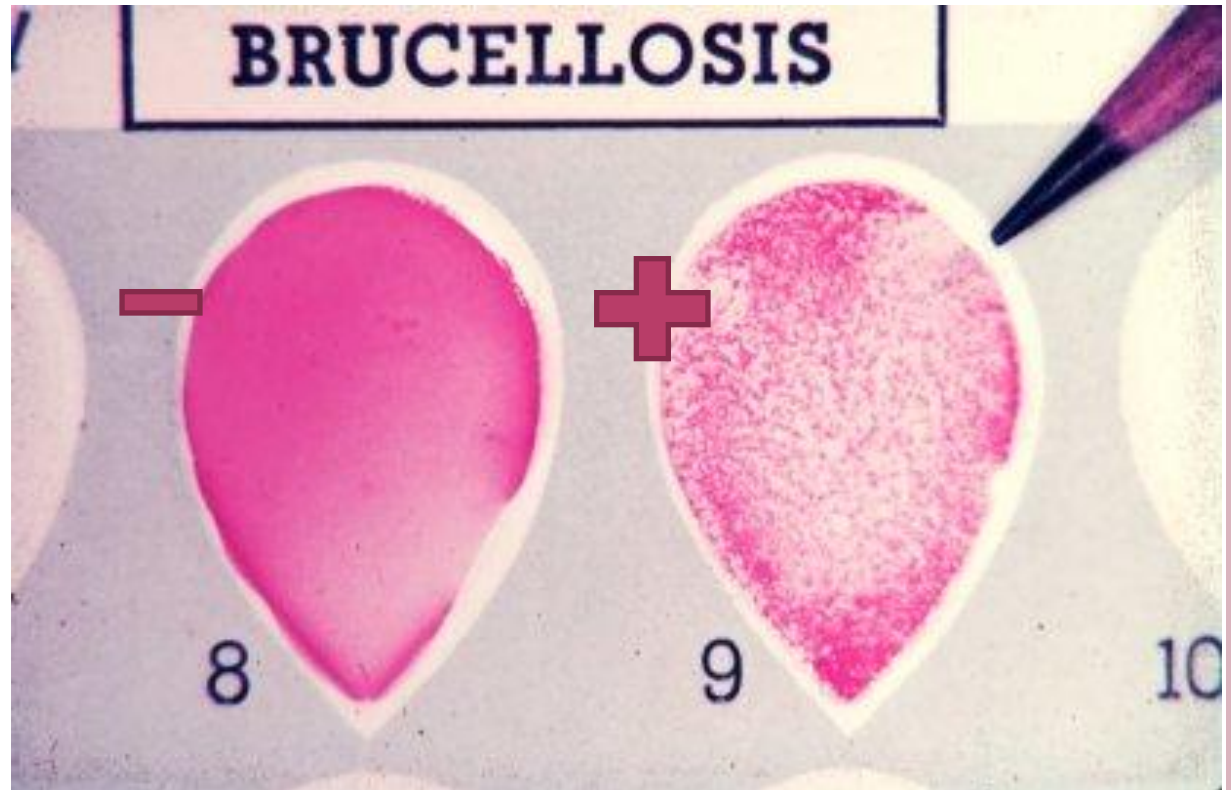
AGLUTINACIJA

Aglutinacija predstavlja reakciju između nerastvorljivog (uobličnog) antigena (**aglutinogena**) i antitela (**aglutinina**) pri čemu se stvara kompleks – **aglutinat**. Aglutinat se taloži na dnu epruvete kao talog neravnih ivica ili se u metodi brze aglutinacije na pločici vidi kao pojava zrnastog taloga.



BRZA AGLUTINACIJA

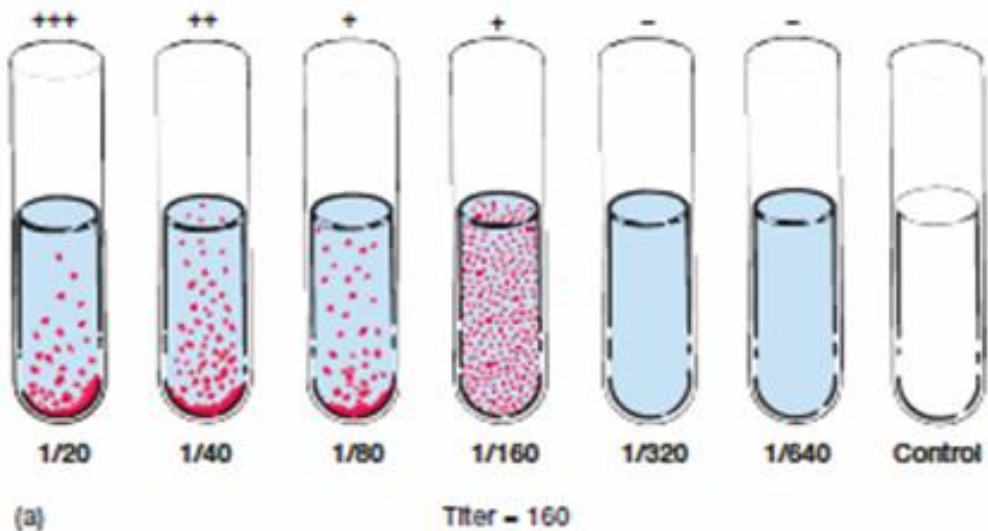
Metodom brze aglutinacije
se detektuje samo
prisustvo antitela
(kvalitativna metoda).



SPORA AGLUTINACIJA

Spora aglutinacija se izvodi u nizu epruveta pri čemu se mešaju ispitujući krvni serum u serijskim razblaženjima i odgovarajući antigen. Navedena metoda je **kvalitativna** (određuje se prisustvo antitela), ali i **kvantitativna** (određuje se titar antitela).

Pozitivna reakcija se zapaža kao kao **talog neravnih ivica** na dnu epruvete koje je posledica stvaranja kompleksa Ag-At



TITAR ANTITELA JE NAJVEĆE RAZBLAŽENJE KRVNOG SERUMA U KOJEM SU PRISUTNA ANTITELA

Što je veće razblaženje krvnog seruma u kome se može detektovati prisustvo At, to je viši titar At.

Podatak o titru antitela nam govori o njihovoj koncentraciji u krvnom serumu, a samim tim o prisustvu i fazi infekcije (viši titar At govori o akutnoj infekciji, odnosno infekciji koja je u toku; niži titar At govori da je infekcija ili u početnoj fazi ili se radi o periodu nakon infekcije kada nivo At polako opada).



REAKCIJA VEZIVANJA KOMPLEMENTA (RVK)

RVK se može koristiti za ispitivanje prisustva Ag ili At u materijalu.

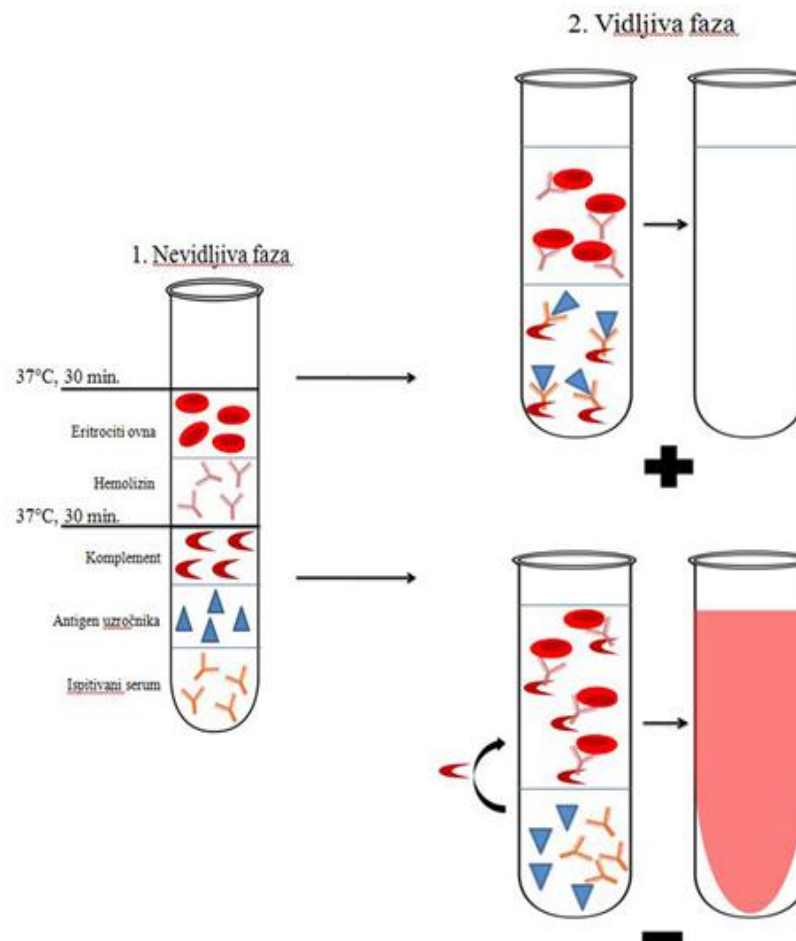
1. Nevidljiva faza

Pripremljeni Ag *Brucella* i komplement inkubišu se sa serumom koji se ispituje na prisustvo specifičnih At. U slučaju da su u k. serumu prisutna specifična At, doći će do stvaranja kompleksa Ag-At-komplement i lize Ag.

2. Vidljiva faza

Prva faza RVK nije vidljiva tako da se u drugoj fazi izvođenja reakcije dodaje **indikatorski sistem** koji se sastoji od eritrocita ovna (drugi antigen) i odgovarajućeg imunog seruma kunića (tzv. hemolizina) dobijenog imunizacijom kunića ovčijim eritrocitima (antitela specifična za drugi antigen)

Posle toga se ova mešavina ponovo inkubiše i očitava se reakcija.



REAKCIJA VEZIVANJA KOMPLEMENTA (RVK)

U slučaju da je reakcija pozitivna, tj. da u ispitujućem serumu ima At, ona se u prvoj fazi vežu i prave kompleks sa antigenom i komplementom (kompleks Ag-At-komplement) pri čemu dolazi do lize antigena, međutim to nije vidljivo golim okom. Indikatorski sistem dodat u drugoj fazi nam omogućuje vizuelizaciju ove reakcije i očitavanje rezultata.

Ako je reakcija pozitivna, stvaranjem kompleksa Ag-At-komplement u prvoj fazi se istroši sav komplement.

U drugoj fazi se specifično vežu eritrociti ovna i At kunića, međutim, kako je sav komplement potrošen, ne stvara se kompleks Ag-At-komplement i samim tim neće doći do lize drugog antigena, odnosno eritrocita. U suprotnom, ako je reakcija negativna i u prvoj fazi ne dođe do stvaranja kompleksa Ag-At-komplement, sav komplement iz prve faze se troši u drugoj fazi pri čemu dolazi do hemolize.

Dakle:

POZITIVNA RVK=NEGATIVNA HEMOLIZA

NEGATIVNA RVK=PRISUTNA HEMOLIZA

