

REAÇÃO DE SOROGLUTINAÇÃO – MODELO TITULAÇÃO DE ANTICORPOS HEMAGLUTINANTES

Prof. Helio José Montassier

REAÇÃO DE SOROAGLUTINAÇÃO

- As **reações de aglutinação** são reações de floculação celular em que o **antígeno é constituído por suspensão homogênea de células [procariotas (bactérias) ou eucariotas (hemácias)], ou ainda de Ags adsorvidos em partículas como o látex.**
- Estas células podem ser **bactérias, hemácias** etc, que normalmente são vistas no microscópio, mas **quando aglutinadas**, elas formam **flocos ou flóculos que são aglomerados visíveis a olho nu.**
- Um dos requisitos essenciais para que ocorra **a reação de aglutinação** é que se tenha disponível uma **suspensão celular** estável.
- É óbvio, também, que tal reação se verifica somente com **antígenos** que estão situados na **superfície celular ou na superfície de partículas.**

REAÇÃO DE SOROAGLUTINAÇÃO

Antígenos aglutinantes:–

A-) de natureza particulada (insolúveis), como células procariotas (**Bactérias**) e eucariotas (**Hemácias**), ou ainda **Ags solúveis adsorvidos em partículas (Hemácias ou Látex).**

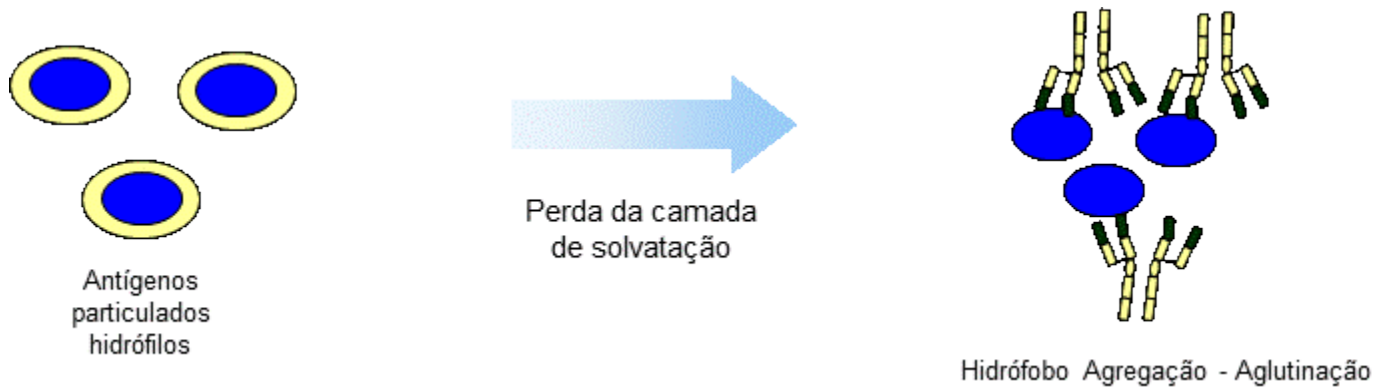
B-) Os Ags aglutinantes devem ser, no mínimo, **bivalentes.**

Características dos anticorpos envolvidos na reação de soroaglutinação:–

A-) Depende da classe ou isótipo – **IgM** tem **maior atividade aglutinante**, enquanto que a **IgG** tem **menor atividade.**

B-) **Anticorpos** devem ser, no mínimo, **bivalentes** quanto à capacidade de se ligar aos antígenos específicos.

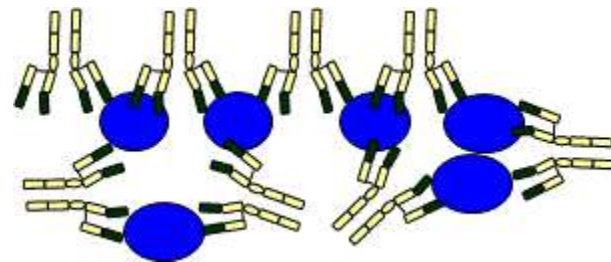
REAÇÃO DE SOROAGLUTINAÇÃO



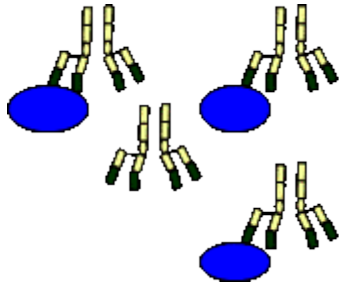
Explicação do fenômeno da aglutinação:

Duas explicações são mais correntemente aventadas: Antígenos particulados hidrófilos Perda da camada de solvatação Hidrófobo Agregação - Aglutinação

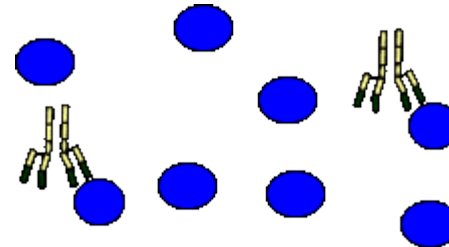
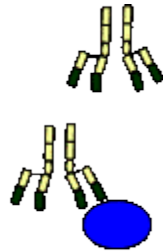
- 1) Revestimento da superfície do antígeno pelo anticorpo o que transformaria a suspensão celular de hidrófila em hidrófoba e daí a aglutinação. (figura 01).**
- 2) Teoria "das malhas" da qual os aglomerados seriam constituídos de células ligadas entre si pelos anticorpos.**



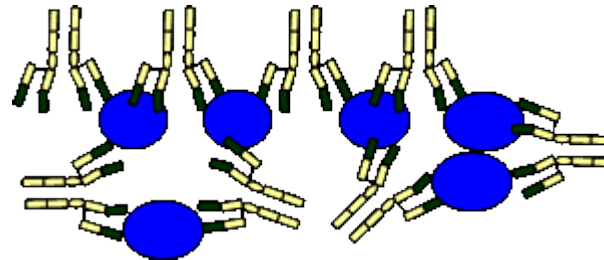
FATORES QUE INTERFEREM NA REAÇÃO DE SOROAGLUTINAÇÃO – Relação entre as Concentrações de Ag e Ac



Excesso de Anticorpos



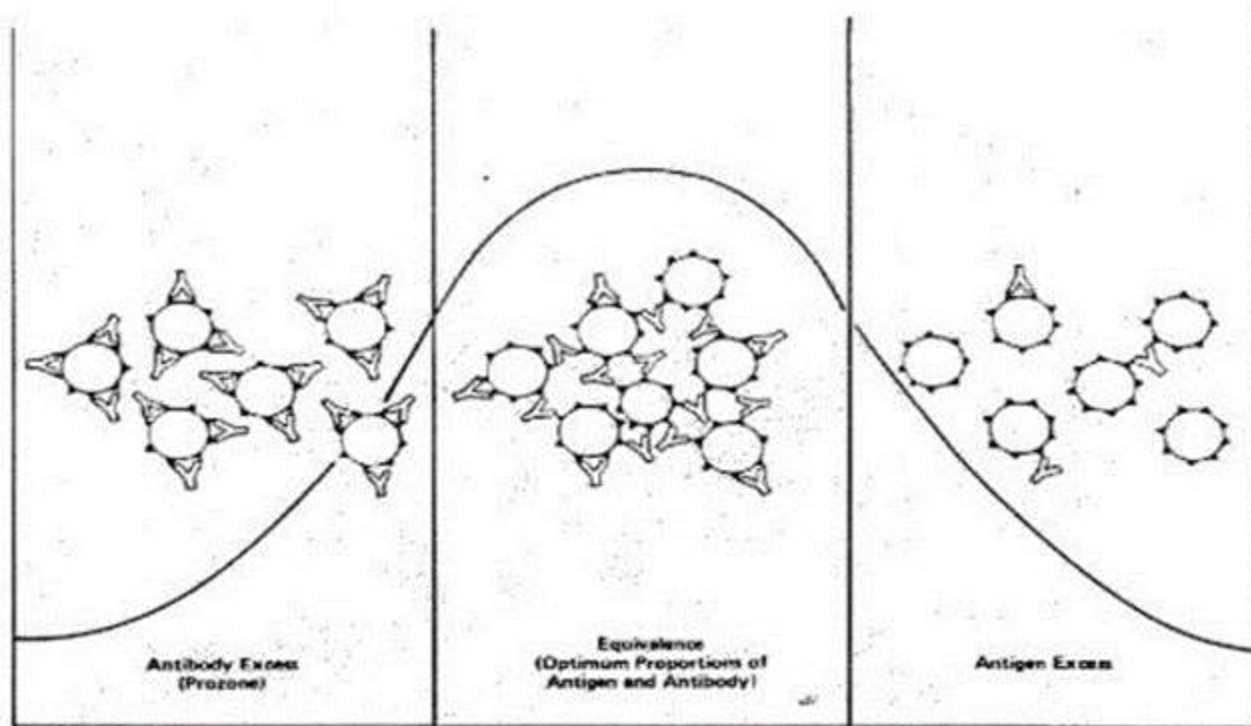
Excesso de Antígenos



Zona de Equivalência

→ A maior formação de imunocomplexos e da aglutinação ocorrerá em situação onde as concentrações de Ags e de Acs específicos estão em equivalência; de forma semelhante ao que ocorre na soroprecipitação.

The ratio of antigen / antibody



Prozone: Ab excess,
precipitate does not form (
soluble immune
complexes)

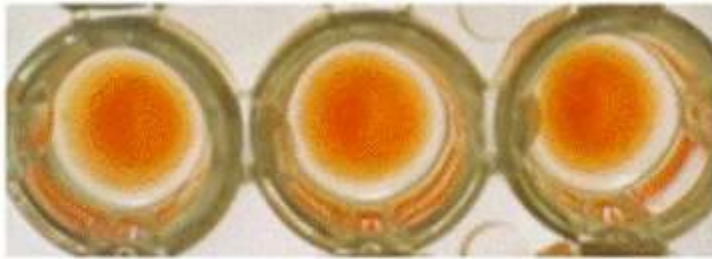
Zone of equivalence-
optimal ratio of Ag/Ab –
insoluble precipitate

Post-zone – excess of Ag
(soluble immune
complexes)

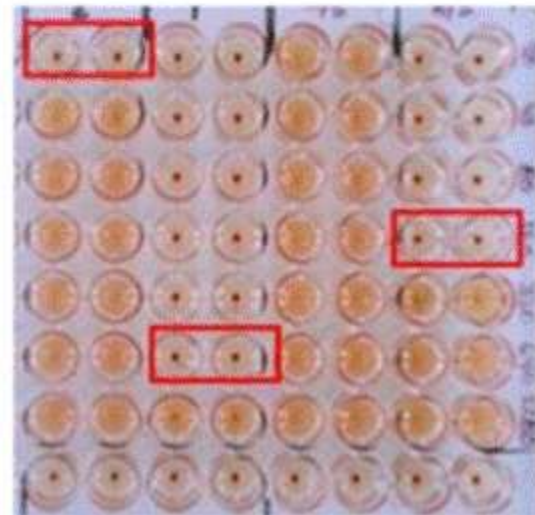
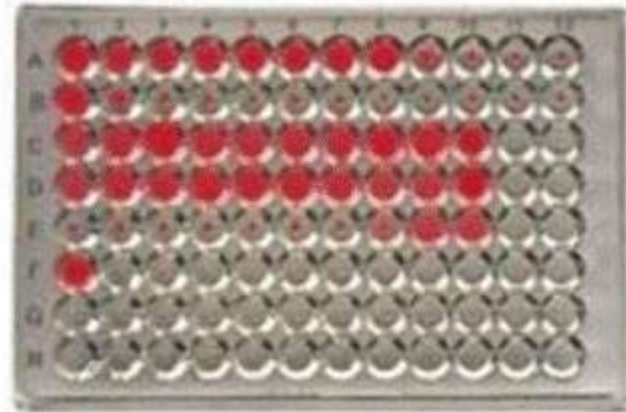
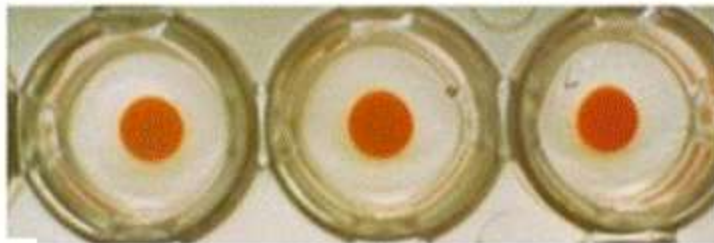
Hemaglutinação (HA)

- Interpretação

Reação Positiva:- Presença de Acs Hemaglutinantes



Reação Negativa:- Ausência de Acs Hemaglutinantes



REAÇÃO DE SOROAGLUTINAÇÃO / HEMAGLUTINAÇÃO

Material necessário:-

- 1) Microplacas plásticas para hemaglutinação.
- 2) Soros de camundongos imunizados com hemácias de carneiro. (SORO 1 = Ec + ACF; SORO 2 = Ec + AIF e SORO 3 = Ec sem Adjuvante),
- 3) Suspensão de hemácias de carneiro a 1%.
- 4) Diluente - Solução salina (NaCl - 0,15M).
- 5) Micropipetadores Monocanal e Multicanal e ponteiras.

Técnica da Reação de Hemaglutinação:-

- 1) Passar, com o pipetador multicanal para cada uma das cavidades das fileiras de cima e de baixo da microplaca (por exemplo nas fileiras A; B; C; D; E e F), um volume de solução salina de 0,025ml (25 ul) / cavidade.**
- 2) Colocar na primeira cavidade das fileiras de cima (A) a (F) 0,025ml (25 ul) do soro de camundongos anti-hemácias de carneiro, imunizados com diferentes protocolos e incluindo ou não adjuvantes (ACF; AIF e sem adjuvantes).**
- 3) Com um pipetador para cada uma das fileiras, começar a homogeneizar as duas primeiras cavidades da fileira de cima e de baixo, contendo os soros e, sem tocar na superfície ou nas bordas da placa, transferir um volume de 0,025 ml (25 ul) para a segunda cavidade da fileira de cima e debaixo. Novamente homogeneizar bem e, com os mesmos cuidados, transferir o mesmo volume para a terceira cavidade e assim sucessivamente até a penúltima cavidade, pois para a última não será transferida nenhum volume das diluições dos soros e estas cavidades servirão como controle da suspensão antigênica de hemácias. No final, portanto, teremos as seguintes diluições dos soros: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048.**



1) Passar, com o pipetador multicanal para cada uma das cavidades das fileiras de cima e de baixo da microplaca (por exemplo nas fileiras A; B; C; D; E e F), um volume de solução salina de 0,025ml (25 ul) / cavidade.



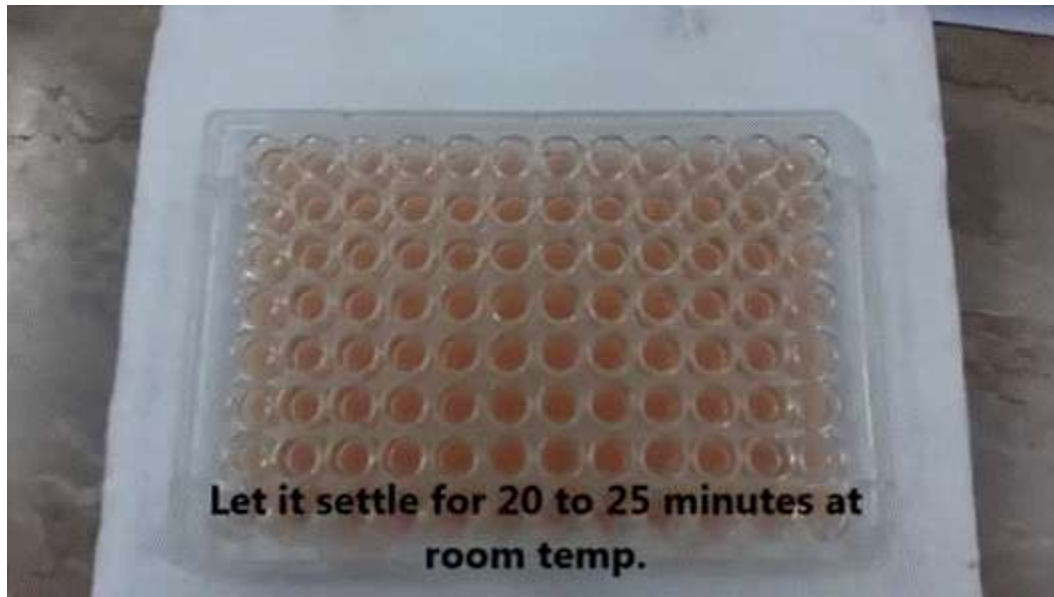
2) Colocar na primeira cavidade das fileiras de cima (A) a (F) 0,025ml (25 ul) do soro de camundongos anti-hemácias de carneiro, imunizados com diferentes protocolos e incluindo ou não adjuvantes (ACF; AIF e sem adjuvantes). Obs. Fazer duplicatas nas fileiras A e B; C e D e E e F.



3) Com um pipetador multicanal contendo ponteiros para cada uma das fileiras que receberam soros a serem testados (fileiras de A a F), começar a homogeneizar as primeiras cavidades da coluna 1, contendo os soros e, sem tocar na superfície ou nas bordas da placa, transferir um volume de 0,025 ml (25 ul) para as cavidades vizinhas da coluna 2. Novamente homogeneizar bem e, com os mesmos cuidados, transferir o mesmo volume (0,025 ml / 25 ul) para as cavidades da coluna 3 e assim sucessivamente até as cavidades da penúltima coluna (coluna 11).

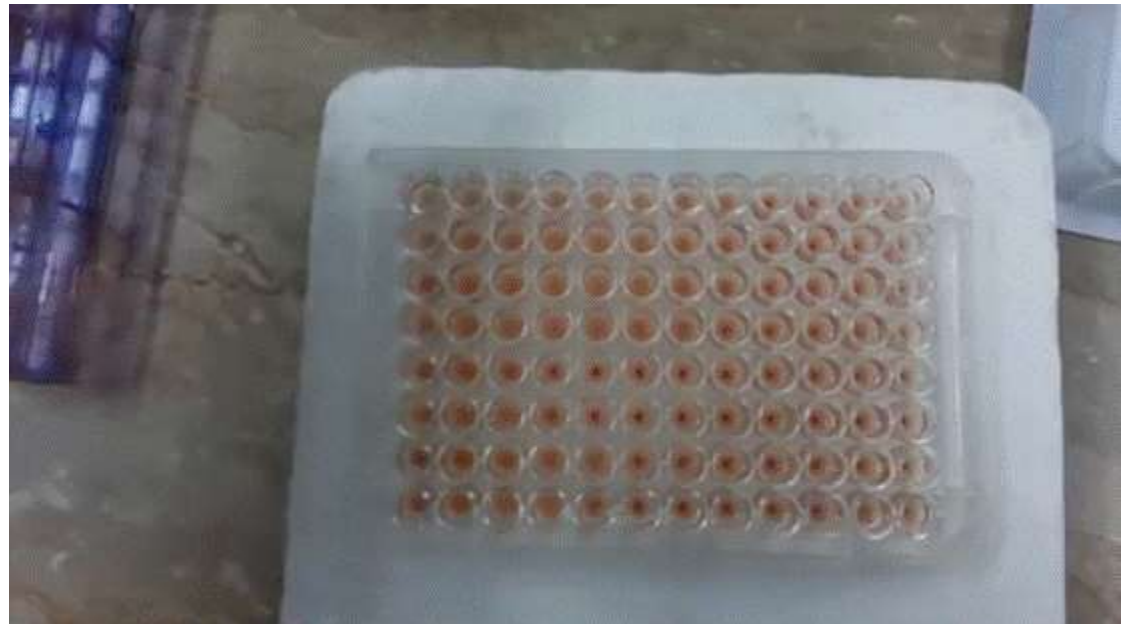
4) Colocar em todas as cavidades das seis fileiras (de A a F) um volume de 0,025ml (25 ul) da suspensão de hemácias de carneiro.

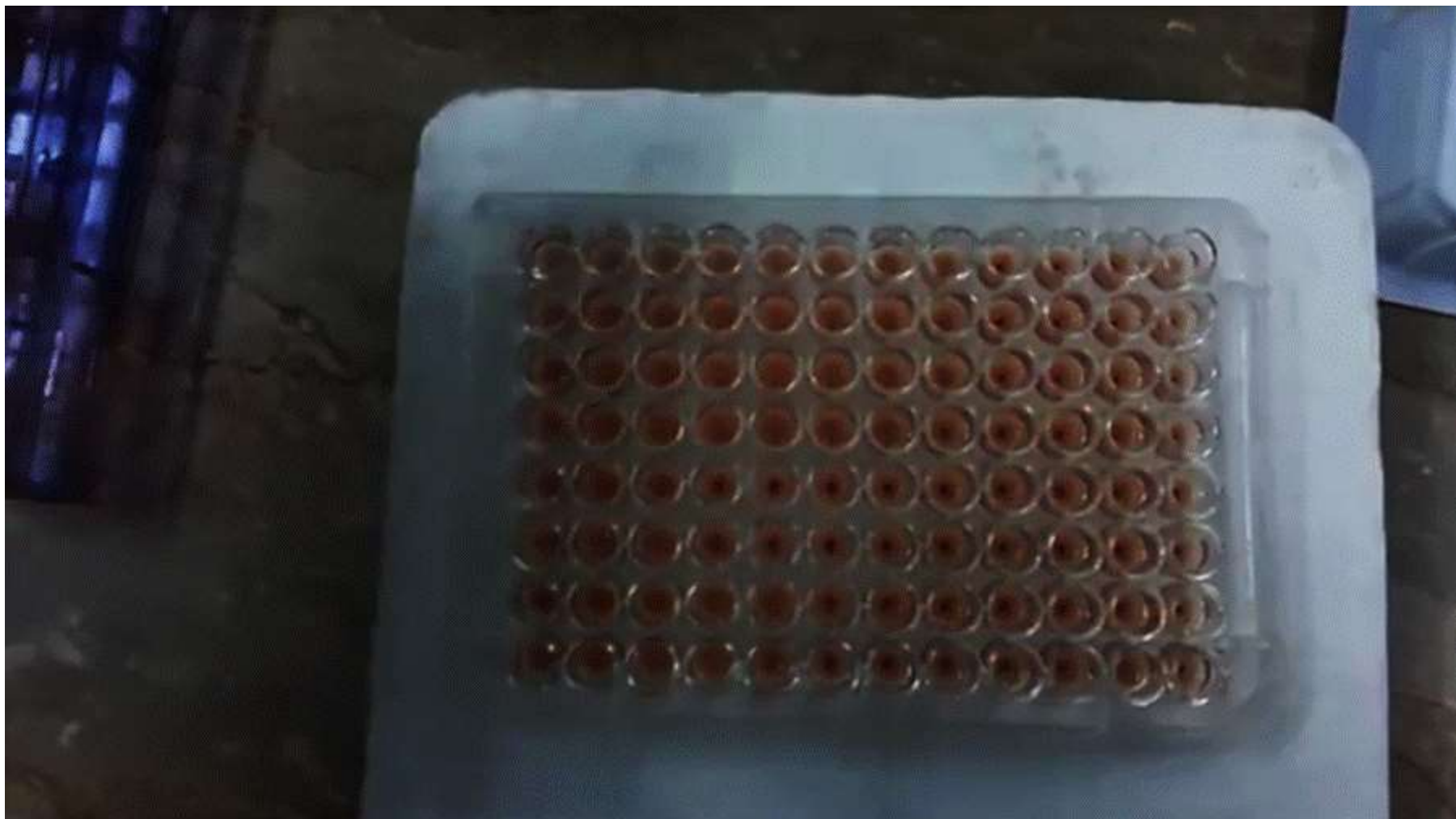




5) Agitar com cuidado a placa e incubar por 25 a 60 minutos à temperatura ambiente.

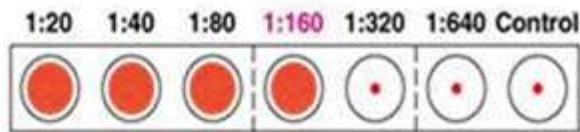
6) Fazer a leitura da reação e, comparando os resultados dos soros e fazer a interpretação dos resultados.





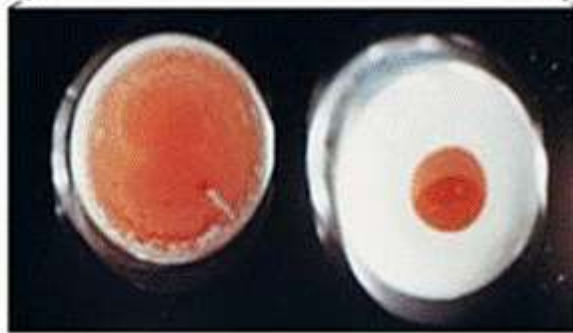
- Leitura dos Resultados (+) ou (-) para Hemaglutinação e Título de Acs Hemaglutinantes = Recíproca da Maior Diluição onde ocorreu Hemaglutinação completa.

Top view
of wells

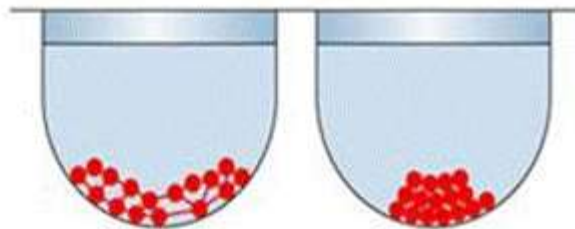


(a)

Enlarged
photo of
wells



Side view
of wells



(b) Agglutinated

(c) Nonagglutinated

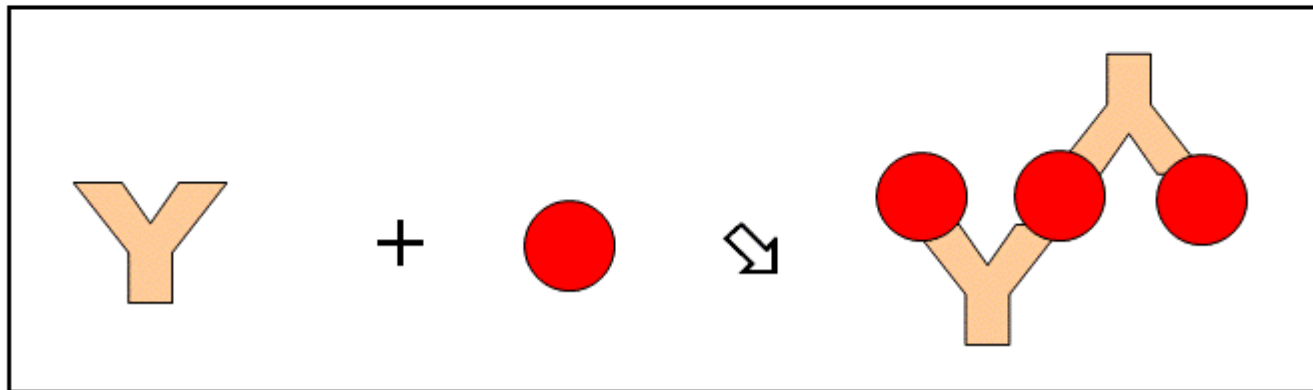
(a) Each well in this microtiter plate contains, from left to right, only half the concentration of serum that is contained in the preceding well. Each well contains the same concentration of particulate antigens, in this instance red blood cells.

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

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

Aglutinação/Hemaglutinação

- **Definição** - testes que têm como seu ponto final a aglutinação de um **antígeno de natureza particulado** (células procarióticas ou eucarióticas)
 - Acs: Aglutinina/hemaglutinina, principalmente do **isótipo IgM*** e IgG
- **Teste de aglutinação qualitativa**
 - Podem ser pesquisados Ag ou Ac (*Via de regra é o Ag, Ex; tipagem de grupos sanguíneos)



Aglutinação/Hemaglutinação

- **Teste de aglutinação quantitativa**

- Título: recíproca da $>$ diluição com resultado +
- Efeito Prozona

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

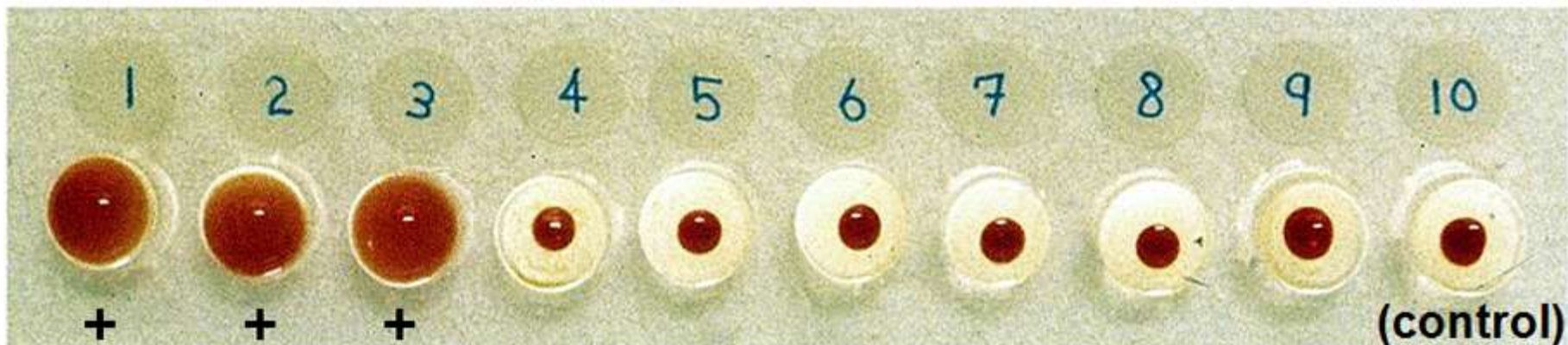
Reações de Aglutinação:-

-Grumos / Flocos / Flóculos visíveis formados após a interação de Ags particulados (Hemácias, Bactérias, Partículas de Látex Revestidas com Ags solúveis) e seus Acs específicos

-Dependem de ligações cruzadas de Ags polivalentes similarmente ao que ocorre nas reações de Soro-precipitação (IgM >>> IgG)

-Possibilitam que sejam sorotipadas algumas bactérias frente a um painel de antissoros.

-Rotineiramente usadas para a tipagem de grupos sanguíneos a serem usados nas transfusões de sangue.



Demonstração de reação de hemaglutinação testando-se diluições seriadas de razão constante =2 de antissoros contra hemácias de carneiro e suspensão de hemácias de carneiro

PERGUNTAS – REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO:-

- 1) Quais os mecanismos da reação de soroaglutinação?**
- 2) Que tipos de antígenos participam da reação de soroaglutinação?**
- 3) Qual(is) a(s) utilidade(s) da reação de soroaglutinação, no sorodiagnóstico em medicina veterinária?**
- 4) Como se procede para titular anticorpos de um soro aglutinante?**

Other Applications of agglutination tests in Serology

- i. **Determination of blood types or antibodies to blood group antigens.**

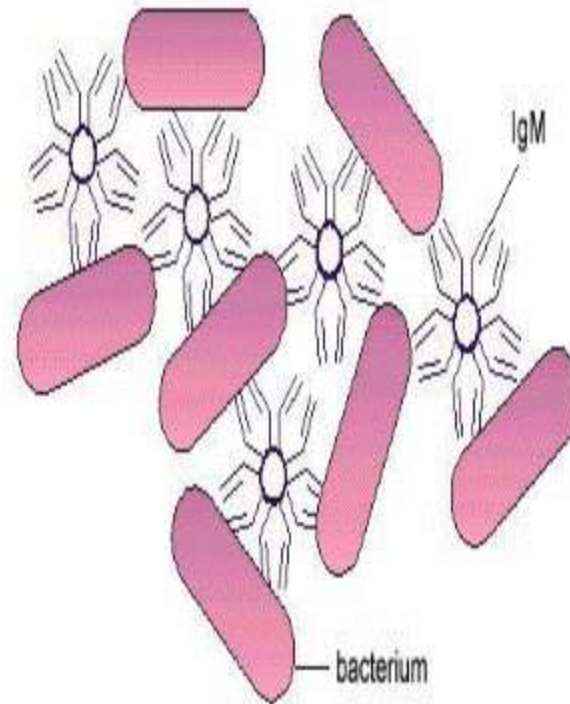
- ii. **To assess bacterial infections**

e.g. A rise in titer of an antibody to a particular bacterium indicates an infection with that bacterial type. N.B. a fourfold rise in titer is generally taken as a significant rise in antibody titer.

Reação de Soro-Aglutinação para a Determinação de Sorotipos de Enterobactérias (Por Ex. Escherichia coli; Salmonella; etc.)

Agglutination how it appear after reactivity

- **O** agglutination is granular
- **H** agglutination is loose and floccular




Diagnostic Technique For Brucellosis in Cattle

Because of the **deceptive nature**, the disease may be easily misdiagnosed or diagnosis may be delayed thereby making clinical diagnosis a challenge

1. Clinical signs

2. Laboratory diagnosis

Diagnostic tools include

- Isolation and identification of *Brucellae* from clinical samples,
- Antigen detection
- Genome detection
- Antibodies detection 

Testes Laboratoriais aplicados ao diagnóstico de Brucelose Bovina

SEROLOGY

- Serum agglutination test (SAT)
- The complement fixation text (CFT)
- ELISA (CELISA) , Recombinant OMP28 ELISA
- RBPT, MRT , 2-mercaptoethanol test (2ME)
- Agar gel immunodiffusion test (AGID)
- Fluorescence polarization assay (FPA) etc.

MOLECULAR METHODS

- PCR,
- RFLP and Southern blot
- Pulse-field gel electrophoresis has been developed that allows the differentiation of several *Brucella* species

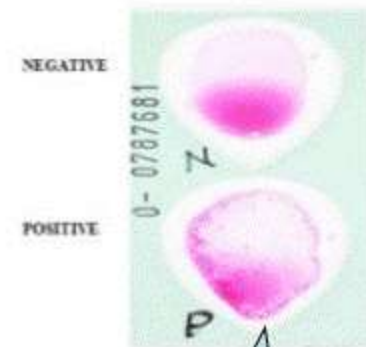


Testes Sorológicos aplicados ao diagnóstico de Brucelose Bovina



Serologic Assays

- Antibody detection
 - Serum
 - Milk
- Rapid
- Inexpensive
- Sensitivity and Specificity
- Assays can be impacted by
 - Vaccination
 - Environmental conditions



Brucella card test

Diagnóstico Sorológico da Brucelose (Provas Oficiais PNCEBT)

Teste de triagem diagnóstica:

Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)
(Rosa de Bengala)

Teste confirmatório de diagnóstico:

Teste do 2-Mercaptoetanol (2-ME)
(2-Mercaptoetanol + Soroaglutinação Lenta)

Teste de referência para trânsito internacional:

Teste de Fixação de Complemento (FC)

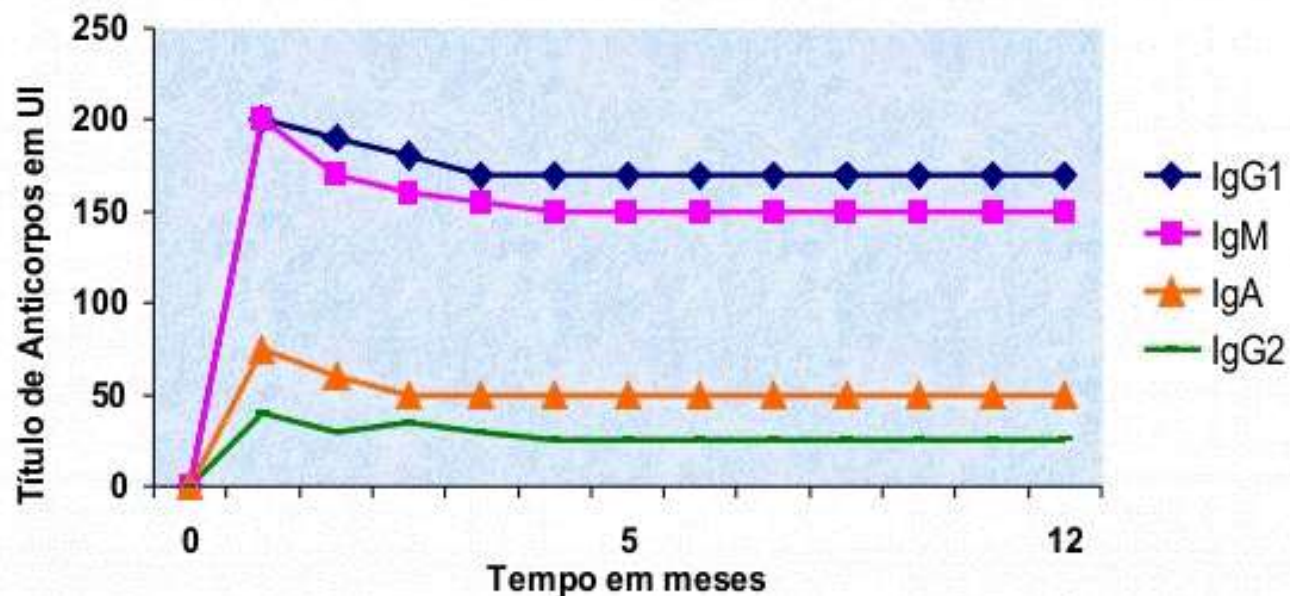
Teste para vigilância epidemiológica:

Teste do Anel em Leite (TAL)



Diagnóstico Sorológico da Brucelose

- Título de anticorpos em bovinos infectados com *Brucella abortus* ao longo do tempo.

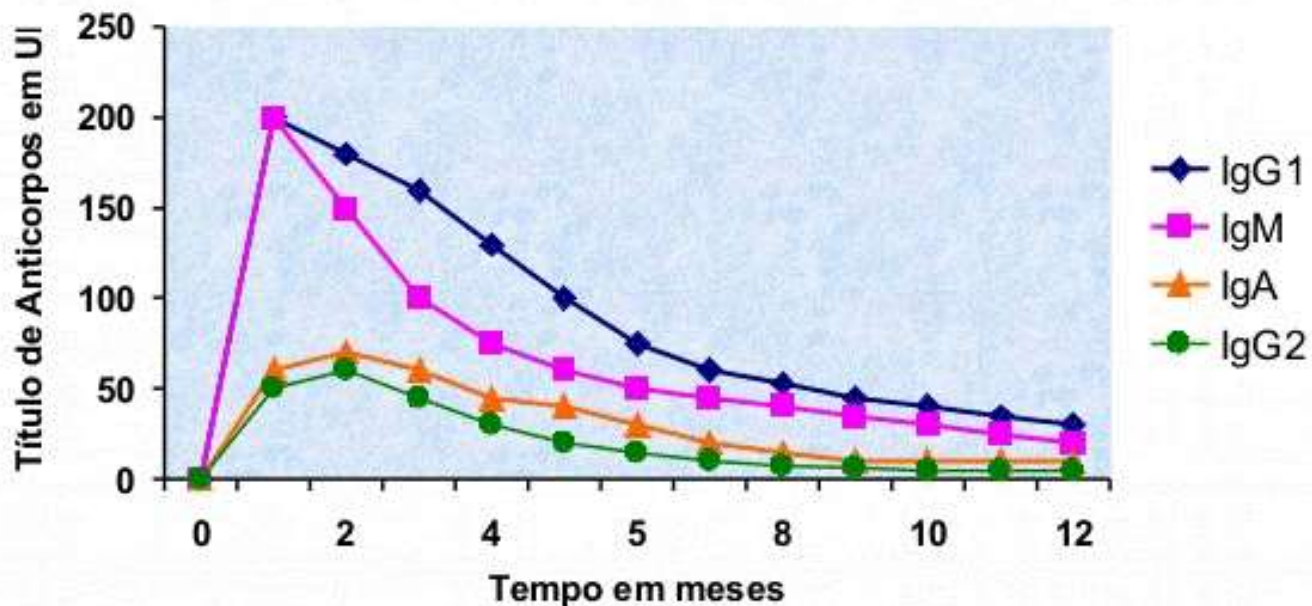


Fonte: Adaptado de Nielsen *et al.*, 1996.



Diagnóstico Sorológico da Brucelose

- Título de anticorpos em bezerras vacinadas entre 3 e 8 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B19.



Fonte: Adaptado de Nielsen *et al.*, 1996.



Testes Sorológicos aplicados ao diagnóstico de Brucelose Bovina




Brucellosis Diagnostic Tests


STANDARD TUBE TEST	
General Information	
AKA - STT	Reagent Code: 3
Primary use	Screening test
Species	Cattle, bovine, and ovine
OIE recognition	No
Immunoglobulins detected	IgM and IgG
Specificity	No published values found
Sensitivity	No published values found
Procedure	
Sample needed	150 µl clear serum
Time needed	48 hour incubation
Instrumentation	Incubator & light source
Test Interpretation	
-Results should be interpreted according to appropriate guidelines-	
Negative	Cloudy fluid suspension with no agglutination
Positive	Clear fluid suspension with agglutination

TEST OVERVIEW

4 tubes are needed for each sample to do a dilution series of 1:20, 1:50, 1:100, and 1:200. 80 µl, 40 µl, 20 µl, and 10 µl sample volume are used to obtain this working dilution series. 10 µl of washed tube antigen is transferred to each tube. The samples are mixed gently by shaking then placed in a 37°C incubator for 48 +- 3 hrs. The results are read by holding the tubes up to a light against a black background. For positive results, there will be a clearing of the fluid suspension with "non-flocc" agglutination present after gentle shaking of the tubes. Negative results will show a "cloudy" fluid suspension with no agglutination after gentle shaking of the tubes.



POSITIVE



NEGATIVE

Testes Sorológicos aplicados ao diagnóstico de Brucelose Bovina

Tube Agglutination Test

- Also known as the standard agglutination test or serum agglutination test (SAT)
- Test serum is diluted in a series of tubes (doubling dilutions)
- Constant defined amount of antigen is then added to each tube and tubes incubated for ~20h @37°C
- Particular antigen clumps at the bottom of the test tube
- Test is read at 50% agglutination
- Quantitative

Testes Sorológicos aplicados ao diagnóstico de Brucelose Bovina

Tube Agglutination Test

13

