

Tecniche immunochimiche

***SCOPO DELLA METODICA**

- Capacità di particolari immunoglobuline, gli **ANTICORPI**, di legare con alta specificità composti di varia natura, permettendone l'identificazione e la quantificazione in miscele complesse e variabili come plasma, siero, urine oppure lisati cellulari, cellule intatte e tessuti;
- Il legame antigene-anticorpo è evidenziato mediante l'utilizzo di **traccianti fluorescenti, radioattivi o enzimatici** oppure tramite visualizzazione della formazione di immunocomplessi in grado di precipitare (**test di precipitazione e agglutinazione**)

DOSAGGI IMMUNOLOGICI

- Dosaggi competitivi radioimmunologici (RIA) o fluorescenti (FIA)
- Saggi di legame a enzimi in fase solida (ELISA a un sito)
- Saggi immunologici di polarizzazione a fluorescenza (FPIA)
- Saggi immunometrici di tipo immunoradiometrico (IRMA) e tramite anticorpi marcati con enzimi (ELISA a due siti o sandwich)
- Dosaggi immunoenzimatici in chemiluminescenza (CLIA) o in fluorescenza (ELFIA)
- Dosaggi immunologici a inibizione enzimatica (EIA omogenei o EMIT)

I test immunologici vengono usati nella ricerca sperimentale, nello sviluppo di nuovi farmaci (drug discovery) e in diagnostica

IMMUNOBLOTTING

- Analizzare proteine specifiche in un lisato cellulare o tessuti dopo separazione elettroforetica della miscela proteica, trasferimento su supporto solido inerte e misurazione dell'antigene proteico tramite anticorpi specifici marcati

IMMUNOISTOCHEMICA (IHC)

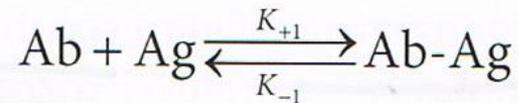
- *Analizzare la presenza e la distribuzione spaziale dell'antigene proteico in situ (in cellule e tessuti) mediante microscopia ottica o a fluorescenza, a seconda del tipo di marcatura dell'anticorpo di rilevazione (difficoltà nel misurare l'intensità di fluorescenza ovvero nel quantificare l'antigene di interesse)*

CITOMETRIA A FLUSSO

- L'emissione del segnale di fluorescenza viene raccolta e utilizzata per ricavare informazioni sulle dimensioni e sul numero delle cellule marcate e sull'intensità di espressione dell'antigene di interesse

PRINCIPI GENERALI

- ✓ SPECIFICITA' E SENSIBILITA' nella scelta dell'anticorpo (Ab);
- ✓ Legame Ab-Ag di tipo non covalente e reversibile;
- ✓ AFFINITA': misura della forza dell'interazione fra Ag e Ab



$$K_a = \frac{K_{+1}}{K_{-1}} = \frac{[\text{Ab-Ag}]}{[\text{Ab}] \times [\text{Ag}]} = \frac{1}{K_d}$$

per [Ab] si ha:

$$[\text{Ab}] = B_{\max} - [\text{Ab-Ag}]$$

$$\frac{[\text{Ab-Ag}]}{[\text{Ag}]} = K_a (B_{\max} - [\text{Ab-Ag}]) = \frac{1}{K_d} (B_{\max} - [\text{Ab-Ag}])$$

PLOT DI SCATCHARD

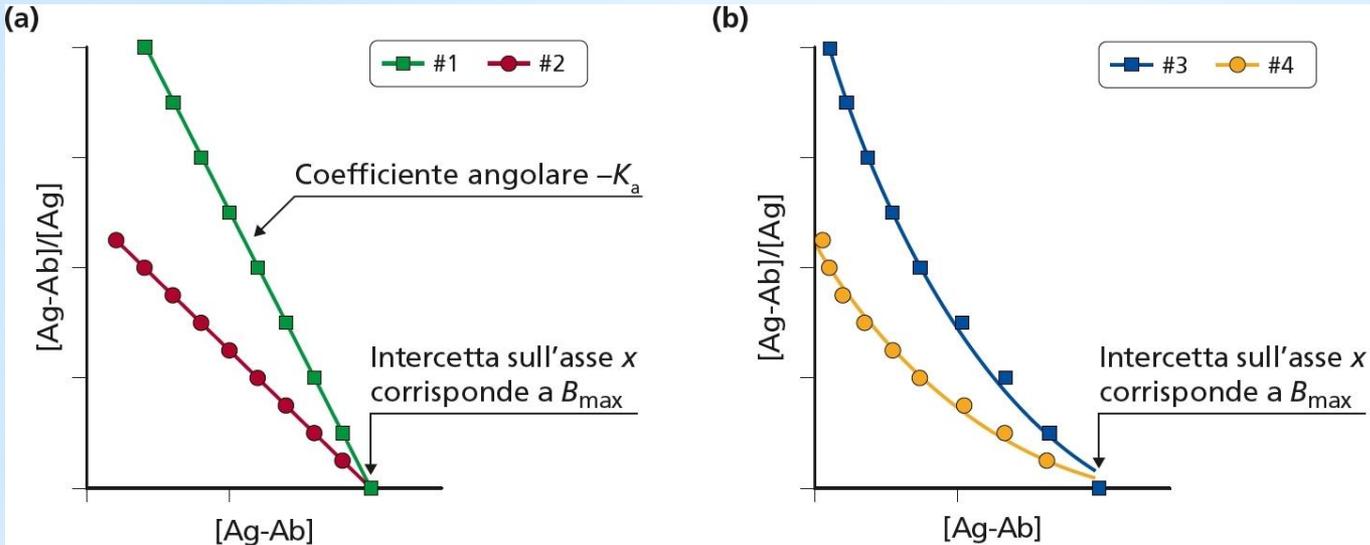


Figura 10.1

Plot di Scatchard di 4 diversi batch di anticorpi. (a) #1 e #2 sono anticorpi monoclonali con diversa affinità e uguale valenza. (b) #3 e #4 sono anticorpi policlonali o miscele di monoclonali.

- ✓ Le misurazioni delle concentrazioni all'equilibrio dell'Ag libero e di quello legato determinano la costante di associazione all'equilibrio (affinità) e la valenza di un anticorpo, cioè il numero di siti leganti l'Ag ($B_{max}/[Ab]$)

COME DETERMINARE LA VALENZA PER L'ANTIGENE (NUMERO DEI SITI DI LEGAME)

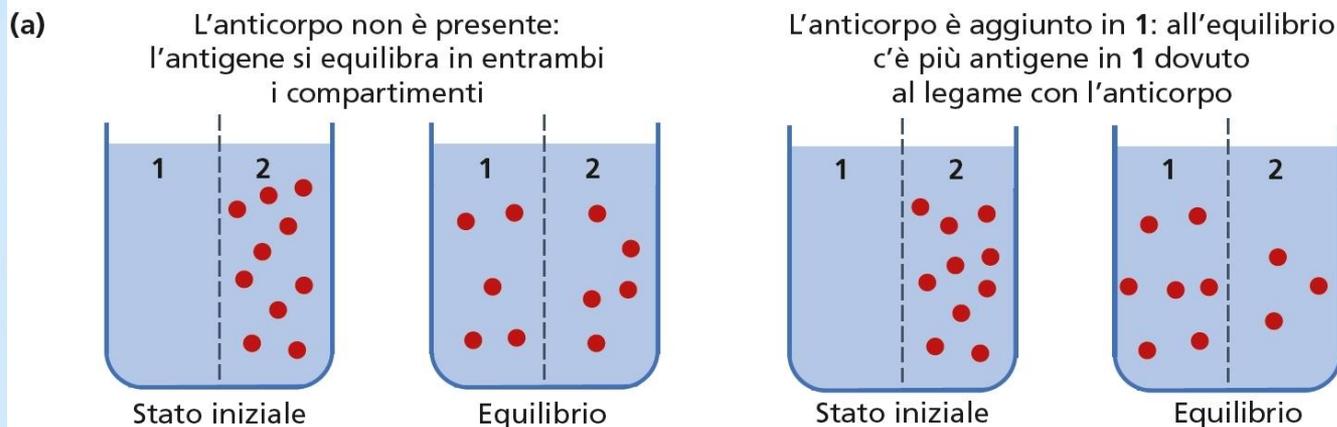
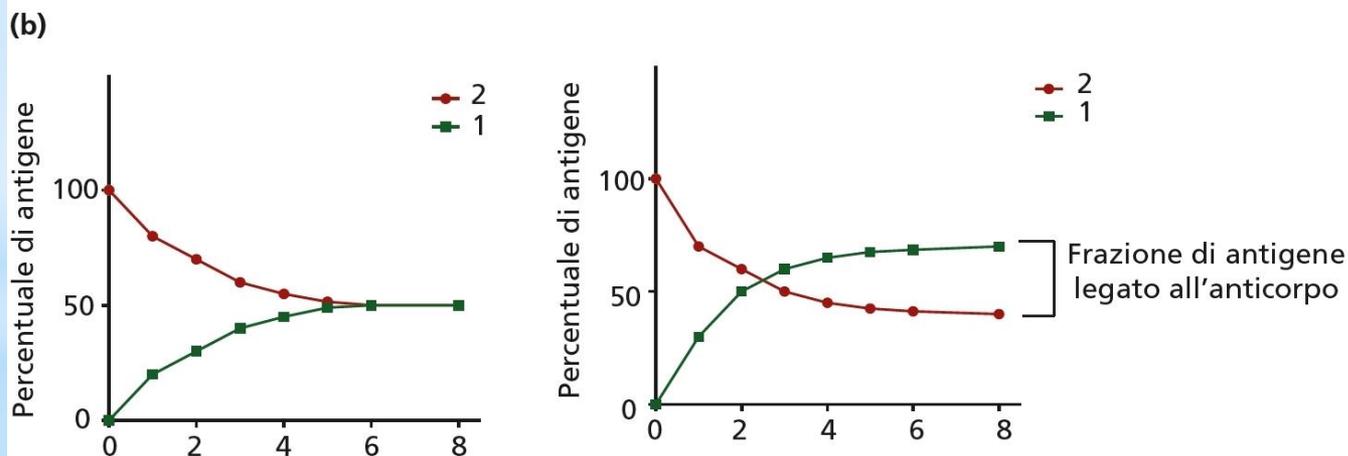


Figura 10.2

Determinazione dell'affinità anticorpale mediante dialisi di equilibrio. (a) La camera di dialisi contiene due compartimenti (1 e 2), separati da una membrana semipermeabile che lascia passare solo la molecola di antigene. L'anticorpo viene aggiunto nel compartimento (1) e l'antigene marcato con un radionuclide in (2). All'equilibrio si misura la concentrazione di radioattività in entrambi i compartimenti. (b) Grafico della concentrazione di antigene in (1) e (2) in funzione del tempo. All'equilibrio, la differenza fra la concentrazione di antigene radioattivo in (1) e (2) rappresenta la quantità di antigene legato all'anticorpo. Dalle misurazioni delle concentrazioni all'equilibrio dell'antigene libero e di quello legato, a varie concentrazioni di antigene iniziale aggiunto, si può determinare la costante di affinità e la valenza dell'anticorpo (plot di Scatchard).



IMMUNODOSAGGI

Metodi marcati

traccianti radioisotopici, enzimatici,
fluorimetrici, bioluminescenti,
chemiluminescenti

Metodi non marcati

Agglutinazione

Se avviene in soluzione
acquosa

Diretta

se l'antigene è corpuscolato
(cellule, batteri)

Indiretta

se l'antigene, solubile, si fa
adsorbire o legare
covalentemente a carrier insolubili
(sfere di lattice, globuli rossi)

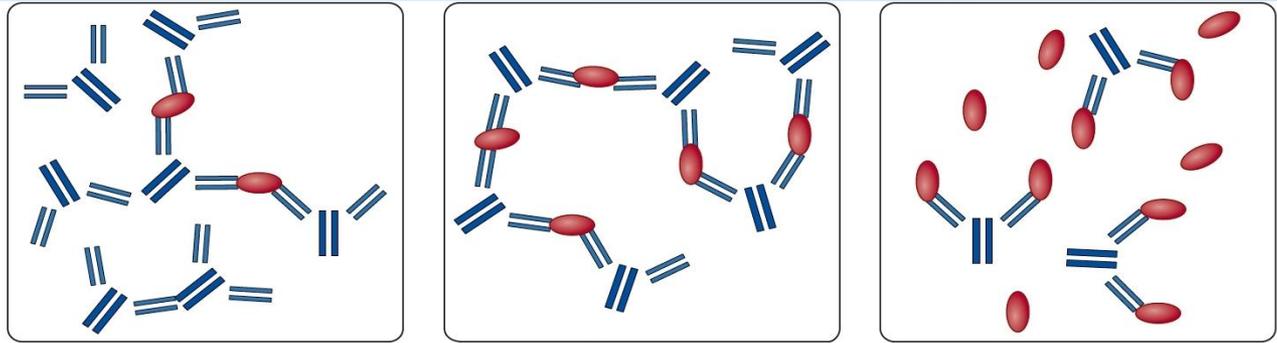
Precipitazione

Se avviene in matrice solida

TEST DI PRECIPITAZIONE

Figura 10.3

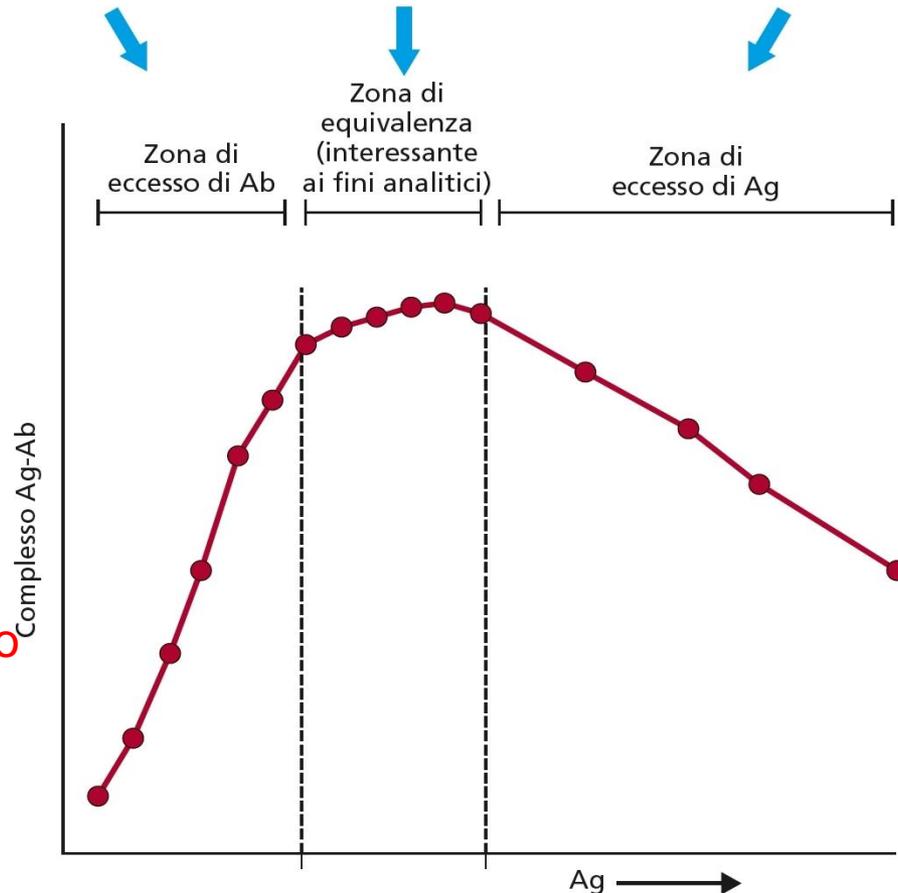
Curva di precipitazione del complesso antigene-anticorpo (Ag-Ab), in funzione della concentrazione di antigene (Ag).



➤ *Ag solubile a contatto con un siero contenente Ab specifici. La formazione degli immunocomplessi si può osservare con un precipitato*

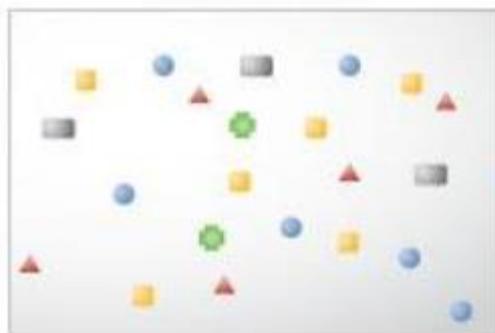
- Si distinguono tre zone:
- ECCESSO DI Ab
 - ZONA DI EQUIVALENZA
 - ECCESSO DI Ag

➤ Si può accoppiare il complesso Ab-Ag a un substrato solido (es. proteina A o proteina G immobilizzata su agarosio o sferette magnetiche)

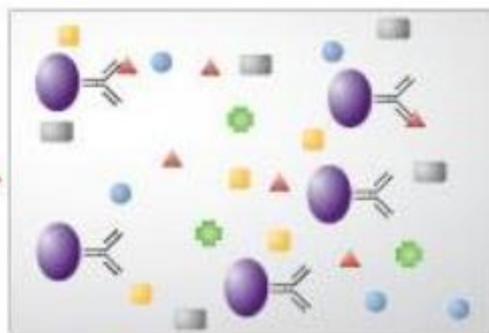


IMMUNOPRECIPITAZIONE IN SOLUZIONE - **OGGI** AUMENTO DELLA EFFICIENZA

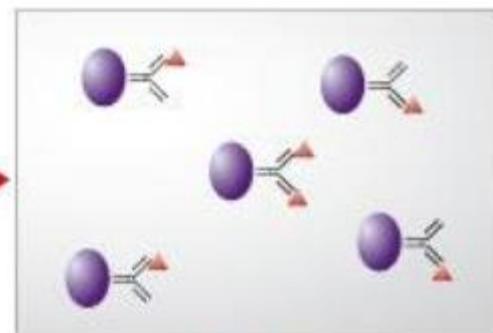
Lisato cellulare o
mistura di proteine



Aggiunta Ab-biglia
di Sefaroso



Centrifugazione



 Coupled Antibody

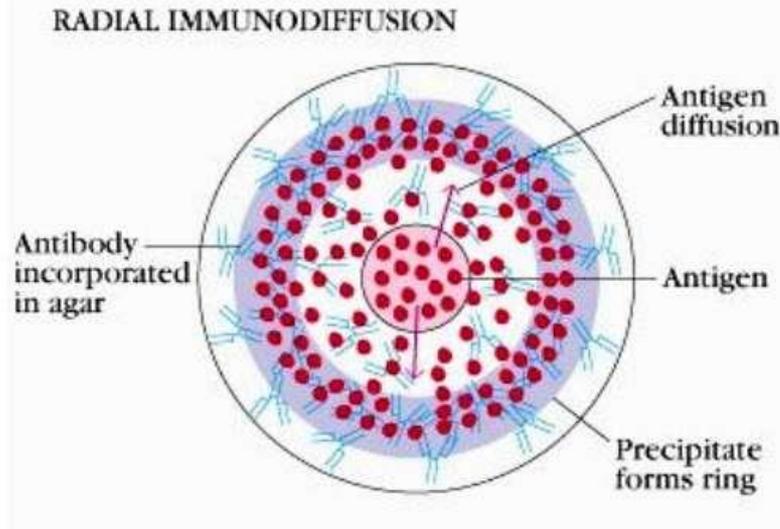
 Antigen

 Spin and wash



**Ab già coniugato
ad una biglia,
facile da separare
dalla soluzione.**

IMMUNODIFFUSIONE RADIALE



Il diametro dell'anello è funzione della concentrazione dell'Ag secondo due metodi distinti:

- METODO MANCINI
- METODO DI FAHEY-McKELVEY (metodo cinetico): d proporzionale al log della concentrazione di Ag prima del punto di equivalenza

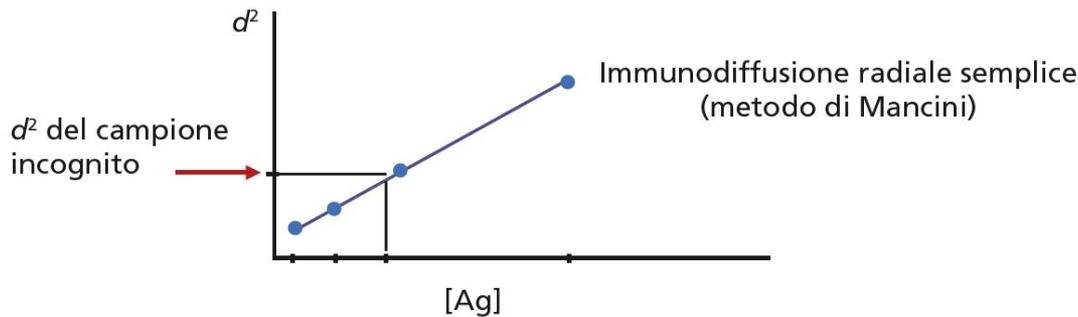
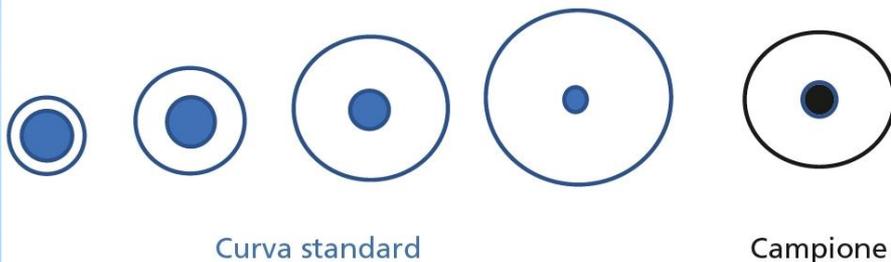


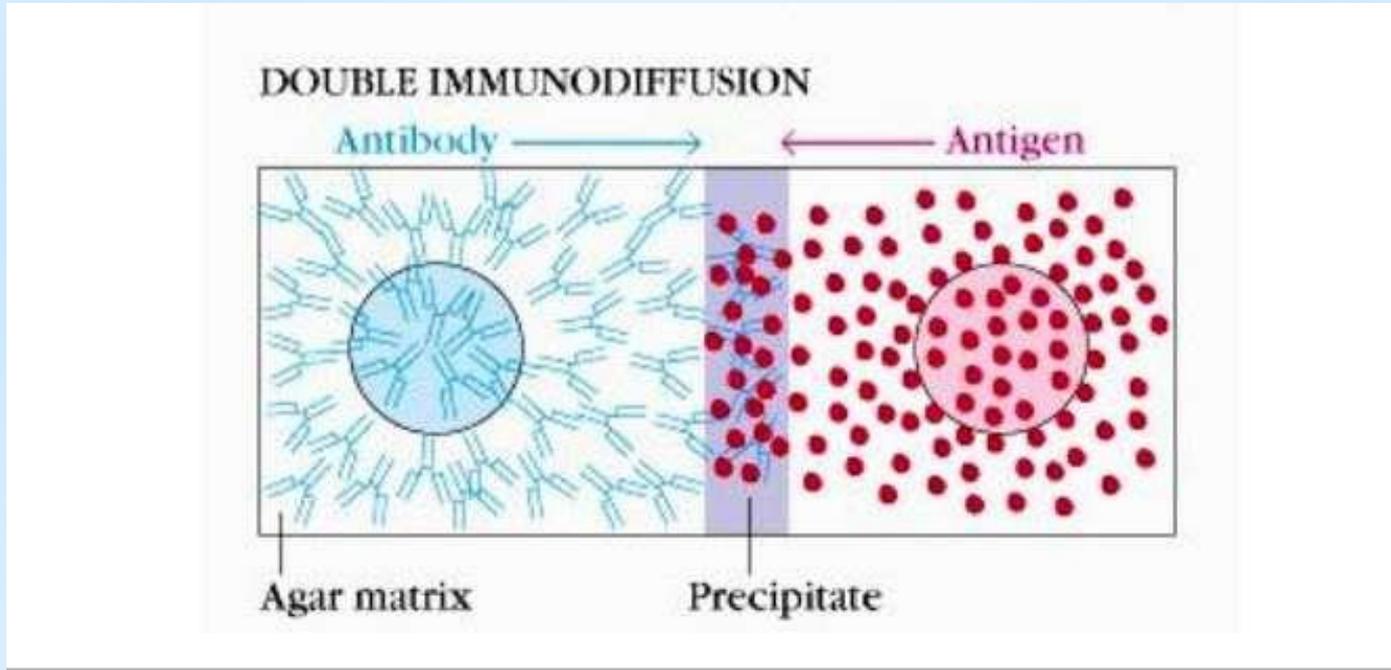
Figura 10.4

Diffusione radiale semplice: il grafico descrive la relazione fra il diametro dell'anello di precipitazione (d) e la concentrazione dell'antigene [Ag]. Viene costruita una curva standard che serve per interpolare il valore d^2 e determinare la concentrazione del campione [Ag], quando la migrazione raggiunge il punto di equivalenza (metodo di Mancini).



Il quadrato del d dell'anello di precipitazione in corrispondenza del punto di equivalenza è proporzionale alla concentrazione dell'Ag

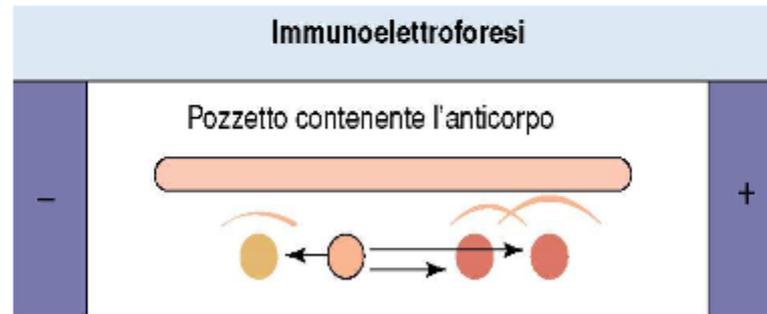
IMMUNODIFFUSIONE DOPPIA O METODO DI OUCHTERLONY



Quando si introducono antigene o anticorpo in pozzetti scavati nell'agar, essi diffondono e danno origine ad una **banda di precipitazione** nel punto d'incontro.

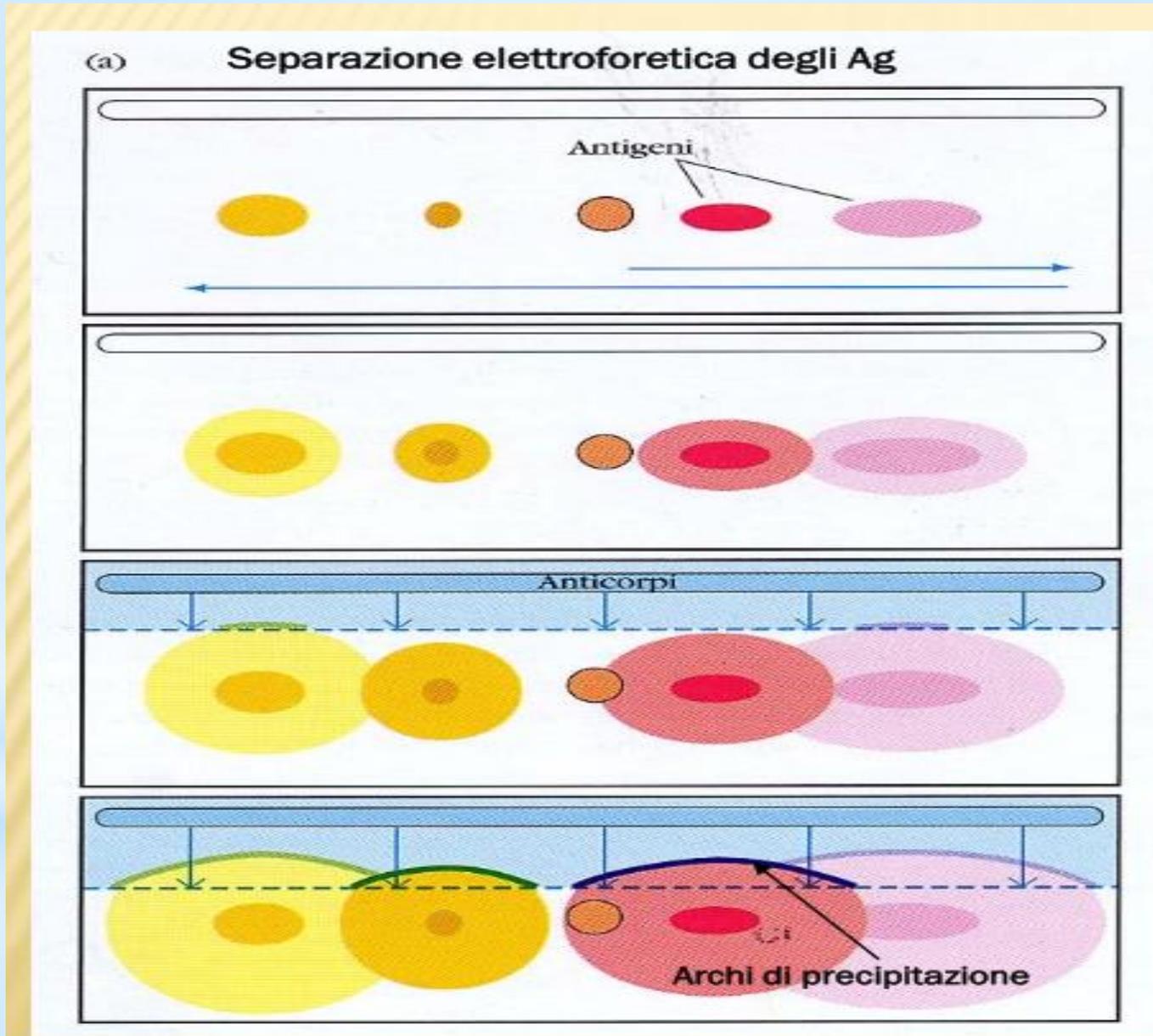
IMMUNOELETTROFORESI

Si unisce la separazione di proteine (antigeni) mediante elettroforesi con la specificità della reazione di immunoprecipitazione:

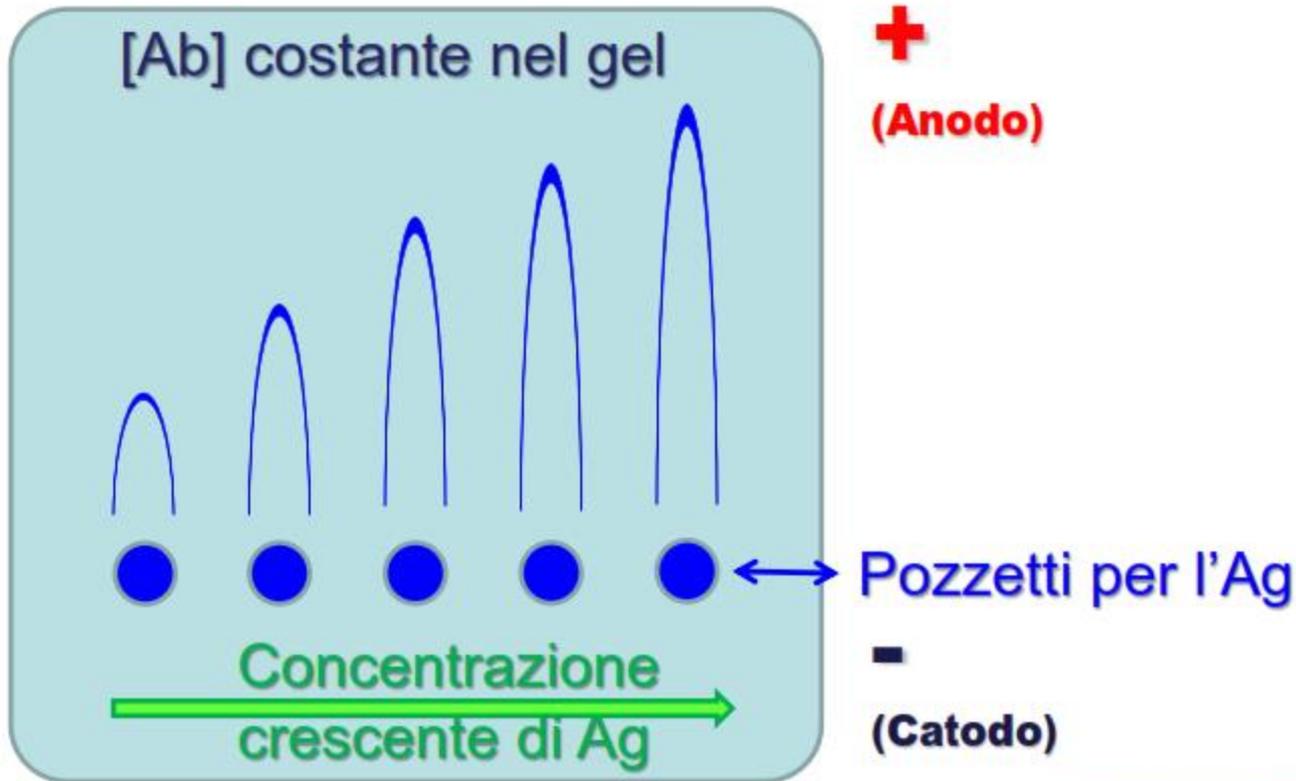


Si esegue prima una **elettroforesi** delle proteine del siero su gel di agar stratificato su lastra di vetro. Ai lati, su dei solchi viene introdotto l'**antisiero** che contiene anticorpi contro le proteine del siero. All'unione tra proteine del siero separate e i rispettivi anticorpi, si formano degli **archi** caratteristici.

IMMUNOELETTROFORESI



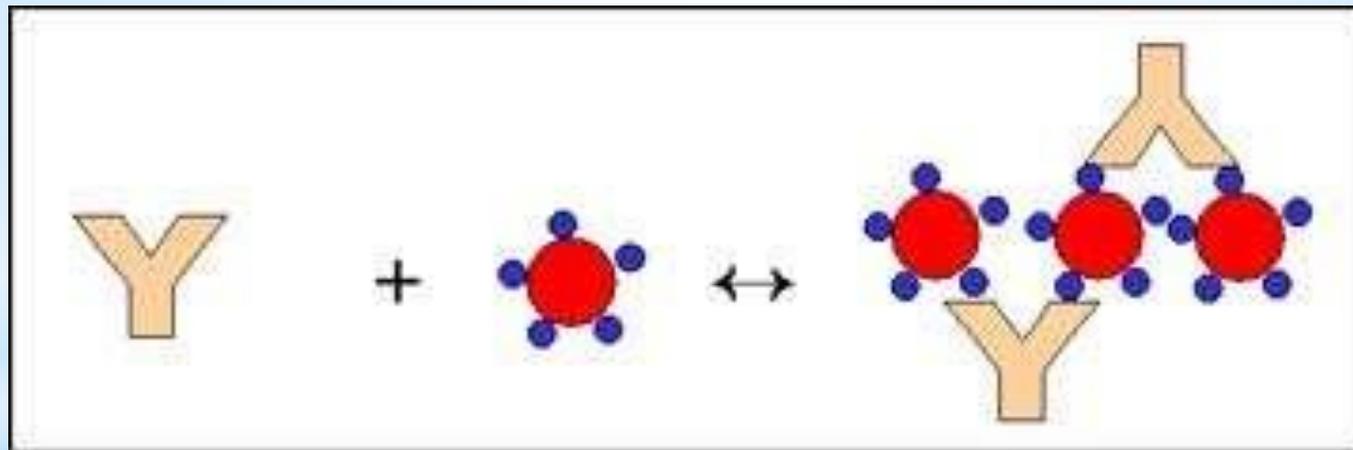
IMMUNOELETTROFORESI ROCKET



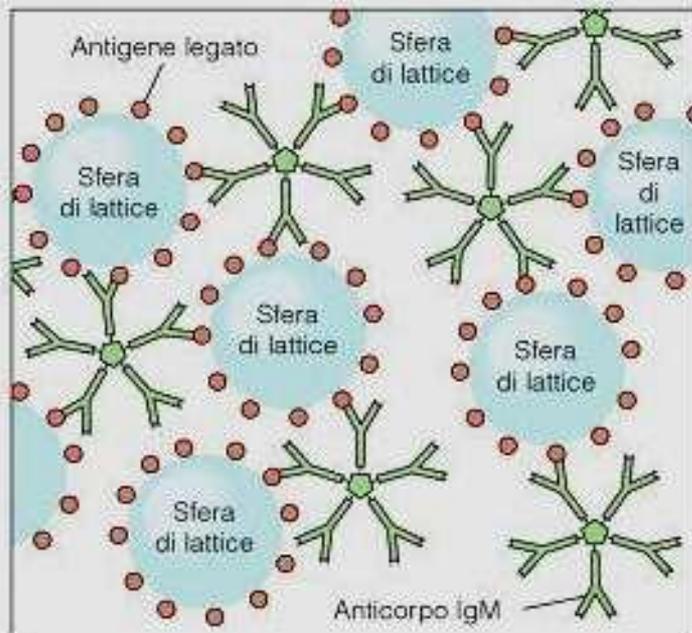
Bande di precipitazione a forma di razzo, la cui **AREA** (o h) è proporzionale alla $[Ag]$.
Tecnica quantitativa.

TEST DI AGGLUTINAZIONE

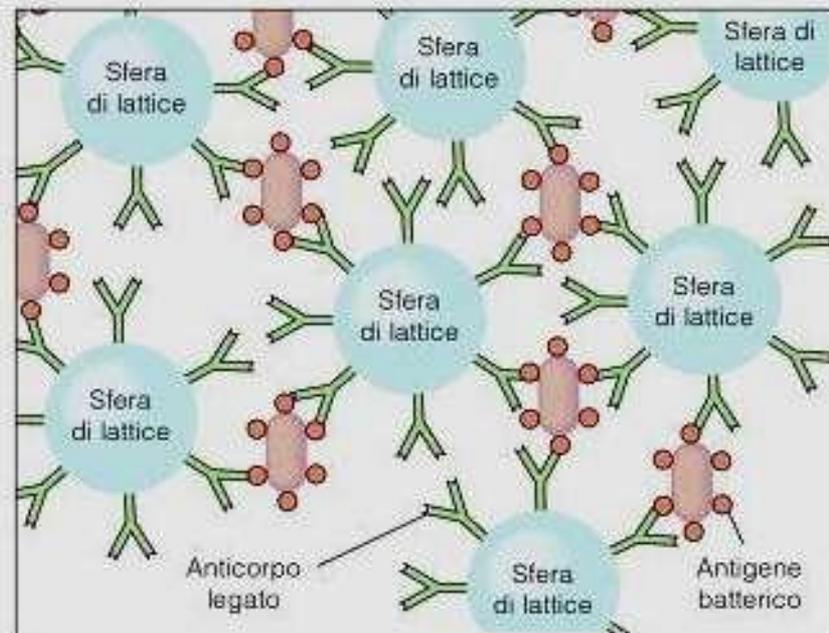
- Diretta: se l'antigene è corpuscolato (cellule, batteri)
- **Indiretta**: se l'antigene è solubile si fa adsorbire o legare covalentemente a carrier insolubili (sfere di lattice, di polistirene, globuli rossi)



TEST DI AGGLUTINAZIONE: metodo indiretto



(a) Test indiretto per la ricerca di anticorpi positivo. Quando le particelle sono legate con l'antigene, l'agglutinazione indica la presenza di anticorpi, come le IgM mostrate in questa figura.



(b) Test indiretto per la ricerca di antigeni positivo. Quando le particelle sono legate con anticorpi monoclonali, l'agglutinazione indica la presenza di antigeni.

Si eseguono quando:

- si vuole ricercare la presenza di anticorpi nel siero di un paziente per diagnosticare una malattia infettiva;

Siero paziente (siero immune) + antigene corrispondente

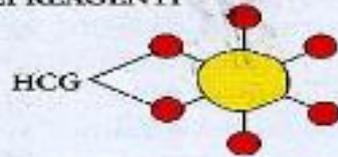
- si vuole identificare un microrganismo in base agli antigeni che possiede

Sospensione microbica (antigeni) + anticorpi specifici

TEST DI GRAVIDANZA: ES. DI INIBIZIONE DI AGGLUTINAZIONE

(Presenza o assenza di gonadotropina)

KIT DEI REAGENTI



Coniugato aptene-carrier

e



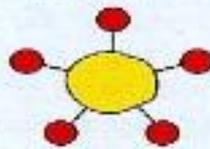
Anticorpo anti-HCG

PROCEDURA

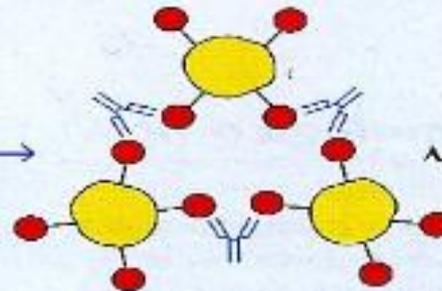
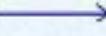
Urina + Anti-HCG $\xrightarrow{\text{Incubazione}}$ + Coniugato HCG-carrier \longrightarrow Osservare se si ha aggregazione

REAZIONI POSSIBILI

(-) reazione: non gravida

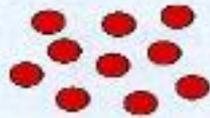


+



Aggregati visibili

(+) reazione: gravida



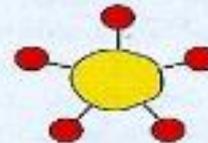
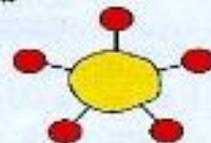
HCG nelle urine

+



+

Ci

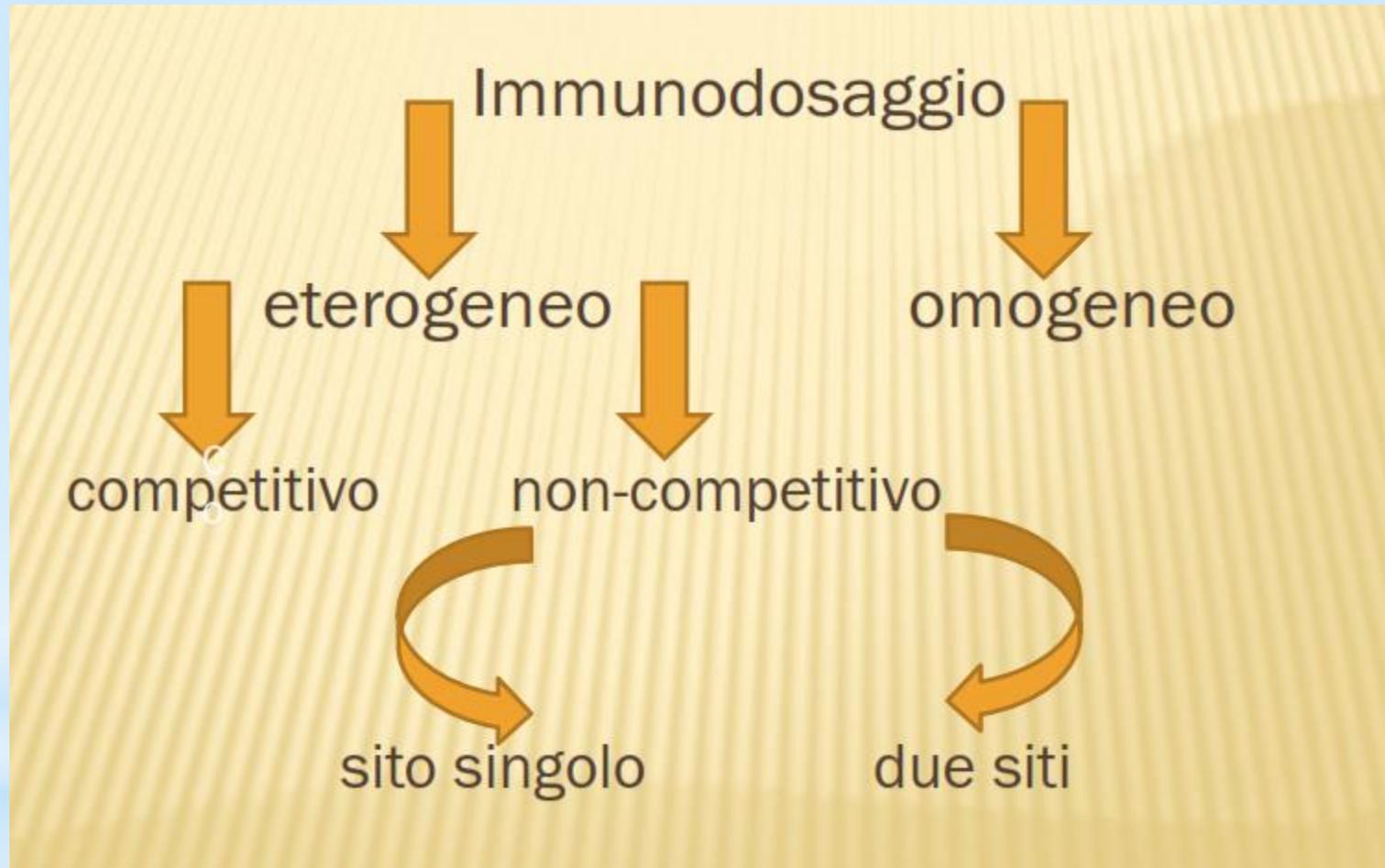


Aggregati assenti

+



DOSAGGI IMMUNOLOGICI

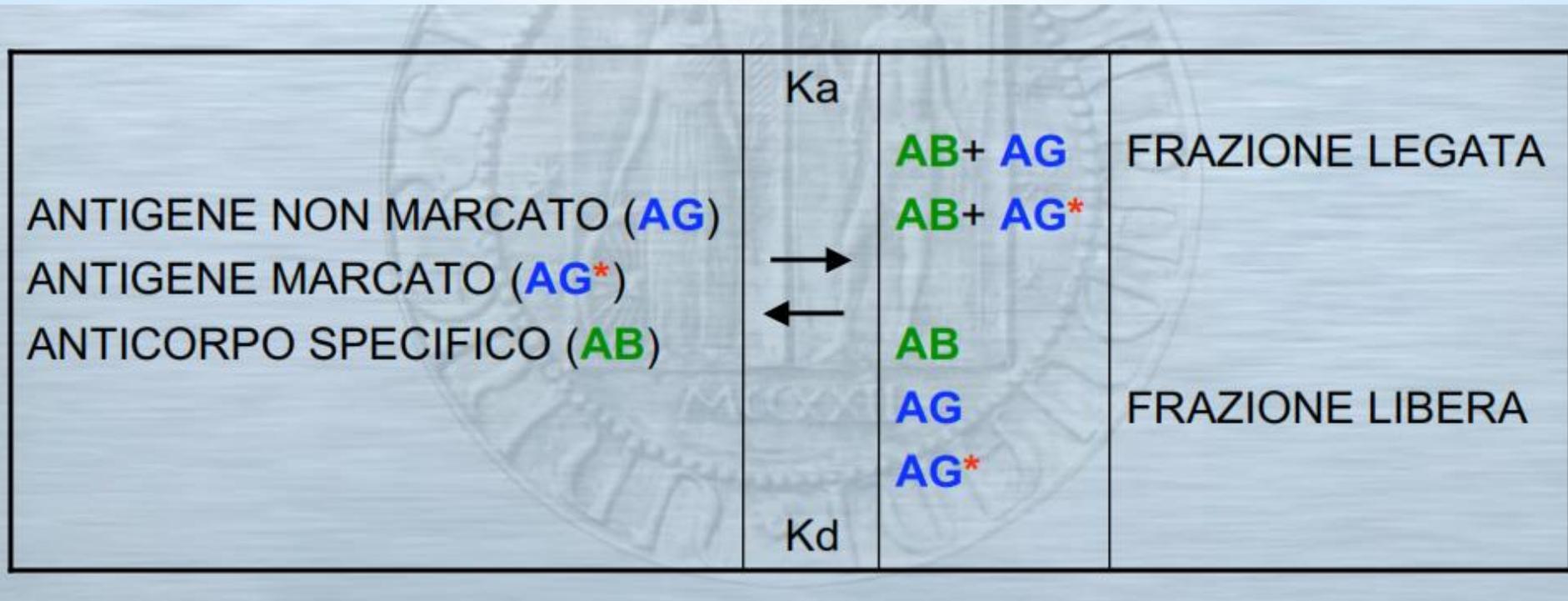


MOLECOLE DI RIVELAZIONE COMUNEMENTE USATE NEGLI IMMUNODOSAGGI

Sistema di rivelazione	Esempio
Radio-isotopi	^{125}I , ^{14}C , ^3H
Enzimi	Perossidasi di rafano, fosfatasi alcalina, β -galattosidasi
Chemiluminescenza	Luminolo, esteri di acridinio
Bioluminescenza	Luciferasi/luciferina
Fluorescenza	Fluoresceina, rodamina., europium

DOSAGGI RADIOIMMUNOLOGICI

Il metodo è basato sulla competizione tra un Ag non marcato e una quantità fissa dello stesso Ag marcato (Ag^*), per il legame con un numero limitante e costante di siti anticorpali:



a) La reazione fra anticorpo ed antigene (marcato e non marcato) possiede una costante di associazione (k_a) elevata ovvero la reazione tende a proseguire verso destra. In altri termini si formano dei complessi antigene anticorpo molto stabili.

b) I complessi anticorpo+antigene ($AB+AG$ e $AB+AG^*$) vengono chiamati frazione legata mentre gli anticorpi (AB) e gli antigeni (AG e AG^*) non legati vengono definiti frazione libera.

c) L'anticorpo non distingue tra antigene marcato e non marcato e quindi, in virtù della legge di azione di massa, **l'antigene piu' concentrato occupa piu' siti anticorpali.**

d) Normalmente la variabile, l'incognita della reazione, e' l'antigene non marcato presente nel siero del paziente.

e) Si utilizzano una serie di soluzioni con antigene non marcato in concentrazione nota per costruire una **curva di calibrazione** (uno standard da usare come riferimento per le misure).

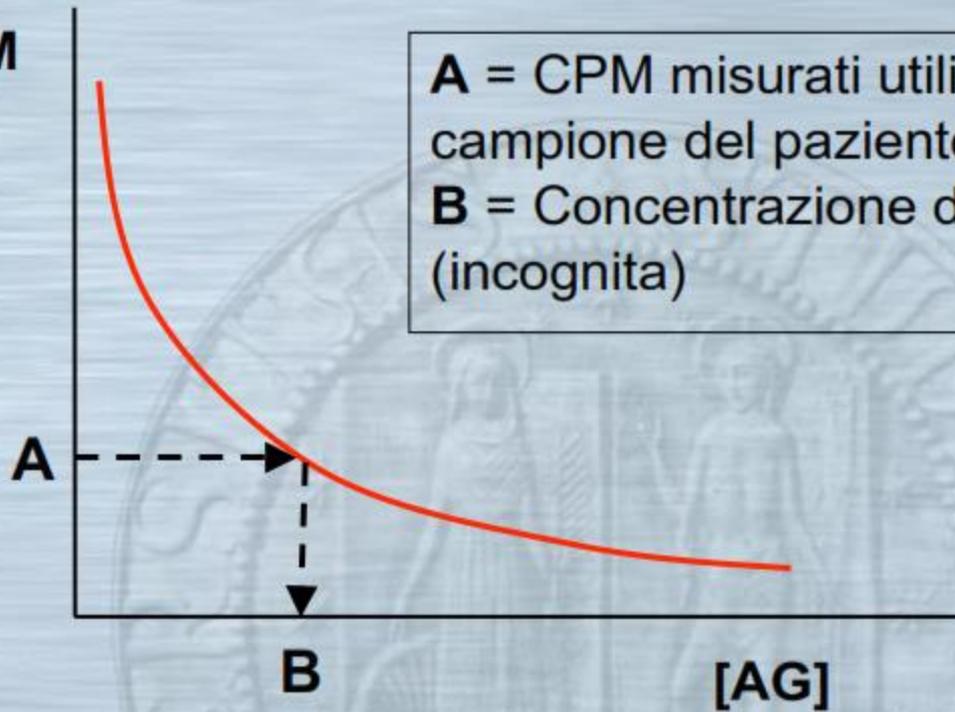
A concentrazioni basse di antigene non marcato aggiunto sarà legato quasi solo antigene marcato. Quindi se elimino la frazione libera e misuro otterrò alti CPM (conteggi per minuto) dovuti alla grande quota di antigene marcato legato all'anticorpo.

A concentrazioni intermedie di antigene non marcato aggiunto ci sarà una quota paragonabile di antigene marcato e non marcato legato all'anticorpo. Di conseguenza i CPM rispetto al caso precedente saranno inferiori.

A concentrazioni elevate di antigene non marcato aggiunto si legherà all'anticorpo quasi solo antigene non marcato. Quindi i CPM saranno ulteriormente ridotti rispetto al caso precedente.

Si noti allora che **maggiore è la concentrazione di antigene non marcato minori sono i CPM che misuro**

CPM



A = CPM misurati utilizzando un campione del paziente
B = Concentrazione dell'antigene (incognita)

Dopo numerose misurazioni con antigene non marcato in quantità nota con la procedura illustrata poco sopra ottengo una curva detta di taratura. Riportando la misura dei CPM ottenuti utilizzando un campione del paziente (ovvero con la stessa tecnica descritta ma con antigene non marcato a concentrazione ignota) sulla curva di taratura posso leggere “semplicemente” la concentrazione dell'antigene che cerco.

Vantaggi del RIA:

- ❖ Si dosa qualsiasi composto, disponibile, però, anche in forma marcata
- ❖ Elevata sensibilità (pg/ml)
- ❖ Elevata specificità
- ❖ Elevata precisione
- ❖ Procedura automatizzata, quindi analisi di elevato numero di campioni

Svantaggi del RIA:

- ❖ Costo elevato di apparecchiature e reagenti
- ❖ Durata dei reagenti
- ❖ Pericoli radiologici legati all'uso del radioattivo: operatori frequentemente controllati
- ❖ Tempi di risposta lunghi

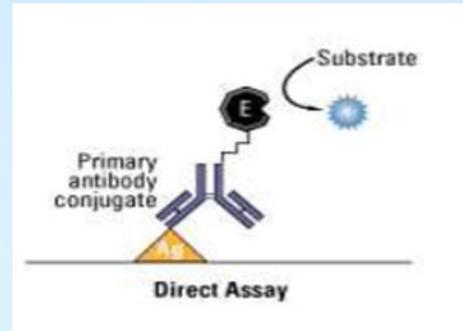
IMMUNODOSAGGI ENZIMATICI (EIA)

ELISA : SAGGI DI LEGAME A ENZIMI IN FASE SOLIDA

PRINCIPIO: Si basa sull'utilizzo di *anticorpi marcati con un enzima* (generalmente la perossidasi), in modo che i coniugati risultanti abbiano una attività sia immunologica sia enzimatica. Avendo uno dei componenti (*antigene o anticorpo*) adeso alla piastra la reazione antigene-anticorpo è immobilizzata e pertanto potrà facilmente essere evidenziata con l'addizione del substrato, che reagendo con l'enzima produrrà una colorazione osservabile a vista e quantificabile con un colorimetro.

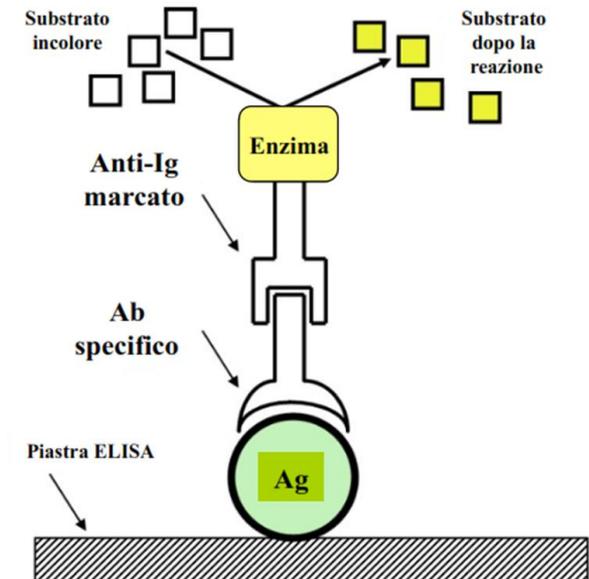
❖ **METODO ELISA DIRETTO:** In questo metodo, che consente di **titolare un antigene**, è un anticorpo primario che deve essere coniugato con un enzima indicatore.

- ✓ Si fa reagire una soluzione di un anticorpo specifico marcato con un antigene ancorato ad una fase solida
- ✓ Dopo aver lavato, si aggiunge il substrato dell'enzima. In questa tecnica, l'attività enzimatica misurata sarà **direttamente proporzionale** alla quantità di antigene presente.

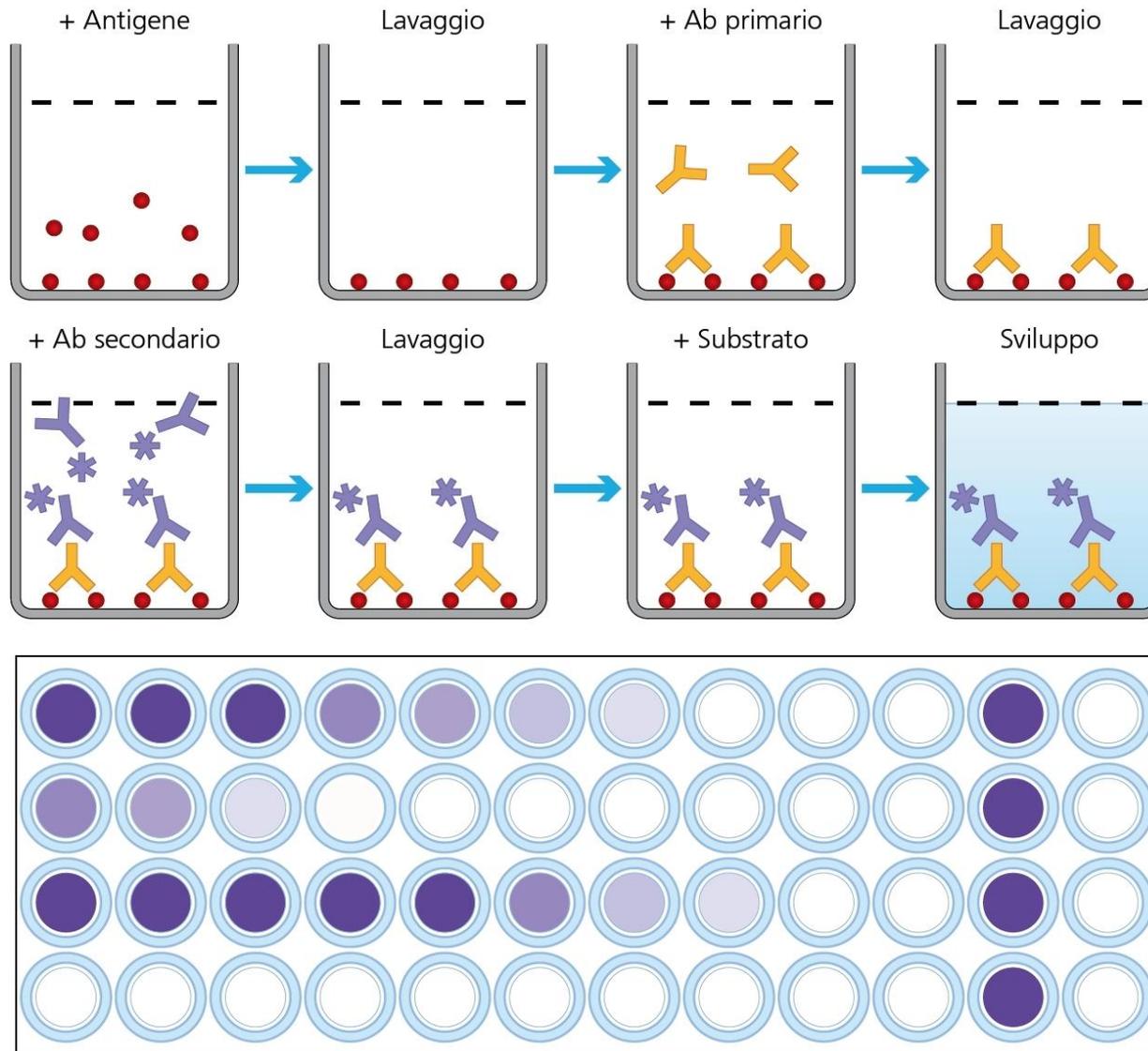


❖ **METODO ELISA INDIRETTO:** serve per **titolare un anticorpo**, anziché un antigene. E' l'anticorpo secondario ad essere coniugato all'enzima.

- ✓ Il materiale da dosare (ad es., un siero umano contenente IgG) viene fatto reagire con l'apposito antigene legato ad una fase solida.
- ✓ Dopo reazione del siero con l'antigene immobilizzato, il materiale che non si è legato viene rimosso mediante lavaggio.
- ✓ Si aggiunge poi un anticorpo anti-IgG (ad es., se il siero era umano, si può aggiungere un anticorpo estratto da un animale di laboratorio immunizzato contro le porzioni costanti di IgG umane) coniugato con un enzima. Si lava di nuovo e si aggiunge substrato dell'enzima: l'**attività** misurata sarà **direttamente proporzionale** alla quantità di **anticorpo** specifico presente nel siero originale.



ELISA



❖ METODO ELISA COMPETITIVO DIRETTO:

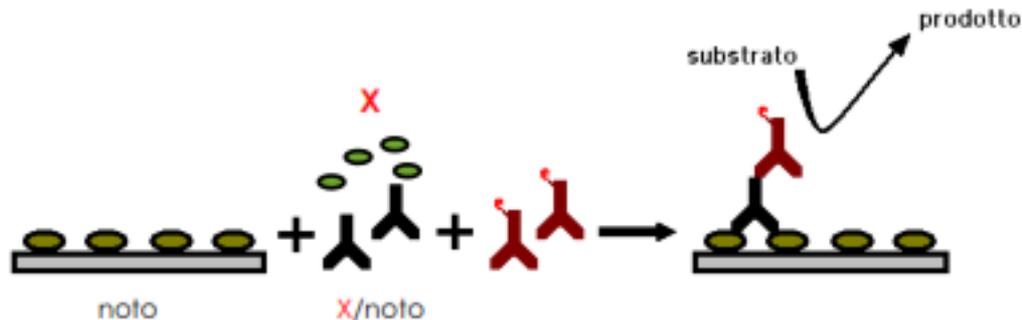
a) Uso coniugato Antigene-Enzima

- ✓ Una quantità fissa di antigene marcato e diluizioni decrescenti di antigene libero (come standard o nel campione) vengono messe a reagire insieme nei confronti di un anticorpo in difetto. In questo modo, l'**antigene marcato e quello libero** si troveranno a **competere** per un numero limitato di **siti anticorpali**. Dopo aver lavato il complesso, si aggiunge il substrato per l'enzima e si misura l'attività enzimatica spettrofotometricamente, fluorimetricamente o mediante chemiluminescenza. La concentrazione del prodotto enzimatico misurata risulterà **inversamente proporzionale** alla concentrazione dell'**analita** (antigene non marcato).



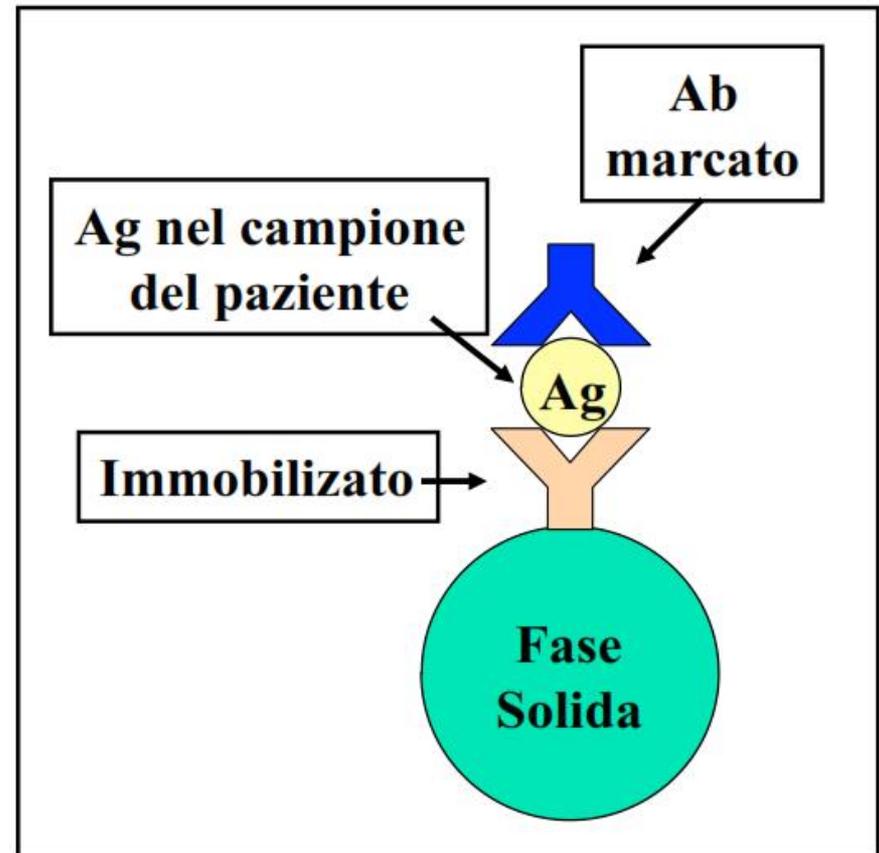
❖ METODO ELISA COMPETITIVO INDIRECTO:

- ✓ La procedura implica l'uso di un **anticorpo secondario marcato**, in grado di riconoscere la regione costante dell'anticorpo primario, precedentemente incubato su fase solida.
- ✓ La reazione di competizione avviene fra l'antigene immobilizzato e quello libero in soluzione come standard o proveniente dal campione, nei confronti dell'anticorpo presente in concentrazione fissa.
- ✓ La misura del prodotto enzimatico sarà **direttamente proporzionale** nel caso della misura del titolo dell'**anticorpo** da determinare, mentre **inversamente proporzionale** per l'**analita**.



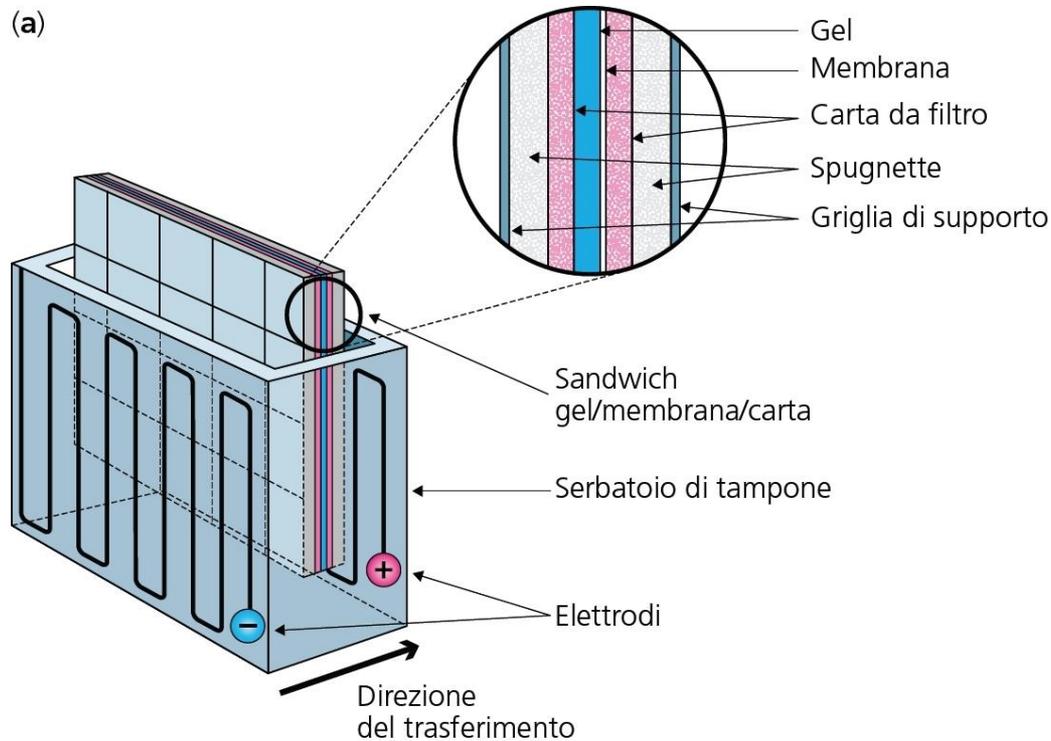
ELISA A DUE SITI (A SANDWICH)

- Rilevamento dell'Ag
 - Immobilizzare l'Ab
 - Incubare con il campione da misurare
 - Aggiungere l'Ab marcato con un enzima
 - La quantità di Ab legato è proporzionale alla quantità di Ag nel campione del paziente.



➤ Test Quantitativo

WESTERN BLOTTING



(b)

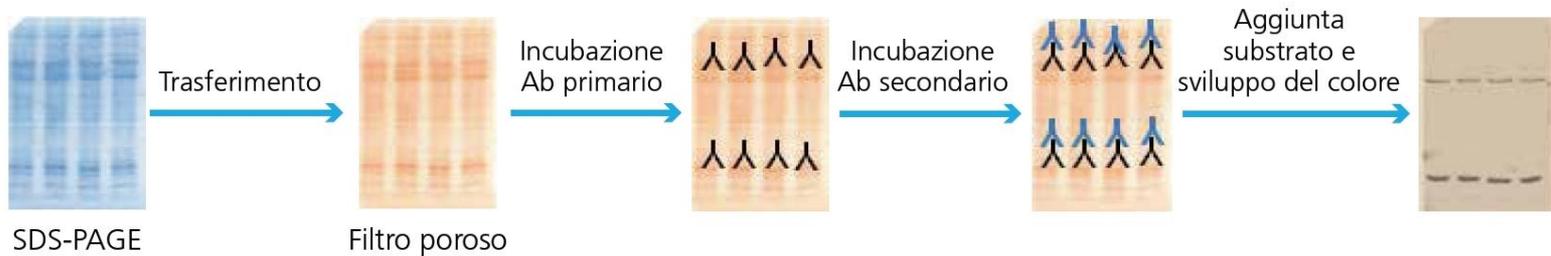
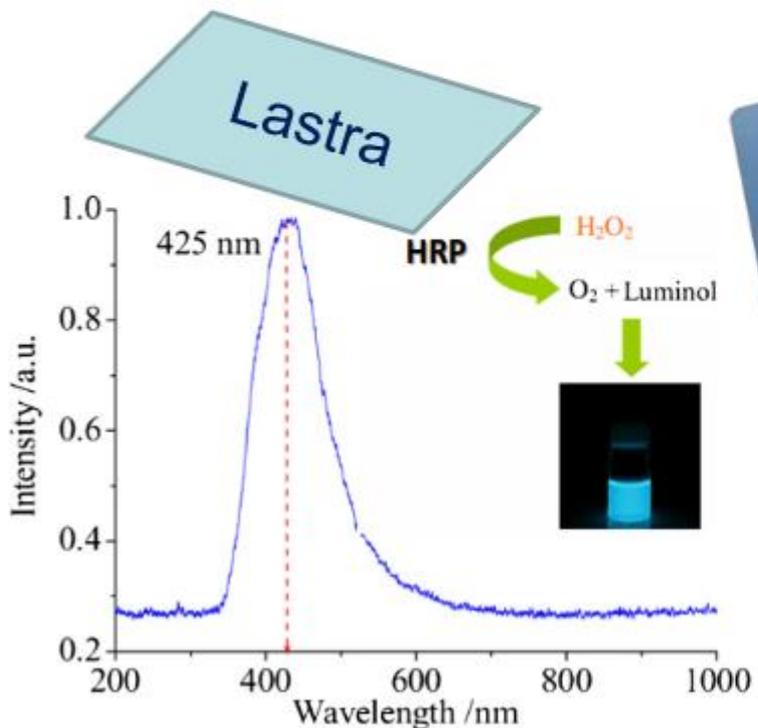
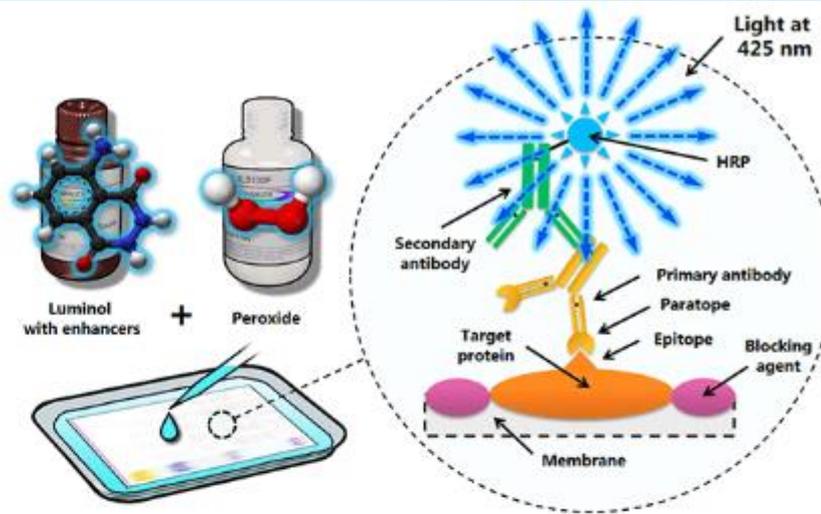


Figura 6.28

Schema di Western blot. (a) Trasferimento delle proteine su filtro. (b) Riconoscimento della proteina d'interesse con anticorpo primario specifico e rivelazione tramite anticorpo secondario.

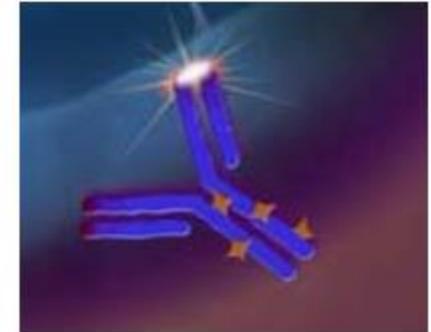
RILEVAZIONE IN CHEMILUMINESCENZA

In presenza di HRP e H_2O_2 il luminolo viene **ossidato**:
si produce **luce**, la cui intensità può essere aumentata di 1000 volte con un intensificatore (enhancer) chimico.



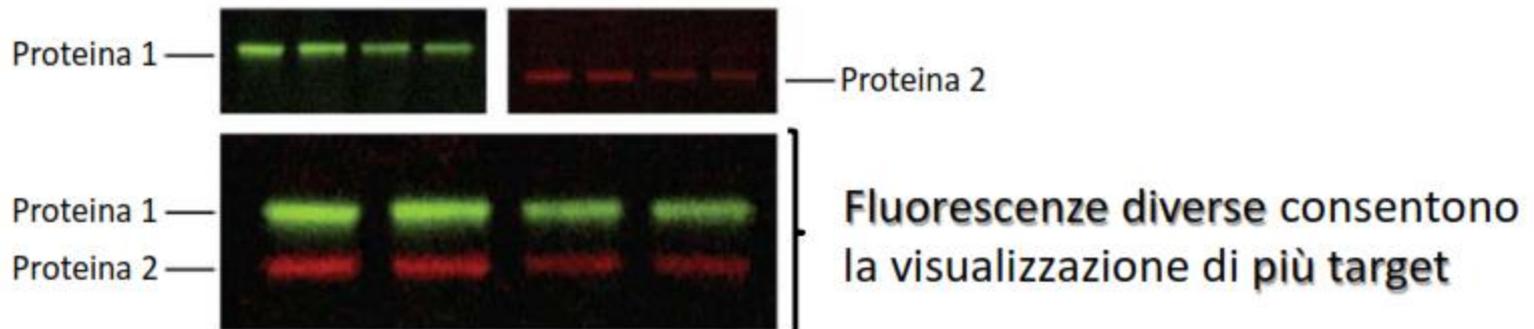
RILEVAZIONE IN FLUORESCENZA

- Adatti al Western Blot.
- Sistema **stabile** per **settimane**.
- **Risparmio** di tempo e denaro.
- Si ottengono **immagini digitalizzate**.



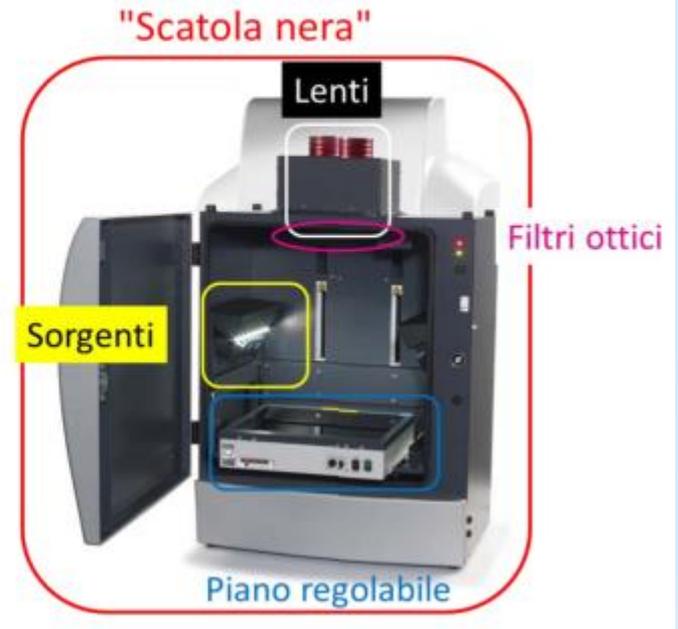
e.....

- No incubazione con substrati o esposizione di lastre
- **Rilevazione** di **target multipli** nello stesso Western Blotting



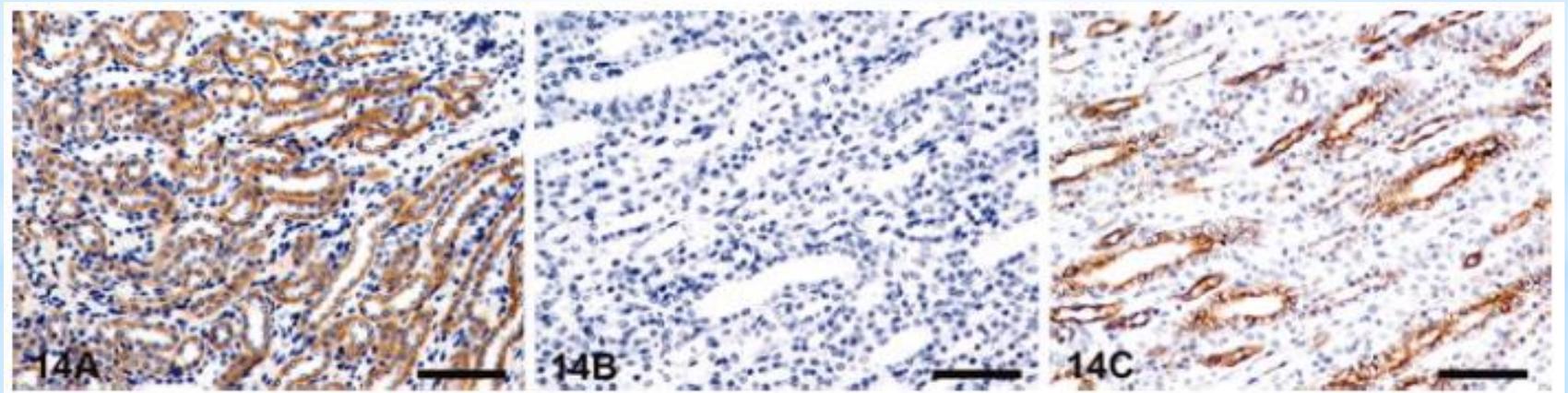
Sistemi per Imaging

Opportune combinazioni di **lampade e filtri** permettono di lavorare nell'**UV**, **Visibile**, e **IR**.



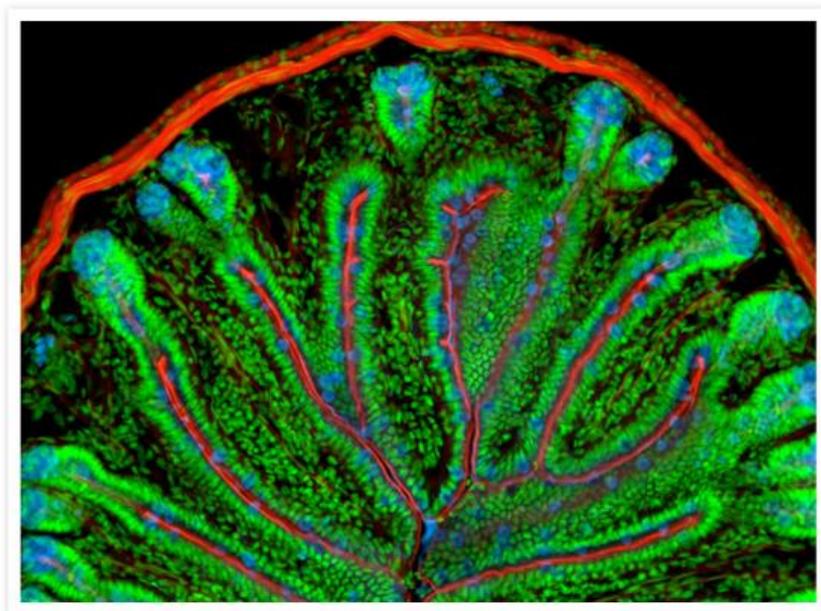
IMMUNOISTOCHEMICA

- L'immunoistochimica è una tecnica che riveste un ruolo molto importante nella routine del **laboratorio di anatomia patologica**; è in **grado infatti di** individuare specifiche molecole o strutture del compartimento intra ed extracellulare.
- La tecnica immunoistochimica si basa sul principio di coniugazione antigene anticorpo in addizione poi con sistemi di rivelazione (enzimatici, fluorescenti) che ne rendono visibile l'avvenuta reazione al microscopio.

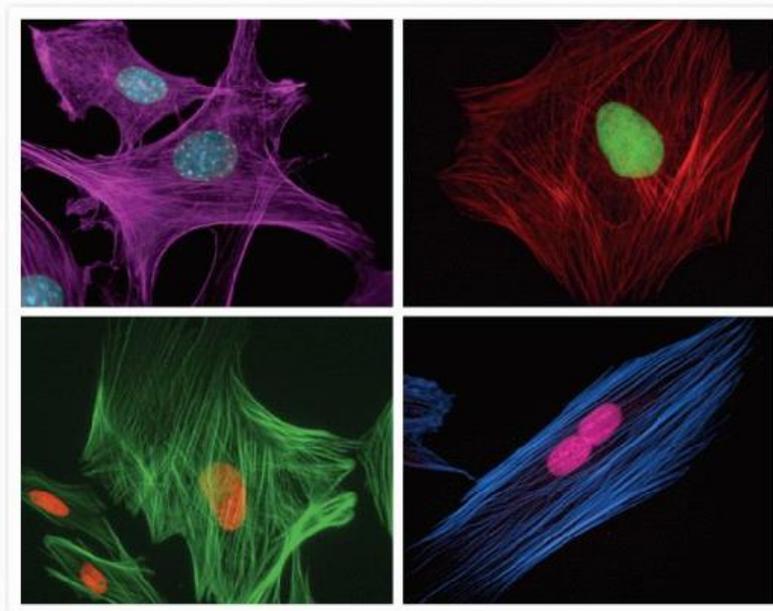


IMMUNOFLUORESCENZA

- Analisi di Tessuti



- Analisi di Singole Cellule



IMMUNOFLUORESCENZA

- I fluorocromi sono molecole utilizzate come coloranti fluorescenti:

-Assorbono l'energia della luce → Eccitazione

-Emettono fluorescenza nel visibile → Emissione

Fluorocromo	Eccitazione (nm)	Emissione (nm)
Fluoresceina (FITC)	495	519
Rodamina	550	573
Ficoeritrina (PE)	565	578
Texas Red	589	615

IMMUNOISTOCHIMICA: Usa un **sistema di rivelazione basato su reazioni chimiche** (perossidasi, fosfatasi, ecc..), tramite enzimi coniugati con l'anticorpo

IMMUNOFLUORESCENZA: Usa un **sistema di rivelazione basato su molecole (fluorocromi) che assorbono onde luminose ad alta frequenza (UV) emettendo onde luminose nel visibile**

CITOMETRIA A FLUSSO

- CITOFLUORIMETRO: E' uno strumento di laboratorio che permette un'analisi veloce ed automatica di popolazioni cellulari in sospensione misurandone le caratteristiche fisiche e/o biochimiche (volume, granulosità, fluorescenza);
- Consente di:
 - quantificare e memorizzare contemporaneamente più parametri per ogni cellula che compone la popolazione;
 - analizzare i dati ottenuti anche dopo l'acquisizione

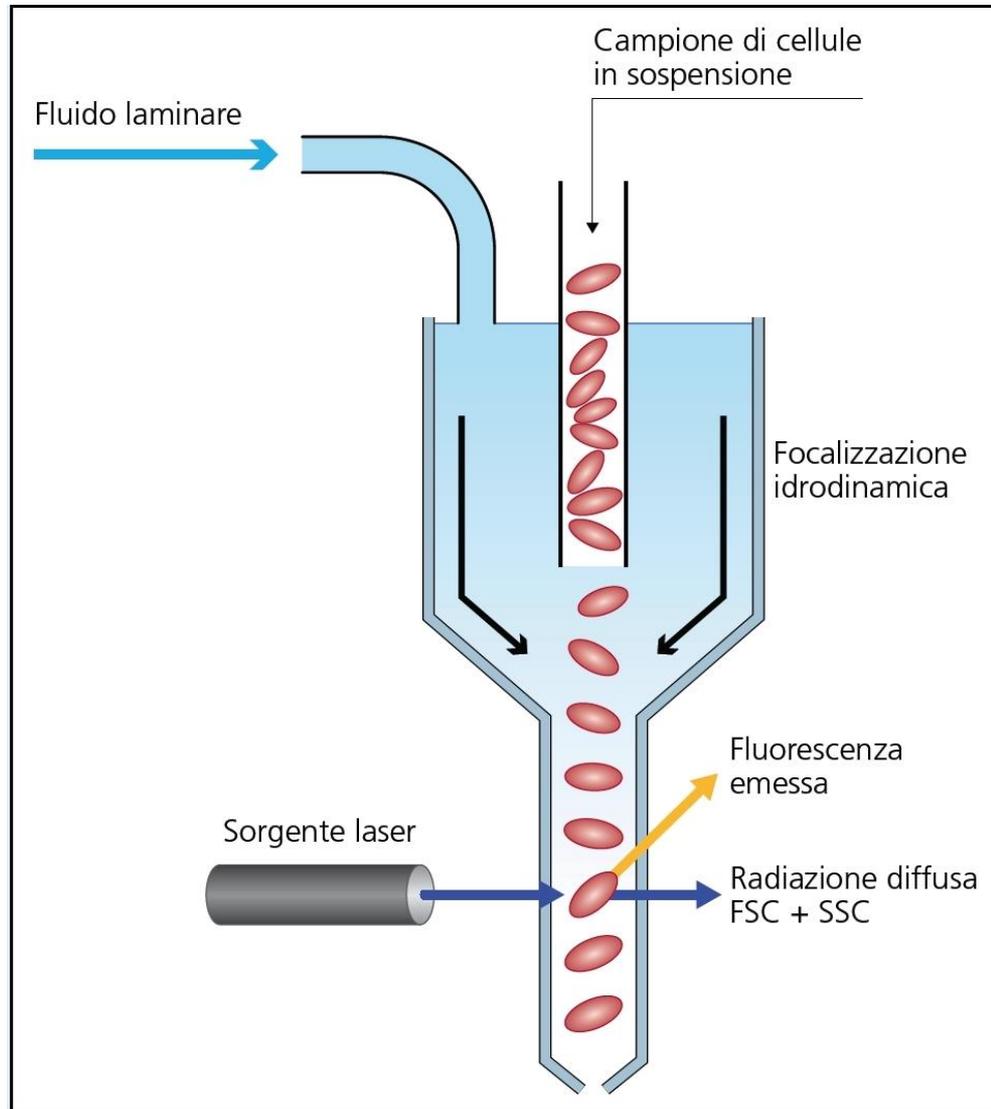
APPLICAZIONE: Determinazione dei marcatori di differenziamento cellulare, di superficie, intracitoplasmatici e intranucleari;

Valutazione del contenuto cellulare di DNA;

Discriminazione tra cellule vive, cellule apoptotiche e necrotiche;

Predisposizione per la separazione cellulare.

CITOFUORIMETRO

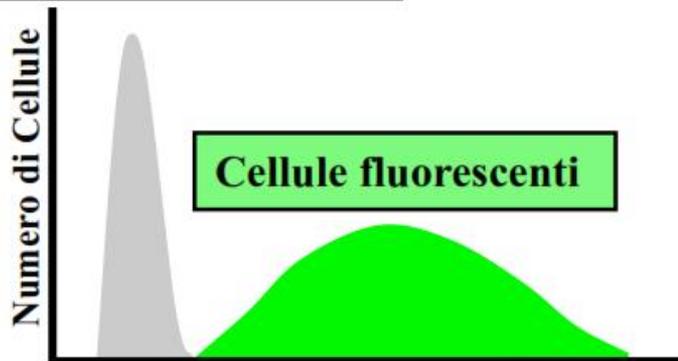


- La popolazione cellulare in sospensione viene spinta all'interno di una camera a flusso dove le singole cellule si dispongono in fila e, venendo colpite dalla luce di un raggio laser, riflettono/rifrattono la luce ed emettono fluorescenza;
- Si generano così dei segnali che vengono raccolti e trasformati in segnali digitali e inviati ad un computer.

- Analisi del campione al FACS

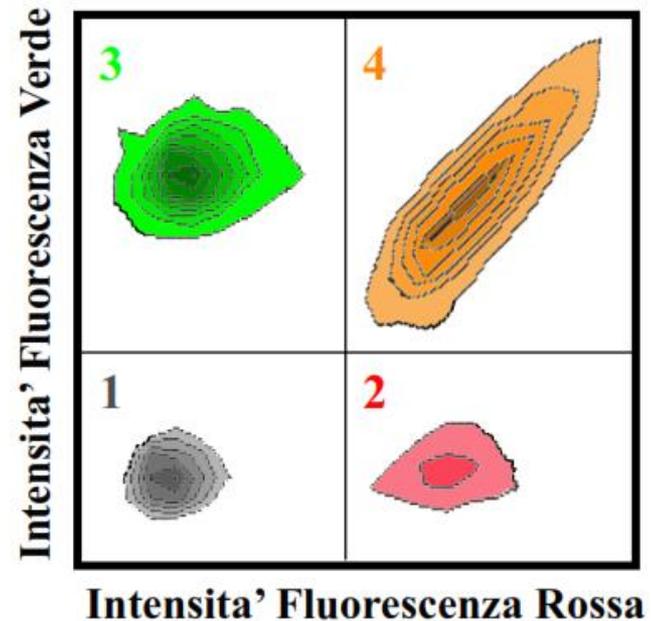
Istogramma con 1 Parametro

Cellule non marcate



Cellule fluorescenti

Istogramma con 2 Parametri



NEFELOMETRIA

La nefelometria è una **metodica ottica** di analisi che permette di ricavare la quantità di sostanza oggetto di analisi **misurando la radiazione diffusa per effetto Tyndall**.

“L'effetto Tyndall consiste essenzialmente nella diffusione di un'onda elettromagnetica a seguito di fenomeni di riflessione e rifrazione generati per interazione con sistemi colloidali costituiti da particelle aventi dimensione dell'ordine della lunghezza d'onda del raggio incidente”.

Viene applicata per fasi disperse estremamente fini, di diametro dell'ordine di decine o centinaia di nanometri e presenta elevati livelli di sensibilità e, opportunamente standardizzata, può essere anche molto precisa.

Biosensori – SPR

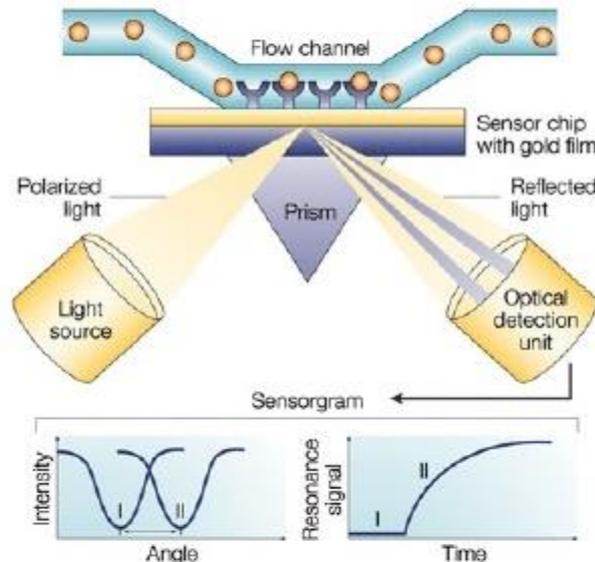
Surface Plasmon Resonance (SPR)

Principio:

Alla base vi e' il riconoscimento specifico tra due macromolecole (es. Ab-Ag).

Il legame tra le due molecole provoca un cambiamento dell'indice di rifrazione del mezzo su cui e' legato l'elemento sensibile.

Questo cambiamento e' valutabile dalla variazione dell'indice di rifrazione del mezzo



Nature Reviews | Drug Discovery