

2) Quale tra queste affermazioni non è corretta?

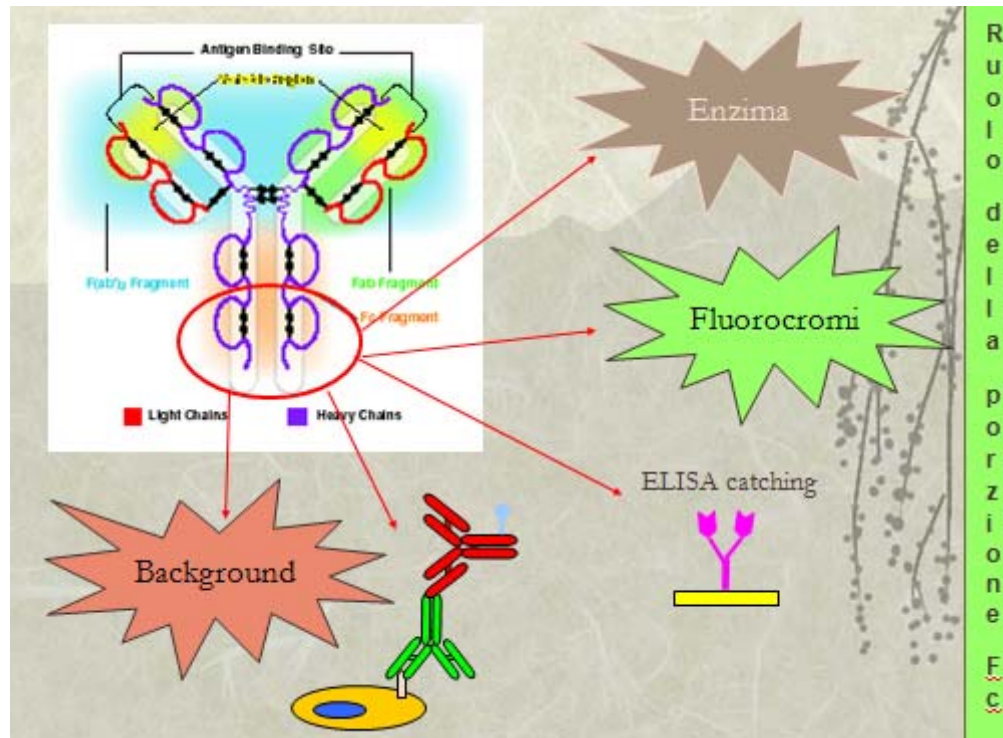
a. la porzione Fc dell'anticorpo può essere utilizzata per il legame della perossidasi

b. la porzione Fc dell'anticorpo serve per il legame dell'anticorpo secondario nelle tecniche indirette

c. la porzione Fc dell'anticorpo viene adsorbita passivamente ai pozzetti nella tecnica di ELISA catching

d. la porzione Fc dell'anticorpo è responsabile dell'attività perossidasi endogena

e. la porzione Fc dell'anticorpo può essere utilizzata per il legame dei fluorocromi



3) Indicare quale tra queste non è un'attività degli anticorpi:

a.fissazione del complemento

b.neutralizzazione

c.opsonizzazione

d.citolisi diretta ←

e.precipitazione

9) riempire gli spazi della tabella sottostante

	Ab policlonali	Ab monoclonali
Origine	Varie specie animali (coniglio, cavallo, capra)	+++ topo
Affinità	Variabile	Nessuna variazione
Sensibilità	Alta (identificazione epitopi multipli dello stesso Ag)	Bassa-moderata
Specificità	Bassa-alta	alta
Contenuto di Ag "irrilevanti"	Alta (10 mg/ml)	Surnatante cellulare: nessuno
Variazioni della partita	sì	no

4) definizione di cross-reattività

Reattività di un anticorpo
verso due o più antigeni
che presentano epitopi
comuni o strutturalmente
simili

5) scrivere un esempio di funzione vantaggiosa della cross-reattività

1) Utilizzo della cross-reattività a fini diagnostici:
Peritonite infettiva del gatto (FIP) e
Gastroenterite trasmissibile del suino (TGE)

2) cross-reattività di Abs anti-Ags umani nei confronti di Ags simili o uguali di altre specie (scarsità di Abs animale-specifici!!!)

6) Elencare i 4 fattori che influenzano la reazione Ag/Ab

- ⌘ Affinità
- ⌘ Avidità
- ⌘ Forma fisica dell'Ag
- ⌘ Rapporto quantitativo Ag/Ab

7) quale di queste definizioni è corretta

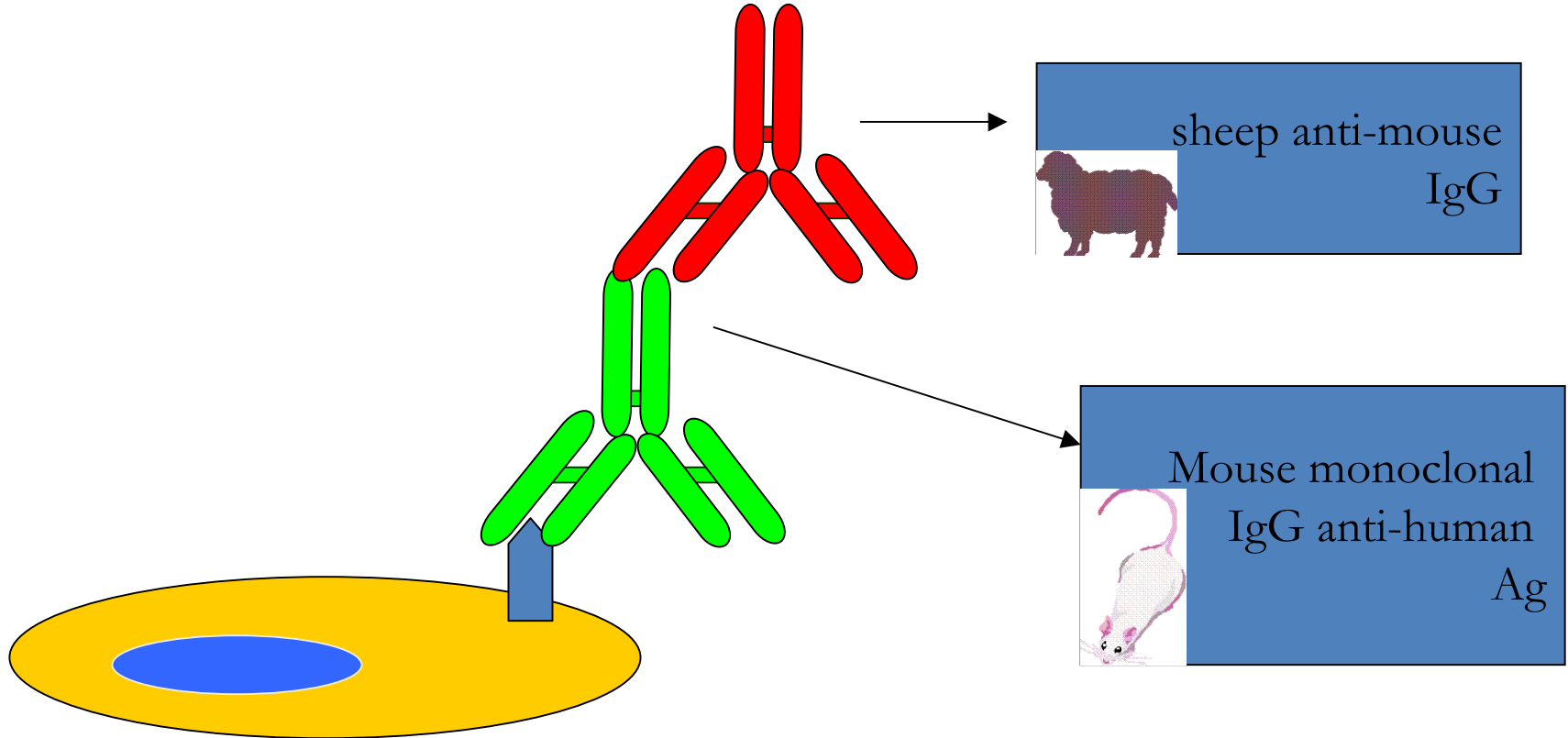
- con antigeni particolati è possibile una reazione di precipitazione
- con antigeni solubili è possibile una reazione di precipitazione ←
- la maggiore quantità di immunocomplessi si forma in eccesso di antigene
- l'affinità Ag/Ab non influenza la diluizione dell'Ab
- non esistono anticorpi monoclonali di coniglio

18) quali sono le soluzioni da adottare per ridurre la colorazione di fondo aspecifica?

- 1) Lavaggi ripetuti
- 2) Aumentare il tempo di blocking o eseguire un doppio blocking
- 3) Diluire l'anticorpo primario
- 4) Ridurre i tempi di incubazione con il cromogeno

8) spiegare il motivo per cui non è possibile utilizzare con metodiche indirette un anticorpo monoclonale di topo su tessuto di topo

Nel tessuto di topo sono presenti normalmente IgG libere. Se si usa un secondario anti-mouse IgG riconoscerà non solo le IgG di topo del primario ma anche quelle del tessuto, determinano una positività diffusa del campione



10) segnare con una croce la risposta esatta

	Risposta qualitativa	Risposta semiquantitativa	Risposta quantitativa	Ricerca di Ag	Ricerca di Ab
Immunoistochimica					
ELISA					
Immunofluorescenza					
Fissazione del complemento					

	Risposta qualitativa	Risposta semiquantitativa	Risposta quantitativa	Ricerca di Ag	Ricerca di Ab
Immunoistochimica	X			X	
ELISA	X	X	X	X	X
Immunofluorescenza	X	X		X	X
Fissazione del complemento	X	X			X

11) indicare almeno due tipologie di marcatori fluorescenti con un esempio

1. Con affinità specifica per alcune componenti cellulari (DAPI; arancio di acridina...)
2. Diretti nei confronti di specifiche componenti cellulari previo legame con Abs
3. Con affinità per fattori del microambiente cellulare (Fura-2)
4. Substrati di enzimi (diacetato di fluoresceina)

12) definizione di:

-controllo negativo

-controllo positivo

-controllo positivo interno

Controllo negativo: campione in cui si omette l'anticorpo primario

Controllo positivo: campione in cui è presente sicuramente l'antigene

Controllo positivo interno: l'antigene che si sta cercando è sicuramente presente nel campione in esame (es.: fattore VIII delle cellule endoteliali)

13) Quale definizione non è corretta?

- a. l'immunofluorescenza su colture cellulari prevede la permeabilizzazione con Triton
- b. nell'immunofluorescenza viene eseguita l'inibizione degli enzimi endogeni con levamisolo o metanolo e acqua ossigenata
- c. l'immunofluorescenza su sezioni tissutali prevede lo smascheramento con trattamento termico o proteolitico
- d. nell'immunofluorescenza su colture cellulari viene effettuato il blocking
- e. nell'immunofluorescenza su colture cellulari dopo il blocking non viene eseguito il lavaggio



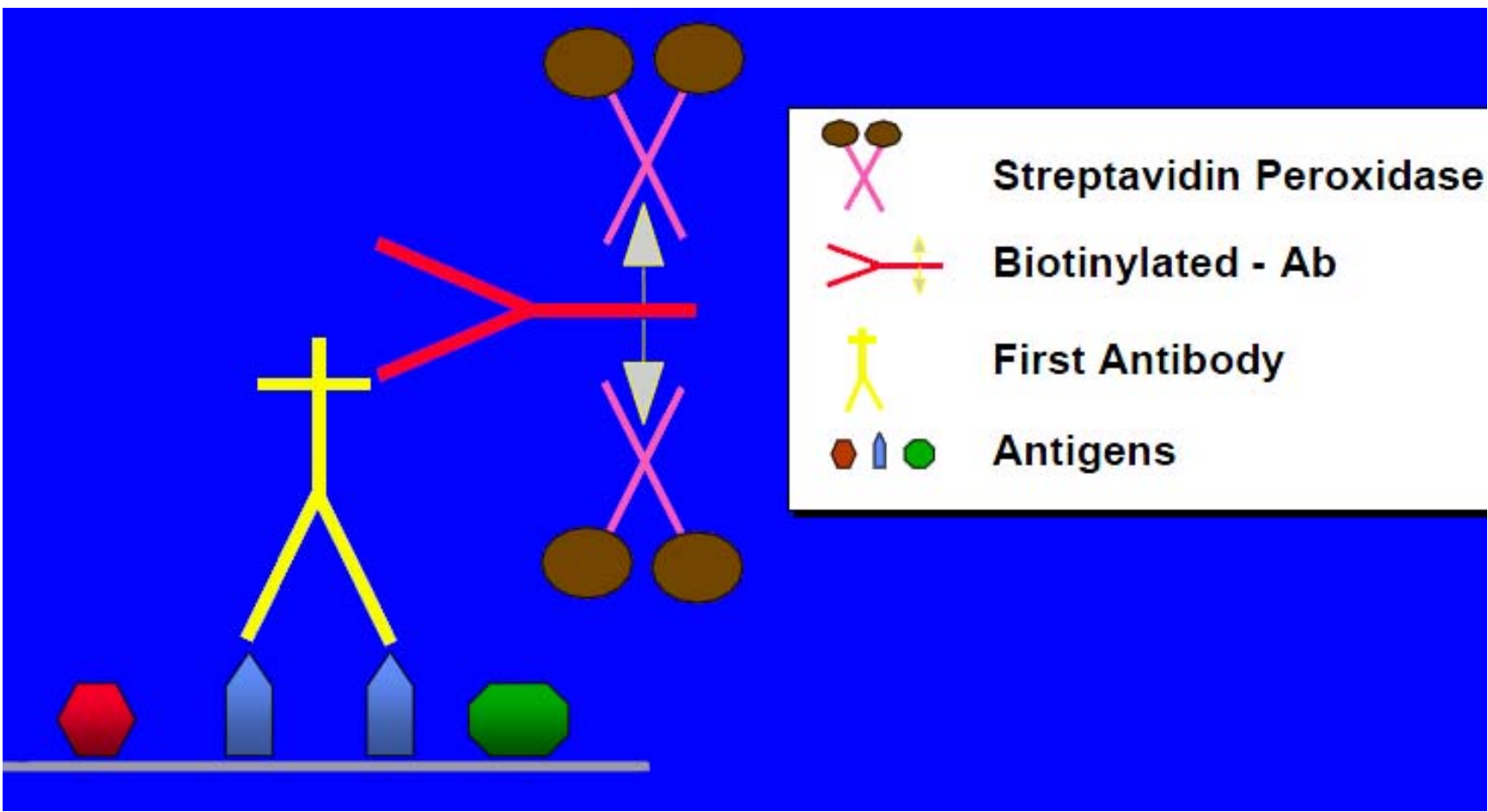
14) inserire nella tabella le combinazioni corrette
 Perossidasi, fosfatasi alcalina, tetrametilbenzene, Fosfatasi
 alcalina, perossidasi, Fast blue BB, p-nitrofenilfosfato,
 aminoetilcarbazono

	enzima	Cromogeno
immunoistochimica		
ELISA		

	enzima	Cromogeno
immunoistochimica	Perossidasi	aminoetilcarbazono
	Fosfatasi alcalina	Fast blue BB
ELISA	Perossidasi	tetrametilbenzene
	Fosfatasi alcalina	p-nitrofenilfosfato

15) cosa si intende per metodo streptavidina-biotina?

Metodo utilizzato in immunocistochemica che prevede un complesso rivelatore formato da: anticorpo biotinilato + molecole di streptavidina legate all'enzima




16) elencare tutte le fasi di una prova di immunocistochimica su strisci citologici.

- 1) Fissazione
- 2) Inibizione degli enzimi endogeni
- 3) Blocking
- 4) Anticorpo primario
- 5) Anticorpo secondario
- 6) Complesso rivelatore
- 7) Cromogeno
- 8) Colorazione di contrasto
- 9) montaggio

17) indicare tre sostanze che vengono utilizzate per la fase di blocking

- ✓ latte in polvere
- ✓ siero di albumina bovina (BSA)
- ✓ normal goat/donkey/swine/horse serum IgG free

19) quale di queste definizioni è corretta:

a. la metodica ELISA prevede la fissazione di un Ag o un Ab in fase solida 

b. l'ELISA classica serve per la determinazione dell'Ag

c. con l'ELISA competitiva il siero negativo non determina reazione colorimetrica

d. la misurazione quantitativa dell'ELISA classica avviene tramite la diluizione per raddoppio e la valutazione del titolo anticorpale

Applicando un'ELISA competitive come risulterà un siero positivo?

In caso di siero contenente Abs per l'Ag, si inibisce il legame dell'Ab marcato e quindi non si ha reazione colorimetrica (antigene adsorbito; aggiunta siero; aggiunta Abs specifici per l'Ag marcati con enzima)

Qual è il risultato di una prova positiva con la fissazione del complemento (con spiegazione)?

Se nel siero sono presenti Abs per l'Antigene, il complemento aggiunto viene tutto consumato e non è più disponibile per la reazione; quando viene aggiunto il sistema rivelatore, non si avrà emolisi.

Cosa sono gli inibitori aspecifici dell'emoagglutinazione e come possono essere rimossi?

-sostanze proteiche, mucoproteiche, lipidiche che si adsorbono al virus (simulazione del comportamento degli Abs inibenti l'emoagglutinazione); rimozione degli inibitori aspecifici: trattamento del siero a 56°C per 30 min