Sped. in A. P. 45% - art.2 comma 20/b legge 662/96 - n° 24 - Febbraio 1987 - Direttore responsabile: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Tipolitografia Nuova ATA Genova

ISSN 0394 3291

Caleidoscopio *Italiano*

Norman P. Kubasik

Il dosaggio Enzimoimmunologico e Fluoroimmunologico

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

24

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1987

Caleidoscopio
Italiano

Norman P. Kubasik

The Genesee Hospital Rochester, New York - USA

Il dosaggio Enzimoimmunologico e Fluoroimmunologico

24

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1987

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

Informazioni generali. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

Testo. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

Frontespizio. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

Bibliografia. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

Tabelle e figure. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

Unità di misura. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

Abbreviazioni. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

Presentazione della monografia. Riporre le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spedite al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista *Caleidoscopio* rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Editoriale

Questo volume vuol proseguire idealmente il discorso iniziato con le monografie sul dosaggio radioimmunologico, già pubblicate in questa collana, per ampliare il quadro sulle metodologie di studio in Patologia Clinica.

Il dottor Kubasik, con la consueta chiarezza e metodologia, illustra e pone ordine in un campo spesso caratterizzato da confusione nei termini e nei metodi.

L'Autore d'altra parte ha la competenza e la preparazione che permette simili operazioni.

Dopo essere stato Laboratory Technician presso il "The Genesee Hospital" a Rochester, il "Syracuse Memorial Hospital "a Syracuse, e Biochemist presso "The Genesee Hospital" è attualmente Assitent Director di Clinical Chemistry.

E' membro della "Associazione Americana di Clinical Chemists ". In questa Associazione ha ricoperto numerosi incarichi. Ha fatto parte del Comitato per il Programma e le Designazioni (Upstate New York Section), è stato membro del Consiglio Nazionale (Upstate N. Y. Section). E' stato Presidente e Presidente per il Programma (Upstate N. Y. Section) e ha fatto parte dell'Editorial Board della Rivista Clinical Chemistry News.

E' membro della Associazione dei Patologi Clinici dell'Ospedale di Rochester, di cui è stato ripetutamente Presidente.

E', ancora, membro dell'Accademia Nazionale di Biochimica Clinica e della "Clinical Ligand Assay Society".

E' inoltre docente Universitario di Biochemistry e di Clinical Science a Rochester.

L'intensa attività scientifica del dottor Kubasik è testimoniata, infine, da circa settanta pubblicazioni originali, settanta abstracts e oltre centosessanta relazioni tenute in tutti i continenti, è stato anche in Italia numerose volte, ospite a Simposi e Conferenze.

Sergio Rassu

FIGURA 1. **RAFFRONTO TRA EIA E RIA**

I dosaggi immunocompetitivi per il legame proteico sono quelli nei quali le proprietà di riconoscimento molecolare degli anticorpi fanno uso di antigeni marcati, apteni o anticorpi. I marcatori più comuni sono i radioisotopi, che permettono un dosaggio sensibile, specifico e preciso di un grosso numero e varietà di analiti biologici.

Tuttavia, quando si usano dei radioisotopi esistono degli svantaggi. La breve emivita degli isotopi, i pericoli per la salute legati al loro uso, i problemi di smaltimento delle scorie radioattive, e la strumentazione necessaria per le misurazioni rappresentano degli indubbi svantaggi.

I marcatori enzimatici possono utilizzare l'anticorpo per la specificità, gli effetti amplificanti dell'enzima per la sensibilità, e conservare ancora la precisione. Nella figura 1 viene fatto un raffronto di alcuni vantaggi e svantaggi dell'enzimoimmunoassay (EIA) e del radioimmunoassay (RIA).

FIGURA 1. **RAFFRONTO TRA EIA E RIA**

	EIA	**RIA**
SENSIBILITA'	ELEVATA (ETEROGENEO)	PIU' ELEVATA
PRECISIONE	ACCETTABILE	ACCETTABILE
SPECIFICITA'	ELEVATA	ELEVATA
LETTURA RISULTATI	OBIETTIVA O SOGGETTIVA	OBIETTIVA
STRUMENTAZIONE	SPETTROFOTOMETRO O COLORIMETRO	CONTATORE DI RADIO-ATTIVITA'
POSSIBILITA' DI AUTOMAZIONE	SI	SI
STABILITA' DEI REAGENTI	LUNGO PERIODO DI STOCCAGGIO	T 1/2 DELL'ISOTOPO
PREPARAZIONE DI ANTICORPI O ANTIGENI	PUO' ESSERE DIFFICILE	PUO' ESSERE DIFFICILE
MISURE DI SICUREZZA NEL LABORATORIO	MINORI	ISOTOPO
REGOLAMENTAZIONE	MINIMA O ALCUNA	LICENZA PER L'USO DI ISOTOPI, SMALTIMENTO
TEMPI DI DOSAGGIO	DAMINUTI A ORE LUNGHI DELL'EIA	GENERALMENTE PIU'
NECESSITA' DI UNA FASE DI SEPARAZIONE	SI E NO	SI

FIGURA 2. **DOSAGGIO ENZIMOIMMUNOLOGICO: CONSIDERAZIONI GENERALI**

L'enzima deve:

1.Essere facilmente reperibile in forma stabile e altamente purificata ad un costo ragionevole.
2.Avere un elevato numero catalitico che viene conservato dopo coniugazione o/e stoccaggio.
3.Essere solubile,
4.Contenere parecchi residui di lisina per la coniugazione.
5.Differire dagli enzimi presenti in significative concentrazioni nei liquidi biologici.

Ilsubstrato deve:

1.Essere voluminoso, facilmente reperibile, economico e stabile.
2.Non trovarsi in significative concentrazioni nei liquidi biologici.

La reazione enzima-substrato deve:

1.Avere un pH ottimale che non impedisca la reazione antigene-anticorpo.
2.Non essere inibita da una qualsiasi sostanza presente nei liquidi biologici.
3.Avere la possibilità di un arresto del dosaggio semplice, rapido e riproducibile.

FIGURA 2. **DOSAGGIO ENZIMOIMMUNOLOGICO: CONSIDERAZIONI GENERALI**

***L'ENZIMA**

Disponibile
Purificato
Stabile
Elevato numero catalitico
Coniugabile
Diverso dagli enzimi nel siero

*** IL SUBSTRATO**

Grande
Disponibile
Stabile
Diverso dai costituenti nel siero

***LA REAZIONE**

pH ottimale
Nessun inibitore nel siero
Rapida, riproducibile, semplice termine

FIGURA 3. **IMMUNODOSAGGI ETEROGENEI**

Un immunodosaggio eterogeneo necessita della separazione del marcato libero dal marcato legato. In una procedura RIA manuale, questo è l'ultimo passaggio prima del conteggio dell'isotopo ed il calcolo dei risultati.

Con la procedura EIA, tuttavia, la reazione con produzione di colore deve ancora verificarsi, I dosaggi immuno-enzimatici sono conosciuti con una varietà di termini generali come:

EIA: Enzyme immunoassay.

ELA: Enzyme-labeled assay.

CELLA: Competitive enzyme-linked immunoassay.

FUSA:Enzyme-linked immunosorbant assay

FIGURA 3. **IMMUNODOSAGGI ETEROGENEI**

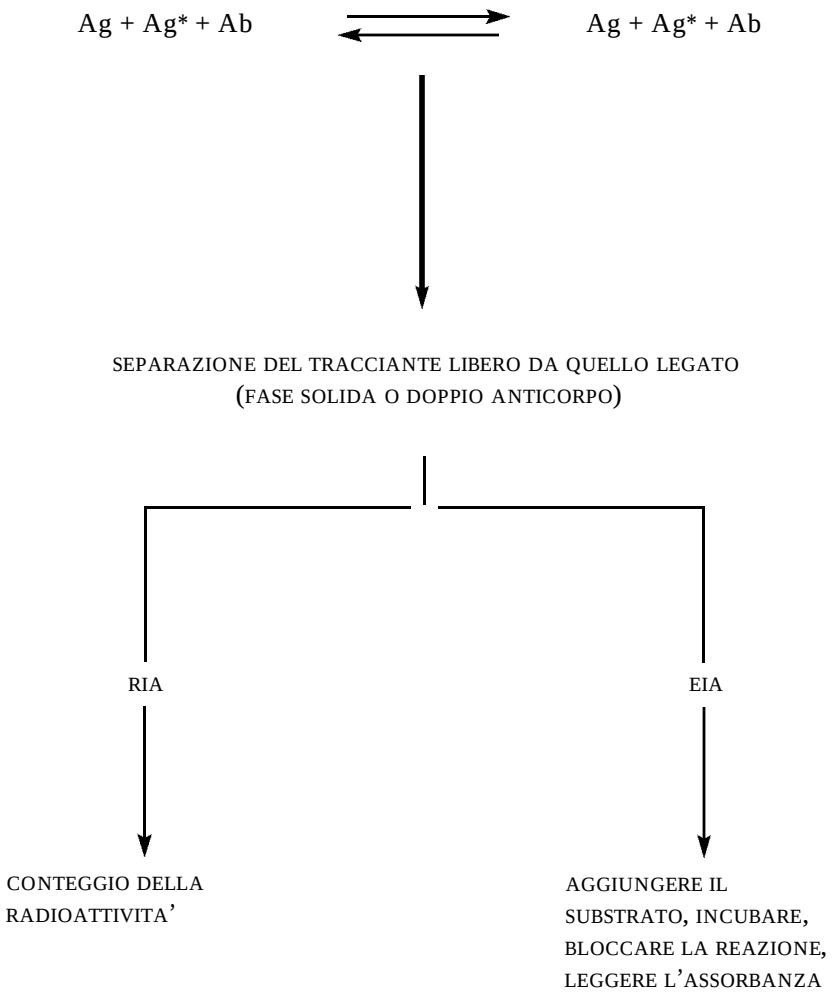


FIGURA 4. **ELISA: DOSAGGIO COMPETITIVO PER LA DETERMINAZIONE DELL'ANTIGENE**

Nel dosaggio competitivo dell'antigene mostrato nella figura 4, viene adsorbito passivamente un anticorpo, specifico per l'antigene in esame, su un supporto in fase solida (ad esempio polistirene). La fase solida viene quindi lavata con tampone (ad es. Tween 20-fosfato-salma) per rimuovere l'anticorpo non adsorbito e minimizzare un legame non specifico.

Fase 1. L'antigene del siero da testare viene mischiato con un antigene marcato con enzima per legare un limitato numero di siti anticorpali sulla fase solida. Dopo l'incubazione, la fase solida viene lavata al fine di rimuovere la quota non legata (libera) dell'antigene marcato e non marcato, e i componenti del siero che non hanno reagito.

Fase 2. Viene aggiunto il substrato per l'enzima.

Fase 3. Trascorso il tempo opportuno per il massimo sviluppo del colore, la reazione enzimatica viene bloccata (per esempio aggiungendo NaOH), e viene determinata l'intensità del colore dei singoli campioni. Le concentrazioni dell'antigene nel siero in esame vengono calcolate sulla base di una serie nota di calibratori. L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nel siero in esame.

FIGURA 4. **ELISA: DOSAGGIO COMPETITIVO PER LA DETERMINAZIONE DELL'ANTIGENE**

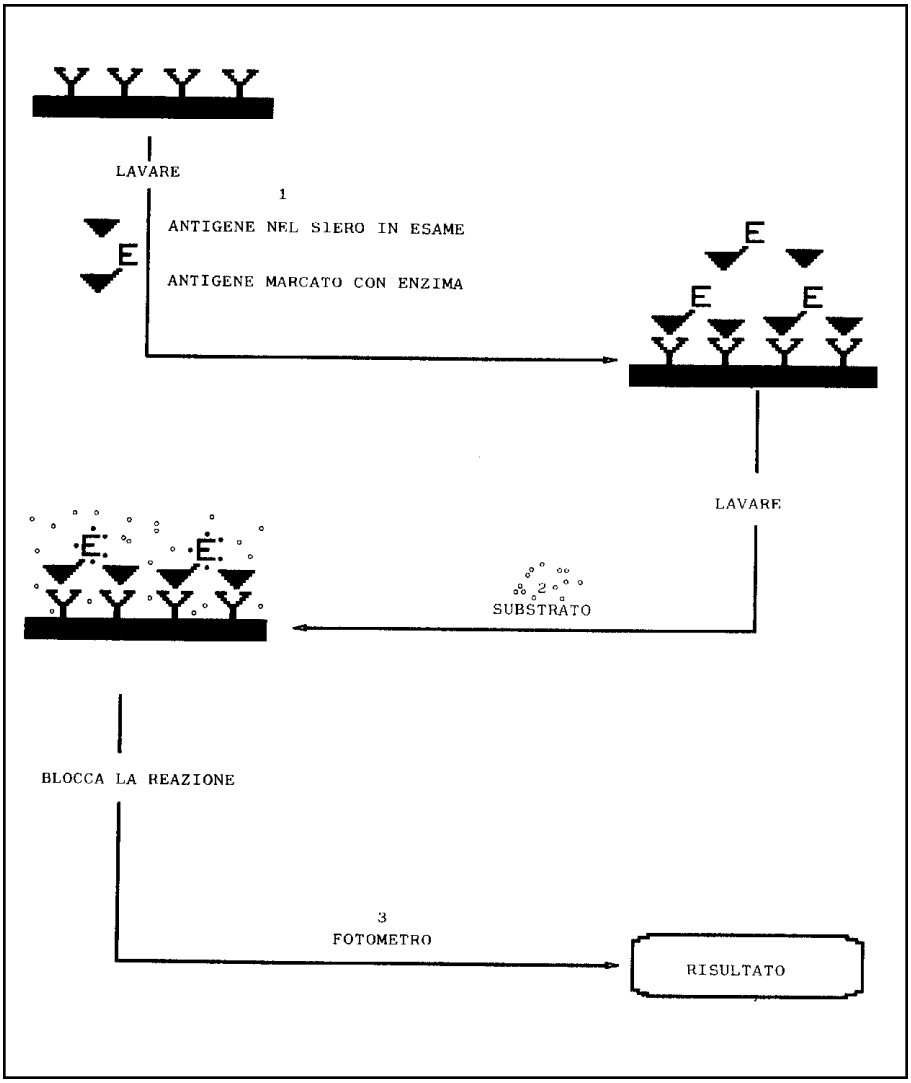


FIGURA *5.* **ELISA: IL DOSAGGIO DELL'ANTIGENE CON LA TECNICA DEL DOPPIO ANTICORPO "SANDWICH".**

Nel dosaggio con la tecnica del doppio anticorpo sandwich del l'antigene, mostrato nella figura *5,* viene passivamente adsorbito un anticorpo, specifico per l'antigene in esame, su una fase solida (per esempio polistirene). La fase solida viene quindi lavata con un tampone Tween 20-fosfato-salino per rimuovere l'anticorpo non adsorbito e ridurre al minimo il legame non specifico.

Fase I. L'antigene nel siero in esame si attacca all'anticorpo in fase solida. Dopo l'incubazione, la fase solida viene lavata al fine di rimuovere tutte le componenti del siero che non hanno reagito.

Fase 2. Viene aggiunto l'anticorpo specifico marcato con enzima, che si lega al già legato antigene. Dopo l'incubazione, si rimuove con il lavaggio l'eccesso dell'anticorpo specifico enzimo-marcato.

Fase 3. Viene aggiunto il substrato per l'enzima.

Fase 4. Trascorso il tempo opportuno per il massimo sviluppo del colore, la reazione enzimatica viene bloccata (per esempio aggiungendo NaOH), e viene determinata l'intensità del colore dei singoli campioni. Le concentrazioni dell'antigene nel siero in esame vengono calcolate sulla base di una serie nota di calibratori. L'intensità del colore è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nel siero in esame. Questa tecnica è utile per antigeni con elevato peso molecolare.

FIGURA 5. **ELISA: IL DOSAGGIO DELL'ANTIGENE CON LA TECNICA DEL DOPPIO ANTICORPO "SANDWICH".**

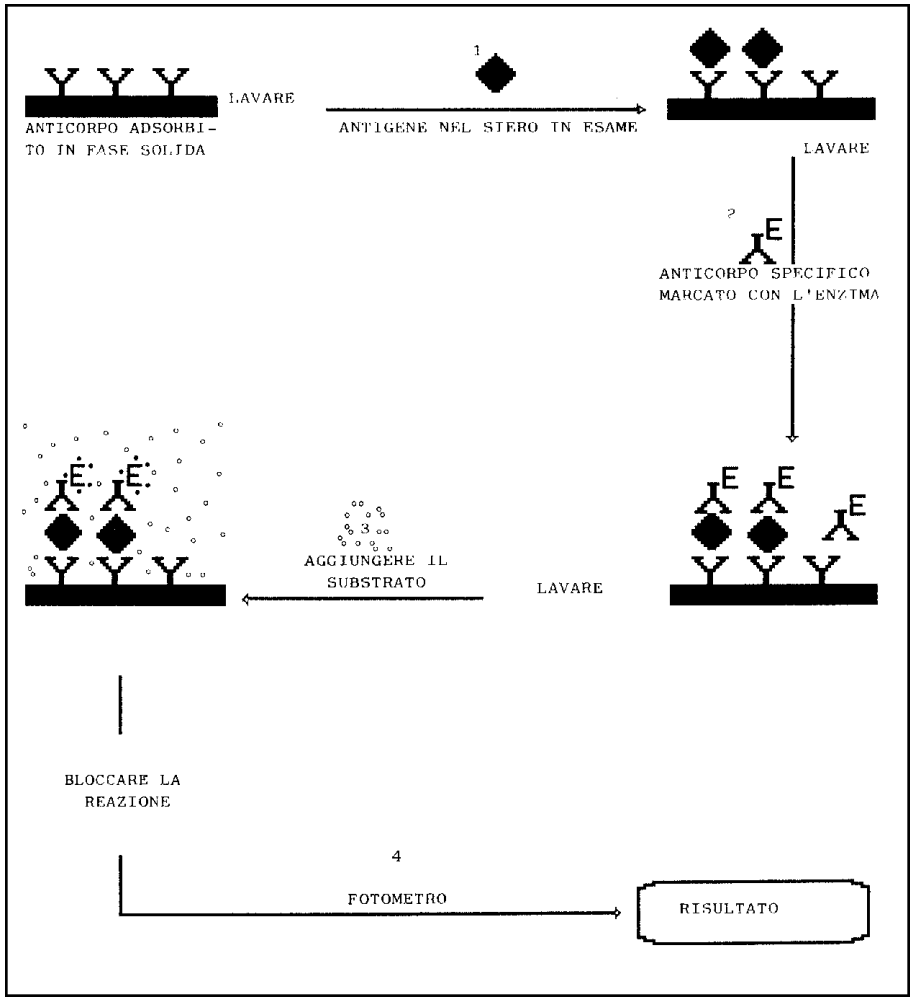


FIGURA 6. **DOSAGGIO INDIRETTO PER LA DETERMINAZIONE DELL'ANTICORPO**

Nel dosaggio indiretto dell'anticorpo mostrato nella figura 6, l'antigene specifico per l'anticorpo in esame viene immobilizzato con l'adsorbimento passivo su una fase solida (per esempio polistirene). La fase solida viene quindi lavata con un tampone Tween 20-fosfato-salino per rimuovere l'anticorpo non adsorbito e ridurre al minimo il legame non specifico.

Fase 1. L'anticorpo nel siero in esame si attacca sull'antigene in fase solida. Dopo l'incubazione, la fase solida viene lavata al fine di rimuovere ogni componente del siero che non abbia reagito.

Fase 2. Viene aggiunta una specifica anti-immunoglobulina marcata con l'enzima e si fa incubare. Questa si attaccherà ad ogni anticorpo fisso all'antigene. Dopo l'incubazione, si rimuove l'anti-immunoglobulina marcata con l'enzima in eccesso mediante lavaggio.

Fase 3. Viene aggiunto il substrato per l'enzima.

Fase 4. Dopo un appropriato periodo di incubazione per il massimo sviluppo di colore, la reazione enzimatica viene bloccata (per esempio aggiungendo NaOH), e determinata l'intensità del colore dei singoli campioni. L'intensità del colore è una misura della quantità di enzima marcato attaccato, che è proporzionale al livello di anticorpi nel siero in esame. Se sono disponibili gli standard o calibratori, i risultati delle concentrazioni dell'anticorpo nel siero in esame possono essere riportati in unità di massa. Più spesso, tuttavia, i risultati sono espressi come titoli.

FIGURA 6. **DOSAGGIO INDIRETTO PER LA DETERMINAZIONE DELL'ANTICORPO**

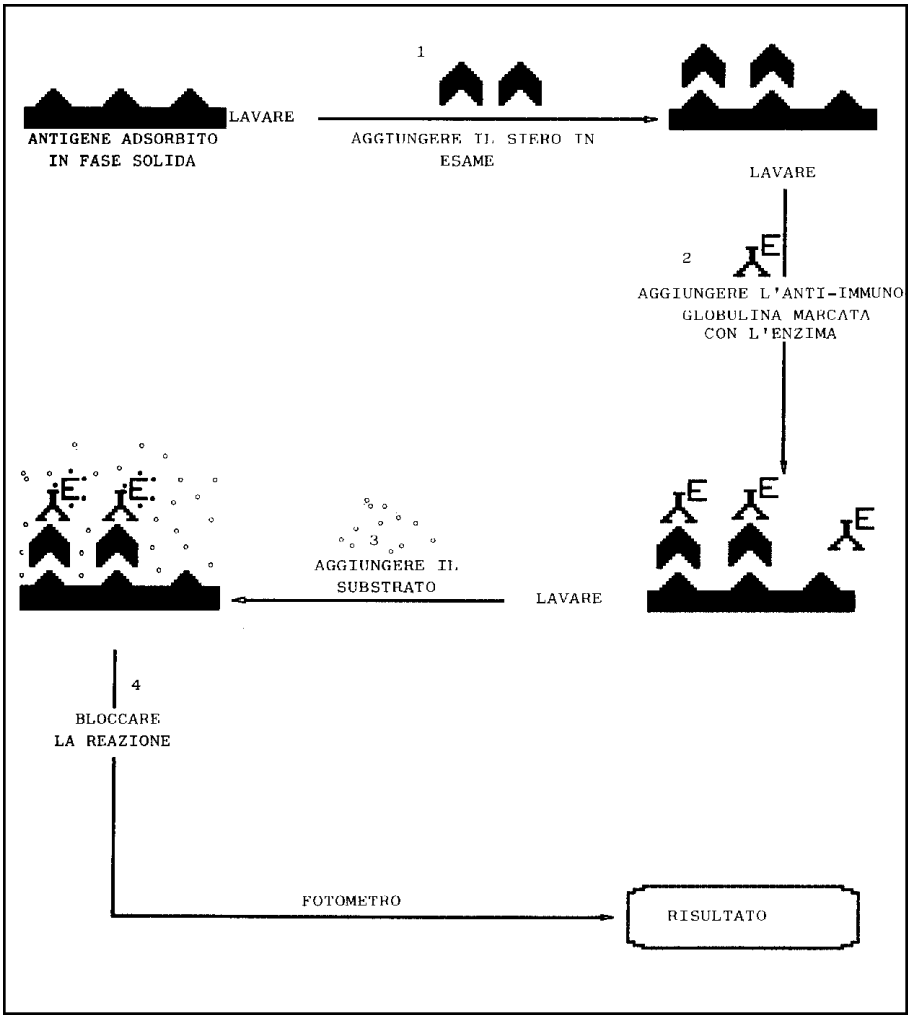


FIGURA 7. **ELISA: IL DOPPIO ANTICORPO ANTIGLOBULINA-"SANDWICH" PER LA DETERMINAZIONE DELL'ANTIGENE**

Con la determinazione dell'antigene mediante la tecnica del doppio anticorpo, mostrato nella figura 7, si utilizza un sistema in cui i due anticorpi sono di specie differenti. Viene utilizzato inoltre un terzo anticorpo come anti-immunoglobulina con l'enzima come tracciante, il primo anticorpo (ad esempio di coniglio) viene immobilizzato con adsorbimento passivo sulla fase solida (ad es. polistirene). La fase solida viene quindi lavata con il tampone Tween 20-fosfato-salino per rimuovere l'anticorpo non adsorbito e ridurre al minimo il legame non specifico.

Fase 1. L'antigene nel siero in esame viene ad attaccarsi all'anticorpo in fase solida. Dopo l'incubazione, la fase solida viene lavata al fine di rimuovere tutti i componenti del siero che non hanno reagito.

Fase 2. Viene aggiunto un secondo anticorpo di un'altra specie (ad es. montone) specifico per l'antigene. Dopo l'incubazione, si rimuove mediante lavaggio l'eccesso del secondo anticorpo.

Fase 3. Viene aggiunta l'immunoglobulina specifica anti-montone marcata con l'enzima. Questa si attaccherà a tutte le immunoglobuline di montone fissate all'antigene. Dopo l'incubazione, si procede alla rimozione mediante lavaggio dell'eccesso dell'immunoglobulina anti-montone marcata con l'enzima.

Fase 4. Viene aggiunto il substrato per l'enzima.

Fase *5.* Dopo un appropriato tempo di incubazione necessario al massimo sviluppo del colore, la reazione enzimatica viene bloccata (ad es. con l'aggiunta di NaOH), e l'intensità del colore è una misura della quantità del tracciante enzimatico attaccato, che è proporzionale alla concentrazione dell'antigene nel siero in esame. La concentrazione dell'antigene può essere calcolata in base ad una serie nota di calibratori.

FIGURA 7. **ELISA: IL DOPPIO ANTICORPO ANTIGLOBULINA-"SANDWICH" PER LA DETERMINAZIONE DELL'ANTIGENE**

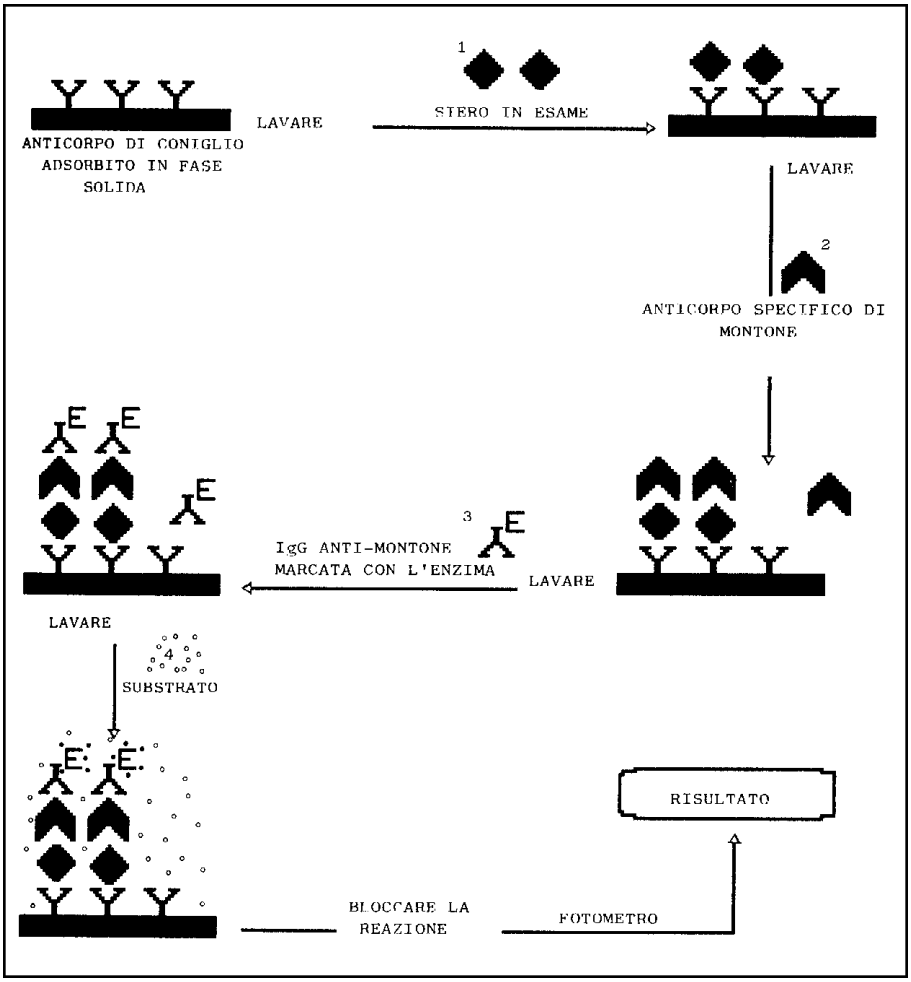


FIGURA 8. **ANTICORPI IgM-vs-IgG**

Uno degli importanti usi delle tecniche ELISA è la ricerca della presenza degli anticorpi nel siero per la conferma sierologica dell'infezione (per es. epatite A, rosolia). Per essere diagnostica di una infezione recente, la conferma necessita del dosaggio abbinato del siero nella fase acuta e/o nella fase della convalescenza, e la dimostrazione della siero-conversione o un incremento significativo del titolo (in genere quadruplo). Frequentemente, non può essere dimostrato un tale incremento nel titolo se i campioni di siero non sono stati raccolti ad appropriati intervalli di tempo. L'ELISA, quindi, è di notevole aiuto in quanto ha la capacità di determinare le immunoglobuline G (IgG) anticorpi della fase di convalescenza, e quelle M (IgM) della fase acuta.

La differenziazione di questi due tipi di anticorpi, permette la sierodiagnosi di fase acuta o di convalescenza dell'infezione.

FIGURA 8. **ANTICORPI IgM-vs-IgG**

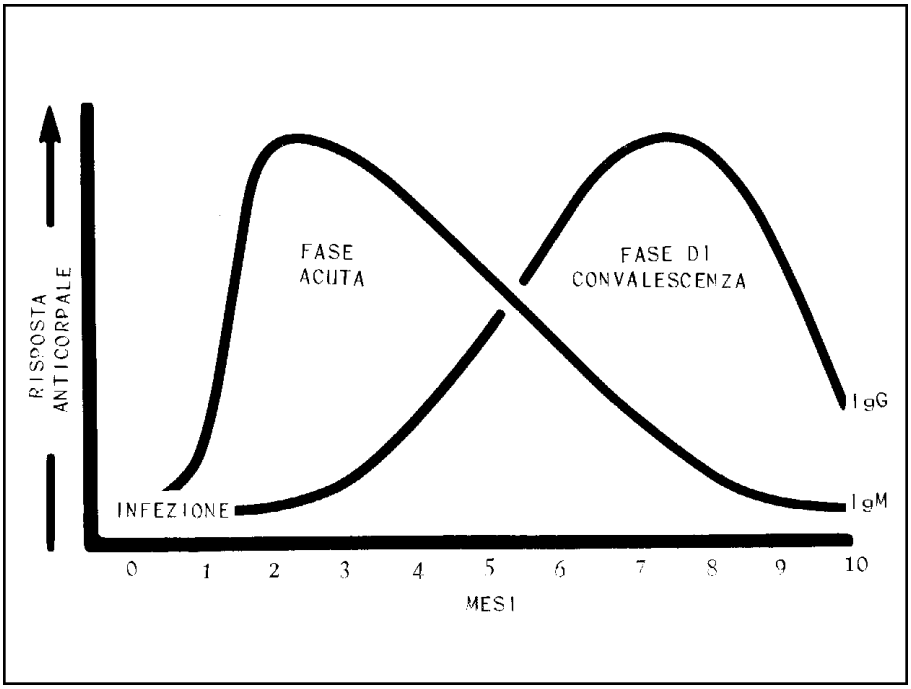


FIGURA 9. **ELISA: INDIVIDUAZIONE DEGLI ANTICORPI IgM-SPECIFICI MEDIANTE LA DETERMINAZIONE INDIRETTA DELL'ANTICORPO**

Questo ELISA è simile a quello descritto nella figura 6.

Fase 1. Numerosi anticorpi Ig del siero in esame vengono attaccati all'antigene specifico in fase solida. Dopo l'incubazione, la fase solida viene lavata per rimuovere i componenti del siero che non abbia reagito.

Fase 2. Viene aggiunto un anticorpo IgM marcato con enzima capace di legare solamente gli anticorpi IgM attaccati. Dopo l'incubazione, si procede alla rimozione mediante lavaggio dell'eccesso dell'anticorpo lgM marcato con l'enzima.

Fase 3. Viene aggiunto il substrato per l'enzima.

Fase 4. Dopo un opportuno tempo di incubazione necessario al massimo sviluppo del colore, la reazione enzimatica viene bloccata (ad es. aggiungendo NaOH), e viene determinata l'intensità del colore dei singoli campioni. L'intensità del colore è espressione della quantità di tracciante enzimatico attaccato, che è proporzionale alle anti-IgM nel campione in esame.

FIGURA 9. **ELISA: INDIVIDUAZIONE DEGLI ANTICORPI IgM-SPECIFICI MEDIANTE LA DETERMINAZIONE INDIRETTA DELL'ANTICORPO**

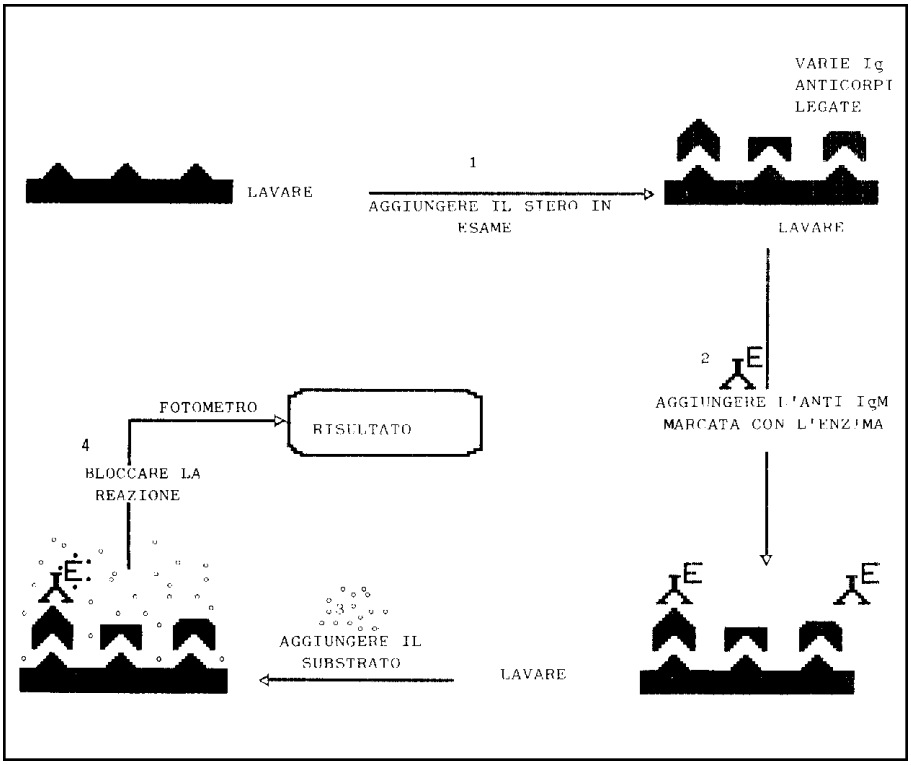


FIGURA 10. **ELISA: DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI IgM SPECIFICI MEDIANTE LA TECNICA DEL DOPPIO ANTICORPO SANDWICH-ANTIGLOBULINA**

Questo FUSA è simile a quello descritto nella figura 7.

Fase 1. Vari anticorpi IgM, presenti nel siero in esame, vengono attaccati ad anticorpi anti-IgM in fase solida. Dopo l'incubazione, la fase solida viene lavata per rimuovere i composti del siero che non hanno reagito.

Fase 2. Viene aggiunto un antigene specifico che si lega soltanto alle IgM specifiche di interesse. Dopo l'incubazione, l'antigene in eccesso viene rimosso mediante lavaggio.

Fase 3. Viene aggiunto un anticorpo, specifico per l'antigene, marcato con enzima. Questo si attaccherà a tutti gli antigeni fissi. Dopo l'incubazione, si procede alla rimozione mediante lavaggio dell'eccesso dell'anticorpo marcato con l'enzima.

Fase 4. Viene aggiunto il substrato per l'enzima.

Fase 5. Dopo un opportuno tempo di incubazione necessario al massimo sviluppo del colore, la reazione enzimatica viene bloccata (ad es. aggiungendo NaOH), e viene determinata l'intensità del colore dei singoli campioni. L'intensità del colore è espressione della quantità di tracciante enzimatico attaccato, che è proporzionale alle anti-IgM nel campione in esame.

FIGURA 10. **ELISA: DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI IgM SPECIFICI MEDIANTE LA TECNICA DEL DOPPIO ANTICORPO SANDWICH-ANTIGLOBULINA**

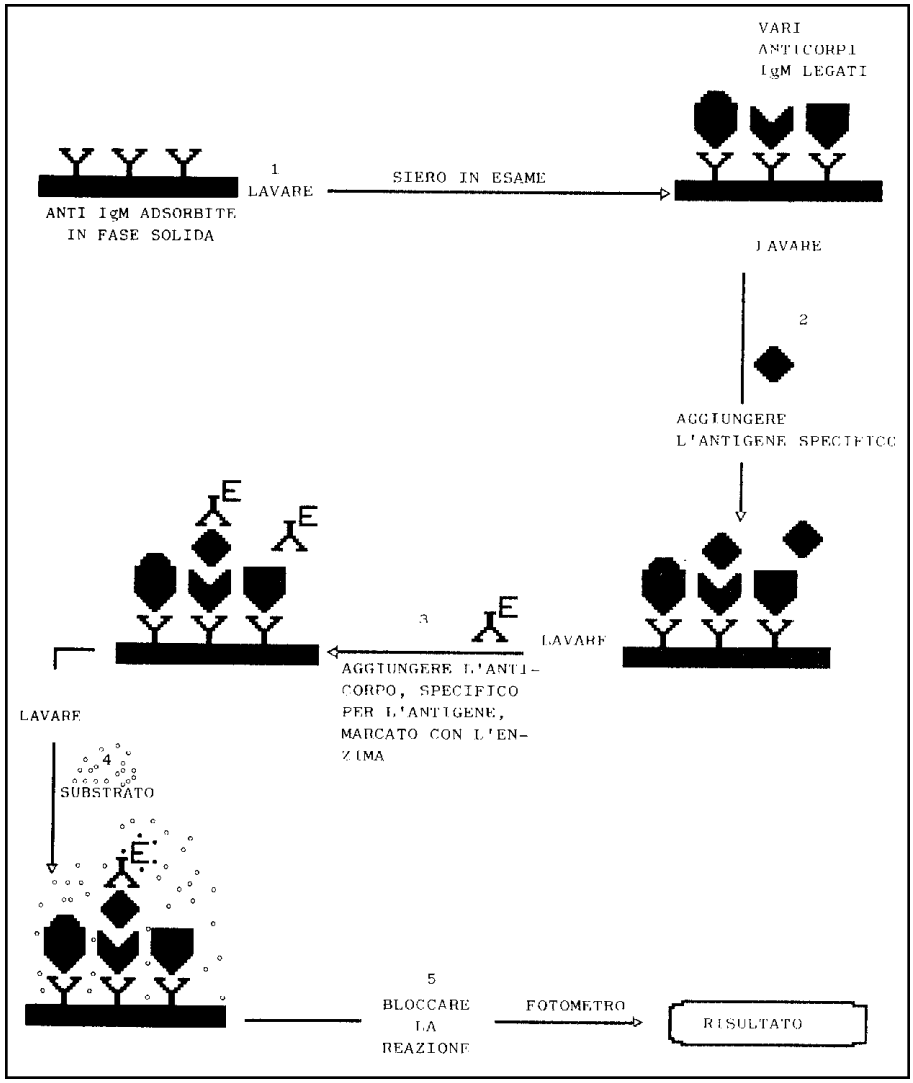


FIGURA 11. **EIA: PREPARAZIONE DELLA FASE SOLIDA ADSORBITA CON PROTEINE**

L'adsorbimenro passivo delle proteine alla superficie si verifica principalmente con legami idrofobici. Perciò, devono essere considerate le seguenti condizioni ottimali per l'adsorbimento.

1. pH: le interazioni idrofobiche sono favorite quando la carica netta della molecola è zero. Per le IgG, l'adsorbimento è massimo a pH tra *8,5* e 10.

2. Forza ionica: le concentrazioni dei sali capaci di neutralizzare localizzate cariche proteiche favoriscono le interazioni idrofobiche.

3. **Temperatura:** Gli aumenti della temperatura favoriscono la velocità di diffusione, e perciò aumentano la probabilità che le molecole proteiche entrino in contatto con la superficie della fase solida. In pratica è sufficiente la temperatura ambientale.

4. **Tempo:** Se viene utilizzato un livello saturante di proteina questo è generalmente un processo rapido. Nella maggior parte dei casi sono sufficienti due ore.

***5.* Concentrazione proteica:** Se la proteina è una IgG, deve essere lasciato sufficiente spazio per il legame successivo dell'antigene. Se la proteina che deve essere adsorbita è un antigene, tanto più antigene viene adsorbito sulla fase solida, meglio è. Lo stoccaggio della fase liquida adsorbita con le proteine deve essere fatto a 4 ^{0}C, piuttosto che a temperatura ambiente.

FIGURA 11. **EIA: PREPARAZIONE DELLA FASE SOLIDA ADSORBITA CON PROTEINE**

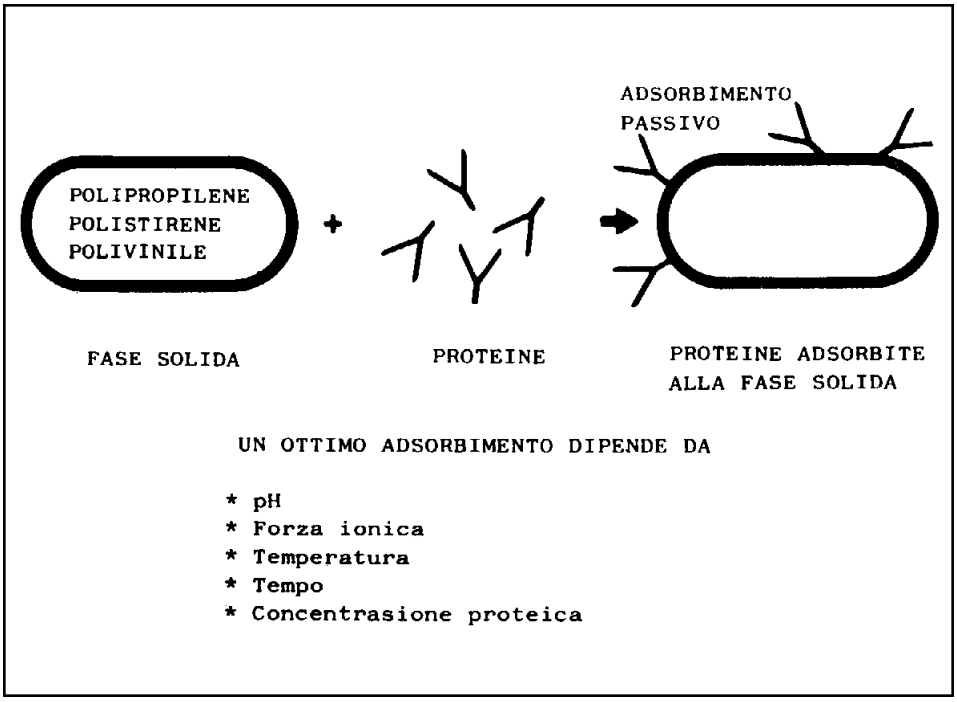


FIGURA 12. **EIA ETEROGENEO: GLI ENZIMI CONIUGATI**

Gli enzimi, per essere comunemente utilizzati come coniugati, devono soddisfare i seguenti criteri generali:

1. Gli enzimi devono essere facilmente reperibili.
2. Gli enzimi devono essere stabili.
3. Gli enzimi devono essere generalmente presenti nei campioni in esame.
4. L'attività enzimatica dell'enzima deve essere facilmente misurata.
5. L'enzima deve avere un turnover estremamente elevato.

I due enzimi più comunemente utilizzati sono la perossidasi da rafano (HRPO) e la fosfatasi alcalina. L'HRPO ha numerosi substrati disponibili che danno differenti reazioni colorate. Tuttavia, tutti i cromogeni sono più o meno instabili. L'HRPO è inoltre soggetta all'inattivazione da parte di agenti preservanti, ossidanti e riducenti. Viene utilizzata prevalentemente per i dosaggi "sandwich", dove l'HRPO non entra in contatto con i componenti del siero. Per il dosaggio competitivo, è generalmente più sicuro utilizzare la fosfasi alcalina, in quanto l'enzima, il substrato e il prodotto sono tutti abbastanza stabili. La figura 12 elenca gli enzimi comunemente utilizzati nell'EIA eterogeneo, i loro substrati e le reazioni.

FIGURA 12. **EIA ETEROGENEO: GLI ENZIMI CONIUGATI**

Enzimi comunemente utilizzati	**Substrati**	**Reazioni**		
Perossidasi da rafano (HPRO)	O-Fenilediamina Acido 5-Aminosalicilico 4-Aminoantipirene ABTS	$2DH+H_2O_2$ (incolore)	E → ←	$2D+H_2O_2$ (colorata)
Fosfatasi Alcalina (mucosa intestinale di vitello e E. Coli)	P-Nitrofenil Fosfato	PNPP (incolore)	E → ←	P-Nitrofenolo (colorata)
B-D Galattosidasi (E. Coli)	O-Nitrofenil-B-D-Galattopiranoside	ONPGP (incolore)	E →	P-Nitroferolo (colorata)
Glucosio Ossidasi	D Glucosio / H_2O_2 / DH / HPRO	D Glucosio+H_2O	E →	D Glucosio 5-Lattone+H_2O_2
		H_2O_2 +2 DH 22 (incolore)	HPRO →	2 D + $2H_2O$ 2 (colorata)

FIGURA 13. **LA CONIUGAZIONE DELL'ENZIMA PER MEZZO DELLA GLUTARALDEIDE**

La glutaraldeide, una dialdeide, è una delle procedure più largamente utilizzate per la coniugazione dell'enzima. Il legame proteina-proteina avviene tramite residui aminoacidi, formando una base di Schift. I coniugati vengono preparati miscelando semplicemente l'enzima e la seconda proteina (per es. una immunoglobina) in presenza di glutaraldeide, nelle condizioni ottimali. Questa procedura sembra offrire una maggiore efficienza immune utilizzando la fosfàtasi alcalina come enzima piuttosto che la perossidasi.

FIGURA 13. **LA CONIUGAZIONE DELL'ENZIMA PER MEZZO DELLA GLUTARALDEIDE**

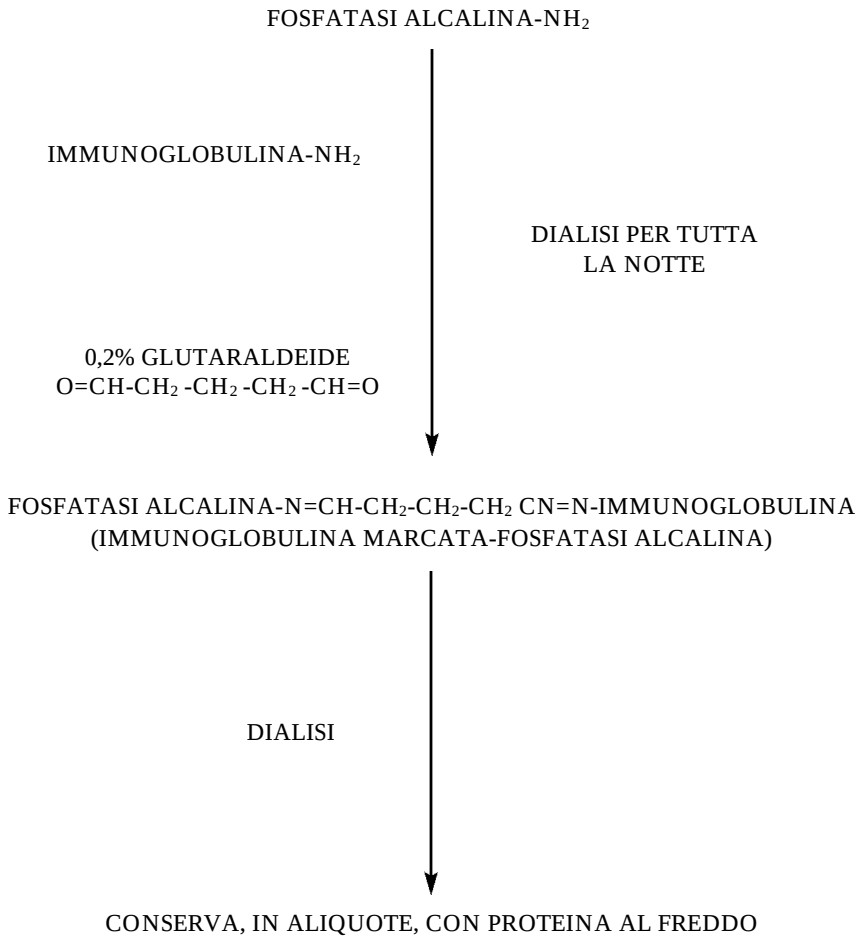


FIGURA 14. **LA CONIUGAZIONE DELL'ENZIMA PER MEZZO DEL PERIODATO DI SODIO**

Quando le immunoglobuline sono accoppiate con enzimi, la maggior parte dei metodi utilizzano come sito per la coniugazione i gruppi epsilon amino della lisina.

La perossidasi da rafano (HRPO), di un totale di 300 aminoacidi, ha soltanto sei molecole dell'aminoacido lisina. La componente costituita dai carboidrati dell'HRPO è sulla superficie e probabilmente impedisce stericamente la coniugazione proteine-proteina. Questo fenomeno ha determinato una ridotta efficienza di accoppiamento utilizzando agenti come la glutaraldeide. Un metodo alternativo utilizza come sito per la coniugazione la componente costituita dai carboidrati piuttosto che l'apoperossidasi. Per ossidazione il carboidrato viene convertito in un gruppo aldeide. La perossidasi ossidata viene quindi accoppiata all'immunoglobulina formando una base di Schiff I gruppi aminici degli enzimi vengono bloccati dal reagire con il fluorodinitrobenzene. Per stabilizzare la base di Schiff con legame covalente viene aggiunto il boroidrato di sodio. Una cromatografia su colonna (Sephadex) elimina le proteine così come i carboidrati contaminanti. I coniuganti vengono quindi conservati congelati in aliquote, in presenza di albumina sierica bovina (BSA).

L'efficienza dell'accoppiamento può raggiungere il 70%, l'accoppiamento di due molecole di perossidasi ad una singola immunoglobulina viene considerato ottimale. Il metodo di accoppiamento con ossidazione per mezzo di periodato viene utilizzato solo per enzimi glicoproteici.

FIGURA 14. **LA CONIUGAZIONE DELL'ENZIMA PER MEZZO DEL PERIODATO DI SODIO**

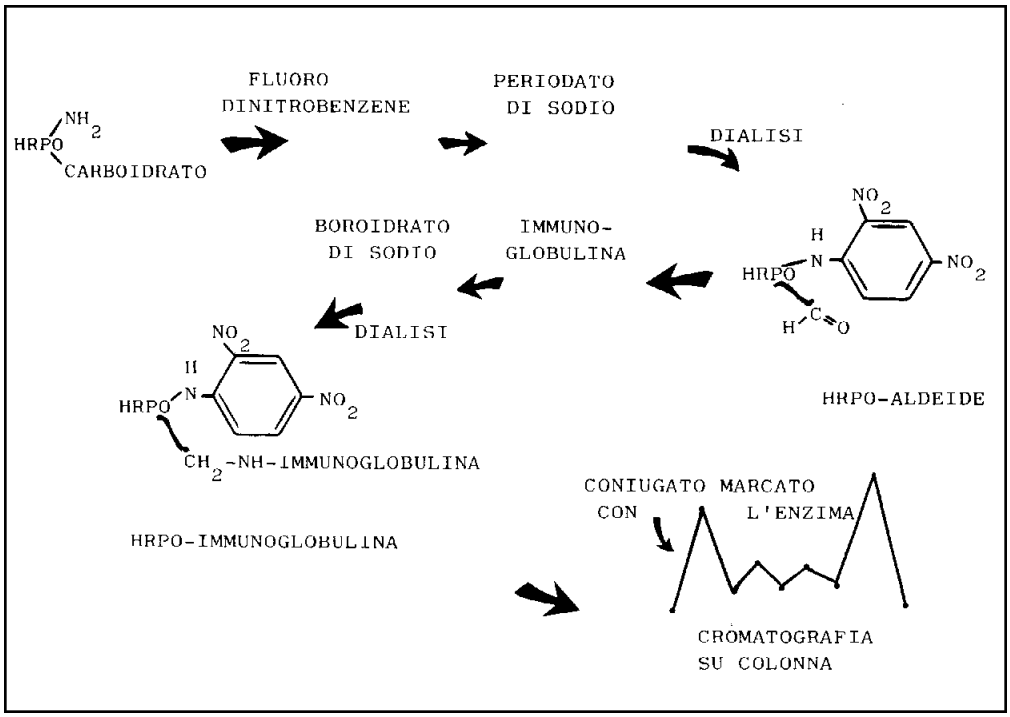
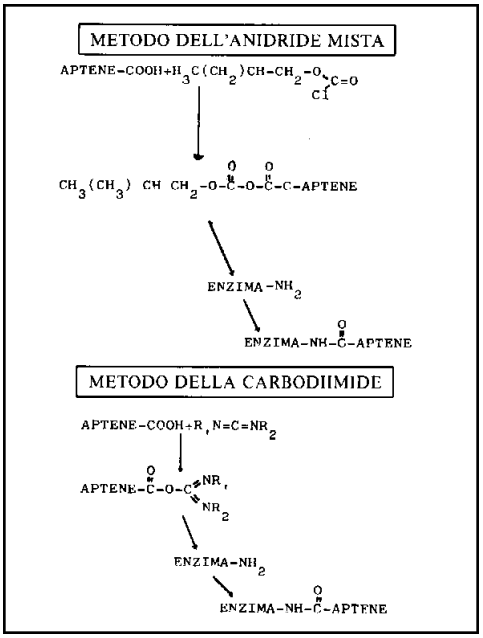


FIGURE 15 e 16. **EIA: LA CONIUGAZIONE DELL'ENZIMA CON L'APTENE**

I metodi per accoppiare gli enzimi con gli apteni generalmente differiscono da quelli usati per accoppiare gli enzimi alle proteine. Gli apteni possono differire dalle proteine nel numero e nella natura dei loro gruppi funzionali, solubilita, etc. I metodi usati sono spesso identici a quelli utilizzati nel preparare i coniugati aptene-proteina per l'immunizzazione. I più comuni di questi sono:

1. Il metodo dell'anidride mista: (figura 15).
2. Il metodo della carbodiimide: (figura *15).*
3. Il metodo imidato bifunzionale: (figura 16).
4. Il metodo del periodato: (figura 16).

FIGURE 15 e 16. **EIA: LA CONIUGAZIONE DELL'ENZIMA CON L'APTENE**



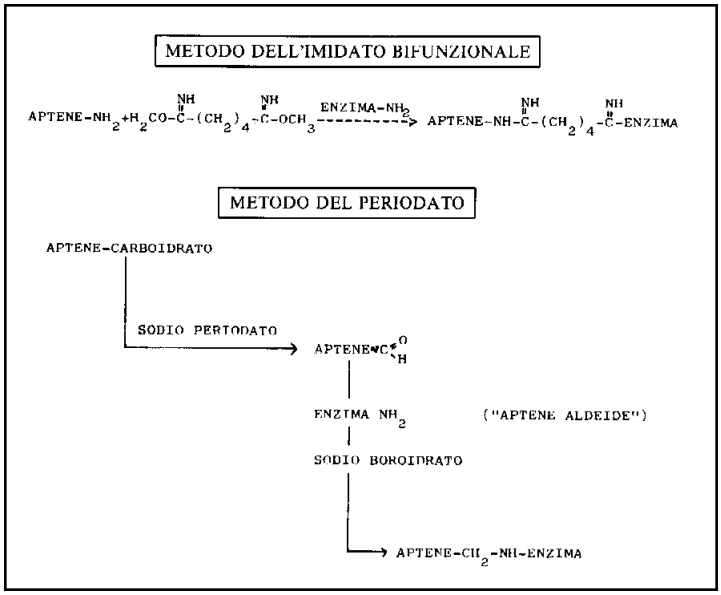


FIGURA 17. **EIA ETEROGENEO: I SUBSTRATI**

Benché siano stati descritti numerosi sistemi enzimatici per l'EIA eterogeneo, i due sistemi più comunemente utilizzati sono la fosfatasi alcalina (E.C. n. 3.1.3.1.) e la perossidasi da rafano (E.C. n. 1.11.1.7.). I substrati più comuni e i parametri chiave per questi due enzimi sono elencati nella figura 17.

FIGURA 18. **EIA OMOGENEO**

Il dosaggio immuno-enzimatico omogeneo utilizza anticorpi che si attaccano ad un aptene specifico che è stato coniugato ad un enzima. Il complesso anticorpo-aptene enzimo-marcato non ha attività enzimatica. Questo è probabilmente determinato da modificazioni indotte dal legarsi dell'anticorpo ad un gruppo attivo dell'enzima, o dall'impedimento di quelle modificazioni conformazionali necessarie per l'attività catalitica.

Quando nel sistema è presente l'aprene libero, questo può competere per il legame con l'anticorpo, determinando cosi che più aptene enzimo-marcato rimanga libero. Quindi può ora essere misurata l'attività enzimatica.

Poiché non è necessaria una fase di separazione, questo tipo di dosaggio è chiamato dosaggio immuno-enzimatico omogeneo. Questo dosaggio inoltre si presta alla misurazione della cinetica dell'enzima. Gli enzimi più comunemente utilizzati sono la malato deidrogenasi e la glucoso-6-fosfato deidrogenasi (figura 18).

FIGURA 17. **EIA ETEROGENEO: I SUBSTRATI**

Enzima	**Substrato**	**Colore**	**pH**	**Lunghezza d'onda, nm**
Perossidasi da Rafano	Acido 5-Aminosalicilico e H_2O_2	Marrone	5,6	450
	O-Fenilenediamina e H_2O_2	Marrone	4,5	420
	2,2' Azino-DI- (3-Etilbenztia-zoline-6-Sulfonato), (ABTS) e H_2O_2	Verde	3,5	420
Fosfatasi Alcalina	P-Nitrofenil Fosfato in Dietanolamina	Giallo-Verde	9,8	420

FIGURA 18. **EIA OMOGENEO**

(ENZIMA-APTENE): ANTICORPO + APTENE ⇄
(ENZIMA-APTENE) + ANTICORPO : APTENE

ENZIMI COMUNEMENTE USATI	**REAZIONE DEL SUBSTRATO (I)**
Malato Deidrogenasi (E.C.1.1.1.37) (Mitocondri del miocardio del maiale)	L-Malato + NAD^+ ⇄ Oxalo Acetato + NADH + H^+
Glucosio-6-Fosfato Deidrogenasi (E.C.1.1.1.49)	D-Glucosio-6-P + $NADP^+$ ⇄ D-Gluconato-6-P + NADPH + H^+

FIGURA 19. **EIA OMOGENEO: METODO DI ANALISI**

Il dosaggio immuno-enzimatico omogeneo significa che non è necessaria alcuna fase di separazione per dividere il marcato libero e legato. Nell'esempio mostrato nella figura 19, sono elencate le seguenti fasi:

Fase 1. Il siero del paziente viene aggiunto all'aptene marcato con l'enzima.

Fase 2. Viene aggiunto l'anticorpo specifico contro l'aptene in esame. Se il campione del paziente non contiene alcun aptene che competa con l'aptene enzimo-marcato per i siti leganti dell'anticorpo, l'aptene enzimo-marcato viene completamente legato (parte sinistra). Se nel campione è presente l'aptene, questo compete con l'aptene enzimomarcato per la limitata quantità di anticorpo (parte destra). Così, vi sono meno anticorpi che inibiscono l'attività enzimatica dell'aptene marcato.

Fase 3. Viene aggiunto l'appropriato substrato per l'enzima.

Fase 4. Le modificazioni nell'absorbanza vengono misurate (cineticamente) e la concentrazione dell'aptene nel siero del paziente viene calcolata riferita ad una serie nota di calibratori. Le modificazioni nell'absorbanza sono direttamente proporzionali alla concentrazione dell'aptene nel siero del paziente.

FIGURA 19. **EIA OMOGENEO: METODO DI ANALISI**

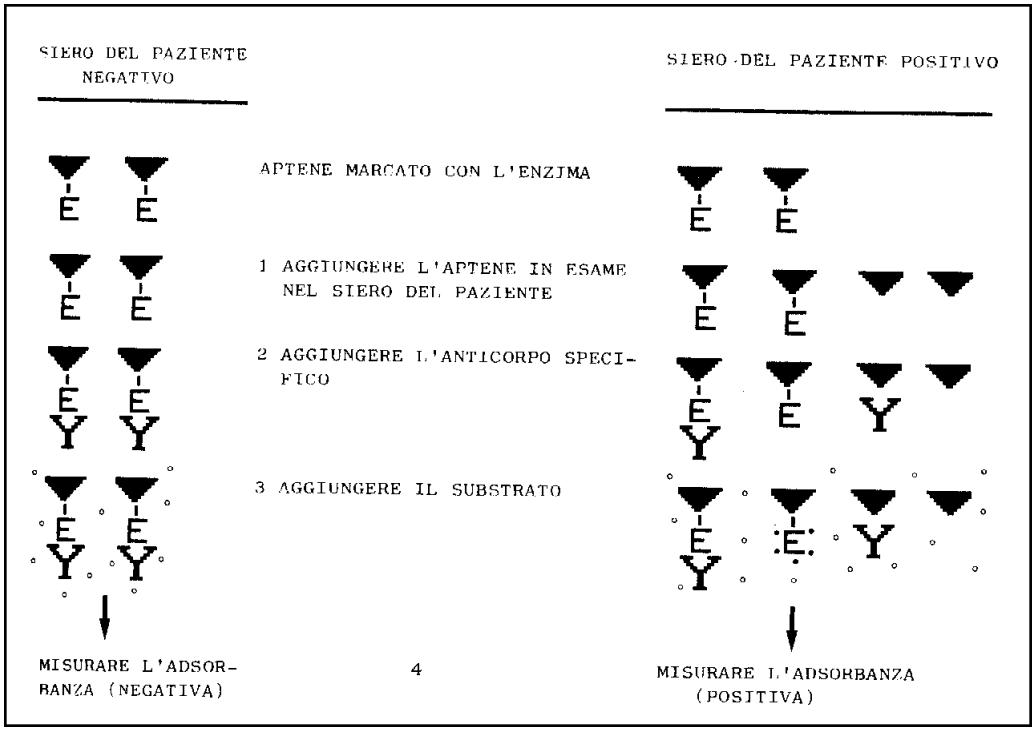


FIGURA 20. **RIA ENZIMATICO**

Al fine di unire i vantaggi dell'enzima e del dosaggio radioimmunologico **(RIA),** è stato descritto il RIA enzimatico mostrato nella figura 20. Il metodo utilizza aspetti di entrambi il RIA e l'ELISA, e ha dimostrato una sensibilità maggiore di entrambi i metodi considerati individualmente.

Fase 1. Uno specifico antigene nel siero in esame viene attaccato all'anticorpo in fase solida. Dopo l'incubazione, la fase solida viene lavata al fine di rimuovere tutti i componenti del siero che non hanno reagito.

Fase *2.* Viene aggiunta una anti-immunoglobulina specifica marcata con la fosfatasi alcalina. Questa si attaccherà a tutti gli antigeni già fissi all'anticorpo in fase solida. Dopo l'incubazione, si procede alla rimozione mediante lavaggio l'eccesso di anti-immuno globulina enzimo-marcata.

Fase 3. Viene aggiunto il substrato per l'enzima (^{3}H-adenosina monofosfato).

Fase 4. Dopo un'appropriato tempo di incubazione, l'^{3}H-adenosina prodotta dalla reazione della anti-immunoglobulina marcata con la fosfatasi alcalina e dell'^{3}1-I-adenosina monofosfato viene separata mediante cromatografia su colonna con DEAE-Sephadex L'^{3}H-adenosina viene misurata in un contatore a scintillazione liquida. La radioattività misurata è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nel siero in esame.

FIGURA 20. **RIA ENZIMATICO**

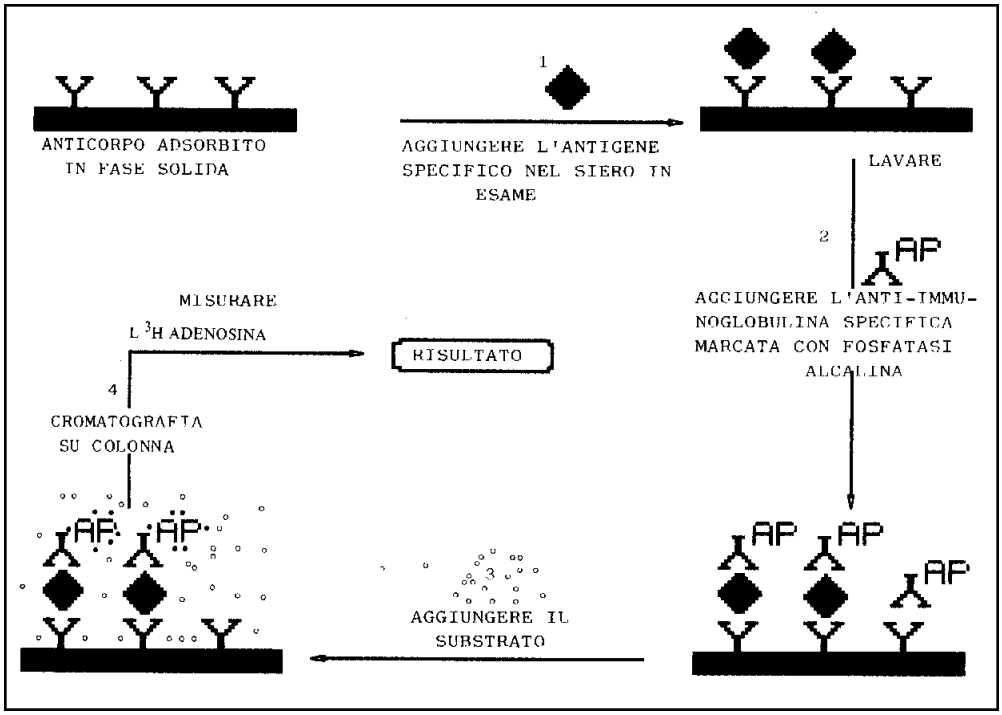


FIGURA 21. **FLUORESCENZA**

Viene chiamata "fluorescenza" l'emissione di luce dalla materia che è sotto l'influenza di un agente eccitante. Quando l'emissione di luce persiste dopo la rimozione dell'agente eccitante, il fenomeno viene chiamato "fosforescenza". Fluorescenza e fosforescenza sono praticamente identici, eccetto nella durata della luce. "Luminescenza" è il termine che comprende entrambi i fenomeni.

Come si vede nella figura, un fotone con un'energia appropriata per lunghezza d'onda eccita la molecola fluorescente, elevandola da uno stato fondamentale di singoletto (S0) a vari stati di energia più elevata: stati eccitati del singoletto (Si, S_2, etc.). Gli stati eccitati del singoletto sono quelli in cui gli elettroni esterni all'atomo rimangono accoppiati, ma uno viene portato ad un livello energetico più elevato. I vari stati di eccitazione del singoletto ritornano allo stato S_1 attraverso transizioni senza emissione di radiazione. La fluorescenza è un ritorno allo stato fondamentale con l'emissione di luce di lunghezza d'onda più lunga della luce eccitante (transizione con emissione di radiazione). Nella fosforescenza l'emissione di energia è ritardata, con il ritorno allo stato fondamentale che si verifica attraverso la formazione di un tripletto.

Esistono parecchi tipi di luminescenza, che differiscono soltanto nell'origine dell'energia coinvolta nell'eccitare la molecola ad uno stato elettronico più elevato (dal quale può essere emessa la luce mentre la molecola ritorna allo stato basale). Alcuni di questi processi di eccitazione sono:

la luce visibile (fotoluminescenza)
il calore a bassa temperatura (termoluminescenza)
il freddo (baroluminescenza)
la corrente di ioni (ionoluminescenza)
i processi metabolici (bioluminescenza)
le radiazioni dei radioelementi (radioluminescenza)
le reazioni chimiche (chemiluminescenza)

FIGURA 21. **FLUORESCENZA**

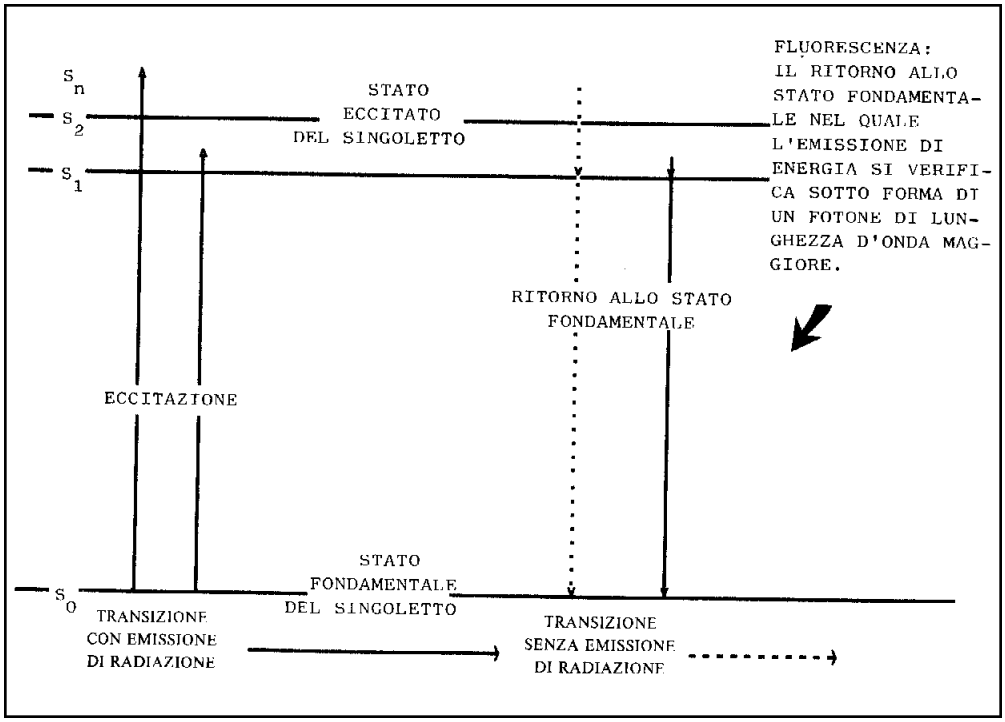


FIGURA 22. **FLUOROFORI COMUNEMENTE UTILIZZATI NEL DOSAGGIO FL UOROIMMUNOLOGICO**

I quattro fluorofori comunemente utilizzati nel dosaggio fluoruimmunologico sono illustrati in questa figura. I più comunemente utilizzati sono la fluoresceina, la tetrametilrodamina, e l'umbelliferone L'europio, un raro chelato della terra, viene utilizzato meno frequentemente. Sono stati usati come fluorofori anche l'isoluminolo e la nicotinamide.

Le figure 23 e 24 elencano alcune delle principali caratteristiche dei fluorofori.

FIGURA 22. **FLUOROFORI COMUNEMENTE UTILIZZATI NEL DOSAGGIO FL UOROIMMUNOLOGICO**

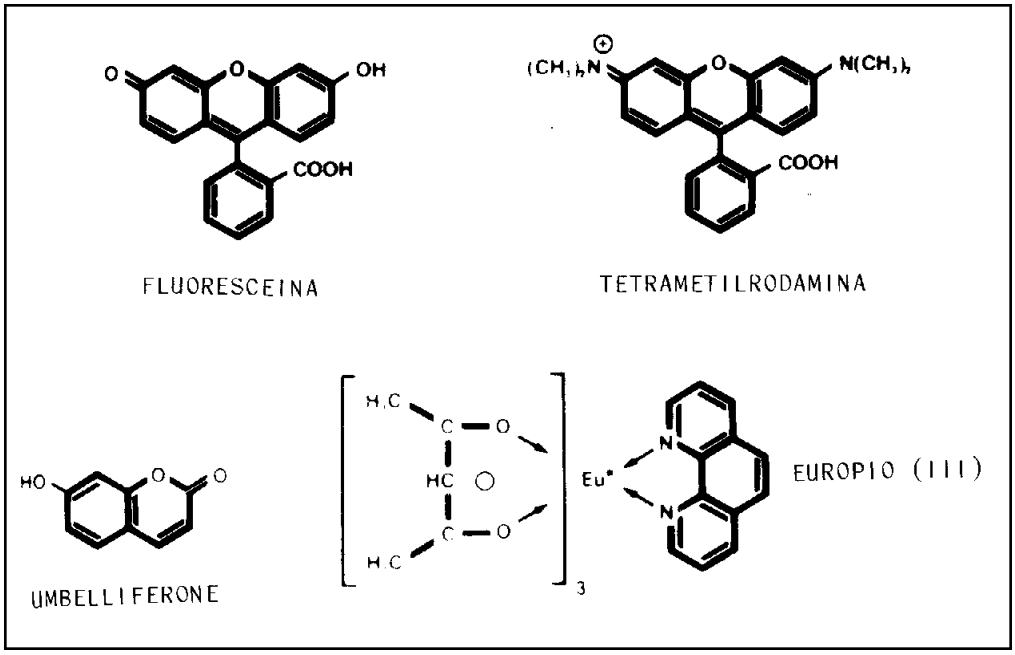


FIGURE 23 e 24. **CARATTERISTICHE DEI FLUOROFORI**

In questa figura vengono presentate le lunghezze d'onda dell'assorbimento massimo e l'emissione massima (fluorescenza), lo spostamento di Stokes, e la durata della fluorescenza dei fluorofori comunemente utilizzati nel FIA. Lo spostamento di Stokes è la differenza della lunghezza d'onda osservata tra gli assorbimenti massimi.

Le caratteristiche ottimali dei fluorofori da utilizzare nei dosaggi immunologici includono: una elevata cessione quantica della fluorescenza; un grosso coefficiente di estinzione al massimo assorbimento; e uno spostamento di Stokes ampio. La durata della fluorescenza deve essere sufficiente da permettere la rotazione determinabile, mentre non deve essere sufficientemente lunga da causare la completa randomizzazione del sistema. La stabilità per lunghi periodi di tempo dei fluorofori può richiedere la conservazione liofilizzata al buio.

Se il fluoroforo assorbe nel campo del visibile dello spettro, è opportuno evitare la necessità dì sorgenti di luce ultravioletta. Il fluoroforo non deve interferire con la reazione immunologica antigene-anticorpo e deve, dopo la coniugazione, conservare le caratteristiche ottimali precedentemente descritte.

La fluorescenza massima per la fluoresceina e la rodamina è alla lunghezza d'onda rispettivamente di 520 e 580 nm. Queste lunghezze d'onda sono generalmente libere dall'interferenza di sottofondo causata dalla fluorescenza del siero.

L'umbelliferone ha una lunghezza d'onda di emissione di *450* nm, e può essere soggetto a una maggiore fluorescenza da parte del siero nativo.

FIGURE 23 e 24. **CARATTERISTICHE DEI FLUOROFORI**

	Lunghezza d'onda (nm)		**Spostamento di Stokes (nm)**
	assorbimento massimo	**Fluorescenza massima**	
Fluoresceina	490	520	30
Tetrametil Rodamina	550	580	30
Umbelliferone	380	450	70
Rari chelati della terra	Dipende dall'agente chelante		~200

FIGURA 24.

	Durata della Fluorescenza	**Cessione quantica**	**Coefficiente d'estinzione**
Fluoresceina	5 nsec	~0,9	$8*10^4$
Tetrametil Rodamina	"	elevata	$5*10^4$
Umbelliferone	"	elevata	$2*10^4$
Rari chelati della terra	~100 usec	variabile	Dipende dall'agente chelante

FIGURA *25.* **I PIÙ IMPORTANTI DOSAGGI FLUOROIMMUNOLOGICI**

I più importanti dosaggi fluoroimmunologici possono essere divisi in due gruppi, eterogenei ed omogenei.

Eterogenei. E richiesta una fase per separare il materiale marcato nelle frazioni libera e legata prima della misurazione. Queste fasi di separazione sono simili a quelle utilizzate nei RIA. Il FIA in fase solida, mostrato nella figura 26, è un esempio di questo tipo di dosaggio. La fase solida può essere rappresentata da un supporto o sferette di plastica inerte, particelle magnetizzabili di cellulosa / ossido di ferro, dischi di carta, etc. In questo tipo di dosaggio generalmente non viene richiesta la centrifugazione. I FIA in fase liquida impiegano una fase di separazione mediante precipitazione con sali o con secondo anticorpo. I FIA sia in fase liquida che in fase solida possono anche utilizzare la tecnica del sandwich simile a quelle descritte per l'FIA nella figura 5.

Omogenei. Nei FIA omogenei non viene richiesta una fase di separazione. Questo perché la fluorescenza legata ad un antigene o ad un aprene viene alterata in misura direttamente proporzionale alla quantità di anticorpo specifico che forma complessi con l'antigene. Esempi di FIA omogenei sono:

FIA a smorzamento diretto *(figura 27)*

FIA a smorzamento indiretto o dosaggio fluoroimmunologico a protezione *(figura 28)*

Immunodosaggio a fluorescenza polarizzata *(figura 29)*

Dosaggio fluoroinimunologico con substrato marcato *(figura 30)*

Immunodosaggio con trasferimento di fluoroeccitazione *(figure 31* e *32)*

FIGURA *25.* **I PIÙ IMPORTANTI DOSAGGI FLUOROIMMUNOLOGICI**

ETEROGENEI

*FIA IN FASE SOLIDA

*FIA IN FASE LIQUIDA

OMOGENEI

*FIA A SMORZAMENTO DIRETTO

*FIA A SMORZAMENTO INDIRETTO (DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO A PROTEZIONE)

*IMMUNODOSAGGIO A FLUORESCENZA POLARIZZATA

*DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO CON SUBSTRATO MARCATO

* IMMUNODOSAGGIO CON TRASFERIMENTO DI FLUOROECCITAZIONE

FIGURA 26. **DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO COMPETITIVO IN FASE SOLIDA**

Il FIA competitivo in fase solida è un dosaggio eterogeneo che richiede una fase di separazione. La separazione del fluoroforo per la misurazione finale allontana i fluorofori endogeni ed altre sostanze che interferiscono presenti nel campione che potrebbero influenzare il segnale.

Nel FIA competitivo, l'anticorpo specifico per l'antigene che deve essere misurato, viene adsorbito passivamente su un supporto che costituisce la fase solida (ad es. polistirene). La fase solida viene quindi lavata con un tampone (ad es. fosfato-salina-Tween-20) per rimuovere l'anticorpo non adsorbito ed eliminare il legame non specifico.

Fase 1. L'antigene nel campione in esame viene miscelato con l'antigene marcato fluorescente per competere per un limitato numero di siti anticorpali sulla fase solida. Dopo l'incubazione la fase solida viene lavata per rimuovere l'antigene marcato e non marcato non legati (liberi), e i componenti del siero che non hanno reagito.

Fase 2. Viene misurata la fluorescenza dei singoli campioni. La concentrazione dell'antigene nel campione in esame può essere calcolata raffrontandola con una serie di calibratori dosati allo stesso modo. La fluorescenza finale è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nel siero in esame.

FIGURA 26. **DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO COMPETITIVO IN FASE SOLIDA**

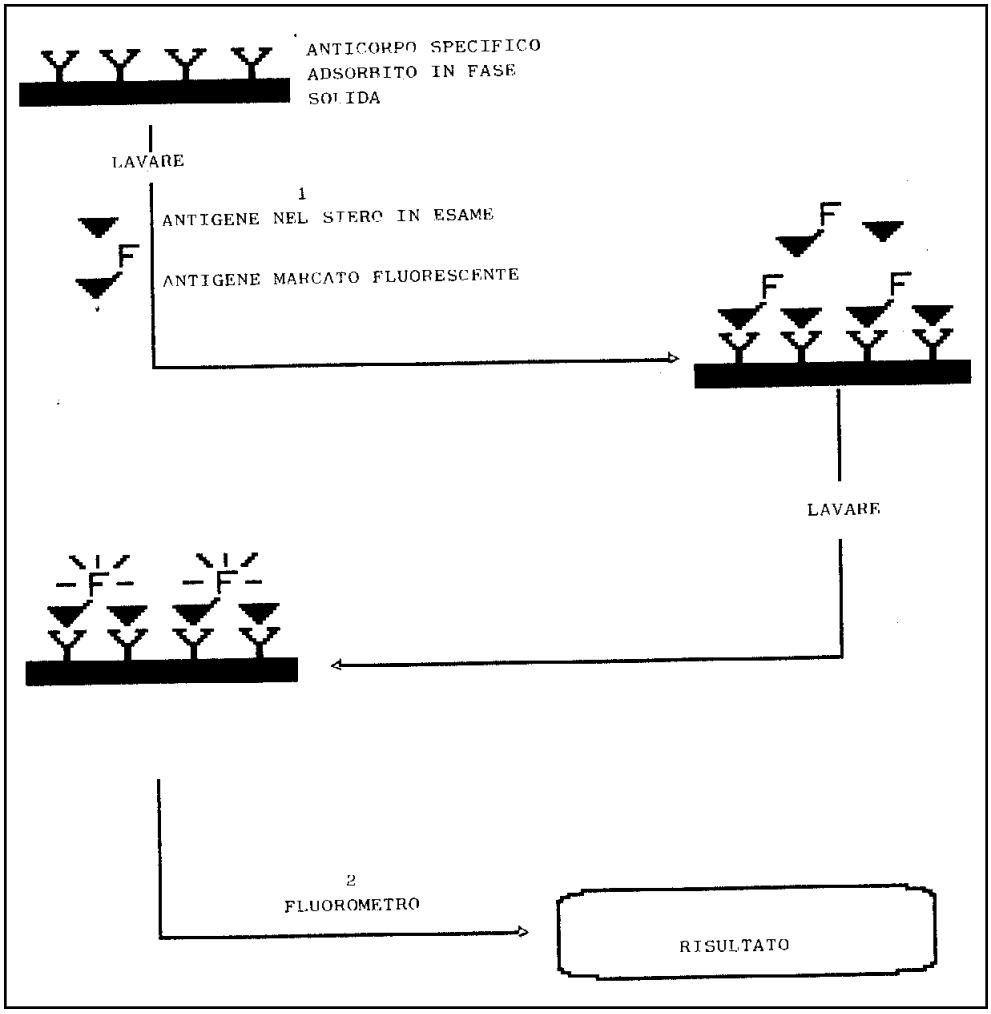


FIGURA 27. **DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO A SMORZAMENTO DIRETTO**

Il dosaggio fluoroimmunologico a smorzamento diretto, viene generalmente utilizzato per molecole più piccole (apteni), dove la distanza tra il marcatore fluorescente e il sito di riconoscimento antigene-anticorpo è verosimilmente piccola.

L'esempio mostrato in questa figura può essere spiegato in questo modo:

Fase 1. Viene aggiunta un'aliquota, nel siero del paziente, del complesso aptene marcato-fluorescente.

Fase 2. Viene aggiunto un anticorpo specifico contro l'aptene. Se il campione del paziente non contiene l'aptene che competa con il complesso aptene inarcato-fluorescente, il complesso viene completamente legato dall'anticorpo (parte sinistra). Tuttavia, se è presente l'aptene, questo competerà con il complesso aptene marcato-fluorescente per il limitato numero di siti anticorpali disponibili (parte destra).

Fase 3. Viene misurata la fluorescenza. Nel campione del paziente negativo la fluorescenza viene smorzata dalla coniugazione con l'anticorpo specifico per l'aprene. Benché non sia stato completamente chiarito l'esatto meccanismo dello smorzamento del fluoroforo dopo il legame con l'anticorpo, sembra che il legame dell'anticorpo possa determinare una alterazione della struttura elettronica e della composizione vibrazionale dello stato elettronico dell'antigene marcato. Il campione positivo del paziente conserva l'aprene marcato-fluorescente non legato che emette la fluorescenza.

Una misurazione quantitativa della concentrazione dell'aptene nel siero del paziente può essere ottenuta paragonando la fluorescenza misurata rispetto a quella di una serie di calibratori. Il livello della fluorescenza finale osservata è direttamente proporzionale alla concentrazione sconosciuta dell'aptene nel siero del paziente.

FIGURA 27. **DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO A SMORZAMENTO DIRETTO**

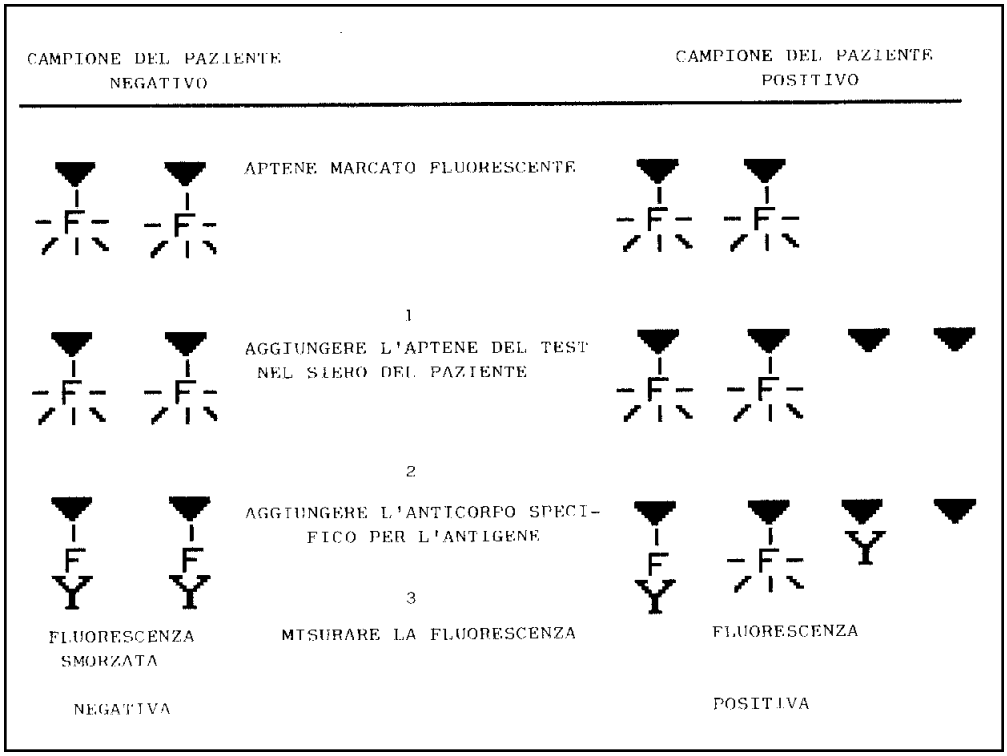


FIGURA 28. **DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO A SMORZAMENTO INDIRETTO (DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO A PROTEZIONE)**

Il **FIA** a smorzamento indiretto conosciuto anche conie dosaggio fluoroimmunologico a protezione è un dosaggio omogeneo generalmente utilizzato per molecole più voluminose, dove la distanza tra il marcatore fluorescente e il sito di riconoscimento antigeneanticorpo è verosimilmente grande. Vengono utilizzati due anticorpi - uno diretto contro l'antigene che deve essere misurato e uno diretto contro il marcatore fluorescente.

L'esempio mostrato in questa figura può essere spiegato in questo modo:

Fase 1. Vengono messi insieme l'antigene marcato con fluoresceina e l'antigene nel campione non noto in competizione per un limitato numero di siti coni binanti anticorpali specifici per l'antigene. Il prodotto risultante dall'incubazione è una miscela di antigene libero e legato all'anticorpo

Fase 2. Vengono aggiunti alla miscela gli anticorpi anti-fluoresceina questi quindi si legano alla frazione libera dell'antigene marcato con fluoresceina Il legame alla fluoresceina, della frazione legata all'anticorpo, viene impedito dall'impedimento sterico esercitato dall'anticorpo specifico per l'antigene.

Fase 3. La fluorescenza finale che viene misurata deriva totalmente dalla frazione legata. La concentrazione dell'antigene nel campione sconosciuto può essere quantificata dosando una serie di calibratori La fluorescenza finale è inversamente proporzionale alla concentrazione in origine dell'antigene nel campione non noto.

FIGURA 28. **DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO A SMORZAMENTO INDIRETTO (DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO A PROTEZIONE)**

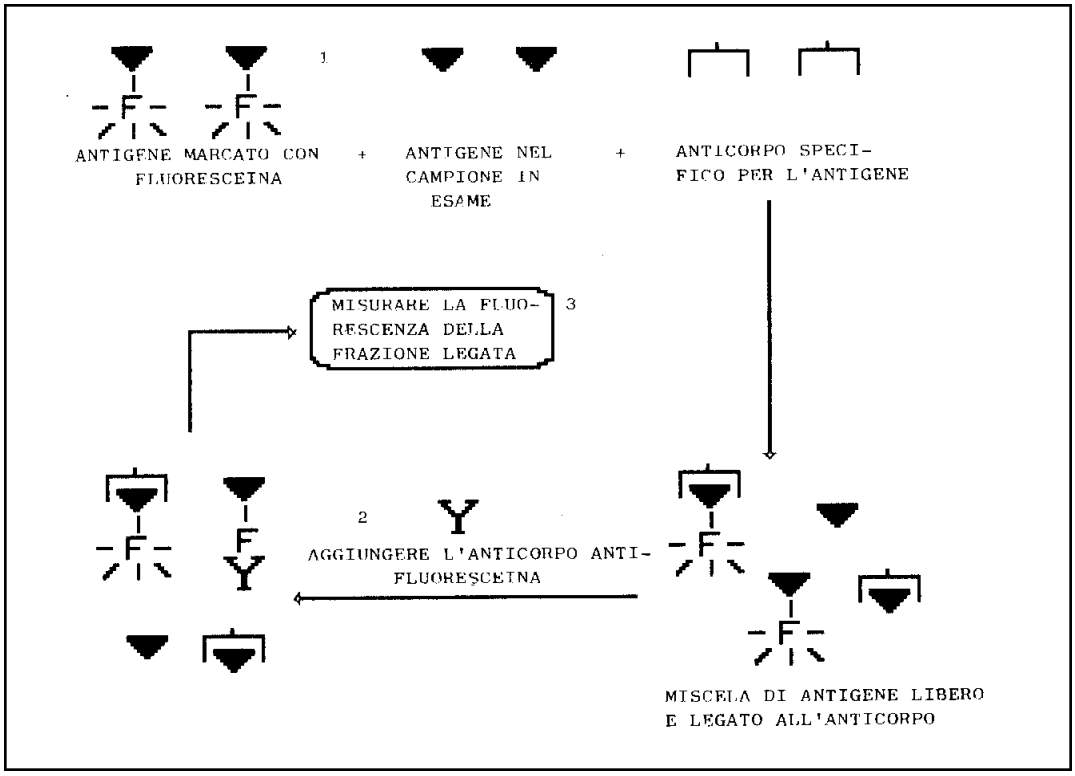


FIGURA 29. **IMMUNODOSAGGIO A FLUORESCENZA POARIZZATA**

La fluorescenza polarizzata misura la modificazione nell'angolo della luce fluorescente polarizzata emessa da una molecola fluorescente. La miscela di reazione viene eccitata dirigendo un raggio di luce polarizzata dapprima verticalmente, quindi orizzontalmente, e osservando le modificazioni nell'angolo della luce polarizzata emessa. La polarizzazione della luce emessa dipende prevalentemente dalla velocità di rotazione della molecola marcata-fluorescente. La frazione dell'aprene marcato fluorescente non legata (libera) precipita rapidamente in soluzione, ed emette poca luce su tiri piano polarizzato. Tuttavia, quando l'aptene marcato fluorescente viene legato ad una voluminosa molecola anticorpale, si forma una molecola più grossa che precipita lentamente ed emette una luce 10-15 volte superiore. Le dimensioni e la conformazione delle molecole fluorescenti, la viscosità del solvente, e la temperatura del sistema possono anch'essi influenzare la polarizzazione della fluorescenza.

Nell'immunodosaggio a fluorescenza polarizzata, i reagenti chiave sono gli apteni marcati fluorescenti e l'anticorpo specifico diretto contro l'aptene. Quando l'aptene marcato fluorescente si lega all'anticorpo, il fluoroforo non è libero di ruotare (a causa delle elevate dimensioni molecolari) nel tempo in cui la luce viene absorbita ed emessa. Perciò, quando viene usata una luce linearmente polarizzata per l'eccitazione del fluoroforo, la luce in emissione è ancora molto polarizzata Tuttavia, quando l'aptene marcato fluorescente non è legato all'anticorpo (libero), la sua rotazione in soluzione è molto maggiore e la luce emessa è depolarizzata. L'immunodosaggio a fluorescenza polarizzata omogeneo in questa figura può essere spiegato nel modo seguente:

Fase 1 I. Il siero del paziente viene aggiunto all'aprene marcato fluorescente.

Fase 2. Viene aggiunto l'anticorpo specifico diretto contro l'aptene. Se il siero del paziente non contiene l'aptene che competa con l'aptene marcato fluorescente, quest'ultimo viene completamente legato (parte sinistra). Se è presente l'aptene, questo competerà con l'aptene marcato fluorescente per la limitata quantità di anticorpo aggiunto (parte destra).

Fase 3. Dopo l'incubazione, i campioni vengono eccitati, come detto precedentemente, con luce polarizzata. Per la misurazione è necessario un fluorometro polarizzato. Nella reazione con il campione del paziente negativo (parte sinistra), il complesso anticorpoaptene marcato fluorescente non è libero di ruotare, e la fluorescenza che ne risulta è ancora altamente polarizzata al momento del l'emissione. Tuttavia, nella reazione con il campione del paziente positivo (parte destra), l'aptene marcato-fluorescente è libero di ruotare in soluzione, e il valore di polarizzazione tende perciò a diminuire.

Una valutazione quantitativa dell'aptene nel siero del paziente può essere ottenuta paragonando ad una serie di calibratori processati allo stesso modo. La riduzione della polarizzazione è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'aprene nel siero del paziente.

FIGURA 29. **IMMUNODOSAGGIO A FLUORESCENZA POARIZZATA**

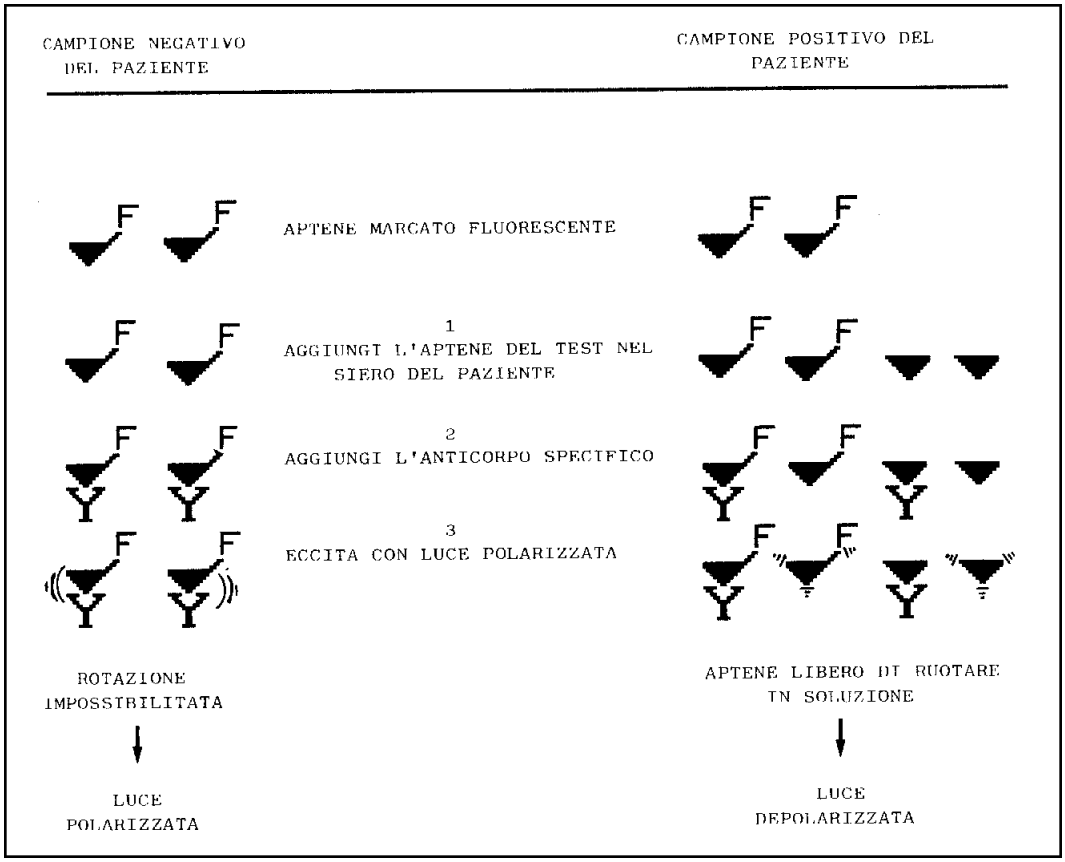


FIGURA 30. **DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO CON SUBSTRATO MARCATO**

Il dosaggio fluoroimmunologico omogeneo con substrato marcati (SLEIA) è stato applicato soprattutto per il dosaggio di farmaci (apteni) nei liquidi biologici. Per il successo del SLFIA è critica la sintesi di un substrato enzimatico fluorogenico (per es. beta-galattosil-umbelliferone) coniugato con il farmaco o l'aprene che deve essere misurato. Accoppiando il fluoroforo al complesso substrato enzimatico/aptene la fluorescenza viene smorzata (complesso non fluorescente). Tuttavia, quando questo complesso viene trattato con un enzima specifico (per es. la beta-galattosidasi) viene staccato il substrato e si forma un prodotto fluorescente. Quando l'anticorpo specifico diretto contro l'aptene si lega al complesso aptene substrato-fluoroforo, il substrato diventa inaccessibile all'azione dell'enzima, e non viene prodotta fluorescenza. L'aggiunta di aptene non marcato, tuttavia, determina una competizione per l'anticorpo con il complesso aptene substrato-fluoroforo, permettendo che urta quantità maggiore del complesso marcato reagisca con l'enzima, Il substrato viene staccato e quindi prodotta la fluorescenza. lì dosaggio tipo-SLFIA mostrato in questa figura può essere spiegato nel modo seguente:

Fase 1. Viene aggiunta un'aliquota del siero del paziente al complesso aptene substratofluoroforo (non fluorescente)

Fase 2. Viene aggiunto un anticorpo specifico diretto contro l'aptene. Se il siero del paziente non contiene un aptene che competa con il complesso aptene substrato-fluoroforo, il complesso aptene substrato-fluoroforo si lega completamente all'anticorpo (parte sinistra). Se è presente l'aptene, questo compete con il complesso aptene substratofluoroforo per la limitata quantità di anticorpo disponibile (parte destra).

Fase 3. Viene aggiunto l'enzima. Il substrato è libero di reagire con l'enzima soltanto quando non è completamente legato all'anticorpo. Nel campione negativo del paziente (parte sinistra), non c'è attività enzimatica. Perciò non viene misurata alcuna fluorescenza. Ma nel campione del paziente positivo (parte destra). alcuni complessi aptene substrato-fluoroforo non sono legati all'anticorpo e sono liberi di reagire con l'enzima. Il substrato viene staccato, e viene prodotta la fluorescenza.

Una misurazione quantitativa dell'aptene nel siero del paziente può essere ottenuta utilizzando una serie di calibratori. L'aumento della fluorescenza è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'aptene nel siero del paziente, lì SLFIA può essere valutato o con un metodo cinetico, o bloccando la reazione.

FIGURA 30. **DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO CON SUBSTRATO MARCATO**

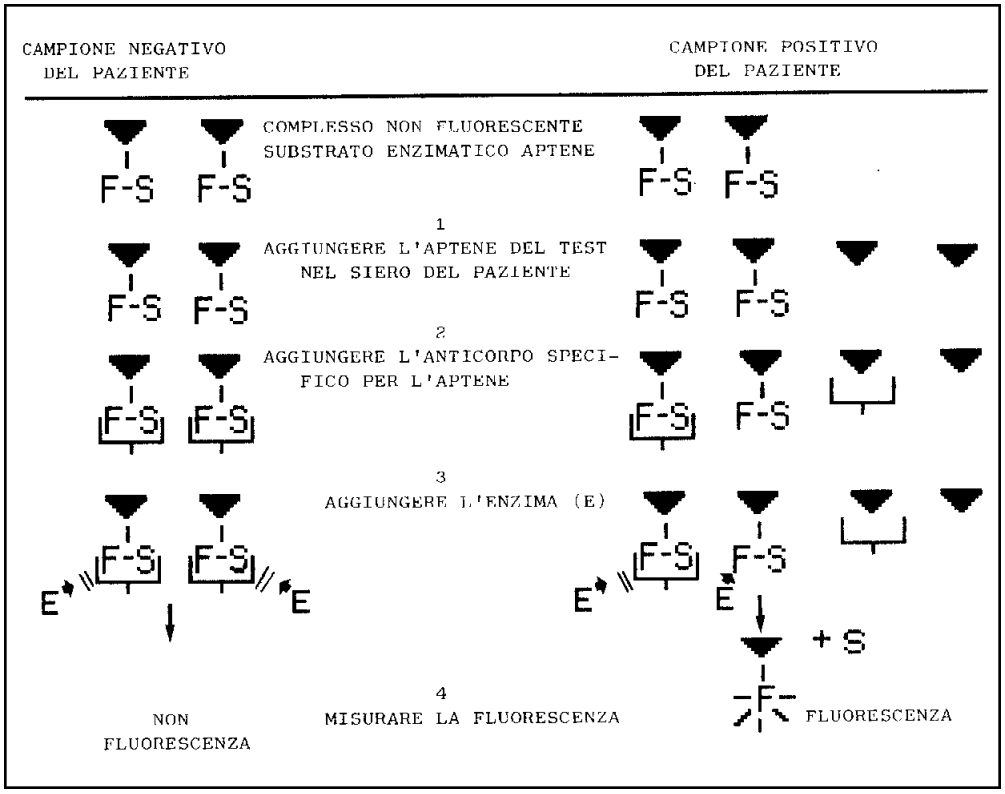


FIGURE 31 e 32. **IMMUNODOSAGGIO CON TRASFERIMENTO DI FLUOROECCITAZIONE**

L'immunodosaggio con trasferimento di fluoroeccitazione (FETI) necessita di una molecola fluorescente (un aptene marcato con fluoresceina-donatore) che emette fluorescenza nella stessa regione dello spettro nella quale una seconda molecola fluorescente (anticorpo marcato con rodamina-accettore) la assorbe. L'emissione dell'aptene marcato con fluoresceina viene trasferita e smorzata quando si lega con l'anticorpo marcato con rodamina, La realizzazione del trasferimento di energia e dello smorzamento dipende da:

1) La sovrapposizione degli spettri di fluorescenza e di assorbimento rispettivamente del donatore e dell'accettore e

2) la distanza tra l'aptene marcato legato e l'accettore di energia nel complesso anticorpale (generalmente entro i 10 nm),

Queste figure dimostrano due possibili approcci al FETI: un sistema con l'aptene marcato e un dosaggio tipo 'sandwich".

FIGURA 31. **IL SISTEMA CON APTENE MARCATO**

Si mette ad incubare l'aptene marcato con fluoresceina e l'aptene nel siero del paziente con un anticorpo specifico, per l'aptene che deve essere misurato, marcato con rodamina. Quando l'aptene marcato con fluoresceina si lega con l'anticorpo marcato con rodamina, l'energia fluorescente della fluoresceina viene trasferita all'accettore rodamina, e la fluorescenza risultante viene smorzata. Viene misurata la sola fluorescenza della frazione libera.

FIGURE 31 e 32. **IMMUNODOSAGGIO CON TRASFERIMENTO DI FLUOROECCITAZIONE**

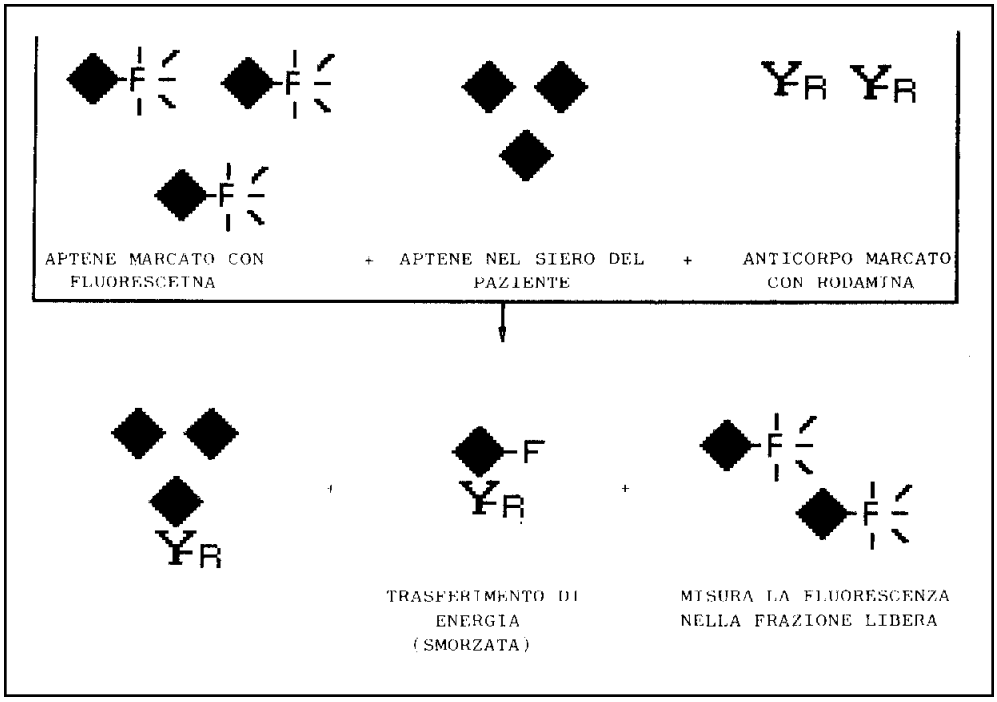


FIGURE 32. **IL DOSAGGIO TIPO "SANDWICH"**

In questo sistema, usato con un legante multivalente capace di legarsi con più di un anticorpo, gli anticorpi marcati sono sia donatori che accettori. Si mettono ad incubare l'anticorpo marcato con fluoresceina, l'aptene nel siero del paziente, e l'anticorpo marcato con rodamina. Quando i due anticorpi si sono legati all'aptene, l'energia fluorescente della fluoresceina viene trasferita all'accettore rodamina, e la fluorescenza è smorzata. Viene misurata la sola fluorescenza dell'anticorpo non legato.

Il FETI non ha trovato ancora una applicazione routinaria a causa degli svantaggi che comporta: quanto necessario per una doppia marcatura, la fluorescenza endogena di fondo, la necessità degli anticorpi marcati, e la sovrapposizione degli spettri di assorbimento della rodamina e della fluoresceina; Tuttavia, lavori di ricerca hanno descritto il dosaggio FETI per numerose sostanze (per es. morfina, albumina sierica, e immunoglobuline G, A, e M).

FIGURE 32. **IL DOSAGGIO TIPO "SANDWICH"**

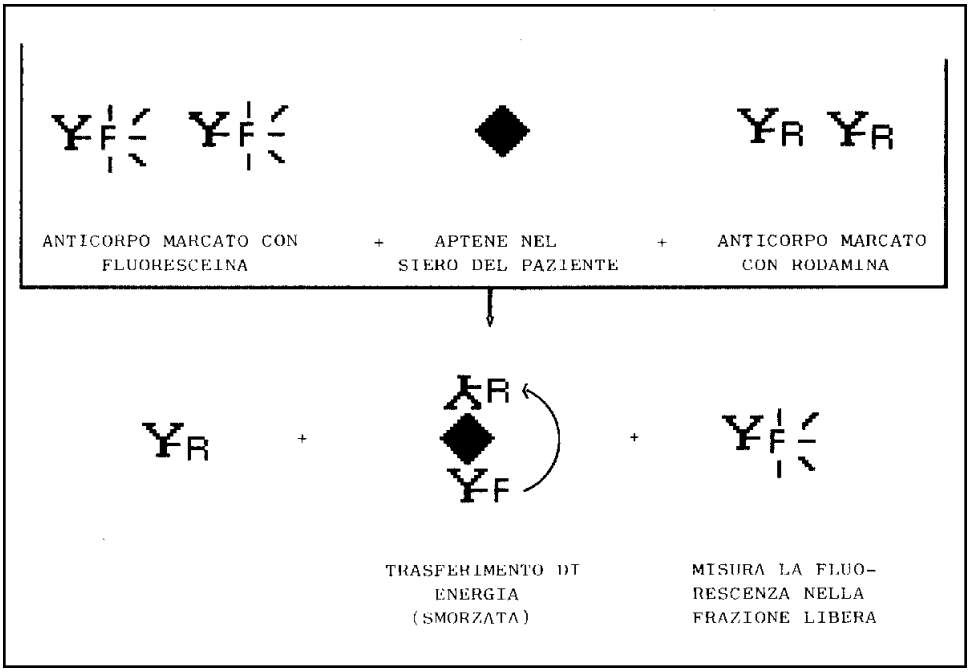


FIGURA 33. **IL DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO: VANTAGGI**

Come per l'EIA, il maggior vantaggio del FIA è l'eliminazione dei pericoli per la salute legati all'uso del radioisotopo, la necessità delle autorizzazioni, e le precauzioni per lo smaltimento che sono necessarie per il RIA. Gli altri aspetti positivi del FIA sono la lunga durata del tracciante, la potenziale automazione, la rapidità di dosaggio, la sensibilità, la specificità e la precisione. Il concetto di una pluri-marcatura con differenti fluoro-fori per realizzare parecchi dosaggi simultaneamente rappresenta un'eccitante possibilità.

FIGURA 33. **IL DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO: VANTAGGI**

VANTAGGI

***NESSUN PERICOLO DI RADIOATTIVITA', NECESSITA' DI AUTORIZZAZIONE, O PROBLEMI DI SMALTIMENTO DEI RIFIUTI.**

***LUNGO PERIODO DI CONSERVAZIONE**

***MAGGIORE SENSIBILITA' DEI METODI COLORIMETRICI**

***AUTOMATIZZABILE (DOSAGGIO OMOGENEO)**

***SEMI AUTOMATIZZABILE (DOSAGGIO ETEROGENEO)**

***PRECISO, RAPIDO E SPECIFICO**

***POSSIBILITA' DI UTILIZZARE PIU' DI UN MARCATORE**

FIGURA 34. **IL DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO: SVANTAGGI**

Il maggiore svantaggio del FIA è rappresentato dall'interferenza del fondo endogeno derivante dalla fluorescenza del siero in esame. Le proteine sieriche con energie di eccitazione di 340 nm ed energie di emissione di 470 nm sono le cause comuni di fluorescenza di fondo. Anche la bilirubina emette fluorescenza da 400 a 450 nm circa. Esiste anche la possibilità di smorzamento da parte del campione di siero originario. Un notevole miglioramento nel FIA verrà raggiunto non appena verranno la strumentazione e fluorofori migliori. Generalmente, il FIA non ha le stesse capacità di sensibilità che invece sono fornite dal RIA.

FIGURA 34. **IL DOSAGGIO FLUOROIMMUNOLOGICO: SVANTAGGI**

SVANTAGGI

***FLUORESCENZA DI FONDO ENDOGENA DEI CAMPIONI BIOLOGICI**

***MANCANZA DI STRUMENTAZIONE CONVENIENTE (IN VIA DI MIGLIORAMENTO)**

***MENO SENSIBILE DEL RIA**

***ATTUALE MANCANZA DI FLUOROFORI ADATTI**

Bibliografia

Il dosaggio enzimoimmunologico

1. Scharpe S.L., Cooreman W.M., Bloome W.J. et al., *Clin. Chem*., 22. 733 (1976).

2. *Immunoassay In The Chimical Laboratory*, Nakamura R.M., Dito W.R. and Tucker E.S., Eds., Alan R. Liss, Inc., N.W. (1979).

3. Harris C.C., Yolken R.H. et al., *Proc. Natl. Acad. Science*, 76, 5336 (1979).

4. Boitieux Y.L., Desmet G. and Thomas D., *Clin. Chem*., 25, 318 (1979).

5. Aizawa M., Morioka A., Suzuki S. et al., *Anal. Biochem*., 94, 22 (1979).

6. Meyerhof M.E. and Rechnitz G.A., *Anal. Biochem*., 95. 483 U979).

7. O'Sullivan M.J., Bridues J.W. and Marks V., *Ann. Clin. Biochem*., 16, 221 (1979).

8. Voller A., Barileti A. and Bidwell D.E., *J. Clin. Pathol.*, 31, 507 (1978).

9. Schuurs A.H.W.M. and Vanweemen B.K., *Clin. Chem. Acta*, 81, 1(1977).

10. Engwall E. and Perlmann P., *J. Immunol.*, 109, 129 (1972).

Il dosaggio fluoroimmunologico

1. Jollev M.E., Stroupe S.D., Wang, C.H.J. et al.: "Fluorcscenza Polarization Immunoassay I-Monitoring Aminoglycoside Antibiotics in Serum and Plasma", *Clin. Chem.*, 27, 1190, (1981).

2. Popelka S.R., Miller D.M., Holen J.T. et al.: "Fluorescence Polarization Immunoassay II-Analyzer for Rapid, Precise Measurement of Fluorescence Polarization with use of Disposable Cuvettes", *Clin. Chem.*, 27, 1198. (1981).

3. Li T.M.. Benovic J.L. and Burd J.F.: "Serum Theophylline Determination by Fluorescence Polarization Immunoassay Utilizing an Umbelliferone Derivative as a Fluorescent Label". *Anal. Biochem.,* 118, 102, (1981).

4. Smith D.S., Al-Hakiem M.H. and Landon J.: "A Review of Fluoroimmunoassay and Immunofluorometric Assay", *Ann. Clin. Biochem.,* 18, 253 (1981).

5. Wong R.C., Burd J.F., Carrico R.J.. et al.: "Substrate-Labeled Fluorescent Immunoassay for Phenytoin in Human Serum", *Clin. Chem.,* 25, 686 (1979).

6. Worah D.. Yeung K.K., Ward FE. et al.: "A Homogenous Fluorescent Immunoassay for Human IgM", *Clin. Chem.,* 27, 673 (1981).

7. Nargessi R.D., Landon J. and Smith D.S.: "Non-Separation Fluoroimmunoassay of Human Albumin in Biological Fluids", *Clin. Chem. Acta,* 89, 461, (1978).

8. Nargessi R.D., Landon J. and Smith D.S.: "Use of Antibodies Against the Label in Non-Separation Non-Isotopic Immunoassay: 'Indirect Quenching' FIA of Proteins", *J. of Immunol. Methods,* 26, 307, (1979).

9. O'Donnel C.M. and Suffin S.C.: "Fluorescence Immunoassay", *Ana!. Chem.,* 51, 33A? (1979).

10. Visor G.C. and Schulman S.G.: "Fluorescence Immunoassay", *J. Phar - maceutical Sciences,* 70, 469, (1981).

11. Lim C.S., Miller J.N. and Bridges J.W.: "Energy-Transfer Immunoassay: A Study of the Experimental Parameters in an Assay for Human Serum Albumin", *Anal. Biochem.,* 108, 176, (1989).

12. Ullman E.F., Schwarzberg M. and Rubenstein K.E.: "Fluorescent Excitation Transfer Immunoassay", *J. Bio!. Chem.,* 251, 4172 (1976).

13. Zuk R.F., Rowley G.L. and Ullman E.F.: "Fluorescence Protection Immunoassay: A New Homogenous Assay Technique", *Clin. Chem.,* 25, 1554, (1979).

Indice

Editoriale

Figura 1. Raffronto tra FIA e RIA

Figura 2. Dosaggio Enzimoimmunologico: considerazioni generalii

Figura 3. Immunodosaggi eterogenei

Figura 4. ELISA: dosaggio competitivo per la determinazione dell'antigene

Figura 5. ELISA: il dosaggio dell'antigene con la tecnica del doppio anticorpo "sandwich"

Figura 6. Dosaggio indiretto per la determinazione dell'anticorpo

Figura 7. ELISA: il doppio anticorpo antiglobulina-"sandwich" per la determinazione dell'antigene

Figura 8. Anticorpi lgM-vs-IgG

Figura 9. ELISA: individuazione degli anticorpi IgM-specifici mediante la determinazione indiretta dell'anticorpo

Figura 10. ELISA: determinazione degli anticorpi IgM specifici mediante la tecnica del doppio anticorpo sandwich-antiglobulina

Figura 11. EIA: preparazione della fase solida adsorbita con proteine

Figura 12. EIA ererogeneo: gli enzimi coniugati

Figura 13. La coniugazione dell'enzima per mezzo della glutaraldeide

Figura 14. La coniugazione dell'enzima per mezzo del periodato di sodio

Figura 15 e 16. EIA: la coniugazine dell'enzima con l'aprene

Figura 17. ETA eterogeneo: i substrati

Figura 18. EIA omogeneo

Figura 19. EIA omogeneo: metodo di analisi

Figura 20. RIA-enzimatico

Figura 21. Fluorescenra

Figura 22. Fluorofori comunemente utilizzati nel dosaggio fluoroimmunologico

Figura 23 e 24. Caratteristiche dei fluorofori

Figura 25. I più importanti dosaggi fluoroimmunologici

Figura 26. Dosaggio fluoroimmunologico competitivo in fase solida

Figura 27. Dosaggio fluoroimmunologico a smorzamento diretto

Figura 28. Dosaggio fluoroimmunologico a smorzamento indiretto (Dosaggio fluoroimmunologico a protezione)

Figura 29. Immunodosaggio a fluorescenza polarizzata

Figura 30. Dosaggio fluoroimmunologico con substrato marcato

Figure 31 e 32. Immunodosaggio con trasferimento di fluoroeccitazione

Figura 33. Il dosaggio fluoroimmunologico: vantaggi

Figura 34. Il dosaggio fluoroimmunologico: svantaggi

Bibliografia

Indice

Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio

Caleidoscopio
Italiano

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La β-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della Vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-me - nopausale.*** **Febbraio '86.**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico e fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 5, numero 24

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0338 2202502
E-mail: rassu@ssnet.it

Responsabile Commerciale
Alessandra Pater

EDITORE

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Carmela Tiberti

Servizio Abbonamenti
Fina Grandeppieno
Flavio Damarciasi

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);
Telefax (010) 803498- 809070.
Internet URL:http://medicalsystems.editoria.com e http://www.medicalsystems.it
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay, Guida Pratica Immulite®, Caleidoscopio, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Pandora, Journal of Preventive Medicine and Hygiene, Tribuna Biologica e Medica.

Stampa
Tipolitografia ATA
16143 Genova - Via G. Torti, 32 c.r.
Tel. (010) 513120 - Fax (010) 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/1984
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Febbraio 1987
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano