

Sped. in A. P. 45% - art.2 comma 20/b legge 662/96 - n° 9 - Dicembre 1984 - Direttore responsabile: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Tipolitografia Nuova ATA Genova

www.medicalsystems.it
http://medicalsystems.editoria.com

ISSN 0394 3291

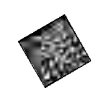
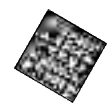
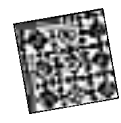
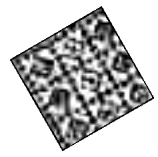
Caleidoscopio

Italiano



Norman P. Kubasik

Il Dosaggio Radioimmunologico (1)



Direttore Responsabile
Sergio Rassu

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1984

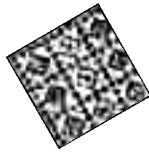
Caleidoscopio

Italiano



Norman P. Kubasik

The Genesee Hospital Rochester (USA)



Il Dosaggio Radioimmunologico (1)



Direttore Responsabile
Sergio Rassu

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1984

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 spediti 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 Rassa
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari**

RINGRAZIAMENTO

Ringrazio la signora Michela Spanu per la collaborazione prestata nella realizzazione grafica.

Figura 1. IL DOSAGGIO RADIOIMMUNOLOGICO

Il dosaggio radioimmunologico (RIA) è un metodo analitico che unisce la specificità di una reazione immunologica (con formazione di un complesso antigene-anticorpo) con la sensibilità di un metodo radiochimico. Questa tecnica è stata descritta per la prima volta dai dottori Yalow e Berson nel 1959, che la utilizzarono per la prima volta nel dosaggio dei livelli plasmatici di insulina nell'uomo. Da allora, il dosaggio radioimmunologico si è sviluppato ed è diventata la tecnica di routine per dosaggio di ormoni, farmaci, vitamine, enzimi, virus, markers tumorali, e un'infinità di altre sostanze sia in campo clinico che nella ricerca.

Il corso sul RIA comprende tre volumi. Questo volume descrive i principi basilari del legame competitivo e i metodi per la separazione delle frazioni di antigene libero e legato all'anticorpo. Il volume successivo descriverà i metodi di marcatura con isotopi, il loro rilevamento e inoltre la valutazione della risposta immune e della produzione di anticorpi.

Il volume terzo, infine, illustrerà l'analisi dei dati, l'allestimento della curva, e il controllo di qualità.

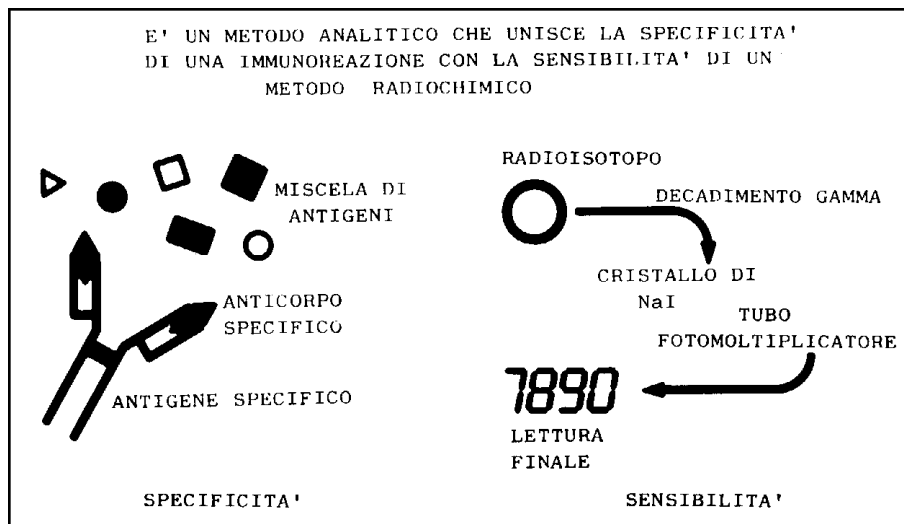


Figura 1. IL DOSAGGIO RADIOIMMUNOLOGICO

Figura 2. L'ERA PRE-RADIOIMMUNOLOGICA.

Prima che si affermasse la metodica del RIA, il dosaggio degli ormoni nei liquidi biologici si basava sul dosaggio biologico e l'analisi chimica.

L'analisi chimica tuttavia, richiedeva una fase di isolamento, purificazione e di concentrazione elaborata, e non era sufficientemente sensibile da far fronte al dosaggio di tutti gli ormoni nel sangue. Il dosaggio biologico permetteva la determinazione dei singoli ormoni in base alla loro attività biologica. Tuttavia erano metodi poco sensibili, laboriosi, costosi, e indaginosi. In questa figura vengono mostrati tre esempi di procedura per il dosaggio biologico in vivo e in vitro per illustrare la complessità e l'indaginosità del dosaggio biologico.

Il RIA, d'altra parte, è una metodica rapida, capace di incrementare in maniera impressionante la sensibilità e la precisione della misurazione della concentrazione dell'ormone.

Nel corso di queste pagine, si dovrà tener sempre conto del fatto che, a differenza del dosaggio biologico, il RIA misura l'attività immunologica e non quella biologica. Fortunatamente è stato dimostrato, per la maggior parte dei composti misurati, un andamento parallelo dell'attività biologica e di quella immunologica.

Figura 3. COMPONENTI BASE DEL RIA

I tre componenti chiave di un dosaggio RIA sono:

1. **L'ANTICORPO (ANTISIERO):** L'anticorpo è una proteina sierica, prodotta dalle cellule linfoidi che appartiene alla famiglia delle immunoglobuline. Questo ha la capacità di reagire con l'antigene o con una configurazione antigenica responsabile della sua produzione. Gli anticorpi utilizzati nel dosaggio radioimmunologico devono essere specifici, sensibili, e avere una costante di affinità accettabile.

2. **L'ANTIGENE:** In immunologia, l'antigene viene definito una sostanza capace di indurre la produzione di anticorpi. Nel dosaggio RIA, l'antigene corrisponde spesso al composto (presente nel campione del paziente) che deve essere misurato, e al composto che si legherà all'anticorpo.

3. **L'ANTIGENE MARCATO:** L'antigene marcato può essere identico all'antigene che deve essere misurato nel campione del paziente (o possedere una capacità legante simile). Esso, tuttavia, contiene anche uno o più atomi di un particolare isotopo radioattivo.

Non è necessaria una identica attività biologica dell'antigene marcato e non marcato. La validità di un dosaggio RIA dipende da un identico comportamento immunologico dell'antigene nel campione in esame con l'antigene degli standards di riferimento.

IL DOSAGGIO BIOLOGICO	
INSULINA:	<i>In vivo</i> : valutazione dell'ipoglicemia indotta nei ratti ipofisectomizzati, adrenalectomizzati e resi diabetici con alloxana. <i>In vitro</i> : Valutazione della captazione di glucosio da parte del cuscinetto di tessuto adiposo epididimale di ratto.
PTH	: <i>In vivo</i> : Valutazione nel cane degli effetti sui livelli sierici di calcio. <i>In vitro</i> : Valutazione dell'attivazione della adenil-ciclastasi della corteccia renale di ratto.
TSH	: <i>In vivo</i> : Accelerazione della metamorfosi dei girini. <i>In vitro</i> : Riduzione del calo di peso di fettoni di tiroide bovina.

Figura 2. L'ERA PRE-RADIOIMMUNOLOGICA.

Anticorpo :	E' una proteina sierica appartenente alla famiglia delle immunoglobuline prodotte dalla serie linfocitaria, un anticorpo ha la capacità di reagire con la configurazione antigenica responsabile della sua produzione.
Antigene :	Qualsiasi sostanza capace di provocare la produzione di anticorpi. Nel RIA è anche composto nel siero del paziente che si legherà all'anticorpo.
Antigene marcato :	Un complesso essenzialmente uguale all'antigene nel campione del paziente ma che contiene anche uno o più atomi di un particolare isotopo radioattivo.

Figura 3. COMPONENTI BASE DEL RIA

Figura 4. FORMAZIONE DI ANTICORPI POLICLONALI

Questa figura mostra il modo più semplice per la produzione di anticorpi usati nel RIA. Un antigene (l'immunogeno) viene iniettato nel coniglio per indurre la produzione di anticorpi. L'antigene deve soddisfare due esigenze basilari per indurre una risposta anticorpale:

1. Deve essere eterologo per il coniglio.
2. Deve avere un peso molecolare superiore a circa 5.000.

Dopo un intervallo adeguato, e in genere dopo iniezioni di richiamo, il coniglio viene salassato e l'antisiero raccolto. In molti casi, una semplice centrifugazione del sangue del coniglio è sufficiente per la raccolta e il siero o plasma del coniglio può essere direttamente utilizzato nel dosaggio. Tra le procedure di purificazioni dell'antisiero ricordiamo la cromatografia su gel e per affinità.

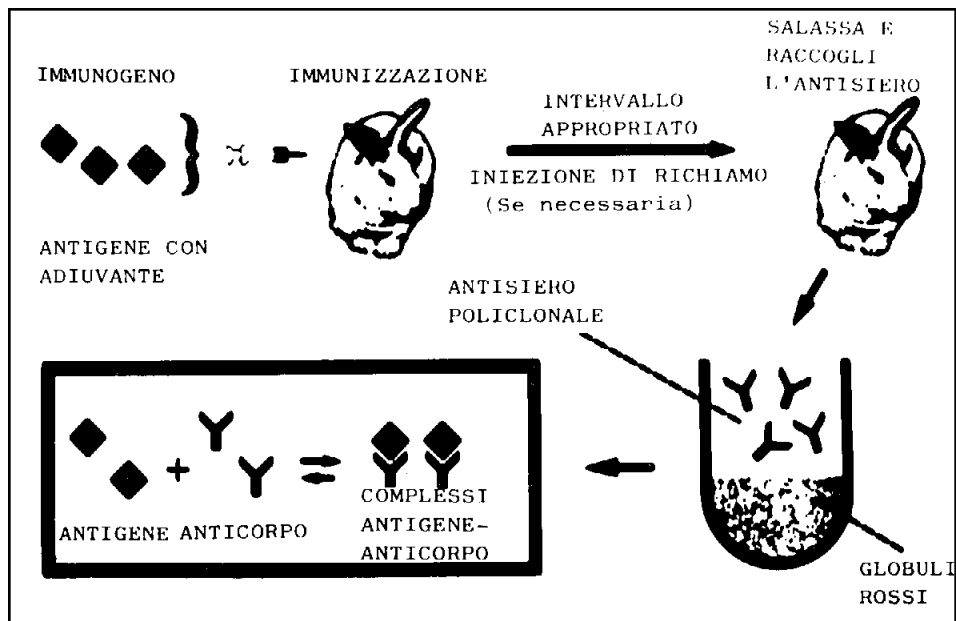


Figura 4. FORMAZIONE DI ANTICORPI POLICLONALI

Figura 5. PRINCIPALI ISOTOPI UTILIZZATI NEL RIA

I radioisotopi utilizzati nel RIA sono lo strumento per la quantificazione del dosaggio. L'estrema sensibilità degli strumenti di rilevazione della scintillazione permette limiti di rilevazione estremamente bassi per tutte le sostanze misurate con il RIA.

I principali isotopi utilizzati nel RIA sono mostrati in questa figura.

L'isotopo più comunemente utilizzato è lo Iodio 125. Questo ha una emivita di 60 giorni, ed emette radiazioni gamma. Il trizio (^3H) viene utilizzato tuttora per il dosaggio di numerosi steroidi e farmaci. Esso emette radiazioni beta (questo richiede un sistema per la rilevazione a scintillazione liquida), e ha una emivita di 12,26 anni. Il cobalto emette radiazioni gamma, ha una emivita di 267 giorni e viene utilizzato solo per il dosaggio della cobalamina (vitamina B12).

(Gli isotopi e la loro misurazione sono discussi dettagliatamente in un successivo numero: il RIA II).

Figura 6. PREPARAZIONE DEGLI ANTIGENI RADIOMARCATI

I radioisotopi sono prodotti da un piccolo numero di fabbriche specializzate attraverso l'irradiazione di un precursore in un reattore nucleare o ciclotrone.

EMITTENTI RADIAZIONI BETA: Molti farmaci e steroidi che contengono atomi di idrogeno se vengono esposti (in particolari condizioni) al gas trizio scambiano il loro idrogeno con il trizio. Talvolta è necessario un prolungato processo di purificazione per rimuovere il trizio legato debolmente dal composto marcato.

EMITTENTI RADIAZIONI GAMMA: Sono disponibili numerose tecniche per la marcatura con Iodio 125 (vedi RIA II). I siti più comuni di iodinazione sono gli amino acidi tirosina o istidina. Molecole più piccole (apteni) richiedono una modificazione chimica prima della marcatura con Iodio 125.

La cobalamina (vitamina B12) è marcata con cobalto 57.

Radioisotopo	Emivita T1/2	Particella/ Energia
¹²⁵ Iodio	60 giorni	gamma /28,35 KEV
Trizio (³ H)	12,26 anni	beta/18 KEV
⁵⁷ Cobalto	267 giorni	gamma/122 KEV

Figura 5. PRINCIPALI ISOTOPI UTILIZZATI NEL RIA

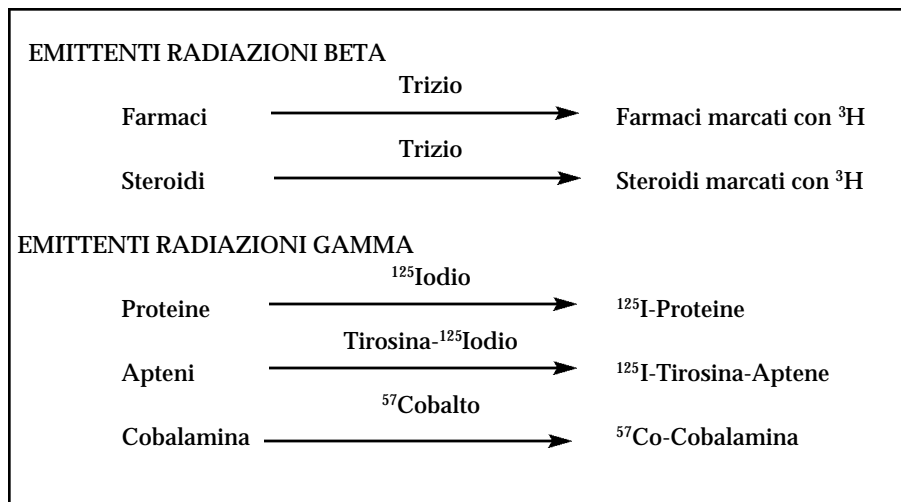


Figura 6. PREPARAZIONE DEGLI ANTIGENI RADIOMARCATI

Figura 7. RELAZIONE STRUTTURA/FUNZIONE DELL'ANTICORPO

Questa figura dimostra la struttura basilare a forma di Y della classe delle immunoglobuline G (IgG). Questa è composta da due tipi di catene polipeptidiche una catena pesante (più grande con un peso molecolare di 55.000-90.000) e una catena leggera (più piccola con un peso molecolare di circa 25.000). La maggior parte degli anticorpi usati nel dosaggio RIA sono della classe delle IgG. (Maggior dati sul ruolo degli anticorpi nel dosaggio RIA verranno fornite in un volume successivo RIA II).

La molecola delle IgG è formata da due catene pesanti identiche (chiamate gamma) e da due identiche catene leggere (chiamate kappa o lambda) legate insieme da ponti disolfuro.

Ciascuna catena leggera o pesante ha due differenti regioni funzionali.

La porzione amino (N) terminale delle catene leggera o pesante viene definita regione variabile. Nella regione variabile, la sequenza aminoacidica differisce da anticorpo ad anticorpo, ed è responsabile della differenza dei siti combinati che legano specificamente antigeni differenti.

La eterogeneità aminoacidica della regione variabile permette la produzione di un grosso numero di strutture tridimensionali complementari nella forma ad un vasto numero di antigeni. E' stato calcolato che i vertebrati hanno una potenzialità genetica di produrre sino a 100.000.000 di anticorpi (o siti combinati con antigeni) differenti tra loro.

Il legame dell'anticorpo con l'antigene è estremamente specifico e sensibile. L'immunocomplesso che si forma è termodinamicamente più stabile della quota libera. La regione costante carbossi (C) terminale delle catene leggere o pesanti ha la stessa sequenza aminoacidica per tutte le immunoglobuline di una sottoclasse.

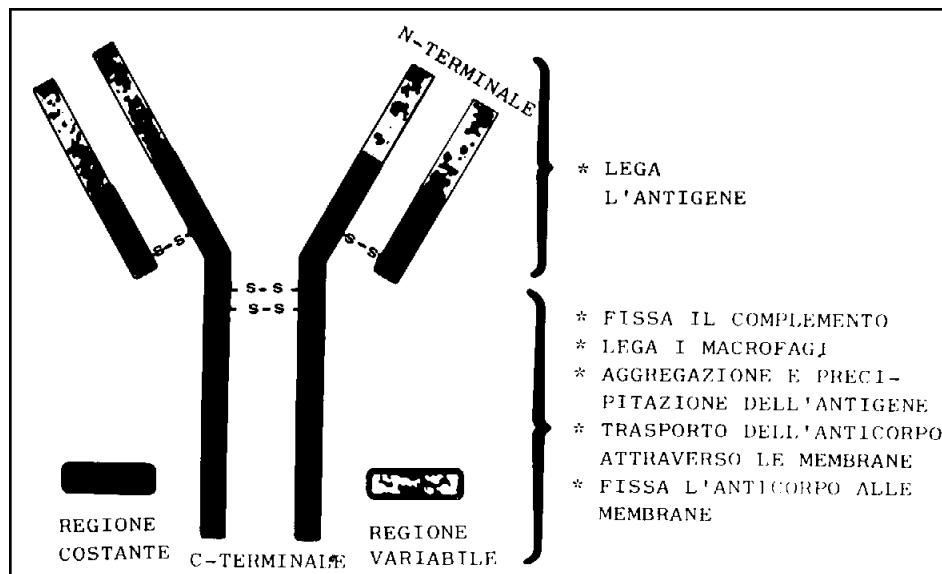


Figura 7. RELAZIONE STRUTTURA/FUNZIONE DELL'ANTICORPO

Figura 8. LEGAME ANTIGENE ANTICORPO

Il termine RIA sta a significare che nel dosaggio viene utilizzato un radioisotopo, e che questo si basa su una reazione immunologica. Nella maggior parte dei RIA viene marcato l'antigene. La misurazione nel campione dell'antigene sconosciuto (non marcato) dipende della sua capacità di spiazzare dal legame con l'anticorpo (AB) l'antigene marcato (Ag*). A questo scopo, l'anticorpo deve reagire e legarsi allo stesso modo sia con l'antigene marcato che con quello non marcato.

Questa figura mostra la reazione dell'antigene proteico marcato e non marcato con l'anticorpo. La sola differenza tra l'antigene marcato e quello non marcato è il radioisotopo attaccato al primo. L'anticorpo riconosce un determinante antigenico specifico su entrambe gli antigeni.

Il composto radiomarcato non deve inibire il legame antigene-anticorpo.

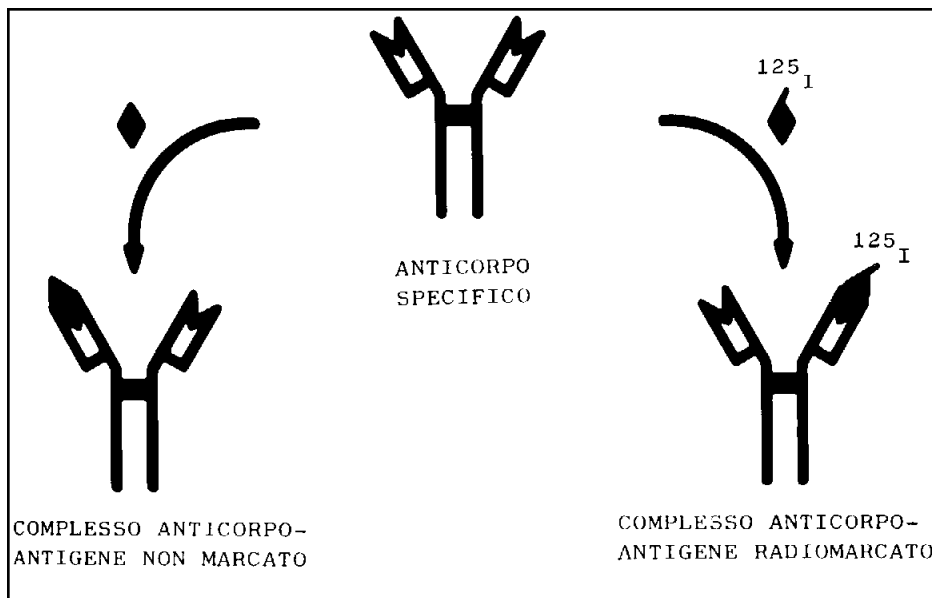


Figura 8. LEGAME ANTIGENE ANTICORPO

Figura 9. PRINCIPI DEL RIA: SCHEMA GENERALE

Il dosaggio radioimmunologico (RIA) fa parte del più ampio gruppo dei dosaggi per competizione di legame. Come dimostrato nella figura 9 in un dosaggio RIA all'equilibrio, l'antigene non marcato e una costante quantità di antigene marcato competono simultaneamente per un limitato e costante numero di siti leganti su un anticorpo specifico.

Il solo parametro che varia è la concentrazione dell'antigene non marcato. L'anticorpo non distingue l'antigene marcato da quello non marcato, e perciò si lega ad entrambi con la stessa affinità. Secondo la legge di azione di massa, l'antigene (marcato e non marcato) presente in maggiori concentrazioni occuperà più siti leganti anticorporeali. I complessi anticorpo-antigene non marcato e anticorpo-antigene marcato vengono denominati frazione legata. L'antigene non legato (marcato e non marcato) costituisce la frazione libera.

Un altro sistema per considerare il principio basilare del RIA è il seguente: In assenza di antigene non marcato, una certa quantità di antigene radiomarcato si legherà all'anticorpo. Quindi tanto più antigene non marcato viene aggiunto, tanto maggiore sarà la quantità di antigene marcato che verrà spiazzato dall'anticorpo o il cui legame verrà inibito.

Gli effetti dell'inibizione o dello spiazzamento del legame dell'antigene marcato con l'anticorpo da parte dell'antigene non marcato sono paragonati con quelli che si hanno utilizzando soluzioni a concentrazione nota di antigene non marcato, e quindi si calcolano le concentrazioni dei campioni non noti.

La costante di affinità (K) per la formazione dei complessi antigene anticorpo è estremamente grande e, benché la reazione sia del tipo reversibile, l'equilibrio è di gran lunga spostato a destra in altre parole, i complessi antigene-anticorpo sono estremamente stabili. (K_a = costante di associazioni, K_d = costante di dissociazione).

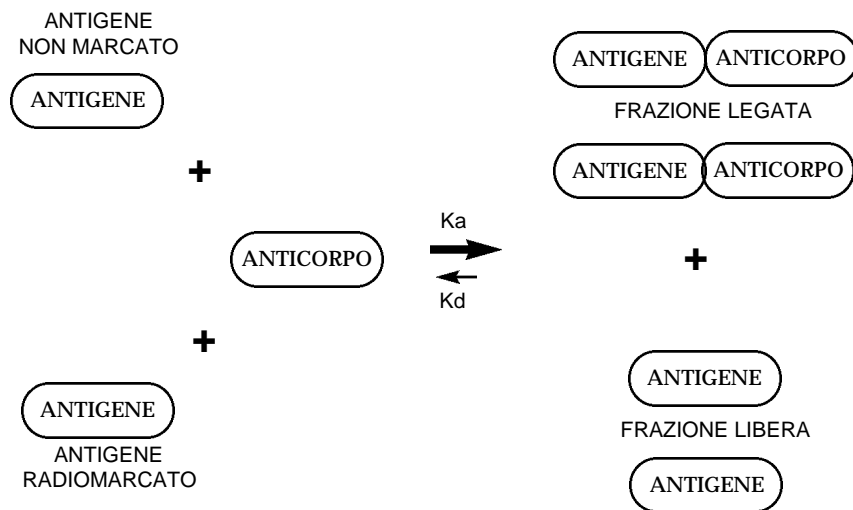


Figura 9. PRINCIPI DEL RIA: SCHEMA GENERALE

Figura dal 10 al 12. PREPARAZIONE DELLA CURVA DI TARATURA

I principi basilari del dosaggio RIA in un dosaggio all'equilibrio sono mostrati nelle successive figure 10, 11, 12. La preparazione della curva di taratura viene illustrata utilizzando concentrazioni di standard basse, medie ed elevate. L'esempio mostra solo alcune molecole di antigene e di anticorpo, mentre in realtà sono coinvolte nella reazione migliaia di molecole. In tutti i casi, la quantità del tracciante radioattivo e dell'anticorpo rimane costante, quello che varia è solo la concentrazione dell'antigene non marcato che viene aggiunto.

Figura 10. STANDARD CON BASSA CONCENTRAZIONE

Gli antigeni radiomarcato e non marcato competono per quattro siti combinanti anticorpali. Poiché l'anticorpo riconosce allo stesso modo l'antigene radiomarcato e non marcato, la legge di azione di massa stabilisce che tre antigeni radiomarcato si legheranno all'anticorpo per ogni antigene non marcato legato. La frazione legata all'anticorpo viene separata dalla frazione libera, e quindi viene misurata la quantità di radioattività presente. Il bianco del dosaggio (NBS) viene sottratto e il conteggio per minuto (CPM) registrato viene riportato su grafico corredandolo con le concentrazioni di antigene non marcato. In questo caso, il 75% della frazione legata conteneva l'antigene marcato; perciò, i CPM sono elevati. In un RIA all'equilibrio, CPM elevati sono associati con una concentrazione bassa degli standards o dei campioni in esame.

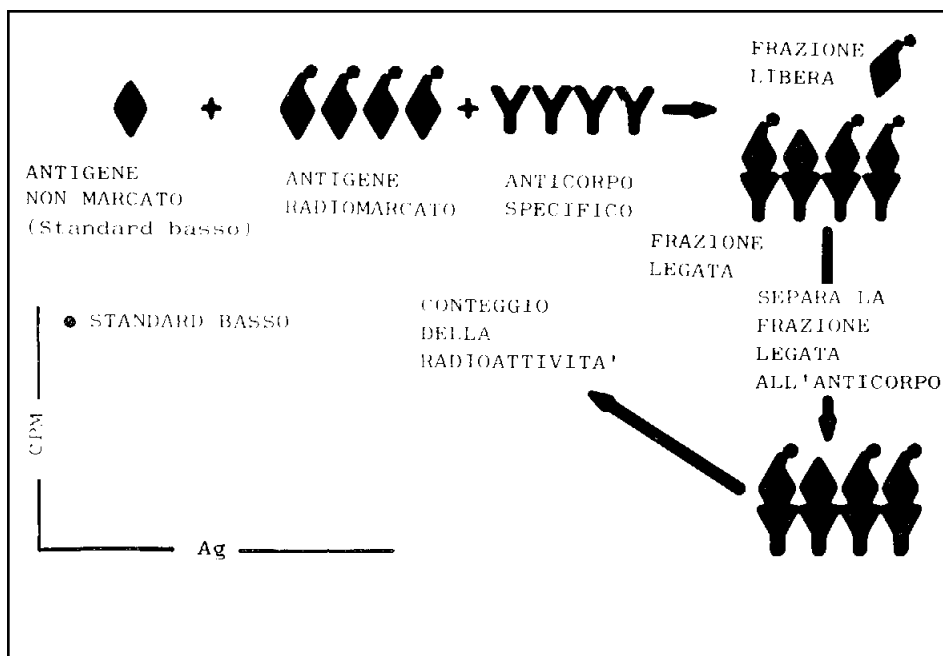


Figura 10. STANDARD CON BASSA CONCENTRAZIONE

Figura 11 STANDARD CON CONCENTRAZIONE MEDIA

Nello standard a concentrazione media è presente una concentrazione uguale di antigeni marcati e non marcati che competono per i quattro siti combinanti anticorpali. Perciò nella frazione legata sono presenti in parti uguali (1 a 1) i complessi anticorpo-antigene marcati e non marcati. Dopo la separazione e il conteggio della frazione legata, i CPM sono riportati nella stessa curva standard come mostrato nella figura 10.

Soltanto il 50% della frazione legata contiene un antigene marcato, così i CPM sono inferiori rispetto a quelli dello standard a bassa concentrazione, ma è presente una concentrazione di antigeni o standard maggiore.

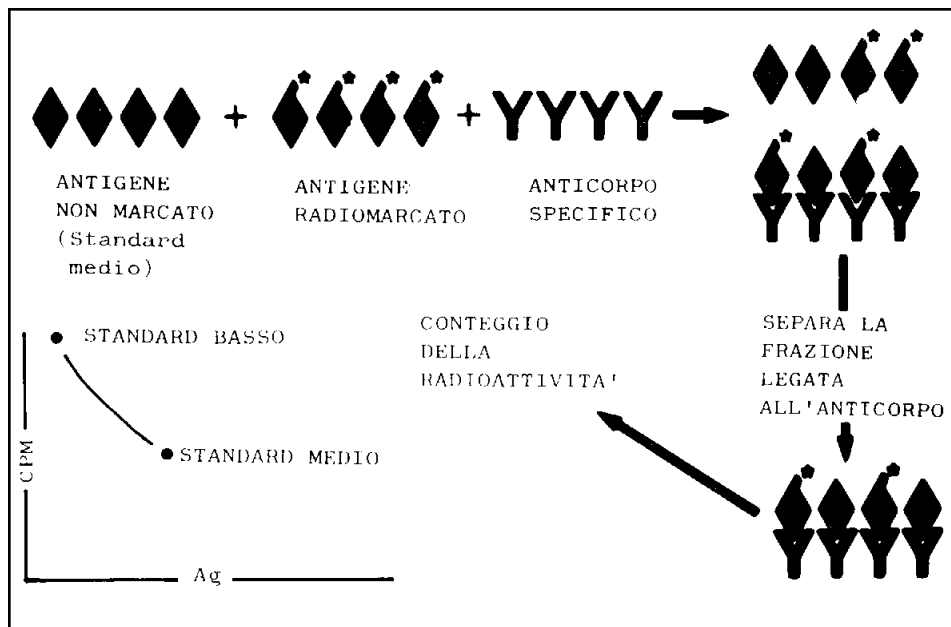


Figura 11. STANDARD CON CONCENTRAZIONE MEDIA

Figura 12. STANDARD CON CONCENTRAZIONE ALTA

Dodici antigeni non marcati e quattro antigeni marcati competono per quattro siti combinanti anticorpali. Poiché gli antigeni non marcati superano in numero quelli marcati, troveremo che la maggior parte dell'antigene legato all'anticorpo è non marcato (75%). Soltanto il 25% della frazione legata contiene un antigene marcato. Quando la frazione legata viene separata, conteggiata, e interpolata sulla curva standard dell'esempio, noi troveremo dei bassi valori di CPM associati con una concentrazione ancor maggiore di antigene non marcato (o standard).

La curva standard che si ottiene non è una linea retta, ma curvilinea.

(Le curve standards e il calcolo dei dati vengono descritti nel RIA III).

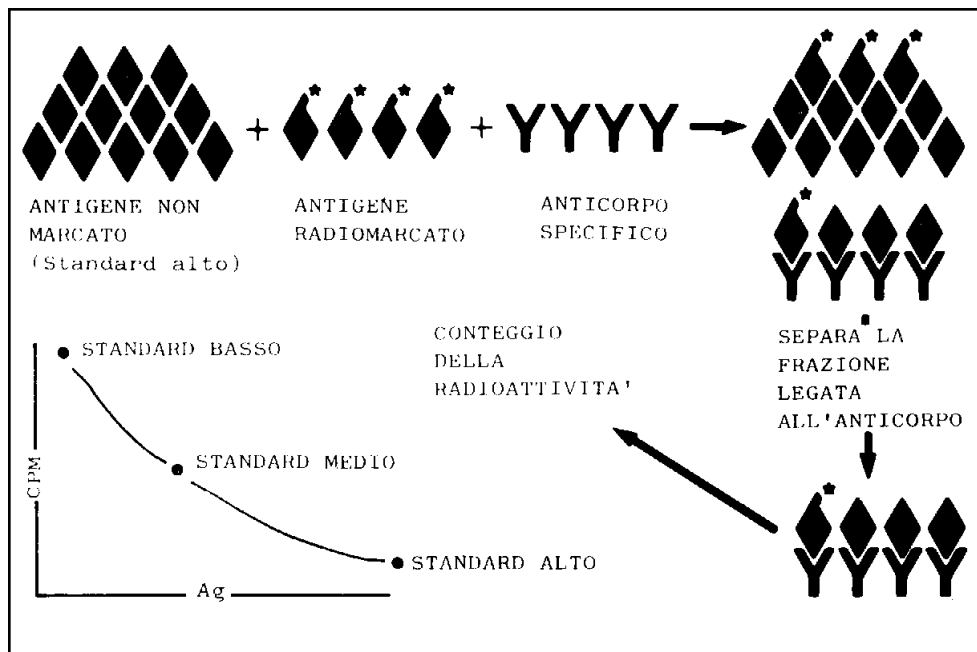


Figura 12. STANDARD CON CONCENTRAZIONE ALTA

Figura 13. CALCOLO DELLA CONCENTRAZIONE DEI CAMPIONI IN ESAME

La curva standard del dosaggio RIA si ottiene come illustrato nella figura 13. Numerosi standard sono utilizzati per aumentare la sicurezza della curva. I campioni in esame sono dosati allo stesso modo degli standards. Quando viene conteggiata la frazione legata, e viene sottratto l'NSB, la concentrazione di campioni viene calcolata sulla curva standard come mostrato nella figura.

Nell'esempio in figura, il campione non noto ha $5700 \text{ CPM} - 500 \text{ CPM (NSB)} = 5200 \text{ CPM}$. Si riportano sulla curva standard i 5200 CPM che corrispondono ad una concentrazione di antigene di 5.5 unità.

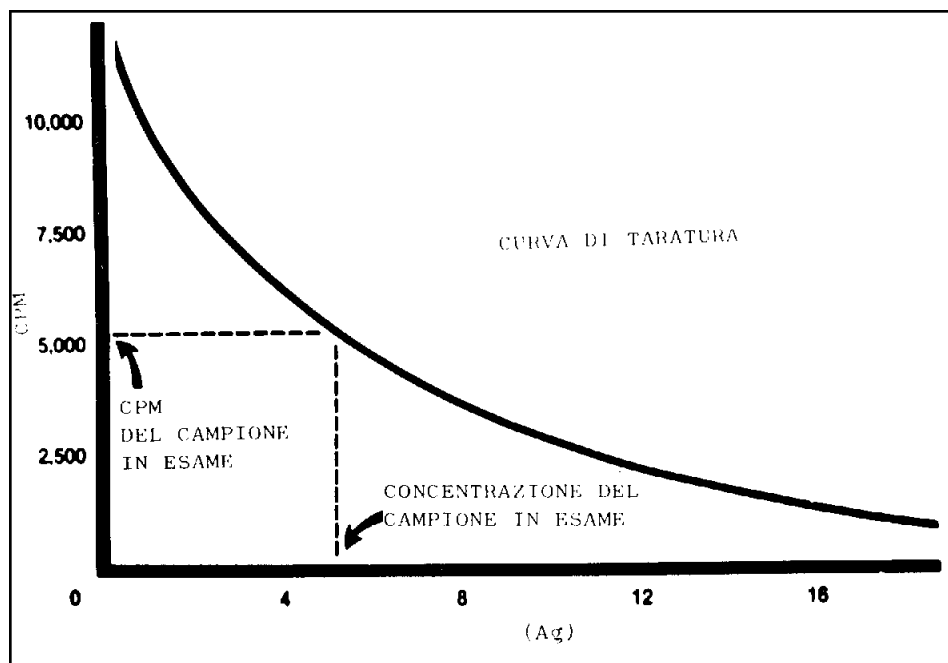


Figura 13. CALCOLO DELLA CONCENTRAZIONE DEI CAMPIONI IN ESAME

Figura 14. CONTE ASPECIFICHE O “BIANCO” (NSB)

Un metodo di separazione perfetto separa la frazione legata all'anticorpo da quella libera in due fasi ben distinte. In realtà, questa perfezione non viene mai raggiunta. Una certa quota della frazione libera sarà presente con la frazione legata, anche in assenza di anticorpo.

Questo “bianco” o conte aspecifiche (legame non dovuto cioè ad una specifica reazione antigene-anticorpo) può essere causato da diverse ragioni:

1. La frazione libera può rimanere fisicamente intrappolata nel precipitato. Questo si può ovviare, o migliorare, lavando il precipitato.

2. Si può avere la precipitazione di contaminanti marcati del tracciante. Questo può essere ridotto con un'attenta purificazione del tracciante.

3. Si può verificare l'assorbimento del tracciante alla superficie della provetta di dosaggio.

4. La tecnica di separazione fisica della frazione libera e legata può essere insoddisfacente.

5. Non è possibile raggiungere una separazione completa della frazione libera e legata poiché le caratteristiche della frazione libera possono essere simili, ma non identiche, a quelle del complesso legato. Per esempio, un dosaggio per l'insulina che utilizzi il solfato di ammonio come agente per la separazione può non distinguere tra l'insulina libera e quella legata all'anticorpo, e precipitare così entrambe le frazioni.

Nel conteggio finale si deve tener conto del bianco (NSB).

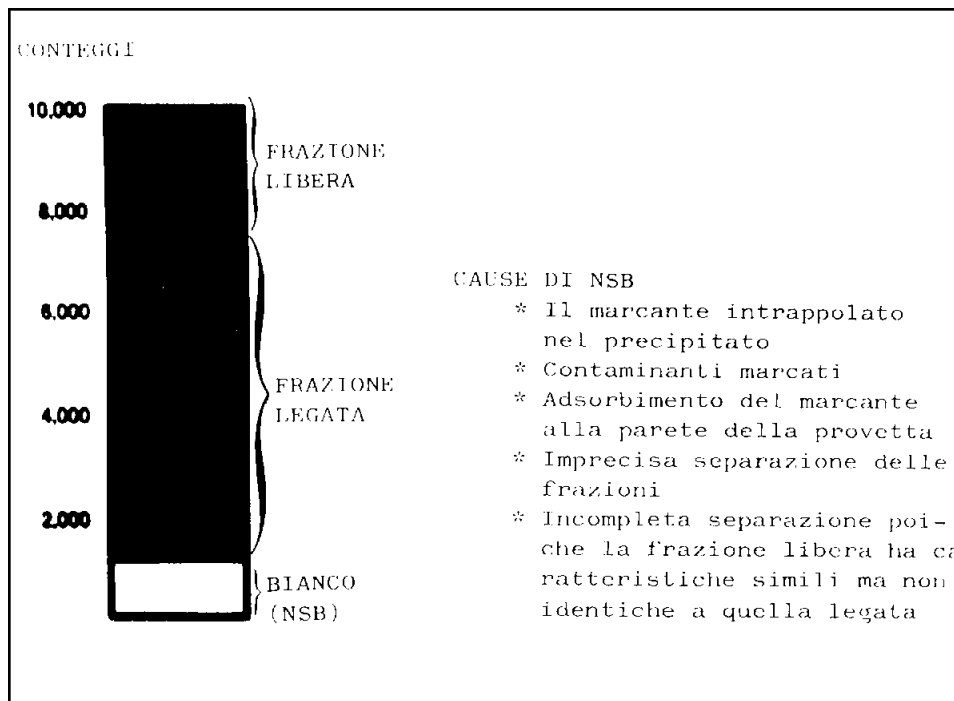


Figura 14. CONTE ASPECIFICHE O "BIANCO" (NSB)

Figura 15 e 16. CAPACITA' LEGANTE MASSIMA (Bo)

Figura 15.

La capacità legante massima (Bo o B subzero) è l'espressione della quantità di antigene marcato legato all'anticorpo in assenza di antigene non marcato (cioè la concentrazione "zero" della curva standard meno il NSB). Bo è anche definito come B/T (bound/total) quella frazione cioè di antigene marcato legato all'anticorpo.

In generale un RIA viene allestito in modo tale che la quantità di anticorpo aggiunto legni circa il 50% dell'antigene marcato aggiunto se per esempio, l'antigene marcato aggiunto ha 10.000 CPM, ciascuna delle frazioni libera e legata dovrebbe avere 5.000 CPM. Il range ottimale va dal 25 al 75% del legame.

B_0 rappresenta il risultato del calcolo della quantità di Antigene radiomarcato legato all'Anticorpo in assenza di Antigene non marcato (la concentrazione "zero" delle provette della curva di taratura). B_0 può essere anche espresso come legato/totale (B/T).

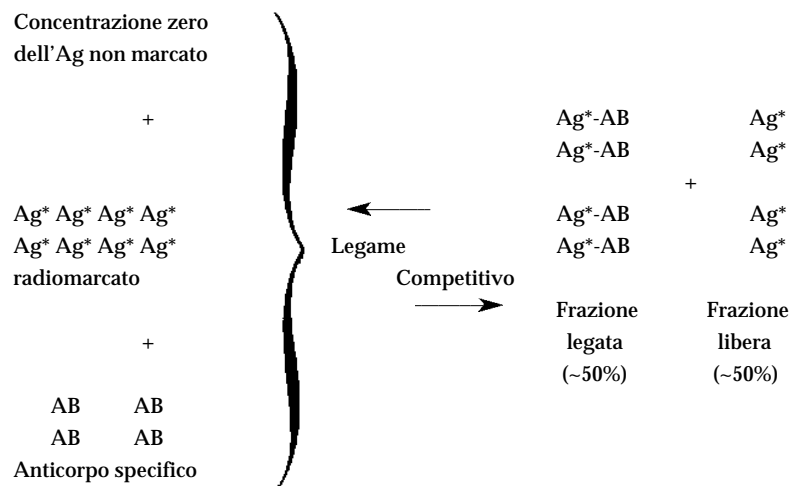


Figura 15. CAPACITA' LEGANTE MASSIMA (B_0)

Figura 16. CAPACITA' LEGANTE MASSIMA (Bo)

La ragione per la scelta del 50% come capacità legante massima viene mostrata in questa figura.

Bo aumentato: Se l'anticorpo lega tutto l'antigene marcato che viene (messo), l'aggiunta di piccole quantità di antigene non marcato potrebbe non essere notata, e il dosaggio potrebbe essere insensibile nel range basso della curva standard.

Bo diminuito: Se l'anticorpo lega soltanto il 5-15% dell'antigene marcato (aggiunto), si potrebbe avere una curva standard piatta e insensibile.

I modelli di rappresentazione della curva oggi utilizzati non considerano come parametri la capacità legante massima relazionata alla concentrazione, ma piuttosto fissano la capacità legante massima al 100% e calcolano i rimanenti standards come frazione di Bo. Questo metodo minimizza alcuni degli effetti negativi osservati nella curva presentata.

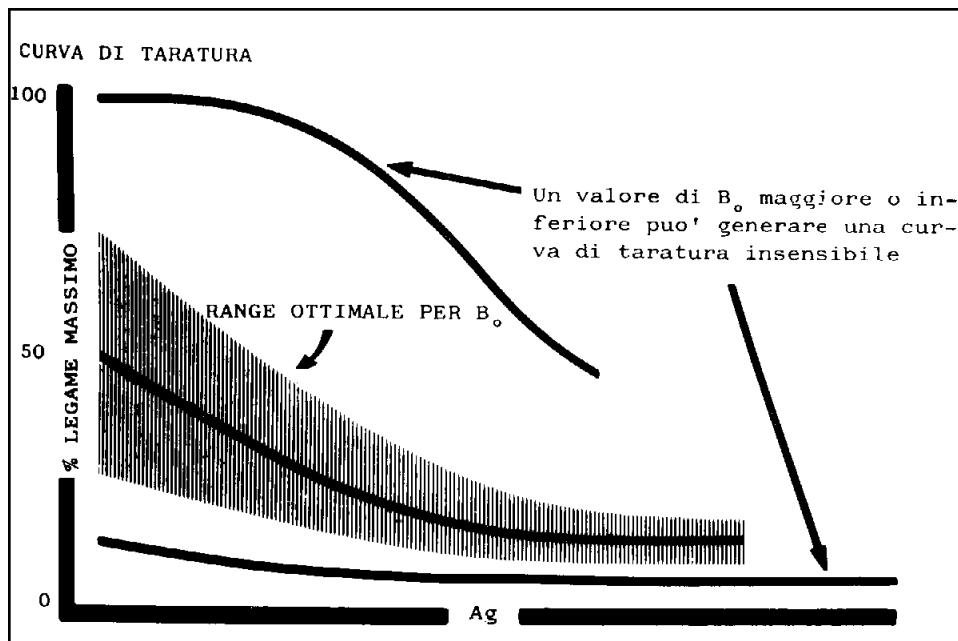


Figura 16. CAPACITA' LEGANTE MASSIMA (B_0)

Figura 17. DIFFERENTI TIPI DI RIA

Esistono tre tipi generali di RIA che utilizzano nella reazione l'antigene marcato.

1. **DOSAGGIO ALL'EQUILIBRIO:** La incubazione simultanea di antigene, antigene marcato, e anticorpo. Questa è la forma più comune del RIA.

2. **DOSAGGIO PER COMPETIZIONE DI LEGAME:** Con questa tecnica, l'antigene marcato (Ag^*) forma i complessi con l'anticorpo (Ab).

Quindi viene aggiunto l'antigene non marcato (Ag) ai complessi Ag^*-Ab , che spiazza l'antigene marcato (Ag^*) dai complessi formati.

3. **DOSAGGIO SEQUENZIALE:** In questo sistema, si mette a reagire l'antigene non marcato o il campione in esame con l'anticorpo. Poiché questa reazione avviene in eccesso di anticorpo saranno disponibili ancora siti leganti anticorpali. Si aggiunge quindi l'antigene marcato, che andrà a saturare i restanti siti anticorpali liberi. Per alcuni composti questo metodo offre una maggiore sensibilità, ma risente della riduzione del range di concentrazione che può essere misurato.

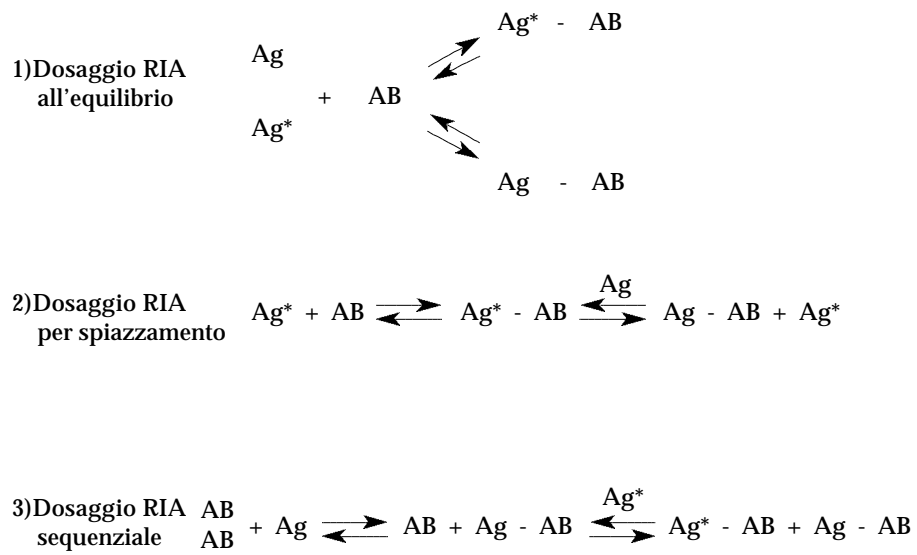


Figura 17. DIFFERENTI TIPI DI RIA

Figura 18. METODO DI SEPARAZIONE IDEALE

Una fondamentale esigenza di qualsiasi dosaggio RIA è un metodo per la separazione dell'antigene libero marcato e non marcato dall'antigene legato all'anticorpo specifico. Idealmente, questa procedura dovrebbe essere netta (fornire una completa separazione delle frazioni libera e legata), non influenzata dal siero o altre sostanze non specifiche, riproducibile, tecnicamente semplice, rapida, poco costosa, e non dovrebbe interferire con la reazione antigene-anticorpo. Come vedremo, questo metodo ideale non esiste. Ciascun metodo di separazione ha i suoi vantaggi e svantaggi.

Figura 19. I PIU' IMPORTANTI METODI DI SEPARAZIONE

In questo volume discuteremo dei quattro maggiori metodi di separazione.

1. La precipitazione non specifica dei complessi antigene-anticorpo con sali e solventi (solfato di ammonio, etanolo, polietilenglicol-PEG).

2. L'immunoprecipitazione dei complessi solubili antigene-anticorpo (tecnica del doppio anticorpo).

3. L'adsorbimento dell'antigene su fase solida (come più importante esempio verranno discusse le provette sensibilizzate con l'anticorpo).

4. L'adsorbimento non specifico dell'antigene (verranno discussi come più importanti esempi il carbone e il carbone-destrano).

Verranno anche illustrati la filtrazione su gel, la proteina A, e il metodo del doppio anticorpo con PEG.

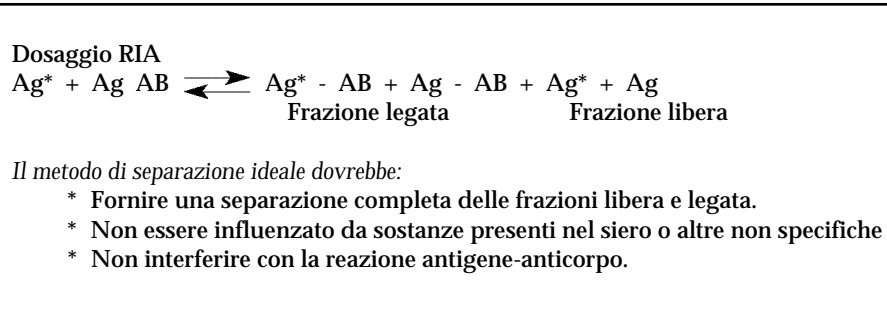


Figura 18. METODO DI SEPARAZIONE IDEALE

- * Precipitazione non specifica dei complessi antigene-anticorpo.
(Ammonio solfato, etanolo, PEG)
- * Immuno precipitazione dei complessi solubili antigene-anticorpo.
(Doppio anticorpo)
- * Adsorbimento non specifico dell'antigene.
- * Adsorbimento dell'antigene in fase solida.
(Provette sensibilizzate con l'anticorpo, grani, vetro, etc.).

Figura 19. I PIU' IMPORTANTI METODI DI SEPARAZIONE

Figura 20. FILTRAZIONE SU GEL

Poiché i complessi antigene anticorpo sono molecole molto più voluminose degli antigeni liberi, è possibile separarli con l'uso della filtrazione su gel con l'uso di appropriate resine o destrani polimerizzati (per esempio il Sephadex).

La cromatografia su colonna può separare miscele di molecole in base alle loro dimensioni molecolari. I composti con un volume molecolare maggiore (la frazione legata) passa rapidamente attraverso la colonna. Invece, sostanze con un peso molecolare inferiore (la frazione libera) entrano all'interno di pori microscopici del gel e il loro flusso viene inibito. Le molecole più piccole vengono quindi eluite in un secondo tempo.

Benché interessante, la filtrazione su gel si è dimostrata poco pratica. La preparazione delle singole colonne per il dosaggio di numerosi campioni e richiede molto tempo e spazio. La raccolta degli eluati delle colonne richiede particolare perizia. Si può verificare l'adsorbimento dell'antigene libero su gel, e i complessi antigene-anticorpo possono venir separati.

Benché la filtrazione su gel sia poco pratica nelle tecniche RIA manuali, tuttavia ha avuto un limitato successo se impiegata con strumenti commerciali automatizzati di RIA che utilizzano la forza centrifuga. Uno dei vantaggi delle colonne di gel è la possibilità di un riutilizzo.

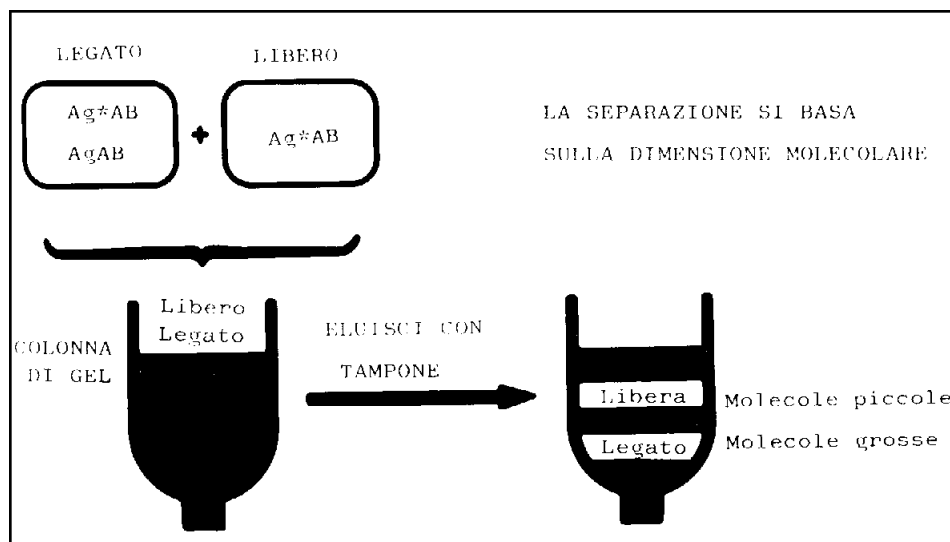


Figura 20. FILTRAZIONE SU GEL

Figura 21. PRECIPITAZIONE NON SPECIFICA DEI COMPLESSI ANTIGENE-ANTICORPO PER MEZZO DI SALI E SOLVENTI

Un certo numero di dosaggi RIA si basano sulla precipitazione non specifica dei complessi antigene-anticorpo utilizzando sali neutri o solventi organici. I sali e i solventi comunemente utilizzati sono l'etanolo, il polietilenglicole (PEG), e il solfato d'ammonio. Il meccanismo attraverso il quale i sali e i solventi precipitano la frazione legata sembra essere il legame con l'acqua che normalmente forma un guscio intorno alle molecole per mantenerle in soluzione. L'avidità per l'acqua (idrofilia) del solfato d'ammonio o del PEG determina la rimozione dapprima dell'acqua che forma il guscio di grosse molecole proteiche solubili (la frazione legata), rendendole insolubili e precipitandole.

La frazione libera (generalmente uno steroide idrofobico o un farmaco) rimane solubile anche ad alte concentrazioni dell'agente separante.

Tipiche concentrazioni di questi agenti sono il 40-50% per il solfato d'ammonio, il 12-20% per il PEG, e il 30-50% per l'etanolo.

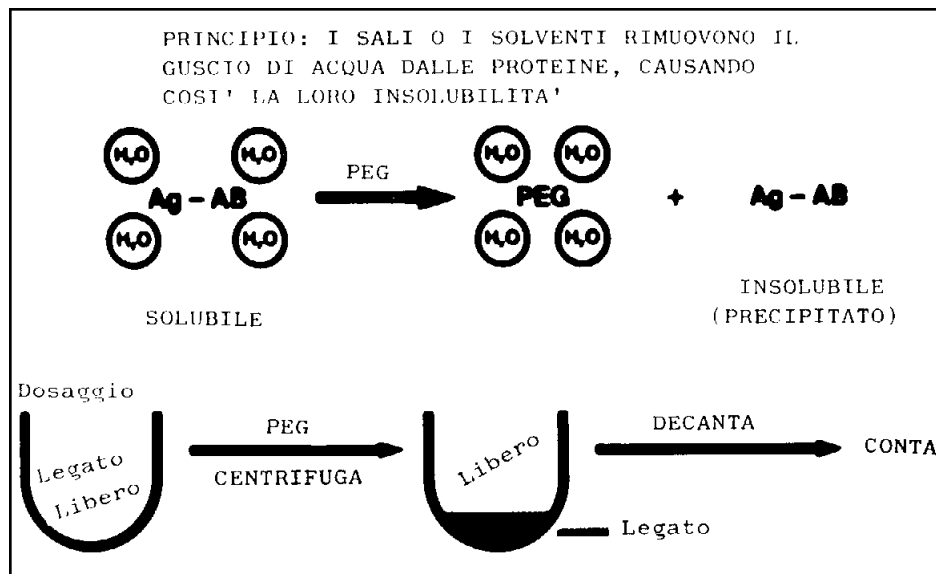


Figura 21. PRECIPITAZIONE NON SPECIFICA DEI COMPLESSI ANTIGENE-ANTICORPO PER MEZZO DI SALI E SOLVENTI

Figura 22. PRECIPITAZIONE NON SPECIFICA DEI COMPLESSI ANTIGENE-ANTICORPO: DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE OTTIMALE DEL SOLVENTE

Nell'esempio mostrato in questa figura, vengono aggiunte varie concentrazioni di PEG ad una serie di identiche reazioni RIA con o senza anticorpo. La percentuale della iniziale radioattività aggiunta alla miscela di reazione viene misurata nel precipitato finale con PEG. In questo esempio, la concentrazione ottimale del PEG come precipitante è del 15% circa. Questo rappresenta il punto dove si verifica la massima separazione delle frazioni libere e legate. Non è importante solamente che il PEG precipiti la frazione legata, ma è anche importante che la frazione libera rimanga in soluzione. Questo esempio rappresenta solo un sistema acquoso; quando si dosano soluzioni proteiche (come il plasma/siero), deve essere fatta una valutazione anche di questo.

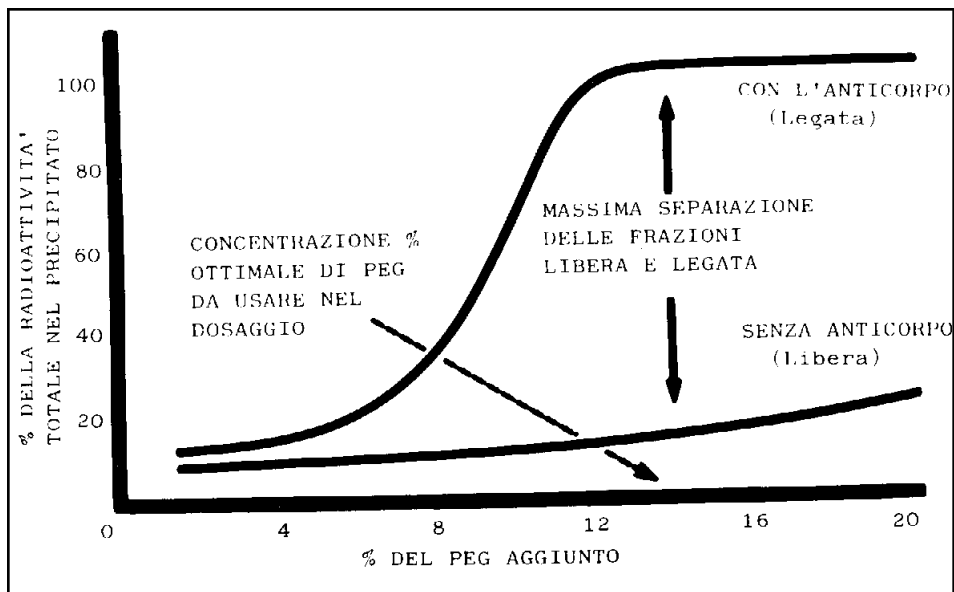


Figura 22. **PRECIPITAZIONE NON SPECIFICA DEI COMPLESSI ANTIGENE-ANTICORPO: DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE OTTIMALE DEL SOLVENTE**

Figura 23. PRECIPITAZIONE NON SPECIFICA DEI COMPLESSI ANTIGENE-ANTICORPO PER MEZZO DI SALI E SOLVENTI: VANTAGGI E SVANTAGGI

La precipitazione frazionata della parte legata con sali o solventi è un mezzo semplice (un singolo pipettamento), economico (per il basso costo di sali e solventi), e rapido (i campioni in genere sono pronti per la centrifugazione nel giro di cinque minuti). Questo metodo è applicabile a un grosso numero di dosaggi, ed è riproducibile.

Tuttavia, questa tecnica ha importanti svantaggi.

Uno di questi è la non specificità (per la co-precipitazione della frazione libera con quella legata), insieme ad una incompleta separazione della frazione legata. Il metodo risente anche del pH, del tempo, della temperatura, della concentrazione proteica del campione, e della concentrazione del sale o del solvente.

Si osservano inoltre più elevati valori del bianco (NSB) con alte concentrazioni dei sali o dei solventi.

<p>VANTAGGI</p> <ul style="list-style-type: none">* Rapido* Semplice* Economico* Applicabile a numerosi dosaggi* Riproducibile <p>SVANTAGGI</p> <ul style="list-style-type: none">* Co-precipitazione della frazione libera con quella legata (non specifica)* Incompleta separazione della frazione legata* Dipendente dalla concentrazione proteica, dal pH, dal tempo, dalla temperatura, e dalla concentrazione del sale/solvente* Valori elevati dei bianchi
--

Figura 23. PRECIPITAZIONE NON SPECIFICA DEI COMPLESSI ANTIGENE-ANTICORPO PER MEZZO DI SALI E SOLVENTI: VANTAGGI E SVANTAGGI

Figura 24. IMMUNOPRECIPITAZIONE DEI COMPLESSI SOLUBILI ANTIGENE-ANTICORPO: LA TECNICA DEL DOPPIO ANTICORPO

La tecnica di separazione del doppio anticorpo ha ottenuto un notevole successo nel RIA. Il metodo si propone di precipitare il prodotto solubile della prima reazione (Antigene-Anticorpo 1) con l'aggiunta di un secondo anticorpo diretto contro l'Anticorpo 1. Questo causa la formazione di un immunocomplesso insolubile (Antigene-Anticorpo 1-Anticorpo 2).

I ricercatori hanno generalmente utilizzato la pecora o le capre per la produzione del secondo anticorpo diretto contro le immunoglobuline purificate dei conigli o dei porcellini d'India. Gli antisieri di pecora o capra devono essere concentrati prima dell'uso su cromatografia o con sali precipitanti. Le diluizioni o le concentrazioni del primo anticorpo usato nel RIA sono in genere basse. Il precipitato formato col secondo anticorpo può essere così troppo piccolo per un lavoro accurato e per la separazione. Per questa ragione, vengono aggiunte alla miscela di reazione siero normale di coniglio, siero normale di porcellino d'India, o gamma globuline, alla diluizione finale da 1:50 a 1:3600, per aumentare la massa del precipitato. Il precipitato formato (in genere dopo un periodo di incubazione di 24-48 ore) può essere quindi raccolto per centrifugazione. Un'unica provetta è necessaria per l'incubazione della reazione, la separazione del precipitato, e il conteggio finale della radioattività.

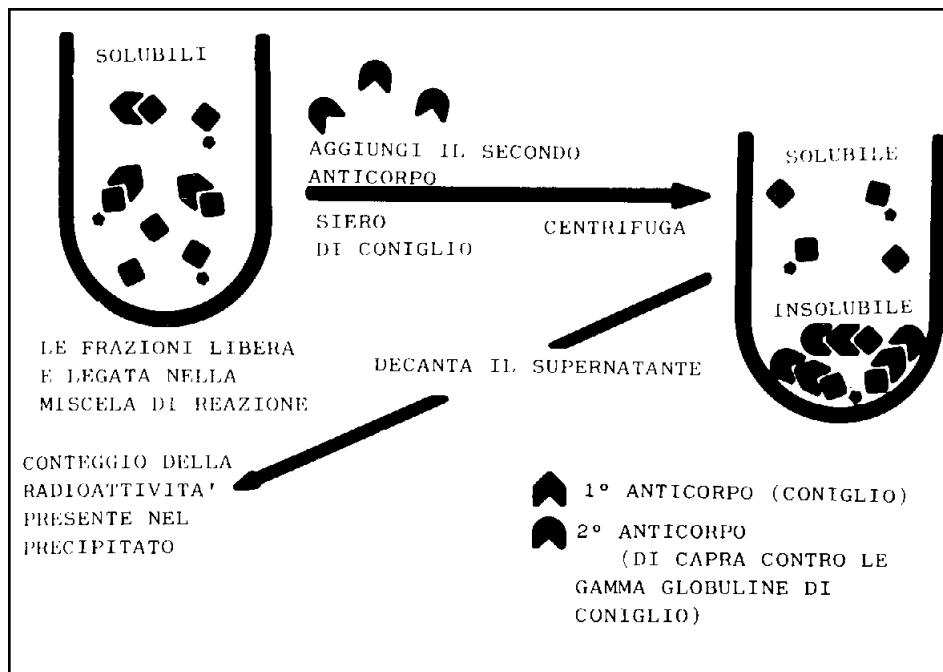


Figura 24. IMMUNOPRECIPITAZIONE DEI COMPLESSI SOLUBILI ANTIGENE-ANTICORPO: LA TECNICA DEL DOPPIO ANTICORPO

Figura 25. LA TECNICA DEL DOPPIO ANTICORPO: METODICHE DI PRE E POST-PRECIPITAZIONE

In questa figura, la fase di post-precipitazione con doppio anticorpo descritta precedentemente viene raffrontata al metodo di pre-precipitazione con doppio anticorpo. Nella tecnica di pre-precipitazione, la fase di immunoprecipitazione si verifica prima della reazione competitiva all'equilibrio. Il vantaggio di questa tecnica è che gli effetti non specifici del siero difficilmente interferiscono nella fase di immuno precipitazione con il secondo anticorpo. Tuttavia viene richiesta una quantità di anticorpo maggiore, rispetto alla tecnica di post-precipitazione, per legare la stessa quantità di antigene. La sensibilità della pre-precipitazione è inferiore rispetto a quella raggiunta con il metodo della post-precipitazione, verosimilmente questo dipende dal fatto che l'affinità del primo anticorpo viene alterata nel legare un anticorpo precipitato.

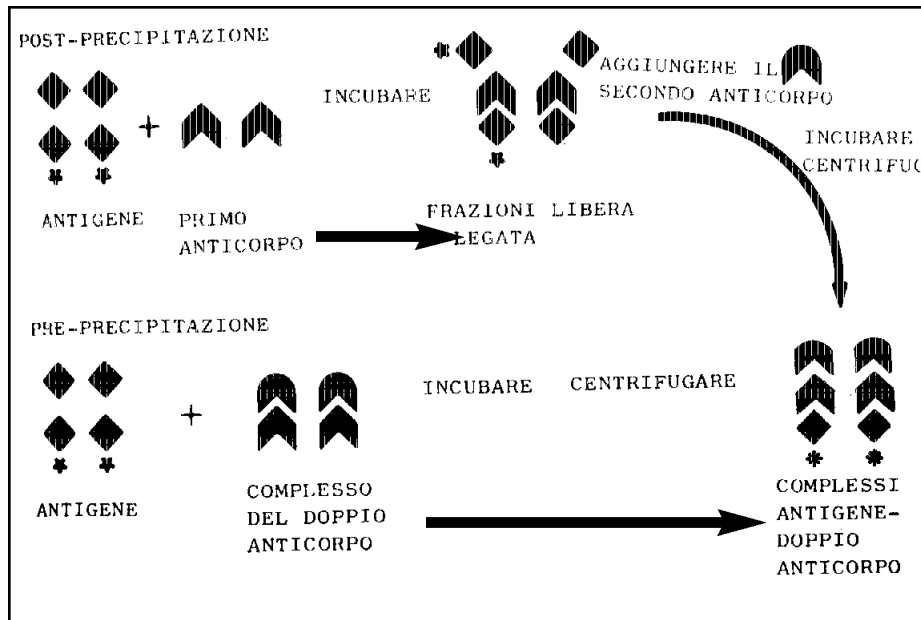


Figura 25. LA TECNICA DEL DOPPIO ANTICORPO: METODICHE DI PRE E POST-PRECIPITAZIONE

Figura 26. LA TECNICA DEL DOPPIO ANTICORPO: VANTAGGI E SVANTAGGI**VANTAGGI**

Il metodo di separazione con il doppio anticorpo, in condizioni ottimali, soddisfa la maggior parte delle esigenze per un metodo di separazione ideale elencate nella figura 18. Esso permette una separazione netta e specifica delle separazioni libera e legata, ed è facilmente applicabile a molti e differenti dosaggi radioimmunologici. Generalmente può essere utilizzato un antisiero di capra contro le gammaglobuline di coniglio in numerosi dosaggi RIA che utilizzano una immunoglobulina di coniglio come primo anticorpo. Il secondo anticorpo ha scarsi effetti sulla prima reazione antigene anticorpo, e, dopo un periodo di incubazione minimo, è relativamente indipendente dal tempo e la temperatura.

SVANTAGGI

Il metodo di separazione con il doppio anticorpo richiede l'introduzione di un altro reagente e di un altro passaggio (il pipettamento del secondo anticorpo), insieme ad una seconda reazione immunologica.

Tutti questi sono potenziali cause di errore analitico. Perizia e attenzione sono richiesti nella aspirazione o decantazione della soluzione surnatante. Il periodo di incubazione di 24-48 ore è una perdita di tempo. Questo può essere ridotto ad alcuni minuti usando una procedura di separazione come col PEG descritta nella figura 21, in combinazione con i due anticorpi (vedi la figura 27). Inoltre, alcuni campioni di siero possono interferire con la reazione del secondo anticorpo (per la cross reazione con le gammaglobuline umane). La realizzazione ottimale della tecnica di separazione del doppio anticorpo richiede l'esatta concentrazione del secondo anticorpo per indurre la massima precipitazione del complesso immune, e richiede la presenza di una pressoché costante concentrazione di siero umano in tutte le provette degli standards, controlli e campioni in esame.

VANTAGGI

- * Specifico
- * Netta separazione della frazione libera e legata
- * Facilmente applicabile a molti e differenti RIA
- * Effetti minimi sulla reazione primaria antigene-anticorpo
- * Indipendente dal tempo e dalla temperatura (dopo una minima incubazione)

SVANTAGGI

- * Richiede un altro reagente e un ulteriore passaggio
- * Viene introdotta una seconda reazione immunologica
- * Richiede tempo (si usa il PEG per accelerare)
- * Si possono incontrare gamma globuline umane che cros-reagiscono con l'anticorpo o con la reazione del secondo anticorpo (raro)

Figura 26. LA TECNICA DEL DOPPIO ANTICORPO: VANTAGGI E SVANTAGGI

Figura 27. COMBINAZIONE DI PIU' METODI DI SEPARAZIONE: LA TECNICA DEL DOPPIO ANTICORPO ASSOCIATA AL PEG

Una delle procedure più comunemente utilizzate nel processo di separazione di un dosaggio RIA è la combinazione dei due metodi precedentemente descritti: la tecnica del doppio anticorpo e la precipitazione con sali.

L'immunospecificità del metodo del doppio anticorpo viene modificata con l'aggiunta di una soluzione di PEG dal 4 al 6 per cento. Il PEG riduce la fase di precipitazione a pochi minuti, e viene aggiunto ad una bassa concentrazione sufficiente ad evitare i problemi del NSB che vengono osservati a concentrazioni di PEG più elevate.

Questa figura illustra la tecnica del doppio anticorpo e PEG utilizzato nel dosaggio radioimmunologico della fosfatasi acida prostatica (PAP).

Viene utilizzato un dosaggio RIA sequenziale (con ritardata aggiunta del tracciante) per aumentare la sensibilità. Il dosaggio RIA col doppio anticorpo della PAP necessita di tre reagenti fondamentali: la PAP radiomarcata con iodio (^{125}I -PAP), un anticorpo di coniglio diretto contro la PAP (AB-1), e un anticorpo di capra diretto contro le immunoglobuline del coniglio (AB-2). Nel nostro esempio, il PEG accelera la precipitazione del complesso del doppio anticorpo.

Le tappe basilari del dosaggio radioimmunologico della PAP sierica sono:

1: Pipettamento del siero del paziente, dello standard o controllo, e dell'AB-1.

2: Pipettamento della ^{125}I -PAP dopo appropriato periodo di incubazione.

3: Pipettamento dell'AB-2 dopo il raggiungimento dell'equilibrio. Il PEG viene quindi aggiunto per precipitare il complesso del doppio anticorpo. La centrifugazione compatta il precipitato.

4: L'ultima tappa comprende la decantazione del surnatante, il conteggio della frazione legata all'anticorpo nel precipitato, e il calcolo della concentrazione della PAP non nota riferendosi alla serie di standard a concentrazione nota. La quantità di radioattività presente nel precipitato legato all'anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione del PAP presente nel campione non noto.

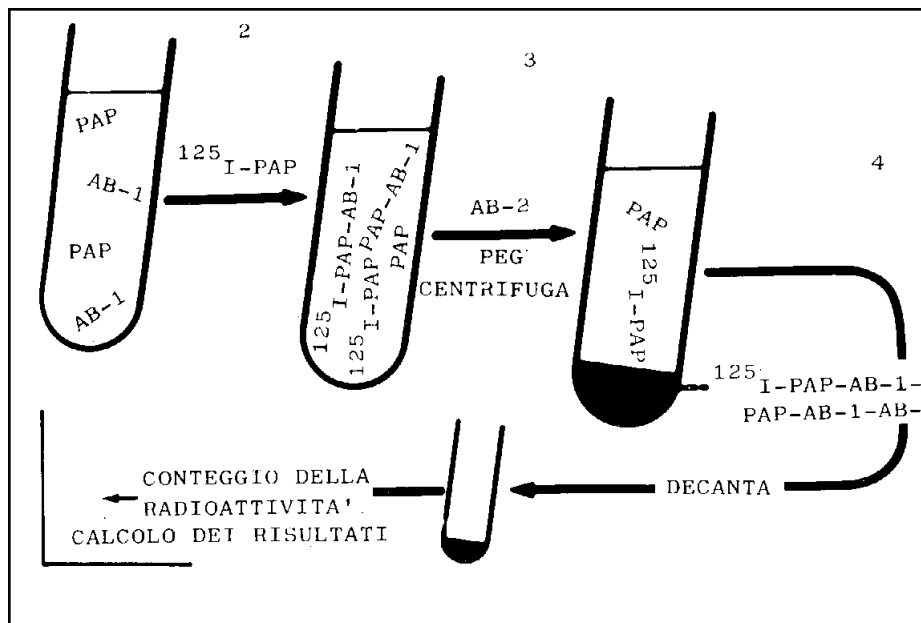


Figura 27. COMBINAZIONE DI PIU' METODI DI SEPARAZIONE: LA TECNICA DEL DOPPIO ANTICORPO ASSOCIATA AL PEG

Figura 28. ADSORBIMENTO DELL'ANTICORPO SU FASE SOLIDA: LE PROVETTE SENSIBILIZZATE CON L'ANTICORPO

Benché esistano numerosi metodi per l'adsorbimento dell'anticorpo su fase solida, come esempio principale di questa tecnica verranno utilizzate le provette sensibilizzate con l'anticorpo. In questa figura, le provette di polipropilene vengono lasciate a contatto di una appropriata diluizione dell'anticorpo principale per numerose ore, quindi lavate, e utilizzate per il RIA. Gli anticorpi aderiscono alla superficie di plastica con un legame non covalente, non specifico, idrofobico. Ovviamente, il sito di attacco dell'anticorpo con la superficie di plastica non deve interferire con la reazione principale antigene-anticorpo.

Il resto della reazione consiste nella competizione dell'antigene marcato e non marcato per i siti leganti dell'anticorpo. Dopo l'incubazione, le provette vengono semplicemente decantate (e lavate, se necessario) e viene effettuato il conteggio dell'antigene marcato legato all'anticorpo.

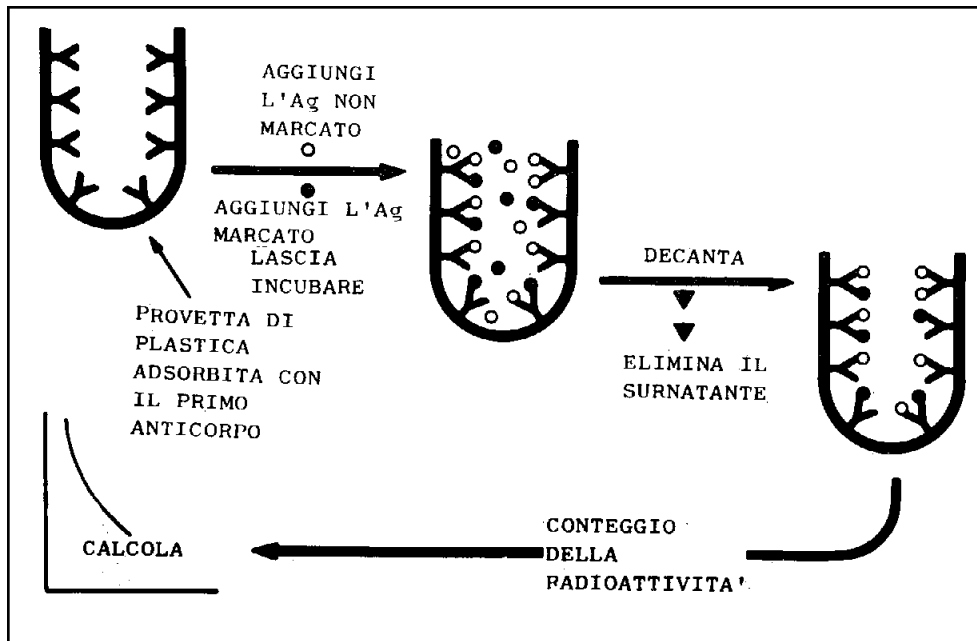


Figura 28. ADSORBIMENTO DELL'ANTICORPO SU FASE SOLIDA: LE PROVETTE SENSIBILIZZATE CON L'ANTICORPO

Figura 29. PROVETTE ADSORBITE CON L'ANTICORPO: ADSORBIMENTO DELLE PROTEINE SULLA FASE SOLIDA

L'adsorbimento passivo di proteine sulla superficie si verifica principalmente attraverso legami idrofobici. Perciò, devono essere soddisfatte le seguenti condizioni ottimali.

1. pH: Le interazioni idrofobiche sono favorite quando lo scambio netto della molecola è zero. Per le IgG, l'adsorbimento è massimo a pH da 8,5 a 10.

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

3. Temperatura: L'aumento della temperatura stimola la velocità di diffusione e perciò aumentano le probabilità che le molecole proteiche vengano in contatto con la superficie della fase solida. In pratica è sufficiente la temperatura ambientale.

4. Tempo: Se viene usata una concentrazione di proteine saturante, questo è generalmente un processo rapido. Sono sufficienti in genere due ore.

5. Concentrazione proteica: Se la proteina è una IgG, deve essere lasciato uno spazio sufficiente sulla fase solida per il successivo legame dell'antigene. Se la proteina che deve essere adsorbita è un antigene, tanto più antigene viene adsorbito alla fase solida tanto meglio è.

La conservazione delle proteine legate alla fase solida dovrebbe avvenire a 4° C, piuttosto che a temperatura ambiente.

I tubi di plastica devono inoltre essere trattati con glutaraldeide per cercare di legare l'anticorpo al tubo con un legame covalente. Benché questa procedura sia tecnicamente più difficile e non è possibile utilizzarla con tutti gli anticorpi, in alcuni casi fornisce la possibilità di un processo di adsorbimento migliore e più controllabile rispetto a quello che si ottiene con il più semplice adsorbimento non covalente.

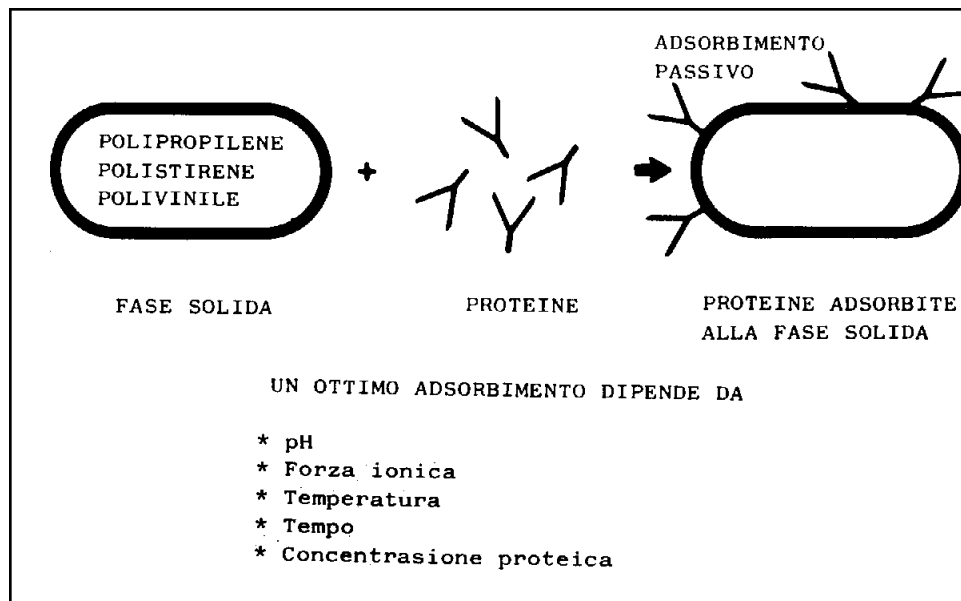


Figura 29. **PROVETTE ADSORBITE CON L'ANTICORPO: ADSORBIMENTO DELLE PROTEINE SULLA FASE SOLIDA**

Figura 30. PROVETTE ADSORBITE CON L'ANTICORPO: VANTAGGI E SVANTAGGI**VANTAGGI**

Il più importante vantaggio delle provette adsorbite con l'anticorpo è la semplicità della separazione delle frazioni libera e legata. Questa può essere ottenuta con una semplice decantazione della provetta dopo l'incubazione o, se necessario, lavando la fase solida. Viene così eliminata la centrifugazione. Tutti i componenti del dosaggio vengono messi in un'unica provetta, il legame con l'antigene è rapido e irreversibile, e comporta minimi problemi di legame non specifico.

SVANTAGGI

Molti degli svantaggi della tecnica dei tubi adsorbiti sta nella preparazione e realizzazione degli stessi tubi adsorbiti con l'anticorpo. Sono generalmente necessarie grosse quantità di anticorpo per il processo di adsorbimento, e la preparazione dei tubi è complessa. La quantità di anticorpo che può essere adsorbita è anche soggetta a limiti fisici.

Questo metodo, finora non è stato ben adattato a grossi ormoni polipeptidici (sono necessarie in genere più elevate concentrazioni di antisiero), e le velocità di reazione (cinetiche) sono più lente. La diminuita velocità di reazione (cinetiche) sono più lente. La diminuita velocità di reazione può essere spiegata dalle cinetiche della soluzione, nel senso che solo un reagente (l'antigene) è libero in soluzione e l'altro reagente (l'anticorpo) è fisso. L'antigene deve spostarsi sulla parete della provetta per poter reagire con l'anticorpo.

<p>VANTAGGI</p> <ul style="list-style-type: none">* Separazione della frazione libera e legata semplice* Tutti i componenti del dosaggio in un'unica provetta* Il legame dell'antigene è rapido e irreversibile* minimi problemi di conte specifiche* Viene eliminata la centrifugazione <p>SVANTAGGI</p> <ul style="list-style-type: none">* Sono necessarie maggiori quantità di anticorpo nel processo di adsorbimento* La preparazione delle provette adsorbite è complessa* La quantità di anticorpo che può essere adsorbita ha un limite fisico* Il metodo non è stato ben adattato per gli ormoni polipeptidici* Cinetiche più lente rispetto a quelle in fase liquida
--

Figura 30. **PROVETTE ADSORBITE CON L'ANTICORPO: VANTAGGI E SVANTAGGI**

**Figura 31. ADSORBIMENTO DELL'ANTICORPO SU FASE SOLIDA:
ALTRI METODI**

Sono disponibili, oltre le provette sensibilizzate con l'anticorpo, numerosi altri materiali solidi per legare l'anticorpo.

E' possibile preparare particelle (come i polimeri di polisaccaridi e grani (Sephadex e Sepharosio), dischi di carta, di vetro, e cellulosa attivata dal trattamento con bromuro di cianogeno che reagiscono con gruppi aminoacidi di antisieri specifici. Con queste procedure è spesso necessaria la centrifugazione. La tecnica del doppio anticorpo in fase solida (DASP) sfrutta il legame del secondo anticorpo con la particella attivata. Come nelle tecniche in fase liquida, il secondo anticorpo in fase solida viene aggiunto al fine di legare e precipitare gli immunocomplessi che si sono formati dopo la reazione tra l'antigene e il primo anticorpo. Il secondo anticorpo immuno-adsorbente viene aggiunto in eccesso rispetto al primo anticorpo.

Una tecnica recente che utilizza particelle magnetizzabili di ossido di ferro/cellulosa consta di un anticorpo attaccato ad una matrice di cellulosa contenente Fe_3O_4 . Con l'applicazione di un campo magnetico viene realizzata una rapida separazione delle frazioni libera e legata.

Vengono anche utilizzati numerosi sistemi di sfere e grani sensibilizzati con anticorpo, simile al sistema delle provette adsorbite con l'anticorpo. Questi dosaggi in genere comprendono una fase di lavaggio o aspirazione per separare l'antigene libero da quello legato. Vengono anche utilizzate provette adsorbite col doppio anticorpo nelle quali il primo anticorpo viene attaccato al secondo anticorpo (precedentemente adsorbito alla parete della provetta). Il numero dei siti combinati disponibili per l'antigene viene incrementato con l'uso di questa tecnica.

Figura 32. Adsorbimento non specifico dell'antigene: il carbone.

- * *PARTICELLE ATTIVATE*
(Sephadex, Sepharosio, dischi di carta, cellulosa, vetro).
(Doppio anticorpo in fase solida-DASP-)
- * *PARTICELLE MAGNETIZZABILI DI OSSIDO DI FERRO/CELLULOSA*
- * *GRANI E SFERE SENSIBILIZZATI*
- * *PROVETTE ADSORBITE CON IL DOPPIO ANTICORPO*

**Figura 31. ADSORBIMENTO DELL'ANTICORPO SU FASE SOLIDA:
ALTRI METODI**

Figura 32. ADSORBIMENTO NON SPECIFICO DELL'ANTIGENE: IL CARBONE

Il carbone, e in particolare il carbone attivato-destrano (DCC), è un diffuso metodo di separazione dell'antigene libero e legato con l'adsorbimento della frazione libera. Questo metodo può essere utilizzato dove esistano grosse differenze dimensione/carica tra le frazioni libera e legata. Il carbone ha una superficie irregolare che adsorbe le molecole cariche, e le dimensioni dell'area disponibile del carbone per una data proteina varia in relazione alla dimensione, la forma, e la carica della proteina. Perciò se le differenze dimensioni/carica tra la frazione legata all'anticorpo e quella libera sono grosse, il carbone può essere usato con successo, ad esempio i complessi digossina-anticorpo rispetto alla digossina non legata o i complessi estradiolo-anticorpo rispetto all'estradiolo non legato. Tuttavia non è utile per le grosse molecole proteiche come i complessi virus-anticorpo rispetto ai virus. Questa figura illustra l'adsorbimento da parte del carbone della frazione libera di una reazione. La centrifugazione permette la precipitazione al fondo della provetta. Il surnatante (contenente la frazione legata) può essere quindi decantato e contato.

Le proteine, il talco, la silice, l'idrossiapatite, e il florisil sono adsorbenti simili che non saranno discussi in questo corso. Anche i sistemi a scambio ionico che utilizzano le resine sono adsorbenti. Le resine possono essere attivate su carta e possono quindi adsorbire la frazione libera quando vengono messe in una miscela di reazione.

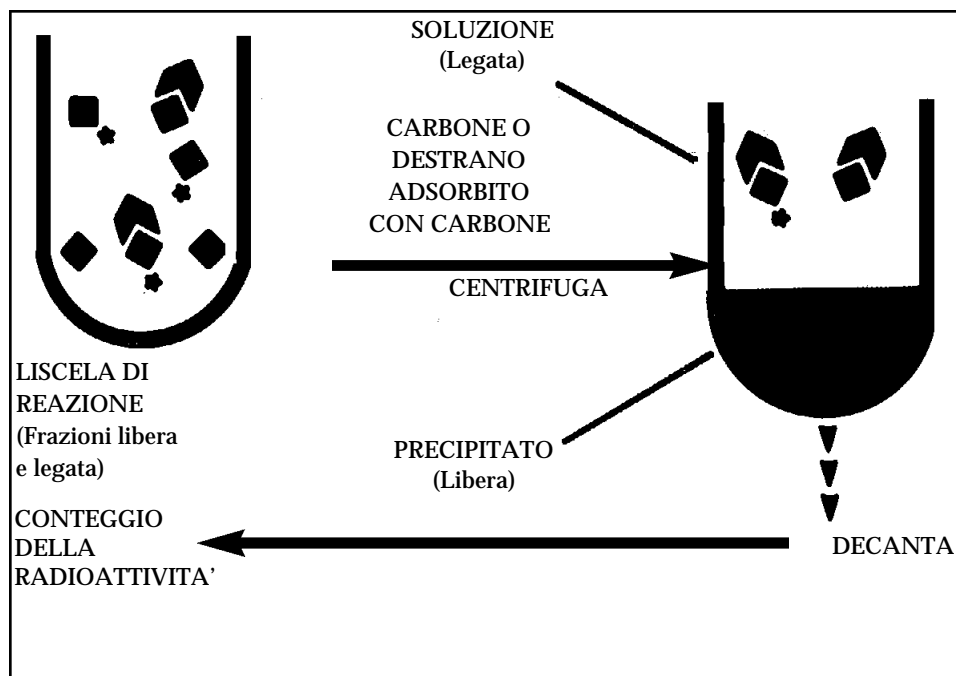


Figura 32. ADSORBIMENTO NON SPECIFICO DELL'ANTIGENE: IL CARBONE

Figura 33. VALUTAZIONE DEL CARBONE COME METODO DI SEPARAZIONE

In questa figura, vengono aggiunte crescenti quantità di carbone alla reazione per un'ipotetica sostanza "X". In assenza di anticorpo diretto contro la sostanza "X", tutta la frazione libera viene precipitata quando la quantità di carbone aggiunta rappresenta l'1.0% o più. In ogni caso si può notare che a concentrazioni di carbone più elevate si verifica il "distacco" dall'anticorpo della sostanza legata "X" (aumento dei CPM nella frazione libera).

La concentrazione di carbone da utilizzare in questo dosaggio è rappresentata dal punto dove viene osservata la differenza massima nella precipitazione della frazione libera rispetto al quella legata.

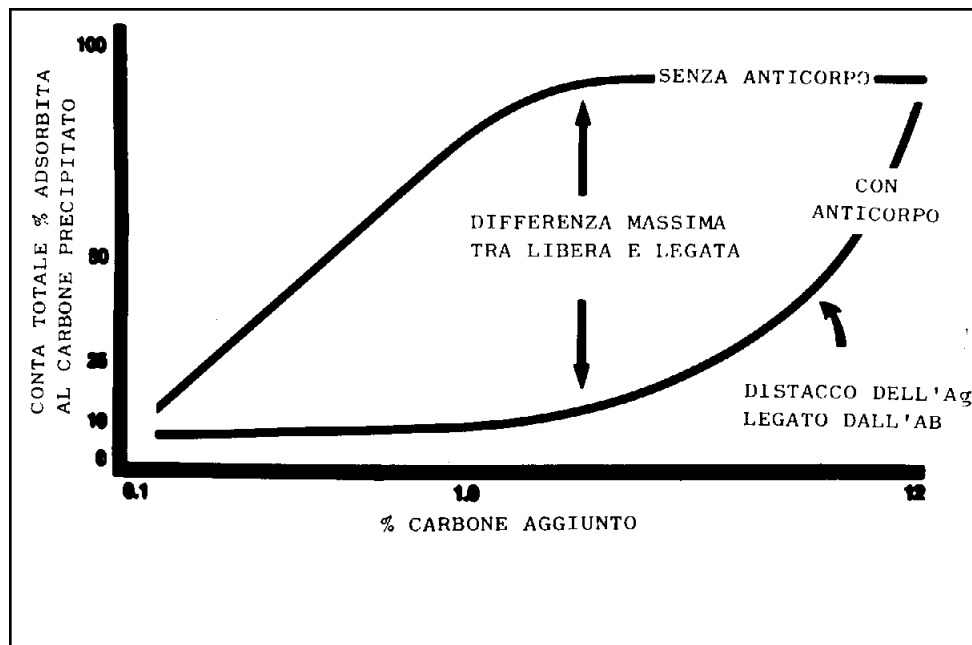


Figura 33. VALUTAZIONE DEL CARBONE COME METODO DI SEPARAZIONE

Figura 34. CARBONE E CARBONE-DESTRANO: VANTAGGI E SVANTAGGI

VANTAGGI

La tecnica di separazione con il carbone è riproducibile, rapida, richiede un unico passaggio, è poco costosa, e sono disponibili numerosi adsorbenti. Il suo più importante uso nel RIA è stato nel dosaggio delle molecole più piccole o di apteni (farmaci, steroidi, e vitamine).

SVANTAGGI

La tecnica di separazione con il carbone può essere influenzata significativamente dal variare delle concentrazioni proteiche. Perciò, è estremamente importante che gli standards, i controlli, e i campioni abbiano una concentrazione proteica simile. Inoltre, alcuni degli antigeni legati possono essere "staccati" dagli anticorpi, alterando il rapporto dell'antigene libero e legato. Questo fenomeno è più evidente con anticorpi che hanno un'affinità inferiore.

La fase di incubazione con il carbone richiede un rispetto preciso dei tempi per tutti i campioni, può richiedere una temperatura di 4° C, e può essere influenzata dal pH e dalla forza ionica.

Nonostante i numerosi svantaggi che si incontrano con l'uso del carbone come mezzo di separazione, questo è tuttavia estremamente efficace per alcuni ben individuati dosaggi.

<p>VANTAGGI</p> <ul style="list-style-type: none">* Riproducibile* Rapido* Semplice* Economico* Disponibili molti adsorbenti <p>SVANTAGGI</p> <ul style="list-style-type: none">* Sensibile e differenti concentrazioni proteiche* Disturba i complessi antigene-anticorpi (separandoli)* Sensibile all'affinità dell'anticorpo*Necessità di un rigoroso rispetto dei tempi* Può essere sensibile alla temperatura* Dipende dal pH e dalla forza ionica
--

Figura 34. **CARBONE E CARBONE-DESTRANO: VANTAGGI E SVANTAGGI**

Figura 35. PROTEINA A

La Proteina A è un costituente della parete cellulare del batterio *Staphylococcus aureus*, che è stato dimostrato lega il frammento Fc (frammenti cristallizzabili) della maggior parte delle immunoglobuline G (IgG) dei mammiferi. Essa lega le IgG in un sito lontano da quello che lega l'antigene, e non influenza la reazione immune. La Proteina A è un metodo sensibile come il doppio anticorpo per numerosi dosaggi RIA.

Come è possibile vedere in questa figura, la Proteina A agisce come secondo anticorpo (come quello mostrato nella figura 24). Le preparazioni di *Stafilococcus aureus* uccisi sono generalmente conservate in una soluzione salina con tampone di fosfati a una concentrazione del 10% (W/V). Gli stafilococchi vengono diluiti 1 a 10 con il tampone fornito, e in ciascuna provetta vengono aggiunti circa 100 microlitri.

Non è necessario alcun periodo di incubazione, e la provetta può essere subito passata al vortex e centrifugata. Il surnatante viene eliminato, e la frazione legata può essere contata.

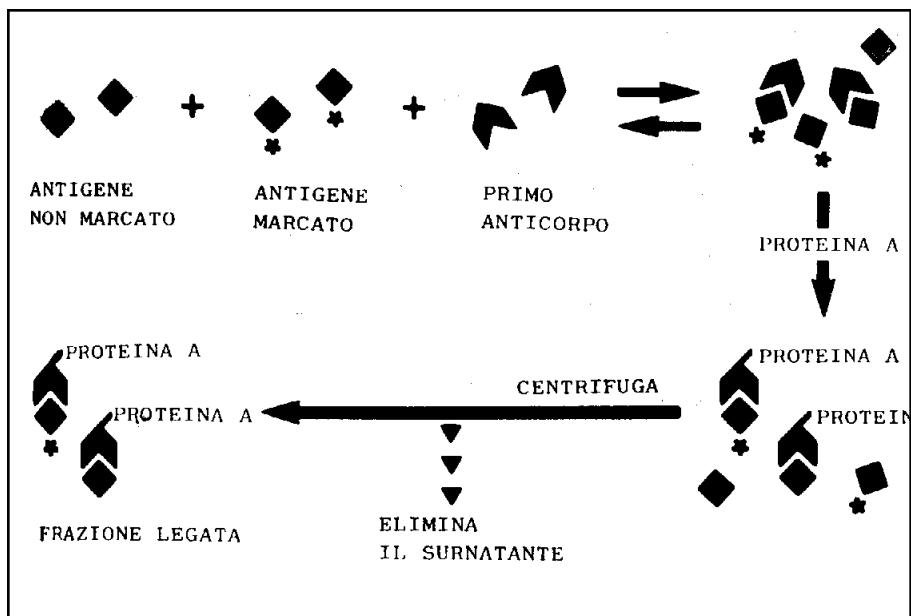


Figura 35. **PROTEINA A**

Bibliografia

1. Yalow, R.S., and Berson, S.A., Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods, *Nature*, 184, 1648 (1959).
2. Wide, L., Use of particulate immunosorbants in RIA, *Methods in Enzymology*, 73, 203 (1981).
3. Ying, S.Y., RIA of peptide hormones using killed *Staphylococcus aureus* as a separating agent, *Methods in Enzymology*, 73, 245 (1981).
4. Nye, L., Forrest, G.C., Greenwood, H., et al, Solid phase magnetic particle RIA, *Clin. Chim. Acta*, 69, 387 (1976).
5. Ratliffe, J.G., Separation techniques in saturation analysis, *Br. Med. Bull.*, 30, 32 (1974).
6. Leiva, B., Separation technique as a guide in helping select an RIA kit, *Am. J. Med. Tech.*, 43, 41 (1976).
7. Parker, C.W., Radioimmunoassay, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21, 113 (1981).
8. Binoux, M.A., and Odell, W.D., Use of Dextran-coated charcoal to separate antibodybound from free hormone: A critique, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 36, 303 (1976).
9. Lim, F., and Buehler, R.J., Microencapsulation of antibody for use in RIA, *Methods in Enzymology*, 73, 254 (1981).
10. Chard, T., Ammonium sulfate and polyethylene glycol as reagents to separate antigen from antigen-antibody complexes, *Methods in Enzymology*, 70, 280.
11. Yalow, R.S., Radioimmunoassay: A probe for the fine structure of biological systems, *J. Amer. Med. Women's Assoc.*, 33, 244 (1978).

Indice

Figura 1.	Il dosaggio immunologico (RIA)	pag.
Figura 2.	L'era pre-radiomunologica	»
Figura 3.	Componenti base del RIA	»
Figura 4.	Formazione di anticorpi policlonali	»
Figura 5.	Principali isotopi utilizzati nel RIA	»
Figura 6.	Preparazione degli antigeni radiomarcanti	»
Figura 7.	Relazione struttura/funzione dell'anticorpo	»
Figura 8.	Legame antigene-anticorpo	»
Figura 9.	Principi del RIA: schema generale	»
Figura 10.	Preparazione della curva di taratura: standard con bassa concentrazione	»
Figura 11.	Preparazione della curva di taratura: standard con media concentrazione	»
Figura 12.	Preparazione della curva di taratura: standard con alta concentrazione	»
Figura 13.	Calcolo della concentrazione dei campioni in esame	»
Figura 14.	Conte aspecifiche o "bianco" (NSB)	»
Figura 15.	Capacità legante massima (Bo) I	»
Figura 16.	Capacità legante massima (Bo) II	»
Figura 17.	Differenti tipi di RIA	»
Figura 18.	Metodo di separazione ideale	»
Figura 19.	I più importanti metodi di separazione	»

Figura 20. Filtrazione su gel	»
Figura 21. Precipitazione non specifica dei complessi antigene-anticorpo con l'uso di sali e solventi	»
Figura 22. Precipitazione non specifica dei complessi antigene-anticorpo: determinazione della concentrazione ottimale del solvente	»
Figura 23. Precipitazione non specifica dei complessi antigene-anticorpo con l'uso di sali e solventi: vantaggi e svantaggi ...	»
Figura 24. Immunoprecipitazione dei complessi solubili antigene-anticorpo: la tecnica del doppio anticorpo	»
Figura 25. La tecnica del doppio anticorpo: metodiche di pre- e post-precipitazione	»
Figura 26. La tecnica del doppio anticorpo: svantaggi e vantaggi	»
Figura 27. Combinazione di più metodi di separazione: la tecnica del doppio anticorpo associata al PEG	»
Figura 28. Adsorbimento dell'anticorpo su fase solida: le provette sensibilizzate con l'anticorpo	»
Figura 29. Provette adsorbite con l'anticorpo: adsorbimento delle proteine in fase solida	»
Figura 30. Provette adsorbite con l'anticorpo: vantaggi e svantaggi	»
Figura 31. Adsorbimento dell'anticorpo su fase solida: altri metodi	»
Figura 32. Adsorbimento non specifico dell'antigene: il carbone	»
Figura 33. Valutazione del carbone come metodo di separazione	»
Figura 34. Carbone e carbone attivato-destrano: vantaggi e svantaggi	»
Figura 35. Proteina A	»
Bibliografia	»
Indice	»

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.**

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 2, numero 9

Direttore Responsabile

Sergio Rasso
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0338 2202502
E-mail: rasso@ssnet.it

Responsabile Ufficio Acquisti

Giusi Cunietti

EDITORE

Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Letizia Cuccuru

Servizio Abbonamenti

Maria Grazia Papalia
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://medicalsistemas.editoria.com> e <http://www.medicalsistemas.it>

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay,
Guida Pratica Immulite[®], Kaleidoscopio, 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 Genova n. 34 del 31/7/1996

Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Dicembre 1984

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