

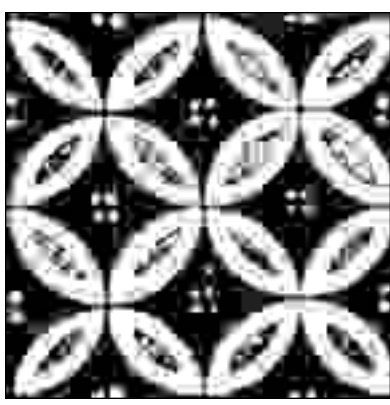
Sped. in A. P. 45% - art.2 comma 20/b legge 662/96 - n° 11 - Febbraio 1988 - Direttore responsabile: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Tipolitografia Nuova ATA Genova

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

ISSN 0394 3291

Caleidoscopio

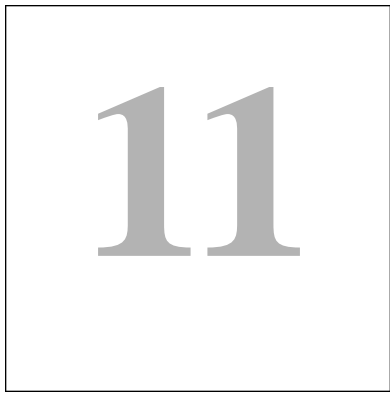
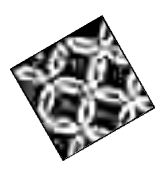
Italiano



Norman P. Kubasik

Il dosaggio radioimmunologico (2)

Parte seconda



Direttore Responsabile
Sergio Rassu

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1988

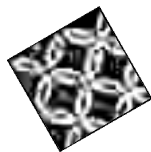
Caleidoscopio

Italiano



Norman P. Kubasik

The genesee Hospital Rochester (USA)



Il dosaggio radioimmunologico (2)

Parte seconda



Direttore Responsabile
Sergio Rassu



Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1988

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 Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Caleidoscopio

Italiano

Editoriale

La seconda parte di questo secondo volume affronterà i problemi legati alla preparazione degli anticorpi policlonali e monoclonali usati nel dosaggio radioimmunologico. Esistono in totale cinque importanti classi di immunoglobuline prodotte dal sistema immune dei mammiferi, le immunoglobuline G, A, M, D, E (IgG, IgA, IgM, IgD, e IgE). Le più comuni immunoglobuline incontrate nei dosaggi RIA sono le IgG.

Figura 25. L'ANTIGENE.

Col termine di "antigene" viene definita "ogni sostanza capace di provocare una risposta immune" (la produzione di anticorpi). Col termine di "immunogeno" viene definita in maniera simile "ogni sostanza capace di indurre una risposta immune". È stato suggerito da alcuni di sostituire il termine "antigene" con quello di "immunogeno". Il termine "antigene" potrebbe quindi essere utilizzato per definire una sostanza capace di combinarsi con un anticorpo.

Gli apteni sono sostanze (generalmente di basso peso molecolare) che, quando inoculate in un ospite, non inducono la formazione di anticorpi. Tuttavia l'aptene può essere reso antigenico se accoppiato ad una voluminosa sostanza estranea (per esempio proteina o polipetide) per formare un antigene. Un determinante antigenico è una regione attiva ed esposta della molecola antigenica con la quale si combina l'anticorpo.

Il termine "apteni" ed "epitopi" possono essere usati per i determinanti antigenici.

ANTIGENE	Una sostanza capace di stimolare la produzione di anticorpi.
IMMUNOGENO	Una sostanza capace di indurre una risposta immune.
APTENE	Una sostanza di basso peso molecolare che non induce la formazione di anticorpi; viene usata anche per descrivere un determinante antigenico.
DETERMINANTE ANTIGENICO	Area esposta attiva dell'antigene con la quale si combina l'anticorpo: conosciuto anche come aptene o epitopo.

Figura 25 L'ANTIGENE

Figura 26. L'ANTICORPO: DEFINIZIONI E FUNZIONI.

Gli anticorpi sono proteine sieriche e sono prodotti dalle cellule della serie linfoide. Essi appartengono alla famiglia delle immunoglobuline. Gli anticorpi hanno la capacità di reagire con la configurazione antigenica responsabile della loro produzione.

Gli anticorpi combattono le sostanze estranee con:

1. La neutralizzazione - Gli anticorpi bloccano efficacemente le sostanze estranee, impedendo la loro azione dannosa. La sostanza neutralizzata, insieme con l'anticorpo, viene quindi fagocitata e distrutta dai fagociti.
2. La formazione di complessi antigene-anticorpo. I complessi causano la precipitazione e la rimozione dell'antigene dal circolo.
3. L'agglutinazione - Gli anticorpi si attaccano direttamente alla superficie del batterio, collegando numerosi batteri tra loro e formando degli aggregati batterici relativamente grandi e non invasivi.
4. La batteriolisi - Gli anticorpi, insieme con il complemento, distruggono la parete cellulare batterica, eliminandola.
5. L'opsonizzazione - Gli anticorpi e il complemento aumentano la suscettibilità batterica alla fagocitosi.

ANTICORPO:

Una proteina sierica prodotta dalla serie linfoide che appartiene alla famiglia delle immunoglobuline. Esso ha la capacità di reagire con la configurazione antigenica responsabile della sua produzione.

LE PIU' IMPORTANTI FUNZIONI DELL'ANTICORPO

SONO:

- Neutralizzazione
- Formazione di complessi antigene-anticorpo
- Agglutinazione
- Batteriolisi
- Opsonizzazione

Figura 26 L'ANTICORPO: DEFINIZIONI E FUNZIONI

Figura 27. STRUTTURA DELLE IMMUNOGLOBULINE.

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 molecola è formata da due catene pesanti identiche e da due identiche catene leggere legate insieme da ponti disolfuro. Il numero e l'esatta posizione dei ponti disolfuro differisce e caratterizzano ciascuna sottoclasse delle Ig.

Ciascuna catena leggera e pesante ha due differenti regioni funzionali. La porzione amino (N) terminale delle catene leggera e pesante viene definita regione variabile. La sequenza aminoacida differisce da anticorpo ad anticorpo, ed è responsabile della differenza dei siti combinanti che legano specificamente antigeni differenti.

La regione costante carbossi (C) terminale delle catene leggere e pesanti ha la stessa sequenza aminoacida per tutte le immunoglobuline di una sottoclasse ed è responsabile di altre e differenti funzioni.

Ciascuna molecola delle IgG è capace di legare due molecole di antigene.

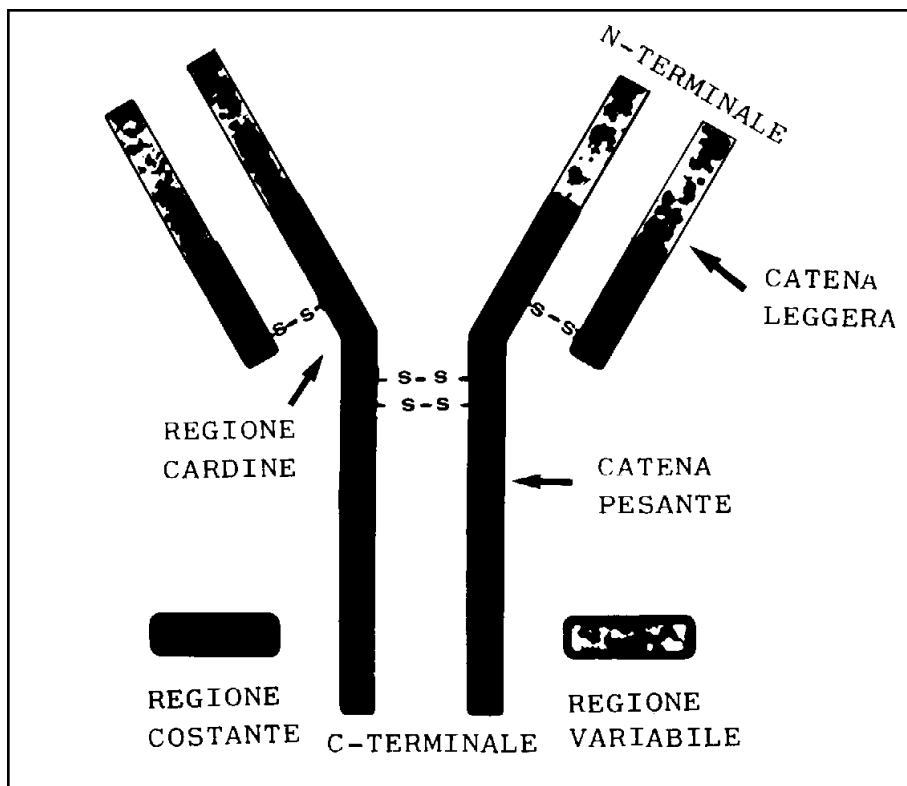


Figura 27 STRUTTURA DELLE IMMUNOGLOBULINE

Figura 28. RELAZIONI STRUTTURA/FUNZIONI DELL'ANTICORPO

Come mostrato nella figura 27 (Struttura delle immunoglobuline), la regione variabile della molecola delle immunoglobuline, contiene la sequenza aminoacida eterogenea, così come i residui che prendono contatto con l'antigene. L'eterogeneità aminoacidica della regione variabile rende possibile la produzione di un grosso numero di strutture tridimensionali complementari per forma all'enorme numero di antigeni estranei. È stato calcolato che i vertebrati hanno la capacità, geneticamente determinata di produrre circa 100.000.000 differenti anticorpi (siti leganti l'antigene).

La regione costante delle immunoglobuline è responsabile della distruzione degli antigeni estranei attraverso la fissazione del complemento, il legame dei macrofagi, e l'aggregazione e precipitazione dell'antigene.

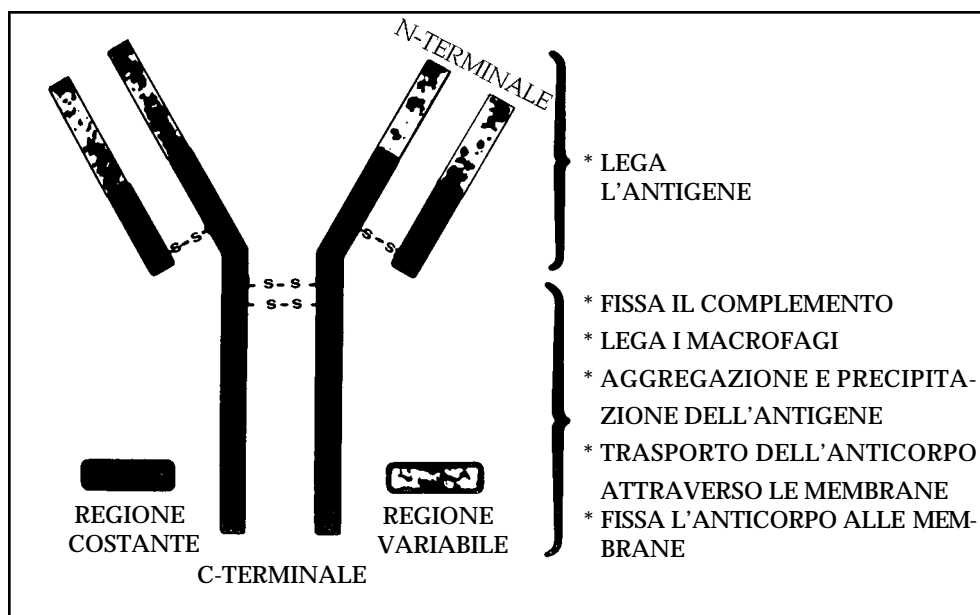


Figura 28 RELAZIONI STRUTTURA/FUNZIONI DELL'ANTICORPO

Figura 29. REAZIONI ANTIGENE-ANTICORPO.

Le forze che tengono legate insieme antigeni e anticorpi sono rappresentate tutte da legami non covalenti. Si possono individuare quattro fondamentali tipi di legami o forze presenti:

1. Legami di idrogeno-rappresentati dalla attrazione di atomi estremamente elettronegativi.
2. Legami idrofobici-rappresentati dalla aggregazione di gruppi non polari che allontanano le molecole di acqua.
3. Forze di Coulomb-rappresentate dalla attrazione ionica di due gruppi con carica opposta.
4. Le forze di Van der Waal-attrazioni molto deboli che si verificano quando due molecole si avvicinano l'una all'altra.

I fattori che influenzano la forza dei legami non covalenti comprendono il pH la molarità e la forza ionica del tampone, la temperatura e la lunghezza di incubazione della reazione.

Formazione di legame non covalente

- 1 Legami di idrogeno
- 2 Legami idrofobici
- 3 Forze di Coulomb
4. Forze di Van Der Wall

Dipendente dal pH, molarità e forza ionica del tampone, temperatura e tempi della reazione di incubazione.

Figura 29 REAZIONI ANTIGENE-ANTICORPO

Figura 30. IL SISTEMA IMMUNE E LA PRODUZIONE ANTICORPALE.

La popolazione linfocitaria dà origine nell'uomo ai due principali sistemi immunitari: cellulare e umorale. I linfociti originano da una cellula staminale nel midollo osseo.

I linfociti possono essere morfologicamente e immunologicamente suddivisi in linfociti-B (cellule-B, indipendenti dal timo) o linfociti-T (cellule-T, timo dipendenti). Quando un antigene entra all'interno del corpo, incontra un macrofago, viene "processato", e quindi trasportato attraverso i vasi linfatici sino al linfonodo più vicino. Qui l'antigene "processato" dal macrofago interagisce con i:

LINFOCITI-T. I linfociti-T si differenziano in cellule memoria e cellule che controllano il susseguente riconoscimento dell'antigene e l'ipersensibilità ritardata. Essi sono responsabili della immunità cellulare. La produzione di anticorpi, benché funzione delle cellule-B, è sotto il controllo regolatorio delle cellule-T (helpers e soppressori). Le cellule-T a lunga vita formano l'area corticale dei linfonodi e alcune aree periferiche del sistema linfoide. Alcune popolazioni delle cellule-T migrano nell'area di infiammazione, mentre altre costituiscono le cellule della memoria. Le cellule-T costituiscono circa il 65-75% della popolazione linfocitaria.

LINFOCITI-B. I linfociti-E si trovano principalmente in circolo nel sangue e nei linfonodi, e costituiscono circa il 35% dei linfociti trovati nel sangue periferico. In presenza di un antigene "processato" dai macrofagi, le cellule-E si differenziano e proliferano in doni di plasmacellule che producono anticorpi diretti contro l'antigene specifico. Esso può contenere molti determinanti antigenici in relazione alla complessità molecolare dell'antigene. Questi determinanti antigenici stimolano quindi la replicazione delle cellule-E e la loro differenziazione in doni di plasmacellule secernenti anticorpi. I singoli determinanti antigenici stimoleranno anticorpi che variano in specificità e affinità.

Una singola plasmacellula è capace di secernere una singola classe di immunoglobuline.

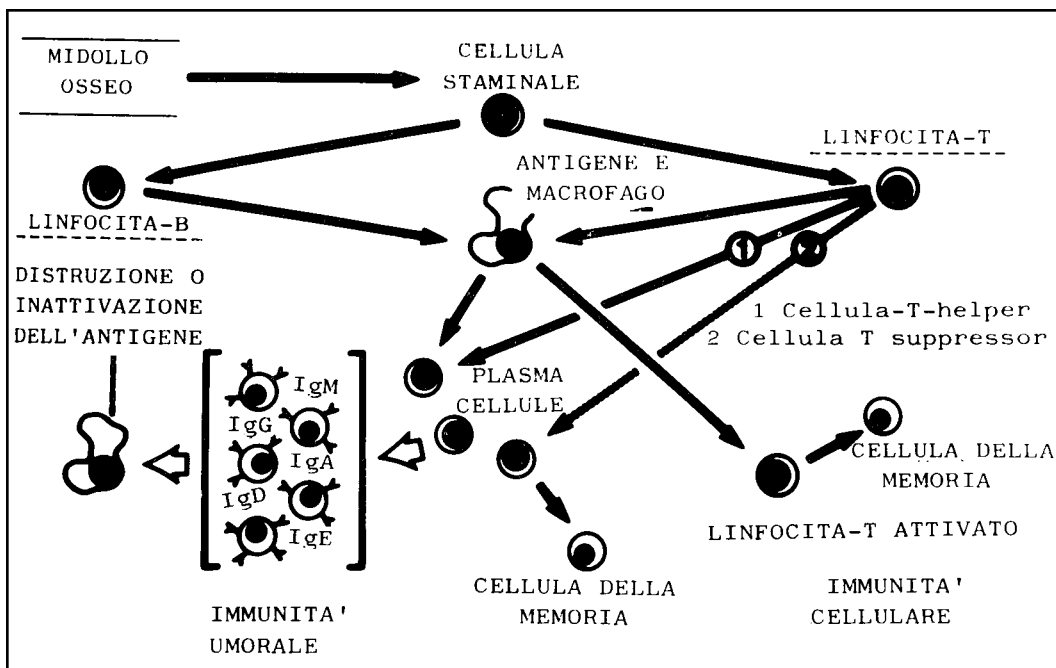


Figura 30 IL SISTEMA IMMUNE E LA PRODUZIONE ANTICORPALE

Figura 31. LA RISPOSTA ANTICORPALE CONVENZIONALE POLICLONALE.

La frazione delle immunoglobuline di un convenzionale antisiero policlonale è eterogenea. Le plasma cellule producono varie classi di anticorpi che si legano a specifiche strutture (determinanti antigenici o epitopi) sulla superficie dell'antigene. Una singola molecola di anticorpo o un singolo clone plasmacellulare è specifico per un unico tipo di determinante antigenico. Ma possono esistere molti determinanti su un singolo voluminoso antigene, che stimolano la sintesi di molte e differenti popolazioni di anticorpi.

Questa eterogenea risposta policlonale è molto importante in vivo per proteggere l'individuo contro gli agenti patogeni. Tuttavia per alcune applicazioni *in vitro*, l'isolamento del desiderato antigene specifico da una miscela policlonale può dimostrarsi un difficile processo. L'isolamento è generalmente ottenuto con l'uso della cromatografia per affinità o di assorbimento.

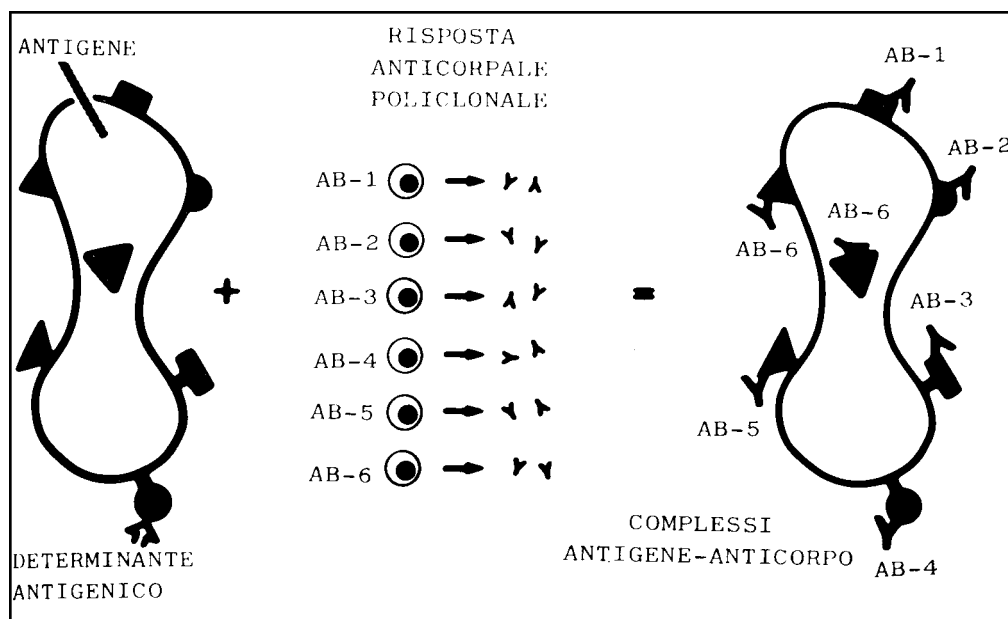


Figura 31 LA RISPOSTA ANTICORPALE CONVENZIONALE POLICLONALE

Figura 32. GLI ANTIGENI COME IMMUNOGENI.

In termini generali, la immunogenicità, di una molecola dipende da due requisiti:

1. LA DIMENSIONE: Le piccole molecole con un peso molecolare inferiore a 5.000 generalmente non possono indurre la produzione di anticorpi negli animali da esperimento, a meno che non vengano attaccate (coniugate), prima della immunizzazione, con legame covalente a grosse molecole immunogeniche o proteine. Benché il peso molecolare non sia l'unico fattore determinante l'antigenicità, esiste in genere una relazione inversa tra le dimensioni molecolari e la capacità di una sostanza di stimolare la produzione di anticorpi. E' ben noto, inoltre, che la coniugazione di piccole molecole con grosse proteine aumenta l'antigenicità delle specie più piccole.

2. DIFFERENZE NELLA STRUTTURA MOLECOLARE: L'antigene immunizzante deve essere "estraneo per l'individuo" o differente nella struttura molecolare rispetto alle molecole presenti per natura nell'animale in cui viene inoculato.

Perciò, grosse molecole proteiche possono essere inoculate direttamente negli animali ospiti per la produzione di anticorpi. Piccoli apteni (farmaci o steroidi) necessitano, prima della immunizzazione, della coniugazione con grosse proteine estranee.

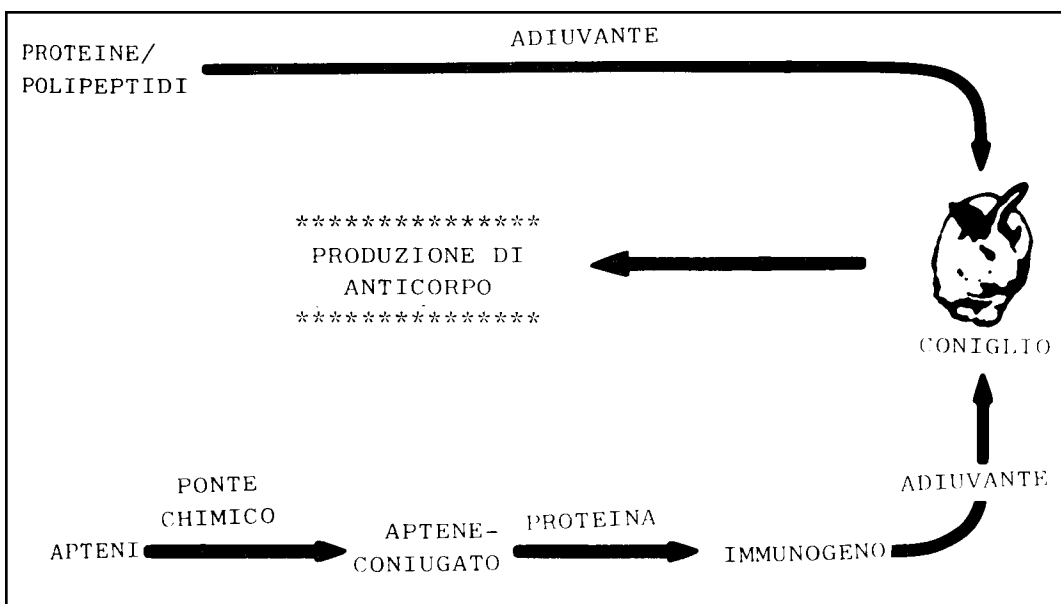


Figura 32 GLI ANTIGENI COME IMMUNOGENI

Figura 33 e 34. DERIVATI APTENE-PONTE.

Peptidi di piccolo peso molecolare, steroidi, farmaci, iodotironine, e altri apteni sono generalmente abbastanza immunogenici nel coniglio dopo la coniugazione con grosse proteine immunogeniche come l'albumina sierica bovina (ESA) o la tireglobulina bovina.

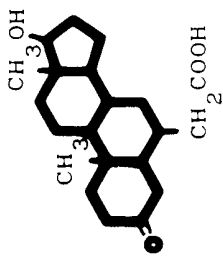
La SA viene comunemente utilizzata perché contiene molte unità di lisina per la coniugazione, poiché la struttura è conosciuta in sufficiente dettaglio, è disponibile in commercio in una forma accettabilmente pura ed è un buon antigene. Eenché siano descritti in letteratura numerosi metodi di coniugazione aptene-BSA, solo due comuni metodi verranno discussi in questo volume.

Poiché la maggior parte degli apteni non posseggono gruppi funzionali che permettano il legame diretto alla ESA, bisogna prima ottenere un derivato dell'aptene, che contenga un acido carbossilico. Questo derivato può essere quindi utilizzato per formare un legame peptidico covalente con l'epsilon amino gruppo della lisina della BSA.

Queste figure dimostrano che esistono una grossa varietà di derivati ("ponti") disponibili per gli steroidi. La scelta del ponte dipende dal sito di attacco, la lunghezza del ponte, l'orientamento del nucleo dello steroide, e l'immunogenicità desiderata del complesso steroide-ponteproteina.

Inoltre, con la scelta accorta del sito di attacco dell'aptene-ponte alla proteina di trasporto, è possibile ottenere la formazione di anticorpi con una aumentata specificità verso parti selezionate della molecola dello steroide. L'accoppiamento dell'aptene attraverso una posizione lontana dai gruppi funzionali responsabili della sua specificità ormonale risparmia questi come determinanti antigenici.

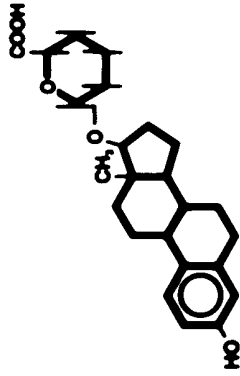
Figura 33



Estrone 3-solfato

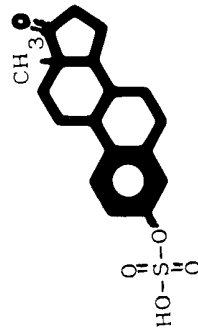
CARBOSSI METIL
STEROIDI

6-β Carbossimetil
testosterone



Estradiolo-17β glucuronide

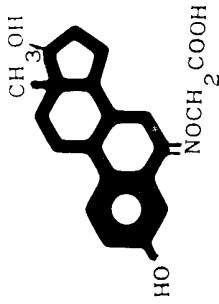
GLUCURONIDE



SOLFATI

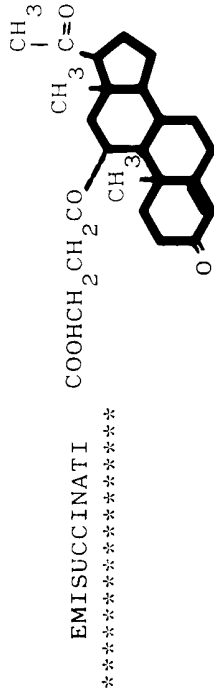
DERIVATI APTENE-PONTE

Figura 34



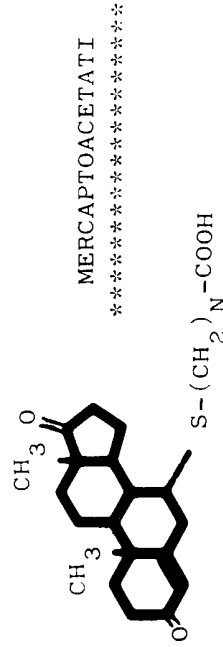
Estradiolo-6-O(carbossimetil)ossime

O-CARBOSSIMETIL
OSSIMI



Progesterone-11α-emisuccinato

EMISUCCINATI



Androstenedione-7α carbossimetil tioetere

MERCAPTOACETATI

Figura 35. CONIUGAZIONE DELL'APTENE: LA REAZIONE CON ANIDRIDE MISTA.

La reazione con anidride mista è una utile procedura per coniugare gli apteni steroidei alla BSA di trasporto. Una volta che il ponte carbossilico viene sistemato nella molecola steroidea, la reazione con anidride mista può essere suddivisa in due parti.

PARTE I: Il derivato aptenico e un clorocarbonato vengono dissolti in un solvente anidro (per esempio il diossano) la cui temperatura viene mantenuta da un bagno di ghiaccio, e viene aggiunta una amina terziaria (per esempio la tri-N-butilamina) per rimuovere l'HCl e formare l'anidride mista. La reazione si completa in meno di 30 minuti, e le basse temperature favoriscono la stabilità dell'anidride.

PARTE II: L'anidride mista viene decomposta e accoppiata con l'epsilon amino gruppo del residuo della lisina nella BSA. La BSA viene aggiunta in acqua a pH alcalino (circa 8) mescolando. Si continua ad agitare a bassa temperatura per circa 4 ore. Quindi si purifica l'immunogeno aptene-BSA con le colonne cromatografiche o dialisi, separandolo dal derivato aptenico che non ha reagito e dal reagente in eccesso.

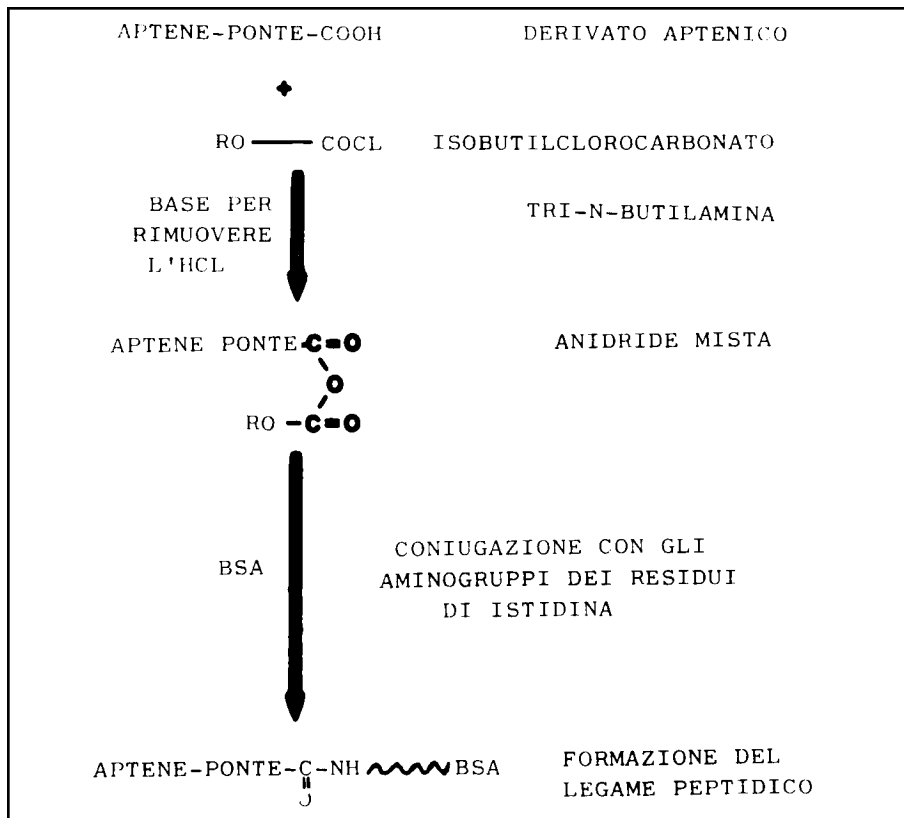


Figura 35 CONIUGAZIONE DELL'APTENE: LA REAZIONE CON ANIDRIDE MISTA

Figura 36. CONIUGAZIONE DELL'APTENE: LA REAZIONE CON CARBODIIMIDE.

La reazione con carbodiimide induce la formazione di legami peptidici, ed è estremamente utile per la produzione di immunogeno aptene-BSA.

In questa figura viene mescolato il derivato aptenico in eccesso con la BSA di trasporto al pH di 7.0. Viene aggiunta la carbodiimide (viene comunemente usato l'1-etil-3 (3) -dimetilaminopropil carbodiimide HCl), si lascia incubare a temperatura ambiente per circa un'ora. Quindi si purifica l'immunogeno aptene-BSA (ad esempio con la dialisi o la cromatografia), e si isola per liofilizzazione.

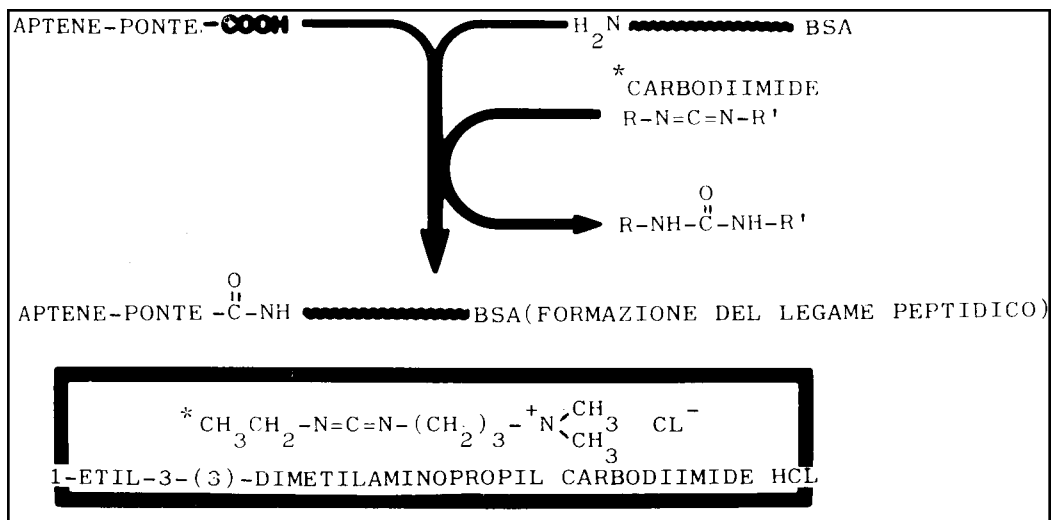


Figura 36 CONIUGAZIONE DELL'APTENE: LA REAZIONE CON CARBODIIMIDE

Figura 37. LA DERIVATIZZAZIONE DELL'APTENE PER LA RADIO-MARCATURA O LA FORMAZIONE DELL'IMMUNOGENO.

In questa figura, viene illustrata una via comune per la produzione di un immunogeno e il tracciante \sim I marcante usato nel dosaggio RIA della digitossina.

La digitoxigenina (digossina priva di carboidrato rimosso dalla posizione 3 del carbonio) viene fatta reagire con l'anidride succinica per preparare la 3-0-succinil digitoxigenina. La reazione con la carbodiimide di questo intermedio con la ESA produce un immunogeno che può essere usato nella produzione di anticorpi contro la digitossina. L'aggiunta della tirosina metil estere, con la seguente marcatura con ^{125}I , produce la ^{125}I -succinil digitoxigenina tirosina metil estere che può essere usata come tracciante iodinato nel dosaggio RIA.

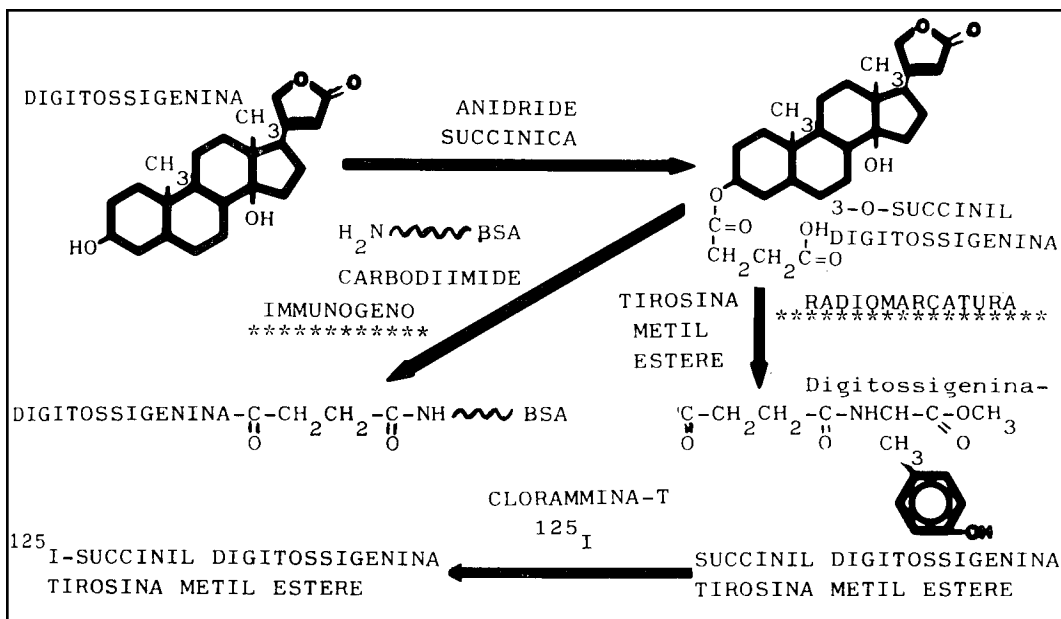


Figura 37 LA DERIVAZIONE DELL'APTENE PER LA RADIOMARCATURA O LA FORMAZIONE DELL'IMMUNOGENO

Figura 38. LA PRODUZIONE DI ANTICORPI POLICLONALI.

Oggi sono utilizzate numerose procedure e protocolli, da differenti laboratori e ricercatori, di immunizzazione per la produzione di antisieri. In genere, l'ottenimento di un antisiero utile viene raggiunto riducendo a quantità di immunogeno iniettata nell'animale ricevente alla minima dose efficace, e aumentando l'intervallo tra le iniezioni al massimo permesso dall'animale. La quantità di immunogeno richiesta per produrre una soddisfacente risposta anticorpale varia da alcuni microgrammi ad alcuni milligrammi.

Un adiuvante potenzia la risposta immune se viene iniettato insieme all'immunogeno. L'adiuvante più comunemente utilizzato è quello di Freund, e contiene una sospensione di micobatteri, oltre ad olio minerale e un emulsificante. La funzione dell'adiuvante è di prolungare il tempo di ritenzione nel corpo, permettendo al sistema immune un tempo sufficiente per avere accesso all'immunogeno.

Benché siano state descritte numerose vie di somministrazione, quella che sembra dare i risultati più soddisfacenti, senza iniezioni di richiamo, è l'iniezione intradermica in più sedi.

Gli animali comunemente utilizzati per la produzione di antisieri sono i conigli, le pecore, le capre, e i porcellini d'India. La scelta di una particolare specie animale dipende dal volume dell'antisiero desiderato, l'"estranità" dell'immunogeno per l'animale, e le particolari disposizioni del laboratorio per curare un certo animale.

Le iniezioni di richiamo di immunogeno vengono solitamente fatte ad intervalli da sei a otto settimane e la raccolta del sangue (insieme al controllo del titolo anticorpale, della specificità e della affinità) viene fatta da una a due settimane dopo le iniezioni di richiamo. Generalmente il titolo aumenta dopo l'immunizzazione, raggiungendo un valore costante dal settimo all'ottavo mese; anche l'affinità aumenta (per un periodo di tempo maggiore). La specificità dell'anticorpo tende a raggiungere il massimo intorno al sesto-ottavo mese.

Numerosi animali devono essere trattati per la produzione di anticorpi, poiché la risposta del singolo animale a differenti immunogeni varia.

Questa variazione è una funzione, almeno in parte, del differente patrimonio genetico dell'animale.

Per purificare gli antisieri, si può procedere ad assorbirli con la BSA per rimuovere l'anticorpo precipitabile dalla proteina di trasporto, quindi purificarlo ulteriormente con la precipitazione specifica o con la cromatografia per affinità. La cromatografia per affinità consiste nella precipitazione specifica dell'anticorpo con l'antigene responsabile della sua produzione. L'antigene deve quindi essere separato dall'anticorpo senza essere denaturato. I metodi per ottenere questo comprendono l'uso di soluzioni di sali o basi forti, con la formazione di complessi con diazo composti, o con la digestione enzimatica della parte antigenica. Nella maggior parte dei casi è inevitabile la perdita di materiale specifico.

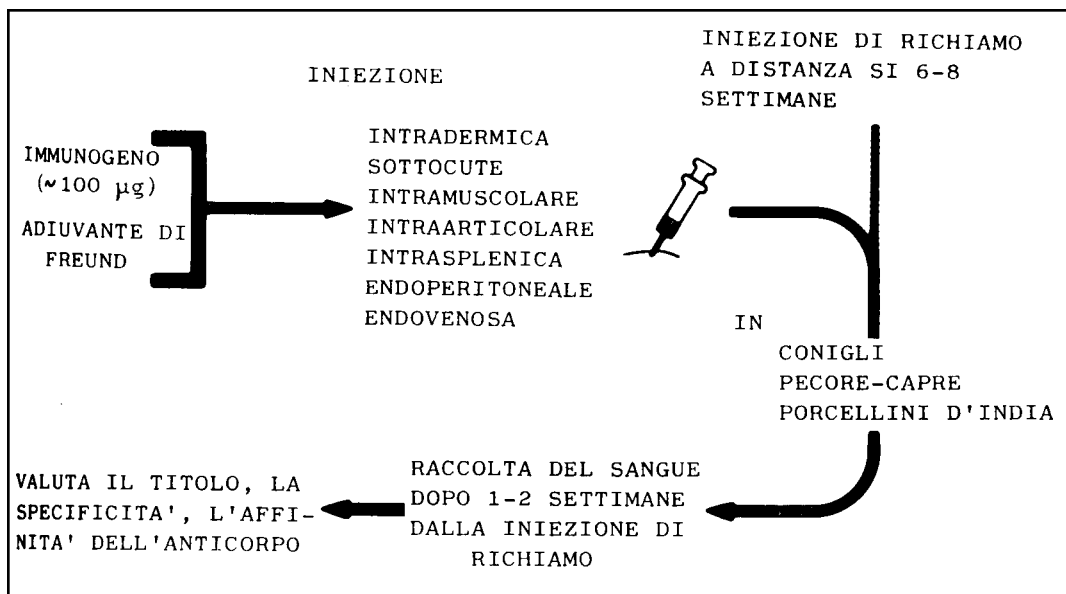


Figura 38 LA PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI

**Figura 39. VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ANTISIERO:
IL TITOLO.**

“Il titolo” viene definito come “la diluizione dell’antisiero utilizzata nella provetta di dosaggio per esami di routine (per esempio, 50 ml di una diluizione 1:10.000)”. Maggiore è il titolo, maggiore è il numero di dosaggi che possono essere fatti dal salasso. Il titolo è proporzionale al prodotto della concentrazione di anticorpo e della costante di affinità dell’antisiero.

La tecnica più conveniente per testare il titolo di un anticorpo consiste nell’incubare diluizioni seriali dell’antisiero con piccolissime quantità di antigene radiomarcato che deve essere usato nel RIA. Dopo l’incubazione, le frazioni libera e legata all’anticorpo vengono separate e contate. La diluizione che lega il 50% del tracciante (range dal 30 al 70%) è la diluizione che generalmente viene utilizzata per il dosaggio RIA.

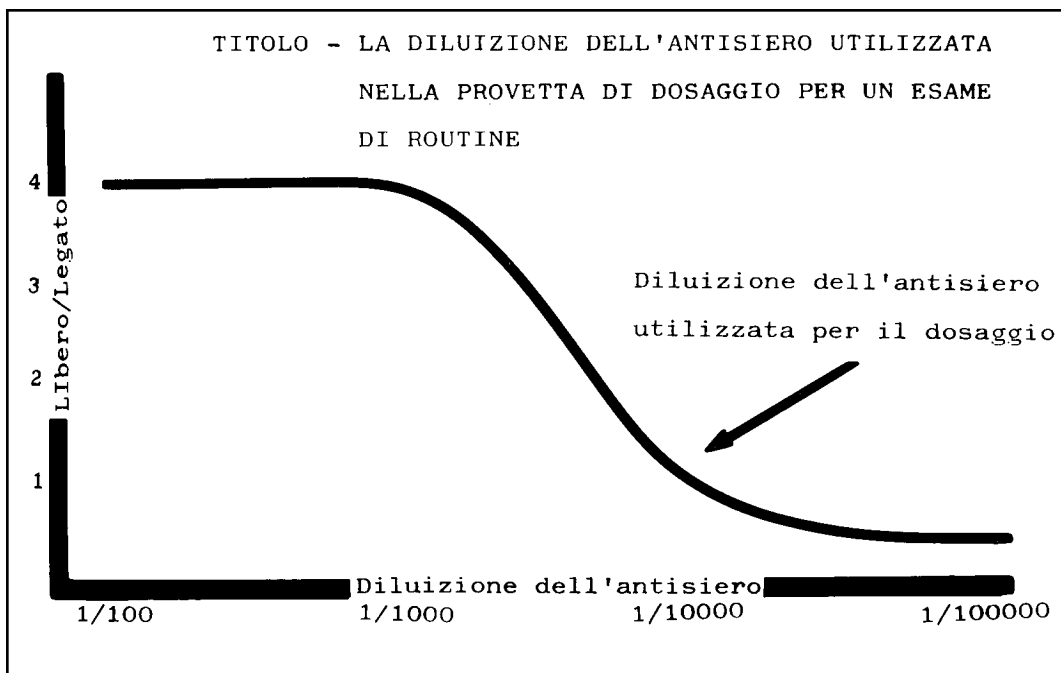


Figura 39 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ANTISIERO: IL TITOLO

**Figura 40. VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ANTISIERO:
LA SPECIFICITA'.**

“La specificità” può essere definita come “il grado al quale un antisiero reagisce solo con l’ormone o la sostanza in esame nelle condizioni ben definite di un dosaggio RIA”. Gli anticorpi possono o no legare gli antigeni che sono strettamente connessi strutturalmente all’antigene responsabile della loro produzione.

Quando gli anticorpi legano questi antigeni, si registra una interazione energetica che è generalmente più bassa di quella dell’antigene che ha indotto la produzione anticorpale. Nell’esempio mostrato in questa figura, un antisiero ottenuto contro la subunità beta della Gonadotropina Corionica Umana (HCG) viene testato per una possibile reattività crociata con ormoni strutturalmente simili (LH, FSH e TSH).

Benché tutti e quattro gli ormoni abbiano una subunità alfa proteica comune, hanno anche le subunità proteiche beta differenti. Il grafico dimostra una buona curva RIA con l’HCG, e nessun legame (o reattività crociata) con LH, FSH, o TSH. Questo antisiero dovrebbe essere specifico per il dosaggio della subunità beta dell’HCG.

Per valutare la specificità, tutte le sostanze o ormoni che sono biochimicamente simili alla sostanza che deve essere dosata devono essere esaminati per valutare la reattività crociata. Con un sistema, i dati sulla specificità vengono ottenuti da studi sullo spiazzamento e viene calcolata in base alla massa della sostanza immunogenica I che è necessaria per spiazzare il 50% della sostanza radiomarcata I. Questo valore viene diviso per la massa della sostanza X che ha una reazione crociata necessaria per spiazzare la stessa percentuale dell’immunogeno marcato I.

$$\frac{\text{Massa dell'immunogene I richiesto per spianare il 50\% di I}}{\text{Massa della sostanza X che cross - reagisce richiesta per spiazzare il 50\% di I}} \times 100$$

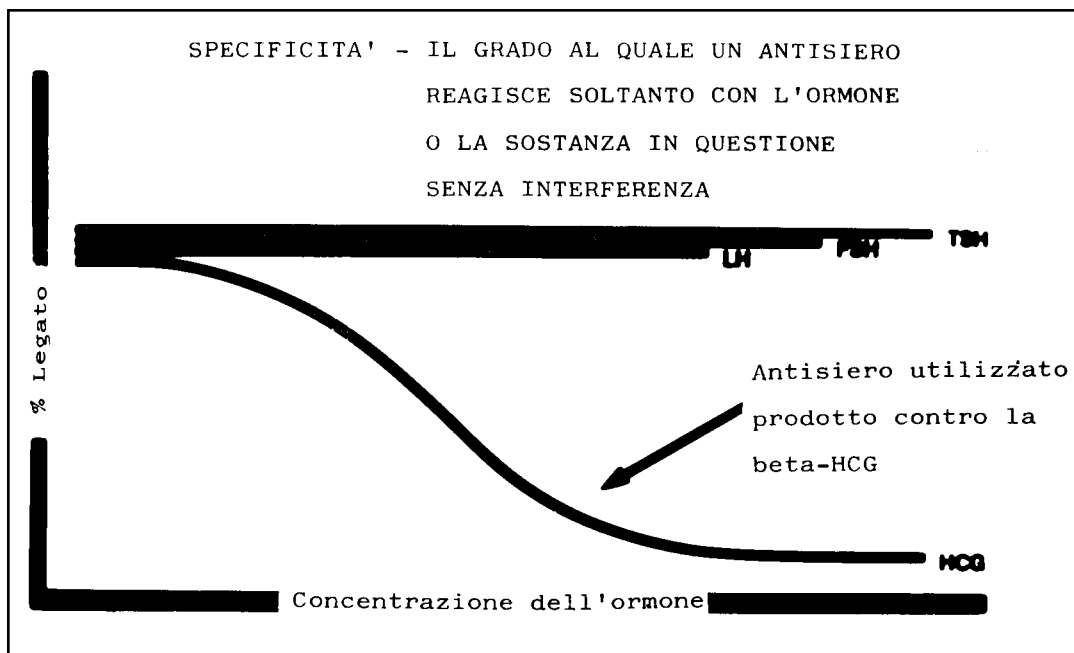


Figura 40 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ANTISIERO: LA SPECIFICITA'

Figura 41. VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ANTISIERO L’AFFINITA’.

Una elevata affinità causa un legame relativamente irreversibile dell’antigene all’anticorpo, così che piccole variazioni della quantità di antigene sconosciuto causerà una ben distinta e percettibile modificazione, dopo la separazione, nel rapporto dell’antigene libero e legato. Un legame debole non permette la individuazione di piccole variazioni, rendendo così l’esame poco sensibile. Perciò, la sensibilità varia direttamente con la costante di affinità dell’anticorpo. La costante di affinità deve essere circa 100 volte più elevata della corrispondente costante di affinità di una qualsiasi proteina legante specifica nel siero (come la transcortina o la sex hormone binding globulin).

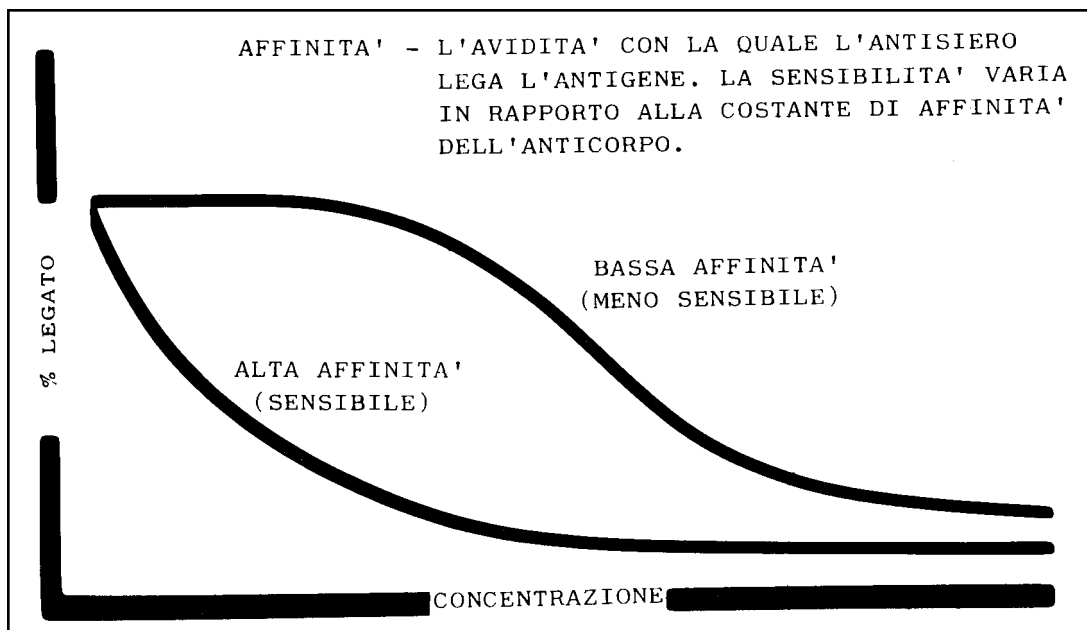


Figura 41 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ANTISIERO: L'AFFINITA'

Figura 42. LA RISPOSTA ANTICORPALE MONOCLONALE.

Gli anticorpi monoclonali sono anticorpi omogenei uniformi diretti contro un singolo determinante antigenico o epitopo presente sulla molecola antigenica. La produzione *in vitro* di anticorpi monoclonali consiste nella selezione di un anticorpo omogeneo con le caratteristiche desiderate tra i molti anticorpi prodotti in una risposta convenzionale policlonale.

La produzione *in vitro* di anticorpi monoclonali con l'uso di ibridomi viene discussa nelle figure 43-45.

Brevemente, ibridoma è il nome dato al prodotto della fusione di una cellula produttrice anticorpi (linfocita-E) e una forma tumorale di un particolare tipo di cellula del midollo osseo (mieloma). L'ibrido formato dalla fusione di queste due cellule ha le proprietà di entrambe le cellule. Il prodotto è un singolo anticorpo specifico la cui produzione è teoricamente immortale.

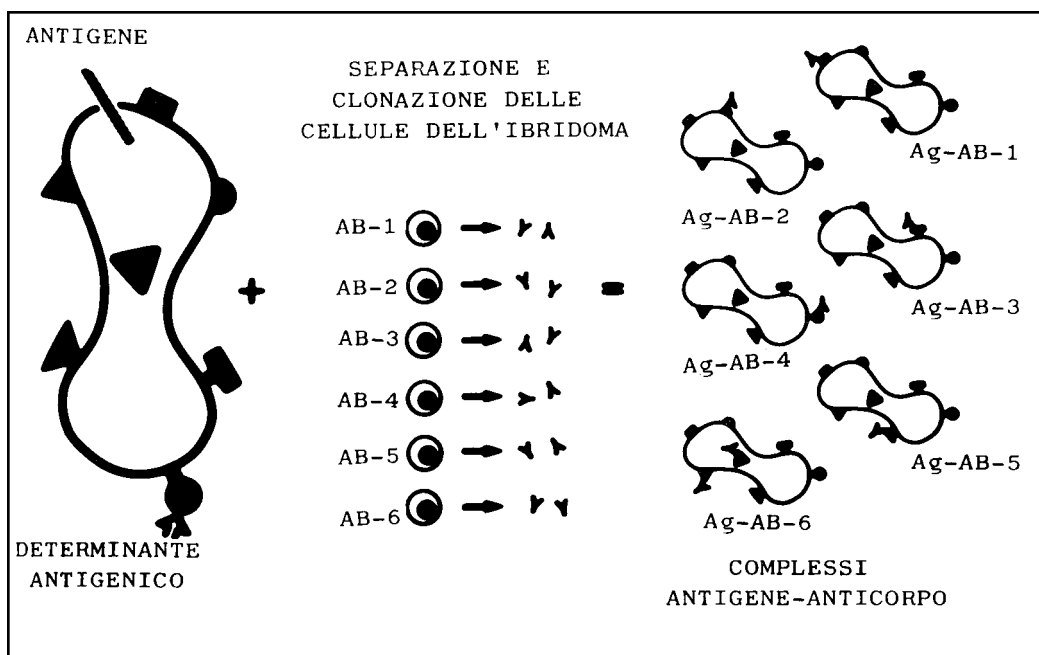


Figura 42 LA RISPOSTA ANTICORPALE MONOCLONALE

Figura 43. GLI IBRIDOMI E LA PRODUZIONE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI: SCHEMA GENERALE.

Gli anticorpi policlonali sono prodotti con l'immunizzazione di un animale ospite (in genere un coniglio), raccogliendo, dopo un periodo di tempo appropriato (da settimane a mesi), i sieri dell'animale. Gli anticorpi policlonali presenti nei sieri sono capaci di reagire con molti antigeni e/o determinanti antigenici sulla loro superficie. Come già accennato, può essere necessaria una prolungata fase di purificazione per poter utilizzare nella diagnostica alcuni di questi anticorpi.

La tecnica degli anticorpi monoclonali è stata sviluppata nel 1975 da Milstein e Kohler [Nature, 256, 495 (1975)]. In breve, lo schema generale della produzione degli anticorpi monoclonali comprende dapprima l'immunizzazione di un topo con l'antigene contro il quale devono essere prodotti gli anticorpi. I linfociti del topo produttori anticorpi (le cellule della milza - sono la fonte più elementare di un grosso numero di cellule-E) vengono "fusi" con i linfociti maligni che originano da un ceppo di cellula mielomatosa di topo, cresciuta in cultura (cellula di mieloma). Il mieloma di topo è un ceppo cellulare mutato che ha perduto la capacità di produrre le immunoglobuline del mieloma. Se non si verificasse ciò, l'ibride risultante potrebbe produrre anticorpi fatti di varie combinazioni di immunoglobuline di entrambe le cellule di origine una risposta del tutto imprevedibile.

L'"ibridoma" che ne risulta contiene il patrimonio genetico di ciascuna cellula- i geni che controllano la produzione di anticorpi specifici dalle cellule della milza e i geni che permettono una indefinita proliferazione cellulare dalle cellule del mieloma.

Le cellule dell'ibridoma devono quindi essere separate e conservate in cultura. Ciascun ibridoma donato (separato e messo in cultura individualmente) produce quindi uno specifico anticorpo (monoclonale), capace di reagire con il determinante antigenico specifico che ha causato la sua formazione.

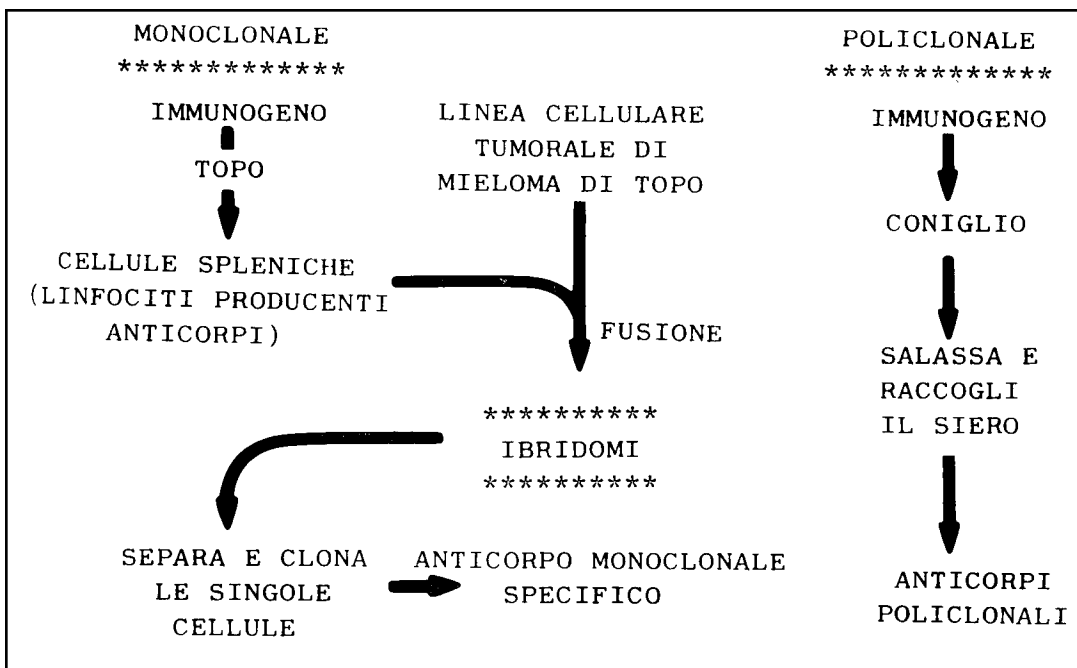


Figura 43 GLI IDRIDI E LA PRODUZIONE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI: SCHEMA GENERALE

Figura 44. LA PRODUZIONE DELL'IBRIDOMA (1).

Al fine di produrre un ibridoma, si procede alla immunizzazione di un topo con un antigene specifico. I protocolli di immunizzazione variano, ma al topo viene solitamente somministrata una iniezione di richiamo da 3 a 5 giorni prima della fusione. Le milze di quegli animali che producono i più elevati titoli anticorpali vengono rimosse, e una sospensione di linfociti anticorpali vengono rimosse, e una sospensione di linfociti splenici (circa 10^8 cellule) viene mischiata con le cellule di topo ottenute da un mieloma (circa 10^7 cellule). La miscela viene incubata con polietilenglicole (PEG) per circa 8 minuti per favorire la fusione delle membrane cellulari. Dopo la fusione, le cellule possono essere sospese in un tessuto di cultura di crescita HAT contenuto in piastre con micropozzetti. Poiché di circa 200.000 cellule spleniche soltanto una forma un ibrido vitale con una cellula di mieloma, si devono eliminare le cellule di mieloma non fuse e gli ibridi mieloma-mieloma. Questo è possibile usando la cultura selettiva HAT. Come cellule di origine vengono utilizzate le cellule di mieloma di topo che non posseggono l'enzima ipoxantina fosforibosil transferasi, e il tessuto di crescita contiene ipoxantina (H), aminopteridina (A), e timidina (T) (HAT). Poiché le cellule mielomatose non hanno l'enzima transferasi, esse non possono utilizzare l'ipoxantina aggiunta per sintetizzare le purine. L'aminopteridina blocca la sintesi endogena di purine e pirimidine. Le cellule di mieloma non fuse e gli ibridi mieloma-mieloma, a causa del blocco della sintesi delle purine e pirimidine muoiono. D'altra parte, un ibrido tra una cellula splenica e di mieloma contiene l'enzima transferasi fornito dalle cellule spleniche, utilizza l'ipoxantina e la timidina aggiunta per la sintesi della purina e della pirimidina, e sopravvive.

Le cellule spleniche non fuse, e gli ibridi milza-milza muoiono spontaneamente dopo alcune replicazioni.

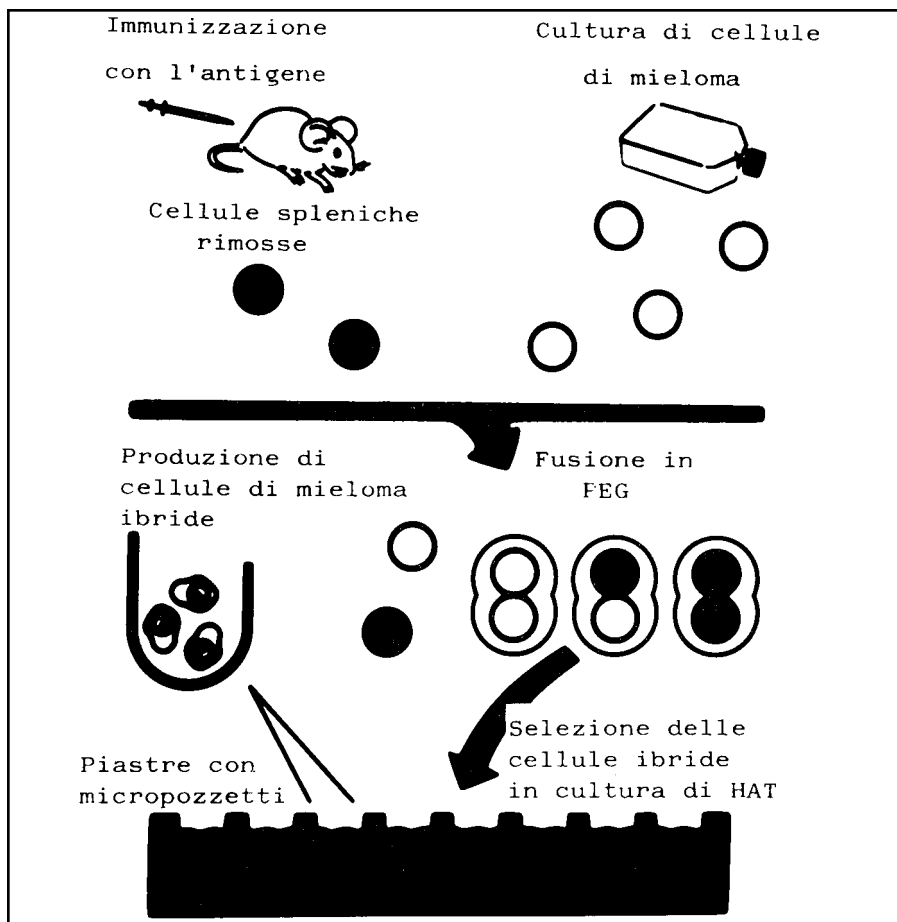


Figura 44 LA PRODUZIONE DELL'IBRIDOMA (1)

Figura 45. LA PRODUZIONE DELL'IBRIDOMA (2).

I cloni ibridi diventano visibili in circa il 30% dei pozzetti, da due a quattro settimane dopo la fusione. Gli ibridi hanno la stessa morfologia delle cellule di mieloma di origine. Il surnatante dei pozzetti contenenti questi doni in moltiplicazione viene analizzato e si procede alla titolazione degli anticorpi diretti contro l'antigene immunizzante. Gli ibridi positivi per gli anticorpi vengono fatti crescere e donati, quanto prima possibile, su un appropriato terreno di crescita. Dopo un adeguato periodo di tempo si procede ad una rivalutazione della produzione di anticorpi, e gli ibridi vengono riclonati. La tecnica per diluizione al limite (di meno di una cellula per coltura) o l'uso di medium semisolidi come l'agar, permette agli ibridi di crescere con una densità talmente bassa che ogni crescita si può considerare derivante da un singolo clone.

La procedura della riclonazione permette l'eliminazione della contaminazione di varianti, dei doni che non producono anticorpi, e le cellule che hanno perduto la capacità di produrre anticorpi a causa della perdita di cromosomi. Se si permette che la crescita continui, le varianti degli ibridi possono sovracrescere gli ibridomi desiderati.

A questo punto, le scorte di ibridomi possono essere congelate e immagazzinate, fatte crescere in cultura, o iniettate in topolini immunosoppressi. I topi producono una ascite da tumore con grosse quantità di anticorpi monoclonali. Gli ibridomi congelati possono essere accumulati per un periodo di tempo illimitato (sinora). Quando vengono sgelati e inniettati nei topolini o vengono fatti crescere in terreno di cultura, gli ibridomi produrranno anticorpi identici a quelli prodotti per la prima volta. La cromatografia per affinità si è dimostrata un utile mezzo di purificazione degli anticorpi monoclonali ottenuti.

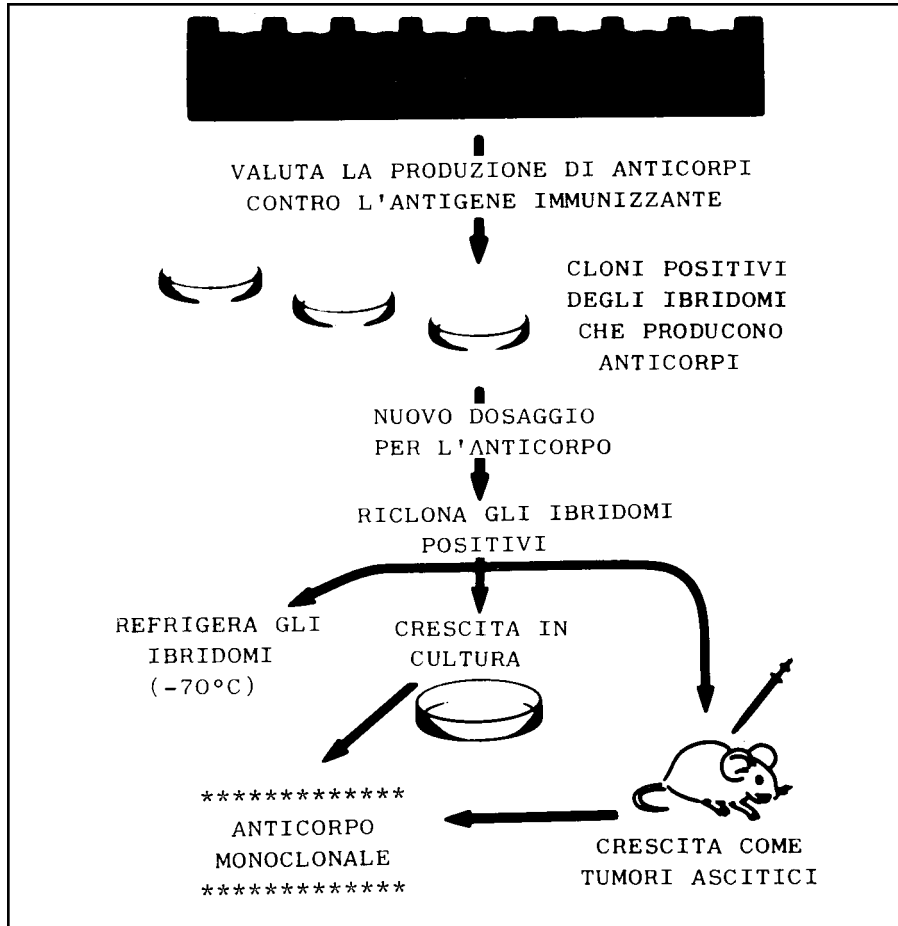


Figura 45 LA PRODUZIONE DELL'IBRIDOMA (2)

Figura 46. ALCUNE PROTEINE DI TRASPORTO SIERICHE UTILIZZATE NELLA TECNICA DELLA CPB.

Un dosaggio radiochimico con competizione per il legame che utilizza come legante specifico un anticorpo viene definito dosaggio RIA. Quando si utilizza come legante specifico una proteina sierica, il dosaggio viene in genere definito per competizione proteica (CPE). Questi leganti sono in genere proteine specifiche di trasporto plasmatico che funzionano biologicamente aumentando l'emivita e la solubilità di un composto nel sangue, mentre riducono la loro escrezione renale. Questo fornisce una costante riserva di un composto biologicamente attivo per l'organo bersaglio. Le proteine di trasporto plasmatiche come la TEG (globulina legante la tiroxina), la CEG (globulina legante il cortisolo), la SHEG (globulina legante gli ormoni sessuali) si possono ottenere facilmente dal siero, sono abbastanza stabili, e possono essere utilizzate nella tecnica della CPE. Ci sono degli aspetti negativi legati all'uso di queste proteine. Alcune mancano di specificità, e necessitano di una fase di separazione pre-dosaggio della sostanza che deve essere dosata (per esempio gli ormoni steroidei). Sebbene la sensibilità sia soddisfacente, è inferiore a quella degli anticorpi usati nel RIA.

LEGANTE DOSATA	ORIGINE DEL LEGANTE	S O S T A N Z A
TBG (Globulina legante la tiroxina)	Plasma	T4
CBG (Transcortina)	Plasma	Cortisolo 11-desossicortisolo
SHBG (Globulina legante gli ormoni sessuali)	Plasma	Estradiolo Testosterone Steroidi sessuali
Transcobalamina FI (Fattore intrinseco)	Plasma Gastrointestino	Cobalamina
BLG (Beta lattoglobulina)	Latte	Folati
Proteina chinasi	Muscolo bovino	AMP ciclico

Figura 46 ALCUNE PROTEINE DI TRASPORTO SIERICHE UTILIZZATE NELLA TECNICA DELLA CPB

Figura 47. ALCUNI RECETTORI TISSUTALI UTILIZZATI NEL RRA

Parecchi ormoni proteici esercitano i loro effetti accoppiandosi prima ad un recettore di membrana specifico che, in rapporto con l'adenil ciclasi, stimola la formazione intracellulare di APM ciclico. L'AMP ciclico quindi completa il messaggio ormonale originale. Questi siti recettoriali della membrana cellulare sono stati isolati ed utilizzati come composti leganti specifici nel dosaggio radiorecettoriale (RRA).

Il principale vantaggio dato dall'uso delle proteine recettoriali nel RRA consiste nel fatto che il recettore misura l'attività biologica. Deve essere sempre ricordato, e sottolineato, che il dosaggio RIA misura soltanto la attività immunologica. Tuttavia le proteine del recettore presentano problemi tecnici considerevoli. I recettori si ottengono da tessuti differenti e non vengono completamente solubilizzati. Sono presenti in piccole concentrazioni, sono instabili, e possono essere danneggiati facilmente nelle procedure di omogenizzazione e ultracentrifugazione necessarie per la loro preparazione. In questa figura vengono presentati alcuni dei RRA in uso.

<u>ORIGINE DEL RECETTORE</u>	<u>SOSTANZA DOSATA</u>
Proteina del tubulo del testicolo di ratto	FSH
Linfociti umano, membrane di epatociti	Insulina Ormone della crescita
Membrane di cellule della ghiandola mammaria	Prolattina
Membrane di cellule tiroidee tiroidee	Immunoglobuline stimolanti la tiroide
Membrane di corpo luteo ovarico, cellule testicolari	HCG

Figura 47 ALCUNI RECETTORI TISSUTALI UTILIZZATI NEL RRA

Figura 48. RAFFRONTO TRA CPB, RRA, E RIA.

In questa figura vengono paragonati i vantaggi e gli svantaggi del CPBA, del RRA, e del dosaggio RIA utilizzando anticorpi policlonali e monoclonali.

SPECIFICITA': Potenzialmente la maggiore specificità può essere raggiunta utilizzando in un dosaggio RIA gli anticorpi monoclonali.

RAPPORTO CON L'ATTIVITA' BIOLOGICA: Il RRA ha il valore più elevato per questa variabile.

FONTE RIPRODUCIBILE DELL'AGENTE LEGANTE: Il RIA, utilizzando gli anticorpi monoclonali, ha la possibilità di avere una origine pressoché eterna di anticorpi.

STABILITA' NELLO STOCCAGGIO: Gli anticorpi liofilizzati sono stabili per anni alla temperatura di frigorifero.

TITOLO: Il titolo e l'affinità degli anticorpi sono superiori ai recettori di membrana e alle proteine di trasporto plasmatiche.

Allo stato attuale delle conoscenze, sembra che il RIA, utilizzando gli anticorpi monoclonali, sia teoricamente il migliore tra i dosaggi radiochimici rispetto al CPE e/o al RRA.

PROPRIETA'	CPB	RRA	RIA	
			Anticorpo policlonale	Anticorpo monoclonale
SPECIFICITA'	Alta	Molto alta	Molto alta	Potenzialmente altiss.
RELAZIONE CON L'ATTIVITA' BIOLOGICA	Alta	Molto alta	Variabile	
ORIGINE RIPRODUCIBILE DEL LEGANTE	Alta	Alta	Variabile	Molto alta
STABILITA' NELLO STOCCAGGIO	Stabile	Variabile	Molto stabile	
TITOLO	Basso	Basso	Molto alto	
PREPARAZIONE	Semplice diluizione del plasma	Frazionam. cellula	Immunizzazione	Produzione di ibridoma

Figura 48 RAFFRONTAMENTO TRA CPB, RRA, E RIA

Bibliografia

1. Parker, c.W., Radioimmunoassay, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21, 113 (1981).
2. Felber, J.P., Radioimmunoassay in the Clinical Chemistry Laboratory, *Adv. in. Clin. Chem.*, 20, 130 (1978).
3. Steroid Immunoassay, Cameron, E.H.D., Hillier, S.G., and Griffiths, K., eds., Alpha Omega Publishing Ltd., U.K. (1975).
4. Radioimmunoassay of Steroid Hormones, Gupta, D., ed., Verlag Chemie, Weinheim (1980).
5. Practical Competitive Binding Assay Methods, Ranson, J.P., ed., CV. Mosby Co. (1976).
6. Methods in Enzymology, Vunakis, H.V., and Langone, J.J., eds., Voi. 70, Academic Press (1980).
7. Hormones in Human Blood: Detection and Assay, Antoniadis, H.N., ed., Harvard University Press (1976).
8. Walker, W.H.C., An Approach to Immunoassay, *Clin. Chem.*, 23, 384 (1977).
9. Radioimmunoassay and Saturation Analysis, *Brit. Med. Bull.*, 30 (1974).
10. Bauminger, S., Kohen, F., Lindner, H.R., Steroids as Haptens: Optimal Design of Antigens for the Formation of Antibodies to Steroid Hormones, *J. Steroid Biochem.*, 5, 739 (1974).
11. Gijzen, A.H.J., Brombacher, P.J., Janssens, H.H.P., et al, Isolation and Purification of Cortisol-Binding Immunoglobulin by Affinity Chromatography, *Clin. Chim. Acta*, 58, 177 (1975).
12. Wilde, C.E., and Ottewill, D., A Practical Guide to Gamma-Counting in RIA, *Ann. Clin. Biochem.*, 17, 1 (1980).

13. Chervu, L.R., and Murty, D.R.K., Radiolabeling of Antigens: Procedures and Assessment of Properties, *Seminars in Nuci. Med.*, 5, 157 (1975).
14. Hybridomas and Monoclonal Antibodies, Program 125, Bioeducational Publications, Rochester. New York (1982).

Indice

Premessa

Figura 25 L'ANTIGENE

Figura 26 L'ANTICORPO: DEFINIZIONI E FUNZIONI.

Figura 27 STRUTTURA DELLE IMMUNOGLOBULINE

Figura 28 RELAZIONI STRUTTURA/FUNZIONE DELL'ANTICORPO

Figura 29 REAZIONI ANTIGENE-ANTICORPO

Figura 30 IL SISTEMA IMMUNE E LA PRODUZIONE ANTICORPALE

Figura 31 LA RISPOSTA ANTICORPALE CONVENZIONALE
POLICLONALE

Figura 32 GLI ANTIGENI COME IMMUNOGENI

Figura 33 DERIVATI APTENE-PONTE (1)

Figura 34 DERIVATI APTENE-PONTE (2)

Figura 35 CONIUGAZIONE DELL'APTENE: LA REAZIONE CON
ANIDRIDE MISTA

Figura 36 CONIUGAZIONE DELL'APTENE: LA REAZIONE CON
CARBODIIMIDE

Figura 37 LA DIRIVATIZZAZIONE DELL'APTENE PER LA
RADIOMARCATURA O LA FORMAZIONE DI IMMUNOGENO

Figura 38 LA PRODUZIONE DI ANTICORPI POLICLONALI

Figura 39 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ANTISIERO: IL
TITOLO

Figura 40 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ANTI-SIERO: LA
SPECIFICITA'

**Figura 41 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ANTISIERO:
L’AFFINITA’**

Figura 42 LA RISPOSTA ANTICORPALE MONOCLONALE

**Figura 43 GLI IBRIDOMI E LA PRODUZIONE DEGLI ANTICORPI
MONOCLONALI: SCHEMA GENERALE**

Figura 44 LA PRODUZIONE DELL’IBRIDOMA (1)

Figura 45 LA PRODUZIONE DELL’IBRIDOMA (2)

**Figura 46 ALCUNE DELLE PROTEINE DI TRASPORTO SIERICHE
UTILIZZATE NELLA TECNICA DELLA CPB**

Figura 47 ALCUNI RECETTORI TISSUTALI UTILIZZATI NEL RRA

Figura 48 RAFFRONTO TRA CPB, RRA, E RIA.

Bigliografia

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.**
10. **Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.**
11. **Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.**

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 3, numero 11

Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0338 2202502
E-mail: rassu@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[®], 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 Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Febbraio 1985 - Prima ristampa: Febbraio 1988
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