TECNICHE IMMUNOCHIMICHE

ALCUNE DEFINIZIONI……

ANTIGENE: molecola che, introdotta in un organismo, è in grado di attivare la risposta anticorpale. Gli antigeni sono tipicamente macromolecole solubili in acqua e che possiedono un alto grado di complessità chimica. Maggiore il peso molecolare, maggiori le probabilità che funzionino come antigeni. Le proteine eterologhe (cioè, provenienti da organismi diversi dall'animale trattato) di massa molecolare >10000 Da sono generalmente degli ottimi antigeni, mentre i piccoli peptidi non sono di solito antigenici.

Due sono essenzialmente le **proprietà di un antigene**:

- ✓ **IMMUNOGENICITÀ:** capacità di indurre una risposta immunitaria
- ✓ **ANTIGENICITÀ:** capacità di reagire in maniera specifica con i prodotti finali delle risposte immuni (anticorpi e/o recettori di membrana)

ALCUNE DEFINIZIONI……

Da che cosa dipende l'immunogenicità di una sostanza?

- **Estraneità:** il sistema immunitario è in grado di discriminare il "self" dal "non self", di conseguenza, le molecole estranee ad un determinato organismo hanno capacità immunogenica;
- **Specie animale:** le proprietà immunogene di un antigene variano a seconda della specie animale utilizzata per la produzione di anticorpi;
- **Peso molecolare:** più è elevato il peso molecolare della molecola in esame e maggiore sarà la possibilità di avere una risposta immunogenica;
- **Degradabilità:** macromolecole insolubili sono più immunogene di quelle più piccole e solubili, poiché vengono più facilmente fagocitate ed elaborate dal sistema macrofagico;
- **Complessità chimica e strutturale delle molecole:** l'eterogeneità chimica apporta immunogenicità. Ad esempio omopolimeri anche adeguatamente grandi hanno immunogenicità bassa se confrontata con polimeri, contenenti aminoacidi diversi, dello stesso peso molecolare. D'altra parte, gli antigeni proteici risultano tanto più immunogeni quanto più sono complessi i loro livelli di organizzazione molecolare (struttura terziaria e quaternaria).

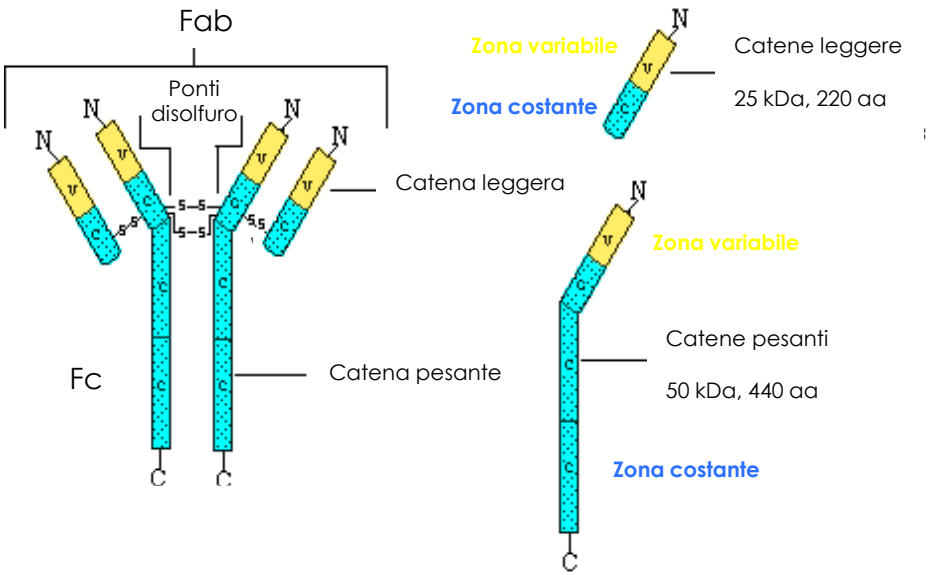
ALCUNE DEFINIZIONI……

Tutte le sostanze sono immunogeniche?

No, infatti esistono piccole sostanze organiche, dette **apteni**, monovalenti (con un unico determinante antigenico), antigeniche, ma non immunogeniche. Possono venire legate artificialmente in modo covalente ad una proteina che prende il nome di carrier (BSA, KLH) e funzionare come epitopi naturali, scatenando la risposta anticorpale.

ANTICORPI

Gli anticorpi, prodotti dalle plasmacellule, appartengono al gruppo di proteine note come **immunoglobuline (Ig)**, classificabili in cinque diverse classi: IgG, IgA, IgM, IgE, e IgD. Gli anticorpi strutturalmente più semplici sono le **IgG**, costituite da quattro catene polipeptidiche: due catene leggere identiche tra di loro e due catene pesanti anch'esse identiche tra loro; rappresentano circa l'80% delle Ig del siero.



F_{ab} : *Fragment antigen binding*

F_c : *Fragment crystallizable*

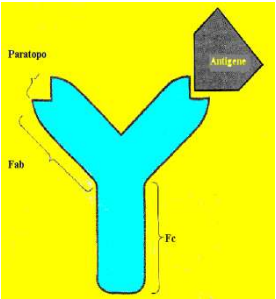
ALCUNE DEFINIZIONI……

Tabella 18.1. Principali caratteristiche chimico-fisiche e biologiche delle classi di immunoglobuline.

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Peso molecolare	160.000	160.000 o multiplo	900.000	160.000	190.000-200.000
Costante di sedimentazione	7S	7-15S	19S	7S	8S
Mobilità elettroforetica	γ lente	γ veloci	γ veloci	γ veloci	γ veloci
Tipo di catena pesante	γ	α	μ	δ	ε
Tipo eli catena leggera	k o λ	k o λ	k o λ	k o λ	k o λ
Distribuzione primaria	Liquidi interstiziali e sangue (40%)	Colostro, saliva, secrezioni intestinali e dello apparato respiratorio, sangue (40%)	Sangue (80%)	Sangue (75%)	Sangue (50%)
Concentrazione nel siero normale g/dl	1,0-1,5	0,1-0,4	0,05-0,15	0,003	Estremamente bassa
% nel siero normale	73%	19%	7%	1%	–
Periodo di dimezzamento nel siero	23 giorni	6 giorni	5 giorni	2,8 giorni	2,5 giorni
Attività principale		Neutralizzazione di tossine e di virus	Effetto battericida e opsonizzatite	?	Reazione: ipersensibilità di tipo immediato
Placenta	Passano	No	No	No	No
Complemento	Fissano	No	Fissano	No	No

Interazione antigene-anticorpo

- Sistema chiave-serratura :



- L'unione che si instaura tra un antigene ed il corrispondente anticorpo porta alla formazione di quello che viene definito **IMMUNOCOMPLESSO**. Tale unione è altamente specifica ed è regolata da forze di tipo chimico-fisico (legami di natura non covalente) che agiscono tra i determinanti dell'antigene e dell'anticorpo (Forze di Coulomb, Forze di Van der Waals, legami H);

- La formazione degli immunocomplessi determina una serie di eventi finalizzati alla definitiva distruzione o neutralizzazione dell'antigene.

ALCUNE DEFINIZIONI……

- L'equilibrio fra antigene e l'anticorpo viene espresso dalla legge di massa:

$$Ab + Ag \Leftrightarrow AbAg \qquad K_a = \frac{[AbAg]}{[Ab]\cdot[Ag]} = \frac{1}{K_d}$$

- Quando, per una determinata concentrazione di Ag, si ha:

$$[AgAb] = [Ab]$$

cioè i siti antigenici dell'anticorpo sono saturati **per metà** con l'antigene, allora il valore del reciproco della concentrazione dell'antigene libero sarà uguale alla **costante di affinità:**

$$K_a = \frac{1}{[Ag]} = \frac{1}{K_d}$$

La costante K_a (anche costante di associazione) è definita dalla concentrazione di antigene libero necessario perché venga raggiunto il 50% di saturazione dei siti anticorpali ed una misura dell'affinità intrinseca o della stabilità del legame Ag-Ab.

ALCUNE DEFINIZIONI……

- Il valore della costante di affinità di un anticorpo per un dato antigene **determina**, negli esperimenti immunochimici, **sia il limite di rilevabilità** (che migliora con l'aumentare dell'affinità), **sia la specificità** (che cresce all'aumentare della differenza tra il valore della costante di affinità di un Ab verso l'Ag specifico e quello relativo ad un Ag meno specifico);

- Le K_{aff} possono variare da $10^9 \div 10^{10}$ M^{-1} nel caso di anticorpi con elevata affinità per l'antigene, a $10^4 \div 10^5$ M^{-1} nel caso, invece, di immunoglobuline con bassa affinità.

ALCUNE DEFINIZIONI……

- **Affinità:** forza dell'interazione antigene-anticorpo, misurata dalla costante di equilibrio della reazione di associazione;
- **Reazione antigene-anticorpo:** reazione dinamica e reversibile tra un anticorpo e un antigene per dare origine al complesso antigene-anticorpo. E' caratterizzata da una costante di equilibrio definita;
- **Immunogeno:** sostanza antigenica (antigene, coniugato aptene-proteina) che, in contatto con un ospite immunocompetente, è capace di stimolare la produzione di anticorpi specifici;
- **Sito legante anticorpale (paratopo):** regione della molecola anticorpale capace di combinarsi con il corrispondente determinante antigenico;
- **Determinante antigenico (epitopo):** elemento strutturale della molecola antigenica riconosciuto dall'anticorpo e capace di combinarsi con il corrispondente sito legante anticorpale;
- **Marcatore:** sostanza (radioisotopo, enzima, fluoroforo ecc) che introdotta nella struttura di un reagente (antigene, aptene, anticorpo) ne consente la rivelazione.

TECNICHE IMMUNOCHIMICHE

La specificità delle reazioni antigene-anticorpo e la sensibilità di "marcatori" (enzimi, isotopi, sostanze fluorescenti, radicali liberi) possono essere combinate insieme per compiere un "**dosaggio immunologico**", ossia quantificare con precisione una sostanza antigenica, presente, nel nostro caso, nei fluidi biologici.

IMMUNODOSAGGI

Metodi marcati

traccianti radioisotopici, enzimatici, fluorimetrici, bioluminescenti, chemiluminescenti

Metodi non marcati

Agglutinazione

Se avviene in soluzione acquosa

Diretta

se l'antigene è corpuscolato (cellule, batteri)

Indiretta

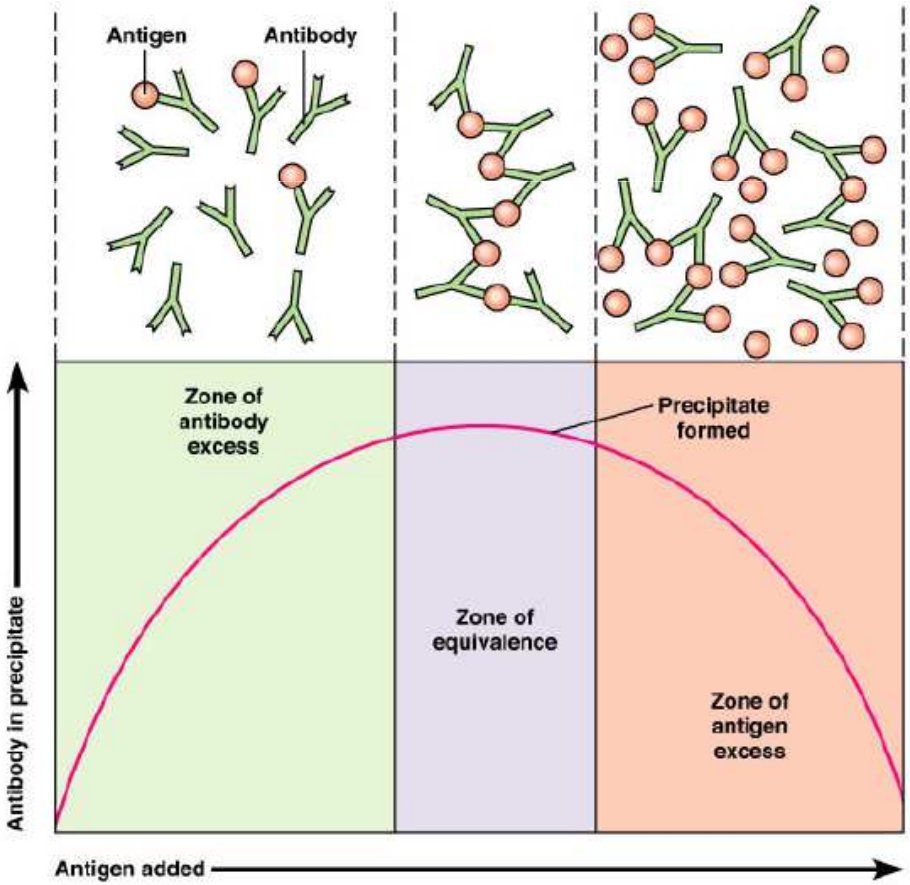
se l'antigene, solubile, si fa adsorbire o legare covalentemente a carrier insolubili (sfere di lattice, globuli rossi)

Precipitazione

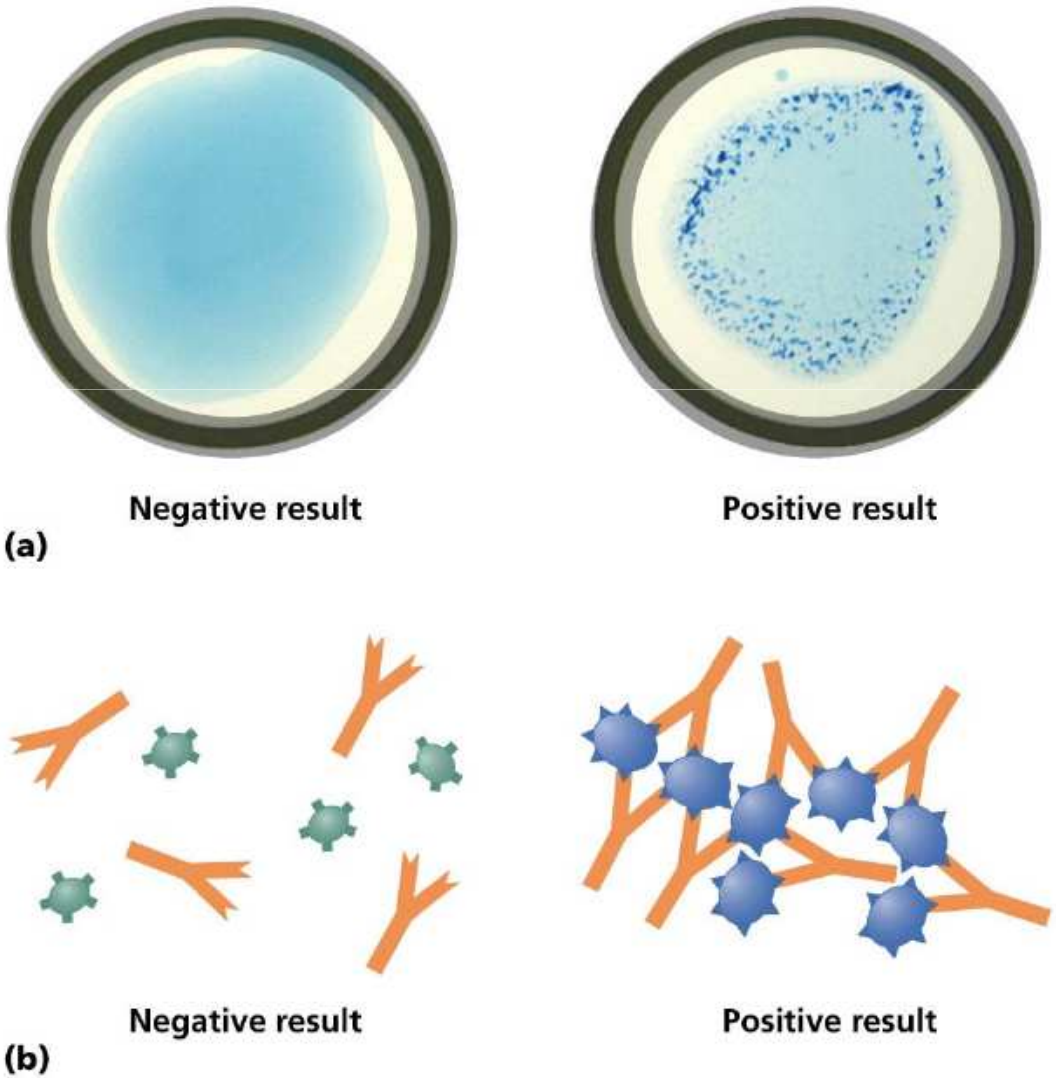
Se avviene in matrice solida

Reazioni di agglutinazione/precipitazione

In adatte condizioni sperimentali (pH, temperatura, forza ionica), e con **adatti rapporti stechiometrici**, si può ottenere la precipitazione del complesso antigene-anticorpo, anche di peso molecolare molto elevato.

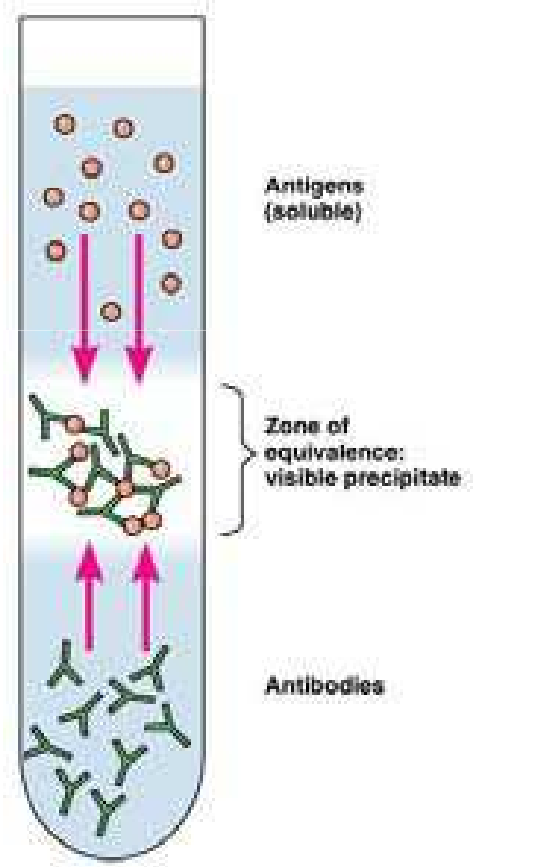


REAZIONI DI AGGLUTINAZIONE/PRECIPITAZIONE

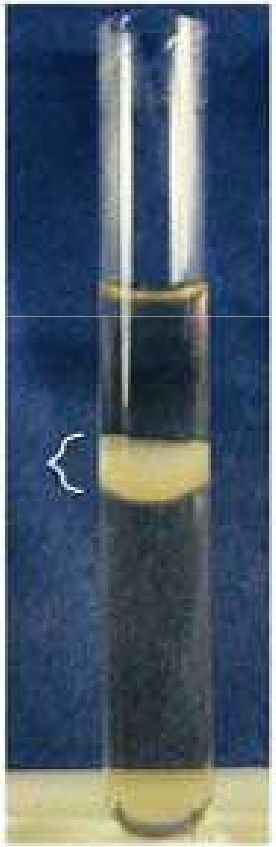


Test di precipitazione ad anello,

Ring Test

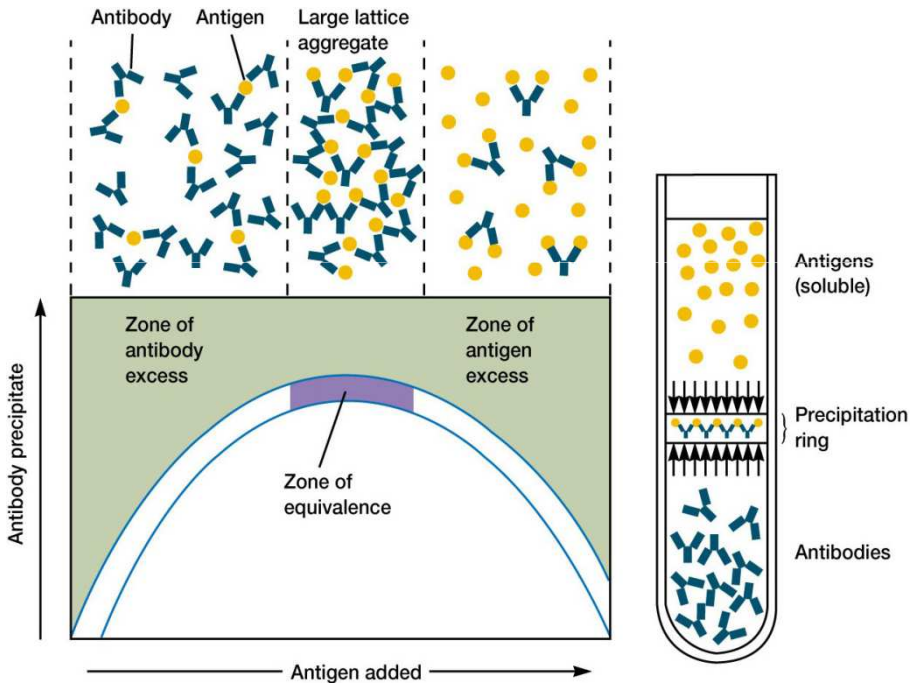


(a)

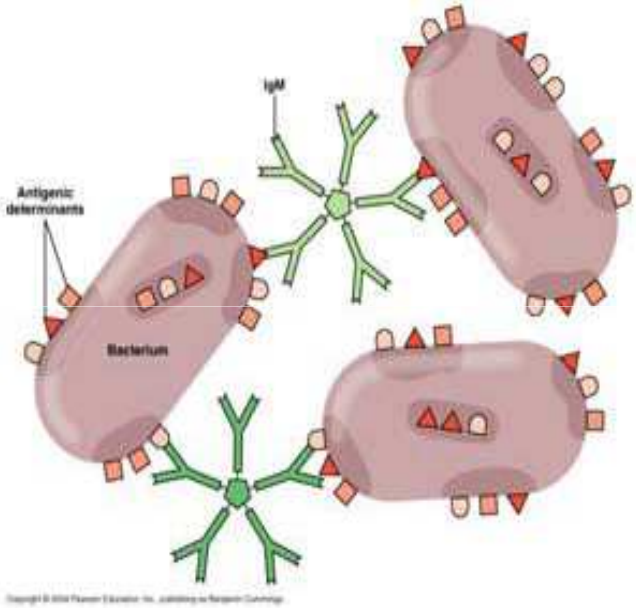


(b)

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



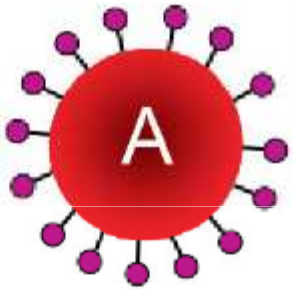
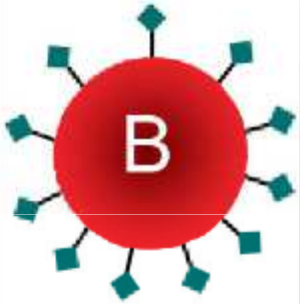
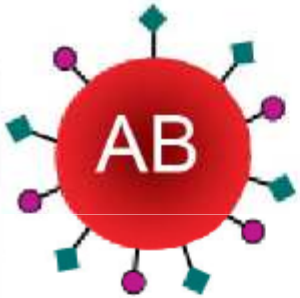
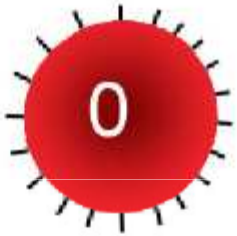
REAZIONI DI AGGLUTINAZIONE/PRECIPITAZIONE



Ricerca di IgM o IgG per verificare la infezione in corso o già avvenuta!!!

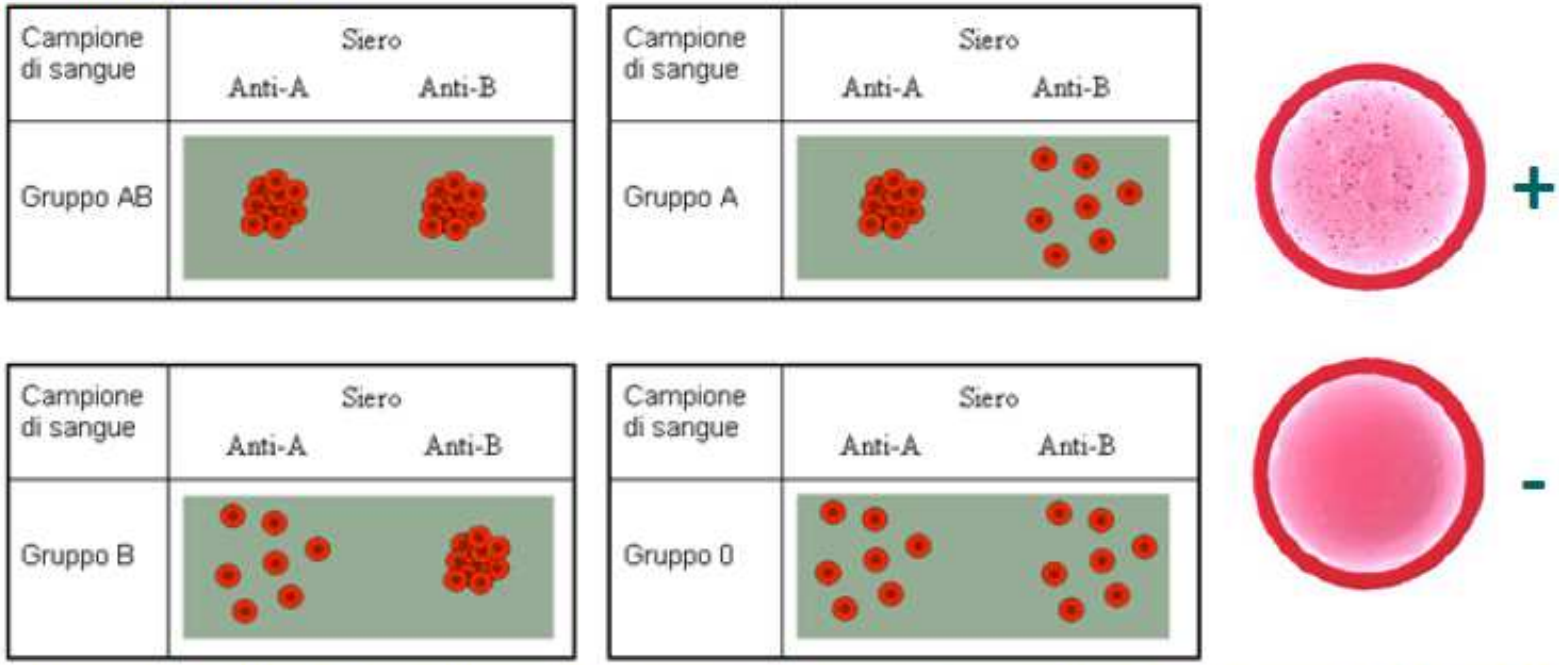
REAZIONI DI AGGLUTINAZIONE/PRECIPITAZIONE

Le reazioni di agglutinazione vengono utilizzate per deteriminare il gruppo sanguigno.

	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo AB	Gruppo 0
Tipo di globuli rossi				
Anticorpi presenti	Anti-B	Anti-A	Nessuno	Anti-A e Anti-B
Antigeni presenti	Antigene A	Antigene B	Antigeni A e B	Nessuno

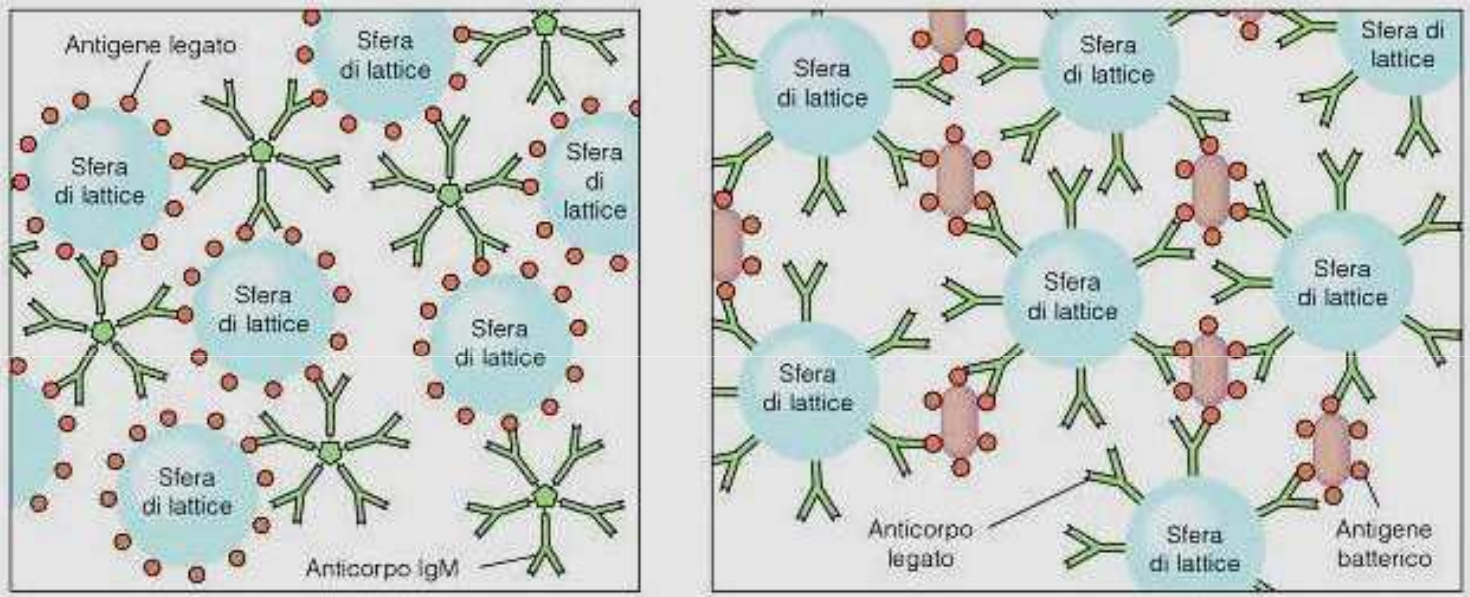
REAZIONI DI AGGLUTINAZIONE/PRECIPITAZIONE

La procedura consiste nel verificare la reazione del sangue di una persona con due diversi tipi di siero immune contenente anticorpi anti-A o anti-B. Su un vetrino vengono poste due gocce di sangue, ad una di esse viene aggiunta una goccia del siero "ANTI-A" e sull'altra una goccia del siero "ANTI-B".



Se non si verifica alcuna reazione il sangue in esame appartiene al gruppo 0 (zero), se invece si ha agglutinazione solo con l'anti-A è del gruppo A, se reagisce con l'anti-B è del gruppo B, e se osserviamo la reazione di agglutinazione con l'anti-B e con l'anti-A il sangue appartiene al gruppo AB.

REAZIONI DI AGGLUTINAZIONE/PRECIPITAZIONE



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

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

INFEZIONE BATTERICA: ricerca della Proteina C reattiva (CRP), prodotta dal fegato

- ***In vitro*** **lega il polisaccaride C dello Pneumococco**
- ***In vivo*** **può legare: polisaccaridi batterici, funghi, parassiti unicellulari etc**
- **Aumenta nelle malattie reumatiche di natura infiammatoria, alcuni tumori e in numerose condizioni patologiche**

PROTEINA C REATTIVA (PCR)

Determinazione qualitativa e semiquantitativa mediante agglutinazione al lattice della proteina c reattiva

PRINCIPIO DEL TEST

La Proteina C reattiva, contenuta nel siero, causa l'agglutinazione di particelle di lattice ricoperte di anticorpo anti-PCR.

CAMPIONI

Siero fresco. Stabilità 7 giorni a 2-8°C. Per periodi più lunghi congelare a –20°C, e portare a temperatura ambiente prima dell'analisi.
Campioni torbidi devono essere centrifugati.

REAGENTI

Lattice
Particelle di lattice ricoperte di anticorpo anti-PCR; conservanti e stabilizzanti.

Controllo Positivo
Soluzione stabilizzata, di origine umana, avente concentrazione PCR di 30 - 50 mg/L.

Controllo Negativo
Soluzione proteica non reattiva con il lattice.

Tutti i Reattivi contengono sodio azide 0.095%.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reattivi sono pronti all'uso.
La sospensione di Lattice va risospesa con molta cura. Dopo averla resa omogenea per dolce inversione, riempire e svuotare più volte la pompetta dosatrice.
Stabilità: fino alla scadenza indicata in etichetta conservati a 2-8°C. Non congelare.

MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Soluzione Fisiologica.
COD. AK00110 Slide e bastoncini a perdere.

Reagenti	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5	Area 6
Fisiologica	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Campione	50 µl	50 µl da 1	50 µl da 2	50 µl da 3	50 µl da 4	50 µl da 5
Scartare 50 µl dall'ultima area						
Lattice	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Titolo	12 mg/l	24 mg/l	48 mg/l	96 mg/l	192 mg/l	384 mg/l

VALORI DI RIFERIMENTO

Generalmente la concentrazione di proteina C Reattiva in adulti sani non raggiunge 5 mg/l, in stato di malattia da 4 a 8 ore dopo un evento acuto possono raggiungere livelli fino a 500 mg/l.
Il valore medio di proteina C reattiva su 143 individui sani è risultato 0.64 mg/l con un intervallo da 0.08 mg/l a 3.11 mg/l. (Clinal Chemistry 43:1; 52-58: 1997)
Ogni laboratorio dovrebbe stabilire dei propri intervalli di riferimento in relazione alla propria popolazione.

SIGNIFICATO CLINICO

La Proteina C Reattiva è una proteina presente normalmente nel siero, la quale incrementa significativamente dopo diverse forme di danni tessutali, infezioni batteriche e virali, infiammazioni, e neoplasia maligna. La PCR contribuisce alla difesa non specifica dell'attivazione dei complementi e all'accelerazione della fagocitosi.
Il PCR test ha un alto valore diagnostico su prove diagnostiche fatte sulla base di casi storici e scoperte cliniche.

Interferenze
Non si sono verificate interferenze in presenza di:

emoglobina	≤ 1000 mg/dl
bilirubina	≤ 20 mg/dl
lipidi	≤ 1000 mg/dl

Il fattore reumatico può interferire a concentrazioni ≥ 100 UI/ml.

Sieri torbidi o lipemici possono dare false positività.

CONSIDERAZIONI SULLO SMALTIMENTO

Il prodotto è destinato all'utilizzo all'interno di laboratori di analisi professionali. Per un corretto smaltimento dei rifiuti fare riferimento alla normativa vigente e alle schede informative in materia di sicurezza.

CONFEZIONI

CODICE AK00110 (100 TESTS)

Lattice	1 x 5 ml

CODICE AK00111 (100 TESTS)

Lattice	1 x 5 ml
Controllo Positivo	1 x 0.5 ml
Controllo Negativo	1 x 0.5 ml
Slide bollo nero	3
Bastoncini	50

CODICE AK00105 (Controlli PCR)

Controllo Positivo	1 x 0.5 ml
Controllo Negativo	1 x 0.5 ml

BIBLIOGRAFIA

Lars-Olof Hanson et al.Current Opinion in Infectious diseases 1997; 10: 196-201.
M.M. Pepsy. The Lancet 1981; March 21 : 653 –656.

METODI AL LATTICE PER AUTOMAZIONE

SIEROPROTEINE UMANE

Kit per la determinazione **immuno-turbidimetrica** quantitativa delle sieroproteine umane su sistemi automatici.

PRODOTTO	Cont.	REF.
APOLIPOPROTEINA A1	1x50; 1x2 ml	5635
APOLIPOPROTEINA B	1x50; 1x2 ml	5640
APTOGLOBINA	1x50; 1x2 ml	5645
ALFA 1-ANTITRIPSINA	1x50; 1x2 ml	5606
ALFA 2-MACROGLOBULINA	1x50; 1x2 ml	5615
ALFA 1-GLICOPROTEINA ACIDA	1x50; 1x2 ml	5610
ANTITROMBINA III	1x50; 1x2 ml	5630
CATENA KAPPA	1x80; 1x2 ml	5686
CATENA LAMBDA	1x80; 1x2 ml	5688
CERULOPLASMINA	1x80; 1x2 ml	5650
C1 ESTERASI INIBITORE	1x80; 1x2 ml	5655
COMPLEMENTO C3	1x50; 1x2 ml	5665
COMPLEMENTO C4	1x50; 1x2 ml	5670
IGG	1x50; 1x2 ml	5675
IGA	1x50; 1x2 ml	5680
IGM	1x50; 1x2 ml	5685
PREALBUMINA	1x80; 1x2 ml	5700
TRANSFERRINA	1x50; 1x2 ml	5710

CALIBRATORI

PRODOTTO	Cont.	REF.
CALIBRATORE SIERO PROTEINE Siero liquido	1x2 ml	5720
CALIBRATORE APO A1 - B Siero liofilizzato	1x1 ml	5725

SIERI DI CONTROLLI

PRODOTTO	Cont.	REF.
CONTROLLO SIERO PROTEINE Siero liquido	4x1 ml	5732
CONTROLLO APO A1 - B Siero liofilizzato	1x2 ml	5734

METODI IN AGGLUTINAZIONE AL LATTICE SU VETRINO

AUTOIMMUNITA'

PRODOTTO	Cont.	REF.
LUPUS ERYTHEMATOSUS (Anti n-DNA) Latex Test rapido di agglutinazione al lattice per l'identificazione di anticorpi anti-n-DNA.	50 Test	66148

GRAVIDANZA

PRODOTTO	Cont.	REF.
hCG Latex Metodo diretto, su vetrino, senza tampone di diluizione del campione (urina), con anticorpi Monoclonali immobilizzati su lattice - **Tempo di incubazione 2 minuti.** Sensibilità 200-300 mIU\ml.	50 Test	65120

MALATTIE INFETTIVE

PRODOTTO	Cont.	REF.
EPATITE B (Antigene di superficie) Latex Test al lattice su vetrino per la determinazione rapida dell'antigene di superficie dell'epatite B nel siero - **Tempo di reazione: 5 min** - Prodotto non destinato a screening di donazioni di sangue od emoderivati (D.L. 12/12/1991). **Solo per uso di ricerca, non per uso diagnostico in vitro.**	50 Test	66150
MONONUCLEOSI Latex Metodo rapido su slide al lattice per la determinazione qualitativa e semi-quantitativa degli anticorpi eterofili associati alla mononucleosi infettiva (IM) su siero o plasma - Reagenti liquidi pronti all'uso in flaconi dotati di contagocce - Controllo positivo e negativo compresi nel kit - **Tempo di risposta 2 min.**	50 Test	66152
ROTAVIRUS Latex Test rapido di agglutinazione al lattice per l'identificazione di Rotavirus - Kit completo di controllo positivo e negativo.	50 Test	LC200
SIFILIDE – RPR (VDRL) Test di agglutinazione su vetrino con microparticelle di carbone - Metodo qualitativo e semiquantitativo - Tempo di reazione 8 min. - Kit completo di controllo positivo e negativo.	150 Test	66035
SIFILIDE - TPHA Test basato su emoagglutinazione indiretta su micropiastre con eritrociti sensibilizzati per la determinazione degli anticorpi specifici contro il Treponema Pallidium - Test qualitativo / quantitativo – Test rapido 45 min. – Kit completo di controllo positivo e negativo.	100 Test	66162
TOXO Latex Test al lattice su vetrino per la ricerca dell'antigene Toxoplasma Gondii - Kit completo di controllo positivo e negativo.	100 Test	66175

REUMATOLOGIA

PRODOTTO	Cont.	REF.
ASO (ANTISTREPOLYSIN O) Latex SD **ASO (ANTISTREPOLYSIN O) Latex SD / Completo di controlli** Test al lattice su vetrino senza diluizione (SD) del campione per la determinazione degli anticorpi antistreptolisina O nel siero - Test qualitativo/semi-quantitativo - **Tempo di reazione 2 minuti.**	100 Test 100 Test	66125 66130
CPR (PROTEINA C REATTIVA) Latex SD **CPR (PROTEINA C REATTIVA) Latex SD / Completo di controlli** Test al lattice su vetrino senza diluizione (SD) del campione per la determinazione della proteina C reattiva nel siero - Test qualitativo/semi-quantitativo - Tempo di reazione **2 minuti.**	100 Test 100 Test	66126 66140
RF (FATTORE REUMATOIDE) Latex SD **RF (FATTORE REUMATOIDE) Latex SD / Completo di controlli** Test al lattice su vetrino senza diluizione (SD) del campione per la determinazione del fattore reumatoide nel siero - Test qualitativo/semi-quantitativo - **Tempo di reazione 2 minuti.**	100 Test 100 Test	66128 66160
WAALER ROSE Latex SD **WAALER ROSE Latex SD / Completo di controlli** Test emoagglutinazione su vetrino senza diluizione (SD) del campione per la determinazione dei fattori reumatoidi - Sensibilità 6 IU/l - Test qualitativo e semi-quantitativo - **Tempo di reazione 2 minuti.**	100 Test 100 Test	66129 66161

REAGENTI PER GRUPPI SANGUIGNI

ANTISIERI MONOCLONALI

PRODOTTO	Cont.	REF.
ANTI - A Monoclonale	10 ml	5400
ANTI - B Monoclonale	10 ml	5410
ANTI - A+B Monoclonale	10 ml	5420
ANTI - D IGG+IGM (Rho) Monoclonale	10 ml	5430

FENOTIPI RHESUS

PRODOTTO	Cont.	REF.
ANTI – C Monoclonale	2 ml	5460
ANTI – c Monoclonale	2 ml	5462
ANTI – E Monoclonale	2 ml	5464
ANTI – e Monoclonale	2 ml	5466
ANTI - C+D+E Monoclonale	5 ml	5468
ANTI – Kell Monoclonale	5 ml	5469

SIERI ANTIGLOBULINE PER TEST DI COOMBS

PRODOTTO	Cont.	REF.
ANTI GLOBULINA UMANA (COOMBS)	10 ml	5450
ALBUMINA BOVINA 22 %	10 ml	5455
ALBUMINA BOVINA 30 %	10 ml	5484

REAZIONI DI PRECIPITAZIONE

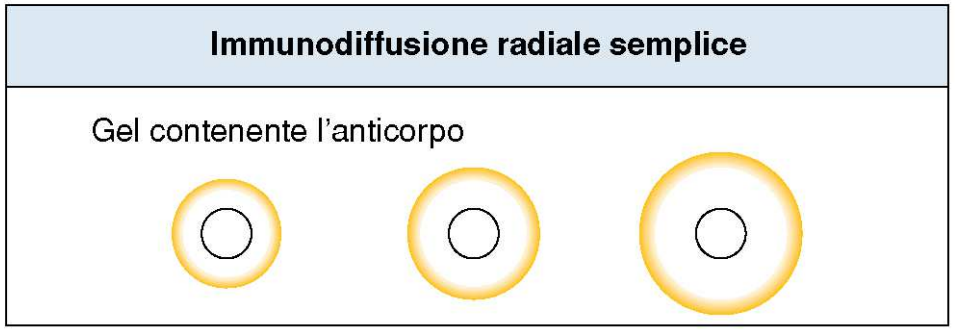
Se l'immunoprecipitazione avviene in un gel, si parla più propriamente di

Immunodiffusione

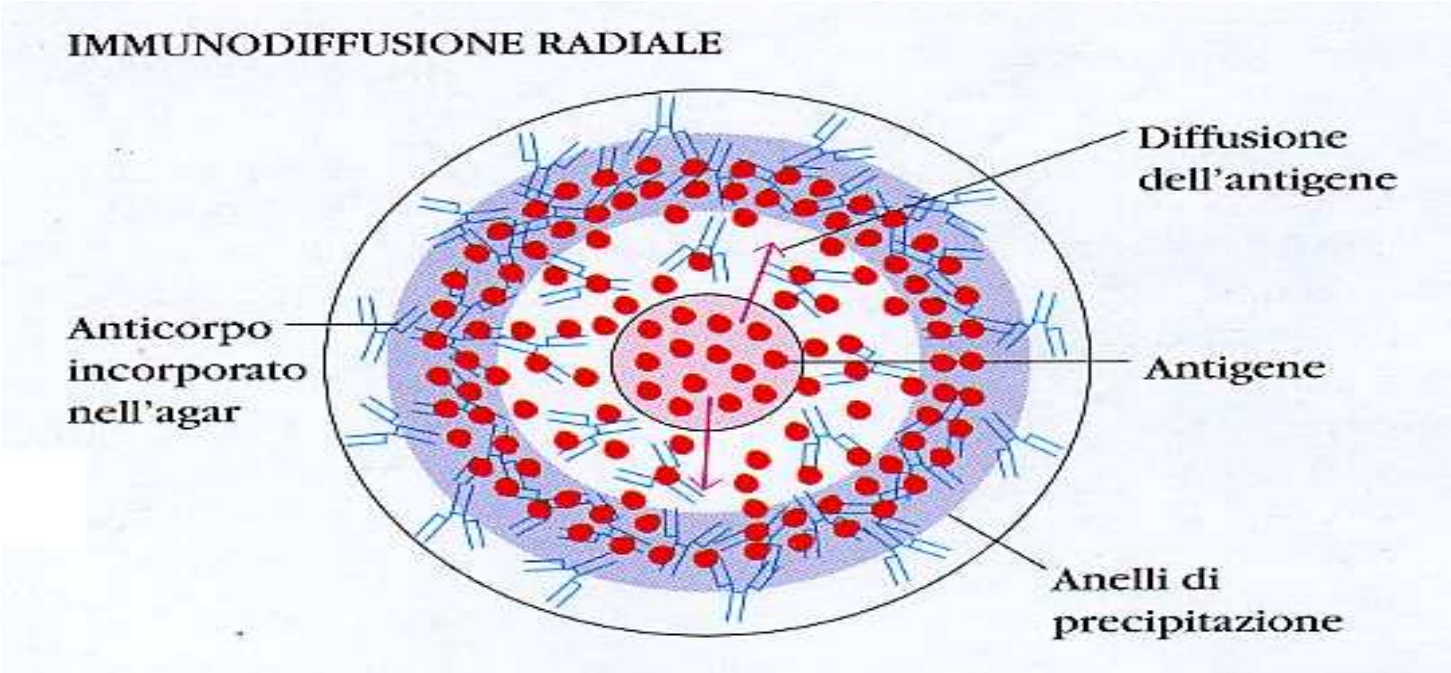
Metodi di immunodiffusione più comuni per il **dosaggio di antigeni**:

- **Immunodiffusione radiale semplice**
- **Immunodiffusione doppia**
- **Immunoelettroforesi**

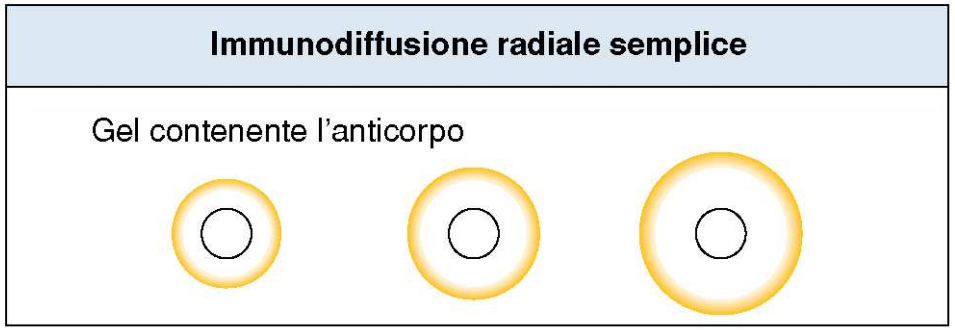
Immunodiffusione radiale semplice



Il diametro dell'anello sarà funzione della concentrazione dell'antigene

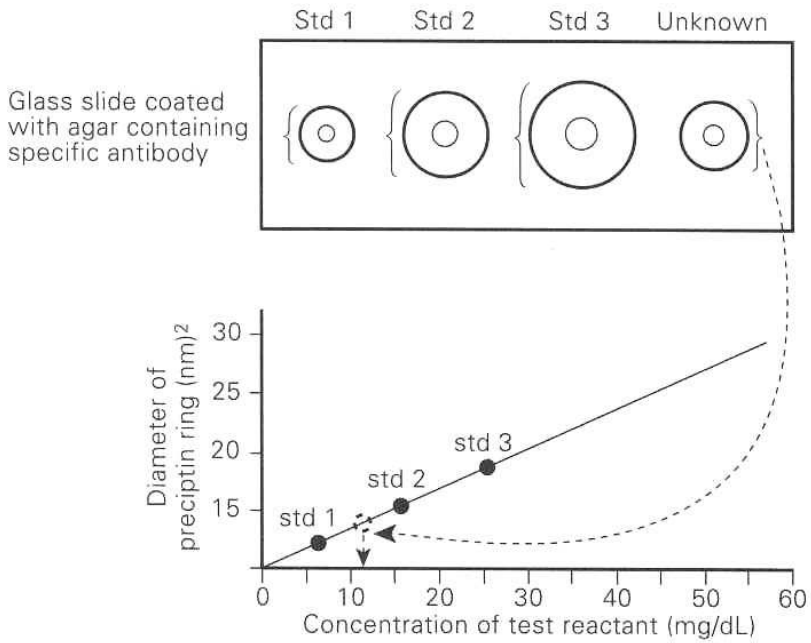


Immunodiffusione radiale semplice



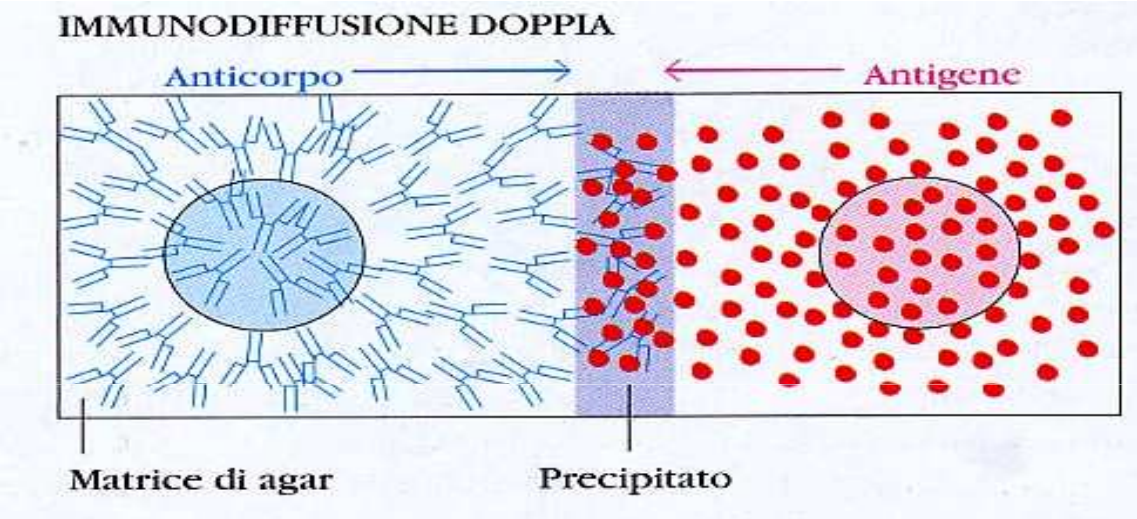
Il diametro dell'anello sarà funzione della concentrazione dell'antigene

Costruzione retta di taratura:



REAZIONI DI PRECIPITAZIONE

Immunodiffusione doppia (metodo di Ouchterlony)

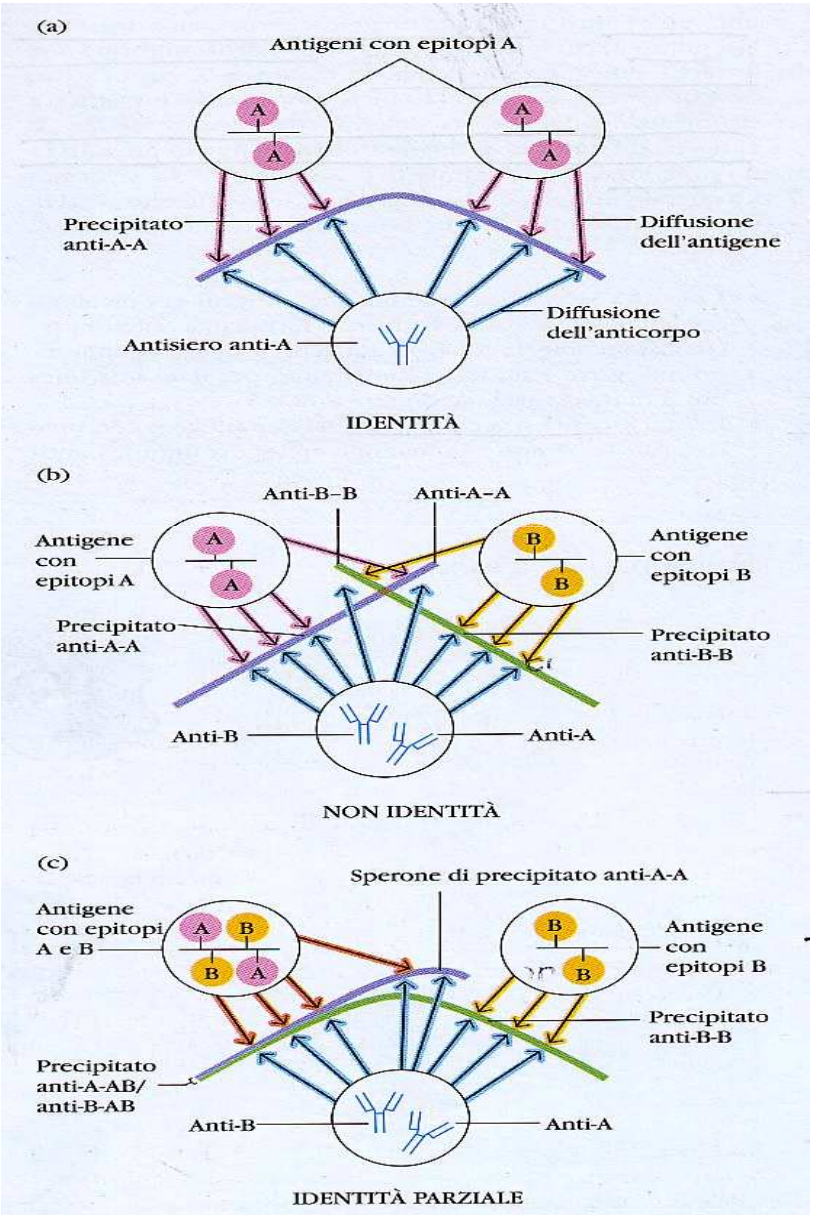


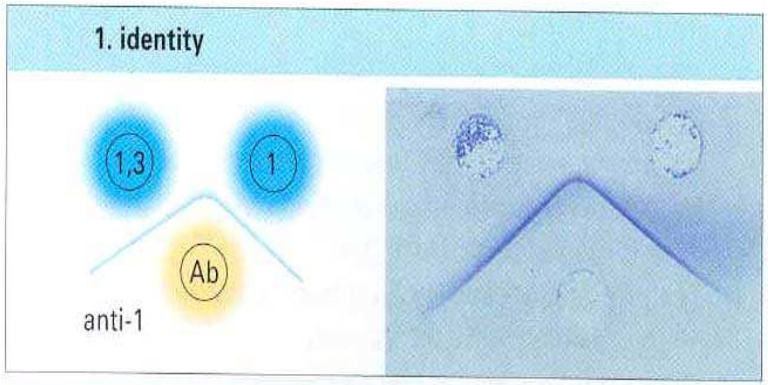
Immunodiffusione doppia		
Antigene a a Anticorpo per: anti-a Identità	a b anti-a + anti-b Non identità	a + b a anti-a + anti-b Identità parziale

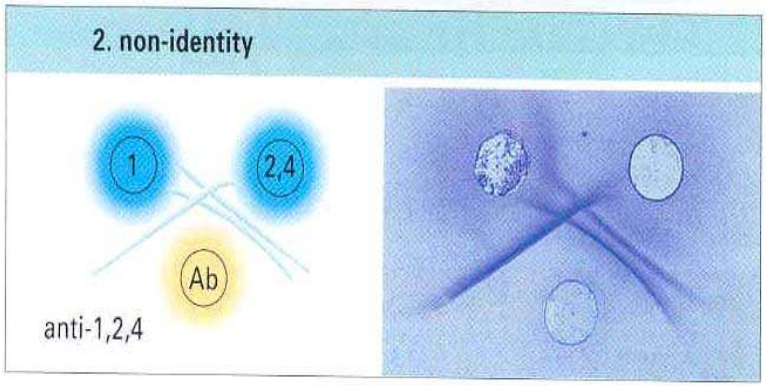
a e b : epitopi sugli antigeni

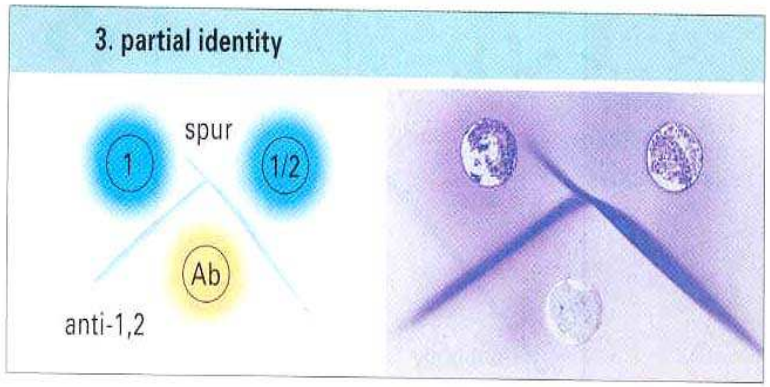
La posizione della banda dà una stima semiquantitativa della concentrazione di antigene

REAZIONI DI PRECIPITAZIONE









PIASTRE IMMUNODIFFUSIONE RADIALE (RID)

IMMUNOGLOBULINE

PRODOTTO	Cont.	REF
IgG (2500 - 25000 mg/l)	1x12 Test	5735
IgA (640 - 6400 mg/l)	1x12 Test	5737
IgM (380 - 3800 mg/l)	1x12 Test	5739
KIT COMBI (IgG+IgA+IgM)	1x12 Test	5741/A

FRAZIONI DEL COMPLEMENTO

PRODOTTO	Cont.	REF
C3	1x12 Test	5743
C4	1x12 Test	5745
C3/C4	2x6 Test	5746

PLASMAPROTEINE

PRODOTTO	Cont.	REF
ALBUMINA	1x12 Test	5742
ALFA 1 ANTITRIPSINA	1x12 Test	5747
ALFA 1 GLICOPROTEINA ACIDA	1x12 Test	5750
APOLIPOPROTEINA A1	1x12 Test	5749
APOLIPOPROTEINA B	1x12 Test	5751
APOLIPOPROTEINA A1/B	2x6 Test	5752
APTOGLOBINA	1x12 Test	5753
CERULOPLASMINA	1x12 Test	5754
TRANSFERRINA	1x12 Test	5755

FATTORI DELLA COAGULAZIONE

PRODOTTO	Cont.	REF
ANTITROMBINA III	1x12 Test	5759
FIBRINOGENO	1x12 Test	5761

MICROPROTEINURIA DI BENCE-JONES

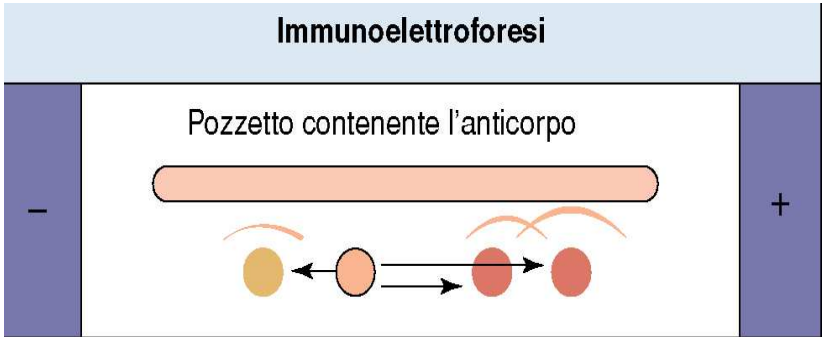
PRODOTTO	Cont.	REF
BENCE-JONES Test **immunodiffusione doppia** per la ricerca nelle urine delle catene **Kappa e Lambda**.	20 Test	66173
CATENA KAPPA	1x12 Test	5764
CATENA LAMBDA	1x12 Test	5766
CATENA KAPPA / CATENA LAMBDA	2x6 Test	5768

SIERO DI CONTROLLO PROTEINE

PRODOTTO	Cont.	REF.
SIERO DI CONTROLLO RID	4x0,5 ml	5762

Immunoelettroforesi

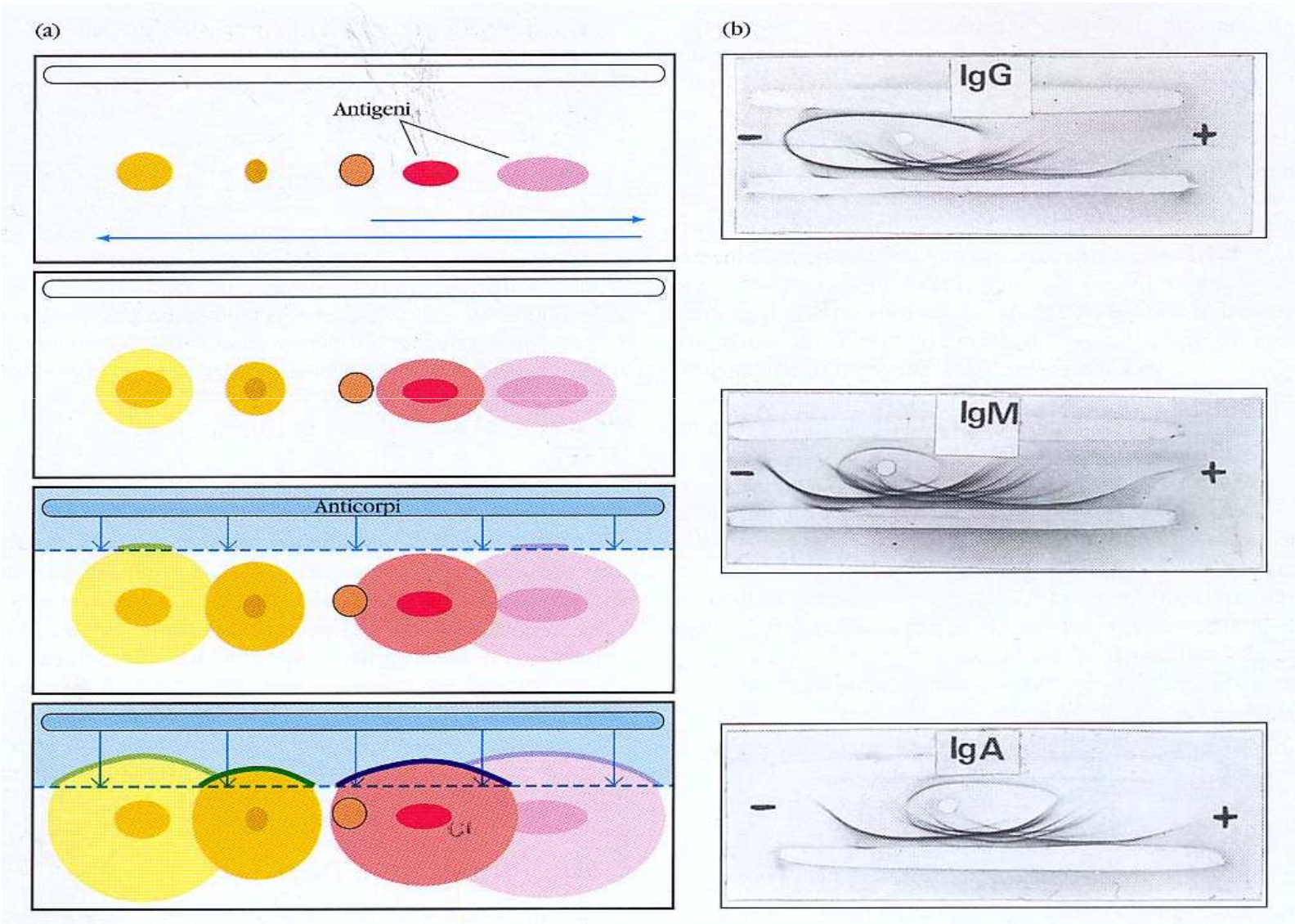
Si unisce la separazione di proteine (antigeni) mediante elettroforesi con la specificità della reazione di immunoprecipitazione:



Usata per indagini qualitative:

- ✓ nell'alterato anabolismo delle IgG (gammapatie mono- e policlonali)
- ✓ nello studio delle anomalie della sintesi proteica (analbuminemia, agammaglobulinemia, ecc)

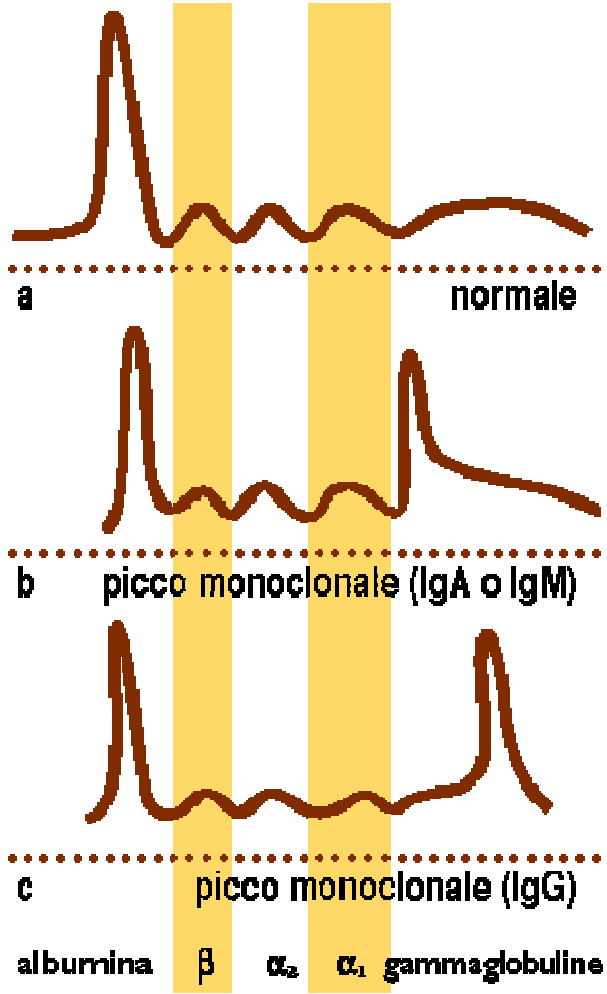
REAZIONI DI PRECIPITAZIONE



REAZIONI DI PRECIPITAZIONE

Quando un clone di plasmacellule produce una proteina M, si ha una modifica dell'elettroforesi. Una proteina monoclonale può migrare ovunque nella regione delle gamma globuline. Le IgM e le IgA tendono a migrare più velocemente rispetto alle IgG (figure b e c). Per l'identificazione certa della proteina M si può utilizzare l'immunoelettroforesi.

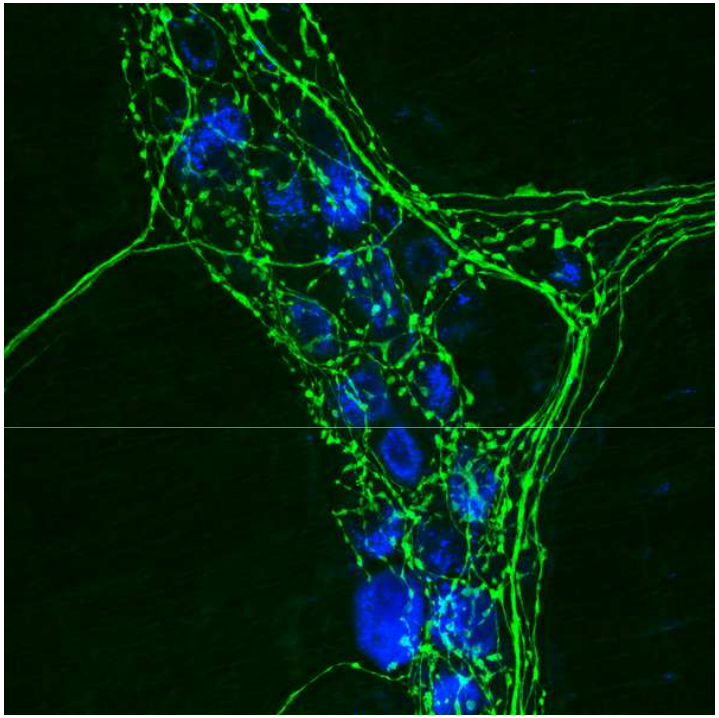
L'**immunoelettroforesi** si avvale dell'applicazione di **anticor**pi **contro le proteine sieriche già elettroforeticamente separate**: **si generano archi di precipitazione dovuti alla reazione tra antigene e anticorpo**. Se è presente una gammopatia monoclonale, si produrrà una modifica dell'arco di precipitazione sulla banda delle IgA o delle IgG o delle IgM, che permette di riconoscere a quale classe di immunoglobuline appartiene la proteina M.



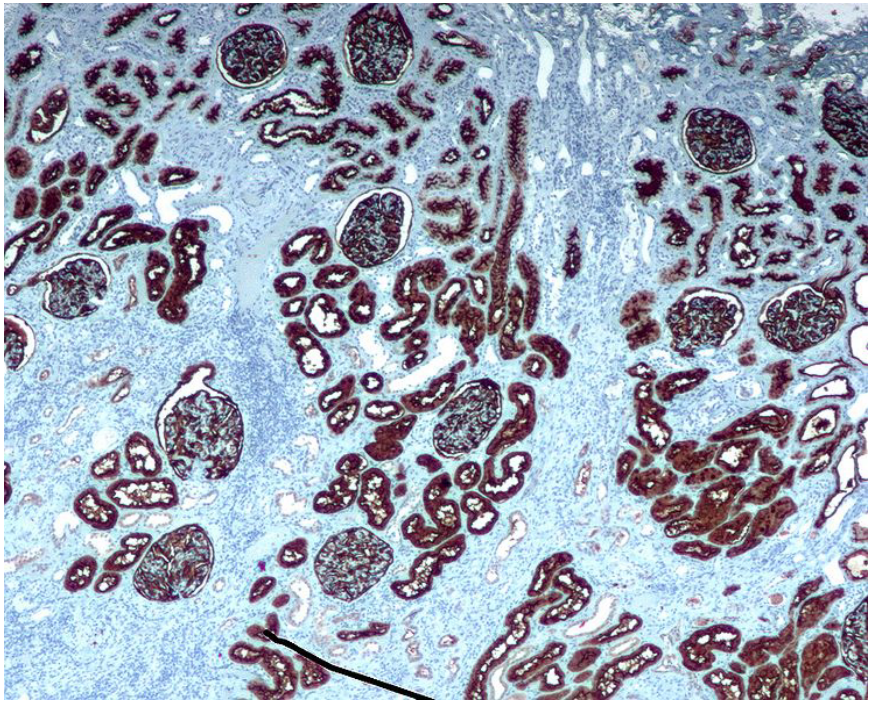
Immunoistochimica (IHC)

- Tecnica usata per mostrare la presenza di antigeni (per lo più proteine) nella loro esatta localizzazione in sezioni istologiche di tessuti, preservandone struttura ed integrità, usando una specifica reazione antigene-anticorpo, ed in cui **l'anticorpo è marcato da molte e differenti specie chimiche** (essenzialmente enzimi, come HRP o AP, capaci di catalizzare una reazione chimica) o da fluorofori (FITC);
- L'immunoistochimica prevede la combinazione dell'immunologia e della microscopia, in quanto il complesso antigene-anticorpo deve essere visibile al microscopio;
- Usati anticorpi policlonali e monoclonali.

IMMUNOISTOCHIMICA

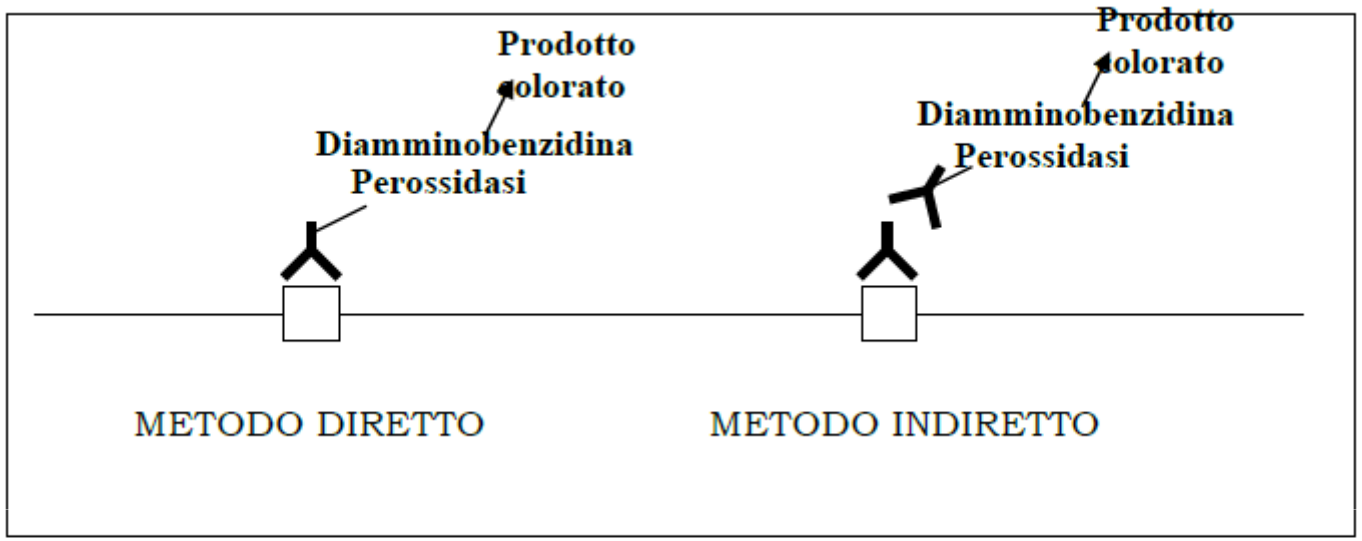


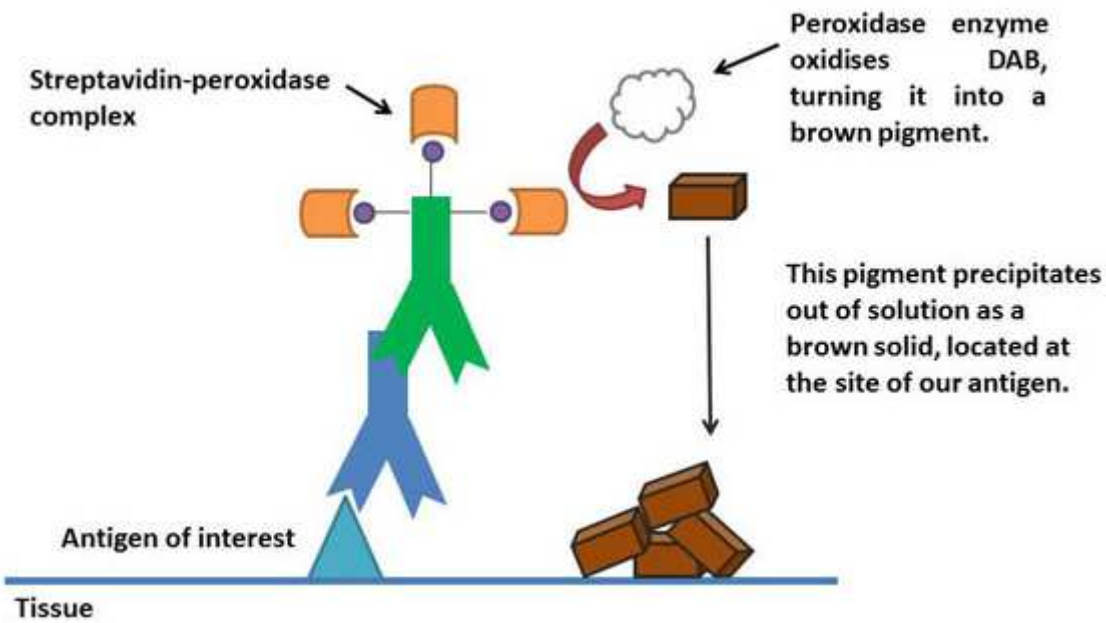
IHC di tirosin-idrolasi (TH) in verde, negli assoni dei neuroni



Colorazione IHC di una sezione di rene con il marcatore CD10

IMMUNOISTOCHIMICA



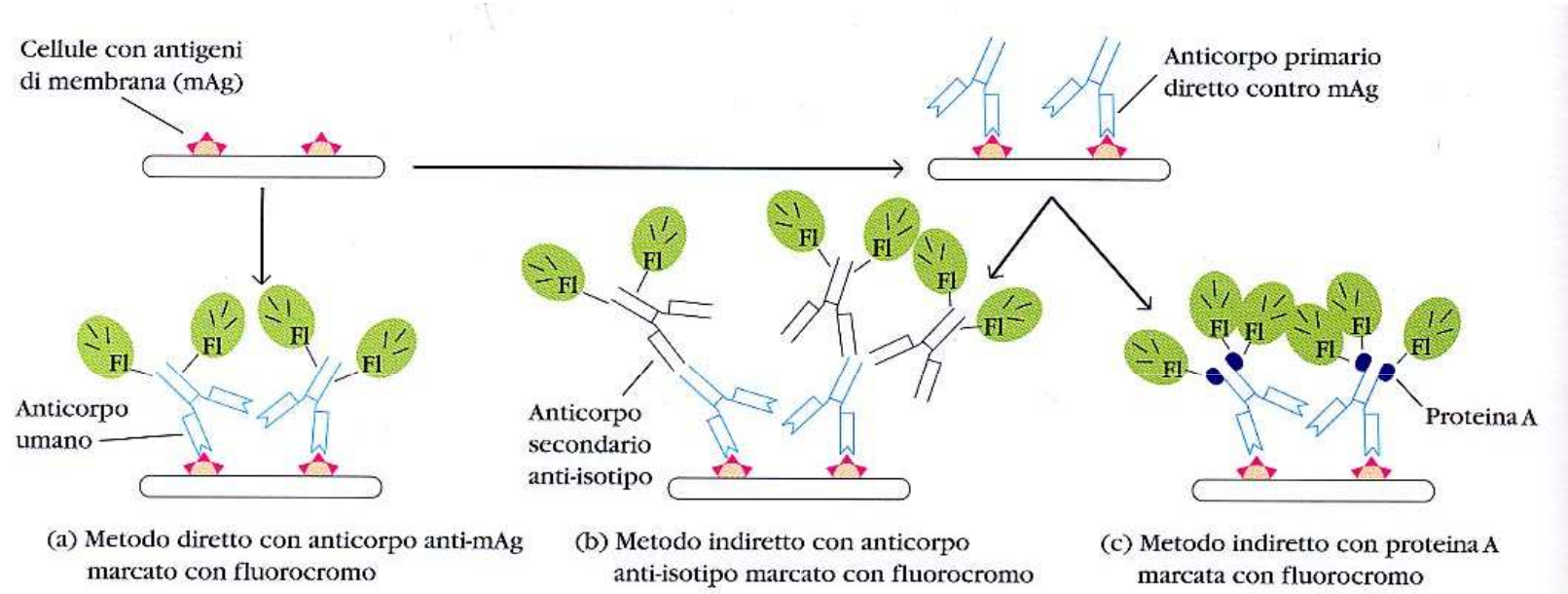


USO di IHC

- Antigeni tissutali o di superficie cellulare per la diagnosi di patologie autoimmuni
- Markers tumorali
- Tipizzazione tumorale
- Marcatori di differenziamento
- Marcatori agenti infettivi (virus, batteri)

Immunofluorescenza (IF)

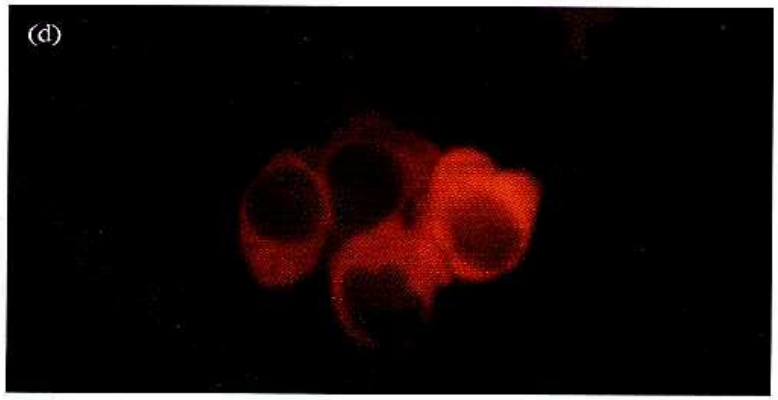
Gli Ab sono marcati con molecole fluorescenti

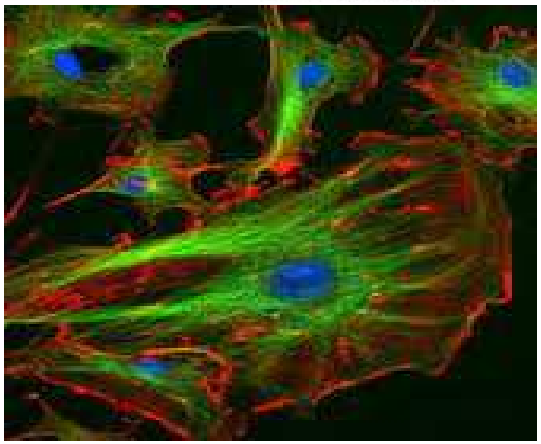


(a) Metodo diretto con anticorpo anti-mAg marcato con fluorocromo

(b) Metodo indiretto con anticorpo anti-isotipo marcato con fluorocromo

(c) Metodo indiretto con proteina A marcata con fluorocromo





IMMUNOFLUORESCENZA

- Le molecole fluorescenti assorbono luce a una determinata lunghezza d'onda (eccitazione) e la emettono ad un'altra lunghezza d'onda (emissione);
- Se gli Ab sono marcati con i fluorocromi, possono essere rilevati attraverso la valutazione della luce colorata emessa in seguito all'eccitazione a una determinata lunghezza d'onda;
- La luce emessa può essere rivelata con un microscopio a fluorescenza;
- I coloranti possono essere coniugati alla regione Fc di una molecola senza modificarne la specificità;
- Coloranti: fluoresceina, rodamina, ficoeritrina ecc.

Citofluorimetria (CFM)

- E' una tecnica che permette la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un mezzo fluido;
- Rende possibile la misurazione di proprietà multiple di singole cellule ad una velocità molto rapida, permettendo una dettagliata analisi qualitativa e quantitativa;
- Si basa sull'impiego di Ab monoclonali fluorescenti;
- Consente l'analisi (e *sorting*) delle diverse popolazioni di cellule del sangue, che esprimono sulla propria superficie **markers specifici** che le discriminano le une dalle altre.

APPLICAZIONI

- Permette di analizzare un elevato numero di cellule in breve tempo (50.000 cellule in pochi secondi), quantificando numerosi parametri per ogni singola cellula.
- Permette ad es. di determinare il contenuto di DNA, di RNA, i diversi sottotipi cellulari, gli organelli intracellulari, l'attività di alcuni enzimi.

  - ✓ Studio della ploidia e della proliferazione cellulare;
  - ✓ Analisi del ciclo cellulare;
  - ✓ Analisi immunofenotipica multiparametrica;
  - ✓ Risposta del sistema immunitario alla somministrazione di vaccini (cellule antigene specifiche, produzione di citochine, ecc);
  - ✓ Livelli di apoptosi in patologie associate a deplezione cellulare (es AIDS) o accumulo cellulare (tumori);
  - ✓ ecc. ecc. !!!!!

Principio di funzionamento del citometro a flusso

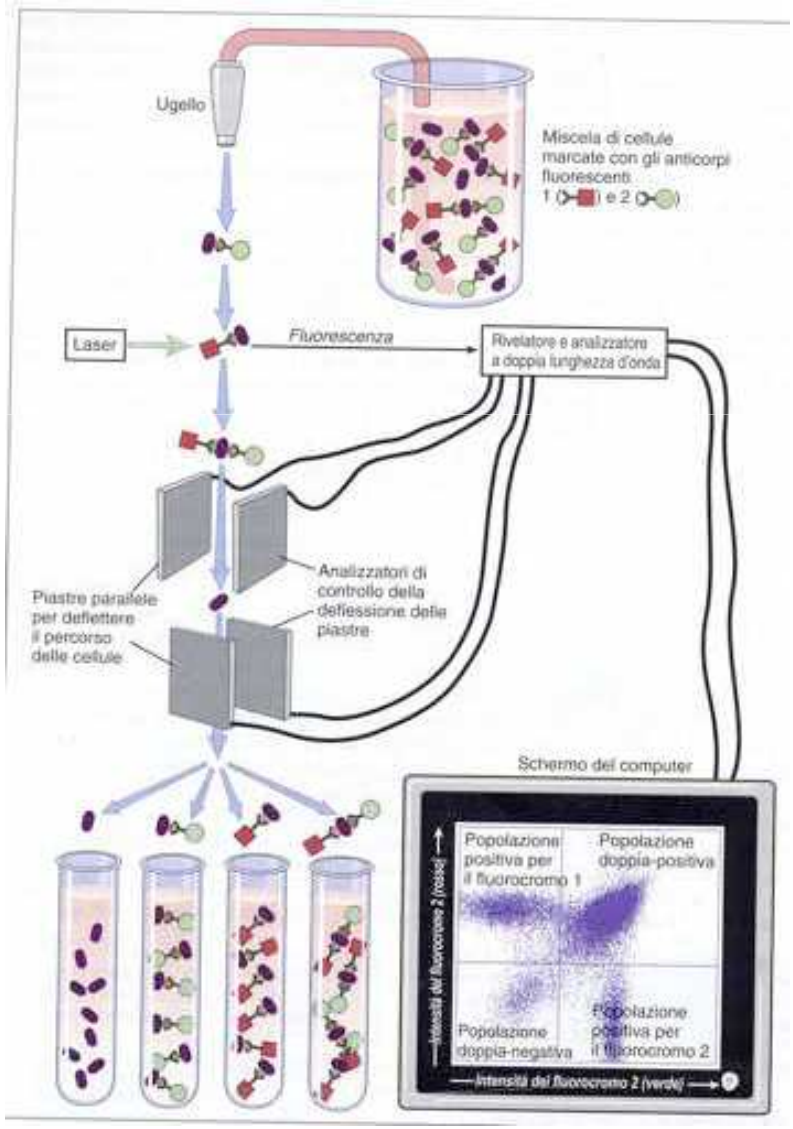
(FACS, *fluorescence-activated cell sorter)*

1. Le cellule, marcate, di una popolazione eterogenea vengono aspirate dalla provetta e immesse in una camera di flusso dove vengono separate le une dalla altre.

2. Ogni singola cellula viene poi attraversata da un fascio di luce che eccita i fluorocromi (anticorpi fluorescenti) e determina l'emissione di un segnale fluorescente

3. Il segnale passando attraverso un sistema di filtri e specchi raggiunge un rivelatore; viene quindi processato elettronicamente, trasformato da analogico a digitale e inviato all'analizzatore, che elabora il dato e lo visualizza tramite un grafico

4. Attraverso piastre di deflessione le cellule analizzate possono essere raccolte separatamente tramite un processo definito "sorting".



LA CITOFLUORIMETRIA NELLA DIAGNOSTICA DELLE MALATTIE EMATOLOGICHE

Campioni:

- ✓ Sangue periferico
- ✓ Sangue midollare
- ✓ Liquido pleurico, ascitico, pericardico
- ✓ Sospensione cellulare da tessuto

Marcatori: la nomenclatura CD

Si considera membro di un ***Cluster of Differentiation*** un marcatore di superficie che:

- ✓ identifica un particolare tipo cellulare o un certo stadio differenziativo
- ✓ ha una struttura biochimica definita
- ✓ è riconosciuto da un gruppo di Ab monoclonali diversi

CD13 e CD33 → leucemia linfoblastica acuta

CD34 → marker 'staminale' in AML (prognosi infausta, terapia più aggressiva)

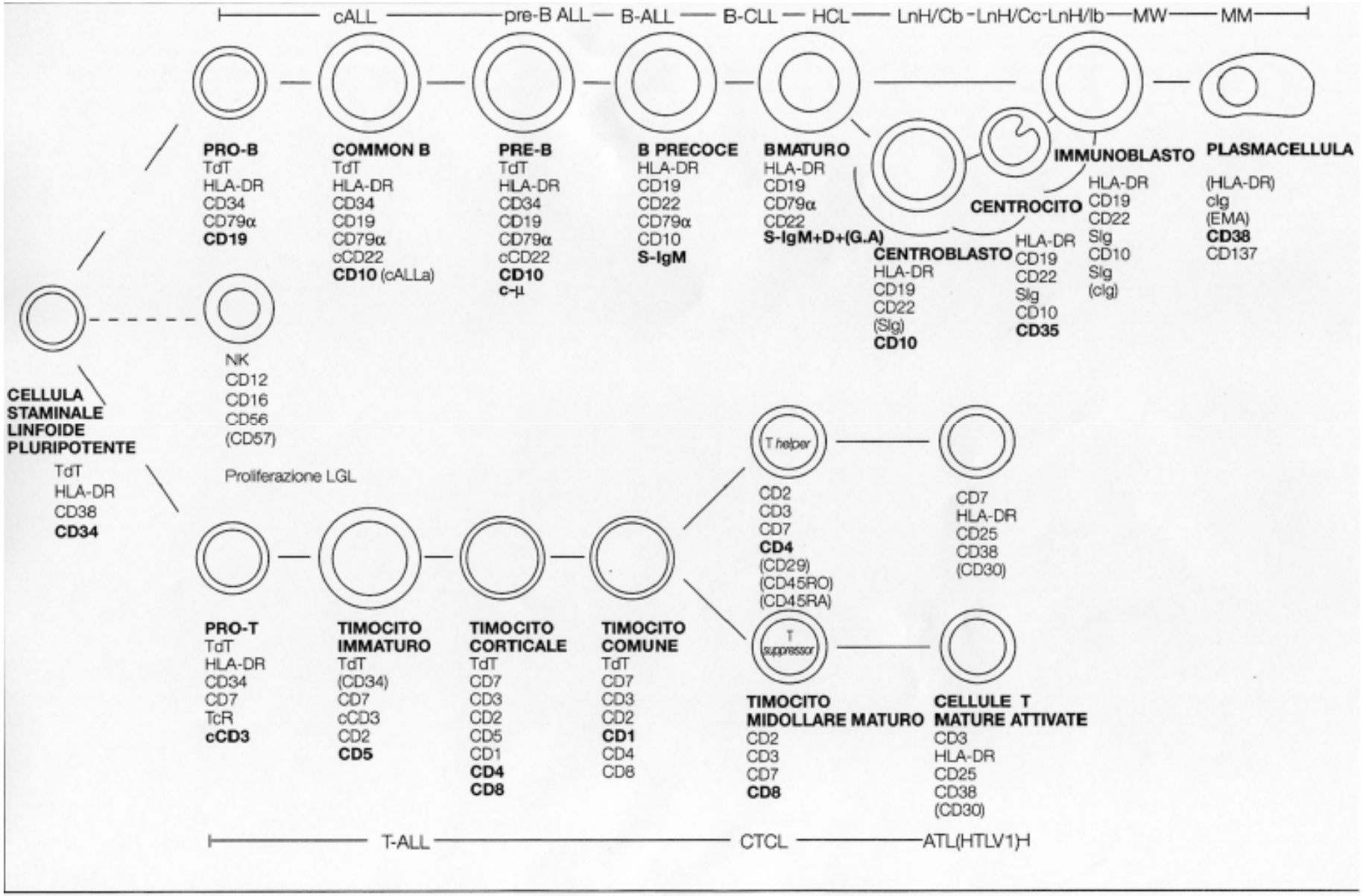
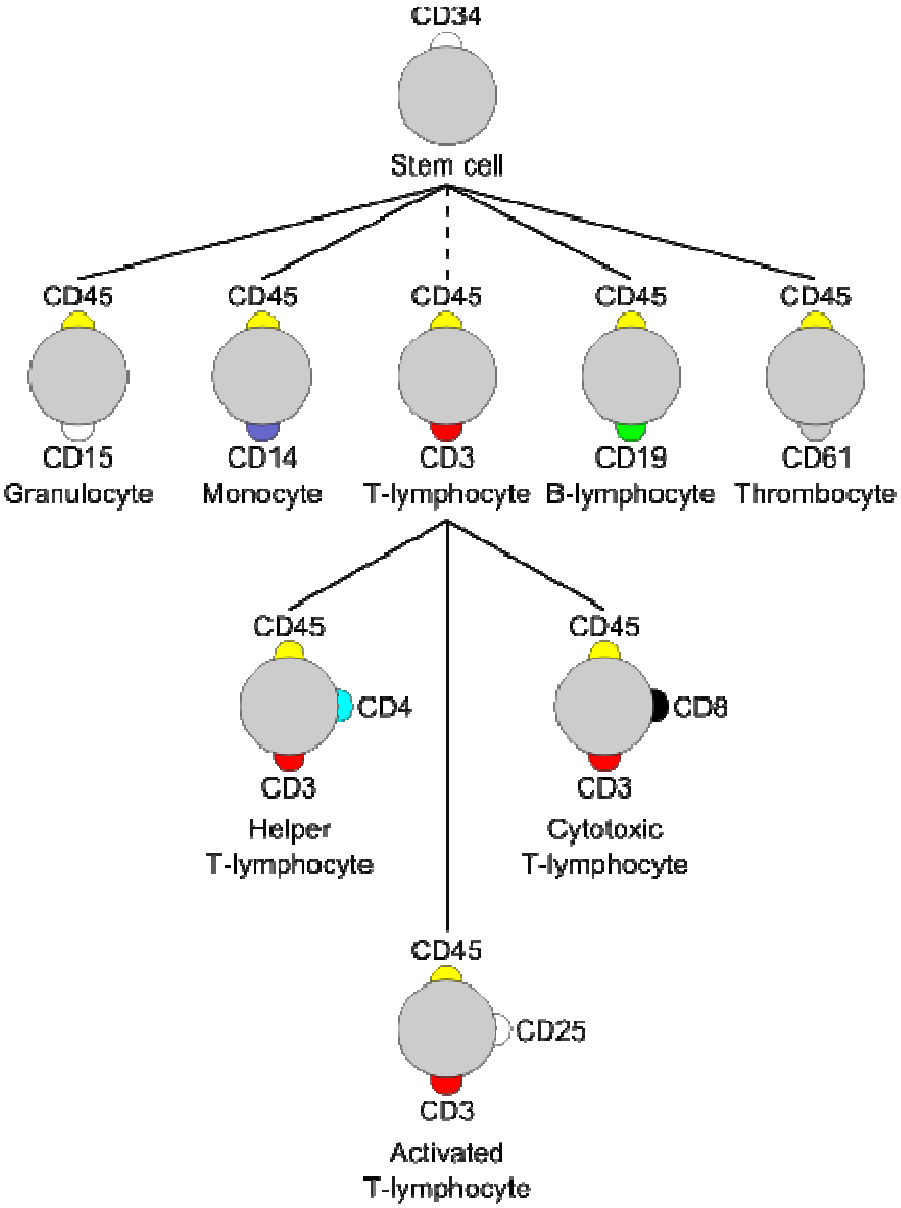


Figura 12.1 Schema della linfopoiesi. Per ogni singolo stadio maturativo sono state elencate le principali forme linfoproliferative a esso correlate.

CITOFLUORIMETRIA

Type of cell	CD markers
stem cells	CD34+, CD31-, CD117
all leukocyte groups	CD45+
Granulocyte	CD45+, CD11b, CD15+, CD24+, CD114+, CD182+[6]
Monocyte	CD45+, CD14+, CD114+, CD11a, CD11b, CD91+,[6] CD16+[7]
T lymphocyte	CD45+, CD3+
T helper cell	CD45+, CD3+, CD4+
T regulatory cell	CD4, CD25, and Foxp3
Cytotoxic T cell	CD45+, CD3+, CD8+
B lymphocyte	CD45+, CD19+ or CD45+, CD20+, CD24+, CD38, CD22
Thrombocyte	CD45+, CD61+
Natural killer cell	CD16+, CD56+, CD3-, CD31, CD30, CD38



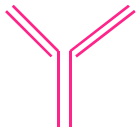
Metodi radioimmunologici

RIA: Radio-Immuno-Assay
(1977 premio Nobel per la medicina a Rosalyn Yalow)

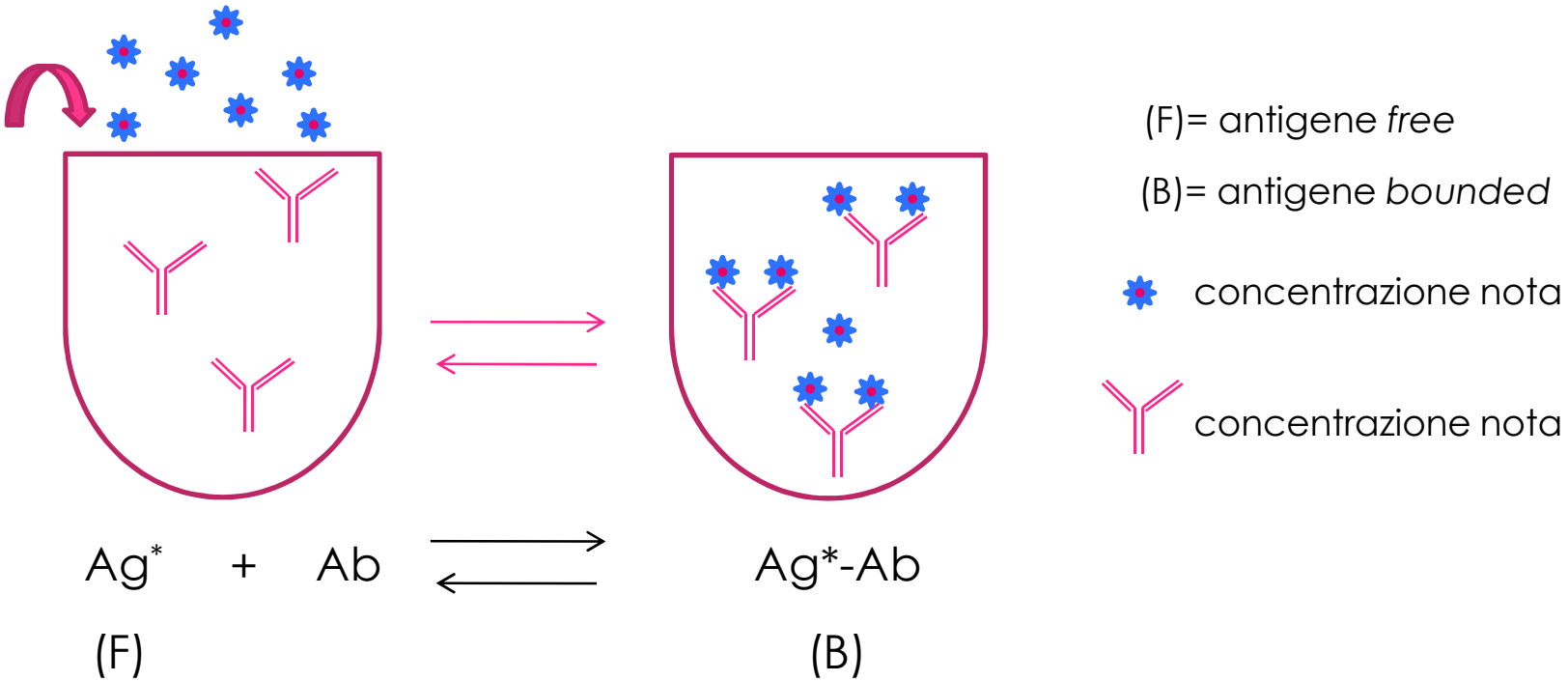
Metodo, per la misura di proteine, **ormoni** ecc. in fluidi biologici, basato sulla **competizione**, tra un antigene non marcato ed una quantità nota dello stesso antigene marcato, per il legame con un numero limitato e costante di siti anticorpali (**DOSAGGI COMPETITIVI ED IN DIFETTO DI REATTIVO**)

Antigene non marcato, Ag

Antigene marcato (^{125}I), Ag*


Anticorpo, Ab

1)

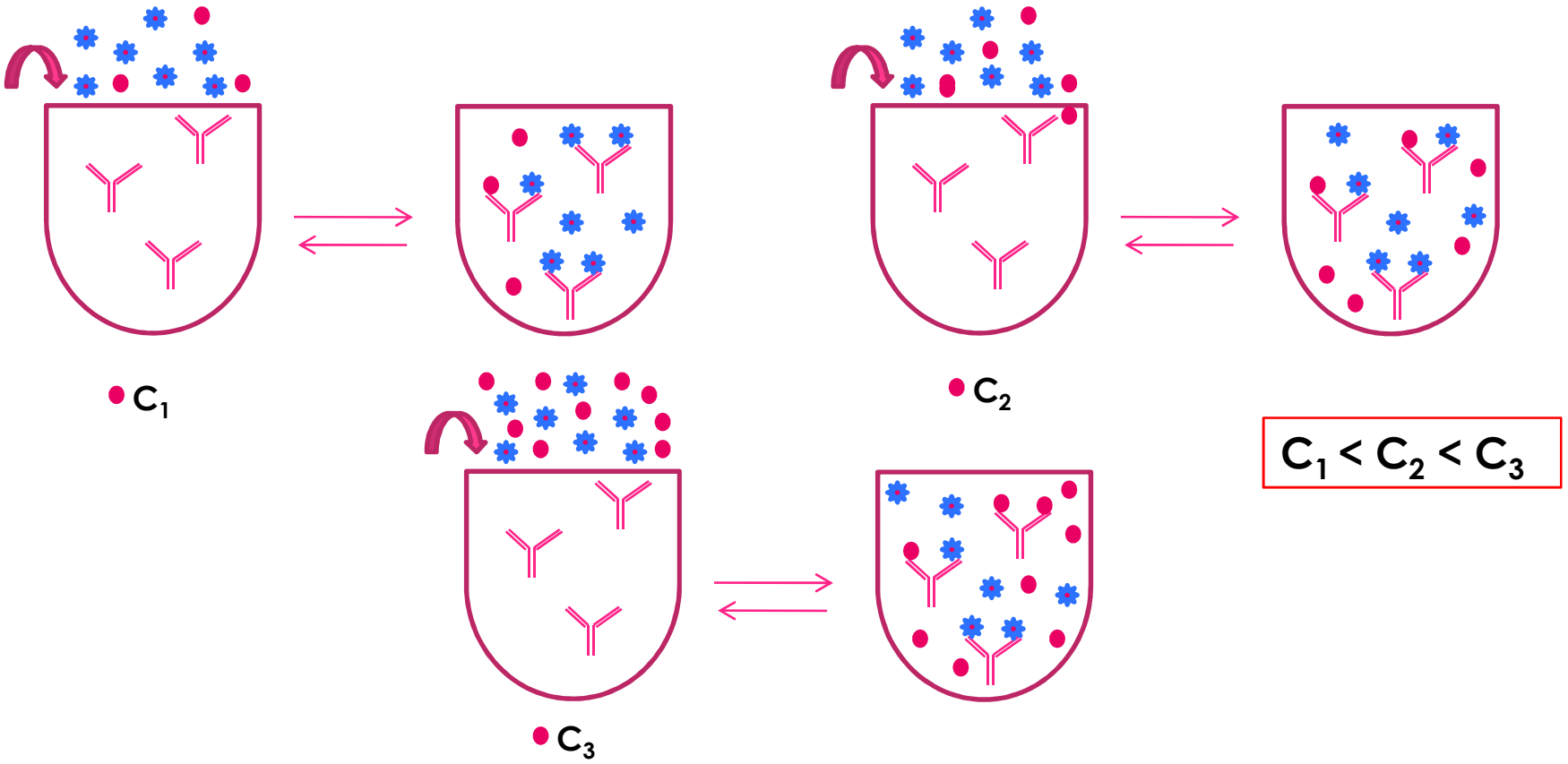


All'equilibrio, dopo aver separato l'immunocomplesso marcato dall'antigene marcato libero, si procede alla misura della radioattività (dosaggio dei raggi γ) delle due soluzioni:

$$\frac{\text{radioattività legata (B)}}{\text{radioattività libera (F)}} \quad \text{all' equilibrio}$$

2) Costruzione retta di taratura:

Supponiamo di aggiungere lo stesso tipo di antigene, ma **non marcato**, in **quantità** di volta in volta **NOTE (standard necessari per la costruzione della retta)**



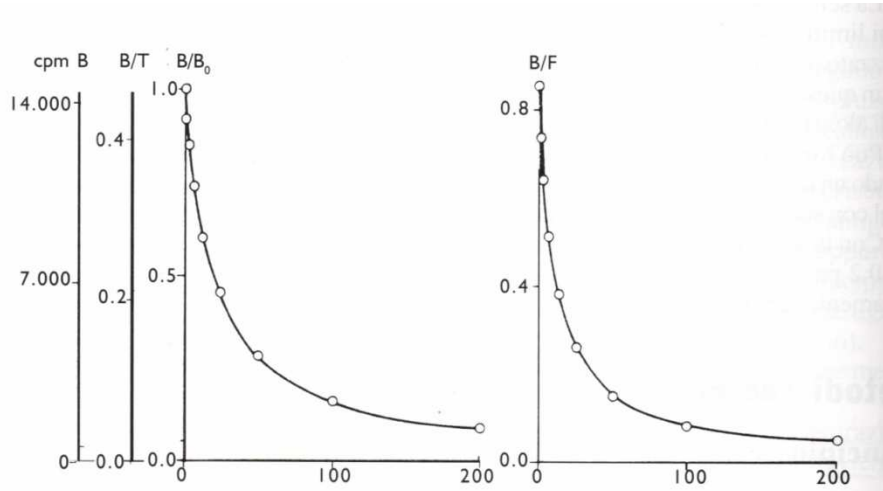
Aumentando la concentrazione dell'antigene non marcato, favorisco la COMPETIZIONE con l'antigene marcato per i siti di legame sull'anticorpo

RIA

Sempre separando l'immunocomplesso dall'antigene libero, si misura la radioattività delle due soluzioni, monitorando lo spiazzamento dell'antigene marcato:

$$\frac{\text{radioattività legata (B)}}{\text{radioattività libera (F)}}$$

ogni volta che si aggiunge una quantità nota di antigene non marcato, TALE RAPPORTO CAMBIA (**diminuisce** all'**aumentare** della quantità di **antigene non marcato**)



Si può costruire una retta di taratura, che riporta in grafico tale rapporto in funzione delle concentrazioni note di antigene non marcato usate libero

3) Adesso si può analizzare un sistema in cui l'**antigene non marcato** si trova **in un fluido biologico** e ne bisogna determinare la concentrazione (si risale alla concentrazione incognita dell'antigene per semplice **interpolazione sulla retta di taratura**); ad essere **note** sono la concentrazione di **anticorpo**, **in difetto** rispetto alla quantità necessaria per legare tutto l'antigene presente, e di **antigene marcato**

La tecnica del dosaggio radioimmunologico è comune in vari ambiti clinici: diagnosi del diabete (**dosaggio insulina**), dell'**ipertensione**, di patologie correlate a **disfunzioni tiroidee** e dell'**ormone della crescita**, dosaggio nel sangue di **sostanze stupefacenti** o applicazioni forensi (**antidoping**).

Anche: Vitamina B-12, Vitamina D3, Tireoglobulina, Testosterone, Renina, Osteocalcina, Glucagone, Fosfatasi prostatica, Calcitonina, Aldosterone urinario, Aldosterone

RIA

Composto ricercato	Metodo analitico	Applicazione clinica
ACTH	RIA	Diagnostica ormonale
TSH	RIA	Diagnostica ormonale
Proinsulina	RIA	Diagnostica ormonale
Insulina	RIA	Diagnostica ormonale
Glucagone	RIA	Diagnostica ormonale
Ormone luteinizzante (LH)	RIA	Diagnostica ormonale
Ormone follicolostimolante (FSH)	RIA	Diagnostica ormonale
Somatotropina corionica (HCS)	RIA	Diagnostica ormonale
Gonadotropina corionica (HCG)	RIA	Diagnostica ormonale
Acido folico	RIA	Diagnostica ormonale
Renina	RIA	Diagnostica ormonale
Angiotensina	RIA	Diagnostica ormonale
Aldosterone	RIA	Diagnostica ormonale
Estriolo	RIA	Diagnostica ormonale
Estradiolo	RIA	Diagnostica ormonale
Estrone	RIA	Diagnostica ormonale
Testosterone	RIA	Diagnostica ormonale
Epitestosterone	RIA	Diagnostica ormonale
Progesterone	RIA	Diagnostica ormonale
T_4	RIA	Diagnostica ormonale
T_3	Protein binding	Diagnostica ormonale
T_4	Protein binding	Diagnostica ormonale
B_{12}	Protein binding	Diagnostica ormonale
Acido folico	Protein binding	Diagnostica ormonale
Cortisolo	Protein binding	Diagnostica ormonale
Gastrina	RIA	Diagnostica immunologica
α_1-fetoproteina	RIA	Diagnostica immunologica
Antigene AU	RIA	Diagnostica immunologica
IgD	RIA	Diagnostica immunologica
IgE	RIA	Diagnostica allergologica
Ferritina	RIA	Diagnostica biochimica
Antigene carcino-embriogeno (CEA)	RIA	Diagnostica immunologica
Digossina	RIA	Diagnostica farmacologica
Digitossina	RIA	Diagnostica farmacologica
Morfina	RIA	Diagnostica tossicologica
cAMP, cGMP, cIMP, cUMP	RIA	Diagnostica biochimica

Vantaggi del RIA:

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

Svantaggi del RIA:

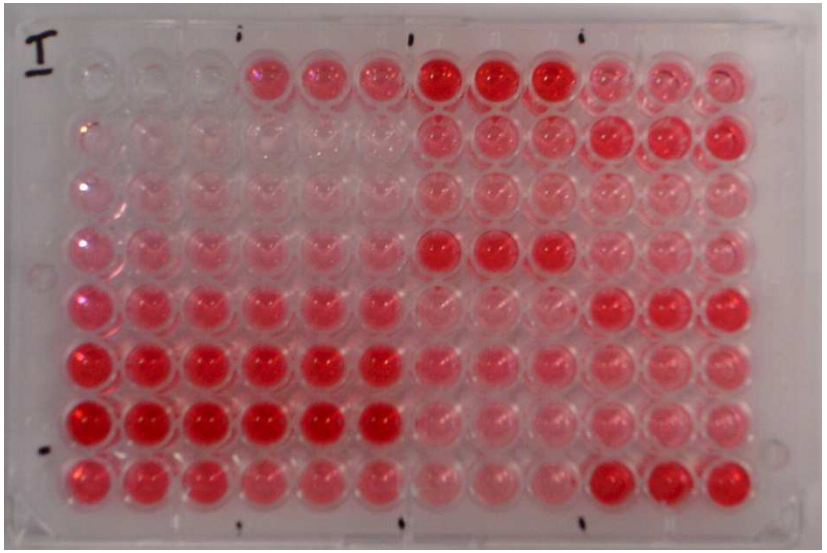
- Costo elevato di apparecchiature e reagenti
- Durata dei reagenti
- Pericoli radiologici legati all'uso del radioattivo: operatori frequentemente controllati
- Tempi di risposta lunghi

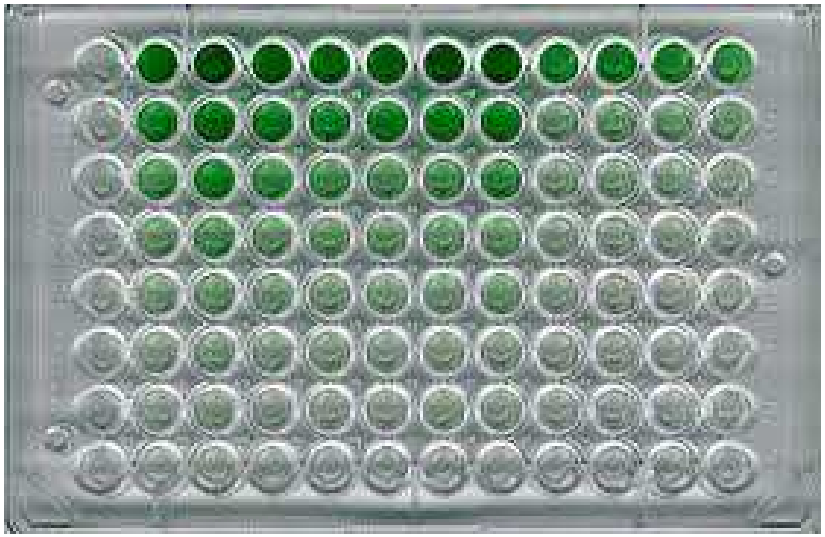
Metodi Immunoenzimatici

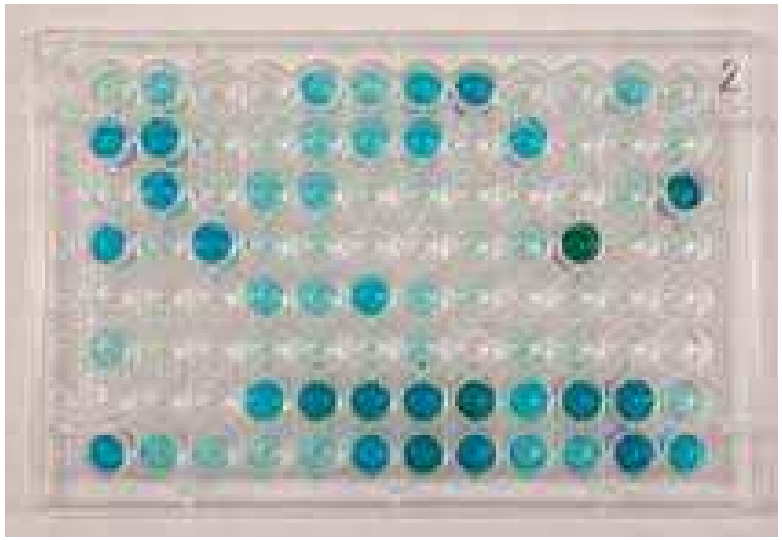
ELISA: Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay

- L'ELISA è una tecnica molto utilizzata, basata sulla coniugazione chimica di enzimi (quali ad es. la fosfatasi alcalina o la perossidasi) con anticorpi o antigeni. L'attività di questi enzimi è facilmente monitorabile e consente di quantificare la concentrazione di complesso coniugato ('marcato') con facilità e precisione. A seconda del particolare metodo utilizzato, l'ELISA può servire per il **dosaggio di antigeni o anticorpi**.
- Antigene riconosciuto dall'anticorpo specifico (*Immuno*)
- Analita (antigene o anticorpo) adsorbito sulla superficie del sistema (*sorbent*)
- Antigene/anticorpo riconosciuto da un (secondo) anticorpo marcato con un enzima (*Enzyme linked*), capace di dare una reazione il cui prodotto sia **colorato**

ELISA

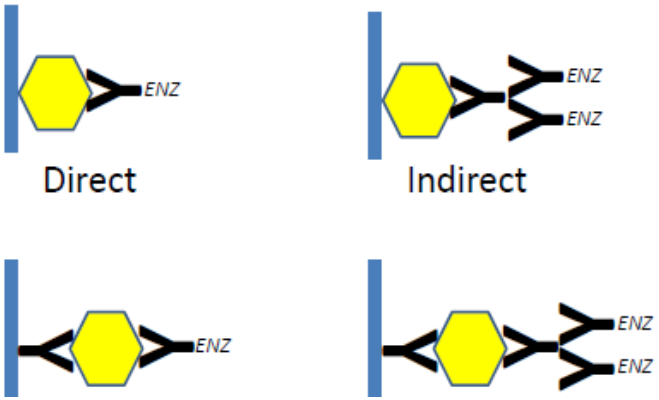




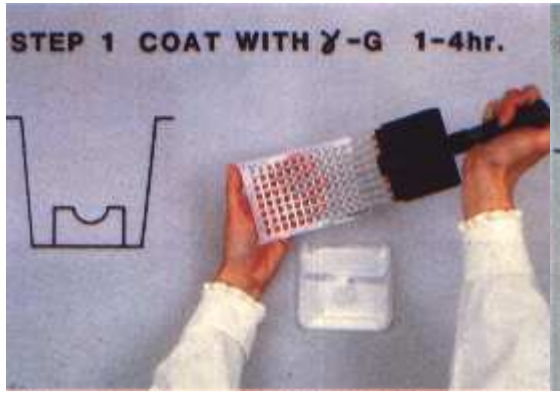


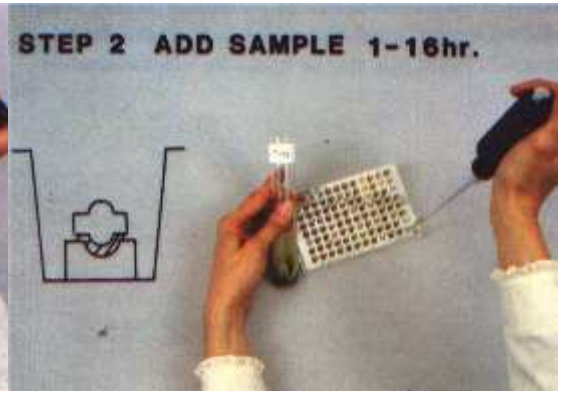
TIPI ELISA:

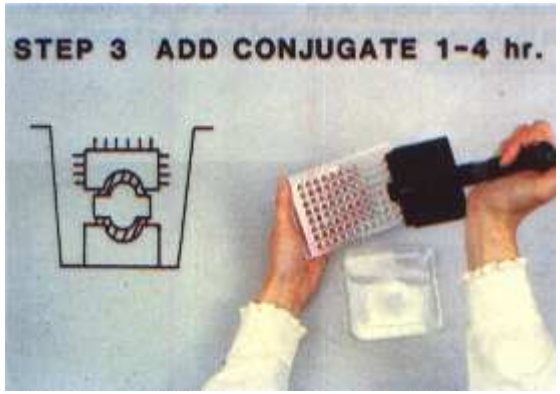
- DIRETTO (Anticorpo primario marcato)
- INDIRETTO (Anticorpo secondario marcato)
- COMPETITIVO DIRETTO
- COMPETITIVO INDIRETTO
- DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich*) DIRETTO
- DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich*) INDIRETTO

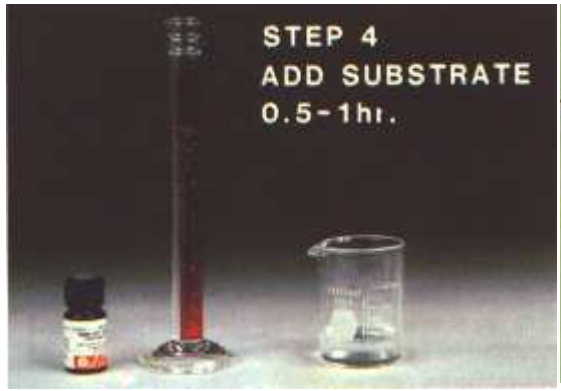


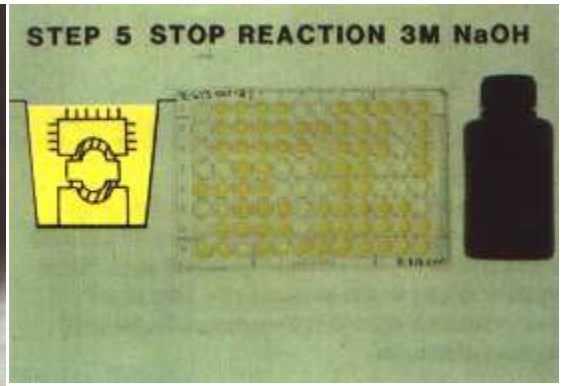
ELISA

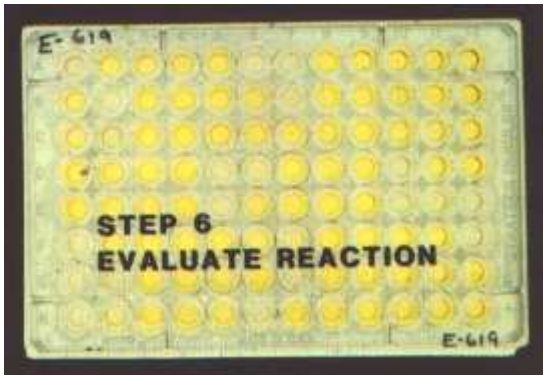

STEP 1 COAT WITH γ-G 1-4hr.

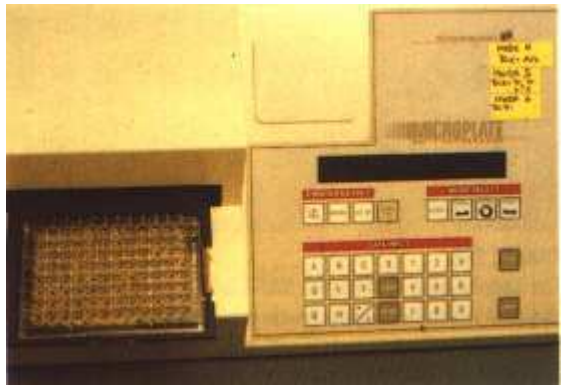

STEP 2 ADD SAMPLE 1-16hr.


STEP 3 ADD CONJUGATE 1-4 hr.


STEP 4
ADD SUBSTRATE
0.5-1hr.

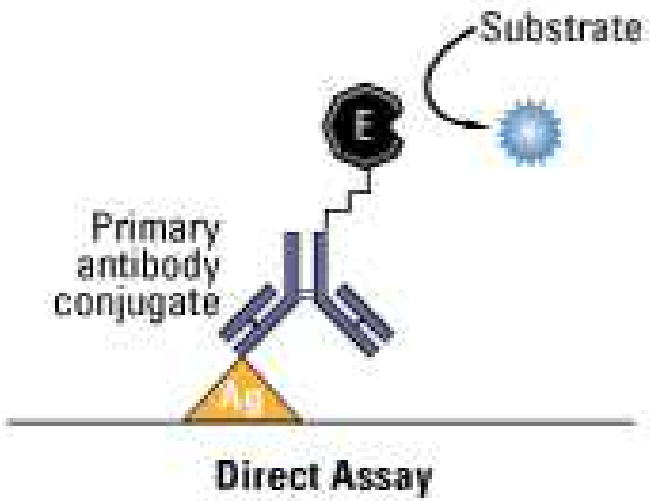

STEP 5 STOP REACTION 3M NaOH


STEP 6
EVALUATE REACTION



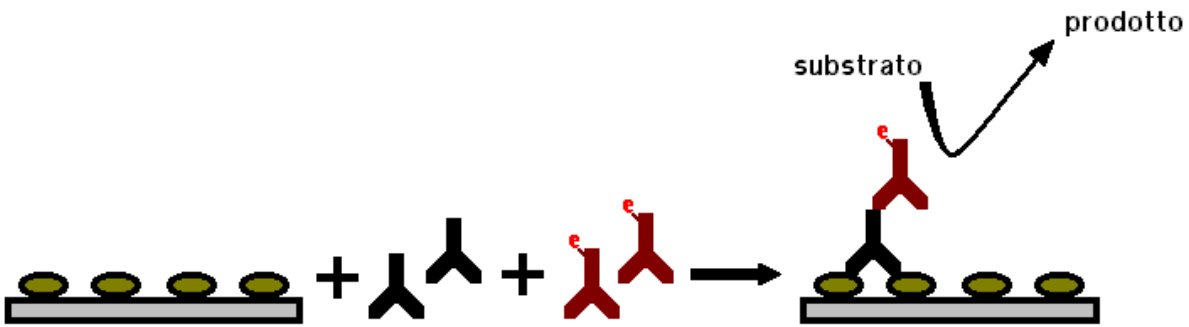
- **METODO ELISA DIRETTO:** In questo metodo, che consente di **titolare un antigene**, è un anticorpo primario che deve essere coniugato con un enzima indicatore.

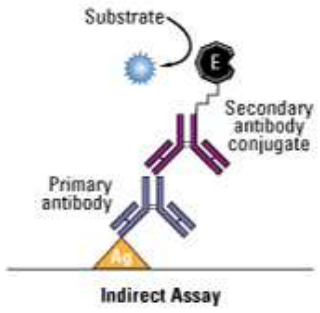
  - ✓ Si fa reagire una soluzione di un anticorpo specifico marcato con un enzima con un antigene ancorato ad una fase solida
  - ✓ Dopo aver lavato, si aggiunge il substrato dell'enzima. In questa tecnica, l'attività enzimatica misurata sarà **direttamente proporzionale** alla quantità di antigene presente.



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

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

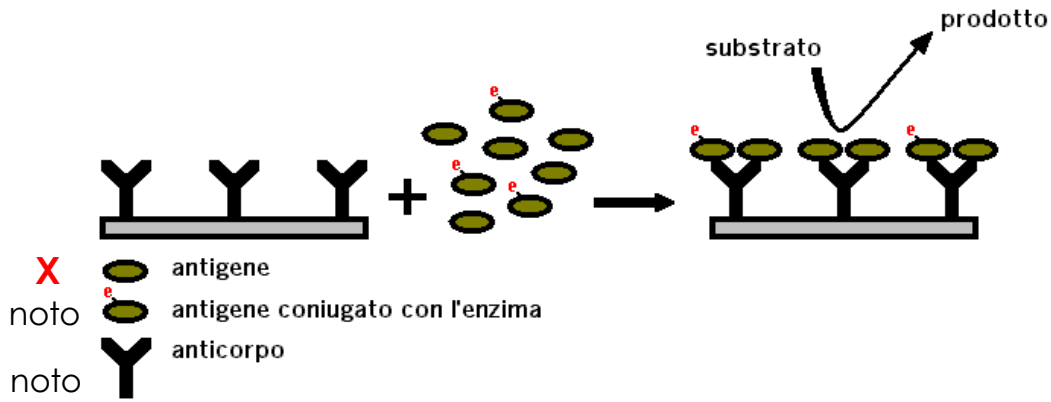




❖ METODO ELISA COMPETITIVO DIRETTO:

a) Uso coniugato Antigene-Enzima

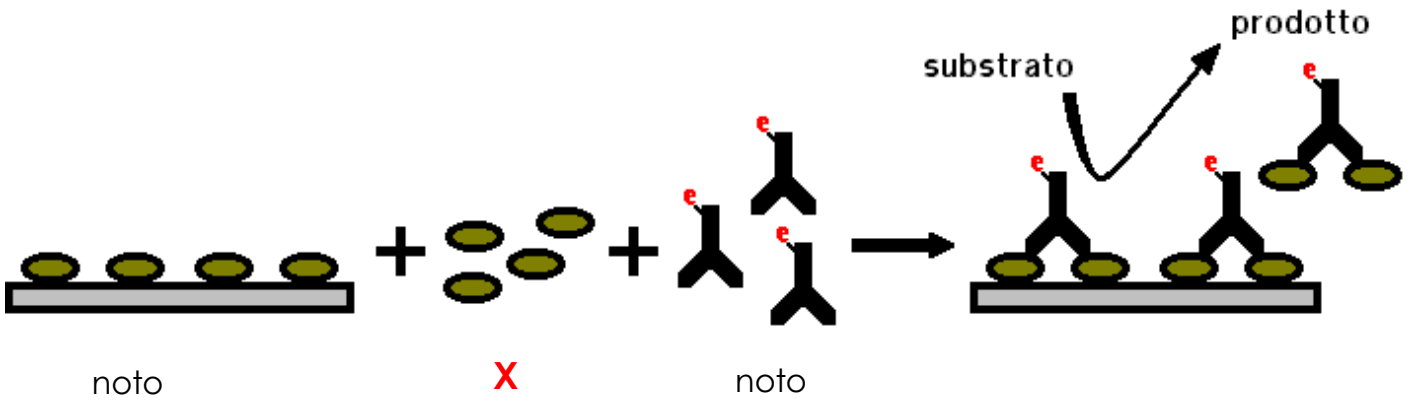
✓ Una quantità fissa di antigene marcato e diluizioni decrescenti di antigene libero (come standard o nel campione) vengono messe a reagire insieme nei confronti di un anticorpo in difetto. In questo modo, l'antigene marcato e quello libero si troveranno a competere per un numero limitato di siti anticorpali.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



❖ METODO ELISA COMPETITIVO DIRETTO:

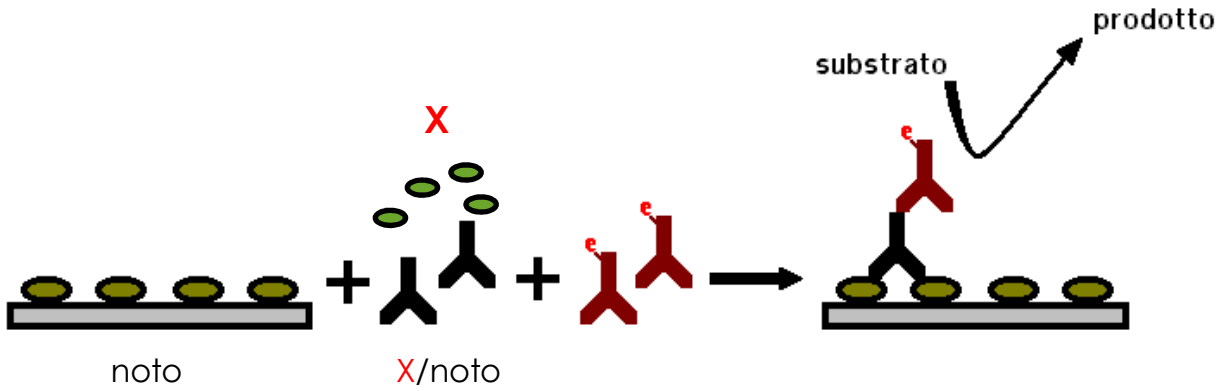
b) Uso coniugato Anticorpo-Enzima

✓ Questo tipo di saggio competitivo coinvolge l'uso del coniugato anticorpo-enzima, con l'antigene immobilizzato sulla fase solida. La reazione di competizione avviene fra l'antigene immobilizzato e quello libero in soluzione (come standard o proveniente dal campione), nei confronti dell'anticorpo marcato presente in concentrazione fissa e in difetto. La misura del prodotto della reazione enzimatica sarà inversamente proporzionale alla concentrazione di antigene presente nel campione.



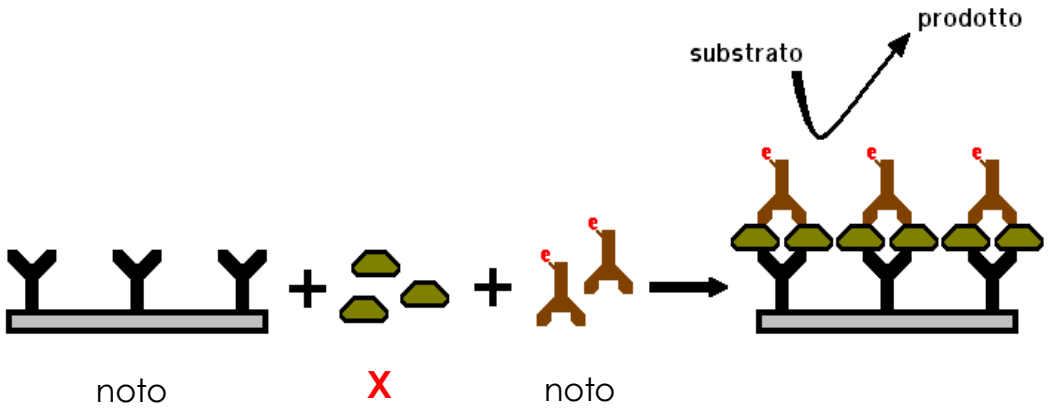
❖ METODO ELISA COMPETITIVO INDIRETTO:

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



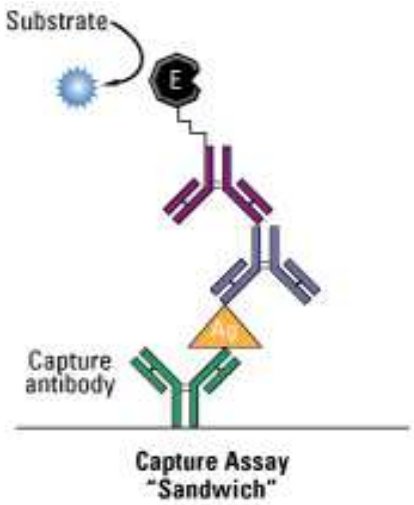
- **METODO DAS-ELISA DIRETTO:** Questa metodica può essere utilizzata esclusivamente quando l'analita possiede almeno due epitopi.

  - ✓ Un eccesso di anticorpo verso il primo sito antigenico viene immobilizzato sulla fase solida e incubato con diluizioni successive di antigene presente nel campione (incognito) o in soluzioni standard (per costruire la retta di taratura). Dopo il lavaggio, il complesso Ag-Ab immobilizzato viene incubato con una concentrazione fissa di anticorpo marcato che andrà a legarsi al secondo sito antigenico dell'immunocomplesso. La misura del prodotto della reazione enzimatica risulterà direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene (analita) da stimare.



❖ **METODO DAS-ELISA INDIRETTO:** In questo metodo, è un anticorpo secondario che deve essere coniugato con un enzima indicatore.

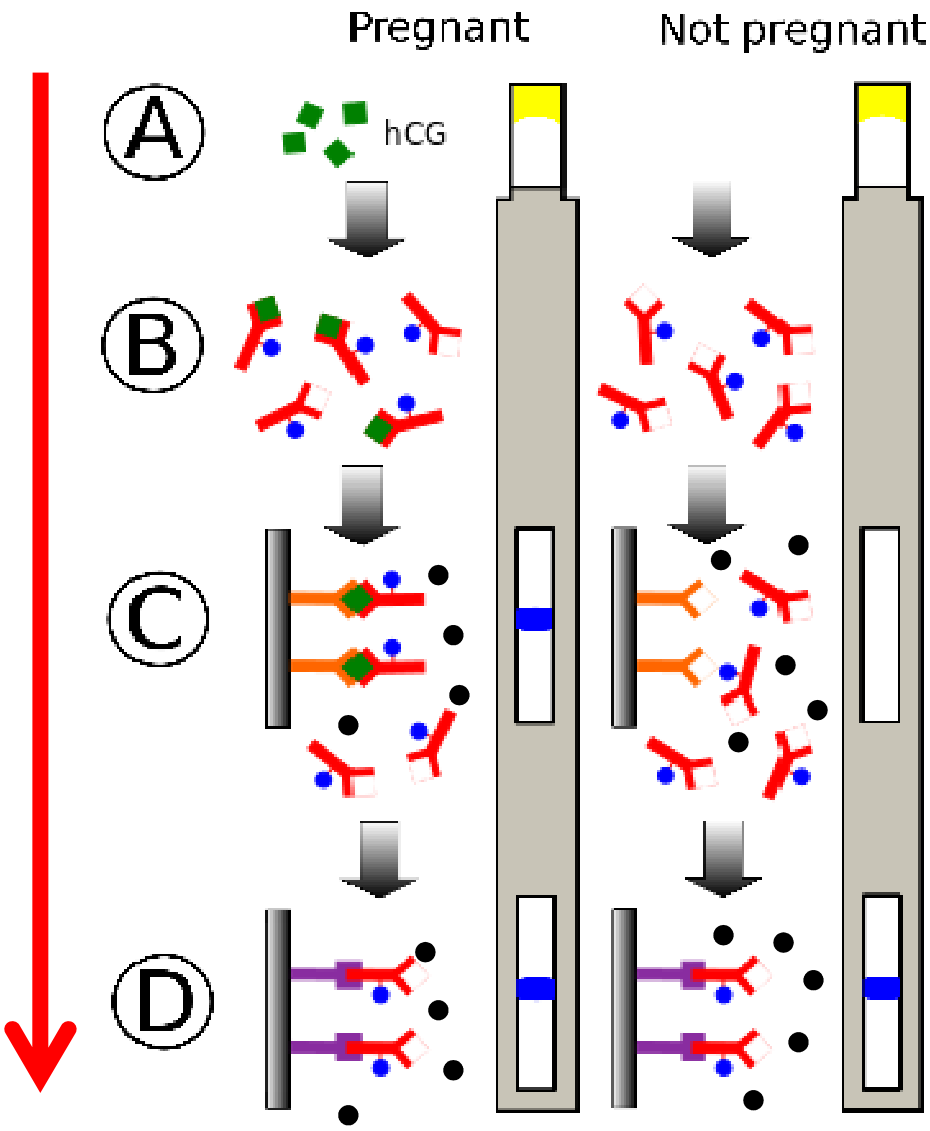
- ✓ Si fa reagire una soluzione ignota di antigene con un anticorpo specifico legato ad una fase solida, si lava e si aggiunge un secondo anticorpo (che dovrà essere policlonale oppure dovrà essere un anticorpo monoclonale diverso da quello immobilizzato, capace di riconoscere un diverso epitopo dell'antigene).
- ✓ Dopo un secondo lavaggio si aggiunge un terzo anticorpo, capace di legarsi al secondo e contenente l'enzima; dopo lavaggi opportuni, viene aggiunto il substrato dell'enzima. In questa tecnica, l'attività enzimatica misurata sarà direttamente proporzionale alla quantità di antigene presente.



ELISA

- Gli enzimi più comunemente usati sono la perossidasi di rafano, **HRP**, o la fosfatasi alcalina, **AP**.
- I substrati enzimatici dovrebbero essere idealmente stabili, non tossici e poco costosi: substrati non colorati sono convertiti in prodotti colorati (OPD,arancio e TMB, blu).
- **ELISA IN CHIMICA CLINICA:** ricerca di proteine nel plasma, a concentrazioni così basse da non poter essere rilevate ad es. con metodi nefelometrici (basati sulla torbidità) (proteina C, proteina S, ecc.); dosaggio del ferro nel siero; ricerca di anticorpi (anti-HIV); ricerca di ormoni come l'insulina, di estrogeni, di **gonadotropina corionica umana**, di antigeni di superficie delle epatiti, ecc ecc.

MOVIMENTO PER CAPILLARITÀ



hCG, Antigene

α-hCG, anticorpo primario libero

● Enzima

α-hCG, anticorpo primario immobilizzato

• Substrato dell'enzima

● Enzima

α-IgG, anticorpo secondario immobilizzato

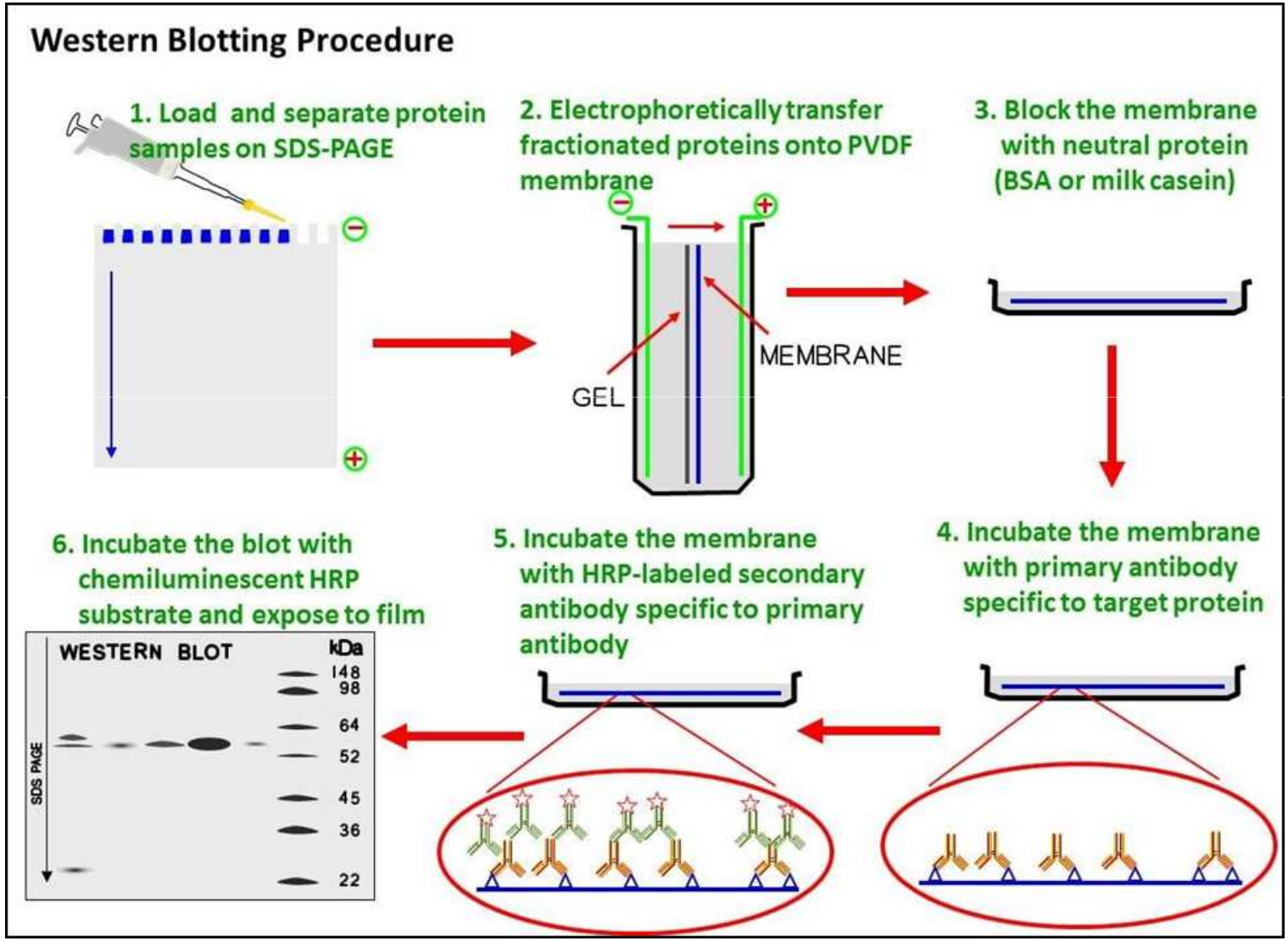
• Substrato dell'enzima

● Enzima

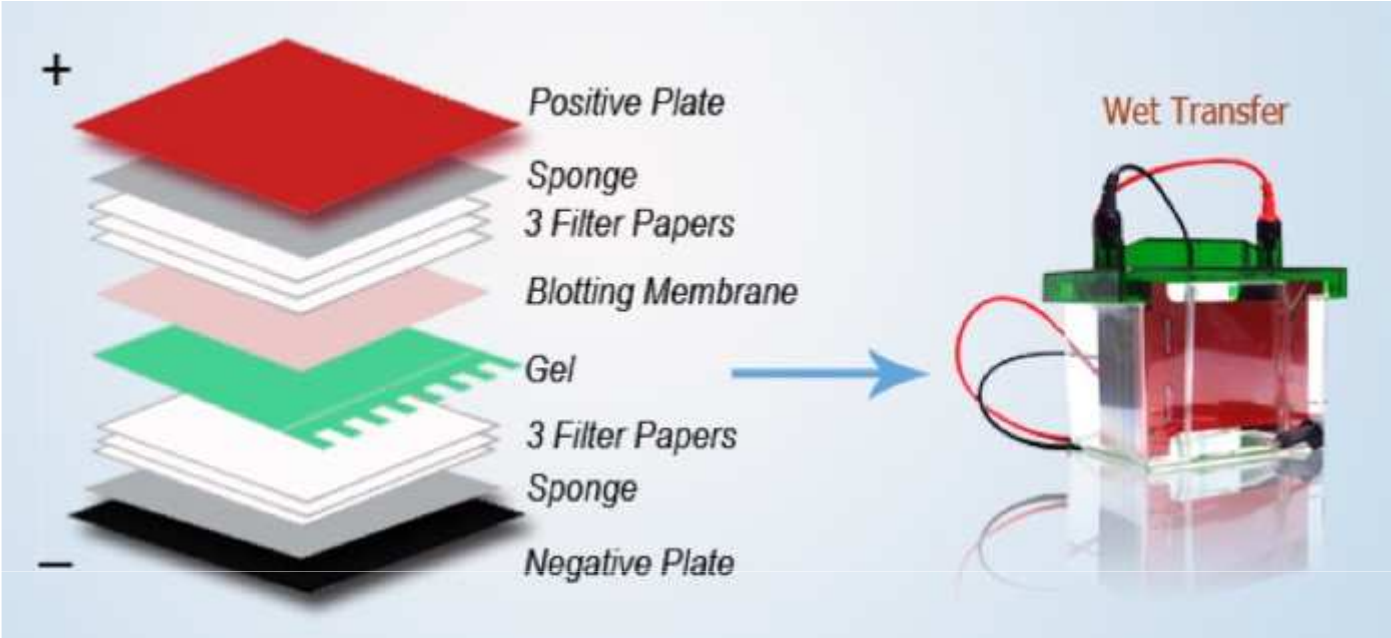
WESTERN BLOTTING

- Questa tecnica combina la risoluzione dell'elettroforesi con la sensibilità della rivelazione immunochimica.
- Permette di rivelare e quantificare proteine che reagiscono con un anticorpo specifico.
- Le proteine, dopo esser state frazionate in SDS-PAGE, vengono trasferite su membrana (nitrocellulosa, PVDF), grazie ad un campo elettrico trasversale che le forza a migrare dal gel sulla membrana a cui aderiscono. Dopo il trasferimento, si procede in maniera identica a quella delle tecniche ELISA o RIA (lavaggio, saturazione dei siti, incubazione con anticorpo primario, incubazione anticorpo secondario, rivelazione).

WESTERN BLOTTING

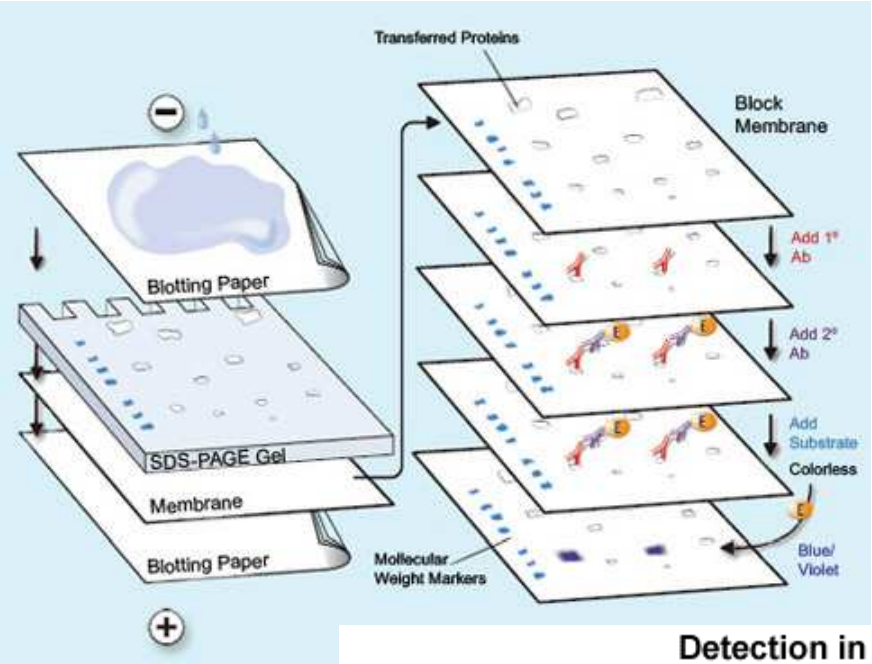


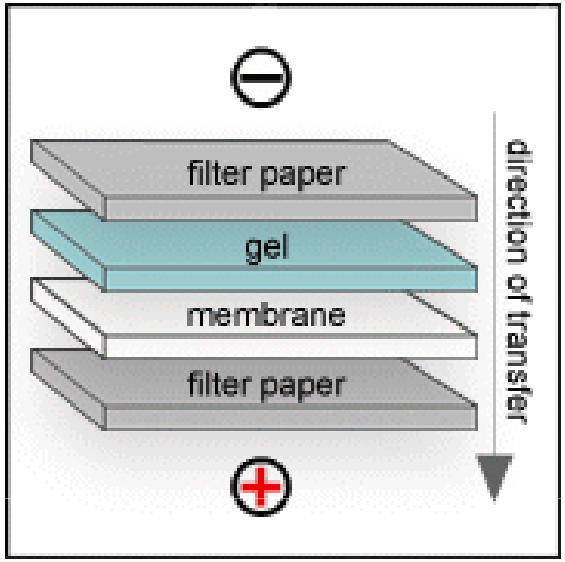
WESTERN BLOTTING



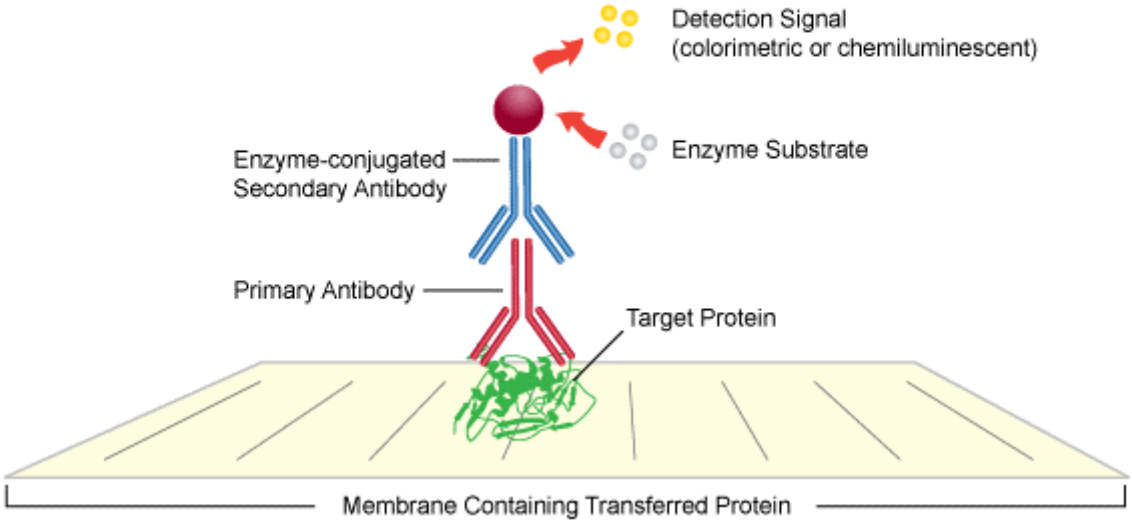
Mini Trans-Blot cell.

WESTERN BLOTTING

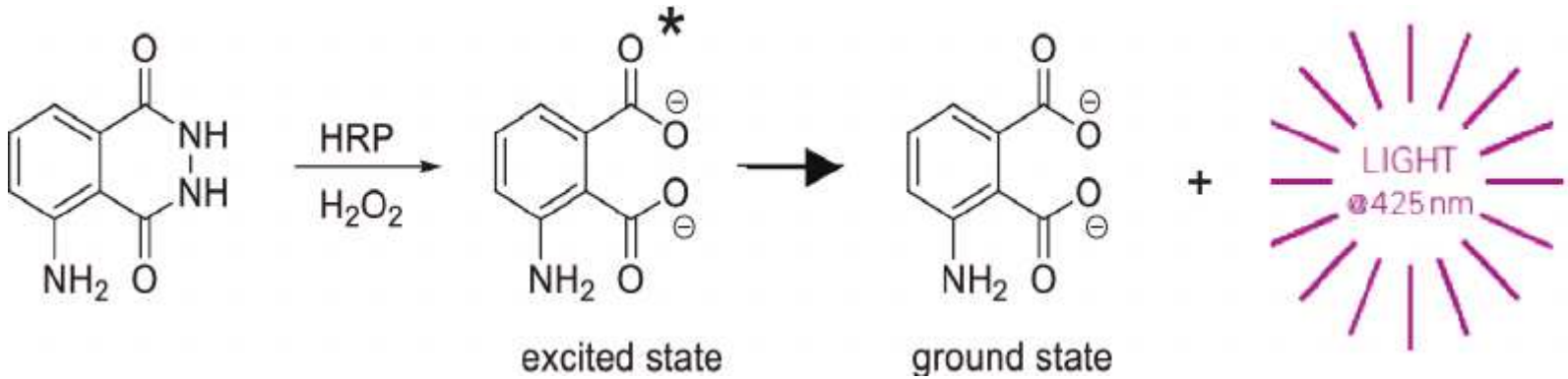




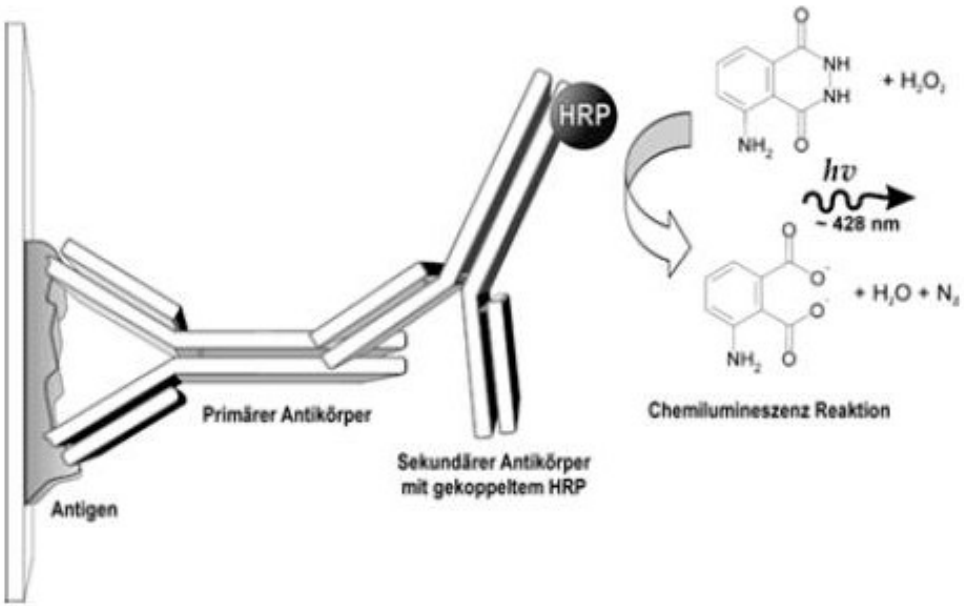
Detection in Western Blots

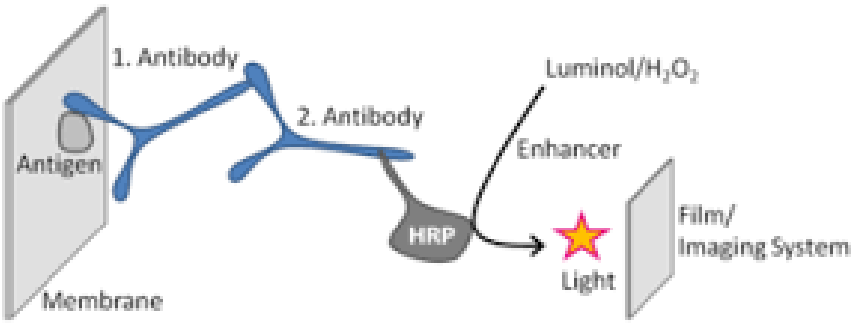


WESTERN BLOTTING

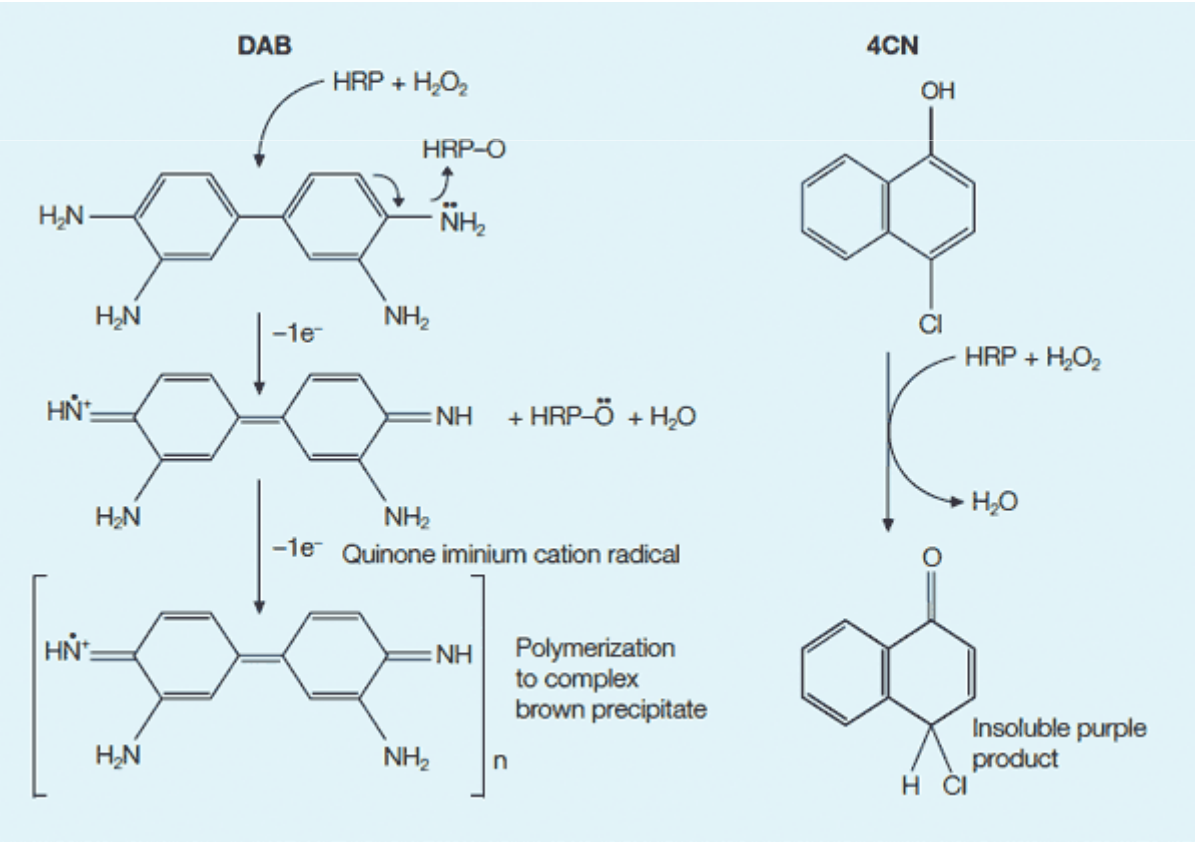


Luminol





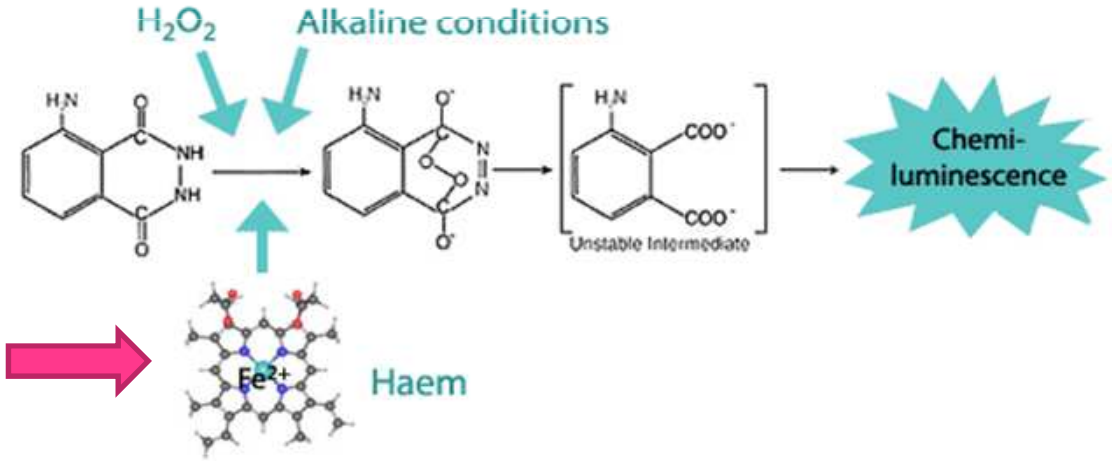
WESTERN BLOTTING



Chemiluminescenza

Diverse reazioni biologiche (che si avvalgono di **ossidasi**) comportano la produzione di acqua ossigenata (H_2O_2); quest'ultima, reagendo con composti come il **LUMINOL**, in condizioni alcaline ed in presenza di catalizzatori a base di ferro, dà luogo alla emissione di fotoni :

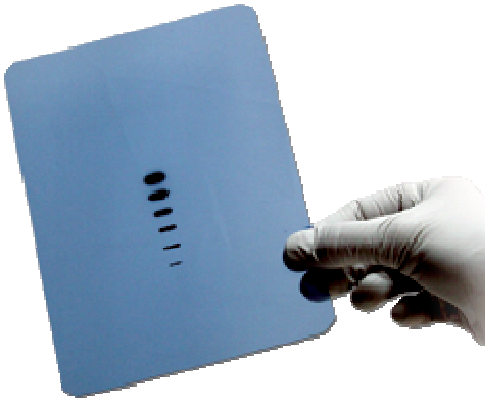
anche catalizzata da

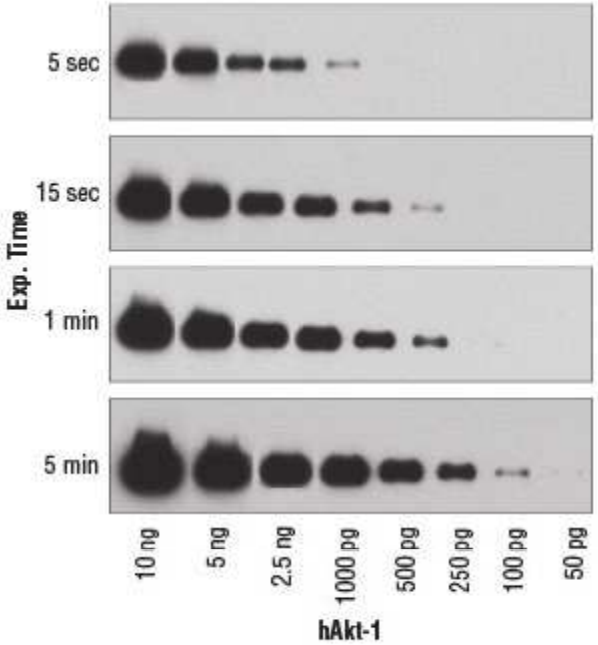


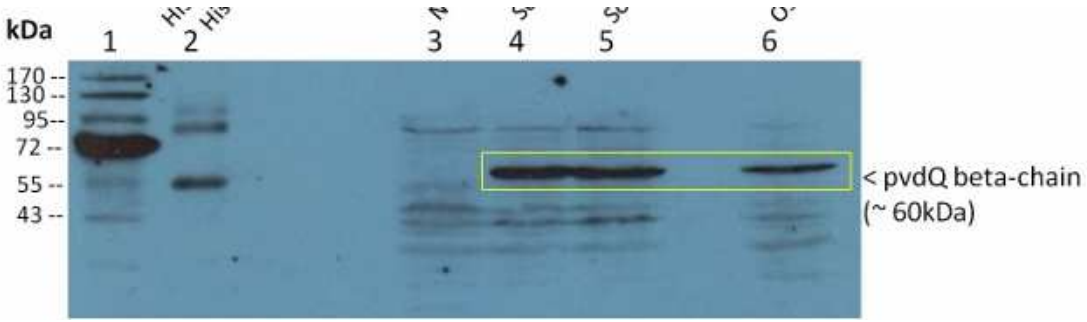
Sostanze come il luminol possono essere usate nella sintesi di coniugati da usare poi **come traccianti biologici**, ad es. in alternativa a quelli radioattivi

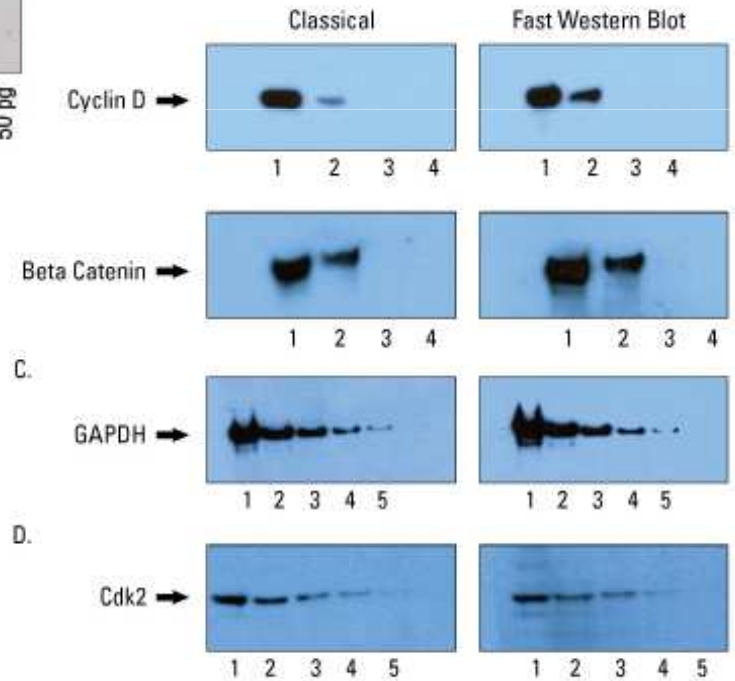
Luminescenza

WESTERN BLOTTING









APPLICAZIONI CLINICHE

Larga applicazione delle tecniche immunochimiche in campo chimico-clinico per ricerche qualitative e quantitative di antigeni, anticorpi, apteni

Tecnica	Risultati qualitativi	Risultati quantitativi	Principali applicazioni
Immunodiffusione radiale	Scarsi	Ottimi	Dosaggi di singoli antigeni o anticorpi
Immunoelettroforesi (Laurell)	Scarsi	Ottimi	Idem
Immunodiffusione bidimensionale (Outcherlony)	Ottimi	Scarsi	Identificazione antigeni o anticorpi
Controimmunoelettroforesi	Buoni	Buoni	Identificazione di antigeni a basse concentrazioni
Immunoelettroforesi (Grabar)	Ottimi	Scarsi	
Immunoelettroforesi crociata (Clarke-Freeman)	Ottimi	Buoni	Identificazione antigeni
Immunochimica con marcatori (RIA et al.)	Scarsi	Ottimi	Identificazione antigeni Dosaggio antigeni,anticorpi, apteni

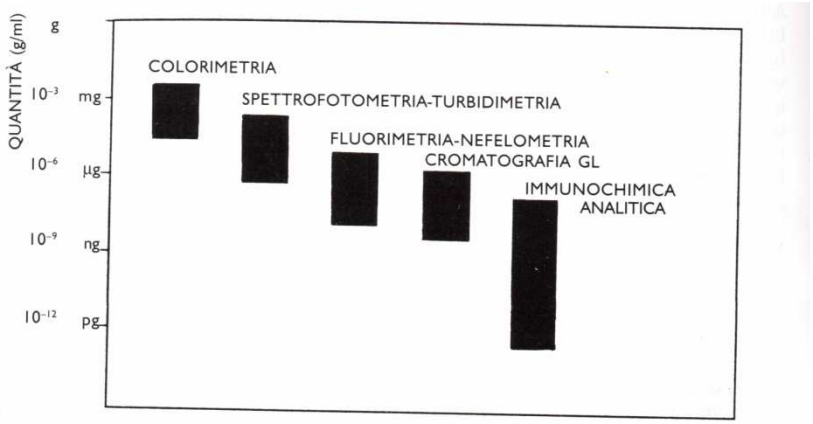


Figura 18.10. Livelli di sensibilità di alcune tecniche di misura comunemente impiegate in chimica-clinica; i metodi immunochimici (con vari marcatori) presentano i livelli di sensibilità nettamente più elevati.

APPLICAZIONI CLINICHE

- Ormoni nel sangue, nella saliva, nelle urine (ipofisari, tiroidei, corticosurrenalici, ecc.);
- Immunoglobuline del liquor, IgE e allergeni vari e IgD nel siero, proteine di derivazione tubulare e glomerulare nelle urine;
- Isoenzimi nel siero e nelle urine;
- Farmaci nel siero e nelle urine (antiepilettici, antidepressivi, cardioattivi, immunosoppressivi ecc.);
- Droghe d'abuso nei fluidi biologici (oppiacei, allucinogeni, cannabinoidi, cocaine;
- Interleuchine
- Diagnosi di H.Pylori, Herpes, Toxoplasma ecc.;
- Marcatori di formazione e di riassorbimento del tessuto osseo (osteocalcina, fosfatasi alcalina, peptidi del collagene, ecc.)