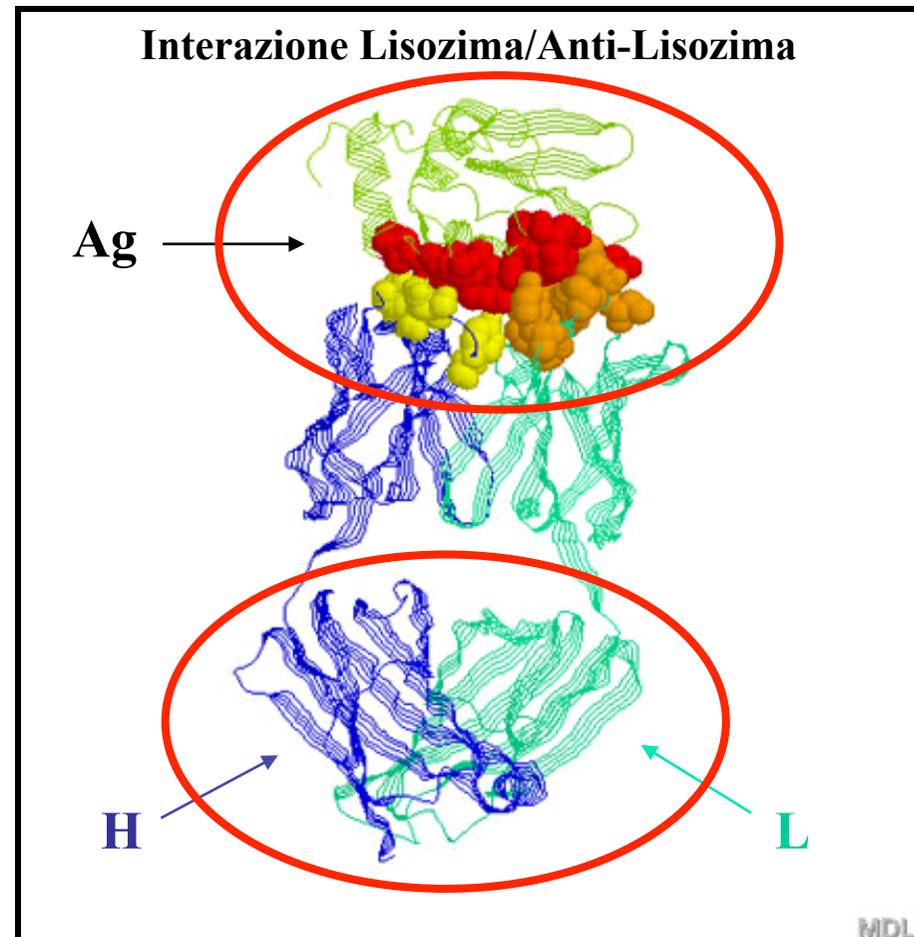


Tecniche Immunologiche

Reazioni

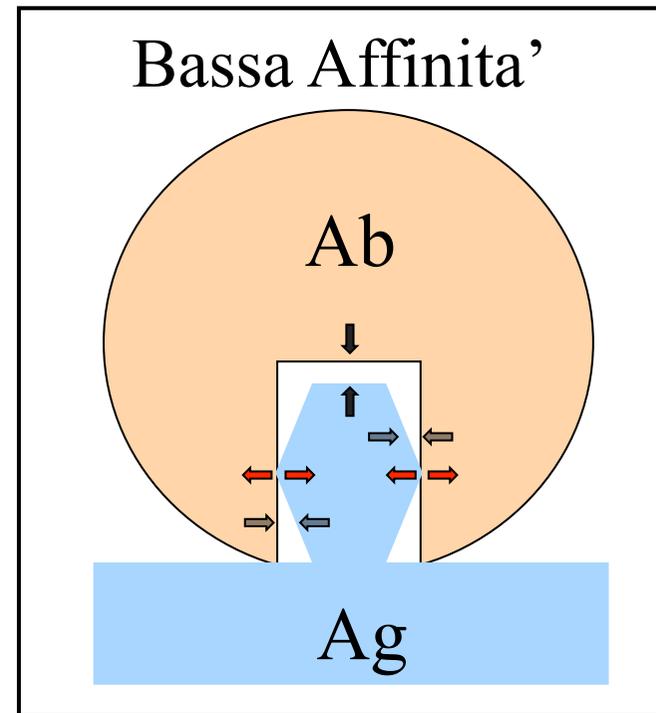
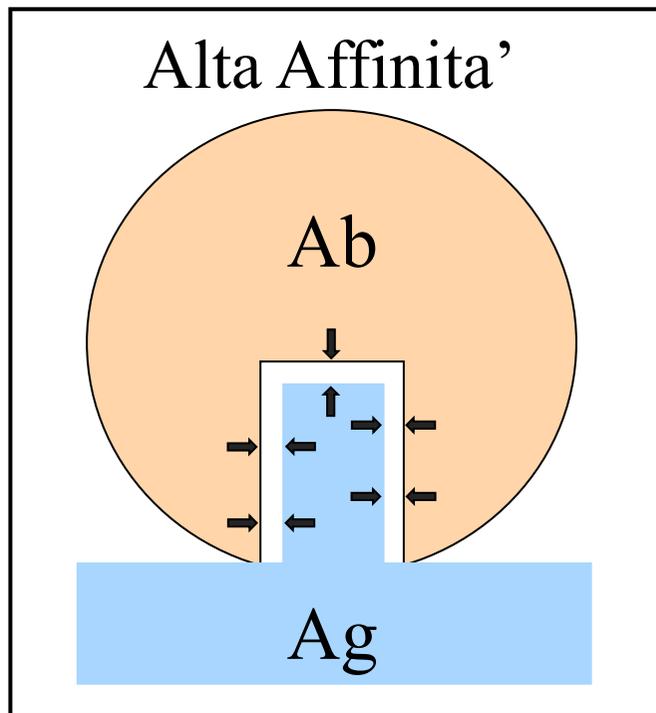
Antigene (Ag)/Anticorpo (Ab)

- Modello Chiave-Serratura
- Legami non covalenti:
 - Legami Idrogeno
 - Legami Elettrostatici
 - Legami Idrofobici
- Molti legami tra Ag e Ab
- Processo Reversibile



Affinità dell'anticorpo

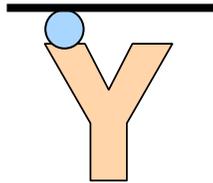
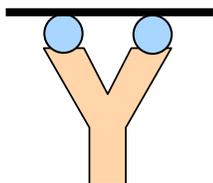
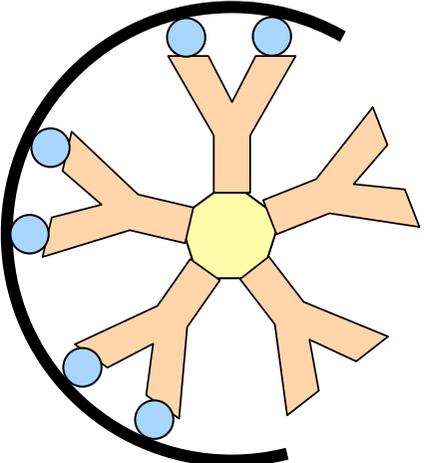
- La forza della reazione tra un singolo determinante antigenico ed un singolo sito di legame dell'anticorpo

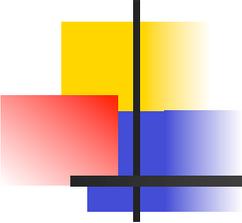


Affinità' = Somma delle forze attrattive e repulsive

Avidità dell'anticorpo

- La forza totale del legame tra un Ag con molti determinanti e Abs multivalenti

 <p>$K_{eq} = 10^4$ Affinità'</p>	 <p>10^6 Avidità'</p>	 <p>10^{10} Avidità'</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

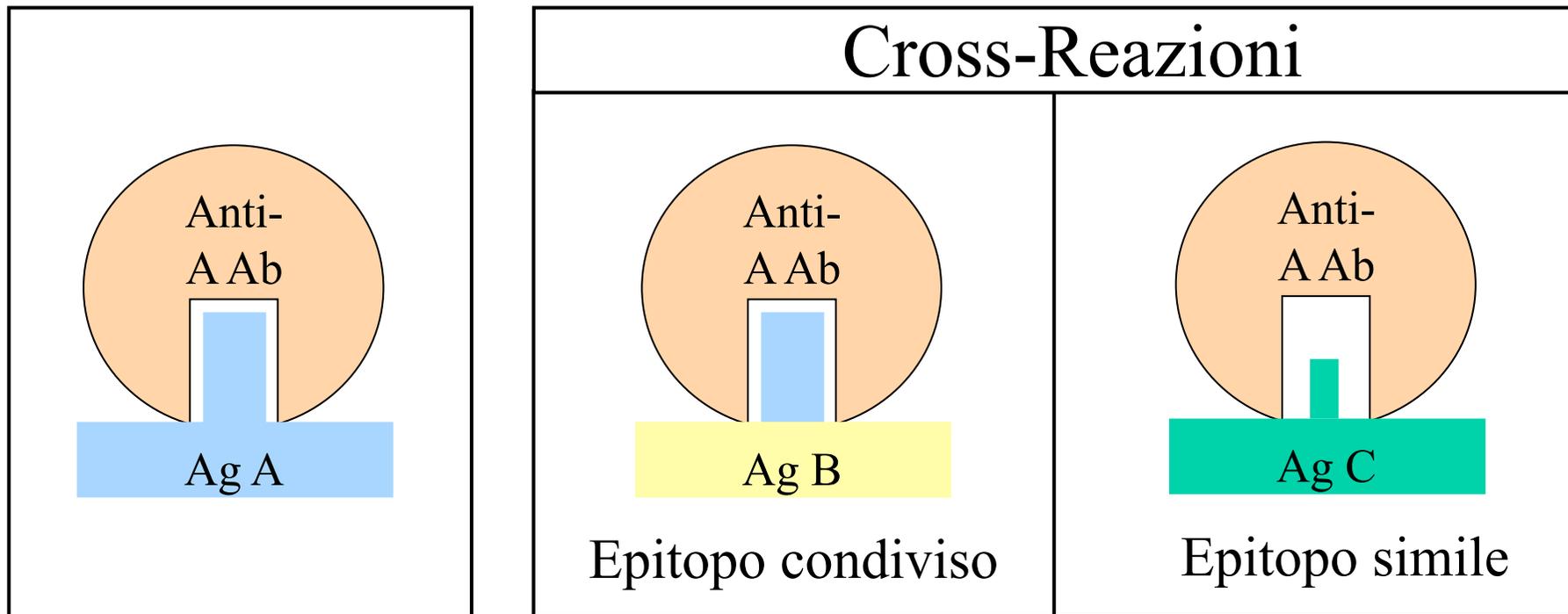


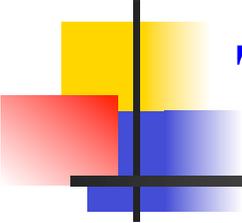
Specificità dell'anticorpo

- La capacità per un singolo anticorpo di reagire contro un solo determinante antigenico.
- La capacità per una popolazione di anticorpi di reagire contro un solo antigene.

Reazione Incrociata (Cross-Reazione)

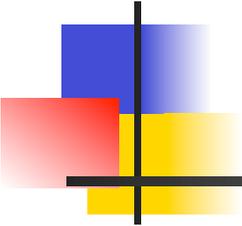
- La capacità di un singolo anticorpo di reagire contro più determinanti antigenici.
- La capacità di una popolazione di anticorpi di reagire contro più antigeni.





Test Basati sulle Reazioni Ag/Ab

- Tutti i test basati sulle reazioni Ag/Ab permettono di misurare piccole quantità degli immunocomplessi.
- Tutti i test basati sulle reazioni Ag/Ab possono essere utilizzati per misurare l'antigene o l'anticorpo presenti nel campione.

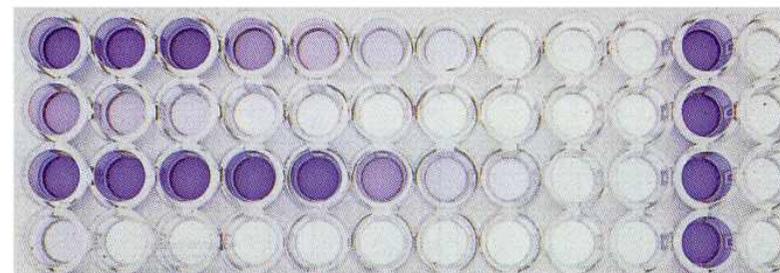
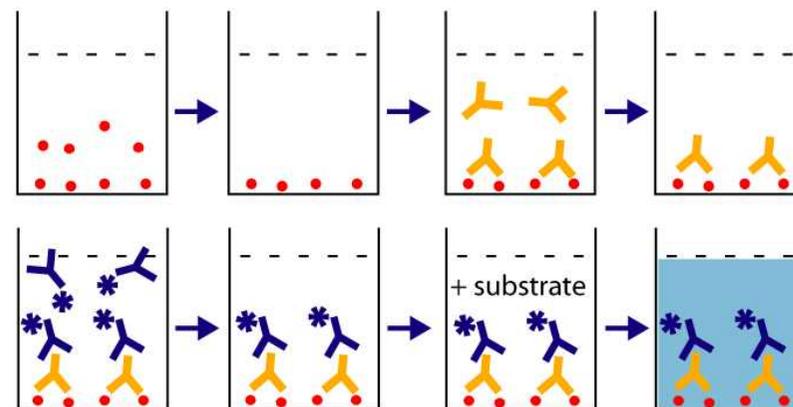
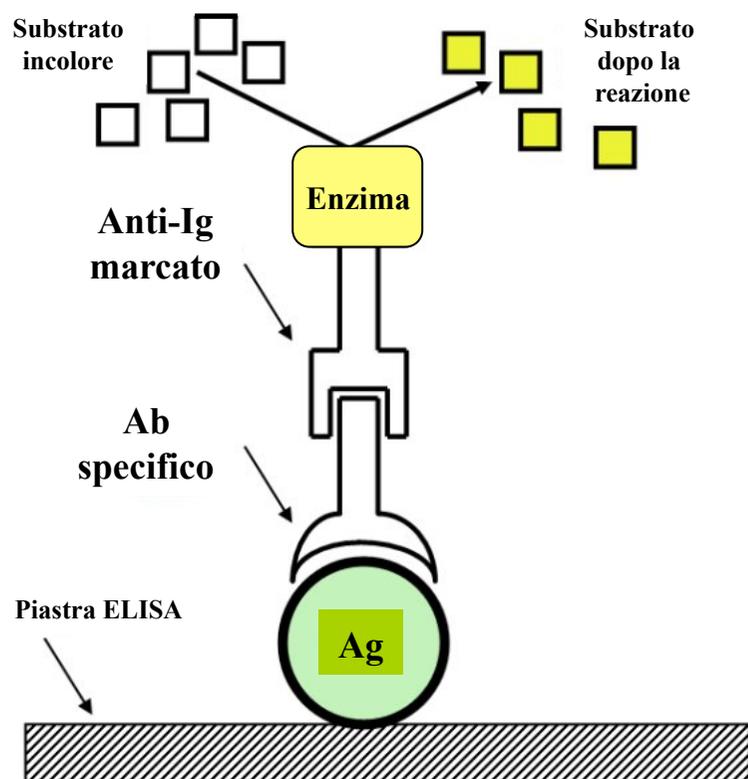


**Enzyme-Linked
Immuno**s**orbent **A**ssay
(ELISA):**

**Saggio di
Immunoassorbimento Legato
ad Enzima**

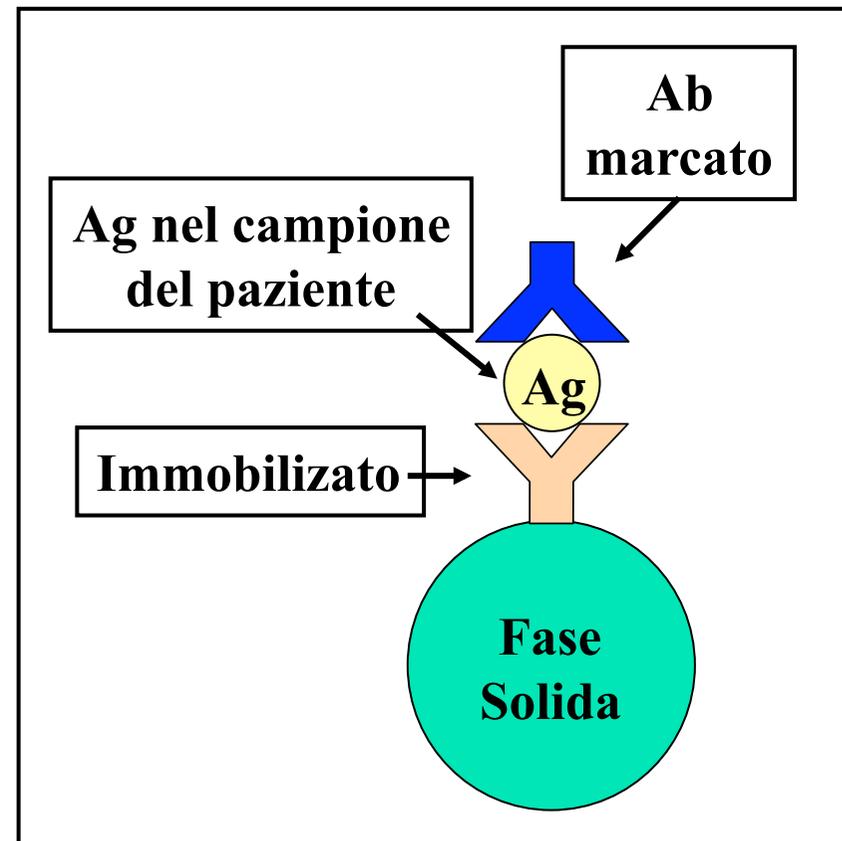
Principio dell'ELISA

- 1 componente (Ag o Ab) immobilizzato su piastra
- 1 componente (Ag/ Ab / Anti-Ig) marcato con enzima
- L'enzima (perossidasi) reagisce con il substrato
- La reazione produce una colorazione misurabile



ELISA Diretto per Ag

- Rilevamento dell'Ag
 - Immobilizzare l'Ab
 - Incubare con il campione da misurare
 - Aggiungere l'Ab marcato con un enzima
 - La quantità di Ab legato e' proporzionale alla quantità di Ag nel campione del paziente.

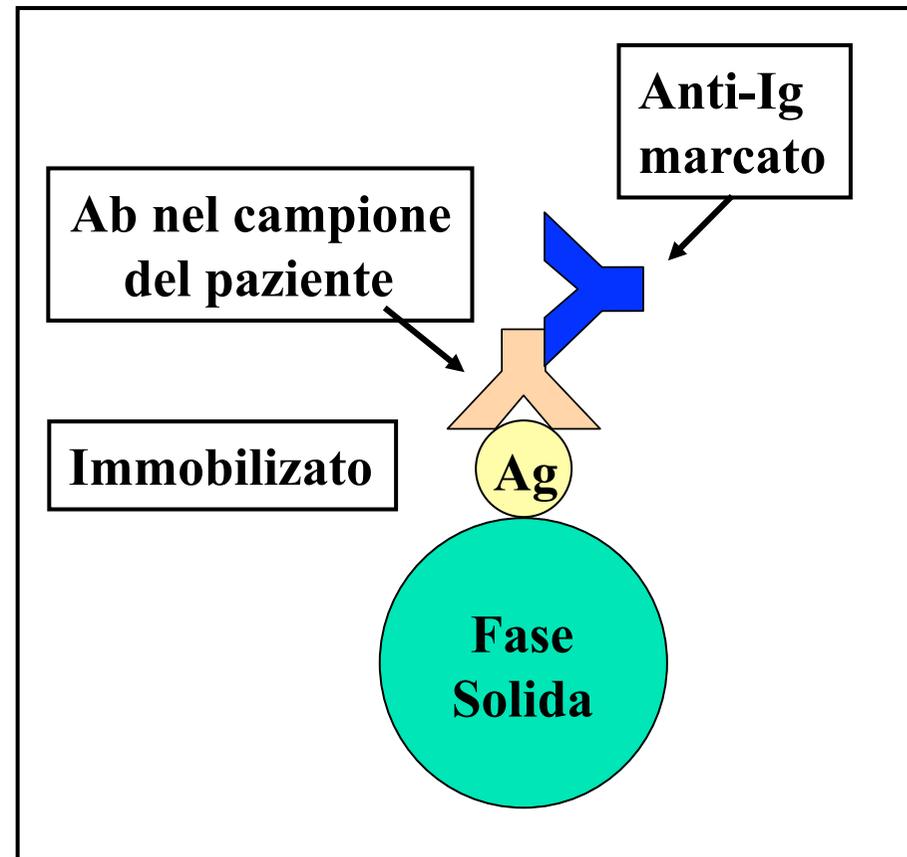


➤ Test Quantitativo

ELISA Diretto per Ab

- Rilevamento dell'Ab
 - Immobilizzare l'Ag
 - Incubare con il campione da misurare
 - Aggiungere l'anti-Ig marcato con un enzima
 - La quantità di anti-Ig legato e' proporzionale alla quantità di Ab nel campione del paziente.

➤ Test Quantitativo



ELISA Competitivo per l'Ag

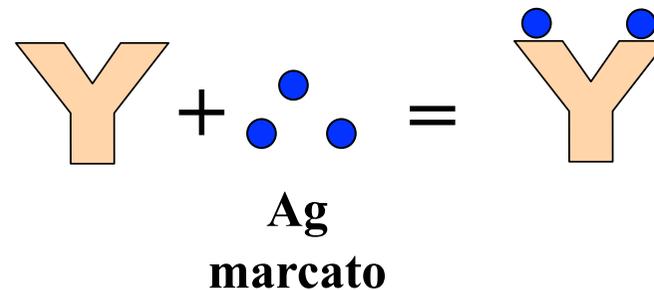
- Metodo:

1) Determinare la quantità di Ab necessario per legare una quantità nota di Ag marcato con un enzima.

2) Usare le quantità predeterminate di Ag marcato e di Ab.

Aggiungere il campione da misurare contenente l'Ag non marcato come competitore.

Prima del Test



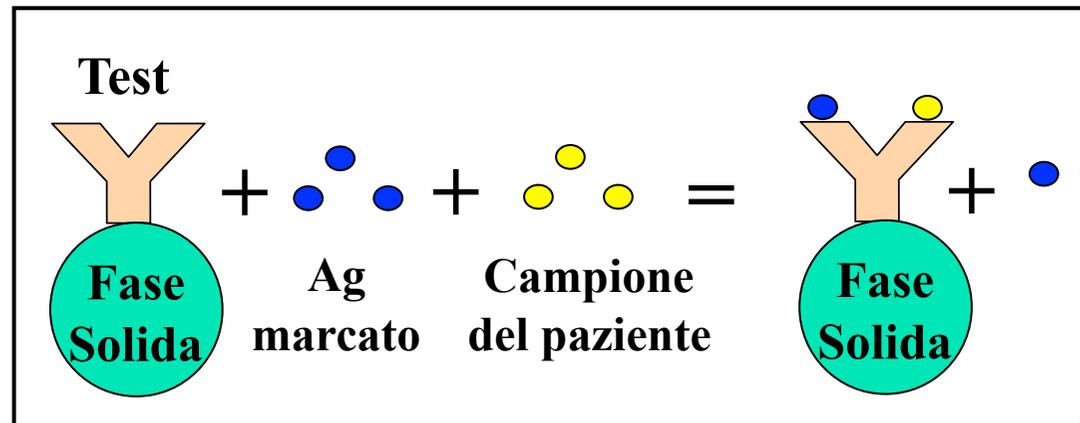
Test



ELISA Competitivo per l'Ag

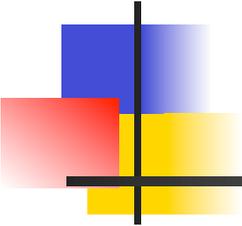
■ Metodo:

3) Determinare la quantità di Ag marcato che si è legato all'Ab



- La concentrazione viene determinata dal confronto con una curva standard usando quantità note di Ag non marcato

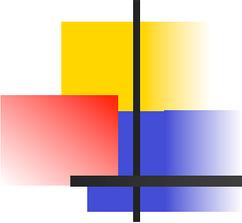
➤ Test Quantitativo



Immunofluorescenza

e

Citofluorimetria



Immunofluorescenza

- Preparazione dei campioni → Accessibilità Ag

Antigeni sulla membrana citoplasmatica:

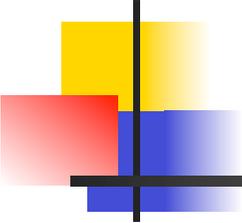
-direttamente accessibili

Antigeni intracellulari:

-inaccessibili senza trattamento preventivo

1) Fissazione

2) Permeabilizzazione



Immunofluorescenza

- Preparazione dei campioni → Marcatura Ab

Traccianti Fluorescenti:

- 1 tracciante per singolo Ab = 1 tracciante per singolo Ag
- Fino a 4 traccianti diversi per un campione

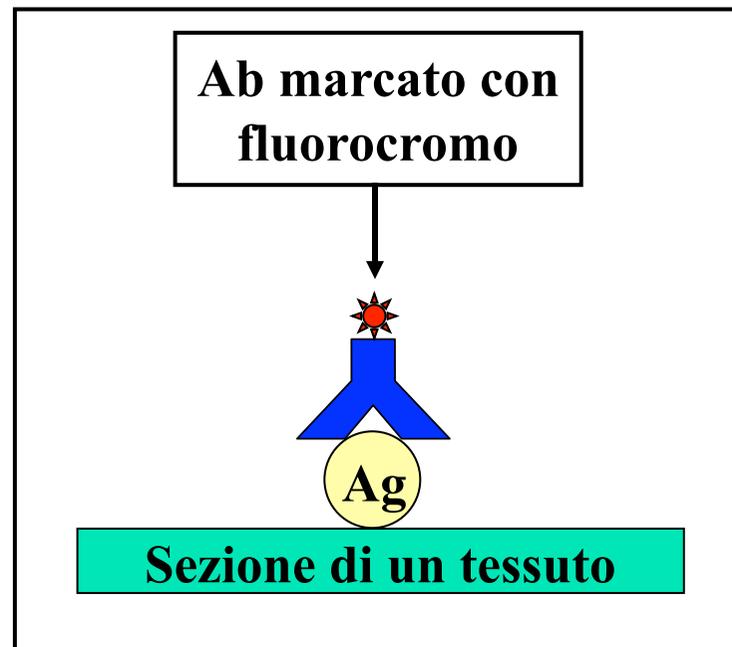
Fluorescenza e Fluorocromi

- I fluorocromi sono molecole utilizzate come coloranti fluorescenti:
 - Assorbono l'energia della luce → Eccitazione
 - Emettono fluorescenza nel visibile → Emissione

Fluorocromo	Eccitazione (nm)	Emissione (nm)
Fluoresceina (FITC)	495	519
Rodamina	550	573
Ficoeritrina (PE)	565	578
Texas Red	589	615

Immunofluorescenza

- Diretta
 - L'anticorpo che riconosce l'antigene e' marcato con un fluorocromo (molecola fluorescente)

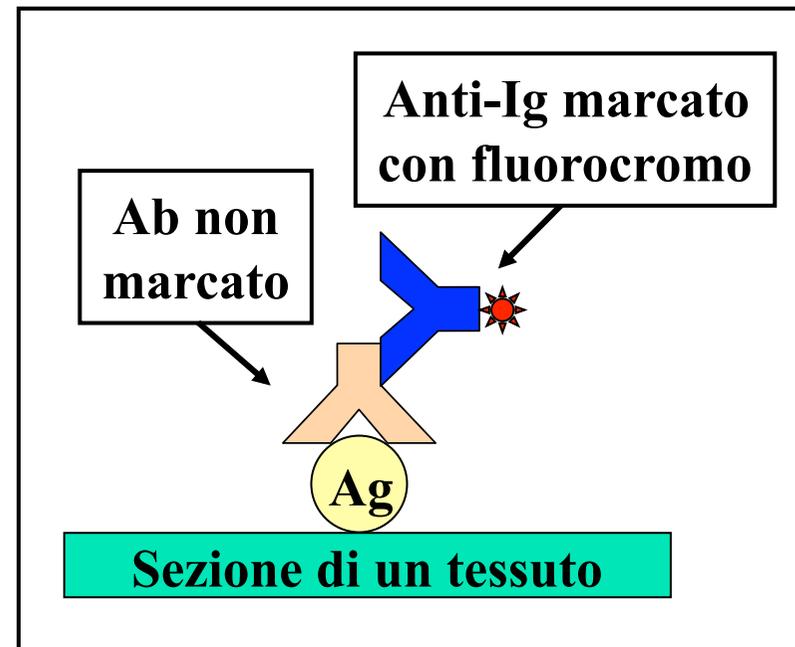


Immunofluorescenza

■ Indiretta

- L'Ab che riconosce l'Ag non e' marcato
- Viene utilizzato un anti-Ig marcato con un fluorocromo per rilevare il legame del primo Ab.

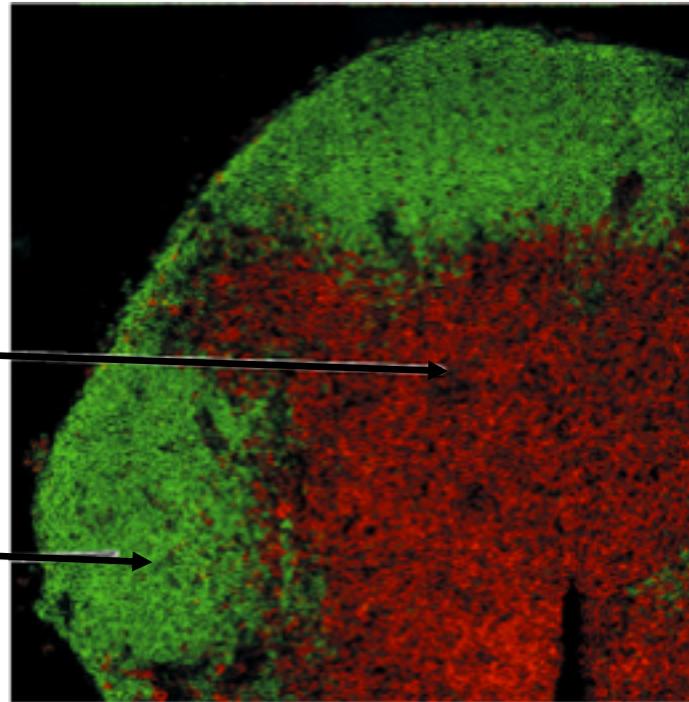
➤ Test Qualitativo/Semi-Quantitativo



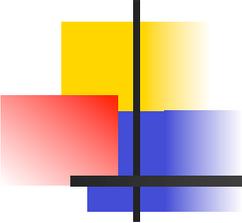
Immunofluorescenza

Area T
(Paracorticale)

Area B
(Follicoli)

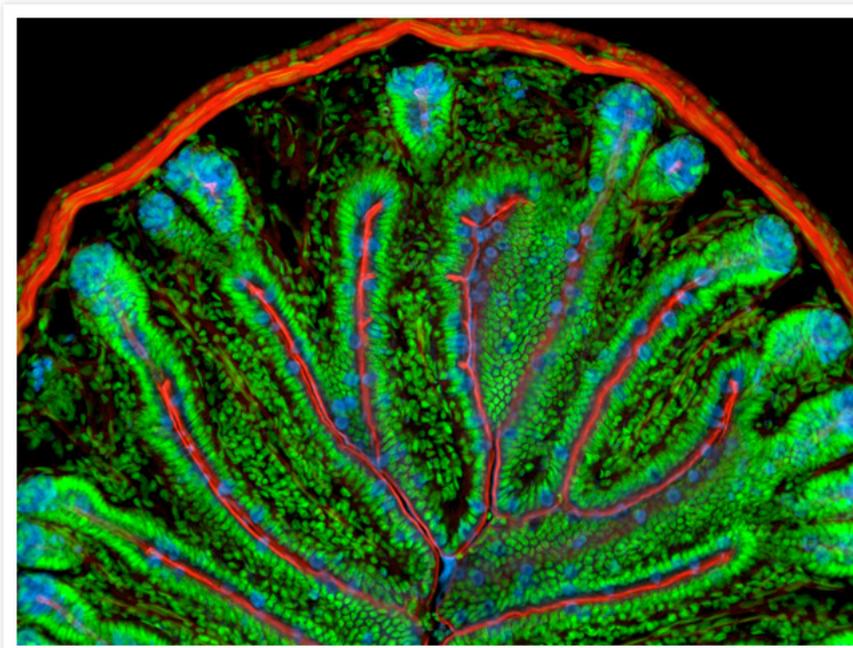


Linfociti T e B all'interno di un linfonodo

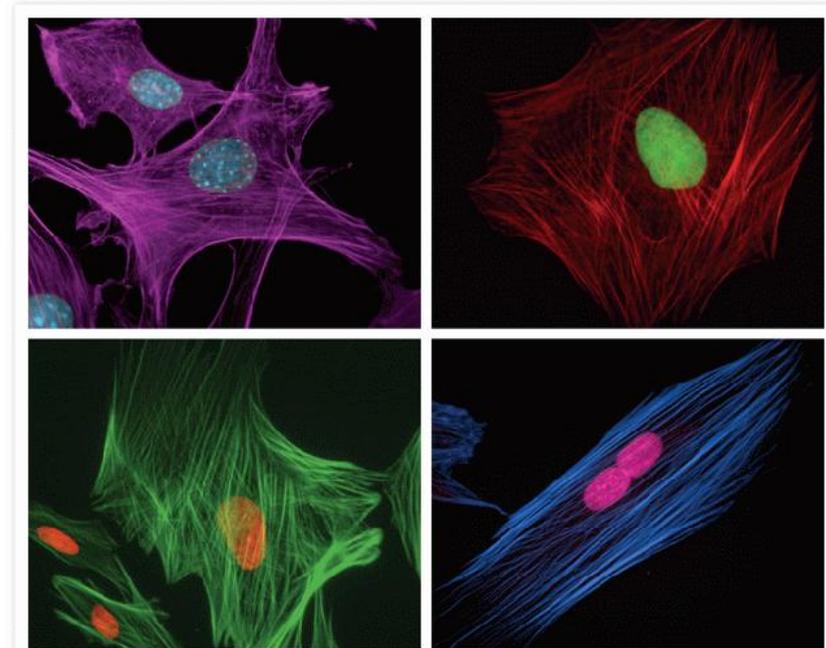


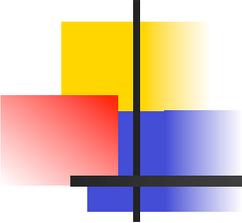
Immunofluorescenza

- Analisi di Tessuti



- Analisi di Singole Cellule





Citofluorimetria

- Preparazione dei campioni → Accessibilità Ag

Antigeni sulla membrana citoplasmatica:

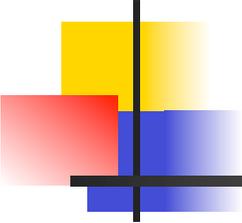
-direttamente accessibili

Antigeni intracellulari:

-inaccessibili senza trattamento preventivo

1) Fissazione

2) Permeabilizzazione



Citofluorimetria

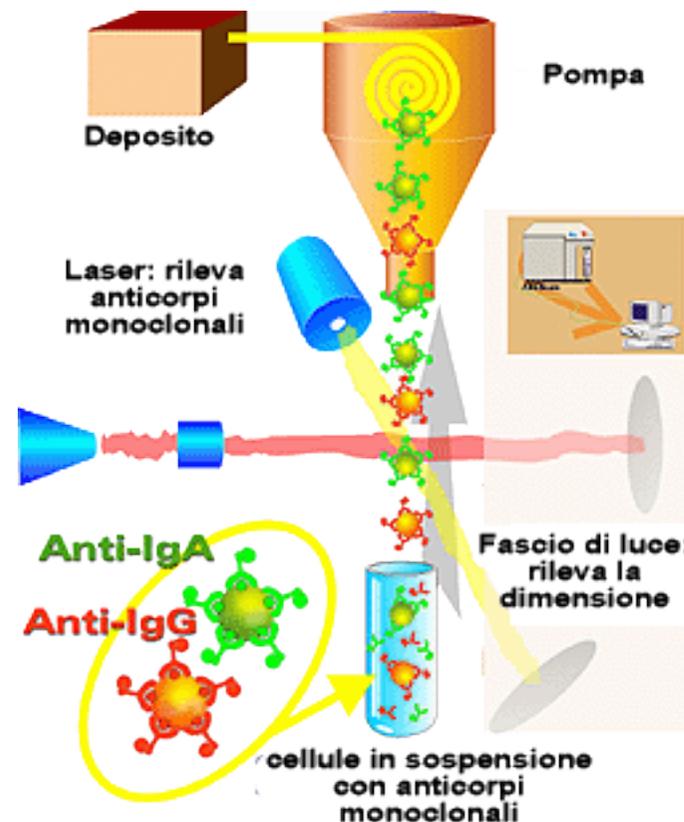
- Preparazione dei campioni → Marcatura Ab

Traccianti Fluorescenti:

- 1 tracciante per singolo Ab = 1 tracciante per singolo Ag
- Fino a 3 traccianti diversi per un campione

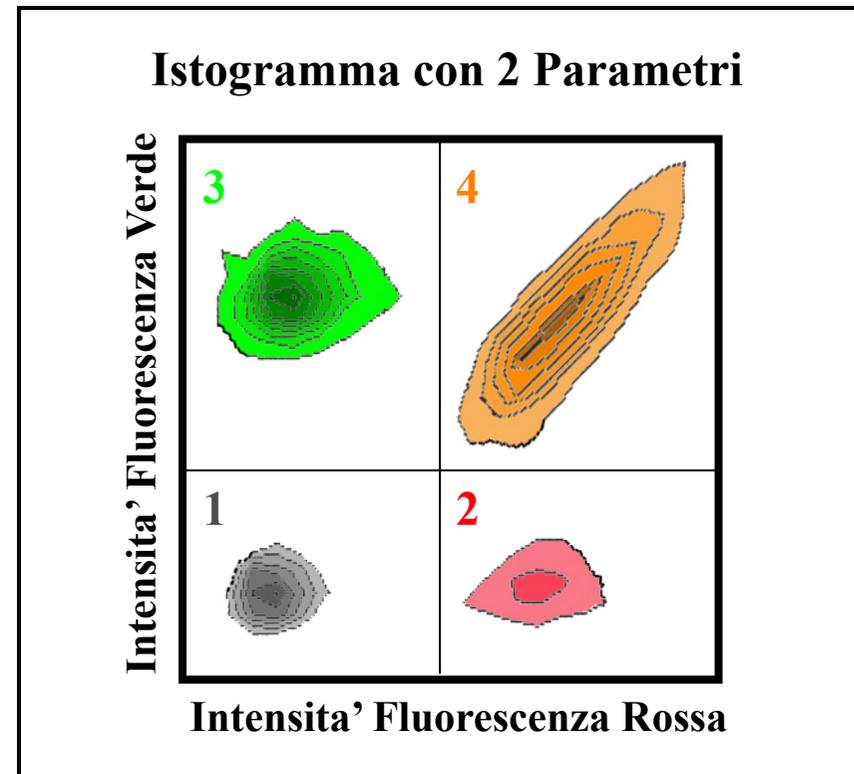
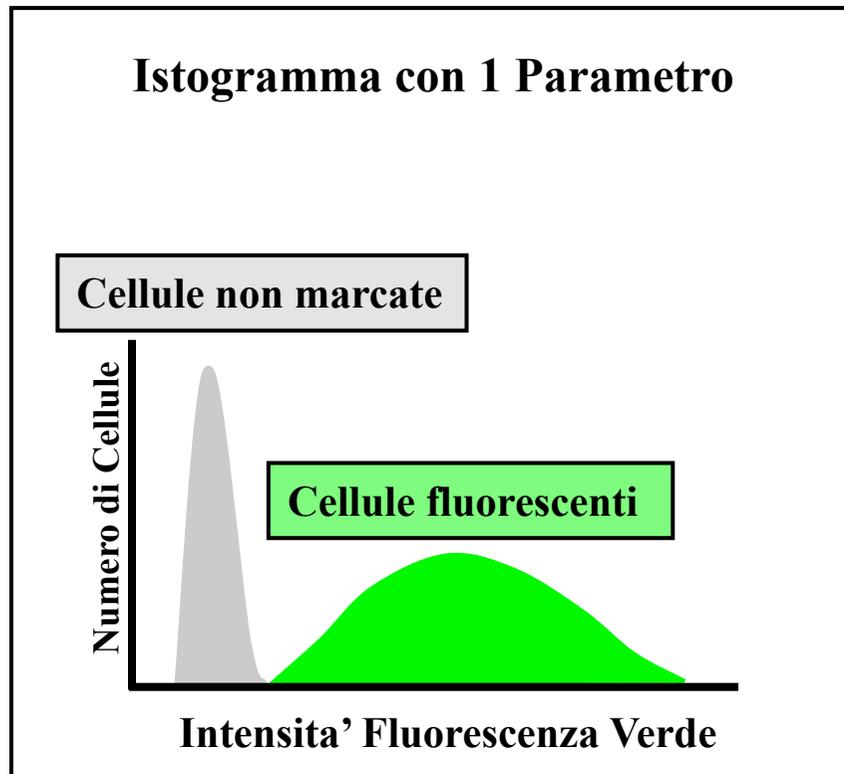
Citofluorimetria

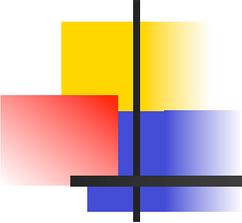
- La sospensione di cellule da analizzare viene marcata con una molecola fluorescente
- La marcatura avviene con Fluorescenza Diretta o Indiretta
- Il campione di cellule viene analizzato con un citofluorimetro (FACS)



Citofluorimetria

- Analisi del campione al FACS



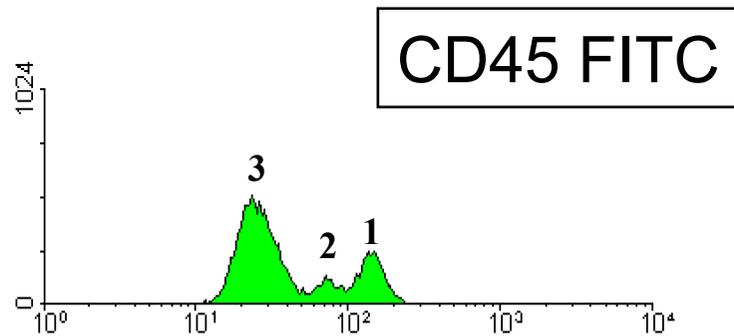


Citofluorimetria

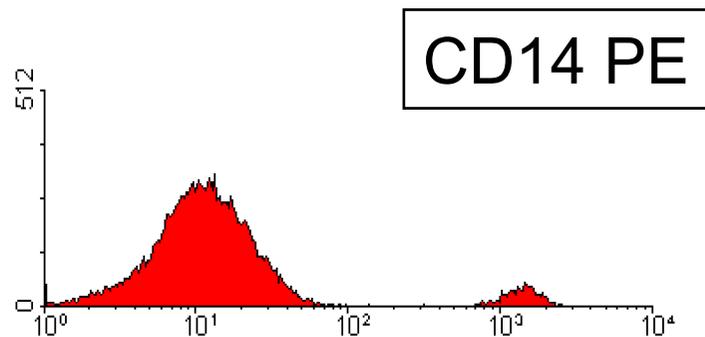
- Esempio: Analisi cellule da sangue periferico
 - Miscela di linfociti, monociti e granulociti
 - Colorazione con Ab monoclonali:
 - 1) **Anti-CD14** (specifico per monociti) marcato con **ficoeritrina (PE)**
 - 2) **Anti-CD45** (presente su tutti i leucociti: linfociti>monociti>granulociti) marcato con **fluoresceina (FITC)**

Citofluorimetria

- Analisi cellule da sangue periferico (1 parametro)



CD45=linfociti>monociti>granulociti
(1) (2) (3)

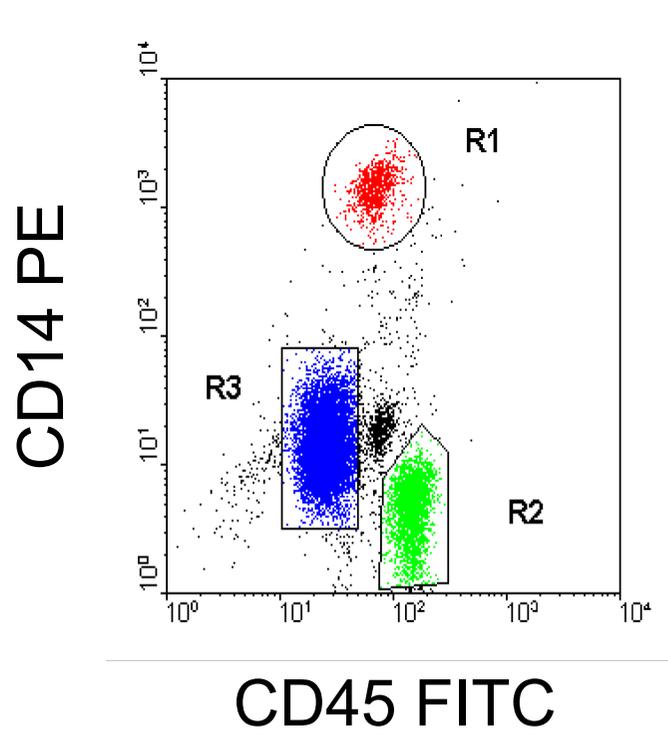


CD14=monociti

Intensita' Fluorescenza

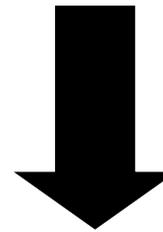
Citofluorimetria

- Analisi cellule da sangue periferico (2 parametri)



CD14=monociti

CD45=linfociti>monociti>granulociti



R1=monociti (CD14+)

R2=linfociti (CD45>monociti)

R3=granulociti (CD45<monociti)