

ALTRE TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

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
covalentemente a carrier insolubili
(sfere di lattice, globuli rossi)

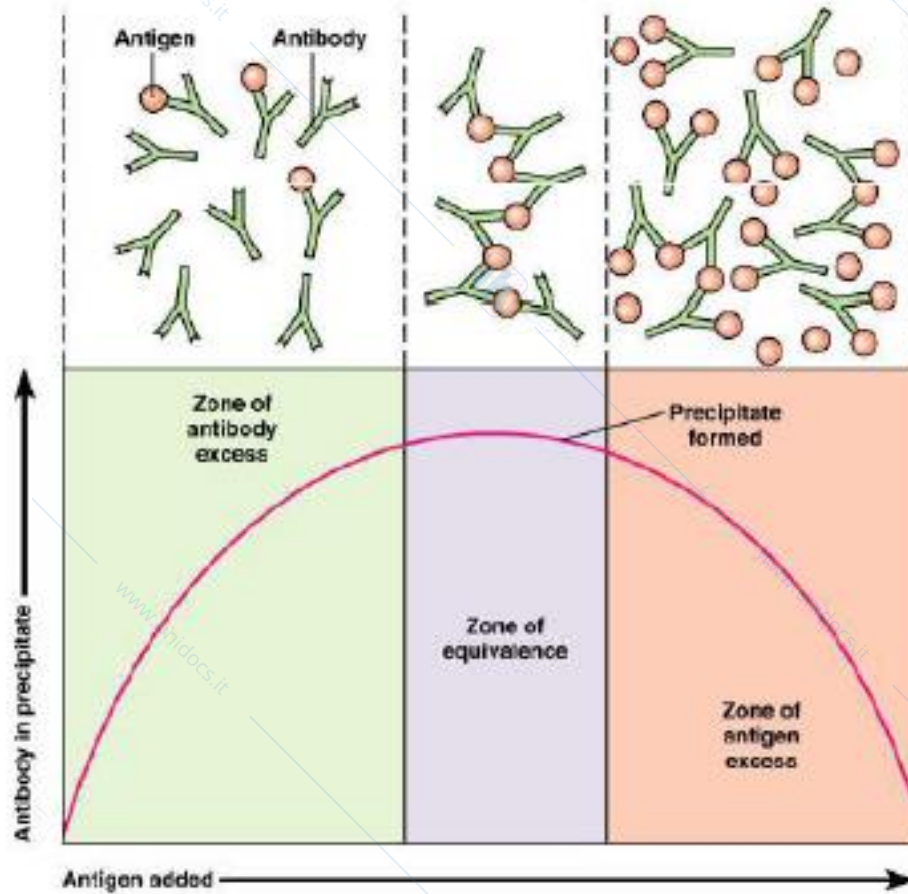
Precipitazione

Se avviene in matrice solida

Reazioni di agglutinazione/precipitazione

È un fenomeno dovuto all'aggregazione e alla sedimentazione di un antigene dopo reazione con l'anticorpo

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.



PRECIPITAZIONE

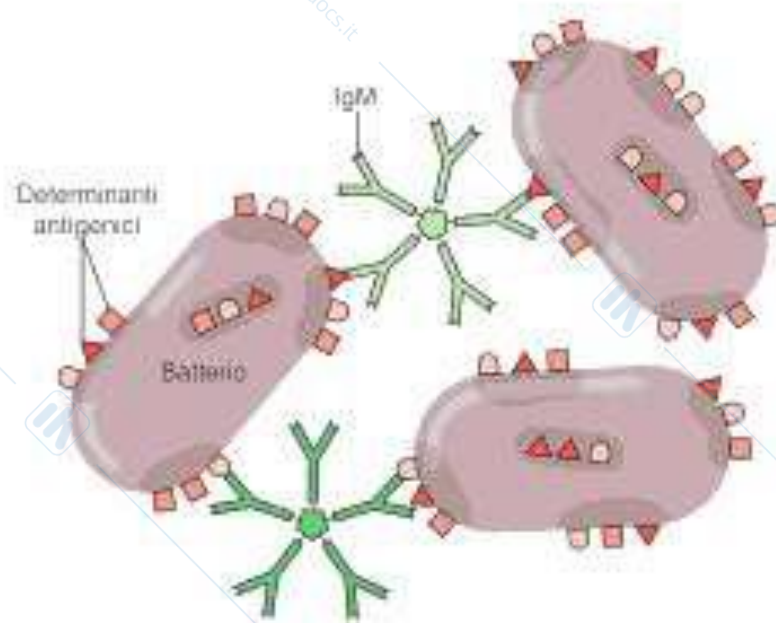
Si distinguono tre zone:

- ECCESSO DI ANTICORPI
- ZONA DI EQUIVALENZA
- ECCESSO DI ANTIGENE

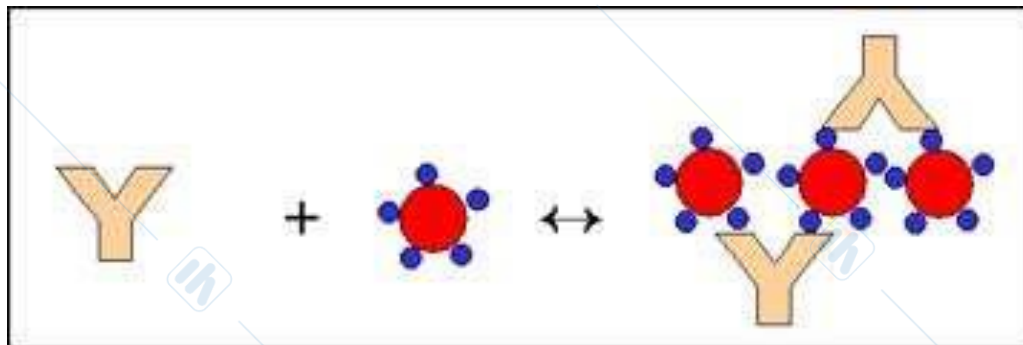
concentrazione di immunoprecipitato in funzione della concentrazione dell'antigene presente

AGGLUTINAZIONE

diretta: se l'antigene è corpuscolato (cellule, batteri)



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



Si eseguono quando:

- Si vuole ricercare la presenza di anticorpi nel siero di un paziente per diagnosticare una malattia infettiva;



Siero paziente (siero immune) + antigene corrispondente

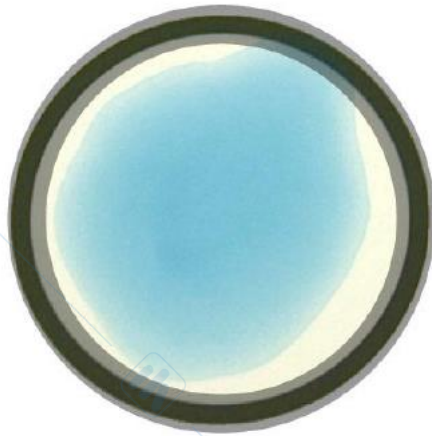
- Si vuole identificare un microrganismo in base agli antigeni che possiede.



Sospensione microbica (antigeni) + anticorpi specifici

Questi metodi, che si basano sulla formazione dell'immunocomplesso Ag-Ab, vengono chiamate **REAZIONI SIEROLOGICHE**

Reazioni di agglutinazione

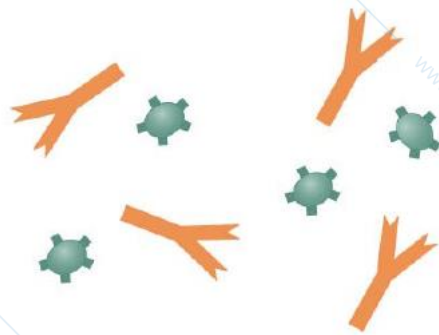


Negative result

(a)

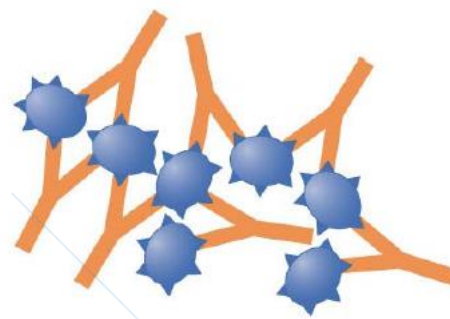


Positive result



Negative result

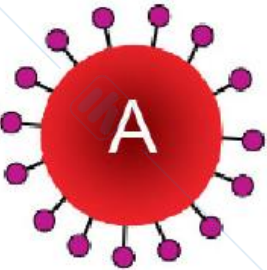
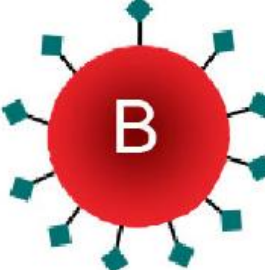
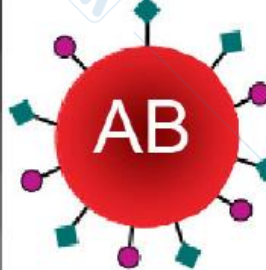



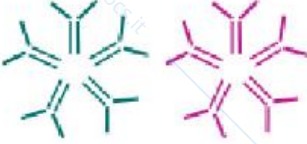



(b)



Positive result




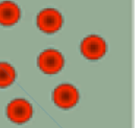
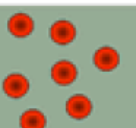

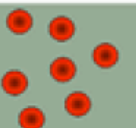
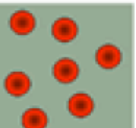
Determinazione del gruppo sanguigno

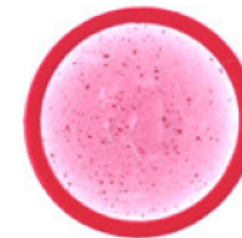
Le reazioni di agglutinazione vengono utilizzate per determinare il gruppo sanguigno.

	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

Determinazione del gruppo sanguigno

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".

Campione di sangue	Siero	
	Anti-A	Anti-B
Gruppo AB		
Gruppo A		
Gruppo B		
Gruppo 0		



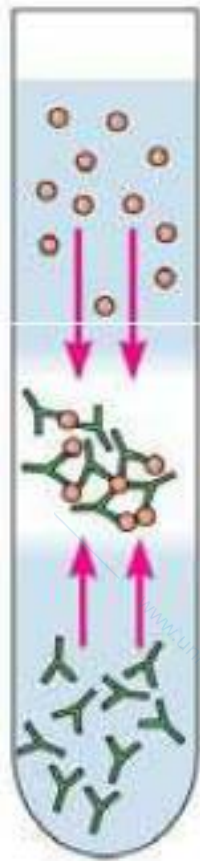
+



-

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.

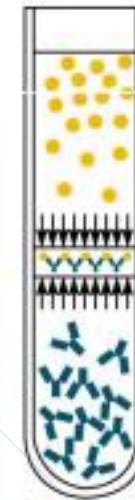
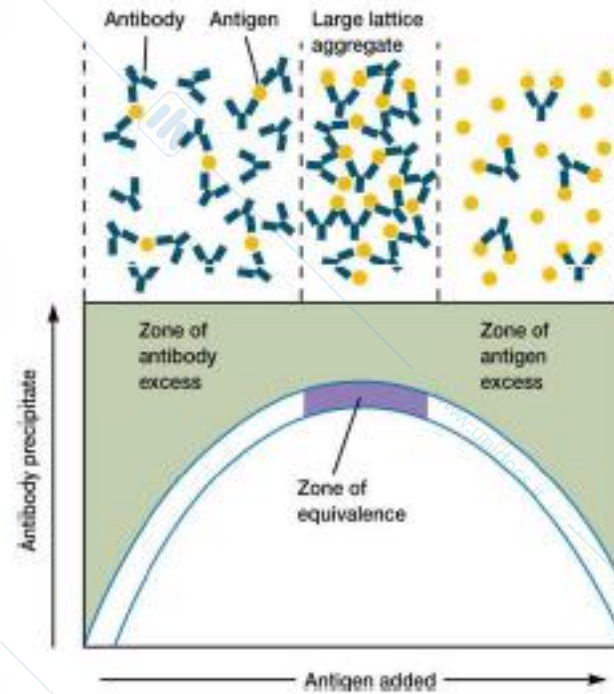
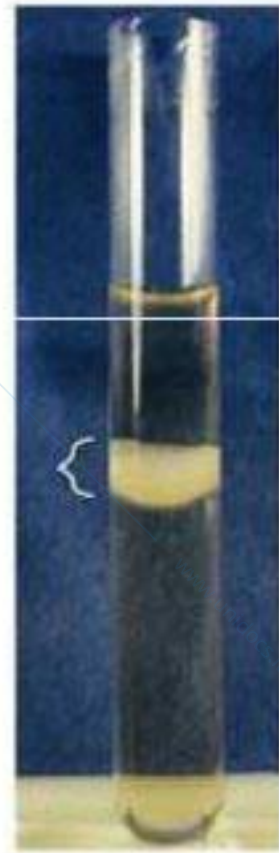
Test di precipitazione ad anello, Ring Test



Antigens
(soluble)

Zone of
equivalence:
visible precipitate

Antibodies



Antigena
(soluble)

Precipitation
ring

Antibodies

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**
- **Immunolettroforesi**

Immunodiffusione radiale

REAGENTS:

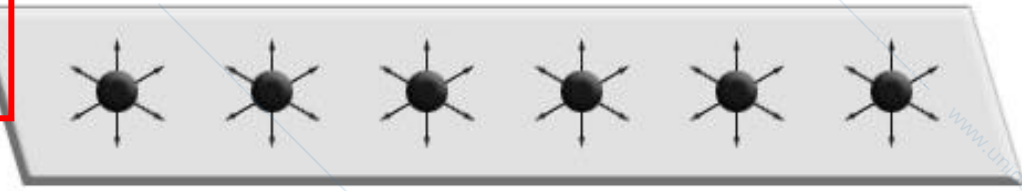
agar gel impregnated with antiglobulins (anti-IgG)

gel impregnated with uniform concentration of anti-IgG

1. add serum sample & IgG standards to wells



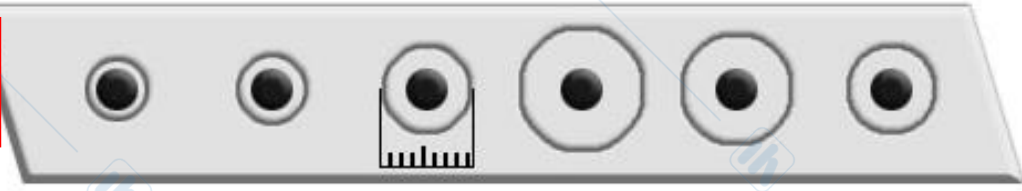
2. allow time for diffusion of IgG's into gel



3. precipitin rings form at site of optimal IgG:anti-IgG concentration

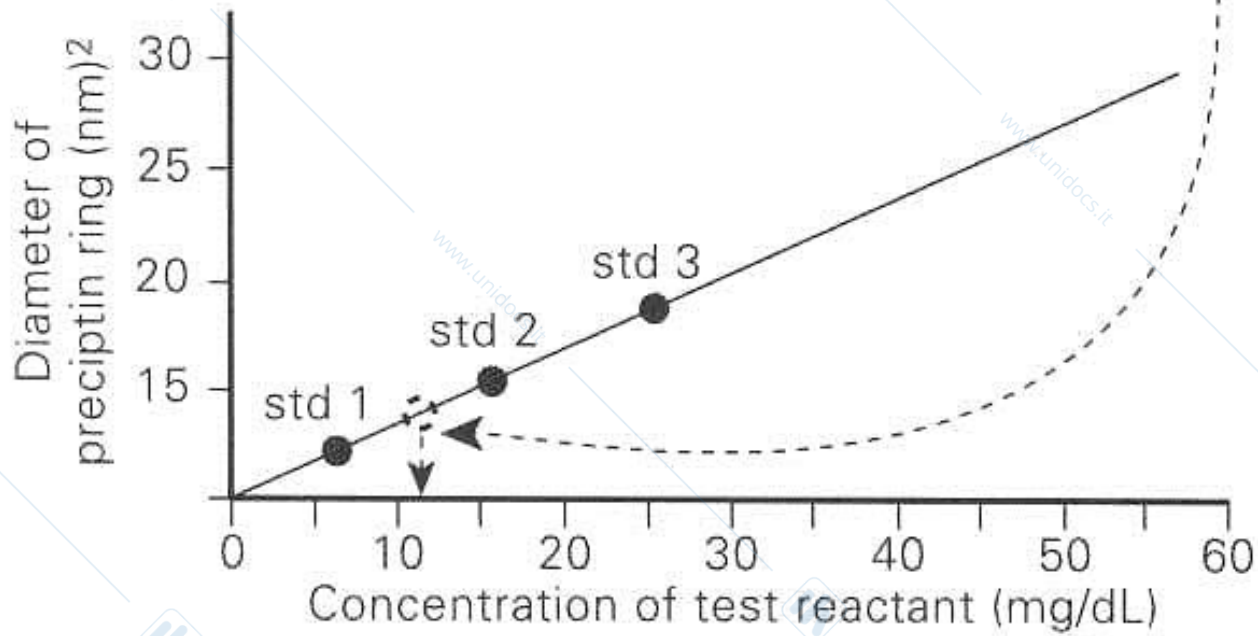
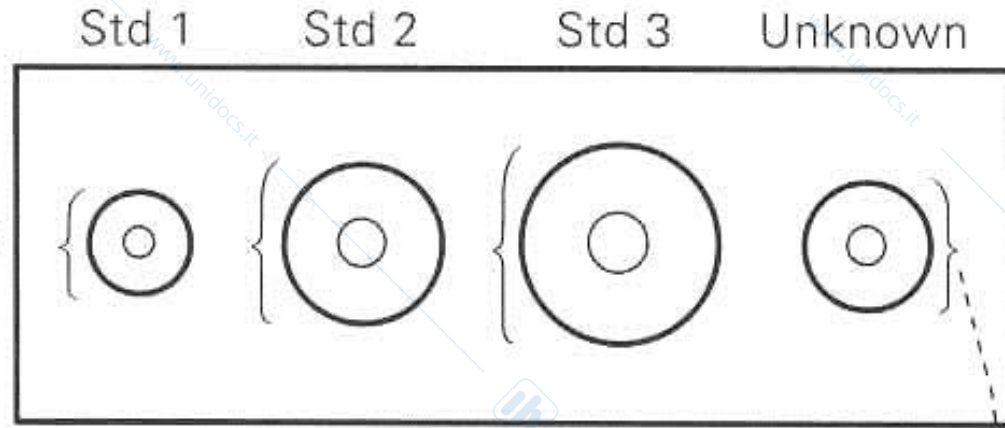


4. measure ring diameters (proportional to IgG concentrations)

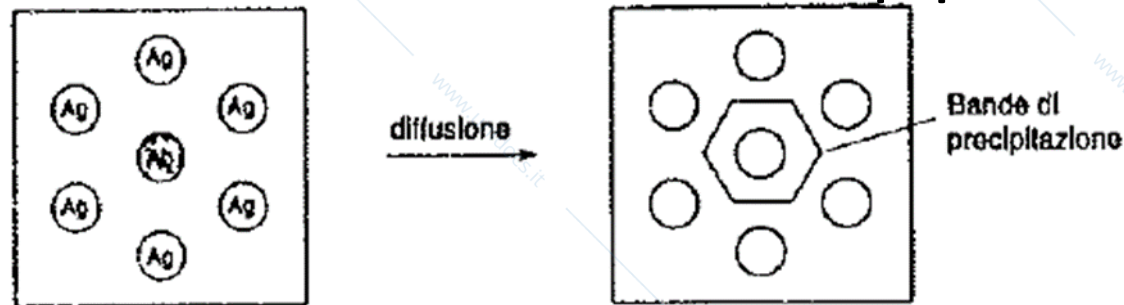


Il diametro dell'anello sarà funzione della concentrazione dell'antigene

Glass slide coated with agar containing specific antibody



Immunodiffusione doppia

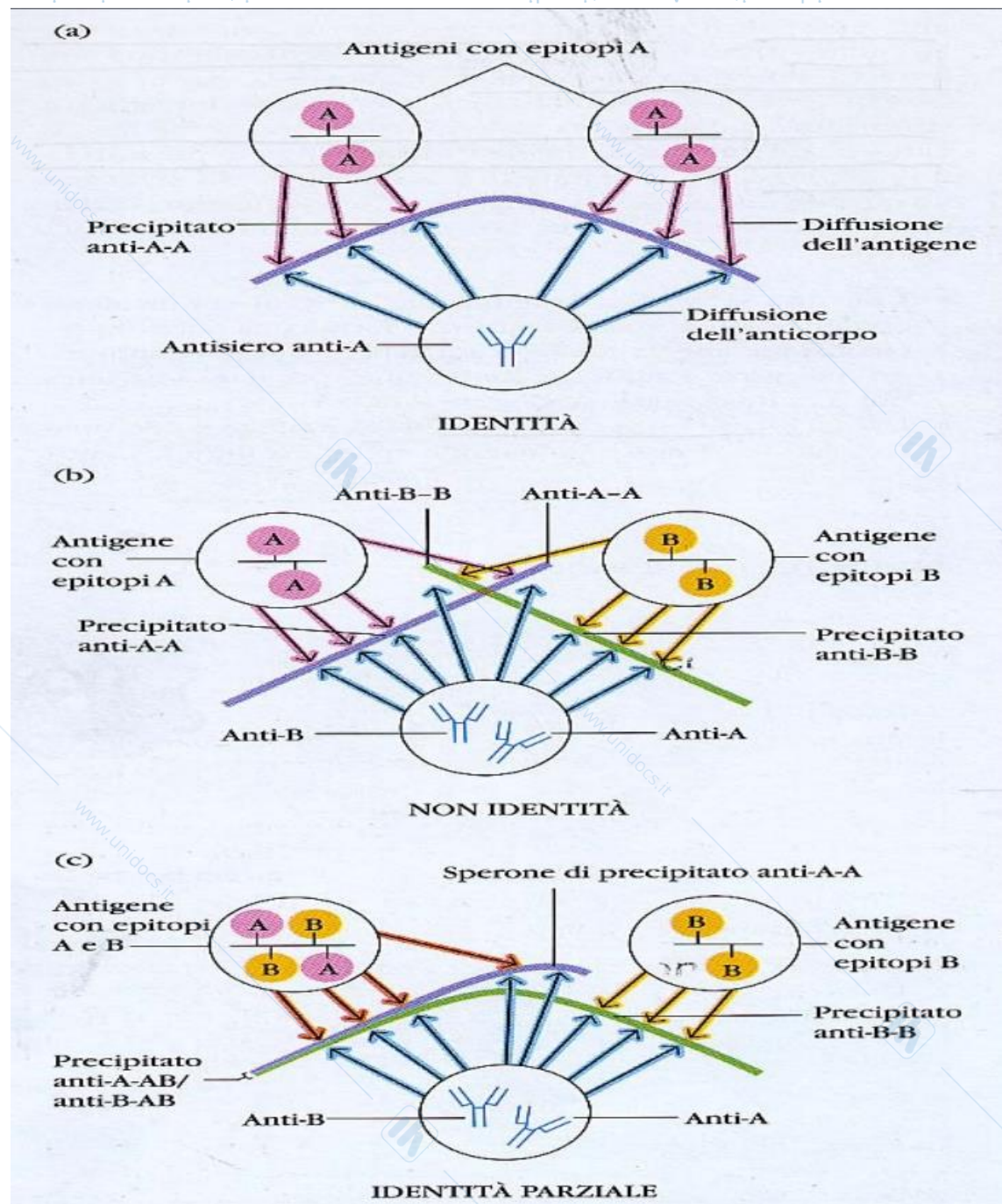


Si utilizza un gel di agar nel quale vengono scavati dei pozzetti. Nel pozzetto centrale si può depositare l'anticorpo e nei pozzetti attorno i diversi antigeni. Anticorpo ed antigene diffondono nell'agar, in corrispondenza del punto di equivalenza si forma l'immunoprecipitato, che può essere meglio evidenziato mediante colorazione. L'esperimento viene condotto in camera umida.

Questa tecnica permette di stabilire se gli antigeni depositati nei diversi pozzetti sono o non sono identici o se hanno epitopi in comune. Si ha una reazione di identità tra più antigeni contenenti identici epitopi quando le bande di precipitazione si fondono lungo una linea continua. Si ha invece una reazione di non identità quando il pozzetto centrale contiene anticorpi contro diversi antigeni, ma questi non hanno un epitopo in comune: si ottengono in questo caso due bande di precipitazione che si intersecano. Si ha infine una reazione di identità parziale quando i due antigeni hanno almeno un epitopo in comune, ma gli anticorpi utilizzati riconoscono sia l'epitopo in comune sia un altro epitopo proprio di uno solo degli antigeni.

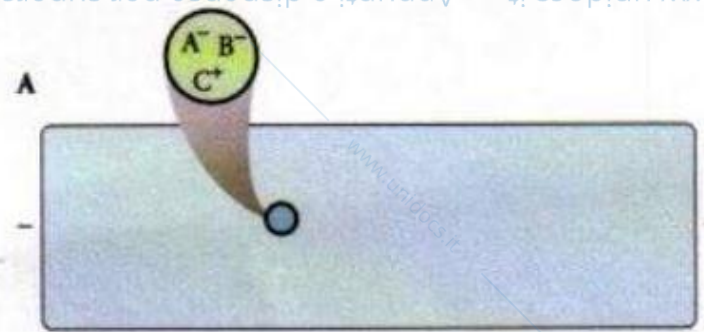
Diagrammi di possibili
 Modelli di precipitazione
 con la doppia immuno-
 diffusione eseguita su un
 antisiero e 2 diversi
 preparati antigenici

A: epitopi identici
 B: nessun epitopo in
 comune
 C: identità parziale

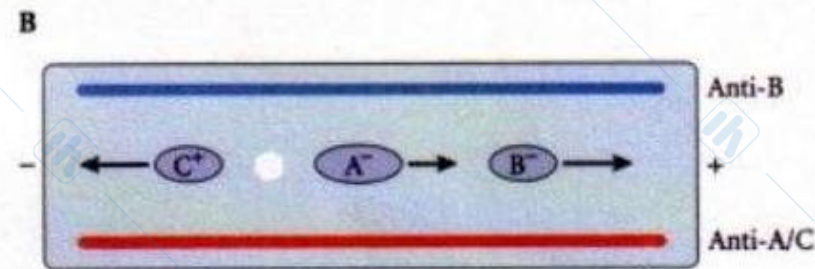


Immunolettroforesi

Antigeni separati per elettroforesi



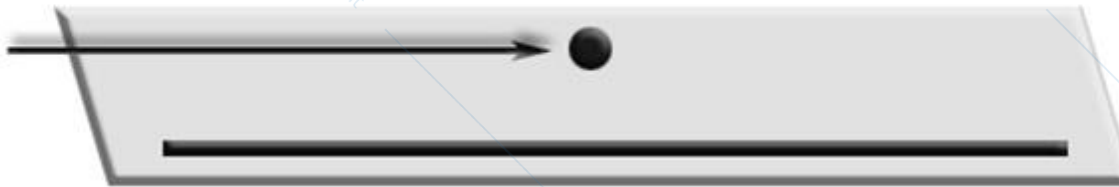
Anticorpi caricati in un solco nel gel



L'immunolettroforesi è una tecnica che unisce la specificità della reazione di immunoprecipitazione con la separazione di molecole mediante elettroforesi. Solitamente si utilizza un gel d'agarosio su cui si praticano due incisioni parallele e si scavano alcuni pozzetti. Nei pozzetti si depositano gli antigeni e si fa avvenire l'elettroforesi. Al termine dell'elettroforesi, le due incisioni parallele sono riempite con un antisiero opportuno e si lascia in incubazione per una notte. Gli antigeni diffondono radialmente e gli anticorpi diffondono lateralmente dando quindi luogo ad archi di precipitazione.

Immunolettroforesi

1. Add serum to well



2. Electrophorese serum proteins

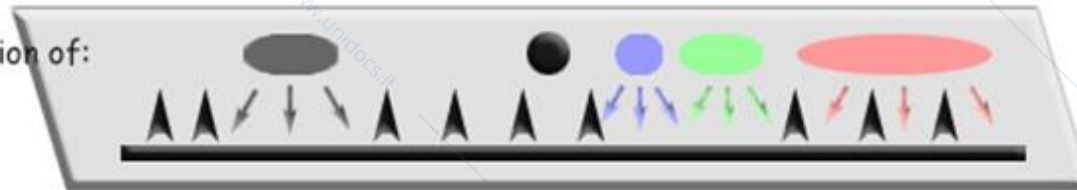


3. Add antiserum to slot



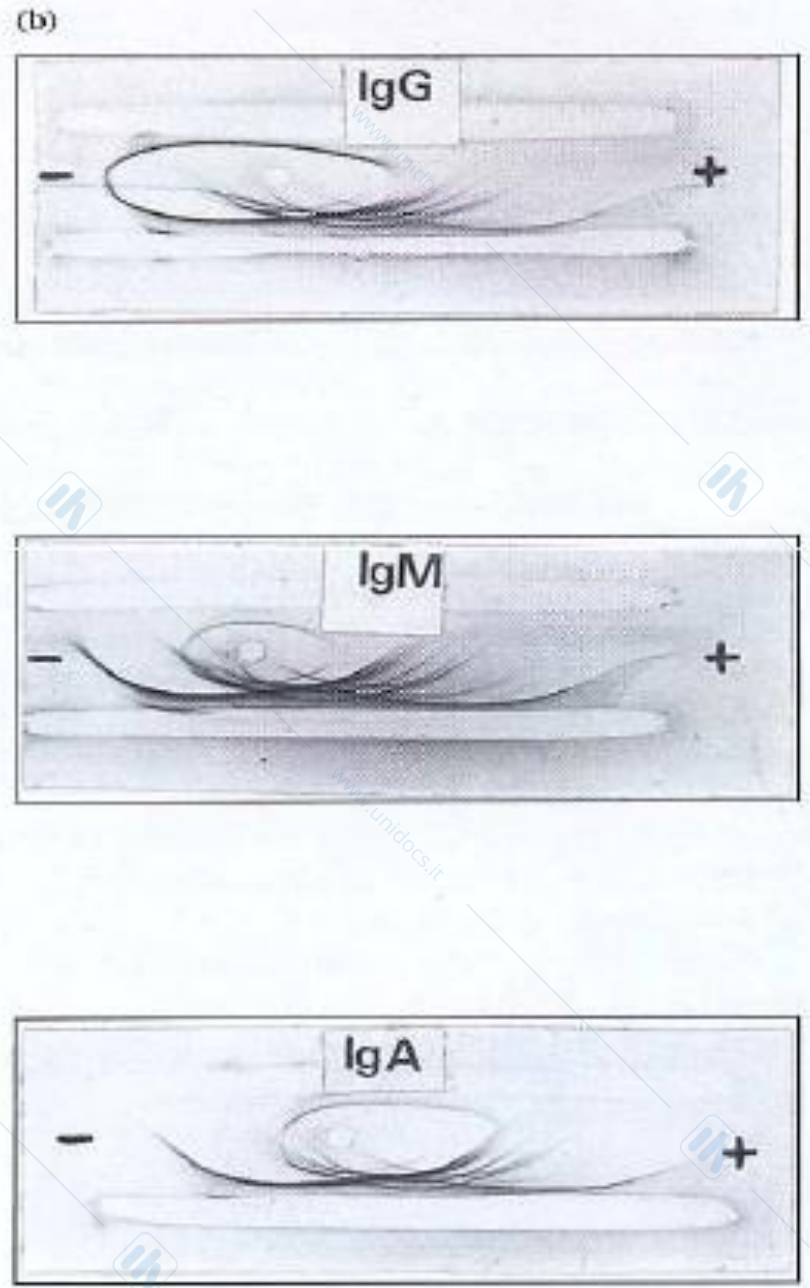
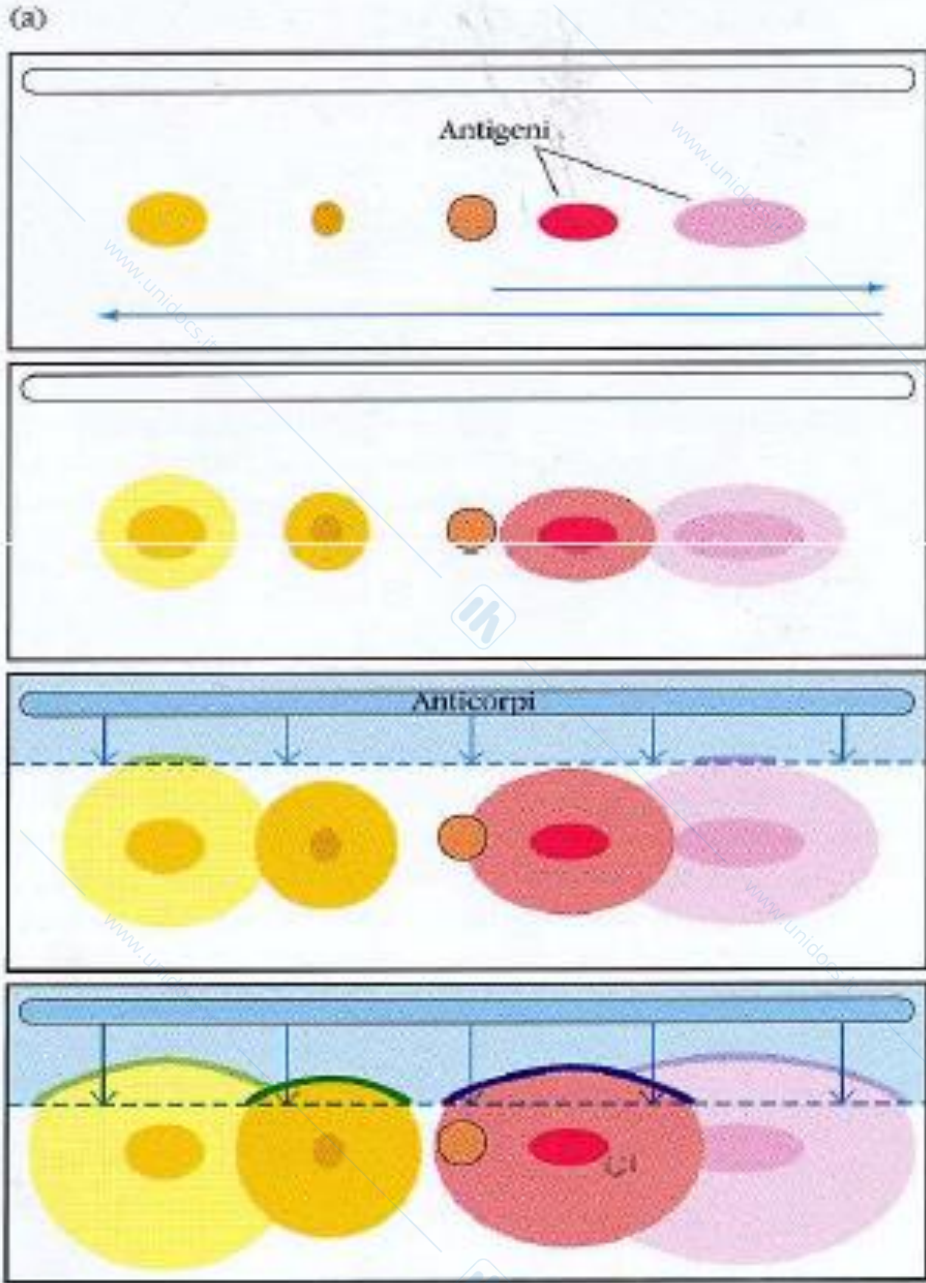
4. allow time for diffusion of:

- serum proteins
- Ab's in antiserum

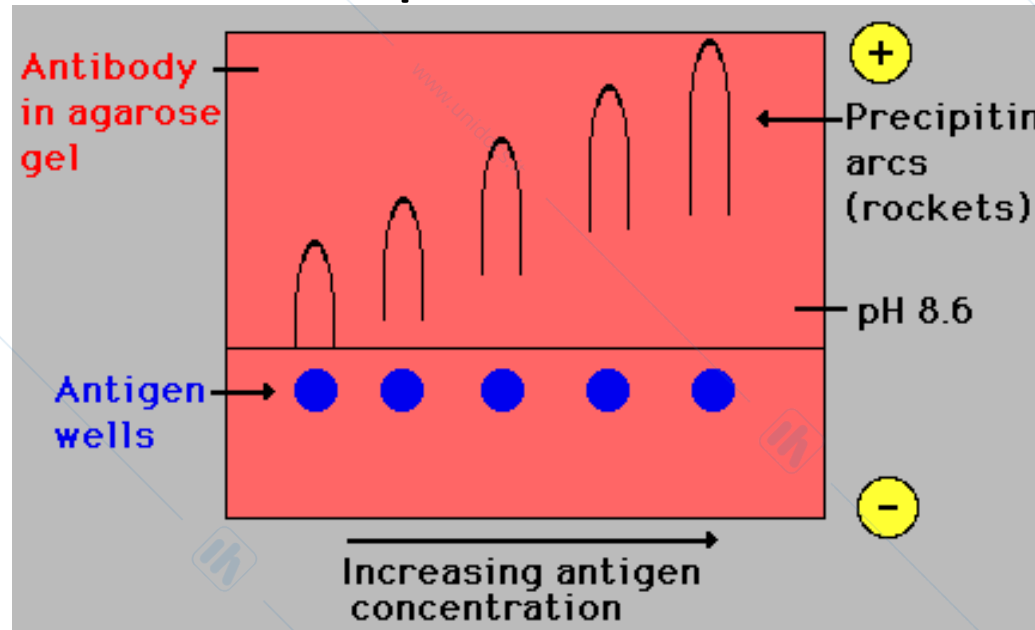


5. stain gel & read precipitin lines





Rocket electrophoresis



L'immunolettroforesi quantitativa, chiamata anche "rocket elettroforesi" è una tecnica che si avvale, come l'immunodiffusione radiale semplice, di un **gel d'agar in cui sia presente un determinato anticorpo**. In questa matrice vengono scavati dei piccoli pozzetti nei quali vengono posti degli antigeni. Applicando una corrente continua gli antigeni migrano verso l'anodo e incontrano gli anticorpi che si muovono invece verso il catodo; quando antigene e anticorpo avranno raggiunto l'equivalenza stechiometrica si formeranno gli immunoprecipitati insolubili che daranno archi di precipitazione .

Rocket electrophoresis

IMMUNOELETTROFORESI QUANTITATIVA

Più l'antigene è concentrato nel pozzetto, più alto sarà il suo arco di precipitazione.

Ponendo in grafico l'altezza degli archi contro la concentrazione si otterrà una retta di taratura che servirà per determinare la concentrazione di un antigene in un campione ignoto.

