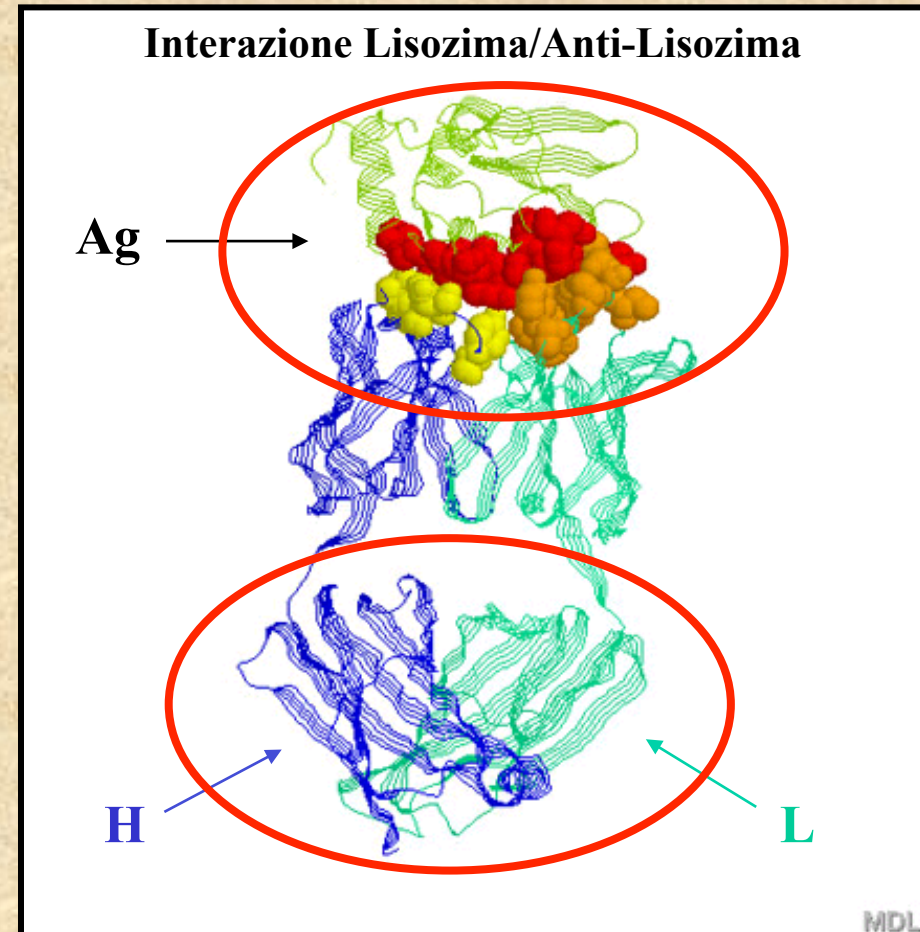


Tecniche Immunologiche

Reazioni

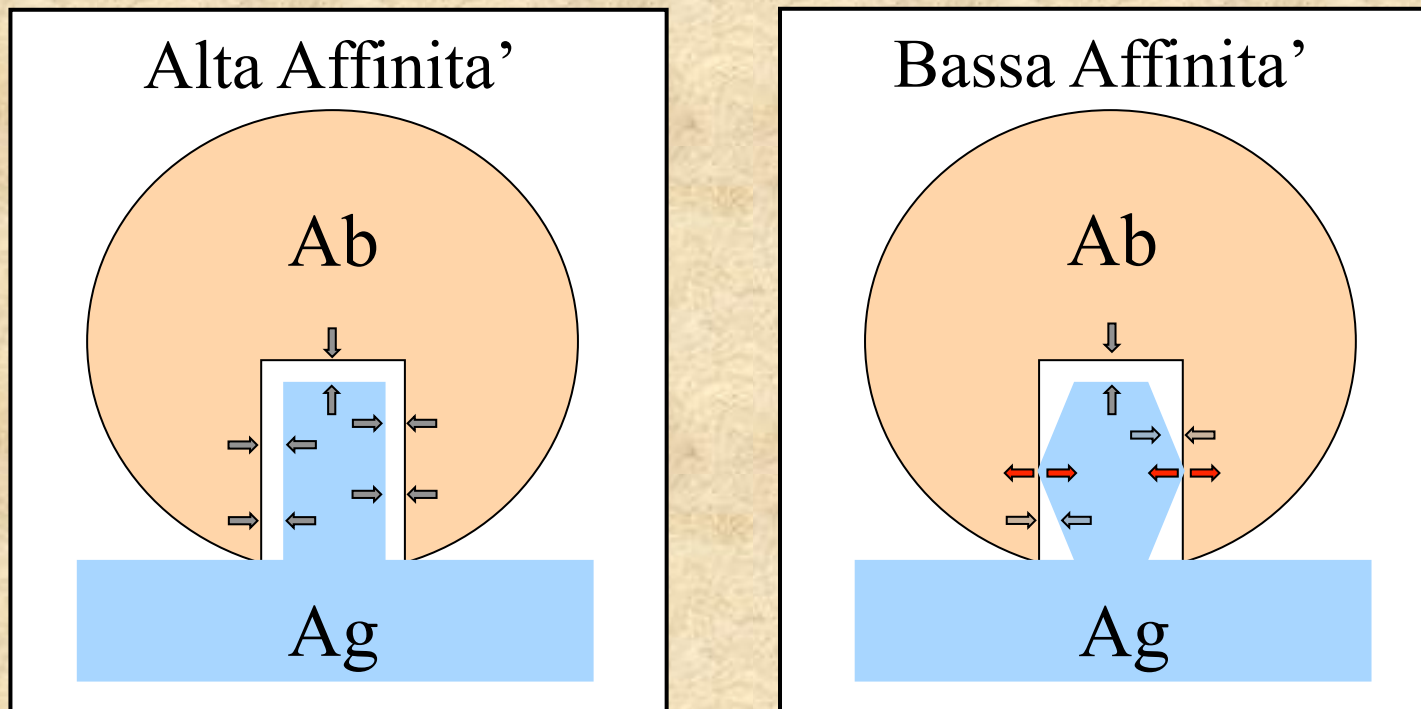
Antigene (Ag)/Anticorpo (Ab)

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



Affinita'

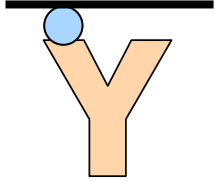
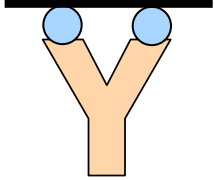
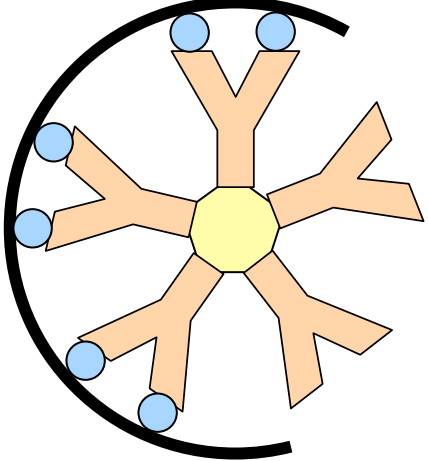
- La forza della reazione tra un singolo determinante antigenico ed un singolo sito di legame dell'anticorpo



Affinita' = Somma delle forze attrattive e repulsive

Avidita'

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

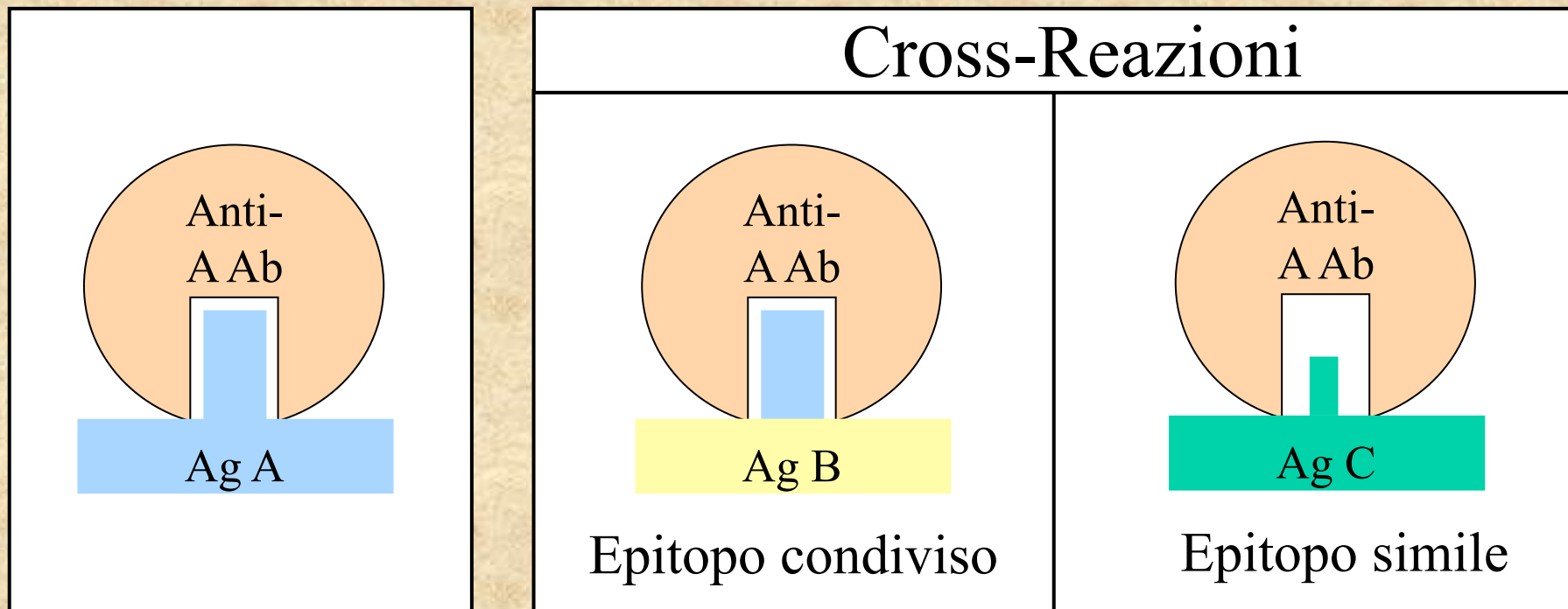
		
$K_{eq} = 10^4$ Affinita'	10^6 Avidita'	10^{10} Avidita'

Specificita'

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

Reazione Incrociata (Cross- Reazione)

- La capacita' di un singolo anticorpo di reagire contro piu' determinanti antigenici.
- La capacita' di una popolazione di anticorpi di reagire contro piu' antigeni.



Test Basati sulle Reazioni Ag/Ab

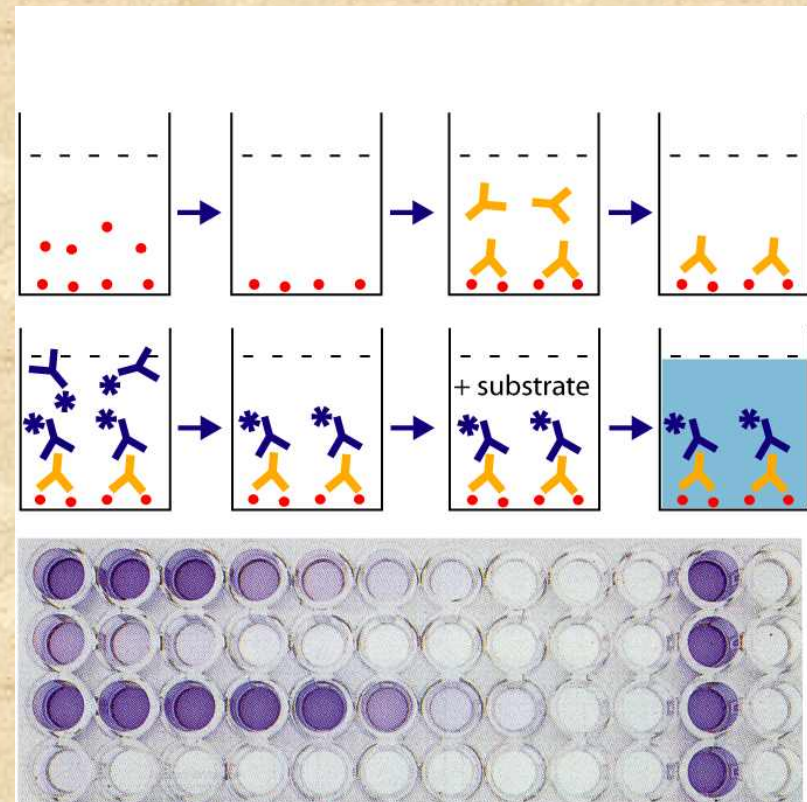
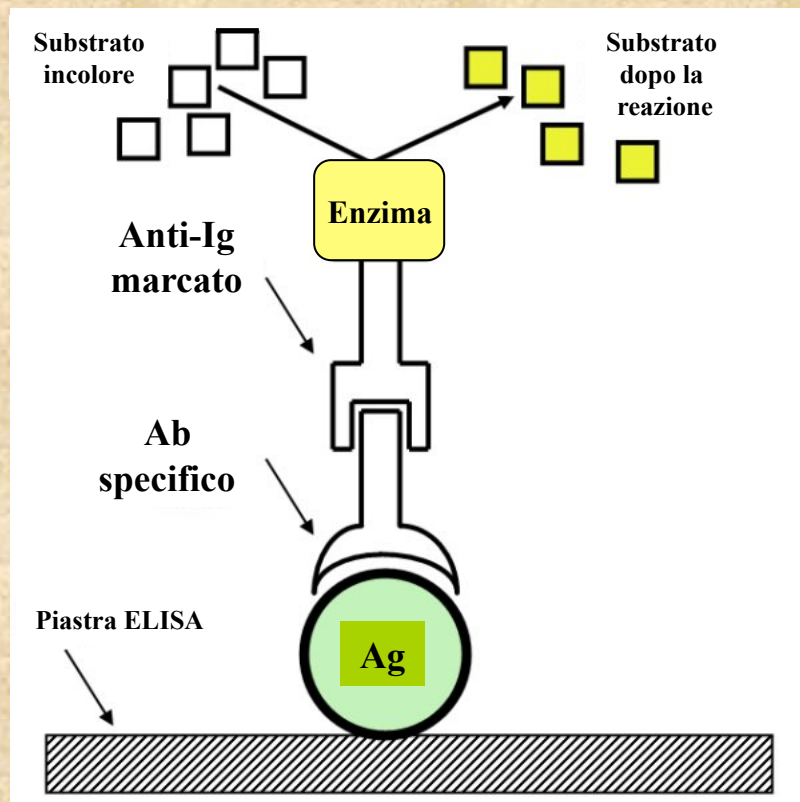
- Tutti i test basati sulle reazioni Ag/Ab permettono di misurare piccole quantità degli immuno-complessi.
- Tutti i test basati sulle reazioni Ag/Ab possono essere utilizzati per misurare l'antigene o l'anticorpo presenti nel campione.

**Enzyme-Linked Immunosorbent
Assay (ELISA):**

**Saggio di Immunoassorbimento
Legato ad Enzima**

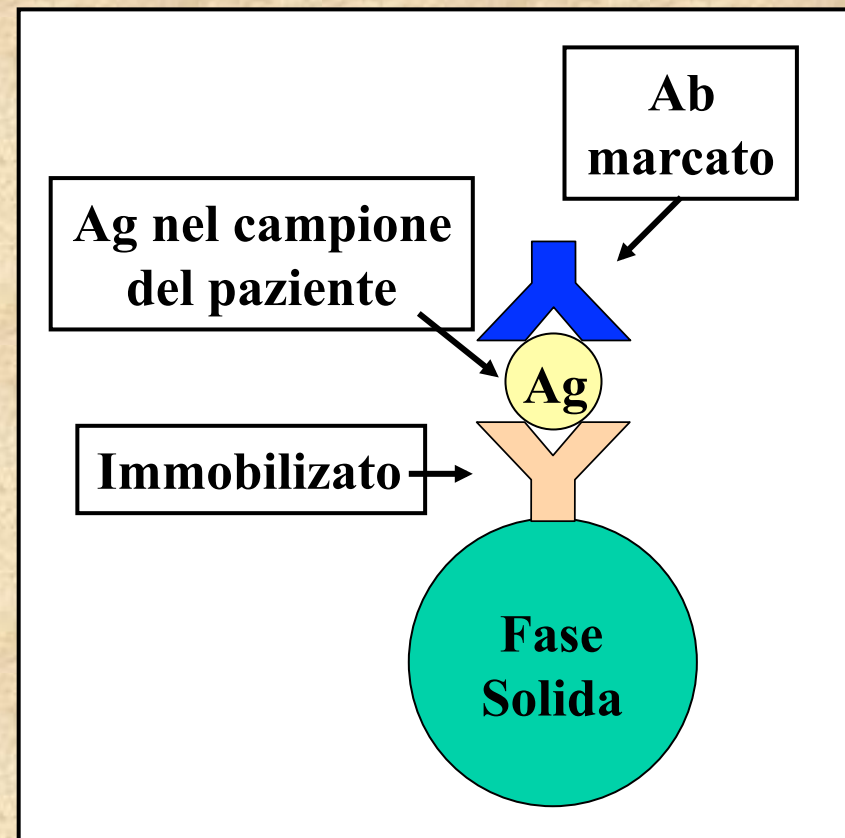
Principio dell'ELISA

- 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

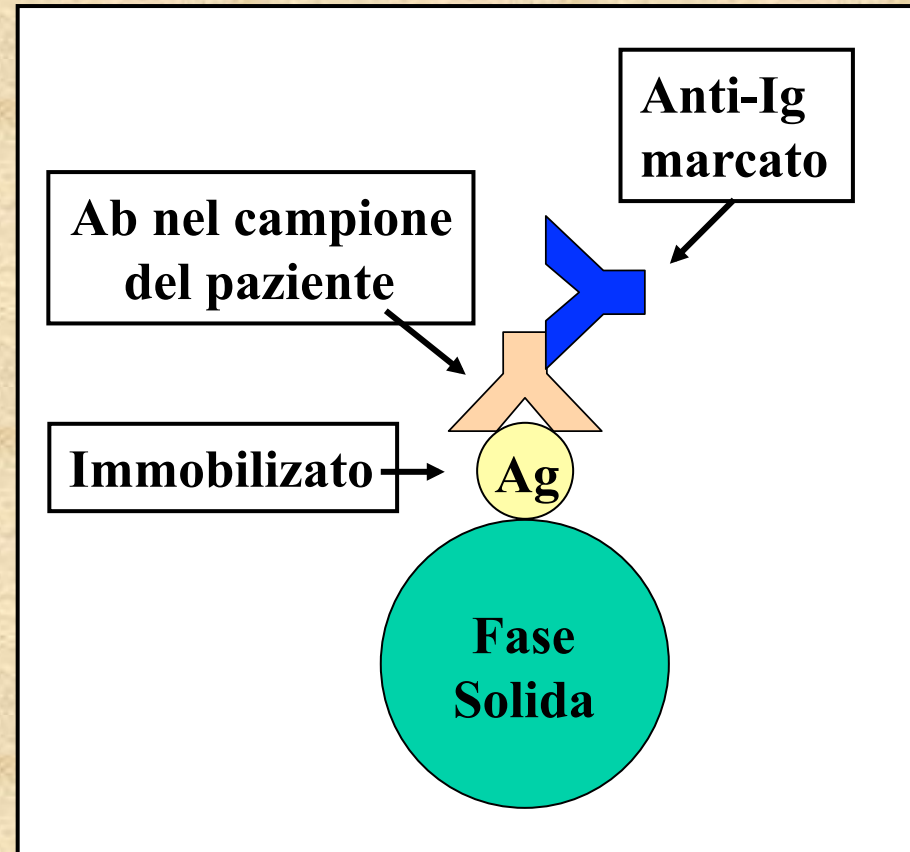
- Rilevamento dell'Ag
 - Immobilizzare l'Ab
 - Incubare con il campione da misurare
 - Aggiungere l'Ab marcato con un enzima
 - La quantità di Ab legato è' proporzionale alla quantità di Ag nel campione del paziente.



➤ 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 è proporzionale alla quantità di Ab nel campione del paziente.



➤ 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

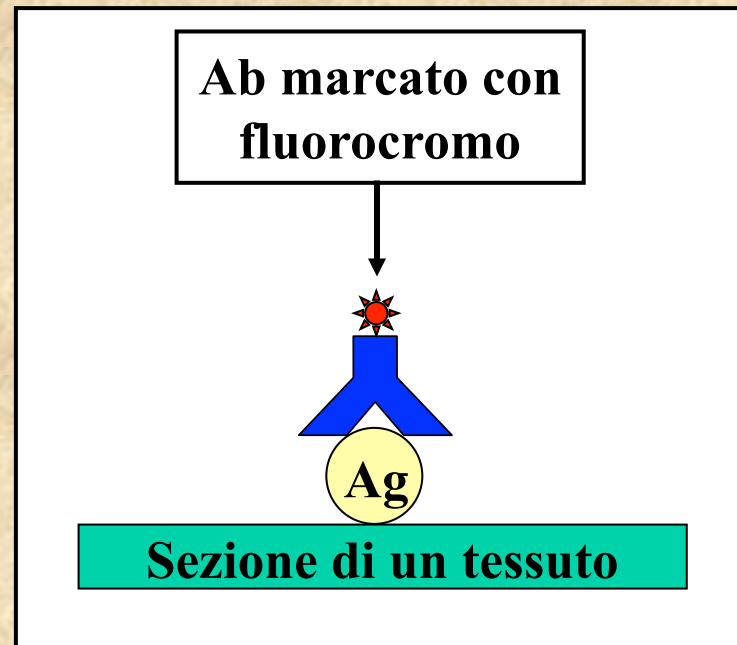
Fluorescenza e Fluorocromi

- 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

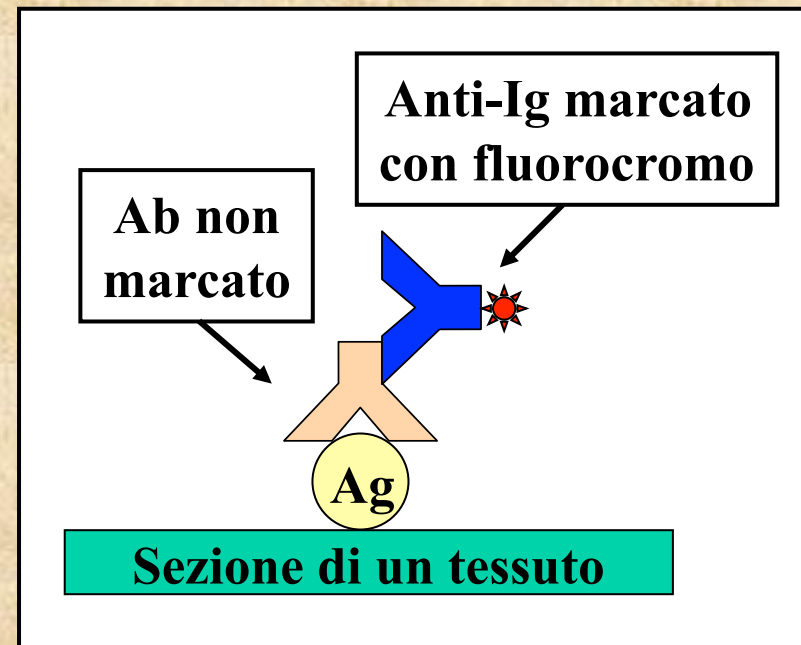
Immunofluorescenza

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



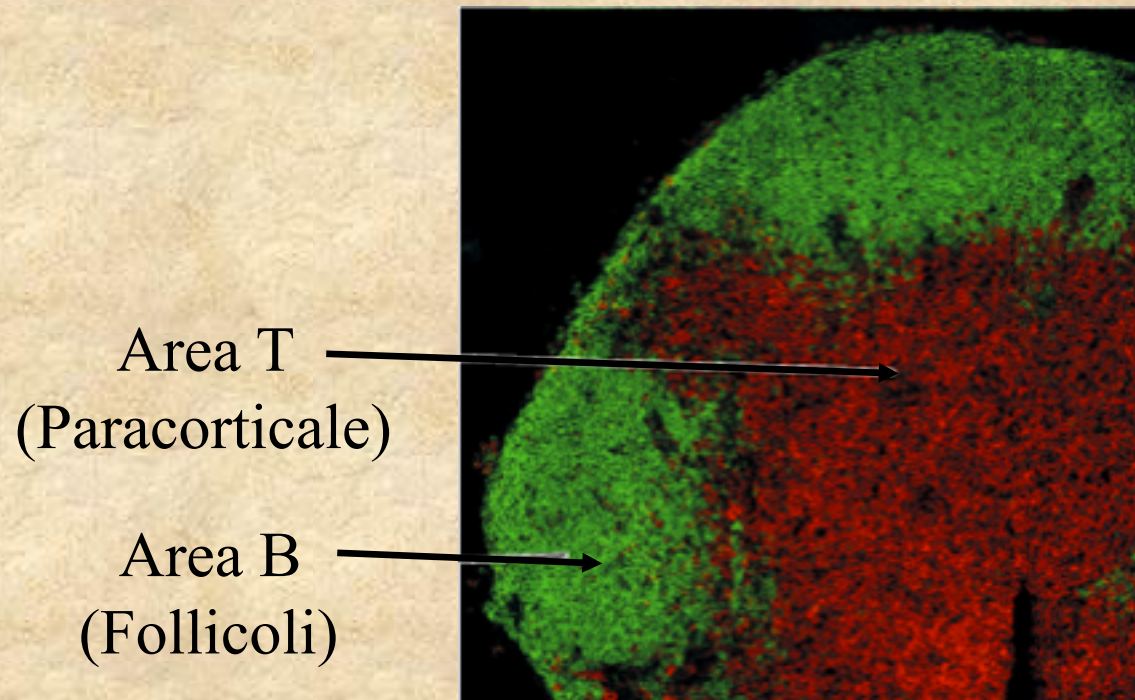
Immunofluorescenza

- 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

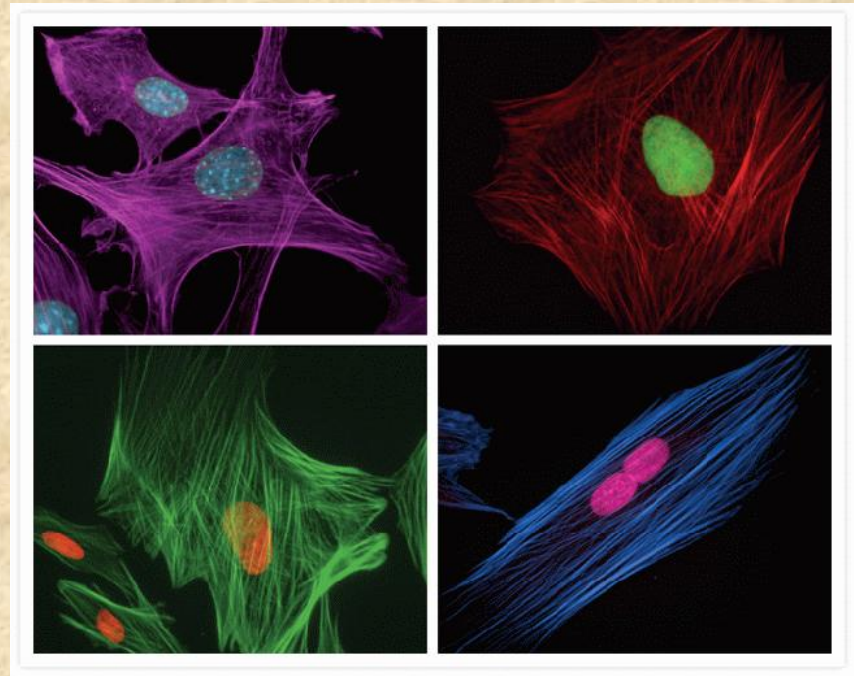
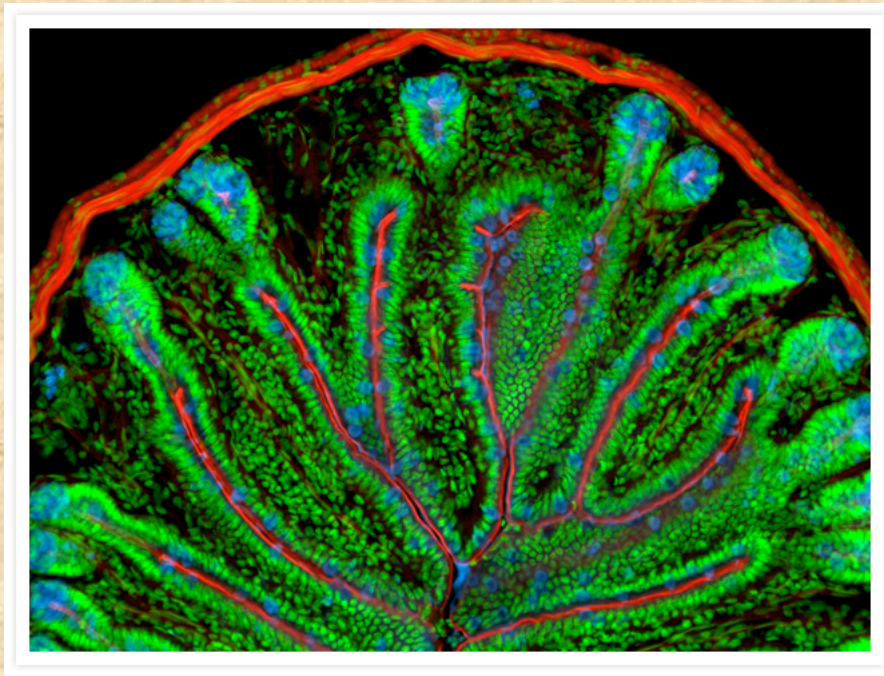
Immunofluorescenza



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

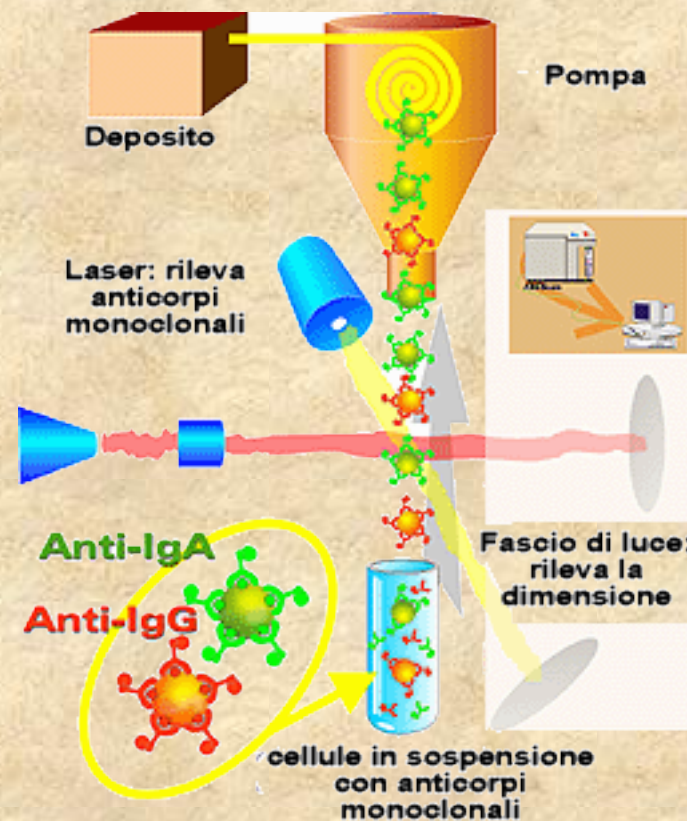
Traccianti Fluorescenti:

- 1 tracciante per singolo Ab = 1 tracciante per singolo Ag
- Fino a 8 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

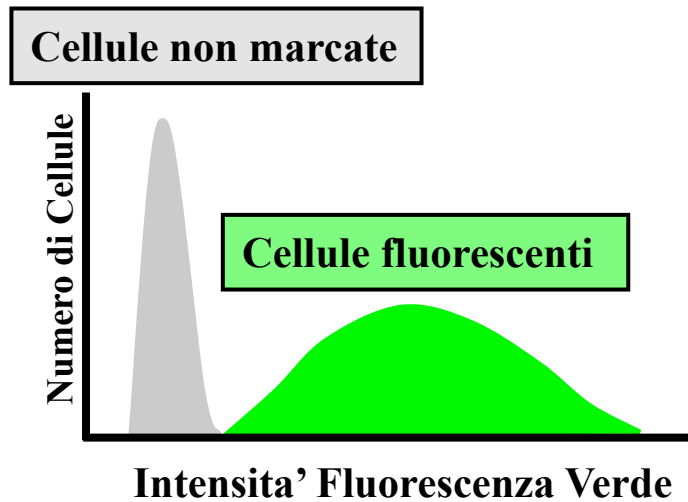
- Il campione di cellule viene analizzato con un citofluorimetro (FACS)



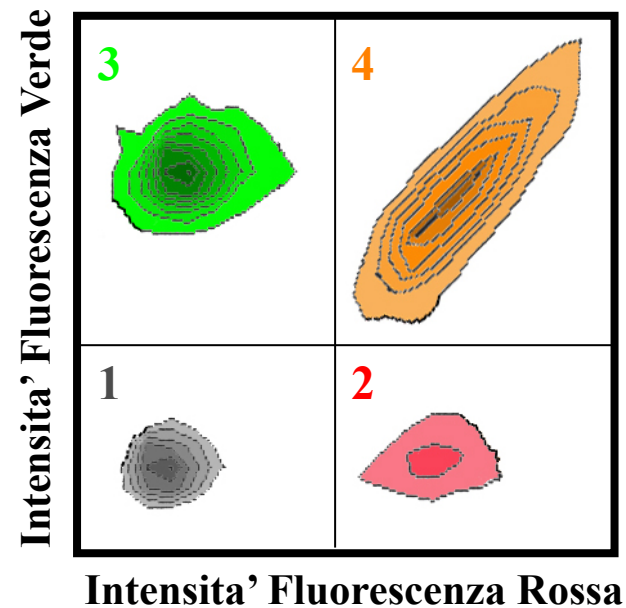
Citofluorimetria

- Analisi del campione al FACS

Istogramma con 1 Parametro



Istogramma con 2 Parametri

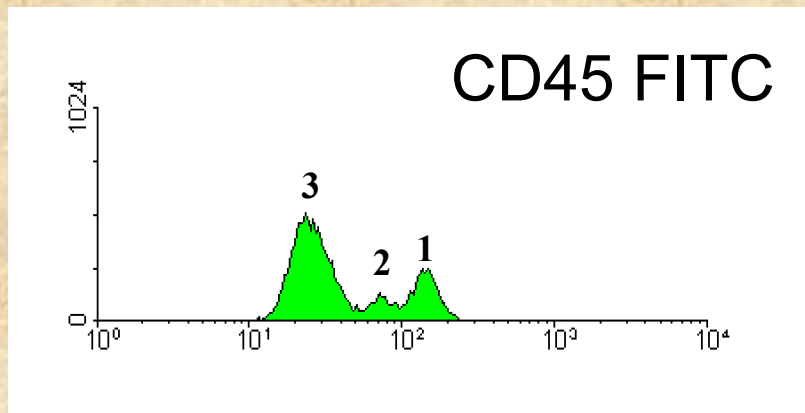


Citofluorimetria

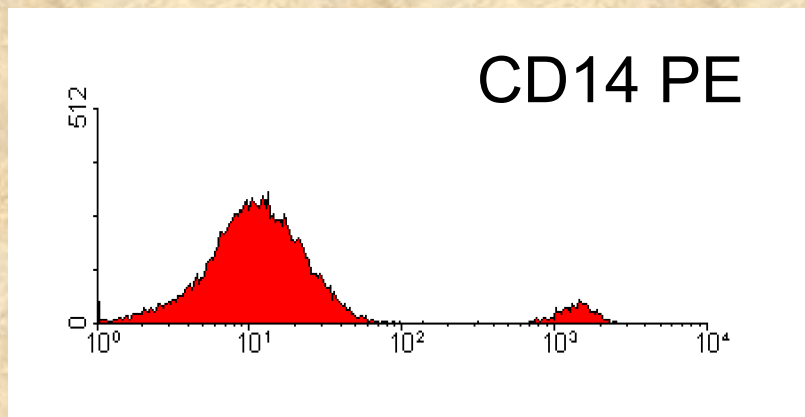
- Esempio: Analisi cellule da sangue periferico
 - Miscela di linfociti, monociti e granulociti
 - Colorazione con Ab monoclonali:
 - 1) **Anti-CD14** (specifico per monociti)
marcato con **ficoeritrina (PE)**
 - 2) **Anti-CD45** (presente su tutti i leucociti:
linfociti>monociti>granulociti)
marcato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

Citofluorimetria

- Esempio: Analisi cellule da sangue periferico con 1 parametro



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

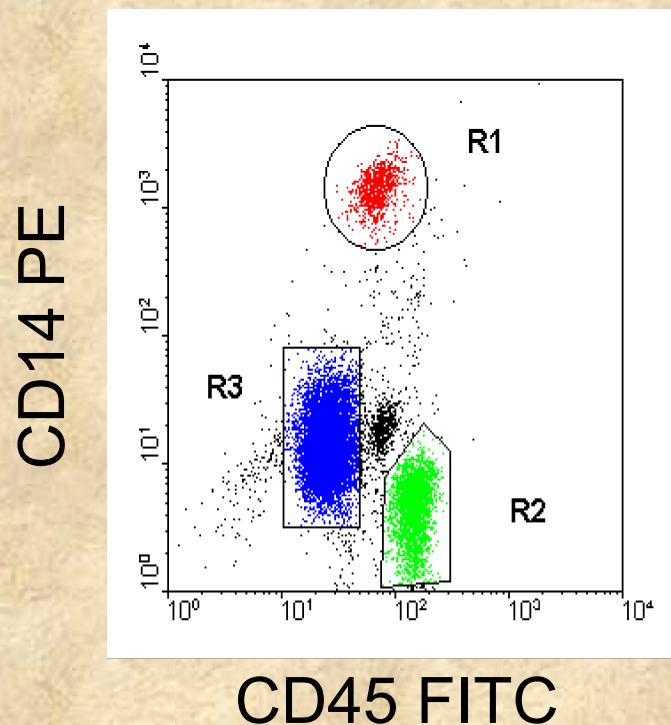


CD14=monociti

Intensita' Fluorescenza

Citofluorimetria

- Esempio: Analisi cellule da sangue periferico con 2 parametri



CD14=monociti

CD45=linfociti>monociti>granulociti



R1=monociti (CD14+)

R2=linfociti (CD45>monociti)

R3=granulociti (CD45<monociti)