

Κεφ. 23B

Ανοσοχημικές Τεχνικές

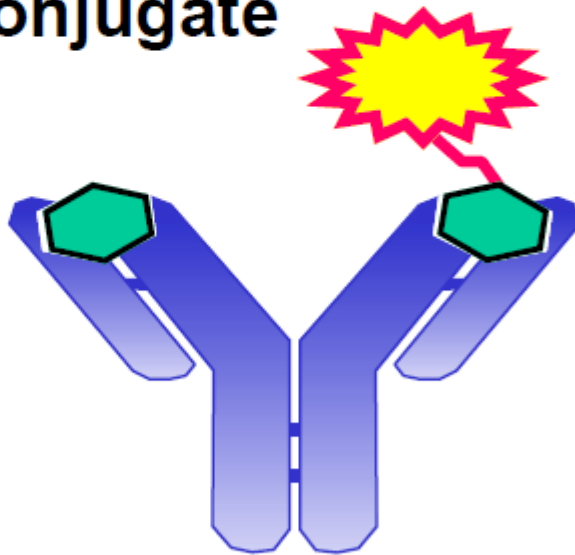
## Τεχνικές Ανοσοχημικών Προσδιορισμών με βάση τη μέθοδο μέτρησης ελεύθερου ή συνδεδεμένου ιχνηθέτη και επιλογή επισημαντή

Όνομασία	Συμβολισμός	Επισημαντής	Μέθοδος μέτρησης
1. Ραδιοανοσο-προσδιορισμός (Radioimmunoassay)	RIA	Ραδιοϊσότοπα	Μέτρηση ακτινοβολίας (ετερογενής)
2. Ένζυμοανοσο-προσδιορισμός Enzyme – Immunoassay	EIA	Ένζυμο	Παρουσία υποστρώματος με κλασικές αναλυτικές μεθόδους (ομογενής και ετερογενής)
3. Φθορισμοανοσο-προσδιορισμός Fluorescence – Immunoassay	FIA	Φθορίζουσα ουσία	Φθορισμομετρία (ομογενής και ετερογενής)
4. Νεφελοανοσο-προσδιορισμός Nephelometric Immunoassay	NIA	-----	Νεφελομετρικός προσδιορισμός συμπλόκου αντιγόνου - αντισώματος

# Immunoassay Conjugates - Detecting Binding

AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC

**Immunoassay  
Conjugate**



**Detectable Label**

**Radiolabel (RIA)**

**Enzyme (EIA)**

**Fluorescence (FIA)**

**Luminescence**

**Electrochemical**

**Visual**

**Colloidal gold**

**Colored latex**

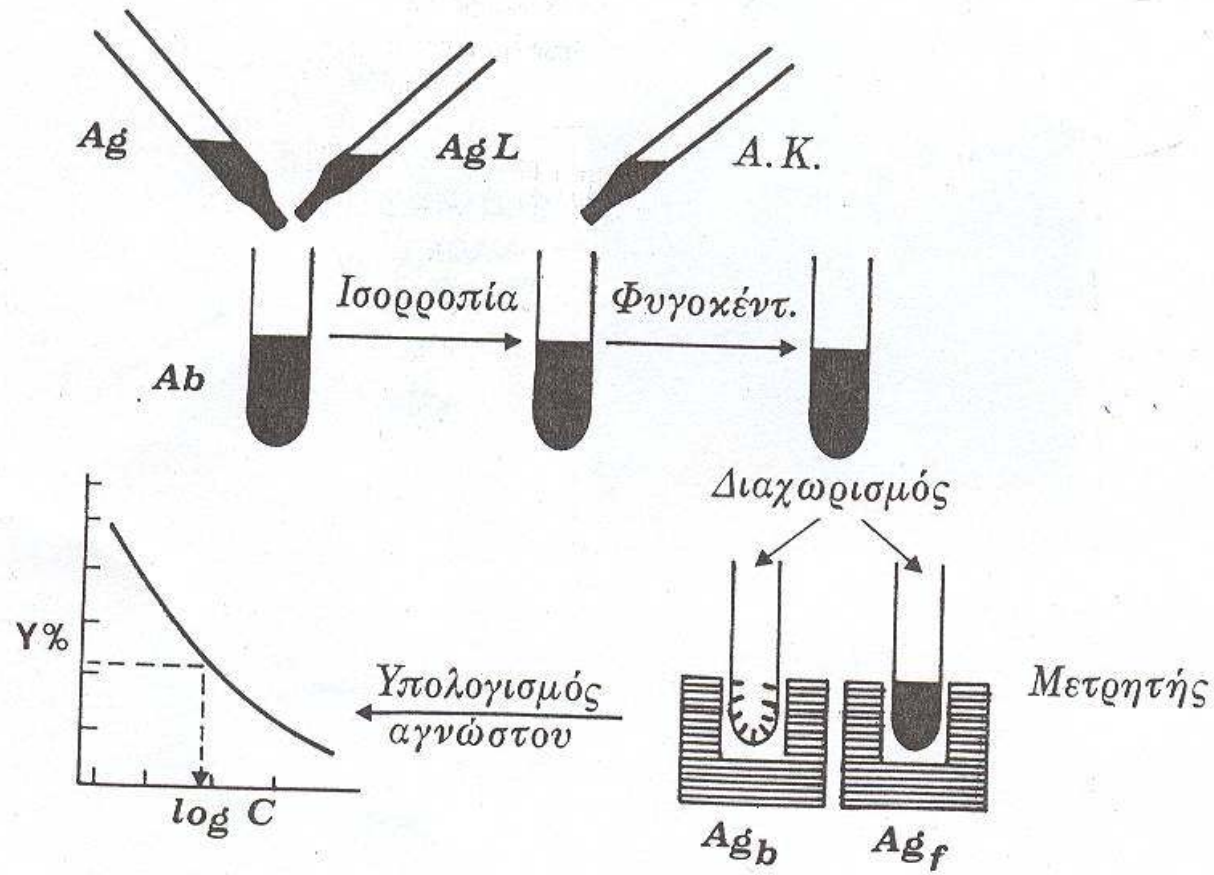
# Ραδιοανοσοπροσδιορισμοί Radioimmunoassays **RIA** (1)

- Παλαιότερη ανοσοχημική τεχνική
- Τάση να αντικατασταθεί, αλλά βρίσκει ακόμη ευρεία εφαρμογή
- Ιχνηθέτης προσδιοριζόμενης ουσίας (φάρμακο, ορμόνη, βιταμίνη, κλπ) παρασκευάζεται με εισαγωγή ενός ραδιοϊσοτόπου στο μόριο της ουσίας  
 $^3\text{H}$  ,  $^{14}\text{C}$  ,  $^{131}\text{I}$  ,  $^{75}\text{Se}$  ,  $^{125}\text{I}$
- Μόνο ετερογενής τεχνική

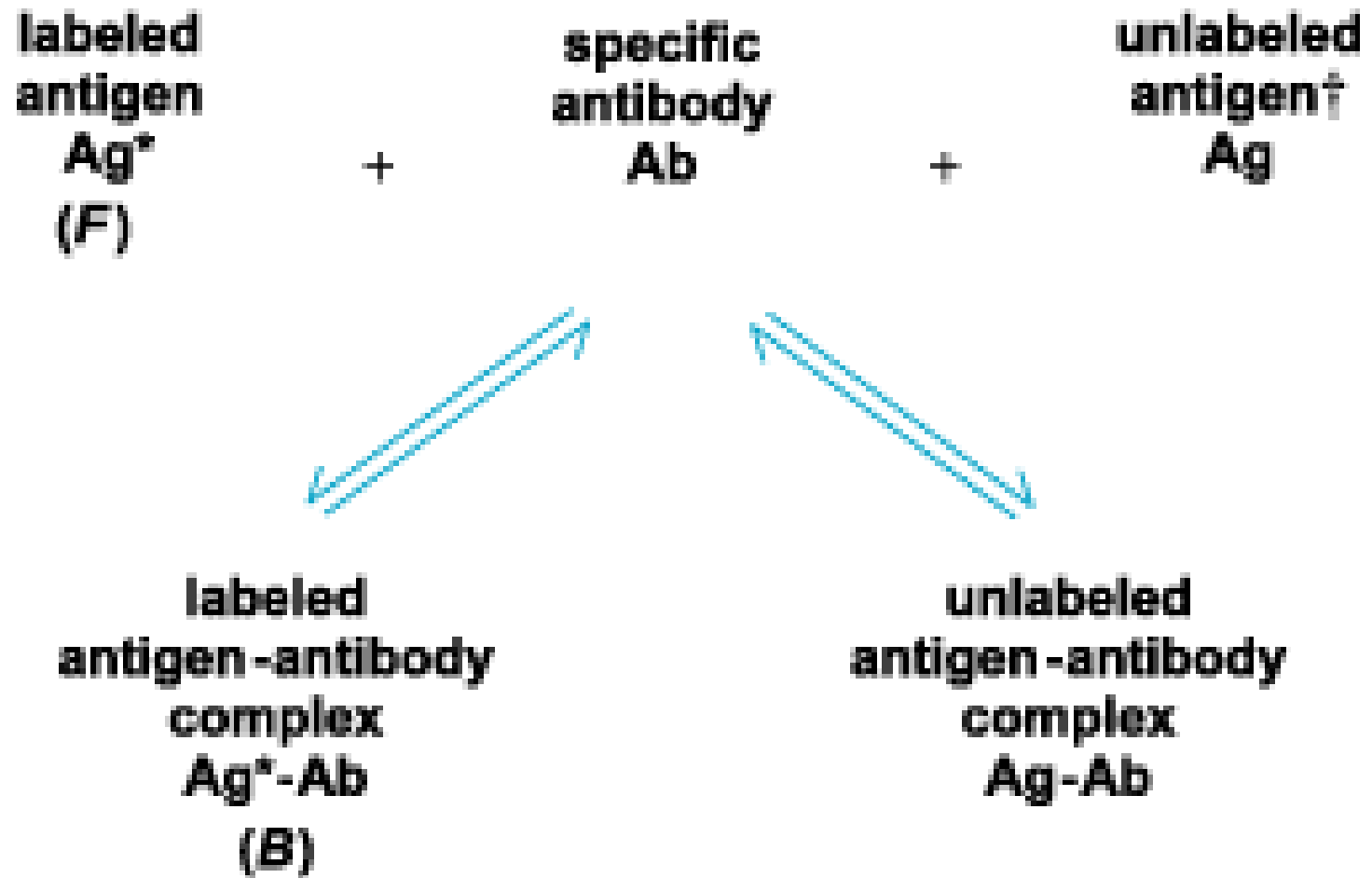
# Ραδιοανοσοπροσδιορισμοί Radioimmunoassays **RIA** (2)

- Μετά την αποκατάσταση ισορροπίας, το συνδεδεμένο επισημασμένο αντιγόνο διαχωρίζεται από το ελεύθερο επισημασμένο αντιγόνο
- Μετρείται η **ραδιενέργεια** σε μια από τις δύο φάσεις με **μετρητή σπινθηρισμού** (scintillation counter)

# Πορεία RIA



# RIA

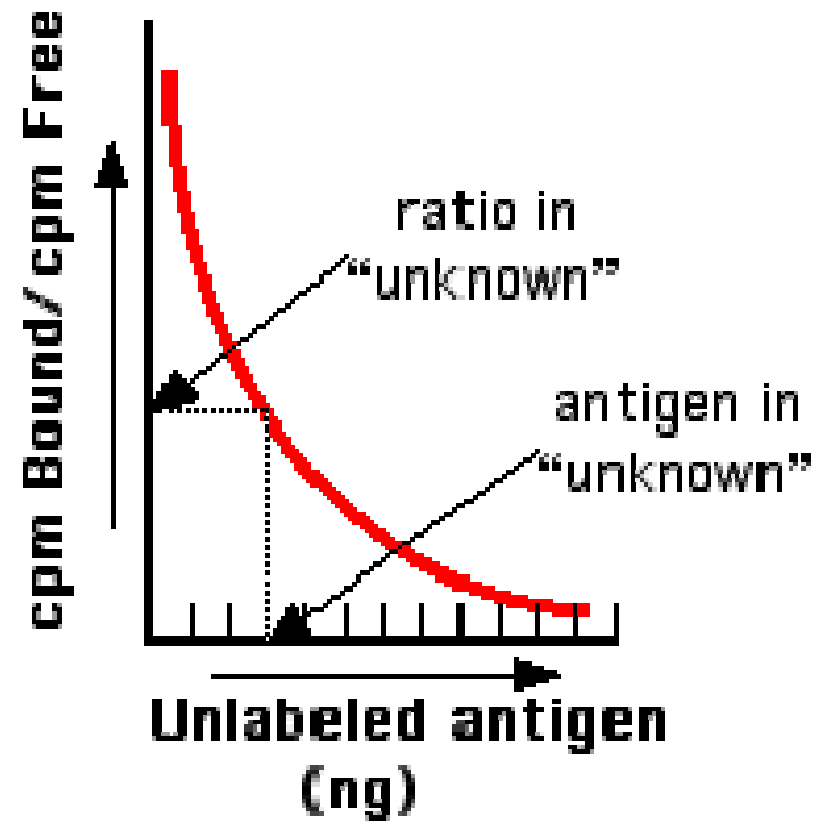
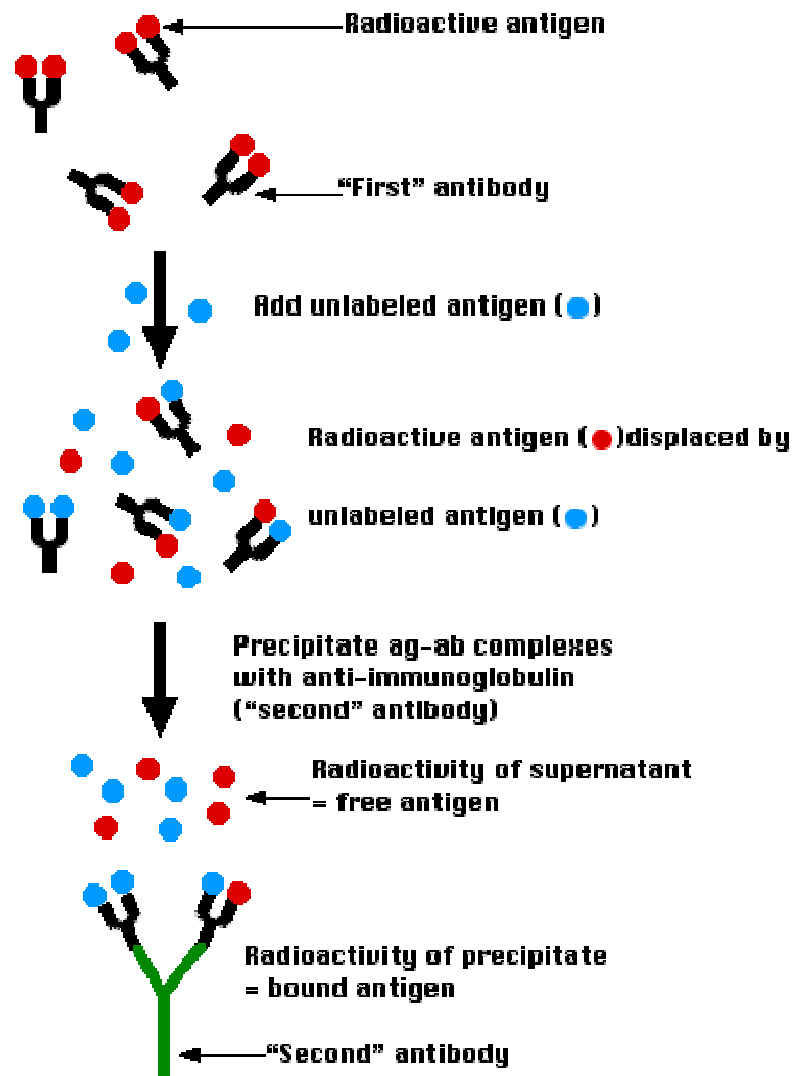




Gamma Counter



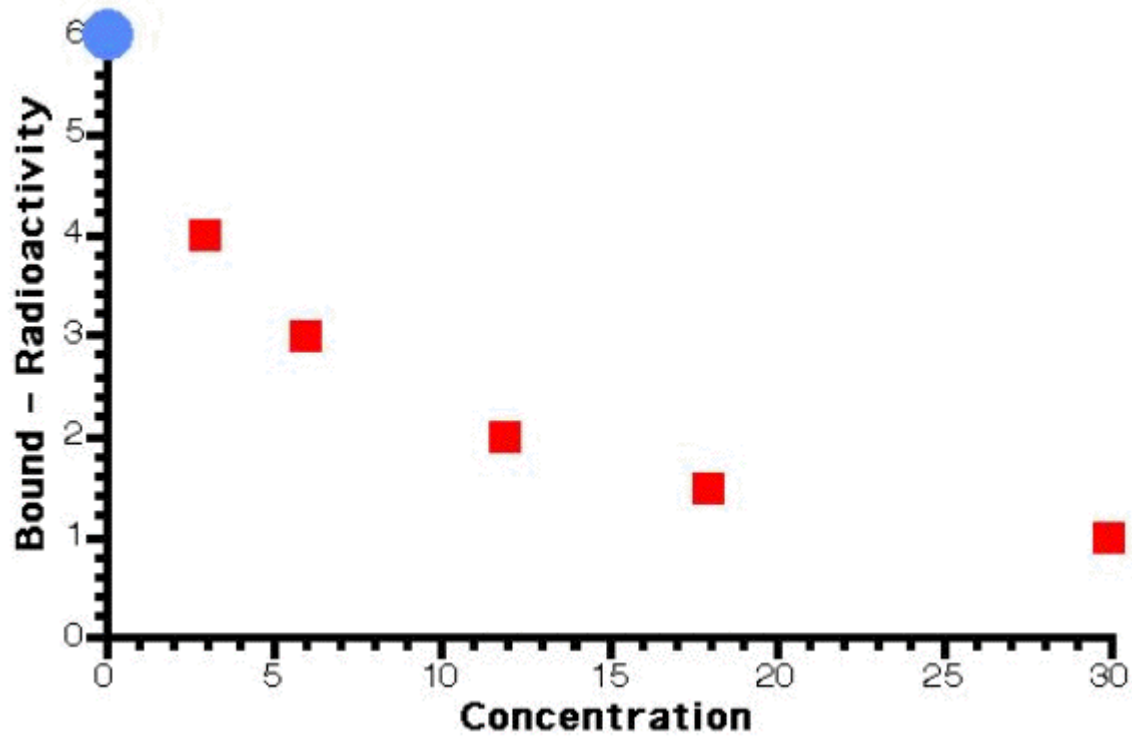
# RIA



# Χαρακτηριστικά RIA

- Μεγάλη ευαισθησία, με όρια ανίχνευσης  $10^{-8}$  –  $10^{-10}$  M
- Μειονεκτήματα:
  - Χειρισμός ραδιενεργών ιχνηθετών είναι επικίνδυνος για την υγεία
  - Παρασκευή, φύλαξη και διάθεση ιχνηθετών διέπεται από αυστηρούς κανονισμούς
  - Απαιτείται ειδικευμένο προσωπικό και ειδικά όργανα
  - Περιορισμένος χρόνος ζωής αντιδραστηρίων
  - Ετερογενής (απαιτείται διαχωρισμός φάσεων)

# RIA-Καμπύλη αναφοράς



# Τυπικά παραδείγματα RIA

- Σημαντικός αριθμός φαρμάκων και αρκετές ορμόνες προσδιορίζονται σε βιολογικά δείγματα με μεγάλη ευαισθησία

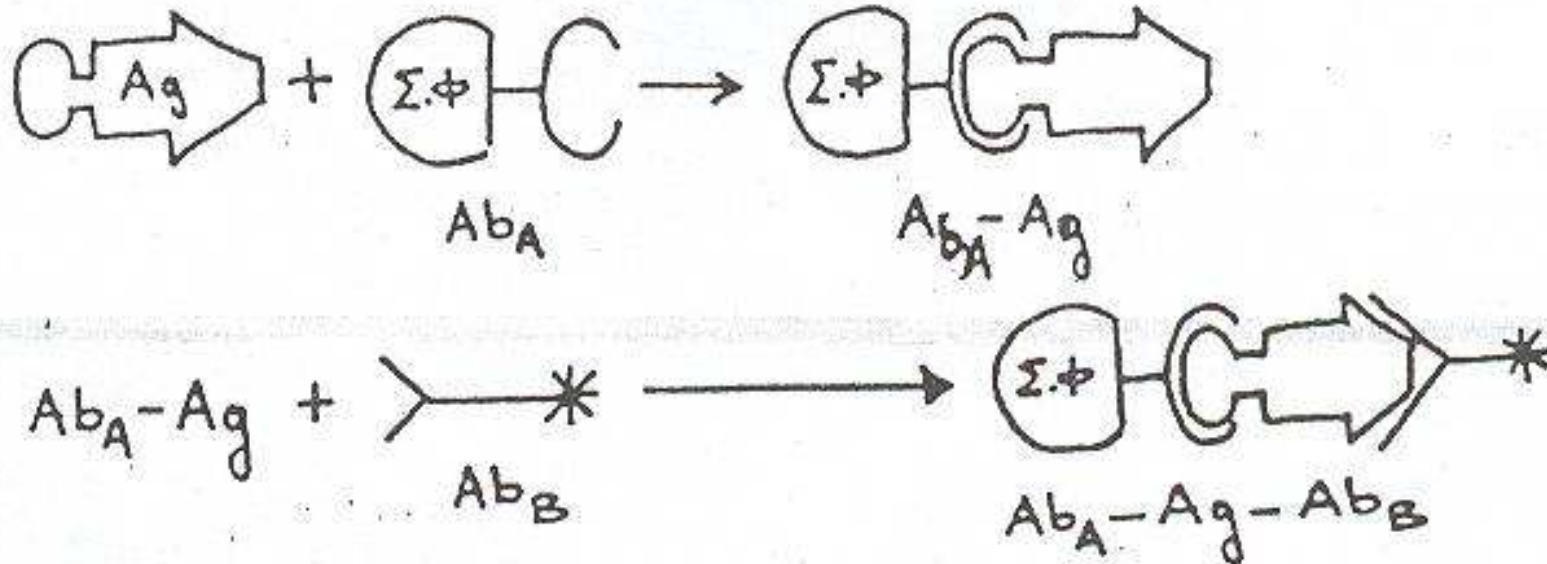
Προσδιοριζόμενη ουσία	Ραδιοεπισημαντής	Παρατηρήσεις
1. Ατροπίνη	$^{14}\text{C}$	Όριο ανιχν. 6 ng/mL, 10 $\mu\text{L}$ ορού
2. Κοκαΐνη	$^{125}\text{I}$	Όριο ανιχν. 2 ng/mL, ούρα
3. Διγοξίνη	$^3\text{H}$ , $^{125}\text{I}$	Όριο ανιχν. 0,3 ng/mL, ορός
4. Μορφίνη	$^3\text{H}$	Όριο ανιχν. 0,1 ng/mL, ορός
5. Νικοτίνη	$^3\text{H}$	
6. Τετραϋδροκαναβινόλη	$^3\text{H}$	
7. Θυροξίνη	$^{125}\text{I}$	

# Ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός ImmunoRadioMetric Assay (IRMA)

- Μη ανταγωνιστική τεχνική δύο θέσεων (μέθοδος **sandwich**)
- Εφαρμόζεται για προσδιορισμό μεγάλων αντιγόνων με δύο τουλάχιστον αντιγονικές θέσεις
- Αντίσωμα A ακινητοποιημένο σε στερεή φάση (σφαιρίδια) συνδέεται με τη μια θέση του αντιγόνου
- Στη συνέχεια προστίθεται αντίσωμα B ραδιοεπισημασμένο, και συνδέεται με τη δεύτερη θέση του αντιγόνου
- Τελικό προϊόν  $Ab_B - Ag - Ab_A$  -στερεή φάση φυγοκεντρείται και μετρείται η ραδιενέργειά του
- Το αντιγόνο μετατρέπεται ποσοτικά στο σύμπλοκο και η ραδιενέργεια ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου

# Αρχή ανοσοραδιομετρικού προσδιορισμού (IRMA) τύπου sandwich

(Σ.Φ: μαγνητικά σφαιρίδια για διαχωρισμό με τη βοήθεια μαγνητικού πεδίου)



# Ενζυμοανοπροσδιορισμοί (Enzyme ImmunoAssays, EIA) (1)

- Ως ιχνηθέτες χρησιμοποιούνται τα προς προσδιορισμό
  - Αντιγόνα
  - Απτένια
  - Αντισώματά τους
- Στα οποία έχει συνδεθεί με **χημικό δεσμό** ένα ένζυμο
- Αναλυτικό σήμα είναι η **ενζυμική ενεργότητα**
  - Συνήθως δεν επηρεάζεται κατά την παρασκευή του ιχνηθέτη
  - Κατά την ανοσοχημική αντίδραση, παρατηρείται, είτε **αναστολή**, είτε **διατήρηση της ενζυμικής ενεργότητας**

# Ενζυμοανοπροσδιορισμοί (Enzyme ImmunoAssays, EIA) (2)

- Είδη EIA
  - Ομογενείς
    - Αναστολή ενζυμικής ενεργότητας κατά την ανοσοχημική αντίδραση
  - Ετερογενείς
    - Διατήρηση ενζυμικής ενεργότητας κατά την ανοσοχημική αντίδραση



# Πλεονεκτήματα ΕΙΑ έναντι ΡΙΑ (1)

- Μη ύπαρξη κινδύνων ραδιενέργειας κατά την παρασκευή, φύλαξη και χρήση ιχνηθετών, και την απόρριψή τους
- Μεγαλύτερος δυνατός χρόνος αποθήκευσης ενζυμοεπισημασμένων ιχνηθετών
  - π.χ. 1 έτος ή περισσότεροέναντι των ραδιοεπισημασμένων
  - ολίγες ημέρες

# Πλεονεκτήματα EIA έναντι RIA (2)

- Δυνατότητα χρησιμοποίησής πολύ απλών και φθηνών οργάνων μετρήσεως αναλυτικού σήματος
  - Η ενζυμική ενεργότητα παρακολουθείται με ένα απλό φωτόμετρο ή φθορισμόμετρο ή **χημειοφωταγείόμετρο**
- Ομογενείς EIA ολοκληρώνονται σε λίγα min και αυτοματοποιούνται εύκολα
- Ετερογενείς EIA ιδανικοί για ποιοτικές δοκιμασίες με το μάτι

# Μειονεκτήματα EIA έναντι RIA

- Τα συστατικά πλάσματος είναι δυνατόν να επηρεάσουν την ενζυμική ενεργότητα
- Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας δυνατόν να είναι περισσότερο πολύπλοκη απ' ό,τι η μέτρηση ραδιενέργειας
- Αντιδράσεις με ενζυμοεπισημασμένους ιχνηθέτες επιδέχονται ολιγότερο έλεγχο
- Ομογενείς EIA (οι πλέον επιθυμητοί), έχουν περιορισμένη ευαισθησία, σε σχέση με RIA και ετερογενείς EIA

# Ένζυμα ως αποτελεσματικοί επισημαντές (labels)

- Πολύ δραστικοί ιχνηθέτες
- Ένα μόριο ενζύμου συνήθως μετατρέπει  $10^3 - 10^4$  μόρια υποστρώματος σε προϊόν ανά min
  - Μερικές φορές και μέχρι  $10^6 - 10^7$  μόρια

# Ιδιότητες ενός ιδανικού ενζύμου – επισημαντή (1)

- Υψηλή ενζυμική ενεργότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος
  - μικρή σταθερά Michaelis  $K_m$σε pH στο οποίο δεν παρεμποδίζεται η σύνδεση αντιγόνου – υποστρώματος
- Σταθερότητα ενζύμου στην τιμή pH, που ευνοεί τη σύνδεση αντιγόνου – αντισώματος (συνήθως ουδέτερο pH), και ενεργό στο pH αυτό, ειδικότερα για ομογενείς ΕΙΑ

# Ιδιότητες ενός ιδανικού ενζύμου – επισημαντή (2)

- Αναλυτική μέθοδος μέτρησης ενζυμικής ενεργότητας φθηνή, ακριβής και ευαίσθητη, και κατά προτίμηση φασματοφωτομετρική
- Παρουσία δραστικών ομάδων, δια μέσου των οποίων να είναι δυνατή η ομοιοπολική σύνδεση με το αντιγόνο, αντίσωμα ή απτένιο, με ελάχιστη απώλεια ενζυμικής ενεργότητας ή ανοσοδραστικότητας

# Ιδιότητες ενός ιδανικού ενζύμου – επισημαντή (3)

- Σταθερότητα ενζυμοεπισημασμένων προϊόντων συνδέσεως (ενζυμικοί ιχνηθέτες) σε συνήθεις συνθήκες φυλάξεως και χρήσεως
- Διαθεσιμότητα διαλυτού ενζύμου υψηλής καθαρότητας σε χαμηλό κόστος
- Απουσία κινδύνων για την υγεία από το ένζυμο, υποστρώματα και συνένζυμα
- Απουσία ενζυμικής ενεργότητας και παραγόντων που επιδρούν σε αυτή, από το αναλυόμενο δείγμα (ιδιαίτερα για τους ομογενείς ΕΙΑ)

# Λοιπές απαιτήσεις ΕΙΑ

- Ανάγκη για ένα απλό φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό ενζυμικής ενεργότητας ιδιαίτερα επιτακτική για ποιοτικές δοκιμασίες και εργαστήρια ρουτίνας
- Ενζυμικές αντιδράσεις να οδηγούν στην παραγωγή προϊόντος με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη μοριακή απορροφητικότητα



# Συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα ένζυμα (1)

- Για ομογενείς ΕΙΑ
  - ακετυλοχολινεστεράση
  - β-γαλακτοσιδάση
  - γλυκοζο-6-φωσφορική δεϋδρογενάση
  - λυσοζύμη
  - μηλειϊκή δεϋδρογενάση

# Συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα ένζυμα (2)

- Για ετερογενείς ΕΙΑ
  - ακετυλοχολινεστεράση
  - αδενοσινο-απταμινάση
  - β-γαλακτοσιδάση
  - αλκαλική φωσφατάση
  - γλυκοζοξειδάση
  - καταλάση
  - ουρεάση
  - υπεροξειδάση

## Συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα ένζυμα (3)

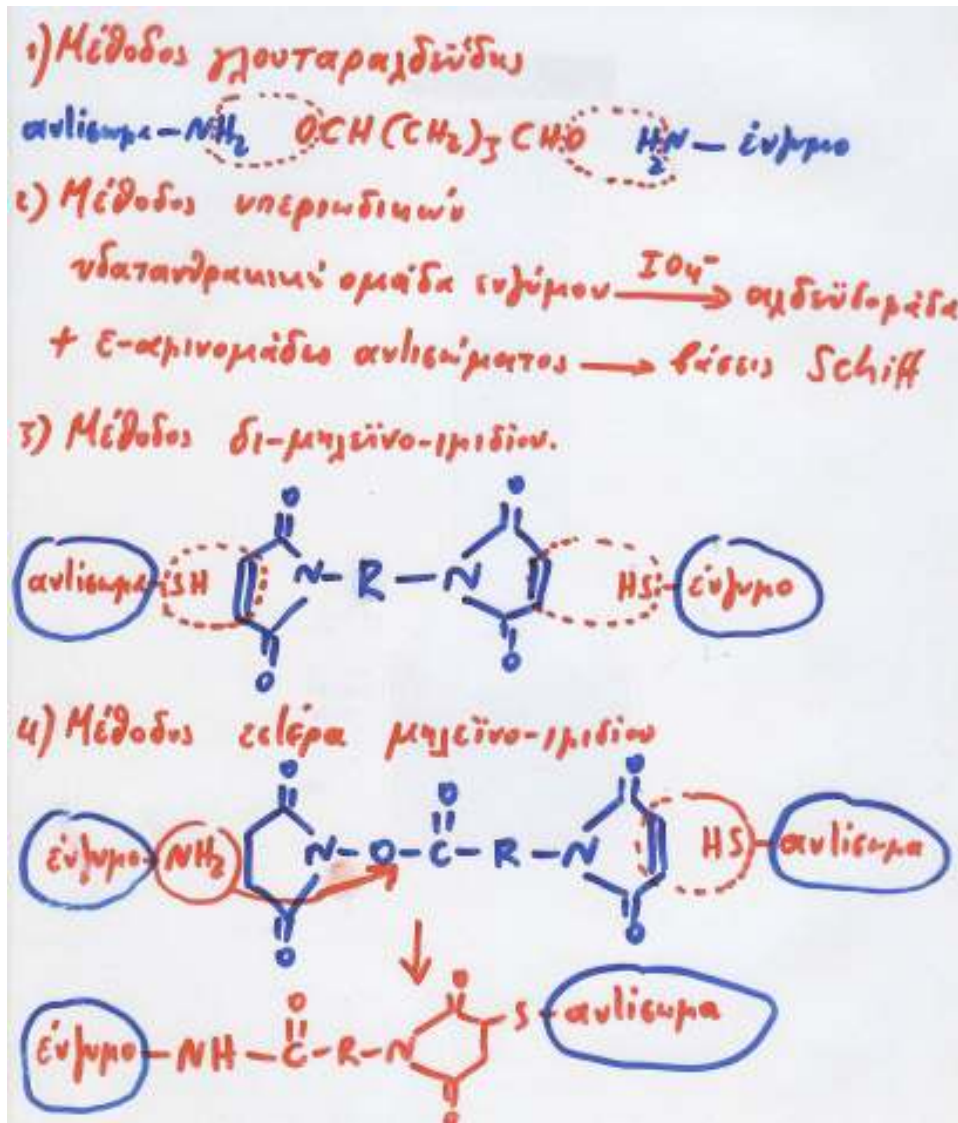
Ένζυμο (Πηγή)	Άριστα pH	Ειδική δραστικ*.	K <sub>m</sub> (mM)	Υπόστρωμα / Μέθοδος μέτρησης
<b>A. Ομογενείς ΕΙΑ</b>				
1. Ακετυλοχαλινεστεράση ( <i>Electrophorus electricus</i> )	7-8	1400	0,090	Ακετυλοχαλίνη / Ηλεκτρόδιο νάλου ή φασματοφωμετρικ.
2. β-Γαλακτοσιδάση ( <i>Escherichia Coli</i> )	6-8	600	1	β-D-Γαλακτοσίδης / Φωτο- μετρικά ή φθορισμομετρικά.
3. Γλυκοζο-6-φωσφορική δευδρογενάση ( <i>Leucosporus mesenteroides</i> )	7-8	400	0,1	Φωσφορική-6-γλυκόζη+NADP+ φασμ.-UV ή φθορισμομετρ. προσδιάρ. NADPH.
4. Άνισοζύμη ( <i>Άσκόμυα αυγών</i> )	4,5-5,5	-	-	Βλεννοπολυσακχαρίτης φασματοφωμετρία UV.
5. Μηλική δευδρογενάση (καρδιά χαίρου)	8,5-9,5	1000	0,3	Οξαλοξικό οξύ + NADH φασματοφωμετρία UV.
<b>B. Ήτερογενείς ΕΙΑ</b>				
1. Ακετυλοχαλινεστεράση			(όπως ανωτέρω A.1)	
2. Αδενσίνιο-απαμινάση (έντερο μόσχου)	7,5-9	200	0,060	Αδενσίνη / Εκλεκτικό ηλε- κτρόδιο αερίου αμμωνίας.
3. Αλκαλική φωσφατάση (έντερο μόσχου)	8-10	1000	0,2	Φωσφορική p-νιτροφαινόλη φασματοφωμετρία ορατού ή φθορισμομετρία.
4. β-Γαλακτοσιδάση		(όπως ανωτέρω A.2)		
5. Γλυκοζοξειδάση ( <i>Aspergillus niger</i> )	4-7	200	33	Γλυκόζη / Το παραγόμενο H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> αντιδρά με χρωμο- γόνο / φασματοφωτ. ορατού.
6. Καταλάση (ήπαρ μόσχου)	6-8	40000	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> φασματοφωμετρία UV ή θερμομετρία
7. Ουρεάση (όσπρια)	6,5-7,5	10000	10	Ουρία / Η παραγόμενη NH <sub>3</sub> εντιδρά με χρωμογ. (φασμ.) ή με ηλεκτρόδια αμμωνίας.
8. Υπεραξειδάση (ρεπένια)	5-7	4500	-	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + χρωμογόνο φασματοφωμετρία ορατού.

\* μονάδες ανά mg στους 37° C.

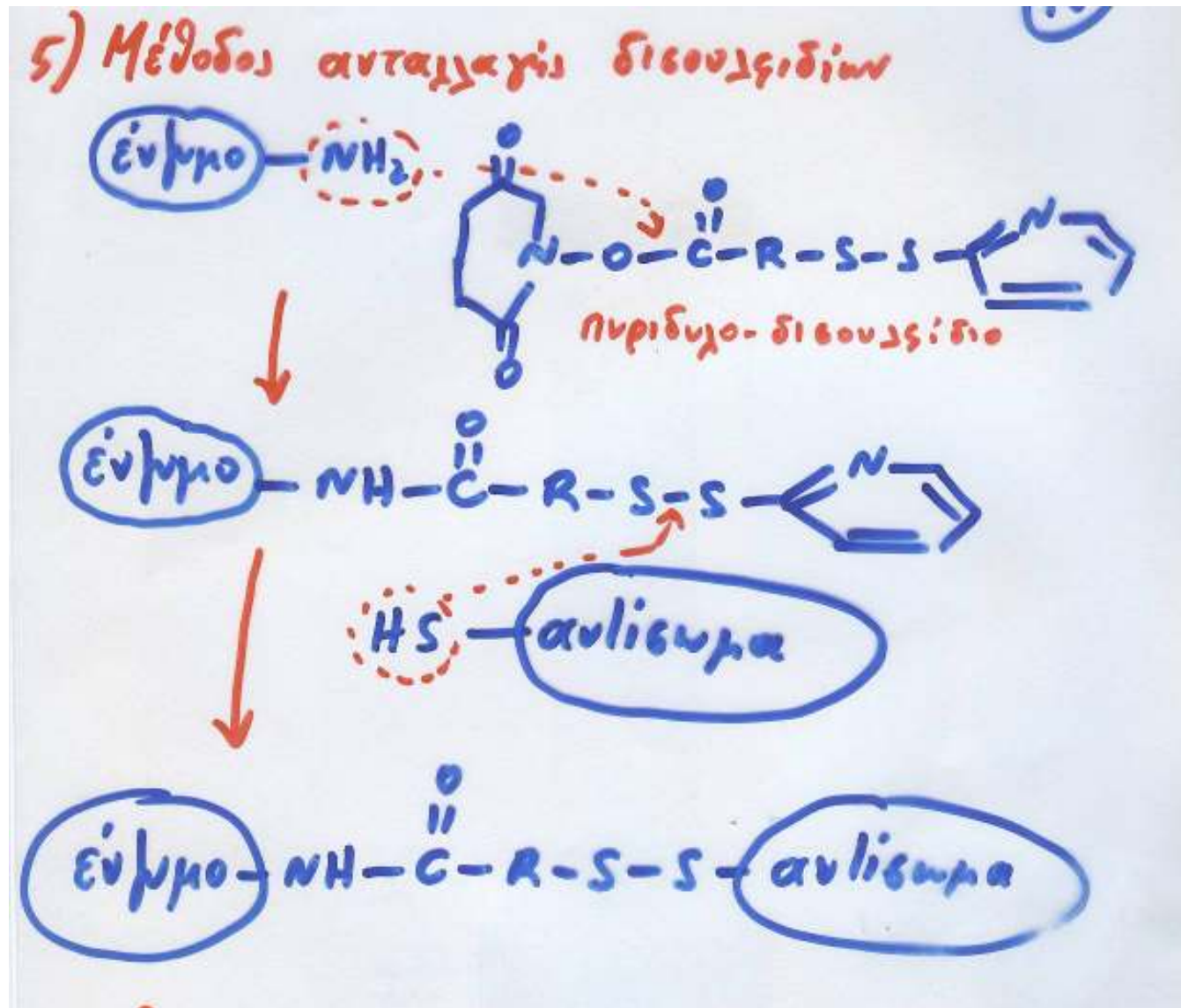
# Σύνδεση ενζύμων με αντισώματα (πρωτεΐνες) ή απτένια

- Χρησιμοποιούνται διάφορες αντιδράσεις συνδέσεως μέσω δραστικών τους ομάδων – καρβοξυλίων, αμινο-, θειολο-, και φαινολο-ομάδων
- Μετά την αντίδραση συνδέσεως ακολουθεί στάδιο απομάκρυνσης ελεύθερων μορίων των πρωτεϊνών και των αντιδραστηρίων με τη βοήθεια **χρωματογραφίας συγγενείας ή μοριακών κοσκίνων**

# Αντιδράσεις συνδέσεως ενζύμων με αντισώματα (πρωτεΐνες) (A)



Αντιδράσεις συνδέσεως ενζύμων με αντισώματα (πρωτεΐνες) (B)



# Τεχνικές ΕΙΑ

- Ανταγωνιστικές
  - Ανταγωνισμός μεταξύ ιχνηθέτη και προσδιοριζόμενου στην αντιγονική αντίδραση
- Κορεσμού (ανοσομετρικές)
  - Το προσδιοριζόμενο μετατρέπεται ποσοτικά σε μετρούμενο προϊόν

# Ομογενείς EIA

## Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT) (1)

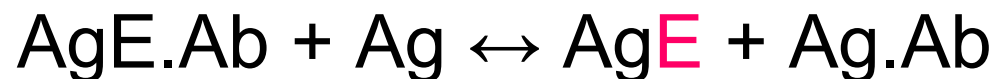
- Περισσότερο χρησιμοποιούμενη τεχνική ομογενούς EIA
- Εμπορική αξιοποίηση από εταιρεία Syva, κυρίως για προσδιορισμό φαρμάκων σε ορό
- Το προσδιοριζόμενο αντιγόνο (απτένιο) Ag συνδέεται με ένα ένζυμο E και σχηματίζει τον ιχνηθέτη AgE, χωρίς σημαντική αλλοίωση της ενεργότητας του E προς το υπόστρωμα S
- Όταν ο ιχνηθέτης AgE ενωθεί με το αντίσωμα Ab σχηματίζεται το ανενεργό σύμπλοκο AgE.Ab, στο οποίο η ενζυμική ενεργότητα ελαττώνεται
  - Το αντίσωμα παρεμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος με το ενεργό κέντρο του ενζύμου



# Ομογενείς ΕΙΑ

## Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT) (2)

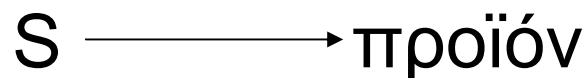
- Εάν υπάρχει ελεύθερο αντιγόνο Ag (φάρμακο) στο δείγμα, αυτό αντικαθιστά ανταγωνιστικά τον ιχνηθέτη AgE στο ανενεργό σύμπλοκο AgE.Ab



(ανενεργό)

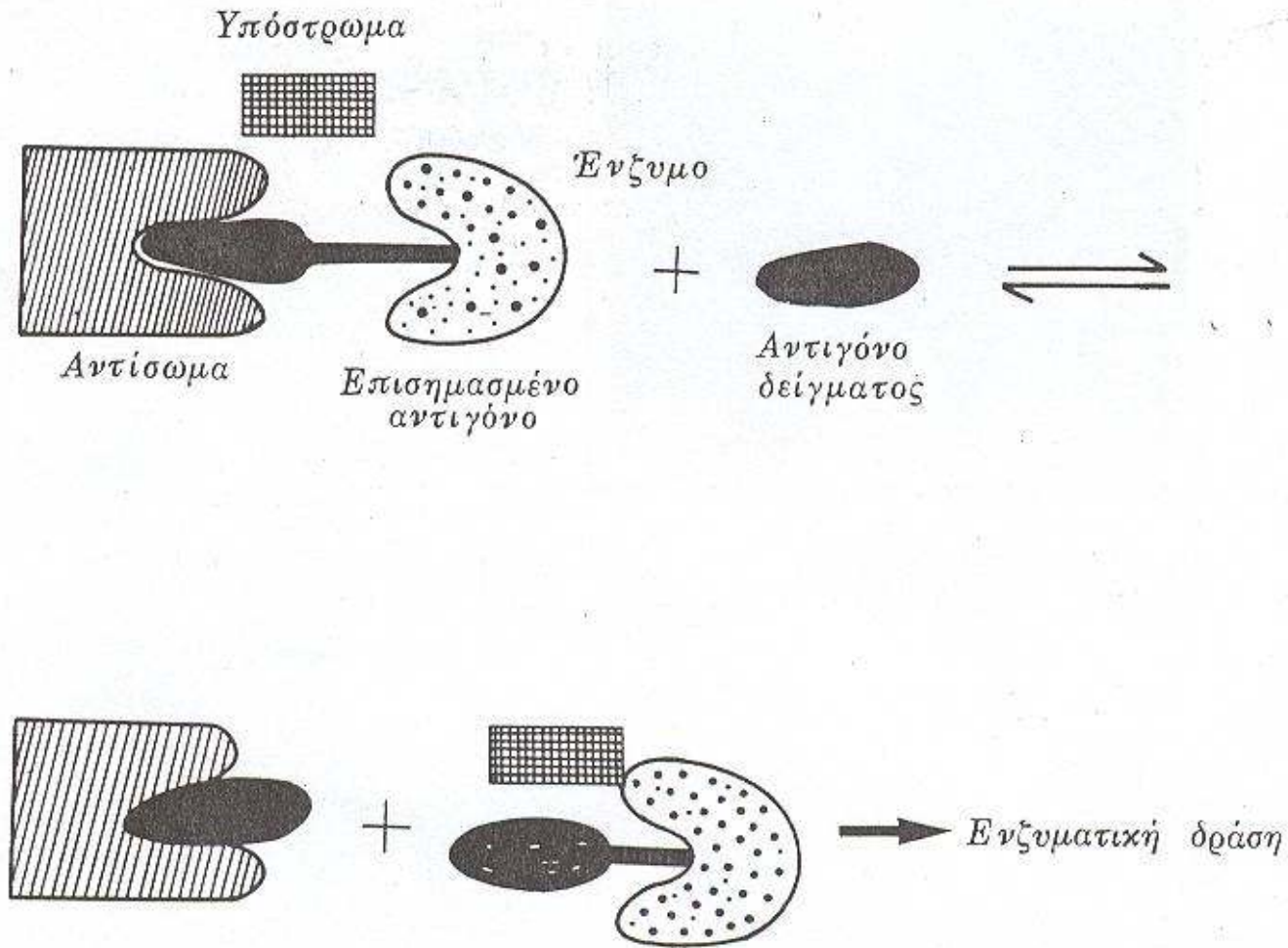
(ενεργό)

- Τελικά πραγματοποιείται η αντίδραση



- Η ενεργότητα του ενζύμου ανάλογη της συκεντρώσεως αντιγόνου στο δείγμα

# Αρχή μεθόδου ομογενούς ενζυμοανασοπροσδιορισμού (EMIT)



# Χαρακτηριστικά παραδείγματα ενζυμικών συστημάτων EMIT (1)

- Λυσοζύμη

- Υπόστρωμα φυσικό πολυσακχαρίτη βακτηρίου και μέτρηση της θολερότητας εναιωρήματος βακτηρίου
- Η σύνδεση ιχνηθέτη με το αντίσωμα αναστέλλει μέχρι 98% την ενζυμική ενεργότητα
- Χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό φαρμάκων εξάρτησης (π.χ. αμφεταμίνη)

## Χαρακτηριστικά παραδείγματα ενζυμικών συστημάτων EMIT (2)

- Ένζυμα **γλυκοζο-6-φωσφορική δεϋδρογενάση** και **μηλειϊκή δεϋδρογενάση**
  - Η ενζυμική ενεργότητα μειώνεται μέχρι 80% κατά τη σύνδεση των ιχνηθετών με τα αντισώματα των απτενίων
  - Χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό θεραπευτικών επιπέδων φαρμάκων και ναρκωτικών (π.χ. φαινυτοΐνης, μορφίνης)

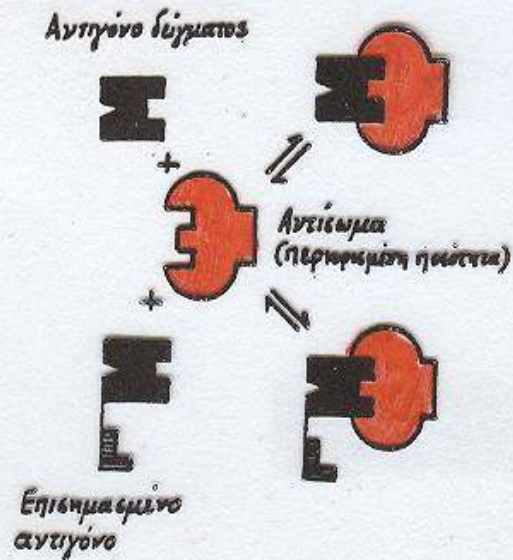
# Κύριο πλεονέκτημα ΕΙΑ

- Εύκολη αυτοματοποίηση
  - Συνεπάγεται γρήγορη λήψη αποτελεσμάτων
- Τα συσκευασμένα αντιδραστήρια (kit) μπορούν να χρησιμοποιηθούν με
  - Φυγοκεντρικούς αναλυτές
  - Συστήματα συνεχούς ροής
  - Αυτοματοποιημένα συστήματα κινητικών αναλύσεων

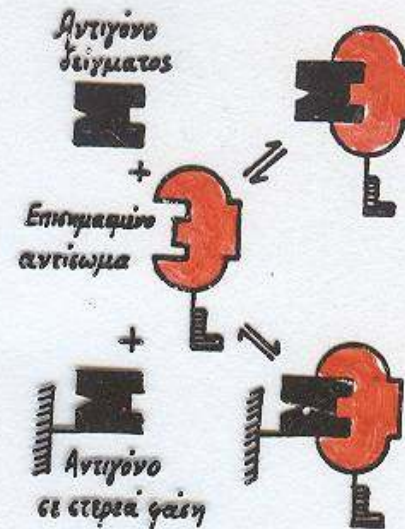
## Ετερογενείς EIA

### Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

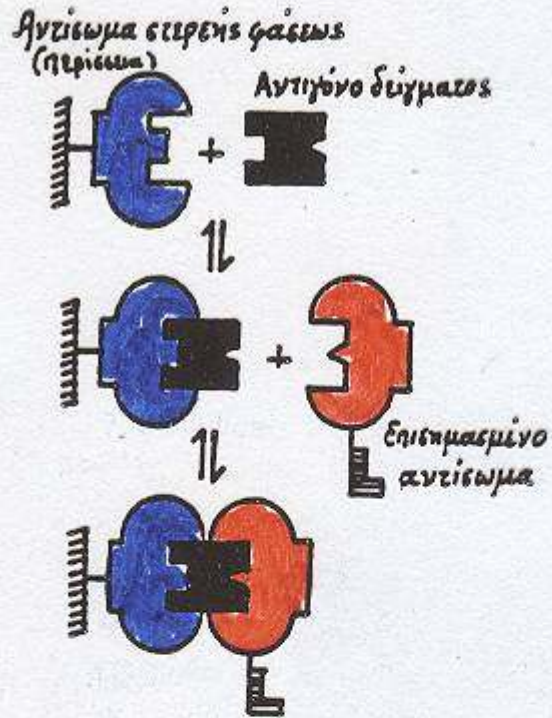
- Κυριότερος εκπρόσωπος η τεχνική ELISA σε διάφορες παραλλαγές
- Η ενεργότητα του ενζυμικού ιχνηθέτη διατηρείται και μετά τη σύνδεση ιχνηθέτη με αντίσωμα (ετερογενής προσδιορισμός, διαφορά από τεχνική EMIT)
- Βασικό χαρακτηριστικό η χρήση της προσρόφησης (sorption) σε τοιχώματα πλαστικών σωλήνων και σφαιριδίων κατά το διαχωρισμό των φάσεων
- Εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό αντιγόνων (απτενίων) και αντισωμάτων



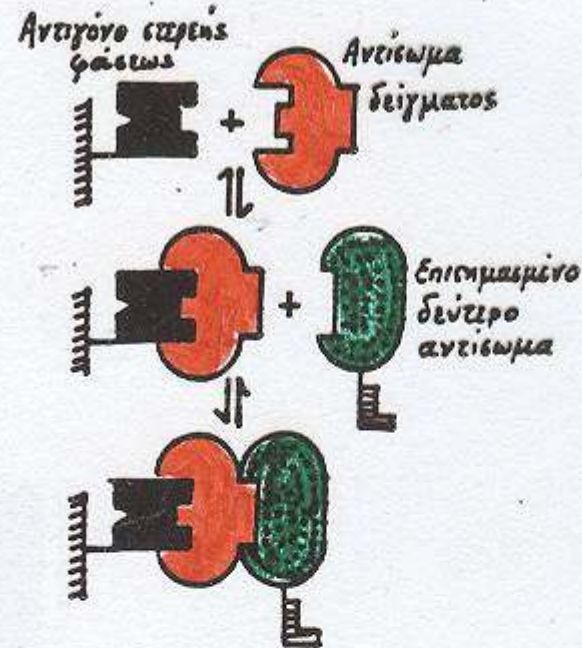
Σχήμα 5-10. Κλασικός συναγωνιστικός ετερογενής EIA για αντιγόνα. Όλα τα συστατικά αναμειγνύονται με περιορισμένη ποσότητα αντισώματος (ακίνητοποιημένου σε στερεά φάση (πχ. τοιχώματα σωλήνων, σφαιρίδια). Μετά το διαχωρισμό, μετρείται η ενζυμική δράση του συνδεδεμένου ιχνηθέτη με την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος, που είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου.



Σχήμα 5-11. Συναγωνιστικός (ανοσομετρικός) ELISA για αντιγόνα. Το ένζυμοεπισημασμένο αντίσωμα αντιδρά με το αντιγόνο του δείγματος και ακολούθως προστίθεται σε περίσσεια ακίνητοποιημένου αντιγόνου. Μετά από έκπλυση μετρείται η ενζυμική δράση του συνδεδεμένου ιχνηθέτη που είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου. Η τεχνική ομοιάζει με την τεχνική IRMA.



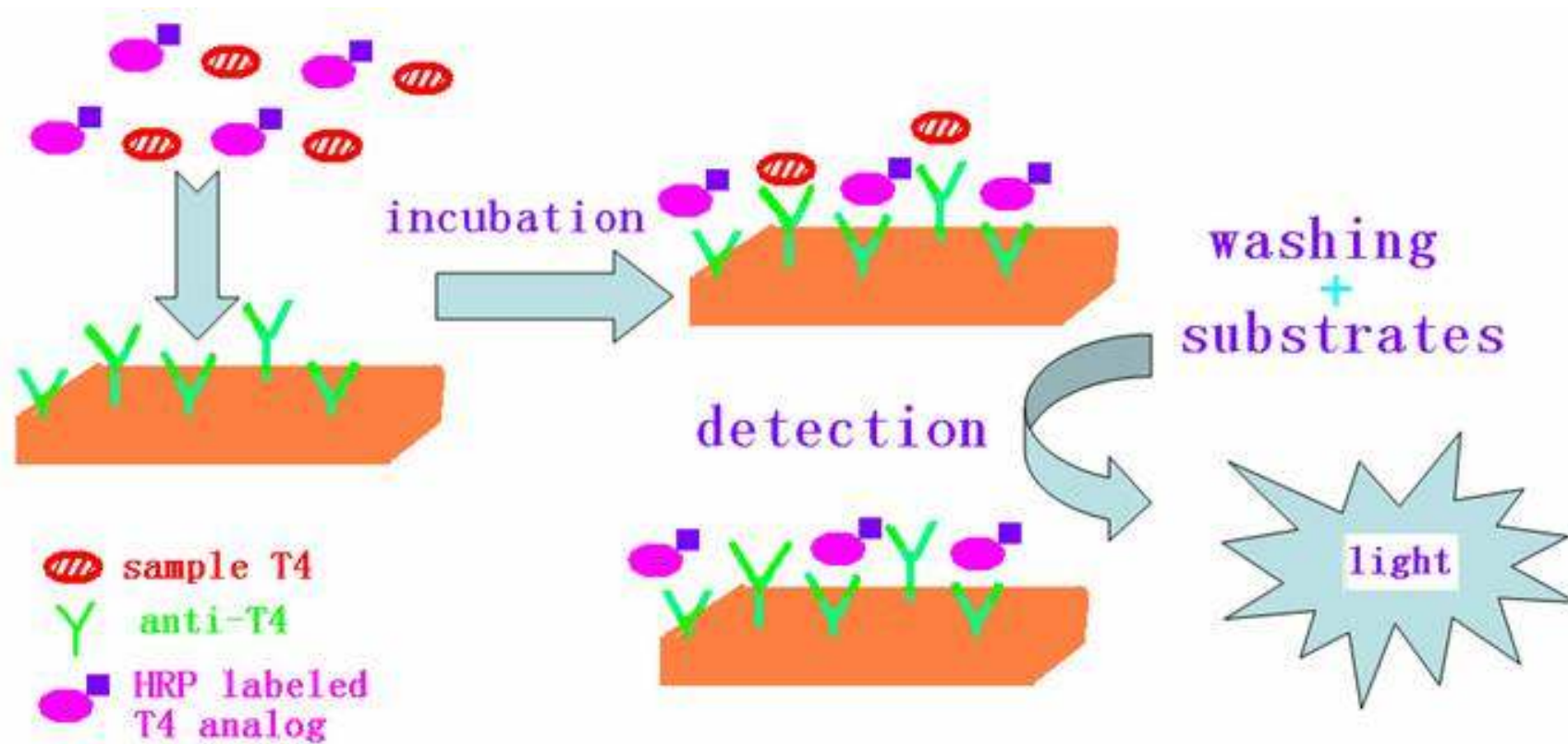
Σχήμα 5-12. Μη συναγωνιστικός ΕΙΑ τύπου sandwich για αντιγόνα. Το αντιγόνο του δείγματος εναμειγνύεται με περίσσεια αντισώματος στερεάς φάσεως. Μετά την έκπτυξη της στερεάς φάσεως, προστίθεται ενζυμοεπισημασμένο δεύτερο αντίσωμα ειδικό για άλλη θέση του αντιγόνου. Μετά την έκπτυξη της στερεάς φάσεως μετρείται η ενζυμική δράση του δεσμευμένου ιχνηθέτη που είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου του δείγματος.



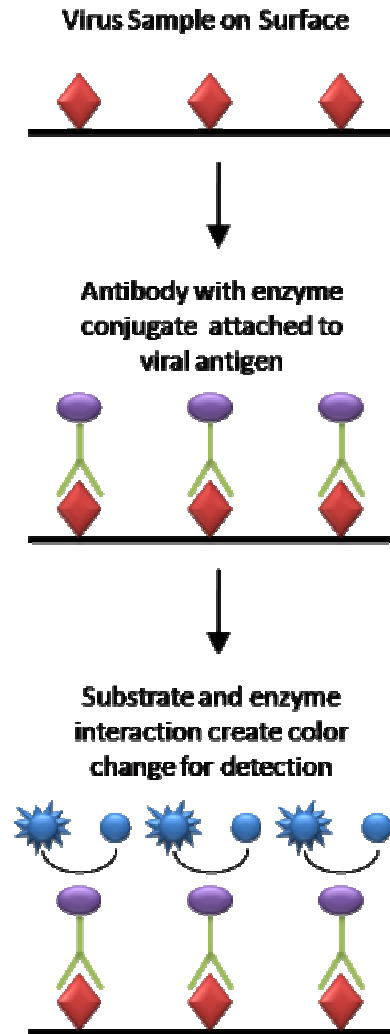
Σχήμα 5-13. Μη συναγωνιστικός ΕΙΑ τύπου sandwich για αντισώματα. Το αντίσωμα του δείγματος εναμειγνύεται με περίσσεια αντιγόνου ακινητοποιημένου σε στερεά φάση. Μετά την έκπτυξη της στερεάς φάσεως, προστίθεται ενζυμοεπισημασμένο δεύτερο αντίσωμα ειδικό για το πρώτο αντίσωμα. Μετά την έκπτυξη της στερεάς φάσεως μετρείται η ενζυμική δράση του δεσμευμένου ιχνηθέτη που είναι ανάλογη της ποσότητας του αντισώματος του δείγματος.



# Αρχή Χημειοφωταυγειο-ενζυμο ανοσοπροσδιορισμού (ELISA) για T4 Χρήση ενζύμου υπεροξειδάσης (HRP)



# Προσδιορισμός Ιών με ELISA



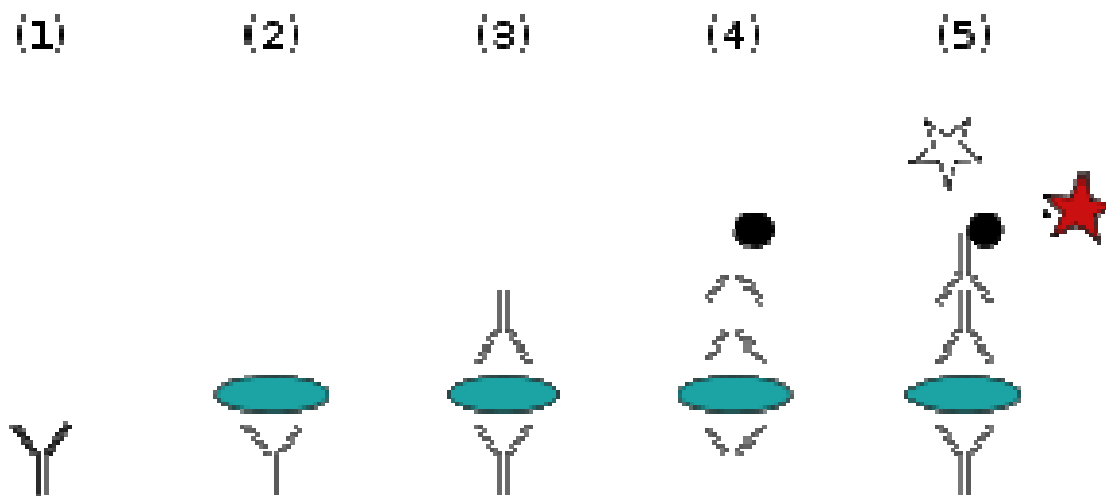
- Ιοί προσροφημένοι σε επιφάνεια συνδέονται ανταγωνιστικά (με τους ιούς του δείγματος) με ενζυμοεπισημασμένο αντίσωμα
- Προσθήκη υποστρώματος παρέχει χρωματική αλλαγή προς ανίχνευση

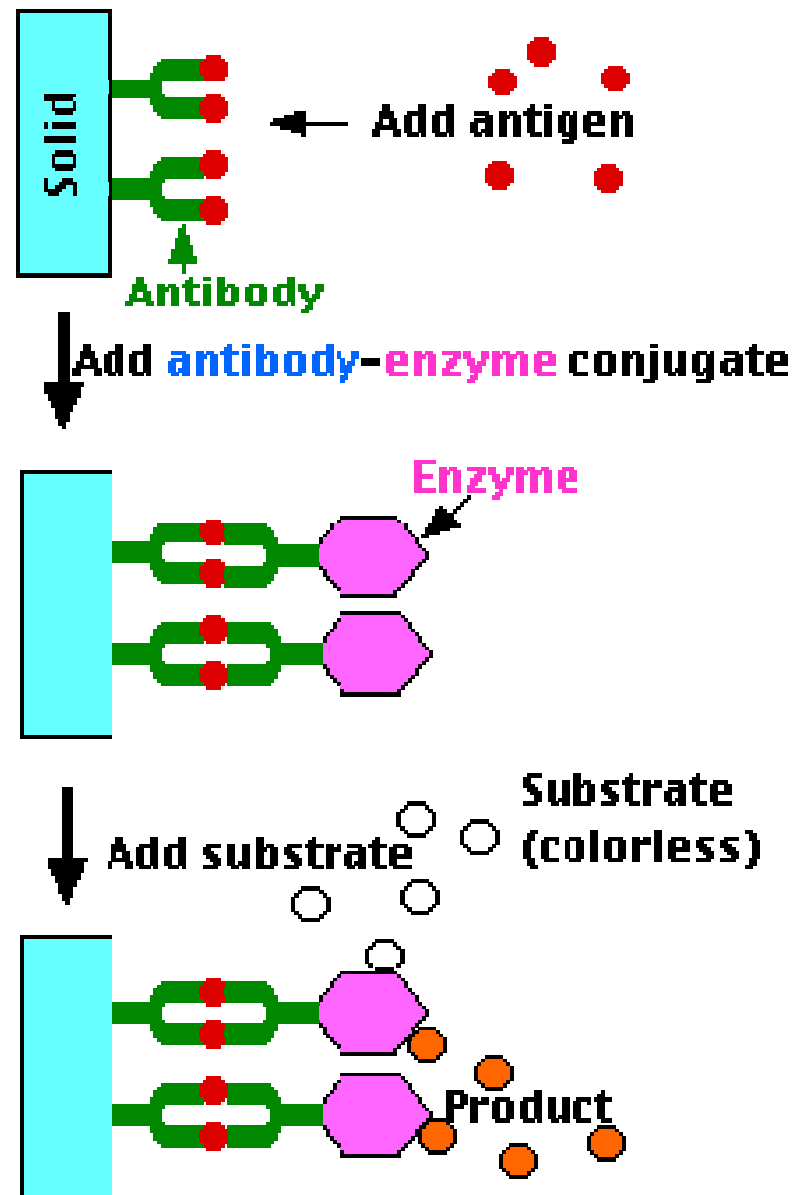
## Τυπικές εφαρμογές ΕΙΑ προσδιορισμού φαρμάκων

Ουσία	Ένζυμο – επισημανση	Υπόστρωμα	Μέτρηση
1. Αμφεταμίνη	Λυσοζύμη	Βλενοπολυσακ- χαρίτης	UV
2. Φαινυτοΐνη	G-6-P- δεϋδρογενάση	G-6-P, NAD <sup>+</sup>	UV
3. Διγοξίνη	Υπεροξειδάση	Χρωμογόνο + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Vis
4. Μορφίνη	Μηλειϊκή δεϋδρογενάση	Οξαλοξεικό οξύ + NADH	UV

## Αρχή ανοσομετρικού ELISA τύπου sandwich

Το προς προσδιορισμό αντιγόνο (κυανή σφαίρα) συνδέεται με το προσροφημένο αντίσωμα A (στάδιο 2). Προστίθεται αντίσωμα B (στάδιο 3), οπότε δημιουργείται sandwich. Στη συνέχεια προστίθεται επισημασμένο αντίσωμα B (στάδιο 4) και με προσθήκη υποστρώματος (στάδιο 5) παράγεται χρώμα προς ανίχνευση







# Φθορισμοανοδοπροσδιορισμοί Fluorescence ImmunoAssays, FIA

(1)

- Τεχνική με αρκετές παραλλαγές
- Χρησιμοποιούνται ως επισημαντές στο προσδιοριζόμενο αντιγόνο, και σε ορισμένες περιπτώσεις και στο αντίσωμα, φθορίζουσες ουσίες, που η εκπομπή φθορισμού τους επηρεάζεται από τη σύνδεση αντιγόνου – αντισώματος
- Επισημαντές στους FIA:
  - Φλουορεσκεΐνη
  - Τετραμεθυλοροδαμίνη
  - Ουμπελιφερόνη
  - Ισολουμινόλη
  - Παράγωγα νικοτιναμιδίου

# Φθορισμοανοδοπροσδιορισμοί Fluorescence ImmunoAssays, FIA (2)

- Ομογενείς FIA
  - Η εκπομπή φθορισμού αναστέλλεται σε σημαντικό ποσοστό από την αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος
- Ετερογενείς FIA
  - Το αναλυτικό σήμα δεν επηρεάζεται από τη σύνδεση αντιγόνου – αντισώματος
  - Μέθοδοι διαχωρισμού φάσεων όπως RIA



Μηχανισμοί φθορισμού επηρεαζόμενοι από ανοσοχημική αντίδραση με αναλυτικές εφαρμογές

- Μεταφορά διέγερσης (ενέργειας φθορισμού),  
Fluorescence Excitation Transfer Immunoassays  
(FETI)
- Πόλωση ακτινοβολίας φθορισμού, Fluorescence  
Polarization ImmunoAssay (FPIA)
- Παραγωγή φθορισμού με ενζυματική δράση,  
Enzyme Fluorescence ImmunoAssay (EPIA)
- Ενίσχυση ή απόσβεση φθορισμού

## Τεχνικές FIA

### Fluorescence Energy Transfer Immunoassay (FETI) (1)

- Χρησιμοποιούνται δύο επισημαντές
  - Το επισημασμένο αντιγόνο παρασκευάζεται με σύνδεση του μορίου προσδιοριζόμενης ουσίας με μια φθορίζουσα ουσία – δότη φθορισμού (π.χ. φλουορεσκεΐνη)
  - Το αντίσωμα της προσδιοριζόμενης ουσίας επισημαίνεται με μια δεύτερη ουσία – δέκτη φθορισμού (π.χ. ροδαμίνη)
  - Το φάσμα εκπομπής φθορισμού φλουορεσκεΐνης συμπίπτει με φάσμα απορρόφησης (διέγερσης) της ροδαμίνης

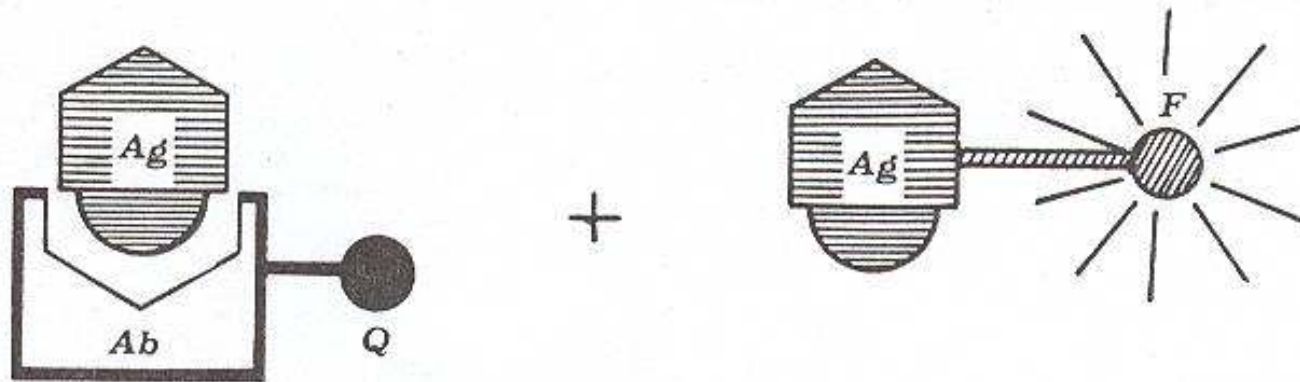
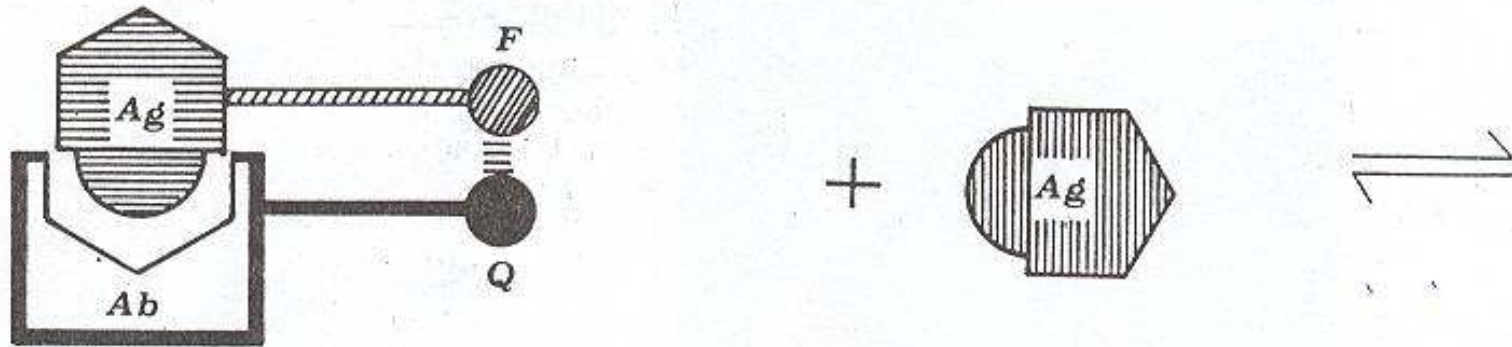
## Τεχνικές FIA

### Fluorescence Energy Transfer Immunoassay (FETI) (2)

- Κατά την αντίδραση συνδέσεως αντιγόνου – αντισώματος, τα δύο επισημασμένα μόρια θα βρεθούν πολύ κοντά
  - Μεταφορά ενέργειας φθορισμού από το δότη στο δέκτη (απόσβεση φθορισμού)
- Εάν στο μείγμα προστεθεί το δείγμα που περιέχει το προσδιοριζόμενο, λόγω ανταγωνισμού, θα ελευθερωθεί ανάλογη ποσότητα επισημασμένου αντιγόνου
  - Το ελεύθερο επισημασμένο αντιγόνο φθορίζει

# Αρχή FETI

F: φθορίζουσα ουσία (δότης), Q:  
φθορίζουσα ουσία (δέκτης, αποσβέστης)



## Τεχνικές FIA

### Fluorescence Energy Transfer Immunoassay (FETI) (3)

- Η μετρούμενη ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας
- Απουσία αναλύτη, ο φθορισμός της φλουορεσκείνης είναι ελάχιστος
  - Η τεχνική FETI είναι ομογενής
- Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό φαρμάκων και ορμονών σε ορό
- Αυτοματοποιήθηκε από εταιρεία Syva, με το όργανο Advance

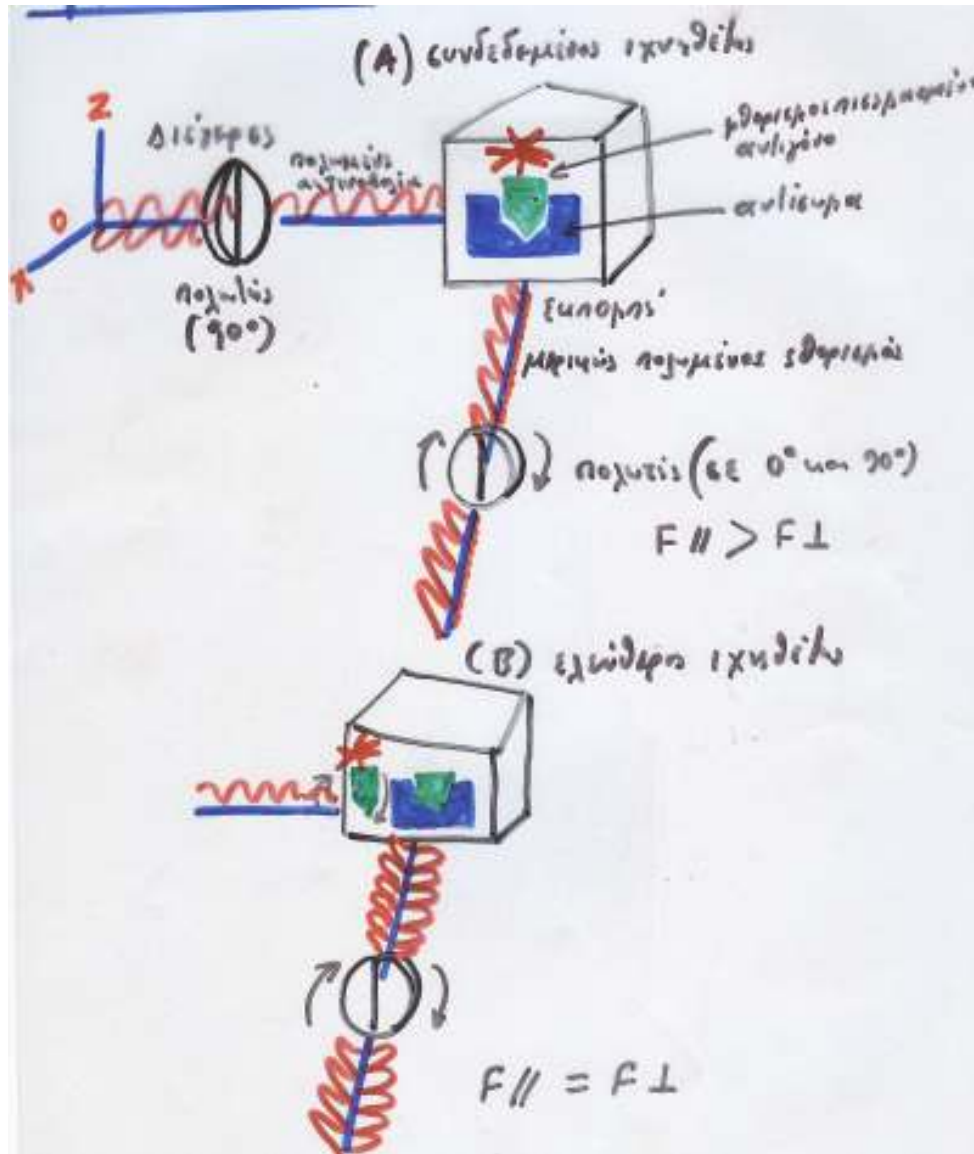
# Τεχνική FPIA (1)

- Ανταγωνιστική και ομογενής
- Ιχνηθέτης: αντιγόνο επισημασμένο με φθορίζουσα ουσία (φλουορεσκεΐνη)
- Σύμπλοκο ιχνηθέτη – αντισώματος μεγάλου μεγέθους
  - Μικρή ταχύτητα περιστροφής
- Ελεύθερος ιχνηθέτης μικρού μεγέθους
  - Μεγάλη ταχύτητα περιστροφής

# Τεχνική FRIA (2)

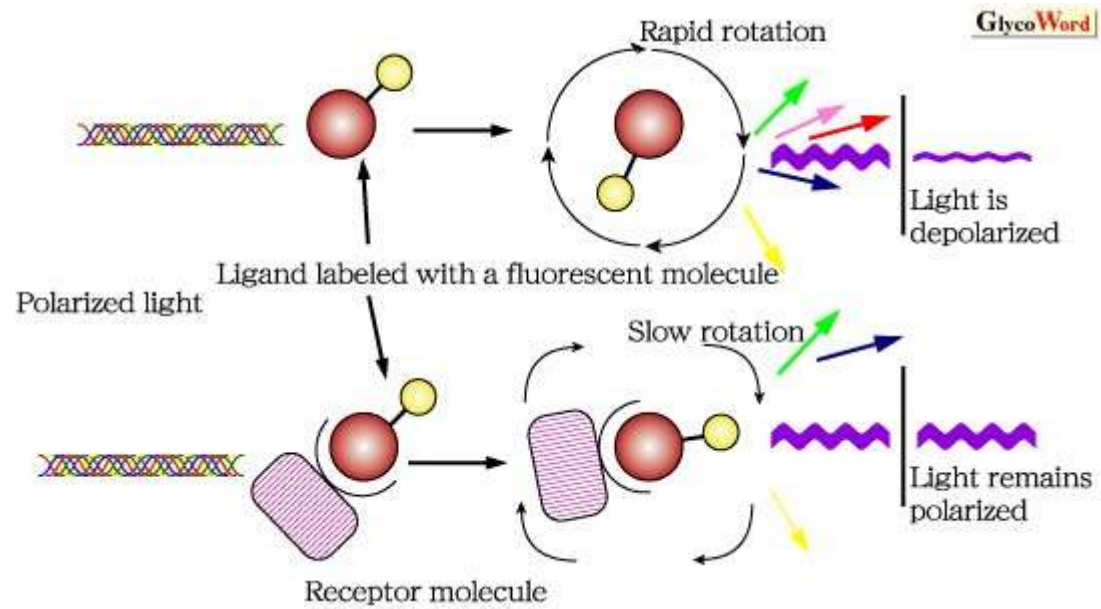
- Διέγερση μείγματος με πολωμένη ακτινοβολία σε ένα ειδικό φθορισμόμετρο με
  - Ο δεσμευμένος ιχνηθέτης εκπέμπει ακτινοβολία φθορισμού πολωμένη (λόγω ακαμψίας)
  - Ο ελεύθερος ιχνηθέτης εκπέμπει μη πολωμένη ακτινοβολία φθορισμού (λόγω περιστροφής)
- Ένταση πολωμένου φθορισμού αντιστρόφως ανάλογη συγκέντρωσης απτενίου
- Εμπορική διάθεση από εταιρεία Abbot (αναλυτής TDx) για προσδιορισμό φαρμάκων σε βιολογικά υγρά.

# Αρχή FPIA

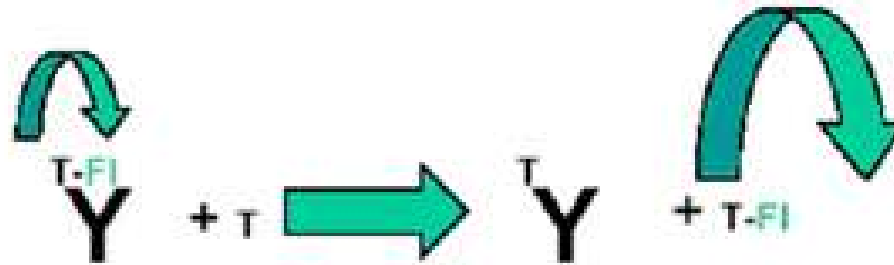




# Αρχή FPIA

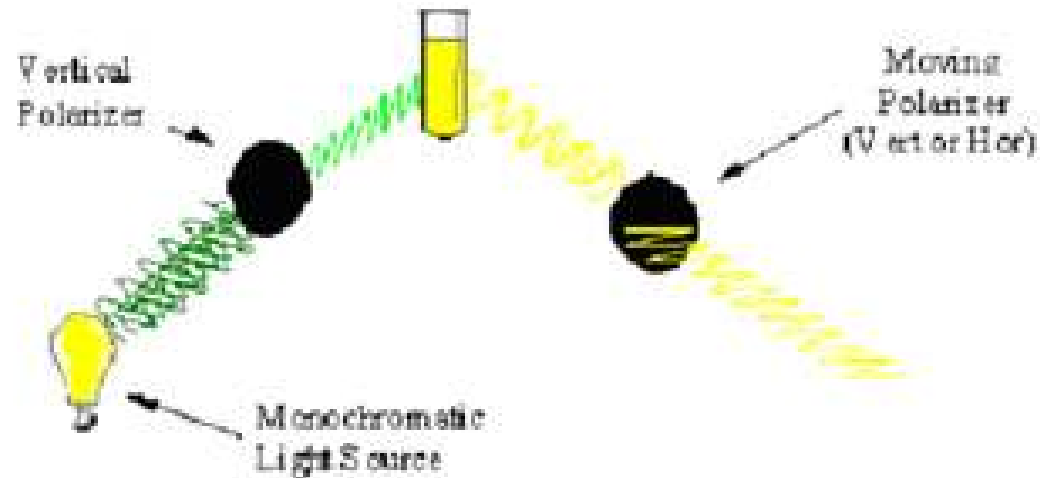


# Αρχή FPIA

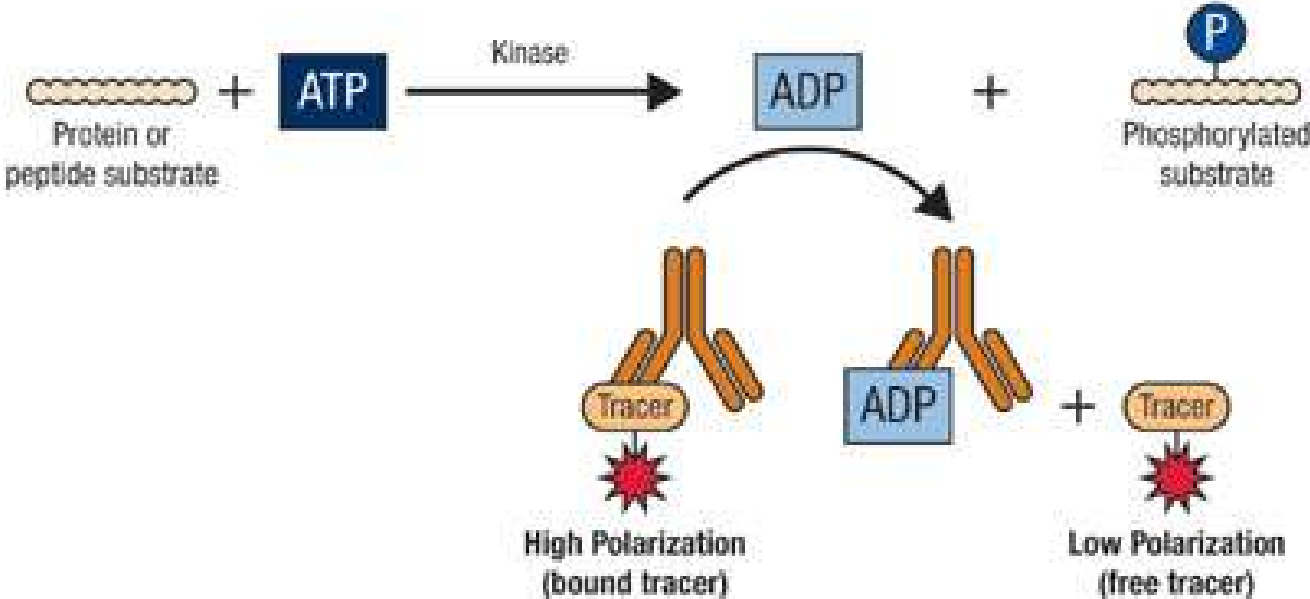


Antibody w/ Fluorophore  
Labeled Target Rotates Slowly

When Displaced or Competed Off by Unlabeled  
Target, Fluorophore Rotates Much Faster and Appears  
Less Polarized, More Randomized Emission



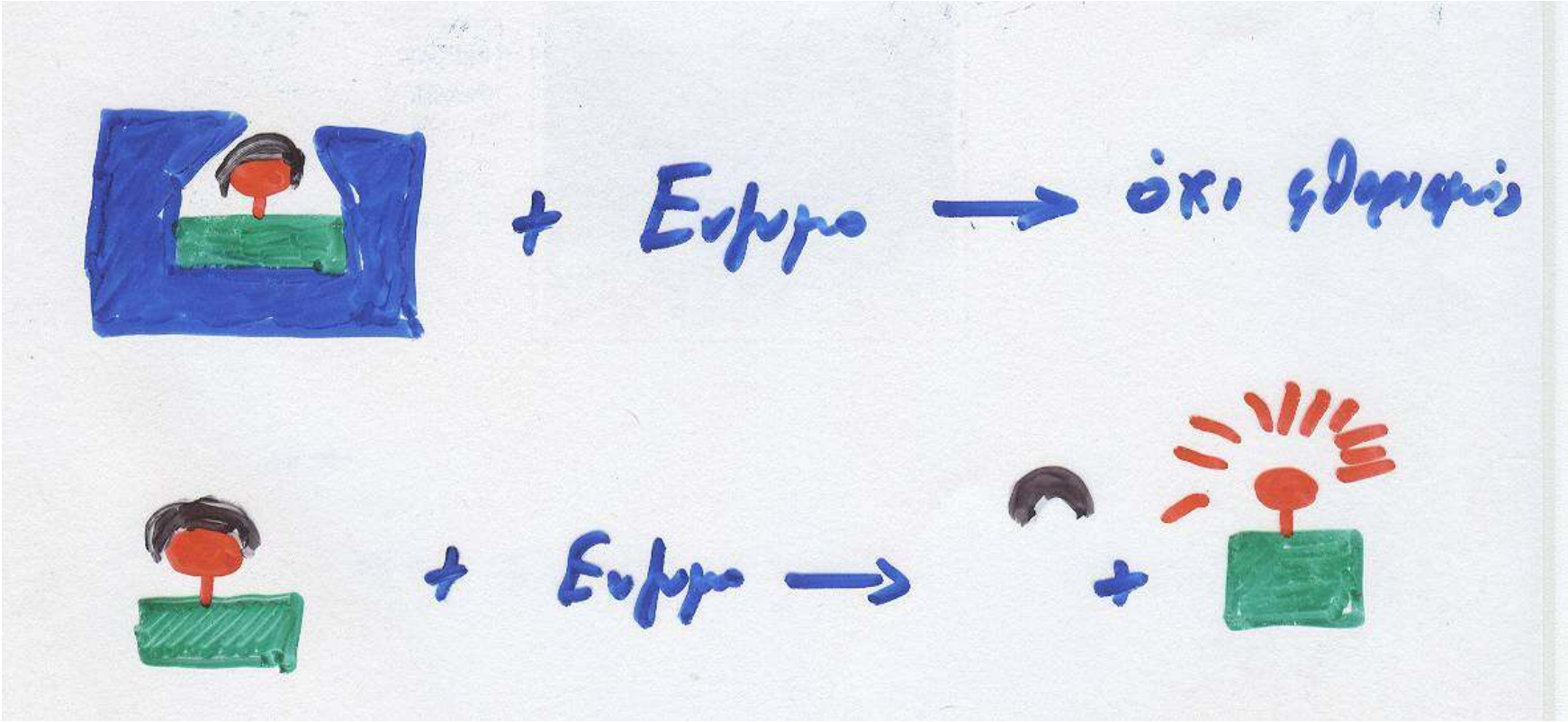
# Αρχή FPIA



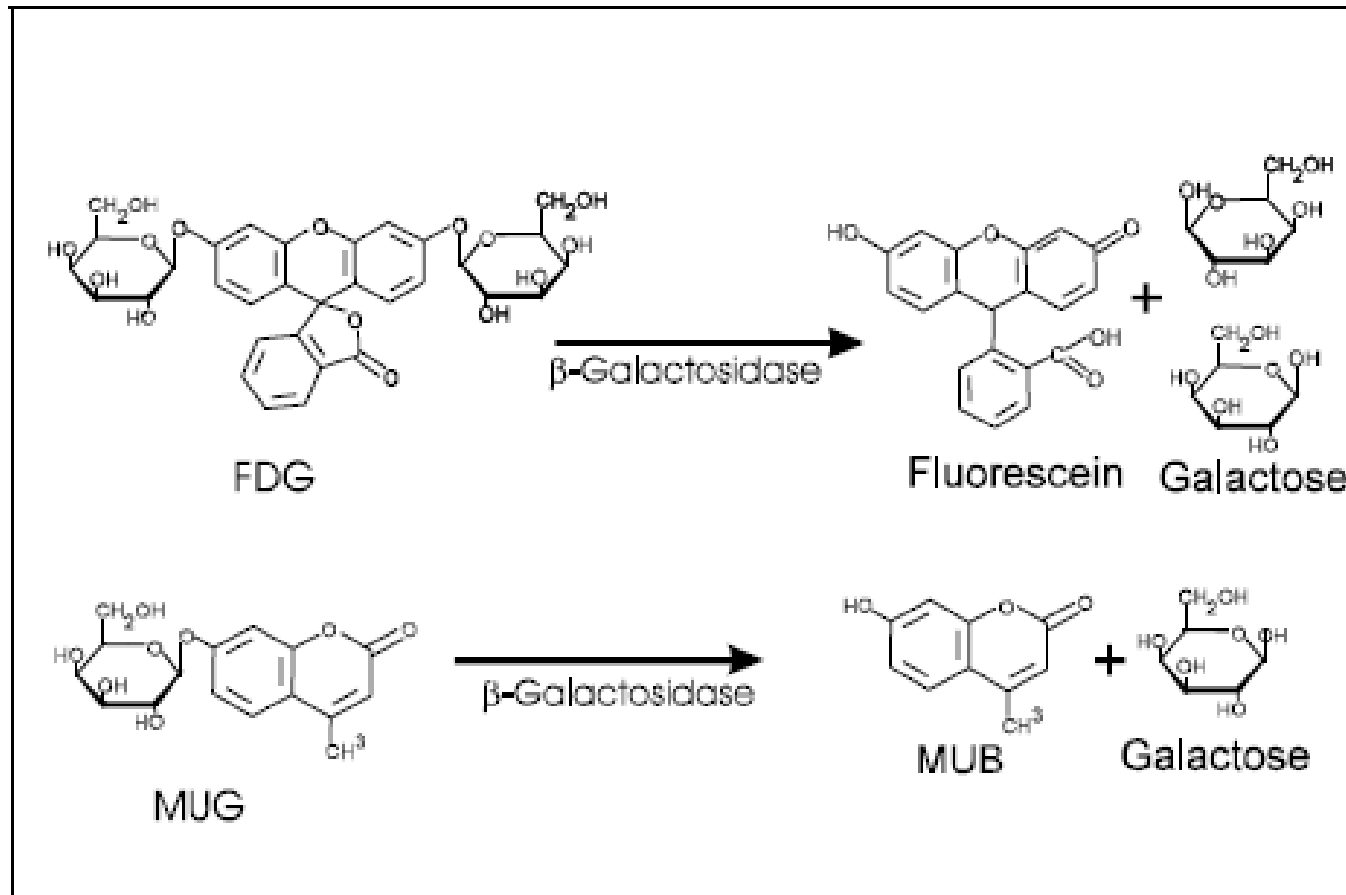
# Τεχνική ΕΦΙΑ

- Ομογενής τεχνική
- Ιχνηθέτης: αντιγόνο επισημασμένο με μη φθορίζον παράγωγο φθορίζουσας ουσίας (π.χ. γαλακτοζυλο – ουμπελιφερόνη)
- Το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση ελευθερώνει τη φθορίζουσα ουσία στον ελεύθερο ιχνηθέτη, όχι όμως στο συνδεδεμένο (λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης)
- Ένταση φθορισμού ανάλογη συγκέντρωσης αντιγόνου / απτενίου στο δείγμα

# Αρχή EFIA



# EFIA



# Νέες τεχνικές FIA

- Χρήση ιχνηθετών χημειοφωταύγειας (παραγωγή φθορισμού από χημική αντίδραση)
  - Με αυξημένη ευαισθησία)
- Τεχνική χρονικά διαχωριζόμενου φθορισμού (time – resolved fluorescence)
  - Χρησιμοποιούνται σύμπλοκα Eu τα οποία εκπέμπουν φθορισμό μακράς διάρκειας όταν διεγείρονται με παλμική ακτινοβολία

# Ομογενής τεχνική FIA χρονικά διαχωριζόμενου φθορισμού

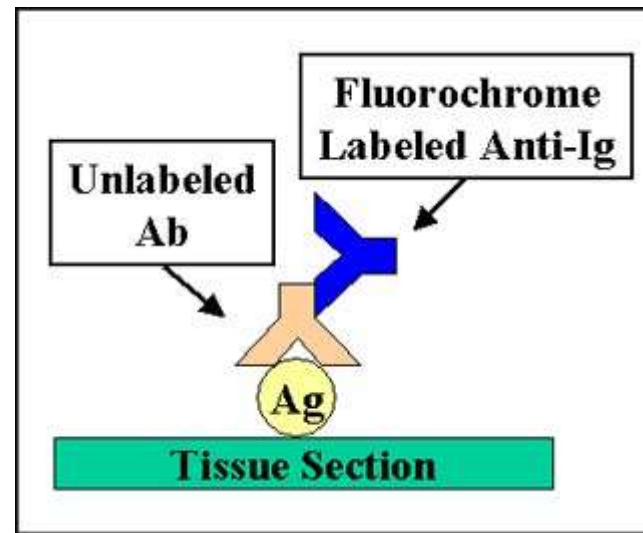
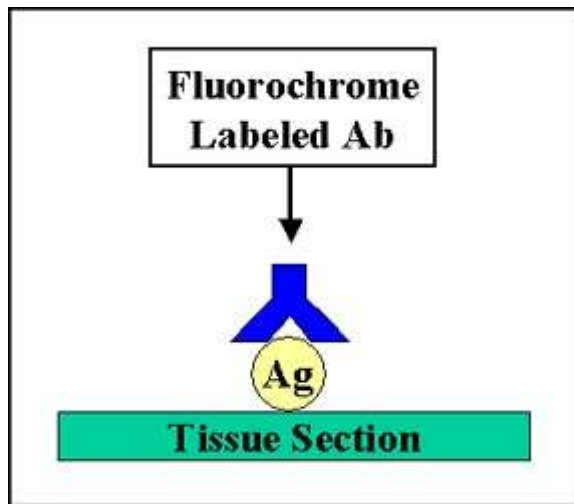




# Πλεονεκτήματα FIA - Εφαρμογές

- Οι προσδιορισμοί FIA έχουν υψηλή ευαισθησία (χαμηλά όρια ανίχνευσης)
- Παραδείγματα εφαρμογών (με όρια ανίχνευσης)
  - Αντιβιοτικό γενταμυκίνη (2  $\mu\text{g/ml}$ )
  - Ορμόνη ινσουλίνη ( $10^{-8}$  mol)
  - Πρωτεΐνη αντιθρυψίνη (0,1 μονάδα / ml)
  - Ορμόνη θυροξίνη ( $10^{-9}$  M)
  - Ναρκωτικά αλκαλοειδή κωδεΐνη ( $10^{-9}$  M) και μορφίνη ( $10^{-10}$  M)
  - Βιταμίνη βιοτίνη ( $10^{-11}$  M)

Σύνδεση φθορισμοεπισημασμένου Ab με το αντιγόνο ιστού (αριστερά) και FIA sandwich Ag-Ab<sub>A</sub>-anti-Ab<sub>A</sub> με φθορισμοεπισημασμένο anti-Ab<sub>A</sub> (δεξιά)



# Νεφελανοσοπροσδιορισμοί

## Nephelometric ImmunoAssays, NIA (1)

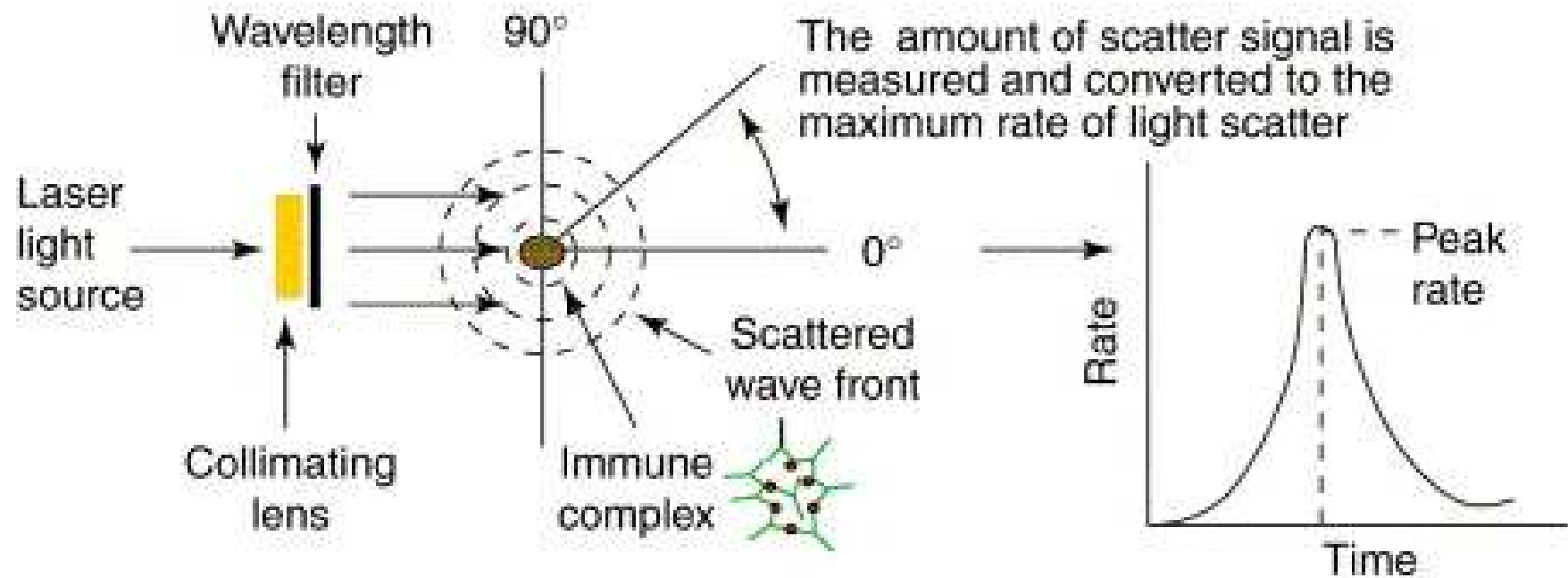
- Η τεχνική NIA **δεν χρησιμοποιεί ιχνηθέτη**
- Εκμεταλεύεται το γεγονός ότι τα σύμπλοκα μεγαλομοριακών αντιγόνων (πρωτεΐνες) με τα αντισώματά τους είναι δυσδιάλυτα συσσωματώματα, που μετά τη δημιουργία τους καθιζάνουν ως **ανοσοϊζήματα**
- Το αρχικό στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων παρακολουθείται **νεφελομετρικά**
  - Μέτρηση ισχύος σκεδαζόμενης ή ανακλώμενης ακτινοβολίας με ανιχνευτή ευρισκόμενο κάθετα προς προσπίπτουσα ακτινοβολία (340 nm)

# Νεφελανοσοπροσδιορισμοί

## Nephelometric ImmunoAssays, NIA (2)

- Αναλυτικό σήμα είναι η παρακολούθηση σχηματισμού των «**κέντρων σκέδασης**», που είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου αντιγόνου
- Εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών για τις οποίες υπάρχουν διαθέσιμα αντισώματα
  - Π.χ. Προσδιορισμός αλβουμίνης σε ορό και ούρα
- Χαρακτηρίζεται από πολύ καλή εκλεκτικότητα
- Απαιτεί απλά και φθηνά όργανα (νεφελόμετρα)

# Αρχή NIA



## Νεφελομετρικοί ανοσοπροσδιορισμοί αναστολής Nephelometric Inhibition ImmunoAssays, NIIA (1)

- Οι NIIA αναπτύχθηκαν για να αξιοποιηθούν τα πλεονεκτήματα της τεχνικής και στον προσδιορισμό ενώσεων μικρού μοριακού βάρους (απτενίων) (MB < 4000)
  - Σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με το αντίσωμά τους

# Νεφελομετρικοί ανοσοπροσδιορισμοί αναστολής

## Nephelometric Inhibition ImmunoAssays, NIIA (2)

- Αρχή τεχνικής NIIA
  - Για κάθε προσδιοριζόμενο απτένιο παρασκευάζεται:
    - Ένα μεγαλομοριακό σύμπλεγμα ενός απτενίου με μια πρωτεΐνη φορέα (όπως αυτό που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη αντισωμάτων απτενίων)
    - ή Ένα πολυαπτενικό σύμπλεγμα
  - Το σύμπλεγμα αυτό είναι ικανό να σχηματίζει ανοσοϊζημα με το αντίσωμα του απτενίου

## Νεφελομετρικοί ανοσοπροσδιορισμοί αναστολής Nephelometric Inhibition ImmunoAssays, NIIA (3)

- Αρχή τεχνικής NIIA
  - Στο δείγμα που περιέχει το προς προσδιορισμό απτένιο προστίθεται ποσότητα αντισώματος και ακολούθως το μεγαλομοριακό σύμπλεγμα του απτενίου
  - Το απτένιο δεσμεύοντας το αντίσωμα αναστέλλει το σχηματισμό συσσωματώματος του αντισώματος με το μεγαλομοριακό σύμπλεγμα και μειώνει την ισχύ της ακτινοβολίας που μετρείται με το νεφελόμετρο

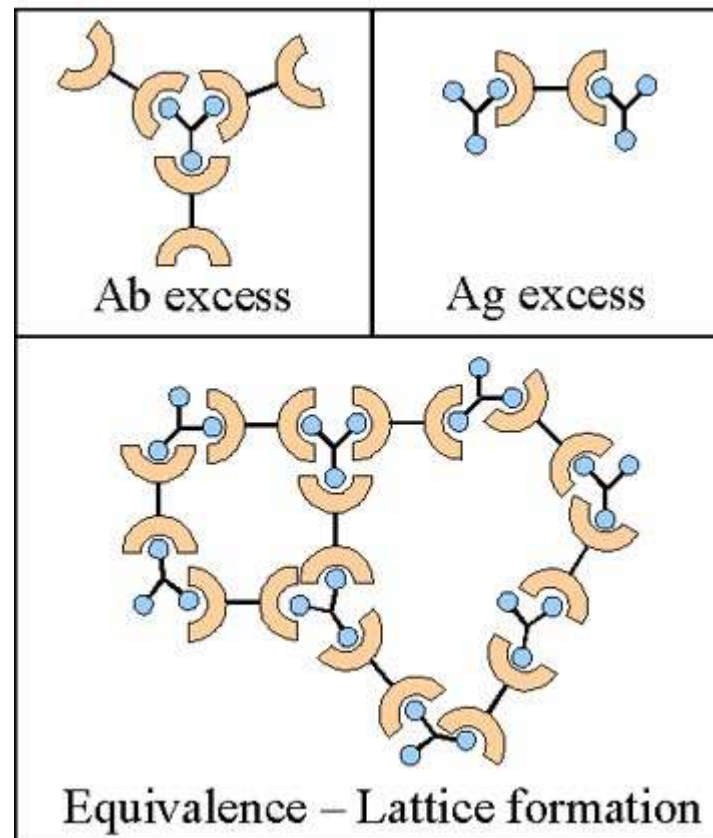


# Νεφελομετρικοί ανοσοπροσδιορισμοί αναστολής

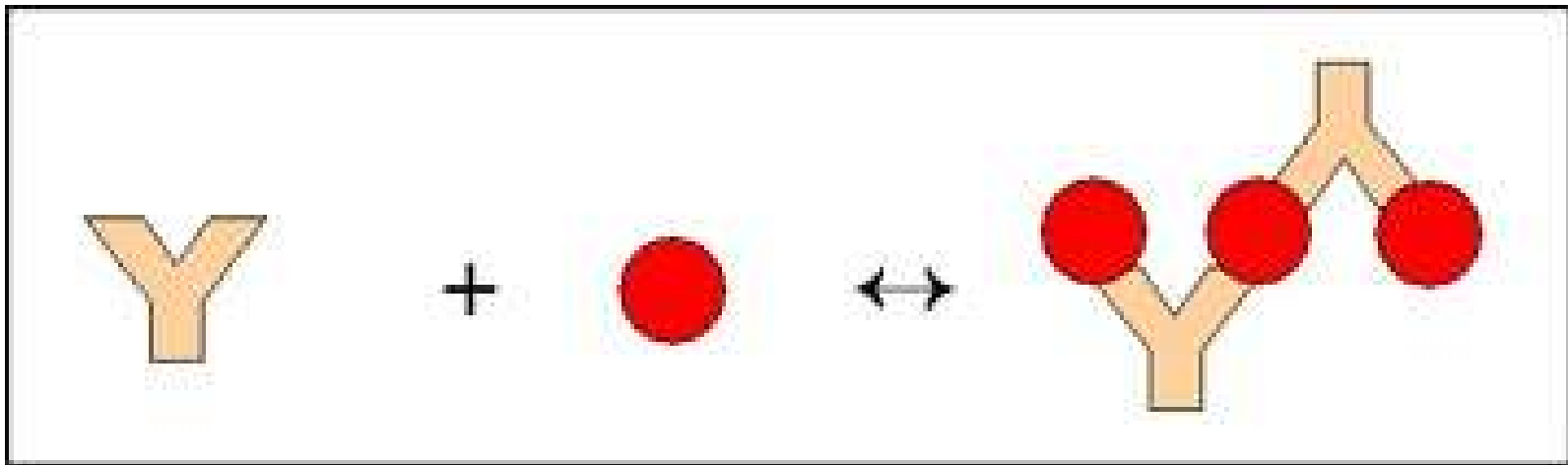
## Nephelometric Inhibition ImmunoAssays, NIIA (4)

- Η τεχνική NIIA αυτοματοποιήθηκε από εταιρεία Beckman με το όργανο ICS (Immunochemistry System)
  - Εκτός από στοιχειομετρικές μετρήσεις (έχει περατωθεί η αντίδραση)
  - Εκτελεί και κινητικές νεφελομετρικές μετρήσεις
- Οι προσδιορισμοί φαρμάκων (π.χ. φαινυτοΐνης, φαινοβαρβιτάλης, θεοφυλλίνης)
  - Έχουν τα πλεονεκτήματα των ομογενών προσδιορισμών (αυξημένη ακρίβεια και επαναληψιμότητα, απλότητα και αυτοματισμό)
  - Τα αντιδραστήρια έχουν πολύ μακρά διάρκεια ζωής
- Περιορισμός η σχετικά μικρή ευασισθησία (περιοχή 0,1 – 1  $\mu\text{mol/L}$ ) και στο ότι απαιτεί σχετικά μεγάλο όγκο δείγματος

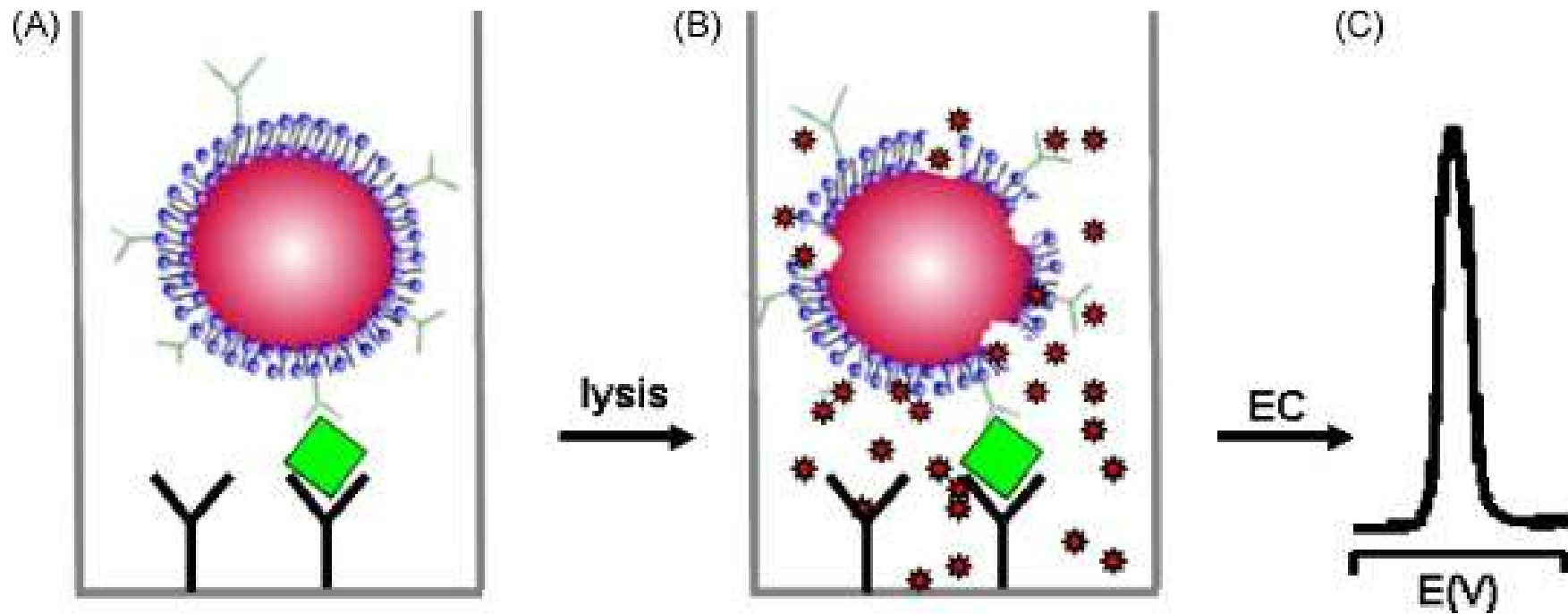
# Επίδραση συγκεντρώσεων Ag-Ab



# Σχηματισμός ανοσοϊζημάτων



# Λιπωσμικοί ανοσοπροσδιορισμοί



# Λιπσωμικός ανοσοπροσδιορισμός

