

Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές

Διάλεξη 6

-Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί

Αλίκη Ντζιφά, PhD
2024

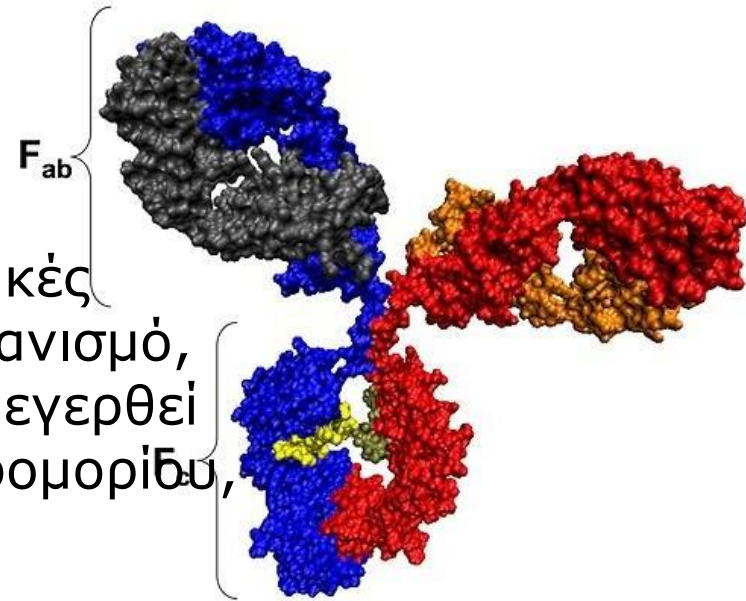
ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί είναι αναλυτικές μέθοδοι που στηρίζονται στη χρήση αντισωμάτων με υψηλή εξειδίκευση έναντι ενός συγκεκριμένου αντιγόνου (Ag) ή αντισώματος (Ab).
- συνδυάζουν τεχνολογίες χημείας και ανοσολογίας.
- Οι ανοσοχημικές τεχνικές βασίζονται στην εξαιρετικής εξειδίκευσης ανοσοχημική αντίδραση αντιγόνου (Ag) και αντισώματος (Ab) η οποία οδηγεί στη δημιουργία ενός συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος (antigen-antibody complex)
- Σε μια τυπική ανοσοχημική ανάλυση ή ανοσοανάλυση (Immunoassay) χρησιμοποιείται ένα αντίσωμα υψηλής ειδίκευσης για την ανίχνευση του υπό μελέτη αντιγόνου (το οποίο μπορεί να είναι ακόμα και ένα άλλο αντίσωμα).
- Η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος επιτρέπει:
 - Την ταυτοποίηση συγκεκριμένων μορίων (αντιγόνων)
 - Την ποσοτικοποίηση τους με υψηλή αναλυτική ευαισθησία

ΧΡΗΣΙΜΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

- **ΑΝΤΙΣΩΜΑ-antibody**

ή ανοσοσφαιρίνες (Ig): περίπλοκες σφαιρικές πρωτεΐνες που συντίθενται σε ένα οργανισμό, όταν το ανοσοποιητικό του σύστημα διεγερθεί από την παρουσία κάποιου ξένου μακρομορίδιου, του αντιγόνου

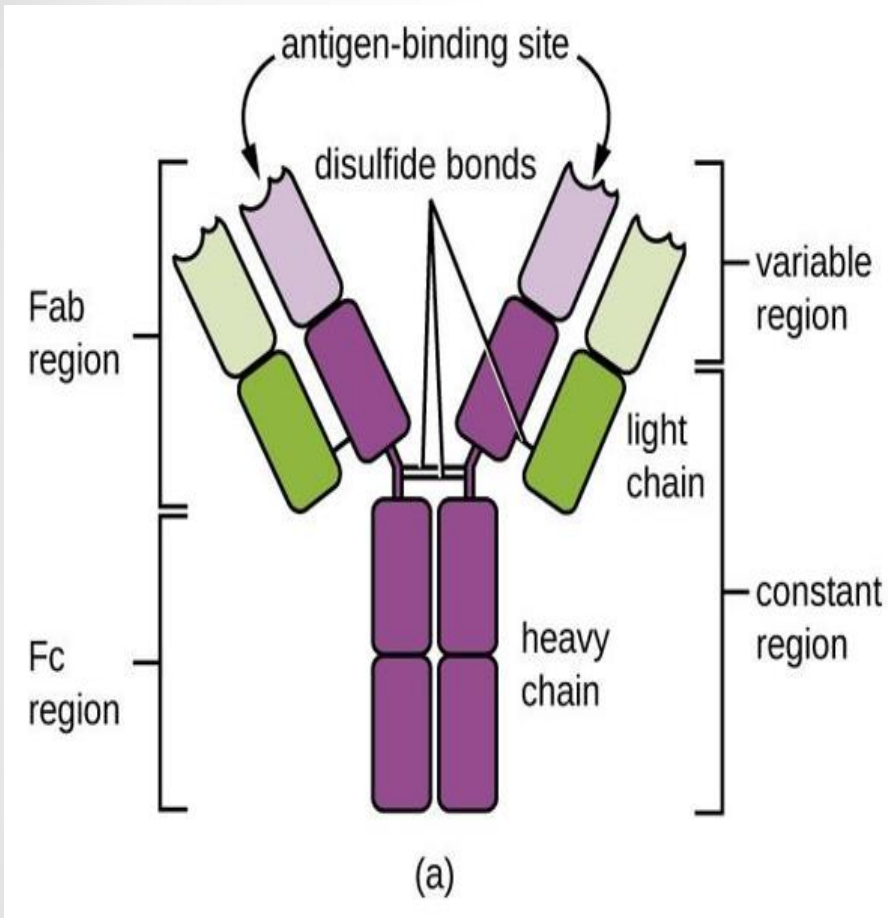


Το κύριο υδατοδιαλυτό αντίσωμα στον ορο αιματος (serum) είναι η ανοσοσφαιρίνη IgG σε ένα ποσοστό 80%

Οι IgG είναι τετραμερή γλυκοπρωτεϊνικά μόρια με χαρακτηριστική διαμόρφωση στο χώρο που μοιάζει με ύψιλον (Y)

παράγονται από τα B - λεμφοκύτταρα και χρησιμοποιείται από το ανοσοποιητικό σύστημα για να αναγνωρίσει και να ακινητοποιήσει ξένα αντικείμενα όπως τα βακτήρια και τους ιούς

• ANΤΙΣΩΜΑ-antibody



- Μεταβλητή περιοχή
- Σταθερή περιοχή

- δύο τμήματα Fab (Fragment antigen binding): περιοχή πρόσδεσης του αντιγόνου. Διαφορετική πρωτοταγής δομή σε αμινοξέα, στις Fab περιοχές εξηγεί την εξειδίκευση των IgG
- δύο όμοιες βαριές (446αα) και δύο όμοιες ελαφριές αλυσίδες (219 αα).
- Οι πολυπεπτιδικές αυτές αλυσίδες συγκρατούνται μέσω δισουλφιδικών δεσμών
- ένα αντίσωμα μπορεί να συνδέεται με διαφορετικούς επιτόπους στο ίδιο αντιγόνο ή και σε διαφορετικά αντιγόνα.
- Περιοχές του αντισώματος που δεν δεσμεύουν αντιγόνα: Fc τμήμα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σήμανση με ραδιοϊσότοπα ή ένζυμα

• ANΤΙΓΟΝΟ-antigen

- ❖ Κάθε ξένο μακρομόριο (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, νουκλεϊνικά οξέα) που είναι ικανά να επάγουν ειδική ανοσολογική απάντηση → δημιουργία αντισωμάτων στον οργανισμό)
- Κάθε ουσία που ερχόμενη σε επαφή με τα αντισώματα, ή με μια ειδική στερεοδομή, τον υποδοχέα του T- λεμφοκυττάρου, μπορεί να αντιδράσει στερεοχημικά με αυτά και να συνδεθεί μαζί τους με μια σχετικά ισχυρή δύναμη σύνδεσης.

• ΕΠΙΤΟΠΟΣ-epitope

- ❖ Διάφορες περιοχές του αντιγόνου που καθορίζουν τη σύνδεση του με συγκεκριμένα αντισώματα.
- οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα είναι αμινοξέα της επιφάνειας των πρωτεϊνών (συνήθως 4-6αα), απαρτίζονται από συνεχόμενα ή/και μη συνεχόμενα αμινοξέα της πρωτεϊνικής αλληλουχίας

• ΠΑΡΑΤΟΠΟΣ-paratope

Το τμήμα της μεταβλητής περιοχής του αντισώματος που αναγνωρίζει ειδικά τον επίτοπο του αντιγόνου που προκάλεσε την παραγωγή του.

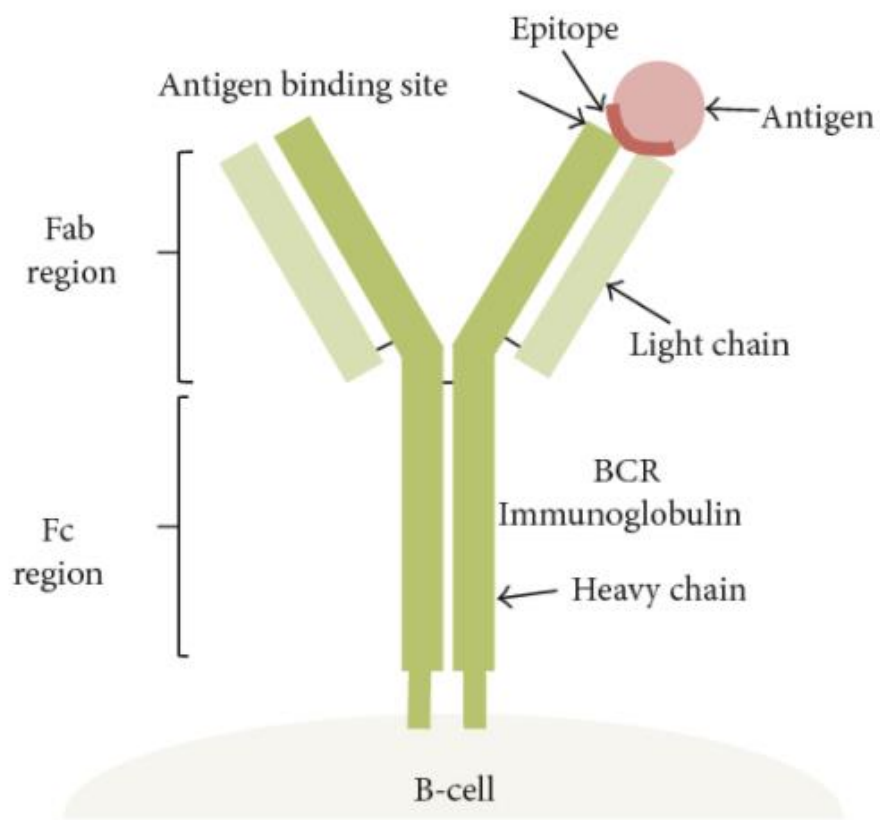
➤ ΑΝΟΣΟΓΟΝΟ-immunogen

- ❖ είναι μεγαλομοριακό αντιγόνο, που έχει την ικανότητα να προκαλέσει την ανάπτυξη αντισώματος, όταν εισαχθεί σε ένα οργανισμό

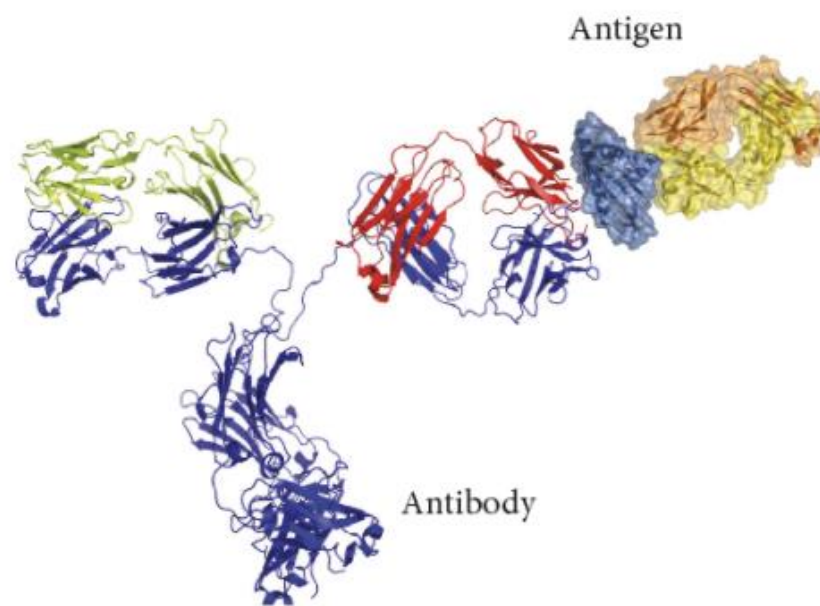
➤ ΑΠΤΕΝΙΑ-haptens

- ❖ Μικρομοριακά ($MW < 4000$) αντιγόνα (π.χ. φάρμακα, ορμόνες, φυτοφάρμακα κλπ.), που είναι ικανά να αντιδράσουν με ειδικά αντισώματα αλλά ΟΧΙ να προκαλέσουν την παραγωγή και την ανάπτυξη αντισωμάτων
- Θα πρέπει να συνδεθούν με μια πρωτεΐνη-φορέα όπως π.χ η βόειος οραλβουμίνη (BSA, bovine serum albumin)
- Τα απτένια αποτελούν πολλές από τις ουσίες που προσδιορίζονται με ανοσοχημικές μεθόδους.

ΣΥΝΔΕΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

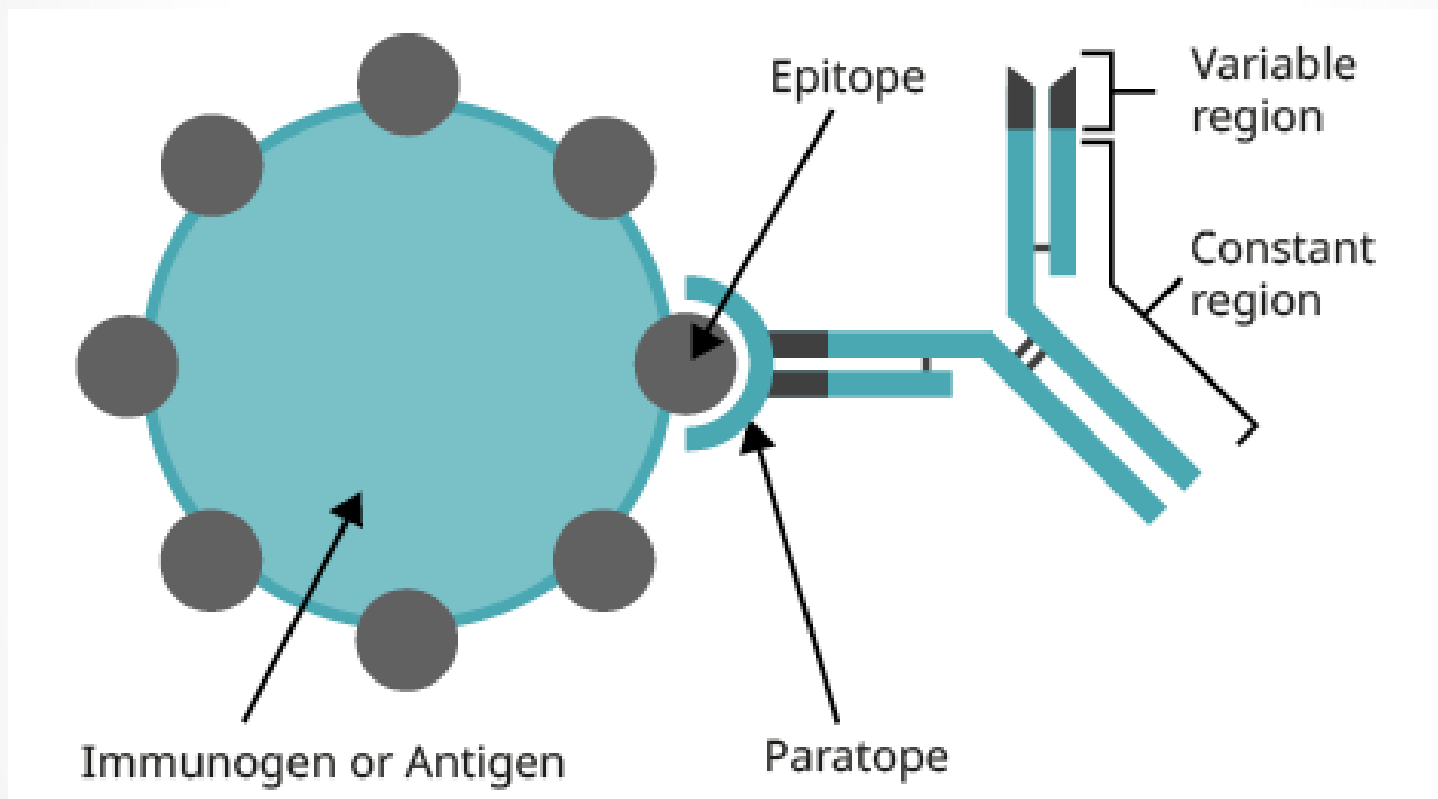


(a)

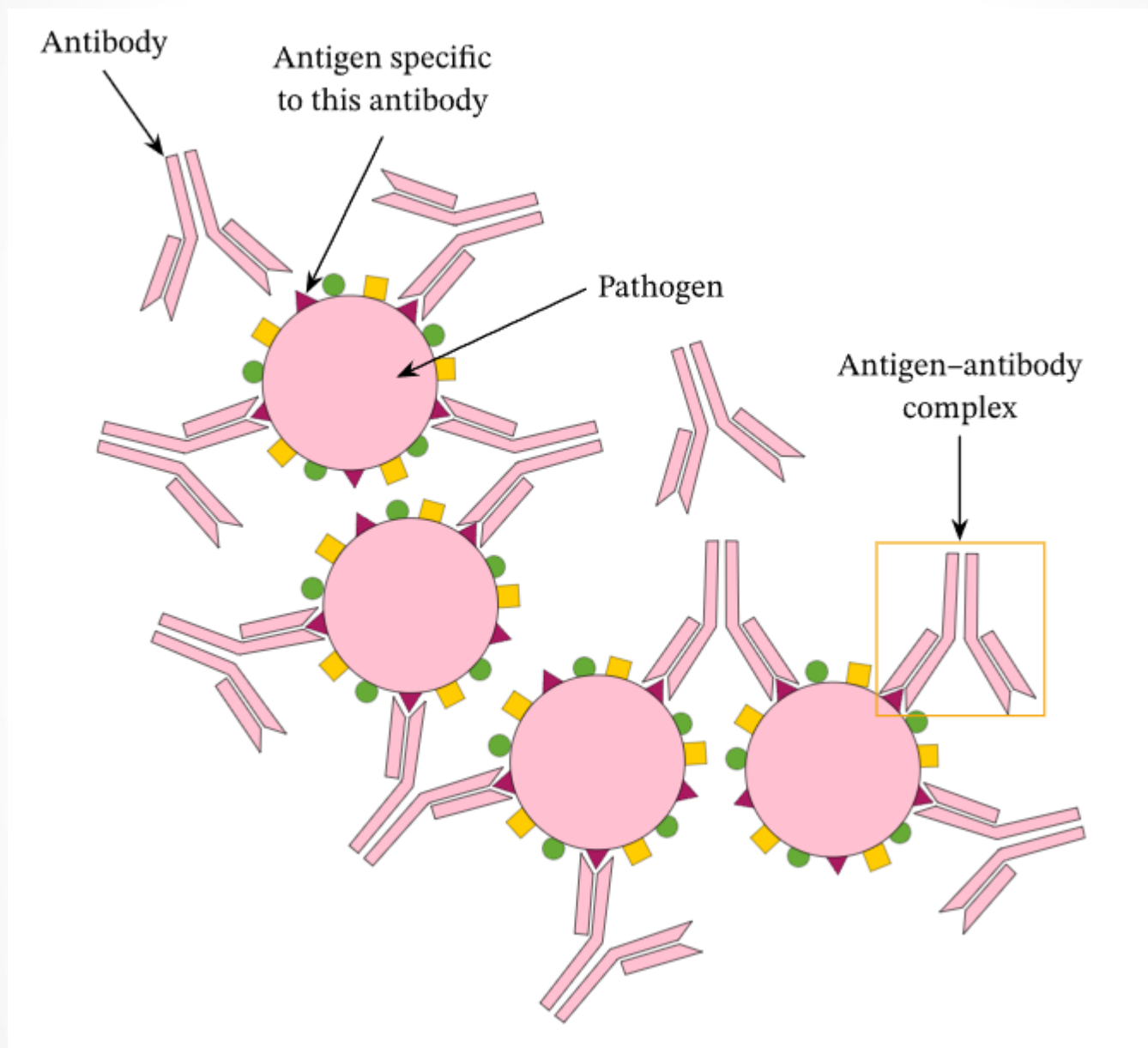


(b)

ΣΥΝΔΕΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

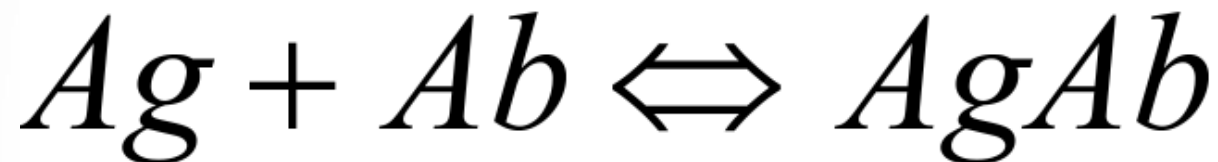


ΣΥΝΔΕΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ



ΣΥΝΔΕΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

- Αντίδραση συνδέσεως αντιγόνου (Ag) με το εξειδικευμένο αντίσωμά του (Ab) προς δημιουργία του πολύ σταθερού συμπλόκου (Ag.Ab)

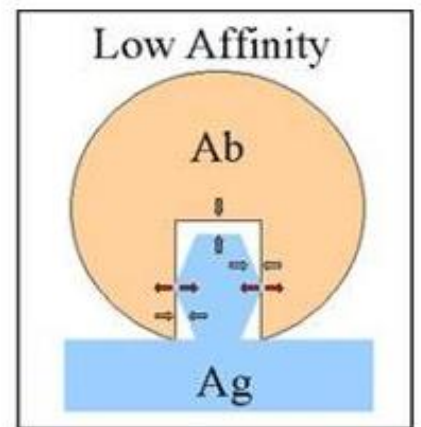
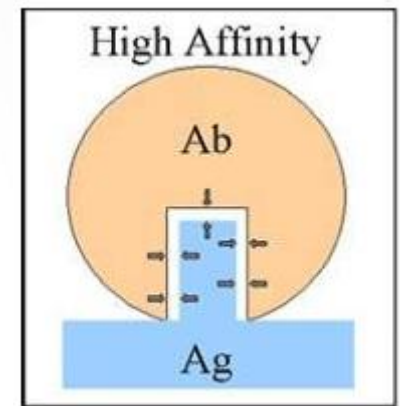
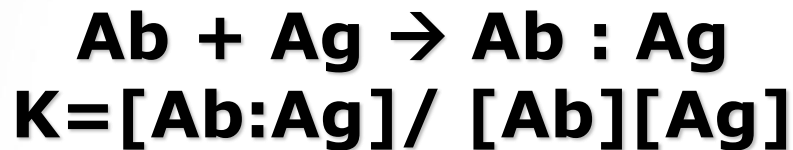


- Η ανοσοαντίδραση Ag-Ab στηρίζεται ποιοτικά και ποσοτικά σε τρία χαρακτηριστικά μεγέθη
 1. Συγγένεια
 2. Συνάφεια
 3. Ειδικότητα

ΣΥΝΔΕΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

➤ Συγγένεια-Affinity

Σχετίζεται με την ισχύ του δεσμού μεταξύ ενός μόνο παρατόπου του Ab με τον αντίστοιχο αντιγονικό του επίτοπο

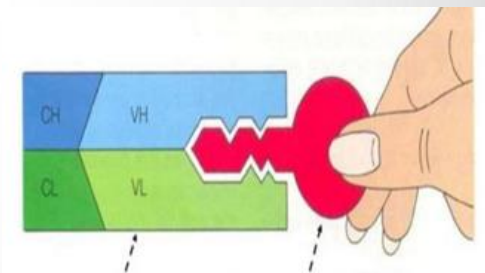


➤ Συνάφεια-Avidity

Σχετίζεται με τη συνολική ισχύ σύνδεσης Ab-Ag και εξαρτάται ευθέως από το πλήθος και την συγγένεια των παρατόπων προς τους επιτόπους

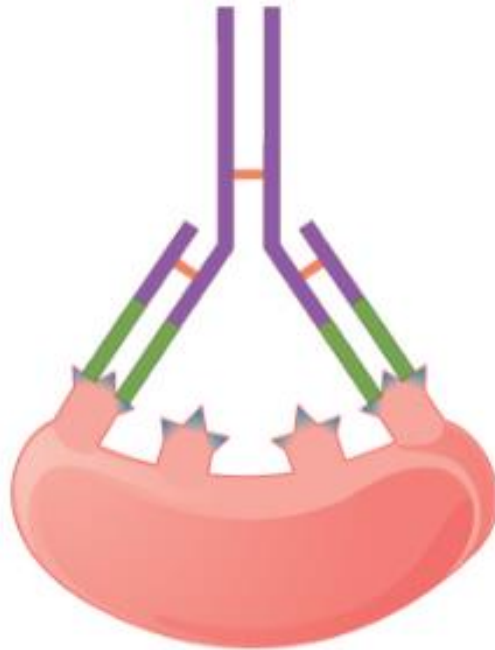
➤ Ειδικότητα-Specificity

Εκφράζει την εκλεκτικότητα με την οποία το αντίσωμα συνδέεται με το αντίστοιχο-παριστάνεται ως σχέση κλειδιού- κλειδαριάς
Η ειδικότητα ενός Ab προς κάποιο Ag εκφράζεται με την συμπληρωματικότητα της στερεοδομής μεταξύ επιτόπου του Ag και αντισώματος

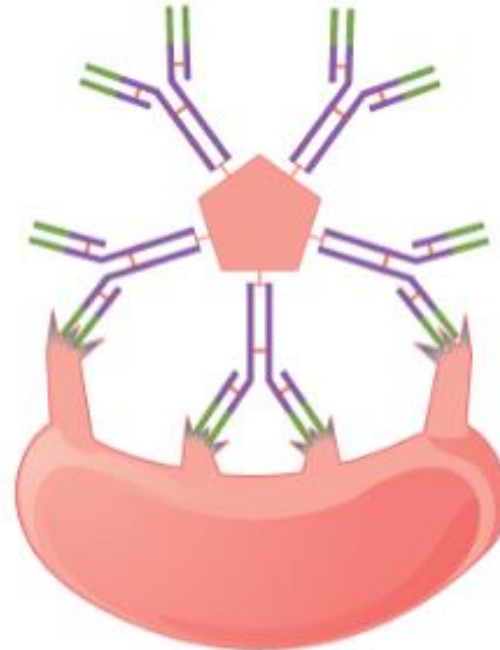


ΣΥΝΔΕΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

(a) Affinity versus avidity



Affinity refers to the strength of a single antibody–antigen interaction. Each IgG antigen binding site typically has high affinity for its target.

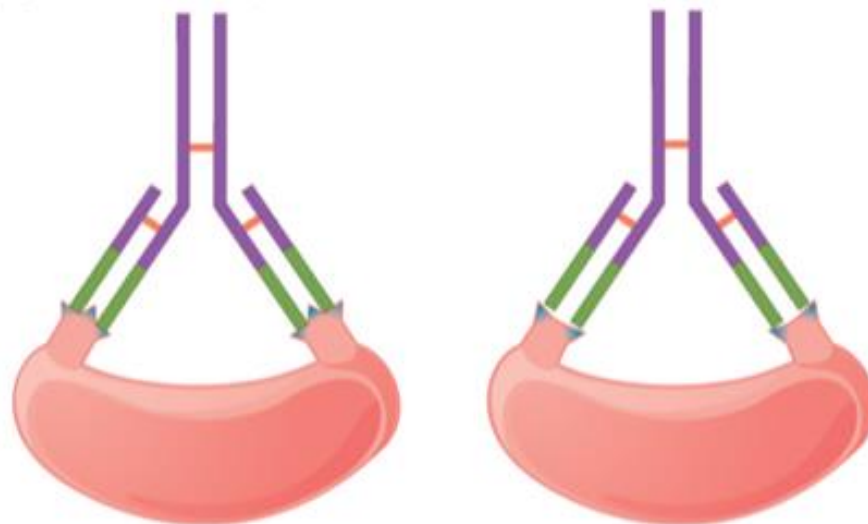


Avidity refers to the strength of all interactions combined. IgM typically has low affinity antigen binding sites, but there are ten of them, so avidity is high.

ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ (cross-reaction)

- ✓ Εκφράζει το φαινόμενο, όπου παρατηρείται σύνδεση του ειδικού αντισώματος με αντιγόνο Ag2 διαφορετικό του ανοσογόνου Ag1 λόγω ύπαρξης παρόμοιου αντιγονικού επιτόπου.
- ✓ Στην περίπτωση αυτή αντισώματα εξειδικευμένα έναντι ενός επιτόπου του ομολόγου αντιγόνου (A) είναι δυνατό να αντιδρούν και με παρόμοιους, αλλά διαφορετικούς επιτόπους άλλων ετερόλογων αντιγόνων.
- ✓ Στην περίπτωση αυτή έχουμε μικρότερη σταθερά σύνδεσης Ab-Ag

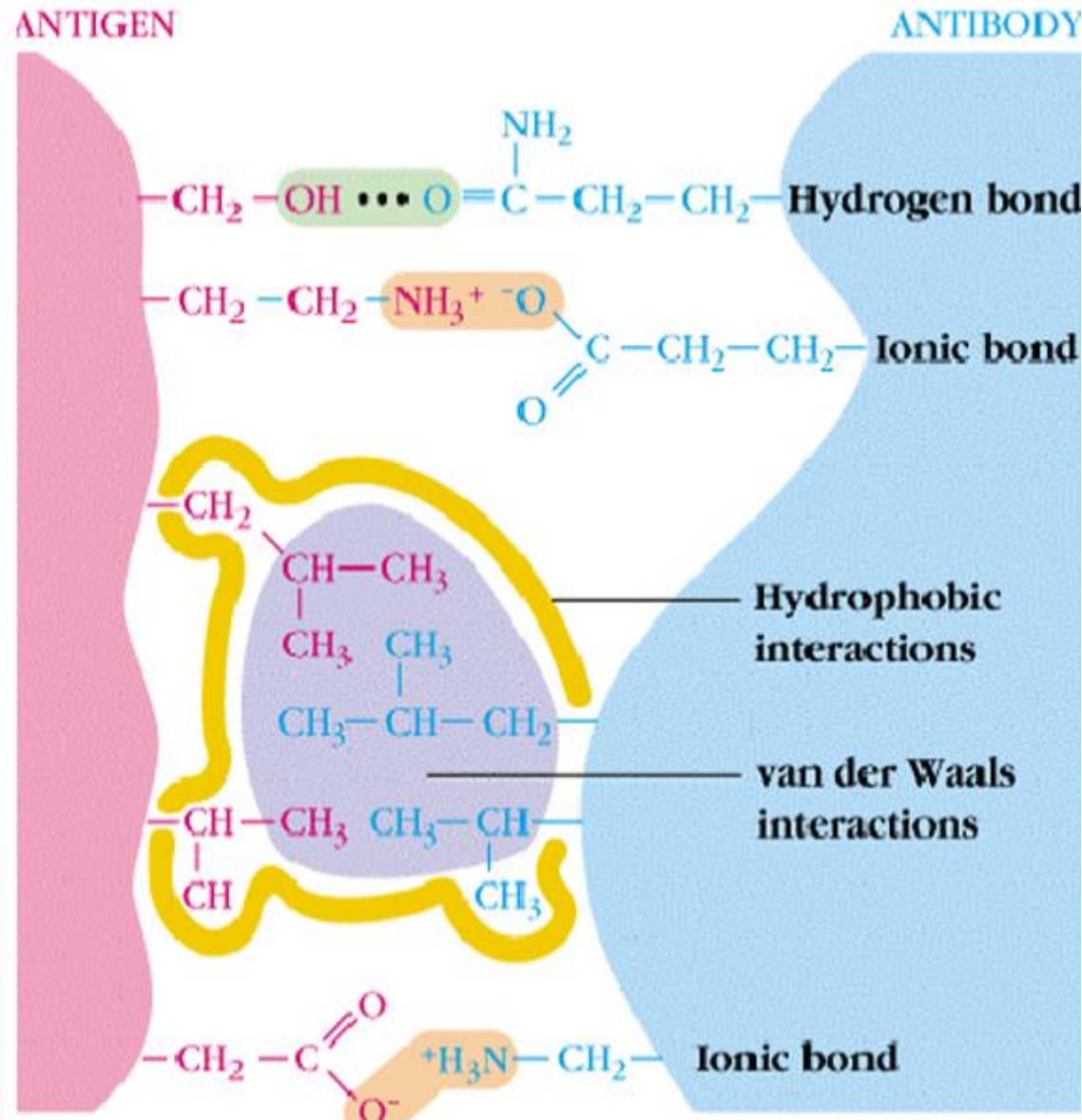
(b) Cross reactivity



An antibody may react with two different epitopes.

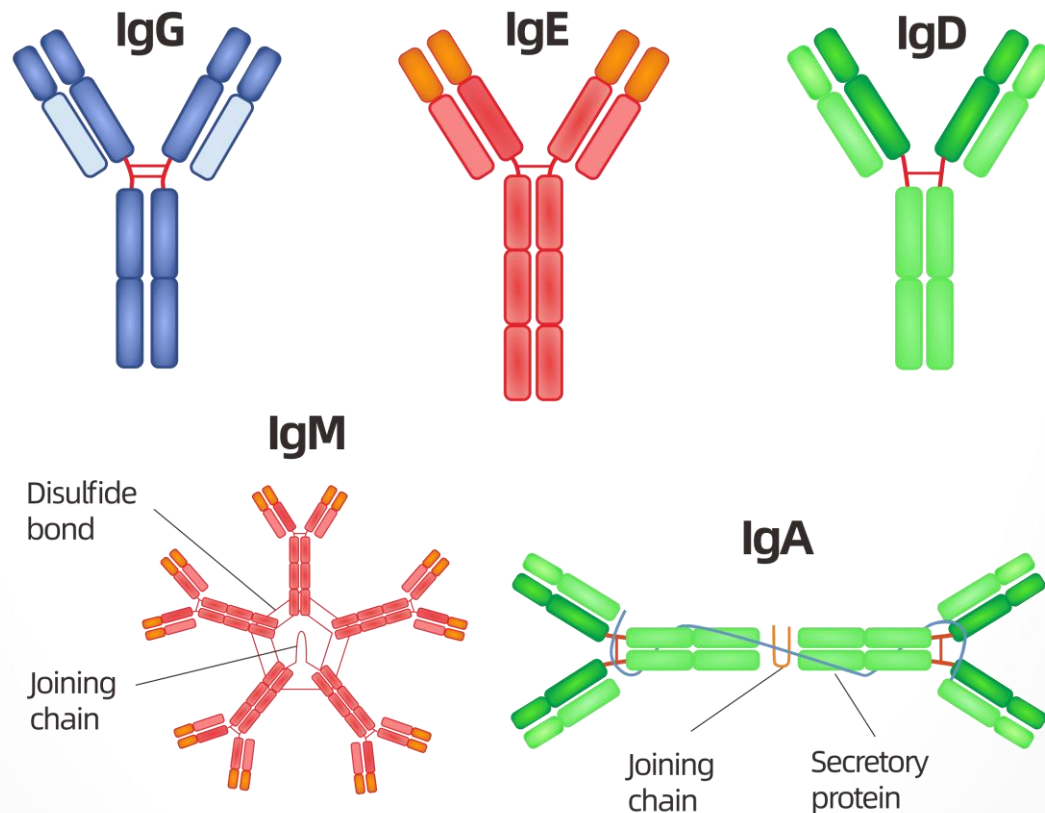
ΣΥΝΔΕΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

- Η σύνδεση Ag με Ab γίνεται με το σχηματισμό πολλαπλών μη ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των επιτόπων του Ag και των αντίστοιχων θέσεων σύνδεσης των Fab περιοχών του Ab



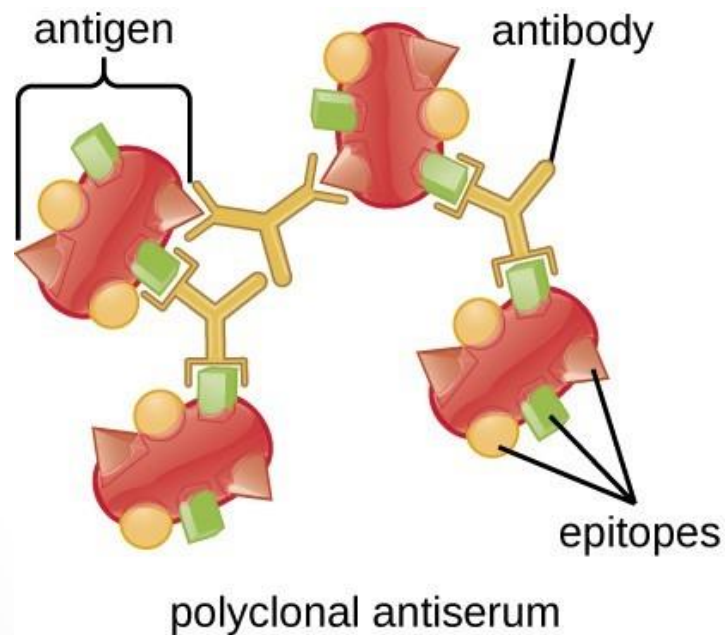
ΕΙΔΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

- ❑ Τα αντισώματα διακρίνονται σε πέντε διάφορες τάξεις (ισότυποι) και υποτάξεις με βάση τον τύπο της βαριάς αλυσίδας: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE
- Μονομερές αντίσωμα: Με ένα Y (2 θέσεις)
- Διμερές αντίσωμα (IgA): Με δύο Y
- Πενταμερές αντίσωμα: (IgM): Με 5 Y



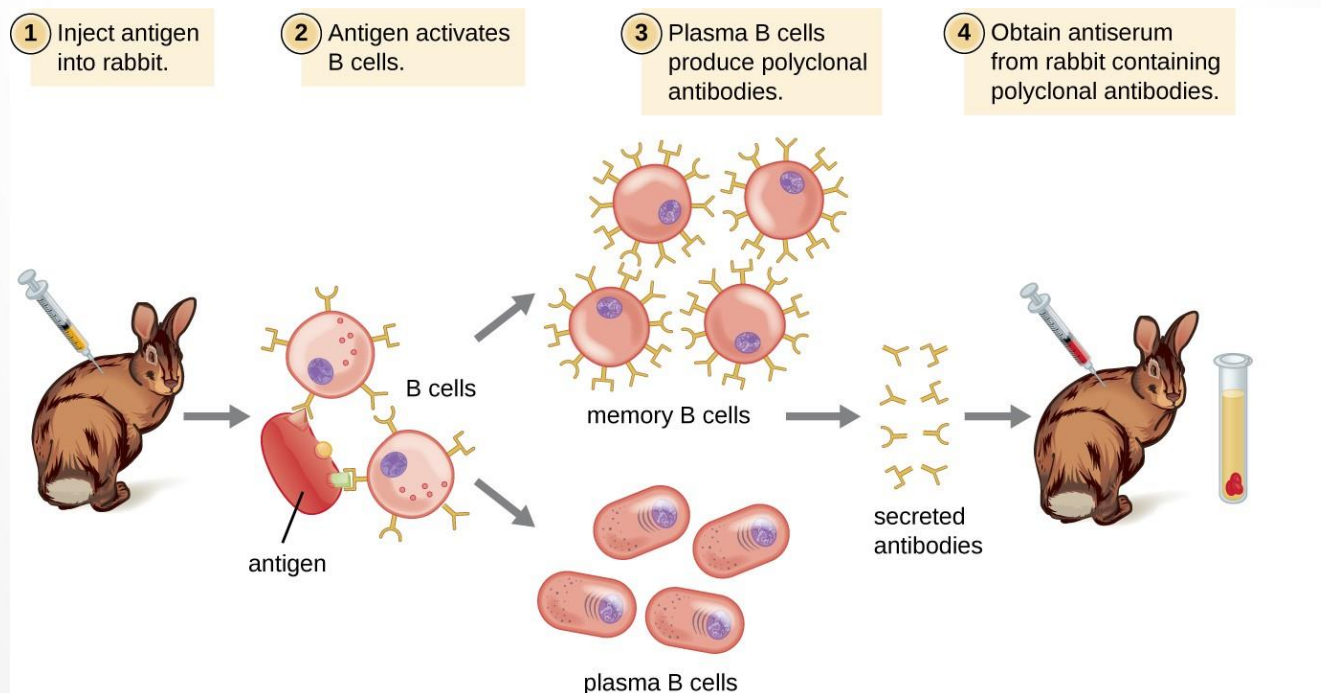
ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

- Τα Β-λεμφοκύτταρα παράγουν πολλά διαφορετικά αντισώματα, το κάθε ένα από τα οποία αναγνωρίζει ένα **διαφορετικό επίτοπο στην επιφάνεια του ίδιου αντιγόνου**
- ονομάζονται πολυκλωνικά λόγω του ότι είναι προϊόντα πολλών διαφορετικών κλώνων Β-λεμφοκυττάρων –άρα αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του ίδιου αντιγόνου
- κάθε μόριο πρωτεΐνης μπορεί να προσδεθεί σε περισσότερα του ενός Ab → Η ετερογένεια των πολυκλωνικών αντισωμάτων μπορεί να αποβεί πλεονέκτημα σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ ανίχνευση μιας πρωτεΐνης που βρίσκεται σε χαμηλές ποσότητες



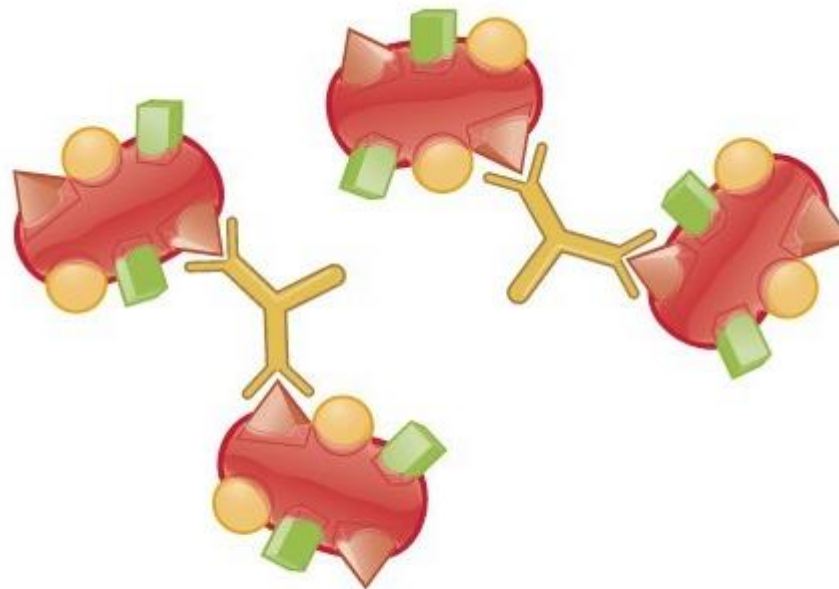
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

- Τα πολυκλωνικά αντισώματα μπορούν να **παραχθούν σε πολλούς οργανισμούς** όπως για παράδειγμα το κουνέλι, ποντικός και γίδα
- Παράγονται **με επαναλαμβανόμενη ένεση του αντιγόνου** (π.χ. μιας πρωτεΐνης), στο ζώο για 3-4 **εβδομάδες**.
- Το **αντιγόνο ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που παράγουν αντισώματα (B κύτταρα) τα οποία το αναγνωρίζουν**
- Αρκετές εβδομάδες αργότερα **παιρνουμε αίμα** από το ανοσοποιημένο κουνέλι, **το φυγοκεντρούμε και διαχωρίζουμε τα κύτταρα από τον ορό**
- Ο ορός που ονομάζεται και **αντιορός (antiserum) περιέχει πολλά διαφορετικά αντισώματα IgG για το αντιγόνο στο οποίο έχει εκτεθεί το ζώο.**



ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

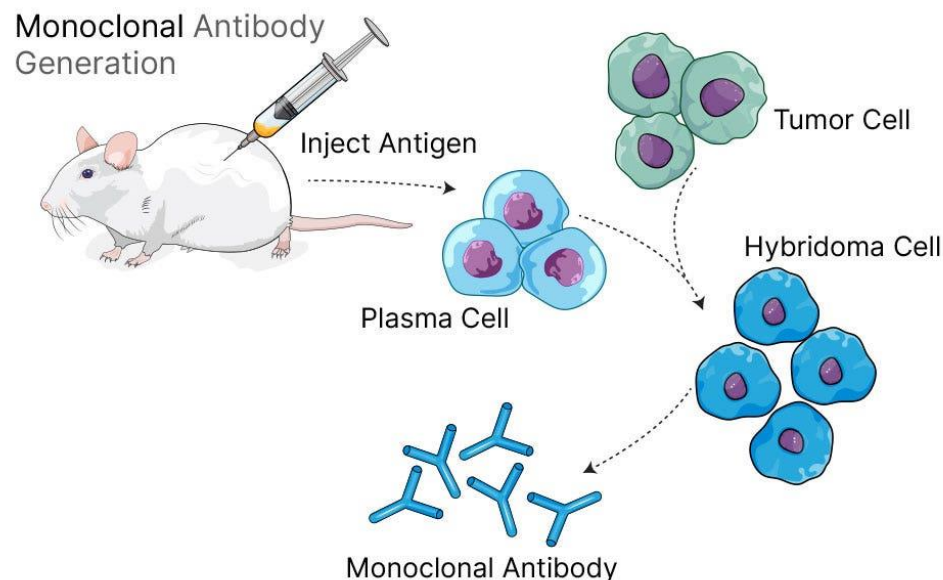
- αντισώματα που παράγονται από κλώνους **ενός κυττάρου**, που παράγει μόνο ένα αντίσωμα, και αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο επίτοπο.
- ένα μονοκλωνικό αντίσωμα είναι ένα σύνολο πανομοιότυπων αντισωμάτων με την ίδια εξειδίκευση
- Τα πιο συνηθισμένα: **mouse** monoclonals



monoclonal antibodies

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

- Η μέθοδος στηρίχθηκε στην ανακάλυψη ότι μπορεί να γίνει **σύντηξη κυττάρων B από ένα ανοσοποιημένο ζώο (συνήθως από ένα ποντίκι) με αθάνατα κύτταρα μυελώματος**
- Άρα και παραγωγή μεγάλης ποσότητας ομοιογενούς αντισώματος οποιασδήποτε επιθυμητής ειδικότητας.
- **Υβριδώματα:** Τα υβριδικά κύτταρα που προκύπτουν από την σύντηξη. Ουσιαστικά είναι υβρίδια των κανονικών B λεμφοκυττάρων και κυττάρων του μυελώματος.
- Τα B λεμφοκύτταρα που έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής σε καλλιέργεια ιστών, μετατρέπονται στα υβριδώματα που έχουν αθανασία που οφείλεται στα κύτταρα του αρχικού όγκου.



ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

1975: Από τους Georges Kohler και Cesar Milstein αναπτύχθηκε η μέθοδος για την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων, οποιασδήποτε επιθυμητής ειδικότητας.

1984: ΒΡΑΒΕΙΑ NOBEL ΙΑΤΡΙΚΗΣ (ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ)



ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

- η μεγάλη τους εξειδίκευση δηλαδή η πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης του αντισώματος με αντιγόνα που φέρουν επιτόπους παρόμοιους με αυτούς του υπό μελέτη αντιγόνου είναι πολύ μικρή
- Απόδοση απεριόριστης ποσότητας αντισώματος με σταθερά χαρακτηριστικά
- Χημική συγγένεια και ειδικότητα πλήρως καθορισμένες με δυνατότητα επιλογής ως προς την εφαρμογή
- Δυνατότητα παραγωγής εξαιρετικά ειδικού αντισώματος από μη καθαρό ανοσογόνο
- Διαθεσιμότητα αντισωμάτων έναντι πολλών και διαφορετικών και απομεμακρυσμένων επιτόπων του ιδίου αντιγόνου
- Δυνατότητα εύκολου καθαρισμού σε μεγάλες ποσότητες με μεθόδους που δεν καταστρέφουν την ανοσοδραστικότητα
- Καθαρά αντιδραστήρια που δίνουν χαμηλό σήμα υποβάθρου (background) και μη-ειδικής σύνδεσης (non specific binding, NSB)
- Συνήθως δεν παρεμποδίζουν τη βιολογική δραστικότητα του αντιγόνου (πχ ενζύμου)

ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

- Συνήθως χαμηλότερη χημική συγγένεια έναντι των πολυκλωνικών
- Εξάρτηση από ένα και μόνο επίτοπο, ο οποίος σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μην είναι αντιπροσωπευτικός για το αντιγόνο ως σύνολο (σε περιπτώσεις πολυμορφικών επιτόπων)
- Πιθανότητα εμφάνισης ασυνήθιστων φυσικών ιδιοτήτων που εξαρτώνται από τον συγκεκριμένο ιδιότυπο
- Δεν εμφανίζουν ιδιότητες καθίζησης ή συγκόλλησης

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Α. ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

- α) διπλή ανοσοδιάχυση
- β) Ανοσοηλεκτροφόρηση (Immunoelectrophoresis)
- γ) Αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (Crossover immunoelectrophoresis, CIE)
- δ) Ανοσοκαθήλωση (Immunofixation)
- ε) Western blotting

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Β. ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΜΗ-ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΕΣ

α) απλή ακτινωτή ανοσοδιάχυση (single radial immunodiffusion, SRID, Mancini)

β) Ανοσοηλεκτροφόρηση Rocket

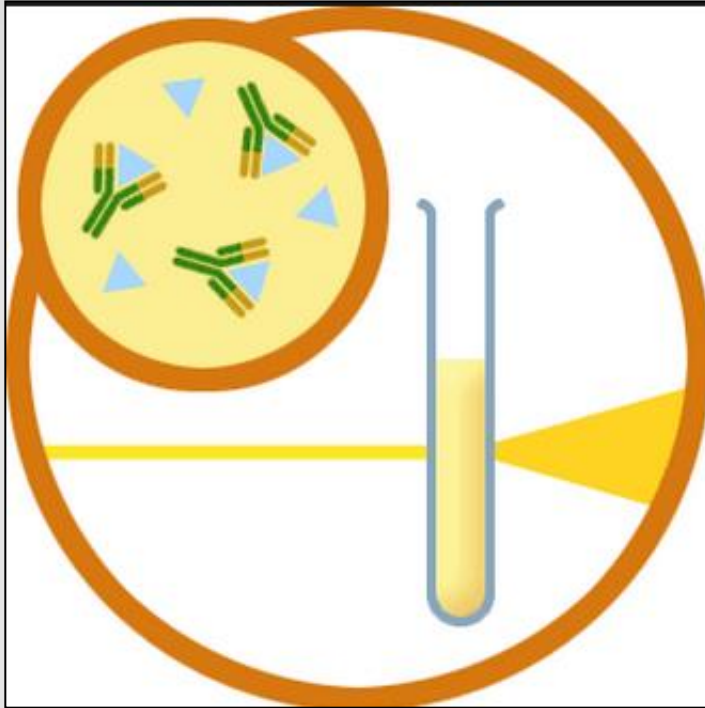
γ) Διασταυρούμενη ανοσοηλεκτροφόρηση (Crossed immunoelectrophoresis)

δ) Νεφελομετρία (Nephelometry), Θολερομετρία (Turbidimetry)

στ) Μέθοδοι συγκόλλησης (Agglutination assays)

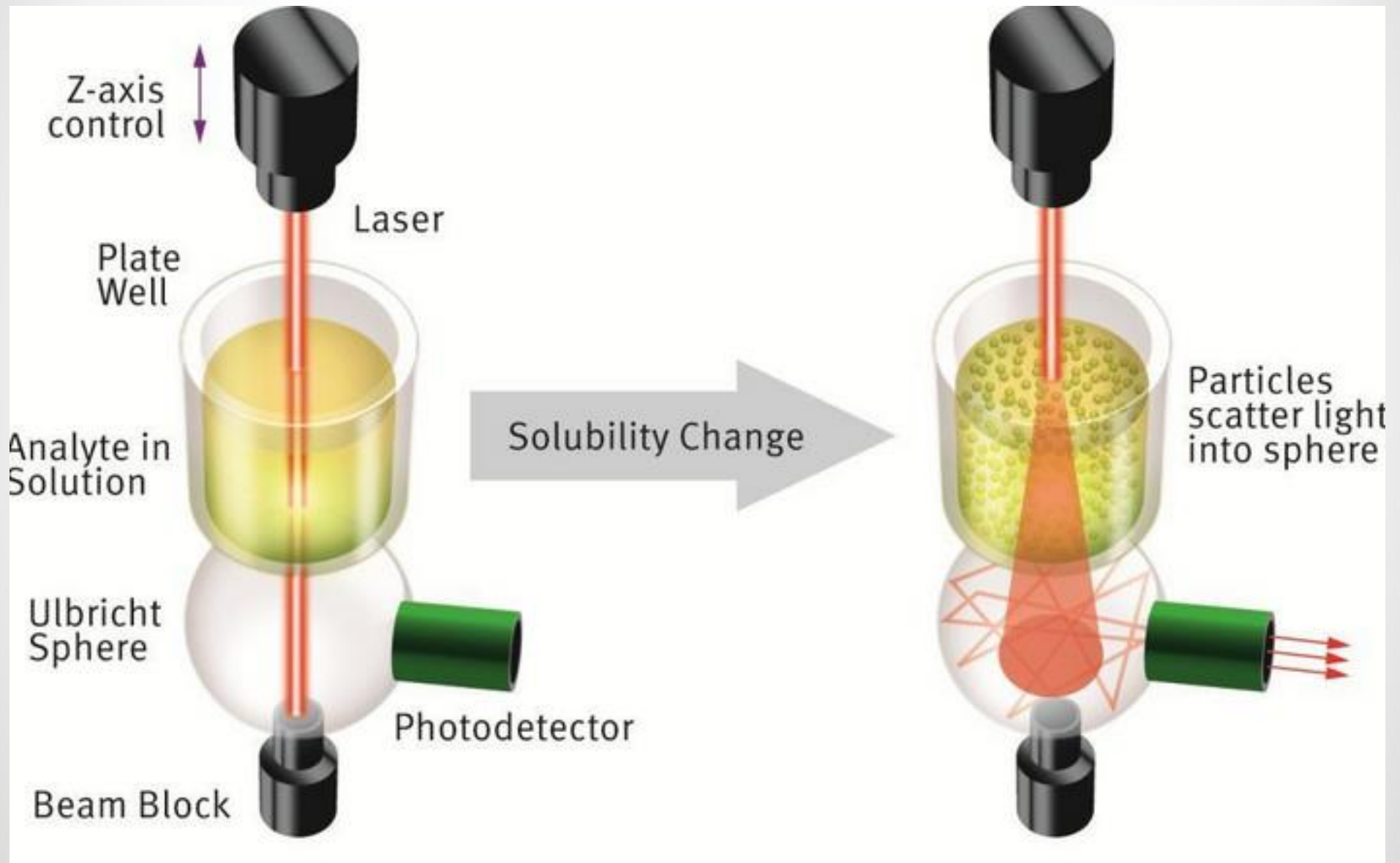
Θολωσιμετρία- Νεφελομετρία

❖ Μη-ιχνηθετημένοι ανοσοπροσδιορισμοί



- ❑ Βασίζονται στο σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων και την επακόλουθη θολερότητα του δείγματος
- ❑ Η θολερότητα προκαλεί μείωση της έντασης της προσπίπτουσας δέσμης ακτινοβολίας καθώς αυτή περνά διαμέσου ενός διαλύματος σωματιδίων.
- ❑ Μέτρηση αυτής της μείωσης στην ένταση της προσπίπτουσας δέσμης ακτινοβολίας που προκαλείται από τη σκέδαση, ανάκλαση και απορρόφηση της ακτινοβολίας
- ❑ Θολωσιμετρία: Η θολερότητα μετράται **υπό γωνία 180°** ως προς την προσπίπτουσα δέσμη ακτινοβολίας.
- ❑ Νεφελομετρία: Η θολερότητα μετράται **υπό γωνία 90°** ως προς την προσπίπτουσα δέσμη ακτινοβολίας.

Θολωσιμετρία- Νεφελομετρία



Θολωσίμετρο



Νεφελόμετρο



ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

- ❖ Στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς γίνεται μέτρηση του σήματος που παράγεται μετά από την ανοσοχημική αντίδραση μιας πρωτεΐνης με ένα ειδικό αντίσωμα και την δημιουργία ενός ανοσοσυμπλόκου, από έναν ειδικό ανιχνευτή

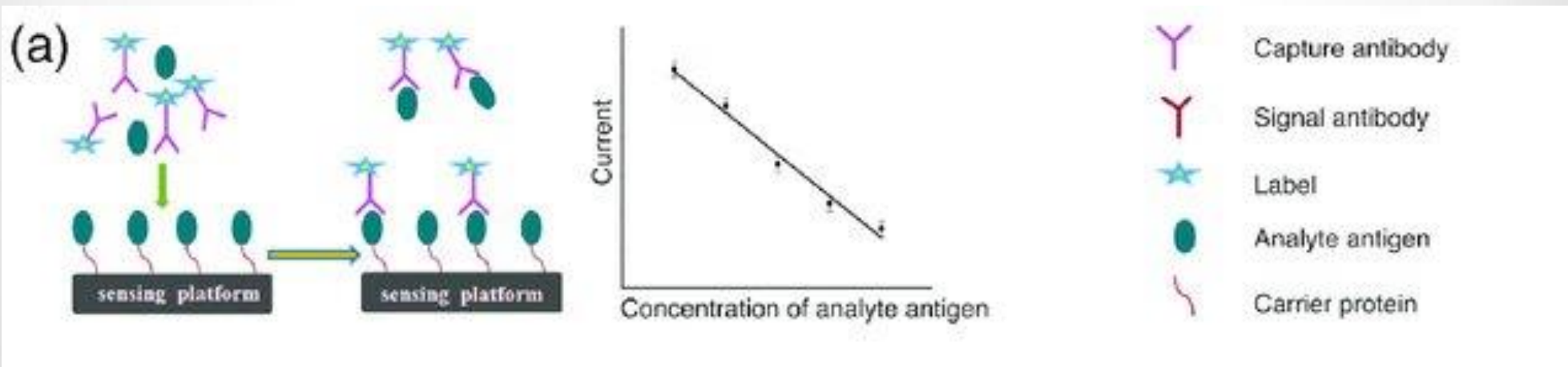
❖ **ΙΧΝΗΘΕΤΗΜΕΝΟΙ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ (labelled immunoassays)**

1. με τον αριθμό των αντισωμάτων που συμμετέχουν στις ανοσοχημικές αντιδράσεις σε
 - **Ανταγωνιστικές**
 - **μη ανταγωνιστικές**
2. ανάλογα με το αν γίνεται διαχωρισμός των ανοσοσυμπλόκων που σχηματίζονται κατά την δοκιμασία από τα ελεύθερα αντιδρώντα του διαλύματος σε
 - **Ομογενείς**
 - **Ετερογενείς**
3. με το είδος του σήματος που μετριέται σε αυτές,
 - **ραδιοανοσολογικές τεχνικές και οι μη ισοτοπικές**
 - **τεχνικές Χημειοφωταύγειας**
 - **ανοσοενζυμικές μέθοδοι**

1. ΤΥΠΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

□ Ανταγωνιστικού τύπου (competitive immunoassays)

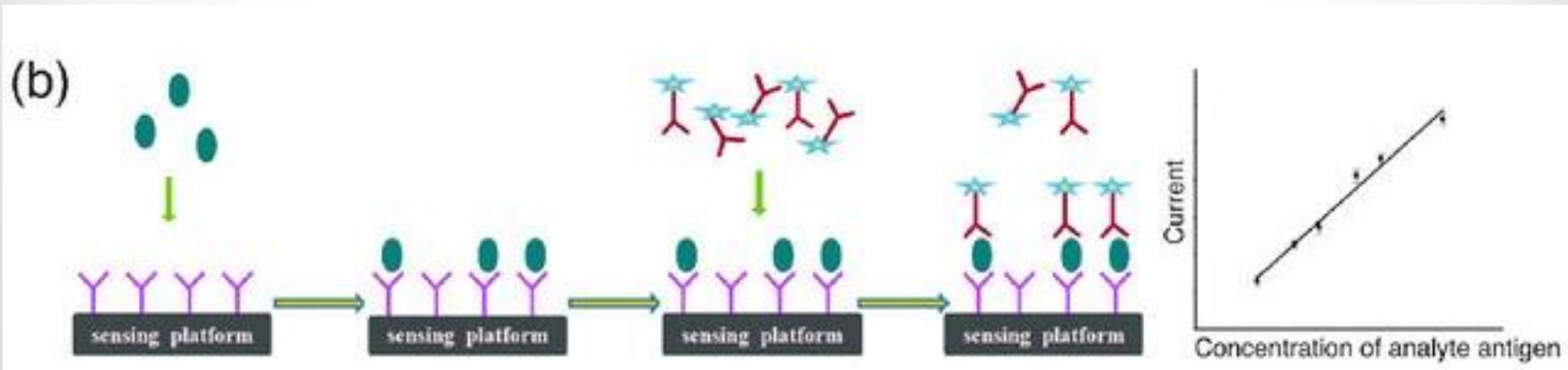
- Το αντιγόνο και το επισημασμένο αντιγόνο (το οποίο έχει προστεθεί εξωγενώς στο μίγμα της αντίδρασης) ανταγωνίζονται για την κάλυψη περιορισμένων θέσεων
- Προϋπόθεση ότι διατηρούνται σταθερές οι συγκεντρώσεις Ag^* και Ab -αύξηση συγκέντρωσης του Ag συνοδεύεται από μείωση της συγκέντρωσης του συμπλόκου μεταξύ επισημασμένου Ag^* και Ab



1. ΤΥΠΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

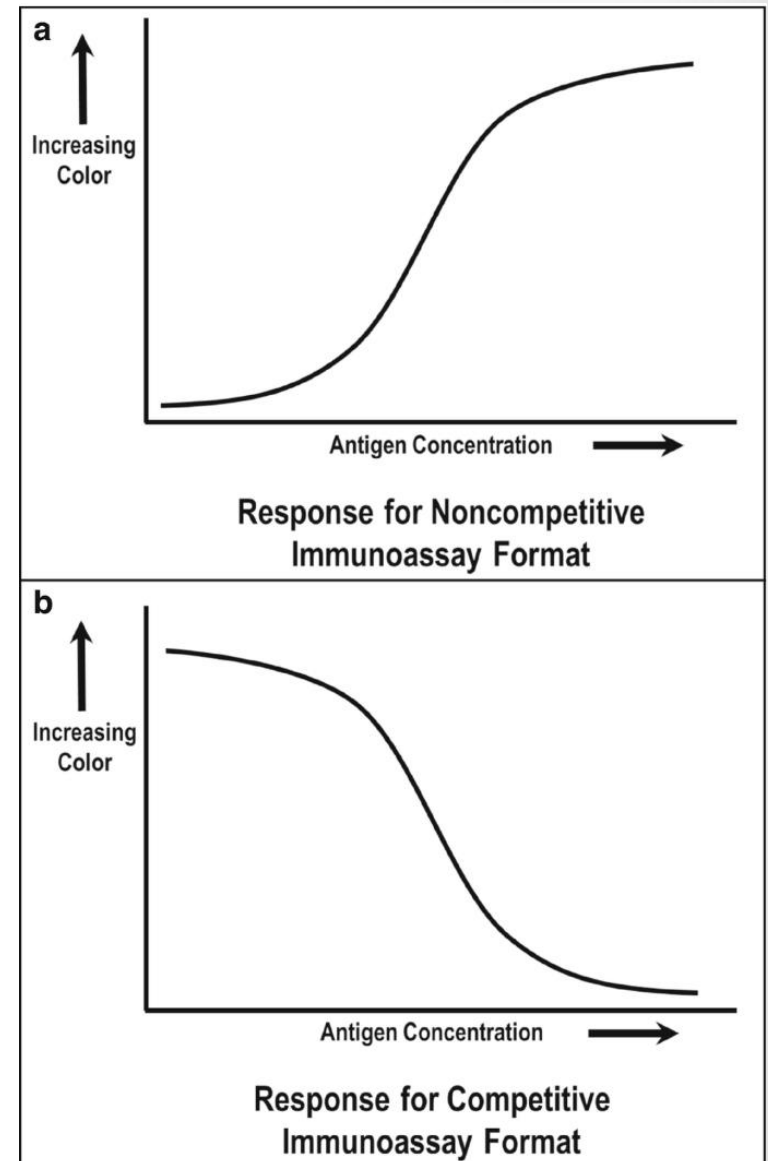
□ Μη Ανταγωνιστικού τύπου (non-competitive immunoassays)-τυπου sandwich

- Βασίζονται στην ποσοτική δέσμευση της προσδιοριζόμενης ουσίας Ag από αντίσωμα Ab_1 που βρίσκεται σε περίσσεια ως προς αυτή. Το σύμπλεγμα $AgAb_1$ προσδένεται στη συνέχεια με επισημασμένο αντίσωμα Ab_2 το οποίο αναγνωρίζει διαφορετικό επίτοπο της προσδιοριζόμενης ουσίας από αυτόν που αναγνωρίζει το Ab_1 .
- Προϋπόθεση: η ύπαρξη απομακρυσμένων μεταξύ τους επιτόπων



ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΩΝ – ΜΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

- ❖ Οι μη ανταγωνιστικές μέθοδοι γενικά χρησιμοποιούνται για αντιγόνα μεγαλύτερου μοριακού βάρους σε σχέση με αυτά που μπορούν να προσδιοριστούν με τις ανταγωνιστικές μεθόδους, με τις οποίες εξάλλου μπορούν να προσδιοριστούν ακόμα και απτένια.
- ❖ Σαν τεχνικές, οι μη ανταγωνιστικές μέθοδοι, είναι πολύ γρηγορότερες ενώ οι ανταγωνιστικές είναι αργές αφού απαιτούν μεγάλους χρόνους επώασης για την επίτευξη ισορροπίας
- ❖ Οι μη ανταγωνιστικές μέθοδοι έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία κάτι που οφείλεται στο γεγονός ότι η καμπύλη αναφοράς τους είναι ευθεία, σε σχέση με τις ανταγωνιστικές δεν είναι ευθεία αλλά σιγμοειδής
- ❖ Οι μη ανταγωνιστικές τεχνικές είναι κατάλληλες για αντιγόνα με πολλούς επιτόπους ενώ οι ανταγωνιστικές για αντιγόνα με έναν επίτοπο



2. ΕΙΔΟΣ ΙΧΝΗΘΕΤΗ

❖ Σε όλους τους ιχνηθετημένους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς είναι απαραίτητο μετά το πέρας των αντιδράσεων να προσδιοριστεί η κατανομή του επισημασμένου αντιγόνου ή αντισώματος (ιχνηθέτη) μεταξύ της ελεύθερης και της δεσμευμένης μορφής του

□ **Ετερογενείς ανοσοπροσδιορισμοί (heterogenous immunoassays)**

Όταν απαιτείται διαχωρισμός των επισημασμένων ανοσοσυμπλεγμάτων από την ελεύθερη μορφή του ιχνηθέτη

□ **Ομογενείς ανοσοπροσδιορισμοί (homogenous immunoassays)**

Όταν το σήμα παράγεται από τα ανοσοσυμπλέγματα διαφέρει από το σήμα που παρέχουν τα ελευθερα μόρια του ιχνηθέτη τότε η μέτρηση του ελεύθερου ιχνηθέτη γίνεται παρουσία του δεσεμυμένου

ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΩΝ-ΟΜΟΓΕΝΩΝ

ΟΜΟΓΕΝΕΙΣ	ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ
<ul style="list-style-type: none">✓ Εύκολη διαδικασία✓ Εύκολη αυτοματοποίηση✓ Robust διαδικασία <p>! Περιορισμένη δυναμική περιοχή ! Περιορισμένη εφαρμογή ! Ευαίσθητες σε matrix effect</p>	<p>! Πολυπλοκότερη διαδικασία ! Δύσκολη αυτοματοποίηση</p> <ul style="list-style-type: none">✓ Ευρεία δυναμική περιοχή✓ Γενική εφαρμογή✓ Μικρότερη ευαισθησία σε matrix effect

- Οι ομογενείς ανοσοδοκιμασίες είναι γρήγορες, εύκολες στην εκτέλεση, μπορούν εύκολα να αυτοματοποιηθούν, αφού η μέτρηση των ανοσοσυμπλόκων γίνεται χωρίς την απομάκρυνσή τους από τα ελεύθερα μόρια και είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν χημικοί αναλυτές που είναι πολύ διαδεδομένοι. Λόγω της απουσίας του σταδίου του διαχωρισμού οι δοκιμασίες αυτές είναι εκτεθειμένες σε ουσίες του δείγματος που μπορεί να προκαλέσουν παρεμπόδιση στην μέθοδο
- Οι ετερογενείς ανοσοδοκιμασίες μπορούν να μετρήσουν μεγάλα και μικρά μόρια, είναι κατάλληλες για ανάλυση μεγάλων δειγμάτων, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της ανάλυσης. Το πρόσθετο βήμα διαχωρισμού είναι πιο χρονοβόρο, με αποτέλεσμα ο προσδιορισμός να είναι πιο πολύπλοκος και πιθανόν λιγότερο ακριβής

3. ΕΙΔΟΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΙΧΝΗΘΕΤΗ

□ ΙΣΟΤΟΠΙΚΟΙ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Ράδιοανασσοπροσδιορισμοί (radioimmunoassay, RIA)
- Άνοσοραδιομετρικοί προσδιορισμοί (immunoradiometric assay, IRMA)

□ ΜΗ ΙΣΟΤΟΠΙΚΟΙ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Χρησιμοποιούν ως ιχνηθέτες ένζυμα σε συνδυασμό με χρωμογόνα ή φθορισμογόνα υποστρώματα, φθορίζοντα μόρια ή άτομα και χημειοφωταύγη μόρια

▪ ανοσοενζυμικές μέθοδοι

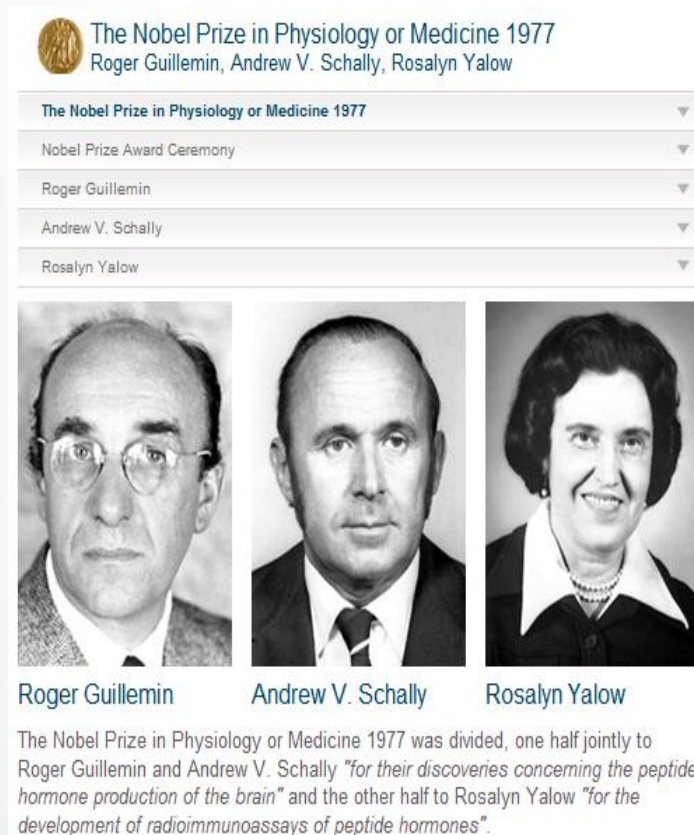
Όταν ο ιχνηθέτης είναι ένζυμο - συνήθως Αλκαλική φωσφατάση (ALP) ή HRP (Horseradish peroxidase)

▪ ανοσοφθορισμομετρικές μέθοδοι

Όταν ο ιχνηθέτης είναι φθορίζουσα ουσία

Ραδιοανοσοπροσδιορισμοί (Radioimmunoassays, RIA)

- Οι ραδιοανοσολογικές μέθοδοι (RIA, IRMA) αποτελούν την παλαιότερη ανοσοχημική μέθοδο (Yellow & Berson, 1959). ΒΡΑΒΕΙΟ NOBEL 1977
- "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man".
J. Clin. Invest. 39 (7): 1157-75



Προσδιορισμός ινσουλίνης
στο πλάσμα με τη βοήθεια
Ab και ινσουλίνης
επισημασμένης με ^{131}I

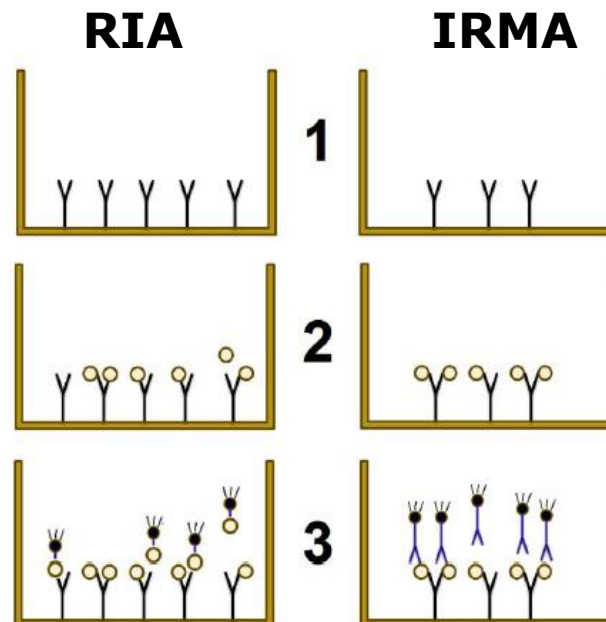
ΡΑΔΙΟΙΧΝΗΘΕΤΕΣ

Ισοτοπικοί Ιχνηθέτες		
Ισότοπο	Χρόνος ημιζωής	Ενέργεια
^{125}I	60,2 ημέρες	20 - 80 keV, γ-ακτινοβολία
^{32}S	87,9 ημέρες	167 keV, β-σωματίδια
^{14}C	5760 έτη	158 keV, β-σωματίδια
^3H	12,3 έτη	18 keV, β-σωματίδια

- Για την εφαρμογή τους έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί διάφορα ραδιοισότοπα, αλλά σήμερα αυτό που χρησιμοποιείται ευρέως είναι το ^{125}I .
- Το ^{125}I έχει χρόνο ημίσειας ζωής 60 ημέρες, δηλαδή μέσα σε 60 ημέρες η ραδιενέργεια που εκπέμπει μειώνεται στο 50%.
- Αυτός ο χρόνος είναι ικανοποιητικός για διαγνωστική χρήση.

Ραδιοανοσολογικές μέθοδοι (RIA, IRMA)

- Υπάρχουν Ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου προσδιορισμοί
- Τα τρία βασικά στάδια στις ραδιοανοσολογικές μεθόδους.
- Αριστερά φαίνεται η ανταγωνιστική μέθοδος (RIA, Radioimmunoassays), όπου το θερμό αντιγόνο (αυτό που φέρει το ραδιοϊσότοπο ^{125}I) ανταγωνίζεται το αντιγόνο του ασθενούς.
- Δεξιά φαίνεται η μη ανταγωνιστική μέθοδος (IRMA, Immunoradiometric assays), όπου το ραδιοϊσότοπο είναι ενωμένο με αντίσωμα το οποίο ενώνεται με το ακινητοποιημένο αντίγονο του ασθενούς από δεύτερο αντίσωμα.



Ραδιοανοσολογικές μέθοδοι (RIA, IRMA)

❖ **RIA**

❖ **IRMA**

I-¹²⁵ labeled **ANTIGEN**

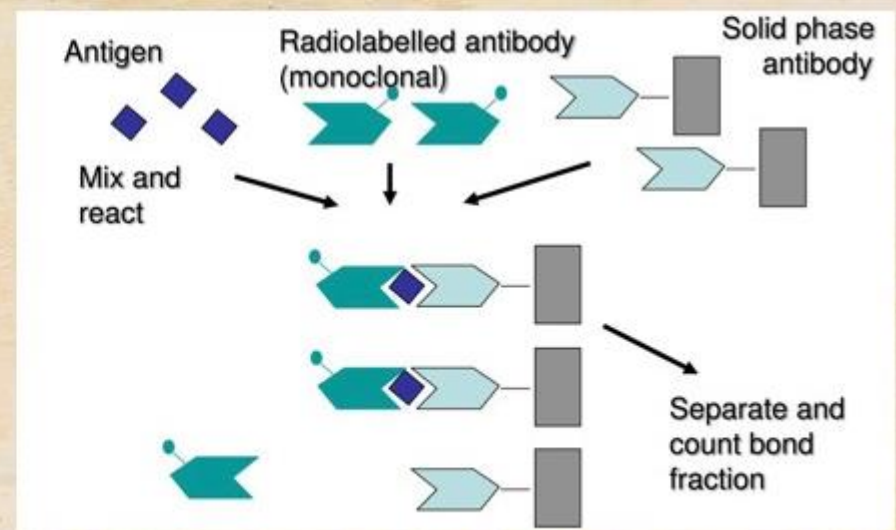
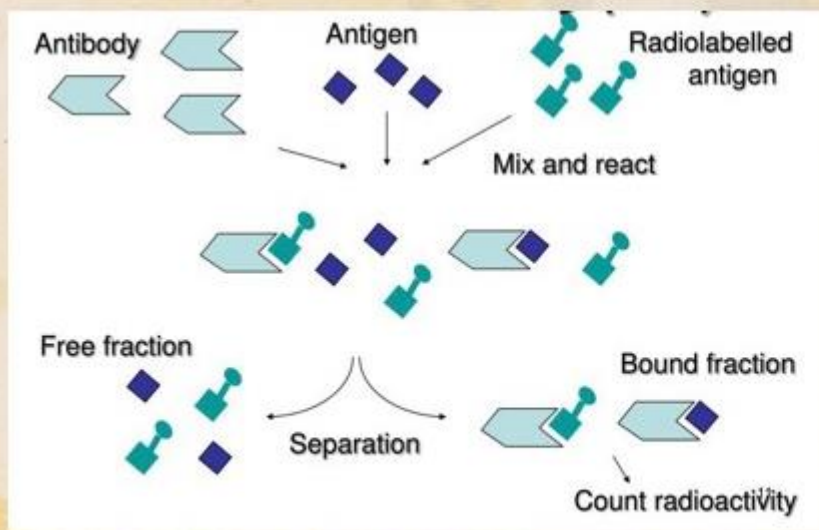
I-¹²⁵ labeled **ANTIBODY**

COMPETITIVE and heterogenous

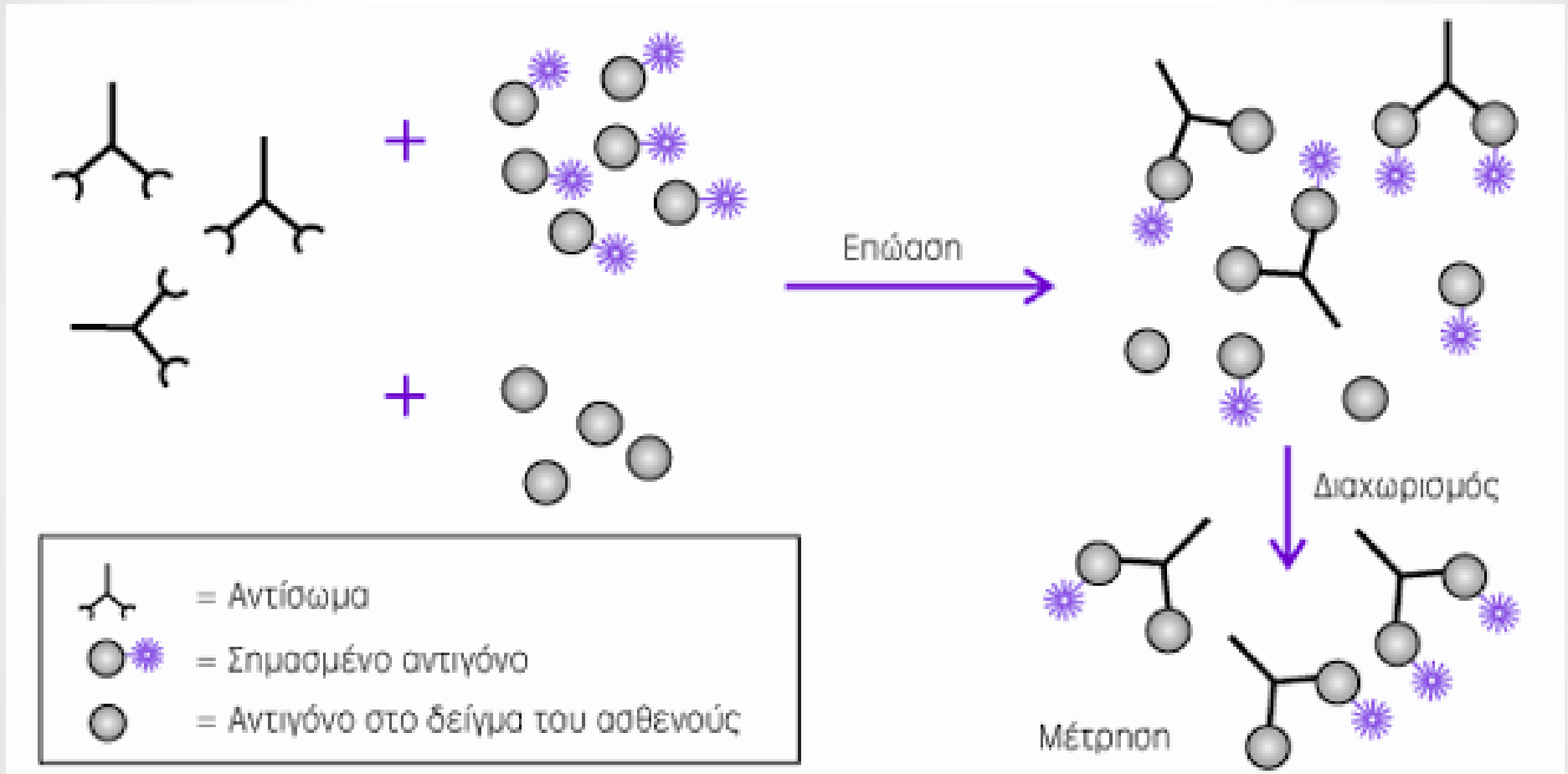
NON-COMPETITIVE and heterogenous

First developed, "**GOLD STANDARD**"

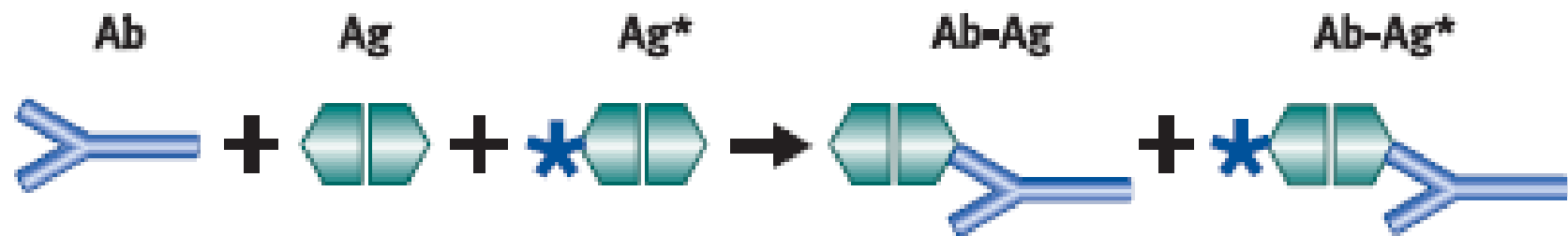
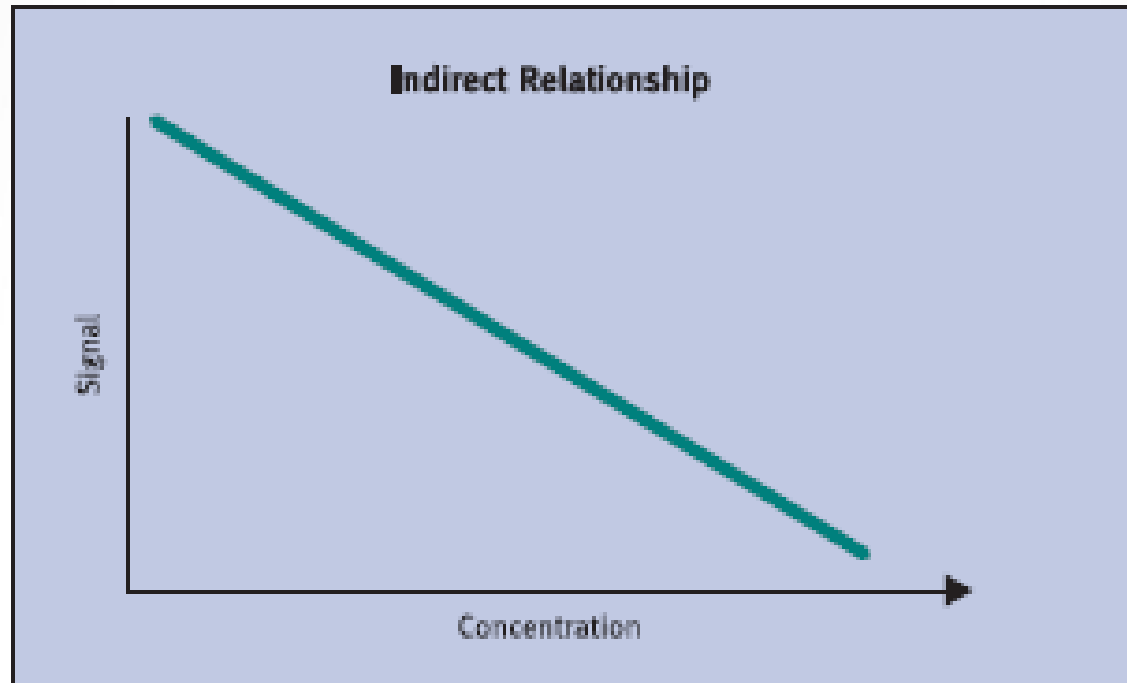
HIGHER sensitivity and specificity
Wider working range



ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ RIA



Χαρακτηριστική καμπύλη αναφοράς RIA



Ραδιοανοσοπροσδιορισμοί (Radioimmunoassays, RIA)

Η επιτυχία των RIA οφείλεται:

- Εξαιρετική ευαισθησία
- Εξαιρετική ειδικότητα
- Ευκολία στην εκτέλεση
- Δυνατότητα εφαρμογής προσδιορισμού σε τεράστια ποικιλία ουσιών όπως ορμονών, φαρμάκων, ενζύμων, κ.ά.

ΑΝΟΣΟΡΑΔΙΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ (Immunoradiometric assays, IRMA)

- Miles & Hales (1968)
- Μη-ανταγωνιστικού τύπου
- Το αντίσωμα βρίσκεται σε περίσσεια και μεταφέρει τον ιχνηθέτη-ισότοπο
- Η ποσότητα του ιχνηθετημένου αντισώματος είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης της προς προσδιορισμό ουσίας

Κύρια πλεονεκτήματα έναντι των RIA:

α) καλύτερη ευαισθησία

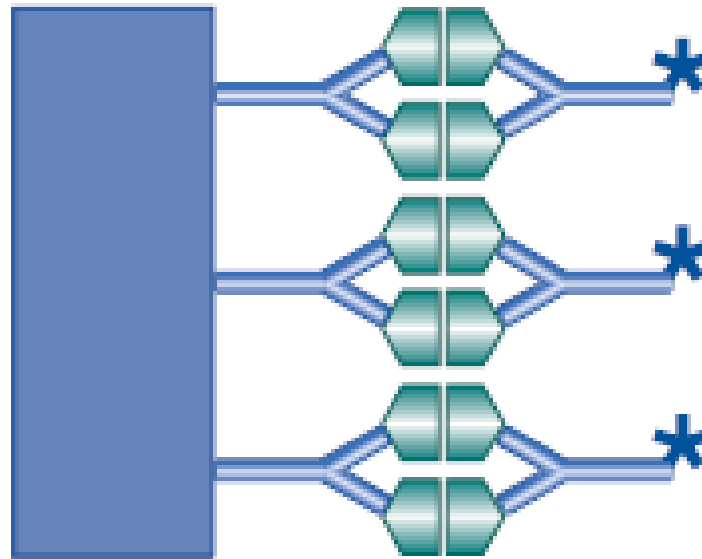
β) Ταχύτερες αντιδράσεις (υψηλότερη συγκέντρωση αντισώματος)

γ) καλύτερη αξιοποίηση των μονοκλωνικών αντισωμάτων

ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΙΡΜΑ ΤΥΠΟΥ Sandwich

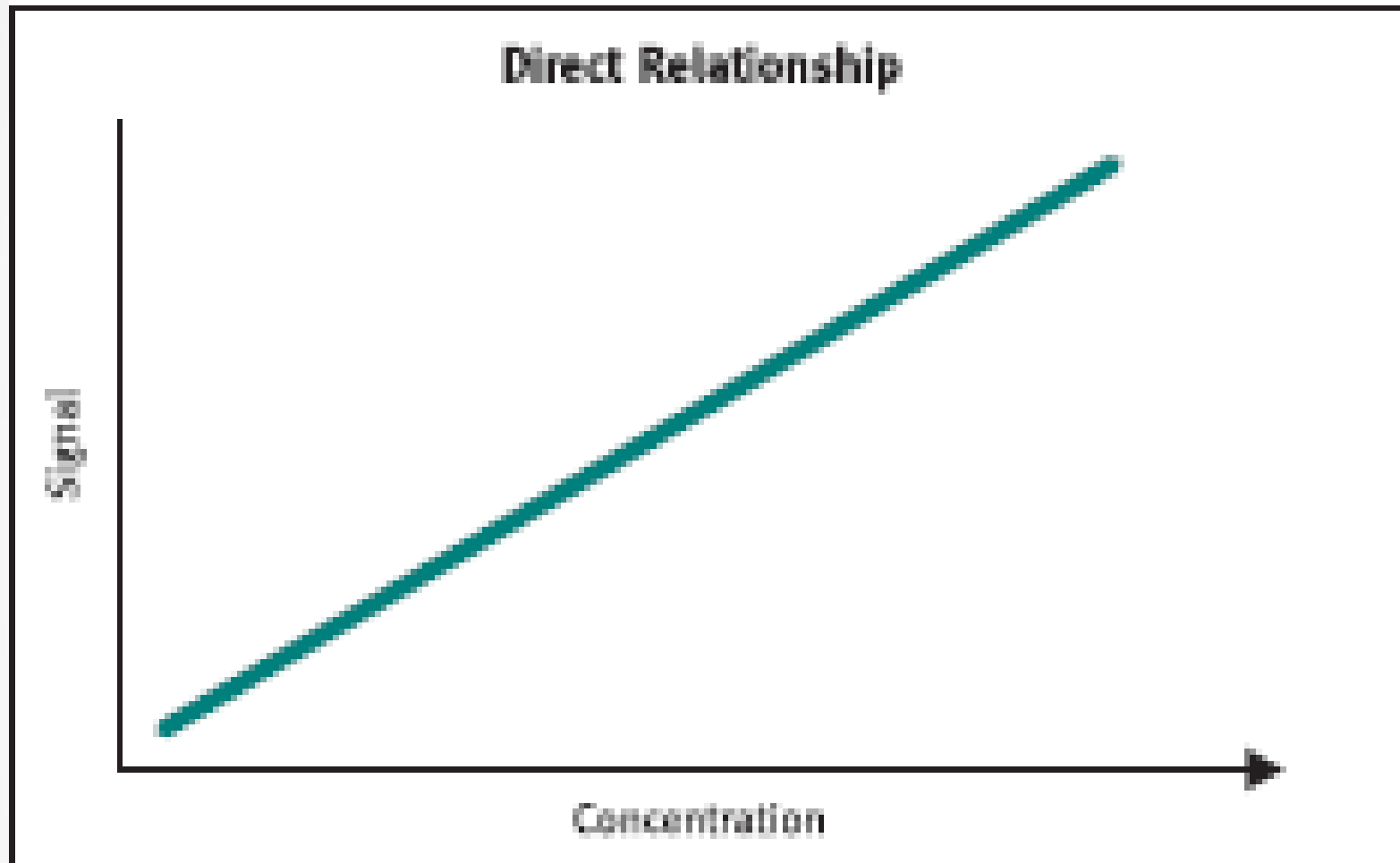
Sandwich Assays: Antibodies bind to two sites on analyte

Solid support:
microparticles
beads
microtiter plates



*Απαραίτητη προϋπόθεση η ύπαρξη στο μόριο δύο
απομακρυσμένων επιτόπων*

Χαρακτηριστική καμπύλη αναφοράς IRMA



ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ (enzyme immunoassays, ΕΙΑ)

Ιστορική αναδρομή

•Avrameas & Uriel, 1966, Ινστιτούτο Pasteur Avrameas S, Guilbert B. A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. Eur J Immunol 1971;1:394-396

•Nakane & Pierce, 1966, USA : Σήμανση αντισωμάτων με υπεροξειδάση για ανίχνευση ανοσοσυμπλεγμάτων και κυτταρικών συστατικών

•Στις ανοσοενζυμικές μεθόδους ο ιχνηθέτης είναι ένζυμο. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι τα HRP, ALP και β-GAL και τα υποστρώματα τους μπορεί να είναι χρωμογόνα ή φθορισμογόνα.

•Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι μπορεί να είναι ανταγωνιστικές και μη ανταγωνιστικές, ομογενείς ή ετερογενείς.

ΚΥΡΙΟΤΕΡΟΙ ΜΗ ΙΣΟΤΟΠΙΚΟΙ ΙΧΝΗΘΕΤΕΣ

Ένζυμο	Είδος ενζύμου	Χρωμογόνα υποστρώματα	Συντόμευση	Μήκος κύματος (nm)	
Υπεροξειδάση (HRP)	Οξειδάση	2,2-άζινο δις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ	ABTS	415	
		3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη	TMB	450	
		Ορθο-φαινυλενοδιαμίνη	OPD	492	
		Φθορίζοντα υποστρώματα			Συντόμευση
		π-υδροξυφαινυλοξικό οξύ			HPAA
		3-(π-υδροξυφαινυλο) προπιονικό οξύ			HPPA
Αλκαλική φωσφατάση (ALP)	Υδρολάση	Χρωμογόνα υποστρώματα	Συντόμευση	Μήκος κύματος	
		π-φωσφορική νιτροφαινόλη	pNPP	405	
		Φθορίζοντα υποστρώματα			Συντόμευση
		4-μεθυλο φωσφορική ουμπελιφερόνη			MUP
β-γαλακτοσιδάση (β-GAL)	Υδρολάση	Χρωμογόνα υποστρώματα	Συντόμευση	Μήκος κύματος	
		ο-νιτροφαινυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη	oNPG	420	
		Ερυθρό χλωροφαινόλης-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης	CPRG	571	
		Φθορίζοντα υποστρώματα			Συντόμευση
		4-μεθλουμπελιφερολ-β-D γαλακτοπυρανοσίδη			MUG

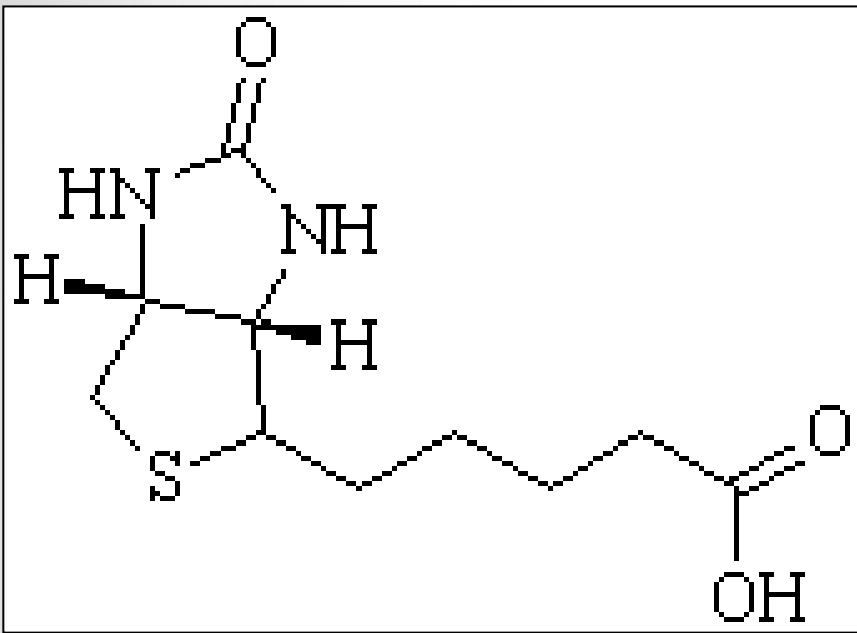
ΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΝΖΥΜΟΥ-ΙΧΝΗΘΕΤΗ

- Υψηλή ειδική ενεργότητα (specific activity)
- Μεγάλη σταθερότητα σε συνθήκες φύλαξης αλλά και ανάλυσης
- Διαθέσιμο καθαρό ένζυμο σε χαμηλό κόστος και αναπαραγωγίμη ποιότητα
- Φθηνά και σταθερά μη-τοξικά υποστρώματα ικανά να σχηματίζουν σταθερά και ανιχνεύσιμα προϊόντα
- απουσία ενδογενούς ενζύμου στο μίγμα της αντίδρασης
- Χαμηλή τιμή K_m για το υπόστρωμα

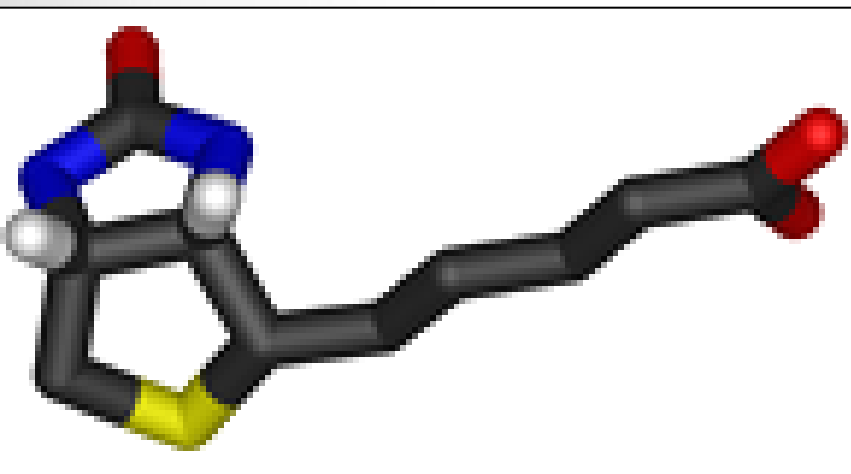
Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης

- Η σύνδεση των αντισωμάτων-αντιγόνων με ένα σταθερό υπόστρωμα προκειμένου να ακινητοποιηθούν, πρέπει να γίνεται έτσι ώστε να μην καταστραφεί η λειτουργικότητα του αντισώματος.
- Στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς για την ακινητοποίηση χρησιμοποιούνται συνήθως πλαστικοί φορείς (πολυστρυρένιο ή μικροπλάκες τιτλοδότησης, σωλήνες κτλ.) ακόμα και μαγνητικά σωματίδια.
- Η σύνδεση μπορεί να γίνει απευθείας ομοιοπολικά μέσω χημικής αντίδρασης ή μέσω διαμοριακής σύνδεσης (cross linking) ή μέσω προσρόφησης .
- Η πρόσδεση μπορεί να γίνει μέσω συστημάτων όπως αβιδίνης-βιοτίνης , πρωτεΐνης A,G .
- Με την ακινητοποίηση ελαττώνονται τα στάδια της ανάλυσης ,αφού δεν χρειάζεται φυγοκέντρηση για να γίνει διαχωρισμός, οπότε μπορεί αυτή η μέθοδος να χρησιμοποιηθεί για οποιοδήποτε αντιγόνο-αντίσωμα καθώς και να αυτοματοποιηθεί.
- Η ακινητοποίηση όμως επηρεάζει την ταχύτητα και την ικανότητα με την οποία μπορεί να συνδεθεί το αντίσωμα με το αντιγόνο

Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης



- Η **βιοτίνη** είναι μία μικρή πρωτεΐνη (ΜΒ = 244 D) που ανήκει στη κατηγορία των βιταμινών (βιταμίνες Η, Β7).
- Βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές μεταβολικές διαδικασίες.
- Η βιοτίνη μπορεί να ενωθεί με πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων ένζυμα και αντισώματα, δημιουργώντας μεταξύ τους μία γέφυρα ανάμεσα στο ένζυμο και το αντίσωμα. Για να επιτελέσει τον ρόλο της χρειάζεται ένα ακόμα ενδιάμεσο μόριο. Αυτό μπορεί να είναι είτε η αβιδίνη, είτε η στρεπταβιδίνη.



Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης

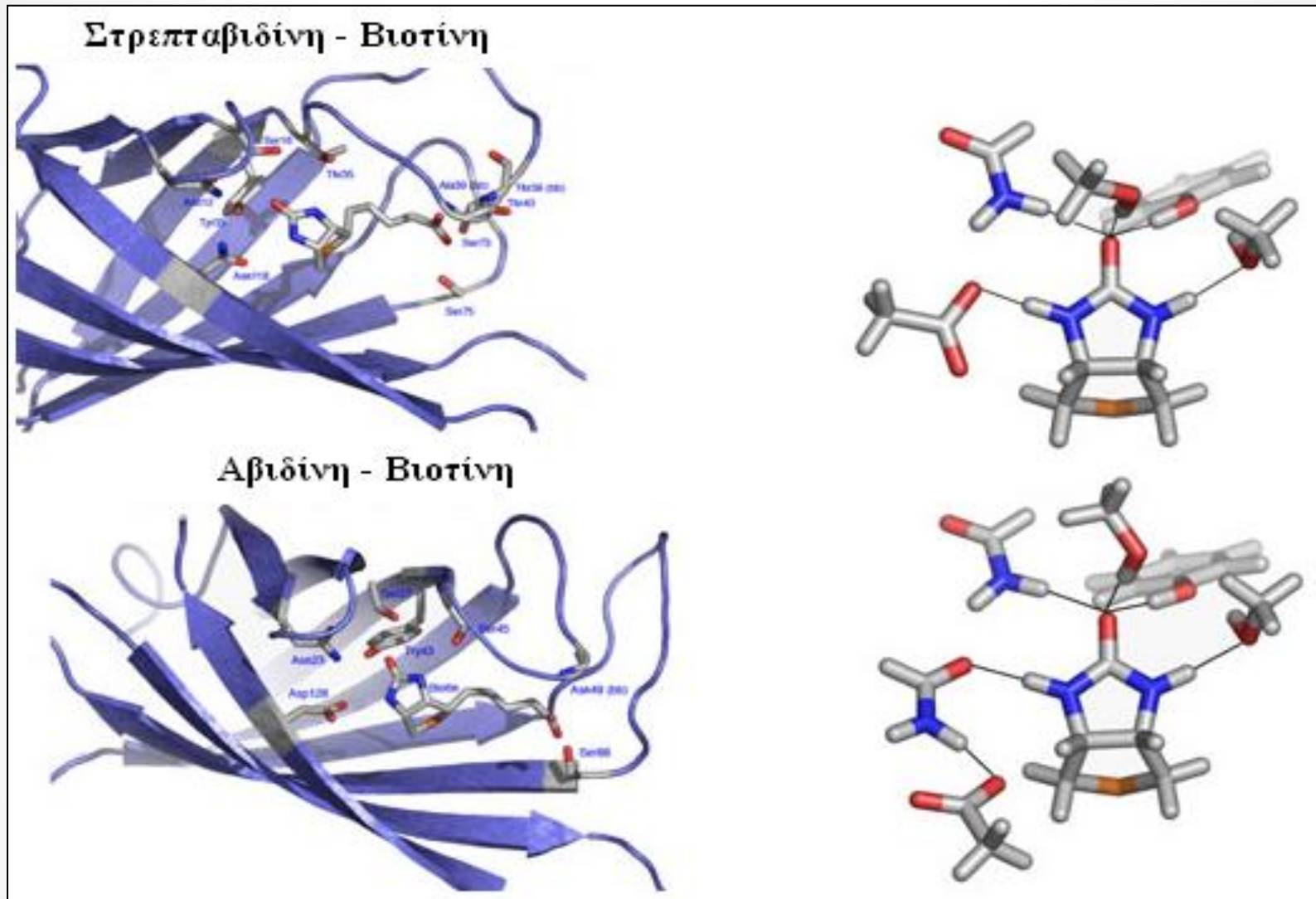
- Η **αβιδίνη** είναι ένα μόριο με 2 ενεργά κέντρα (MB περίπου 65000 D) με τα οποία μπορεί να αντιδράσει με τη βιοτίνη, αλλά και πολλές άλλες πρωτεΐνες με μη ειδικό τρόπο
- Βρίσκεται σε πολλά κύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές μεταβολικές διαδικασίες.
- Στην εργαστηριακή τεχνολογία χρησιμοποιείται για την ένωσή της με το μόριο της βιοτίνης, όχι όμως με τόσο ισχυρή χημική συγγένεια, όπως συμβαίνει με το μόριο της στρεπταβιδίνης.
- Πλεονεκτεί από τη στρεπταβιδίνη στο ότι παράγεται εύκολα από αυγά κότας.

Η **στρεπταβιδίνη** παρόμοια με την αβιδίνη είναι ένα τετραμερές μόριο μοριακού βάρους 60.000 D.

Σε αντίθεση με την αβιδίνη επιτυγχάνει ειδική σύνδεση με τη βιοτίνη λόγω της διαφορετικής αμινοξικής της ακολουθίας.

Η παραγωγή της όμως, είναι δυσκολότερη και μεγαλύτερου κόστους, αφού προέρχεται από τον *Streptomyces avidinii*.

Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης



- **Αναπαράσταση δομής συμπλόκων στρεπταβιδίνης-βιοτίνης και αβιδίνης βιοτίνης**

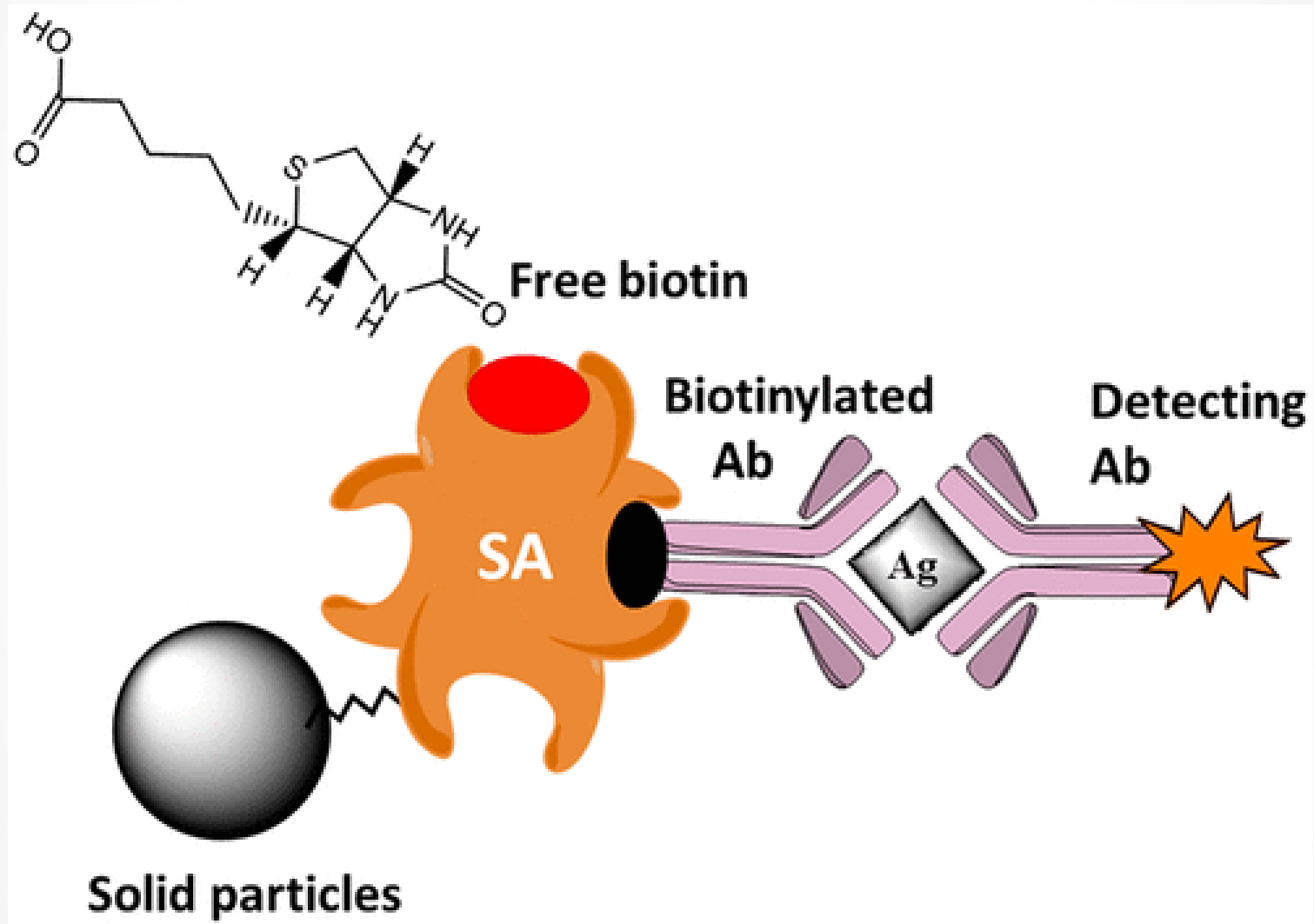
- **Αντίστοιχα μοντέλα θέσεων σύνδεσης.**

Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης

□ Ιδιότητες του συστήματος:

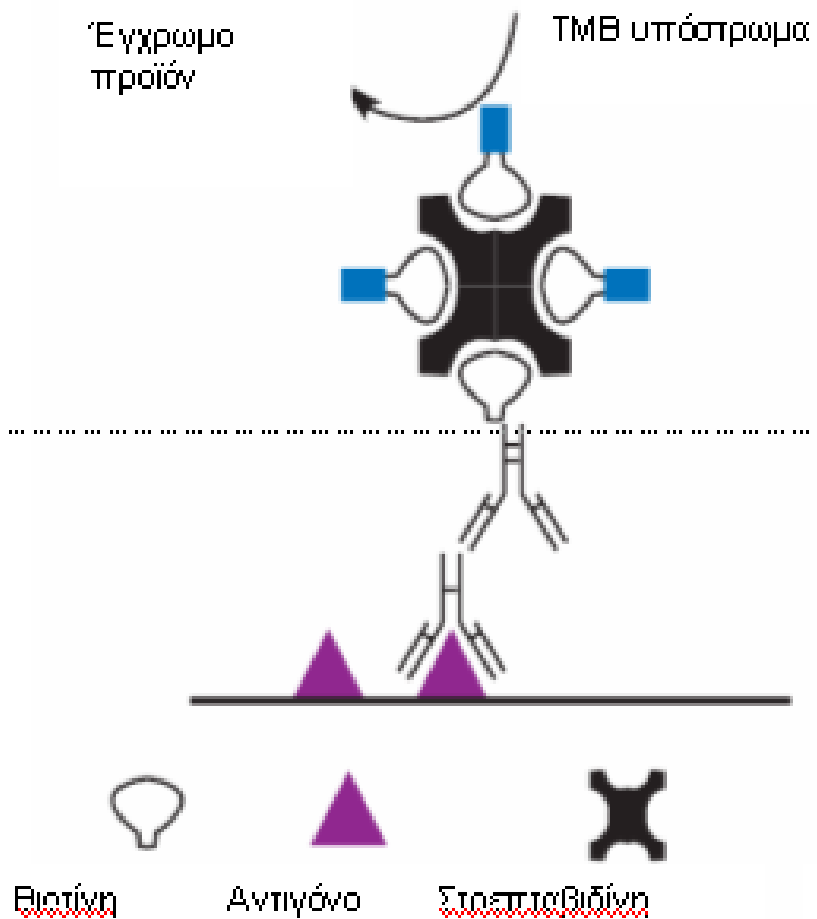
- Μη ομοιοπολική σύνδεση των δύο μορίων → τεράστια σταθερά σχηματισμού ($K = 10^{15}$ L/mol), διατήρηση του συμπλόκου χωρίς συνέπειες από την επίδραση που ασκούν αλλαγές στο pH, χαοτροπικοί παράγοντες, πολλαπλές εκπλύσεις κ.λπ.
- Ο δεσμός χαρακτηρίζεται από μεγάλη ειδικότητα.
- Στρεπταβιδίνη → 4 (αβιδίνη 2) θέσεις δέσμευσης βιοτίνης → πολλαπλή βιοτινυλίωση.
- Στρεπταβιδίνη: ιδιαίτερα ανθεκτική στις δραστικές συνθήκες που απαιτούνται για τη σύνδεσή της με μόρια μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους ή στερεές επιφάνειες.
- Δε χάνει την ενεργότητα σύζευξής της με βιοτίνη.

Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης

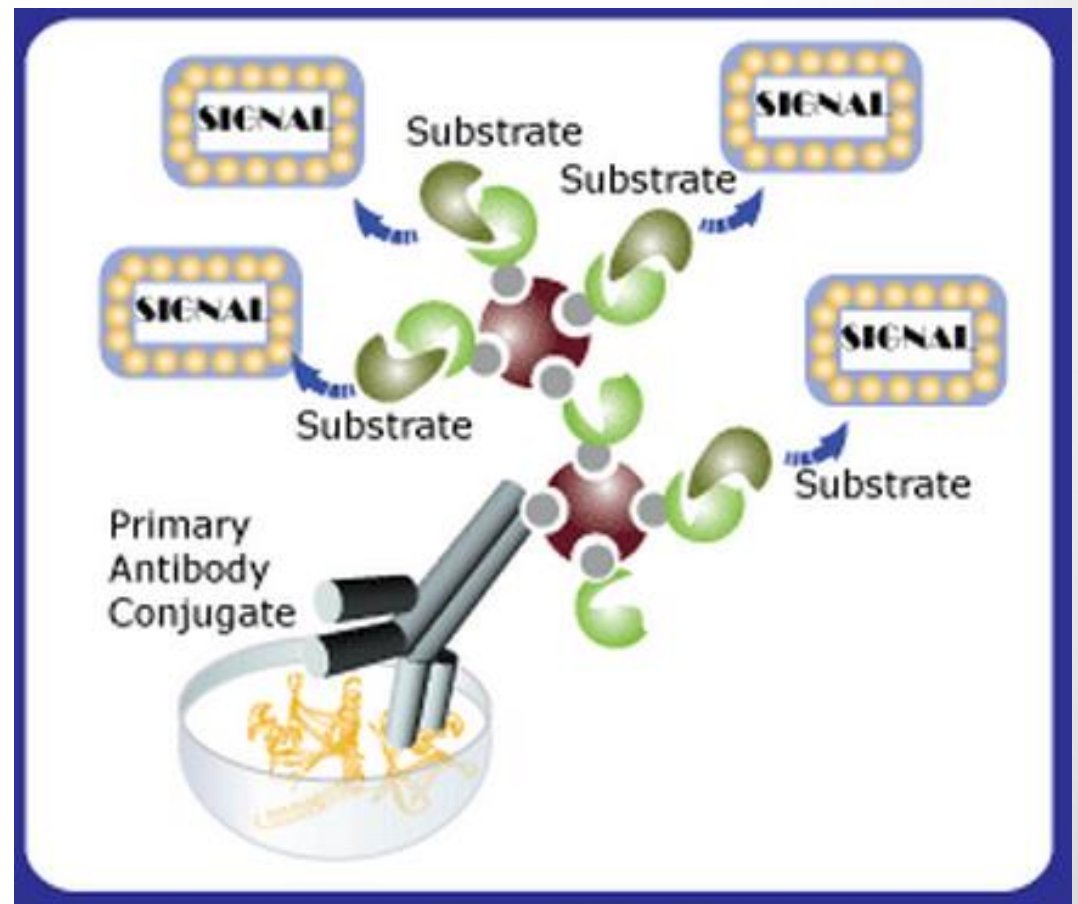


Σύστημα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης

(α) ELISA



- Ενίσχυση σήματος μέσω γέφυρας στρεπταβιδίνης-βιοτίνης



Προσδιορισμός Ανοσοπροσρόφησης Δεσμευμένου Ενζύμου (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

- Ο κυριότερος εκπρόσωπος των ανοσοχημικών τεχνικών
- χρησιμοποιείται ευρέως και σε διάφορες παραλλαγές.
- Τεχνική υψηλής ευαισθησίας, που συνδυάζει απλή οργανολογία, χαμηλό κόστος και χαμηλή επικινδυνότητα των ιχνηθετών.
- Ανίχνευση σε συγκεντρώσεις nano- και pico- molar (10^{-12} to 10^{-9} moles per liter)
- Στόχος: ανίχνευση πρωτεϊνών, πεπτιδίων, ορμονών, αντισωμάτων για διαγνωστικούς αλλά και ερευνητικούς σκοπούς

ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ELISA

Προσρόφηση των
αντιγόνων του
δείγματος

Coating

Antigen is adsorbed onto well in ELISA plate in coating buffer

Remove buffer and wash plate



Κάλυψη μη-ειδικών
θέσεων

Blocking

A buffer containing unrelated protein is used to block free sites in the wells

Remove buffer and wash plate



Αναγνώριση/
σύνδεση Ag-
σημασμένου Ab

Detection

Enzyme conjugated detection antibody binds antigen

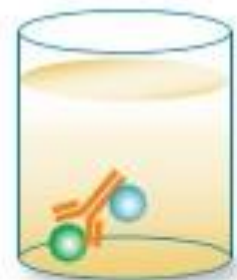
Remove buffer and wash plate



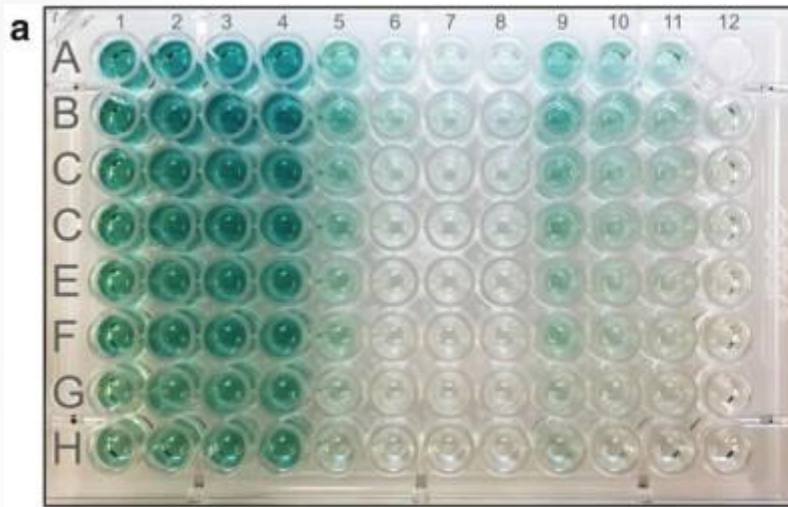
Ενζυμική αντίδραση
και μέτρηση σήματος

Readout

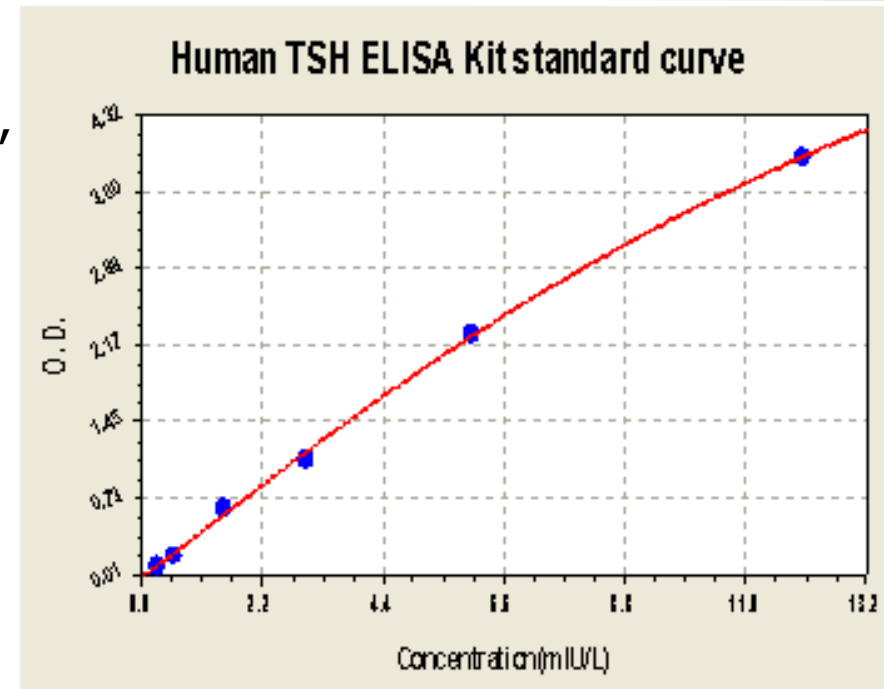
Substrate is catalyzed by enzyme to generate colored readout



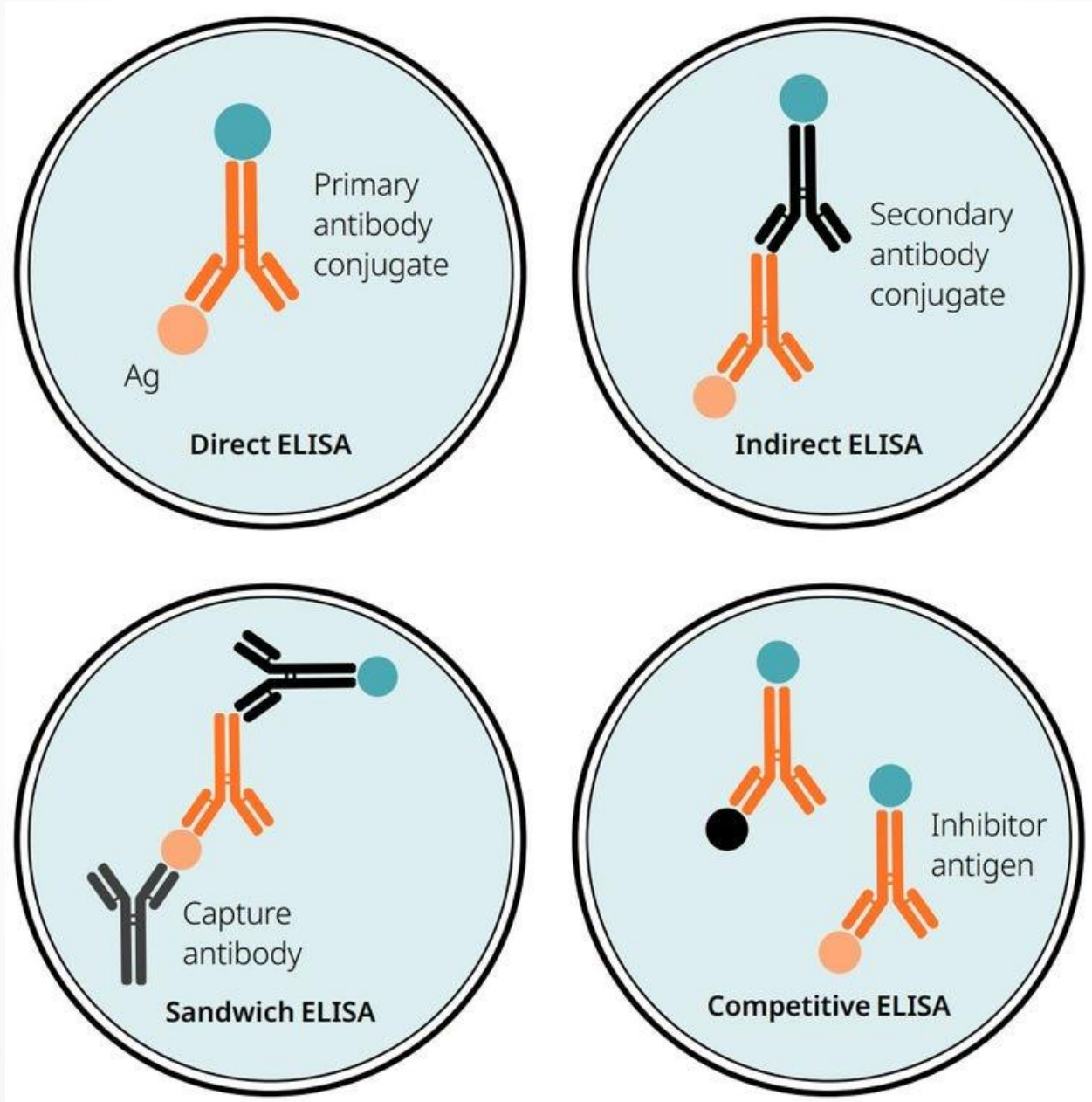
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ELISA



- ❖ Η μέτρηση της έντασης του χρώματος ή του φθορισμού γίνεται σε ειδικά φωτόμετρα,
- ❖ δίνει πληροφορίες για τον αριθμό των σημασμένων συμπλόκων και κατ' επέκταση, για την ποσότητα του αντιγόνου που θέλουμε να ανιχνεύσουμε στο άγνωστο δείγμα
- ❖ Η ποσοτικοποίηση γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης του αντιγόνου που θέλουμε να ανιχνεύσουμε στο δείγμα
- ❖ αναλύονται ταυτόχρονα με τα άγνωστα δείγματα στην ίδια μικροπλάκα!

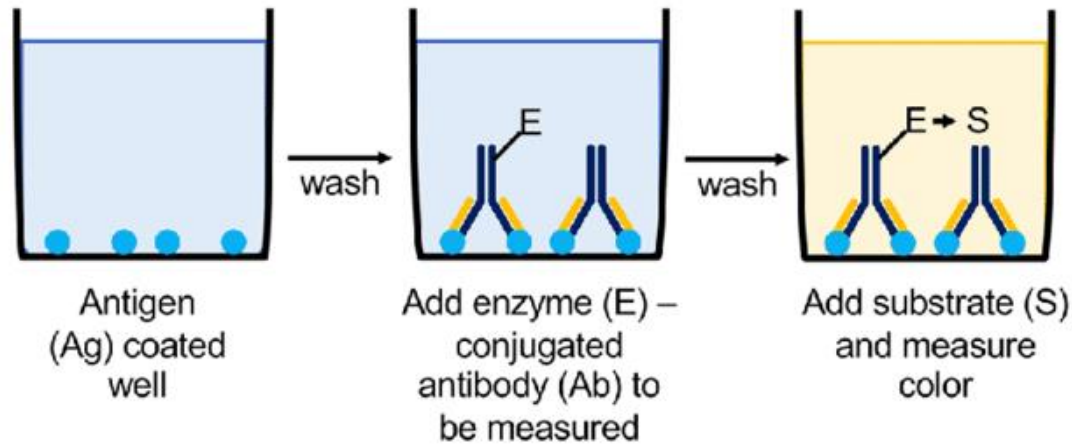


ΤΥΠΟΙ ELISA



AMEΣΗ-DIRECT ELISA

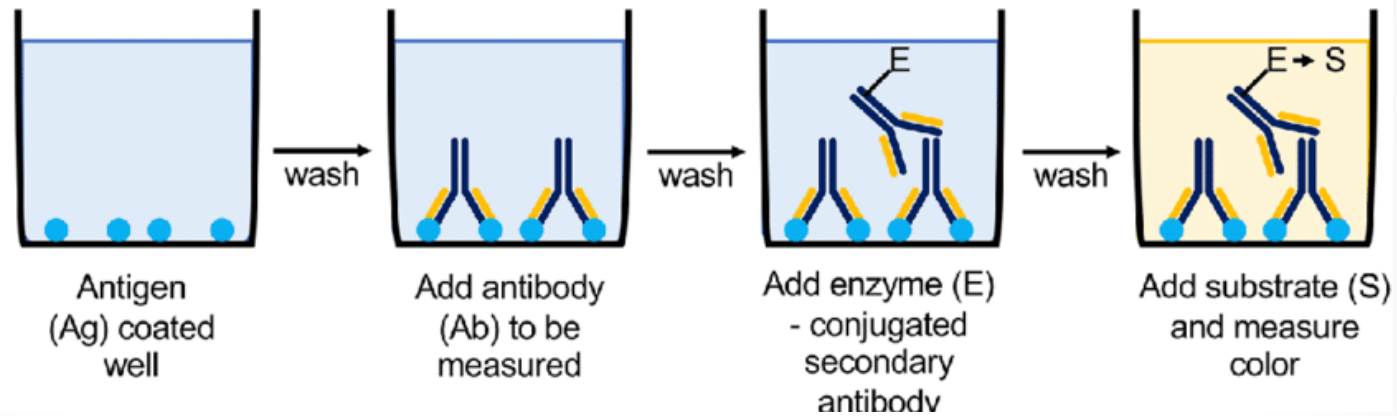
(a) Direct ELISA



Type	Key points	Advantages	Disadvantages
<p>DIRECT ELISA</p>	<p>Binds antigens, including the desired target, in a sample directly to the plate. An enzyme-conjugated antibody is then added as a probe for the desired analyte.</p>	<p>Only one antibody is used, so cross-reactivity is not a concern</p> <p>Rapid</p>	<p>Low sensitivity</p> <p>Non-specific binding of antigens so background may be high</p>

EMΜΕΣΗ-INDIRECT ELISA

(b) Indirect ELISA

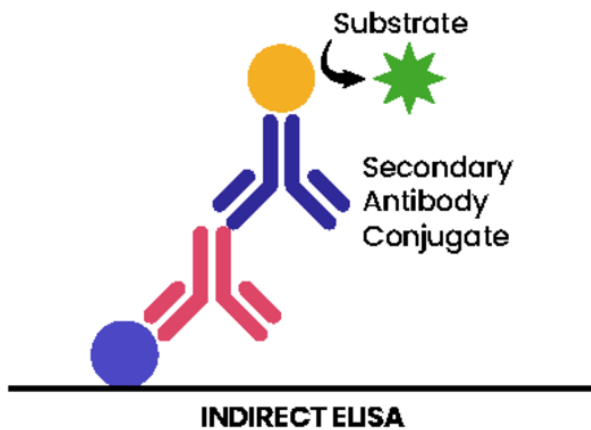


Type

Key points

Advantages

Disadvantages



Binds antigens, including the desired target, in the sample to the plate. However, it involves two antibodies; a primary antibody and a secondary conjugated antibody.

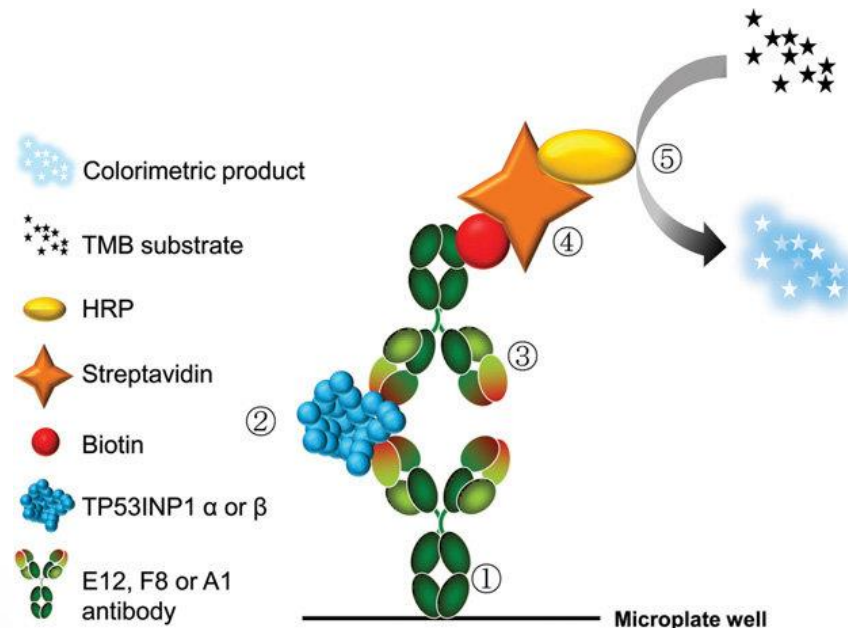
High sensitivity

There is a risk of antibody cross-reactivity

Non-specific binding of sample antigens so background may be high

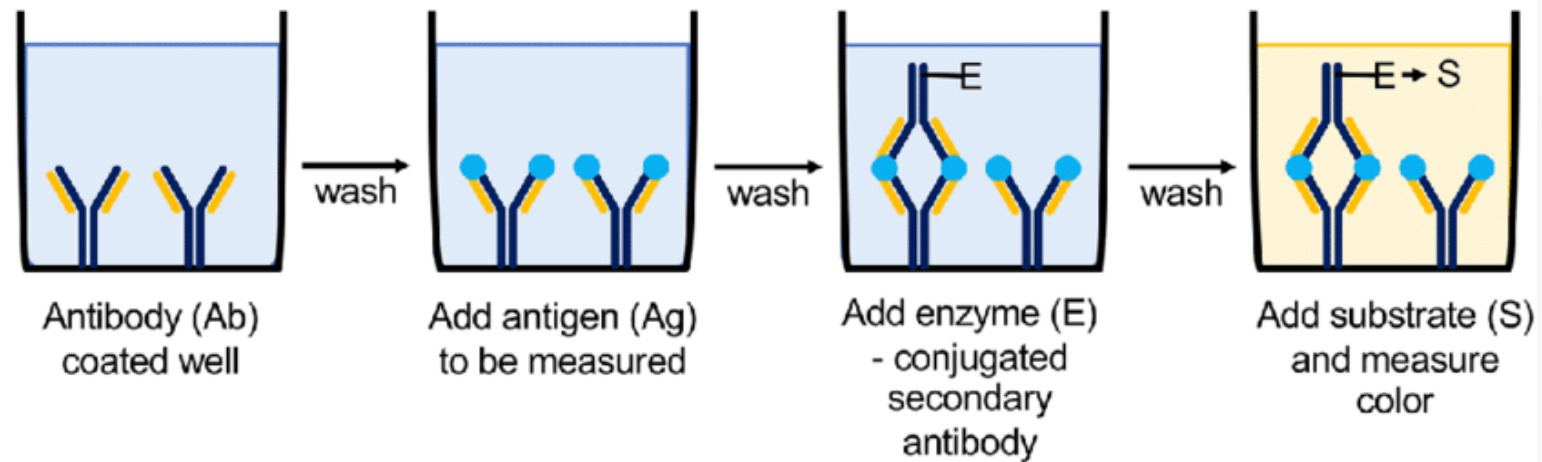
ELISA ΤΥΠΟΥ SANDWICH

- Η ELISA τύπου Sandwich χρησιμοποιεί δύο διαφορετικά αντισώματα που αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους στο ίδιο αντιγόνο
- Εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ορμονών, κυτταροκινών, ανοσοσφαιρινών και άλλων πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά και σε υπερκείμενα καλλιιεργειών.
- Για την ποσοτικοποίηση των εξεταζόμενων δειγμάτων χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς που γίνεται με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αναφοράς του αντιγόνου, δηλαδή διαλύματος που περιέχει γνωστή συγκέντρωση του αντιγόνου



ELISA ΤΥΠΟΥ SANDWICH

(c) Sandwich ELISA

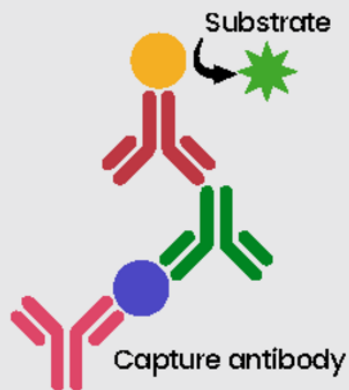


Type

Key points

Advantages

Disadvantages



SANDWICH ELISA

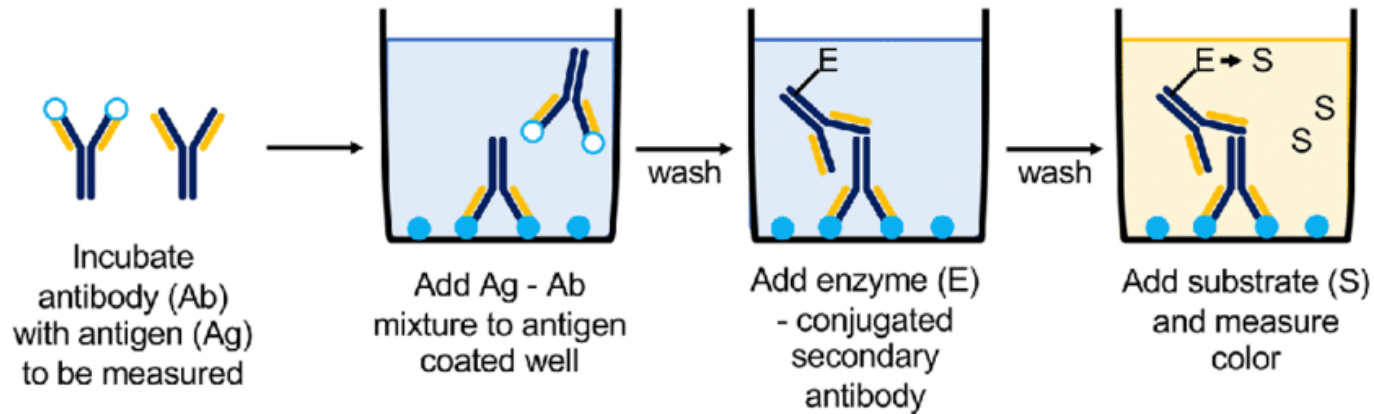
The target is bound between a capture antibody (for antigen detection) or capture protein (for antibody detection) and the conjugated detecting antibody, creating a "sandwich".

Highly sensitive and specific

Choosing the right antibody pair can be time-consuming

ELISA ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ (COMPETITIVE ELISA)

(d) Competitive ELISA

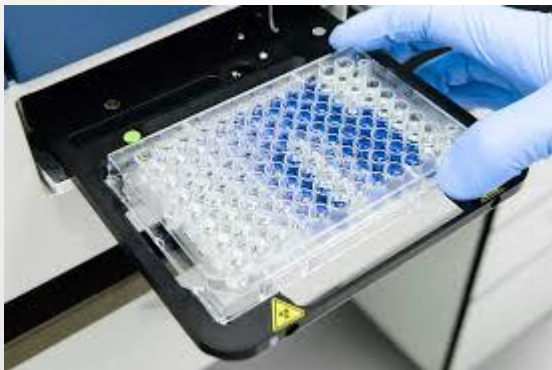


Type	Key points	Advantages	Disadvantages
<p>Antibody-coated Well</p> <p>Conjugated Antigen</p> <p>Substrate</p> <p>COMPETITIVE ELISA</p>	<p>Involves competition between the binding of the sample antigen and conjugated antigen to a specific amount of antibody. The more antigen in the sample, the less conjugated antigen binds and the lower the assay signal.</p>	<p>Rapid</p> <p>Requires little/ no sample pre-processing</p> <p>Useful for small targets that cannot easily be bound with two antibodies</p>	<p>Low specificity</p>

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ELISA

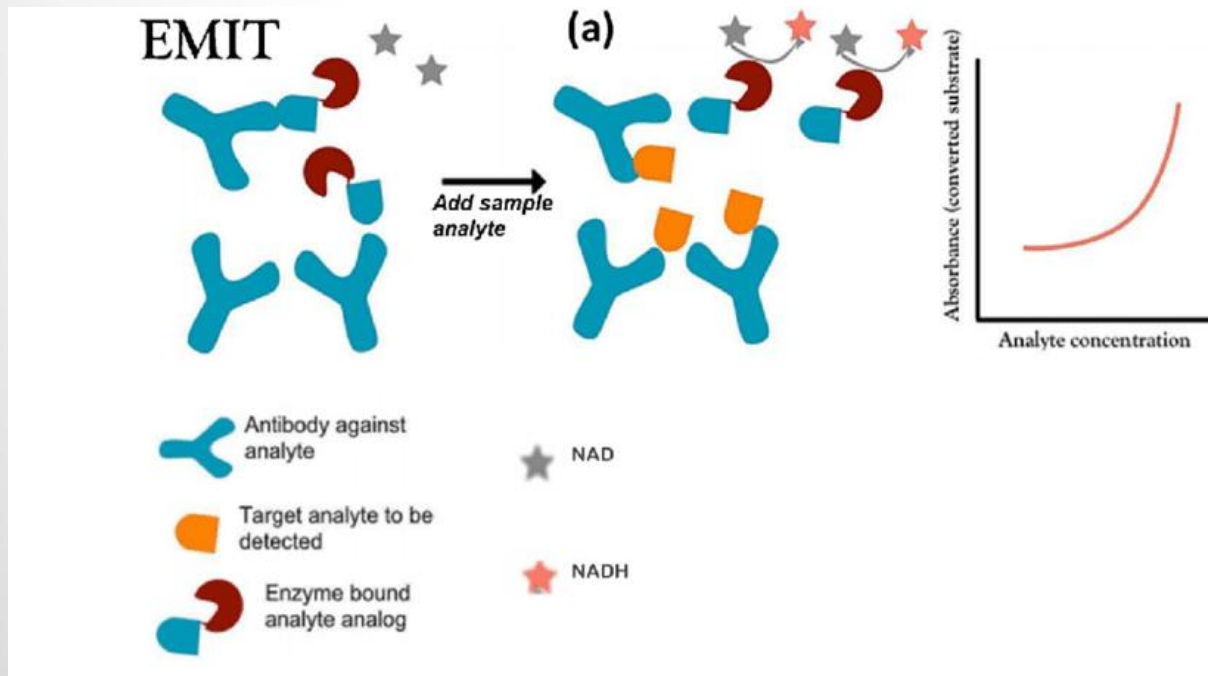
- ❑ Οι τεχνικές ELISA εφαρμόζονται ευρύτατα στην ανάλυση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε τρόφιμα ή βιολογικά δείγματα, ορμονών και άλλων βιομορίων σε βιολογικά δείγματα, για διαγνωστικούς σκοπούς.
- Μέτρηση συγκέντρωσης αντισωμάτων ορού αιματος (για προηγούμενη έκθεση σε ασθένεια π.χ HIV)
- Ανίχνευση αλλεργιογόνων στα τρόφιμα (γάλα, φιστίκια, καρύδια, αμύγδαλα και αυγά, GMOs)
- Εξάρσεις ασθενειών (Disease Outbreaks)- παρακολούθηση της εξάπλωσης της νόσου π.χ. HIV, γρίπη των πτηνών, κρυολογήματα, χολέρα κλπ)
- Ανίχνευση αντιγόνων π.χ. ορμόνες εγκυμοσύνης, αλλεργιογόνα φαρμάκων κ.λπ.
- έτοιμα kit για τον προσδιορισμό περιβαλλοντικών ρύπων όπως τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια, PCBs)
- Ανίχνευση λοίμωξης SARS-CoV-2

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ELISA



Ανοσοενζυμική Ενισχυμένη μέθοδος (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique ή EMIT)

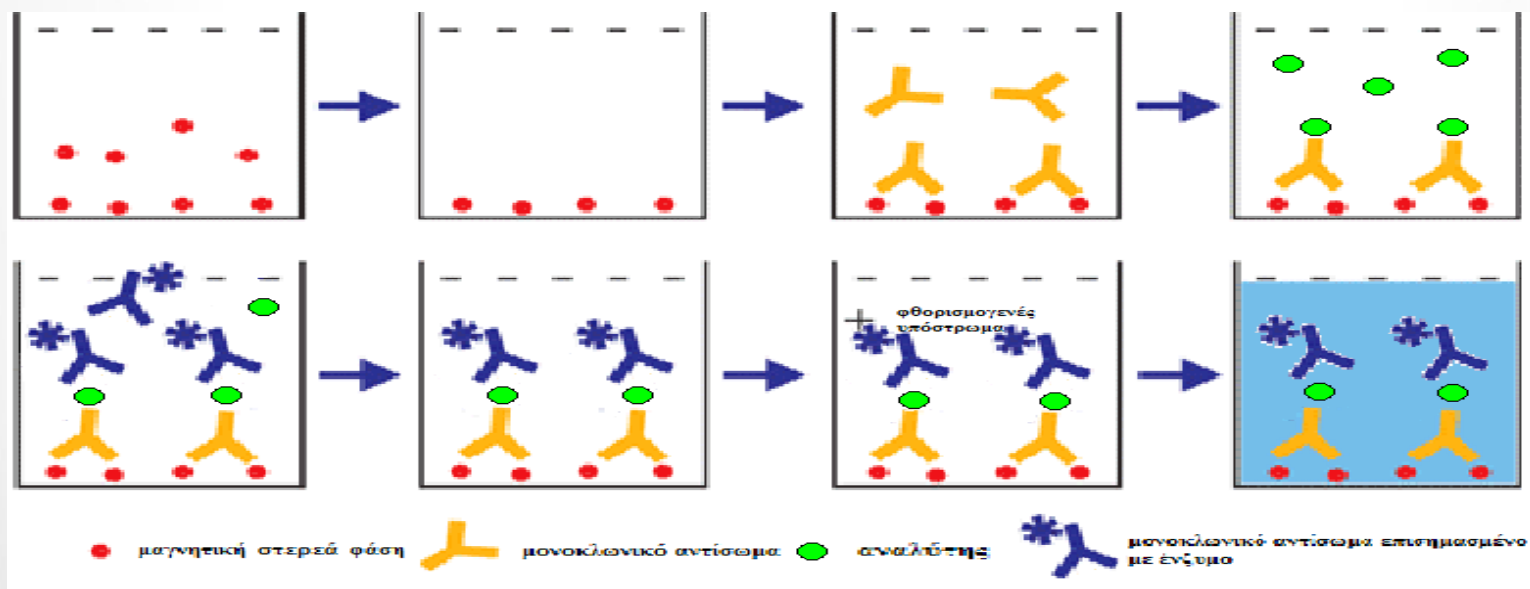
- **Ομογενής ανοσοενζυμικός προσδιορισμός**
- χρησιμοποιείται ευρέως για τη μέτρηση ναρκωτικών και φαρμακευτικών ουσιών. Ο ιχνηθέτης της μεθόδου είναι το ένζυμο αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (**G6-PD**).



Η μέθοδος είναι ανταγωνιστικού τύπου. Όσο περισσότερο φάρμακο υπάρχει στον ορό του ασθενούς τόσο περισσότερο από αυτό θα συνδεθεί με τα αντισώματα και άρα τόσο περισσότερο αντιγόνο επισημασμένο με ένζυμο παραμένει ελεύθερο να αντιδράσει

Ανοσοφθορισμομετρικοί προσδιορισμοί

- Συνδυάζουν: υψηλή εξειδίκευση των ανοσοπροσδιορισμών και υψηλή ευαισθησία της φθορισμομετρικής ανίχνευσης
- Βασίζονται στην ενζυμική ιχνηθέτηση με παράλληλη φθορισμομετρική ανίχνευση του σήματος της ενζυμικής αντίδρασης
- Ένζυμα στους ανοσοφθορισμοπροσδιορισμούς: ιχνηθέτες δρώντας σε κατάλληλα φθορισμογόνα υποστρώματα

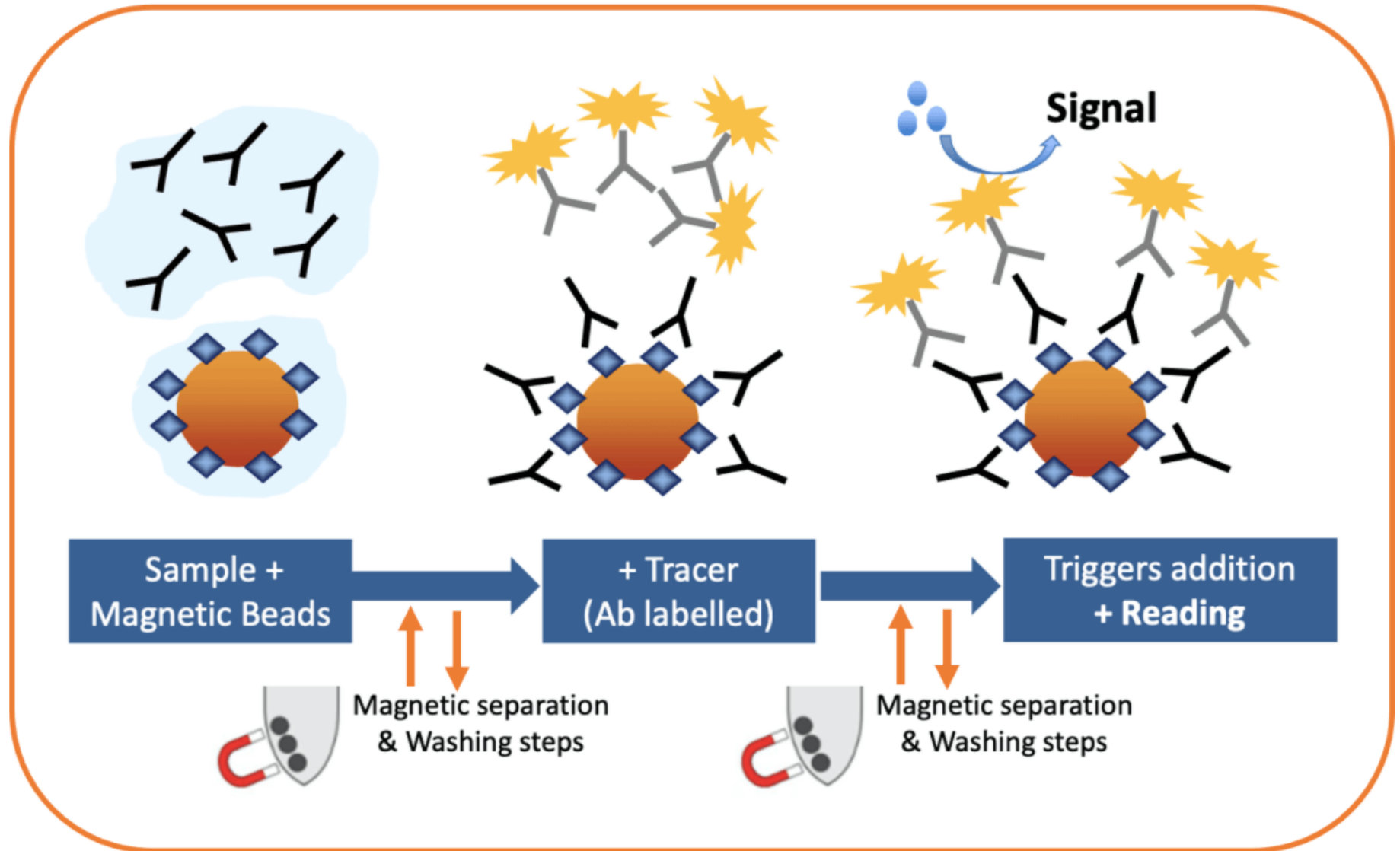


ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ

Chemiluminescence immunoassay ,CLIA

- Η χημειοφωταύγεια (CLIA) αποτελεί την πλέον διαδεδομένη σήμερα ανοσοχημική μέθοδο.
- Η δυνατότητα αυτοματισμού, ο σύντομος χρόνος απόδοσης των αποτελεσμάτων καθώς και η υψηλή ευαισθησία, την καθιστούν πρώτη επιλογή για μεγάλους κατασκευαστικούς οίκους με πολύ γνωστά μοντέλα αναλυτών (Dimension, Cobas, Elecsys, Architect, Centaur κ.α.).
- Η έμμεση χημειοφωταύγεια βασίζεται στη παραγωγή φωτός μέσω μίας ενζυμικής αντίδρασης. Οι αναλυτές χρησιμοποιούν αντίστοιχα την φωσφορική διοξετάνη την οποία αποφωσφορυλιώνουν με την ALP.
- Το φως στην άμεση χημειοφωταύγεια παράγεται απ'ευθείας από τον ιχνηθέτη (εστέρας ακριδίνης), χωρίς τη χρήση ενζύμου

ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ



- με παραμαγνητικά σφαιρίδια.
- Τα αντισώματα είναι ακινητοποιημένα πάνω σε μεταλλικές μπίλιες που αποτελούν τη στερεή φάση.

ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Αυτοματοποιημένη ELISA



Αυτοματοποιημένη ELISA



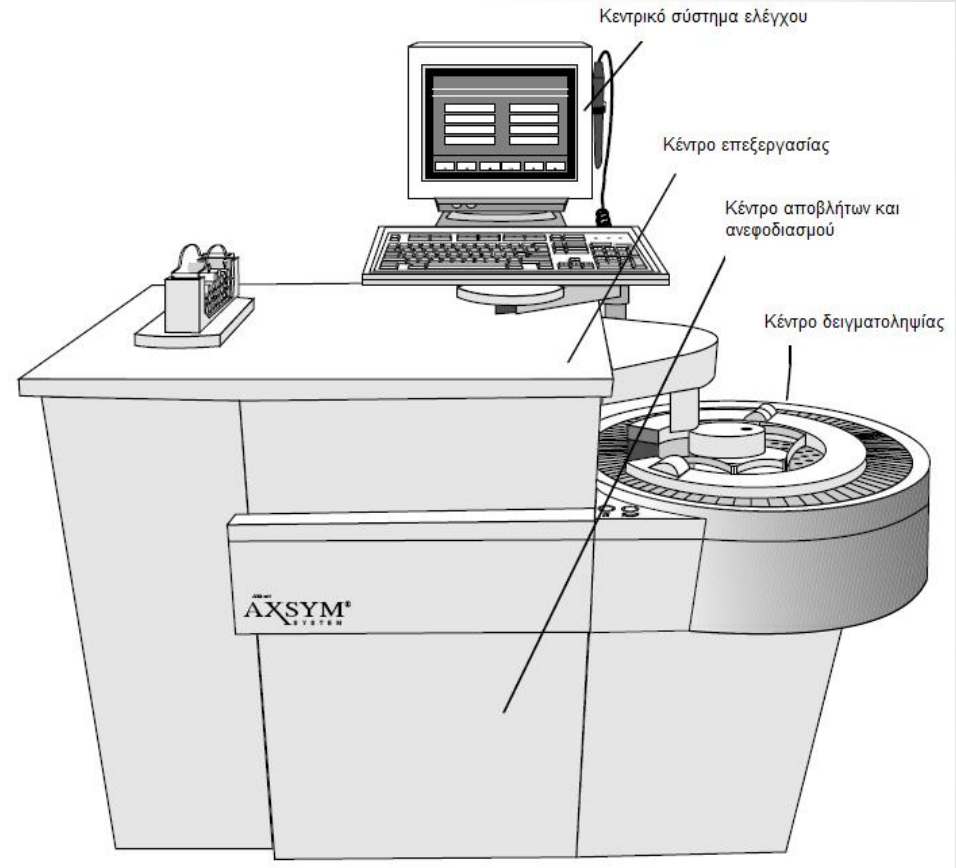
Αυτοματοποιημένη ELISA



Αυτοματοποιημένη ELISA



Ανοσοαναλυτής AxSYM Abbot Microparticle Enzyme immunoassay (ΜΕΙΑ)



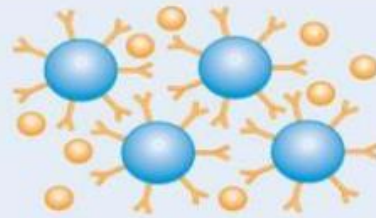
- Εκτελεί ανοσοπροσδιορισμούς χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μικροσωματιδιακού ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού (ΜΕΙΑ) και την FPIA σε δείγματα ορού ή πλάσματος
- Εξετάσεις: ορμόνες αναπαραγωγής, θυρεοειδικές ορμόνες, καρκινικοί δείκτες, καρδιακοί δείκτες, δείκτες αναιμίας, ναρκωτικές ουσίες κ.ά.

Ανοσοαναλυτής AxSYM Abbot

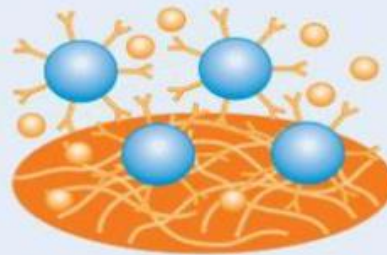
Microparticle Enzyme immunoassay (MEIA)

A summary of how the components work in combination with the sample to produce a signal and corresponding test result is shown in Figure 2-8.

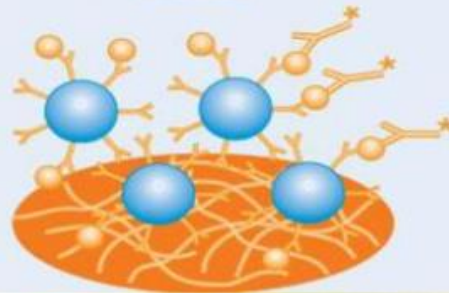
Notice how the glass fiber matrix serves to anchor the complexes. Also note that this method uses a noncompetitive format, so that the amount of analyte is directly proportional to the amount of signal.



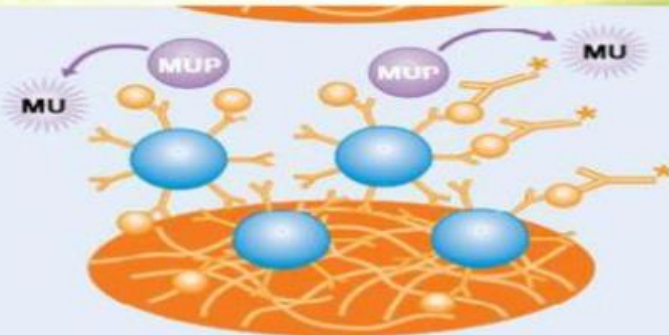
Microparticles coated with anti-analyte antibodies and sample are incubated together to form a reaction mixture.



An aliquot of the reaction mixture is transferred to the glass fiber matrix.



Alkaline phosphatase-labeled anti-analyte antibodies are allowed to bind to the microparticle complex.



The substrate 4-methylumbelliferyl phosphate (MUP) is added to the matrix. The fluorescent product, methylumbelliferone (MU) is measured.

Αυτόματος ανοσοαναλυτής ELECSYS 2010

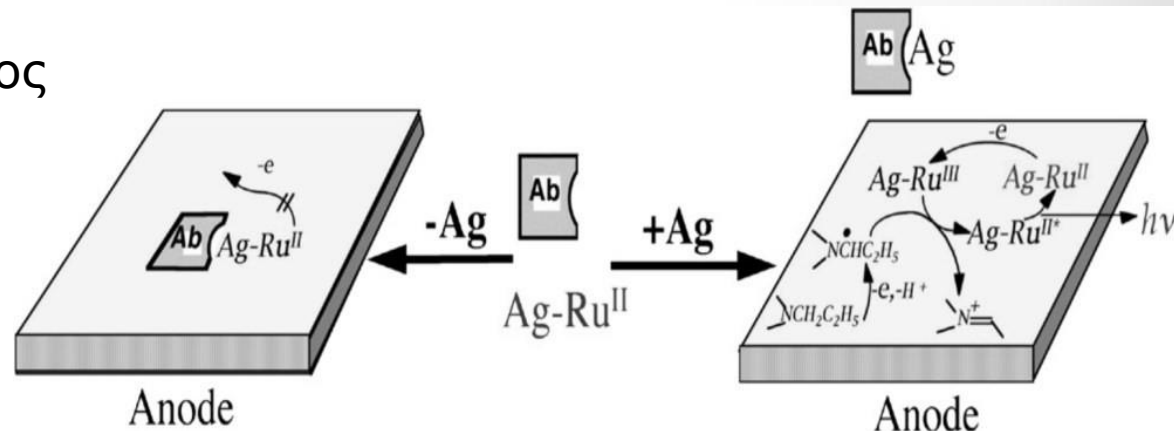
- Για ετερογενείς ανοσοπροσδιορισμούς, ηλεκτροχημειοφωταύγεια (electrochemiluminescence – ECL)
- Μέθοδος «sandwich» με γέφυρα βιοτίνης – στρεπταβιδίνης
- Εξετάσεις: ορμόνες αναπαραγωγής, θυρεοειδικές ορμόνες, καρκινικοί δείκτες, καρδιακοί δείκτες, δείκτες αναιμίας κ.ά.



ELECSYS 2010

Αρχή μεθόδου - ηλεκτροχημειοφωταύγεια

- Αντίδραση χημειοφωταύγειας μορίων που παράγονται ηλεκτροχημικά πάνω στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου
- Παράγεται μέσω μιας αντίδρασης μεταφοράς ηλεκτρονίων ανάμεσα σε ένα οξειδωμένο και ένα ανηγμένο μόριο
- Υψηλής ευαισθησίας τεχνική, πλεονεκτήματα:
 - Όχι ραδιοϊσότοπα.
 - Όρια ανίχνευσης για ιχνηθέτες πολύ χαμηλά (200 fmol/L).
 - Δυναμικό εύρος διαγράμματος βαθμονόμησης >6 τάξεις μεγέθους.
 - Εξαιρετικά σταθεροί ιχνηθέτες
 - Εκλεκτικότητα → ικανότητα των επισημασμένων μορίων να πλησιάσουν την επιφάνεια του ηλεκτροδίου.
 - Ιχνηθέτες μικρά μόρια (~1000Da) → επισήμανση απενίων ή μεγάλων μορίων ενώ πολλαπλοί ιχνηθέτες συνδέονται με πρωτεΐνες ή ολιγονουκλεοτίδια
 - Απλή και ταχύτερη μέθοδος



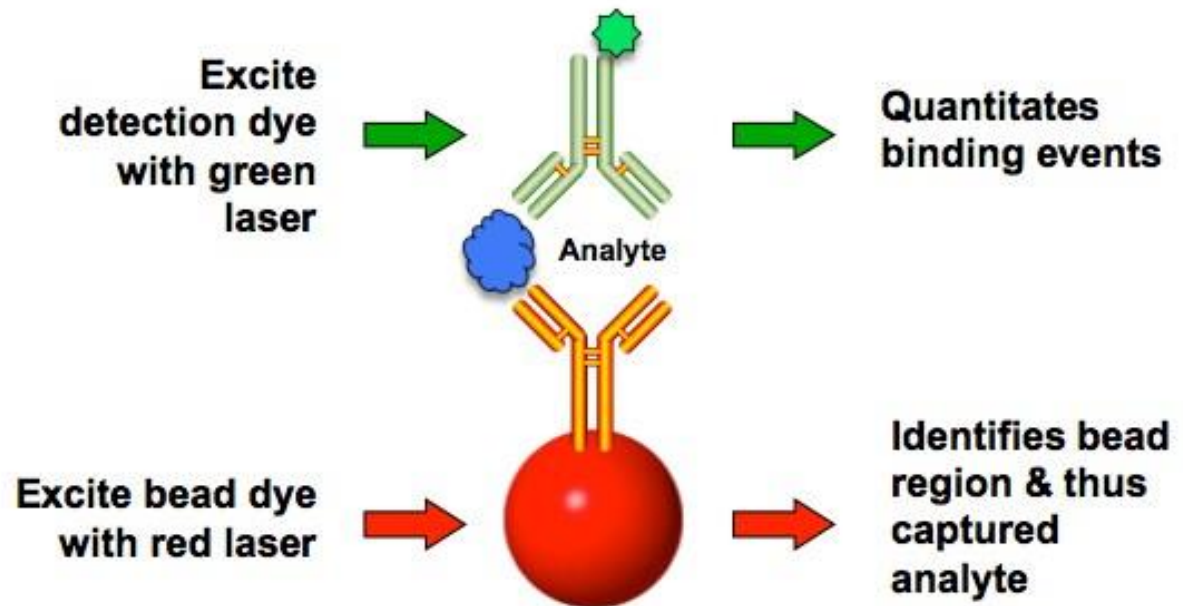
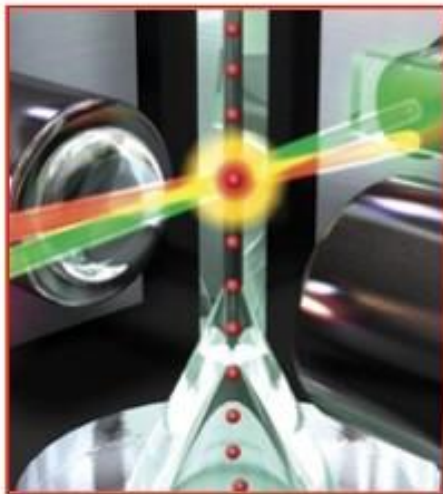
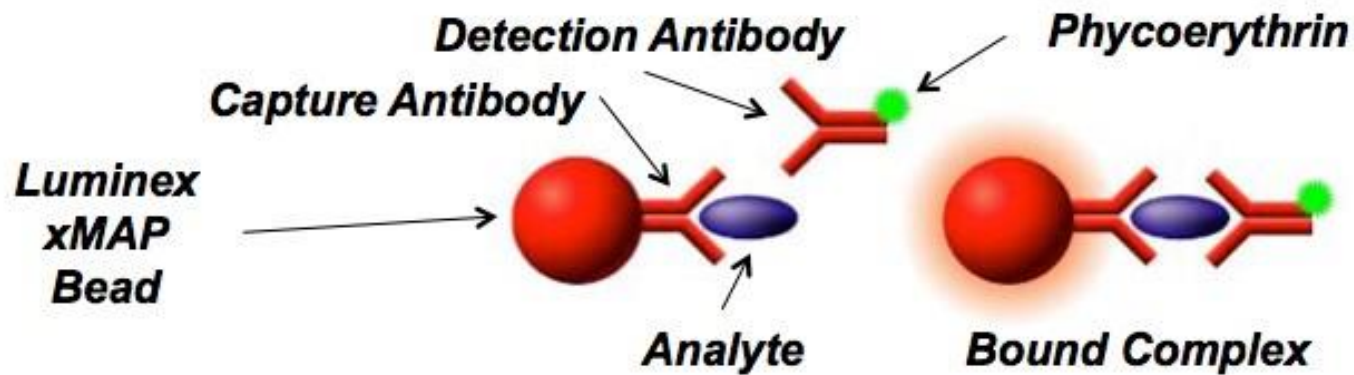
Αυτόματος ανοσοαναλυτής AIA 1800



- Εκτελεί ενζυμικούς ανοσοπροσδιορισμούς με σύστημα φθορισμομετρικής ανίχνευσης (ENZYMELINKED FLUORESCENT IMMUNOASSAY-ELFIA) σε δείγματα ορού ή πλάσματος
- Αρχή μεθόδου - ενζυμοανοσοφθορισμομετρία
- Εξετάσεις: ορμόνες αναπαραγωγής, θυρεοειδικές ορμόνες, καρκινικοί δείκτες, καρδιακοί δείκτες, δείκτες αναιμίας κ.ά.

πολυπαραμετρική ELISA

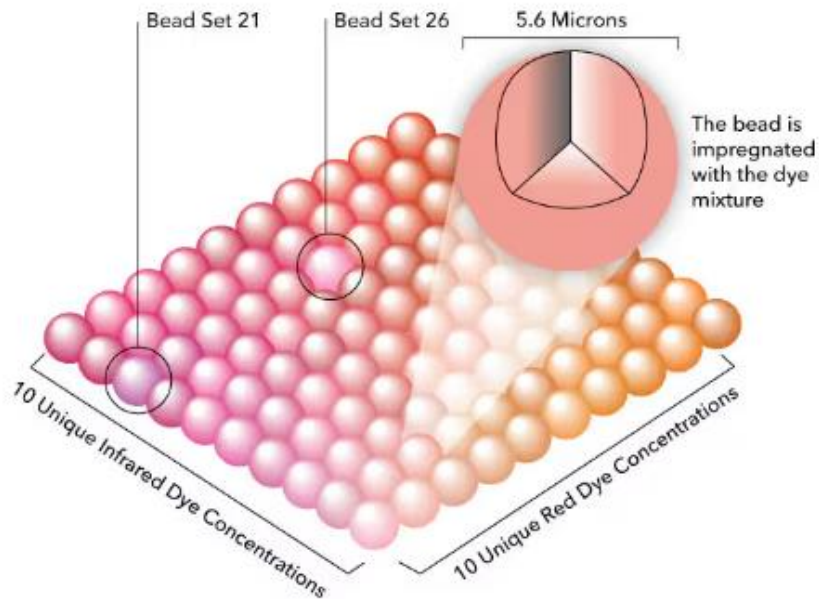
Αρχή λειτουργίας συστήματος Luminex



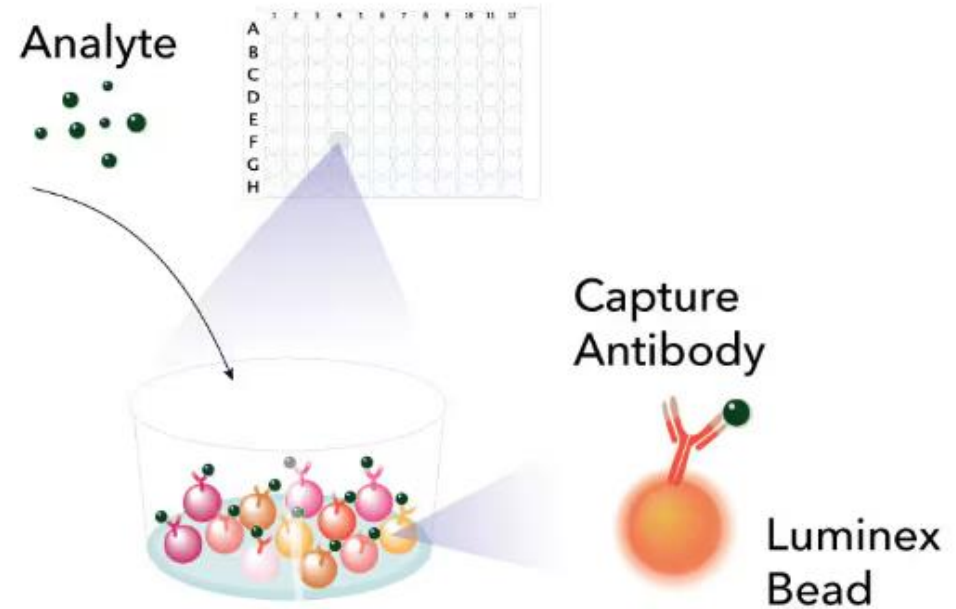
Αρχή λειτουργίας συστήματος Luminex

Luminex Assay Principle

Luminex Bead Spectrum

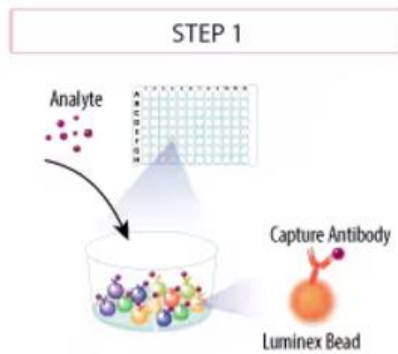


Luminex Assay Principle

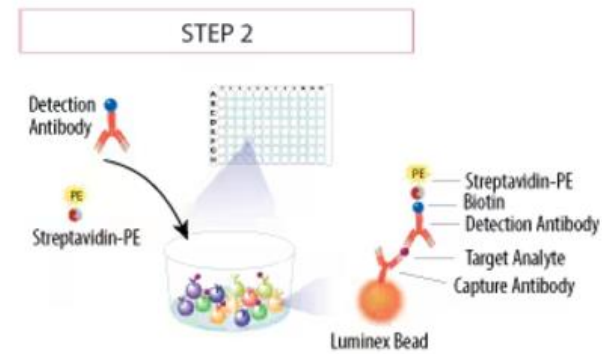


Luminex[®] assays use a set of fluorescent beads where each bead falls in a unique spot on the fluorescent spectrum. The beads are coated with capture antibody targeted to the analyte of interest. See full [Luminex Assay Principle](#).

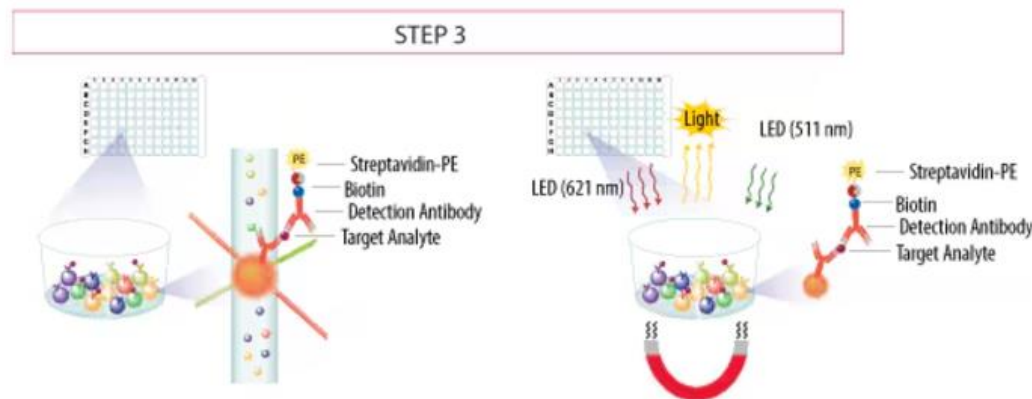
Αρχή λειτουργίας συστήματος Luminex



The sample is added to a mixture of color-coded beads, pre-coated with analyte-specific capture antibodies. The antibodies bind to the analytes of interest.



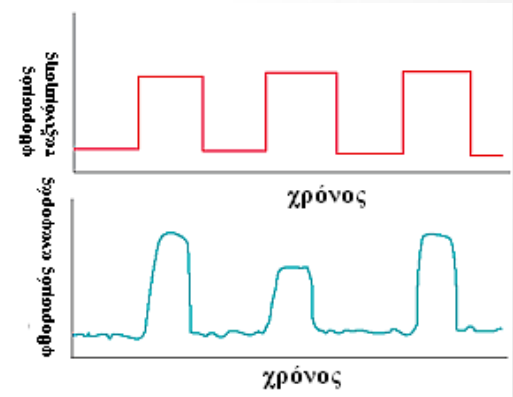
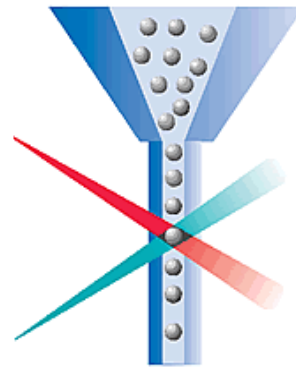
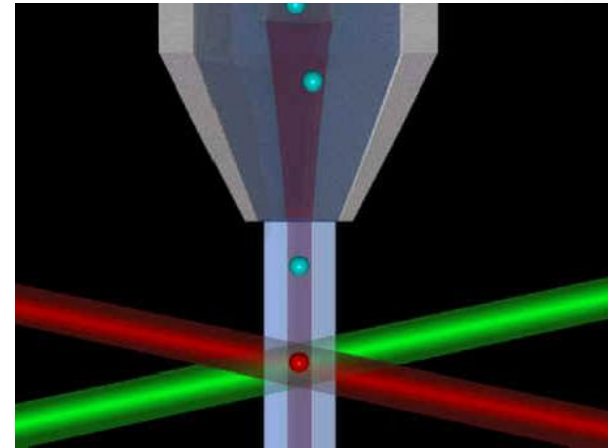
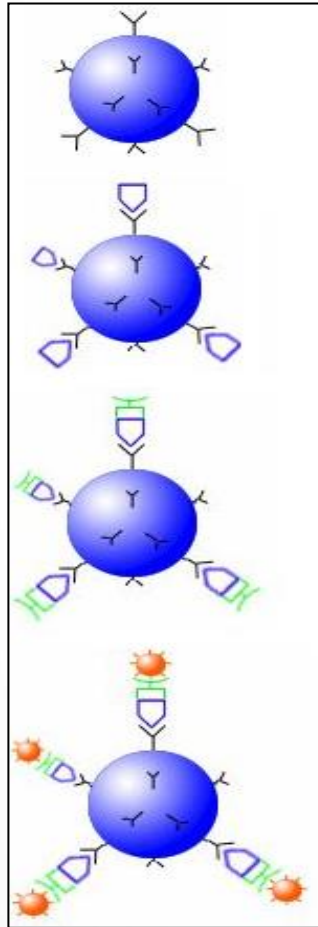
Biotinylated detection antibodies specific to the analytes of interest are added and form an antibody-antigen sandwich. Phycoerythrin (PE)-conjugated streptavidin is added. It binds to the biotinylated detection antibodies.



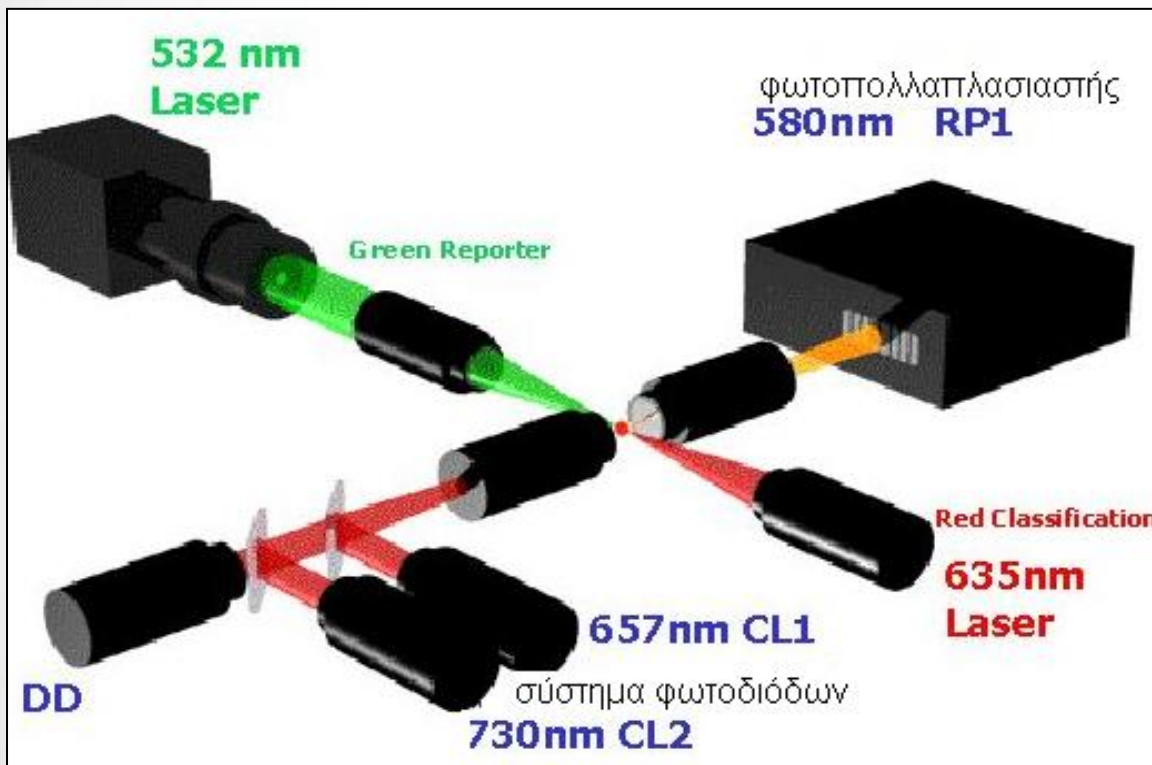
Beads are read on a dual-laser flow-based detection instrument, such as the **Luminex 200™** or **FlexMap®** analyzer. One laser classifies the bead and determines the analyte that is being detected. The second laser determines the magnitude of the PE-derived signal, which is in direct proportion to the amount of analyte bound.

In addition to flow-based analyzers, the **xMAP INTELLIFLEX®** is an advanced multiplexing instrument that offers automation capabilities. It boasts a compact design with a reduced footprint and a wide dynamic range, providing powerful performance. The instrument enables the simultaneous detection of up to 500 analytes in a single sample volume and offers high sensitivity and accuracy.

Αρχή λειτουργίας συστήματος Luminex



Αναπαράσταση των συστημάτων LASER, PMT και φωτοδιόδων στο Luminex-100.



• Τα σφαιρίδια ρέουν μέσω του ρυθμιστικού διαλύματος στις ακτίνες των δυο LASER.

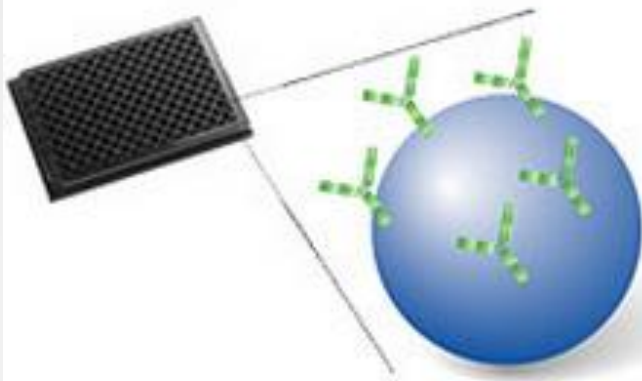
• Με διέγερση στα 635 nm του LASER ταξινόμησης, οι δυο φθορίζουσες ουσίες εκπέμπονται σε διαφορετικά μήκη κύματος: 657 nm και 730 nm.

• Μια τρίτη φθορίζουσα ουσία, η φυκοερυθρίνη διεγείρεται στα 532 nm από το LASER αναφοράς (green reporter laser) που εκπέμπει στα 580 nm.

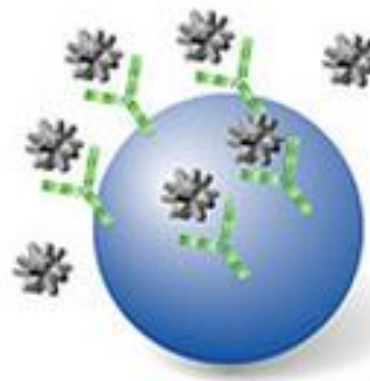
• Το όργανο καταγράφει τη μέση τιμή έντασης φθορισμού (MFI) των 50-80 σφαιριδίων κάθε.σετ και υπολογίζει την συγκέντρωση κάθε ουσίας-στόχου στο δείγμα.

Αρχή λειτουργίας συστήματος Luminex

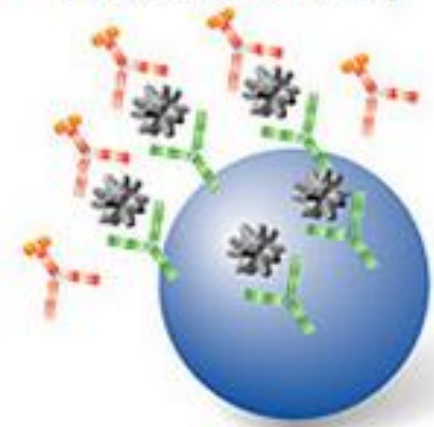
Step One
Dispense capture beads



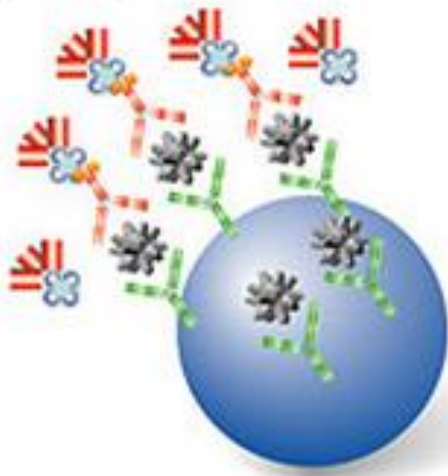
Step Two
Add samples



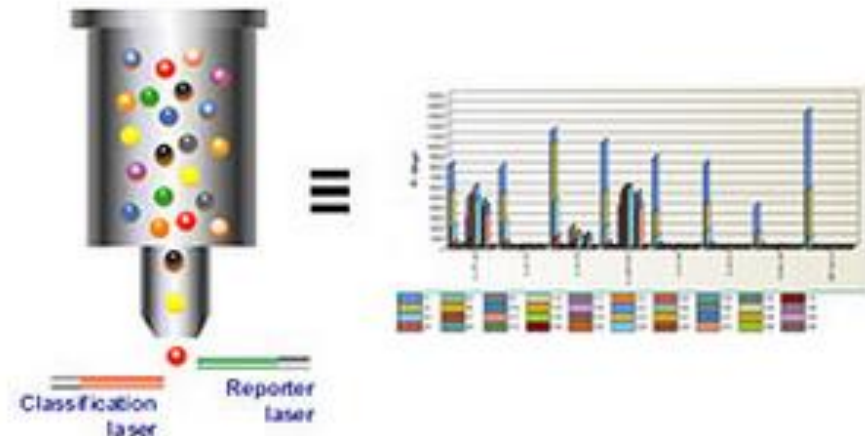
Step Three
Add detection antibody



Step Four
Add reporter dye

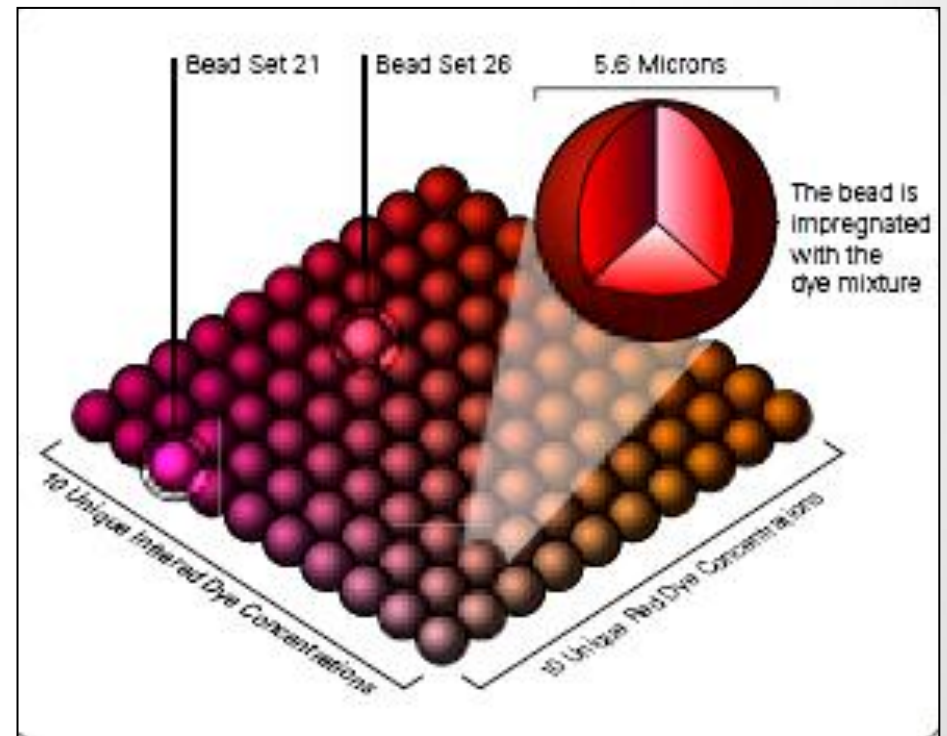
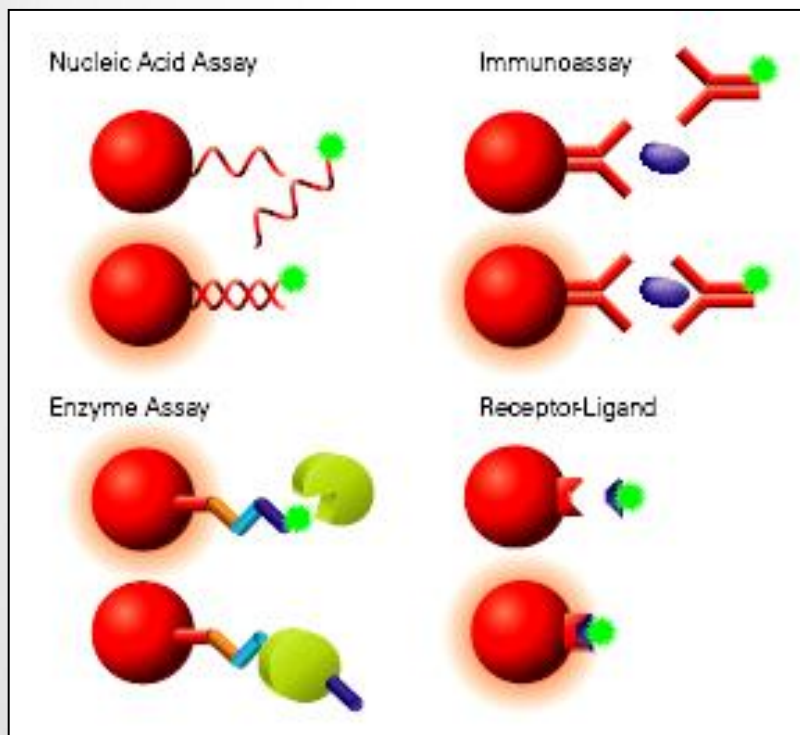


Step Five
Fluorescent sorting and data reduction



πολυπαραμετρική ELISA

Αρχή λειτουργίας συστήματος Luminex



xMAP Technology

