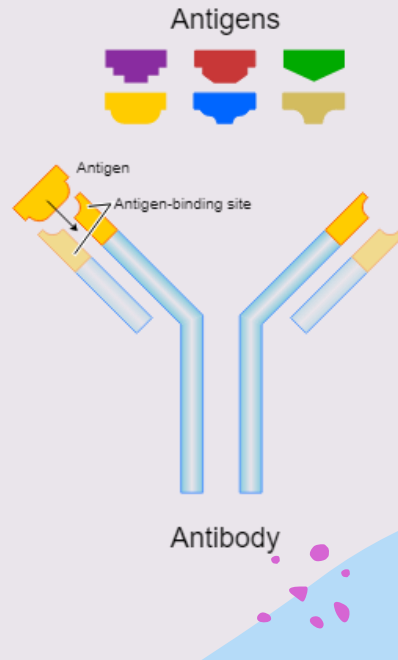


Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές

Ανοσοχημικές Τεχνικές

Δρ. Μάριος Κωστάκης -

Μ. Κουτπάρης (Ομ.
Καθηγητής)



1

Βιολογικά Υγρά

- Ορός Αίματος
- Πλάσμα Αίματος
- Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
- Ούρα
- Πτύελα
- Σίελος

Παρουσιάζουν εξαιρετικές δυσκολίες, λόγω πολυπλοκότητας. Περιέχουν μεγάλο αριθμό φυσιολογικών και μη ουσιών και τους μεταβολίτες τους.

2

Κλινικές αναλύσεις

Σύγχρονη θεραπευτική καθιέρωσ σειρά κλινικών αναλύσεων στα δείγματα αυτά για

- Διαγνωστικούς σκοπούς
- Παρακολούθηση θεραπευτικής αγωγής

Προσδιορισμοί όπως:

Ορμόνες (Θυρεοειδούς, Οιστρογόνων, Ινσουλίνης κλπ)

Προϊόντων μικροβιακών λοιμώξεων για διαγνωστικούς σκοπούς

Χορηγούμενων φαρμάκων για τον καθορισμό θεραπευτικών επιπέδων (**Therapeutic Drug Monitoring, TDM**) και έλεγχο χορηγούμενης δόσης.

Διαφόρων ναρκωτικών, αναβολικών και τοξικών ουσιών για σκοπούς **Ιατροδικαστικούς, τοξικολογικούς**, ελέγχους φαρμακοδιέγερσης (**doping**).

3

Προβλήματα Βιοαναλυτικών Τεχνικών

- Πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις προσδιοριζόμενων ουσιών ($\mu\text{g/mL}$, **ppm** ή ng/mL , **ppb**)
- Περιορισμένη ποσότητα δείγματος (**μερικά μL έως 0,5 mL**)
- **Πολυπλοκότητα** βιολογικών δειγμάτων.
- Επίλυση προβλήματος:
Ανάπτυξη Αναλυτικών μεθόδων υψηλής **ευαισθησίας** και υψηλής **ειδικότητας**

4

Προβλήματα Βιοαναλυτικών Τεχνικών

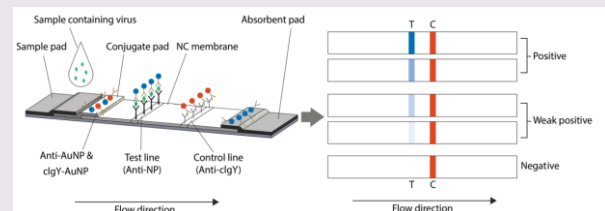
- Χρωματογραφικές Τεχνικές μειονεκτούν ως προς:
 - Ευαισθησία (**GC, HPLC**)
 - Κόστος απαιτούμενων οργάνων (**GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS, LC-MS/MS**)
 - Ανάγκη **απομόνωσης** προσδιοριζόμενης ουσίας πριν την εφαρμογή της τεχνικής

5

Λύση αναλυτικού προβλήματος βιοαναλυτικών τεχνικών

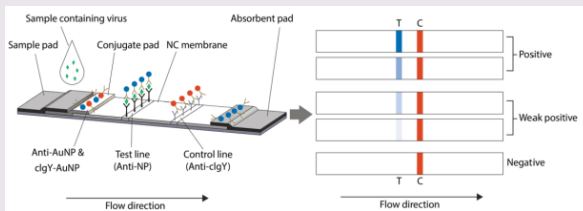
Ανάπτυξη ανοσοχημικών προσδιορισμών ή ανοσοπροσδιορισμών (immunoassays) ή ανοσοχημικοί ή ανοσοβιολογικοί προσδιορισμοί.

Αρχή λειτουργίας: Χρησιμοποιούνται αντισώματα ως εκλεκτικά αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό ουσιών με αντιγονικές ιδιότητες που συνδέονται εξειδικευμένα από αυτά.



6

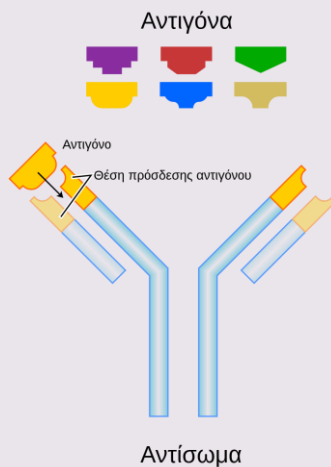
Κατάσταση ανοσοχημικών προσδιορισμών



Ορμόνες
Φάρμακα
Βιταμίνες
Ένζυμα
Ισοένζυμα
Ειδικές Πρωτεΐνες
Νουκλεοτίδια
Αντιγόνα ιών
Καρκινοεμβρυϊκά αντιγόνα
Τοξίνες μικροβίων
Αντισώματα

7

Βασικές Έννοιες – Αντίσωμα (Antibody)



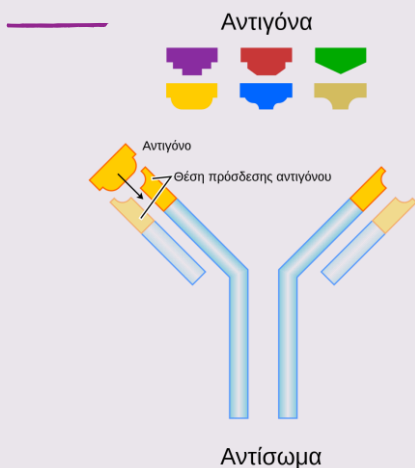
Αντίσωμα είναι εξειδικευμένη πρωτεΐνη (ανοσοσφαιρίνη) που παράγεται στον οργανισμό, όταν το ανοσοποιητικό σύστημα διεγερθεί από την παρουσία κάποιου εξειδικευμένου μορίου, που ονομάζεται αντιγόνο.

Έχει την ικανότητα να συνδέεται (δεσμεύει) εκλεκτικά με το ειδικό αντιγόνο, που προκάλεσε τη δημιουργία του και να το εξουδετερώνει.

Τα αντισώματα διατηρούνται για αρκετό χρονικό διάστημα στον οργανισμό (ανάπτυξη ανοσίας)

8

Βασικές Έννοιες – Αντιγόνο (Antigen)

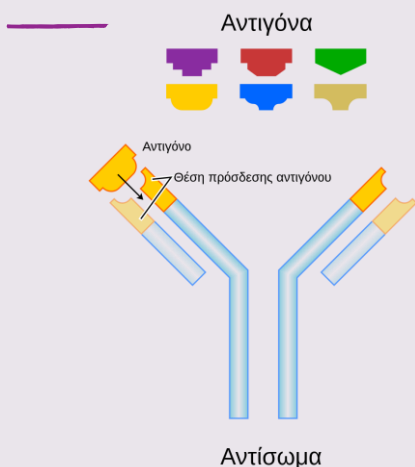


Κάθε μόριο ικανό να **αντιδράσει (συνδεθεί)** με ένα **αντίσωμα**, αλλά όχι και υποχρεωτικά ικανό να προκαλέσει την ανάπτυξη ανοσίας.

Ανοσογόνο (immunogen) είναι μεγαλομοριακό αντιγόνο που έχει την ικανότητα να προκαλέσει την ανάπτυξη αντισώματος, όταν εισαχθεί σε ένα οργανισμό.

9

Βασικές Έννοιες – Απτένιο (Hapten)

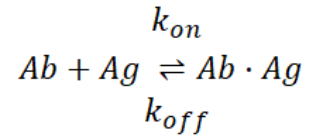


Μικρομοριακά αντιγόνα (**φάρμακα, ορμόνες, φυτοφάρμακα κλπ**) **ΜΒ<4000**, που είναι ικανά να αντιδράσουν με ειδικά αντισώματα αλλά μη ικανά να προκαλέσουν ανάπτυξη αντισωμάτων.

Για να προκαλέσουν την παραγωγή αντισωμάτων πρέπει να συνδεθούν με μία πρωτεΐνη φορέα, όπως βόειος οραλβουμίνη (**BDA**).

Αποτελούν την πλειονότητα των προσδιοριζόμενων με ανοσοπροσδιορισμού ουσιών.

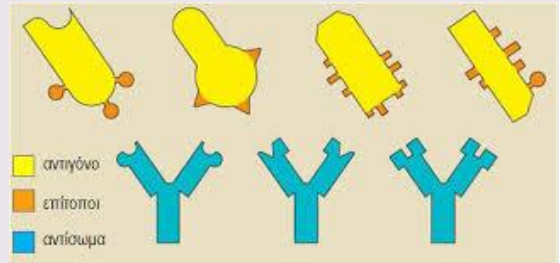
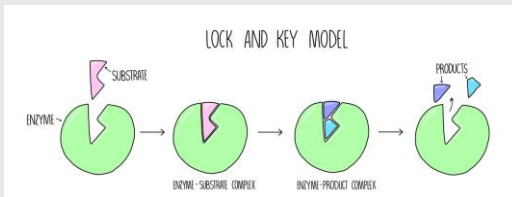
10



Βάση ανοσοχημικών προσδιορισμών

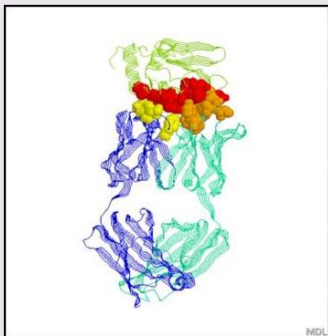
Αντίδραση συνδέσεως αντιγόνου (Ag) με το εξειδικευμένο αντίσωμα του (Ab) προς δημιουργία του πολύ σταθερού συμπλόκου (Ag.Ab)

Η εξαιρετική εξειδίκευση της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος παριστάνεται ως σχέση κλειδιού - κλειδαριάς.

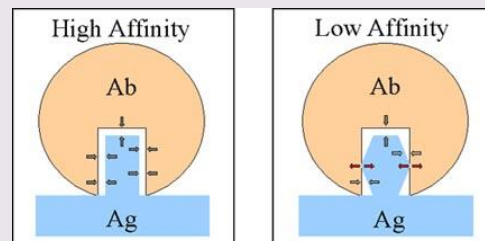


11

Σύνδεση Ag-Ab



Source: Li, Y., Li, H., Smith-Gill, S. J., Mariuzza, R. A., Biochemistry 39, 6296, 2000



12

Σύνδεση Ag-Ab

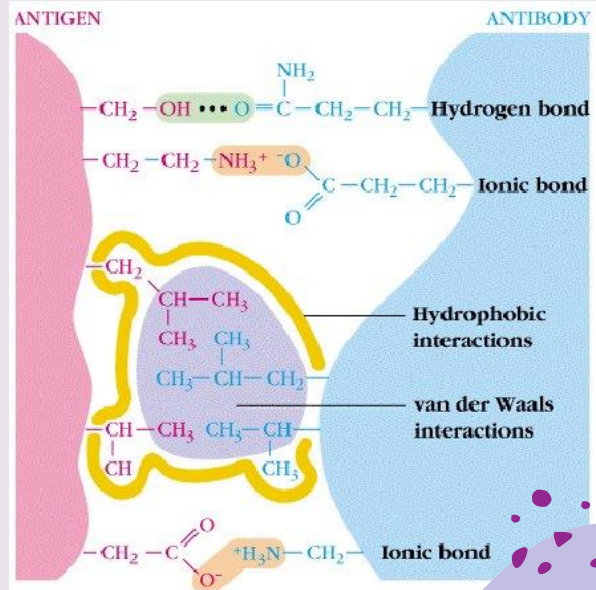
Τα αντισώματα δεσμεύουν το αντιγόνο που «ευθύνεται» για τη δημιουργία του, σχηματίζοντας σταθερό σύμπλοκο με ισχυρές μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις:

Δυνάμεις Coulomb

Δεσμούς υδρογόνου

Υδρόφοβους δεσμούς

Δυνάμεις van der Waals



13

Αναλυτική Εφαρμογή αντιγόνου-αντισώματος

Η αναλυτική εφαρμογή των ανοσοχημικών έγινε έπειτα από δύο παρατηρήσεις:

- 1) Η **μη ομοιοπολική σύνδεση** του αντιγόνου με την **πρωτεΐνη-αντίσωμα** είναι **εξαιρετικά εξειδικευμένη** (σχέση κλειδιού-κλειδαριάς) και **αμφίδρομη**, με πολύ μεγάλη σταθερά ισορροπίας ($k_1 \gg k_{-1}$)
- 2) Ελαφρά τροποποιημένο αντιγόνο με κάποιο φορέα αναλυτικού σήματος (επισημασμένο αντιγόνο, **labelled**, AgL, ιχνηθέτης) αντικαθιστά ανταγωνιστικά το μη επισημασμένο αντιγόνο (Ag) (αναλύτης).

14

Αναλυτική Εφαρμογή αντιγόνου-αντισώματος

Ο σχηματισμός του εξειδικευμένου συμπλόκου Ag.Ab με εμφάνιση ιζήματος ή συσσωματώματος (ανοσοίζημα) χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του αντιγόνου (ορμόνης, τοξίνης μικροβίου, αντιγόνου ιού κλπ)

Η ανταγωνιστική σύνδεση του φυσικού αντιγόνου (Ag) και του επισημασμένου αντιγόνου (ιχνηθέτη) (AgL) χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αντιγόνου

Το φυσικό αντιγόνο είναι γνωστό και ως ψυχρό αντιγόνο (αντιδρά σε $T < 37^{\circ}\text{C}$), ενώ το επισημασμένο και ως θερμό αντιγόνο ή ιχνηθέτης (αντιδρά σε $T \geq 37^{\circ}\text{C}$).

15

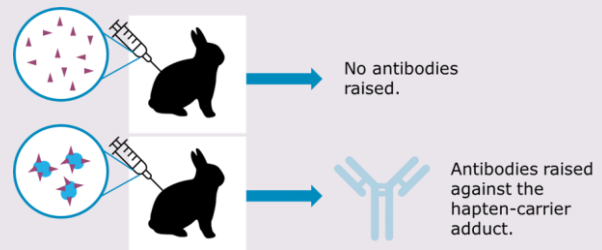
Παρασκευή ανοσογόνων και αντισωμάτων

Οι περισσότερες ουσίες, των οποίων ενδιαφέρει ο προσδιορισμός (ορμόνες, φάρμακα, βιταμίνες κλπ) είναι μικρού MB (< 1000).

Δεν είναι ικανές να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα πειραματόζων για παραγωγή εξειδικευμένου αντισώματος, είναι απτένια.

Πρέπει να γίνει μια σύνδεση μέσω μιας πρωτεΐνης-φορέα.

Συνήθως αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA)

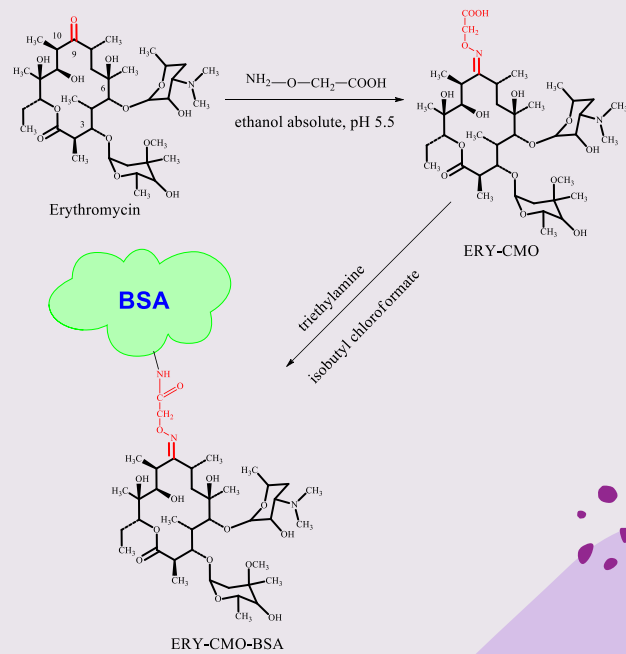


16

Σύνδεση απτενίων - BSA

Χρησιμοποιούνται διάφορες αντιδράσεις οργανική χημείας, ανάλογα με χαρακτηριστικές ομάδες που διαθέτει το προς σύνδεση απτένιο.

Π.χ Ανοσοχημικό προσδιορισμός ερυθρομυκίνης (αντιβιοτικό). Η ερυθρομυκίνη (ERY) αντιδρά - μετατρέπεται με καρβοξυμεθυλο υδροξυλαμίνη (CMO) και η τροποποιημένη ερυθρομυκίνη (ERY-CMO) συνδέεται με την BSA.



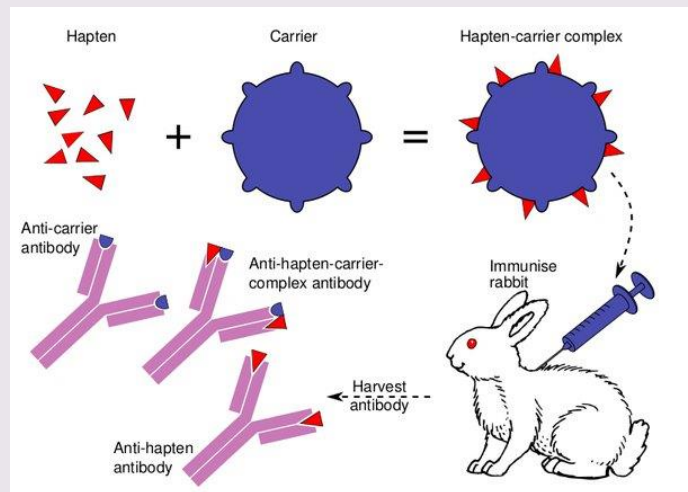
17

Παραγωγή αντισωμάτων απτενίων 1

Μετά την Παρασκευή του ανοσογόνου που περιέχει το προς προσδιορισμό απτένιο γίνεται καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας.

Το ανοσογόνο ενίεται (υποδερμικά ή ενδοδερμικά) στο σώμα ζώου-ξενιστή (πρόβατο, αλόγου, κουνελιού κλπ)

Ενεργοποιείται το ανοσοποιητικό σύστημα του ζώου και παράγει το αντίσωμα (Ab) μία σφαιρίνη ικανή να σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο τόσο με το ανοσογόνο, όσο και το απτένιό του.



18

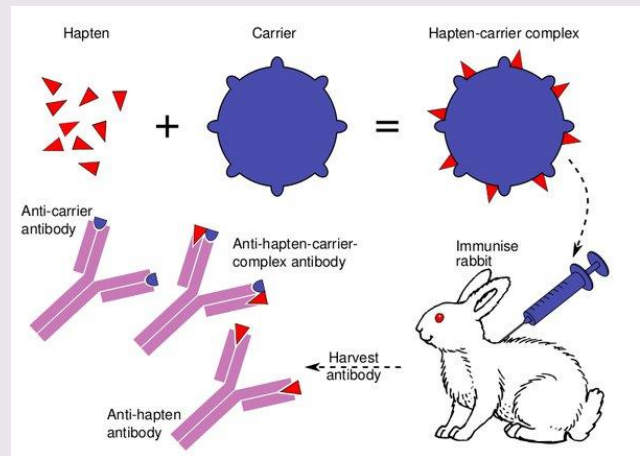
Παραγωγή αντισωμάτων απτενίων 2

Αντισώματα που αναπτύσσονται σε ζώα-ξενιστές είναι πολυκλωνικά

Μπορεί να συνδεθούν σε κάποιο βαθμό με ουσίες παρόμοιες με το απτένιο (διασταυρούμενη δραστηριότητα)

Μονοκλωνικά αντισώματα με υψηλότερη εξειδίκευση παράγονται από υβριδία κυττάρων (υψηλού κόστους)

Ορός που περιέχει αντίσωμα σε μεγάλη συγκέντρωση λέγεται **αντιορός (antiserum)**, φυλάσσεται σε χαμηλή θερμοκρασία για μεγάλα χρονικά διαστήματα.



19

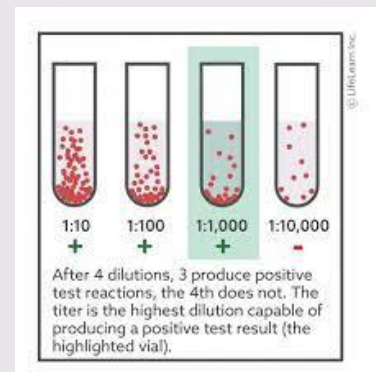
Τίτλος (titer) αντιορού

Συγκέντρωση αντισώματος σε αντιορό εκφράζεται με το **τίτλο (titer)**

Τίτλος: Μέγιστη αραιώση αντιορού στο μείγμα της αντίδρασης, που είναι απαραίτητη και ικανή να αντιδράσει ο αντιορός με συγκεκριμένη ποσότητα επισημασμένου αντιγόνου.

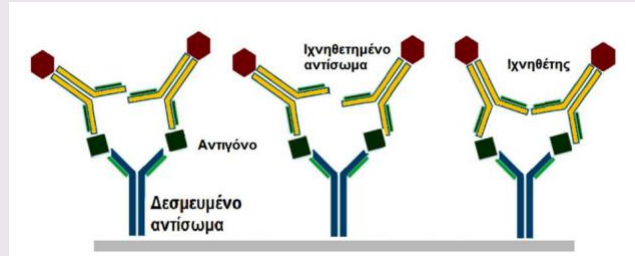
Εκφράζονται ως **κλάσματα αραιώσης** (π.χ. 1/200 έως 1/10000)

Από 1 mL αντιορού μπορούν να εκτελεσθούν χιλιάδες ανοσοχημικοί προσδιορισμοί.



20

Παρασκευή επισημασμένων αντιγόνων



Η αρχή στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς οφείλεται στην σύνδεση ενός **επισημασμένου αντιγόνου (ιχνηθέτης)** με το ειδικό αντίσωμα που είναι ή μπορεί να γίνει **φορέας αναλυτικού σήματος**.

Η ευαισθησία ενός ανοσοχημικού προσδιορισμού εξαρτάται από την ευκολία και την ακρίβεια με την οποία μπορεί να μετρηθεί ο **επισημαντής** που συνδέεται με το αντιγόνο.

21

Τεχνικές ανοσοχημικών προσδιορισμών

Οι ανοσοχημικές τεχνικές διακρίνονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες:

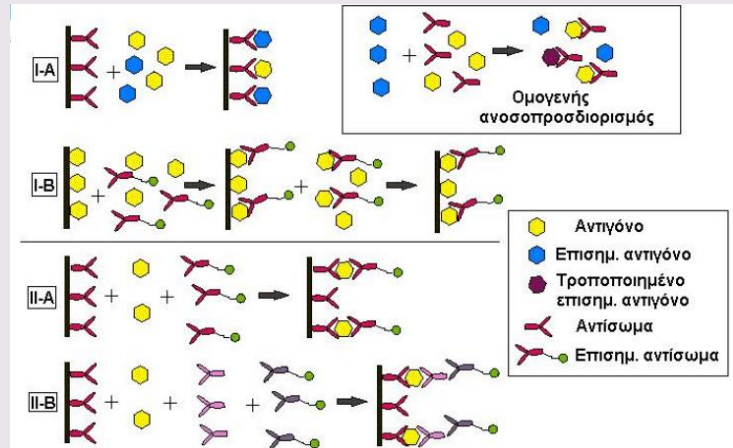
Τις ομοιογενείς (homogenous) και τις ετερογενείς (heterogenous)

Ομοιογενείς: Δεν απαιτείται διαχωρισμός του ελευθέρου από το συνδεδεμένο επισημασμένο αντιγόνο. Η σύνδεση προκαλεί σημαντική μείωση ή εξάλειψη του αναλυτικού σήματος.

Ετερογενείς: Απαιτείται ο διαχωρισμός του ελευθέρου από το συνδεδεμένο επισημασμένο αντιγόνο. Η σύνδεση δεν εξαλείφει το αναλυτικό σήμα.

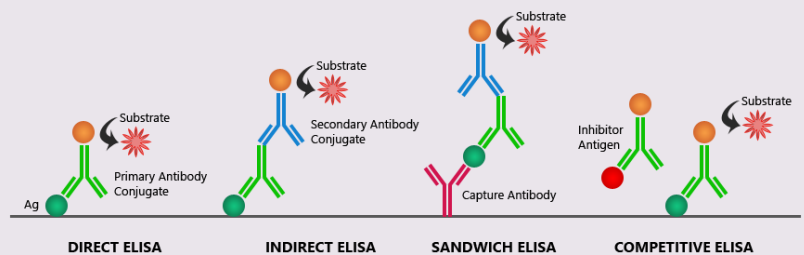
22

Τεχνικές ανοσοχημικών προσδιορισμών



23

Τύποι ανοσοχημικών προσδιορισμών



Ανταγωνιστικός (competitive),
ανταγωνιστικός σύνδεσης
φυσικού αντιγόνου και
ιχνηθέτη

Μη ανταγωνιστικός
(αντιγόνο ή αντίσωμα
αντιδρά ποσοτικά με
περίσσεια επισημασμένου
αντισώματος ή αντιγόνου)

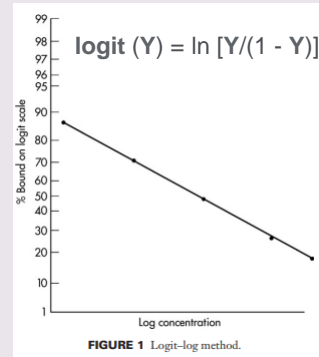
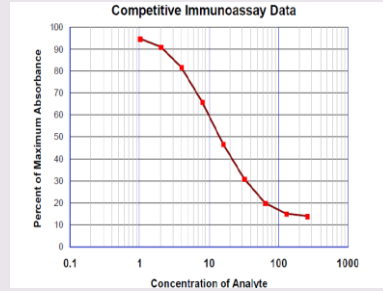
Τύπου sandwich (χρήση
δύο αντισωμάτων)

24

Ποσοτικοποίηση

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι δεν είναι τόσο απλές ως προς την μετατροπή του σήματος σε συγκέντρωση καθώς δεν είναι πάντα ευθείες γραμμές οι καμπύλες βαθμονόμησης. Πολλές φορές είναι σιγμοειδείς καμπύλες.

Το σύνηθες μοντέλο είναι μια logit - log μετατροπή.



25

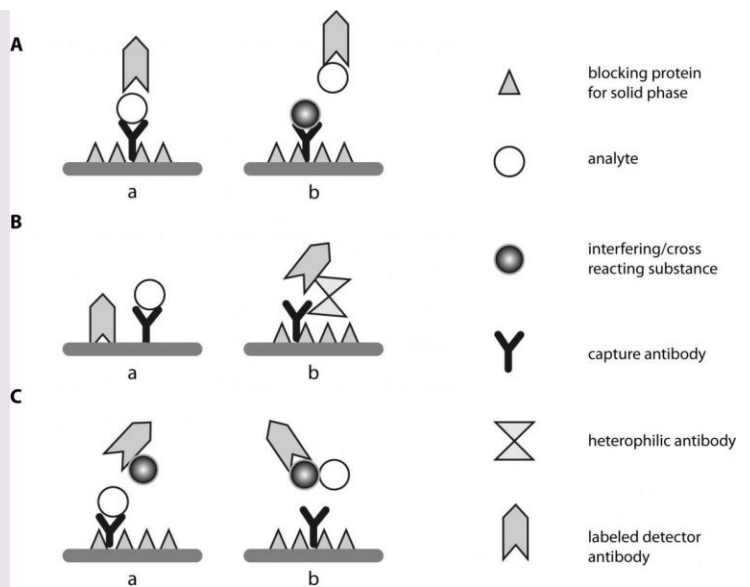
Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

Παρόλο που τα αντισώματα χαρακτηρίζονται από ειδικότητα, είναι δυνατόν να συνδεθούν και ουσίες παρόμοιες με το απένιο

Συνηθέστερο στα πολυκλωνικά αντισώματα

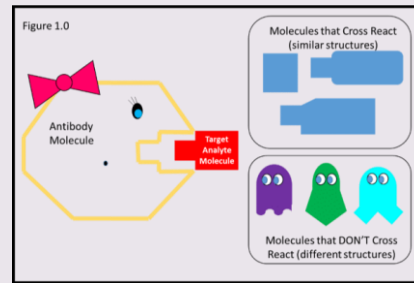
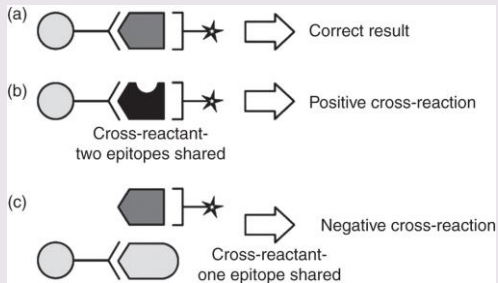
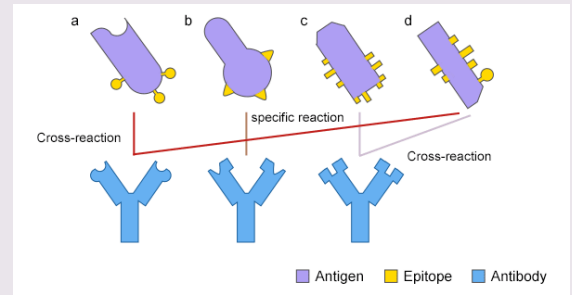
Τα μονοκλωνικά αντισώματα εμφανίζουν σχεδόν ιδανική ειδικότητα

Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως **διασταυρούμενη δραστικότητα (cross-reactivity)**



26

Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα



27

Τεχνικές Ανοσοπροσδιορισμών

Με βάση τη μέθοδο μέτρησης του ιχνηθέτη

28

Τεχνικές Ανοσοπροσδιορισμών

Όνομασία	Συμβολισμός	Επισημαντής	Μέθοδος Μέτρησης
Ραδιοανοσοπροσδιορισμός Radioimmunoassay	RIA	Ραδιοϊσότοπα	Μέτρηση ακτινοβολίας
Ενζυμοανοσοπροσδιορισμός Enzyme-immunoassay	EIA	Ένζυμο	Κλασικές αναλυτικές μέθοδοι
Φθορισμοανοσοπροσδιορισμός Fluorescence-Immunoassay	FIA	Φθορίζουσα ουσία	Φθορισμομετρία
Νεφελοανοσοπροσδιορισμός Nephelometric Immunoassay	NIA		Νεφελομετρικός προσδιορισμός συμπλόκου αντιγόνου - αντισώματος

29

Ραδιοανοσοπροσδιορισμοί (RIA)

- Η παλαιότερη ανοσοχημική μέθοδο που έχει χρησιμοποιηθεί.
- Ετερογενής και ανταγωνιστικές
- Ο Ιχνηθέτης της προσδιοριζόμενης ουσίας παρασκευάζεται με την εισαγωγή ενός ραδιοϊσοτόπου (π.χ. ^3H , ^{14}C , ^{131}I , ^{75}Se , ^{125}I)
- Διαχωρίζεται το ελεύθερο με το συνδεδεμένο ιχνηθέτη
- Μέτρηση ραδιενέργεια σε μία από τις δύο φάσεις με μετρητές σπινθηρισμού (σωματίδια - β και γ - ακτινοβολία)

30

Ραδιοανοσοπροσδιορισμοί (RIA)

- Πολύ καλή ευαισθησία
- Μεγάλη επικινδυνότητα για την υγεία (αυστηροί κανόνες παραγωγής, χρήσης και διακίνησης)
- Κόστος χρήσης
- Περιορισμένος χρόνος ημιζωής
- Το ραδιοϊσότοπο είναι παράγοντας αποσταθεροποίησης των άλλων συστατικών της μεθόδου.

31

Ενζυμοανοσοπροσδιορισμοί (EIA)

- 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.

32

Ομοιογενείς EIA – Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT)

- Περισσότερο χρησιμοποιούμενη τεχνική ομογενούς EIA
- Κυρίως για προσδιορισμό φαρμάκων σε ορό
- Το προσδιοριζόμενο αντιγόνο (Απτενιο) **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

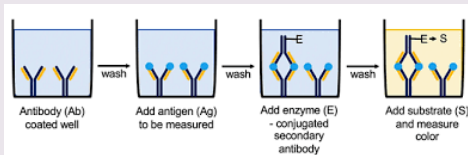
33

Ετερογενής EIA – Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

- Κυριότερος εκπρόσωπος των ανοσοχημικών τεχνικών
- Η ενεργότητα του ενζυμικού ιχνηθέτη διατηρείται και μετά τη σύνδεση ιχνηθέτη με τα αντισώματα
- 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.

34

ELISA-Βασικά στάδια της μεθόδου



Προσρόφηση των αντιγόνων του δείγματος

Κάλυψη μη ειδικών θέσεων (blocking)

Αναγνώριση/σύνδεση Ag-σημασμένου Ab.

Ενζυμική επισύμανση και μέτρηση σήματος

35

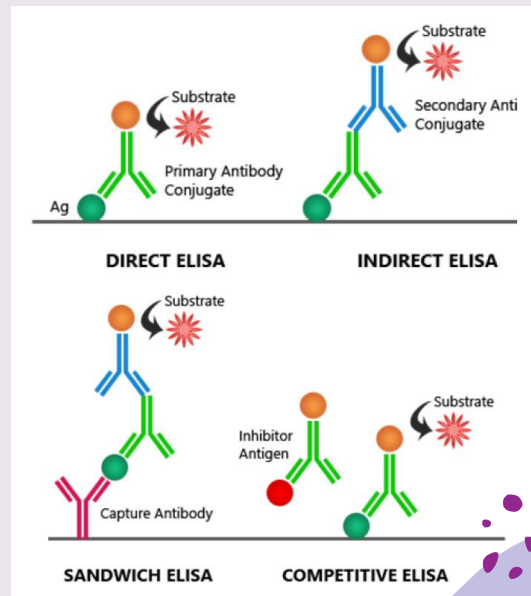
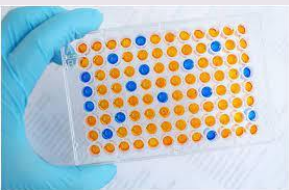
Τύποι ELISA

Άμμεση

Έμμεση

Τύπου Sandwich

Ανταγωνιστική

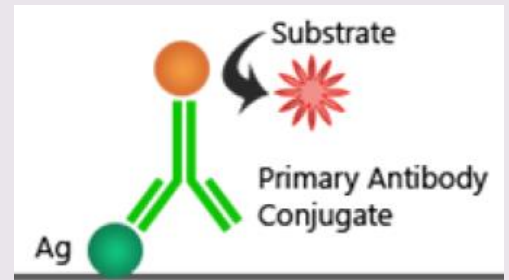


36

Τύποι ELISA – Άμεση

Αρχή λειτουργίας: Σε μια άμεση ELISA, ένα αντιγόνο ή ένα δείγμα αντισώμα ανίχνευσης συνδέεται με την πρωτεΐνη στόχο. Στη συνέχεια προστίθεται υπόστρωμα, παράγοντας σήμα που είναι ανάλογο με την ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα. Δεδομένου ότι μόνο ένα αντίσωμα χρησιμοποιείται σε μια άμεση ELISA, είναι λιγότερο ειδική σε σχέση με τους άλλους τύπους.

Απλή και γρήγορη, ολοκληρώνεται σε μία φάση
 Λιγότερο ειδική γιατί χρησιμοποιεί μόνο 1 αντίσωμα
 Υψηλό υπόβαθρο αν όλες οι πρωτεΐνες είναι ακινητοποιημένες στο φρεάτιο (well)
 Μπορεί να να είναι χρονοβόρα κατά την εκτέλεση πολλαπλών Πειραμάτων
 Το σήμα ενισχύεται λιγότερο

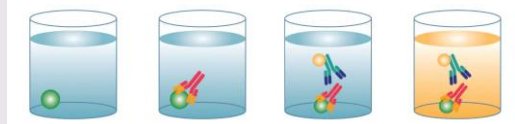
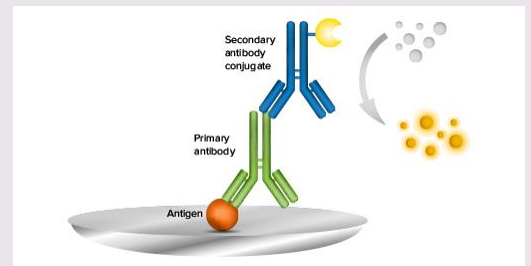


37

Τύποι ELISA – Έμμεση

Αρχή Λειτουργίας: Είναι παρόμοια με μια άμεση ELISA στο ότι ένα αντιγόνο ακινητοποιείται σε μια πλάκα, αλλά περιλαμβάνει ένα πρόσθετο βήμα ανίχνευσης ενίσχυσης. Αρχικά, προστίθεται ένα μη συζευγμένο πρωτογενές αντίσωμα ανίχνευσης και συνδέεται με το συγκεκριμένο αντιγόνο. Στη συνέχεια προστίθεται ένα συζευγμένο δευτερεύον αντίσωμα που κατευθύνεται εναντίον του είδους ξενιστή του πρωτογενούς αντισώματος. Στη συνέχεια, το υπόστρωμα παράγει ένα σήμα ανάλογο με την ποσότητα του αντιγόνου που είναι δεσμευμένο στο φρεάτιο.

Ενίσχυση σήματος με τη χρήση δευτερεύοντως αντισώματος
 Πιθανότητα διασταυρούμενης αντιδραστικότητας που μπορεί να προκληθεί από το δευτερεύον αντίσωμα

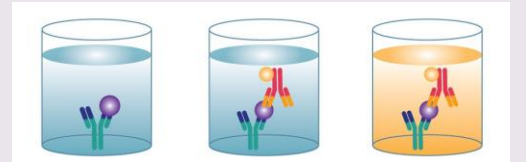
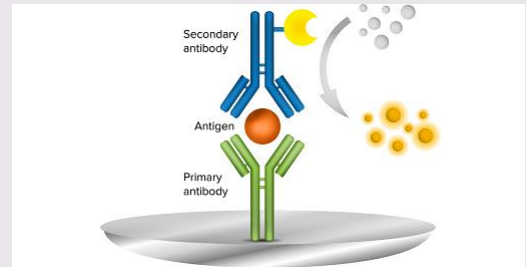


38

Τύποι ELISA – Τύπου Sandwich

Αρχή Λειτουργίας: Είναι ο πιο κοινός τύπος ELISA. Δύο ειδικά αντισώματα χρησιμοποιούνται για την σάντουιτς του αντιγόνου, που συνήθως αναφέρονται ως ταιριαστά ζεύγη αντισωμάτων. Το αντίσωμα σύλληψης επικαλύπτεται στη μικροπλάκα, προστίθεται δείγμα και η πρωτεΐνη που ενδιαφέρει δεσμεύεται και ακινητοποιείται στην πλάκα. Στη συνέχεια προστίθεται το συζευγμένο αντίσωμα ανίχνευσης και συνδέεται με έναν επιπλέον επίτοπο στην πρωτεΐνη στόχο. Το αντίσωμα που προστίθεται, παράγει ένα σήμα που είναι ανάλογο με την ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας που υπάρχει στο δείγμα.

Υψηλής ειδικότητα και ευαισθησία (δύο αντισώματα)
Συμβατή με πολύπλοκα δείγματα
Μεγαλύτερα πρωτόκολλα
Πρόκληση η ανάπτυξη (πολύπλοκη διαδικασία)

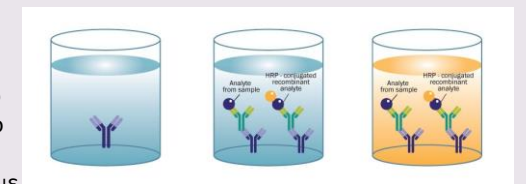
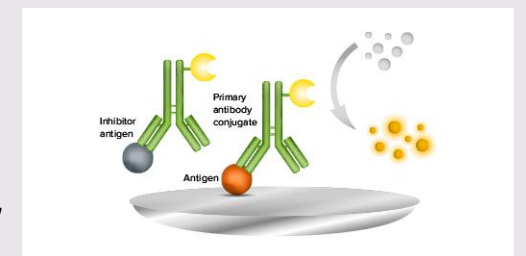


39

Τύποι ELISA – Ανταγωνιστική

Αρχή Λειτουργίας: Χρησιμοποιούνται συνήθως για μικρά μόρια, όταν η πρωτεΐνη που ενδιαφέρει είναι πολύ μικρή για να γίνει αποτελεσματική σάντουιτς με δύο αντισώματα. Παρόμοια με μια ELISA σάντουιτς, ένα αντίσωμα σύλληψης επικαλύπτεται σε μια μικροπλάκα. Αντί να χρησιμοποιηθεί ένα συζευγμένο αντίσωμα ανίχνευσης, ένα συζευγμένο αντιγόνο χρησιμοποιείται για να ολοκληρωθεί η σύνδεση με το αντιγόνο που υπάρχει στο δείγμα. Όσο περισσότερο αντιγόνο υπάρχει στο δείγμα, τόσο λιγότερο συζευγμένο αντιγόνο θα συνδεθεί στο αντίσωμα σύλληψης. Προστίθεται υπόστρωμα και το σήμα που παράγεται είναι αντιστρόφως ανάλογο με την ποσότητα πρωτεΐνης που υπάρχει στο δείγμα.

Δυνατότητα ποσοτικοποίησης μικρών μορίων
Λιγότερο ειδικό λόγω του ενός αντισώματος
Απαιτεί ένα συζευγμένο αντίσωμα



40

Ενζυμοαναοσοπροσδιορισμοί (EIA)

- Αντιγόνα ή αντισώματα έχουν συνδεθεί με ομοιοπολικό δεσμό με ένα ένζυμο
- Ανυπαρξία κινδύνων ραδιενέργειας
- Μεγαλύτερος δυνατός χρόνος αποθήκευση των ενζυμοεπισημασμένων ιχνηθετών
- Πολύ απλούστερα και φθηνότερα όργανα (π.χ. ένα απλό φωτόμετρο)
- Δεν απαιτούνται ειδικό χώροι, όπως στις RIA.
- Τα συστατικά του πλάσματος συνήθως επηρεάζουν την ενζυμική ενεργότητα.
- Οι EIA με χρωμογόνο υπόστρωμα έχουν μικρότερη ευαισθησία σε σχέση με τις RIA. Αλλά παραπλήσιες ή και καλύτερη με φωταύγεια.

41

Φθορισμοαναοσοπροσδιορισμοί – Fluorescence ImmunoAssays, FIA

Χρησιμοποιούνται ως επισημαντές στον προσδιοριζόμενο αντιγόνο και σε ορισμένες περιπτώσεις και στο αντίσωμα, φθορίζουσες ουσίες.

Η εκπομπή του φθορισμού επηρεάζεται από τη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος

Επισημαντές FIA: Φλουορεσεκίνη, Τετραμεθυλοροδαμίνη, Ουμπελιφερόνη κλπ

Ομογενείς FIA

Η εκπομπή φθορισμού αναστέλλεται σε σημαντικό ποσοστό από την ανρίδραση αντιγόνου-αντισώματος

Ετερογενεί FIA

Το αναλυτικό σήμα δεν επηρεάζεται από την σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος.

Πλεονεκτήματα: Χαμηλά όρια ανίχνευσης

42

Νέφελανοσοπροσδιορισμοί – Nephelometric ImmunoAssays, 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 καθοιζάνουν ως ανοσοϊζήματα

Το αρχικό στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων παρακολουθείται νεφελομετρικά

Το αναλυτικό σήμα είναι η παρακολούθηση σχηματισμού των «κέντρων σκέδασης», που είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου αντιγόνου

Χαρακτηρίζεται από πολύ καλή εκλεκτικότητα

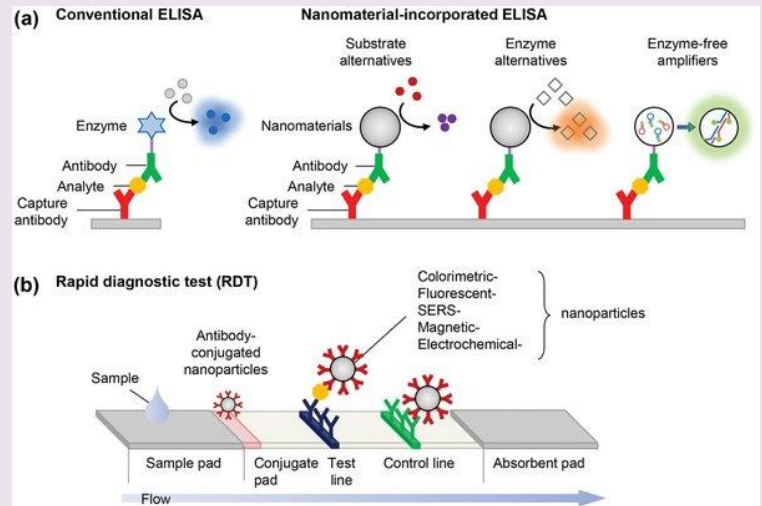
Απαιτεί απλά και φθηνά όργανα (νεφελόμετρα)

43

Παραδείγματα εφαρμογών

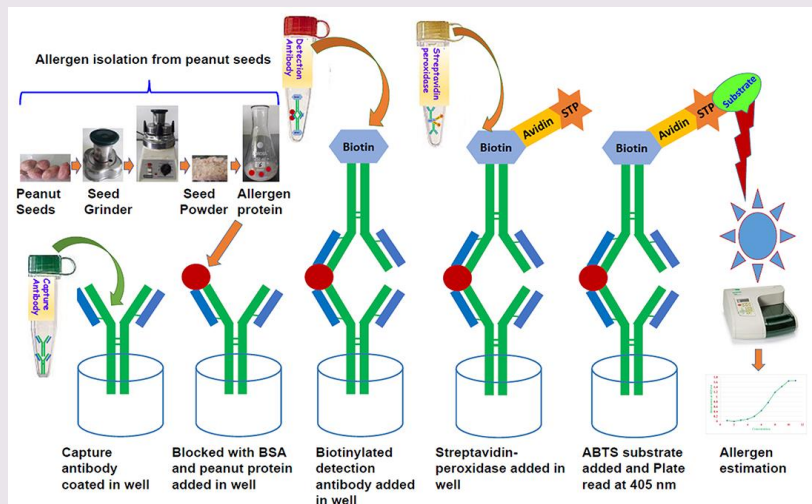
44

Προσδιορισμός SARS-CoV-2



45

Προσδιορισμός Αλλεργιογόνων σε τρόφιμα



46