

Κεφ. 23Α

Ανοσοχημικές Τεχνικές

Ανοσοχημικές Τεχνικές

Εισαγωγή (1)

- Ανάλυση βιολογικών δειγμάτων

- Ορός αίματος
- Πλάσμα αίματος
- Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
- Ούρα
- Πτύελα
- Σίελος, κλπ

παρουσιάζει εξαιρετικές δυσκολίες, λόγω
πολυπλοκότητας

- Περιέχουν μεγάλο αριθμό φυσιολογικών και μη ουσιών και τους μεταβολίτες τους

Ανοσοχημικές Τεχνικές

Εισαγωγή (2)

- Σύγχρονη θεραπευτική καθιέρωσε σειρά κλινικών αναλύσεων στα δείγματα αυτά για:
 - Διαγνωστικούς σκοπούς
 - Παρακολούθηση θεραπευτικής αγωγής
- Απαιτούνται προσδιορισμοί:
 - Ορμονών
 - Θυρεοειδούς
 - Οιστρογόνων
 - Ινσουλίνης, κλπ

Ανοσοχημικές Τεχνικές

Εισαγωγή (3)

- 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)

Αναλυτικό πρόβλημα βιοαναλύσεων (1)

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

Αναλυτικό πρόβλημα βιοαναλύσεων (2)

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

Λύση αναλυτικού προβλήματος βιοαναλύσεων

- Ανάπτυξη ανοσοχημικών προσδιορισμών ή ανοσοπροσδιορισμών (immunoassays)
 - Λέγονται και ανοσοχημικοί ή ανοσοβιολογικοί προσδιορισμοί
- Αρχή: Χρησιμοποιούν αντισώματα ως εκλεκτικά αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό ουσιών με αντιγονικές ιδιότητες που συνδέονται εξειδικευμένα από αυτά

Ανοσοπροσδιορισμοί

Ιστορία (1)

- Πρώτη ανοσοχημική μέθοδος προτάθηκε από τον **Berson και Yalow** (1959)
 - Αφορούσε προσδιορισμό ινσουλίνης
- Έκτοτε οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί, που χαρακτηρίζονται από **υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα**, έτυχαν τεράστιας ανάπτυξης
- Η πρωτοπόρος στον τομέα Yalow τιμήθηκε με Nobel Φυσιολογίας και Ιατρικής (1977)
- Η τεχνική έχει τόση σπουδαιότητα στην Κλινική Ανάλυση / Βιοανάλυση όση η ανάπτυξη της χρωματογραφίας στη χημική ανάλυση

Rosalyn Sussman Yalow

Nobel 1977



Σημερινή κατάσταση ανοσοπροσδιορισμών

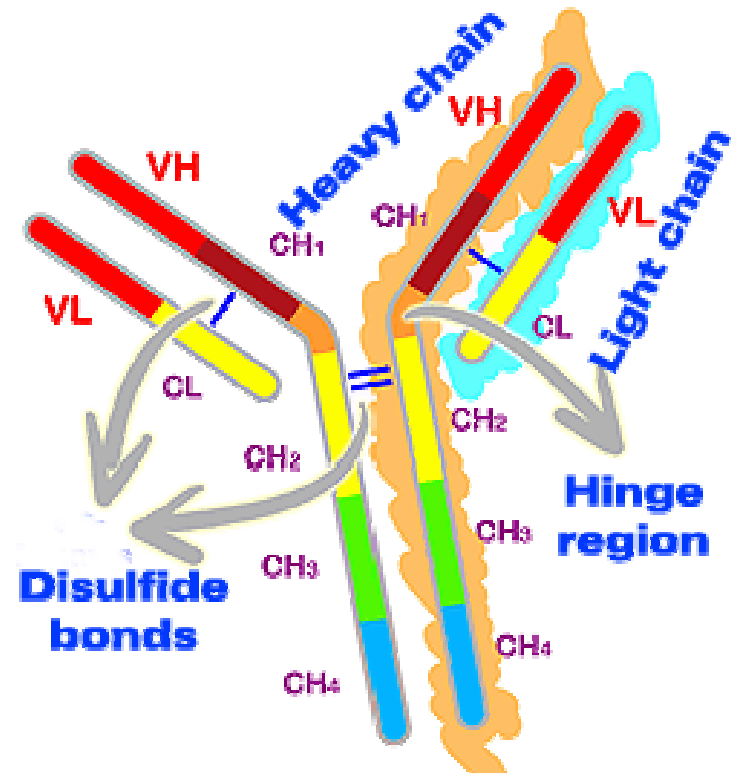
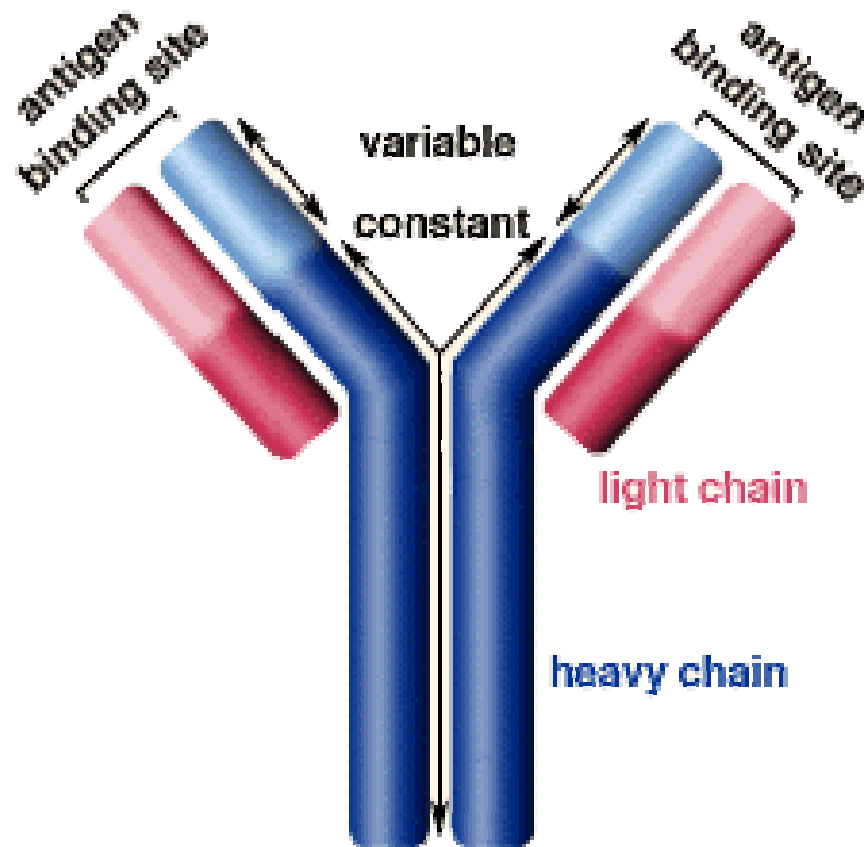
- Μεγάλος αριθμός ουσιών ανιχνεύεται / προσδιορίζεται σε βιολογικά δείγματα με αυτοματοποιημένους αναλυτές σε βάση ρουτίνας
 - Ορμόνες
 - Φάρμακα
 - Βιταμίνες
 - Ένζυμα
 - Ισοένζυμα
 - Ειδικές πρωτεΐνες
 - Νουκλεοτίδια
 - Αντιγόνα ιών
 - Καρκινοεμβρυϊκά αντιγόνα
 - Τοξίνες μικροβίων
 - Αντισώματα
 - Φυτοφάρμακα, κλπ

Βασικές έννοιες ανοσοχημείας (1)

Αντίσωμα (Antibody, Ab)

- **Εξειδικευμένη πρωτεΐνη** (ανοσοσφαιρίνη), που παράγεται από τον οργανισμό (ενός ζώου), όταν το **ανοσοποιητικό του σύστημα** διεγερθεί από την παρουσία κάποιου εξειδικευμένου ξένου μορίου, του **αντιγόνου**
- 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**)

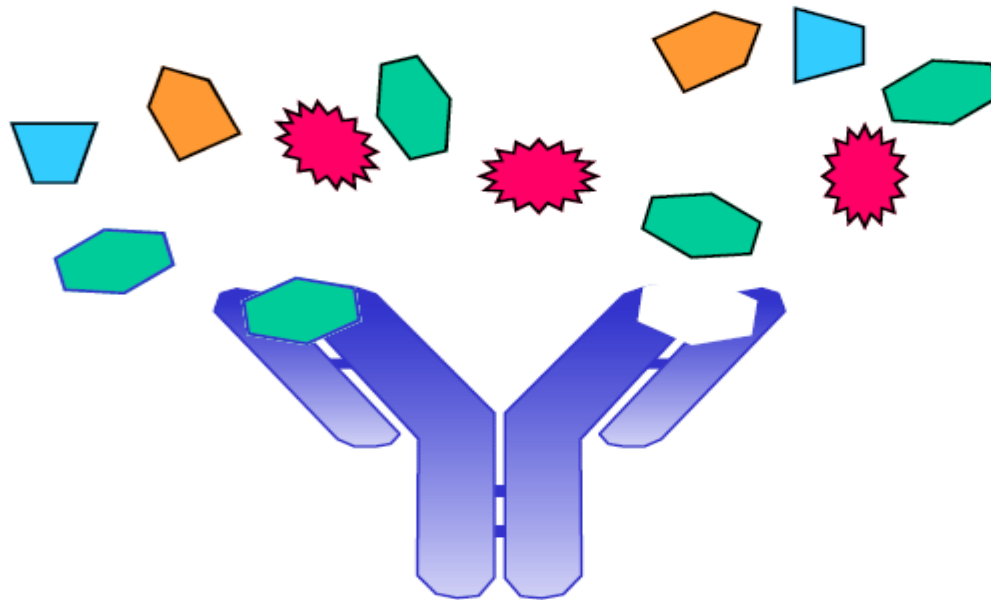
Δομή Αντισώματος



Ειδικότητα Αντισωμάτων

Antibody-Antigen Binding

EIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC



Βασικές έννοιες ανοσοχημείας (2)

Αντιγόνο (Antigen, Ag)

- Γενικά είναι κάθε μόριο **ικανό να αντιδράσει (συνδεθεί) με ένα αντίσωμα**, αλλά όχι και υποχρεωτικά ικανό να προκαλέσει την ανάπτυξη αντισώματος
- **Ανοσογόνο (immunogen)** είναι μεγαλομοριακό αντιγόνο, που έχει την ικανότητα να προκαλέσει την ανάπτυξη αντισώματος, όταν εισαχθεί σε ένα οργανισμό

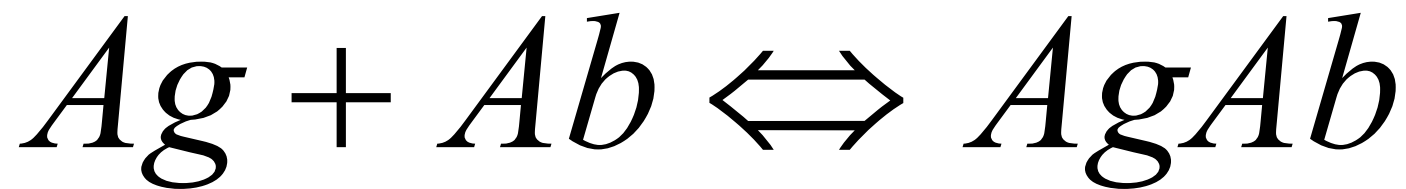
Βασικές έννοιες ανοσοχημείας (3)

ΑΠΤΈΝΙΟ (hapten)

- Μικρομοριακά αντιγόνα (φάρμακα, ορμόνες, φυτοφάρμακα, κλπ) ($MB < 4000$), 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 μια πρωτεΐνη φορέα, όπως η βόειος οραλβουμίνη (BSA)
- Αποτελούν την πλειονότητα των προσδιοριζόμενων με ανοσοπροσδιορισμούς ουσιών

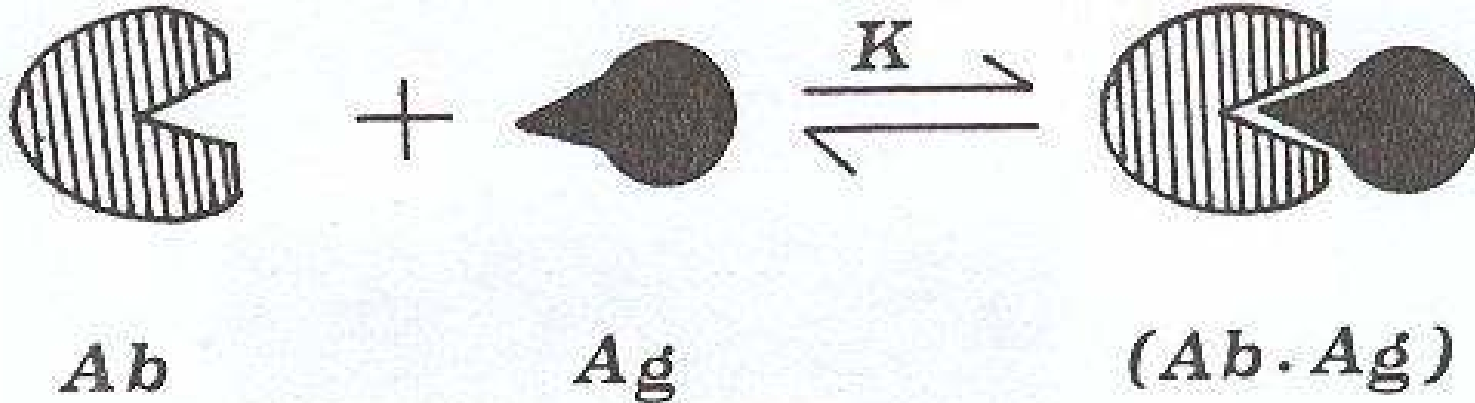
Βάση ανοσοχημικών προσδιορισμών (1)

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



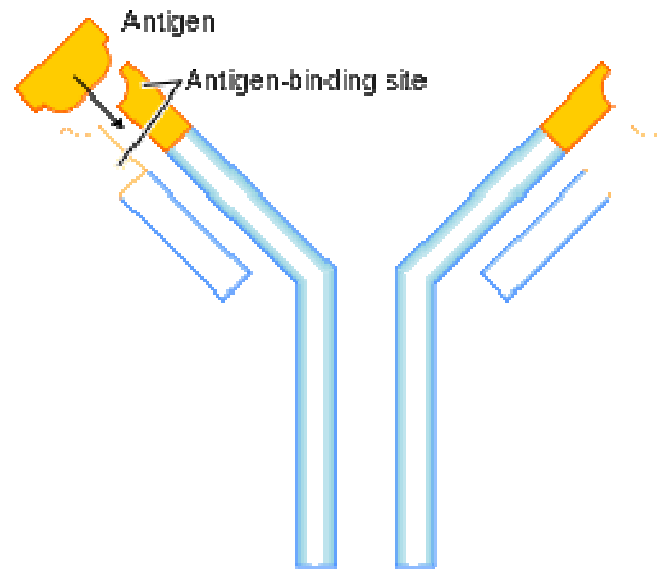
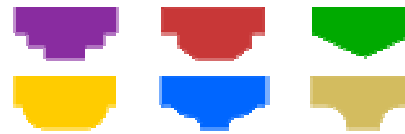
Βάση ανοσοχημικών προσδιορισμών (2)

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



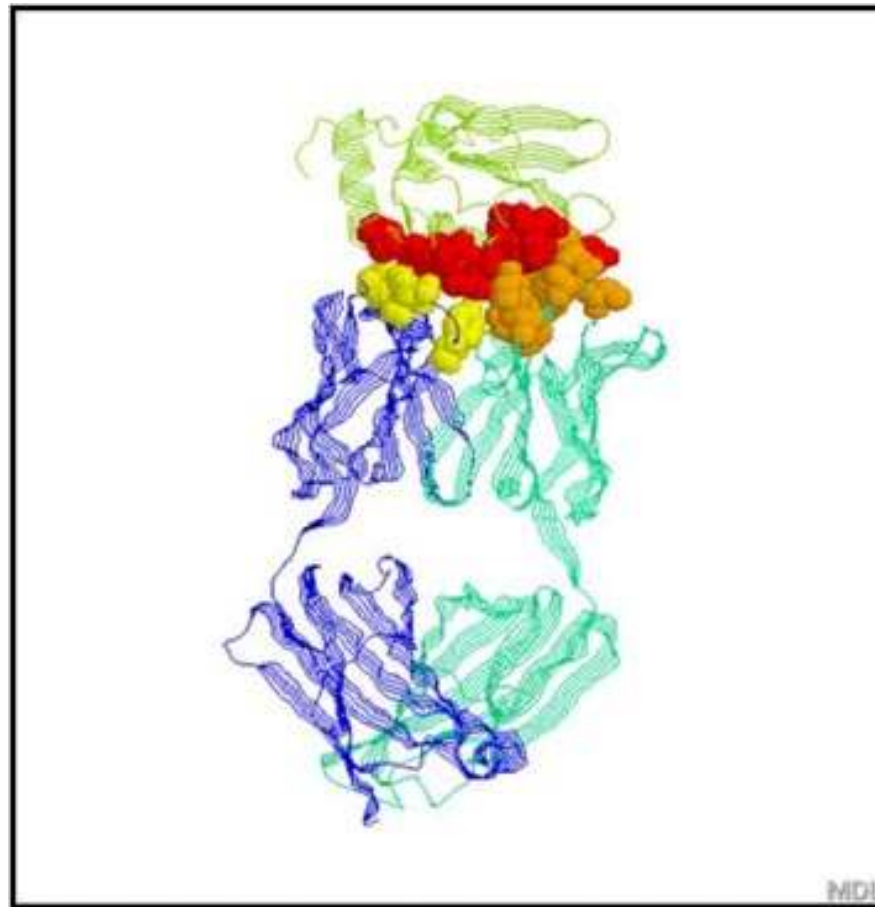
Σχηματική παράσταση εξειδικευμένης αντίδρασης
αντιγόνου – αντισώματος
Το αντίσωμα αναγνωρίζει μόνο το αντιγόνο που το
παρήγαγε (κίτρινο)

Antigens



Antibody

Σύνδεση Ag-Ab

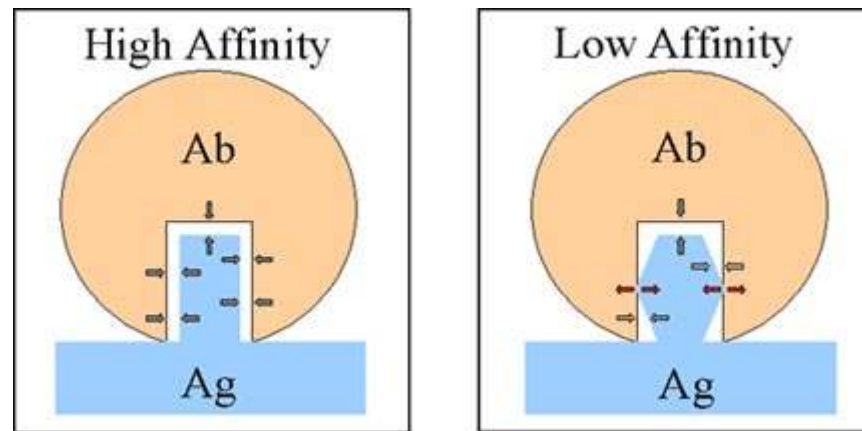


Source: Li, Y., Li, H., Smith-Gill, S. J.,
Mariuzza, R. A., Biochemistry 39, 6296, 2000

Σύνδεση Ag-Ab

Αριστερά υψηλή συγγένεια

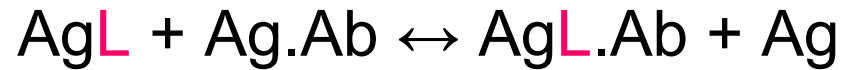
Δεξιά χαμηλή συγγένεια



Αναλυτική εφαρμογή αντίδρασης αντιγόνου – αντισώματος (1)

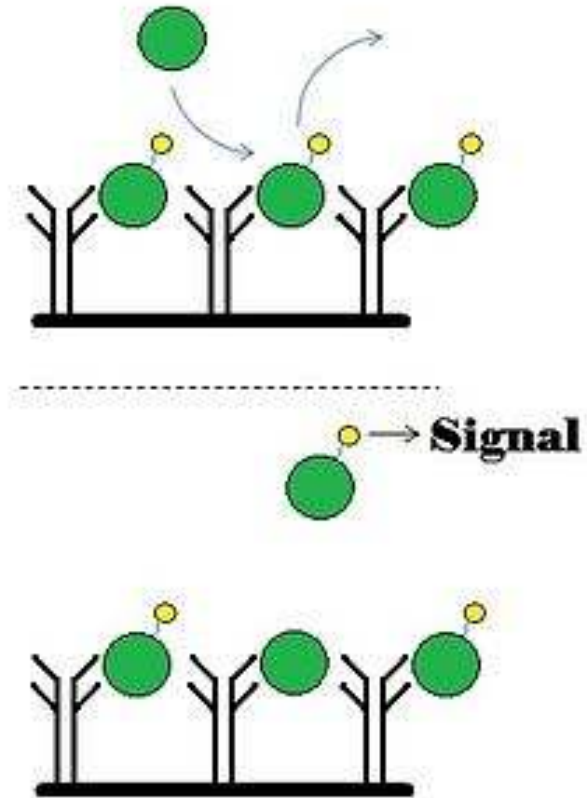
- Βρήκε αναλυτική εφαρμογή μετά από δύο παρατηρήσεις:
 - A) Η μη ομοιοπολική σύνδεση του αντιγόνου με την πρωτεΐνη-αντίσωμα είναι εξαιρετικά εξειδικευμένη (σχέση κλειδιού – κλειδαριάς) και αμφίδρομη, με πολύ μεγάλη σταθερά ισορροπίας ($k_1 \gg k_{-1}$)
 - B) Ελαφρά τροποποιημένο αντιγόνο με κάποιο φορέα αναλυτικού σήματος (επισημασμένο αντιγόνο, labelled, AgL, ιχνηθέτης) αντικαθιστά ανταγωνιστικά το μη επισημασμένο αντιγόνο (Ag) (αναλύτης)

Αναλυτική εφαρμογή αντίδρασης αντιγόνου – αντισώματος (2)



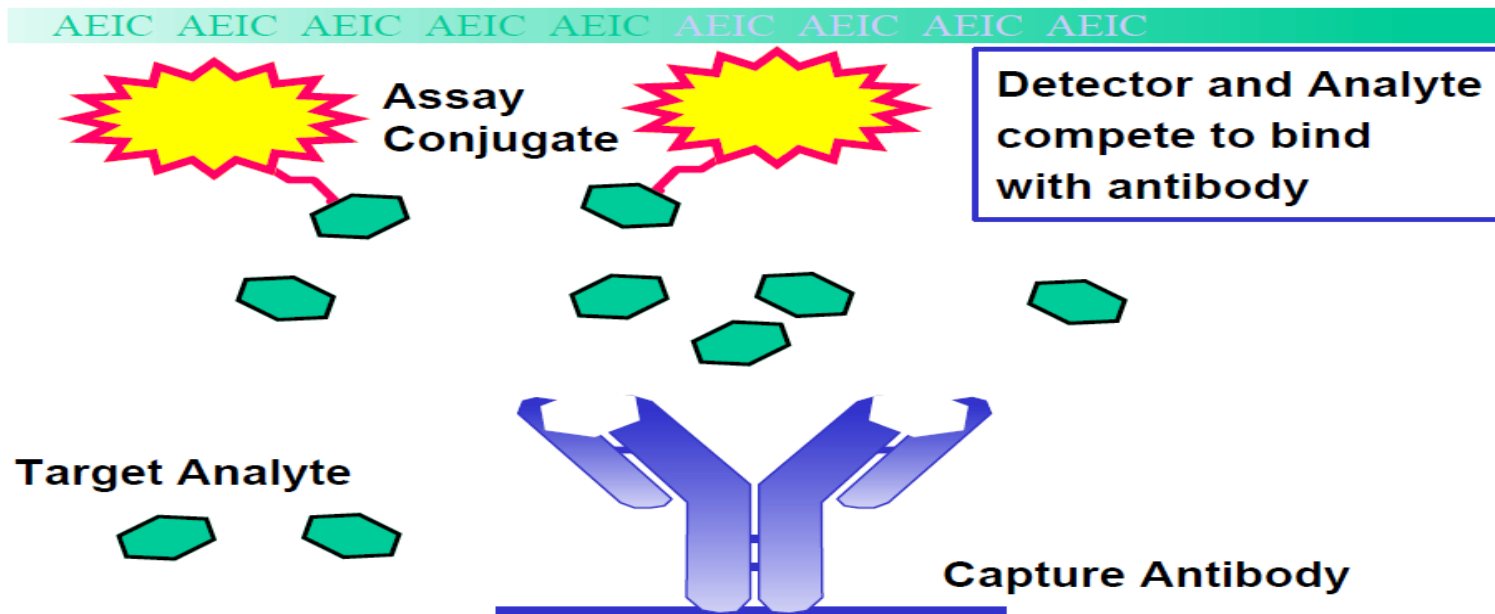
- Ο σχηματισμός του εξειδικευμένου συμπλόκου Ag.Ab με **εμφάνιση ιζήματος** ή συσσωματώματος (ανοσοϊζημα) χρησιμοποιείται για την **ταυτοποίηση** του αντιγόνου (ορμόνης, τοξίνης μικροβίου, αντιγόνου ιού, κλπ)
- Η **ανταγωνιστική σύνδεση** του φυσικού αντιγόνου (Ag) και του επισημασμένου αντιγόνου (ιχνηθέτη) (AgL) χρησιμοποιείται για τον **ποσοτικό προσδιορισμό** του αντιγόνου
- Το φυσικό αντιγόνο είναι γνωστό και ως **ψυχρό αντιγόνο**, ενώ το επισημασμένο και ως **θερμό αντιγόνο ή ιχνηθέτης**

Ανταγωνιστικός ανοσοπροσδιορισμός
Ο αναλύτης (πράσινος χωρίς ιχνηθέτη) εκτοπίζει
το επισημασμένο αντιγόνο που ανιχνεύεται ή
μετρείται



Ανταγωνιστικός Ανοσοπροσδιορισμός

Competitive Immunoassay



Παρασκευή ανοσογόνων και αντισωμάτων (1)

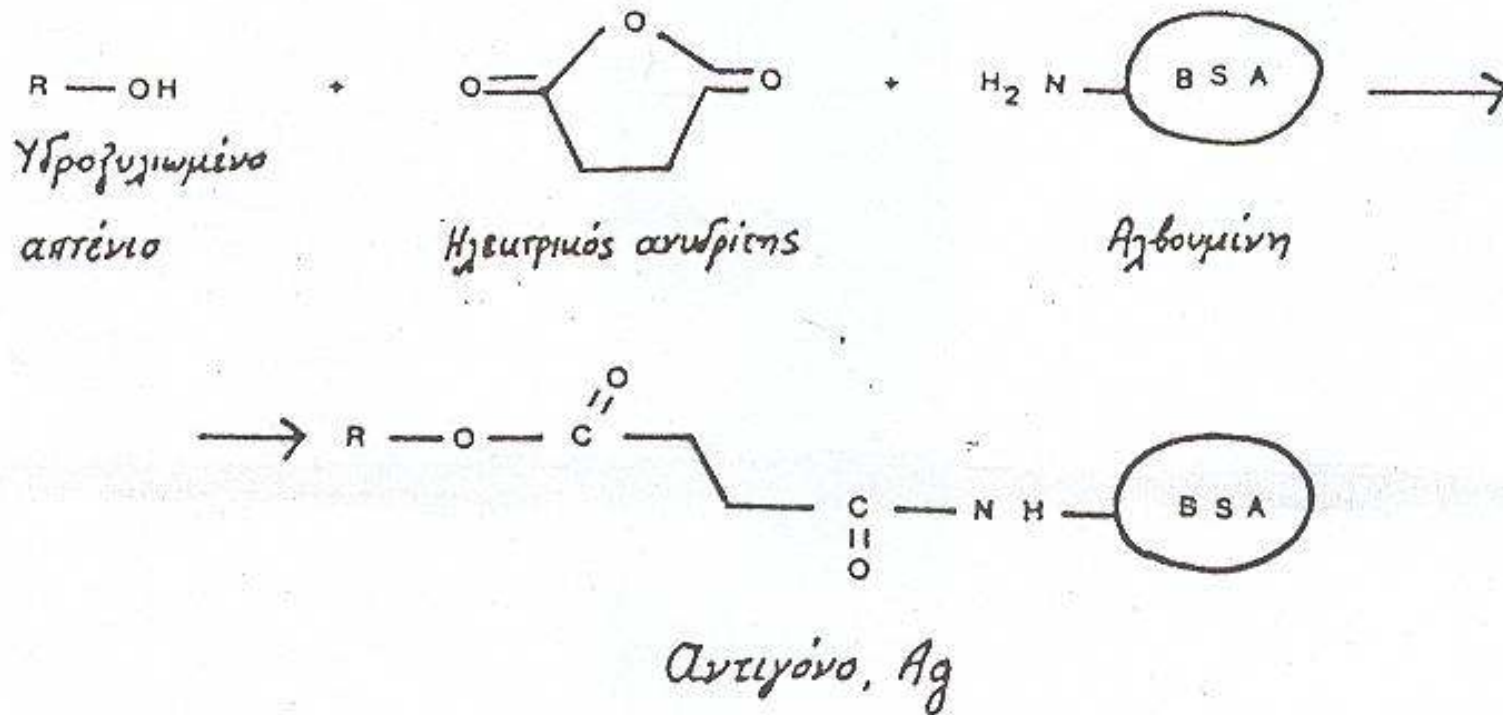
- Οι περισσότερες ουσίες, των οποίων ενδιαφέρει ο προσδιορισμός (ορμόνες, φάρμακα, βιταμίνες κλπ), είναι μικρού ΜΒ (<1000).
- Δεν είναι ικανά να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα πειραματοζώων για παραγωγή εξειδικευμένου αντισώματος
- Είναι απτένια, πρέπει να γίνει χημική σύνδεση με πρωτεΐνη – φορέα
- Συνήθως αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA).

Παρασκευή ανοσογόνων και αντισωμάτων (2)

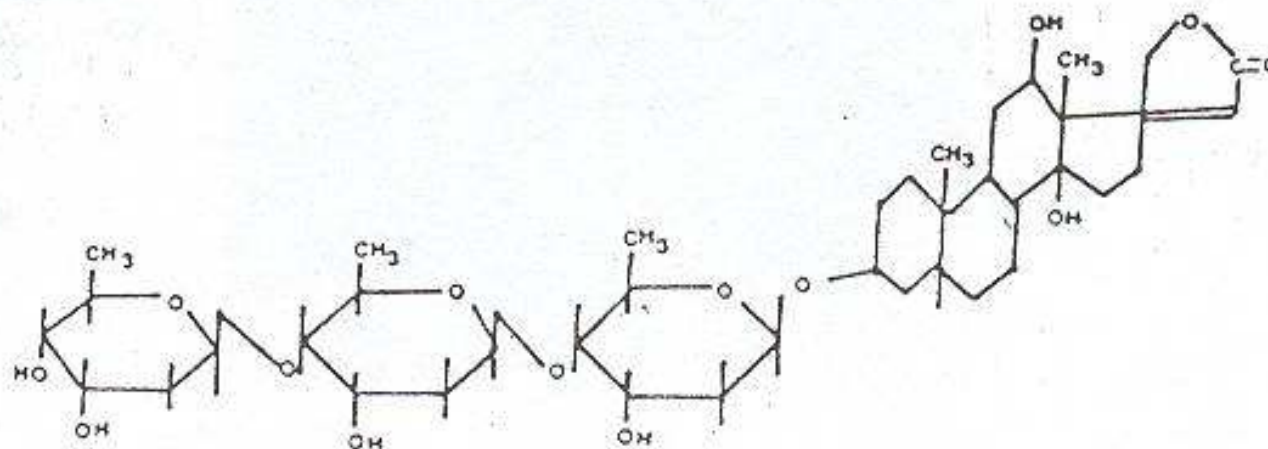
Σύνδεση απτενίων - BSA

- Χρησιμοποιούνται διάφορες αντιδράσεις οργανικής χημείας, ανάλογα με χαρακτηριστικές ομάδες, που διαθέτει το προς σύνδεση απτένιο.
 - Με υδροξυλομάδα συνδέονται με αμινομάδα της BSA με ηλεκτρικό ανυδρίτη
 - Με μόρια σακχάρου (π.χ. γλυκοζίτης διγοξίνη), κατεργάζονται με υπεριωδικά για το σχηματισμό καρβονυλομάδας που συνδέεται με αμινομάδες της BSA.
 - Με καρβοξυλομάδα συνδέονται με αμινομάδα της BSA με τη μέθοδο καρβοδιιμιδίου και αντίστροφα.

Σχηματισμός εστέρων υδροξυλιωμένων απτενίων με ηλεκτρικό ανυδρίτη και αμιδική σύνδεση με BSA

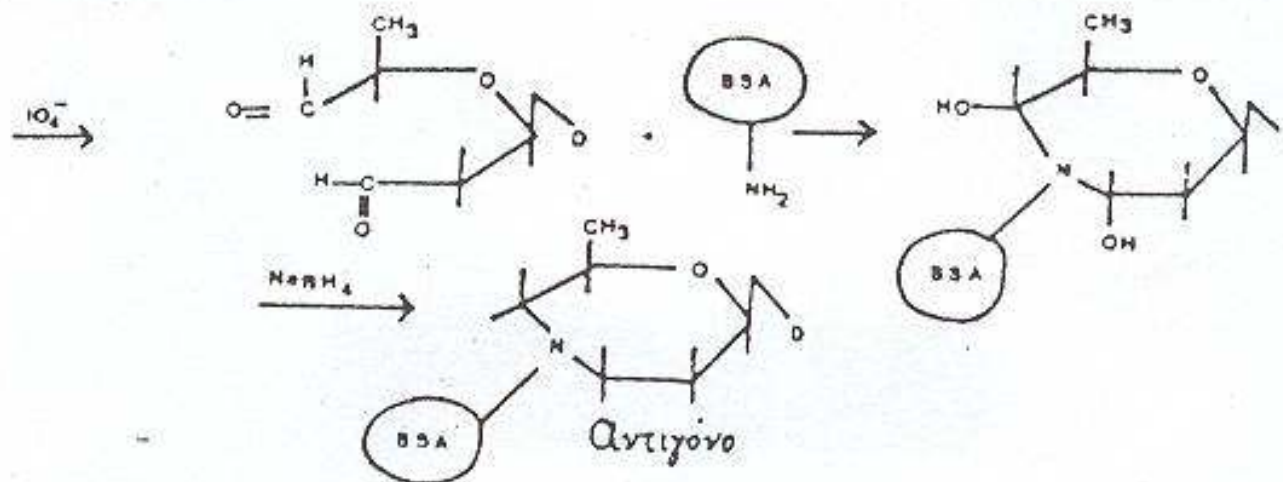


Σχηματισμός καρβονυλικής ομάδας με διάσπαση υδατανθρακικού τμήματος απτενίου (ο γλυκοσίδης διγοξίνη) με υπεριοδικά (A)

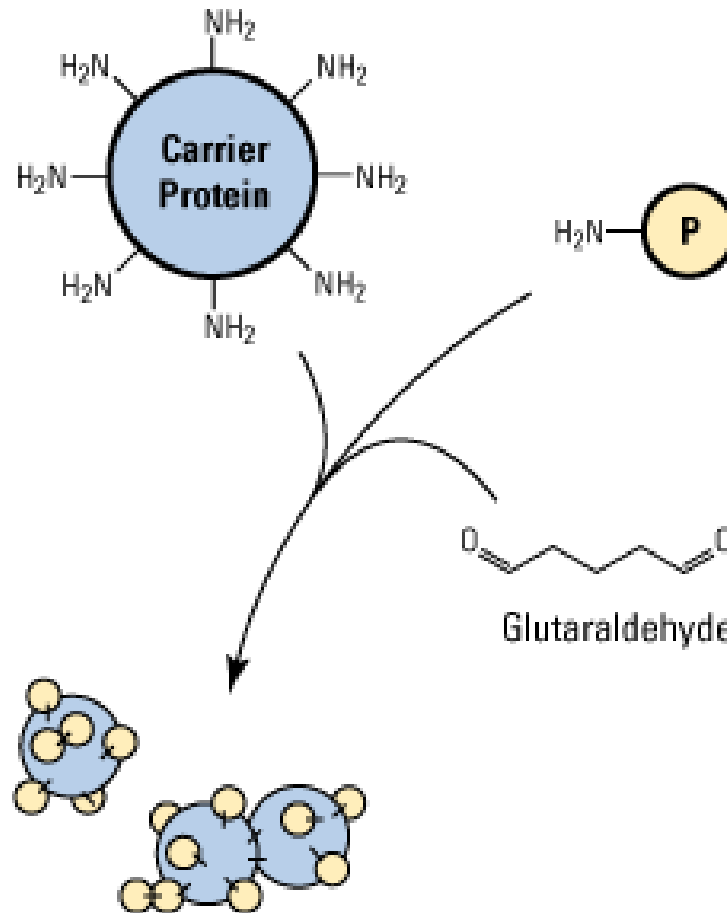


Διγοξίνη (γλυκοσίδης)

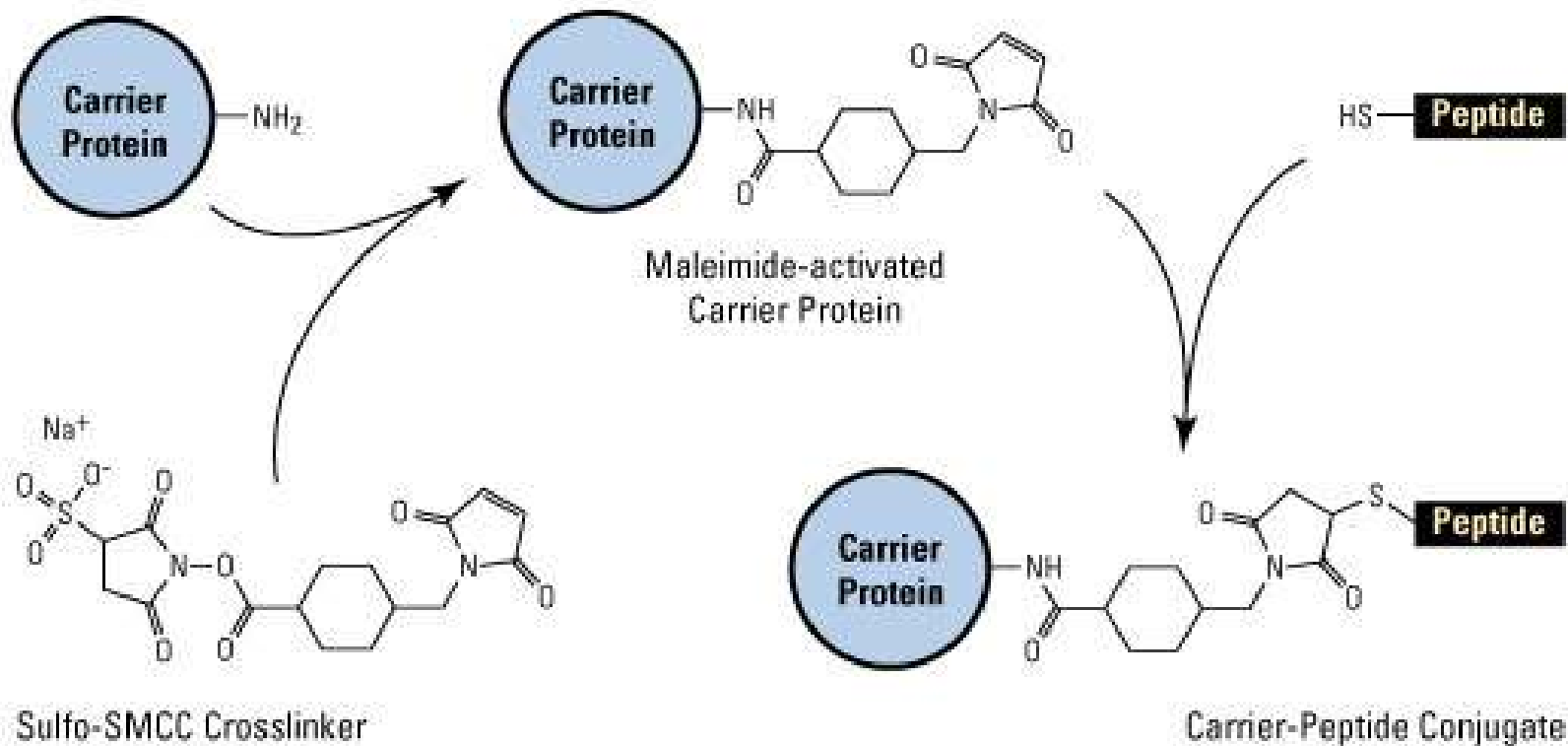
Σχηματισμός καρβονυλικής ομάδας με διάσπαση υδατανθρακικού τμήματος απτενίου (ο γλυκοσίδης διγοξίνη) με υπεριοδικά (B)



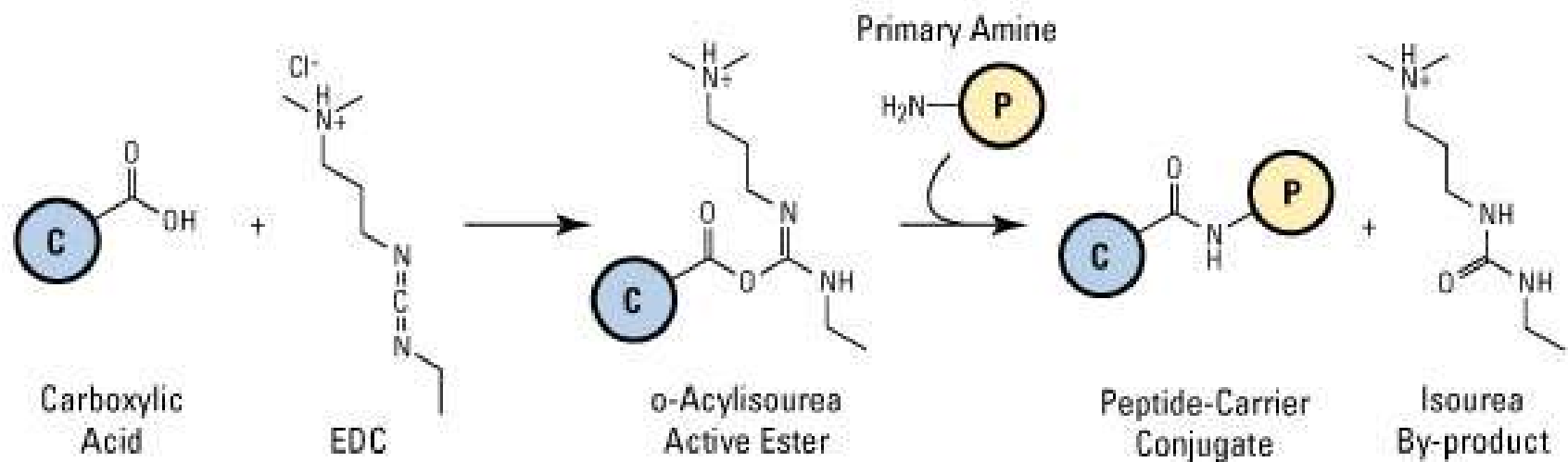
Σύνδεση απτενίου (P) με αμινομάδα με τις αμινομάδες της BSA με τη βοήθεια νλουταραλδεΐδης



Σύνδεση πεπτιδίου με ομάδα $-SH$ με την BSA μέσω μαλειμιδίου



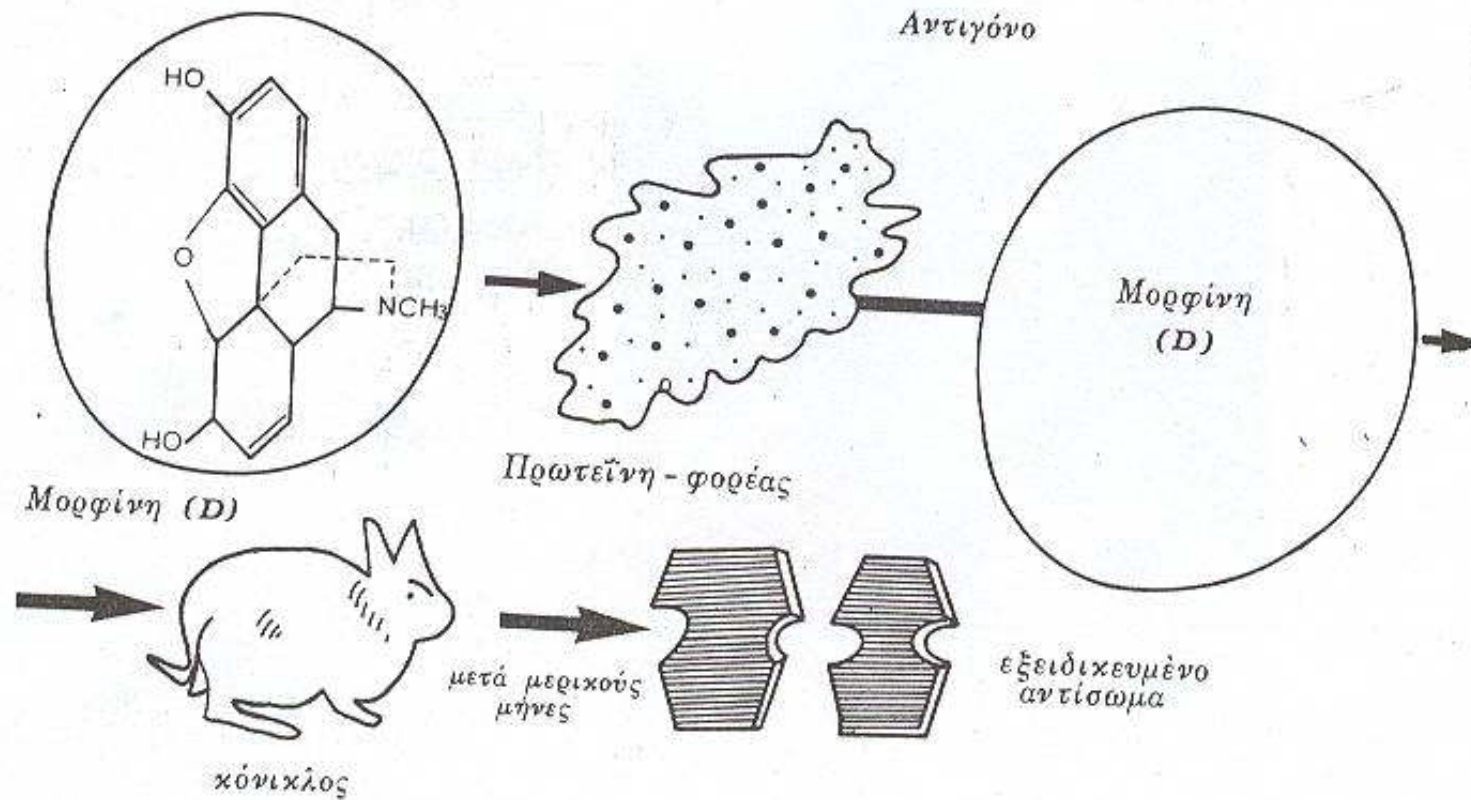
Σύνδεση πεπτιδίου (P) με φορέα καρβοξυλικό οξύ



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 (προβάτου, αλόγου, κονίκλου, κλπ)
- Ενεργοποιείται το ανοσοποιητικό σύστημα του ζώου και παράγει αντίσωμα (Ab) μια σφαιρίνη ικανή να σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο, τόσο με το ανοσογόνο, όσο και το απτένιό του.

Σχηματική παράσταση ανάπτυξης αντισωμάτων για τη μορφίνη



Παραγωγή αντισώματος του απτενίου αμινοβενζολοσουλφονικών μετά από σύνδεση με BSA

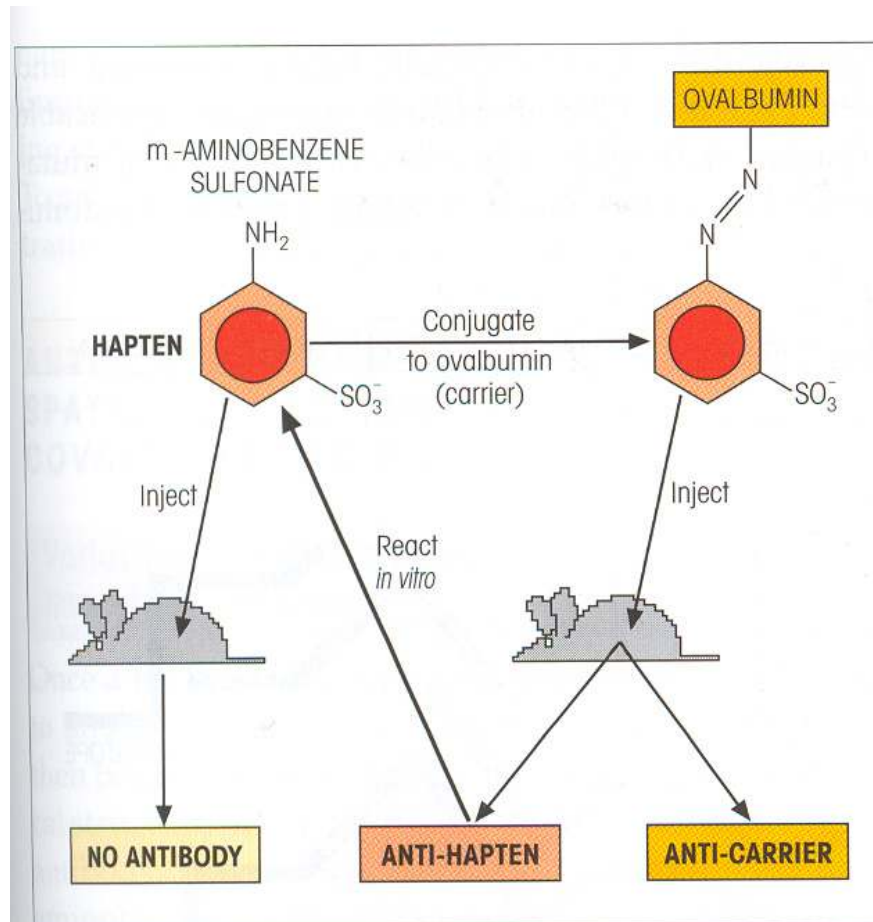
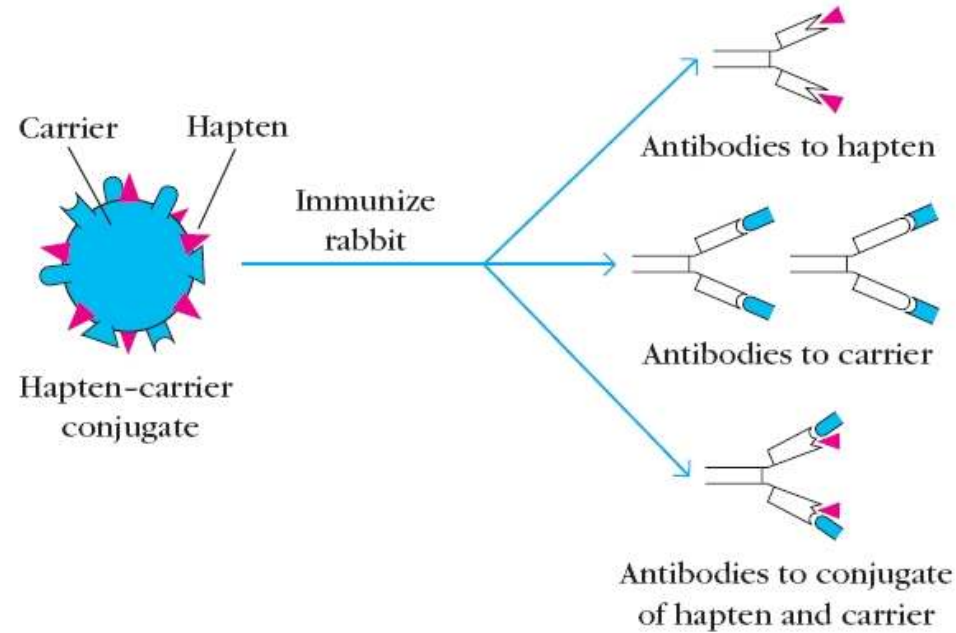


Figure 5.1. A hapten on its own will not induce antibodies. However, it will react *in vitro* with antibodies formed to a conjugate with an immunogenic carrier.

Παραγόμενα αντισώματα από τα πειραματόζωα

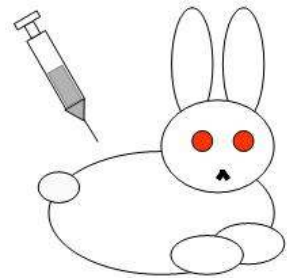


Injection with:	Antibodies formed:
Hapten (DNP)	None
Protein carrier (BSA)	Anti-BSA
Hapten-carrier conjugate (DNP-BSA)	Anti-DNP (major) Anti-BSA (minor) Anti-DNP/BSA (minor)

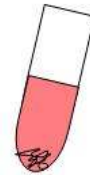
Παραγωγή αντισωμάτων απτενίων (2)

- 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 υβρίδια κυττάρων (υψηλού κόστους)
- Ορός που περιέχει αντίσωμα σε μεγάλη συγκέντρωση λέγεται αντιορός (antiserum), φυλάσσεται σε χαμηλή θερμοκρασία για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων

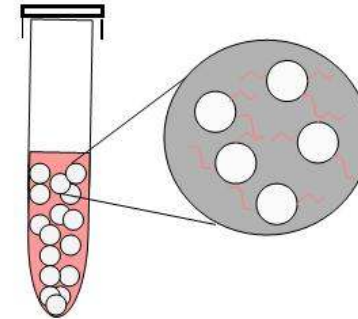


A solution containing a specific antigen is injected into a rabbit; the rabbit is immunized.



serum

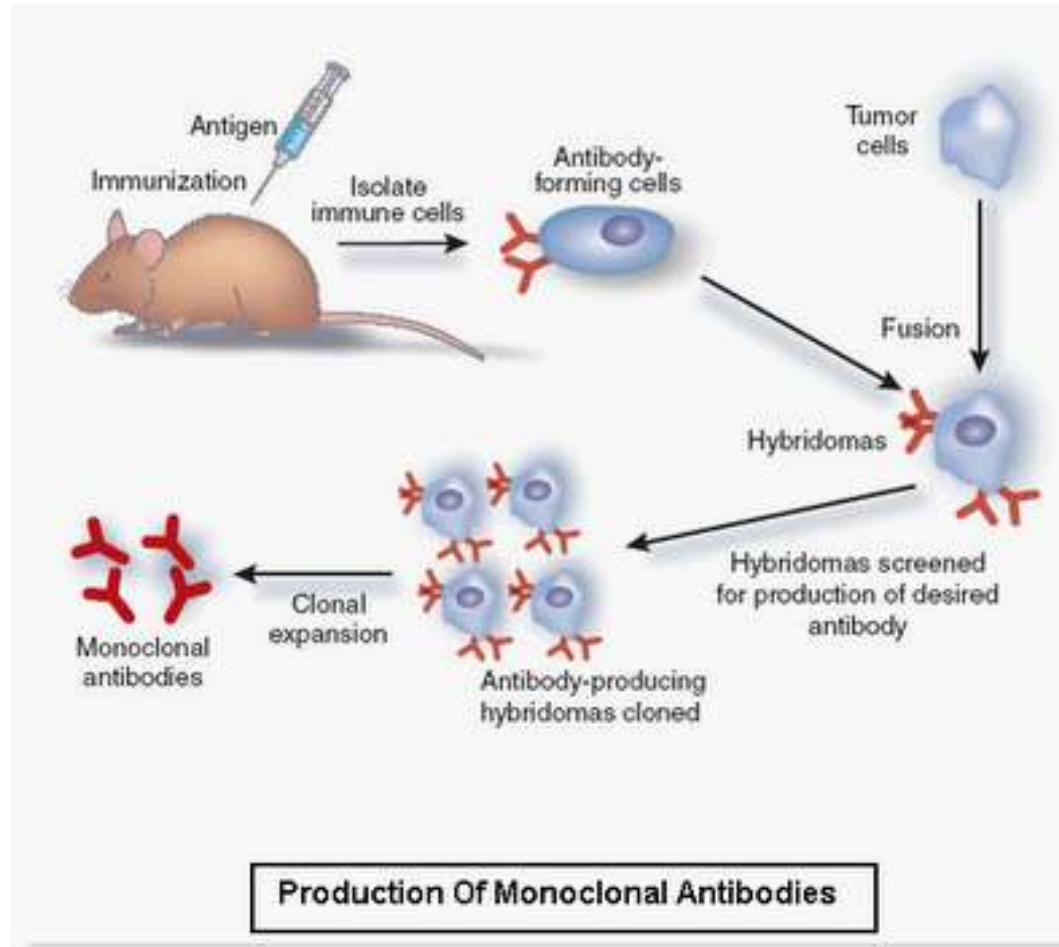
Antiserum is taken from the rabbit; the supernatant contains the antibodies of interest.



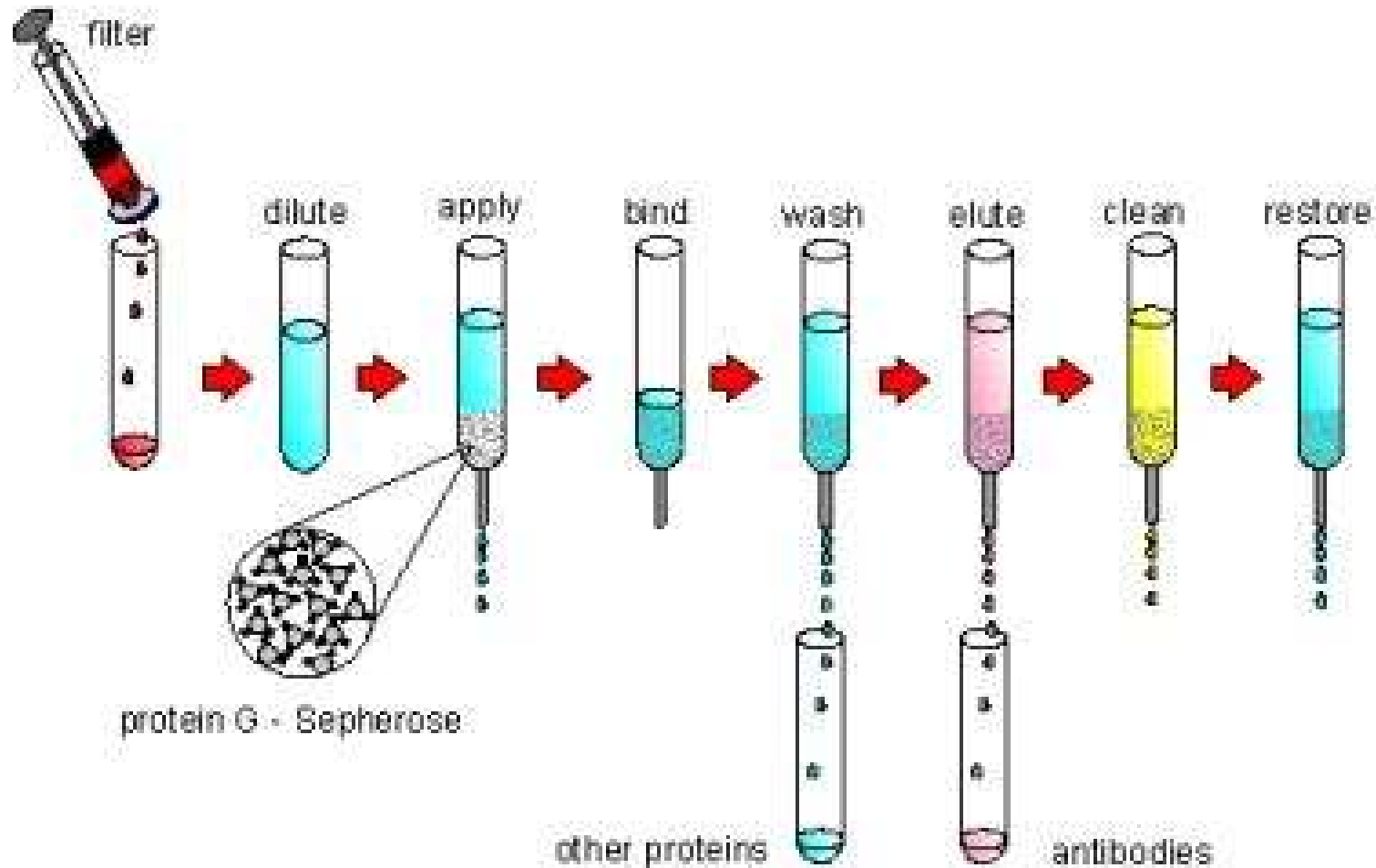
Antibodies are incubated with sepharose beads that is conjugated to the original antigen.



Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων



Καθαρισμός αντισωμάτων



Τίτλος (titer) αντιορού

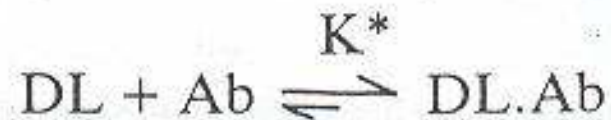
- Συγκέντρωση αντισώματος σε αντιορό εκφράζεται με τον **τίτλο (titer)**
- Τίτλος: Μέγιστη αραίωση αντιορού στο μείγμα της αντίδρασης, που είναι απαραίτητη και ικανή να αντιδράσει ο αντιορός με συγκεκριμένη ποσότητα επισημασμένου αντιγόνου
- Εκφράζονται ως κλάσματα αραίωσης (1/200 έως 1/10000)
- Από 1 mL αντιορού μπορούν να εκτελεσθούν χιλιάδες ανοσοχημικοί προσδιορισμοί

Παρασκευή επισημασμένων αντιγόνων

- Βασική αρχή των **ανταγωνιστικών ανοσοχημικών** προσδιορισμών είναι η **ανταγωνιστική σύνδεση** του προσδιοριζόμενου φυσικού αντιγόνου και ενός **επισημασμένου αντιγόνου (ιχνηθέτη)** 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

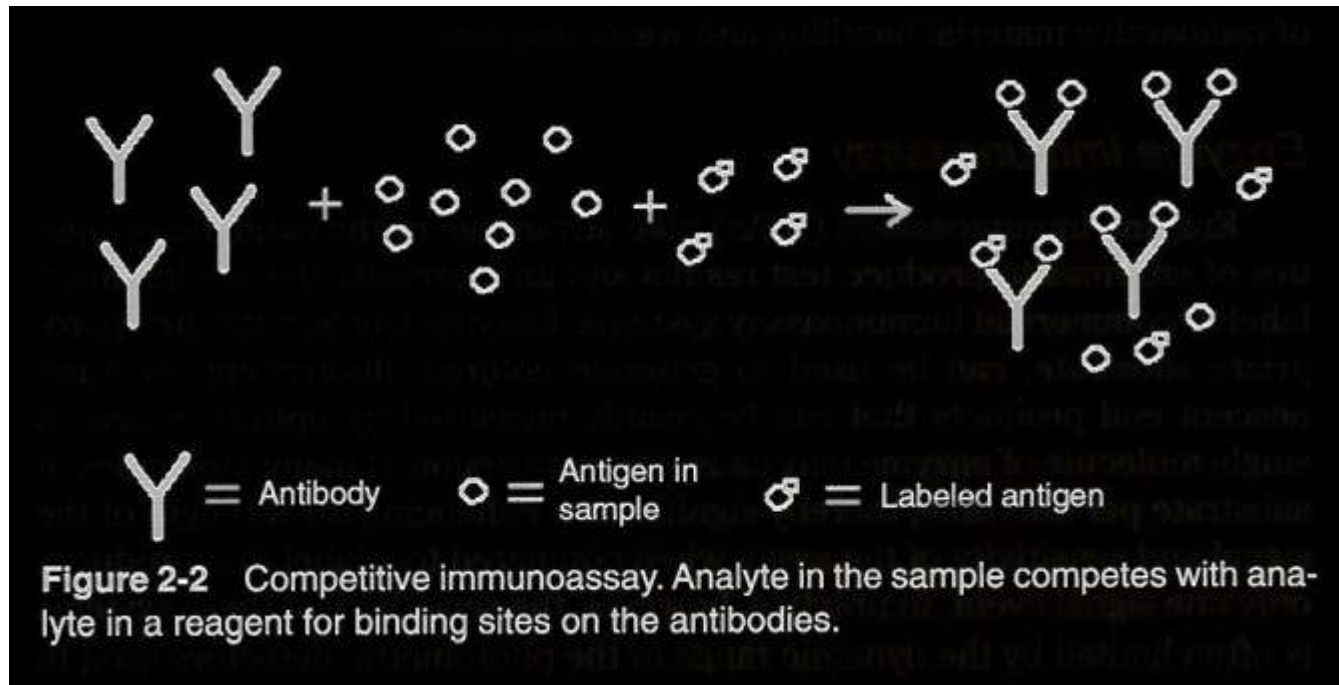
Ιδανικός επισημαντής

- Δεν μεταβάλλει τα χαρακτηριστικά συνδέσεως που παρατηρούνται κατά τη σύνδεση φυσικού αντιγόνου με το αντίσωμα
- Το αντίσωμα να συνδέεται εξ ίσου καλά με το μη επισημασμένο προσδιοριζόμενο μόριο (D) και το επισημασμένο (DL)



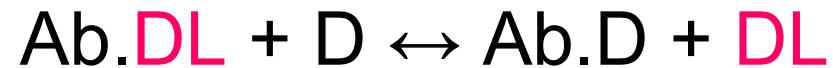
$$K = K^*$$

Αρχή Ανταγωνιστικού Ανοσοπροσδιορισμού



Αρχή Ανταγωνιστικού Ανοσοπροσδιορισμού

- Ανταγωνιστική εκτόπιση ιχνηθέτη DL από το σύμπλοκο με το αντίσωμα από τη μη επισημασμένη προσδιοριζόμενη ουσία D (φάρμακο)



- Η ποσότητα DL που εκτοπίζεται είναι ανάλογη με την ποσότητα της ουσίας D που υπάρχει στο δείγμα
- Η μέτρηση του αναλυτικού σήματος, που φέρει ο ο ιχνηθέτης DL, παρέχει με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς, την ποσότητα της D.

Υπολογισμοί σε υποθετικό ανταγωνιστικό ανοσοχημικό σύστημα

Μετά την αποκατάσταση ισορροπίας

Μονάδες ληφθείσες			Συνδεδεμένο		Ελεύθερο		%Συνδεδεμένο	
D	DL	Ab	D	DL	D	DL	DL	Y
0,0	20,0	10,0	0	10,0	0	10,0	50,0	1,00
5,0	20,0	10,0	2,0	8,0	3,0	12,0	40,0	0,80
10,0	20,0	10,0	3,3	6,7	6,7	13,3	33,5	0,67
20,0	20,0	10,0	5,0	5,0	15,0	15,0	25,0	0,50
30,0	20,0	10,0	6,0	4,0	24,0	16,0	20,0	0,40
40,0	20,0	10,0	6,7	3,3	33,3	16,7	16,5	0,33
50,0	20,0	10,0	7,1	2,9	42,9	17,1	14,5	0,29
60,0	20,0	10,0	7,5	2,5	52,5	17,5	12,5	0,25
80,0	20,0	10,0	8,0	2,0	72,0	18,0	10,0	0,20
100,0	20,0	10,0	8,3	1,7	91,7	18,3	8,5	0,17

$Y = (\text{Συνδεδεμένο DL}) / (\text{Συνδεδεμένο DL})_0$

Αρχή Ανταγωνιστικού Ανοσοπροσδιορισμού

- Το ποσοστό του συνδεδεμένου επισημασμένου αντιγόνου μειώνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας
- Αυξανόμενη της συγκέντρωσης της D αυξάνεται η εκτόπιση του DL (έννοια της **ανταγωνιστικής σύνδεσης (competitive binding)**)
- Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιείται η σχέση (**λόγος σημάτων**)
$$Y = (\text{Συνδεδεμένο DL}) / (\text{Συνδεδεμένο DL})_0$$

Αρχή Ανταγωνιστικού Ανοσοπροσδιορισμού

Competitive Immunoassay

AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC

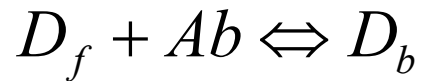
I. No analyte - high detection signal



II. Analyte present - detection signal reduced



Μελέτη Ισορροπίας Αντίδρασης Ag - Ab



$$K = \frac{[D_b]}{[D_f][Ab]}$$

$$\frac{[D_b]}{[D_f]} = K \times Ab_t - K \times [D_b] \text{ (διάγραμμα _ Scatchard)}$$


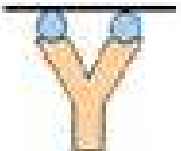
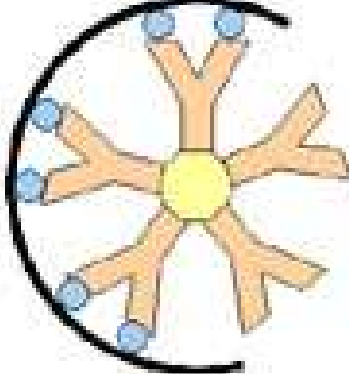
$$[D] = [DL] \frac{Y}{1-Y}$$

$$\log it Y = \ln \frac{Y}{1-Y}$$

$$\log it Y = -2,3 \log [D] + 2,3 \log [DL]$$

Η σταθερά σύνδεσης Ag – Ab

(**Affinity**: συγγένεια, **Avidity**: πολλαπλή δέσμευση)

			
$K_{eq} =$	10^4	10^6	10^{10}
	Affinity	Avidity	Avidity

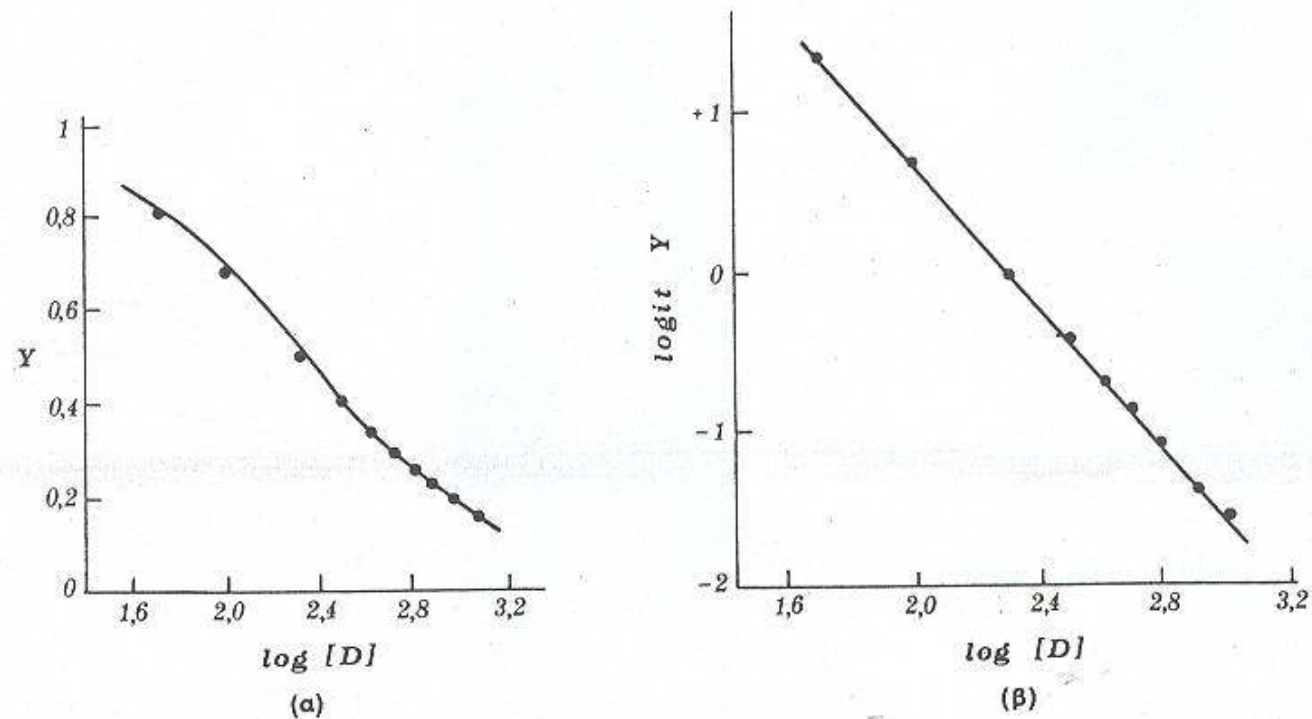
Καμπύλη Αναφοράς Ανταγωνιστικού Ανοσοπροσδιορισμού (1)

- Διάγραμμα logit Y ως προς $\log [D]$ δίνει γραμμική καμπύλη αναφοράς
- Στην πράξη μετρείται το αναλυτικό σήμα που παρέχει το συνδεδεμένο (B) ή το ελεύθερο (F) επισημασμένο αντιγόνο για τα διάφορα πρότυπα του αντιγόνου D
- Μετρείται πάντοτε και ένα μηδενικό πρότυπο ($D=0$) για το οποίο το αναλυτικό σήμα θα είναι B_0 ή F_0

Καμπύλη Αναφοράς Ανταγωνιστικού Ανοσοπροσδιορισμού (2)

- Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς
 $\%(B/B_0)$ ή $\%(F/F_0)$ ή $\%(B/F)$ ως προς:
 - [D] (για στενή περιοχή)
 - $\log [D]$ για ευρεία περιοχή
- Με χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών δεν υπάρχει ανάγκη γραμμικοποίησης της καμπύλης αναφοράς
- Υπολογίζονται τα άγνωστα από τη σιγμοειδή καμπύλη Y ως προς D με διάφορους αλγόριθμους (spline).

Καμπύλες αναφοράς ανταγωνιστικού ανοσοπροσδιορισμού



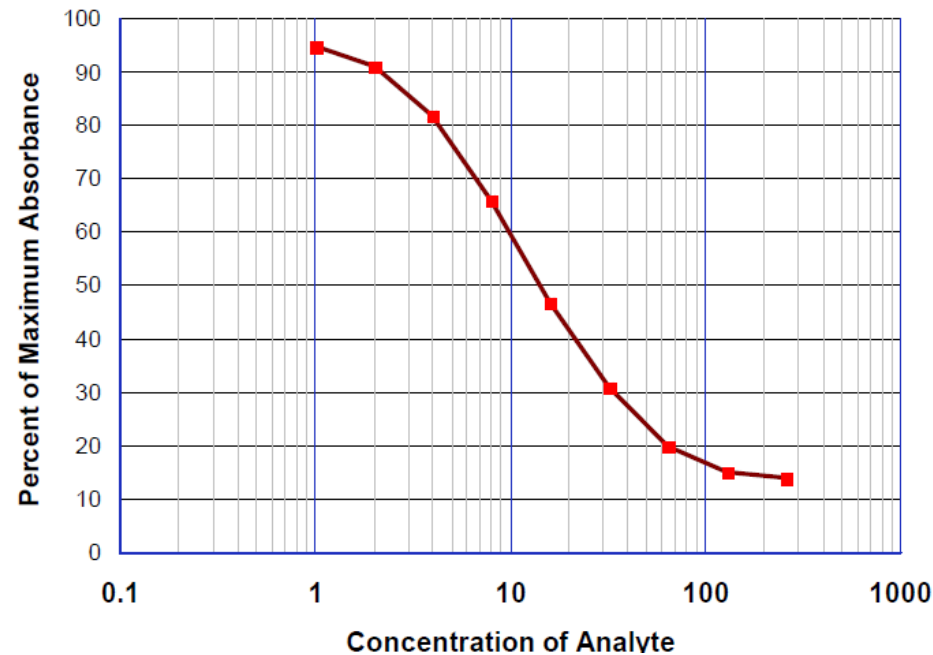
Σχήμα 23-3. α) Καμπύλη αναφοράς του ανοσοχημικού προσδιορισμού του πίνακα 23-1. Οι μονάδες συγκεντρώσεως είναι αυθαίρετες. β) Διάγραμμα logit-log.

Καμπύλες αναφοράς ανταγωνιστικού ανοσοπροσδιορισμού

Competitive Immunoassay Data Format

AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC

Competitive Immunoassay Data



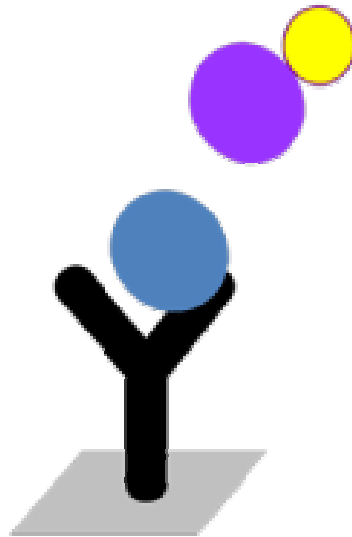
Τύποι ανοσοπροσδιορισμών

- **Ανταγωνιστικός (competitive)**
 - Ανταγωνισμός σύνδεσης φυσικού αντιγόνου και ιχνηθέτη
- **Μη ανταγωνιστικός ή κορεσμού ή ανοσομετρικός**
 - Το προσδιοριζόμενο αντιγόνο ή αντίσωμα αντιδρά ποσοτικά με περίσσεια επισημασμένου αντισώματος ή αντιγόνου, αντίστοιχα
- Τύπου **sandwich** (χρήση δύο αντισωμάτων)

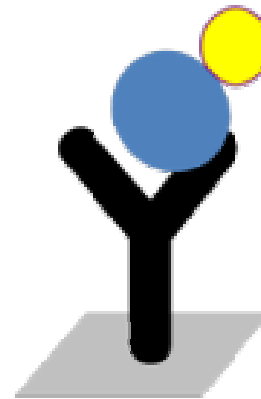
Τύποι Ανοσοπροσδιορισμών



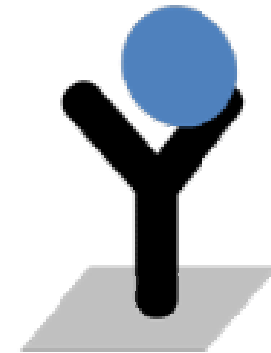
A. Sandwich Method



B. Competitive Method



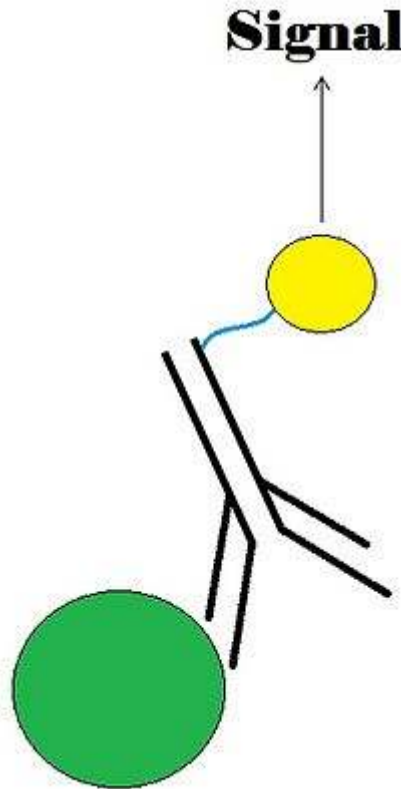
C. Direct-label Method



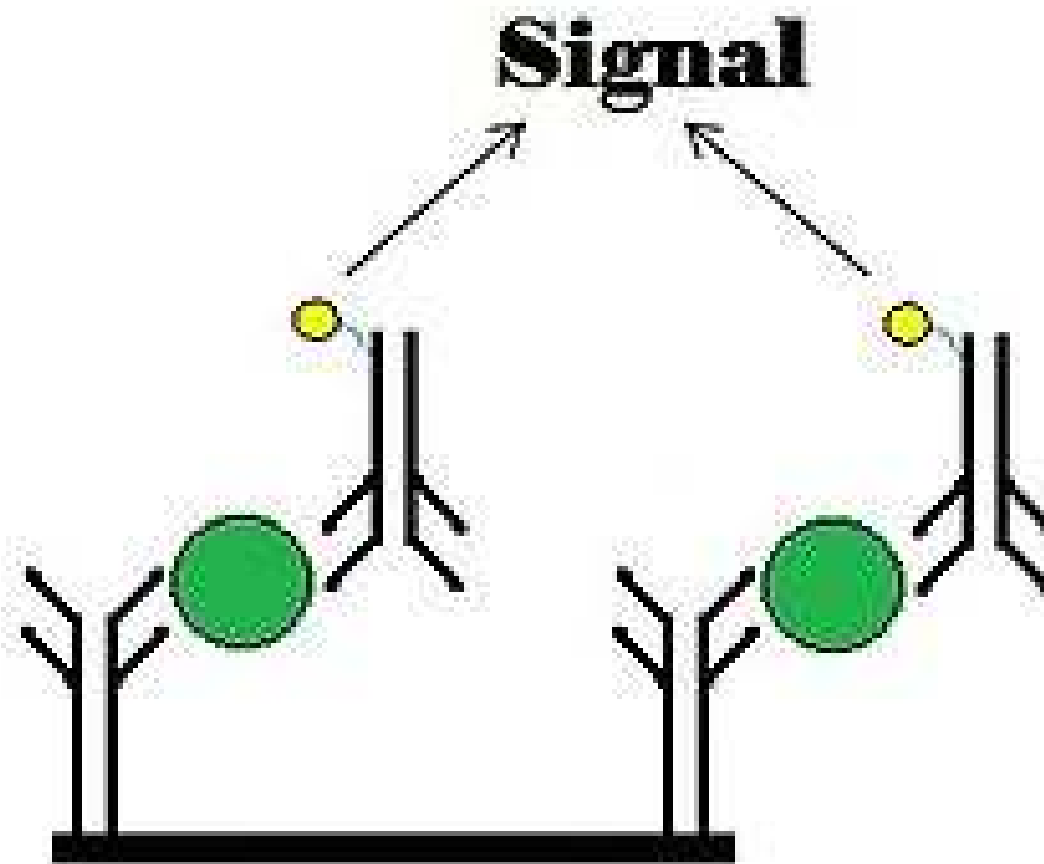
D. Label-free Method

Αρχή Ανοσοπροσδιορισμού

Περιλαμβάνει: **Αναλύτη** (πράσινο), αντίσωμα (μαύρο) και ένα ανιχνεύσιμο **ιχνηθέτη** (κίτρινο)



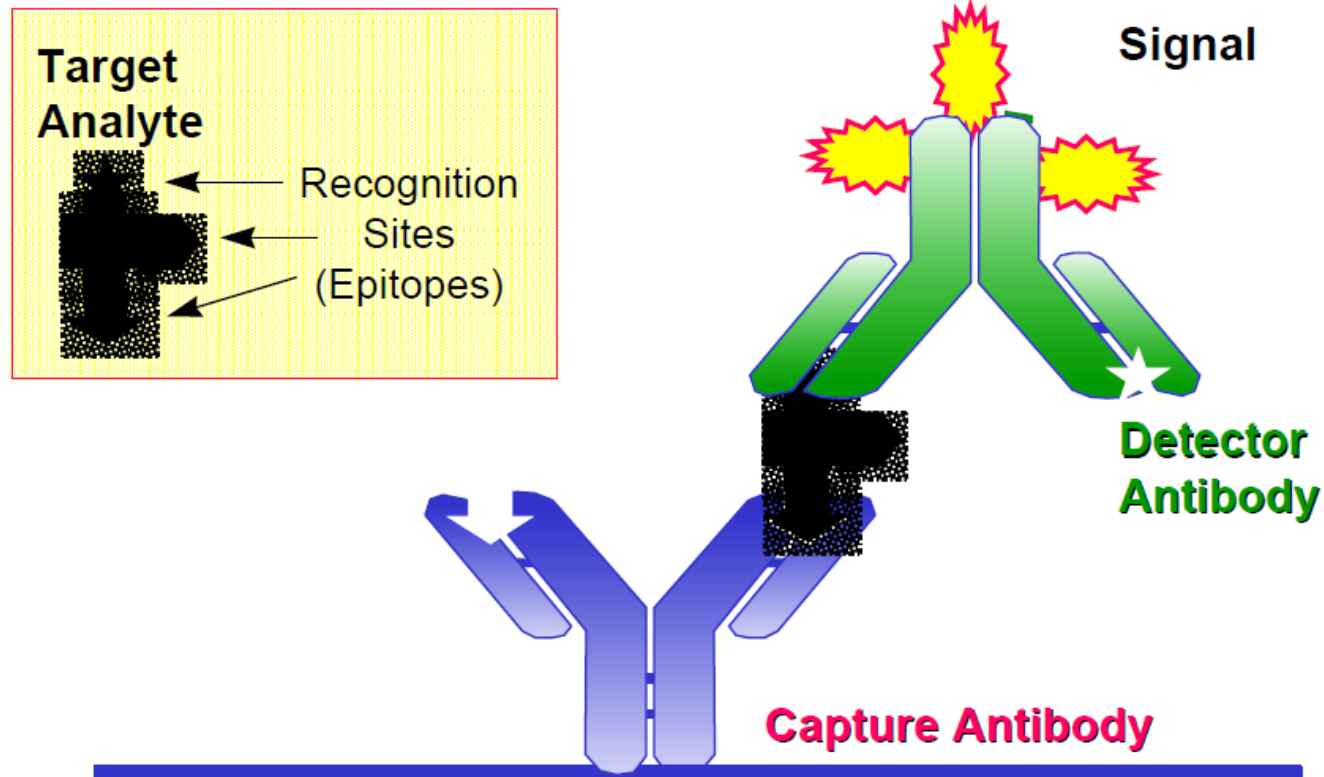
Δύο πλευρών, μη ανταγωνιστικός
ανοσοπροσδιορισμός αναλύτη, τύπου sandwich



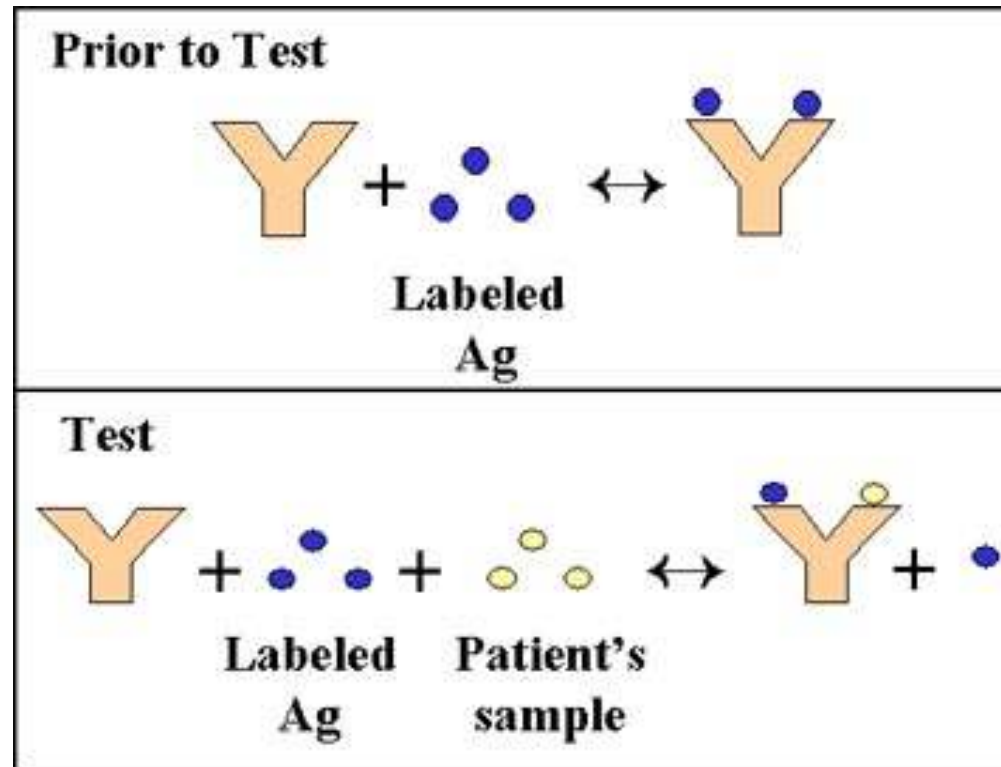
Ανοσοπροσδιορισμός διπλού αντισώματος τύπου sandwich

Double Antibody Sandwich Immunoassay

AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC



Πορεία ανταγωνιστικού προσδιορισμού



Τεχνικές Ανοσοχημικών Προσδιορισμών (1)

- Διαφοροποιούνται στη μέθοδο μέτρησης του ελεύθερου ή συνδεδεμένου ιχνηθέτη
- Ομογενής (homogeneous)
 - Με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο είναι δυνατή η μέτρηση μόνο του ελεύθερου ιχνηθέτη παρουσία του συνδεδεμένου
 - Η σύνδεση του DL με το Ab εξαλείφει το αναλυτικό σήμα του ιχνηθέτη

Τεχνικές Ανοσοχημικών Προσδιορισμών (2)

- Ετερογενής (heterogeneous)
 - Το αναλυτικό σήμα του συνδεδεμένου ιχνηθέτη δεν εξαλείφεται
 - Για τη μέτρηση του ελεύθερου ιχνηθέτη πρέπει να προηγηθεί διαχωρισμός των φάσεων

Διαχωρισμός φάσεων ετερογενών ανοσοπροσδιορισμών

- Μετά την αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ αναλύτη και ιχνηθέτη με το αντίσωμα ακολουθεί διαχωρισμός φάσεων (ενωμένη – ελεύθερη)
- Ο διαχωρισμός πρέπει να είναι:
 - Ποσοτικός
 - Ταχύς
 - Απλός
 - Χαμηλού κόστους
 - Να μη διαταράσσει την ισορροπία σύνδεσης αντιγόνου – αντισώματος
- Οι τεχνικές διαχωρισμού βασίζονται στις διαφορετικές ιδιότητες ελεύθερου αντιγόνου και συμπλόκου Ag-Ab (φάσεις)

Τεχνικές Διαχωρισμού Φάσεων Ετερογενών Ανοσοπροσδιορισμών (1)

- Χρωματογραφία και ηλεκτροφόρηση
 - Μειονέκτημα μεγάλος χρόνος
 - Μη εφαρμόσιμες στα εργαστήρια ρουτίνας
- Διήθηση υδροπηκτής (gel filtration)
 - Βασίζεται στο διαφορετικό μέγεθος φάσεων
 - Μειονέκτημα ο μεγάλος χρόνος

Τεχνικές Διαχωρισμού Φάσεων Ετερογενών Ανοσοπροσδιορισμών (2)

- **Χημική καταβύθιση συμπλόκου Ag.Ab**
 - Βασίζεται στη διαφορετική διαλυτότητα των δύο φάσεων
 - Χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια καταβύθισης (Na_2SO_4 , αιθανόλη, πολυαιθυλενογλυκόλη)
 - Καταβυθίζεται το σύμπλοκο Ag.Ab και AgL.Ab, το οποίο μετρείται.
 - Παραμένουν στο διάλυμα το ελεύθερο Ag και AgL

Τεχνικές Διαχωρισμού Φάσεων Ετερογενών Ανοσοπροσδιορισμών (3)

- **Φυσική προσρόφηση.** Χρησιμοποιείται:
 - Ενεργός άνθρακας (προσροφά μικρομόρια, άρα και τα ελεύθερα απτένια, όχι όμως πρωτεΐνες)
 - Κυτταρίνη
 - Τάλκης
 - Διοξειδίο πυριτίου
 - Μπετονίτης
 - Τοιχώματα **πλαστικών σωλήνων** μέσα στους οποίους γίνεται η αντίδραση

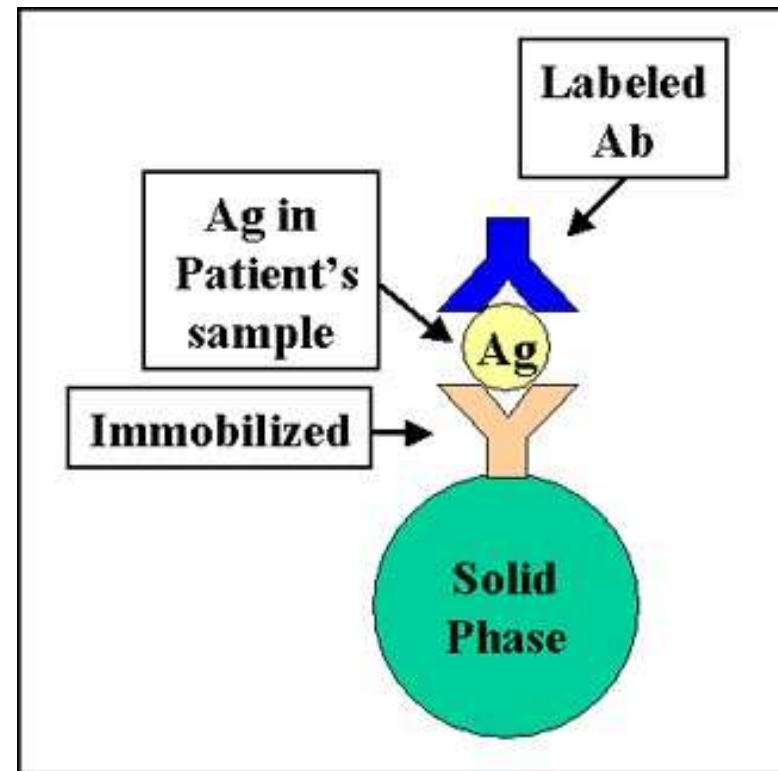
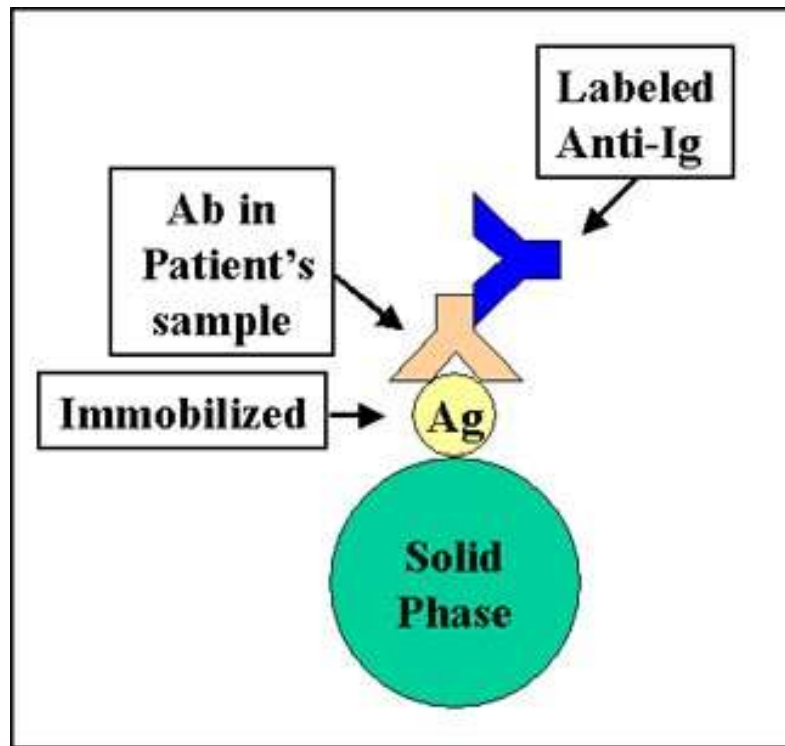
Τεχνικές Διαχωρισμού Φάσεων Ετερογενών Ανοσοπροσδιορισμών (4)

- **Τεχνική διπλού αντισώματος**
 - Χρησιμοποιείται δεύτερο αντίσωμα AbB για να συνδεθεί με το σύμπλοκο Ag.AbA
 - Σχηματίζεται μεγάλο συσσωμάτωμα (Ag.AbA.AbB) που διαχωρίζεται με φυγοκέντρηση παρουσία αιθυλενογλυκόλης
 - Για την παραγωγή AbB το αντίσωμα AbA (που παρήχθηκε σε ένα ζώο, π.χ κόνικλο) εισάγεται ως αντιγόνο σε ένα άλλο ζώο, π.χ. πρόβατο.
 - Παράγεται αντιορός του αντιορού (π.χ. Anti-rabbit antiserum) που προκαλεί καθίζηση του Ag.AbA (ανοσοκαθίζηση)

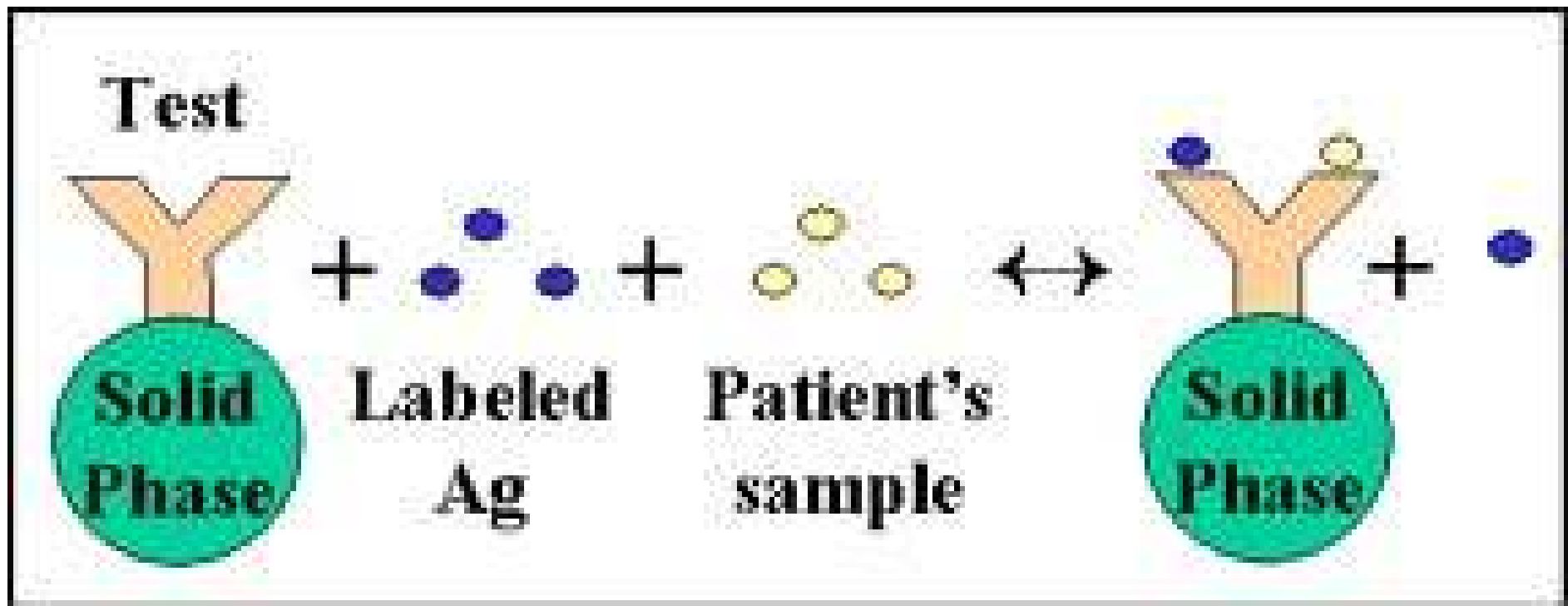
Τεχνικές Διαχωρισμού Φάσεων Ετερογενών Ανοσοπροσδιορισμών (5)

- **Τεχνική αντισώματος στερεής φάσης (solid-phase antibody technique)**
 - Ευρείας εφαρμογής τεχνική
 - Αντίσωμα ακινητοποιημένο με χημικό δεσμό σε στερεό υπόστρωμα (πλαστικό πολυμερές, ύαλος, αγαρόζη, μαγνητικά σφαιρίδια, τοίχωμα πλαστικών σωλήνων αντίδρασης)
 - Το σύμπλοκο Ag.Ab γίνεται τμήμα στερεής φάσης
 - Το ελεύθερο αντιγόνο (φυσικό και επισημασμένο) παραμένει στην υγρή φάση και παραλαμβάνεται με φυγοκέντρηση ή απόχυση

Τεχνικές Ανοσοπροσδιορισμών στερεής φάσης
Αριστερά για τον προσδιορισμό αντισωμάτων και
δεξιά για τον προσδιορισμό αντιγόνων.
Αμφότερες είναι τύπου sandwich



Αρχή ανταγωνιστικού ανοσοπροσδιορισμού με αντίσωμα σε στερεή φάση



Χαρακτηριστικά ποιότητας ανοσοχημικών προσδιορισμών (1)

Εξειδίκευση

- Εξαρτάται από την ικανότητα του αντισώματος να αναγνωρίζει και να συνδέει μόνο την προσδιοριζόμενη ουσία
- Παρόλο που τα αντισώματα χαρακτηρίζονται από ειδικότητα, είναι δυνατόν να συνδεθούν και ουσίες παρόμοιες με το απτένιο
 - Συνηθέστερο στα πολυκλωνικά αντισώματα
 - Τα μονοκλωνικά αντισώματα εμφανίζουν σχεδόν ιδανική ειδικότητα (είναι όμως υψηλού κόστους)
- Προκαλείται παρεμπόδιση γνωστή ως **διασταυρούμενη δραστικότητα (cross-reactivity)**

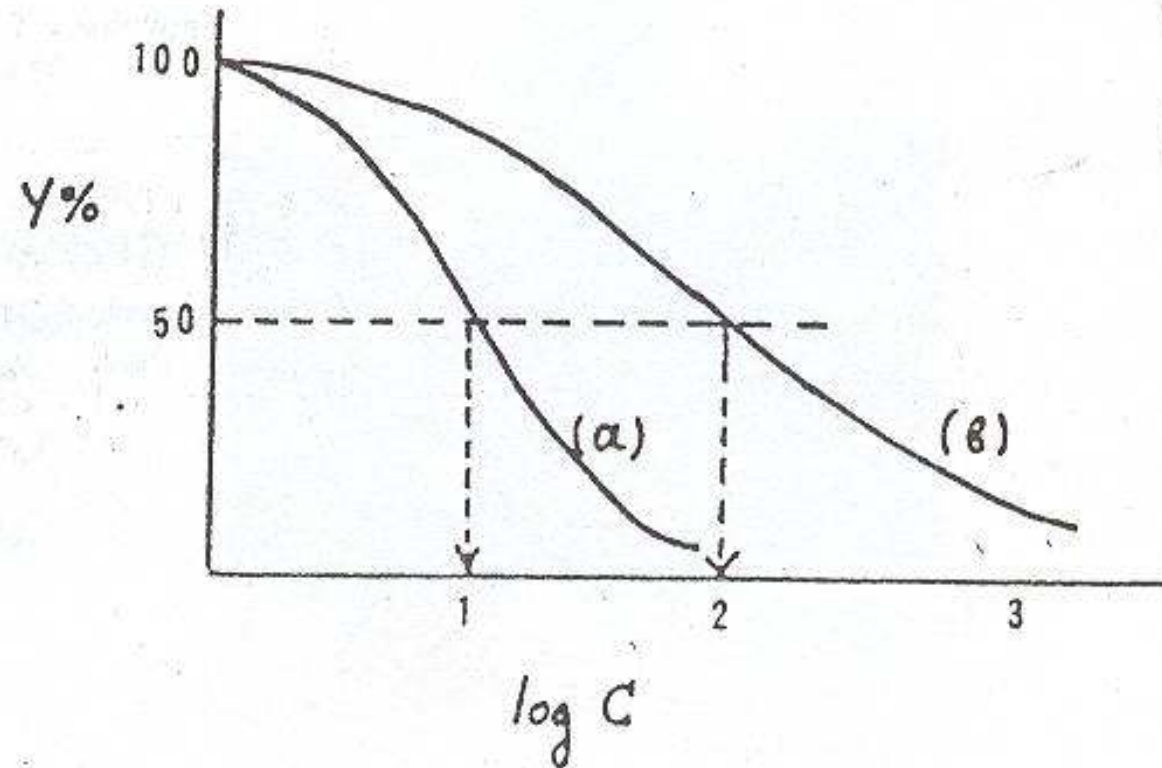
Χαρακτηριστικά ποιότητας ανοσοχημικών προσδιορισμών (2)

Εξειδίκευση

- **Διασταυρούμενη δραστικότητα**
 - Εκφράζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης του αναλύτη προς τη συγκέντρωση του παρεμποδιστή για τις οποίες προκαλείται ανταγωνιστική εκτόπιση ιχνηθέτη 50%
- Όσο μεγαλύτερη η εξειδίκευση, τόσο μικρότερη η διασταυρούμενη δραστικότητα

Διαγράμματα καμπυλών απόκρισης για τον υπολογισμό διασταυρούμενης δραστικότητας ($\Delta\Delta$).

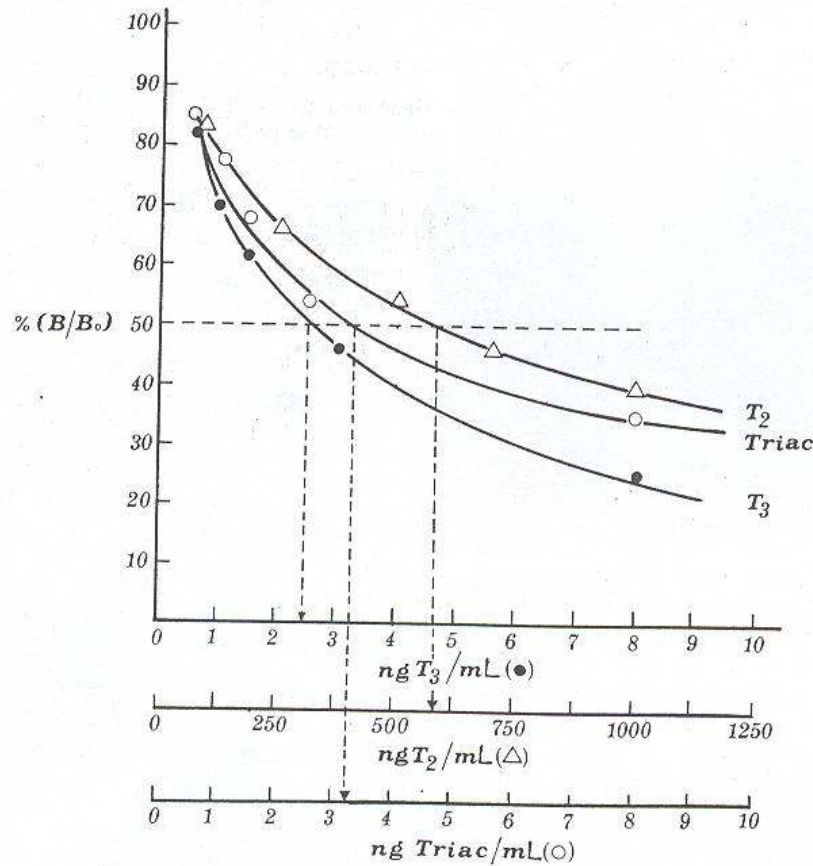
(α): προς προσδιορισμό ουσία, (β): παρεμποδιστής
 $\Delta\Delta = (10 / 100) \times 100 = 10\%$



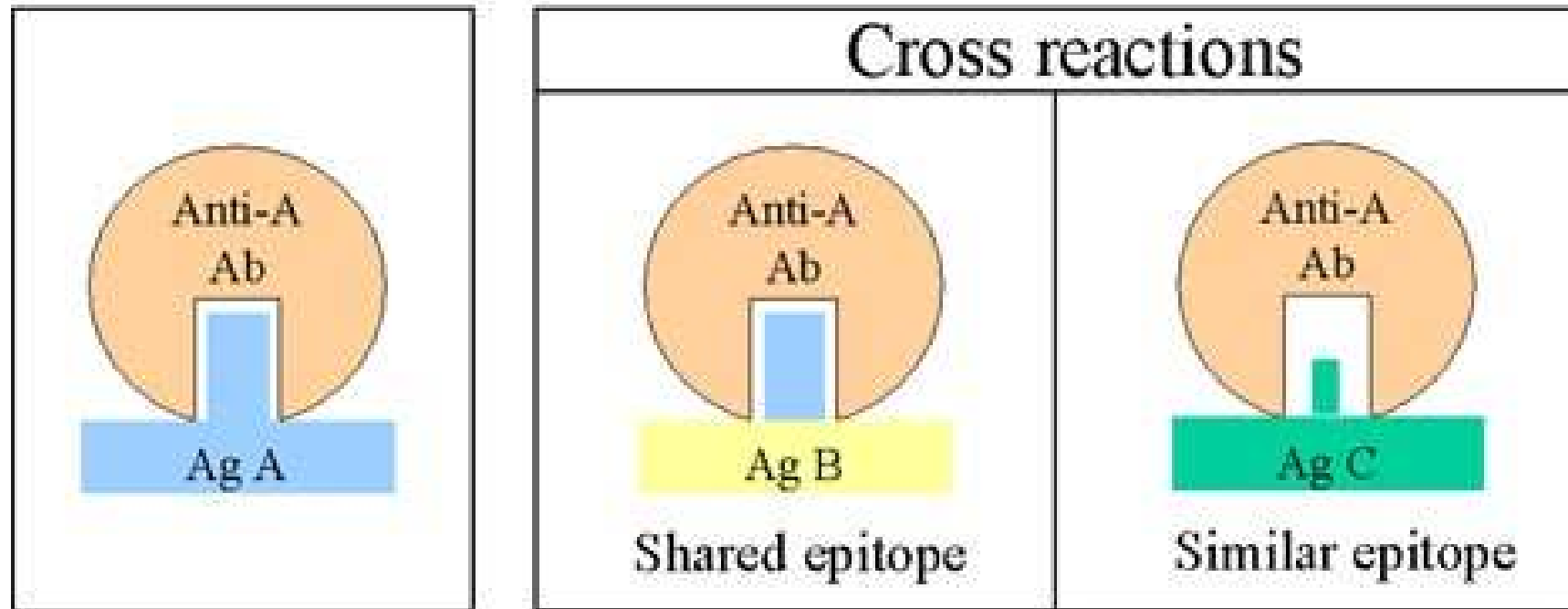
Διαγράμματα καμπυλών απόκρισης για τον υπολογισμό διασταυρούμενης δραστικότητας ($\Delta\Delta$) για T_2 .

$$\Delta\Delta T_2 = (2,5 / 588) \times 100 = 0,42\%$$

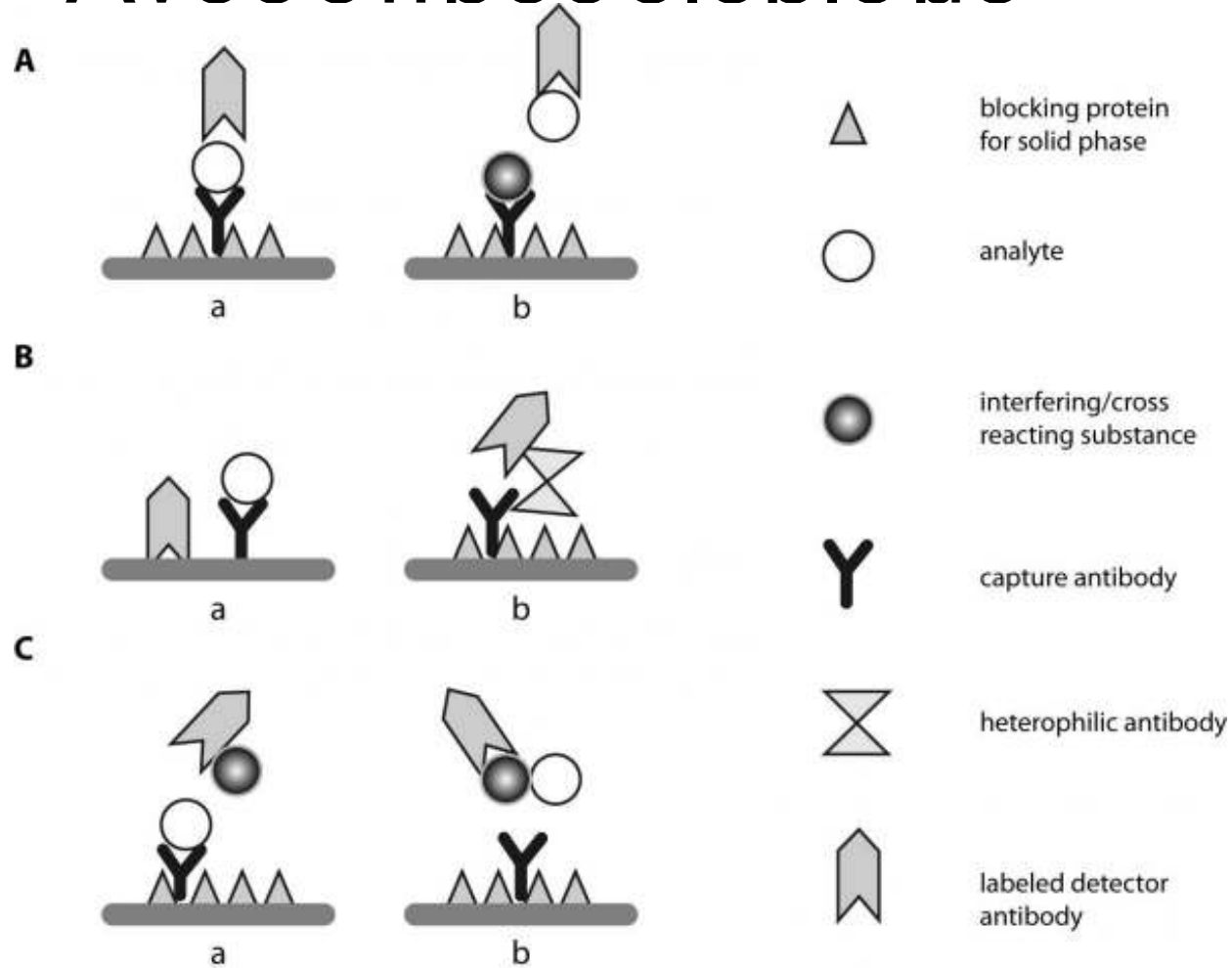
$$\Delta\Delta \text{Triac} = (2,5 / 3,3) \times 100 = 76\%$$



Παραδείγματα Διασταυρούμενης Αντίδρασης

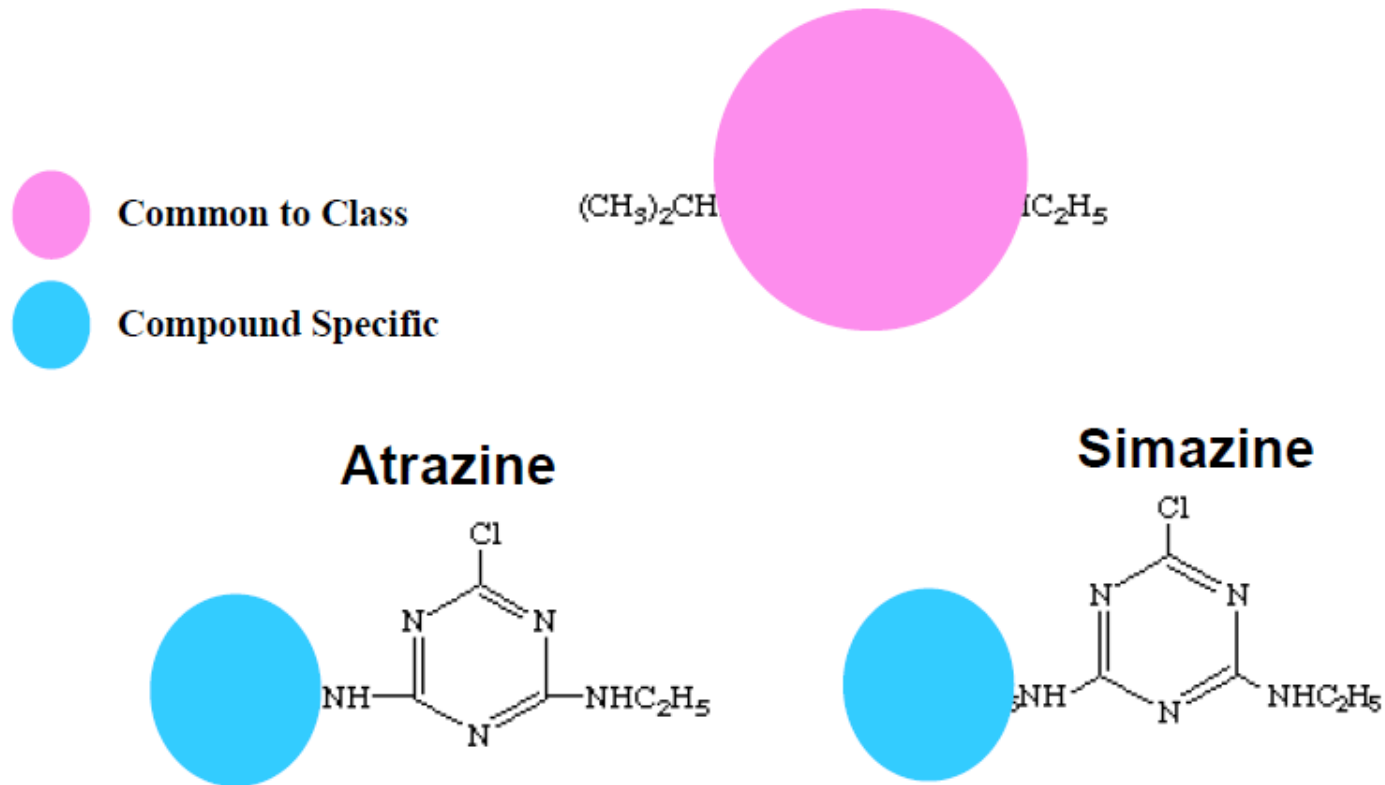


Παρεμποδίσεις σε Ποσοτικό Ανοσοπροσδιορισμό



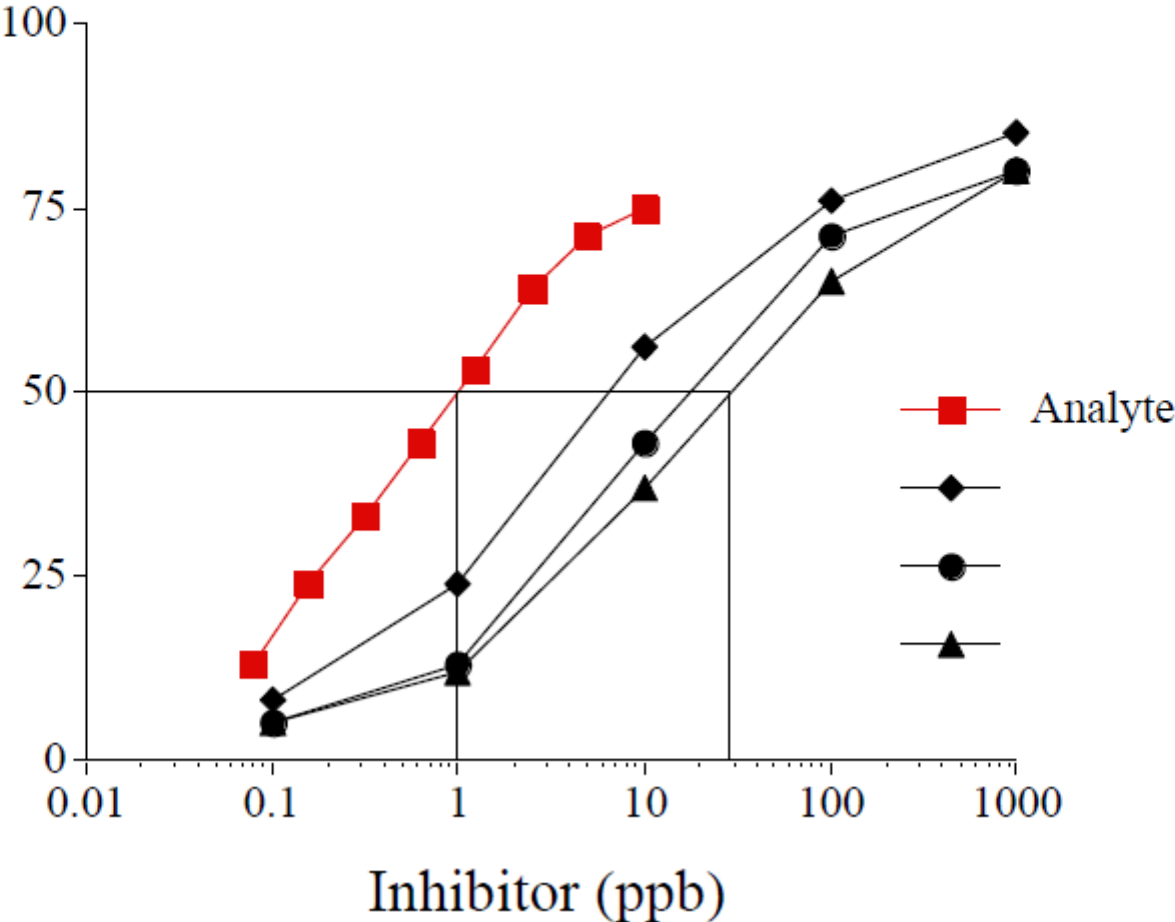
Specificity Considerations for Triazine Herbicides

AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC



Selecting an Assay Conjugate for Sensitivity

AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC AEIC



Χαρακτηριστικά ποιότητας ανοσοπροσδιορισμών

Ευαισθησία

- Εκφράζεται από την κλίση της καμπύλης αναφοράς και έχει μονάδες αντίστροφης συγκέντρωσης
- Εξαρτάται από τη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση αντισώματος
 - Είναι τόσο μεγαλύτερη, όσο μικρότερος είναι ο τίτλος (μεγαλύτερη αραίωση) του αντισώματος
 - Πολύ μεγάλη αραίωση περιορίζει την περιοχή συγκεντρώσεων του προσδιορισμού
- Μεγιστοποιείται όταν επιλέγονται συνθήκες που μεγιστοποιούν την κλίση

Χαρακτηριστικά ποιότητας ανοσοπροσδιορισμών

- **Επαναληψιμότητα**
 - Εκφράζεται από την τυπική απόκλιση SD ή %σχετική απόκλιση %RSD ή CV
- **Όριο ανίχνευσης (detection limit)**
 - Προσδιορίζεται από διάγραμμα SD (μονάδες συγκέντρωσης) συναρτήσεως συγκέντρωσης της ουσίας D
 - Η τομή στον άξονα των τεταγμένων είναι το SD_0 μηδενικού προτύπου και $LOD = SD_0 \times 3,3$

Διάγραμμα SD συναρτήσει C για τον υπολογισμό ορίου ανίχνευσης
 $LOD = 0,16 \times 3,3 = 0,55 \text{ ng/mL}$

