

Marcanții utilizați uzual

- **Fluorocromi** (rodamina, fluoresceina), care emit respectiv o lumină roșu-oranj sau verde-galbenă la tratarea lor cu raze UV
(Reacția de Imuno-Fluorescență)
- **Enzime** (fosfataza alcalină, peroxidaza), capabile să modifice culoarea unui substrat (Reacția Imuno-enzimatică)
- **Radio-izotopi** (^{125}I sau ^3H), care emit respectiv raze gamma și beta (Analiza Radio-Imună)

Reacția Imuno-Enzimatică (RIE, ELISA

- *Enzyme Linked Immunosorbent Assays*).

- Tehnicile ELISA reprezintă metode imunoenzimaticе sensibile de titrare a Atg sau Atc, cu aplicabilitate în identificarea serologică și în serodiagnostic, etape importante pentru stabilirea diagnosticului unor afecțiuni umane.
- **PRINCIPIU** - La baza tehnicilor ELISA stă o înlănțuire de reacții :
 - **primul element** (Atg sau Atc) este imobilizat pe un suport solid (polistiren)
 - **al doilea element** al reacției (Atc sau respectiv Atg de testat) este legat de primul printr-o reacție specifică Atg – Atc
 - Alt element al reacției este un **reactiv marcat enzimatic** (cu peroxidaza sau fosfataza alcalină) în cadrul unui **conjugat**, care se va lega de complexul format între primii doi reactanți, tot printr-o reacție imună specifică.
 - Enzima reținută în godeu acționează degradativ pe un **substrat cromogen**, incolor. Degradarea substratului de către enzimă antrenează *oxidarea cromogenului* care devine un compus colorat ce urmează a fi *detectat spectrofotometric* la o lungime de undă corespunzătoare (culoare albastră – diverse **nuante de albastru**)

Elementele necesare

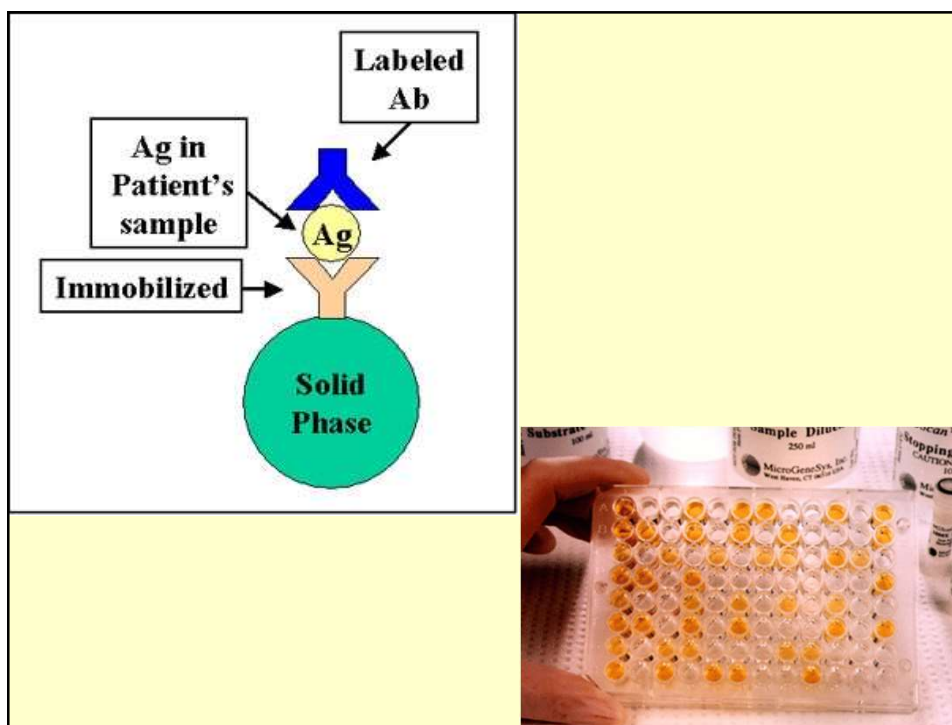
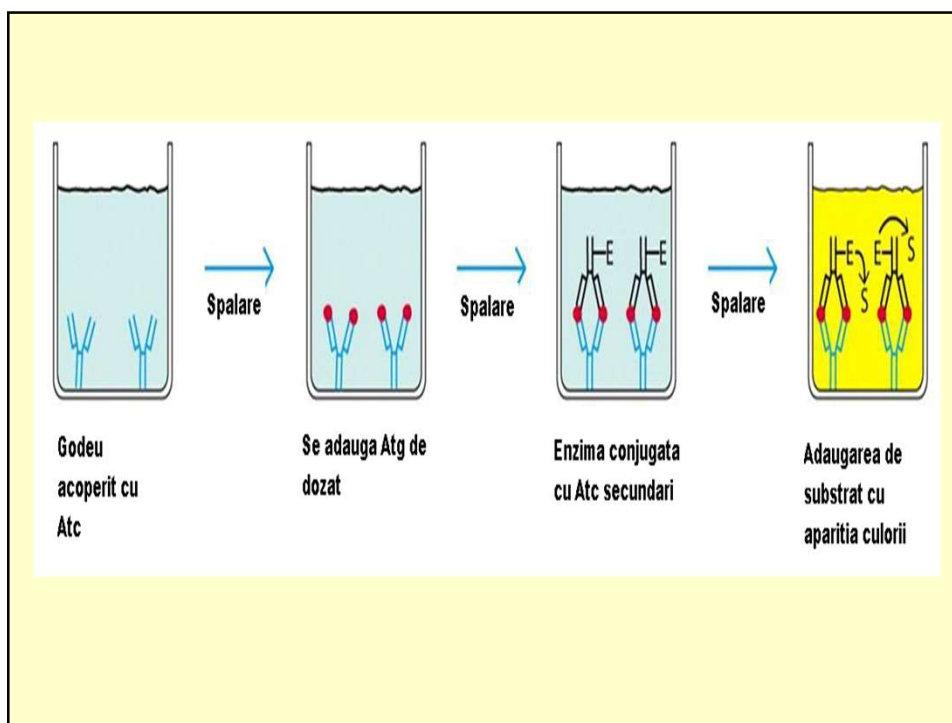
- **Antigenul** poate fi o proteina sau un carbohidrat → producerea de Atc specifici.
- **Anticorprii** sunt substante de natura proteica produși de către celule ale sistemului imunitar ca răspuns la patrunderea în organism a unui Atg.
- **Conjugatul enzimatic** este o enzima atașată ireversibil la o proteina, de obicei la un Atc. Reacția enzimei conjugată determină schimbarea de culoare ce constituie semnalul.
- **Enzime** = catalizatori biochimici, compuși care măresc viteza reacțiilor chimice ce se desfășoară în sistemele biologice, fără să se consume în cursul lor. Intensitatea reacției este proporțională cu cantitatea de enzimă folosită.
 - Enzime utilizate: peroxidaza, fosfataza alcalină, glucozoxidaza etc
 - Enzima + substrat cu cromofor — citire la spectrofotometru.
- **Cromoforul** este o substanță ce determină schimbări de culoare în urma reacției catalizate de către enzima conjugată.
- **Substraturi**: conțin substraturi caracteristice enzimei folosite și substanțe cromogene care formează produși de reacție colorați (cromofore)
- Soluție stop – pt stoparea reacției în toate godeurile (culoarea albastră virează în galben – diverse **nuante de galben**, portocaliu)
- **Faza solidă** reprezintă suportul fix la nivelul căruia are loc adsorbția primului reactant. Adsorbția presupune adăugarea Atg sau Atc diluat într-o soluție tampon în godeu.

- **Produse biologice analizate**

- ser,
- plasma,
- urina,
- scaun,
- lichid sinovial,
- LCR,
- lichid de lavaj bronșic.

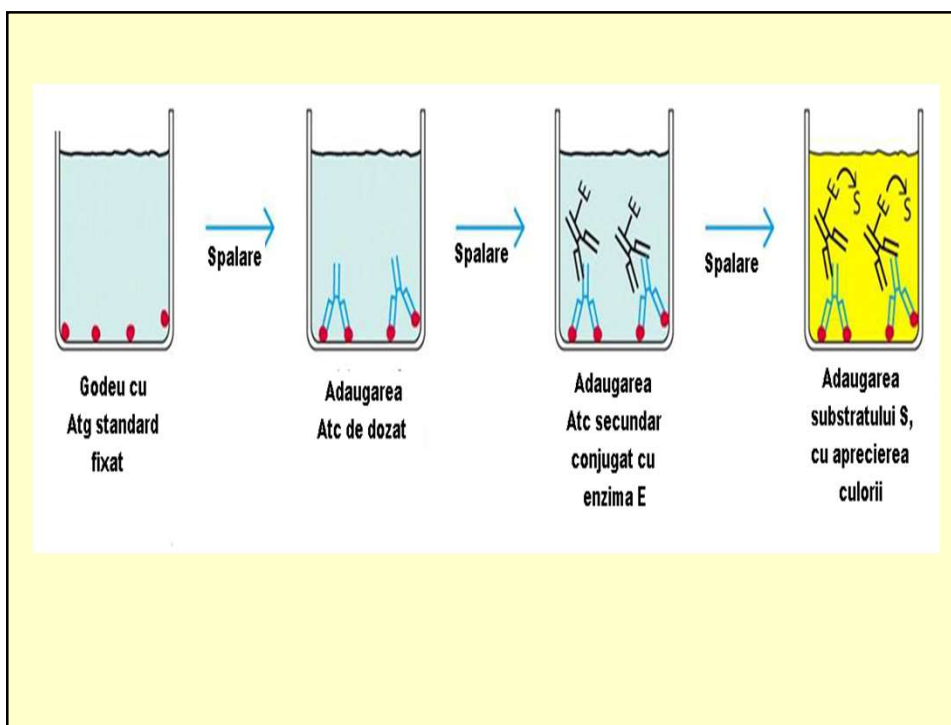
RIE directă (metoda sandwich)

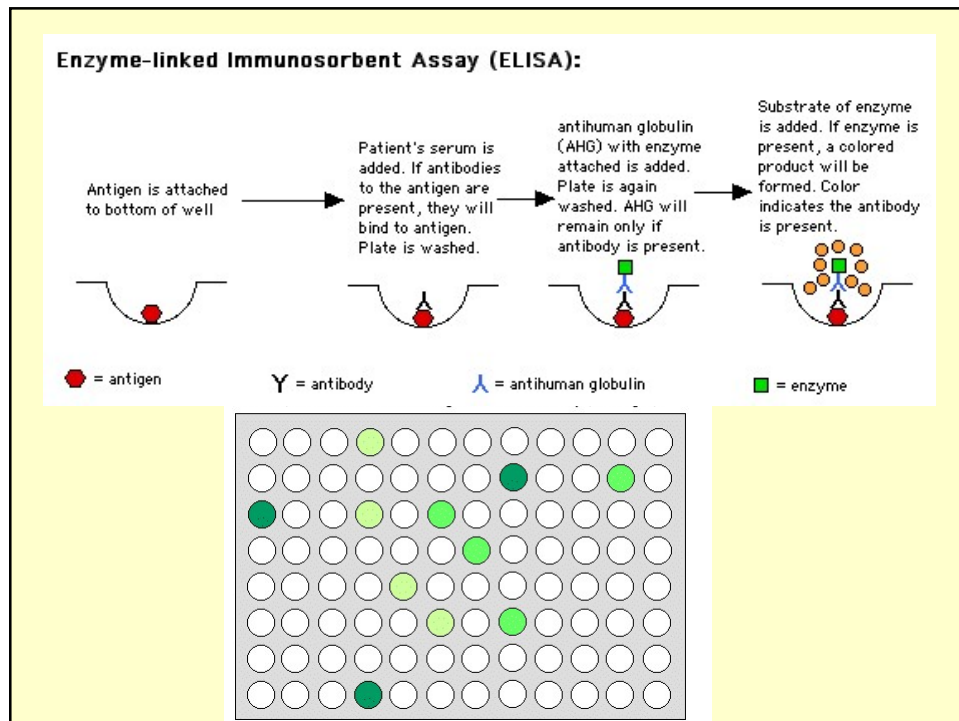
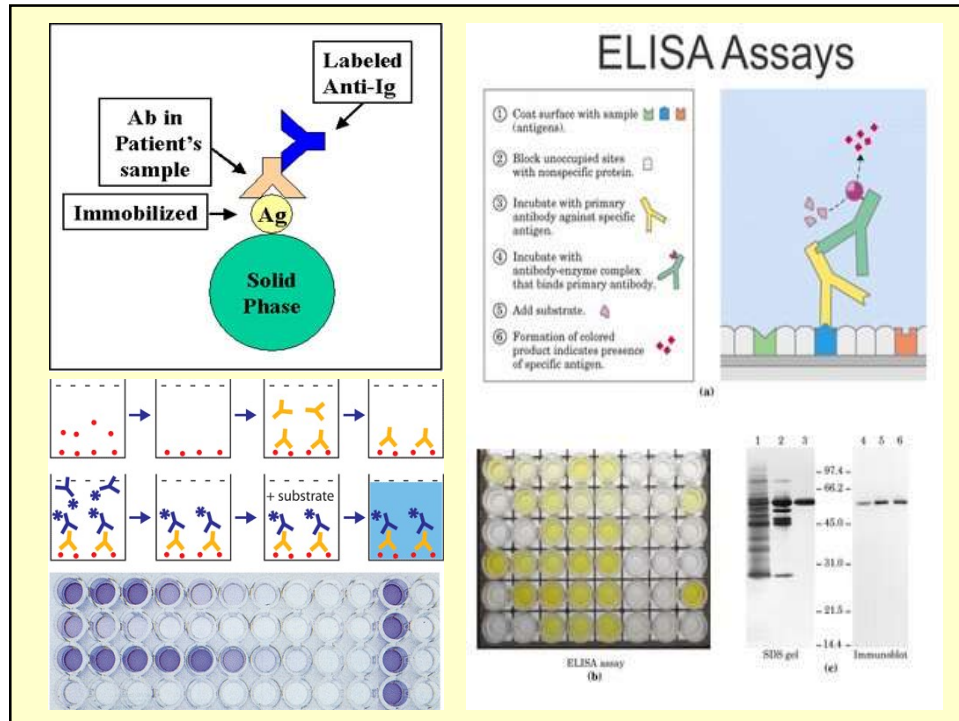
- **Utilizată doar în sero-identificarea Atg.**
- În godeurile din placa de polistiren în care sunt fixați **Atc cunoscuți** se toarnă soluția de **Atg necunoscut**
 - Incubare 1h.
- După o spălare minuțioasă a godeurilor se adaugă **Ac marcați cu enzime - conjugatul** care se fixează pe epitopii liberi ai Atg polivalent.
 - Incubare de 30 min-1h
- Spălare
- Prezența complexului **Atc-Atg-Atc-marcă** se depistează cu ajutorul **substratului cromogen** (substanță inițial incoloră, dar care se colorează sub acțiunea enzimei, ex. apa oxigenată și orthofenilendiamina).
- Se citește DO la **spectrofotometru**



RIE indirectă

- **Utilizată în serodiagnostic (dozarea Atc)**
- **Atg cunoscut** este fixat la fundul godeurilor.
- **Atc (serul testat)** se introduce în godeu,
 - Incubare 1h
 - Spălare
- Se adaugă **ligandul marcat cu enzimă – conjugatul** (anti-Ig sau proteina A cuplate cu enzimă). Acest ligand se fixează pe Atc testați.
 - Incubare 1h
 - Spălare
- Se adaugă apoi **substratul cromogen**.
- Cantitatea de Atc se măsoară după densitatea optică a lichidului din godeuri → Se citește DO la **spectrofotometru**





APLICATIILE TEHNICII ELISA

Testul ELISA are multiple aplicații :

- determinarea cantitativă a unor proteine cu importanță diagnostică:
 - α- fetoproteina, Atg carcinoembrionar
- determinarea cantitativă a unor Atg de natură infecțioasă bacteriene, virale (HIV), fungice, prazitare sau/și a Atc corespunzători din serul bolnavilor, în scop diagnostic;
- evidențierea și titrarea auto-Atc ca markeri pentru bolile autoimune, virale (anti-HIV).
- Dozări de:
 - Hormoni
 - Markeri tumorali
 - Droguri, medicamente
 - Citokine

TEHNICA IMUNOBLOT (WESTERN BLOT)

permite identificarea Atg sau a Atc dintr-un amestec.

PRINCIPIUL TEHNICII - Proteinele din amestecul studiat sunt separate prin electroforeză în gel de agaroză în funcție de G moleculară.

I etapă – electroforeza în gel a probei de Atg → migrarea fracțiunilor

II etapă – transferul electric al Atg pe membrana de nitroceluloză

III etapă – pe membrană sunt aplicați succesiv Atc dirijați contra Atg, apoi conjugatul marcat cu enzimă, care permite depistarea Atc fixați.

- Spălare

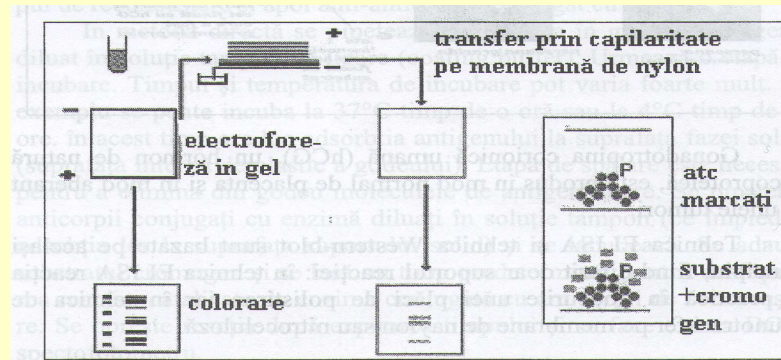
- Se adaugă substratul cromogen

→ Fiecare complex Atg-Atc formează zone colorate distincte.

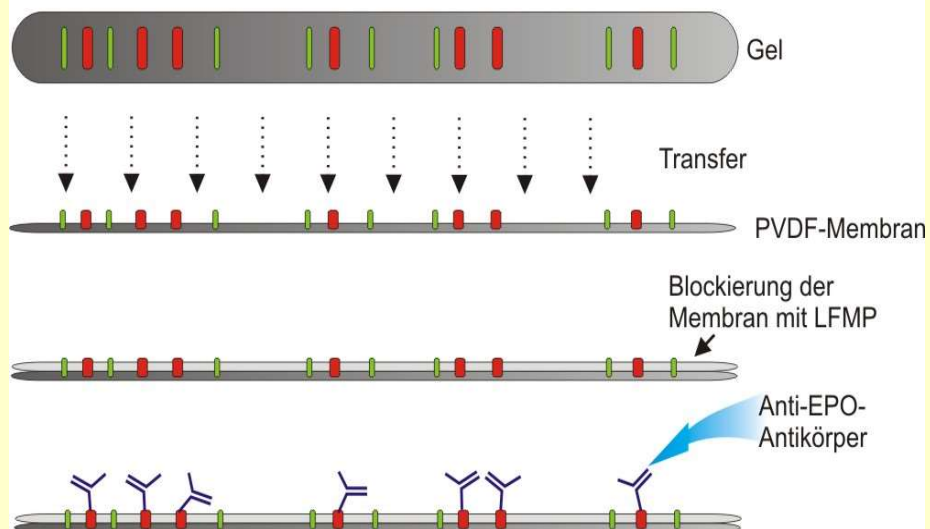
➤ **REZULTATE** - Reacția pozitivă se traduce prin apariția de benzi orizontale colorate cu intensitate diferită, în zonele unde a avut loc reacția Atg-Atc.

➤ **UTILIZARE :**

- depistarea Atc anti-HIV,
- caracterizarea Atc monoclonali.



EPO und andere urinäre Proteine

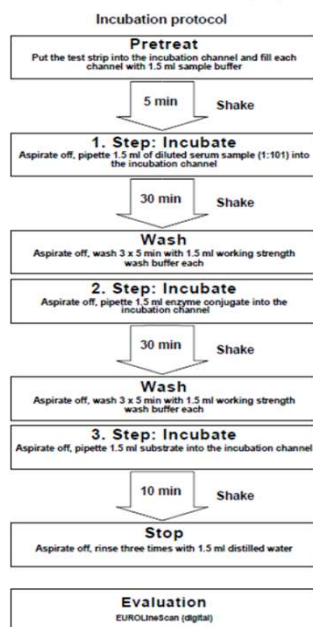


TEHNICA MODERNA IMUNOBLOT (WESTERN BLOT)



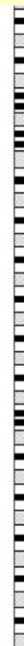
TEHNICA MODERNA IMUNOBLOT (WESTERN BLOT)

EUROIMMUN EUROLINE ANA Profile et Mi-2, Ku, DFS70 (IgG)



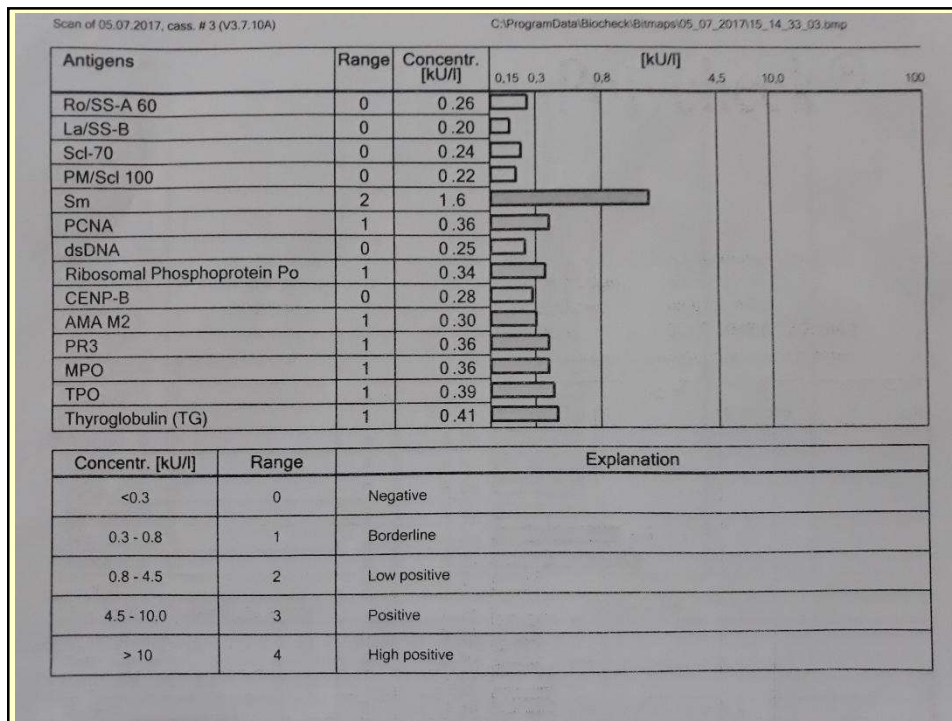
Antigen	Description
Mi-2	Recombinant Mi-28 protein
Ku	Recombinant Ku protein
nRNP/Sm	Highly purified U1-nRNP (native)
Sm	Highly purified Sm-antigen (native), the main component of the Sm-preparation is presented by the D protein
SS-A	Highly purified SS-A-antigen (60 kDa, native)
Ro-52	Recombinant Ro-52 (52 kDa)
SS-B	Highly purified SS-B-antigen (native)
Scl-70	Highly purified Scl-70 antigen (DNA topoisomerase I)
PM-Scl100	Recombinant PM-Scl100 protein
Jo-1	Jo-1 (Histidyl-tRNA synthetase) antigen purified by affinity chromatography
CENP B	Recombinant centromere protein B
PCNA	Recombinant PCNA (36 kDa)
dsDNA	Highly purified, native double stranded DNA
Nucleosomes	Native highly purified mononucleosomes
Histones	Highly purified histones
Rib. P-protein	Ribosomal P-proteins purified by affinity chromatography
AMA-M2	Highly purified proteins from the pyruvate-dehydrogenase complex (mitochondria antigen M2)
DFS70	Recombinant DFS70 (full length)

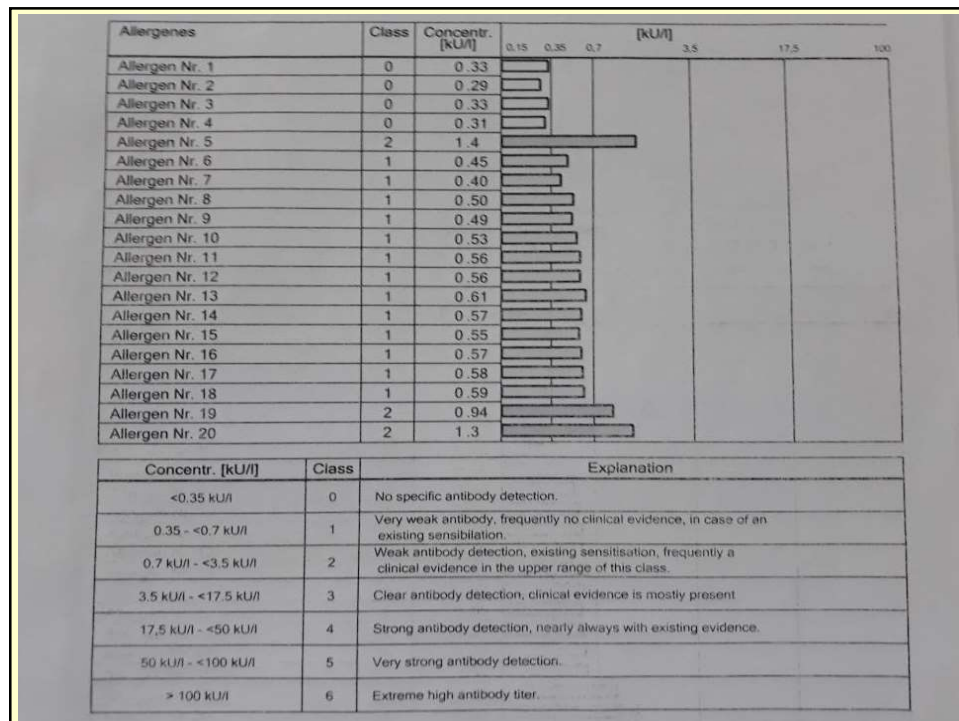
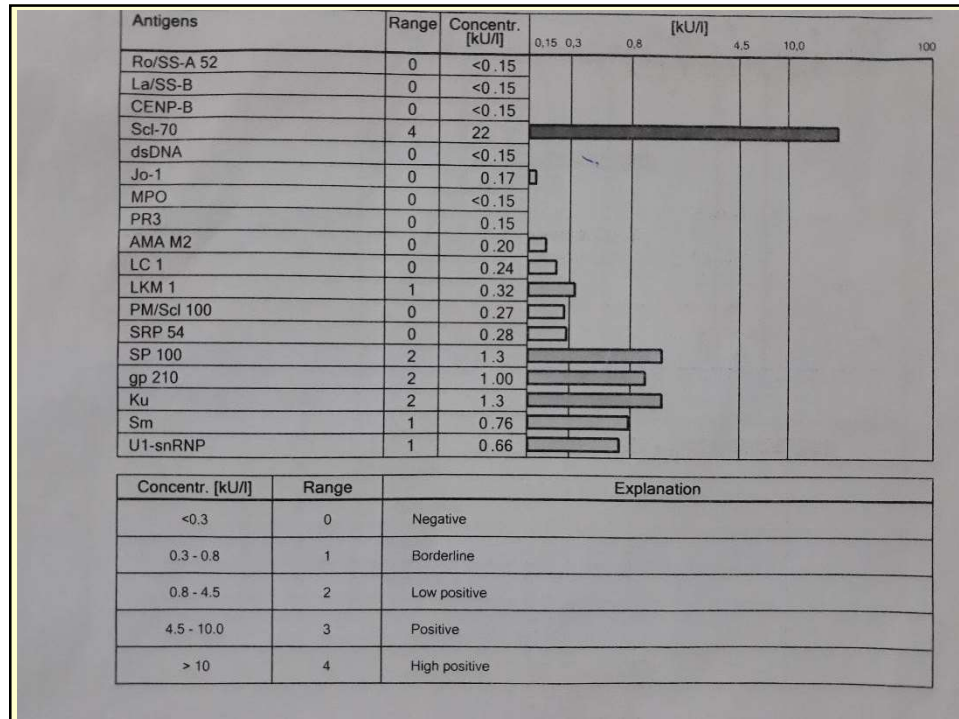
Mi-2
Ku
nRNP/Sm
Sm
SS-A
Ro-52
SS-B
Scl-70
PM-Scl100
Jo-1
CENP B
PCNA
dsDNA
Nucleosomes
Histones
Rib. P-protein
AMA-M2
DFS70
Control



Autoantibodies against	Autoimmune disease	Prevalence
nRNP/Sm	MCTD	95%
Sm	SLE	5% - 40%
SS-A	SS or SLE	40% - 95% or 20% - 60%
	Neonatal lupus erythematosus	95% - 100%
Ro-52	SS or SLE	70% - 90% or 40% - 60%
	SSc or idiopathic inflammatory myopathy	20% or 20% - 40%
SS-B	SS or SLE	40% - 95% or 10% - 20%
	Neonatal lupus erythematosus	75%
Scl-70	SSc	25% - 75%
	Diffuse or limited form of SSc	40% - 65% or 5% - 15%
PM-Scl	SSc including overlap syndrome	10% - 20% or 5% - 20%
	PM/SSc overlap syndrome	18%
	SSc (anti-PM-Scl75 positive)	24% - 50%
	SSc (anti-PM-Scl100 positive)	7%
CENP A	SSc - limited form or SSc - diffuse form	80% - 95% or 5% - 10%
CENP B	SSc - limited form or SSc - diffuse form	80% - 95% or 8%
	PBC	10% - 30%
PCNA	SLE	3%
dsDNA	SLE	40% - 90%
Nucleosomes	SLE	40% - 70%
Histones	Drug-induced SLE	95% - 100%
	SLE or RA	50% or 15% - 50%

Autoantibodies against	Autoimmune disease	Prevalence
DFS70	Atopic dermatitis	4% - 10%
	Rheumatic diseases	5% - 10%
Mi-2α	DM	approx. 20%
Mi-2β	DM, associated with neoplasia (e.g. colon or breast carcinoma)	approx. 10%
Ku	SLE/myositis/SSc	up to 10% / 40% / 5%
RP11	SSc	5%
RP155	SSc	7%
Sp100	PBC	21%
PML	PBC	13%
gp210	PBC	26%





DETERMINAREA ATC SPECIFICI DIFERITELOR PROTEINE VIRALE HIV

➤ **PRINCIPIU** Prin această tehnică pot fi evidențiate *fracțiunile Atg ale virusului HIV1* sau *HIV2* (fracțiuni separate în prealabil prin electroforeză efectuată în gel de poliacrilamidă și electrotransferate pe o bandă de nylon) sub forma unor benzi colorate în albastru-violet în prezența Atc anti-HIV1 sau anti-HIV2 și cu ajutorul Atc antiglobuline umane marcați enzimatic.

➤ ETAPELE TEHNICII

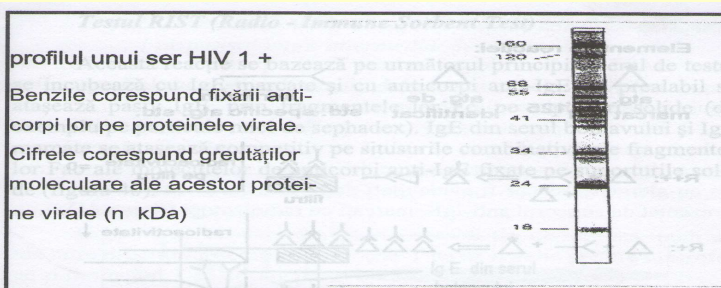
- Separarea fracțiunilor Atg ale virusului HIV1 sau HIV2 sub formă de benzi (Proteinele sunt separate **electroforetic în gel de poliacrilamidă**

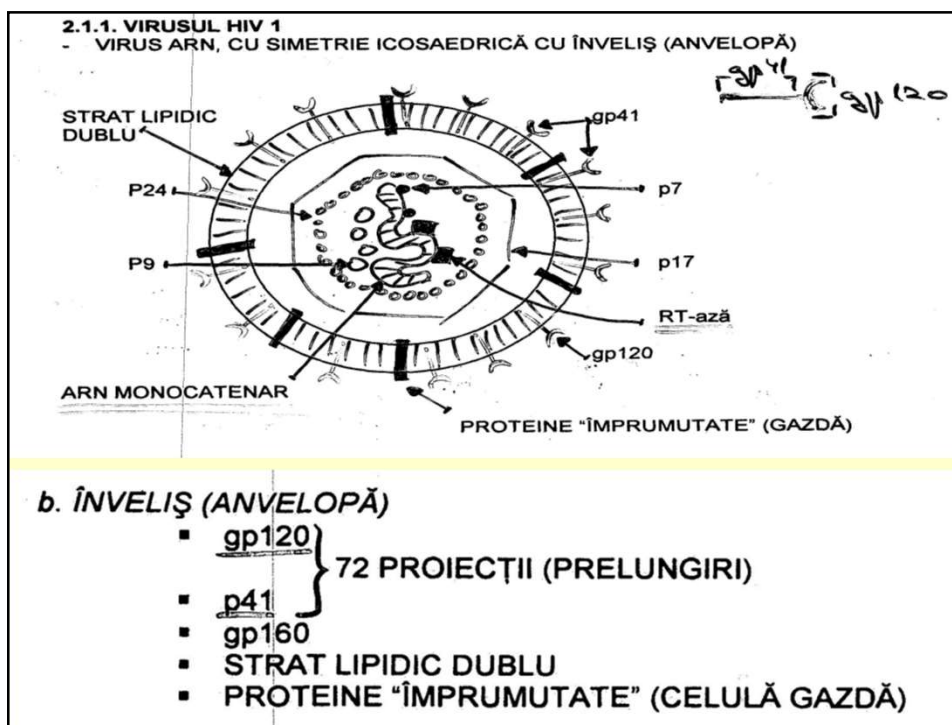
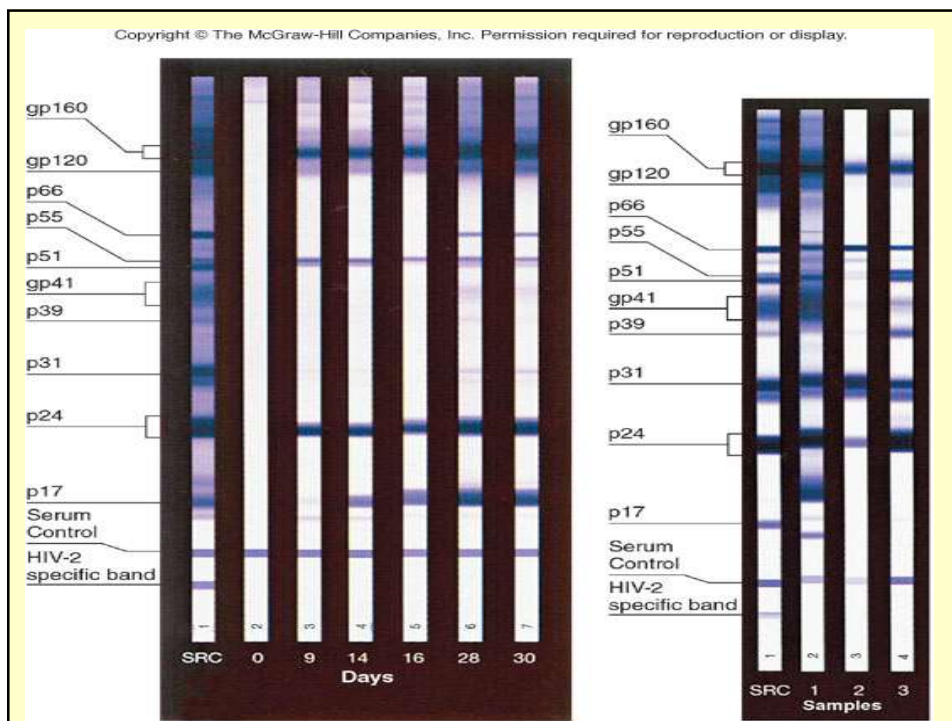
- Sub acțiunea câmpului electric are loc difuzia proteinelor conform GM, aranjându-se în zone liniare subțiri diferite: mai aproape de start se aranjează proteinele cu masă moleculară mare (120-150 kDa), la final se aranjează proteinele cu masă moleculară mică (5-10kDa).

- Apoi lamela de gel este transferată pe o **foaie de nitroceluloză** amplasată între electrozii unei surse de curent continuu.

(Sub acțiunea câmpului electric are loc trecerea proteinelor din gel pe nitroceluloză, unde se fixează foarte bine pe hârtie)

- Proteinele fixate sunt marcate cu o enzimă (e.g. alkaline phosphatase sau peroxidase) incoloră.
- Procedura ulterioară de montare a reacției este similară tehnicii ELISA.
- **INCUBAREA** benzilor cu **serul de cercetat** și cu **serurile martor (pozitiv, negativ)** timp de 2 ore la t camerei → Spalare
- **INCUBAREA** benzilor cu **conjugatul (Atc anti-globuline umane cuplați cu enzima)** 2 ore la t camerei → Spalare
- **INCUBAREA** benzilor cu **soluție revelatoare** 20 minute la t camerei.
- Apariția **benzilor colorate** identifică Atc specifici subfracțiunilor Atg virale.





REACTIILE RIA

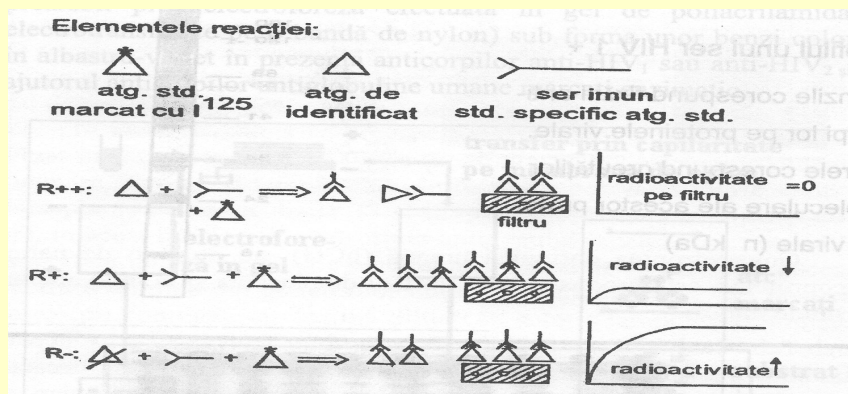
*RIA – radioimmunoassay = radio
imunotestarea*

- **Analiza radioimună (RIA)** - folosită în cadrul unor tehnici sensibile, pentru măsurarea titrului unui Atg sau al unor Atc, folosind **reactanți marcați radioactiv**.
- **PRINCIPIUL REACTIEI** - Radioimunotestarea se bazează pe afinitatea unui Atg necunoscut pentru Atc său specific și pe posibilitatea formei radioactive a Atg de a intra în competiție cu Atg de dozat, nemarcat și de același tip.
- Cantitatea de complexe Atg marcat-Atc care se stabilește prin măsurarea radioactivității prezente la nivelul unui filtru ce nu lasă să treacă decât elementele izolate ale reacției, este o funcție inversă a concentrației de Atg nemarcat care se determină.
- Reacția se citește la un SCINTILATOR pentru radiații gama
- Principiul este asemănător cu cel al RIE/ELISA
 - Atg se fixează la fundul godeurilor din placa de plastic.
 - Se adaugă Atc testați care se vor combina cu Atg omolog.
 - După spălarea godeurilor, se adaugă un ligand radiomarcant (Atc marcați cu izotopi radioactivi) (anti-Ig).
 - După eliminarea excesului de izotopi prin spălare, se măsoară radioactivitatea : ea este proporțională cu concentrația Atc dozați.



APLICAȚII

evaluarea unor factori prezenți în ser în conc f reduse : Atg carcionembrionar, alfa-fetoproteina, hormoni, enzime, medicamente;
dozarea unor Atc anti-bacterieni : Atc anti-toxine bacteriene,
detectarea anumitor Atg și Atc în serul bolnavilor cu infecții virale.



TESTUL RIST (Radio-Immune Sorbent Test)

PRINCIPIU : Serul de testat se incubează cu IgE marcate și cu Atc anti-IgE; în prealabil se atașează pasiv Ig E prin fragmentele lor Fc pe suporturi solide (de ex particule mici de sephadex). IgE din serul bolnavului și IgE marcate se atașează competitiv pe situsurile combinate ale fragmentelor Fab ale moleculelor de Atc anti-IgE fixate pe suporturile solide.

- Cu cât există o cantitate mai mare de molecule de IgE în serul de testat cu atât mai puține molecule de IgE marcate vor fi atașate.
- După centrifugare se îndepărtează supernatantul care conține IgE rămase nelegate → **se măsoară radioactivitatea sedimentului care va exprima indirect cantitatea de IgE din serul bolnavului.**
- **Radioactivitatea sedimentului este invers proporțională cu titrul de Atc IgE din serul de testat.**

APLICAȚII

- diagnosticul **stărilor de hipersensibilitate imediată mediate de IgE** (reacții anafilactice)

TESTUL RAST (Radio Allergo Sorbent Test)

- Tehica dozează radio-imunologic Ig din izotipul IgE specifice uni alergen dat
- **PRINCIPIU** – *Alergenul* este fixat pe un suport solid (particule de agaroză) peste care se aplică **serul pac**. Dacă serul conține Atc IgE specifici alergenului respectiv, aceștia se vor combina cu alergenul și vor fi evidențiați după adăugarea unui **conjugat** reprezentat de **Atc anti-IgE marcați cu radioizotopi**.
- RAST poate deveni o tehnică imuno-enzimatică de tip ELISA când se dorește evitarea markerilor radioactivi.