



Mara Mirasoli, Aldo Roda
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche
Università di Bologna
Dora Melucci, Sonia Casolari, Pierluigi
Reschiglian
Dipartimento di Chimica "G. Ciamician"
Università di Bologna
mirasoli@alma.unibo.it

FFF-CL: APPLICAZIONI IN CAMPO BIOANALITICO

I saggi immunoenzimatici basati sull'FFF offrono vari vantaggi rispetto ai sistemi convenzionali su piastra microtiter. La cinetica della reazione immunologica che coinvolge le sfere micrometriche è infatti più veloce e non è richiesta una fase di lavaggio per separare il tracciante libero da quello legato, in quanto essi sono quantificabili dall'area del void-peak e del picco ritenuto. Inoltre essi si prestano allo sviluppo di metodi per l'analisi simultanea di più analiti, obiettivo di particolare interesse. In questo lavoro viene presentato uno studio di fattibilità per lo sviluppo di saggi immunoenzimatici basati su FFF-CL ed i risultati preliminari da esso ottenuti.

Quando è richiesto un metodo selettivo per la determinazione diretta di un analita in una matrice complessa di origine biologica, alimentare o ambientale, sono poche le tecniche in grado di competere con i saggi immunometrici (*immunoassay*), basati sulla reazione immunologica tra l'analita di interesse (*An*) ed un anticorpo specifico (*Ab*) (1). Le caratteristiche tipiche del legame anticorpale conferiscono elevata specificità a tali saggi, che se accoppiati a tecniche di rivelazione sensibili consentono la quantificazione di analiti in tracce. La disponibilità di anticorpi specifici per numero-

sissimi composti e la possibilità di effettuare determinazioni su campioni complessi senza un preventivo trattamento giustificano la vasta applicabilità degli *Immunoassay* e la loro diffusione nello sviluppo di test in chimica clinica, per l'analisi di farmaci, nel monitoraggio ambientale e negli screening su campioni alimentari (2).

Saggi immunoenzimatici: EIA e ELISA

In un saggio immunometrico il segnale analitico è comunemente generato da una specie detta tracciante, ottenuta marcando l'analita (*An**) o l'anticorpo

(*Ab**) con un composto ad elevata rivelabilità (ad esempio un radioisotopo, un enzima, una molecola fluorescente o chemiluminescente, CL) (3).

Quando si sintetizza il tracciante utilizzando un enzima, si parla di metodi immunoenzimatici (EIA = *Enzyme Immuno Assay*). In questi casi il vantaggio principale è legato all'effetto di amplificazione del segnale dovuto al turnover del substrato, con conseguente possibilità di rivelare analiti in tracce. Tra i sistemi di rivelazione dell'attività enzimatica, l'uso di substrati CL permette di sviluppare metodi con limiti di rivelazione paragonabili a quelli ottenuti

con i radioisotopi, riducendo i problemi di stabilità del tracciante ed eliminando i rischi per la salute degli operatori.

I metodi EIA competitivi sono basati sulla competizione tra An e An* nei confronti di un numero limitato di molecole di Ab, in genere immobilizzate su un supporto solido (ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) costituito tipicamente dai pozzetti di una piastra di polivinile o polistirene (piastra *microtiter*). L'uso di piastre *microtiter*, estremamente diffuso, permette di quantificare numerosi campioni (anche

Dispositivi immunometrici disponibili sul mercato

Attualmente sono commercialmente disponibili un numero elevatissimo di dispositivi analitici basati su metodi immunometrici. Essi si possono distinguere in tre categorie principali:

a) metodi per applicazioni sul campo (*lateral flow immunoassay*), basati sull'uso di strip reattive che forniscono in tempi brevi, e generalmente senza la necessità di strumentazione accessoria, informazioni semi-quantitative su analiti di interesse alimenta-

soprattutto se si utilizza la rivelazione colorimetrica) o automatizzata; sono disponibili kit commerciali per numerosissimi analiti che coprono praticamente tutti i settori applicativi della chimica analitica; c) sistemi automatizzati per analisi immunometriche in ambito clinico, caratterizzati da elevata produttività. I più diffusi sono il sistema TDX (Abbott), che utilizza metodi immunometrici omogenei basati su misure di anisotropia di fluorescenza, ed il sistema Elecsys (Roche), che impiega metodi eterogenei su supporto magnetico e rivelazione mediante CL elettrogenata.

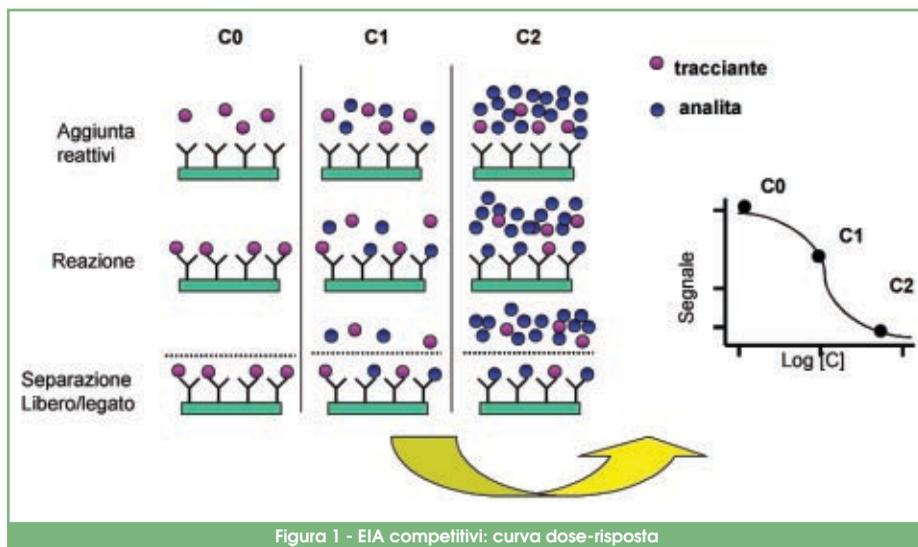


Figura 1 - EIA competitivi: curva dose-risposta

centinaia) in una sola analisi. In seguito al processo di competizione, la frazione di An* legata alle molecole di anticorpo è inversamente proporzionale alla quantità di An presente nel campione, quindi misurando l'attività enzimatica sulla fase solida è possibile quantificare l'analita, previa costruzione di una curva di calibrazione, detta *curva dose-risposta*, avente la forma di una sigmoide (Figura 1).

re, clinico o ambientale;

b) metodi immunometrici in formato piastre *microtiter* (generalmente a 96 pozzetti), nei quali l'analita viene quantificato prevalentemente mediante sistemi di rivelazione colorimetrici, o fluorescenti, o CL. Tali metodi possono essere utilizzati in laboratorio in modalità quasi esclusivamente manuale (in questo caso richiedono una strumentazione relativamente semplice e poco costosa,

ELISA multianalita: nuove strategie

L'interesse di molti ricercatori è oggi rivolto verso lo sviluppo di metodi ELISA multianalita, in grado, cioè di quantificare più di una specie in una singola analisi e su un'unica aliquota di campione. Una delle possibili strategie prevede l'immobilizzazione di anticorpi diversi sulla medesima superficie e la distinzione di segnali specifici originati da differenti traccianti. Ciò è stato ottenuto ad esempio realizzando speciali piastre prototipo in cui ogni pozzetto è suddiviso in diversi sotto-pozzetti, nei quali è possibile immobilizzare anticorpi per analiti diversi (4). Sono stati inoltre sviluppati vari sistemi di tipo microarray che prevedono la deposizione di numerosi *microspot*, ciascuno contenente un anticorpo specifico, su una superficie (per esempio i pozzetti di una piastra *microtiter*, sistema SearchLight commercializzato da Pierce Endogen) e la rivelazione di ciascun analita mediante substrati CL ed analisi d'immagine mediante camera CCD. Questa metodica soffre tuttavia di fenomeni di *cross-talk* del segnale CL tra i diversi

FFF-CL: Applications in Bioanalysis

FFF-based immunoassays offer various advantages with respect to the conventional systems on microtiter plate format: the kinetics of the immunological reaction that involves micrometer-sized beads is much faster, and cumbersome washing steps are not required to separate free and bound tracer, which can be respectively quantified by the void-peak and retained-peak areas. Moreover they are suited to simultaneous, multi-analyte detection, an interesting target to hit.

In this work, we present a feasibility study on FFF-CL-based immunoassays, and the preliminary results thereby obtained.

ABSTRACT 

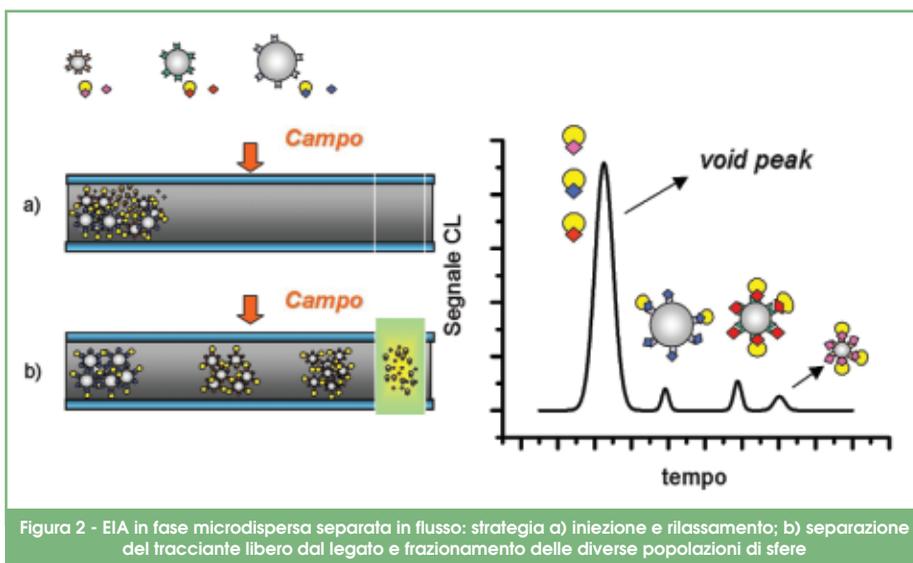


Figura 2 - EIA in fase microdispersa separata in flusso: strategia a) iniezione e rilassamento; b) separazione del tracciante libero dal legato e frazionamento delle diverse popolazioni di sfere

spot all'interno di uno stesso pozzetto, riducendo l'affidabilità del dato analitico. Recentemente è stato commercializzato un sistema immunometrico multianalita (LabMAP, Luminex Corp., Austin, TX) basato sull'uso di vari fluorofori per ottenere popolazioni di microsferi con caratteristiche di fluorescenza distinguibili, e traccianti fluorescenti per quantificare l'analita. Il dosaggio immunometrico avviene sulla superficie delle sfere. Successivamente le sfere sono separate mediante un sistema con un principio simile a quello dei citometri a flusso: durante il passaggio di ciascuna sfera al rivelatore, l'analita viene identificato in base alle caratteristiche di fluorescenza della sfera e quantificato in base al segnale fluorescente del tracciante immobilizzato sulla sfera stessa (5). Questi metodi sono tuttavia molto costosi e richiedono strumenta-

zione complessa.

ELISA multianalita: la strategia proposta

In questo lavoro proponiamo una diversa strategia per la realizzazione di un metodo ELISA competitivo multianalita. Essa prevede il legame di anticorpi diversi a nano o microparticelle, distinguibili per il diametro differente, e la separazione delle varie popolazioni mediante una tecnica separativa a flusso (frazionamento in campo di flusso-flusso, FFFF) capace di eseguire un frazionamento in base alle dimensioni. Ogni analita eluito dal frazionatore sarà poi quantificato indipendentemente mediante la misura dell'attività enzimatica su ciascuna popolazione di particelle, impiegando la CL come metodo di rivelazione ultrasensibile (Figura 2).

La novità dello studio, evidenziata dai dati

preliminari riportati, consiste nella separazione in flusso della fase microdispersa a cui è legato l'anticorpo anti-analita e nell'impiego del segnale di area di picco fratto-grafico per la costruzione di una curva dose-risposta. Rispetto ai sistemi convenzionali su piastra *microtiter* l'uso di particelle come supporto favorisce la cinetica della reazione immunologica, grazie alla maggiore estensione della superficie di interfaccia solido-soluzione. Inoltre il metodo che intendiamo mettere a punto permette il lavaggio dell'eccesso di tracciante durante la separazione.

Tra le tecniche separative di tipo liquido cromatografico il meccanismo di frazionamento in campo-flusso (FFF) è particolarmente adatto ad applicazioni in campo bioanalitico in quanto particolarmente *soff*. La separazione si realizza infatti in un canale in assenza di fase stazionaria per l'azione combinata del flusso laminare di una fase mobile bio-compatibile e del campo esterno applicato perpendicolarmente ad esso (6). L'impiego di una tecnica di rivelazione come la CL aggiunge qualità al sistema in termini di rivelabilità, intervallo dinamico e selettività.

L'accoppiamento FFF-CL è stato recentemente presentato dagli autori per la quantificazione e la rivelazione di microparticelle di polistirene (PS) legate all'enzima perossidasi di rafano (HRP), in grado di catalizzare la reazione di ossidazione del luminolo da parte dell' H_2O_2 , uno dei sistemi CL più comunemente impiegati (7, 8). Tale sistema costituisce un modello per ELISA su microparticelle disperse in FFF ed i risultati ottenu-

Bibliografia

- (1) C.P. Price, Principles and Practice of Immunoassay, 2nd Ed., D.J. Newman (Eds.), New York, 1997.
- (2) D.S. Hage, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 294R.
- (3) P. Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Practice and Theory of Enzyme Immunoassay, Elsevier, 1985, Vol. 15.
- (4) A. Roda *et al.*, *Clin. Chem.*, 2002, **48**(10), 1654.
- (5) U. Prabhakar *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 2002, **260**(1-2), 207.
- (6) J. Giddings *et al.*, FFF Handbook, M. Shimpf Eds. Inc., New York, 2000.
- (7) A. Roda *et al.*, *Talanta*, 2003, **60**, 303.
- (8) A. Roda *et al.*, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 1417.
- (9) P. Reschiglian *et al.*, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5945.

ti sono stati la base di partenza per studiare la fattibilità di tali saggi. Lo studio condotto ha portato a mettere a punto uno schema strumentale che prevede l'accoppiamento di tipo on-line con introduzione del substrato CL in flusso post-colonna (FIA-CL). Tale assetto (Figura 3) ha permesso di risolvere in modo indipendente i problemi correlati alla fase di frazionamento e a quella di rivelazione per la quale è stato scelto un substrato caratterizzato da elevata sensibilità ed in grado di produrre un segnale stabile nel tempo. Impiegando la tecnica FIA sono state sperimentate condizioni tali da ottenere: risoluzione a linea di base tra *void peak* e picco ritenuto nel frattogramma CL; recupero alto e riproducibile; frazionamento delle sfere senza perturbare la stabilità del legame anticorpo-tracciante.

Per semplificare lo studio di fattibilità in questione, si è esaminato il caso di un *immunoassay* per un singolo analita, il cloramfenicolo (CAF), un antibiotico ad ampio spettro d'azione. L'importanza della determinazione in tracce di questo farmaco risiede nel fatto che esso presenta, anche alle dosi terapeutiche, una notevole tossicità per l'uomo e per questo la UE ha bandito il suo impiego negli animali destinati alla produzione di alimenti per l'uomo. La procedura sperimentale adottata ha

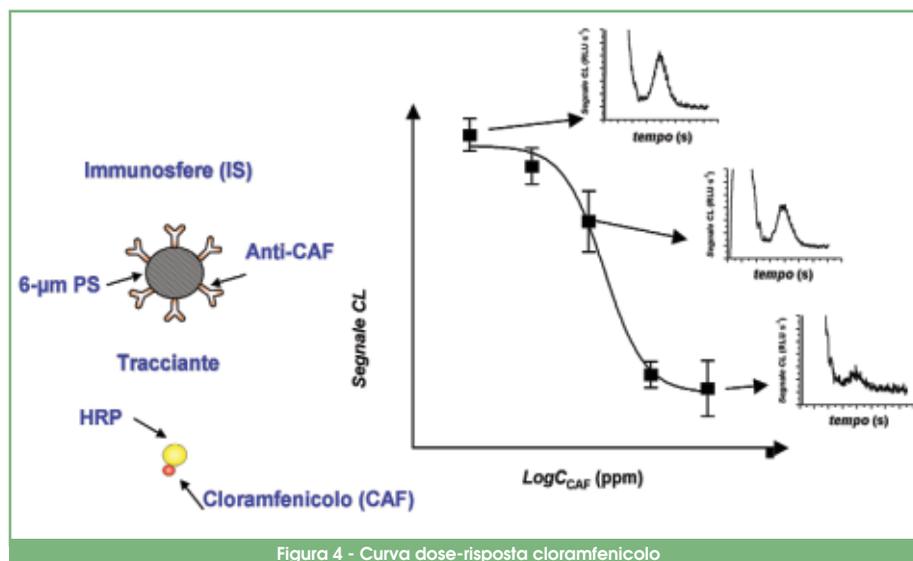


Figura 4 - Curva dose-risposta cloramfenicolo

previsto la sintesi di "immunosfere" (IS) ottenute legando un anticorpo anti-CAF a particelle di polistirene di 6 µm. Le IS sono state disperse in una soluzione contenente una quantità nota di tracciante (CAF-HRP), poi suddivise in varie frazioni ed addizionate di quantità diverse di analita (CAF). Dopo un tempo di incubazione necessario a raggiungere le condizioni di equilibrio, gli standard così ottenuti sono stati iniettati nel sistema FIA-CL. L'area del picco ritenuto (A_{CL}) registrata sul frattogramma CL e riportata in funzio-

ne del logaritmo della concentrazione di CAF ha permesso di ottenere una curva dose risposta (Figura 4).

Possibili applicazioni

Lo studio proposto pone le basi ad una possibile brevettabilità del metodo nella prospettiva di realizzare un kit commerciale per l'analisi in tracce mediante ELISA su fase solida microdispersa separata in flusso con rivelazione CL.

La capacità del frazionatore FIA di separare nano e microparticelle di polistirene di vari diametri, con elevata selettività ed in tempi brevi, dimostrata in precedenti lavori (8, 9), evidenzia il potenziale impiego del sistema FIA-CL per la realizzazione di un saggio immunoenzimatico multianalita, con risvolti applicativi di evidente interesse. L'assetto strumentale proposto presenta un'elevata flessibilità in quanto l'iniezione in flusso post-colonna del substrato CL permette di variare la composizione del cocktail CL in corrispondenza dell'uscita di ciascun picco frattografico.

Poiché la reazione immunologica su fase microdispersa è molto rapida, in prospettiva prevediamo di poter sviluppare un sistema automatizzato per analisi ad alta produttività (high throughput screening, HTS)

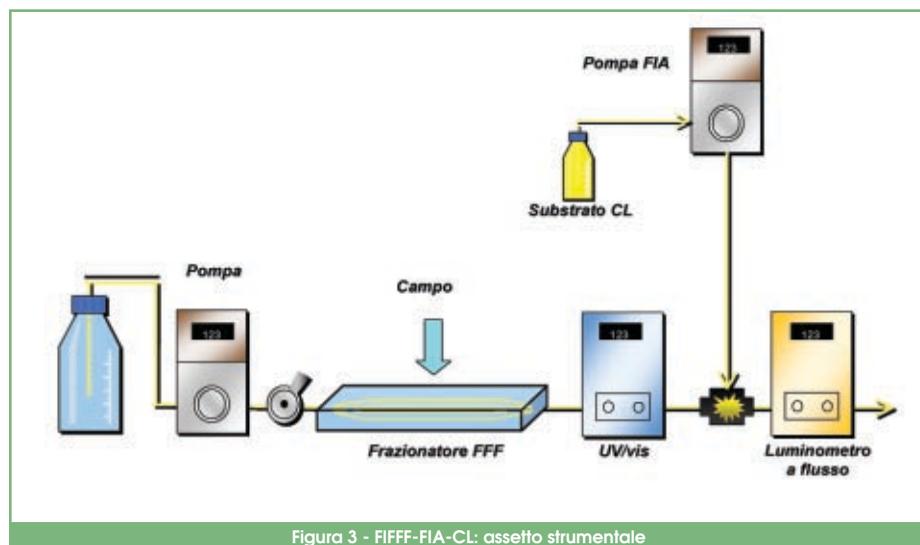


Figura 3 - FIA-CL: assetto strumentale