



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900546623
Data Deposito	04/10/1996
Data Pubblicazione	04/04/1998

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N		

Titolo

SAGGIO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI ANTI-ENDOMISIO

MI 96 A 2054

Titolare: VECCHI Maurizio

4 OTT. 1996

DESCRIZIONE

I076831/DV

La presente invenzione riguarda un nuovo metodo per la diagnosi della malattia celiaca.

Più precisamente, la presente invenzione riguarda un nuovo metodo per il dosaggio di anticorpi anti-endomisio presenti nel siero di pazienti affetti dalla malattia celiaca.

La malattia celiaca è caratterizzata da persistente intolleranza al glutine, che induce atrofia dei villi digiunali con iperplasia delle cripte e cattivo assorbimento di molteplici sostanze nutritive, con i conseguenti segni e sintomi clinici, quali calo ponderale (o mancato accrescimento nei bambini), diarrea, gonfiore addominali, anemia da carenza di ferro o di vitamine, osteoporosi ed altro. Tali alterazioni sono reversibili dopo esclusione del glutine dalla dieta.

La diagnosi di celiachia si è sempre basata sul riscontro alla biopsia digiunale delle lesioni caratteristiche e della loro regressione dopo adeguato periodo di dieta. Negli ultimi anni, tuttavia, è sempre più frequente il ricorso all'utilizzo di metodiche sierologiche che permettono uno "screening" non invasivo delle popolazioni a rischio e dei soggetti con sospetto clinico di malattia. I dosaggi di anticorpi sierici IgA anti-gliadina (AGA), anti-reticolina (ARA), anti-digiuno ed anti-endomisio (EMA) sono infatti caratterizzati da sensibilità e specificità assai elevate nella diagnosi di

questa malattia.

Tali dosaggi sono pertanto divenuti mezzi di diagnosi molto utilizzati nel sospetto clinico di celiachia, ed essendo applicabili su ampie popolazioni di soggetti, hanno permesso di riconoscere una prevalenza della malattia assai elevata (attorno a 1:250) anche in popolazioni che erano erroneamente ritenute a basso rischio come ad esempio quella statunitense.

Tra gli anticorpi elencati sopra, gli EMA sono caratterizzati da una sensibilità ed una specificità vicine al 100 % ed il saggio basato su di essi è ritenuto pertanto il test più accurato.

Una tecnica convenzionale adottata per la determinazione degli EMA nel siero di pazienti comprende l'utilizzo di metodiche di immunofluorescenza su tessuto di esofago distale di scimmia, in quanto tale tessuto è particolarmente ricco di antigene reattivo. Dopo aver incubato il siero umano sul tessuto di scimmia fissato su vetrino portaoggetti, la presenza nel siero di eventuali anticorpi anti-endomisio può essere valutata utilizzando un anticorpo fluoresceinato anti IgA umane che si fissa agli anticorpi eventualmente legati al tessuto. Ciò risulta in una particolare intensità di fluorescenza, rilevabile con specifici microscopi.

L'uso di tale tecnica presenta però diversi svantaggi. Innanzi tutto l'utilizzo di tali tessuti risulta essere molto costoso e soprattutto pone problemi di ordine ecologico, in

quanto le scimmie sono specie protette; in secondo luogo questa metodica, seppure sia di facile interpretazione, rimane in ogni caso una tecnica soggettiva, legata alla personale valutazione dell'osservatore, e dipende comunque dalla concentrazione locale di endomisio presente nel tessuto di esofago che può variare da campione a campione.

Diverse pubblicazioni, ad esempio B. Ladinser, E. Rossipal, K. Pittschieler, Gut 1994; 35; 776-778, hanno reso noto che la reattività anti-endomisiale può essere valutata, con sensibilità e specificità analoghe alle tecniche con esofago distale di scimmia, su tessuto di cordone ombelicale umano.

L'uso di tale tecnica permette di ovviare agli inconvenienti summenzionati del costo e dell'anti-ecologicità connessi all'utilizzo del tessuto di esofago di scimmia; il cordone ombelicale umano è infatti ampiamente disponibile e viene normalmente eliminato al termine del parto. Resta comunque sempre la problematica legata all'applicazione dell'immunofluorescenza, vale a dire la soggettività della valutazione, la lentezza e la complicatezza dell'analisi.

Si presenta quindi il problema di disporre di un metodo per la determinazione dell'anticorpo EMA contenuto nel siero di soggetti con sospetto clinico di malattia celiaca, che ovvii a tutti gli inconvenienti summenzionati.

Il problema viene risolto, secondo l'invenzione, da un

nuovo metodo di tipo sandwich per rilevare l'IgA sierica umana anti-endomisio (EMA), eventualmente presente in un campione, comprendente le fasi di:

- (a) immobilizzare un antigene reattivo con gli anticorpi anti-endomisio su una fase solida;
- (b) portare a contatto la fase solida ottenuta nella fase (a) con detto campione contenente eventualmente detta IgA sierica umana anti-endomisio;
- (c) portare a contatto la fase solida ottenuta nella fase (b) con una fase acquosa contenente un anticorpo anti IgA umane legato ad un tracciante;
- (d) rilevare la presenza di detto tracciante nella fase solida ottenuta nella fase (c).

Preferibilmente, il metodo secondo la presente invenzione comprende l'uso di un enzima come tracciante legato all'anticorpo anti IgA umane. In particolare la presente invenzione comprende l'uso dell'enzima fosfatasi alcalina.

In un ulteriore aspetto della presente invenzione, l'antigene reattivo con gli anticorpi anti-endomisio è ottenuto da un tessuto animale. Si è rivelato particolarmente vantaggioso l'uso del tessuto di cordone ombelicale umano come fonte di antigene reattivo con gli anticorpi anti-endomisio.

Preferibilmente, l'anticorpo anti IgA umane legato ad un tracciante è un anticorpo IgG di coniglio anti IgA umane.

La presente invenzione riguarda anche un corredo

diagnostico per l'attuazione del metodo appena descritto, comprendente, conservati distintamente uno dall'altro:

- (a) una piastra costituente una fase solida
- (b) una fase liquida contenente un antigene reattivo con gli anticorpi anti-endomisio;
- (c) un anticorpo anti IgA umane, legato ad un tracciante, in fase acquosa;
- (d) miscele di sieri di soggetti sani;
- (e) miscele di sieri di soggetti affetti da celiachia.

Le miscele di sieri con diagnosi nota sono essenziali componenti del corredo diagnostico della presente invenzione, in quanto le loro analisi mediante il metodo della presente invenzione determinano l'intervallo di affidabilità del test stesso.

Preferibilmente, il corredo diagnostico secondo l'invenzione comprende inoltre tamponi di lavaggio in fase acquosa.

In una particolare forma di esecuzione del corredo diagnostico secondo la presente invenzione, detto tracciante è un enzima e, in particolare, detto enzima è la fosfatasi alcalina.

Infine, la presente invenzione riguarda anche un corredo diagnostico per l'esecuzione del metodo descritto precedentemente, comprendente, conservati distintamente uno dall'altro:

- (a) una piastra costituente una fase solida avente un antigene reattivo con gli anticorpi anti-endomisio fissato su di essa;
- (c) un anticorpo anti IgA umane, legato ad un tracciante, in fase acquosa;
- (d) miscele di sieri di soggetti sani;
- (e) miscele di sieri di soggetti affetti da celiachia.

Preferibilmente, il corredo diagnostico secondo l'invenzione comprende inoltre tamponi di lavaggio in fase acquosa.

In una particolare forma di esecuzione del corredo diagnostico secondo la presente invenzione, detto tracciante è un enzima e, in particolare, detto enzima è la fosfatasi alcalina.

Il metodo secondo l'invenzione presenta diversi vantaggi rispetto ai metodi utilizzando le tecniche di immunofluorescenza. In primo luogo, la preparazione delle piastre di reazione per il metodo secondo la presente invenzione richiede una quantità decisamente minore di antigene ed un tempo di gran lunga più breve rispetto alla preparazione dei vetrini per l'immunofluorescenza.

Un ulteriore vantaggio del metodo secondo la presente invenzione consiste nel fatto che l'analisi effettiva degli EMA può essere svolta in tempi molto più brevi rispetto alle tecniche di immunofluorescenza, in quanto i campioni non devono

essere analizzati ad uno ad uno, mediante un microscopio, dal personale del laboratorio, bensì essi vengono scansionati da strumenti rilevatori a velocità nettamente superiori. Il vantaggio più importante del metodo secondo la presente invenzione sta comunque nel fatto di ottenere un risultato delle analisi consistente nella lettura quantitativa di una grandezza fisica, quale la densità ottica, che non può dare adito agli errori causati dalla soggettività di una valutazione qualitativa, come nel caso dell'immunofluorescenza.

E' inoltre possibile fornire un corredo diagnostico già pronto comprendente una piastra (fase solida) e fornire separatamente l'antigene e l'anticorpo anti IgA umane coniugato con l'enzima, in modo tale da accelerare notevolmente l'intera procedura del test diagnostico.

Verrà in seguito riportato, a titolo illustrativo e non limitativo, un esempio specifico di applicazione del metodo secondo la presente invenzione, facendo riferimento alle figure allegate, in cui:

la figura 1 è un diagramma rappresentante la media e la deviazione standard delle letture di densità ottica di sieri di soggetti affetti da celiachia (CE) e di soggetti sani (controlli), ottenute con il metodo secondo l'invenzione e

la figura 2 è un diagramma rappresentante la distribuzione delle letture della densità ottica di sieri di soggetti affetti da celiachia (CE) e di soggetti sani (controlli).

ESEMPIO

Processazione del cordone ombelicale

Il cordone ombelicale umano, immediatamente dopo il parto, viene tagliato in frammenti di circa 1 cm di lunghezza, i quali vengono in seguito congelati mediante azoto liquido e conservati ad una temperatura di -80°C .

Preparazione dell'omogenato

Uno o più frammenti di cordone ombelicale vengono scongelati e lavati con tampone salina-fosfato (0,15 M NaCl, pH 7,2, PBS) fino a completa rimozione del materiale ematico in esso contenuto. Il frammento di cordone viene quindi posto in tampone fosfato ad una temperatura variabile tra 0 e 4°C (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 10 mM, pH 7,2) contenente leupeptina, aprolinina e pepstatina ciascuna in concentrazione di $1\ \mu\text{g/ml}$. Il tessuto viene successivamente omogenato con quattro cicli di 30 s ciascuno, mantenendo il materiale a $0-4^{\circ}\text{C}$. Il prodotto così ottenuto viene successivamente centrifugato a 1500 g per 20 minuti. Il sovranatante viene prelevato e, dopo valutazione della sua concentrazione proteica, viene conservato a -20°C fino al momento dell'esecuzione degli esperimenti ELISA.

Esecuzione della metodica ELISA

Il coating delle piastre ELISA, realizzate in polistirene, viene effettuato durante un periodo di 14 ore a 4°C con aliquote da $100\ \mu\text{l}$ di omogenato di cordone diluito in tampone salina fosfato (NaCl 0,15M), fino ad ottenere una

concentrazione proteica finale di 0,3 mg/ml. La piastra viene in seguito lavata tre volte con aliquote di 200 μ l di tampone salina fosfato contenente Tween 20 allo 0,05 % per ciascun pozzetto.

Aliquote di 100 μ l di siero da testare diluito 1:10 in tampone salina-fosfato contenente Tween 20 allo 0,05 % ed albumina serica bovina al 2 % vengono successivamente incubate in ciascun pozzetto per un'ora a 37°C. La piastra viene in seguito lavata come sopra ed incubata a 37 °C con aliquote di 100 μ l di IgG di coniglio anti IgA umane coniugate con fosfatasi alcalina, diluite 1:500 in tampone salina-fosfato. La piastra viene nuovamente sottoposta a lavaggi come sopra e successivamente incubata a temperatura ambiente con p-nitrofenilfosfato diluito in soluzione di dietanolammina (97 ml/l), NaN_3 (0,2 g/l) e MgCl_2 (100 mg/l) in acqua distillata, pH 9,8 al buio e per 40 minuti. La densità ottica di ciascun pozzetto può a questo punto essere rilevata con un lettore ELISA ad una lunghezza d'onda di 405 nm.

Il valore soglia sotto il quale il siero testato viene considerato sano, è stato calcolato sommando alla media delle letture di densità ottica ottenute nei sieri di controllo due deviazioni standard della stessa, in modo tale da ottenere un valore che abbracci verosimilmente il 95 % dei valori ottenuti in una popolazione di soggetti normali. Il valore così calcolato è stato diviso per la media delle letture ottenute

nella popolazione normale di controllo, ottenendo così un coefficiente numerico che potrà essere utilizzato in ciascun successivo esperimento per il calcolo del valore-soglia utilizzando un pool di sieri normali di controllo.

Si è poi proceduto all'analisi di 107 sieri in cieco (47 prelevati da soggetti con enteropatia da glutine e 60 da soggetti sani di controllo). La figura 1 illustra la media e la deviazione standard delle letture di densità ottica nei 107 sieri analizzati. I risultati di questi esperimenti sono stati positivi: la media dei valori di densità ottica nei sieri di soggetti affetti da celiachia (CE) è stata di 0,680 (mediana =0,647, deviazione standard =0,307), mentre nei sieri sani (controlli) è risultata di 0,179 (mediana =0,146, deviazione standard =0,098). La differenza tra le due medie è risultata altamente significativa ($p < 10^{-6}$).

La figura 2 illustra la distribuzione delle letture di densità ottica dei 107 campioni. Calcolando il valore soglia come sopra descritto, (rappresentato nella figura con una linea tratteggiata orizzontale) soltanto 4 CE sono risultati negativi al test, mentre soltanto 2 controlli hanno dato valori lievemente superiori.

Il test ELISA eseguito nel modo descritto sopra ha dato risultati uguali a quelli ottenuti con immunofluorescenza in 106/107 sieri esaminati.

Dalle sperimentazioni effettuate è risultato che

alcuni parametri del procedimento appena descritto possono essere variati entro certi limiti ottenendo ugualmente risultati soddisfacenti:

Il pH del tampone utilizzato durante il processo può variare tra 7 e 8; possono inoltre essere utilizzati diversi sistemi tampone, convenzionalmente utilizzati nel settore, come ad esempio il sistema Tris/HCl.

Il siero umano può essere utilizzato non diluito, oppure diluito fino a 1:100.

In alternativa alle IgG di coniglio anti IgA umane, possono essere utilizzati anticorpi anti IgA umane di altri animali (topo, maiale, ecc.)

Possono inoltre essere utilizzate diverse tecniche di misurazione oltre a quella ELISA; ad esempio si possono usare tecniche RIA (Radioimmunoassay) in cui al posto di un enzima viene utilizzato un tracciante radioattivo. In tal caso viene quindi rilevata la radioattività e non l'attività enzimatica dei complessi legati alla superficie della fase solida.

Applicando la metodica ELISA, possono essere utilizzati, in alternativa alla fosfatasi alcalina, altri enzimi come ad esempio la perossidasi, senza osservare cambiamenti sostanziali nei risultati ottenuti.


Dr. Rinaldo FERRECCIO
N. Iscriz. ALBO 575
(In proprio e per gli altri)

RIVENDICAZIONI

1. Metodo di tipo sandwich per rilevare l'IgA sierica umana anti-endomisio (EMA), eventualmente presente in un campione, comprendente le fasi di:

- (a) immobilizzare un antigene reattivo con gli anticorpi anti-endomisio su una fase solida;
- (b) portare a contatto la fase solida ottenuta nella fase (a) con detto campione contenente eventualmente detta IgA sierica umana anti-endomisio;
- (c) portare a contatto la fase solida ottenuta nella fase (b) con una fase acquosa contenente un anticorpo anti IgA umane legato ad un tracciante;
- (d) rilevare la presenza di detto tracciante nella fase solida ottenuta nella fase (c).

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detto tracciante è un enzima.

3. Metodo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che detto enzima è la fosfatasi alcalina.

4. Metodo secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detto antigene reattivo con gli anticorpi anti-endomisio è ottenuto da un tessuto animale.

5. Metodo secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che detto antigene reattivo con gli anticorpi anti-endomisio è ottenuto dal tessuto di cordone ombelicale umano.

6. Metodo secondo una qualunque delle rivendicazioni

precedenti, caratterizzato dal fatto che detto anticorpo anti IgA umane legato ad un tracciante è un anticorpo IgG di coniglio anti IgA umane.

7. Corredo diagnostico per l'esecuzione del metodo secondo le rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto di comprendere i seguenti componenti:

- (a) una piastra costituente una fase solida
- (b) una fase liquida contenente un antigene reattivo con gli anticorpi anti-endomisio;
- (c) un anticorpo anti IgA umane, legato ad un tracciante, in fase acquosa;
- (d) miscele di sieri di soggetti sani;
- (e) miscele di sieri di soggetti affetti da celiachia.

8. Corredo diagnostico secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto di comprendere tamponi di lavaggio in fase acquosa.

9. Corredo diagnostico secondo la rivendicazione 7 o 8, caratterizzato dal fatto che detto tracciante è un enzima.

10. Corredo diagnostico secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che detto enzima è la fosfatasi alcalina.

11. Corredo diagnostico per l'esecuzione del metodo secondo le rivendicazioni da 1 a 6, caratterizzato dal fatto di comprendere i seguenti componenti:

- (a) una piastra costituente una fase solida avente un

antigene reattivo con gli anticorpi anti-endomisio
fissato su di essa;

(c) un anticorpo anti IgA umane, legato ad un tracciante,
in fase acquosa;

(d) miscele di sieri di soggetti sani;

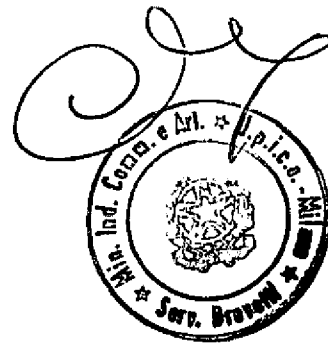
(e) miscele di sieri di soggetti affetti da celiachia.

12. Corredo diagnostico secondo la rivendicazione 11,
caratterizzato dal fatto di comprendere tamponi di lavaggio in
fase acquosa.

13. Corredo diagnostico secondo la rivendicazione 11 o 12,
caratterizzato dal fatto che detto tracciante è un enzima.

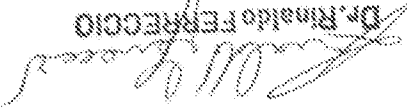
14. Corredo diagnostico secondo la rivendicazione 13,
caratterizzato dal fatto che detto enzima è la fosfatasi
alcalina.


Dr. Rinaldo FERRECCIO
N. iscriz. ALBO 525
(In proprio e per gli altri)



(in propria e per gli altri)
N. iscritt. ALBO 628

Dr. Rinaldo FERRECCIO



Densita' ottica.

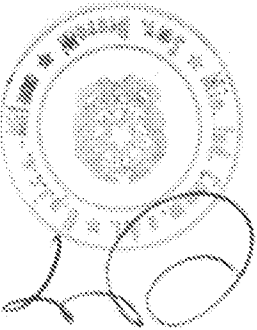
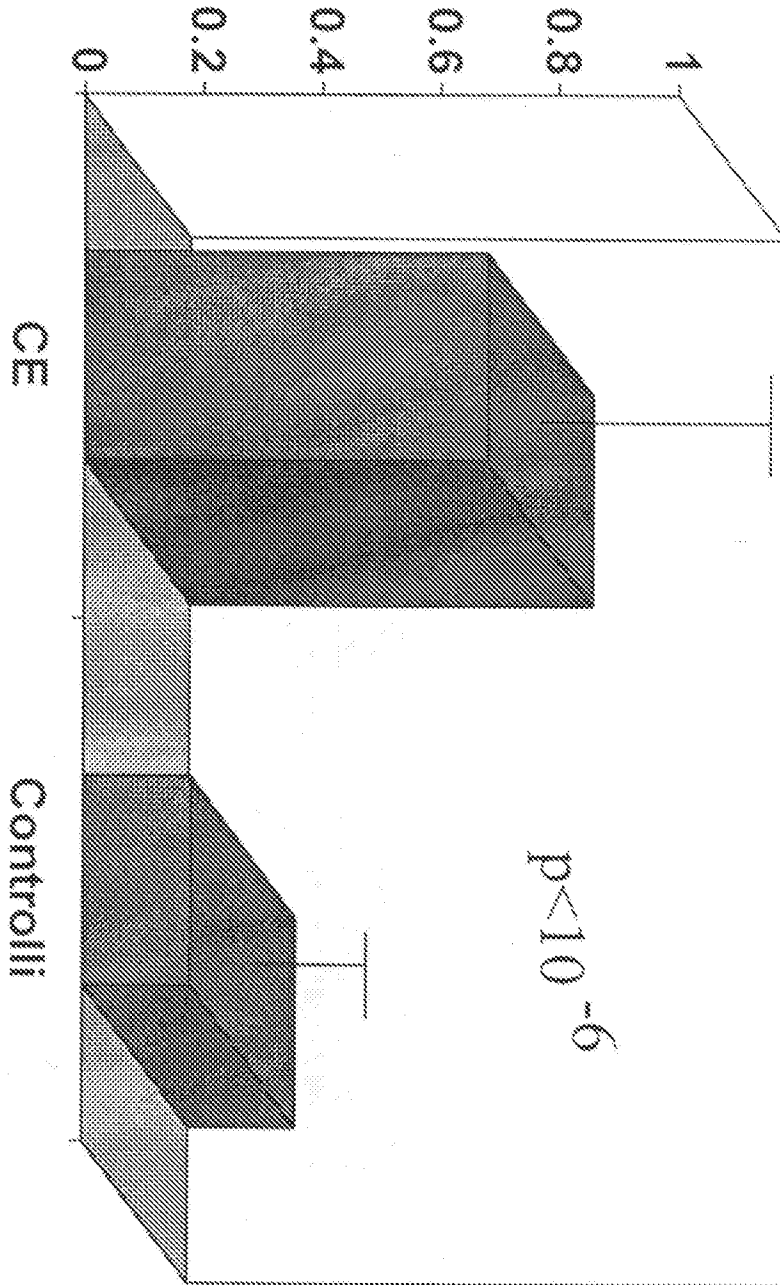
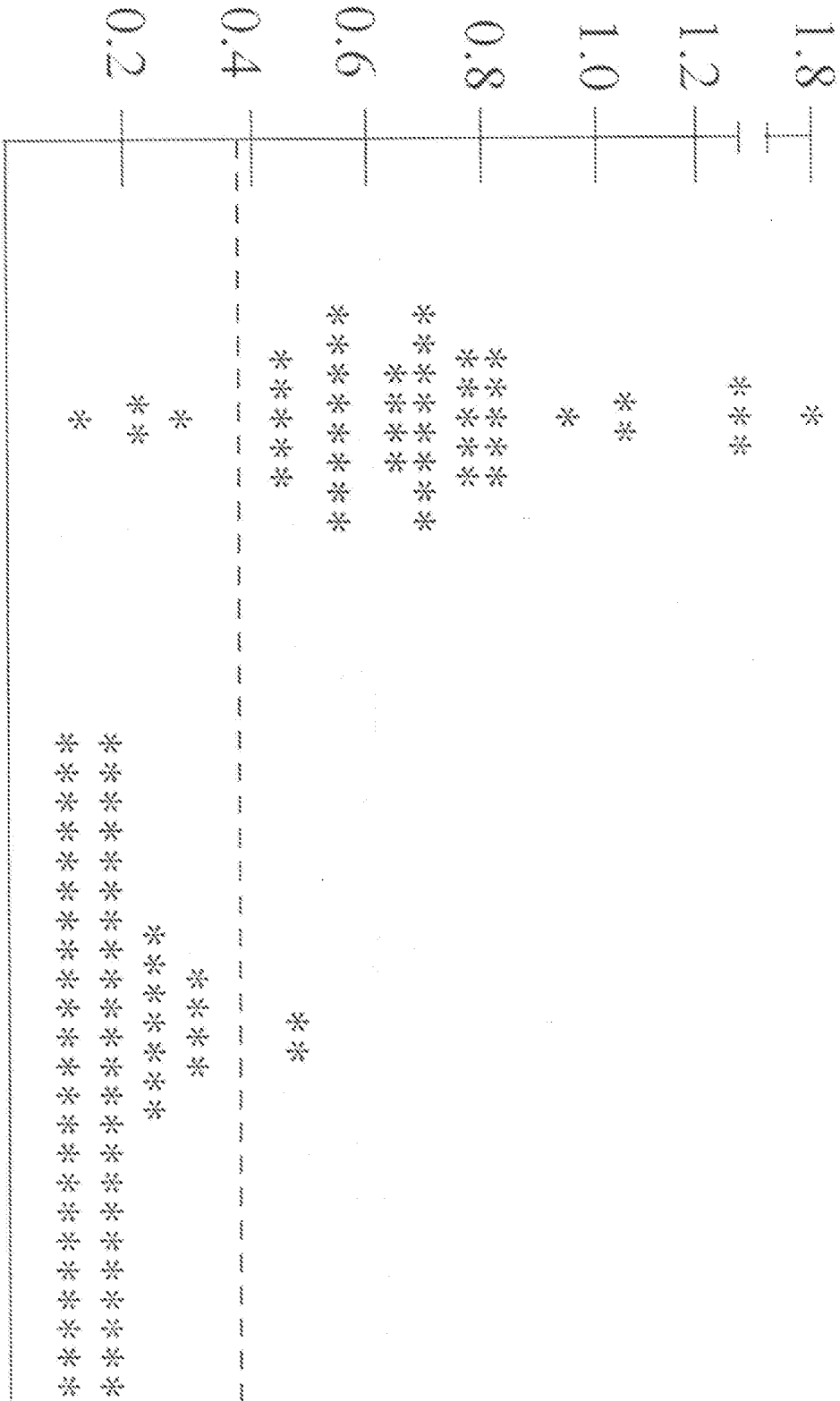


Fig. 1

MI 96 A 2034

Dr. Rinaldo FERRICCIO
N. Iscritt. ALBO 528
(in proprio e per gli altri)

Densita' ottica.



CE

Fig. 2

Controlli

33
29
20
37

