

***Dosaggio di citochine e chemochine  
mediante  
Multiplex bead based assay***

Dott.ssa Letizia Lombardelli

L'avvento dell' ELISA all'inizio degli anni '70 è stata una rivoluzione per l'analisi proteomica. La possibilità di estendere la misurazione di un analita a più analiti è stata sviluppata alla fine degli anni '90 grazie alla tecnologia XMAP®



I test immunologici basati sulla xMAP technology consentono il rilevamento e la quantificazione simultanea di più citochine e chemochine. Questa tecnologia ad alto rendimento produce risultati paragonabili all' **ELISA** ma con maggiore efficienza, sensibilità, velocità e gamma dinamica.

Getting Started with xMAP® Technology

**Luminex**  
complexity simplified.

*Lo strumento*

Software

Corpo dello  
strumento

HTM



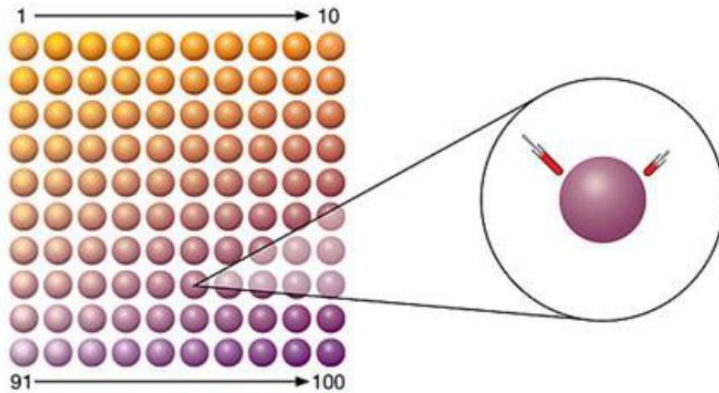
Piattaforma XY

Kit



## Le biglie

Dosaggio basato su microsferi magnetiche di diametro  $5.6\mu\text{m}$  sulla cui superficie è legato un anticorpo specifico per l'analita che vogliamo quantificare



Le microsferi sono coniugate con 2 fluorocromi che, in concentrazioni diverse, possono determinare fino a 100 colorazioni  
Ogni sfera con il suo particolare spettro sarà legata ad un anticorpo specifico per un analita

In linea teorica si può dosare contemporaneamente 100 analiti

Uomo, topo, ratto, coniglio, etc...

# Pannelli

- AFP
- CA-125
- Leptin
- CEA
- MIF
- VEGF-A-A
- TRAIL
- PSA
- Osteopontin
- Antithrobin III
- Vit D binding Protein
- Ferritin
- Galectin 3
- Mpo
- lgfbp-3
- CEA

- Glucagon
- C-Peptide
- Leptin
- Insulin
- GLP-1
- GIP
- PYY
- Ghrelin
- Amylin

- Testosteron
- Estradiol
- Corticosterone
- TSH
- T3
- AqRP

- Apo E
- Amiloydβ40
- Amiloydβ42
- sICAM-1
- sVCAM-1
- PAI-1
- GDNF
- sRAGE
- s100B

- Myostatin
- Oncostatin M
- Osteoprotegerin
- Irisin
- Apelin
- ACTH
- Musclin
- Osteocalcin
- DKK1
- SPARC
- Osteopontin
- SOST

•Pannelli sul cancro  
 •Malattie del metabolismo (diabete, adipochine,  
 Biomarker dell'osso e miochine, ormoni)  
 •Cardiovascolare  
 •Neuroscienze (malattie neurodegenerative,  
 disordini neurologici)  
 •Immunologia (citochine, chemochine,  
 Pannelli Th1, Th2, Th17)  
 •Proteine della fase acuta  
 •Marker di tossicità renale

- Troponin I
- Troponin T
- BNP
- NT-proBNP
- sICAM-1
- Myeloperossidase

- TAU
- Park7
- Park5
- NGFβ
- AGP
- SAP
- GP

- IL-1β
- IL-1Ra
- IL-2
- IL-4
- IL-5
- IL-6
- IL-7
- IL-8
- IL-9
- IL-10
- IL-12
- IL-13
- IL-15
- IL-17
- EOTAXIN
- FGF
- G-CSF
- GM-CSF
- IFN-γ
- IP-10
- MCP-1
- MIP-α
- MIP-1β
- PDGF
- RANTES
- TNF-α
- VEGF

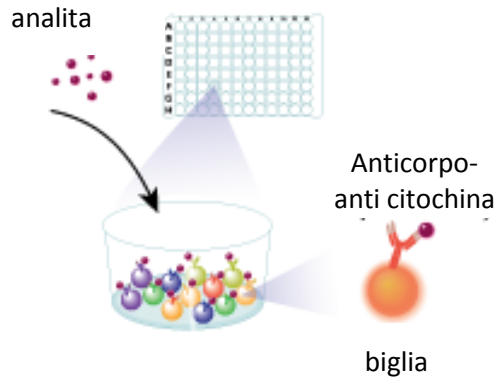
- The 5-plex panel detects:
- Ferritin
  - Fibrinogen
  - Procalcitonin
  - Serum amyloid A
  - Tissue plasminogen activator
- The 4-plex panel detects:
- α-2-macroglobin
  - C-reactive protein (CRP)
  - Haptoglobin
  - Serum amyloid P

- Calbindin
- Clusterin
- GST-π
- IL-18
- KIM-1
- MCP-1
- Albumin
- B2M
- Cystatin C
- NGAL
- Osteopontin
- TFF3

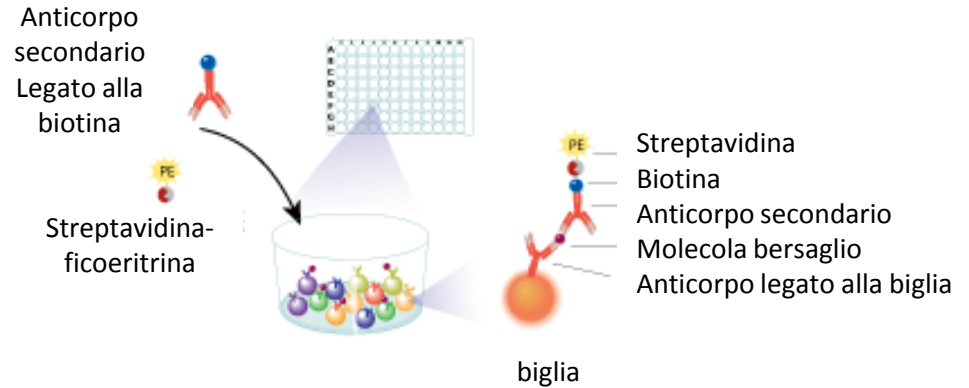
- IL-1β
- IL-4
- IL-6
- IL-10
- IL-17A
- IL-17F
- IL-17A/F (singleplex only)
- IL-21
- IL-22
- IL-23
- IL-25
- IL-31
- IL-33
- IFN-γ
- sCD40L
- TNF-α

## Saggio: procedura

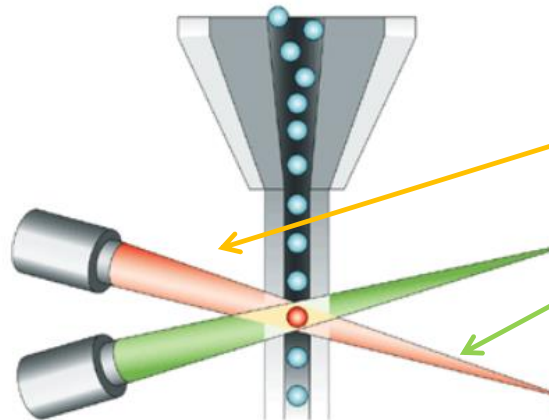
### Fase 1



### Fase 2

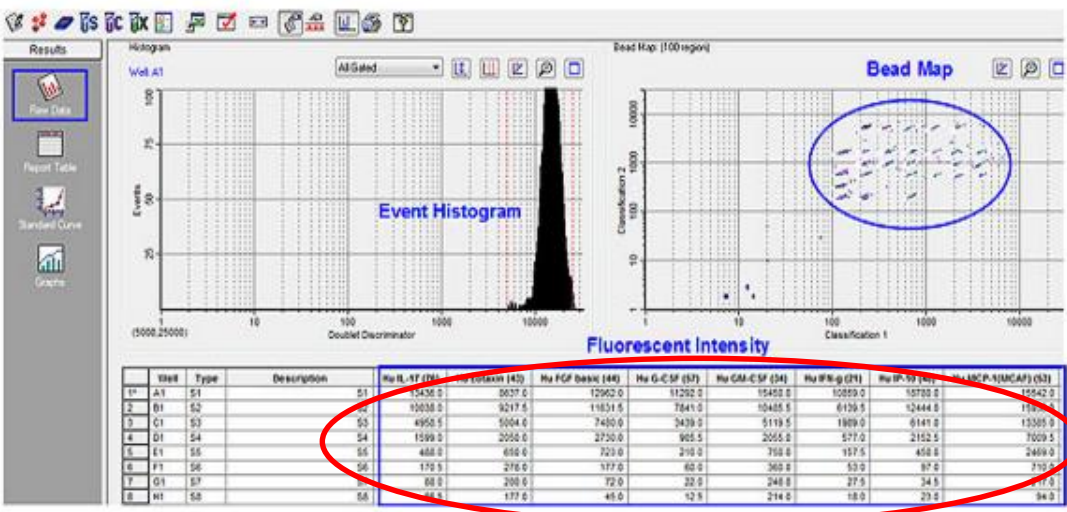


Terminato il saggio, la piastra viene inserita nella piattaforma XY ed è pronta per essere letta  
Le microsfere aspirate da un ago sono portate nella camera di lettura dove vengono fatte passare una ad una



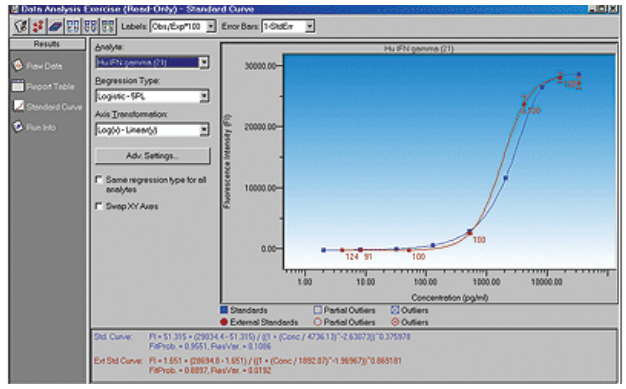
Qui sono colpite da due laser.  
Uno riconosce il colore della microsfere e dunque il **relativo analita**  
Riconosciuto dall'anticorpo ad esso legato  
L'altro **quantifica la forza del segnale**  
Eccitando il fluoroforo legato  
All'anticorpo secondario

# Analisi del dato



Obs Conc	Exp Conc	(Obs/Exp) * 100
25244.19	34015.00	74
9221.96	8503.75	108
2039.84	2125.94	96
550.84	531.48	104
136.04	132.87	102
32.64	33.22	98
7.75	8.30	93
2.29	2.08	110

Recovery percentage

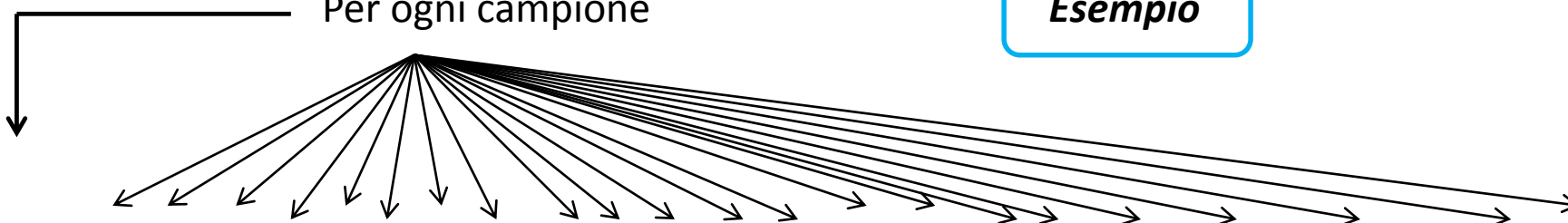


Type	Well	Description	FI	FI - Bkgd	Std Dev	Std Err	%CV	Group	Ratio	
1	C1	C1_D1	HeLa Unstimulated	409.3	409.3	9.55	6.75	2.33	C1	1.00
2	C2	E1_F1	HEK + EGF	724.8	724.8	100.06	70.75	13.81	C1	1.77
3	C3	G1_H1	HEK + UV	635.5	635.5	40.31	28.50	6.34	C1	1.55
4	C4	A2_B2	HeLa + TNF-alpha	4268.0	4268.0	41.01	29.00	0.96	C1	10.43
5	C5	C2_D2	HeLa + IFN-alpha	401.0	401.0	4.24	3.00	1.06	C1	0.98
6	X8	G3_H3	TNFa 0 min	349.3	349.3	20.15	14.25	5.77	X8	1.00
7	X1	E2_F2	TNFa 5min	3338.8	3338.8	39.95	28.25	1.20	X8	9.56
8	X2	G2_H2	TNFa 15 min	355.8	355.8	23.69	16.75	6.68	X8	1.02
9	X3	A3_B3	TNFa 40 min	344.5	344.5	75.66	53.50	21.96	X8	0.99
10	X4	C3_D3	TNFa 60 min	365.5	365.5	12.02	8.50	3.29	X8	1.05
11	X5	E3_F3	TNFa 90 min	537.8	537.8	67.63	47.75	12.56	X8	1.54
12	X12	C5_D5	LPS 0 min	268.5	268.5	47.38	33.50	17.64	X12	1.00
13	X7	A4_A5	LPS 5 min	517.3	517.3	3.18	2.25	0.62	X12	1.93
14	X8	B4_C4	LPS 15 min	1527.3	1527.3	199.45	112.75	10.44	X12	5.69
15	X9	D4_E4	LPS 40 min	3491.3	3491.3	336.35	239.25	9.69	X12	13.00
16	X10	F4_G4	LPS 60 min	3888.3	3888.3	799.38	565.25	20.56	X12	14.48
17	X11	B5_H4	LPS 90 min	2455.3	2455.3	324.21	229.25	13.20	X12	9.14
18	X13	A1_B1	Blank	113.3	113.3	5.30	3.75	4.68		

Quantitative cytokine assay report (above) and qualitative phosphoprotein assay report (below).

Per ogni campione

Esempio



	IL1B	IL1RA	IL2	IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IL9	IL10	IL13	IL15	IL17	EOTAXIN	FGF	GCSF	IFNG	IP10	MCP1	MIP1A	MIP1B	PDGFB	RANTES	TNFA	VEGF
campione 1	0,83	50,37	14,53	1,43	11,12	0,71	10,9	152,58	53,12	12,22	2,64	138,56	1,22	5,42	98,18	169,97	0	11,86	9,24	4	21,58	0	347,76	21,86	196,33
campione 2	0,2	20,31	0	0	0,51	0,63	0	49,58	0	0,61	0	0	0	0	0	4,77	0	0	11,85	5,94	0	0	4,28	5,16	0
campione 3	0,83	16,23	0	0	1,73	0	0	71,37	5,57	0,95	0	0	0	0,03	0	4,77	0	0	0	0,68	6,1	0	123,77	5,16	0
campione 4	1,95	28,18	0,84	0,15	1,73	0,11	0	135,16	19,16	0,84	0	0	0	0,5	0	0	0	2,35	3,96	0,49	21,35	1,33	503,63	11,28	70,58
campione 5	0,2	28,18	0	0	0,51	0,55	0	42,67	0	0,61	0	0	0	0	0	11,03	0	0	7,94	4,58	0	0	1,62	3,3	0
campione 6	0,48	20,31	0	0	0,51	0	0	55,14	2,55	0,61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,49	2,95	0	86,43	1,3	61,3
campione 7	3,96	20,31	0,34	0,15	3,42	0	0	291,2	24,17	0,84	0	46,18	0	0,47	20,5	15,31	0	7,24	9,24	0,73	25,58	13,35	860,26	20,28	141,94
campione 8	0,11	12,01	0	0	0	0	0	0	0,38	0	0	0	0	0	0	0,73	0	0	0	0	0	0	*0,37	0	41,01
campione 9	0,2	20,31	796,9	0	1,73	0,11	0	325,91	16,04	1,06	1,58	0	0	0,33	0	45,36	0	0	23,58	13,02	20,63	0	518,08	47,55	149,06
campione 10	0,25	28,18	380,37	0	2,87	0,38	0	255,4	14,18	1,06	0,18	0	0	0,29	20,5	25,25	0	0	24,63	11,29	18,23	0	534,84	31,16	15,81
campione 11	0,79	28,18	11,25	0	2,87	0,11	0	231,34	24,17	1,06	0,51	38,88	0	0,43	0	27,7	0	0	4,24	6,8	21,86	0	699	17,07	193,08
campione 12	1,78	28,18	17,77	0,15	4,5	0,11	0	391,71	24,17	0,84	1,15	69,83	0	0,64	20,5	34,97	0	2,35	20,48	7,48	27,45	7,22	1370,67	23,44	228,01
campione 13	0,66	50,37	23,75	1,21	9,63	0,63	10,9	101,73	50,87	11	3,25	113,57	1,74	5,21	98,18	162,83	0	8,94	4,79	7,43	26,81	0	677,95	26,55	196,33
campione 14	0,16	28,18	398,22	0	2,31	0	0	42,67	9,85	0,38	0	0	0	0	0	6,61	0	0	0	1,24	10,92	0	264,57	23,44	125,47
campione 15	0,2	20,31	166,94	0	1,14	0,11	0	96,61	11,7	0,13	0	0	0	0,13	0	12,75	0	0	16,88	6,58	13,3	0	295,23	17,07	0
campione 16	0,83	28,18	2,71	0	1,44	0,11	0	108,35	19,78	0,38	0	0	0	0,29	0	7,51	0	2,35	1,62	1,39	18,23	0	456,69	15,44	56,48
campione 17	1,7	20,31	4,04	0,15	3,42	0	0	154,86	25,11	0,61	0	58,82	0	0,5	0	13,61	0	5,22	4,66	0,99	22,91	10,81	1045,29	13,79	240,32
campione 18	0,39	43,15	5,14	1,33	9,13	0,63	8,57	53,75	38,08	10,79	2,32	97,63	0,96	5,07	89,61	131,2	0	8,94	0	1,07	14,99	0	299,22	13,79	169,82
campione 19	0,11	12,01	197,19	0	1,14	0	0	29,1	9,85	0,84	0	0	0	0,13	0	13,61	0	0	0	1,95	11,6	0	272,37	18,68	166,42
campione 20	0,39	28,18	680,29	0,15	2,31	0,38	0	62,16	15,42	0,61	0	0	0	0,43	20,5	11,9	0	0	7,72	6,22	16,22	0	366,04	40,19	0
campione 30	0,11	20,31	307,12	0	2,31	0,11	0	76,37	8,01	0,49	0	0	0	0,13	0	11,9	0	0	6,2	4,75	10,52	0	350,6	20,28	38,24
campione 31	0,75	20,31	25,33	0,15	1,14	0	0	126,16	21,03	0,61	0	0	0	0,43	20,5	16,99	0	2,35	2,72	2,38	21,27	0	567,18	13,79	58,91
campione 32	1,87	12,01	10,84	0,15	2,31	0	0	248,15	23,23	0,61	0	42,64	0	0,5	20,5	23,62	0	5,22	11,46	3,03	23,64	6,2	876,8	17,07	166,42



## **Vantaggi (1)**

- Possibilità di **analisi contemporanea** di numerosi ligandi (fino a 100)
- Grande **flessibilità** che consente al ricercatore di crearsi il proprio apposito pannello in base alla propria ricerca
- Flusso velocissimo (20.000 microsfere al secondo) che porta il vantaggio di rendere brevi i **tempi di analisi**
- **Piccolo volume** di campione necessario per l'analisi (in genere 50µl)
- **Ampi intervalli** quantitativi di analisi
- Permette lo studio di molecole presenti **in molte tipologie diverse di fluidi biologici** dai surnatanti di colture cellulari, al plasma, il siero , il fluido follicolare, la saliva, il liquido sinoviale, le lacrime etc...

## Vantaggi (2)

- Il test viene effettuato in genere in una giornata, e il software restituisce il dato in pg/ml
- Ogni kit ha una piastra da 96 in cui si possono generalmente
- Maggior **sensibilità** rispetto all'ELISA →
- Costi **inferiori** per analizzare numerosi analiti

Journal of Reproductive Immunology

Performance evaluation of microbead and ELISA assays for follicular G-CSF: a non-invasive biomarker of oocyte developmental competence for embryo implantation\*

Nathalie Lédée <sup>a,b,\*</sup>, Carine Munaut <sup>b</sup>, Valérie Sérazin <sup>c</sup>, Sophie Perrier d'Hauterive <sup>b</sup>, Letizia Lombardelli <sup>d</sup>, Federica Logiodice <sup>d</sup>, Robert Wainer <sup>c</sup>, Virginie Gridalet <sup>b</sup>, Gérard Chaouat <sup>a</sup>, Francis Frankenne <sup>b</sup>, Jean Michel Foidart <sup>b</sup>, Marie-Pierre Piccinni <sup>d</sup>

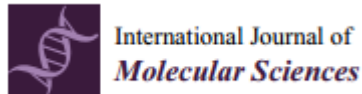
## Applicazioni del nostro laboratorio

- Dosaggio di molecole presenti nel surnatante di coltura



### **Medroxyprogesterone Acetate Decreases Th1, Th17, and Increases Th22 Responses via AHR Signaling Which Could Affect Susceptibility to Infections and Inflammatory Disease**

*Marie-Pierre Piccinni<sup>1\*</sup>, Letizia Lombardelli<sup>1</sup>, Federica Logiodice<sup>1</sup>, Ornella Kullolli<sup>1</sup>, Enrico Maggi<sup>1,2</sup> and Marylynn S. Barkley<sup>3</sup>*



### **Decidual Interleukin-22-Producing CD4+ T Cells (Th17/Th0/IL-22+ and Th17/Th2/IL-22+, Th2/IL-22+, Th0/IL-22+), Which Also Produce IL-4, Are Involved in the Success of Pregnancy**

*Federica Logiodice<sup>1</sup>, Letizia Lombardelli<sup>1</sup>, Ornella Kullolli<sup>1</sup>, Herman Haller<sup>2</sup>, Enrico Maggi<sup>1,3</sup>, Daniel Rukavina<sup>4</sup> and Marie-Pierre Piccinni<sup>1,\*</sup>*

Clinical and Molecular Allergy

### **Interleukin-17-producing decidual CD4+ T cells are not deleterious for human pregnancy when they also produce interleukin-4**



*Letizia Lombardelli<sup>1</sup>, Federica Logiodice<sup>1</sup>, Maryse Aguerre-Girr<sup>2</sup>, Ornella Kullolli<sup>1</sup>, Herman Haller<sup>5</sup>, Ysabel Casart<sup>2</sup>, Alain Berrebi<sup>3</sup>, Fatima-Ezzahra L'Faqihi-Olive<sup>2</sup>, Valérie Duplan<sup>2</sup>, Sergio Romagnani<sup>1</sup>, Enrico Maggi<sup>1</sup>, Daniel Rukavina<sup>4</sup>, Philippe Le Bouteiller<sup>2</sup> and Marie-Pierre Piccinni<sup>1\*</sup>*

- Dosaggio di molecole presenti nei fluidi follicolari

Fertility and Sterility®

## **Levels of follicular G-CSF and interleukin-15 appear as noninvasive biomarkers of subsequent successful birth in modified natural in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection cycles**

*Nathalie Lédée, M.D., Ph.D.,<sup>a,c</sup> René Frydman, M.D.,<sup>a,b</sup> Agnès Osipova, M.D.,<sup>b</sup> Joelle Taieb, M.D.,<sup>a,b</sup> Vanessa Gallot, M.D.,<sup>b</sup> Letizia Lombardelli, Ph.D.,<sup>c</sup> Federica Logiodice, Ph.D.,<sup>c</sup> Marie Petitbarat, M.Sc.,<sup>a</sup> Renato Fanchin, M.D.,<sup>a,b</sup> Gérard Chaouat, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup> Nelly Achour-Frydman, M.D.,<sup>a,d</sup> and Marie Pierre Piccinni, Ph.D.<sup>c</sup>*

- Dosaggio di molecole presenti nel siero e nello sputum di pazienti con BPCO



EUROPEAN RESPIRATORY *journal*

FLAGSHIP SCIENTIFIC JOURNAL OF ERS

## **Effect of pulmonary rehabilitation (PR) on inflammation status in patients with COPD**

Francesco Gigliotti, Claudia Coli, Letizia Lombardelli, Isabella Romagnoli, Federica Logiodice, Barbara Lanini, Ornella Kullooli, Barbara Binazzi, Paola Parronchi, Enrico Maggi, Marie-Pierre Piccinni  
European Respiratory Journal 2015 46: PA2210; DOI: 10.1183/13993003.congress-2015.PA2210

- Dosaggio di molecole presenti nei sieri e nel plasma
- Dosaggio di molecole presenti nel liquido sinoviale
- Dosaggio di molecole presenti nell'urina

## ***Riferimenti:***

- Prof.ssa Marie-Pierre Piccinni  
Immunologia piano terzo CUBO  
Telefono: 055/2758338  
e-mail: [mppiccinni@hotmail.com](mailto:mppiccinni@hotmail.com)

- Dott.ssa Letizia Lombardelli  
Immunologia piano terzo CUBO  
Telefono: 055/2758338  
e-mail: [letizia.lombardelli@unifi.it](mailto:letizia.lombardelli@unifi.it)