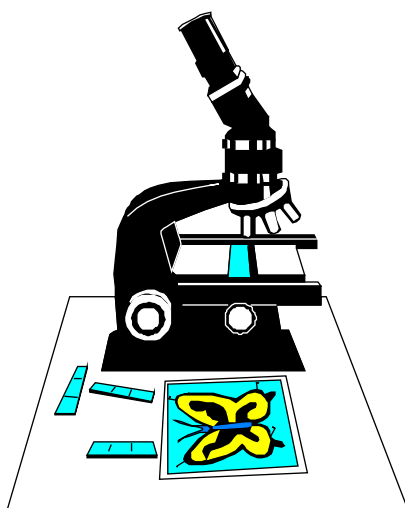


ΚΕΦΑΛΑΙΟ 19ο : ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- 👁 Εργαστηριακός έλεγχος δειγμάτων
- 👁 Έλεγχος για αντισώματα
- 👁 Έλεγχος V.D.R.L.
- 👁 Προσδιορισμός ομάδων αίματος
- 👁 Σήμανση του πλαστικού ασκού
- 👁 Ανακεφαλαίωση
- 👁 Ερωτήσεις



19. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

19.1 Εργαστηριακός έλεγχος δειγμάτων

Όπως έχει προαναφερθεί, από κάθε αιμοδότη, εκτός από τον ασκό με το αίμα που προορίζεται για μετάγγιση, λαμβάνονται και δείγματα αίματος για να γίνουν ορισμένες εξετάσεις. Σύμφωνα με τη νομοθεσία της αιμοδοσίας, το αίμα του κάθε ασκού πρέπει να ελέγχεται για :

- Ηπατίτιδα Β
- Ηπατίτιδα C
- Σύφιλη
- Aids

Πρέπει επίσης να προσδιορίζεται η ομάδα αίματος, κατά το σύστημα ABO, και ο παράγοντας Rhesus.

Τα δείγματα αίματος, που προορίζονται για εξέταση, πρέπει να είναι σωστά σημασμένα, με τον ίδιο αριθμό μητρώου που έχει και ο ασκός.

Μετά από κάθε εξέταση, αναγράφεται το αποτέλεσμα σε ετικέτα και επικολλάται στον ασκό έτσι, ώστε να γνωρίζει το προσωπικό της αιμοδοσίας τα στοιχεία του κάθε ασκού (π.χ. ομάδα αίματος, Rh κ.λπ.).

Η χρήση του αίματος κάθε ασκού επιτρέπεται μόνο, αν ο εργαστηριακός έλεγχος είναι αρνητικός για τα νοσήματα που προαναφέραμε. Σε αντίθετη περίπτωση, ο ασκός πρέπει να καταστρέφεται και να ενημερώνεται ο αιμοδότης για τα αποτελέσματα.

19.2 Έλεγχος για αντισώματα

• Ηπατίτιδα Β

Ο έλεγχος του αίματος για τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) γίνεται με μεθόδους και αντιδραστήρια μεγάλης ευαισθησίας και ειδικότητας. Σκοπός είναι η ανίχνευση του **αντιγόνου επιφανείας** του ιού (HbsAg) ή αλλιώς του Αυστραλιανού αντιγόνου.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι :

- Η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA ή EIA.
- Η ραδιοανοσολογική μέθοδος RIA.

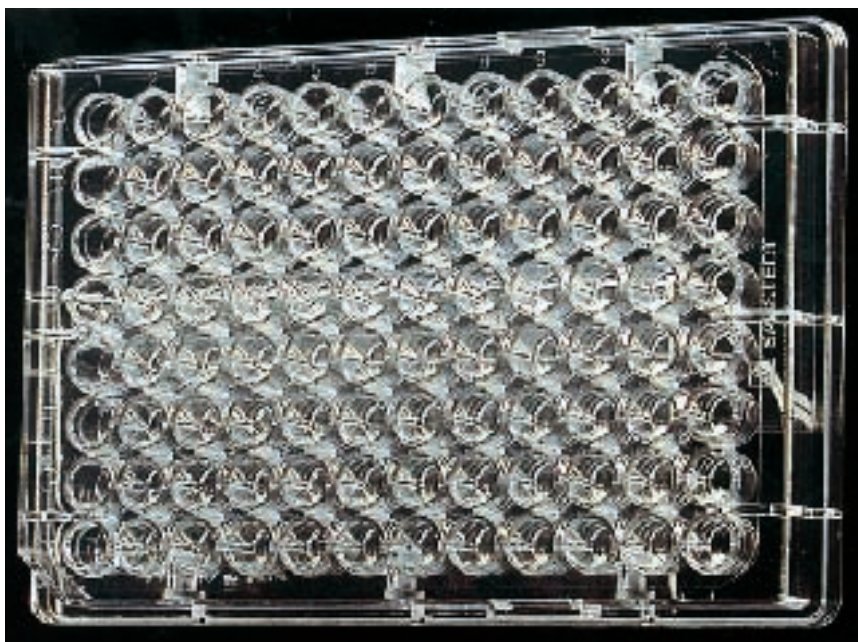
Θα γίνει περιγραφή μόνο της μεθόδου ELISA, αφού η RIA γίνεται σε ορισμένα μόνο εργαστήρια λόγω των ραδιενεργών υλικών που χρησιμοποιούνται.

• ELISA

Υλικά-αντιδραστήρια

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται υπάρχουν στο εμπόριο και περιλαμβάνουν τις ακριβείς οδηγίες για τη χρησιμοποίησή τους. Αυτά είναι :

- Πλάκες μικροτιτλισμού (Εικ. 19.1), στον πυθμένα των οποίων έχει επιστρωθεί anti-Hbs.
- Buffer αραιώσης του ορού (diluent buffer).
- Διάλυμα πλυσίματος (washing solution).
- Αντι-αντίσωμα (conjugate) συνδεδεμένο με ένζυμο.
- Χρωμογόνο OPD (ορθοφαινυλοδιαμίδα).
- Ειδικό αντιδραστήριο για να σταματήσει η αντίδραση (stopping solution).



Εικόνα 19.1
Πλάκα μικροτιτλισμού

Μέθοδος

- Αραιώνουμε τον ορό, που πρόκειται να εξετάσουμε, με το ειδικό buffer αραιώσης
- Τοποθετούμε μια συγκεκριμένη ποσότητα, ανάλογα με τις οδηγίες, σε κάθε θέση της πλάκας μικροτιτλισμού
- Επωάζουμε για ορισμένο χρόνο και θερμοκρασία, σύμφωνα με τις οδηγίες, συνήθως για 1 ώρα στους 37°C. Σ' αυτό το χρόνο γίνεται η σύνδεση του anti-HBs με το HBsAg, αν υπάρχει στον ορό.
- Ξεπλένουμε την πλάκα με το διάλυμα πλυσίματος και στραγγίζουμε τα υπολείμματα του υγρού χωρίς όμως να το αφήσουμε να στεγνώσει εντελώς. Η σύνδεση του αντιγόνου με το αντίσωμα, που έχει ήδη γίνει, είναι τόσο ισχυρή, που δεν χαλάει με το πλύσιμο.

- Προσθέτουμε το αντι-αντίσωμα (conjugate).
 - Επωάζουμε στην ίδια θερμοκρασία με πριν για ορισμένο χρόνο, ώστε να συνδεθεί το αντι-αντίσωμα με το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος.
 - Επαναλαμβάνουμε το πλύσιμο.
 - Προσθέτουμε το ειδικό χρωμογόνο OPD.
 - Επωάζουμε σύμφωνα με τις οδηγίες. Στο χρόνο αυτό διασπάται το χρωμογόνο από το αντι-αντίσωμα και παράγεται χρώμα.
 - Προσθέτουμε το ειδικό αντιδραστήριο για να σταματήσουμε την αντίδραση (stopping solution).
 - Μετράμε σε ειδικό φωτόμετρο την απορρόφηση του φωτός.
- Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, γίνεται επιβεβαίωση με πιο εξειδικευμένη μέθοδο, όπως η Western Blot.

• Ηπατίτιδα C

Ο έλεγχος του αίματος για τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) γίνεται καταρχήν με τη μέθοδο **ELISA**, με την οποία ανιχνεύονται **αντισώματα** έναντι του ιού HCV. Αν το αποτέλεσμα είναι θετικό, τότε επαναλαμβάνεται η εξέταση λαμβάνοντας αίμα από τον τμηματοποιημένο σωληνίσκο του ασκού. Η επιβεβαίωση του θετικού αποτελέσματος γίνεται με το **επιβεβαιωτικό test RIBA**.

• Έλεγχος για τον ιό HIV

Ο έλεγχος των δειγμάτων για τον ιό της ανοσολογικής ανεπάρκειας του ανθρώπου μπορεί να γίνει με διάφορες τεχνικές. Αρχικά, ο έλεγχος γίνεται με τη μέθοδο **ELISA**, προκειμένου να ανιχνευθούν **αντισώματα** έναντι του ιού HIV. Αν το αποτέλεσμα είναι θετικό, επαναλαμβάνεται η εξέταση λαμβάνοντας νέο αίμα από το σωλήνα του ασκού. Αν και στο δεύτερο δείγμα είναι θετικό το αποτέλεσμα, τότε πρέπει να γίνει επαλήθευση με μια άλλη μέθοδο, που λέγεται **ανοσοαποτύπωμα Western Blot (WB)**. Με αυτή τη μέθοδο ανιχνεύονται συγκεκριμένες πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες του ιού.

Η τεχνική Western Blot γίνεται σε Ειδικά Κέντρα Αναφοράς για το Aids.

19.3 Έλεγχος V.D.R.L.

Η σύφιλη οφείλεται στο **τρεπόννημα της σπειροχαΐτης**, το οποίο δεν επιβιώνει περισσότερο από 72 ώρες στους 4°C. Έτσι, από αίμα το οποίο συντηρείται στο ψυγείο, δεν μπορεί να μεταδοθεί η σύφιλη. Αντιθέτως, μπορεί να μεταδοθεί με τα προϊόντα του αίματος, που συντηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου, όπως π.χ. τα συμπυκνωμένα αιμοπετάλια, που μεταγγίζονται αμέσως μετά την αιμοληψία. Ο έλεγχος για σύφιλη βέβαια είναι υποχρεωτικός για όλους τους αιμοδότες και γίνεται κυρίως με την τεχνική **V.D.R.L.** Με αυτή τη μέθοδο γίνεται ανίχνευση **αντισωμάτων** για τη σύφιλη. Αν το αποτέλεσμα είναι θετικό, ενημερώνεται ο αιμοδότης και του συστήνεται να απευθυνθεί σε εξειδικευμένο κέντρο για έναν πιο πλήρη έλεγχο.

19.4 Προσδιορισμός των ομάδων αίματος

• Σύστημα ABO

Ο καθορισμός των ομάδων αίματος, κατά το σύστημα ABO, στηρίζεται στο αξίωμα ότι στο πλάσμα του αίματος υπάρχουν συγκολλητίνες (αντισώματα), μόνο αν λείπουν τα αντίστοιχα συγκολλητινογόνα (αντιγόνα) από το τοίχωμα των ερυθροκυττάρων.

Ο εργαστηριακός έλεγχος μπορεί να γίνει άμεσα ή έμμεσα:

Στην πρώτη περίπτωση, γίνεται αναζήτηση του συγκολλητινογόνου των ερυθρών αιμοσφαιρίων (έλεγχος ερυθρών), χρησιμοποιώντας τους γνωστούς ορούς anti-A, anti-B, anti-AB (οροί test).

Στη δεύτερη περίπτωση, γίνεται αναζήτηση της συγκολλητίνης του ορού (έλεγχος ορού), χρησιμοποιώντας γνωστά ερυθρά αιμοσφαίρια ομάδας A, B και AB.

Οι δύο παραπάνω δοκιμασίες μπορούν να γίνουν τόσο σε αντικειμενοφόρο πλάκα, όσο και σε σωληνάριο.

• Καθορισμός αντιγόνων

Υλικά

Τα απαιτούμενα υλικά για τον καθορισμό αντιγόνων (έλεγχος ερυθρών αιμοσφαιρίων) είναι:

- Αντικειμενοφόρες πλάκες.
- Αίμα με αντιπηκτικό. Μετά την αποχώρηση του ορού, παίρνουμε ερυθρά πλυμένα και κάνουμε εναιώρημα 5-10% σε ισότονο διάλυμα NaCl.
- Φυσιολογικός ορός, δηλαδή ισότονο διάλυμα NaCl 0,9gr% ή 9gr‰. Χρησιμοποιείται για την πλύση των ερυθρών και ως μέσο εναιώρησής τους.
- Τρεις ισχυροί οροί tests :
 - αντι-A,
 - αντι-B
 - αντι-AB
- Προσοχή, πρέπει να ελέγχουμε τη δραστικότητα των αντιορών με κύτταρα γνωστής ταυτότητας (εναιώρημα ερυθρών A και B ομάδας).
- Διαφανοσκόπιο. Είναι ειδική φωτιζόμενη πλάκα, που θερμαίνεται γύρω στους 40-45°C.

Δοκιμασία σε πλάκα

Τεχνική

- Στην καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα, τοποθετούμε τρεις σταγόνες εναιωρήματος ερυθρών για εξέταση χωριστά
- Δίπλα σε καθεμία από αυτές, τοποθετούμε αντίστοιχα τρεις σταγόνες ορού anti-A, anti-B, anti-AB

- Αναμιγνύουμε καλά καθεμία σταγόνα ελαιώδους ερυθρών με την αντίστοιχη σταγόνα του αντιορού. Η ανάμιξη γίνεται με το άκρο μιας οδοντογλυφίδας, ξεχωριστής για κάθε αντιορό (Εικ. 19.2).

Για την επισκόπηση του αποτελέσματος η πλάκα τοποθετείται στο διαφανοσκόπιο, όπου ανακινείται ήπια συνεχώς, για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο των 2 λεπτών. Η ανάγνωση του αποτελέσματος γίνεται μακροσκοπικά-μικροσκοπικά και συνίσταται στην παρουσία ή όχι συγκόλλησης (κροκίδες). Ορατή συγκόλληση σημαίνει ότι το αίμα είναι θετικό για τον αντιορό που προσθέσαμε ενώ, αντίθετα, η μη συγκόλληση σημαίνει ότι το αίμα είναι αρνητικό για τον παραπάνω αντιορό.

Έτσι τα άτομα στο σύστημα ABO, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των αντιγόνων A και B στα ερυθροκύτταρά τους, χωρίζονται σε άτομα A, B, AB και O ομάδας.

• Καθορισμός αντισωμάτων

Υλικά

Τα απαιτούμενα υλικά για τον καθορισμό αντισωμάτων (έλεγχος ορού, ανάστροφη μέθοδος) είναι :

- Αντικειμενοφόρες πλάκες.
- Ορός για εξέταση.
- Ερυθρά tests, δηλαδή ερυθρά των ομάδων A και B.
- Διαφανοσκόπιο.



Εικόνα 19.2

Ομάδα αίματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα με τη χρήση αντιορών

Τεχνική

Στην καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούμε :

-Δύο χωριστές σταγόνες του ορού, που θέλουμε να εξετάσουμε.

-Δίπλα στην κάθε μια από αυτές, από μια σταγόνα ελαιωρήματος ερυθρών Α και Β αντίστοιχα.

-Αναμιγνύουμε καλά, με ξεχωριστή οδοντογλυφίδα, κάθε σταγόνα ορού με την αντίστοιχη σταγόνα ερυθρών.

-Ανάγνωση του αποτελέσματος.

Σε αυτή τη μέθοδο, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι ανιχνεύουμε αντισώματα και όχι ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. Συνεπώς, το αποτέλεσμα είναι ανάστροφο. Αν, για παράδειγμα, παρατηρηθεί συγκόλληση σε γνωστά ερυθρά ομάδα Α, τότε ο ορός προέρχεται από άτομο ομάδας Β.

Τέλος, πρέπει να γνωρίζουμε ότι, σε περιπτώσεις δυσκολιών στον καθορισμό της ομάδας Α, προχωρούμε στον προσδιορισμό υποομάδων αίματος συστήματος ABO, για την κατάταξη της ομάδας Α και ΑΒ στους τύπους A_1 , A_1B και A_2 , A_2B . Η τεχνική της δοκιμασίας είναι η ίδια με τον καθορισμό των ομάδων αίματος του συστήματος ABO και γίνεται με τη βοήθεια ειδικού αντιορού, του αντι- A_1 . Με τη χρήση της, γίνεται ο διαχωρισμός των ερυθρών σε A_1 και A_2 .

Παράγοντας RHESUS

Ο έλεγχος για τον καθορισμό του παράγοντα Rhesus γίνεται μόνο στα ερυθρά αιμοσφαίρια (έλεγχος αντιγόνων) και όχι στον ορό, γιατί το σύστημα αυτό, αντίθετα προς το σύστημα ABO, στερείται φυσικών αντισωμάτων.

Ο καθορισμός του συστήματος Rhesus περιλαμβάνει :

Τον καθορισμό του παράγοντα D των ερυθρών αιμοσφαιρίων (αντιγόνο) με τη χρήση ισχυρού συγκολλητικού ορού αντι-D.

Τον καθορισμό των παραγόντων C και E των ερυθρών αιμοσφαιρίων με τη χρήση συγκολλητικού ορού αντι-C ή αντι-CD και αντι-E ή αντι-DE για τον έλεγχο κάθε αίματος αρνητικού με τον αντι-D ορό.

Την ανίχνευση του αντιγόνου D^u (ποικιλία του αντιγόνου D).

Τα άτομα χωρίζονται σε Rhesus θετικά και Rhesus αρνητικά, ανάλογα με την παρουσία ή μη του αντιγόνου D. Επομένως και ο χαρακτηρισμός ενός ατόμου ως D-θετικό ή D-αρνητικό άτομο αντιστοιχεί στο Rhesus-θετικό ή Rhesus-αρνητικό άτομο. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει ακόμη να δίνεται στην ανίχνευση του αντιγόνου D^u . Για παράδειγμα, σε περίπτωση μεταγγίσεως μονάδας αίματος D^u θετικό σε άτομο ομάδας αίματος Rhesus αρνητικό, τότε αυτό κινδυνεύει να ευαισθητοποιηθεί και να παρουσιάσει σοβαρές αντιδράσεις σε μια επόμενη μετάγγιση αίματος με D^u θετικό.

Η δοκιμασία για τον καθορισμό του παράγοντα Rhesus (έλεγχος αντιγόνου D) μπορεί να γίνει τόσο σε αντικειμενοφόρο πλάκα, όσο και σε σωληνάριο. Τα απαιτούμενα υλικά είναι:

- Αντικειμενοφόρες πλάκες.
- Αίμα με αντιπηκτικό. Μετά το διαχωρισμό του ορού πλένουμε τα ερυθρά και παρασκευάζουμε εναιώρημα σε NaCl 5-10%.
- Φυσιολογικός ορός.
- Ορός αντι-D αμιγής.
- Διαφανοσκόπιο.
- Θερμοκρασία 37°C.

Δοκιμασία σε πλάκα

Τεχνική

Στην καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούμε:

- Μία σταγόνα εναιωρήματος ερυθρών.
- Δίπλα ακριβώς τοποθετούμε μια σταγόνα αντι-D ορού.
- Αναμιγνύουμε καλά τις σταγόνες με το άκρο μιας οδοντογλυφίδας
- Τοποθετούμε την πλάκα στο διαφανοσκόπιο, όπου ανακινείται ήπια για 1-3 λεπτά και παρατηρούμε.

-Τέλος, ελέγχουμε για την ύπαρξη ή μη ορατής συγκόλλησης. Ορατή συγκόλληση σημαίνει αίμα D θετικό (ή Rhesus θετικό). Η μη ορατή συγκόλληση σημαίνει αίμα D αρνητικό (ή Rhesus αρνητικό). Πρέπει όμως να καθορίσουμε και τους παράγοντες C και E με τους αντίστοιχους αντιορούς. Η τεχνική είναι η ίδια με το αντιγόνο D και το αποτέλεσμα διαβάζεται ως συγκόλληση ή όχι. Η μη συγκόλληση σημαίνει απουσία των αντιγόνων (C και E), οπότε προχωρούμε στην ανίχνευση του αντιγόνου D^u. Αν και το D^u είναι αρνητικό, λέμε ότι το αίμα που εξετάζουμε είναι Rhesus αρνητικό. Σε περίπτωση απουσίας των αντιγόνων D, D^u, C και E, η μονάδα αίματος χαρακτηρίζεται ως Rhesus null.

19.5 Σήμανση του πλαστικού ασκού

Η σήμανση του πλαστικού ασκού, μετά το τέλος του εργαστηριακού ελέγχου, περιλαμβάνει την επικόλληση ετικετών, στις οποίες αναγράφονται :

- ⇒ Η ομάδα αίματος.
- ⇒ Το Rhesus.
- ⇒ Το αρνητικό αποτέλεσμα για :
 - ηπατίτιδα B και C
 - σύφιλη
 - Aids
- ⇒ Τη σημείωση της ημερομηνίας λήξης του αίματος με
- Το περιεχόμενο αντιπηκτικό.

Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, διότι τυχόν λάθος μπορεί να αποβεί μοιραίο για τον μεταγγιζόμενο.

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Ο εργαστηριακός έλεγχος των δειγμάτων στην αιμοδοσία εξασφαλίζει τον δέκτη από πιθανά νοσήματα και ασύμβατες μεταγγίσεις.

Πληροφορεί ακόμη και τον δότη για πιθανές παθολογικές καταστάσεις, για τις οποίες μέχρι εκείνη τη στιγμή δεν γνώριζε.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

ΤΟ ΑΙΜΑ ΚΑΘΕ ΑΣΚΟΥ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΕΛΕΓΧΕΤΑΙ ΓΙΑ:

- ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β
- ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ C
- ΣΥΦΙΛΗ
- AIDS

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΜΑΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ABO



ΟΜΑΔΑ ΑΙΜΑΤΟΣ	A	B	AB	0
ΕΡΥΘΡΑ	AgA	AgB	AgAAgB	—
ΠΛΑΣΜΑ	AbB	AbA	—	AbAAbB

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Ποιες εξετάσεις περιλαμβάνει ο εργαστηριακός έλεγχος των δειγμάτων.
2. Τι γνωρίζετε για τον έλεγχο έναντι της ηπατίτιδας B.
3. Τι γνωρίζετε για τον έλεγχο έναντι της ηπατίτιδας C.
4. Τι γνωρίζετε για τον έλεγχο έναντι του HIV.
5. Προσδιορισμός ομάδων αίματος με το σύστημα ABO.
6. Προσδιορισμός του παράγοντα Rhesus.
7. Έμμεση τεχνική για τον προσδιορισμό της ομάδος αίματος.