

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ
ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΤΟΝΟΥ - ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ IN VITRO

10.1 Γενικά

Η τεράστια εξέλιξη της επιστήμης της Ανοσολογίας κατά τις τελευταίες δεκαετίες στον τομέα της έρευνας, είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη σύγχρονων εργαστηριακών μεθόδων και την άμεση εφαρμογή τους στο κλινικό ανοσολογικό εργαστήριο.

Οι σύγχρονες αυτές μέθοδοι εφαρμογής της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος, συμβάλλουν ουσιαστικά στη διερεύνηση και τη διάγνωση ενός ευρέος φάσματος νοσημάτων, όπως λοιμωδών (μικροβιακών, ιγενών, παρασιτικών, κ.λπ.), αιματολογικών, αυτοανόσων, νεοπλασματικών, ανοσοανεπαρκειών, στη διαπίστωση ιστοσυμβατότητας στις μεταμοσχεύσεις κ.α.

Από τις αντιδράσεις αντιγόνου – αντισώματος που πραγματοποιούνται στο εργαστήριο (in vitro), άλλες γίνονται ορατές διότι ακολουθούνται από δευτερεύοντα φαινόμενα (όπως σχηματισμός ιζήματος, ορατής συγκόλλησης, αιμόλυσης κ.λ.π.), άλλες όμως δεν ακολουθούνται από δευτερεύοντα φαινόμενα και για να γίνουν ορατές χρησιμοποιούμε σήμανση του αντιγόνου ή του αντισώματος με διάφορους δείκτες (όπως ένζυμο, ραδιοϊσότοπα, φθοριοχρώματα, κ.λπ.).

Το σύνολο όλων αυτών των αντιδράσεων που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρύτατα στο κλινικό εργαστήριο περιγράφεται παρακάτω αναλυτικά, γίνεται δε και μια σύντομη αναφορά σε μεθόδους νεότερες που εφαρμόζονται και στην κλινική πράξη αλλά κυρίως σε ερευνητικά εργαστήρια, για να μπορέσει να γίνει κατανοητή η αρχή λειτουργίας τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11°

ΙΖΗΜΑΤΙΝΟΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

11.1 Γενικά

Ιζηματοαντίδραση ονομάζουμε την ένωση ενός *διαλύτου* αντιγόνου με το ομόλογο αντίσωμα και το σχηματισμό ιζήματος (ορατού συμπλέγματος). Η ιζηματοαντίδραση είναι βασική ανοσολογική αντίδραση που χρησιμοποιείται ευρύτατα στο κλινικό εργαστήριο.

Η ιζηματοαντίδραση γίνεται σε δύο φάσεις:

1. Στην πρώτη φάση γίνεται η ταχεία ένωση του αντιγόνου με το αντίσωμα και ο σχηματισμός μικρών διαλυτών συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος

2. Στη δεύτερη φάση τα διαλυτά αυτά συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν μεγάλα αδιάλυτα συμπλέγματα τα οποία με την παρουσία ηλεκτρολύτη που είναι απαραίτητος στη φάση αυτή καθιζάνουν και σχηματίζουν ορατό *ίζημα*.

Τα αντισώματα που μετέχουν στις ιζηματοαντιδράσεις ονομάζονται “ιζηματινές”. Για να πραγματοποιηθεί μια ιζηματοαντίδραση πρέπει να υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες PH και θερμοκρασίας, καθώς και η παρουσία ηλεκτρολύτη. Τον σημαντικότερο όμως ρόλο στο σχηματισμό του ιζήματος παίζουν οι σχετικές συγκεντρώσεις (η *αναλογία*) αντιγόνου - αντισώματος.

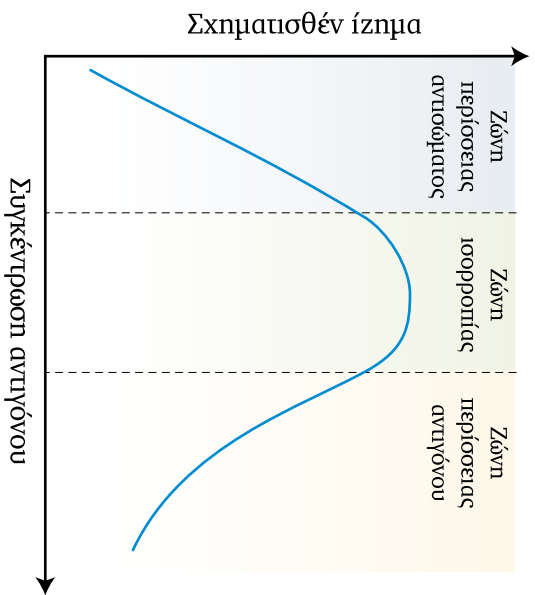
Οι ιζηματοαντιδράσεις χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο είτε ως ποιοτικές είτε ως ποσοτικές μέθοδοι. Στις ποιοτικές, απλώς ανχνεύουμε την ύπαρξη ενός αντισώματος ή αντιγόνου π.χ. στον ορό ενός ασθενούς, αρκεί να χρησιμοποιήσουμε το αντίστοιχο αντιγόνο ή αντίσωμα. Στις ποσοτικές, προσδιορίζουμε με ακρίβεια την ποσότητα του αντισώματος ή του αντιγόνου.

Οι ιζηματοαντιδράσεις διακρίνονται σε αυτές που γίνονται σε υγρό μέσο (υγρό περιβάλλον) και αυτές που γίνονται σε πικτή (γέλη).

11.2 Ιζηματοαντιδράσεις σε υγρό μέσο

Η σύνδεση αντιγόνου - αντισώματος *δ’* ένα διάλυμα δεν είναι στατική, αλλά εξελίσσεται ανάλογα με την ποσότητα του αντιγόνου και του αντισώματος. Για να έχουμε σχηματισμό ορατού ιζήματος πρέπει να υπάρχει *άριστη αναλογία* αντιγόνου-αντισώματος. Σε περίπτωση περίσσειας αντισώματος ή αντιγόνου **δεν** παρατηρείται ίζημα. Ενώ στην περίπτωση ισορροπίας αντιγόνου-αντισώματος, σχηματίζεται το μεγαλύτερο δίκτυο αδιάλυτων συμπλεγμάτων και έχουμε την εμφάνιση άφθονου ιζήματος.

Η διαδικασία αυτή μελετάται και περιγράφεται στην καμπύλη Heideberger-Kendall (καμπύλη ποσοτικής ιζηματοαντίδρασης), η οποία δείχνει την ποσότητα του ιζήματος που σχηματίζεται σε υγρό μέσο, ανάλογα με τις ποσότητες αντιγόνου αντισώματος. (Σχήμα 11.1)



Σχήμα 11.1 Καμπύλη ποσοτικής ιζηματοαντίδρασης (Heidelberger-Kendall)

Στην καμπύλη αυτή διακρίνονται τρεις ζώνες:

- α) η ζώνη περίσσειας του αντισώματος (απουσία ιζήματος)
- β) η ζώνη ισορροπίας αντιγόνου-αντισώματος (άριστες συνθήκες για σχηματισμό άφθονου ιζήματος) και
- γ) η ζώνη περίσσειας του αντιγόνου (απουσία ιζήματος).

Δοκιμή του δακτυλίου (ring test)

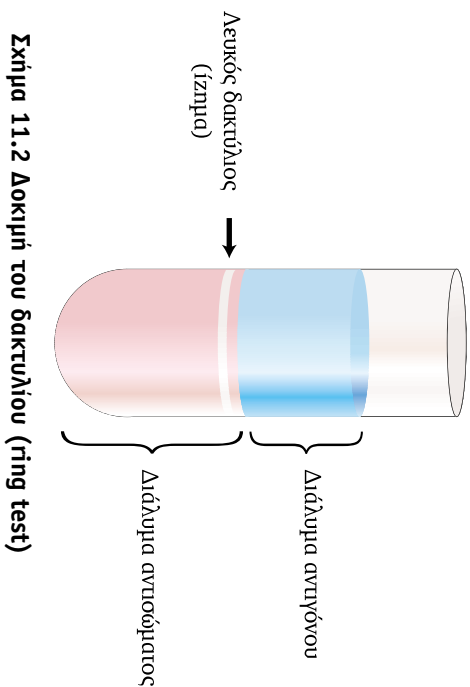
Είναι η πιο απλή μορφή της ιζηματοαντίδρασης. (Σχήμα 11.2) Είναι ποιοτική μέθοδος και γίνεται σε λεπτό σωλήνα ως εξής:

1. Στον πυθμένα λεπτού σωλήνα τοποθετείται το διάλυμα του αντιγόνου.
2. Στη συνέχεια, πάνω σε αυτό, επιτιβάζεται με προσοχή το διάλυμα του αντιγόνου

Εάν το αντίσωμα είναι ειδικό για το αντιγόνο, στο σημείο επαφής αντιγόνου - αντισώματος σχηματίζεται λευκός δακτύλιος (ορατό ίζημα) που οφείλεται στο σχηματισμό αδιάλυτων συμπλεγμάτων αντιγόνου - αντισώματος.

Η μέθοδος είναι ταχεία και έχει χρησιμοποιηθεί για γρήγορη ανίχνευση αντιγόνου ή αντισώματος σε βιολογικά υγρά, όπως για αναζήτηση αντιγόνων πνευμονιόκοκκου στο ENY με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων σε μηνιγγίτιδα από πνευμονιόκοκκο. Έχει χρησιμοποιηθεί επίσης στη μικροβιολογία για ταξινόμηση Β-αιμολυτικών στρεπτοκόκκων.

Από τις μεθόδους ιζηματοαντίδρασης σε υγρό μέσο, αυτή που χρησιμοποιείται ευρύτατα σήμερα στο ανοσολογικό εργαστήριο είναι η **Μεφελόμετρία** η οποία έχει αντικαταστήσει πολλές άλλες μεθόδους στη σύγχρονη διαγνωστική πράξη. (Η μέθοδος περιγράφεται στο 15^ο κεφάλαιο: ΝΕΟΤΕΡΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ)



Σχήμα 11.2 Δοκιμή του δακτυλίου (ring test)

11.3 Ιζηματοαντιδράσεις σε πικτή (γέλη)

Κατά τις ιζηματοαντιδράσεις σε πικτή (γέλη-gel) όπως άγαρ, αγαρόζη, το αντιγόνο και το αντίσωμα τοποθετούνται μέσα σε ημιρευστο υλικό και καθώς το ένα διαχέεται προς το άλλο, στο σημείο όπου θα συναντηθούν σε *άριστη αναλογία*, σχηματίζεται θαλερή γραμμή (γραμμή καθίζησης) που οφείλεται στο σχηματισμό αδιάλυτων συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος.

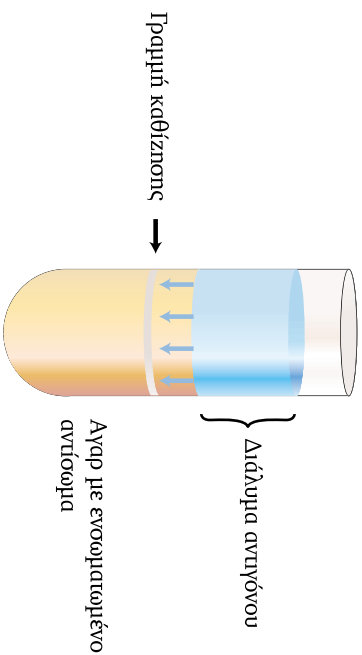
Σε ορισμένες περιπτώσεις, μετά την αντίδραση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ειδική χρωστική για πρωτεΐνες ώστε να είναι πιο εμφανής η γραμμή καθίζησης.Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται (πικτή-άγαρ, διαλύματα αντιγόνου κ.λ.π.) υπάρχουν στο εμπόριο και είτε είναι έτοιμα προς χρήση, είτε παρασκευάζονται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Διακρίνουμε τις εξής εφαρμογές της ιζηματοαντίδρασης σε πικτή (γέλη) :

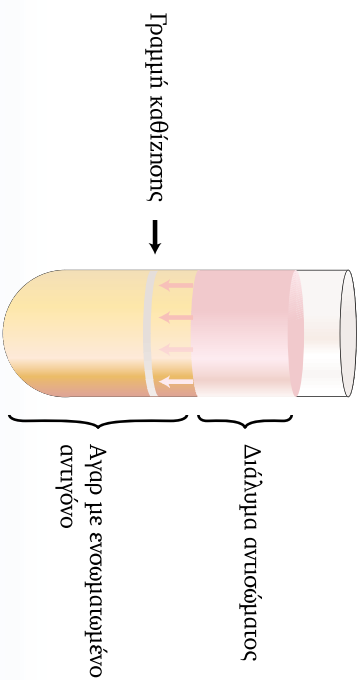
α) Απλή διάχυση προς μία κατεύθυνση

1. Μέσα σε ένα σωληνάριο τοποθετείται άγαρ, στο οποίο προηγουμένως έχει *ενσωματωθεί* το διάλυμα του αντισώματος. (Σχήμα 11.3)
2. Στη συνέχεια, πάνω στη στιβάδα του άγαρ επιτιβάζεται το διάλυμα του αντιγόνου. Το αντιγόνο διαχέεται στη στιβάδα του άγαρ που βρίσκεται από κάτω του και αντιδρά με το ενσωματωμένο αντίσωμα. Η διάχυση αυτή του αντιγόνου έχει ως αποτέλεσμα τη βαθμιαία ελάττωση της πυκνότητάς του και στο σημείο που το αντιγόνο και το αντίσωμα θα βρεθούν υπό άριστη αναλογία σχηματίζεται ίζημα που φαίνεται σαν θαλερή γραμμή (γραμμή καθίζησης).

Η μέθοδος μπορεί να πραγματοποιηθεί και αντίστροφα (Σχήμα 11.4), δηλαδή να ενσωματωθεί το διάλυμα του αντιγόνου μέσα στο άγαρ και στη συνέχεια να επιτιβάσουμε το διάλυμα του αντισώματος. Τότε το αντίσωμα θα διαχυθεί στο άγαρ και θα αντιδράσει με το ενσωματωμένο αντιγόνο ώστε να σχηματίσει τη γραμμή καθίζησης στο σημείο της άριστης αναλογίας.



Σχήμα 11.3: Αιπλή διάχυση προς μια κατεύθυνση (Άγαρ με ενσωματωμένο αντίσωμα)

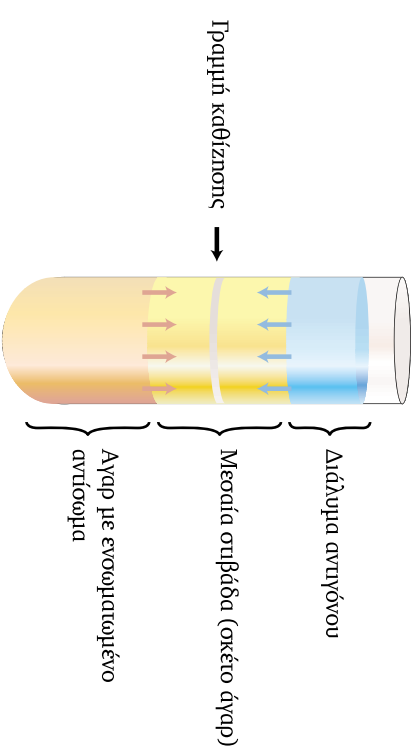


Σχήμα 11.4: Αιπλή διάχυση προς μια κατεύθυνση (Άγαρ με ενσωματωμένο αντιγόνο)

β) Αιπλή διάχυση προς μία κατεύθυνση

1. Μέσα σε ένα σωληνάριο τοποθετείται άγαρ στο οποίο προηγουμένως έχει ενσωματωθεί το διάλυμα του αντισώματος. (Σχήμα 11.5)
2. Από πάνω τοποθετείται μια δεύτερη στιβάδα με σκέτο άγαρ.
3. Τέλος επιτιβάζεται το διάλυμα του αντιγόνου πάνω στην επιφάνεια του σκέτου άγαρ.

Το αντίσωμα και το αντιγόνο διακρίνονται ταυτόχρονα, το ένα προς τα πάνω, το άλλο προς τα κάτω και συναντώνται στη μεσαία στιβάδα άγαρ. Στο σημείο που θα συναντηθούν σε άριστη αναλογία θα σχηματιστούν τη γραμμή καθίζησης.

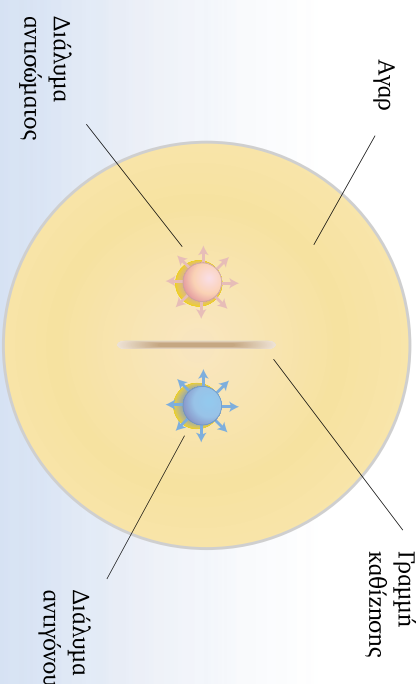


Σχήμα 11.5 Αιπλή διάχυση προς μια κατεύθυνση

γ) Αιπλή διάχυση προς δυο κατευθύνσεις (Ouchterlony)

Η μέθοδος γίνεται σε τρυβλίο ή σε γυάλινη πλάκα.

1. Το τρυβλίο ή η πλάκα καλύπτεται με άγαρ.
2. Πάνω στο άγαρ ανοίγονται δυο οπές. Στην μια τοποθετείται το διάλυμα του αντισώματος και στην άλλη το διάλυμα του αντιγόνου. (Σχήμα 11.6) Το αντίσωμα και το αντιγόνο διακρίνονται από τις οπές στις οποίες βρίσκονται. Στο σημείο που θα συναντηθούν σε άριστη αναλογία ανάμεσα στις δυο οπές, θα σχηματιστεί η γραμμή καθίζησης.



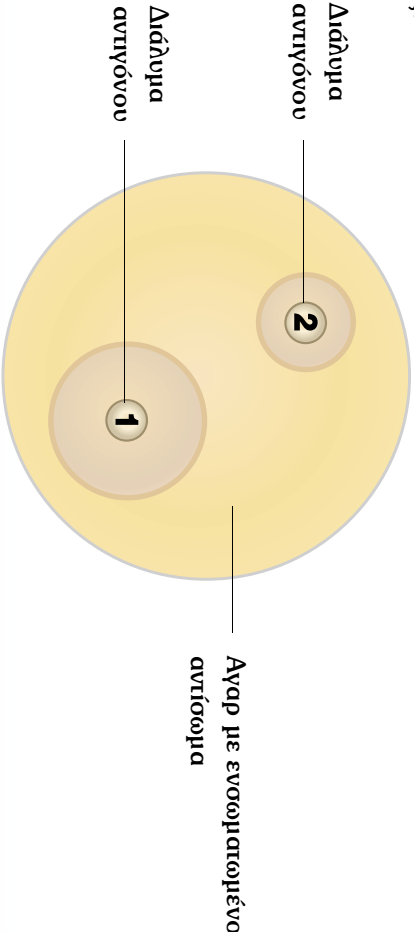
Σχήμα 11.6 Αιπλή διάχυση προς δυο κατευθύνσεις (Ouchterlony)

Η μέθοδος εφαρμόζεται συχνά για την ανίχνευση ειδικών αντι-ΕΝΑ αντισωμάτων σε ασθενείς με νοσήματα του κολλαγόνου (αυτοάνοσα νοσήματα), καθώς και στη μικροβιολογία για ανίχνευση αντισωμάτων έναντι μικροβίων. Τα αντιδραστήρια υπάρχουν στο εμπόριο και η εξέταση γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες.

δ) Κυκλωτερής ανοσοδιάχυση (Mancini)

- 1. Πάνω σε τρυβλίο ή πλάκα επιστρώνεται άγαρ μέσα στο οποίο έχει προηγουμένως ενσωματωθεί διάλυμα αντι σώματος. Έτσι σε ολόκληρη την επιφάνεια του άγαρ υπάρχει ενσωματωμένη η ίδια ποσότητα αντι σώματος. (Σχήμα 11.7)
- 2. Στη συνέχεια, πάνω στο άγαρ ανοίγεται οπή, μέσα στην οποία τοποθετούμε το διάλυμα του αντιγόνου. Το αντιγόνο διαχέεται γύρω-γύρω από την οπή και ενώνεται με το αντίσωμα που είναι ενσωματωμένο στο άγαρ.

Κοντά στην οπή το αντιγόνο είναι σε μεγάλη συγκέντρωση (περίσσεια) επομένως δεν σχηματίζεται ίζημα. Όσο απομακρύνεται από την οπή, η πυκνότητά του ελαττώνεται και στο σημείο που θα βρεθεί σε άριστη αναλογία με το αντίσωμα σχηματίζεται ίζημα το οποίο εμφανίζεται με τη μορφή δακτύλιου (δακτύλιος καθίζησης). Ο δακτύλιος αυτός έχει κέντρο την οπή και η διάμετρος του είναι ανάλογη με την ποσότητα του αντιγόνου που τοποθετήθηκε μέσα στην οπή. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του αντιγόνου, τόσο μεγαλύτερος είναι ο δακτύλιος.



Σχήμα 11.7 Κυκλωτερής ανοσοδιάχυση (Mancini)

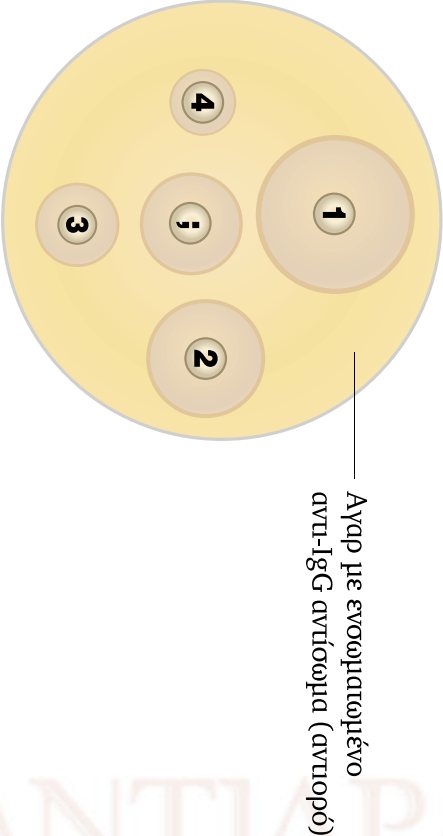
Στις οπές 1 και 2 τοποθετήθηκαν διαλύματα διαφορετικής πυκνότητας (διαφορετικής ποσότητας) του ίδιου αντιγόνου. Από τη διάμετρο των σχηματισθέντων δακτύλιων συμπεραίνουμε ότι η πυκνότητα του αντιγόνου στην οπή 1 είναι μεγαλύτερη από την πυκνότητα του αντιγόνου στην οπή 2

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA, IgM. Η τεχνική της μεθόδου είναι απλή: Για κάθε μια από τις τρεις ανοσοσφαιρίνες χρησιμοποιείται πλάκα (ή τρυβλίο) στην επιφάνεια της οποίας υπάρχει άγαρ με ενσωματωμένο τον αντίστοιχο αντιγό (δηλαδή ενσωματωμένο αντι-IgG, αντι-IgA ή αντι-IgM αντίσωμα αντίστοιχα).

Περίγραφή μεθόδου μέτρησης της IgG: (Σχήμα 11.8)

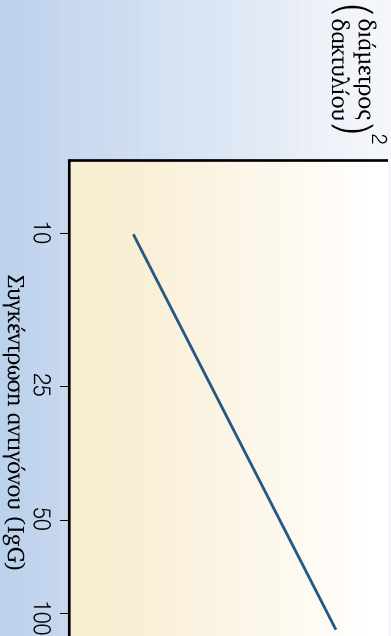
- 1. Σ'ένα τρυβλίο επιστρώνουμε άγαρ μέσα στο οποίο έχει ενσωματωθεί αντίσωμα έναντι της IgG (IgG-αντιγόρος).
- 2. Στη συνέχεια, ανοίγουμε οπές πάνω στο άγαρ. Στην μια οπή τοποθετούμε τον ορό αίματος του εξεταζόμενου ατόμου και στις άλλες οπές τοποθετούμε διαδοχικές αραιώσεις μιας γνωστής (standard) ποσότητας IgG που θα χρησιμοποιηθεί για τις συγκρίσεις με το σχηματισμό καμπύλης αναφοράς (καμπύλης standard).

Αφίνουμε τους ορούς που περιέχονται στις οπές να διαχυθούν μέσα στο άγαρ. Η ανοσοσφαιρίνη IgG που περιέχεται στον εξεταζόμενο ορό δρα σαν αντιγόνο, και καθώς διαχέεται γύρω από την οπή, αντιδρά με το ενσωματωμένο στο άγαρ αντι-IgG αντίσωμα, σχηματίζοντας δακτύλιο καθίζησης γύρω από την οπή. Δακτύλιος καθίζησης θα σχηματίσουν και οι αραιώσεις (standards) με τις γνωστές περιεκτικότητες σε IgG που τοποθετήσαμε στις άλλες οπές. Συγκρίνοντας τώρα τη διάμετρο του δακτύλιου του εξεταζόμενου δείγματος με τις αντίστοιχες των standards μπορούμε να υπολογίσουμε την περιεκτικότητα σε IgG του ορού του οποίου εξετάζουμε. Κάνουμε δηλαδή μια καμπύλη αναφοράς (καμπύλη standard) βάσει της οποίας υπολογίζουμε την ποσότητα IgG του άγνωστου δείγματος. (Σχήμα 11.9)



Σχήμα 11.8: Μέτρηση της IgG με τη μέθοδο Mancini:

Στις οπές 1,2,3,4, τοποθετήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις γνωστής ποσότητας IgG (standards). Στη μεσαία οπή τοποθετήθηκε ο εξεταζόμενος ορός του οποίου την IgG θέλουμε να μετρήσουμε



Σχήμα 11.9: Καμπύλη αναφοράς για τη μέτρηση της IgG του εξεταζόμενου δείγματος βάσει των διαμέτρων των δακτύλιων των standards (διαδοχικών αραιώσεων γνωστής ποσότητας IgG)

Με τον ίδιο τρόπο προσδιορίζουμε τις ανοσοσφαιρίνες IgA και IgM, χρησιμοποιώντας δυο ξεχωριστά τρυβλία με ενσωματωμένο αντι-IgA ή αντι-IgM αντίσωμα (αντιπορό) αντίστοιχα. Τα τρυβλία με τους ενσωματωμένους αντιπορούς τα αγοράζουμε έτοιμα από το εμπόριο ή τα παρασκευάζουμε εμείς στο εργαστήριο ως εξής: Αναμειγνύουμε το λυωμένο ήγαρ με το διάλυμα του αντι σώματος (αντιπορού), το επιστρώνουμε στο τρυβλίο και όταν πηξει ανοίγουμε τις οπές όπου θα τοποθετίσουμε τους εξεταστέους ορούς και τα standards.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανοσοσφαιρινών, των παραγόντων του συμπληρώματος κ.α, αλλά σήμερα έχει αντικατασταθεί από τη νεφελόμετρία, η οποία είναι πιο ακριβής, πιο ευαίσθητη και πιο γρήγορη.

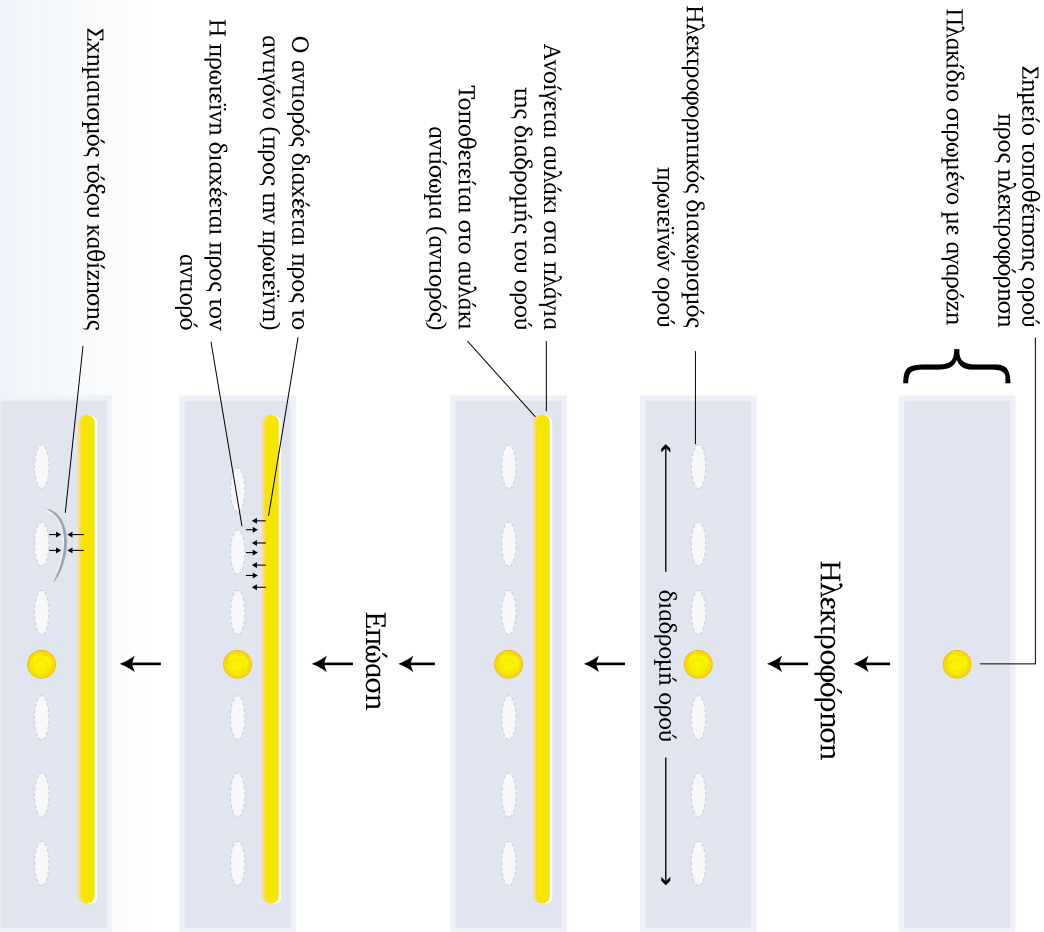
ε) Ανοσονηλεκτροφόρηση

Η μέθοδος συνδυάζει τον ηηεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών με την ανοσοολογική τους αναγνώριση από αντιπορούς ώστε να γίνει ταυτοποίηση και έλγχός τους. Με αυτήν μπορούμε να αναχνεύσουμε την ύπαρξη μονοκλώνικής πρωτεϊνης στον ορό ή σε άλλα βιολογικά υγρά (π.χ. ούρα) του ασθενούς.

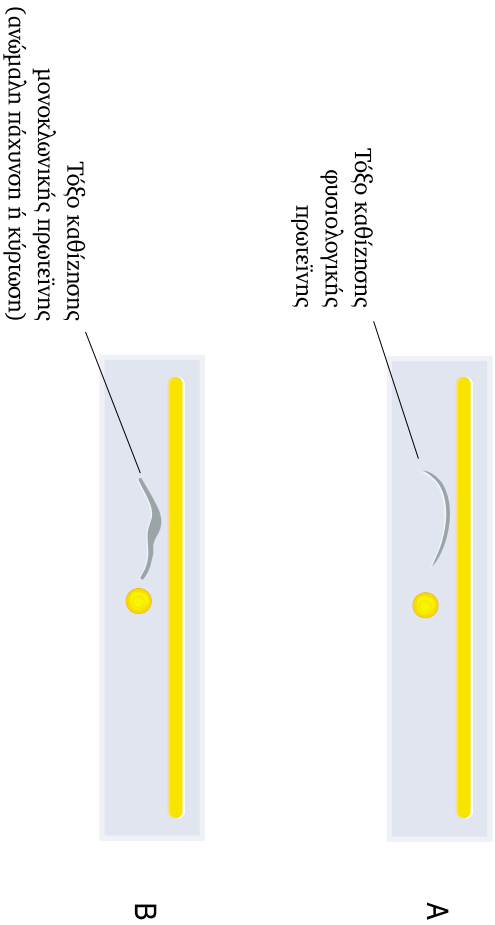
1. Πρώτα γίνεται η ηηεκτροφορηση του ορού (ή άλλων βιολογικών υγρών) πάνω σε αγαρόζη κατά την οποία οι πρωτεϊνες χωρίζονται ανάλογα με την ηηεκτροφορητική τους κινητικότητα.
2. Στη συνέχεια, μετά τον ηηεκτροφορητικό διαχωρισμό του ορού, ανοίγεται αυλάκι στο ένα ή στα δυο πλάγια της διαδρομής του ορού, παράλληλα προς την διαδρομή αυτή. Στο αυλάκι αυτό τοποθετίται αντίσωμα (αντιπορός) έναντι της πρωτεϊνης την οποία θέλουμε να ελέγξουμε π.χ. αντι-IgG ή αντι-IgA ή αντι-IgM κ.λπ. (Σχήμα 11.10α)

Κατά την επώαση που ακολουθεί, το αντίσωμα (αντιπορός) και το αντιγόνο (πρωτεϊνη) διαχέονται το ένα προς το άλλο και στο σημείο συνάντησής τους σε άριστη αναλογία σχηματίζουν τόξο καθίζησης το οποίο γίνεται εμφανές με τη χρήση κατάλληλης χρωστικής.

Με αυτό τον τρόπο ελέγχουμε το τόξο καθίζησης που θα σχηματίσει κάθε μια ανοσοσφαιρίνη με το αντίστοιχο αντίσωμά της. Το σχήμα και η θέση των τόξων αυτών συγκρίνονται με τόξα φυσιολογικών μαρτύρων και μας δίνουν πληροφορίες για ύπαρξη τυχόν παθολογικών πρωτεϊνών (Σχήμα 11.10β). Π.χ. ύπαρξη ανώμαλου τόξου IgG (τόξου με ανώμαλη κύρτωση ή πάχυνση) υποδεικνύει την ύπαρξη μη φυσιολογικής IgG ανοσοσφαιρίνης (δηλαδή μιας μονοκλώνικής IgG ανοσοσφαιρίνης). Ελέγχοντας και τις τρεις τάξεις των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA, IgM, καθώς και τις ελαφρές τους αλυσίδες κ και λ, με τους αντίστοιχους αντιπορούς, μπορούμε να εντοτίσουμε μια μονοκλώνική πρωτεϊνη και να καθορίσουμε τον τύπο στον οποίο ανήκει (π.χ. ανεύρεση μονοκλώνικής πρωτεϊνης τύπου IgA κ). Υπάρχουν περιπτώσεις κατά τις οποίες θα χρειαστεί να ελέγξουμε και τις IgD και IgE ανοσοσφαιρίνες, για τη σπάνια περίπτωση ύπαρξης μονοκλώνικής σε μια από αυτές τις τάξεις. Επίσης μπορεί να ανευρεθεί μονοκλώνική πρωτεϊνη τύπου μόνο κ ή λ (ελαφρών αλυσίδων), όπως συμβαίνει στα ούρα σε λεύκωμα Bence Jones.



Σχήμα 11.10α Ανοσονηλεκτροφόρηση – Στάδια

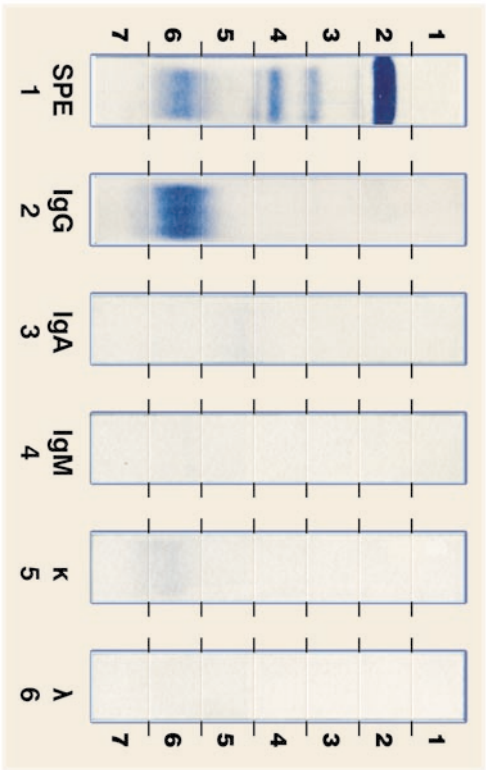


Σχήμα 11.10B Ανοσοηλεκτροφόρηση
A) παράδειγμα τόξου καθίζησης φυσιολογικής πρωτεΐνης
B) παράδειγμα τόξου καθίζησης μονοκλωνικής πρωτεΐνης

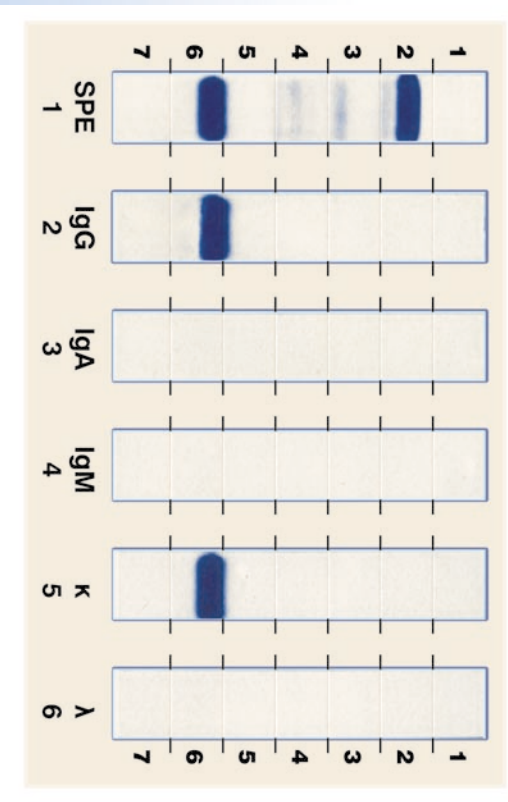
Σήμερα, στην καθημερινή εργαστηριακή πράξη, η ανοσοηλεκτροφόρηση έχει σχεδόν αντικατασταθεί από την **Ανοσοκαθήλωση** η οποία είναι μια τροποποίηση της ανοσοηλεκτροφόρησης. Σ' αυτήν γίνεται ηλεκτροφόρηση του ορού και στη συνέχεια απλώνεται αντιορός π.χ. αντι-IgG ή αντι-IgA ή αντι-IgM, κ.λπ., πάνω σε όλη την επιφάνεια της ηλεκτροφόρησης. Κατά την επώαση που ακολουθεί, ο αντιορός (αντίσωμα) ενώνεται με την αντίστοιχη πρωτεΐνη (αντιγόνο) που υπάρχει από κάτω και μας δίνει γραμμής καθίζησης (ζώνη) που γίνεται εμφανής με τη χρήση χρωστικής. Από τη μορφή της γραμμής καθίζησης μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την ανοσοσφαιρίνη, αν είναι δηλαδή φυσιολογική ή μονοκλωνική. (Φωτογραφίες 11.1a και 11.1b) Υπαρξη στενής και έντονης ζώνης είναι ένδειξη μονοκλωνικής πρωτεΐνης.

Η ανοσοκαθήλωση πλεονεκτηεί έναντι της ανοσοηλεκτροφόρησης γιατί μας δίνει πιο σαφή εικόνα, είναι περισσότερο ευαίσθητη, μπορεί να βρει περισσότερες από μια μονοκλωνικές, εντοπίζει μονοκλωνικές πρωτεΐνες ακόμα και όταν καλύπτονται από άλλες πρωτεΐνες πράγμα που δεν μπορεί η ανοσοηλεκτροφόρηση, είναι πιο αποτελεσματική στην ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό ελαφρών αλυσίδων στον ορό και έχει σχεδόν αντικαταστήσει την ανοσοηλεκτροφόρηση στην καθημερινή εργαστηριακή πράξη.

Τα αντιδραστήρια της ανοσοηλεκτροφόρησης και ανοσοκαθήλωσης προσφέρονται έτοιμα στο εμπόριο και οι εξετάσεις γίνονται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



Φωτογραφία 11.1.α Ανοσοκαθήλωση φυσιολογικού ορού
Στην πρώτη στήλη (SPE) φαίνεται η εικόνα ηλεκτροφόρησης του ορού (SPE: serum protein electrophoresis). Στις στήλες 2-6 φαίνεται η εικόνα με τους αντίστοιχους αντιορούς (αντι-IgG, αντι-IgA, αντι-IgM, αντι-κ, αντι-λ). Δεν παρατηρείται μονοκλωνική ζώνη



Φωτογραφία 11.1.β Ανοσοκαθήλωση ορού ασθενούς με πολλαπλό μυέλωμα
Παρατηρείται μονοκλωνική πρωτεΐνη τύπου IgGκ (ζώνη έντονη και στενή με τον αντι-IgG και αντι-κ αντιορό). Αυτή η ζώνη της μονοκλωνικής πρωτεΐνης φαίνεται και στη στήλη 1 (SPE) δηλαδή στην ηλεκτροφόρηση του ορού.

Αξιολόγηση του αποτελέσματος:
Η ανίχνευση μονοκλωνικής πρωτεΐνης (ή παραπρωτεΐνης όπως ονομάζεται), παρατηρείται στις λεγόμενες *παραπρωτεϊναιμίες* (μονοκλωνικές γαμμαπάθειες). Οι *παραπρωτεϊναιμίες* μπορεί να είναι είτε *α)* *κακοίθεις* (όπως το πολλαπλό μυέλωμα, η μακροσφαιριναιμία Waldenström, κ.α.), είτε *β)* *ακαθάρσιςτης σημασίας* (ανίχνευση μονοκλωνικής πρωτεΐνης σε άτομα συνήθως μεγάλης ηλικίας χωρίς όμως άλλα ευρήματα ή κλινικές εκδηλώσεις που χρειάζονται παρακολούθηση επί μακρό χρονικό διάστημα μήπως εξελιχθούν σε πολλαπλό μυέλωμα ή άλλη κακοήδη παραπρωτεϊναιμία) είτε *γ)* *δευτεροπαθείς* (ανίχνευση μονοκλωνικής πρωτεΐνης σε διάφορα άλλα νοσήματα, όπως σε χρόνια λοιμώδη νοσήματα, αυτοάνοσα νοσήματα, διάφορα νεοπλασματα κ.α.)

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Ιζηματοαντίδραση ονομάζεται η ένωση ενός διαλυτού αντιγόνου με το ομόλογο αντίσωμα και ο σχηματισμός ιζήματος (ορατού συμπλέγματος).

Για την πραγματοποίηση μιας ιζηματοαντίδρασης πρέπει να υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες PH και θερμοκρασίας καθώς και η παρουσία ηλεκτρολύτη. Ο σχηματισμός όμως του ιζήματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις σχετικές συγκεντρώσεις (τιν αναλογία) αντιγόνου και αντι σώματος: για να υπάρξει ορατό ιζημα πρέπει να υπάρχει άριστη αναλογία αντιγόνου-αντισώματος.

Οι ιζηματοαντιδράσεις μπορεί να είναι ποιοτικές ή ποσοτικές. Διακρίνονται σε αυτές που γίνονται σε υγρό μέσο και σε αυτές που γίνονται σε πικτή (γέλη). Στις ιζηματοαντιδράσεις που γίνονται σε υγρό μέσο ανήκουν η δοκιμή του δακτυλίου και η νεφέλομετρία. Στις ιζηματοαντιδράσεις που γίνονται σε πικτή ανήκουν : η απλή διάχυση προς μια κατεύθυνση, η διπλή διάχυση προς μια κατεύθυνση, η διπλή διάχυση προς δυο κατευθύνσεις (Ouchterlony), η κυκλωτερής ανοσοδιάχυση (Mancini), η ανοσοηλεκτροφόρηση και η ανοσοκαθήλωση.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

- 1. Τι είναι ιζηματοαντιδραση;
- 2. Ποιες είναι οι φάσεις μιας ιζηματοαντιδρασης;
- 3. Ποια είναι η απαραίτητη προϋπόθεση για το σχηματισμό ορατού ιζήματος σε μια ιζηματοαντιδραση;
- 4. Ποιες ιζηματοαντιδράσεις γίνονται σε υγρό μέσο;
- 5. Ποιες ιζηματοαντιδράσεις γίνονται σε πηκτή (γέλη);
- 6. Πώς γίνεται η απλή διάχυση προς μια κατεύθυνση;
- 7. Πώς γίνεται η διπλή διάχυση προς μια κατεύθυνση;
- 8. Πώς γίνεται η διπλή διάχυση προς δυο κατευθύνσεις (Ouchterlony);
- 9. Ποιες εφαρμογές της Ouchterlony γνωρίζετε;
- 10. Πώς γίνεται η κυκλωτερής ανοσοδιάχυση (Mancini);
- 11. Περιγράψτε τη μέτρηση της IgG με τη μέθοδο Mancini.
- 12. Πώς γίνεται η ανοσοηλεκτροφόρηση;
- 13. Τι ανιχνεύουμε με την ανοσοηλεκτροφόρηση ;

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12°
ΣΥΤΚΟΛΛΗΤΙΝΟΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

12.1 Γενικά

Συγκολλητινοαντίδραση ονομάζουμε την ένωση ενός *σωματιδιακού* αντιγόνου με το ομόλογο αντίσωμα και το σχηματισμό κροκίδων (συγκόλλησης). Η συγκόλληση αυτή γίνεται ορατή είτε με γυμνό μάτι, είτε με μεγεθυντικό φακό είτε στο μικροσκόπιο.

Η συγκόλληση διακρίνεται σε: α) άμεση και β) έμμεση (ή παθητική).

Στην άμεση συγκόλληση το αντιγόνο *βρίσκεται πάνω στην επιφάνεια* των κυττάρων (είναι δηλαδή *φυσικό επιφανειακό* αντιγόνο) όπως είναι τα αντιγόνα των ομάδων αίματος που βρίσκονται πάνω στα ερυθρά αιμοσφαίρια, καθώς και τα διάφορα αντιγόνα των μικροβίων που βρίσκονται πάνω στο μικροβιακό κύτταρο. Κλασικά παραδείγματα εφαρμογών της άμεσης συγκόλλησης είναι ο προσδιορισμός των ομάδων και υποομάδων του αίματος (δοκιμασίες αιμοσυγκόλλησης) και οι δοκιμασίες Widal και Wright (δοκιμασίες μικροβιακής συγκόλλησης για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι μικροβίων).

Στην έμμεση (ή παθητική) συγκόλληση το αντιγόνο *έχει προσροφηθεί* πάνω στην επιφάνεια σωματιδίων κατόπιν ειδικής επεξεργασίας. Δηλαδή το αντιγόνο δεν υπήρχε εξ αρχής πάνω στο σωματίδιο (δεν ήταν *φυσικό* αντιγόνο όπως στην άμεση συγκόλληση), αλλά *προσροφήθηκε* (προσκολλήθηκε) πάνω στην επιφάνεια του σωματιδίου με ειδική επεξεργασία. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται αδρανή σωματίδια όπως είναι τα σωματίδια latex , τα σωματίδια bentonite, καθώς και τα ερυθρά αιμοσφαίρια, στην επιφάνεια των οποίων έχουν προσροφηθεί διάφορα αντιγόνα. Παρουσία των αντίστοιχων αντισωμάτων τα σωματίδια αυτά συγκολλώνται όπως και στην άμεση συγκόλληση. Όταν χρησιμοποιούνται σωματίδια latex, η δοκιμασία έμμεσης συγκόλλησης ονομάζεται “συγκόλληση latex”. Όταν χρησιμοποιούνται ερυθρά αιμοσφαίρια, η δοκιμασία έμμεσης συγκόλλησης ονομάζεται “παθητική αιμοσυγκόλληση” .

Έμμενη - Φάσεις συγκολλητινοαντιδρασης:

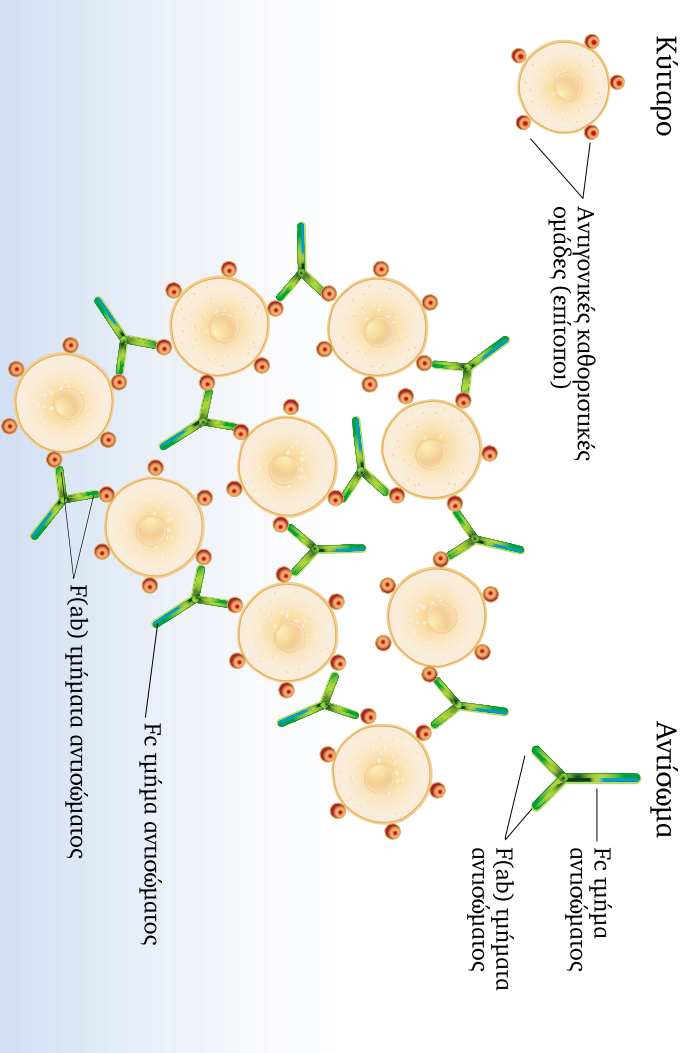
Τα σωματίδια σε ένα ενδιώρημα απωθούνται μεταξύ τους λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρουν στην επιφάνειά τους (ηλεκτροστατικές απωθητικές δυνάμεις). Εάν προστεθούν τα ομόλογα αντισώματα, μειώνονται τα αρνητικά φορτία και τα σωματίδια συμπλησιάζουν μεταξύ τους, γεγονός που εμφανίζεται ως συγκόλληση. Στην συγκολλητινοαντιδραση λοιπόν, σωματίδια (ή κύτταρα) που στην επιφάνειά τους φέρουν αντιγόνα, παρουσία των ομόλογων αντισωμάτων συμπλησιάζουν και συγκολλώνται σε ομάδες. Τα αντισώματα αυτά που προκαλούν συγκόλληση ονομάζονται “συγκολλητίνες”.

Η συγκολλητινοαντίδραση γίνεται σε δυο φάσεις: Στην πρώτη φάση γίνεται η αναγνώριση του αντιγόνου από το αντίσωμα και το αντίσωμα ενώνεται με τις καθοριστικές αντιγονικές ομάδες (επιτόπους) που βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια του κυττάρου (σωματιδίου). Στη

δεύτερη φάση τα κύτταρα που έχουν ενωθεί με τα αντισώματα συμπλησιάζουν και συγκολλώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας κροκίδες (ορατή συγκόλληση). Οι κροκίδες σφειλίζονται στο σχηματισμό δικτυωτού πλέγματος μεταξύ των κυττάρων και των αντισωμάτων. (Σχήμα 12.1) Τα μόρια δηλαδή των αντισωμάτων χρησιμεύουν σαν γέφυρες που ενώνουν τα κύτταρα μεταξύ τους και έτσι σχηματίζονται μεγάλα θρόμβιαμα κυττάρων που γίνονται ορατά με τη μορφή κροκίδων.

Προϋποθέσεις για τη δημιουργία συγκόλλησης:

Για να γίνει συγκόλληση των σωματιδίων (ή κυττάρων) με ένα αντίσωμα, πρέπει το αντίσωμα αυτό να έχει πιο μεγάλη ισχύ για σύνδεση από τις απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των σωματιδίων, έτσι ώστε να μπορεί να τις εξουδετερώσει και να συνδέσει τα σωματίδια μεταξύ τους. Έτσι εξηγείται γιατί η IgM εξαιτίας της πενταμερούς δομής της και της μεγαλύτερης ισχύος για σύνδεση σε σχέση με την IgG είναι πιο αποτελεσματικός παράγοντας συγκόλλησης. Η IgM είναι περίπου 750 φορές ισχυρότερη συγκολλητική σε σχέση με την IgG.



Σχήμα 12.1: Σχηματισμός δικτυωτού πλέγματος στην συγκολλητινοαντίδραση

Απαραίτητες προϋποθέσεις για τη δημιουργία συγκόλλησης είναι η κατάλληλη αναλογία αντιγόνου-αντισώματος καθώς και η παρουσία πλεκτρολύτη. Αν δεν τηρούνται αυτές οι προϋποθέσεις, η πρώτη φάση δεν ακολουθείται από τη δεύτερη και η αντίδραση δεν ολοκληρώνεται (δεν γίνεται ορατή συγκόλληση). Η συγκόλληση μπορεί να παρεμποδιστεί και έτσι να μη ολοκληρωθεί η αντίδραση, στις εξής περιπτώσεις : όταν τα αντισώματα έχουν

μικρή ισχύ για σύνδεση, όταν η θερμοκρασία είναι ακατάλληλη, όταν υπάρχει μικρός αριθμός επιτόπων πάνω στην επιφάνεια του σωματιδίου (όπως το αντιγόνο D στο Rhesus), όταν υπάρχει μεγάλη περίσσεια αντισώματος (δημιουργία φαινομένου προζώνης) και όταν υπάρχουν πολύ έντονες απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των σωματιδίων.

Τα αντισώματα που δεν έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν την πλήρη συγκόλληση συνηθίζεται να ονομάζονται “στελή” αντισώματα. Γνωρίζουμε όμως ότι η αποτυχία της συγκόλλησης δεν οφείλεται σε ειδικές μορφές αντισωμάτων, αλλά εξηγείται απο τις ιδιότητες του αντιγόνου και του αντισώματος και από τις συνθήκες που παρακωλύουν τη συγκόλληση οι οποίες αναφέρθηκαν παραπάνω.

Πλανεκτιμήματα – Μειονεκτιμήματα - Εφαρμογές συγκολλητινοαντιδράσεων:

Τα βασικά πλανεκτιμήματα των συγκολλητινοαντιδράσεων είναι η απλότητα, η ευκολία και η ταχύτητα στην εκτέλεση τους χωρίς τη χρησιμοποίηση ακριβών μηχανημάτων, η μεγάλη ευαισθησία τους, καθώς επίσης και η μεγάλη ποικιλία αντισωμάτων που μπορούν να ανιχνεύσουν. Μειονεκτιμήματα είναι οι μη ειδικές συγκολλήσεις που μπορούν να παρατηρηθούν, οι δυσκολίες στην ανεύρεση και συντήρηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθώς και το φαινόμενο προζώνης το οποίο περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Παρά τα μειονεκτιμήματα τους, οι συγκολλητινοαντιδράσεις έχουν τόσα πλανεκτιμήματα, ώστε γίνονται συνεχώς προσβάσιμες παρασκευής νέων αντιδραστηρίων με μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία, για την εφαρμογή τους σε όλα τα επίπεδα της εργαστηριακής πρακτικής, κυρίως όμως στις προκαταρκτικές δοκιμασίες. Η απλότητα στην εκτέλεση των δοκιμασιών αυτών επιβάλλει την απόλυτη ακριβεία στην εκτέλεσή τους, την καλή συντήρηση των αντιδραστηρίων και την εμπειρία του εργαστηρίου για την αποφυγή ψευδώς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων. Πολύ σημαντικό στοιχείο είναι η χρησιμοποίηση των καταλλήλων θετικών και αρνητικών μαρτύρων (controls), ώστε οι δοκιμασίες να είναι όσο το δυνατόν περισσότερο αξιόπιστες.

Οι συγκολλητινοαντιδράσεις γίνονται είτε σε πλάκα είτε σε δοκιμαστικά σωληνάρια. Για ημιοσοστική εκτίμηση των αντισωμάτων χρησιμοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις του υπό εξέταση ορού, οπότε το αποτέλεσμα εκφράζεται ως “τίτλος” αντισωμάτων. “**Τίτλος” αντισωμάτων είναι η μεγαλύτερη αραιώση του υπό εξέταση ορού στην οποία εμφανίζεται συγκόλληση.**

Οι συγκολλητινοαντιδράσεις σήμερα χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην καθημερινή εργαστηριακή πράξη για τον προσδιορισμό των ομάδων και υποομάδων αίματος και του Rhesus, για την τυποποίηση μικροοργανισμών με τη βοήθεια γνωστών αντιορών (όπως τυποποίηση E.coli, σαλμονελλών κ.α), για την αναζήτηση στον ορό του αίματος αντισωμάτων έναντι μικροβίων με χρησιμοποίηση γνωστών αντιγόνων (όπως στις αντιδράσεις Widal, Wright κ.α.), για ανίχνευση ρευματοειδούς παράγοντα (RF) και C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), για ανίχνευση αντισωμάτων στη λοιμώδη μονοπυρήνωση (mono test), στη σύφιλη (VDRL) και σε πολλές άλλες εφαρμογές.

12.2 Φαινόμενο προζώνης

Είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται σε μερικές συγκολλητινοαντιδράσεις, όπως κατά την ανίχνευση στον ορό του αίματος αντισωμάτων εναντίον ορισμένων μικροβίων. Στο φαινόμενο προζώνης παρατηρείται το εξής παράδοξο: Στις μικρές αραιώσεις του ορού, όπου υπάρχει

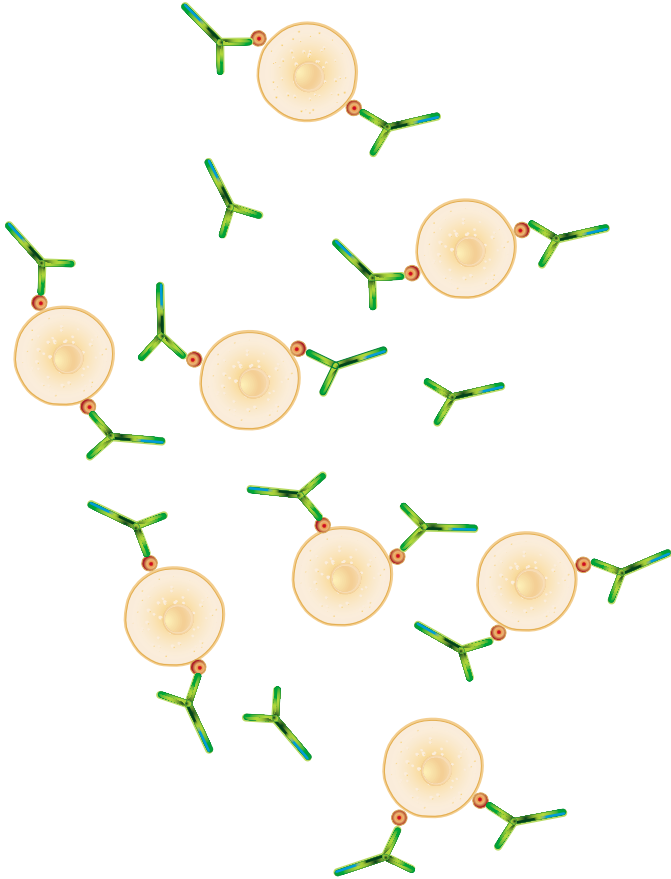
μεγάλο ποσό αντισωμάτων, η αντίδραση είναι αρνητική (δεν παρατηρείται δηλαδή συγκόλληση), ενώ όταν προχωρούμε σε μεγαλύτερες αραιώσεις του ορού, όπου ελαιοώνεται το ποσό των αντισωμάτων, η αντίδραση θετικοποιείται (γίνεται δηλαδή ορατή συγκόλληση). Αυτό βεβαίως ενέχει τον κίνδυνο, εάν κάνουμε μόνο τις πρώτες αραιώσεις του ορού και δεν προχωρήσουμε σε μεγαλύτερες αραιώσεις, να χαρακτηρίσουμε την συγκολλητινοαντίδραση ως ψευδώς “αρνητική” και τον ασθενή “αρνητικό” για αντισώματα.

Το φαινόμενο προζώνης είχε παρατηρηθεί από παλιά και ερμηνεύτηκε με τη θεωρία των “στελών” αντισωμάτων. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, στον ορό των ασθενών υπάρχουν “στελή” αντισώματα, τα οποία μπορούν μεν να ενωθούν με τις καθαριστικές αντιγονικές ομάδες πάνω στην επιφάνεια των κυττάρων, αλλά δεν έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν συγκόλληση των κυττάρων παρουσία φυσιολογικού ορού. Τα “στελή” αυτά αντισώματα θεωρήθηκε ότι εμποδίζουν τα “πλήρη” αντισώματα (τις συγκολλητινες) που επίσης υπάρχουν στον ορό να ενωθούν με τις καθαριστικές ομάδες και να προκαλέσουν συγκόλληση. Στις μεγαλύτερες αραιώσεις του ορού, τα “στελή” αντισώματα ελαιοώνονται και έτσι μπορούν να δράσουν πλέον τα “πλήρη” αντισώματα, τα οποία βρίσκουν τώρα ελεύθερες καθαριστικές ομάδες πάνω στα κύτταρα, ενώνονται με αυτές και προκαλούν την συγκόλληση. Τα “στελή” αντισώματα μπορούν να προκαλέσουν συγκόλληση μόνο παρουσία μεγαλομοριακών ενώσεων όπως λευκωματινής αντί φυσιολογικού ορού.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι δεν υπάρχουν ειδικές μορφές αντισωμάτων που εμποδίζουν τη συγκόλληση. Η αποτυχία της συγκόλλησης που παρατηρείται στις μικρές αραιώσεις του ορού οφείλεται στην *μεγάλη περίσσεια αντισωμάτων* που υπάρχει στην μικρή αραιώση. Η εξήγηση του φαινομένου είναι η εξής: Στις μικρές αραιώσεις του ορού, υπάρχει μεγάλη περίσσεια αντισωμάτων σε σχέση με τις καθαριστικές αντιγονικές ομάδες που βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια των κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το κάθε αντίσωμα να ενώνεται με το ένα σημείο σύνδεσής του (το ένα Fab κλάσμα του) να μη βρίκει κενή θέση σε άλλο κύτταρο. (Σχήμα 12.2) Έτσι όμως, αφού το κάθε αντίσωμα δεν μπορεί να συνδεθεί και με τα δυο γειτονικά κύτταρα, δεν μπορεί να λειτουργήσει σαν γέφυρα συμπληνίζοντας και ενώνοντας τα κύτταρα μεταξύ τους ώστε να σχηματιστεί δικτυωτό πλέγμα και να γίνει ορατή συγκόλληση (σχηματισμός κροκίδων).

Στις μεγαλύτερες αραιώσεις του ορού ελαιοώνονται τα αντισώματα και αποκαθίσταται η αναλογία αντιγόνου-αντισωμάτων. Τώρα, το κάθε αντίσωμα ενώνεται με το ένα του σημείο σύνδεσης σε αντιγονική ομάδα ενός κυττάρου και με το άλλο σε αντιγονική ομάδα γειτονικού κυττάρου η οποία πλέον είναι ελεύθερη λόγω της ελαιοώσεως των αντισωμάτων. Έτσι το αντίσωμα λειτουργεί σαν γέφυρα και συμπληνίζει τα γειτονικά κύτταρα κάνοντας ορατή συγκόλληση.

Αυτή λοιπόν *η αναστολή της συγκόλλησης από περίσσεια αντισωμάτων αποτρέπει το “φαινόμενο προζώνης”*. Το φαινόμενο προζώνης παρατηρείται κατά την συγκολλητινοαντίδραση Wright, που είναι μέθοδος ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι της βρουκέλλας σε άτομα που πάσχουν από μείταιο πυρετό (βρουκέλλωση). Η συγκολλητινοαντίδραση Wright περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο ΟΡΟΔΟΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ. Εκεί αναφέρεται και ο τρόπος αντιμετώπισης του φαινομένου προζώνης για την αποφυγή των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.



Σχήμα 12.2: Περίσσεια αντισωμάτων σε σχέση με τις αντιγονικές καθαριστικές ομάδες. Δεν σχηματίζεται δικτυωτό πλέγμα

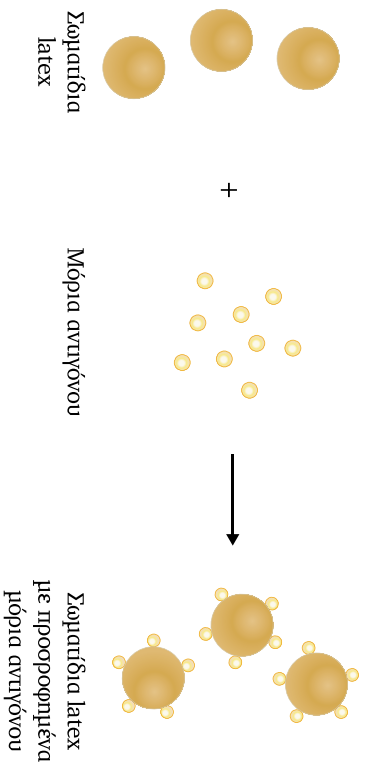
12.3 Μικροβιακή συγκόλληση

Η μικροβιακή συγκόλληση είναι μέθοδος άμεσης συγκόλλησης και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι μικροβίων στον ορό του αίματος ασθενών που πάσχουν από διάφορες μικροβιακές λοιμώξεις

Κατά τη μικροβιακή συγκόλληση χρησιμοποιείται γνωστό μικροβιακό αντιγόνο και αναζητούνται στον ορό των ασθενών αντισώματα έναντι αυτού. Οι πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες αντιδράσεις μικροβιακής συγκόλλησης είναι η αντίδραση Widal για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των σαλμονελλών και η αντίδραση Wright για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των βρουκέλλων. Και οι δυο μέθοδοι περιγράφονται αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο: ΟΡΟΔΟΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ.

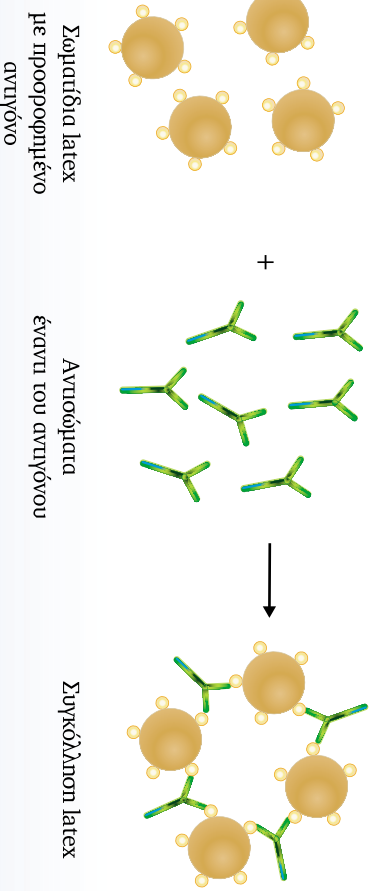
12.4 Συγκόλληση Latex

Είναι μέθοδος έμμεσης (παθητικής) συγκόλλησης. Σ’ αυτήν χρησιμοποιούνται σωματίδια latex, δηλαδή σωματίδια από πολυστυρένιο. Τα σωματίδια αυτά, με ειδική επεξεργασία, έχουν προσροφήσει πάνω στην επιφάνειά τους μόρια αντιγόνου. (Σχήμα 12.3)



Σχήμα 12.3: Προσρόφηση μορίων αντιγόνου πάνω σε σωματίδια latex

Τα σωματίδια latex που έχουν προσροφημένα πάνω στην επιφάνειά τους μέρια αντιγόνου, μπορούν τώρα να συγκολληθούν παρουσία των αντίστοιχων αντισωμάτων και να δώσουν ορατή συγκόλληση. (Σχήμα 12.4)



Σχήμα 12.4: Συγκόλληση latex

Τα αντιγόνα που προσροφώνται πάνω στα σωματίδια latex μπορεί να είναι πρωτεϊνικά ή πολυσακχαριδικά. Έτσι, πολλά αντιγόνα μικροβίων, ιών, μυκήτων, παρασίτων, καθώς επίσης και διάφορες ορμόνες, ανοσοσφαιρίνες, κυτταρικά και πυρηνικά αντιγόνα και πολλά άλλα, μπορούν να προσροφηθούν και με τον τρόπο αυτό να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση των αντίστοιχων αντισωμάτων. Οι εφαρμογές της συγκόλλησης latex είναι πάρα πολλές. Παραδείγματα αντιδράσεων latex που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα στο εργαστήριο είναι η ανίχνευση του ρευματοειδούς παράγοντα (RF) και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) που περιγράφονται στο κεφάλαιο ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ.

Οι εταιρείες σήμερα διαθέτουν μια ευρεία ποικιλία αντιδραστηρίων latex σε πλήρη kit με control για ανίχνευση αντισωμάτων έναντι πολλών μικροοργανισμών όπως Βρουκέλλας, σαλμονέλλας, λιστέριας, τοξοπλάσμωσης κ.α., τα οποία μπορεί να προμηθευτεί κανείς και να εκτελέσει την συγκολλητινοαντίδραση latex σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

12.5 Παθητική αιμοσυγκόλληση

Είναι μέθοδος έμμεσης (παθητικής) συγκόλλησης, όπως και η αντίδραση latex, αντι όμως για σωματίδια latex χρησιμοποιούνται ερυθρά αιμοσφαίρια, γί αυτό και ονομάζεται “παθητική αιμοσυγκόλληση”. Πάνω στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων έχουν προσροφηθεί με ειδική διεργασία διάφορα αντιγόνα. Η προσρόφηση αυτή των αντιγόνων πάνω στα ερυθρά αιμοσφαίρια γίνεται ή παθητικά ή μετά από επεξεργασία των ερυθρών με διάφορες χημικές ουσίες π.χ. μετά από επεξεργασία με ταννίνη. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που έχουν προσροφημένα πάνω στην επιφάνειά τους αντιγόνα, μπορούν τώρα να συγκολληθούν παρουσία των αντίστοιχων αντισωμάτων και να δώσουν συγκόλληση που γίνεται ορατή ως αιμοσυγκόλληση.

Ερυθρά αιμοσφαίρια με προσροφημένα αντιγόνα έχουν χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση αντισωμάτων έναντι E.coli, τοξοπλάσμματος, εχινόκοκκου, διαφόρων ιών καθώς και άλλων μικροοργανισμών. Στο εμπόριο διατίθενται από τις εταιρείες πλήρη kit για γρήγορη ανίχνευση των αντισωμάτων αυτών, τα οποία μπορεί κανείς να πραγματοποιήσει σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Στην παθητική αιμοσυγκόλληση ανήκει και η αντίδραση Waaler-Rose που εφαρμόστηκε για την ανίχνευση ρευματοειδούς παράγοντα και χρησιμοποιεί ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου.

12.6 Αντίδραση Coombs

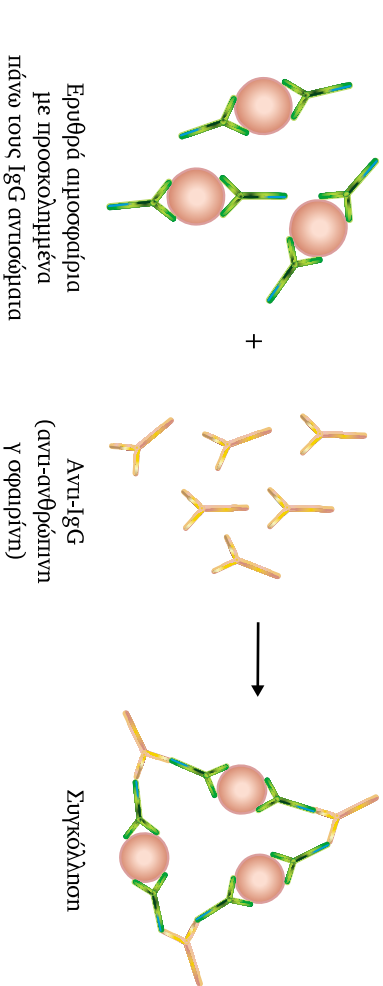
Η αντίδραση Coombs χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των λεγόμενων “ατελών” αντισωμάτων, δηλαδή αντισωμάτων IgG τα οποία μπορούν να συνδεθούν με αντιγονικές ομάδες των ερυθρών αιμοσφαιρίων και να **προσκολληθούν πάνω στα ερυθρά** αιμοσφαίρια **χωρίς να τα συγκολλούν**.

Τέτοια αντισώματα είναι τα IgG αντισώματα έναντι του D αντιγόνου του Rhesus (αντι-D αντισώματα) και παρατηρούνται σε διάφορες καταστάσεις, όπως π.χ. στα ερυθρά νεογνών με αιμολυτική νόσο. Η εξέταση με την οποία ανιχνεύουμε την ύπαρξη αυτών των αντισωμάτων που είναι προσκολλημένα **πάνω στα ερυθρά** αιμοσφαίρια ονομάζεται *έμμεση Coombs*.

Όμως IgG αντισώματα έναντι του D αντιγόνου του Rhesus μπορεί να υπάρχουν και *στον ορό του αίματος* αοθενών. Τέτοια αντισώματα βρίσκονται στον ορό του αίματος μητέρας Rhesus αρνητικών μετά από γέννηση Rhesus θετικού παιδιού, ή σε άτομα Rhesus αρνητικά μετά από μετάγγιση Rhesus θετικού αίματος. Η εξέταση με την οποία ανιχνεύουμε την ύπαρξη αυτών των αντισωμάτων *στον ορό του αίματος* ονομάζεται *έμμεση Coombs*.

12.6.1 Άμεση Coombs

Η άμεση Coombs ανιχνεύει IgG αντισώματα έναντι του D αντιγόνου του Rhesus τα οποία είναι προσκολλημένα **πάνω στα ερυθρά** αιμοσφαίρια χωρίς να προκαλούν συγκόλλησή τους. Η έλλειψη συγκόλλησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων οφείλεται στις ισχυρές απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των ερυθρών (ισχυρό αρνητικό φορτίο της επιφάνειάς τους) και στο μικρό αριθμό αντιγονικών ομάδων D πάνω σε κάθε ερυθρό (δηλαδή, υπάρχει ουσιαστικά περίσσεια αντισωμάτων σε σχέση με τις λίγες αντιγονικές ομάδες D). Έτσι, δεν σχηματίζεται αρκετό δίκτυο για να προκληθεί συγκόλληση.



Σχήμα 12.5: Άμεση Coombs

Στην άμεση Coombs, για να προκαλέσουμε την συγκόλληση των ερυθρών αυτών αιμοσφαιρίων που έχουν πάνω τους προσκολλημένα IgG αντισώματα *προσθέτουμε αντι-IgG αντίσωμα*. Το αντίσωμα αυτό ονομάζεται και *αντι-ανθρώπινη γ σφαιρίνη (anti-human)* διότι είναι αντίσωμα έναντι της IgG ανοσοσφαιρίνης του ανθρώπου. Το προστιθέμενο αντι-IgG αντίσωμα θα δράσει σαν γέφυρα μεταξύ των IgG αντισωμάτων της επιφάνειας των ερυθρών αιμοσφαιρίων και θα τα συνδέσει μεταξύ τους, οπότε τα ερυθρά θα συμπληνώσουν και θα γίνει ορατή συγκόλληση (Σχήμα 12.5).

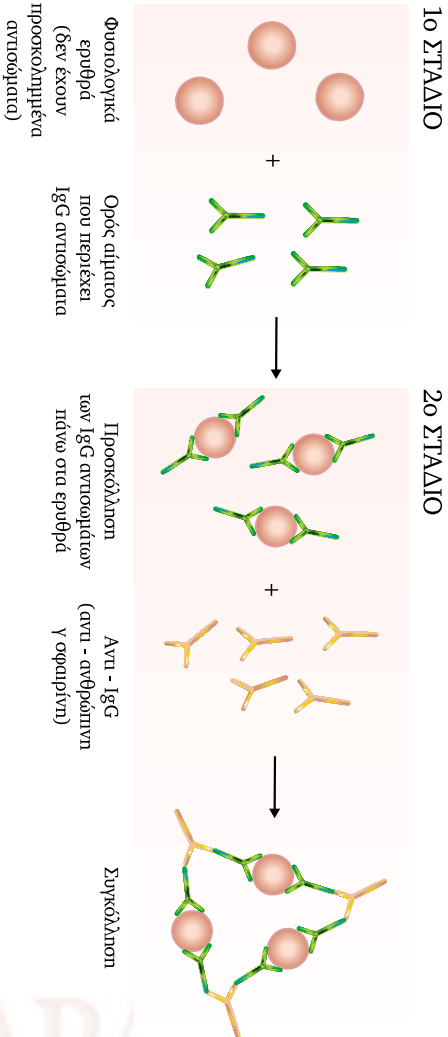
Η εξέταση αυτή πραγματοποιείται για ανίχνευση αντισωμάτων που βρίσκονται *πάνω στα ερυθρά αιμοσφαίρια*, όπως είναι τα ερυθρά των νεογνών με αιμολυτική νόσο, των ασθενών με αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία καθώς και των ασθενών με αιμολυτική αναιμία από φάρμακα.

12.6.2 Έμμεση Coombs

Η αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται όταν θέλουμε να ανιχνεύσουμε αντι-D αντισώματα τα οποία βρίσκονται *στον ορό του αίματος*. Τέτοια αντισώματα (που είναι όπως είπαμε IgG) βρίσκονται στον ορό του αίματος μητέρων Rhesus αρνητικών μετά από γέννηση Rhesus θετικού παιδιού, ή σε άτομα Rhesus αρνητικά μετά από μεταγγιση Rhesus θετικού αίματος. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται Rhesus ευαισθητοποίηση ή ισοανοσοποίηση και περιγράφεται αναλυτικά στα αντιστοιχα κεφάλαια της αιματολογίας. Τα αντισώματα αυτά δεν προκαλούν πρόβλημα στα άτομα που τα έχουν στον ορό τους γιατί είναι αντισώματα εναντίον των Rhesus **θετικών** ερυθρών αιμοσφαιρίων ενώ τα άτομα αυτά είναι Rhesus **αρνητικά**. Όμως, σε επόμενη εγκυμοσύνη Rhesus θετικού παιδιού από μητέρα που έχει ευαισθητοποιηθεί, τα IgG αντισώματα αυτά, περνούν μέσω του πλακούντα στο έμβryo και προκαλούν συγκόλληση και αιμόλυση των ερυθρών του αιμοσφαιρίων. Έχει λοιπόν μεγάλη σημασία η ανίχνευση των αντισωμάτων αυτών στον ορό του αίματος των ευαισθητοποιημένων ατόμων με την έμμεση Coombs.

Η έμμεση Coombs γίνεται σε δυο στάδια. (Σχήμα 12.6)

1. Στο πρώτο στάδιο παίρνουμε τον εξεταζόμενο ορό στον οποίο θέλουμε να ερευνήσουμε αν υπάρχουν τα IgG αντισώματα έναντι του αντιγόνου D του Rhesus (αντι-D αντισώματα).



Σχήμα 12.6: Έμμεση Coombs

Επιδίδουμε τον ορό αυτό με γνωστά φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια ομάδος 0 Rhesus θετικά, τα οποία έχουμε στο εργαστήριο για αυτόν τον σκοπό. Κατά τη διάρκεια της επώσεως τα IgG αντισώματα - αν υπάρχουν στον εξεταζόμενο ορό - προσκολλώνται πάνω στα Rhesus θετικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Μετά το τέλος της επώσεως, έχουμε ερυθρά αιμοσφαίρια με προσκολλημένα πάνω τους τους IgG αντισώματα.

2. Στο δεύτερο στάδιο κάνουμε ό,τι και στην άμεση Coombs. Προσθέτουμε δηλαδή στα ερυθρά αυτά αντι-IgG αντίσωμα (αντι-ανθρώπινη γ σφαιρίνη), που δρα σαν γέφυρα και ενώνει τα IgG αντισώματα μεταξύ τους κάνοντας ορατή τη συγκόλληση.

Βλέπουμε λοιπόν ότι η έμμεση Coombs διαφέρει από την άμεση Coombs στο ότι προηγείται ένα στάδιο στο οποίο δίνουμε την ευκαιρία στα αντισώματα που βρίσκονται στον ορό του αίματος να προσκολληθούν πάνω σε ερυθρά αιμοσφαίρια ώστε να μπορέσουμε στη συνέχεια να τα ανιχνεύσουμε με άμεση Coombs.

Η έμμεση Coombs χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση που θέλουμε να ερευνήσουμε αν υπάρχουν *στον ορό του αίματος* αντισώματα έναντι των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπως σε νυναικές Rhesus αρνητικές που γέννησαν Rhesus θετικό παιδί, ή σε άτομα Rhesus αρνητικά που έκαναν μεταγγιση Rhesus θετικού αίματος.

Η τεχνική της άμεσης και έμμεσης Coombs περιγράφεται στα αντίστοιχα κεφάλαια του βιβλίου Αιματολογίας-Αιμοδοσίας.

Πώς λαμβάνονται τα αντι-IgG αντισώματα (αντι-ανθρώπινη γ σφαιρίνη) :

Τα αντι-IgG αντισώματα (ή αλλιώς: *αντι-ανθρώπινη γ σφαιρίνη* ή *αντισφαιρινικός ορός* ή *ορός Coombs* ή *anti-human* όπως έχει επικρατήσει να λέγεται στην καθημερινή εργαστηριακή πράξη) χρησιμοποιούνται στην αντίδραση Coombs αλλά και σε πολλές άλλες εφαρμογές. Παράγονται με τον εξής τρόπο: Χορηγούμε με ένεση IgG αντίσωμα ανθρώπου σε ένα πειραματόζωο, συνήθως κουνέλι. Το IgG αντίσωμα αυτό του ανθρώπου, **δρα σαν αντιγόνο** για το κουνέλι, συνεπώς το κουνέλι παράγει αντισώματα εναντίον του (παράγει λοιπόν **αντι-IgG αντισώματα**). Τα αντισώματα αυτά κυκλοφορούν στον ορό του αίματος του κουνελιού, απ' όπου τα παίρνουμε με αιμόληψία.

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Συγκολλητινοαντίδραση ονομάζεται η ένωση ενός σωματιδιακού αντιγόνου με το ομόλογο αντίσωμα και ο σχηματισμός κροκίδων (ορατής συγκόλλησης). Διακρίνεται σε άμεση συγκόλληση και έμμεση ή παθητική συγκόλληση.

Φαινόμενο προζώνης είναι η αναστολή της συγκόλλησης λόγω περίσσειας αντισωμάτων που παρatiπρείται σε μερικές συγκολλητινοαντιδράσεις.

Η μικροβιακή συγκόλληση είναι μέθοδος άμεσης συγκόλλησης με την οποία ανιχνεύονται στον ορό των ασθενών αντισώματα εναντίον μικροβίων. Κλασικά παράδειγματα οι συγκολλητινοαντιδράσεις Vidal και Wright.

Η συγκόλληση Latex είναι μέθοδος έμμεσης (παθητικής) συγκόλλησης που χρησιμοποιεί σωματίδια πολυστυρενίου τα οποία με κατάλληλη επεξεργασία έχουν προσροφήσει πάνω στην επιφάνειά τους μόρια αντιγόνου. Κλασικές εφαρμογές της η ανίχνευση ρευματοειδούς παράγοντα (RF) και C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP).

Η παθητική αιμοσυγκόλληση είναι μέθοδος έμμεσης (παθητικής) συγκόλλησης που χρησιμοποιεί ερυθρά αιμοσφαίρια στην επιφάνεια των οποίων έχουν προσροφηθεί διάφορα αντιγόνα.

Η αντίδραση Coombs είναι συγκολλητινοαντίδραση με την οποία ανιχνεύονται IgG αντισώματα τα οποία μπορούν να προσκολλώνται πάνω στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων χωρίς να τα συγκολλούν. Τέτοια είναι τα αντισώματα εναντίον του D αντιγόνου του Rhesus. Με την άμεση Coombs ανιχνεύονται αντισώματα προσκολλημένα πάνω στα ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ με την έμμεση Coombs αντισώματα που βρίσκονται στον ορό του αίματος.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Τι είναι συγκολλητινοαντίδραση;
2. Τι είναι άμεση και τι έμμεση συγκόλληση;
3. Ποιες είναι οι φάσεις της συγκολλητινοαντιδράσεως;
4. Ποιες είναι οι προϋποθέσεις για τη δημιουργία συγκόλλησης;
5. Ποια είναι τα πλεονεκτήματα και ποια τα μειονεκτήματα των συγκολλητινοαντιδράσεων;
6. Ποιες είναι οι κυριότερες εφαρμογές των συγκολλητινοαντιδράσεων;
7. Τι είναι το φαινόμενο προζώνης; Πώς εξηγείται;
8. Τι είναι μικροβιακή συγκόλληση; Ποιες οι κυριότερες εφαρμογές της;
9. Τι είναι συγκόλληση latex; Ποιες οι κυριότερες εφαρμογές της;
10. Τι είναι η αντίδραση Coombs; Σε τι διακρίνεται;
11. Περιγράψτε εν συντομία την άμεση Coombs.
12. Τι ανιχνεύει η άμεση Coombs; Σε ποιες περιπτώσεις εφαρμόζεται;
13. Περιγράψτε εν συντομία την έμμεση Coombs.
14. Τι ανιχνεύει η έμμεση Coombs; Σε ποιες περιπτώσεις εφαρμόζεται;
15. Τι είναι η αντι-ανθρώπινη γ σφαιρίνη; Πώς αλλιώς λέγεται; Πώς παράγεται;

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13^ο

ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Ορολογικές αντιδράσεις ονομάζονται οι αντιδράσεις που γίνονται στο εργαστήριο στον ορό του αίματος των ασθενών. Με τις αντιδράσεις αυτές αναζητούνται στον ορό του αίματος αντι σώματα εναντίον μικροβίων, ιών, παρασίτων, κυττάρων, καθώς και διάφοροι παράγοντες (π.χ. ρευματοειδής παράγοντας, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη κ.α.) .

Οι ορολογικές αντιδράσεις μπορεί να ανήκουν σε διάφορα είδη αντιδράσεων αντιγόνου-αντι σώματος όπως στις συγκολλητινοαντιδράσεις, αιμολυτικές αντιδράσεις, αντιδράσεις σύνδεσης συμπληρώματος κ.λ.π.

Μερικές από τις πιο συνήθεις ορολογικές αντιδράσεις που γίνονται σήμερα στο εργαστήριο είναι οι : ASTO, CRP, RA Test, Mono test, Widal, Wright, VDRL, οι οποίες και περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

13.1 ASTO

Είναι αντίδραση με την οποία αναζητούνται στον ορό του αίματος αντι σώματα εναντίον της στρεπτολυσίνης-Ο του πυογόνου στρεπτόκοκκου (στρεπτόκοκκου ομάδας-Α) σε άτομα που πάσχουν από στρεπτοκοκκική λοίμωξη. Τα αντι σώματα αυτά ονομάζονται “αντιστρεπτολυσίνη-Ο” .

Η αντιστρεπτολυσίνη-Ο εμφανίζεται στο αίμα του ασθενούς από τις πρώτες μέρες της νόσου και ο τίτλος της (δηλαδή το ποσό των αντι σωμάτων) αυξάνει συνεχώς. Διατηρείται σε υψηλό επίπεδο όσο κρατά η αρρώστια αλλά πέφτει σιγά – σιγά όσο υποχωρεί αυτή. Αυξάνεται και πάλι σε περίπτωση υποτροπής της νόσου, γι αυτό και ο προσδιορισμός του τίτλου έχει μεγάλη διαγνωστική σημασία.

Οι συνήθεις μέθοδοι με τις οποίες αναχνεύεται ο τίτλος της αντιστρεπτολυσίνης- Ο στον ορό του αίματος είναι :

- α) Μέθοδος αναστολής της αιμόλυσης
- β) Μέθοδος συγκόλλησης σωματιδίων latex .

13.1.1 Προσδιορισμός ASTO με τη μέθοδο αναστολής της αιμόλυσης

Αρχή της μεθόδου:

Η στρεπτολυσίνη-Ο του στρεπτόκοκκου έχει την ιδιότητα να αιμολύει τα ερυθρά αιμοσφαίρια ανθρώπου και ζώων in vitro. Το αντίσωμά της (η αντιστρεπτολυσίνη) εξουδετερώνει αυτήν την αιμολυτική ικανότητα της στρεπτολυσίνης. Αν στον ορό του αίματος του αρρώστου υπάρχει αντιστρεπτολυσίνη, αυτή θα εξουδετερώσει τη στρεπτολυσίνη και δε θα προκληθεί αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Αναμινγνύουμε λοιπόν στο εργαστήριο τον εξεταζόμενο ορό με ορισμένη ποσότητα στρεπτολυσίνης. Στη συνέχεια προσθέτουμε ερυθρά αιμοσφαίρια. Αν δεν γίνει αιμόλυση, σημαίνει ότι στον ορό περιέχεται αντιστρεπτολυσίνη η οποία εξουδετέρωσε τη στρεπτολυσίνη που βάλαμε. Όσο περισσότερη αντιστρεπτολυσίνη υπάρχει στον ορό, τόσο σε μεγαλύτερες αραιώσεις ο ορός αυτός θα προκαλεί αναστολή της αιμόλυσης.

Αντιδραστήρια:

Αυτά διατίθενται έτοιμα στο εμπόριο και χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Είναι τα εξής:

1. Στρεπτολυσίνη. Φέρεται λυοφιλοποιημένη, δηλαδή αποξηραμένη σε φιαλίδια. Πριν από τη χρήση της ανασυσταίνεται με νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
2. Ρυθμιστικό διάλυμα buffer (ποικίλλει ανάλογα με την κατασκευάστρια εταιρεία)
3. Πρότυπος ορός. Είναι ορός που περιέχει γνωστή ποσότητα αντιστρεπτολυσίνης
4. Ερυθρά αιμοσφαίρια. Συνήθως είναι ερυθρά πρόβατου ή κουνελιού. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ερυθρά ανθρώπου ομάδας 0.
5. Εξεταστέος ορός. Πρέπει να είναι διαυγής. Αν είναι θολός, λιπαιμικός, ικτερικός ή αιμολυμένος είναι ακατάλληλος για την αντίδραση. Πριν από την εξέταση αδρανοποιείται στους 56 °C για 30 λεπτά.

Εκτέλεση:

1. Κάνουμε αραιώσεις του εξεταστέου ορού με το ρυθμιστικό διάλυμα. Δε γίνονται υποδιπλάσιες αραιώσεις αλλά ενδίδιμες αραιώσεις. Κάθε εργαστήριο μπορεί να χρησιμοποιεί τη μέθοδο των αραιώσεων που περιγράφει ο κατασκευαστής των αντιδραστηρίων. Τις ίδιες αραιώσεις κάνουμε και στον πρότυπο ορό. Συνήθως γίνονται 10 αραιώσεις (από 1:50 έως 1:2400).
2. Τοποθετούμε τις αραιώσεις με τη σειρά σε σωληνάρια
3. Προσθέτουμε διάλυμα στρεπτολυσίνης στα σωληνάρια
4. Ανακινούμε και τα αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά
5. Προσθέτουμε ελαιώρημα των ερυθρών στα σωληνάρια και βάζουμε το στατό στον κλίβανο των 37 °C για 45 λεπτά. Ενδίδιμεσα ανακινούμε μια-δυο φορές κάθε 15 λεπτά. Βγάζουμε από τον κλίβανο και εξετάζουμε τα σωληνάρια για παρουσία ή μη αιμόλυσης.

Ανάγνωση:

Εάν στον εξεταζόμενο ορό δεν υπάρχει καθόλου αντιστρεπτολυσίνη θα υπάρχει αιμόλυση σε όλα τα σωληνάρια. Αν όμως υπάρχει αντιστρεπτολυσίνη, αυτή θα αναστείλει την αιμόλυση στα πρώτα σωληνάρια όπου το ποσό του ορού είναι μεγαλύτερο. Όσο περισσότερη αντιστρεπτολυσίνη έχει ο ορός, τόσο η αναστολή της αιμόλυσης θα παρατηρηθεί σε περισσότερα σωληνάρια ίσως και σε όλα. Το τελευταίο σωληνάριο στο οποίο δεν υπάρχει αιμόλυση είναι ο τίτλος της αντιστρεπτολυσίνης. Κάποια σωληνάρια που δείχνουν οριακή αντίδραση πρέπει να φυγοκεντρηθούν για να καθιζήσουν τα μη αιμολυθέντα ερυθρά και να φανεί καλύτερα η παρουσία ή μη αιμόλυσης.

Πριν γίνει η ανάγνωση του τίτλου του εξεταζόμενου ορού θα πρέπει να βεβαιωθούμε ότι ο πρότυπος ορός έδωσε τον αναμενόμενο τίτλο. *Ο τίτλος της αντιστρεπτολυσίνης είναι η τελευταία αραιωση του ορού χωρίς αιμόλυση και εκφράζεται σε μονάδες Todd.*

13.1.2 Προσδιορισμός ASTO με τη μέθοδο latex

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται σωματίδια latex τα οποία είναι καλυμμένα με στρεπτολυσίνη-0. Τα σωματίδια αυτά συκολλώνονται όταν έλθουν σε επαφή με το αντίστοιχο αντίσωμα, δηλαδή με την αντιστρεπτολυσίνη-0. Τα αντιδραστήρια αυτά προσφέρονται έτοιμα στο εμπόριο και ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή.

Μπορεί να γίνει και ημιοσοτική latex με αραιώσεις του εξεταζόμενου ορού. Η latex δοκιμή δεν επιπρεάζεται από την παρουσία λιπιδίων στον ορό, από θολρότητα, ή από παρουσία χολερυθρίνης ή αιμοσφαιρίνης.

Αξιολόγηση της ASTO:

Η αντιστρεπτολυσίνη εμφανίζεται στο αίμα των πασχόντων από οξεία στρεπτοκοκκική λοίμωξη μια εβδομάδα περίπου από την έναρξη της νόσου και αυξάνεται σιγά σιγά μέχρι την 5η περίπου εβδομάδα, οπότε φθάνει και στο μέγιστο της τιμής της. Κατά τον 2ο μήνα αρχίζει να πέφτει. Μικρές ποσότητες αντισωμάτων παρατηρούνται και στον ορό υγιών που είχαν κάποτε νοσήσει και αυτό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως ηλικία, γεωγραφική θέση, κοινωνικο-οικονομικές συνθήκες, κλίμα κ.α. Τιμές πάνω από 250 μονάδες στους ενήλικες και πάνω από 333 μονάδες στα παιδιά θεωρούνται αυξημένες.

Η ASTO βγαίνει θετική σε ασθενείς με ρευματικό πυρετό, με οξεία σπειραματονεφρίτιδα και σε μικρότερα ποσοστά σε πάσχοντες από στρεπτοκοκκική πυοδερμία και οξεία αμυγδαλίτιδα. Η κύρια διαγνωστική της αξία είναι στο ρευματικό πυρετό.

13.2 CRP

Η CRP (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη) είναι μια σφαιρίνη που υπάρχει φυσιολογικά στον ορό του αίματος σε συγκέντρωση < 1 mg/dl. Το ποσό της όμως στον ορό αυξάνει όταν υπάρχει ενεργός φλεγμονή, καταστροφή ιστών και κακοήγης εξέλιξη, γι'αυτό και έχει σημασία ο προσδιορισμός της. Το όνομά της οφείλεται στο ότι ενώνεται με το C πολυσακχαριδικό αντιγόνο του πνευμονόκοκκου και σχηματίζει ίζημα.

Οι μέθοδοι ανίχνευσής της είναι :

- α) μέθοδος συγκόλλησης latex που γίνεται σε πλάκα και χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα στα εργαστήρια γιατί είναι απλή και γρήγορη, αλλά δίνει ποιοτικά ή ημιοσοτικά αποτελέσματα και
- β) η νεφελωμετρία που είναι μέθοδος εκλογής διότι συνδυάζει ακριβή ποσοτική μέτρηση, μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα και έχει αντικαταστήσει όλες τις άλλες μεθόδους.

13.2.1 Προσδιορισμός CRP με τη μέθοδο latex

Χρησιμοποιούνται σωματίδια latex καλυμμένα με αντίσωμα έναντι της CRP. Αντιδραστήριο latex μαζί με πλάκidia και μέρτυρες διατίθενται από διάφορες εταιρίες. Η αντίδραση γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και μπορεί να είναι απλή ανίχνευση ή ημιοσοτικός προσδιορισμός. Μικροδιαφορές στην τεχνική υπάρχουν ανάλογα με την εταιρία, σε γενικές γραμμές όμως κάνουμε τα εξής:

- Στην απλή ανίχνευση**
1. Βάζουμε σε αντικειμενοφόρο πλάκα μια σταγόνα του εξεταστέου ορού χωρίς καμιά αραιωση και από μια σταγόνα θετικού και αρνητικού μάρτυρα.
 2. Προσθέτουμε σε όλες τις σταγόνες από μια σταγόνα του εναλωρήματος latex.
 3. Ανακατεύουμε τις σταγόνες με ξεχωριστό ραβδάκι. Ανακινούμε και μετά από 3-5 λεπτά διαβάζουμε για συγκόλληση συγκρίνοντας πάντα με το θετικό και αρνητικό μάρτυρα. Δεν πρέπει να καθυστερήσουμε να το διαβάσουμε γιατί μετά από 5 λεπτά μπορεί να εμφανιστεί μη ειδική συγκόλληση. Επίσης, αν ο ορός είναι πολύ λιπαρικός μπορεί να δώσει μη ειδική συγκόλληση.

Στον ημιποσοτικό προσδιορισμό

Κάνουμε την ίδια αντίδραση αλλά με αραιώσεις του εξεταστέου ορού.

Οι αραιώσεις γίνονται με ισότονο διάλυμα Nacl και είναι: 1:20 1:40 1:80 1:160 κ.ο.κ.

Ο τίτλος της CRP θα είναι η τελευταία αραιωση που εξακολουθεί να δίνει συγκόλληση.

Αξιολόγηση της CRP:

Η CRP αυξάνει σε μικροβιακές λοιμώξεις, ρευματικό πυρετό, ρευματοειδή αρθρίτιδα, νεοπλασμάτα, χειρουργικές επεμβάσεις, εγκαύματα, έμφραγμα του μυοκαρδίου κ.α. Ο ποσοτικός προσδιορισμός διαδοχικών δειγμάτων βοηθά στην παρακολούθηση της νόσου, στην εκτίμηση της βαρύτητας της λοίμωξης και της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Για αυτό, για τον προσδιορισμό της προτιμάται σήμερα η **νεφελόμετρία** που δίνει ποσοτικά αποτελέσματα με μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία. Τίμές CRP 1-10 mg/dl θεωρούνται μέτρια αύξηση και >10 mg/dl σαφής αύξηση.

13.3 Ρευματοειδής Παράγοντας (RF)

Ο ρευματοειδής παράγοντας (RF) είναι αντίσωμα έναντι του Fc κλάματος της IgG. Ανήκει κυρίως στις IgM ανοσοσφαιρίνες μπορεί όμως να είναι και IgG ή IgA, ακόμα και IgE ή IgD. Χαρακτηριστικά, ο ρευματοειδής παράγοντας αυξάνει στη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Οι μέθοδοι προσδιορισμού του RF που έχουν χρησιμοποιηθεί από παλιά είναι οι **συγκολλητινοαντιδράσεις, κυρίως η αντίδραση latex**. Σήμερα, μέθοδος εκλογής με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα που δίνει επιπλέον και ποσοτικά αποτελέσματα είναι η **νεφελόμετρία** που έχει αντικαταστήσει τις άλλες μεθόδους, κυρίως στα νοσοκομειακά εργαστήρια. Περιγράφεται όμως και η μέθοδος latex για λόγους διδακτικούς και διότι βρίσκεται ακόμη εφαρμογές στα μικρά εργαστήρια. Η συγκολλητινοαντίδραση και η νεφελόμετρία ανιχνεύουν IgM ρευματοειδή παράγοντα. Οι άλλοι ρευματοειδείς παράγοντες ανιχνεύονται με ELISA ή ραδιοανοσολογικές μεθόδους και ζητούνται σε ειδικές μόνο περιπτώσεις.

13.3.1 RA test - δοκιμή latex

Χρησιμοποιούνται σωματίδια latex καλυμμένα με IgG ανοσοσφαιρίνη και αναζητείται στον ορό του αίματος αντίσωμα έναντι της IgG (δηλαδή ρευματοειδής παράγοντας). Τα αντιδραστήρια της μεθόδου προσφέρονται στο εμπόριο από όλους σχεδόν τους οίκους και περιλαμβάνουν και

θετικό και αρνητικό μάρτυρα. Η αντίδραση γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, αλλά κατά βάση η τεχνική και η αξιολόγηση είναι περίπου ίδιες.

Αρχή της μεθόδου:

Σωματίδια latex καλυμμένα με IgG ανοσοσφαιρίνη συγκολλώνται όταν έρθουν σε επαφή με ρευματοειδή παράγοντα.

Εκτέλεση:

1. Πάνω σε γυάλινη πλάκα συγκολλητινοαντιδράσεων τοποθετούμε μια σταγόνα του εξεταστέου ορού που τον έχουμε αραιώσει 1:20 με το ρυθμιστικό διάλυμα που περιλαμβάνεται στη συσκευασία. Επίσης τοποθετούμε ξεχωριστά μια σταγόνα από το θετικό και μια από τον αρνητικό μάρτυρα.
2. Βάζουμε κοντά σε κάθε μια από τις τρεις σταγόνες από μια σταγόνα αντιγόνο latex.
3. Με ξεχωριστή οδοντογλυφίδα ή γυάλινο ραβδάκι ανακατεύουμε τον κάθε ορό με το αντιγόνο.
4. Ανακινούμε την πλάκα κυκλικά πίσω - μπρος επί 1 έως 5 λεπτά, παρατηρώντας για εμφάνιση συγκόλλησης. Πρώτα εξετάζουμε τους μάρτυρες. Ο θετικός πρέπει να παρουσιάσει γρήγορη και σαφή συγκόλληση, ενώ ο αρνητικός θα πρέπει να παραμείνει ομοιογενής. Εμφανόμενα αποτελέσματα μπορεί να βγουν αν ο εξεταζόμενος ορός είναι λιπαρικός, αν αργήσει να διαβαστεί το αποτέλεσμα, αν το latex μπήκε στην κατάψυξη.

Ερμηνεία:

Η δοκιμή βγαίνει θετική στο 80-90% των πασχόντων από ρευματοειδή αρθρίτιδα. Επίσης βγαίνει θετική σε υψηλά ποσοστά στο σύνδρομο Sjögren και σε χαμηλότερα ποσοστά σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, όπως στο συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ), σκληρόδερμα, μικτή νόσο του συνδετικού ιστού κ.α. Μπορεί να βγει θετική και σε μερικούς ασθενείς που πάσχουν από οξείες και χρόνιες λοιμώξεις (όπως ιογενείς λοιμώξεις, λέπρα, φυματίωση, σύφιλη, υποξεία ενδοκαρδίτιδα κ.α.), σε νεοπλασμάτα, αλλά και σε μικρό ποσοστό φυσιολογικών ατόμων, κυρίως μεγαλύτερης ηλικίας.

13.3.2 Ημιποσοτική RA δοκιμή

1. Κάνουμε πρώτα σε μια σειρά σωληναρίων υποδιπλάσιες αραιώσεις του εξεταζόμενου ορού 1:20 1:40 1:80 1:160 1:320.
2. Μια σταγόνα από την κάθε αραιωση μεταφέρεται πάνω στην πλάκα.
3. Προστίθεται από μια σταγόνα του αντιδραστηρίου latex, γίνεται η αντίδραση όπως περιγράφεται παραπάνω και στη συνέχεια διαβάζεται το αποτέλεσμα.

13.4 Mono test

Η εξέταση χρησιμοποιείται για την εργαστηριακή διάγνωση της λοιμώδους μονοπυρήνωσης. Η λοιμώδης μονοπυρήνωση (ΔΜ) είναι νόσος προκαλούμενη από τον ιό Epstein Barr που ανήκει στην ομάδα των ερπητοϊών. Στη λοιμώδη μονοπυρήνωση, εκτός από τα ειδικά αντι σώματα που παράγονται εναντίον του ιού Epstein Barr, εμφανίζονται στον ορό του ασθενή και αντι σώματα

ετερόφιλα που λέγονται έτσι γιατί *συγκολλούν ερυθρά αιμοσφαίρια άλλων ειδών όπως ίππου, προβάτου και άλλων ζώων*. Αυτά τα ετερόφιλα αντισώματα (ή Paul-Bunnell αντισώματα) ανιχνεύονται με το mono test.

Αρχή της μεθόδου:

Στο mono test χρησιμοποιούμε ερυθρά αιμοσφαίρια ίππου και ελέγχουμε αν συγκολλώνται με τον ορό του ασθενούς. Αν τα ερυθρά συγκολληθούν, σημαίνει ότι στον ορό υπάρχουν τα ετερόφιλα αντισώματα.

Παρατηρήσεις πάνω στη μέθοδο:

Στον ορό του αίματος μερικών ατόμων μπορεί να υπάρχουν και άλλα ετερόφιλα αντισώματα που δεν έχουν σχέση με τη λοιμώδη μονοπυρήνωση (όπως ετερόφιλα αντισώματα ορονοσίας που παράγονται μετά από αντιετανικό ορό με ορό ίππου). Αυτά τα ετερόφιλα αντισώματα μπορεί να παρέμβουν στην αντίδραση και να προκαλέσουν λανθασμένο αποτέλεσμα. Γι αυτό στο mono test χρησιμοποιούνται ερυθρά αιμοσφαίρια ίππου ειδικά κατεργασμένα με φορμόλη και καλυμμένα με σωματίδια latex τα οποία ***συγκολλώνται μόνο με τα ετερόφιλα αντισώματα της λοιμώδους μονοπυρήνωσης*** και όχι με τα άλλα ετερόφιλα αντισώματα.

Τα αντιδραστήρια προσφέρονται έτοιμα στο εμπόριο σε μορφή kit που περιλαμβάνει θετικό και αρνητικό μάρτυρα (controls) και η αντίδραση γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι οδηγίες πρέπει να ακολουθούνται με μεγάλη ακρίβεια για την αποφυγή ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων.

Αξιολόγηση

Τα ετερόφιλα αντισώματα εμφανίζονται περί το τέλος της πρώτης εβδομάδας της νόσου. Η δοκιμασία ανιχνεύει ετερόφιλα αντισώματα στο 90% περίπου των περιπτώσεων λοιμώδους μονοπυρήνωσης στους ενήλικες, σε παιδιά όμως - ιδιαίτερα κάτω των 4 ετών- σε μικρότερα ποσοστά. Επειδή στα παιδιά συνήθως εμφανίζονται τα αντισώματα αργότερα σε σχέση με τους ενήλικες, μια αρνητική εξέταση δεν αποκλείει τη νόσο και χρειάζεται επανέλεψη.

13.5 Widal

Είναι αντίδραση μικροβιακής συγκόλλησης (συγκολλητινοαντίδραση) κατά την οποία ανιχνεύονται στον ορό του αίματος του αρρώστου αντισώματα έναντι των *σαλμονελλών*. Τα αντισώματα αυτά εμφανίζονται στον ορό του αίματος ανθρώπου που πάσχει από γενικευμένη *σαλμονέλλωση* (τυφοειδή ή παράτυφο) κατά το τέλος της πρώτης εβδομάδας της νόσου.

Αντιδραστήρια

Για την εκτέλεση της αντίδρασης χρειάζονται:

- 1. Τα αντιγόνα των *σαλμονελλών*.
- 2. Ο ορός του αρρώστου.

Ως αντιγόνα χρησιμοποιούνται το σωματικό αντιγόνο O και το βλεφαριδικό αντιγόνο H των *σαλμονελλών*. Τα αντιγόνα αυτά λαμβάνονται έτοιμα από το εμπόριο. Στην Ελλάδα οι γενικευμένες *σαλμονελλώσεις* οφείλονται κατά κανόνα στη *σαλμονέλλα* του τυφοειδούς και του παράτυφου B.

Γι αυτό χρησιμοποιούνται στη Widal τα σωματικά και βλεφαριδικά αντιγόνα και των δυο αυτών *σαλμονελλών* ως εξής:

Σαλμονέλλα τύπου: σωματικό αντιγόνο (TO) και βλεφαριδικό αντιγόνο (TH)

Σαλμονέλλα παράτυφου B: σωματικό αντιγόνο (BO) και βλεφαριδικό αντιγόνο (BH)

Η συγκολλητινοαντίδραση γίνεται σε *σαλινάρια* με διαδοχικές αραιώσεις του εξεταζόμενου ορού και ολοκληρώνεται σε 2 μέρες.

13.5.1 Widal σε σαλινάρια:

Εκτέλεση:

1. Γίνονται υποδιπλάσιες αραιώσεις του υπό εξέταση ορού (από 1:20 μέχρι 1:320) σε ισοόνοιο NaCl. Θα χρειαστούμε δυο χωριστά στατό με 2 σειρές *σαλινάρια* στο καθένα, μια σειρά μπροστά και μια πίσω. Το ένα στατό είναι για τις H συγκολλήσεις (με τα TH αντιγόνα μπροστά και τα BH αντιγόνα πίσω) και το άλλο για τις O συγκολλήσεις (με τα TO αντιγόνα μπροστά και τα BO αντιγόνα πίσω).

2. Διαμοιράζονται με τη σειρά οι υποδιπλάσιες αραιώσεις του ορού σε όλα τα *σαλινάρια* και στη συνέχεια τοποθετούνται ίσο όγκοι αντιγόνου σε κάθε μια από τις 4 σειρές, ήτοι από το TH στην 1^η σειρά, από το BH στη 2^η σειρά, από το TO στην 3^η σειρά και από το BO στην 4^η σειρά. Με τον τρόπο αυτό οι αραιώσεις του ορού υποδιπλασιάζονται και οι τελικές αραιώσεις γίνονται από 1:40 μέχρι 1:640.

3. Το στατό με τα H αντιγόνα μεταφέρεται σε υδατόλουτρο 50° C όπου αφήνεται για 2 ώρες. Μετά παραμένει για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου για να κατακαθίσουν τα συγκολλήματα, γίνεται μια πρώτη ανάγνωση και στη συνέχεια τοποθετείται στο ψυγείο για την τελική ανάγνωση την άλλη μέρα.

Το στατό με τα O αντιγόνα φέρεται στον κλίβανο των 37° C, όπου αφήνεται για 2 ώρες και μετά τοποθετείται στο ψυγείο για να διαδοστεί το αποτέλεσμα την άλλη μέρα.

Ανάγνωση της Widal.

Διαβάζουμε το αποτέλεσμα κοιτάζοντας τον πυθμένα κάθε *σαλιναρίου* χωριστά πάνω από ένα μεγεθυντικό καθρέφτη. Πρώτα διαβάζουμε χωρίς να ανακινήσουμε τα *σαλινάρια* και μετά ξαναδιαβάζουμε με ανακίνηση. Με την ανακίνηση μπρος στο μεγεθυντικό καθρέφτη μπορούμε να δούμε τις οριακές συγκολλήσεις ιδιαίτερα με τα O-αντιγόνα. Οι εικόνες των συγκολλήσεων που περιμένουμε είναι οι εξής:

Η H-συγκόλληση χαρακτηρίζεται από μεγάλες κροκίδες σε όλη την έκταση του πυθμένα του *σαλιναρίου*. Με την ελαφρά ανακίνηση δεν σπάνε αλλά φαίνονται καλύτερα. Η O-συγκόλληση χαρακτηρίζεται από λεπτές κροκίδες που είναι συγκεντρωμένες σε μικρότερη περιοχή του πυθμένα του *σαλιναρίου*. Στην ανακίνηση εύκολα διασκορπίζονται.

Τίτλος συγκόλλησης είναι η τελευταία αραιωση που δίνει συγκόλληση. Στην απάντηση πρέπει να αναγράφεται ο τίτλος για όλα τα αντιγόνα. Παράδειγμα θετικής Widal σε περιπτώση τυφοειδούς πυρετού είναι π.χ:

TH 1:320 TO 1:160 BH – BO –

13.5.2 **Widal σε πλάκα**

Εκτός από την Widal σε σωληνάρια γίνεται και η Widal σε πλάκα. Είναι μια προκαταρκτική ταχεία μέθοδος. Τα αντιγόνα υπάρχουν έτοιμα σε σετ μαζί με θετικό και αρνητικό μάρτυρα.

Εκτέλεση:

Η εξέταση γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, σε γενικές γραμμές ως εξής: Σε μια γυάλινη πλάκα βάζουμε διαδοχικά ελαττούμενες ποσότητες του εξεταζόμενου ορού. Προσθέτουμε από μια σταγόνα αντιγόνου σε κάθε μια από τις σταγόνες του ορού. Ανακατεύουμε με μια οδοντογλυφίδα από την τελευταία αραιώση προς την πρώτη.

Ανακινούμε την πλάκα στα χέρια μας προς-πίσω 15-20 φορές ώστε να ανακατευτεί καλά το αντιγόνο με τον ορό για 1 λεπτό και διαβάζουμε την συγκόλληση μπρος σε φωτεινή επιφάνεια. Παράλληλα εξετάζουμε με τον ίδιο τρόπο τον θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα. Η ανάγνωση πρέπει να γίνει γρήγορα. Με τον αρνητικό μάρτυρα δεν πρέπει να γίνει συγκόλληση. Με τον θετικό μάρτυρα πρέπει να γίνει συγκόλληση στην αραιώση που δίνει ο κατασκευαστής συνήθως στην αραιώση 1:80

Αξιολόγηση της Widal

Η εξέταση Widal είναι σχετικά περιορισμένης διαγνωστικής αξίας σήμερα, διότι έχουν βελτιωθεί οι μέθοδοι απομόνωσης της σαλμονέλλας από τα κλινικά υλικά. Επιπλέον από πολλούς παράγοντες που κάνουν δύσκολη την αξιολόγηση του αποτελέσματος, όπως το ότι σε κάθε πληθυσμό υπάρχουν υγιή άτομα που έχουν αντισώματα προς τα αντιγόνα O ή /και H των σαλμονελλών.

Η Widal είναι αρνητική την πρώτη εβδομάδα της νόσου και αρχίζει να γίνεται θετική μετά τη δεύτερη εβδομάδα. Ατομικοί παράγοντες όπως η ηλικία, η λίγη αντιβιοτικών στην αρχή της νόσου κ.α. μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή αντισωμάτων. Επίσης, το εμβόλιο TAB (τυφοειδής, παρτύφου Α και παρτύφου Β) μπορεί να αφήσει αντισώματα για διάφορα χρονικά διαστήματα.

Από την ανάλυση αυτή προκύπτει ότι δεν υπάρχει ένας ορισμένος τίτλος αντισωμάτων που χαρακτηρίζει θετική τη δοκιμασία Widal. Μόνο η **αύξηση του τίτλου στην πορεία της νόσου** μπορεί να αποτελέσει ένδειξη ενεργής λοίμωξης. Άρα συνιστάται να υπάρχουν δυο δείγματα του ορού, ένα στην αρχή της νόσου και ένα μετά τη 10^η μέρα, οπότε, αν βρεθεί άνοδος του τίτλου κατά δυο σωληνάρια (άνω του τετραπλάσιου) θεωρείται θετικό το αποτέλεσμα.

Η μέθοδος μπορεί να γίνει και με συγκολλητινοαντίδραση latex ή με παθητική αιμοσυγκόλληση με ερυθρά αιμοσφαίρια ευαισθητοποιημένα (καθυμμένα) με τα O και H αντιγόνα σαλμονελλών. Είναι μέθοδοι ταχείες και προκαταρκτικές.

13.6 **Wright**

Είναι αντίδραση μικροβιακής συγκόλλησης (συγκολλητινοαντίδραση). Κατ’ αυτήν ανακινούνται αντισώματα έναντι των βρουκέλλων στον ορό του αίματος ασθενών που πάσχουν από βρουκέλλωση (μελινταίο πυρετό). Χρησιμοποιείται ευρύτατα στα εργαστήρια. Σαν αντιγόνο χρησιμοποιείται στέλεχος Br.abortus που έχει νεκρωθεί με θέρμανση. Η συγκολλητινοαντίδραση αυτή γίνεται με αραιώσεις του ορού σε σωληνάρια ή σε πλάκα.

13.6.1 **Wright σε σωληνάρια**

Αντιδραστήρια:

- 1. Το αντιγόνο είναι εναιώρημα καλλιεργήματος της Br.abortus στέλεχος 1019 που έχει μεγάλη αντιγονική σταθερότητα και μειωμένη παθογόνο δράση. Φέρεται έτοιμο στο εμπόριο.
- 2. Ο ορός του αρρώστου πρέπει να είναι διαυγής και όχι αιμόλυμένος.
- 3. Το αραιωτικό υγρό με το οποίο θα γίνουν οι αραιώσεις του ορού είναι κοινό NaCl 0,85%. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί πυκνό διάλυμα NaCl 5% για να εξουδετερωθεί η εμφάνιση προζώνης.
- 4. Ο θετικός μάρτυρας είναι ορός γνωστού τίτλου, τον οποίο αραιώνουμε όπως και το εξεταστέο δείγμα για να δούμε αν θα δώσει τον αναμενόμενο τίτλο.

Εκτέλεση:

- 1. Σε μια σειρά από 10 σωληνάρια κάνουμε υποδιπλασίες αραιώσεις του εξεταζόμενου ορού.
- 2. Προσθέτουμε σε όλα τα σωληνάρια το αντιγόνο.
- 3. Ανακινούμε το στατό και το τοποθετούμε στον κλίβανο των 37° C, όπου το αφήνουμε μέχρι την επόμενη και μεθεπόμενη μέρα (48ωρο) και διαβάζουμε. Μετά τις πρώτες 24 ώρες κάνουμε την πρώτη ανάγνωση και αν είναι θετική η αντίδραση ειδοποιούμε την κλινική, αλλά η τελική ανάγνωση του τίτλου θα γίνει μετά 48ωρη επίταση. Τίτλος της αντίδρασης είναι η τελευταία αραιώση στην οποία παρατηρείται συγκόλληση.

Παρατηρήσεις

Πρόβλημα μπορεί να παρατηρηθεί με το φαινόμενο προζώνης, όπου στις μικρές αραιώσεις του ορού δεν παρατηρείται συγκόλληση λόγω της περιόσεως των αντισωμάτων (βλέπε κεφάλαιο ΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΟΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ) Το φαινόμενο προζώνης μπορεί να αποφευχθεί με δυο τρόπους: α) αν χρησιμοποιήσουμε σαν αραιωτικό διάλυμα πυκνό διάλυμα NaCl 5% ή β) αν προσθέσουμε αντι-ανθρώπινη γ σφαιρίνη (anti-human ή αντισφαιρινικό ορό ή ορό Coombs όπως επίσης ονομάζεται). Η αντι-ανθρώπινη γ σφαιρίνη θα συνδεθεί με τα αντισώματα που είναι προσκολλημένα πάνω στις βρουκέλλες και θα τα συμπληρώσει μεταξί τους κάνοντας ορατή συγκόλληση. Η αντίδραση Wright στην οποία προστίθεται αντισφαιρινικός ορός ονομάζεται **“Wright Coombs”** και περιγράφεται παρακάτω.

Αξιολόγηση της Wright

Τίτλος 1:40 και κάτω δεν αξιολογείται σαν θετικός. Τίτλος 1:80 θεωρείται οριακός και θα αξιολογηθεί ανάλογα με την περίπτωση, αν δηλαδή ο ασθενής είναι κάτοικος πόλεων που δεν έχει καμιά σχέση με την κτηνοτροφία, αν είναι η πρώτη φορά που αρρωσταίνει με συμπτώματα ύποπτα για βρουκέλλωση κ.λ.π. Συνιστάται τότε να ξαναγίνει δοκιμή με νέο δείγμα που θα ληφθεί μετά από μια ή δυο εβδομάδες. Αν όμως ο ασθενής έχει σχέση με κτηνοτροφία, αν έρχεται σε επαφή με ζώα (κρεοπώλη, κτηνίατρος), ή μένει σε περιοχή όπου ενδημεί η νόσος, τίτλος 1:80 θα θεωρηθεί αρνητικός. Τα ίδια περίπου ισχύουν και για τίτλο 1:160. Τίτλος όμως 1:320 δεν μπορεί να αγνοηθεί και θεωρείται ενδεικτικός ότι το άτομο πάσχει από βρουκέλλωση.

13.6.2 Wright σε πλάκα

Το αντιγόνο είναι πυκνό εναίωρημα του προτύπου στελέχους που χρησιμοποιείται και στη μέθοδο των σωληναρίων. Προσφέρεται έτοιμο στο εμπόριο σε συσκευασία μαζί με την πλάκα και τους μάρτυρες.

Εκτέλεση

Ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή. Σε γενικές γραμμές:

- 1. Στην πλάκα τοποθετούνται διαδοχικά ελαττούμενες ποσότητες του εξεταζόμενου ορού.
- 2. Προσθέτουμε από μια σταγόνα του αντιγόνου.
- 3. Ανακατεύουμε με οδοντογλυφίδα αρχίζοντας από την τελευταία αραιώση του ορού.
- 4. Ανακινούμε συνεχώς την πλάκα μπρος-πίσω και κυκλικά για 3 λεπτά και διαβάζουμε.

Σε θετική αντίδραση θα δούμε λεπτή συγκόλληση. Τίτλος αντισωμάτων είναι η τελευταία αραιώση που παρουσιάζει σαφή συγκόλληση. Η μέθοδος έχει το προσόν ότι είναι ταχεία και δεν απαιτεί σωληνάρια. Είναι καλή για προκαταρκτική εξέταση αλλά δεν έχει επαναληψιμότητα στον τίτλο. Είναι μέθοδος για μικρά εργαστήρια ή για ορεπιδημιολογικές μελέτες

13.6.3 Wright Coombs

Γνωρίζουμε ότι στον ορό ασθενών υπάρχουν τα λεγόμενα “στερή” αντισώματα, τα οποία προσκολλώνται μεν πάνω στις βρουκέλλες αλλά δεν προκαλούν τη συγκόλλησή τους. Αυτό συμβαίνει στις μικρές αραιώσεις του ορού λόγω περισείας των αντισωμάτων σε σχέση με τα αντιγονικά μόρια της βρουκέλλας (φαινόμενο πρόωσης). Για να γίνει ορατή η συγκόλληση προσθέτουμε αντιφαιρινικό ορό (anti-human, ή αντι-ανθρώπινη γ σφαιρίνη, ή ορό Coombs) που είναι αντίσωμα έναντι των αντισωμάτων των προσκολλημένων πάνω στις βρουκέλλες. Ο ορός αυτός αναγνωρίζει τα αντισώματα αυτά, ενώνεται μ’ αυτά και λειτουργώντας σαν γέφυρα ανάμεσά τους συμπλησιάζει τα κύτταρα της βρουκέλλας επί των οποίων είναι προσκολλημένα και τα συγκολλά.

Αντιδραστικότητα

- 1. Αντιφαιρινικός ορός έτοιμος στο εμπόριο
- 2. Αντιγόνο εναίωρημα νεκρό B.abortus

Εκτέλεση:

- 1. Γίνονται σε σωληνάρια υποδιπλάσιες αραιώσεις του εξεταζόμενου ορού με φυσιολογικό διάλυμα NaCl.
- 2. Προσθέτουμε αντιγόνο σε όλα τα σωληνάρια.
- 3. Αφήνουμε το στατό σε υδατόλουτρο 37° C για 2 ώρες.
- 4. Φυγοκεντρούνται τα σωληνάρια στις 3000 στροφές για 5 λεπτά. Πετιέται το υπερκείμενο, προστίθεται φυσιολογικό διάλυμα NaCl και ξαναφυγοκεντρείται. Επαναλαμβάνεται το πλύσιμο αυτό τρεις φορές για να φύγει κάθε ίχνος από τον ορό και τελικά επαναιώνονται τα ίζηματα σε φυσιολογικό διάλυμα NaCl.
- 5. Προστίθεται σε κάθε σωληνάριο από 1 σταγόνα αντιφαιρινικού ορού αραιωμένου 1:50.
- 6. Φέρεται το στατό στον κλίβανο των 37° C όπου αφήνεται μέχρι την άλλη μέρα οπότε και το διαβάζουμε.

Ανώνυμοι:

Διαβάζεται όπως κάθε συγκολλητινοαντίδραση. Αν δεν υπάρχουν αντιβρουκέλλικά αντισώματα δεν θα παρατηρηθεί συγκόλληση σε κανένα σωληνάριο. Αν υπάρχουν θα εμφανιστεί συγκόλληση. Η τελευταία αραιώση του ορού που δίνει πλήρη συγκόλληση δηλώνει τον τίτλο των αντισωμάτων.

Ερμηνεία:

Η δοκιμή αυτή δίνει συχνότερα θετική σε σχέση με τη Wright και σε υψηλότερο τίτλο. Θετικός θεωρείται τίτλος από 1:160 και άνω.

13.7 VDRL

Η αντίδραση VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) είναι κροκιδωτική δοκιμή, ανήκει στις συγκολλητινοαντιδράσεις και με αυτήν αναζητούνται στον ορό του αίματος αντισώματα τα οποία εμφανίζονται σε άτομα που έχουν προσβληθεί από το μικρόβιο της σύφιλης (δηλαδή από το ωχρό τρεπόννημα ή ωχρά σπειροχαιτη όπως ονομάζεται).

Τα αντισώματα αυτά αντιδρούν με αντιγόνο καρδιολιπίνης. Η καρδιολιπίνη είναι ένα φωσφολιπίδιο που βρίσκεται στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων σε πολλά όργανα του σώματος. Τα αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης που ανιχνεύονται σε ασθενείς με σύφιλη οφείλονται στην αντίδραση του μικροβίου με τους ιστούς του ασθενούς.

Αντιδραστικότητα:

- 1. Αντιγόνο καρδιολιπίνης
- 2. Ρυθμιστικό διάλυμα με NaCl 1%
- 3. Θετικός μάρτυρας
- 4. Αρνητικός μάρτυρας
- 5. Ορός του αρρώστου

Τα αντιδραστήρια προσφέρονται από τις εταιρίες σε κτλ. Η εξέταση γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πριν την έναρξη, ο προς εξέταση ορός αδροντοποιείται στους 56° C για 30 λεπτά.

Εκτέλεση:

- 1. Σε πλάκα τίθεται αδραντοποιημένος ορός
 - 2. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα του αντιγόνου.
 - 3. Γίνεται ανακίνηση της πλάκας και ακολουθεί ανάγνωση της στο μικροσκόπιο. Η ύπαρξη κροκίδων χαρακτηρίζει την αντίδραση ως θετική. Η ίδια διαδικασία γίνεται και με τον θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα.
- Μπορεί να γίνει και ποσοτική VDRL με αραιώσεις του ορού.

Αξιολόγηση:

Η VDRL χρησιμοποιείται ευρύτατα στην καθημερινή πράξη για την εργαστηριακή διάγνωση της σύφιλης. Βγαίνει θετική συνήθως 4-6 εβδομάδες μετά τη μόλυνση, είναι δε σε πολύ ψηλά ποσοστά θετική -σχεδόν πάντα - στο δεύτερο στάδιο της νόσου. Ο τίτλος της πέφτει με τη θεραπεία, γι αυτό είναι χρήσιμη δοκιμασία για τον έλεγχο του θεραπευτικού αποτελέσματος (δείκτης ίασης).

Επειδή όμως τα αντισώματα που ανιχνεύει η VDRL είναι αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης και όχι ειδικά αντισώματα έναντι του μικροβίου, η αντίδραση μπορεί να βγει θετική και σε μερικές άλλες περιπτώσεις όπου επίσης παρατηρούνται αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης. Έτσι η εξέταση βγαίνει ψευδώς θετική σε άτομα που πάσχουν από κολλαγνώσεις, λέπρα, ελονοσία, λοιμώδη μονοκυρήνωση, ηπατίτιδα και άλλα λοιμώδη νοσήματα, πιθανόν σε εγκυμοσύνη κ.λπ. Άρα, σε περίπτωση θετικής VDRL πρέπει να γίνει επιβεβαίωση με ειδικές δοκιμασίες που ανιχνεύουν αντισώματα **ειδικά** έναντι του μικροβίου. Η θετική VDRL για να θεωρηθεί διαγνωστική για σύφιλη πρέπει να συσχετίζεται και με άλλα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα.

Μολονότι η VDRL δεν είναι ειδική για τη σύφιλη, η μεγάλη ευαισθησία της, αλλά και η ευκολία και η ταχύτητα στην εκτέλεσή της καθώς και το χαμηλό της κόστος την κάνει εξαιρετικά χρήσιμη στην καθημερινή εργαστηριακή πράξη.

13.8 RPR

Η αντίδραση RPR (Rapid Plasma Reagin) είναι τροποποίηση της VDRL. Το αντιγόνο είναι το ίδιο (καρδιολιπίνη) αλλά επί πλέον περιέχει κοκκία άνθρακα που κάνουν την κροκίδωση εντονότερη και εύκολα ορατή με γυμνό μάτι. Έχει την ίδια ευαισθησία και την ίδια ειδικότητα με την VDRL.

Οι ορολογικές αντιδράσεις είναι αντιδράσεις που γίνονται στον ορό του αίματος των ασθενών. Με τις αντιδράσεις αυτές αναζητούνται στον ορό του αίματος αντισώματα έναντι μικροβίων, ιών, παρασίτων, καθώς και διάφοροι παράγοντες, όπως ο ρευματοειδής παράγοντας, η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη κ.α. Οι πιο συνηθισμένες ορολογικές αντιδράσεις είναι οι εξής:

Η ASLO, που αναζητά στον ορό του αίματος αντισώματα έναντι της στρεπτολυσίνης-0 του πτυογόνου στρεπτοκόκκου σε άτομα που πάσχουν από στρεπτοκοκκική λοίμωξη. Η συνήθης μέθοδος ανίχνευσής της είναι η μέθοδος αναστολής της αιμόλυσης. Μπορεί όμως να χρησιμοποιηθεί και η μέθοδος latex.

Η CRP, που προσδιορίζει το ποσό της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης στον ορό του αίματος. Το ποσό αυτό αυξάνει σε ενεργό φλεγμονή, καταστροφή ιστών και νεοπλασίες. Οι συνήθεις μέθοδοι προσδιορισμού της είναι η μέθοδος latex και η νεφελόμετρία η οποία είναι και μέθοδος εκλογής γιατί συνδυάζει ακριβή ποσοτική μέτρηση, μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα.

Ο Ρευματοειδής παράγοντας (RF) που είναι αντίσωμα έναντι του Fc κλάσματος της IgG και βρίσκεται αυξημένος κυρίως στη ρευματοειδή αρθρίτιδα αλλά και σε άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, σε οξείες και χρόνιες λοιμώξεις, νεοπλασίες κ.λ.π. Κλασική μέθοδος ανίχνευσής του υπήρξε η μέθοδος latex, σήμερα όμως μέθοδος εκλογής είναι η νεφελόμετρία που συνδυάζει μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα και δίνει ποσοτικά αποτελέσματα.

Το Monο test που ανιχνεύει τα ετερόφιλα αντισώματα που παράγονται στην λοιμώδη μονοκυρήνωση και βοηθά στην εργαστηριακή διάγνωση της νόσου.

Η Widal που είναι αντίδραση μικροβιακής συγκόλλησης (συγκολλητινοαντίδραση) με την οποία ανιχνεύονται στον ορό του αίματος αντισώματα έναντι των σαλμονελλών.

Η Wright που είναι αντίδραση μικροβιακής συγκόλλησης (συγκολλητινοαντίδραση) με την οποία ανιχνεύονται στον ορό του αίματος αντισώματα έναντι των βρουκελλών.

Η VDRL και η RPR που είναι κροκιδωτικές δοκιμές με τις οποίες αναζητούνται στον ορό του αίματος αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης τα οποία παράγονται σε ασθενείς με σύφιλη

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

- 1. Τι ονομάζουμε ορολογικές αντιδράσεις; Ποιες είναι οι πιο συνηθισμένες ορολογικές αντιδράσεις που γίνονται στο εργαστήριο;
- 2. Τι ανιχνεύει η ASTO; Με ποιες μεθόδους γίνεται συνήθως ο προσδιορισμός της;
- 3. Πότε είναι αυξημένη η ASTO;
- 4. Τι είναι η CRP; Ποιες είναι οι μέθοδοι ανίχνευσής της και ποια είναι η μέθοδος εκλογής (η μέθοδος που προτιμάται);
- 5. Πότε αυξάνει η CRP;
- 6. Τι είναι ο ρευματοειδής παράγοντας; Με ποιες μεθόδους τον προσδιορίζουμε; Ποια είναι η μέθοδος εκλογής;
- 7. Σε ποιες περιπτώσεις είναι θετικός ο ρευματοειδής παράγοντας;
- 8. Τι είναι το Mono test ;
- 9. Τι είναι η Widal; Πώς αξιολογείται;
- 10. Τι είναι η Wright; Πώς αξιολογείται;
- 11. Τι είναι η Wright Coombs; Γιατί γίνεται;
- 12. Τι είναι η VDRL;
- 13. Πότε βγαίνει ψευδώς θετική η VDRL;
- 14. Τι είναι η RPR;

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14°

ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ

Είναι από τις παλαιότερες ορολογικές διαγνωστικές μεθόδους. Με αυτές αναζητούμε στον ορό του αίματος αντισώματα που με το ορόλογο αντιγόνο σχηματίζουν σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος το οποίο συνδέει και καταναλώνει το συμπλήρωμα. Κλασική εφαρμογή των αντιδράσεων αυτών είναι η αντίδραση **Wasserman** στη σύφιλη. Η αντίδραση σύνδεσης του συμπληρώματος μπορεί να εφαρμοστεί εκτός από τη σύφιλη και σε πολλά άλλα μικροβιακά, ιογενή και παρασιτικά νοσήματα. Παλαιότερα είχε χρησιμοποιηθεί και στην ελνικοκκίαση (αντίδραση Weinberg). Σήμερα αυτές οι αντιδράσεις δεν χρησιμοποιούνται πια και εδώ γίνεται μια σύντομη αναφορά στην αντίδραση Wasserman για λόγους κυρίως διδακτικούς.

Αρχή της μεθόδου σύνδεσης του συμπληρώματος:

Γνωρίζουμε ότι κάθε αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος προκαλεί την σύνδεση συμπληρώματος. Η σύνδεση αυτή του συμπληρώματος όμως δεν είναι ορατή, γι αυτό προστίθεται σε δεύτερη φάση ένας δείκτης. Σαν δείκτης χρησιμοποιούνται ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου και ορός ζώου που περιέχει αντισώματα προς τα ερυθρά αυτά. Αυτό είναι το λεγόμενο αιμολυτικό σύστημα. Για να δράσει το αιμολυτικό σύστημα και να αιμολύσει τα ερυθρά, πρέπει να υπάρχει ελεύθερο συμπλήρωμα (να μην έχει δεσμευτεί στην προηγούμενη φάση από σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος). Αν δεν υπάρχει ελεύθερο συμπλήρωμα (έχει δηλαδή δεσμευτεί στην προηγούμενη φάση), δεν θα γίνει αιμόλυση. Συνεπώς θετική είναι η αντίδραση σύνδεσης του συμπληρώματος, όταν το συμπλήρωμα που θα βάλουμε δεσμευτεί όλο στην πρώτη φάση οπότε δεν θα γίνει αιμόλυση στη δεύτερη φάση.

14.1 Αντίδραση Wasserman

Φάσεις της αντίδρασης:

Στην Wasserman αναζητούμε στον ορό του ασθενούς αντισώματα έναντι της καρδιολιδίνης που εμφανίζονται σε ασθενείς με σύφιλη (για τα αντισώματα αυτά μιλήσαμε και στο προηγούμενο κεφάλαιο της VDRL). Η αντίδραση Wasserman γίνεται σε δυο φάσεις.

1^η φάση:

- 1. Φέρνουμε σε επαφή τον εξεταζόμενο ορό με αντιγόνο καρδιολιδίνης. Αν στον ορό υπάρχουν αντισώματα έναντι της καρδιολιδίνης, θα ενωθούν με το αντιγόνο και θα σχηματιστεί σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος.
- 2. Στη συνέχεια προσθέτουμε συμπλήρωμα, το οποίο **θα συνδεθεί** από το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος. Η πρώτη φάση ολοκληρώθηκε, η αντίδραση όμως αυτή δεν δίνει ορατό αποτέλεσμα. Πρέπει με κάποιο τρόπο να διαπιστώσουμε αν συνδέθηκε το συμπλήρωμα. Για να γίνει ορατό το αποτέλεσμα προχωρούμε στην δεύτερη φάση

2^η φάση:

Για να δούμε αν συνδέθηκε το συμπτήρωμα που βάλαμε στην πρώτη φάση, προσθέτουμε ένα **αιμολυτικό σύστημα**. Δηλαδή μίγμα ερυθρών προβάτου με αντιπροβάτειο αιμολυτικό ορό. Ο αντιπροβάτειος αιμολυτικός ορός έχει την ιδιότητα να αιμολύει τα ερυθρά του προβάτου με την παρουσία συμπηλνήρωματος. Αν στη δεύτερη φάση υπάρχει ελεύθερο συμπηλνήρωμα (δεν δεσμεύτηκε δηλαδή στην πρώτη φάση), αυτό θα συνδεθεί με το αιμολυτικό σύστημα και θα προκληθεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η αντίδραση αυτή γίνεται ορατή σαν αιμόλυση.

Ερμηνεία της αντίδρασης - Περιπτώσεις:

A) Αν στον ορό του αίματος **υπάρχουν αντι σώματα** έναντι της καρδιολιπίνης, αυτά θα ενωθούν με το αντιγόνο, και το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος θα συνδέσει το συμπτήρωμα που προσθέσαμε. Όταν στη συνέχεια, στη 2^η φάση, προσθέσουμε το αιμολυτικό σύστημα δεν θα υπάρχει συμπηλνήρωμα (αφού συνδέθηκε στην 1^η φάση) και **δεν θα γίνει αιμόλυση. Η Wasserman είναι θετική.**

B) Αντίθετα, αν στον εξετάζόμενο ορό **δεν υπάρχουν αντι σώματα**, δεν θα συνδεθεί το συμπηλνήρωμα στην 1^η φάση της δοκιμής, θα παραμείνει ελεύθερο και όταν στη 2η φάση προσθέσουμε το αιμολυτικό σύστημα **θα γίνει αιμόλυση. Η Wasserman είναι αρνητική.**

Αρα :	Απουσία αιμόλυσης	=	Θετική Wasserman
	Αιμόλυση	=	Αρνητική Wasserman

Αντιδραστήρια

1. Αντιγόνο καρδιολιπίνης: Είναι αλκοολικό διάλυμα εκχυλίσματος καρδιάς βοδιού που περιέχει χοήνωση και λεκθίνη. Είναι τυποποιημένο και προσφέρεται έτοιμο στο εμπόριο.
2. Συμπληρώμα: Είναι ορός αίματος ινδοχοίρου. Προσφέρεται έτοιμο στο εμπόριο λυοφιλιοποιημένο. Η αναούστασή του γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες.
3. Αιμολυτικό σύστημα. Αποτελείται από ερυθρά πρόβάτου και αιμολυτικό αντιπροβάτειο ορό (δηλαδή αντισώματα έναντι των ερυθρών του προβάτου που προκαλούν αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων). Ο αιμολυτικός ορός είναι ορός ίππου ή κουνελιού που ανοσοποιήθηκε προς τα ερυθρά αιμοσφαίρια του προβάτου. Παρασκευάζεται μετά από επανειλημμένες ενέσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου σε ίππο ή κουνέλι, οπότε παράγονται αντισώματα έναντι των τους που τα παίρνουμε με αιμόληψη.
4. Θετικός μάρτυρας. Μπορεί να είναι ορός αίματος θετικού αρρώστου ή να τον αγοράσουμε έτοιμο από το εμπόριο.
5. Ορός αίματος του εξεταζόμενου. Πριν από την εξέταση αδρανοποιείται στους 56° για 30 λεπτά.

Αξιολόγηση του αποτελέσματος:

Όπως η VDRL έτσι και η Wasserman ανιχνεύει αντισώματα έναντι της καρδιολιπίνης. Τα αντισώματα αυτά δεν παρατηρούνται μόνο στη σύφιλη αλλά και σε άλλα νοσήματα. Έτσι η Wasserman βγαίνει ψευδώς θετική στις νόσους που βγαίνει και η VDRL (Λέπρα, ελονοσία, κολλογονώσεις, λοιμώδη μονοπυρήνωση, ηπατίτιδα κ.λπ.). Ένας τρόπος για να ξεχωρίσει μια ψευδώς θετική Wasserman από μια αληθινή θετική αντίδραση είναι να δώσουμε πενικιλίνη.

Αν πρόκειται για σύφιλη, στην επανάληψη της εξέτασης θα πάρουμε αρνητικό αποτέλεσμα, ενώ αν πρόκειται για ψευδώς θετική, η αντίδραση θα παραμείνει θετική και μετά τη λήψη πενικιλίνης.

Οι δοκιμές VDRL και Wasserman λέγονται **μη τρεπονημικές** (επειδή το αντιγόνο που χρησιμοποιούν δεν είναι αντιγόνο του μικροβίου ωχρού τρεπονήματος αλλά είναι αντιγόνο καρδιολιπίνης). Οι δοκιμές αυτές βγαίνουν θετικές στο 70-77 % των ασθενών που πάσχουν από πρωτογενή, όψιμη, ή λανθάνουσα σύφιλη. Στη δευτερογενή όμως σύφιλη τα ποσοστά είναι πολύ μεγαλύτερα (90 % και πλέον). Οι αντιδράσεις αυτές έχουν το πλεονέκτημα ότι αρνητικοποιούνται μετά την επιτυχημένη θεραπεία και την ίαση, δηλαδή **χρησιμεύουν ως δείκτης ίασης της νόσου.**

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Οι αντιδράσεις σύνδεσης του συμπληρώματος είναι ορολογικές αντιδράσεις που βασίζονται στην ιδιότητα που έχουν τα συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος να συνδέουν το συμπλήρωμα. Η σύνδεση όμως του συμπληρώματος δεν φαίνεται, γ' αυτό χρησιμοποιούμε σε δεύτερη φάση ένα αιμολυτικό σύστημα (ερυθρά προβάτου με αντιπροβάτειο ορό).

Αν υπάρχει στον εξεταζόμενο ορό το ομόλογο αντίσωμα, θα ενωθεί με το αντιγόνο και θα συνδεθεί το συμπλήρωμα, οπότε δεν απομένει συμπλήρωμα ελεύθερο για να προκαλέσει αιμόλυση του αιμολυτικού συστήματος (μη αιμόλυση = θετική αντίδραση). Αντίθετα, αν λείπει το αντίσωμα, το συμπλήρωμα δε συνδέεται, μένει ελεύθερο και προκαλεί αιμόλυση του αιμολυτικού συστήματος (αιμόλυση = αρνητική αντίδραση).

Κλασική εφαρμογή της αντίδρασης σύνδεσης του συμπληρώματος είναι η αντίδραση Wasserman που χρησιμοποιήθηκε στην ορολογική διάγνωση της σύφιλης.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Ποια είναι η αρχή της μεθόδου σύνδεσης του συμπληρώματος;
2. Περιγράψτε με συντομία την Wasserman. Πότε θα πούμε ότι είναι θετική και πότε αρνητική;
3. Ποιο αντιγόνο χρησιμοποιείται στην Wasserman;
4. Τι είναι το αιμολυτικό σύστημα;
5. Πώς αξιολογείται το αποτέλεσμα της Wasserman. Πότε βγαίνει ψευδώς θετική;

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 15°

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΕΞΗΜΑΣΜΕΝΟΥ

ΑΝΤΙΤΟΝΟΥΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

15.1 Γενικά για τα φθοριοχρώματα, ραδιοϊσότοπα και ένζυμα

Ένας μεγάλος αριθμός ανοσολογικών τεχνικών έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια και εφαρμόζεται συστηματικά πλέον στο ανοσολογικό εργαστήριο και όχι μόνο. Αυτές οι τεχνικές εκμεταλλεύονται την αντίδραση αντιγόνου - αντι σώματος (Ag-Ab), δηλαδή την ιδιότητα των αντισωμάτων να αναγνωρίζουν ανάμεσα από πλήθος άλλων ουσιών τα αντιστοιχα προς αυτά αντιγόνα, και να σχηματίζουν ανοσοσυμπλέγματα. Επίσης, χρησιμοποιούν την επίσημανση είτε του αντιγόνου είτε του αντισώματος με κάποιες ύοσιές που επιτρέπουν την εύκολη σχετικά ανίχνευση και μέτρηση τους. Είναι πλέον σχετικά απλή υπόθεση η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός αντιγόνων όπως οι πρωτεΐνες του ορού, οι ορμόνες και διάφοροι καρκινικοί δείκτες που μας βοηθούν στην επιτυχή διάγνωση ασθενειών.

Το 1941 ο Coons, πρωτοπορούσας τη σήμανση ειδικών αντισωμάτων με φθορίζουσες χρωστικές ενώ το 1959 οι R. S. Yalow και S. R. Berson, οι οποίοι τιμήθηκαν με βραβείο Nobel το 1977, χρησιμοποίησαν αντιγόνο επισημασμένο με ραδιοϊσότοπο για την μέτρηση της ινσουλίνης. Τέλος το 1966, οι Avrameas και Hriελ στη Γαλλία ταυτόχρονα με τους Nakane και Pierce χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά τα ένζυμα για την ταυτοποίηση και εντοπισμό αντιγόνων. Ανάλογα με το τρόπο επίσημανσης που χρησιμοποιείται κάθε φορά έχουν αναπτυχθεί και οι αντίστοιχες μέθοδοι, όπως είναι ο **ανοσοφθορισμός** στην περίπτωση των φθορίζουσων χρωστικών, η **ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA)** στην περίπτωση των ραδιοϊσοτόπων και η **ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA)** στην περίπτωση των ενζύμων τις οποίες και θα εξετάσουμε αναλυτικά παρακάτω.

15.2 Ανοσοφθορισμός

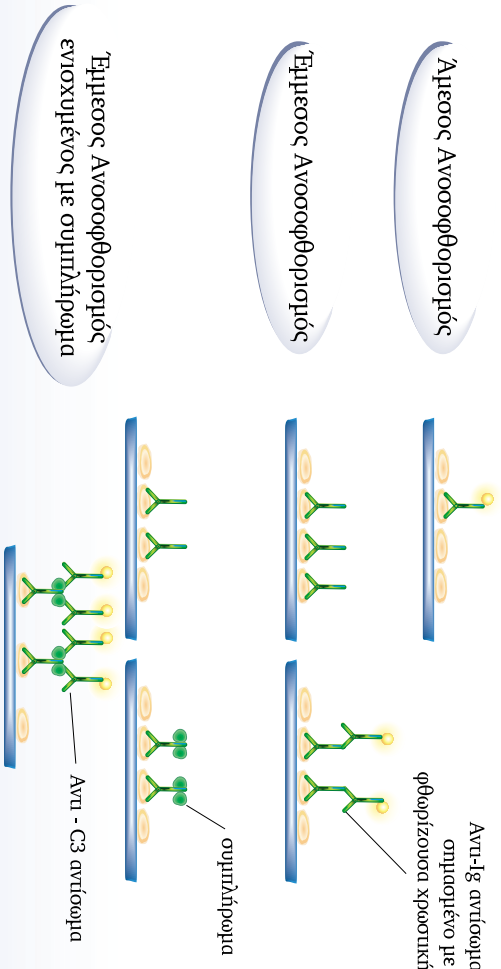
Ανοσοφθορισμός είναι η μέθοδος ανίχνευσης αντιγόνων ή αντισωμάτων σε βιολογικά υλικά με τη χρήση οεσημασμένων αντισωμάτων με φθορίζουσες χρωστικές. Χρησιμοποιείται για τον *in situ* (επί τόπου) εντοπισμό μιας πρωτεΐνης σ' ένα κύτταρο ή ιστό. Πρόκειται για απλή μέθοδο στην εφαρμογή της, η οποία παρουσιάζει μεγάλη επαναληψιμότητα και χρησιμοποιείται τόσο για ερευνητικούς όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς. **Φθορισμός** ονομάζεται το φαινόμενο της εκπομπής δευτερεύουσας φωτεινής ακτινοβολίας από ένα διεγερμένο μόριο. Οι φθορίζουσες χρωστικές χρησιμοποιούνται για τη σήμανση αντισωμάτων.

Οι τεχνικές του ανοσοφθορισμού διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, στον **άμεσο** και **έμμεσο** ανοσοφθορισμό.

Στον άμεσο ανοσοφθορισμό η φθορίζουσα χρωστική προσδένεται άμεσα στο ειδικό αντίσωμα και εφορμόζεται στην τομή ή στα μονιμοποιημένα κύτταρα οχηματίζοντας φθορίζον συμπλήρωμα εντοπισμένο στη θέση του αντιγόνου.

Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιούμε μη επισημασμένο αντίσωμα έναντι του αντιγόνου που εξετάζουμε και στη συνέχεια προσθέτουμε δεύτερο αντίσωμα σηματομένο με φθορίζουσα χρωστική το οποίο παρουσιάζει ειδικότητα έναντι της σταθερής περιοχής του ήδη χρησιμοποιημένου αντι σώματος. Το αποτέλεσμα είναι η ενίσχυση του σήματος φθορισμού γιατί σε κάθε δεσμευμένο πρώτο αντίσωμα προσδένονται πάνω από ένα φθορίζοντα αντί σώματα, με συνέπεια την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου.

Αρχή λειτουργίας των Ανοσοφθορισμών



Εικόνα 15.1 Η αρχή λειτουργίας των Ανοσοφθορισμών.

Η διαδικασία που ακολουθείται στον έμμεσο ανοσοφθορισμό είναι η ακόλουθη: Παρασκευάζονται μονόστιβα κυτάρων σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Τα κύτταρα μονιμοποιούνται με φορμαλδεΐδη. Τα παρασκευάσματα επωάζονται με το αντίσωμα έναντι του αντιγόνου που θέλουμε να εντοπίσουμε. Ακολουθεί επώαση με το δεύτερο αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με τη φθορίζουσα ουσία. Μια επιπλέον παραλλαγή της παραπάνω τεχνικής είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός, ενισχυμένος από συμπλήρωμα. Τα παρασκευάσματα εξετάζονται σε ειδικό μικροσκόπιο φθορισμού.

Ραδιοανοσοδογική μέθοδος (RIA)

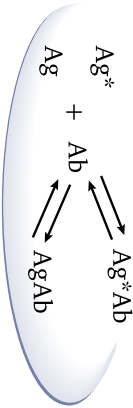
Αρχή λειτουργίας της μεθόδου



Ag = Αντιγόνο Ab = Αντίσωμα
AgAb = Σύμπλοκο αντιγόνου - αντισώματος



Ag* = Ραδιενεργό σηματομένο αντιγόνο
Ag*Ab = Ραδιοϊχνηθετημένο σύμπλοκο αντιγόνου - αντισώματος



Εικόνα 15.2 Αρχή λειτουργίας της Ραδιοανοσοδογικής μεθόδου (RIA). Η Ραδιοανοσοδογική μέθοδος σπριζίζεται στην ανταγωνιστικότητα ενός επισημασμένου αντιγόνου με το ίδιο μη επισημασμένο αντιγόνο για τις θέσεις δέσμευσης του αντίστοιχου αντισώματος το οποίο βρίσκειται σε περιορισμένη ως προς το αντιγόνο συγκέντρωση.

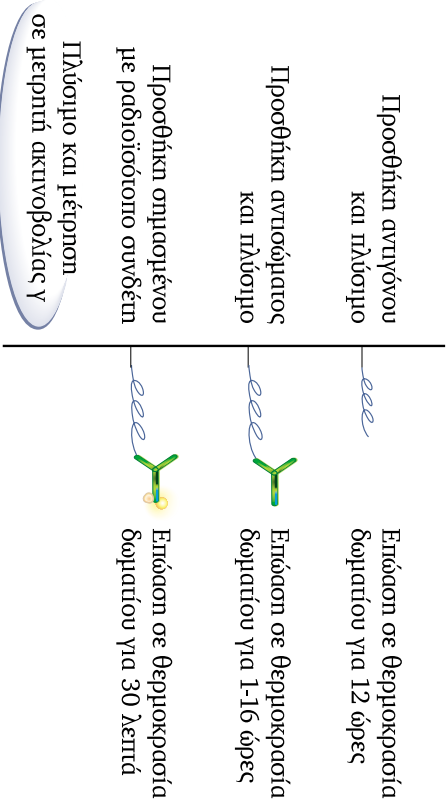
15.3 Ραδιοανοσοδογική μέθοδος (RIA)

Πρόκειται για μια απλή, ευαίσθητη μέθοδο η οποία παρουσιάζει υψηλή ακρίβεια ενώ είναι εξαιρετικά οικονομική. Αρχή της μεθόδου είναι η **ανταγωνιστική τεχνική ή μέθοδος του περιορισμένου αντιδραστήριου**.

Χρησιμοποιούμε ραδιενεργά επισημασμένο αντιγόνο το οποίο ανταγωνίζεται με το προς μέτρηση αντιγόνο για την πρόσδεση σε περιορισμένη ποσότητα του αντίστοιχου αντισώματος. Όσο περισσότερο είναι ποσοτικά το μη σηματομένο ή ‘ψυχρό’ αντιγόνο τόσο λιγότερο επισημασμένο αντιγόνο θα προσδένεται στο αντίσωμα, τόσο ασθενέστερο θα είναι το σήμα και αντίστροφα.

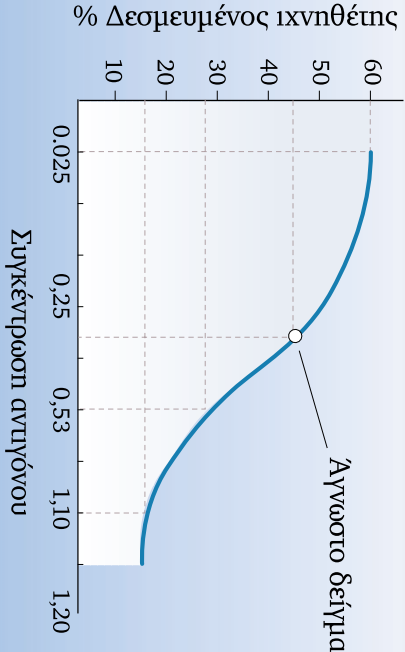
Ραδιοανοσοδογική μέθοδος (RIA)

Διαγραμματική απεικόνιση της μεθόδου



Εικόνα 15.3 Διαγραμματική απεικόνιση της Ραδιοανοσοδογικής μεθόδου (RIA). Το μη επισημασμένο αντιγόνο αποτελεί στη ραδιοανοσοανάλυση (RIA), είτε πρότυπο διάλυμα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, είτε το προς εξέταση δείγμα.

Καμπύλη αναφοράς για ραδιοανοσοδογική ανάλυση (RIA)



Εικόνα 15.4 Πρότυπη καμπύλη σε Ραδιοανοσοδογική ανάλυση (RIA).

Η μέτρηση της ραδιενέργειας του σύμπλοκου σημασμένου αντιγόνου - αντισώματος γίνεται σε μετρητή ακτινοβολίας γ.

Η χρήση ραδιενεργών ουσιών απαιτεί την απαραίτητη τήρηση κάποιων πρακτικών από το προσωπικό. Τα κυριότερα μέτρα προστασίας είναι:

α. Η χρήση των ραδιενεργών ουσιών γίνεται σε προκαθορισμένο χώρο με περιορισμένη πρόσβαση του προσωπικού σε αυτόν.

β. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πάντα μιας χρήσης, ποδιά εργαστηρίου και να πλένονται τα χέρια μετά από κάθε επιμέρους εργασία.

γ. Η απόρριψη των ραδιενεργών καταλοίπων πρέπει να γίνεται σε προκαθορισμένους χώρους σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς.

15.4 Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA)

Η πιο πρόσφατη μέθοδος προσδιορισμού του συμπλέγματος αντιγόνου - αντισώματος είναι η ανοσοενζυμική τεχνική και πιο συγκεκριμένα η μέθοδος ELISA. Πρόκειται για απλή στην εκτέλεσή της τεχνική, η οποία προσφέρει μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια, δεν απαιτεί ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό (εκτός από φωτόμετρο με κατάλληλα φίλτρα) ενώ κυκλοφορεί μεγάλος αριθμός προτυποποιημένων δοκιμασιών (kit) για ένα πολύ μεγάλο φάσμα εφαρμογών. Η αρχή λειτουργίας των ανοσοενζυμικών μεθόδων (ELISA) είναι η κάτωθι:

Ανίχνευση του συμπλέγματος αντιγόνου - αντισώματος ή ακινητοποιημένου αντισώματος με τη χρήση αντισώματος ομοιοποδικά συνδεδεμένου με ένζυμο.

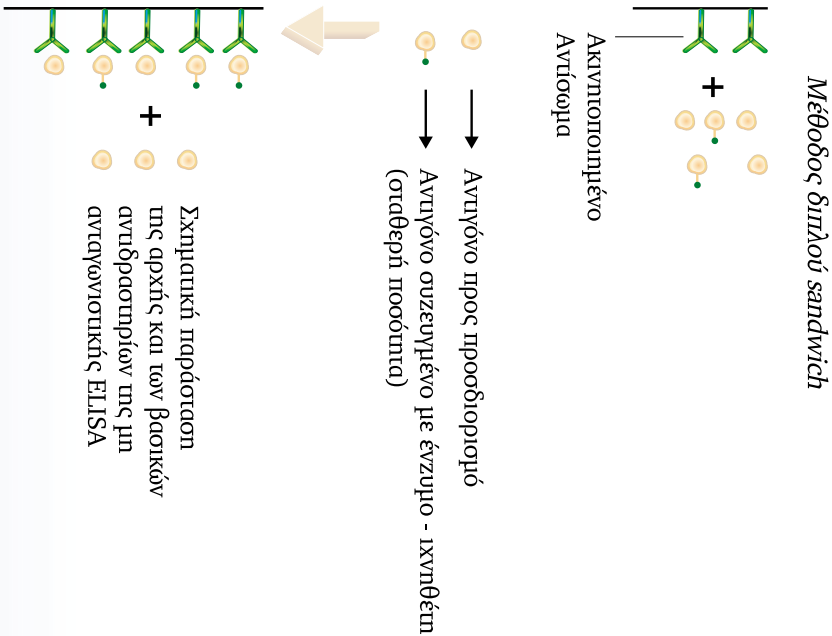
Το ένζυμο με την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος (άχρωμο) καταλύει την αντίδραση η οποία καταλήγει στον σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος

Η ποσότητα του χρώματος (άρα και του προϊόντος) είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου.



Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι διακρίνονται τόσο σε **ανταγωνιστικές**, όπως στην περίπτωση της ραδιοανοσοανάλυσης (RIA) όσο και σε **μη ανταγωνιστικές** (μέθοδος sandwich). Η αρχή λειτουργίας της ανταγωνιστικής μεθόδου είναι ίδια με της ραδιοανοσοδογικής μεθόδου με την εξαίρεση της σημασης του αντιγόνου με ένζυμο.

Ανταγωνιστική ανοσενzymική μέθοδος (ELISA)

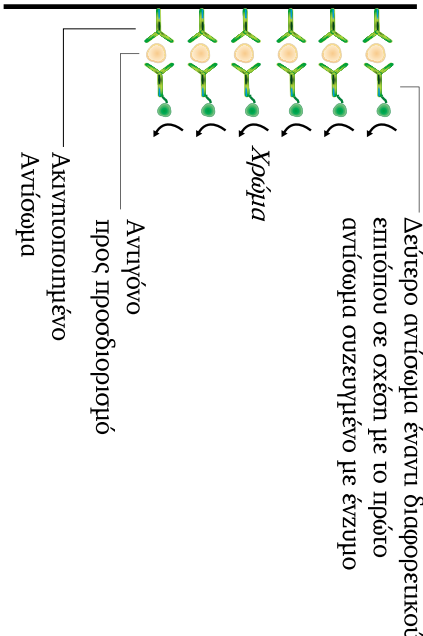


Εικόνα 15.5 Διαγραμματική απεικόνιση της ανταγωνιστικής ανοσενzymικής μεθόδου (ELISA).

Στις μη ανταγωνιστικές ανοσοανδλύσεις (ανοσοανδλύσεις δυο θέσεων), χρησιμοποιούνται δυο αντισώματα, ένα επισημασμένο και ένα μη επισημασμένο, ανεπτυγμένα έναντι δυο διαφορετικών επιτόπων της προσδιοριζόμενης ουσίας. Τα αντισώματα αυτά παράδουν το μετρούμενο μόριο υπό μορφή "sandwich". Σε αντίθεση με την ανοσοανδύση ανταγωνιστικού τύπου, στην περίπτωση αυτή όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του αντιγόνου, τόσο περισσότερο επισημασμένο αντίσωμα δεσμεύεται.

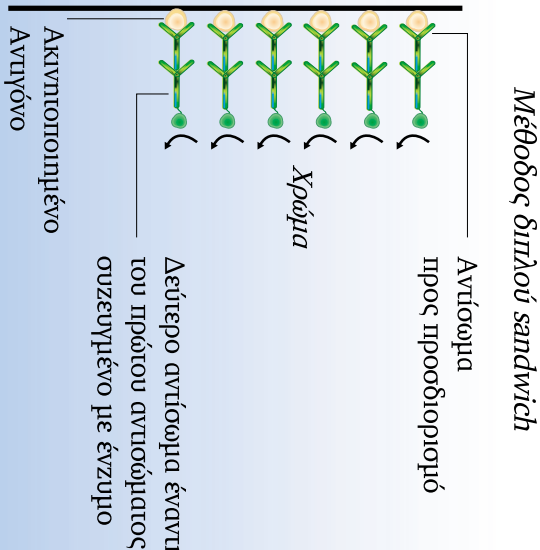
Σε μια άλλη μορφή μη ανταγωνιστικής ανοσοανδύσης, που χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό τίτλου αντισωμάτων, το προς μέτρηση αντίσωμα συνδέεται με το αντιγόνο και στη συνέχεια συνδέεται στο ανοσοσύμπλεγμα επισημασμένο αντίσωμα έναντι του προς μέτρηση αντισώματος.

Μέθοδος Sandwich (ELISA)



Εικόνα 15.6 Διαγραμματική απεικόνιση της μη ανταγωνιστικής ανοσενzymικής μεθόδου (ELISA).

Μη ανταγωνιστικές ανοσενzymικές μέθοδοι (ELISA)



Εικόνα 15.7: Διαγραμματική απεικόνιση της μη ανταγωνιστικής ανοσενzymικής μεθόδου (ELISA) με τη μέθοδο του διπλού sandwich.

Τα συννηθέστερα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στις ανοσοενζυμικές μεθόδους (ELISA) είναι η αλκαλική φωσφατάση, η υπεροξειδάση του ραπανού και η β-γαλακτοσιδάση. Τα αντίστοιχα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται είναι η φωσφορική π-νιτροφαινόλη και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης είναι μεταξύ 10 και 30 λεπτών.

15.5 Νεότερες Μέθοδοι

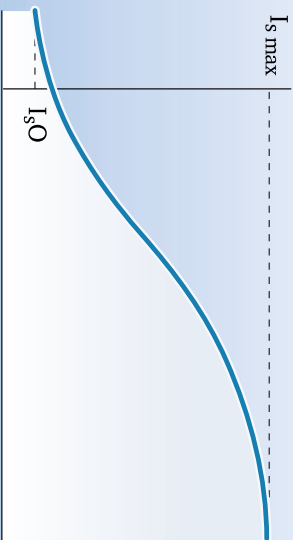
15.5.1 Νεφελομετρία

Πρόκειται για μέθοδο μέτρησης της συγκέντρωσης διαφόρων ουσιών στα βιολογικά υγρά. Αφορά κυρίως πρωτεΐνες οι οποίες αντιδρούν με τα αντι σώματά τους σχηματίζοντας συμπλέγματα αντιγόνου - αντισώματος.

Η νεφελομετρία είναι μέθοδος μέτρησης της σκέδασης του φωτός, όταν δέσμη ακτίνων από μια φωτεινή πηγή πέσει σε σωματίδια ή μακρομόρια (ανοσοσυμπλέγματα) που βρίσκονται σε ένα διάλυμα. Το ποσοστό του σκεδαζόμενου φωτός από τα συμπλέγματα αντιγόνου - αντισώματος είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της ουσίας (πρωτεΐνη). Το φως που περνά ή που ανακλάται, μετρείται με κοινά φωτόμετρα ή με φασματοφωτόμετρα. Υπάρχει όμως και η δυνατότητα χρήσης και ειδικών οργάνων όπως είναι τα **νεφελόμετρα**. Πρόκειται για εξειδικευμένα όργανα μέτρησης εκπνεπόμενου φωτός, προσαρμοσμένα στην συγκεκριμένη μέθοδο, τα οποία επιτρέπουν την εξέταση μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Υπάρχουν διάφορες νεφελομετρικές μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούνται για την μέτρηση της συγκέντρωσης του αντιγόνου. Προκειμένου να γίνουν νεφελομετρικοί προσδιορισμοί στο νεφελόμετρο είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσουμε πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης, για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς. Η καμπύλη αναφοράς είναι συνάρτηση της έντασης του σκεδασμένου φωτός (I_s) και της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.

Καμπύλη αναφοράς για νεφελομετρικούς προσδιορισμούς



Συγκέντρωση πρωτεϊνών
Εικόνα 15.8: Πρότυπη καμπύλη για νεφελομετρικούς προσδιορισμούς.

Η νεφελομετρία προσφέρει μια σειρά από πλεονεκτήματα όπως είναι η ευκολία χρήσης των αυτόματων αναλυτών, η μεγάλη ακρίβεια της μεθόδου και η υψηλή ταχύτητα μετρήσεων μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA, IgM καθώς και της CRP, του RF και των παραγόντων του συμπληρώματος. Έχει χρησιμοποιηθεί και για τη μέτρηση παραγόντων της πήξης, φαρμάκων και ορμονών. Η νεφελομετρία είναι ακριβής, ταχεία, εύκολη στην εφαρμογή της, έχει καλή ευαισθησία και ειδικότητα, δυνατότητα μέτρησης χαμηλών συγκεντρώσεων και είναι αυτο-ματοποιημένη.

15.5.2 Θολερομετρία

Η θολερομετρία χρησιμοποιείται όπως και η νεφελομετρία για την εκτίμηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά. Σε αυτή την περίπτωση όμως μετράμε την μείωση της έντασης του προσπίπτοντος φωτός κατά τη διέλευσή του από το διάλυμα των συμπλεγμάτων πρωτεΐνης - αντιπρού.

Η θολερομετρία χρησιμοποιείται επίσης και για τη μέτρηση της δραστηριότητας των αντιβιοτικών, βιταμινών κτλ. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούμε καλλιέργειες βακτηρίων στις οποίες προσθέτουμε σε κατάλληλες αραιώσεις τα αντιβιοτικά που μελετούμε. Όσο μεγαλύτερη είναι η θολρότητα που οφείλεται στη βακτηριακή ανάπτυξη, τόσο μικρότερα είναι η δραστηριότητα του αντιβιοτικού.

Η ευαισθησία της μεθόδου είναι περίπου ίδια με της νεφελομετρίας με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται εξίσου με τη νεφελομετρία στην καθημερινή εργαστηριακή πρακτική.

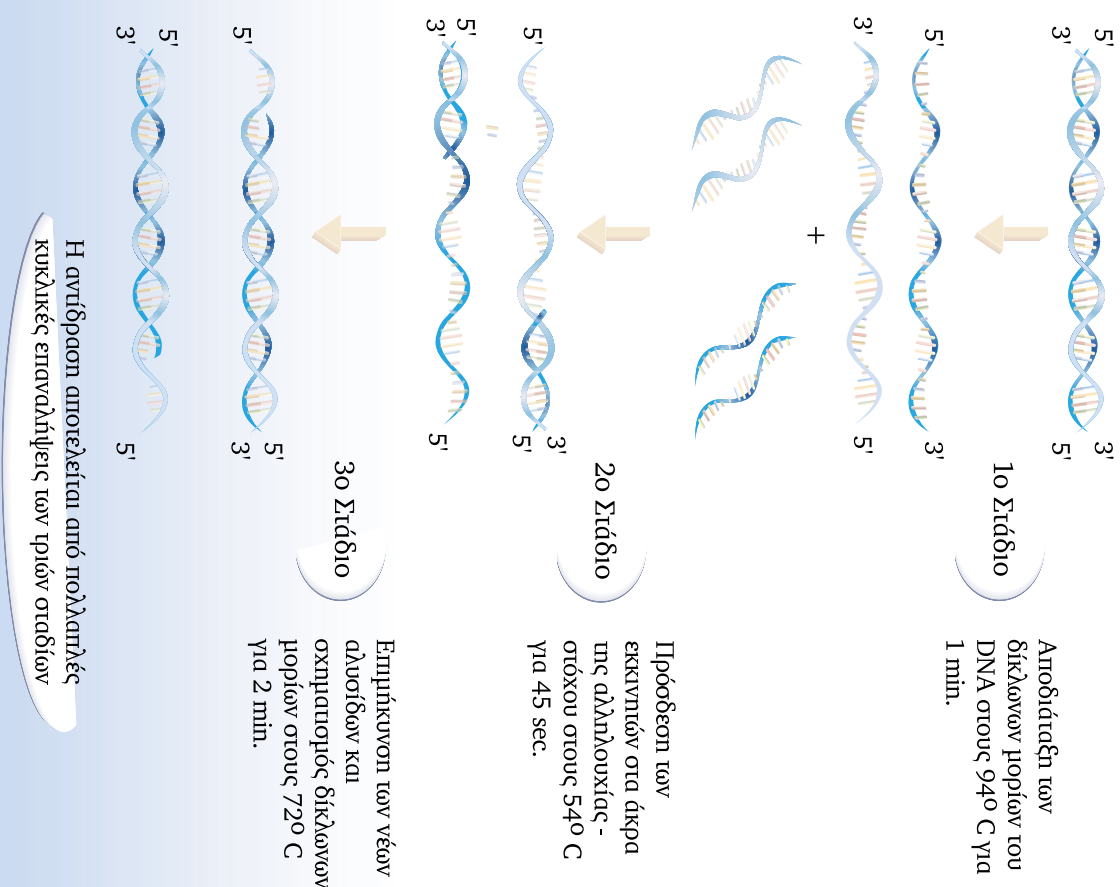
15.5.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) πρωτοπαρουσιάστηκε το 1985 από τον K. Mullis (Nobel Χημείας, 1993) και σήμερα αποτελεί την πιο δημοφιλή τεχνική της Μοριακής Βιολογίας.

Το **DNA στόχος** αποτελεί το πρότυπο DNA, το οποίο πολλαπλασιάζεται με ενζυμικό τρόπο σε σημείο που να είναι πλέον ανανεώσιμο και εκμεταλλεύσιμο για οποιοδήποτε σκοπό.

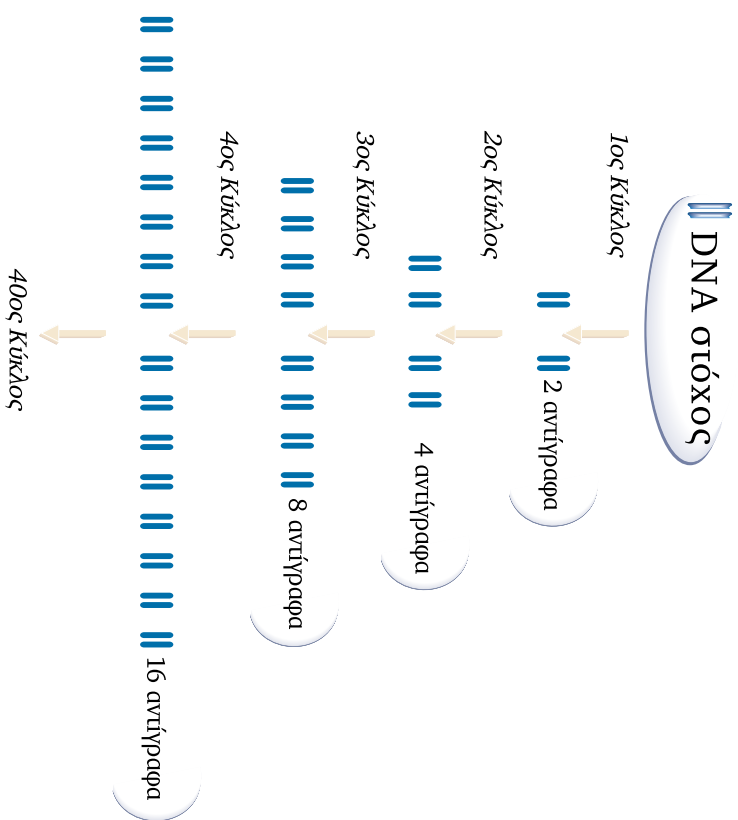
Το πρώτο στάδιο της μεθόδου είναι η **αποδιάταξη** του DNA στόχου, δηλαδή η μετατροπή του δικλόνου μορίου DNA σε μονόκλωνο. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τη σύνδεση των μονόκλωνων τμημάτων με **εκκινητές** (primers), ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων συμπληρωματικών προς τα άκρα της αλληλουχίας στόχου. Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει την επιμήκυνση των νέων αλυσίδων με τη δράση του ενζύμου **Taq πολυμεράση** (πρόκειται για ένζυμο DNA πολυμεράσης με προέλευση το βακτήριο *Thermus aquaticus*, το οποίο διατηρεί τη δράση του σε υψηλές θερμοκρασίες) και των ελεύθερων δεοξυριβονουκλεοτιδίων τα οποία προσδένονται συμπληρωματικά ως προς την αρχική αλυσίδα σχηματίζοντας δυο νέα δίκλωνα μόρια DNA. Η εναλλαγή των τριών σταδίων αποτελεί έναν κύκλο της αντίδρασης του PCR κατά τον οποίο διπλασιάζεται η ποσότητα του DNA.

Αλυσιδωτή αντίδραση της
Πολυμεράσης (PCR)



Εικόνα 15.9 Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων κάθε κύκλου αντίδρασης της Αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Συνήθως απαιτούνται 25 με 40 κύκλοι για το σχηματισμό ικανής ποσότητας του DNA στόχου. Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) είναι πολλαπλά αντίγραφα του αρχικού DNA.

Εκθετική αύξηση του DNA



Εικόνα 15. 10 Το τμήμα του DNA στόχου πολλαπλασιάζεται 2^η, όπου η είναι ο αριθμός των κύκλων δηλ. εάν πραγματοποιήσουμε 40 κύκλους καταλήγουμε στον σχηματισμό περισσότερων από 1 δισεκατομμύριο αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA.

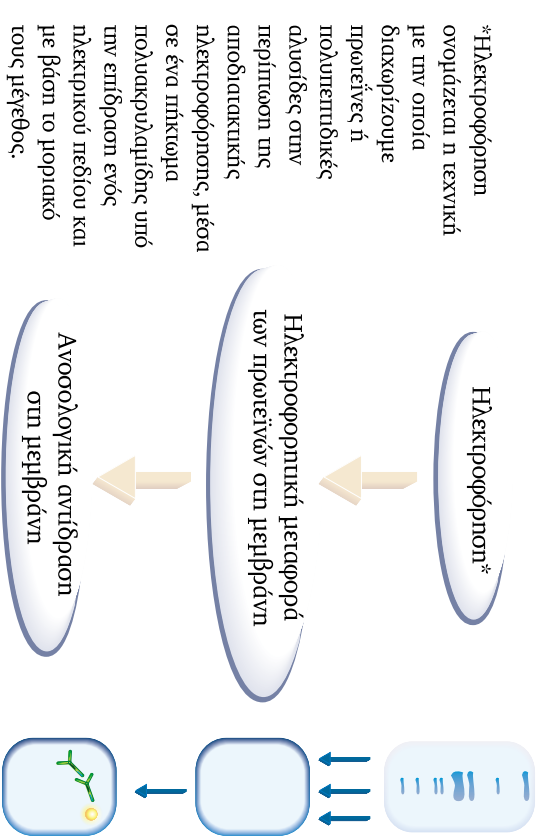
Στα σύγχρονα εργαστήρια η όλη διαδικασία είναι αυτοματοποιημένη. Το μόνο που απαιτείται είναι η προσθήκη των κατάλληλων αντιδραστηρίων σε μια ειδική συσκευή, **το θερμοκυκλοποιητή**.

Οι εφαρμογές της μεθόδου είναι πάρα πολλές. Χρησιμοποιείται στην Ιατρική για τη διάγνωση ασθενειών και γενετικών ανωμαλιών ενώ χρησιμοποιείται και στην Εγκληματολογία για τη διερεύνηση υποθέσεων.

15.5.4 Ανοσοαποτύπωμα (WESTERN BLOT)

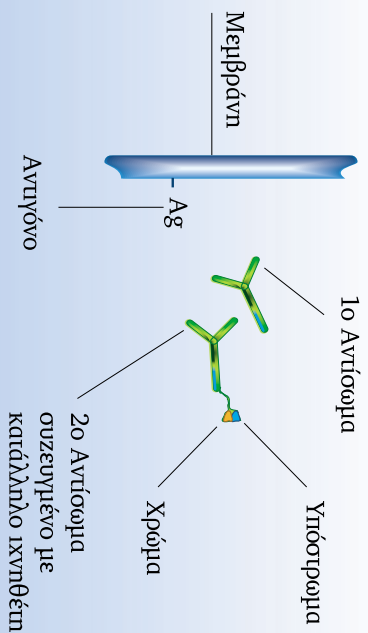
Με το ανοσοαποτύπωμα (Western Blot) μπορούμε να ποιοποιήσουμε την ύπαρξη μιας οποιοσδήποτε πρωτεΐνης, αρκεί να έχουμε αντι σώματα έναντι αυτής. Πρόκειται για μέθοδο ποιοτικού προσδιορισμού που εφαρμόζεται μόνο σε πρωτεΐνες. Η τεχνική περιλαμβάνει την ηλεκτροφορητική ανάλυση του αντιγονικού δείγματος και μεταφορά των πρωτεϊνών σε φίλτρο

Στάδια του Ανοσοαποτυπώματος - Western Blot



Εικόνα 15.11 Τα στάδια του Ανοσοαποτυπώματος.

Ανοσοαποτύπωμα Western Blot



Εικόνα 15.12 Έμμεσος τρόπος ανίχνευσης του αντιγόνου στη μεμβράνη.

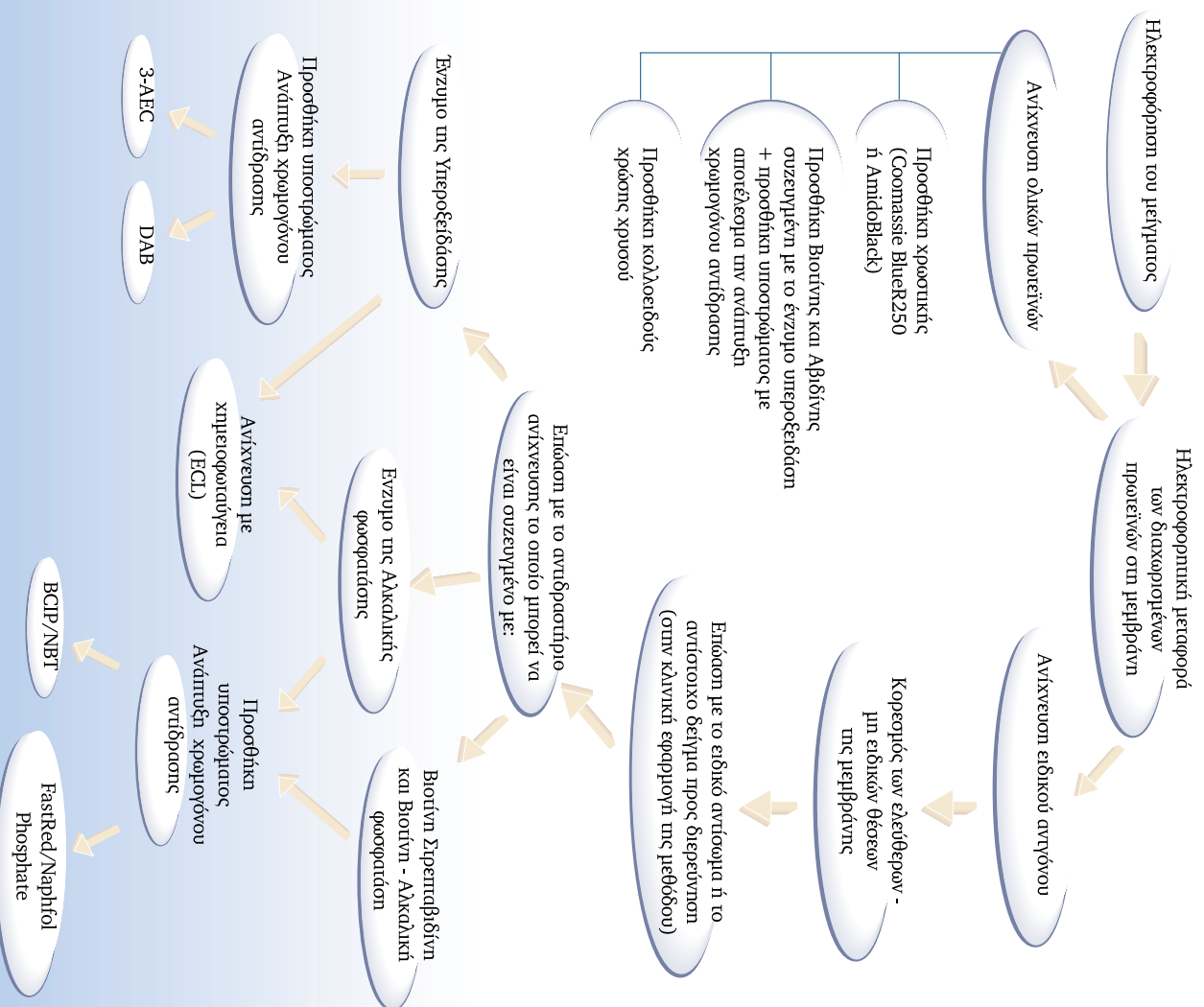
ντροκυτταρίνης, νάυλον ή PVDF. Οι μεμβράνες αυτές έχουν την ιδιότητα να προσροφούν τις πρωτεΐνες και να εμφανίζεται το ακριβές “αποτύπωμα” των πρωτεϊνών όπως έχουν διαχωριστεί στο πλέγμα. Η μεμβράνη επάγεται με το αντίσωμα της πρωτεΐνης που θέλουμε να προσδιορίσουμε και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο ομοιοπολικά με το ένζυμο υπεροξειδάση. Προσθέτοντας το κατάλληλο υπόστρωμα, παράγεται έγχρωμο προϊόν που κατακηνίζεται στις θέσεις που υπάρχει το σύμπλοκο.

Όταν απαιτείται μεγαλύτερη ευαισθησία, τότε χρησιμοποιείται η χρώση κατά ECL η οποία είναι 100 φορές πιο ευαισθησία σε σύγκριση με την χρώση κατά DAB. Βασίζεται στην αρχή της φωταύγειας. **Χημειοφωταύγεια** ονομάζεται το φαινόμενο παραγωγής ακτινοβολίας από μια χημική αντίδραση.

Η μέθοδος του ανοσοαποτυπώματος έχει ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Έχει κλινική εφαρμογή κυρίως στη διάγνωση των ερπητικών λοιμώξεων, με την ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό ασθενών έναντι του ιού του έρπητα τύπου I και II, και του Συνδρόμου Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS).

Ανοσοδογική Αντίδραση στη Μembrάνη

Τρόποι ανίχνευσης αντιγόνου
με τη χρήση διαφορετικών ιχνιδίων



Εικόνα 15.13 Τα διαδοχικά στάδια της μεθόδου του ανοσοαποτυπώματος.

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Οι μέθοδοι οι οποίες εκμεταλλεύονται σημασμένα αντιγόνα ή αντισώματα βρίσκονται σήμερα σε ευρεία χρήση στο εργαστήριο. Διακρίνονται στους ανοσοφθορισμούς, στη ραδιοανοσοδογική μέθοδο και στην ανοσοενζυμική μέθοδο ενώ νεότερες μέθοδοι έχουν καθιερωθεί τα τελευταία χρόνια όπως είναι η νεφρομετρία, η θολομετρία, η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και το ανοσοαποτύπωμα.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

- 1. Τι ονομάζουμε ανοσοφθορισμό;
- 2. Δώστε τον ορισμό του φθορισμού.
- 3. Σε ποιες κατηγορίες διακρίνονται οι τεχνικές του ανοσοφθορισμού; Ποια από τις δύο κατηγορίες είναι πιο αποτελεσματική;
- 4. Ποια η αρχή λειτουργίας της ραδιοανοσολογικής μεθόδου (RIA);
- 5. Ποια η αρχή λειτουργίας της ανοσοενζυμικής μεθόδου (ELISA);
- 6. Σε ποιες κατηγορίες διακρίνονται οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι (ELISA);
- 7. Ποια τα πλεονεκτήματα της νεφελόμετρίας;
- 8. Να περιγράψετε την καμπύλη αναφοράς των νεφελόμετρικών προσδιορισμών.
- 9. Ποια η αρχή λειτουργίας της θολομετρίας και ποιες οι εφαρμογές της;
- 10. Ποια η αρχή λειτουργίας της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και ποιες οι εφαρμογές της;
- 11. Από ποια στάδια αποτελείται ένας κύκλος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR);
- 12. Τι ονομάζουμε εκκινητές;
- 13. Τι είναι το ανοσοαποτίπωμα (Western Blot);
- 14. Περιγράψτε τα στάδια του ανοσοαποτίπωματος (Western Blot).
- 15. Τι είναι η ημειοφωταύγεια;
- 16. Ποιες οι εφαρμογές του ανοσοαποτίπωματος;

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 16°
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΠΟΠΑΘΕΣΜΩΝ ΤΟΥΣ

16.1 Προσδιορισμός του αριθμού των λεμφοκυττάρων

Τα έμμορφα συστατικά του αίματος αποτελούνται από τα ερυθροκύτταρα, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Τα ερυθροκύτταρα συμμετέχουν στην μεταφορά του οξυγόνου στους ιστούς και στην απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα ενώ τα λευκοκύτταρα συμμετέχουν στο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα λευκά αιμοσφαίρια διακρίνονται σε **κοκκιώδη** και σε **μη κοκκιώδη** κύτταρα. Τα κοκκιώδη κύτταρα αποτελούνται από τα βασεόφιλα, τα ουδετερόφιλα και τα ηωσινόφιλα τα οποία μαζί με τα μονοκύτταρα τα οποία είναι μη κοκκιώδη κύτταρα συμμετέχουν στους μηχανισμούς της μη ειδικής άμυνας με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης. Τα μη κοκκιώδη κύτταρα διακρίνονται και σε μια άλλη κατηγορία κυττάρων, τα λεμφοκύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για τους μηχανισμούς της ειδικής ανοσολογικής αντίδρασης. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες στα T και στα B λεμφοκύτταρα. Όταν ο οργανισμός προσβληθεί από κάποιο παθόγено μικροοργανισμό, τότε κινητοποιούνται τόσο τα B λεμφοκύτταρα, όσο και τα T λεμφοκύτταρα. Τα B λεμφοκύτταρα πολλαπλασιάζονται με πολύ γρήγορους ρυθμούς προκειμένου να συνθέσουν και να εκκρίνουν ικανό αριθμό αντισωμάτων στο πλάισιο της χυμικής ανοσολογικής απόκρισης ενώ τα T λεμφοκύτταρα στο πλάισιο της κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης εκκρίνουν με τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα τις λεμφοκίνες. Οι λεμφοκίνες κινητοποιούν μεγάλο αριθμό T κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων τα οποία επιτίθενται άμεσα στους παθολόγους μικροοργανισμούς.

Είναι σαφές ότι ο αριθμός των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα αποτελεί κριτήριο στις σύγχρονες διαγνωστικές μεθόδους για την ύπαρξη ή όχι κάποιου εισβολέα, και άρα ένδειξη κάποιας λοίμωξης από βακτήριο, ιό ή μύκητα. Επίσης στο πλάισιο της μελέτης των ανοσολογικών αποκρίσεων για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών πρωτοκόλλων που αφορούν ασθένειες με σοβαρές επιπτώσεις, όπως είναι η Επίκτητη Ανοσολογική Ανεπάρκεια (AIDS) ή οι διάφορες μορφές των νεοπλασμάτων (καρκίνοι), είναι απαραίτητη η μέληψη των λεμφοκυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται με την απομόνωσή τους από τα άλλα συστατικά του αίματος, τον προσδιορισμό του αριθμού τους και το διαχωρισμό σε υποπληθυσμούς λειτουργικά διακριτών λεμφοκυττάρων.

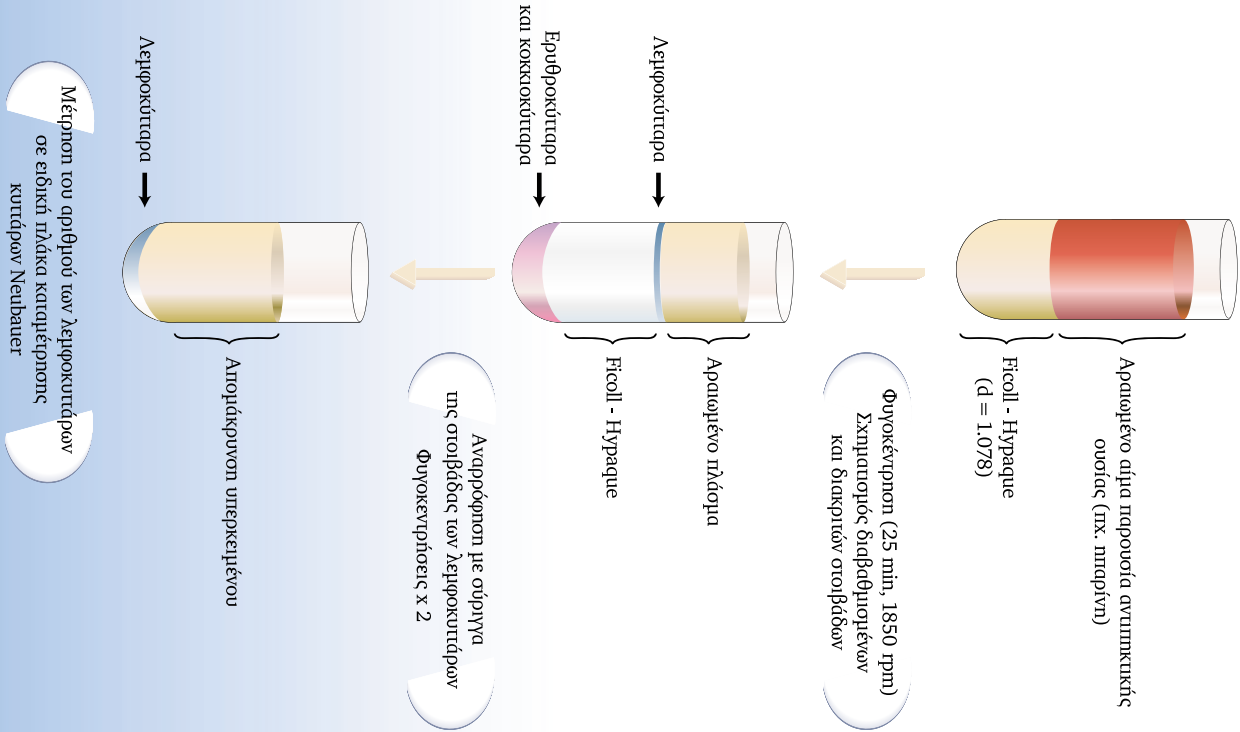
Το περιφερικό αίμα αποτελεί την πιο εύκολα διαθέσιμη πηγή των λεμφοκυττάρων. Αμέσως μετά την αιμοληψία το αίμα τοποθετείται σε φιάλida τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα όπως είναι η ηπαρίνη για την αποφυγή σχηματισμού θρόμβων.

Η **απομόνωση των λεμφοκυττάρων** από τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος γίνεται με τη

βοήθεια του συνθετικού μέσου Ficoll - Hypaque. Πρόκειται για διάλυμα το οποίο είναι πιο πυκνό από τα λεμφοκύτταρα, αλλά παρουσιάζει χαμηλότερη πυκνότητα σε σχέση με τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα. Το δείγμα του λεμφθέντος αίματος αφού αραιωθεί με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογία 1:1, επιστιβάζεται με προσοχή πάνω σε διάλυμα Ficoll – Hypaque, ώστε να σχηματισθεί χαρακτηριστικό διστιβό. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας σειράς από διαβαθμισμένες και διακριτές στιβάδες. Η κάθε στιβάδα αποτελείται και από ένα χαρακτηριστικό πληθυσμό κυττάρων. Στον πυθμένα του σωληναρίου συγκεντρώνονται τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα που είναι πυκνότερα του Ficoll-Hypaque. Πάνω από το Ficoll - Hypaque βρίσκεται μια στιβάδα η οποία αποτελείται από τα λεμφοκύτταρα και ελάχιστα μονοκύτταρα. Πάνω από αυτή την στιβάδα κυττάρων βρίσκεται το πλάσμα του αίματος. Με τη βοήθεια μιας σύριγγας παίρνουμε τα κύτταρα της στιβάδας που μας ενδιαφέρει και ακολουθούν δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Σκοπός αυτών των φυγοκεντρήσεων είναι η απομάκρυνση του Ficoll-Hypaque το οποίο εάν παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε επαφή με τα κύτταρα έχει τοξικά αποτελέσματα. Το εναίωρημα των κυττάρων αφήνεται σε ηρεμία για 1 ώρα σε επωαστικό θάλαμο. Τα μονοκύτταρα προσκολλώνται στην επιφάνεια του φιάλιδου ενώ τα λεμφοκύτταρα απομακρύνονται σε καθαρή πλέον μορφή.

Απομόνωση των Λεμφοκυττάρων του Αίματος

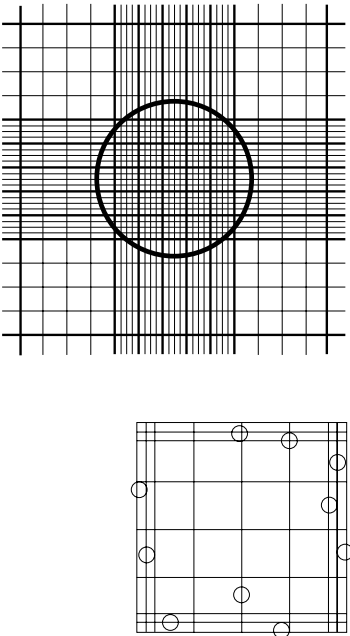
Μέθοδος της διαφορικής φυγοκέντρησης σε υλικό Ficoll - Hypaque



Εικόνα 16.1 Διαδικασία απομόνωσης των λεμφοκυττάρων του αίματος

Μέτρηση των Λεμφοκυττάρων

Χρήση πλάκας καταμέτρησης κυττάρων Neubauer



$$\begin{aligned} \text{Αριθμός Λεμφοκυττάρων/ml} &= \text{Αριθμός των κυττάρων} \times \text{Συντελεστής Αραίωσης} \times 10.000 \\ \text{Συνολικός αριθμός Λεμφοκυττάρων} &= \text{Αριθμός λεμφοκυττάρων/ml} \times \text{Όγκος εναπολημμένος των κυττάρων} \end{aligned}$$

Εικόνα 16.2 Μέτρηση αριθμού των λεμφοκυττάρων με τη χρήση πλάκας Neubauer

Η **μέτρηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων** γίνεται με τη χρήση ειδικής πλάκας καταμέτρησης κυττάρων, **Neubauer**. Πρόκειται για αντικειμενοφόρο πλάκα η οποία φέρει ειδικές διαγραμμίσεις οι οποίες οχηματίζουν τετραγωνίδια σταθερού όγκου. Με τις κατάλληλες αραιώσεις είναι δυνατόν να γίνει μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στα αντίστοιχα τετραγωνίδια με ένα από φωτονικό μικροσκόπιο.

Χρησιμοποιώντας και την κατάλληλη χρωστική, όπως είναι η **Trypan Blue** μπορούμε να διακρίνουμε τα ζωντανά από τα νεκρά κύτταρα. Η συγκεκριμένη χρωστική εισέρχεται στο εσωτερικό των νεκρών κυττάρων και τα βάφει με το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα της. Με αυτό τον τρόπο εκτός από τη μέτρηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων είναι δυνατός και ο υπολογισμός της **βιωσιμότητάς** τους.

Πίνακας 16.1: Φυσιολογικός αριθμός κυττάρων του αίματος

Πληθυσμός κυττάρων	Μέσος αριθμός κυττάρων ανά μικρολίτρο (μl)	Φυσιολογικό εύρος τιμών
Λευκά αιμοσφαίρια	7400	4500 - 11000
Λεμφοκύτταρα	2500	1000 - 4800
Ουδετερόφιλα	4400	1800 - 7700
Ηωσινόφιλα	200	0 - 450
Βασεόφιλα	40	0 - 200
Μονοκύτταρα	300	0 - 800

Ποσοστό υποπληθυσμών των λεμφοκυττάρων	
Υποπληθυσμός λεμφοκυττάρων	% των λεμφοκυττάρων
T Βοηθητικά λεμφοκύτταρα	55
T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα	25
B λεμφοκύτταρα	10
Άλλες κατηγορίες (πχ. NK κύτταρα)	10

16.2 Επιφανειακοί δείκτες των λεμφοκυττάρων

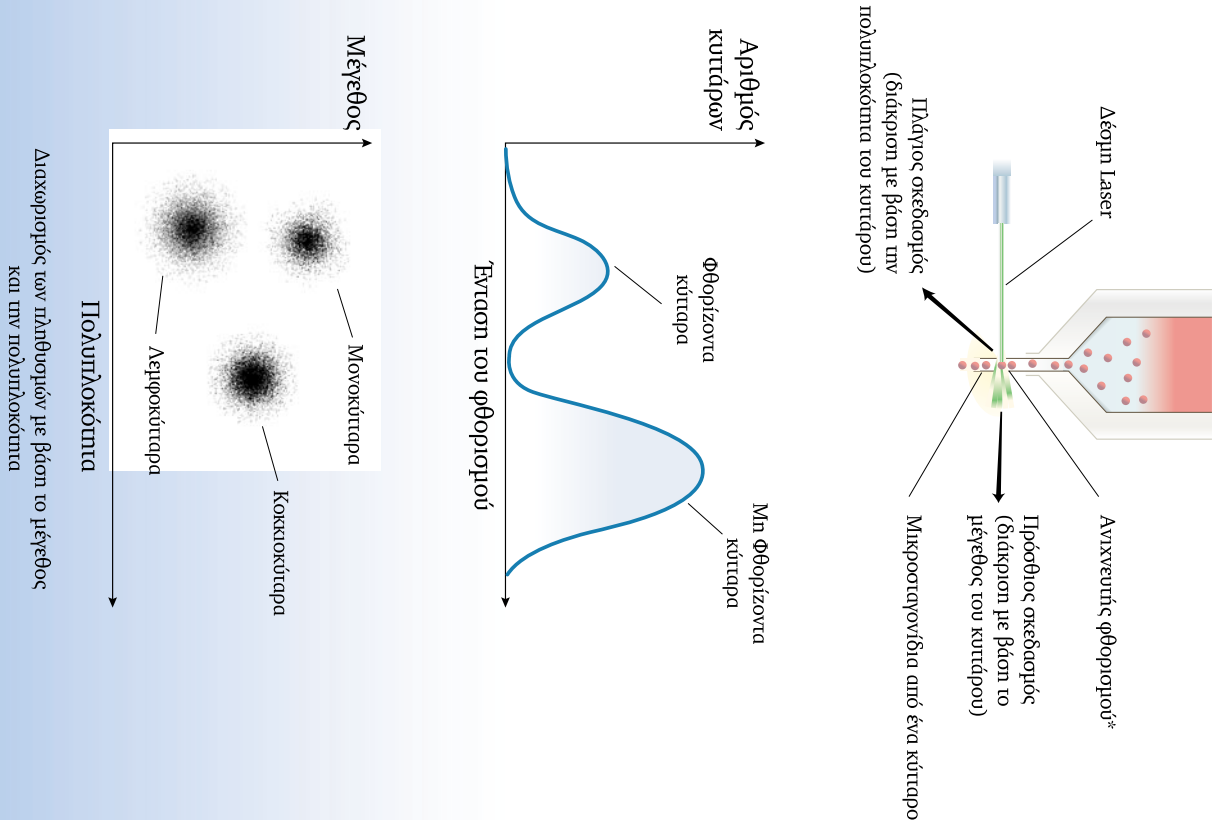
Τα λεμφοκύτταρα αποτελούνται από πολλούς διακριτούς λειτουργικά υποπληθυσμούς αν και στο μικροσκόπιο όλα εμφανίζουν την ίδια χαρακτηριστική μορφή. Μικρά στρογγυλά κύτταρα με λίγο κυτταροδόλασμα. Είναι απαραίτητο όμως για την περαιτέρω μελέτη τους αλλά και για διαγνωστικούς σκοπούς να μπορούμε να διακρίνουμε κάθε πληθυσμό. Αυτό επιτυγχάνεται με την εκμετάλλευση της παρουσίας πρωτεϊνών της κυτταρικής τους επιφάνειας οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε πληθυσμό, τους **επιφανειακούς δείκτες**.

Ένας μεγάλος αριθμός επιφανειακών δεικτών έχει ήδη χαρακτηριστεί όσον αφορά τα λεμφοκύτταρα. Κατατάσσονται σύμφωνα με μια συστηματική ονοματολογία, το **σύστημα CD**. Κάθε δείκτης χαρακτηρίζεται από έναν αύξοντα αριθμό πχ. CD2, CD16, CD83, CD164 κτλ.

Τα T λεμφοκύτταρα στο σύνολό τους χαρακτηρίζονται από την παρουσία του επιφανειακού δείκτη CD3, μύριο το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίησή τους. Σημαντικότερος δείκτης των B λεμφοκυττάρων είναι ο επιφανειακός δείκτης CD19. Επίσης, τα T λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε περαιτέρω υποπληθυσμούς όπως είναι τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα που χαρακτηρίζονται από το δείκτη CD4 και τα T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα που χαρακτηρίζονται από το δείκτη CD8.

Κυταρομετρία Ροής

Αρχή λειτουργίας του κυταρομετρητή ροής



Εικόνα 16.3 Αρχή λειτουργίας του κυταρομετρητή ροής.

16.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των πληθυσμών των B και T λεμφοκυττάρων με ανίχνευση αντιγόνων επιφανείας τους (Κυταρομετρία Ροής)

Η παρουσία των επιφανειακών δεικτών σε συνδυασμό με την ύπαρξη των αντίστοιχων μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι αυτών έχει προκαλέσει επανάσταση στη μελέτη αυτών των πληθυσμών αλλά και στην καθημερινή τους χρήση σε διαγνωστικό επίπεδο.

Ο καθορισμός, η μέτρηση αλλά και ο διαχωρισμός υποπληθυσμών κυττάρων γίνεται με βάση το μέγεθος και την πολυπλοκότητά τους σε συνδυασμό με την ένταση του φθορισμού των συνδεδεμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι επιφανειακών δεικτών. Τα παραπάνω πραγματοποιούνται σε **κυταρομέτρο ροής**.

Πρόκειται για αυτοματοποιημένη μέθοδο μέτρησης και διαχωρισμού κυττάρων με βάση συγκεκριμένα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, όπως είναι το μέγεθος και η πολυπλοκότητα τους. Έχει την ικανότητα να εξετάζει ξεχωριστά κάθε ένα κύτταρο από ένα κυτταρικό εναιώρημα με την πρόσπτωση μιας δέσμης Laser πάνω του. Εκτός από τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά έχει την ικανότητα να προσδιορίζει την ένταση δύο τουλάχιστον διαφορετικών φθοριοχρωμάτων που είναι συνδεδεμένα με αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πληθυσμών των T και B λεμφοκυττάρων σε δείγμα αίματος εφαρμόζουμε την ακόλουθη διαδικασία. Αφού απομονώσουμε τα λεμφοκύτταρα, όπως περιγράφηκε παραπάνω, χρησιμοποιούμε μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των CD3 και CD19 επιφανειακών δεικτών. Τα λεμφοκύτταρα επιάζονται με τα συγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία είναι συζευγμένα με αντίστοιχες φθορίζουσες χρωστικές π.χ. FITC και PE. Τα μονοκλωνικά αντισώματα δεσμεύονται στα κύτταρα που φέρουν τους αντίστοιχους δείκτες και στη συνέχεια περνάνε από κυταρομετρητή ροής. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται υπό μορφή γραφικών παραστάσεων και ποσοστών.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η πλήρης αυτοματοποίηση που επιτρέπει τον έλεγχο τεράστιου αριθμού κυττάρων και την ανίχνευση έστω και μικρού αριθμού κυττάρων που ανήκουν σε συγκεκριμένο πληθυσμό. Χρησιμοποιείται στην καθημερινή διαγνωστική πρακτική σε ανοσολογικά, αιματολογικά και νεοπλασματικά νοσήματα.

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Τα λεμφοκύτταρα πρωταγωνιστούν στους μηχανισμούς της ειδικής ανοσολογικής αντίδρασης. Είναι σημαντικό να απομονώσουμε και να προσδιορίζουμε τον αριθμό τους με συνοπτικές και απλές διαδικασίες όπως γίνεται με τη χρήση του Ficol-Hypaque και της πλάκας Neubauer. Τα λεμφοκύτταρα φέρουν επιφανειακούς δείκτες τους οποίους τους εκμεταλλευόμαστε για το διαχωρισμό υποπληθυσμών τους, όπως είναι τα T και B λεμφοκύτταρα με τη χρήση της Κυτταρομετρίας Ροής.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Γιατί είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τον αριθμό των λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα;
2. Ποια είναι τα στάδια απομόνωσης των λεμφοκυττάρων;
3. Με ποιο τρόπο γίνεται η μέτρηση των λεμφοκυττάρων;
4. Με ποιο τρόπο γίνεται ο υπολογισμός της βιωσιμότητας των λεμφοκυττάρων;
5. Τι ονομάζουμε επιφανειακούς δείκτες των λεμφοκυττάρων;
6. Τι είναι το κυτταρόμετρο ροής και ποια τα πλεονεκτήματά του;

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 17^ο

ΗΛΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

17.1 Γενικά

Το **ΗΛΑ Σύστημα** ή **Μείζον Σύστημα Ισοσυμβατότητας (ΜΗΣ)** είναι ένα σύνολο στενά συνδεδεμένων γονιδίων που εκφράζουν τα αντίστοιχα **ΗΛΑ - αντιγόνα** στην επιφάνεια όλων των εμπύρηνων κυττάρων του οργανισμού. Πρόκειται δηλαδή για πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: στα τάξης Ι, τάξης ΙΙ και τάξης ΙΙΙ ΗΛΑ. Τα τάξης Ι ΗΛΑ μόρια βρίσκονται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα του οργανισμού ενώ τα τάξης ΙΙ ΗΛΑ μόρια βρίσκονται κυρίως στα μακροφάγα και τα Β λεμφοκύτταρα. Τα τάξης Ι ΗΛΑ αντιγόνα διακρίνονται στα **ΗΛΑ-A, B, C** ενώ τα τάξης ΙΙ στα **ΗΛΑ-DP, DQ και DR** αντιγόνα.

Τα γονίδια των ΜΗΣ είναι **πολυμορφικά** δηλ. υπάρχει μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων σε κάθε γονίδιο. **Αλληλόμορφα** ονομάζουμε γονίδια που βρίσκονται στην ίδια γονιδιακή θέση των ομόλογων χρωμοσωμάτων και ελέγχουν την ίδια ιδιότητα με διαφορετικό τρόπο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα ΗΛΑ τάξης Ι π.χ. στην περίπτωση του ΗΛΑ-B υπάρχουν 250 διαφορετικά αλληλόμορφα.

Είναι γνωστό ότι στις μεταμοσχεύσεις συμβαίνει πάντα απόρριψη του μοσχεύματος, εκτός αν ο δότης και ο δέκτης έχουν τα ίδια αντιγόνα ισοσυμβατότητας. Επίσης σημαντικός είναι ο ρόλος τους στην ειδική ανοσία. Απαιρέτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων είναι η αντιγονοπαρουσίαση των συμπλεγμάτων ΜΗΣ-πεπτιδίου στον TCR υποδοχέα των λεμφοκυττάρων.

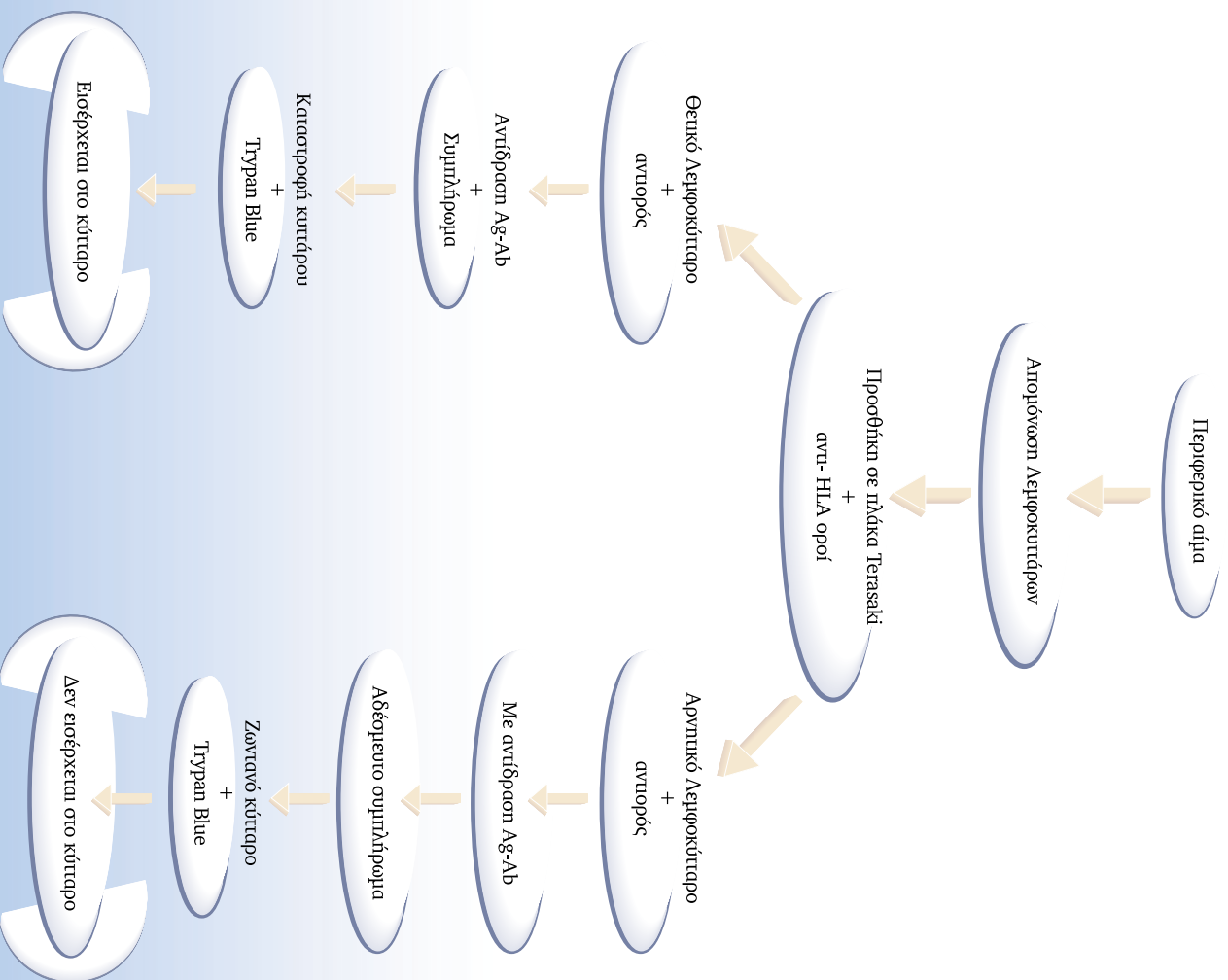
Η ταυτοποίηση των ΗΛΑ - αντιγόνων αποτελεί καθημερινή πρακτική στα σύγχρονα ανοσολογικά εργαστήρια και ιδιαίτερα στα εργαστήρια ισοσυμβατότητας. Η ΗΛΑ τυποποίηση συμβάλλει στη βελτίωση της έκβασης των μεταμοσχεύσεων ιστών και οργάνων βοηθώντας στην επιλογή του κατάλληλου δότη. Επιτρέπει τη συσχέτιση των ΗΛΑ μορίων με νοσήματα, ενώ χρησιμοποιούνται και στη φυλογενετική ανάλυση των ανθρώπινων φυλών.

17.2 Ταυτοποίηση των ΗΛΑ

Οι τεχνικές ισοσυμβατότητας που χρησιμοποιούνται για την τυποποίηση των ΗΛΑ - αντιγόνων διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: Στις **κλασικές ορολογικές μεθόδους** και στις **σύγχρονες τεχνικές της μοριακής βιολογίας**.

Στην περίπτωση των ορολογικών τεχνικών χρησιμοποιείται η **μικρολεμφοκυτταρική μέθοδος** των δύο σταδίων με τη χρήση συμπληρώματος κουνελιού και τη χρώση με κυανού του μεθυλενίου. Η αρχή της μεθόδου είναι η ικανότητα των λεμφοκυττάρων που φέρουν στην επιφάνειά τους το ΗΛΑ – αντιγόνο έναντι του οποίου περιέχει αντι σώματα ο ορός, να σχηματίζουν

Μικρολεμφοκυτταρική Δοκιμασία



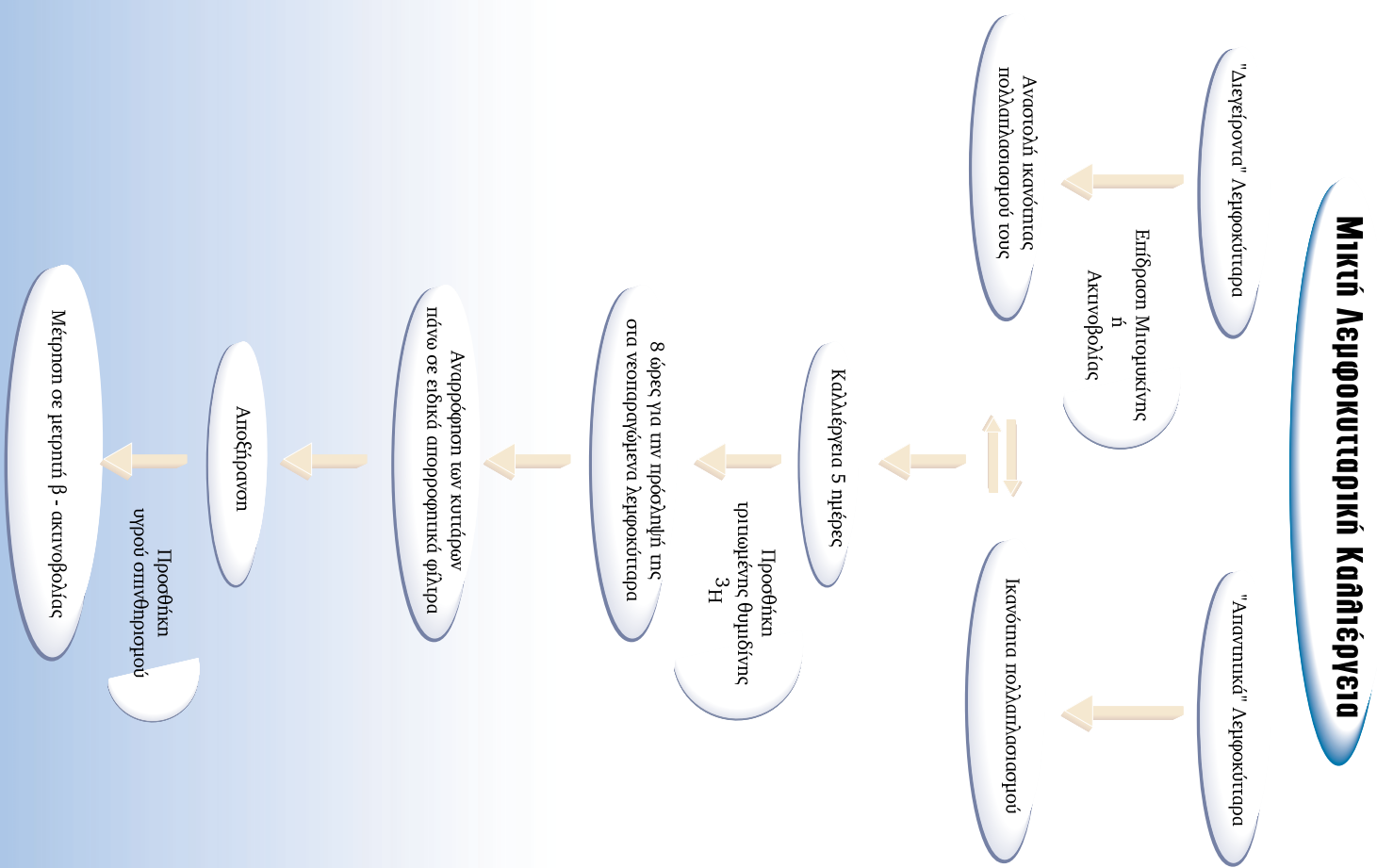
Εικόνα 17.1 Τα διαδοκικά στάδια της Μικρολεμφοκυτταρικής Δοκιμασίας

σύμπλεγμα αντιγόνου - αντι σώματος. Στη συνέχεια ενεργοποιείται το συμπλήρωμα το οποίο καταστρέφει την κυτταρική μεμβράνη του λεμφοκυττάρου. Με την προσθήκη της χρωστικής Trypan Blue διαπιστώνεται η ύπαρξη ζώντων ή νεκρών λεμφοκυττάρων. Τα ζωντανά λεμφοκύτταρα δεν επιτρέπουν την είσοδο της χρωστικής στο εσωτερικό τους, σε αντίθεση με τα νεκρά λεμφοκύτταρα. Με αυτήν παρατήρηση στο μικροσκόπιο διαπιστώνεται η ύπαρξη ή όχι των συγκεκριμένων HLA - αντιγόνων που εξετάζουμε. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε πλάκες Terasaki οι οποίες φέρουν φρέατα πολύ μικρού όγκου. Σε αυτά προσθέτουμε τους αντίστοιχους αντιορούς και στη συνέχεια τα απομονωμένα λεμφοκύτταρα.

Μια πολύ χρήσιμη τεχνική ιστοσυμβατότητας η οποία χρησιμοποιείται με επιτυχία για την επιλογή του κατάλληλου δότη στις μεταμοσχεύσεις είναι η **Μικτή Λεμφοκυτταρική Καλλιέργεια (ΜΚΚ)**.

Σε καλλιεργητικό μέσο αναμειγνύονται τα λεμφοκύτταρα του δότη και του δέκτη του μοσχεύματος. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αναστολή της ικανότητας πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων του δότη (διεγείροντα κύτταρα), είτε με την επίδραση μιας χημικής ουσίας, της Μιτομυκίνης C, είτε με την ακτινοβολήση τους. Στη συνέχεια οι δύο πληθυσμοί των λεμφοκυττάρων συγκαλλιεργούνται σε φρέατα πλάκων κυτταρικής καλλιέργειας για πέντε ημέρες. Στη συνέχεια προστίθεται τριτιωμένη θυμιδίνη (^3H). Η τριτιωμένη θυμιδίνη προοδωμάται από το νεοσυνθεόμενο DNA των λεμφοκυττάρων που πολλαπλασιάζονται. Μετά από σύντομο χρονικό διάστημα τα κύτταρα αναρροφώνται σε ειδικά απορροφητικά φίλτρα μαζί με τη ραδιενέργεια που είχαν προσλάβει και στη συνέχεια γίνεται μέτρησή τους σε μετρητή β-ακτινοβολίας.

Όσο μεγαλύτερη είναι η διέγερση και κατ' επέκταση ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων του δότη, τόσο μεγαλύτερες είναι οι τιμές της ραδιενέργειας που λαμβάνονται από τον μετρητή.



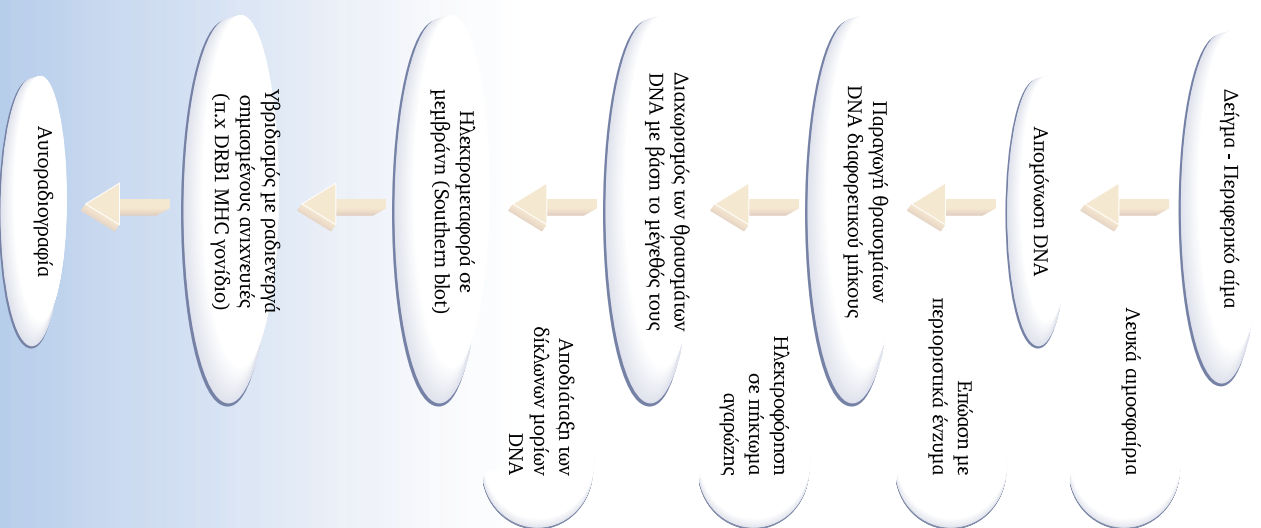
Εικόνα 17.2 Τα διαδοχικά στάδια της Μικτής Λεμφοκυτταρικής Καλλιέργειας (MLR).

Τα τελευταία χρόνια με τη γαδόσια πρόοδο των τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας καθιερώθηκε η HLA - γονδιακή τυποποίηση σε επίπεδο ρουτίνας. Πρόκειται για την τεχνική της ανάλυσης των πολυμορφισμών μήκους θραύσματος από περιοριστικό ένζυμο (**DNA RFLP ανάλυση**), την αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης με οδηγονουκλεοτίδια ειδικής αλληλουχίας (**PCR-SSO**) και την αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκκιντές ειδικής αλληλουχίας (**PCR-SSP**).

Η DNA RFLP ανάλυση στηρίζεται στο σπάσιμο του DNA από ένζυμα περιορισμού που κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις. Τα κομμάτια του DNA που σχηματίζονται ανιχνεύονται στη συνέχεια με ειδικούς ανιχνευτές για την μοριακή τυποποίηση των αλληλομόρφων. Πρόκειται για επίμονη και χρονοβόρα μέθοδο.

HLA τυποποίηση με DNA - RFLP

Rstriction Fragment Length Polymorphisms



Εικόνα 17.3 Τα διαδοχικά στάδια της HLA τυποποίησης με DNA - RFLP.

Για το λόγο αυτό σε κλινική εφαρμογή έχουν καθιερωθεί οι μέθοδοι που εκμεταλλεύονται την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Η PCR-SSO ανάλυση περιλαμβάνει την ενίσχυση του DNA - στόχου με PCR και στη συνέχεια τον υβριδισμό του προϊόντος με οδηγονουκλεοτίδια ειδικής αλληλουχίας, ξεχωριστά για κάθε HLA-A, B, C, DR, DP και DQ ειδικότητα. Πρόκειται για μια από τις πιο καθιερωμένες και χρησιμοποιούμενες μεθόδους που επιτρέπει την τυποποίηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων με αξιοπιστία και ακρίβεια.

Η PCR-SSP ανάλυση ολοκληρώνεται με την PCR σε ένα στάδιο μιας και η χρήση των εκκινητών ειδικής αλληλουχίας επιτρέπει την HLA - τυποποίηση άμεσα. Αποτελεσμα είναι η τεχνική να είναι πάρα πολύ σύντομη (μόλις τρεις ώρες) και να προσφέρει υψηλή ακρίβεια. Πρόκειται επίσης για μια καθιερωμένη τεχνική στην κλινική πράξη αλλά δεν είναι κατάλληλη για μεγάλο αριθμό δειγμάτων ενώ απαιτεί και μεγάλη ποσότητα αρχικού DNA.

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Το Μείζον Σύστημα Ισοσυμβατότητας (ΜΗΣ) ή αντιγόνα ισοσυμβατότητας είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Είναι χαρακτηριστικές για κάθε άνθρωπο, και παίζουν σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς ειδικής ανοσίας. Η ΗΛΑ ταυτοποίηση είναι απαραίτητη στις μεταμοσχεύσεις οργάνων και γίνεται με ορολογικές τεχνικές όπως είναι η Μικροδευφοκυτταρική Μέθοδος και η Μικτή Δευφοκυτταρική Καλλιέργεια αλλά και τεχνικές Μοριακές Βιολογίας όπως είναι η DNA RFLP ανάλυση, η PCR - SSO και η PCR - SSP.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Τι είναι το ΗΛΑ σύστημα ή Μείζον Σύστημα Ισοσυμβατότητας;
2. Σε ποιες κατηγορίες διακρίνονται τα ΗΛΑ αντιγόνα;
3. Γιατί είναι σημαντική η ΗΛΑ ταυτοποίηση;
4. Σε ποιες κατηγορίες διακρίνονται οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ΗΛΑ ταυτοποίηση;
5. Περιγράψτε την Μικροδευφοκυτταρική Μέθοδο.
6. Ποια τα στάδια της Μικτής Δευφοκυτταρικής Καλλιέργειας (MLR);
7. Αναφέρατε τις μοριακές τεχνικές ΗΛΑ ταυτοποίησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Αρσένη Π. (1991). Ανοσοηλεκτροφόρηση - Ανοσοκαθίλων – Αντίθετη Ανοσοηλεκτροφόρηση. Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα Ανοσολογίας - Σεμινάριο Ανοσολογίας (Ανοσολογική Μεθοδολογία), σελ.26.

Γερμενής Α. Ε. (2000). Ιατρική Ανοσολογία. Εκδόσεις Παπαζήση. Αθήνα.

Δημητρακόπουλος Γ. (1993). Ιατρική Βακτηριολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχάλην. Αθήνα.

Δημητρακόπουλος Γ. (1998). Ανοσολογία. Ίδρυμα Ευγενίδου. Αθήνα.

Ελληνική Εταιρία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας (1994). Ανοσοχημικές Μέθοδοι - Εφαρμογές στην Κλινική Χημεία. 6ο Σεμινάριο. Αθήνα.

Εμμανουηλίδου - Αρσένη Α. (1994). Ιατρική Μικροβιολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα.

Ηλιάδης Β. (2000). Τα Νόμιμα Ιατρικής - Φυσιολογίας στην υπηρεσία της ανθρωπότητας. Εκδόσεις Ελληνικά Γράμματα, Αθήνα.

Ηλιάδης Β. και Οικονόμου Θ. (2000). Βιολογία Γ' Ενιαίου Λυκείου. Εκδόσεις Ελληνικά Γράμματα, Αθήνα.

Ιορδανίδη Π. και Γεροχρήστου-Ζορμπά (1997). Τεχνολογία Οργάνων Εργαστηρίου. Ίδρυμα Ευγενίδου. Αθήνα.

Καρακάσι Α. (1995). Αντιπυρηνικά Αποσώματα. Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας; 40 (2): 139-151.

Καρακάσι Α. (1998). Ανοσολογική διερεύνηση μη οργανοειδικών αυτοανώσων νοσημάτων - Αυτοαντισώματα. Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα Ανοσολογίας – Σεμινάριο Ανοσολογίας, σελ. 248-253.

Καρακάσι Α., Πισκοντάκη Ι., Ινιωτάκη Α., Χαραλαμπίτσου Δ., Σφικακής Π., Χωρέμη Ε. (1992). Σύγκριση Elisa και Immunoblotting για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων έναντι του Scl-70 σε ασθενείς με διάχυτη σκληροδερμία. Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, 37:566.

Καρακάσι-Γαρδουλή Άννα (1992). Ο έλεγχος της αντιγονικότητας των σπερματοζωαρίων και της προκαλούμενης αυτο- και ισο- ανοσοποίησης δια των μεθόδων ΙΑΤ, ΜΑR test και ELISA. Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα.

Κατσούλας Χ. (2000). Βιολογία Γενικής Παιδείας Β' τάξης Ενιαίου Λυκείου. Εκδόσεις Βολανάκη, Αθήνα.

Μαργάρας Β. και Λαμπροπούλου-Μαργάρα Μ. (2000). Βιολογία Κυττάρου. Μοριακή Προσέγγιση. 4η έκδοση. Εκδόσεις Τυπόγραμμα, Πάτρα.

Ματαυτσή - Δίζα Ε. (1998). Συγκολλητινοαντιδράσεις - Ιζηματοαντιδράσεις Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα Ανοσολογίας-Σεμινάριο Ανοσολογίας, σελ.29.

Μουτσόπουλος Χ.Μ. (1994). Αυτάνοσα Ρευματικά Νοσήματα. Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα Ανοσολογίας - Σεμινάριο Ανοσολογίας, σελ.164.

Μπαρώνά-Μάμαλη Φ., Μπότσαρης Ι., Μπουμπουχάκης Ι. και Περάκη Β. (2000). Βιολογία

Τεχνική Παιδείας Γ' τάξης Ενιαίου Λυκείου. 2η έκδοση. Οργανισμός Εκδόσεων Διδακτικών Βιβλίων, Αθήνα.

Παυλάτου Μ. (1997). Ανοσολογία. 3^η έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας. Αθήνα.

Χαρίτορας Α. Α. (1991). Σημειώσεις Ανοσολογίας. Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Χατζημέτρου - Κουρουνάκη Α. (1997). Ανοσοβιολογία. Β' Έκδοση. University Studio Press. Θεσσαλονίκη.

ΕΕΝΟΤΑΩΣΣΗ

A. Karakassi, I. Piskontaki, A. Imiotaki, D. Charalambopoulos, P. Sfikakis, H. Choremi (1992). Autoantibodies against Scl-70 by Immunoblotting and ELISA in patients with Systemic Sclerosis. 8th International Congress of Immunology. Budapest, Hungary. Abstracts p.641.

Foukas L., Katsoulas H., Paraskevopoulos N., Metheniti A., Lambropoulou M and Marmaras V. (1998). Phagocytosis of *Escherichia coli* by insect hemocytes requires both activation of the Ras/Mitogen activated protein kinase signal transduction pathway for attachment and β_3 integrin for internalization. *J. Biol. Chem.* 273, 14813-14818.

Harrison's Principles Of Internal Medicine. (1994). 13th ed. International edition.

Hyde R M. (1995). Immunology. National medical Series for Independent Study. Williams and Wilkins editions, Philadelphia, U.S.A.

Janeway C. and Travers P. (1999). Κληνική Ανοσοβιολογία. 2η έκδοση. Πρόλογος: Μουτσόπουλος Χ. Μετάφραση: Βλαχοναγνώπουλος Π. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πααχαλίδης, Αθήνα.

Katsoulas H.L., Margomenou L., Tsiatas M.L., Pyrgaki C., Tsitsilonis O.E, Voelter W., Baxevanis C.N. and Papamichail M. (2001). Characterization of supernatants from activated human lymphocytes with monoclonal antibodies against CD3 (ACD3S). Communication within the Immune System: Basic Rules and their Breakdown - Euroconference on Molecular Aspects of the Initiation and Regulation of Immune Responses, *San Feliu de Guixols*, Spain.

Katsoulas H.L., Tsitsilonis O.E, Baxevanis C.N., Panayiotou G., Margomenou L., Tsiatas M.L., and Papamichail M. (2001). Analysis of immunoenhancing agents present within anti-CD3 activated lymphocyte supernatants (ACD3S) using proteomics. *3rd Balkan Congress of Immunology*, Athens, Greece.

Kelley W. N., Harris E. D. Jr., Ruddy S., Sledge C. B. (1993). Textbook of Rheumatology. Fourth edition, Philadelphia, W.B. Saunders Co.

Klebanoff S. J. (1988). Phagocytic cells: Products of oxygen metabolism. In: *"Inflammation"* Ed. Gallin J., Goldstein R. and Snyderman. Raven Press, New York. USA.

Kosmas N. E., Zorpidou D., Vassiliareas V., Roussou T. and Michaelides S. (1997). Decreased C4 Complement Component Serum Levels Correlate with the Degree of Emphysema in Patients with Chronic Bronchitis. *Chest*, 112:341-47.

Lambropoulou M., Katsoulas H. and Marmaras V. (1997). LPS-Triggered hemocyte spreading and immune-protein release. Assays of *E. coli* aggregation by hemocyte immune proteins. In: *"Techniques in Insect Immunology"* Ed. Weisner A., Dunphy G., Marmaras V., Morishima I., Sugumaran M. and Yamakawa M. SOS Publications, Fair Haven, NJ., USA.

Liszewski M. K., Fairies T. C., Lubin D. M., Rooney I. A., Atkinson J. B. (1996). Control of

the complement system. *Adv. Immunol.* 61: 201-13.

Lydyard P., Whelan A. and Fanger M. (2000). Instant Notes in Immunology. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK.

Mc Carty G. A. (1986). Autoantibodies and their relation to rheumatic diseases. *Advances in Rheumatology*. Medical Clinics of North America, 70:237.

Metchnikoff E. (1884). Ueber eine Sprosspilzkrankheit der Daphnien. Beitrag zur Lehre uber den Kampf der Phagocyten gegen Krankheitserreger. *Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* 96: 177-195.

Michaelides S. and Grange M. J. (1989). Relationship between immunoglobulin levels, tuberculin hypersensitivity and radiological extent of disease in greek patients with pulmonary tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 2, 727-730.

Peter J.B., Shoenfeld Y. (eds). (1996). Autoantibodies. Elsevier Publications.

Reichlin M. (1993). Antibodies to defined antigens in the systemic rheumatic diseases. *Bulletin on the Rheumatic Diseases*, 42 (8) : 4.

Roitt I., Brostoff J. and Male D. (1995). Ανοσολογία 3η έκδοση. Πρόλογος: Μουτσόπουλος Χ. Εμπορικές Εκδόσεις "Γρ. Παπιογιάνος", Αθήνα.

Rose N., Conway de Macario E., Fahey J., Friedman H., Penn G. (1992). Manual of Clinical Laboratory Immunology. American Society for Microbiology. 4th edition, Washington, D.C.

Stites D. P. Terr A. I., Parslow T. G eds. (1997). Medical Immunology. Ninth edition. Appleton & Lange Publications.

Tan E.M. (1989). Antinuclear Antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 44:93.

Ternynck T. and Avrameas S. (1990). Ανοσοενζυμικές Τεχνικές. Μετάφραση: Αντρέας Π. Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur, Αθήνα.

Towbin H., Stachelin T. and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins of polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4358.

Vella J P, Mangee C, Vos L, et al. (1999). Cellular and humoral mechanisms of vascularized allograft rejection iduced by indirect recognition of donor MHC allopeptides. *Transplantation*; 67: 1523-32.

Weir D. M, Stewart J. (1993). Immunology. Churchill Livingstone, U.K.

Young J. D. (1985). Role of ionic events in the triggering of phagocytosis. *J. Theor. Biol.* 116: 475-545.