



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

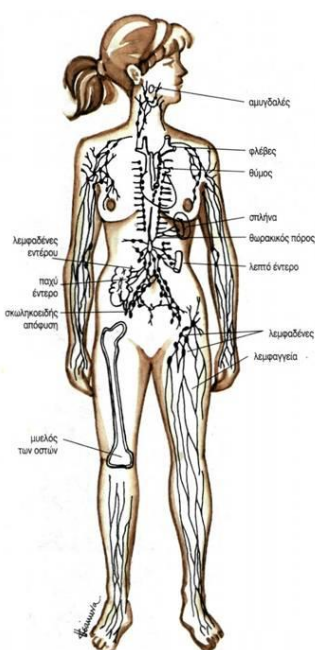
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Το Ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από πλήθος μορίων και κυττάρων με κυρίαρχο στόχο τη διάκριση μεταξύ εαυτού και ξένου, δηλαδή μεταξύ συστατικών του οργανισμού και εξωγενών, δυνητικά επιβλαβών παραγόντων. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος παράγονται στο μυελό των οστών, όπου ένα σημαντικό ποσοστό τους υφίσταται μερική ωρίμανση. Ακολούθως μεταναστεύουν σε εξειδικευμένους ιστούς (δευτερογενή λεμφικά όργανα) ή κυκλοφορούν στα αιμοφόρα αγγεία και σε ένα εξειδικευμένο σύστημα αγγείων, γνωστό ως λεμφικό σύστημα. Τα λεμφικά όργανα διακρίνονται σε πρωτογενή (μυελός των οστών, θύμος αδένας), όπου παράγονται τα λεμφοκύτταρα και σε δευτερογενή ή περιφερικά (λεμφαδένες), όπου εγκαθίστανται τα ώριμα λεμφοκύτταρα και αρχίζουν οι ειδικές για κάθε αντιγόνο ανοσολογικές απαντήσεις.



Εικόνα 1: Το ανθρώπινο Λεμφικό Σύστημα. Διακρίνονται τα κύρια και ορισμένα δευτερογενή λεμφικά όργανα, καθώς και το πλούσιο δίκτυο των λεμφικών αγγείων.

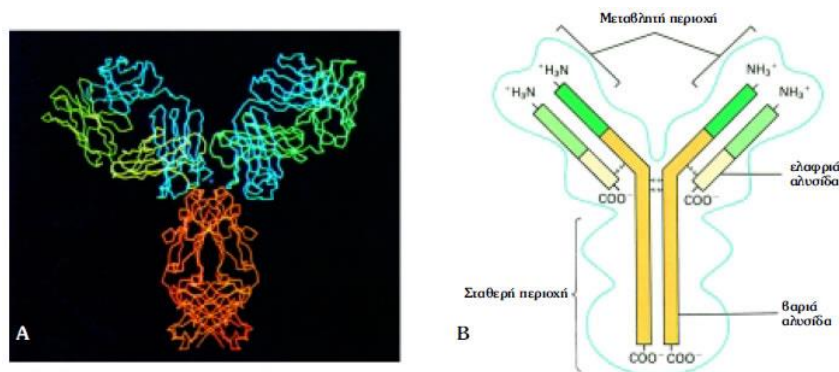
Τα σημαντικότερα γνωρίσματα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η εξειδίκευση, η προσαρμογή και η μνήμη. Στη **Χυμική** ανοσολογική απάντηση τα στοιχεία αναγνώρισης είναι ειδικές πρωτεΐνες που ονομάζονται **αντισώματα** και παράγονται από τα

πλασματοκύτταρα, ενώ στην **Κυτταρική** ανοσολογική απάντηση τα Τ-λεμφοκύτταρα θανατώνουν κύτταρα που φέρουν ξένες ουσίες και διεγείρουν τη χυμική απόκριση συνδράμοντας τα Β-λεμφοκύτταρα, δηλαδή τα πρόδρομα των πλασματοκυττάρων.

Ανοσοσφαιρίνες

Τα αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες, είναι πρωτεΐνες που συντίθενται από τον οργανισμό ως απάντηση στην παρουσία οιασδήποτε ξένης ουσίας στο εσωτερικό του. Αντιγόνο ονομάζεται κάθε ξένο στοιχείο, ικανό να προκαλέσει την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και τον επακόλουθο σχηματισμό αντισωμάτων. Το αντίσωμα διαθέτει ειδική συγγένεια για το αντιγόνο, προσκολλώμενο σε μια συγκεκριμένη θέση του που καλείται **αντιγονικός προσδιοριστής** ή **επίτοπος**. Τα μόρια των αντισωμάτων που έχουν κοινή εξειδίκευση για ένα αντιγόνο συνήθως χαρακτηρίζονται από ετερογένεια, γιατί αποτελούν προϊόντα πολλών πλασματοκυττάρων. Χαρακτηρίζονται από σημαντικές φυσικοχημικές διαφορές στο μέγεθος, στο φορτίο, στη διαλυτότητα, διαφορές ως προς την αμινοξική τους σύσταση και το περιεχόμενο σε υδατάνθρακες. Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν πέντε διάκριτες τάξεις ανοσοσφαιρινών: **IgA, IgD, IgE, IgG και IgM**. Οι IgA αποτελούν το 15-20% του ποσού των ανοσοσφαιρινών του ανθρώπινου ορού και εμφανίζονται κυρίως ως μονομερείς. Χωρίζονται σε υποτάξεις ή υπότυπους, τους IgA₁ και IgA₂. Γενικά, οι IgA είναι οι κυρίαρχες ανοσοσφαιρίνες στο σάλιο, το γάλα, και τις τραχειοβρογχικές και ουρογεννητικές εκκρίσεις. Οι IgD αποτελούν το 1% της ολικής ποσότητας των αντισωμάτων, εντοπιζόμενες σε μεγάλη ποσότητα στη μεμβράνη πολλών Β-λεμφοκυττάρων. Η ακριβής λειτουργία της τάξης αυτής δεν έχει διευκρινισθεί. Οι IgE βρίσκονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των βασεόφιλων και σιτευτικών κυττάρων. Πιθανόν διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ανοσία έναντι παρασίτων, καθώς και σε εμφάνιση αλλεργιών, όπως το άσθμα. Οι IgG ανοσοσφαιρίνες είναι οι κύριες ανοσοσφαιρίνες στον ορό υγιούς ανθρώπου (70-75% επί του συνόλου). Χωρίζονται στις υποτάξεις IgG₁, IgG₂, IgG₃, και IgG₄ ανάλογα με τον αριθμό των εσωτερικών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνικών αλυσίδων (ελαφριάς-βαριάς και βαριάς-βαριάς), εμφανίζονται ως μονομερείς και κατανέμονται ισότιμα μεταξύ των ενδοαγγειακών και εξωαγγειακών αποθεμάτων. Αποτελούν το κύριο αντίσωμα στις δευτερογενείς ανοσοποιητικές απαντήσεις. Οι IgM αντιπροσωπεύουν το 10% των ανοσοσφαιρινών και διαθέτουν χαρακτηριστική ακτινωτή πενταμερή δομή μοριακού βάρους 970 kD.

Περιορίζονται στην ενδοαγγειακή δεξαμενή και αποτελούν το πρώιμο αντίσωμα που παρατηρείται συχνά στις ανοσοποιητικές απαντήσεις έναντι πολύπλοκων μικροοργανισμών. Τα αντισώματα όλων των τάξεων περιλαμβάνουν κοινή βασική δομή, αυτή του μονομερούς. Το μονομερές αποτελείται από δύο πανομοιότυπες **ελαφριές αλυσίδες (L)** και δύο πανομοιότυπες **βαριές αλυσίδες (H)**, μοριακού βάρους 25 και 50kD αντίστοιχα, είναι δηλαδή της δομής L_2H_2 . Οι τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες συνδέονται ως εξής: κάθε L αλυσίδα συνδέεται με μία H αλυσίδα μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού, ενώ οι δύο H συνδέονται μεταξύ τους με τουλάχιστον ένα S-S δεσμό.

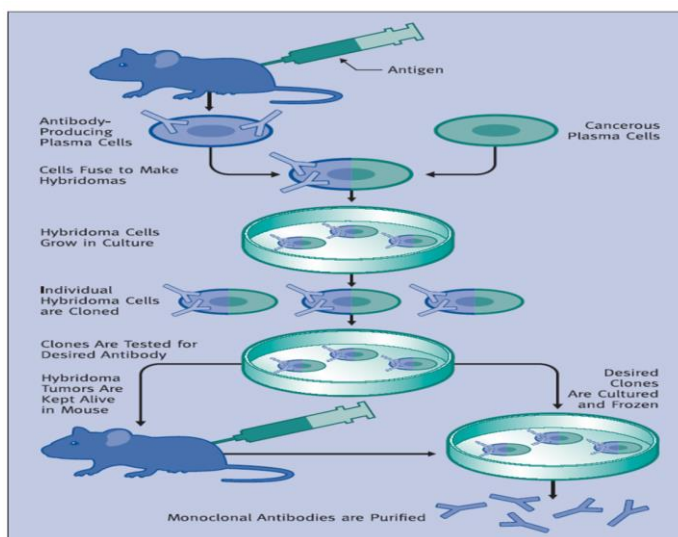


Εικόνα 2: Απεικόνιση Ανοσοσφαιρίνης IgG: A. Προσομοίωση βάσει κρυσταλλογραφικής ανάλυσης, B. Σχηματική αναπαράσταση τριτοταγούς δομής, όπου διακρίνονται οι επιμέρους συστατικές περιοχές.

Μονοκλωνικά Αντισώματα: Συνοπτική παρουσίαση διαδικασίας παραγωγής και εφαρμογών

Η ανοσοποίηση ενός ζώου με συγκεκριμένο αντιγόνο επάγει την παραγωγή ενός εξαιρετικά ανομοιογενούς μίγματος αντισωμάτων. Για αρκετά χρόνια η παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων ομοιογενών αντισωμάτων ήταν ανέφικτη, ώσπου οι *Kohler* και *Milstein*, το 1975 ανακάλυψαν ότι η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αντισώματος οποιασδήποτε εξειδίκευσης είναι δυνατή. Η εργασία τους βασίστηκε στην τεχνική της κυτταρικής σύντηξης. Η διαδικασία παραγωγής τους συνοπτικά είναι η ακόλουθη: Αρχικά ενύεται στο ποντίκι το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει. Το αντιγόνο επάγει τον πολλαπλασιασμό των ειδικών κυττάρων που παράγουν τα αντισώματα. Ακολουθούν αναμνηστικές ενέσεις σε διαστήματα μερικών εβδομάδων και ακολούθως αφαιρείται ο σπλήνας του ζώου και παρασκευάζεται εναιώρημα από B-λεμφοκύτταρα. Πολλά από αυτά παράγουν αντισώματα,

ωστόσο δε ζουν απεριόριστα. Για αυτό το λόγο συντήκονται με κύτταρα του μυελώματος. Ακολουθεί μεταφορά τους σε ειδικό περιοριστικό θρεπτικό υλικό που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη των ελεύθερων Β-λεμφοκυττάρων, ούτε των κυττάρων του μυελώματος παρά μόνο των υβριδωμάτων. Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι ταυτόσημες ανοσοσφαιρίνες που παράγονται από έναν κλωνικό πληθυσμό Β-κυττάρων. Προσφέρουν εξαιρετική ειδικότητα και αξιοπιστία σε αναλυτικές αντιδράσεις αλλά και σε θεραπευτικές προσεγγίσεις. Μπορούν να είναι ολόκληρα ανοσοσφαιρινικά μόρια, ή κλάσματα αυτών ή συνθέσεις διαφορετικών κλασμάτων. Συνήθως προκαλούν ανοσοαντίδραση σε κλινικές εφαρμογές. Για το λόγο αυτό παράγονται μονοκλωνικά αντισώματα με διαφόρους βαθμούς αυτολογοποίησης: χιμαιρικά, ανθρωποποιημένα ή και πλήρως ανθρώπινα. Στην κλινική πράξη, χρησιμοποιούνται λόγω της εξαιρετικής τους ειδικότητας για εστιασμένη κυτταροκτονία μέσω ενεργοποίησης του Συμπληρώματος ή μέσω οψωνινοποίησης-φαγοκυττάρωσης και για ειδική πρόσδεση ουσιών συζευγμένων επί του μορίου τους (ραδιοϊσότοπα, φάρμακα, φθοροχρωστικές, ένζυμα, μεταλλικά σφαιρίδια).

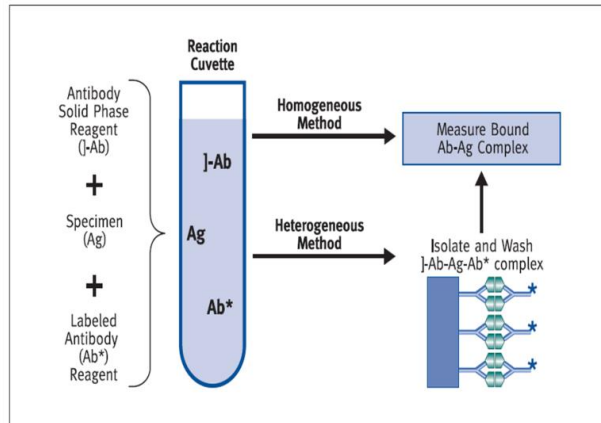


Εικόνα 3: Συνοπτική παρουσίαση της τεχνολογίας παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων. Η επιλογή των επιθυμητών κλώνων, ακολουθείται από την ανάπτυξη τους.

Ανοσοχημικές Μέθοδοι

Η Ανοσοχημεία προσφέρει απλές, ταχείες, ευαίσθητες και στην πλειοψηφία των περιπτώσεων εύκολα αυτοματοποιούμενες μεθόδους προς εφαρμογή σε διαγνωστικές αναλύσεις ρουτίνας σε κλινικά εργαστήρια. Οι Ανοσοχημικές μέθοδοι δεν προϋποθέτουν συνήθως εκτεταμένη και εξαντλητική επεξεργασία του δείγματος και δεν απαιτούν

ιδιαίτερα ακριβό εξοπλισμό. Οι περισσότερες εξ αυτών βασίζονται σε απλή ανίχνευση και μέτρηση ορισμένου φωτεινού ή φθορίζοντος σήματος. Οι ανοσοχημικές μέθοδοι έχουν ταχέως αντικαταστήσει τις χρωματογραφικές μεθόδους στο πεδίο των κλινικών διαγνώσεων, προσφέροντας ταχύτατη ανίχνευση αντισωμάτων που σχετίζονται με ασθένειες, μοριακών δεικτών νοσημάτων, ορμονών κ.λπ. Οι προσδιορισμοί που επιτυγχάνονται μπορεί να είναι ποιοτικοί ή ποσοτικοί, ενώ αξίζει να σημειωθεί πως η Ανοσοϊστοχημεία, εκ των βασικότερων διαγνωστικών εργαλείων στα σύγχρονα κλινικά εργαστήρια, βασίζεται εν πολλοίς στην αρχή της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος. Όλες οι ανοσοχημικές μέθοδοι βασίζονται στην απολύτου εξειδίκευσης και υψηλής ευαισθησίας αντίδραση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος. Κατά την εφαρμογή ανοσοχημικών μεθόδων προσδιορισμού, μπορεί το προς ανίχνευση μόριο στο δείγμα (αντιγόνο), να ταυτοποιηθεί και ποσοτικοποιηθεί μέσω του ανταγωνισμού του με το σεσημασμένο αντίστοιχο μόριο, για την πρόσδεση (συναγωνιστική πρόσδεση) σε ειδικό αντίσωμα. Το μη σεσημασμένο αντιγόνο (το προς ταυτοποίηση) παρεμποδίζει τη δέσμευση του σεσημασμένου, διότι ανταγωνίζονται για κοινή θέση πρόσδεσης. Στις μη συναγωνιστικές εκδοχές των μεθόδων, ενός ή δυο σταδίων, το προς ταυτοποίηση μόριο ανιχνεύεται με τη χρήση συνδυασμού αντισωμάτων διαφορετικής εξειδίκευσης. Οι μη συναγωνιστικές μέθοδοι παρέχουν υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση δεικτών που σχετίζονται με την καρδιακή και την ηπατική λειτουργία. Επιπλέον, γίνεται διάκριση των ανοσοχημικών μεθόδων σε ομοιογενείς και ετερογενείς. Οι πρώτες, δεν απαιτούν το διαχωρισμό του σχηματιζόμενου συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος από το ελεύθερο αντιγόνο, κατά την ολοκλήρωση της διαδικασίας και την εξαγωγή συμπερασμάτων και έτσι είναι ευκολότερες στην εφαρμογή και ταχείες στην εκτέλεσή τους, ενώ χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μικρομοριακών αντιγόνων, όπως φαρμακολογικά δραστικά μόρια. Αντίθετα, στις ετερογενείς, απαιτείται ο διαχωρισμός του σχηματιζόμενου συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος και η έκπλυση-απομάκρυνση του ελεύθερου αντιγόνου στα τελικά τους στάδια, πριν την ολοκλήρωση της διαδικασίας, ενώ η διαδικασία περιλαμβάνει συνήθως ενδιάμεσα στάδια και είναι περισσότερο χρονοβόρα.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση ομοιογενούς και ετερογενούς ανοσοχημικής αντίδρασης. Οι ομοιογενείς αντιδράσεις δεν απαιτούν το διαχωρισμό του σχηματιζόμενου συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος από το ελεύθερο αντιγόνο, ενώ στις ετερογενείς, απαιτείται ο παραπάνω διαχωρισμός και ακολούθως η έκπλυση-απομάκρυνση του ελεύθερου αντιγόνου.

Ανοσοχημικές μέθοδοι που χρησιμοποιούν σσημασμένα μόρια

Στις τεχνικές των ανοσοδοκιμασιών χρησιμοποιούνται συχνά **σσημασμένα μόρια** για την ανίχνευση αντιγόνων και αντισωμάτων. Είναι εξαιρετικά ευαίσθητες και πολύ οικονομικές αναφορικά με την κατανάλωση αντιδραστηρίων. Στις δοκιμασίες στερεάς φάσης για αντισώματα χρησιμοποιούνται:

A. Προσδέματα σσημασμένα με ένζυμα (ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέτρηση, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).

B. Προσδέματα σσημασμένα με ραδιοϊσότοπα (Ραδιοανοσοπροσδιορισμός, Radio-Immuno-Assay, RIA).

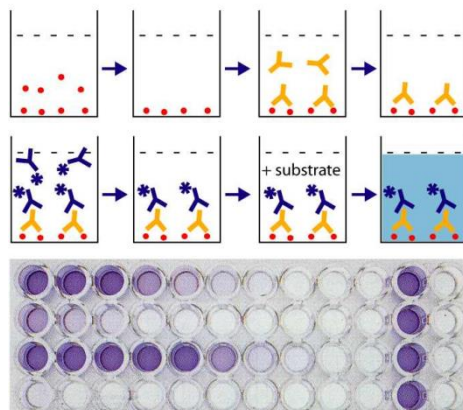
Στον ραδιοανοσοπροσδιορισμό σημαίνεται το σταθερό συστατικό (αντίσωμα ή αντιγόνο) με ραδιοϊσότοπο, συνήθως με ραδιενεργό ¹²⁵I. Στην ELISA γίνεται χημική σύνδεση ενός ενζύμου με το αντίσωμα ή το αντιγόνο. Αυτές είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες ανοσολογικές δοκιμασίες, διότι δίδουν τη δυνατότητα ελέγχου μμεγάλου αριθμού δειγμάτων σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Η **ακινητοποίηση του αντιγόνου** ή του αντισώματος σε στερεό υπόστρωμα μπορεί να γίνει είτε με προσκόλληση σε σφαιρίδια (αγαρόζης, κυτταρίνης,

πολυακρυλαμίδης κ.λπ) με χημικό δεσμό, είτε με φυσική προσρόφηση σε πλαστικές επιφάνειες με ασθενείς δυνάμεις (ηλεκτροστατικές, υδρόφοβες κλπ). Χάρης στον εύκολο χειρισμό των υλικών και την απλότητα της διαδικασίας αυτή η μέθοδος προσρόφησης/ακινητοποίησης χρησιμοποιείται ευρύτατα.

Ενζυμοσύνδετη Ανοσοπροσροφητική Μέθοδος (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

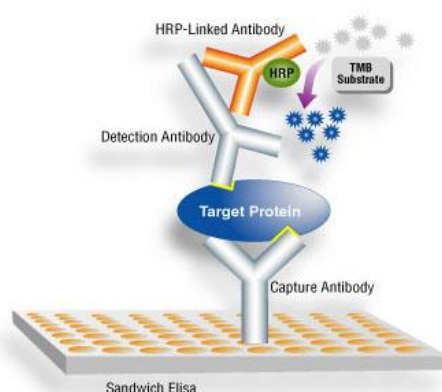
Η ενζυμοσύνδετη ανοσοδοκιμασία (ELISA) αποτελεί μια ευαίσθητη και ειδική αναλυτική μέθοδο για εντοπισμό και ποσοτική εκτίμηση διαλυτών βιομορίων-αντιγόνων. Η χρήση συζευγμένου ενζύμου που παράγει σήμα με χρωμοαντίδραση αντί ραδιενέργειας καθιστά την ELISA όχι μόνο περισσότερο ευαίσθητη αλλά και ασφαλέστερη από τη RIA ενώ διατηρεί την υψηλή ειδικότητα που προσδίδει ο δεσμός παράτοπου-επίτοπου (ο παράτοπος είναι η ειδική θέση του αντισώματος στην οποία γίνεται η πρόσδεση του επιτόπου του αντιγόνου). Αντιγόνα επωάζονται σε ισότονο διάλυμα αλάτων, μέσα σε φρεάτια ειδικών πλαστικών πλακών ή σε σωληνάκια. Μικρές ποσότητες προσροφώνται επάνω στην πλαστική επιφάνεια. Το ελεύθερο αντιγόνο απομακρύνεται με πλύση. (Στο πλακίδιο πρέπει να προστεθεί στη συνέχεια περίσσεια γνωστής πρωτεΐνης για να κορεστεί όλη η πλαστική επιφάνεια ώστε να παρεμποδιστεί οποιαδήποτε μη ειδική σύνδεση των μετέπειτα προστιθέμενων πρωτεϊνών). Προστίθεται το εξεταζόμενο δείγμα που περιέχει ενδεχομένως το υπό αναζήτηση αντίσωμα και το οποίο συνδέεται με το αντιγόνο. Οι μη προσδεμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται με πλύση. Το τυχόν προσδεμένο αντίσωμα ανιχνεύεται με την επακόλουθη προσθήκη σεσημασμένων αντι-αντισωμάτων. Συνήθως τα αντι-αντισώματα σημαίνονται μέσω της ομοιοπολικής σύνδεσής τους με ένζυμο. Το μη συνδεδεμένο αντι-αντίσωμα απομακρύνεται με πλύση. Το σεσημασμένο αντίσωμα καθίσταται ορατό με την προσθήκη χρωμογόνου, το οποίο είναι ένα άχρωμο υπόστρωμα επάνω στο οποίο δρα το ενζυμικό τμήμα του αντισώματος για να παραχθεί ένα έγχρωμο τελικό προϊόν. Η ποσότητα του εξεταζόμενου αντισώματος μετριέται εκτιμώντας την ποσότητα του έγχρωμου τελικού προϊόντος με σάρωση της οπτικής πυκνότητας των φρεατίων της πλάκας. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάγνωση πολλών φρεατίων με τη βοήθεια ειδικών φασματοφωτόμετρων ELISA, γεγονός που κάνει τη μέθοδο ταχύτατη. Η ELISA δεν υπολογίζει συγκέντρωση αλλά τίτλο του αναζητούμενου μορίου (μια συγκριτική έκφραση

της συγκέντρωσης μέσω μιας σειράς προτύπων γνωστού σήματος). Η ευαισθησία της τεχνικής είναι συνήθως περίπου για ανίχνευση 1-50 ng/ml ειδικού αντισώματος.



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση κλασικής ELISA – Μικροπλακίδιο ELISA. Η εμφάνιση χρώματος υποδηλώνει θετική αντίδραση και άρα την ύπαρξη του υπό αναζήτηση μορίου. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του μορίου στο δείγμα.

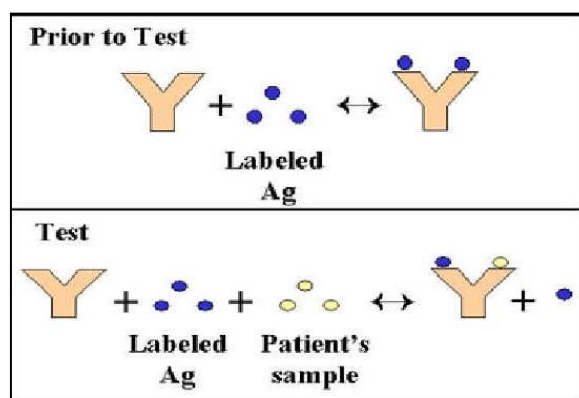
Εκτός από την κλασική ELISA, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές προσεγγίσεις κατά τις οποίες μπορεί το αντίσωμα να δεσμεύεται στο υπόστρωμα (αντί για το αντιγόνο) ή να χρησιμοποιούνται διαφορετικά προσδέματα που φέρουν το ένζυμο.



Εικόνα 6: Εναλλακτική ELISA, τύπου Sandwich. Ειδικό αντίσωμα δεσμεύεται σταθερά στο υπόστρωμα, ακολουθεί σύνδεση της πρωτεΐνης που ανιχνεύεται στο δείγμα, ενώ ένα δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με ένζυμο προστίθεται στην αντίδραση. Το ένζυμο διασπά το υπόστρωμά του σε μια αντίδραση που παράγει χρώμα.

Ραδιοανοσοπροσοφητική διαδικασία (RadioImmunoAssay, RIA)

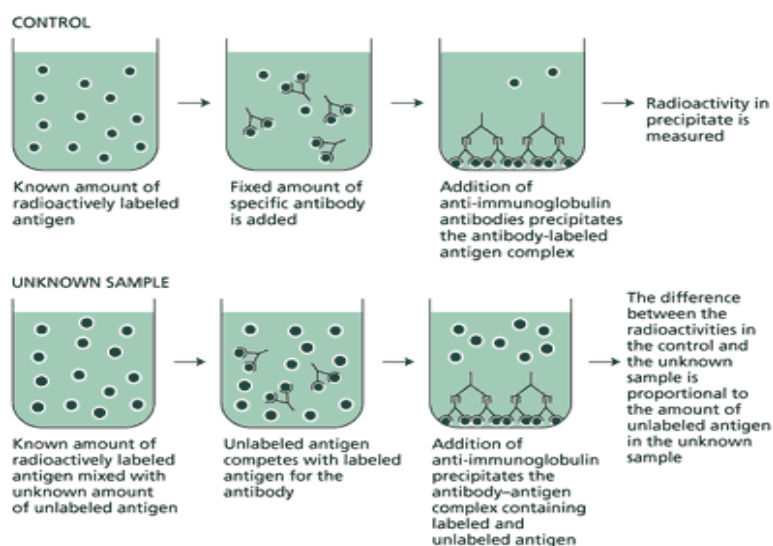
Η RIA αποτελεί ιδιαίτερα ευαίσθητη ανοσοχημική μέθοδο, ευρέως εφαρμοζόμενη για τη μέτρηση-ποσοτικοποίηση αντιγόνων με πολύ χαμηλή συγκέντρωση σε δείγματα, όπως βιολογικά υγρά. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, γνωστή ποσότητα αντιγόνου ραδιοσημαίνεται με τη χρήση συνήθως I^{125} . Γνωστή ποσότητα σεσημασμένου αντιγόνου και ποσότητα δείγματος (που πιθανόν να περιέχει το ελεύθερο αντιγόνο) επώάζονται με ειδικό αντίσωμα, συνήθως μονοκλωνικό. Το σεσημασμένο αντιγόνο, ανταγωνίζεται με το αντιγόνο του δείγματος για πεπερασμένο αριθμό παρατόπων του αντισώματος.



Εικόνα 7: Η αρχή λειτουργίας της Ραδιοανοσοπροσοφητικής μεθόδου. Γνωστή ποσότητα σεσημασμένου αντιγόνου και ποσότητα δείγματος επώάζονται με ειδικό αντίσωμα, συνήθως μονοκλωνικό. Το σεσημασμένο αντιγόνο, ανταγωνίζεται με το αντιγόνο του δείγματος (εφόσον αυτό υπάρχει) για συγκεκριμένο αριθμό δεσμευτικών περιοχών του αντισώματος.

Τα προσδεμένα αντιγόνα διαχωρίζονται με κατάλληλο τρόπο από τα ελεύθερα και μετράται η ραδιενέργεια είτε του υπολειπόμενου ελεύθερου σεσημασμένου αντιγόνου στο υπερκείμενο υγρό, είτε η ραδιενέργεια του συμπλοκοποιημένου αντιγόνου στο ίζημα. Υψηλά ποσά ραδιενέργειας καταδεικνύουν χαμηλή συγκέντρωση του αντιγόνου στο δείγμα και αντίστροφα. Έτσι, η μετρούμενη ραδιενέργεια είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση του υπό μελέτη αντιγόνου στο δείγμα. Για τη αφαίρεση της ραδιενέργειας υποβάθρου (μη ειδική δέσμευση, θόρυβος), μετρούνται δείγματα-αρνητικοί μάρτυρες που δεν περιέχουν το υπό εξέταση αντιγόνο. Η χαμηλή ειδική ραδιενέργεια επιτρέπει ακριβέστερη ποσοτική εκτίμηση του τίτλου (σύγκριση του ραδιενεργού σήματος-«κρούσεις»- με αυτό γνωστών προτύπων δειγμάτων) αλλά όχι μεγάλη ευαισθησία, διατηρώντας ως

μέγιστο πλεονέκτημα της τεχνικής την υψηλή ειδικότητα που προσδίδει ο δεσμός παράτοπου-επίτοπου (κατ' ουσία αντιγόνου-αντισώματος), με αποτέλεσμα αυξημένη διακριτική ικανότητα σε διαλύματα ομοειδών μορίων με μικρές αλλά σημαντικές δομικές διαφορές, όπως διάφορα μικροβιακά ή καρκινικά αντιγόνα και αυτοαντιγόνα.



Εικόνα 8: Μέτρηση αντιγόνου σε δείγμα με τη βοήθεια της Ραδιοανοσοπροσροφητικής μεθόδου. Το σεσημασμένο αντιγόνο, ανταγωνίζεται με το αντιγόνο του δείγματος για πεπερασμένο αριθμό παρατόπων του αντισώματος. Δεύτερο αντίσωμα, έναντι της σταθερής περιοχής του πρώτου (αντιορός), χρησιμοποιείται για την καταβύθιση των συμπλόκων, εκείνων με το σεσημασμένο και αυτών με το μη σεσημασμένο αντιγόνο. Η μετρούμενη διαφορά ραδιενέργειας (Δcrm), μεταξύ του δείγματος-μάρτυρα και του πειραματικού, είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση του υπό μελέτη αντιγόνου στο δείγμα.

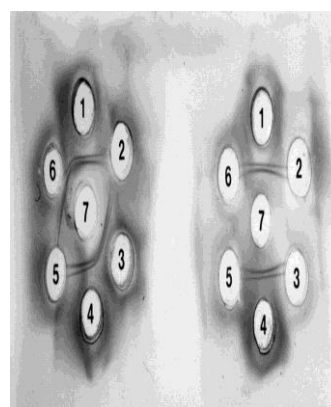
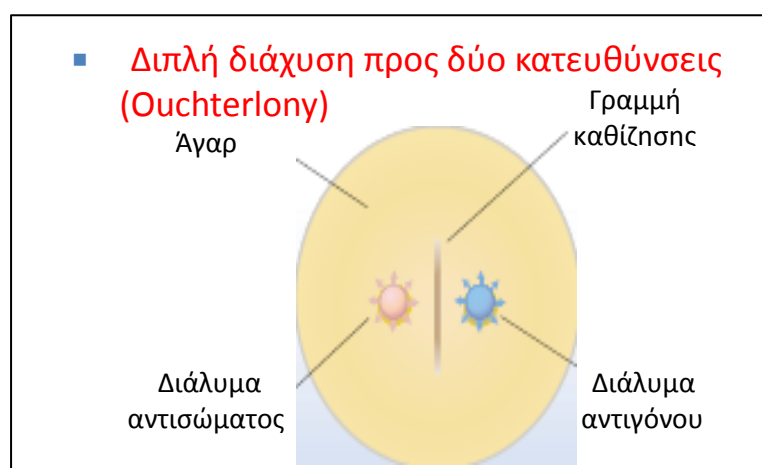
Ανοσοραδιομετρική μέθοδος (Immuno-Radio-Metric-Assay, IRMA)

Αναμιγνύονται κατάλληλης εξειδίκευσης σεσημασμένο μονοκλωνικό αντίσωμα και το δείγμα που πιθανόν να περιέχει το ζητούμενο αντιγόνο. Προστίθεται ακινητοποιημένο αντιγόνο με σκοπό τη δέσμευση της περίσσειας του αντισώματος. Το μονοκλωνικό αντίσωμα προσδένεται τόσο στο αντιγόνο του δείγματος (εφόσον είναι παρόν), όσο και στο ακινητοποιημένο αντιγόνο. Ακολουθεί φυγοκέντριση του δείγματος, οπότε το σύμπλοκο ελεύθερου αντιγόνου-αντισώματος παραμένει στο υπερκείμενο. Ακολουθεί μέτρηση της

ραδιενέργειας για την ποσοτικοποίηση του αντιγόνου του δείγματος. Αντίστοιχα μπορεί να ανιχνευθεί άγνωστο αντίσωμα σε δείγμα (π.χ σε δείγματα με υποψία παρουσίας αυτοαντισωμάτων).

Ανοσοδιάχυση

Η ανοσοδιάχυση είναι μέθοδος ποιοτικής και/ή ποσοτικής μέτρησης της συγκέντρωσης αντιγόνων ή αντισωμάτων σε κάποιο βιολογικό υγρό. Υπάρχουν 2 βασικά είδη ανοσοδιάχυσης. Η (απλή) ακτινωτή ανοσοδιάχυση που είναι κυρίως ποσοτική μέθοδος, και η διπλή ανοσοδιάχυση που είναι και ποσοτική μέθοδος. Είναι μια εξαιρετικά δημοφιλής τεχνική λόγω της ευρείας διαθεσιμότητας και της απλότητάς της. Η αρχή της μεθόδου είναι απλή: το αντιγόνο διαχέεται σε πηκτή αγαρόζη, στην οποία το αντίσωμα είναι ομοιόμορφα κατανεμημένο. Η περιοχή του ιζήματος που σχηματίζεται όταν η διάχυση ολοκληρωθεί (διάμετρος δακτυλίου), είναι ανάλογη με την ποσότητα του παρόντος αντιγόνου. Η διπλή ανοσοδιάχυση χρησιμοποιείται για την εύρεση της συγγένειας μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος και επίσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αντιγόνου σε ένα δείγμα. Παραλλαγή της διπλής, αποτελεί και η Κυκλοτερής Ανοσοδιάχυση σε πλάκα.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της διπλής ανοσοδιάχυσης. Χρησιμοποιείται για την εύρεση της συγγένειας μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος και επίσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αντιγόνου σε ένα δείγμα

Ηλεκτροφορητικές μέθοδοι

Ηλεκτροφόρηση είναι η μετακίνηση ηλεκτρικά φορτισμένων μορίων σε ηλεκτρικό πεδίο. Ανάλογα με το φορτίο, το μέγεθος, και το σχήμα που έχουν οι πρωτεΐνες, όταν βρίσκονται σε ηλεκτρικό πεδίο διαχωρίζονται σε διακριτές μεταξύ τους ζώνες. Η μετανάστευση των φορτισμένων μορίων μπορεί να γίνει είτε μέσα σε κάποιο διάλυμα είτε με τη χρησιμοποίηση ενός μέσου υποστήριξης όπως είναι το χαρτί, η οξική κυτταρίνη, ή το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην πράξη γιατί είναι χημικά αδρανές, εύκολα παρασκευάσιμο, διάφανο και σταθερό σε ενζυμική επεξεργασία. Επίσης, η διάμετρος των πόρων του πλέγματος μπορεί να τροποποιηθεί ελεγχόμενα ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες διαχωρισμού. Κατά την τεχνική αυτή, η διαφορετική θέση μετανάστευσης της κάθε πρωτεΐνης στο πήκτωμα (ή της κάθε πολυπεπτιδικής αλυσίδας όταν επικρατούν αποδιατακτικές συνθήκες), εξαρτάται κυρίως από το μοριακό βάρος κάθε πρωτεΐνης.



Εικόνα 10: Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

Το πήκτωμα έχει βαφεί με κατάλληλη χρωστική και αποχρωματιστεί, ώστε να είναι ορατές οι ζώνες που αντιστοιχούν σε διαφορετικές πρωτεΐνες. Παράλληλα με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και μίγμα πρωτεϊνών με γνωστά μοριακά βάρη ως μάρτυρας.

Ανοσοηλεκτροφόρηση

Η ανοσοηλεκτροφόρηση αποτελεί μια παραλλαγή της κλασικής ηλεκτροφόρησης, η οποία συνδυάζει στοιχεία ανοσοβιολογίας και βοηθά στην ταυτοποίηση και ανάλυση μορίων με ανοσοβιολογική δραστικότητα. Περιλαμβάνει σειρά μεθοδολογιών και τεχνικών που στοχεύουν στην ποσοτική και ποιοτική ανάλυση μορίων με βιολογικό ενδιαφέρον. Χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης και παραλλάσσεται ο τρόπος εφαρμογής του δείγματος. Στην απλούστερη εκδοχή, διανοίγεται στο πήκτωμα μια οπή και εκεί τοποθετείται το προς ανάλυση δείγμα (αντιγόνο). Χαράσσεται επίσης επιμήκης αύλακα, όπου θα τοποθετηθεί το κατάλληλο αντίσωμα. Μετά την τοποθέτηση του δείγματος εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο παράλληλα στην αύλακα και τα συστατικά του δείγματος υφίστανται ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, και την αναίρεση του ηλεκτρικού πεδίου, τοποθετείται στην αύλακα το διάλυμα του αντισώματος και επιτρέπεται τόσο στο αντίσωμα, όσο και στις ζώνες του δείγματος να διαχυθούν. Αν και εφόσον τα μόρια του αντισώματος, συναντήσουν τα κατάλληλα αντιγόνα στο δείγμα, τότε λαμβάνει χώρα αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος και το προκύπτον σύμπλοκο κατακρημνίζεται σχηματίζοντας καμπυλωτές γραμμές, που μοιάζουν με τόξα. Παραλλαγές της περιγραφείσης μεθόδου αποτελούν η Διασταυρωτή Ανοσοηλεκτροφόρηση και η Ρουκετοειδής Ανοσοηλεκτροφόρηση. Αν το αρχικό στάδιο της ανοσοηλεκτροφόρησης, αντικατασταθεί με Ισοηλεκτρική Εστίαση, τότε προκύπτει η τεχνική της Ανοσοηλεκτροεστίασης. Η παραλλαγή αυτή, εκτός από τις παρεχόμενες ανοσοβιολογικές πληροφορίες, αναφορικά με τα ισοηλεκτρικά σημεία των περιεχόμενων στο δείγμα ουσιών, μπορεί να φανεί χρήσιμη και στον προσδιορισμό τυχόν προσμίξεων του δείγματος.

Ανοσοκαθήλωση

Η ανοσοκαθήλωση αποτελεί ποιοτική μέθοδο, με αισθητά υψηλότερη ευαισθησία συγκριτικά με την ανοσοηλεκτροφόρηση. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με τα φορτία τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια γίνεται ταυτοποίηση των πρωτεϊνών μέσω ανοσοκαθήλωσης, χρησιμοποιώντας ειδικούς μονοδύναμους αντιορούς. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται όχι μόνο η ταυτοποίηση της μονοκλωνικής πρωτεΐνης αλλά και ο καθορισμός του τύπου των ελαφρών και βαριών αλυσίδων. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που πρέπει να ανιχνευθούν εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις

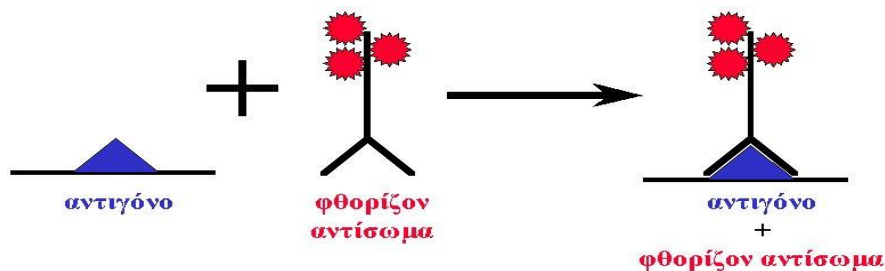
ανοσοσφαιρινών όπως για παράδειγμα σε Αμυλοείδωση, Μονήρες Πλασμοκύττωμα καθώς και στη διάγνωση υποτροπών μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών.



Εικόνα 11: Στάδια της ανοσοκαθήλωσης. Ο υπό μελέτη ορός ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα, το οποίο ακολούθως επιστρώνεται με αντιορό σε όλη του την επιφάνεια. Την επώαση διαδέχεται η προσθήκη κατάλληλης χρωστικής, που θα κάνει ορατή τη ζώνη καθίζησης.

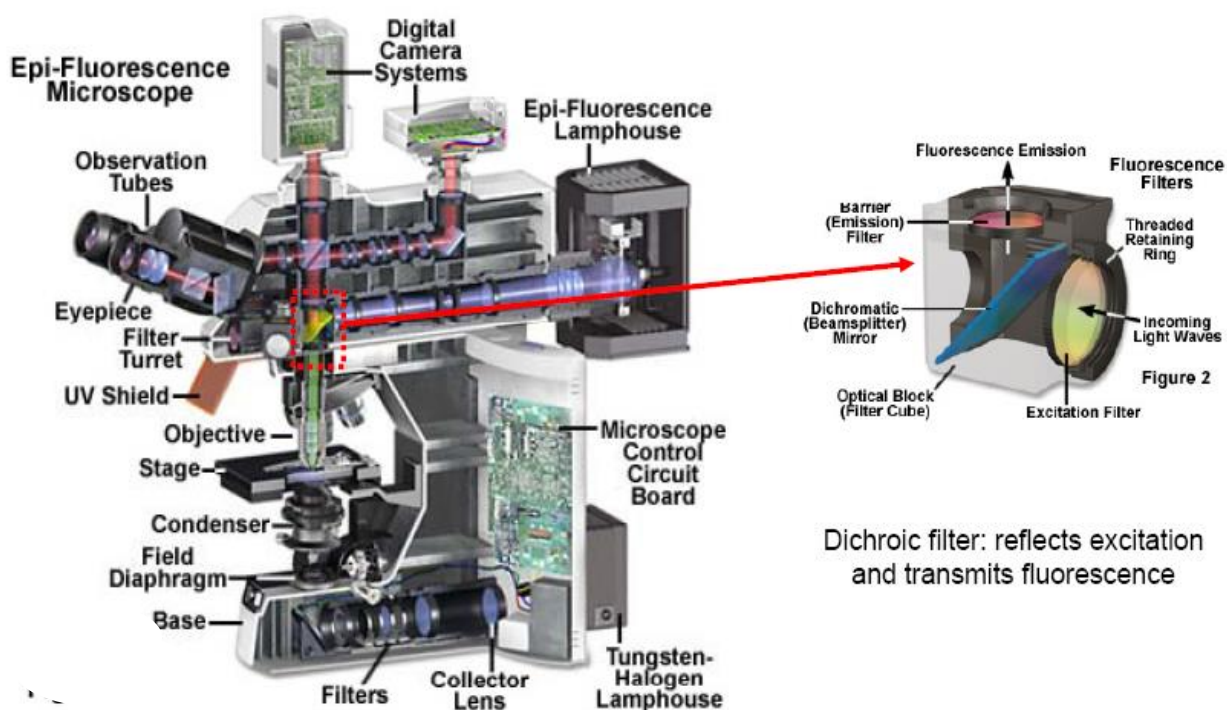
Ανοσοφθορισμός (Immuno-Fluorescence-Assay, IFA)

Ο ανοσοφθορισμός αποτελεί ανοσοϊστοχημική τεχνική κατά την οποία το ειδικό σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος (Ag-Ab complex) γίνεται ορατό στο μικροσκόπιο φθορισμού, με τη βοήθεια τροποποιημένου αντισώματος που φέρει προσδεμένη φθοροχρωστική.



Εικόνα 12: Αρχή λειτουργίας του Ανοσοφθορισμού. Το ειδικό σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος (Ag-Ab complex) γίνεται ορατό στο μικροσκόπιο φθορισμού.

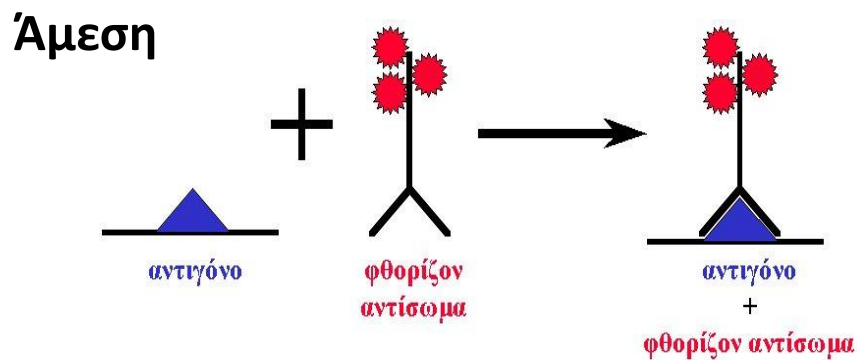
Ο ανοσοφθορισμός έφερε επανάσταση στις απεικονιστικές τεχνικές, αλλά κυρίως στη μικροσκοπία. Συνδυάζει όπως αναφέρθηκε ήδη ένα αντίσωμα (ή κλάσμα αυτού που φέρει τον παράτοπο-περιοχή αλληλεπίδρασης με τον επίτοπο του αντιγόνου) με μια φθοροχρωστική. Ο παράτοπος προσδένεται στον επίτοπο, με αποτέλεσμα τον ειδικό εντοπισμό του φθοροχρώματος σε αυτόν. Υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, το φθορόχρωμα εκπέμπει φώς στην ορατή περιοχή, με αποτέλεσμα την ευκρινή και ειδική διάκριση του επιτόπου.



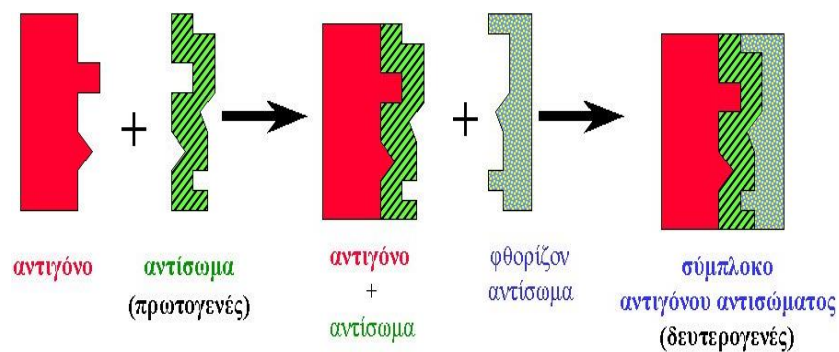
Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση και απεικόνιση εσωτερικής δομής και οργανολογίας του μικροσκοπίου φθορισμού.

Η ύπαρξη φθοροχρωστικών με διαφορετικά φάσματα εκπομπής (ορατά χρώματα) επιτρέπει την ταυτόχρονη χρήση αντισωμάτων με διαφορετικούς παρατόπους για διαφορεική χρώση εντός συγκεκριμένου δείγματος, με αποτέλεσμα είτε διαφορική

ανίχνευση είτε συνανίχνευση αριθμού διαφορετικών επιτοπικών δομών. Οι εφαρμογές είναι πολλές, καθώς περιορίζονται αποκλειστικά από τον διαθέσιμο αριθμό παρατόπων. Αντίθετα, η διακριτική ικανότητα της μεθόδου περιορίζεται από τον σχετικά μικρό αριθμό διαθέσιμων και διακριτών χρωμάτων εκπομπής των φθοροχρωστικών, επιτρέποντας μικρό αριθμό συμπαρατηρούμενων δομών. Στον άμεσο ανοσοφθορισμό, το σεσημασμένο με τη φθορίζουσα ουσία αντίσωμα αλληλεπιδρά με το ειδικό αντιγόνο και ακολουθεί η καταγραφή του σήματος φθορισμού. Στην έμμεση παραλλαγή της μεθόδου, ένα πρώτο μη σεσημασμένο αντίσωμα αλληλεπιδρά με το αντίστοιχο αντιγόνο του δείγματος και ακολουθεί η προσθήκη σεσημασμένου αντιορού, που αντιδρά με το πρώτο αντίσωμα και ακολουθεί η καταγραφή του σήματος.

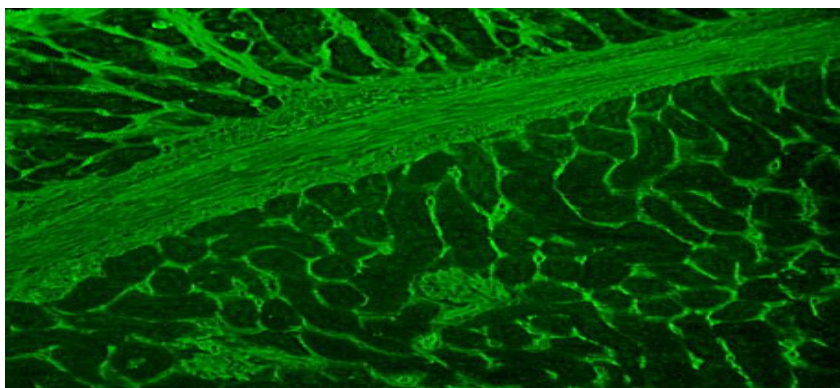


Έμμεση μέθοδος



Εικόνα 14: Άμεσος και Έμμεσος ανοσοφθορισμός. Στην άμεση παραλλαγή, το σεσημασμένο με τη φθοροχρωστική αντίσωμα αλληλεπιδρά με το αντιγόνο και ακολουθεί η καταγραφή του σήματος. Στην έμμεση, ένα πρώτο μη σεσημασμένο αντίσωμα(πρωτογενές) αλληλεπιδρά με αντιγόνο του δείγματος και ακολουθεί η προσθήκη σεσημασμένου αντιορού (δευτερογενές αντίσωμα), που αντιδρά με το πρώτο αντίσωμα και ακολουθεί η καταγραφή του σήματος.

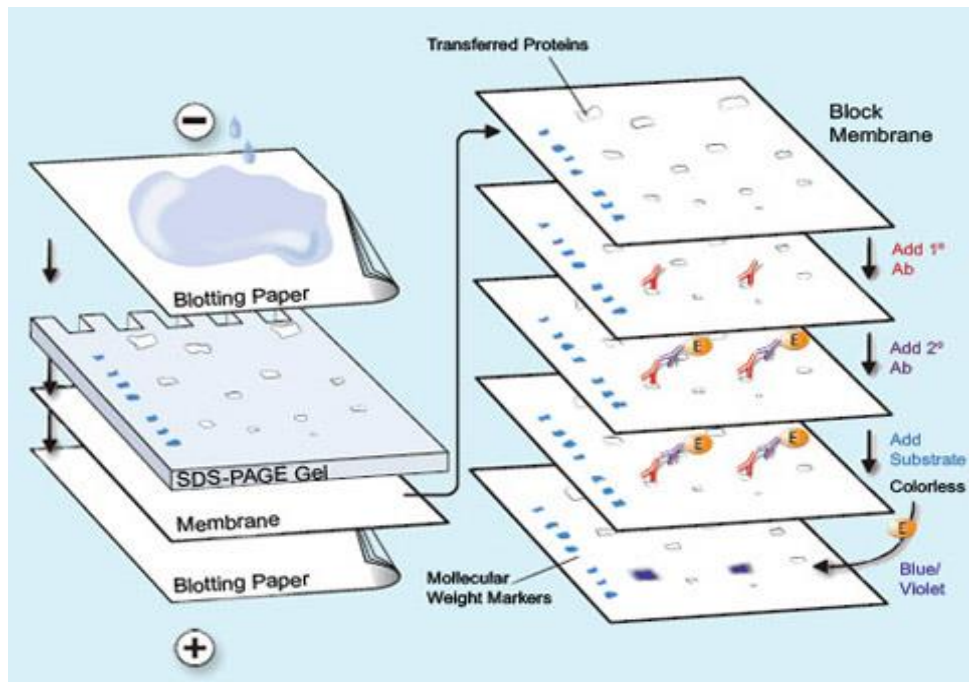
Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται το χαμηλό κόστος, η ευκολία στην εκτέλεση, ο εντοπισμός της ακριβούς-φυσικής θέσης του αντιγόνου στο βιολογικό δείγμα και η ικανοποιητική ειδικότητα και ευαισθησία. Στα μειονεκτήματα της τεχνικής περιλαμβάνεται ο χρόνος που απαιτείται και η ανάγκη ύπαρξης εξειδικευμένου προσωπικού, ο ημιποσοτικός προσδιορισμός και η αδυναμία ανίχνευσης διαλυτών αντιγόνων.



Εικόνα 15: Χαρακτηριστική εικόνα μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού. Αντισώματα έναντι της Ρετικουλίνης (Anti-Reticular Antibodies-ARA).

Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting, Western Blotting)

Η αποτύπωση αποτελεί μια ευρεία μέθοδο ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης βιολογικών μακρομορίων, στην οποία, μόρια που έχουν ήδη διαχωριστεί μεταξύ τους, μεταφέρονται σε σταθερό υπόστρωμα, συνήθως μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή πολυβινυλοχλωριδίου, όπου και αφήνουν το αποτύπωμά τους (στύπωμα). Τα μεταφερθέντα μόρια υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία για τον ποιοτικό και ποσοτικό τους προσδιορισμό. Η μέθοδος που εφαρμόζεται για την ανάλυση πρωτεϊνικών μορίων αναφέρεται ως ανοσοαποτύπωση ή ανάλυση κατά Western. Οι πρωτεΐνες που έχουν μεταφερθεί στη μεμβράνη ανιχνεύονται εν συνεχεία με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων σε δυο στάδια. Προηγείται η στόχευση της υπό εξέταση πρωτεΐνης με ειδικό, έναντι αυτής αντίσωμα και ακολουθεί η προσθήκη δεύτερου αντισώματος, που αναγνωρίζει το πρώτο και διαθέτει συζευγμένο ένζυμο που μπορεί να αντιδρά με ορισμένο υπόστρωμα και να παράγει οπτικά διακριτό προϊόν (αντίδραση χημειοφωταύγειας). Η ένταση του σήματος είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση της υπό ανάλυση πρωτεΐνης.



Εικόνα 16: Ανοσοαποτύπωση κατά Western - Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου. Με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου τα πρωτεϊνικά μόρια μεταφέρονται από το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης στη μεμβράνη. Προστίθεται το ειδικό αντίσωμα αναγνώρισης, ακολούθως το δεύτερο ενζυμοσύνδετο αντίσωμα και τέλος το υπόστρωμα του ενζύμου. Το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης συσχετίζεται με την ποσότητα της αρχικής στοχευόμενης πρωτεΐνης

Θολοσιμετρία

Με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου, καταμετράται η ελάττωση της έντασης του φωτός λόγω σκεδασμού, καθώς αυτό διέρχεται μέσα από εναιώρημα (δείγμα προς μελέτη), υπό γωνία 180° . Η μετρούμενη ελάττωση είναι γενικά ανάλογη με τη συγκέντρωση των αιωρούμενων σωματιδίων ή συμπλόκων και έτσι επιτυγχάνεται με τη βοήθεια προτύπων η εύρεση της συγκέντρωσης αυτών. Η θολοσιμετρία αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για δείγματα με έντονη θολερότητα, όπου τα αιωρούμενα σωματίδια έχουν μεγάλο μέγεθος σε σχέση με το μήκος κύματος του ορατού φωτός (κύτταρα, ανοσοσυμπλέγματα).

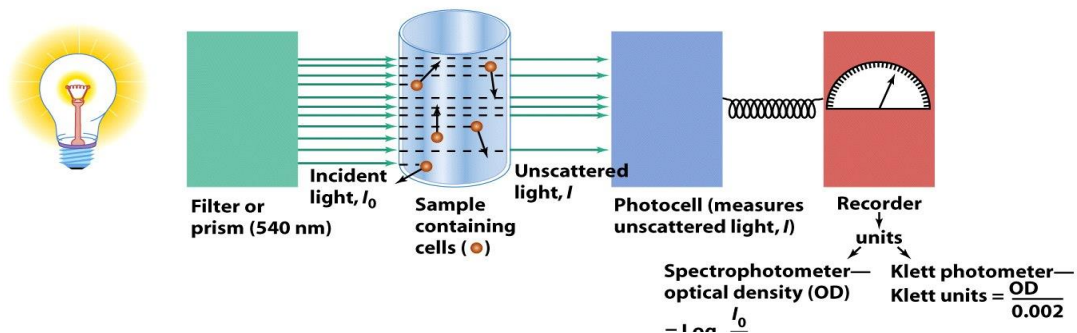
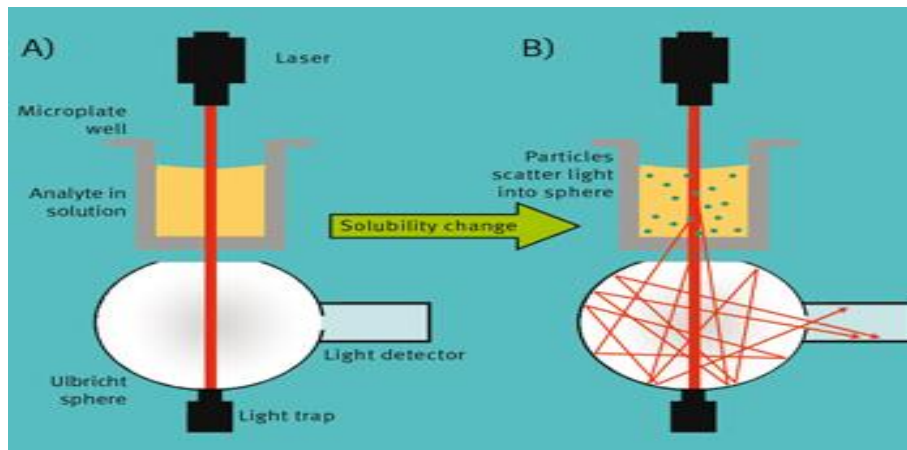


Figure 6-12a Brock Biology of M
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc

Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης μέτρησης κατά την εφαρμογή της τεχνικής της θολοσιμετρίας. Καταμετράται η ελάττωση της έντασης του φωτός λόγω σκεδασμού, καθώς αυτό διέρχεται μέσα από εναιώρημα (δείγμα προς μελέτη), υπό γωνία 180° .

Νεφελομετρία

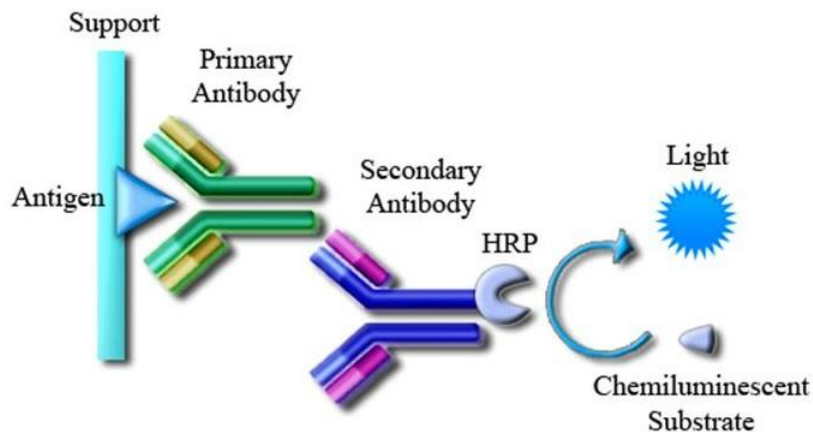
Η νεφελομετρία βασίζεται στη μέτρηση της ποσότητας φωτός που σκεδάζεται υπό γωνία, σχετικά με το προσπίπτον φως της πηγής, όταν αυτό διέρχεται μέσα από εναιώρημα σωματιδίων, κυττάρων ή συμπλόκων. Αποτελεί την αναλυτική μέθοδο εκλογής για δείγματα σχετικά διαυγή, στα οποία τα αιωρούμενα σωματίδια έχουν μικρό μέγεθος σε σχέση με το μήκος κύματος του ορατού φωτός. Μεταξύ των εφαρμογών αξίζει να αναφερθούν ο προσδιορισμός φαρμάκων σε βιολογικά υγρά, ελευθέρων ή συνδεδεμένων σε πρωτεΐνες του ορού (Αντιεπιληπτικά, Αντιβιοτικά), η παρακολούθηση της αύξησης μικροβιακών πληθυσμών, η ποσοτική ανάλυση πρωτεϊνών στον ορό (Σερουλοπλασμίνη, Τρανσφερρίνη, Αλβουμίνη) κ.λπ. Αποτελεί μέθοδο πιο ειδική από τη θολοσιμετρία. Μεταξύ των πλεονεκτημάτων αναφέρονται η ακρίβεια, η ευκολία εφαρμογής, η ικανοποιητική ευαισθησία, η ειδικότητα, η δυνατότητα μέτρησης χαμηλών συγκεντρώσεων των υπό εξέταση ουσιών και η ταχύτητα.



Εικόνα 17: Αρχή λειτουργίας της αναλυτικής μεθόδου της νεφελομετρίας. Βασίζεται στη μέτρηση της ποσότητας φωτός που σκεδάζεται υπό γωνία σχετικά με το προσπίπτον φως, όταν αυτό διέρχεται μέσα από εναιώρημα σωματιδίων, κυττάρων ή συμπλόκων.

Ανοσοχημειοφωταύγεια (Chemiluminescence-Immuno-Assay CHIA)

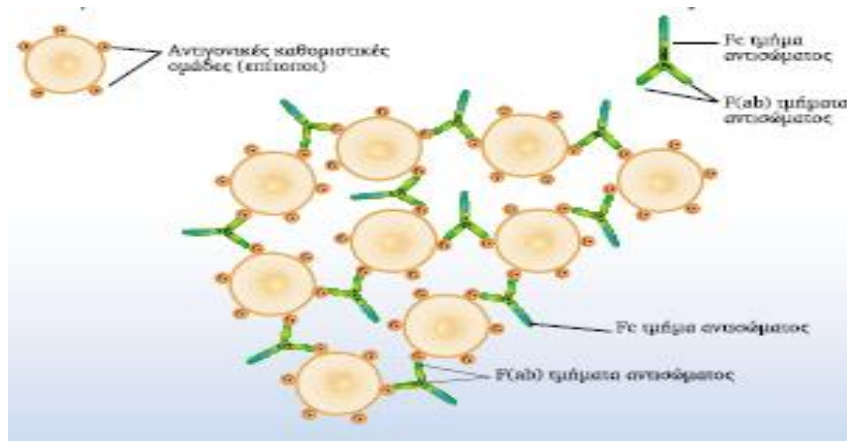
Η χημειοφωταύγεια ως φυσικοχημικό φαινόμενο λαμβάνει χώρα, όταν ενέργεια υπό τη μορφή φωτός, απελευθερώνεται από υλικά, κατά τη διάρκεια μιας χημικής αντίδρασης. Σημαντικός αριθμός μορίων διαθέτει την ικανότητα εκδήλωσης χημειοφωταύγειας, μεταξύ αυτών, η Λουμινόλη, Εστέρες της Ακριδίνης, παράγωγα του Ρουθενίου κ.λπ. Στις χημειοφωταυγιομετρικές μεθόδους, αντί χρωμογόνων ή φθορίζοντων υποστρωμάτων, χρησιμοποιούνται υποστρώματα τα οποία φωταυγάζουν, έχουν δηλαδή την ιδιότητα να μετατρέπουν μέρος της ενέργειας, από μία επισυμβαίνουσα χημική αντίδραση, σε φωτεινή ακτινοβολία. Η διάρκεια εκπομπής ποικίλλει και κυμαίνεται από στιγμιαία αναλαμπή, μέχρι εκπομπή σημαντικά μεγάλης χρονικής διάρκειας. Ανάλογα με το είδος του εκπεμπόμενου φωτός μπορεί και να απαιτείται ποικιλία καταγραφικών οργάνων. Είναι κατάλληλη για την επισήμανση και μέτρηση τόσο αντιγόνων όσο και αντισωμάτων. Η ποσότητα του εκπεμπόμενου φωτός κατά την εκδήλωση του φαινομένου, είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του υπό μελέτη και στοχευόμενου μορίου. Σημαντικές εφαρμογές της μεθόδου στη σύγχρονη διαγνωστική αποτελούν η χρήση της για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση αντιθυρεοσφαιρικών αντισωμάτων (anti-TG) και αντισωμάτων κατά της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (anti-TPO), σε πολύ κοινές θυρεοειδοπάθειες κ.α.



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση της ανοσοχημειοφωταυγικής αντίδρασης. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι χημικώς προσδεδεμένο με ένζυμο (*Horse Radish Peroxidase*, HRP) και η αλληλεπίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμα προκαλεί την εκπομπή φωτός, βάσει του φαινομένου της χημειοφωταύγειας.

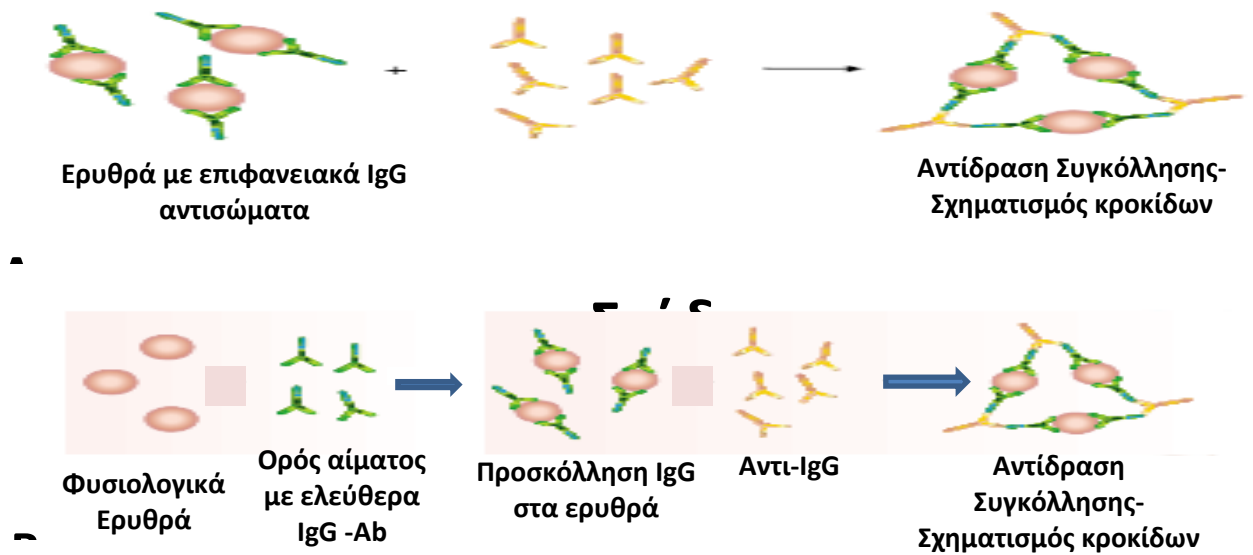
Αντιδράσεις Συγκόλλησης

Διαγνωστική μεθοδολογία με μεγάλο εύρος παραλλαγών που βασίζεται στην ειδική αντίδραση η οποία εκδηλώνεται μεταξύ αντιγονικών επιτόπων αντιγόνων και ειδικών δεσμευτικών θέσεων των αντισωμάτων (παράτοποι). Οι συγκολλητινοαντιδράσεις, σε περίπτωση που υπάρχει η προς ταυτοποίηση ουσία-στόχος σε διαυγές διάλυμα δείγματος, δημιουργούν ίζημα, πιστοποιώντας την παρουσία της, μέσω μεταβολής της θολερότητας του διαλύματος αντίδρασης. Βασίζονται στην ύπαρξη πολλαπλών επιτόπων σε ένα μόριο αντιγόνου και στην ύπαρξη δύο παρατόπων σε κάθε αντίσωμα (μονοκλωνικό ή μη). Ο συνδυασμός αυτών των ιδιοτήτων δημιουργεί ένα πλέγμα από διασυνδεδεμένα με αντίσωμα μόρια του αντιγόνου, με αποτέλεσμα την κροκίδωση. Εκτός από την απλότητα της εξέτασης, οι συγκολλητινοαντιδράσεις χαρακτηρίζονται από υψηλή ειδικότητα, λόγω του δεσμού επιτόπου-παρατόπου και μπορεί να έχουν επιλεγόμενο φάσμα ανίχνευσης: αν παράδειγμα επιλεγεί και αναπτυχθεί αντίσωμα έναντι ενός τελείως ειδικού επιτόπου, το φάσμα ανίχνευσης θα έχει εξαιρετική ειδικότητα έναντι του συγκεκριμένου αντιγόνου. Αν επιλεγεί περισσότερο κοινός επίτοπος, το φάσμα ανίχνευσης αυξάνεται και περιλαμβάνει όλα τα πιθανά αντιγόνα-φορείς ενώ μειώνεται η διακριτικότητα της τεχνικής.



Εικόνα 19: Διαγραμματική απεικόνιση συγκολλητινοαντίδρασης. Ο σχηματισμός του δικτυωτού πλέγματος (κροκίδα) προϋποθέτει αυξημένη αντιγονική ισχύ, σωστή αναλογία αντιγόνου-αντισώματος, παρουσία κατάλληλων ηλεκτρολυτών και σωστή θερμοκρασία αντίδρασης. Η θολερότητα είναι εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση του αντιγόνου και συναρτάται ευθέως με αυτή.

Μια κλασική δοκιμή που έχει διαγνωστική αξία και βασίζεται στις συγγολλητινοαντιδράσεις είναι η δοκιμή κατά Coombs. Μια σειρά από ασθένειες, καθώς και ορισμένα φάρμακα (κινιδίνη, μεθυλντόπα), μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή αντισωμάτων, τα οποία στοχεύουν τα εαυτά ερυθρά αιμοσφαίρια και μπορεί είτε να προσκολλούνται στην επιφάνεια αυτών ή να κυκλοφορούν στο αίμα. Το αποτέλεσμα της δράσης των αντισωμάτων αυτών είναι η καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων και η συνακόλουθη εκδήλωση συμπτωμάτων αναιμίας. Η άμεση δοκιμή κατά Coombs στοχεύει στην αποκάλυψη των αντισωμάτων που βρίσκονται σταθερά προσκολλημένα στην επιφάνεια των αιμοσφαιρίων, ενώ η έμμεση στην ταυτοποίηση κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων. Η έμμεση εφαρμόζεται συχνά σε ελέγχους που ακολουθούν μεταγγίσεις αίματος για θεραπευτικούς σκοπούς. Και στις δυο περιπτώσεις ο σχηματισμός κροκίδων υποδηλώνει την ύπαρξη αυτοαντισωμάτων έναντι των ερυθρών αιμοσφαιρίων.



Εικόνα 20: Συγκολλητινοαντίδραση κατά Coombs. Στην άμεση αντίδραση A), επιφανειακές ανοσοσφαιρίνες αντιδρούν με τον αντιορό και σχηματίζουν κροκίδες. Στην έμμεση αντίδραση B), κυκλοφορούντα αντισώματα αλληλεπιδρούν με τα ερυθρά αιμοσφαίρια και η προσθήκη αντιορού οδηγεί στην κροκίδωση του δείγματος.