

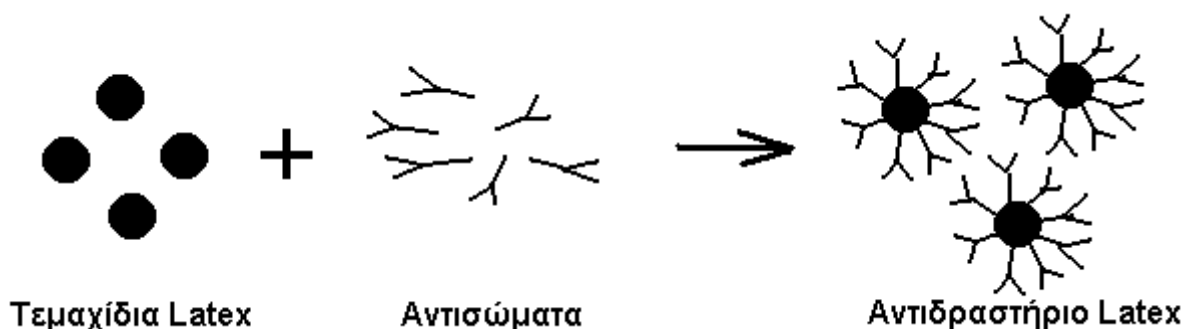
ΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΟΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Εισαγωγή

Οι συγκολλητινοαντιδράσεις (**LAT - Latex Agglutination Test**) είναι η πιο πρόσφορη ανοσολογική μέθοδος για το μικροβιολογικό και ανοσολογικό εργαστήριο. Είναι η παλαιότερη ανοσολογική τεχνική αφού πρωτοπεριγράφηκε από τους Max Gruber και Herbert Durham μόλις το 1896 (για το δονάκιο της χολέρας και τον τυφοειδή πυρετό). Βασίζονται στην ορατή ένωση αντιγόνου και αντισώματος η οποία είναι εύκολα αντιληπτή με γυμνό μάτι ή μικροσκόπιο λόγω της συγκόλλησης που παρατηρείται.

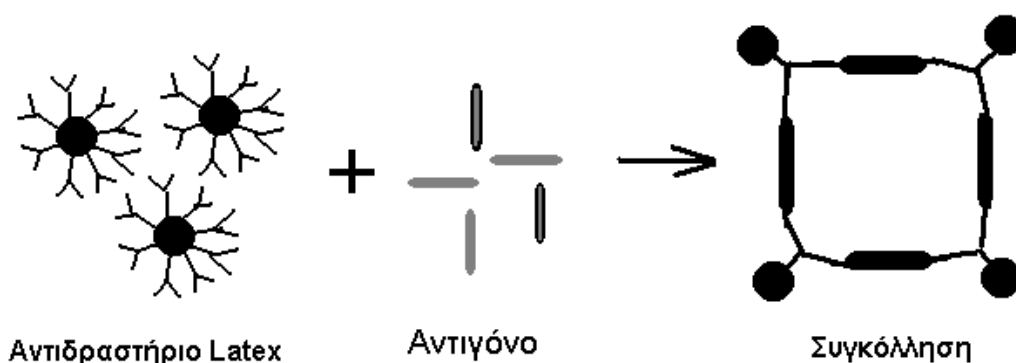
Αρχή μεθόδου

Στις συγκολλητινοαντιδράσεις το αντιδραστήριο αποτελείται από τεμαχίδια latex δηλ. αδρανή σφαιρικά σωματίδια από πολυστυρένιο στα οποία επικαλύπτονται από μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά έναντι του πολυτεπτιδίου (αντιγόνου) το οποίο θέλουμε να προσδιορίσουμε.



Δημιουργία αντιδραστηρίου latex (συγκόλληση αντισωμάτων σε latex)

Εάν προσθέσουμε στο διάλυμα του αντιδραστηρίου μας ορό ή πλάσμα ασθενούς, τότε στην περίπτωση που ο ορός φέρει το αντίστοιχο αντιγόνο, το αντιγόνο θα ενωθεί με τα αντισώματα των latex και θα προκαλέσει συγκόλληση των τεμαχιδίων latex μεταξύ τους. Η συγκόλληση είναι ορατή με γυμνό μάτι με την μορφή της κροκίδωσης.



Δοκιμασία συγκολλητινοαντίδρασης για την ανίχνευση αντιγόνου

Μεθοδολογία

Πάνω σε ειδικά πλακίδια τοποθετούμε μία σταγόνα αντιδραστηρίου και μία σταγόνα από τον ορό ή πλάσμα των ασθενών μας. Οι οροί των ασθενών συνοδεύονται πάντα από ορούς θετικού ή αρνητικού μάρτυρα. Αναμιγνύουμε τις σταγόνες αντιδραστηρίου-ορού και αφήνουμε τις πλάκες να αναδευτούν για μερικά λεπτά σε ειδικό οριζόντιο αναδευτήρα (vibrator). Παρατηρούμε προσεκτικά για κροκίδωση. Για μεγαλύτερη σιγουριά μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε μεγενθυτικό φακό ή ακόμα σε μερικές περιπτώσεις και μικροσκόπιο.

Για να είναι το αποτέλεσμα μας σίγουρο από την άποψη ποιότητας των αντιδραστηρίων και εκτέλεσης της μεθόδου θα πρέπει ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας να μας δώσουν το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Ο μεν θετικός μάρτυρας δείχνει έντονη κροκίδωση ενώ ο αρνητικός την πλήρη απουσία αυτής.

Το αποτέλεσμα αξιολογείται ως **θετικό (+)** ή **αρνητικό (-)** (ποιοτικός προσδιορισμός). Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος μπορούμε να το σχολιάσουμε με **σταυρούς (+)** 1 (ασθενή κροκίδωση) έως 4 (πολύ έντονη κροκίδωση).

Άλλες φορές προβαίνουμε σε **ημιποσοτικό** προσδιορισμό. Δηλαδή στην περίπτωση που το αποτέλεσμα βγει θετικό αραιώνουμε τον ορό σε αραιώση που εμείς επιλέγουμε και επαναλαμβάνουμε. Αν και στην νέα αραιώση δούμε κροκίδωση αραιώνουμε τον ορό ακόμα περισσότερο και επαναλαμβάνουμε μέχρις ότου δεν βλέπουμε πια κροκίδωση. Σε αυτή την περίπτωση αναγράφουμε στο αποτέλεσμα και την αραιώση που χρησιμοποιήσαμε π.χ. θετικό 1/10.

Φαινόμενο προζώνης

Στο φαινόμενο προζώνης η **υψηλή συγκέντρωση ενός αντιγόνου δεν είναι ορατή με την αναμενόμενη κροκίδωση**. Έχουμε δηλαδή **ένα ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα**. Μάλιστα στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούμε πολλαπλές αραιώσεις του ορού του ασθενούς (π.χ. στην Wright) είναι δυνατόν να έχουμε ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα στις μικρές αραιώσεις (δηλ. μεγάλη συγκέντρωση αντιγόνου ορού) και θετικό στις μεγαλύτερες αραιώσεις (μικρή συγκέντρωση αντιγόνου ορού). Οφείλεται στην παρουσία δευτερογενών αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς που δεσμεύουν το αντιγόνο πριν προλάβουν να συνδεθούν με αυτό τα αντισώματα του αντιδραστήριου. Εμφανίζεται συχνότερα στην αντίδραση Wright δηλαδή στο αντιγόνο της *Brucella abortus*.

Για να υποπτευθούμε το φαινόμενο προζώνης και μην δώσουμε ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα θα πρέπει να γνωρίζουμε την κλινική εικόνα του ασθενούς και σε περίπτωση που υποπτευτούμε ότι υπάρχει πράγματι προζώνη να κάνουμε αραιώση και να επαναλάβουμε την δοκιμασία.

Στην κατηγορία των συγκολλητινοαντιδράσεων περιλαμβάνονται οι δοκιμασίες που γίνονται για την ομάδα αίματος (ABO και Rhesus) καθώς και η δοκιμασία Coombs. Υπάρχουν όμως πλήθος άλλων προσδιορισμών που γίνονται με την μέθοδο της συγκολλητινοαντίδρασης μεταξύ των οποίων οι συχνότερα εκτελούμενες δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Εξέταση	Διαγνωστική χρησιμότητα
CRP	Φλεγμονή από ποικίλη αιτία. (Ιστική βλάβη από τραύμα, έμφραγμα κ.α.)
RF ή Ra-test	Ρευματοειδείς παράγοντες. (Ρευματοειδή αρθρίτιδα)
ASTO ή ASL	Τίτλος αντιστρεπτολυσίνης O. (Λοίμωξη από στρεπτόκοκκο)
Mono-test	Λοίμωξη από τον ιό Epstein Bar. (Λοιμώδη μονοκυρήνωση)
Widal	Σαλμονέλα τύπου – αντιγόνα O και H. (Σαλμονέλα παρατύπου A και B)
Wright	Λοίμωξη από βρουκέλα (Μελιταίος πυρετός)
Le-test	Κύτταρα λύκου. (Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος)
RPR ή VDRL	Λοίμωξη από σύφιλη

Οι συχνότερα εκτελούμενες συγκολλητινοαντιδράσεις

Εφαρμογές των συγκολλητινοαντιδράσεων στην ανοσολογία

Προσδιορισμός συγκέντρωσης CRP

Η πρωτεΐνη CRP (C-reactive protein, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη) ανακαλύφθηκε το 1930 από τους William Tillet και Thomas Francis. Αυτοί προσδιόρισαν πρώτοι την πρωτεΐνη στον ορό ασθενών που έπασχαν από πνευμονοκοκκική πνευμονία, όπου ήταν συνδεδεμένη με τον C-πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος του πνευμονιοκόκκου (από όπου και η ονομασία CRP).

Η CRP είναι ένα πολυπεπτίδιο (MB = 110.000 daltons) που ανήκει στην κατηγορία των πρωτεϊνών «οξείας φάσεως» (APP). Με τον όρο αυτό χαρακτηρίζουμε εκείνες τις πρωτεΐνες που η συγκέντρωση του αυξάνει (θετική πρωτεΐνη οξείας φάσεως) ή ελαττώνεται (αρνητική πρωτεΐνη οξείας φάσεως) κατά τουλάχιστον 25% κατά την διάρκεια της φλεγμονής.

Καταστάσεις που συχνά οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές όσον αφορά τη συγκέντρωση πρωτεϊνών οξείας φάσεως είναι ιστική καταστροφή από λοίμωξη, τραύμα, χειρουργική επέμβαση, εγκαύματα και προχωρημένος καρκίνος. Μέτρια αύξηση παρατηρείται μετά εντατική άσκηση, θερμοπληξία και τοκετό. Μικρές αλλαγές παρατηρούνται σε αγχώδεις καταστάσεις και σε διάφορα ψυχιατρικά νοσήματα.

Παραγωγή CRP

Η παραγωγή της CRP γίνεται στα **ηπατοκύτταρα** ως ταχεία απάντηση στην ενεργοποίηση τους από κυτταροκίνες που παράγονται από ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα. Η παραγωγή της μπορεί να φτάσει μέχρι και το εκατονταπλάσιο της συγκέντρωσης της στα φυσιολογικά άτομα (Φ.Τ.: CRP < 5 mg/ml).

Δράση της CRP

Η κύρια δράση της CRP είναι η ικανότητα της να συνδέεται με το μόριο φωσφατιλοχολίνης και ως εκ τούτου να αντιδρά με τους πολυσακχαρίτες της κυτταρικής μεμβράνης των μικροβίων καθώς και με φωσφολιπιδικά τμήματα κατεστραμμένων κυττάρων. Η σύνδεση της CRP με τα υποστρώματα αυτά οδηγεί σε **ενεργοποίηση της κλασσικής οδού του συμπληρώματος** με αποτέλεσμα την φαγοκυττάρωση των βακτηρίων. Άλλες προφλεγμονώδεις δράσεις της CRP περιλαμβάνουν την έκκριση κυτταροκινών της φλεγμονής και ιστικών παραγόντων

από τα μονοκύτταρα. Είναι πιθανόν ότι η CRP έχει πολλούς ρόλους στην παθοφυσιολογία της φλεγμονώδους διαδικασίας.

Εκτός από προφλεγμονώδης η δράση της μπορεί να είναι και αντιφλεγμονώδης. Η CRP φαίνεται ότι εμποδίζει την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και κατά συνέπεια και την έξοδο των ουδετεροφίλων στο σημείο της φλεγμονής.

Ο ρόλος της CRP στην διάγνωση

Η μέτρηση του CRP είναι μία απλή και γρήγορη δοκιμασία για την διάγνωση κρυφής **βακτηριακής λοίμωξης** ή **τραυματισμού κάποιου ιστού**. Η συγκέντρωση της αυξάνει ραγδαία μετά από έμφραγμα ενώ μπορεί ακόμα να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση μεταεγχειρητικών ασθενών καθώς και ως παράγοντας κινδύνου για στεφανιαία καρδιακή νόσο. Ως δείκτης φλεγμονής η CRP χρησιμοποιείται ως ένας γενικός δείκτης χωρίς να μπορεί να μας προσδιορίσει το αίτιο της φλεγμονής. Σήμερα είναι γνωστό ότι από ασθενείς με CRP υψηλότερη από 100 mg/ml το 80 - 85% έχουν βακτηριακή λοίμωξη.

Σωματίδια Latex για μέτρηση CRP

Στην συγκολλητινοαντίδραση που πραγματοποιείται τα σωματίδια latex είναι καλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα (mAb) έναντι της πρωτεΐνης CRP.

Προσδιορισμός ρευματοειδούς παράγοντα (RF ή Ra-test)

Ο προσδιορισμός του ρευματοειδούς παράγοντα (Rheumatoid factor – RF) είναι η ανοσολογική μέθοδος ρουτίνας για την διάγνωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Ο ρευματοειδής παράγοντας ανακαλύφθηκε από τον Waaler το 1940 ενώ η ονομασία RF δόθηκε από τον Pike το 1949.

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα ανήκει στα λεγόμενα **αυτοάνοσα νοσήματα**. Με τον όρο αυτοάνοσα νοσήματα ορίζουμε την ομάδα των νοσημάτων στα οποία ο οργανισμός παράγει αντισώματα έναντι των δικών του ουσιών. Συγκεκριμένα στην ρευματοειδή αρθρίτιδα ο οργανισμός παράγει αντισώματα κατά των ανοσοσφαιρινών του ή κατά πρωτεϊνών του αρθρικού χόνδρου.

Ως προς τα κλινικά ευρήματα είναι μία χρόνια πολυσυστηματική νόσος, άγνωστης αιτιολογίας. Μολονότι υπάρχουν ποικίλες συστηματικές εκδηλώσεις, το χαρακτηριστικό γνώρισμά της είναι η φλεγμονώδης υμενίτιδα που αφορά συνήθως

περιφερικές αρθρώσεις σε συμμετρική κατανομή. Η δυνατότητα της υμενίτιδας να προκαλεί καταστροφή του χόνδρου και διάβρωση του οστού με συνεπακόλουθο την παραμόρφωση της άρθρωσης, αποτελεί το χαρακτηριστικό της νόσου. Οι γυναίκες προσβάλλονται τρεις φορές περισσότερο από τους άνδρες. Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν ρόλο στην εμφάνιση της νόσου

Παραγωγή RF

Ο ρευματοειδής παράγοντας είναι ένα σύνολο αντισωμάτων έναντι του τμήματος Fc της ανοσοσφαιρίνης IgG. Το Fc κλάσμα είναι το τμήμα του αντισώματος που συνδέεται με τα λευκοκύτταρα. Στην ρευματοειδή αρθρίτιδα ο οργανισμός παράγει αντισώματα (RF) έναντι των ίδιων των αντισωμάτων του της τάξεως IgG. Η παραγωγή των RF οφείλεται στο ότι κατά την ένωση του αντιγόνου με την ανοσοσφαιρίνη IgG το μόριο της IgG παθαίνει κάποια αλλοίωση δηλ. αλλάζει η στερεοδιάταξη του μορίου με αποτέλεσμα να αποκαλύπτονται συγκεκαλυμμένοι επίτοποι και έτσι η αλλοιωμένη IgG να δρα ως αυτοαντιγόνο προκαλώντας την παραγωγή αντισωμάτων.

Ο ρόλος του RF στην διάγνωση

Θετική δοκιμασία RF δεν είναι απαραίτητα και διαγνωστική για την ρευματοειδή αρθρίτιδα. Θετική RF παρατηρείται σε πολλά άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, χρόνιες λοιμώξεις, κίρρωση του ήπατος και σε ασθενείς με χρόνια αναπνευστικά προβλήματα. Η τελική διάγνωση δίνεται από τα κλινικά ευρήματα. Η μέτρηση του RF γίνεται συνήθως στον ορό. Μπορεί όμως να ζητηθεί και για το αρθρικό υγρό καθώς και σε άλλα υγρά όπως πλευριτικό ή περικαρδιακό. Η εξέταση RF ζητείται συνήθως μαζί με την CRP αφού και αυτή ως πρωτεΐνη οξείας φάσεως αυξάνει ραγδαία στα πρώιμα στάδια της νόσου.

Σωματίδια Latex για μέτρηση RF

Στην συγκολλητινοαντίδραση που πραγματοποιείται τα σωματίδια latex είναι καλυμμένα με σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος (Ag - Ab) δηλ. γ-ανοσοσφαιρίνης (Ag: IgG) / αντι-ανθρώπινης γ-ανοσοσφαιρίνης (Ab: anti-IgG).

Εφαρμογές των συγκολλητινοαντιδράσεων στην ιατρική μικροβιολογία

Αντίδραση Widal - Wright

Οι αντιδράσεις Widal και Wright, αν και ξεχωριστές συγκολλητινοαντιδράσεις, εκτελούνται πάντα μαζί αφού μας δίνουν μια γρήγορη απάντηση για την διαφορική διάγνωση εμπύρετων νοσημάτων από δύο συχνά απαντούμενους παθογόνους και εύκολα μεταδιδόμενους οργανισμούς, την **βρουκέλλα (Wright)** και την **σαλμονέλλα (Widal)**.

Η συγκολλητινοαντίδραση Wright χρησιμοποιεί μόνο ένα αντιγόνο, το απενεργοποιημένο στέλεχος **Brucella abortus**. Αντιθέτως στην συγκολλητινοαντίδραση Widal χρησιμοποιούνται και αξιολογούνται τέσσερα διαφορετικά αντιγόνα:

Σωματιδικό αντιγόνο O (Salmonella typhi)

Βλεφαριδικό αντιγόνο H (Salmonella typhi)

Σαλμονέλλα παρατύφου A (Salmonella paratyphi A)

Σαλμονέλλα παρατύφου B (Salmonella paratyphi B)

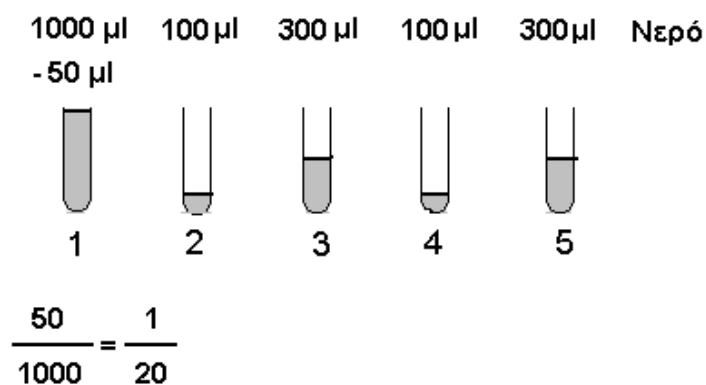
Οι συγκολλητινοαντιδράσεις Widal - Wright είναι **ημιποσοτικοί προσδιορισμοί**.

Κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας πραγματοποιούμε τις ακόλουθες αραιώσεις: 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320. Οι αραιώσεις μπορούν να γίνουν σε σωληνάρια αιμολύσεως ή ακόμα και πάνω στις ίδιες τις αντικειμενοφόρες πλάκες που θα γίνουν οι συγκολλήσεις. Οι αραιώσεις επαναλαμβάνονται και για τα 5 αντιγόνα.

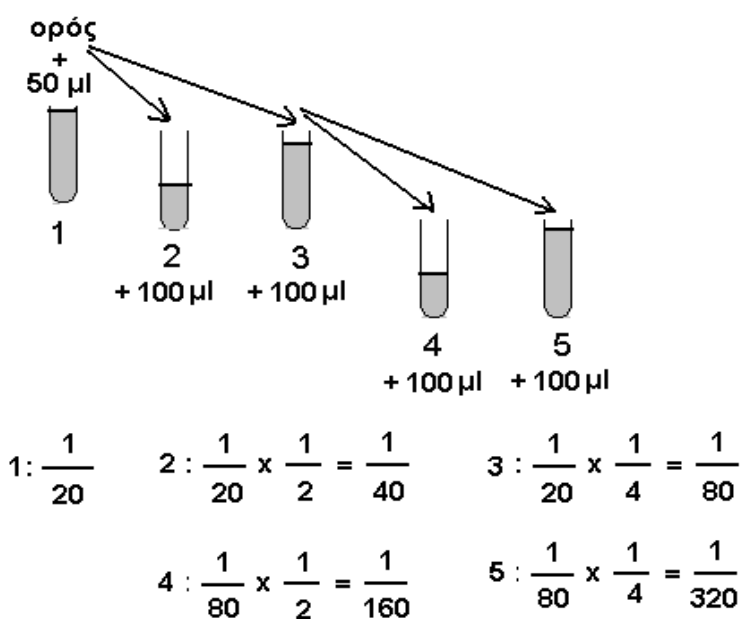
Μετά την αραιώση τοποθετούμε με παστεράκι πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες μία σταγόνα από τις πέντε αραιώσεις, προσθέτουμε μία σταγόνα του αντίστοιχου αντιγόνου και κατόπιν αναμιγνύουμε με ένα παστεράκι. Ακολουθεί ανάδευση για λίγα λεπτά σε οριζόντιο αναδευτήρα.

Αξιολογούμε το αποτέλεσμα τις ανοσοαντίδρασης, ελέγχοντας για τυχόν κροκιδώσεις. Θετικός θεωρείται ο τίτλος που κάνει κροκίδωση πάνω από δύο σταυρούς. Αν στην αραιώση 1/320 έχουμε θετικό αποτέλεσμα, δηλ. κροκίδωση, τότε

επαναλαμβάνουμε την δοκιμασία με μεγαλύτερη αραιώση. Στις απαντήσεις των ασθενών αναγράφουμε πάντα τον τίτλο της συγκολλητινοαντίδρασης.



Δημιουργία αραιώσεων για Widal - Wright. Προσθήκη νερού



Δημιουργία τελικών αραιώσεων Widal-Wright. Προσθήκη ορού.