

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

ΒΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ELISA

Σύνοψη

Στο κεφάλαιο αυτό θα περιγραφούν οι σημαντικότερες ανοσοχημικές τεχνικές και συγκεκριμένα οι αρχές μεθόδων των ανοσοενζυμικών τεχνικών, των ραδιοανοσοενζυμικών τεχνικών και της χημειοφωταύγειας. Και οι τρεις τεχνικές αποτελούν τους βασικούς τρόπους προσδιορισμών πρωτεϊνών ποιοτικά ή ποσοτικά. Χρησιμοποιούν και οι τρεις αντισώματα αλλά επιπλέον ένζυμα, ραδιοϊσότοπα και χημικές ενώσεις φωταύγειας.

Επίσης, θα περιγραφούν οι ανοσοχημικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη κλινική χημεία με τη μορφή IVDs (βλ. Κεφάλαια 7 & 9). Ιδιαίτερη έμφαση θα δοθεί στις ανοσοενζυμικές μεθόδους και ιδιαίτερα στην τεχνική ELISA, η οποία αποτελεί και την πλέον διαδεδομένη ανοσοχημική μέθοδο, λόγω της ευκολίας της χρήσης της από την άποψη του εξοπλισμού, της τεχνικής, της ασφάλειας, αλλά και της ποικιλίας των πρωτεϊνικών μορίων που μπορούν να προσδιοριστούν με αυτή.

Προαπαιτούμενες γνώσεις

Στο κεφάλαιο αυτό, θα διδαχθούν τεχνικές που βασίζονται μεταξύ άλλων στην απορρόφηση του φωτός. Κατά συνέπεια είναι απαραίτητη η γνώση του Κεφαλαίου 1, που αφορά στις βασικές αρχές φωτομετρίας και χρωματομετρικών αναλύσεων.

6.1 Εισαγωγή

Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί, όπως υπονοεί και η ονομασία τους, αναφέρονται σε εκείνη την κατηγορία των αναλυτικών μεθόδων που συνδυάζουν τεχνολογίες χημείας και ανοσολογίας. Πρακτικά αναφέρονται στις μεθόδους που χρησιμοποιούν τουλάχιστον μία φορά αντισώματα. Δεδομένου ότι τα αντισώματα συνδέονται μόνο με πρωτεΐνες, είναι προφανές ότι οι μέθοδοι αυτοί χρησιμοποιούνται μόνο για τον ποσοτικό ή ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών και όχι άλλης οργανικής ή ανόργανης ένωσης.

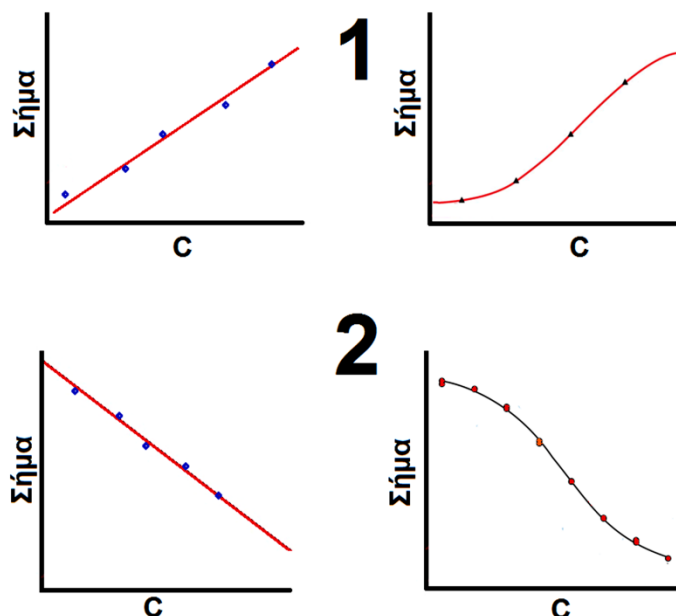
Οι διαφορετικές αρχές μεθόδων που εφαρμόζουν, απαιτούν, όπως είναι αναμενόμενο, διαφορετικές τεχνολογίες από τις φωτομετρικές αναλύσεις, δηλαδή διαφορετικά όργανα, διαφορετικά αντιδραστήρια και διαφορετικούς αναλυτές. Η σύγχρονη τεχνολογία όμως, έχει οδηγήσει στην κατασκευή πολύ-αναλυτών, που συνδυάζουν φωτομετρικές και ανοσοχημικές τεχνικές στην ίδια πλατφόρμα, μειώνοντας έτσι σημαντικά κόστη σε υλικούς και ανθρώπινους πόρους.

6.2 Η βασική αρχή των Ανοσοχημικών τεχνικών

Οι ανοσοχημικοί αναλυτές μετρούν με ειδικό ανιχνευτή το σήμα που παράγεται από κάποια χημική αντίδραση. Αυτή η χημική αντίδραση πυροδοτείται από την ένωση της πρωτεΐνης με το αντίσωμα και της δημιουργίας ενός ανοσοσυμπλέγματος (Διαμαντής et al., 1987). Επειδή δε, μέσα στον οργανισμό τα αντισώματα ενώνονται με αντιγόνα, οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται γενικά «αντιγόνα», αν και πολλές φορές απέχουν από την πραγματική έννοια του αντιγόνου της ανοσολογίας. Μπορεί δηλαδή να είναι πραγματικά αντιγόνα, υπό την ανοσολογική έννοια, αλλά μπορεί να είναι και αντισώματα (π.χ. αντισώματα έναντι ιών) καθώς και απτένια. Τα απτένια είναι πρωτεΐνες που διεγείρουν τον οργανισμό για την παραγωγή αντισωμάτων παρά μόνο ύστερα από τη σύνδεση τους με μεγαλύτερες από αυτά πρωτεΐνες.

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία ανοσοχημικών τεχνικών, ανάλογα με το σήμα που μετράται από αυτές, τον αριθμό των αντισωμάτων που συμμετέχουν στις χημικές αντιδράσεις, αλλά και στον διαχωρισμό των ανοσοσυμπλόκων (σύνδεση αντιγόνων – αντισωμάτων) από τα υπόλοιπα μέρη του διαλύματος. Στον Πίνακα 6.1 καταγράφονται οι σημαντικότερες κατηγορίες τους.

Θα πρέπει εδώ να τονιστεί, ότι στις ανοσοχημικές μεθόδους η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση δεν είναι τόσο απλή όπως στις φωτομετρικές αναλύσεις. Σε αντίθεση με τις φωτομετρικές αναλύσεις, οι καμπύλες βαθμονόμησης στις ανοσοχημικές αντιδράσεις δεν είναι πάντα ευθείες γραμμές (Σχήμα 6.1). Οπότε δεν ισχύει η «απλή μέθοδος των τριών» που γνωρίσαμε στις φωτομετρικές αναλύσεις τελικού σημείου (βλ. Κεφάλαια 1 & 2).



Σχήμα 6.1 Πιθανές καμπύλες αναφοράς σε ανταγωνιστικές και μη ανταγωνιστικές ανοσοχημικές μεθόδους. Οι κατασκευαστές αναλυτών και αντιδραστηρίων προσπαθούν σήμερα να προσαρμόσουν τις καμπύλες αναφοράς σε ευθεία γραμμή για να αυξήσουν την ευαισθησία τους.

Ανάλογα με το σήμα		
Χρωματική αντίδραση	Κρούσεις ραδιοϊσοτόπων	Ένταση παραγόμενου φωτός
Ανοσοενζυμικές μέθοδοι	Ραδιοανοσολογικές μέθοδοι	Χημειοφωταύγεια
Ανάλογα με τον αριθμό των αντισωμάτων που συμμετέχουν στην αντίδραση		
Ένα αντίσωμα	Δύο αντισώματα	
Ανταγωνιστικές μέθοδοι	Μη ανταγωνιστικές μέθοδοι	
Ανάλογα με τον διαχωρισμό ανοσοσύνπλοκων		
Διαλυτό ανοσοσύνπλοκο	Ακίνητοποιημένο ανοσοσύνπλοκο	
Ομογενείς μέθοδοι	Ετερογενείς μέθοδοι	

Πίνακας 6.1 Οι βασικές κατηγορίες των ανοσοχημικών μεθόδων.

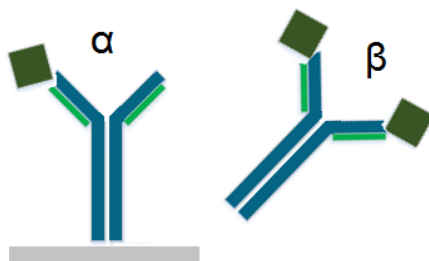
6.3 Οι κατηγορίες των Ανοσοχημικών τεχνικών

6.3.1 Ομογενείς και Ετερογενείς Ανοσοχημικές μέθοδοι

Από τις δύο αυτές κατηγορίες συνηθέστερες είναι οι ετερογενείς μέθοδοι και από αυτές η **ELISA** (Enzyme Linked Immunoassay Antibody) είναι αυτή που χρησιμοποιείται πολύ στις δια χειρός μεθόδους (manual).

Στις ετερογενείς μεθόδους τα αντισώματα είναι προσκολλημένα πάνω σε στερεή επιφάνεια (Σχήμα 6.2α). Τέτοιες συνηθισμένες επιφάνειες είναι ο πλαστικός πυθμένας των πηγαδιών (wells) μιας πλάκας μικροτιλοδότησης, ο πυθμένας γυάλινων ή συνηθέστερα πλαστικών σωληναρίων και η επιφάνεια σφαιριδίων latex ή μαγνητικών σφαιρών. Οι ετερογενείς μέθοδοι επιλέγονται για αντιγόνα που έχουν την ίδια χημική συμπεριφορά, είτε είναι ενωμένα με αντιγόνα, είτε όχι.

Αντίθετα, στις ομογενείς ανοσοχημικές μεθόδους τα ανοσοσύμπλοκα παραμένουν σε διαλυτή μορφή μέσα στο διάλυμα αντίδρασης (Σχήμα 6.2β). Στις ομογενείς μεθόδους τα ενωμένα με τα αντισώματα αντιγόνα έχουν διαφορετική συμπεριφορά από τα μη συνδεδεμένα. Έτσι, είναι δυνατή η μέτρησή τους, χωρίς να χρειάζεται να απομακρυνθούν τα μη συνδεδεμένα. Αυτή η ιδιότητα των αντιγόνων στις ομογενείς μεθόδους τις καθιστά εύκολα αυτοματοποιήσιμες, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν μπορούν να αυτοματοποιηθούν και οι ετερογενείς μέθοδοι.



Σχήμα 6.2 Η σύνδεση αντιγόνων και αντισωμάτων σε ετερογενείς και ομογενείς μεθόδους. Κάθε αντίσωμα (συμβολίζεται ως Y λόγω του σχήματος του) μπορεί να ενωθεί με ένα ή δύο ίδια αντιγόνα σε εξειδικευμένες θέσεις που ονομάζονται $Fab_{1,2}$ καθώς και με μία σταθερή επιφάνεια με την τρίτη κενή θέση που ονομάζεται Fc .

6.3.2 Οι διαφορές των Ανοσοχημικών μεθόδων ανάλογα με τον Ιχνηθέτη

Υπάρχουν πολλών ειδών ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται στις ανοσοχημικές τεχνικές. Σε γενικές γραμμές διακρίνονται σε ένζυμα, ραδιοϊσότοπα και μόρια χημειοφωταύγειας.

6.3.2.1 Όταν ο Ιχνηθέτης είναι Ένζυμο – οι Ανοσοενζυμικές μέθοδοι

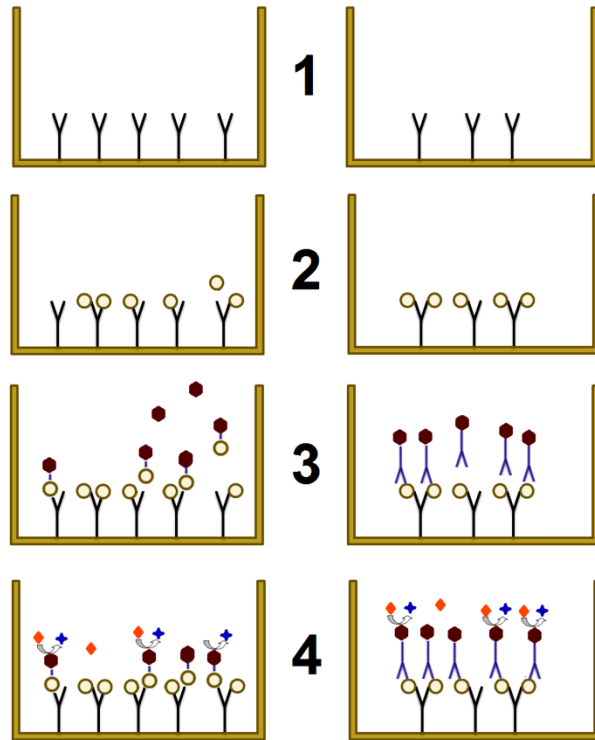
Από τους τρεις διαφορετικούς ιχνηθέτες, αυτοί που προκαλούν μεγαλύτερη καθυστέρηση στην ολοκλήρωση της μεθόδου είναι τα ένζυμα, αφού απαιτείται η αντίδραση τους με το υπόστρωμα και ο σχετικός επιπλέον χρόνος επώασης. Παρ' όλα αυτά οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι είναι οι πλέον διαδιδόμενες λόγω του εύκολου και ασφαλούς χειρισμού τους.

Τριών ειδών ένζυμα χρησιμοποιούνται στις ανοσοενζυμικές μεθόδους. Και τα τρία καταλύουν χρωμογόνα και φθορίζοντα υποστρώματα (Πίνακας 6.2).

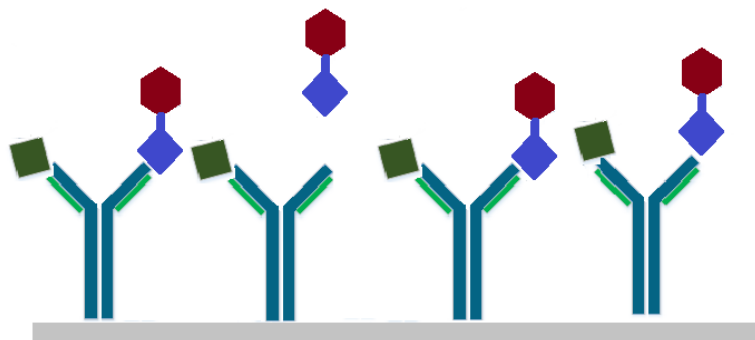
Τα **χρωμογόνα υποστρώματα** οδηγούν στη παραγωγή έγχρωμου διαφανούς διαλύματος, το οποίο μπορεί να απορροφήσει φως συγκεκριμένου μήκους κύματος. Ό,τι ακριβώς γίνεται δηλαδή, και στις φωτομετρικές μεθόδους, όπου η μετατροπή της απορρόφησης σε συγκέντρωση βασίζεται στον γνωστό νόμο του Lambert-Beer: $A = \epsilon d C$ (βλ. Ενότητα 1.6). Η απορρόφηση του φωτός μετράται σε κατάλληλο φωτόμετρο που μετατρέπει την απορρόφηση σε συγκέντρωση χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη καμπύλη αναφοράς.

Αντίθετα, τα **φθορίζοντα υποστρώματα** παράγουν φθορισμό ύστερα από τη διέγερση τους με φως συγκεκριμένου μήκους κύματος. Η ένταση του φθορισμού μετατρέπεται σε συγκέντρωση, βάση καμπύλης αναφοράς, κατά κανόνα σε ειδικό αναλυτή. Γενικά τα φθορίζοντα υποστρώματα αποτελούν τη βασική επιλογή στις αυτοματοποιημένες ανοσοενζυμικές μεθόδους.

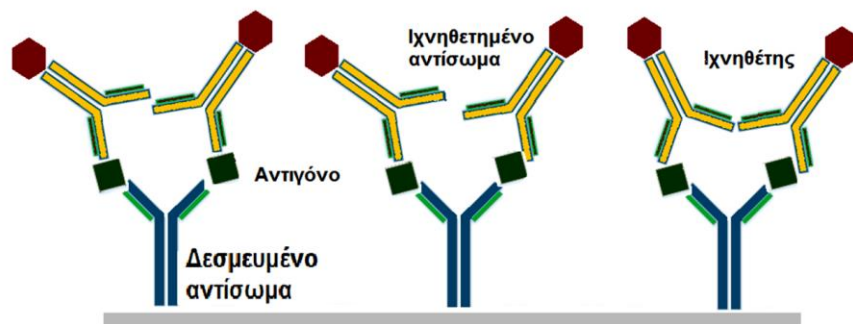
Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλη ποικιλία, αφού υπάρχουν ετερογενείς (η γνωστή ELISA) αλλά και πολλές ομογενείς μέθοδοι (Σχήμα 6.3). Όπως και οι υπόλοιπες ανοσοχημικές μέθοδοι διαίρονται σε ανταγωνιστικές (Σχήμα 6.4) μη ανταγωνιστικές μεθόδους (Σχήμα 6.5).



Σχήμα 6.3 Τα τυπικά στάδια μιας μεθοδολογίας ELISA. Αριστερά φαίνεται μία ανταγωνιστική μεθοδολογία, όπου τα ακινητοποιημένα αντισώματα δέχονται τα αντιγόνα του δείγματος, καθώς και τα σημασμένα αντιγόνα με κατάλληλο ένζυμο. Δεξιά φαίνεται μία μη ανταγωνιστική μεθοδολογία, όπου τα αντιγόνα του ασθενούς καλύπτουν σχεδόν εξ'ολοκλήρου τα ακινητοποιημένα αντισώματα και δέχονται πάνω τους μία δεύτερη ομάδα σημασμένων αντισωμάτων με κατάλληλο ένζυμο. Και στις δύο περιπτώσεις το ένζυμο αντιδρά με το υπόστρωμα και παράγει έγχρωμο σήμα.



Σχήμα 6.4 Η διάταξη αντισωμάτων και αντιγόνου στις ανταγωνιστικές μεθόδους. Το ελεύθερο αντιγόνο προέρχεται από τον ασθενή και δεσμεύει θέσεις σύνδεσης του σημασμένου αντιγόνου με κατάλληλο ιχνηθέτη.



Σχήμα 6.5 Η διάταξη αντισωμάτων και αντιγόνου στις μη ανταγωνιστικές μεθόδους. Το ελεύθερο αντιγόνο ενώνεται με δύο αντισώματα εκ των οποίων το ένα (στις ετερογενείς μεθόδους) το ακινητοποιεί πάνω στη στερεή επιφάνεια και το δεύτερο φέρει τον ιχνηθέτη που θα παράγει το σήμα για τον μέτρηση.

Ένζυμο	Είδος ενζύμου	Χρωμογόνα υποστρώματα	Συντόμευση	Μήκος κύματος (nm)	
Υπεροξειδάση (HRP)	Οξειδάση	2,2-άζινο δις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ)	ABTS	415	
		3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη	TMB	450	
		Ορθο-φαινυλενοδιαμίνη	OPD	492	
		Φθορίζοντα υποστρώματα			Συντόμευση
		π-υδροξυφαινυλοξικό οξύ		HPPA	
		3-(π-υδροξυφαινυλο) προπιονικό οξύ		HPPA	
Αλκαλική φωσφατάση (ALP)	Υδρολάση	Χρωμογόνα υποστρώματα	Συντόμευση	Μήκος κύματος	
		π-φωσφορική νιτροφαινόλη	pNPP	405	
		Φθορίζοντα υποστρώματα			Συντόμευση
		4-μεθυλο φωσφορική συμπελιφερόνη		MUP	
β-γαλακτοσιδάση (β-GAL)	Υδρολάση	Χρωμογόνα υποστρώματα	Συντόμευση	Μήκος κύματος	
		ο-νιτροφαινυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη	oNPG	420	
		Ερυθρό χλωροφαινόλης-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη	CPRG	571	
		Φθορίζοντα υποστρώματα			Συντόμευση
		4-μεθυλουμπελιφερόλ-β-D γαλακτοπυρανοσίδη		MUG	

Πίνακας 6.2 Τα κυριότερα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται σε ανοσοενζυμικές μεθόδους (Ρίζος, 1994).

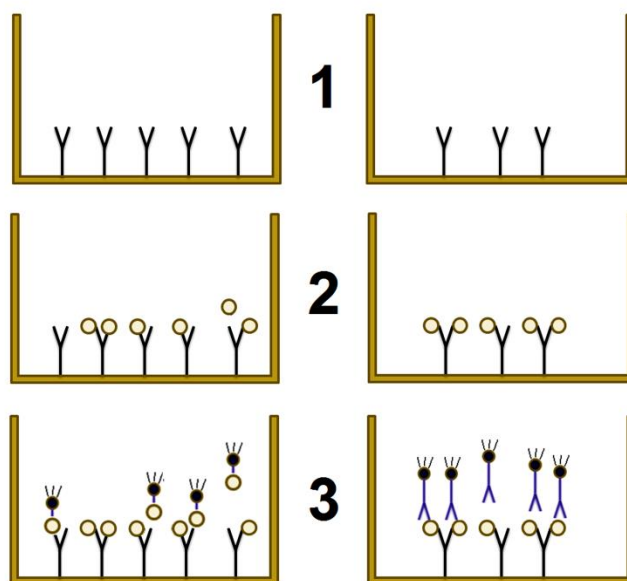
6.3.2.2 Όταν ο Ιχνηθέτης είναι Ραδιοϊσότοπο – οι Ραδιοανοσολογικές μέθοδοι

Οι ραδιοανοσολογικές μέθοδοι (RIA, IRMA) (Σχήμα 6.6) αποτελούν την παλαιότερη ανοσοχημική μέθοδο (Yellow & Berson, 1959). Για την εφαρμογή τους έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί διάφορα ραδιοϊσότοπα, αλλά σήμερα αυτό που χρησιμοποιείται ευρέως είναι το ^{125}I . Το ^{125}I έχει χρόνο ημίσειας ζωής 60 ημέρες, δηλαδή μέσα σε 60 ημέρες η ραδιενέργεια που εκπέμπει μειώνεται στο 50%. Αυτός ο χρόνος είναι ικανοποιητικός για διαγνωστική χρήση.

Σε αντίθεση με τις ανοσοενζυμικές μεθόδους δεν είναι εύκολη η πλήρη αυτοματοποίηση τους, ενώ έχουν το μεγάλο πλεονέκτημα της πολύ υψηλής ευαισθησίας, της ικανοποιητικής ταχύτητας, του χαμηλού κόστους και της εύκολης σχετικά δημιουργίας των αντίστοιχων μεθόδων. Μειονέκτημα τους είναι η επικινδυνότητα των ραδιοισοτόπων.

Το σήμα που μετράται στις ραδιοανοσολογικές μεθόδους είναι οι κρούσεις ανά λεπτό (cpm). Με την κατασκευή κατάλληλης καμπύλης αναφοράς είναι δυνατή η μετατροπή των κρούσεων σε συγκέντρωση του

αντιγόνου. Υπάρχουν ανταγωνιστικές (Σχήματα 6.4, 6.6) και μη ανταγωνιστικές ραδιοανοσολογικές μέθοδοι (Σχήματα 6.5 & 6.6), όπου ανταγωνίζεται ή όχι το μετρούμενο αντιγόνο του ασθενούς (ψυχρό αντιγόνο), με το αντιγόνο του αντιδραστηρίου που περιέχει ραδιοϊσότοπο (θερμό αντιγόνο) (Ευαγγελάτος, 1999).



Σχήμα 6.1 Τα τρία βασικά στάδια στις ραδιοανοσολογικές μεθόδους. Αριστερά φαίνεται η ανταγωνιστική μέθοδος (RIA), όπου το θερμό αντιγόνο (αυτό που φέρει το ραδιοϊσότοπο ^{125}I) ανταγωνίζεται το αντιγόνο του ασθενούς. Δεξιά φαίνεται η μη ανταγωνιστική μέθοδος (IRMA), όπου το ραδιοϊσότοπο είναι ενωμένο με αντίσωμα το οποίο ενώνεται με το ακινητοποιημένο αντίγονο του ασθενούς από δεύτερο αντίσωμα.

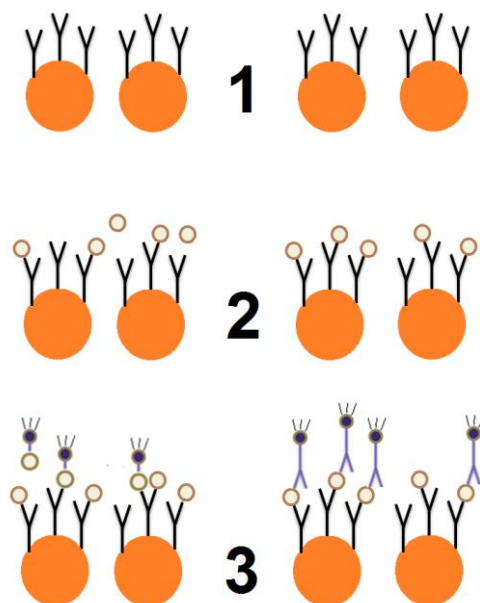
6.3.2.3 Όταν ο Ιχνηθέτης είναι μόριο Φωταύγειας – η Χημειοφωταύγεια

Η χημειοφωταύγεια (CIA, ICMA) είναι το φυσικό φαινόμενο της παραγωγής φωτεινής ακτινοβολίας από μία εξώθερμη χημική αντίδραση (A+B). Η οξειδοαναγωγική αυτή αντίδραση παρέχει την ενέργεια σε προϊόν της, ώστε αυτό να διεγερθεί (C*). Καθώς αμέσως αποδιεγείρεται για να επιστρέψει σε σταθερή ενεργειακή κατάσταση (C), εκπέμπει χαρακτηριστική φωτεινή ακτινοβολία (hv). Η συνολική αντίδραση περιγράφεται απλοποιημένα από την εξίσωση: $A + B \rightarrow C^* \rightarrow C + hv$

Η απόδοση της αντίδρασης σε φωτεινή ακτινοβολία, δηλαδή ο αριθμός των φωτονίων ανά μόριο αντιδρώντος, εκφράζεται από τον «λόγο απόδοσης» που ισούνται με το κλάσμα: αριθμός εκπεμπόμενων φωτονίων / αριθμός μορίων A ή B. Η μέγιστη τιμή του λόγου είναι η μονάδα, προς την οποία πλησιάζει η εκπομπή του φωτός, που παράγει το έντομο της πυγολαμπίδας κατά την οξείδωση του μορίου της λουσιφερόλης. Στην εργαστηριακή πάντως τεχνολογία το σήμα της χημειοφωταύγειας ονομάζεται «σχετική μονάδα φωτός» (**Relative Light Unit**).

Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα σήμερα μόρια παραγωγής φωταύγειας είναι οι **κυκλικές υδραζίδες** (λουμινόλη, ισολουμινόλη, αμινικά παράγωγα της ισολουμινόλης), οι **εστέρες της ακριδίνης**, τα **διοξετάνια** και τα **άλατα του ρουθηνίου**.

Η χημειοφωταύγεια αποτελεί τη νεώτερη ανοσοχημική μέθοδο και την πλέον αυτοματοποιημένη. Είναι ταχύτερη, προσεγγίζει την ευαισθησία των ραδιοανοσολογικών μεθόδων, αλλά παράλληλα είναι ασφαλέστερη από αυτές. Οι μέθοδοι της χημειοφωταύγειας έχουν όμως μεγάλο κόστος, δεδομένου ότι παρέχονται πλήρως αυτοματοποιημένες. Υπάρχουν ανταγωνιστικές και μη ανταγωνιστικές μέθοδοι χημειοφωταύγειας (Σχήμα 6.7).



Σχήμα 6.7 Τα τρία βασικά στάδια στις μεθόδους χημειοφωταύγειας. Το σχήμα αναπαριστάει μία άμεση ετερογενή μέθοδο, όπου τα αντισώματα είναι ακινητοποιημένα πάνω σε μεταλλικές μπίλιες. Αριστερά φαίνεται η ανταγωνιστική μέθοδος (CIA), όπου το σημασμένο αντιγόνο (φέρει εστέρα ακριδίνης) ανταγωνίζεται το αντιγόνο του ασθενούς. Δεξιά φαίνεται η μη ανταγωνιστική μέθοδος (ICMA, όπου ο εστέρας ακριδίνης είναι ενωμένος με αντίσωμα το οποίο ενώνεται με το ακινητοποιημένο αντίγόνο του ασθενούς από δεύτερο αντίσωμα.

6.3.3 Ανταγωνιστικοί και μη Ανταγωνιστικοί μέθοδοι

Μία σημαντική διαφοροποίηση των ανοσοχημικών μεθόδων είναι αυτή μεταξύ ανταγωνιστικών και μη ανταγωνιστικών μεθόδων. Η επιλογή μεταξύ των δύο αυτών μεθοδολογιών μεθόδων έχει να κάνει με τον αριθμό των «επιτόπων» πάνω στο αντιγόνο που πρόκειται να μετρηθεί. Οι επίτοποι είναι θέσεις πάνω στα αντιγόνα στις οποίες ενώνονται τα αντισώματα.

Όταν το αντιγόνο έχει δύο επιτόπους μπορεί να συνδεθεί με δύο αντισώματα ίδια ή διαφορετικά. Αυτά τα αντιγόνα μπορεί να είναι ορμόνες π.χ. TSH, δείκτες καρκίνου π.χ. CEA, Ferr, TSH, PSA, αλλά και αντιγόνα των ιών HBV, HIV, HCV. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται **μη ανταγωνιστική** ή αλλιώς **Sandwich**. Σε αυτή την περίπτωση το αντιγόνο ακινητοποιείται μεταξύ δύο αντισωμάτων. Το πρώτο αντίσωμα είναι σταθερά ενωμένο πάνω σε στερεή φάση και το δεύτερο φέρει τη σήμανση (Σχήμα 6.5). Σε αυτή την περίπτωση το σήμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιγόνου και αυξάνεται, όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή του (Σχήμα 6.1α).

Αντίθετα, όταν το αντιγόνο έχει ένα μόνο επίτοπο, χρησιμοποιούνται οι **ανταγωνιστικές μέθοδοι**. Στις ανταγωνιστικές μεθόδους το αντιγόνο είναι σε έλλειψη και καταλαμβάνει ένα μέρος μόνο από τις διαθέσιμες θέσεις σύνδεσης των αντισωμάτων. Σε αυτή την περίπτωση το αντιγόνο του ασθενούς ανταγωνίζεται άλλο αντιγόνο που φέρει σήμανση (Σχήμα 6.4). Κατά συνέπεια το παραγόμενο σήμα είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιγόνου δηλαδή αυξάνεται, όσο μειώνεται το παραγόμενο σήμα (Σχήμα 6.1β).

Γενικά, οι μη ανταγωνιστικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για αντιγόνα μεγαλύτερου μοριακού βάρους από αυτά των ανταγωνιστικών μεθόδων, αφού οι τελευταίες χρησιμοποιούνται ακόμα και για τον προσδιορισμό απτενίων, που έχουν πολύ μικρό σχετικά μοριακό βάρος. Επιπλέον, είναι ταχύτερες και με πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία. Η υψηλή τους ευαισθησία οφείλεται και στην καμπύλη αναφοράς τους, η οποία συνήθως είναι ευθεία γραμμή σε αντίθεση με τις ανταγωνιστικές που συνήθως είναι σιγμοειδής (Σχήμα 6.1).

EIA	Ανοσοενζυμική μέθοδος
SFIA	Φθορισμο-ανοσοενζυμική μέθοδος
ELISA	Ανοσο-απορροφητική μέθοδος συνδεδεμένου ενζύμου
RIA	Ραδιοανοσολογική μέθοδος
IRMA	Ραδιοανοσομετρική μέθοδος
RAST	Ραδιοαλλεργιοαπορροφητική μέθοδος
RIST	Ραδιοανοσοαπορροφητική μέθοδος
CIA	Ανοσοχημειοφωταύγεια
ICMA	Ανοσοχημειοφωταυγειομετρική μέθοδος
eCLIA/ECL	Ηλεκτροχημειοφωταύγεια
FPIA	Ανάλυση πολωμένου φθορισμού
PACIA	Μικροσωματιδιακή ανοσοενζυμική ανάλυση
ICIA	Τεχνολογία δέσμευσης ιόντων
EMIT	Ανοσοενζυμική ενισχυμένη μέθοδος
LOCI	Ανοσοχημειοφωταύγεια καναλιού οξυγόνου
FETI	Μέθοδος μεταφοράς φθορισμομετρικής ενέργειας
TR-FIA	Μέθοδος χρονικά διαχωριζόμενου φθορισμού
SL-FIA	Ανοσοφθορισμομετρικοί προσδιορισμοί με επισημασμένο υπόστρωμα
DELFLIA	Ανοσοφθορισμομετρική ενισχυμένη διάσταση λανθανιδών

Πίνακας 6.3 Αυτοματοποιημένες ανοσοχημικές μέθοδοι.

Παράμετροι απόδοσης	Ανοσοχημικές μέθοδοι		
	EIA - ELISA	RIA - IRMA	CIA, CLIA
Ευαισθησία	Πολύ καλή	Πολύ υψηλή	Υψηλή
Ακρίβεια	Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή
Σταθερότητα αντιδραστηρίου	Υψηλή	Μέτρια	Υψηλή
Τεχνικός εξοπλισμός	Φθορισμόμετρο Φωτόμετρο Γυμνό μάτι Αυτόματος αναλυτής	Μετρητής γ ή β ακτινοβολίας	Φωταυγειόμετρο Αυτόματος αναλυτής
Νομικές υποχρεώσεις	Όχι	Ναι	Όχι
Εξειδίκευση προσωπικού	Μέτρια	Υψηλή	Μέτρια
Χρόνος εξέτασης	*	**	*
Αυτοματισμός	Ναι	Ναι	Ναι

Πίνακας 6.4 Σύγκριση των τριών κατηγοριών ανοσοχημικών μεθόδων (Ρίζος, 1994).

6.4 Οι Ετερογενείς Ανοσοχημικές μέθοδοι, η ELISA

Για να γίνουν κατανοητές οι ανοσοχημικές μέθοδοι θα περιγραφεί αναλυτικά η κυριότερη εκπρόσωπος αυτών η ELISA. Δεδομένου ότι η ELISA είναι ιδιαίτερα ασφαλής για την υγεία των χειριστών και δεν απαιτεί αυτόματο εξοπλισμό αποτελεί την καλύτερη επιλογή για τη διδασκαλία των ανοσοχημικών μεθόδων στο εργαστήριο κλινικής χημείας.

Στις ανοσοενζυμικές μεθόδους ο ιχνηθέτης είναι ένζυμο. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι τα HRP, ALP και β-GAL (Πίνακας 6.2) και τα υποστρώματα τους μπορεί να είναι χρωμογόνα ή φθορισμογόνα. Από αυτά, τα χρωμογόνα υποστρώματα χρησιμοποιούνται τόσο σε αυτόματες, όσο και σε χειρονακτικές μεθόδους, ενώ αντίθετα τα φθορισμογόνα υποστρώματα χρησιμοποιούνται αποκλειστικά πλέον σε αυτόματους αναλυτές. Η επιλογή κάθε ενζύμου και υποστρώματος γίνεται με βάση την προσδοκώμενη ευαισθησία, επαναληψιμότητα, ταχύτητα αντίδρασης, τυχόν παρεμβολές στην αναλυτική μέθοδο και άλλα κ.α. Για παράδειγμα τα φθορισμογόνα υποστρώματα εξασφαλίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία από τα χρωμογόνα. Η υπεροξειδάση απαιτεί μικρότερη επώαση από τα άλλα δύο ένζυμα, ενώ η αλκαλική φωσφατάση και η β-γαλακτοσιδάση εξασφαλίζουν καλύτερη επαναληψιμότητα, μετά από μεγάλο χρόνο επώασης.

Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι μπορεί να είναι ανταγωνιστικές και μη ανταγωνιστικές, ομογενείς ή ετερογενείς. Ειδικότερα εδώ θα αναφερθούμε στις ετερογενείς μεθόδους σε αυτές δηλαδή, που ένα από τα αντισώματα του αντιγόνου είναι κολλημένο πάνω σε στερεή επιφάνεια. Η προσκόλληση αυτή εξασφαλίζεται με τις παρακάτω μεθόδους (Termynck & Avrameas, 1988):

1. **Ένωση αντισώματος με πλαστική επιφάνεια.** Γίνεται με ηλεκτροστατικές και κυρίως υδρόφοβες δυνάμεις. Είναι η πιο συνηθισμένη περίπτωση, αφού χρησιμοποιείται στα «πηγαδάκια» των πλακών ELISA.
2. **Ένωση αντισώματος με μαγνητικά σφαιρίδια.** Γίνεται με ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Χρησιμοποιείται σε αυτόματες μεθόδους χημειοφωταύγειας κ.α.
3. **Ένωση αντισώματος με σφαιρίδια πολυακρυλαμίδης, κυτταρίνης, αγαρόζης.** Γίνεται με χημικό δεσμό και χρησιμοποιείται σε αυτόματες μεθόδους.
4. **Ένωση αντισώματος με γυάλινα σωληνάκια.** Γίνεται με ηλεκτροστατικές δυνάμεις, αλλά δεν χρησιμοποιείται ιδιαίτερα σε αντιδραστήρια IVDs.

Η ένωση αντιγόνου – αντισώματος γίνεται εύκολα λόγω της χημικής συγγένειας των δύο μορίων. Αντίθετα, η ένωση ενζύμου - υποστρώματος απαιτεί συγκεκριμένες χημικές συζεύξεις, δηλαδή χημικές γέφυρες. Οι συζεύξεις αυτές άλλοτε εξασφαλίζουν απλά τη σταθερή ένωση ενζύμου και αντισώματος και άλλοτε ενισχύουν σημαντικά το παραγόμενο σήμα.

Αυτές οι συζεύξεις γίνονται με (Λιβανίου, 1998):

Υπεριωδικό νάτριο. Χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τη σύζευξη της υπεροξειδάσης με αντισώματα μέσω της υδατανθρακικής περιοχής του αντισώματος και της υπεροξειδάσης. Επειδή η υδατανθρακική περιοχή δεν συμμετέχει συνήθως στην ένωση ενζύμου και αντισώματος δεν επηρεάζεται η ενζυμική δραστηριότητα.

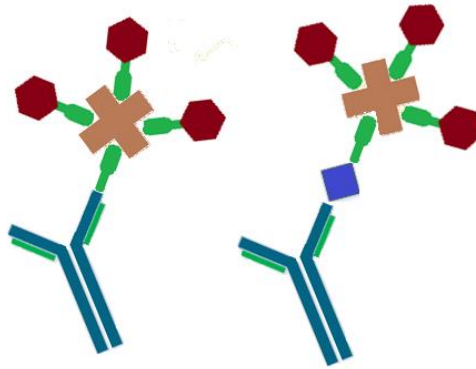
• **Γλουταλδεύδη.** Εξασφαλίζει τη διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ ενζύμου και αντισώματος μέσω των ελεύθερων ε-αμινομάδων της λυσίνης.

• **Σύμπλεγμα αβιδίνης – βιοτίνης και στρεπταβιδίνης - βιοτίνης.**

Η **βιοτίνη** είναι μία μικρή πρωτεΐνη (MB = 244 D) που ανήκει στη κατηγορία των βιταμινών (βιταμίνες H, B7). Βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές μεταβολικές διαδικασίες. Η βιοτίνη μπορεί να ενωθεί με πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων ένζυμα και αντισώματα, δημιουργώντας μεταξύ τους μία γέφυρα ανάμεσα στο ένζυμο και το αντίσωμα. Λόγω μεγέθους όμως, μπορεί να ενωθεί είτε με το ένα, είτε με το άλλο. Για να επιτελέσει επομένως τον ρόλο της χρειάζεται ένα ακόμα ενδιάμεσο μόριο. Αυτό μπορεί να είναι είτε η αβιδίνη, είτε η στρεπταβιδίνη.

Η **αβιδίνη** είναι ένα μόριο με 4 ενεργά κέντρα (MB περίπου 65000 D) με τα οποία μπορεί να αντιδράσει με τη βιοτίνη, αλλά και πολλές άλλες πρωτεΐνες με μη ειδικό τρόπο (Σχήμα 6.8). Βρίσκεται σε πολλά κύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές μεταβολικές διαδικασίες. Στην εργαστηριακή τεχνολογία χρησιμοποιείται για την ένωσή της με το μόριο της βιοτίνης, όχι όμως με τόσο ισχυρή χημική συγγένεια, όπως συμβαίνει με το μόριο της στρεπταβιδίνης. Πλεονεκτεί από τη στρεπταβιδίνη στο ότι παράγεται εύκολα από αυγά κότας.

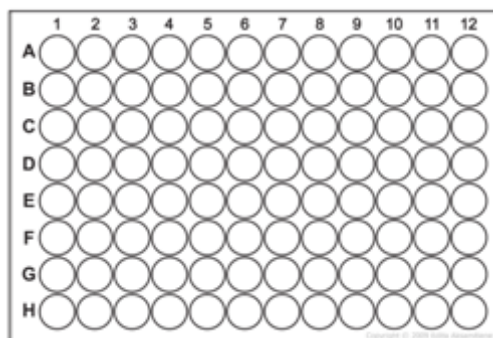
Η **στρεπταβιδίνη** παρόμοια με την αβιδίνη είναι ένα τετραμερές μόριο μοριακού βάρους 60.000 D. Σε αντίθεση με την αβιδίνη επιτυγχάνει ειδική σύνδεση με τη βιοτίνη λόγω της διαφορετικής αμινοξικής της ακολουθίας. Η παραγωγή της όμως, είναι δυσκολότερη και μεγαλύτερου κόστους, αφού προέρχεται από τον *Streptomyces avidinii*.



Σχήμα 6.8 Αναπαράσταση της ένωσης των συμπλεγμάτων βιοτίνης – αβιδίνης και βιοτίνης – στρεπταβιδίνης. Τα δύο αυτά συμπλέγματα έχουν τη δυνατότητα να ενώνονται με πολλά ένζυμα αυξάνοντας έτσι σημαντικά το παραγόμενο σήμα.

6.4.1 Βασικά αντιδραστήρια και αναλώσιμα που περιέχονται στα kits της ELISA

1. Πηγαδάκια **μικροτιτλοδότησης**: Πρόκειται για πλαστική πλάκα που περιέχει 96 μικροπηγαδάκια (**microwells**) και είναι επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης που θέλουμε να μετρήσουμε. Ο όγκος των αντιδραστηρίων που μπορούν να χωρέσουν, είναι περίπου 300 μL (Σχήμα 6.9). Διατηρούνται στο ψυγείο και σε κάποιες περιπτώσεις και σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε όμως περίπτωση είναι απαραίτητο να παραμείνουν σε στεγνό περιβάλλον, αφού η αυξημένη θερμοκρασία θα αλλοιώσει τα προσκολλημένα σε αυτά αντισώματα.
2. Βαθμονομητές (**standards** ή **calibrators**). Για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιούνται πολλά standards, συνήθως 1 έως 6. Πρόκειται για μικρά φιαλίδια του 1 mL έτοιμα προς χρήση. Χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς (**calibration**).
3. Διαλύματα ελέγχου (**control samples**). Πρόκειται για μικρά φιαλίδια συνήθως των 0,5 mL με διαφορετικού χρώματος καπάκια για να ξεχωρίζουν.
4. Σύζευγμα ενζύμου (**conjugate**). Περιέχει αντίσωμα ενωμένο με ένζυμο. Είναι έτοιμο προς χρήση.
5. Υπόστρωμα (**substrate**). Είναι η ουσία που θα αντιδράσει με το ένζυμο του conjugate. Αυτή η χημική αντίδραση θα παράγει χρώμα του οποίου η ένταση θα μετρηθεί στο φωτόμετρο.
6. Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (**stop solution**). Πρόκειται για ένα ισχυρό οξύ (H_2SO_4), που χρησιμεύει για τη διακοπή της αντίδρασης ενζύμου και υποστρώματος. Αμέσως μετά μπορεί να γίνει η φωτομέτρηση.
7. Διάλυμα πλύσης (**wash solution**). Πρόκειται για ένα συμπυκνωμένο διάλυμα (π.χ. 40X), το οποίο πρέπει να αραιωθεί πριν τη χρήση του με απεσταγμένο νερό. Παρόλα αυτά διατηρείται στο ψυγείο για περιορισμένο χρονικό διάστημα. Συνηθισμένα απορρυπαντικά είναι τα BND (5-βρωμο-5-νιτρο-1,3-διοξάνιο) και το MIT (2-μεθυλ-4-ισοθειαζολ-3-όνη).



Σχήμα 6.9 Πλάκα μικροτιτλοδότησης της ELISA. Όλες οι πλάκες έχουν από 96 πηγαδάκια.

6.4.2 Υλικά και Εξοπλισμός που δεν παρέχονται με τα kits

Το εργαστήριο που εκτελεί μεθόδους ELISA χρειάζεται εξοπλισμό αναλωσίμων και ηλεκτρονικών συσκευών. Σήμερα στην αγορά κυκλοφορούν αυτόματοι αναλυτές ELISA, που μπορούν να εξυπηρετήσουν ταυτόχρονα από δύο έως πολύ περισσότερες πλάκες ELISA (Φωτογραφία 6.1). Μπορούν να πραγματοποιήσουν όλα τα στάδια, όπως προαραίωση δειγμάτων, τοποθέτηση δειγμάτων και αντιδραστηρίων, πλυσίματα, φωτομέτρηση και αυτόματο υπολογισμό των συγκεντρώσεων. Απευθύνονται όμως σε εργαστήρια που έχουν μεγάλο αριθμό δειγμάτων.



Φωτογραφία 6.1 Αυτόματοι αναλυτές ELISA διαφόρων εταιρειών (Human, Menarini, Biobase). Κάθε αναλυτής μπορεί να τρέχει τουλάχιστον δύο πλάκες ELISA ταυτόχρονα.

Η ELISA είναι μία μέθοδος που με λίγα σχετικά όργανα μπορεί να «τρέξει» σε μικρό διαγνωστικό εργαστήριο, ερευνητικό ίδρυμα, ακόμα και σε εκπαιδευτικό.

Απαραίτητα όργανα	Προαιρετικά όργανα
Μονή πιπέττα ενός ή ρυθμιζόμενου όγκου	Αυτόματη πλυστική συσκευή
Διηθητικό χαρτί για το τίνιγμα των πλακών ELISA	Πιπέττα 8 ή 12 καναλιών
Φωτόμετρο ELISA	Θάλαμο υγρασίας (όπου χρειάζεται)
	Πλαστικό κάλυμμα για την αποφυγή εξάτμισης (όπου χρειάζεται)

Πίνακας 6.5 Βασικός και προαιρετικός εξοπλισμός για την εκτέλεση της μεθόδου ELISA.

6.4.3 Τα βασικά στάδια της μεθοδολογίας ELISA

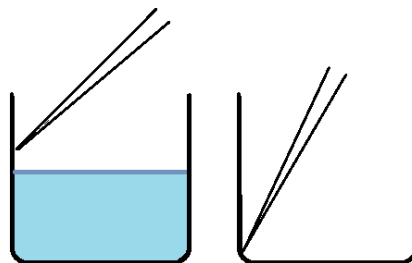
Παρακάτω θα περιγραφούν τα στάδια μιας τυπικής ELISA δύο σταδίων (Σχήμα 6.3). Η ELISA δύο σταδίων, σε αντίθεση με την ταχύτερη ELISA ενός σταδίου, περιλαμβάνει στάδια επώασης και πλύσης πριν την τοποθέτηση του συνδέτη. Αυτό εξασφαλίζει την απομάκρυνση ουσιών, που μπορεί να προκαλέσουν παρεμβολές στις ανοσοχημικές μεθόδους (βλ. στο τέλος του Κεφαλαίου). Το μειονέκτημα της είναι ότι απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο επώασης από την ELISA ενός σταδίου και για αυτό επιλέγεται όπου πραγματικά χρειάζεται καλό πλύσιμο και διαχωρισμός ουσιών.

1. **Απόψυξη των αντιδραστηρίων** (Φωτογραφία 6.2). Δείγματα, υλικά αναφοράς, υλικά ελέγχου, αντιδραστήρια και πλάκες μικροτιτλοδότησης πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου, πριν τη χρήση τους. Χωρίς αυτήν, μπορεί να προκύψουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.



Φωτογραφία 6.2 Ένα τυπικό kit ELISA (της εταιρείας ReQuest). Φαίνεται η πλάκα μικροτιλοδότησης ή πλάκα ELISA, τα διαλύματα των conjugate, stop, wash, enzyme και substrate, καθώς και τα μικρά σωληνάρια των controls και των calibrators.

- 2. Τοποθέτηση βαθμονομητών.** Κατά κανόνα εισάγονται 100 μL ή και 50 μL σε κάθε πηγαδάκι. Η απόρριψη από την αυτόματη πιπέττα γίνεται προσεκτικά στα τοιχώματα του πηγαδιού, χωρίς να σχηματίζονται φυσαλίδες (Σχήμα 6.10). Οι βαθμονομητές μπαίνουν πάντα εις διπλούν, ξεκινώντας από τον βαθμονομητή με τη μεγαλύτερη ή μικρότερη συγκέντρωση και προχωρώντας στη συνέχεια κατά αύξουσα ή φθίνουσα σειρά αντίστοιχα.



Σχήμα 6.10 Η σωστή απόρριψη δείγματος και αντιδραστηρίων μέσα στα πηγαδάκια της πλάκας ELISA.

- 3. Τοποθέτηση δειγμάτων ελέγχου.** Τοποθετούνται 100 μL ή 50 μL σε κάθε πηγαδάκι και σε κάθε περίπτωση σε ίση ποσότητα με τα δείγματα. Υπάρχει θετικό και αρνητικό δείγμα ελέγχου καθένα από τα οποία έχει όρια ελέγχου, τα οποία δεν πρέπει να παραβιαστούν από τη συγκέντρωση των δειγμάτων ελέγχου που θα υπολογιστούν στην πορεία. Προτείνεται τα δείγματα ελέγχου και τα δείγματα των ασθενών να τοποθετούνται εις διπλούν.
- 4. Τοποθέτηση δειγμάτων.** Τοποθετούνται 100 μL ή 50 μL δείγματος ασθενών σε κάθε πηγαδάκι. Αν και είναι ασφαλέστερο να τοποθετούνται επίσης εις διπλούν συνηθίζεται να μπαίνουν και μονά δείγματα. Σε πολλές περιπτώσεις τα δείγματα πρέπει να αραιωθούν πρώτα με κατάλληλο διαλύτη. Αυτό όμως δεν είναι απαραίτητο για τους βαθμονομητές και τα δείγματα ελέγχου.
- 5. Επώαση.** Σε αυτό το στάδιο, η επώαση απαιτείται για την πρόσδεση των αντιγόνων (βαθμονομητών, δειγμάτων ελέγχου, δειγμάτων ασθενών) στα αντισώματα που είναι ακινητοποιημένα στον πυθμένα. Γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και ο χρόνος ποικίλει ανάλογα με το kit. Σε πολλά kits αυτή η επώαση παραλείπεται.
- 6. Έκπλυση.** Αποσκοπεί στην απομάκρυνση των αντιγόνων που δεν προσδέθηκαν και γενικά όλων των συστατικών των δειγμάτων, που δεν χρειάζονται για τις περαιτέρω αντιδράσεις. Γίνεται με ειδικό

απορρυπαντικό που έχει παρασκευαστεί σε κατάλληλη ποσότητα, πριν τη χρήση. Κατά την πλύση τοποθετούνται 100 μL wash σε κάθε πηγαδάκι. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται τουλάχιστον 3 φορές. Το πλύσιμο μπορεί να γίνει με αυτόματο μηχάνημα εκπλύσεως για ELISA (Φωτογραφία 6.3) ή χειρονακτικά χρησιμοποιώντας απλή, ηλεκτρονική ή οκτακάναλη πιπέτα (Σχήμα 6.11). Στο τέλος των πλυσιμάτων τα πηγαδάκια αποστραγγίζονται για να μην έχουν υλικό ή φυσαλίδες.



Φωτογραφία 6.3 Αυτόματα πλυστικά ELISA διαφόρων εταιρειών (Biotek, Thermo). Αν και η έκπλυση των πλακών ELISA μπορεί να γίνει και χειρονακτικά με τη βοήθεια οκτακάναλης πιπέτας, το αυτόματο πλύσιμο είναι γρήγορο και αποτελεσματικό.



Σχήμα 6.11 Τύποι πιπετών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δοκιμασίες ELISA. Πιπέττες με ένα, οκτώ ακόμα και με δώδεκα ρύγχη μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν.

- 7. Τοποθέτηση συνδέτη.** Τοποθετείται σε όλα τα πηγαδάκια ίση ποσότητα. Συνήθως τοποθετούνται 100 μL αλλά κάθε kit έχει δικές του οδηγίες. Σε πολλά kits ο συνδέτης ενώνεται απευθείας με τα αντιγόνα, χωρίς να προηγείται αραίωση ή πλύση.
- 8. Επώαση.** Γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και ο χρόνος ποικίλει ανάλογα με το kit. Συνήθως η επώαση αυτή καταναλώνει το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, περίπου μία ώρα με ανοχή ± 5 λεπτά.
- 9. Έκπλυση.** Γίνεται με ειδικό απορρυπαντικό, που έχει παρασκευαστεί σε κατάλληλη ποσότητα πριν τη χρήση.
- 10. Τοποθέτηση υποστρώματος.** Τοποθετείται σε όλα τα πηγαδάκια ίση ποσότητα. Συνήθως τοποθετούνται 100 μL . Μόλις τοποθετηθεί το υπόστρωμα αρχίζουν τα δείγματα βαθμονομητών, ελέγχου και ασθενών να αλλάζουν χρώμα. Η ύπαρξη χρώματος είναι ενδεικτική θετικής αντίδρασης.
- 11. Επώαση.** Γίνεται συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου και ο χρόνος ποικίλει ανάλογα με το kit. Συνήθως είναι ο μικρότερος χρόνος σε διάρκεια. Αν το υπόστρωμα είναι το **TMB** (τρι-μεθυλο-βενζιδίνη), τότε η επώαση θα πρέπει να γίνει στο σκοτάδι.
- 12. Τοποθέτηση διαλύματος τερματισμού.** Τοποθετείται αμέσως μετά το υπόστρωμα χωρίς ενδιάμεσο πλύσιμο. Τοποθετείται σε όλα τα πηγαδάκια ίση ποσότητα (100 μL). Μόλις τοποθετηθεί το διάλυμα τερματισμού στα πηγαδάκια, αυτά παίρνουν το τελικό τους χρώμα.
- 13. Υπολογισμός των απορροφήσεων.** Ο προσδιορισμός γίνεται σε ειδικό φωτόμετρο για πλάκες ELISA (Φωτογραφία 6.4). Συνιστάται να γίνεται σε δύο μήκη κύματος, για να εξαλειφονται τυχόν παρεμβολές στο χρώμα από αιμοσφαιρίνη, χολερυθρίνη κ.α. Το τελικό χρώμα παραμένει σταθερό συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, που συνήθως παρατείνεται εάν διατηρηθούν στο ψυγείο.



Φωτογραφία 6.4 Φωτόμετρα για πλάκες ELISA. Διαδοχικά μοντέλα της ίδιας εταιρείας (Stat Fax), που δείχνουν και την εξέλιξη του αυτοματισμού (διαδοχικά τα μοντέλα 303+, 2100, 4300, 4400).

14. Ο υπολογισμός των **συγκεντρώσεων των δειγμάτων και των controls** γίνεται υπολογιστικά μετά την κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Η καμπύλη είναι σιγμοειδής ή γραμμική και οι υπολογισμοί των συγκεντρώσεων των δειγμάτων και των controls μπορούν να γίνουν είτε με γραφικό, είτε με μαθηματικό τρόπο.

6.5 Εργαστηριακό μέρος

Παραδείγματα Ανταγωνιστικής και μη Ανταγωνιστικής ELISA

Η ανταγωνιστική και η μη ανταγωνιστική ELISA δεν διαφέρουν τόσο στα στάδια της ανάλυσης, όσο στην φιλοσοφία τους που αντικατοπτρίζεται και στους υπολογισμούς μετατροπής της απορρόφησης σε συγκέντρωση.

Η βασική πορεία εργασίας για τις μεθόδους ELISA είναι περίπου η ίδια για ανταγωνιστικές και μη ανταγωνιστικές μεθόδους. Σε αυτό το κεφάλαιο, θα δούμε δύο παραδείγματα από ανταγωνιστική και μη ανταγωνιστική ELISA από εμπορικά kit της διεθνούς αγοράς.

6.5.1 Ο προσδιορισμός της FT₃ με ELISA

Η ορμόνη FT₃ προσδιορίζεται ευρέως σε νοσήματα του θυροειδούς. Οι τιμές αναφοράς της είναι 1,4 – 4,2 pg/mL. Έχει μοριακό βάρος 651 D. Είναι δηλαδή μια εξαιρετικά μικρή πρωτεΐνη. Προσδιορίζεται με ανταγωνιστική μέθοδο, αφού δεν διαθέτει πάνω από ένα επίτοπο για να συνδέεται με αντισώματα anti-FT₃.

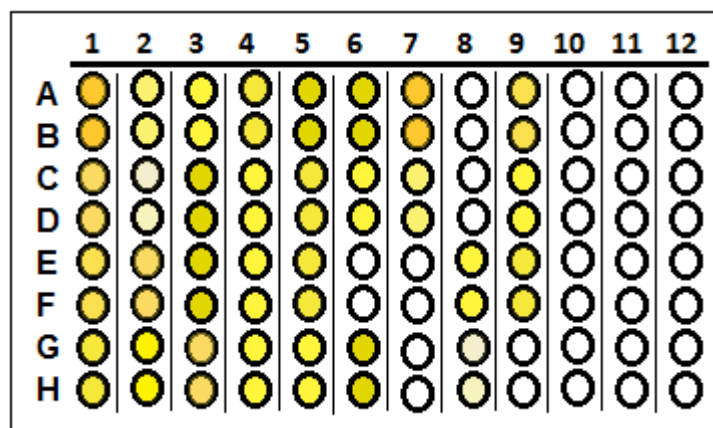
Για το παράδειγμα, επιλέχτηκε το αντιδραστήριο FT₃ της Leico technologies. Ο κατασκευαστής του ακολουθεί διαδικασία ανάλυσης παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε, με την επισήμανση ότι τοποθετούνται από 50 μL δείγματος και το διάλυμα του συνδέτη μπαίνει αμέσως μετά τα δείγματα χωρίς επώαση. Είναι δηλαδή ELISA ενός σταδίου. Χρησιμοποιεί 6 βαθμονομητές με συγκεντρώσεις 0, 0,6, 1,3, 4, 8 και 16 pg/mL. Η ποιότητα της ανάλυσης ελέγχεται με δύο δείγματα ελέγχου, ένα με χαμηλή συγκέντρωση, εύρους 0,5 – 0,8 pg/mL (Low control) και ένα με υψηλή συγκέντρωση εύρους 8,4 – 12,4 pg/mL (High control). Τα προσκολλημένα αντισώματα προέρχονται από εμβολιασμό προβάτου, το ένζυμο είναι το HRP και το υπόστρωμα το TMB.

Στο παράδειγμα που περιγράφουμε όλα τα δείγματα μπαίνουν **εις διπλούν**. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στις δοκιμασίες ELISA, αφού δεν ιδιαίτερα επαναλήψιμες. Στην αρχή μπαίνουν οι βαθμονομητές, ακολουθεί το «χαμηλό» και μετά το «υψηλό» δείγμα ελέγχου και κατόπιν με τη σειρά τα δείγματα (Πίνακας 6.6).

Cal 1	Cal 5	Pts 1	Pts 5	Pts 9	Pts 13	Pts 17	Pts 21	Pts 25	-	-	-
Cal 1	Cal 5	Pts 1	Pts 5	Pts 9	Pts 13	Pts 17	Pts 21	Pts 25	-	-	-
Cal 2	Cal 6	Pts 2	Pts 6	Pts 10	Pts 14	Pts 18	Pts 22	Pts 26	-	-	-
Cal 2	Cal 6	Pts 2	Pts 6	Pts 10	Pts 14	Pts 18	Pts 22	Pts 26	-	-	-
Cal 3	Low Ctrl	Pts 3	Pts 7	Pts 11	Pts 15	Pts 19	Pts 23	Pts 27	-	-	-
Cal 3	Low Ctrl	Pts 3	Pts 7	Pts 11	Pts 15	Pts 19	Pts 23	Pts 27	-	-	-
Cal 4	High Ctrl	Pts 4	Pts 8	Pts 12	Pts 16	Pts 20	Pts 24	Pts 28	-	-	-
Cal 4	High Ctrl	Pts 4	Pts 8	Pts 12	Pts 16	Pts 20	Pts 24	Pts 28	-	-	-

Πίνακας 6.6 Πίνακας δειγμάτων που έχουν τοποθετηθεί στα πηγαδάκια της ELISA για τον προσδιορισμό της FT₃.

Το υπόστρωμα TMB που χρησιμοποιείται στην ανάλυση παράγει μπλε χρώμα, που μετατρέπεται σε κίτρινο μετά την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού (Σχήμα 6.12). Η απορρόφηση του τελικού διαλύματος μετρείται στα 450 nm. Η πλάκα φωτομετρήθηκε σε ειδικό φωτόμετρο για πλάκες ELISA (Φωτογραφία 6.4) και υπολογίστηκαν οι τιμές των απορροφήσεων (Πίνακας 6.7). Ως ανταγωνιστική μέθοδος η απορρόφηση μειώνεται, όσο αυξάνει η συγκέντρωση.



Σχήμα 6.12 Οι χρωματικές αποχρώσεις μιας πλάκας ELISA μετά από την εκτέλεση ενός ανταγωνιστικού προσδιορισμού. Φαίνονται οι χρωματικές διαβαθμίσεις των βαθμονομητών και των δειγμάτων ελέγχου στις στήλες 1 και 2. Τα υπόλοιπα είναι δείγματα ασθενών που έχουν «τρέξει» εις διπλούν.

2,063	0,558	0,645	0,895	2,012	2,145	3,021	0,125	1,654	0	0	0
2,138	0,589	0,652	0,875	2,211	2,156	2,365	0,225	1,625	0	0	0
1,815	0,335	0,336	0,521	1,856	0,541	0,546	0,356	0,584	0	0	0
1,866	0,345	0,315	0,546	1,825	0,523	0,321	0,346	0,521	0	0	0
1,546	1,513	0,241	0,658	1,652	0,348	0,254	0,875	0,845	0	0	0
1,595	1,521	0,223	0,689	1,645	0,356	0,299	0,888	0,84	0	0	0
0,983	0,547	1,925	0,921	0,752	1,854	0,221	0,658	0,254	0	0	0
0,968	0,543	1,9	0,912	0,745	1,865	0,102	0,653	0,125	0	0	0

Πίνακας 6.7 Πίνακας υποθετικών τιμών απορρόφησης σε ανταγωνιστική μέθοδο. Οι μηδενικές τιμές αντιπροσωπεύουν την έλλειψη δείγματος σε αυτές τις θέσεις.

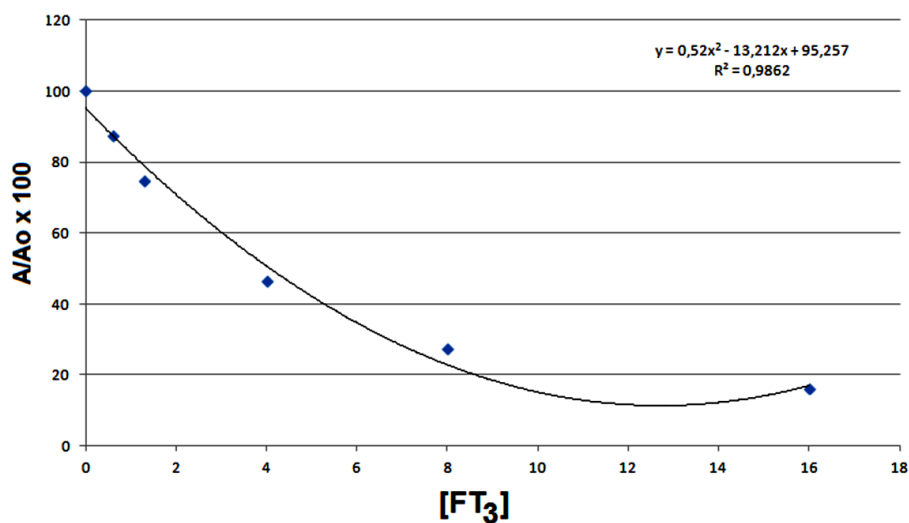
Βαθμονομητής	Συγκέντρωση βαθμονομητή	A ₁	A ₂	Μέση τιμή A ₁ , A ₂	CV%	A _i /A ₀ %
Cal 1	0	2,063	2,138	2,15	2,5	100
Cal 2	0,6	1,815	1,866	1,84	2,0	88
Cal 3	1,3	1,546	1,595	1,57	2,2	75
Cal 4	4	0,983	0,968	0,98	1,1	46
Cal 5	8	0,558	0,589	0,57	3,8	27
Cal 6	16	0,335	0,345	0,34	2,1	16

Πίνακας 6.8 Οι τιμές συγκεντρώσεων των βαθμονομητών και των αντίστοιχων απορροφήσεων καθώς και ο υπολογισμός του λόγου A_i/A₀% στις ανταγωνιστικές μεθόδους.

Χρησιμοποιώντας τις τιμές συγκέντρωσης και απορρόφησης των βαθμονομητών (Πίνακας 6.8) κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς. Σχεδιάζεται για αυτό σύστημα αξόνων, όπου στον οριζόντιο άξονα τοποθετούνται οι τιμές των βαθμονομητών και στον κάθετο άξονα ο λόγος %A_i/A₀. Ο λόγος αυτός εκφράζει τη μείωση της απορρόφησης σε σχέση με την απορρόφηση του μηδενικού βαθμονομητή (Cal 1) (Σχήμα 6.13).

$$\%A_i/A_0 = \frac{A_i}{A_0} \times 100\% \text{ (Εξίσωση 6.1)}$$

Η τιμή A_i είναι η τιμή απορρόφησης κάθε βαθμονομητή, δείγματος ελέγχου ή ασθενούς. Στη περίπτωση όμως που χρησιμοποιούνται διπλά δείγματα, τότε η τιμή A_i είναι η μέση τιμή των δύο δειγμάτων. Τα φωτόμετρα ELISA μπορούν να προγραμματιστούν να μετρούν μονά ή διπλά δείγματα και να υπολογίζουν αυτόματα τις μέσες τιμές. Η τιμή A₀ είναι η απορρόφηση του μηδενικού βαθμονομητή, είτε η μέση τιμή των δύο μηδενικών βαθμονομητών.



Σχήμα 6.13 Καμπύλη αναφοράς σε ανταγωνιστική μέθοδο. Κανονικά είναι πολωνυμική καμπύλη, η οποία όμως μετατρέπεται συνήθως σε γραμμική μετά από λογαριθμοποίηση του ενός άξονα.

6.5.1.1 Η κατασκευή της Καμπύλης Αναφοράς

Ανεξάρτητα από το αν το εργαστήριο θα «τρέξει» διπλά δείγματα ελέγχου ή ασθενών, οι βαθμονομητές «μπαίνουν» πάντα δύο φορές. Κατά συνέπεια, οι τιμές απορρόφησης που χρησιμοποιούνται στη κατασκευή της καμπύλης αναφοράς είναι οι μέσες τιμές των δύο απορροφήσεων κάθε βαθμονομητή. Ο λόγος που «τρέχουν» διπλοί βαθμονομητές είναι για να μπορεί να ελεγχθεί η εγκυρότητα τους. Έτσι δεν θα πρέπει οι δύο τιμές να διαφέρουν πολύ μεταξύ τους. Το μέτρο της διαφοράς τους είναι ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV%) ο οποίος δεν πρέπει να υπερβεί ένα συγκεκριμένο ποσοστό π.χ. 10%. Εάν οι απορροφήσεις ενός

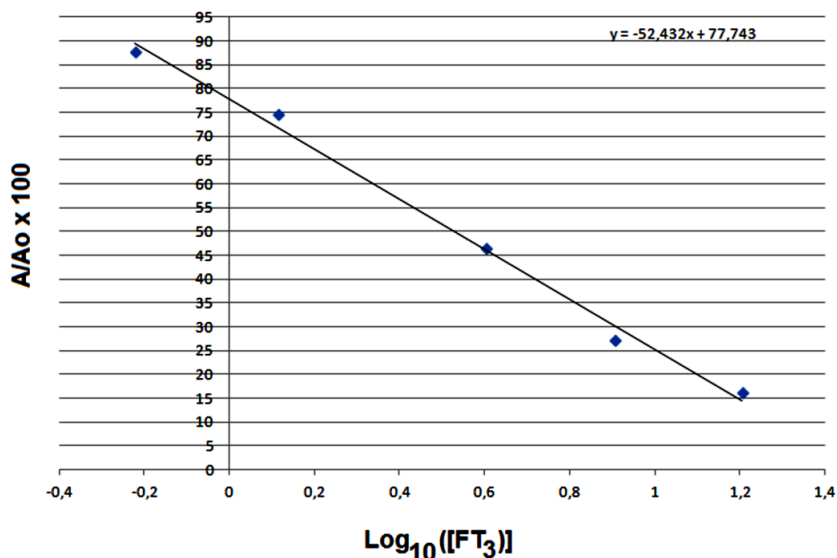
βαθμονομητή διαφέρουν πάνω από 10%, τότε θα πρέπει να αφαιρεθεί η απορρόφηση που είναι φανερό ότι δεν ταιριάζει με τις γειτονικές της. Η δυνατότητα αυτή υπάρχει σε όλα τα φωτόμετρα ELISA, πολύ δε περισσότερο αν χρησιμοποιηθεί λογιστικό φύλλο.

Στο παράδειγμα μας, η καμπύλη αναφοράς έχει σχεδιαστεί σε λογιστικό φύλλο (Excel) (Σχήμα 6.14) και χαρακτηρίζεται ως πολυωνυμική. Η εξίσωση βαθμονόμησης έχει υπολογιστεί αυτόματα από το λογιστικό φύλλο και φαίνεται πάνω στο σχήμα της καμπύλης μαζί με τον συντελεστή συσχέτισης R^2 . Ο συντελεστής συσχέτισης R^2 δείχνει τη συσχέτιση μεταξύ των δύο μεγεθών, της συγκέντρωσης και της απορρόφησης. Τιμές R^2 κοντά στη μονάδα ($R^2 \approx 1$) θεωρούνται ικανοποιητικές.

Οι πολυωνυμική εξίσωση επιλύεται όμως δύσκολα. Για τον λόγο αυτό προτιμάται η μετατροπή της σε γραμμική. Η μετατροπή γίνεται με τη λογαριθμοποίηση (δεκαδικός λογάριθμος) των συγκεντρώσεων. Η γραμμική εξίσωση είναι απλούστερη εξίσωση, στην οποία η συγκέντρωση υπολογίζεται ως ακολούθως:

$$y = ax + b \text{ (Εξίσωση 1.14)}$$

$$\text{ή } A_1/A_0 = a \log_{10}([FT_3]) + b \text{ (Εξίσωση 6.2)}$$



Σχήμα 6.14 Μετατροπή πολυωνυμικής σε γραμμική εξίσωση αναφοράς, μετά από τη λογαριθμοποίηση του οριζόντιου άξονα των συγκεντρώσεων.

Σύμφωνα με την εξίσωση 6.3 και το αντίστοιχο διάγραμμα (Σχήμα 6.14) στον οριζόντιο άξονα βρίσκεται ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης του FT_3 και στον κάθετο άξονα ο λόγος A_1/A_0 . Ο άγνωστος στην προηγούμενη εξίσωση είναι ο $\log_{10}([FT_3])$ ο οποίος ισούται με:

$$\log_{10}([FT_3]) = ((A_1/A_0) - b)/a \text{ (Εξίσωση 6.3)}$$

Η συγκέντρωση του FT_3 υπολογίζεται από τη μετατροπή του λογάριθμου σε ακέραιο.

$$\text{Αν } \log_{10}([FT_3]) = D \text{ τότε } [FT_3] = 10^D \text{ (Εξίσωση 6.4)}$$

6.5.1.1.1 Η αξιολόγηση των Τιμών Απορρόφησης

Οι τιμές απορρόφησης αξιολογούνται, με βάση τους παρακάτω κανόνες:

- Καμιά τιμή συγκέντρωσης ασθενούς δεν μπορεί να δοθεί, εάν οι τιμές των δειγμάτων ελέγχου δεν βρίσκονται μέσα στα προβλεπόμενα όρια. Μειονέκτημα των αναλύσεων ELISA είναι ότι τα δείγματα

ελέγχου «τρέχουν» μαζί μ'εκείνα των ασθενών και σε περίπτωση αστοχίας τους δεν υπάρχει η δυνατότητα να γίνουν επιδιορθωτικές ενέργειες, πριν «τρέξουν» τα δείγματα.

- Δεν πρέπει οι τιμές των δύο απορροφήσεων να έχουν μεγάλη διαφορά μεταξύ τους, δηλαδή μεγάλη διασπορά. Συνήθως οι κατασκευαστές των kit αναφέρουν μέχρι πόσο επιτρέπεται να είναι αυτή η διαφορά π.χ. ο συντελεστής μεταβλητότητας των δύο τιμών να μην υπερβαίνει το 10%. Φυσικά για να γίνει αυτός ο έλεγχος θα πρέπει τα δείγματα να «μπαίνουν» διπλά. Αν αυτό γίνεται μόνο για τους βαθμολογητές, ο έλεγχος περιορίζεται σε αυτούς. Εάν οι απορροφήσεις ενός βαθμονομητή διαφέρουν υπερβολικά μεταξύ τους, τότε θα πρέπει να αφαιρεθεί η απορρόφηση που είναι φανερό ότι δεν ταιριάζει με τις γειτονικές της και η καμπύλη να ξαναπολογιστεί. Εάν αυτό όμως συμβεί σε δείγματα ελέγχου και ασθενών, τότε θα πρέπει να αξιολογηθεί η διαφορά με γνώμονα την κλινική σημασία του αποτελέσματος.
- Κάθε μεθοδολογία ELISA έχει ένα συγκεκριμένο εύρος μέτρησης, που ξεκινά από την τιμή ποσοτικοποίησης και φτάνει μέχρι το όριο γραμμικότητας. Τιμές συγκέντρωσης μικρότερες από την τιμή ποσοτικοποίησης (βλ. Κεφάλαιο 1 και 9) δίνονται απλά μικρότερες από αυτήν και τιμές συγκέντρωσης μεγαλύτερες από το όριο γραμμικότητας δεν δίνονται καθόλου. Στη τελευταία περίπτωση γίνεται αραιώση του δείγματος και νέα μέτρηση. Το τελικό αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται επί τον συντελεστή αραιώσης. Στο παράδειγμα της FT₃ της συγκεκριμένης εταιρείας το εύρος μέτρησης ξεκινά από την τιμή του μηδενικού βαθμονομητή και εκτείνεται λίγο πάνω από την τιμή του τελευταίου βαθμονομητή (18 pg/mL).
- Τιμές απορρόφησης μικρότερες από το όριο ποσοτικοποίησης ή μεγαλύτερες από το όριο γραμμικότητας (βλ. Κεφάλαιο 9) δεν χρησιμοποιούνται στον υπολογισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων των ασθενών. Όταν η συγκέντρωση ενός δείγματος υπολογίζεται μεγαλύτερη από το όριο γραμμικότητας, τότε θα πρέπει το δείγμα αυτό να αραιωθεί και να γίνει νέος προσδιορισμός.

Σύμφωνα με τα παραπάνω πριν την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (Πίνακας 6.8) θα πρέπει να γίνει αξιολόγηση των απορροφήσεων (Πίνακας 6.7) για το αν η καμπύλη αναφοράς είναι έγκυρη. Φαίνεται λοιπόν, ότι η διασπορά των απορροφήσεων είναι αποδεκτή (CV% < 10%) αλλά και ότι μειώνονται με προβλεπόμενο τρόπο από την αρχική τους μέγιστη τιμή. Κατά συνέπεια, η ανάλυση μπορεί να προχωρήσει στο επόμενο στάδιο, δηλαδή στον σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς και στον υπολογισμό της εξίσωσης αναφοράς (Εξισώσεις 1.14, 6.2).

Τα αποτελέσματα που υπολογίζονται από τις εξισώσεις 6.3 και 6.4 περιλαμβάνουν και τιμές ασθενών που δεν μπορούν να δοθούν (Πίνακας 6.9). Π.χ. ο ασθενής 3 (Pts = 3) έχει τιμή συγκέντρωσης πάνω από το όριο γραμμικότητας. Ο ασθενής αυτός θα λάβει τιμή > 18 pg/mL. Το ίδιο θα συνέβαινε και για τους ασθενείς 20, 21 και 28, εάν δεν είχαν μεγάλη διασπορά οι τιμές απορρόφησης τους (CV > 10%). Για αυτούς τους ασθενείς θα πρέπει οι μετρήσεις να επαναληφθούν και το ίδιο θα πρέπει να γίνει και για τους ασθενείς 17 και 18. Το δείγμα του ασθενή 3 που ήταν πάνω από το όριο γραμμικότητας θα αραιωθεί και θα γίνει νέα ανάλυση.

Δείγμα	A ₁	A ₂	Μέση τιμή A ₁ , A ₂	CV%	A _i /A ₀ %	Αποτέλεσμα	CV%
Low C	1,51	1,52	72	0,4	72	1,3	0,4
High C	0,55	0,54	26	0,5	26	9,7	0,5
Pts 1	0,65	0,65	31	0,8	31	7,8	0,8
Pts 2	0,34	0,32	16	4,6	16	15,4	4,6
Pts 3	0,24	0,22	11	5,5	11	18,7	5,5
Pts 4	1,93	1,90	92	0,9	91	0,6	0,9
Pts 5	0,90	0,88	43	1,6	42	4,8	1,6
Pts 6	0,52	0,55	25	3,3	25	10,0	3,3
Pts 7	0,66	0,69	31	3,3	32	7,4	3,3
Pts 8	0,92	0,91	44	0,7	44	4,5	0,7
Pts 9	2,01	2,21	96	6,7	101	0,4	6,7
Pts 10	1,86	1,83	88	1,2	88	0,7	1,2

Pts 11	1,65	1,65	79	0,3	79	1,0	0,3
Pts 12	0,75	0,75	36	0,7	36	6,4	0,7
Pts 13	2,15	2,16	102	0,4	102	0,3	0,4
Pts 14	0,54	0,52	26	2,4	25	10,0	2,4
Pts 15	0,35	0,36	17	1,6	17	14,6	1,6
Pts 16	1,85	1,87	88	0,4	89	0,6	0,4
Pts 17	3,02	2,37	144	17,2	128	0,1	17,2
Pts 18	0,55	0,32	26	36,7	21	12,3	36,7
Pts 19	0,25	0,30	12	11,5	13	17,1	11,5
Pts 20	0,22	0,10	11	52,1	8	21,7	52,1
Pts 21	0,13	0,23	6	40,4	8	21,1	40,4
Pts 22	0,36	0,35	17	2,0	17	14,6	2,0
Pts 23	0,88	0,89	42	1,0	42	4,8	1,0
Pts 24	0,66	0,65	31	0,5	31	7,7	0,5
Pts 25	1,65	1,63	79	1,3	78	1,0	1,3
Pts 26	0,58	0,52	28	8,1	26	9,6	8,1
Pts 27	0,85	0,84	40	0,4	40	5,2	0,4
Pts 28	0,25	0,13	12	48,1	9	20,5	48,1

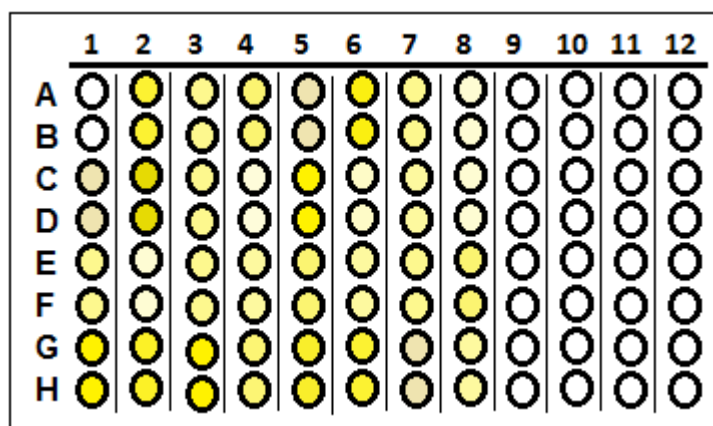
Πίνακας 6.9 Οι τιμές συγκεντρώσεων των ασθενών και των δειγμάτων ελέγχου.

Οι γραμμικές καμπύλες αναφοράς έχουν πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία από τις μη γραμμικές, αφού μετατρέπουν το παραγόμενο σήμα του ιχνηθέτη σε συγκέντρωση με αναλογικό τρόπο. Αυτός άλλωστε είναι ο λόγος που μετατρέπεται η πολυωνυμική καμπύλη σε γραμμική (Σχήμα 6.14).

6.5.2 Ο Προσδιορισμός της TSH με ELISA

Ο προσδιορισμός της TSH γίνεται με μη ανταγωνιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί το ίδιο ένζυμο και υπόστρωμα με τον προσδιορισμό της FT₃, οπότε η όλη αναλυτική διαδικασία είναι παρόμοια. Δεδομένου ότι υπάρχουν πολλές ομοιότητες με το προηγούμενο παράδειγμα, θα επικεντρωθούμε στη καμπύλη αναφοράς και στον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των ασθενών.

Οι τιμές αναφοράς για την TSH είναι 0,4 – 4,2 μU/mL. Χρησιμοποιούνται 6 βαθμονομητές με συγκεντρώσεις 0, 0,5, 2, 5, 10, 25 μU/mL και δύο δείγματα ελέγχου, ένα χαμηλού επιπέδου με συγκέντρωση 0,6 – 1,3 μU/mL και ένα υψηλού επιπέδου με συγκέντρωση 6,4 – 8,4 μU/mL. Στον Πίνακα 6.10 φαίνεται η σειρά τοποθέτησης βαθμονομητών, δειγμάτων ελέγχου και δειγμάτων ασθενών. Στον Πίνακα 6.11 φαίνονται και οι απορροφήσεις όλων των δειγμάτων βαθμονομητών, δειγμάτων ελέγχου και δειγμάτων ασθενών (Σχήμα 6.15).



Σχήμα 6.15 Οι χρωματικές αποχρώσεις μιας πλάκας ELISA, μετά από την εκτέλεση ενός μη ανταγωνιστικού προσδιορισμού. Όλα τα δείγματα έχουν «τρέξει» εις διπλούν.

Cal 1	Cal5	Pts 1	Pts 5	Pts 9	Pts 13	Pts 17	Pts 21	-	-	-	-
Cal 1	Cal 5	Pts 1	Pts 5	Pts 9	Pts 13	Pts 17	Pts 21	-	-	-	-
Cal 2	Cal 6	Pts 2	Pts 6	Pts 10	Pts 14	Pts 18	Pts 22	-	-	-	-
Cal 2	Cal 6	Pts 2	Pts 6	Pts 10	Pts 14	Pts 18	Pts 22	-	-	-	-
Cal 3	Low Cctl	Pts 3	Pts 7	Pts 11	Pts 15	Pts 19	Pts 23	-	-	-	-
Cal 3	Low Cctl	Pts 3	Pts 7	Pts 11	Pts 15	Pts 19	Pts 23	-	-	-	-
Cal 4	High Ctrl	Pts 4	Pts 8	Pts 12	Pts 16	Pts 20	Pts 24	-	-	-	-
Cal 4	High Cctl	Pts 4	Pts 8	Pts 12	Pts 16	Pts 20	Pts 24	-	-	-	-

Πίνακας 6.10 Πίνακας δειγμάτων που έχουν τοποθετηθεί στα πηγαδάκια της ELISA σε μη ανταγωνιστικό προσδιορισμό.

0,061	1,412	0,348	0,895	0,426	0,214	2,145	4,154	0	0	0	0
0,064	1,426	0,34	0,875	0,421	0,213	2,156	4,126	0	0	0	0
0,159	2,684	0,387	0,521	0,521	0,845	0,541	0,654	0	0	0	0
0,154	2,726	0,365	0,546	0,546	0,822	0,523	0,632	0	0	0	0
0,398	0,280	0,248	0,658	0,658	1,652	0,348	0,321	0	0	0	0
0,39	0,274	0,265	0,689	0,689	1,645	0,356	0,333	0	0	0	0
0,8	0,923	0,879	0,921	0,921	0,752	1,854	0,221	0	0	0	0
0,823	0,921	0,821	0,912	0,912	0,745	1,845	0,102	0	0	0	0

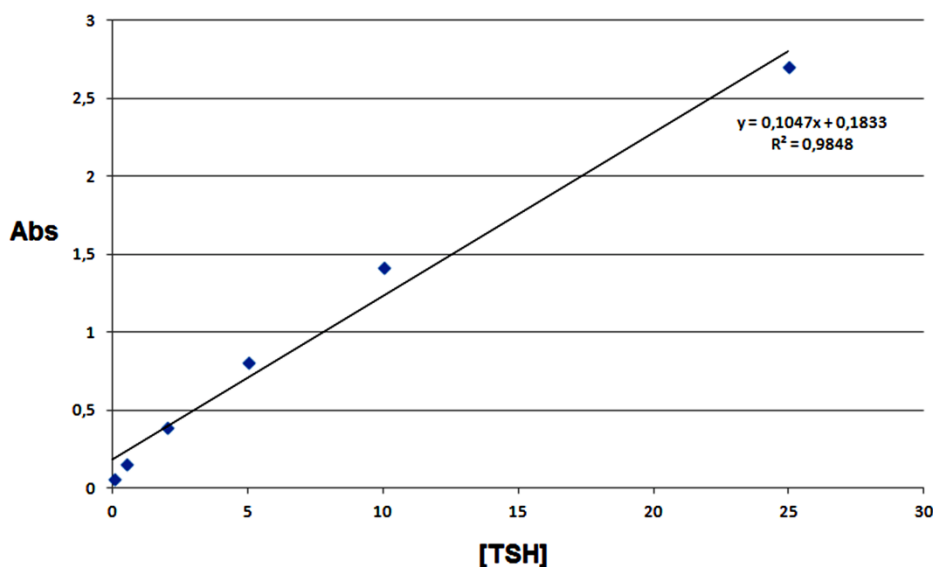
Πίνακας 6.11 Πίνακας υποθετικών τιμών απορρόφησης σε ανταγωνιστική ELISA.

Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων θα πρέπει να σχεδιαστεί καμπύλη αναφοράς. Προηγουμένως θα πρέπει να μελετηθούν οι διπλές απορροφήσεις των βαθμονομητών. Παρατηρείστε ότι η απορρόφηση A_2 του βαθμονομητή 5 (Πίνακας 6.12) δεν είναι σωστή για δύο λόγους. Πρώτον, ενώ η αύξηση των απορροφήσεων είναι γραμμική και αναμένεται, με βάση τη συγκέντρωση των βαθμονομητών 3 και 4, ο διπλασιασμός της απορρόφησης του βαθμονομητή 5, η τελευταία είναι πολύ μεγαλύτερη. Το πρόβλημα εντοπίζεται στην πολύ μεγάλη διασπορά των δύο απορροφήσεων του βαθμονομητή 5 ($CV\% = 29\%$). Η λύση είναι η αφαίρεση της απορρόφησης A_2 (2,154), οπότε αντί του μέσου όρου θα χρησιμοποιηθεί μόνο η απορρόφηση A_1 (1,419).

Βαθμονομητής	Συγκέντρωση βαθμονομητή	A ₁	A ₂	Μέσος όρος	CV%
Cal 1	0	0,061	0,064	0,06	3,4
Cal 2	0,5	0,159	0,154	0,16	2,3
Cal 3	2	0,398	0,39	0,39	1,4
Cal 4	5	0,8	0,823	0,81	2,0
Cal 5	10	1,419	2,154	1,783	29,4
Cal 6	25	2,684	2,726	2,7	1,1

Πίνακας 6.12 Οι συγκεντρώσεις των βαθμονομητών και οι απορροφήσεις τους σε μη ανταγωνιστική ELISA.

Από τους Πίνακες 6.10, 6.11 φαίνεται ότι οι βαθμονομητές, τα δείγματα ελέγχου και τα δείγματα ασθενών μπήκαν εις διπλούν, κάτι, που όπως ειπώθηκε είναι επιθυμητό στις αναλύσεις ELISA. Από τον Πίνακα 6.12 σχεδιάζεται η καμπύλη αναφοράς, η οποία τώρα είναι γραμμική (Σχήμα 6.16).



Σχήμα 6.16 Η γραμμική καμπύλη αναφοράς στην μη ανταγωνιστική μέθοδο.

Η καμπύλη αναφοράς στη μη ανταγωνιστική μέθοδο έχει τη μορφή:

$$y = ax + b \text{ (Εξίσωση 1.14)}$$

$$\text{ή } Abs = a [TSH] + b \text{ (Εξίσωση 6.5)}$$

Σύμφωνα με την εξίσωση παλινδρόμησης που υπολόγισε το λογιστικό φύλλο ισχύει:

$$Abs = 0,1047 [TSH] + 0,1833 \text{ (Εξίσωση 6.6)}$$

$$\text{ή } [TSH] = (Abs - 0,1833)/0,1047 \text{ (Εξίσωση 6.7)}$$

Είναι φανερό, ότι οι μη ανταγωνιστικές μέθοδοι έχουν απλούστερες καμπύλες και εξισώσεις αναφοράς. Η γραμμική τους σχέση εξασφαλίζει μεγαλύτερη ευαισθησία από τις ανταγωνιστικές μεθόδους. Φυσικά και αυτές οι αναλύσεις έχουν τους ίδιους περιορισμούς με τις ανταγωνιστικές μεθόδους.

Όπως και στις ανταγωνιστικές μεθόδους οι τιμές των δειγμάτων ελέγχου (Πίνακας 6.13) θα πρέπει να είναι μέσα στα προβλεπόμενα όρια (όπως εδώ), οι συγκεντρώσεις να μην υπερβαίνουν το εύρος μέτρησης και όταν χρησιμοποιούνται διπλές απορροφήσεις η διασπορά τους (CV%) να μην υπερβαίνει ένα

συγκεκριμένο όριο (π.χ. 10%). Κατόπιν όλων αυτών αποτελεί παράδοξο η συγκέντρωση του ασθενούς 20 του οποίου οι δύο απορροφήσεις έχουν μεγάλη διαφορά μεταξύ τους (CV = 52%). Κανονικά η ανάλυση του δείγματος αυτού πρέπει να επαναληφθεί, αλλά επειδή και οι δύο απορροφήσεις είναι πολύ μικρές κάτι τέτοιο θεωρείται φυσιολογικό αφού πρόκειται για απορροφήσεις κοντά στο τυφλό. Για τον ασθενή αυτόν η τιμή που θα δοθεί είναι συγκέντρωση μικρότερη από το όριο ποσοτικοποίησης (< 0,01 mU/μL).

Δείγμα	A ₁	A ₂	Μέση τιμή	CV%	Αποτέλεσμα
Low Ctrl	0,280	0,274	0,277	1,53	0,89
High Ctrl	0,923	0,921	0,922	0,15	7,06
Pts 1	0,348	0,34	0,6485	1,64	1,53
Pts 2	0,387	0,365	0,3255	4,14	1,84
Pts 3	0,248	0,265	0,232	4,69	0,70
Pts 4	0,879	0,821	2,082	4,82	6,37
Pts 5	0,426	0,421	0,4235	0,83	2,29
Pts 6	0,521	0,546	0,5335	3,31	3,34
Pts 7	0,658	0,689	0,6735	3,25	4,68
Pts 8	0,921	0,912	0,9165	0,69	7,00
Pts 9	0,214	0,213	0,2135	0,33	0,29
Pts 10	0,845	0,822	0,8335	1,95	6,21
Pts 11	1,652	1,645	1,6485	0,30	13,99
Pts 12	0,752	0,745	0,7485	0,66	5,40
Pts 13	2,145	2,156	2,1505	0,36	18,79
Pts 14	0,541	0,523	0,532	2,39	3,33
Pts 15	0,348	0,356	0,352	1,61	1,61
Pts 16	1,854	1,865	1,8595	0,42	16,01
Pts 17	4,154	4,126	4,14	0,48	37,79
Pts 18	0,654	0,632	0,643	2,42	4,39
Pts 19	0,321	0,333	0,327	2,59	1,37
Pts 20	0,221	0,102	0,1615	52,10	-0,21
Pts 21	0,387	0,365	0,376	4,14	1,84
Pts 22	0,356	0,346	0,351	2,01	1,60
Pts 23	0,875	0,888	0,8815	1,04	6,67
Pts 24	0,658	0,653	0,6555	0,54	4,51

Πίνακας 6.13 Πίνακας απορροφήσεων και αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό της TSH.

6.6 Παρατηρήσεις και επιπλέον πληροφορίες για τις Καμπύλες Βαθμονόμησης

6.6.1 Μονά ή Διπλά δείγματα;

Όπως αναφέρθηκε στα προηγούμενα πειράματα, είναι πολύ χρήσιμο τα δείγματα να «τρέχουν» εις διπλούν. Αυτό βοηθά πολύ στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων ELISA. Εάν αυτό δεν μπορεί να γίνει για πρακτικούς ή οικονομικούς λόγους, θα πρέπει τουλάχιστον να τρέχουν εις διπλούν οι βαθμονομητές (Video 6.1).

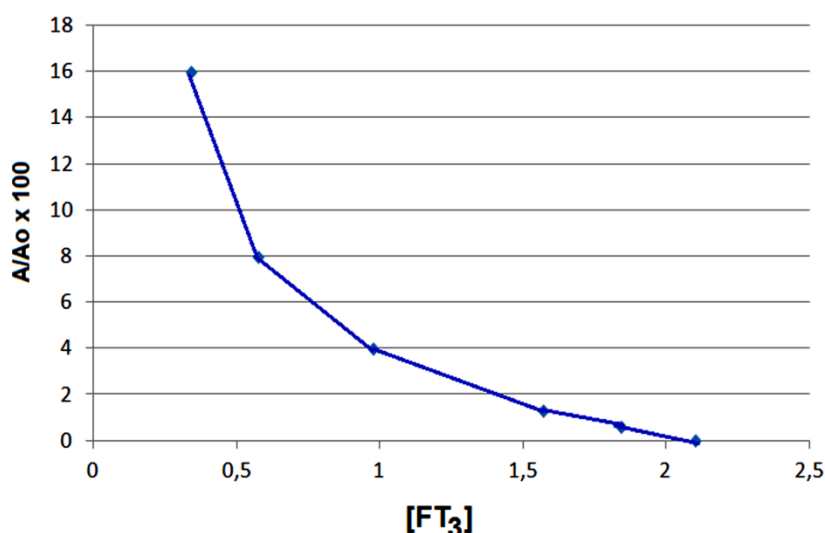
6.6.2 Η Διχρωματική Ανάλυση

Η προσθήκη του διαλύματος τερματισμού (H_2SO_4) μετατρέπει το τελικό χρώμα των αντιδράσεων σε αποχρώσεις του κίτρινου. Η ένταση του κίτρινου χρώματος μπορεί να δεχτεί παρεμβολές από χημικές ουσίες ίδιου χρώματος π.χ. της χολερυθρίνης. Για τον λόγο αυτό, συνιστάται να μετρώνται δύο διαφορετικές απορροφήσεις με δύο διαφορετικά μήκη κύματος. Συνήθως, εκτός από το μήκος κύματος που συνιστάται για το συγκεκριμένο υπόστρωμα, μετράται και η απορρόφηση στα 650 nm. Σε αυτό το μήκος κύματος απορροφά η χολερυθρίνη και άλλες ουσίες ίδιου χρώματος.

6.6.3 Άλλοι τρόποι υπολογισμού των Εξισώσεων Αναφοράς

Οι εξισώσεις βαθμονόμησης που παρουσιάστηκαν στα δύο προηγούμενα παραδείγματα είναι εξισώσεις παλινδρόμησης (**Ενότητα 1.16**) (Κουμπάρης, 1994). Δεν αποτελούν όμως τον μοναδικό τρόπο υπολογισμού τους.

Ένας άλλος τρόπος που προσφέρεται στα φωτόμετρα ELISA είναι η μέθοδος «σημείο προς σημείο» (**point to point**). Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο τα σημεία της καμπύλης αναφοράς ενώνονται μεταξύ τους με ευθύγραμμα τμήματα κάθε ένα από τα οποία ορίζεται με τη δική του εξίσωση της μορφής $y = ax + \beta$ (Σχήμα 6.17). Το φωτόμετρο ανάλογα με την απορρόφηση κάθε δείγματος επιλέγει την κατάλληλη εξίσωση $y = ax + \beta$. Προφανώς η μαθητική αυτή μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί στις γραμμικές καμπύλες αναφοράς οι οποίες, ούτως ή άλλως, ορίζονται από μία εξίσωση $y = ax + \beta$.



Σχήμα 6.17 Καμπύλη αναφοράς τύπου *point to point* για τον προσδιορισμό της FT_3 . Η καμπύλη αναφοράς αποτελείται από πέντε ευθύγραμμα τμήματα που ορίζονται από πέντε εξισώσεις $y = ax + b$.

Πολύ καλύτερες επιλογές από τις εξισώσεις regression και *point to point* είναι οι καμπύλες **spline**. Η επιλογή *spline* υπάρχει σε πολλά φωτόμετρα ELISA και πλεονεκτεί στο ότι με τη βοήθεια συνδυασμού εξισώσεων η καμπύλη αναφοράς περνά από τη συντομότερη απόσταση μεταξύ των σημείων των βαθμονομητών. Η μέθοδος *spline* μπορεί να εφαρμοστεί και σε γραμμικές και σε μη γραμμικές καμπύλες αναφοράς.

Η κατασκευή των καμπύλων αναφοράς έχει σημαντικό οικονομικό κόστος, λόγω των πολλών βαθμονομητών και αναλύσεων που απαιτούνται στις περισσότερες ανοσοχημικές μεθόδους. Επιπλέον, οι πολλές αναλύσεις που απαιτούν, αυξάνουν την πιθανότητα σφάλματος που σημαίνει νέα καθυστέρηση και κόστος. Για τον λόγο αυτό, πολλοί αυτόματοι ανοσοχημικοί αναλυτές επιλέγουν να ενωματούσουν μέσα στα λογισμικά τους τα αριθμητικά δεδομένα μιας πλήρους καμπύλης (**master curve**), έτσι ώστε κάθε φορά ο χρήστης του αναλυτή να χρειάζεται μόνο να την προσαρμόζει στις ιδιαιτερότητες της ανάλυσης. Έτσι, αντί της κατασκευής πολύπλοκων σιμοειδών καμπυλών μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο δύο βαθμονομητές, όπως γίνεται στις γραμμικές καμπύλες αναφοράς. Από τους δύο βαθμονομητές θα παραχθεί ένας μαθηματικός

συντελεστής με τον οποίο θα πολλαπλασιάζεται το παραγόμενο σήμα κάθε δείγματος ασθενούς για να γίνει ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του.

6.7 Στοιχεία για τις άλλες Ανοσοχημικές μεθόδους

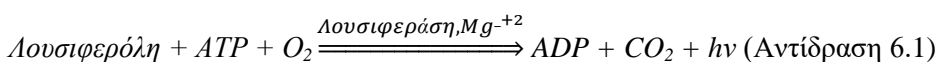
Οι υπόλοιπες ανοσοχημικές μέθοδοι, ραδιοανοσοενζυμικές, χημειοφωταύγειας, ετερογενείς και ομογενείς, αν και έχουν σημαντικές διαφορές από την ELISA, αυτές περιορίζονται στο αναλυτικό στάδιο. Αντίθετα, η δημιουργία των καμπυλών αναφοράς έχει σημαντικές ομοιότητες. Ο ένας άξονας είναι πάντα οι τιμές της συγκέντρωσης των βαθμονομητών και ο άλλος οι τιμές του σήματος (Abs, RLU, cpm). Σε όλες τις ανταγωνιστικές μεθόδους η καμπύλη βαθμονόμησης αυξάνεται σε σχέση με την τιμή του σήματος και σε όλες τις μη ανταγωνιστικές μεθόδους η καμπύλη μειώνεται. Μέθοδοι όπως regression, point-to-point και spline χρησιμοποιούνται εξίσου.

6.7.1 Χημειοφωταύγεια

Η χημειοφωταύγεια αποτελεί την πλέον διαδεδομένη σήμερα ανοσοχημική μέθοδο (Γρηγόρη 2011· Ζερβού 1998· Νικολού 2000). Η δυνατότητα αυτοματισμού, ο σύντομος χρόνος απόδοσης των αποτελεσμάτων καθώς και η υψηλή ευαισθησία, την καθιστούν πρώτη επιλογή για μεγάλους κατασκευαστικούς οίκους με πολύ γνωστά μοντέλα αναλυτών (Dimension, Cobas, Elecsys, Architect, Centaur κ.α.). Θα παρουσιαστούν εδώ λίγα στοιχεία για τις σύγχρονες παραλλαγές της βασικής μεθοδολογίας CHIA.

6.7.1.1 Έμμεση ή Ενισχυμένη Χημειοφωταύγεια

Η έμμεση χημειοφωταύγεια βασίζεται στη παραγωγή φωτός μέσω μίας ενζυμικής αντίδρασης, κάτι που άλλωστε συμβαίνει και στη φύση και συγκεκριμένα στο έντομο της πυγολαμπίδας, η οποία χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα την λουσιφερόλη. Οι αναλυτές χρησιμοποιούν αντίστοιχα την φωσφορική διοξετάνη την οποία αποφωσφορυλιώνουν με την ALP. Μόλις η διοξετάνη χάσει τον φωσφόρο της καθίσταται ασταθής και παράγεται έτσι φως μέχρις ότου εξαντληθεί το υπόστρωμα της ALP.



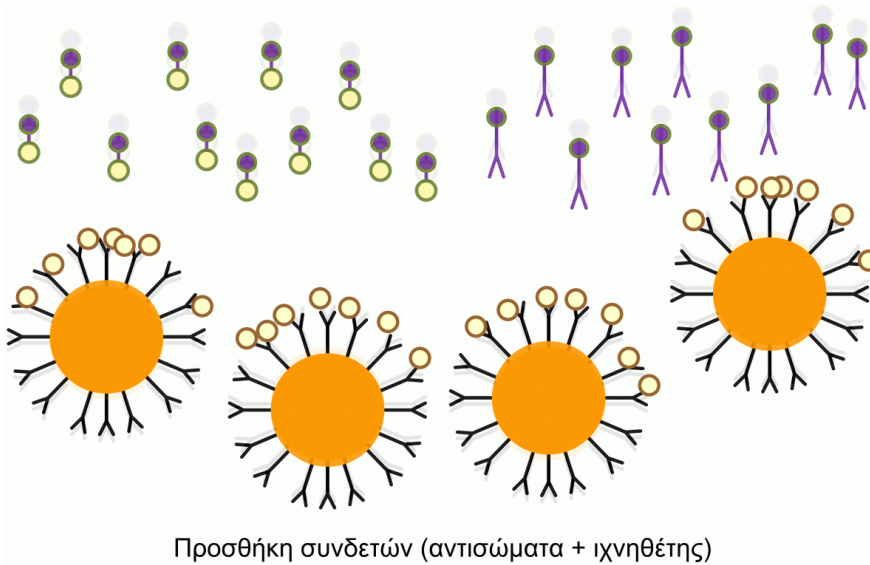
Έμμεση χημειοφωταύγεια χρησιμοποιούν οι αναλυτές Immulite της εταιρείας Siemens. Οι αναλυτές χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα τη **φωσφορική διοξετάνη**, την οποία αποφωσφορυλιώνουν με την αλκαλική φωσφατάση (ALP). Μόλις η διοξετάνη χάσει τον φωσφόρο της καθίσταται ασταθής και παράγονται φωτόνια των οποίων η ενέργεια τους είναι ανάλογη της ποσότητας της φωσφορικής διοξετάνης. Το φως παράγεται συνεχώς μέχρις ότου εξαντληθεί το υπόστρωμα της ALP. Το γεγονός ότι με τη μέθοδο αυτή παράγεται συνεχώς φως επιτρέπονται πολλαπλές μετρήσεις στο ίδιο δείγμα αυξάνοντας την αξιοπιστία της μεθόδου.

6.7.1.2 Η Άμεση/Μικροσωματιδιακή Χημειοφωταύγεια

Το φως στην άμεση χημειοφωταύγεια παράγεται απ'ευθείας από τον ιχνηθέτη (εστέρας ακριδίνης), χωρίς τη χρήση ενζύμου (Γρηγόρη, 2011). Το γεγονός αυτό συντομεύει τον χρόνο ανάλυσης. Η τεχνολογία αυτή όπως τουλάχιστον χρησιμοποιείται από τους αναλυτές Advia Centaur της Siemens χρησιμοποιεί τη διμεθυλική μορφή των εστέρων ακριδίνης. Για την παραγωγή φωτός οι εστέρες ακριδίνης οξειδώνονται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η έκλυση φωτός μεγιστοποιείται με τη μετατροπή του περιβάλλοντος από όξινο σε βασικό. Η ταχύτητα των αναλύσεων με τους εστέρες ακριδίνης οφείλεται και στο μέγεθος των εστέρων ακριδίνης που είναι κατά πολύ μικρότεροι από το μόριο της αλκαλικής φωσφατάσης. Κατά συνέπεια δεν εμποδίζονται οι γειτονικές θέσεις δέσμευσης των τμημάτων Fab των αντισωμάτων που είναι δεσμευμένα πάνω στα μαγνητικά μικροσωματίδια.

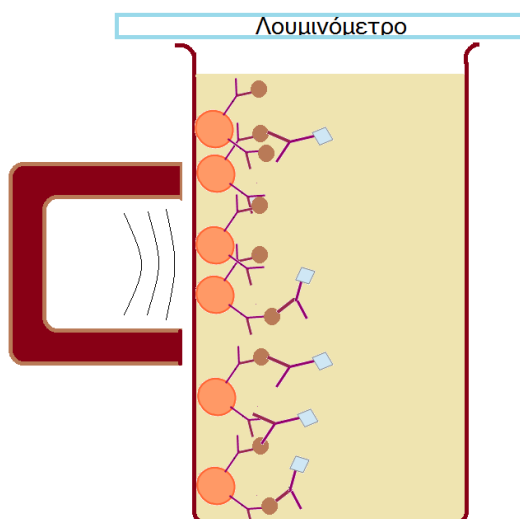
Τα παραμαγνητικά σωματίδια (Paramagnetic particles ή **PMP**) είναι οξείδια του σιδήρου που έχουν την ιδιότητα να έλκονται από μαγνήτη. Πάνω στα PMP συγκολλούνται αντισώματα τα οποία καλούνται γενικά στερεή φάση. Κατά τη διάρκεια της επώασης το αντιγόνο που θέλουμε να μετρήσουμε συνδέεται με τα αντισώματα της στερεής φάσης. Μετά τη σύνδεση αυτή τα PMP έλκονται από μαγνήτες οι οποίοι τα

ακινητοποιούν πάνω τους. Τα μόρια του διαλύματος που δεν συνδέθηκαν με τα PMP ξεπλένονται. Με τα PMP κολλημένα πάνω στους μαγνήτες προστίθεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου και ξεκινά η αντίδραση (Animation 6.1).



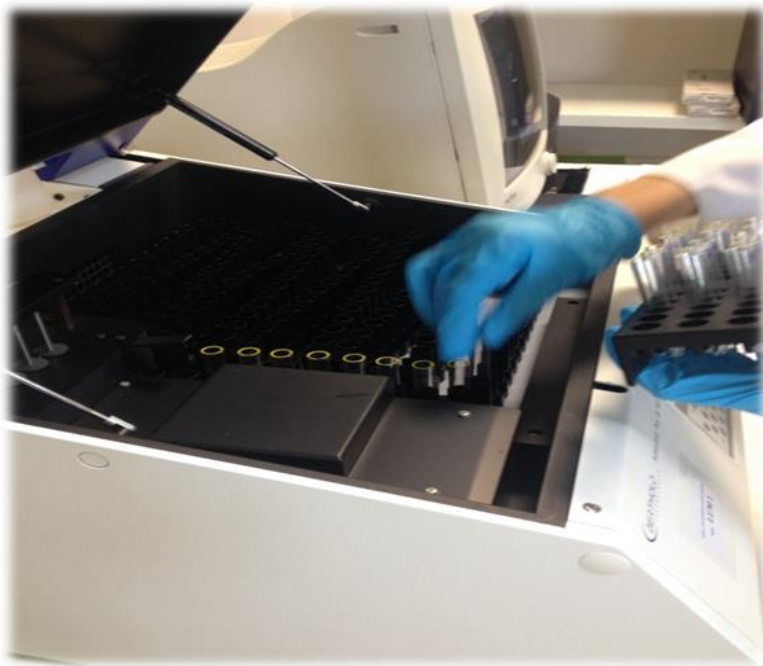
Animation 6.1 Τα βασικά στάδια της χημειοφωταύγειας με παραμαγνητικά σφαιρίδια. Εδώ τα αντισώματα είναι ακινητοποιημένα πάνω σε μεταλλικές μπίλιες που αποτελούν τη στερεή φάση. Αριστερά φαίνεται η ανταγωνιστική μέθοδος, όπου το σημασμένο αντιγόνο με εστέρα ακριδίνης ανταγωνίζεται το αντιγόνο του ασθενούς. Δεξιά φαίνεται η μη ανταγωνιστική μέθοδος, όπου οι εστέρες ακριδίνης των conjugate αντισωμάτων ενώνονται με όλα τα ακινητοποιημένα αντίγωνα της στερεής φάσης.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται με μικρές παραλλαγές και από τους αναλυτές Architect της εταιρείας Abbott. Συμβολίζεται ως **CMIA** από τα αρχικά Chemilumescence Microparticles Immunoassay. Στηρίζεται όπως και άλλες μέθοδοι στην σύνδεση αντιγόνων με συνδεδεμένα, πάνω σε μαγνητικά σφαιρίδια, αντισώματα (Animation 6.2).



Προσθέτουμε N-μεθυλακριδόνη στο μίγμα αντίδρασης και απελευθερώνεται φως που μετράται άμεσα

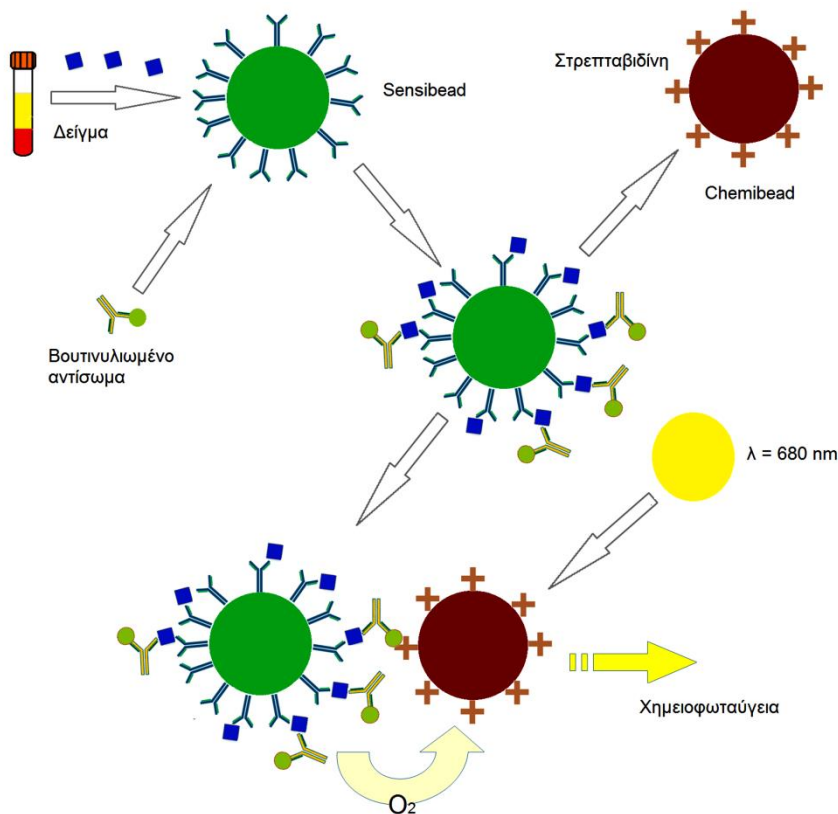
Animation 6.2 Αναπαράσταση της μικροσωματιδιακής ανοσοχημειοφωταύγειας. Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με παραμαγνητικά σφαιρίδια, με την επίδραση αντισωμάτων, διαχωρίζονται από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του δείγματος.



Φωτογραφία 6.1 Η φόρτωση του φωταυγείομετρου (ή λουμινόμετρου) με φιαλίδια βαθμονομητών, δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (controls) και δειγμάτων ασθενών κατά τον προσδιορισμό ορμονών με ενζυμική χημειοφωταύγεια.

6.7.1.3 Η Ανοσοχημειοφωταύγεια Καναλιού Οξυγόνου

Η ανοσοχημειοφωταύγεια καναλιού οξυγόνου (**Luminescent oxygen channeling immunoassay** ή **LOCI**) βασίζεται στην αλληλεπίδραση δύο σωματιδίων latex, τα sensibead και chemibead, που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση (Σχήμα 6.18). Το sensibead περιέχει τη βαφή φθαλοκυανίνη και φέρει αντισώματα ειδικά για το αντιγόνο που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Τα αντισώματα του sensibead ενώνονται και με τα σωματίδια chemibead, που περιέχουν στρεπταβιδίνη και μία οργανική ένωση τύπου ολεφίνης. Η κοντινή αυτή απόσταση μεταξύ των σωματιδίων sensibead και chemibead έχει σαν αποτέλεσμα, όταν το sensibead διεγερθεί με κατάλληλο μήκος κύματος, η φθαλοκυανίνη που περιέχει, να εκπέμπει μονήρη οξυγόνο που αμέσως θα αντιδράσει με το γειτονικό chemibead και θα παράξει φως.

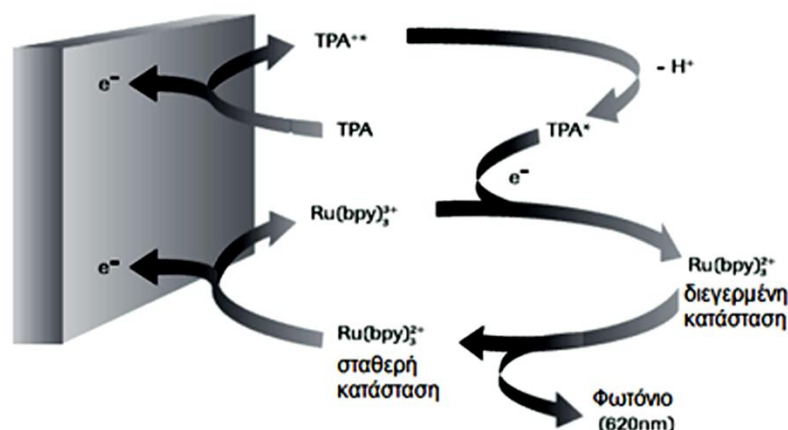


Σχήμα 6.18 Αναπαράσταση της ανοσοχημιοφωταύγειας καναλιού οξυγόνου.

6.7.1.4 Ηλεκτροχημιοφωταύγεια

Η ηλεκτροχημιοφωταύγεια (**Electrochemiluminescence Immunoassay** ή **eCLIA**) χρησιμοποιεί ως ιχνηθέτη το **ρουθίνιο**, το οποίο δεν ενεργοποιείται χημικά όπως τα άλλα μόρια (πχ εστέρες ακριδίνης, λουσιφερόλη), αλλά με την εφαρμογή **διαφοράς δυναμικού** (mV). Αυτό έχει ως πλεονέκτημα τον καλύτερο έλεγχο της αντίδρασης. Η eCLIA θεωρείται σήμερα η πιο ευαίσθητη (δηλαδή μπορεί να μετρήσει πολύ μικρές συγκεντρώσεις) και προηγμένη αυτοματοποιημένη ανοσοχημική μέθοδος.

Τα άλατα του **χηλικού συμπλόκου του ρουθηνίου** [τρις(διπυριδυλ)-ρουθηνίου, $(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})$] έχουν τη δυνατότητα όταν ανάγονται να παράγουν φως. Η αντίδραση παραγωγής φωτός από το σύμπλοκο $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ προϋποθέτει και την ταυτόχρονη χρησιμοποίηση της **τριπροπυλαμίνης (TPA)**. Η όλη αντίδραση λαμβάνει χώρα στην **επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου** (Σχήμα 6.19). Εκεί η ρίζα TPA^+ και το $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ αντιδρούν μεταξύ τους και το $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ μετατρέπεται σε $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Αυτή η μεταφορά ενέργειας δημιουργεί μία διεγερμένη κατάσταση, η οποία είναι ασταθής και επιστρέφει γρήγορα στην αρχική κατάσταση με την εκπομπή ενός φωτονίου στα 620 nm. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται συνεχώς. Η ρίζα TPA ανάγεται σε παραπροϊόντα τα οποία δεν επηρεάζουν την αντίδραση της χημιοφωταύγειας, επειδή όμως εξαντλείται θα πρέπει να βρίσκεται σε περίσσεια. Στο τέλος της αντίδρασης το ρουθίνιο αναγεννάται και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλούς κύκλους παραγωγής φωτονίων. Καθώς εξαντλείται η ποσότητα της TPA, που βρίσκεται στο ηλεκτρικό πεδίο, η ισχύς του φωτός (σήμα) μειώνεται με αργό ρυθμό από το μέγιστο σημείο που έφτασε αρχικά. Το σύμπλοκο ρουθηνίου αναγεννάται συνεχώς και το σύμπλοκο αντιγόνου – αντισώματος παράγει στο τέλος πολλά φωτόνια.



Σχήμα 6.19 Αναπαράσταση της αρχής μεθόδου της ηλεκτροχημειοφωταύγειας (Roche diagnostics, 1998).

6.8 Οι Ομογενείς Ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, ως ομογενείς ανοσοχημικοί προσδιορισμοί καλούνται εκείνοι στους οποίους δεν απαιτείται ο διαχωρισμός συνδεδεμένου και ασύνδετου με τα αντισώματα αντιγόνου. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι **δεν χρειάζεται να γίνονται εκπλύσεις** μεταξύ των διαδοχικών σταδίων της μεθόδου, χαρακτηριστικό γνώρισμα των ετερογενών μεθόδων. Στις ομογενείς μεθόδους η διάκριση μεταξύ συνδεδεμένου και ασύνδετου αντιγόνου βασίζεται στις διαφορετικές χημικές και φυσικές ιδιότητες τους και σε αυτές οφείλεται η μεγαλύτερη ποικιλία των ομογενών προσδιορισμών σε σχέση με τους ετερογενείς. Θα αναφερθούμε παρακάτω σε μερικές από τις πιο χαρακτηριστικές.

6.8.1 Η Ανοσοενζυμική Ενισχυμένη μέθοδος

Η ανοσοενζυμική ενισχυμένη μέθοδος (**Enzyme Multiplied Immunoassay Technique** ή **EMIT**) χρησιμοποιείται ευρέως για τη μέτρηση ναρκωτικών και φαρμακευτικών ουσιών. Ο ιχνηθέτης της μεθόδου είναι το ένζυμο αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (**G6-PD**).

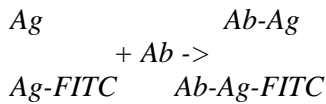
$D\text{-γλυκόζη-6-φωσφορική} + NAD(P) \rightleftharpoons D\text{-γλυκονο-δ-λακτόνη-6-φωσφορική} + NAD(P)H_2$ (Αντίδραση 6.2)

Το ένζυμο αυτό όταν προστίθεται σε διάλυμα που περιέχει το αντιγόνο, δηλ. το φάρμακο ή τη ναρκωτική ουσία, ενώνεται μαζί του και σχηματίζει σύμπλοκο. Στο σύμπλοκο αυτό το ένζυμο είναι ενεργό, αλλά η ενεργότητα του μειώνεται, μόλις το σύμπλοκο ενζύμου-φαρμάκου ενωθεί με το ειδικό για το αντιγόνο αντίσωμα. Η μείωση της ενεργότητας οφείλεται στο γεγονός ότι το αντίσωμα δεσμεύει το ενεργό κέντρο του ενζύμου και έτσι εμποδίζεται η σύνδεση του ενζύμου με το υπόστρωμα του, την 6-φωσφορική γλυκόζη.

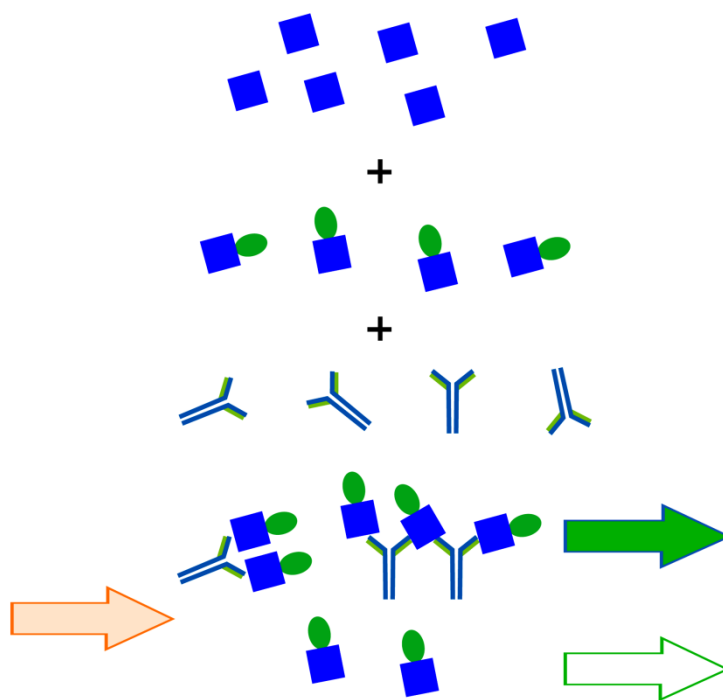
Η μέθοδος είναι ανταγωνιστικού τύπου. Όσο περισσότερο φάρμακο υπάρχει στον ορό του ασθενούς τόσο περισσότερο από αυτό θα συνδεθεί με τα αντισώματα και άρα λιγότερο σύμπλοκο ενζύμου-φαρμάκου θα συνδεθεί με τα εναπομείναντα αντισώματα. Το φωτόμετρο του αναλυτή μετρά την απορρόφηση του NADH της οποίας η μέγιστη τιμή εμφανίζεται σε διαφορετικό μήκος κύματος από το συνένζυμο NAD⁺.

6.8.2 Ο Πολωμένος Φθορισμός

Η μέθοδος του πολωμένου φθορισμού (**Fluorescence Polarization Immunoassay** ή **FPIA**) είναι ανταγωνιστικού τύπου και χρησιμοποιεί ως ιχνηθέτη τη φθορίζουσα ουσία φλουορεσκεΐνη (**FITC**) (Λιανίδου, 1994). Εδώ το ελεύθερο αντιγόνο (Ag) και ο συνδεδεμένος ιχνηθέτης (Ag-FITC) ανταγωνίζονται για το πιο θα ενωθεί με το αντίσωμα (Ab), σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα.



Μετά το πέρας της αντίδρασης τα μόρια που μπορούν να φθορίσουν μέσα στο διάλυμα είναι τα Ag-FITC και τα Ab-Ag-FITC. Για τη διάκριση των δύο συμπλόκων χωρίς να προηγηθεί ο διαχωρισμός τους (ομογενής προσδιορισμός) εφαρμόζεται στο διάλυμα **πολωμένη ακτινοβολία διεγέρσεως**. Πολωμένη ονομάζεται η ακτινοβολία της οποίας όλα τα σωματίδια ταλαντώνονται στο ίδιο επίπεδο. Η πολωμένη ακτινοβολία διεγέρσεως διεγείρει τη FITC οπότε αυτή παράγει πράσινο χρώμα. Αν το μοριακό βάρος του συμπλόκου είναι μεγάλο (Ab-Ag-FITC), τότε το φως που παράγεται από τη FITC είναι πολωμένο. Αντίθετα στο μικρό σύμπλοκο FITC (Ag-FITC) το παραγόμενο φως δεν είναι πολωμένο (Σχήμα 6.20). Κατάλληλοι ανιχνευτές μετρούν το πολωμένο φως και κατά συνέπεια και την ποσότητα του αντιγόνου. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του Ag του δείγματος, τόσο μικρότερη είναι η ακτινοβολία φθορισμού (ανταγωνιστική μέθοδος).

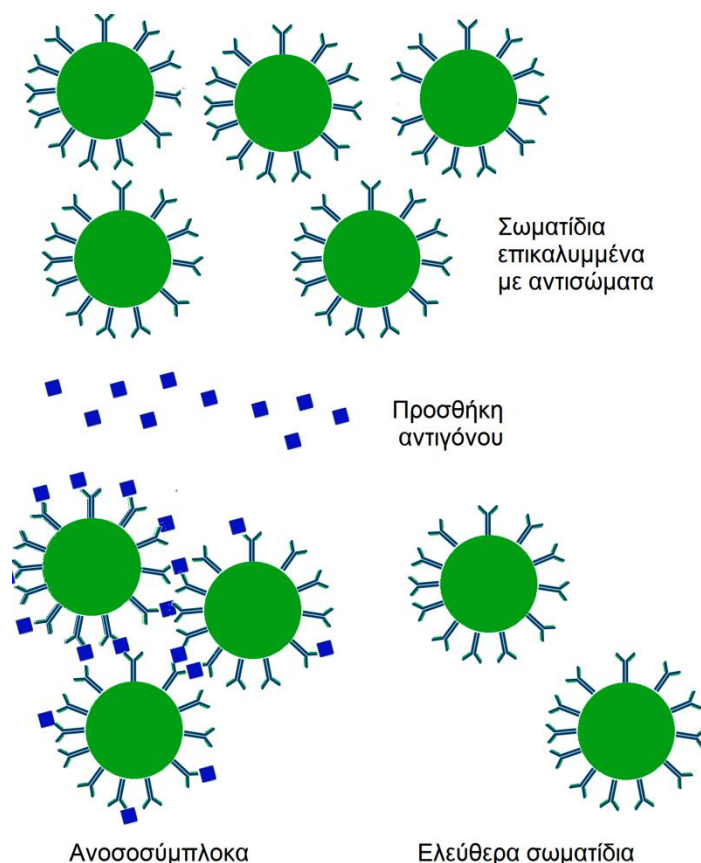


Σχήμα 6.20 Αναπαράσταση της ομογενούς μεθόδου του πολωμένου φθορισμού. Τα αντιγόνα του δείγματος ανταγωνίζονται όμοια αντιγόνα σημασμένα με τη φθορίζουσα ουσία FITC. Μόνο τα σημασμένα ανοσοσυμπλέγματα πολώνουν το φως που τα διεγείρει.

6.8.3 Η Μικροσωματιδιακή Ανάλυση

Η μικροσωματιδιακή ανάλυση (**Particle Counting Immunoassay ή PACIA**) είναι μια αυτοματοποιημένη ανταγωνιστική ανοσοχημική μέθοδος. Δεν χρησιμοποιεί ενζυμική ανάλυση, αλλά παρ' όλα αυτά εξετάζεται μαζί με τις ανοσοενζυμικές μεθόδους, διότι πολλοί ανοσοενζυμικοί αναλυτές εκτελούν και τη μικροσωματιδιακή ανάλυση. Η αρχή της μεθόδου είναι παρόμοια με τις συγκολλητινοαντιδράσεις.

Σε αυτή χρησιμοποιούνται μικρά σφαιρίδια latex, που είναι επικαλυμμένα με αντισώματα έναντι του αναζητούμενου αντιγόνου. Τα αντιγόνα του ορού του ασθενούς προκαλούν τη συγκόλληση των σφαιριδίων. Το πλήθος των συγκολλήσεων εκτιμάται από τη μέτρηση των μη-συγκολλημένων σφαιριδίων, που διέρχονται μέσα από συσκευή παρόμοια με τον κυτταρομετρητή ροής (Σχήμα 6.21). Είναι ανταγωνιστική μέθοδος.



Σχήμα 6.21 Αναπαράσταση των τριών σταδίων της αυτόματης μικροσωματιδιακής ανάλυσης.

6.9 Παράγοντες που επηρεάζουν τις Ανοσοχημικές αναλύσεις

Είναι πολλοί οι παράγοντες που μπορούν να επιδράσουν στις ανοσοχημικές αναλύσεις και να δώσουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Άλλοι παράγοντες οφείλονται σε τεχνικά προβλήματα της ανάλυσης (Πίνακας 6.14) και άλλες φορές σε προβλήματα που σχετίζονται με τη συμπεριφορά των αντισωμάτων των αντιδραστηρίων (Δεσύμπρης, 1994).

6.9.1 Το φαινόμενο του Αγκίστρου

Το φαινόμενο του αγκίστρου (hook effect) εμφανίζεται σε δείγματα πολύ υψηλής συγκέντρωσης τα οποία ψευδώς φαίνονται με μηδενική συγκέντρωση. Σε αυτή τη περίπτωση, το αντιγόνο είναι σε τόσο υψηλή συγκέντρωση, που ο όγκος τους δημιουργεί παρεμβολές στη σύνδεση γειτονικών αντιγόνων με τα αντισώματα της αντίδρασης. Η αντιμετώπιση του προβλήματος έγκειται στη **προ-αραίωση του δείγματος** από τον αναλυτή, αλλά και στη γνώση του **ιατρικού ιστορικού του ασθενούς**. Εάν ο αναλυτής δεν μπορεί να λύσει το πρόβλημα με προαραίωση, τότε από τη γνώση του ιατρικού ιστορικού θα πρέπει να εντοπιστεί έγκαιρα το πρόβλημα και να γίνει προ-αραίωση χειρονακτικά από τον χρήστη του αναλυτή.

6.9.2 Τα Ετερόφιλα Αντισώματα

Πρόκειται για αντισώματα που αναπτύσσονται στον ορό ορισμένων ανθρώπων έναντι των **αντισωμάτων** που χρησιμοποιούνται στις ανοσοχημικές τεχνικές. Τα αντισώματα αυτά παράγονται από τον εμβολιασμό ζώων με ανθρώπινα αντιγόνα. Συνήθως τα ετερόφιλα αντισώματα εμφανίζονται στον ορό ατόμων, που πάσχουν από κάποια φλεγμονή και το ανοσοποιητικό τους σύστημα είναι εξαιρετικά διεγερμένο. Η σύνδεση των

ετερόφιλων αντισωμάτων με τα αντισώματα του αντιδραστηρίου δεσμεύει τα τελευταία, οπότε δεν αντιδρά ο ιχνηθέτης και το αποτέλεσμα βγαίνει αρνητικό.

6.9.3 Τα Αυτοαντισώματα

Μια πολύ σπάνια περίπτωση αναφέρεται σε ανθρώπινα αντισώματα, που δεσμεύουν τα αντιγόνα του ανθρώπου που θέλουμε να μετρήσουμε. Τα αντισώματα αυτά ονομάζονται αυτοαντισώματα και σε αυτά περιλαμβάνεται πχ η παρουσία αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων **anti-TG**. Τα αντισώματα αυτά συνδέονται με τη θυρεοσφαιρίνη του ασθενούς (**TG**) με αποτέλεσμα αυτή να μην μπορεί να ενωθεί με τα αντισώματα του αντιδραστηρίου.

6.9.4 Τα Θεραπευτικά Αντισώματα

Σήμερα όλο και περισσότερο χρησιμοποιούνται αντισώματα σε θεραπείες, κυρίως του καρκίνου. Το αποτέλεσμα είναι να αναπτύσσουν ορισμένα άτομα αντισώματα έναντι των οντακικών (HAMA) από τα οποία παράγονται κυρίως τα μονοκλωνικά θεραπευτικά αντισώματα. Τα αντισώματα HAMA μπορούν να προκαλέσουν ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

6.9.5 Άλλοι ανοσολογικοί παράγοντες που παρεμβαίνουν στις μετρήσεις

Εκτός από τις προηγούμενες ισχυρές ανοσολογικές παρεμβολές μπορούν να επιδράσουν και άλλες, έστω και με λιγότερο φανερά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, οι ρευματοειδείς παράγοντες (RF) μπορεί να επιδράσουν με το τμήμα Fc των αντισωμάτων που περιέχονται στα αντιδραστήρια των ανοσοχημικών μεθόδων, εμποδίζοντας έτσι, τη σύνδεση του αντιγόνου. Παρόμοιες παρεμβολές μπορούν να κάνουν και οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος προς αντισώματα κονίκλου, που χρησιμοποιούνται ως αντιδραστήρια.

Προβλήματα	Αίτια	Πιθανές λύσεις
Χωρίς σήμα/Μη εμφάνιση χρώματος	Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν σε λάθος σειρά ή κάποιο στάδιο δοκιμασίας παραλήφθηκε.	Ελέγξτε το φύλλο οδηγιών και επαναλάβετε τη δοκιμασία.
	Δεν αραιώθηκαν τα δείγματα με τον κατάλληλο διαλύτη, (εφόσον απαιτείται).	Ελέγξτε την αραιώση των δειγμάτων πριν την έναρξη της τεχνικής.
	Δεν παρασκευάστηκε σωστά ή δεν είχε αποθηκευτεί σωστά το αντιδραστήριο του συνδέτη (conjugate).	Όλα τα προϊόντα σύζευξης περιέχονται σε κάθε kit κάθε παρτίδας. Εάν απαιτείται η αραιώση του αρχικού διαλύματος, πρέπει συμπίκνωμα και διαλύτης να αναμιγνύονται σε σωστές ποσότητες.
	Προσθήκη μη επαρκούς ποσότητας αντισώματος ή παράληψη της προσθήκης του.	Έλεγχος προσθήκης σωστής ποσότητας αντισώματος.
	Παράληψη προσθήκης διαλύματος υποστρώματος.	Έλεγχος προσθήκης διαλύματος υποστρώματος κατάλληλης συγκέντρωσης.
	Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης περιέχει αζωτούχο νάτριο.	Παρασκευή φρέσκου διαλύματος έκπλυσης.

Χαμηλής έντασης σήμα	Η θερμοκρασία του εργαστηρίου είναι πολύ χαμηλή.	Η θερμοκρασία του δωματίου πρέπει να είναι 18 - 25°C. Αποφύγετε να εκτελείτε την τεχνική κάτω από αεραγωγούς κλιματισμού ή κοντά σε παράθυρα.
	Μη σωστή παρασκευή του διαλύματος εκπλύσης (wash).	Παρασκευάστε φρέσκο διάλυμα εκπλύσης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του Kit.
	Χρησιμοποιήθηκε χρόνος επώασεων μικρότερος από το αναμενόμενο.	Ακολουθείτε τους χρόνους επώασεων, που προτείνει ο κατασκευαστής.
	Τα αντιδραστήρια ήταν σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία.	Βεβαιωθείτε ότι τα αντιδραστήρια είναι σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.
	Τα αντιδραστήρια έχουν λήξει.	Βεβαιωθείτε για την ημερομηνία λήξης των αντιδραστηρίων, που αναγράφεται στη συσκευασία, τόσο με ανοιχτή, όσο και κλειστή συσκευασία.
	Το φωτόμετρο ή άλλη αυτόματη συσκευή ήταν ρυθμισμένη σε λάθος μήκος κύματος ή δεν είχε βαθμονομηθεί σωστά.	Έλεγχος μήκους κύματος και βαθμονόμηση εκ νέου της συσκευής.
	Ανεπαρκής ποσότητα αντιγόνου ασθενούς.	Χρήση της σωστής ποσότητας αντιγόνου, όπως προτείνει ο κατασκευαστής.
	Ανεπαρκής ποσότητα αντισώματος.	Χρήση της σωστής ποσότητας αντισώματος, όπως προτείνει ο κατασκευαστής.
	Το αντιδραστήριο του υποστρώματος ήταν πολύ αραιό.	Χρησιμοποιήστε υψηλότερη συγκέντρωση αντιδραστηρίου ανίχνευσης.
Υψηλής έντασης υπόβαθρο (high background)	Χρησιμοποιήθηκε νερό κακής ποιότητας κατά την παρασκευή του διαλύματος πλύσης.	Ελέγξτε την ποιότητα του νερού που χρησιμοποιείται.
	Το διάλυμα υποστρώματος έχει αλλοιωθεί.	Βεβαιωθείτε ότι το υπόστρωμα είναι άχρωμο, πριν από την προσθήκη στην πλάκα.
	Ανεπαρκές πλύσιμο ή κακή απόδοση πλύσης.	Αυξήστε τον αριθμό των εκπλύσεων. Βεβαιωθείτε ότι παρέχονται τουλάχιστον 400 μL του διαλύματος εκπλύσης σε κάθε κυψελίδα ανά πλύση.
	Μικροβιακή μόλυνση του συστήματος ύδρευσης.	Απομακρύνετε τη μικροβιακή μόλυνση με έκπλυση του συστήματος με αραιό διάλυμα χλωρίνης (10% κατ' όγκο) που ακολουθείται από μεγάλη ποσότητα απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού.
	Η συσκευή ανάγνωσης των αποτελεσμάτων ήταν ρυθμισμένη σε λάθος μήκος κύματος ή δεν είχε βαθμονομηθεί σωστά.	Ελέγξτε το μήκος κύματος του φωτομέτρου. Βαθμονομείστε σωστά το φωτόμετρο.
	Η θερμοκρασία του εργαστηρίου ήταν πολύ υψηλή ή πολύ χαμηλή.	Η αντίδραση γίνεται συνήθως θερμοκρασία δωματίου 18 - 25°C. Αποφύγετε την εργασία κάτω από αεραγωγούς κλιματισμού ή κοντά σε παράθυρα.

	Τα αντιδραστήρια περιείχαν προσμίξεις ή δεν παρασκευάστηκαν σωστά.	Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιήθηκαν τα σωστά αντιδραστήρια, και ότι δεν έχει γίνει επιμόλυνση.
	Τα πηγαδάκια της πλάκας ήταν μολυσμένα.	Χρησιμοποιήστε πολυκάναλες πιπέτες χωρίς να αγγίζετε την πλάκα.
Ανάπτυξη χρώματος με αργό ρυθμό.	Οι πλάκες δεν είναι στη σωστή θερμοκρασία.	Εξασφαλίστε ότι οι πλάκες και τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.
	Το ανοσοσύμπλεγμα είναι αδύναμο.	Η παρασκευή των διαλυμάτων υποστρώματος πρέπει να γίνεται αμέσως πριν από τη χρήση. Βεβαιωθείτε ότι τα αντιδραστήρια δεν έχουν λήξει, έχουν αποθηκευτεί σωστά, και χρησιμοποιούνται στη σωστή συγκέντρωση.
	Τα διαλύματα των αντιδραστηρίων έχουν επιμολυνθεί.	Παρουσία προσμείξεων, όπως αζίδιο του νατρίου και το υπεροξείδιο μπορεί να επηρεάσουν την αντίδραση υποστρώματος. Αποφύγετε τη χρήση αντιδραστηρίων που περιέχουν αυτά τα συντηρητικά.

Πίνακας 6.14 Συνηθισμένα τεχνικά προβλήματα, αιτίες και λύσεις τους σε μεθόδους ELISA.

Βίντεο που δημιουργήθηκε για αυτό το Κεφάλαιο



Ο ποσοτικός προδιορισμός των αυτοαντισωμάτων anti-ds DNA με ELISA, https://youtu.be/119v95_17hg.

Σχετικό οπτικό υλικό από το διαδίκτυο

- Παρουσίαση αυτόματου αναλυτή Human <https://www.youtube.com/watch?v=tDp8aWrVkXQ&feature=plcp> (τελευταία προσπέλαση 15/1/2015).
- Μάθημα ELISA από το πανεπιστήμιο Michigan (τελευταία προσπέλαση 15/1/2015). https://www.youtube.com/watch?v=70TPrFL_8-M (τελευταία προσπέλαση 15/1/2015).
- Τα στάδια ανταγωνιστικής και μη ανταγωνιστικής ELISA <https://www.youtube.com/watch?v=Kb26nQVMHds> (τελευταία προσπέλαση 15/1/2015).

- Αναπαράσταση με κινούμενα σχέδια της ELISA: <https://www.youtube.com/watch?v=6Ue1Hd3dyaQ> (τελευταία προσπέλαση 15/1/2015).
- Αναπαράσταση με κινούμενα σχέδια της ELISA: <https://www.youtube.com/watch?v=lNxZxJtvB94> (τελευταία προσπέλαση 15/1/2015).
- Manual τεχνική ELISA: <https://www.youtube.com/watch?v=Tr61S-2F2B4> (τελευταία προσπέλαση 15/1/2015).
- Αναπαράσταση με κινούμενα σχέδια της τεχνικής DELFIA <https://www.youtube.com/watch?v=NrJbjuSXb8c> (τελευταία προσπέλαση 15/1/2015).

Πηγές φωτογραφιών με προέλευση το διαδίκτυο

- Σχήμα 6.11 <http://www.labnews.co.uk> (τελευταία προσπέλαση 20/1/2015).

Αναφορές

1. ΓΡΗΓΟΡΗ Κ. (2011) *Η τεχνική της χημειοφωταύγειας*. Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ.
2. ΕΥΑΓΓΕΛΑΤΟΣ, Π. (1994) *Ραδιοανοσοανάλυσεις*. Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ.
3. ΔΕΣΥΠΙΡΗΣ, Α. (1994) *Ενδογενείς παράγοντες που παρεμβαίνουν στις ανοσοανάλυσεις*. Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ.
4. ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ, Φ., ΣΙΣΚΟΣ, Α., ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ-ΔΙΑΜΑΝΤΗ, Α. (1987) *Μαθήματα κλινικής χημείας*. Αθήνα: Εκδόσεις Λύχνος.
5. ΖΕΡΒΟΥ, Ε. (1988) *Χημειοφωταύγεια*, Αθήνα: Σεμινάριο ανοσολογίας 16^{ος} κύκλος.
6. ΚΑΛΟΚΑΙΡΙΝΟΣ, Κ. (1994) *Ανοσοχημειοφωταύγεια*. Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ.
7. ΚΟΥΥΠΠΑΡΗΣ, Μ. (1994) *Χημειομετρία ανοσοχημικών προσδιορισμών*. Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ.
8. ΚΟΚΚΑΛΙΑΡΗΣ, Δ. (2011) *Ανοσοενζυμικές δοκιμασίες*. Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ.
9. ΛΙΒΑΝΙΟΥ, Ε. (1994) *Ενίσχυση σήματος στις ανοσοανάλυσεις*, Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ.
10. ΛΙΑΝΙΔΟΥ, Σ. (1994) *Εφαρμογές του φθορισμού στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς*. Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ.
11. ΜΟΥΡΑΤΗ, Ο. (2015) *Προσδιορισμός ανασυνδυσμένης GH με χημειοφωταύγεια*. Αθήνα: ΤΕΙ Αθήνας.
12. ΝΙΚΟΛΟΥ, Χ. (2000) *Η χημειοφωταύγεια στις ανοσοανάλυσεις*, Αθήνα: Σεμινάριο ανοσολογίας 18^{ος} κύκλος
13. ΠΑΥΛΑΤΟΥ, Π. (1997) *Ανοσολογία*. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας.
14. ΡΙΖΟΣ, Δ. (1994) *Ανοσοενζυμικές τεχνικές*. Αθήνα: Σεμινάριο της ΕΕΚΧ-ΚΒ.
15. COBA CORNING (1995) *Οδηγίες χρήσης του αναλυτή ACS:180*.
16. TERNYNCK, T. & AVRAMEAS, S. (1988) *Ανοσοενζυμικές τεχνικές*. Αθήνα: Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur.
17. ROCHE DIAGNOSTICS (1998) *Οδηγίες χρήσης του αναλυτή Elecsys 2010*.
18. ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. (1995) *Ανοσολογία*. Αθήνα: Εκδόσεις Γρ. Παρισιάνος