

# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

## ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

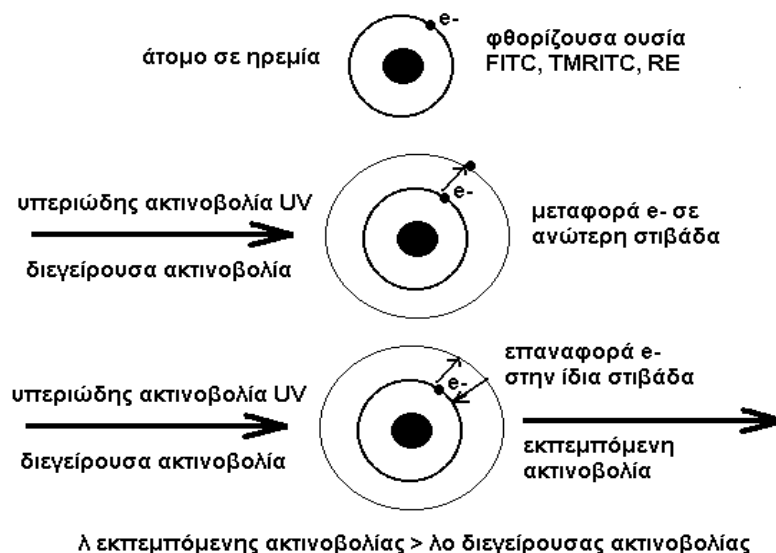
### Εισαγωγή

Ο ανοσοφθορισμός είναι η μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων στα ανοσολογικά εργαστήρια.

### Ο μηχανισμός του φθορισμού

Ως φθορισμός ορίζεται η εκπομπή φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος από μια ουσία η οποία ακτινοβολείται από φως μικρότερου μήκους κύματος. Την παραπάνω ιδιότητα την εκμεταλλευόμαστε στα **μικροσκόπια φθορισμού**.

Στον φθορισμό χρησιμοποιείται υπεριώδες φως (UV) το οποίο πέφτει πάνω στα ηλεκτρόνια των ατόμων του φθοριοχρώματος<sup>1</sup>. Τότε αυτά διεγείρονται και απελευθερώνουν με τη μορφή φωτονίων την ενέργεια που προσέλαβαν. Μέρος της αρχικής διεγείρουσας ενέργειας καταναλώνεται με αποτέλεσμα το φθοριόχρωμα να εκπέμπει φως μικρότερης ενέργειας (μεγαλύτερου μήκους κύματος) από τη διεγείρουσα ακτινοβολία.



### Ο μηχανισμός φθορισμού

<sup>1</sup> Το φθοριόχρωμα είναι μια οργανική ουσία που έχει την ιδιότητα να φθορίζει δηλαδή να ακτινοβολεί όταν διεγερθεί κατάλληλα (βλ. παρακάτω).

### Φθοριοχρώματα ή φθορίζουσες χρωστικές

Είναι ειδικές χημικές ουσίες που έχουν την ιδιότητα να **φθορίζουν** και χρησιμοποιούνται στον ανοσοφθορισμό (βλ. παρακάτω) για τη σήμανση των αντισωμάτων. Κάθε φθοριόχρωμα απελευθερώνει φθορίζον φως συγκεκριμένου μήκους κύματος το οποίο καθορίζεται από το ποσό της ενέργειας που καταναλώνεται κατά την διέγερση των ηλεκτρονίων του.

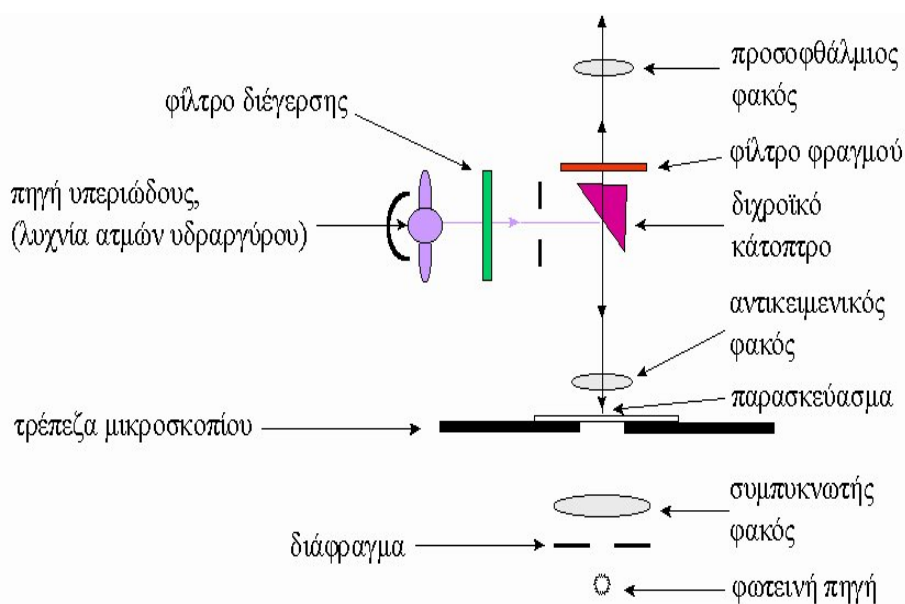
Τα σημαντικότερα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται στον ανοσοφθορισμό είναι τα:

1. **Ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC)**, εκπέμπει **πράσινο** χρώμα.
2. **Ισοθειοκυανική τετραμεθυλοραδαμίνη (TMRITC)**, εκπέμπει **κόκκινο** χρώμα.
3. **Φυκοερυθρίνη (RE)**, εκπέμπει **πορτοκαλί** χρώμα.

### Μικροσκόπια φθορισμού

Τα βασικά τμήματα αυτών των μικροσκοπίων είναι τα ακόλουθα:

1. **Φωτεινή πηγή** – παρέχει ενέργεια υπό μορφή φωτονίων. Χρησιμοποιούνται λυχνίες υδραργύρου ή αλογόνου.
2. **Διεγερτικός ηθμός** – αφήνει να περάσει μόνο η ακτινοβολία που διεγείρει το φθοριόχρωμα.
3. **Πυκνωτής** – κατευθύνει και εστιάζει το επιλεγμένο φως που εκπέμπεται από το παρασκεύασμα.
4. **Αντικειμενικός φακός** – συγκεντρώνει το φως που εκπέμπεται από το παρασκεύασμα.
5. **Διχροϊκό κάτοπτρο** - επιτρέπει τη διέλευση των επιλεγμένων μηκών κύματος προς μια μόνο κατεύθυνση.
6. **Ηθμός φραγμού** – αφήνει να περάσει μόνο ο φθορισμός.
7. **Προσοφθάλμιος φακός** – μεγεθύνει και καθιστά ορατό το φθορισμό του δείγματος.



Διάταξη μικροσκοπίου φθορισμού

### Υποστρώματα για δοκιμασίες ανοσοφθορισμού

Στις μεθόδους ανοσοφθορισμού τα αντισώματα που ανιχνεύονται αντιδρούν με αντιγόνα που βρίσκονται πάνω σε κύτταρα ή ιστούς. Τα κύτταρα ή ιστοί βρίσκονται προσκολλημένα πάνω σε ειδικά διαμορφωμένες αντικειμενοφόρες πλάκες. Τα υποστρώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον φθορισμό είναι τα ακόλουθα:

1. **Τομές ιστών.** Χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων και τη μελέτη υλικού βιοψίας.
2. **Μονοστιβάδες κυτταροκαλλιεργημάτων.** Χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων. Πρόκειται για μονοστιβάδες νεοπλασματικών κυττάρων ανθρώπου ή ζώων (Herp-2, Hela, KB κ.α.). Αναπτύσσονται με μικροκαλλιέργεια σε πλάκες με πολλαπλά βυθίσματα. Μονοστιβάδες από μολυσμένο κυτταροκαλλιέργημα χρησιμοποιούνται για την μελέτη ιών.
3. **Εναιωρήματα ζωντανών κυττάρων.** Εναιώρημα ζωντανών κυττάρων χρησιμοποιείται για την ανίχνευση επιφανειακών αντιγόνων μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος ή μυελού των οστών και διαφόρων νεοπλασματικών κυττάρων ή αντισωμάτων έναντι αυτών.
4. **Επιχρίσματα κυττάρων ή μικροοργανισμών.** Είναι κατάλληλα για την ανίχνευση διαφόρων αντισωμάτων.

### Εφαρμογές ανοσοφθορισμού

#### 1. Ανίχνευση μικροοργανισμών

Βακτήρια, παράσιτα, μύκητες, ρικέτιες, ιοί ανιχνεύονται σε ιστούς, βιολογικά υγρά και καλλιέργειες με την μέθοδο του **άμεσου** ή του **έμμεσου** ανοσοφθορισμού.

#### 2. Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι μικροοργανισμών

Η ανίχνευση αυτή γίνεται στον ορό πασχόντων με την μέθοδο του **έμμεσου** ανοσοφθορισμού.

#### 3. Ανίχνευση φυσικών αντιγόνων

Τέτοια αντιγόνα είναι: ορμόνες, ένζυμα, οργανοειδικά αντιγόνα, εμβρυϊκά αντιγόνα, αντιγόνα όγκων, αντιγόνα λεμφοκυττάρων, μακροφάγων, ερυθρών αιμοσφαιρίων καθώς και τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας. Πραγματοποιείται σε ιστούς και μεμονωμένα κύτταρα με την μέθοδο του **άμεσου** και του **έμμεσου** ανοσοφθορισμού.

#### 4. Ανίχνευση μικροοργανισμών και συμπληρώματος στους ιστούς.

Χρησιμοποιείται για την διάγνωση των αυτοάνοσων νόσων. Πραγματοποιείται με **άμεσο** ανοσοφθορισμό.

#### 5. Ανίχνευση αυτοαντισωμάτων

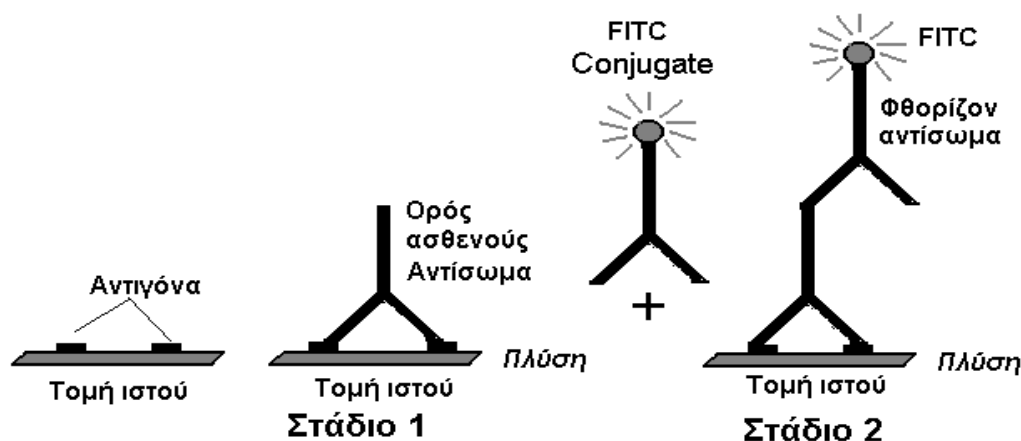
Χρησιμοποιείται για την διάγνωση των αυτοάνοσων νόσων. Πραγματοποιείται με **έμμεσο** ανοσοφθορισμό.

## Τύποι ανοσοφθορισμού

### Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA) πραγματοποιείται με τα ακόλουθα στάδια:

- Στάδιο 1. Ο **ορός του ασθενούς του οποίου τα αντισώματα που ψάχνουμε** τοποθετείται πάνω σε τομή ιστού που περιέχει το αντιγόνο.
- Στάδιο 2. Ακολουθεί **έκπλυση** με φωσφορούχο διάλυμα για την απομάκρυνση του ασύνδετου αντισώματος.
- Στάδιο 3. Κατόπιν **προστίθεται το φθορίζον αντίσωμα**.
- Στάδιο 4. Ακολουθεί **νέα πλύση** για την απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου φθορίζοντος αντισώματος.
- Στάδιο 5. Ακολουθεί **μικροσκόπηση** σε μικροσκόπιο φθορισμού.



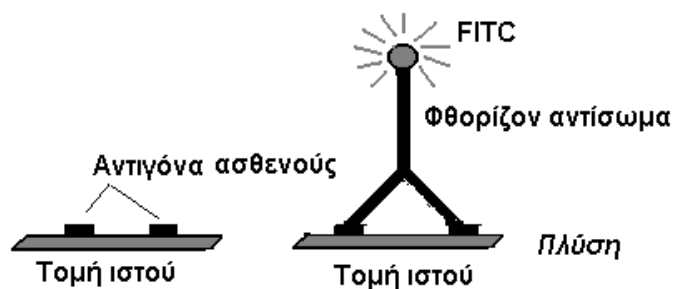
Έμμεσος ανοσοφθορισμός

### Άμεσος ανοσοφθορισμός

Ο άμεσος ανοσοφθορισμός (DFA) πραγματοποιείται με τα ακόλουθα στάδια:

- Στάδιο 1. Πάνω σε τομή ιστού που περιέχει τα αντιγόνα που ψάχνουμε προστίθεται **φθορίζον αντίσωμα**.
- Στάδιο 2. Ακολουθεί **πλύση** με φωσφορούχο διάλυμα και απομάκρυνση του πλεονάζοντος αντισώματος.
- Στάδιο 3. Ακολουθεί **μικροσκόπηση** σε μικροσκόπιο φθορισμού.

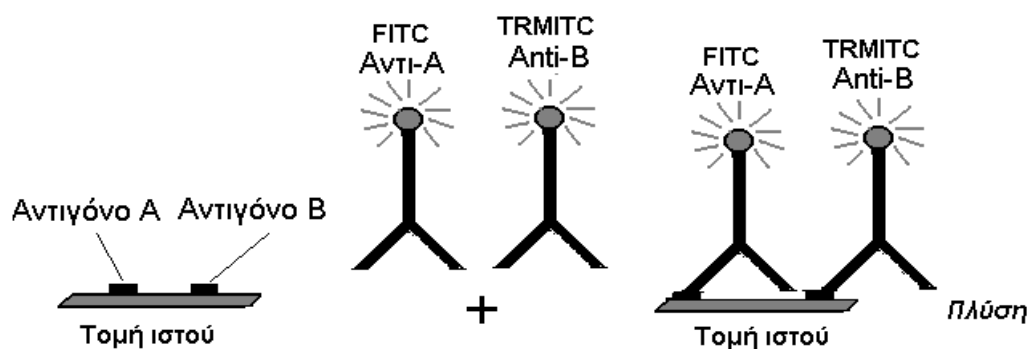
Όπως φαίνεται από την περιγραφή των δύο μεθόδων IFA, DFA ο **έμμεσος ανοσοφθορισμός** χρησιμοποιείται για την **ανίχνευση αντισωμάτων** στον ορό των ασθενών ενώ ο **άμεσος ανοσοφθορισμός** για την **ανίχνευση αντιγόνων** του ασθενή πάνω σε υλικό βιοψίας.



Άμεσος ανοσοφθορισμός

### Ανοσοφθορισμός με διπλή φθορίζουσα χρώση

Στην τεχνική αυτή γίνεται ταυτόχρονα χρήση δύο αντιορών<sup>2</sup> σημασμένων με διαφορετικά φθοριοχρώματα για την ανίχνευση δύο διαφορετικών αντιγόνων στο ίδιο υπόστρωμα.



Ανοσοφθορισμός με προσθήκη διπλής φθορίζουσας χρώσεως

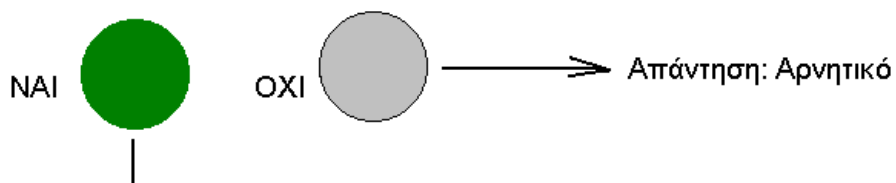
### ΑγγλοΕλληνικό Λεξιλόγιο

Indirect immunoFluorence Assay	Έμμεσος Ανοσοφθορισμός
Direct immunoFluorence Assay	Άμεσος Ανοσοφθορισμός
Fluorence	Φθορισμός
ImmunoFluorence	Ανοσοφθορισμός

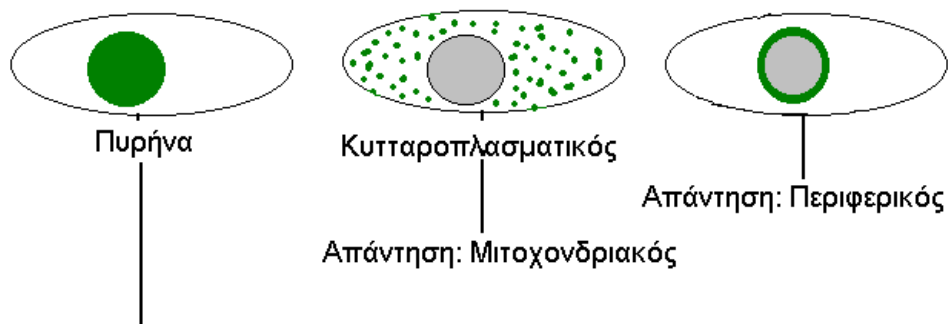
<sup>2</sup> Άλλη ονομασία για τα αντισώματα

## Αλγόριθμος μικροσκόπησης ANA σε πλακίδια ανοσοφθορισμού

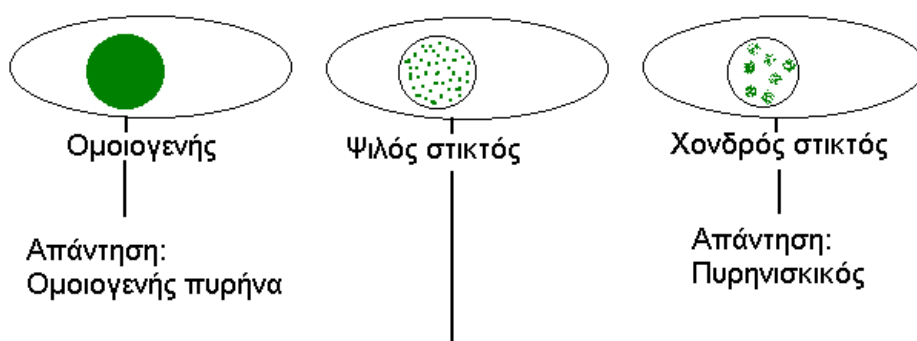
1η Ερώτηση: Θετικό ή αρνητικό; (υπάρχει φθορισμός;)



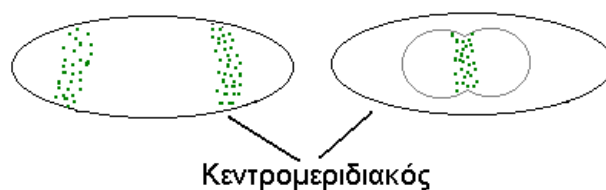
2η Ερώτηση: Ο φθορισμός εντοπίζεται στον πυρήνα, στο κυτταροπλάσμα ή περιφερειακά του πυρήνα;



3η Ερώτηση: Τι είδους φθορισμό έχει ο πυρήνας;



4η Ερώτηση: Τι είδους ψιλό στικτό φθορισμό έχει ο πυρήνας;



Βρίσκουμε την τελευταία αραιώση που εμφανίζεται ο φθορισμός  
1/40 1/80 1/160 1/320 1/640