

## 2. ENZYMIΚΗ ΑΝΟΣΟΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Κύρια μέθοδος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης αντιγόνων ή αντισωμάτων σε βιολογικά υγρά

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μία σημαντική πρόοδος, σε επίπεδο λειτουργικών μελετών, επιτεύχθηκε στην Ανοσολογία με την ανάπτυξη διαφόρων ανοσοδοκιμασιών (*Immunoassays*). Ορισμένες ανοσοδοκιμασίες στηρίχτηκαν στην ειδικότητα αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός αντιγόνου και ειδικού αντισώματος. Η ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA (ή Δοκιμασία Ενζυμο-Συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης) πρωτοπεριγράφηκε από τους Engvall και Perlman το 1971 και αποτελεί μία ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδο τόσο για ερευνητικούς όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς.

Η ELISA είναι μέθοδος υψηλής **ευαισθησίας**, η οποία επιτρέπει τον **ποσοτικό** προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινών, χημικών ουσιών, ορμονών σε βιολογικά υγρά με τη χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνου υποστρώματος. Τα βασικά πλεονεκτήματά της έναντι των άλλων ανοσοδοκιμασιών είναι: (**α**) κυρίως, η υψηλότερη ευαισθησία της και η επαναληψιμότητά της και (**β**) η μη χρησιμοποίηση ραδιενέργειας, όπως στις μεθόδους RIA (*Radioimmunoassay*). Η αρχή της μεθόδου έγκειται στην ειδική **αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος**. Η ELISA αποτελεί μία ιδιαίτερα προσαρμόσιμη τεχνική δεδομένου ότι ανάλογα με την εφαρμογή, τα αντιδραστήρια και την ευαισθησία που επιδιώκεται, η μέθοδος παρουσιάζει πολλαπλές παραλλαγές, όπως η έμμεση ELISA, η ELISA τύπου Sandwich, η ανταγωνιστική ELISA, η άμεση και η έμμεση κυτταρική ELISA. Σε όλες τις παραλλαγές της μεθόδου, τα βασικά στοιχεία που τη χαρακτηρίζουν είναι: (1) η πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεή επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση, *ImmunoSorbent*), (2) η χρήση ενζυμο-συζευγμένου (*Enzyme-Linked*) αντισώματος και (3) η χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων, τα οποία μετά από αντίδραση με το ένζυμο παράγουν διαλυτό έγχρωμο

**προϊόν (χρώμα ή φθορισμό) επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος.**

## **ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

### **A. Πρόσδεση/Ακίνητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεά επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση)**

Το εξεταζόμενο αντιγόνο ή αντίσωμα αρχικά ακινητοποιείται σε στερεά επιφάνεια. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω **χημικού δεσμού** (προσκόλληση σε σφαιρίδια κυτταρίνης, αγαρόζης, πολυακρυλαμιδίου) ή μέσω **φυσικής προσρόφησης** με **υδρόφοβο δεσμό** (προσρόφηση σε πλαστική επιφάνεια). Η πρακτική απλότητα χειρισμού των πλαστικών σκευών και η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιώντας πλάκες μικροτιτλοποίησης καθιστά τον δεύτερο τρόπο προσρόφησης ευρύτερα χρησιμοποιούμενο στις ανοσοδοκιμίες ELISA. Μειονέκτημά του αποτελεί η διαφορά προσρόφησης του αντιγόνου ή αντισώματος που μπορεί να εμφανίζουν διαφορετικά πλαστικά σκεύη ή διαφορετικά φρεάτια του ίδιου πλαστικού σκεύους. Ωστόσο, η χρήση πρωτεϊνών για τον αποκλεισμό της μη ειδικής προσρόφησης και απορρυπαντικών κατά τις επωάσεις και τις εκπλύσεις καθιστούν το προαναφερόμενο πρόβλημα αμελητέο.

### **B. Χρήση ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος**

Η χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων αποτελεί ένα βασικό χαρακτηριστικό της μεθόδου ELISA, σε σύγκριση με άλλες ανοσοδοκιμασίες που χρησιμοποιούν ραδιενέργεια για την ανίχνευση των προϊόντων. Η σύζευξη ενζύμων στα αντισώματα προβλέπει το σχηματισμό ενός σταθερού ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του ενζύμου και του αντισώματος, ο οποίος δεν επηρεάζει την ικανότητα του αντισώματος να αναγνωρίζει το αντιγόνο αλλά ούτε την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. Ένας σημαντικός αριθμός ενζύμων χρησιμοποιείται επιτυχώς στη μέθοδο ELISA, όπως η ραφανική υπεροξειδάση (HRP), η αλκαλική φωσφατάση (AP), η β-γαλακτοσιδάση (β-Gal), και διακρίνονται σε άμεσα δραστικά στο υπόστρωμα (αλκαλική φωσφατάση, β-γαλακτοσιδάση) και αυτά που δρουν έμμεσα (ραφανική υπεροξειδάση). Η επιλογή του ενζύμου εξαρτάται από την εφαρμογή της

μεθόδου.\*

### Γ. Χρήση χρωμογόνου υποστρώματος

Η ανίχνευση του εξεταζόμενου αντιγόνου ή αντισώματος πραγματοποιείται με την προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος που αντιδρά με το ένζυμο παράγοντας έγχρωμο προϊόν (φως ή φθορισμό). Η επιλογή του ζεύγους ενζύμου-υποστρώματος της χρωμογόνου αντίδρασης καθορίζει την ευαισθησία της δοκιμασίας. Παράμετροι που συντελούν στην επιλογή ενζύμου-υποστρώματος και εξασφαλίζουν την υψηλότερη ευαισθησία της δοκιμασίας είναι: ( $\alpha$ ) η ταχύτερη αντίδραση μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος προκειμένου να παράγεται έγχρωμο προϊόν σε μεγάλη ποσότητα, ( $\beta$ ) το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης να ανιχνεύεται με μεγάλη ευαισθησία και ( $\gamma$ ) η ενζυμική δραστηριότητα να μην επηρεάζεται από παράγοντες του εξεταζόμενου δείγματος.

### Δ. Ανίχνευση προϊόντος

Η επιλογή του ενζύμου και του υποστρώματος καθορίζουν τη μέθοδο ανίχνευσης και μέτρησης του προϊόντος της ανοσοδοκιμασίας. Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε κάθε περίπτωση **το προϊόν της ανοσοδοκιμασίας είναι διαλυτό**, γεγονός που αποτελεί ιδιαίτερο και το σημαντικότερο χαρακτηριστικό της μεθόδου. Η μέτρηση του τελικού προϊόντος μπορεί να πραγματοποιηθεί με φωταύγεια, φθορισμομετρία ή χρωματομετρία. Μολονότι, η χημειοφωταύγεια παρέχει αυξημένη ευαισθησία στη δοκιμασία, οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι μέτρησης είναι οι χρωματομετρικές. Ο λόγος της ευρύτατης χρήσης τους είναι ότι παρέχουν: (1) γρήγορη οπτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων, (2) σταθερότητα του έγχρωμου προϊόντος για αρκετό χρόνο μετά τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης και (3) απλή και οικονομική μέτρηση μέσω φωτομέτρησης. Η μέτρηση του προϊόντος της χρωμογόνου αντίδρασης πραγματοποιείται με μέτρηση της **οπτικής πυκνότητας** (*Optical Density, OD*) των δειγμάτων.

---

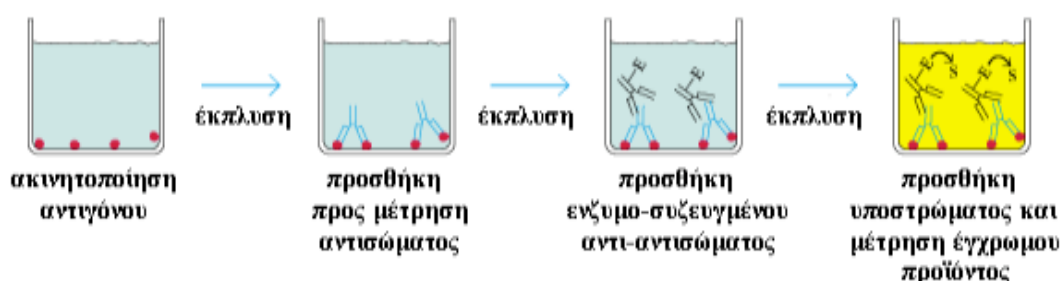
\* Πειραματικά, η σύζευξη μπορεί να επιτευχθεί με πολλές μεθόδους, με ευρύτερα χρησιμοποιούμενες τη μέθοδο του υπερϊωδικού νατρίου ( $\text{NaIO}_4$ ) και της γλουταραλδεϋδης. Εντούτοις, σπάνια σήμερα η σύζευξη ενζύμου-αντισώματος γίνεται στο εργαστήριο καθώς τα ενζυμο-συζευγμένα αντισώματα είναι ευρύτατα διαθέσιμα εμπορικά.

Βασικό ρόλο στην ακρίβεια της δοκιμασίας διαδραματίζει ο χρόνος ανάπτυξης του προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης, ο οποίος κυμαίνεται ανάλογα με την ενζυμική δράση και την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (οξέος ή βάσης). Έτσι, η ακρίβεια βασίζεται αφενός στην προσθήκη του διαλύματος τερματισμού στην κατάλληλη χρονική στιγμή και αφετέρου στην προσθήκη σταθερού όγκου του προαναφερόμενου διαλύματος.

## ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ELISA

### I. Έμμεση ELISA

Για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένου αντιγόνου σε βιολογικά υγρά εφαρμόζεται η παραλλαγή της έμμεσης ELISA



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση Έμμεσης ELISA (από R.A. Goldsby, T.J. Kindt, B.A. Osborne, J. Kubly, *Immunology*).

Κατά την παραλλαγή αυτή (Εικόνα 1), ακινητοποιείται το αντιγόνο στη στερεά επιφάνεια και ακολούθει η επώαση με το εξεταζόμενο βιολογικό υγρό. Η ύπαρξη αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων στο εξεταζόμενο δείγμα ανιχνεύεται με τη χρήση ενός **αντι-αντισώματος** συζευγμένου με ένζυμο\*. Η ποσότητα του ενζύμου που θα προσκολληθεί στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο "αντιγόνο-αντίσωμα-ενζυμοσυζευγμένο αντι-αντίσωμα" είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υπό εξέταση αντισώματος στο βιολογικό υγρό. Τα αποτελέσματα

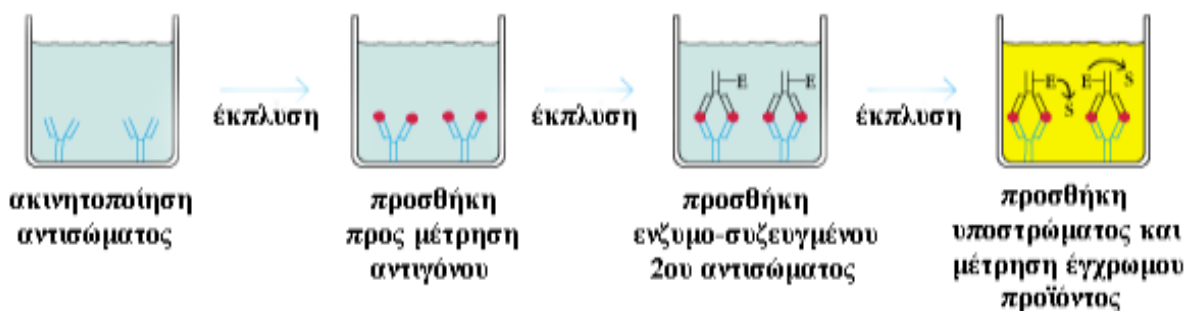
\* Για παράδειγμα, αν το εξεταζόμενο βιολογικό υγρό είναι ανθρώπινος ορός αίματος τότε το "αντι-αντίσωμα" θα είναι αντίσωμα που έχουν παραχθεί σε ζώα μετά από ανοσοποίηση με ανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα ζώα, για το σκοπό αυτό, είναι το πρόβατο, η κατσίκια και το κουνέλι. Στην άσκηση που προσδιορίζεται ο τίτλος αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου της *Leishmania Donovanii* σε ορό σκύλου χρησιμοποιείται αντι-αντίσωμα κουνελιού έναντι των ανοσοσφαιρινών σκύλου. Συχνά στην εργαστηριακή ορολογία, το αντι-αντίσωμα αναφέρεται και ως δεύτερο αντίσωμα.

εκφράζονται σαν **τίτλος αντισώματος**. Η παραλλαγή αυτή εφαρμόζεται για: (α) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι λοιμογόνων παραγόντων, όπως ο ιός HIV, (β) προσδιορισμό τίτλου αντισωμάτων μετά από εμβολιασμό ή ανοσοποίηση ζώων, (γ) ανίχνευση αυτοαντισωμάτων, (δ) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αλλεργιογόνων και (ε) ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αντιγόνων, όπως στην περίπτωση της λεισμανίασης.

## II. ELISA τύπου Sandwich

**Για την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένου αντιγόνου σε βιολογικά υγρά εφαρμόζεται η παραλλαγή της ELISA τύπου Sandwich**

Η παραλλαγή της ELISA τύπου Sandwich (Εικόνα 2) χαρακτηρίζεται από τη χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του αντιγόνου.



*Εικόνα 2.* Σχηματική απεικόνιση ELISA τύπου Sandwich (από R.A. Goldsby, T.J. Kindt, B.A. Osborne, J. Kuby, *Immunology*).

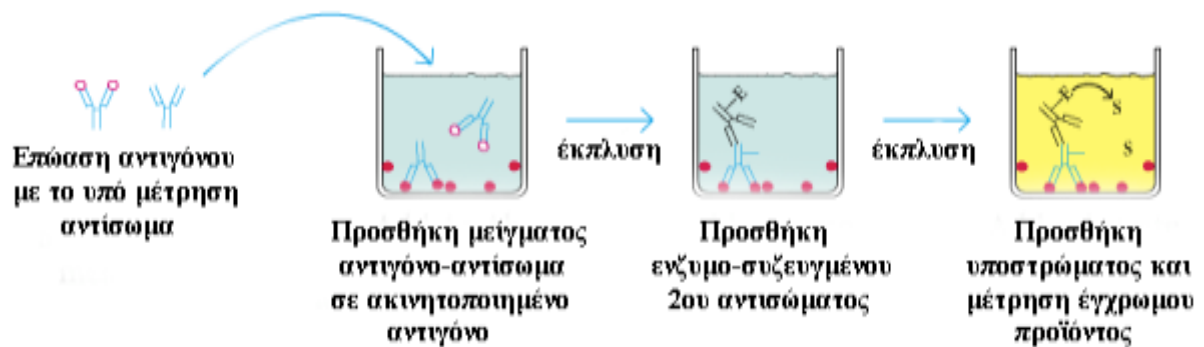
Το πρώτο αντίσωμα ακινητοποιείται στην στερεά επιφάνεια, στη συνέχεια προστίθεται το εξεταζόμενο δείγμα που περιέχει το υπό ανίχνευση αντιγόνο σε άγνωστη συγκέντρωση. Μετά την αντίδραση του πρώτου αντισώματος με το εξεταζόμενο αντιγόνο, ακολουθεί η προσθήκη του ενζυμο-συζευγμένου δευτέρου αντισώματος. Η ποσότητα του δευτέρου αντισώματος που θα προσδεθεί, άρα και ενζύμου, είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου που έχει προσδεθεί στο πρώτο αντίσωμα. Στη συνέχεια, προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα και μέσω ενζυμικής αντίδρασης ανιχνεύεται ποσότητα προϊόντος ανάλογη αυτής του αντιγόνου

που έχει συνδεθεί με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Για την ποσοτικοποίηση των εξεταζόμενων δειγμάτων χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς που γίνεται με διαδοχικές αραιώσεις **διαλύματος αναφοράς του αντιγόνου**, δηλαδή διαλύματος που περιέχει γνωστή συγκέντρωση του αντιγόνου, και τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν σε διεθνή μονάδα συγκέντρωσης (g/l ή υποδιαίρεσεις, π.χ. ng/ml, pg/ml). Η ELISA τύπου Sandwich εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ορμονών, κυτταροκινών, ανοσοσφαιρινών και άλλων πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά και σε υπερκείμενα καλλιιεργιών.

### ΟΓΝΚΥΣ"

" "

Αν είναι απαραίτητη η ποσοτική μέτρηση του αντιγόνου αλλά διαθέτουμε μόνο ένα αντίσωμα ή το αντιγόνο δεν διαθέτει περισσότερους από ένα επίτοπο τότε εφαρμόζουμε την ανταγωνιστική τύπου ELISA. Οι ανταγωνιστικές ELISA χαρακτηρίζονται από τον ανταγωνισμό μεταξύ διαλυτού και ακινητοποιημένου σε στερεά επιφάνεια αντιγόνου για την πρόσδεση στο αντίσωμα.



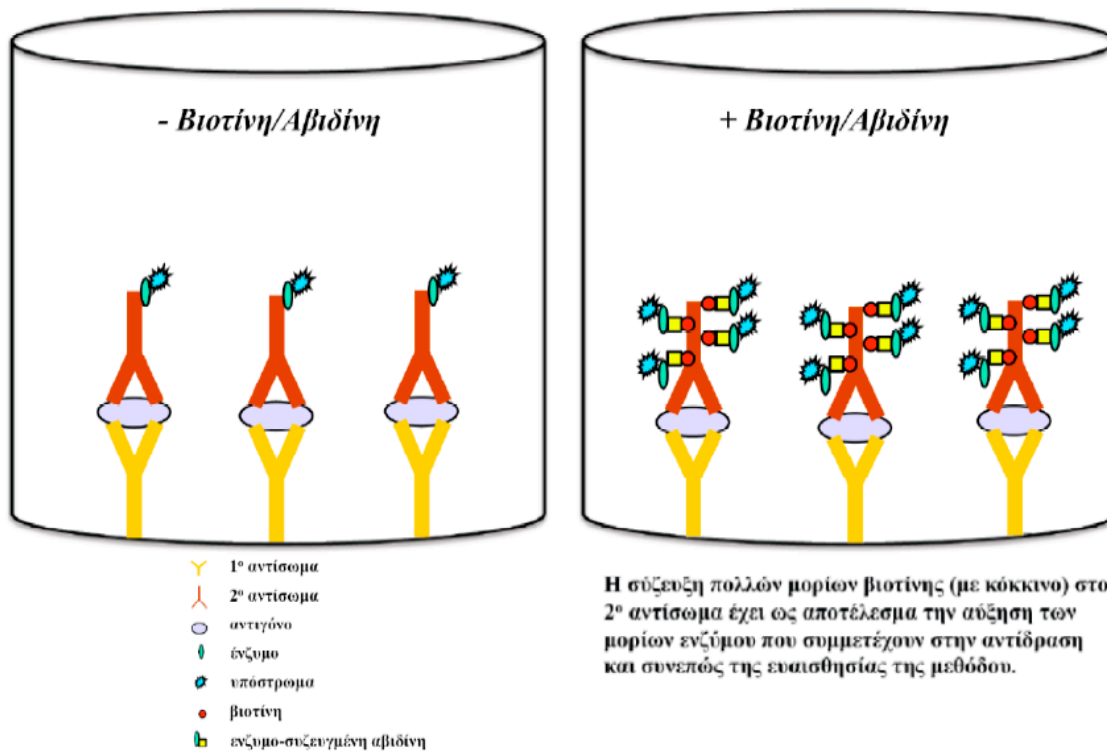
*Εικόνα 3.* Σχηματική απεικόνιση Ανταγωνιστικής ELISA (από R.A. Goldsby, T.J. Kindt, B.A. Osborne, J. Kuby, *Immunology*).

Το αντιγόνο σε διαλυτή μορφή αναμειγνύεται με περίσσεια ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος. Το μείγμα συνεπώαζεται με το ακινητοποιημένο σε στερεά επιφάνεια αντιγόνο, σε συνθήκες που επιτρέπουν να αναπτυχθεί ανταγωνισμός μεταξύ του ακινητοποιημένου και του διαλυτού αντιγόνου για την πρόσδεση με το αντίσωμα (Εικόνα 3). Η ενζυμική αντίδραση είναι μέγιστη απουσία του διαλυτού αντιγόνου και μειώνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσής του.

## ΑΥΞΗΣΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ELISA είναι μέθοδος που πλεονεκτεί έναντι άλλων ανοσοδοκιμασιών ως προς την ευαισθησία. Οι περισσότερες παραλλαγές ELISA έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν τα εξεταζόμενα μόρια σε συγκεντρώσεις της τάξης των **1-100 ng/ml**. Σε αρκετές εφαρμογές απαιτείται μεγαλύτερη ευαισθησία της τάξης των pg ( $10^{-12}$  g) ή και fg ( $10^{-15}$  g). Η ευαισθησία της μεθόδου μπορεί να αυξηθεί αλλάζοντας τις παραμέτρους της αντίδρασης, όπως το pH στο οποίο γίνεται η πρόσδεση του αντισώματος στη στερεά επιφάνεια, χρήση αντισωμάτων με μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης στα πλακίδια και υψηλότερης συγγένειας, αλλά και αύξηση του χρόνου επώασης.

Ωστόσο, η τροποποίηση που επιφέρει τα πλέον ικανοποιητικά αποτελέσματα έγκειται στο επίπεδο του επιλεγόμενου ενζύμου και υποστρώματος. Ο ευρύτερα χρησιμοποιούμενος τρόπος αύξησης της ευαισθησίας είναι το σύστημα της βιοτίνης-αβιδίνης και βασίζεται στην αύξηση του αριθμού μορίων ενζύμου που αναλογούν σε κάθε σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος (Εικόνα 4). Η **βιοτίνη** μπορεί να συζευχθεί με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών όταν στο μόριό της σχηματισθεί ομάδα ενεργού εστέρα. Η **αβιδίνη** ή **στρεπταβιδίνη** με τη σειρά της σχηματίζει μη ομοιοπολικά σύμπλοκα με την βιοτίνη με την υψηλότερη συγγένεια που απαντάται στη φύση ( $kD = 10^{-15}$ ).



Εικόνα 4. Αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου ELISA με τη χρήση του συστήματος βιοτίνης-αβιδίνης.

Έτσι, η στρατηγική που ακολουθείται είναι η σύζευξη της βιοτίνης στο δεύτερο αντίσωμα, η αντίδραση με ενζυμο-συζευγμένη αβιδίνη και ακολούθως η προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος. Δεδομένου ότι σε κάθε μόριο αντισώματος ή αντιγόνου προσδένονται πολλά μόρια βιοτίνης και η αντίδραση βιοτίνης-αβιδίνης είναι υψηλής συγγένειας αυξάνεται κατά πολύ ο αριθμός των μορίων ενζύμου που συμμετέχουν στην αντίδραση. Αποτέλεσμα της προαναφερόμενης διαδικασίας είναι η αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου κατά 10 - 100 φορές.



## **ΣΥΝΟΨΗ ΒΑΣΙΚΩΝ ΑΡΧΩΝ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

- Η ELISA είναι μία ενζυμική μέθοδος, με χρήση ενζυμο-συζευγμένων αντισωμάτων και χρωμογόνων υποστρωμάτων, κατά την οποία η συγκέντρωση του εξεταζόμενου μορίου προσδιορίζεται από την ποσότητα του έγχρωμου προϊόντος που παράγεται από την αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος.
- Η ELISA είναι μία μέθοδος υψηλά ευαίσθητη που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινών, χημικών ουσιών, ορμονών σε βιολογικά υγρά και έχει την ικανότητα να ανιχνεύει τα υπό εξέταση μόρια σε συγκεντρώσεις έως και της τάξης των **pg** και σε ειδικές περιπτώσεις **fg**.
- Τα πλεονεκτήματά της σε σύγκριση με άλλες ανοσοδοκιμασίες είναι η υψηλότερη ευαισθησία της, η επαναληψιμότητά της και η μη χρησιμοποίηση ραδιενέργειας.
- Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος και ανάλογα με την εφαρμογή, τα αντιδραστήρια και την ευαισθησία που επιδιώκεται η μέθοδος παρουσιάζει πολλαπλές παραλλαγές.
- Τα βασικά στάδια της μεθόδου είναι: (**α**) η πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεή επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση), (**β**) η χρήση ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος και (**γ**) η χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων, τα οποία αντιδρούν με το ένζυμο και παράγουν χρώμα ή φθορισμό επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος.

**1<sup>ο</sup> ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ. ΕΜΜΕΣΗ ELISA: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΙΤΛΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΟΡΟ ΣΚΥΛΟΥ ΜΟΛΥΣΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ *LEISHMANIA DONOVANI***

**ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ**

Πρόκειται για διαγνωστική δοκιμασία με στόχο την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του *Leishmania Donovanii* στον ορό σκύλων που πιθανώς έχουν μολυνθεί με το παράσιτο. Αν ο ορός είναι θετικός συμπεραίνουμε ότι ο σκύλος είναι μολυσμένος. Αντίθετα, αν ο ορός είναι αρνητικός ο σκύλος δεν έχει μολυνθεί ή η μόλυνση είναι πολύ πρόσφατη.

Με τη χρήση διαδοχικών αραιώσεων του ορού προσδιορίζουμε τον τίτλο των αντισωμάτων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ως "**τίτλος**" ορίζεται το αντίστροφο της μεγαλύτερης αραιώσης του ορού που αναπτύσσει έγχρωμο προϊόν. Για παράδειγμα, αν στην αραιώση 1:1.600 δεν αναπτυχθεί κίτρινο χρώμα και στην αραιώση 1:800 αναπτυχθεί, τότε ο τίτλος του ορού είναι 800.

Ο προσδιορισμός του τίτλου των αντισωμάτων είναι διαγνωστικά σημαντικός. Για παράδειγμα, υψηλός τίτλος αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι υπάρχει πιθανά ενεργή λοίμωξη. Εφόσον συμπληρωματικές εξετάσεις με άλλες μεθοδολογίες (π.χ. ανοσοφθορισμός) είναι επίσης θετικές τότε ο σκύλος υποβάλλεται σε θεραπευτική αγωγή. Σε επανεξέταση με έμμεση ELISA, αν ο τίτλος μειώνεται τότε συμπεραίνουμε ότι πολύ πιθανά το ζώο ανταποκρίνεται στη θεραπεία. Στην περίπτωση που ο τίτλος παραμένει υψηλός, ο σκύλος δεν ανταποκρίνεται άρα πρέπει να υποβληθεί σε διαφορετική θεραπευτική αγωγή.

**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ**

- **Στερεά επιφάνεια.** Πλακίδια 96 φρεατίων (8 × 12 cm) από πολυπροπυλένιο ή πολυστυρένιο (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Πλακίδιο 96 φρεατίων.

- **Αντιγόνο *Leishmania Donovanii*.** Το αντιγόνο παρασκευάζεται από συνολικό εκχύλισμα καλλιέργειας παρασίτων.

- **Οροί** [8 οροί υγείων σκύλων (αρνητικοί) και 5 οροί σκύλων που ελέγχονται για λοίμωξη με *Leishmania Donovani* (θετικοί)].
- **Αντίσωμα κουνελιού έναντι ανοσοσφαιρινών σκύλου συνδεδεμένο με HPO.**
- **Υπόστρωμα.** TMB (3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη).

Το TMB οξειδώνεται κατά την ενζυμική αποικοδόμηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) από τη υπεροξειδάση της ραφάνου (HRP). Το οξειδωμένο προϊόν του TMB έχει έντονο μπλέ χρώμα. Σε όξινο περιβάλλον το χρώμα μετατρέπεται σε κίτρινο.

- **Φωτόμετρο.** Αυτόματο φωτόμετρο ειδικό για πλακίδια 96 φρεατίων (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Φωτόμετρο για πλακίδια 96 φρεατίων.

- **Ρυθμιστικά διαλύματα**

- **0.1M  $NaHCO_3$**  (δισανθρακικό νάτριο), pH 9.5 (**Διάλυμα για την ευαισθητοποίηση των πλακιδίων**).

- **PBS**, pH 7.2, 0.15 M NaCl, 0.01 M  $PO_4^{3-}$ , 0.0027 M KCl.

- **PBS + Tween-20 0.1%** (**Διάλυμα έκπλυσης** των πλακιδίων ανάμεσα στο κάθε στάδιο της μεθόδου. Το Tween-20 είναι απορρυπαντικό που βοηθάει στην έκπλυση των ουσιών που έχουν προσδεθεί μη ειδικά στο πλακίδιο).

- **PBS + Tween-20 0.1% + 1% BSA** (**Ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας**. Στο διάλυμα αυτό γίνονται οι αραιώσεις όλων των αντισωμάτων και αντιγόνων).

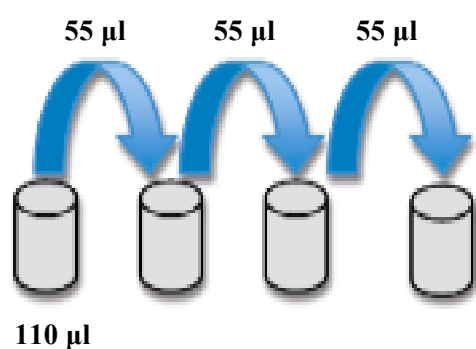
- **1M  $H_3PO_4$**  (Διάλυμα τερματισμού της ενζυμικής αντίδρασης).

**ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΕΣ ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ:**

- Όλες οι αραιώσεις πραγματοποιούνται σε διάλυμα εργασίας.
- Ο όγκος που προστίθεται σε κάθε φρεάτιο είναι σταθερά 50 μl.

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

1. Αρχικά, ευαισθητοποιούνται τα πλακίδια με προσθήκη 50 μl κεκαθαρμένου αντιγόνου *Leishmania Donovanii*, συγκέντρωσης 5 μg/ml σε διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9.5, σε κάθε φρεάτιο και ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 4°C (γίνεται από τους διδάσκοντες).
2. Στη συνέχεια το πλακίδιο εκκλίνεται 3 φορές με εμβάπτιση σε διάλυμα PBS + Tween-20 0.1%.
3. Στα φρεάτια προστίθενται: **α.** στην κολώνα 2, εις απλούν 50 μl αρνητικών μαρτύρων σε αραιώση 1:100 και **β.** στις κολώνες 3-8, οι 5 εξεταζόμενοι οροί σε αραιώσεις 1:100 ως 1:800 (4 διαδοχικές αραιώσεις ορών 1:2) (βλέπε επεξήγηση εκτέλεσης της άσκησης στα παρακάτω σχήματα). Ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



1:100      1:200      1:400      1:800

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	White	White	White	White
B	Blank	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	White	White	White	White
C	Blank	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	White	White	White	White
D	Blank	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	White	White	White	White
E	White	Red	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White
F	White	Red	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White
G	White	Red	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White
H	White	Red	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White

● Blank (μη προσθήκη ορού)

● Αρνητικοί Οροί 1:100

● Εξεταζόμενοι Οροί

A: αραιώση 1:100

B: αραιώση 1:200

C: αραιώση 1:400

D: αραιώση 1:800

- Η αραιώση 1:100 δίνεται έτοιμη.
- Προσθήκη σε κάθε άδειο erpendorf 55 μl διαλύματος εργασίας και μεταφορά 55 μl από την πρότερη αραιώση.
- Φόρτωση σε κάθε φρεάτιο όγκου 50 μl από την κάθε αραιώση.

**3α.** Στην κολώνα 1 προστίθεται το "τυφλό" (*blank*) για τον προσδιορισμό του θορύβου. Στο τυφλό προστίθενται όλα τα αντιδραστήρια **εκτός του ορού**. Αντί αυτού προστίθεται όγκος 50 μl διαλύματος εργασίας (PBS + 0.1% Tween-20 + 1% BSA). Το τυφλό αποτελεί σημείο ελέγχου της σωστής εκτέλεσης της δοκιμασίας. Υψηλές τιμές θορύβου υποδηλώνουν την ύπαρξη διασταυρούμενων αντιδράσεων, επιμόλυνση των αντιδραστηρίων ή πιθανή χρήση λάθος αντιδραστηρίων. Στην περίπτωση αυτή, η δοκιμασία επαναλαμβάνεται και αν το πρόβλημα επιμένει αλλάζουμε αντιδραστήρια.

**3β.** Η δοκιμασία διαδοχικών αραιώσεων των ορών μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε τον τίτλο των αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του παρασίτου.

**3γ.** Οι τιμές οπτικής πυκνότητας (OD) των αρνητικών ορών χρησιμεύουν για να καθορίσουμε το "κατώφλι θετικότητας" (βλέπε παρακάτω).

**4.** Στη συνέχεια το πλακίδιο εκκλίνεται, όπως παραπάνω, και σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 50 μl αντισώματος κουνελιού έναντι ανοσοσφαιρινών σκύλου HPO-συνδεδεμένου, σε αραιώση 1:5.000, και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. [*Το αντίσωμα δίνεται έτοιμο (αραιωμένο) από τους διδάσκοντες*].

**5.** Πραγματοποιείται εκ νέου έκλυση και στη συνέχεια προστίθενται 50 μl μείγματος 1:1 υποστρώματος TMB και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και γίνεται επώαση για χρονικό διάστημα 15 λεπτά προκειμένου να τελεστεί η ενζυμική αντίδραση. (*Η προσθήκη του υποστρώματος θα γίνει με χρήση πολυπιπέτας από τους διδάσκοντες*).

**6.** Μετά την ανάπτυξη έντονου μπλέ χρώματος η ενζυμική αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 50 μl διαλύματος H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M σε κάθε φρεάτιο. Στους θετικούς ορούς αναπτύσσεται κίτρινο χρώμα και η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης αντισώματος σε κάθε φρεάτιο.

**7.** Τέλος, πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 450 nm σε φωτόμετρο ειδικό για πλακίδια 96 φρεατίων.

**8.** Ανάλυση και συζήτηση αποτελεσμάτων.

### Προσδιορισμός Τίτλου

Για παράδειγμα, σε μία πειραματική διαδικασία έμμεσης ELISA για τον προσδιορισμό τίτλου σε ορούς προκύπτουν οι παραπάνω τιμές.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.044	0.163	0.438	1.070	0.863	↓ Αραιώσεις			1:100			
B	0.041	0.132	0.270	0.874	0.592				1:200			
C	0.052	0.114	0.161	0.521	0.401				1:400			
D	0.048	0.126	0.113	0.298	0.244				1:800			
E	Blank	Negs	Op. 1	Op. 2	Op. 3							
F		1:100										
G												
H												

→ Το κατώφλι θετικότητας καθορίζεται από τις τιμές των αρνητικών μαρτύρων (ορών)

**Πρώτον**, θα πρέπει να ελεγχθούν οι τιμές οπτικής πυκνότητας στο τυφλό. Οι τιμές στην προκειμένη περίπτωση είναι εντός των αναμενόμενων ορίων, γεγονός που υποδηλώνει τη μη ύπαρξη διασταυρούμενων αντιδράσεων, επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων ή πιθανής χρήσης λάθος αντιδραστηρίων.

**Δεύτερον**, θα πρέπει να ελεγχθούν οι τιμές σε όλα τα υπόλοιπα φρεάτια με σκοπό την επιβεβαίωση της σωστής πειραματικής εκτέλεσης και ειδικότερα την ορθή πραγματοποίηση των αραιώσεων. Οι τιμές στην προκειμένη περίπτωση μειώνονται καθοδικά που σημαίνει πως οι αραιώσεις έχουν γίνει σωστά.

**Τρίτον**, σημαντικό σημείο για την ανάλυση των αποτελεσμάτων αποτελεί ο καθορισμός του κατωφλίου θετικότητας. Οι τιμές οπτικής πυκνότητας των 4 διαφορετικών αρνητικών ορών (κολώνα 2) χρησιμεύουν για να καθορίσουμε το κατώφλι θετικότητας σύμφωνα με τον τύπο:

$$\bar{x} + (2 \times SD) \quad \text{ή σε πιο αυστηρές συνθήκες} \quad 2 \times \bar{x},$$

όπου  $\bar{x}$  είναι ο μέσος όρος και SD (Standard Deviation) η σταθερά απόκλισης των τιμών οπτικής πυκνότητας του αρνητικού ορού.

Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, η τιμή του  $\bar{x}$  μέσου είναι 0.13375. Συνεπώς, το κατώφλι θετικότητας ισούται με **0.2675** κάτω από τις πιο αυστηρές συνθήκες. Θα πρέπει να σημειωθεί

πως το κατώφλι θετικότητας δεν αποτελεί αυστηρό αριθμητικό όριο με την έννοια ότι κάθε τιμή πάνω αυτού σημαίνει θετικότητα. Έτσι, τιμές οπτικής πυκνότητας με ελάχιστη απόκλιση από την τιμή του κατωφλίου θετικότητας θα εκτιμώνται ως αρνητικές.

**Τέταρτον**, δεδομένου ότι ως "**τίτλος**" ορίζεται το αντίστροφο της μεγαλύτερης αραιώσης του ορού που αναπτύσσει έγχρωμο προϊόν, στους ορούς των οποίων οι τιμές οπτικής πυκνότητας είναι μεγαλύτερες του κατωφλίου θετικότητας, όπως και στους τρεις ορούς, λαμβάνουμε υπόψη την τιμή της μεγαλύτερης αραιώσης που υπερβαίνει αυτή του κατωφλίου θετικότητας\*. Στην προκειμένη περίπτωση, οι τιμές **0.270** του ορού 1, **0.298** του ορού 2 και **0.401** του ορού 3 είναι αυτές που θα χρησιμοποιήσουμε για τον προσδιορισμό του τίτλου. Η τιμή του ορού 1 αντιστοιχεί σε αραιώση 1:200, συνεπώς, ο τίτλος είναι **200**. Η τιμή του ορού 2 αντιστοιχεί σε αραιώση 1:800, συνεπώς, ο τίτλος είναι **800**. Τέλος, η τιμή του ορού 3 αντιστοιχεί σε αραιώση 1:400, συνεπώς, ο τίτλος είναι **400**.

#### **ANAMENOMENA ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Στην άσκηση θα χρησιμοποιηθούν θετικοί και αρνητικοί οροί για την ανοσοδοκιμασία. Η θετικότητα των ορών θα βαθμονομηθεί από τον κάθε φοιτητή με βάση την οπτική πυκνότητα των δειγμάτων και θα προσδιορισθεί ο τίτλος των ορών.

---

\* Ως κατώφλι θετικότητας, στο προκειμένο παράδειγμα, θα λαμβάνουμε την τιμή **0.2675**, δηλαδή οι υπολογισμοί θα πραγματοποιούνται κάτω από πιο αυστηρές συνθήκες.

### Προσδιορισμός της Ευαισθησίας και της Ειδικότητας Διαγνωστικής Μεθόδου.

Στο κείμενο αναφέρεται ότι: «Οι τιμές οπτικής πυκνότητας του αρνητικού ορού χρησιμεύουν για να καθορίσουμε το κατώφλι θετικότητας σύμφωνα με τον τύπο  $2 \times \bar{x}$  ». Στα πλαίσια της παρούσας εκπαιδευτικής άσκησης η παραπάνω προσέγγιση αν και εμπειρική δεν είναι λαθεμένη. Αν όμως θελήσουμε να προσδιορίσουμε το κατώφλι θετικότητας για διαγνωστικούς σκοπούς, η προσέγγιση αυτή δεν είναι κατάλληλη. Πρώτον, οι τιμές οπτικής πυκνότητας των ορών ενός πληθυσμού υγείων μαρτύρων μπορεί να αποκλίνουν σημαντικά και κατά συνέπεια δεν μπορούμε να περιοριστούμε στις τιμές λίγων μόνο ορών. Η απόκλιση των τιμών οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, μεταξύ των οποίων οι πιο σημαντικοί είναι μη ειδικές και διασταυρούμενες αντιδράσεις. Δεύτερο, το εύρος των τιμών οπτικής πυκνότητας του ορού των ασθενών είναι συνήθως μεγάλο, με αποτέλεσμα οι κατώτερες τιμές των ασθενών να αλληλεπικαλύπτονται με τις ανώτερες των υγείων μαρτύρων. Δεδομένης της αλληλοεπικάλυψης αυτής, είναι απαραίτητο να οριστεί μία τιμή οπτικής πυκνότητας που καθορίζει το όριο λήψης απόφασης. Τα δείγματα με τιμές ανώτερες από την τιμή αυτή χαρακτηρίζονται θετικά ενώ αυτά με τιμές κατώτερες αρνητικά. Το όριο λήψης απόφασης καθορίζει την διαγνωστική ευαισθησία και την διαγνωστική ειδικότητα.

Ως διαγνωστική **ευαισθησία** ορίζεται ο λόγος των αληθώς θετικών δειγμάτων (ασθενών) προς το άθροισμα των αληθώς θετικών και ψευδώς αρνητικών δειγμάτων (υγείων) ήτοι:

$$\text{Ευαισθησία} = \frac{\text{Αληθώς θετικά}}{\text{Αληθώς θετικά} + \text{Ψευδώς αρνητικά}} \times 100$$

Με άλλα λόγια η ευαισθησία ορίζεται ως το ποσοστό των δειγμάτων των ασθενών που χαρακτηρίζονται θετικά. Παράδειγμα, αν σε εκατό δείγματα ασθενών τα 96 είναι άνω του ορίου (θετικά) ενώ τα 4 κάτω (αρνητικά) τότε η ευαισθησία της δοκιμασίας είναι 96%.

Ως διαγνωστική **ειδικότητα** ορίζεται ο λόγος των αληθώς αρνητικών δειγμάτων (υγείων) προς το άθροισμα των αληθώς αρνητικών και ψευδώς θετικών δειγμάτων (υγείων) ήτοι:

$$\text{Ειδικότητα} = \frac{\text{Αληθώς αρνητικά}}{\text{Αληθώς αρνητικά} + \text{Ψευδώς θετικά}} \times 100$$

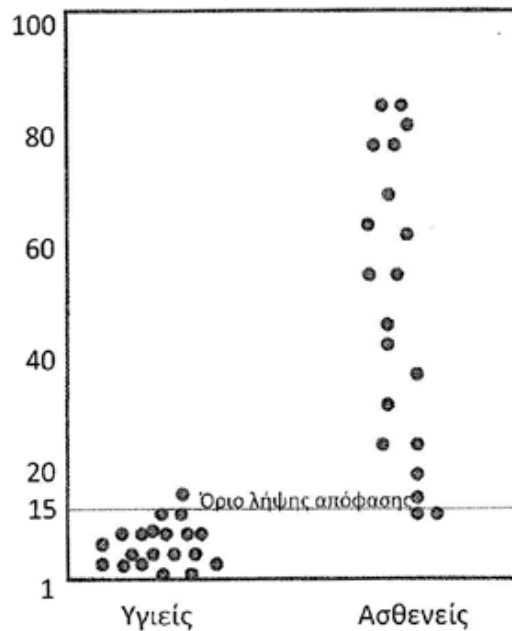


Με άλλα λόγια η ειδικότητα ορίζεται ως το ποσοστό των δειγμάτων των υγείων που προσδιορίζονται ως αρνητικά. Παράδειγμα: αν σε εκατό δείγματα υγείων τα 90 είναι κάτω του ορίου (αρνητικά) ενώ τα 10 άνω (θετικά) τότε η ειδικότητα της δοκιμασίας είναι 90%. Με βάση τους παραπάνω ορισμούς αν αυξήσουμε την τιμή του ορίου λήψης απόφασης αυξάνει η ειδικότητα, αφού λιγότεροι οροί υγιών μαρτύρων θα προσδιορίζονται ως θετικοί, ενώ μειώνεται η ευαισθησία αφού περισσότεροι οροί ασθενών θα προσδιορίζονται ως αρνητικοί. Το αντίθετο θα συμβεί αν μειώσουμε την τιμή του ορίου λήψης απόφασης.

Δεν υπάρχει ενιαία μέθοδος καθορισμού του ορίου λήψης απόφασης. Το όριο καθορίζεται αυθαίρετα με κριτήριο αν για την συγκεκριμένη δοκιμασία είναι προτιμότερο να αυξήσουμε την ευαισθησία ή την ειδικότητα.

### Παραδείγματα:

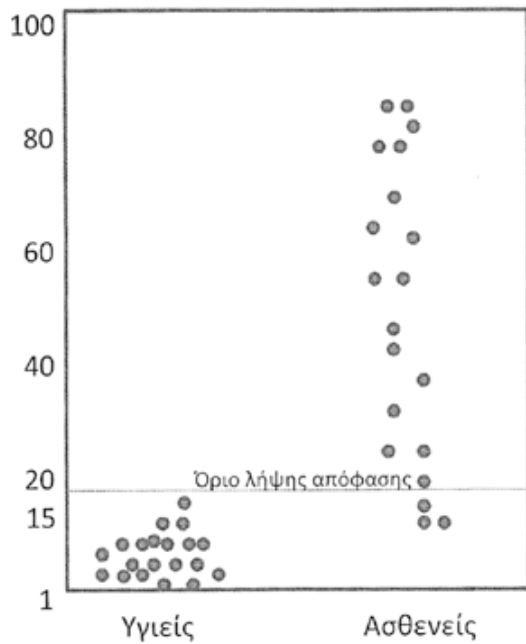
ΣΧΗΜΑ 1



$$\text{Ευαισθησία} = \frac{18}{18 + 2} \times 100 = 90\%$$

$$\text{Ειδικότητα} = \frac{19}{19 + 1} \times 100 = 95\%$$

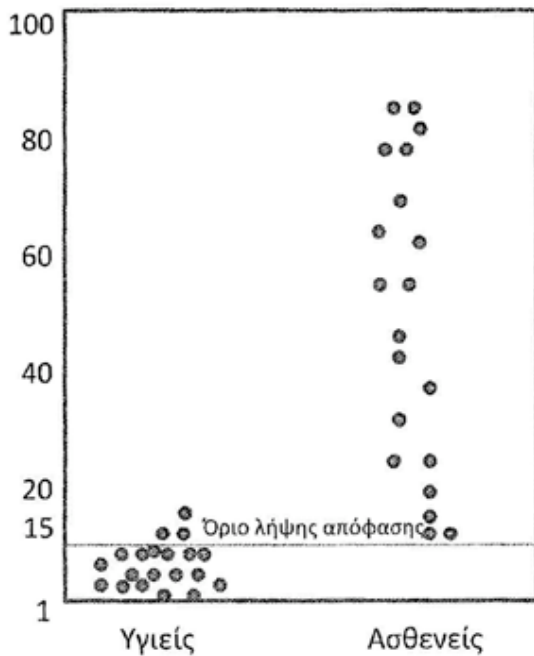
ΣΧΗΜΑ 2: Αύξηση ορίου λήψης απόφασης



$$\text{Ευαισθησία} = \frac{17}{17 + 3} \times 100 = 85\%$$

$$\text{Ειδικότητα} = \frac{20}{20 + 0} \times 100 = 100\%$$

ΣΧΗΜΑ 3: Μείωση ορίου λήψης απόφασης



$$\text{Ευαισθησία} = \frac{20}{20 + 0} \times 100 = 100\%$$

$$\text{Ειδικότητα} = \frac{17}{17 + 3} \times 100 = 85\%$$