

τεχνικές καθορισμού ομάδων αίματος και Rhesus



- 12.1 Σύστημα ABO
- 12.2 Τεχνική προσδιορισμού των αντιγόνων A και B της επιφάνειας των ερυθροκυττάρων - άμεση τεχνική σε πλάκα
- 12.3 Τεχνική προσδιορισμού των αντιγόνων A και B της επιφάνειας των ερυθροκυττάρων - άμεση τεχνική σε σωληνάριο
- 12.4 Τεχνική προσδιορισμού των αντισωμάτων Αντι - A και Αντι -B στον ορό ή το πλάσμα - έμμεση τεχνική σε πλάκα
- 12.5 Τεχνική προσδιορισμού των αντισωμάτων Αντι - A και Αντι -B στον ορό ή το πλάσμα - έμμεση τεχνική σε σωληνάριο
- 12.6 Αντιγόνα RHESUS
- 12.7 Τεχνική προσδιορισμού αντιγόνου D των ερυθροκυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα
- 12.8 Τεχνική προσδιορισμού του αντιγόνου D των ερυθροκυττάρων σε δοκιμαστικό σωληνάριο
- 12.9 Τεχνική προσδιορισμού αντιγόνου Du των ερυθροκυττάρων σε δοκιμαστικό σωληνάριο
- 12.10 Τεχνική ανίχνευσης του αντιγόνου K του συστήματος KELL

Όταν ολοκληρωθεί αυτή η ενότητα, θα έχεις τη δυνατότητα:

- ✓ να οργανώνεις τον τρόπο εκτέλεσης της τεχνικής.
- ✓ να επιλέγεις τα απαραίτητα υλικά και σκεύη για την εκτέλεση των προσδιορισμών.
- ✓ να εκτελείς με ασφάλεια, επιτυχία και αξιοπιστία τις τεχνικές προσδιορισμού των αντιγόνων A, B, D, D_u και K των αντιγονικών συστημάτων ABO, Rhesus και Kell.
- ✓ να διερευνάς τα αρνητικά αποτελέσματα και τα ασύμβατα στοιχεία για μία μετάγγιση.
- ✓ να διατηρείς τον εργαστηριακό χώρο καθαρό.



Αν συναντήσεις λέξεις που δε γνωρίζεις τη σημασία τους, ψάξε πρώτα στο λεξιλόγιο και μετά ρώτησε τον καθηγητή σου.

12.1. Σύστημα ABO



Ας θυμηθούμε:

- **Τι είναι τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα:**

Η κυτταρική μεμβράνη των ερυθροκυττάρων μπορεί να έχει κάποιες χαρακτηριστικές προεξοχές που ονομάζονται ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. Ονομάζονται έτσι, γιατί μπορούν να προκαλέσουν το αμυντικό σύστημα ενός οργανισμού που θα τα δεχτεί να αντιδράσει, παράγοντας αντισώματα.

- **Πώς κατασκευάζονται τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα:**

Για την παραγωγή τους ακολουθείται «σχέδιο» που υπάρχει μέσα σε **γονίδια** του 9ου χρωμοσωμιακού ζευγαριού. Με την εκτέλεση – «έκφραση» των γονιδιακών εντολών κατασκευάζονται τα αντιγόνα. Είναι μόρια που χημικά ανήκουν στην κατηγορία των απλών ή σύνθετων σακχάρων. Τα αντιγόνα συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη. Η σύνδεση γίνεται είτε μέσω μιας πρωτεΐνης της μεμβράνης, οπότε έχουμε ένα γλυκο-πρωτεϊνικό δεσμό, είτε απευθείας με την εξωτερική λιπιδική στοιβάδα, οπότε έχουμε ένα γλυκο-λιπιδικό δεσμό.

Κατά τη γέννηση του ανθρώπου τα αντιγόνα δεν είναι ολοκληρωμένα. Η βιοχημική τους κατασκευή ολοκληρώνεται μέχρι το 2ο – 4ο χρόνο και παραμένει σταθερή σε όλη τη διάρκεια της ζωής του.

- **Είναι όλα τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα ίδια;**

Όχι, δεν είναι όλα τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα ίδια. Τα αντιγόνα είναι πολλα και διαφορετικά σε χημική δομή, ανάλογα με τα σάκχαρα και τα άλλα στοιχεία που συμμετέχουν στη δομή τους. Γι' αυτό κατατάσσονται σε **συστήματα** που περιλαμβάνουν περίπου ομοειδή σε σύσταση ή ιδιότητες αντιγόνα. Το σπουδαιότερο αντιγονικό σύστημα είναι το σύστημα ABO.

- **Ποια ερυθροκυτταρικά αντιγόνα περιλαμβάνει το σύστημα ομάδων ABO;**

Βασικά περιλαμβάνει δύο τύπους ερυθροκυτταρικών α-

ντιγόνων, που η στερεοχημική τους δομή συμβολίζεται με τα γράμματα **A** και **B**.

Υπάρχει μια πρόδρομη βασική ουσία, η οποία αποτελείται από 4 σάκχαρα που τοποθετούνται με ορισμένη σειρά, το ένα μετά το άλλο. Το άκρο αυτής της αλληλουχίας των σακχάρων μπορεί να καλυφθεί τελείως με ένα ακόμη σάκχαρο. Αυτό το τελευταίο, μπορεί ποιοτικά να είναι ένα από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην αρχική σειρά ή να είναι διαφορετικό. Έτσι, σχηματίζονται οι αντιγονικοί τύποι **A** και **B**.

Αν το άκρο αυτής της βασικής σειράς των σακχάρων καλυφθεί «εν μέρει» με τα ανάλογα σάκχαρα, τότε δημιουργούνται αντιγονικές υποομάδες.

Πρώτος ο Γερμανός γιατρός και ερευνητής Landsteiner ανακάλυψε την ύπαρξη τους και παρατήρησε ότι η παρουσία ή η απουσία του ενός ή και των δύο τύπων αντιγόνων A και B από τη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων είναι αρκετή για να μας επιτρέψει να κατατάξουμε τους ανθρώπους σε 4 ομάδες αίματος, δημιουργώντας έτσι το αντιγονικό σύστημα ABO.

Άρα, αναζητώντας στο εργαστήριο το είδος του **αντιγονικού στοιχείου που υπάρχει στα ερυθροκύτταρα** ενός ανθρώπου, τον κατατάσσουμε σε μια από τις 4 ομάδες. Αυτός ο προσδιορισμός λέγεται **άμεσος**.

Στη συνέχεια της μελέτης του, ο Landsteiner απέδειξε την παρουσία ή την απουσία του ενός ή και των δύο τύπων **αντισωμάτων** αντι – A και αντι – B στον **ορό του αίματος** κάθε ανθρώπου. Αν το άτομο έχει το αντιγόνο A στα ερυθρά του, ο ορός του αποκτά το αντι – B αντίσωμα. Αν υπάρχει το B αντιγόνο στα ερυθρά, ο ορός αποκτά το αντι – A αντίσωμα. Το αντίσωμα δηλαδή, κατασκευάζεται για να δρα ενάντια στο αντιγόνο που απουσιάζει από τα ερυθρά αιμοσφαίρια ενός ατόμου και όχι ενάντια σε δικό του συστατικό.

Η παραγωγή των αντισωμάτων αρχίζει μετά τη γέννηση, αυξάνεται μετά τον 6ο χρόνο και παραμένει σταθερή σε όλη τη διάρκεια της ζωής.

Στο ανοσολογικό αυτό αξίωμα, στηρίζεται ο εργαστηριακός προσδιορισμός των **αντισωμάτων του ορού** ο οποίος λέγεται **έμμεσος** ή **ανάστροφη μέθοδος**.

12.2. Τεχνική προσδιορισμού των αντιγόνων A και B της επιφάνειας των ερυθροκυττάρων. Άμεση τεχνική σε πλάκα

• Τι θέλουμε να βρούμε;

Σκοπός μας είναι να προσδιορίσουμε την ομάδα αίματος στο σύστημα ABO στην οποία ανήκει ένας άνθρωπος, προκειμένου να μπορέσει να δώσει ή να πάρει αίμα. Σύμφωνα με αυτά που είπαμε παραπάνω, μας ενδιαφέρει να προσδιορίσουμε ποιο συνδυασμό αντιγόνων A, B ή AB έχει στα ερυθροκύτταρά του.

Στο εργαστήριο (in vitro) ροιπόν, για την αναζήτηση των αντιγόνων, πρέπει να προκαλέσουμε την ένωση του αντιγόνου που υπάρχει στα ερυθρά, αν και δεν ξέρουμε ποιο είναι, με ένα αντίσωμα που θα βάλουμε εμείς. Το αντίσωμα βρίσκεται σε αντιορό που παίρνουμε από το εμπόριο και είναι γνωστής ταυτότητας (αντι – A ή αντι – B).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Όταν προστεθεί το κατάλληλο αντίσωμα, αυτό πηκσιάζει το ερυθροκύτταρο και συνδέεται με δυνάμεις συνοχής με το ομόλογο αντιγόνο φτιάχνοντας ένα ζευγάρι. Το ζευγάρι αυτό θα ενωθεί με άλλο ζευγάρι κ.ο.κ. μέχρι να «κολληθούν» όλα μεταξύ τους. Αυτό το φαινόμενο λέγεται **συγκόλληση** και γίνεται αντιληπτή από το σχηματισμό **κροκίδων**.

ΔΕΙΓΜΑ

Χρησιμοποιείται πρόσφατο ολικό αίμα με αντιπηκτικό EDTA ή συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια.



Το αίμα πρέπει να έχει ληφθεί το τελευταίο εικοσιτετράωρο και να μην είναι αιμολυμένο ούτε να έχει μικροθρόμβους.

Για εκπαιδευτικούς λόγους μπορεί να χρησιμοποιηθεί τριχοειδικό αίμα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για να γίνει ο προσδιορισμός χρειάζονται τα εξής αντιδραστήρια:

1. Αντιοροί: Είναι ειδικοί οροί με αντισώματα, γι' αυτό λέγονται αντιοροί. Αν έχουν ένα είδος αντισώματος π.χ. αντι- A λέγονται μονοκλώνικοί. Αν έχουν αντι - A και αντι - B λέγονται πολυκλώνικοί. Οι μονοκλώνικοί αντιοροί έχουν ελεγχθεί και δεν περιέχουν ιούς ούτε άηλου είδους αντισώματα. Βρίσκονται μέσα σε σταγονομετρικά φιαλίδια, έχουν ημερομηνία λήξης και συντηρούνται στο ψυγείο στους 4°C. Πριν από τη χρήση τους, παραμένουν για 20 λεπτά στη θερμοκρασία του εργαστηριακού χώρου.

Αντί για αντισώματα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν φυτικές ουσίες, που έχουν την ιδιότητα να αντιδρούν επιλεκτικά με το A ή B αντιγόνο. Οι ουσίες αυτές λέγονται **ρεκτίνες**.



Εικόνα 12.1: Αντιοροί προσδιορισμού αντιγόνων A και B



Αν χρησιμοποιηθούν αντιοροί μετά την ημερομηνία λήξης, τα αποτελέσματα θα είναι αναξιόπιστα και επικίνδυνα για τη ζωή του ανθρώπου που εξετάζεται.












Αν δεν επαναφέρουμε στα κατάλληλα επίπεδα τη θερμοκρασία των αντιορών, θα καθυστερήσει η ένωση αντιγόνου – αντισώματος.



Πριν χρησιμοποιηθούν οι αντιοροί, πρέπει να ελέγχουμε πόσο δραστικά είναι τα αντισώματα που περιέχουν. Αυτό γίνεται με γνωστής ταυτότητας ερυθροκύτταρα. Αλλιώς,

**ΟΡΓΑΝΑ,
ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ**

υπάρχει κίνδυνος να γίνουν ασθενείς συγκολλήσεις και να αξιολογηθούν λανθασμένα τα αποτελέσματα.

- | | |
|---|--|
|  διαφανοσκόπιο |  γάντια |
| (φωτιζόμενη |  πηλαστικοποιημένο χαρτοσέντονο |
| και θερμαινόμενη |  αντικειμενοφόρες πλάκες |
| πλάκα 22 °C) |  ξύλινα ραβδάκια |
|  χρονόμετρο |  πηλαστικά ή γυάλινα τριχοειδή |
| χειρός |  δοχείο απόρριψης αιχμηρών αντικ. |
| |  ποτήρι ζέσεως με διάλυμα |
| | χλωρίνης 1:10 |



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα τριχοειδή και τα ραβδάκια, σε διάλυμα χλωρίνης. Το υποχλωριώδες νάτριο, αδρανοποιεί τα ενζυμικά συστήματα των ιών και των βακτηρίων. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ**1. Φοράμε γάντια.**

2. Απλώνουμε ένα κομμάτι πηλαστικοποιημένο χαρτοσέντονο επάνω στον πάγκο εργασίας και συγκεντρώνουμε τα υλικά.

3. Βάζουμε επάνω στο αριστερό τμήμα της αντικειμενοφόρου πλάκας μία σταγόνα αντιορού αντι- A και στο δεξί τμήμα μία σταγόνα αντιορού αντι- B.



Οι αντικειμενοφόρες πλάκες πρέπει να είναι απολύτως καθαρές.

4. Ανακινούμε το φιαλίδιο συλλογής του αίματος για να γίνει το δείγμα ομοιογενές.

5. Μεταφέρουμε με τριχοειδές μία σταγόνα δείγματος δίπλα στις σταγόνες αντι- A και αντι- B και πετάμε το τριχοειδές στο διάλυμα χλωρίνης ή στο δοχείο απόρριψης αιχμηρών αντικειμένων.



Ο όγκος των αντιορών πρέπει να είναι τόσος, όσος και ο όγκος του δείγματος.



Αν η σήμανση των αντιορών γίνει λανθασμένα ή δε βάλουμε καθόλου αντιορούς ή εναιώρημα ερυθρών, τα αποτελέσματα που θα πάρουμε θα είναι ελλιπή και επικίνδυνα για τη ζωή του εξεταζόμενου ανθρώπου.

6. Αναμειγνύουμε κυκλικά με καθαρό ξύλινο ραβδάκι ή τριχοειδές τη σταγόνα αντι- Α με τη σταγόνα του δείγματος. Ύστερα πετάμε το μέσο ανάμειξης στο διάλυμα χλωρίνης.

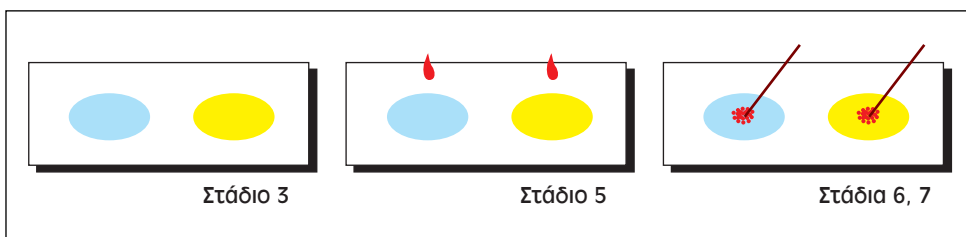


Το μέσο ανάμειξης των αντιορών με το δείγμα πρέπει να είναι καθαρό και για κάθε ανάμειξη διαφορετικό.

7. Παίρνουμε άλλο καθαρό ξύλινο ραβδάκι ή τριχοειδές και αναμειγνύουμε κυκλικά τη σταγόνα του αντι- Β με την αντίστοιχη σταγόνα του δείγματος. Πετάμε το χρησιμοποιημένο μέσο ανάμειξης στο διάλυμα χλωρίνης.

8. Ανασηκώνουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα και την ανακινούμε με κυκλικές κινήσεις. Η συγκόλληση εφόσον δημιουργηθεί θα γίνει ορατή με το σχηματισμό κροκίδων σε χρονικό διάστημα 2 λεπτών της ώρας.

9. Επιβεβαιώνουμε τη συγκόλληση παρατηρώντας στο διαφανοσκόπιο.



Εικόνα 12.2 : Προσδιορισμός αντιγόνων Α και Β σε αντικειμενοφόρο πλάκα (άμεση τεχνική)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. Θετικό: Έγινε συγκόλληση η οποία φαίνεται με το σχηματισμό κροκίδων.

β. Αρνητικό: Δεν έγινε συγκόλληση και γι' αυτό δε σχηματίστηκαν κροκίδες.



Τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα δεν έχουν ακόμη καλά σχηματιστεί σε άτομα ηλικίας μικρότερης των 6 μηνών. Το πόσο καλά «φαίνεται» και αντιδρά ένα κυτταρικό αντιγόνο στην ανοσολογία λέγεται «ισχυρή έκφραση».



Λοιμώξεις από μικρόβια επηρεάζουν τη δύναμη έκφρασης των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων.



Καλό είναι να ξέρουμε βασικά στοιχεία που έχουν σχέση με την ηλικία του εξεταζόμενου, αν πρόκειται για τοκετό, τη διάγνωση, αν πρόκειται για νόσο. Αυτές οι πληροφορίες είναι χρήσιμες, όταν αντιμετωπίζουμε δυσκολίες κατά την εκτέλεση των τεχνικών και πρέπει να τις ερμηνεύσουμε.



Συγκρίνουμε τα αποτελέσματα με θετικό και αρνητικό μάρτυρα για να επιβεβαιώσουμε την εγκυρότητα ή μη των αποτελεσμάτων.

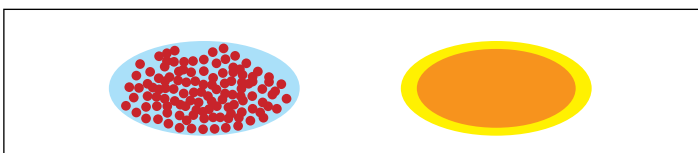


Αν καθυστερήσουμε να αξιολογήσουμε το αποτέλεσμα, το αίμα θα στεγνώσει περιφερικά στο πλακάκι και αυτό μπορεί να θεωρηθεί, λανθασμένα, ως συγκόλληση.

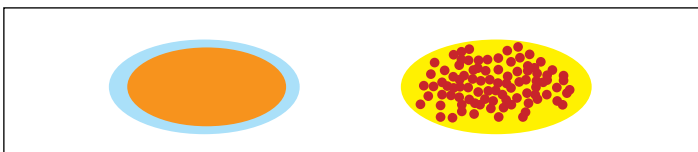
ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όταν το αποτέλεσμα χαρακτηριστεί **θετικό**, δηλαδή δούμε σχηματισμό κροκίδων, σημαίνει ότι τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα έχουν συνενωθεί με τα ομόλογα αντισώματα.

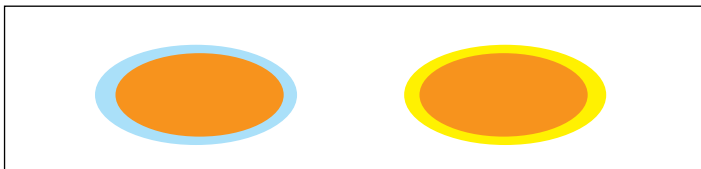
▶ Αν η συγκόλληση γίνει εκεί που τοποθετήθηκε η σταγόνα με τον αντι- A ορό, αποκαλύπτεται η ύπαρξη αντιγόνου A στο ερυθροκύτταρο.



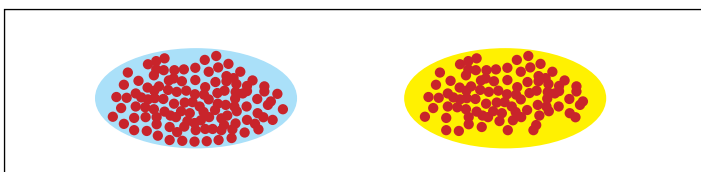
▶ Αν η συγκόλληση γίνει εκεί που τοποθετήθηκε η σταγόνα με τον αντι- B ορό, αποκαλύπτεται η ύπαρξη αντιγόνου B.



▶ Όταν το αποτέλεσμα χαρακτηριστεί **αρνητικό**, δηλαδή δεν εμφανιστούν κροκίδες, σημαίνει ότι δεν υπάρχουν ερυθροκυτταρικά αντιγόνα A ή B, γι αυτό δεν έγινε η σύνδεση με τους αντι- A ή αντι- B ορούς και στη συνέχεια δεν έγινε συγκόλληση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.



▶ Αν, τέλος, η συγκόλληση γίνει και στις δύο σταγόνες των αντιορών, σημαίνει ότι υπάρχουν ερυθροκυτταρικά αντιγόνα A και B.



Ο προσδιορισμός της ομάδας γίνεται με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων και στις δύο σταγόνες.

Στις πραγματικές εργαστηριακές συνθήκες εργασίας ταυτόχρονα με τους αντι- A και αντι- B ορούς χρησιμοποιείται και ο αντι- AB ορός. Στην περίπτωση αυτή επάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούνται συνοδικά 3 σταγόνες δείγματος και η όλη διαδικασία γίνεται σύμφωνα με όσα προαναφέραμε. Με αυτόν τον τρόπο είναι σαν να ελέγχουμε την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων των αντι- A και αντι- B ορών, ενώ ταυτόχρονα προσδιορίζεται και η ομάδα αίματος AB. Η διαδικασία αυτή φαίνεται στο συγκεντρωτικό πίνακα 2, που βρίσκεται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου.

12.3. Τεχνική προσδιορισμού των αντιγόνων A και B των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Άμεση τεχνική σε σωληνάριο

Αν η τεχνική προσδιορισμού των αντιγόνων σε αντικειμενοφόρο πηλάκα δε δώσει σαφή αποτελέσματα ή έχουμε λόγους να αμφιβάλλουμε για την αξιοπιστία τους, επαναλαμβάνουμε τον προσδιορισμό με την τεχνική σε δοκιμαστικό σωληνάριο.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα αντιγόνα της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων ενώνονται με τους ομόλογους αντι- ορούς ή τις ομόλογες ηλεκτίνες.

ΔΕΙΓΜΑ

Εναιώρημα ερυθρών αιμοσφαιρίων 2 – 5% σε NaCl 0.9%



Τα εναιωρήματα των ερυθρών αιμοσφαιρίων δεν πρέπει να είναι πυκνότερα από όσο ορίζεται γιατί το περίσσειμα των ερυθρών θα ελαττώσει την ισχύ των αντιδραστηρίων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Χρησιμοποιούμε τους ίδιους αντιορούς που χρησιμοποιήσαμε για την εφαρμογή της μεθόδου σε αντικειμενοφόρο πηλάκα.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ



φυγόκεντρος



διαφανοσκόπιο



γάντια



έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων (στατώ)



δοκιμαστικά σωληνάκια αιμολύσεως



υαλογράφος



σιφώνιο Pasteur



αντικειμενοφόρος πηλάκα



ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης
1:10



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια και τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε με υαλογράφο τα στοιχεία του εξεταζόμενου, επάνω σε δύο δοκιμαστικά σωληνάρια αιμολύσεως. Σε κάθε σωληνάριο σημειώνουμε και από μία ένδειξη : αντι- A, αντι- B.



Τα δοκιμαστικά σωληνάρια πρέπει να είναι απολύτως καθαρά.

2. Τοποθετούμε από μία σταγόνα του αντίστοιχου αντιορού σε κάθε σωληνάριο.

3. Προσθέτουμε με σιφώνιο Pasteur μία σταγόνα εναιωρήματος ερυθρών σε κάθε σωληνάριο.

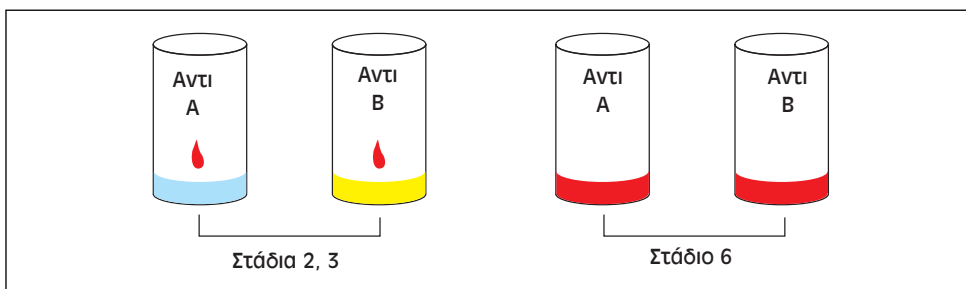


Οι μικροποσότητες του δείγματος τοποθετούνται στη βάση των σωληναρίων για να μην κατακρατηθούν στα τοιχώματά τους.

4. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές/λεπτό για 15 – 30 δευτερόλεπτα της ώρας.

5. Ανακινούμε το περιεχόμενο των σωληναρίων με απαλά χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης.

6. Παρατηρούμε μακροσκοπικά τη δημιουργία ή μη συγκόλλησης.



Εικόνα 12.3 : Προσδιορισμός αντιγόνου A και B σε δοκιμαστικό σωληνάριο (άμεση τεχνική)

7. Μεταφέρουμε με σιφώνιο Pasteur μία σταγόνα από κάθε δοκιμαστικό σωληνάριο επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.



Ξαναθυμίζουμε:

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες πρέπει να είναι απολύτως καθαρές.

8. Επιβεβαιώνουμε τη συγκόλληση παρατηρώντας στο διαφανοσκόπιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. **Θετικό:** Έγινε συγκόλληση η οποία φαίνεται με το σχηματισμό κροκίδων.

β. **Αρνητικό:** Δεν έγινε συγκόλληση και γι 'αυτό δε σχηματίστηκαν κροκίδες.



Τα ηλικιωμένα άτομα έχουν χαμηλότερο επίπεδο αντι – Α και αντι – Β αντισωμάτων.



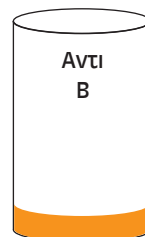
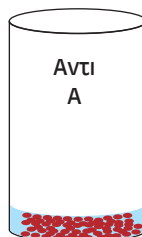
Υπενθυμίζουμε:

Τα αντισώματα του ορού αρχίζουν να παράγονται μετά τη γέννηση του ανθρώπου. Η παραγωγή τους αυξάνεται τα πρώτα 5 –6 χρόνια και παραμένει στάσιμη σε όλη τη διάρκεια της υπόλοιπης ζωής του.

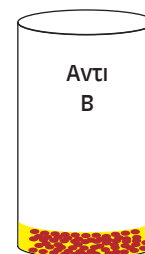
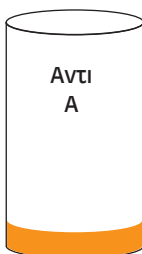
ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα έχουν συνενωθεί με τα ομόλογα αντισώματα.

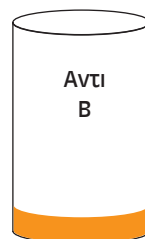
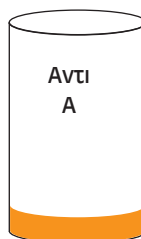
▶ Η δημιουργία συγκόλλησης στο σωληνάριο όπου βάλουμε τη σταγόνα με τον αντι – Α ορό δηλώνει την ύπαρξη αντιγόνου Α στο ερυθροκύτταρο.



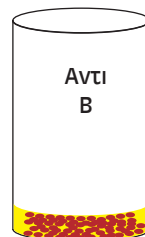
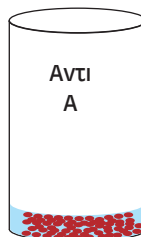
▶ Η δημιουργία συγκόλλησης στο σωληνάριο όπου βάλουμε τη σταγόνα με τον αντι– Β ορό δηλώνει την ύπαρξη αντιγόνου Β στο ερυθροκύτταρο.



▶ Σε περιπτώσεις αρνητικού αποτελέσματος δεν υπάρχουν ερυθροκυτταρικά αντιγόνα A ή B και δεν γίνεται συνένωση με τους αντι- A ή αντι- B ορούς.



▶ Αν δημιουργηθεί συγκόλληση και στα δύο σωληνάρια με τους αντι- A και αντι- B ορούς δηλώνει την ύπαρξη αντιγόνου A και B στο ερυθροκύτταρο.



Με τον προσδιορισμό των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων καθορίζεται η ομάδα αίματος του ανθρώπου. Ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των αντιγόνων A και B διακρίνουμε 4 ομάδες αίματος:

ΟΜΑΔΑ ΑΙΜΑΤΟΣ (Αν υπάρχει το αντιγόνο)	ΑΝΤΙ - Α ΟΡΟΣ + ΔΕΙΓΜΑ (αποτέλεσμα)	ΑΝΤΙ - Β ΟΡΟΣ + ΔΕΙΓΜΑ (αποτέλεσμα)
A	συγκόλληση	όχι συγκόλληση
B	όχι συγκόλληση	συγκόλληση
AB	συγκόλληση	συγκόλληση
O	όχι συγκόλληση	όχι συγκόλληση

Πίνακας 12.1: Συγκολλήσεις κατά τον προσδιορισμό των ομάδων αίματος του συστήματος ABO

12.4. Τεχνική προσδιορισμού των αντισωμάτων **Αντι – Α και Αντι – Β** στον ορό ή το πλάσμα. **Έμμεση τεχνική σε πλάκα**

• Τι θέλουμε να βρούμε;

Το ερώτημα είναι «ποια αντι - ερυθροκυτταρικά αντισώματα έχει στον ορό του ένας άνθρωπος;».

Στο εργαστήριο λοιπόν, για την αναζήτηση των αντισωμάτων του ορού πρέπει να φέρουμε σε επαφή τον ορό του εξεταζόμενου με ερυθροκύτταρα γνωστού αντιγόνου. Φυσικά τα ερυθροκύτταρα αυτά δεν ανήκουν στο εξεταζόμενο άτομο.

Η αναζήτηση των συγκολλητινών (αντισώματα) με τη βοήθεια γνωστών συγκολλητινογόνων (αντιγόνα) βασίζεται στο αξίωμα που διατυπώθηκε στην εισαγωγή, **ότι δηλαδή, υπάρχουν οι συγκολλητίνες στον ορό ή το πλάσμα όταν δεν υπάρχουν τα αντίστοιχα συγκολλητινογόνα στα ερυθρά αιμοσφαίρια.**

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε ορό ή πλάσμα.



Το δείγμα δεν πρέπει να είναι αιμολυμένο.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ



διαφανοσκόπιο



γάντια



π्लाστικοποιημένο χαρτοσέντονο



σιφώνια Pasteur



αντικειμενοφόρες πλάκες



ξύλινα ραβδάκια ή π्लाστικά



τριχοειδή



ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης

1:10



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια, τα ραβδάκια και τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- 1. Εναιώρημα 25% ερυθρών αιμοσφαιρίων ομάδας Α**
- 2. Εναιώρημα 25% ερυθρών αιμοσφαιρίων ομάδας Β**

Η Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία προτείνει τη χρησιμοποίηση εναιωρήματος ερυθρών αιμοσφαιρίων ομάδας Ο ως αρνητικό μάρτυρα.

Σε αυτή την περίπτωση επάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούμε 3 σταγόνες όπως φαίνεται στο συγκεντρωτικό πίνακα 2, που βρίσκεται στο τέλος του παρόντος κεφαλαίου.

**Υπενθύμιση:**

Τα εναιωρήματα των ερυθρών αιμοσφαιρίων δεν πρέπει να είναι πυκνότερα από όσο ορίζεται, γιατί η περίσσεια των ερυθρών θα ελαττώσει την ισχύ των αντιδραστηρίων.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

- 1.** Απλώνουμε πάνω στον πάγκο εργασίας πηλαστικοποιημένο χαρτοσέντονο και συγκεντρώνουμε τα υλικά.
- 2.** Βάζουμε με σιφώνιο Pasteur τη μία μετά την άλλη δύο σταγόνες από το δείγμα επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

**Υπενθύμιση:**

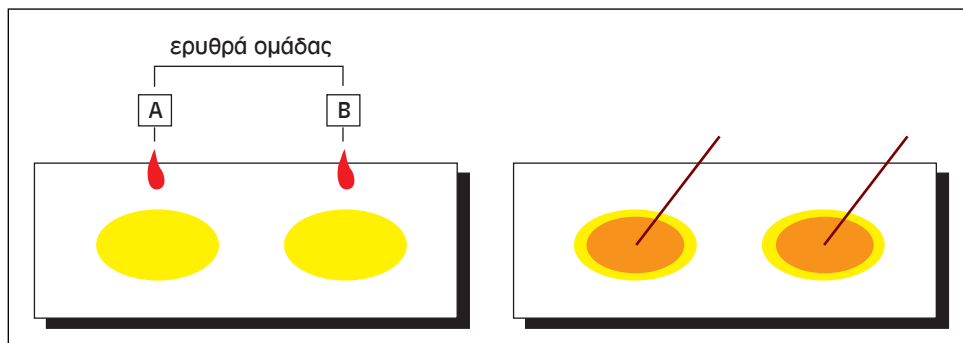
Οι αντικειμενοφόρες πλάκες πρέπει να είναι απολύτως καθαρές.

- 3.** Ανακινούμε τα εναιωρήματα μέχρι να γίνουν ομοιογενή.
- 4.** Προσθέτουμε από μία σταγόνα εναιωρήματος ομάδας Α και ομάδας Β, αντίστοιχα, στις ομάδες του δείγματος.
- 5.** Αναμειγνύουμε ανά δύο τις σταγόνες με διαφορετικό ξύλινο ραβδάκι ή πηλαστικό τριχοειδές.



Το μέσο ανάμειξης των αντιορών με το δείγμα πρέπει να είναι καθαρό και για κάθε ανάμειξη διαφορετικό.

- 6.** Ανασηκώνουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα και την ανακινούμε με κυκλικές κινήσεις. Η συγκόλληση εφόσον δημιουργηθεί θα γίνει ορατή με το σχηματισμό κροκίδων σε χρονικό διάστημα 2 λεπτών της ώρας.
- 7.** Επιβεβαιώνουμε τη συγκόλληση παρατηρώντας στο διαφανοσκόπιο.



Εικόνα 12.4: Προσδιορισμός αντισωμάτων του ορού αίματος ως προς ABO (ανάστροφη μέθοδος)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- α. Θετικό:** Έγινε συγκόλληση η οποία φαίνεται με το σχηματισμό κροκίδων.
- β. Αρνητικό:** Δεν έγινε συγκόλληση και γι' αυτό δεν σχηματίστηκαν κροκίδες.



ΠΡΟΣΟΧΗ ! Ισχύουν αυτά που τονίσαμε και στην άμεση μέθοδο:



Το επίπεδο των αντι- A και αντι- B αντισωμάτων είναι χαμηλότερο στα ηλικιωμένα άτομα.



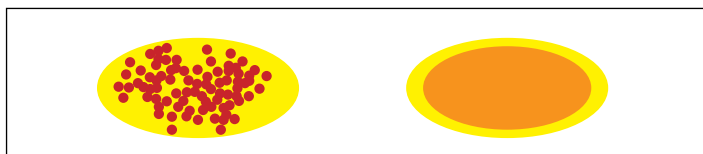
Τα αντισώματα του ορού αρχίζουν να παράγονται μετά τη γέννηση του ανθρώπου. Η παραγωγή τους αυξάνεται τα πρώτα 5 –6 χρόνια της ζωής και παραμένει στάσιμη σε όλη την υπόλοιπη ζωή.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

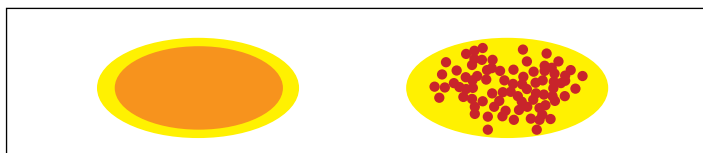
Η παρουσία αιμόλυσης ή συγκόλλησης είναι ενδεικτική της ύπαρξης του αντίστοιχου αντισώματος στον ορό ή το πλάσμα.

Υπάρχουν οι παρακάτω πιθανότητες:

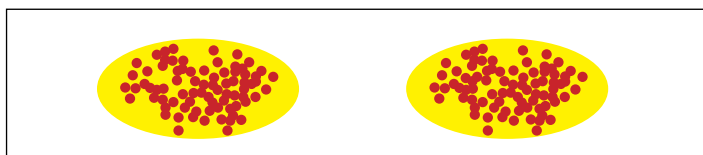
- ▶ Η συγκόλληση γίνεται μόνο στο δείγμα με τα αντιγονικώς γνωστά ερυθρά αιμοσφαίρια ομάδας A. Αυτό σημαίνει ότι στον ορό ή το πλάσμα υπάρχουν αντισώματα αντι - A. Άρα ο ορός προέρχεται από άτομο που ανήκει στην ομάδα αίματος B.



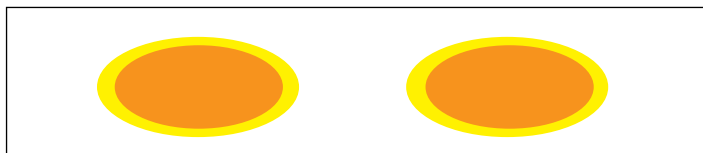
▶ Η συγκόλληση γίνεται μόνο στο μείγμα με τα αντιγονικώς γνωστά ερυθρά αιμοσφαίρια ομάδας B. Αυτό σημαίνει ότι στον ορό ή το πλάσμα υπάρχουν αντισώματα αντι – B. Άρα ο ορός προέρχεται από άτομο που ανήκει στην ομάδα αίματος A.



▶ Η συγκόλληση γίνεται και στα δύο μείγματα με τα αντιγονικώς γνωστά ερυθρά αιμοσφαίρια ομάδας A και B. Τούτο σημαίνει ότι στον ορό ή το πλάσμα υπάρχουν αντισώματα αντι – B και αντι – A. Άρα, ο ορός προέρχεται από άτομο που ανήκει στην ομάδα αίματος O.



▶ Η συγκόλληση δε γίνεται σε κανένα από τα μείγματα. Αυτό σημαίνει ότι στον ορό ή στο πλάσμα δεν υπάρχουν αντισώματα. Άρα, ο ορός προέρχεται από άτομο που ανήκει στην ομάδα αίματος AB.



12.5. Τεχνική προσδιορισμού των αντισωμάτων **Αντι – Α και Αντι – Β** στον ορό ή το πλάσμα. **Έμμεση τεχνική σε σωληνάριο**

Αν η τεχνική προσδιορισμού των αντιγόνων σε αντικειμενοφόρο πλάκα δε δώσει σαφή αποτελέσματα ή έχουμε λόγους να αμφιβάλλουμε για την αξιοπιστία τους, επαναλαμβάνουμε τον προσδιορισμό με την τεχνική σε δοκιμαστικό σωληνάριο.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αναζήτηση των συγκολλητινών (αντισώματα) με τη βοήθεια γνωστών αιμοσυγκολλητινογόνων (αντιγόνων) βασίζεται στο αξίωμα ότι υπάρχουν τα αντισώματα στον ορό ή το πλάσμα όταν δεν υπάρχουν τα αντίστοιχα αντιγόνα στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Όταν η ένωση αντιγόνου με το κατάλληλο αντίσωμα γίνει στον ορό, ακολουθεί αιμόλυση του ερυθροκυττάρου, επειδή στον ορό του αίματος υπάρχουν τα ένζυμα του συμπληρώματος.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε ορό ή πλάσμα.



Υπενθυμίζουμε:

Το δείγμα δεν πρέπει να είναι αιμολυμένο.

Ο προσδιορισμός των αντισωμάτων είναι προτιμότερο να γίνεται στον ορό, γιατί, μετά την πιθανή ένωση αντιγόνου - αντισώματος, τα ένζυμα του συμπληρώματος θα προκαλέσουν αιμόλυση των ερυθροκυττάρων. Η απουσία αντιπηκτικού ενεργοποιεί αποτελεσματικότερα το συμπλήρωμα.



Τα αντιπηκτικά EDTA και τα κατρικά άλατα παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Εναιώρημα 25% ερυθρών αιμοσφαιρίων ομάδας A
2. Εναιώρημα 25% ερυθρών αιμοσφαιρίων ομάδας B



Ισχύει η υπενθύμιση:

Τα εναιωρήματα των ερυθρών αιμοσφαιρίων δεν πρέπει να είναι πυκνότερα από όσο ορίζεται, γιατί η περίσσεια των ερυθρών θα ελαττώσει την ισχύ των αντιδραστηρίων.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ



φυγόκεντρος



γάντια



υαλογράφος



έδρανο στήριξης π्लाστικών σωληναρίων



δοκιμαστικά σωληνάρια αιμοηύσεως



σιφώνια Pasteur



ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε με υαλογράφο σε δύο δοκιμαστικά σωληνάρια αιμοηύσεως τα στοιχεία του εξεταζόμενου και από μία ένδειξη : Α ή Β.

2. Βάζουμε με σιφώνιο Pasteur μία σταγόνα από το εναιώρημα των γνωστών ερυθροκυττάρων ομάδας Α και Β στα σωληνάρια αντίστοιχα με την προσημειωμένη ένδειξη.

3. Προσθέτουμε και στα δύο σωληνάρια από μία σταγόνα ορό ή πλάσμα του εξεταζόμενου.



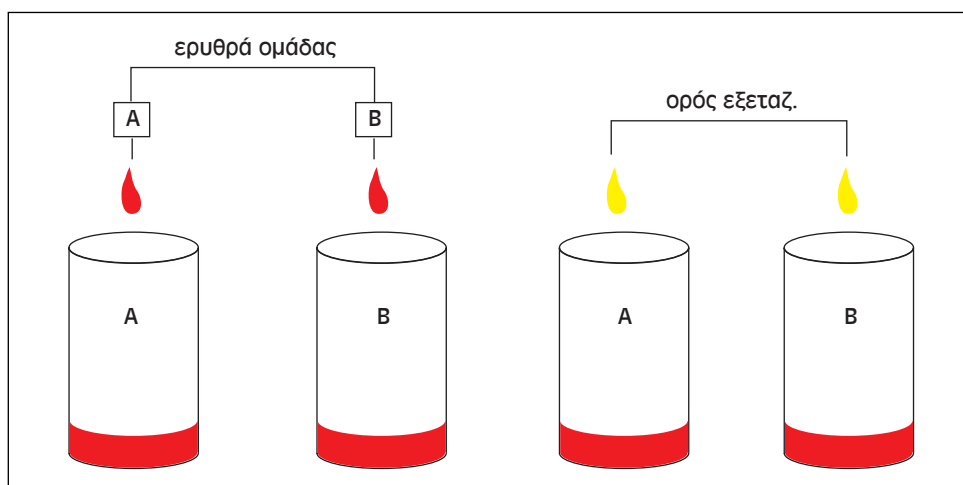
Οι μικροποσότητες των αντιορών και του δείγματος τοποθετούνται στη βάση των σωληναρίων για να μην κατακρητιθούν στα τοιχώματά τους.



Αν η σήμανση των αντιορών γίνει λανθασμένα ή δε βάλουμε καθόλου αντιορούς ή και εναιώρημα ερυθρών, τα αποτελέσματα που θα πάρουμε θα είναι ελλιπή και επικίνδυνα για τη ζωή του εξεταζόμενου.

4. Ανακινούμε με απαλές κινήσεις.

5. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές/λεπτό για 15 – 30 δευτερόλεπτα.
6. Ελέγχουμε μακροσκοπικά για τη δημιουργία ή μη αιμόλυσης.
7. Ανακινούμε το περιεχόμενο των σωληναρίων με απαλά χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης.
8. Παρατηρούμε αν δημιουργήθηκε ή όχι συγκόλληση.



Εικόνα 12.5 : Προσδιορισμός αντισωμάτων ορού αίματος ως προς ABO

Στην τεχνική προσδιορισμού των αντισωμάτων σε δοκιμαστικό σωληνάριο, εκτός από τη δημιουργία ή μη συγκόλλησης, έχουμε και τη δημιουργία ή μη αιμόλυσης.

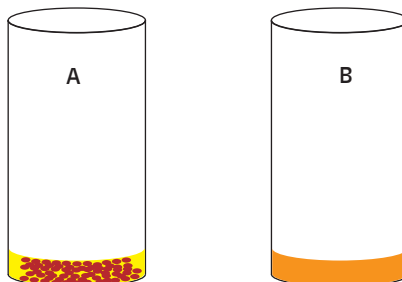
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- α. Θετικό:** α₁. Έγινε αιμόλυση των ερυθροκυττάρων η οποία φαίνεται με το ροδαλό χρώμα του υπερκείμενου υγρού μετά τη φυγοκέντρηση.
- α₂. Έγινε συγκόλληση η οποία φαίνεται με το σχηματισμό κροκίδων.
- β. Αρνητικό:** β₁. Δεν έγινε αιμόλυση, γι' αυτό και δεν άηλαξε το χρώμα του υπερκείμενου υγρού μετά τη φυγοκέντρηση
- β₂. Δεν έγινε συγκόλληση, γι' αυτό και δεν σχηματίστηκαν κροκίδες.

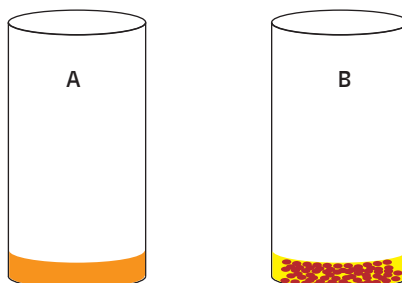
ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η παρουσία αιμόλυσης ή συγκόλλησης είναι ενδεικτική της ύπαρξης του αντίστοιχου αντισώματος στον ορό ή το πλάσμα.

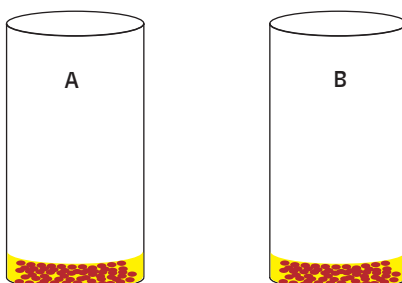
▶ Αν γίνει συγκόλληση μόνο στο μείγμα με τα αντιγονικώς γνωστά ερυθρά αιμοσφαίρια ομάδας A, σημαίνει ότι στον ορό ή το πλάσμα υπάρχουν αντισώματα αντι – B και ως ομάδα αίματος του εξεταζόμενου καθορίζεται η B.



▶ Αν γίνει συγκόλληση μόνο στο μείγμα με τα αντιγονικώς γνωστά ερυθρά αιμοσφαίρια ομάδας B, σημαίνει ότι στον ορό ή το πλάσμα υπάρχουν αντισώματα αντι – A και ως ομάδα αίματος του εξεταζόμενου καθορίζεται η A.

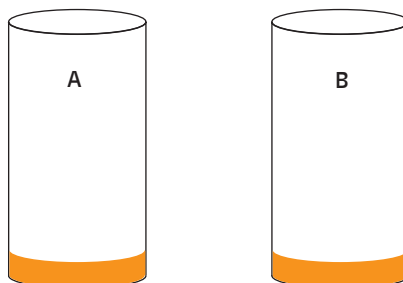


▶ Αν γίνει συγκόλληση και στα δύο μείγματα με τα αντιγονικώς γνωστά ερυθρά αιμοσφαίρια ομάδας A και B, σημαίνει ότι στον ορό ή το πλάσμα υπάρχουν



αντισώματα αντι – B και αντι – A και ως ομάδα αίματος του εξεταζόμενου καθορίζεται η O.

▶ Αν δε γίνει συγκόλληση σε κανένα από τα μείγματα, σημαίνει ότι στον ορό ή στο πλάσμα δεν υπάρχουν αντισώματα και ως ομάδα αίματος του εξεταζόμενου καθορίζεται η AB.



Υπάρχει περίπτωση να προκύψουν ασάφειες και δυσκολίες στον προσδιορισμό της ομάδας A. Αυτό συμβαίνει γιατί το αντιγόνο A μπορεί να καλύπτει πλήρως ή μερικώς τη βασική σειρά των σακχάρων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή. Έτσι μπορεί να υπάρχει η υποομάδα A_1 και A_2 .

Για τον προσδιορισμό του είδους της υποομάδας χρησιμοποιούνται ηλεκτίνες. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται η ηλεκτίνη από το εκχύλισμα του φασολιού *Dolichos biflorus*. Η ουσία αυτή συγκολλά τα ερυθροκύτταρα υποομάδας A_1 και δε συγκολλά τα ερυθροκύτταρα της υποομάδας A_2 . Έτσι γίνεται ο διαχωρισμός των διαφόρων τύπων αντιγόνου A (άμεση τεχνική).

Κατά την ανάστροφη μέθοδο στον ορό του εξεταζόμενου βάζουμε 2 σταγόνες ερυθροκυττάρων αντιγονικής σύστασης A_2 οι οποίες δε θα συγκολληθούν εφόσον πρόκειται για ορό αίματος υποομάδας A_2 .

Οι δοκιμασίες μπορούν να γίνουν τόσο σε αντικειμενοφόρο πλάκα όσο και σε σωληνάριο. Η πορεία των δοκιμασιών είναι η ίδια με την πορεία αναζήτησης των αντιγόνων A και B των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

ΟΜΑΔΕΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ABO									
ΟΜΑΔΑ	ΑΜΕΣΗ ΜΕΘΟΔΟΣ					ΑΝΑΣΤΡΟΦΗ ΜΕΘΟΔΟΣ			
	εξεταστέα ερυθρά				ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΕΡΥΘΡΩΝ	εξεταστέος ορός			
	αντι- A ₁	αντι- A	αντι- B	αντι- A, B		Γνωστά ερυθρά ομάδας A	Γνωστά ερυθρά ομάδας B	Γνωστά ερυθρά ομάδας 0	ΑΝΤΙ ΣΩΜΑΤΑ ΟΡΟΥ
A ₁	+	+	-	+	A ₁	-	+	-	αντι- B
A	-	+	-	+	A	-	+	-	αντι- B
B	-	-	+	+	B	+	-	-	αντι- A
AB	+	+	+	+	AB	-	-	-	κανένα
O	-	-	-	-	-	+	+	-	αντι-A, αντι- B

Πίνακας 12.2: Το χρώμα των αντιδραστηρίων του πίνακα είναι ίδιο με το χρώμα των αντιδραστηρίων ή της ετικέτας του φιαλιδίου των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο

Όπως είπαμε, οι προσδιορισμοί αυτοί γίνονται στο δείγμα του εθεθοντή αιμοδότη και στο δείγμα του ατόμου στο οποίο θα γίνει μετάγγιση αίματος (δέκτης) αληθιά και σε κάθε άτομο που θέλει και πρέπει να γνωρίζει την ομάδα αίματός του.

Για να μην αποβεί **μοιραία** μία μετάγγιση, τηρούνται πάντα οι εξής αρχές:

α. Ο δότης και ο δέκτης του αίματος **πρέπει να ανήκουν στην ίδια ομάδα αίματος.**

β. Το άτομο που έχει στον ορό του μία συγκεκριμένη ισοαιμοσυγκολλητίνη **πρέπει να μην πάρει** ερυθροκύτταρα που φέρουν στη μεμβράνη τους το αντίστοιχο αντιγόνο...

ΟΜΑΔΕΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ABO		ΠΑΙΡΝΟΥΝ ΑΙΜΑ ΑΠΟ	ΔΙΝΟΥΝ ΑΙΜΑ ΣΕ
I	A	A	A
II	B	B	B
III	AB	A, B, O	AB
IV	O	O	A, B, AB

Πίνακας 12.3: Δυνατότητες μεταγγίσεως

- **Μόνο σε δείγμα αίματος μπορεί να γίνει προσδιορισμός της ομάδας αίματος ενός ανθρώπου;**

Τα αντιγόνα του συστήματος ABO είναι διαδεδομένα στη φύση. Βρίσκονται στα ζώα, στα φυτά, στους μύκητες, στα βακτηρίδια. Στον ανθρώπινο οργανισμό, εκτός από τα ερυθροκύτταρα, βρίσκονται στη μεμβράνη όλων των κυττάρων. Επίσης βρίσκονται και στις εκκρίσεις (σάλιο, δάκρυα, σπέρμα κ.τ.λ.) πολλών ανθρώπων. Γι ' αυτό σε καταστάσεις φθοράς της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων ο προσδιορισμός γίνεται σε δείγμα σάλιου.

12.6. Αντιγόνα RHESUS



Να θυμηθούμε:

- **Τι είναι τα αντιγόνα του συστήματος Rhesus;**

Όπως και τα αντιγόνα του συστήματος ABO, είναι και αυτά προεξοχές της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων, διαφορετικής όμως στερεοχημικής δομής από αυτά του ABO. Οι κατασκευές που εντάσσονται στο σύστημα Rhesus βρίσκονται μόνο στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και όχι στις μεμβράνες άλλων κυττάρων.

- **Ποια αντιγόνα περιλαμβάνονται στο σύστημα Rhesus;**

Το αντιγονικό σύστημα Rhesus είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο και περιλαμβάνει περισσότερα από 40 αντιγόνα. Όμως τα πιο σημαντικά είναι έξι για τα οποία ο Γερμανός γιατρός Fisher διατύπωσε μια θεωρία για τον τρόπο με τον οποίο κληρονομούνται. Τα έξι αυτά αντιγόνα συμβολίζονται με τα γράμματα **D**, **d**, **C**, **c** (διαβάζεται «σε» μικρό), **E**, **e** (διαβάζεται «ε» μικρό) και είναι κατασκευές που «περιγράφονται» σε συγκεκριμένα γονίδια τα οποία έχουν τις αντίστοιχες πληροφορίες. Η πληροφορία για το αντιγόνο **d** δεν «εκφράζεται», δηλαδή δεν εκτελείται, ώστε να κατασκευαστεί τελικά η αντίστοιχη δομή **d** στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Οι **γονότυποι**, οι

οποίοι είναι το άθροισμα των πληροφοριών που έχουμε για μια κατασκευή στα δύο χρωμοσώματα κάθε ζεύγους, περιλαμβάνουν έξι πληροφορίες, **Dd** (ή **DD** ή **dd**), **Cc** (ή **CC** ή **Cc**), **Ee** (ή **EE** ή **Ee**). Οι **φαινότυποι** όμως, οι κατασκευές των οποίων τελικά φαίνονται (εκφράζονται) στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης είναι πέντε ποικιλίες, οι **D**, **C**, **E**, **c** και **e** και εμφανίζονται κατά ζεύγη, όπως καθορίζεται από τον γονότυπο, εκτός από το ζεύγος **Dd**, που θα εκφραστεί μόνο ως **D**.

- **Τι σημαίνει ότι κάποιος είναι RH(+) ή RH(-) ;**

Το σύμβολο Rh είναι συντομογραφία του Rhesus. Θεωρητικά, για να χαρακτηριστεί το σύστημα Rhesus ως αρνητικό πρέπει να απουσιάζει το D αλλιώς και το C και το E αντιγόνο που είναι οι ισχυρές μορφές. Το αντιγόνο D είναι όμως το ισχυρότερο από όλα, γι αυτό στην καθημερινή πράξη η παρουσία του στα ερυθροκύτταρα είναι ικανή να χαρακτηρίσει το άτομο **Rhesus θετικό (Rh+)**. Αυτό συμβαίνει στο 85% του πληθυσμού, ο οποίος έχει είτε τον γονότυπο **DD** είτε τον **Dd**. Το υπόλοιπο 15%, που δεν το έχει, θεωρείται **Rhesus αρνητικό (RH -)**. Αυτό σημαίνει ότι στον γονότυπό του έχει τις πληροφορίες **dd**, οι οποίες δεν εκφράζονται, δε γίνεται δηλαδή η αντίστοιχη κατασκευή.

- **Πώς βρίσκουμε τα αντιγόνα Rhesus;**

Η αναζήτησή τους γίνεται στη μεμβράνη των ερυθρών. Ο καθορισμός των ομάδων Rhesus γίνεται με τους αντιορούς, δηλαδή με αντισώματα που στρέφονται εναντίον του κάθε ενός από τα αντιγόνα που εκφράζονται στη μεμβράνη. Τέτοιοι είναι οι αντι - D, αντι - C, αντι - \bar{e} , αντι - E και αντι - \bar{e} . Δεν υπάρχει αντιορός d, αφού, όπως είπαμε, η γονιδιακή πληροφορία d υπάρχει αλλιώς δεν "εκφράζεται".

Πρακτικά, ο υποχρεωτικός έλεγχος για το χαρακτηρισμό του ατόμου αφορά την αναζήτηση της παρουσίας ή μη του D αντιγόνου.

Υπάρχει όμως περίπτωση το αντιγόνο D να εκφράζεται στη μεμβράνη, αλλιώς να μην ανιχνεύεται σε μεγάλη συχνό-

τητα. Έτσι, δε δίνει εύκολα συγκόλληση με το αντίστοιχο αντισώμα ή μπορεί να μη δώσει καθόλου συγκόλληση, δίνοντας ψευδώς αρνητική ταυτότητα. Αυτό το αντιγόνο D, το οποίο χρειάζεται ειδική επεξεργασία για να αποκαλυφθεί, ονομάζεται Du.

Τα αντισώματα Rhesus είναι πάντα επίκτητα. Δημιουργούνται στα άτομα που **δεν έχουν** κάποιο αντιγόνο του συστήματος – είναι δηλαδή **αρνητικά** ως προς αυτό και ευαισθητοποιούνται με το αντίστοιχο αντιγόνο.

Επειδή λοιπόν δεν υπάρχουν εξ αρχής στον ορό του αίματος των ανθρώπων συγκολλητίνες αντι - Rhesus, ο έλεγχος δεν περιλαμβάνει την ανάστροφη ή έμμεση δοκιμασία. Η αναζήτηση αντισωμάτων αντι - Rhesus γίνεται όταν υπάρχουν ενδείξεις ευαισθητοποίησης.

Η Διεθνής Εταιρεία Αιμοδοσίας (ISBT) προτείνοντας τροποποίηση στους συμβολισμούς των αντισωμάτων Rhesus, χρησιμοποιεί τα εξής σύμβολα:

- ▶ Για το αντιγόνο D το σύμβολο Rh1.
- ▶ Για το αντιγόνο C το σύμβολο Rh2.
- ▶ Για το αντιγόνο Du το σύμβολο RhW1.
- ▶ Για το αντιγόνο E το σύμβολο Rh3 κλπ.

12.7. Τεχνική προσδιορισμού αντιγόνου **D** των ερυθροκυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα

• Τι θέλουμε να βρούμε;

Θέλουμε να ελέγξουμε αν ένα άτομο έχει το αντιγόνο D στα ερυθρά του, αν δηλαδή είναι Rhesus θετικό.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε εναιώρημα 20 – 25% ερυθροκυττάρων.



Ισχύει ότι έχουμε πει και στο σύστημα ABO:

Τα εναιωρήματα των ερυθρών αιμοσφαιρίων δεν πρέπει να είναι πυκνότερα από όσο ορίζεται, γιατί η περίσσεια των ερυθρών θα ελαττώσει την ισχύ των αντιδραστηρίων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντι – D ορό: Είναι ειδικός ορός με αντισώματα που έχουν την ιδιότητα να συκολληθούν το αντιγόνο D των ερυθροκυττάρων.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- 🔧 διαφανοσκόπιο – 🔧 γάντια
- 🔧 ρεζοσκόπιο (37 – 40°C) 🔧 πηλαστικοποιημένο χαρτοσέντονο
- 🔧 αντικειμενοφόρος πλάκα
- 🔧 σιφώνιο Pasteur
- 🔧 ξύλινο ραβδάκι ή πηλαστικό τριχοειδές
- 🔧 ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια, τα ραβδάκια και τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Απλώνουμε ένα κομμάτι πηλαστικοποιημένο χαρτοσέντονο και συγκεντρώνουμε τα υλικά.

2. Τοποθετούμε μία σταγόνα αντι – D επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.



ΠΡΟΣΟΧΗ!

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες πρέπει να είναι απολύτως καθαρές.



Η θερμοκρασία αντίδρασης – ένωσης του D αντιγόνου με τον αντι– D πρέπει να είναι 37°C.

3. Προσθέτουμε μία σταγόνα από το δείγμα.



Ο όγκος του δείγματος πρέπει να είναι τόσος όσος και ο όγκος των αντιορών.

4. Αναμειγνύουμε τις δύο σταγόνες με ξύλινο ραβδάκι.



Το μέσο ανάμειξης πρέπει να είναι καθαρό.

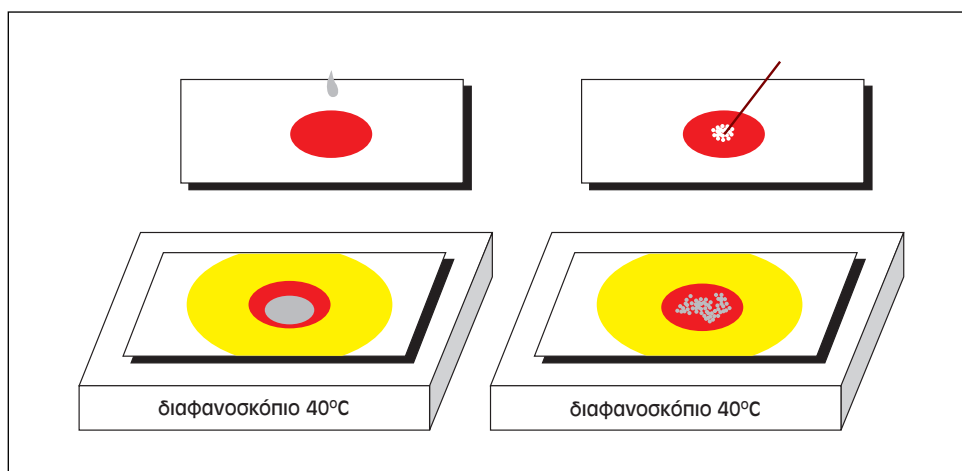
5. Ανασπώνουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα και ανακινούμε με κυκλικές κινήσεις. Η συγκόλληση εφόσον δημιουργηθεί, θα γίνει ορατή με το σχηματισμό κροκίδων σε χρονικό διάστημα 2 λεπτών της ώρας.



Υπενθυμίζουμε:

Αν καθυστερήσει η αξιολόγηση του αποτελέσματος, το αίμα θα στεγνώσει περιφερικά ή τα ερυθροκύτταρα θα διαταχθούν σε στήλες (φαινόμενο rouleaux). Και στις δύο αυτές περιπτώσεις δημιουργείται μία ψευδής εικόνα συγκόλλησης.

6. Επιβεβαιώνουμε τη συγκόλληση παρατηρώντας επάνω σε ρεζοσκόπιο θερμοκρασίας 37 – 40 °C.



Εικόνα 12.6 : Προσδιορισμός αντιγόνου D σε αντικειμενοφόρο πλάκα

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- α. Θετικό:** Έγινε συγκόλληση η οποία φαίνεται με το σχηματισμό κροκίδων.
- β. Αρνητικό:** Δεν έγινε συγκόλληση και γι 'αυτό δεν σχηματίστηκαν κροκίδες.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Αν υπάρχουν αμφιβολίες κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, θα γίνει επιβεβαίωση με την τεχνική σε δοκιμαστικό σωληνάριο.

Η δημιουργία συγκόλλησης σημαίνει ότι υπάρχει το αντιγόνο D στα ερυθροκύτταρα, οπότε το άτομο χαρακτηρίζεται ως **Rhesus θετικό (+)**.

Αν δε δημιουργηθεί συγκόλληση σημαίνει ότι:

α. Μπορεί να απουσιάζει το αντιγόνο D από τα ερυθροκύτταρα. Το άτομο είναι Rhesus αρνητικό (-)

β. Πρόκειται για αντιγόνο Du που δύσκολα αντιδρά με τον αντι ορό. **Επιβάλλεται λοιπόν να ακολουθήσει ειδική ανίχνευση του αντιγόνου Du.**

12.8. Τεχνική προσδιορισμού του αντιγόνου D των ερυθροκυττάρων σε δοκιμαστικό σωληνάριο

• Γιατί κάνουμε αυτή την τεχνική;

Γίνεται στην περίπτωση που έχουμε αμφιβολίες για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων κατά τον προσδιορισμό σε αντικειμενοφόρο πλάκα.











ΔΕΙΓΜΑ

Εναιώρημα 2 – 5% ερυθροκυττάρων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντι – D ορός: Είναι ειδικός ορός με αντισώματα που έχουν την ιδιότητα να συγκολληθούν το αντιγόνο D των ερυθροκυττάρων.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- | | |
|--|---|
|  φυγόκεντρος |  γάντια |
|  διαφανοσκόπιο |  υαλογράφος |
|  επιτραπέζιο χρονόμετρο |  δοκιμαστικά σωληνάρια αιμολύσεως |
| |  έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων |
| |  σιφώνια Pasteur |
| |  αντικειμενοφόρος πλάκα |
| |  ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10 |



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια και τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε με υαλογράφο τα στοιχεία του εξεταζόμενου και την ένδειξη D σε ένα δοκιμαστικό σωληνάριο αιμολύσεως.



Να μην ξεχνάμε την καθαριότητα των δοκιμαστικών σωληναρίων.

2. Βάζουμε με σιφώνιο Pasteur μία σταγόνα από τα συμπυκνωμένα ερυθρά στη βάση του σωληναρίου.



Να θυμηθούμε, όπως με τα σωληνάρια στο σύστημα ABO: Οι μικροποσότητες των αντιορών και του δείγματος τοποθετούνται στη βάση των σωληναρίων για να μην κατακρητιθούν στα τοιχώματά τους.

3. Προσθέτουμε μία σταγόνα αντι- D.



Προσοχή! Ημερομηνία λήξης, ποσότητα και ποιότητα αντιδραστηρίων.

4. Ανακινούμε με απαλές κινήσεις.

5. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές/λεπτό για 15 – 30 δευτερόλεπτα της ώρας.

6. Ανακινούμε το περιεχόμενο του σωληναρίου με απαλά χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης.

7. Παρατηρούμε μακροσκοπικά για τη δημιουργία ή μη συγκόλλησης.

Αν υπάρχει αμφιβολία:

α. Μεταφέρουμε με σιφώνιο Pasteur μία σταγόνα επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.



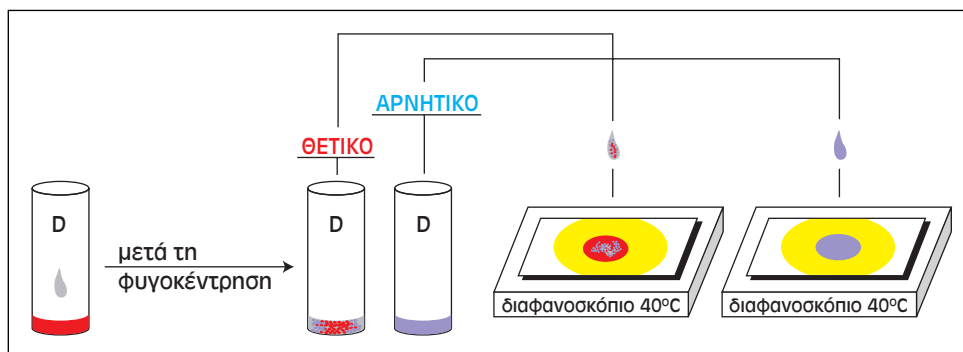
Μην ξεχνάμε την καθαριότητα των αντικειμενοφόρων πλακών.

β. Παρατηρούμε στο διαφανοσκόπιο θερμοκρασίας 40°C τη δημιουργία ή μη συγκόλλησης μέσα σε διάστημα 3 λεπτών της ώρας.



Υπενθυμίζουμε για το χρόνο αξιολόγησης

Αν καθυστερήσει η αξιολόγηση του αποτελέσματος, το αίμα θα στεγνώσει περιφερικά και θα θεωρηθεί ως συγκόλληση.



Εικόνα 12.7: Προσδιορισμός αντιγόνου D

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- α. ΘΕΤΙΚΟ:** Έγινε συγκόλληση η οποία φαίνεται με το σχηματισμό κροκίδων.
- β. Αρνητικό:** Δεν έγινε συγκόλληση και γι' αυτό δε σχηματίστηκαν κροκίδες.

Σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος θα ακολουθήσει οπωσδήποτε έλεγχος για το αντιγόνο Du. Η επιβεβαίωση αυτή έχει μεγάλη σημασία στις περιπτώσεις αιμοδοσίας.

Υπενθύμιση:

Ο έλεγχος για τον καθορισμό του αντιγόνου D του συστήματος Rhesus δε γίνεται στον ορό του εξεταζόμενου, επειδή στο σύστημα Rhesus δεν υπάρχουν φυσικά αντισώματα.

12.9. Τεχνική προσδιορισμού αντιγόνου Du των ερυθροκυττάρων σε δοκιμαστικό σωληνάριο

- **Πότε γίνεται η τεχνική αυτή;**

Η διαδικασία αυτή γίνεται στην περίπτωση που με τις προηγούμενες τεχνικές έχει διαπιστωθεί η απουσία του αντιγόνου D από τα ερυθροκύτταρα.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο αντισφαιρινικός ορός υποβιβάζεται το ασθενές αντιγόνο D να εκφραστεί και στη συνέχεια να συγκολληθεί με τον αντι – D ορό.

ΔΕΙΓΜΑ

Εναιώρημα 2 – 5% ερυθρών αιμοσφαιρίων του εξεταζόμενου σε NaCl 0.9%.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Τα εναιωρήματα των ερυθρών αιμοσφαιρίων δεν πρέπει να είναι πυκνότερα από όσο ορίζεται, γιατί η περίσσεια των ερυθρών θα ελαττώσει την ισχύ των αντιδραστηρίων. Το αίμα πρέπει να έχει ληφθεί το τελευταίο εικοσιτετράωρο και να μην είναι αιμολυμένο ούτε να έχει μικροθρόμβους.



ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ



επωαστικός κλίβανος



φυγόκεντρος



επιτραπέζιο χρονόμετρο



γάντια



υαλογράφος



έδρανο στήριξης



δοκιμαστικού σωληναρίου



δοκιμαστικό σωληνάριο



αιμοηύσεως



σιφώνια Pasteur



ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Αντι – D ορός

2. Φυσιοθολογικός ορός (NaCl 0.9%)

3. Αντισφαιρινικός ορός (πολυδύναμος): Είναι ορός που περιέχει αντισώματα εναντίον των σφαιρινών του ανθρώπου (αντισώματα αντι – IgG). Προέρχεται από τον ορό ευαισθητοποιημένου πειραματόζωου με IgG σφαιρίνη.

**ΠΡΟΣΟΧΗ!**

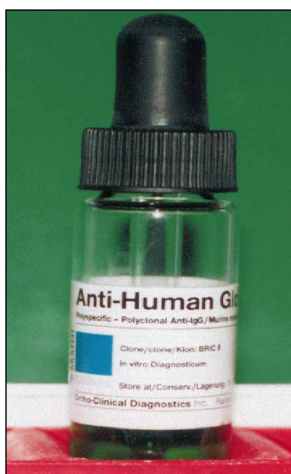
Η χρησιμοποίηση αντιορών μετά την ημερομηνία λήξης θα δώσει αναξιόπιστα και επικίνδυνα για τη ζωή του εξεταζόμενου αποτελέσματα.



Η ελλιπής επαναφορά της θερμοκρασίας των αντιορών θα καθυστερήσει την ένωση αντιγόνου – αντισώματος.



Η δραστηριότητα των αντιορών πρέπει να ελέγχεται με γνωστής ταυτότητας ερυθροκύτταρα για να μη γίνονται ασθενείς συγκολλήσεις με κίνδυνο να προβούμε σε λανθασμένη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 12.8: Αντισφαιρινικός ορός

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε τα στοιχεία του εξεταζόμενου και την ένδειξη Du σε δοκιμαστικό σωληνάριο αιμολύσεως.
2. Βάζουμε 2 σταγόνες του αντι- D.
3. Προσθέτουμε με σιφώνιο Pasteur 2 σταγόνες από το δείγμα.

**ΠΡΟΣΟΧΗ! Υπενθυμίζουμε:**

Ο όγκος του δείγματος πρέπει να είναι τόσος όσος και ο όγκος των αντιορών.



Οι μικροποσότητες των αντιορών και του δείγματος τοποθετούνται στη βάση των σωληναρίων για να μην κατακρατηθούν στα τοιχώματά τους.

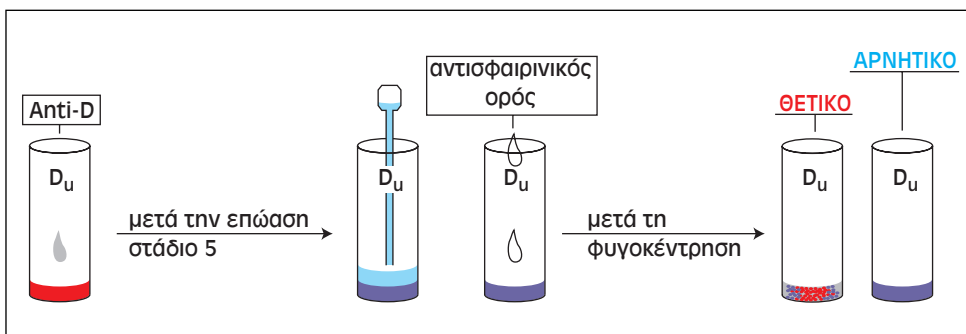
4. Ανακινούμε απαλά για να αναμειχθούν.
5. Τοποθετούμε το μείγμα σε επωαστικό κλίκανο και σε θερμοκρασία 37°C για 15 – 30 λεπτά της ώρας.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Η θερμοκρασία αντίδρασης – ένωσης του D_u αντιγόνου με τον αντι- D και τον αντισφαιρινικό ορό αντίστοιχα πρέπει να είναι 37°C.

6. Προσθέτουμε ίση ποσότητα NaCl για να “πλύνουμε” τρεις φορές τα ερυθροκύτταρα.
7. Βάζουμε 2 σταγόνες πολυδύναμου αντισφαιρινικού ορού.
8. Ανακινούμε απαλά.
9. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές/λεπτό για 15 δευτερόλεπτα της ώρας.
10. Παρατηρούμε μακροσκοπικά για τη δημιουργία ή μη συγκόλλησης.



Εικόνα 12.9 : Προσδιορισμός αντιγόνου D_u .

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- α. **Θετικό:** Έγινε συγκόλληση η οποία φαίνεται με το σχηματισμό κροκίδων.
Το δείγμα χαρακτηρίζεται ως Rhesus (+).
- β. **Αρνητικό:** Δεν έγινε συγκόλληση και γι' αυτό δε σχηματίστηκαν κροκίδες.
Το δείγμα χαρακτηρίζεται ως Rhesus (-).

Για μία συμβατή, ως προς το σύστημα Rhesus, μεταγγισιοθεραπεία δεν ξεκινά ότι:

1. Ο έλεγχος για την παρουσία του αντιγόνου D είναι υποχρεωτικός.
2. Σε πολυμεταγγιζόμενο άτομο και έγκυες γυναίκες γίνεται έλεγχος για την παρουσία και των άλλων αντιγόνων (C, E).
3. Σε άτομα Rh (+) θα μεταγγισθεί αίμα Rh (+) ατόμων.
4. Σε άτομα Rh (-) θα μεταγγισθεί αίμα Rh (-) ατόμων.
5. Άτομα Rh (-) και Du (+) χαρακτηρίζονται ως Rh (+) και δίνουν αίμα σε Rh (+).

12.10. Τεχνική ανίχνευσης του αντιγόνου K του συστήματος KELL

Το σύστημα ανακαλύφθηκε από τον Coombs και τους συνεργάτες του το 1946. Η ονομασία του συστήματος και των αντιγόνων δόθηκε από το όνομα της αρρώστου Kell και του αρρώστου Cellano στους οποίους πρωτοανιχνεύτηκε. Είναι ένα πολύπλοκο σύστημα που αντιπροσωπεύεται από τα αντιγονικά ζεύγη K (Kell) και k (Cellano). Μελέτες έδειξαν ότι άτομα C (-) είναι K (+) και αντίστροφα. Το αντιγόνο K είναι ισχυρότερο από το αντιγόνο D του συστήματος Rhesus, γι' αυτό αποφεύγεται η μετάγγιση Kell (+) σε άτομα Kell (-), δηλαδή ομοζυγώτες κκ.

Η ανίχνευση του αντιγόνου K γίνεται σε πολυμεταγγιζόμενα άτομα για την πρόληψη αιμολυτικών αντιδράσεων μετά τη μετάγγιση και σε νεογνά για την αιτιολόγηση της αιμολυτικής αναιμίας τους.

ΔΕΙΓΜΑ

Εναιώρημα 3 – 5% ερυθροκυττάρων σε NaCl



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Τα εναιωρήματα των ερυθρών αιμοσφαιρίων δεν πρέπει να είναι πυκνότερα από όσο ορίζεται γιατί η περίσσεια των ερυθρών θα ελαττώσει την ισχύ των αντιδραστηρίων.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- 🔧 επωαστικός κλίβανος
- 🔧 φυγόκεντρος
- 🔧 επιτραπέζιο χρονόμετρο
- 🔧 γάντια
- 🔧 υαλογράφος
- 🔧 δοκιμαστικά σωληνάρια αιμοηύσεως
- 🔧 έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- 🔧 σιφώνια Pasteur
- 🔧 ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Αντι – Kell
2. Φυσιολογικός ορός
3. Αντι – Human (αντισφαιρινικός ορός)



Εικόνα 12.10: Αντιδραστήριο Αντι-Kell



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Μην ξεχνάμε την ημερομηνία λήξης, τη θερμοκρασία και τον έλεγχο ισχύος των αντιδραστηρίων.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε με υαλογράφο τα στοιχεία του εξεταζόμενου και την ένδειξη K στο δοκιμαστικό σωληνάριο.
2. Βάζουμε 2 σταγόνες αντι- Kell.
3. Προσθέτουμε 2 σταγόνες από το δείγμα.

**Υπενθυμίζουμε:**

Ο όγκος του δείγματος πρέπει να είναι τόσος όσος και ο όγκος των αντιορών.



Οι μικροποσότητες των αντιορών και του δείγματος τοποθετούνται στη βάση των σωληναρίων για να μην κατακρατηθούν στα τοιχώματά τους.

4. Ανακινούμε ήπια για να αναμειχθούν.
5. Επωάζουμε σε θερμοκρασία 37°C για 15 λεπτά της ώρας.
6. Προσθέτουμε φυσιολογικό ορό για να "πλύνουμε" με τη γνωστή διαδικασία τρεις φορές τα ερυθροκύτταρα.
7. Βάζουμε δύο σταγόνες αντισφαιρινικό ορό (αντι - Human) στα "πλυμένα" πλέον ερυθροκύτταρα.
8. Ανακινούμε για να αναμειχθούν.
9. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές / λεπτό για 1 λεπτό.
10. Παρατηρούμε μακροσκοπικά για τη δημιουργία ή μη συγκόλλησης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- α. Θετικό:** Έγινε συγκόλληση η οποία φαίνεται με το σχηματισμό κροκίδων. Στα ερυθροκύτταρα υπάρχει το αντιγόνο K.
- β. Αρνητικό:** Δεν έγινε συγκόλληση και γι 'αυτό δεν σχηματίστηκαν κροκίδες.

Στο εργαστήριο της αιμοδοσίας όλοι οι προαναφερόμενοι προσδιορισμοί σε αντικειμενοφόρο πλάκα γίνονται επάνω σε μία πλάκα οπαλίνης η οποία είναι χωρισμένη σε τετράγωνα. Σε κάθε τετράγωνο, οριζόντια, γίνεται διαφορετικός προσδιορισμός στο ίδιο δείγμα.

Κάθετα αριστερά τοποθετείται δείγμα άηλου ατόμου και ακολουθούν οι ίδιοι προσδιορισμοί.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων η πλάκα τοποθετείται επάνω σε κατάλληλο φωτισμό (διαφανοσκόπιο). Μετά τη χρήση της πλένεται σχολαστικά και χρησιμοποιείται πάλι για άηλους προσδιορισμούς.

Σύγχρονες τεχνικές

Οι προσδιορισμοί των αντιγόνων και των αντισωμάτων του συστήματος ABO, των αντιγόνων του συστήματος Rhesus και των αντιγόνων του συστήματος Kell γίνονται και με νεότερες τεχνικές οι οποίες στηρίζονται στην ίδια αρχή. Ενδεικτικά αναφέρονται οι τεχνικές:

- ▶ σε gel
- ▶ οι αυτοματοποιημένες
- ▶ τα αυτόματα ή ημιαυτόματα συστήματα μικροπλάκων

Η επιλογή της εφαρμογής τους στα εργαστήρια γίνεται με κριτήρια αξιοπιστίας, ευαισθησίας, κόστους, ταχύτητας κτλ

Μεγάλη εφαρμογή βρίσκει η **τεχνική σε Gel**:

Μικροσωληνάκια με Sephadex Gel σε μορφή πλάκας, εμποτισμένα με τους κατάλληλους αντιορούς ή μη εμποτισμένα προσδιορίζουν με μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια αντιγόνα και αντισώματα του δείγματος.

Η αξιολόγηση γίνεται με σταυρούς (+) και δηλώνεται η παρουσία ή η απουσία ερυθροκυττάρων από τον πυθμένα των μικροσωληναρίων. Όταν απουσιάζουν τα ερυθροκύτταρα, είναι ένδειξη ότι υπάρχει το αντιγόνο ή το αντίσωμα που αναζητάμε και το αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται ως θετικό (+).


Α Ν Α Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ω Σ Η

Στις ενότητες αυτού του κεφαλαίου “φρεσκαρίστηκαν” οι απαραίτητες γνώσεις για τα αντιγόνα των ερυθροκυττάρων και τα αντισώματα του ορού του εξεταζόμενου.

Δόθηκαν στοιχεία για την επεξεργασία του δείγματος του εξεταζόμενου και οδηγίες για τον τρόπο χρήσης και συντήρησης των αντιδραστηρίων.

Έγινε περιγραφή των τεχνικών ανεύρεσης σε αντικειμενοφόρο πηλικά ή σε δοκιμαστικό σωληνάριο, των αντιγόνων A, B, D, Du και K, των αντιγονικών συστημάτων ABO, RHESUS και KELL.

Αναλύθηκαν οι τεχνικές επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων κατά τους αντιγονικούς προσδιορισμούς με την αναζήτηση της παρουσίας ή απουσίας των αντισωμάτων αντι – A και αντι – B του συστήματος ομάδων ABO.

Τα  επεσήμαναν τη σημασία καθαρότητας των σκευών, τη σωστή τοποθέτηση των αντιδραστηρίων, τις ιδιαιτερότητες του αντιγόνου D και του Du, τις πηλασματικές συγκολληήσεις, κ.λπ.

**Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:**

1. Μετατρέπουμε τους πηλαγιότιτλους σε ερωτηματικές προτάσεις και δίνουμε τις αντίστοιχες απαντήσεις. Όπως: ποια είναι η αρχή της μεθόδου; Τι δείγμα χρησιμοποιούμε; κ.ο.κ.
2. Απαντάμε σε όλες τις ερωτήσεις που ακολουθούν τους πηλαγιότιτλους και ορίζουν το θέμα που αναπτύσσεται στις παραγράφους.

Ας δούμε τι καταλάβαμε:

1. Τι δηλώνει η συντομογραφία B Rh(+);
2. Ένα απαντητικό δεητίο εργαστηρίου έγραψε:
Ομάδα αίματος AB Rh(+).

- α. Ποιες εργαστηριακές τεχνικές έδωσαν το αποτέλεσμα αυτό;
β. Ποια αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν για τους προσδιορισμούς;
γ. Σε τι δείγμα έγιναν οι προσδιορισμοί;
3. Ποιοι προσδιορισμοί έγιναν στο εργαστήριο και τι αποτελέσματα έδωσε ο κάθε προσδιορισμός, ώστε το εξεταζόμενο δείγμα να χαρακτηρίζεται ως ομάδα αίματος O Rh(+);
4. Ο προσδιορισμός του αντιγόνου D έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα.
α. Τι θα κάνουμε για να το επαληθεύσουμε;
β. Ποια αντιδραστήρια θα χρησιμοποιήσουμε για την επαλήθευση και σε τι θα μας χρησιμεύσει το κάθε ένα;
5. Με ποιο τρόπο οι παρακάτω παράγοντες επηρεάζουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων;
α. Το είδος του αντιπηκτικού
β. Η πυκνότητα του εναιωρήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων
γ. Η θερμοκρασία των αντιορών
δ. Ο όγκος και η ισχύς των αντιδραστηρίων
ε. Ο χρόνος αξιοθόγησης των αποτελεσμάτων
6. Ενώνουμε τη στήλη των στοιχείων που αναζητάμε, με τη στήλη του δείγματος το οποίο θα εξετάσουμε.
- | | |
|----------------------------|----------------------|
| 1. Αντιγόνο D _u | I. Εναιώρημα ερυθρών |
| 2. Αντίσωμα αντι – A | II. Ορός αίματος |
| 3. Αντιγόνο A | III. Ολικό αίμα |
| 4. Αντιγόνο D | |
| 5. Αντιγόνο K | |
| 6. Αντιγόνο B | |
| 7. Αντίσωμα αντι – B | |

7. Βάζουμε σε κύκλο τη σωστή απάντηση.

7.1. Η ανίχνευση του αντιγόνου D του συστήματος Rhesus γίνεται σε θερμοκρασία:

- α. 22°C
- β. 4°C
- γ. 40°C
- δ. 18°C

7.2. Για τον προσδιορισμό του αντιγόνου D_u χρησιμοποιούμε :

- α. αντι – D και αντι - D_u
- β. αντι – D και αντι - Human
- γ. αντι – D_u και αντι – Human

8. Για να μην αποβεί μοιραία μία μετάγγιση, τι προσέχουμε ως προς το σύστημα Rhesus;

9. Ποιες από τις παρακάτω προτάσεις είναι σωστές και ποιες λανθασμένες; Σημειώνουμε **Σ** για τις σωστές και **Λ** για τις λανθασμένες.

- | | Σ | Λ |
|--|--------------------------|--------------------------|
| α. Με την ανάστροφη μέθοδο ελέγχουμε τα αντιγόνα των ερυθρών στον ορό του αίματος χρησιμοποιώντας αντιορούς. | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| β. Με την ανάστροφη μέθοδο ελέγχουμε τα αντισώματα στον ορό του αίματος χρησιμοποιώντας γνωστά ερυθρά. | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| γ. Με την άμεση μέθοδο ελέγχουμε τα αντιγόνα των ερυθρών χρησιμοποιώντας αντιορούς. | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| δ. Με την άμεση μέθοδο ελέγχουμε τα αντισώματα στα ερυθρά αιμοσφαίρια χρησιμοποιώντας γνωστά ερυθρά. | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Ας εφαρμόσουμε αυτά που μάθαμε:

1. Κατά την άμεση τεχνική προσδιορισμού των αντιγόνων του συστήματος ABO παρατηρήθηκε συγκόλληση στο αίμα με τον αντι-A ορό και δεν παρατηρήθηκε συγκόλληση στο αίμα με τον αντι – AB ορό.

- α. Ποια τεχνικά σφάλματα προκάλεσαν αυτήν την ασυμφωνία;
- β. Τι θα κάνουμε για να διευκρινίσουμε ποιο είναι το σωστό αποτέλεσμα;

2. Έχετε αρκετή ποσότητα μόνο ορού του αίματος του εξεταζόμενου. Σας ζητείται να επαναλάβετε τον προσδιορισμό του αντιγόνου D.
 - α. Τι θα απαντήσετε;
 - β. Πώς θα δικαιολογήσετε την απάντησή σας;

Προτάση για περαιτέρω διερεύνηση:

1. Προσδιορίστε όλοι οι μαθητές της τάξης την ομάδα αίματός σας.
 - α. Σε τι συχνότητα συναντάται η κάθε ομάδα αίματος;
 - β. Από ποιο συμμαθητή σου μπορείς να πάρεις αίμα; Σε ποιον μπορείς να δώσεις;