

Από την Ανοσοηλεκτροφόρηση στην Ανοσοκαθήλωση και  
**Ανοσοαφαίρεση-Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρησης**  
(*immunosubtraction capillary electrophoresis (IS-CE)*)



Χρήστος Ντίνας  
Βιοχημικός-Κλινικός Χημικός  
Υπεύθυνος Εργαστηρίου Medisyn

## Εισαγωγή

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ήταν η κύρια μέθοδος ανίχνευσης της παρουσίας μονοκλωνικών παραπρωτεϊνών. Σήμερα η εφαρμογή της μεθόδου τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Capillary Electrophoresis, CE), λόγω της καλύτερης διαχωριστικής της ικανότητας και της αυτοματοποιημένης τεχνικής, σταδιακά φαίνεται να επιλέγεται από πολλά εργαστήρια σαν μέθοδος ρουτίνας.

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση είναι μια διαχωριστική τεχνική υψηλής απόδοσης, στην οποία η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται σε στενούς τριχοειδείς σωλήνες, μικρής εσωτερικής διαμέτρου, οι οποίοι έχουν πληρωθεί με ρυθμιστικό διάλυμα και

πραγματοποιείται διαχωρισμός τόσο μικρών όσο και μεγάλων μορίων. Ο διαχωρισμός αυτός διευκολύνεται από τη χρήση υψηλών τάσεων, οι οποίες δημιουργούν ηλεκτροσωματική ροή και ηλεκτροφορητική ροή των ρυθμιστικών διαλυμάτων και των φορτισμένων συστατικών, αντίστοιχα, μέσα στον τριχοειδή σωλήνα. Η χρήση των υψηλών ηλεκτρικών πεδίων οδηγεί σε σύντομους χρόνους ανάλυσης, υψηλή απόδοση και αποτελεσματικό διαχωρισμό.

Απαιτείται ελάχιστος όγκος δείγματος, ενώ η δυνατότητα ανίχνευσης επάνω στη στήλη (on-column) καθώς και το δυναμικό της τεχνικής για ποσοτική ανάλυση και αυτοματοποίηση την καθιστούν μια διαχωριστική τεχνική υψηλών προδιαγραφών.

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση έχει ευαισθησία και ειδικότητα 95% και 99%, αντίστοιχα, σε αντίθεση με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, η οποία είχε ευαισθησία και ειδικότητα 91% και 99%, αντίστοιχα.

Με βάση την αρχή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, αναπτύχθηκε το 1977 από τον Aguzzi και Roggi η Ανοσοαφαίρεση – Immunosubtraction Capillary Electrophoresis (IS-CE) ως εναλλακτική μέθοδος της ανοσοκαθήλωσης.

---

### *Διαφοροποίηση και ταυτοποίηση των μονοκλωνικών παραπρωτεϊνών*

---

Η διαφοροποίηση και ταυτοποίηση των μονοκλωνικών παραπρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση μονοδύναμων πολυκλωνικών αντιορών, με τις τεχνικές της ανοσοηλεκτροφόρησης, της ανοσοκαθήλωσης (IF) και της ανοσοαφαίρεσης – τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης.

Η **ανοσοηλεκτροφόρηση** είναι η πρώτη μέθοδος εφαρμογής για τη διαφοροποίηση και ταυτοποίηση των μονοκλωνικών παραπρωτεϊνών, η οποία είναι εύκολη από τεχνικής άποψης και λιγότερο δαπανηρή από την ανοσοκαθήλωση. Η ανοσοηλεκτροφόρηση είναι ποιοτική μέθοδος και αποτελεί συνδυασμό ηλεκτροφόρησης και ανοσοδιάχυσης. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με τα φορτία τους σε πήκτωμα (γέλη) αγαρόζης. Στη συνέχεια γίνεται ταυτοποίηση των πρωτεϊνών μέσω ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιώντας ειδικούς αντιορούς μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση της παρουσίας μονοκλωνικής πρωτεΐνης και ο καθορισμός του τύπου των ελαφρών και βαριών αλυσίδων.

Η **ανοσοκαθήλωση (IF)** αποτελεί εξέλιξη της ανοσοηλεκτροφόρησης και υπερτερεί αυτής σε πολλά σημεία. Είναι 50 φορές πιο ευαίσθητη σε σχέση με την ανοσοηλεκτροφόρηση. Η ανοσοκαθήλωση περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1964, τροποποιήθηκε το 1969 και έκτοτε εφαρμόζεται ευρέως για την έρευνα και τη

διάγνωση των μονοκλωνικών παραπρωτεϊνών. Πρόκειται για μια απλή τεχνική, πρακτική, αξιόπιστη, με απλότητα ερμηνείας των αποτελεσμάτων και γι αυτό, στις περισσότερες περιπτώσεις, είναι η τεχνική επιλογή για τη διάγνωση των γαμμασφαιρινοπαθειών. Η ανοσοκαθήλωση έχει αντικαταστήσει πλήρως τη μέθοδο της ανοσοηλεκτροφόρησης, σαν μέθοδο ρουτίνας, σε όλα τα εργαστήρια. Πολλές φορές μάλιστα παρατηρείται να συνεχίζει να ζητείται, από συνήθεια, η ανοσοηλεκτροφόρηση αντί της ανοσοκαθήλωσης.

## *Η Ανοσοαφαίρεση – Immunosubtraction Capillary Electrophoresis (IS-CE)*

### **Αρχή της μεθόδου:**

Οι πρωτεΐνες ορού, σε ελεύθερο διάλυμα, διαχωρίζονται σε τριχοειδή διοξειδίου του πυριτίου με βάση την ηλεκτροφορητική κινητικότητα τους και την ηλεκτροοσμωτική ροή σε υψηλή τάση σε ένα αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα. Οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται άμεσα κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης με απορρόφηση UV.

Οι πρωτεΐνες ορού αναμειγνύονται με ειδικούς αντιορούς που κατευθύνονται έναντι: IgG, IgA, IgM και κ, λ αλυσίδων.

Οι ανοσοσφαιρίνες αντιδρούν ειδικά με τους αντίστοιχους αντιορούς τους. Στο τέλος της ανάλυσης, κάθε πρότυπο αντιορού, IgG, IgA, IgM, κ και λ αυτόματα επικαλύπτεται με το ηλεκτροφορογράμμα των πρωτεϊνών.

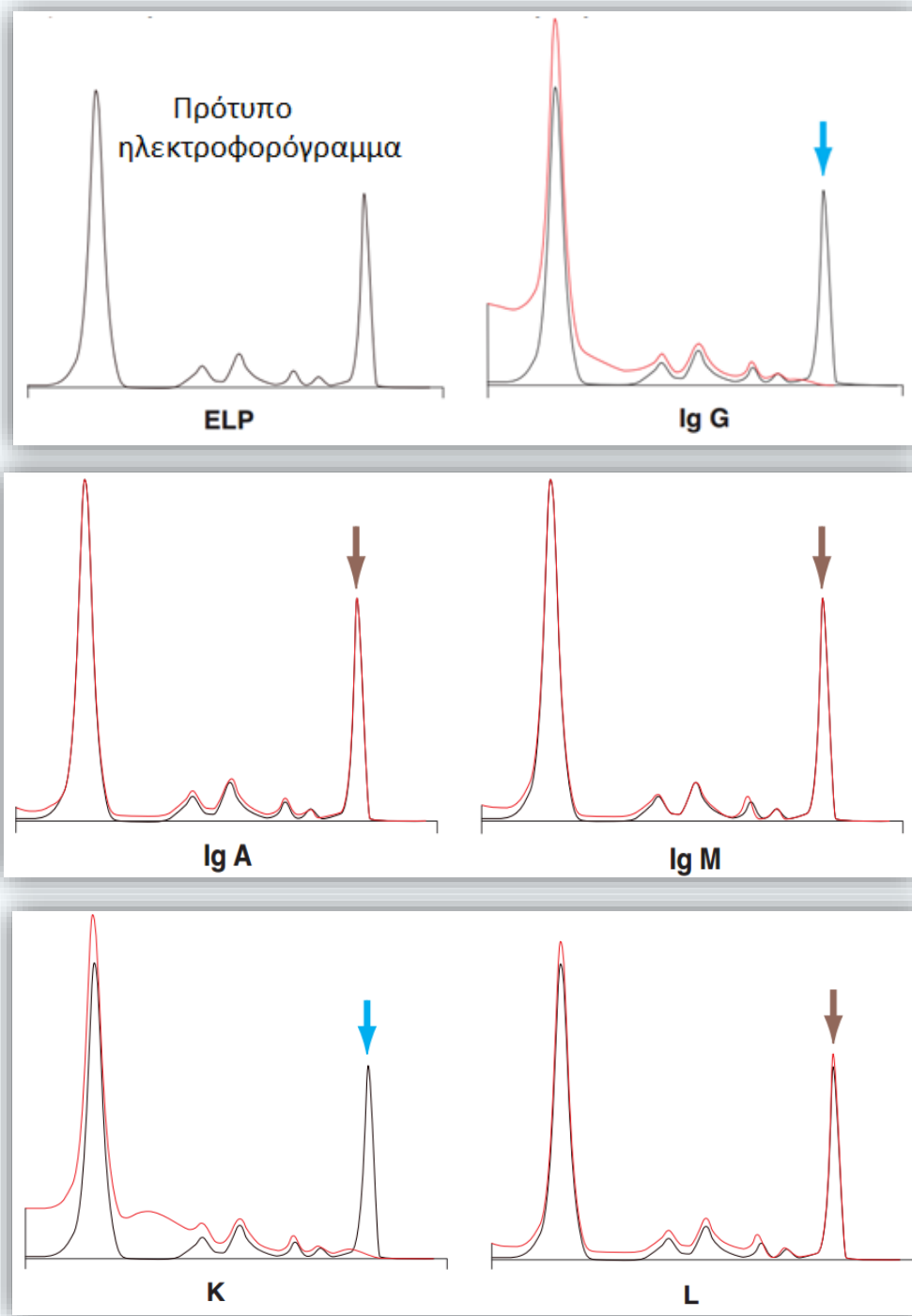
Η εξαφάνιση (αφαίρεση) της παραπρωτεΐνης στον επεξεργασμένο πρότυπο αντιορό υποδεικνύει την παρουσία μονοκλωνικής πρωτεΐνης. Σε αντίθετη περίπτωση, η μορφή του ηλεκτροφορογράμματος θα παραμείνει αμετάβλητη (βλέπε ηλεκτροφορογράμματα).

Όλα τα στάδια της διαδικασίας είναι πλήρως αυτοματοποιημένα. Το ποιοτικό προφίλ των πρωτεϊνών αποδίδεται στην οθόνη του υπολογιστή του αναλυτικού συστήματος για την ερμηνεία του αποτελέσματος.

Το κύριο πλεονέκτημα εφαρμογής της μεθόδου της ανοσοαφαίρεσης είναι η αντικατάσταση της χειροκίνητης (manual) μεθόδου, για την τυποποίηση των πρωτεϊνών του ορού, με πλήρως αυτοματοποιημένη ανάλυση και ανίχνευση των παραπρωτεϊνών. Εκτός αυτού η τεχνολογία αυτή είναι χρήσιμη για την ερμηνεία αμφίβολων αποτελεσμάτων που είναι δύσκολο να ερμηνευθούν με τη συμβατική τεχνολογία.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η μέθοδος της ανοσοαφαίρεσης έχει καλή συσχέτιση με την ανοσοκαθήλωση (IF) για την ανίχνευση και την τυποποίηση των μονοκλωνικών πρωτεϊνών και η παράλληλη εφαρμογή τους είναι χρήσιμο εργαλείο για την επίλυση μεθοδολογικών προβλημάτων και των δύο μεθόδων.

### Παράδειγμα ανίχνευσης παραπρωτεΐνης IgG, κ



Μειωμένη παραπρωτεΐνη (αφαίρεση) – ένδειξη παραπρωτεΐνης  
Δεν παρατηρείται αφαίρεση – μη ένδειξη παραπρωτεΐνης

*Προβλήματα αξιολόγησης των αποτελεσμάτων της  
Ανοσοηλεκτροφόρησης, Ανοσοκαθήλωσης και της  
Ανοσοαφαίρεσης.*



- ❖ Η ανοσοηλεκτροφόρηση αδυνατεί να ανιχνεύσει και να ταυτοποιήσει πρωτεΐνες που δεν είναι ανοσοσφαιρίνες, ενώ αυτό δεν συμβαίνει με την τεχνική της ανοσοκαθήλωσης και της ανοσοαφαίρεσης.
- ❖ Η ανοσοηλεκτροφόρηση αδυνατεί να διαφοροποιήσει ανοσοσυμπλέγματα από μονοκλωνικές ανοσοσφαιρίνες. Η κατάσταση μπορεί να βελτιωθεί, αν μέρος του ανοσοσυμπλέγματος είναι ρευματοειδής παράγοντας και το δείγμα υποστεί επεξεργασία με μερκαπτοαιθανόλη. Όταν μέρος του ανοσοσυμπλέγματος είναι μονοκλωνικός ρευματοειδής παράγοντας, το ανοσοσύμπλεγμα μπορεί να δώσει θετική αντίδραση με όλους τους αντιορούς. Το πρόβλημα αυτό δεν υπάρχει με την τεχνική της ανοσοκαθήλωσης και της ανοσοαφαίρεσης.
- ❖ Όταν η συγκέντρωση των μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών είναι πολύ χαμηλή ή αυτές είναι πολυμερείς IgA ή IgM, η ανίχνευσή τους γίνεται με την ανοσοκαθήλωση και την ανοσοαφαίρεση, ενώ η ανοσοηλεκτροφόρηση αδυνατεί να τις ανιχνεύσει.
- ❖ Η ανοσοκαθήλωση έχει πολλά βήματα εφαρμογής και αυτό είναι ένα από τα μειονεκτήματα της – πρώτα τοποθετούνται οι αντιοροί με τη βοήθεια ειδικού εναποθέτη ευθέως επάνω στην περιορισμένη περιοχή όπου πραγματοποιήθηκε ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών του δείγματος. Στη συνέχεια ακολουθεί το ξέπλυμα της περίσσιας των πρωτεϊνών.

Μετά ακολουθεί η χρώση – αποχρωματισμός και τέλος η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Η ανοσοαφαίρεση – Capillary electrophoresis είναι τεχνικά απλούστερη και πιο αυτοματοποιημένη από την ανοσοκαθήλωση.

- ❖ Ένα άλλο πρόβλημα της ανοσοκαθήλωσης είναι το εύρος της άριστης σχέσης αντιγόνου (αραίωση ορού) προς αντίσωμα (αντιορών) – καμπύλη ισοδυναμίας Heidelberger. Όταν αυτή η σχέση δεν είναι η άριστη (100-200 mg πρωτεΐνες) στην τεχνική της ανοσοκαθήλωσης μπορεί να παρατηρηθεί το φαινόμενο της προζώνης. Η ανοσοαφαίρεση – Capillary electrophoresis δεν φαίνεται να επηρεάζεται τόσο από αυτό το φαινόμενο.

- ❖ Με τη μέθοδο της ανοσοκαθήλωσης όταν υπάρχει μονοκλωνική κ-ελαφρά αλυσίδα, η αντίδραση με το μονοδύναμο αντι-κ είναι σαφής. Αντίθετα, αν υπάρχει λ-αλυσίδα, επειδή αυτή έχει ασταθή αντιγονική ιδιότητα, δεν ανιχνεύεται πάντα από τον ειδικό αντιορό. Έτσι σε περιπτώσεις μονοκλωνικής IgA-λ, ενώ ο αντιορός κατά της βαριάς IgA αλυσίδας σχηματίζει ένα ευρύ μονοκλωνικό έπαρμα, η ελαφρά λ-αλυσίδα δεν αντιδρά. Με τη μέθοδο της ανοσοαφαίρεσης – Capillary electrophoresis δεν παρατηρείται αυτό το πρόβλημα.



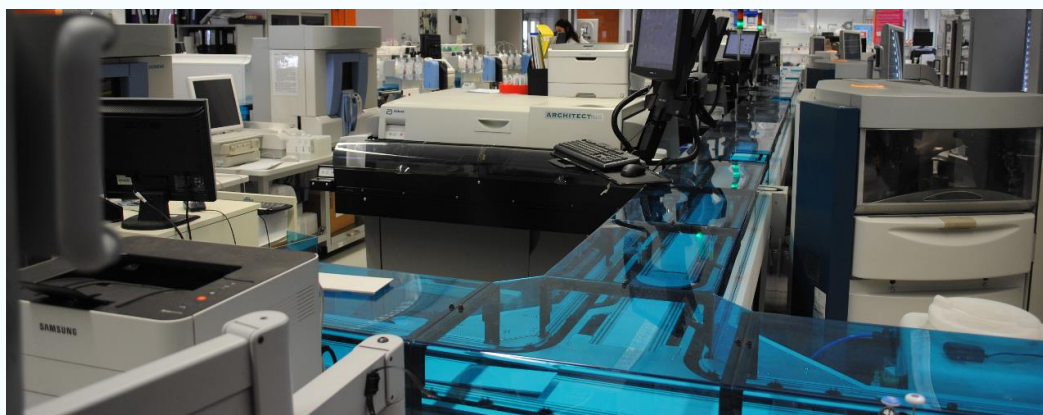
- ❖ Σε περίπτωση μονοκλωνικών γαμμασφαιρινοπαθειών της τάξης των IgM, κ-ελαφράς αλυσίδας, μπορεί το μονοκλωνικό έπαρμα να υπερκαλυφθεί από τις IgG ή και τις IgA και να μην ανιχνευθεί με την ανοσοκαθήλωση, παρά μόνο αν γίνει επεξεργασία του ορού με μερκαπτοαιθανόλη. Με την ανοσοαφαίρεση – Capillary electrophoresis δεν φαίνεται να έχουμε αυτό το πρόβλημα.
- ❖ Επειδή οι αντιγονικοί καθοριστές των μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών είναι στενά περιορισμένοι (ιδιαίτερα σε περιπτώσεις μονοκλωνικών IgM και IgA), οι ειδικοί μονοδύναμοι πολυκλωνικοί αντιοροί μπορεί να μην εντοπίσουν και να μην αναγνωρίσουν οπωσδήποτε το αντιγόνο και έτσι να προκύψουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με τη μέθοδο της ανοσοκαθήλωσης. Στην ανοσοαφαίρεση – Capillary electrophoresis δεν παρατηρείται αυτό το φαινόμενο.

- ❖ Με την ανοσοαφαίρεση, στην πράξη, υπάρχει δυσκολία στην ερμηνεία του προτύπου της IS-CE μικρών IgG ζωνών σε ένα πολυκλωνικό προφίλ σε σχέση με την IF επειδή η πολύκλωνη IgG στη γ περιοχή επίσης αφαιρείται από το αντίσωμα αντι-IgG όταν χρησιμοποιείται η ανοσοαφαίρεση. Η μεγάλη εμπειρία του εργαστηρίου, σε αυτή την περίπτωση είναι ουσιαστική.

Η ανοσοαφαίρεση φαίνεται σταδιακά να προτιμάται σαν μέθοδος ρουτίνας από πολλά εργαστήρια. Στην Ελλάδα ήδη εφαρμόζεται: Γ. Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Πειραιά «ΜΕΤΑΞΑ», Γ.Ν. Νίκαιας «ΑΓ. Παντελεήμων», Γ.Ν. Αθηνών «Λαϊκό», Γ.Ν. Θεσ/νίκης «Ιπποκράτειο», Γ.Ν. Θεσ/νίκης «Παπαγεωργίου», Γ.Ν. Θεσ/νίκης «ΑΧΕΠΑ», Γ.Ν. Θεσ/νίκης «Παπανικολάου», Πανεπιστημιακό Γ.Ν. Ιωαννίνων, Γ.Ν. Καβάλας.

Το εργαστήριο Medisyn μετά από πολύμηνη παράλληλη μελέτη των δύο μεθοδολογιών κατέληξε στο συμπέρασμα ότι, **η ανοσοαφαίρεση – Capillary electrophoresis είναι μια χρήσιμη μέθοδος για την ανίχνευση των παραπρωτεϊνών και μια καλή εναλλακτική λύση έναντι της IF.**

Λόγω όμως των παραπάνω επισημάνσεων θα διατηρηθεί η μέθοδος της ανοσοκαθήλωσης για την ανίχνευση και τυποποίηση των παραπρωτεϊνών στα ούρα, καθώς και σαν επιβεβαιωτική, παράλληλη, μέθοδο στην τυποποίηση των παραπρωτεϊνών στο ορό, όταν κρίνεται απαραίτητο από το εργαστήριο Medisyn.



Συνεταιρισμός Εργαστηριακών Ιατρών

**MEDISYN**

Προηγμένες **Ιατρικές** Υπηρεσίες & Εφαρμογές