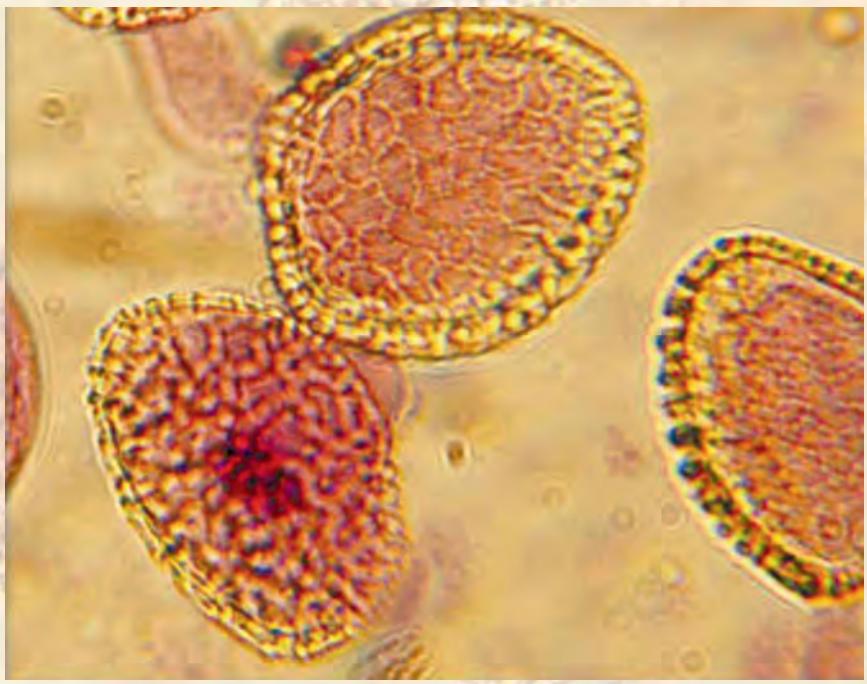
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ

Φωτεινή Γερανιωτάκη Γεώργιος Μπόλλας Νικόλαος Σοφούλης

Αιματολογία
Αιμοδοσία ΙΙ

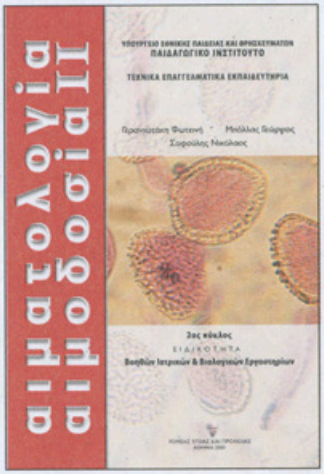


2ος ΚΥΚΛΟΣ
Ειδικότητα: Βοηθών Ιατρικών & Βιολογικών Εργαστηρίων

ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ
«ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ»

αιματολογία
αιμοδοσία II



Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί ειδικά για το βιβλίο Αιματολογία-Αιμοδοσία ΙΙ από τη συγγραφική ομάδα.

Η δημιουργία σχημάτων, σκίτσων και εικόνων έγινε ειδικά για το βιβλίο από τη Στέλα Βαλάση, σπουδάστρια μουσικών σπουδών, Εθνικού Ωδείου, τον Παναγιώτη Βαλάση μαθητή Λυκείου και το Χρήστο Γιοράν φοιτητή του χημικού τμήματος του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τα σκίτσα για την εισαγωγή των ενοτήτων έγιναν από το Φίλιππο Παπανικολάου, Τεχνολόγο ιατρικών εργαστηρίων, φοιτητής Βιολογικού τμήματος Πανεπιστημίου Αθηνών.

Με απόφαση της ελληνικής κυβέρνησης τα διδακτικά βιβλία του Δημοτικού, του Γυμνασίου, του Λυκείου και των Τ.Ε.Ε, τυπώνονται από τον Οργανισμό Εκδόσεως Διδακτικών Βιβλίων και διανέμονται δωρεάν.

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ

ΤΕΧΝΙΚΑ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΗΡΙΑ

Γερανιωτάκη Φωτεινή Μπόλλας Γιώργιος Σοφούλης Νικόλαος

αιματολογία αιμοδοσία II

2ος κύκλος

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

ΒΟΗΘΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΕΚΔΟΣΕΩΣ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ
ΑΘΗΝΑ

ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΗ ΟΜΑΔΑ

Γερανιωτάκη Φωτεινή, *Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων, εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης*

Μπόλλας Γεώργιος, *Αιματολόγος*

Σοφούλης Νικόλαος, *Παθολόγος*

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΚΡΙΣΗΣ

Αγγελάκας Ιωάννης, *Αγγειοχειρούργος, Δ/ντής Αγγειοχειρουργικής κλινικής 401 Στρατιωτικού Νοσοκομείου*

Μπίμπα Βασιλική, *Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων, εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης*

Pizou Ευαγγελία, *Μικροβιολόγος, εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης*

ΣΥΝΤΟΝΙΣΤΗΣ

Κοτονιάς Γεώργιος, *Τεχνολόγος τροφίμων, εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης*

ΓΛΩΣΣΙΚΗ ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ

Γραμματικάκη Μαρία, *Φιλόλογος, εκπαιδευτικός Δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης*

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Καβαλλάρη Παναγιώτα, *εκπαιδευτικός Πρωτοβάθμιας εκπαίδευσης*

ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ
ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΤΟΥ ΤΟΜΕΑ
«ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ»
Ματίνα Στάππα, *Οδοντίατρος,*
Πάρεδρος Ε.Θ. του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος .....

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΑΝΑΙΜΙΕΣ

1.1. Γενικά 14
1.2 Διάκριση Αναιμιών 16
1.2.1 Αναιμίες οφειλόμενες κυρίως σε μείωση της παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων 17
1.2.2 Αναιμίες που οφείλονται σε αυξημένη καταστροφή ερυθρών 21
1.2.3 Μεθαιμορραγικές αναιμίες 25
1.3 Θαλασσαιμίες 25
1.3.1 Θαλασσαιμία α 26
1.3.2 Μεσογειακή αναιμία (θαλασσαιμία β) 27
1.4 Αιμοσφαιρινοπάθεια S 29
1.5 Πρόληψη και αντιμετώπιση των κληρονομικών αναιμιών 31
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 33
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ 34

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

2.1 Αιμόσταση και μηχανισμοί (Αγγειακός – Αιμοπεταλιακός) 36
2.1.1 Πρωτογενής αιμόσταση 36
2.1.2 Δευτερογενής αιμόσταση 37
2.2 Μηχανισμός της πήξης του αίματος 38
2.3 Ταξινόμηση των αιμορραγικών καταστάσεων και νόσων 40
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 41
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ 41

Β. ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΣΥΣΤΗΜΑ ΟΜΑΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΒΟ

3.1 Ερυθροκυτταρικά αντιγόνα 46
3.1.1 Γενικά 46
3.1.2 Αντιγόνα του συστήματος ΑΒΟ 47
3.1.3 Υποομάδες αντιγόνου Α 49
3.2 Κληρονομικότητα των αντιγόνων ΑΒΟ 50
3.3 Ουσίες που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα ΑΒΟ φυτικής ή ζωικής προέλευσης 51
3.4 Κατανομή των αντιγόνων ΑΒΟ στην Ελλάδα 52
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 53
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ 54

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

4.1 Συγκολλητίνες 56
4.2 Η αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος 58
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 63
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ 64

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΣΥΣΤΗΜΑ RHESUS

5.1 Ιστορία 66
5.2 Αντιγόνα του συστήματος RHESUS 67
5.3 Αντιγόνο D_u 67
5.4 Κληρονομικότητα 68
5.5 Παραλλαγές των αντιγόνων 70
5.6 Αντι- RHESUS αντισώματα 70
5.6.1 Μηχανισμοί ευαισθητοποίησης 70
5.6.2 Ιδιότητες των αντισωμάτων του συστήματος RHESUS 71
5.7 Άλλα αντιγονικά συστήματα 72
5.7.1 Σύστημα Kell 72
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 73
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ 74

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ

6.1 Γενικά 76
6.2 Ενδείξεις για μετάγγιση 76
6.3 Ενδείξεις για μετάγγιση παραγώγων αίματος 77
6.4 Ατυχή συμβάματα (επιπλοκές) από μετάγγιση αίματος 80
6.5 Μετάδοση νοσημάτων από μετάγγιση αίματος ...81
6.6 Μόλυνση του προς μετάγγιση αίματος 82
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 83
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ 84

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 – ΤΜΗΜΑ ΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

7.1 Τι πρέπει να έχει υπόψη του ο εργαζόμενος στο τμήμα συμβατότητας 86
7.2 Διαδικασία για τη μετάγγιση 86
7.2.1 Έντυπο δελτίο αίτησης αίματος 88
7.2.2 Δείγμα αίματος (Rhesus) του ασθενούς (δέκτη) 88
7.2.3 Ομάδα αίματος (Rhesus) του ασθενούς ...88
7.2.4 Επιλογή αίματος για τη μετάγγιση 90
7.2.5 Διασταύρωση 91
7.3 Μετάγγιση αίματος σε επείγουσες καταστάσεις 92
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 93
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ 93

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΙΜΙΩΝ

8.1 Εξετάσεις που αφορούν την ανίχνευση μιας αιματολογικής αναιμίας 99
8.1.1 Ερυθραυστότητα των ερυθροκυττάρων ...100
8.1.2 Μέτρηση της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθροκυττάρων 101
8.2 Εξετάσεις για διαταραχές της αιμοσφαιρίνης 106

8.2.1 Βοηθητική τεχνική για το πλύσιμο των ερυθροκυττάρων 106
8.2.2 Βοηθητική τεχνική παρασκευής αιμολύματος ερυθρών αιμοσφαιρίων με τολουόλη 108
8.2.3 Βοηθητική τεχνική παρασκευής αιμολύματος για την ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης σε cellogel 111
8.2.4 Ηλεκτροφόρηση 114
8.2.5 Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε ταινίες οξικής κυτταρίνης 116
8.2.6 Δοκιμασία δρεπανώσεως των ερυθροκυττάρων 128
8.2.7 Δοκιμασία διαλυτότητας της αιμοσφαιρίνης S 132
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ 135
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ 136

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΚΩΝ ΔΙΑΘΕΣΕΩΝ

9.1. Εισαγωγή 141
9.2 Δοκιμασία περιχειρίδος ή δοκιμασία θετικής πίεσης RUBMEL – LEED 141
9.3 Τεχνική μέτρησης του χρόνου ροής ή τεχνική του DUKE 144
9.4 Τεχνική του IVY 148
9.5 Μέθοδος μέτρησης του χρόνου πήξης σε αντικειμενοφόρο πλάκα 150
9.6 Μέθοδος μέτρησης του χρόνου πήξης σε δοκιμαστικό σωληνάριο ή μέθοδος LEE -WHITE 152
9.7 Συστολή του θρόμβου 156
9.8 Χρόνος προθρομβίνης του πλάσματος (PT) ή χρόνος QUICK 160
9.9 Προσδιορισμός του χρόνου μερικής θρομβοπλαστίνης που είναι ενεργοποιημένης με καολίνη 165
9.10 Προδιορισμός ινωδογόνου μέθοδος CLAUSS 168
9.11 Thrombotest 171
9.12 Άλλες τεχνικές ελέγχου των αιμοραγικών καταστάσεων 172
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ 174
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ 174

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 – ΜΥΕΛΟΓΡΑΜΜΑ

10.1 Γενικά 179
10.2 Αναρρόφηση μυελού των οστών 179
10.3 Οστεομυελική βιοψία 182
10.4 Μυελική βιοψία με χειρουργική επέμβαση στο χειρουργείο 183
10.5 Τεχνικές επεξεργασίας δειγμάτων 183
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 189
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ 190

Β. ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11 – ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

11.1 Τεχνική για το πλύσιμο ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσα στον ασκό συλλογής του ολικού αίματος ..195
11.2 Εναιώρημα αιμοπεταλίων. Τεχνικές διαχωρισμού των αιμοπεταλίων (συμπυκνωμένα αιμοπετάλια) 197
11.3 Εναιώρημα ερυθρών αιμοσφαιρίων 200
11.4 Πλάσμα – παράγωγα πλάσματος 202
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ 207
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ 207

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12 – Τεχνικές καθορισμού ομάδων αίματος και RHESUS

12.1 Σύστημα ABO 211
12.2 Τεχνική προσδιορισμού των αντιγόνων A και B της επιφάνειας των ερυθροκυττάρων – άμεση τεχνική σε πλάκα 213
12.3 Τεχνική προσδιορισμού των αντιγόνων A και B της επιφάνειας των ερυθροκυττάρων – άμεση τεχνική σε σωληνάριο 219
12.4 Τεχνική προσδιορισμού των αντισωμάτων Αντι – A και Αντι –B στον ορό ή το πλάσμα - έμμεση τεχνική σε πλάκα 223
12.5 Τεχνική προσδιορισμού των αντισωμάτων Αντι – A και Αντι –B στον ορό ή το πλάσμα – έμμεση τεχνική σε σωληνάριο 227
12.6 Αντιγόνα RHESUS 233
12.7 Τεχνική προσδιορισμού αντιγόνοθ D των ερυθροκυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα 235
12.8 Τεχνική προδιορισμού του αντιγόνου D των ερυθροκυττάρων σε δοκιμαστικό σωληνάριο ...239
12.9 Τεχνική προδιορισμού αντιγόνοθ Du των ερυθροκυττάρων σε δοκιμαστικό σωληνάριο ..241
12.10 Τεχνική ανίχνευσης του αντιγόνου K του συστήματος KELL 245
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ 249
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ 249

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13 – ΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ

13.1 Συμβατότητα 255
13.2 Άμεση επείγουσα δοκιμασία διασταύρωσης ...256
13.3 Έμμεση μη επείγουσα δοκιμασία διασταύρωσης 260
13.4 Δοκιμασίες COOMBS 267
13.4.1 Άμεση δοκιμασία COOMBS 268
13.4.2 Έμμεση δοκιμασία COOMBS 275
ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ 282
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ 283

ΕΠΙΜΕΤΡΟ 285

ΛΕΞΙΛΟΓΙΟ 291

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 294

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

*Το διδακτικό εγχειρίδιο "**Αιματολογία-Αιμοδοσία ΙΙ**" είναι γραμμένο με βάση τη διδακτέα ύλη που καθορίζεται από το αναλυτικό πρόγραμμα του ΥΠΕΠΘ.*

Είναι το αποτέλεσμα συγχρονισμένης και επίπονης δουλειάς μεταξύ των συγγραφέων, των κριτών, της φιλολόγου και του προσωπικού του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου, οι οποίοι συνεργάστηκαν αρμονικά με στόχο τη συγγραφή ενός βιβλίου, που θα αποδίδει εύκολα και κατανοητά την ουσία των περιεχομένων κεφαλαίων χωρίς όμως να χάνει την επιστημονική του αξία.

*Απευθύνεται στους μαθητές της ειδικότητας **Βοηθών Ιατρικών και Βιολογικών Εργαστηρίων** (Β.Ι.Β.Ε.) της Α' τάξης του Β' κύκλου σπουδών του τομέα Υγείας και Πρόνοιας των Τεχνολογικών Επαγγελματικών Εκπαιδευτηρίων (Τ.Ε.Ε.).*

Σκοπός του είναι η παροχή αξιοποιήσιμων βασικών και ειδικών γνώσεων, θεωρητικών και πρακτικών, ώστε ο μαθητής να είναι σε θέση να συνδυάζει την εργαστηριακή διερεύνηση με τη θεωρία.

Η δομή του εγχειριδίου βοηθά το μαθητή στην καλλιέργεια της αναλυτικής και συνθετικής του σκέψης, στην ανάπτυξη της δημιουργικής του φαντασίας και στην απόκτηση όλων των αναγκαίων δεξιοτήτων, ώστε να επιτελεί με μεθοδικότητα και ασφάλεια τις εργαστηριακές αναλύσεις.

Οι ασκήσεις στο τέλος κάθε κεφαλαίου έχουν στόχο να καλλιεργήσουν την κριτική σκέψη του μαθητή αλλά και να μειώσουν τον κίνδυνο της παγίδευσής του από την πνευματική μονομέρεια στην οποία μπορεί να τον οδηγήσει η εξειδίκευση.

Τα 🔔 που υπάρχουν μέσα στο κείμενο, σκοπό έχουν να επιστήσουν την προσοχή του μαθητή σε ενέργειες που ενέχουν τον κίνδυνο ατυχήματος ή την πιθανότητα εξαγωγής εσφαλμένων συμπερασμάτων.

Επειδή το κείμενο είναι κατατοπιστικό, το λεξιλόγιο που παρατίθεται στο τέλος του βιβλίου είναι διατυπωμένο σε επιστημονική γλώσσα για να εξοικειώνεται ο μαθητής με την ιατρική ορολογία.

Δίνουμε το βιβλίο μας προς χρήση των μαθητών των Τ.Ε.Ε. με την πεποίθηση ότι θα τους βοηθήσει να αξιοποιήσουν τις γνώσεις που θα αποκτήσουν για το καλό της κοινωνίας μέσα στην οποία θα ζουν και θα εργάζονται.

Η συγγραφική ομάδα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

*Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε το προσωπικό του αιματολογικού εργαστηρίου και της αιμοδοσίας του **«Θριασίου» νοσοκομείου Ελευσίνας** για το πολύτιμο εργαστηριακό υλικό που μας παραχώρησε αλλά και για τις αξιόλογες επισημάνσεις του.*

Ιδιαίτερα θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις γιατρούς:

- *Μαντή Χριστίνα, Διευθύντρια του αιματολογικού εργαστηρίου*
- *Γεωργούτσου Παρασκευή, Επιμελήτρια Β' του αιμ/κού εργαστηρίου*
- *Ζωίδου Αμαλία, Διευθύντρια της αιμοδοσίας*
- *Ξανθάκη Άννα, Επιμελήτρια Α' της αιμοδοσίας*
- *Τιλίδου Καλλιόπη, Επιμελήτρια Β' της αιμοδοσίας και*
- *Γερομεριάτη Κωνσταντίνα, Επιμελήτρια Β' της αιμοδοσίας.*

*Επίσης ευχαριστούμε θερμά τη διεύθυνση και το προσωπικό των εργαστηρίων αιματολογικού, βιοχημικού, ΤΑΟ και αιμορραγικών διαθέσεων του **νοσοκομείου Παίδων «Αγία Σοφία»** καθώς και τη διεύθυνση και το προσωπικό του εργαστηρίου της αιμοδοσίας του νοσοκομείου Πεντέλης «Αμαλία Φλέμινγκ».*

Τέλος ευχαριστούμε τους:

- *Σοφούλη Ιωάννη, Υπ/χο ΠΝ μικροβιολόγο και*
- *Σάββα Ειρήνη, πνευμονολόγο, για την πολύτιμη βοήθειά τους.*

Οφείλουμε ευγνωμοσύνη στις οικογένειες μας και στους επιστήθιους φίλους μας για την αμέριστη συμπαράσταση και την ουσιαστική βοήθειά τους σε όλη τη διάρκεια της συγγραφής του βιβλίου.

Η συγγραφική ομάδα

Γ Α Ι Μ Α*

ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ

ΑΙΜΟΔΟΤΗΣ

ΑΙΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ

ΑΙΜΟΚΑΘΑΡΣΗ

ΑΙΜΟΔΕΡΜΑ

ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ

ΑΙΜΟΛΥΣΗ

ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΟΣ

ΑΙΜΟΜΕΙΞΙΑ

ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΟ

ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ

ΑΙΜΟΡΡΑΓΩ

ΑΙΜΟΡΡΟΦΙΛΙΑ

ΑΙΜΟΡΡΟΦΙΛΙΚΟΣ

ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ

ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ

ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΟ

ΑΙΜΟΦΥΡΤΟΣ

** Λέξη που χρησιμοποιείται στη λογοτεχνία ιδιαίτερα στη δημοτική ποίηση*

Αν έχεις το πόθο να μαθαίνεις,
θα αποκτήσεις πολλές γνώσεις.
Ό,τι γνωρίζει,
διατήρησέ το με τις μελέτες σου
και ό,τι δεν έχεις ακόμα μάθει,
απόκτησέ το με τη σπουδή.

ΙΣΟΚΡΑΤΗΣ

– ΠΡΩΤΟ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ –

α. αιματολογία ΙΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

αναιμίες

1.1 Γενικά
1.2 Διάκριση αναιμιών
1.2.1 Αναιμίες οφειλόμενες κυρίως σε μείωση της παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων
1.2.2 Αναιμίες που οφείλονται σε αυξημένη καταστροφή ερυθρών
1.2.3 Μεθαιμορραγικές αναιμίες
1.3 Θαλασσαιμίες
1.3.1 Θαλασσαιμία α
1.3.2 Μεσογειακή αναιμία (θαλασσαιμία β)
1.4 Αιμοσφαιρινοπάθεια S
1.5 Πρόληψη και αντιμετώπιση των κληρονομικών αναιμιών
ΠΕΡΙΛΗΨΗ
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1.1. Γενικά

Αναιμία είναι η ελάττωση του αιματοκρίτη ή της αιμοσφαιρίνης ή του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων κάτω από το 10% της φυσιολογικής τιμής που προβλέπεται για το συγκεκριμένο πληθυσμό.

Οι φυσιολογικές τιμές των παραπάνω ερυθροκυτταρικών παραμέτρων διαφέρουν ανάμεσα σε άνδρες και γυναίκες, σε παιδιά, βρέφη ή νεογνά.

Τα νεογνά έχουν υψηλότερες τιμές οι οποίες μειώνονται κατά τη βρεφική ηλικία.

Στην προεφηβική ηλικία οι τιμές είναι ίδιες και στα δύο φύλα αλλά μετά την είσοδο στην εφηβεία και με την επίδραση των ορμονών του ανδρικού φύλου παρατηρείται στους άνδρες αύξηση της τιμής του αιματοκρίτη κατά 4 – 6% και της αιμοσφαιρίνης 5 gr/dl περίπου σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των γυναικών.

Οι φυσιολογικές τιμές σε κάθε ηλικία καθορίζονται μετά από μετρήσεις που γίνονται στους αντίστοιχους πληθυσμούς και περιλαμβάνουν τη μέση τιμή συν μια σταθερή απόκλιση γύρω από αυτή. Δηλαδή το 95% των ατόμων του πληθυσμού.

Τιμές που βρίσκονται εκτός των φυσιολογικών αυτών ορίων δεν είναι απαραίτητα παθολογικές αλλά μπορεί να οφείλονται σε φυσιολογική ιδιαιτερότητα του εξεταζόμενου.

Είναι βασικό να γνωρίζουμε ότι **η αναιμία μόνη της δε στοιχειοθετεί πάθηση**. Συμπεριλαμβάνεται στην κλινική εικόνα κάποιας πάθησης και αποτελεί κλινική της έκφραση.

Η αναιμία μπορεί να είναι κλινική έκφραση της σιδηροπενίας που συνοδεύει διαιτητικές παρεκκλίσεις (π.χ. φυτοφαγία) ή του μεταστατικού καρκίνου οστών από καρκίνο προστάτη σαν αποτέλεσμα διηθήσεως του μυελού των οστών από καρκινικά κύτταρα.

Έτσι η αναιμία μπορεί να είναι αποτέλεσμα μιας πολύ απλής κατάστασης, όπως η μείωση κατανάλωσης τροφών πλούσιων σε σίδηρο (σιδηροπενική αναιμία) άλλά και κλινική έκφραση μια βαρύτατης κατάστασης, όπως η μεταστατική νόσος στα οστά.

Κλινική εκτίμηση της αναιμίας

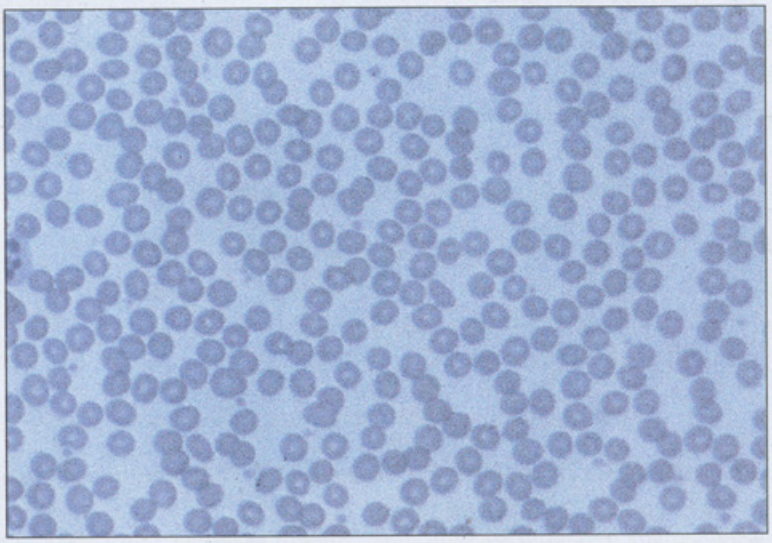
Τα κλινικά συμπτώματα της αναιμίας ποικίλλουν ανάλογα με την ταχύτητα της εγκατάστασής της. Σε περιπτώσεις **ταχείας** εγκατάστασης της αναιμίας (π.χ. αιμορραγία, οξεία αιμόλυση) προέχουν συμπτώματα από το καρδιαγγειακό σύστημα όπως: ταχυκαρδία, υπόταση, δύσπνοια.

Σε περιπτώσεις όπου η εγκατάσταση της αναιμίας είναι **βραδεία** (π.χ. έλλειψη αιμοποιητικού παράγοντα) δίνεται η χρονική δυνατότητα στον οργανισμό να αναπληρώσει τον όγκο αίματός του. Ο ασθενής παραμένει ασυμπτωματικός παρά τις

χαμηλές τιμές αιματοκρίτη. Εάν δε γίνει διόρθωση της αναιμίας παρατηρείται: ωχρότητα, κοιλονυχία, ευθραυστότητα ονύχων, ίκτερος, κεφαλαλγία, διαταραχές ισορροπίας, διαταραχές εμμήνου ρύσεως κ.λ.π.

Η προσέγγιση του ασθενή με αναιμία είναι ανάλογη με την προσέγγιση του ασθενή με οποιαδήποτε πάθηση και περιλαμβάνει:

- τη λήψη του ιστορικού
- την κλινική εξέταση
- τον εργαστηριακό έλεγχο



Εικόνα 1.1. Επίχρισμα φυσιολογικού περιφερικού αίματος

Εργαστηριακός έλεγχος

Ο εργαστηριακός έλεγχος περιλαμβάνει εξετάσεις που αφορούν την ίδια τη διερεύνηση αλλά και άλλες εξετάσεις ανάλογα με το πρόβλημα του αρρώστου.

1. Αιματοκρίτης και αιμοσφαιρίνη
2. Ερυθροκυτταρικοί δείκτες
3. Αριθμός δικτυοερυθροκυττάρων
4. Αριθμός λευκών και λευκοκυτταρικός τύπος
5. Αριθμός και ποιότητα αιμοπεταλίων
6. Μορφολογία ερυθρών στο επίχρισμα αίματος (Εικόνα 1.1)
7. Εικόνα μυελού των οστών (επίχρισμα βιοψίας)
8. Σίδηρος ορού και ολική σιδηροδεσμευτική ικανότητα
9. Φερριτίνη ορού

10. Επίπεδα βιταμίνης B_{12} και φυλλικών
11. Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης
12. Πλήθος άλλων εξετάσεων ανάλογα με την περίπτωση της αναιμίας

1.2. Διάκριση αναιμιών

Δεν υπάρχει γενικά παραδεκτό σχήμα ταξινόμησης των αναιμιών.

Οι παθήσεις αυτές μπορεί να διακριθούν από αιτιολογικής, μορφολογικής ή παθοφυσιολογικής άποψης. Καθεμία από τις ταξινομήσεις αυτές έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Ένα μόνο αίτιο μπορεί για παράδειγμα να προκαλέσει πολλά διαφορετικά είδη, από μορφολογικής άποψης, αναιμιών. Από την άλλη μεριά μια αναιμία ενός μορφολογικού τύπου (π.χ. μακροκυτταρική) μπορεί να οφείλεται σε πολλά αίτια.

Μια αναιμία μπορεί να οφείλεται:
α. Σε μειωμένη παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων
β. Σε αύξηση του ρυθμού καταστροφής τους
γ. Σε απώλεια αίματος

Οι κυριότεροι εκπρόσωποι των παραπάνω κατηγοριών είναι:

- **Αναιμίες οφειλόμενες κυρίως σε μείωση της παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων**

α) Έλλειψη ερυθροποιητικού παράγοντα:
- στη σύνθεση της αίμης: σιδηροπενικές
- στη σύνθεση του DNA: μεγαλοβλαστικές αναιμίες

β) σε άγνωστους μηχανισμούς: αναιμία χρόνιων παθήσεων
γ) Μυελοφθισικές αναιμίες
δ) Απλαστική αναιμία. Διαταραχή στο πρόδρομο κύτταρο των ερυθροκυττάρων

- **Αναιμίες οφειλόμενες σε αυξημένη καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων (αιμολυτικές αναιμίες)**

α) Αιμολυτικές αναιμίες από αίτια ενδοερυθροκυτταρικά
β) Αιμολυτικές αναιμίες από αίτια εξωερυθροκυτταρικά

- **Αναιμίες οφειλόμενες σε απώλεια αίματος (Μεθαιμορραγικές αναιμίες)**

α) Αιμορραγία από το πεπτικό: γαστρορραγία, εντερορραγία
β) Αιμορραγία από το αναπνευστικό: αιμόπτυση
γ) Αιμορραγία από το ουροποιητικό: αιματουρία
δ) Κακώσεις

1.2.1 Αναιμίες οφειλόμενες κυρίως σε μείωση της παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων

Σιδηροπενική αναιμία

Είναι η συχνότερα απαντόμενη αναιμία.

Αναπτύσσεται όταν ελαττωθούν τα αποθέματα σιδήρου στις αποθήκες του οργανισμού: Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη **μείωση παραγωγής αίμης**, την **καθυστέρηση παραγωγής αιμοσφαιρίνης** και την απελευθέρωση στο περιφερικό αίμα ερυθρών αιμοσφαιρίων μικρού μεγέθους **(μικροκύτταρα)** και πτωχών σε αιμοσφαιρίνη **(υπόχρωμα)**.

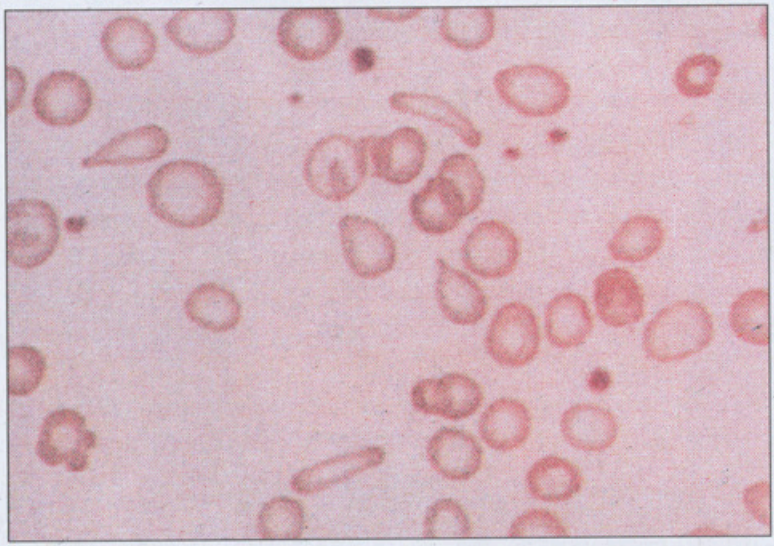
Οι μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί να εγκατασταθεί η σιδηροπενία είναι:

α) η ανεπαρκής πρόσληψη σιδήρου π.χ.: νεογνά τα οποία λαμβάνουν γάλα φτωχό σε σίδηρο, ανάπτυξη κατά την παιδική ηλικία, γυναίκες όταν βρίσκονται στη γόνιμη περίοδο της ζωής τους, έμμηνος ρύση, τοκετός, γαλουχία, ακρεοφαγία

β) Ελαττωμένη απορρόφηση όπως συμβαίνει σε γαστρεκτομή ή διάφορα σύνδρομα δυσαπορρόφησης.

γ) Αυξημένες απώλειες όπως σε διαφραγματοκήλη, κακοήθεια, αιματουρία.

Αν η σιδηροπενία αναπτυχθεί βαθμιαία μπορεί να συνοδεύεται από ελάχιστες κλινικές εκδηλώσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν τα κοινά συμπτώματα όλων των αναιμιών: αίσθημα κόπωσης, ελάττωση της αντοχής στην προσπάθεια, ευερεθιστότητα, ζάλη. Στη βαρύτερη σιδηροπενία παρατηρείται κοιλονυχία, ωχρότητα, χειλίτιδα, ενώ σε μικρό ποσοστό των περιπτώσεων παρατηρείται μυϊκή αδυναμία και σπληνομεγαλία.



Εικόνα 1.2. *Περιφερικό αίμα από ασθενή με σιδηροπενική αναιμία Παρατηρούνται ερυθρά αιμοσφαίρια με υποχρωμία*

Από τα εργαστηριακά ευρήματα αξίζει να σημειώσουμε:

- Τα ερυθροκύτταρα είναι μικρότερα από το φυσιολογικό και ωχρά (υπόχρωμη μικροκυτταρική αναιμία)(Εικόνα 1.2)
- Ο μέσος όγκος των ερυθρών (MCV) είναι ελαττωμένος
- Ο σίδηρος του ορού είναι ελαττωμένος
- Η δεσμευτική ικανότητα το σιδήρου είναι αυξημένη
- Η φερριτίνη είναι ελαττωμένη
- Ο αριθμός των ΔΕΚ είναι φυσιολογικός

Θεραπεία

Στόχος της θεραπείας είναι **η εξάλειψη του αιτίου** της σιδηροπενίας, **η αναπλήρωση του σιδήρου** του οργανισμού και **η πλήρωση των αποθηκών**.

Αυτό γίνεται με χορήγηση σκευασμάτων σιδήρου από το στόμα για χρονικό διάστημα δύο (2) ή και περισσότερων μηνών.

Σε αποτυχία της λήψης από το στόμα (μη συνεργασία του ασθενή ή πάθηση που εμποδίζει την από του στόματος λήψη σιδήρου) ο σίδηρος χορηγείται παρεντερικά ενδομυϊκά ή ενδοφλέβια.

Μεγαλοβλαστική αναιμία

Οι μεγαλοβλαστικές αναιμίες μπορεί να οφείλονται **σε έλλειψη βιταμίνης B_{12}** ή σε **έλλειψη φυλλικού οξέος** αλλά και σε **άλλα αίτια.** Χαρακτηρίζονται από μεγάλα ερυθρά αιμοσφαίρια στο περιφερικό αίμα (MCV> 100).

Η βιταμίνη B_{12} και το φυλλικό οξύ είναι ουσίες απαραίτητες για τη σύνθεση του DNA των πρόδρομων μορφών των ερυθροκυττάρων. Όταν παρουσιάζεται έλλειψή τους καθυστερεί η κυτταρική διαίρεση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων του μυελού σε ωριμότερα κύτταρα. Η καθυστέρηση αυτή αφορά το DNA του πυρήνα των κυττάρων, ενώ η κυτταροπλασματική ανάπτυξή τους συνεχίζεται. Όταν αργότερα γίνεται η κυτταρική αυτή διαίρεση τα κύτταρα που προκύπτουν είναι μεγαλύτερα (περίσσεια κυτταροπλάσματος) και τα περισσότερα από αυτά καταστρέφονται στο μυελό των οστών (μη αποδοτική ερυθροποίηση).

Η Βιταμίνη B_{12} δεν παράγεται στον οργανισμό. Είναι λοιπόν απαραίτητη η πρόσληψή της με την τροφή. Βρίσκεται μόνο στις τροφές ζωικής προελεύσεως (κρέας, γαλακτοκομικά).

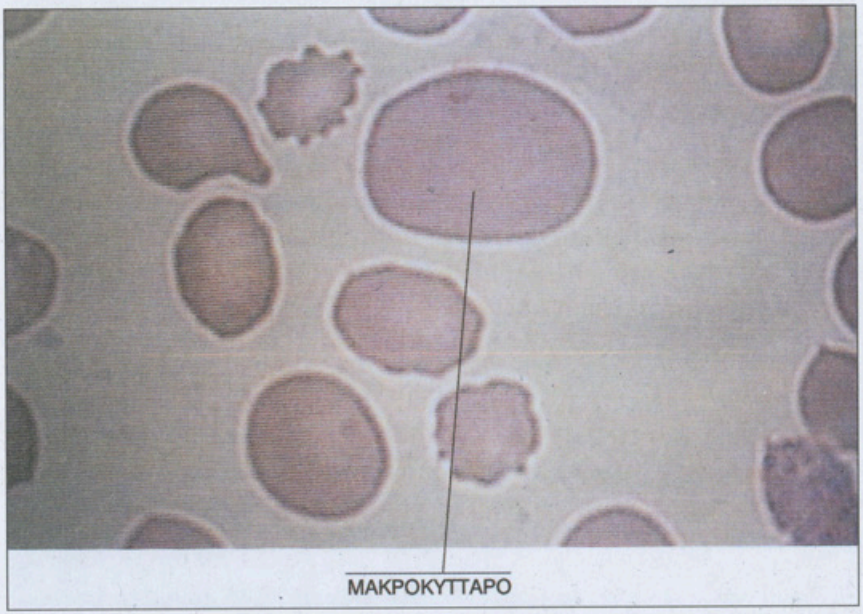
Κατά τη διέλευσή της από το στομάχι, η B_{12} ενώνεται με μία πρωτεΐνη (ενδογενώς) η οποία παράγεται από τα κύτταρα του στομάχου. Το σύμπλοκο ενδογενή παράγοντα - B_{12} συνεχίζει την πορεία του στον πεπτικό σωλήνα για να γίνει η απορ-

ρόφηση της B_{12} από το τελευταίο κομμάτι του λεπτού εντέρου (τελικός ειλεός). **Έλλειψη B_{12} μπορεί να δημιουργηθεί είτε από *ελλιπή πρόσληψη τροφών πλούσιων σε B_{12}* (σπάνια στην Ελλάδα), είτε από *πλημμελή απορρόφησή της* κατά την πορεία της στον πεπτικό σωλήνα** (έλλειψη ενδογενούς παράγοντα, γαστρεκτομή, παθήσεις του ειλεού που δυσκολεύουν την απορρόφησή της, ύπαρξη βακτηριδίων μέσα στο έντερο που καταναλώνουν B_{12}).

Το φυλλικό οξύ είναι βιταμίνη η οποία βρίσκεται κυρίως στα φρούτα και τα λαχανικά. Αίτια έλλειψής του είναι η ανεπαρκής πρόσληψη τροφών πλούσιων σε φυλλικό οξύ, κακή απορρόφηση που οφείλεται σε παθήσεις του εντέρου, καθώς και περιπτώσεις αυξημένων απαιτήσεων σε φυλλικό οξύ, όπως η εγκυμοσύνη και η ανάπτυξη κατά την παιδική ηλικία.

Η κλινική εικόνα της νόσου περιλαμβάνει τις κλινικές εκδηλώσεις της αναιμίας που έχουν ήδη αναφερθεί. Χαρακτηριστικά είναι η προσβολή της γλώσσας, η οποία εμφανίζεται λεία, εξέρυθρη και επώδυνη.

Η έλλειψη κυρίως της βιταμίνης B_{12} προκαλεί συμπτώματα και από το νευρικό σύστημα, όπως μουδιάσματα των δακτύλων των κάτω άκρων, αστάθεια βάδισης, αλλά και ψυχικές διαταραχές, όπως απώλεια μνήμης, κατάθλιψη, άνοια. Τα συμπτώματα του νευρικού συστήματος δεν προκαλούνται από την αναιμία αλλά από την έλλειψη της βιταμίνης B_{12} η οποία είναι απαραίτητη βιταμίνη και για το νευρικό σύστημα.



Εικόνα 1.3. *Ερυθρό αιμοσφαίριο με χαρακτηριστική μακροκυττάρωση: Φαίνεται το μέγεθός του σε σύγκριση με τα υπόλοιπα ερυθρά*

Εργαστηριακός έλεγχος

Οι εργαστηριακές εξετάσεις που απαιτούνται για τη διερεύνηση της μεγαλοβλαστικής αναιμίας είναι:

- Μέτρηση επιπέδων βιταμίνης B_{12} και φυλλικού οξέος στο αίμα
- Αιματοκρίτης, αιμοσφαιρίνη, λευκά, αιμοπετάλια
- Ερυθροκυτταρικοί δείκτες (MCV, MCHC, MCH)
- Μέτρηση Δ.Ε.Κ.
- Επίχρισμα αίματος
- Έλεγχος μυελού των οστών (μυελόγραμμα)

Παρατηρείται αναιμία πολλές φορές με συνυπάρχουσα λευκοπενία και θρομβοπενία. Αύξηση του MCV - Μείωση των Δ.Ε.Κ. Στο επίχρισμα του αίματος τα ερυθροκύτταρα είναι μεγάλα και ωοειδή (μακροκύτταρα Εικόνα 1.3), ενώ παρατηρούνται και διαταραχές των λευκών αιμοσφαιρίων (πολυκατάτμητα, πολυμορφοπύρηνα).

Το μυελόγραμμα δίνει εικόνα μεγάλων ερυθροβλαστών (μεγαλοβλάστες).

Θεραπεία

Η έλλειψη φυλλικού οξέος καλύπτεται με την από στόματος χορήγηση φυλλικού οξέος. Συνιστάται κυρίως καθ'όλη τη διάρκεια της κύησης.

Η έλλειψη B_{12} καλύπτεται με ενδομυϊκές ενέσεις B_{12}. Όταν η έλλειψη οφείλεται σε μη ανατάξιμη αιτία μπορεί η χορήγηση αυτή να είναι απαραίτητη για όλη τη ζωή του ασθενή.

Αναιμία χρόνιας νόσου

Είναι η αναιμία που μπορεί να συνοδεύει χρόνια λοιμώδη νοσήματα, νεοπλάσματα, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και χρόνια ηπατοπάθεια. Μοιάζει με τη σιδηροπενική αναιμία, γιατί τα ερυθροκύτταρα είναι μικρά και υπόχρωμα και ο σίδηρος του αίματος μπορεί να είναι χαμηλός, αλλά η φερριτίνη (που είναι μέτρο των αποθηκών του σιδήρου του οργανισμού) είναι φυσιολογική ή αυξημένη.

Μυελοφθισική αναιμία

Είναι η αναιμία που προκύπτει από διαταραχή της αρχιτεκτονικής του μυελού των οστών, όταν αυτός καταλαμβάνεται από καρκινικά κύτταρα (είτε του αιμοποιητικού ιστού π.χ. λευχαιμικά κύτταρα, είτε άλλου ιστού π.χ. μεταστατικά κύτταρα από καρκίνο προστάτη).

Απλαστική αναιμία

Είναι η αναιμία εκείνη που χαρακτηρίζεται από αδυναμία του μυελού των οστών

να παράγει κύτταρα του αίματος λόγω βλάβης του αρχέγονου κυττάρου. Συνήθως έχουμε αναιμία, λευκοπενία και θρομβοπενία (έλλειψη όλων των σειρών).

Ο παράγοντας που επέφερε βλάβη στο αρχέγονο κύτταρο του μυελού των οστών μπορεί να είναι γνωστός (ακτινοβολία, τοξική ουσία), όμως πολλές φορές παραμένει άγνωστος (ιδιοπαθής απλαστική αναιμία).

1.2.2 Αναιμίες που οφείλονται σε αυξημένη καταστροφή ερυθρών

Αιμολυτικές αναιμίες

Ο μέσος **χρόνος ζωής των ερυθρών** αιμοσφαιρίων σε φυσιολογικές καταστάσεις είναι περίπου **90-120 ημέρες**. Μετά την κατασκευή των ερυθροκυττάρων στο μυελό των οστών και την ελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία, αρχίζει μια βαθμιαία αλλοίωση (φθορά) τόσο των πρωτεϊνών της μεμβράνης όσο και των ενδοκυττάριων ενζύμων, η οποία τελικά οδηγεί σε λύση της μεμβράνης και καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων **(αιμόλυση)**. Στις αιμολυτικές αναιμίες έχουμε **μείωση του μέσου χρόνου ζωής των αιμοσφαιρίων**. Όταν η μείωση αυτή είναι μικρή (μικρή αιμόλυση), τότε ο οργανισμός έχει το χρόνο να αντιδράσει υπερπαράγοντας ερυθρά αιμοσφαίρια. Αντίθετα όταν η μείωση του χρόνου ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι μεγάλη (ο μέσος χρόνος ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορεί να είναι μερικές ώρες), τότε ο οργανισμός αδυνατεί να υπερπαράγει ερυθρά με αποτέλεσμα κλινική εκδήλωση αναιμίας (οξεία αιμόλυση).

Οι αιμολυτικές αναιμίες μπορεί να οφείλονται σε:

α) Διαταραχές της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων

β) Διαταραχές των ενζύμων των ερυθροκυττάρων

γ) Διαταραχές της αιμοσφαιρίνης

δ) Αντιδράσεις αντισωμάτων με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη

ε) Επιδράσεις τοξικών ουσιών ή προϊόντων μικροβίων στην ερυθροκυταρική μεμβράνη

στ) Τραυματισμό των ερυθροκυττάρων κατά την πορεία τους μέσα από το κυκλοφορικό σύστημα.

Τις αιμολυτικές αναιμίες μπορούμε να τις διακρίνουμε:

1. Σε οξείες και χρόνιες

2. Σε κληρονομικές ή επίκτητες

3. Σε αυτοάνοσης ή μη αυτοάνοσης αιτιολογίας

4. Ανάλογα με το αν η διαταραχή είναι ενδοκυτταρική ή εξωκυτταρική

5. Σε ενδαγγειακές ή εξωαγγειακές

Κάθε αναιμία μπορεί να πάρει περισσότερους από έναν από τους παραπάνω χαρακτηρισμούς, π.χ., η σφαιροκυττάρωση είναι χρόνια κληρονομική αναιμία οφειλόμενη σε ενδοκυττάρια αίτια και η καταστροφή των ερυθρών είναι κυρίως εξωαγγειακή.

Οξείες είναι οι αιμολυτικές αναιμίες που ο μέσος χρόνος ζωής (ΜΧΖ) των ερυθροκυττάρων είναι πολύ μικρός, ενώ ***χρόνιες*** εκείνες που ο ΜΧΖ των ερυθροκυττάρων πλησιάζει το φυσιολογικό.

Κληρονομικές είναι οι αιμολυτικές αναιμίες που κληρονομούνται από γενιά σε γενιά με κάποιον από τους γνωστούς τύπους κληρονομικότητας (όπως: επικρατής, υπολειπόμενος, φυλοσύνδετος), ενώ ***επίκτητες*** εκείνες που η αιμόλυση οφείλεται σε αίτια που δεν έχουν σχέση με κληρονομικότητα.

Αυτοάνοσες είναι οι αιμολυτικές αναιμίες που οφείλονται σε αντισώματα τα οποία καταστρέφουν τη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων.

Ενδοκυτταρική χαρακτηρίζεται η αιμολυτική αναιμία όταν το αίτιο που προκαλεί την αιμόλυση είναι μέσα στο ερυθροκύτταρο (αιμοσφαιρινοπάθειες, σφαιροκυττάρωση).

Εξωκυτταρική όταν το αίτιο που προκαλεί την αιμόλυση δεν έχει σχέση με το ερυθροκύτταρο (π.χ. αιμόλυση που οφείλεται σε καταστροφή των ερυθροκυττάρων που προσκρούουν πάνω σε μεταλλικές προσθετικές βαλβίδες).

Η αιμόλυση μπορεί να συμβεί αυτόματα μέσα στα αγγεία του κυκλοφορικού συστήματος (**ενδαγγειακή αιμόλυση**) ή να συμβεί μετά από πρόσληψη - λύση των ερυθροκυττάρων από κύτταρα του Δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (**εξωαγγειακή αιμόλυση**).

Στις αιμολυτικές αναιμίες συνήθως υπάρχει **ωχρότητα**, **ίκτερος** και **σπληνομεγαλία**.

Εργαστηριακά ευρήματα της αιμόλυσης

Στην αιμόλυση έχουμε λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και απελευθέρωση αιμοσφαιρίνης στην κυκλοφορία. Η αιμοσφαιρίνη αυτή ενώνεται με απτοσφαιρίνες (πρωτεΐνες του πλάσματος), ενώ η αίμη της αιμοσφαιρίνης αποδομείται σε χολερυθρίνη.

Στο αίμα βρίσκουμε: **αναιμία, αυξημένες τιμές χολερυθρίνης, αύξηση των δικτυοερυθροκυττάρων, χαμηλά επίπεδα απτοσφαιρινών, ενώ στο μυελόγραμμα παρατηρείται υπερπλασία της ερυθράς σειράς**.

Οι κυριότερες αιμολυτικές αναιμίες είναι:

- Αιμολυτικές αναιμίες λόγω βλάβης της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων
- Αιμολυτικές αναιμίες λόγω ενζυμικών διαταραχών των ερυθροκυττάρων
- Αιμολυτικές αναιμίες ανοσολογικού τύπου

α) Αιμολυτικές αναιμίες λόγω βλάβης της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων
Κληρονομικές νόσοι που κληρονομούν συνήθως τον επικρατούντα χαρακτήρα.

Η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων αποτελείται κυρίως από λιπίδια. Μεταξύ των λιπιδίων υπάρχουν πρωτεΐνες, οι οποίες διατηρούν την αρχιτεκτονική και τη μορφολογία της μεμβράνης. Κληρονομικές διαταραχές των στηρικτικών αυτών πρωτεϊνών έχουν σαν αποτέλεσμα αλλαγή στη μορφολογία της μεμβράνης.

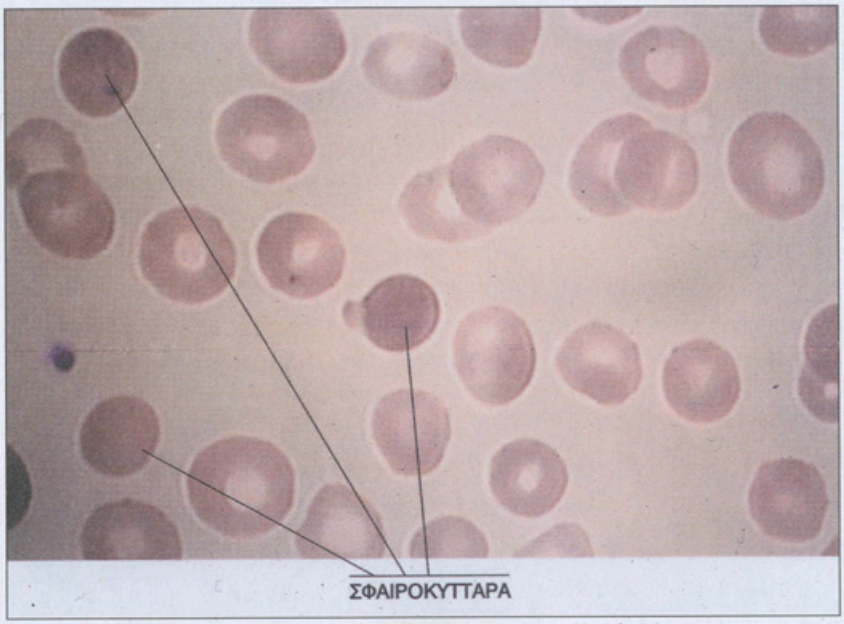
Τα ερυθρά αιμοσφαίρια λαμβάνουν μορφή σφαιριδίων (σφαιροκυττάρωση, Εικόνα 1.4), έλλειψης (ελλειπτοκυττάρωση), αχινού (εχινοκυττάρωση ή ακανθοκυττάρωση, Εικόνα 1.5). Η ωσμωτική αντίστασή τους μειώνεται και η αιμόλυση που παρατηρείται μπορεί να είναι ήπια ή αρκετά εκσεσημασμένη.

β) Αιμολυτικές αναιμίες λόγω ενζυμικών διαταραχών των ερυθροκυττάρων
Η συχνότερη εκπρόσωπός τους είναι η έλλειψη G6PD (γλυκοζο-6φωσφορική αφυδρογονάση). Η νόσος είναι κληρονομική.

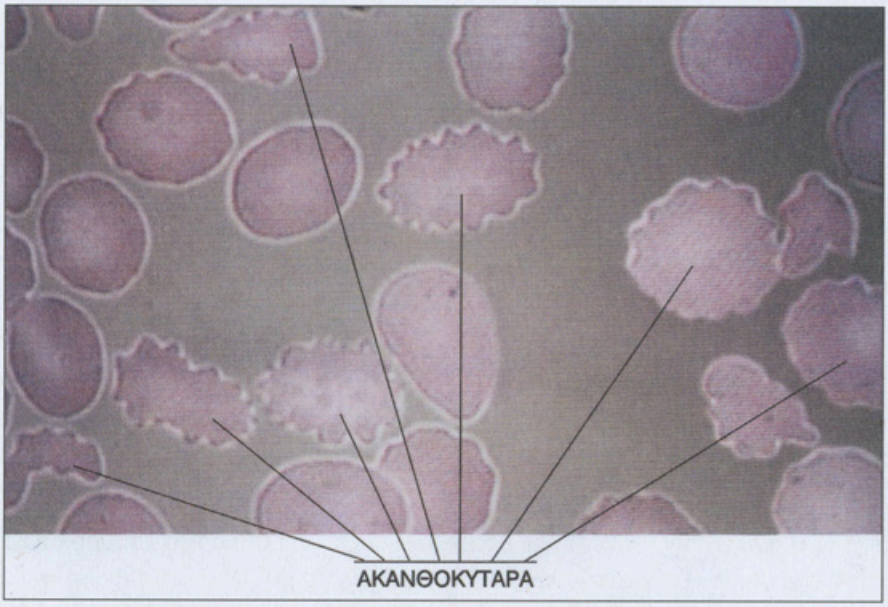
Το G6PD δρα αντιοξειδωτικά και προστατεύει τη μεμβράνη του ερυθροκυττάρου από την επίδραση οξειδωτικών και τοξικών παραγόντων.

Σε έλλειψή του προκαλείται αιμόλυση όταν το πάσχον άτομο:

α) έρχεται σε επαφή με οξειδωτικές ουσίες όπως: ανθελονοσιακά, σουλφοναμίδες, ασπιρίνη, ναφθαλίνη και αντιμικροβιακά



Εικόνα 1.4. *Επίχρισμα περιφερικού αίματος με σφαιροκύτταρα*



Εικόνα 1.5. *Επίχρισμα περιφερικού αίματος με ακανθοκύτταρα ή εχινοκύτταρα*

β) νοσεί από λοιμώξεις ή άλλες οξείες καταστάσεις (π.χ. διαβήτης, οξέωση)
γ) καταναλώνει ποσότητα χλωρών κουκιών (κυαμισμός)

Η ανίχνευση της νόσου γίνεται κατά τη γέννηση με τη μέτρηση των επιπέδων G6PD στο αίμα των νεογνών.

γ) Αιμολυτικές αναιμίες ανοσολογικού τύπου

Οι αιμολυτικές αυτές αναιμίες οφείλονται στην ύπαρξη αντισωμάτων τα οποία καταστρέφουν τη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων και προκαλούν τη λύση τους (αντισώματα έναντι των ερυθροκυττάρων). Τα αντισώματα αυτά βρίσκονται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων ή ανιχνεύονται στον ορό του αίματος του ασθενή.

Η ανίχνευση αντισωμάτων τόσο πάνω στα ερυθροκύτταρα όσο και στον ορό του ασθενή γίνεται με την αντίδραση Coombs (άμεση, έμμεση Coombs).

Ο ειδικός εργαστηριακός έλεγχος που χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση των αιμολυτικών συνδρόμων περιλαμβάνει:

- Την ωσμωτική αντίσταση ερυθρών
- Τη μέτρηση των επιπέδων G6PD
- Την άμεση και έμμεση αντίδραση Coombs

1.2.3 Μεθαιμορραγικές αναιμίες

Είναι οι αναιμίες εκείνες που οφείλονται σε αιμορραγία. Το βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι σ' αυτές έχουμε πάντα **απώλεια αίματος** που όταν είναι μεγάλη προκαλεί βαριά κλινική εικόνα με επαπειλούμενο θάνατο του ασθενή.

Συχνά απαιτείται άμεση μετάγγιση αίματος.

Ανάλογα με το σύστημα – όργανο που αιμορραγεί έχουμε: **γαστρορραγία, εντερορραγία, αιματουρία, αιμόπτυση, μητρορραγία**. Συχνές είναι και οι αιμορραγίες που προέρχονται από βίαιες καταστάσεις (πτώσεις, τροχαία ατυχήματα, πυροβολισμοί, κατάγματα κ.λ.π.).

Αιμορραγία μπορεί να προκληθεί και από πολλές άλλες νόσους που ταξινομούνται στις αιμορραγικές καταστάσεις και που θα περιγραφούν στο επόμενο κεφάλαιο.

1.3. Θαλασσαιμίες

Η αιμοσφαιρίνη (Hb) αποτελείται από αίμη και σφαιρίνη.

Κάθε μόριο αιμοσφαιρίνης αποτελείται από 4 αλυσίδες σφαιρίνης και 4 μονάδες αίμης.

Οι αλυσίδες σφαιρίνης που υπάρχουν στα μόρια αιμοσφαιρίνης είναι οι: α, β, γ, δ. Κάθε μόριο φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης δομείται με 2 αλυσίδες α και 2 αλυσίδες κάποιας από τις άλλες αιμοσφαιρίνες. Έτσι έχουμε τις αιμοσφαιρίνες A ($\alpha_2\beta_2$), F ($\alpha_2\gamma_2$), A_2 ($\alpha_2\delta_2$).

Η φυσιολογική αιμοσφαιρίνη στα ερυθροκύτταρα του ενήλικα είναι η αιμοσφαιρίνη A η οποία έχει 2 μόρια α αλύσου και 2 μόρια β αλύσου ($\alpha_2\beta_2$).

Τα ερυθροκύτταρα του φυσιολογικού ενήλικα περιέχουν 97% Hb A ($\alpha_2\beta_2$) , 2-3% Hb A_2 ($\alpha_2\delta_2$), >1% Hb F ($\alpha_2\gamma_2$).

Υπάρχουν δύο μορφών διαταραχές της σφαιρίνης:

α) Οι Θαλασσαιμίες όπου λόγω μετάλλαξης έχουμε **μείωση** ή **εξαφάνιση της σύνθεσης ενός τύπου σφαιρίνης** (ποσοτικές διαταραχές σφαιρίνης).

β) Οι Αιμοσφαιρινοπάθειες όπου λόγω μετάλλαξης **αλλοιώνεται η δομή** και **η λειτουργία της αιμοσφαιρίνης** (ποιοτικές διαταραχές σφαιρίνης).

Η κληρονομικότητα στις θαλασσαιμίες και τις αιμοσφαιρινοπάθειες ακολουθεί τους νόμους του Medel.

Οι θαλασσαιμίες αποτελούν ομάδα κληρονομικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από τη μείωση ή την εξαφάνιση της παραγωγής μίας ή περισσοτέρων αλύσων σφαιρίνης. Η μη παραγωγή κάποιας σφαιρίνης έχει σαν αποτέλεσμα την περίσσεια

της άλλης η οποία καθιζάνει με μορφή εγκλείστων μέσα στο ερυθροκύτταρο.

Κοινά χαρακτηριστικά των θαλασσαιμιών είναι:

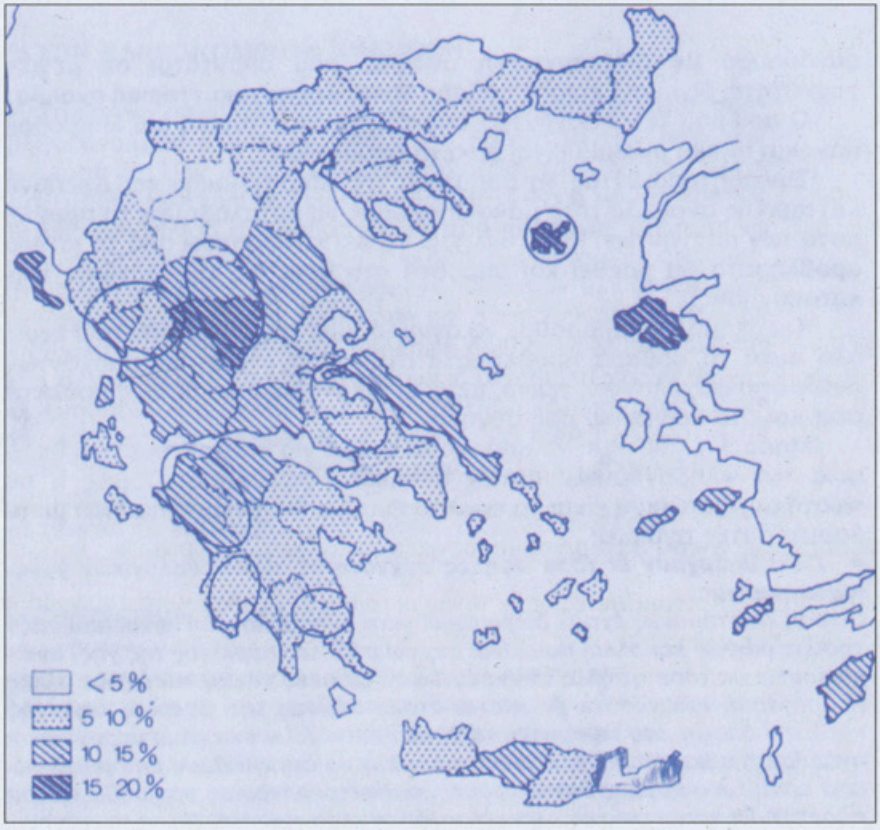
- Η μειωμένη παραγωγή μίας ή περισσότερων αλύσων
- Η ενδομυελική καταστροφή των ερυθροβλαστών
- Η υποχρωμία των ερυθρών
- Η αιμόλυση στο περιφερικό αίμα

Ανάλογα με την αλυσίδα που λείπει αλλά και με το βαθμό της έλλειψής της έχουμε τη διαφορετική κλινική εικόνα που χαρακτηρίζει τις θαλασσαιμίες.

1.3.1 Θαλασσαιμία α

Στη θαλασσαιμία **α** έχουμε έλλειψη (μη παραγωγή) των α αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης. Είναι συχνότερη σε άτομα Ασιατικής καταγωγής. Στην Ελλάδα φορείς παθολογικού γόνου **α** είναι λιγότεροι από 0,5% (Χάρτης 1).

Η έλλειψη των α αλυσίδων δημιουργεί περίσσεια γ αλυσίδων κατά την εμβρυϊ-



Χάρτης 1.1 Η κατανομή της α θαλασσαιμίας στον Ελληνικό πληθυσμό

κή ζωή και περίσσεια β αλυσίδων κατά την εξωμήτριο ζωή όταν και αρχίζει η παραγωγή των β αλυσίδων.

Η περίσσεια των γ αλυσίδων κατά την εμβρυϊκή ζωή έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία τετραμερών μορίων αιμοσφαιρίνης γ_4 που αποτελούν την αιμοσφαιρίνη Barts (Hb Barts) ενώ η περίσσεια β αλυσίδων στην εξωμήτριο ζωή έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία τετραμερών μορίων αιμοσφαιρίνης β_4 που συνιστούν την αιμοσφαιρίνη Η (HbH).

Ανάλογα με την ποσοτική έλλειψη παραγωγής α αλυσίδων διακρίνουμε τις παρακάτω μορφές:

- σιωπηλή μορφή φορέα με μικρή έλλειψη παραγωγής αλυσίδων α όπου το προσβεβλημένο άτομο δεν έχει κλινικές εκδηλώσεις
- κλασσική μορφή φορέα με μεγαλύτερη έλλειψη παραγωγής αλυσίδων α όπου ο φορέας δεν έχει κλινικά συμπτώματα αλλά παρατηρείται ήπια αναιμία με μικρά και υπόχρωμα ερυθρά αιμοσφαίρια .

Οι δύο παραπάνω μορφές αποτελούν τους ετεροζυγωτές της α μεσογειακής αναιμίας.

- Αιμοσφαιρινοπάθεια Η, όπου υπάρχει σημαντική μείωση στην παραγωγή των α αλυσίδων

Εμφανίζεται με κλινική εικόνα αναιμίας ή και περιφερικής αιμόλυσης η οποία αντιρροπείται καλά από τον οργανισμό .

- Ομόζυγος αιμοσφαιρινοπάθεια Α, εμβρυϊκός ύδρωπας, όπου υπάρχει παντελής έλλειψη των α αλυσίδων

Η κατάσταση είναι ασύμβατη με τη ζωή και έχουμε ενδομήτριο θάνατο του εμβρύου.

Η κληρονομικότητα στην **α** Μεσογειακή Αναιμία είναι όμοια μ' εκείνη της β Μεσογειακής αναιμίας

1.3.2 Μεσογειακή αναιμία (Θαλασσαιμία β)

Χαρακτηρίζεται από την **ύπαρξη παθολογικού γόνου για την αιμοσφαιρίνη β και τη μείωση ή εξάλειψη της παραγωγής β αλυσίδων**.

Στην Ελλάδα περίπου το 8 % του πληθυσμού φέρει κάποιο παθολογικό γόνο για τη β μεσογειακή αναιμία (Χάρτης 2).

1. Ετερόζυγη Μεσογειακή αναιμία

Υπάρχει **μειωμένη παραγωγή β αλυσίδων** ενώ οι α αλυσίδες συντίθονται κανονικά.Τα άτομα συνήθως είναι ασυμπτωματικά. Άλλοτε παρουσιάζουν μικρή αδυναμία,

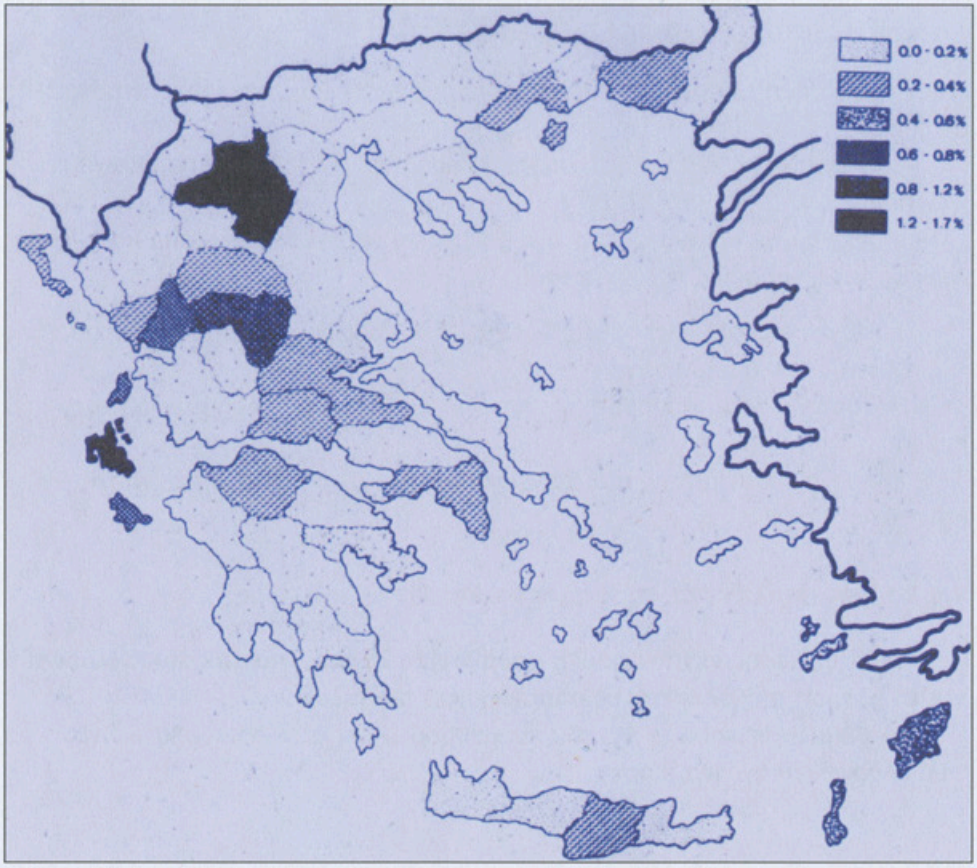
ελαφρύ ίκτερο καθώς και μικρή διόγκωση του σπλήνα. Υπάρχει ήπια αναιμία με μικρά ερυθρά αιμοσφαίρια (MCV) τα οποία είναι υπόχρωμα (όπως στη σιδηροπενία χωρίς όμως να υπάρχει έλλειψη σιδήρου).

Η ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης θέτει τη διάγνωση όπου συνήθως παρατηρείται αύξηση της αιμοσφαιρίνης HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$) πάνω από το διπλάσιο της φυσιολογικής.

2. Ομόζυγη μείζων Μεσογειακή αναιμία

Η νόσος εμφανίζεται μετά τους 4 – 6 πρώτους μήνες της ζωής, περίοδος όπου φυσιολογικά έχουμε μετάπτωση της παραγωγής των γ αλυσίδων της εμβρυϊκής HbF ($\alpha_2\gamma_2$) στις β αλυσίδες της αιμοσφαιρίνης A ($\alpha_2\beta_2$).

Η έλλειψη των β αλυσίδων έχει σαν αποτέλεσμα την κατακρήμνιση των α αλυσίδων και την ενδομυελική καταστροφή των ερυθρών (μη αποδοτική ερυθροποίηση).



Χάρτης 1.2. *Η κατανομή των ετεροζυγωτών της β μεσογειακής αναιμίας στον Ελληνικό πληθυσμό. Με κύκλους περιγράφονται περιοχές με αυξημένη συχνότητα ετεροζυγωτών με αιμοσφαιρινοπάθεια S*

Η νόσος χαρακτηρίζεται από αναιμία, αιμόλυση, υπικτερική χρώση του δέρματος και των επιπεφυκότων, ανορεξία, διάρροιες, υπερσπληνισμό.

Τα χαρακτηριστικά του προσώπου γίνονται μογγολοειδή (μεγάλη προβολή των ζυγωματικών και των μετωπιαίων οστών καθώς και κύρτωση της ράχης της ρινός).

Ο αιματοκρίτης είναι χαμηλός · 20%.

Η εξέταση του επιχρίσματος του αίματος αποκαλύπτει πολλά στοχοκύτταρα και δακρυοκύτταρα.

Στην ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης υπάρχουν μεγάλα ποσά HbF και ποικίλες ποσότητες αιμοσφαιρίνης A και A_2.

Θεραπεία

Η ζωή των ασθενών εξαρτάται από τις μεταγγίσεις αίματος που αποσκοπούν στη διατήρηση της αιμοσφαιρίνης πάνω από 10 gr.

Οι συχνές μεταγγίσεις έχουν σαν αποτέλεσμα την υπερφόρτωση του ασθενή με σίδηρο (Fe) και την εναπόθεσή του στους ιστούς (αιμοσιδήρωση). **Ο σίδηρος είναι τοξικός για τους ιστούς και ιδιαίτερα για την καρδιά.** Η χρόνια εναπόθεσή σιδήρου στην καρδιά προκαλεί καρδιακή ανεπάρκεια που είναι και η κυριότερη αιτία θανάτου των ασθενών με μεσογειακή αναιμία.

1.4. Αιμοσφαιρινοπάθεια S

Η αιμοσφαιρινοπάθεια **S** χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη παθολογικής αιμοσφαιρίνης **S (HbS)**. Στη θέση της αλυσίδας β υπάρχει η αλυσίδα βs που προκύπτει από την πρώτη με αντικατάσταση ενός μόνο αμινοξέος της αλυσίδας.

Έτσι το ερυθροκύτταρο που περιέχει αιμοσφαιρίνη **S** όταν βρίσκεται σε συνθήκες υποξίας ή οξέωσης αλλάζει μορφή και γίνεται δύσκαμπτο και ανελαστικό (δρεπανοκύτταρο).

Η δρεπανοκυτταρική νόσος περιλαμβάνει τη δρεπανοκυτταρική αναιμία **(ετερόζυγη – ομόζυγη)** καθώς και διπλά ετερόζυγες καταστάσεις όπως η μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία. Όλες οι μορφές χαρακτηρίζονται από ύπαρξη HbS. Είναι συχνή στους Μαύρους της Αμερικής αλλά και στους Μεσογειακούς λαούς (Χάρτης 1.2).

Ομόζυγη Δρεπάνωση

Στην ομόζυγη δρεπάνωση δεν υπάρχουν καθόλου β αλυσίδες αλλά μόνο αλυσίδες βs. Η Hb στα ερυθρά των ασθενών αυτών είναι κυρίως HbS ενώ δεν υπάρχει καθόλου HbA.

Παρατηρείται αναιμία (Ht 18–30%) λόγω έντονης αιμόλυσης.

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια στο αίμα είναι ορθόχρωμα - πολλά από τα οποία εμφανίζουν τη μορφή στοχοκυττάρων. Επίσης μπορεί να ανευρίσκονται και δρεπανοκύτταρα (Εικόνα 1.6).

Οι ασθενείς με ομόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία παρουσιάζουν αναστολή στην αύξηση και στην ανάπτυξη, αυξημένη ευαισθησία στις λοιμώξεις, ενώ χαρακτηριστικές είναι οι αγγειοαποφρακτικές κρίσεις. Οι αγγειοαποφρακτικές κρίσεις είναι επώδυνες κρίσεις που οφείλονται σε έμφρακτα που αποφράζουν μικρά αγγεία διαφόρων οργάνων.

Δημιουργείται έντονος πόνος στα σημεία της απόφραξης όπως έντονος θωρακικός πόνος, έντονος κοιλιακός πόνος, πόνος των οστών κ.λ.π.

Οι κρίσεις αυτές μπορεί να οφείλονται σε συνυπάρχουσα λοίμωξη αλλά πολλές φορές η αιτία τους είναι άγνωστη.

Μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία

Η μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία είναι σπάνια στη χώρα μας. Στη μικροδρεπανοκυτταρική αναιμία έχουμε συνύπαρξη της β μεσογειακής αναιμίας και της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας.

Η αναιμία εδώ είναι υπόχρωμη μικροκυτταρική με στοχοκύτταρα αλλά με σπάνια δρεπανοκύτταρα.

Εικόνα 1.6. *Επίχρισμα περιφερικού αίματος με δρεπανοκύτταρα*

Στην ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης παρατηρείται: HbA, HbS, HbF.

Η κλινική εικόνα εξαρτάται από τη δυνατότητα του οργανισμού να παράγει β αλυσίδες. Όσο λιγότερες β αλυσίδες παράγονται τόσο η κλινική εικόνα της μικροδρεπανοκυτταρικής αναιμίας μοιάζει με την εικόνα της ομόζυγης δρεπανοκυτταρικής αναιμίας.

Ετερόζυγη Δρεπανοκυτταρική αναιμία

Χαρακτηρίζεται από συνύπαρξη αλυσίδων β και αλυσίδων βs.

Στην ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης παρατηρείται HbA 55% και HbS στα ίδια περίπου ποσοστά.

Οι επώδυνες κρίσεις παρουσιάζονται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις υποξίας (απότομη άνοδος σε μεγάλο ύψος, κάτω από συνθήκες σκληρής σωματικής κόπωσης) και είναι όμοιες με εκείνες της ομόζυγης δρεπανοκυτταρικής αναιμίας.

Πρόληψη της δρεπανοκυτταρικής νόσου:

Αποφυγή συνθηκών υποξίας – οξέωσης, όπως η απότομη άνοδος σε μεγάλα ύψη, αεροσκάφη χωρίς ελεγχόμενη εσωτερική πίεση κενού, σκληρή σωματική κόπωση κ.λ.π.

Η διερεύνηση των θαλασσαιμιών και των αιμοσφαιρινοπαθειών γίνεται με τη βοήθεια των παρακάτω εξετάσεων:

α) Γενική αίματος, Fe, φεριτίνη, ερυθροκυτταρικοί δείκτες

β) Μελέτη της μορφολογίας των ερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα με προσοχή για την αποκάλυψη εγκλείστων

γ) Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης για τον ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο των αιμοσφαιρινών HbA, HbA_2, HbF, HbS.

δ) Έλεγχος αιμόλυσης: Χολερυθρίνη, LDH, ΔΕΚ, αιμοσφαιρίνη ούρων, ωσμωτική αντίσταση ερυθρών

ε) Δοκιμασία δρεπάνωσης

στ) Νεότερες τεχνικές όπως η βιοσύνθεση των αλυσίδων σφαιρίνης

1.5. Πρόληψη και Αντιμετώπιση των Κληρονομικών Αναιμιών

Τόσο οι αιμοσφαιρινοπάθειες όσο και οι θαλασσαιμίες κληρονομούνται με τον υπολειπόμενο σωματικό χαρακτήρα δηλαδή **οι ετεροζυγώτες** (άτομα που φέρουν έναν παθολογικό και ένα φυσιολογικό γόνο) είναι **απλοί φορείς** ενώ **οι ομοζυγώτες πάσχουν**.

Η κληρονομικότητα ακολουθεί τους νόμους του Medel σύμφωνα με την εφαρμογή των οποίων:

α) Τα τέκνα που προκύπτουν από συνεύρεση ενός ετεροζυγώτη με ένα υγιές άτομο έχουν πιθανότητες να είναι κατά 50% ετεροζυγώτες και 50% υγιή (Εικόνα 1.7).

β) Τα τέκνα που προκύπτουν από συνεύρεση δύο ετεροζυγωτών έχουν πιθανότητες να είναι κατά 25% υγιή, 50% ετερόζυγα και 25% ομόζυγα (πάσχοντες) για το συγκεκριμένο γόνο (Εικόνα 1.8).

Ο σημαντικότερος ρόλος στην πρόληψη των αιμοσφαιρινοπαθειών είναι η ενημέρωση και η προσπάθεια ανεύρεσης των ετεροζυγωτών (συνήθως φέρουν έναν παθολογικό γόνο αλλά είναι ασυμπτωματικοί).

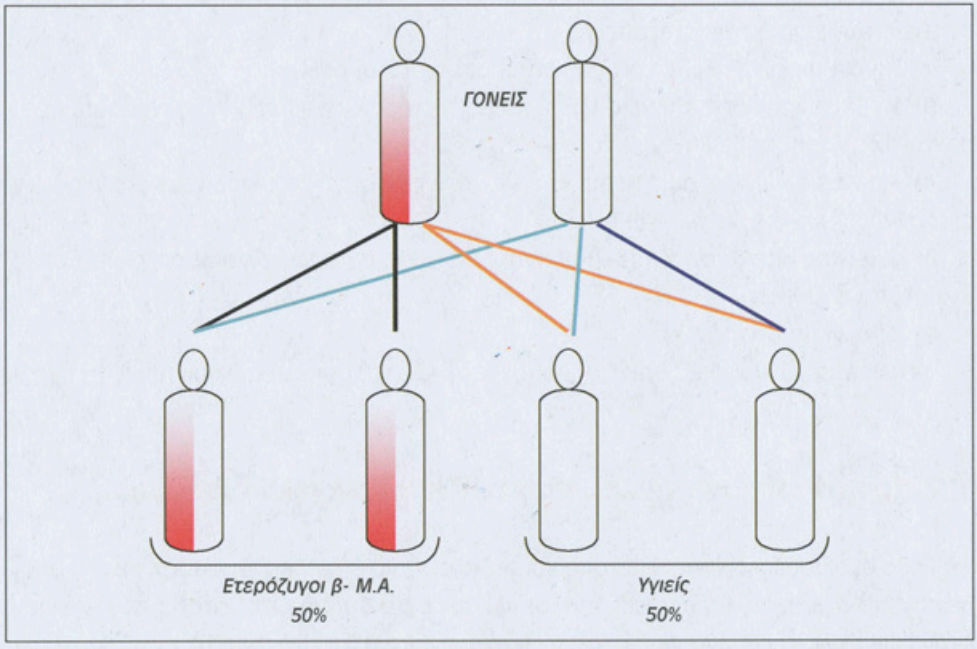
– Πρέπει να γίνεται ***προγαμιαίος έλεγχος*** με σκοπό την ανεύρεση και την ενημέρωση των ετεροζυγωτών.

– Σε περίπτωση γάμων μεταξύ ετεροζυγωτών είναι απαραίτητο να γίνεται ***προγεννητικός έλεγχος*** για την αποφυγή γεννήσεων ομοζυγωτών.

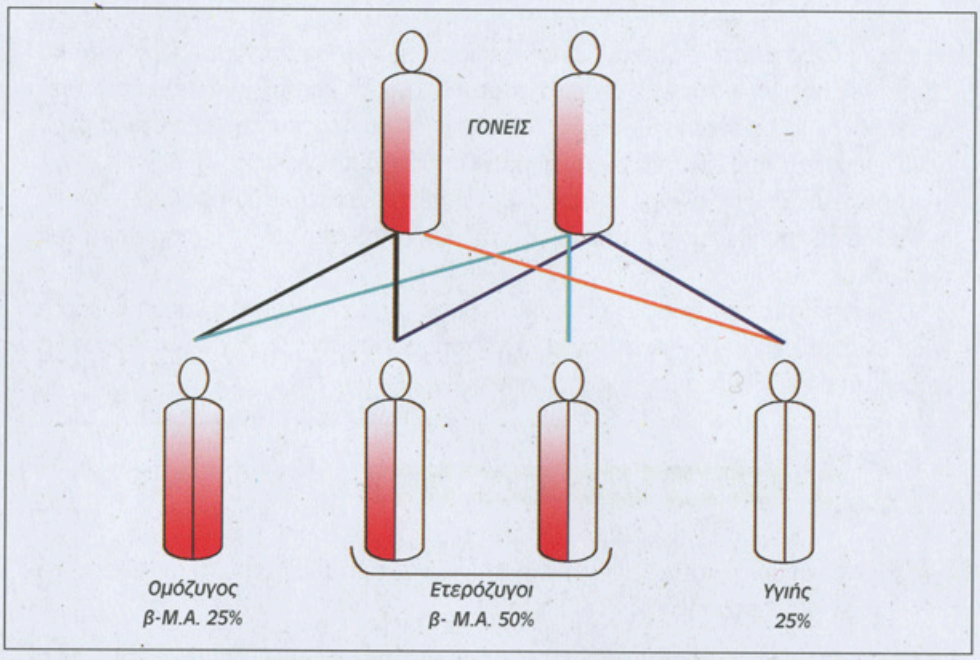
Η προγεννητική διάγνωση μπορεί να γίνει:

α) Με έλεγχο του αμνιακού υγρού σε υλικό αμνιοκέντησης την 13η – 15η εβδομάδα της κύησης.

β) Με λήψη εμβρυϊκού αίματος από τον πλακούντα (πλακουντοκέντηση) κατά την 18η – 20η εβδομάδα της κύησης.



Εικόνα 1.7. *Πιθανότητες που έχουν τα τέκνα όταν από τους γονείς ο ένας είναι υγιής και ο άλλος φορέας της β μεσογειακής αναιμίας*



Εικόνα 1.8. *Πιθανότητες που έχουν τα τέκνα όταν και οι δυο γονείς είναι φορείς της β μεσογειακής αναιμίας*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αναιμία είναι η πτώση του αιματοκρίτη ή της αιμοσφαιρίνης ή των ερυθροκυττάρων σε τιμές κάτω από τις φυσιολογικές.

Η αναιμία μπορεί να οφείλεται σε πλήθος αιτιών τα οποία ταξινομούνται σε τρεις ομάδες. Διακρίνουμε αναιμία οφειλόμενη: α) σε μειωμένη παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, β) σε αυξημένη καταστροφή ερυθρών αιμοσφαιρίων, γ) σε απώλεια αίματος. Στην πρώτη ομάδα κατατάσσονται κυρίως οι σιδηροπενικές και οι μεγαλοβλαστικές αναιμίες. Στη δεύτερη οι αιμολυτικές αναιμίες μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται οι αιμοσφαιρινοπάθειες και οι θαλασσαιμίες. Στην τρίτη ομάδα έχουμε αναιμίες που οφείλονται σε αιμορραγίες.

Οι αναιμίες μπορεί να είναι κληρονομικές και επίκτητες. Οι κληρονομικές μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά και ακολουθούν τους νόμους της κληρονομικότητας. Οι επίκτητες μπορεί να συμβούν σε κάθε άτομο είτε από παράγοντα ή απώλεια αίματος είτε από τοξική επίδραση εξωγενών αιτιών στο αιμοποιητικό σύστημα.

Η κλινική εικόνα των αναιμιών περιλαμβάνει συμπτώματα γενικά για όλες τις αναιμίες τα οποία προκύπτουν από αυτή καθ' αυτή την πτώση του αιματοκρίτη καθώς και συμπτώματα ειδικά για κάθε αναιμία. Τα ειδικά αυτά συμπτώματα μπορεί να οφείλονται: α) στην επίδραση της έλλειψης του αιμοποιητικού παράγοντα και

από άλλα συστήματα που τον χρησιμοποιούν (π.χ. έλλειψη Fe από το πεπτικό σύστημα, έλλειψη B_{12} από το νευρικό σύστημα), β) στη βασική νόσο που προκάλεσε την αναιμία (π.χ. κακοήθη λεμφώματα), γ) σε επιδράσεις της θεραπείας στον οργανισμό σε αυτές (συσσώρευση σιδήρου από τις μεταγγίσεις).

Η διερεύνηση της αναιμίας περιλαμβάνει πλήθος εξετάσεων που αφορούν τη διάγνωση της αναιμίας, την τυποποίησή της και την ανεύρεση του αιτίου που την προκάλεσε.

Η θεραπεία της αναιμίας είναι ανάλογη με το αίτιο. Μπορεί να είναι απλή χορήγηση ενός αιμοποιητικού παράγοντα (π.χ. σίδηρος από το στόμα για μικρό χρονικό διάστημα) ή και ιδιαίτερα πολύπλοκη όπως η δια βίου μεταγγίσεις.

Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας

1. Τι είναι αναιμία και πώς γίνεται η κλινική εκτίμησή της σε περιπτώσεις ταχείας εγκατάστασής της;
2. Ποια είναι τα αίτια που μπορεί να προκαλέσουν αναιμία και ποιες οι διαφορές μεταξύ αιμολυτικών και μεθαιμορραγικών αναιμιών
3. Ποια είναι η συχνότερα απαντόμενη αναιμία και πως γίνεται η διαγνωστική διερεύνησή της;
4. Πού οφείλονται οι αιμολυτικές αναιμίες και πώς μπορούμε να τις διακρίνουμε;
5. Σε μια αιμολυτική ή σε μια μεθαιμορραγική αναιμία ίδιας βαρύτητας έχουμε περισσότερες πιθανότητες να προχωρήσουμε σε μετάγγιση αίματος και γιατί;
6. Τι είναι θαλασσαιμίες και τι αιμοσφαιρινοπάθειες; Δώστε από ένα παράδειγμα – εξήγηση.
7. Τι είναι και τι περιγράφουν οι νόμοι του Medel;
8. Ποια είναι τα κοινά χαρακτηριστικά των θαλασσαιμιών;
9. Ποιες είναι οι 4 μορφές της α μεσογειακής αναιμίας;
10. Περιγράψτε τις αγγειοαποφρακτικές κρίσεις. Πού μπορεί να οφείλονται;
11. Γιατί οι ασθενείς με ομόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία δεν έχουν καθόλου αιμοσφαιρίνη Α;
12. Με ποιο τρόπο γίνεται ο προγαμιαίος και με ποιο ο προγεννητικός έλεγχος για την πρόληψη των αιμοσφαιρινοπαθειών;

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

αιμορραγικές καταστάσεις

2.1 Αιμόσταση και μηχανισμοί (Αγγειακός - Αιμοπεταλιακός)
2.1.1 Πρωτογενής αιμόσταση
2.1.2 Δευτερογενής αιμόσταση
2.2 Μηχανισμός της πήξης του αίματος
2.3 Ταξινόμηση των αιμορραγικών καταστάσεων και νόσων
ΠΕΡΙΛΗΨΗ
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

2.1. Αιμόσταση και μηχανισμοί (Αγγειακός - Αιμοπεταλιακός)

Αιμόσταση είναι η διακοπή, το «σταμάτημα» της αιμορραγίας που συμβαίνει μετά από κάκωση ενός αγγείου.

Η αιμόσταση δηλαδή είναι ένας αμυντικός μηχανισμός που βοηθάει τον οργανισμό να διατηρεί το αίμα μέσα στα αγγεία του μετά από κάθε αιμορραγία.

Εάν δεν υπήρχε ο μηχανισμός της αιμόστασης, κάθε αιμορραγία θα κατέληγε σε απώλεια όλου του αίματος του οργανισμού.

Η αιμόσταση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία συμμετέχουν επιμέρους μηχανισμοί που αλληλεπιδρούν όμως μεταξύ τους.

Διακρίνουμε τους μηχανισμούς:

α) του αγγειακού τοιχώματος

β) των αιμοπεταλίων

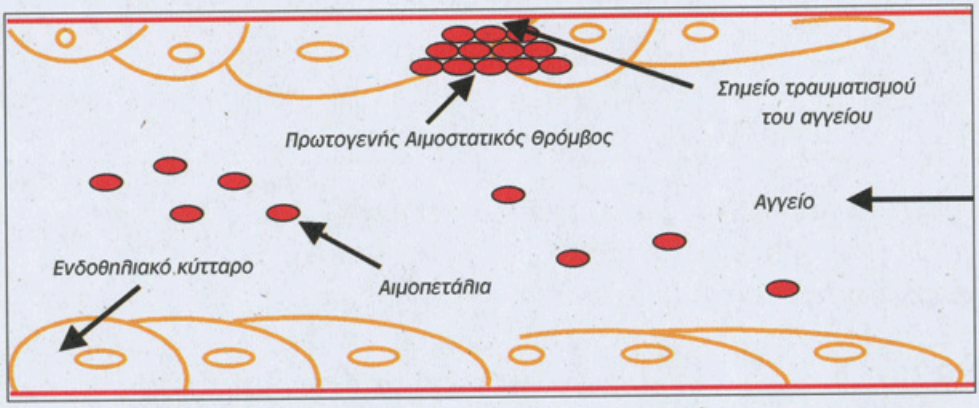
γ) των πρωτεϊνών της πήξεως του αίματος

Η αιμόσταση αρχίζει μερικά δευτερόλεπτα μετά την κάκωση του αγγείου και ολοκληρώνεται περίπου μια ώρα αργότερα. Έχουμε την αρχική ή πρωτογενή και τη δευτερογενή αιμόσταση.

2.1.1 Πρωτογενής αιμόσταση

Στην πρωτογενή αιμόσταση συμμετέχουν κυρίως ο μηχανισμός του αγγειακού τοιχώματος καθώς και ο μηχανισμός των αιμοπεταλίων (Εικόνα 2.1).

Στην αρχή γίνεται **σύσπαση του αγγείου** και ταυτόχρονα, λόγω της κάκωσης,



Εικόνα 2.1. *Μετά τον τραυματισμό του αγγείου αιμοπετάλια προσκολλώνται και συσσωρεύονται στο σημείο του τραύματος (πρωτογενής αιμοστατικός θρόμβος)*

αποκαλύπτεται το κολλαγόνο (ουσία που βρίσκεται μέσα στο τοίχωμα του αγγείου). Η αποκάλυψη της ουσίας αυτής προκαλεί λίγα αιμοπετάλια να προσκολληθούν πάνω στο σημείο του τραύματος (προσκόλληση των αιμοπεταλίων).

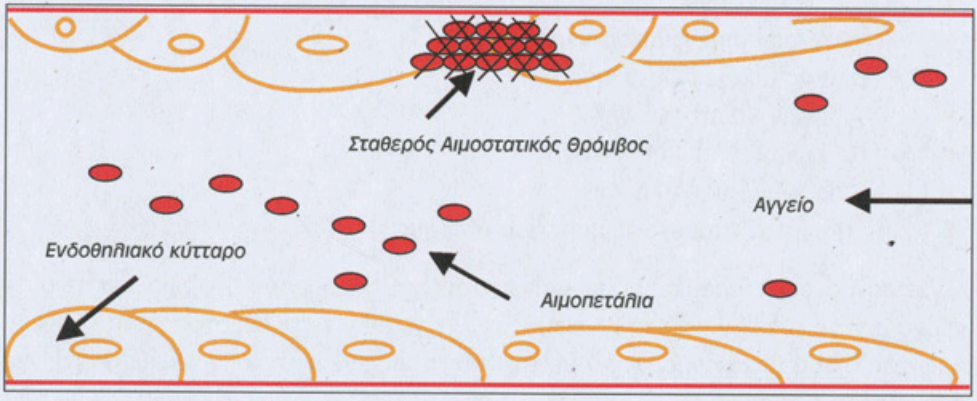
Τα αιμοπετάλια που **προσκολλούνται** αρχικά παράγουν ουσίες οι οποίες κινητοποιούν και άλλα αιμοπετάλια τα οποία **συσσωρεύονται** πάνω από αυτά που ήδη έχουν προσκολληθεί (συσσώρευση αιμοπεταλίων).

Με τους παραπάνω μηχανισμούς αγγειοσύσπαση – προσκόλληση – συσσώρευση αιμοπεταλίων δημιουργείται ο πρωτογενής αιμοστατικός θρόμβος και ολοκληρώνεται η πρωτογενής φάση της αιμόστασης.

2.1.2 Δευτερογενής αιμόσταση

Κατά τη δευτερογενή αιμόσταση **ο ήδη σχηματισμένος θρόμβος** (πρωτογενής αιμοστατικός θρόμβος) **γίνεται πιο στερεός και συμπαγής**. Αυτό επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση των παραγόντων της πήξης.

Η ενεργοποίηση αυτή έχει σαν τελικό αποτέλεσμα τη **μετατροπή του ινωδογόνου σε ινική** που περιχαρακώνει το θρόμβο σαν δίχτυ (δίκτυο ινικής) και τον κάνει πιο συμπαγή και πιο ισχυρό (σταθερός αιμοστατικός θρόμβος, Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2. *Με την ενεργοποίηση των παραγόντων πήξης, ο σχηματισμένος θρόμβος γίνεται σταθερός (σταθερός αιμοστατικός θρόμβος)*

2.2. Μηχανισμός της πήξης του αίματος

Όπως προαναφέρθηκε η πήξη του αίματος είναι ο τρίτος μηχανισμός αιμόστασης, η κινητοποίηση του οποίου αποσκοπεί στο σχηματισμό ινικής που θα καταστήσει το θρόμβο συμπαγή και στερεό.

Σε ανεπάρκεια του μηχανισμού της πήξης ο πρωτογενής θρόμβος που έχει σχηματιστεί από τα αιμοπετάλια δεν μπορεί να σταθεροποιηθεί στο σημείο της κάκωσης του αγγείου, απομακρύνεται έτσι από την κυκλοφορία με αποτέλεσμα τη συνέχεια της αιμορραγίας.

Στην πραγματικότητα ο μηχανισμός της πήξης του αίματος αποτελείται από πολλές ουσίες (παράγοντες) οι περισσότερες από τις οποίες είναι πρωτεΐνες. Παλαιότερα αναφέρονταν με πολλά ονόματα αλλά σήμερα για λόγους απλούστευσης περιγράφονται με λατινικούς αριθμούς. Δηλαδή:

- I - Ινωδογόνο
- II - Προθρομβίνη
- III - Ιστικός παράγων
- IV - Ασβέστιο
- V - Προαξελαρίνη
- VII - Προκομβερτίνη
- VIII - Α αντιαιμορροφιλικός παράγων
- IX - Β αντιαιμορροφιλικός παράγων
- X - Παράγων Stuart-Prower
- XI - Πρόδρομη θρομβοπλαστίνη
- XII - Παράγων Hugeman και
- XIII - Παράγων σταθεροποίησης του ινώδους

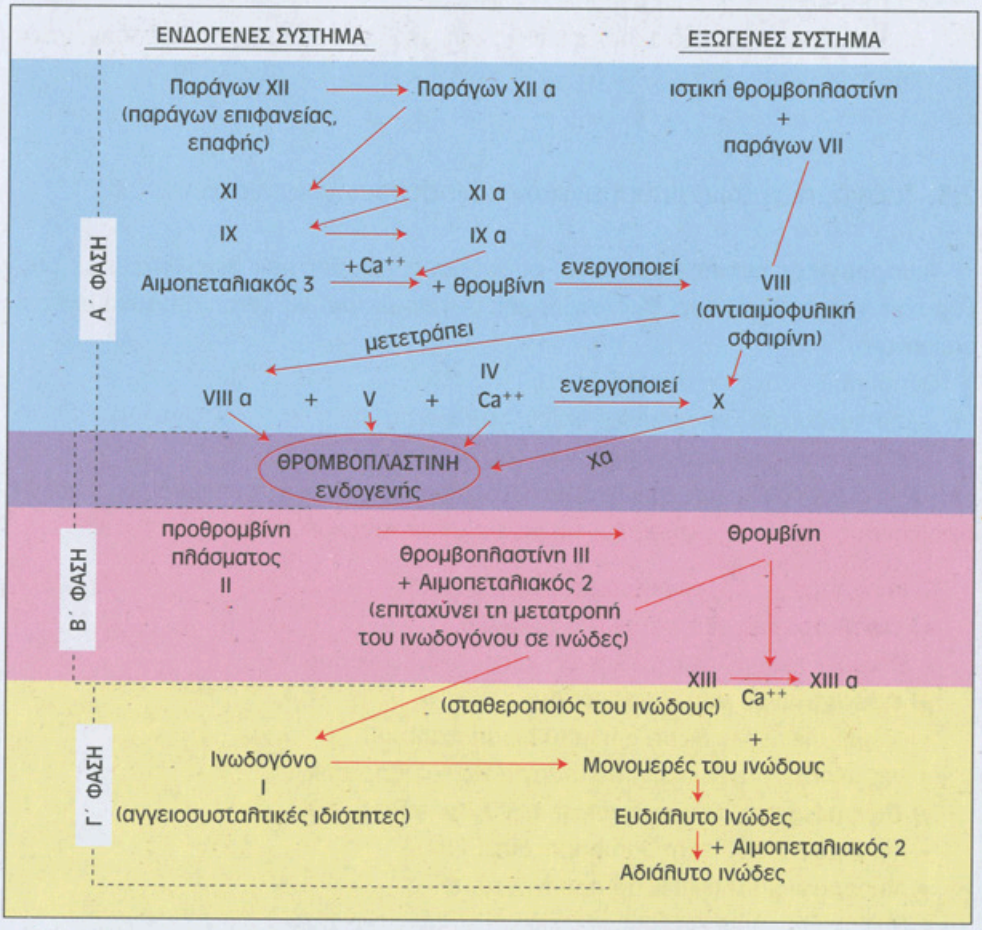
Σε καταστάσεις ηρεμίας οι πρωτεΐνες αυτές κυκλοφορούν στο πλάσμα σε ανενεργό μορφή. Όταν γίνει τραυματισμός του αγγείου γίνεται ενεργοποίηση κάποιων πρωτεϊνών του μηχανισμού, που με τη σειρά τους ενεργοποιούν άλλες πρωτεΐνες με καθορισμένη σειρά.

Η κάθε ενεργοποιημένη πρωτείνη ενεργοποιεί την επόμενη κ.ο.κ. Η σειρά αυτή των διαδοχικών ενεργοποιήσεων έχει παρομοιαστεί με καταρράκτη (καταρράκτη της πήξης) ο οποίος καταλήγει στη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί δρόμοι με τους οποίους μπορεί να γίνει έναρξη του μηχανισμού της πήξης. Η ενδογενής και η εξωγενής οδός της πήξης. Η διαφορά τους είναι ότι η πυροδότηση της έναρξης της λειτουργίας του «καταρράκτη της πήξης» γίνεται όσον αφορά την **ενδογενή οδό** από τη βλάβη του αγγειακού τοιχώ-

ματος του οποίου «αποκαλύπτονται» οι κολλαγόνες ίνες, ενώ στην **εξωγενή οδό** από βλάβη έξω από το αγγειακό τοίχωμα (από ιστούς δηλαδή που βρίσκονται γύρω από το τραυματισμένο αγγείο) και όχι από τους ίδιους τους ιστούς του αγγείου. Ο τραυματισμός των ιστών αυτών προκαλεί την απελευθέρωση της ιστικής θρομβοπλαστίνης η οποία και ενεργοποιεί την εξωγενή οδό της πήξης.

Τόσο η ενεργοποίηση της ενδογενούς όσο και της εξωγενούς οδού της πήξης καταλήγουν στην ενεργοποίηση του παράγοντα **X**. Με την ενεργοποίηση του παράγοντα X αρχίζει η κοινή οδός της πήξης (ίδια πορεία και για τις δυο οδούς). Ο ενεργοποιημένος παράγοντας **X**, παρουσία του παράγοντα **V** καθώς και **ασβεστίου** μετατρέπει την ανενεργό **προθρομβίνη** σε **θρομβίνη**, η οποία με τη σειρά της μετατρέπει το **ινωδογόνο** σε **ινώδες** και **δίκτυο ινικής**.



Εικόνα 2.3. *Σχηματική απεικόνιση του καταρράκτη της πήξης (με το χαρακτήρα α επισημαίνονται οι ενεργοποιημένοι παράγοντες)*

Το ασβέστιο που αναφέρεται και ως παράγοντας IV της πήξης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε όλες τις οδούς της πήξης.

Η έλλειψη παραγόντων της πήξης προκαλεί νόσους – αιμορραγικές καταστάσεις – ανάλογες με τον παράγοντα που λείπει.

Ο έλεγχος της αιμόστασης γίνεται με:

- τη μέτρηση των αιμοπεταλίων
- τη μέτρηση του χρόνου ροής
- τη μέτρηση του χρόνου πήξης
- τον έλεγχο συστολής θρόμβων
- τη μέτρηση του χρόνου προθρομβίνης
- τη μέτρηση του ινωδογόνου
- το thrombofax (παλαιά μέθοδος)
- άλλες πολύπλοκες δοκιμασίες καθώς και μετρήσεις επιπέδων των παραγόντων πήξης

2.3. Ταξινόμηση των αιμορραγικών καταστάσεων και νόσων

Αιμορραγικές καταστάσεις είναι οι παθήσεις εκείνες που οφείλονται σε διαταραχές της αιμόστασης. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να είναι κληρονομικές ή επίκτητες.

Οι παθήσεις αυτές χαρακτηρίζονται:

- Από αυτόματες αιμορραγίες (χωρίς σοβαρή αιτία)
- Από πετέχιες (μικρές αιμορραγίες του δέρματος)
- Από αιμορραγίες που εμφανίζονται μετά από χειρουργικές επεμβάσεις ή κακώσεις και που θα έπρεπε φυσιολογικά να έχουν σταματήσει.

Οι κυριότερες αιμορραγικές καταστάσεις είναι:

α) Οφειλόμενες στο αγγειακό τοίχωμα

- Εύκολες εκχυμώσεις, μελανιές, γεροντικό εξάνθημα

β) Οφειλόμενες στα αιμοπετάλια

- Θρομβοπενίες (μείωση αριθμού αιμοπεταλίων).
- Θρομβοασθένειες (κακή λειτουργία των αιμοπεταλίων)

γ) Οφειλόμενες σε διαταραχές των παραγόντων πήξεως

- Αιμορροφιλία Α (έκπτωση παράγοντα VIII)
- Αιμορροφιλία Β (έκπτωση παράγοντα IX)
- Ηπατική ανεπάρκεια
- Shock

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αιμόσταση είναι ένας αμυντικός μηχανισμός που βοηθά τον οργανισμό να διατηρεί το αίμα του μετά από κακώσεις των αγγείων. Το αποτέλεσμα της αιμόστασης είναι η δημιουργία σταθερού θρόμβου που επικάθεται στο σημείο της κάκωσης του αγγείου και σταματά την αιμορραγία.

Στη διαδικασία της αιμόστασης συμμετέχουν τα αγγεία, τα αιμοπετάλια και ο μηχανισμός πήξης. Οποιαδήποτε κληρονομική η επίκτητη διαταραχή στους παραπάνω μηχανισμούς έχει σαν αποτέλεσμα νόσο. Οι παραπάνω νόσοι ονομάζονται αιμορραγικές καταστάσεις και χαρακτηρίζονται από την εμφάνιση αυτόματων αιμορραγιών ή επίταση – παράταση αιμορραγιών που θα έπρεπε να έχουν σταματήσει.

Η διερεύνηση των αιμορραγικών καταστάσεων περιλαμβάνει πλήθος εξετάσεις με τις οποίες μπορούμε να ανακαλύψουμε το σημείο εκείνο του αιμοστατικού μηχανισμού που έχει υποστεί τη διαταραχή και σαν αποτέλεσμα την εγκατάσταση της αιμορραγικής νόσου.

Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:

1. Τι είναι αιμόσταση και ποίοι είναι οι μηχανισμοί της αιμόστασης;
2. Περιγράψτε το μηχανισμό πήξης του αίματος;
3. Τι είναι πήξη του αίματος;
4. Τι είναι αιμορραγικές καταστάσεις;
5. Ποιες αιμορραγικές καταστάσεις γνωρίζετε;
6. Ποιες είναι οι σημαντικότερες κλινικές εκδηλώσεις των αιμορραγικών καταστάσεων;
7. Τι είναι ο «καταρράκτης της πήξης» ;
8. Με ποιες εξετάσεις (ονομαστικά) γίνεται ο έλεγχος της αιμόστασης;

9. Τι είναι ο πρωτογενής και τι ο σταθερός αιμοστατικός θρόμβος;

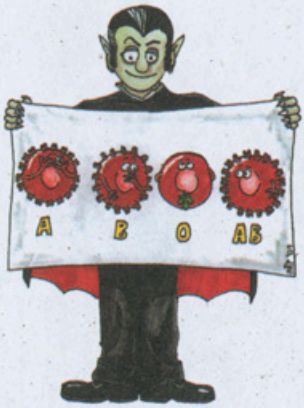
10. Ποιο είναι το αποτέλεσμα της πήξης;

11. Τι σχέση έχει ο μηχανισμός αιμόστασης με το μηχανισμό πήξης του αίματος;

12. Τι είναι ενδογενής και τι εξωγενής οδός ως μηχανισμός πήξης;

– ΔΕΥΤΕΡΟ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ –

β. αιμοδοσία ΙΙ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

σύστημα ομάδων αίματος ΑΒΟ

3.1 Ερυθροκυτταρικά αντιγόνα
3.1.1 Γενικά
3.1.2 Αντιγονα του συστήματος ΑΒΟ
3.1.3 Υποομάδες αντιγόνου Α
3.2 Κληρονομικότητα των αντιγόνων ΑΒΟ
3.3 Ουσίες που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα ΑΒΟ φυτικής ή ζωικής προέλευσης
3.4 Κατανομή των αντιγόνων ΑΒΟ στην Ελλάδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

3.1. Ερυθροκυτταρικά αντιγόνα

3.1.1 Γενικά

Αρκετές φορές κατά το παρελθόν, αναφέρονται προσπάθειες που έγιναν για να πραγματοποιηθούν μεταγγίσεις αίματος, από ζώο σε άνθρωπο ή από άνθρωπο σε άνθρωπο. Στην πλειοψηφία τους ήταν αποτυχημένες. Ο ασθενής παρουσίαζε βαρύτατες αντιδράσεις, αλλεργικά φαινόμενα, έντονο πόνο στο στήθος, οσφυαλγία, αιμοσφαιρινουρία κ.λ.π. με συνήθη κατάληξη το θάνατο.

Το έτος 1900 ο Karl Landsteiner ανακάλυψε το σύστημα ΑΒΟ, που αποτελεί και το σημαντικότερο από όλα τα συστήματα ομάδων αίματος.

Ο Landsteiner πήρε δείγματα αίματος από τους συναδέλφους του, χώρισε τον ορό από τα κύτταρα, έκανε εναιώρημα κυττάρων και ανέμειξε τον ορό του καθενός με τα εναιωρήματα των υπολοίπων. Τότε παρατήρησε ότι άλλα μείγματα έκαναν συγκόλληση και άλλα όχι. Με τη μέθοδο αυτή, κατηγοριοποίησε τα δείγματα σε τρεις ομάδες, τις Α, Β και Ο.

Δύο χρόνια αργότερα προστέθηκε και η τέταρτη ομάδα ΑΒ από τους Sturli και Decastello. Επίσης, ο Landsteiner διαπίστωσε πως με την παρουσία ή την απουσία δυο μονάχα αντιγόνων, των Α και Β, ήταν δυνατό να αποτυπωθεί η ύπαρξη 4 ομάδων αίματος. Ακόμα ανακάλυψε ότι **στον ορό κάθε ανθρώπου περιέχεται κάποιο αντίσωμα που ενεργεί εναντίον των αντιγόνων τα οποία απουσιάζουν από τα ερυθρά αιμοσφαίρια του συγκεκριμένου ατόμου (δηλαδή αν είναι ομάδας Α περιέχει αντισώματα αντι-Β).**

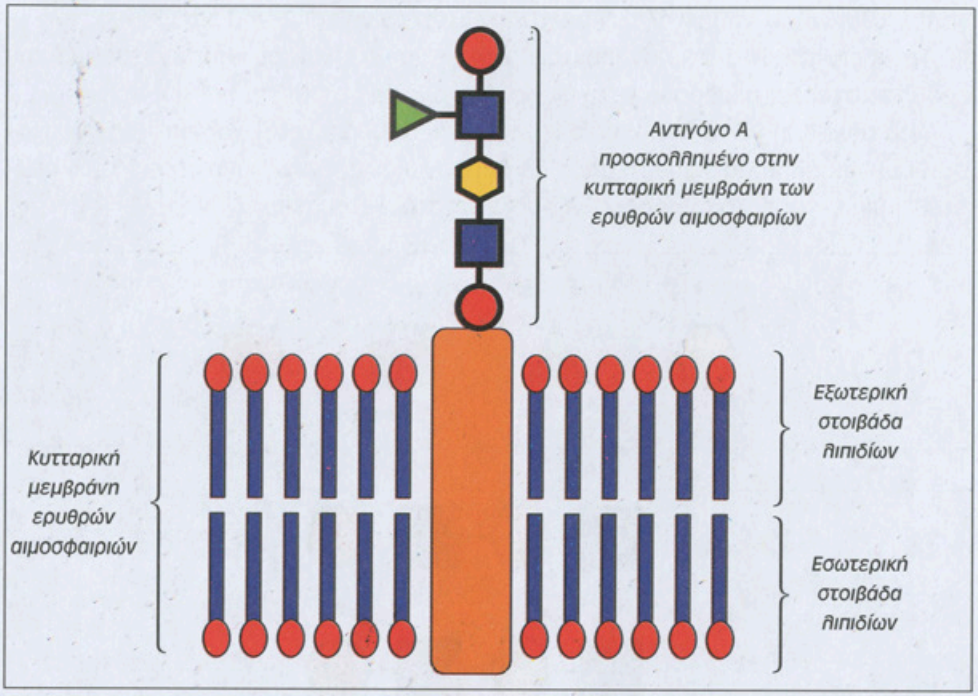
Τι πράγμα όμως είναι τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα;

Η δομή της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Εικόνα 3.1), σχηματίζεται από λιπίδια και πρωτεΐνες. Τα λιπίδια είναι τοποθετημένα με τη μορφή διπλής στοιβάδας (διπλοστοιβάδα). Από τις πρωτεΐνες άλλες είναι διαμεμβρανικές και άλλες όχι.

Βασικές πρωτεΐνες της μεμβράνης είναι οι γλυκοφορίνες Α και Β και η πρωτεΐνη 3. Αυτές διεκπεραιώνουν αρκετές λειτουργίες του κυττάρου αλλά ταυτόχρονα έχουν κυρίαρχο ρόλο σαν αντιγόνα. Οι προαναφερόμενες πρωτεΐνες είναι διαμεμβρανικές, επομένως κάποιο τμήμα τους εξέχει της κυτταρικής μεμβράνης. Ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων ή των σακχάρων του προεξέχοντος τμήματος, τα κύτταρα αποκτούν ταυτότητα. Τα αντιγόνα είναι τα δακτυλικά αποτυπώματα των κυττάρων. Πράγματι αυτά αποτελούν τα συστήματα ομάδων αίματος.

Η ερυθροβλάστη, ωριμάζοντας προς ερυθρό αιμοσφαίριο, χάνει έναν πολύ σημαντικό πληθυσμό αντιγόνων. Ωστόσο διατηρούνται αρκετά ώστε να μπορούν να καταταγούν σε 20 διαφορετικά συστήματα ομάδων αίματος.

Συνοψίζοντας, το πρωτεϊνικό τμήμα που εξέχει της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης παρέχει στο κύτταρο αντιγονική ικανότητα. Η αλληλουχία των αμινοξέων και των σακχάρων του τμήματος αποτελούν τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα ή συγκολλητινογόνα.



Εικόνα 3.1. *Σχηματική παράσταση της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των αντιγόνων της*

3.1.2 Αντιγόνα του συστήματος ΑΒΟ

Η μορφή των αντιγόνων του συστήματος ΑΒΟ καθορίζεται από την αλληλουχία των σακχάρων που συνδέονται με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Τα σάκχαρα μπορούν να συνδεθούν με τη μεμβράνη με δυο τρόπους. Είτε απευθείας το σάκχαρο ενώνεται με την εξωτερική λιπιδική στοιβάδα, προσκολλάται σε ένα μόριο σφιγγομυελίνης και σχηματίζεται ένα γλυκολιπίδιο, είτε το σάκχαρο συνδέεται με μια πρωτεΐνη σχηματίζοντας γλυκοπρωτεϊνικό δεσμό.

Τα σάκχαρα που δημιουργούν τις αντιγονικές αλυσίδες είναι 4. Τα εξής:

- N-ακετυλογαλακτοζαμίνη,
- D-γαλακτόζη,
- N-ακετυλογλυκοζαμίνη και

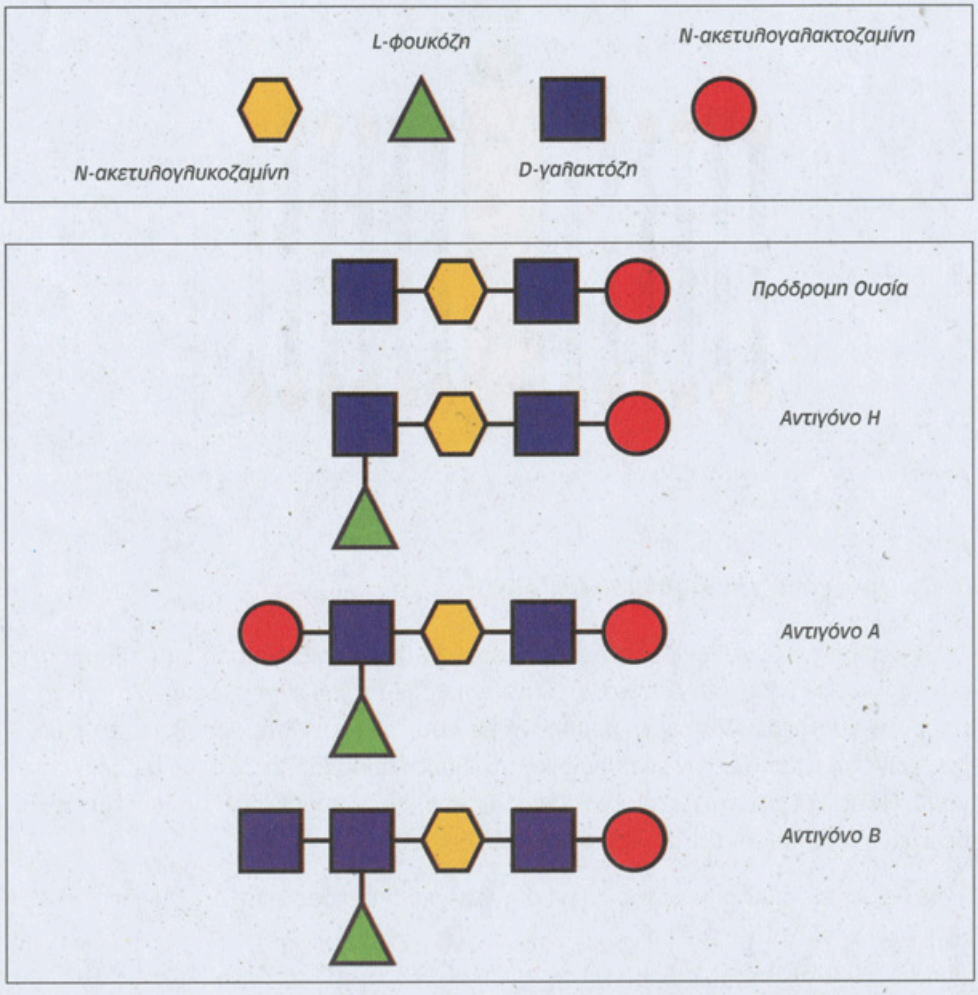
- L-φουκόζη.

Από αυτά προέρχονται όλες οι ομάδες του συστήματος ΑΒΟ (Εικόνα 3.2).

Στην αρχή συντίθεται μια πρόδρομη ουσία που στερείται αντιγονικών ιδιοτήτων. Η πρόδρομη ουσία αποτελείται από σάκχαρα με την εξής αλληλουχία: N-ακετυλογαλακτοζαμίνη, D-γαλακτόζη, N-ακετυλογλυκοζαμίνη και D-γαλακτόζη.

Το μόριο της N-ακετυλογαλακτοζαμίνης είναι εκείνο που θα συνδεθεί με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη (είτε με πρωτεΐνη, είτε με λιπίδιο).

Από την άλλη μεριά της αλυσίδας βρίσκεται το μόριο της D-γαλακτόζης. Αν προστεθούν και άλλα σάκχαρα, η αλυσίδα λαμβάνει αντιγονικές ιδιότητες. Μόλις προστεθεί μια L-φουκόζη, η πρόδρομη ουσία μετατρέπεται σε αντιγόνο Η.



Εικόνα 3.2. *Σχηματική παράσταση των αντιγόνων που απαρτίζουν το σύστημα ομάδων ΑΒΟ*

Το αντιγόνο Η γίνεται αντιγόνο Α άν προσθέσουμε μια Ν-ακετυλογαλακτοζαμίνη στη μεριά της D-γαλακτόζης.

Αντίθετα αν προσθέσουμε μια D-γαλακτόζη στο αντιγόνο Η, θα τροποποιηθεί σε αντιγόνο Β.

Ανάλογα με την παρουσία τους ή την απουσία τους διακρίνουμε τις εξής ομάδες:

1. Ομάδα Α παρουσία των αντιγόνων Η και Α.

2. Ομάδα Β παρουσία των αντιγόνων Η και Β.

3. Ομάδα ΑΒ παρουσία των αντιγόνων Η, Α και Β.

4. Ομάδα Ο παρουσία του αντιγόνου Η.

Παρατηρείται ότι το αντιγόνο Η υπάρχει στο σύνολο των κατηγοριών και αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την έκφραση όλων των ομάδων του συστήματος ΑΒΟ.

Ήδη αναφέρθηκε ότι στα άτομα, που τα ερυθρά τους δεν φέρουν κάποιο από τα αντιγόνα (συγκολλητινογόνα) αυτά, ο ορός τους περιέχει αντίσωμα (συγκολλητίνη) που ενώνεται και αντιδρά με το απόν αντιγόνο (στην περίπτωση που συνευρεθούν).

Ανάλογα με τα αντιγόνα που φέρουν στα ερυθρά τους και τα αντισώματα που περιέχουν στον ορό τους, κατατάσσουμε τους ανθρώπους σε 4 κύριες ομάδες του συστήματος ΑΒΟ.

3.1.3 Υποομάδες αντιγόνου Α

Παρά τις 4 κύριες ομάδες που περιγράφηκαν, από το 1911 είναι γνωστό πως η ομάδα Α διακρίνεται σε υποκατηγορίες (A_1, A_2, A_3,....A_X).

Οι σπουδαιότερες αυτών είναι δυο οι A_1 και A_2.

Η A_1 παρουσία ανθρώπινου αντι-A_1 ορού ή λεκτίνης αντι-A_1 προκαλεί συγκολλήσεις στα κύτταρα. Αντίθετα τα κύτταρα A_2 υποομάδας δεν συγκολλούνται.

Ο ανθρώπινος αντι-A_1 ορός κυκλοφορεί στο εμπόριο. Η λεκτίνη αντι-A_1 παράγεται από σπόρους του φυτού Dolichos biflorus.

Οι οροί αντι-Α, σπανίως είναι ικανοί να ξεχωρίσουν μεταξύ A_1 και A_2 υποομάδας.

Από τα άτομα που έχουν ομάδα Α, το 80% ανήκει στην υποκατηγορία A_1 και αναγνωρίζονται γιατί τα ερυθρά τους αιμοσφαίρια συγκολλούνται με την παρουσία του ορού αντι-A_1.

Το υπόλοιπο 20% περίπου των ατόμων ομάδας Α ανήκει στην υποομάδα A_2. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια αυτών των ανθρώπων συγκολλούνται από τον ορό αντι-Α αλλά όχι από τον ορό ή τη λεκτίνη αντι-A_1.

Εκτός από την ομάδα Α και η ομάδα Β παρουσιάζει υποομάδες οι οποίες είναι πολύ σπάνιες και μικρότερης σημασίας.

3.2. Κληρονομικότητα των αντιγόνων ΑΒΟ

Κατά τη γέννηση ενός ατόμου, τα αντιγόνα του συστήματος ΑΒΟ δεν έχουν αναπτυχθεί εντελώς. Αναπτύσσονται μέχρι το 2ο-4ο έτος κατά την οποία συμπληρώνεται η ανάπτυξή τους και έκτοτε παραμένουν σταθερά για όλη την υπόλοιπη ζωή.

Η παραγωγή των συγκεκριμένων αντιγόνων ρυθμίζεται βάσει γενετικών κανόνων από καθορισμένα γονίδια.

Τα γονίδια που ρυθμίζουν την παραγωγή και την έκφραση των αντιγόνων εδράζονται στα μακρά σκέλη του χρωμοσώματος 9 και είναι τρία αλληλόμορφα ζεύγη.

Τα εξής:

1. Το ζευγάρι Η/h, με το γόνο Η επικρατή και το γόνο h υπολειπόμενο

2. Το ζευγάρι ΑΒΟ, με τους γόνους Α και Β επικρατείς και το γόνο Ο υπολειπόμενο και

3. Το ζευγάρι Se/se, με το γόνο Se επικρατή και το γόνο se υπολειπόμενο.

- Όπως αναφέρθηκε στην πρώτη ενότητα του κεφαλαίου, αρχικώς συντίθεται μια πρόδρομη ουσία χωρίς αντιγονικές ιδιότητες. Κατόπιν προστίθεται ένα σάκχαρο και η πρόδρομη ουσία μετατρέπεται σε αντιγόνο Η. Ουσιαστικά ο γόνος Η ευθύνεται για την παραγωγή του αντιγόνου Η. Όταν ο γονότυπος έχει τη σύσταση Η/Η ή Η/h, τότε εξασφαλίζεται η σύνθεση του αντιγόνου Η, που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την παραγωγή των αντιγόνων Α και Β αφού είναι ο βιοχημικός σκελετός τους.
- Αναφορικά με το δεύτερο αλληλόμορφο ζεύγος των γόνων ΑΒΟ γνωρίζουμε αρκετά στοιχεία. Το γονίδιο Α ευθύνεται για την προσκόλληση ουσιών στο αντιγόνο Η και τη μετατροπή του σε αντιγόνο Α. Παρόμοια ο γόνος Β, με ανάλογο τρόπο, συνδέει ουσίες στο αντιγόνο Η και το μετατρέπει σε αντιγόνο Β. Αντίθετα ο γόνος Ο αφήνει το αντιγόνο Η να παραμένει ως έχει. Σύμφωνα με όλα αυτά, οι ομάδες κατά ΑΒΟ εμφανίζουν τους εξής γονότυπους:

1. Ομάδα Α: γόνοι Α/Α ή Α/Ο και Η/Η ή Η/h

2. Ομάδα Β: γόνοι Β/Β ή Β/Ο και Η/Η ή Η/h

3. Ομάδα ΑΒ: γόνοι Α/Β και Η/Η ή Η/h

4. Ομάδα Ο: γόνοι Ο/Ο και Η/Η ή Η/h

- Το τρίτο αλληλόμορφο ζεύγος αφορά τους εκκριτικούς (secretors) γόνους. Αυτοί είναι οι Se (επικρατής γόνος) και se (υπολειπόμενος γόνος). Από τη δράση τους οφείλεται αν τα αντιγόνα της ομάδας ΑΒΟ θα περιέχονται στα υγρά που εκκρίνουν οι αδένες ενός ανθρώπου (π.χ. σίελο κ.λ.π.). Ο γόνος **Se είναι υπεύθυνος** για την παρουσία των αντιγόνων ΑΒΟ στις εκκρίσεις. Απεναντίας ο γόνος **se δεν ευθύνεται** για την παρουσία τους στις εκκρίσεις. Όταν έχουμε γονότυ-

πο Se/Se ή Se/se, τότε τα άτομα είναι εκκριτικού τύπου. Στην περίπτωση όμως που πρόκειται για γονότυπο se/se, τα άτομα είναι μη εκκριτικού τύπου (nonsecretors), εκκρίνονται κάποιες γλυκοπρωτεΐνες που στερούνται της αντιγονικής δράσης των Η, Α, και Β. Το 80% του πληθυσμού περίπου ανήκει στον εκκριτικό τύπο και το 20% στο μη εκκριτικό.

Πριν κλείσουμε αυτήν την ενότητα, δεν πρέπει να παραλείψουμε να αναφέρουμε την **ομάδα Bombay**.

Είδαμε πως ο γόνος Η είναι υπεύθυνος για την παραγωγή του αντιγόνου Η. Στην πολύ σπάνια περίπτωση, που το άτομο είναι ομόζυγο στον υπολειπόμενο γόνο h/h, τότε δεν παράγεται αντιγόνο Η. Έτσι, μολονότι παράγονται σε ικανοποιητικά επίπεδα τα συστατικά για τη δημιουργία των Α και Β αντιγόνων, αυτά ουσιαστικά είναι ανίκανα να συναρμολογηθούν αφού δεν υπάρχει αντιγόνο Η, που αποτελεί τον κορμό των υπολοίπων.

Η ομάδα αυτή λέγεται **«φαινότυπος Oh»** ή **«ομάδα Bombay»** γιατί πρωτοανακαλύφθηκε στην Ινδία που συναντώνται και τα περισσότερα περιστατικά.

Ο ορός ανθρώπου με ομάδα Bombay περιέχει αντισώματα αντι-Α, αντι-Β και αντι-Η, προκαλώντας συγκολλήσεις με όλα τα ερυθρά του συστήματος ΑΒΟ.

Ασθενής τέτοιας ομάδας μπορεί να λάβει μετάγγιση με αίμα μόνο της ίδιας ομάδας. Ευτυχώς είναι πολύ σπάνια και στον Ελλαδικό χώρο σχεδόν ανύπαρκτη.

3.3. Ουσίες που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα ΑΒΟ φυτικής ή ζωικής προέλευσης

Σήμερα υπάρχουν αρκετά φυτικά ή ζωικά παρασκευάσματα που δρουν σαν συγκολλητίνες. Η χρήση τους στα εργαστήρια και κυρίως στις αιμοδοσίες είναι ευρύτατα διαδεδομένη.

Η μεγάλη βοήθεια που μας προσφέρουν είναι η **ταυτοποίηση της ομάδας αίματος άγνωστων ερυθρών αιμοσφαιρίων**.

Μερικά από τα παρασκευάσματα αυτά που λέγονται και λεκτίνες είναι:

1. Η ουσία αντι-Α, λαμβανόμενη από αδένες ή αυγά φιδιών που ανήκουν στα είδη Helix pomatia, Helix hortensis κ.ά.

2. Η ουσία αντι-Β, αντλούμενη από το μύκητα Fomes fomentarius.

3. Η ουσία αντι-A_1, που παρασκευάζεται από σπόρους του φασολιού Dolichos biflorus. Έχει την πολύτιμη ιδιότητα να αντιδρά πολύ έντονα με ερυθρά υποομάδας A_1, προκαλώντας συγκολλήσεις ενώ αντιδρά ελάχιστα ή καθόλου με ερυθρά υποομάδας A_2. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να διακρίνουμε τις υποομάδες της ομάδας Α.

4. Η ουσία αντι-Η, η οποία λαμβάνεται από εκχυλίσματα του φασολιού Ulex Europeus. Αυτή αντιδρά και προκαλεί συγκολλήσεις με ερυθρά ομάδας Ο, A_2 και A_2B αλλά παρουσιάζει πολύ μικρή αντίδραση με ελάχιστη ή ανύπαρκτη συγκόλληση σε ερυθρά ομάδας A_1, A_1B και Β.

3.4. Κατανομή των αντιγόνων ΑΒΟ στην Ελλάδα

Στην Ελληνική καθώς και στην υπόλοιπη Ευρωπαϊκή φυλή, οι ομάδες, κατά το σύστημα ΑΒΟ, που βρίσκονται σε μεγάλη αναλογία είναι οι Α και Ο.

Σε λαούς άλλων φυλών, όπως οι Ινδοί καθώς και σε νομαδικές φυλές που ζουν στην Ευρώπη, η αναλογία αυτή αλλάζει και πλειοψηφούν άλλες ομάδες (Β, ΑΒ).

Όσον αφορά τον Ελλαδικό γεωγραφικό χώρο, η πληθυσμιακή κατανομή των αντιγόνων του συστήματος ΑΒΟ περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

Γονότυπος	Φαινότυπος	Αντιγόνα	Συχνότητα %	Αντισώματα
A_1/A_1 A_1/A_2 A_1/O	A_1	A_1	32	Αντι-Β
A_2/A_2 A_2/O	A_2	A_2, Η	8	Αντι-Β Αντι-A_1 3%
Β/Β Β/Ο	Β	Β	14	Αντι-A_1
A_1/B A_2/B	A_1B A_2B	A_1, Β A_2, Β	5	Κανένα Αντι-A_1 25%
Ο/Ο	Ο	Η	41	Αντι-Α Αντι-Β
h/h	Bombay	Κανένα		Αντι-Η Αντι-A_1 Αντι-Β

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πρωτεϊνικό τμήμα που εξέχει της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης παρέχει στο κύτταρο αντιγονική ικανότητα. Η αλληλουχία των αμινοξέων και των σακχάρων του τμήματος αποτελούν τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα ή συγκολλητινογόνα.

Το έτος 1900 ο Karl Landsteiner ανακάλυψε το σύστημα ΑΒΟ, το οποίο αποτελεί και το σημαντικότερο από όλα τα συστήματα ομάδων αίματος.

Η μορφή των αντιγόνων του συστήματος ΑΒΟ καθορίζεται από την αλληλουχία των σακχάρων που συνδέονται με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Τα σάκχαρα που δημιουργούν τις αντιγονικές αλυσίδες είναι 4. Από αυτά προέρχονται όλες οι ομάδες του συστήματος ΑΒΟ. Στην αρχή συντίθεται μια πρόδρομη ουσία που στερείται αντιγονικών ιδιοτήτων. Σ' αυτήν αν προστεθούν και άλλα σάκχαρα, η αλυσίδα λαμβάνει αντιγονικές ιδιότητες. Το αντιγόνο Η υπάρχει στο σύνολο των κατηγοριών και αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την έκφραση όλων των ομάδων του συστήματος ΑΒΟ. Στα άτομα, που τα ερυθρά τους δεν φέρουν κάποιο από τα αντιγόνα (συγκολλητινογόνα) αυτά, ο ορός τους περιέχει αντίσωμα (συγκολλητίνη) το οποίο ενώνεται και αντιδρά με το απόν αντιγόνο (στην περίπτωση που συνευρεθούν).

Παρά τις 4 κύριες ομάδες που περιγράφηκαν, η ομάδα Α διακρίνεται σε υποκατηγορίες. Οι σπουδαιότερες αυτών είναι δύο οι A_1 και A_2.

Η παραγωγή των αντιγόνων ρυθμίζεται βάσει γενετικών κανόνων από καθορισμένα γονίδια. Τα γονίδια που ρυθμίζουν την παραγωγή και την έκφραση των αντιγόνων είναι τρία αλληλόμορφα ζεύγη.

Τα εξής:

1. Το ζευγάρι H/h, με το γόνο H επικρατή και το γόνο h υπολειπόμενο

2. Το ζευγάρι ΑΒΟ, με τους γόνους Α και Β επικρατείς και το γόνο Ο υπολειπόμενο και

3. Το ζευγάρι Se/se, με το γόνο Se επικρατή και το γόνο se υπολειπόμενο.

Στην πολύ σπάνια περίπτωση, κατά την οποία το άτομο είναι ομόζυγο στον υπολειπόμενο γόνο h/h, τότε εμφανίζεται μια περίεργη ομάδα που λέγεται **«φαινότυπος Oh»** ή **«ομάδα Bombay»**.

Σήμερα υπάρχουν αρκετά φυτικά ή ζωικά παρασκευάσματα που δρουν σαν συγκολλητίνες. Η χρήση τους στα εργαστήρια και κυρίως στις αιμοδοσίες είναι ευρύτατα διαδεδομένη.

Στην Ελληνική καθώς και στην υπόλοιπη Ευρωπαϊκή φυλή, οι ομάδες κατά το σύστημα ΑΒΟ που βρίσκονται σε μεγάλη αναλογία είναι οι Α και Ο.

Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:

1. Ποια είναι η πρώτη ουσία με αντιγονικές ιδιότητες στο σύστημα ΑΒΟ;
2. Ποια αντισώματα περιέχονται στον ορό δύο ανθρώπων που ο ένας έχει ομάδα ΑΒ και ο άλλος Ο;
3. Πώς ξεχωρίζουμε σε ποια υποομάδα ανήκει ένα άτομο ομάδας Α;
4. Τι είναι η ομάδα Bombay;
5. Τι ρυθμίζουν οι γόνοι Se και se; Άτομο με γονότυπο se/se τι αντιγόνα περιέχει στις εκκρίσεις του;
6. Ένας τραυματίας με ομάδα αίματος Ο, αν χρειαστεί μετάγγιση αίματος θα βρει συμβατό αίμα εύκολα ή δύσκολα και γιατί;
7. Ποιο αντιγόνο του συστήματος ΑΒΟ είναι η βάση για τα υπόλοιπα;

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα

4.1 *Συγκολλητίνες*

4.2 *Η αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

4.1. Συγκολλητίνες

Τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα είναι πρωτεΐνες της κατηγορίας των γ-σφαιρινών που καλούνται και ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulins), με συμβολισμό Ig.

Οι ανοσοσφαιρίνες είναι πολλών ειδών, IgM, IgG, IgA, IgE....

Τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα αποτελούν ένα μικρό υποσύνολο των ανοσοσφαιρινών και ανήκουν κυρίως στις κατηγορίες IgM (μοριακού βάρους περίπου 900000-1000000) και IgG (μοριακού βάρους περίπου 300000).

Επειδή τα αντισώματα αυτά, όταν συνευρεθούν με τα αντίστοιχα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα **(συγκολλητινογόνα)** που βρίσκονται τοποθετημένα στην κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αντιδρούν και προκαλούν συγκόλληση των ερυθρών, συχνά τα αποκαλούμε **συγκολλητίνες**.

Κάθε άτομο κληρονομεί από τους φυσικούς γονείς του τα ερυθροκυτταρικά του αντιγόνα, τα οποία του καθορίζουν και την ομάδα αίματος.

Στο άμεσο παρελθόν ήταν αποδεκτό, ότι τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα κατατάσσονταν σε **φυσικά** και **άνοσα**.

Όταν για οποιονδήποτε λόγο στην κυκλοφορία ενός ατόμου εισέλθουν ερυθρά αιμοσφαίρια άλλου ατόμου διαφορετικής ομάδας αίματος, τότε θα αναγνωριστούν τα ξένα αντιγόνα και θα κατασκευαστούν ταχέως αντισώματα που θα ενωθούν μαζί τους και θα προκαλέσουν καταστροφή των "εισβολέων" ερυθρών. Τα αντισώματα που αναπτύχθηκαν λέγονται **άνοσα** και ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των **IgG**. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη δημιουργία τους είναι η είσοδος ερυθρών αιμοσφαιρίων με άγνωστα στον οργανισμό αντιγόνα, ώστε να προκύψει ανοσοποίηση.

Στον ορό πολλών ανθρώπων όμως, ανιχνεύονται αντισώματα (π.χ. αντι-Α ή αντι-Β) τα οποία μολονότι δεν προήλθαν από ανοσοποίηση, δηλαδή από είσοδο ξένων αντιγόνων στον οργανισμό, μπορούν να αναγνωρίζουν ερυθροκυτταρικά αντιγόνα και να αντιδρούν μαζί τους. Τα αντισώματα αυτά ονομάζονται **φυσικά** και είναι κυρίως ανοσοσφαιρίνες **IgM**, λιγότερα **IgG** και σπανίως **IgA**.

Η ονομασία "φυσικά" αντισώματα δεν είναι ακριβής και δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Για παράδειγμα, αντισώματα αντι-Α και αντι-Β δεν υπάρχουν στον ορό των νεογνών. Εμφανίζονται τους πρώτους μήνες της βρεφικής περιόδου και αυξάνονται σταδιακά μέχρι την ηλικία των 4-5 ετών. Έκτοτε παραμένουν σταθερά για την υπόλοιπη ζωή του ανθρώπου. Συχνά στα ηλικιωμένα άτομα, τα επίπεδα των αντι-Α και αντι-Β αντισωμάτων είναι χαμηλότερα σε σύγκριση με τους νέους ενήλικες.

Όλα τα προαναφερόμενα οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι και τα αποκαλούμενα "φυσικά" αντισώματα είναι το αποτέλεσμα μιας άνοσης αντίδρασης (αντιγόνου-αντισώματος), δηλαδή κάποιο άγνωστο αντιγόνο εισήλθε στον οργανισμό και αυτός

με τη σειρά του απάντησε δημιουργώντας ένα αντίσωμα που να ταιριάζει στο συγκεκριμένο αντιγόνο.

Επομένως, στην πραγματικότητα και τα φυσικά είναι άνοσα αντισώματα, πολλές φορές όμως συνεχίζουμε να διατηρούμε αυτή τη διάκριση για ευκολότερη συνεννόηση.

Όταν δεν υπάρχει γνωστό αίτιο ανοσοποίησης, η δημιουργία φυσικών αντισωμάτων μπορεί να εξηγηθεί με δυο υποθέσεις που ακολουθούν πολύπλοκους συνειρμούς.

Αυτές είναι:

1. Η θεωρία του Burnet και

2. Η θεωρία του Wiener.

Σε γενικές γραμμές μπορούμε να διατυπώσουμε τα εξής:

Στη φύση υπάρχουν ουσίες ευρύτατα διαδεδομένες (μέσα σε τροφές, βακτηρίδια κ.λ.π.) που έχουν δομή εντελώς όμοια ή σχεδόν όμοια με τη δομή των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων. Αμέσως μόλις γεννηθεί το παιδί, επειδή ο πεπτικός σωλήνας του παρουσιάζει κάποια αωρότητα τους πρώτους μήνες της εξωμήτριας ζωής, εισέρχονται στον οργανισμό του αυτά τα αντιγόνα, είτε με μικρόβια είτε με τροφές και δεσμεύονται από τα φαγοκύτταρα και φαγοκυτταρώνονται.

- Αν ο οργανισμός διαθέτει στα κύτταρά του κάποιο από αυτά τα αντιγόνα, το αναγνωρίζει και δεν κινεί τη διαδικασία της άνοσης αντίδρασης για την παραγωγή αντισωμάτων.
- Αντίθετα, αν κάποιο αντιγόνο δε συμπεριλαμβάνεται στα δικά του, τότε μόλις πραγματοποιηθεί η φαγοκυττάρωση στα μακροφάγα φαγοκύτταρα, δίνεται εντολή να ξεκινήσει η διαδικασία της άνοσης αντίδρασης για να παραχθούν αντισώματα εναντίον αυτού του αντιγόνου.

Αυτά θα λέγονται φυσικά (για ευκολία), ανήκουν στην κατηγορία των IgM ανοσοσφαιρινών και είναι ψυχρού τύπου. Τα επίπεδά τους διαφέρουν από άτομο σε άτομο.

Αν στο μέλλον, εισχωρήσει παρεντερικά (π.χ. με εμβόλια, με μετάγγιση αίματος...) κάποιο αντιγόνο από αυτά στον οργανισμό, αναγνωρίζεται ταχύτατα και επαναπραγματοποιείται αναμνηστική άνοση αντίδραση με παραγωγή νέων αντισωμάτων που θα λέγονται άνοσα, ανήκουν στις κατηγορίες των IgM και IgG ανοσοσφαιρινών κυρίως και είναι θερμού τύπου. Τα επίπεδά τους θα έχουν υψηλούς τίτλους.

Η παραγωγή αντισωμάτων αρχίζει κανονικά μετά τη γέννηση. Γι' αυτό, ο έλεγχος ενός βρέφους έως 6 μηνών δεν είναι αξιόπιστος γιατί περιέχει αντισώματα της μητέρας του που πέρασαν σ' αυτό μέσω του πλακούντα.

Σαν **φυσικές συγκολλητίνες** θεωρούνται οι ανοσοσφαιρίνες **αντι-Α**, **αντι-Β** και **αντι-Η**. Η παρουσία τους θεωρείται πολύ χρήσιμη γιατί μας πιστοποιούν απόλυτα τις ομάδες αίματος ως προς το σύστημα ΑΒΟ.

4.2. Η αντίδραση άντιγόνου-αντισώματος

Τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα βρίσκονται προσκολλημένα στην κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και καθορίζουν την ομάδα αίματος.

Τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα «κολυμπούν» στο πλάσμα και ερευνούν για άγνωστα αντιγόνα.

Έχει γίνει σαφές ότι κάθε οργανισμός υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγει αντισώματα έναντι αντιγόνων που δε διαθέτει (δηλαδή δεν περιέχονται στα δικά του).

Αν για οποιοδήποτε λόγο, ξένα ερυθρά αιμοσφαίρια εισέλθουν στην κυκλοφορία ενός ατόμου, τότε τα αντισώματά του θα αναγνωρίσουν τον εισβολέα, θα συνδεθούν με τα αντιγόνα του και θα ξεκινήσει μια διαδικασία καταστροφής των άγνωστων κυττάρων.

Μια τέτοια διαδικασία, που πραγματοποιείται σε φυσικές συνθήκες εντός οποιουδήποτε έμβιου οργανισμού, διεθνώς αποκαλείται με τον όρο in vivo.

Μόλις τα αντισώματα ενωθούν με τα ξένα αντιγόνα, δε σημαίνει πως αυτόματα καταστράφηκαν τα άγνωστα ερυθροκύτταρα. Απλά τότε διαπιστώνεται η «εισβολή» και δραστηριοποιούνται οι μηχανισμοί εξόντωσης.

Οι μηχανισμοί αυτοί είναι δυο:

1. Η φαγοκυττάρωση

2. Η αιμόλυση.

Καθένας ακολουθεί ξεχωριστή διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω.

- Τα λευκά αιμοσφαίρια έχουν στην περιφέρειά τους ειδικούς υποδοχείς που τα βοηθούν να συνδέονται με αντισώματα. Όταν λοιπόν ξένα ερυθρά εισέλθουν στην κυκλοφορία κάποιου ατόμου, τα ερυθροκυτταρικά τους αντιγόνα θα ενωθούν με το ένα άκρο των ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων του οργανισμού. Έτσι ενωμένα θα περιπλανώνται μέσα στο κυκλοφορικό σύστημα μέχρι κάποιο λευκό αιμοσφαίριο, μονοκύτταρο ή ουδετερόφιλο πολυμορφοπύρηνο, δεσμεύσει το συγκεκριμένο αντίσωμα μαζί με το ερυθρό που βρίσκεται στην άλλη άκρη του. Το λευκό αιμοσφαίριο θα δεσμεύσει αρκετά αντισώματα και τα ερυθρά αιμοσφαίρια γύρω του θα σχηματίσουν ρόδακες. Στη συνέχεια, τα ερυθρά φαγοκυτταρώνονται από τα λευκοκύτταρα και καταστρέφονται. Αν το αντίσωμα που έκανε την ανίχνευση είναι ισχυρό τότε η φαγοκυττάρωση γίνεται πολύ γρήγορα.
- Μέσα στον ορό του ανθρώπου, υπάρχει μια ομάδα πρωτεϊνών που ονομάζεται συμπλήρωμα. Οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος συνολικά είναι 9 και σε φυσιολογικές συνθήκες παραμένουν αδρανείς. Μόλις ξένα ερυθρά εισχωρήσουν

στον οργανισμό και υπάρξει αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος προκαλείται ερεθισμός της πρώτης πρωτεΐνης του συμπληρώματος που από αδρανής γίνεται ενεργοποιημένη. Στη συνέχεια οι ουσίες αυτές λειτουργούν σα ντόμινο, όπου η μια δρα επί της άλλης. Πράγματι, η πρώτη ενεργοποιημένη δρα επί της δεύτερης και την ενεργοποιεί, αυτή με τη σειρά της ενεργοποιεί την τρίτη, η τρίτη την τέταρτη κ.ο.κ. ώσπου ενεργοποιείται η έκατη. Η τελευταία είναι πολύ ισχυρό κυτταρολυτικό ένζυμο. Έχει την ιδιότητα να δρα επί της κυτταρικής μεμβράνης των ευαισθητοποιημένων (από τα αντισώματα) ερυθρών και να προκαλεί ανοίγματα (στην πραγματικότητα εμβολίζει την κυτταρική μεμβράνη και ανοίγει τρύπες). Το αποτέλεσμα είναι η αιμόλυση των ερυθρών αφού ό,τι υπάρχει στο κυτταρόπλασμά τους, κυρίως αιμοσφαιρίνη, διαχέεται στο πλάσμα μέσα από τα κενά της κυτταρικής μεμβράνης. Οι ασθενείς μετά από αιμόλυση τέτοιας μορφής παρουσιάζουν βαρύτατη κλινική εικόνα.

Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα, τα αντισώματα που προκαλούν συγκόλληση αποκαλούνται συγκολλητίνες και εκείνα που προκαλούν αιμόλυση ονομάζονται αιμολυσίνες.

Στο σωληνάριο (In vitro)

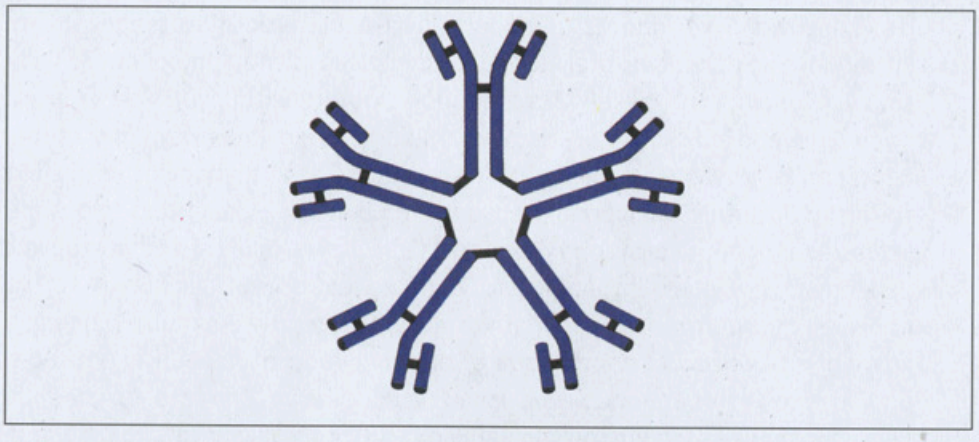
Οι διαδικασίες που τελούνται υπό **φυσιολογικές συνθήκες εντός** οποιουδήποτε **έμβιου οργανισμού** λέμε ότι συμβαίνουν **in vivo**.

Πολλές από αυτές, έχουμε τη δυνατότητα **μιμούμενοι τις συνθήκες** κάτω από τις οποίες συμβαίνουν να τις πραγματοποιήσουμε στο εργαστήριο (σε σωληνάριο). Τότε λέμε ότι εκτελέστηκαν **in vitro**.

Η μεθοδολογία αυτή είναι πάρα πολύ χρήσιμη γιατί μας βοηθά να κατανοήσουμε κάποια άγνωστα προβλήματα καθώς και να προλάβουμε ατυχή συμβάματα που θα παρατηρούνταν σε ασθενείς. Για παράδειγμα, όταν θέλουμε να μεταγγίσουμε έναν ασθενή με αίμα, έχουμε την ευκαιρία να δούμε αν τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα του δότη αντιδρούν με τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα του δέκτη, ώστε να διαπιστώσουμε αν η μετάγγιση είναι συμβατή ή ασύμβατη και να προλάβουμε τα ατυχή γεγονότα που ακολουθούν μια ασύμβατη μετάγγιση.

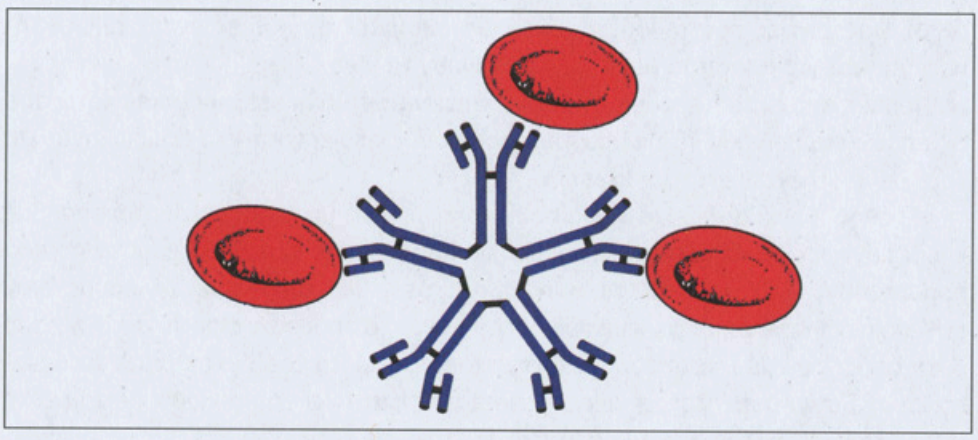
Η δομή και οι ιδιότητες των δυο βασικότερων κατηγοριών αντισωμάτων, IgM και IgG διαφέρουν, γι' αυτό και χρησιμοποιούνται διαφορετικοί τρόποι ανίχνευσής τους.

Οι IgM ανοσοσφαιρίνες είναι μεγαλύτερες σε μέγεθος και όγκο (Εικόνα 4.1), υπάρχουν με τη μορφή πενταμερούς μορίου μέσα στον ορό και διαθέτουν 10 θέσεις καθεμιά με τις οποίες μπορούν να ενωθούν με τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. Το μεγάλο μέγεθος τις βοηθά να συλλαμβάνουν δυο ή περισσότερα γειτονικά ερυθρά και να τα συγκολλούν (Εικόνα 4.2).



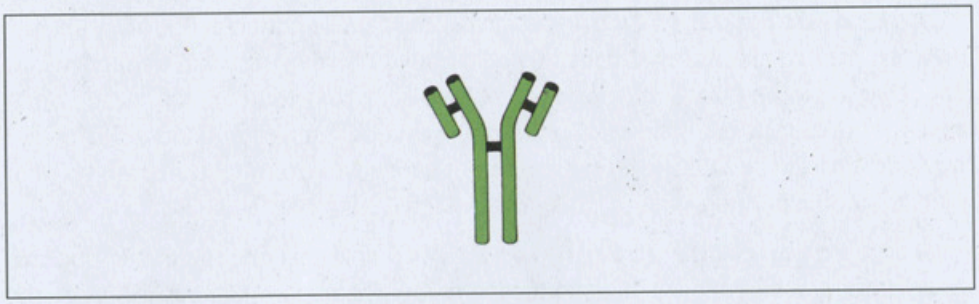
Εικόνα 4.1. *Σχηματική παράσταση αντισώματος τύπου IgM*

Τα IgM αντισώματα εκτός από μεγάλο μέγεθος, έχουν και μεγάλο εύρος θερμικής δράσης. Μπορούν να δρουν σε θερμοκρασία 4° C (ψυγείου) ονομαζόμενα και ψυχροσυγκολλητίνες, σε θερμοκρασία 20° C (δωματίου) και σε θερμοκρασία 37° C (σώματος).

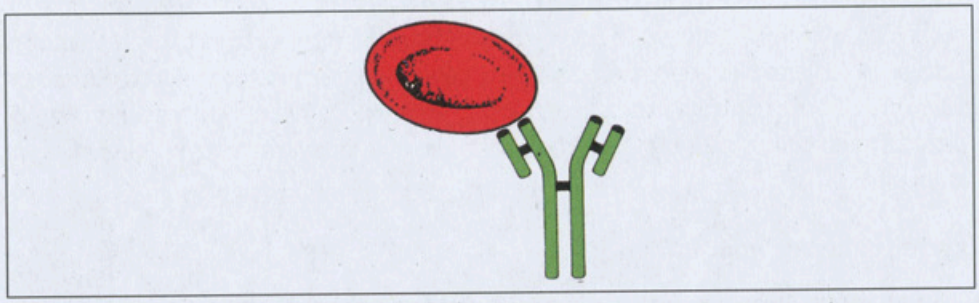


Εικόνα 4.2. *Το αντίσωμα IgM έχει τη δυνατότητα να συλλαμβάνει και να συγκολλά δυο ή περισσότερα ερυθρά αιμοσφαίρια*

Αντίθετα οι IgG ανοσοσφαιρίνες έχουν μικρότερο μέγεθος και κυκλοφορούν στον ορό σαν μόρια μονομερή (Εικόνα 4.3). Αυτό σημαίνει πως ευαισθητοποιούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια προσκολλώντας επάνω τους αλλά αδυνατούν εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους να προκαλέσουν τη συγκόλλησή τους (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.3. *Σχηματική παράσταση αντισώματος τύπου IgG*



Εικόνα 4.4. *Το IgG αντίσωμα έχει την ικανότητα να συνδεθεί με ερυθρό αιμοσφαίριο αλλά δεν δύναται πάντα να το συγκολλάει*

Σύμφωνα με αυτές τις ιδιότητες διακρίνουμε τα αντισώματα σε δύο κατηγορίες:

1. Εκείνα που είναι ικανά να προκαλέσουν συγκόλληση σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου και τα ονομάζουμε **πλήρη ή διδύναμα**.

2. Εκείνα που αδυνατούν να προκαλέσουν συγκόλληση σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου αλλά μόνο προσηλώνονται στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων χωρίς να φαίνεται η παρουσία τους και ονομάζονται **ατελή ή μονοδύναμα**.

Στα πλήρη ανήκουν IgM κυρίως αντισώματα και στα ατελή IgG.

Η ανίχνευση αντισωμάτων IgM του συστήματος ΑΒΟ με τη χρήση γνωστών αντιορών σε εναιώρημα ερυθροκυττάρων εντός ισότονου διαλύματος χλωριούχου νατρίου γίνεται εύκολα. Κι αυτό γιατί η απόσταση μεταξύ των ερυθρών είναι τέτοια, ώστε το μεγάλο μόριο της IgM ανοσοσφαιρίνης μπορεί να την καλύψει και να συγκολλήσει γειτονικά ερυθρά. Η εξέταση πρέπει να γίνεται στους 4, 20 και 37° C.

Στην περίπτωση ανιχνεύσεως αντισωμάτων τύπου IgG (ατελή) προκαλούνται ειδικές συνθήκες για να μειωθεί η απόσταση μεταξύ των ερυθρών και να επέλθει συγκόλληση in vitro. Αυτό επιτυγχάνεται με τους εξής τρόπους:

Κατεργασία με ένζυμα. Αρκετά ένζυμα όπως παπαϊνη, θρυψίνη, βρωμελίνη, φισίνη κ.ά. έχουν την ιδιότητα να αφαιρούν από την κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών μόρια με αρνητικό φορτίο, όπως είναι τα μόρια του σιαλικού οξέος. Αποτέλεσμα είναι η μείωση του νέφους κατιόντων γύρω από τα ερυθρά και η πτώση των απωθητικών δυνάμεων. Έτσι έχουν την ευκαιρία τα ατελή αντισώματα να προκαλέσουν συγκόλληση.

Αυξάνοντας την ιονική ισχύ. Αυτό επιφέρει ελάττωση της αποστάσεως μεταξύ των ερυθρών και μεγαλύτερη πιθανότητα να συμβεί συγκόλληση από τα αντισώματα.

Προσθήκη λευκωματίνης (αλβουμίνης). Η λευκωματίνη δρα με τον εξής μηχανισμό. Το μεγάλο μόριό της κολλά πάνω στην κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών. Τα γειτονικά ερυθροκύτταρα μπορούν να έρθουν πιο κοντά και τα αντισώματα έχουν τη δυνατότητα να τα συγκολλήσουν. Η λευκωματίνη προσφέρεται στο εμπόριο σε έτοιμο διάλυμα 22-30% και στο εργαστήριο αναπαράγεται η συγκεκριμένη τεχνική in vitro.

Αντισφαιρινικός ορός

Αρκετά ατελή αντισώματα, τύπου IgG βρίσκονται προσκολλημένα επάνω στην κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών, προκαλώντας τους ευαισθητοποίηση αλλά λόγω του μικρού τους μεγέθους αδυνατούν να τα συγκολλήσουν.

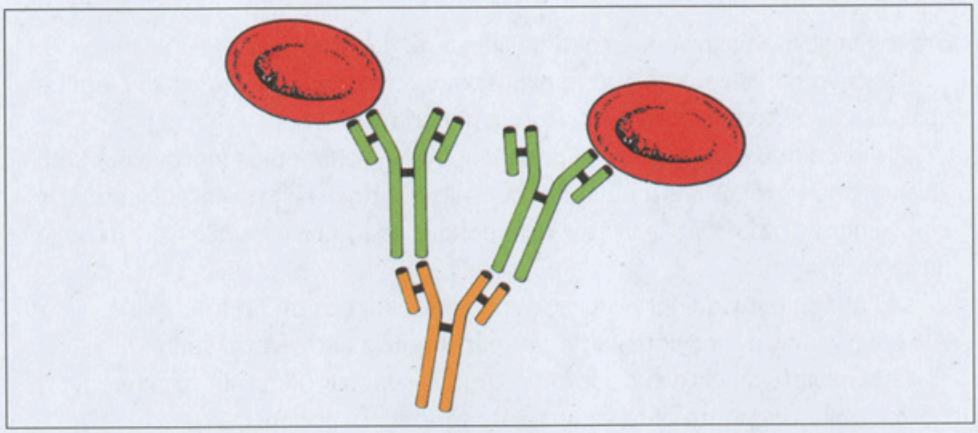
Οι Coomb και συνεργάτες, με ένεση, εισήγαγαν σε πειραματόζωα (κουνέλια), ανθρώπινα αντισώματα IgG.

Το οργανικό σύστημα των πειραματόζωων αναγνώρισε τις ανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες (αντισώματα IgG) σαν ξένα αντιγόνα. Προκλήθηκε άνοση αντίδραση (αντιγόνου-αντισώματος) και έγινε άμεση παραγωγή, από πλευράς πειραματόζωων, αντισωμάτων που δεσμεύουν τις ανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες (αντι-αντισώματα).

Λαμβάνοντας από τον ορό των κουνελιών τα αντι-αντισώματα που δημιουργήθηκαν, στην ουσία κατέχουμε αντιανθρώπειο ορό (anti-human).

Εξετάζοντας λοιπόν in vitro την παρουσία ατελών αντισωμάτων προσκολλημένων σε ανθρώπινα ερυθρά, έχουμε τη δυνατότητα στο σωληνάριο που περιέχει το εναιώρημα των ερυθρών να προσθέσουμε αντι-αντισώματα (αντισφαιρινικό ορό). Τα τελευταία θα ανιχνεύσουν ατελή IgG αντισώματα και θα ενωθούν μαζί τους. Με τον τρόπο αυτό θα λειτουργήσουν σαν μεγαλομοριακές γέφυρες. Έτσι, αν τα ατελή αντισώματα είναι προσκολλημένα σε ερυθρά από τη μια μεριά και ενωμένα με αντιαντισώματα από την άλλη (Εικόνα 4.5), το μόριό τους θα έχει τώρα το απαιτούμενο μέγεθος, ώστε να προκαλέσει συγκολλήσεις των ερυθρών.

Επομένως ο αντισφαιρινικός ορός ενεργεί σαν γέφυρα που μακραίνει το μόριο των IgG ανοσοσφαιρινών και τα κάνει πιο δραστικά.



Εικόνα 4.5. *Σχηματική παράσταση αντισφαιρινικού ορού. Με καφέ είναι τα αντισώματα των πειραματόζωων που δεσμεύουν τα ανθρώπινα αντισώματα (πράσινα), τα οποία έχουν δεσμεύσει ερυθρά αιμοσφαίρια*

Στην καθημερινή πρακτική ο ρόλος του είναι πολύτιμος και χρησιμοποιείται σε συγκεκριμένες εξετάσεις που έχουν πάρει το όνομα του πρώτου ερευνητή (Coombs άμεση και έμμεση) και θα αναλυθούν στο αντίστοιχο εργαστηριακό κεφάλαιο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα αποτελούν ένα μικρό υποσύνολο των ανοσοσφαιρινών και ανήκουν κυρίως στις κατηγορίες IgM και IgG.

Στο άμεσο παρελθόν, ήταν αποδεκτό ότι τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα κατατάσσονταν σε φυσικά και άνοσα. Η ονομασία "φυσικά" αντισώματα δεν είναι ακριβής και δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Τα φυσικά είναι άνοσα αντισώματα, πολλές φορές όμως συνεχίζουμε να διατηρούμε αυτή τη διάκριση για ευκολότερη συνεννόηση.

Σαν φυσικές συγκολλητίνες θεωρούνται οι ανοσοσφαιρίνες αντι-Α, αντι-Β και αντι-Η. Η παρουσία τους θεωρείται πολύ χρήσιμη γιατί μας πιστοποιούν απόλυτα τις ομάδες αίματος ως προς το σύστημα ΑΒΟ.

Τα αντισώματα που προκαλούν συγκόλληση αποκαλούνται συγκολλητίνες και εκείνα που προκαλούν αιμόλυση ονομάζονται αιμολυσίνες.

Οι διαδικασίες που τελούνται, υπό φυσιολογικές συνθήκες, εντός οποιουδήποτε έμβιου οργανισμού, λέμε ότι συμβαίνουν in vivo. Πολλές από αυτές, έχουμε τη δυνατότητα, μιμούμενοι τις συνθήκες κάτω από τις οποίες συμβαίνουν να τις πραγματοποιήσουμε στο εργαστήριο (σε σωληνάριο). Τότε λέμε ότι εκτελέ-

στηκαν in vitro. Διακρίνουμε τα αντισώματα σε δυο κατηγορίες:

1. Εκείνα που είναι ικανά να προκαλέσουν συγκόλληση σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου και τα ονομάζουμε πλήρη ή διδύναμα.

2. Εκείνα που αδυνατούν να προκαλέσουν συγκόλληση σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου αλλά μόνο προσηλώνονται στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων χωρίς να φαίνεται η παρουσία τους και ονομάζονται ατελή ή μονοδύναμα.

Στα πλήρη ανήκουν IgM κυρίως αντισώματα και στα ατελή IgG.

Η ανίχνευση αντισωμάτων IgM του συστήματος ΑΒΟ γίνεται εύκολα.

Στην περίπτωση ανιχνεύσεως αντισωμάτων τύπου IgG (ατελή) προκαλούνται ειδικές συνθήκες. Αυτό επιτυγχάνεται με τους εξής τρόπους:

Με την κατεργασία με ένζυμα.

Με την αύξηση της ιονικής ισχύος.

Με την προσθήκη λευκωματίνης (αλβουμίνης).

Ο αντισφαιρινικός ορός ενεργεί σαν γέφυρα που μακραίνει το μόριο των IgG ανοσοσφαιρινών και τα κάνει πιο δραστικά.

Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:

1. Τι είναι συγκολλητίνες και τι αιμολυσίνες; Τι είδους ανοσοσφαιρίνες είναι οι αιμολυσίνες;

2. Τα «φυσικά» αντισώματα τι είδους ανοσοσφαιρίνες είναι;

3. Είναι δυνατό να μεταφερθούν φυσικά αντισώματα από τη μητέρα διαμέσου του πλακούντα στο παιδί και γιατί;

4. Τι είδους αντισώματα μας βοηθά να ανιχνεύσουμε ο αντισφαιρινικός ορός και με ποιο τρόπο;

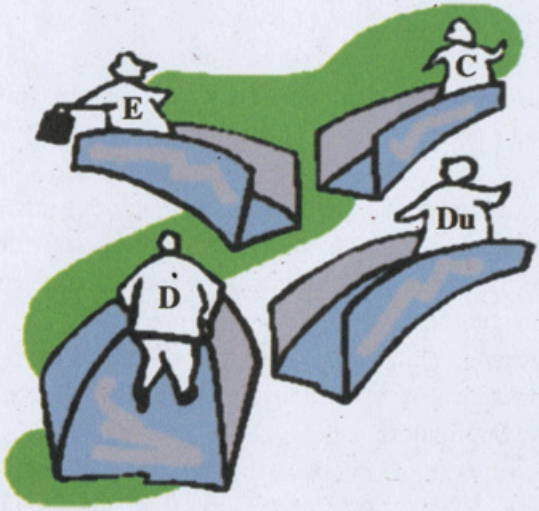
5. Με ποιες τεχνικές ανιχνεύουμε ατελή αντισώματα in vitro;

6. Υπάρχει πραγματική διάκριση μεταξύ φυσικών και άνοσων αντισωμάτων και γιατί;

7. Όταν ερυθρά αιμοσφαίρια του ίδιου ατόμου βρεθούν εντός ηλεκτρολυτικού διαλύματος, τι περιμένουμε να συμβεί και γιατί;

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

σύστημα Rhesus



5.1 Ιστορία
5.2 Αντιγόνα του συστήματος RHESUS
5.3 Αντιγόνο Du
5.4 Κληρονομικότητα
5.5 Παραλλαγές των αντιγόνων
5.6 Αντι - RHESUS αντισώματα
5.6.1 Μηχανισμοί ευαισθητοποίησης
5.6.2 Ιδιότητες των αντισωμάτων του συστήματος RHESUS
5.7 Άλλα αντιγονικά συστήματα
5.7.1 Σύστημα Kell
ΠΕΡΙΛΗΨΗ
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

5.1. Ιστορία

Το 1939 δημοσιεύθηκε σε επιστημονικό περιοδικό ένα άρθρο από τους Levin και Stetson, που ανέφερε πως μια γυναίκα η οποία γέννησε νεκρό έμβρυο εμφάνισε βαριά αιμολυτική αντίδραση όταν της έκαναν μετάγγιση με το αίμα του συζύγου της. Ο ορός της γυναίκας αυτής συγκολλούσε in vitro όχι μόνο τα ερυθρά του συζύγου της, αλλά το 80% των ερυθρών από 104 άλλους ανθρώπους που είχαν συμβατότητα μαζί της ως προς το σύστημα ομάδας ΑΒΟ.

Στην πορεία αποκαλύφθηκε πως το υπεύθυνο αντιγόνο δεν είχε καμία σχέση με τα αντιγόνα ΑΒΟ. Μολονότι έγιναν προσπάθειες να προκληθεί ανοσοποίηση κουνελιών, αυτό δεν έγινε εφικτό

Το συμβάν ερμηνεύτηκε με την εξής υπόθεση. Το έμβρυο κληρονόμησε από τον πατέρα του κάποιο αντιγόνο που δεν υπήρχε στα αντιγόνα της μητέρας του. Αυτό ευαισθητοποίησε τη μητέρα του που παρήγαγε αντισώματα. Όταν μετά αυτή μεταγγίστηκε με αίμα του συζύγου της, τα αντισώματα ενώθηκαν με τα αντιγόνα και προκάλεσαν έντονη συγκόλληση.

Ένα χρόνο αργότερα, το 1940 οι Landsteiner και Wiener μετά από χορήγηση αίματος πιθήκου Macacus Rhesus σε κουνέλια και ινδικά χοιρίδια (είδος ποντικιών) τους προκάλεσαν ανοσοποίηση.

Κατόπιν εξακρίβωσαν πως τα αντισώματα που παρήγαγαν τα πειραματόζωα είχαν τη δυνατότητα να συγκολλούν in vitro εκτός από τα ερυθρά του πιθήκου και τα ερυθροκύτταρα του 85% των λευκών ανθρώπων της Νέας Υόρκης. Τα ερυθρά των ανθρώπων (85%) που συγκολλούσε ο αντι-Rhesus ορός κουνελιού, ονομάστηκαν Rhesus (Ρέζους) θετικά και τα υπόλοιπα 15% που δεν συγκολλούνταν Rhesus αρνητικά.

Την ίδια χρονιά (1940) οι Wiener και Peters, στον ορό ασθενών που είχαν μεταγγιστεί με συμβατό αίμα κατά ΑΒΟ αλλά είχαν εμφανίσει βαριές αιμολυτικές αντιδράσεις, ανίχνευσαν αντίσωμα παρόμοιο με το αντι-Rhesus του κουνελιού.

Το έτος 1941 ο Levin με τους συνεργάτες του απέδειξαν ότι η εμβρυϊκή ερυθροβλάστωση (ο σημερινός όρος είναι "αιμολυτική νόσος του νεογνού") εκδηλώνεται λόγω ασυμβατότητας στο σύστημα Rhesus μεταξύ της μητέρας και του παιδιού.

Οι Landsteiner και Wiener δημοσίευσαν το 1941 μια ολοκληρωμένη μελέτη όπου εκεί ανέφεραν πως το αντιγόνο Rhesus υπάρχει στο 85% των ατόμων που ανήκουν στη λευκή φυλή.

Αρκετά χρόνια μετά διαχωρίστηκε το ανθρώπινο αντίσωμα αντι-Rhesus από εκείνο του κουνελιού. Στο αντίσωμα του κουνελιού δόθηκε η ονομασία αντι-LW από τα αρχικά των επιστημόνων που το ανακάλυψαν (Landsteiner και Wiener).

Το σύστημα Rhesus αποτελεί το σπουδαιότερο αμέσως μετά το σύστημα ΑΒΟ στην κατηγοριοποίηση των ομάδων αίματος.

5.2. Αντιγόνα του συστήματος Rhesus

Το αντιγονικό σύστημα Rhesus είναι αρκετά πολύπλοκο. Περιλαμβάνει ένα σημαντικό πληθυσμό αντιγόνων που αγγίζουν σε αριθμό τα 40 και εμφανίζουν ποικιλομορφία χαρακτηριστικών.

Τα σπουδαιότερα από αυτά, εξαιτίας της κλινικής τους εφαρμογής, είναι πέντε τα **D, C, c, E και e**.

Ανάλογα με την παρουσία ή απουσία του D αντιγόνου, τα άτομα χωρίζονται σε Rhesus θετικά (παρουσία του D αντιγόνου) και Rhesus αρνητικά (απουσία του D αντιγόνου).

Τα υπόλοιπα αντιγόνα (C, c και E, e) υπάρχουν στο αίμα κάθε ανθρώπου δύο από κάθε ζεύγος, δηλαδή CC, Cc ή cc και EE, Ee ή ee. Η έλλειψη του ενός από τα αντιγόνα του ζεύγους σημαίνει τη διπλή παρουσία του άλλου (δηλαδή έλλειψη του C σημαίνει παρουσία cc και αντίστροφα έλλειψη του c σημαίνει παρουσία CC, το ίδιο συμβαίνει και με το ζεύγος Ee).

Το αντιγόνο D είναι το βασικότερο όλων από τα αντιγόνα του συστήματος Rhesus. Είναι αυτό που με την παρουσία του χαρακτηρίζει ένα άτομο Rhesus θετικό (Rh +) και με την απουσία του Rhesus αρνητικό (Rh -). Έχει πολύ έντονη αντιγονική δράση και γι αυτό ελέγχεται η συμβατότητά του απαραιτήτως σε όλες τις μεταγγίσεις αίματος.

Στους ασθενείς που υποβάλλονται σε τακτικές μεταγγίσεις γίνεται έλεγχος και για τα υπόλοιπα αντιγόνα του συστήματος Rhesus (C, c, E, e).

5.3. Αντιγόνο Du

Όπως έχει αναφερθεί, τα αντιγόνα που καθορίζουν τις ομάδες αίματος είναι τμήματα πρωτεϊνών που εξέχουν από την κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Αντιγόνα που ανήκουν στο ίδιο είδος (είναι όμοια) υπάρχουν αρκετά σε κάθε ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Ανάλογα με τον πληθυσμό τους (αν είναι πολλά ή λίγα), εκφράζεται και η δυναμικότητά τους. Για παράδειγμα ο πληθυσμός των αντιγόνων του συστήματος ΑΒΟ που βρίσκεται πάνω στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη είναι 250000-1200000. Ο αριθμός των αντιγόνων D είναι 10000-30000 ανά ερυθρό αιμοσφαίριο. Τα υπόλοιπα αντιγόνα του συστήματος Rhesus (C, c, E και e) βρίσκονται σε μικρότερη αναλογία.

Σε έναν πολύ μικρό αριθμό ατόμων παρατηρείται το φαινόμενο να εμφανίζονται ως Rhesus αρνητικοί (απουσία αντιγόνου D) όταν γίνεται ο έλεγχος ομάδας στην

πλάκα ενώ με λεπτομερέστερο έλεγχο στο σωληνάριο να παρουσιάζονται ως Rhesus θετικοί (παρουσία αντιγόνου D). Τότε λέμε πως οι άνθρωποι έχουν αντιγόνο D^u.

Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με δυο τρόπους.

1. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια στην κυτταρική τους μεμβράνη φέρουν αντιγόνα D αλλά ο αριθμός τους είναι μικρός (ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχουν 10000-30000, εδώ υπάρχουν περίπου 600) και γι αυτό έχουν μειωμένη δραστικότητα.

2. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν στη μεμβράνη τους αντιγόνα D και μάλιστα με κανονική πυκνότητα αλλά αυτά για κάποια άγνωστη αιτία εμφανίζουν ποιοτική ανωμαλία που τους προκαλεί προβληματική αντιγονική δράση.

Οι άνθρωποι με αντιγόνο Du στον πληθυσμό της Ευρώπης αποτελούν ποσοστό περίπου 5‰ και στις ΗΠΑ 30‰.

Τα άτομα αυτά σαν αιμοδότες τα θεωρούμε Rhesus θετικά ενώ όταν χρειάζεται να μεταγγιστούν τους χορηγείται αίμα Rhesus αρνητικό.

5.4. Κληρονομικότητα

Το σύστημα Rhesus δεν είναι απλό όπως το ΑΒΟ αλλά από την αρχή οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι πρόκειται για ένα αρκετά πολύπλοκο σύστημα ομάδων.

Η γενετική του μεταβίβαση έχει προσεγγιστεί με δύο θεωρίες. Καθεμιά από αυτές δίνει και διαφορετική ονοματολογία στα αντιγόνα που το απαρτίζουν

Θεωρία των Fisher-Race. Σύμφωνα με αυτήν, τα αντιγόνα κληρονομούνται με τρία ζεύγη αλληλόμορφων γόνων. Στα βραχέα σκέλη του χρωμοσώματος 1 υπάρχει μια γονιδιακή περιοχή όπου εκεί είναι τοποθετημένα τρια γειτονικά γονίδια πολύ στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους. Οι γόνοι αυτοί κατά σειρά είναι οι D/d, C/c και E/e. Οι D, C, c E και e ευθύνονται για την παραγωγή των αντίστοιχων αντιγόνων (δηλαδή D, C, c, E και e). Ο γόνος d δεν παράγει αντιγόνο (σιωπηλός γόνος). Όλοι μεταβιβάζονται με συνεπικρατούντα χαρακτήρα, δεν πρέπει να θεωρήσουμε ότι οι d, c και e είναι υπολειπόμενοι χαρακτήρες. Είναι βασικό να προσέξουμε ότι όλα τα αντιγόνα βρίσκονται κατά τριάδες. Οι κυριότεροι συνδυασμοί που καθορίζουν την ομάδα Rhesus περιγράφονται στον πίνακα 1.

Θεωρία του Wiener. Αυτή διαφωνεί με την προηγούμενη. Σ' αυτήν τη θεωρία υποστηρίζεται πως δεν υπάρχουν τρία ξεχωριστά γονίδια αλλά μόνο ένα. Ο γόνος αυτός παράγει ένα αντιγόνο που είναι σύνθετο (π.χ. υπάρχει ο γόνος R_1 που παράγει το αντιγόνο Rh_1 το οποίο αποτελείται από τα μέρη Rh_0, rh_ και hr__, περιέχει δηλαδή τρία διαφορετικά αντιγονικά κομμάτια).

Συνδυασμοί γόνων ανά χρωμόσωμα κατά Fisher-Race	
Rhesus θετικοί	**Rhesus αρνητικοί**
DCe	**dce**
DcE	**dCe**
Dce	**dcE**
DCE	**dCE**

Πίνακας 1

Οι διαφορές που παρουσιάζουν οι δυο αυτές θεωρίες, αν δηλαδή υπάρχει ένας γόνος αντί τριών πολύ στενά συνδεδεμένων μεταξύ τους, δεν είναι κάτι πολύ σημαντικό, όσον αφορά την πρακτική πλευρά του ζητήματος.

Στη θεωρία του Fisher οι γόνοι και τα αντιγόνα έχουν τα ίδια ονόματα ενώ στη θεωρία του Wiener χρησιμοποιούνται διαφορετικοί συμβολισμοί. Για μεγαλύτερη ευκολία χρησιμοποιείται η ονοματολογία του Fisher.

Ο πίνακας 2 δείχνει την αντιστοιχία των ομάδων ανάμεσα στις δύο διατυπωμένες θεωρίες.

FISHER	WIENER
DCe	R_1
DcE	R_2
Dce	R_0
DCE	R_z
dce	r
dCe	r_
dcE	r__
dCE	r_y

Πίνακας 2

5.5. Παραλλαγές των αντιγόνων

Σπανίως, ορισμένα άτομα παρουσιάζουν ελλείψεις κάποιων ή και όλων των αντιγόνων του συστήματος Rhesus. Τότε αναφερόμαστε στους φαινοτύπους Rh null (– -) και D –.

Κατά το φαινότυπο Rh null απουσιάζουν και τα πέντε αντιγόνα (D, C, c, E και e).

Υπάρχει ένα υπολειπόμενο γονίδιο (r), που σε φυσιολογικές συνθήκες δεν εκφράζεται. Όταν όμως αυτό βρεθεί σε ομόζυγη μορφή (r/r) τότε προκαλεί αναστολή στη δράση των γονιδίων του συστήματος Rhesus (D, C/c και E/e). Το αποτέλεσμα είναι να μην παράγονται τα αντίστοιχα αντιγόνα.

Στο φαινότυπο D - - απουσιάζουν τα αντιγόνα C, c, E και e.

Αυτό γίνεται επειδή το αντιγόνο D καταλαμβάνει πολύ περισσότερες θέσεις από αυτές που του αναλογούν πάνω στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης του ερυθρού αιμοσφαιρίου και δεν αφήνει χώρο στα υπόλοιπα αντιγόνα (C, c, E και e).

5.6. Αντι-Rhesus αντισώματα

5.6.1 Μηχανισμοί ευαισθητοποίησης

Τα αντι-Rhesus αντισώματα είναι άνοσα αντισώματα. Δημιουργούνται μετά από άνοση αντίδραση. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε μετά από ασύμβατη μετάγγιση είτε κατά την εγκυμοσύνη. Το αντίσωμα που ενδιαφέρει περισσότερο είναι το αντι-D.

Ένας άνθρωπος που είναι Rhesus αρνητικό (Rh -), αρχικά δεν έχει αντι-D αντίσωμα.

Αν μεταγγιστεί με αίμα Rhesus θετικό (Rh +), ο οργανισμός του θα αναγνωρίσει το D αντιγόνο σαν ξένο και θα δημιουργήσει αντι-D αντισώματα που θα εξουδετερώσουν το συγκεκριμένο αντιγόνο.

Στην περίπτωση που μεταγγιστεί ξανά με Rhesus θετικό αίμα, θα πυροδοτηθεί αναμνηστική αντίδραση και αυτή τη φορά τα γεγονότα που θα συμβούν θα είναι πολύ πιο γρήγορα και πιο έντονα.

Άλλος τρόπος ευαισθητοποίησης είναι η εγκυμοσύνη.

Μια μητέρα με Rhesus αρνητικό αίμα κυοφορεί έμβρυο με Rhesus θετικό (έχει κληρονομήσει από τον πατέρα του τον D γόνο).

Κατά τη γέννα συμβαίνουν τραυματισμοί των αιμοφόρων αγγείων του πλακούντα και έτσι μπορούν να περάσουν ερυθρά αιμοσφαίρια του παιδιού (Rh +) στο κυκλοφορικό σύστημα της μητέρας (Rh -).

Τα λευκά αιμοσφαίρια της μητέρας αναγνωρίζουν τα ξένα ερυθρά και τα καταστρέφουν. Ταυτόχρονα όμως δίνουν εντολή να κατασκευαστούν αντισώματα που θα συνδέονται και θα αντιδρούν με τα ξένα αντιγόνα. Έτσι από δω και στο εξής η μητέρα θα φέρει αντι-Rhesus αντισώματα.

Το πρόβλημα θα είναι πολύ μεγάλο αν αυτή η μητέρα που έχει ευαισθητοποιηθεί με αντι-Rhesus αντισώματα ξαναμείνει έγκυος και το έμβρυο έχει πάλι ομάδα αίματος Rhesus θετικό.

Τα αντισώματα της μητέρας που είναι ανοσοσφαιρίνες τύπου IgG έχουν την ικανότητα να διέρχονται τον πλακούντα. Θα εισέλθουν στο κυκλοφορικό σύστημα του εμβρύου, θα αναγνωρίσουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια του εμβρύου σαν ξένα και θα τα καταστρέψουν.

Το φαινόμενο αυτό μπορεί να πάρει μεγάλη έκταση και να επιφέρει ακόμα και το θάνατο στο έμβρυο. Στο παρελθόν είχε την ονομασία «ερυθροβλάστωση του εμβρύου». Η επίσημη σημερινή ορολογία είναι «Αιμολυτική Νόσος του Νεογνού» (ΑΝΝ).

Η νόσος αρχίζει κατά την ενδομήτρια ζωή. Στα νεογνά η αιμόλυση είναι μέγιστη την περίοδο της γέννας και στην πορεία ελαττώνεται καθώς μικραίνει η συγκέντρωση των μητρικών αντισωμάτων στη βρεφική κυκλοφορία.

Οι μηχανισμοί ευαισθητοποίησης που περιγράφτηκαν μπορεί να συμβούν και με τα άλλα αντιγόνα του συστήματος Rhesus (π.χ. αντι-c) όμως τα αντι-D αντισώματα είναι πιο συχνά και τα φαινόμενα που προκαλούν πολύ πιο έντονα.

5.6.2 Ιδιότητες των αντισωμάτων του συστήματος Rhesus

Τα αντισώματα του συστήματος Rhesus είναι άνοσα και δημιουργούνται κατά την εγκυμοσύνη ή μετά από ασύμβατη μετάγγιση.

Ανήκουν κυρίως στις IgG ανοσοσφαιρίνες και δε συνδέουν (ενεργοποιούν) το συμπλήρωμα.

Για να ανιχνευτούν in vitro σε σωληνάριο πρέπει συνήθως να προσθέσουμε αντισφαιρινικό ορό.

Όταν ο οργανισμός εκτεθεί πάλι στο αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή τους, τότε παρατηρείται άμεση αύξηση του πληθυσμού τους στον ορό (αύξηση τίτλου).

5.7. Άλλα αντιγονικά συστήματα

5.7.1 Σύστημα Kell

Αποτελεί το τρίτο σε σπουδαιότητα σύστημα ομάδων αίματος μετά τα ΑΒΟ και Rhesus.

Ανακαλύφθηκε το 1946 και ονομάστηκε έτσι από την πρώτη ασθενή που είχε αυτό το όνομα (Kell).

Σχετικά με τη φύση των αντιγόνων που απαρτίζουν το σύστημα Kell γνωρίζουμε ελάχιστα. Έχουν βρεθεί περί τα 20 αντιγόνα.

Τα βασικότερα είναι τα **K** (Kell) και **k** (Celano) καθώς και τα αντιθετικά αντιγόνα Kp^a/Kp^b και Js^a/Js^b.

Η παρουσία των αντιγόνων ελέγχεται από αντίστοιχα γονίδια.

Υπάρχει ένα αντιγόνο (K_x) που πιστεύεται πως είναι η πρόδρομη ουσία του συστήματος Kell.

Τελευταία, έχει προταθεί νέα ονοματολογία για τα αντιγόνα του συστήματος Kell, παρόμοια με εκείνη του συστήματος Rhesus, δηλαδή K1 (K), K2 (k), K3 (Kp^a), K4 (Kp^b), K6 (Js^a) και K7 (Js^b).

Τα αντιγόνα του συστήματος Kell βρίσκονται μόνο στην κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών εκτός από το K_x που μπορεί να βρεθεί και στα λευκά αιμοσφαίρια. Η συγκέντρωσή τους στην ερυθροκυτταρική επιφάνεια είναι 3000-6000 αντιγονικά αντίγραφα ανά κύτταρο.

Παρά τη μικρή παρουσία τους, το αντιγόνο K εμφανίζει μεγάλη αντιγονική ισχύ γι αυτό πρέπει να αποφεύγεται ασύμβατη μετάγγιση. Ευτυχώς η συχνότητά του στη λευκή φυλή είναι μικρή (9%) ενώ το αλληλόμορφό του k (Celano) ανιχνεύεται σχεδόν στο σύνολο (99,8%) των λευκών ανθρώπων.

Αφού λοιπόν το K αντιγόνο είναι ισχυρό, εύκολα μπορούν να δημιουργηθούν αντι-Kell αντισώματα. Αυτά είναι ανοσοσφαιρίνες τύπου IgG, που δε συνδέουν το συμπλήρωμα. Αναπτύσσονται κατά την εγκυμοσύνη και με ασύμβατη μετάγγιση. Έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν Αιμολυτική Νόσο του Νεογνού (όπως συμβαίνει και στο σύστημα Rhesus).

Συστήματα ομάδων αίματος υπάρχουν αρκετά. Αναπτύξαμε εκτενώς εκείνα που είναι τα περισσότερο σημαντικά από πλευράς εργαστηριακής και κλινικής σημασίας.

Μερικά από τα υπόλοιπα, αναφορικά είναι:

- Σύστημα MNSs (M, N, S, s)
- Σύστημα Duffy (Fy^a, Fy^b)

- Σύστημα Kidd (Jk^a, Jk^b)
- Σύστημα Lutheran (Lu^a, Lu^b)
- Σύστημα Lewis (Le^a, Le^b)
- Σύστημα Ii (I, i)
- Σύστημα P
- Σύστημα Xg

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σύστημα Rhesus αποτελεί το σπουδαιότερο αμέσως μετά το σύστημα ΑΒΟ στην κατηγοριοποίηση των ομάδων αίματος.

Περιλαμβάνει ένα σημαντικό πληθυσμό αντιγόνων που αγγίζουν σε αριθμό τα 40. Το αντιγόνο D είναι το βασικότερο όλων από τα αντιγόνα του συστήματος Rhesus. Είναι αυτό που με την παρουσία του χαρακτηρίζει ένα άτομο Rhesus θετικό (Rh +) και με την απουσία του Rhesus αρνητικό (Rh -).

Τα αντι-Rhesus αντισώματα είναι άνοσα αντισώματα. Δημιουργούνται μετά από άνοση αντίδραση. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε μετά από ασύμβατη μετάγγιση, είτε κατά την εγκυμοσύνη. Για να ανιχνευτούν in vitro σε σωληνάριο πρέπει συνήθως να προσθέσουμε αντισφαιρινικό ορό.

Μπορούν να προκαλέσουν Αιμολυτική Νόσο του Νεογνού.

Το σύστημα Kell αποτελεί το τρίτο σε σπουδαιότητα σύστημα ομάδων αίματος μετά τα ΑΒΟ και Rhesus. Τα αντιγόνα του συστήματος Kell βρίσκονται μόνο στην κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών. Τα βασικότερα είναι τα K (Kell) και k (Celano) καθώς και τα αντιθετικά αντιγόνα Kp^a/Kp^b και Js^a/Js^b. Η συγκέντρωσή τους στην ερυθροκυτταρική επιφάνεια είναι 3000-6000 αντιγονικά αντίγραφα ανά κύτταρο.

Παρά τη μικρή παρουσία τους, το αντιγόνο K εμφανίζει μεγάλη αντιγονική ισχύ γι αυτό πρέπει να αποφεύγεται ασύμβατη μετάγγιση. Αναπτύσσονται κατά την εγκυμοσύνη και με ασύμβατη μετάγγιση. Έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν Αιμολυτική Νόσο του Νεογνού.

Συστήματα ομάδων αίματος υπάρχουν και άλλα.

Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:

1. Ποιο αντιγόνο είναι εκείνο που καθορίζει ένα άτομο σαν Rhesus θετικό ή Rhesus αρνητικό;

2. Ένας ασθενής έχει ομάδα Rhesus D_u θετικό. Με τι αίμα πρέπει να μεταγγιστεί;

3. Πώς προκαλείται Αιμολυτική Νόσος του Νεογνού;

4. Ποια είναι τα αντισώματα που μπορούν να προκαλέσουν ΑΝΝ;

5. Ποιο αντιγόνο θεωρείται η πρόδρομη ουσία του συστήματος Kell;

6. Αναφέρετε 5 συστήματα ομάδων αίματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

μετάγγιση αίματος

6.1 Γενικά
6.2 Ενδείξεις για μετάγγιση
6.3 Ενδείξεις για μετάγγιση παραγώγων αίματος
6.4 Ατυχή συμβάματα (επιπλοκές) από μετάγγιση αίματος
6.5 Μετάδοση νοσημάτων από μετάγγιση αίματος
6.6 Μόλυνση του προς μετάγγιση αίματος
ΠΕΡΙΛΗΨΗ
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

6.1. Γενικά

Πολλοί αρχαίοι λαοί, μεταξύ αυτών και οι Έλληνες, πίστευαν πως το αίμα κρύβει θεραπευτικές ιδιότητες. Από γραπτά τεκμήρια που συναντάμε στον Όμηρο, σε Αιγυπτιακούς παπύρους και Συριακά χειρόγραφα γίνεται φανερό πως ήξεραν για τη χορήγηση του αίματος. Ειδικά οι Έλληνες και οι Λατίνοι πρέπει να γνώριζαν τη μετάγγιση. Ωστόσο, ιστορικά σαν πρώτη μετάγγιση θεωρείται εκείνη που έγινε στον Πάπα Ιννοκέντιο τον 8ο αιώνα μ.Χ.. Όμως, η πρώτη λεπτομερής περιγραφή της μεταγγισιακής τεχνικής αποδίδεται στο Γερμανό Αντρέα Libanius το 1615.

Επειδή τα γεγονότα που συνέβησαν ήταν εκτός από επιτυχημένα και αποτυχημένα (τις περισσότερες φορές), με συχνό αποτέλεσμα το θάνατο των ασθενών, αναπτύχθηκε μεγάλη πολεμική εναντίον των μεταγγίσεων.

Η ανακάλυψη από τον Landsteiner το 1900 των ομάδων αίματος ΑΒΟ άλλαξε αρκετά τα πράγματα προς το καλύτερο.

Τα τελευταία 50 χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος ώστε πλέον η χορήγηση αίματος αποτελεί έναν ξεχωριστό και πολύ σημαντικό κλάδο της Αιματολογίας, **την Αιμοδοσία**, με ειδικούς κανόνες λειτουργίας, εξαιρετική οργάνωση και εξειδικευμένο τεχνολογικό και επιστημονικό προσωπικό.

Μαζί όμως με την αλματώδη πρόοδο που σημειώθηκε στην τεχνική των μεταγγίσεων, παρατηρείται ορισμένες φορές και υπέρμετρη κατανάλωση του αίματος που σε μερικές περιπτώσεις είναι αδικαιολόγητη.

Για το λόγο αυτό θεσπίστηκαν κάποια κριτήρια που καθορίζουν ποια άτομα έχουν ενδείξεις να μεταγγιστούν και ποια όχι. Φυσικά τα κριτήρια αυτά δεν είναι απόλυτα ούτε δεσμευτικά γιατί το βασικότερο ρόλο αναλαμβάνει ο θεράπων ιατρός που παρακολουθεί την κλινική πορεία του ασθενούς και η απόφασή του είναι εκείνη που θα καθορίσει τη θεραπευτική στρατηγική.

6.2. Ενδείξεις για μετάγγιση

Σε νεογνά

1. Όταν τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι κάτω από 13 gr/dl (Hb<13gr/dl) σε νεογνά μικρότερα των 24 ωρών.

2. Όταν τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι κάτω από 13 gr/dl (Hb<13gr/dl) και συνυπάρχει καρδιακή ανεπάρκεια, πνευμονικό νόσημα ή κυανωτική καρδιοπάθεια.

3. Όταν υπάρχει οξεία απώλεια αίματος που ξεπερνά το 10% του ολικού όγκου αίματος.

4. Όταν υπάρχει απώλεια αίματος που ξεπερνά το 5-10% του ολικού όγκου αίματος εξαιτίας των επαναλαμβανόμενων αιμοληψιών.

5. Όταν τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι κάτω από 8 gr/dl (Hb<8gr/dl) και ταυτόχρονα παρουσιάζονται και κλινικές εκδηλώσεις αναιμίας.

Σε ενήλικες

Στους ενήλικες υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες που αποτελούν ένδειξη για μετάγγιση: **α)** η **οξεία αιμορραγία** και **β)** η **χρόνια αναιμία.**

Η οξεία αιμορραγία. Αποτελεί μεγάλο και άμεσο κίνδυνο για την ίδια τη ζωή του ασθενούς. Εξαρτάται από την ποσότητα του αίματος που χάθηκε.

Οξεία αιμορραγία μπορεί να εμφανιστεί σε πολλές περιπτώσεις μερικές από τις οποίες είναι:

- Αιμορραγία από το πεπτικό σύστημα (γαστρορραγία, αιματέμεση, μέλαινες κενώσεις, έλκος στομάχου ή δωδεκαδακτύλου, πολύποδες εντέρου κλπ).
- Αιμορραγία από τραυματισμό (τροχαίο ατύχημα, πυροβολισμός κλπ).
- Αιμορραγία από προβλήματα της πήξης του αίματος (διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, έλλειψη παραγόντων της πήξης κλπ).
- Απώλεια αίματος από χειρουργικές επεμβάσεις (εγχειρήσεις καρδιάς, αγγείων, νεφρών, σπληνός, ορθοπεδικές, στομάχου κλπ).
- Απώλεια αίματος στη μαιευτική (κατά τη γέννα, σε αμβλώσεις κλπ).

Άλλοι λόγοι που παρουσιάζουν συμπτώματα ολιγαιμίας (πτώση της αρτηριακής πίεσης, ταχυπαλμία, ωχρότητα δέρματος, ολιγουρία, καταβολή, κακουχία κλπ).

Η χρόνια αναιμία. Στις περιπτώσεις χρόνιας αναιμίας εξαντλούμε όλα τα θεραπευτικά περιθώρια πριν φτάσουμε στις μεταγγίσεις αίματος. Εφόσον αυτά δεν επαρκούν τότε αντιμετωπίζεται η αναιμία με μεταγγίσεις αίματος που πραγματοποιούνται ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε η αιμοσφαιρίνη του ασθενούς να διατηρείται σε επίπεδα ψηλότερα των 8-10 gr/dl.

6.3. Ενδείξεις για μετάγγιση παραγώγων αίματος

Από κάθε μονάδα (φιάλη) αίματος που λαμβάνεται από έναν δότη γίνεται διαχωρισμός των προϊόντων. Έτσι από **το ολικό αίμα** ξεχωρίζουμε κυρίως τα **ερυθρά** αιμοσφαίρια και το πλάσμα. Επίσης μπορούμε να πάρουμε **λευκά** αιμοσφαίρια και **αιμοπετάλια**.

Το πλάσμα μπορεί κι αυτό με τη σειρά του να διαχωριστεί σε **λευκωματίνη** (αλβουμίνη), **ινωδογόνο**, **παράγοντες πήξης**, **σφαιρίνες** κλπ.

Σπανιότατα σήμερα γίνεται μετάγγιση ολικού αίματος. Το σύνηθες είναι να μεταγγίζονται παράγωγα του αίματος ανάλογα με το πρόβλημα του αρρώστου.

Ολικό αίμα. Όπως αναφέρθηκε σπάνια χορηγείται ολικό αίμα. Η μοναδική περίπτωση που δικαιολογείται η χορήγησή του, είναι σε ασθενή με αθρόα (πολύ μεγάλη) αιμορραγία. Σ' αυτήν την περίπτωση πρέπει να αντικαταστήσουμε τα χαμένα ερυθρά αιμοσφαίρια ταχύτατα, με πρόσφατο αίμα (η λήψη του να έχει γίνει μέσα στο τελευταίο πενθήμερο).

Συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια. Περίπου το 80% των απαιτούμενων μεταγγίσεων μπορούν και πρέπει να γίνονται με συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια. (Εικόνα 6.1) Οι ενδείξεις έχουν ήδη διατυπωθεί. Αναφορικά, χορηγούνται σε καταστάσεις αναιμίας, αιμορραγίας, χειρουργικών επεμβάσεων και σε χρόνιες παθήσεις όπως η μεσογειακή αναιμία.

Λευκά αιμοσφαίρια. Αυτά μπορούν να ληφθούν με ειδική μέθοδο (λευκαφαίρεση). Χορηγούνται σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις ανοσοκατασταλμένων ασθενών για προφύλαξη ή αντιμετώπιση λοιμώξεων. Πρόβλημα αποτελούν η συλλογή και η συντήρησή τους.

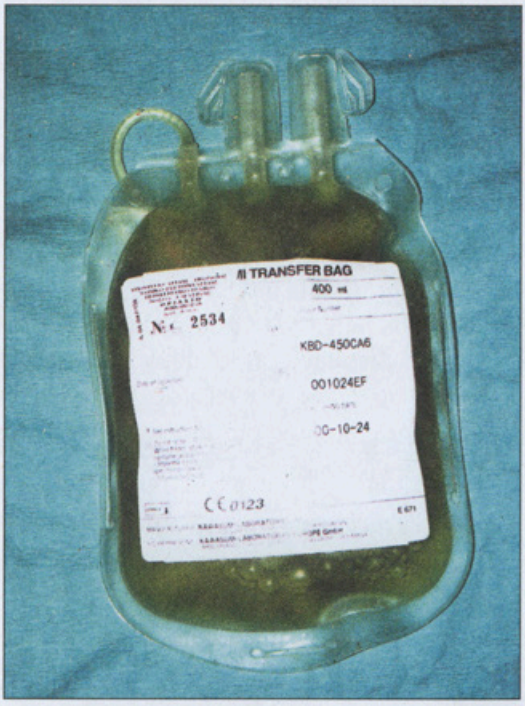
Εικόνα 6.1. *Ασκός με συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια*

Αιμοπετάλια. Χορηγούνται σε ασθενείς με θρομβοπενία ή θρομβασθένεια, οι οποίοι παρουσιάζουν πυρετό, αιμορραγικές εκδηλώσεις ή αριθμό αιμοπεταλίων μικρότερο από 5000 ανά mm^3. Τα αιμοπετάλια διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 22° C), μέσα σε ειδικούς ασκούς, μέχρι 5 ημέρες.

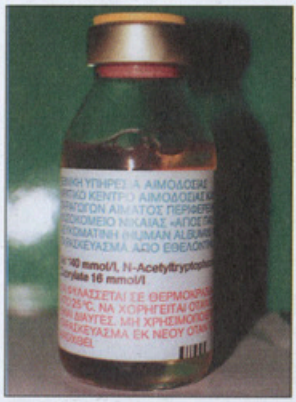
Πλάσμα. Παρέχεται σε περιπτώσεις υπολευκωματιναιμίας, μεγάλης απώλειας όγκου αίματος, βαριά εγκαύματα, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη (ΔΕΠ), αιμορραγική διάθεση από έλλειψη κάποιου παράγοντα της πήξης που δεν το γνωρίζουμε ή δεν υπάρχει αυτόνομο σκεύασμά του. Επίσης, σε μερικές σπάνιες παθολογικές καταστάσεις πραγματοποιείται πλασμαφαίρεση όπου αφαιρείται ένα σημαντικό μέρος του πλάσματος του ασθενούς και χορηγείται ίσος όγκος φυσιολογικού πλάσματος από δότη ή δότες (θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα). (Εικόνα 6.2).

Ινωδογόνο. Χορηγείται όταν παρατηρείται μεγάλη πτώση των επιπέδων του στο αίμα και προκαλούνται αιμορραγίες.

Παράγοντες πήξης. Σε ασθενείς με γνωστή έλλειψη (αιμορροφιλικούς) μεταγγίζονται καθαροί συμπυκνωμένοι παράγοντες. Υπάρχουν σε αυτόνομα σκευάσματα οι αντιαιμορροφιλικοί παράγοντες VIII και IX.



Εικόνα 6.2. *Ασκός πλάσματος*



Εικόνα 6.3. *Φιαλίδιο με λευκωματίνη*

γ-σφαιρίνες. Είναι πρωτεΐνες και χρησιμοποιούνται για την **προφύλαξη από λοιμώξεις ατόμων** που εμφανίζουν συγγενή έλλειψη. Υπάρχουν και ειδικές γ-σφαιρίνες (ανοσοσφαιρίνες), που έχουν ένδειξη σε εξειδικευμένες μόνο περιπτώσεις.

Λευκωματίνη (Human Albumin). Δίνεται σε ασθενείς με **χαμηλά λευκώματα** αίματος, οι οποίοι παρουσιάζουν οιδήματα, εξαιτίας διαταραχής της ωσμωτικής πίεσης στο κυκλοφορικό σύστημα. (Εικόνα 6.3)

6.4. Ατυχή συμβάματα (επιπλοκές) από μετάγγιση αίματος

Πιθανόν, κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας μιας μετάγγισης, να παρουσιαστούν κάποια δυσάρεστα γεγονότα. Αυτά μπορεί να είναι:

Πυρετική αντίδραση. Συνήθως εμφανίζεται μέσα στο πρώτο ημίωρο και συνοδεύεται με ρίγος. Μπορεί να οφείλεται σε κάποια πυρετογόνο ουσία μικροβίου που εισχώρησε στη φιάλη ή σε κάποια πρωτεΐνη των λευκών αιμοσφαιρίων ή των αιμοπεταλίων του δότη. Στο παρελθόν οι πυρετικές αντιδράσεις ήταν συχνές. Από την εποχή που χρησιμοποιούνται πλαστικοί ασκοί μιας χρήσεως και ειδικά φίλτρα για τη χορήγηση του αίματος έχουν μειωθεί πάρα πολύ.

Αλλεργικές αντιδράσεις. Τις περισσότερες φορές είναι ελαφριάς μορφής. Αρχίζουν με αίσθημα κνησμού, ερυθρότητα σε κάποιο μέρος του σώματος και σε σπάνιες περιπτώσεις προκαλείται άσθμα. Σε βαριά αλλεργία δύναται να προκληθεί ακόμα και shock. Τα φαινόμενα υποχωρούν γρήγορα μετά από λήψη αντιισταμινικών ή κορτικοειδών φαρμάκων. Οι αντιδράσεις μπορεί να οφείλονται είτε σε ανάπτυξη κάποιου αντισώματος (κυρίως από προηγούμενη μετάγγιση) είτε γιατί ο δέκτης έλαβε αίμα από αλλεργικό αιμοδότη.

Αντιδράσεις από τη χαμηλή θερμοκρασία του χορηγούμενου αίματος. Αυτό συμβαίνει όταν μεταγγίζουμε με γρήγορο ρυθμό μεγάλες ποσότητες αίματος, αμέσως μόλις βγουν από το ψυγείο. Προκαλούνται κυρίως διαταραχές της καρδιακής λειτουργίας (ακόμα και καρδιακή ανακοπή).

Υπερφόρτωση του κυκλοφορικού συστήματος. Άτομα μεγάλης ηλικίας ή καρδιοπαθείς, αν λάβουν μεγάλες ποσότητες αίματος σε μικρό χρονι-

κό διάστημα, παρουσιάζουν υπερφόρτωση του κυκλοφορικού συστήματος με δυσάρεστες συνέπειες (πνευμονικό οίδημα, καρδιακή ανεπάρκεια κλπ).

Αιμολυτικές αντιδράσεις. Η κυριότερη αιτία αιμόλυσης είναι η ασυμβατότητα σε κάποια από τις ομάδες αίματος (ABO, Rhesus, Kell κλπ). Σε μια τέτοια περίπτωση, οι εξελίξεις είναι γρήγορες και τα συμβάματα πολύ έντονα. Μια άλλη αιτία είναι η παραμονή του αίματος για μεγάλο χρονικό διάστημα εκτός ψυγείου. Πολλά μικρόβια έχουν τη δυνατότητα να αποικήσουν τη φιάλη και να προκαλέσουν αιμόλυση των ερυθρών.

6.5. Μετάδοση νοσημάτων από μετάγγιση αίματος

Είναι γνωστό πως αρκετά νοσήματα, ακόμα και θανατηφόρα, μπορούν να μεταδοθούν με τη μετάγγιση αίματος.

Η λεπτομερής εξέταση της υγείας του αιμοδότη πριν την αιμοδοσία καθώς και ο έλεγχος που γίνεται σε κάθε φιάλη αίματος, αποτελούν τις ασφαλιστικές δικλείδες ώστε το αίμα που θα χορηγηθεί να μην ενέχει κινδύνους μετάδοσης νοσημάτων.

Νοσήματα που μεταδίδονται με μεταγγίσεις αίματος είναι:

Ηπατίτιδα Β. Εκτός από την εκτίμηση του αιμοδότη γίνεται και ειδική εξέταση σε κάθε φιάλη προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο μετάγγισης αίματος που φέρει τον υπεύθυνο ιό.

Ηπατίτιδα C. Ακολουθείται η ίδια στρατηγική με την ηπατίτιδα Β.

HIV (ο ιός που προκαλεί το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας AIDS). Γίνεται συστηματικός έλεγχος στις φιάλες και τους αιμοδότες γιατί ο ιός είναι θανατηφόρος. Ευτυχώς, στην Ελλάδα η συχνότητα της νόσου είναι μικρή.

Σύφιλη. Η πιθανότητα μετάδοσης της ασθένειας με μετάγγιση αίματος σχεδόν έχει μηδενιστεί. Το μικρόβιο που ευθύνεται για τη νόσο καταστρέφεται αν παραμείνει 72 ώρες σε θερμοκρασία 4° C. Έτσι αίμα που διατηρήθηκε σε ψυγείο τουλάχιστον επί τριημέρου αποκλείεται να μεταδώσει τη νόσο. Ωστόσο, κάθε φιάλη ελέγχεται με ειδική εξέταση.

Ελονοσία. Το παράσιτο της ελονοσίας μπορεί να μεταδοθεί με μετάγγιση. Γι αυτό γίνεται λεπτομερής εξέταση του αιμοδότη και αν δημιουργηθούν υποψίες νόσου, αποκλείεται ο αιμοδότης.

Κυτταρομεγαλοϊός (CMV). Μολονότι μπορεί να μεταδοθεί με μετάγγιση δεν έχει μεγάλη σημασία, αφού δεν προκαλεί σοβαρά προβλήματα, γι αυτό

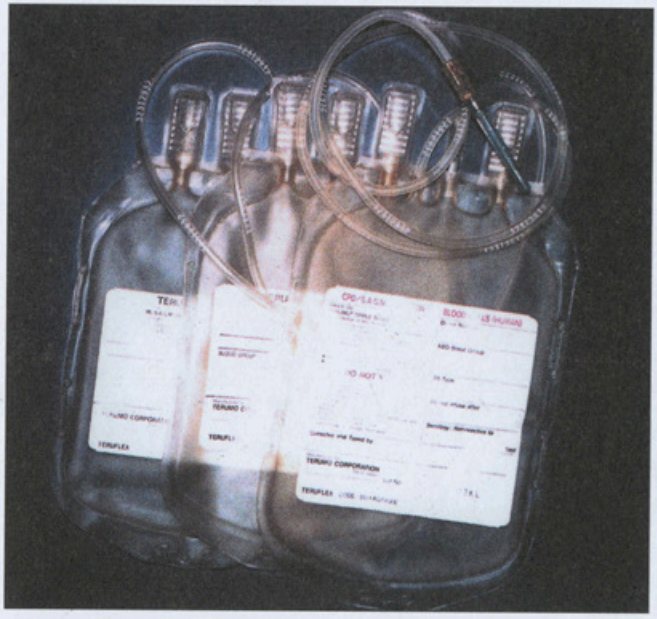
άλλωστε και δεν ελέγχεται συστηματικά. Παίζει σπουδαίο ρόλο όμως σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς στους οποίους μπορεί να επιφέρει και θάνατο. Σε τέτοιες περιπτώσεις ελέγχεται.

Ιός του Ebstein-Bar (EBV). Προκαλεί το νόσημα λοιμώδη μονοπυρήνωση. Σε γενικές γραμμές ακολουθείται τακτική παρόμοια με τον προηγούμενο ιό (CMV).

6.6. Μόλυνση του προς μετάγγιση αίματος

Η μόλυνση του αίματος εντός της φιάλης είναι σύνηθες φαινόμενο ωστόσο ο θάνατος του ασθενή, ο οποίος τυχόν έλαβε το μολυσμένο αίμα, είναι πολύ σπάνιο γεγονός.

Στο παρελθόν, το αίμα αποθηκευόταν σε γυάλινες φιάλες και η μόλυνσή του ήταν συχνότερη. Από την περίοδο όμως που εφαρμόστηκε η φύλαξή του σε διπλούς ή τριπλούς πλαστικούς ασκούς, κλειστού κυκλώματος μιας χρήσεως (Εικόνα 6.4), ελαττώθηκαν πάρα πολύ τα ατυχή συμβάματα.



Εικόνα 6.4. *Τριπλοί πλαστικοί ασκοί, κλειστού κυκλώματος, μιας χρήσεως*

Οι βασικές αιτίες μόλυγσης σήμερα οφείλονται στην παράβαση των κανόνων α)κατά τη λήψη του αίματος από τον αιμοδότη και β)κατά τη συντήρηση.

Η μειωμένη προφύλαξη από τα μικρόβια την ώρα που λαμβάνεται το αίμα ενέχει σοβαρούς κινδύνους μόλυνσης του ασκού. Ορισμένα από αυτά μπορούν να επιβιώσουν σε χαμηλές θερμοκρασίες (θερμοκρασίες ψυγείου), ενώ άλλα έχουν την ικανότητα ακόμη και να πολλαπλασιάζονται.

Μόλις το μολυσμένο αίμα μεταγγιστεί, τα μικρόβια θα αποικήσουν τον οργανισμό του ασθενή-δέκτη και θα προκαλέσουν εκδήλωση νοσημάτων.

Η άλλη επίσης βασική αιτία μόλυνσης είναι η παραμονή του αίματος εκτός ψυγείου για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Μικρόβια που δυσκολεύονται να επιβιώσουν σε ψυχρό περιβάλλον, πολλαπλασιάζονται τάχιστα εκτός ψυγείου.

Μεγαλύτερη πιθανότητα μόλυνσης έχουν οι ασκοί συλλογής συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων που διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου (22° C).

Για να μειωθεί ο κίνδυνος μόλυνσης του αίματος πρέπει να γίνεται λεπτομερής καθαρισμός του δέρματος του αιμοδότη στην περιοχή της φλεβοκέντησης. Αν παρατηρείται παθολογική δερματική αλλοίωση του δότη, πρέπει αυτός να αποκλειστεί από την αιμοδοσία.

Επίσης απαιτείται προσεκτική μακροσκοπική εξέταση του ασκού με το αίμα. Στην περίπτωση που παρουσιαστεί θολερότητα στο περιεχόμενο, τότε η φιάλη αχρηστεύεται.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία 50 χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος ώστε πλέον η χορήγηση αίματος αποτελεί ένα ξεχωριστό και πολύ σημαντικό κλάδο της Αιματολογίας, την Αιμοδοσία. Επίσης θεσπίστηκαν κάποια κριτήρια που καθορίζουν ποια άτομα έχουν ενδείξεις να μεταγγιστούν και ποια όχι. Άλλα κριτήρια ισχύουν για τα νεογνά και άλλα για τους ενήλικες.

Από το ολικό αίμα ξεχωρίζουμε τα ερυθρά αιμοσφαίρια, το πλάσμα, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Το πλάσμα μπορεί κι αυτό με τη σειρά του να διαχωριστεί σε λευκωματίνη, ινωδογόνο, παράγοντες πήξης, σφαιρίνες κλπ. Σπανιότατα σήμερα γίνεται μετάγγιση ολικού αίματος. Το σύνηθες είναι να μεταγγίζονται παράγωγα του αίματος ανάλογα με το πρόβλημα του αρρώστου.

Πιθανόν, κατά τη διάρκεια ή μετά το πέρας μιας μετάγγισης, να παρουσιαστούν κάποια δυσάρεστα γεγονότα όπως πυρετός, αλλεργία, αιμόλυση, υπερφόρτωση του κυκλοφορικού συστήματος κλπ.

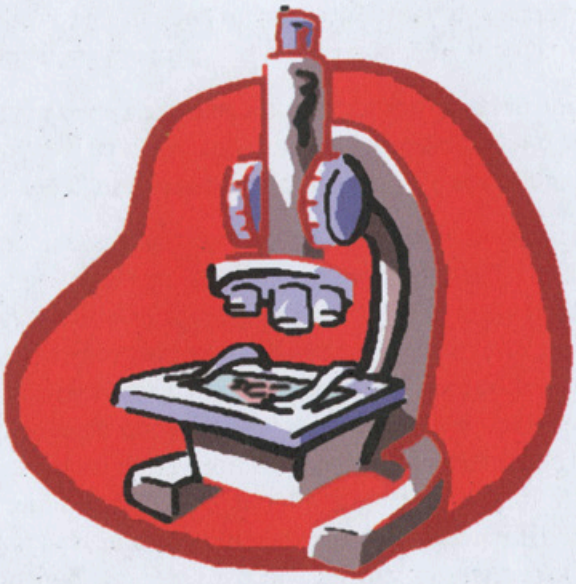
Η λήψη αίματος εγκυμονεί κινδύνους μετάδοσης νοσημάτων από το δότη στο δέκτη. Ακόμη επιφυλάσσει ατυχή συμβάματα από τη μετάγγιση μολυσμένου αίματος. Συνεπώς επιβάλλεται ο λεπτομερής έλεγχος κάθε φιάλης πριν τη χορήγησή της.

Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:

1. Ποιες είναι οι ενδείξεις μετάγγισης αίματος στα νεογνά;
2. Σε ασθενή με μεσογειακή αναιμία θα χορηγούσατε ολικό αίμα; Αιτιολογείστε την απάντηση.
3. Ασθενής με χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης πρέπει να μεταγγιστεί. Ποιο από τα παράγωγα αίματος πρέπει να του χορηγηθεί; Αιτιολογείστε την απάντηση.
4. Γιατί τα συμπυκνωμένα αιμοπετάλια ενέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να μολυνθούν;
5. Σε ασθενή που έχει αριθμό αιμοπεταλίων 100000 ανά mm^3 (Φυσιολογικές τιμές 150000-400000 ανά mm^3) τι θα κάνετε; Αιτιολογείστε την απάντηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

τμήμα συμβατότητας



7.1 Τι πρέπει να έχει υπόψη του ο εργαζόμενος στο τμήμα συμβατότητας
7.2 Διαδικασία για τη μετάγγιση
7.2.1 Έντυπο δελτίο αίτησης αίματος
7.2.2 Δείγμα αίματος του ασθενούς (δέκτη)
7.2.3 Ομάδα αίματος και Rhesus του ασθενούς (δέκτη)
7.2.4 Επιλογή αίματος για τη μετάγγιση
7.2.5 Διασταύρωση
7.3 Μετάγγιση αίματος σε επείγουσες καταστάσεις
ΠΕΡΙΛΗΨΗ
ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

7.1. Τι πρέπει να έχει υπόψη του ο εργαζόμενος στο τμήμα συμβατότητας

Το βασικό μέλημα των εργαζομένων στο τμήμα συμβατότητας είναι να χορηγηθεί στον έχοντα ανάγκη ασθενή αίμα συμβατό με το δικό του. Με τη σοβαρή και προσεκτική εργασία του τμήματος συμβατότητας αποφεύγονται ανεπιθύμητα αποτελέσματα που μπορούν να προκύψουν από μη συμβατή μετάγγιση αίματος, καθώς και από μετάγγιση αίματος μολυσμένου, μη ελεγμένου ή κακώς συντηρημένου.

Οι βασικές διαδικασίες, οι οποίες εκτελούνται στο τμήμα συμβατότητας είναι, ο καθορισμός της ομάδας αίματος δότη και δέκτη για τα αντιγονικά συστήματα ABO και Rhesus, καθώς και η διασταύρωση αίματος μεταξύ δότη και δέκτη.

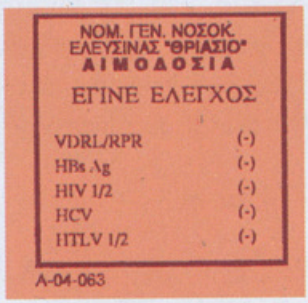
Το αίμα (και τα παράγωγά του) που προέρχεται από την αιμοδοσία, φυλάσσεται στην τράπεζα αίματος, σε ειδικούς ασκούς, που περιέχουν ειδικά αντιπηκτικά – συντηρητικά διαλύματα και διατηρούνται σε ψύξη με καθορισμένες ειδικές θερμοκρασίες συντήρησης. Οι παραπάνω συνθήκες είναι απαραίτητες, ώστε να διατηρείται το αίμα σε καλή κατάσταση και να είναι δυνατή η χορήγησή του για μεγάλο διάστημα μετά τη λήψη του από το δότη. Σε κάθε μονάδα αίματος (Εικόνα 7.1), που φυλάσσεται στην αιμοδοσία, είναι απαραίτητο σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία να αναγράφεται σε ειδική σήμανση (ετικέτα) **η ομάδα αίματος** (ABO) και **το Rhesus**, καθώς και **η ημερομηνία λήξης** του αίματος. Κάθε αίμα που βρίσκεται στην τράπεζα αίματος έχει ελεγχθεί για HIV (ιός της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας), σύφιλη **(VDRL)**, ηπατίτιδα Β **(HbsAg)** και ηπατίτιδα C **(αντι HCV)** (Εικόνα 7.2).

Οι εργαζόμενοι στο τμήμα συμβατότητας οφείλουν να χειρίζονται τις φιάλες αίματος χρησιμοποιώντας κάθε κανόνα αντισηψίας, να μεριμνούν για τη σωστή συντήρηση, ψύξη και απόψυξη του αίματος, να ελέγχουν τις ειδικές σημάνσεις στους ασκούς αίματος προς αποφυγή λαθών και να ακολουθούν ακριβώς τη διαδικασία για τη μετάγγιση.

7.2. Διαδικασία για τη μετάγγιση

Ο όρος διαδικασία για τη μετάγγιση περιλαμβάνει όλες **τις ενέργειες** και **τις εξετάσεις** που λαμβάνουν χώρα στην τράπεζα αίματος **πριν από τη μετάγγιση** και σκοπό έχουν την παροχή στο δέκτη (μεταγγιζόμενο) αίματος συμβατού με το δικό του. Η σωστή και σχολαστική τήρηση των κανόνων της διαδικασίας για τη μετάγγιση εξασφαλίζει για το δέκτη μετάγγιση που από τη μία θα ωφελήσει και από την άλλη δεν θα δημιουργήσει προβλήματα τα οποία μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο και

Εικόνα 7.1. *Μονάδα αίματος έτοιμη προς χορήγηση*



Εικόνα 7.2. *Ετικέτα ορολογικού ελέγχου*

τη ζωή ακόμα του μεταγγιζόμενου. Οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα πριν τη μετάγγιση είναι:

α) Έντυπο δελτίο αίτησης αίματος (Εικόνα 7.3)

β) Δείγμα αίματος ασθενούς (δέκτη)

γ) Ομάδα αίματος ασθενούς

δ) Επιλογή αίματος για μετάγγιση

ε) Διασταύρωση

Με τις τέσσερις πρώτες διαδικασίες αυξάνονται οι πιθανότητες να υπάρξει συμβατότητα του αίματος του δότη με το αίμα του δέκτη, ενώ με την τελευταία γίνεται έλεγχος (δοκιμασία συμβατότητας) μεταξύ του αίματος του δότη και του δέκτη, που εξασφαλίζει όσο το δυνατόν περισσότερο το επιθυμητό αποτέλεσμα (συμβατότητα) και μειώνει την πιθανότητα ανεπιθύμητων συμβάντων.

7.2.1 Έντυπο δελτίο αίτησης αίματος

Είναι το έντυπο, που αποστέλλεται από το θεράποντα γιατρό, το οποίο αιτείται από την τράπεζα αίματος τη χορήγηση αίματος ή παραγώγων του. Η σύνταξη του εντύπου αυτού και η αποστολή του στο τμήμα αιμοδοσίας είναι απαραίτητη προκειμένου να ακολουθήσει ο έλεγχος συμβατότητας αίματος για κάθε ασθενή. Στο δελτίο αυτό πρέπει να αναγράφονται :

- Το όνομα, το επώνυμο, το πατρώνυμο και η ηλικία του ασθενούς.
- Η κλινική και το τμήμα που νοσηλεύεται ο ασθενής
- Η διάγνωση – ασθένεια, από την οποία πάσχει ο ασθενής
- Η ημερομηνία και η ώρα σύνταξης του δελτίου αίτησης
- Το ιστορικό του ασθενή, όσον αφορά προηγηθείσες μεταγγίσεις και τυχόν αντιδράσεις
- Ο αριθμός των μονάδων αίματος και των παραγώγων που ζητούνται
- Ο επιθυμητός χρόνος μετάγγισης και ο βαθμός του επείγοντος της μετάγγισης
- Το ονοματεπώνυμο του αιτούντος θεράποντος ιατρού και η υπογραφή του

7.2.2 Δείγμα αίματος του ασθενούς (δέκτη)

Μαζί με το Έντυπο Δελτίο Αίτησης Αίματος, αποστέλλεται στην αιμοδοσία ποσότητα 5cm^3 αίματος του ασθενή σε σωληνάριο χωρίς συντηρητικά. Σε ετικέτα πάνω στο σωληνάριο αναγράφονται **το ονοματεπώνυμο**, το **πατρώνυμο** και **η κλινική** που νοσηλεύεται ο ασθενής, καθώς και **η ημερομηνία αιμοληψίας** του δείγματος.

7.2.3 Ομάδα αίματος και Rhesus του ασθενούς (δέκτη)

Στο δείγμα αίματος του ασθενούς που αποστέλλεται στο τμήμα συμβατότητας, γίνεται προσδιορισμός της ομάδας αίματος για τα συστήματα ΑΒΟ και Rhesus (D). Σε ειδικές περιπτώσεις (όπως πολυμεταγγιζόμενα άτομα, άτομα στα οποία έχουν προηγηθεί αντιδράσεις από μετάγγιση, έγκυες γυναίκες) γίνεται προσδιορισμός αντιγόνων και άλλων συστημάτων και ιδίως των συστημάτων: Rhesus E,e C,c και Kell.

ΕΘΝΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΥΓΕΙΑΣ - ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΕΘΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΥΓΕΙΑΣ
ΝΟΜΑΡΧΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ
ΕΛΕΥΣΙΝΑΣ «ΘΡΙΑΣΙΟ»

ΚΛΙΝΙΚΗ:.....

Ημερ/νία:....., *ώρα* ..... *π.μ.* / *μ.μ.*

ΠΡΟΣ
ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ ΤΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ
ΕΛΕΥΣΙΝΑΣ «ΘΡΙΑΣΙΟ»

Καθορισμός ομάδας αίματος ABO, Rh και εξετάσεις συμβατότητας

Όνομα ασθενή: .....
ΕΠΩΝΥΜΟ ΟΝΟΜΑ

Όνομα Πατέρα/Συζύγου ..... Ηλικία: .....

Διάγνωση: ..... Ημερομ. εισόδου: .....

Αν προβλέπεται μετάγγιση να συμπληρωθούν τα παρακάτω:

Προηγήθησαν άλλες μεταγγίσεις; ..... *Πότε;* .....

Παρατηρήθησαν αντιδράσεις; ..... *Ht* ..... *Hb* .....

Σημειώσατε την περίπτωση:

☐ *Μετάγγιση εξαιρ. επείγουσα*
Σημειώνεται ΜΟΝΟ σε περίπτωση απόλυτης ανάγκης και με ευθύνη του εντελλόμενου για τη μετάγγιση γιατρού ο οποίος και υποχρεώνεται να βεβαιώσει το επείγον με υπογραφή. Υπενθυμίζεται ότι η συνακόλουθη του επείγοντος απλούστευση των εξετάσεων συμβατότητας δημιουργεί σοβαρότατους κινδύνους.

(Υπογραφή)

☐ *Μετάγγισης μη επείγουσα*

☐ *Μετάγγισης κατά την εγχείρηση ημερ/νία* .....

☐ *Εξετάσεις συμβατότητας προληπτικά*

☐ *Καθορισμός ομάδας ABO - Rh*

☐ *Μετάγγιση μόλις γίνουν οι εξετάσεις συμβατότητας.*

Αιτουμένη ποσότητα: Ολικού αίματος μονάδ.....
(ΜΟΝΑΔΑ ΑΙΜΑΤΟΣ = 450ml)

Πλάσματος μονάδες: .....
(ΜΟΝΑΔΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ = 250ml)

Η ΠΑΡΑΓΩΓΑ

Συμπυκνωμένα ερυθρά μονάδες: .....

Αιμοπετάλια μονάδες: .....

Ο ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΓΙΑΤΡΟΣ

Τα παρακάτω συμπληρώνονται από το Εργαστήριο του Κέντρου

Ομάδα ABO ☐ Rh ☐ Φαινότυπος Rh ☐

Αριθμοί φιαλών αίματος	Ποσό αίματος ή παραγώγων	ABO και Rh	σε φ	σε λεύκωμ.	Ένζυμο	Coombs

(Υπογρ.)

Ημερομ.: .....

Δ - 04 - 014

Εικόνα 7.3. *Έντυπο δελτίο αίτησης αίματος*

7.2.4 Επιλογή αίματος για τη μετάγγιση

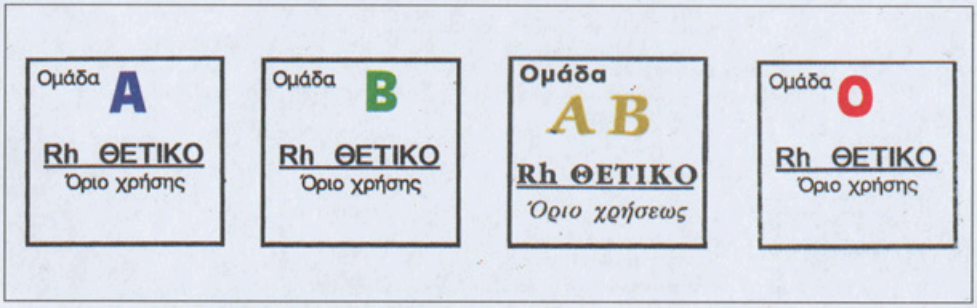
Γίνεται προσπάθεια να επιλεγεί από την τράπεζα αίμα που θα είναι **της ίδιας ομάδας ΑΒΟ και Rhesus (D)** με το αίμα του ασθενούς που πρόκειται να μεταγγισθεί (Εικόνα 7.4 και Εικόνα 7.5).

Εάν στην τράπεζα δεν υπάρχει τέτοιο αίμα και η μετάγγιση δεν είναι επείγουσα, γίνεται προσπάθεια να ανευρεθεί από άλλες Τράπεζες αίματος. Εάν η προσπάθεια είναι ανεπιτυχής, τότε μπορεί να χορηγηθεί αίμα διαφορετικής ομάδας κατά ΑΒΟ σύμφωνα με τα παρακάτω:

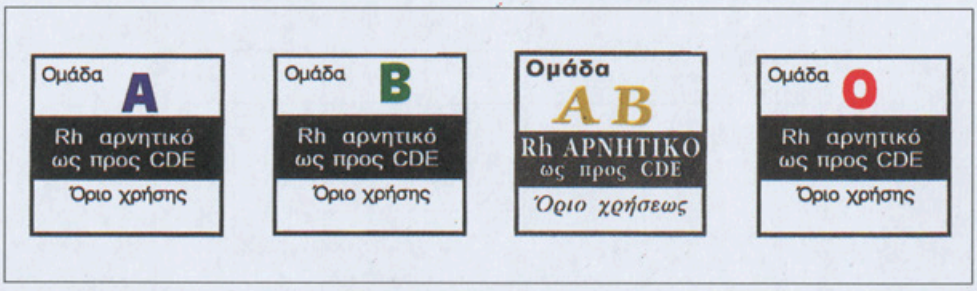
Η ομάδα Ο μπορεί να πάρει αίμα μόνο από ομάδα Ο, ενώ, αντίθετα, όλες οι Ομάδες μπορούν να πάρουν αίμα από την ομάδα Ο. Αυτός είναι ο λόγος, που η ομάδα Ο χαρακτηρίζεται παγκόσμιος δότης.

Η ομάδα ΑΒ μπορεί να πάρει αίμα από Α ή Β ή Ο και χαρακτηρίζεται παγκόσμιος δέκτης.

Σε Rhesus αρνητικό (-) γίνεται προσπάθεια χορήγησης αίματος Rhesus αρνητικό (-).



Εικόνα 7.4. *Ετικέτες ομάδων αίματος κατά ΑΒΟ Rhesus θετικά*



Εικόνα 7.5. *Ετικέτες ομάδων αίματος κατά ΑΒΟ Rhesus αρνητικά*

Πίνακας Επιλογής Ομάδας Αίματος για Μετάγγιση στο Σύστημα ΑΒΟ		
ΟΜΑΔΑ ΑΣΘΕΝΗ	ΛΑΜΒΑΝΕΙ ΑΙΜΑ	
	1η ΕΠΙΛΟΓΗ	2η ΕΠΙΛΟΓΗ
Ο	Ο	-
Α	Α	Ο
Β	Β	Ο
ΑΒ	ΑΒ	Ο, Α, Β

Η ομάδα Ο είναι πανδότης.
Η ομάδα ΑΒ είναι πανδέκτης.

Με τη χορήγηση στο μεταγγιζόμενο αίματος ομάδας ίδιας με τη δική του, μειώνεται η πιθανότητα ανεπιθύμητων αντιδράσεων και αυξάνεται ο χρόνος επιβίωσης των ερυθροκυττάρων του μεταγγιζόμενου αίματος στον οργανισμό του ασθενή.

7.2.5 Διασταύρωση

Αφού έχει επιλεγεί το αίμα, το οποίο θα χορηγηθεί στον ασθενή, ακολουθεί η διασταύρωση του αίματος του δέκτη με εκείνο του δότη (Εικόνα 7.6). Η διασταύρωση έχει σαν σκοπό την ανίχνευση (πριν γίνει η μετάγγιση) αντισωμάτων - τέλειων ή ατελών – στον ασθενή – δέκτη, που πιθανόν θα κατέστρεφαν τα ερυθρά του δότη μετά τη μετάγγιση.

Στη διαδικασία της διασταύρωσης χρησιμοποιούνται διάφορα υποστρώματα, τα οποία ελέγχονται σε διάφορες θερμοκρασίες και φέρνουν σε επαφή τον ορό του δέκτη με τα ερυθροκύτταρα του δότη.

Εάν από τον έλεγχο με διασταύρωση αποκαλυφθούν αντισώματα τα οποία θα κατέστρεφαν τα ερυθρά του δότη, τότε το αίμα που έχει επιλεγεί **απορρίπτεται** για τη συγκεκριμένη μετάγγιση και ακολουθεί διασταύρωση για άλλη μονάδα αίματος.

Πρέπει να σημειωθεί, ότι παρά την προσπάθεια για σωστή τεχνική διασταύρωσης και παρότι χρησιμοποιούνται όλο και πιο εξελιγμένες τεχνικές για την ανίχνευση πλήρων ή ατελών αντισωμάτων στον ορό του δέκτη, δεν μπορεί πάντα να εξασφαλισθεί η φυσιολογική επιβίωση των ερυθροκυττάρων που θα μεταγγισθούν στο δέκτη και ούτε να προληφθεί η ανοσοποίηση του δέκτη.

Αυτό συμβαίνει, γιατί δεν είναι δυνατόν να γίνει διασταύρωση για όλα τα αντι-

ΕΘΝΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ

της αριθ. .....μονάδας
Ομάδας ..... Rh .....
βρέθηκε ΣΥΜΒΑΤΟ με το αίμα του ασθενούς
.....
ομάδας ..... Rh .....
Ημερομ. ..... Κλινική .....
Υπογραφή εκτελέσαντος τη συμβατότητα

Εικόνα 7.6. *Ετικέτα διασταυρωμένου αίματος*

σώματα που μπορεί να υπάρχουν στον ορό του δέκτη, αλλά ούτε να προβλεφθεί η απάντηση του δέκτη απέναντι στα αντιγόνα των ερυθροκυττάρων του δότη που είναι ξένα προς τον εαυτό του.

7.3. Μετάγγιση αίματος σε επείγουσες καταστάσεις

Σε εξαιρετικά επείγουσες καταστάσεις στις οποίες απειλείται η ζωή του ασθενή (οξείες μεγάλες αιμορραγίες), είναι δυνατόν να απαιτείται άμεση μετάγγιση αίματος. Στις περιπτώσεις αυτές, όταν δεν υπάρχει χρόνος να ολοκληρωθούν οι διαδικασίες της διασταύρωσης, ο θεράπων ιατρός μπορεί να αναλάβει την ευθύνη και να ζητήσει άμεση μετάγγιση αίματος, χωρίς να προηγηθεί διασταύρωση. Ο γιατρός είναι υποχρεωμένος να αναφέρει στο έντυπο με το οποίο ζητάει το αίμα την ανάγκη χορήγησης χωρίς διασταύρωση, καθώς και την αιτία από την οποία απειλείται η ζωή του ασθενή.

Η υποχρέωση του τμήματος συμβατότητας είναι να χορηγήσει αίμα όσο το δυνατόν πιο συμβατό με το αίμα του ασθενή, που πρόκειται να μεταγγισθεί.

- Αν ο χρόνος δεν είναι απόλυτα πιεστικός και υπάρχει δυνατότητα να καθορισθεί η ομάδα αίματος του ασθενή, τότε χορηγείται αίμα της ίδιας ομάδας με του ασθενή (χωρίς να έχει γίνει διασταύρωση).
- Αν ο χρόνος είναι απόλυτα πιεστικός, χορηγείται αίμα ομάδας Ο (παγκόσμιος δότης), αφού από το αίμα αυτό αφαιρεθεί το 70% του πλάσματος. Προτιμάται η χορήγηση αίματος Ο Rh αρνητικού. Όταν δεν υπάρχει στην τράπεζα αίματος αίμα

Ο Rh αρνητικό, τότε χορηγείται Ο Rh θετικό. Ταυτόχρονα με τη χορήγηση της πρώτης μονάδας αίματος (χωρίς διασταύρωση) αρχίζει στο τμήμα συμβατότητας η διαδικασία της διασταύρωσης, προκειμένου να συνεχιστεί η μετάγγιση του ασθενή όσο γρηγορότερα γίνεται με αίμα απόλυτα συμβατό με το δικό του.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εργαζόμενοι στο τμήμα συμβατότητας πρέπει να ενεργούν έχοντας αίσθημα αυξημένης ευθύνης απέναντι στον ασθενή (μεταγγιζόμενο).

Λάθη στο τμήμα συμβατότητας δεν είναι δυνατόν να δικαιολογηθούν, γιατί μπορεί να προκαλέσουν μοιραία αποτελέσματα.

Πρέπει να τηρείται με σχολαστικότητα η διαδικασία μετάγγισης (Έντυπο δελτίο αίτησης αίματος, δείγμα αίματος του ασθενή, ομάδα αίματος του ασθενούς, επιλογή αίματος για μετάγγιση, διασταύρωση αίματος).

Ακόμη και σε εξαιρετικά επείγουσες καταστάσεις στις οποίες ζητείται αίμα χωρίς διασταύρωση, πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια, ώστε να χορηγηθεί αίμα όσο το δυνατόν πιο συμβατό με το αίμα του ασθενή.

Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:

1. Ποιο είναι το βασικό μέλημα των εργαζομένων στο τμήμα συμβατότητας;
2. Σε τι είδους έλεγχο έχει υποβληθεί μία μονάδα αίματος που φυλάσσεται στην τράπεζα αίματος.
3. Ποια είναι τα στάδια της μετάγγισης αίματος;
4. Ποια είναι τα κριτήρια για τη συμβατότητα του αίματος που προορίζεται για μετάγγιση;
5. Ποιον ονομάζουμε παγκόσμιο δότη και παγκόσμιο δέκτη;
6. Τι ομάδα θα θέλατε να είχατε σε περίπτωση άμεσης ανάγκης για λήψη αίματος,;

7. Τι γνωρίζετε για τη μετάγγιση αίματος σε επείγουσες καταστάσεις;

8. Ποιος φέρει την ευθύνη για μη συμβατή μετάγγιση, η οποία έλαβε χώρα σε επείγουσα κατάσταση;

9. Η επιτυχής διασταύρωση του αίματος εξασφαλίζει 100% τη συμβατότητα δότη – δέκτη και γιατί;

– ΠΡΩΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ –

α. αιματολογία ΙΙ

Η εργαστηριακή ανάλυση,
για να προάγει την υγεία,
πρέπει να ερευνήσει την ασθένεια,
όπως η μουσική,
για να δημιουργήσει την αρμονία,
πρέπει να εξετάσει τη δυσαρμονία.

ΠΛΟΥΤΑΡΧΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

εργαστηριακός έλεγχος των αναιμιών

8.1 Εξετάσεις που αφορούν την ανίχνευση μιας αιμολυτικής αναιμίας

8.1.1 Ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων

8.1.2 Μέτρηση της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθροκυττάρων

8.2 Εξετάσεις για διαταραχές της αιμοσφαιρίνης

8.2.1 Βοηθητική τεχνική για το πλύσιμο των ερυθροκυττάρων

8.2.2 Βοηθητική τεχνική παρασκευής αιμολύματος ερυθρών αιμοσφαιρίων με τολουόλη

8.2.3 Βοηθητική τεχνική παρασκευής αιμολύματος για την ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης σε cellogel

8.2.4 Ηλεκτροφόρηση

8.2.5 Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε ταινία οξικής κυτταρίνης

8.2.6 Δοκιμασία δρεπανώσεως των ερυθροκυττάρων

8.2.7 Δοκιμασία διαλυτότητας της αιμοσφαιρίνης S

Όταν ολοκληρωθεί αυτή η ενότητα, θα έχεις τη δυνατότητα:

- ✓ *να χρησιμοποιείς τις προηγούμενες γνώσεις για να κατανοήσεις τις νέες γνώσεις.*
- ✓ *να κατανοείς την αλληλουχία των βιολογικών αντιδράσεων που συμβαίνουν κατά την εξέλιξη της εργαστηριακής άσκησης.*
- ✓ *να παρασκευάζεις με ακρίβεια και ασφάλεια τα διαγνωστικά αντιδραστήρια.*
- ✓ *να επιλέγεις τα απαραίτητα σκεύη και υλικά για την ολοκλήρωση της ανάλυσης.*
- ✓ *να εκτελείς με ασφάλεια και αξιοπιστία τις διαγνωστικές εξετάσεις.*
- ✓ *να χειρίζεσαι με δεξιότητα τα όργανα και τα σκεύη των εργαστηριακών εξετάσεων.*
- ✓ *να συγκρίνεις τις τιμές των μετρήσεων με τις φυσιολογικές τιμές λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία και το φύλο του ασθενή.*
- ✓ *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.**

8.1. Εξετάσεις που αφορούν την ανίχνευση μιας αιμολυτικής αναιμίας

Ας θυμηθούμε:

ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

"**Αναιμία** λέγεται η ελάττωση του ποσού της **αιμοσφαιρίνης**, της τιμής του **αιματοκρίτη** και, ενδεχομένως, και του αριθμού των **ερυθροκυττάρων** σε επίπεδα χαμηλότερα από τα κατώτερα φυσιολογικά όρια που αντιστοιχούν στην ηλικία και το φύλο του ατόμου."

Η διάγνωση μιας αναιμίας απαιτεί σχεδιασμό διαδοχικών εξετάσεων. Τα στοιχεία από μία μόνο εξέταση είναι αναξιόπιστα για τη διάγνωση. Η στρατηγική της διάγνωσης των αναιμιών περιλαμβάνει τους εξής στόχους:

Α : Εξετάσεις που αφορούν τα ερυθροκύτταρα

Πρέπει να σημειωθεί ότι το φρεσκάρισμα των γνώσεων που έχουν ήδη αποκτηθεί , από το μάθημα " Αιματολογία Ι ", είναι αναγκαία προϋπόθεση για το "χτίσιμο" των νέων γνώσεων.

Β : Εξετάσεις για σίδηρο

Ο στόχος αυτός αναλύεται στο μάθημα "Βιολογικές και βιοχημικές εξετάσεις". Είναι απαραίτητος ο συνδυασμός των γνώσεων.

Γ : Εξετάσεις που αφορούν την ανίχνευση και την επιβεβαίωση μιας αιμολυτικής αναιμίας

Ο στόχος αυτός θα αναλυθεί στις ενότητες του βιβλίου αυτού.

Δ : Εξετάσεις για διαταραχές της αιμοσφαιρίνης

Και ο στόχος αυτός θα αναλυθεί στις ενότητες του βιβλίου αυτού.

Ε: Άλλες εξετάσεις που αφορούν τον έλεγχο της ποσότητας της βιταμίνη Β12 και του φυλλικού οξέος

Κάθε στόχος του σχεδιασμού των εξετάσεων περιλαμβάνει πολλές διαγνωστικές τεχνικές.

Οι εργαστηριακές μέθοδοι συνεχώς τροποποιούνται εξαιτίας της ραγδαίας εξέλιξης της ιατρικής τεχνολογίας. Αυτοματοποιημένες ηλεκτρονικές συσκευές ολοκληρώνουν τους προσδιορισμούς με ταχύτητα και μεγάλη αξιοπιστία. Σε περιπτώσεις που εντοπίζονται παθολογικά ευρήματα κάνουμε επανέλεγχο των αποτελεσμάτων με κλασικές εργαστηριακές τεχνικές, οι οποίες ονομάζονται τεχνικές αναφοράς.

8.1.1 Ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων

Ας ανακαλέσουμε προηγούμενες γνώσεις:

Ώσμωση ονομάζεται η μετακίνηση ενός διαλύτη από ένα διάλυμα μικρότερης συγκέντρωσης προς ένα διάλυμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης διαλυμένης ουσίας, όταν τα δύο διαλύματα διαχωρίζονται από μεμβράνη ημιδιαπερατή. Η μεμβράνη αυτή, εκλεκτικά, αποτρέπει το πέρασμα των μορίων της διαλυμένης ουσίας, αλλά επιτρέπει το πέρασμα του διαλύτη.

Αυτό γίνεται όταν η **ωσμωτική πίεση,** δηλαδή η πίεση που εξασκούν στη μεμβράνη τα μόρια της διαλυμένης ουσίας, είναι άνιση στις δύο πλευρές της μεμβράνης. Με την ώσμωση γίνεται προσπάθεια να εξισωθούν οι ωσμωτικές πιέσεις.

- **Συμβαίνει το φαινόμενο της ώσμωσης στον ανθρώπινο οργανισμό;**

Το φαινόμενο της ώσμωσης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε ορισμένα βιολογικά φαινόμενα όπως, στη φυσιολογία του κυττάρου.

Το ερυθρό αιμοσφαίριο παραμένει ακέραιο μέσα στο πλάσμα, επειδή το πλάσμα έχει την ίδια ωσμωτική πίεση με αυτό (π=7,7atm), είναι δηλαδή ισοτονικό. Ο φυσιολογικός ορός (διάλυμα NaCl 0,9%) ή το διάλυμα γλυκόζης 5,5% έχει την ίδια ωσμωτική πίεση με το αίμα, γι' αυτό χορηγείται με ασφάλεια ενδοφλέβια σε περιπτώσεις που χρειάζεται αναπλήρωση των υγρών του οργανισμού.

- **Τι θα συμβεί σε περίπτωση διαφορετικής ωσμωτικής πίεσης από τη φυσιολογική;**

α. Αν το ερυθροκύτταρο βρεθεί μέσα σε διάλυμα που έχει **μικρότερη ωσμωτική πίεση**, τότε περνάει υγρός διαλύτης

στο κύτταρο για να αραιώσει το εσωτερικό του. Έτσι, ο όγκος του μεγαλώνει και καταστρέφεται η κυτταρική του μεμβράνη.

Η αντοχή της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων εξαρτάται από το σχήμα του κυττάρου και την ποιότητα της μεμβράνης. Όσο αυξάνει το πάχος του κυττάρου τόσο η ωσμωτική του αντίσταση ελαττώνεται. Όσο μικραίνει το πάχος του κυττάρου τόσο η ωσμωτική του αντίσταση αυξάνεται. Σε παθολογικές καταστάσεις η κυτταρική μεμβράνη παρουσιάζει μειωμένη αντοχή σε περιβάλλον που ασκεί μεγάλη εξωκυττάρια πίεση.

Στα σφαιροκύτταρα αρκεί το πέρασμα μικρής ποσότητας διαλύματος για να προκαλέσει διόγκωση του κυττάρου και καταστροφή της κυτταρικής του μεμβράνης.

β. Αν το ερυθροκύτταρο βρεθεί σε διάλυμα με **μεγαλύτερη ωσμωτική πίεση**, υγρό του κυττάρου θα μετακινηθεί προς τα έξω και έτσι το κύτταρο θα συρρικνωθεί.

8.1.2 Μέτρησης της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθροκυττάρων

Σε ποιες περιπτώσεις χρειάζεται να γίνει η μέτρηση;

Το όριο αντοχής της κυτταρικής μεμβράνης είναι διαφορετικό σε κάθε παθολογική κατάσταση και αποτελεί διαγνωστικό στοιχείο για:

- Επίκτητη αιμολυτική αναιμία
- Κληρονομική σφαιροκυττάρωση
- Σιδηροπενική αναιμία
- Αιμολυτική νόσο του νεογνού
- Αιμοσφαιρινοπάθεια S
- Θαλασσαιμία
- Ηπατοπάθειες
- Σπληνεκτομή
- Μακροκυττάρωση

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ελέγχεται η ανθεκτικότητα της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, όταν αυτά βρεθούν σε περιβάλλον υποτονικό.

Στην ίδια αρχή στηρίζεται και η μέθοδος της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθροκυττάρων μετά από 24ωρη επώαση σε θερμοκρασία 37° C.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε φλεβικό αίμα σε οξαλικό κάλιο.

Η εξέταση πρέπει να γίνει σε 2 ώρες από την αιμοληψία.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Μητρικό διάλυμα ισοδύναμο προς διάλυμα 10% χλωριούχου νατρίου: Το διάλυμα παρασκευάζεται διαλύοντας 18g χλωριούχο νάτριο, 3.423g ένυδρο μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4 $2H_2O$) και 0.376g ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο (NaH_2PO_4 $2H_2O$) σε απιονισμένο νερό και αραιώνοντας μέχρι τελικό όγκο 200ml. Το διάλυμα συντηρείται στους ± 4 °C μέσα σε πωματισμένη ογκομετρική φιάλη.

2. Απιονισμένο νερό

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- ζυγός
- φυγόκεντρος
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- φωτόμετρο
- γάντια
- ποτήρι ζέσεως
- ογκομετιρκή φιάλη
- έδρανο στήριξης των σωληναρίων (στατώ)
- δοκιμαστικά σωληνάρια αιμολύσεως
- αυτόματες πιπέτες
- υαλογράφος
- χαρτί με υποδιαιρέσεις χιλιοστόμετρου
- ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10

Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης παθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα ρύγχοι 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. Αραιώνουμε μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml, 88 ml απιονισμένο νερό και 12 ml από το μητρικό διάλυμα. Συνεχίζουμε και τις υπόλοιπες αραιώσεις με αναλογίες όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Καλό είναι η παρασκευή να ξεκινάει από το διάλυμα με τη μικρότερο πυκνότητα σε χλωριούχο νάτριο και να προχωρεί προς το διάλυμα με τη μεγαλύτερη πυκνότητα σε χλω-

ριούχο νάτριο. Έτσι μπορούμε να χρησιμοποιούμε για την παρασκευή των αραιώσεων την ίδια ογκομετρική φιάλη. Οι διαδοχικές αραιώσεις του χλωριούχου νατρίου (NaCl) πρέπει να γίνονται με ακρίβεια για την επιτυχία της εξέτασης.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ	ΔΙΑΛΥΜΑ NaCl 10%	ΑΠΙΟΝΙΣΜΕΝΟ ΝΕΡΟ	ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ NaCl / 100 ml
1	12	88	1.2
2	10	90	1.0
3	9.0	91	0.9
...	...	...	...
11	6.0	94	0.6
12	5.75	94.25	0.575
13	5.5	94.5	0.55
14	5	95	0.5
15	4.75	95.25	0.475
16	4.5	95.5	0.45
17	4.25	95.75	0.425
18	4.0	96.0	0.4
...	...	...	...
22	1.0	99	0.10

Ο αριθμός των αραιώσεων είναι διαφορετικός σε κάθε διαγνωστικό εργαστήριο. Εξαρτάται από το είδος της πάθησης που κάθε φορά διερευνάται. Περισσότερο συνηθισμένος είναι ο αριθμός των 6, των 10 και των 12 αραιώσεων, μέσα όμως στο εύρος των τιμών που αναζητούνται οι περισσότερες παθολογικές καταστάσεις. Οι ενδιάμεσες αραιώσεις, όπως, π.χ, οι αραιώσεις 15, 16, 17, κ.λπ. χρησιμοποιούνται για τον ακριβή προσδιορισμό έναρξης της αιμόλυσης, στοιχείο απαραίτητο για τη διάγνωση.

Μπορούμε να αυξήσουμε την ευαισθησία της μεθόδου, επωάζοντας το δείγμα σε θερμοκρασία 37°C για 24 ώρες.

Χρήσιμο είναι να κρατάμε από κάθε αραίωση 50 ml σε θερμοκρασία 40°C, για τυχόν επανέλεγχο. Οι αραιώσεις διατηρούνται σταθερές για αρκετές εβδομάδες.

2. Αριθμούμε 6, 10, 12 ή 20 δοκιμαστικά σωληνάρια αιμολύσεως και σημειώνουμε κωδικοποιημένα τα στοιχεία του ασθενή.

Τα σωληνάρια των αραιώσεων ενός δείγματος (ασθενούς) να μην μπερδευτούν με τα σωληνάρια των αραιώσεων άλλου δείγματος (ασθενούς).

3. Βάζουμε 5 ml από κάθε αραίωση στο αντίστοιχο σωληνάριο.

4. Προσθέτουμε 0.5 ml ή 0,02 ml δείγματος και αναρροφούμε 3 φορές από το διάλυμα για να γίνει η ανάμειξη.

Πετάμε το ρύγχος στο διάλυμα χλωρίνης. Το υποχλωριώδες νάτριο που είναι το συστατικό της χλωρίνης αδρανοποιεί τα ενζυμικά συστήματα των ιών και των βακτηρίων. Στο τέλος της άσκησης τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο. Έτσι σταματάμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων.

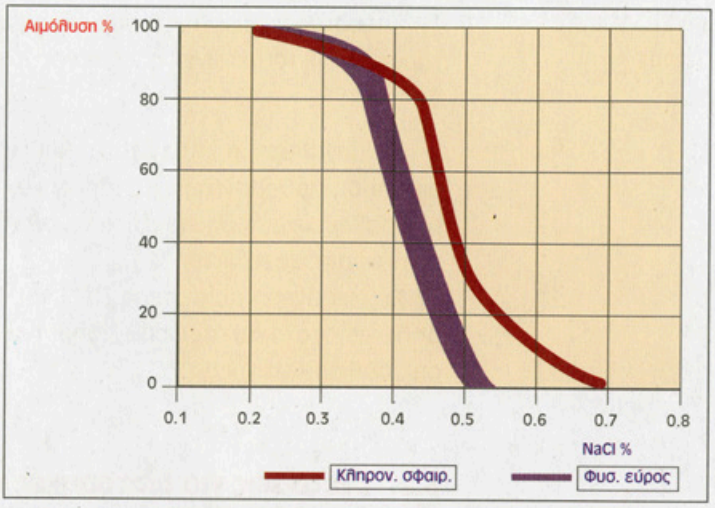
Τα σωληνάρια παραμένουν σε ηρεμία σε θερμοκρασία 20° C για 30 λεπτά της ώρας. Ύστερα:

5. Ανακινούμε ήπια.

6. Φυγοκεντρούμε στις 2000 στρ / λεπτό για 5 λεπτά της ώρας.

7. Εξετάζουμε την όψη του υπερκειμένου κάθε αραίωσης, και συγκρίνουμε την όψη της αιμόλυσής του σε σχέση με την όψη της πλήρους αιμόλυσης του υπερκειμένου (αραίωση 22).

8. Προσδιορίζουμε το βαθμό αιμόλυσης με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του υπερκείμενου υγρού σε μήκος κύματος 540nm. Για το μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιούμε το υπερκείμενο υγρό της αραίωσης 3.



***Εικόνα 8.1**: Καμπύλη γραφικής παράστασης ευθραυστότητας ερυθροκυττάρων*

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αιμόλυση

Η απάντηση δίνεται:

α. Με την καμπύλη γραφικής παράστασης. Στον κάθετο άξονα σημειώνουμε τις τιμές αιμόλυσης % και στον οριζόντιο τις αραιώσεις του χλωριούχου νατρίου σε g/l.

Το επί τοις % της αιμόλυσης κάθε δοκιμαστικού σωληναρίου υπολογίζεται με τον παρακάτω τύπο:

$$\%\ \text{αιμόλυση} = \frac{\text{οπτική πυκνότητα υπερκειμένου}}{\text{οπτική πυκνότητα με 100\% αιμόλυση}} \times 100$$

β. Ορίζεται η πυκνότητα NaCl που δίνει την αρχή της αιμόλυσης και η πυκνότητα NaCl που δίνει ολική αιμόλυση (δεν υπάρχουν ερυθρά αιμοσφαίρια στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωληναρίου.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ

- **Τι σημαίνει ότι το ερυθροκύτταρο αιμολύθηκε;**

Το ερυθρό αιμοσφαίριο βρέθηκε σε διάλυμα που έχει μικρότερη ωσμωτική πίεση από αυτό. Από την κυτταρική του μεμβράνη πέρασε μέσα στο κύτταρο νερό του διαλύματος με αποτέλεσμα το κύτταρο να διογκωθεί. Η διόγκωση αυτή υπερβαίνει το όριο αντοχής της κυτταρικής του μεμβράνης με αποτέλεσμα η μεμβράνη να καταστραφεί (αιμόλυση).

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

Καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων 50 % συμβαίνει σε πυκνότητα χλωριούχου νατρίου από 0,40 % - 0,45 %.

Σε μεγαλύτερη πυκνότητα NaCl >5,8 % -6,4 % γίνεται αιμόλυση παθολογικών κυττάρων και υποδηλώνονται σοβαρές ασθένειες, όπως επίκτητη αιμολυτική αναιμία , κληρονομική σφαιροκυττάρωση κ.ά.

Σε μικρότερη πυκνότητα NaCl < 0,30 % η αιμόλυση υποδηλώνει στοχοκυττάρωση σιδηροπενική αναιμία, αιμοσφαιρινοπάθεια Cuais κ.λπ.

8.2. Εξετάσεις για διαταραχές της αιμοσφαιρίνης

Για να γίνει η ανίχνευση των αιμοσφαιρινικών διαταραχών, το δείγμα πρέπει πρώτα να το επεξεργαστούμε ακολουθώντας τις παρακάτω βοηθητικές τεχνικές και στη συνέχεια να το ηλεκτροφορίσουμε.

8.2.1 Βοηθητική τεχνική για το πλύσιμο των ερυθροκυττάρων

Το πλύσιμο των ερυθροκυττάρων χρειάζεται να γίνει για πολλές διαγνωστικές εξετάσεις, όπως ***παρασκευή αιμολύματος, δοκιμασία διασταύρωσης,*** κ.λπ.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν καταστρέφονται όταν βρεθούν σε ισότονο διάλυμα 0.9 % χλωριούχου νατρίου (NaCl). Μπορούν όμως να διαχωριστούν από το πλάσμα και τα άλλα έμμορφα στοιχεία του αίματος με φυγοκέντρηση.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε 5 ml φλεβικό αίμα σε EDTA.

Η ανάμειξη του αίματος με το αντιπηκτικό και η ανακίνηση του σωληναρίου κατά τη διαδικασία πρέπει να γίνονται με ήπιες κινήσεις.

Η μεταφορά του αίματος από τη σύριγγα στο φιαλίδιο συλλογής του δείγματος γίνεται με αργή ροή, κατά μήκος του τοιχώματος του φιαλιδίου, αφού αφαιρεθεί η βελόνα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Διάλυμα 0.9 % χλωριούχου νατρίου (φυσιολογικός ορός).

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- φυγόκεντρος
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- γάντια
- υαλογράφος
- έδρανο στήριξης των σωληναρίων
- δοκιμαστικό σωληνάριο αιμολύσεως
- 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 τα στοιχεία του ασθενή επάνω σε ένα δοκιμαστικό σωληνάριο αιμολύσεως και μεταφέρουμε το δείγμα.

2. Φυγοκεντρούμε το σωληνάριο στις 2000 στροφές / λεπτό για 20 λεπτά της ώρας.

Τα συστατικά του αίματος θα διαχωριστούν με ευκρίνεια ακολουθώντας πιστά τους κανόνες της φυγοκέντρησης.

3. Αφαιρούμε το πλάσμα με σιφώνιο Pasteur.

Πετάμε το σιφώνιο μέσα στο διάλυμα της χλωρίνης. Το πλάσμα είναι βιολογικό υγρό και γι'αυτό ο κίνδυνος για τη μετάδοση λοιμώξεων είναι μεγάλος.

4. Προσθέτουμε άφθονη ποσότητα ισότονου διαλύματος 0.9 % χλωριούχου νατρίου, με σιφώνιο Pasteur.

5. Ανακινούμε με απαλές κινήσεις για να μη σπάσουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια (αιμόλυση).

6. Φυγοκεντρούμε στις 2000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά της ώρας.

7. Αφαιρούμε το υπερκείμενο με άλλο σιφώνιο Pasteur.

Οι αναρροφήσεις κατά την επανάληψη γίνονται με καθαρό σιφώνιο Pasteur. Όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια αφού παραμείνουν 30 λεπτά της ώρας στο διάλυμα της χλωρίνης, τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

Επαναλαμβάνουμε τα στάδια Νο 4, 5, 6 και 7 μέχρι το υπερκείμενο να είναι διαυγές.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που μένουν στο κάτω μέρος του σωληναρίου μετά την τελευταία φυγοκέντρηση είναι απομονωμένα από τα άλλα στοιχεία του αίματος και συμπυκνωμένα.

8.2.2 Βοηθητική τεχνική παρασκευής αιμολύματος ερυθρών αιμοσφαιρίων με τολουόλη

Η βοηθητική αυτή τεχνική είναι χρήσιμη όταν:

- δεν πραγματοποιείται άμεσα η ηλεκτροφόρηση
- απαιτείται επανέλεγχος ή περαιτέρω έλεγχος.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε πλυμένα ερυθρά αιμοσφαίρια.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. **Απιονισμένο νερό:** Έχει αιμολυτική δράση.
2. **Τολουόλη:** Έχει αιμολυτική δράση.

ΠΡΟΣΟΧΗ !
Η τολουόλη είναι εύφλεκτη, καυστική και τοξική ουσία.

3. **Κυανιούχο διάλυμα:** Το διάλυμα παρασκευάζεται με τη διάλυση 0.2 g KCN μέσα σε 1000 ml απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αυτό χρησιμεύει για τη συντήρηση του αιμολύματος στην κατάψυξη για 30 ημέρες.

ΠΡΟΣΟΧΗ !
Το κυανιούχο κάλιο όταν έρθει σε όξινο περιβάλλον εκλύει δηλητηριώδες αέριο. Αποφεύγουμε την επαφή του αντιδραστηρίου με το δέρμα και την εισπνοή των ατμών του.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- αναδευτήρας (Vortex)
- φυγόκεντρος
- ζυγός
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- γάντια
- υαλογράφος
- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- δοκιμαστικά σωληνάρια αιμολύσεως
- σιφώνια Pasteur
- χωνί
- διηθητικό χαρτί (Whatman No 1)
- ογκομετρικός κύλινδρος
- ογκομετρική φιάλη
- 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.

1. Σημειώνουμε με υαλογράφο τα στοιχεία του ασθενή και την ένδειξη I, II σε δύο σωληνάρια αιμολύσεως και βάζουμε στο "I" μια ποσότητα πλυμένων αιμοσφαιρίων.

Υπενθύμιση:
Πετάμε το σιφώνιο στο διάλυμα χλωρίνης.

2. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό σε όγκο διπλάσιο του όγκου των ερυθροκυττάρων.

3. Ανακινούμε ισχυρά στον αναδευτήρα (Vortex).

4. Τοποθετούμε το σωληνάριο στο έδρανο, όπου παραμένει 30 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου.

5. Προσθέτουμε 1 όγκο τολουόλης.

ΠΡΟΣΟΧΗ !
Η τολουόλη είναι εύφλεκτη, καυστική και τοξική ουσία.

6. Ανακινούμε το σωληνάριο στον αναδευτήρα (Vortex) για 2-3 λεπτά της ώρας. Τα ερυθροκύτταρα αιμολύονται και ελευθερώνεται η αιμοσφαιρίνη τους.

7. Φυγοκεντρούμε στις 1200 στροφές / λεπτό για 30 λεπτά της ώρας. Τα συστατικά διαχωρίζονται σε τρεις στοιβάδες. Οι στοιβάδες από κάτω προς τα πάνω είναι:

1η στοιβάδα: Διάλυμα αιμοσφαιρίνης (αιμόλυμα).

2η στιβάδα: Κυτταρικές μεμβράνες κατεστραμμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων και

3η στοιβάδα: Τολουόλη

8. Τοποθετούμε το σωληνάριο στο έδρανο.

ΠΡΟΣΟΧΗ !
Να μην ανακατευτούν οι στοιβάδες μεταξύ τους.

9. Εφαρμόζουμε διηθητικό χαρτί – φίλτρο σε ένα χωνί και το τοποθετούμε επάνω στο σωληνάριο.

Το χωνί πρέπει να είναι όσο γίνεται μικρότερο για να μη συγκρατήσει το διηθητικό χαρτί την παραμικρή ποσότητα αιμολύματος.

10. Διαβρέχουμε με ελάχιστο απιονισμένο νερό το φίλτρο αμέσως πριν από τη διήθηση.

11. Παίρνουμε ένα σιφώνιο Pasteur. Πιέζουμε το πουάρ για να φύγει όλος ο αέρας.

α. Βυθίζουμε το ρύγχος του μέχρι τον πυθμένα, διαπερνώντας διαδοχικά τη στοιβάδα της τολουόλης και τη στοιβάδα των μεμβρανών.

ΠΡΟΣΟΧΗ !
Κρατάμε σταθερή την πίεση στο πουάρ.

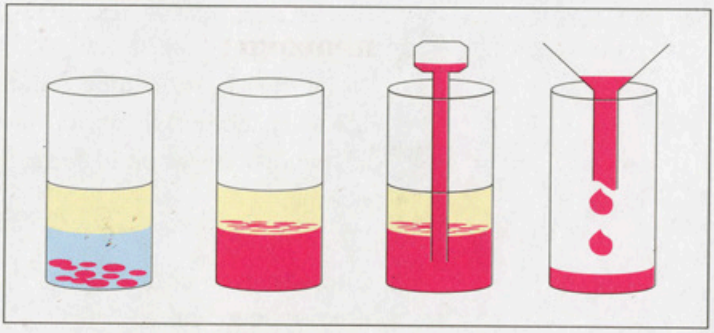
β. Αναρροφούμε το αιμόλυμα, ελαττώνοντας σιγά – σιγά την πίεση στο πουάρ.

ΠΡΟΣΟΧΗ !
Κατά την έξοδο προσέχουμε να μην αναρροφήσουμε υλικό από τις άλλες δύο στοιβάδες.

Πετάμε το σιφώνιο στο διάλυμα χλωρίνης. Μετά το τέλος της άσκησης πετάμε τα σιφώνια στο απορριμματοδοχείο.

12. Ρίχνουμε το αιμόλυμα στο φίλτρο. Το αιμόλυμα διηθείται. Μετά τη διήθηση, καθαρό πλέον, είναι έτοιμο για οποιαδήποτε διαγνωστική εξέταση ακολουθήσει.

Εάν πρόκειται να κρατηθεί το δείγμα του αιμολύματος στην κατάψυξη, τότε θα πρέπει η αιμοσφαιρίνη να μετατραπεί σε κυανομεθαιμοσφαιρίνη, με την προσθήκη δύο σταγόνων κυανιούχου διαλύματος ανά 3 ml αιμολύματος. Διατηρείται στους ± 4°C για μερικές ημέρες και στους –20°C για αρκετές εβδομάδες.



***Εικόνα 8.2**: Παρασκευή αιμολύματος με τολουόλη*

8.2.3 Βοηθητική τεχνική παρασκευής αιμολύματος για την ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης σε cellogel

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Στην απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης, που περιέχεται σε κάθε ερυθροκύτταρο μετά την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης του. Η πυκνότητα της αιμοσφαιρίνης στο διάλυμα, το οποίο λέγεται αιμόλυμα, μπορεί να μετρηθεί.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε 2.5 ml φλεβικό αίμα σε EDTA.

Είναι αναγκαίο να γνωρίζουμε το ποσό της αιμοσφαιρίνης στο δείγμα, πριν γίνει η επεξεργασία του αιμολύματος.

Η ανάμειξη του αίματος με το αντιπηκτικό και η ανακίνηση του σωληναρίου κατά τη διαδικασία πρέπει να γίνουν με ήπιες κινήσεις.

Η μεταφορά του αίματος από τη σύριγγα στο φιαλίδιο συλλογής του δείγματος γίνεται με αργή ροή του, κατά μήκος του τοιχώματος του φιαλιδίου, αφού αφαιρεθεί η βελόνα.

Οι αναλογίες μεταξύ αίματος και αντιπηκτικού τηρούνται αυστηρά, όπως αυτές αναγράφονται στα φιαλίδια της συλλογής του αίματος.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. **Νιτρικό νάτριο ($NaNO_3$)** 2 g σε 1 lt φυσιολογικό ορό.
2. **Κυανιούχο κάλιο (KCN)** 1 g σε lt φυσιολογικό ορό.

ΠΡΟΣΟΧΗ !

Το κυανιούχο κάλιο όταν έρθει σε όξινο περιβάλλον εκλύει δηλητηριώδες αέριο. Αποφεύγουμε την επαφή του αντιδραστηρίου με το δέρμα και την εισπνοή των ατμών του.

3. **Φυσιολογικός ορός** 0.9 % (Sodium Chloride, NaCl).
4. **Απιονισμένο νερό.**

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- φυγόκεντρος
- αναδευτήρας (Vortex)
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- ζυγός
- γάντια
- υαλογράφος
- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- ογκομετρικό κωνικό σωληνάριο
- αυτόματες πιπέτες
- ογκομετρικός κύλινδρος
- σιφώνια Pasteur
- ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10

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

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε τα στοιχεία του ασθενή επάνω σε ένα ογκομετρικό κωνικό σωληνάριο και βάζουμε μέσα 15 ml διάλυμα $NaNO_3$.

2. Προσθέτουμε 0.2 ml από το δείγμα.

Τηρούμε τις αναλογίες με ακρίβεια για τη βιοχημική μετατροπή της αιμοσφαιρίνης σε μεθαιμοσφαιρίνη.
Πετάμε το ρύγχος στο διάλυμα της χλωρίνης για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης παθανών λοιμώξεων.

3. Φυγοκεντρούμε στις 2000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά.

4. Πετάμε το υπερκείμενο με μια απότομη ανάστροφη κίνηση του σωληναρίου στο νιπτήρα.

5. Προσθέτουμε κυανιούχο κάλιο σε ποσότητα ίση με τον όγκο των ερυθροκυττάρων.

Εάν δεν τηρηθούν οι αναλογίες μεταξύ δείγματος και αντιδραστηρίου δεν θα γίνει ολοκληρωμένη μετατροπή της μεθαιμοσφαιρίνης σε κυανομεθαιμοσφαιρίνη.

6. Φυγοκεντρούμε στις 2000 στροφές / λεπτό για 5 λεπτά της ώρας.

7. Πετάμε το υπερκείμενο με μια απότομη ανάστροφη κίνηση του σωληναρίου στο νιπτήρα.

8. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό σε ποσότητα (V) ίση με το 1/10 της αιμοσφαιρίνης του αρχικού δείγματος. Δηλαδή, εάν η Hb είναι 12 g/dl ο όγκος του απιονισμένου νερού θα είναι 1.2 ml.

9. Πωματίζουμε και ανακινούμε το σωληνάριο στον αναδευτήρα (Vortex) για 20 λεπτά της ώρας.

Το αιμόλυμα είναι έτοιμο για την τεχνική της ηλεκτροφόρησης.

Διατηρείται στους $\pm 4^{\circ}C$ για 7 ημέρες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έντονο κόκκινο χρώμα.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων σπάζει και ελευθερώνεται η περιεχόμενη αιμοσφαιρίνη. Μόλις έρθει σε επαφή με το $NaNO_3$, μετατρέπεται σε μεθαιμοσφαιρίνη και μετά σε κυανομεθαιμοσφαιρίνη με την επίδραση του KCN. Η κυανομεθαιμοσφαιρίνη είναι ουσία βιοχημικά σταθερή, γι' αυτό χρησιμοποιείται περισσότερο στην αιμοσφαιρινομετρία.

8.2.4 Ηλεκτροφόρηση

Ας ανακαλέσουμε προηγούμενες γνώσεις:

ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Η ηλεκτροφόρηση αναφέρεται στη μετακίνηση κάθε υλικού στοιχείου που φέρει ηλεκτρικό φορτίο, όταν βρίσκεται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Μόρια που φέρουν ηλεκτρικό φορτίο θα μετακινηθούν ανάλογα με αυτό, είτε προς την **κάθοδο (-)** είτε προς την **άνοδο (+)** του ηλεκτροφοριτικού συστήματος. Μέσα σε διάλυμα πιο όξινο από το ισοηλεκτρικό σημείο της ουσίας, η ουσία αποκτά θετικό φορτίο και μετακινείται προς την κάθοδο (-). Αντίθετα σε διάλυμα πιο βασικό από το ισοηλεκτρικό σημείο της ουσίας, η ουσία θα αποκτήσει αρνητικό φορτίο και θα μετακινηθεί προς την άνοδο (+).

Η ταχύτητα αυτής της μετακίνησης εξαρτάται από:

1. Την ισχύ του ηλεκτρικού ρεύματος
2. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος
3. Τη θερμοκρασία του συστήματος
4. Το υλικό της ταινίας
5. Το ηλεκτρικό φορτίο του μορίου

- **Πώς αξιοποιείται η αρχή της ηλεκτροφόρησης στην εργαστηριακή ανάλυση;**

Ας συνδεθούμε με τη Βιοχημεία:

α. Οι πρωτεΐνες έχουν **αμφολυτική ιδιότητα**, δηλαδή παρουσιάζουν θετικό ή αρνητικό φορτίο ανάλογα με το pH του διαλύματος μέσα στο οποίο θα βρεθούν και

β. Η αιμοσφαιρίνη είναι μία **πρωτεΐνη του αίματος(αιμο-**

πρωτεΐνη). Το μόριο της αποτελείται από τη σφαιρίνη, με τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες σε δύο ζεύγη και την αίμη με τέσσερα μόρια σιδηροπορφυρίνης. Η μετακίνηση , λοιπόν, των πρωτεϊνικών μορίων της κατά την ηλεκτροφόρηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και ανίχνευση φυσιολογικών και παθολογικών αιμοσφαιρινών.

Η αιμοσφαιρίνη **A**, **A_2** (τύποι ενήλικα) και η αιμοσφαιρίνη **F** (εμβρυϊκή) είναι οι συνηθισμένες φυσιολογικές αιμοσφαιρίνες.

Από τους διαφόρους τύπους παθολογικής αιμοσφαιρίνης, οι πιο γνωστοί είναι η αιμοσφαιρίνη **S** (υπεύθυνη για την δρεπανοκυτταρική αναιμία) και η αιμοσφαιρίνη **H** (α-Μεσογειακή αναιμία). Πάνω από 350 ποικιλίες αιμοσφαιρίνης έχουν ταυτοποιηθεί.

- **Τι χρειαζόμαστε για να γίνει η ηλεκτροφόρηση;**

Οι συσκευές της ηλεκτροφόρησης είναι πολλές. Βασικά όμως αποτελούνται από

- το ηλεκτροφορητικό λεκανίδιο – λουτρό
- τη συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος
- το διανομέα του δείγματος

Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι ηλεκτροφόρησης, ανάλογα με το pH του ρυθμιστικού διαλύματος και το υλικό υποστήριξης (υπόστρωμα) που χρησιμοποιείται.

Τα διάφορα υποστρώματα έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

ΕΙΔΟΣ ΥΠ/ΤΟΣ	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
Χαρτί	– Εύχρηστο – Φθηνό	– Μετουσιώνεται η αιμοσφαιρίνη – Ελλιπής διαχωρισμός των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων – Μεγάλη διάρκεια (14 –16 ώρες) – Απορροφά το δείγμα – Μεγάλη ποσότητα δείγματος

Αγαρ – ζελατίνη	– Διαθέσιμο σε πρώτη ζήτηση	– Μικρή απορρόφηση του δείγματος – Μεγάλη ποσότητα δείγματος – Μεγάλη διάρκεια
Οξική κυτταρίνη	– Μικρή ποσότητα δείγματος – Μικρή διάρκεια (≈1 ώρα)	– Ακριβή – Δε διαχωρίζει με ευκρίνεια την αιμοσφαιρίνη Α από την αιμοσφαιρίνη F

***Πίνακας 8.1**: Είδη υποστρωμάτων ηλεκτροφόρησης*

Εάν κατά την ηλεκτροφόρηση η ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός κλάσματος συμπίπτει με τη θέση άλλου κλάσματος, τότε γίνεται διερεύνηση σε όξινο pH.

Οι αιμοσφαιρίνες έχουν άλλη ηλεκτροφορητική συμπεριφορά σε όξινο και άλλη σε αλκαλικό pH του ρυθμιστικού διαλύματος, όπως φαίνεται στον πίνακα:

ΟΞΙΝΟ pH						**ΒΑΣΙΚΟ pH**				
κάθοδος (-)			άνοδος (+)		**σταγόνα αίματος**	άνοδος (+)			κάθοδος (-)	
F	**A**, A_2, D, E, G, H	O	**S**	C		H	**A**	**F**	**S**, G, D	A_2, C, E, O

***Πίνακας 8.2:** Ηλεκτροφορητική συμπεριφορά αιμοσφαιρινών σε διαφορετικό pH*

8.2.5 Ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε ταινία οξικής κυτταρίνης

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μικρή ποσότητα αιμοσφαιρίνης η οποία είναι μείγμα πρωτεϊνών, όταν βρεθεί σε ηλεκτρικό πεδίο και **αλκαλικό περι-**

βάλλον ιονίζεται και διαχωρίζεται στα κλάσματα από τα οποία αποτελείται. Ο διαχωρισμός φαίνεται με τη μετακίνηση των μορίων προς τα ηλεκτρόδια.

Η κατεύθυνση και η ταχύτητά της μετακίνησης εξαρτάται από το **φορτίο** των μορίων και το **μοριακό τους βάρος**.

Αν διακόψουμε την παροχή του ηλεκτρικού ρεύματος και χρωματίσουμε τα κλάσματα επάνω σε υπόστρωμα οξικής κυτταρίνης, θα παρατηρήσουμε **κάθετες γραμμώσεις**. Το πάχος, η ένταση του χρώματος και η θέση των γραμμώσεων εξαρτάται από τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης.

ΔΕΙΓΜΑ

Αιμόλυμα φλεβικού αίματος σε EDTA.

Το αιμόλυμα μπορεί να είναι πρόσφατο ή συντηρημένο στους ±4 °C ή στους −10 °C.

Για να ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση μέσα στο εργαστηριακό τρίωρο είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί συντηρημένο δείγμα το οποίο θα έχουμε ετοιμάσει μαζί με τα αντιδραστήρια σε ένα εργαστηριακό μάθημα, πριν από την εκτέλεση της ηλεκτροφόρησης.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Ρυθμιστικό διάλυμα – (buffer) με pH 8.9 (TRIS-EDTA-ΒΟΡΙΚΟ): Κάνουμε ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος με απιονισμένο νερό. Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο, μέσα σε πωματισμένη ογκομετρική φιάλη πάνω στην οποία αναγράφεται η ημερομηνία παρασκευής του, για 10 περίπου ημέρες.

2. Χρωστικό διάλυμα: Διάλυμα Χρωστικής Ponceans που παρασκευάζεται διαλύοντας 0.5 g χρωστικής ουσίας σε 100 ml διαλύματος 7.5% τριχλωροξικού οξέος (CCl_3COOH) ή διάλυμα χρωστικής Light Green που παρασκευάζεται βάζοντας σε ογκομετρικό κύλινδρο 50ml μεθανόλης (CH_3OH), 10ml οξικό οξύ (CH_3COOH) και 40 ml νερό (H_2O). Μέσα σε αυτό διαλύουμε 500mg Light Green.

3. Διάλυμα αποχρωματισμού: Υδατικό διάλυμα 5% οξικού οξέος (CH_3COOH).

4. Διάλυμα έκλουσης: Ίσα μέρη ακετόνης (CH_3COCH_3) και παγόμορφου οξικού οξέος (CH_3COOH) 1:1. Με τα συστατικά αυτά θα γίνει διάλυση της οξικής κυτταρίνης.

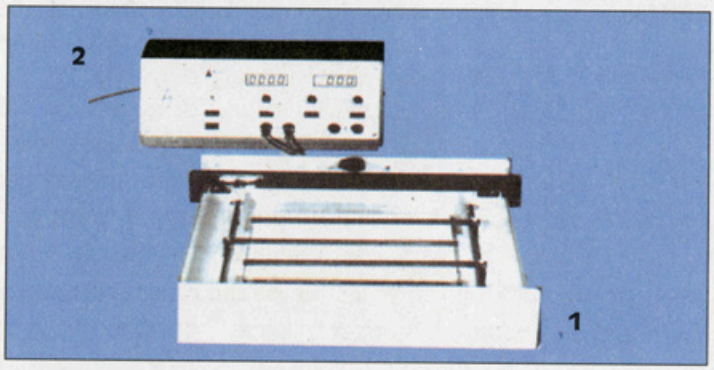
5. Διάλυμα διαφανοποίησης: Περιέχει 87ml μεθανόλη (CH_3OH) και 12ml παγόμορφο οξικό οξύ και 1ml γλυκερόλης.

6. Απόλυτη μεθανόλη.

> Επειδή η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης έχει μεγάλη διάρκεια μπορούμε να έχουμε παρασκευάσει τα αντιδραστήρια στο προηγούμενο εργαστηριακό μάθημα μαζί με το αιμόλυμα.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- συσκευή ηλεκτροφόρησης: Λουτρό ηλεκτροφόρησης, Τροφοδοτικό ρεύματος, Μεταφορέας δειγμάτων (Applicator)



Εικόνα 8.3: Λουτρό (1) και τροφοδοτικό ρεύματος (2) ηλεκτροφόρησης

- ζυγός
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- κλίβανος
- φωτόμετρο
- γάντια
- ογκομετρικός κύλινδρος
- ογκομετρική φιάλη
- αυτόματες πιπέτες
- ταινίες οξικής κυτταρίνης: Είναι πορώδεις, ξηρές, αδιαφανείς και σπάζουν εύκολα. Υπάρχουν σε πολλές διαστάσεις. Χρήσιμο είναι να γνωρίζουμε πόσα cm πλάτος έχουν. Χρησιμοποιούνται σαν "υποστρώματα" επάνω στις οποίες θα "τρέξουν" τα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης και ως αγωγοί του ηλεκτρικού ρεύματος.
- σιφώνια Pasteur
- υαλογράφος

- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- 5 ή 7 λεκανίδια με καπάκι σε σχήμα παραλληλογράμμου
- διηθητικό χαρτί
- δοκιμαστικά σωληνάρια
- ψαλίδι, μεταλλική λαβίδα
- κυβέτες
- αντικειμενοφόρος πλάκα
- ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10

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

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Βάζουμε λίγη ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα σε ένα λεκανίδιο.

2. Τοποθετούμε προσεκτικά την ταινία οξικής κυτταρίνης με την απορροφητική (γυαλιστερή) πλευρά προς τα κάτω, ώστε να επιπλεύσει για 1 λεπτό. Όταν διαβραχεί καλά τη βυθίζουμε και την αφήνουμε να παραμείνει για 10 λεπτά. Με αυτούς τους χειρισμούς γεμίζουν οι πόροι της, γίνεται ευλύγιστη, αλλά παραμένει αδιαφανής.

Οι προτεινόμενοι χρόνοι κάθε σταδίου στην πορεία της τεχνικής δεν τροποποιούνται αυθαίρετα και περιστασιακά.

3. Στεγνώνουμε την ταινία ανάμεσα σε δύο φύλλα διηθητικό χαρτί λίγο πριν από τη χρήση τους.

4. Γεμίζουμε με ίση ποσότητα ρυθμιστικό διάλυμα και τα δύο διαμερίσματα του λουτρού της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

5. Ανασηκώνουμε τη "γέφυρα" από το λουτρό της συσκευής.

6. Σταθεροποιούμε την ταινία επάνω στη γέφυρα προσέχοντας να μην τσαλακωθεί.

Η καλή κατάσταση της ταινίας (να μην σπάσει ούτε να τσαλακωθεί) εξασφαλίζεται με λεπτούς χειρισμούς και δίνει αξιοπιστία στην κινητικότητα των κλασμάτων.
Οι φυσαλλίδες κάτω από τη "γέφυρα" δυσκολεύουν την ομαλή δίοδο του ηλεκτρικού ρεύματος.

7. Επανατοποθετούμε τη γέφυρα στο λουτρό. Προσέχουμε το (+) της γέφυρας να συμπίπτει με το (+) του λουτρού της συσκευής, χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλλίδες.

Η ταύτιση των ομοίων πόλων, δηλαδή το (+) με το (+) και το (–) με το (–), εξασφαλίζει την επιτυχία της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης.

8. Τοποθετούμε ≃10μl αιμολύματος σε μία υποδοχή – πηγαδάκι της πλάκας του διανομέα με αυτόματη πιπέτα. Σε κάθε υποδοχή μπορούμε να τοποθετήσουμε διαφορετικό αιμόλυμα.

Εάν το δείγμα έχει συντηρηθεί πρέπει να γίνει επαναφορά της θερμοκρασίας του αφήνοντάς το για λίγο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
Η ποσότητα του δείγματος δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερη γιατί θα υπερχειλίσει η υποδοχή και θα αναμειχθούν τα δείγματα.

9. Τοποθετούμε το διανομέα επάνω στις υποδοχές με το αιμόλυμα. Το δείγμα διαβρέχει (διαποτίζει) τα "δοντάκια" - "clips".

10. Ακουμπάμε απαλά το διανομέα επάνω στην άκρη της ταινίας που βρίσκεται στην κάθοδο (-). Το δείγμα μεταφέρεται στην ταινία. Απομακρύνουμε το διανομέα.

Τα στάδια Νο 9 & 10 πρέπει να εκτελεστούν μέσα σε 15 δευτερόλεπτα όταν υπάρχει ο μεταφορέας δειγμάτων, για να μην ξεραθεί το αιμόλυμα. Εάν δεν υπάρχει διανομέας, η μεταφορά του δείγματος γίνεται με σιφώνιο Pasteur. Στην περίπτωση αυτή τα στάδια Νο 8, 9 και 10 δεν πραγματοποιούνται.

11. Καλύπτουμε με το κάλυμμά της τη συσκευή και περιμένουμε 5 λεπτά.

12. Συνδέουμε τη συσκευή με το τροφοδοτικό. Προσέχουμε το (+) της συσκευής να συνδεθεί με το (+) του τροφοδοτικού.

13. Ρυθμίζουμε την τάση του ρεύματος (Volts). Η τάση αντιστοιχεί σε 1 mA/cm πλάτους της ταινίας. Συνήθως 210 - 250 Volts.

14. Ρευματοδοτούμε για 30 – 60 λεπτά περίπου. Στο στάδιο αυτό γίνεται ο διαχωρισμός των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων.

> Η παρακολούθηση κατά διαστήματα της ηλεκτροφόρησης επιβάλλεται, μην τυχόν και χαθούν προς την άνοδο (+) αιμοσφαιρινικά κλάσματα που κινούνται ταχύτερα.

15. Διακόπτουμε τη ρευματοδότηση και απομακρύνουμε την ταινία από τη γέφυρα της συσκευής συγκρατώντας την από τα δύο άκρα με μεταλλική λαβίδα.

Συνεχίζουμε με το χρωματισμό των κλασμάτων

16. Εμβαπτίζουμε την ταινία μέσα στο χρωστικό διάλυμα, σκεπάζουμε το λεκανίδιο για να μην εξατμίζεται το διάλυμα και την αφήνουμε 10 λεπτά της ώρας.

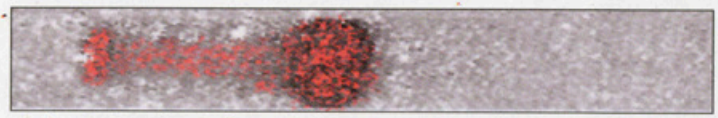
17. Γεμίζουμε τρία λεκανίδια με διάλυμα αποχρωματισμού.

18. Εμβαπτίζουμε διαδοχικά την ταινία αφήνοντάς την 3 λεπτά στο κάθε ένα. Με τις εκπλύσεις αυτές τα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης γίνονται εμφανή και η ταινία αποχρωματίζεται.

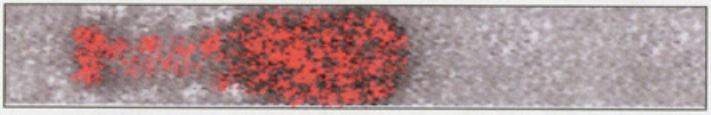
> Τα διαλύματα αποχρωματισμού δεν επαναχρησιμοποιούνται μετά τη χρήση τους.

19. Στεγνώνουμε την ταινία ανάμεσα σε δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού.

20. Μελετάμε και καταγράφουμε τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης. Πάντα συγκρίνουμε τα αποτελέσματα με το ηλεκτροφορητικό αποτέλεσμα φυσιολογικού αιμολύματος (μάρτυρας). Η ταινία μπορεί να παραμείνει στο μόνιμο αρχείο.

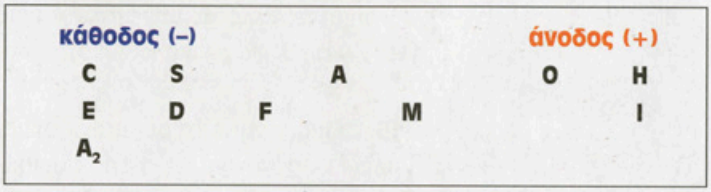


Εικόνα 8.4: *Ταινία οξικής κυτταρίνης με φυσιολογικό αιμόλυμα (μάρτυρας)*

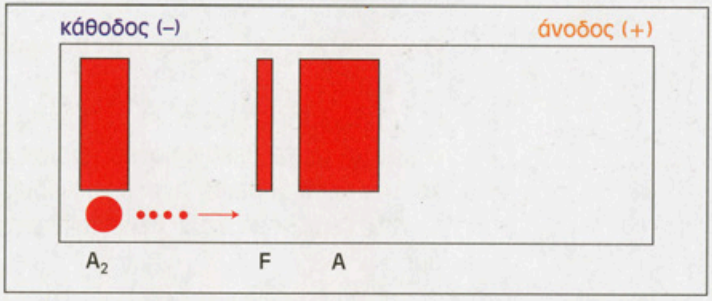


Εικόνα 8.5: *Ταινία οξικής κυτταρίνης με φυσιολογικό αιμόλυμα νεογεννήτου*

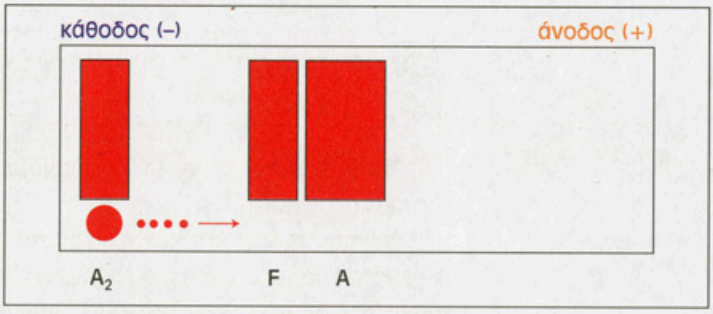
Ακολουθούν σχηματοποιημένες οι περιοχές στις οποίες τρέχουν τα αιμοσφαιρινικά κλάσματα τόσο φυσιολογικού αιμολύματος όσο και παθολογικών αιμολυμάτων.



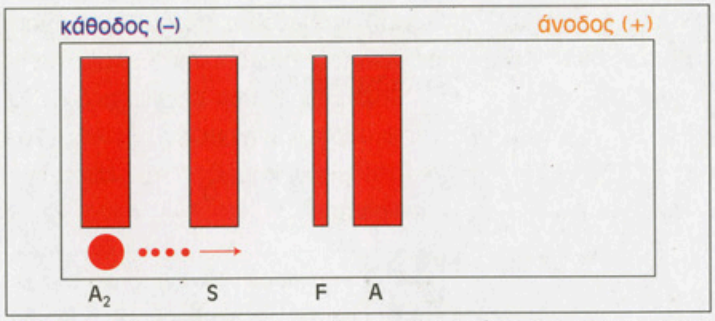
Εικόνα 8.6: *Ηλεκτροφορητική περιοχή αιμοσφαιρινικών κλασμάτων*



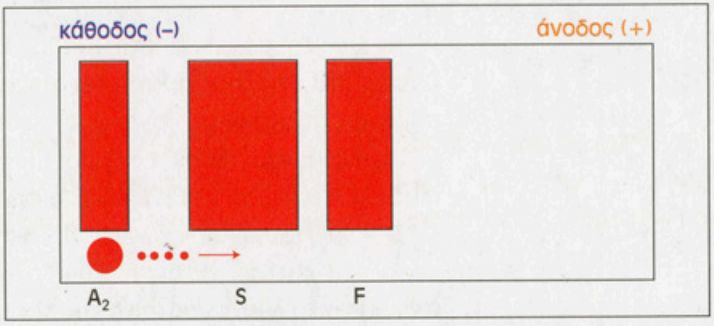
Εικόνα 8.7: *Ηλεκτροφορητική κίνηση φυσιολογικών αιμοσφαιρινικών κλασμάτων (μάρτυρας)*



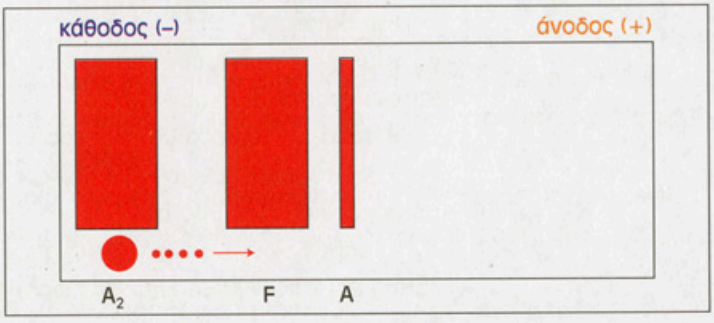
Εικόνα 8.8: *Ηλεκτροφορητική κίνηση αιμοσφαιρινικών κλασμάτων αιμολύματος με στίγμα μεσογειακής αναιμίας*



Εικόνα 8.9: *Ηλεκτροφορητική κίνηση αιμοσφαιρινικών κλασμάτων αιμολύματος με στίγμα δρεπανοκυτταρικής αναιμίας*



Εικόνα 8.10: *Ηλεκτροφορητική κίνηση αιμοσφαιρινικών κλασμάτων αιμολύματος με ομόζυγη δρεπανοκυτταρική αναιμία*



Εικόνα 8.11: *Ηλεκτροφορητική κίνηση αιμοσφαιρινικών κλασμάτων αιμολύματος με ομόζυγη β – θαλασσαιμία*

Ακολουθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός:

1. Σημειώνουμε με υαλογράφο τόσα δοκιμαστικά σωληνάρια όσα είναι τα κλάσματα που διαχωρίστηκαν. Σ' ένα δοκιμαστικό σωληνάριο γράφουμε την ένδειξη ''Τ'' (τυφλό). Θα το χρησιμοποιήσουμε για να μηδενίσουμε το φωτόμετρο.

2. Τοποθετούμε στο κάθε δοκιμαστικό σωληνάριο ίση ποσότητα (συνήθως 1 ml) διαλύματος έκλουσης.

3. Διαχωρίζουμε προσεχτικά σε ίσα μεγέθη τα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης με ένα ψαλίδι. Ύστερα κόβουμε ένα, ίσων διαστάσεων, κομμάτι διαυγούς ταινίας (χωρίς κλάσμα αιμοσφαιρίνης).

Το κόψιμο της ταινίας σε κομμάτια ίσου μεγέθους (διαχωρισμός των κλασμάτων) βοηθά στην ακρίβεια του ποσοτικού διαχωρισμού.

4. Βυθίζουμε μέσα στο διάλυμα των σωληναρίων με λαβίδα ένα ένα τα κομμάτια της ταινίας σε αντιστοιχία με τη σήμανση που έχουμε κάνει. Στο σωληνάριο με την ένδειξη "Τ" βυθίζουμε το διαυγές κομμάτι της ταινίας. Αυτό θα χρησιμοποιηθεί για το μηδενισμό του φωτομέτρου.

5. Ανακινούμε συνεχώς για 15 λεπτά της ώρας. Η ταινία της οξικής κυτταρίνης διαλύεται. Το διάλυμα παίρνει κόκκινο ή πράσινο χρώμα, αντίστοιχα της χρωστικής ουσίας που χρησιμοποιήθηκε. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του ποσού της αιμοσφαιρίνης.

Στη συνέχεια θα γίνει η πυκνομέτρηση. Για τη χρήση του φωτομέτρου ακολουθούμε πιστά τις οδηγίες χρήσης της κατασκευάστριας εταιρείας.

6. Μηδενίζουμε το φωτόμετρο με το τυφλό "Τ".

7. Φωτομετρούμε το περιεχόμενο όλων των σωληναρίων σε μήκος κύματος 540 nm.

8. Σημειώνουμε τις τιμές της απορρόφησης και υπολογίζουμε επί τοις % κάθε κλάσμα εφαρμόζοντας τον παρακάτω τύπο:

$$\%\ \text{Αιμοσφαιρινικό κλάσμα} = \frac{\text{Απορρόφηση αιμοσφαιρινικού κλάσματος}}{\text{Άθροισμα τιμών απορρόφησης όλων των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων}} \times 100$$

Εάν κριθεί αναγκαίο να γίνει ακριβέστερος προσδιορισμός των κλασμάτων με **πυκνομέτρηση** τότε μετά το βήμα Νο 20 η ταινία **διαφανοποιείται** και η πορεία διαμορφώνεται ως εξής:

1. Εμβαπτίζουμε την ταινία σε απόλυτη μεθανόλη για 1 λεπτό της ώρας.

2. Μεταφέρουμε την ταινία μέσα στο διαφανοποιητικό διάλυμα για 10 λεπτά.

3. Απλώνουμε, χωρίς να τσαλακωθεί, την ταινία επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

4. Τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα με την ταινία σε κλίβανο 50 °C μέχρι να στεγνώσει. Σ' αυτή τη φάση η ταινία γίνεται διαφανής και χάνει την πορώδη σύστασή της.

5. Περνάμε τη διαφανοποιημένη ταινία στο ειδικό μηχάνημα το οποίο θα μετρήσει τα αιμοσφαιρινικά κλάσματα. Η απάντηση θα δοθεί σε γραμμικό διάγραμμα.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των κλασμάτων της αιμοσφαιρίνης είναι διαφορετική. Από τις αιμοσφαιρίνες του ενήλικα, η A έχει την μεγαλύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Πίσω από αυτή κινείται η F ενώ η A_2 μένει πολύ πίσω, κοντά στο σημείο τοποθέτησης του αιμολύματος (εικόνα 8.7). Αλλαγή στο ποσοστό των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων δηλώνει παθολογική κατάσταση (εικόνες 8.8, 8.9, 8.10 και 8.11).

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

HbA	97.5%	
HbA_2	1.5% - 3.5%	
HbF	0% - 2%	για τους ενήλικες
	60% - 90%	για τα νεογνά. Σταδιακά το ποσό αυτό μειώνεται και γύρω στον έκτο μήνα παίρνει την τιμή 2%.

Πρόταση για τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης

Για να ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση μέσα σε ένα εργαστηριακό τρίωρο, είναι αναγκαίο να γίνει καταμερισμός των εργασιών.

Μία ομάδα αναλαμβάνει την **προετοιμασία του δείγματος** (στάδια Νο 8,9,10,και 11) αφού πρώτα επαναφέρει τη θερμοκρασία του συντηρημένου αιμολύματος.

Μία άλλη ομάδα αναλαμβάνει την **προετοιμασία της ταινίας** της οξικής κυτταρίνης (στάδια Νο 1,2,και 3), την οποία στη

συνέχεια θα τοποθετήσει στην ηλεκτροφορητική συσκευή (στάδιο Νο 6).

Η τρίτη ομάδα **γεμίζει το λουτρό** της ηλεκτροφορητικής συσκευής (στάδια Νο 4,5,6,και 7) και **ρευματοδοτεί** τη συσκευή (στάδια Νο 12,13,14 και 15).

Όσο διαρκεί η ηλεκτροφόρηση μπορούμε να ετοιμάζουμε τα υλικά και τα σκεύη για το **χρωματισμό** και τον **αποχρωματισμό** των κλασμάτων της ηλεκτροφόρησης (στάδια Νο 16,17,18 και 19).

Μετά ακολουθεί η **μελέτη των αποτελεσμάτων**.

Στο επόμενο εργαστηριακό τρίωρο θα γίνει η ποσοτική εκτίμηση των κλασμάτων της ηλεκτροφόρησης.

Άλλες μέθοδοι

Όταν πρέπει να διερευνηθούν με μεγάλη ακρίβεια τα αιμοσφαιρινικά κλάσματα **S** και $\mathbf{A_2}$ εφαρμόζουμε **τη μέθοδο της χρωματογραφίας**.

Η μέθοδος στηρίζεται στην ανταλλαγή φορτίων μεταξύ των ρητινών (θετικά φορτισμένες) και των αιμοσφαιρινών.

Το pH και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος είναι τέτοια ώστε τα αιμοσφαιρινικά κλάσματα να έχουν διαφορετικά αρνητικά φορτία και να κατακρατούνται "παγιδεύονται" με τελείως διαφορετικό τρόπο από τις ρητίνες. Έτσι μένει ελεύθερο κάθε φορά και ένα διαφορετικό αιμοσφαιρινικό κλάσμα, το οποίο μετά τη διήθησή του φωτομετρείται σε μήκος κύματος 415 nm.

Όλα τα απαραίτητα υλικά για την εκτέλεση της χρωματομετρικής μεθόδου (αντιδραστήρια, ρητίνες ή στήλες ρητινών μιας χρήσης) διατίθενται συσκευασμένα από τις διάφορες εταιρείες.

Ακολουθούμε πιστά τις οδηγίες χρήσης των εταιρειών. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δώσουμε:

1. Στην καταλληλότητα των ρητινών. Κάθε αλλαγή στο αρχικό τους χρώμα δηλώνει αλλοίωση.

2. Στην ημερομηνία λήξης των ρητινών.

3. Στο είδος του αντιπηκτικού. Το κατάλληλο αντιπηκτικό είναι το EDTA.

Ο προσδιορισμός του ποσοστού στα εκατό (%) του διηθημένου αιμοσφαιρινικού κλάσματος γίνεται εφαρμόζοντας τον τύπο:

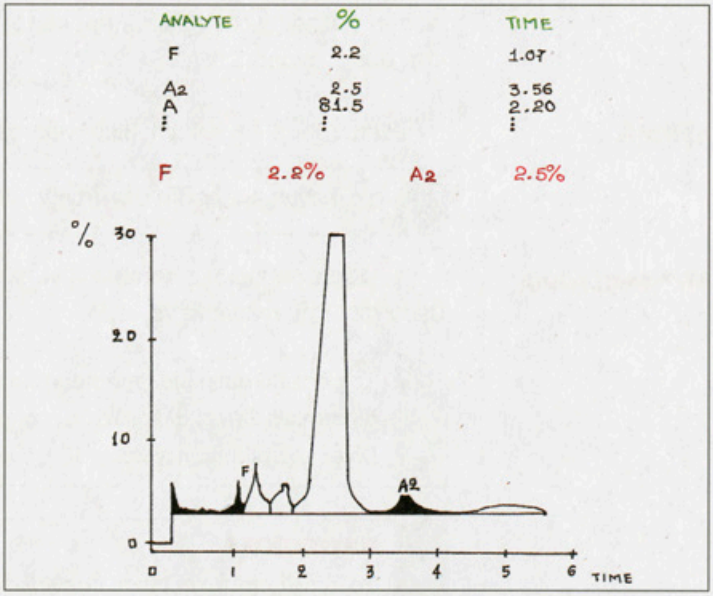
$$HbS\% = \frac{\text{Απορρόφηση αιμοσφαιρίνης S}}{\text{Άθροισμα τιμών της αιμοσφαιρίνης του ολικού αίματος}} \times 100$$

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας έχει προσφέρει στην καθημερινή εργαστηριακή πράξη **αυτόματους αναλυτές** για τον προσδιορισμό των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων.

Οι αναλυτές αυτοί έχουν τη δυνατότητα να πλένουν τα ερυθρά, να φτιάχνουν αιμόλυμα, να ηλεκτροφορούν και να εκτυπώνουν τα αποτελέσματα.

Στηρίζονται στην ιοντοανταλλαγή των φορτίων των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων με τα φορτία ειδικών διαλυμάτων αναφοράς.

Τα αποτελέσματα δίνονται με τη μορφή ιστογράμματος. Στον κατακόρυφο άξονα είναι σημειωμένο το ποσοστό του αιμοσφαιρινικού κλάσματος και στον οριζόντιο ο χρόνος ηλεκτροφορητικής κίνησης.



Εικόνα 8.12: *Ιστόγραμμα αυτόματης ηλεκτροφορητικής ανάλυσης*

8.2.6 Δοκιμασία δρεπανώσεως των ερυθροκυττάρων

ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Ας συνδεθούμε με την Αιματολογία Ι:

Τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα έχουν όλα την ίδια διάμετρο (7-8 mm). Το σχήμα τους είναι αμφίκοιλο κυρτοειδές, φαίνονται όμως σφαιρικά. Το χρώμα τους είναι σκούρο κίτρινο προς το πορτοκαλί, λιγότερο έντονο στο κέντρο και περισσότερο έντονο στην περιφέρεια.

Κάθε αλλαγή στο μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα των ερυθροκυττάρων συνοδεύει και χαρακτηρίζει διάφορες αιματολογικές παθήσεις.

- **Πότε κάνουμε τη δοκιμασία;**

Εάν κατά την ηλεκτροφόρηση της αιμοσφαιρίνης σε ταινία οξικής κυτταρίνης βρεθεί κλάσμα που η ηλεκτροφορητική του θέση μας βάζει σε υποψία για την ύπαρξη αιμοσφαιρίνης S, πρέπει να κάνουμε διερεύνηση με τη δοκιμασία δρεπανώσεως.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το φυσιολογικό σχήμα των ερυθρών αιμοσφαιρίων μεταβάλλεται σε **δρεπανοειδές**, όταν τα ερυθροκύτταρα βρεθούν σε περιβάλλον με ελάχιστο οξυγόνο (υποξία). Η μεταβολή αυτή συμβαίνει *μόνο αν η αιμοσφαιρίνη που περιέχουν είναι η δρεπανοκυτταρική S*, πρόκειται δηλαδή για δρεπανοκυτταρική αναιμία.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε 2.5 ml φλεβικό αίμα σε EDTA ή τριχοειδικό.

> Το δείγμα μπορεί να συντηρηθεί στους 4°C.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Μεταδιθειώδες νάτριο ($Na_2S_2O_5$): Διαλύουμε 0,1 g μέσα σε 5 ml απιονισμένο νερό.

> Το υδατικό αυτό διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν χρησιμοποιηθεί γιατί αλλοιώνεται εύκολα.
> Είναι ισχυρό αναγωγικό.

> **ΠΡΟΣΟΧΗ !**
> Το αντιδραστήριο είναι ερεθιστικό. Προστατεύουμε το δέρμα μας. Δεν το βάζουμε στο στόμα μας.

2. Φωσφορικό δινάτριο (Na_2HPO_4): Διαλύουμε 16,2 g σε 11 ml απιονισμένο νερό.

Πριν την έναρξη της δοκιμασίας αναμειγνύονται δύο όγκοι του πρώτου αντιδραστηρίου και τρεις όγκοι του δεύτερου αντιδραστηρίου.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- επωαστικός κλίβανος
- μικροσκόπιο
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- γάντια
- υαλογράφος
- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- δοκιμαστικό σωληνάριο αιμολύσεως
- σιφώνια Pasteur
- αντικειμενοφόρος πλάκα
- καλυπτρίδα
- βαζελίνη
- τρυβλίο
- βαμβάκι
- κεδρέλαιο
- ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10

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

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Τοποθετούμε στο έδρανο στήριξης ένα δοκιμαστικό σωληνάριο αιμολύσεως με σημειωμένα επάνω τα στοιχεία του ασθενή.

2. Ανακινούμε με ήπιες κινήσεις το φιαλίδιο με το δείγμα για να γίνει ομοιογενές.

3. Μεταφέρουμε με σιφώνιο Pasteur 1 – 2 σταγόνες από το δείγμα στο σωληνάριο.

ΠΡΟΣΟΧΗ !

Πετάμε το σιφώνιο μέσα σε διάλυμα χλωρίνης.

4. Προσθέτουμε 1 - 2 σταγόνες από το μείγμα των αντιδραστηρίων.

Οι ίσες ποσότητες δείγματος και αντιδραστηρίου βοηθούν στην ομαλή αναγωγική αντίδραση.

5. Βάζουμε με σιφώνιο μια μικρή σταγόνα από το μείγμα επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

Υπενθύμιση:
Πετάμε το χρησιμοποιημένο σιφώνιο στο διάλυμα της χλωρίνης.

6. Καλύπτουμε προσεκτικά τη σταγόνα με την καλυπτρίδα.

Η τοποθέτηση της καλυπτρίδας γίνεται προσεκτικά, χωρίς να εγκλωβιστεί αέρας στο παρασκεύασμα.

7. Κλείνουμε με βαζελίνη ή κεδρέλαιο περιμετρικά την καλυπτρίδα, χρησιμοποιώντας σιφώνιο Pasteur.

Το σφράγισμα της περιμέτρου της καλυπτρίδας πρέπει να γίνεται χωρίς διάκενα για να μην προσλαμβάνει η αιμοσφαιρίνη ατμοσφαιρικό οξυγόνο.
Το χρησιμοποιημένο σιφώνιο πετάγεται στο διάλυμα χλωρίνης.

8. Βάζουμε βαμβάκι εμποτισμένο με νερό μέσα σε ένα τρυβλίο.

9. Τοποθετούμε το παρασκεύασμα μέσα στο τρυβλίο και το αφήνουμε για 20 λεπτά σε επωαστικό κλίβανο 37°C.

Το υγρό περιβάλλον βοηθά να μην ξεραθεί το παρασκεύασμα.
Σε ετερόζυγη μορφή αιμοσφαιρινοπάθειας S μπορεί να κρατήσει η επώαση 1 ώρα.

10. Μικροσκοπούμε αναζητώντας δρεπανοκύτταρα. Η μικροσκόπηση επαναλαμβάνεται στα 30, 60 και 120 λεπτά.

> Η επαναλαμβανόμενη μικροσκόπηση δίνει αξιόπιστα διαφορικά στοιχεία για τις αιμοσφαιρινοπάθειες.

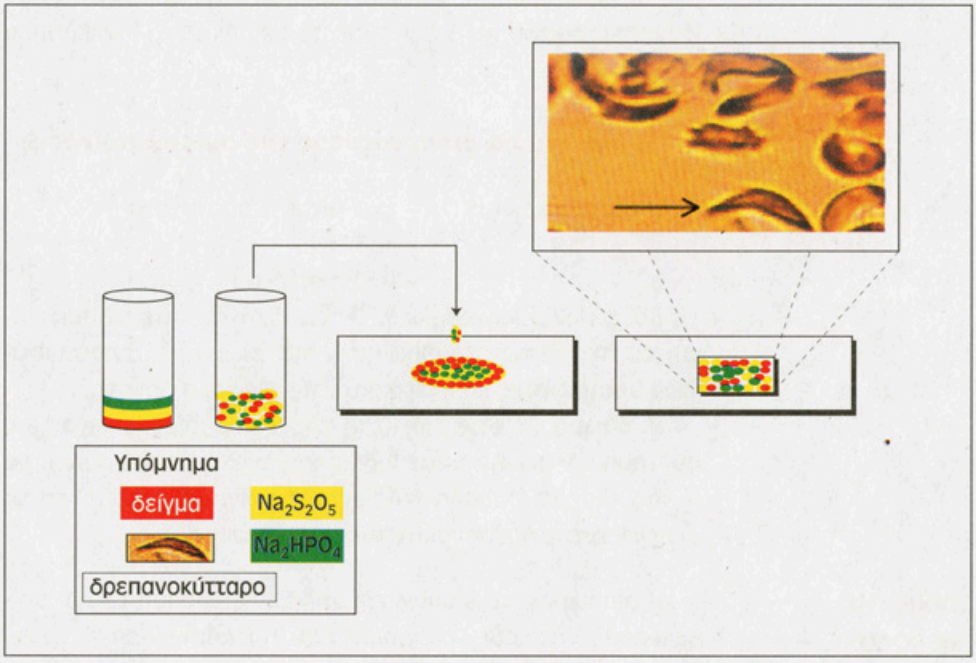
Εάν η τεχνική γίνει με τριχοειδικό αίμα, τα στάδια Νο 1, 2 και 3 τροποποιούνται ως εξής:

1. Τοποθετούμε επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα 1 σταγόνα τριχοειδικό αίμα.

2. Προσθέτουμε με σιφώνιο 1 σταγόνα από το μείγμα των αντιδραστηρίων.

3. Αναμειγνύουμε με το σιφώνιο τις δύο σταγόνες με κυκλικές κινήσεις.

Συνεχίζουμε με τους χειρισμούς των σταδίων Νο 6, 7, 8, 9, και 10.



***Εικόνα 8.13**: Δοκιμασία δεπανώσεως των ερυθροκυττάρων*

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. ***ΘΕΤΙΚΟ:*** Υπάρχουν πυκνοχρωματικά ημισελήνοειδή ερυθροκύτταρα (δρεπανοκύτταρα).

β. *ΑΡΝΗΤΙΚΟ:* Δεν υπάρχουν πυκνοχρωματικά ημισελληνοειδή ερυθροκύτταρα (δρεπανοκύτταρα).
Τα ερυθροκύτταρα είναι φυσιολογικά.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η δρεπάνωση γίνεται σταδιακά. Τα ερυθροκύτταρα αρχικά διατάσσονται σε στήλες, αργότερα παίρνουν επίμηκες σχήμα και στη συνέχεια αποκτούν μυτερές άκρες (οξύαιχμα), γίνονται, δηλαδή, **δρεπανοκύτταρα**.

Η δρεπάνωση γίνεται **γρήγορα στην ομόζυγη** δρεπανοκυτταρική αναιμία και **αργά στην ετερόζυγη** δρεπανοκυτταρική αναιμία. Ο ποιοτικός αυτός έλεγχος αποτελεί στοιχείο για να διαγνωστεί η δρεπανοκυτταρική πάθηση από άλλες αιμοσφαιρινοπάθειες, όταν οι αιμοσφαιρίνες τους έχουν την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε αλκαλικό περιβάλλον που έχει και η αιμοσφαιρίνη S.

8.2.7 Δοκιμασία διαλυτότητας της αιμοσφαιρίνης S

Η αιμοσφαιρίνη **S**
- έχει μικρή διαλυτότητα
- καθιζάνει και
- πολυμερίζεται.

Λόγω των φυσικοχημικών αυτών ιδιοτήτων της **αλλοιώνεται το σχήμα** των ερυθρών αιμοσφαιρίων και **δημιουργούνται θρομβώσεις** και έμφρακτα στα διάφορα όργανα.

Η δοκιμασία διαλυτότητας της δοκιμασίας S είναι μία σύντομη και αξιόπιστη μέθοδος που ανιχνεύει την παρουσία ή απουσία της παθολογικής αιμοσφαιρίνης S. Γίνεται για τη διάγνωση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αιμοσφαιρίνη S ανάγεται από την επίδραση του όξινου θειώδους νατρίου. Το προϊόν που προκύπτει, επειδή έχει μικρή διαλυτότητα, θολώνει το μείγμα.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε ολικό αίμα σε αντιπηκτικό.

Κατάλληλα αντιπηκτικά για τη συλλογή του δείγματος είναι το EDTA, το ACD και η ηπαρίνη.
Το δείγμα δεν πρέπει να έχει ίχνος αιμόλυσης.

Εάν το δείγμα συντηρηθεί στους ±4°C είναι κατάλληλο μέχρι και 8 εβδομάδες από τη λήψη του.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών: Το διάλυμα κρατάει σταθερό το pH της βιοχημικής αντίδρασης. Βρίσκεται μέσα σε φιαλίδιο με ή χωρίς ειδικό δοσομετρικό πώμα. Διατηρείται στους 15°-30°C.

2. Όξινο θειώδες νάτριο ($NaHSO_3$): Είναι ένα ισχυρότατο αντιδραστήριο σε λυόφιλη μορφή μέσα σε δοκιμαστικά σωληνάρια της κατασκευάστριας εταιρείας.

Εάν το αντιδραστήριο είναι σε υγρή μορφή, είναι ακατάλληλο για χρήση.

ΟΡΓΑΝΑ ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- γάντια
- υαλογράφος
- ειδικά δοκιμαστικά σωληνάρια της κατασκευάστριας εταιρείας που περιέχουν το αντιδραστήριο Νο 2 σε λυόφιλη μορφή
- ειδικό έδρανο στήριξης των δοκιμαστικών σωληναρίων
- αυτόματη πιπέτα αντιδραστηρίων
- ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10

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

Τα δοκιμαστικά σωληνάρια πρέπει να χρησιμοποιηθούν μέσα σε διάστημα 30 ημερών από το άνοιγμα της συσκευασίας.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε με υαλογράφο τα στοιχεία του εξεταζόμενου πάνω στα ειδικά δοκιμαστικά σωληνάρια της συσκευασίας τα οποία περιέχουν το όξινο θειώδες νάτριο.

2. Αφαιρούμε το πώμα του σωληναρίου και βάζουμε 4 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα.

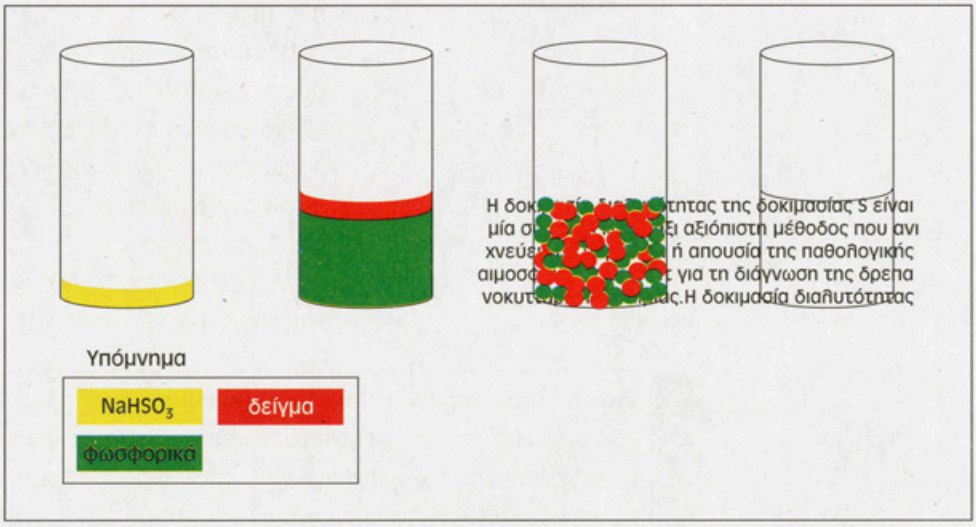
3. Προσθέτουμε 50 ml από το δείγμα και πωματίζουμε το δοκιμαστικό σωληνάριο.

Υπενθύμιση:
Πετάμε το ρύγχος στο διάλυμα χλωρίνης.

4. Ανακινούμε δυνατά με αναστροφή το δοκιμαστικό σωληνάριο για να αναμειχθούν τα υλικά.

5. Αφήνουμε το μείγμα στη θερμοκρασία δωματίου για 10-20 λεπτά της ώρας.

6. Ελέγχουμε μπροστά από επιφάνεια με γραμμώσεις (υπάρχει στη συσκευασία) ή γράμματα, τη δημιουργία ή μη θόλωσης του μείγματος. Το κριτήριο για τη θόλωση είναι η ευκρινής ή μη ευκρινής εικόνα των γραμμώσεων ή των γραμμάτων πίσω από το δοκιμαστικό σωληνάριο.



Εικόνα 8.14: *Έλεγχος της διαλυτότητας της αιμοσφαιρίνης S*

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. ***Θετικό:*** Η όψη του μείγματος είναι **θολερή** και δε φαίνονται οι γραμμώσεις της επιφάνειας ή οι λέξεις ενός κειμένου πίσω από το δοκιμαστικό σωληνάριο.

β. ***Αρνητικό:*** Η όψη του μείγματος είναι **διαυγής** και φαίνονται ξεκάθαρα οι γραμμώσεις της επιφάνειας ή οι λέξεις ενός κειμένου.

Για την αξιοπιστία του αποτελέσματος καλό είναι να χρησιμοποιήσουμε θετικό και αρνητικό μάρτυρα οι οποίοι δίνονται από την κατασκευάστρια εταιρεία.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Έγινε αιμόλυση των ερυθροκυττάρων και ελευθερώθηκε η αιμοσφαιρίνη.

Εάν είναι **παθολογικής δομής (S), μένει αδιάλυτη** και αυτό το συμπεραίνουμε από τη **θόλωση** μείγματος.

Εάν είναι **φυσιολογικής δομής, διαλύεται** και αυτό το συμπεραίνουμε από τη **διαύγεια** του μείγματος.

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Στις ενότητες αυτού του κεφαλαίου παρουσιάστηκαν αντιπροσωπευτικές εξετάσεις που αφορούν την ανίχνευση μιας αιμολυτικής αναιμίας και την ανίχνευση και επιβεβαίωση διαταραχών της αιμοσφαιρίνης.

Αναλύθηκαν οι πλέον απαραίτητες βοηθητικές τεχνικές επεξεργασίας των δειγμάτων, προκειμένου να εκτελεστούν αυτές οι δοκιμασίες.

Έγινε σαφής:

- η χρησιμότητα της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης για τη διάγνωση των αναιμιών και
- η αναγκαιότητα να επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα μιας εξέτασης εκτελώντας ειδικές, για την κάθε διαταραχή, τεχνικές.

Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:

1. Μετατρέπουμε τους πλαγιότιτλους σε ερωτηματικές προτάσεις και δίνουμε τις αντίστοιχες απαντήσεις. Π.χ.: Ποια είναι η αρχή της μεθόδου; Τι δείγμα χρησιμοποιούμε; κ.ο.κ.

2. Απαντάμε σε όλες τις ερωτήσεις που ακολουθούν τους πλαγιότιτλους και ορίζουν το θέμα που αναπτύσσεται στις παραγράφους.

Ας δούμε τι καταλάβαμε:

1. Συμπληρώνουμε τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούμε στις παρακάτω τεχνικές:
   α. Αιμολύματος .....
   β. Δρεπάνωσης ..... και .....
   γ. Ωσμωτικής αντίστασης .....
   δ. Διαλυτότητας ..... και .....

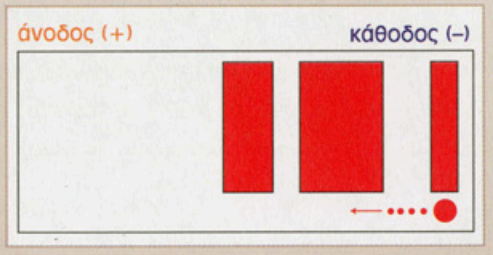
2. Το πλύσιμο των ερυθροκυττάρων γίνεται με:
   α. 10% NaCl β. 0,9% NaCl
   γ. 5% NaCl δ. 0,5% NaCl

3. Ποια μακροσκοπικά στοιχεία χαρακτηρίζουν τη δοκιμασία διαλυτότητας ως θετική; Πως θα εξηγήσουμε το αποτέλεσμα;

4. Ποια η σημασία των σημείων προσοχής στα στάδια Νο 6,7 και 10 για την επιτυχία της ηλεκτροφόρησης;

5. Έχουμε τις τιμές των απορροφήσεων των αιμοσφαιρινικών κλασμάτων:
   HbA = 0,40 HbA_2 = 0,95 HbF = 3,42
   α. Πώς θα υπολογίσουμε το ποσοστό % του κάθε κλάσματος;
   β. Ποια πάθηση υποψιαζόμαστε;

6. Μελετούμε την σχηματική παράσταση μιας ηλεκτροφόρησης.
   α. Ποια κλάσματα έχουν "τρέξει";
   β. Σε τι υποψίες μας βάζει αυτή η εικόνα;
   γ. Ποια άλλη εξέταση πρέπει να κάνουμε για να βεβαιωθούμε;



7. *Βάζουμε σε κύκλο μία ή περισσότερες απαντήσεις, εφόσον θεωρούμε ότι ισχύουν:*

7.1 Κατά τη μέτρηση της ωσμωτικής αντίστασης, σε πυκνό διάλυμα, βρίσκουμε >50% αιμόλυση ερυθροκυττάρων σε:

α. Μικροκυτταρική αναιμία
β. Κληρονομική σφαιροκυττάρωση
γ. Υπόχρωμη αναιμία
δ. Σιδηροπενική αναιμία
ε. Δρεπανοκυτταρική αναιμία

7.2 Στην παρασκευή του διαλύματος, για τον έλεγχο της ωσμωτικής αντίστασης των ερυθροκυττάρων χρησιμοποιείται:

α. Απεσταγμένο νερό
β. Ανθρακικό νάτριο
γ. Κιτρικό νάτριο
δ. Οξαλικό κάλιο
ε. Χλωριούχο νάτριο

7.3 Για την ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης σε ταινία οξικής κυτταρίνης, το δείγμα είναι:

α. Ολικό αίμα
β. Τριχοειδικό αίμα
γ. Φλεβικό αίμα
δ. Πλυμένα ερυθρά
ε. Αιμόλυμα φλεβικού αίματος
στ. Αιμόλυμα τριχοειδικού αίματος

7.4 Σε χαρτί ηλεκτροφόρησης, σε pH 8,6 , η αιμοσφαιρίνη που κινείται τελευταία είναι:

α. Η HbC
β. Η HbA
γ. Η HbA_2
δ. Η HbF
ε. Η HbS

7.5 Η αιμοσφαιρίνη που παραμένει αδιάλυτη όταν ανάγεται είναι:

α. Η HbC
β. Η HbA
γ. Η HbA_2
δ. Η HbF
ε. Η HbS

7.6 Για ένα πλασματικά αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμασίας δρεπάνωσης μπορεί να ευθύνεται:

α. Το μεταδιθειώδες νάτριο που παρασκευάστηκε την προηγούμενη μέρα
β. Η υγρασία στην ατμόσφαιρα
γ. Το ατελές σφράγισμα της καλυπτρίδας
δ. Οι ίσες ποσότητες δείγματος και αντιδραστηρίου
ε. Το ότι το δείγμα ήταν από τριχοειδικό αίμα

7.7 Σε ένα εργαστήριο στο οποίο πρέπει να γίνει ηλεκτροφόρηση αιμοσφαίρίνης, ποιο υπόστρωμα είναι το καταλληλότερο, αν ισχύει κάθε φορά μια από τις παρακάτω συνθήκες :

α. Υπάρχει οικονομικό πρόβλημα

β. Πρέπει να δοθεί πολύ γρήγορα απάντηση

γ. Έχουμε μικρή ποσότητα δείγματος

δ. Ισχύει το β και γ συγχρόνως

ε. Θέλουμε οπωσδήποτε να προσδιορίσουμε την αιμοσφαιρίνη F

Ας εφαρμόσουμε αυτά που μάθαμε:

1. Εάν υποψιαζόμαστε σιδηροπενική αναιμία, ποιες αραιώσεις θα κάνουμε και γιατί, προκειμένου να μετρήσουμε την ωσμωτική αντίσταση των ερυθρών αιμοσφαιρίων;

2. Συγκεντρώνοντας τα υλικά για την εκτέλεση της δοκιμασίας δρεπανώσεως διαπιστώσαμε ότι δεν έχουμε τα υλικά για το περιμετρικό "σφράγισμα" της καλυπτρίδας. Τι θα κάνουμε;

α. Θα παρακάμψουμε το στάδιο αυτό.

β. Θα ζητήσουμε νέα αιμοληψία αύριο το πρωί που θα έχουμε τα υλικά.

γ. Θα συντηρήσουμε το δείγμα και θα επαναλάβουμε αύριο την τεχνική.

Αιτιολογούμε την επιλογή και μη επιλογή μας.

Προτάσεις για περαιτέρω διερεύνηση:

1. Νεότερες αυτοματοποιημένες τεχνικές ηλεκτροφόρησης. Σε ποια αρχή στηρίζονται; Ποια τα πλεονεκτήματα και ποια τα μειονεκτήματά τους;

2. Ποια μικρόβια και ποια παράσιτα μπορούν να προκαλέσουν αιμολυτική αναιμία;

3. Τι συμβαίνει όταν η αιμοσφαιρίνη συνδεθεί με μονοξείδιο του άνθρακα; Συσχετίζουμε το μηχανισμό με το κάπνισμα και τους ρύπους της ατμόσφαιρας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

εργαστηριακός έλεγχος αιμορραγικών διαθέσεων

9.1 Εισαγωγή
9.2 Δοκιμασία περιχειρίδος ή δοκιμασία θετικής πίεσης RUBMEL - LEED
9.3 Τεχνική μέτρησης του χρόνου ροής ή τεχνική του DUKE
9.4 Τεχνική του IVY
9.5 Μέθοδος μέτρησης του χρόνου πήξης σε αντικειμενοφύρο πλάκα
9.6 Μέθοδος μέτρησης του χρόνου πήξης σε δοκιμαστικό σωληνάριο ή μέθοδος LEE -WHITE
9.7 Συστολή του θρόμβου
9.8 Χρόνος προθρομβίνης του πλάσματος (PT) ή χρόνος QUICK
9.9 Προσδιορισμός του χρόνου μερικής θρομβοπλαστίνης ενεργοποιημένης με καολίνη
9.10 Προδιορισμός ινωδογόνου μέθοδος CLAUSS
9.11 Thrombotest
9.12 Άλλες τεχνικές ελέγχου των αιμοραγικών καταστάσεων

Όταν ολοκληρωθεί αυτή η ενότητα θα έχεις τη δυνατότητα:

- ✓ *Να δίνεις οδηγίες προς τον εξεταζόμενο για το τι πρέπει να κάνει πριν την εξέταση.*
- ✓ *Να αντιμετωπίζεις τις δυσκολίες κατά τη λήψη των δειγμάτων.*
- ✓ *Να επεξεργάζεσαι τα δείγματα.*
- ✓ *Να επιλέγεις τα κατάλληλα όργανα, υλικά και σκεύη για την εκτέλεση των προσδιορισμών.*
- ✓ *Να εκτελείς τις βασικότερες διαγνωστικές τεχνικές διερεύνησης των αιμορραγικών παθήσεων.*
- ✓ *Να συγκρίνεις τις τιμές των αποτελεσμάτων.*
- ✓ *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.**

9.1. Εισαγωγή

Φυσιολογικά ο οργανισμός, μόλις συμβεί μία αυτόματη ή προκλητή αιμορραγία, αντιδρά με πολύπλοκους μηχανισμούς για να τη σταματήσει. Οι μηχανισμοί αυτοί ενεργοποιούνται ο ένας μετά τον άλλο.

Από την αγγειοσύσπαση που «πυροδοτεί» την έναρξη του αιμοστατικού μηχανισμού, μέχρι τη διάλυση του θρόμβου στο τέλος του μηχανισμού πήξης, συμβαίνουν διαδοχικά σημαντικά φαινόμενα.

Αν κάτι δεν πάει καλά, τότε αλυσιδωτά επηρεάζονται οι παράγοντες που συμμετέχουν με συνέπεια ή να καθυστερεί η πήξη του αίματος ή να μην πήζει καθόλου.

Το εργαστήριο πρέπει να δώσει απάντηση στο ερώτημα: "**Ποια είναι τα αίτια αυτών των παθολογικών καταστάσεων που εκδηλώνονται με καθυστέρηση ή αδυναμία πήξης;**". Γι' αυτό, χρειάζεται να γίνουν πολλοί και διαφορετικοί προσδιορισμοί παραγόντων που μπορεί να ευθύνονται για τη διαταραχή.

Οι έλεγχοι στο εργαστήριο έχουν τους παρακάτω στόχους:

1ος στόχος: Να εκτελεστούν τεχνικές απλές και αξιόπιστες οι οποίες θα έχουν την ευαισθησία να εντοπίσουν τα πιο συχνά αίτια των αιμορραγικών διαταραχών.

2ος στόχος: Να ανιχνευθούν τα λιγότερο συχνά αίτια της αιμορραγικής διαταραχής με ειδικές και περισσότερο ευαίσθητες τεχνικές.

9.2. Δοκιμασία περιχειρίδος ή δοκιμασία θετικής πίεσης RUMBEL – LEED

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- **Τι ελέγχουμε με τη δοκιμασία αυτή;**

Αξιολογούμε το πόσο αντέχουν ή πόσο εύθραυστα είναι τα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων, όταν βρεθούν κάτω από συνθήκες πίεσης.

- **Σε τι μας χρησιμεύει αυτή η γνώση;**

Το τοίχωμα των αγγείων, όταν χαλάσει, απελευθερώνει κάποιες ουσίες. Οι ουσίες αυτές, σε αλληλεπίδραση με τα αιμοπετάλια, πυροδοτούν την πρώτη φάση της αιμόστασης. Όταν, λοιπόν, έχουμε να λύσουμε ένα πρόβλημα του τύπου: ***«Τι δεν πάει καλά με το μηχανισμό πήξης αυτού του ασθενούς;»***, επιχειρούμε να αξιολογήσουμε την αντοχή ή την ευθραυστότητα των αγγείων. Ανάλογα με το αποτέλεσμα, κατευθυνόμαστε για διαφορετικό ή συμπληρωματικό είδος εργαστηριακής διάγνωσης των παθήσεων οι οποίες προκαλούν διαταραχή της αιμόστασης και της πήξης. Οι κυριότερες τέτοιες παθήσεις είναι:

- Οι θρομβοασθένειες
- Η απλαστική αναιμία
- Η αιμορροφιλία
- Η αλλεργική πορφύρα

ΟΡΓΑΝΟ

σφυγμομανόμετρο

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

Η δοκιμασία θα γίνει στο βραχίονα.

1. Εφαρμόζουμε την περιχειρίδα (τον αεροθάλαμο) στο βραχίονα (μπράτσο) του εξεταζόμενου.

2. Φουσκώνουμε την περιχειρίδα μέχρι το μανόμετρο να φτάσει σε πίεση 70 – 90 mmHg.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Κρατάμε σταθερή την πίεση για 5 λεπτά της ώρας.

3. Ανοίγουμε τη βαλβίδα για να φύγει όλος ο αέρας από την περιχειρίδα και την αφαιρούμε από το βραχίονα του εξεταζόμενου.

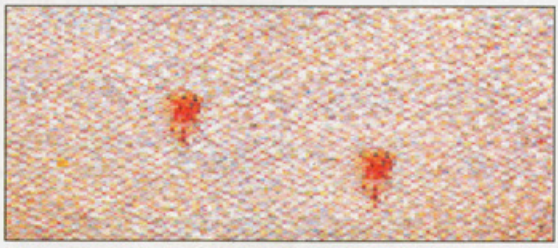
4. Παρατηρούμε σε όλα τα μέρη του χεριού για να δούμε αν σχηματίστηκαν ή δε σχηματίστηκαν πετέχιες (αιμορραγικές κηλίδες).

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Εάν ζητηθεί επανάληψη λόγω αμφιβολιών, η δοκιμασία γίνεται στο άλλο χέρι.

Η εξέταση μπορεί να επαναληφθεί στο ίδιο χέρι 10 μέρες μετά την προηγούμενη δοκιμασία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. ***Αρνητική:*** Δε σχηματίστηκε παθογνωμικός αριθμός κηλίδων.



Εικόνα 9.1: *Κηλίδες (πετέχειες)*

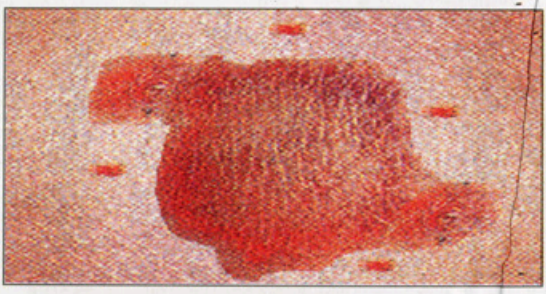
ΠΡΟΣΟΧΗ!

Μέχρι 5 σποραδικές κηλίδες, είναι φυσιολογική κατάσταση.

Δεν εφησυχάζουμε στην περίπτωση που δε σχηματιστεί καμία κηλίδα. Η αρνητική δοκιμασία δεν αποκλείει διαταραχή.

β. ***Θετική:*** Σε όλες τις παρακάτω περιπτώσεις:

- Εάν υπάρχουν **λίγες** κηλίδες στην πάνω επιφάνεια του βραχίονα, σημειώνουμε **1 σταυρό (+)**.
- Εάν υπάρχουν **πολλές** κηλίδες στην πάνω επιφάνεια του βραχίονα, σημειώνουμε **2 σταυρούς (++)**.
- Εάν υπάρχουν **πολλές** κηλίδες σε όλο το βραχίονα και στη ραχιαία (επάνω) επιφάνεια του άκρου χεριού, σημειώνουμε **3 σταυρούς (+++)**.
- Εάν υπάρχουν **πολλές**, **μεγάλες** και **συγκεντρωμένες στο ίδιο μέρος** κηλίδες (στο βραχίονα, στον αντιβραχίονα και στην επάνω ή στην παλαμιαία επιφάνεια του άκρου του χεριού), σημειώνουμε **4 σταυρούς (++++)**.



Εικόνα 9.2: *Κηλίδα (μεγάλη-συρρέουσα)*

Πριν χαρακτηρίσουμε τη δοκιμασία ως **θετική** ή ως **αρνητική**, συνυπολογίζουμε τους παράγοντες που την επηρεάζουν:

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Ανάλογα με την υφή και το πάχος του δέρματος του εξεταζόμενου, μπορεί να έχουμε πλασματικά θετική ή και αρνητική τη δοκιμασία.

Αν το εξεταζόμενο άτομο πέρασε ή περνά περίοδο ιογενών λοιμώξεων (γρίπη,ιλαρά), έχει έμμηνη ροή ή έχει πάρει κορτικοειδή φάρμακα, τα τοιχώματα των τριχοειδών είναι πολύ εύθραυστα.

Γυναίκες με επίπεδο οιστρογόνων χαμηλότερο από το φυσιολογικό, μπορεί να δώσουν θετική τη δοκιμασία, χωρίς να σημαίνει ότι έχουν διαταραχή της αιμόστασης.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Η δοκιμασία σε άτομα με φυσιολογικά τοιχώματα αγγείων βγαίνει αρνητική.

9.3. Τεχνική μέτρησης του χρόνου ροής ή τεχνική του DUKE

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- **Τι δηλώνει ο χρόνος ροής;**

Ο χρόνος ροής δηλώνει το χρονικό διάστημα, από τη στιγμή που θα αρχίσει η αιμορραγία του τριχοειδούς, την οποία εμείς προκαλέσαμε, μέχρι τη στιγμή που θα σταματήσει.

- **Γιατί προκαλούμε αιμορραγία;**

Όπως είναι γνωστό, μετά τον τραυματισμό ενός αγγείου,

αμύνεται ο οργανισμός για να σταματήσει την αιμορραγία (αιμόσταση). Στην πολύπλοκη αυτή λειτουργία, παίρνουν μέρος τα αιμοπετάλια, το τοίχωμα των αγγείων και παράγοντες πήξης. Οι δράσεις όλων αυτών των παραγόντων αλληλοεξαρτώνται. Εμείς, λοιπόν, στο εργαστήριο προκαλώντας αιμορραγία μπορούμε να μελετήσουμε το πόσο γρήγορα θα αντιδράσει το τοίχωμα του τραυματισμένου αγγείου και πόσο αποτελεσματικά θα συνεργαστούν τα αιμοπετάλια, για να σταματήσει η αιμορραγία.

- **Σε τι μας χρησιμεύει αυτή η γνώση;**

Η ενεργοποίηση του αιμοστατικού μηχανισμού διαταράσσεται σε ομάδα νοσημάτων με αποτέλεσμα να καθυστερεί το σταμάτημα της προκλητής -στο εργαστήριο - αιμορραγίας. Άρα, μετρώντας το χρόνο ροής, ανιχνεύουμε τις διαταραχές του αιμοστατικού μηχανισμού και βοηθάμε στη διάγνωση των παθήσεων.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- χρονόμετρο χειρός
- γάντια
- βαμβάκι
- οινόπνευμα
- σκαριφιστήρα (αιμολέτα ή Lancet)
- διηθητικό χαρτί σε σχήμα κύκλου
- δοχείο απόρριψης αιχμηρών αντικειμένων
- απορριμματοδοχείο

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Εμποτίζουμε με οινόπνευμα ένα κομμάτι βαμβάκι και κάνουμε αντισηψία στο λοβό του αυτιού του εξεταζομένου.

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Προτιμότερο είναι να χρησιμοποιούμε αιθέρα για να αποφύγουμε υπεραιμία.

Ο αιθέρας, όταν παραμείνει στον αέρα, δημιουργεί εκρηκτικό μείγμα.

Προσέχουμε να μη δημιουργήσουμε υπεραιμία γιατί θα έχουμε πλασματικά μεγαλύτερο χρόνο ροής.

Μετά την αντισηψία πετάμε το βαμβάκι στο απορριμματοδοχείο.

2. Ετοιμάζουμε το σκαριφιστήρα.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Δεν πιάνουμε το τμήμα της ακίδας , έστω και αν φοράμε γάντια.

3. Σταθεροποιούμε, ανάμεσα στο δείκτη και στο μεγάλο δάχτυλο του χεριού μας το λοβό του αυτιού του εξεταζόμενου πιέζοντας ελαφρά.

4. Κάνουμε νύξη του δέρματος του λοβού με το σκαρφιστήρα.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Χρειάζεται σταθερότητα του χεριού για να μην τρυπήσουμε τα δάχτυλά μας.
Η νύξη δεν πρέπει να δημιουργήσει μεγάλη πληγή στο δέρμα γιατί θα έχουμε πλασματική παράταση του χρόνου ροής.
Πετάμε το σκαριφιστήρα στο ειδικό δοχείο για τα αιχμηρά αντικείμενα.

5. **Βάζουμε σε λειτουργία το χρονόμετρο** μόλις εμφανιστεί η πρώτη σταγόνα αίματος στο σημείο της νύξης.

6. Απορροφούμε με το διηθητικό χαρτί τη σταγόνα του αίματος.

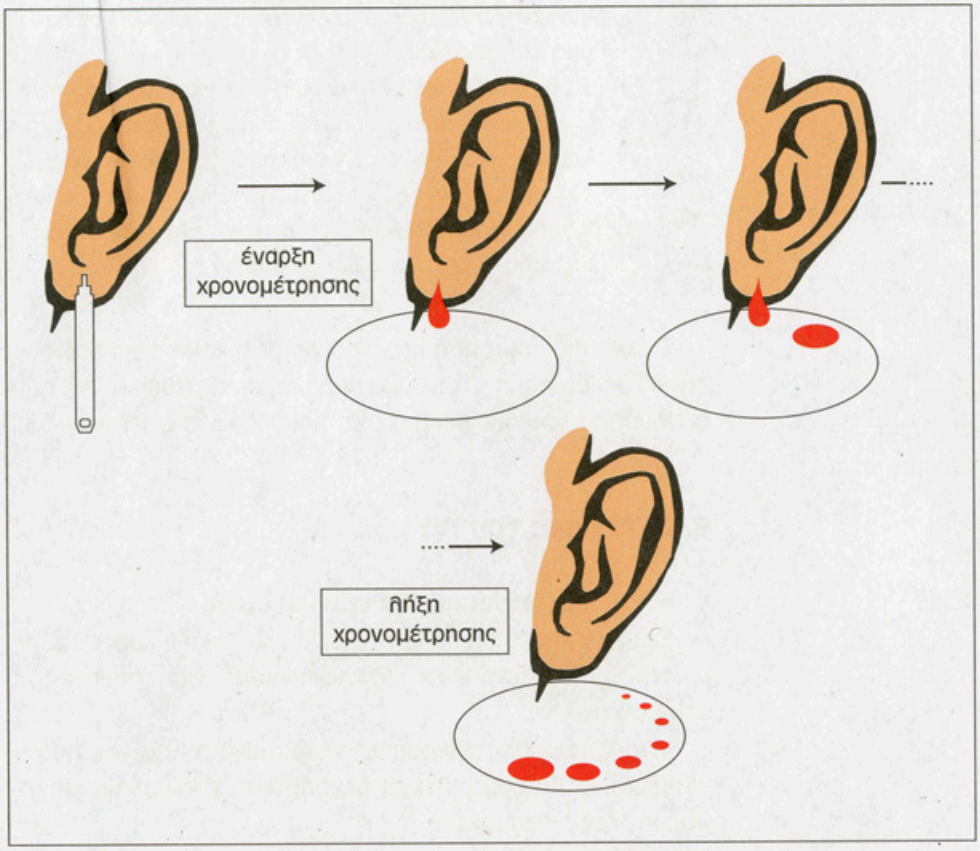
ΠΡΟΣΟΧΗ!
Το διηθητικό χαρτί δεν πρέπει να ακουμπήσει στην πληγή.

Μετά από 15 δευτερόλεπτα:
7. Απορροφούμε τη δεύτερη σταγόνα.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Δεν ακουμπάμε την πληγή. Εάν αποσπαστεί ο σχηματιζόμενος θρόμβος θα έχουμε πλασματική παράταση του χρόνου ροής.

8. Συνεχίζουμε ανά 15 δευτερόλεπτα, μέχρι να σταματήσει να τρέχει αίμα.

Με το σταμάτημα της ροής σταματάμε και το χρονόμετρο.
Καταγράφουμε το χρόνο που κράτησε η αιμορραγία.



Εικόνα 9.3: Χρόνος ροής κατά Duke

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

Ο χρόνος ροής σε φυσιολογικά άτομα είναι:
1 – 4 λεπτά της ώρας.

Μέσα στο χρονικό αυτό διάστημα θα πρέπει τα αιμοπετάλια **να συσσωρευτούν** στο σημείο του τραυματισμού, **να προσκολληθούν** επάνω στο ενδοθήλιο του αγγείου, το οποίο πρέπει στη συνέχεια **να συσπαστεί** για να σταματήσει η αιμορραγία.

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Η μεγάλη κατανάλωση οινοπνεύματος παρατείνει το χρόνο ροής.

Η λήψη ασπιρίνης πρέπει να διακοπεί 3 τουλάχιστον ημέρες πριν την εξέταση.

Εάν η εξέταση γίνει σε συνθήκη πολύ χαμηλής ή πολύ υψηλής θερμοκρασίας, επηρεάζονται τα αποτελέσματα με ελάττωση και παράταση αντίστοιχα του χρόνου ροής.

Εάν σημειωθεί χρόνος μεγαλύτερος από 6 λεπτά επαναλαμβάνεται ο προσδιορισμός με περισσότερο ευαίσθητες τεχνικές, π.χ. χρόνος ροής κατά Ivy.

Εκτός από την απλή και διαδεδομένη τεχνική προσδιορισμού χρόνου ροής κατά Duke υπάρχει και η μέθοδος IVY που συνδυάζει τη φιλοσοφία του χρόνου ροής και της περιχειρίδας.

9.4. Τεχνική του IVY

- **Πότε επιλέγουμε την τεχνική αυτή;**

Σε περίπτωση που με την τεχνική του Duke ο χρόνος ροής βρίσκεται παρατεταμένος, καταφεύγουμε για επαλήθευση στην τεχνική Ivy.

Είναι δοκιμασία περισσότερο πολύπλοκη από την προηγούμενη, αλλά ανιχνεύει με μεγαλύτερη ευαισθησία τις αιμορραγικές διαταραχές.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- σφυγμομανόμετρο
- χρονόμετρο χειρός
- γάντια
- βαμβάκι
- οινόπνευμα
- σκαριφιστήρα
- δοχείο απόρριψης αιχμηρών αντικειμένων
- διηθητικό χαρτί κομμένο σε τετράγωνο σχήμα
- απορριμματοδοχείο
- διάλυμα Betadine
- Αποστειρωμένος αυτοκόλλητος επίδεσμος (π.χ. Hansaplast)

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Βάζουμε γύρω από το βραχίονα του εξεταζομένου την περιχειρίδα του σφυγμομανομέτρου.

2. Κάνουμε αντισηψία σε μία περιοχή του αντιβραχίονα χωρίς επιφανειακές φλέβες.

ΠΡΟΣΟΧΗ !
Εάν γίνει διατομή μεγαλύτερου αιμοφόρου αγγείου, η δοκιμασία σταματά και επιλέγουμε κατάλληλο σημείο στο άλλο χέρι.
Πετάμε το βαμβάκι της αντισηψίας στο απορριμματοφόρο δοχείο.

3. Φουσκώνουμε την περιχειρίδα μέχρι τα 40 mmHg.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Η πίεση που ασκείται πρέπει να είναι σταθερή σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

4. **Βάζουμε σε λειτουργία το χρονόμετρο** μόλις φανεί έστω και λίγο αίμα μετά τη νύξη του δέρματος.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Πετάμε το σκαριφιστήρα στο ειδικό δοχείο για τα αιχμηρά αντικείμενα.

5. Απορροφούμε με διηθητικό χαρτί το αίμα.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Το διηθητικό χαρτί δεν ακουμπά στην τομή.

6. Συνεχίζουμε να απορροφούμε το αίμα που αναβλύζει, κάθε 10 δευτερόλεπτα.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Τοποθετούμε απαλά το διηθητικό χαρτί επάνω στο αίμα για να μην παρασύρουμε το θρόμβο.

Όταν σταματήσει η τομή να δίνει αίμα:

7. Σταματάμε το χρονόμετρο και καταγράφουμε το χρόνο.

8. Βγάζουμε την περιχειρίδα από το βραχίονα του εξεταζομένου.

9. Επαλείφουμε με αντισηπτικό διάλυμα (π.χ. Betadine) την τομή και την καλύπτουμε με αποστειρωμένο αυτοκόλλητο επίδεσμο.

ΔΕΝ ΞΕΧΝΩ!

Κάθε παραβίαση της ακεραιότητας της επιδερμίδας είναι ένα πέρασμα για τα μικρόβια τα οποία προκαλούν σοβαρότατες λοιμώξεις.

Πετάμε το βαμβάκι της αντισηψίας στο απορριμματοφόρο δοχείο.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

Ο χρόνος ροής σε φυσιολογικά άτομα διαρκεί:
2 – 9 λεπτά.
Ορισμένα εργαστήρια δίνουν χρόνο ροής 7 λεπτά.

Παράταση του χρόνου ροής έχουμε στις παρακάτω περιπτώσεις:

- θρομβοπενία
- απλαστική αναιμία
- διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη
- βαριά ηπατοπάθεια, κ.λπ.

9.5. Μέθοδος μέτρησης του χρόνου πήξης σε αντικειμενοφόρο πλάκα

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- **Τι είναι ο χρόνος πήξης;**

Χρόνος πήξης είναι ο χρόνος που χρειάζεται για να πήξει μία ποσότητα αίματος έξω από τον οργανισμό του ανθρώπου.

Με τον προσδιορισμό αυτό ελέγχουμε την ποιότητα και την ποσότητα των αιμοπεταλίων κατά την πρώτη φάση της αιμόστασης.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε τριχοειδικό αίμα.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Μπορούμε να υποβοηθήσουμε το αίμα να αναβλύσει πέζοντας με τη ράγα του δαχτύλου **απαλά**, ώστε να μην αναμειχθεί το αίμα με υγρά του τραυματισμένου ιστού. Η παρουσία των ιστικών υγρών συντομεύει την πήξη του αίματος.

ΟΡΓΑΝΑ ΥΛΙΚΑ, ΣΚΕΥΗ

- χρονόμετρο χειρός
- γάντια
- αντικειμενοφόρος πλάκα
- βελόνα σύριγγας ή σκαριφιστήρα
- δοχείο απόρριψης αιχμηρών αντικειμένων

Ας θυμηθούμε τον τρόπο λήψης τριχοειδικού αίματος.

Οι ακραίες θερμοκρασίες περιβάλλοντος έξω από το όριο των 18°-22°C επηρεάζουν ανάλογα το χρόνο πήξης.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Βάζουμε την πρώτη κατάλληλη σταγόνα στο κέντρο της αντικειμενοφόρου πλάκας και **βάζουμε σε λειτουργία το χρονόμετρο**.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Στο αίμα δεν πρέπει να υπάρχει το παραμικρό ίχνος ιστού από τη νύξη του δέρματος.
Η διάμετρος της σταγόνας του αίματος να είναι περίπου 5 mm.

ΑΣ ΘΥΜΗΘΟΥΜΕ:
Η αντικειμενοφόρος πλάκα πρέπει να είναι σχολαστικά καθαρή.

2. Περιμένουμε 2 λεπτά.

3. Βαπτίζουμε την άκρη μιας βελόνας μέσα στη σταγόνα του αίματος με φορά παράλληλη προς την επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας.

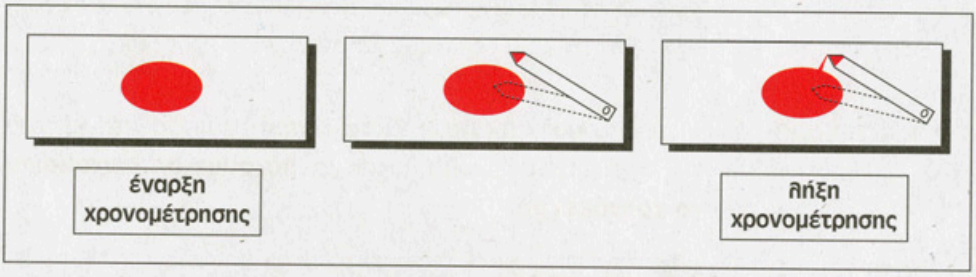
4. Ανασηκώνουμε τη βελόνα αργά και παρατηρούμε εάν σχηματίστηκαν "κλωστές" ινικής.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Εάν ανασηκώσουμε απότομα τη βελόνα, υπάρχει κίνδυνος να αποσπαστεί η ινική με αποτέλεσμα να κάνουμε αναξιόπιστη χρονομέτρηση.

Επαναλαμβάνουμε κατά διαστήματα τους χειρισμούς των σταδίων Νο 3 και 4.

5. Σταματάμε το χρονόμετρο μόλις το άκρο της βελόνας συγκρατήσει "κλωστές" ινικής και καταγράφουμε το χρόνο που απαιτήθηκε για να πήξει η σταγόνα του αίματος.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Πετάμε τη βελόνα μέσα στο ειδικό δοχείο για τα αιχμηρά αντικείμενα.



Εικόνα 9.4: *Σχηματισμός ινικής (χρόνος πήξης)*

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

Ο χρόνος πήξης σε φυσιολογικά άτομα είναι:
4 – 8 λεπτά.

9.6. Μέθοδος μέτρησης του χρόνου πήξης σε δοκιμαστικό σωληνάριο ή μέθοδος LEE - WHITE

Επειδή κατά τη λήψη φλεβικού αίματος, ο κίνδυνος να ανακατευτεί υγρό των ιστών με το αίμα είναι μικρότερος, εκτελούμε την τεχνική των Lee και White.

Ας θυμηθούμε τον τρόπο λήψης φλεβικού αίματος.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε 5 ml φλεβικού αίματος

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Βάζουμε σε λειτουργία το χρονόμετρο μόλις φανεί αίμα μέσα στη σύριγγα.

Προσέχουμε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες κατά την ώρα της λήψης.

Εάν δεν παρακεντηθεί εύκολα η φλέβα, επιχειρούμε φλεβοπαρακέντηση στο άλλο χέρι για να αποφύγουμε την παρουσία ιστικών υγρών στο δείγμα.

Μετά την αιμοληψία δεν πωματίζουμε τη βελόνα, αλλά την αφαιρούμε από τη σύριγγα περνώντας τη από την ειδική εγκοπή του δοχείου αιχμηρών αντικειμένων.

ΟΡΓΑΝΑ
ΥΛΙΚΑ, ΣΚΕΥΗ

- υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C
- χρονόμετρο χειρός
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- γάντια
- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων (στατώ)
- δοκιμαστικά σωληνάρια διαμέτρου 8 mm
- υαλογράφος

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Αριθμούμε 4 δοκιμαστικά σωληνάρια με υαλογράφο και τα τοποθετούμε σε έδρανο.

Τα σωληνάρια πρέπει να είναι σχολαστικά καθαρά.

Η διάμετρος όλων των δοκιμαστικών σωληναρίων να είναι 8 mm. Εάν χρησιμοποιηθούν σωληνάρια μικρότερης διαμέτρου, η πήξη του αίματος γίνεται συντομότερα.

2. Αφήνουμε τα σωληνάρια για 5 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C.

3. Ανασηκώνουμε ένα ένα τα σωληνάρια και βάζουμε ακριβώς 1 ml αίμα.

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Προσέχουμε να μην πέσουν σταγόνες από το νερό του υδατόλουτρου μέσα στα σωληνάρια.

Μοιράζουμε στα σωληνάρια το αίμα αργά χωρίς τη βελόνα της σύριγγας για να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες.

Πετάμε τη βελόνα στο ειδικό δοχείο συγκέντρωσης των αιχμηρών αντικειμένων.

Η διανομή γίνεται προσεχτικά για να μην τρέξει αίμα στην εξωτερική επιφάνεια του σωληναρίου και λερωθεί το νερό του υδατόλουτρου.

Ο όγκος του αίματος επηρεάζει ανάλογα το χρόνο πήξης.

Το 1 ml αίματος που απομένει μέσα στη σύριγγα δεν το χρησιμοποιούμε.

4. Περιμένουμε 2 λεπτά.

5. Γέρνουμε αργά, με μικρή κλίση, με τη σειρά ένα - ένα τα σωληνάρια και ελέγχουμε εάν έπηξε το αίμα.

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Ο τρόπος κίνησης των σωληναρίων επηρεάζει το χρόνο πήξης του αίματος.

6. Επαναλαμβάνουμε τον ίδιο χειρισμό μετά 1 λεπτό και επανελέγχουμε κατά διαστήματα 30 δευτερολέπτων.

Θεωρούμε ότι έγινε η πήξη όταν το αίμα δεν κυλά στα τοιχώματα του σωληναρίου.

ΠΡΟΣΟΧΗ!

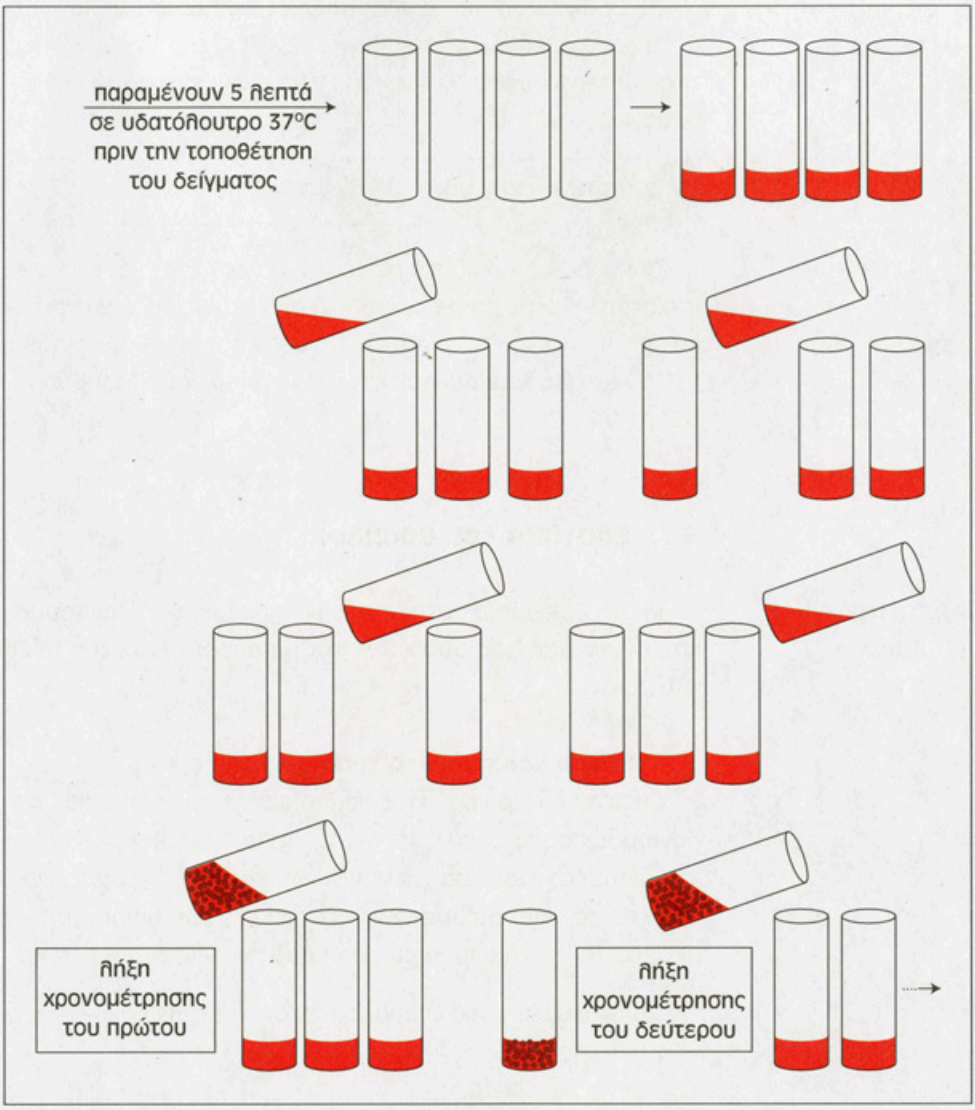
Η κλίση που γέρνουμε τα σωληνάρια μεγαλώνει σε μοίρες όσο περνά ο χρόνος της διαδικασίας.

Εάν η συχνότητα κίνησης είναι μεγαλύτερη, το αίμα πήζει νωρίτερα.

7. Καταγράφουμε το χρόνο. Συνεχίζουμε με τους ίδιους χειρισμούς μέχρι να καταγράψουμε το χρόνο πήξης του δεύτερου σωληναρίου κ.ο.κ.

8. Υπολογίζουμε το χρόνο πήξης του εξεταζόμενου αφού βρούμε τη μέση τιμή του χρόνου πήξης όλων των σωληναρίων. Δηλαδή:

$$\text{Χρόνος πήξης εξεταζομένου} = \frac{\text{Χρόνος πήξης 1ου + 2ου + 3ου + 4ου σωληναρίου}}{4}$$



Εικόνα 9.5 : *Χρόνος πήξης κατά Lee – White*

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

Ο χρόνος πήξης σε φυσιολογικά άτομα είναι 6 – 12 λεπτά της ώρας.

Παραλλαγές της τεχνικής:

α) Σε θερμοκρασία δωματίου.

Φυσιολογικές τιμές 5 – 18 λεπτά

β) Σε δοκιμαστικά σωληνάρια με επάλειψη σιλικόνης.

Έχει το πλεονέκτημα ότι λόγω μεγάλου εύρους τιμής είναι περισσότερο σαφής η διάκριση μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού χρόνου.

Φυσιολογικές τιμές 12 – 20 λεπτά

Οι τεχνικές αυτές, στα περισσότερα εργαστήρια, έχουν αντικατασταθεί με άλλες, μεγαλύτερης ακρίβειας, όπως τεχνική μέτρησης του χρόνου πήξης μερικής θρομβοπλαστικής (PTT) και του χρόνου πήξης ενεργοποιημένης θρομβοπλαστίνης (APTT).

9.7. Συστολή του θρόμβου

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Με τη δοκιμασία αυτή υπολογίζουμε ποιοτικά και ποσοτικά την ένταση της συστολής του θρόμβου μετά την πήξη του αίματος.

- **Ποια η χρησιμότητα του προσδιορισμού;**

Είναι η δεύτερη βασική δοκιμασία μετά τη δοκιμασία υπολογισμού του χρόνου ροής με την οποία μπορούμε να ανιχνεύσουμε διαταραχές των αγγείων και των αιμοπεταλίων. Μαζί με τα αποτελέσματα της μέτρησης των αιμοπεταλίων μπορούμε να κάνουμε διάγνωση ομάδων νοσημάτων, π.χ.:

- διαταραχές συσσώρευσης των αιμοπεταλίων
- θρομβοπενίες
- αγγειακές βλάβες

Την παραπάνω δοκιμασία μπορούμε να εκτελέσουμε και ως συνέχεια της δοκιμασίας μέτρησης του χρόνου πήξης.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε 2 ml φλεβικό αίμα

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Εάν υπάρχει πολυκυτταραιμία, η συστολή του θρόμβου θα είναι μειωμένη.

Πρέπει να αποφεύγεται η λήψη αίματος με συσκευή "πεταλούδα".

Μετά την αιμοληψία δεν πωματίζουμε τη βελόνα, αλλά την αφαιρούμε από τη σύριγγα περνώντας τη από την ειδική εγκοπή του δοχείου αιχμηρών αντικειμένων.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- υδατόλουτρο
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- γάντια
- αυτόματη πιπέτα
- υαλογράφος
- πλαστικά δοκιμαστικά σωληνάρια
- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- ξύλινο ραβδάκι
- σιφώνια Pasteur
- ογκομετρικό δοκιμαστικό σωληνάριο
- ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10

Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα ρύγχοι, σιφώνια 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. Σημειώνουμε με υαλογράφο τα στοιχεία του εξεταζόμενου στο δοκιμαστικό σωληνάριο.

2. Βάζουμε μέσα 2 ml φλεβικό αίμα, τοποθετούμε το σωληνάριο σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 3 ώρες και βάζουμε σε λειτουργία το χρονόμετρο.

3. Ελέγχουμε την πρώτη ώρα αν σχηματίστηκε θρόμβος και αν αποκολλάται από τα τοιχώματα του σωληναρίου. Αν δεν αποκολλάται, ανασηκώνουμε το σωληνάριο και με ένα ξύλινο ραβδάκι πιέζουμε περιφερικά για να τον αποκολλήσουμε.

4. Επανατοποθετούμε το σωληνάριο στο υδατόλουτρο μέχρι να ολοκληρωθεί ο χρόνος της τεχνικής.

5. Παρατηρούμε τη μορφή, το μέγεθος και τη θέση του θρόμβου.

Αν ζητηθεί ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου ορού τότε:

6. Αναρροφούμε με σιφώνιο Pasteur τον ορό που έχει αναβλύσει και τον μεταφέρουμε σε ογκομετρικό δοκιμαστικό σωληνάριο.

Για την ασφάλεια όλων φροντίζουμε οι πάγκοι εργασίας να μην λερωθούν με βιολογικά υγρά, γι' αυτό βάζουμε το σιφώνιο Pasteur στο διάλυμα χλωρίνης.

7. Αποστραγγίζουμε το θρόμβο και τον πετάμε σε απορριμματοδοχείο.

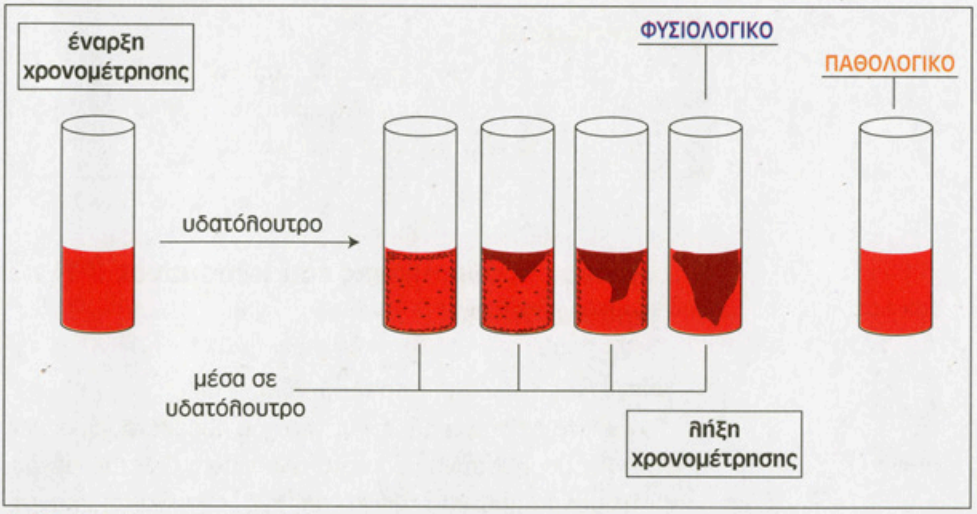
8. Αναρροφούμε τον υπόλοιπο ορό και το βάζουμε στο ογκομετρικό σωληνάριο.

ΝΑ ΜΗΝ ΞΕΧΝΑΜΕ!

Πετάμε το σιφώνιο στο διάλυμα χλωρίνης.

9. Υπολογίζουμε τον όγκο του παραγόμενου ορού εφαρμόζοντας τον τύπο:

$$\text{ικανότητα συστολής του θρόμβου } \% = \frac{\text{όγκος ορού}}{\text{όγκος φλεβικού αίματος}} \times 100$$



Εικόνα 9.6 : *Σχηματισμός θρόμβου*

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α. Ποιοτική εκτίμηση:

Το αποτέλεσμα της δοκιμασίας θεωρείται:

α. Φυσιολογικό όταν ο θρόμβος έχει **συρρικνωθεί**, **αιωρείται** μέσα στον παραγόμενο ορό και **διατηρεί το σχήμα του σωληναρίου** από το οποίο απομακρύνθηκε.

β. Παθολογικό στις εξής περιπτώσεις:

α. Όταν δε σχηματιστεί θρόμβος.

β. Όταν σχηματιστεί θρόμβος αλλά:

β1. Δεν αιωρείται μέσα στον παραγόμενο ορό.

β2. Δεν αποκολλάται από τα τοιχώματα του δοκιμαστικού σωληναρίου.

β3. Είναι λεπτός και καταστρέφεται εύκολα.

β4. Αφού αποκολληθεί από το σωληνάριο, γίνεται μία άμορφη μάζα.

Β. Ποσοτική εκτίμηση:

70 – 100%

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Ο τρόπος και ο χρόνος συστολής του θρόμβου επηρεάζεται από: Την τιμή του αιματοκρίτη, τον αριθμό των αιμοπεταλίων και την τιμή του ινωδογόνου.

9.8. Χρόνος προθρομβίνης του πλάσματος (PT) ή χρόνος QUICK

- **Τι είναι ο χρόνος προθρομβίνης;**

Το χρονικό διάστημα από τη στιγμή που προσθέτουμε ασβεστιούχο θρομβοπλαστίνη μέσα στο πλάσμα του εξεταζομένου μέχρι τη στιγμή που θα πήξει το πλάσμα, ονομάζεται **χρόνος προθρομβίνης**.

Η προθρομβίνη είναι η ανενεργή – πρόδρομη ουσία της θρομβίνης. Κατά τον μηχανισμό της πήξης μετατρέπεται σε θρομβίνη με την επίδραση της θρομβοπλαστίνης.

προθρομβίνη —θρομβοπλαστίνη—> θρομβίνη

- **Τι ελέγχουμε με τη δοκιμασία αυτή;**

Με τη δοκιμασία προσδιορισμού του χρόνου προθρομβίνης:

- Εξετάζουμε αν έγιναν μεταβολές στους παράγοντες του εξωγενούς συστήματος πήξης.
- Εντοπίζουμε διαταραχές στο μηχανισμό του δεύτερου σταδίου πήξης του αίματος.

- **Πότε χρειάζεται να γίνει αυτή η τεχνική;**

Η τεχνική γίνεται πάντα σε περιπτώσεις:

- ηπατικής βλάβης
- για τη ρύθμιση της αντιπηκτικής αγωγής (λήψη αντιπηκτικών από το στόμα)
- πριν από εγχείρηση (προφύλαξη από φλεβική θρόμβωση)

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η παρουσία της ασβεστούχου ιστικής θρομβοπλαστίνης ενεργοποιεί τους παράγοντες του προθρομβονικού συμπλέγματος (ΙΙ,V,VII και X) με αποτέλεσμα το πλάσμα να πήξει.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε πλάσμα ολικού αίματος σε κιτρικό νάτριο.

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Η λήψη του αίματος πρέπει να γίνει σε σωληνάρια κενού (τεχνική Vacutainer).

Αν υπάρχουν ιστικά υγρά μέσα στο πλάσμα, ο χρόνος προθρομβίνης συντομεύεται.

Η αναλογία του κιτρικού νατρίου με το αίμα πρέπει να είναι 4,5 ml αίμα σε 0,5 ml αντιπηκτικό.

Η ανάμειξη πρέπει να γίνει γρήγορα και προσεκτικά για να μη δημιουργηθούν θρόμβοι.

Πλάσμα που παρέμεινε 4 ώρες μετά τη λήψη του ολικού αίματος είναι ακατάλληλο για τον προσδιορισμό.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Ιστική θρομβοπλαστίνη με χλωριούχο ασβέστιο ($CaCl_2$) σε ξηρή (λυοφιλοποιημένη) μορφή: Περιέχει απόσταγμα εγκεφάλου ή πνεύμονα ή πλακούντα από κουνέλι ή βοοειδές. Μεγαλύτερη ευαισθησία για περισσότερους παράγοντες πήξης έχει η λευκωματίνη που προέρχεται από εγκέφαλο κουνελιού, είτε μόνη της είτε με $CaCl_2$. Πριν από τη χρήση του $CaCl_2$ γίνεται ανασύσταση σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας στους $\pm 4^{\circ}C$ για 7 ημέρες.

2. Πλάσμα φυσιολογικού ατόμου (plasma control) ή μείγμα πλασμάτων φυσιολογικών ατόμων:Χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων (οι χρόνοι που δίνει λαμβάνονται ως οι φυσιολογικοί)

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Όλα τα αντιδραστήρια προθερμαίνονται στους $37^{\circ}C$ για 15 λεπτά. Αν παραταθεί ο χρόνος, τα αντιδραστήρια θα αλλοιωθούν.

Στην περίπτωση της αιμορροφιλίας ο χρόνος προθρομβίνης είναι φυσιολογικός, επειδή η πλήρης θρομβοπλαστίνη δεν ανιχνεύει την έλλειψη του παράγοντα VIII.

ΟΡΓΑΝΑ ΥΛΙΚΑ, ΣΚΕΥΗ

- υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C
- χρονόμετρο χειρός
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- γάντια
- υαλογράφος
- πλαστικά δοκιμαστικά σωληνάρια εσωτερικής διαμέτρου 8 mm
- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- αυτόματες πιπέτες
- ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10

Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα ρύγχη, 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 σε ένα δοκιμαστικό σωληνάριο αιμολύσεως και σε ένα άλλο την ένδειξη Μ (Μάρτυρας).

Υπενθυμίζουμε ως προς τα σωληνάρια: Τα σωληνάρια πρέπει να έχουν εσωτερική διάμετρο 8 mm και να είναι πολύ καθαρά.

2. Τοποθετούμε δοκιμαστικά σωληνάρια σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C για 5 λεπτά.

3. Βάζουμε 0,1ml πλάσμα του εξεταζόμενου στο αντίστοιχο σωληνάριο και 0,1 ml πλάσμα μάρτυρα στο αντίστοιχο σωληνάριο.

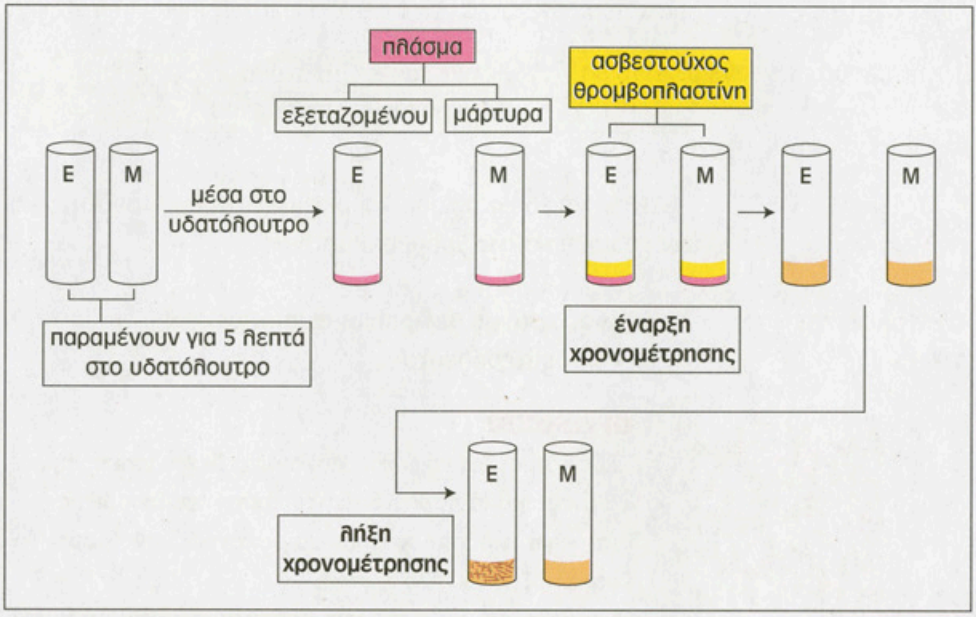
4. Προσθέτουμε 0,2 ml διαλύματος ασβεστούχου θρομβοπλαστίνης στο εξεταζόμενο δείγμα και **βάζουμε σε λειτουργία το χρονόμετρο**.

5. Ανασηκώνουμε το σωληνάριο από το υδατόλουτρο, το κινούμε για 10 δευτερόλεπτα, ώστε να αναμειχθούν τα υλικά και το επανατοποθετούμε στο υδατόλουτρο.

6. Ελέγχουμε αν σχηματίστηκε ή δε σχηματίστηκε ινώδες με απαλή ανακίνηση του σωληναρίου σε λοξή θέση.

7. **Σταματάμε το χρονόμετρο**, μόλις παρατηρηθεί σχηματισμός ινώδους, και καταγράφουμε το χρόνο.

8. Επαναλαμβάνουμε τους ίδιους χειρισμούς των σταδίων Νο 3, 4, 5 και 6 για το δείγμα του μάρτυρα.



Εικόνα 9.7: Χρόνος Προθρομβίνης

9. Υπολογίζουμε το χρόνο προθρομβίνης. Ανάλογα με τον τρόπο υπολογισμού εκφράζεται με δύο τρόπους:

α. ***Ως πηλίκο*** του χρόνου του ενός δείγματος σε σχέση με το χρόνο του άλλου δείγματος. Όταν το άλλο δείγμα είναι η θρομβοπλαστίνη διεθνούς αναφοράς, τότε το πηλίκο εκφράζεται ως αναλογία (Ratio) προσαρμοσμένη στα διεθνή δεδομένα και λέμε ότι είναι I.N.R. (= International Normalized Ratio)

$$\text{I.N.R. ή } R = \frac{\text{χρόνος εξεταζόμενου}}{\text{χρόνος μάρτυρα}}$$

Ο τρόπος αυτός υπολογισμού του χρόνου προθρομβίνης έγινε για να μην δημιουργείται σύγχυση στη ρύθμιση της αντιπηκτικής αγωγής λόγω διαφορετικών εργαστηριακών αποτελεσμάτων.

β. *Ως αριθμητική σχέση* της μέτρησης του χρόνου του εξεταζόμενου προς το χρόνο του μάρτυρα . Η σχέση αυτή συγκρίνεται με το σταθερό πρότυπο θρομβοπλαστίνης (Index) χρησιμοποιώντας ειδικές καμπύλες αναφοράς. Ο δείκτης που προκύπτει λέγεται I.S.I (= International Sensitivity Index).

$$\text{I.S.I. ή I} = \frac{\text{χρόνος μάρτυρα}}{\text{χρόνος εξεταζόμενου}} \times 100$$

Είναι ένας δείκτης που χαρακτηρίζει τη δραστικότητα και την ευαισθησία της θρομβοπλαστίνης.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

- **Ποιος χρόνος θεωρείται φυσιολογικός;**

11 – 14 δευτερόλεπτα.

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Κάθε εργαστηριακή μεθοδολογία δίνει διαφορετικές τιμές.

Τα αντιπηκτικά παρατείνουν το χρόνο προθρομβίνης.

Διατροφή πλούσια σε πράσινα λαχανικά συντομεύει το χρόνο πήξης του πλάσματος.

Η υπερβολική κατανάλωση οινοπνευματωδών παρατείνει σημαντικά το χρόνο προθρομβίνης.

Καταστάσεις αφυδάτωσης του οργανισμού συντομεύουν το χρόνο προθρομβίνης.

Αυξημένες τιμές χρόνου προθρομβίνης έχουμε σε περιπτώσεις:

1. Έλλειψης βιταμίνης Κ

2. Αιμορραγικής νόσου των νεογνών

3. Δηλητηρίασης από σαλικυλικά, κ.λπ.

Ελαττωμένες τιμές χρόνου προθρομβίνης έχουμε σε περιπτώσεις:

Υπερλειτουργίας ωοθηκών, κ.λπ.

9.9. Προσδιορισμός του χρόνου μερικής θρομβοπλαστίνης ενεργοποιημένης με καολίνη

Ας θυμηθούμε:

Για την εκτέλεση της ***τεχνικής του χρόνου πήξης*** (βλέπε προηγούμενη διδακτική ενότητα) χρησιμοποιείται διάλυμα θρομβοπλαστίνης με μεγάλη ευαισθησία για την ανίχνευση πολλών παραγόντων. *Παρ'όλα αυτά δεν ανιχνεύεται η έλλειψη του παράγοντα VIII (αιμορροφιλία).*

Ύστερα από έρευνες διαπιστώθηκε ότι αν χρησιμοποιηθεί λιγότερο ισχυρή θρομβοπλαστίνη, δηλαδή θρομβοπλαστίνη μερικής ευαισθησίας, στο πλάσμα που προέρχεται από αιμορροφιλικό άτομο, θα πάρουμε σαφή αποτελέσματα, τα οποία θα μας επιτρέψουν να κάνουμε καλύτερη διάγνωση.

Επίσης παρατήρησαν ότι και πολλοί άλλοι παράγοντες του ενδογενούς συστήματος πήξης ανιχνεύτηκαν με αξιοπιστία, όταν προστέθηκε καολίνη-κεφαλίνη (μέθοδος προσδιορισμού χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης). Όλα αυτά έδωσαν στη μέθοδο αξία, γι' αυτό είναι διαδεδομένη.

Η μέθοδος ελέγχου ηκτικότητας χρόνου μερικής θρομβοπλαστίνης PTT χρησιμοποιείται για τον προσυμπτωματικό έλεγχο των διαταραχών του ενδογενούς συστήματος πήξης. Η μέθοδος ελέγχου ηκτικότητας Activated Partial Thromboplastin Time APTT ελέγχει τις ίδιες λειτουργίες και επιπλέον χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση των ατόμων που ακολουθούν αντιηκτική αγωγή με ηπαρίνη.

- **Υπάρχει θρομβοπλαστίνη στον ανθρώπινο οργανισμό;**

Η θρομβοπλαστίνη στον οργανισμό παράγεται στο πλάσμα και βρίσκεται σε όλους τους ιστούς του σώματος. Κατά το μηχανισμό της πήξης επιδρά στην προθρομβίνη και τη μετατρέπει σε θρομβίνη.

- **Τι είναι ο χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης;**

Ως χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης ορίζεται το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την πήξη πλάσματος που

επωάστηκε με καολίνη – κεφαλίνη, μόλις αυτό έρθει σε επαφή με $CaCl_2$.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε πλάσμα προθερμασμένο σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C.

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Το πλάσμα να έχει διαχωριστεί από ολικό αίμα σε κιτρικό νάτριο τηρώντας τις αναλογίες.

Ο προσδιορισμός πρέπει να γίνει μέσα σε 2 ώρες από το διαχωρισμό του πλάσματος.

Το πλάσμα δεν πρέπει να έχει ίχνη αιμόλυσης.

Εάν δε γίνει αμέσως η εξέταση, το πλάσμα μπορεί να καταψυχθεί στους – 20°C.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Ατελής θρομβοπλαστίνη. Το Thrombofax είναι ένα από τους τύπους αντιδραστηρίων που κυκλοφορούν στο εμπόριο. Βρίσκεται σε ξηρή μορφή και είναι μείγμα Καολίνης και Κεφαλίνης. Ακολουθούμε πιστά τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας για την ανασύσταση και τη συντήρησή του. Στις συσκευασίες του εμπορίου κυκλοφορεί και ως Kontact APTT.

2. Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$). Είναι έτοιμο και διατηρείται στους ±4°C και έχει καθορισμένο χρόνο λήξης.

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Προθερμαίνουμε μικρές ποσότητες από τα αντιδραστήρια σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 15 λεπτά σε διαφορετικά δοκιμαστικά σωληνάρια.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C
- χρονόμετρο χειρός
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- γάντια
- υαλογράφος
- πλαστικά δοκιμαστικά σωληνάρια εσωτερικής διαμέτρου 8 mm
- έδρανο στήριξης
- αυτόματες πιπέτες
- ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10

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

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε με υαλογράφο τις ενδείξεις "Ε" (εξεταστέο) και "Μ" (μάρτυρας) σε δύο δοκιμαστικά σωληνάρια.

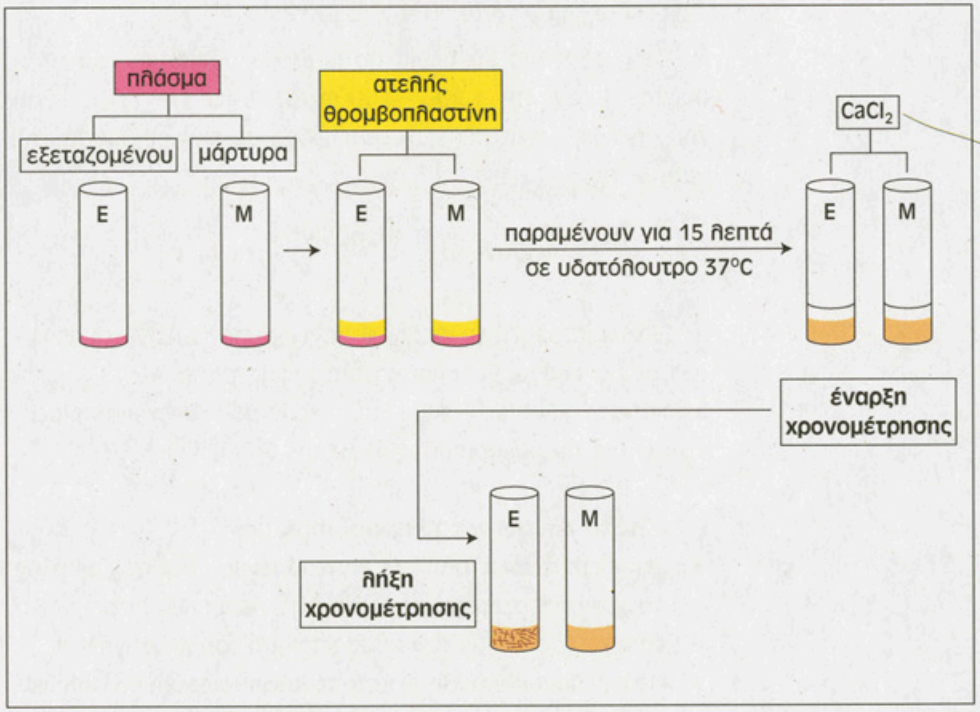
2. Βάζουμε 0,1 ml πλάσματος του εξεταζόμενου και 0,1 ml πλάσματος μάρτυρα στα αντίστοιχα δοκιμαστικά σωληνάρια.

3. Προσθέτουμε 0,1 ml ατελούς θρομβοπλαστίνης (Thrombofax) και στα δύο σωληνάρια.

4. Ανακινούμε για να αναμειχθούν και τοποθετούμε τα σωληνάρια σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για15 λεπτά.

5. Προσθέτουμε 0,1 ml $CaCl_2$ και στα δύο σωληνάρια και **βάζουμε σε λειτουργία το χρονόμετρο**.

6. **Σταματάμε το χρονόμετρο μόλις δημιουργηθεί πλασματικός θρόμβος** και καταγράφουμε το χρόνο.



Εικόνα 9.8: Χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

Στα φυσιολογικά άτομα ο χρόνος πήξης του πλάσματος είναι 20-40 δευτερόλεπτα.

Ο χρόνος Ρ.Τ. είναι παρατεταμένος σε καταστάσεις:

- αιμορροφιλίας Α και Β
- ηπαρινοπάθειας
- έλλειψης βιταμίνης, κ.λπ.

Ο χρόνος Ρ.Τ. είναι μειωμένος σε καταστάσεις:

- νεοπλασιών
- οξείας αιμορραγίας, κ.λπ.

9.10. Προσδιορισμός ινωδογονου μέθοδος CLAUSS

Είναι η καλύτερη μέθοδος προσδιορισμού του ινωδογόνου, γιατί προσδιορίζει το βιολογικά ενεργό ινωδογόνο.

Ας θυμηθούμε:

Το ινωδογόνο είναι μία πολύπλοκη πρωτεΐνη του πλάσματος σε αναλογία 200 – 400 mg/dl. Κατά την τρίτη φάση της πήξεως, μετατρέπεται σε ινώδες με την επίδραση της θρομβίνης.

$$\text{ινωδογόνο} = \xrightarrow{\text{θρομβίνη}} \text{ινώδες}$$

Εκτός από αυτή τη βιοχημική αντίδραση, αυξάνεται σε καταστάσεις φλεγμονών και καταστροφής των ιστών. Ο προσδιορισμός του λοιπόν, είναι διπλά χρήσιμος και έχει αντικαταστήσει τον προσδιορισμό χρόνου της θρομβίνης.

- **Πότε κάνουμε τον προσδιορισμό;**

- Στις περιπτώσεις που οι προηγούμενες δοκιμασίες πήξης έδωσαν παρατεταμένους χρόνους, πρέπει να διερευνηθεί το αποτέλεσμα με τον προσδιορισμό του ινωδογόνου.
- Για την παρακολούθηση καταστάσεων ινωδόλυσης και διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το ζητούμενο είναι ο χρόνος που χρειάζεται το αραιωμένο πλάσμα του εξεταζόμενου για να πήξει, μόλις έρθει σε επαφή με τη θρομβίνη.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε πλάσμα αραιωμένο με ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογία 1:10.

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Το πλάσμα δεν πρέπει να έχει ίχνη αιμόλυσης.
Ακολουθούμε προσεκτικά τις οδηγίες της εταιρείας.
Η έντονη μυϊκή άσκηση να αποφεύγεται πριν από τη λήψη του αίματος.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. **Διάλυμα θρομβίνης**
2. **Ρυθμιστικό διάλυμα:** Χρησιμοποιείται για τις αραιώσεις του πλάσματος.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C
- χρονόμετρο χειρός
- γάντια
- υαλογράφος
- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωλήνων
- πλαστικά δοκιμαστικά σωληνάρια διαμέτρου 8mm
- αυτόματη πιπέτα
- ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10

Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα ρύγχη, 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 σ' ένα δοκιμαστικό σωληνάριο.

ΠΡΟΣΟΧΗ

Στο υλικό κατασκευής, τη διάμετρο και την καθαρότητα των δοκιμαστικών σωλήνων.

2. Βάζουμε μέσα μία ποσότητα αραιωμένου πλάσματος και το επωάζουμε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 2 λεπτά.

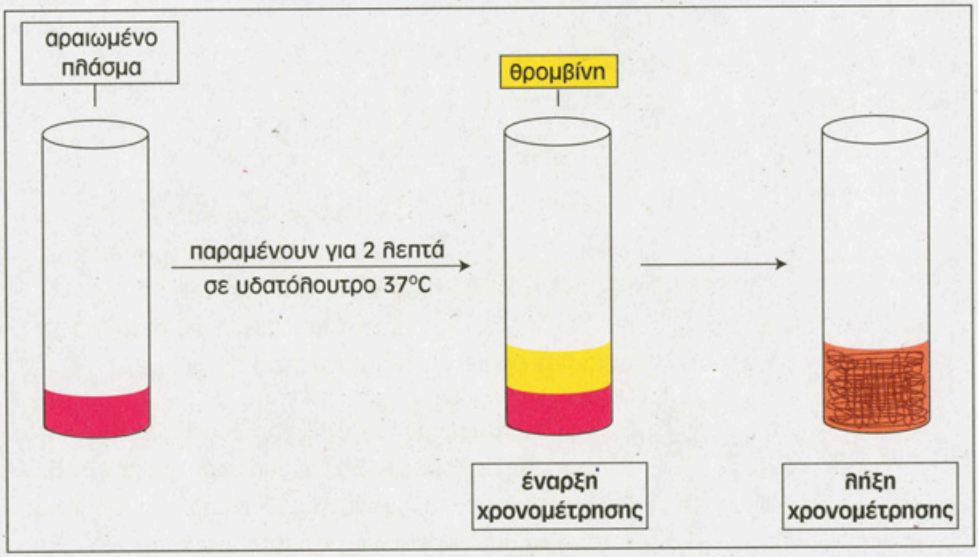
3. Προσθέτουμε ίση ποσότητα θρομβίνης και **βάζουμε σε λειτουργία το χρονόμετρο**.

4. Παρατηρούμε αν δημιουργήθηκε ή όχι ινώδες. **Μόλις σημειωθεί η πήξη καταγράφουμε το χρόνο.**

ΠΡΟΣΟΧΗ!

Αν το πλάσμα πήξει σε χρόνο μικρότερο από 5 δευτερόλεπτα επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία. Αραιώνουμε 1:20 το πλάσμα και διπλασιάζουμε τη νέα μέτρηση του χρόνου.

Αν το πλάσμα πήξει σε χρόνο μεγαλύτερο από 15 δευτερόλεπτα, επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία. Αραιώνουμε 1:5 το πλάσμα και υποδιπλασιάζουμε τη νέα μέτρηση του χρόνου.



Εικόνα 9.9: *Προσδιορισμός ινωδογόνου*

Τα αποτελέσματα δίνονται βάσει καμπύλης και εκφράζονται σε mg/dl.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

200 – 400 mg/dl

Τιμές υψηλότερες του φυσιολογικού έχουμε σε καταστάσεις:

- φλεγμονών (π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα)
- καρκίνου
- κύησης, κ.λπ.

Τιμές χαμηλότερες του φυσιολογικού έχουμε σε καταστάσεις:

- ηπατοπάθειας
- ινωδόλυσης
- διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης, κ.λπ.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Η λήψη αντισυλληπτικών επηρεάζει το αποτέλεσμα.

9.11. Thrombotest

Είναι μία δοκιμασία που ελέγχει συγχρόνως τους παράγοντες II, VII, X και IX.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε ολικό αίμα σε κιτρικό νάτριο.

Μετά την αιμοληψία δεν πωματίζουμε τη βελόνα, αλλά την αφαιρούμε από τη σύριγγα περνώντας τη από την ειδική εγκοπή του δοχείου αιχμηρών αντικειμένων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Thrombotest: Είναι έτοιμο από την εταιρεία και περιέχει βόεια εγκεφαλική θρομβοπλαστίνη με μεγάλη ευαισθησία και βόειο πλάσμα.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

- υδατόλουτρο
- χρονόμετρο χειρός
- γάντια
- υαλογράφος
- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- αυτόματες πιπέτες
- δοκιμαστικό σωληνάριο

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε τα στοιχεία του εξεταζόμενου σ' ένα γυάλινο δοκιμαστικό σωληνάριο και βάζουμε μέσα 50 μl ολικού αίματος.

2. Προσθέτουμε 250 μl αντιδραστήριο Thrombotest και **πατάμε το χρονόμετρο.**

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Το αντιδραστήριο πρέπει να έχει προθερμανθεί σε υδατόλουτρο στους 37°C

3. Παρατηρούμε πότε θα πήξει το πλάσμα και **καταγράφουμε το χρόνο.**

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Οι οδηγίες της εταιρείας πρέπει να τηρούνται σχολαστικά.
Η αξιολόγηση γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- **Τι είδους τιμές παίρνουμε;**

Ποσοστό στα εκατό (%)

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

< 50%

ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

ΟΝΟΜΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ	ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	ΑΙΜΟ-ΠΕΤΑΛΙΑ	ΣΤΑΔΙΟ			
			1ο	2ο	3ο	4ο
Δοκιμασία περιχειρίδας	✓	✓				
Χρόνος ροής	✓	✓				
Χρόνος πήξης		✓	✓			
Συστολή του θρόμβου		✓				
Χρόνος προθρομβίνης		✓				
Χρόνος APTT		✓				
Προσδιορισμός ινωδογόνου					✓	

9.12. Άλλες τεχνικές έλεγχου των αιμορραγικών καταστάσεων

Εκτός από τους προσδιορισμούς που αναλύθηκαν ενδεικτικά στις προηγούμενες ενότητες, ένας περισσότερο λεπτομερής

έλεγχος των αιμορραγικών καταστάσεων μπορεί να περιλαμβάνει (και όχι μόνο) κατηγοριοποιημένες τις παρακάτω εξετάσεις.

Εργαστηριακές δοκιμασίες διερεύνησης διαταραχών στην αιμόσταση

1. Αρίθμηση αιμοπεταλίων	150000 – 400000/mm^3
2. Μέσος όγκος των αιμοπεταλίων	7,4 – 10,4 fl
3. Ποιοτικός έλεγχος αιμοπεταλίων:	
α. Δοκιμασία προσκόλλησης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων	32 – 65%
β. Έλεγχος του 3^{ου} αιμοπεταλιακού παράγοντα (PF_3).	

Εργαστηριακές δοκιμασίες διερεύνησης διαταραχών στο ενδογενές και εξωγενές σύστημα της πήξης

1.Χρόνος πήξης σε τριχοειδές σωληνάριο	5 – 7 λεπτά
2. Χρόνος Howell (επανασβεστιωμένου πλάσματος)	90 – 250 δ/τα
3. Αυτοματοποιημένος χρόνος πήξης (ACT)	150 – 180 δ/τα
4. Χρόνος θρομβίνης (T.T)	7 – 12 δ/τα
5. Προσδιορισμός του παράγοντα II	80 – 100%
6. Προσδιορισμός του παράγοντα XI	65 – 135%
7. Προσδιορισμός του παράγοντα V	50 –150%
8. Προσδιορισμός του παράγοντα XII	50 – 150%
9. Προσδιορισμός του παράγοντα VII	65 – 140%
10. Προσδιορισμός του παράγοντα VIII	55 – 145%
11. Προσδιορισμός του παράγοντα IX	60 – 140%
12. Προσδιορισμός του παράγοντα X	45 – 155%
13. Έλεγχος ινωδολυτικής ικανότητας	30 δ/τα
14. Έλεγχος αποδομής ινώδους	5 – 10 mg
15. Προσδιορισμός της πρωτεΐνης C	71 – 142%
16. Thrombotest (ελέγχει συγχρόνως τους παράγοντες II, VI, X και IX)	<50%

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Στις ενότητες αυτού του κεφαλαίου αναλύθηκαν δοκιμασίες που ελέγχουν διαταραχές στο τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων, στην *ποσότητα* και την *ποιότητα* των αιμοπεταλίων και στον μηχανισμό πήξης του αίματος.

Μόνο ο έλεγχος της αντοχής του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων δε μας διαφωτίζει ιδιαίτερα. Προκαλώντας όμως τον τραυματισμό τους (βλέπε τεχνική χρόνου ροής), επιβεβαιώνουμε την αξιολόγηση της αντοχής τους και παίρνουμε στοιχεία σχετικά με την ποσότητα και την ποιότητα των αιμοπεταλίων.

Έτσι, αν τα αποτελέσματα με αυτές τις τεχνικές είναι παθολογικά, τότε:

- Θα αναζητήσουμε τη διαταραχή στις πρόδρομες και ανενεργές ουσίες που προϋπάρχουν στο πλάσμα (τεχνική χρόνου προθρομβίνης, προσδιορισμός ινωδογόνου).
- Αν χρειαστεί, θα παρατηρήσουμε το πώς αντιδρούν οι παράγοντες πήξης, όταν έρθουν σε επαφή με ενεργοποιητικές ουσίες, όπως είναι η ιστική θρομβοπλαστίνη, η θρομβοπλαστίνη με καολίνη, η θρομβίνη.
- Τέλος, θα χρονομετρήσουμε το διάστημα που χρειάζεται το τελικό προϊόν (ινώδες) για να δημιουργηθεί.

Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:

1. Μετατρέπουμε τους πλαγιότιτλους σε ερωτηματικές προτάσεις και δίνουμε τις αντίστοιχες απαντήσεις. Π.χ.: Ποια είναι η αρχή της μεθόδου; Τι δείγμα χρησιμοποιούμε; κ.ο.κ.

2. Απαντάμε σε όλες τις ερωτήσεις που ακολουθούν τους πλαγιότιτλους και ορίζουν το θέμα που αναπτύσσεται στις παραγράφους.

Ας δούμε τι καταλάβαμε:

1. Έστω ότι ο χρόνος που χρειάστηκε το αίμα του εξεταζόμενου να σχηματίσει ινώδες είναι 18 δευτερόλεπτα. Ποιο είναι το R και ποιο το I του εξεταζόμενου. Αξιολογούμε τα αποτελέσματα.

2. Κατά τον προσδιορισμό του χρόνου πήξης σε αντικειμενοφόρο πλάκα, ποιο ή ποια από τα παρακάτω «λάθη τεχνικής» θα μπορούσε να προκαλέσει παράταση του χρόνου πήξης;
   α. Σκονισμένη αντικειμενοφόρος πλάκα
   β. Θερμοκρασία χώρου 33°C.
   γ. Παρουσία ιστικών υγρών.
   δ. Διάμετρος σταγόνας 3mm.

3. Κατά τον προσδιορισμό του χρόνου πήξης με τη μέθοδο Lee-White, ποιο ή ποια από τα παρακάτω «λάθη τεχνικής» θα μπορούσε να προκαλέσει συντόμευση του χρόνου πήξης;
   α. Λερωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες
   β. Δοκιμαστικοί σωλήνες μικρότερης διαμέτρου
   γ. Παρουσία ιστικών υγρών
   δ. Γρήγορη ανακίνηση σωληναρίων

4. Εφαρμόζουμε την τεχνική Duke για να προσδιορίσουμε το χρόνο ροής ενός ατόμου. Το βρίσκουμε να έχει παραταθεί. Πριν δώσουμε το αποτέλεσμα:
   α.Ποια λάθη ή αμέλειες πρέπει να βεβαιωθούμε ότι δεν κάναμε, τα οποία ενδεχομένως να ευθύνονται για την παράταση του χρόνου που μετρήσαμε;
   β. Αν βεβαιωθούμε ότι δεν διαπράχθηκαν λάθη, θα προχωρήσουμε σε ανακοίνωση του αποτελέσματος;

5. Σε ποια δοκιμασία ελέγχου πηκτικότητας έχει σημασία το αν ο εξεταζόμενος έρχεται για να πάρουμε το δείγμα στο εργαστήριο μετά από άσκηση σε γυμναστήριο;

6. Αν στα παρακάτω άτομα πραγματοποιήσουμε προσδιορισμό χρόνου προθρομβίνης, συμπληρώστε δίπλα από την κάθε περίπτωση το πώς θα επηρεαστεί το αποτέλεσμα της εξέτασης (συντομευμένος χρόνος, παρατεταμένος χρόνος):

ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ
Αλκοολικός	
Αφυδατωμένο βρέφος	
Ηλικιωμένος με αντιπηκτική αγωγή	
Νεογέννητο με αιμολυτική νόσο	
Ρευματοπαθής, που παίρνει ασπιρίνες	
Φανατικός φυτοφάγος, λάτρης λαχανικών	

7. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του χρόνου μερικής θρομβοπλαστίνης είναι:
   α. Κεφαλίνη
   β. Ιστική θρομβολαστίνη
   γ. Ηπαρίνη
   δ. Θρομβίνη

Πρόταση για περαιτέρω διερεύνηση:

Έχετε διαβάσει τον όρκο του Ιπποκράτη; Αν ναι, ποια ανθρωπιστικά και δεοντολογικά στοιχεία περιλαμβάνει;

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

μυελόγραμμα

10.1 Γενικά

10.2 Αναρρόφηση μυελού των οστών

10.3 Οστεομυελική βιοψία

10.4 Μυελική βιοψία με χειρουργική επέμβαση στο χειρουργείο

10.5 Τεχνικές επεξεργασίας δειγμάτων

Όταν ολοκληρωθεί αυτή η ενότητα, θα έχεις τη δυνατότητα:

- ✓ *Να γνωρίζεις τι είναι το μυελόγραμμα.*
- ✓ *Να αναφέρεις τις τεχνικές και την τοποθεσία λήψης του μυελού των οστών.*
- ✓ *Να γνωρίζεις τα κριτήρια επιλογής της τοποθεσίας λήψης σε σχέση με την ηλικία του ασθενούς.*
- ✓ *Να γνωρίζεις τις χρώσεις επιλογής και τα χρωστικά αποτελεσμάτων μυελικών στοιχείων.*

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

10.1. Γενικά

- **Τι είναι το μυελόγραμμα;**

Μυελόγραμμα είναι η λήψη μυελού των οστών, η παρασκευή μυελικών επιχρισμάτων, η βαφή τους με ειδικές χρώσεις και η μελέτης τους στο οπτικό μικροσκόπιο. Αποτελεί μια πάρα πολύ βασική εξέταση για την διάγνωση αιματολογικών νοσημάτων, νεοπλασμάτων και κοκκιωματωδών καταστάσεων.

Τα τελευταία χρόνια, με την αλματώδη εξέλιξη της τεχνολογίας, έχουν αναπτυχθεί καινούριες μέθοδοι εξετάσεων (π.χ. κυτταρομετρία ροής) που τείνουν να αντικαταστήσουν κατά πολύ τις εφαρμογές του μυελογράμματος. Όμως αυτό παραμένει ακόμα μέθοδος εκλογής για τη μελέτη του μυελού των οστών και τη διάγνωση αρκετών νοσημάτων, αφού μας δίνει τη δυνατότητα να παρατηρήσουμε **την παραγωγή**, **την ωρίμανση** και **την καταστροφή** των σημαντικότερων **κυτταρικών σειρών** του αιμοποιητικού ιστού καθώς και την **προσβολή τους** από ξένα κύτταρα (π.χ. νεοπλασματικά).

Η παρακέντηση του οστού και η λήψη μυελικού ιστού γίνεται με τις εξής τεχνικές:

1. Με αναρρόφηση μυελού των οστών
2. Με οστεομυελική βιοψία
3. Με χειρουργική επέμβαση στο χειρουργείο.

Οι βασικές αντενδείξεις ώστε να μην επιχειρηθούν οι εξετάσεις αυτές είναι, η αιμορραγική διάθεση λόγω θρομβοπενίας ή ανεπάρκειας παραγόντων της πήξης και η λήψη αντιπηκτικής αγωγής.

Παρακάτω περιγράφονται οι τεχνικές αναλυτικά.

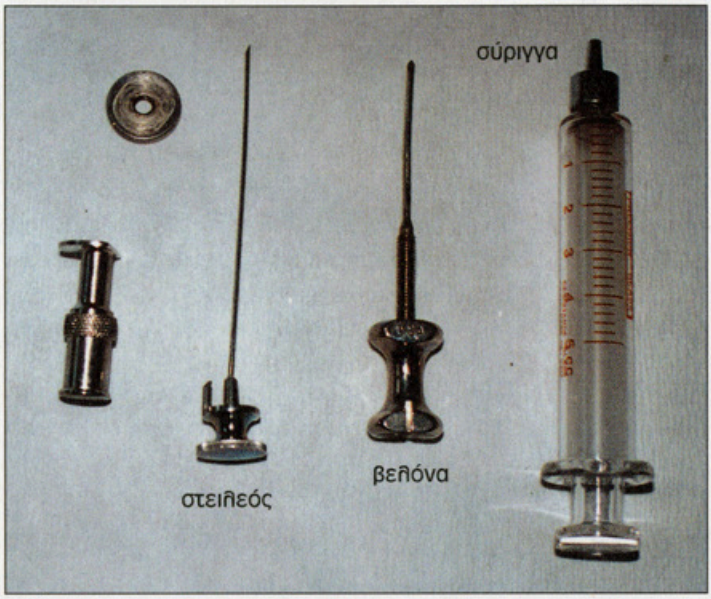
10.2. Αναρρόφηση μυελού των οστών

ΟΡΓΑΝΑ

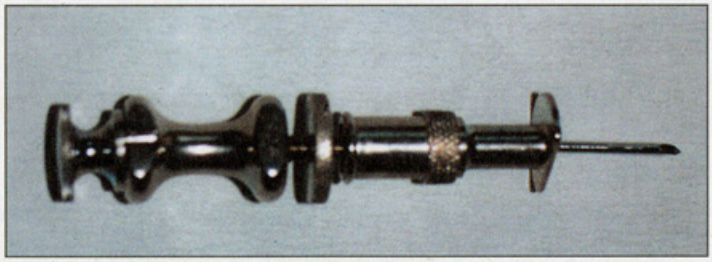
Χρησιμοποιούνται ειδικές βελόνες τύπου Klima κυρίως, ειδικά κατασκευασμένες ώστε να αντέχουν σε πολλαπλές χρήσεις και επαναλαμβανόμενες αποστειρώσεις, ενώ τελευταία αρχίζουν να επικρατούν προϊόντα μιας χρήσεως.

Οι συσκευές αυτές αποτελούνται από μια βελόνα, ένα στειλεό που φέρεται εντός του αυλού της βελόνας και μια κινούμενη ασφάλεια με την οποία ελέγχεται το βάθος στο οποίο θα εισέλθει η βελόνα.

Τις περισσότερες φορές το σετ συμπληρώνεται με μια σύριγγα αναρροφήσεως που εφαρμόζει πολύ καλά στο στόμιο της βελόνας (Εικόνες 10.1 και 10.2). Στην περίπτωση που αυτή δεν περιέχεται, τότε χρησιμοποιείται μια οποιαδήποτε σύριγγα.



Εικόνα 10.1. *Σετ στερνικής παρακέντησης. Φαίνονται κατά σειρά από αριστερά προς τα δεξιά 1) η ασφάλεια, 2) ο βιδωτός οδηγός της ασφάλειας (στρογγυλή ροδέλα), 3) ο στειλεός, 4) η βελόνα και 5) η σύριγγα.*



Εικόνα 10.2. *Βελόνα στερνικής παρακέντησης συναρμολογημένη.*

Οι περιοχές που επιλέγονται για να αναρροφηθεί μυελός των οστών είναι οι εξής:

1. *Στέρνο.* Αποτελεί μια από τις καλύτερα επιλεγμένες θέσεις γιατί το στέρνο έχει αρκετά **καλή κυτταροβρίθεια**, δεν είναι πολύ συμπαγές οστό και βρίσκεται αρκετά κοντά στην επιφάνεια του δέρματος. Πρόβλημα αποτελεί το γεγονός ότι ο εξεταζόμενος έχει τη δυνατότητα να βλέπει καθ' όλη τη διάρκεια του εγχειρήματος.

Σε στερνική παρακέντηση υποβάλλονται άτομα **εφηβικής ηλικίας** και **ενήλικες**. **Απαγορεύεται** αυστηρά η εξέταση αυτή σε **βρέφη** και **παιδιά** γιατί εγκυμονεί πολλούς κινδύνους (πιθανόν να προκληθούν κακώσεις στο στέρνο ή σε υποκείμενα όργανα).

Η λαβή του στέρνου είναι μια καλή τοποθεσία για να γίνει η παρακέντηση επειδή βρίσκεται έξω από τον καρδιακό χώρο (έτσι αποφεύγονται ατυχή συμβάματα) και συνήθως παρέχει ικανοποιητικό μυελικό υλικό.

2. *Λαγόνιος ακρολοφία.* Η οπίσθια άνω λαγόνιος άκανθα είναι **πλουσιότερη σε μυελική ουσία** και επιτρέπεται να παρακεντηθεί σε **όλες τις ηλικίες**, γι αυτό και επιλέγεται συχνότερα. Η πρόσθια άνω λαγόνιος άκανθα επιλέγεται σε βρέφη και παιδιά κυρίως ή ενήλικες που παρουσιάζουν πρόβλημα στην παρακέντηση της οπίσθιας άνω λαγονίου ακρολοφίας.

3. *Κνήμη.* Αφορά εξέταση παιδιών, ηλικίας **18 μηνών και κάτω**. Επιλέγεται, γιατί ακινητοποιείται εύκολα και το παιδί δεν μπορεί να παρακολουθήσει τη διαδικασία. Σε ηλικίες πάνω από 18 μηνών το οστό της κνήμης σκληρύνεται, ενώ ταυτόχρονα αλλάζει και η περιεκτικότητά του σε κυτταρικά στοιχεία.

Τοποθεσία καλύτερη για παρακέντηση είναι ακριβώς κάτω από το κνημιαίο όγκωμα.

4. *Αποφύσεις σπονδύλων.* Υπάρχει η δυνατότητα να παρακεντηθούν οι ακανθώδεις αποφύσεις των οσφυϊκών και κατωτέρων θωρακικών σπονδύλων. Το εγχείρημα αυτό αποφεύγεται, γιατί υπάρχει κίνδυνος τραυματισμού της σπονδυλικής στήλης με πολύ δυσάρεστες συνέπειες.

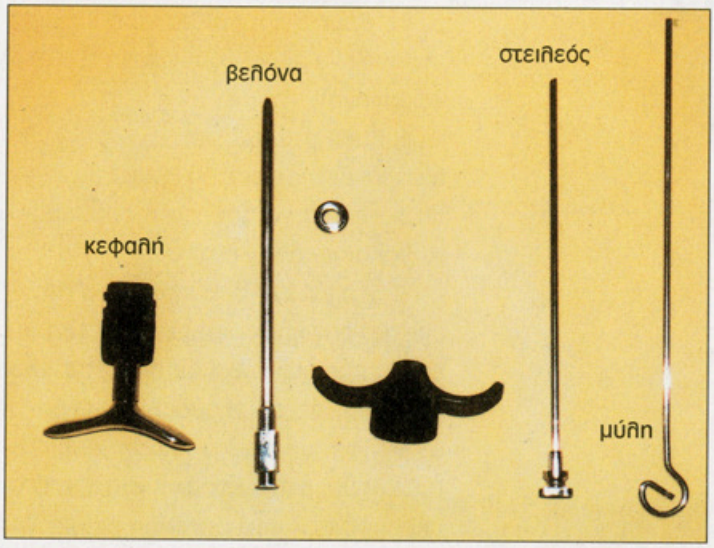
10.3. Οστεομυελική βιοψία

- **Πότε επιλέγεται η οστεομυελική βιοψία;**

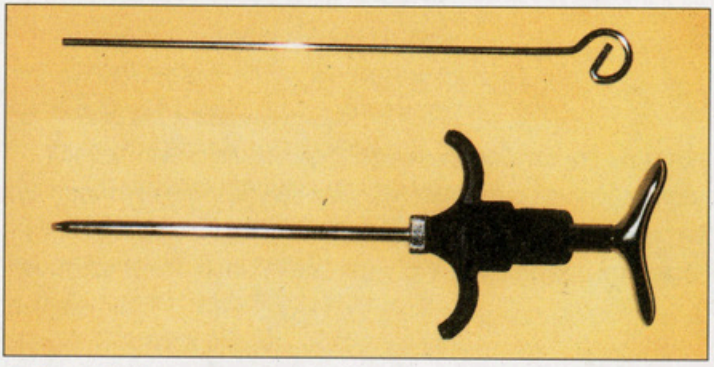
Αρκετές φορές η μέθοδος αναρροφήσεως μυελού των οστών δεν αποδίδει, είτε γιατί παρουσιάζεται "ξηρή" αναρρόφηση (dry tap), είτε γιατί χρειαζόμαστε περισσότερα στοιχεία για τη διάγνωση κακοήθων νοσημάτων του αίματος ή μεταστατικών νεοπλασιών.

Στις περιπτώσεις αυτές είναι απαραίτητη η οστεομυελική βιοψία.

ΟΡΓΑΝΑ



Εικόνα 10.3. *Σετ οστεομυελικής βιοψίας. Φαίνονται από αριστερά προς τα δεξιά κατά σειρά η κεφαλή, η βελόνα βιοψίας, ο στειλεός και η μύλη.*



Εικόνα 10.4. *Σετ οστεομυελικής βιοψίας συναρμολογημένο.*

Χρησιμοποιούνται βελόνες τύπου Jamshidi ή τύπου Islam, μιας ή πολλαπλών χρήσεων (Εικόνες 10.3 και 10.4).

Κάθε σετ περιλαμβάνει τη βελόνα βιοψίας, την κεφαλή της βελόνας, ένα στειλεό και τη μύλη

Η περιοχή που επιλέγεται για να γίνει η εξέταση είναι η λαγόνιος ακρολοφία και μάλιστα προτιμάται η οπίσθια άνω λαγόνια άκανθα γιατί η πρόσθια έχει οστό παχύτερο και σκληρότερο.

10.4. Μυελική βιοψία με χειρουργική επέμβαση στο χειρουργείο

- **Πότε χρειάζεται να γίνει μυελική βιοψία;**

Η μυελική βιοψία με χειρουργική επέμβαση χρησιμοποιείται για ασθενείς με εντοπισμένες βλάβες και δίνει περισσότερες πληροφορίες ως προς την κυτταροβρίθεια του μυελού και τον ιστολογικό τύπο.

Η δυσκολία επανάληψης της εξέτασης, η απαίτηση περισσότερου χρόνου, η ανάγκη συνεργασίας πολλών γιατρών διαφορετικών ειδικοτήτων (Αιματολόγου, Χειρουργού, Αναισθησιολόγου, Ιστοπαθολόγου κλπ) καθώς και οι κίνδυνοι που επιφυλάσσει ένα χειρουργείο, είναι τα μεγάλα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου.

Γίνεται λοιπόν κατανοητό, γιατί αυτή η εξεταστική τεχνική εφαρμόζεται σπανιότατα.

10.5. Τεχνικές επεξεργασίας δειγμάτων

Από την οστεομυελική βιοψία παραλαμβάνουμε οστεομυελικό έμβολο το οποίο τοποθετούμε σε ειδικό φιαλίδιο με ή χωρίς φορμαλδεΰδη 10%.

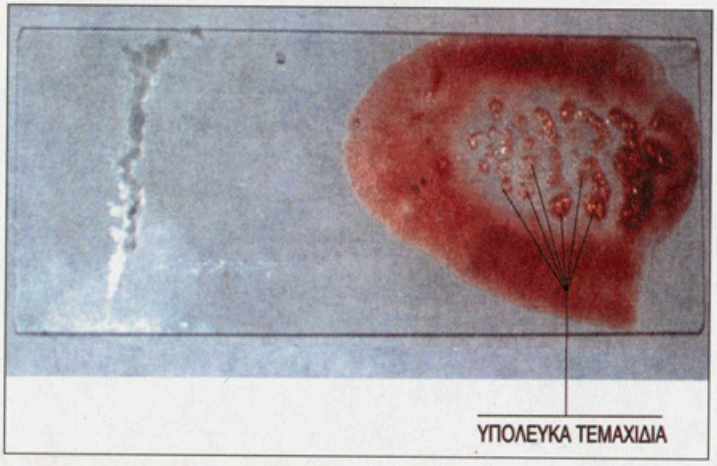
Στις περιπτώσεις που έχουμε συλλέξει μυελό των οστών μέσα σε σύριγγα ή φιαλίδιο, ακολουθείται η εξής πορεία.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

- Γίνεται επίστρωση του μυελού σε αντικειμενοφόρους πλάκες, <u>όσο το δυνατόν γρηγορότερα, επειδή υπάρχει κίνδυνος να πήξει</u>. Ο τρόπος επίστρωσης είναι παρόμοιος

με του περιφερικού αίματος. Τοποθετείται μια σταγόνα από την αναρροφηθείσα μυελική ουσία σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα, στη μέση γραμμή κατά το πλάτος και στο πρώτο τρίτο ή τέταρτο κατά μήκος. Ακολούθως με μια άλλη πλάκα ή καλυπτρίδα απλώνουμε τη σταγόνα. Πρέπει στο επιστρωμένο υλικό να διακρίνουμε υπόλευκα κοκκία από μικρά μυελικά τεμάχια που επιβεβαιώνουν την ύπαρξη μυελικής ουσίας (Εικόνα 10.5). Τα πλακίδια αφήνονται σε περιβάλλον δωματίου να ξεραθούν και μετά στέλνονται στο αιματολογικό εργαστήριο για βαφή.

- Το βάψιμο γίνεται κυρίως με χρωστικές τύπου Romanowsky και ακολουθείται μεθοδολογία σχεδόν ίδια με του περιφερικού αίματος. Οι χρώσεις που κρίνονται απαραίτητες για τη μελέτη ενός μυελογράμματος είναι δύο. Η χρώση **May-Grunwald-Giemsa** και η χρώση του **κυανού της Πρωσίας**.



Εικόνα 10.5. *Μυελικό επίχρισμα πριν τη βαφή. Διακρίνονται υπόλευκα κοκκία ένδειξη ύπαρξης μυελικής ουσίας*

Χρώση May-Grunwald-Giemsa.

ΥΛΙΚΑ

Απαιτούνται τα εξής διαλύματα:

1. Διάλυμα May-Grunwald
2. Διάλυμα Giemsa και
3. Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer).

Τα πλακίδια τοποθετούνται μέσα σε ειδικό γυάλινο δοχείο με υποδοχές που περιέχει διάλυμα May-Grunwald (μητρικό διάλυμα χρωστικής May-Grunwald + ίσο όγκο απεσταγμένου νερού με ρυθμισμένο pH 6,8) για 5 λεπτά.

Ακολούθως μεταφέρονται σε άλλο δοχείο με υποδοχές που περιέχει διάλυμα Giemsa προσφάτως αραιωμένο (χρωστική Giemsa + υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα Sorensen με αναλογία 1:10) και αφήνεται για 15 λεπτά.

Τέλος γίνεται πλύσιμο των παρασκευασμάτων με υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα Sorensen και αφήνονται στον αέρα σε όρθια θέση να στεγνώσουν.

Χρώση σιδήρου ή κυανού της Πρωσίας.

Απαιτούνται τα παρακάτω:

1. Απόλυτη μεθυλική αλκοόλη
2. Διάλυμα σιδηροκυανιούχου καλίου 2%
3. 0,2 N/1 υδροχλωρικού οξέος
4. 0,1% υδατική ηωσίνη ή σαφρανίνη.

Τα αποξηραμένα μυελικά επιχρίσματα μονιμοποιούνται σε απόλυτη μεθανόλη για 15 λεπτά. Παρασκευάζεται διάλυμα μίγματος σιδηροκυανιούχου καλίου και υδροχλωρικού οξέος με ανάμειξη ίσων όγκων των δυο διαλυμάτων και θερμαίνεται στους 37°C. Τοποθετούνται μέσα στο παραπάνω διάλυμα τα μονιμοποιημένα επιχρίσματα για 10 λεπτά και χρωματίζονται. Στη συνέχεια πλένονται με τρεχούμενο νερό επί 15-20 λεπτά. Μετά βάφονται ξανά επί 15-30 δευτερόλεπτα με διάλυμα 0,1% υδατικής ηωσίνης ή υδατικής σαφρανίνης, ξεπλένονται και αφήνονται να στεγνώσουν. Τα κοκκία σιδήρου χρωματίζονται πράσινα-κυανά (όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο).

Αφού πραγματοποιηθεί η βαφή των πλακιδίων, έπεται η μελέτη τους στο οπτικό μικροσκόπιο από εξειδικευμένους (Αιματολόγους κυρίως) γιατρούς, όπου θα συντάξουν το μυελόγραμμα.

Στο πρόσφατο παρελθόν εκτός από τις δυο αυτές χρώσεις, τα δείγματα επεξεργάζονταν και με άλλες, όπου καθεμιά είχε πρωταρχικό ρόλο για τη διάγνωση ορισμένων παθήσεων. Πολλά εργαστήρια εξακολουθούν ακόμα και σήμερα να χρησιμοποιούν αυτές τις μεθόδους.

Αναφορικά μερικές από τις χρώσεις είναι:

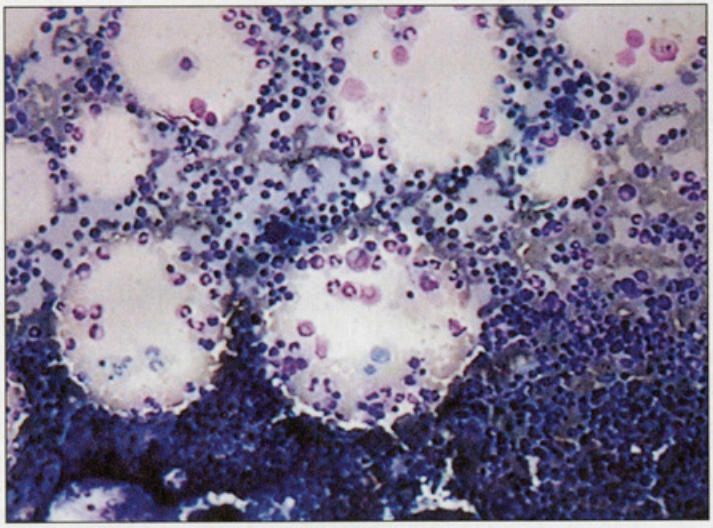
- Αλκαλική φωσφατάση λευκών
- Αντίδραση υπεροξειδάσης (μυελοϋπεροξειδάση)
- Αντίδραση PAS (Periodic acid-Schiff reaction)
- Αντίδραση όξινης φωσφατάσης
- Εστεράσες (ειδική εστεράση, μη ειδική εστεράση, διπλή εστεράση)

Μελέτη μυελογράμματος

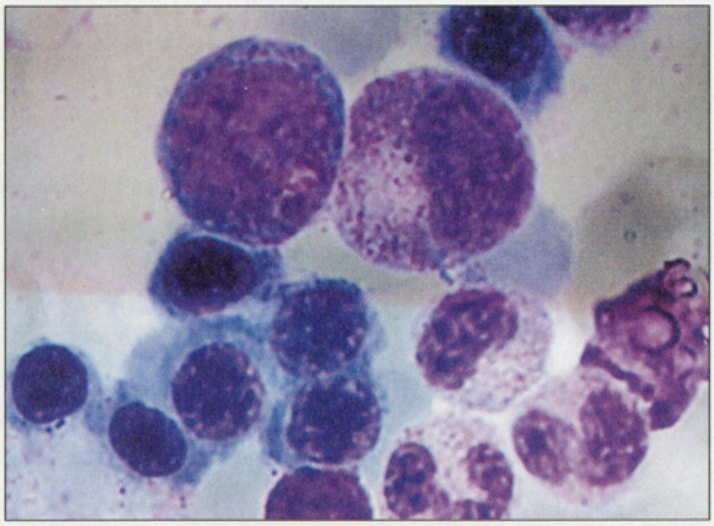
Η μελέτη του μυελού στο οπτικό μικροσκόπιο γίνεται αρχικά με φακό μικρής μεγέθυνσης (συνήθως Χ10) και στη συνέχεια με καταδυτικό φακό μεγάλης ισχύος (Χ100).

Στα μυελικά επιχρίσματα που βάφτηκαν με χρώση May-Grunwald-Giemsa (Εικόνες 10.6 και 10.7) θα παρατηρήσουμε τα εξής:

- Την κυτταροβρίθεια του μυελού και την αναλογία λίπους-κυττάρων, αν δηλαδή ο μυελός είναι *ορθοκυτταρικός* (φυσιολογική κυτταρικότητα), *υπερπλαστικός* (αυξημένη κυτταρικότητα), *υποπλαστικός* (ελαττωμένη κυτταρικότητα) ή *απλαστικός* (πολύ ελαττωμένη μέχρι πλήρης εξαφάνιση των κυτταρικών στοιχείων).



Εικόνα 10.6. *Μυελός των οστών με χρώση May-Grunwald-Giemsa. Παρατήρηση με μικρή μεγέθυνση (Χ10). Ελέγχεται η κυτταροβρίθεια.*



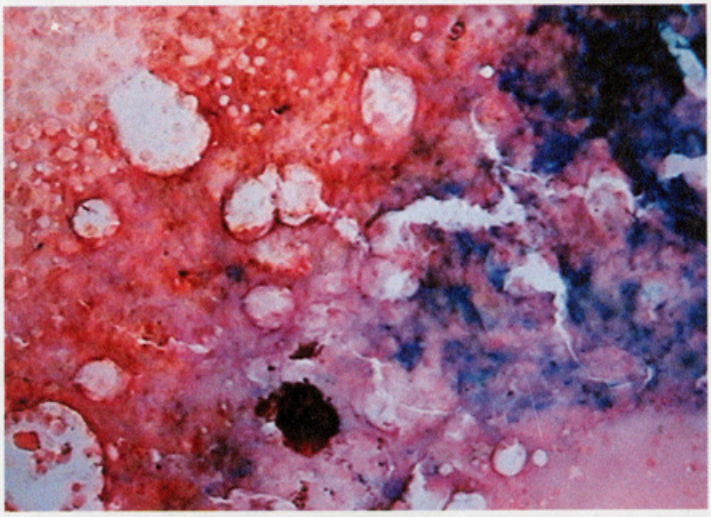
Εικόνα 10.7. *Παρατήρηση του ίδιου μυελού με μεγαλύτερη μεγέθυνση (Χ100)*

- Την *παρουσία* ή *απουσία* μεγακαρυοκυττάρων, *τον αριθμό* τους ανά οπτικό πεδίο και τη *μορφολογία* τους.
- Την αναλογική σχέση των κυττάρων της κοκκιώδους και της ερυθράς σειράς
- Την *πρόοδο της ωριμάνσεως* των κυτταρικών στοιχείων και των τριών σειρών καθώς και το *συγχρονισμό ωρίμανσης* μεταξύ του πυρήνα με το κυτταρόπλασμα.
- Την *παρουσία παθολογικών* μυελικών στοιχείων.
- Την *εμφάνιση ξένων κυττάρων*, όπως νεοπλασματικών, τα οποία συνήθως είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος και βρίσκονται μαζεμένα σχηματίζοντας σωρούς.
- Την *ύπαρξη παρασίτων* όπως η λεϊσμάνια Donovani.

Σε καλά οργανωμένες αιματολογικές μονάδες **η χρώση σιδήρου με κυανό της Πρωσίας** αποτελεί μέθοδο ρουτίνας και συμπληρώνει τη μελέτη του μυελογράμματος.

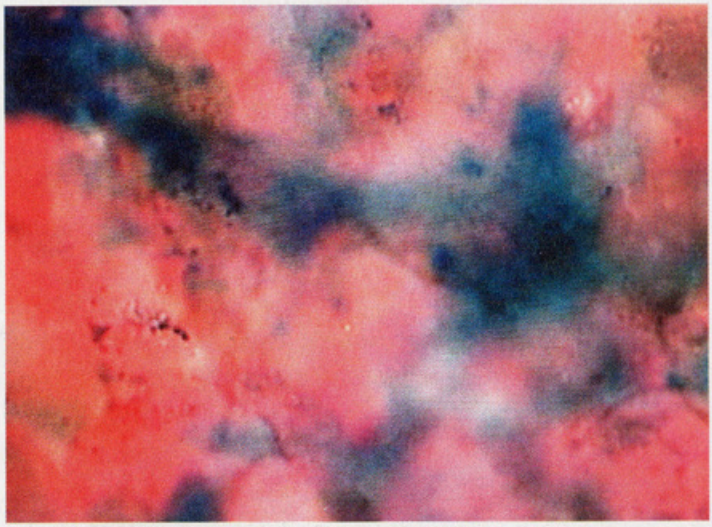
Κατά την παρατήρηση των πλακιδίων ο σίδηρος εμφανίζεται **φυσιολογικά** σαν πράσινα-κυανά κοκκία (Εικόνες 10.8 και 10.9) τοποθετημένα μαζί, είτε ελεύθερα στον εξωκυττάριο χώρο είτε μέσα σε μακροφάγα.

Η ποσοτική του εκτίμηση σημειώνεται **με σταυρούς (++)**.



Εικόνα 10.8. *Χρώση μυελού με κυανό της Πρωσίας. Παρατήρηση με μικρή μεγέθυνση (Χ10). Ο σίδηρος φαίνεται με χρώμα πράσινο-κυανό.*

Στις σιδηροπενικές αναιμίες παρατηρείται μείωση μέχρι και πλήρη έλλειψη (Εικόνα 10.10). Επίσης, πρέπει να ερευνάται η ύπαρξη σιδηροβλαστών και η ποσοτική τους αναλογία. Οι σιδηροβλάστες είναι ερυθροβλάστες που περιέχουν μέσα στο πρωτόπλασμά τους διάσπαρτα κοκκία σιδήρου.



Εικόνα 10.9. *Χρώση σιδήρου. Η ίδια εικόνα σε παρατήρηση με μεγάλη μεγέθυνση (Χ100). Ο σίδηρος χρωματίζεται με πράσινο-κυανό.*

Εικόνα 10.10. *Χρώση σιδήρου σε μυελό. Παρατήρηση με μικρή μεγέθυνση. Ο μυελός έχει πλήρη απουσία σιδήρου.*

Όταν τα κοκκία αυτά κατανέμονται γύρω από τον πυρήνα σαν δακτύλιος, τότε αποκαλούνται δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες και είναι χαρακτηριστικό διαγνωστικό γνώρισμα των σιδηροβλαστικών αναιμιών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μυελόγραμμα είναι η λήψη μυελού των οστών, η παρασκευή μυελικών επιχρισμάτων, η βαφή τους με ειδικές χρώσεις και η μελέτη τους στο οπτικό μικροσκόπιο. Αποτελεί μια πάρα πολύ βασική εξέταση για τη διάγνωση αρκετών νοσημάτων. Η παρακέντηση του οστού και η λήψη μυελικού ιστού γίνεται με τις εξής τεχνικές:

- αναρρόφηση μυελού των οστών
- οστεομυελική βιοψία
- χειρουργική επέμβαση στο χειρουργείο.

Η εξέταση τελείται από έμπειρο, εξειδικευμένο γιατρό με την υποστήριξη νοσηλευτικού προσωπικού κάτω από άσηπτες συνθήκες.

Γίνεται επίστρωση του μυελού σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

Στο βάψιμο χρησιμοποιούνται κυρίως χρωστικές τύπου Romanowsky και ακολουθείται μεθοδολογία σχεδόν ίδια με του περιφερικού αίματος.

Οι χρώσεις που κρίνονται απαραίτητες για τη μελέτη ενός μυελογράμματος είναι δύο. Η χρώση May-Grunwald-Giemsa και η χρώση του κυανού της Πρωσίας.

Τέλος γίνεται μελέτη με οπτικό μικροσκόπιο και αξιολόγηση αποτελεσμάτων.

Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:

1. Σε ένα βρέφος με ποια μέθοδο θα λαμβάναμε μυελό;
2. Σε έναν ενήλικα ποια μέθοδο θα χρησιμοποιούσαμε πρώτη για να κάνουμε μυελόγραμμα και γιατί;
3. Ποιο είναι το γεγονός που θα μας επιβεβαιώσει τη λήψη μυελού των οστών κατά την επίστρωση;
4. Ποιες είναι οι απαραίτητες χρώσεις για ένα μυελόγραμμα;
5. Σε ένα βρέφος θα επιχειρούσαμε στερνική παρακέντηση και γιατί;

– ΔΕΥΤΕΡΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ –

β. αιμοδοσία ΙΙ

Η ανθρωπιά είναι κυκλική
παρουσία.
Δε βρίσκεται στραμμένη
προς
ένα μονάχα σημείο του ορίζοντα.
Εκείνος που είναι αληθινά
ανθρώπινος
όχι,
δεν έχει το δικαίωμα,
δε μπορεί να μην είναι
σε κάθε περίσταση ανθρώπινος.
Η ανθρωπιά δεν είναι επάγγελμα,
δεν είναι όργανο αυτοπροβολής
και επιτυχίας.

Δοκιμιογράφος
Ι.Μ.ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΠΟΥΛΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

παράγωγα αίματος

11.1 Τεχνική για το πλύσιμο ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσα στον ασκό συλλογής του ολικού αίματος

11.2 Εναιώρημα αιμοπεταλίων. Τεχνικές διαχωρισμού των αιμοπεταλίων (συμπυκνωμένα αιμοπετάλια)

11.3 Εναιώρημα ερυθρών αιμοσφαιρίων

11.4 Πλάσμα – παράγωγα πλάσματος

Όταν ολοκληρωθεί αυτή η ενότητα, θα έχεις τη δυνατότητα:

- ✓ να κατανοείς την έννοια της περιεκτικότητας ενός εναιωρήματος ή διαλύματος "κατ' όγκο".
- ✓ να μπορείς να παρασκευάσεις διαλύματα διαφορετικής περιεκτικότητας, ανάλογα με τη μονάδα όγκου που σου ζητείται.
- ✓ να περιγράφεις τις τεχνικές διαχωρισμού των αιμοπεταλίων.
- ✓ να αναφέρεις τα είδη των παραγώγων πλάσματος και τη χρησιμότητά τους.

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

11.1. Τεχνική για το πλύσιμο ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσα στον ασκό συλλογής του ολικού αίματος

• **Τι είναι τα πλυμένα ερυθρά αιμοσφαίρια;**

Πλυμένα ερυθρά είναι τα ερυθρά στα οποία αφού τα διαχωρίσαμε από το πλάσμα, προσθέτουμε κατάλληλο ισότονο διάλυμα για να απομακρυνθεί όσο είναι δυνατόν κάθε στοιχείο πλάσματος και κάθε στοιχείο κρυοπροστατευτικού παράγοντα (υλικό για την προστασία των ερυθροκυττάρων κατά τη συντήρηση της μονάδας των ερυθρών).

• **Σε ποιες παθολογικές καταστάσεις χορηγούμε συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια;**

Η χορήγηση συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι απαραίτητη στις εξής περιπτώσεις:

- Οξεία αναιμία
- Χρόνια αναιμία, όπως η μεσογειακή αναιμία.

• **Γιατί πλένουμε τα ερυθρά αιμοσφαίρια;**

- Για να απομακρύνουμε το πλάσμα, όταν για θεραπευτικούς λόγους χρειαζόμαστε μόνο ερυθρά (συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια).
- Για να απομακρύνουμε τον κρυοπροστατευτικό παράγοντα λίγο πριν από τη μετάγγιση (απογλυκερινοποιημένα ερυθρά αιμοσφαίρια) .
- Για να απομακρύνουμε όσο το δυνατόν περισσότερα (το 70%) λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια που περιέχονται σ'αυτά.

> Τα κύτταρα αυτά μπορεί να προκαλέσουν αντίδραση (πυρετό) σε πολυμεταγγιζόμενο άτομο.

• **Με ποιες μορφές βρίσκονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια στο εργαστήριο αιμοδοσίας;**

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια βρίσκονται με τις εξής μορφές:

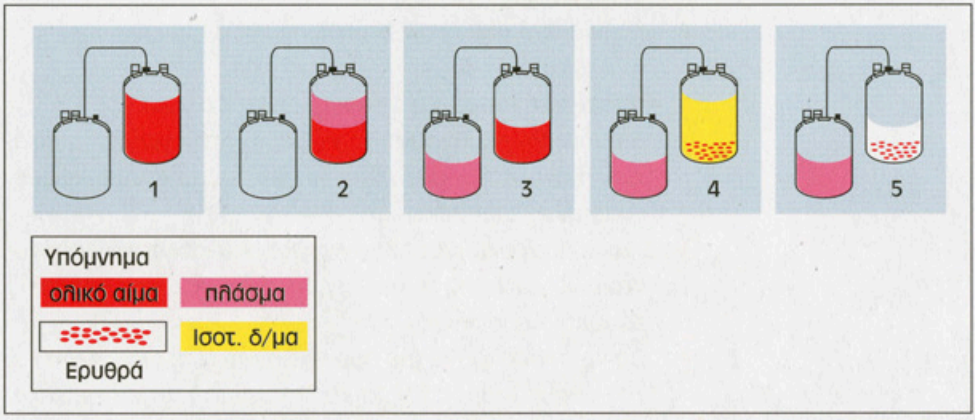
1. Συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια

2. Κατεψυγμένα ερυθρά αιμοσφαίρια

3. Συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια, που είναι "πτωχά" σε λευκά αιμοσφαίρια

Σε γενικές γραμμές ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία:

- Συλλέγουμε ποσότητα περίπου 450 ml (±10 ml) αίματος αιμοδότη σε σύστημα διπλού ασκού αιμοδοσίας.
- Φυγοκεντρούμε τον ασκό ή τον αφήνουμε ακίνητο να καθιζάνουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια.
- Διαχωρίζουμε με το συμπιεστή τη στοιβάδα των ερυθρών από τη στοιβάδα του πλάσματος, το οποίο κατά τη συμπίεση μεταφέρεται στο συνοδό ασκό.
- Προσθέτουμε ειδικό διάλυμα σε ποσότητα διπλάσια του όγκου των ερυθρών και ανακινούμε για να αναμειχθούν.
- Φυγοκεντρούμε τον ασκό ή τον αφήνουμε ακίνητο να καθιζάνουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια.
- Αναρροφούμε με το ειδικό μηχάνημα το διάλυμα το οποίο μας είναι άχρηστο και γι'αυτό το πετάμε.



Εικόνα 11.1: *Λήψη συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων και έκπλυσή τους.*

Απαραίτητα πρέπει να προσέξουμε:

Υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης του δείγματος, γι'αυτό εργαζόμαστε με πολλή προσοχή.

Τα ερυθρά μπορούν να διαχωριστούν από το πλάσμα οποτεδήποτε πριν από την ημερομηνία λήξης του ολικού αίματος.

Ο όγκος των ερυθρών πρέπει να είναι περίπου 220-320 ml και να δίνει τιμή αιματοκρίτου 70% ανά μονάδα.

Τα συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να συντηρηθούν σε θερμοκρασία 1-6°C.

Κατά την επεξεργασία δεν πρέπει να γίνει αιμόλυση των ερυθρών.

Είναι απαραίτητος ο πλήρης ορολογικός έλεγχος για την αποφυγή μετάδοσης λοιμώξεων και ο έλεγχος συμβατότητας με το δέκτη.

Η ετικέτα του ασκού των ερυθρών αιμοσφαιρίων πρέπει να μας δίνει στοιχεία για το είδος του συντηρητικού και του κρυοπροστατευτικού παράγοντα.

Μόλις γίνει το πλύσιμο των συντηρημένων ερυθρών και πριν από τη μετάγγιση γράφουμε στην ετικέτα του ασκού τα στοιχεία του εργαστηρίου και την ημερομηνία.

11.2. Εναιώρημα αιμοπεταλίων. Τεχνικές διαχωρισμού των αιμοπεταλίων (συμπυκνωμένα αιμοπετάλια)

- **Σε ποιες καταστάσεις χορηγούμε αιμοπετάλια;**

Υπάρχουν πολλές παθολογικές καταστάσεις στις οποίες με τη χορήγηση αιμοπεταλίων βελτιώνεται η ποιότητα ζωής του ασθενούς και άλλες στις οποίες αποκαθίσταται πλήρως η υγεία του:

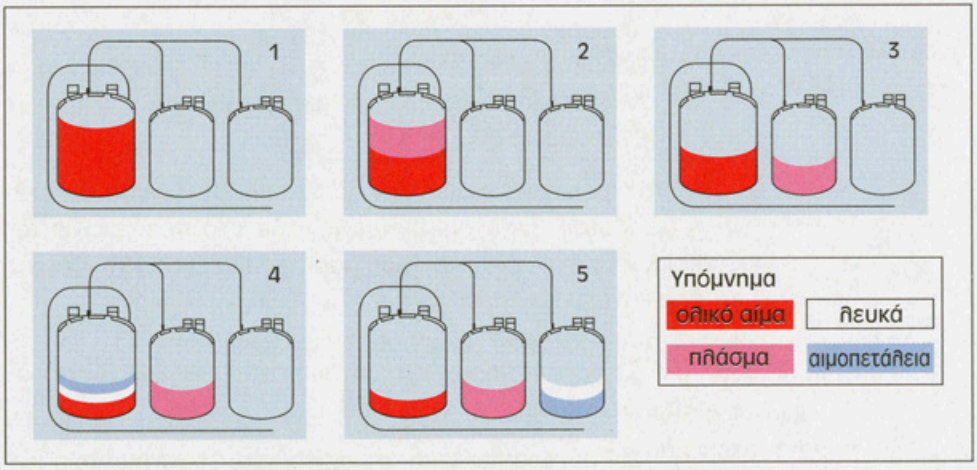
- Αιμορραγία.
- Θρομβοπεννία.
- Λειτουργική ανωμαλία των αιμοπεταλίων,
- Εγχειρήσεις.

Τα αιμοπετάλια όμως, όπως και τα άλλα έμμορφα στοιχεία του αίματος, είναι εναιωρημένα μέσα στο πλάσμα. Πρέπει λοιπόν να διαχωριστούν τόσο από τα άλλα έμμορφα στοιχεία όσο και από το πλάσμα.

Α. Σε γενικές γραμμές, συνήθως, ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία:

- Συλλέγουμε το αίμα του αιμοδότη σε σύστημα τριπλών ασκών αιμοδοσίας.

- Διατηρούμε τον ασκό σε συνθήκες θερμοκρασίας 20 – 25°C μέχρι την έναρξη της επεξεργασίας. Το αίμα διατηρείται *τουλάχιστον μία ώρα, αλλά όχι παραπάνω από έξι ώρες* από τη στιγμή της συλλογής του αίματος.
- Φυγοκεντρούμε τον ασκό στις 1000 στροφές/λεπτό για 6-9 λεπτά της ώρας. Με τη φυγοκέντρηση διαχωρίζονται τα συστατικά σε στοιβάδες. Στο κάτω μέρος του ασκού είναι η στοιβάδα των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ακολουθεί η στοιβάδα των αιμοπεταλίων και των λευκών αιμοσφαιρίων και τέλος η στοιβάδα του πλάσματος.
- Διαχωρίζουμε με το συμπιεστή τη στοιβάδα των ερυθρών αιμοσφαιρίων από τις άλλες στοιβάδες, οι οποίες κατά τη συμπίεση μεταφέρονται στον πρώτο συνοδό ασκό.
- Φυγοκεντρούμε τον πρώτο συνοδό ασκό στις 3000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά. Τα συστατικά θα διαχωριστούν πάλι σε στοιβάδες. Στο κάτω μέρος του ασκού δημιουργείται η στοιβάδα των ερυθρών, ακολουθεί η στοιβάδα των λευκών και τέλος η στοιβάδα των αιμοπεταλίων.
- Συμπιέζουμε τις στοιβάδες πάνω στο όριο της στοιβάδας των αιμοπεταλίων. Το πλάσμα μαζί με όσο το δυνατόν περισσότερη ποσότητα λευκών μεταφέρεται στον τρίτο συνοδό ασκό.
- Συντηρούμε τη μονάδα στους 20 – 24°C για 3 – 7 ημέρες. Η διάρκεια συντήρησης εξαρτάται από τη σύσταση του πλαστικού ασκού.



Εικόνα 11.2: *Λήψη συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων*

Η δυνατότητα επιβίωσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη μέθοδο διαχωρισμού και από τη θερμοκρασία συντήρησης. Αν για παράδειγμα η συντήρηση γίνει στους 6°C, υπάρχει ένα περιθώριο 48 ωρών μέχρι να πάψει η μεμβράνη τους να είναι σταθερή. Αν για το διαχωρισμό τους χρησιμοποιηθεί ανοιχτό σύστημα, τότε πρέπει να μεταγγισθούν μέσα σε 24 ώρες.

Κατά την τεχνική του διαχωρισμού τηρούμε τις συνθήκες φυγοκέντρησης – ως προς τη ταχύτητα και το χρόνο – που εφαρμόζει το κάθε εργαστήριο ή προτείνει η κατασκευάστρια εταιρεία. Το τελικό προϊόν που συνήθως παίρνουμε είναι σε όγκο ≥ 50ml, με αριθμό αιμοπεταλίων ≥ $6X10^{10}$ και με λευκοκύτταρα ≥ $2X10^{8}$ και pH ≥ 6.

Απαραιτήτως πρέπει να προσέξουμε:

Κατά τη διαδικασία του διαχωρισμού πρέπει να εξασφαλίζονται άσηπτες συνθήκες.

Να μην παραβιάζεται η στεγανότητα (κλειστό σύστημα). Αν παραβιασθεί η στεγανότητα, το δείγμα χορηγείται μέσα σε 6 ώρες από τη στιγμή της παρασκευής του, εκτός και αν καταψυχθεί.

Αν καταψυχθεί, πριν από τη χορήγησή του στον ασθενή, πρέπει να γίνει επαναφορά της θερμοκρασίας του στους 20 – 24°C (ρευστοποίηση) και να μεταγγιστεί μέσα σε 5 ώρες.

Β. Εκτός από την παραπάνω τεχνική, υπάρχει και **η αυτόματη μέθοδος ή μέθοδος εθελοντικής αιμοπεταλιοαφαίρεσης**. Με τη βοήθεια αυτόματων οργάνων συλλέγεται από έναν *εθελοντή* αιμοδότη μια μεγάλη ποσότητα αιμοπεταλίων. Η συλλογή γίνεται είτε **με το σύστημα αυτόματης ροής** είτε της **συνεχούς ροής**. Η διαδικασία κρατάει 2.5 ώρες και ο δότης πρέπει:

- να έχει ηλικία μικρότερη των 60 χρόνων
- να έχει βάρος τουλάχιστον 60 Kg
- να έχει καλό φλεβικό σύστημα, δηλαδή τα τοιχώματα των φλεβών να είναι ανθεκτικά και
- να μην έχει πάρει ασπιρίνη 5 μέρες πριν από τη λήψη.

Η συντήρηση των αιμοπεταλίων γίνεται στους 20 – 24°C με διαρκή ανάδευση.

Γ. Εκτός από την εθελοντική αιμοπεταλιοαφαίρεση γίνεται **θεραπευτική αιμοπεταλιοαφαίρεση,** όταν υπάρχει ασθενής με σοβαρότατη θρομβοκυττάρωση, οπότε η τιμή των αιμοπεταλίων του είναι μεγαλύτερη της φυσιολογικής τιμής.

Συμπυκνωμένα αιμοπετάλια μπορούν να μεταγγισθούν χωρίς έλεγχο συμβατότητας. Σε νεογνά όμως είναι ασφαλέστερο το πλάσμα του δότη να είναι συμβατό με το αίμα του νεογνού, τουλάχιστον ως προς το σύστημα ΑΒΟ. Ο έλεγχος και η λογική της συμβατότητας – του κατά πόσο δηλαδή το αίμα του δότη ταιριάζει ανοσολογικά με το αίμα του δέκτη – περιγράφεται στο παρακάτω κεφάλαιο.

11.3. Εναιώρημα ερυθρών αιμοσφαιρίων

- **Τι είναι το εναιώρημα;**

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια, όπως και τα άλλα κυτταρικά στοιχεία του αίματος, δε διαλύονται στο πλάσμα, αλλά αιωρούνται και μεταφέρονται με τη ροή του. Στο φυσικό αίμα τα ερυθροκύτταρα αιωρούνται μαζί με τα άλλα κύτταρα. Όμως στο εργαστήριο συχνά θέλουμε να μελετήσουμε **μόνο τα ερυθροκύτταρα**, κυρίως για να εξετάσουμε τις ιδιότητές της μεμβράνης τους, ώστε, για παράδειγμα, να ελεγχθεί η δυνατότητα πραγματοποίησης μιας μετάγγισης. Τότε σχηματίζουμε **εναιώρημα ερυθρών αιμοσφαιρίων.** Είναι μια βοηθητική τεχνική επεξεργασίας του δείγματος αίματος που εξετάζουμε, απαραίτητη για να προχωρήσουν διάφορες εργαστηριακές τεχνικές.

- **Τι πρέπει να προηγηθεί πριν από την παρασκευή του εναιωρήματος:**

Πριν από την παρασκευή του εναιωρήματος τα ερυθροκύτταρα πρέπει πρώτα να πλένονται με φυσιολογικό ορό.

- **Πώς θα ξεκινήσουμε;**

Ανάλογα με το σκοπό και το είδος του δείγματος που εξε-

τάζουμε χρειαζόμαστε διαφορετική πυκνότητα ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσα στο εναιώρημα. Παρόλο που δεν πρόκειται για διάλυμα, ωστόσο χρησιμοποιούμε την ίδια τεχνική με αυτήν που χρησιμοποιούμε για να εκφράσουμε την περιεκτικότητα διαλυμένων ουσιών σε ένα διαλύτη.

Γενικά με την έκφραση κ% όγκο προς όγκο (%v/v) για το διάλυμα μιας ουσίας Χ εννοούμε ότι σε διάλυμα όγκου 100ml της ουσίας Χ υπάρχουν κ ml ουσίας Χ. Από αυτά βγαίνει το συμπέρασμα ότι σε 100 ml διαλύματος ουσίας Χ κ% v/v θα υπάρχουν κ ml ουσίας Χ και (100 – κ) ml διαλύτη.

Για να βρούμε την περιεκτικότητα ενός διαλύματος μιας ουσίας εκφρασμένη σε %v/v, όταν γνωρίζουμε τον όγκο της διαλυμένης ουσίας και του διαλύτη, χρησιμοποιούμε το γενικό τύπο:

$$\frac{\text{ml διαλυμένης ουσίας}}{\text{ml διαλυμένης ουσίας} + \text{ml διαλύτη}} \times 100 = \%\ v/v$$

Επειδή τα ml είναι μονάδα όγκου, αλλά δεν είναι απαραίτητο ούτε πάντα δυνατό να χρησιμοποιούμε αυτή τη μονάδα, η περιεκτικότητα μπορεί να εκφραστεί με οποιαδήποτε άλλη μονάδα όγκου, αρκεί να χρησιμοποιείται η ίδια μονάδα για τη διαλυμένη ή αιωρούμενη ουσία και για το διαλύτη.

Αυτό σημαίνει ότι ο αρχικός ορισμός μπορεί να αποδοθεί ως εξής: *"Διάλυμα κ% κατ' όγκο μιας ουσίας Χ σημαίνει ότι σε 100* ***όγκους*** *διαλύματος βρίσκονται κ* ***όγκοι*** *ουσίας Χ"*. Από αυτό εύκολα συνάγεται το συμπέρασμα ότι σε αυτό το διάλυμα θα βρίσκονται και (100 – κ) όγκοι διαλύτη. Αυτό αποτελεί και τον κύριο τρόπο δουλειάς στο εργαστήριο.

Ακολουθούν παραδείγματα, στα οποία φαίνεται πότε επιλέγουμε τον έναν ή τον άλλο τρόπο, ανάλογα με το ζητούμενο διάλυμα ή εναιώρημα και με την ακρίβεια που απαιτείται κάθε φορά.

Παραδείγματα:

1ο Έστω ότι μας ζητείται να παρασκευάσουμε εναιώρημα ερυθρών αιμοσφαιρίων 5% κατ' όγκο.

Σύμφωνα με τα παραπάνω μπορούμε να εργαστούμε με 2 τρόπους:

α. Παίρνουμε 5 **ml** ερυθρών και τα τοποθετούμε σε ογκομετρική φιάλη των 100 **ml,** προσθέτουμε διαλύτη ως τη χαραγή. Έτσι θα προκύψει διάλυμα όγκου 100 **ml** από τα οποία τα 5 **ml** είναι ερυθρά. Άρα, πρόκειται για ένα διάλυμα 5%.

β. Δεδομένου ότι η **ελάχιστη (αλλά μη ακριβής) μονάδα όγκου** που διαθέτουμε στο εργαστήριο είναι η **σταγόνα** (Μ 0.05 ml), μπορούμε, σε περιπτώσεις που δεν απαιτείται μεγάλη ακρίβεια, να αραιώσουμε 1 σταγόνα ερυθρών αιμοσφαιρίων με 19 σταγόνες φυσιολογικού ορού. Έτσι προκύπτει διάλυμα 20 σταγόνων από τις οποίες η μία είναι ερυθρά, δηλαδή 1/20=0.05 ή 5%.

2ο Έστω ότι μας ζητείται να παρασκευάσουμε διάλυμα λευκωματίνης 22% v/v.

Η διαδικασία με τις σταγόνες που παρουσιάζεται στο β μέρος του 1ου παραδείγματος δεν είναι πρακτικώς αξιοποιήσιμη, γιατί θα πρέπει να μετρήσουμε κλασματικά μέρη σταγόνων. Αντί γι' αυτό βάζουμε 22 ml λευκωματίνης σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και προσθέτουμε διαλύτη ως τη χαραγή.

3ο Για να παρασκευάσουμε διάλυμα μιας οποιασδήποτε ουσίας 3% v/v αναμειγνύουμε 3 ml της δοθείσας ουσίας με 97 ml κατάλληλου διαλύτη. Έτσι έχουμε **περίπου** 100 ml διαλύματος από τα οποία τα 3 ml είναι η δοθείσα ουσία.

Πρέπει να τονίσουμε ότι μία τέτοια διαδικασία δεν είναι καλό να ακολουθείται σε περιπτώσεις που απαιτείται μεγάλη ακρίβεια, γιατί το τελικό διάλυμα **δε θα έχει όγκο ακριβώς ίσο** με 100 ml. Γενικά, μία τέτοια διαδικασία ακολουθείται για παρασκευάσματα που θα χρησιμοποιηθούν σε εξετάσεις με χαμηλές απαιτήσεις ακρίβειας.

11.4. Πλάσμα - παράγωγα πλάσματος

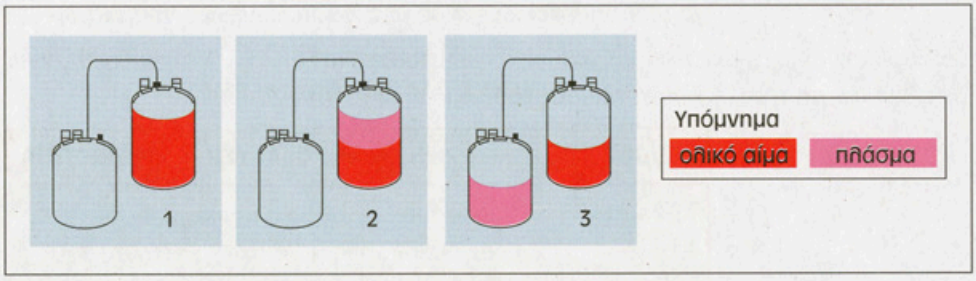
Πλάσμα λέγεται το υγρό μέσα στο οποίο αιωρούνται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Είναι πλούσιο σε νερό, άλατα, πρωτεΐνες, γλυκόζη, βιταμίνες, λιπίδια, ορμόνες και χρωστικές ουσίες. Το χρώμα του είναι υποκίτρινο.

Η συλλογή του πλάσματος γίνεται ως εξής:

Α. Μετά τη συλλογή του ολικού αίματος του εθελοντή αιμοδότη σε σύστημα διπλού ασκού αιμοδοσίας, γίνεται ο διαχωρισμός του πλάσματος ακολουθώντας σε γενικές γραμμές την παρακάτω διαδικασία:

- Φυγοκεντρούμε τον ασκό στις 1000 στροφές/λεπτό για 2 λεπτά της ώρας. Με τη φυγοκέντρηση διαχωρίζονται τα συστατικά σε στοιβάδες. Στο κάτω μέρος του ασκού είναι η στοιβάδα των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ακολουθεί η στοιβάδα των αιμοπεταλίων και τέλος η στοιβάδα του πλάσματος.
- Αναρροφούμε με ειδικό μηχάνημα τη στοιβάδα του πλάσματος και την τοποθετούμε σε φιάλη. Στη συνέχεια, ακολουθεί άλλη επεξεργασία.

Υπενθυμίζουμε ότι πρέπει να προσέξουμε:
Κατά τη διαδικασία του διαχωρισμού πρέπει να εξασφαλίζονται άσηπτες συνθήκες.
Να μην παραβιάζεται η στεγανότητα (κλειστό σύστημα).
Αν παραβιασθεί η στεγανότητα, το δείγμα χορηγείται μέσα σε 6 ώρες από τη στιγμή της παρασκευής του, εκτός και αν καταψυχθεί.



Εικόνα 11.3 : *Διαχωρισμός πλάσματος*

Β. Εκτός από την παραπάνω τεχνική, υπάρχει και **η αυτόματη μέθοδος ή μέθοδος εθελοντικής πλασμαφαίρεσης**. Με τη βοήθεια αυτόματων οργάνων συλλέγεται ολικό αίμα από έναν *εθελοντή* αιμοδότη, διαχωρίζεται το πλάσμα και επι-

στρέφονται στην κυκλοφορία τα κυτταρικά στοιχεία του εθελοντή αιμοδότη.

Κατά τη διαδικασία πλασμαφαίρεσης τηρούμε άσηπτες συνθήκες.
Η πλασμαφαίρεση δεν πρέπει να γίνεται συχνότερα από 8 εβδομάδες.
Κάθε 4 μήνες πρέπει να γίνεται εξέταση στον εθελοντή αιμοδότη για το ποσό των πρωτεϊνών στον ορό του (φυσιολογικές τιμές: 6 g ανά dl).

Γ. Εκτός από την εθελοντική πλασμαφαίρεση, γίνεται και **θεραπευτική πλασμαφαίρεση** σε περιπτώσεις ομόλογης μετάγγισης.

Στο πλάσμα γίνεται σχολαστικά όλο το εύρος των εργαστηριακών εξετάσεων του ολικού αίματος.

Τα οργανικά συστατικά του πλάσματος μπορούν να διαχωριστούν και να απομονωθούν με διάφορες τεχνικές. Ο τρόπος που τα διαθέτουμε, η προεργασία την οποία πρέπει να υποστεί το πλάσμα για να τα πάρουμε και η θεραπευτική χρησιμότητά τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Σε όλα τα διαχωριζόμενα συστατικά γίνεται επεξεργασία ή με θέρμανση ή με υπεριώδη ακτινοβολία ή με προσθήκη ειδικών ουσιών για να αδρανοποιηθούν οι πιθανοί ιοί, ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος μετάδοσης ιογενών νοσημάτων.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

ΕΙΔΟΣ	ΜΟΡΦΗ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ
πλάσμα	**1.** πλάσμα ενός δότη (-18°C) **2.**πρόσφατα κατεψυγμένο – 30°C	από το ολικό αίμα διαχωρίζεται το πλάσμα	σε απώλειες όγκου του αίματος, τραυματικό σοκ, εγκαύματα, αιμορραγική διάθεση

	3. υγρό 3–6°C **4**. ξηρό		είναι αποτελεσματικό μέχρι και 5 ημέρες από την ημερομηνία λήξης του ολικού αίματος από το οποίο αποχωρίστηκε, για όλες τις παραπάνω περιπτώσεις
Λευκωματίνη	διάλυμα 5%, 25% και διάλυμα 25%	κλασματοποίηση του πλάσματος	εγκαύματα, αιμορραγία, καταπληξία, περιτονίτιδα, οξεία παγκρεατίτιδα
Ανοσοσφαιρίνες	**1**. πολυδύναμες	κλασματοποίηση κοινού πλάσματος	προφύλαξη από λοιμώδη αίτια, επίκτητη διαταραχή στη σύνθεση των αντισωμάτων, ανεπάρκεια παραγωγής αντισωμάτων, διαταραχή στη λειτουργία των Β λεμφοκυττάρων
	2.ειδικές ή άνοσες	πλάσμα από ανοσοποιημένους δότες	προφύλαξη για την ανοσοποίηση

			Rhesus αρνητικών μητέρων, προφύλαξη από την παρωτίτιδα, τον κοκκύτη, τον τέτανο, την ευλογιά, τη λύσσα, την ηπατίτιδα Β, τον έρπητα ζωστήρα, στην αντιμετώπιση της θρομβοπενικής πορφύρας, της σηψαιμίας των νεογνών
Παράγων VIII	κρυοκαθίζημα ή συμπυκνωμένο	πρόσφατο κατεψυγμένο πλάσμα	για τη θεραπεία της αιμορροφιλίας Α, επίκτητη ή συγγενή ινωδογονοπενία
Προθρομβινικό σύμπλεγμα		πλάσμα που κατακρημνίζεται ο παράγοντας VIII και το ινωδογόνο	θεραπεία αιμορροφιλίας Β αιμορραγία
Ινωδογόνο	ξηρή 40°C	από νωπό πλάσμα μέσα σε 6 ώρες από τη λήψη	σε ινωδογονοπενία λόγω διάχυτης ενδοαγγεια-

		του ολικού αίματος	κής πήξης, παθολογική ινωδόλυση, μεγάλες αιμορραγίες, φυσιολογικό τοκετό, χειρουργικές και μαιευτικές επεμβάσεις
Παράγων XIII		πλακουντιακό αίμα ή πρόσφατο κατεψυγμένο πλάσμα	αντιμετώπιση συγγενούς έλλειψης του παράγοντα XIII
Αντιθρομβίνη III		πρόσφατο κατεψυγμένο πλάσμα	την αποτροπή θρομβοεμβολικών επεισοδίων, σε διάσπαρτη ενδοαγγειακή πήξη

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Στις ενότητες αυτού του κεφαλαίου δόθηκε ο ορισμός του εναιωρήματος και ο τρόπος παρασκευής εναιωρημάτων διαφορετικής πυκνότητας. Παρουσιάστηκαν οι τρόποι διαχωρισμού των αιμοπεταλίων και του πλάσματος και, τέλος, δόθηκαν τα είδη των παραγώγων του πλάσματος και η χρησιμότητά τους.

Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:

1. Μετατρέπουμε τους πλαγιότιτλους σε ερωτηματικές προτάσεις και δίνουμε τις αντίστοιχες απαντήσεις. Π.χ.: Ποια είναι η αρχή της μεθόδου; Τι δείγμα χρησιμοποιούμε; κ.ο.κ.

2 Απαντάμε σε όλες τις ερωτήσεις που ακολουθούν τους πλαγιότιτλους και ορίζουν το θέμα που αναπτύσσεται στις παραγράφους.

Ας δούμε τι καταλάβαμε:

1. Έχουμε διάλυμα 10% v/v αιθανόλης όγκου 25 ml. Πόσα ml διαλύτη πρέπει να προσθέσουμε για να πάρουμε διάλυμα συγκέντρωσης 5% v/v ;

2. Ποια είναι σε γενικές γραμμές η πορεία της τεχνικής του διαχωρισμού των αιμοπεταλίων και του πλάσματος;

3. Ποια σημεία πρέπει να προσέξουμε κατά την τεχνική του διαχωρισμού των αιμοπεταλίων και του πλάσματος;

4. Σε ποιες παθολογικές καταστάσεις θα βοηθούσε η μετάγγιση πλάσματος, ανοσοσφαιρινών και ινωδογόνου;

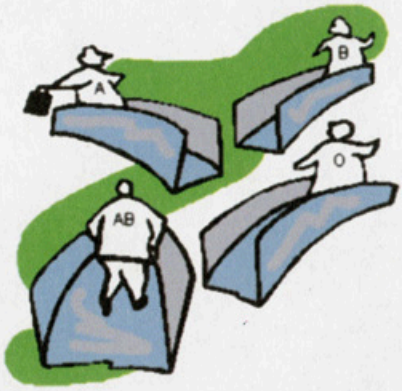
5. Ποιοι από τους παρακάτω εθελοντές δότες αιμοπεταλίων είναι κατάλληλοι και ποιοι δεν είναι; Δικαιολογούμε την απάντησή μας:
   Δότης Α: Ηλικίας 62 ετών και βάρους 85 κιλών
   Δότης Β: Ηλικίας 22 ετών και βάρους 50 κιλών
   Δότης Γ: Ηλικίας 45 ετών και βάρους 68 κιλών
   Δότης Δ: Ηλικίας 27 ετών και βάρους 70 κιλών, ο οποίος πριν 10 ημέρες είχε πάρει ασπιρίνη
   Δότης Ε: Ηλικίας 40 ετών και βάρους 65 κιλών, με ιστορικό θρομβοφλεβίτιδας στο αριστερό άνω άκρο

Πρόταση για περαιτέρω διερεύνηση:

1. Οι ανάγκες της πατρίδας μας σε αίμα ετησίως ανέρχονται σε πολύ μεγάλο αριθμό μονάδων αίματος. Αναζητήστε τον αριθμό αυτό και αναπτύξτε τη σημασία της εθελοντικής αιμοδοσίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

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 προδιορισμού του αντιγόνου D των ερυθροκυττάρων σε δοκιμαστικό σωληνάριο
12.9 Τεχνική προδιορισμού 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 ΑΒΟ

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 γονιαδιακών 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 πολλά 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 ΑΒΟ.

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

Βασικά περιλαμβάνει δύο τύπους ερυθροκυτταρικών α-

ντιγόνων, που η στερεοχημική τους δομή συμβολίζεται με τα γράμματα **Α** και **Β**.

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 **Α** και **Β**.

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 Α και Β από τη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων είναι αρκετή για να μας επιτρέψει να κατατάξουμε τους ανθρώπους σε 4 ομάδες αίματος, δημιουργώντας έτσι το αντιγονικό σύστημα ΑΒΟ.

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 – Α και αντι - Β στον **ορό του αίματος** κάθε ανθρώπου . Αν το άτομο έχει το αντιγόνο Α στα ερυθρά του, ο ορός του αποκτά το αντι – Β αντίσωμα. Αν υπάρχει το Β αντιγόνο στα ερυθρά, ο ορός αποκτά το αντι – Α 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 ΑΒΟ 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 Α, Β ή ΑΒ έχει στα ερυθροκύτταρά του.

Στο εργαστήριο (in vitro) λοιπόν, 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 – Α ή αντι – Β).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Όταν προστεθεί το κατάλληλο αντίσωμα, αυτό πλησιάζει 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 «κολλήσουν» 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– Α λέγονται μονοκλωνικοί. Αν έχουν αντι – Α και αντι - Β λέγονται πολυκλωνικοί. Οι μονοκλωνικοί αντιοροί έχουν ελεγχθεί και δεν περιέχουν ιούς ούτε άλλου 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 Α ή Β αντιγόνο. Οι ουσίες αυτές λέγονται **λεκτίνες**.

Εικόνα 12.1: *Αντιοροί προσδιορισμού αντιγόνων Α και Β*

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,

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

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- διαφανοσκόπιο (φωτιζόμενη και θερμαινόμενη πλάκα 22°C)
- χρονόμετρο χειρός
- γάντια
- πλαστικοποιημένο χαρτοσέντονο
- αντικειμενοφόρες πλάκες
- ξύλινα ραβδάκια
- πλαστικά ή γυάλινα τριχοειδή
- 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 πλαστικοποιημένο χαρτοσέντονο επάνω στον πάγκο εργασίας και συγκεντρώνουμε τα υλικά.

3. Βάζουμε επάνω στο αριστερό τμήμα της αντικειμενοφόρου πλάκας μία σταγόνα αντιορού αντι – Α και στο δεξί τμήμα μία σταγόνα αντιορού αντι– Β.

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– Α και αντι– Β 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.

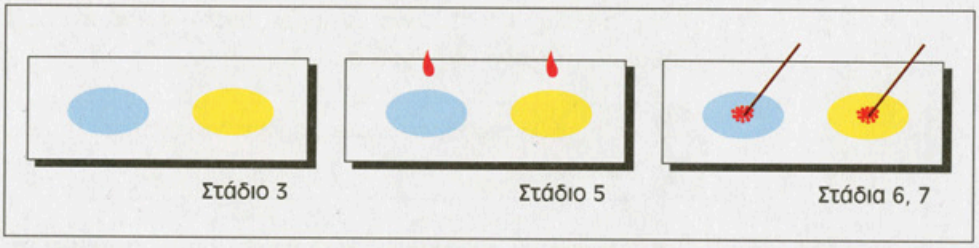
6. Αναμειγνύουμε κυκλικά με καθαρό ξύλινο ραβδάκι ή τριχοειδές τη σταγόνα αντι– Α με τη σταγόνα του δείγματος. Ύστερα πετάμε το μέσο ανάμειξης στο διάλυμα χλωρίνης.

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

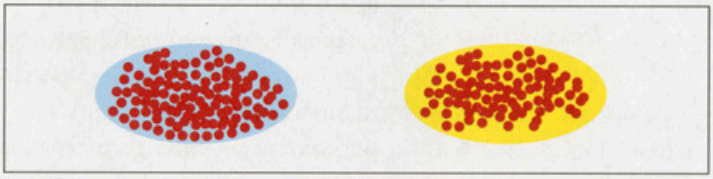
Όταν το αποτέλεσμα χαρακτηριστεί **θετικό**, δηλαδή δούμε σχηματισμό κροκίδων, σημαίνει ότι τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα έχουν συνενωθεί με τα ομόλογα αντισώματα.

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

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

Όταν το αποτέλεσμα χαρακτηριστεί **αρνητικό**, δηλαδή δεν εμφανιστούν κροκίδες, σημαίνει ότι δεν υπάρχουν ερυθροκυτταρικά αντιγόνα Α ή Β, γι αυτό δεν έγινε η συνένωση με τους αντι– Α ή αντι– Β 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 Α και Β.



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

Στις πραγματικές εργαστηριακές συνθήκες εργασίας ταυτόχρονα με τους αντι– Α και αντι– Β ορούς χρησιμοποιείται και ο αντι– ΑΒ ορός. Στην περίπτωση αυτή επάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούνται συνολικά 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– Α και αντι– Β ορών, ενώ ταυτόχρονα προσδιορίζεται και η ομάδα αίματος ΑΒ. 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 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

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

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 περίσσευμα των ερυθρών θα ελαττώσει την ισχύ των αντιδραστηρίων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- φυγόκεντρος
- διαφανοσκόπιο
- γάντια
- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων (στατώ)
- δοκιμαστικά σωληνάρια αιμολύσεως
- υαλογράφος
- σιφώνιο 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, επάνω σε δύο δοκιμαστικά σωληνάρια αιμολύσεως. Σε κάθε σωληνάριο σημειώνουμε και από μία ένδειξη : αντι–Α, αντι– Β.

> Τα δοκιμαστικά σωληνάρια πρέπει να είναι απολύτως καθαρά.

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

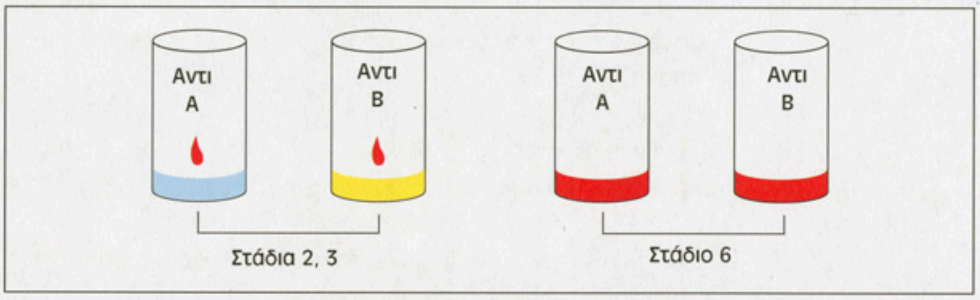
3. Προσθέτουμε με σιφώνιο Pasteur μία σταγόνα εναιωρήματος ερυθρών σε κάθε σωληνάριο.

> 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 Α και Β 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:

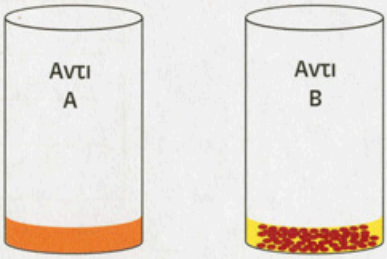
Τα αντισώματα του ορού αρχίζουν να παράγονται μετά τη γέννηση του ανθρώπου. Η παραγωγή τους αυξάνεται τα πρώτα 5 –6 χρόνια και παραμένει στάσιμη σε όλη τη διάρκεια της υπόλοιπης ζωής του.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

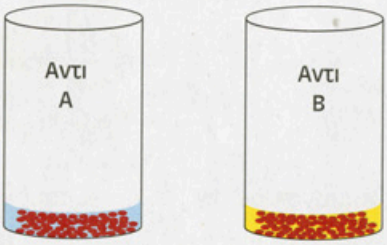
- Η δημιουργία συγκόλλησης στο σωληνάριο όπου βάλαμε τη σταγόνα με τον αντι – Α ορό δηλώνει την ύπαρξη αντιγόνου Α στο ερυθροκύτταρο.

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



- Σε περιπτώσεις αρνητικού αποτελέσματος δεν υπάρχουν ερυθροκυτταρικά αντιγόνα Α ή Β και δεν γίνεται συνένωση με τους αντι– Α ή αντι– Β ορούς.

- Αν δημιουργηθεί συγκόλληση και στα δύο σωληνάρια με τους αντι – Α και αντι – Β ορούς δηλώνει την ύπαρξη αντιγόνου Α και Β στο ερυθροκύτταρο.



Με τον προσδιορισμό των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων καθορίζεται η ομάδα αίματος του ανθρώπου. Ανάλογα με την ύπαρξη ή μη των αντιγόνων Α κα Β διακρίνουμε 4 ομάδες αίματος:

ΟΜΑΔΑ ΑΙΜΑΤΟΣ (Αν υπάρχει το αντιγόνο)	ΑΝΤΙ – Α ΟΡΟΣ + ΔΕΙΓΜΑ (αποτέλεσμα)	ΑΝΤΙ – Β ΟΡΟΣ + ΔΕΙΓΜΑ (αποτέλεσμα)
Α	συγκόλληση	όχι συγκόλληση
Β	όχι συγκόλληση	συγκόλληση
ΑΒ	συγκόλληση	συγκόλληση
Ο	όχι συγκόλληση	όχι συγκόλληση

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

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.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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.**

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε ορό ή πλάσμα.

Το δείγμα δεν πρέπει να είναι αιμολυμένο.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- διαφανοσκόπιο
- γάντια
- πλαστικοποιημένο χαρτοσέντονο
- σιφώνια Pasteur
- αντικειμενοφόρες πλάκες
- ξύλινα ραβδάκια ή πλαστικά 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 πλαστικοποιημένο 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.

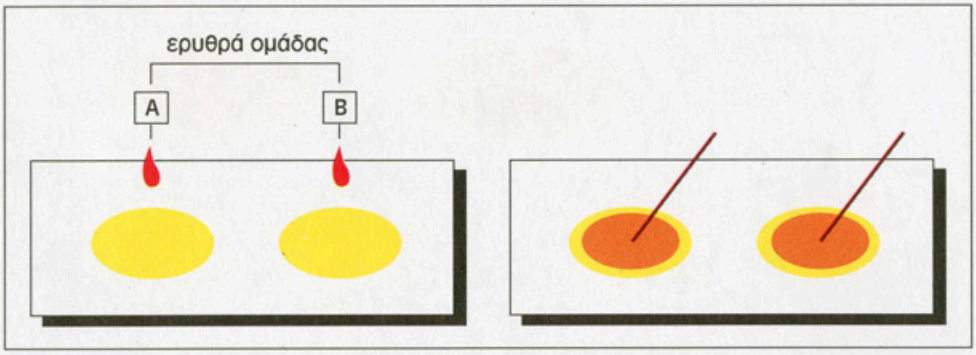
4. Προσθέτουμε από μία σταγόνα εναιωρήματος ομάδας Α και ομάδας Β, αντίστοιχα, στις ομάδες του δείγματος.

5. Αναμειγνύουμε ανά δύο τις σταγόνες με διαφορετικό ξύλινο ραβδάκι ή πλαστικό 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 ΑΒΟ (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– Α και αντι– Β 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 Α. Αυτό σημαίνει ότι στον ορό ή το πλάσμα υπάρχουν αντισώματα αντι – Α. Άρα ο ορός προέρχεται από άτομο που ανήκει στην ομάδα αίματος Β.

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

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

- 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 ΑΒ.

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 κιτρικά άλατα παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

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

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 πλαστικών σωληναρίων
- δοκιμαστικά σωληνάρια αιμολύσεως
- 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 αιμολύσεως 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 κατακρατηθούν 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.

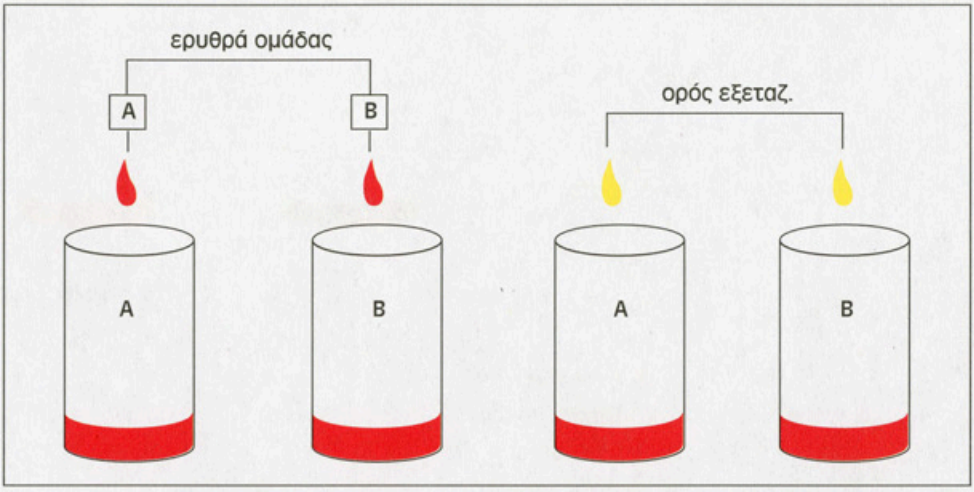
4. Ανακινούμε με απαλές κινήσεις.

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 ΑΒΟ*

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:* **$α_1$.** Έγινε αιμόλυση των ερυθροκυττάρων η οποία φαίνεται με το ροδαλό χρώμα του υπερκείμενου υγρού μετά τη φυγοκέντρηση.

$α_2$. Έγινε συγκόλληση η οποία φαίνεται με το σχηματισμό κροκίδων.

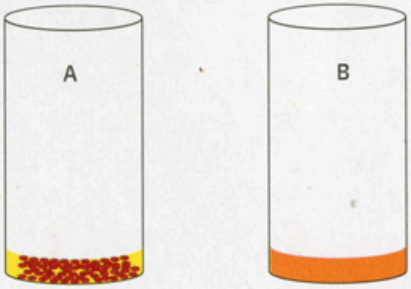
β. *Αρνητικό:* **$β_1$.** Δεν έγινε αιμόλυση, γι' αυτό και δεν άλλαξε το χρώμα του υπερκείμενου υγρού μετά τη φυγοκέντρηση

$β_2$. Δεν έγινε συγκόλληση, γι' αυτό και δεν σχηματίστηκαν κροκίδες.

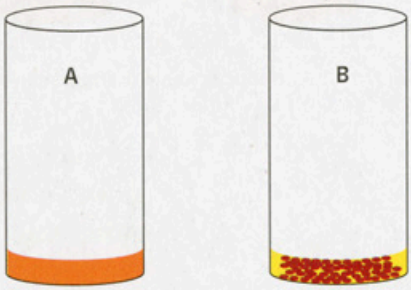
ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

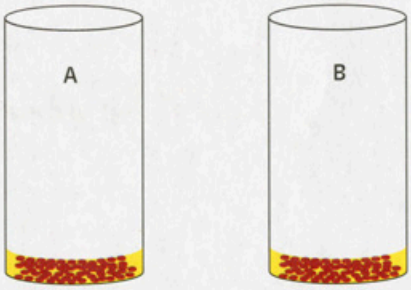
- Αν γίνει συγκόλληση μόνο στο μείγμα με τα αντιγονικώς γνωστά ερυθρά αιμοσφαίρια ομάδας Α, σημαίνει ότι στον ορό ή το πλάσμα υπάρχουν αντισώματα αντι – Β και ως ομάδα αίματος του εξεταζόμενου καθορίζεται η Β.



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

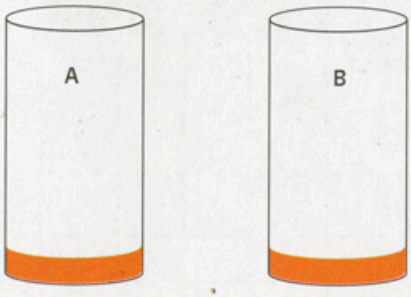


- Αν γίνει συγκόλληση και στα δύο μείγματα με τα αντιγονικώς γνωστά ερυθρά αιμοσφαίρια ομάδας Α και Β, σημαίνει ότι στον ορό ή το πλάσμα υπάρχουν



αντισώματα αντι – Β και αντι – Α και ως ομάδα αίματος του εξεταζόμενου καθορίζεται η Ο.

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 ΑΒ.



Υπάρχει περίπτωση να προκύψουν ασάφειες και δυσκολίες στον προσδιορισμό της ομάδας Α. Αυτό συμβαίνει γιατί το αντιγόνο Α 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 λεκτίνες. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται η λεκτίνη 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 Α (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 Α και Β των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

ΟΜΑΔΕΣ ΑΙΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΑΒΟ									
	ΑΜΕΣΗ ΜΕΘΟΔΟΣ					ΑΝΑΣΤΡΟΦΗ ΜΕΘΟΔΟΣ			
	εξεταστέα ερυθρά					εξεταστέος ορός			
ΟΜΑΔΑ	αντι-A_1	αντι-Α	αντι-Β	αντι-Α, Β	ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΕΡΥΘΡΩΝ	Γνωστά ερυθρά ομάδας Α	Γνωστά ερυθρά ομάδας Β	Γνωστά ερυθρά ομάδας 0	ΑΝΤΙ ΣΩΜΑΤΑ ΟΡΟΥ
A_1	+	+	-	+	A_1	-	+	-	αντι– Β
Α	-	+	-	+	Α	-	+	-	αντι– Β
Β	-	-	+	+	Β	+	-	-	αντι– Α
ΑΒ	+	+	+	+	ΑΒ	-	-	-	κανένα
0	-	-	-	-	-	+	+	-	αντι–Α, αντι– Β

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 εθελοντή αιμοδότη και στο δείγμα του ατόμου στο οποίο θα γίνει μετάγγιση αίματος (δέκτης) αλλά 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 ΑΒΟ		ΠΑΙΡΝΟΥΝ ΑΙΜΑ ΑΠΟ	ΔΙΝΟΥΝ ΑΙΜΑ ΣΕ
I	Α	Α	Α
II	Β	Β	Β
III	ΑΒ	Α, Β, 0	ΑΒ
IV	0	0	Α, Β, ΑΒ

Πίνακας 12.3: *Δυνατότητες μεταγγίσεως*

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

Τα αντιγόνα του συστήματος ΑΒΟ 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 ΑΒΟ, είναι και αυτά προεξοχές της κυτταρικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων, διαφορετικής όμως στερεοχημικής δομής από αυτά του ΑΒΟ. 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), Cē (ή CC ή C̄C̄) Eē (ή EE ή Eē). Οι **φαινότυποι** όμως, οι κατασκευές των οποίων τελικά φαίνονται (εκφράζονται) στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης είναι πέντε ποικιλίες, οι D, C, ē, E, ē, 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 αλλά 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 – ē, αντι – E και αντι – ē. Δεν υπάρχει αντιορός d, αφού, όπως είπαμε, η γονιδιακή πληροφορία d υπάρχει αλλά 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, αλλά να μην ανιχνεύεται σε μεγάλη συχνό-

τητα. Έτσι, δε δίνει εύκολα συγκόλληση με το αντίστοιχο αντίσωμα 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 ΑΒΟ:
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 συγκολλούν το αντιγόνο D των ερυθροκυττάρων.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- διαφανοσκόπιο – ρεζοσκόπιο (37 – 40°C)
- γάντια
- πλαστικοποιημένο χαρτοσέντονο
- αντικειμενοφόρος πλάκα
- σιφώνιο Pasteur
- ξύλινο ραβδάκι ή πλαστικό 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 πλαστικοποιημένο 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.

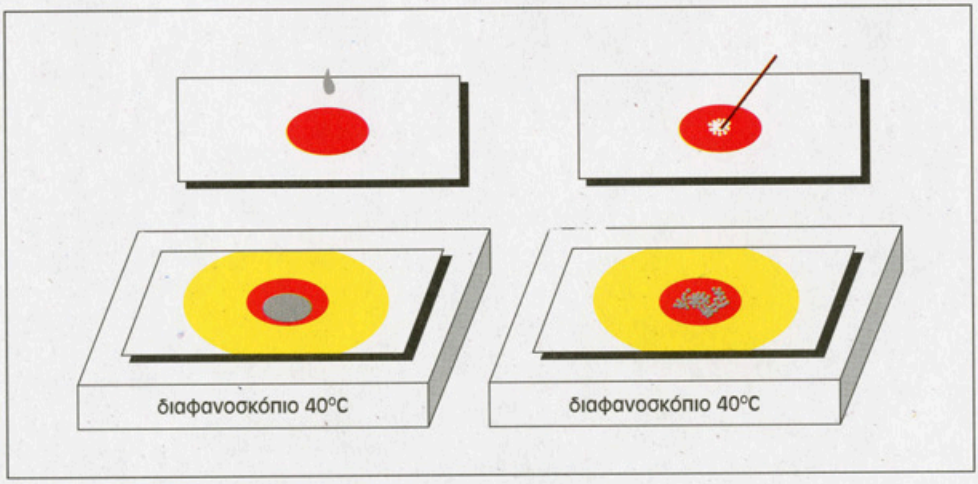
4. Αναμειγνύουμε τις δύο σταγόνες με ξύλινο ραβδάκι.

> Το μέσο ανάμειξης πρέπει να είναι καθαρό.

5. Ανασηκώνουμε 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 συγκολλούν το αντιγόνο D των ερυθροκυττάρων.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- φυγόκεντρος
- διαφανοσκόπιο
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- γάντια
- υαλογράφος
- 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 ΑΒΟ: Οι μικροποσότητες των αντιορών και του δείγματος τοποθετούνται στη βάση των σωληναρίων για να μην κατακρατηθούν 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:

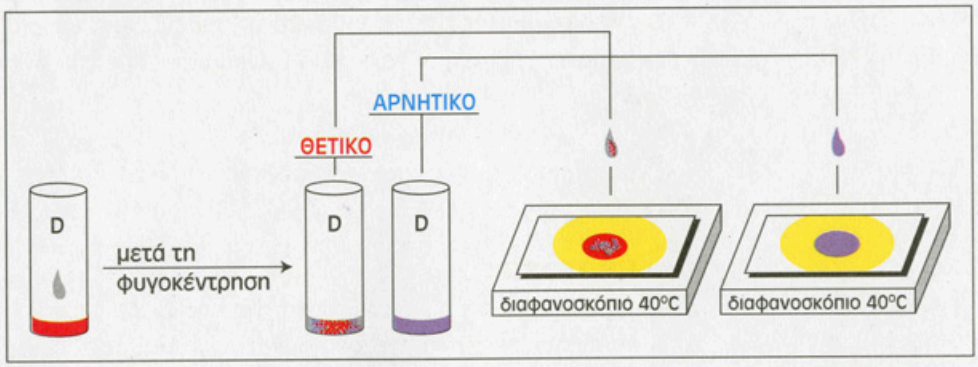
α. Μεταφέρουμε με σιφώνιο Pasteur μία σταγόνα επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

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. ***Θετικό:*** 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 ερυθροκυτάρων 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 υποβοηθά 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 αιμολύσεως
- 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. **Φυσιολογικός 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 δραστικότητα 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 κλίβανο και σε θερμοκρασία 37°C για 15 – 30 λεπτά της ώρας.

ΠΡΟΣΟΧΗ !

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

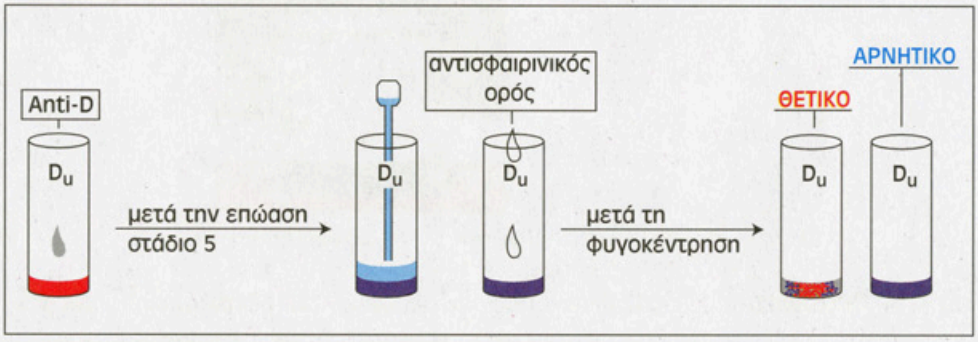
6. Προσθέτουμε ίση ποσότητα NaCl για να "πλύνουμε" τρεις φορές τα ερυθροκύτταρα.

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 Du.*

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 ξεχνώ 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 κ (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 αιμολύσεως
- 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 άλλου 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 άλλους προσδιορισμούς.

Σύγχρονες τεχνικές

Οι προσδιορισμοί των αντιγόνων και των αντισωμάτων του συστήματος ΑΒΟ, 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 μικροπλακών

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

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

Μικροσωληνάρια 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 (+).

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

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 πλάκα 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 πλασματικές συγκολλήσεις κ.λπ.

Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:

1. Μετατρέπουμε τους πλαγιότιτλους 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 πλαγιότιτλους και ορίζουν το θέμα που αναπτύσσεται στις παραγράφους.

Ας δούμε τι καταλάβαμε:

1. Τι δηλώνει η συντομογραφία B Rh(+);

2. Ένα απαντητικό δελτίο εργαστηρίου έγραφε:
   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 Ο 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 αξιολόγησης 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.	☐	☐
β. Με την ανάστροφη μέθοδο ελέγχουμε τα αντισώματα στον ορό του αίματος χρησιμοποιώντας γνωστά ερυθρά.	☐	☐
γ. Με την άμεση μέθοδο ελέγχουμε τα αντιγόνα των ερυθρών χρησιμοποιώντας αντιορούς.	☐	☐
δ. Με την άμεση μέθοδο ελέγχουμε τα αντισώματα στα ερυθρά αιμοσφαίρια χρησιμοποιώντας γνωστά ερυθρά.	☐	☐

Ας εφαρμόσουμε αυτά που μάθαμε:

1. Κατά την άμεση τεχνική προσδιορισμού των αντιγόνων του συστήματος ΑΒΟ παρατηρήθηκε συγκόλληση στο αίμα με τον αντι-Α ορό και δεν παρατηρήθηκε συγκόλληση στο αίμα με τον αντι – ΑΒ ορό.

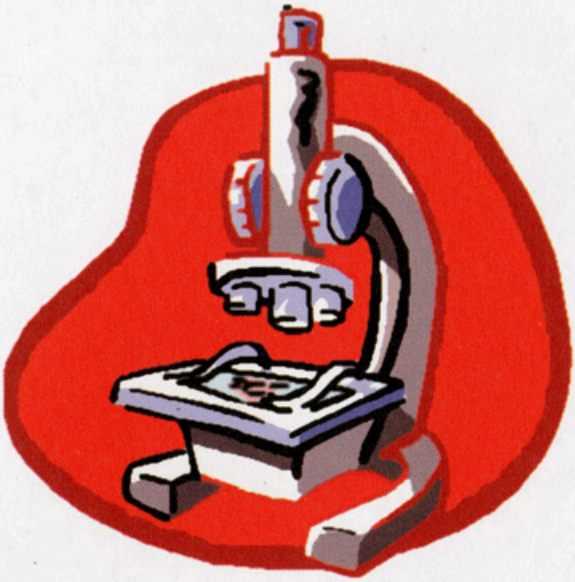
α. Ποια τεχνικά σφάλματα προκάλεσαν αυτήν την ασυμφωνία;
β. Τι θα κάνουμε για να διευκρινίσουμε ποιο είναι το σωστό αποτέλεσμα;

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;

συμβατότητα



13.1 Συμβατότητα

13.2 Άμεση επείγουσα δοκιμασία διασταύρωσης

13.3 Έμμεση μη επείγουσα δοκιμασία διασταύρωσης

13.4 Δοκιμασίες COOMBS

13.4.1 Άμεση δοκιμασία COOMBS

13.4.2 Έμμεση δοκιμασία COOMBS

Όταν ολοκληρωθεί αυτή η ενότητα θα έχεις τη δυνατότητα:

- ✓ *να οργανώνεις τον τρόπο εκτέλεσης των τεχνικών συμβατότητας.*
- ✓ *να επιλέγεις τα απαραίτητα υλικά και σκεύη για την εκτέλεση των τεχνικών συμβατότητας.*
- ✓ *να εκτελείς με ασφάλεια, επιτυχία και αξιοπιστία τις τεχνικές συμβατότητας.*
- ✓ *να συγκρίνεις τα αποτελέσματα των τεχνικών και να διερευνάς τα ασύμβατα στοιχεία για μια 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.

13.1. Συμβατότητα

Η ιστορία της μετάγγισης του αίματος είναι τόσο παλιά όσο και η Ιατρική. Οι άνθρωποι πίστευαν ότι το αίμα είναι η κατοικία της ψυχής και των αρετών. Οι αναγεννητικές του ιδιότητες το έκαναν μυστηριακό και προκάλεσαν τη δημιουργία μύθων.

Πρώτος ο γιατρός Philip Syng Physiks μετάγγισε αίμα από άνθρωπο σε άνθρωπο.

- **Τι σημαίνει συμβατότητα;**

Στις μεταγγίσεις, όπως και στις μεταμοσχεύσεις, κατά τις οποίες ιστός ενός ανθρώπου εισάγεται σε άλλο άνθρωπο, είναι απαραίτητο να εξασφαλιστούν οι προϋποθέσεις, ώστε ο εισερχόμενος ιστός να γίνει αποδεκτός από το ανοσοποιητικό σύστημα του δέκτη (ή λήπτη). Αυτό σημαίνει ότι ο δότης με το λήπτη θα πρέπει να έχουν **ανοσολογική συγγένεια**, δηλαδή όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ομοιότητα ή ταυτότητα των σπουδαιότερων κυτταρικών αντιγόνων. Τότε η μεταμόσχευση ή η μετάγγιση είναι **συμβατή**.

- **Πώς ελέγχεται η συμβατότητα;**

Το όφελος από τη χορήγηση αίματος είναι μεγάλο. Οι υποχρεωτικές προεργασίες πριν από τη μετάγγιση ακολουθούν θεμελιώδεις κανόνες, ώστε τα αποτελέσματα των δοκιμασιών να είναι αξιόπιστα. Οι προεργασίες αυτές λέγονται **τεχνικές ελέγχου συμβατότητας**. Σκοπός των αναλύσεων είναι να εντοπιστούν όσο το δυνατόν περισσότερα πιθανά ασύμβατα στοιχεία τα οποία θα προκαλέσουν επικίνδυνες για τη ζωή του ασθενούς παρενέργειες.

- **Αν ξέρουμε τις ομάδες αίματος δότη και δέκτη γιατί χρειάζεται να γίνει ο έλεγχος συμβατότητας;**

Τα ασύμβατα στοιχεία μπορεί να προέρχονται είτε από την παρουσία πλήρων ή ατελών αντισωμάτων των συστημάτων ΑΒΟ, Rhesus κ.α. είτε από την παρουσία μιας υποομάδας ή από λανθασμένο καθορισμό της ομάδας αίματος του δέκτη και του δότη.

Αν υπάρχουν αντισώματα στον ορό του δέκτη τα οποία στρέφονται εναντίον των αντιγόνων του δότη, θα καταστρέψουν τα εισερχόμενα ερυθροκύτταρα. Εμείς στο εργαστήριο (in vitro) πρέπει να ελέγξουμε την ύπαρξή των αντισωμάτων αυτών για να προλάβουμε την καταστροφή τους.

Για το σκοπό αυτό γίνεται ανάμειξη των ερυθρών αιμοσφαιρίων του δότη με τον ορό του δέκτη. Γίνεται δηλαδή "μία δοκιμαστική μετάγγιση σε σωληνάρια". Το 1940 ο ερευνητής Moss εφάρμοσε πρώτος τη δοκιμασία συμβατότητας πριν από τη μετάγγιση. Ο αντισφαιρινικός ορός που χρησιμοποίησε περιέχει αντισώματα ικανά να δεσμεύουν όλες τις σφαιρίνες του ανθρώπου.

- **Ποιες είναι οι τεχνικές διασταύρωσης;**

Υπάρχουν δύο τεχνικές δοκιμασίες διασταύρωσης. Η **άμεση** και η **έμμεση**.

Για να εκτελεστούν πρέπει προηγουμένως να γίνει μια επεξεργασία των ερυθροκυττάρων του δότη. Αναζήτησε σε προηγούμενη διδακτική ενότητα *τη βοηθητική τεχνική για το πλύσιμο των αιμοσφαιρίων* και τη *βοηθητική τεχνική για την παρασκευή του εναιωρήματος των ερυθροκυττάρων.*

13.2. Άμεση επείγουσα δοκιμασία διασταύρωσης

- **Πότε γίνεται η Άμεση Επείγουσα Δοκιμασία Διασταύρωσης;**

Υπάρχουν περιπτώσεις κατά τις οποίες απαιτείται να χορηγηθεί όσο το δυνατόν γρηγορότερα μονάδα αίματος σε κάποιον ασθενή. Στόχος του εργαστηρίου είναι, μέσα σε ελάχιστο χρόνο, σε δείγμα αίματος του ασθενούς και του δότη:

α. Να προσδιορίσει την **ομάδα αίματος** των συστημάτων **ABO** και **Rhesus** .

β. Να διερευνήσει τη **συμβατότητα** του αίματος του **δότη** με το αίμα του **δέκτη.**

Γρήγορα οργανώνονται οι τεχνικές διαδικασίες ελέγχου

συμβατότητας και πραγματοποιείται η τεχνική της διασταύρωσης, ταυτόχρονα σε διαφορετικά δοκιμαστικά σωληνάρια.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζεται ο **ορός** του **δέκτη** στον οποίο πιθανώς υπάρχουν ασύμβατα αντισώματα.

> Ο ορός πρέπει να έχει διαχωριστεί από πρόσφατο δείγμα αίματος.
> Ο ορός πρέπει να μην είναι αιμολυμένος.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. **Εναιώρημα πλυμένων ερυθρών του δότη**, 5% σε NaCl 0.9%.

> Το δείγμα πρέπει να είναι πρόσφατο για να είναι ισχυρή η ανοσολογική έκφραση.
> Αν χρησιμοποιηθεί αντιπηκτικό, καλό είναι να επιλέγεται το EDTA για να μη δραστηριοποιείται το συμπλήρωμα.
> Το πλύσιμο των ερυθρών πρέπει να είναι σχολαστικό για να μην προκύψουν πλασματικά αρνητικά αποτελέσματα.
> Να μην τροποποιούμε αυθαίρετα την πυκνότητα του εναιωρήματος για να μην προκύψουν πλασματικά αρνητικές συγκολλήσεις.

2. **Φυσιολογικός ορός** NaCl 0.9% .
3. **Διάλυμα λευκωματίνης 22%:** Η λευκωματίνη ισχυροποιεί την αντιγονική έκφραση.

> Η πυκνότητα της λευκωματίνης δεν πρέπει να τροποποιείται για να μην προκύψουν πλασματικά θετικές συγκολλήσεις.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- υδατόλουτρο 37°C
- επιτραπ. χρονόμετρο
- φυγόκεντρος
- μικροσκόπιο
- γάντια, στυλό
- αυτοκόλλητες ετικέτες
- δοκιμαστικά σωληνάρια
- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων (στατώ)

- σιφώνια Pasteur
- αντικειμενοφόρος πλάκα
- καλυπτρίδα
- ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10

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

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε με ευκρίνεια επάνω σε τρεις αυτοκόλλητες ετικέτες τα στοιχεία του ασθενή (ονοματεπώνυμο, πατρώνυμο), όπως αυτά αναγράφονται στο αρχικό σωληνάριο συλλογής του δείγματος. Σημειώνουμε επίσης από ένα νούμερο 1, 2, 3 και τις επικολλούμε σε τρία δοκιμαστικά σωληνάρια.

Υπενθυμίζουμε:
Τα δοκιμαστικά σωληνάρια πρέπει να είναι απολύτως καθαρά.

2. Τοποθετούμε σε κάθε σωληνάριο τα υλικά, όπως αυτά αναγράφονται στον πίνακα:

ΔΕΙΓΜΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΕ ΣΤΑΓΟΝΕΣ	1	2	3
ορός δέκτη	3	3	3
εναιώρημα ερυθρών	3	3	3
λευκωματίνη	-	-	3

Πίνακας 13.1: *Αναλογίες αντιδραστηρίων και δείγματος*

Η παράλειψη ή η λανθασμένη τοποθέτηση των υλικών θα οδηγήσει σε αναξιόπιστα αποτελέσματα.

3. Τηρούμε τις παρακάτω συνθήκες:

ΣΩΛΗΝΑΡΙΟ	ΣΥΝΘΗΚΗ
1_o	Παραμονή στους 22 °C για 15 λεπτά.
2_o	Επώαση στους 37 °C για 15 λεπτά.
3_o	Επώαση στους 37 °C για 15 λεπτά.

Πίνακας 13.2: *Συνθήκες επώασης*

4. Φυγοκεντρούμε και τα τρία σωληνάρια στις 1000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά της ώρας.

5. Ελέγχουμε αν έγινε ή δεν έγινε αιμόλυση των ερυθροκυττάρων.

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

7. Μεταφέρουμε με διαφορετικά σιφώνια Pasteur μία σταγόνα από κάθε σωληνάριο επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και όλες τις σταγόνες τις απλώνουμε σε παράλληλες γραμμές. Για τη δημιουργία λεπτότερης στοιβάδας ερυθροκυττάρων χρησιμοποιούμε καλυπτρίδα.

8. Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο για την επιβεβαίωση συγκόλλησης ή μη συγκόλλησης. Αρχικά η παρατήρηση γίνεται με τον αντικειμενικό φακό 10Χ και στη συνέχεια με τον αντικειμενικό φακό 40Χ.

Εφόσον η διαδικασία δώσει αρνητικό αποτέλεσμα, το αίμα του δότη χαρακτηρίζεται ως συμβατό με το αίμα του ασθενή και γίνεται η μετάγγιση σύμφωνα με την ομάδα αίματός του.

Στο εργαστήριο πραγματοποιείται η τεχνική της έμμεσης μη επείγουσας διασταύρωσης χωρίς περικοπές στα στάδια της διαδικασίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. ***Θετικό:*** Έγινε αιμόλυση ή συγκόλληση των ερυθροκυττάρων και το αποτέλεσμα εκφράζεται ως **ασυμβατότητα**.

Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, αν μεταγγισθεί μονάδα αίματος από το συγκεκριμένο δότη προς τον ασθενή, τότε τα ερυθροκύτταρα του δότη θα συγκολληθούν από τα υπάρχοντα αντι – ερυθροκυτταρικά αντισώματα.

Αυτό θα επιφέρει πολλές επικίνδυνες για τη ζωή του δέκτη επιπλοκές και είναι αντίθετο με το στόχο της μεταγγισιοθεραπείας. Γι αυτό **η μετάγγιση είναι ασύμβατη**.

β. *Αρνητικό:* Δεν έγινε αιμόλυση ή συγκόλληση των ερυθροκυττάρων και το αποτέλεσμα εκφράζεται **ως συμβατότητα**.

Σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος ο δέκτης δεν έχει αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα για να συγκολληθούν τα ερυθροκύτταρα του δέκτη. Άρα **η μετάγγιση είναι συμβατή**.

13.3. Έμμεση μη επείγουσα δοκιμασία διασταύρωσης

Είναι μία διεξοδική ανίχνευση των περισσότερων ασύμβατων στοιχείων στον ορό του ασθενή τα οποία μπορεί να αντιδράσουν με το αίμα του δότη, ολοκληρώνεται σε τρεις φάσεις

- **Πρώτη φάση.** Κατά τη φάση αυτή (αρχική ή ψυχρή φάση) εξακριβώνονται κυρίως τα ψυχρά αντισώματα ελέγχοντας τη δημιουργία ή μη συγκόλλησης μεταξύ των ερυθροκυττάρων του δότη από τον ορό του δέκτη σε θερμοκρασία δωματίου (22°C).
- **Δεύτερη φάση.** Γίνεται έλεγχος για αιμόλυση ή συγκόλληση των ερυθροκυττάρων του δότη από τον ορό του δέκτη παρουσία λευκωματίνης 37°C (φάση λευκωματίνης). Με τις συνθήκες αυτές εξακριβώνονται τα περισσότερα είδη των πλήρων αντισωμάτων όπως τα αντι – D, αντι – E, αντι – C, της κατηγορίας των IgM.
- **Τρίτη φάση.** Τα ερυθροκύτταρα έρχονται σε επαφή με τον αντισφαιρινικό ορό. Η φάση αυτή (θερμή φάση) είναι πολύτιμη, γιατί επιβεβαιώνει την παρουσία ή μη όσων αντισωμάτων προσδιορίστηκαν κατά τις προηγούμενες φάσεις και επιπλέον ανιχνεύει τα ατελή αντισώματα. Παρ' όλα αυτά όμως δεν είναι δυνατό να ελεγχθούν όλα τα ασύμβατα στοιχεία.

Παράλληλα γίνεται επανέλεγχος των ομάδων αίματος του συστήματος ΑΒΟ και του συστήματος RHESUS του δέκτη και του δότη.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε ορό από τον δέκτη.

ΠΡΟΣΟΧΗ !
Ο ορός πρέπει να έχει διαχωριστεί από πρόσφατο δείγμα αίματος.
Ο ορός πρέπει να μην είναι αιμολυμένος.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- φυγόκεντρος
- υδατόλουτρο
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- γάντια
- στυλό
- αυτοκόλλητη ετικέτα
- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- δοκιμαστικό σωληνάριο
- 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. **Εναιώρημα ερυθροκυττάρων** του δότη, 5% σε NaCl 0.9%
2. **Φυσιολογικός ορός 0.9% NaCl:** Βοηθά στο να ανιχνευτούν τα πλήρη αντισώματα, γιατί γίνεται πιο ισχυρή η ικανότητα της πλήρους σύνδεσης τους με τα αντιγόνα, σε θερμοκρασία δωματίου. Παρά την ιοντική δύναμη της λευκωματίνης που χρησιμοποιείται στη δεύτερη φάση, η αναγνώριση των αντιγόνων χρειάζεται απαραίτητα την παρουσία του NaCl.
3. **Λευκωματίνη 22%:** Βοηθά στο να ανιχνευτούν τα ατελή ή πλήρη αντισώματα, κυρίως εναντίον των αντιγόνων του συστήματος Kell και σπανιότερα του Rhesus.

4. Αντισφαιρινικός ορός (αντι – αντίσωμα): Είναι αντίσωμα που φτιάχνεται από άλλους ζωικούς οργανισμούς εναντίον των ανθρώπινων αντισωμάτων. Βοηθά στην ανίχνευση πολλών και διαφορετικών αντισωμάτων των συστημάτων Rhesus, Kell συνδέοντας τα ελεύθερα Fc τμήματα των IgG αντισωμάτων.

ΠΡΟΣΟΧΗ !

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

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

Η ισχύς των αντιδραστηρίων πρέπει να ελέγχεται για να αποφευχθούν τα πλασματικά αρνητικά αποτελέσματα.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε με ευκρίνεια επάνω σε αυτοκόλλητη ετικέτα τα στοιχεία του ασθενή όπως αυτά αναγράφονται στο αρχικό σωληνάριο συλλογής του δείγματος και είμαστε έτοιμοι για την πραγματοποίηση της πρώτης φάσης.

2. Βάζουμε μέσα 2 σταγόνες ορού του δέκτη.

Ο ορός πρέπει να είναι πρόσφατος και χωρίς αιμόλυση. Σε περίπτωση διαδοχικών μεταγγίσεων ζητάμε νέο δείγμα αίματος κάθε 48 ώρες.

3. Προσθέτουμε μία σταγόνα εναιωρήματος 5% ερυθρών του δότη σε φυσιολογικό ορό.

4. Αφήνουμε το μείγμα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18° – 25°C) για 30 λεπτά της ώρας. Με την επώαση θα ισχυροποιηθεί η έκφραση των πλήρων αντισωμάτων.

Αλλαγή στα θερμικά όρια και το χρόνο της επώασης δίνει πλαστά θετικά αποτελέσματα.

5. Φυγοκεντρούμε στις 1000στροφές / λεπτό για 2 λεπτά της ώρας.

6. Παρατηρούμε την όψη του υπερκείμενου υγρού για τη διαπίστωση δημιουργίας ή μη αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων.

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

Αν η ανακίνηση γίνει βίαια θα αποσυνδεθούν τα αντισώματα από τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα και οι ασθενείς συγκολλήσεις δε θα αξιολογηθούν με κίνδυνο να χαρακτηρισθεί το αποτέλεσμα ως αρνητικό.

8. Ελέγχουμε αν δημιουργήθηκε ή όχι συγκόλληση των ερυθροκυττάρων.

Με αυτούς τους χειρισμούς ολοκληρώθηκε **η πρώτη φάση** της δοκιμασίας διασταύρωσης.

Σε περίπτωση **αρνητικών** αποτελεσμάτων (μη δημιουργία συγκόλλησης) συνεχίζουμε για την εκτέλεση της **δεύτερη φάσης**. Αρχικά:

9. Προσθέτουμε 3 σταγόνες λευκωματίνη.

Η ποσότητα της λευκωματίνης χρειάζεται να είναι ανάλογη με την ποσότητα του δείγματος γι' αυτό πρέπει να προσέξουμε να μην κατακρατηθεί στα τοιχώματα των σωληναρίων

10. Ανακινούμε απαλά για να αναμειχθούν τα υλικά.

11. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές / λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.

Η φυγοκέντρηση γίνεται, γιατί έτσι σταθεροποιείται το αντίσωμα επάνω στο αντιγόνο.

12. Παρατηρούμε για τη δημιουργία ή μη **αιμόλυσης** των ερυθροκυττάρων.

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

14. Παρατηρούμε για τη δημιουργία ή μη **συγκόλλησης** των ερυθροκυττάρων.

Αν δεν παρατηρηθεί ούτε αιμόλυση ούτε συγκόλληση των ερυθροκυττάρων, τότε:

15. Τοποθετούμε το σωληνάριο σε υδατόλουτρο 37°C για 30 – 60 λεπτά της ώρας.

ΠΡΟΣΟΧΗ !
Η θερμοκρασία ισχυροποιεί την ένωση αντιγόνου και αντισώματος.

16. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές / λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.

17. Ελέγχουμε για αιμόλυση των ερυθροκυττάρων.

18. Ανακινούμε το περιεχόμενο των σωληναρίων με απαλά χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης. Ελέγχουμε για συγκόλληση των ερυθροκυττάρων.

Αν κατά το τελευταίο αυτό στάδιο της δεύτερη φάσης διασταύρωσης έχουμε **αρνητικό** αποτέλεσμα:

19. Πλένουμε τα ερυθρά 3 φορές με φυσιολογικό ορό 0,9% σε NaCl.

ΠΡΟΣΟΧΗ !
Το σχολαστικό πλύσιμο των ερυθροκυττάρων απομακρύνει τα ελεύθερα αντισώματα. Αυτά, όταν υπάρχουν, δεσμεύουν τον αντισφαιρινικό ορό, και εμποδίζεται έτσι η συγκόλληση των ερυθροκυττάρων, με επακόλουθο πλασματικό αρνητικό αποτέλεσμα.

20. Προσθέτουμε στο στεγνό ίζημα των ερυθροκυττάρων 2 σταγόνες πολυδύναμου αντισφαιρινικού ορού.

21. Ανακινούμε με απαλές κινήσεις για να αναμειχθούν τα υλικά.

22. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές / λεπτό για 2 λεπτά της ώρας.

23. Παρατηρούμε για τη δημιουργία ή μη **αιμόλυσης** των ερυθροκυττάρων .

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

25. Εξετάζουμε αν δημιουργήθηκε ή όχι **συγκόλληση** των ερυθροκυττάρων.

Για μεγαλύτερη αξιοπιστία στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και των τριών φάσεων συγκρίνουμε τα αποτελέσματα με θετικό και αρνητικό μάρτυρα.

Ο έλεγχος συμβατότητας μπορεί να γίνει και με τη μέθοδο των δύο σωληναρίων.

Η πορεία που ακολουθούμε είναι η εξής:

1. Σημειώνουμε με υαλογράφο στο πρώτο δοκιμαστικό σωληνάριο τον αριθμό 1 και στο δεύτερο σωληνάριο τον αριθμό 2.

2. Βάζουμε σε κάθε σωληνάριο 2 σταγόνες ορού του δέκτη και 2 σταγόνες εναιωρήματος ερυθροκυττάρων του δότη.

3. Προσθέτουμε μόνο στο δεύτερο σωληνάριο 2 σταγόνες λευκωματίνης.

Η ποσότητα της λευκωματίνης χρειάζεται να είναι ανάλογη με την ποσότητα του δείγματος, γι' αυτό πρέπει να προσέξουμε να μην κατακρατηθεί στα τοιχώματα των σωληναρίων.

4. Ανακινούμε τα σωληνάρια για να αναμειχθούν τα υλικά.

5. α. Φυγοκεντρούμε το πρώτο σωληνάριο στις 1500 στροφές / λεπτό για 5 λεπτά της ώρας.

β. Τοποθετούμε το δεύτερο σωληνάριο σε υδατόλουτρό θερμοκρασίας 37° C για 30 λεπτά της ώρας και ύστερα το φυγοκεντρούμε στις 1500 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.

Αλλαγή στα θερμικά όρια και το χρόνο της επώασης δίνει πλαστά θετικά αποτελέσματα.

6. Εξετάζουμε μακροσκοπικά και μικροσκοπικά αν δημιουργήθηκε ή όχι αιμόλυση ή συγκόλληση.

Αν το αποτέλεσμα είναι **αρνητικό** τότε:

7. Πλένουμε τα ερυθρά αιμοσφαίρια του σωληναρίου Νο 2 με φυσιολογικό ορό, τουλάχιστον 3 φορές και απομακρύνουμε κάθε ίχνος υπερκειμένου.

ΠΡΟΣΟΧΗ !

Το σχολαστικό πλύσιμο των ερυθροκυττάρων απομακρύνει τα ελεύθερα αντισώματα. Αυτά, όταν υπάρχουν, δεσμεύουν τον αντισφαιρινικό ορό και εμποδίζεται έτσι η συγκόλληση των ερυθροκυττάρων με επακόλουθο πλασματικό αρνητικό αποτέλεσμα.

8. Προσθέτουμε 3 σταγόνες αντισφαιρινικό ορό.

9. Ανακινούμε για να αναμειχθούν και φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.

10. Εξετάζουμε μακροσκοπικά και μικροσκοπικά αν δημιουργήθηκε ή όχι αιμόλυση ή συγκόλληση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. ***Θετικό:*** Έγινε αιμόλυση ή συγκόλληση των ερυθροκυττάρων και το αποτέλεσμα εκφράζεται ως **ασυμβατότητα**.

β. ***Αρνητικό:*** Δεν έγινε αιμόλυση ή συγκόλληση των ερυθροκυττάρων και το αποτέλεσμα εκφράζεται ως **συμβατότητα**.

Σε περίπτωση **θετικού** αποτελέσματος, αν μεταγγισθεί μονάδα αίματος από το συγκεκριμένο δότη προς τον ασθενή, τότε τα ερυθροκύτταρα του δότη θα συγκολληθούν από τα υπάρχοντα αντι – ερυθροκυτταρικά αυτά αντισώματα.

Αυτό όμως θα επιφέρει πολλές **επικίνδυνες επιπλοκές** για τη ζωή του δέκτη επιπλοκές και είναι αντίθετο με το στόχο της μεταγγισιοθεραπείας. Η μετάγγιση είναι ασύμβατη.

Σε περίπτωση **αρνητικού** αποτελέσματος ο δέκτης δεν έχει αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα για να συγκολληθούν τα ερυθροκύτταρα του δέκτη. Άρα, **η μετάγγιση είναι συμβατή**.

Χρειάζεται μεγάλη προσοχή να μην εκληφθεί ως ασυμβατότητα το **φαινόμενο της διάταξης των ερυθροκυττάρων σε στήλες** (rouleaux).

Σε μια τέτοια περίπτωση είναι απαραίτητοι οι παρακάτω χειρισμοί:

- Φυγοκεντρούμε πάλι το σωληνάριο στις 1000 στροφές / λεπτό και για 1 λεπτό της ώρας.
- Προσθέτουμε 2 σταγόνες ισότονου διαλύματος NaCl και ανακινούμε για να αναμειχθούν.
- Φυγοκεντρούμε πάλι το σωληνάριο στις 1000 στροφές / λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.
- Εξετάζουμε μακροσκοπικά αν δημιουργήθηκε ή όχι συγκόλληση των ερυθροκυττάρων.

Σε περίπτωση ασυμβατότητας **θα γίνει συγκόλληση** των ερυθροκυττάρων.

Σε περίπτωση διάταξης των ερυθροκυττάρων σε στήλες **δε θα γίνει συγκόλληση** των ερυθροκυττάρων.

13.4. Δοκιμασίες COOMBS

- **Για ποιο λόγο γίνονται;**

Οι κυριότερες παρενέργειες από μία μετάγγιση αίματος είναι οι λοιμώξεις και οι ανοσολογικές επιπλοκές. Αν υπάρχουν πάνω στα ερυθροκύτταρα του δότη προσκολλημένα ατελή αντισώματα ή αν βρίσκονται στον ορό του δέκτη και θα προσκολληθούν μετά τη μετάγγιση, μπορεί να δημιουργηθεί σοβαρή ανοσολογική επιπλοκή. Άρα, είναι σημαντικό να μπορούμε πριν από τη μετάγγιση να αποκαλύπτουμε την τυχόν παρουσία τέτοιων ατελών αντισωμάτων.

Στην ανακάλυψη των ατελών αντισωμάτων σημαντική βοήθεια προσφέρει η δοκιμασία Coombs. Πρώτος ο Coombs το 1945 αναζήτησε τα ατελή αντισώματα στα ερυθροκύτταρα και στον ορό του αίματος και γι' αυτό δόθηκε το όνομά του στη δοκιμασία.

• **Πώς αναζητούμε τα ατελή αντισώματα;**

Η αναζήτηση των αντισωμάτων γίνεται με δύο τεχνικές διαδικασίες την **άμεση** και την **έμμεση.** Και στις δύο απαιτείται η χρήση ενός ειδικού ορού του αντισφαιρινικού ορού. Ο αντισφαιρινικός ορός παρασκευάζεται από ευαισθητοποιημένο με ανθρώπινο ορό κουνέλι. Περιέχει πολλά και διαφορετικά αντισώματα εναντίον των ανθρώπινων αντισωμάτων (σφαιρινών) και λέγεται αντιανθρώπειος ορός ή αντι – γ – σφαιρινικός ορός ή αντιορός.

Το δείγμα πριν τη χρήση του χρειάζεται επεξεργασία.

Αναζήτησε τη βοηθητική *τεχνική για το πλύσιμο των αιμοσφαιρίων* και τη βοηθητική *τεχνική για την παρασκευή του εναιωρήματος των ερυθροκυττάρων* σε προηγούμενη διδακτική ενότητα.

13.4.1 Άμεση δοκιμασία COOMBS

• **Για ποιο λόγο κάνουμε αυτήν την τεχνική;**

Η τεχνική δίνει τη δυνατότητα να εντοπισθούν αντισώματα που **έχουν ήδη επικαλύψει** τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα (ευαισθητοποιημένα ερυθρά). Γι' αυτό το λόγο η αναζήτηση γίνεται σε δείγμα ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Η χρησιμότητα της τεχνικής είναι μεγάλη για τη διάγνωση:

- Αυτοάνοσων αιμολυτικών αναιμιών,
- Αιμολυτικής νόσου των νεογνών,
- Επίκτητων αιμολυτικών αναιμιών, π.χ. μετά τη μετάγγιση αίματος,
- Λεμφωμάτων,
- Επίδρασης χημικών ουσιών,
- Αιμολυτικής αντίδρασης μετά τη μετάγγιση κ.α.

Απαιτείται μεγάλη προσοχή κατά την εκτέλεση, γιατί πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και δίνουν πλασματικά θετικά (+) ή αρνητικά (-) αποτελέσματα.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο αντισφαιρινικός ορός επειδή περιέχει αντισώματα εναντίον των σφαιρινών του ανθρώπου, έχει την ικανότητα να ενώνεται με τα αντισώματα που βρίσκονται ήδη προσκολλημένα στα ευαισθητοποιημένα ερυθροκύτταρα.

ΔΕΙΓΜΑ

Εναιώρημα πλυμένων ερυθροκυττάρων 5% σε NaCl 0.9%.

ΠΡΟΣΟΧΗ !

Το δείγμα πρέπει να είναι πρόσφατο για να είναι ισχυρή η έκφραση των ανοσολογικών στοιχείων. Διαφορετικά θα προκύψουν πλασματικά αρνητικά αποτελέσματα.

Το αντιπηκτικό επιλογής να είναι το EDTA για να μη γίνει προσκόλληση του συμπληρώματος.

Το πλύσιμο των ερυθρών πρέπει να είναι σχολαστικό για να απομακρυνθούν τα ελεύθερα IgG αντισώματα του ορού. Αυτά, όταν υπάρχουν, δεσμεύουν τον αντιορό και εμποδίζεται η συγκόλληση των ερυθροκυττάρων. Σε αυτήν την περίπτωση τα αποτελέσματα θα είναι πλασματικά αρνητικά.

Δεν πρέπει να τροποποιούμε αυθαίρετα την πυκνότητα του εναιωρήματος για να αποφύγουμε τις πλασματικές αρνητικές συγκολλήσεις.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. **Αντισφαιρινικός ορός (πολυδύναμος):** Ο πολυδύναμος ορός έχει ευαισθησία για πολλά αντισώματα
2. **Αντισφαιρινικός ορός μονοδύναμος:** Περιέχει μόνο αντι - IgA
3. **Αντισφαιρινικός ορός μονοδύναμος:** Περιέχει μόνο αντι - IgG
4. **Αντισφαιρινικός ορός μονοδύναμος:** Περιέχει μόνο αντι - IgM
5. **Αντισφαιρινικός ορός μονοδύναμος:** Περιέχει μόνο αντι – C_3d
6. **Αντισφαιρινικός ορός μονοδύναμος:** Περιέχει μόνο αντι – C_3 ή C_4

Για εκπαιδευτικούς λόγους μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο πολυδύναμος αντισφαιρινικός ορός ή ένας μονοδύναμος αντι - IgG ορός.

Οι μονοδύναμοι ταυτοποιούν με ακρίβεια την προέλευση του αντισώματος.

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 ισχύς των αντιορών πρέπει να ελέγχεται για να αποφευχθούν τα πλασματικά αρνητικά αποτελέσματα.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- φυγόκεντρος
- μικροσκόπιο
- διαφανοσκόπιο ή φωτεινή πηγή
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- γάντια
- στυλό
- αυτοκόλλητες ετικέτες
- δοκιμαστικά σωληνάρια αιμολύσεως
- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- σιφώνια Pasteur
- αντικειμενοφόρες πλάκες
- καλυπτρίδα
- ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10

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

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε με ευκρίνεια επάνω σε έξι αυτοκόλλητες ετικέτες τα στοιχεία του ασθενούς (ονοματεπώνυμο, πατρώνυμο), όπως αυτά αναγράφονται στο αρχικό σωληνάριο συλλογής του αίματος και από μία ένδειξη: Πολυδύναμος, IgG, C_3d, C_4, IgA και IgM και τις επικολλούμε σε έξι δοκιμαστικά σωληνάρια αιμολύσεως.

ΠΡΟΣΟΧΗ !!
Η λανθασμένη καταχώριση των στοιχείων του ασθενούς βάζει σε κίνδυνο τη ζωή του.

2. Βάζουμε δύο σταγόνες εναιωρήματος ερυθρών αιμοσφαιρίων στη βάση κάθε σωληναρίου.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Η ποσότητα του δείγματος χρειάζεται να είναι ανάλογη με την ποσότητα των αντιδραστηρίων γι' αυτό πρέπει να προσέξουμε να μη κατακρατηθεί στα τοιχώματα των σωληναρίων.

3. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές/λεπτό για 15 δευτερόλεπτα της ώρας.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Τηρούμε με ακρίβεια τις συνθήκες φυγοκέντρησης για να μην καταστραφεί η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων (αιμόλυση).

4. Απορρίπτουμε τον υπερκείμενο φυσιολογικό ορό για να πάρουμε στεγνό ίζημα ερυθροκυττάρων.

ΠΡΟΣΟΧΗ!
Η σχολαστική απόρριψη του υπερκείμενου υγρού απαλλάσσει το ίζημα από πιθανά ελεύθερα IgG αντισώματα, η παρουσία των οποίων δημιουργεί πλασματικά αρνητικά αποτελέσματα, επειδή θα εμποδίσουν τον αντισφαιρινικό ορό να συγκολλήσει τα ερυθροκύτταρα.

5. Προσθέτουμε στο ίζημα κάθε σωληναρίου 3 σταγόνες από τον αντίστοιχο με την ένδειξη της ετικέτας αντισφαιρινικό ορό.

6. Ανακινούμε ζωηρά για να αναμειχθούν.

7. Περιμένουμε σε θερμοκρασία δωματίου 22°C για 15 λεπτά της ώρας.

ΠΡΟΣΟΧΗ !
Αν δεν τηρηθεί η θερμοκρασία το αντίσωμα θα αποσυνδεθεί από το αντιγόνο και θα δώσει πλασματικά αρνητικό αποτέλεσμα.

8. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.

ΠΡΟΣΟΧΗ !
Η φυγοκέντρηση σταθεροποιεί την ένωση αντιγόνου αντισώματος.

9. Παρατηρούμε σε φωτεινή πηγή για τη δημιουργία ή μη συγκόλλησης των ερυθροκυττάρων μέσα σε χρονικό διάστημα τριών λεπτών της ώρας.

10. Καταγράφουμε τα αποτελέσματα με σταυρούς (0 – 4 +) μέσα σε χρονικό διάστημα 3 λεπτών της ώρας.

ΠΡΟΣΟΧΗ !
Η ξήρανση του παρασκευάσματος θα δώσει πλαστά θετικά αποτελέσματα (θα θεωρηθεί ψεύτικη συγκόλληση).

Αν δεν είναι ευκρινής η συγκόλληση των ερυθροκυττάρων τότε:

11. Μεταφέρουμε με σιφώνιο Pasteur μία σταγόνα από κάθε δοκιμαστικό σωληνάριο σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Απλώνουμε τις σταγόνες σε παράλληλες γραμμές. Για να πετύχουμε λεπτότερη στοιβάδα ερυθροκυττάρων μπορούμε να καλύψουμε το παρασκεύασμα με καλυπτρίδα.

12. Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο αρχικά με τον αντικειμενικό φακό 10Χ και στη συνέχεια με τον αντικειμενικό φακό 40Χ για την παρουσία ή μη ερυθροκυτταρικών σωρών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. ***Αρνητικό:*** Αν **δεν παρατηρηθεί καμία συγκόλληση** σημειώνουμε (0).

β. *Θετικό:* Σε όλες τις παρακάτω περιπτώσεις:

Αν υπάρχουν **σωροί ερυθροκυττάρων που μόλις διακρίνονται,** σημειώνουμε **1 σταυρό (+)**.

Αν υπάρχουν **μικροί αλλά πολλοί σωροί ερυθροκυττάρων,** σημειώνουμε **2 σταυρούς (++)**.

Αν υπάρχουν **μεγάλοι και πολλοί σωροί ερυθροκυττάρων,** σημειώνουμε **3 σταυρούς (+++)** .

Αν υπάρχουν **περισσότεροι μεγάλοι σωροί ερυθροκυττάρων,** σημειώνουμε **4 σταυρούς (++++)**.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Η δοκιμασία Coombs πρέπει να είναι **αρνητική** για τα φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια.

Η άμεση δοκιμασία Coombs είναι **θετική** σε:

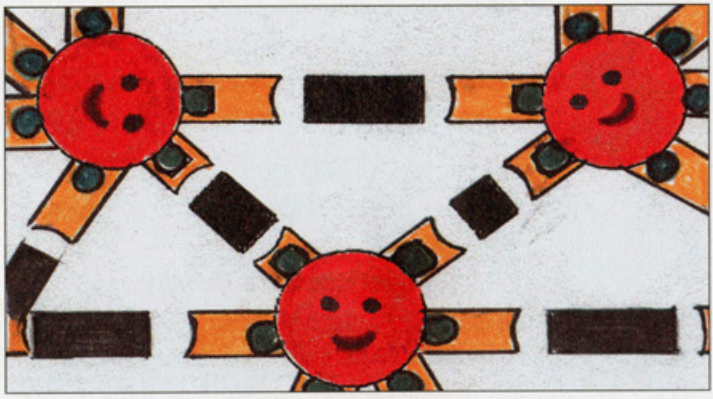
- αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία
- αντιδράσεις κατά τη μετάγγιση
- θεραπεία με ινσουλίνη
- αιμολυτική νόσο του νεογνού, κ.λπ.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ

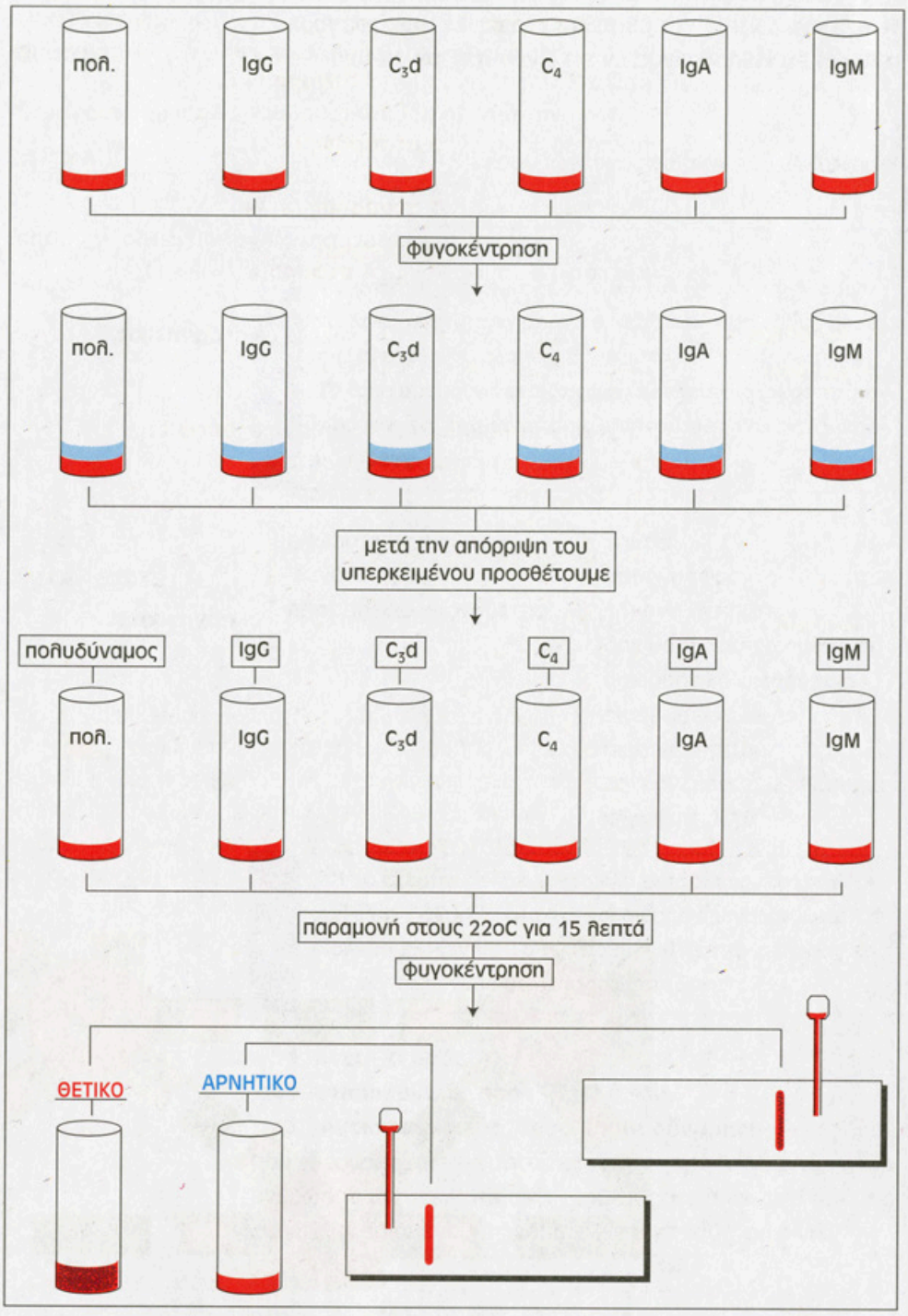
Η άμεση δοκιμασία Coombs είναι **αρνητική** σε:

- μη αυτοάνοσες αιμολυτικές αναιμίες, κ.λπ.

Τα ερυθροκύτταρα του εξεταζόμενου είναι ευαισθητοποιημένα, έχουν δηλαδή προσροφήσει αντισώματα . Τα αντισώματα είναι σφαιρίνες. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια λοιπόν έχουν επενδυθεί με σφαιρίνες. Οι σφαιρίνες της επιφάνειας των ερυθρών ανιχνεύονται με τον αντισφαιρινικό ορό. Ο αντισφαιρινικός ορός λειτουργεί ως μαγνήτης και ενώνει τα ερυθροκύτταρα σε σωρούς (συγκόλληση).



Εικόνα 13.1: *Η δράση του αντισφαιρινικού ορού στην άμεση δοκιμασία Coombs*



Εικόνα 13.2: *Άμεση δοκιμασία Coombs*

13.4.2 Έμμεση δοκιμασία COOMBS

• **Τι ελέγχουμε με την έμμεση δοκιμασία Coombs;**

Με την έμμεση δοκιμασία Coombs ελέγχουμε αν **στον ορό** του ασθενή υπάρχουν αντισώματα, τα οποία θα προσκολληθούν, ύστερα από επώαση in vitro, σε ερυθροκύτταρα που έχουν στη μεμβράνη τους το ειδικό αντιγόνο εναντίον του οποίου στρέφονται.

• **Σε ποιες περιπτώσεις χρειάζεται να γίνει η έμμεση δοκιμασία Coombs ;**

Η έμμεση αντίδραση Coombs εκτελείται:

- Για την ανίχνευση ορισμένων αντιγόνων ,π.χ. του αντιγόνου D_u.
- Σε έγκυο γυναίκα D αρνητική, της οποίας ο σύζυγος είναι D θετικός.
- Σε γυναίκα που το νεογέννητό της παρουσίασε συμπτώματα αιμολυτικής πάθησης.
- Πριν από μετάγγιση, για την ανίχνευση των IgG αντισωμάτων που στρέφονται εναντίων των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων.
- Μετά από μετάγγιση αν παρουσιαστεί παρενέργεια.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε ορό του ασθενούς ή του εξεταζόμενου ατόμου.

Υπενθυμίζουμε:

Το δείγμα πρέπει να είναι πρόσφατο.

Ο διαχωρισμός του ορού από το ολικό αίμα πρέπει να γίνει με προσοχή για να μην υπάρξει ούτε ίχνος αιμόλυσης η οποία θα δώσει πλαστό θετικό αποτέλεσμα.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ελεύθερα αντισώματα του ορού με τη βοήθεια της λευκωματίνης καθηλώνονται στα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. Στη συνέχεια ο αντισφαιρινικός ορός, ο οποίος αναζητάει τα ελεύθερα άκρα των αντισωμάτων, συνδέει το ένα ερυθρό με το άλλο ερυθρό.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Εναιώρημα 2 – 4% πλυμένων ερυθροκυττάρων ομάδας αίματος Ο Rh (+), τριών διαφορετικών δειγμάτων I, II, III. Δείγματα ερυθρών προσφέρονται και έτοιμα από πολλές εμπορικές εταιρείες.

> Τα δείγματα των ερυθρών είναι από διαφορετικά άτομα για να καλύπτουν όσο το δυνατό μεγαλύτερο εύρος αντισωμάτων.

2. Λευκωματίνη 22%: Χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό της συγκόλλησης και δίνει αποτελέσματα σε μικρότερο χρόνο επώασης

3. Αντισφαιρινικός ορός (πολυδύναμος).

> **ΠΡΟΣΟΧΗ !**
> Να θυμηθούμε να ελέγξουμε την ημερομηνία λήξης, τη θερμοκρασία, και την ισχύ των αντιδραστηρίων.

4. Φυσιολογικός ορός NaCl 0.9%

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- υδατόλουτρο (37°C)
- επιτραπέζιο χρονόμετρο
- φυγόκεντρος
- μικροσκόπιο
- γάντια
- στυλό
- αυτοκόλλητες ετικέτες
- έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- δοκιμαστικά σωληνάρια αιμολύσεως
- σιφώνια Pasteur
- αντικειμενοφόρος πλάκα
- καλυπτρίδα
- ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10

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

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Γράφουμε με ευκρίνεια επάνω σε τρεις αυτοκόλλητες ετικέτες τα στοιχεία του ασθενή (ονοματεπώνυμο, πατρώνυμο) και την ένδειξη I ή II ή III.

> Η λανθασμένη καταχώριση των στοιχείων του ασθενούς βάζει σε κίνδυνο τη ζωή του.

2. Βάζουμε μέσα 2 – 3 σταγόνες του εξεταζόμενου ορού.

3. Προσθέτουμε σε κάθε σωληνάριο αντίστοιχα 1 σταγόνα εναιωρήματος ερυθρών 2 – 4% από τα δείγματα I, II και III και 2 – 3 σταγόνες λευκωματίνης 22%.

4. Αναμειγνύουμε με απαλές κινήσεις.

5. Τοποθετούμε τα σωληνάρια σε υδατόλουτρο 37°C για 30 λεπτά της ώρας.

> Αν δεν τηρηθεί η θερμοκρασία, το αντίσωμα θα αποσυνδεθεί από το αντιγόνο και θα δώσει πλασματικά αρνητικό αποτέλεσμα.

6. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές / λεπτό για 15 δευτερόλεπτα της ώρας.

7. Παρατηρούμε για τη δημιουργία ή μη **αιμόλυσης** στο υπερκείμενο υγρό.

8. Ανακινούμε με απαλά χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης και παρατηρούμε για τη δημιουργία ή μη συγκόλλησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και καταγράφουμε το αποτέλεσμα.

Αν δεν έγινε αιμόλυση ούτε συγκόλληση τότε:

9. Προσθέτουμε φυσιολογικό ορό 0.9% NaCl και πλένουμε τα ερυθροκύτταρα τρεις φορές.

> **Υπενθυμίζουμε:**
> Το σχολαστικό πλύσιμο των ερυθροκυττάρων απομακρύνει τα ελεύθερα αντισώματα, τα οποία δεσμεύουν το αντιδραστήριο και εμποδίζουν τη συγκόλληση των ερυθροκυττάρων με επακόλουθο πλασματικό αρνητικό αποτέλεσμα.

10. Απομακρύνουμε σχολαστικά κάθε ίχνος φυσιολογικού ορού μετά την τελευταία φυγοκέντρηση.

11. Προσθέτουμε 3 σταγόνες πολυδύναμου αντισφαιρινικού ορού (αντι – Human).

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

13. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές / λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.

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

15. Παρατηρούμε για τη δημιουργία ή μη **συγκόλλησης** των ερυθροκυττάρων σε χρονικό διάστημα 3 λεπτών της ώρας και καταγράφουμε το αποτέλεσμα.

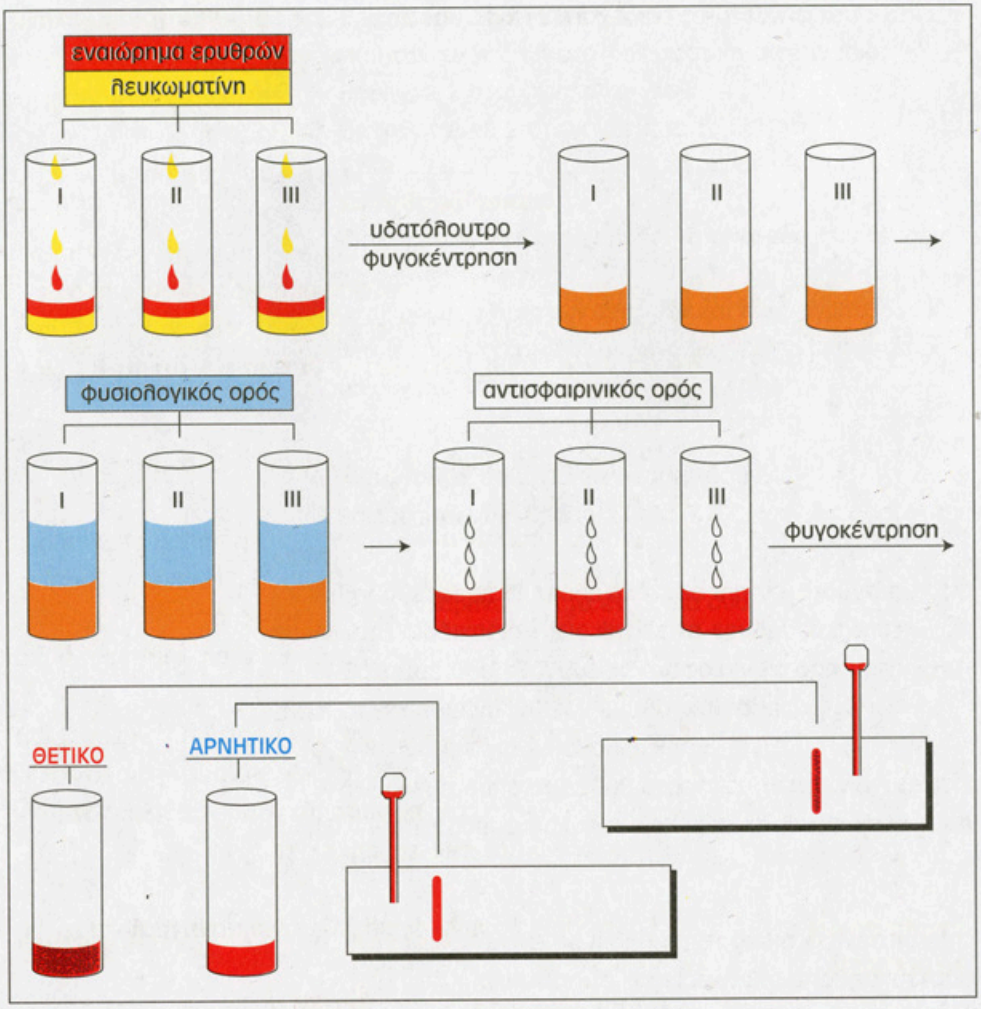
Αν περάσει ο χρόνος, το υλικό θα ξεραθεί και υπάρχει κίνδυνος για δημιουργία ψεύτικης θετικής συγκόλλησης.
Είναι απαραίτητη η χρήση θετικού και αρνητικού μάρτυρα.

Αν δεν είναι ευκρινής η συγκόλληση των ερυθροκυττάρων:

16. Μεταφέρουμε με διαφορετικό σιφώνιο Pasteur μία σταγόνα από κάθε σωληνάριο απάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και απλώνουμε τις σταγόνες σε παράλληλες γραμμές. Για τη δημιουργία λεπτότερης στοιβάδας ερυθροκυττάρων καλύπτουμε το παρασκεύασμα με καλυπτρίδα.

17. Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο αρχικά με τον αντικειμενικό φακό 10Χ και στη συνέχεια με τον αντικειμενικό φακό 40Χ, για την παρουσία ή μη ερυθροκυτταρικών σωρών.

Υπενθύμιση:
Προσέχουμε το υλικό να μην ξεραθεί, γιατί θα έχουμε πλασματικό θετικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 13.3: *Έμμεση δοκιμασία Coombs*

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. ***Θετικό:*** **$α_1$.** Έγινε **αιμόλυση**, επειδή καταστράφηκε η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος που ενεργοποιήθηκε μετά την ένωση με τα αντισώματα.

$α_1$. Έγινε **συγκόλληση.** Σχηματίσθηκαν σωροί ερυθροκυττάρων, επειδή υπάρχουν πολλά άνοσα αντισώματα.

β. ***Αρνητικό:*** **$β_1$. Δεν έγινε αιμόλυση.** Δεν καταστράφηκε η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, επειδή το συμπλήρωμα δεν ενεργοποιείται.

$β_2$. Δεν έγινε συγκόλληση, γι' αυτό δε σχηματίστηκαν σωροί ερυθροκυττάρων, άρα δεν υπάρχουν άνοσα και πλήρη αντισώματα.

Για μεγαλύτερη αξιοπιστία στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων κάνουμε σύγκριση με **θετικό** και **αρνητικό μάρτυρα**.

Η διαδικασία παρασκευής θετικού και αρνητικού μάρτυρα είναι η εξής:

- Αραιώνουμε τον αντι – D ορό του εμπορίου σε αναλογία 1:20 με φυσιολογικό ορό 0.9% NaCl και τον χρησιμοποιούμε σαν ορό – δείγμα. Ως αντιδραστήριο παίρνουμε τα **ερυθροκύτταρα ατόμου ομάδας αίματος O και Rhesus θετικό.**
- Στην περίπτωση του αρνητικού μάρτυρα χρησιμοποιούμε σαν ορό – δείγμα τον αραιωμένο αντι – D ορό και ως αντιδραστήριο τα **ερυθροκύτταρα ατόμου ομάδας αίματος O και Rhesus αρνητικό.**

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Η δοκιμασία Coombs πρέπει να είναι **αρνητική** για το φυσιολογικό ορό.

Η έμμεση Coombs είναι **θετική** σε:

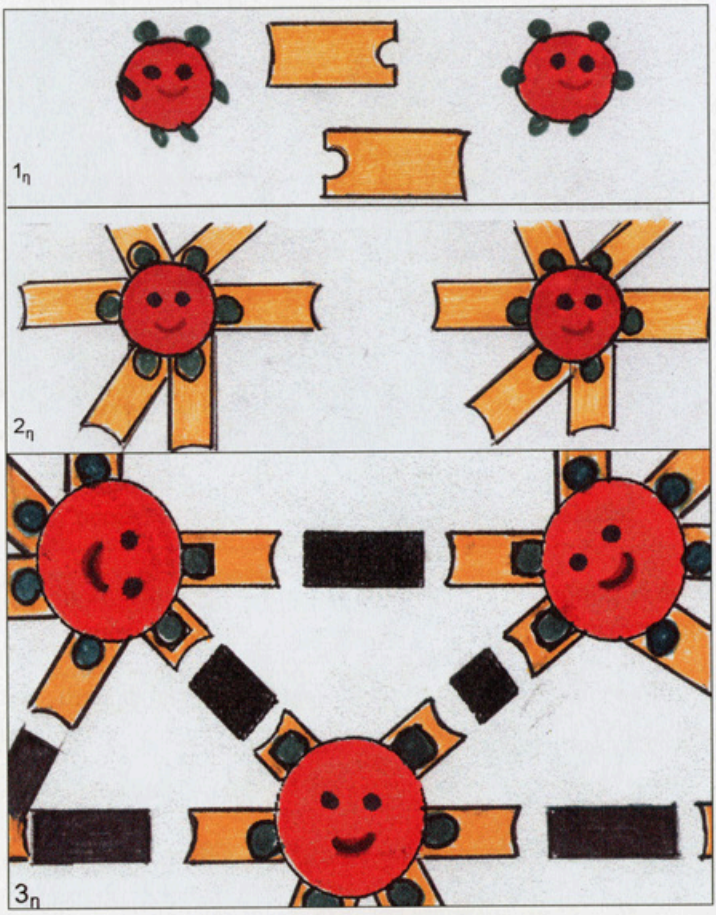
- παρουσία ειδικών αντισωμάτων
- ευαισθητοποίηση από μετάγγιση ή προηγούμενη κύηση.
- αιμολυτική αναιμία που οφείλεται σε φάρμακα.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ

- **Πώς ερμηνεύεται το θετικό αποτέλεσμα;**

Στον ορό του ασθενή υπάρχουν πολλά ατελή αντισώματα (1η). Η προσθήκη της λευκωματίνης βοήθησε να κατευθυνθούν τα αντισώματα προς τις αντιγονικές θέσεις των ερυθροκυττάρων με αποτέλεσμα να τα καλύψουν (2η). Σ' αυτήν την κατάσταση, στην οποία το αντίσωμα είναι προ-

σκολλημένο στο αντίστοιχο κυτταρικό αντιγόνο, επιδρά ο αντισφαιρινικός ορός ▬. Αυτός λειτουργεί σαν "συνδετήρας" και ενώνει αυτές τις δυάδες αντιγόνο και αντίσωμα (3η). Έτσι, φέρνει τη μία κοντά στην άλλη σχηματίζοντας τους ερυθροκυτταρικούς σωρούς (συγκόλληση).



Εικόνα 13.4: *Φάσεις της έμμεσης δοκιμασίας Coombs*

- **Πώς ερμηνεύεται το αρνητικό αποτέλεσμα;**

Δε σχηματίζονται ερυθροκυτταρικοί σωροί (συγκόλληση) επειδή δεν υπάρχουν δυάδες από αντισώματα προσκολλημένα στο αντίστοιχο ερυθροκυτταρικό αντιγόνο. Αυτά θα τα ένωνε, αν υπήρχαν, ο αντισφαιρινικός ορός. Αφού δεν βλέ-

πουμε συγκολλήσεις, δεν υπάρχουν ατελή αντισώματα με τα οποία θα ενώνονταν ο αντισφαιρινικός ορός και τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα μένουν ακάλυπτα.

• **Πώς μπορούμε να ενισχύσουμε ακόμη περισσότερο την δυνατότητα ανίχνευσης ατελών αντισωμάτων**;

1. Σε αρκετές περιπτώσεις ασυμβατότητας απαιτείται να γίνει επεξεργασία των ερυθρών **με πρωτεολυτικά ένζυμα** (βρωμελαΐνη, παπαΐνη, φυσίνη). Τα πρωτεολυτιτικά ένζυμα προκαλούν μία τροποποίηση στην εξωτερική επιφάνεια των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων και ενισχύουν τη σύνδεσή τους με τα αντισώματα (κυρίως αντισώματα, Rhesus και Kidd) ενώ εξουδετερώνουν την έκφραση κάποιων άλλων αντιγόνων (κυρίως των M, N κ.α.)

2. Σε άλλες περιπτώσεις επιβάλλεται να γίνει ενίσχυση της συγκολλητικής ικανότητας αντιγόνου – αντισώματος με διάφορες ουσίες (π.χ. Liss), ώστε να προσδιοριστεί με αξιοπιστία το αντίσωμα.

ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ

Στις ενότητες του κεφαλαίου αυτού ορίστηκε τι σημαίνει συμβατότητα και ποιο είναι το όφελος ελέγχου της συμβατότητας μεταξύ του αίματος του δέκτη με το αίμα του δότη.

Δόθηκαν όλα τα απαραίτητα στοιχεία για τον έλεγχο συμβατότητας σε μία επείγουσα κατάσταση.

Αναλύθηκαν οι τεχνικές εντοπισμού των ασύμβατων στοιχείων μεταξύ του αίματος του δέκτη και του δότη, η άγνοια των οποίων θα βάλει σε κίνδυνο τη ζωή του δέκτη.

Τα επεσήμαναν τα βασικά σημεία για την επιτυχία των τεχνικών ως προς το σχολαστικό πλύσιμο των ερυθροκυττάρων, την καθαρότητα των σκευών, τη διαδοχή, την ποσότητα και τη θερμοκρασία των αντιδραστηρίων, τη σημασία της θερμοκρασίας επώασης, κ.λπ.

Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:

1. Μετατρέπουμε τους πλαγιότιτλους 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 πλαγιότιτλους και ορίζουν το θέμα που αναπτύσσεται στις παραγράφους.

Ας δούμε τι καταλάβαμε:

1. Σε πόσες φάσεις ολοκληρώνεται η έμμεση δοκιμασία Coombs;

2. Ενώνουμε τις φάσεις της έμμεσης μη επείγουσας διασταύρωσης με το είδος των αντισωμάτων που ανιχνεύουμε και το είδος του αντιδραστηρίου που χρησιμοποιούμε.

Α. Δεύτερη	1. ψυχρά και πλήρη	I. Διάλυμα λευκωματίνης
Β. Πρώτη	2. ψυχρά	II. Φυσιολογικός ορός
Γ. Τρίτη	3. πλήρη	III. Αντισφαιρινικός ορός

3. Τι σχέση υπάρχει μεταξύ των αντιδράσεων των τριών σωληναρίων της άμεσης επείγουσας διασταύρωσης και των τριών φάσεων της έμμεσης μη επείγουσας διασταύρωσης;

4. Ποια στοιχεία της μακροσκοπικής παρατήρησης χαρακτηρίζουν θετική την άμεση δοκιμασία Coombs και ποια ερμηνεία δίνετε στα αποτελέσματα;

5. Ποια στοιχεία της μακροσκοπικής παρατήρησης χαρακτηρίζουν ως θετική την έμμεση δοκιμασία Coombs και ποια είναι η ερμηνεία του αποτελέσματος;

6. Το αποτέλεσμα της έμμεσης μη επείγουσας δοκιμασίας διασταύρωσης χαρακτηρίστηκε ως ασυμβατότητα. Σε τι ενέργειες θα προβούμε για να είναι ασφαλές το αποτέλεσμα; Αιτιολογούμε τις ενέργειές μας

Ας εφαρμόσουμε αυτά που μάθαμε:

1. Έχουμε ολοκληρώσει και το έβδομο βήμα της πορείας της άμεσης δοκιμασίας Coombs και διαπιστώνουμε βλάβη στη φυγοκεντρική συσκευή:
   α. Θα συντηρήσουμε το δείγμα στους 37°C για να συνεχίσουμε αύριο;
   β. Θα ακυρώσουμε κάθε τι που ήδη έχουμε κάνει;
   γ. Θα παρακάμψουμε το στάδιο της φυγοκέντρησης και θα ολοκληρώσουμε την τεχνική;
   Αιτιολογούμε την ενέργειά μας.

2. Η πρώτη φάση της έμμεσης μη επείγουσας διασταύρωσης ήταν θετική. ενώ μετά την εκτέλεση της δεύτερης φάσης η απάντηση ήταν αρνητική.
   α. Τι μπορεί να έχει συμβεί;
   β. Τι θα κάνουμε στη συνέχεια;

3. Έχουμε ένα παραπεμπτικό για εκτέλεση έμμεσης δοκιμασίας Coombs σε δείγμα εγκύου γυναίκας το οποίο πρόκειται να γίνει την επόμενη μέρα.
   α. Ποια υλικά πρέπει να βεβαιωθούμε ότι υπάρχουν στο εργαστήριο για να είμαστε έτοιμοι να εκτελέσουμε τη δοκιμασία;
   β. Μετά την εκτέλεση της μεθόδου, το αποτέλεσμα χαρακτηρίστηκε θετικό.*«Επειδή έγινε συγκόλληση 20 λεπτά μετά τη φυγοκέντρηση αφού προστέθηκε ο αντιορός (στάδιο14)»*.
   $β_1$.Είναι ασφαλής η ερμηνεία του αποτελέσματος; Δικαιολογούμε την άποψή μας.
   $β_2$.Αν τελικά είναι πράγματι θετικό το αποτέλεσμα, τι θα σημαίνει για την έγκυο γυναίκα;

Πρόταση για περαιτέρω διερεύνηση:

1. Επισκεφτείτε ένα παιδιατρικό νοσοκομείο και ζητήστε πληροφορίες για το πόσες μονάδες αίματος απαιτούνται ετησίως για την αντιμετώπιση της μεσογειακής αναιμίας στην πατρίδα μας.

ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΛΕΙΤΟΥΡΓΟΥΜΕ ΜΕ ΚΑΝΟΝΕΣ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ ΥΓΕΙΑΣ ΜΑΣ ΚΑΙ ΣΤΗ ΣΩΣΤΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΜΑΣ.

- Στον εργαστηριακό χώρο ΔΕΝ τρώμε, ΔΕΝ πίνουμε και ΔΕΝ καπνίζουμε.
- Φοράμε πάντα την εργαστηριακή μπλούζα για να προστατεύουμε τα ρούχα μας.
- Πλένουμε τα χέρια μας και φοράμε πάντα γάντια μιας χρήσης κατά τη διάρκεια:
  - Των εργαστηριακών ασκήσεων, γιατί τα δείγματα που χρησιμοποιούμε (ολικό και τριχοειδικό αίμα, συμπυκνωμένα ερυθρά, ορό, πλάσμα) ενέχουν μεγάλο κίνδυνο μετάδοσης σοβαρότατων λοιμώξεων.
  - Της καθαριότητας των σκευών και των οργάνων του εργαστηρίου τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την εργαστηριακή άσκηση.
  - Της απολύμανσης της επιφάνειας εργασίας στο τέλος της εργαστηριακής άσκησης.

Αν στην επιφάνεια εργασίας υπάρχει κηλίδα αίματος ή παραγώγου αίματος:

1. Ρίχνουμε αρκετή ποσότητα αδιάλυτης χλωρίνης επάνω στην κηλίδα και την αφήνουμε να επιδράσει για 10 λεπτά της ώρας.

2. Τα μαζεύουμε με χάρτινη χειροπετσέτα και τα βάζουμε προσεκτικά σε πλαστική σακούλα πριν τα πετάξουμε στο απορριμματοδοχείο.

3. Απολυμαίνουμε την επιφάνεια εργασίας.

Αν η ποσότητα του αίματος ή του παραγώγου είναι μεγάλη τότε:

1. Καλύπτουμε με ένα κομμάτι βαμβάκι την κηλίδα αίματος.

2. Διαποτίζουμε το βαμβάκι με αρκετή ποσότητα αδιάλυτης χλωρίνης και την αφήνουμε να επιδράσει για 10 λεπτά της ώρας.

3. Τα μαζεύουμε με χάρτινη χειροπετσέτα και τα βάζουμε προσεκτικά σε πλαστική σακούλα πριν τα πετάξουμε στο απορριμματοδοχείο.

4. Απολυμαίνουμε την επιφάνεια εργασίας.

- Καθαρίζουμε τα όργανα και τις συσκευές μετά το τέλος της εργαστηριακής άσκησης σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας και τις υποδείξεις του καθηγητή.
- Χειριζόμαστε τις ηλεκτρικές συσκευές πάντα με στεγνά χέρια. Υπάρχει κίνδυνος ηλεκτροπληξίας.
- Τακτοποιούμε στις θέσεις τους τα αντιδραστήρια, τα υλικά και τα σκεύη που δε χρειάζονται αποστείρωση.
- Αναφέρουμε στον καθηγητή αν συμβεί το παραμικρό ατύχημα ή φθαρεί κάποιο σκεύος.

ΔΕΝ ΞΕΧΝΩ ΟΤΙ:

- Μετά την αιμοληψία απομακρύνουμε την βελόνα της σύριγγας στην ειδική εγκοπή του δοχείου αιχμηρών αντικειμένων. **Δεν** την πωματίζουμε. Υπάρχει κίνδυνος να τρυπηθούμε.
  Σε περίπτωση που πέσει πάνω στο δέρμα μας αντιδραστήριο ξεπλένουμε με άφθονο νερό και ύστερα σαπουνίζουμε την περιοχή.
- Πλένουμε καλά τα χέρια μας στο τέλος κάθε εργασίας με υγρό σαπούνι ή αντισηπτικό και τρεχούμενο νερό.
  Πρέπει να έχουμε υπόψη μας ότι η υπερβολική χρήση αντισηπτικών καταστρέφει τη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του δέρματος.

Στο σημείο αυτό η Διεθνής Επιτροπή Λοιμώξεων συνιστά:

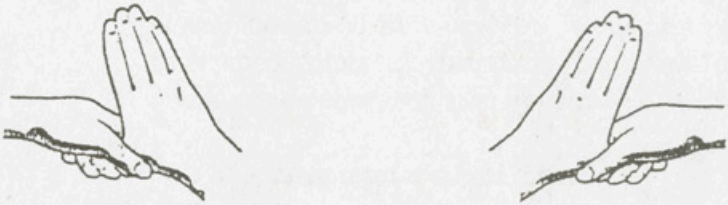
1. Σαπουνίζουμε παλάμη με παλάμη

2. Σύρουμε τη ραχιαία επιφάνεια του δεξιού χεριού πάνω στην παλάμη του αριστερού χεριού και αντιστρόφως.

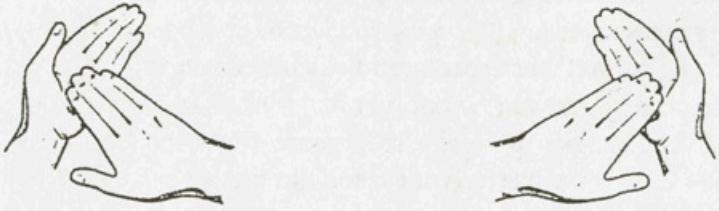
3. Διασταυρώνουμε τα δάχτυλα των δύο χεριών και καθαρίζουμε τις εσωτερικές τους επιφάνειες.

4. Λυγίζουμε τα δάχτυλα των χεριών και σύρουμε την επάνω επιφάνεια των δαχτύλων του δεξιού χεριού στην παλάμη του αριστερού και αντιστρόφως.

5. Περιστρέφουμε τον αντίχειρα του δεξιού χεριού μέσα στην αριστερή παλάμη και αντιστρόφως.



6. Κινούμε κυκλικά τις άκρες των δαχτύλων μέσα στις παλάμες.



7. Ξεπλένουμε καλά με άφθονο τρεχούμενο νερό γιατί τα υπολείμματα από το σαπούνι ή το αντισηπτικό προκαλούν δερματίτιδες.

8. Στεγνώνουμε τα χέρια μας σε χάρτινη χειροπετσέτα.

9. Κλείνουμε τη βρύση κρατώντας τη στρόφιγγα με τη χειροπετσέτα.

10. Πετάμε τη χειροπετσέτα στο απορριμματοδοχείο (βλ. εικόνα 1).

Α Ι Μ Α

ΑΙΜΑΤΗΡΟΣ

ΑΙΜΑΤΙΝΗ

ΑΙΜΑΤΟΚΡΙΤΗΣ

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ

ΑΙΜΑΤΟΜΕΤΡΟ

ΑΙΜΑΤΟΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

ΑΙΜΟΚΑΘΑΡΣΗ

ΑΙΜΑΤΟΚΗΛΙΔΑ

ΑΙΜΑΤΟΧΡΟΥΣ

ΑΙΜΑΤΩΜΑ

ΑΙΜΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ

ΑΙΜΑΓΓΕΙΩΜΑ

ΑΙΜΑΤΟΕΙΔΗΣ

ΑΙΜΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

ΑΝΑΙΜΙΑ

ΥΠΕΡΑΙΜΙΑ

ΑΙΜΟΧΑΡΗΣ

ΑΙΜΑΤΟΧΥΣΙΑ

λεξιλόγιο

Αδρανοποίηση: αναστολή της βιολογικής δραστηριότητας με τη χρήση θερμότητας ή άλλου μέσου.

Αιματέμεση: είναι η παθολογική κατάσταση κατά την οποία συμβαίνει εμετός με αίμα.

Αίμη: Είναι σιδηρούχος ένωση της πρωτοπορφυρίνης που αποτελεί το χρωματοφόρο ή το ελεύθερο πρωτεϊνης τμήμα του μορίου της αιμοσφαιρίνης. Η Αίμη είναι υπεύθυνη για την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου.

Αιμόλυση: Η απελευθέρωση αιμοσφαιρίνης που συνίσταται στο διαχωρισμό της αιμοσφαιρίνης από τα ερυθροκύτταρα και την εμφάνισή της στο πλάσμα.

Αιμοποιητικός: είναι ο ιστός ο οποίος αποτελείται από τα κύτταρα που παράγουν το αίμα.

Αιμοσφαιρινοπάθεια: Είναι μία αιματολογική διαταραχή λόγω τροποποίησης της γενετικά καθορισμένης μοριακής δομής της αιμοσφαιρίνης με χαρακτηριστικές κλινικές και εργαστηριακές διαταραχές και συχνά έκδηλη αναιμία.

Ακρεοφαγία: Η μη λήψη κρέατος με την τροφή.

Αλληλόμορφα γονίδια ή αλλήλια: είναι τα διάφορα αντίγραφα ενός γονιδίου που μπορεί να υπάρχουν (η ποικιλία των μορφών του).

Άμεση δοκιμασία: η δοκιμασία που γίνεται χωρίς τη μεσολάβηση άλλης διαδικασίας.

Αμφολυτική ιδιότητα: Ιδιότητα οργανικής ή ανόργανης ένωσης που δρα άλλοτε σαν οξύ και άλλοτε σαν βάση.

Αναιμία: Ελάττωση κάτω από το φυσιολογικό του αριθμού των ερυθροκυττάρων, του ποσού της αιμοσφαιρίνης ή του αιματοκρίτη. Αποτελεί σύμπτωμα διαφόρων νοσημάτων και διαταραχών.

Ανοσοκατασταλμένος: είναι ο άνθρωπος ο οποίος έχει υποστεί καταστολή του ανοσοποιητικού του συστήματος (δεν δουλεύει καλά το αμυντικό του σύστημα) είτε από κάποια πάθηση είτε από κατασταλτική θεραπεία.

Αντιγόνο: Είναι οποιαδήποτε ουσία ικανή να επάγει μια ειδική ανοσολογική απάντηση και να αντιδρά με τα προϊόντα αυτής της απάντησης δηλαδή με ειδικό αντίσωμα ή ειδικά ευαισθητοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα ή και τα δυο.

Αντιδραστήρια: Είναι οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για την πρόκληση μιας χημικής αντίδρασης με σκοπό την ανίχνευση, μέτρηση, παραγωγή κ.τ.λ. άλλων ουσιών.

Αντίσωμα: Οι πρωτεΐνες που παράγονται από το αμυντικό σύστημα του οργανισμού σε απάντηση στην εισβολή ξένων προς αυτόν αντιγόνων (σωματιδίων).

Απορρόφηση: Η πρόσληψη ουσιών εντός ή διαμέσου ιστών.

Αποχρωματισμός: Η αφαίρεση, έλλειψη ή απώλεια χρώματος.

Απτοσφαιρίνες: Οι πρωτεΐνες του πλάσματος που σε περίπτωση αιμόλυσης ενώνονται με την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και δημιουργούν σύμπλοκο αιμοσφαιρίνης – απτοσφαιρίνης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ποσότητας των απτοσφαιρινών του πλάσματος.

Αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο: Το κύτταρο του μυελού των οστών από το οποίο προέρχονται όλα τα κύτταρα του αίματος και έχει την ιδιότητα του αυτοπολλαπλασιασμού.

Αυτοάνοσος: ο μηχανισμός παραγωγής αντισωμάτων που κατευθύνεται ενάντια στους ιστούς του ίδιου του ατόμου.

Βρέφη: Παιδιά ηλικίας μικρότερης του ενός έτους

Γονίδιο - γόνος: Τμήμα του γενετικού υλικού που βρίσκεται στο DNA του πυρήνα των κυττάρων και περιέχει συγκεκριμένη πληροφορία (π.χ. χρώμα ματιών).

Δακρυοκύτταρα: Ερυθροκύτταρα που μοιάζουν με δάκρυα.

Διάλυμα: Ένα ομογενές μείγμα ενός ή περισσότερων διαλυμένων ουσιών διεσπαρμένων σε επαρκή ποσότητα διαλυτικού μέσου (διαλύτη).

Διήθηση: Η δίοδος διαμέσου ενός ηθμού (φίλτρου) ή ενός υλικού που εμποδίζει τη δίοδο ορισμένων μορίων.

Δρεπανοκυττάρωση: Η παρουσία δρεπανοκυττάρων στο αίμα.

Έγκλειστα: Σωματίδια μέσα στο κυτταρόπλασμα που αποτελούνται από κάποιο δομικό κυτταρικό υλικό (συνήθως οξειδωμένα μόρια αιμοσφαιρίνης).

Έμμεση δοκιμασία: η δοκιμασία που γίνεται μέσω άλλης.

Ενεργοποίηση: διαδικασία που καθιστά μια ουσία δραστική ή που αποκαθιστά τη δραστικότητα ενός προηγουμένως αδρανούς ενζύμου.

Επικρατής γόνος: είναι εκείνος που εκφράζεται οπωσδήποτε όταν υπάρχει (είτε ως ομόζυγος είτε ως ετερόζυγος).

Ερυθροκυτταρικοί παράμετροι: Οι αριθμητικές μετρήσεις που περιγράφουν το ερυθρό αιμοσφαίριο (μέγεθος, περιεκτικότητα σε αιμοσφαιρίνη, ομοιογένεια, ποσοστό επί τοις εκατό των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο αίμα.).

Ευαισθητοποίηση: χορήγηση ενός αντιγόνου για πρόκληση πρωτοπαθούς ανοσολογικής απάντησης.

Ημιπερατός: Αυτός που επιτρέπει τη δίοδο ορισμένων μόνο μορίων μιας ουσίας.

Θρομβοασθένειες: Παθήσεις που χαρακτηρίζονται από φυσιολογικό αριθμό αιμοπεταλίων αλλά από παθολογική λειτουργικότητά τους (π.χ. μειωμένη ικανότητα συγκόλλησης).

Θρομβοπενία: Η μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων κάτω από το κατώτερο φυσιολογικό όριο (< 150.000 mm^3).

Ινώδες ή ινική: Μία αδιάλυτη πρωτεΐνη απαραίτητη για την πήξη του αίματος η οποία σχηματίζεται από το ινωδογόνο με τη δράση της θρομβίνης.

Ισοηλεκτρικό σημείο: Σημείο που δεν παρουσιάζει διακύμανση του ηλεκτρικού δυναμικού.

Καταπληξία ή Shock ή collapsus: είναι η παθολογική κατάσταση η οποία συμβαίνει όταν διαταράσσεται η αναλογία μεταξύ του όγκου του αίματος και της χωρητικότητας του αγγειακού συστήματος.

Κληρονομικότητα: Κάθε χαρακτηριστικό του ανθρώπου καθορίζεται από δύο γονίδια, το ένα προέρχεται από τον πατέρα και το άλλο από τη μητέρα (π.χ. χρώμα μαλλιών, χρώμα οφθαλμών κ.λ.π.).

Κλινική Εικόνα: Το σύνολο των συμπτωμάτων και των σημείων που στοιχειοθετούν μια πάθηση. Συμπτώματα είναι αυτά που αναφέρονται από τον ασθενή (π.χ. πόνος, ζάλη, τάση για έμετο), ενώ σημεία αυτά που αποκαλύπτει ο γιατρός (ακροαστικά ευρήματα, ερυθρότητα δέρματος κ.λ.π.).

Κοιλονυχία: Φυσιολογικά η πλάκα των ονύχων έχει το κυρτό της προς τα πάνω. Στην αντίθετη περίπτωση έχουμε κοιλονυχία.

Κοκκιωματώδεις: είναι οι παθολογικές εκείνες καταστάσεις κατά τις οποίες στις πάσχουσες ιστό δημιουργούνται κοκκιώματα.

Κυανωτική καρδιοπάθεια: είναι η καρδιακή νόσος που εκδηλώνεται με κυάνωση (ο άρρωστος παίρνει χρώμα κυανό).

Κυτταροβρίθεια: είναι ο βαθμός κυτταρικότητας.

Λιπαιμία: Παρουσία περίσσειας λιπιδίων στο αίμα.

Μετάλλαξη: Βλάβη του γενετικού υλικού που αφορά κάποιο συγκεκριμένο γονίδιο και μεταβιβάζεται στις επόμενες γενεές.

Μετουσίωση: Μεταβολή της συνήθους φύσης μιας ουσίας, όπως με προσθήκη μεθανόλης ή ακετόνης στο αλκοόλ, προκειμένου να το καταστήσει ακατάλληλο για πόση, ή μεταβολή της μοριακής δομής των πρωτεϊνών λόγω διάσπασης των δεσμών υδρογόνου από τη θερμότητα ή απόορισμένα χημικά.

Μονοδύναμος ορός: ορός που δίνει γένεση σε κύτταρα ενός μόνο τύπου.

Νεογνά: Νεογέννητα ηλικίας μικρότερης των 30 ημερών.

Ξηρή αναρρόφηση: Ο μυελός των οστών βρίσκεται σε πολτώδη κατάσταση. Όταν κατά την αναρρόφησή του ο εξεταστής αδυνατεί να εισροφήσει μυελό τότε λέμε ότι συμβαίνει ξηρή αναρρόφηση.

Οξέωση: Ο οργανισμός έχει τάση να παράγει συνεχώς οξέα αλλά διαθέτει και αμυντικούς μηχανισμούς για τη διατήρηση της οξύτητας του αίματός του σε φυσιολογικά όρια. Αύξηση της οξύτητας (σε παθολογικές καταστάσεις) λέγεται οξέωση (pH < 7,35).

Πολυδύναμος ορός: ορός που έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται κατά πολλούς και διάφορους τρόπους ή επιδρά σε περισσότερους από έναν ιστούς ή όργανα.

Ρόδακες ή ροζέτες: Είναι το σχήμα που δημιουργείται όταν ερυθρά αιμοσφαίρια κολλήσουν γύρω από ένα λευκό αιμοσφαίριο.

Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer): Είναι το χημικό σύστημα που πρόλαμβάνει μεταβολές της συγκέντρωσης ιόντων υδρογόνου.

Στοχοκύτταρα: Ερυθροκύτταρα που μοιάζουν με στόχους.

Συγκόλληση: συγκόλληση εναιωρούμενων κυττάρων που εκτίθενται σε ειδικό ορό.

Συμπλήρωμα: μια σειρά πρωτεϊνικών ενζύμων του ορού συνδέονται με το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος. Αποτελείται από 9 λειτουργικά συστατικά που συμβολίζονται από C1 έως C9 και τα οποία προκαλούν κυτταρόλυση και καταστροφή των μικροβίων ή συμμετέχουν σε ανοσολογικές και βιολογικές δράσεις.

Σύνδρομο δυσαπορρόφησης: Παθήσεις στις οποίες δεν απορροφούνται από το έντερο ουσίες απαραίτητες για τον οργανισμό. Οι παθήσεις αυτές συνήθως συνοδεύονται από διάρροιες.

Σφαιροκύτταρο: Ένα μικρό, σφαιρικό, πλήρες ερυθροκύτταρο αιμοσφαιρίνης, χωρίς τη συνήθη κεντρική ωχρότητα που ανευρίσκεται χαρακτηριστικά στην κληρονομική σφαιροκυττάρωση, καθώς επίσης και στην επίκτητη αιμολυτική αναιμία.

Υπέρτονο: Υποδηλώνει ένα διάλυμα με μεγαλύτερη ωσμωτική πίεση σε σχέση με άλλο προς το οποίο συγκρίνεται.

Υπολειπόμενος γόνος: είναι εκείνος που για να εκφραστεί πρέπει να υπάρχει σε ομόζυγη μορφή.

Υποξία: Η χαμηλή περιεκτικότητα οξυγόνου στο αίμα του ασθενή.

Υπότονο: Υποδηλώνει διάλυμα χαμηλότερης ωσμωτικής πίεσης από άλλο προς το οποίο συγκρίνεται.

Φεριτίνη: Πρωτείνη του αίματος που περιέχει πολλά μόρια σιδήρου μέσω της οποίας μετράμε τις αποθήκες σιδήρου του οργανισμού.

Φυλοσύνδετος γόνος: Είναι ο γόνος εκείνος ο οποίος μεταβιβάζεται με τα χρωματοσώματα του φύλου (X, Y).

Χειλίτιδα: Φλεγμονή των χειλέων.

βιβλιογραφία

1. Α.Εμμανουηλίδου-Αρσένη. Ιατρική Μικροβιολογία, Θεωρία-Πράξη, 1982.
2. Α.Πισίδης. Ανατομική.
3. Α.Φερτάκης. Αιματολογία, 1992.
4. Άννα Σαχίνη Καρδάση- Μαρία Πάνου. Παθολογική και Χειρουργική Νοσηλευτική, 1997.
5. Αρ.Φερτάκης. Μαθήματα Παθολογικής Φυσιολογίας, 1985.
6. Γ.Αραπάκης. Διαγνωστική Προσέγγιση Αρρώστου με Αναιμία. «Ημέρες Παθολογίας 96». Γ΄ Παθολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, 1996.
7. Γ.Ηλιόπουλος. Φυσιολογία και φυσιοπαθολογία του αίματος και των αιμοποιητικών οργάνων, 1999.
8. Γ.Χ.Μελέτης. Από το αιματολογικό εύρημα στη διάγνωση, 1991.
9. Γεώργιος Ε. Χαλεβελάκης. Αιμοσφαιρινοπάθειες, 1991.
10. Δ.Λουκόπουλος. Αξιολόγηση Εργαστηριακών Εξετάσεων, 1994.
11. Ε.Βρακίκου. Σιδηροπενική Αναιμία και άλλες Υπόχρωμες Αναιμίες. «Ημέρες Παθολογίας 96» Γ΄ Παθολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, 1996.
12. Ειρ.Κοντοπούλου-Γρίβα. Επιδημιολογία της μετάγγισης αίματος, κριτήρια εφαρμογής και παρενέργειες. 21ο ετήσιο πανελλήνιο ιατρικό συνέδριο, Αθήνα 1995.
13. Ειρήνη Κοντοπούλου, Καλλιόπη Λουίζου, Τιτίκα Μανδαλάκη, Άννα Μανίτσα, Νίτσα Ρενιέρη, Ρεγγίνα Σταθοπούλου, Κυριακή Σωφρονιάδου και Γραμματική Χατζηδημητρίου. Πρακτικό βοήθημα αιμοδοσίας, τεύχη Α, Β, Γ και Δ, 1989-1995.
14. Ειρήνη Κοντοπούλου, Καλλιόπη Λουίζου, Τιτίκα Μανδαλάκη, Άννα Μανίτσα, Νίτσα Ρενιέρη, Ρεγγίνα Σταθοπούλου, Κυριακή Σωφρονιάδου και Γραμματική Χατζηδημητρίου. Βασικοί κανόνες λειτουργίας της αιμοδοσίας, 1989.
15. Ελευθερία Αθανάτου. Κλινική Νοσηλευτική. ΣΤ Έκδοση, 1996.
16. Ετήσιο μετεκπαιδευτικό σεμινάριο 1998. Αιμοδοσία-Αιμόσταση. Αθήνα 29-31 Μαΐου 1998.
17. Θ.Πρωτόπαπα. Εγχειρίδιο εργαστηριακής διάγνωσης, 1993.
18. Θρομβοπενία. 27ο ετήσιο πανελλήνιο ιατρικό συνέδριο. Αθήνα 2001.
19. Ι.Α.Καπετανάκη. Άτλας δερματολογίας, 1980.
20. Ι.Κ.Σταυρίδη. Αιματολογία.
21. Ι.Τσεβρένης. Αιματολογία, 1984.
22. Ιατρική Εταιρία Αθηνών. Κλινικά φροντιστήρια. Αθήνα, 2000.
23. Ιπποκράτη Τσεβρένη, Ειρήνης Κοντοπούλου-Γρίβα. Αιμοδοσία , 1999.
24. Κ.Δ.Γαρδίκα. Αιματολογία, τόμοι Α και Β, 1981.
25. Λένα Παμφίλη. Η διαχείριση του κινδύνου στην ιατρική της μετάγγισης. Ετήσια Σεμινάρια Εξειδίκευσης Εργαστηριακής Αιματολογίας – Αιμοδοσίας. Αθήνα 2001.
26. Ν.Ι.Βοργιά, Ν.Π.Λαουτάρη. Αιματολογία, τόμοι Α 1991 και Β 1995.
27. Παντελής Ε. Μακρής. Αιμόσταση, Φυσιολογία και Παθολογία, 1996
28. Ρ.Σταθοπούλου-Σπάρου. Αναιμία νεογνικής και παιδικής ηλικίας. Εναλλακτική προς τη μετάγγιση αίματος θεραπευτική αγωγή. 21ο ετήσιο πανελλήνιο ιατρικό συνέδριο, Αθήνα 1995.

29. Σωτηρίου Α. Ράπτη. Εσωτερική Παθολογία, 1998.
30. Τ.Μανδαλάκη - Γιαννιτσιώτη. Μηχανισμός Αιμόστασης. Αιμορραγικά Σύνδρομα. Ιατρική Εταιρεία Αθηνών. Αθήνα 2000.
31. Av. Hoffbrand. Essential Haematology. Four Dragons. 3rd Edition. London 1993.
32. Cecil. Παθολογία, 1996.
33. Dorland's. Ιατρικό λεξικό, 1997.
34. Ernest Beutler, Marshall A. Lichtman, Barry S. Coller and Thomas J. Kipps. Williams Hematology, fifth edition, 1995.
35. F.Heckner. Πρακτικό εγχειρίδιο εργαστηριακής αιματολογίας, 1988.
36. Fischbach. Εγχειρίδιο εργαστηριακών εξετάσεων, 1999.
37. G.Richard Lee, Thomas C. Bithell, John Foerster, John W. Athens and John N. Lukens. Wintrobe's Clinical Hematology, ninth edition, 1993.
38. Guidelines for the clinical management of thalassaemia. Thalassaemia International Federation, 2000.
39. Harrison. Εσωτερική Παθολογία, 1994.
40. M.Nestle. Διατροφή στην κλινική πράξη, 1987.
41. Mcnaught-Callander. Εικονογραφημένη φυσιολογία, 1987.
42. Rodger C. Bick. Αιμορραγικές Καταστάσεις. The Medicine Clinics of North American. Philadelphia 1994.

Ενέργεια 2.3.2: **«Ανάπτυξη των Τ.Ε.Ε. και Σ.Ε.Κ.»**

ΠΑΙΔΑΓΩΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ

Σταμάτης Αλαχιώτης

Καθηγητής Γενετικής Πανεπιστημίου Πατρών

Πρόεδρος του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου

Έργο: **«Βιβλία Τ.Ε.Ε.»**

– Επιστημονικός Υπεύθυνος του Έργου

Γεώργιος Βούτσινος

Σύμβουλος του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου

– Υπεύθυνη του Τομέα Υγείας και Πρόνοιας

Ματίνα Στάππα, *Οδοντίατρος*

Πάρεδρος ε.θ. του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου

ΕΚΔΟΣΗ 2009 – ΑΝΤΙΤΥΠΑ: 1.000 – ΑΡ. ΣΥΜΒΑΣΗΣ 1744 / 2009

ΕΚΤΥΠΩΣΗ – ΒΙΒΛΙΟΔΕΣΙΑ : ΕΜ-ΕΣ ΠΡΕΣΣ Α.Ε.

ISBN Set 978-960-06-3112-8
Κωδικός βιβλίου: 0-24-0246
Τ.Β΄ 978-960-06-3123-4

ΙΤΥΕ "ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ"
ινστιτουτο τεχνολογιας υπολογιστων & εκδοσεων

(01) 000000 0 24 0246 8