



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ

ΑΣΗΜΙΝΑ ΣΑΦΑΡΙΚΑ

ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ

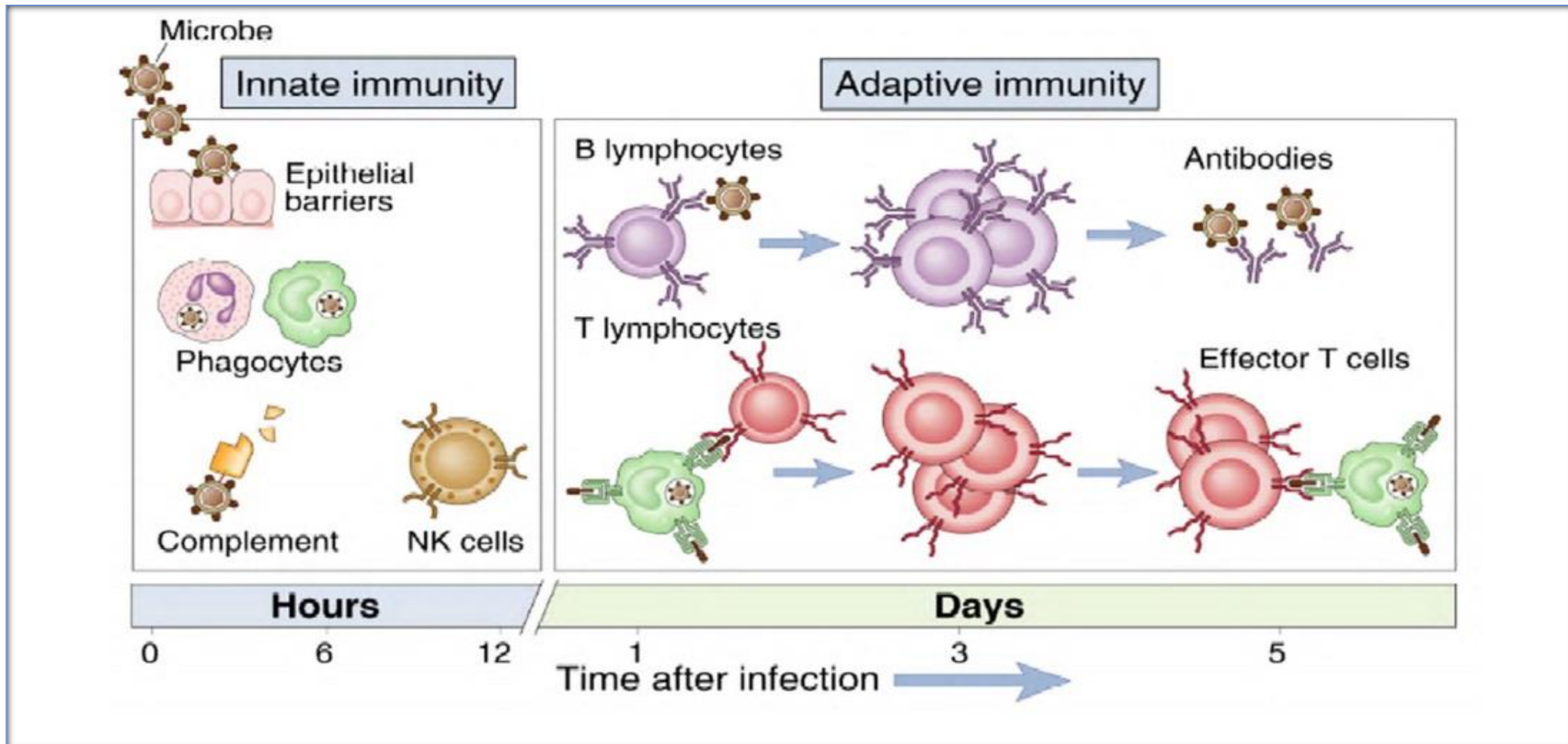
Δ΄ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ

ΑΝΟΣΙΑ

- Μη ειδική – Φυσική (natural, native, innate immunity) Το σύνολο των αμυντικών μηχανισμών που βρίσκονται σε άμεση ετοιμότητα που κινητοποιούνται ευθύς μετά την εισβολή των εξωγενών παθογόνων, μέχρι να αναπτυχθεί η ειδική ανοσιακή απάντηση
- Ειδική – Επίκτητη (acquired, specific, adaptive immunity) Αναγνώριση ξένης ουσίας και απόλυτα ειδική αντίδραση

ΦΥΣΙΚΗ-ΕΙΔΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ



ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

Κύτταρα που συμμετέχουν

- Τ & Β-λεμφοκύτταρα(χαρακτηρίζονται από ειδικότητα)
- «συνοδά» κύτταρα (χωρίς προηγούμενη ευαισθητοποίηση)
 - Μονοπύρηννα – μακροφάγα
 - Κύτταρα «Φυσικοί Φονείς» (NK)
 - Πολυμορφοπύρηννα
 - Δενδριτικά κύτταρα

Παίζουν ρόλο στη φαγοκυττάρωση και στη λύση μικροοργανισμών

ΕΙΔΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

- Χυμική ανοσία (humoral immunity)
 - Αντισώματα: Παραγωγή από Β -κύτταρα
 - Προστασία έναντι εξωκυττάριων βακτηρίων, τοξινών
- Κυτταρική ανοσία (cellular or cell-mediated immunity)
 - Τ -κύτταρα, συνεργασία με ΜΦ
 - Καταστροφή ενδοκυττάριων βακτηρίων και ιών

ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

Μηχανισμός ανοσολογικής απάντησης

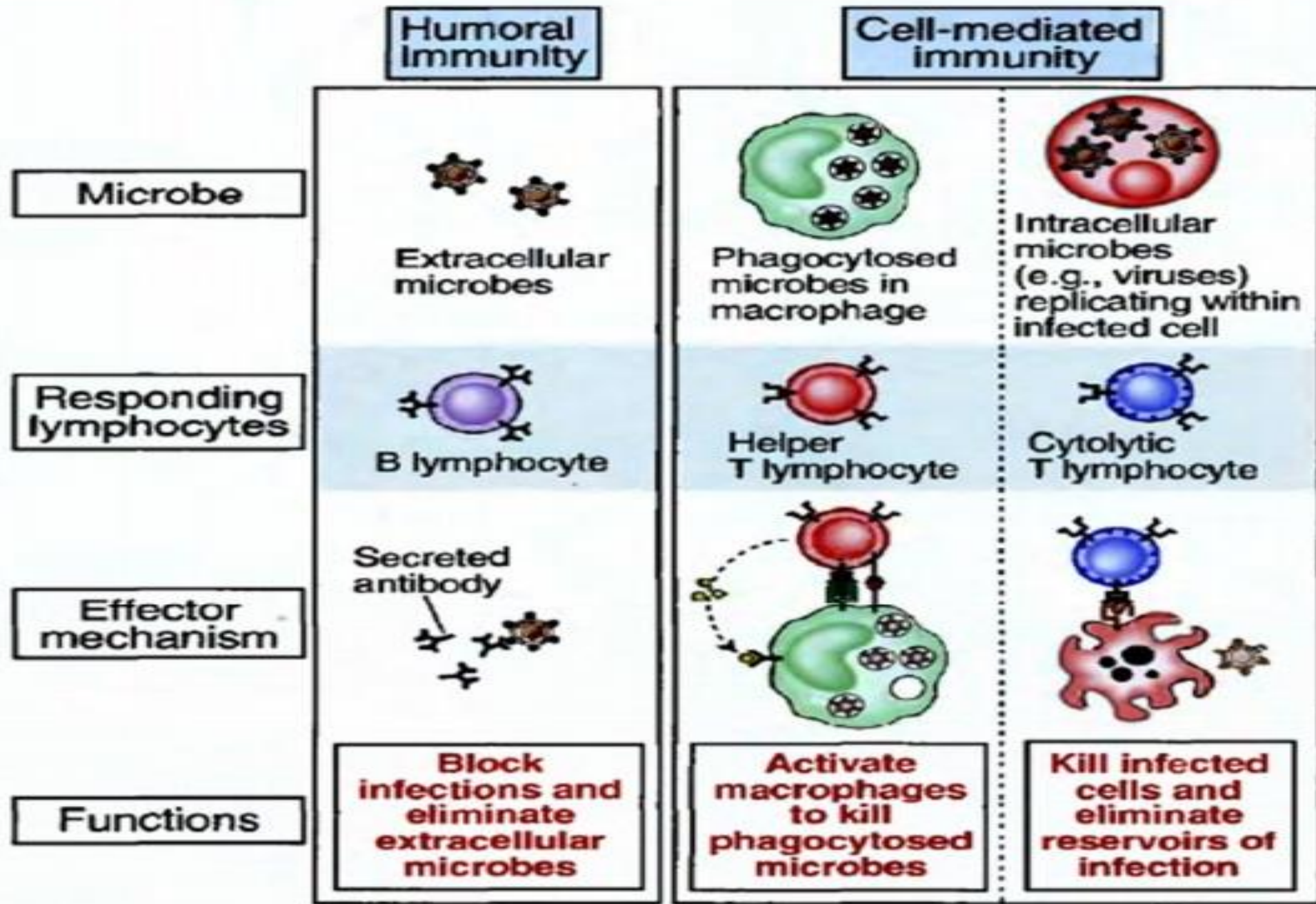
- Παραλαβή Ag από APC
- Παρουσίαση στο βοηθητικό T4-κυτ με TcR + MHC II
- Διέγερση & διαφοροποίηση T4-κυτ. για παραγωγή IL-1 & IL-2
- Ενεργοποίηση B -κυττάρων σε πλασματοκύτταρα-παραγωγή Abs

Βιοσύνθεση αντισώματος

- Λογαριθμική (4-10 ημέρες)
- Δυναμικής ισορροπίας
- Πτωτική

Πρωτογενής ΑΑ: πρώτα IgM (1-2 εβδ.), μετά IgG

Δευτερογενής ΑΑ: κυρίως IgG (IgM σε μικρό ποσοστό)



ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ

- Παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα είτε ως μεμβρανικές πρωτεΐνες και λειτουργούν ως υποδοχείς του Β-κυττάρου για τα αντιγόνα στη φάση αναγνώρισης της χυμικής ανοσίας, είτε εκκρίνονται σαν διαλυτές πρωτεΐνες του πλάσματος ή ορισμένων εκκρίσεων από τα διαφοροποιημένα Β-κύτταρα(πλασματοκύτταρα) υπό την επίδραση του αντιγονικού ερεθίσματος.
- Οι ανοσοσφαιρίνες ή αντισώματα αποτελούν ομάδα γλυκοπρωτεϊνών με παρόμοια δομή και έχουν ως λειτουργία να εξαλείφουν και να εξουδετερώνουν εξωκυττάριους μικροοργανισμούς και μικροβιακές τοξίνες.

ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ-ΤΑΞΕΙΣ

- Διακρίνονται σε 5 τάξεις ή ισοτύπους που καθορίζονται από τις σταθερές περιοχές των βαριών αλυσίδων τους.
- Οι πέντε ισότυποι των ανοσοσφαιρινών είναι οι IgG, IgM, IgA, IgD και IgE που χαρακτηρίζονται αντίστοιχα από τις βαριές αλυσίδες γ,μ,α,δ και ε.
- Υπάρχουν επίσης δυο ισότυποι των ελαφρών αλυσίδων οι κ και οι λ που καθορίζονται από τις διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων στη σταθερή περιοχή των ελαφρών αλυσίδων.
- Η ποσοτική μέτρηση των ανοσοσφαιρινών του ορού γίνεται με νεφελομετρία

IgG

- Αποτελεί το 75% του συνόλου των ανοσοσφαιρινών.
- Κύριος ισότυπος στο αίμα και στους ιστούς.
- Μέση συγκέντρωση 1250mg%(Φ.Τ.800-1700mg%)
- IgG1(70%) είναι κυρίως εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι πρωτεϊνικών αντιγόνων.
- IgG2(20%) είναι αντισώματα έναντι πολυσακχαριτών
- IgG3 (8%) είναι αντισώματα έναντι ιών
- IgG4(2%)

Οι IgG1, IgG3 είναι υπεύθυνες για την οψωνινοποίηση των αντιγόνων με στόχο τη φαγοκυττάρωση.

Όλες οι υποτάξεις της IgG, εκτός της IgG4 ενεργοποιούν την κλασική οδό του συμπληρώματος.

Η IgG διέρχεται τον πλακούντα

IgM

- Η πρώτη ανοσοσφαιρίνη της πρωτογενούς ανοσιακής απάντησης.
- Η πρώτη που συντίθεται στα νεογνά
- Ενεργοποιεί την κλασική οδό του συμπληρώματος.
- Συναθροίζει τα αντιγόνα
- Συγκέντρωση στον ορό(M.T.)125mg%
- Αποτελεί τον υποδοχέα του B λεμφοκυττάρου
- Έχει ρόλο ως εκκριτική ανοσοσφαιρίνη

IgA

- Συγκέντρωση στον ορό(M.T.)250mg%
- Κυρίαρχη τάξη στις εκκρίσεις
- Απαντά ως μονομερής ή διμερής στον ορό






IgD

- Ελάχιστη ποσότητα στον ορό
- Άγνωστη βιολογική λειτουργία

IgE

- Παίζει ρόλο στην άμυνα του οργανισμού έναντι των παρασίτων
- Είναι αρμόδια για τις αλλεργικές αντιδράσεις
- Προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση
- Μικρή συγκέντρωση στον ορό
- Απαντάται στη μεμβράνη των βασεόφιλων, των σιτευτικών και των βλεννογόنيων κυττάρων

Classes of Antibodies and Their Functions

Antibody	Total Serum Antibody (%)	Structure
IgG	80–85	
IgM	5–10	
IgA	15	
IgE	0.002	
IgD	0.2	

Legend:
■ Heavy chain (dark green)
■ Light chain (light green)

Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ-ΔΡΑΣΗ

- Μαζί με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα αναγνωρίζουν και φαγοκυτταρώνουν αντιγόνα
- Τα διασπούν σε αντιγονικά πεπτιδικά θραύσματα
- Τα προσδένουν σε μόρια του συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας MHC και εκτίθενται μαζί στην επιφάνειά τους
- Τ λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν το αντιγόνο όταν παρουσιάζεται από μόρια MHC : περιορισμός MHC

Τ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ(TCR)

- Βρίσκεται στην επιφάνεια των Τ λεμφοκυττάρων και μαζί με συν-υποδοχείς (CD4 και CD8) σταθεροποιεί τη σύνδεση μεταξύ αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και Τ λεμφοκυττάρων
- Αποτελείται από μια αλυσίδα α και μία αλυσίδα β , σπανιότερα από μια αλυσίδα γ και μία δ, με μια σταθερή (Cα και Cβ) και μια μεταβλητή (Vα και Vβ) περιοχή
- Συνδέεται με το CD3 και την πρωτεΐνη ζ και σχηματίζει το σύμπλεγμα του TCR.

ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ-CD

- Ο ανοσοφαινότυπος, δηλαδή η ανοσολογική ταυτότητα των κυττάρων μελετάται με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, που ανιχνεύουν συγκεκριμένα πρωτεϊνικά μόρια κυρίως των λεμφοκυττάρων αλλά και πολλών άλλων κυττάρων.
- Τέτοια ειδικά πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση κυτταρικών υποπληθυσμών και ονομάζονται CD (clusters of designation).
- Διακρίνονται σε δείκτες επιφανείας, κυτταροπλασματικούς και πυρηνικούς δείκτες.
- Τα CD συχνά αναφέρονται και ως κυτταρικοί ή ανοσιακοί δείκτες. Χαρακτηρίζουν την κυτταρική σειρά από την οποία προέρχεται το κύτταρο, το βαθμό ωρίμανσης του, τη διαφορετικότητα του ή/και τη λειτουργική του κατάσταση.

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

- Η κυτταρομετρία ροής είναι μία αυτοματοποιημένη και ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική που επιτρέπει τη μελέτη μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα και τη διάκρισή τους σε φυσιολογικά και παθολογικά.
- Η ταυτοποίηση των κυττάρων γίνεται με βάση την παρουσία ή απουσία, καθώς και την ένταση της έκφρασης χαρακτηριστικών μορίων είτε στην κυτταρική τους μεμβράνη είτε στο εσωτερικό τους. Αντισώματα συνδεδεμένα με φθορίζουσες ουσίες αναγνωρίζουν και προσδένονται στα επιφανειακά ή στα ενδοκυτταρικά μόρια και αναλύονται στο κυτταρόμετρο με τη βοήθεια φωτεινών πηγών (Lasers). Τα σήματα φθορισμού που εκπέμπει το κάθε κύτταρο μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα και μεταφράζονται σε παραμέτρους που αναλύονται με ειδικό λογισμικό. Με αυτό τον τρόπο, μπορούμε να διακρίνουμε και να χαρακτηρίσουμε τους διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς που υπάρχουν σε δείγματα βιολογικών υγρών, όπως για παράδειγμα σε δείγματα μυελού των οστών, αίματος, κ.α.
- Χρησιμοποιώντας αντισώματα συνδεδεμένα με διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες μπορούμε να ανιχνεύουμε ταυτόχρονα σε κάθε μεμονωμένο κύτταρο του ίδιου κυτταρικού πληθυσμού από 2 έως και 12 διαφορετικά επιφανειακά ή ενδοκυτταρικά μόρια (πολυπαραμετρική/πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής). Έτσι μπορούμε να προσδιορίσουμε αναλυτικά τον ανοσοφαινότυπο των κυττάρων ενός δείγματος.

CD4 & CD8

- πρωτεΐνες της επιφάνειας των Τ λεμφοκυττάρων που, μέσω αλληλεπίδρασης με μόρια του MHC τάξης I και II, βοηθούν την αλληλεπίδραση TCR και αντιγόνου
- ανήκουν στην οικογένεια των ανοσοσφαιρινών,
- τα CD4+ Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα προσδένονται στην περιοχή β2 του MHC τάξης II
- τα CD8+ Τ κυτταρολυτικά λεμφοκύτταρα προσδένονται στην περιοχή α3 του MHC τάξης I,

Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

- Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα (helper, TH) : εκφράζουν τον TCR, τον συν-υποδοχέα CD4 και αναγνωρίζουν MHC τάξης II μόρια
 - TH1 κύτταρα: συμμετέχουν σε ανοσολογικές αντιδράσεις που προκαλούν ενδοκυττάρια παθογόνα με συμμετοχή μακροφάγων, παράγουν ιντερφερόνη-γ
 - TH2 κύτταρα: συμμετέχουν σε αντιδράσεις που προκαλούν ελμινθικά εντερικά παράσιτα, με παραγωγή ανοσοσφαιρίνης E για ενεργοποίηση ηωσινόφιλων, βασεόφιλων και σιτευτικών κυττάρων, χωρίς συμμετοχή μακροφάγων, παράγουν IL-4
- Τ κυτταρολυτικά λεμφοκύτταρα (Tc) : εκφράζουν τον TCR, το CD8 και αναγνωρίζουν μόρια MHC τάξης I, και IL-13,

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΕΙΔΗ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

- Τ ρυθμιστικά (regulatory, Treg) : περιλαμβάνουν τα TH, που συνεργάζονται με τα Β κύτταρα προάγοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους σε πλασματοκύτταρα, ενώ συνεργάζονται και με τα Tc κύτταρα προάγοντας την κυτταροτοξική τους δράση
- Τ κατασταλτικά : περιορίζουν ή αναστέλλουν τη δραστηριότητα των TH κυττάρων και ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των Β κυττάρων σε πλασματοκύτταρα, περιλαμβάνουν τα TH1 και TH2.
- Τ εκτελεστικά : προκαλούν λύση άλλων κυττάρων, περιλαμβάνουν τα Τ κυτταρολυτικά και τα NK κύτταρα

ΝΚ(NATURAL KILLER)-ΦΥΣΙΚΟΙ ΦΟΝΕΙΣ

- Ανήκουν στα μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα.
- Αποτελούν το 5-10% των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος.
- Είναι κύτταρα της φυσικής ανοσίας
- Προέρχονται από το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο ,στο μυελό των οστών, το οποίο διαφοροποιείται υπό την επίδραση αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών.
- Υπάρχει και μια ομάδα NK(CD56_{HIGH})που παράγεται στους λεμφαδένες.

NK

- Έχουν την ικανότητα να λύουν
 - κύτταρα μολυσμένα από ιούς ή ενδοκυττάρια μικρόβια
 - Καρκινικά κύτταρα
 - Αλλογενή κύτταρα
- Χωρίς προηγούμενη ευαισθητοποίηση (άμεση απάντηση)
- Χωρίς MHC περιορισμό

NATURAL KILLERS

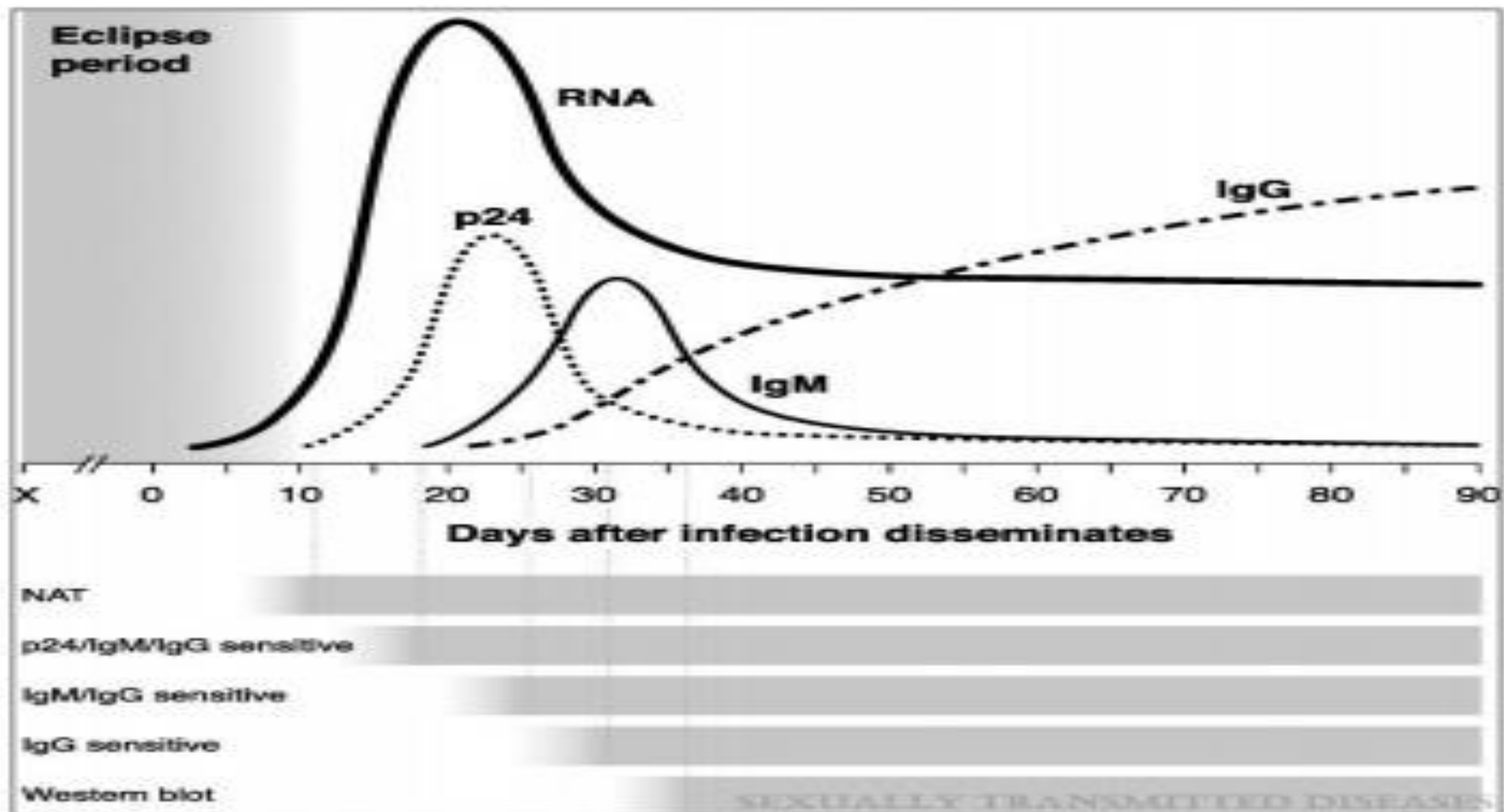
- Τα κύτταρα NK προσδιορίζονται από την έκφραση διαφόρων υποδοχέων στην κυτταρική τους επιφάνεια και δεν αποτελούν ένα ομοιογενή πληθυσμό. Σε γενικές γραμμές, ο πιο κοινός συνδυασμός δεικτών επιφάνειας που χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει την πλειοψηφία των κυττάρων NK είναι η **απουσία του CD3 (CD3-)**, μαζί με την **έκφραση του CD56 και του CD16 (CD56+ CD16+)**. Ωστόσο, δεν εκφράζουν όλα τα κύτταρα NK τους δείκτες CD56 και CD16 ομοιόμορφα και ως εκ τούτου, μπορεί να διαιρεθούν σε υποκατηγορίες (υποπληθυσμούς) με βάση την έκφραση αυτών των δυο μορίων. Τα CD16+ CD56 +/- που είναι και CD3-, αναφέρονται ως **κυτταροτοξικά NK κύτταρα**, ενώ τα CD56+ CD16- NK κύτταρα ονομάζονται **ρυθμιστικά NK κύτταρα** και είναι κύτταρα που εκκρίνουν κυτοκίνες

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ

- Ολικά λεμφοκύτταρα : 23.9% (11-42.2%)
- T : 19.1% (8.2- 36%)
- CD4 T : 10.1%(4.1- 18%)
- CD8 T: 7.3% (2.3- 12.7%)
- B : 2.2% (0.4-5%) κ/λ : 1.5 (1.1- 2.2)
- NK : 2.6% (1.3- 5.7%)
- Πλασματοκύτταρα : 0.06% (0.01- 0.45%)

ΙΟΛΟΓΙΚΟΙ-ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ HIV ΛΟΙΜΩΞΗΣ

- Το HIV-RNA ανιχνεύεται πρώτο στο πλάσμα περίπου 10 μέρες μετά τη λοίμωξη. Φτάνει στη μέγιστη συγκέντρωση σε 30 ημέρες και αρχίζει να ελαττώνεται μετά από 40 ημέρες όπου και σταθεροποιείται.
- Το p24 αντιγόνο του HIV ανιχνεύεται την 14^η μέρα, φτάνει στο peak την 30^η μέρα και εξαφανίζεται την 45^η μέρα.
- Παράγονται αντισώματα ανάμεσα στην 3^η και 4^η εβδομάδα, μετά την έκθεση στον ιό και μένουν για πάντα στον ανθρώπινο οργανισμό.
- IgM αντισώματα ανιχνεύονται την 22^η μέρα φτάνουν στο peak την 35^η μέρα, ελαττώνονται μέχρι την 38^η μέρα οπότε και εμφανίζονται IgG αντισώματα. Τα IgG αντισώματα παραμένουν καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής του ατόμου.



Ιολογικοί και ανοσολογικοί δείκτες της HIV λοίμωξης

ΟΞΕΙΑ HIV ΛΟΙΜΩΞΗ

- Απώλεια CD4 T-λεμφοκυττάρων από το αίμα, σημαντική απώλεια CD4 T-λεμφοκυττάρων από το έντερο.
- Υψηλό ιικό φορτίο
- Αυξημένο αριθμό CD8 λεμφοκυττάρων και αναστροφή του λόγου CD4:CD8 (φυσιολογικά περίπου 2:1)
- Υψηλά επίπεδα ανοσιακής ενεργοποίησης

ΟΞΕΙΑ HIV ΛΟΙΜΩΞΗ

- Οι HIV-ειδικές ανοσιακές απαντήσεις ανιχνεύονται σε 2-3 εβδομάδες
- Εμφάνιση της απάντησης των HIV-ειδικών κυτταροτοξικών και μνημονικών CD8 T λεμφοκυττάρων ,τα οποία καταστρέφουν τα HIV CD4 T-λεμφοκύτταρα με παράλληλη πτώση του ιικού HIV φορτίου αλλά σπάνια η λοίμωξη ελέγχεται πλήρως.
- Ο HIV μολύνει τα ενεργοποιημένα CD4 T λεμφοκύτταρα που απαντούν στον ιό.
- Δυσλειτουργία των HIV-ειδικών μνημονικών T λεμφοκυττάρων εμφανίζεται πολύ νωρίς.
- Εξουδετερωτικά αντισώματα δεν εμφανίζονται για αρκετούς μήνες(παρά μόνο κατά την μετάβαση της οξείας φάσης σε χρόνια)και σπάνια είναι ικανά για την εξουδετέρωση του ιού.

ΧΡΟΝΙΑ HIV ΛΟΙΜΩΞΗ

- Η ανοσιακή ενεργοποίηση δεν επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα.
- Οι ανοσιακές απαντήσεις στο HIV αποκτούν προοδευτικά μεγαλύτερη ποικιλία.
 - Καθώς ο ιός πολλαπλασιάζεται μεταλλαγμένες μορφές εμφανίζονται και αυτές προκαλούν νέες ανοσιακές απαντήσεις(από την πηγή των παρθένων Β και Τ λεμφοκυττάρων).
 - Οι δραστικές ανοσιακές απαντήσεις πιέζουν τον ιό να μεταλλάσσεται με τρόπους που εμποδίζουν την αναγνώριση, κάπως όμοιο με τον τρόπο που οι μεταλλαγές του HIV μπορούν να βλάψουν την δραστικότητα των φαρμάκων(ανοσιακή διαφυγή)

HIV Assay Diagnostic Testing Evolution

Assay progression	Indirect ELISA (HIV-1,2)		Sandwich ELISA HIV1,2 IgG & IgM		Sandwich ELISA HIV1,2 IgG & IgM + p24 Ag	
	HIV-1 lysate	HIV-2 lysate	HIV peptide	p24		
Year	1985	1987	1991	1997	2015	
Generation	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	
Antigen (Ag) Source	Virus Infected Cell Lysate	Lysate & Recombinant	Recombinant & Synthetic peptides	Recombinant & Synthetic peptides	Recombinant & Synthetic peptides	
Specificity	95-98%	>99%	>99.5%	99.5%	99.5%	
Sensitivity	99%	>99.5%	>99.5%	>99.8%	100%	
Negative Window	8-10 weeks	4-6 weeks	2-3 weeks	2 weeks	2 weeks	
Detects Antibody (Ab) and Ag	IgG Anti HIV-1	IgG anti HIV-1 and IgG anti HIV-2	IgG and IgM anti HIV-1, HIV-2 and Group O	IgG and IgM anti HIV-1, HIV-2 and Group O. Also detects HIV-1 p24 Ag	IgG and IgM anti HIV-1, HIV-2 and Group O. Also detects HIV-1 p24 Ag	
Results	Single result	Single result	Single result	Single result; does not differentiate Ab from Ag positivity	Separate HIV-1 and HIV 2 Ab and Ag results	
Confirming Tests	HIV-1 western blot (WB) or Immunofluorescence (IFA)	HIV-1 WB or IFA, HIV-2 ELISA and WB if HIV-1 confirm is negative	HIV-1 WB or IFA, HIV-2 ELISA and WB if HIV-1 confirm is negative	HIV-1.2 differentiation Assay followed by qualitative HIV-1 RNA PCR if differentiation assay is negative	Not determined at the time of this writing	

Ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα αρχικής εξέτασης ΕΙΑ(ENZYMATIC IMMUNOASSAY) (Sharma et al, 2008)

Ψευδώς θετικά	ψευδώς αρνητικά
<ul style="list-style-type: none">• Αυτοάνοσα νοσήματα• Πολλαπλές κυήσεις• Πολλαπλές μεταγγίσεις• Αιματολογικές κακοήθειες• Υπερ-γ- σφαιριναιμία• Οξύς ρευματικός πυρετός• Αλκοολική ηπατίτιδα• Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια• Τεχνικά λάθη	<ul style="list-style-type: none">• Περίοδος παραθύρου• Τεχνικά λάθη• Θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά• Προχωρημένο στάδιο HIV λοίμωξης

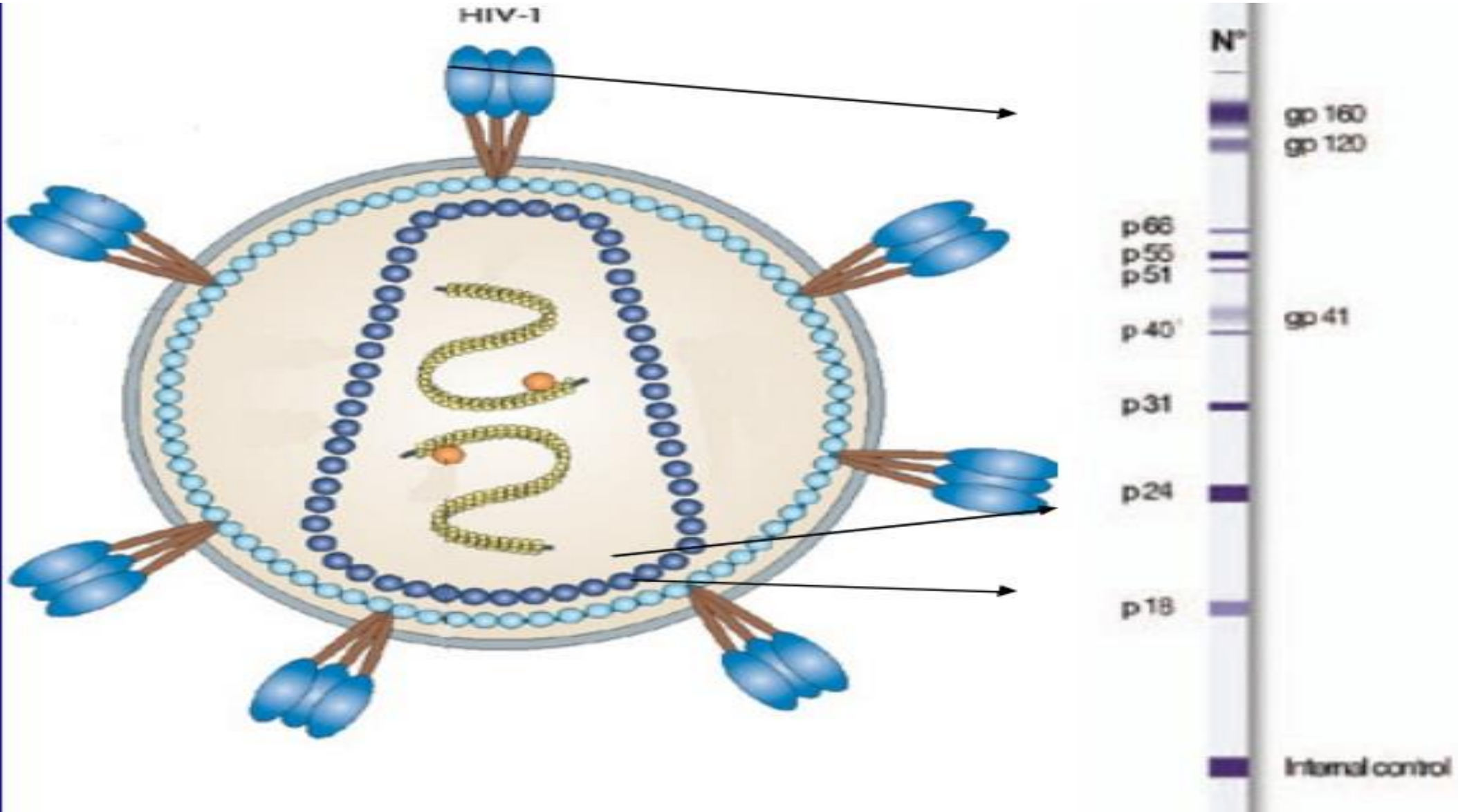
ΔΙΑΓΝΩΣΗ HIV

- Συνιστάται οι κλινικοί γιατροί να παραπέμπουν το βιολογικό δείγμα για εξέταση με 4ης γενιάς ELISA
- Ανιχνεύει αντιγόνο-αντίσωμα HIV-1/2 Ag/Ab (ταυτόχρονη ανίχνευση αντισώματων IgM και IgG ενάντι HIV-1 και HIV-2 και του αντιγόνου HIV-1 p24). Παρ'όλα αυτά δίνει ένα μόνο αποτέλεσμα και δεν διευκρινίζεται αν το θετικό αποτέλεσμα οφείλεται στην παρουσία του HIV-1 p24 αντιγόνου ή στην παρουσία αντισώματος έναντι HIV-1 ή HIV-2.

Western Blot(ανοσοαποτύπωση)

- Είναι η πιο διαδεδομένη επιβεβαιωτική μέθοδος που εφαρμόζεται στα Κέντρα Αναφοράς AIDS μέχρι και σήμερα στη χώρα μας και στην Ευρώπη
- Μπορεί να διεξαχθεί σε χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 5 εβδομάδων μετά την μόλυνση. Για να θεωρηθεί ένα δείγμα θετικό με Western Blot σύμφωνα με τα προτεινόμενα κριτήρια κατά CDC για την HIV-1 και HIV-2 λοιμώξεις απαιτείται η παρουσία αντίστοιχων αντισωμάτων έναντι δύο τουλάχιστον πρωτεϊνών από τις παρακάτω: p24 p26 gp41 gp31 gp120/160 gp125/140
- Επισημαίνεται ότι εξέταση με HIV-1 ανοσοαποτύπωση κατά Western blot μπορεί να αποδώσει ψευδώς αρνητικό ή απροσδιόριστο αποτελέσματα στην φάση της HIV πρωτολοίμωξης.
- Για την επίλυση των περιπτώσεων με ακαθόριστα αποτελέσματα οι καταλληλότερες μέθοδοι είναι η ανίχνευση του HIV RNA και του p24 AgHIV

WESTERN BLOT



NAT TEST(NUCLEIC ACID TEST)

- Σε περίπτωση που η ευαισθησία της επιβεβαιωτικής μεθόδου δεν προσδιορίσει την παρουσία ή μη HIV λοίμωξης μπορεί να αξιολογηθεί η σκοπιμότητα εξέτασης του βιολογικού δείγματος με HIV- NAT. Η ανίχνευση HIV RNA είναι καθοριστική για το τελικό αποτέλεσμα, εφόσον είναι θετικό (ιδίως σε HIV πρωτολοίμωξη τα επίπεδα RNA είναι ιδιαίτερα υψηλά με εύκολη επακόλουθη μετάδοση του ιού στην κοινότητα)

1. Recommended Laboratory HIV Testing Algorithm for Serum or Plasma Specimens

HIV-1/2 antigen/antibody combination immunoassay

(+)

(-)

Negative for HIV-1 and HIV-2 antibodies and p24 Ag

HIV-1/HIV-2 antibody differentiation immunoassay

HIV-1 (+)

HIV-1 (-)

HIV-1 (+)

HIV-1 (-) or indeterminate

HIV-2 (-)

HIV-2 (+)

HIV-2 (+)

HIV-2 (-)

HIV-1 antibodies detected

HIV-2 antibodies detected

HIV antibodies detected

HIV-1 NAT

(+) indicates reactive test result

(-) indicates nonreactive test result

NAT: nucleic acid test

HIV-1 NAT (+)

Acute HIV-1 infection

HIV-1 NAT (-)

Negative for HIV-1

ΒΟΗΘΗΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

- Μέτρηση CD4-T λεμφοκυττάρων
 - Σταδιοποίηση HIV λοίμωξης
 - Καθορισμό του κινδύνου εμφάνισης καιροσκοπικών νοσημάτων & έναρξη προφυλακτικής θεραπείας
- Μέτρηση ιικού φορτίου(HIV RNA)
 - παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της αντιρετροϊκής θεραπείας
 - Πτώση σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα θεωρείται ένδειξη επιτυχούς ανταπόκρισης στην θεραπεία

ΜΕΤΡΗΣΗ HIV RNA

- Ο προσδιορισμός του HIV-1 ιικού φορτίου γίνεται με την ποσοτικοποίηση του γενετικού υλικού του ιού στο αίμα του ασθενούς. Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές εργαστηριακές μέθοδοι για τη μέτρηση του HIV ιικού φορτίου. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται η ίδια μέθοδος για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου ενός ασθενούς. Η πιο κοινή μέθοδος είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με χρήση της ανάστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR). Η μέθοδος αυτή μπορεί να ποσοτικοποιήσει το RNA του HIV-1 ή του HIV-2, με ευαισθησία που φτάνει σε λιγότερα από 50 αντίγραφα / mL.

ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ- ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

- Η πλειονότητα των μικροβίων *M.tuberculosis*, στα αναπνευστικά σταγονίδια παγιδεύεται στο ανώτερο αναπνευστικό και αποβάλλεται
- Ένα ποσοστό 10% φτάνει στις κυψελίδες όπου φαγοκυτταρώνεται από τα κυψελιδικά μακροφάγα.
- Τα μακροφάγα είναι τα κύρια κύτταρα της ανοσιακής απάντησης(φαγοκυτταρώνουν τα μικρόβια, είναι αντιγονοπαρουσιαστικά, παράγουν IL-1, IL-6, TNF-a)
- Η λοιμογονικότητα του οφείλεται στην ικανότητα να επιβιώνει μέσα στα μακροφάγα.
- Το αν τα μακροφάγα κατορθώσουν να περιορίσουν τα μικρόβια ή αν αυτά πολλαπλασιαστούν με τελική λύση των κυττάρων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το μικροβιακό φορτίο, γενετικούς παράγοντες.

ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ- ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

- Μετά από 2-4 εβδομάδες ακολουθεί η ανάπτυξη της ειδικής ανοσίας που εκδηλώνεται με δύο αντιδράσεις έναντι του *M.tuberculosis*.
 - i. Την ενεργοποίηση των μακροφάγων από κυτταροκίνες ευαισθητοποιημένων CD4+T λεμφοκυττάρων(IFN- γ)
 - ii. Την ιστική βλάβη ως αποτέλεσμα αντίδρασης υπερευαισθησίας επιβραδυνόμενου τύπου(Th2)

ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΑ ΦΥΜΑΤΙΚΗ ΛΟΙΜΩΞΗ-ΟΡΙΣΜΟΣ

- Υποκλινική νόσος
- Συνήθως αναπτύσσεται η κυτταρική ανοσία, περιχαρακώνεται η πρωτοπαθής βλάβη και δεν έχουμε πρόοδο σε ενεργό νόσο
- Χωρίς συμπτώματα
- Λοίμωξη *M. tuberculosis*
- Χωρίς μικροβιολογικά ή ακτινολογικά ευρήματα συμβατά με ενεργό φυματίωση
 - Ανιχνεύσιμος αντιγονικός ερεθισμός (Mantoux ή IGRA)

TB-IGRA test (interferon gamma release assay)

- Η ανάλυση QFT-Plus εξετάζει τις απαντήσεις κυτταροεξαρτώμενης ανοσίας (cell-mediated immunity, CMI) ενάντια σε πεπτιδικά αντιγόνα που μιμούνται τις μυκοβακτηριδιακές πρωτεΐνες ESAT-6 και CFP-10. Αυτές οι πρωτεΐνες απουσιάζουν από όλα τα στελέχη BCG και από τα περισσότερα μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια, εκτός από τα *M. kansasii*, *M. szulgai* και *M. marinum*. Το αίμα των ατόμων που έχουν μολυνθεί από μικροοργανισμούς του συμπλέγματος MTB συνήθως περιέχει λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν αυτά και άλλα μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα. Αυτή η διαδικασία αναγνώρισης περιλαμβάνει την παραγωγή και έκκριση της κυτοκίνης IFN- γ , της οποίας η ανίχνευση και ο επακόλουθος ποσοτικός προσδιορισμός της IFN- γ αποτελούν τη βάση για την ανάλυση (ELISA)

TB-IGRA test

- Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτά τα πεπτιδικά αντιγόνα διεγείρουν απαντήσεις IFN- γ σε T κύτταρα ατόμων με μόλυνση από *M. tuberculosis*, αλλά συνήθως όχι και των ατόμων χωρίς μόλυνση ή των ατόμων που έχουν εμβολιαστεί με τον BCG και δεν εμφανίζουν νόσο ή κίνδυνο LTBI. Ωστόσο, ορισμένες φαρμακευτικές αγωγές ή παθήσεις που επηρεάζουν τις ανοσολογικές λειτουργίες ενδέχεται να περιορίσουν τις απαντήσεις της IFN- γ .

IGRA TEST

Πλεονεκτήματα IGRA

- Δεν επηρεάζεται από εμβολιασμό BCG και άτυπα μυκοβακτηρίδια
- Απαιτείται μια μόνο επίσκεψη
- Αντικειμενικότερη μέτρηση
- Πιθανώς καλύτερη μέθοδος σε ανοσοκατεσταλμένους

Μειονεκτήματα IGRA

- Πιο πολύπλοκη, απαιτητική και ακριβή εξέταση
- Αδιευκρίνιστα αποτελέσματα
- Δεν διακρίνει ενεργότητα (PPV 2,7% vs 1,5% mantoux)
- Βραδύτερη θετικοποίηση ειδικά επί εμβολιασμού BCG
- Ψευδώς θετική αν μεσολαβήσουν ≤ 3 ημέρες από mantoux (2-12%)

IGRA TEST-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Είναι « έμμεσο τεστ». Δεν ανιχνεύει άμεσα το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης αλλά την ανοσολογική απάντηση που υποδεικνύει παλιά ή τωρινή έκθεση στο μυκοβακτηρίδιο. Ως εκ τούτου αναμένεται να έχει χαμηλή ειδικότητα για την ενεργό φυματίωση σε περιοχές με υψηλό φορτίο εξ' αιτίας της μεγάλης επίπτωσης της λανθάνουσας φυματίωσης.
- Δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση της ενεργού TB λοίμωξης
- Το IGRA είναι σχεδιασμένο για την ανίχνευση της λανθάνουσας TB λοίμωξης
- Το IGRA test δεν μπορεί να προβλέψει με ακρίβεια τον κίνδυνο των μολυσμένων ατόμων να αναπτύξουν ενεργό TB λοίμωξη.

IGRA TEST

1. Antigen-presentation (ESAT-6, CFP-10, TB7.7)



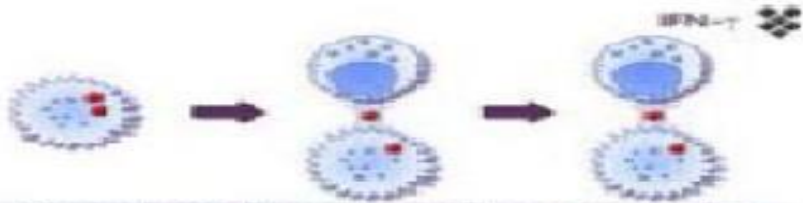
Antigen Presenting cell encounters antigen

Presenting cell ingests, then digests antigen



incubation

2. Ag-specific cytokine production (IFN γ)

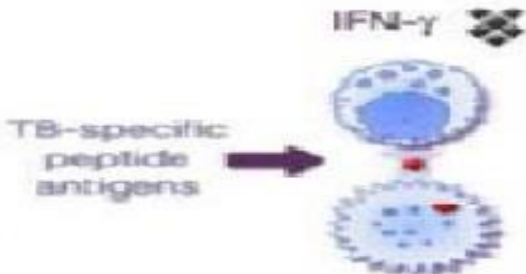


Presenting cell presents antigens to specific T-cells. T-cells activate and secrete IFN- γ



3. Cytokine quantification

If the antigen is TB-specific, only TB specific T-cells will activate and secrete IFN- γ



Using PBMC and ELiSpot



Using plasma and ELISA



HUMAN CYTOMEGALOVIRUS

- Ο ιός αναπαράγεται στα επιθηλιακά κύτταρα ,στα μακροφάγα και σε άλλα κύτταρα μεταδιδόμενος κυρίως από κύτταρο σε κύτταρο σε όλο το σώμα.
- Η πρωτολοίμωξη συνδέεται συχνά με έντονη αντίδραση των CD8+ T-λεμφοκυττάρων, που ίσως συμβάλλει στην ανάπτυξη συνδρόμου αναλόγου της λοιμώδους μονοπυρήνωσης. Τα λεμφοκύτταρα αυτά στη μικροσκόπηση του περιφερικού αίματος φαίνονται ως άτυπα λεμφοκύτταρα
- Μετά τη μόλυνση του ανθρώπου ο ιός ανευρίσκεται σε λανθάνουσα μορφή στα κυκλοφορούντα μονοπύρηνα, μακροφάγα, πολυμορφοπύρηνα, T-κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού και του πνεύμονα, σιελογόνους αδένες
- Στα όργανα αυτά ο ιός μπορεί να διατηρηθεί σε φάση αργού πολλαπλασιασμού ή μη πολλαπλασιασμού (λανθάνουσα λοίμωξη) και να προκαλείται αναζωπύρωση όταν ελαττώνεται η άμυνα του οργανισμού.

CMV

- Τυπικά σε πρωτολοίμωξη τα IgM κορυφώνονται την 4^η-5^η εβδομάδα της νόσου, παραμένουν υψηλά μέχρι τον 3^ο-4^ο μήνα και εξαφανίζονται μετά από 6 μήνες-1 έτος.
- Αυξημένα IgM μπορεί να βρεθούν σε οξεία αρχική λοίμωξη αλλά και σε επανενεργοποίηση παλιάς λοίμωξης.
- Τα IgG κορυφώνονται την 5^η εβδομάδα της νόσου παραμένουν υψηλά μέχρι τον 6^ο μήνα και σταδιακά υποχωρούν σε διάστημα ετών.

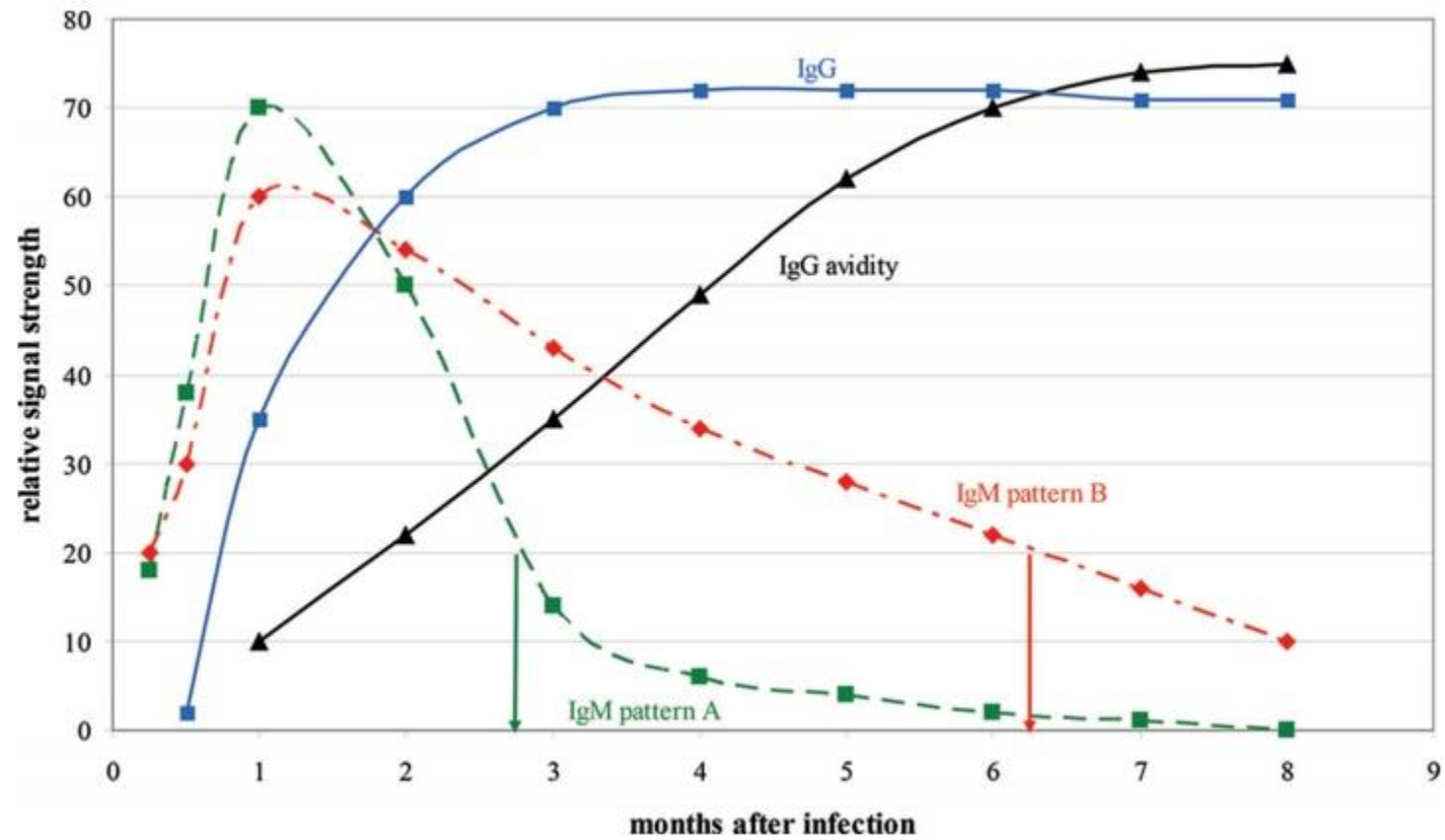
CMV ΛΟΙΜΩΞΗ

- Η διάκριση μεταξύ πρόσφατης (πρωτοπαθούς) και παλαιότερης μόλυνσης από τον κυτταρομεγαλοϊό μπορεί να είναι σημαντικής σημασίας στην κλινική διαχείριση των μεταμοσχευμένων και των εγκύων γυναικών. Παρόλο που σχεδόν όλα τα άτομα με πρόσφατη CMV λοίμωξη έχουν θετικά τα ειδικά IgM αντισώματα έναντι του κυτταρομεγαλοϊού, ορισμένοι ασθενείς με παλαιότερη λοίμωξη μπορεί επίσης να εμφανίζουν τα ειδικά IgM μετά την **επανενεργοποίηση του ιού**. Επομένως, η ανίχνευση των ειδικών IgM δεν είναι αξιόπιστος δείκτης της πρόσφατης μόλυνσης με κυτταρομεγαλοϊό. Η μέτρηση της συγγένειας των ειδικών IgG αντισωμάτων έναντι του κυτταρομεγαλοϊού, μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση των πρόσφατων από τις παλαιότερες λοιμώξεις. Αν και ένας **χαμηλός δείκτης συγγένειας** αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της μόλυνσης με CMV κατά τους προηγούμενους 6 μήνες, ο **υψηλός δείκτης συγγένειας** έχει μεγαλύτερη σημασία από κλινική άποψη. Ένας υψηλός δείκτης αποκλείει ουσιαστικά την πιθανότητα λοίμωξης κατά τους προηγούμενους 4 μήνες.

AVIDITY CMV

- Ο προσδιορισμός της **avidity (συγγένειας)** είναι μια διαγνωστική μέθοδος που χρησιμοποιείται για να διαφοροποιήσει την πρόσφατη (οξεία) από την παρελθούσα λοίμωξη με τον κυτταρομεγαλοϊό στον ορό ασθενούς. Η avidity (συγγένεια) ορίζεται ως η δεσμευτική ισχύς του αντισώματος (σε δείγμα ορού) σε σχέση με το αντίστοιχο αντιγόνο. Η χαμηλή συγγένεια των IgG αντισωμάτων στο πρώιμο στάδιο της λοίμωξης μπορεί να διαφοροποιηθεί από την υψηλή συγγένεια των αντισωμάτων που σχετίζονται με παλαιότερη λοίμωξη. Ο προσδιορισμός της συγγένειας των IgG αντισωμάτων είναι μια επιπλέον ανάλυση στον κλασικό ορολογικό έλεγχο σε σχέση με την κατάσταση της λοίμωξης από τον κυτταρομεγαλοϊό.

CMV



CMV

- Αλλαγές στα επίπεδα των CMV IgM, IgG, and IgG avidity στην πορεία του χρόνου μετά από CMV πρωτολοίμωξη. Το IgM pattern A αντιπροσωπεύει το πρότυπο τυπικής IgM απάντησης, ενώ το IgM pattern B αντιπροσωπεύει την παραμονή επί μακρόν του IgM . Σε CMV IgG θετικό άτομο, ένα θετικό IgM αποτέλεσμα με τιμή 20 δείχνει λοίμωξη περίπου 3 μήνες πριν αν το άτομο έχει IgM pattern A αλλά γύρω στους 6 μήνες πριν αν το άτομο έχει IgM pattern B. Χρησιμοποιώντας το CMV IgG avidity test , μπορεί να προσδιοριστεί ο σωστός χρόνος από τη λοίμωξη: ένα low-avidity αποτέλεσμα (αναμένεται να είναι γύρω στο 30 με βάση αυτό το σχήμα) δείχνει πρωτολοίμωξη περίπου 3 μήνες νωρίτερα, ενώ ένα high-avidity αποτέλεσμα(αναμένεται να είναι περίπου στο 70) δείχνει πρωτολοίμωξη περισσότερο από 6 μήνες πριν

ΕΡΣΤΕΙΝ-ΒΑΡΡ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

- Ανήκει στην οικογένεια των ερπητοϊών (ΗΗV-4)
- Μολύνει αρχικά τα επιθηλιακά κύτταρα του στοματοφάρυγγα (και τους σιελογόνους αδένες και τα Β-λεμφοκύτταρα της περιοχής (υποδοχέας CD21)
- Παρά τον τροπισμό του ιού για τα επιθηλιακά κύτταρα, σε αμυγδαλές που αφαιρέθηκαν από ασθενείς με λοιμώδη μονοπυρήνωση δεν ανιχνεύτηκε ιός εντός των επιθηλιακών κυττάρων (τα επιθηλιακά κύτταρα που προσβάλλονται από τον EBV υφίστανται κυτταρόλυση)
- Αντιθέτως ανιχνεύτηκε σε Β-κύτταρα τόσο σε «λυτική» φάση όσο και σε «λανθάνουσα»

EPSTEIN-BARR

- Άμεση προσβολή των Β-κυττάρων του δαχτυλίου του Waldayer
- Πολλαπλασιάζεται στην περιοχή και διασπείρεται με μολυσμένα Β-λεμφοκύτταρα
- Σε ανοσοικανά άτομα τα Τ-λεμφοκύτταρα αντιδρούν έναντι των μολυσμένων Β-λεμφοκυττάρων και ο ιός περιορίζεται σε λανθάνουσα κατάσταση εντός των Β-λεμφοκυττάρων. Σε απουσία Τ-λεμφοκυττάρων δεν περιορίζεται η λοίμωξη των Β-λεμφοκυττάρων και ο ιός συνεχίζει να αναπαράγεται προκαλώντας χρόνια λοίμωξη και παρουσία άλλων παραγόντων μπορεί να προκαλέσει κακοήγη εξαλλαγή των Β-λεμφοκυττάρων
- Η συμπτωματολογία της λοίμωξης είναι αποτέλεσμα της μάχης μεταξύ των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων(CD8+) να εξουδετερώσουν τα μολυσμένα από τον ιό Β-λεμφοκύτταρα.
- Η πρωιμότερη ένδειξη EBV λοίμωξης είναι η ανεύρεση άτυπων λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα. Τα κύτταρα αυτά είναι παρόντα με την έναρξη της συμπτωματολογίας (προηγούνται των αντισωμάτων). Τα κύτταρα αυτά είναι κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα(CD8+) .

EPSTEIN-BARR

- Ο ιός Epstein-Barr παρουσιάζει αντιγονική πολυπλοκότητα ,για αυτό και η παραγωγή ειδικών αντισωμάτων είναι πολυσύνθετη.
- Η ανοσολογική απάντηση έχει σαν αποτέλεσμα
 - Την παραγωγή αντισωμάτων έναντι του καψιδίου του ιού, τα αντικαψιδικά αντισώματα.(viral capsid antigen, VCA)
 - Τα πρώιμα αντισώματα (early antibodies-EA IgG)
 - Τα αντισώματα έναντι του πυρήνα του ιού.(nuclear antibodies-EBNA)

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΟΥ EBV

- VCA IgM: Υπάρχουν σε υψηλούς τίτλους τις πρώτες 2εβδομάδες της νόσου και σταδιακά ο τίτλος υποχωρεί εντός 4-8 εβδομάδων. Κατά τον προσδιορισμό των VCA IgM, τα οποία θεωρούνται δείκτες ενεργής λοίμωξης παρατηρούνται ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε άτομα με ρευματοειδή παράγοντα για αυτό χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια, τα οποία τον προσροφούν και αποφεύγεται η επίδραση του RF στη διάγνωση της νόσου.
- VCA IgG: Παράγονται μετά την τρίτη με τέταρτη εβδομάδα της νόσου. Παραμένουν θετικά δια βίου σε χαμηλούς τίτλους. Η εξέταση δυο διαδοχικών δειγμάτων αίματος τα οποία ελήφθησαν σε χρονικό διάστημα δυο εβδομάδων με υπερδιπλασιασμό του τίτλου των VCA IgG αποτελεί τον καλύτερο δείκτη πρόσφατης λοίμωξης.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΟΥ EBV

- EBNA-IgG: Σχηματίζονται σχετικά αργά στην πορεία της λοίμωξης, 3^η-6^η εβδομάδα από την έναρξη των συμπτωμάτων σε όλες τις οξείες EBV λοιμώξεις και παραμένουν ισόβια. Μπορεί να μην ανιχνεύονται σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς και σε χρόνια ενεργό EBV λοίμωξη. Διακρίνονται σε 6 υποτύπους, EBNA 1,2,3,4,5,6, τα οποία βαθμιαία μεταβάλλονται κατά τη φάση της ανάρρωσης. Στη λοιμώδη μονοπυρήνωση κυρίως αυξάνονται τα EBNA-1, τα οποία αυξάνονται από τον 2^ο-3^ο μήνα, ενώ τα EBNA-2 αυξάνονται από τον 6^ο-12^ο μήνα της νόσου.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΤΟΥ ΕΒΝ

- Anti-EA IgG : εμφανίζονται στην οξεία φάση της λοίμωξης και γενικά πέφτουν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα μετά από 3 με 6 μήνες . Σε μερικά άτομα ,η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ΕΑ είναι σημάδι ενεργού λοίμωξης. 20% των υγιών ατόμων μπορεί να έχουν αντισώματα έναντι του ΕΑ για χρόνια.

BRUCELLA –ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

- Είναι αερόβιος Gram(-) κοκκοβάκιλλος
- Μικρός αριθμός βρουκελλών (περίπου 10) είναι ικανός να προκαλέσει λοίμωξη.
- Χρόνος επώαση 2-4 εβδομάδες(7 ημέρες-3μήνες,σπάνια έως 10μήνες)
- Το πρώτο βήμα μετά την είσοδο της Βρουκέλλας είναι η φαγοκυττάρωσή της από
 - Ουδετερόφιλα
 - Μακροφάγα
 - Δενδριτικά κύτταρα

Στους δύο τελευταίους τύπους κυττάρων το βακτήριο

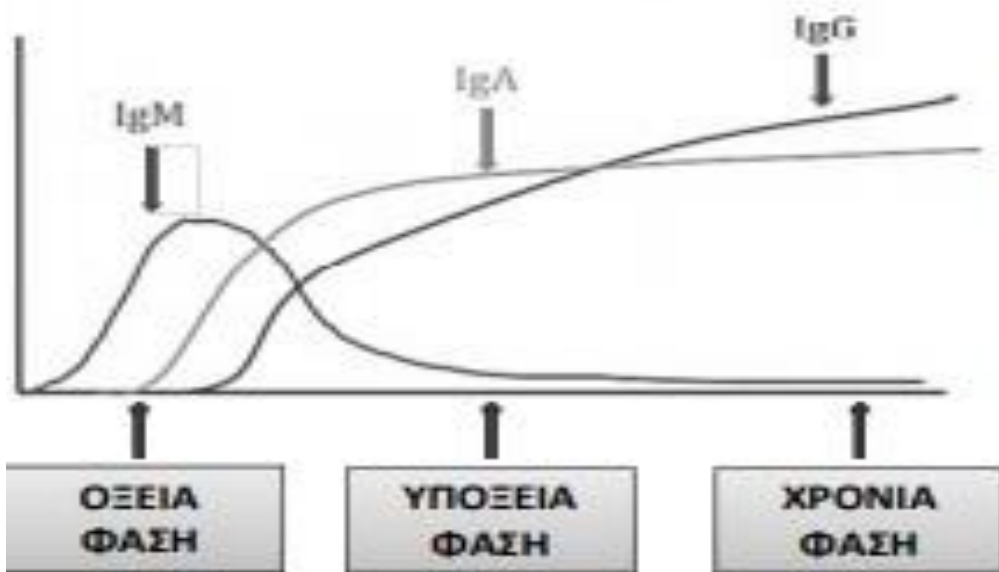
- Επιβιώνει
- Μετακινείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο
 - ένα ιδανικό περιβάλλον για πολλαπλασιασμό
 - Προστατευμένο απο τους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή
 - Δε σκοτώνει τα κύτταρα του ξενιστή για μεγάλες χρονικές περιόδους

BRUCELLA

- Τυπικά τα IgM αντισώματα αυξάνουν από την 1^η-2^η εβδομάδα της νόσου, κορυφώνονται τον 2^ο -3^ο μήνα και σταδιακά υποχωρούν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στη διάρκεια ενός έτους.
- Τα IgG αντισώματα αρχίζουν να αυξάνουν τη 2^η-3^η εβδομάδα της νόσου, κορυφώνονται τον 4^ο με 6^ο μήνα και σταδιακά υποχωρούν εντός ετών σε επίπεδα που δεν συγκολλούν.
- Τα IgA αντισώματα αυξάνουν την 2^η με 3^η εβδομάδα, κορυφώνονται τον 4^ο-6^ο μήνα και σταδιακά υποχωρούν εντός έτους.

BRUCELLA

IgM, IgA και IgG αντισώματα με ELISA



- **IgM:** από 1^η εβδομάδα
- **IgG:** από 2^η εβδομάδα
- **Peak IgM, IgG:** 4^η εβδομάδα και μειώνονται με θεραπεία
- **IgG και IgA (+) για > 6 μήνες:** χρόνια ή εντοπισμένη νόσος
- **Αύξηση IgG και IgA μετά την αρχική πτώση:** υποτροπή

BRUCELLA-ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ WRIGHT

- Είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη – οροαντίδραση αναφοράς
- Η οροδιάγνωση WRIGHT είναι μια αντίδραση συγκόλλησης που χρησιμοποιεί εναιώρημα βακίλων του γένους *Brucella* εξουδετερωμένων μέσω φορμόλης και θερμότητας
- Ανιχνεύει IgG, IgA και (κυρίως) IgM αντισώματα έναντι S-LPS
- Διάγνωση: Συμβατή κλινική εικόνα + τίτλοι $\geq 1:160$ ($\geq 1:320$ σε ενδημικές περιοχές)
- Ορομετατροπή ή αύξηση $\times 4$ του τίτλου σε 2 δείγματα με μεσοδιάστημα ≥ 2 εβδομάδων
- Θετικοποιείται την 2^η-3^η εβδομάδα. Παραμένει θετική για 2 έτη.
- Θετική κυρίως στην οξεία νόσο. Μικρότερη ευαισθησία σε χρόνια νόσο ή τις υποτροπές
- Ευαισθησία 77-92%

ΜΕΙΟΝΕΚΤΉΜΑΤΑ WRIGHT

- Διασταυρούμενες αντιδράσεις => ψευδώς θετική – *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O116 και O157, *Salmonella urbana*, *Yersinia enterocolitica* O9, *Vibrio cholerae*, *Xanthomonas maltophilia*, *Afipia clevelandensis*
- Ψευδώς αρνητική: πρώιμα στάδια, ανοσοκαταστολή
 - Ακατάλληλη για follow-up
 - Χαμηλοί τίτλοι χωρίς ένδειξη νόσου (ενδημικές περιοχές)
 - Δεν ανιχνεύει τη *B. canis*