

# 2

## Έμμεση διαγνωστική (Ανοσοδιαγνωστική)

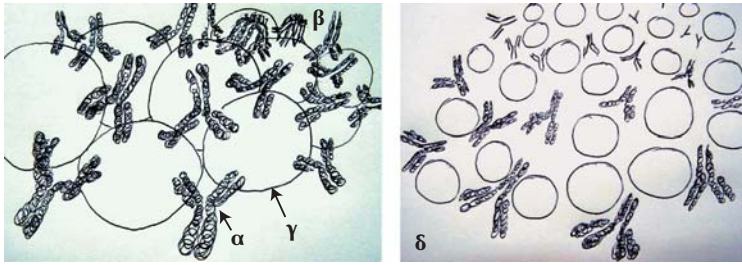
Μετά τη μόλυνση, ο οργανισμός του ξενιστή αναπτύσσει ειδικούς μηχανισμούς για την εξουδετέρωση των παρασίτων και των μεταβολικών τους προϊόντων. Για το σκοπό αυτό **ενεργοποιούνται** μονοκύτταρα/μακροφάγα, Β- και Τ-λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα κ.ά. και **παράγονται** ειδικά αντισώματα, μονοκίνες, λεμφοκίνες κ.ά.

Στα πλαίσια της ανοσοδιαγνωστικής: α) αναζητούνται τα **ενεργοποιημένα κύτταρα** με την εφαρμογή in vitro δοκιμασιών (MIT-macrophage inhibition test, PFC-plaque forming cells κ.ά.) και in vivo δοκιμασιών (ST-skin test, PCA-passive cutaneous anaphylaxis κ.ά.), και β) ανιχνεύονται **ειδικά αντισώματα** (IgG, IgM, IgA, IgE) και **μεταβολικά αντιγόνα των παρασίτων** με την εφαρμογή in vitro δοκιμασιών, όπως LA (latex agglutination test), IHA (indirect haemagglutination test), IIF (indirect immunofluorescence test), RIA (radio immuno assay), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), Sandwich-ELISA, Copro-antigen-ELISA κ.ά.

### ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Οι δοκιμασίες συγκόλλησης σωματιδίων στηρίζονται στην **παρουσία τουλάχιστον δύο παράτοπων στο μόριο κάθε αντισώματος**. Έτσι, όταν οι δύο παράτοποι του μορίου IgG και IgA (Εικ. 47α) ή οι τέσσερις παράτοποι του διμερούς μορίου IgA και οι 10 παράτοποι του πενταμερούς μορίου IgM (Εικ. 47β), συνδέονται με τους **ομόλογους επίτοπους** διαφορετικών φορέων, οι φορείς αυτοί προσεγγίζουν μεταξύ τους, “συγκολλώνται” (Εικ. 47γ, 48α) και διατάσσονται ομαλά στην επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας ή του πυθμένα του βοθρίου, όπου γίνεται η δοκιμασία. Στην αντίθετη περίπτωση, όταν τα αντισώματα είναι μη ειδικά (Εικ. 47δ), τα σωματίδια/φορείς δεν συγκολλώνται, αλλά καθιζάνουν και δημιουργούν ορατό ίζημα (Εικ. 49η).

Ως φορείς αντιγόνου στις δοκιμασίες συγκόλλησης χρησιμοποιούνται ολόκληρα πρωτόζωα (DAT, direct agglutination test), σφαιρίδια latex (LA, latex agglu-



**Εικόνα 47.** Δοκιμασίες συγκόλλησης σωματιδίων (α-μόριο IgG ή IgA, β-μόριο IgM, γ-σωματίδια/φορείς αντιγόνου, δ-απουσία ομόλογων αντισωμάτων και απουσία συγκόλλησης).

mination test), ερυθροκύτταρα (IHA, indirect haemagglutination test) κ.ά.

Συνήθως, όλα τα δείγματα στις δοκιμασίες, εξετάζονται εις διπλούν.

### **Δοκιμασία συγκόλλησης σφαιριδίων latex (LA, latex agglutination test)**

Στη δοκιμασία αυτή φορέας των επιτόπων (αντιγόνο) είναι σφαιρίδια latex. Τα μόρια του αντιγόνου προσκολλώνται με ειδική τεχνική στην επιφάνεια των σφαιριδίων latex και παρουσία ή απουσία, ειδικών αντισωμάτων στο υπό εξέταση δείγμα ορού, προκαλείται (Εικ. 48α) ή όχι (Εικ. 48β), αντίστοιχα, συγκόλληση των σφαιριδίων.

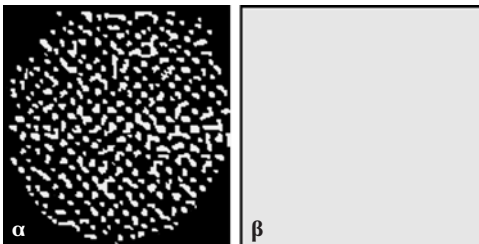
**Αποτελεσματικότητα της δοκιμασίας:** Συχνότερα ανιχνεύονται IgM (3+), IgG (1+) και IgA (1+), με ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση 0.01 μg/ml ορού.

**Υλικά/Δείγμα:** 5-10 απολιπασμένες αντικειμενοφόρες πλάκες, πιπέττα 25 μl, ρύγχοι.

**Αντιδραστήρια:** α) “Ευαισθητοποιημένα” σφαιρίδια latex, β) θετικός και αρνητικός ορός ελέγχου, γ) υπό εξέταση δείγματα ορού.

**Διαλύματα:** Φυσιολογικός ορός, αλκοόλη.

**Συσκευές:** Συσκευή κινητής τράπεζας (Εικ. 53β).



**Εικόνα 48.** Δοκιμασία συγκόλλησης σφαιριδίων latex (α-θετικό αποτέλεσμα, β-αρνητικό αποτέλεσμα).

### Τεχνική

1. **Προσθήκη ειδικών αντισωμάτων και αντιγόνου.** Τοποθετούνται 25 μl από το υπό εξέταση δείγμα ορού (χωρίς αραιώση ή με αραιώση έως 1:5) στην επιφάνεια απολιπασμένης αντικειμενοφόρου πλάκας και προστίθενται 25 μl εναιωρήματος “ευαισθητοποιημένων” σφαιριδίων latex, μετά προσεκτική ανακίνηση του φιαλιδίου. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται σε δύο επιπλέον αντικειμενοφόρες πλάκες με τη χρησιμοποίηση θετικού και αρνητικού ορού ελέγχου, αντίστοιχα.
2. **Συγκόλληση σφαιριδίων μετά τη δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων.** Τα υλικά αναμιγνύονται ήπια με τη χρησιμοποίηση γυάλινης ράβδου και μετά, η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται στην επιφάνεια συσκευής κινητής τράπεζας με ήπια κυκλική κίνηση για 3’-5’ λεπτά της ώρας.
3. **Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.** Η θετική αντίδραση εμφανίζεται με συγκόλληση και ομοιόμορφη διάταξη των σφαιριδίων latex (Εικ. 48α), ενώ στην αρνητική αντίδραση δεν συγκολλώνται τα σφαιρίδια latex (Εικ. 48β).

### Δοκιμασία έμμεσης αιμοσυγκόλλησης (IHA, indirect haemagglutination test)

Στη δοκιμασία IHA φορέας των επιτόπων είναι ερυθροκύτταρα. Τα μόρια του αντιγόνου προσκολλώνται με ειδική τεχνική στην επιφάνεια ερυθροκυττάρων, συνήθως προβάτου και παρουσία ή απουσία ειδικών αντισωμάτων, προκαλείται συγκόλληση και ομοιόμορφη διάταξη των ερυθροκυττάρων (Εικ. 49α) ή καθίζηση των ερυθροκυττάρων (Εικ. 49η), αντίστοιχα.

**Αποτελεσματικότητα της δοκιμασίας:** Όπως της LA.

**Υλικά/Δείγμα:** 2-3 δοκιμαστικοί σωλήνες, 1 πλάκα 96 βοθρίων από πολυστηρένιο με πυθμένα U, πιπέττες 5 μl, 50-100 μl, 500-1000 μl και ρύγχυ.

**Αντιδραστήρια:** α) “Ευαισθητοποιημένα” ερυθροκύτταρα, β) “μη ευαισθητοποιημένα” ερυθροκύτταρα, γ) θετικός και αρνητικός ορός ελέγχου, δ) υπό εξέταση δείγματα ορού.

**Διαλύματα:** Μητρικό φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS, phosphate buffered saline), με σύνθεση/λίτρο: α) 40 g NaCl, β) 1g KCl, γ) 5.8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, δ) 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ε) 0.5 g MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, στ) 3 ml Tween-20 και ζ) 0.2 g NaN<sub>3</sub>. Μετά τη διάλυση των υλικών, συμπληρώνεται απεσταγμένο νερό έως το ένα λίτρο και ρυθμίζεται το pH στο 7.2 με την προσθήκη 1N HCl ή 1N NaOH. Το διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο (4°C) και πριν τη χρησιμοποίησή του αραιώνεται 1:10.

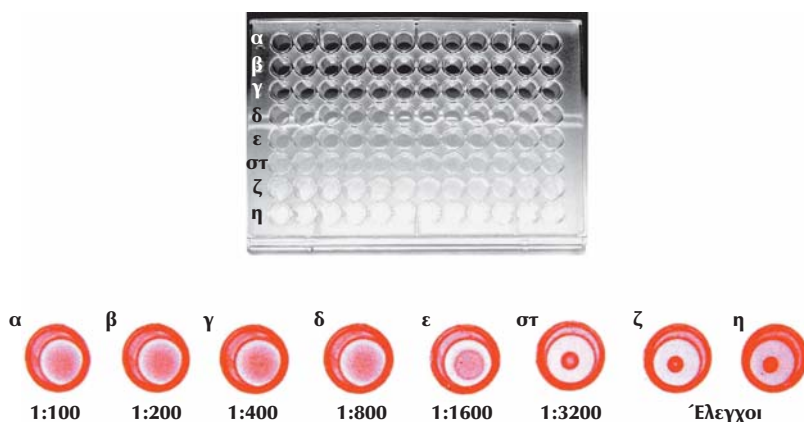
### Τεχνική

1. **Προετοιμασία των δειγμάτων ορού.** α) Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 0.58 ml ρυθμιστικού διαλύματος (PBS, pH 7.2) και προστίθενται 0.02 ml (= 20 μl) από το υπό εξέταση δείγμα ορού (αραιώση 1:50), και β) σε οκτώ

βοθρία πλάκας από πολυστηρένιο (Εικ. 49α-η), τοποθετούνται από 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος. Μετά, προστίθενται στο πρώτο βοθρίο 50 μl του υπό εξέταση δείγματος ορού αραιωμένου 1:50 (επιτυγχάνεται αραιώση 1:100). Μετά προσεκτική ανάμιξη, 50 μl από το πρώτο βοθρίο προστίθενται στο δεύτερο βοθρίο (αραιώση 1:200). Η ανάμιξη και η διαδοχική μετακίνηση 50 μl στο επόμενο βοθρίο επαναλαμβάνονται έως το έκτο βοθρίο, από το οποίο μετά την ανάμιξη απορρίπτονται 50 μl (αραιώσεις 1:400, 1:800, 1:1600 και 1:3200). Στο έβδομο βοθρίο προστίθενται 50 μl της αραιώσης 1:50 του υπό εξέταση δείγματος ορού (αραιώση 1:100), αναμιγνύονται και μετά, απορρίπτονται 50 μl. Το βοθρίο αυτό χρησιμοποιείται ως έλεγχος της πιθανής (φυσιολογικής) παρουσίας μη ειδικών αντισωμάτων κατά των ερυθροκυττάρων (αντι-ερυθροκυτταρικά αντισώματα που προκαλούν λύση των ερυθροκυττάρων, λόγω ενεργοποίησης των γλυκοπρωτεϊνών του συμπληρώματος με την “κλασική” οδό ενεργοποίησης).

2. **Προσθήκη αντιγόνου.** Στα 6 πρώτα (Εικ. 49α-στ) και στο 8<sup>ο</sup> βοθρίο (έλεγχος “ευαισθητοποιημένων” ερυθροκυττάρων, Εικ. 49η), προστίθενται από 20 μl εναιωρήματος\* “ευαισθητοποιημένων” ερυθροκυττάρων (ερυθροκύτταρα/φορείς αντιγόνου), μετά προσεκτική ανακίνηση του φιαλιδίου. Στο 7<sup>ο</sup> βοθρίο (Εικ. 49ζ) προστίθενται 20 μl εναιωρήματος “μη ευαισθητοποιημένων” ερυθροκυττάρων\*, μετά προσεκτική ανακίνηση του φιαλιδίου.
3. **Δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων και συγκόλληση ερυθροκυττάρων.** Μετά ήπια ανακίνηση με το χέρι, η πλάκα αφήνεται σε ηρεμία για 2 ώρες. Κατά το χρονικό αυτό διάστημα, τα μόρια των ομόλογων αντισωμάτων συνδέονται με επίτοπους της επιφάνειας του ίδιου ή διαφορετικών ερυθροκυττάρων, με αποτέλεσμα τα ερυθροκύτταρα να πλησιάζουν μεταξύ τους και να δημιουργούν ομοιόμορφο “δίκτυο” στον πυθμένα του βοθρίου (Εικ. 49α-ε). Όταν δεν υπάρχουν ειδικά αντισώματα ή δεν υπάρχει αντιγόνο (“μη ευαισθητοποιημένα” ερυθροκύτταρα), τα ερυθροκύτταρα δημιουργούν δακτυλιοειδές ίζημα στον πυθμένα του βοθρίου (Εικ. 49στ και ζ).
4. **Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.** Η **θετική αντίδραση** εμφανίζεται ως ομοιόμορφο “δίκτυο” ερυθροκυττάρων στον πυθμένα του βοθρίου (Εικ. 49α-ε) και **εκφράζεται** ως τίτλος με τη μεγαλύτερη αραιώση πριν τη δημιουργία ιζήματος (στο συγκεκριμένο παράδειγμα 1:1600, Εικ. 49ε). Η **αρνητική αντίδραση** εμφανίζεται με τη δημιουργία ιζήματος, λόγω απουσίας ή ανεπαρκούς συγκέντρωσης ειδικών αντισωμάτων (Εικ. 49στ). Επίσης, ίζημα δημιουργείται στο βοθρίο ελέγχου της πιθανής παρουσίας αντι-ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων (Εικ. 49ζ) και στο βοθρίο ελέγχου των “ευαισθητοποιημένων” ερυθροκυττάρων (Εικ. 49η).

\* Η συγκέντρωση των ερυθροκυττάρων καθορίζεται από την παρασκευάστρια εταιρεία.



**Εικόνα 49.** Δοκιμασία έμμεσης αιμοσυγκόλλησης (α- έως στ-αραιώσεις του υπό εξέταση δείγματος ορού, ζ-έλεγχος ορού, η-έλεγχος “ευαισθητοποιημένων” ερυθροκυττάρων).

## ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΜΕ ΑΝΤΙ-ΙΣΟΤΥΠΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Ο **ισότυπος** είναι όμοιος στα μόρια κάθε τάξης αντισωμάτων, σε κάθε ζωικό είδος και προκαλεί την παραγωγή **αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων** (αντι-γ, -μ, -ε, -α, -δ), όταν ενίεται σε άλλο ζωικό είδος (ισότυπος είναι το σύνολο των επιτόπων των “σταθερών περιοχών” CL, CH1, CH2, CH3 του μορίου των IgG, IgA, IgD και επιπλέον, των CH4 του μορίου των IgM και IgE). Τα αντι-ισοτυπικά αντισώματα απομονώνονται, επισημαίνονται με φθορίζουσα ουσία ή με ραδιενεργές στοιχείο ή με ένζυμο και αποτελούν αντίστοιχα, το σύζευγμα (conjugate) στις δοκιμασίες: έμμεσος ανοσοφθορισμός (IIF-indirect immunofluorescence test), RIA (radio immuno assay) και ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Μετά τη δημιουργία του ανοσοσυμπλέγματος, στις δοκιμασίες αυτές, προστίθεται το ειδικό σύζευγμα και τα επισημασμένα αντι-ισοτυπικά αντισώματα συνδέονται με τους αντίστοιχους ομόλογους ισότοπους των αντισωμάτων IgG, IgM, IgA, IgE, IgD των ανοσοσυμπλεγμάτων.

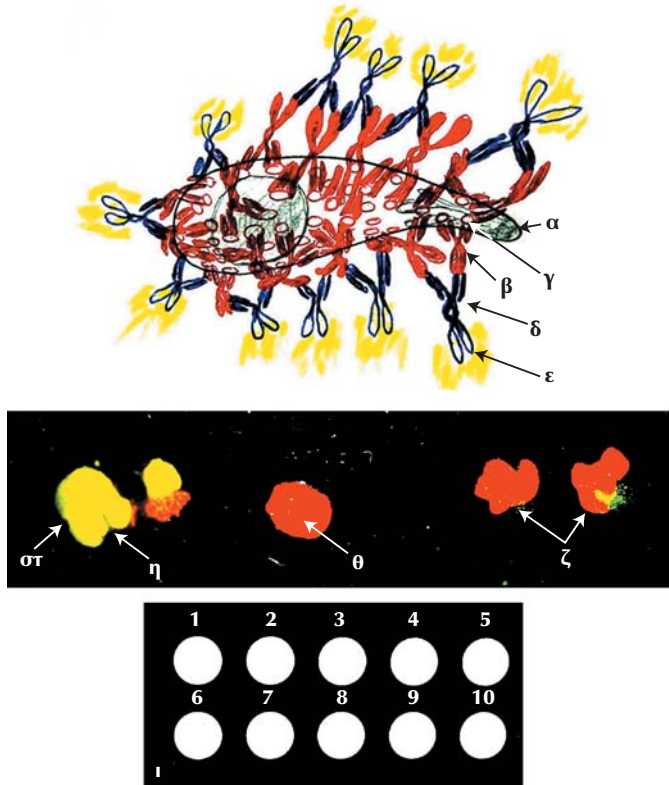
Τα αντιδραστήρια που δεν πήραν μέρος στα διάφορα στάδια της τεχνικής των δοκιμασιών αυτών, απομακρύνονται με ειδικό στάδιο πλυσίματος που γίνεται μετά κάθε στάδιο επώασης. Συνήθως, όλα τα δείγματα εξετάζονται εις διπλούν.

### Δοκιμασία έμμεσου ανοσοφθορισμού

(IIF-indirect immunofluorescence test)

Στη δοκιμασία IIF χρησιμοποιούνται, ως **αντιγόνο**, ολόκληρα πρωτόζωα (Εικ. 50α) ή τομές μεταξύων παρασίτων που προσκολλώνται στην επιφάνεια αντικει-

μενοφόρου πλάκας (Εικ. 50ι) και έπειτα προστίθεται ο ορός. Τα **ειδικά αντισώματα**, όταν υπάρχουν στον ορό, συνδέονται με τους ομόλογους επίτοπους (Εικ. 50β) και δημιουργείται ένα στρώμα ανοσοσυμπλεγμάτων (Εικ. 50γ) στην επιφάνεια του παρασίτου. Στο τρίτο στάδιο της τεχνικής προστίθεται το **σύζευγμα** και δημιουργείται ένα στρώμα αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων (Εικ. 50δ)/φορέων της φθορίζουσας ουσίας (Εικ. 50ε) επάνω στο στρώμα των ειδικών αντισωμάτων και παρατηρείται στο μικροσκόπιο, με κατάλληλο φωτισμό. Η **ένταση του φθορισμού** γύρω από το παράσιτο εξαρτάται από την πλήρη (Εικ. 50στ) ή την ατελή κάλυψή του με ειδικά αντισώματα (Εικ. 50ζ) και αξιολογείται υποκειμενικά ως φθορισμός 1+ έως 4+ (Εικ. 50η) ή σε ειδική συσκευή (fluorometer). Το αρνητικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία αυτή χαρακτηρίζεται από την απουσία φθορισμού (Εικ. 50θ).



**Εικόνα 50.** Δοκιμασία έμμεσου ανοσοφθορισμού

(α-ολόκληρο πρωτόζωο, β-ειδικό αντίσωμα, γ-ομόλογος επίτοπος, δ-αντι-ισοτυπικό αντίσωμα, ε-φθορίζουσα ουσία, στ-πλήρης κάλυψη, ζ-ατελής κάλυψη, η-φθορισμός 4+, θ-απουσία φθορισμού, ι-ειδικό κώρι αντιγόνου αντικειμενοφόρων πλακών εμπορίου).

**Αποτελεσματικότητα της δοκιμασίας:** Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση αντισωμάτων στην IIF είναι μικρότερη των 10 pg/ml ή 0.01 μg/ml ορού.

**Υλικά/Δείγμα:** Αντικειμενοφόρες πλάκες, δοκιμαστικοί σωλήνες, πιπέττες 5 μl, 50-100 μl, 500-1000 μl και ρύγχοι, “υγρός θάλαμος” (δοχείο ή κουτί με κάλυμα και υγρό στυλόχαρτο ή νάυλον σφουγγάρι στον πυθμένα, όπου αφήνονται οι αντικειμενοφόρες πλάκες κατά τα στάδια της επώασης).

**Αντιδραστήρια:** α) Αντιγόνο (πρωτόζωα ή τομές μετάζωων παρασίτων), β) θετικός και αρνητικός ορός ελέγχου, γ) υπό εξέταση δείγματα ορού, δ) σύζευγμα (conjugate) με αντι-ισοτυπικά αντισώματα κατά των ισότυπων του είδους ζώου που εξετάζεται και φθορίζουσα ουσία (FITC, fluorescein isothiocyanate conjugate).

**Διαλύματα:** 1) Μητρικό φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS, phosphate buffered saline, pH 7.2), όπως της IHA, 2) PBS/Evans blue (διάλυμα Evans blue 1:10.000 σε PBS), και 3) PBS/γλυκερίνη (9 ml PBS και 1 ml γλυκερίνης).

**Συσκευές:** Μικροσκόπιο με λάμπα φθορισμού (UV).

### Τεχνική

1. **Προσκόλληση αντιγόνου σε σταθερή επιφάνεια.** Τοποθετούνται 10 μl εναιωρήματος πρωτοζώων<sup>1</sup> στους ειδικούς χώρους αντικειμενοφόρου πλάκας (Εικ. 50ι) και αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα (π.χ. στους 15-25 °C μία νύχτα). Μετά, οι πλάκες χρησιμοποιούνται αμέσως ή διατηρούνται στους -20 °C έως 6 μήνες.
2. **Προσθήκη ειδικών αντισωμάτων.** Τα δείγματα του θετικού και του αρνητικού ορού ελέγχου, καθώς και του υπό εξέταση ορού, αραιώνονται 1:50 έως 1:3200, όπως στη δοκιμασία IHA. Μετά, τοποθετούνται από 20 μl της “άριστης” αραιώσης<sup>2</sup> του θετικού ορού ελέγχου (σε PBS) στους χώρους 1 και 2, του αρνητικού ορού ελέγχου στους χώρους 3 και 4 και κάθε αραιώσης του υπό εξέταση δείγματος ορού (1:100 έως 1:3200) στους χώρους 5 έως 10. Στους χώρους 11 και 12 τοποθετούνται από 5 μl PBS. Οι πλάκες τοποθετούνται σε “υγρό θάλαμο” (για να μη στεγνώσουν τα υλικά) και επωάζονται για 30' λεπτά της ώρας στους 34-40 °C. Όταν στο δείγμα ορού υπάρχουν ειδικά αντισώματα, συνδέονται με τους ομόλογους επίτοπους και δημιουργούνται ανοσομπλέγματα στην επιφάνεια του παρασίτου (Εικ. 50α-γ).
3. **Απομάκρυνση περισίσειας ειδικών αντισωμάτων.** Τα μόρια ειδικών αντισωμάτων που δεν προσκολλήθηκαν στο αντιγόνο (εναιωρούνται στη σταγόνα),

1. Η πυκνότητα των πρωτόζωων παρασίτων καθορίζεται μετά τιτλοποίηση, π.χ. 5-50 εκατομμύρια για τις προμαστιγωτές μορφές *Leishmania* spp./ml.

2. Ως “άριστη” θεωρείται η αραιώση, η οποία εμφανίζει τη μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ του θετικού και του αρνητικού ορού ελέγχου κατά την τιτλοποίηση.

- απομακρύνονται με πλύσιμο της αντικειμενοφόρου πλάκας, 5 φορές, με νερό της βρύσης και αφήνονται να στεγνώσουν για 1' λεπτό της ώρας.
4. **Προσθήκη συζεύγματος (conjugate).** Σε κάθε χώρο των αντικειμενοφόρων πλακών τοποθετούνται από 20 μl της “άριστης” αραιώσης συζεύγματος\* σε PBS/Evans bleu. Οι χώροι 11 και 12 χρησιμοποιούνται ως έλεγχοι του συζεύγματος. Οι πλάκες τοποθετούνται σε “υγρό θάλαμο” και επωάζονται, όπως στο στάδιο 1. Όταν στην επιφάνεια του παρασίτου υπάρχουν ανοσοσυμπλέγματα, τα αντι-ισοτυπικά αντισώματα του συζεύγματος συνδέονται με τους ισότοπους των αντισωμάτων (Εικ. 50γ-δ).
  5. **Απομάκρυνση περισσειας συζεύγματος.** Τα μόρια του συζεύγματος που δεν συνδέθηκαν με τα αντισώματα στην επιφάνεια του παρασίτου και εναιωρούνται στη σταγόνα, απομακρύνονται με πλύσιμο της πλάκας, όπως στο στάδιο 3.
  6. **Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.** Σε κάθε χώρο των αντικειμενοφόρων πλακών τοποθετούνται από 5 μl PBS/γλυκερίνη και ακολουθεί εξέταση του παρασκευάσματος, σε σκοτεινό θάλαμο, σε μικροσκόπιο φθορισμού (1.000X). Η **θετική αντίδραση** εμφανίζεται με φθορισμό (Εικ. 50στ,ζ,η) και εκφράζεται με τη μεγαλύτερη αραιώση πριν τη διακοπή του φθορισμού. Η **αρνητική αντίδραση** εμφανίζεται με την απουσία φθορισμού (απουσία ή ανεπαρκής συγκέντρωση ειδικών αντισωμάτων, Εικ. 50θ).

## Ραδιοανοσολογική δοκιμασία (RIA, radio immuno assay)

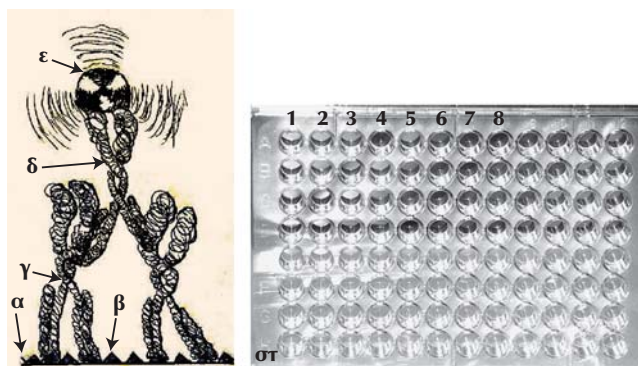
Στη ραδιοανοσολογική δοκιμασία χρησιμοποιούνται, ως **αντιγόνο**, διαλυτό αντιγόνο του παρασίτου, το οποίο στο πρώτο στάδιο της τεχνικής προσκολλάται στην επιφάνεια των βοθρίων πλακών από πολυστηρένιο (Εικ. 51α) ή οι πλάκες προμηθεύονται με προσκολλημένο αντιγόνο από το εμπόριο. Στο δεύτερο στάδιο, προστίθεται ο ορός. Τα **ειδικά αντισώματα**, όταν υπάρχουν, συνδέονται με τους ομόλογους επίτοπους του παρασίτου (Εικ. 51β) και δημιουργείται ένα στρώμα ανοσοσυμπλεγμάτων (Εικ. 51γ). Στο τρίτο στάδιο της τεχνικής προστίθεται το **σύζευγμα** και δημιουργείται ένα στρώμα αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων/φορέων της ραδιενεργούς ουσίας (Εικ. 51δ) επάνω στο στρώμα των ειδικών αντισωμάτων. Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας γίνεται σε μετρητή ραδιενεργείας.

**Αποτελεσματικότητα της δοκιμασίας:** Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση αντισωμάτων στη RIA ανέρχεται σε 0.05 pg/ml ή 0.00005 μg/ml ορού.

**Υλικά/Δείγμα:** Πλάκα 96 βοθρίων από πολυστηρένιο, πιπέττες 5 μl, 50-100 μl, 500-1000 μl (απλές και οκτακάναλες) και ρύγχοι.

\* Η αραιώση του συζεύγματος καθορίζεται από την παρασκευάστρια εταιρεία.





**Εικόνα 51.** Ραδιοανοσολογική δοκιμασία

(α-τοίχωμα από πολυστηρένιο, β-αντιγόνο, γ-ειδικό αντίσωμα, δ-αντι-ισοτυπικό αντίσωμα, ε-ραδιενεργός ουσία, στ-πλάκα από πολυστηρένιο).

**Αντιδραστήρια:** α) Διαλυτό αντιγόνο, β) θετικός και αρνητικός ορός ελέγχου, γ) υπό εξέταση δείγματα ορού, δ) σύζευγμα (conjugate, αντι-ισοτυπικά αντισώματα/φορείς ραδιενεργούς ουσίας).

**Διαλύματα:** 1) Ρυθμιστικό διάλυμα αντιγόνου [σε μικρή ποσότητα διαλύματος 0.1M NaHCO<sub>3</sub> (8.4 g/λίτρο) προστίθεται ποσότητα διαλύματος 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10.6 g/λίτρο) μέχρι το pH να γίνει 9.6], 2) Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS, phosphate buffered saline), όπως της ΙΗΑ, 3) Διάλυμα πλυσίματος πλακών (σύνθεση/λίτρο: α) 1.9 g NaCl, και β) 0.5 ml Tween-20).

**Συσκευές:** Μετρητής ραδιενέργειας, συσκευή κινητής τράπεζας.

### Τεχνική

1. **Προσκόλληση αντιγόνου σε σταθερή επιφάνεια.** Σε 8 βοθρία πλάκας από πολυστηρένιο (Εικ. 51στ), τοποθετούνται 100 μl “άριστης” αραίωσης αντιγόνου σε ρυθμιστικό διάλυμα αντιγόνου (καθορίζεται μετά τιτλοποίηση). Η πλάκα καλύπτεται και τοποθετείται σε συσκευή κινητής τράπεζας για 2 ώρες (22°-28° C) ή 1 ώρα στους 37° C.
2. **Απομάκρυνση περίσσειας αντιγόνου.** Όσα μόρια αντιγόνου δεν προσκολλήθηκαν στα τοιχώματα των βοθρίων και εναιωρούνται στα βοθρία, απομακρύνονται με αναστροφή της πλάκας και πλύσιμο των βοθρίων 3-4 φορές με διάλυμα πλυσίματος.
3. **Προσθήκη ειδικών αντισωμάτων.** Στα βοθρία 1 και 2, τοποθετούνται από 100 μl “άριστης” αραίωσης\* σε PBS του θετικού ορού ελέγχου, στα βοθρία 3

\* Ως “άριστη” θεωρείται η αραίωση, η οποία εμφανίζει τη μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ του θετικού και του αρνητικού ορού ελέγχου κατά την τιτλοποίηση.

και 4 100 μl του αρνητικού ορού ελέγχου, στα βοηθία 5 και 6 100 μl του υπό εξέταση δείγματος ορού και στα βοηθία 7 και 8 από 100 μl PBS. Ακολουθεί επώαση των υλικών, όπως στο στάδιο 1.

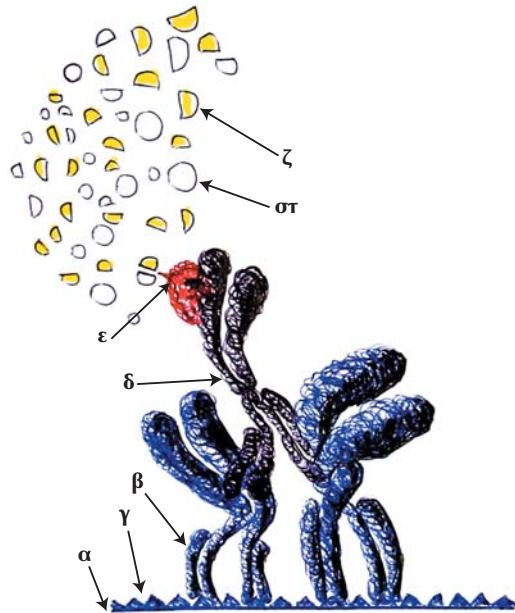
4. **Απομάκρυνση περιόσιαις ειδικών αντισωμάτων.** Όσα μόρια ειδικών αντισωμάτων δεν προσκολλήθηκαν στα τοιχώματα των βοηθίων και εναιωρούνται στα βοηθία, απομακρύνονται με το πλύσιμο των βοηθίων, όπως στο στάδιο 2.
5. **Προσθήκη συζεύγματος (conjugate).** Στα βοηθία 1 έως 6 τοποθετούνται από 100 μl αραιώσης συζεύγματος<sup>1</sup>. Τα βοηθία 7 και 8 χρησιμοποιούνται ως έλεγχοι του συζεύγματος. Ακολουθεί επώαση των υλικών, όπως στο στάδιο 1.
6. **Απομάκρυνση περιόσιαις συζεύγματος.** Όσα μόρια συζεύγματος δεν συνδέθηκαν με τα μόρια των ειδικών αντισωμάτων και εναιωρούνται στα βοηθία, απομακρύνονται με το πλύσιμο των βοηθίων, όπως στο στάδιο 2.
7. **Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.** Γίνεται σε μετρητή ραδιενέργειας και στηρίζεται στη σύγκριση των ενδείξεων στα βοηθία του υπό εξέταση δείγματος ορού, με τις ενδείξεις του θετικού και του αρνητικού ορού ελέγχου.

## Ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA

(enzyme-linked immunosorbent assay)

Στην ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA χρησιμοποιούνται, ως **αντιγόνο**, διαλυτό αντιγόνο του παρασίτου<sup>2</sup>, το οποίο στο πρώτο στάδιο της τεχνικής προσκολλάται στην επιφάνεια των βοηθίων πλακών από πολυστηρένιο (Εικ. 52α). Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται ο ορός. Τα **ειδικά αντισώματα** (Εικ. 52β), όταν υπάρχουν, συνδέονται με τους ομόλογους επίτοπους του παρασίτου (Εικ. 52γ) και δημιουργείται στρώμα ανοσοσυμπλεγμάτων. Στο τρίτο στάδιο προστίθεται το **σύζευγμα** και δημιουργείται στρώμα αντι-ισοτυπικών αντισωμάτων/φορέων του ενζύμου (Εικ. 52ε) επάνω στο στρώμα των ειδικών αντισωμάτων. Στο τέταρτο στάδιο της τεχνικής προστίθεται ο **δείκτης του ενζύμου** (υπόστρωμα, substrate, Εικ. 52στ), ο οποίος διασπάται από το ένζυμο και παράγεται έγχρωμο προϊόν (Εικ. 52ζ). Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων γίνεται οπτικά ή συνήθως, σε **φωτόμετρο** και τα θετικά αποτελέσματα εκφράζονται από 1+ έως 4+ ή ως τιμές

1. Η αραιώση του συζεύγματος καθορίζεται από την παρασκευαστρια εταιρεία ή μετά τιτλοποίηση γνωστού θετικού και αρνητικού ορού ελέγχου.
2. Η προμήθεια του διαλυτού αντιγόνου γίνεται από το εμπόριο ή παρασκευάζεται, π.χ. με την παρακάτω τεχνική: α) το παράσιτο ομοιογενοποιείται σε γουδί (με φυσιολογικό ορό), β) το υλικό φυγοκεντρείται (4.000 στροφές/min, για 4 ώρες στους 4°C), γ) το υπερκείμενο υγρό επεξεργάζεται με υπέρηχους (50 kHz για 2 λεπτά της ώρας), δ) το υλικό φυγοκεντρείται (όπως στο β), και ε) το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιείται, ως διαλυτό αντιγόνο στην ELISA κ.α., μετά τιτλοποίηση ή προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο διουρίας κ.ά.



**Εικόνα 52.** Ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA (α-τοίχωμα από πολυστηρένιο, β-ειδικό αντίσωμα, γ-επίτοποι αντιγόνου, δ-αντι-ισοτυπικό αντίσωμα, ε-ένζυμο, στ-δείκτης ενζύμου, ζ-έγχρωμο προϊόν διάσπασης).

απορρόφησης (A-absorbance), οπτικής πυκνότητας (OD-optical density) κ.ά. σε ορισμένο μήκος κύματος (nm-nanometers).

**Αποτελεσματικότητα της δοκιμασίας:** Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση αντισωμάτων στην ELISA ανέρχεται σε 0.5 pg/ml ή 0.0005 μg/ml ορού.

**Υλικά/Δείγμα:** Πλάκα 96 βοθρίων από πολυστηρένιο, πιπέττες 5 μl, 50-100 μl, 500-1000 μl (απλές και οκτακάναλες) και ρύγγι.

**Αντιδραστήρια:** α) Διαλυτό αντιγόνο, β) θετικός και αρνητικός ορός ελέγχου, γ) υπό εξέταση δείγματα ορού, δ) σύζευγμα (conjugate, αντι-ισοτυπικά αντισώματα/φορείς ενζύμου), ε) υπόστρωμα (χημική ουσία-δείκτης του ενζύμου).

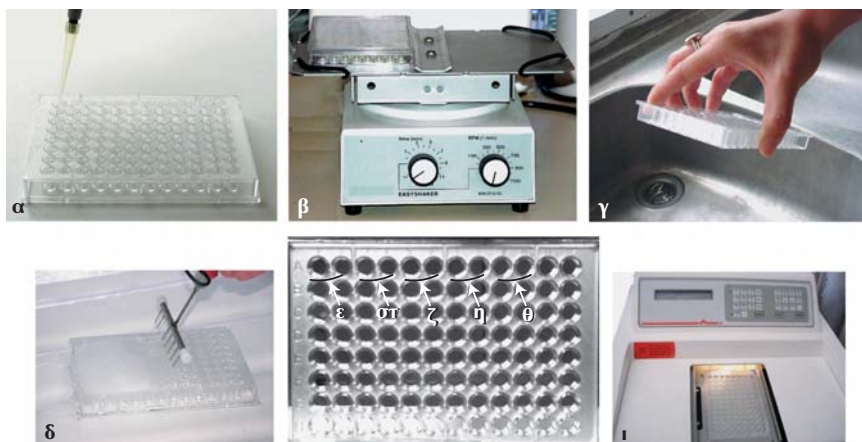
**Διαλύματα:** 1) Ρυθμιστικό διάλυμα αντιγόνου [σε μικρή ποσότητα διαλύματος 0.1M NaHCO<sub>3</sub> (8.4 g/λίτρο) προστίθεται ποσότητα διαλύματος 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10.6 g/λίτρο) μέχρι το pH να γίνει 9.6], 2) Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS, phosphate buffered saline), 3) Ρυθμιστικό διάλυμα δείκτη ενζύμου: Σε μικρή ποσότητα διαλύματος 0.1M NaHCO<sub>3</sub> (8.4 g/λίτρο) προστίθεται ποσότητα διαλύματος 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10.6 g/λίτρο) μέχρι το pH να γίνει 9.8 και μετά, προστίθεται 1 mM MgCl<sub>2</sub>, και 4) Διάλυμα πλυσίματος πλακών (σύνθεση/λίτρο: α) 1.9 g NaCl, και β) 0.5 ml Tween-20).

**Συσκευές:** Φωτόμετρο με φίλτρα μήκους κύματος 405-490 nm, συσκευή κινητής τράπεζας.

## Τεχνική

1. **Προσκόλληση αντιγόνου σε σταθερή επιφάνεια.** Σε 10 βοθρία πλάκας από πολυστερένιο τοποθετούνται 100 μl “άριστης” αραιώσης αντιγόνου σε ρυθμιστικό διάλυμα αντιγόνου (Εικ. 53α). Η πλάκα καλύπτεται και τοποθετείται σε συσκευή κινητής τράπεζας (Εικ. 53β) για 2 ώρες (22°-28° C) ή 1 ώρα στους 37° C.
2. **Απομάκρυνση περίσσειας αντιγόνου.** Το αντιγόνο που δεν προσκολλήθηκε στα τοιχώματα των βοθρίων, απομακρύνεται με αναστροφή της πλάκας (Εικ. 53γ) και πλύσιμο των βοθρίων 3-4 φορές με διάλυμα πλυσίματος (Εικ. 53δ).
3. **Προσθήκη ειδικών αντισωμάτων.** Στα βοθρία 1 και 2 τοποθετούνται από 100 μl “άριστης” αραιώσης<sup>1</sup> σε PBS του θετικού ορού ελέγχου (Εικ. 53ε), στα βοθρία 3 και 4 100 μl του αρνητικού ορού ελέγχου (Εικ. 53στ), στα βοθρία 5 και 6 100 μl του υπό εξέταση δείγματος ορού (Εικ. 53ζ) και στα βοθρία 7 και 8 από 100 μl PBS. Ακολουθεί επώαση των υλικών, όπως στο στάδιο 1.
4. **Απομάκρυνση περίσσειας ειδικών αντισωμάτων.** Τα ειδικά αντισώματα, που δεν δημιούργησαν ανοσοσυμπλέγματα και εναιωρούνται στα βοθρία, απομακρύνονται με το πλύσιμο των βοθρίων, όπως στο στάδιο 2.
5. **Προσθήκη συζεύγματος (conjugate).** Στα βοθρία 1 έως 8 τοποθετούνται από 100 μl αραιώσης συζεύγματος<sup>2</sup>. Τα βοθρία 7 και 8 χρησιμοποιούνται ως έλεγχοι του συζεύγματος (Εικ. 53η). Στα βοθρία 9 και 10 τοποθετούνται από 100 μl PBS. Ακολουθεί επώαση των υλικών, όπως στο στάδιο 1.
6. **Απομάκρυνση περίσσειας συζεύγματος.** Όσα μόρια συζεύγματος δεν συνδέθηκαν με τον ισότυπο των ειδικών αντισωμάτων και εναιωρούνται στα βοθρία, απομακρύνονται, όπως στο στάδιο 2.
7. **Προσθήκη του δείκτη του ενζύμου και παραγωγή έγχρωμου προϊόντος.** Σε όλα τα βοθρία τοποθετούνται από 100 μl διαλύματος δείκτη του ενζύμου<sup>3</sup>. Τα βοθρία 9 και 10 χρησιμοποιούνται ως έλεγχοι του δείκτη του ενζύμου (Εικ. 53θ). Ακολουθεί επώαση των υλικών για 10'-30' λεπτά της ώρας.
8. **Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.** Γίνεται οπτικά ή σε φωτόμετρο (Εικ. 53ι) με φίλτρο μήκους κύματος 405 nm (σύζευγμα με ένζυμο αλκαλική φωσφατάση) ή 450-490 nm (σύζευγμα με ένζυμο υπεροξειδάση) και στηρίζεται στη σύγκριση της έντασης του χρώματος στα βοθρία του υπό εξέταση δείγματος ορού (Εικ. 53ζ), με εκείνη του θετικού (Εικ. 53ε) και του αρνητικού ο-

- 
1. Καθορίζεται μετά τιτλοποίηση.
  2. Η αραιώση του συζεύγματος καθορίζεται από την παρασκευάστρια εταιρεία ή μετά τιτλοποίηση γνωστού θετικού και αρνητικού ορού ελέγχου.
  3. Ο δείκτης ποικίλλει ανάλογα με το ένζυμο. Ο p-nitrophenylphosphate (1 mg/ml ρυθμιστικού διαλύματος δείκτη και προσθήκη 1 mM MgCl<sub>2</sub>) είναι δείκτης της αλκαλικής φωσφατάσης και διασπάται σε κιτρινόχρωμο p-nitrophenol και άχρωμο φωσφόρο (phosphate).



**Εικόνα 53.** Ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA

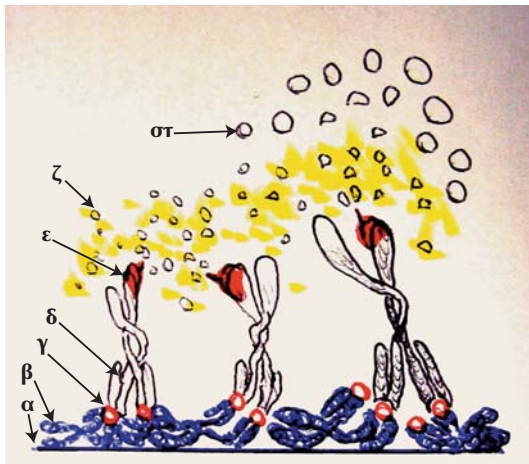
(α-τοποθέτηση αντιδραστηρίων, β-πλάκα σε συσκευή κινητής τράπεζας, γ-αναστροφή της πλάκας, δ-πλύσιμο των βοθρίων, ε-βοθρία θετικού ορού ελέγχου, στ-βοθρία αρνητικού ορού ελέγχου, ζ-βοθρία του υπό εξέταση δείγματος ορού, η-βοθρία ελέγχου συζεύγματος, θ-βοθρία ελέγχου δείκτη του ενζύμου, ι-φωτομέτρηση).

**ορού ελέγχου** (Εικ. 53στ). Η ένταση του χρωματισμού είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων στο δείγμα ορού και εκφράζεται ως 1+, 2+ κ.ο.κ. ή με αντίστοιχη τιμή απορρόφησης. Στα βοθρία των αρνητικών δειγμάτων ορού ελέγχου (Εικ. 53ζ), καθώς και στα βοθρία του ελέγχου του συζεύγματος (Εικ. 53η), δεν αναπτύσσεται χρωματισμός ή αυτός είναι ήπιος, πιθανόν, λόγω συμπτωματικής παρουσίας ετερόλογων αντισωμάτων με μικρή συγγένεια για το αντιγόνο. Επίσης, στα βοθρία ελέγχου του δείκτη του ενζύμου (Εικ. 53θ) δεν αναπτύσσεται χρωματισμός ή αυτός είναι ήπιος, λόγω διάσπασης ελάχιστων μορίων της χημικής ουσίας από την επίδραση μη ελεγχόμενων παραγόντων.

## Ανοσοενζυμική δοκιμασία Sandwich-ELISA

Η Sandwich-ELISA είναι τροποποίηση της ELISA για την ανίχνευση μεταβολικών προϊόντων παρασίτων (π.χ. *Toxoplasma gondii*) σε υγρά του σώματος (ορός, ΕΝΥ κ.ά.).

Στο πρώτο στάδιο της τεχνικής προσκολλώνται στην επιφάνεια των βοθρίων πλάκας από πολυστηρένιο (Εικ. 54α) **μόρια ειδικών αντισωμάτων** (Εικ. 54β) από υπεράνοσο ορό, π.χ. κονίλιου κατά του υπό εξέταση αντιγόνου, π.χ. *T.gondii*. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το υπό εξέταση δείγμα ορού. Όταν σε αυτό περιέχεται **διαλυτό αντιγόνο** (π.χ. μεταβολικά προϊόντα του παρασίτου, Εικ. 54γ), συνδέεται με τα αντισώματα στο τοίχωμα των βοθρίων και δημιουργείται το



**Εικόνα 54.** Ανοσοενζυμική δοκιμασία Sandwich-ELISA (α-τοίχωμα από πολυστηρένιο, β-ειδικό αντίσωμα, γ-διαλυτό αντιγόνο, δ-σύζευγμα, ε-ένζυμο, στ-δείκτης ενζύμου, ζ-έγχρωμο προϊόν διάσπασης).

**πρώτο στρώμα ανοσοσυμπλεγμάτων.** Στο τρίτο στάδιο προστίθεται το **σύζευγμα** (conjugate, Εικ. 54δ), από ειδικά αντισώματα κατά του υπό εξέταση αντιγόνου, π.χ. *T.gondii*, τα οποία προέρχονται από υπεράνοσο ορό **διαφορετικού** είδους ζώου από εκείνο του πρώτου σταδίου (π.χ. αίγα) και στα οποία προσκολλήθηκε ένζυμο (αλκαλική φωσφατάση, υπεροξειδάση κ.ά., Εικ. 54ε). Το σύζευγμα συνδέεται με το αντιγόνο και δημιουργείται **το δεύτερο στρώμα ανοσοσυμπλεγμάτων** (μεταξύ των δύο ανοσοσυμπλεγμάτων παρεμβάλλεται το αντιγόνο, με μορφή sandwich). Στο τέταρτο στάδιο της τεχνικής προστίθεται ο **δείκτης του ενζύμου** (υπόστρωμα, substrate, Εικ. 54στ), παράγεται έγχρωμο προϊόν διάσπασης (Εικ. 54ζ) και τα αποτελέσματα αξιολογούνται, όπως στην ELISA.

**Αποτελεσματικότητα της δοκιμασίας:** Όπως της ELISA.

**Υλικά/Δείγμα:** Πλάκα 96 βοθρίων από πολυστηρένιο με επίπεδο πυθμένα, πιπέττες 5 μl, 50-100 μl, 500-1000 μl και ρύγχυοι.

**Αντιδραστήρια:** α) Ειδικός υπεράνοσος ορός, β) θετικός και αρνητικός ορός ελέγχου, γ) σύζευγμα, δ) δείκτης ενζύμου (υπόστρωμα).

**Διαλύματα:** PBS (όπως της ELISA), διάλυμα πλυσίματος (όπως της ELISA).

**Συσκευές:** Συσκευή κινητής τράπεζας, φωτόμετρο.

### Τεχνική

- 1. Προσκόλληση ειδικών αντισωμάτων σε σταθερή επιφάνεια:** Σε 10 βοθρία πλάκας από πολυστηρένιο, τοποθετούνται από 100 μl της “άριστης” αραιώσης υπεράνοσου ορού\*, π.χ. κατά του *T.gondii*. Μετά, η πλάκα καλύπτεται

\* Ο ορός προέρχεται από υπερανοσοποιημένο ζώο (π.χ. κόνικλος) με το συγκεκριμένο αντιγόνο (π.χ. *T.gondii*) και η “άριστη” αραιώση καθορίζεται μετά τιτλοποίηση γνωστού θετικού και αρνητικού ορού ελέγχου.

- και τοποθετείται σε συσκευή κινητής τράπεζας για 2 ώρες (22°-28° C) ή 1 ώρα στους 37° C.
- Απομάκρυνση περίσσειας ειδικών αντισωμάτων:** Τα μόρια των αντισωμάτων που δεν προσκολλήθηκαν στο αντιγόνο (εναιωρούνται στα βοθρία), απομακρύνονται με αναστροφή της πλάκας και πλύσιμο των βοθρίων, 6 φορές, με το διάλυμα πλυσίματος.
  - Προσθήκη “άριστης” συγκέντρωσης αντιγόνου:** Στα βοθρία 1 και 2 τοποθετούνται από 100 μl αραίωσης<sup>1</sup> του θετικού ορού ελέγχου (σε PBS), στα βοθρία 3 και 4 μl του αρνητικού ορού ελέγχου και στα βοθρία 5 και 6 100 μl του υπό εξέταση δείγματος ορού. Στα βοθρία 7 έως 10 τοποθετούνται από 100 μl PBS και ακολουθεί επώαση των υλικών, όπως στο στάδιο 1.
  - Απομάκρυνση περίσσειας αντιγόνου:** Όσα μόρια αντιγόνου δεν συνδέθηκαν με ειδικά αντισώματα στο τοίχωμα των βοθρίων, απομακρύνονται, όπως στο στάδιο 2.
  - Προσθήκη συζεύγματος (conjugate):** Στα βοθρία 1 έως 8 τοποθετούνται από 100 μl αραίωσης συζεύγματος<sup>2</sup> και στα βοθρία 9 και 10 από 100 μl PBS. Τα βοθρία 7 και 8 χρησιμοποιούνται ως έλεγχοι του συζεύγματος. Ακολουθεί επώαση των υλικών, όπως στο στάδιο 1.
  - Απομάκρυνση περίσσειας συζεύγματος:** Τα μόρια του συζεύγματος που δεν συνδέθηκαν με τα μόρια του αντιγόνου του πρώτου ανοσοσυμπλέγματος, απομακρύνονται με το πλύσιμο των βοθρίων, όπως στο στάδιο 2.
  - Προσθήκη του δείκτη του ενζύμου και παραγωγή έγχρωμου προϊόντος:** Σε όλα τα βοθρία τοποθετούνται από 100 μl του δείκτη του ενζύμου<sup>3</sup>. Τα βοθρία 9 και 10 χρησιμοποιούνται ως έλεγχοι του δείκτη του ενζύμου. Ακολουθεί επώαση των υλικών για 10'-30' λεπτά της ώρας.
  - Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.** Όπως στην ELISA.

## Ανοσοενζυμική δοκιμασία Coproantigen-ELISA

Η δοκιμασία αυτή είναι τροποποίηση της Sandwich-ELISA για την ανίχνευση παρασιτικού αντιγόνου στα κόπρανα (π.χ. μεταβολικά προϊόντα *Echinococcus granulosus* σε κόπρανα σκύλου).

Προετοιμάζεται εναιώρημα περίπου 1 g κοπράνων σε 3 ml PBS και φυγοκεντρείται στα 3.000 g για 10' λεπτά της ώρας. Το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποι-

- 
- Ως “άριστη” θεωρείται η αραίωση, η οποία εμφανίζει τη μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ του θετικού και του αρνητικού ορού ελέγχου κατά την τιτλοποίηση.
  - Η αραίωση του συζεύγματος καθορίζεται από την παρασκευαστρια εταιρεία ή μετά τιτλοποίηση γνωστού θετικού και αρνητικού ορού ελέγχου.
  - Όπως στην ELISA.

είται αμέσως στη δοκιμασία ή διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Τα στάδια της τεχνικής είναι όμοια με της Sandwich-ELISA, με τη διαφορά ότι αντί των δειγμάτων ορού χρησιμοποιούνται αραιώσεις 1:5 των θετικού, αρνητικού και υπό εξέταση δειγμάτων κοπράνων.