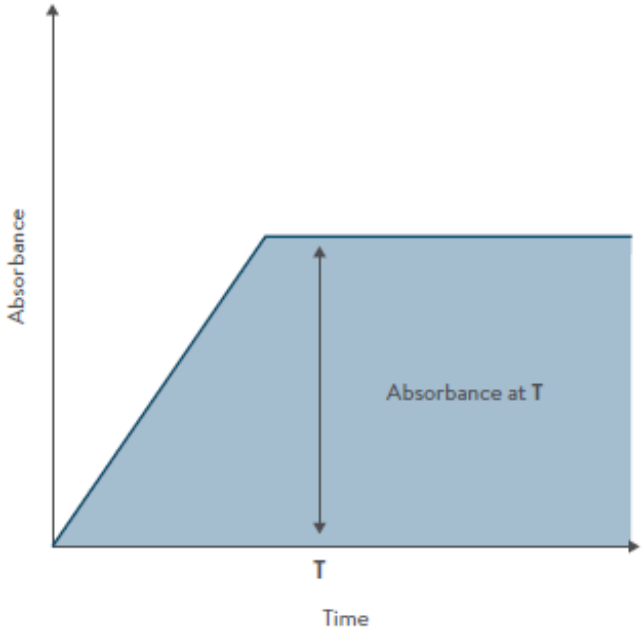
Végpontos reakciók és sebességi (kinetikus) reakciók

Ha az **analitot kémiai reakcióval detektáljuk** két lehetőség van a koncentráció meghatározására: ezek a végpontos reakciók és a sebességi (kinetikus) reakciók

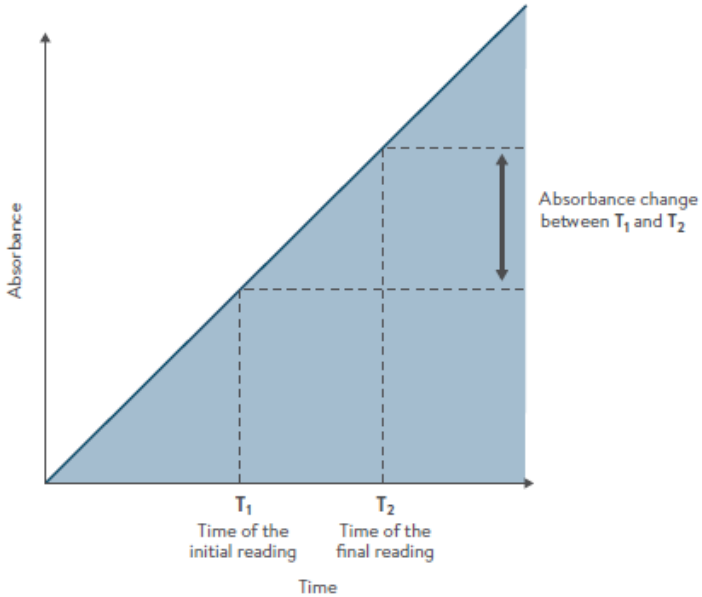
Végpontos reakciók

- Rövid idő alatt és sztöchiometrikusan (pl. egy molekula analitból egy molekula termék keletkezik) végbemenő kémiai reakciók esetén
- Ált. az analit teljes mennyisége termékké alakul át
- Lehet vizsgálni a termék képződését (end-up reakció, abszorbancia magasabb a végpontban), vagy a kiindulási anyag (analit) csökkenését (end-down reakció, abszorbancia alacsonyabb a végpontban)
- Pl. Albumin + brómkrezol lila → színes komplex



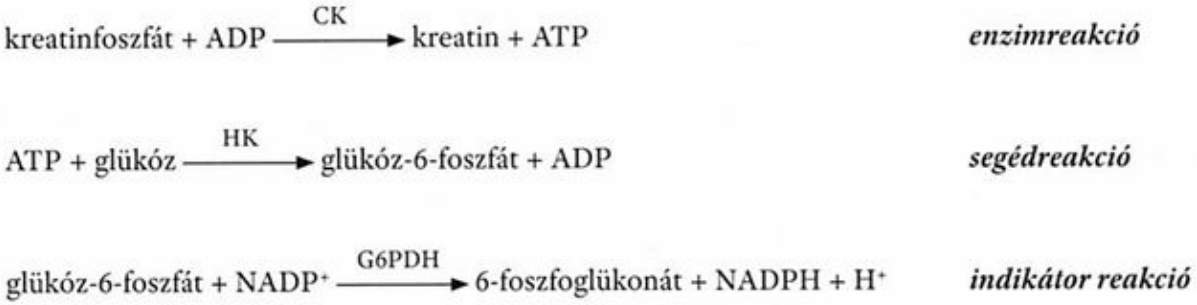
Sebességi (kinetikus) reakciók

- Amikor enzimaktivitást mérünk (egy enzimnél nem tudjuk mennyi végterméket produkál →nem sztöchiometrikus
- Azt vizsgáljuk, hogy fix mennyiségű szubsztrát (a mérendő enzimé, analité) milyen gyorsan alakul át termékké
- Minél több az analit (enzim) a mintában, annál gyorsabb a szubsztrát → termék átalakulás
- Lehet vizsgálni a termék képződését (rate-up reakció, abszorbancia idővel nő), vagy a szubsztrát eltűnését (rate-down reakció, abszorbancia idővel csökken)
- Pl. lipáz, GOT
- Lehet alkalmazni nem enzim analitok esetén is (pl. ammónia mérése, amikor a reakció nagyon lassan éri el a végpontot)



Kreatin-kináz (CK) meghatározás

A CK meghatározást NAC (N-acetilcisztein) aktivált UV kinetikus módszerrel végezzük:



HK: hexokináz
G6PDH: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz

Az indikátor reakcióban a NADPH abszorbancia szint növekedését mérjük 340 nm-s hullámhosszúságú fényelnyelés változása alapján, ami a CK aktivitással arányos. Az oxidált ill. a redukált NADPH UV spektruma különbözik egymástól, a redukált forma abszorpciós maximuma 340 nm-n van, ahol a NADP nem abszorbeál.

A vizsgálatot szérumból végezzük. Haemolysis zavarja a meghatározást. A vörösvértestek ugyan nem tartalmaznak CK enzimet, de a belőlük kiszabaduló adenilát kináz zavarhatja a meghatározást. Az adenilát kináz ugyanis a 2 ADP ↔ ATP + AMP átalakulást katalizálja és ezért a valóságosnál magasabb CK értéket eredményezhet.

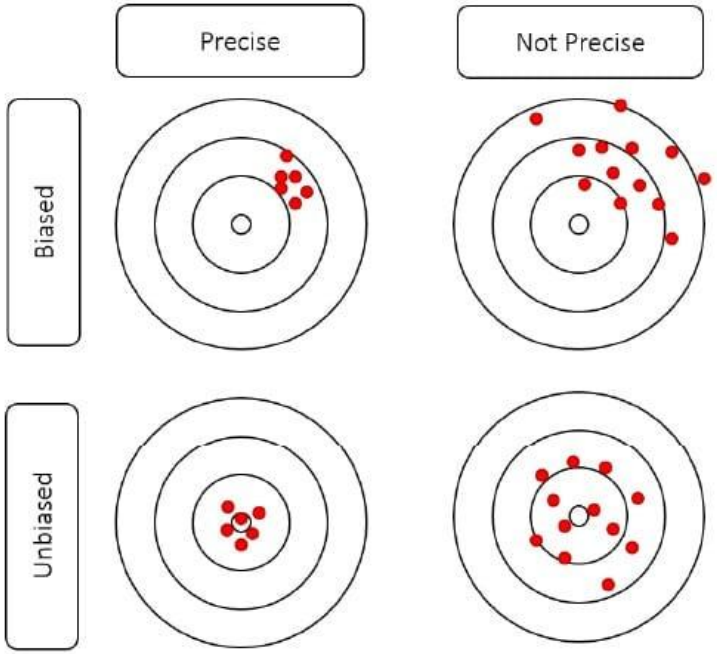
Referencia tartomány: 24-195 U/L

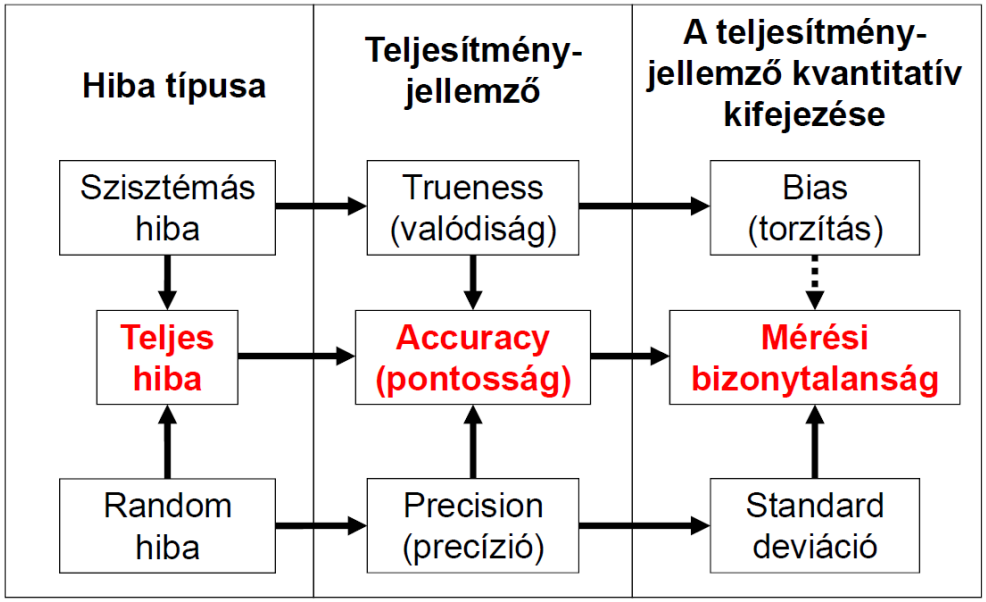
Az egység (1 Unit/L) az az enzimaktivitás, amely 1 perc alatt 1 μmol szubsztrátot alakít át.

Az eredmények értékelésénél feltétlenül figyelembe kell venni, hogy előzetes fizikai megerőltetés, trauma, műtét, sőt, intramusculáris injekció, továbbá hypo-, és hyperthermia, intoxicatio és cerebrovasculáris történések hatására megemelkedhet a CK aktivitás.

Mérés hibái és teljesítményjellemzői

- Mérés során mindig előfordul hiba
- **A mérés teljes hibája** (TE) a szisztémás és a véletlen hibából adódik össze
- **Szisztémás hiba:** a mért értékünk mennyire tér el a valódi értéktől, minél nagyobb ez a hiba a mérésünk **torzítása (bias),** annál nagyobb (minél kisebb a szisztémás hiba, a mérésünk **valódisága** annál jobb)
- **Véletlen (random) hiba:** az ismételt mérések eredményei eltérnek, szóródnak (minél kisebb a szórás (SD) mértéke, annál nagyobb a mérőrendszerünk **precizitása**)
- Többféle precizitás létezik:
  - *Ismételhetőség (repeatability*): rövid időn (futtatáson) belüli mérések, azonos körülmények
  - *Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság*: hosszabb időszak, napok között is lehet (futtatások közötti)
  - *Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság:* ez adja a legkisebb precizitást





Mérési módszer verifikálása

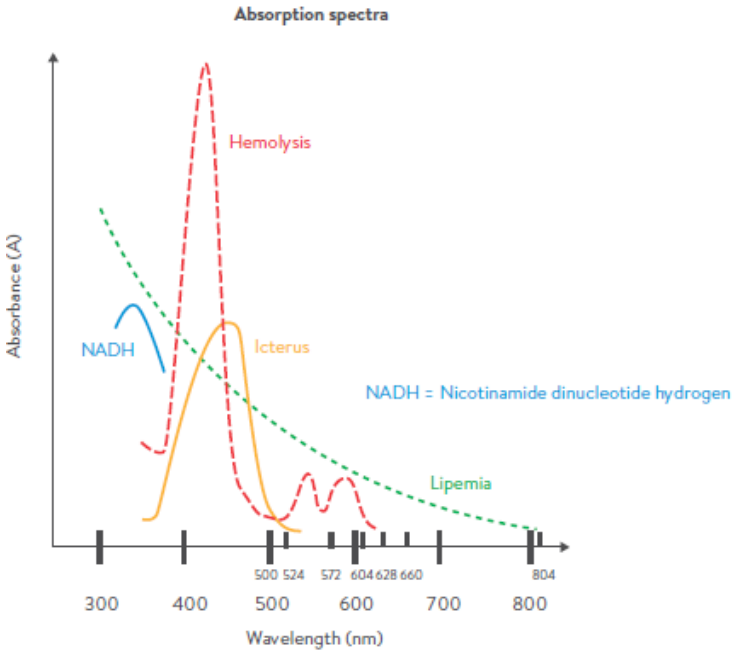
- **Amikor a laborban új vizsgálat, módszer, műszer bevezetésére vagy reagens váltásra kerül sor**
- A gyártó pl. tesztleírásában közölt állításainak helyességét kell ellenőrizni az adott laboratórium körülményei között
- Az ellenőrzés kiterjed a következőkre:
  - Precizitás
  - Valódiság
    - Torzításbecslés
    - Interferenciavizsgálat
    - Módszer összehasonlítás
  - Mérési tartomány
  - Referenciatartomány

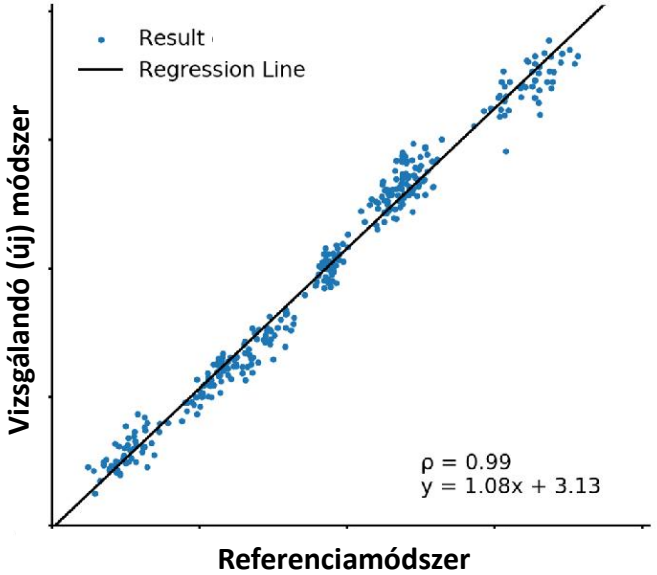
- **Precizitás-ellenőrzés**
  - Véletlen (random) hiba mértékét becsüljük
  - Pl. 5 napon keresztül 5 párhuzamos mérése kétszintű kontrollt használva (kontrollszintekként 25-25 mérés)
  - Futtatásokon belüli precizitást az egyes napok 5 mérésének átlaga, SD és CV értéke adja
  - Futtatások közötti precizitást az 5 nap összes mérésének átlaga, SD és CV értéke adja
  - Ha az eredmények a gyártó által megadott értékek alatti vagy azzal egyenlő, akkor verifikálás sikeres

- **Valódiság-ellenőrzés**
  - A szisztémás hiba mértékét becsüljük
  - **Torzításbecslés**
    - Visszanyerésnek (recovery) is hívják
    - A vizsgált analitra nézve célértékkel rendelkező minta szükséges hozzá (pl. tanúsított referenciaanyag, külső minőség-ellenőrző minta, standard)
    - <u>Betegmintához</u> (mátrix) adunk <u>különböző koncentrációjú</u> analitot tartalmazó <u>standardot</u>
    - A visszanyert mennyiség a <u>módosítatlan és a kiegészített betegmintában mért analit koncentráció közötti különbség</u> <u>osztva a hozzáadott analit koncentrációval</u> és szorozva 100-zal → Visszanyerés (%)
    - Előre meghatározott teljesítményelvárásokkal vetik össze

Mérési módszer verifikálása

- **Valódiság-ellenőrzés**
  - A szisztémás hiba mértékét becsüljük
  - Torzításbecslés
  - **Interferenciavizsgálatok**
    - Annak vizsgálata, hogy interferáló anyag befolyásolja-e a vizsgált analit koncentrációjának pontos meghatározását
    - Leggyakoribb a hemolízis, lipémia és a bilirubin
    - Interferáló anyagot max. koncentrációban hozzáadjuk a mintához
    - Ha befolyásolja a mérést, akkor addig csökkentjük, amíg már nem → interferáló minimális koncentráció meghatározható
  - Interferencia mechanizmusa:
    - Az interferáló anyag közvetlenül elnyeli, vagy szórja a fényt
    - A tesz reagensével reagálva megakadályozza azt a céljának tervezett elérésében
  - **Módszer összehasonlítása**
    - Célja a szisztémás hiba mértékének és típusának meghatározása
    - A használt mérési eljárást (referenciamódszer) hasonlítjuk össze az új mérési eljárással
    - 40, az egész mérési tartományt lefedő, betegminta megmérése mindkét eljárással
    - X tengely a régi, y tengely az új módszer
    - Ha a korrelációs koefficiens négyzete nagyobb mint 0,95, akkor a két módszer jól korrelál egymással





Mérési módszer verifikálása

- **Mérési tartomány ellenőrzés**
  - A gyártó által megadott tartomány ellenőrzése
  - Alacsony (L) és magas (H) analit koncentrációjú minta (kettő a mérési tartomány kész szélső határértéke közeléből)
  - Min. 5 hígítás készítése és lemérése: 4 rész L, 3 rész L +1 rész H, 2 rész L +2 rész H, 1 rész L +3 rész H, 4 rész H
  - Mért és várt koncentrációk összehasonlítása → ha előre meghatározott tűréshatáron belül, akkor elfogadható a gyártó által megadott mérési tartomány
  - Fogalmak:
    - **Analitikai mérési tartomány** (linearitási tartomány): minta előkezelése (pl. hígítása, koncentrálása) nélkül lemérhető tartomány
    - **Klinikai mérési tartomány**: a minta hígítása vagy koncentrálása révén lemérhető tartomány

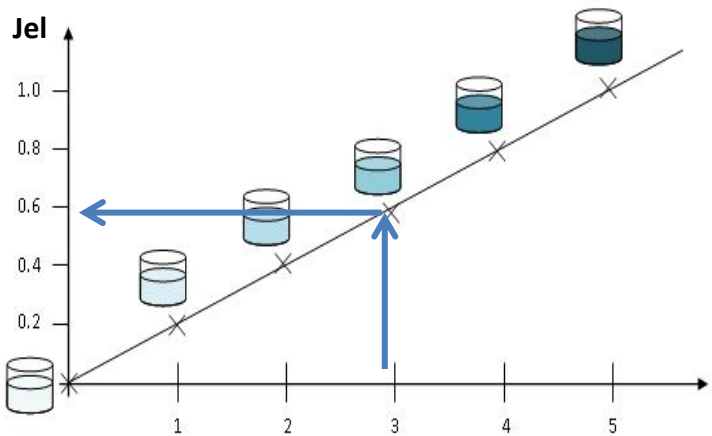
- **Referenciatartomány ellenőrzése**
  - Gyártó által megadott referencia tartományt kell ellenőrizni
  - 20 referenciaegyed mintáját lemérjük
  - A gyártó által megadott referencia határok elfogadhatók, ha a vizsgált egyének maximum 10 %-a esik ki
  - Ha 10% felett, akkor további 20 referenciaegyedet kell bevonni
  - Ha így is van 10% kieső, akkor 120 referenciaegyed bevonásával fel kell venni a saját referenciatartományt

Kalibráció

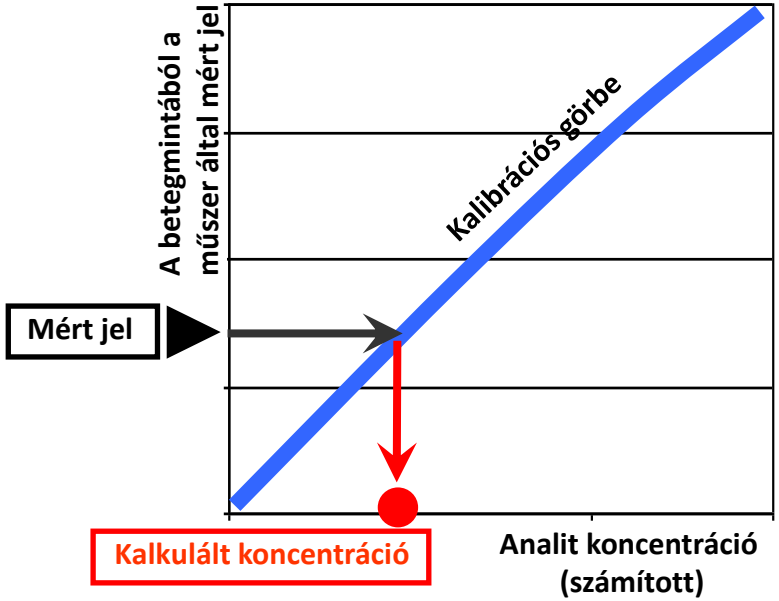
Kalibráció: összeköti az analitikai jelet az analit koncentrációjával

- Lineáris vagy nemlineáris kapcsolat
- Minden egyes analithoz szükség elvégezni
- Több esetben a gyártó megcsinálja, nekünk nem kell (pl. POCT készülékek)
- Ha nekünk kell, akkor a kalibrációs oldatsorozatot (standard sor) a gyártó adja (ismert analit koncentrációjú oldatok, a betegmintához hasonló mátrix)
- A felhasznált kalibrátor oldatok számától függően egy-, két-, hatpontos stb. kalibrációról beszélhetünk

Kalibrációs görbe készítése

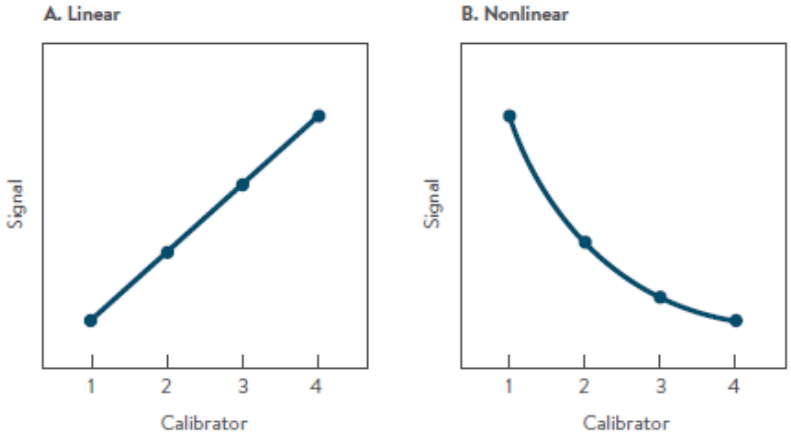


Kalibrációs görbe felhasználása



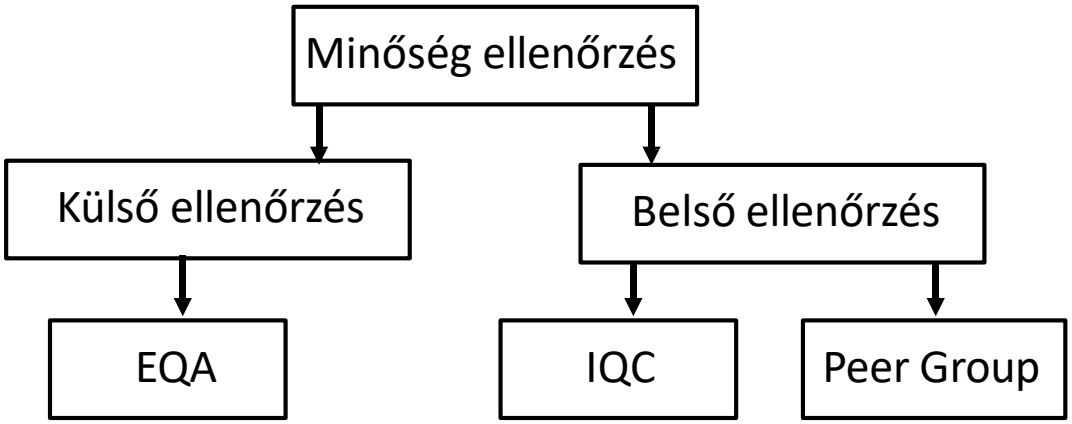
Kalibrációt kell végezni:

- Új LOT (gyártási tétel) számú reagens
- Kieső kontrolleredmény esetén
- Bizonyos események után (pl. műszer javítása, karbantartása)



A laboratóriumi vizsgálatok kontrollrendszerei

Egy mérési módszer bevezetése után annak teljesítményét (kalibrációt és az analizátor megfelelő működését) folyamatosan ellenőrizni kell, aminek eszközei a külső és belső minőség-ellenőrzés (belső és külső kontrollanyagok felhasználásával)



Külső kontroll (EQA)

- Nemzeti programok (QualiCont)
- Nemzetközi programok (pl. EQAS)
- Ismeretlen minták
- Havi, negyedéves, féléves gyakoriság
- Homogén felhasználói csoport (Peer: szűkített módszertani csoport)
- Konszenzus, referens értékek

Belső kontroll (IQC)

- Önellenőrzés
- Gyártói kontrollok
- Valódiságkontrollok
- Független kontrollok
- Ismert minták
- Napi gyakoriság

Laboratóriumi összehasonlító rendszerek

- Független kontroll gyártói
- Kontrollok napi vizsgálati eredményeit
- Ismert minták
- Szűkített módszertani csoport
- Gyakoriság változó

Belső minőségellenőrzés

A **belső (napi) kontrollokhoz** a gyártó célértéket és elfogadási tartományt állapít meg, ami tájékoztató jellegű

- Minden egyes vizsgálandó analithoz szükséges kontroll anyag
- **Célérték**: a kontrollanyagban lévő vizsgálandó analit koncentrációja
- **Elfogadási tartomány**: az a tartomány, amin belül szórhatnak a kontrollmérések eredményei, ha egy kontrollmérés ezen kívülre esik a kontrollmérés nem elfogadható

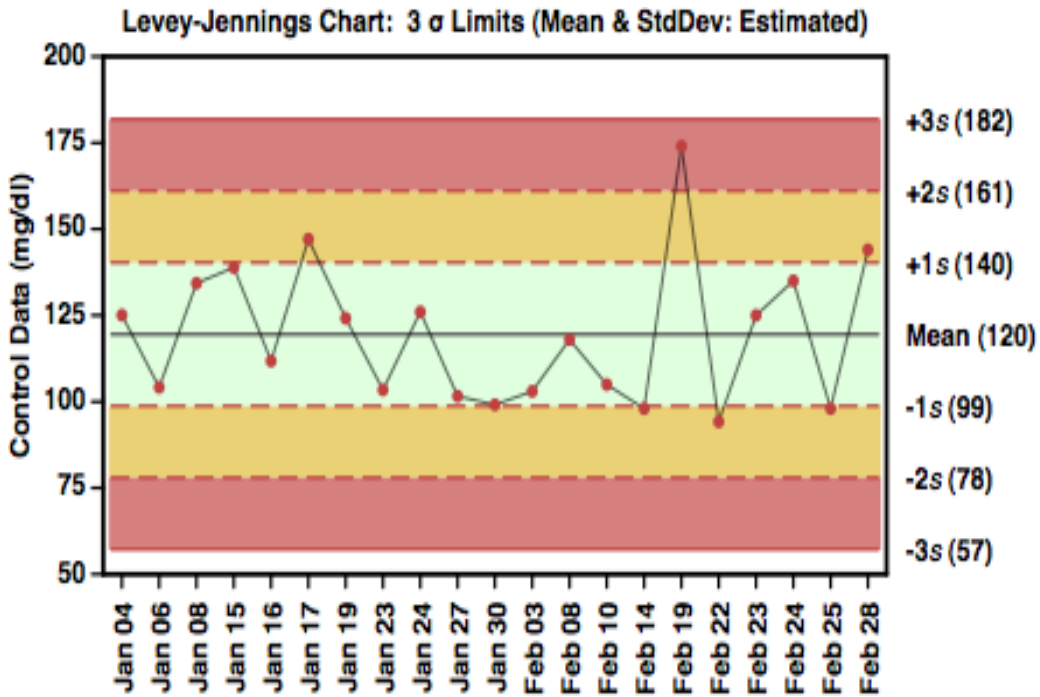
Belső kontrollal kapcsolatban elvárt követelmények:

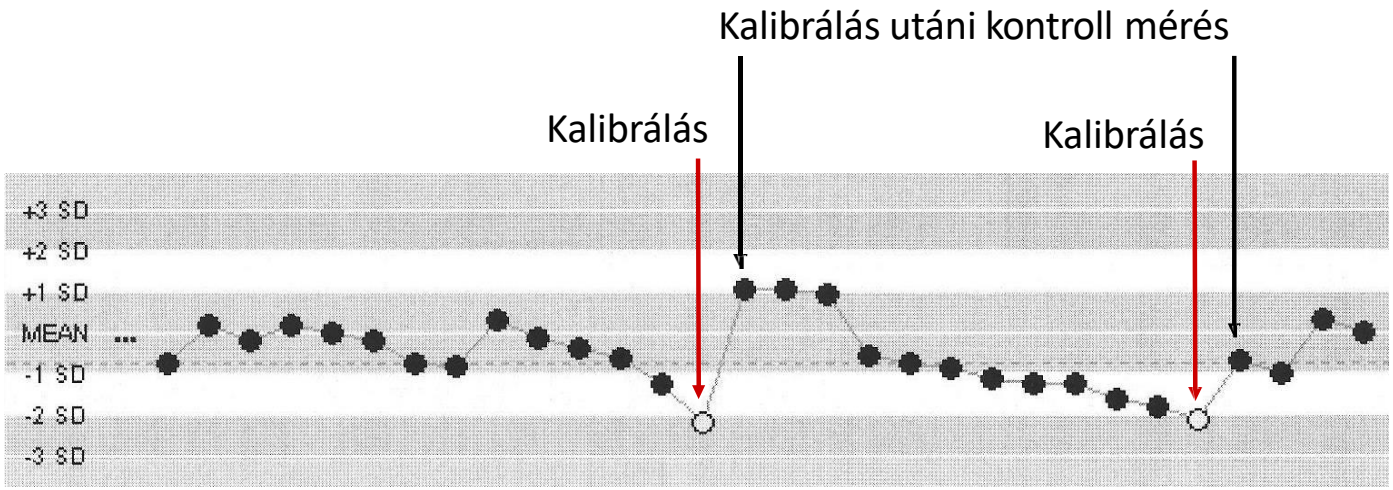
- Humán mátrix alapú (szérum, plazma, vizelet, vér stb.)
- Klinikailag releváns szinteket képviseli (normál és patológiás)
- Értékei legyenek a diagnosztikai döntési határérték körüli tartományban
- Hosszú szavatossági idő, felbontás után is (stabilitás)
- Minimális mennyiség (javasolt az 1 év)
- Multikomponensű – gazdaságosabb felhasználás
- Legyen minél több készülékre bemérve, tájékoztató értékek legyenek feltüntetve
- Elfogulatlan megítélést tegyen lehetővé (független kontroll)

Belső kontroll kiszerelése:

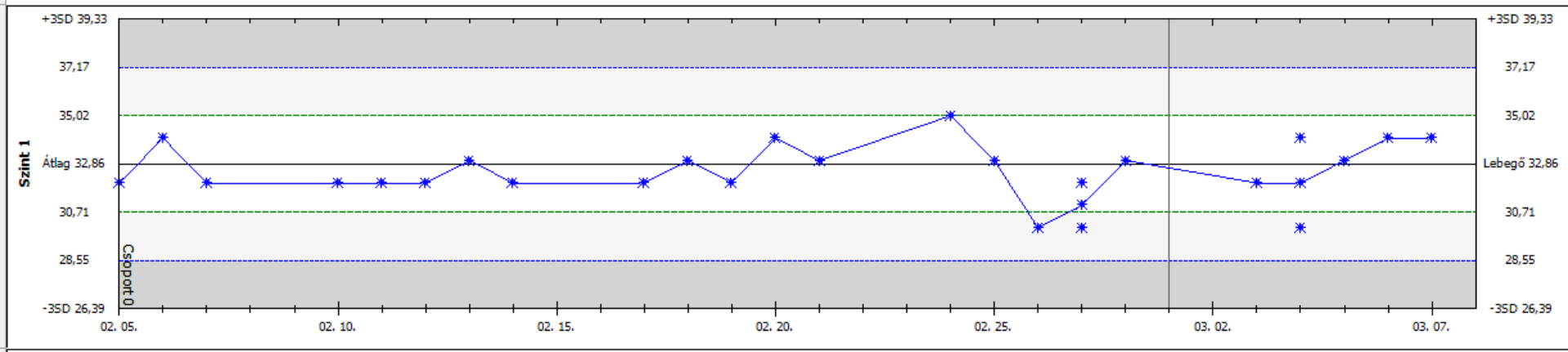
- Liofilizált kontroll: szabályozott előkészítési protokoll
  - higító oldat minősége
  - pipetta minősége
  - oldódási idő
  - keverés, homogenizálás
- Folyékony kontroll
  - előny: készen van, hosszabb eltarthatóság bontva
  - hátrány: drága, tartósítószert tartalmaz ⇒mátrix problémákat okozhat

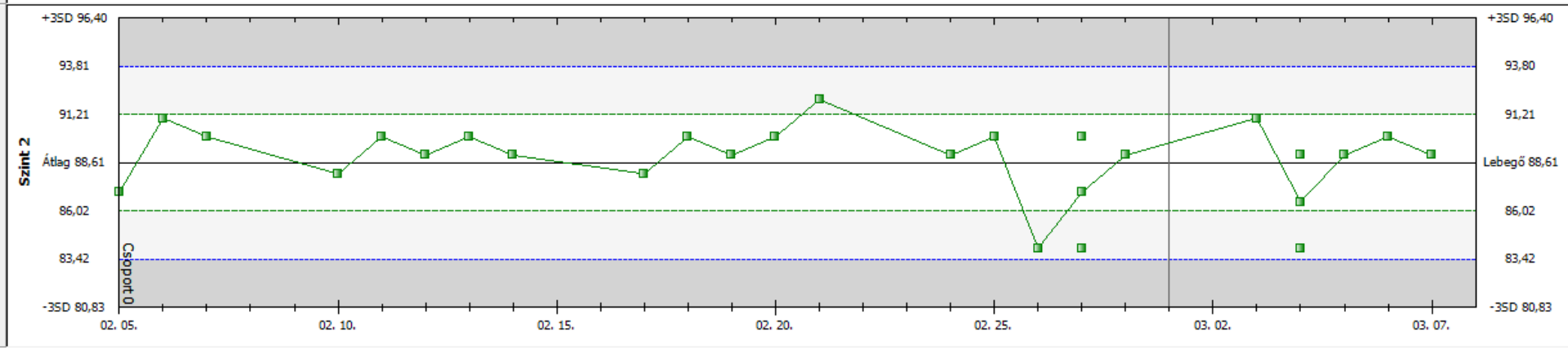
Kontroll mérések szemléltetése



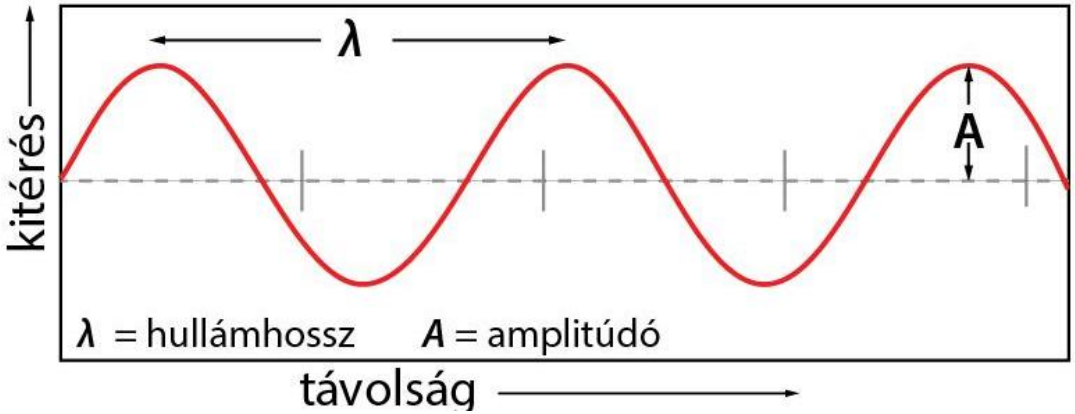


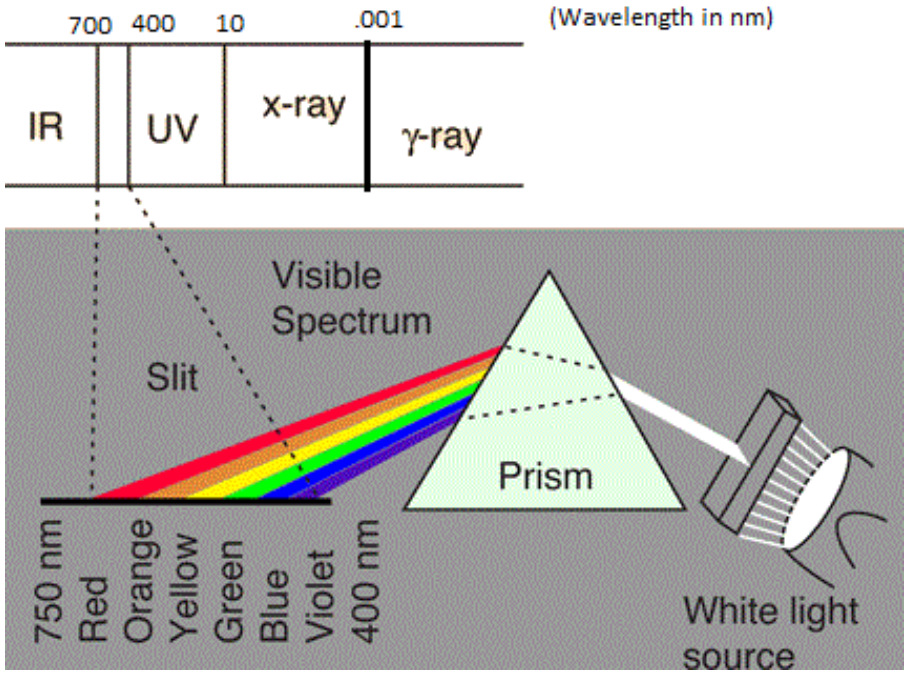
Levey-Jennings-diagram Periódus: 2025. 02. 05. - 2025. 03. 07.
Labor: 360743, SE_KPLA Siemens Atellica CH21, KPLA Központi Laboratórium
Lot: 45980, Multiqual 1,2,3
ALT (ALAT/GPT), Siemens Atellica CH Analyzer, U/L
Halm átlag/SD/CV: [1] 32,86/2,16/6,56, [2] 88,61/2,60/2,93
Összegző statisztika azátlag/SD/CV/SDI pontokra ettől: 2025. 02. 05. eddig: 2025. 03. 07. [1] 32,52/1,29/3,98/25, [2] 88,84/2,10/2,36/25
Ábrázolás a következő függvényében: Saját labor, Aktuális eszköz, Kumulatív

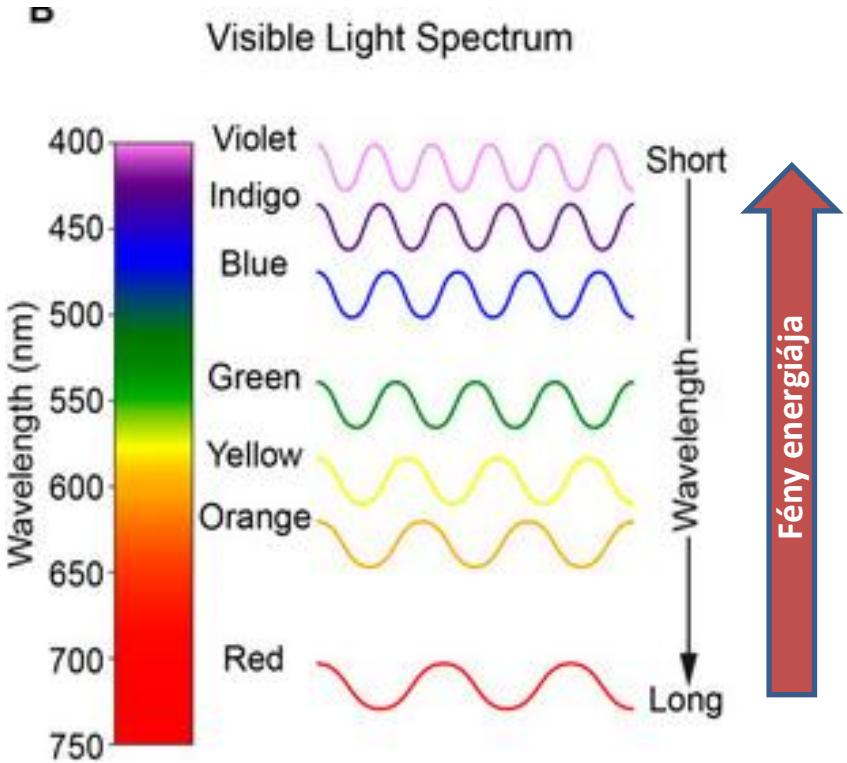




Fénytani alapok

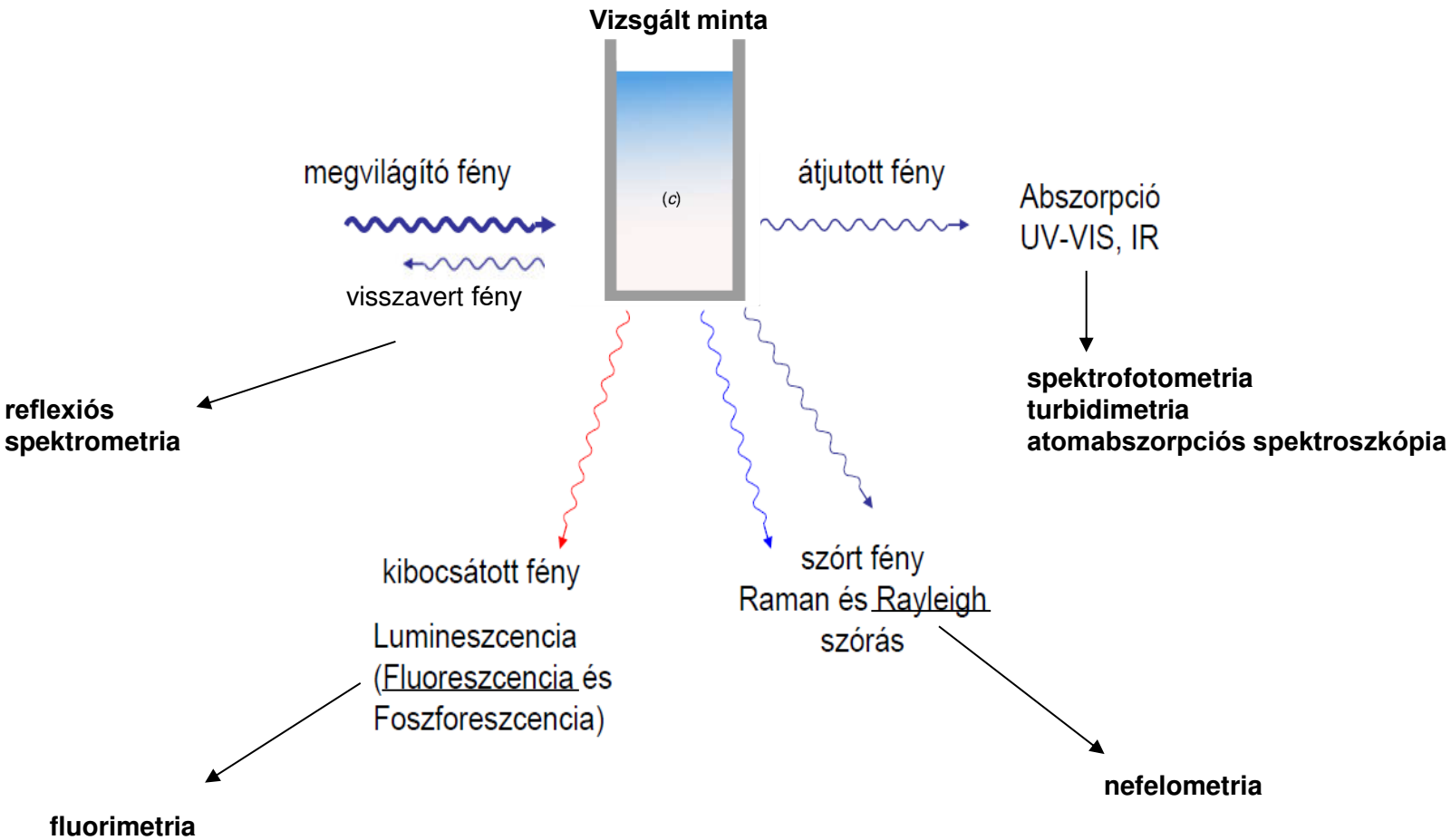






Analitikai módszerek – optikai módszerek

Fotometria: a fény a vizsgált mintában történő elnyelődésén (abszorpció), szóródásán (turbidimetria, nefelometria), gerjesztő tulajdonságán (fluoreszcencia, lángfotometria, lumineszcencia) és ezek fotodetektorral történő mérésén alapszik.
Analit: összefoglaló név, azt a mintában lévő anyagot, komponenst, paramétert nevezzük analitnak, aminek a mennyiségét (koncentrációját) egy adott mérés során meg akarjuk határozni



Analitikai módszerek – Spektrofotometria

- Adott hullámhosszú és ismert intenzitású fénnyel egy mintát besugározva:
  - Egy része elnyelődik (**abszorpció**)
  - Másik része áthalad rajta (**transzmisszió**)
  - Harmadrészt visszaverődik (**reflexió**)

- **A spektrofotometria** során azt vizsgáljuk, hogy az adott anyag milyen mértékben nyeli el a fényt
- **Az elnyelési színkép** (milyen hullámhosszú fényt nyel el) **jellemző az anyagra** és annak szerkezetére
- A használt fény lehet az UV-VIS tartományban (elnyeléskor a molekula kötő elektronjai gerjesztődnek)
- Általában oldatok mennyiségi elemzésére használják, ennek alapja **a Lambert-Beer törvény**
- Az **abszorbancia** (jele: **A**) a fényelnyelés mértékét mutatja meg és **arányos a koncentrációval**

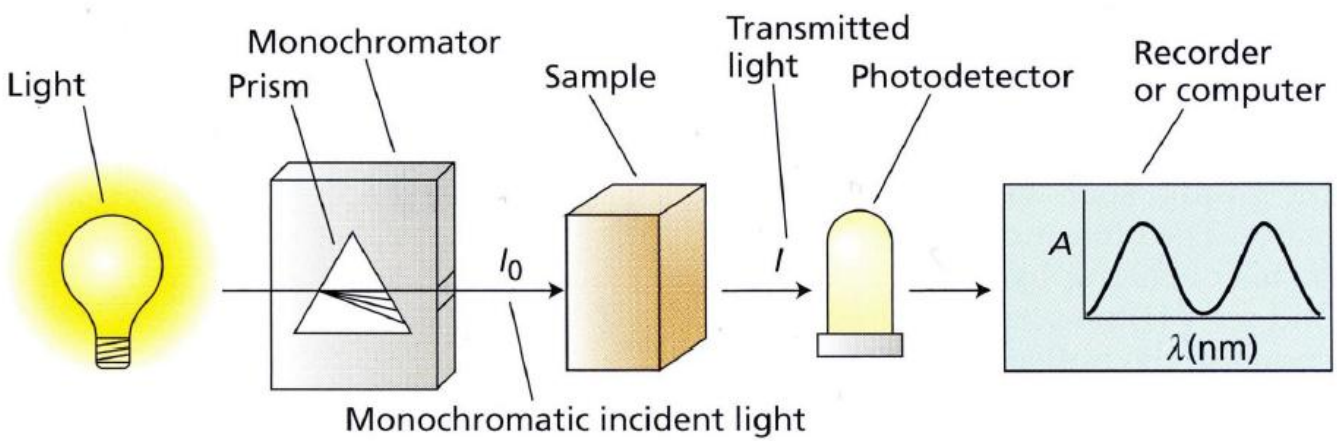
Lambert - Beer törvény

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot \ell$$

ε abszorciós koefficiens ($dm^3mol^{-1}cm^{-1}$)

c koncentráció (mol/dm^3)

ℓ úthossz (küvetta vastagság) (cm)



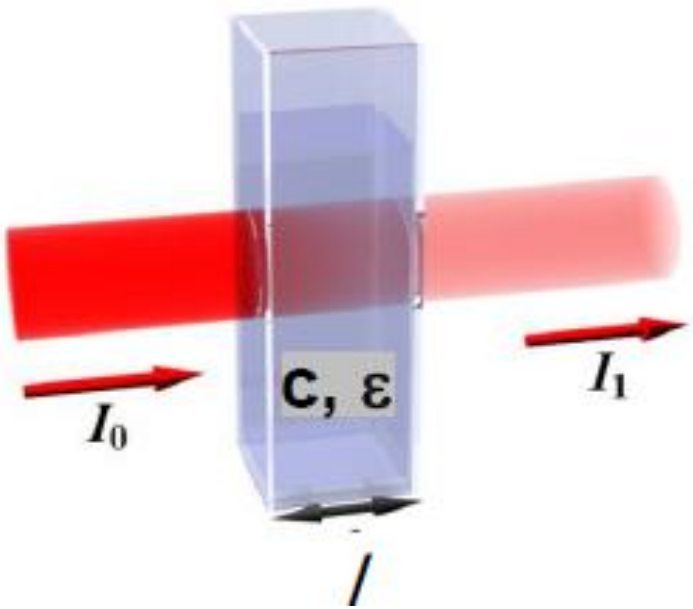
Analitikai módszerek – Spektrofotometria

- Transzmittancia (Áteresztőképesség): $T(\%) = I/I_0 \cdot 100(\%)$
- Abszorbancia (Elnyelés): $A = \log 1/T = -\log T = \log(I_0/I)$
- **Abszorbancia hullámhosszfüggése anyagi minőségre jellemző!**

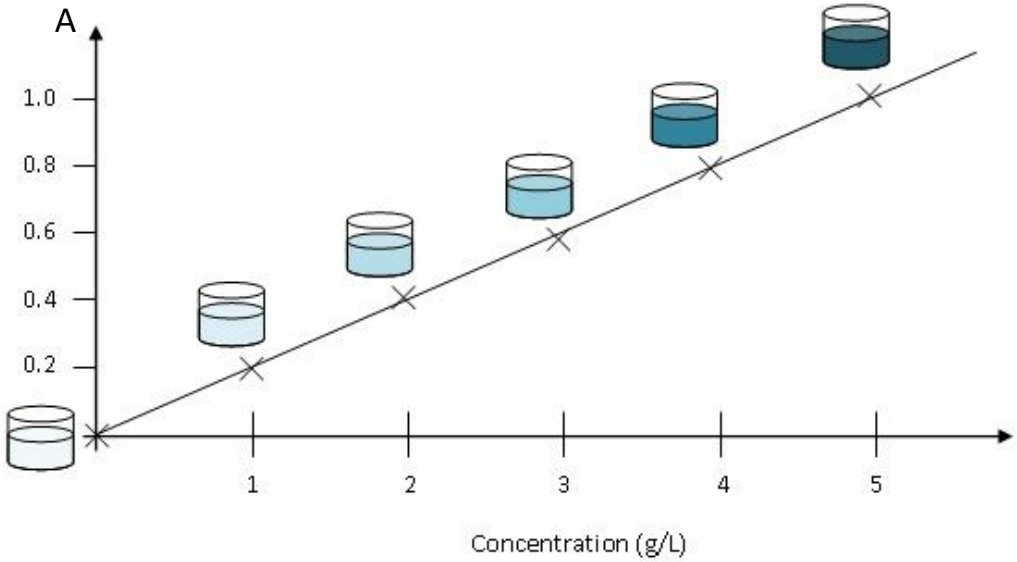
A	T %
0,01	98%
0,1	79%
0,5	32%
1	10%
2	1%
3	0,1%

Lambert–Beer-törvény:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$



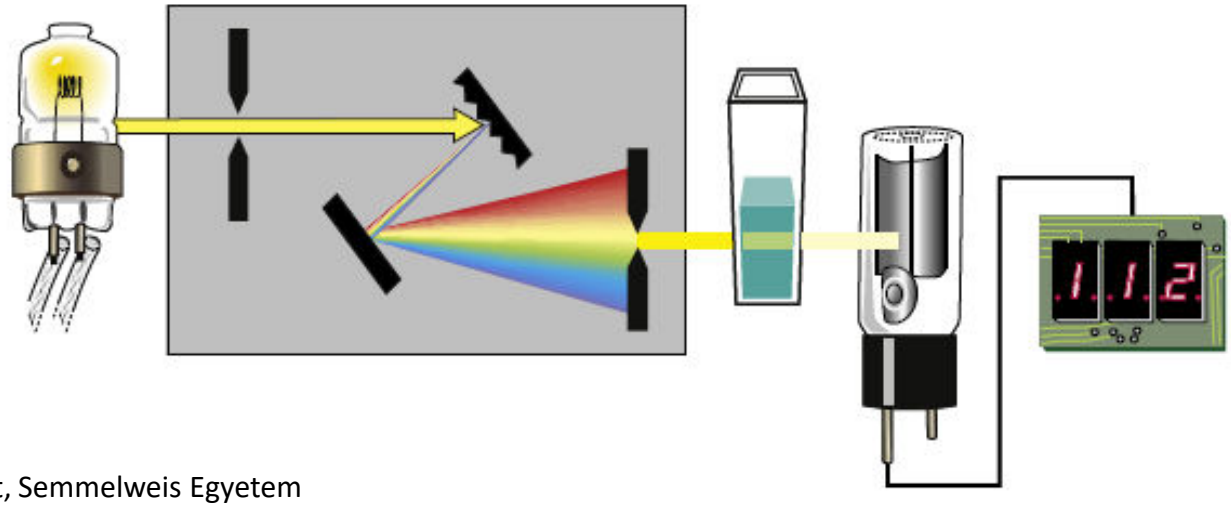
Az **abszorbancia** (jele: **A**) **arányos a koncentrációval**



Analitikai módszerek – Spektrofotometria

A spekrofotométer főbb részei:

- **Fényforrás:**
  - **UV (ultraibolya**, 200 - 320 nm közötti tartomány) esetén deutérium lámpa, nagynyomású hidrogén, esetleg nagynyomású xenon lámpa
  - **VIS (látható fény** tartomány) esetén és közeli infravörös tartományban wolframszálas lámpa, halogén lámpa
  - Fotodióda, amely adott hullámhosszú fény kibocsátására képes
- **Monokromátor:** feladata az említett fényforrások folytonos spektrumából egy adott hullámhosszúságú fény kiválasztása (rés: mérete meghatározza a beeső fény (I_0) erősségét és a hullámhossz tartományt)
- **Küvetta (muntatartó):** anyaga függ a mérésre használt hullámhossztartománytól
  - Kvarc küvetta: 190 nm és felette
  - Műanyag küvetta: 300 nm és felette
  - Üveg küvetta: 340 nm és felette
- **Detektor:** a kimenő fény (I) mérésére szolgál (pl. fotodiódák, diódasoros detektor, PMP-photomultiplier)



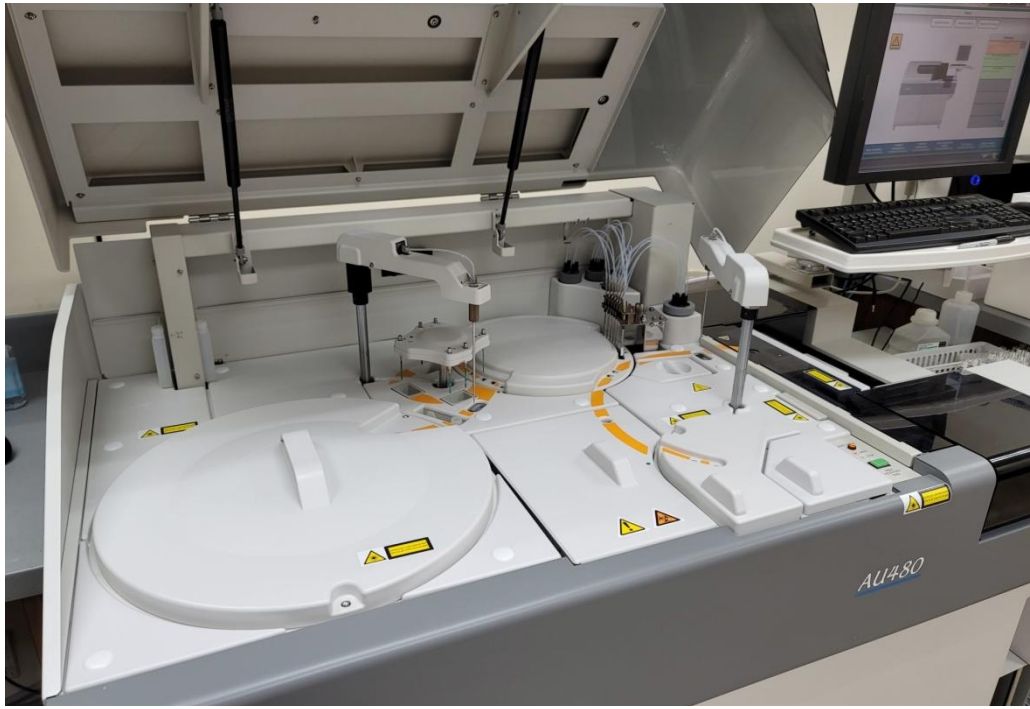
Analitikai módszerek – Spektrofotometria

Főbb alkalmazási területei:

- oldott anyag elnyelési spektrumának meghatározása – anyagok azonosítása
- oldott anyag koncentrációjának meghatározása
- oldott anyagok koncentrációjának időbeli változásának követése – kinetikai mérések

Fotometriás műszerek a laborban:

- klinikai kémiai automaták (spektrofotometria, turbidimetria)
- hematológiai automaták (fehérvérsejtek differenciálása)
- koagulométer (optikai alapú)
- vérgáz analizátor (CO-oximéter)
- ELISA
- ...



Analitikai módszerek – Spektrofotometria

Beckman Coulter AU680 kémiai analizátor

Az optikai rendszer specifikációi

Fotométer

Több hullámhosszú, diffrakciós rácsos spektrofotométer

Fotometriás üzemmódok

Mono- vagy bikromatikus

Hullámhosszak

340–800 nm (13 lépés: 340, 380, 410, 450, 480, 520, 540, 570, 600, 660, 700, 750 és 800 nm)

Fotodetektor

Szilícium fotodiódasor

Fényforrás

Halogénlámpa: 12 V/20 W

Mérhető abszorbanciatartomány

0–3,0 Abs (10 mm-es optikai úthossz egységekre átváltva)

Fotometriás felbontás

0,0001 Abs

Reakciócella

Négyszögletű üvegküvetta

- Fényút hossza: 6 mm (Japán kivételével minden országban)

Fotometriás pontok

28

Mérés típusa

- Végpontos vizsgálat
- Sebességi vizsgálat
- Rögzített pontos vizsgálat
- Elektróda módszer (ISE) (opcionális)

Reakció-hőmérséklet

Száraz inkubálókamra: 37 ± 0,3 °C (98,6 ± 0,5 °F)

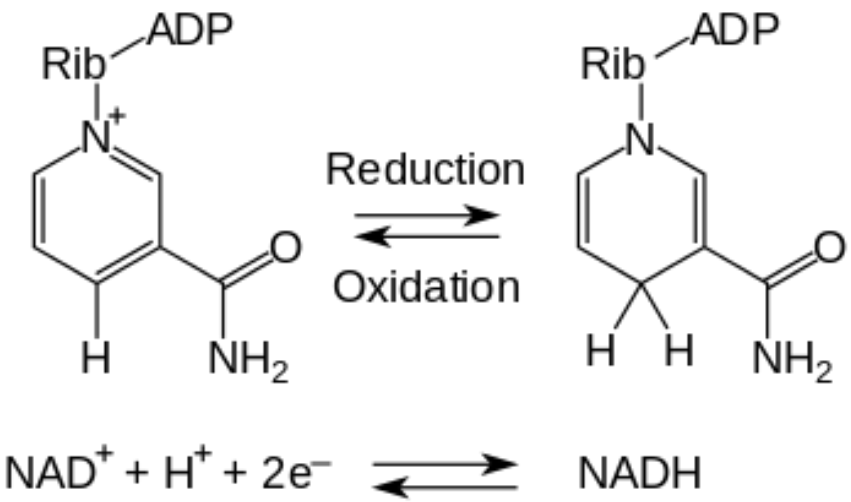
A reakcióoldat mennyisége

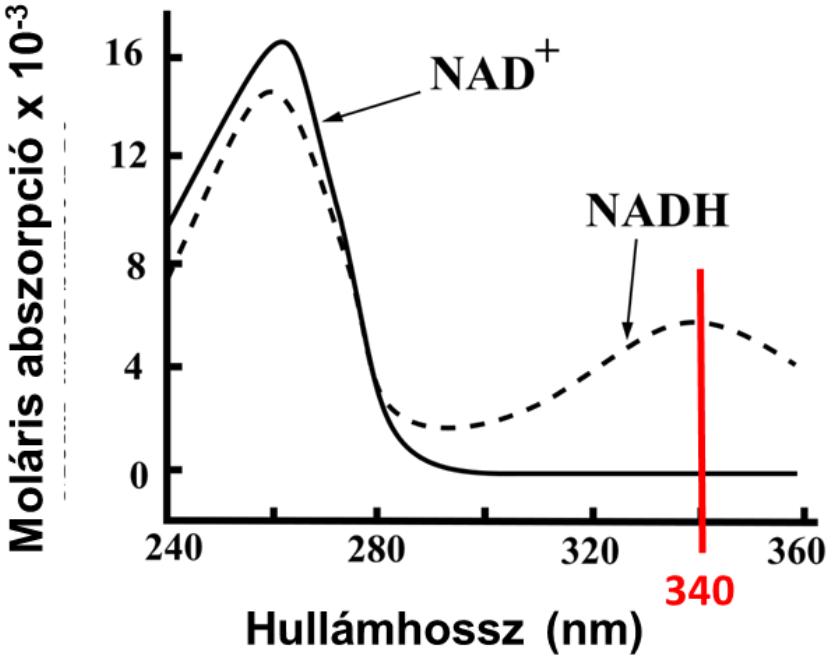
- 120–420 µL (Japán kivételével minden országban)

Analitikai módszerek – Spektrofotometria példák

NAD^+ – NADH átalakulás és ezekre visszavezethető mérések:

- Glükóz (HK-módszer)
- Kreatin-kináz
- AST (GOT)
- ALT (GPT)
- Karbamid

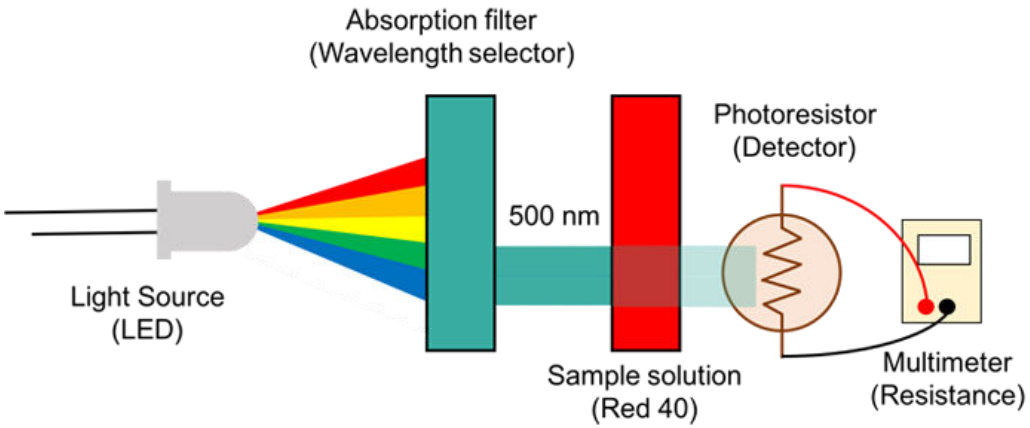


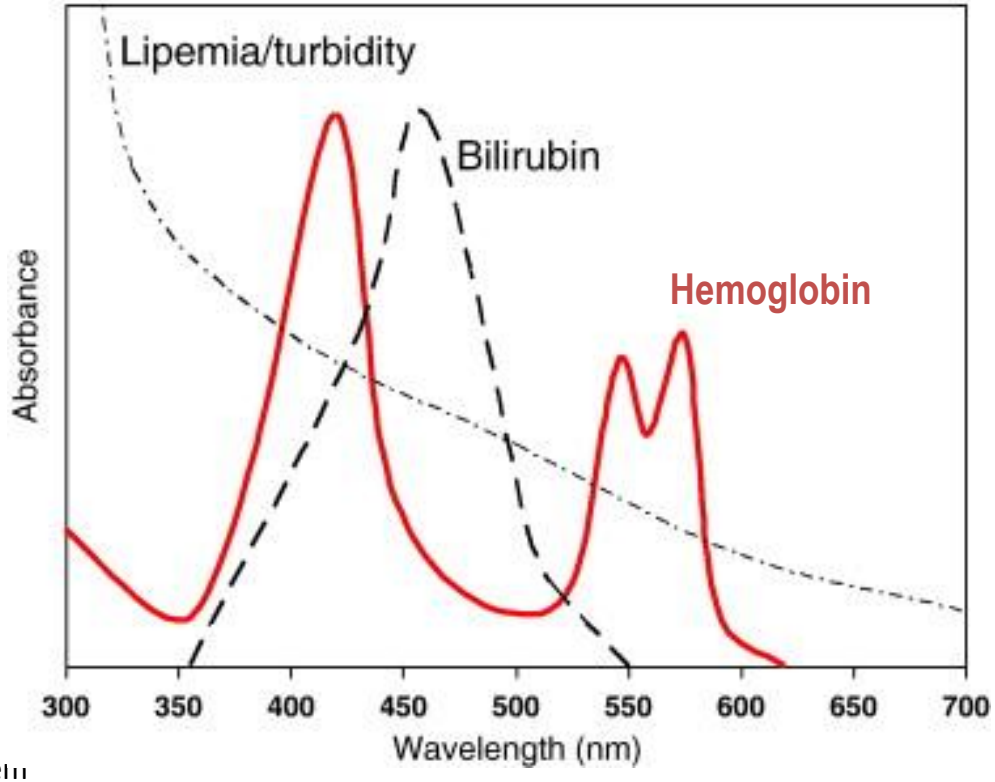


Analitikai módszerek – Spektrofotometria

Zavaró tényezők

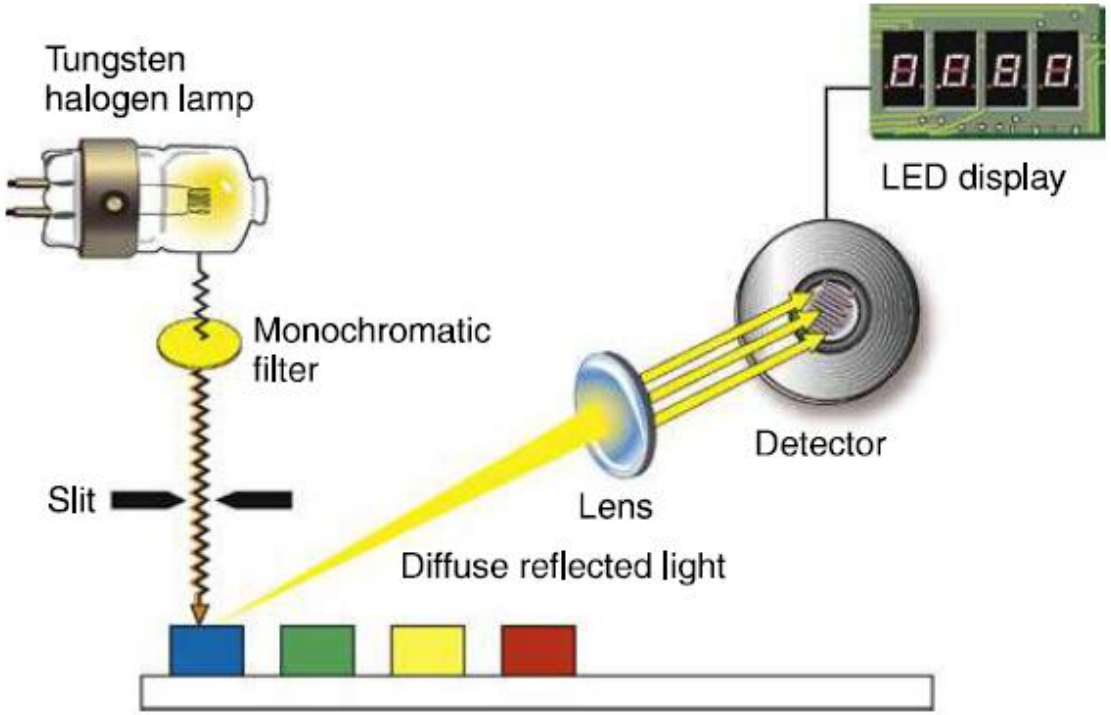
- **Hemolizált** mintában:
  - Eritrocitákból felszabaduló egyéb komponensek (pl. LDH, AST, K^+...)
  - Felszabaduló hem és vasion reakciói
  - Spektrális átfedés
- **Icterusos** mintában:
  - Peroxidázos reakciók (H_2O_2-dal reakcióba lép)
  - Spektrális átfedés
- **Lipémiás** mintában:
  - Fényszórás





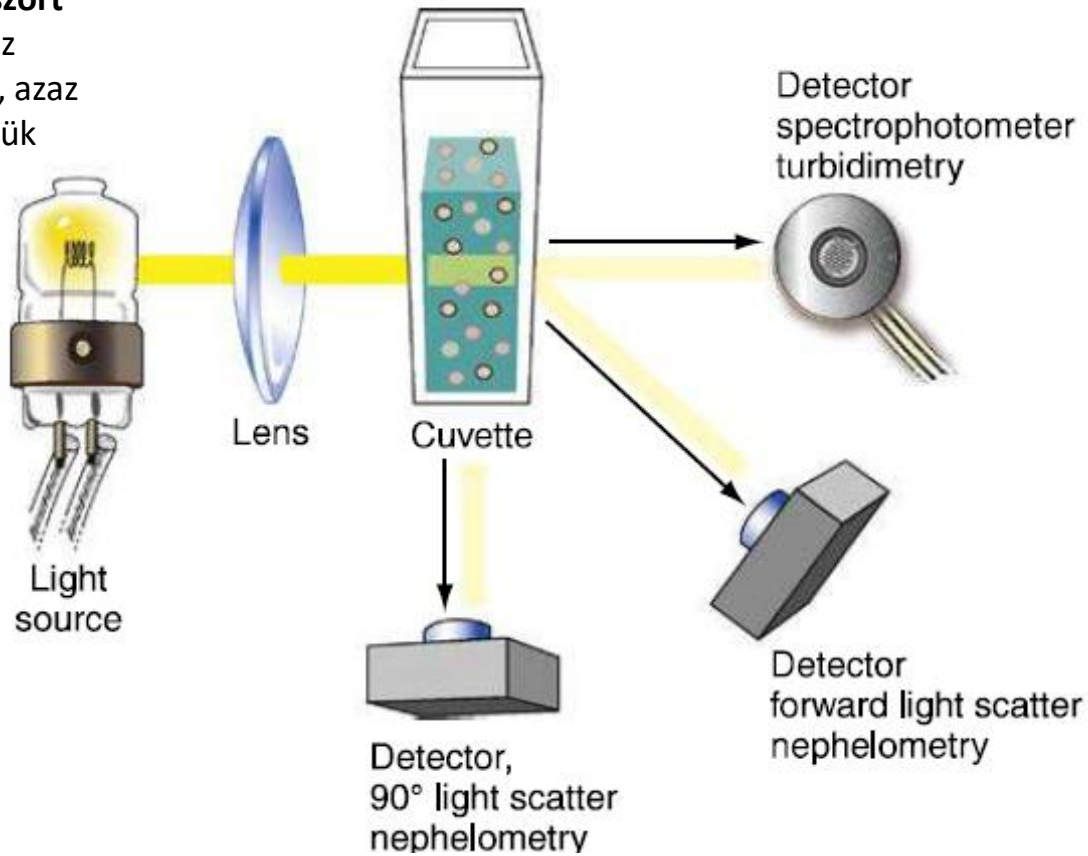
Analitikai módszerek – Reflexiós spektrofotometria

- Szárazreagens technika
- A folyadékminta + szilárd fázisban lévő reagensek → színes termék
- Megvilágítás monokromatikus fénnyel → a szilárd fázisról visszaverődött fény intenzitását mérjük
- **A beeső és visszavert fény intenzitásából számítható reflektancia fordítottan arányos a mért komponens koncentrációjával**
- Felhasználási területek (példák):
  - **Vizeletkémiai analizátorok**
  - POCT vércukorszintmérő (GOD-POD)
  - Lab-on-a-chip fejlesztések
  - Neminvazív szöveti vizsgálómódszerek



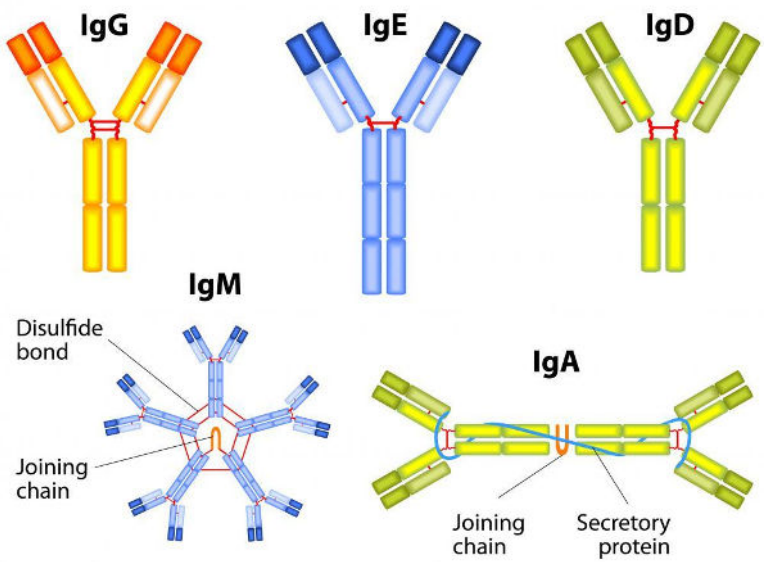
Analitikai módszerek – Turbidimetria, nefelometria

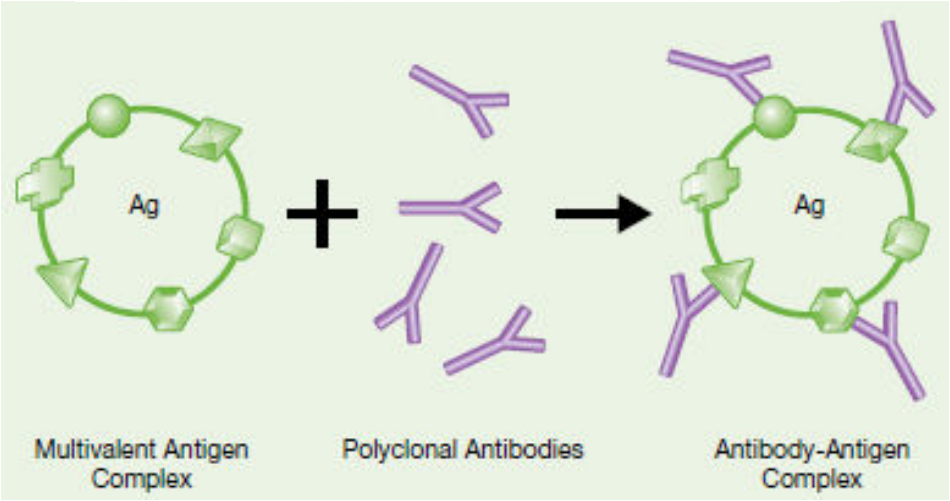
- A **turbidimetria** és a **nefelometria** a kolloid oldatok (részecsketartomány: 1 nm – 500 nm) **fényszóródásának** mérésén alapuló optikai analitikai módszer
- Ha kolloid oldatra vagy diszperzióra fénysugarat (I_0) irányítunk, akkor a fény egy része elnyelődik, a másik része szóródik, míg a maradék (I) változatlanul halad tovább
- A **nefelometriás** mérések során az oldat által **szórt fény intenzitását**, a **turbidimetriás** mérésnél az oldaton **áthaladó fény intenzitás csökkenését**, azaz látszólagos abszorbanciáját (turbiditását) mérjük



Analitikai módszerek – Antigének és antitestek

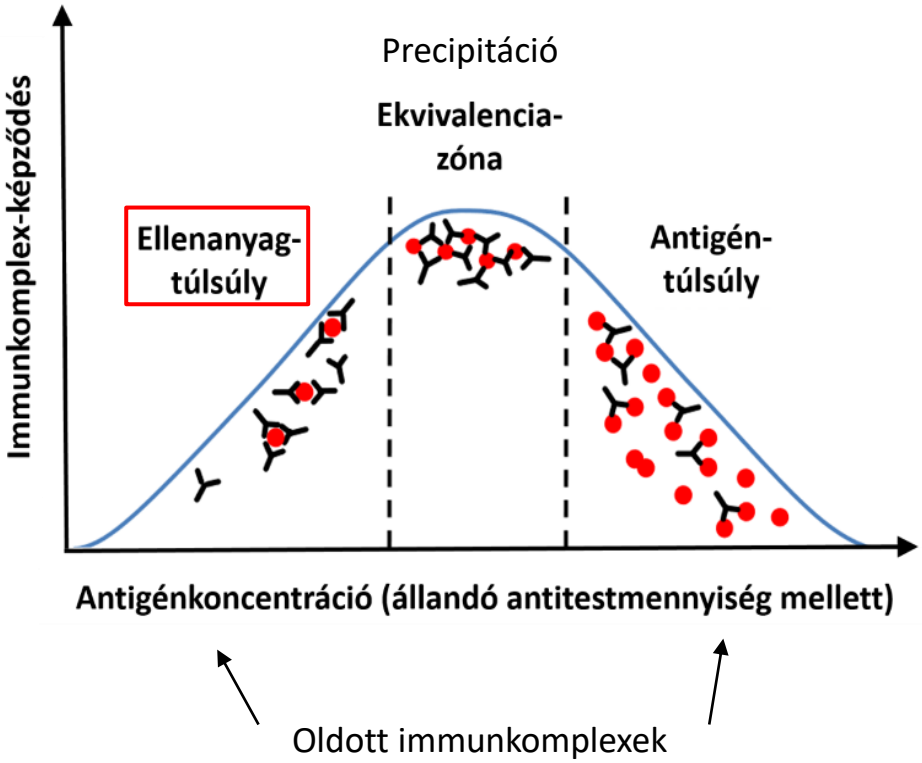
Antigén: az az anyag (testidegen), ami egy adott szervezetben immunreakciót vált ki
Antitest: antigén adott epitópja (antigéndetermináns) ellen termelődő immunglobulin (Ig, immunfehérje)





Heidelberger–Kendall-görbe

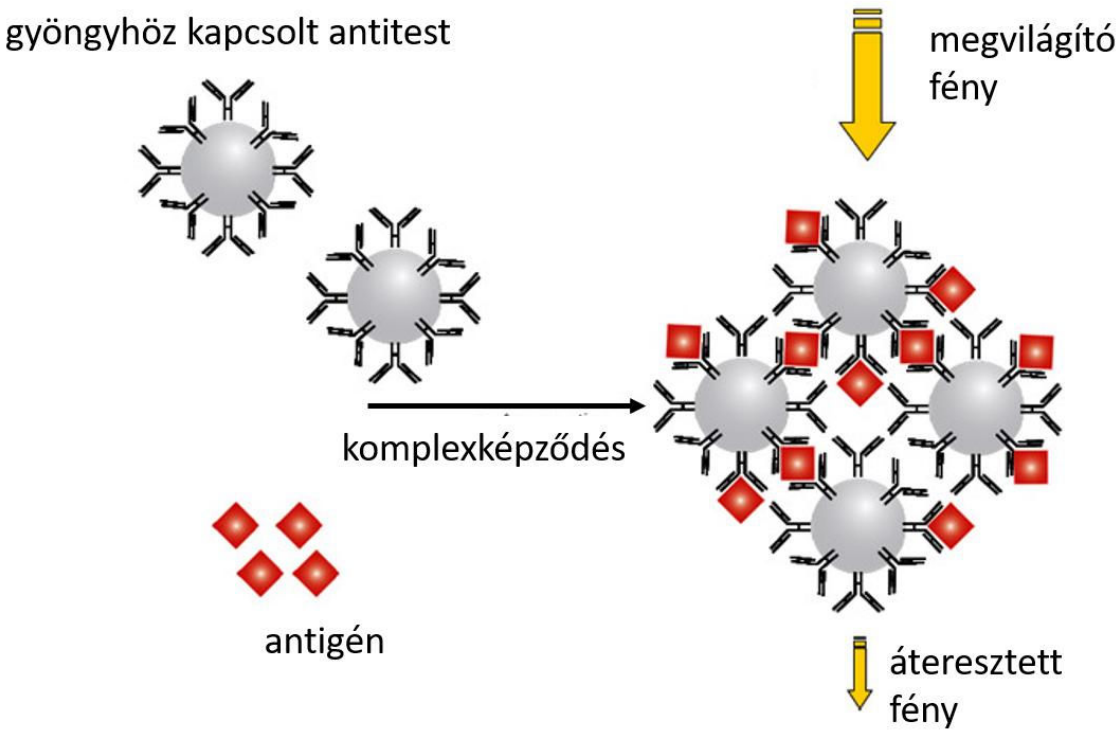
$$[Ag] + [At] \rightleftharpoons [AgAt]$$



Analitikai módszerek – Turbidimetria, nefelometria

Jelerősítés (nefelometria, immunturbidimetria)

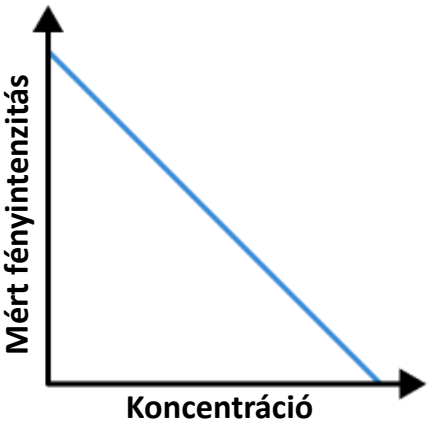
- Mindkét módszer érzékenysége fokozható **latex gyöngyökhöz kötött antitestek** használatával
- Mérési tartományuk/érzékenységük így átfedhet



Jelölőt nem alkalmazó módszer	*Kimutathatósági határ (tömeg/térfogat koncentráció)*
immunprecipitáció	> 0,1 g/l
immunturbidimetria	> 0,05–5 mg/l
immunnefelometria	> 0,01 mg/l

Analitikai módszerek – Turbidimetria

- **Zavarosság (turbiditás) mérés**
- Megvilágítás monokromatikus fénynyalábbal
- **Az áthaladó fény intenzitása csökken, mert a fény egy része a kolloid részecskékbe ütközve irányt változtat (szóródik)**
- **180°-os szögben detektáljuk az áteresztett fényt**
- **Fényintenzitás gyengülését mérjük**

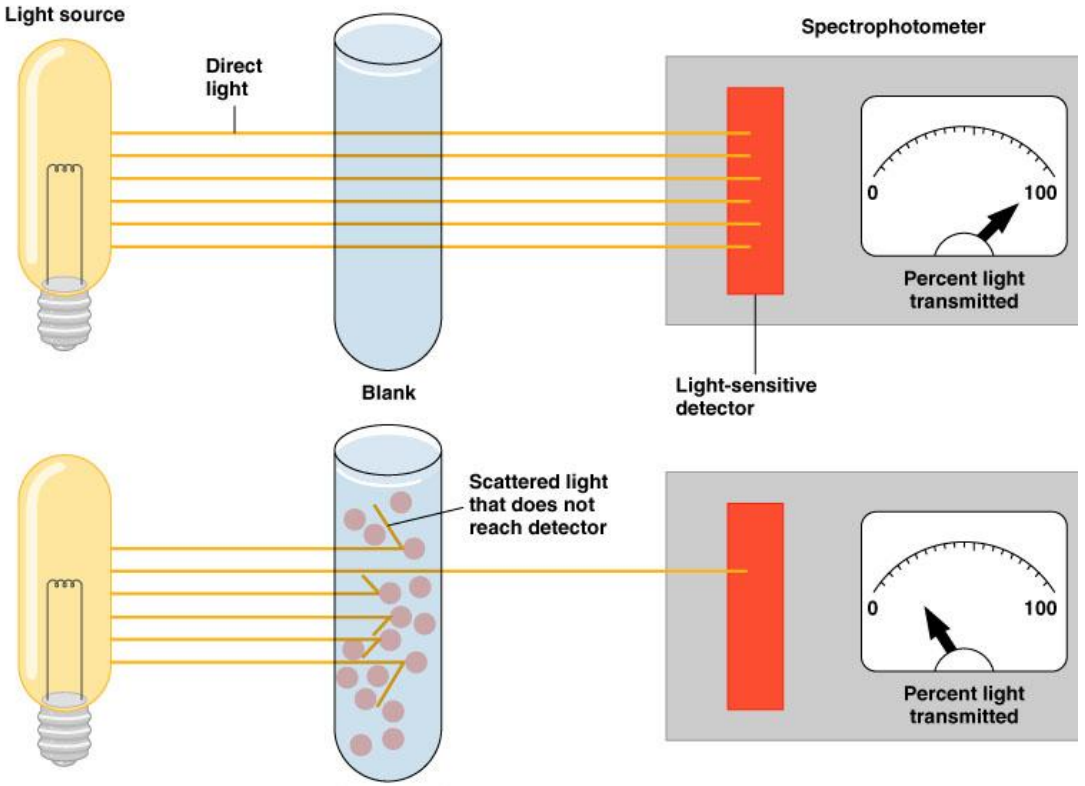


Felhasználás:

- **Immunturbidimetria** (340 nm)
  - Oldott immunkomplexek mérése (ld. később)
  - **Szérumfehérjék koncentrációjának mérése** (C-reaktív protein, IgA, IgG, IgM, transzferrin, prokalcitonin...)
  - Vizelet- és liquorfehérjék mérése

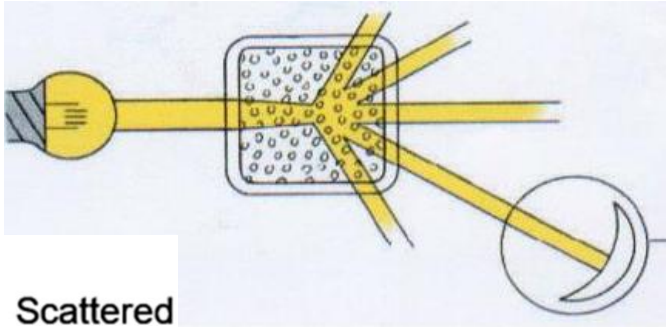
- Aggregométer (620-660 nm)
  - trombocita aggregáció mérése optikai alapon:
  - aktiváció hatására alakváltozás → jelcsökkenés
  - aggregáció → leülepedő aggregátum → jelnövekedés

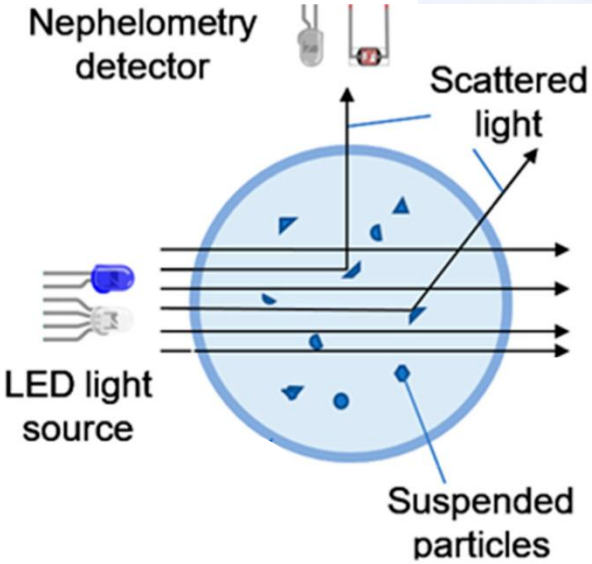
- Hemosztázismérések (optikai alapú koagulométereken)

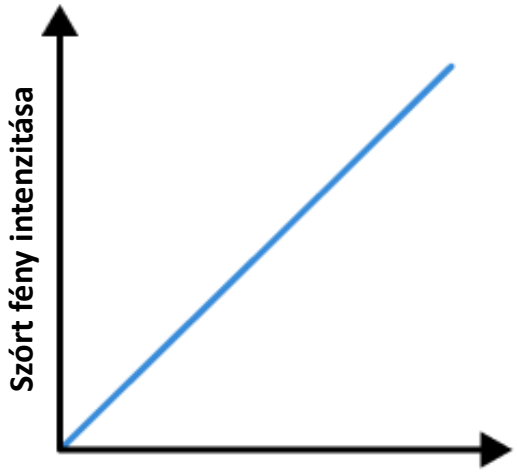


Analitikai módszerek – Nefelometria

- **Kolloid részecskéken szóródó fény intenzitását mérjük**
- Kis koncentrációk tartományában a szórt fény intenzitása a koncentráció lineáris függvénye
- Megvilágítás monokromatikus fénynyalábbal
- **A részecskék által szórt fényt tipikusan a küvettából kijövő fényre 15–90°-os szögben detektáljuk.**
- A megvilágító lézerfény általában kisteljesítményű hélium-neon lézerből származik. A biológiai anyagok önmagukban ezen a hullámhosszon nem mutatnak elnyelődést.
- A nefelometria a turbidimetriánál jóval érzékenyebb módszer, mivel nem a fényszórással arányos fényintenzitás-csökkenés mérését, hanem magának a szórt fénynek a mérését jelenti
- Rutin diagnosztikában:
  - Szérum-, liquor- és vizeletfehérjék mérése (pl. szabad könnyűlánc, Ig alosztályok, IgE, prealbumin, CRP, fibrinogén)
  - Hemosztázis (VWF:GPIbB)



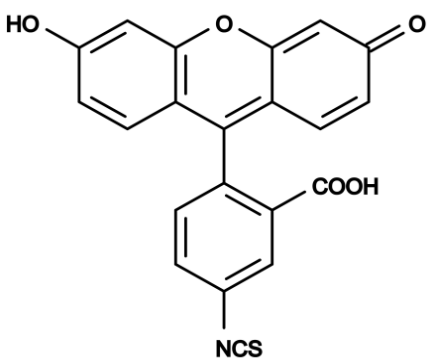


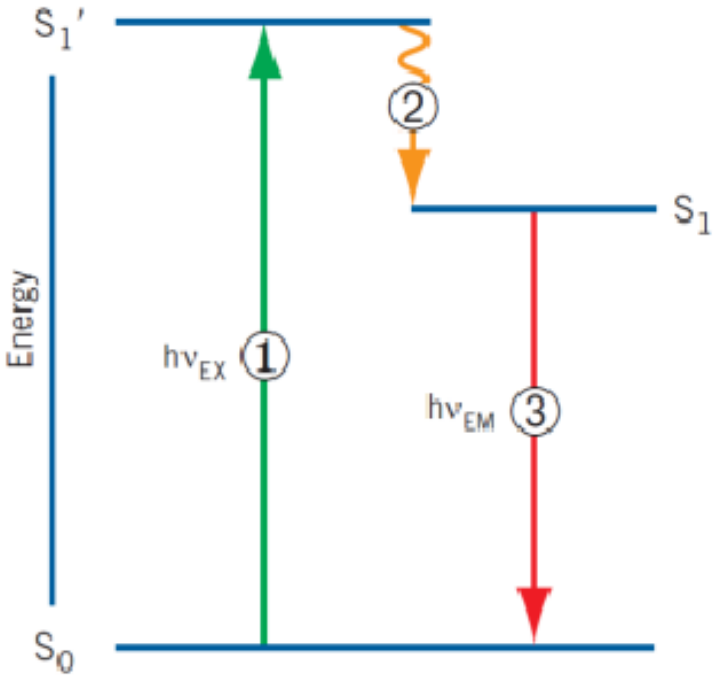


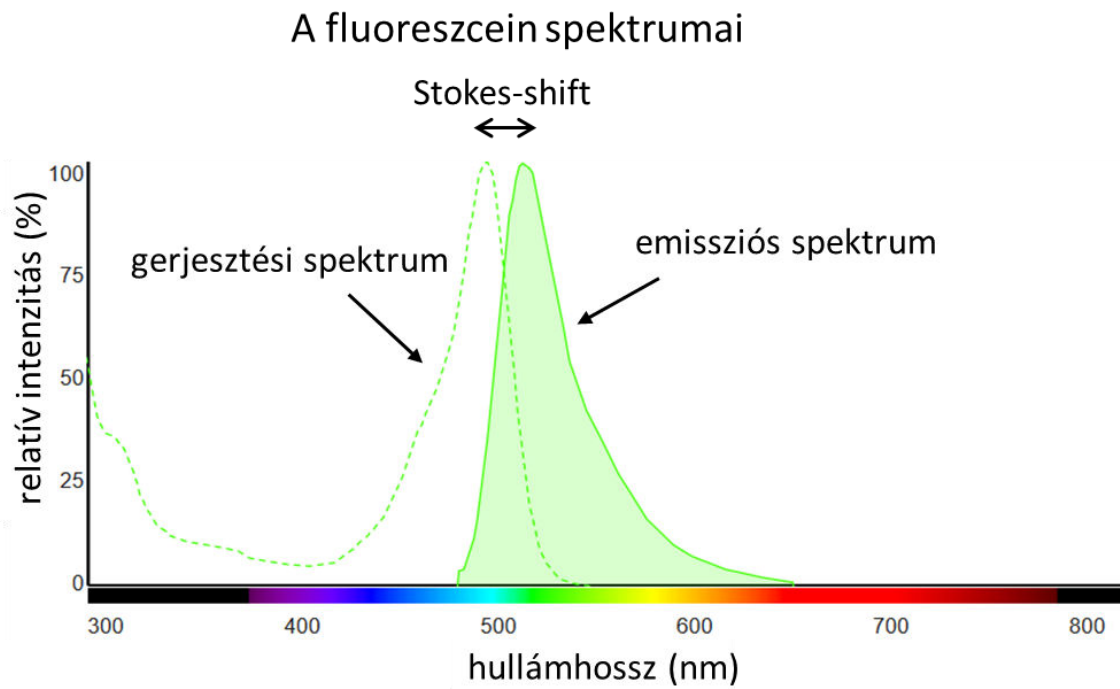
Fénymikroszkópok – Fluoreszcens anyagok

- **Fluorokróm molekulák** gerjeszthetők (gerjesztett állapot ps-os)
- **Delokalizált elektronrendszer** (sokszor heterociklusos, aromás vegyületek)
  - Endogén (pl. fehérjék [Tyr, Trp], NADH, szteroidok...)
  - Exogén (pl. fluoreszcein, rodamin, EtBr...)
- Amikor az elektron a gerjesztett állapotból az alacsonyabb energiájú alapállapotba ugrik, akkor fotont bocsáthat ki (ezt a foton kibocsátást nevezzük fluoreszcens emissziónak)
- **Gerjesztő fény** nagyobb energiájú (és kisebb hullámhosszú) mint az **emittált fény**
- Minden fluorokrómnak van egy **abszorpciós és egy emissziós maximuma**
- Ezeknek **min. 40 nm** különbség kell, hogy szűrőkkel elválaszthatók legyenek

FITC (Fluorescein-5-isothiocyanate)

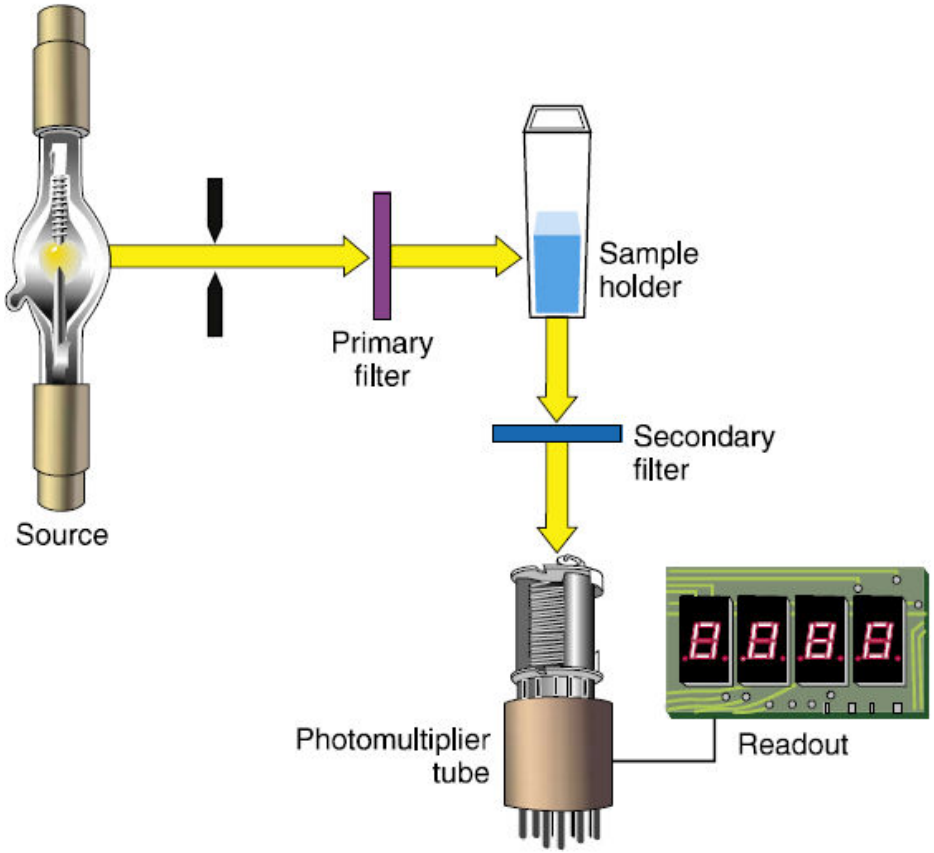






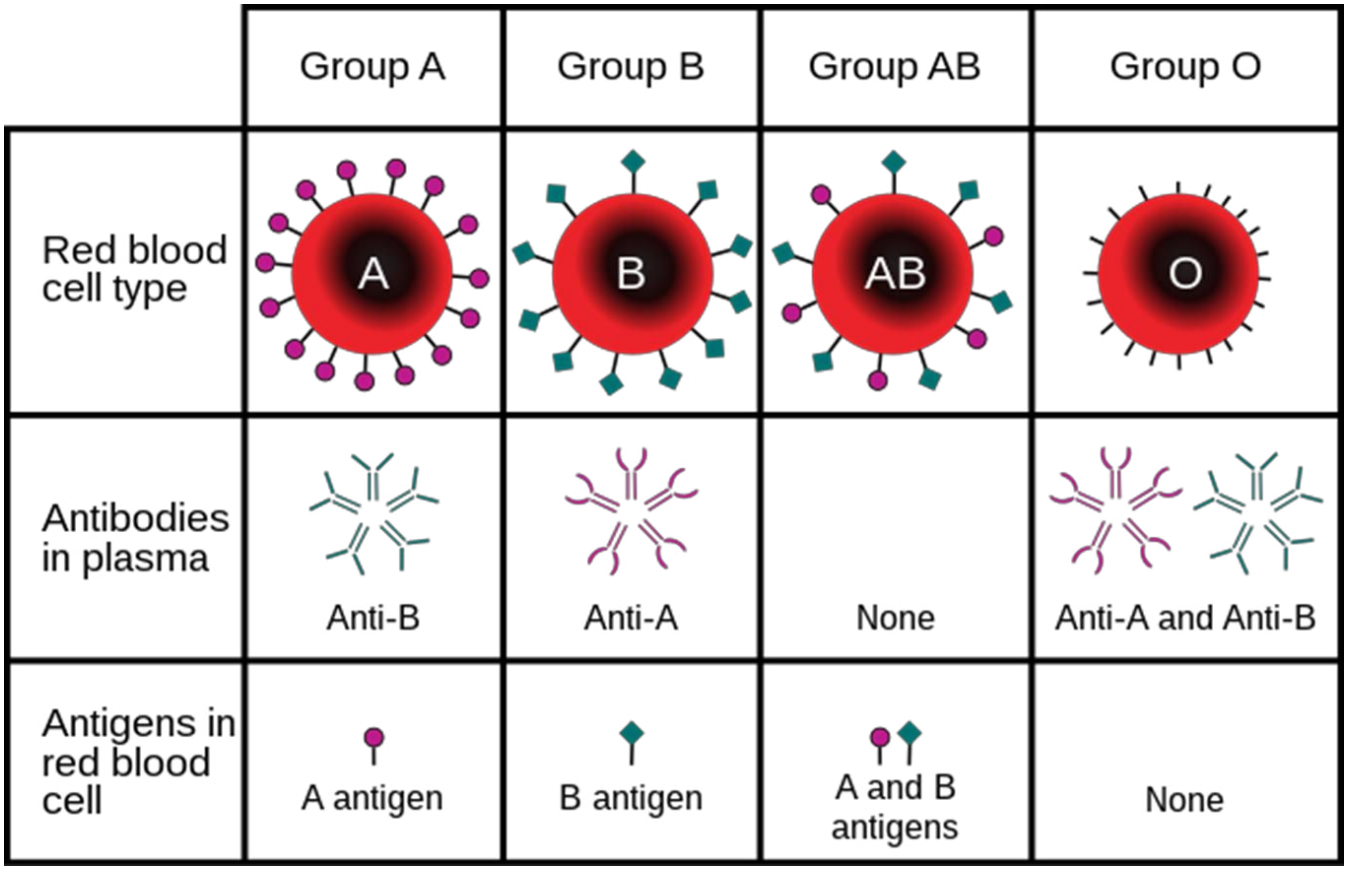
Analitikai módszerek – Fluorimetria

- **A fluorimetria a fluoreszcens molekulák fluoreszcenciájának kvantitatív vizsgálata**
- A biomolekulák jelentős része fluoreszcens, illetve fluoreszcens molekulákkal kémiai úton jelölhető, ezért a fluorimetria széles körben alkalmazható mind analitikai eljárásként mind különböző képalkotó eljárásokban
- Érzékeny (~pmol/l)
- Veszélytelen
- Mivel a gerjesztő fény hullámhossza különbözik a detektált (emittált) fényétől, ezért megfelelő körülmények alkalmazásával a gerjesztő fény jelentette mérési háttér minimálisra csökkenthető
- Változatos jelölési lehetőségek



LANDSTEINER-SZABÁLY

VÉRCSOPORT	ANTIGÉN A VÖRÖSVÉRTESTEKEN	REGULÁRIS ANTITEST SZÉRUMBAN VAGY PLAZMÁBAN	GENOTÍPUS
A	A	anti-B	AA vagy A0
B	B	anti-A	BB vagy B0
AB	A és B	Egyik sem	AB
0	Egyik sem	anti-A és anti-B	00



EGYOLDALAS VÉRCSOPORT-MEGHATÁROZÁS

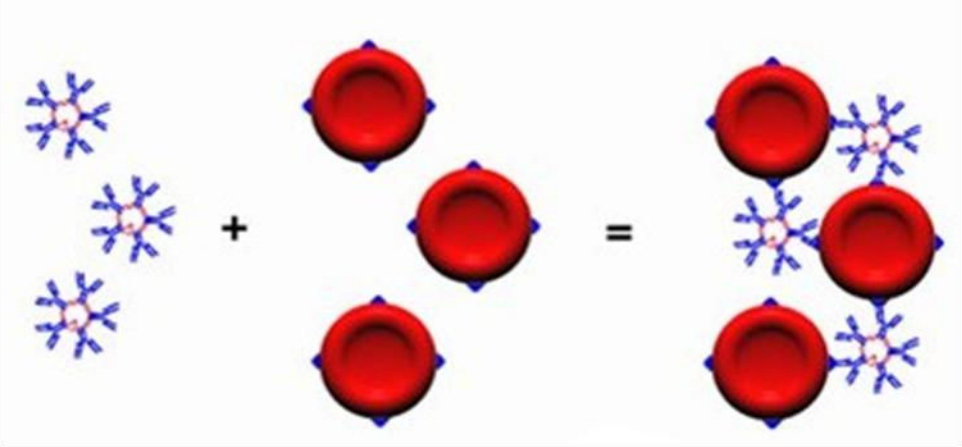
VIZSGÁLANDÓ VVT ÉS ANTI-A TESZTSAVÓ	VIZSGÁLANDÓ VVT ÉS ANTI-B TESZTSAVÓ	VIZSGÁLANDÓ VVT ÉS ANTI-AB TESZTSAVÓ	SAJÁT SAVÓS KONTROLL	ÉRTÉKELÉS, VÉRCSOPORT
–	–	–	–	0
+ + +	–	+ + +	–	A
–	+ + +	+ + +	–	B
+ + +	+ + +	+ + +	–	AB

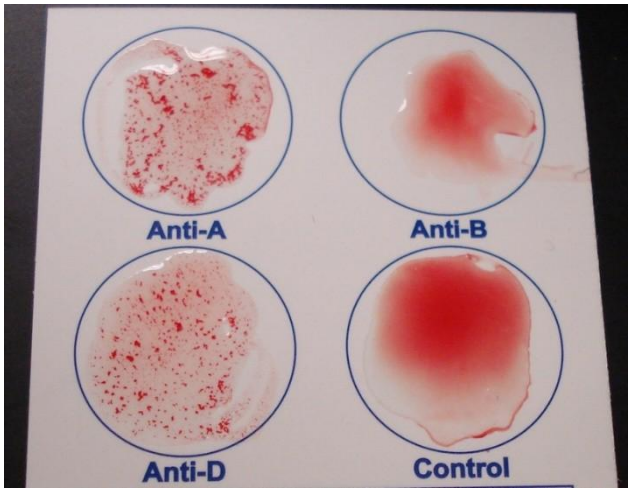
KÉTOLDALAS VÉRCSOPORT-MEGHATÁROZÁS

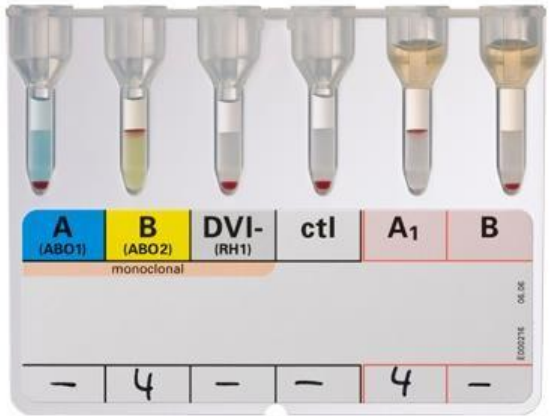
VÉRCSOPORT	TESZTSAVÓK ÉS VIZSGÁLANDÓ VÖRÖSVÉRTEST			TESZTSEJTEK ÉS VIZSGÁLANDÓ SZÉRUM			
	anti-A	anti-B	anti-AB	A1	A2	B	0
0	–	–	–	+ + +	+ + +	+ + +	–
A	+ + +	–	+ + +	–	–	+ + +	–
B	–	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	–	–
AB	+ + +	+ + +	+ + +	–	–	–	–

Agglutináció

- **Agglutináció:** ha az antitestek **nagyobb partikulumokat** (pl. sejteket, latex gyöngyöket) kötnek keresztbe, azok **összecsapzódnak** → szabad szemmel is látható
- **Hemagglutináció**: ha vörösvérsejtek csapzódnak össze
- Az agglutináció az **antitestek egyik élettani funkciója** is, a kórokozók agglutinációja hátráltatja a fertőzések terjedését
- Lehet **direkt** vagy **indirekt**, illetve **aktív** vagy **passzív**.
- Számos laboratóriumi teszt agglutináción alapul







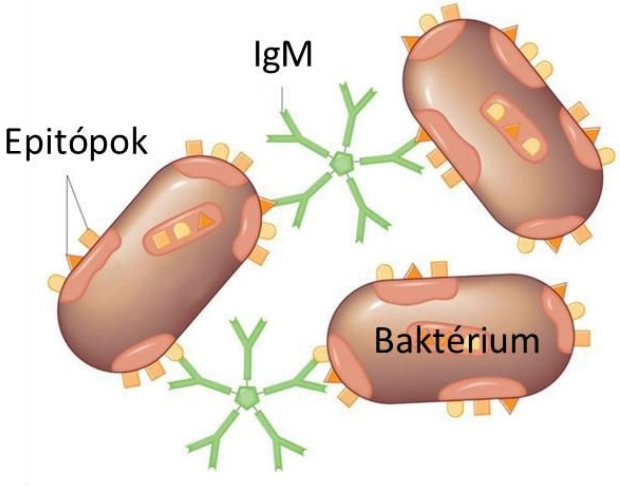
Agglutináció fajtái

Direkt agglutináció:

- Ugyanaz az antitest képes keresztbe kötni a partikulumokat
- **Az IgM izotípusú** antitestekre jellemző

Indirekt agglutináció:

- Egy másodlagos antitest köti keresztbe a részecskéket

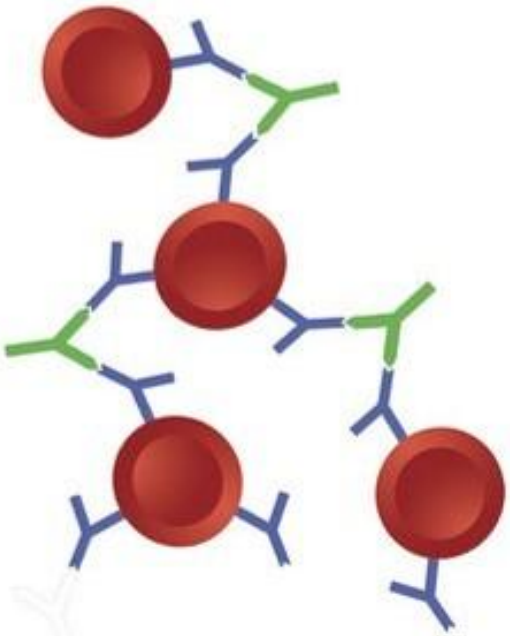


Aktív agglutináció:

- A sejt a saját, sejtfelszíni antigénjével vesz részt a reakcióban
- Példa:
  - Vércsoport meghatározás
  - Bakteriális sejtfelszíni kimutatása

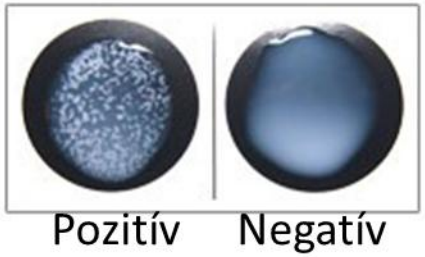
Passzív agglutináció:

- A reakcióban résztvevő hordozó részecskére mesterségesen van rákötve az antigén
- Példa:
  - Latex agglutinációs tesztek



Az agglutináció orvosi jelentősége

- Az antitestek egyik élettani funkciója, a kórokozók elleni védelem része
- Bizonyos kórállapotokban (pl. autoimmun haemolyticus anaemia) in vivo is létrejöhet hemagglutináció
- Diagnosztikai tesztek:
  - **Latex agglutinációs tesztek:**
    - **Autoimmun kórképek** (autoantitestek kimutatása: pl. Rheumatoid arthritis → rheumatoid faktor, SLE →különböző autoantitestek)
    - **Fertőzések** (kórokozó antigénjét vagy az ellene termelt antitestet mutatják ki: pl. anti-streptolizin O antitest, ASO/AST)
    - Egyéb fehérjék (pl. CRP, hCG, D-dimer) kimutatása
  - **Hemagglutinációs tesztek:**
    - **Vércsoport meghatározás**
    - **Coombs-teszt**
    - Hemagglutinációs assay
  - Hemagglutináció-gátláson alapuló vizsgálatok:
    - Vírus hemagglutininek azonosítása
    - Vírus hemagglutinineket neutralizáló antitestek tesztelése



Latex gyöngyök felszínére van kötve a reakcióban résztvevő antigén/antitest →ha a hozzáadott mintában jelen van a vizsgált antitest/antigén, akkor az a gyöngyök összecsapzódását idézi elő

Kromatográfiás módszerek csoportosítása - Immunkromatográfia

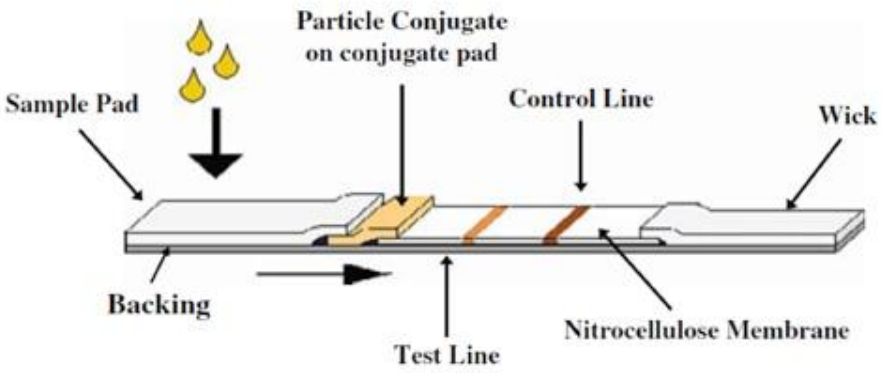
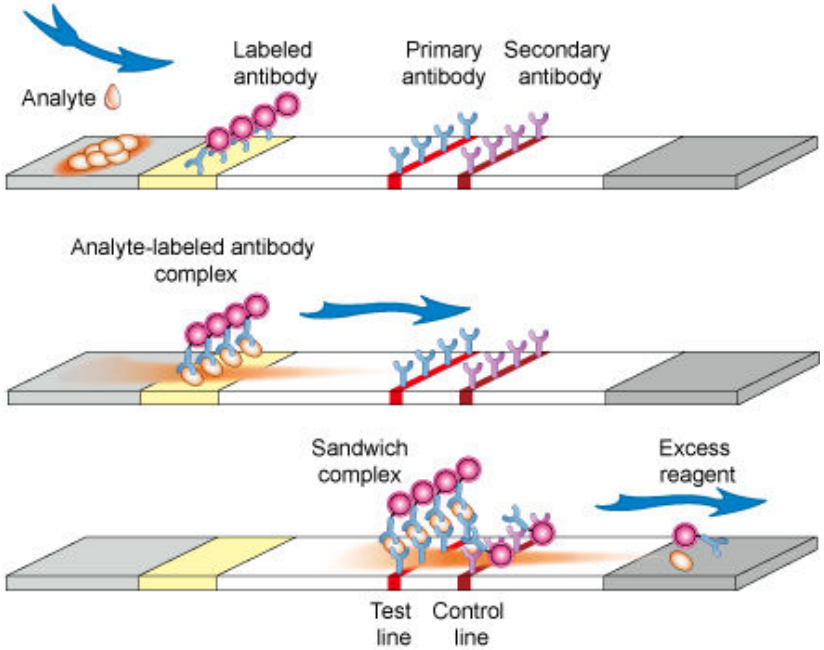
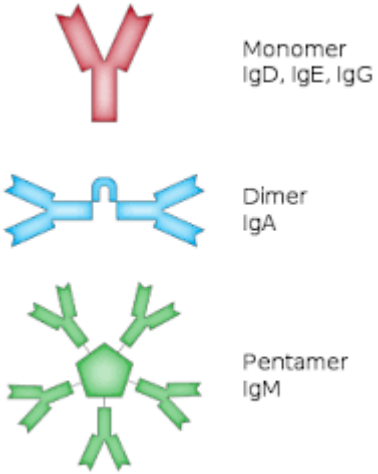
Immunkromatográfiás gyorsteszt technológia

- A mintát a gyorsteszt mintaablakába kell tenni
- Nitrocellulóz-membrán
- A minta a kapilláris jelenség hatására mozog
- A mintában lévő analit (antigén) a konjugátumhoz kötődik (jelölt antitest)
- A minta ezután áthalad egy vagy két teszt vonal (T) és egy kontroll vonal (C) területén is, amelyekre kétféle megkötő molekula van rögzítve:
    - A teszt vonal(ak)on lévő megkötő molekulákhoz csak a vizsgálati minta analitjai kötődhetnek. Ez a mérés specifikusságát garantálja.
    - A mintában lévő analit (antigén) mennyiségének függvényében a tesztvonal(ak) színének intenzitása lehet alacsonyabb vagy magasabb, ezáltal lehetővé téve az analit (antigén) mennyiségi meghatározását.
    - A kontroll vonal területén rögzített molekulák kötik meg az összes marker részecskét, ami áthalad rajtuk. Ez a vonal mutatja meg, hogy a tesztkazetta működik.

A LABORBAN ELÉRHETŐ GYORSTESZTEK:

1. Clostridium difficile gyorsteszt
2. RSV gyorsteszt
3. Influenza gyorsteszt
4. H.pylori Ag gyorsteszt
5. Legionella gyorsteszt
6. Streptococcus pneumoniae gyorsteszt
7. Rota-Adeno vírus gyorsteszt
8. Noro vírus gyorsteszt
9. Cryptococcus gyorsteszt
10. Cryptosporidium-Gradia lambia gyorsteszt
11. Cryptosporidium/Grardia/Entamoeba
12. Meningitis gyorsteszt
13. TBC gyorsteszt

Immunkromatográfás eljárás lényege



„Szendvics” immunkromatográfiás teszt