

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΑΝΟΙΚΤΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ»

**«ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ,
ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΗΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ»**

Τσακατάνη Πολυκαρπία Ραφαηλία

Επιβλέπων Καθηγητής: Σκορίλας Ανδρέας

1. Σκοπός της εργασίας

- Παρουσίαση των βασικών διαγνωστικών μεθόδων.
- Σύγκριση φασματομετρικών, ανοσοχημικών και μοριακών τεχνικών.
- Αξιολόγηση ακρίβειας, αξιοπιστίας, ευαισθησίας και ειδικότητας.
- Ανάλυση της διαδικασίας επικύρωσης.
- Ανάδειξη της σημασίας του ποιοτικού ελέγχου.
- Παρουσίαση των πλεονεκτημάτων και περιορισμών κάθε μεθόδου.



2. Εργαστηριακή Διάγνωση

Ρόλος

Η εργαστηριακή διάγνωση αποτελεί θεμελιώδη πυλώνα της σύγχρονης ιατρικής, καθώς συμβάλλει στην πρόληψη και την έγκαιρη ανίχνευση νοσημάτων, στην επιβεβαίωση της διάγνωσης, στην καθοδήγηση της θεραπευτικής αγωγής και στην παρακολούθηση της πορείας του ασθενούς. Παράλληλα, υποστηρίζει τη λήψη τεκμηριωμένων κλινικών αποφάσεων, καθώς εκτιμάται ότι το 60–70% αυτών βασίζεται σε εργαστηριακά αποτελέσματα.

Κατηγορίες Εργαστηριακών Εξετάσεων

- ☐ Κλινική Χημεία
- ☐ Αιματολογία
- ☐ Μικροβιολογία
- ☐ Ανοσολογία
- ☐ Ανοσοαιματολογία
- ☐ Ιστοπαθολογία & Κυτταρολογία
- ☐ Μοριακή Βιολογία
- ☐ Τοξικολογία
- ☐ Δημόσια Υγεία & Περιβαλλοντικός Έλεγχος

Προαναλυτική Φάση

- Προετοιμασία ασθενούς
- Λήψη δείγματος
- Σήμανση και μεταφορά δείγματος

Αναλυτική Φάση

- Εκτέλεση της εξέτασης
- Χρήση αναλυτών και αντιδραστηρίων
- Ποιοτικός έλεγχος

Μετα- αναλυτική Φάση

- Ερμηνεία αποτελεσμάτων
- Έκδοση αναφοράς
- Αποστολή στον θεράποντα ιατρό



3. Επικύρωση και Αξιολόγηση

Επικύρωση

Επιβεβαιώνει ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για την προβλεπόμενη χρήση της.

Διασφαλίζει αξιόπιστα, ακριβή και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα.

Εφαρμόζεται πριν από την ένταξη μιας νέας μεθόδου στην εργαστηριακή πρακτική.

Αξιολόγηση

Εκτιμά την απόδοση της μεθόδου.

Βασίζεται σε συγκεκριμένες παραμέτρους ποιότητας.

Συμβάλλει στη διασφάλιση της αξιοπιστίας των εργαστηριακών αποτελεσμάτων.

Βασικές Παράμετροι Αξιολόγησης

- ✓ Ακρίβεια (Accuracy)
- ✓ Επαναληψιμότητα (Precision)
- ✓ Ευαισθησία (Sensitivity)
- ✓ Ειδικότητα (Specificity)
- ✓ Γραμμικότητα (Linearity)
- ✓ Όριο Ανίχνευσης (LOD)
- ✓ Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ)

4. Συστήματα διασφάλισης

Πρότυπα Ποιότητας

ISO 15189



- ✓ Διεθνές πρότυπο για τα ιατρικά εργαστήρια
- ✓ Διασφαλίζει ποιότητα και τεχνική επάρκεια
- ✓ Καλύπτει προαναλυτική, αναλυτική και μετααναλυτική φάση
- ✓ Ενισχύει τη αξιοπιστία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων

CLSI



- ✓ Διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες
- ✓ Τυποποιεί εργαστηριακές διαδικασίες
- ✓ Υποστηρίζει την επικύρωση και αξιολόγηση των μεθόδων
- ✓ Προάγει την κλινική αξιοπιστία των αποτελεσμάτων

Ποιοτικός Έλεγχος

ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ (IQC)



- ✓ Καθημερινός έλεγχος στο εργαστήριο
- ✓ Έλεγχος με δείγματα γνωστής τιμής
- ✓ Άμεση ανίχνευση αναλυτικών σφαλμάτων
- ✓ Διασφάλιση σταθερότητας των αποτελεσμάτων

ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΣ (EQA)



- ✓ Σύγκριση με άλλα εργαστήρια
- ✓ Αξιολόγηση της συνολικής απόδοσης
- ✓ Εντοπισμός συστηματικών αποκλίσεων
- ✓ Διασφάλιση συγκρισιμότητας των αποτελεσμάτων

5. Φασματομετρικές Μέθοδοι

Νόμος Beer-Lambert

Αρχή Λειτουργίας

Στηρίζονται στην **απορρόφηση** της ηλεκτρομαγνητικής **ακτινοβολίας** από την υπό εξέταση ουσία. Η απορρόφηση είναι **ανάλογη** της συγκέντρωσης της ουσίας και του μήκους της οπτικής διαδρομής.

Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας με την ύλη

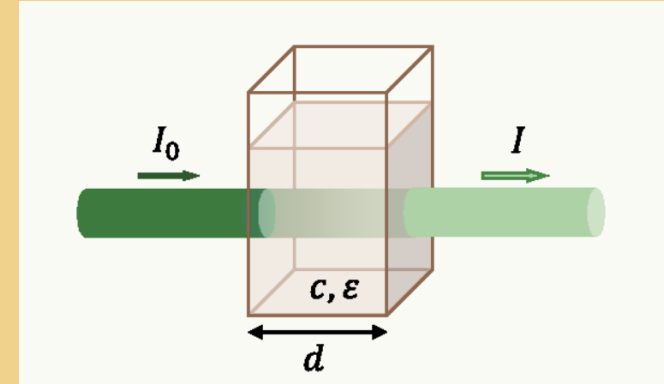
Η φασματομετρία βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη.

Η ακτινοβολία μπορεί να:

- Απορροφηθεί
- Εκπεμφθεί
- Σκεδαστεί

Οι μεταβάσεις πραγματοποιούνται μόνο όταν η ενέργεια του φωτονίου ισούται με τη διαφορά δύο ενεργειακών σταθμών.

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon(\lambda) d c$$



Σχέση Planck

$$E = h\nu$$



6. Φασματομετρία Απορρόφησης

UV-Vis Φασματοσκοπία	IR / FTIR Φασματοσκοπία
Αρχή Μεθόδου	
Απορρόφηση υπεριώδους και ορατής ακτινοβολίας.	Απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας.
Ηλεκτρονικές μεταπτώσεις των μορίων.	Δονήσεις των χημικών δεσμών (stretching, bending).
Ποσοτικός προσδιορισμός με βάση τον νόμο Beer-Lambert.	Ταυτοποίηση ουσιών μέσω του μοναδικού «μοριακού αποτυπώματος».
Ποιοτικός Έλεγχος	
Blank και βαθμονόμηση μήκους κύματος.	Βαθμονόμηση κυματαριθμών (wavenumber).
Πρότυπα αναφοράς και έλεγχος γραμμικότητας.	Πρότυπα αναφοράς και background spectrum.
Έλεγχος επαναληψιμότητας και σταθερότητας οργάνου.	Έλεγχος Αναπαραγωγιμότητα και συντήρηση εξοπλισμού.

7. Φασματομετρία Εκπομπής

Ατομική Φασματοσκοπία Εκπομπής (AES)

Αρχή Μεθόδου

Διέγερση ατόμων με φλόγα ή πλάσμα.
Εκπομπή χαρακτηριστικής ακτινοβολίας.
Η ένταση της εκπομπής είναι ανάλογη της συγκέντρωσης.

Ποιοτικός Έλεγχος

Βαθμονόμηση με πρότυπα.
Δείγματα QC.
Έλεγχος σταθερότητας πηγής και φασματικών παρεμβολών.

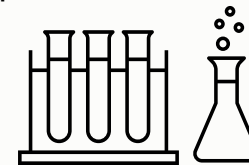
Φθορισμομετρία

Αρχή Μεθόδου

Απορρόφηση φωτός.
Εκπομπή φωτός μεγαλύτερου μήκους κύματος (Stokes Shift).
Υψηλή ευαισθησία για χαμηλές συγκεντρώσεις.

Ποιοτικός Έλεγχος

Πρότυπα αναφοράς.
Έλεγχος πηγής και ανιχνευτή.
Έλεγχος γραμμικότητας και επαναληψιμότητας.



Φωσφορισμομετρία

Αρχή Μεθόδου

Διέγερση σε τριπλή κατάσταση (Triplet State).
Καθυστερημένη εκπομπή φωτός.
Μεγάλος χρόνος ζωής του σήματος.

Ποιοτικός Έλεγχος

Απομάκρυνση οξυγόνου.
Έλεγχος θερμοκρασίας.
Βαθμονόμηση και έλεγχος λόγου σήματος/θορύβου.

8. Φασματομετρία Σκέδασης

Raman Φασματοσκοπία	Rayleigh Σκέδαση
Αρχή Μεθόδου	
Βασίζεται στη μη ελαστική σκέδαση ακτινοβολίας laser.	Βασίζεται στην ελαστική σκέδαση της ακτινοβολίας.
Παρουσιάζει μεταβολή στην ενέργεια των φωτονίων (Raman shift).	Δεν μεταβάλλεται η ενέργεια ή το μήκος κύματος του φωτός.
Παρέχει πληροφορίες για τη χημική δομή και τους μοριακούς δεσμούς.	Χρησιμοποιείται για βαθμονόμηση και μελέτη της οπτικής εξασθένησης.
Ποιοτικός Έλεγχος	
Βαθμονόμηση Raman shift με πρότυπα (π.χ. πυρίτιο).	Έλεγχος σταθερότητας laser και οπτικού συστήματος.
Έλεγχος σταθερότητας laser και ανιχνευτή.	Έλεγχος θορύβου και σήματος υποβάθρου.
Έλεγχος επαναληψιμότητας και παρεμβολών (φθορισμός).	Έλεγχος θερμοκρασίας, πίεσης και θεωρητικού μοντέλου.

9. Ατομική Φασματομετρία



AAS

ICP-OES

ICP-MS

Αρχή Μεθόδου

1

Απορρόφηση ακτινοβολίας από ελεύθερα άτομα μετά από ατομοποίηση του δείγματος

2

Ποσοτικός προσδιορισμός μετάλλων και ιχνοστοιχείων

1

Διέγερση ατόμων σε πλάσμα αργού και μέτρηση της χαρακτηριστικής εκπομπής τους

2

Ταυτόχρονη πολυστοιχειακή ανάλυση με υψηλή ταχύτητα

1

Ιονισμός του δείγματος σε πλάσμα και διαχωρισμός των ιόντων με βάση τον λόγο μάζας/φορτίου (m/z)

2

Εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία για ανίχνευση ιχνοστοιχείων και ισοτόπων

Ποιοτικός Έλεγχος

1

Πρότυπα διαλύματα και blank

2

Έλεγχος βαθμονόμησης, γραμμικότητας και παρεμβολών

1

CRMs, εσωτερικά πρότυπα και καμπύλες βαθμονόμησης

2

Έλεγχος ανακτήσεων και σταθερότητας πλάσματος

1

Εσωτερικά πρότυπα και CRMs

2

Έλεγχος drift, matrix effects και ισοτοπικών παρεμβολών

10. Φασματομετρία Μάζας (MS)

1. Τεχνικές βασισμένες σε λέιζερ (*Laser-Based Ionization Methods*)

MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)	Ιονισμός με χρήση λέιζερ και μήτρας (matrix).
	Υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος μαζών.
	Κατάλληλη για πρωτεΐνες, πεπτίδια και βιομόρια.
MALDI-2	Βελτιωμένη μορφή της MALDI.
	Δεύτερο λέιζερ για μετα-ιονισμό.
	Σημαντικά αυξημένη ευαισθησία και ανίχνευση περισσότερων μορίων.
LA-ICP MSI	Αφαίρεση υλικού με λέιζερ και ιονισμός σε πλάσμα.
	Ιδανική για στοιχειακή ανάλυση και μέταλλα.
	Υψηλή δυναμική περιοχή μέτρησης.
LAESI / IR-MALDESI	Τεχνικές περιβάλλοντος (Ambient).
	Ελάχιστη προετοιμασία δείγματος.
	Κατάλληλες για δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό.

11. Φασματομετρία Μάζας (MS)

2. Τεχνικές βασισμένες σε σωματίδια (Particle-Based)

SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry)

Βομβαρδισμός της επιφάνειας με δέσμη ιόντων.

Παραγωγή δευτερογενών ιόντων.

Πολύ υψηλή χωρική ανάλυση (νανομετρική κλίμακα).

3. Τεχνικές Περιβάλλοντος (Ambient Ionization)

DESI & LAESI

Ανάλυση σε ατμοσφαιρική πίεση.

Ελάχιστη προετοιμασία δείγματος.

Δυνατότητα in situ ανάλυσης.

Μικρότερη χωρική ανάλυση σε σχέση με τη MALDI.

Ποιοτικός Έλεγχος

- ☐ Βαθμονόμηση m/z
- ☐ Εσωτερικά & εξωτερικά πρότυπα
- ☐ Έλεγχος επαναληψιμότητας
- ☐ Έλεγχος Ion Suppression
- ☐ Έλεγχος χωρικής ανάλυσης
- ☐ Έλεγχος ευαισθησίας

4. Τρόποι Απεικόνισης

Microprobe Mode

Σάρωση σημείο προς σημείο (pixel-by-pixel).

Υψηλή ευελιξία και ακρίβεια.

Ταυτόχρονη απεικόνιση μεγαλύτερης επιφάνειας.

Υψηλότερη ταχύτητα ανάλυσης.

12. Πυρηνικές Φασματοσκοπικές Τεχνικές

Γ-Φασματοσκοπία (Gamma Spectroscopy)

Αρχή Μεθόδου

Βασίζεται στην **ανίχνευση ακτίνων γ** που εκπέμπονται από ραδιενεργούς πυρήνες.

Κάθε ραδιοϊσότοπο εκπέμπει **χαρακτηριστικές ενέργειες**, δημιουργώντας μοναδικό ενεργειακό φάσμα.

Η **θέση των κορυφών** χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και η **έντασή τους** για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ραδιοϊσοτόπων.

Ποιοτικός Έλεγχος

- ☐ Βαθμονόμηση ενέργειας με πρότυπες ραδιενεργές πηγές.
- ☐ Έλεγχος απόδοσης και σταθερότητας του ανιχνευτή.
- ☐ Έλεγχος νεκρού χρόνου (dead time) και ποιότητας φάσματος.
- ☐ Επαναληψιμότητα και στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.



13. Πυρηνικές Φασματοσκοπικές Τεχνικές

Mössbauer Φασματοσκοπία

Αρχή Μεθόδου

Βασίζεται στη **συντονισμένη εκπομπή και απορρόφηση ακτίνων γ** χωρίς απώλεια ενέργειας λόγω ανάκρουσης.

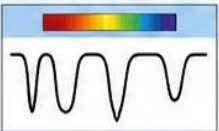
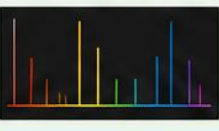
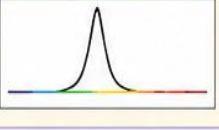
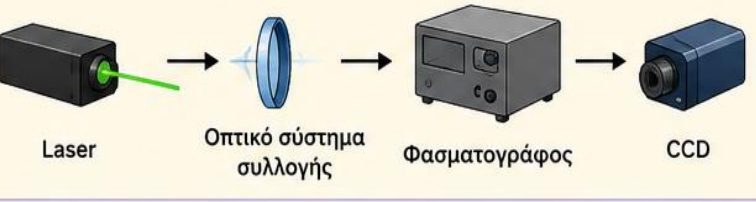
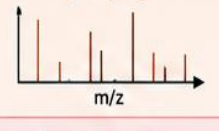
Η ενέργεια των πυρηνικών μεταπτώσεων επηρεάζεται από το **τοπικό χημικό και ηλεκτρονικό περιβάλλον**.

Η μεταβολή της ενέργειας επιτυγχάνεται μέσω του **φαινομένου Doppler**, επιτρέποντας την καταγραφή του φάσματος απορρόφησης.

Ποιοτικός Έλεγχος

- ☐ Βαθμονόμηση της κλίμακας ταχύτητας με πρότυπο **α -Fe**.
- ☐ Έλεγχος σταθερότητας της πηγής γ -ακτινοβολίας.
- ☐ Επαναληψιμότητα μετρήσεων και σύγκριση με πρότυπα φάσματα.
- ☐ Αξιολόγηση των residuals και της ακρίβειας του συστήματος Doppler.

14. Οργανολογία

Φασματοσκοπική τεχνική	Κύρια όργανα	Συμπληρωματικός εξοπλισμός
Φασματοσκοπία απορρόφησης 	 Πηγή φωτός (λαμπτήρες Hg, Xe) Μονοχρωμάτορας Ανιχνευτής (photomultiplier, CCD)	 Οπτικά φίλτρα Κυψελίδες δείγματος Σύστημα βαθμονόμησης
Φασματοσκοπία εκπομπής 	 Πηγή διέγερσης (φλόγα, ICP, τόξο) Μονοχρωμάτορας Ανιχνευτής PMT	 Σύστημα τροφοδοσίας αερίων Θάλαμος εκπομπής
Φασματοσκοπία σκέδασης 	 Laser Οπτικό σύστημα συλλογής Φασματογράφος CCD	 Οπτικά φίλτρα απόρριψης Rayleigh Σύστημα εστίασης
Ατομική φασματοσκοπία 	 Φούρνος γραφίτη ή ICP Λαμπτήρες κοιλότητας καθόδου (HCL) Ανιχνευτής	 Σύστημα ατομοποίησης Σύστημα αερίων Ar
Φασματομετρία μάζας 	 Ιοντική πηγή Αναλυτής μάζας (quadrupole/TOF) Ανιχνευτής ιόντων	 Σύστημα κενού Επιταχυντές ιόντων Υπολογιστικό σύστημα
Πυρηνική φασματοσκοπία 	 Ανιχνευτές HPGe ή NaI(Tl) Πολυκαναλικός αναλυτής (MCA) Πηγή γ-ακτινοβολίας (π.χ. ^{60}Co) Doppler drive Ανιχνευτής γ	 Σύστημα θωράκισης μολύβδου Βαθμονόμηση ενέργειας Σύστημα ελέγχου ταχύτητας Σύστημα ψύξης/σταθεροποίησης

15. Εφαρμογές και Επικύρωση

Εφαρμογές Φασματομετρικών Τεχνικών στη Διάγνωση

Πρώιμη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενειών.

Ποσοτικός προσδιορισμός βιοδεικτών, πρωτεϊνών, ενζύμων και μεταβολιτών.

Ανίχνευση ιχνοστοιχείων και βαρέων μετάλλων (AAS, ICP-MS).

Διάγνωση καρκίνου και άλλων παθήσεων μέσω Raman & Φασματομετρίας Μάζας.

Βιοϊατρική απεικόνιση και εξατομικευμένη ιατρική.

Πυρηνικές τεχνικές για ανίχνευση ραδιοϊσοτόπων και εξειδικευμένες διαγνωστικές εφαρμογές.

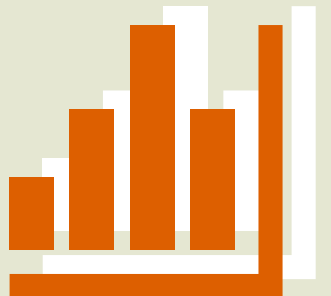
Επικύρωση Φασματομετρικών Μεθόδων



Διασφάλιση ότι η μέθοδος παρέχει **αξιόπιστα, ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα**.

Βασικές παράμετροι

- Γραμμικότητα (Linearity)
- Ακρίβεια (Accuracy)
- Επαναληψιμότητα & Αναπαραγωγιμότητα (Precision)
- Ειδικότητα / Εκλεκτικότητα (Specificity)
- Όριο Ανίχνευσης (LOD) & Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ)



16. Ανοσοχημικές τεχνικές

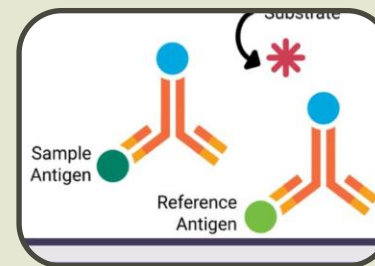
Βασικές αρχές αντίδρασης

- ❑ Ειδικότητα αντιγόνου–αντισώματος
- ❑ Υψηλή συγγένεια δέσμευσης
- ❑ Αναστρέψιμη σύνδεση (δυναμική ισορροπία)
- ❑ Επηρεάζεται από pH, θερμοκρασία και συγκεντρώσεις αντιγόνου/αντισώματος

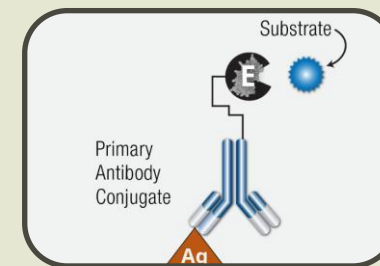
Συστήματα σήμανσης

- ❑ Φθορισμός (Fluorescence)
- ❑ Χημειοφωταύγεια (Chemiluminescence)
- ❑ Ραδιοσήμανση (Radioimmunoassay – RIA)
- ❑ Ενζυμική σήμανση (ELISA)

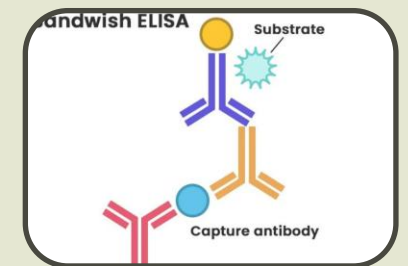
Τύποι ανοσοχημικών δοκιμασιών



Συναγωνιστικές
(Competitive)



Μη
συναγωνιστικές
(Non-
competitive)



Sandwich
ανοσοδοκιμασίες

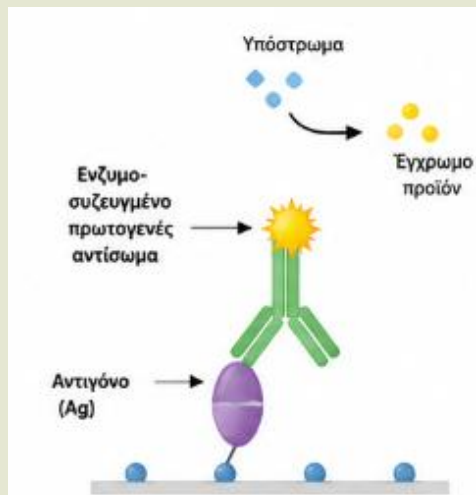
17. ELISA

Αρχή Μεθόδου

- Βασίζεται στην ειδική σύνδεση αντιγόνου–αντισώματος.
- Χρησιμοποιεί ένζυμο ως ιχνηθέτη (label).
- Με την προσθήκη υποστρώματος παράγεται χρωματομετρικό, φθορισμομετρικό ή χημειοφωταυγές σήμα.
- Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη.

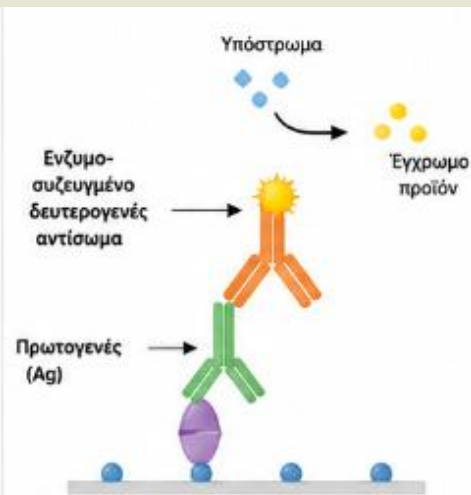
Direct ELISA

- Άμεση σύνδεση σημασμένου αντισώματος με το αντιγόνο



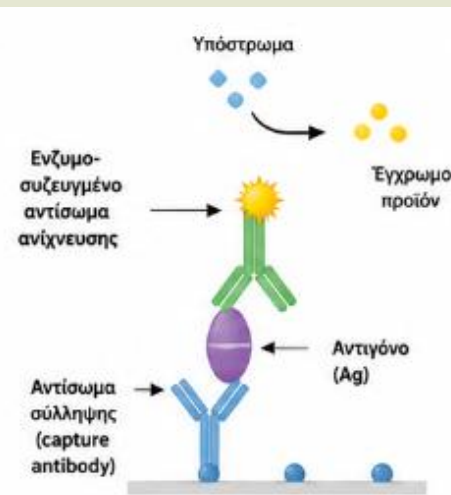
Indirect ELISA

- Ανίχνευση μέσω δευτερογενούς σημασμένου αντισώματος.



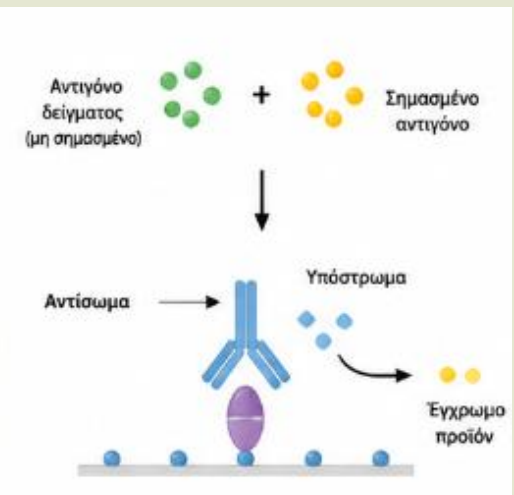
Sandwich ELISA

- Το αντιγόνο δεσμεύεται ανάμεσα σε δύο αντισώματα.



Competitive ELISA

- Ανταγωνισμός μεταξύ αντιγόνων – αντίστροφη σχέση σήματος και συγκέντρωσης.



18. ELISA

Ποιοτικός Έλεγχος

- Χρήση **θετικών και αρνητικών μαρτύρων**.
- Βαθμονόμηση με πρότυπα και καμπύλες αναφοράς.
- Έλεγχος αντιδραστηρίων και εξοπλισμού.
- Επαναληψιμότητα και αξιοπιστία αποτελεσμάτων.

Εφαρμογές

- Διάγνωση λοιμωδών νοσημάτων.
- Ανίχνευση αντισωμάτων και αντιγόνων.
- Προσδιορισμός ορμονών (π.χ. hCG).
- Μέτρηση καρκινικών δεικτών.
- Έρευνα και παρακολούθηση ανοσολογικής απόκρισης.



19. CLIA

Αρχή μεθόδου

- Βασίζεται στην ειδική αντίδραση αντιγόνου–αντισώματος.
- Χρησιμοποιεί χημειοφωταυγείς δείκτες (labels) που παράγουν φως μετά από χημική αντίδραση.
 - Η ένταση του εκπεμπόμενου φωτός είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη.
 - Ανίχνευση με φωτοπολλαπλασιαστή (PMT) ή άλλο ευαίσθητο ανιχνευτή.
 - Υψηλή ευαισθησία και πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης.

Ποιοτικός έλεγχος

- Χρήση δειγμάτων ελέγχου (QC) και πιστοποιημένων προτύπων.
 - Βαθμονόμηση και έλεγχος λόγου Signal/Cut-off (S/Co).
 - Παρακολούθηση CV (<15%), ακρίβειας και επαναληψιμότητας.
- Έλεγχος προαναλυτικών παραγόντων (αιμόλυση, λιπαιμία, αποθήκευση δείγματος).
 - Συμμετοχή σε εξωτερικά προγράμματα ποιοτικού ελέγχου (EQA).

Περιορισμοί – Παρεμβολές

- Ετεροφιλικά αντισώματα & ρευματοειδής παράγοντας.
- Hook (Prozone) effect σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις.
 - Matrix effects (αιμόλυση, λιπαιμία, ικτερία).
- Ανάγκη τακτικής βαθμονόμησης και ανανέωσης αντιδραστηρίων.

20. RIA

Αρχή Μεθόδου: Η RIA είναι συναγωνιστική ανοσοδοκιμασία, όπου το μη σημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζεται το ραδιοσημασμένο (^{125}I) για τη δέσμευση στο αντίσωμα. Η ραδιενέργεια μετράται με γ-μετρητή (Gamma Counter), το σήμα είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη και η ποσοτικοποίηση γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης.

Ποιοτικός έλεγχος

- ❑ Χρήση δειγμάτων ελέγχου (QC) και προτύπων αναφοράς.
- ❑ Έλεγχος καμπύλης βαθμονόμησης σε κάθε αναλυτική σειρά.
- ❑ Αξιολόγηση επαναληψιμότητας (Intra-/Inter-assay).
- ❑ Έλεγχος μη ειδικής δέσμευσης (Non-Specific Binding).
- ❑ Έλεγχος λειτουργίας του **Gamma Counter** και της σταθερότητας των ραδιοσημασμένων αντιδραστηρίων.

Πλεονεκτήματα

Πολύ υψηλή ευαισθησία.

Ανίχνευση εξαιρετικά χαμηλών συγκεντρώσεων (έως 10^{-12} M).

Υψηλή ακρίβεια στον προσδιορισμό ορμονών και βιοδεικτών.



Περιορισμοί

Χρήση ραδιενεργών υλικών.

Ανάγκη ειδικών εγκαταστάσεων και ακτινοπροστασίας.

Υψηλό κόστος και περιορισμένη αυτοματοποίηση.

21. RIA vs IRMA

RIA



Συναγωνιστική μέθοδος



Ραδιοσημασμένο αντιγόνο



Σήμα αντιστρόφως
ανάλογο της συγκέντρωσης



Ανταγωνισμός για θέσεις δέσμευσης

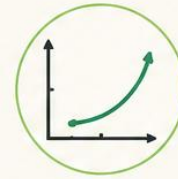
IRMA



Μη συναγωνιστική μέθοδος



Ραδιοσημασμένο αντίσωμα



Σήμα ευθέως
ανάλογο της συγκέντρωσης



Sandwich τεχνική (δύο αντισώματα)

22. FIA

Αρχή Μεθόδου

Χρησιμοποιεί **φθορίζοντες ιχνηθέτες (fluorophores)** συνδεδεμένους με αντιγόνα ή αντισώματα.

Με διέγερση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος εκπέμπεται φθορισμός.

Η ένταση του φθορισμού συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του αναλύτη.

Εφαρμόζεται κυρίως σε **Sandwich** και **Competitive** ανοσοδοκιμασίες.

Ποιοτικός Έλεγχος

- ✓ Δείγματα εσωτερικού ελέγχου (QC).
- ✓ Έλεγχος καμπύλης βαθμονόμησης.
- ✓ Αξιολόγηση επαναληψιμότητας και ακρίβειας.
- ✓ Έλεγχος αυτοφθορισμού και φωτοσταθερότητας.
- ✓ Έλεγχος του οπτικού συστήματος του αναλυτή.

Πλεονεκτήματα

Πολύ υψηλή ευαισθησία.

Χαμηλά όρια ανίχνευσης.

Δεν χρησιμοποιούνται ραδιενεργά υλικά.

Περιορισμοί

Φωτοαποδόμηση φθορίζοντων μορίων.

Παρεμβολές από αυτοφθορισμό.

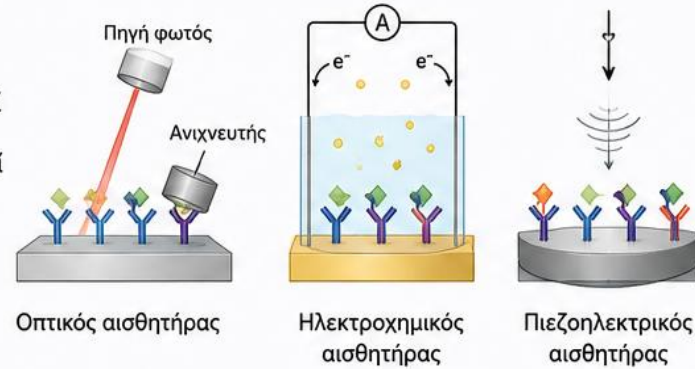
Ανάγκη εξειδικευμένου οπτικού εξοπλισμού.

23. Οργανολογία



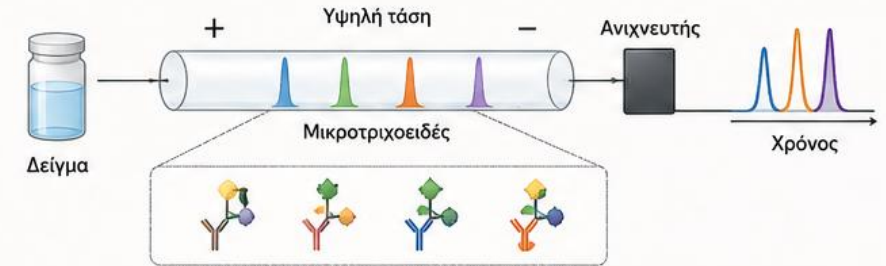
Ανοσοαισθητήρες

- Οπτικοί
- Ηλεκτροχημικοί
- Πιεζοηλεκτρικοί



Υβριδικά συστήματα

- CEIA (Capillary Electrophoresis Immunoassay)
- Υψηλή διαχωριστική ικανότητα.
- Χαμηλά όρια ανίχνευσης.



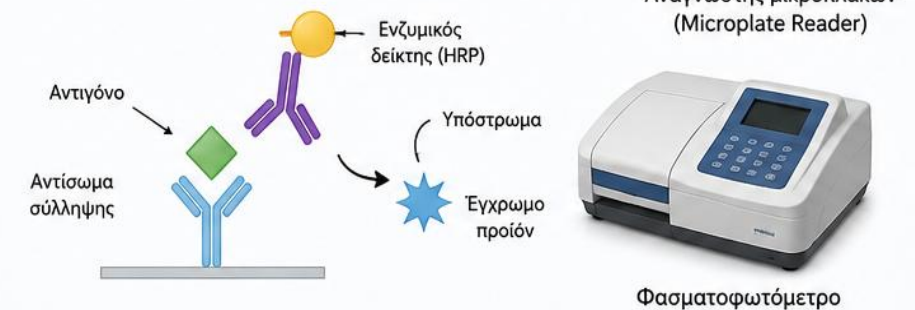
Αυτοματοποιημένες πλατφόρμες

- Συστήματα συνεχούς και έγχυσης ροής (Flow Injection).
- Ταχεία επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων.
- Αυξημένη ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα.



Οργανολογία ανοσοδοκιμασιών

- Σύνδεση αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος με σύστημα ανίχνευσης.
- Χρήση ενζυμικών δεικτών (π.χ. HRP).
- Ανίχνευση με φασματοφωτόμετρα και αναγνώστες μικροπιακών (Microplate Readers).



24. Κλινικές εφαρμογές

> Ογκολογία

Ανίχνευση καρκινικών δεικτών:

- **PSA**
- **CEA**
- **CA-125**

Διάγνωση και παρακολούθηση νεοπλασιών.

Αξιολόγηση θεραπευτικής ανταπόκρισης.

Έγκαιρη ανίχνευση υποτροπής.

> Λοιμώδη νοσήματα

Ανίχνευση **αντιγόνων** και **αντισωμάτων**.

Διάγνωση:

- HIV
- Ηπατίτιδες
- COVID-19
- Σύφιλη
- Φυματίωση

Παρακολούθηση ανοσολογικής απόκρισης.

Έλεγχος αποτελεσματικότητας εμβολιασμού.

25. Επικύρωση

Στόχος

- Διασφάλιση ακρίβειας, αξιοπιστίας και αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου.
- Επιβεβαίωση ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για κλινική χρήση.

Παράμετροι που αξιολογούνται

- Γραμμικότητα (Linearity)
- Ακρίβεια (Accuracy)
- Επαναληψιμότητα & Αναπαραγωγιμότητα (Precision)
- Ευαισθησία (LOD / LOQ)
- Ειδικότητα (Specificity)
- Ανθεκτικότητα (Robustness)

Πρότυπα ποιότητας

- ISO 15189
- ISO/IEC 17025

Κρίσιμοι Παράγοντες Επιτυχίας Ανοσοδοκιμασίας



1. Κρίσιμοι παράγοντες επιτυχίας ανοσοδοκιμασίας:

Ευαισθησία, Ρυθμός απόκρισης , Δυναμικό εύρος, Κόστος αντιδραστηρίων



2. Προμήθεια αντιδραστηρίων: Αντισώματα , Αναλύτης , Πρότυπα , Μήτρες δειγμάτων , Δείγματα ελέγχου .Ετικέτες , Υποστρώματα



3. Έλεγχος οργάνου

Βαθμονόμηση , Έλεγχος απόδοσης . Γραμμικότητα



4. Πειράματα «Απόδειξης Έννοιας» (Proof of Concept): Καθορισμός αρχικών παραμέτρων της δοκιμασίας , Αξιολόγηση καταλληλότητας αντιδραστηρίων Συμβατότητα μήτρας , Μοντέλα ανάλυσης σήματος/θορύβου

Συμβουλευτείτε ειδικό ανοσοδοκιμασιών



5. Βελτιστοποίηση δοκιμασίας: Επιλογή παραγόντων προς βελτιστοποίηση Καθορισμός επιδράσεων μήτρας , Κατασκευή προφίλ ακρίβειας , Συμβουλή με στατιστικό



6. Επικύρωση δοκιμασίας: Ανθεκτικότητα , Επιδράσεις ημέρας-με-ημέρα, Κλιμάκωση Αυτοματοποίηση, Επαναληψιμότητα, Επιδράσεις χειριστή, Ανάλυση ποσοστού ανάκτησης (%)

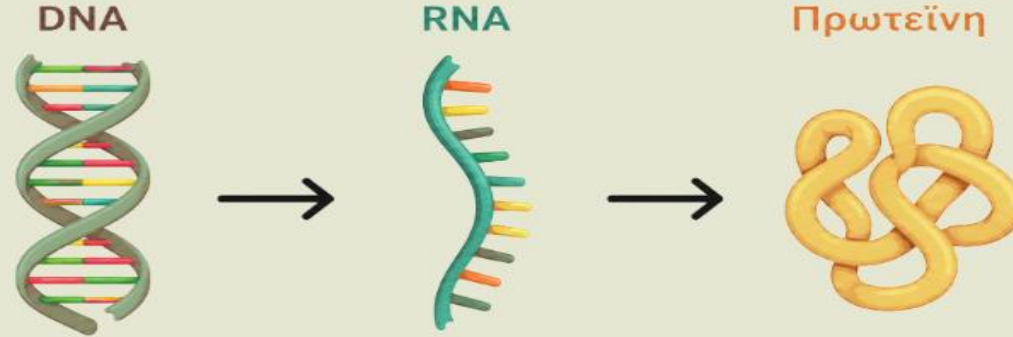


7. Τεκμηρίωση μεθόδου (SOP) και εφαρμογή

26. Μοριακές Μέθοδοι

Θεμελιώδης αρχή: Οι μοριακές μέθοδοι βασίζονται στην ανάλυση του **DNA** και του **RNA**, επιτρέποντας την ανίχνευση γενετικών μεταβολών και παθογόνων με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα.

Κεντρικό Δόγμα της Μοριακής Βιολογίας:



**Αντιγραφή
(Replication)**

Διπλασιασμός του DNA πριν από την κυτταρική διαίρεση.
Διατήρηση της γενετικής πληροφορίας.

**Μεταγραφή
(Transcription)**

Μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από το DNA στο mRNA.
Σύνθεση αγγελιοφόρου RNA.

**Μετα-
μεταγραφικές
τροποποιήσεις**

5' Cap
Poly-A Tail
Splicing (αφαίρεση ιντρονίων)

**Μετάφραση
(Translation)**

Το mRNA χρησιμοποιείται από τα ριβοσώματα για τη σύνθεση πρωτεϊνών.
Τα tRNA μεταφέρουν τα κατάλληλα αμινοξέα.

27. PCR

Αρχή της μεθόδου

- ❑ Ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA in vitro.
- ❑ Βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους θέρμανσης και ψύξης.
- ❑ Η Taq DNA πολυμεράση συνθέτει νέα αντίγραφα DNA.

Εκθετική αύξηση του προϊόντος:

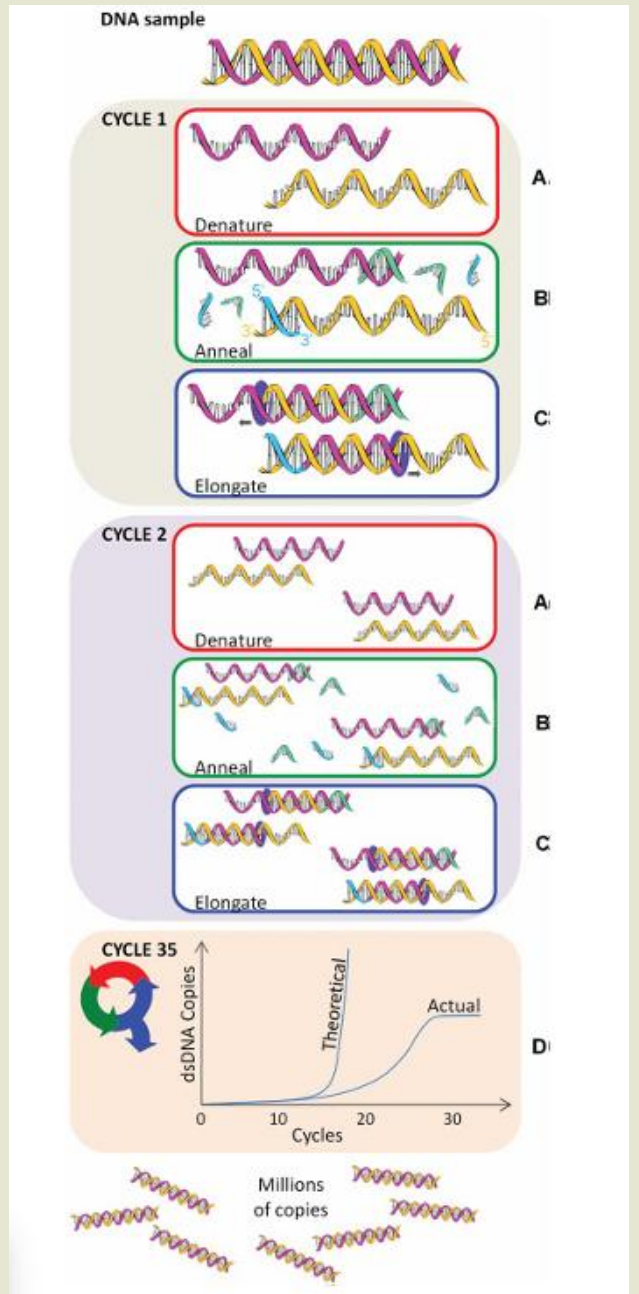
$$N = N_0 \times 2^n$$

Βασικά συστατικά

- Πρότυπο DNA (Template DNA)
- Εκκινητές (Forward & Reverse Primers)
- Taq DNA Polymerase
- dNTPs
- Buffer & Mg^{2+}

Χαρακτηριστικά

- Υψηλή ευαισθησία
- Υψηλή ειδικότητα
- Ταχεία ανίχνευση γενετικού υλικού
- Εφαρμογές στη διάγνωση λοιμώξεων, γενετικών νοσημάτων και καρκίνου



28. Τεχνικές DNA-RNA

- ✓ Η Taq DNA πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές προσθέτοντας συμπληρωματικά νουκλεοτίδια.
- ✓ Συντίθενται νέοι κλώνοι DNA προς την κατεύθυνση 5' → 3'.



- ✓ Το δίκλωνο DNA θερμαίνεται και διαχωρίζεται σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες.
- ✓ Διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων, δημιουργώντας πρότυπα για την επόμενη φάση.

Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι

Οι τρεις φάσεις επαναλαμβάνονται 25–35 φορές, ενώ κάθε κύκλος οδηγεί σε διπλασιασμό του DNA, με αποτέλεσμα την εκθετική ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου.

- ✓ Η θερμοκρασία μειώνεται ώστε οι εκκινητές (primers) να προσδεθούν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA.
- ✓ Η σωστή πρόσδεση των primers καθορίζει την ειδικότητα της ενίσχυσης.

29. Real-time PCR

Αρχή της μεθόδου

- ❑ Ταυτόχρονη ενίσχυση και ποσοτικοποίηση DNA ή RNA σε πραγματικό χρόνο.
- ❑ Η αύξηση του DNA παρακολουθείται μέσω φθορίζοντος σήματος σε κάθε κύκλο PCR.
- ❑ Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας του παραγόμενου DNA.

Βασικές αρχές

Εκθετική φάση: στάδιο όπου πραγματοποιείται αξιόπιστη ποσοτικοποίηση.

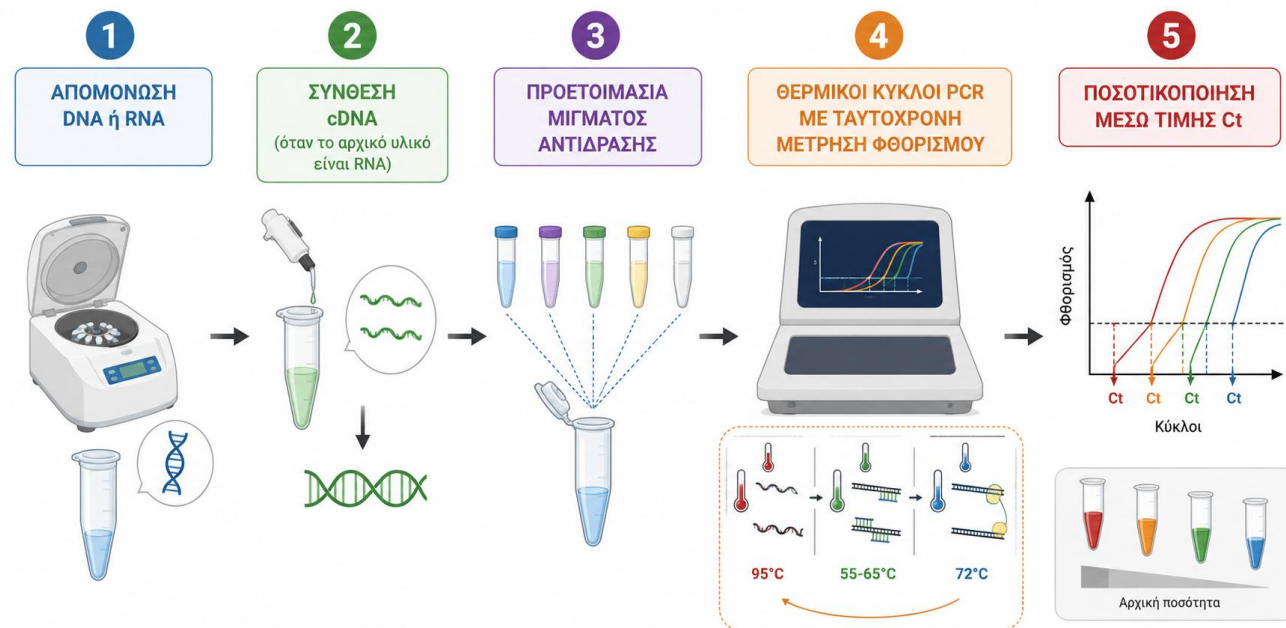
Ct (Cycle Threshold): κύκλος στον οποίο το φθορίζον σήμα υπερβαίνει το κατώφλι (threshold).

Χαμηλό Ct → υψηλή αρχική ποσότητα DNA

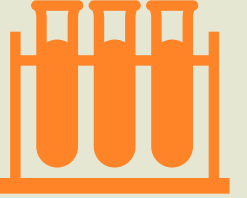
Υψηλό Ct → χαμηλή αρχική ποσότητα DNA

Πλεονεκτήματα

- ❑ Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα
- ❑ Ταχεία και αξιόπιστη ποσοτικοποίηση
- ❑ Ευρεία εφαρμογή στη διάγνωση λοιμώξεων, στην ογκολογία και στη μελέτη γονιδιακής έκφρασης.



30. Τεχνολογίες Αλληλούχισης DNA



Αλληλούχιση 1ης γενιάς - Sanger

- ☐ Αλληλουχεί ένα μόνο τμήμα DNA κάθε φορά.
- ☐ Πολύ υψηλή ακρίβεια.
- ☐ Χαμηλή απόδοση.
- ☐ Χρησιμοποιείται για επιβεβαίωση μεταλλάξεων και μικρών γονιδίων.

Ποιοτικός Έλεγχος



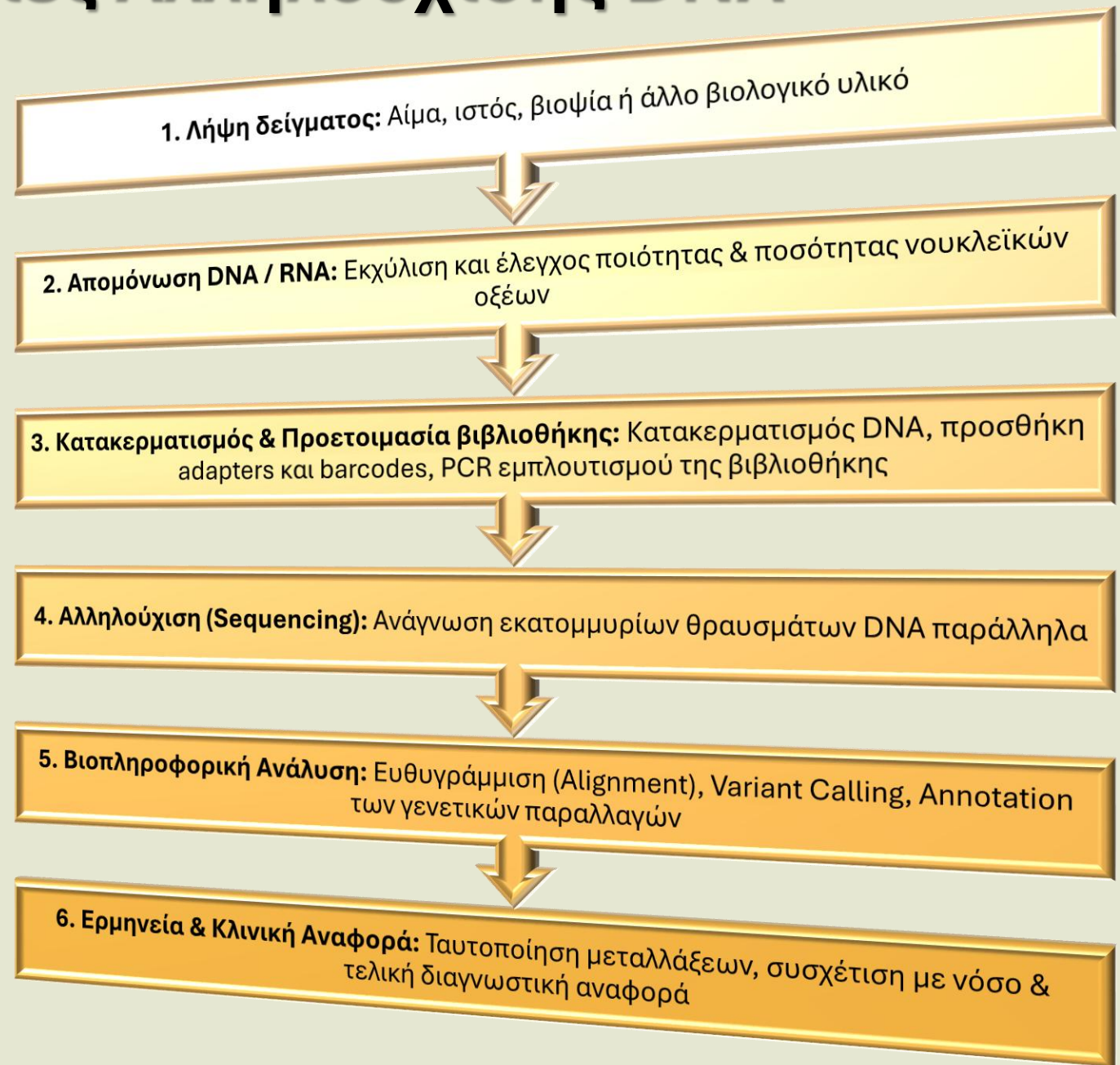
31. Τεχνολογίες Αλληλούχισης DNA

Αρχή λειτουργίας

Μαζικά παράλληλη αλληλούχιση εκατομμυρίων τμημάτων **DNA/RNA**. Υψηλή ταχύτητα, ευαισθησία και ακρίβεια. Ανάλυση ολόκληρου γονιδιώματος ή συγκεκριμένων γονιδίων.

Αλληλούχιση 2ης γενιάς (NGS)

- ☐ Μαζική παράλληλη αλληλούχιση.
- ☐ Εκατομμύρια θραύσματα DNA ταυτόχρονα.
- ☐ Υψηλή ταχύτητα.
- ☐ Υψηλή ευαισθησία.
- ☐ Χαμηλό κόστος ανά βάση.
- ☐ Ανάλυση panel γονιδίων, exome ή ολόκληρου γονιδιώματος.



32. Οργανολογία

Θερμοκυκλοποιητής (Thermal Cycler)

- Εκτελεί τους κύκλους της PCR.
- Ελέγχει με ακρίβεια τις θερμοκρασίες αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης.
- Εξασφαλίζει ομοιόμορφη θέρμανση όλων των δειγμάτων.

Σύστημα οπτικής ανίχνευσης (Real-Time PCR)

- Πηγές διέγερσης (LED, Laser ή λαμπτήρες).
- Ανίχνευση φθορισμού με CCD κάμερες ή φωτοπολλαπλασιαστές.
- Δυνατότητα πολυπλεξίας (Multiplex PCR).

Υπολογιστικό σύστημα

- Επεξεργασία των σημάτων φθορισμού.
- Δημιουργία καμπυλών ενίσχυσης και καμπυλών τήξης.
- Αυτόματος υπολογισμός της τιμής Ct και ερμηνεία αποτελεσμάτων.

Εργαστηριακές συνθήκες

- Διαχωρισμός χώρων προετοιμασίας, PCR και ανάλυσης.
- Αποφυγή επιμόλυνσης.
- Βαθμονόμηση οργάνων και χρήση εσωτερικών/εξωτερικών ποιοτικών ελέγχων.



33. Κλινικές Εφαρμογές και Επικύρωση

Λοιμώδη νοσήματα

Ανίχνευση DNA/RNA παθογόνων με PCR & Real-Time PCR.

Έγκαιρη διάγνωση (HIV, COVID-19, Ηπατίτιδες, Φυματίωση).

Ταυτοποίηση ανθεκτικών στελεχών.

Επιδημιολογική παρακολούθηση και έλεγχος μεταλλάξεων.

Ογκολογία

Ανίχνευση μεταλλάξεων (EGFR, KRAS, BRAF, HER2 κ.ά.).

Πρώιμη διάγνωση καρκίνου.

Επιλογή στοχευμένης θεραπείας (Targeted Therapy).

Παρακολούθηση θεραπείας και υπολειμματικής νόσου.

Επικύρωση μοριακών μεθόδων

- ✓ Αναλυτική ευαισθησία & ειδικότητα
- ✓ LOD (Limit of Detection) και γραμμικότητα
- ✓ Ακρίβεια, επαναληψιμότητα & αναπαραγωγιμότητα
- ✓ Εσωτερικός & εξωτερικός ποιοτικός έλεγχος
- ✓ Cross-validation / External validation
- ✓ Συμμόρφωση με ISO 15189 & ISO/IEC 17025

34. Σύγκριση

Χαρακτηριστικό	Φασματομετρικές Μέθοδοι	Ανοσοχημικές Μέθοδοι	Μοριακές Μέθοδοι
Αρχή λειτουργίας	Αλληλεπίδραση ύλης–ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας	Αντίδραση αντιγόνου–αντισώματος	Ανίχνευση DNA ή RNA
Στόχος ανάλυσης	Μικρά μόρια, μεταβολίτες, στοιχεία	Πρωτεΐνες, ορμόνες, αντιγόνα, αντισώματα	Γενετικό υλικό, μεταλλάξεις, παθογόνα
Ευαισθησία	Μέτρια–Υψηλή	Υψηλή	Πολύ υψηλή
Ειδικότητα	Μέτρια (παρεμβολές δείγματος)	Υψηλή	Πολύ υψηλή
Αξιοπιστία	Μέτρια	Υψηλή	Πολύ υψηλή
Αναπαραγωγιμότητα	Υψηλή	Υψηλή (με αυτοματοποίηση)	Μέτρια–Υψηλή (με σωστή τυποποίηση)
Ποιοτικός έλεγχος	Βαθμονόμηση, standards, LOD	Controls, επαναληψιμότητα, έλεγχος αντιδραστηρίων	Controls, LOD, PCR efficiency, εξωτερική επικύρωση
Κόστος	Χαμηλό	Μέτριο	Υψηλό
Χρόνος ανάλυσης	Λεπτά	1–4 ώρες	3–6 ώρες ή περισσότερο
Κλινικές εφαρμογές	Κλινική χημεία, τοξικολογία, μεταβολικά νοσήματα	Ορμόνες, καρκινικοί δείκτες, λοιμώξεις	Γενετικά νοσήματα, λοιμώξεις, ογκολογία
Πλεονεκτήματα	Γρήγορη, οικονομική, εύκολη	Υψηλή ειδικότητα, ευρεία χρήση	Μέγιστη ευαισθησία & πρώιμη διάγνωση
Περιορισμοί	Μικρότερη ειδικότητα	Διασταυρούμενες αντιδράσεις	Υψηλό κόστος, επιμολύνσεις
Γενική αξιολόγηση	Σταθερές, γρήγορες και οικονομικές, αλλά με περιορισμένη ειδικότητα	Πολύ καλή ισορροπία κόστους–απόδοσης, ιδανικές για screening	Υψηλότερη διαγνωστική ακρίβεια, αλλά αυξημένο κόστος και αυστηρός ποιοτικός έλεγχος

35. Περιορισμοί



Φασματομετρικές
μέθοδοι

Επηρεάζονται από την ποιότητα και την προετοιμασία του δείγματος.

Παρεμβολές από διαλύτες και βιολογικό υπόστρωμα.

Απαιτούν αυστηρή βαθμονόμηση και τυποποίηση.

Πιθανή απώλεια γραμμικότητας σε υψηλές συγκεντρώσεις.



Ανοσοχημικές
μέθοδοι

Παρεμβολές από ετεροφιλικά αντισώματα και αυτοαντισώματα.

Hook effect σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αναλύτη.

Επηρεάζονται από φάρμακα (π.χ. βιοτίνη).

Πιθανότητα ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.



Μοριακές
μέθοδοι

Αναστολείς της PCR μειώνουν την απόδοση της ενίσχυσης.

Υψηλός κίνδυνος επιμόλυνσης των δειγμάτων.

Απαιτούν καθαρό DNA/RNA και εξειδικευμένο εξοπλισμό.

Υψηλότερο κόστος και ανάγκη αυστηρού ποιοτικού ελέγχου.

Συμπέρασμα

Κάθε μέθοδος παρουσιάζει διαφορετικούς περιορισμούς, οι οποίοι αντιμετωπίζονται με σωστή προετοιμασία δείγματος, τυποποίηση των διαδικασιών και εφαρμογή αυστηρού ποιοτικού ελέγχου.

36. Εξελίξεις και Μελλοντικές εφαρμογές

Σύγχρονες εξελίξεις

- **NGS (Next Generation Sequencing):** Ταχεία ανάλυση γονιδιώματος και εφαρμογές στην εξατομικευμένη ιατρική.
- **Υγρή βιοψία (Liquid Biopsy):** Ανίχνευση ctDNA, CTCs και εξωσωμάτων με ελάχιστα επεμβατική δειγματοληψία.
- **Φασματομετρία Μάζας (MS):** Υψηλή ευαισθησία για βιοδείκτες, φάρμακα και μεταβολομική.
- **Τεχνητή Νοημοσύνη (AI):** Ανάλυση μεγάλων δεδομένων, αναγνώριση προτύπων και υποστήριξη κλινικών αποφάσεων.

Μελλοντικές προοπτικές

- Ανάπτυξη Point-of-Care και φορητών διαγνωστικών συστημάτων.
- Ψηφιακές ανοσοδοκιμασίες, Lab-on-a-Chip και βιοαισθητήρες νέας γενιάς.
- Ευρεία εφαρμογή NGS/WGS με χαμηλότερο κόστος και ταχύτερη ανάλυση.
- Συνδυασμός AI + Multi-omics (γονιδιωματική, πρωτεωμική, μεταβολομική).
- Μετάβαση σε εξατομικευμένη ιατρική, με υψηλότερη διαγνωστική ακρίβεια και λιγότερο επεμβατικές εξετάσεις.



Φασματομετρικές μέθοδοι

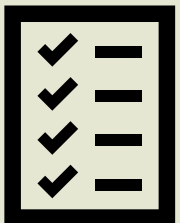
- ☐ Ιδανικές για βιοχημικές εξετάσεις ρουτίνας.
- ☐ Γρήγορες, οικονομικές και πλήρως αυτοματοποιημένες.
- ☐ Εφαρμογές: γλυκόζη, χοληστερόλη, ουρία, ηπατικά ένζυμα.

Ανοσοχημικές μέθοδοι

- ☐ Υψηλή ειδικότητα για πρωτεΐνες, ορμόνες και καρκινικούς δείκτες.
- ☐ Κατάλληλες για screening, διάγνωση και παρακολούθηση θεραπείας.
- ☐ Εφαρμογές: PSA, CA-125, TSH, hCG, HIV, HBV, HCV.

Μοριακές μέθοδοι

- ☐ Επιλογή όταν απαιτείται μέγιστη ευαισθησία και πρώιμη διάγνωση.
- ☐ Ανίχνευση μεταλλάξεων και παθογόνων.
- ☐ Εφαρμογές: SARS-CoV-2, HIV, φυματίωση, EGFR, KRAS, BRAF, HER2.



37. Επιλογή κατάλληλης μεθόδου

38. Συμπεράσματα

1. Οι φασματομετρικές, ανοσοχημικές και μοριακές μέθοδοι αποτελούν τους βασικούς πυλώνες της σύγχρονης εργαστηριακής διάγνωσης.
2. Κάθε κατηγορία παρουσιάζει διαφορετικά πλεονεκτήματα και περιορισμούς ως προς την ευαισθησία, την ειδικότητα, το κόστος και τον χρόνο ανάλυσης.
3. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εξαρτάται από τον κλινικό στόχο, το είδος του δείγματος και τις απαιτήσεις της εξέτασης.
4. Ο ποιοτικός έλεγχος, η επικύρωση και η τυποποίηση αποτελούν βασικές προϋποθέσεις για αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα.
5. Ο συνδυασμός διαφορετικών διαγνωστικών τεχνικών προσφέρει υψηλότερη διαγνωστική ακρίβεια και καλύτερη υποστήριξη των κλινικών αποφάσεων.
6. Οι μελλοντικές εξελίξεις, με την τεχνητή νοημοσύνη, την αυτοματοποίηση και τις τεχνολογίες υψηλής απόδοσης, αναμένεται να ενισχύσουν περαιτέρω την εξατομικευμένη ιατρική.

**Ευχαριστώ
πολύ για την
προσοχή σας!**

