

Biofizika és orvostechnika alapjai

In vitro diagnosztika

1

Klinikai laboratóriumokban leggyakrabban használt műszerek

- összehangoltan az ETK koherens tantárgyaival

2

Klinikai laboratóriumokban leggyakrabban használt műszerek

- Az orvosi laboratóriumokban emberi váladékok (vér, vizelet, széklet, liquor cerebrospinalis, különféle punktátumok, amnionfolyadék, sebváladék, orrváladék, hüvelyváladék, stb.) in vitro vizsgálata történik.
- **In Vitro Diagnosztika** (uniós megnevezés) az orvostechnikai műszerek egy megkülönböztetett csoportját képezi.

3

Klinikai laboratóriumokban leggyakrabban használt műszerek

- Az **IVD** eszközökre az Unió külön Direktívát alkotott:

98/79/EK irányelv

Magyarországi bevezetése:
[8/2003. \(III. 13.\) ESzCsM rendelet](#)

4

Klinikai laboratóriumokban leggyakrabban használt műszerek

- Az automatizálás ellenére minden laboratóriumban megtalálhatók bizonyos **hagyományos műszerek**, pl.:
 - **Hűtőszekrény** – külön a vizsgálati anyagok, külön a hűtve tárolandó reagensek, vegyszerek tárolására.
 - **Mérlegek** (digitális laboratóriumi gyorsmérleg, táramérleg és analitikai mérleg)
 - **Száritószekrény**
 - **Termosztát**
 - **Vizfürdő**
 - **Centrifuga**
 - **Hematokrit centrifuga**
 - **Fotométer**
 - **Fénymikroszkóp**
 - **Automata pipetták**
 - **Automata adagolók**

5

Vérvételi eszközök

- A legtöbb klinikai laboratóriumban nem történik mintavétel, de mindenhol tartanak vizsgálati minta vételére alkalmas eszközöket is, pl. **vérvételi rendszereket**.

6

Vérvételi eszközök



- **Hagyományos:** a vénát vastag injekciós tűvel szűrik meg és a kifolyó vért kémcsövekben fogják fel. Ez az eljárás ma már munkavédelmi szempontból nem megengedhető, ugyanis **a friss vért mindig potenciális fertőző anyagnak kell tekinteni!**
- Vérvételnél mindig **kötelező a gumikesztyű használata!** (zárt rendszernél is)

7

Vérvételi eszközök

- **Korszerű vérvételi eszközök:** egyszeri vénapunkcióval zárt rendszerben többféle vérminta vehető.
- Alapvetően kétféle vérvételi cső használatos:
 - **vákuum** alatt álló cső (**Vacutainer**),
 - speciális **fecskendő**, amelynek, ha megtelt – letörhető a szára és a vér lecentrifugálható benne (Sarstedt, Braun).

8

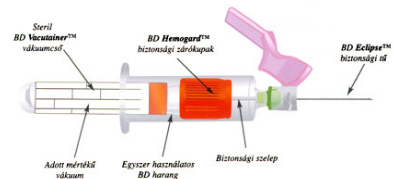
Vérvételi eszközök

- Méreteik a szabványos centrifugacső méreteinek felelnek meg: 11 ml-es (16 mm x 100 mm), 5 ml-es (10 mm x 75 mm), 3 ml (10 mm x 50 mm).
 - a centrifugák rotorbetétei miatt, melyek közvetlenül fogadják.
 - a legtöbb laboratóriumi automata mintatartó rekeszei, vagy tárcsái ezeket a vérvételi csöveket, mint „primer csövet” befogadják.

9

Vérvételi eszközök

- Vacutainer vérvételi rendszerek



10

Vérvételi eszközök



- **Vacutainer vérvételi rendszerek**
 - A vákuumos csöveket speciális, jól tapadó gumikeverékből készített, könnyű dugóval zárják le, amely alatt a gyártás során keltett **vákuum kb. 2 évig megmarad.**
 - **Előnye:**
 - a vért vevők és az azt szállítók is védve vannak
 - centrifugálás után csak be kell helyezni az automatába a csövet úgy, hogy ki sem kell nyitni.
 - **Hátránya:**
 - vérvételnél merevbb szögben kell a vénába szúrni a tűt,
 - kevésbé kedvelt.

11

Vérvételi eszközök



- Minden rendszerben a vérvételi csövek gumidugóját rögzítő műanyag **rögzítő gyűrű színe** utal arra, hogy van-e a csőben adalék (**alvadásgátló**), vagy sem.

Színkód	A vérvételi eszköz funkciója
sárga	steril cső
piros	natív üvegcső (szérum nyérése)
Piros, mint a natív cső, címkén jelzéssel	beégett szilikonlajjal hidrofobizált üvegcső
lila	K ₂ -EDTA tartalmú hematológiai cső
sárga	NH ₄ ⁺ vagy Li-heparin tartalmú cső
kék	Na ₂ -citratos hemostazeológiai cső
fekete	Na ₂ -citratos vérsajsúlyfedéses cső
Szürke	NaF tartalmú cső
Piros/fekete	leválasztóteles natív cső

12

Vérvételi eszközök

- A vérvételi csöveken a **beteg azonosítására** szolgáló címke található, illetve itt a cső vonalkóddal ellátható.
- A kémiai és hematológiai **automaták** felszerelhetők **vonalkód beolvasóval**, így képesek azonosítani a primer csöveket.



13

Centrifugák

- A klinikai laboratóriumokban ma a centrifugálást a **vizsgálati minta előkészítésére** használják.
- Leggyakoribb feladat: a vérplazma, vagy a vérsavó elválasztása a vörsejtektől, illetve a vizeletüledék lecentrifugálása.



14

Centrifugák

- A centrifugálás elve: többfázisú elegeből a kiülepedés sebessége függ az oldat viszkozitásától és az egyes összetevők **fajsúlykülönbségétől**.
 - Az egyes komponensek sűrűsége, valamint sűrűségeinek különbsége is állandó, de a **fajsúlyok** (tömeg x nehézségi gyorsulás / térfogategység) **függ a tömegre ható gyorsulástól**.
 - A **fajsúlykülönbség** megfelelően nagy nehézségi gyorsulással **növelhető** annyira, hogy már kis sűrűségkülönbség esetén is **gyors szétválasztás** következzen be.

15

Centrifugák

- A centrifugában kialakuló centripetális gyorsulás értéke:

$$a = r \cdot \omega^2$$

ahol:

a = a centripetális gyorsulás

r = a forgási sugár

ω = a szögsebesség

16

Centrifugák

- A fordulatszámot általában percenkénti fordulatszámban (**rpm** = rotation per minute) **szokás megadni**.
- Példa: a a centrifugacső feke a tengelytől **12 cm** távolságra van és a centrifuga **3800 rpm** sebességgel forog: a gyorsulás **1947 x g**.

17

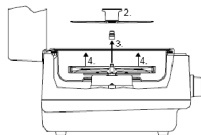
Centrifugák

- A nagy centrifugális erő miatt a rotor terhelésének **kiegyensúlyozottnak** kell lennie, ezért a rotorban egymással szembekerülő anyagok súlyát táramérleg segítségével esetenként be kell állítani.
- Különösen pontos kiegyenlítést igényel a speciális, **12000xg**-vel használt **hematokrit** centrifuga.
- A 10000 rpm-nél nagyobb fordulató centrifugákban már mindenképpen kell hűtés, mivel a rotor súrlódása a rotortér levegőjével tekintélyes hőtermeléssel jár.

18

Centrifugák

■ Hematokrit centrifuga



19

Centrifugák

■ A ma használt centrifugákkal szemben támasztott alapvető igények:

- Legyen **automatikus fedéleteszelés**, tehát amíg a rotor mozog, a fedél ne legyen nyitható (Magyarországon ez munkavédelmi előírás!).
- Rendelkezzen elektronikus **fordulatszámolóval**, fordulatszám-stabilizálóval és legalább percnyi pontosságú idő-előválasztóval.
- **Csendes** üzemű legyen.
- 5-10 g-nál nagyobb **kiegyensúlyozatlanság esetén** a centrifuga automatikusan **kapcsoljon ki**.

20

Pipetták

- A pipetták működése egyszerű: a vizsgált folyadékba mártjuk a pipetta egyik végét. A másik végén szívó erővel hatunk, amelynek hatására a pipettába szívjuk a kívánt folyadékot. A pipetta mindig tartalmaz jelzést, ameddig a folyadékot felszívva a pipettában található folyadék a megfelelő térfogatú lesz.
- Az 1 és 1000 μl térfogatú pipettákat mikropipettáknak nevezzük, míg a klasszikus makropipetták ennél nagyobb folyadékok kimérésére alkalmasak.



21

Pipetták



22

Automata pipetták

- Az automata pipetta elnevezés a szakzsargonból származik, a ma általánosan használt dugattyús, kifolyásra hitelesített pipettákat nevezzük így.
- Mechanikusan, egy dugattyú mozgásával működnek, a mechanikai erőt kezünk mozgásával hozzuk létre, tehát **kézi működtetésűek**.



23

Automata pipetták



- A pipetták **térfogatmérő eszközök**, melyeket folyadékok pontos kimérésére, oldatok készítésére használunk.
- A dugattyús pipettákat kis térfogatok 3 -500 μl közötti tartományban használjuk.
- Az eszköz használatakor a váladékkal emberi kéz nem érintkezik, a dugattyús pipetta használata a munkavédelmi előírásoknak megfelelő (**fertőző, maró és mérgező anyagot szájjal pipettázni tilos!**).

24

Automata pipetták

■ Alaptípusaik:

- 1. **állandó térfogatú** (fix) pipetta, amely csak az eszközön megjelölt egy konkrét térfogat mérésére alkalmas (pl.: 10 µl, 20 µl, 50 µl, stb.).
- 2. **állítható térfogatú** - amellyel a pipetta felső részén található skálán bizonyos határok között beállítható volumen mérhető. Az állíthatók lehetnek fokozatosan és folyamatosan állítható térfogatúak. (pl. 5-20 µl).
- A legpontosabbak a fix térfogatú eszközök

25

Automata pipetták

- Az automata pipetták végére megfelelő méretű műanyag pipettacsúcsot kell húzni.
- A folyadék mindig csak a műanyag csúccsal érintkezik, amit használat után le kell dobni.

26

Automata pipetták

■ Tanácsok a pontos mérés kivitelezéséhez:

- A pipetta-csúcsba csak felszívandó folyadék kerüljön, levegő ne!
- A csúcs szilárdan illeszkedjen a pipettára, különben a mérés pontatlanná válik!
- A csúcsot a felszívás és a kiürítés után is húzzuk végig az edény falán, hogy a kívülről rátapadt anyagot eltávolítsuk!
- Soha ne fordítsuk a pipettát csúccsal felfelé, mert így a csúcs és a dugattyú közé soha nem kerül folyadék, ami a későbbiekben pontatlan mérést eredményez!
- A pipettát időnként szedjük szét és tisztítsuk meg, illetve az előírt karbantartást (tömítés, zsírozás) végezzük el.

27

Automata pipetták

■ Tanácsok a pontos mérés kivitelezéséhez:

- Gravimetriás ellenőrzés: ismert sűrűségű folyadékot mérünk ki az ellenőrizni kívánt pipettával. A kimért folyadék tömegét pontosan mérjük le analitikai mérlegen. A tömeg és a sűrűség ismeretében kiszámítható a folyadék térfogata. Ha ez megegyezik a pipetta térfogatával, az eszköz jól működik, használható.

28

Fotometria



■ az anyagok fényelnyelésén (fényabszorpcióján) alapuló műszeres analízis.

- A különféle vegyületek a fehér fényből más-más hullámhosszú sugarat nyelnek el, így a fényabszorpció hullámhossz szerinti eloszlása – *az abszorpciós színekép* – jellemző az egyes vegyületekre.
- A fényabszorpció **mértékét** az adszorbeáló anyag **koncentrációja** határozza meg.
- A fotometria tehát **minőségi és mennyiségi** elemzésre egyaránt alkalmas mérési módszer.

29

Fotometria



- Ha a vizsgálandó anyag (pl. izzó gáz) - termikus gerjesztés során -**fényt bocsát ki**, amit megfelelő készülékkel (pl. spektroszkóppal) felbontunk, megkapjuk az adott anyagra jellemző **emissziós** (kibocsátási) **színekép**et.

- Ha azonban egy fényforrás fényét a vizsgálandó anyagra bocsátjuk, az anyag **a fény egy részét elnyeli**, a kilépő fényt felbontva az anyag **abszorpciós színekép**ét (elnyelési színekép) kapjuk meg.

30

Fotometria

- A fényelnyelésen alapuló mennyiségi meghatározás elve:

A fény egy részét az oldott anyag részecskéi elnyelik, másik része pedig az oldaton átjutva – csökkent intenzitással lép ki az oldatból.

Az oldat fényelnyelő képességét (abszorpciós érték) **abszorbanciának (A)**, míg az átjutott mennyiségét **transzmisszióknak (T)** nevezzük.

31

Fotometria

- A fényintenzitás változásait a *Lambert-Beer törvény* alapján írhatjuk le:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot l$$

- Ahol:
- I_0 = a beeső fény intenzitása
- I = a kilépő fény intenzitása
- ϵ = a moláris fényelnyelési együttható
- c = az oldat koncentrációja
- l = a rétegvastagság.

32

Fotometria

- A moláris fényelnyelési együttható (ϵ) megadja, hogy 1 cm-es rétegvastagságnál az 1 mol/dm³ koncentrációjú oldatnak mekkora a fényelnyelő képessége (abszorbanciája).
- Az abszorbancia értéke nulla és végtelen között lehet.
- $A=0$, az teljes fény átbecsátás, míg az $A=\infty$, a teljes a fényelnyelés.
- A Lambert-Beer törvény alapján a fényelnyelés mértéke függ az anyagi minőségtől, egyenesen arányos az oldat koncentrációjával (c) és a rétegvastagsággal (l).

33

Fotometria

- Szerves vegyületek vizsgálatához – elsősorban az UV és a látható színtartományban végzett fotometriás mérések terjedtek el.

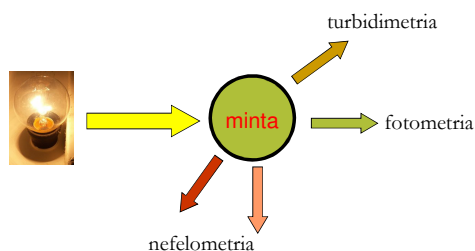
34

Fotometria

- Viszonylag egyszerű berendezéseket igényelnek a látható színtartományban (400-780 nm hullámhosszon) történő fotometriás mérések, amellyel színes oldatok vizsgálhatók (kolorimetria).

35

Fotometria, turbidimetria, nefelometria



36

Fotometria

- A spektrofotométerek monokromatikus fényel működnek. A fényforrásból érkező fénysugár a monokromátoron halad keresztül, amely a fényt a hullámhossz szerint összetevőire bontja. Monokromátorként kvarcprizmát, vagy optikai rácsot használnak.
- A mérést azon a hullámhosszon végezzük, amelynél a vizsgálandó oldat fényelnyelése a legnagyobb. A mérés ekkor válik a legérzékenyebbé.

37

A fénymikroszkóp és használata

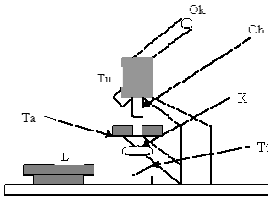


- Lényegében nagyító berendezés, mely két részből áll.
 - 1. mechanikai szerkezetből
 - 2. optikai berendezésből



38

A fénymikroszkóp és használata



39

A fénymikroszkóp és használata

1. Mechanikai szerkezetek:

- **állvány:** A mikroszkóp mechanikai szerkezetének váza, mely talpon nyugszik.
- **tárgyasztal.** Feladata, hogy a tárgy vízszintes síkú eltolását, minden irányba lehetővé tegye
- **tubus,** amelynek a felső végén a szemlencse (okulár), alsó végén pedig a tárgylencse (objektív) található.
- **váltókorong (revolver)** forgatásával különböző nagyítású tárgylencsét tudunk az optikai tengelybe fordítani
- **makrométer csavar** a tubus durvább emelésére vagy süllyesztésére
- **mikrométer csavar** pedig a tubus igen finom elmozdítására
- **binokuláris feltét** lehetővé teszi, hogy mindkét szemmel nézzük a tárgy képét

40

A fénymikroszkóp és használata

2. Az optikai berendezés

- **tükör** feladata, hogy a fényforrás sugarait az optikai tengely irányába terelje
- **kondenzor** feladata, hogy a kondenzorrekesz képét a tárgysíkban előállítsa, és a nyílásszög nagyságát szabályozza. A teljesen nyitott kondenzorrekesz kontraszt nélküli, de fényes, míg a túlságosan zárt sötét, túl kontrasztos képet ad.
- **nagyító berendezés tárgylencséből** (objektívek) és **szemlencséből** (okulárok) áll

41

A fénymikroszkóp és használata

- Mikroszkópizálásakor a fénysugarak a tükrön, a kondenzoron, és a vizsgálandó készítményen haladnak át, és innen a levegőn keresztül a tárgylencsére, a szemlencsére, majd a szemünkbe kerülnek.

42

A fénymikroszkóp és használata



- A levegő fénytörése következtében a fénysugarak egy része azonban nem jut a szemünkbe. Ha a vizsgálandó anyag és a tárgylencse közé olyan folyadékot iktatunk közbe, amelynek fénytörése azonos az üveggel, akkor viszont a levegőn történő áthaladás okozta fényvesztés elmarad.
- Ezt a legnagyobb nagyításra szánt tárgylencsével (**immerziós lencse**, immerzio=bemerülés) és a tárgylemez közé cseppentett immerziós olajjal (cédrusolaj, törésmutatója: 1,51) érhetjük el.

43

A fénymikroszkóp és használata

- Immerziós lencsével általában festett készítményeket vizsgálunk. A kondenzort emeljük, a rekeszt nem használjuk.
 - A tárgyasztalra helyezett készítményre egy kis csepp cédrusolajat teszünk
 - Kiválasztjuk az immerziós lencsét, amit belemerítünk az olajba.
 - Belenézünk a mikroszkópba, és a makrométer csavar segítségével finoman kiemeljük az objektívet az olajból.
 - A mikrométer segítségével élesre állítjuk a képet.

44

A fénymikroszkóp és használata

- **A mikroszkóp használata**
 - A mikroszkópos vizsgálat során a következő általános szabályokat kell figyelembe venni:
 - A vizsgálatot mindig kis nagyítással kezdjük, ilyenkor a kondenzorrekeszt közepesen szűkítjük és a tükröt úgy állítjuk be, hogy a látótér egyenletesen világos legyen.
 - A vizsgálandó anyag fölé a tubust durva beállításra szolgáló csavar (makrométer) segítségével kb. fél cm-re süllyesztjük;
 - A tárgylemezt ráhelyezzük a tárgyasztalra.
 - Belenézünk a mikroszkópba, és a bal kezünk mutató- és hüvelyk ujjával a tárgyasztal csavarjaival finoman mozgatjuk a tárgyasztalon lévő tárgylemezt.
 - Jobb kezünkkel a makrométer segítségével addig emeljük a tubust, amíg észrevesszük a képet.
 - A finom beállításra szolgáló csavar segítségével a képet élesre állítjuk.
 - A készítmény egyik szélén kezdve látótérrel-látótérre haladva szisztematikusan átnézzük.
 - Natív készítménynél a kondenzort süllyesztjük.

45

A fénymikroszkóp és használata



- **Fluoreszcenciás mikroszkópos eljárás**
 - Az anyagok egy része képes fluoreszkálni, vagyis fénybesugárzás hatására a besugárzás ideje alatt az elnyelt fényt kibocsátani. Az anyagnak ezt a tulajdonságát használja fel vizsgálatra a fluoreszcenciás mikroszkópia.
 - A vizsgálatra hosszú hullámhosszú UV-(300-375nm), vagy rövid hullámhosszú kék fényt használjuk, melyek csak gerjesztésre szolgálnak. A fényforrás tehát maga a tárgy és nem a lámpa izzója.

46

A fénymikroszkóp és használata

- A vizsgált tárgyak fluoreszcenciája lehet:
 - a.) saját v. **primer** fluoreszcencia, amely UV- vagy kék fényvel történő megvilágításra spontán jön létre,
 - b.) **szekunder** fluoreszcencia, ha saját fluoreszcenciával nem rendelkező tárgyakat fluoreszkáló festékekkel, fluorokrómmal megfestünk. Ez a festésmód rendszerint polikróm festés, mert a fluorokrómmal festett sejt szerkezeti elemei (az eltérő abszorpció miatt) eltérő színben fluoreszkálnak.

47

Laboratóriumi automaták



- Hematológiai automaták
- Kémiai automaták

48

Hematológiai automaták



- Vörösvérsejt és fehérvérsejt, valamint thrombocytaszámolás is végezhető. (Fotoelektromos módszer vagy elektromos ellenállás módszerrel)

49

Hematológiai automaták

- **Fotoelektromos módszer**
- A hígított vérsuszpenzió keresztülfolyik egy küvetán, ami egy sötétlátóteres kondenzorhoz kapcsolódik. Minden részecske a kondenzor rése előtt haladva felvillan. A fényimpulzusokat a készülék elektromos impulzusokká alakítja, megszámlálja és kijelzi.
- A teljes kvalitatív és kvantitatív vérképet megadja a vörösvérsejtek derivált értékeivel együtt.

50

Hematológiai automaták

- **Elektromos ellenállás módszere**
- Azon alapszik, hogy míg a vérsajt rossz elektromos vezető, bizonyos hígító oldatok jó vezetők. Elektroddokkal elektromos áramlást tartanak fenn a minta és egy kapilláris között.
- Amint egy vérsajt a kapilláris szájadékához jut, és a jó vezető folyadékot onnan kiszorítja, megnöveli az elektromos ellenállást és egy pulzus-szerű potenciálváltozást hoz létre az elektroddok között.
- A pulzus amplitúdója arányos a részecske nagyságával.

51

Kémiai automaták

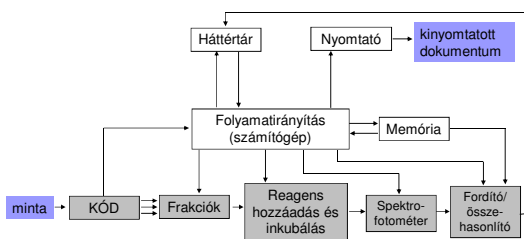


- A klinikai kémiai automaták legtöbbször egy olyan **mérőrobot**, amely többnyire ugyanolyan módon és formában végzi el a vizsgálatokat, mintha azokat manuálisan végeznék el.
- A legtöbb automata 20-25 kémiai vizsgálat elvégzésére alkalmas.

52

Kémiai automaták

- A klinikai kémiai automaták blokkvázlata



53

Kémiai automaták

- Előnye: Az automatáknak magas a termelékenysége, egy műszakban egy laboratóriumi analitikus automata 2000-4000 analitikai eredményt is produkálhat (ez 8-12 kifejezetten gyakorlott laboratóriumi asszisztens erőltetett, folyamatos manuális munkájával érhető el).

54

Kémiai automaták

- Hátránya:
 - A kézzel végzett munka időarányai automatákon általában nehezkesek, ezért nem teszik levetővé a készülék kapacitásának teljes kihasználását.
 - Kis számú vizsgálat elvégzése gazdaságtalan.
 - Nagy, nehéz műszerek, amelyek elhelyezése, mozgatása nehézkes.
 - Működésükhöz jelentős mennyiségű ionmentesített vizet használnak, amit sok esetben külön kell megoldani.

55

Kémiai automaták



- A készülékek lehetnek egy időben csak egyféle módszerrel működtethető, un. *sorozatmérő* automaták, és kis teljesítményű, lassú, *páciensszelektív* automaták.
- A páciensszelektív automaták a vizsgálatokat betegenként és nem módszerenként végzik el.

56

Kémiai automaták

A kémiai automaták működésére jellemző:

- A vizsgálati anyagból a mintavétel automatikusan történik ezért a minták elcsereklésének (ami a leggyakoribb laboratóriumi hiba) kicsi a veszélye.
- Direkt módon képesek azonosítani a vizsgálati anyagokat a vérvételi csőre ragasztott vonalkód alapján.
- A minta és a reagens adagolása is automatikus, a mérési pontossága nagy.
- A kémiai automaták mérőküvettaiban folynak a reakciók, amelyeket az egyszerűbb mozgatás érdekében koszorúszerű fémtárcsába helyeznek.
- A napjainkban általánossá vált $37^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ reakció hőmérséklet biztosítására a küvetta mozgó rotort termosztálják.
- A klinikai automatákban mindig található egy jó minőségű *fotométer*, gyakran potenciometriás nátrium-, ill. kálium meghatározásra alkalmas ionszelektív mérőegység (ISE), ritkábban egyéb mérőműszerek (fluoriméter, polariméter, stb). A fotométer monokromátor rendszere 10-20 hullámhossz beállítását teszi lehetővé általában 340 és 800 nm között. Fényforrásként általában alacsony feszültségű halogénizzókat (ritkábban villanófényt, magasnyomású higanygőzlámpát, vagy xenonlámpát) használnak.
- Mindig van lehetőség soron kívüli (sürgős) vizsgálatok elvégzésére is.

57

Köszönöm a figyelmet!

58