

ΑΝΔΡΕΑΣ ΣΚΟΡΙΛΑΣ
ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΡΧΕΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ

ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΣΥΜΜΕΤΡΙΑ
ΑΘΗΝΑ 2009

Ο μεν βίος βραχύς, η δε τέχνη μακρά, ο δε καιρός οξύς, η δε πείρα σφαλερά, η δε κρίσις χαλεπή.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ, 460-360 π.Χ

Πάσα τε επιστήμη, χωριζομένη δικαιοσύνης και της άλλης αρετής, πανουργία, ου σοφία φαίνεται.

ΠΛΑΤΩΝ, 428-347 π.Χ

Η φύση δεν συνηθίζει να αποκαλύπτει τα κρυμμένα μυστικά της πουθενά περισσότερο από ό,τι στις περιπτώσεις όπου δείχνει δείγματα των έργων της έξω από τις συνηθισμένες διαδικασίες.

WILLIAM HARVEY, 1578-1657

Σε αυτόν που αφιερώνει τη ζωή του στην επιστήμη, τίποτε δεν δίνει μεγαλύτερη χαρά από τον αυξανόμενο αριθμό ανακαλύψεων, αλλά το ποτήρι της ευτυχίας είναι γεμάτο, όταν τα αποτελέσματα των ερευνών του βρίσκουν άμεση κλινική εφαρμογή.

LOUIS PASTEUR, 1822-1895

Αρχίζοντας με ένα απλό μόριο από το γενετικό υλικό DNA, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) μπορεί να παραγάγει 100 δισεκατομμύρια παρόμοια μόρια σε ένα απόγευμα, αλλάζοντας τα μέχρι τώρα δεδομένα.

KARY MULLIS, 1944-

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	113
----------------	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ - ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

1.1 Ασφάλεια και κανόνες υγιεινής σε εργαστήριο Κλινικής Χημείας - Κλινικής Βιοχημείας	16
1.2 Κανόνες ασφαλείας εργαστηρίου ραδιοϊσότοπων	21
1.3 Κανόνες για την απόρριψη εργαστηριακών ραδιενεργών κατάλοιπων	22

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

2.1 Εγκυρότητα και ακρίβεια μεθόδου	23
2.2 Είδη αναλυτικών σφαλμάτων	26
2.3 Βαθμονόμηση οργάνων	27
2.4 Δείγματα ελέγχου	28
2.5 Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας	29
2.6 Εξωτερικός έλεγχος ποιότητας	35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ

3.1 Τιμές αναφοράς	39
3.2 Κριτήρια επιλογής διαγνωστικών δοκιμασιών	40
3.3 Επιδημιολογικές έννοιες	43
3.4 Ανάλυση ROC - Σφάλματα στην ορθή διάγνωση	45

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

4.1 Αιμοληψία	49
4.2 Είδη δειγμάτων και αναλύσεις αίματος	51

4.3	Αιμόλυση	53
4.4	Αντιπηκτικά	54
4.5	Δειγματοληψία και συντήρηση ούρων	56
4.6	Αναλύσεις ούρων	57
4.7	Η δοκιμασία της πλασματοκάθαρσης	60
4.8	Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό - Εργαστηριακές αναλύσεις ..	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΥΤΟΜΑΤΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

5.1	Βασικές αρχές αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην Κλινική Χημεία - Κλινική Βιοχημεία	65
5.1.1	Οπτικές τεχνικές ανάλυσης	65
5.1.2	Φασματοφωτομετρία υπεριώδους - ορατού	67
5.1.3	Φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης	71
5.1.4	Φασματομετρία μάζας	73
5.1.5	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	74
5.1.6	Φθορισμομετρία	76
	<i>Συγχυτικοί παράγοντες στη φθορισμομετρία ..</i>	<i>78</i>
5.1.7	Φλογοφασματοφωτομετρία	79
5.1.8	Νεφελομετρία και θολερομετρία	80
5.1.9	Χημειοφωταύγεια	82
	<i>Ηλεκτροχημειοφωταύγεια - Βιοφωταύγεια</i>	<i>83</i>
5.1.10	Ηλεκτρικές μέθοδοι βιοχημικής ανάλυσης	84
5.2	Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί	86
5.2.1	Συστήματα έμμεσου προσδιορισμού ανοσοσυμπλόκων	88
5.2.2	Προσδιορισμοί ανοσοπροσρόφησης δεσμευμένου Ενζυμου (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)	91
	<i>ELISA συναγωνιστικού τύπου</i>	<i>93</i>
	<i>ELISA μη συναγωνιστικού τύπου</i>	<i>93</i>
5.2.3	Ραδιοανοσοανάλυση (Radioimmunoassay, RIA) ..	97
5.2.4	Ανοσοραδιομετρική ανάλυση (Immunoradiometric assay, IRMA)	100
5.2.5	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών-στύπωμα κατά Western	101
5.2.6	Ανοσοϊστοχημεία, ανοσοφθορισμός, υβριδισμός <i>In Situ</i>	103
5.2.7	Ανοσοαναλύσεις φθορισμού (Fluorescence immunoassays, FIA) και χημειοφωταύγειας (Chemiluminescence immunoassays)	106
5.2.8	Ανοσοχρωματογραφία	107

5.3	Αυτοματοποιημένη κλινική βιοχημική ανάλυση	109
5.3.1	Οργανολογία και είδη αυτόματων αναλυτών	110
	<i>Διαμόρφωση των αναλυτών</i>	110
	<i>Τύποι αυτόματων αναλυτών στο Κλινικό Βιοχημικό Εργαστήριο</i>	110
5.3.2	Βήματα αυτοματοποιημένης κλινικής βιοχημικής ανάλυσης	114
5.3.3	Επιλογή αυτόματου βιοχημικού αναλυτή	118

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ

6.1	Ο κλάδος της Μοριακής Διαγνωστικής	121
6.2	Η μεθοδολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, PCR	122
6.3	Αντιδραστήρια της μεθοδολογίας PCR	127
6.3.1	Η DNA πολυμεράση	127
6.3.2	Το μείγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)	129
6.3.3	Τα ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+})	130
6.3.4	Το ρυθμιστικό διάλυμα	130
6.3.5	Οι εκκινητές	130
6.4	Χρήσεις της μεθοδολογίας PCR	132
6.5	Είδη τεχνικών PCR	135
6.5.1	Η τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής (RT)	135
6.5.2	Η τεχνική της εσωτερικής PCR (nested PCR)	137
6.5.3	Η τεχνική της πολλαπλής PCR (Multiplex PCR)	138
6.5.4	Ποσοτικοποίηση προϊόντων PCR	138
	<i>Η ποσοτική PCR (Quantitative PCR, qPCR)</i>	140
	<i>Υπολογιστικές μέθοδοι της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR)</i>	144
6.6	Τεχνικές ανάλυσης μεταλλάξεων	149
6.6.1	Μέθοδοι προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA (DNA sequencing)	149
	<i>A. Η χημική μέθοδος (μέθοδος Maxam-Gilbert)</i>	149
	<i>B. Η ενζυμική μέθοδος (μέθοδος Sanger)</i>	152
	<i>Γ. Η μέθοδος του πυροφωσφορικού</i>	155
	<i>Δ. Άλλες προσεγγίσεις στον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων του DNA</i>	156
6.6.2	Αρχές μεθόδων ανάλυσης μεταλλάξεων χωρίς προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA	157

A. Η μέθοδος CSGE	157
B. Η μέθοδος DGGE	160
Γ. Η μέθοδος SSCP	160
Δ. Η μέθοδος DHPLC	162
E. Η μέθοδος ASO	163
ΣΤ. Η μέθοδος RFLP	163

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

7.1 Καλοήθεις και κακοήθεις όγκοι	165
7.2 Πολυσταδιακή διαδικασία επαγωγής του καρκίνου	169
7.3 Βιολογικές ιδιότητες των νεοπλασματικών κυττάρων	171
7.4 Φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα σε καλλιέργεια	172
7.5 Σταδιοποίηση του καρκίνου	173
7.6 Πρωτο-ογκογονίδια και ογκογονίδια	175
7.7 Ογκοκατασταλτικά γονίδια	176
7.8 Αποπτωτικά γονίδια	178
7.9 Καρκινικοί δείκτες	179
7.10 Καρκινικοί δείκτες κατά εντόπιση	183
7.11 Τα ογκοεμβρυϊκά αντιγόνα ως καρκινικοί δείκτες	188
<i>Το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο - CEA</i>	189
<i>Η α-εμβρυϊκή πρωτεΐνη - AFP</i>	190
7.12 Τα καρκινικά αντιγόνα - CA	190
7.13 Οι κυτταροκερατίνες	191
7.14 Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών	192
7.15 Το ογκογονίδιο <i>ERBB2</i>	194
7.13 Το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) και οι καλλικρεΐνες	194

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

8.1 Αθηρωμάτωση	197
8.2 Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων	201
8.3 Βιοδείκτες στο έμφραγμα του μυοκαρδίου (EM)	204
8.3.1 Κρεατινική κινάση - ισοένζυμα και ισομορφές	207
8.3.2 Οι καρδιακές τροπονίνες	209
8.3.3 Η μυοσφαιρίνη	211
8.3.4 Η γαλακτική αφυδρογονάση – ισοένζυμα	212
8.3.5 Η ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST/GOT)	214
8.3.6 Το νατριουρητικό πεπτίδιο του εγκεφάλου (BNP/ NPPB)	215

8.3.7	Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)	217
8.3.8	Η λιποπρωτεΐνη α	218
8.4	Μοριακή Διαγνωστική καρδιαγγειακών νοσημάτων	218
8.4.1	Οι Απολιποπρωτεΐνες A1, B και E	219
8.4.2	Το γονίδιο <i>MTHFR</i>	221
8.4.3	Ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου	221
8.4.4	Οι παράγοντες II και V	222
8.4.5	Το γονίδιο <i>GLA</i>	222
8.4.6	Το γονίδιο <i>SCN5A</i>	223
8.4.7	Το γονίδιο <i>PTPN11</i>	223
8.4.8	Το γονίδιο <i>CBS</i>	224
8.4.9	Το γονίδιο <i>ITGB3</i>	224
8.4.10	Το γονίδιο <i>NOS3</i>	224
8.4.11	Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της μεσοκυττάριας ουσίας	225
8.4.12	Το γονίδιο <i>ACE</i>	225
8.4.13	Τα γονίδια των καρδιακών τροποπινών I και T ...	225
8.4.14	Τα γονίδια <i>LDLR</i> και <i>LPL</i>	226

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΣΤΙΣ ΟΠΟΙΕΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ

9.1	Αναλύσεις εργαστηριακής διάγνωσης και παρακολούθησης	229
9.2.	Αναλύσεις στα πλαίσια του προληπτικού ελέγχου υγείας	241

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α, ΠΙΝΑΚΕΣ ΤΙΜΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Πίνακας 1	Τιμές αναφοράς	246
Πίνακας 2	Καρκινικοί δείκτες	336
Πίνακας 3	Γενική εξέταση αίματος	339
Πίνακας 4	Γενική εξέταση ούρων	343
Πίνακας 5	Γενική εξέταση σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα) ...	344
Πίνακας 6	Κρίσιμες τιμές επιβίωσης-όρια πανικού	345
Βιβλιογραφία	347
Ευρετήριο	351

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στο παρόν σύγγραμμα αναλύονται οι βασικές αρχές και στοιχεία από την Κλινική Χημεία/Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική, έναν κλάδο που τα τελευταία χρόνια έχει επεκταθεί, εδραιωθεί και υιοθετήσει τεχνικές και γνώσεις πολλών συναφών κλάδων των Βιοεπιστημών.

Δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στον έλεγχο ποιότητας, στη δειγματοληψία και συντήρηση βιολογικών δειγμάτων, στην αξιολόγηση των εργαστηριακών διαγνωστικών δοκιμασιών, στις αρχές των ευρέως χρησιμοποιούμενων, κλασικών βιοαναλυτικών μεθοδολογιών αλλά και στις σύγχρονες τεχνικές της Μοριακής Διαγνωστικής.

Μεγάλο μέρος του συγγράμματος αφιερώνεται επίσης στην περιγραφή των αναλύσεων στα βιολογικά δείγματα, στις τιμές αναφοράς τους, ενώ γίνεται παράθεση των κυριότερων ασθενειών για τις οποίες χρησιμοποιούνται. Επιπλέον, δίνεται έμφαση στους καρκινικούς δείκτες, καθώς και στους βιοδείκτες καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Αρκετά χωρία εκδίδονται για πρώτη φορά, με αποτέλεσμα, πιθανώς, να υπάρχουν λάθη και παραλείψεις, που θα διορθωθούν στην επόμενη έκδοση. Η υπόδειξή τους είναι καλοδεχούμενη και θα βοηθήσει ιδιαίτερα στη βελτιστοποίηση και ανανέωση της έκδοσης. Το κείμενο, εξάλλου, θα ανανεώνεται συνεχώς, ανάλογα με τις εξελίξεις στο γνωστικό περιεχόμενο της Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής σε παγκόσμιο επίπεδο. Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στα μέλη της ερευνητικής μου ομάδας, καθώς και στη Φιλόλογο Δ. Καββαδά, για τη βοήθεια και την κριτική τους στη διαμόρφωση και σύνταξη του παρόντος εγχειριδίου.

Α. ΣΚΟΡΙΛΑΣ

Εισαγωγή στην Κλινική Χημεία - Κλινική Βιοχημεία

Η επιστήμη της Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας ασχολείται με τη μελέτη της χημικής και βιοχημικής πλευράς της ανθρώπινης ζωής, καθώς και την ανάπτυξη και εφαρμογή εργαστηριακών μεθόδων στη διάγνωση, τη θεραπεία, την πρόγνωση και την πρόληψη των ασθενειών. Επίσης, αντικείμενό της αποτελεί η μελέτη των διαταραχών των βιοχημικών διεργασιών που συμβαίνουν στον ανθρώπινο οργανισμό κατά τις παθολογικές καταστάσεις. Αυτό επιτυγχάνεται με την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων, συννηθέστερα των οποίων είναι το αίμα, τα ούρα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ώστε να προσδιοριστεί η παρουσία και η συγκέντρωση μιας ουσίας ή τμήματος του γενετικού υλικού που σχετίζεται με τη συγκεκριμένη διαταραχή. Σήμερα, εκτενές τμήμα της επιστήμης της Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας, αποτελεί η Μοριακή Διαγνωστική η οποία βασίζεται στην ανάπτυξη και χρήση τεχνικών ανάλυσης των νουκλεϊκών οξέων στο Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης.

Σημαντικά έχει συμβάλει στη διεύρυνση του κλάδου της Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας το Πρόγραμμα του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Human Genome Project). Όπως γνωρίζουμε, πρόκειται για ένα διεθνές ερευνητικό πρόγραμμα, το οποίο ξεκίνησε, επίσημα, την 1/10/1990 και ολοκληρώθηκε τον Απρίλιο του έτους 2003. Συμμετείχαν σε αυτό 20 ινστιτούτα –από ΗΠΑ, Καναδά, Γερμανία, Γαλλία, Μεγάλη Βρετανία, Ιαπωνία και Κίνα– με σκοπό τον προσδιορισμό περισσότερων από 3.000.000.000 νουκλεοτιδίων και 25.000 γονιδίων. Οι γνώσεις που αποκτήθηκαν, και συνεχώς αποκτώνται, συμβάλλουν στην παροχή νέων διαγνωστικών μεθόδων,

στην κατανόηση γενετικών ασθενειών και μηχανισμών καρκινογένεσης, στην εύρεση προδιάθεσης σε ασθένειες, σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις και φάρμακα και, τέλος, στην κατανόηση της εξελεκτικής ιστορίας του ανθρώπου. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί μια σειρά παραμέτρων που πρέπει να αποφευχθούν, ώστε η προσδοκώμενη ωφέλεια να μην αντισταθμίζεται, με επιπτώσεις στην ελευθερία του ατόμου. Οι επιπτώσεις αυτές μπορεί να αφορούν σε γενετικές διακρίσεις στην εργασία, στην ασφάλιση, στην οικογένεια καθώς και στην τυραννία της γνώσης –λόγω θεραπευτικού χάσματος– στην ευγονική και στο μετασχηματισμό γονιδίων με αντιδεοντολογικά κριτήρια.

Λόγω της ιδιαίτερης πολυπλοκότητας των συνεχώς εξελιξιμων βιοαναλυτικών μεθόδων και της κρισιμότητας της παροχής ορθών αποτελεσμάτων βιολογικών αναλύσεων στην κλινική πράξη, ο Κλινικός Χημικός - Βιοχημικός, διεθνώς, απαιτείται να έχει σε βάθος την απαιτούμενη θεωρητική κατάρτιση και εμπειρία, οι οποίες επιτυγχάνονται από προπτυχιακές και, κυρίως, μεταπτυχιακές σπουδές και πρακτική άσκηση. Στα Κλινικά Βιοχημικά Εργαστήρια καθοριστική θέση έχει, επίσης, η τήρηση αρχών δεοντολογίας και κανόνων ασφαλείας και υγιεινής. Η ορθή εργαστηριακή πρακτική και δεοντολογία μπορεί να συνοψιστεί στις εξής τρεις αρχές:

- ▶ Προσοχή στην τήρηση του απορρήτου των εργαστηριακών αποτελεσμάτων και των προσωπικών δεδομένων.
- ▶ Ευσυνειδησία στο χειρισμό των υπό ανάλυση βιολογικών δειγμάτων.
- ▶ Ενημέρωση για τα αποτελέσματα και παραπομπή του ασθενούς σε κλινικούς ιατρούς της κατάλληλης ειδικότητας.

1.1 Ασφάλεια και κανόνες υγιεινής σε εργαστήριο Κλινικής Χημείας - Κλινικής Βιοχημείας

Στα εργαστήρια Κλινικής Χημείας - Κλινικής Βιοχημείας, λόγω του υψηλού βαθμού επικινδυνότητας ορισμένων βιολογικών δειγμάτων αλλά και της χρήσης εξειδικευμένων μηχανημάτων, είναι απαραίτητη η καθιέρωση ειδικών κανόνων ασφαλείας και προστασίας της υγείας των εργαζομένων, με σκοπό την αποφυγή ατυχημάτων και την πρόληψη των μολύνσεων. Επειδή η απόλυτα αξιόπιστη ταυτοποίηση των ασθενών με όλα τα παθογόνα δεν είναι

δυνατή, κάθε βιολογικό δείγμα πρέπει να θεωρείται ως πιθανή πηγή μόλυνσης και πρέπει να γνωρίζονται και να τηρούνται πολύ αυστηρά οι κανόνες ασφαλείας για κάθε δείγμα που μπαίνει στο εργαστήριο. Οι γενικές οδηγίες που απαιτείται να ακολουθούνται στα εργαστήρια Κλινικής Χημείας - Κλινικής Βιοχημείας είναι:

1. Στο Κλινικό Βιοχημικό Εργαστήριο, κάθε εργαζόμενος ή ασκούμενος υποχρεωτικά πρέπει να φοράει, συνεχώς, ελαστικά γάντια (διπλά για εργασία με ραδιοϊσότοπα ή επικίνδυνα βιολογικά υλικά), μακριά ποδιά εργαστηρίου, που πρέπει να είναι καθαρή και τα μανίκια να καλύπτονται από τα γάντια, κλειστά παπούτσια και κάλτσες. Όλες οι πληγές και τα πιθανά κοψίματα πρέπει να καλύπτονται.

2. Απαγορεύονται ΑΥΣΤΗΡΩΣ το κάπνισμα, το φαγητό και η πόση οποιουδήποτε υγρού στον εργαστηριακό χώρο. Απαγορεύεται η μάσηση τσιχλών, η χρήση καλλυντικών όπως και η επαφή τροφίμων ή ποτών με επιφάνειες του συγκεκριμένου εργαστηρίου.

3. Απαγορεύεται αυστηρώς η χρήση σιφωνίων με το στόμα. Πρέπει να χρησιμοποιούνται ειδικά πουάρ για τα σιφώνια ή αυτόματες πιπέτες, τα tip των οποίων πρέπει να αλλάζονται και να αποθηκεύονται σε ειδικά πλαστικά δοχεία, σε κάθε χρήση. Προσοχή απαιτείται στη χρήση των γυάλινων σιφωνίων και άλλων συσκευών για την αποφυγή τραυματισμών από το σπάσιμό τους. Τα πουάρ στα σιφώνια τοποθετούνται ΑΠΑΛΑ, με χρήση μικρής δύναμης.

4. Η χρήση εύφλεκτων, πτητικών, διαβρωτικών ή τοξικών οργανικών ουσιών (αιθανόλη, ακρυλαμίδη, φαινόλη, χλωροφόρμιο, τολουόλιο, ξυλόλη κ.λπ.) ή διαλυμάτων που αναθυμιάζουν (πυκνά διαλύματα οξέων ή βάσεων) πρέπει να γίνεται πάντοτε στους απαγωγούς. Απαιτείται να διαβάζονται προσεκτικά οι ετικέτες των διάφορων αντιδραστηρίων και ο χειρισμός αυτών να γίνεται σύμφωνα με τις υποδείξεις της εταιρείας παραγωγής τους ή τις οδηγίες του υπευθύνου του εργαστηρίου. Κάθε εργαζόμενος πρέπει να γνωρίζει τη ΘΕΣΗ του πυροσβεστήρα και να έχει μάθει από πριν τη χρήση του.

5. Ο πάγκος εργασίας πρέπει να είναι πάντοτε καθαρός και επιστρωμένος με πλαστική μεμβράνη και διηθητικό χαρτί. Απορροφητικά χαρτιά που χρησιμοποιούνται για το σκούπισμα σταγονιδίων σε σιφώνια και βελόνες πρέπει, να ρίχνονται σε πλαστική σακούλα αμέσως και όχι αφού τελειώσει το πείραμα. Ο πάγκος μπορεί να απολυμανθεί με χρήση διαλύματος υποχλωριώδους να-

τρίου (χλωρίνη) 10%, ισοπροπανόλης 70%, προπανόλης 70% ή αιθανόλης 70%.

Η έντονη απολυμαντική ικανότητα των υποχλωριώδη ιόντων (ClO^-) οφείλεται στην οξειδωτική τους δράση και την ενζυμική αδρανοποίηση που προκαλούν σε βακτήρια και ιούς. Επιπλέον τα ClO^- αλληλεπιδρούν με τα φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και παρεμβαίνουν στις μεταβολικές πορείες στο εσωτερικό των κυττάρων. Με ανάλογο τρόπο δρουν και αρκετά άλλα αντισηπτικά, όπως είναι τα ιωδιούχα. Τα υποχλωριώδη αλάτα δεν πρέπει ποτέ να χρησιμοποιούνται μαζί με οξέα αφού παράγεται το τοξικό, για τον άνθρωπο, Cl_2 , σύμφωνα με την αντίδραση: $\text{ClO}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow 1/2 \text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

Η αντισηπτική δράση της αλκοόλης οφείλεται στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και την παρέμβαση που προκαλεί στο μεταβολισμό των μικροβίων, καθώς και στη διατάραξη της ακεραιότητας του κυτταροπλάσματος και της κυτταρικής μεμβράνης. Δρα σε gram θετικά και σε gram αρνητικά βακτήρια, σε μυκοπλάσματα, μύκητες αλλά και σε ιούς με κάψα. Τα αλκοολούχα διαλύματα έχουν μεγαλύτερη αντισηπτική δράση σε συγκεντρώσεις ~70% v/v. Η καθαρή αλκοόλη (95-100%) προκαλεί αφυδάτωση των επιφανειών και δεν έρχεται εύκολα σε επαφή ούτε εισέρχεται στο εσωτερικό των μικροοργανισμών για να τους εξουδετερώσει. Επιπλέον, η παρουσία αλκοόλης, με απουσία νερού, έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απώλεια της δομικής ακεραιότητας και λειτουργικότητας των πρωτεϊνών.

6. Προστατευτικά γυαλιά και μάσκες προσώπου πρέπει να χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις που υπάρχει πιθανότητα απότομης εκτίναξης βιολογικού υγρού, καθώς και σε πειράματα εξαιρετικά επικίνδυνων παθογόνων, όπως στην περίπτωση του ιού SARS.

7. Η χρήση αιχμηρών αντικειμένων, όπως οι βελόνες συριγγών, πρέπει να γίνεται πολύ προσεκτικά. Η άκρη της λοξοτομής της βελόνης δύσκολα διακρίνεται με γυμνό μάτι. Οι χρησιμοποιημένες βελόνες ΔΕΝ σκεπάζονται ξανά, δεν κάμπτονται και δεν αφαιρούνται από τη σύριγγα, αλλά απορρίπτονται σε ειδικούς κάδους ασφαλείας.

8. Ο εργαζόμενος που φορεί υποχρεωτικά γάντια, οφείλει να μην αγγίζει τίποτε μέσα στο εργαστήριο, στην τσάντα του ή στο πρόσωπό του, εκτός από τη συσκευή και όποιο σκεύος έχει σχέση με το πείραμα. Αν σκιστούν τα γάντια κατά τη διάρκεια του πειρά-

ματος, πρέπει να πετάγονται στη σχετική πλαστική σακούλα αχρήστων του χώρου και να αντικαθίστανται αμέσως, αφού γίνει πρώτα πολύ καλό πλύσιμο των χεριών με αντισηπτικό. Ομοίως, σε περίπτωση μόλυνσης των ενδυμάτων του εργαζομένου με επικίνδυνο βιολογικό υλικό, αυτά πρέπει να αφαιρούνται και τοποθετούνται σε πλαστική σακούλα για απολύμανση. Το άγγιγμα σε οτιδήποτε εκτός εργαστηρίου γίνεται μόνο, αφού αφαιρεθούν τα γάντια και ΠΛΥΘΟΥΝ τα χέρια με σαπούνι ή με κατάλληλο αντισηπτικό χεριών. Το σαπούνι καθώς και όλα τα ιοντικά απορρυπαντικά δίστανται, παρουσία νερού, σε διπολικά ιόντα τα οποία απομακρύνουν τους υδρόφοβους λεκέδες αλλά, επιπλέον, διαταράσσουν και τη σταθερότητα των κυτταρικών μεμβρανών των μικροοργανισμών.

9. Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιούνται στον εργαστηριακό χώρο απαγορεύεται να μεταφέρονται σε άλλους εργαστηριακούς χώρους. Απαγορεύεται αυστηρά, κατά τη διάρκεια πειράματος, να αφήνεται συσκευή ή όργανο χωρίς συνεχή ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να ανατίθεται σε άλλον η συνέχιση της παρακολούθησης και το σταμάτημα οποιασδήποτε συσκευής.

10. Σε ΚΑΜΙΑ περίπτωση δε μεταφέρονται θερμά διαλύματα ή αντικείμενα από πάγκο σε πάγκο στο εργαστήριο. Αυτό γίνεται μόνο, όταν μειωθεί κάτω των 50°C η θερμοκρασία τους. Τα θερμαντικά σώματα πρέπει να είναι καλά στερεωμένα, χωρίς να προεξέχουν καλώδια σε σημεία που μπορούν να παρασυρθούν. Στην περίπτωση εγκαύματος (θερμικό ή χημικό), μπαίνει ΑΜΕΣΩΣ η τραυματισμένη περιοχή κάτω από κρύο νερό, κατά προτίμηση τρεχούμενο, για ~5 λεπτά. Εάν μεσολαβούν ρούχα, αυτά απομακρύνονται κατευθείαν. Στεγνώνεται, χωρίς σκούπισμα η καμένη περιοχή, αλείφεται με ενυδατική κρέμα, καλύπτεται με αποστειρωμένη βαζελινούχο γάζα ή και καθαρό στεγνό πανί και ζητείται ιατρική συμβουλή.

11. Η τοποθέτηση των δειγμάτων στη φυγόκεντρο πρέπει να γίνεται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να υπάρχει ισοστάθμιση βάρους στα σκέλη της περιστρεφόμενης κεφαλής, που βρίσκονται το ένα απέναντι από το άλλο, δηλαδή διαμετρικά αντίθετα από τον κεντρικό άξονα περιστροφής της φυγόκεντρος. Εάν δε γίνει σωστή ισοστάθμιση, υπάρχει κίνδυνος να σπάσουν οι σωλήνες στη φυγόκεντρο ή να μετακινηθεί ολόκληρη η φυγόκεντρος από τη θέση της. Το άνοιγμα της φυγόκεντρος ΔΕΝ επιτρέπεται σε καμία πε-

ρίπτωση κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης. Επίσης, κατά το σταμάτημα της φυγοκέντρισης, δεν επιτρέπεται να γίνεται προσπάθεια επιβράδυνσης της περιστρεφόμενης κεφαλής με το χέρι, διότι μπορεί να καταστραφεί ο διαχωρισμός, αλλά υπάρχει και ο κίνδυνος τραυματισμού από την περιστρεφόμενη κεφαλή.

12. Ο χειρισμός επικίνδυνων υλικών πρέπει να γίνεται σε ειδικό απαγωγό. Τα βιολογικά δείγματα πρέπει να μεταφέρονται σε άθραυστα σωληνάρια, με ειδικά πώματα, για την αποφυγή διαρροής ή ψεκασμού κατά την εκπομάτιση. Τα σωληνάρια κρατούνται όρθια και σε περίπτωση μολυσματικής νόσου (π.χ. Ηπατίτιδα, AIDS) επισημαίνονται με κατάλληλη χρωματική ετικέτα και μεταφέρονται σε σφραγισμένους πλαστικούς σάκους.

13. Η απόρριψη των μολυσμένων αναλώσιμων ειδών χρειάζεται να γίνεται σε ειδικές σακούλες, οι οποίες πρέπει να απορρίπτονται με ειδικό σύστημα ασφαλείας, που διέπει τα επικίνδυνα βιολογικά απόβλητα. Η απόρριψη των υγρών βιολογικών δειγμάτων μπορεί να γίνει σε κοινό νεροχύτη, αφού προηγηθεί η 24ωρη παραμονή τους σε πυκνό διάλυμα χλωρίνης. Τα μολυσμένα μη αναλώσιμα σκεύη πρέπει να τοποθετούνται, τουλάχιστον για 24ωρο, σε διάλυμα χλωρίνης 10%, πριν από την έκπλυση και επαναχρησιμοποίησή τους.

14. Ο ιός HIV, ο οποίος προκαλεί το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS), και οι ιοί της ηπατίτιδας B και C στο αίμα και στα βιολογικά υγρά των μολυσμένων ατόμων αποτελούν τους κυριότερους λοιμογόνους παράγοντες, που μπορούν να μεταδοθούν από το αίμα και τα παράγωγά του. Ο ιός της ηπατίτιδας B αποτελεί την πιο συνηθισμένη μόλυνση από το αίμα και τα παράγωγά του. Οι ιοί της ηπατίτιδας B και C είναι επικίνδυνοι για την υγεία του ατόμου, διότι προκαλούν χρόνια ηπατίτιδα σε ορισμένα θύματά τους, η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε κίρρωση ή και σε καρκίνο του ήπατος. Η προφύλαξη από την ηπατίτιδα B μπορεί να επιτευχθεί με εμβολιασμό. Σε περίπτωση ατυχήματος εργαζομένου ο οποίος ήρθε σε επαφή με αίμα ασθενούς (π.χ. κόψιμο με χρησιμοποιημένο δοκιμαστικό σωλήνα ή τρύπημα με χρησιμοποιημένη βελόνη), ο ασθενής πρέπει να εξετάζεται για μόλυνση από ηπατίτιδα B και C καθώς και για HIV. Σε περίπτωση που ο ασθενής είναι θετικός ή ανήκει σε ομάδα υψηλού κινδύνου, ο εργαζόμενος πρέπει να λάβει αμέσως προληπτική θεραπευτική αγωγή. Ο εργαζόμενος πιέζει αμέσως, ελαφρά, την τραυματισμέ-

νη περιοχή, προς το σημείο τραυματισμού, για τη μείωση τυχόν μικροβιακού φορτίου μέσω του αίματος, που θα απομακρυνθεί, και στη συνέχεια απολυμαίνει την περιοχή με αντισηπτικό διάλυμα, κατά προτίμηση ιωδιούχο (π.χ Betadine 10%).

15. Όλη η πειραματική εργασία πρέπει να είναι τόσο ΚΑΛΑ οργανωμένη, πριν από την έναρξή της, ώστε να ελαχιστοποιείται κάθε πιθανός κίνδυνος ατυχήματος. Στο τέλος της εργασίας απαιτείται να πλένονται όλα τα υαλικά και να καθαρίζονται οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της ημέρας. Ο πάγκος εργασίας πρέπει να αφήνεται ΑΠΟΛΥΤΩΣ τακτοποιημένος και καθαρός.

16. ΕΙΔΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ο υπεύθυνος του εργαστηρίου για οποιοδήποτε ατύχημα. Όλα τα ατυχήματα και τα περιστατικά που συμβαίνουν στο εργαστήριο πρέπει να καταγράφονται και να αποσαφηνίζονται τα αίτια που τα προκάλεσαν, ώστε να γίνεται στο μέλλον ευκολότερη η πρόληψή τους.

1.2 Κανόνες ασφαλείας εργαστηρίου ραδιοϊσότοπων

1. Η εργασία με ραδιενεργά ισότοπα ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I όπως είναι οι ραδιοσημάνσεις, υβριδισμοί κτλ, γίνεται σε ειδικό χώρο, πίσω από ασπίδες plexiglass, πάχους τουλάχιστον 1 cm, στον οποίο πρέπει να υπάρχει, σε εμφανή θέση, το γνωστό σήμα της ραδιενέργειας, τόσο στην είσοδο του συγκεκριμένου χώρου όσο και στα σημεία του εσωτερικού (εστία, φιάλες, κ.λπ.) που φέρουν ραδιενέργεια. Η εργασία με ραδιενεργά ισότοπα ^3H και ^{14}C μπορεί να γίνεται προσεκτικά και σε ειδικά διαμορφωμένο πάγκο που φέρει το γνωστό σήμα της ραδιενέργειας στο κάθε εργαστήριο. Τα ραδιοϊσότοπα πρέπει να φυλάσσονται στο κατάλληλο δοχείο και με τις προδιαγραφές των συνθηκών που ορίζουν οι οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας.

2. Ο εργαζόμενος με ραδιοϊσότοπο πρέπει απαραίτητα να φοράει ελαστικά γάντια (διπλά για εργασία με ^{32}P ή ^{125}I), γυαλιά ασφαλείας, κάλτσες, κλειστά παπούτσια και μακριά ποδιά εργαστηρίου, που επιβάλλεται να είναι καθαρή και τα μανίκια να καλύπτονται από τα γάντια.

3. Μόλις το ραδιοϊσότοπο τοποθετηθεί στην εστία, μετράται ο ρυθμός δόσης ακτινοβολίας μπροστά σε αυτήν την εστία αλλά και στη θέση του πλησιέστερου εργαζομένου στο συγκεκριμένο εργαστήριο.

4. Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιούνται στον εργαστηριακό χώρο ραδιοϊσότοπων απαγορεύεται να μεταφέρονται σε άλλους εργαστηριακούς χώρους.

5. Απαγορεύεται αυστηρά κατά τη διάρκεια πειράματος με ραδιοϊσότοπα να αφήνεται συσκευή ή όργανο χωρίς συνεχή παρακολούθηση.

1.3 Κανόνες για την απόρριψη εργαστηριακών ραδιενεργών κατάλοιπων

Οι κανόνες για την απόρριψη στερεών ή υγρών ραδιενεργών κατάλοιπων αποτελούν νόμο του κράτους και οποιεσδήποτε αλλαγές δημοσιεύονται στην Εφημερίδα της Κυβερνήσεως. Περιληπτικά αναφέρονται τα εξής:

1. Σε κάθε εργαστήριο ορίζεται ο επιστημονικός υπεύθυνος ραδιοϊσότοπων, ο οποίος θα πρέπει να έχει αποδεδειγμένα (σχετικές επιστημονικές δημοσιεύσεις, διδακτορικό) εργαστεί, στο παρελθόν, με ραδιοϊσότοπα. Επιπλέον, ορίζονται και τεχνικοί υπεύθυνοι οι οποίοι πρέπει να διαθέτουν ανάλογη εμπειρία ή να εκπαιδεύονται από τον επιστημονικό υπεύθυνο.

2. Υγρά κατάλοιπα ^3H και ^{14}C φυλάσσονται σε πλαστικές φιάλες με πώμα και τα στερεά κατάλοιπα σε πλαστικά κουτιά με ένδειξη της ραδιενέργειας. Τα ραδιενεργά υλικά παραδίδονται συνοδευόμενα από έγγραφο του υπευθύνου του εργαστηρίου όπου εκτελέστηκε το πείραμα (στο οποίο αναγράφεται το είδος, η ποσότητα και η ημερομηνία), σε τεχνικό υπεύθυνο, ο οποίος τα φυλάσσει σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο, έως ότου συλλεγούν από την Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας (ΕΕΑΕ) ή κριθεί από τον επιστημονικό υπεύθυνο ραδιοϊσότοπων ότι έχουν υποστεί την αναγκαία αραίωση και εξασθένηση, που προβλέπονται από τους κανονισμούς, ώστε να είναι δυνατόν να απορριφθούν στο δίκτυο ή μαζί με τα άλλα στερεά απόβλητα.

3. Ραδιενεργά κατάλοιπα ^{32}P φυλάσσονται σε πλαστικές φιάλες πίσω από ασπίδες plexiglass, πάχους τουλάχιστον 1 cm, έως ότου η ραδιενέργεια εξασθενήσει και μπορούν να απορριφθούν μετά από μέτρηση με μετρητή τύπου Geiger.