

Optické metody- turbidimetrie, nefelometrie

Katedra laboratorních metod LF MU

Mgr. Jana Gottwaldová

Turbidimetrie a nefelometrie



Patří mezi běžné analytické optické metody

- v klinické biochemii se používají k stanovení velké skupiny bílkovin – tzv. „specifických proteinů“
- využívají rozptylu světla na heterogenních částicích v koloidních roztocích a mikrosuspenzích



Turbidimetrie a nefelometrie

Princip

Rozptyl světla na heterogenních částicích je založen na **Tyndallově jevu**:

„Rozptýlené záření na částicích má stejnou vlnovou délku jako záření dopadající na koloidní částice“.

Rozptýlené světlo vychází z roztoku všemi směry.
(Tyndall, britský fyzik, 19 st.)

Turbidimetrie a nefelometrie



Tyndallův jev - dokonalý difúzní rozptyl

- platí pro částice které mají velikost menší než $1/10$ (př. IgG-20nm) vlnové délky dopadajícího záření
- U částice o velikosti větší $1/10 - 1$ (400-1400nm) násobek vlnové délky dopadajícího světelného záření je maximum rozptýleného světla směřováno dopředu a málo dozadu vzhledem k dopadajícímu záření – eliptický rozptyl

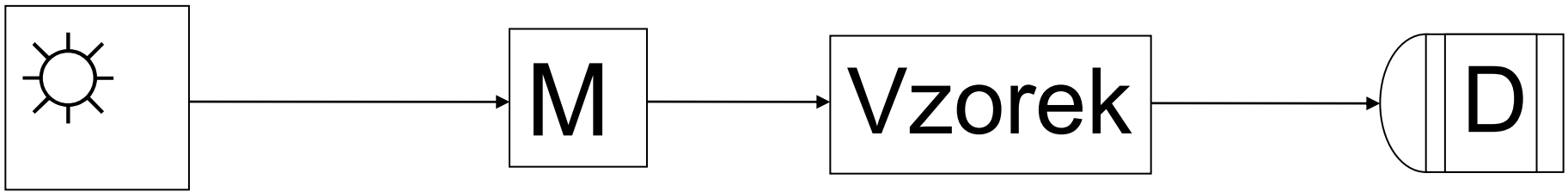
Turbidimetrie



- Princip je založen na měření procházejícího **světla zeslabeného rozptylem** na částicích při průchodu světelného záření prostředím s velkými molekulami (bílkoviny)
- sleduje **pokles intenzity záření** procházející absorbující a rozptylující vrstvou
- Na částicích dochází k rozptylu záření a částečně i jeho absorpci
- Závislost turbidance (odpovídá A) na koncentraci analytu je nelineární

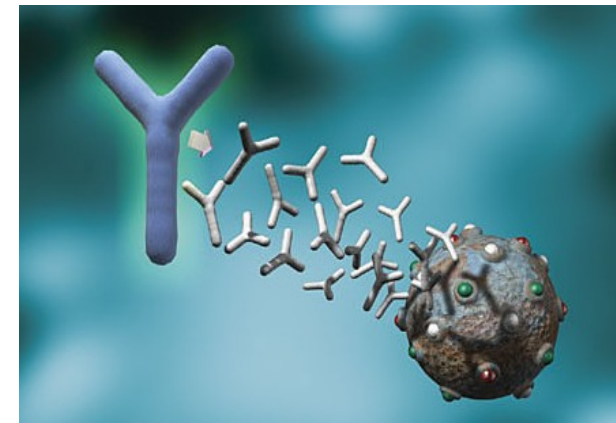
Turbidimetrie

- K turbidimetrickému měření zákalu se využívají **absorpční fotometry a spektrofotometry** - jednoúčelové turbidimetry se dnes v klinické biochemii nevyužívají
- měření se provádí v přímém směru, v ose světelného paprsku



Turbidimetrie

- měření stupně zákalu - **turbidity**
-
- využívají se **precipitační reakce mezi antigenem a protilátkou**
- Nutno získat dostatečně stálou suspenzi měřené reakční směsi - k tomuto účelu se používají **ochranné koloidy** (nejčastěji polyetylenglykol).



Turbidimetrie



- Fotometrická **citlivost je nepřímo úměrná vlnové délce**. Proto se např. specifické proteiny stanovují při nejkratší vlnové délce dosažitelné standardním fotometrem, tj. při **340 nm** v blízké UV oblasti.
- Do střední UV oblasti nelze dál postupovat, i kdyby to spektrofometr technicky umožňoval, protože se začne projevovat absorpce nezreagovaných bílkovin, která může hrubě zkreslit měření zákalu po vzniku imunokomplexu.

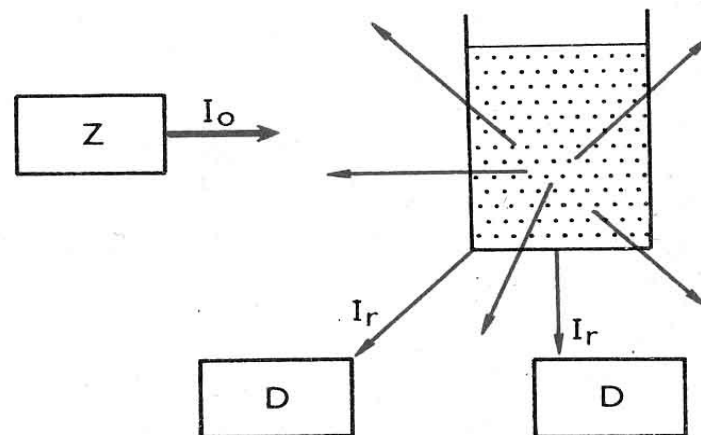
Turbidimetrie



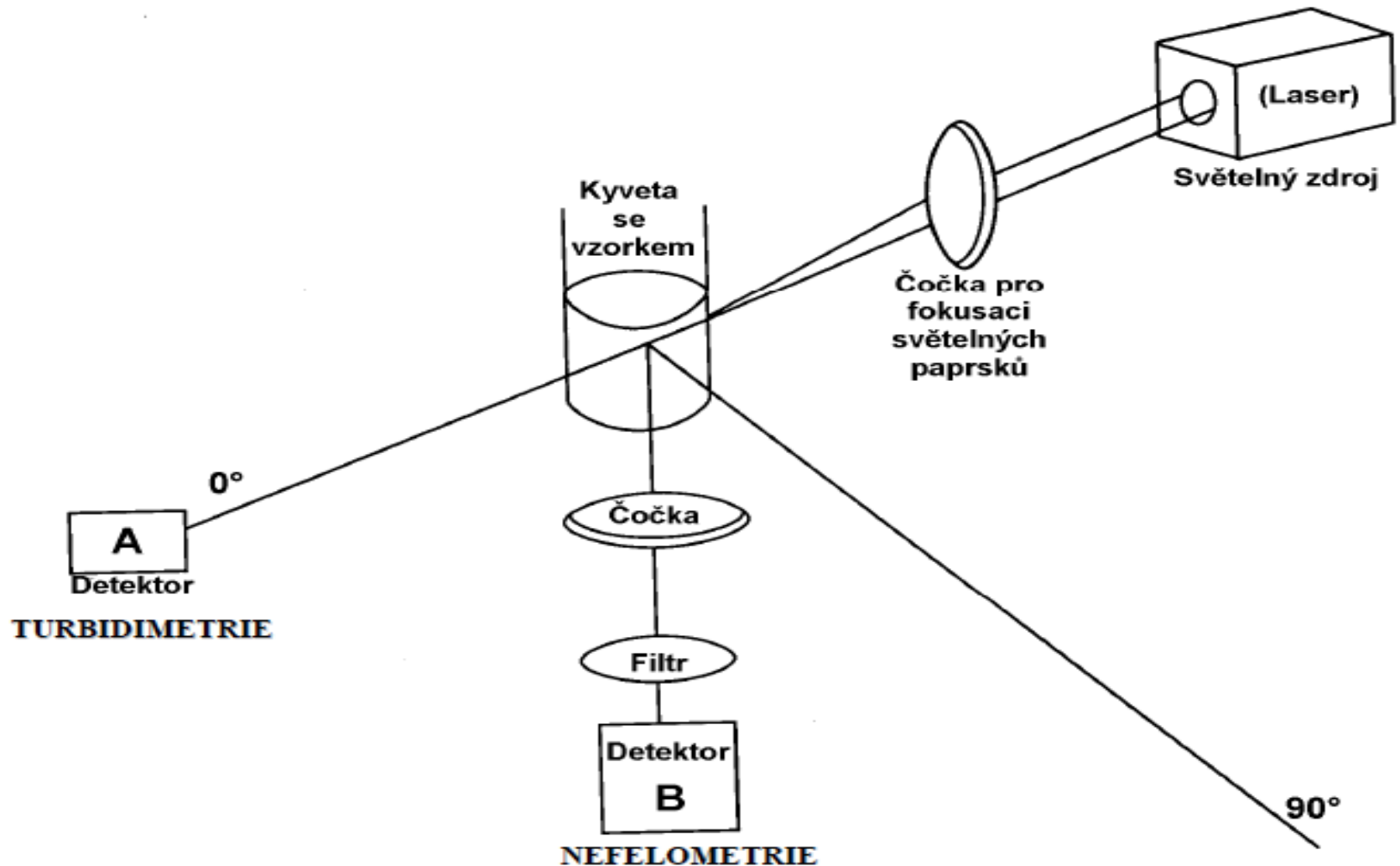
- Pro kvalitní turbidimetrii je nutná fotometrická citlivost $<0,02$ mA
- Na biochemických analyzátorech dosahují turbidimetrické metody reprodukovatelnost asi 5%
- Je třeba snížit vliv interferujících látek na minimum – jakýkoliv vliv, který způsobí vznik částic odlišné velikosti (koncentrace činidel, teplota)
- Hemolýza a ikterus ruší méně než při nefelometrii

Nefelometrie

- zabývá se měřením intenzity difúzně rozptýleného světla na dispergovaných částicích.
- Pro tyto účely slouží buď nefelometrický nástavec k fotometru, u nichž se difúzně rozptýlené světlo sleduje pod úhlem 90° , nebo jsou vyvinuty speciální přístroje - nefelometry



Nefelometrie x turbidimetrie



Nefelometrie



Rozdělení

dle použitého zdroje záření:

- **Laserový nefelometr**
- **Konvenční nefelometry**

Laserový nefelometr



Helium neonový nebo argonový laser

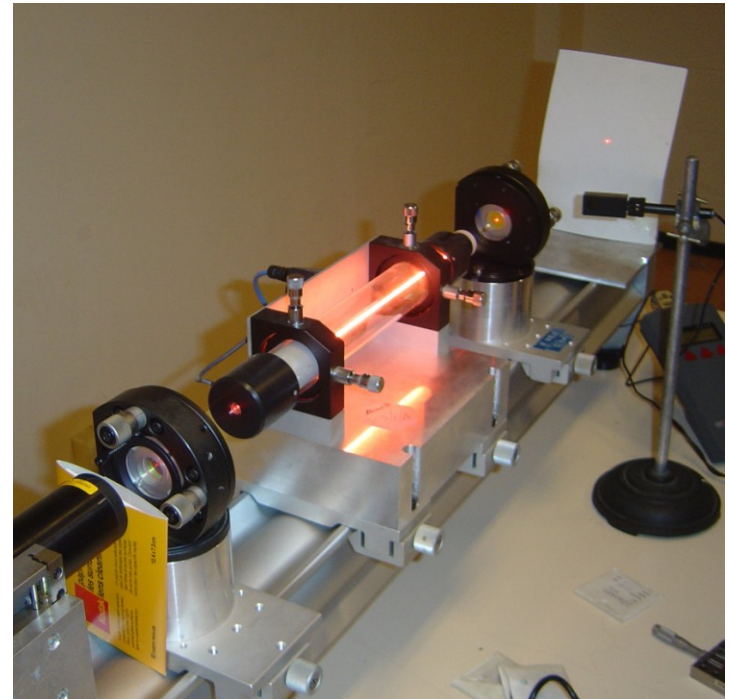
- Tento zdroj monochromatického světla je mimořádně intenzivní a má vysoký stupeň směrovosti paprsku
- Rozptýlené světlo se sleduje detektorem nastaveným pod úhlem 5 až 35° (fotonkou nebo fotonásobičem), ale ve víceúčelových přístrojích pod úhlem 90°.

Laserový nefelometr

LASER = **L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation = zesilování světla pomocí stimulované (vynucené) emise záření

Hlavní součásti laseru :

- zdroj excitační energie
- aktivní prostředí
- rezonátor



Laser



Hlavní součásti laseru :

- **zdroj excitační energie** – budící zdroj působící elektrický výboj
- **aktivní prostředí** -tj. látka obsahující oddělené kvantové energetické hladiny elektronů – může se jednat o plyn (nebo směs plynů), krystaly, polovodiče
- **rezonátor** – tvořen dvěma zrcadly:
 1. Koncové s odrazivostí 100%
 2. Výstupní s odrazivostí 99%, tzn. částečně propustné, umožňující vyzařování světelného paprsku

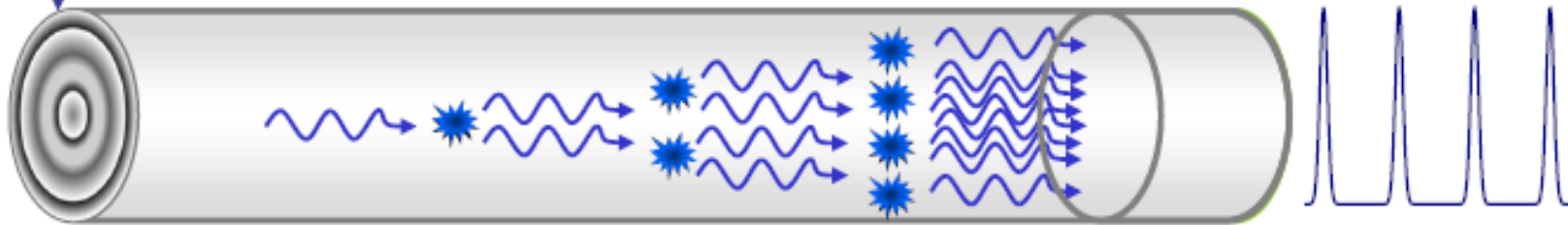
Laser - princip

- Většina molekul látky musí být v excitovaném stavu
- Po absorpci světla dojde ke stimulaci molekuly a ta vyzáří dva fotony
- Fotony následně způsobí emisi dvojnásobného množství fotonů
- Všechny fotony mají stejnou energii, i vlnovou délku a emitované světlo má stejnou barvu – je monochromatické a je také koherentní

zrcadlo

zrcadlo
(částečně
propustné)

pulsy



- Látce je neustále dodávána energie, aby byly molekuly neustále excitovány
- Fotony se odrážejí uvnitř prostoru mezi dvěma zrcadly
- Fotony v pulzech procházejí částečně propustným zrcadlem
- Vzdálenost pulzů je dána velikostí prostoru mezi zrcadly a rychlostí cyklu
- Spektrum je čarové - pouze jedna vlnová délka

Konvenční nefelometry



Konvenční nefelometry

- používají jako světelný zdroj žárovku nebo xenonovou výbojku
- Monochromátor - interferenční filtr.
- Detektor je nastaven pod úhlem 70 až 90°.

Xenonová oblouková lampa



- Poskytuje intenzivní světelné záření pomocí elektrického oblouku
- Skládá se z oválné baňky vyrobené z křemenného skla ve které jsou proti sobě umístěné katoda a anoda v atmosféře xenonu
- Teplota elektrického oblouku se pohybuje okolo 6000 °C
- Produkuje vysoce energetické, spojitě záření v UV oblasti

Xenonová oblouková lampa



Nefelometrie



Rozdělení podle typu měření

- **System měření v end point režimu**– po smíchání antigenu a protilátky proběhne měření po dosažení rovnovážného stavu - možnost falešně negativní (nízká) koncentrace antigenu. Proto je nutné nastavení systému tak, aby měření probíhala v oblasti lineární části křivky

Měření v tomto režimu je o řád citlivější než turbidimetrie (0,1 mg/l)

Nefelometrie

System měření v end point režimu

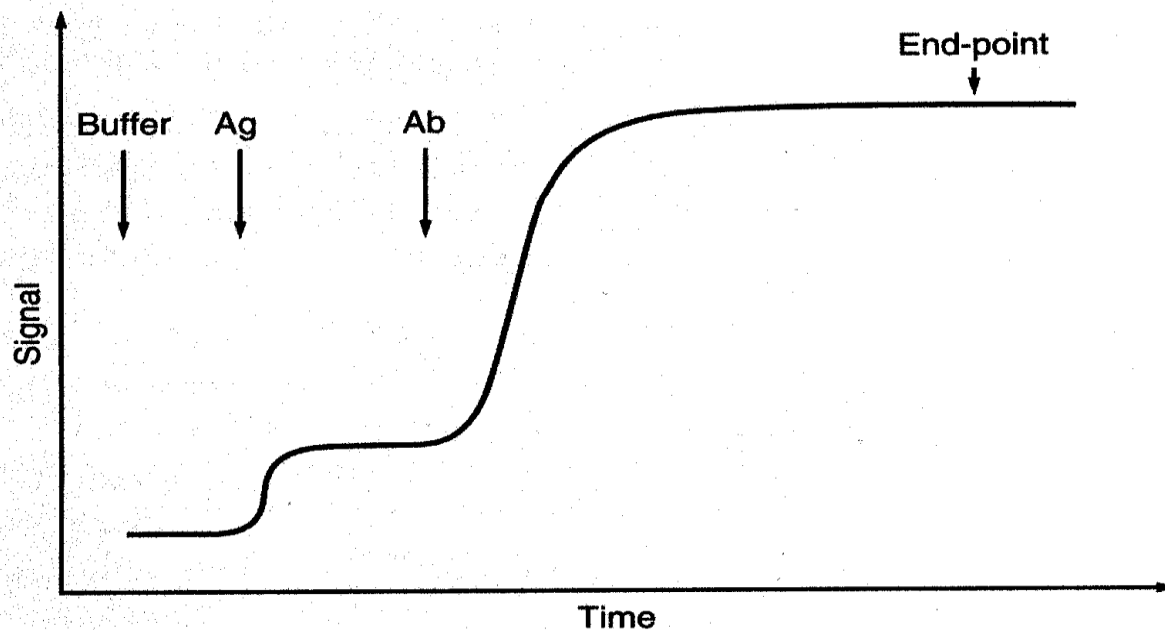


Figure 3. Signal development as a function of time. The addition of buffer, antigen (Ag), and antibody (Ab) to the reaction cuvette is indicated by arrows.



Nefelometrie

Rozdělení podle typu měření

System měření v kinetickém režimu -

RATE-reakce je rychlejší, měří se přírůstek vzniku precipitátu v pravidelných časových intervalech, po dosažení rovnovážného stavu (desítky vteřin) se měření ukončuje

Nefelometrie

- **System měření v kinetickém režimu**

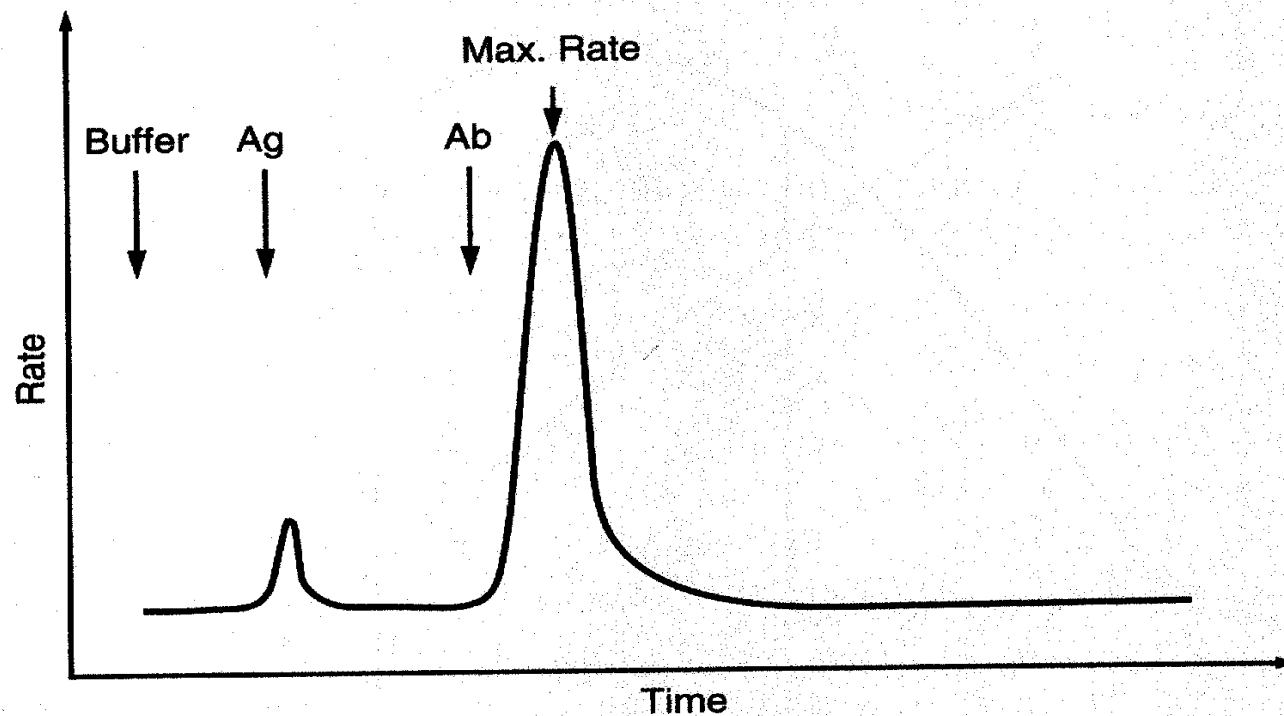
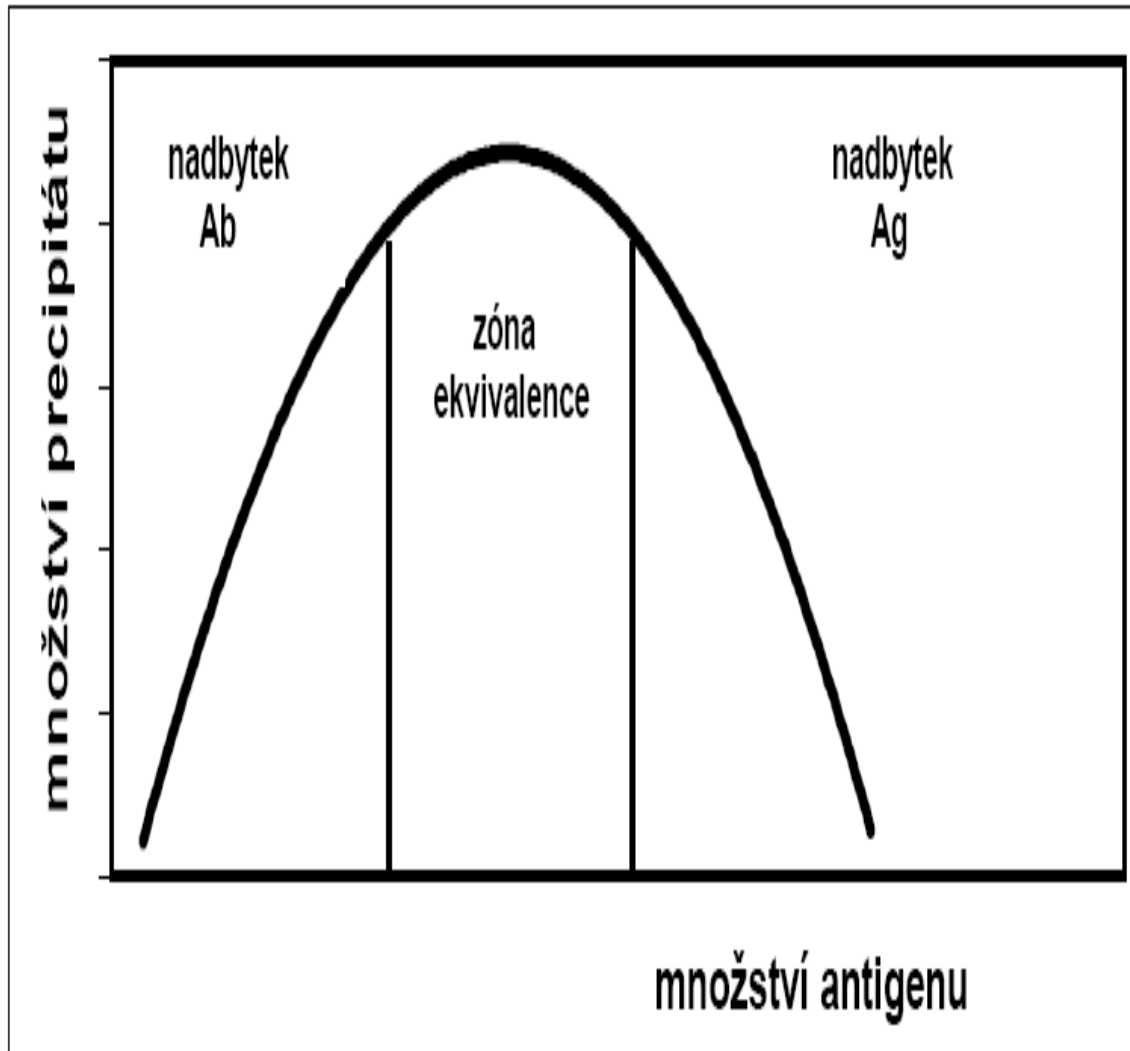


Figure 4. Reaction velocity (rate) as a function of time. The addition of buffer, antigen (Ag), and antibody (Ab) to the reaction cuvette is indicated by arrows.

Průběh imunoprecipitační reakce



Heidelbergo-Kendalova
křivka:

Oblast ekvivalence
• Oblast nadbytku
protilátky

Zákalové metody:

nefelometrie, turbidimetrie

• Oblast nadbytku antigenu

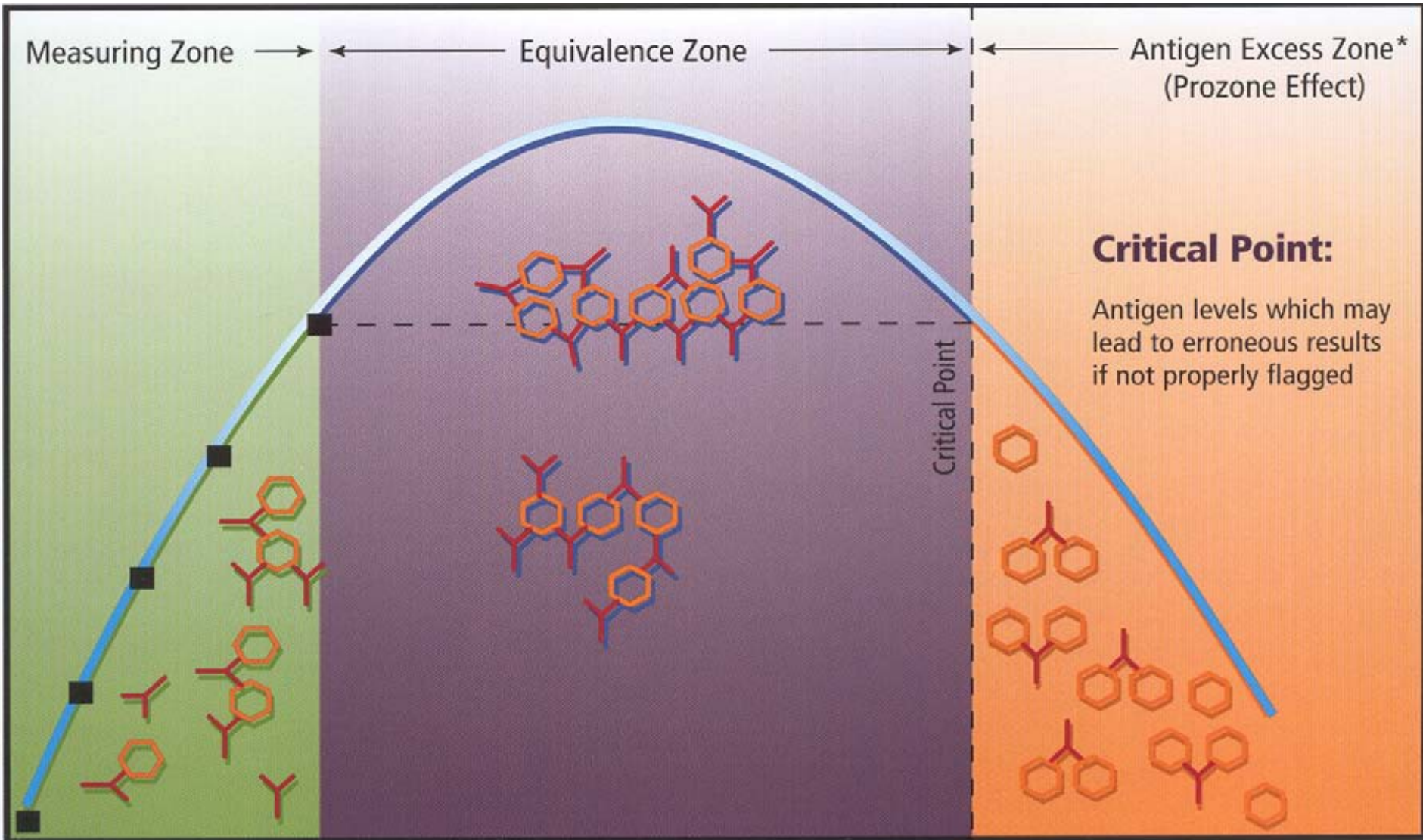
Ab - protilátka

Ag - antigen

Limitující faktory imunochemických stanovení

- Limitující faktor: precipitát se tvoří pouze při optimálním množství antigenu a protilátky, při nadbytku některé ze složek se precipitát začne rozpouštět.
- tzn. JEDNA HODNOTA KONCENTRACE PRECIPITÁTU TAK ODPOVÍDÁ DVĚMA KONCENTRACÍM ANTIGENU – možnost vydání falešně negativního výsledku

Imunoprecipitační křivka podle Heidelberga a Kendalla



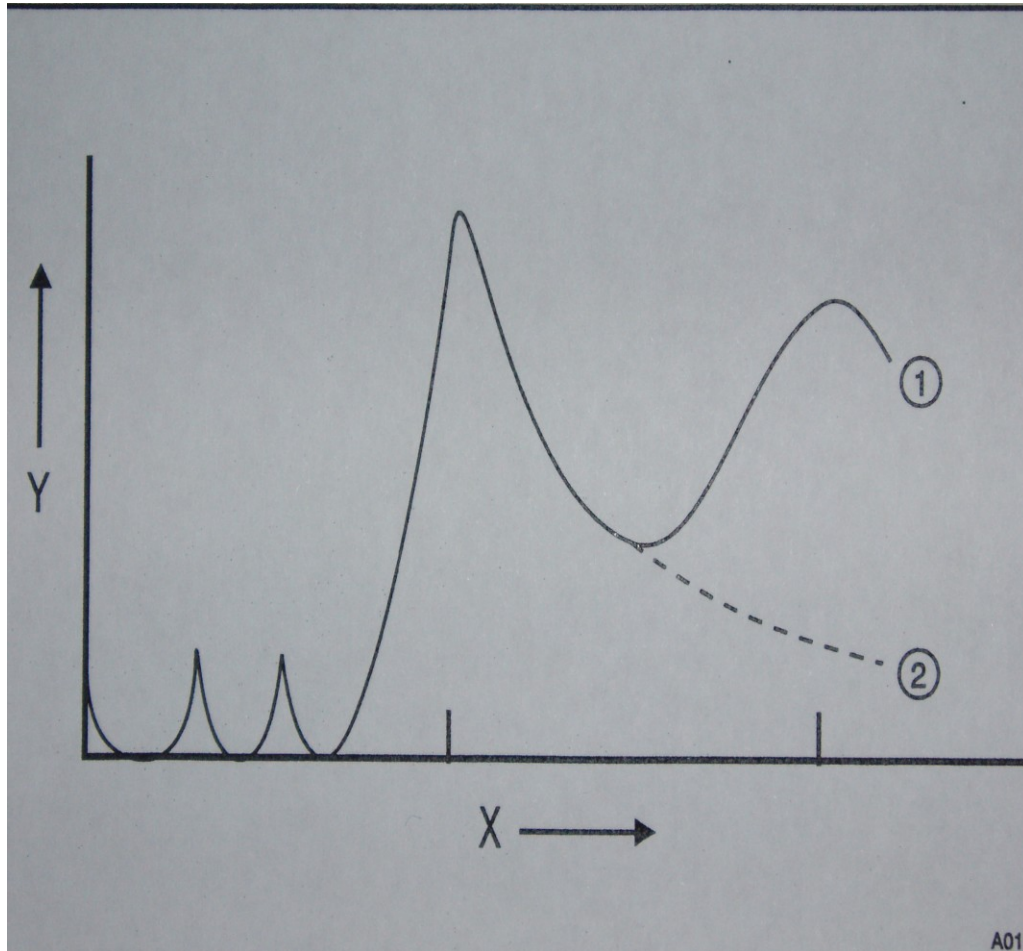


Detekce nadbytku antigenu

Několik způsobů:

- Kontrola přidavkem naředěného antigenu po proběhnuté imunoprecipotační reakci – následuje automatické opakování analýzy s vyšším ředěním.
- Přídavek malého množství vzorku k činidlu před vlastní reakcí – je-li po krátké inkubaci překročen koncentrační práh zjištěný při kalibraci, vzorek se měří automaticky znovu při vyšším ředění

Detekce nadbytku antigenu



1. V případě zachování nadbytku Ab dojde další tvorbě imunokomplexů a nárůstu intenzity rozptýleného světla
2. Pokud byla protilátka již spotřebována, nevede přidání dalšího antigenu k tvorbě imunokomplexů a na detektoru nezjistíme žádnou odezvu – reakce se automaticky opakuje při vyšším ředění

Imunochemický systém - IMAGE 800

- Analyzátor výrobce Beckman Coulter
- využívá turbidimetrického a nefelometrického principu
- Pracuje v kinetickém režimu - měří zvýšení intenzity světla rozptýleného částicemi v kyvetě v čase



IMAGE 800 - reagenční část



- Reagenční karusel pro 24 reag. kazet
- Teplota 15 C
- 4 lahvičky s pufry bez chlazení
- Reag. kazety značené čárovým kódem
- Otevřený systém
- Softwarová kapacita -50 metod
- Kalibrační data- kal. křivka výrobce má 8-12 bodů, provádí se pouze jednobodové ověření



Vzorková část

- Vzorky ve zkumavkách s čár. kódem
- Vzorkový karusel pro 8 stojánků po 9 vzorcích
 - ředící roztoky pro vzorky
 - ředící segmenty pro ředění vzorků
- Kapacita: 180 testů za hodinu, v sérii lze provést 12 metod

Reakční část



- Reakční karusel – 39 reak. plastových kyvet,
1 referenční – známá hodnoty rozptylu,
nastavení optického systému
- Teplota 37 C
- Optika – zdroje záření, detektory

Turbidimetrie



- měření stupně zákalu (turbidity) – v důsledku imunoprecipitační reakce
- Měří se snížení intenzity světla při průchodu roztokem částic v kyvetě v důsledku rozptylu světla
- Immage pracuje v kinetickém režimu – hodnotí rychlost nárůstu zákalu v čase
- NIPIA= imunoanalýza na částicích v blízké infračervené oblasti

Turbidimetrie



- Zdroj pro NIPIA: světlo emitující dioda – poskytuje monochromatické záření $\lambda = 940 \text{ nm}$
- Detekce záření: v přímém směru, v ose světelného paprsku zdroje v blízké IR oblasti (940 nm)
- Vyžití: stanovení FLC

Nefelometrie



- Zdroj: helium-neonový laser – dává monochromatické záření o $\lambda = 670 \text{ nm}$
- Detekce: detektor je umístěn v úhlu 90° ke směru laserového paprsku
- Využití: stanovení specifických proteinů v séru, v likvoru a moči

Nefelometrie



- Zdroj: helium-neonový laser – dává monochromatické záření o $\lambda = 670 \text{ nm}$
- Detekce: detektor je umístěn v úhlu 90° ke směru laserového paprsku
- Využití: stanovení specifických proteinů v séru, v likvoru a moči

Řešení problému s imunoprecipitační křivkou

- Nutno provést taková opatření, aby nedošlo k omylu při odečítání vyšších koncentrací antigenu
- **IMMAGE** : detekce nadbytku antigenu pomocí přidavku dalšího antigenu po ukončení reakce

Jestliže nenavázaná protilátka ...	Přídavek dalšího antigenu bude mít za následek...	System IMAGE...
Je přítomna	Zvýšení poměrové odezvy	Použije k výpočtu výsledku původní poměrovou odezvu
Není přítomna	Žádné zvýšení poměrové odezvy	Vzorek automaticky zopakuje s vyšším ředěním s testem na přebytek antigenu dokud nezíská správný výsledek

Automatizovaný nefelometr BN Pro Spec

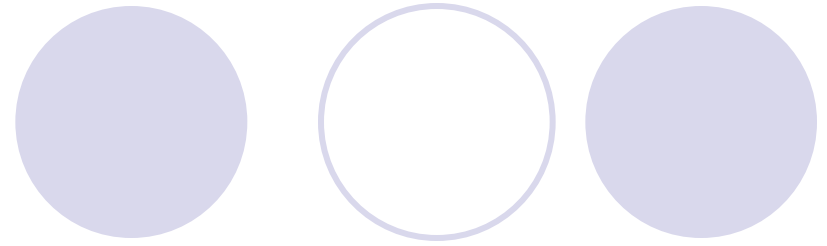
- **Výrobce: Siemens (dříve Dade Behring)**
- **Max. provozní rychlost 180 analýz za hod.**
- **Pracuje v režimu po vzorcích**
- **K dispozici je více než 60 metod**
- **Zdroj světla: LED dioda (840 nm)**
- **Detektor – křemíková fotodioda je umístěn pod úhlem 13-24 °**

Automatizovaný nefelometr BN Pro Spec

- **Reagenční disk** je temperován na 8°C, v analyzátoru lze umístit 35 činidel
- **Reakční disk:** 60 polystyrénových kyvet pro opakované použití
- Měření probíhá při 37 °C
- Délka inkubace je 6-12 min.
- Vzorková část: lze umístit až 100 vzorků, umožňuje používat primární, sekundární zkumavky a kepy



Nefelometr Array 360



- Výrobce: Beckman Coulter
- Měření v kinetickém režimu
- Rychlost 40-80 analýz za hod.
- Zdroj světla: halogenová žárovka (400-620 nm)
- Detektor: křemíková fotonka
- K dispozici asi 60 metod
- Nevýhoda: pracovní teplota pouze 26,7 °C, velký mrtvý objem, stabilita kalibrace pouze 14 dní

Nefelometr - Delta

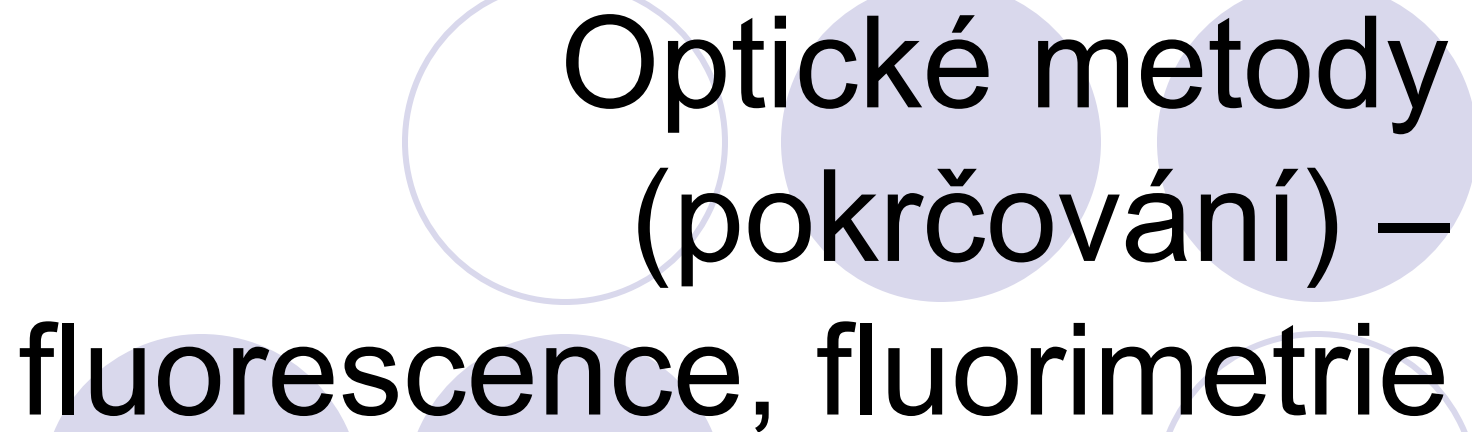
- Výrobce Radim
- Zdroj světla laser (670 nm)
- K dispozici 100 metod
- Rychlost 150 analýz za hod. (startovací čas 30 min., ukončovací čas 15 min. !)
- Reagenční část: 54 pozic pro reagensie, chlazená
- Reakční část: 120 omyvatelných kyvet, temperovaných na 37 °C
- Vzorková část: pro 80 vzorků



Turbox plus



- Jednoduchý manuální nefelometr
- Výrobce: ORION Diagnostica
- Lze měřit až 100 vzorků za hodinu
- Zdroj světla je LED dioda (635 nm)
- Detektor: 2 fotodiody
- Tovární kalibrace je na magnetické kartě



Optické metody
(pokrčování) –
fluorescence, fluorimetrie

Luminisceční metody



Luminiscence – je emise světla při návratu elektronu z excitovaného stavu na nižší energetickou hladinu

Druhy luminiscence:

❖ **Fluorescence**

- Fosforescence
- Chemiluminiscence

Vzájemně se liší:

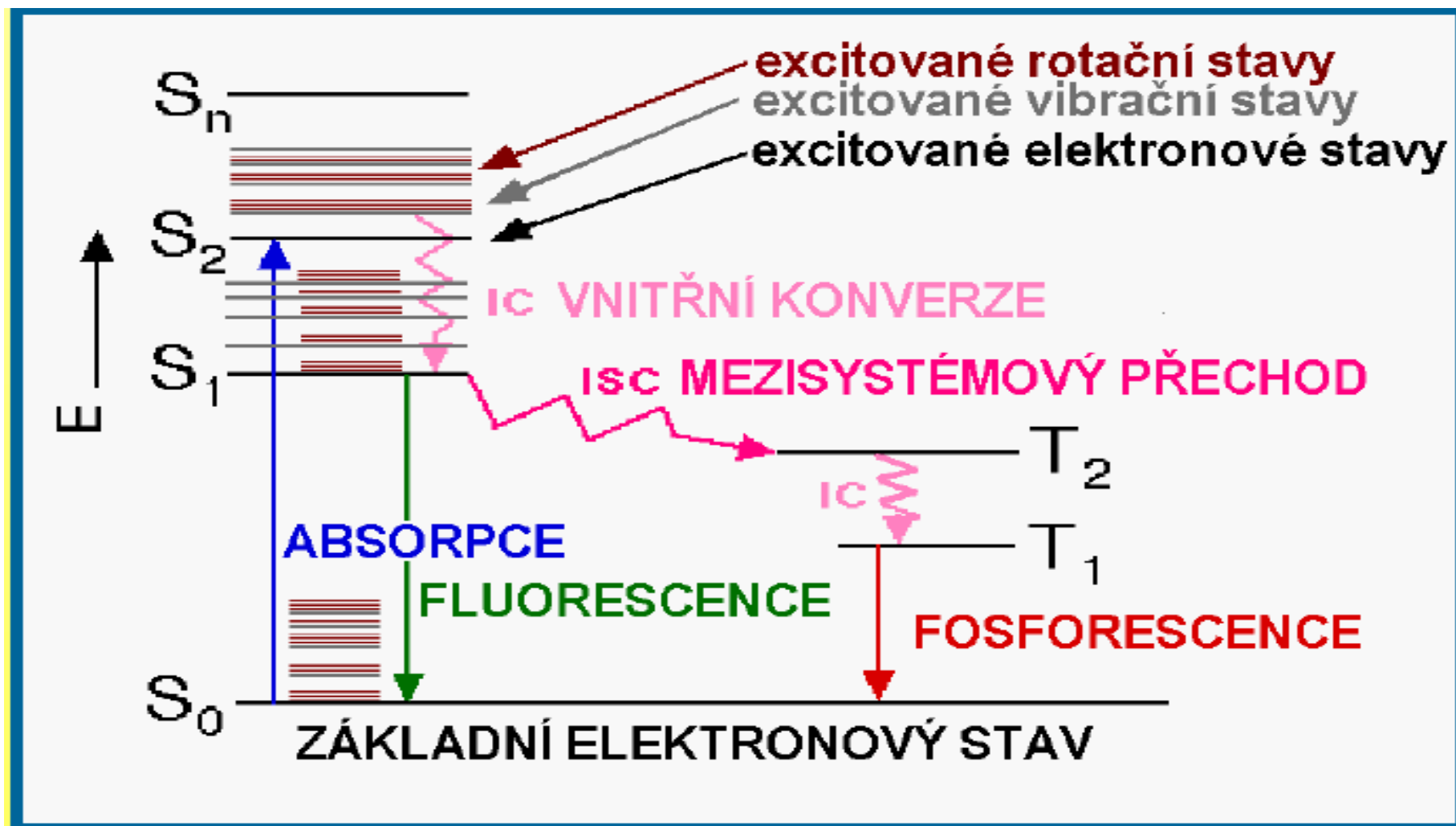
- způsobem aktivace elektronu do excitovaného stavu
- způsobem vyzáření energie

Fluorescence



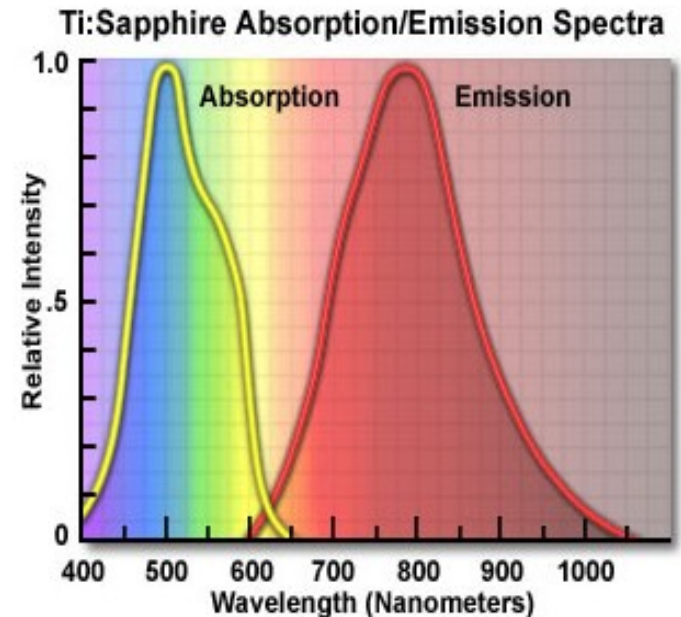
- druh luminiscence, u níž dochází k emisi světla v čase kratším než 10^{-8} s
- Je to emise elektromagnetického záření při přechodu mezi dvěma stavy téže multiplicity (obvykle dvěma singlety)
- molekuly absorbují světlo při jedné vlnové délce (excitační) a reemitují při větší vlnové délce (emisní)

Fluorescence a fosforescence



Fluorescence

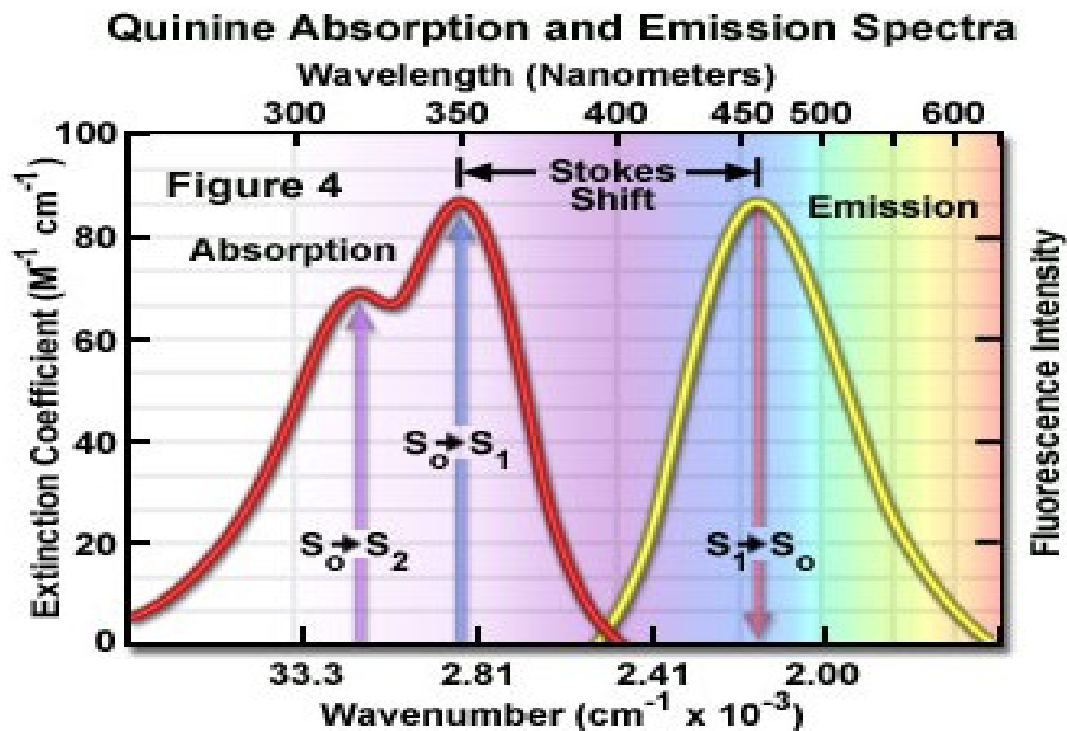
- Při excitaci se molekuly dostanou na vyšší energetickou hladinu a při návratu do základního stavu se část energie vyzáří také ve formě tepla.
- Proto má emitované záření fluoreskujících sloučenin vždy vyšší vlnovou délku (tj. méně energie) než excitační záření, vyvolávající fotoluminiscenci



Fluorescence

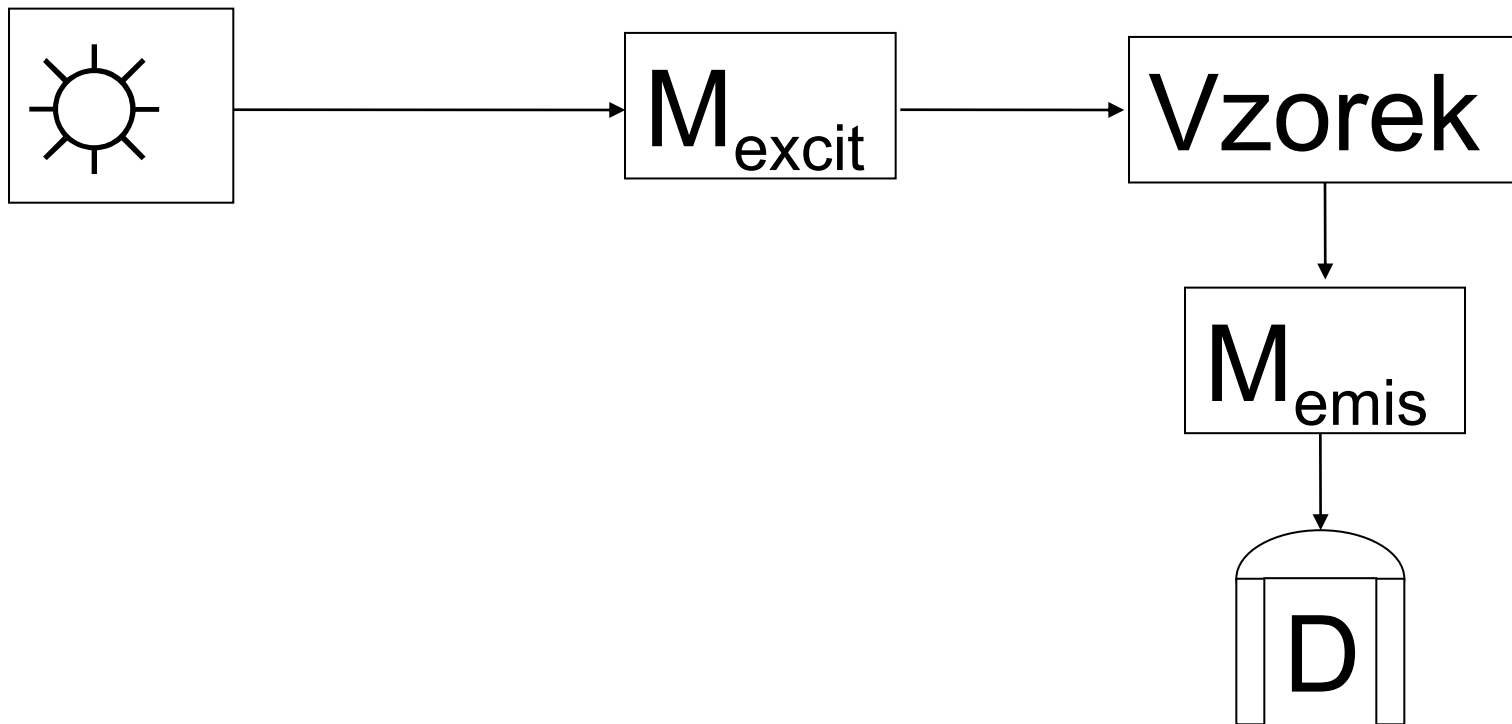
Stokesův posun

rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního primárního) a emitovaného (sekundárního) záření



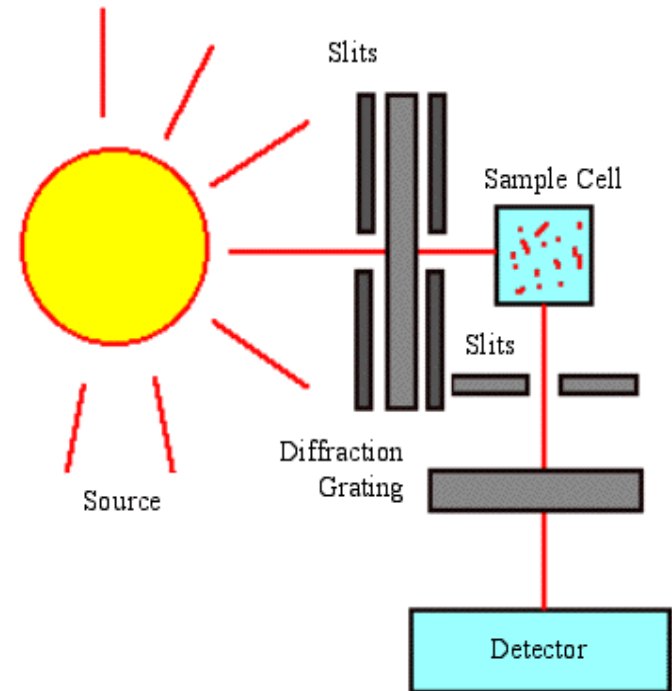
Fluorimetrie

- Přístroje, které se používají k měření intenzity emisního záření se nazývají fluorimetry



Fluorimetry

- Zdroj světla: xenonová nebo xenono-rtuťová lampa (300-550 nm)
- Monochromátor pro výběr excitačního záření
- Absorpční prostředí – křemíková kvjeta
- Monochromátor pro sekundární emisní záření
- Detektor: fotonásobič, je umístěn pod úhlem 90° vzhledem ke zdroji záření



Fluorimetrie



- Imunochemické metody s fluorescenční detekcí
- Intenzita fluorescence je úměrná koncentraci fluoroforu
- Metody jsou řádově citlivější než měření absorbance (100-1000x)
- Fluorescence je více specifická, protože existuje jen málo přirozených fluoroforů, které by mohly způsobit interferenci

Fluorimetry



- Automatizované imunoanalyzátory
- Fluorescenční polarizované systémy – TDx, Imx
- DELFIA – imunoreagencie značené europiem
- Průtoková cytometrie

Fluorofory



- látky, které fluoreskují. Většina obsahuje konjugované dvojně vazby

Přirozené fluorofory

- Tryptofan
- porfyriny

Analytické fluorofory

- Fluorescein
- Methylumbelliferon
- Methylumbelliferonfosfát (MUP)
- Cheláty lanthanidů (Europium)

The slide features six decorative circles of varying shades of light purple. Two are hollow outlines, and four are solid. They are arranged in two rows: the top row has three circles (hollow, solid, solid) and the bottom row has three circles (solid, solid, hollow).

Děkuji za pozornost