

# **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

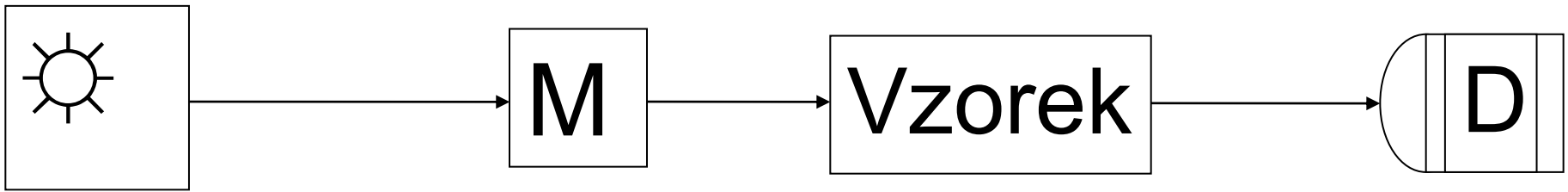
# Turbidimetrie



- 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

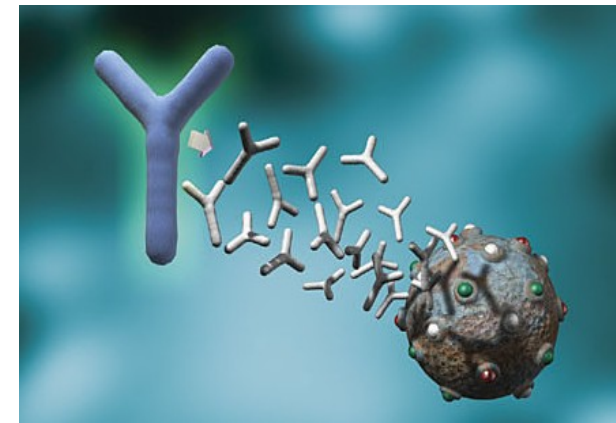
# Turbidimetrie

- 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.



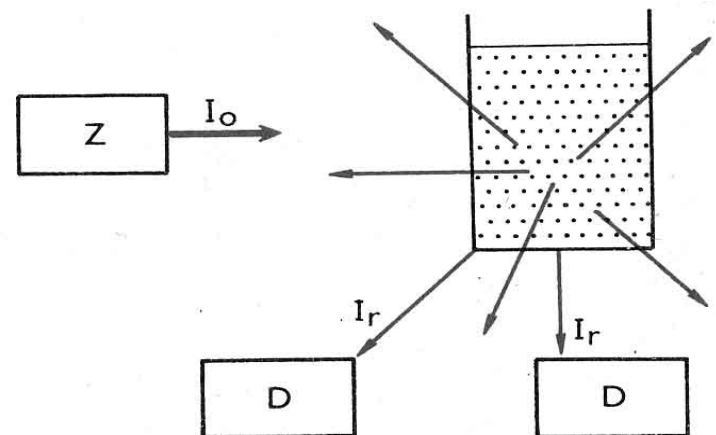
# Turbidimetrie



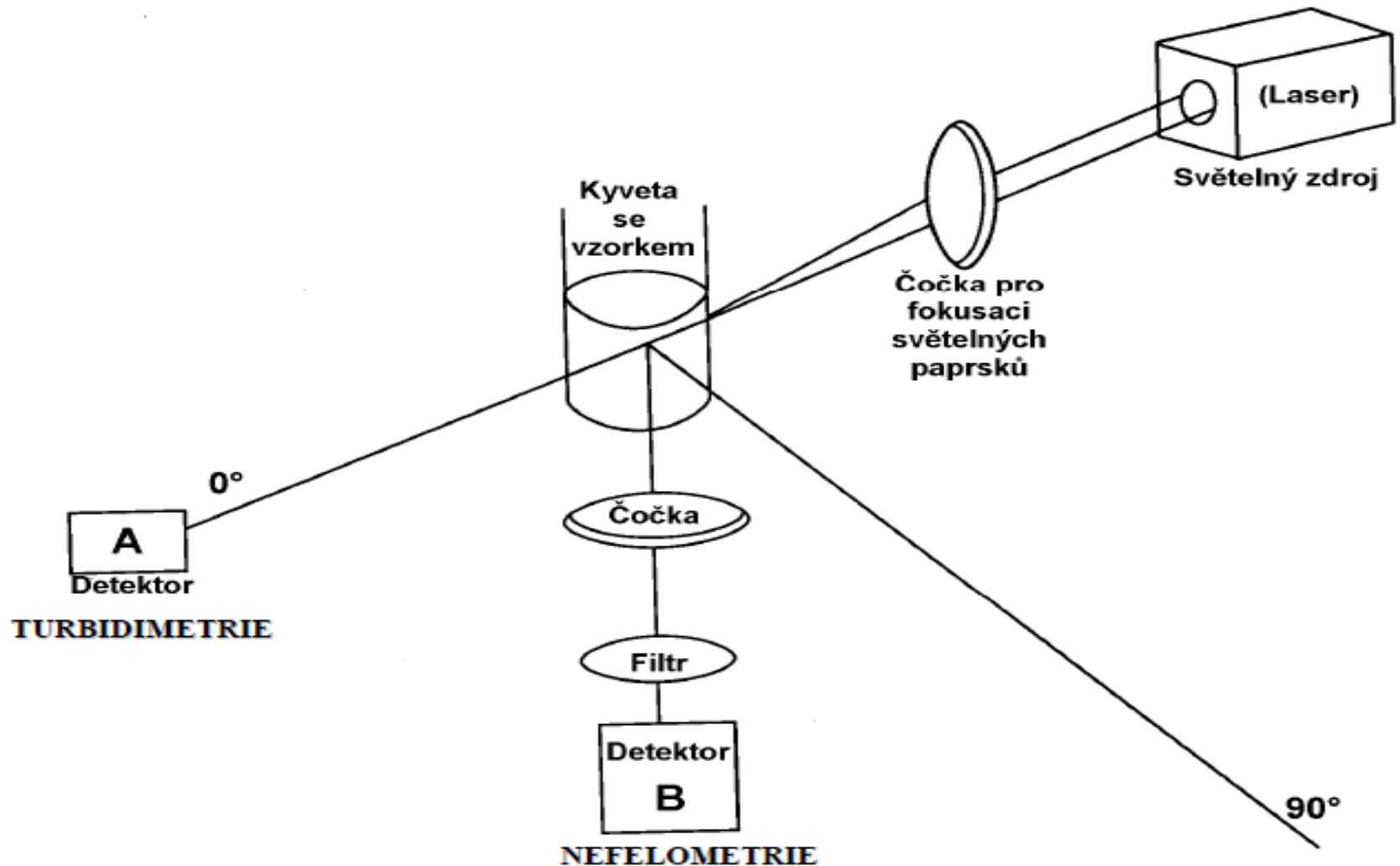
- Pro kvalitní turbidimetrii je nutná fotometrická citlivost  $<0,02$  mA
- Na biochemických analyzátorech dosahují turbidimetrické metody reprodukovatelnost asi 5%
- Je třeba snížit vliv interferujících látek na minimum – jakýkoliv vliv, který způsobí vznik částic odlišné velikosti (koncentrace činidel, 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  $90^\circ$ , 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

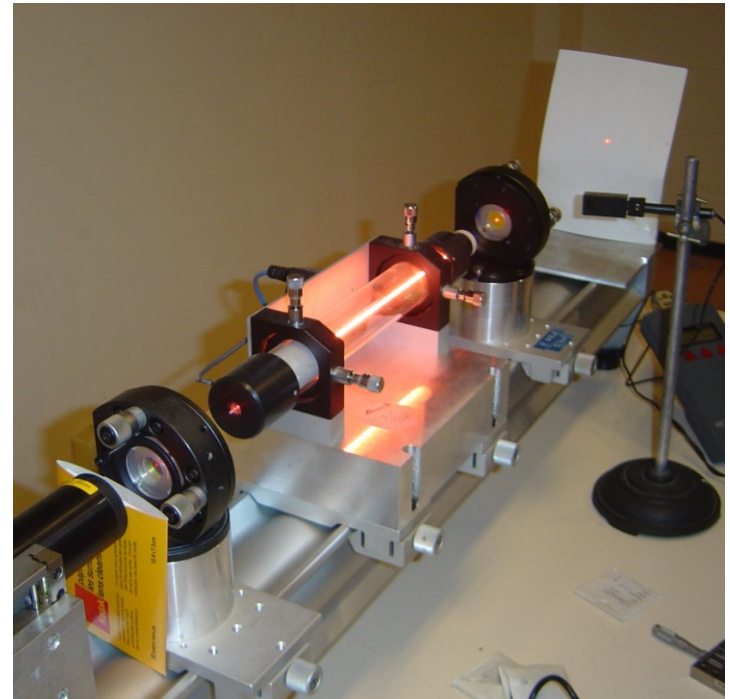
- Tento zdroj monochromatického světla je mimořádně intenzivní a má vysoký stupeň směrovosti paprsku
- Rozptýlené světlo se sleduje detektorem nastaveným pod úhlem 5 až 35° (fotonkou nebo fotonásobičem), ale ve víceúčelových přístrojích pod úhlem 90°.

# Laserový nefelometr

**LASER = Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation = 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

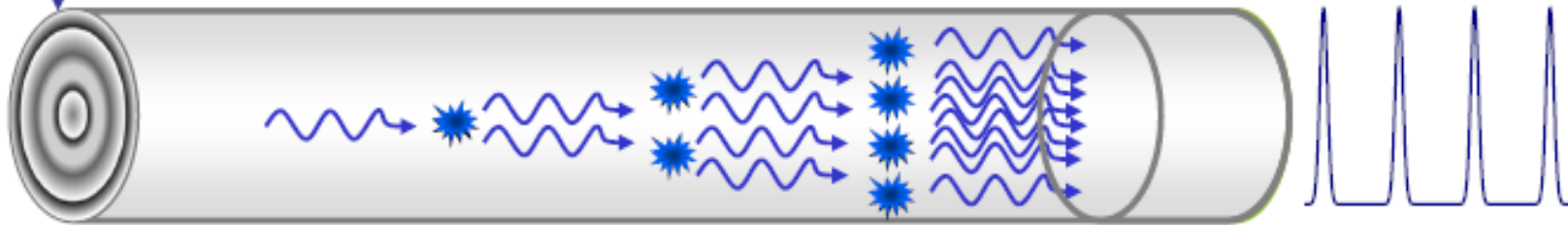
# Laser - princip

- 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



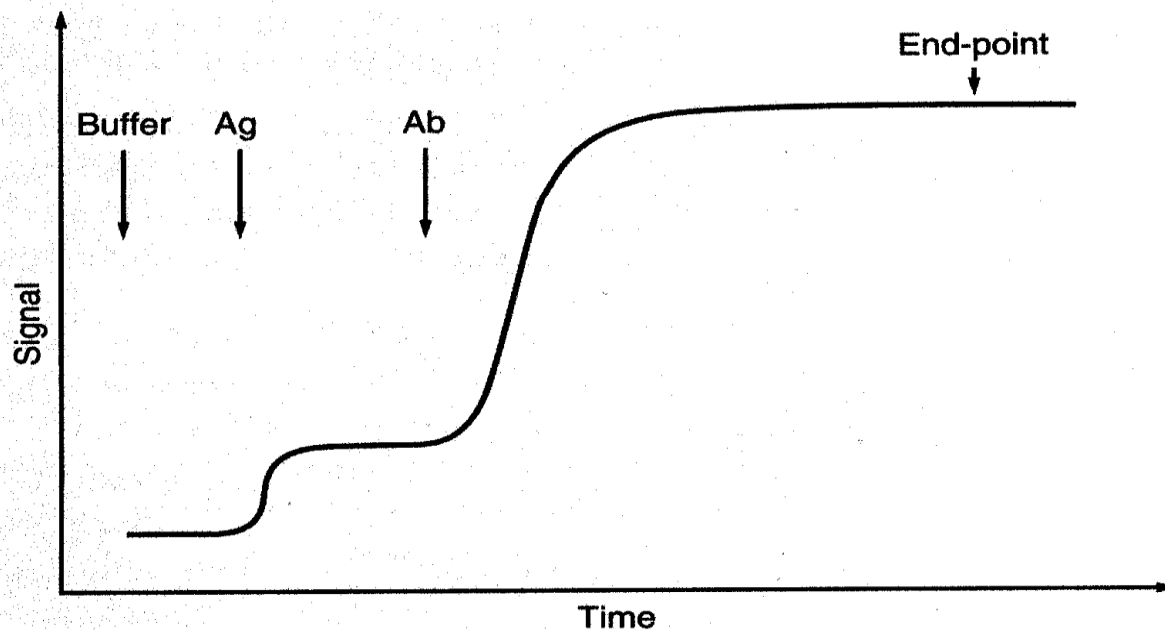
## Rozdělení podle typu měření

- **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

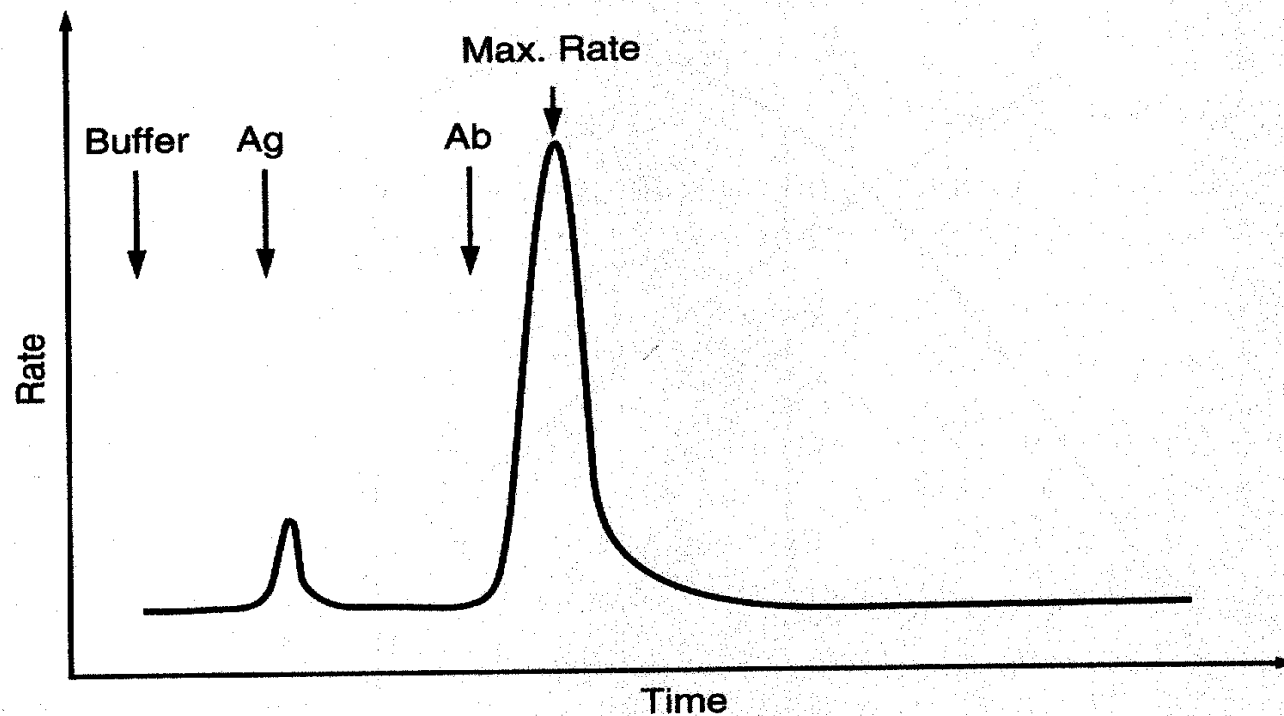
## Rozdělení podle typu měření

### 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

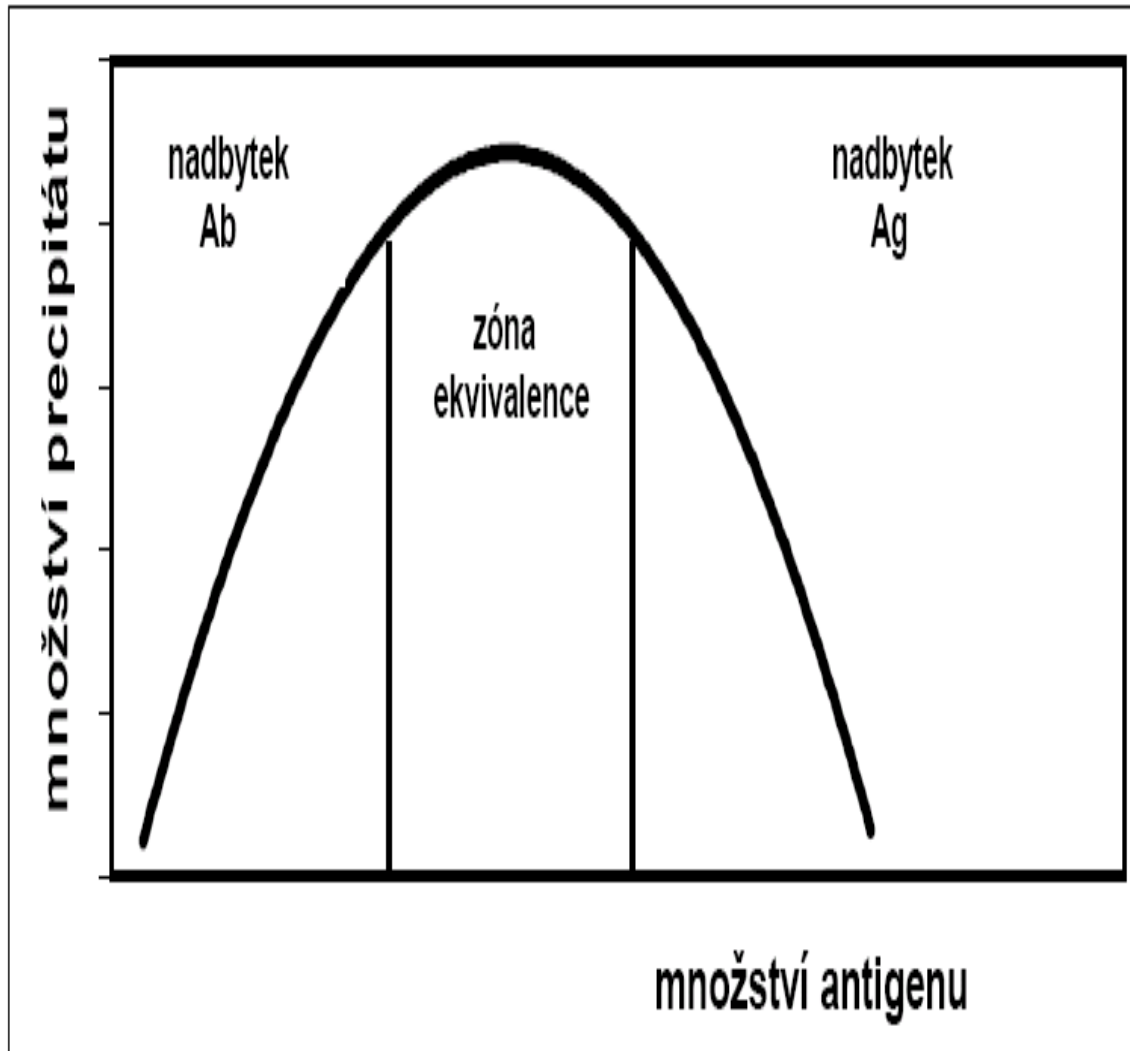
# Nefelometrie

- **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

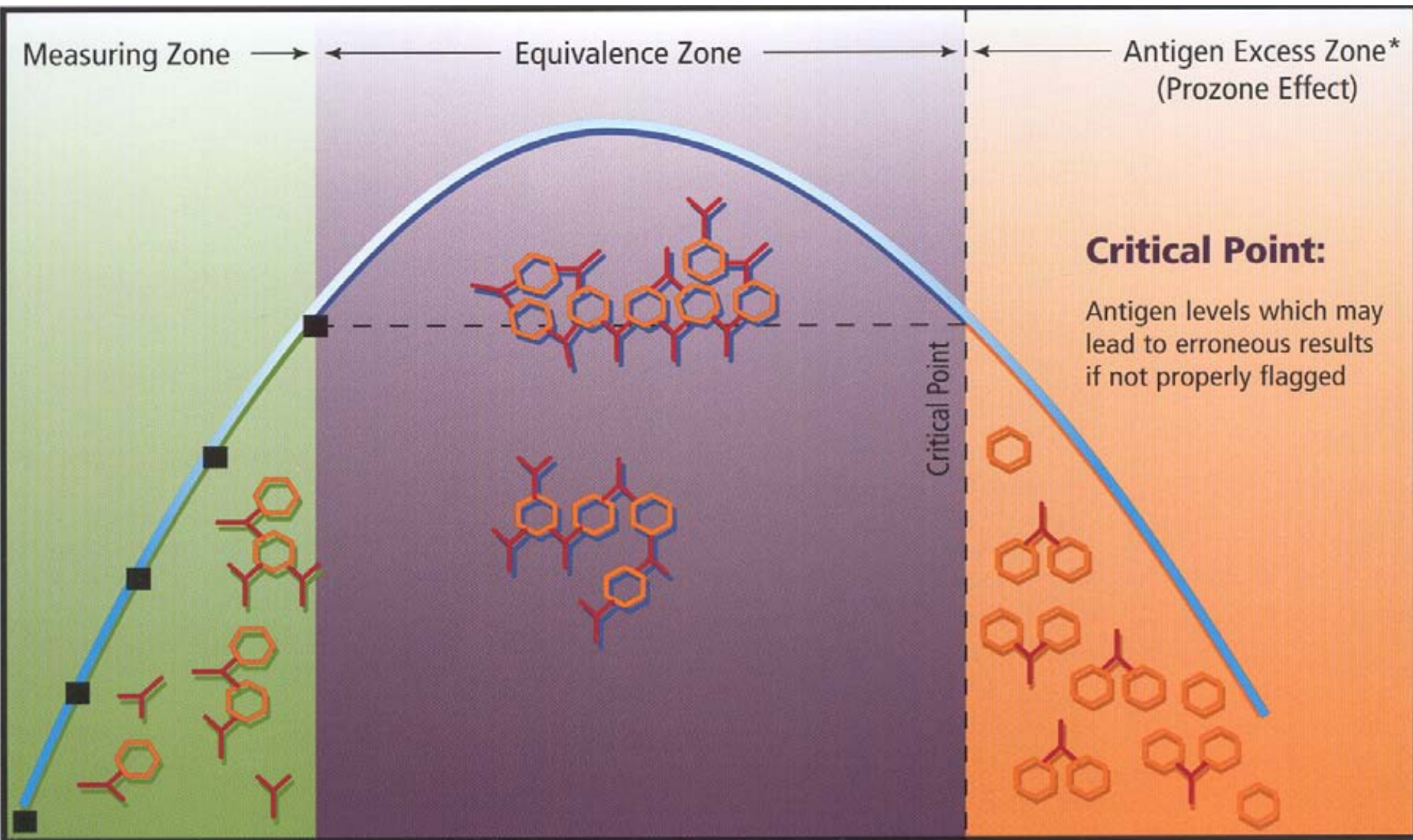
Ag - antigen



# 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



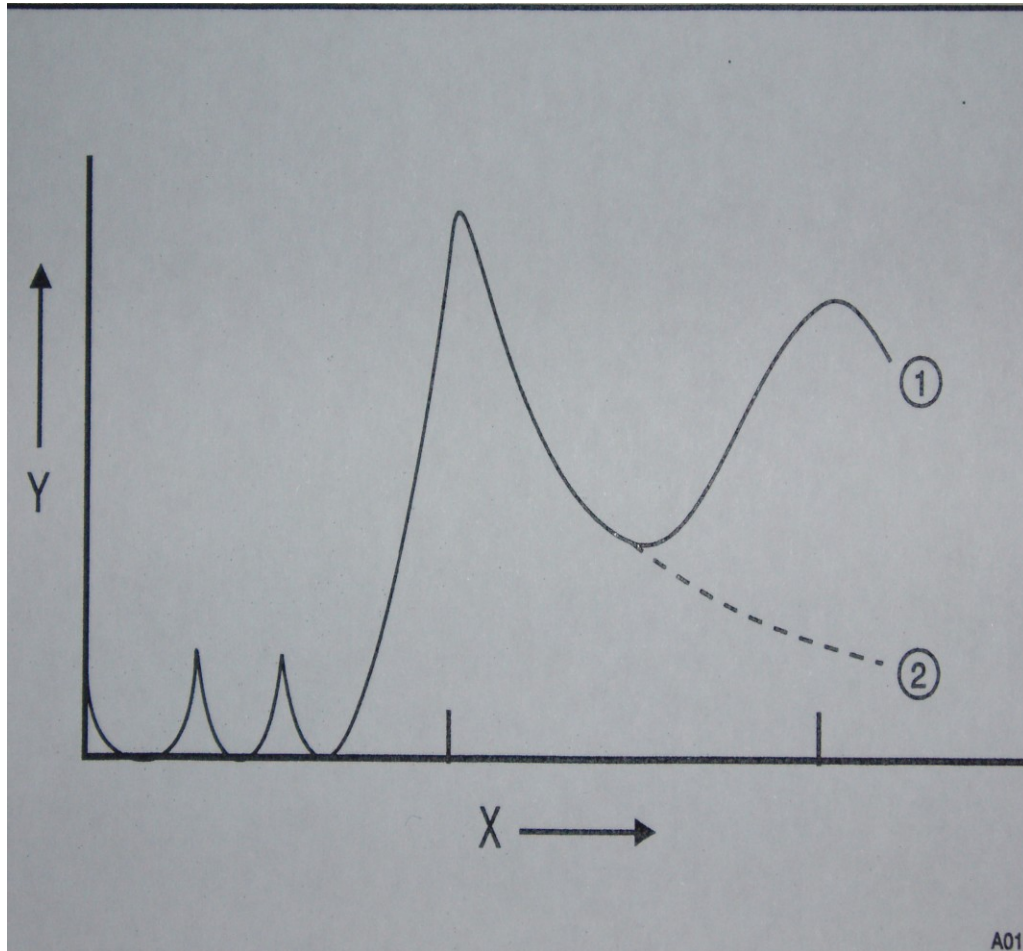


# Detekce nadbytku antigenu

## 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  $90^\circ$  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  $90^\circ$  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

<b>Jestliže nenavázaná protilátka ...</b>	<b>Přídavek dalšího antigenu bude mít za následek...</b>	<b>System IMAGE...</b>
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 °**

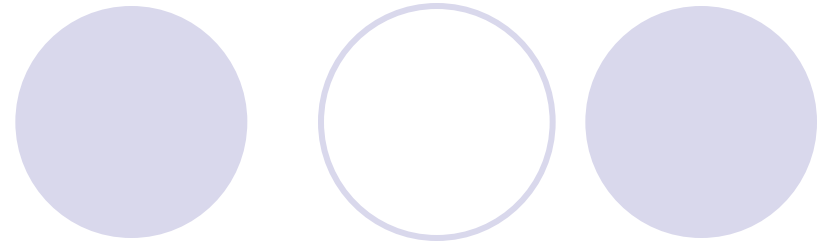
# Automatizovaný nefelometr BN Pro Spec

- **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

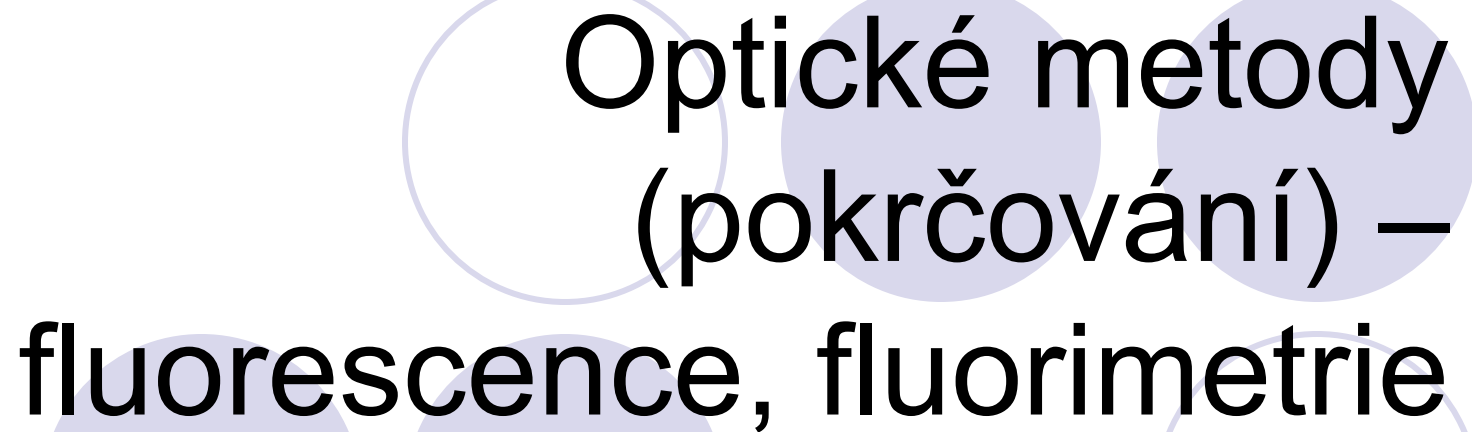
- Výrobce Radim
- Zdroj světla laser (670 nm)
- K dispozici 100 metod
- Rychlost 150 analýz za hod. (startovací čas 30 min., ukončovací čas 15 min. !)
- Reagenční část: 54 pozic pro reagensie, chlazená
- Reakční část: 120 omyvatelných kyvet, temperovaných na 37 °C
- Vzorková část: pro 80 vzorků



# 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:**

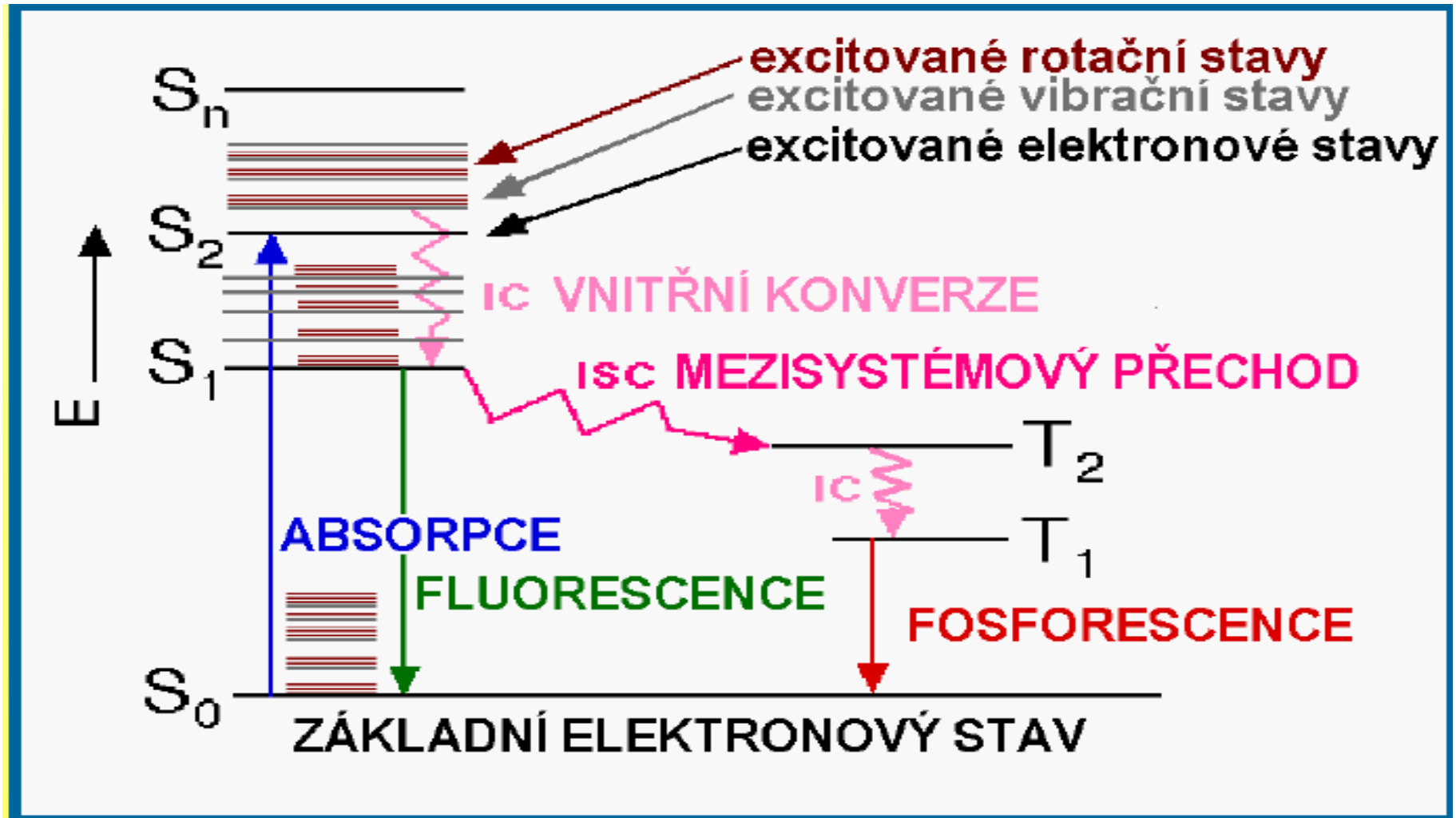
- způsobem aktivace elektronu do excitovaného stavu
- způsobem vyzáření energie

# Fluorescence

A decorative graphic at the top of the slide consists of two groups of three circles. The left group has a solid light purple circle on the left, a white circle with a light purple outline in the middle, and a solid light purple circle on the right. The right group has a solid light purple circle on the left, a white circle with a light purple outline in the middle, and a solid light purple circle on the right.

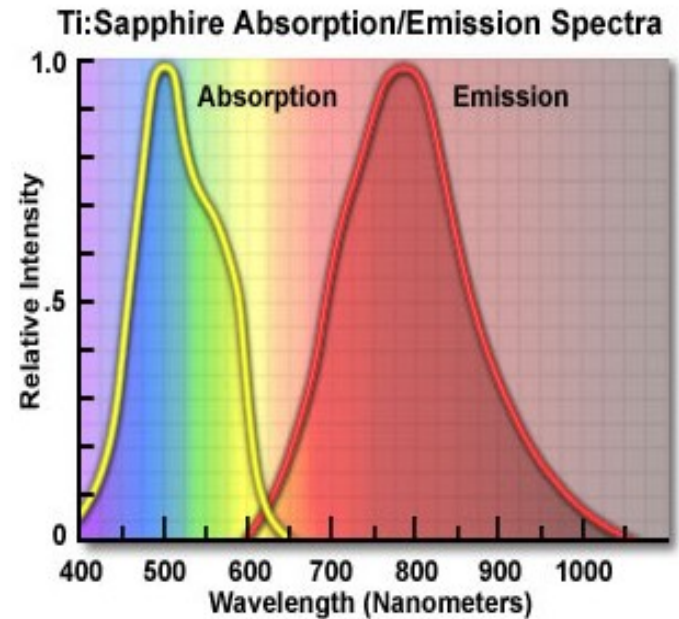
- druh luminiscence, u níž dochází k emisi světla v čase kratším než  $10^{-8}$  s
- Je to emise elektromagnetického záření při přechodu mezi dvěma stavy téže multiplicity (obvykle dvěma singlety)
- molekuly absorbují světlo při jedné vlnové délce (excitační) a reemitují při větší vlnové délce (emisní)

# 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

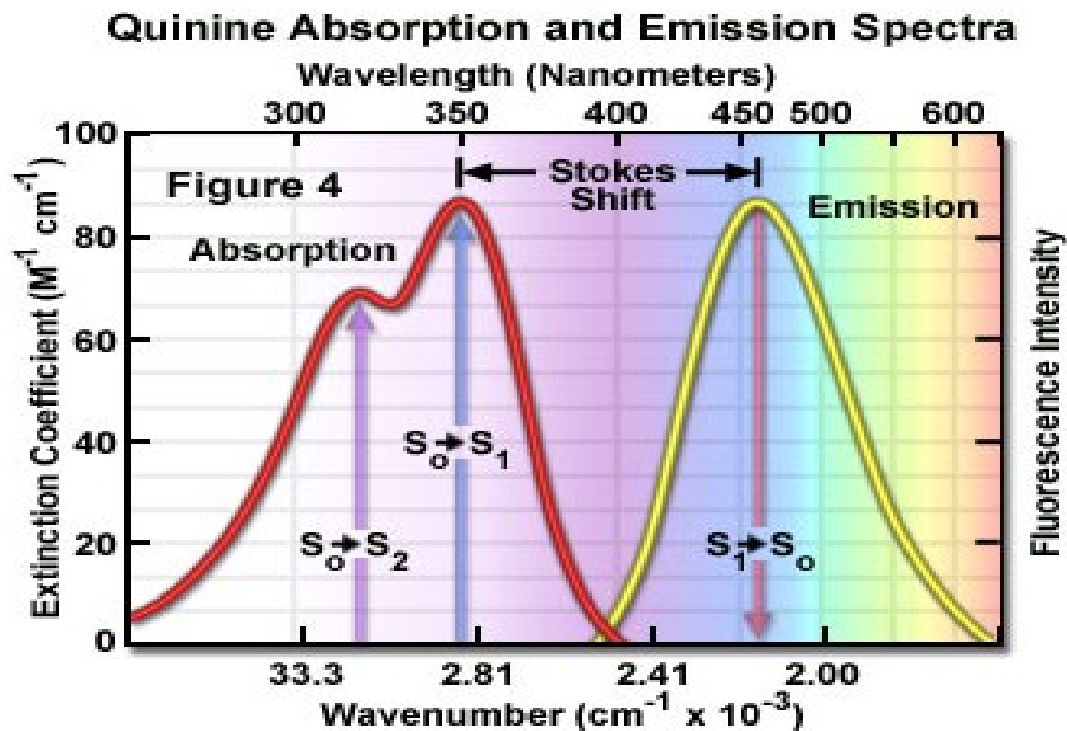




# Fluorescence

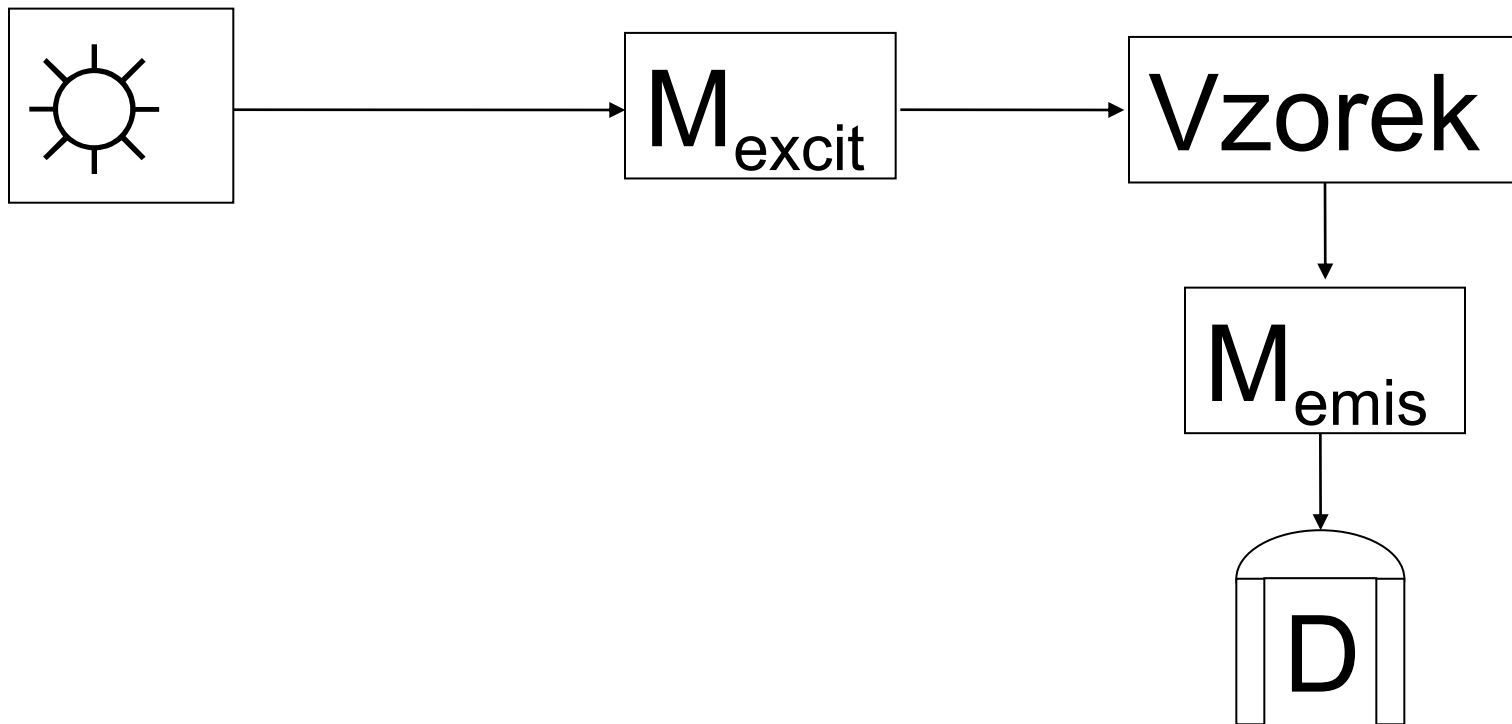
## Stokesův posun

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



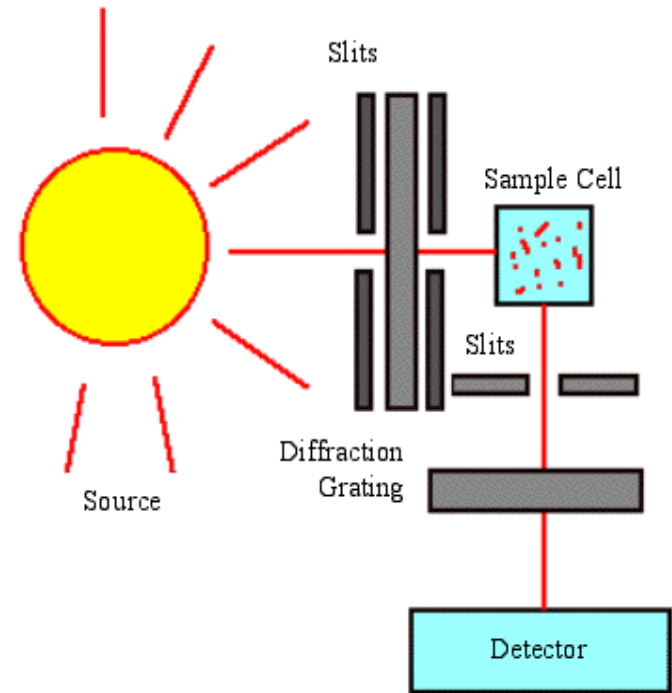
# Fluorimetrie

- 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 kyveta
- Monochromátor pro sekundární emisní záření
- Detektor: fotonásobič, je umístěn pod úhlem  $90^\circ$  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)



**Děkuji za pozornost**

