

RIA instrumentace

Jana Číhalová
OKB FN Brno
jcihalova@email.cz



RIA instrumentace



- Radioizotopové metody
- Radioindikátorové značenky- ^{125}I
- Detekce ionizujícího záření
- Popis přístrojů v klin.laboratořích RIA -princip detekce gama záření
- Kalibrace a metrologie přístroje

Radioizotopové metody



- Využívají ve svém principu základní vlastnosti radioizotopů – ionizující záření
- interakce ionizujícího záření s hmotou: excitace (emitace energie) a ionizace (tvorba nabitých iontů)
- Radioinuklidy se používají v imunoanalýzách ke značení imunokomplexu Ag-Ab
- Měří se radioaktivita záření
- Citlivé, specifické, levné metody, 10^{-9} - 10^{-12} mol/l
- RIA, IRMA, *RRA (TRAK)* , *REA (nukleotidy)*



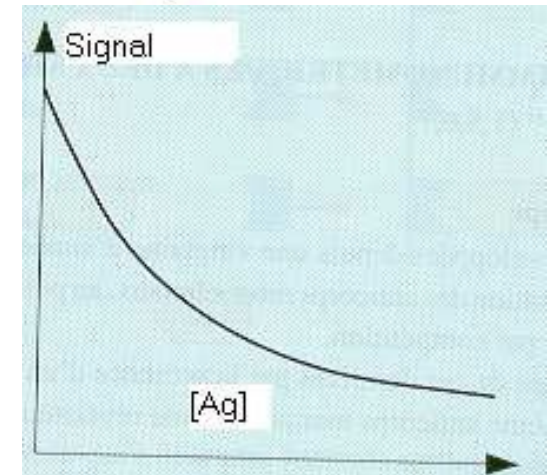
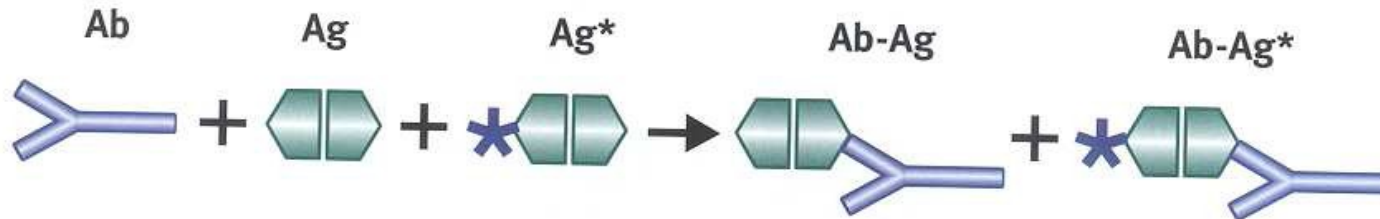
RIA (Radio Immuno Assay)

kompetitivní uspořádání

radioizotopem značený antigen (Ag), protilátka (Ab) je v limitovaném množství , soutěžení Ag a Ag* o vazbu na Ab navázáno 20-80 % značeného Ag

Ag málo vazebných míst

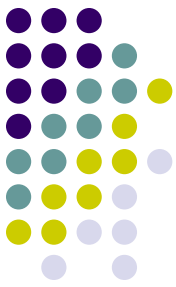
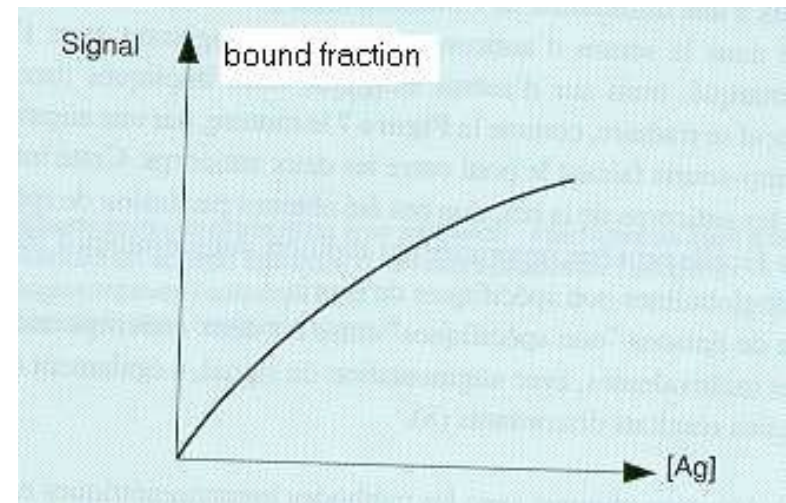
stanovení malých molekul antigenu (léky, tyroidální a steroidní hormony,



IRMA (Immuno Radio Metric Assay)

nekompetitivní

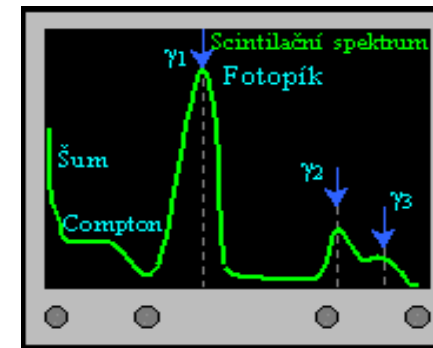
2 protilátky, jedna z nich je vázána na pevnou fázi (zkumavka) a druhá je radioizotopem značena radioizotopem a je v nadbytku
stanovení antigenu s minimálně 2 antigenními determinanty
stanovení velkých molekul (hormony, peptidy, karbohydráty)
krátká inkubační doba

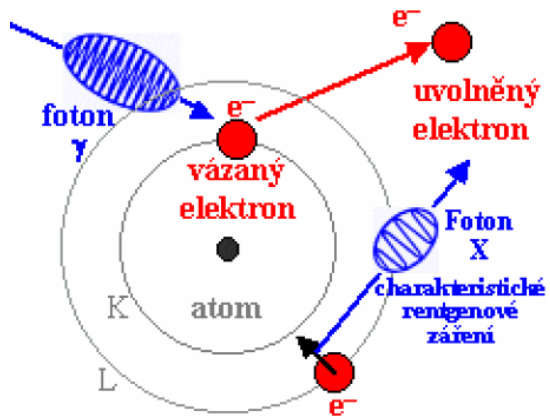


Radionuklidy

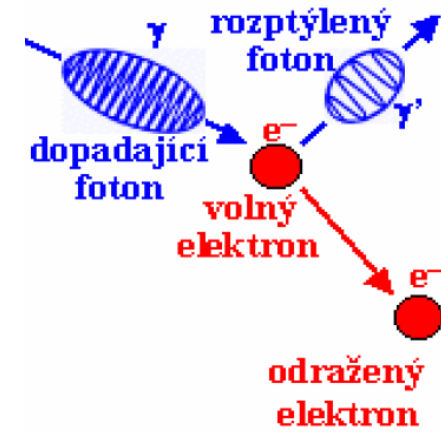


- Radionuklid- látka kt. má schopnost se samovolně přeměňovat za vzniku ionizujícího záření, jejich aktivita klesá v čase
- radionuklidy: **IVD soupravy: ^{125}I ($t_{1/2} = 60$ d)**
 - nukleární medicína: ^{131}I ($t_{1/2} = 8$ d), ^{123}I ($t_{1/2} = 13,2$ h), ^{60}Co ($t_{1/2} = 70,8$ d), ^{51}Cr ($t_{1/2} = 27,7$ d), ^{32}P ($t_{1/2} = 14,3$ d), ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ min),
 - biologie (analýza stáří): ^{14}C ($t_{1/2} = 5730$ r)
- ^{125}I - radiojod ve formě alkalických jodidů
 - $t_{1/2} = 60$ dní
 - nepřímý ionizační efekt (fotoefekt, Comptonův rozptyl)
 - gama zářič (35keV)
 - RTG záření (27keV)
 - sumační pík (62keV) - pro stanovení, čím vyšší sumační pík, tím větší detekční účinnost
 - aktivita ^{125}I v soupravách RIA je řádově $\times 10^2$ kBq





Fotoefekt



Comptonův rozptyl

Detekce ionizujícího záření

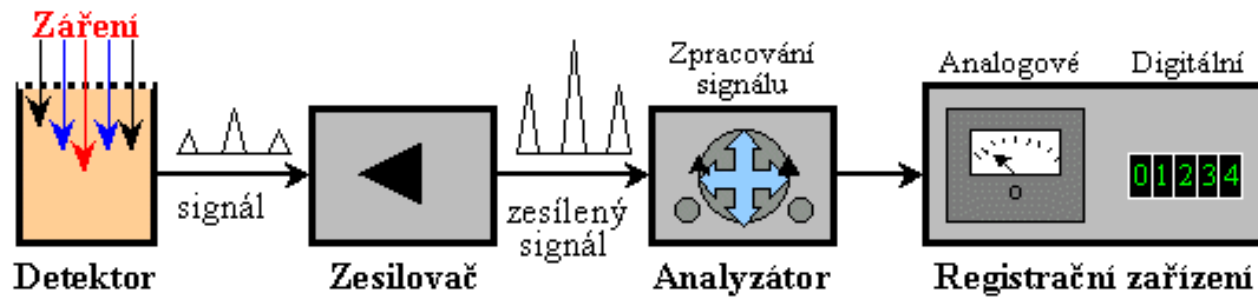


- Detektory záření- určují intenzitu záření, počet kvant záření, bez informací o druhu záření: filmové a termoluminiscenční dozimetry (*přijatá dávka*), ionizační komory, G.-M. (*v určitém prostoru*)



- Spektrometry- měří intenzitu, počet kvant a energie záření (scintilační detektory, polovodičové detektory)

Detekce ionizovaného záření



Scintilační detektor

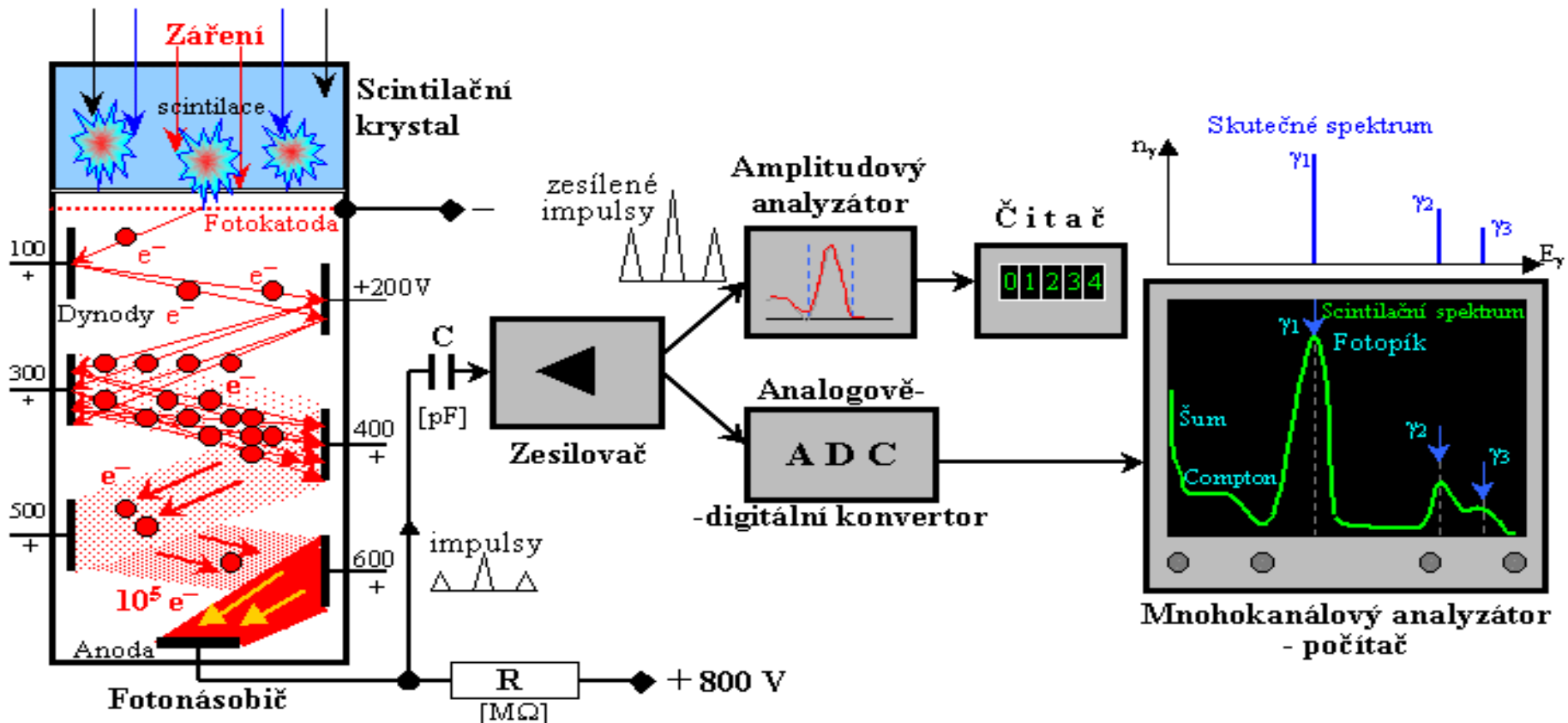
ionizující záření projde scintilačním krystalem (NaJ s TI)

e^- uvolněné při procesu fotoelektrický jev, Comptonově rozptylu excitují atomy krystalu \rightarrow luminiscenční záření v podobě záblesků (scintilace)

z fotokatody se uvolní e^- , ty směřují k anodě fotonásobiče.

Vzniká napěťový impulz který se dále zpracovává a vyhodnocuje

výška (amplituda) impulzu na fotonásobiči je úměrná energii gama záření
počet impulzů za čas = aktivita ve vzorku



Konstrukční provedení scintilačních krystalů



- Nejčastěji se používají krystaly jodidu sodného aktivovaného thaliem - NaI(Tl).
- Scintilátor NaI(Tl) je umístěn ve **světlotěsném** hliníkovém pouzdře, které chrání krystal před pronikáním vlhkosti vzduchu a před pronikáním vnějšího světla do fotonásobiče. Vnitřní strany pouzdra jsou opatřeny bílou **reflexní vrstvou**, která odráží světelné fotony na fotokatodu fotonásobiče.
- Pro obecnou detekci a spektrometrii záření gama se používají **planární** scintilační krystaly válcového tvaru o průměru 2-7cm a výšky cca 2-8cm.
- **studnové** nebo příčně vrtané scintilační krystaly s otvorem pro měření vzorků ve zkumavkách

Přednosti scintilačního detektoru



- **1. Vysoká detekční účinnost (citlivost)**

Scintilační detektory tedy mají vysokou detekční účinnost (citlivost), která se často **blíží 100%**.

- **2. Krátká mrtvá doba- časový interval od detekce jednoho kvanta, po kterou detektor není schopen detekovat další kvantum**

Doba trvání scintilace v krystalu je krátká - 10^{-9} sec.

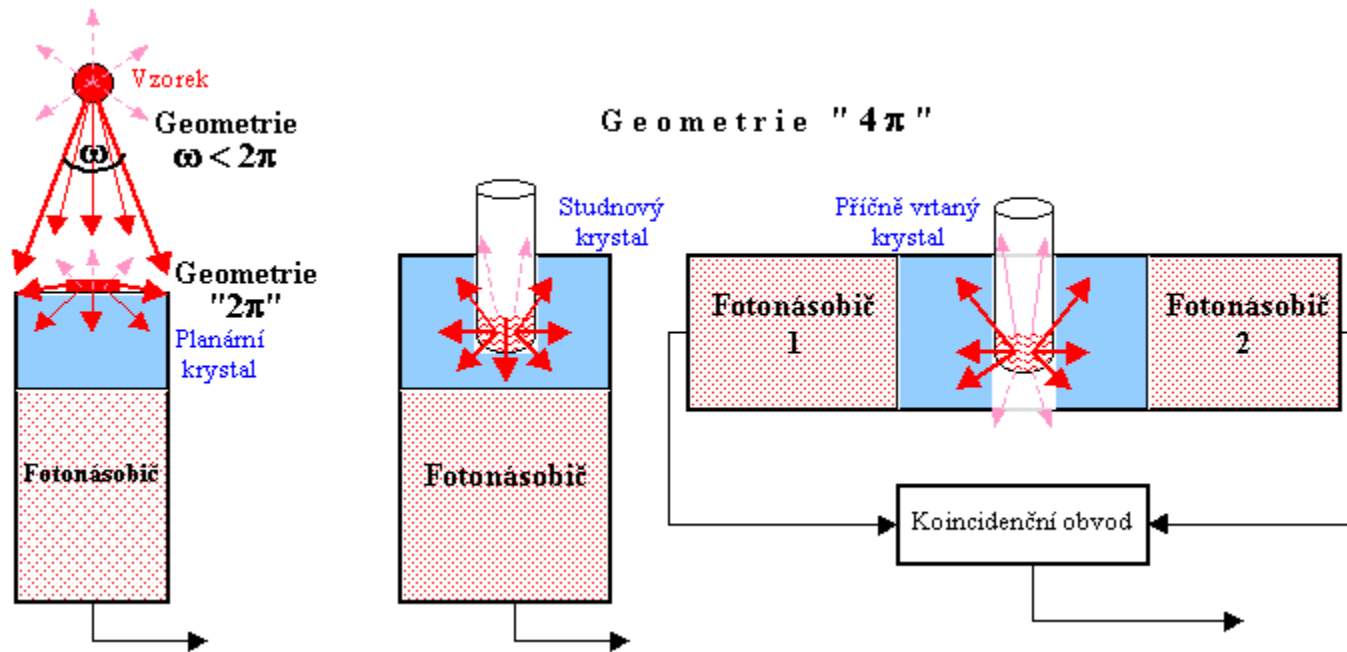
Doba, po kterou procházejí elektrony a násobí se ve fotonásobiči, je - cca 10^{-8} sec.

Doba formování a zpracování elektrického impulsu (časová konstanta) v zesilovači a analyzátoru je u cca 10^{-6} sekundy; právě tato (nejpomalejší) doba je v celém spektrometrickém řetězci určující. Mrtvá doba scintilačního detektoru je tedy asi 1ms, což je téměř 100-krát kratší, než u G.-M. detektorů.

- **3. Spektrometrické vlastnosti**

Intenzita světelného záblesku ve scintilátoru je přímo úměrná energii kvanta, která se tam pohltila. **Amplitudovou analýzou** výstupních impulsů ze scintilačního detektoru můžeme tedy provádět **energetickou analýzu** detekovaného záření - jeho **spektrometrii**.

Měření radioaktivity vzorků



Planární detektor

Do detektoru jde polovina záření

(měříme v geometrii $2\pi = 180^\circ$)

Účinnost 50%

Čím větší vzdálenost od detektoru, tím nižší účinnost

Studnový detektor

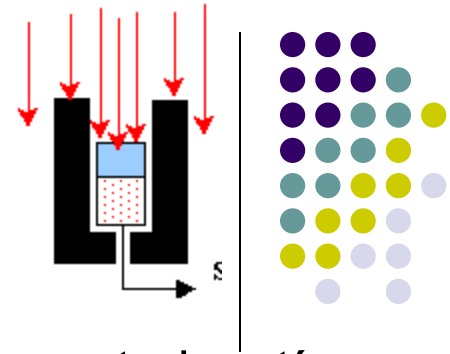
Do detektoru jde veškeré emitované záření (měříme v geometrii $4\pi = 360^\circ$)

Vyšší detekční účinnost

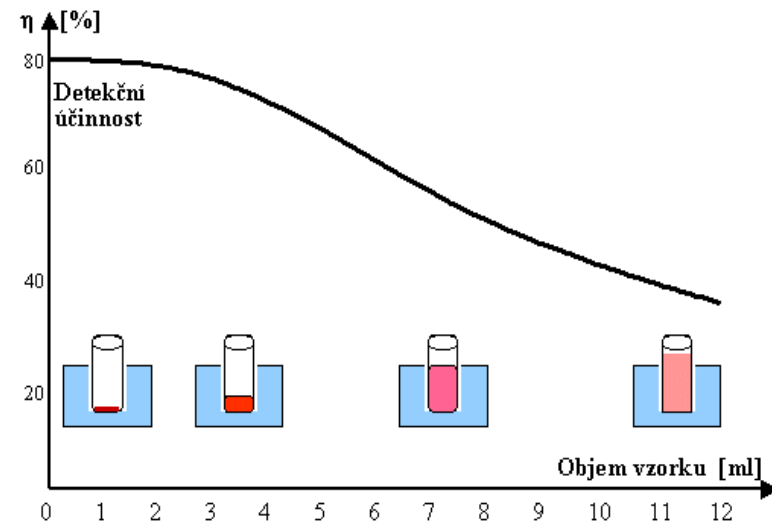
Vzorek leží na dně studnového detektoru

U vzorků beta rozpuštěných v kapalném scintilátoru se může přiblížit 100 %

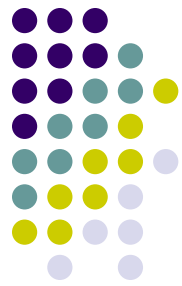
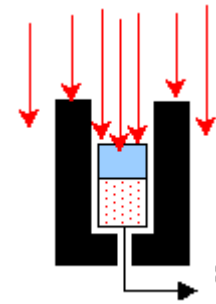
Měření radioaktivity vzorků



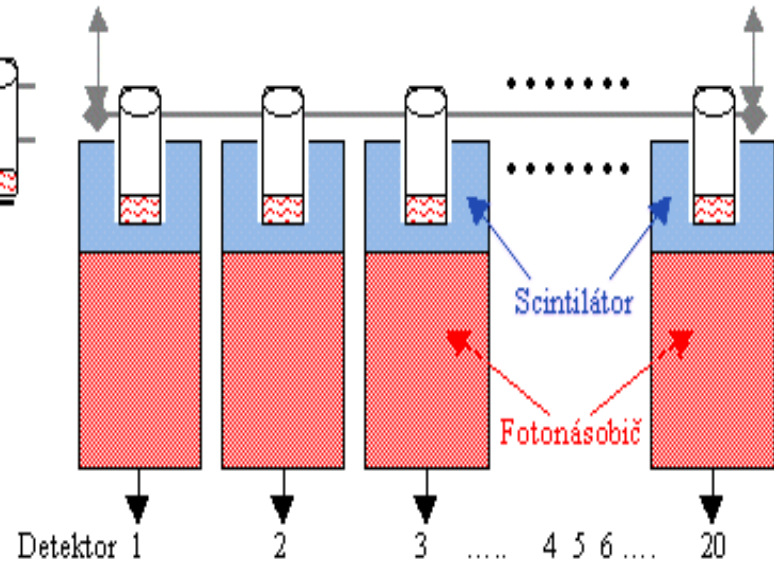
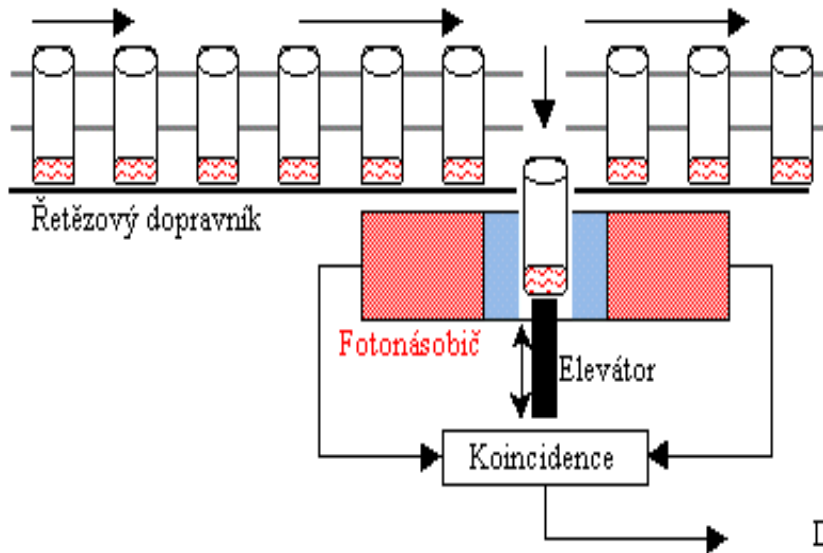
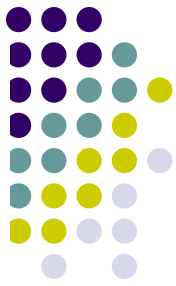
- Polohová závislost: čím výše je vzorek umístěn v otvoru studny, tím větší část záření vychází bez užitku ven
- Objemová závislost: čím vyšší je objem vzorku ve zkumavce, tím větší část vzorku se nachází poblíž otvoru studny, kde je nejnižší detekční účinnost (objem do 3 ml pokles aktivity do 5%)
- Vliv absorpce záření:
rozdílná tloušťka skla zkumavek- přednost umělé hmotě
- Nastavení detekční aparatury



Měření série vzorků



- **Jeden detektor**- pracné a zdlouhavé
- **Vícetedektorové systémy**- nezávislé studnové scintilační detektory, umístěné vedle sebe, každý detektor má svůj fotonásobič, vzorky se ukládají do zásobníků (pouzder), které přesně zapadají do otvorů detektorů, měření probíhá současně ve všech detektorech, jednotlivé detektory jsou zasazeny do olova- zábrana prozařování jednoho detektoru do okolních
!!! Předpoklad stejné detekční účinnosti všech detektorů !!!
- **Automatické vzorkoměniče** = gama-automaty
Detekční aparatury vybavené elektro-mechanickým zařízením pro výměnu vzorků, kapacita 100- 500 vzorků, automatické zasunování jednotlivých vzorků do dutiny studnového či vrtaného detektoru



automatický vzorkoměnič

vícetektorový systém
gama čítač





STRATEC SR 300 je plně automatizovaný analyzátor pro RIA

sestavající se z jednotlivých modulů: pipetovací, inkubační, promývací stanice, gama- čítač



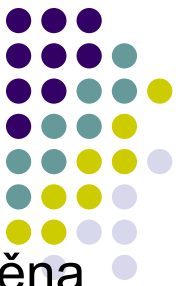
a 10-channel, 1000-sample PerkinElmer Wizard 1470 gamma counter

Kalibrace detekčních přístrojů



- Firemní kalibrace: základní seřízení výrobcem
- Relativní kalibrace: návaznost je dána kontrolou aktivity kalibrovaného etalonu
- Metrologická kalibrace- ověření přístroje autorizovanou laboratoří

Stabilita měřícího přístroje



- Nestabilita detektoru: posun spektra, změna polohy fotopíku, změna počtu registrovaných pulzů
- Kolísání vysokého napětí na dynodách
- Únava fotonásobiče
- Změny vlastností scintilačního krystalu
- Nutné zajištění teplotní stabilizace prostředí, nikdy neměříme ihned po zapnutí přístroje

- Krátkodobé testy: měření pozadí na kontaminaci detektorů
detekční odezva na etalon

- Dlouhodobé testy: metrologická kalibrace
standardizace (odchylka pro jednotl. detektor max 20V)

- Statistická kontrola stability přístroje: opakované měření téhož vzorku
průměr a δ měření porovnáme s teoretickou \sqrt{N} (!!! 3 δ nestabilita)

Chyby měření



- Náhodné: nestabilita detekční aparatury, chyby při přípravě vzorku (pipetování, homogenizace)
- Systematické: trvalé nižší nebo vyšší výsledky, mrtvá doba detektoru, vliv teploty, kontaminace detektoru
- Hrubé: porucha přístroje, chybné nastavení přístroje

Závěr RIA



- VÝHODY

- jednoduchá instrumentace: stačí univerzální gama čítač

- jednoduché měření- měření aktivity

- jednoduchá a reprodukovatelná metoda měření

- vysoce citlivé stanovení, splňují kritéria kvality

- nízká cena stanovení

- propracované metody (jodace malých molekul i proteinů)

- NEVÝHODY

- krátká doba expirace souprav

- malá možnost automatizace

- nutnost pracovat v sériích, s každou sérií měření je zapotřebí nová kalibrace

- práce s otevřenými radiozárči

- likvidace RA odpadu- čekání na snížení radiace na uvolňovací úroveň (min. 6 poločasů rozpadu)

- v laboratořích pracujících s RIA sledované pásmo, provozní předpisy, proškolené laborantky



Zdroje informací k problematice RIA

- Hušková M., Hušák V. : Vyšetřovací metody in vitro v nukleární medicíně, 1979, Brno
- <http://astronuklfyzika.cz>- vše o nukleární a radiační fyzice

kontakt : jcihalova@fnbrno.cz