

RIA instrumentace

Jana Číhalová
OKB FN Brno
jcihalova@fnbrno.cz

RIA instrumentace

osnova

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

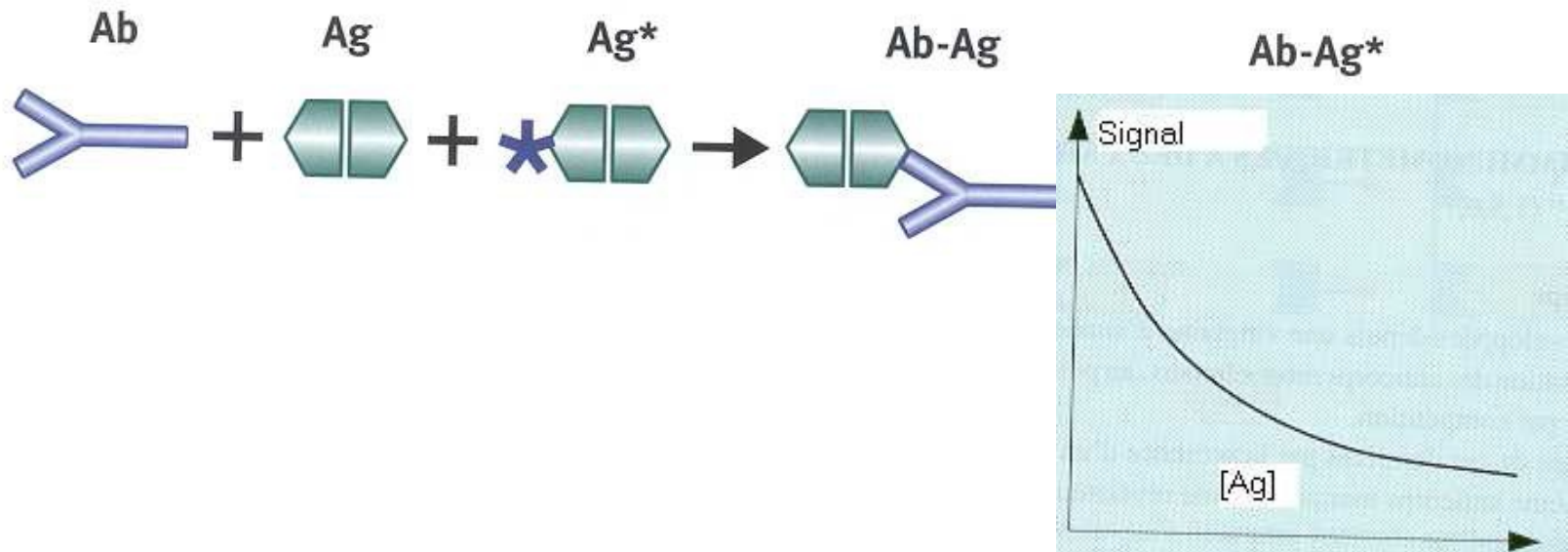
Radioizotopové metody

- Využívají ve svém principu základní vlastnosti radioizotopů – ionizující záření
- interakce ionizujícího záření s hmotou: excitace (emitace energie) a ionizace (tvorba nabitých iontů)
- Radionuklidy 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,

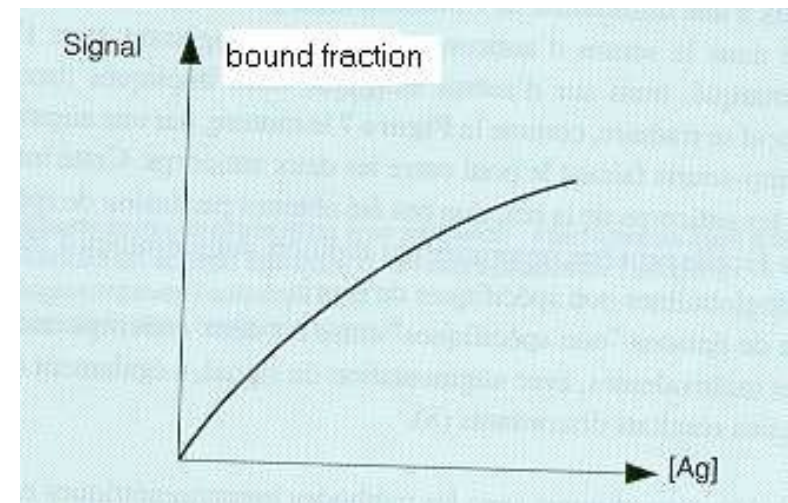


IRMA (Immuno Radio Metric Assay)

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)
krátká inkubační doba



RIA soupravy

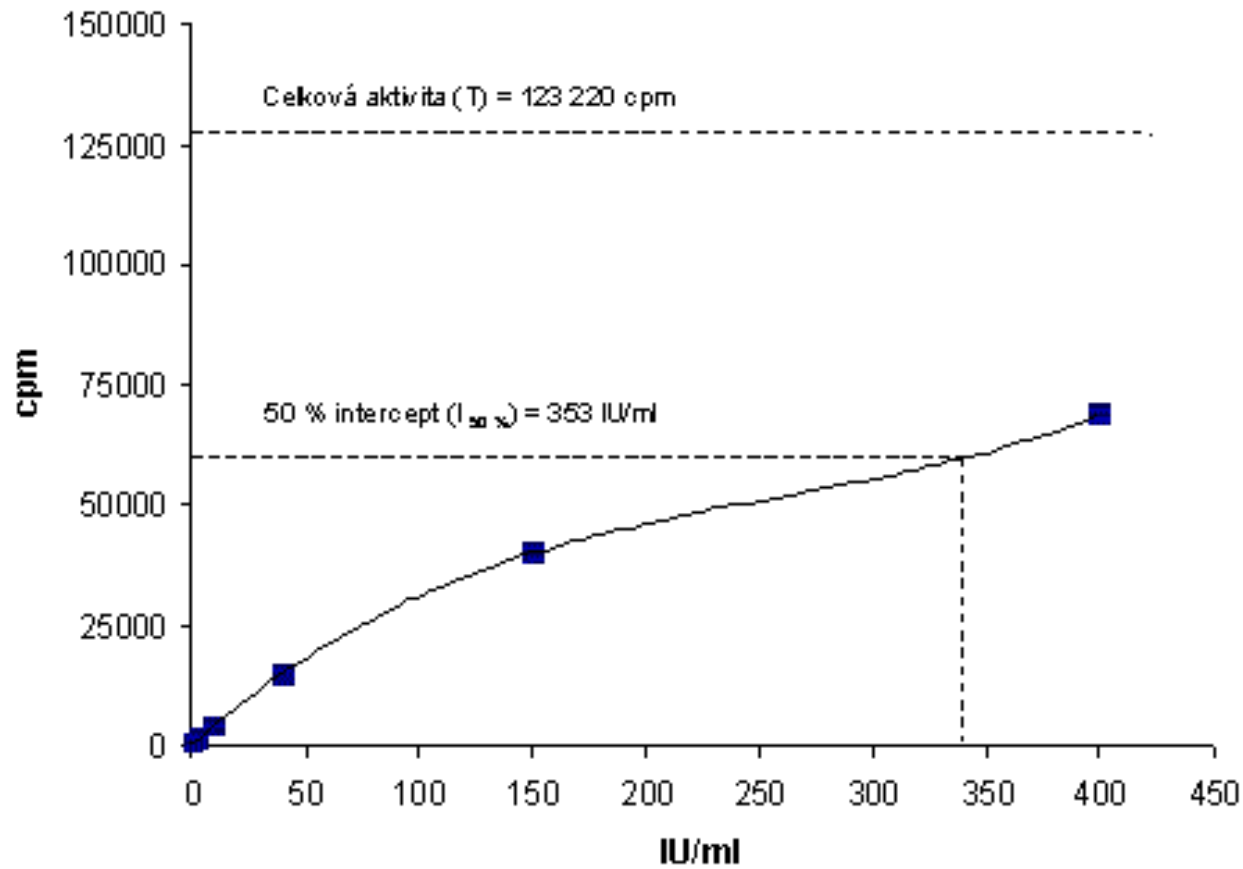
- Zkumavky potažené protilátkou proti stanovovanému analytu
- Antigen (Protilátka) označen značenkou ^{125}I
- Kalibrátory: nulový standard, další 5 standardů
- Kontrolní vzorek
- Promývací roztok



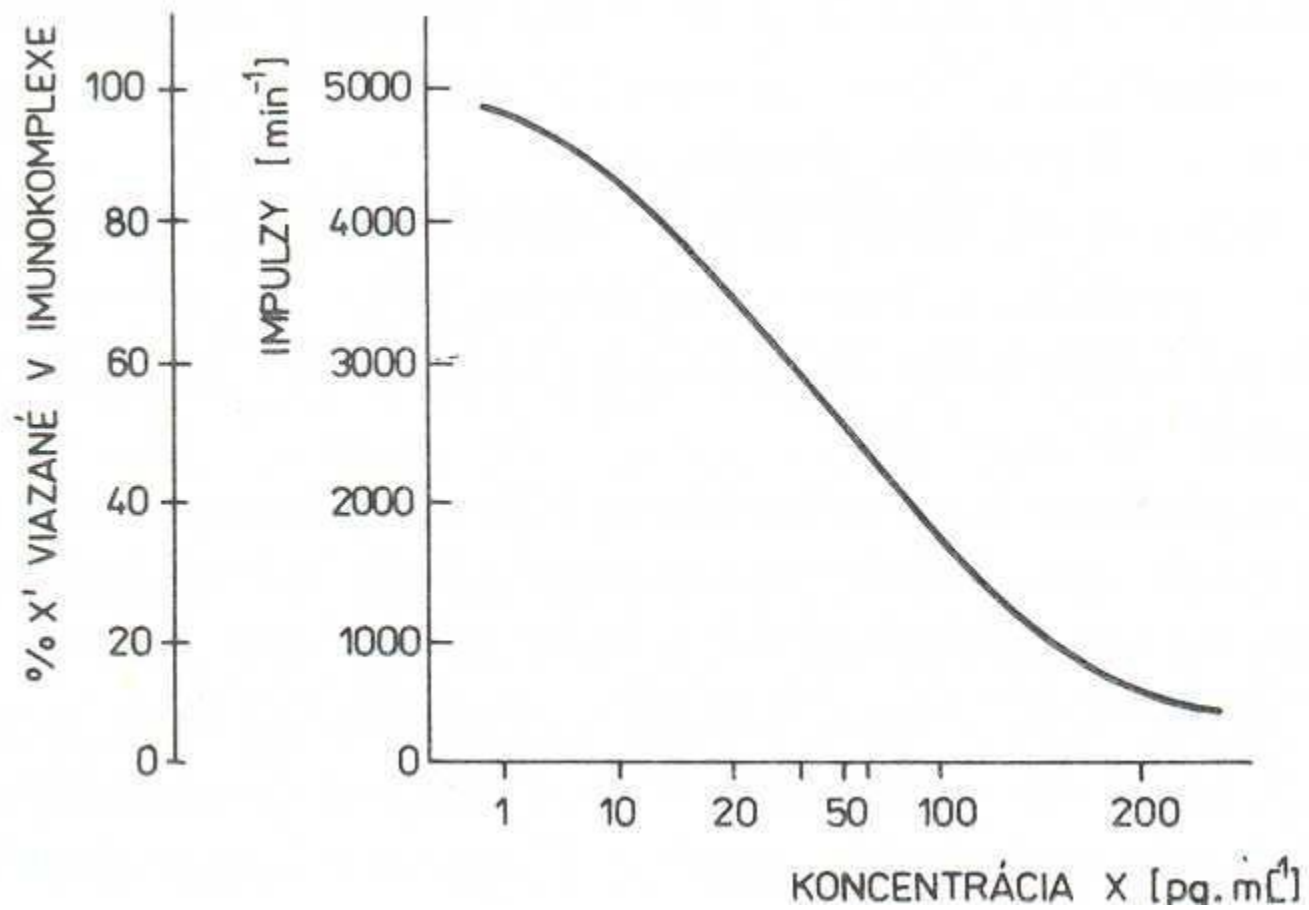
Komerční kit na stanovení radioimunoanalýzy

Pracovní protokol

Krok 1 pipetace	Krok 2 inkubace	Krok 3 měření
<p>Do potažených zkumavek: 25 μl kalibrátoru, kontroly, neznámého vzorku</p> <p>400μl radioindikátoru</p> <p>Promíchat</p> <p>Nepotažená zkumavka na celkovou aktivitu</p>	<p>Inkubace 2 hodiny při 2-8 °C za stálého třepání</p>	<p>Pečlivě odsajte obsah potažených zkumavek Promyjte 2 ml promývacího roztoku (postup opakujte dvakrát) Měřte vázanou a celkovou aktivitu po dobu 1 min</p>
		<p>Immunotech, 17-OH progesteron</p>

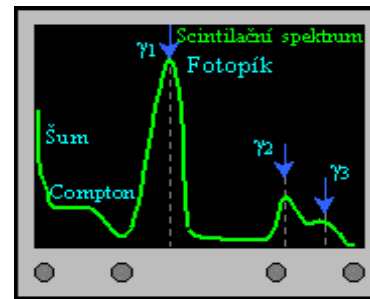


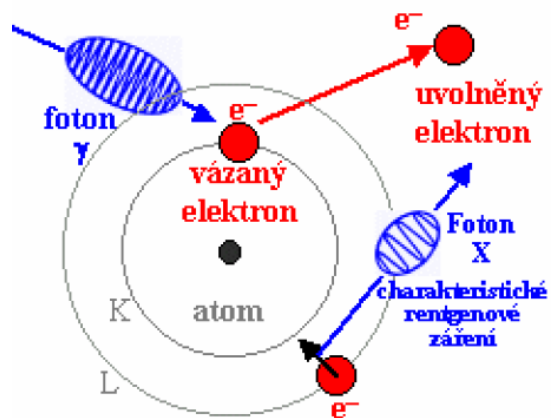
- pro odečítání v okrajových oblastech je křivka příliš strmá- dělají se tranformace křivky



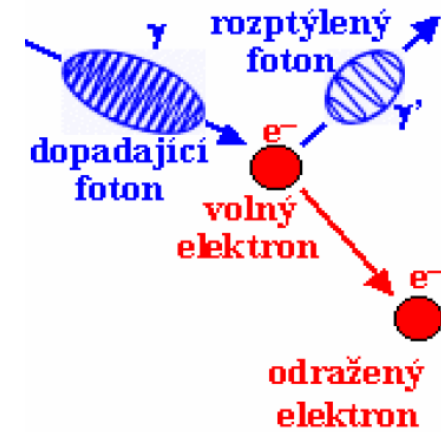
Radionuklidy

- Radionuklid- látka kt. má schopnost se samovolně přeměňovat za vzniku ionizujícího záření, jejich aktivita klesá v čase
- radionuklidy: **IVD soupravy: ^{125}I ($t_{1/2} = 60 \text{ d}$)**
 - nukleární medicína: ^{131}I ($t_{1/2} = 8 \text{ d}$), ^{123}I ($t_{1/2} = 13,2 \text{ h}$), ^{60}Co ($t_{1/2} = 70,8 \text{ d}$), ^{51}Cr ($t_{1/2} = 27,7 \text{ d}$), ^{32}P ($t_{1/2} = 14,3 \text{ d}$), ^{18}F ($t_{1/2} = 110 \text{ min}$),
 - biologie (analýza stáří): ^{14}C ($t_{1/2} = 5730 \text{ r}$)
- ^{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 $\times 10^2 \text{ kBq}$





Fotoefekt



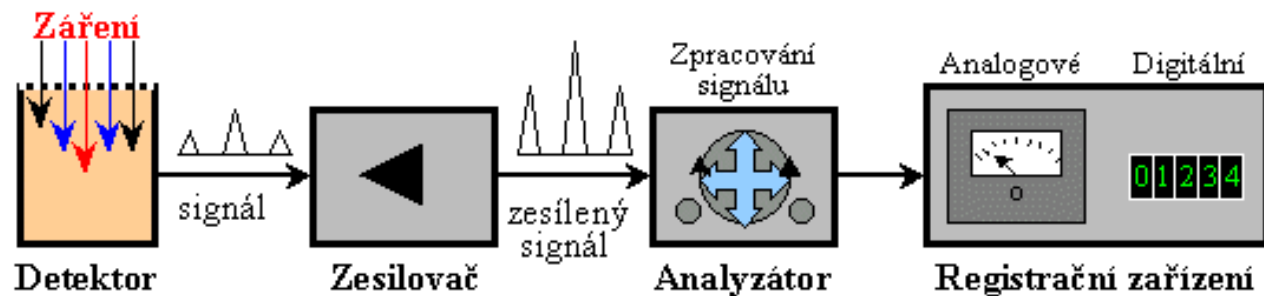
Comptonův rozptyl

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 a magnetické detektory)



Detekce ionizujícího záření



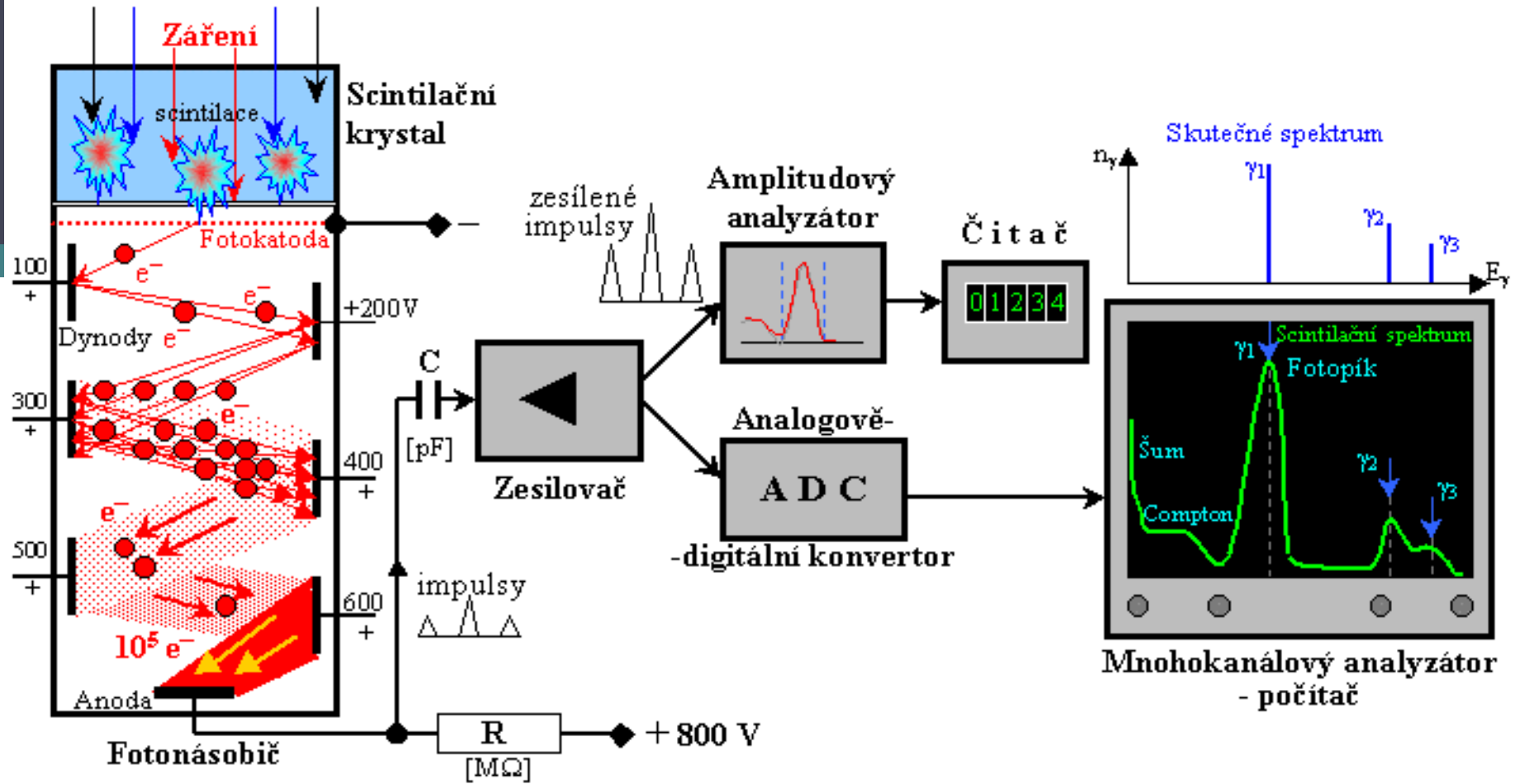
Scintilační detektory

- Přeměna energie ionizujícího záření na záblesky viditelného záření tzv. luminiscenční záření (scintilace)
- Luminiscenční centra vznikají vniknutím iontů cizího prvku do krystalové mřížky iont.krystalu ZnS (Ag), ZnS(Cu), NaJ(Tl), LiJ (Eu)

**Scintilační počítač= scintilátor+
fotonásobič+registr. zařízení**

Scintilační detektor

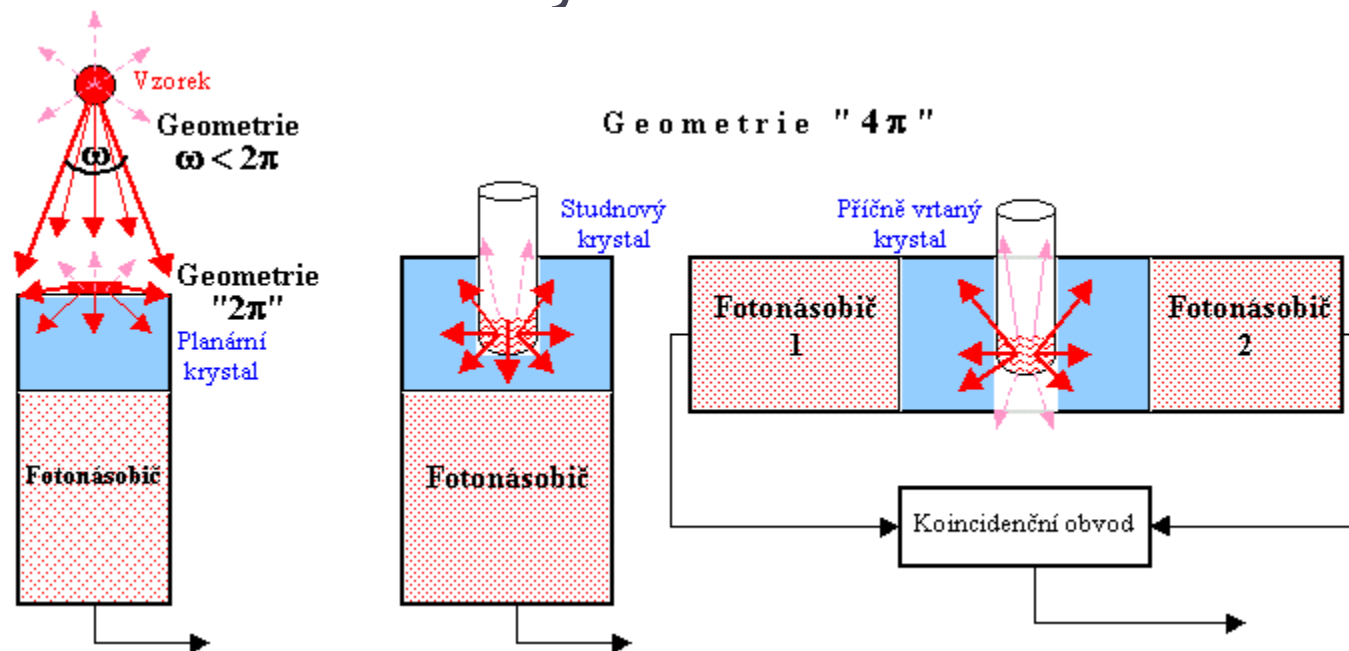
ionizující záření projde scintilačním krystalem (NaJ s Tl)
 e^- uvolněné při procesu fotoelektrický jev, Comptonově rozptylu excitují atomy krystalu
 tzv. luminiscenční záření v podobě záblesků (scintilace)
 z fotokatody se uvolní e^- , ty směřují k anodě fotonásobiče.
 Vzniká napěťový impulz který se dále zpracovává a vyhodnocuje
 výška (amplituda) impulzu na fotonásobiči je úměrná energii gama záření
počet zaregistrovaných 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

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 %

Přednosti scintilačního detektoru

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

Scintilační detektory mají vysokou detekční účinnost (citlivost), která se často **blíží 100%**. (u ^{125}I je 75%)

- **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 .

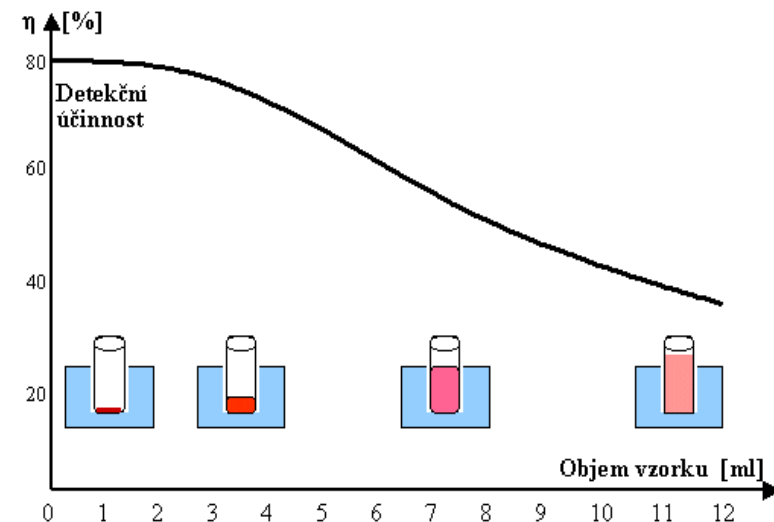
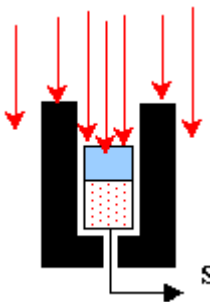
Doba formování a zpracování elektrického impulsu (časová konstanta) v zesilovači a analyzátoru je u cca 10^{-6} sekundy; právě tato (nejpomalejší) doba je v celém spektrometrickém řetězci určující. Mrtvá doba scintilačního detektoru je tedy asi 1ms, což je téměř 100-krát kratší, než u G.-M. detektorů.

- **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**.

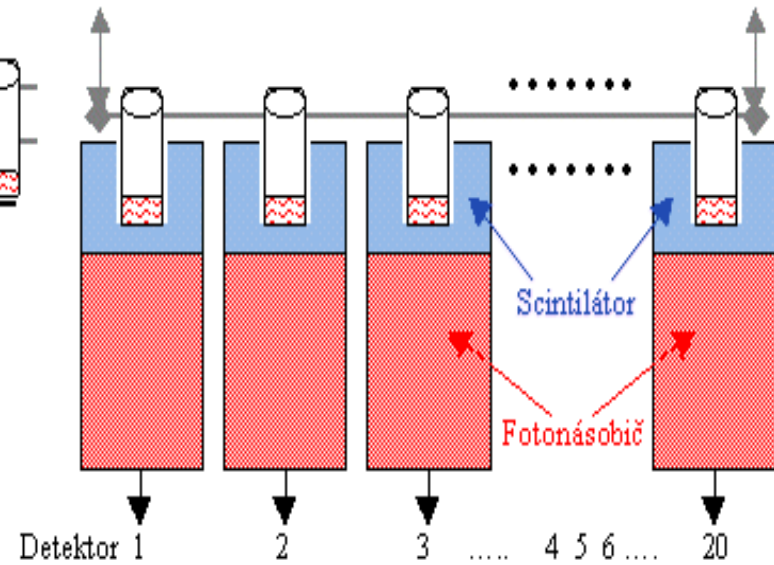
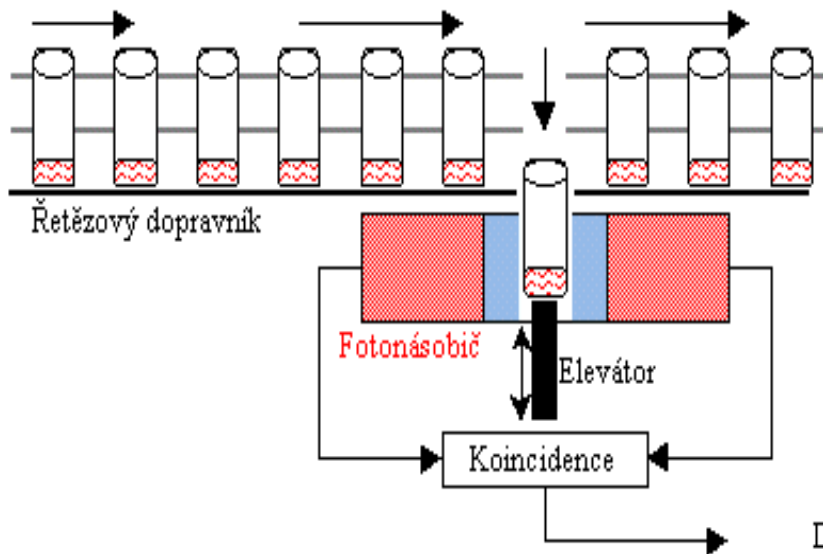
Měření radioaktivity vzorků

- ❖ 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
- ❖ **Vícetektorové 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



Automatizace v RIA: STRATEC SR 300

sestává z jednotlivých modulů: pipetovací, inkubační, promývací stanice, a detekční jednotka (gama- čítač)

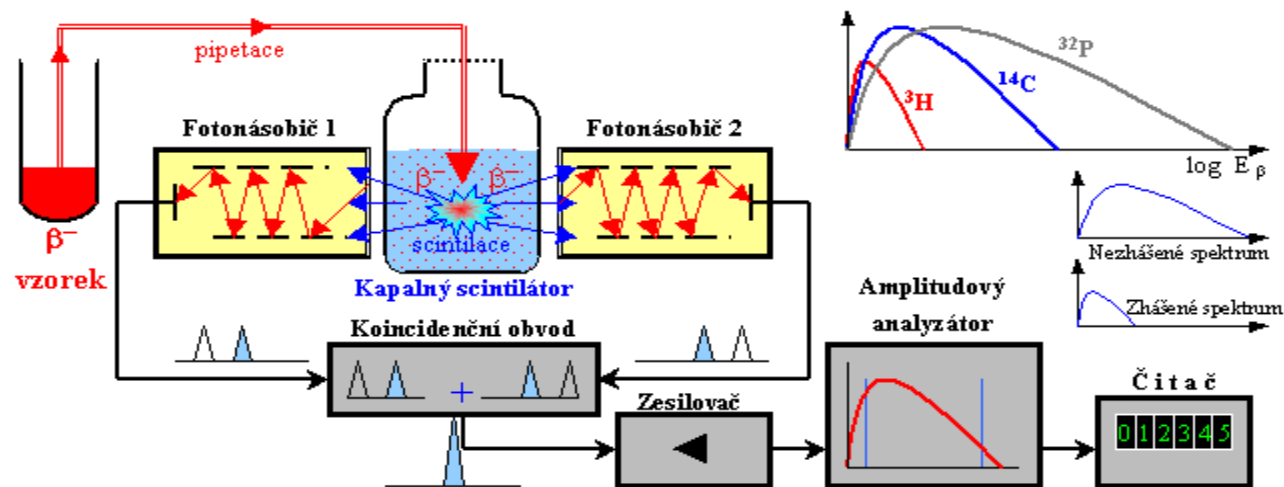


Vysoce kapacitní gamačítač: PerkinElmer Wizard 1470
10 kanálový, vysoká kapacita pro měření vzorků

Detekce záření beta kapalnými scintilátory

- ❖ Měřený β^- radioaktivní vzorek přimícháme přímo do roztoku kapalného scintilátoru v průhledné lahvičce. Tím odpadá samoabsorbce. Při radioaktivní přeměně bude vylétající elektron β^- bezprostředně interagovat se scintilátorem. Takto vzniká scintilační záblesk.
- ❖ Vzniklé scintilace jsou snímány ve fotonásobiči, kde se světelné záblesky převádějí na elektrické impulzy jako je tomu u běžných scintilačních detektorů.
- ❖ *počet zaregistrovaných impulzů za čas = aktivita ve vzorku*
- ❖ *Detekční účinnost u ^3H je 50%.*
- ❖ *Uplatnění : $^3\text{H}_1$, $^{14}\text{C}_6$ stopovací analýzy- měření aktivity v tělesných tekutinách nebo vzorcích tkáně*

Detekce záření beta kapalnými scintilátory



Pozn.: kapalný scintilátor= rozpouštědlo a v něm rozpouštěná scintilační látka

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)

Chyby měření

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

Kontrola kvality v RIA

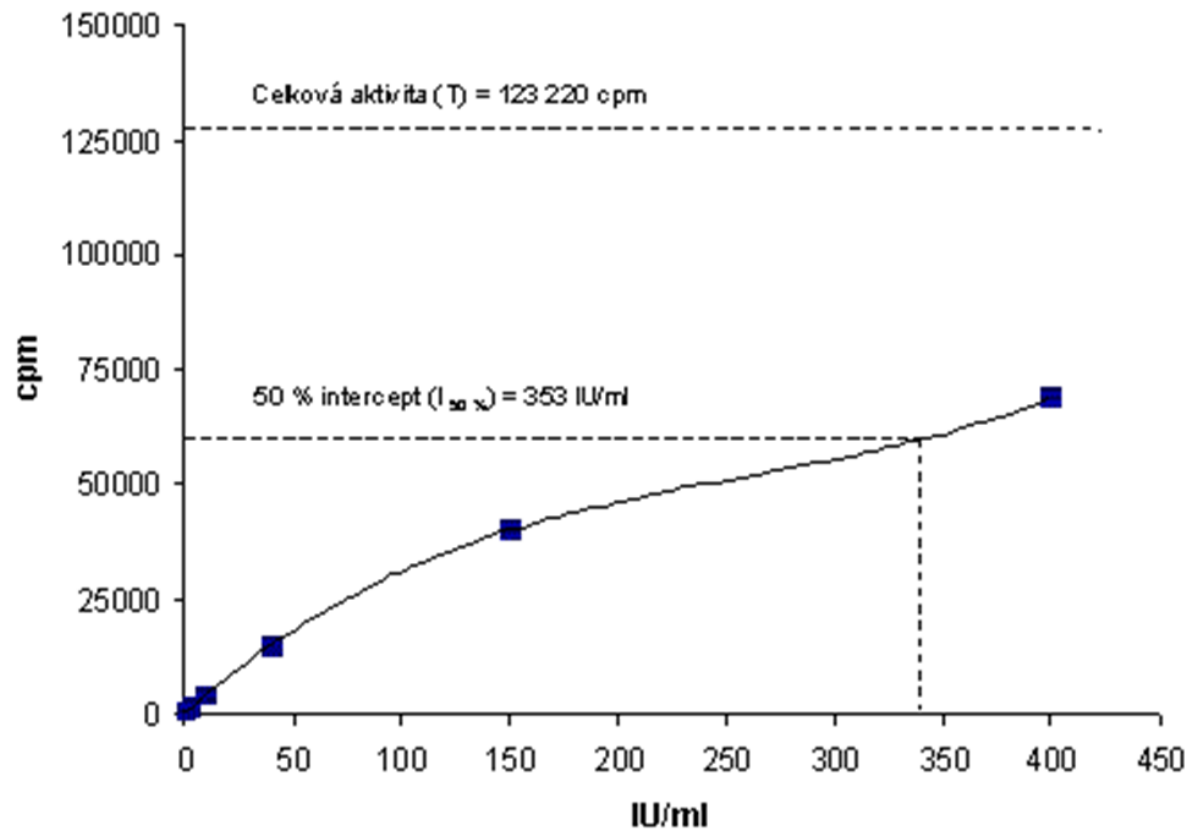
- Celková aktivita vzorku (T)
 - ❖ udává aktivitu radioindikátoru; přidává se do nepotažených zkumavek (odpadá krok odsávání a promývání)
 - ❖ ke kontrole stability měřící aparatury a měření radioaktivity dané série zkumavek
 - ❖ Z naměřených četností impulzů se vypočte průměr a srovnává s dlouhodobým průměrem celkové aktivity dané reagentie.
 - ❖ Jestliže průměrná hodnota přesáhne $2SD$ dlouhod.průměru, lze předpokládat poškození indikátoru, nestabilitu měřící aparatury.

Kontrola kvality v RIA

- Podíl specificky vázané aktivity při nulové koncentraci určované látky (B_0)
 - ❖ Replikáty nulového standardu , vypočte se průměr
 - ❖ Hodnota specificky vázané aktivity se vyjadřuje v procentech jako podíl průměru radioaktivity B_0 a celkové radioaktivity T
 - ❖ $B_0/T (\times 100)$ %- průměr a SD
 - ❖ $B_0/T > 2SD$ porušení standard.podmínek (nízká citlivost nebo nízká specificita)

Kontrola kvality v RIA

- Tvar kalibrační závislosti
 - ❖ intercept- koncentrace určované látky ve vzorku, která vyvolá určité zvýšení (u IRMA) nebo snížení (RIA) jeho radioaktivity ve srovnání s radioaktivitou nulového standardu.
 - ❖ Nejvhodnější použití 50 % interceptu; sledování u většího počtu stanovení , vypočte se průměr a SD
 - ❖ Pokud hodnota 50.interceptu spadá mimo interval $\mu \pm 2SD$ - nutno stanovení vyloučit a provést znovu s jinou kalibrací (nekvalitní standardy)



Kontrola kvality v RIA

- drift kontrolních vzorků- nestabilita výsledků ve stanovení, systematický posun od skutečných hodnot. Může být projevem nesprávného postupu analýzy, nestabilní přístroj apod.

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 radiozáríči
likvidace RA odpadu- čekání na snížení radiace na uvolňovací úroveň (min. 6 poločasů rozpadu)
v laboratořích pracujících s RIA je sledované pásmo, provozní předpisy, proškolené laborantky

Odběry RIA souprav v ČR představuje 10% z celkového trhu ve světě (dominantní postavení Německo, Jižní Korea, Rusko, Francie); dominantní dodavatelé Immunotech, DiaSorin, Cis-Bio, Fujirebio)

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