The slide features a decorative arrangement of six circles. Three solid light purple circles are positioned in the upper right and lower left areas. Three hollow light purple circles are positioned in the upper middle and lower right areas. The title text is centered and overlaid on these circles.

# **Optické metody- turbidimetrie, nefelometrie**

**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

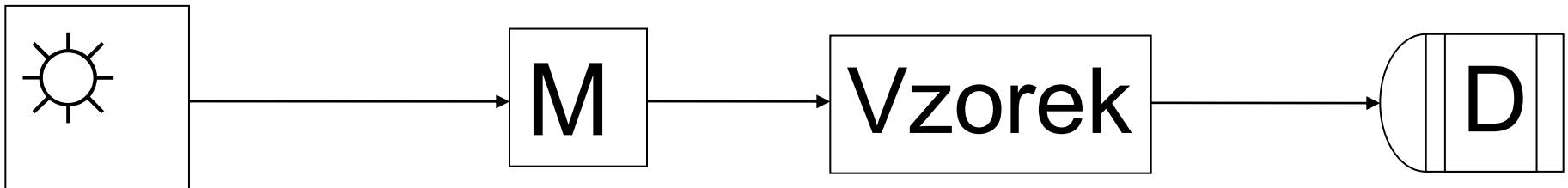
# Turbidimetrie



- 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

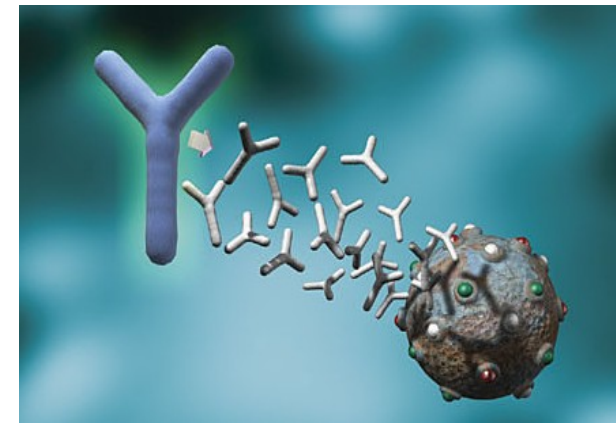
# Turbidimetrie

- 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.



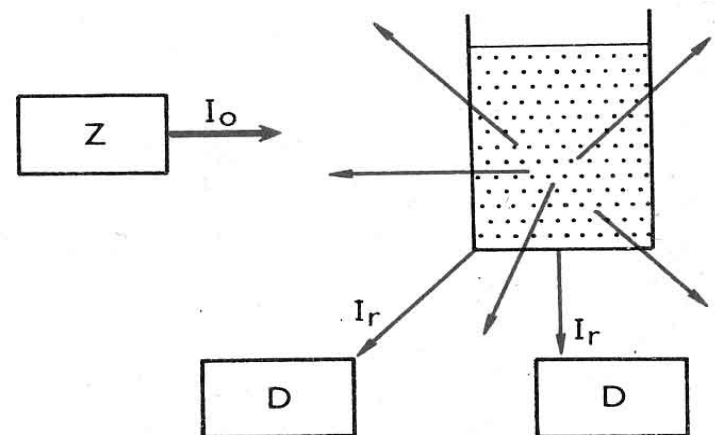
# Turbidimetrie



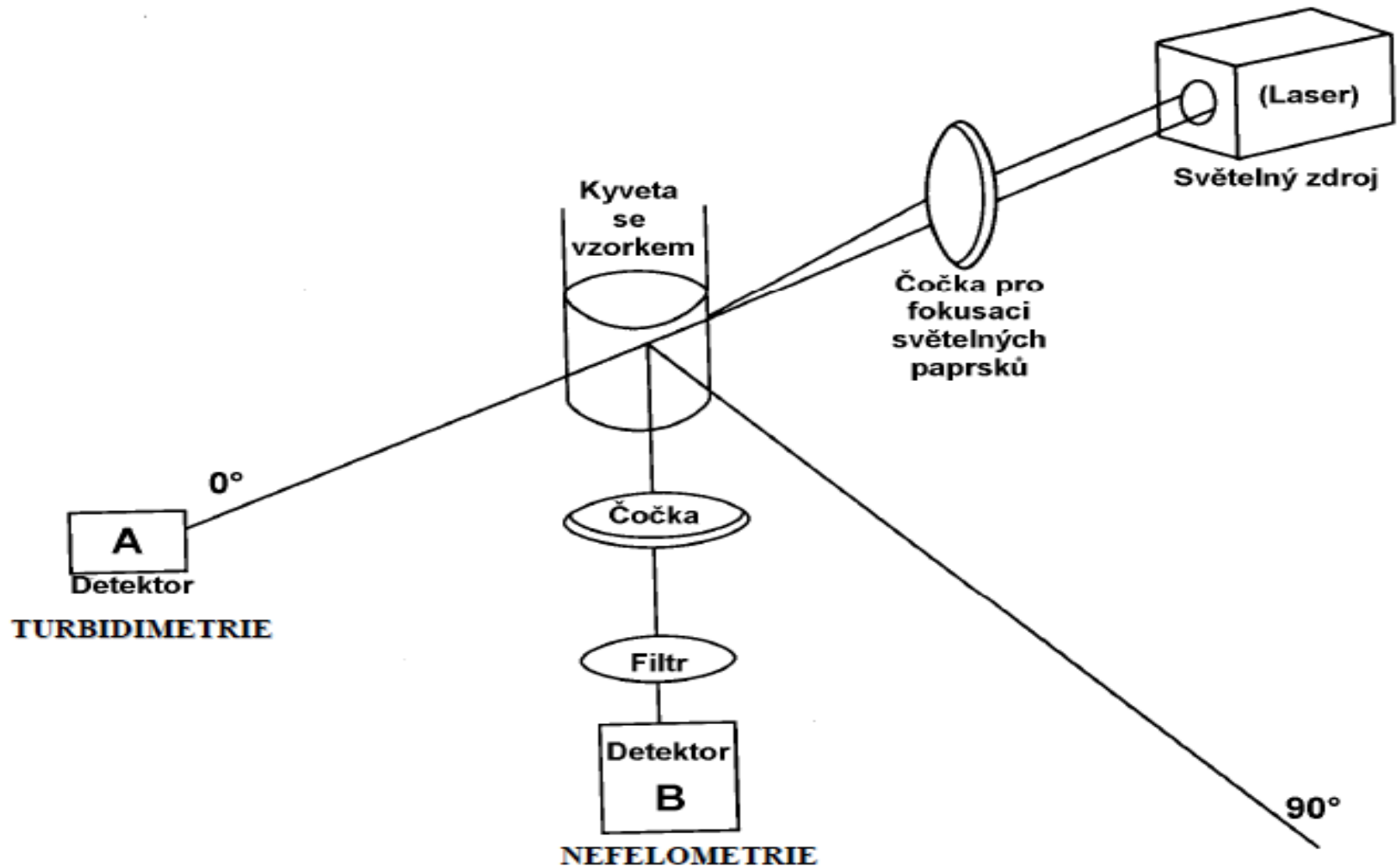
- Na biochemických analyzátoch dosahujú turbidimetrické metódy reprodukovateľnosť asi 5%
- Je treba znížiť vliv interferujících látek na minimum – jakýkoliv vliv, který způsobí vznik částic odlišné velikosti (koncentrace činidel, teplota)
- Hemolýza a ikterus ruší méně než při nefelometrii

# 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

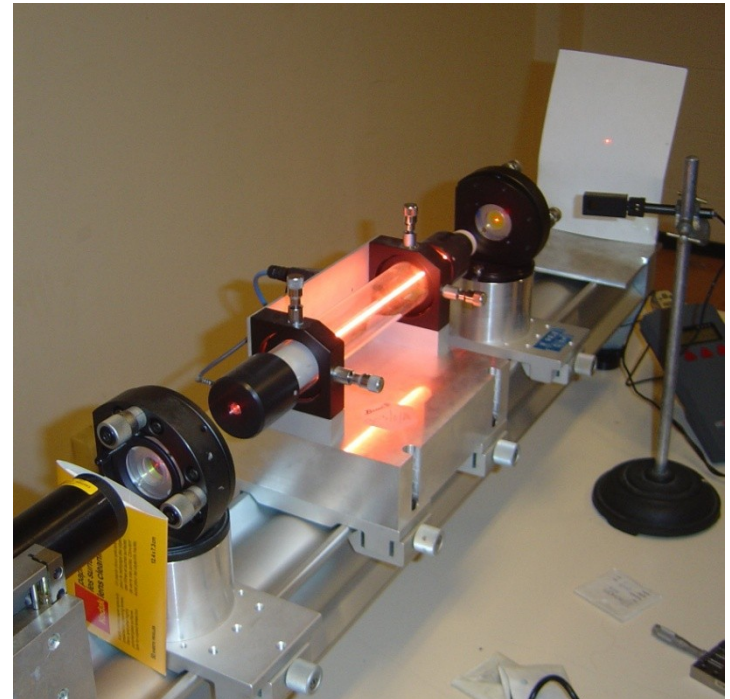
- Tento zdroj monochromatického světla je mimořádně intenzivní a má vysoký stupeň směrovosti paprsku
- Rozptýlené světlo se sleduje detektorem nastaveným pod úhlem 5 až 35° (fotonkou nebo fotonásobičem), ale ve víceúčelových přístrojích pod úhlem 90°.

# Laserový nefelometr

**LASER** = **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

# 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



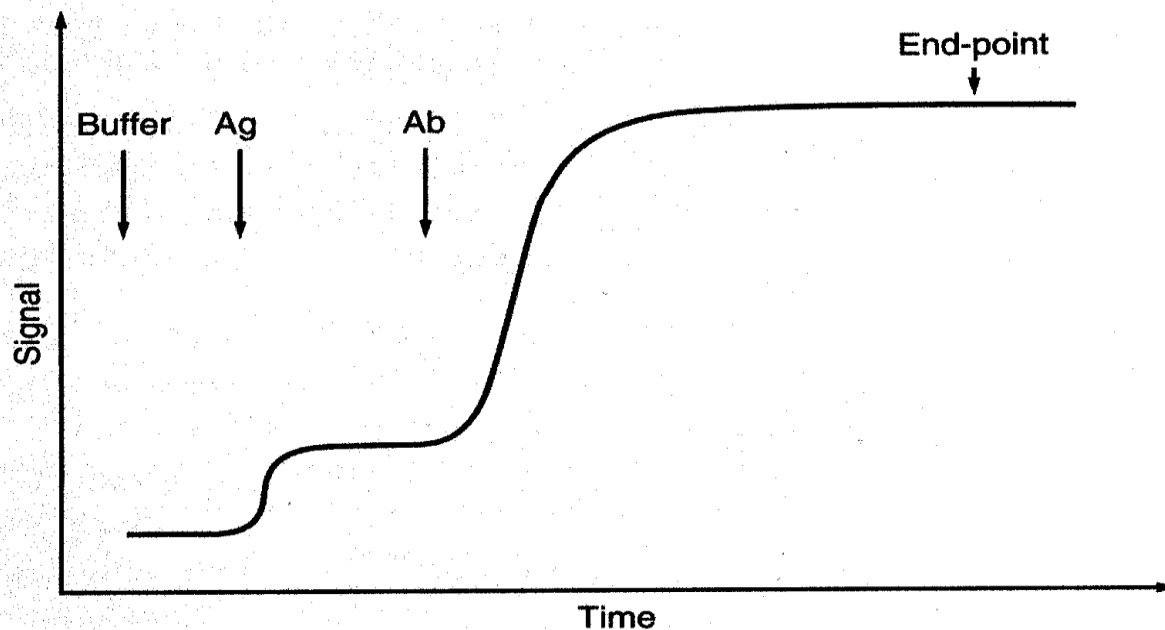
## Rozdělení podle typu měření

- **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

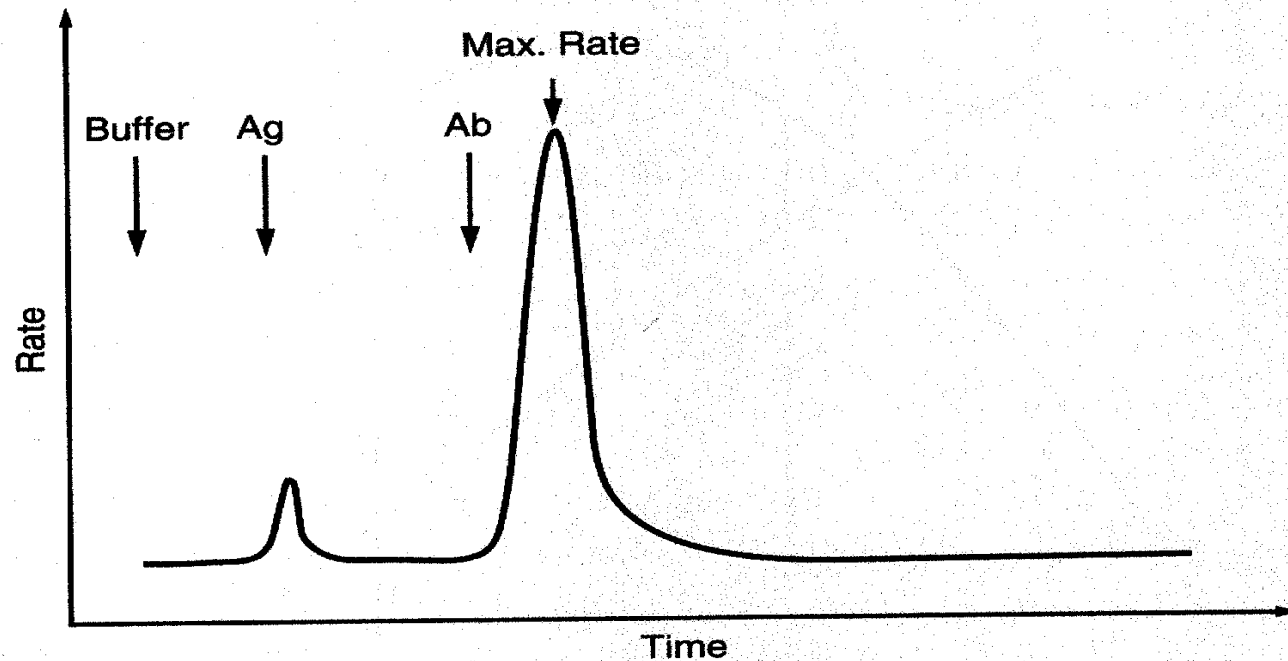
## Rozdělení podle typu měření

### 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

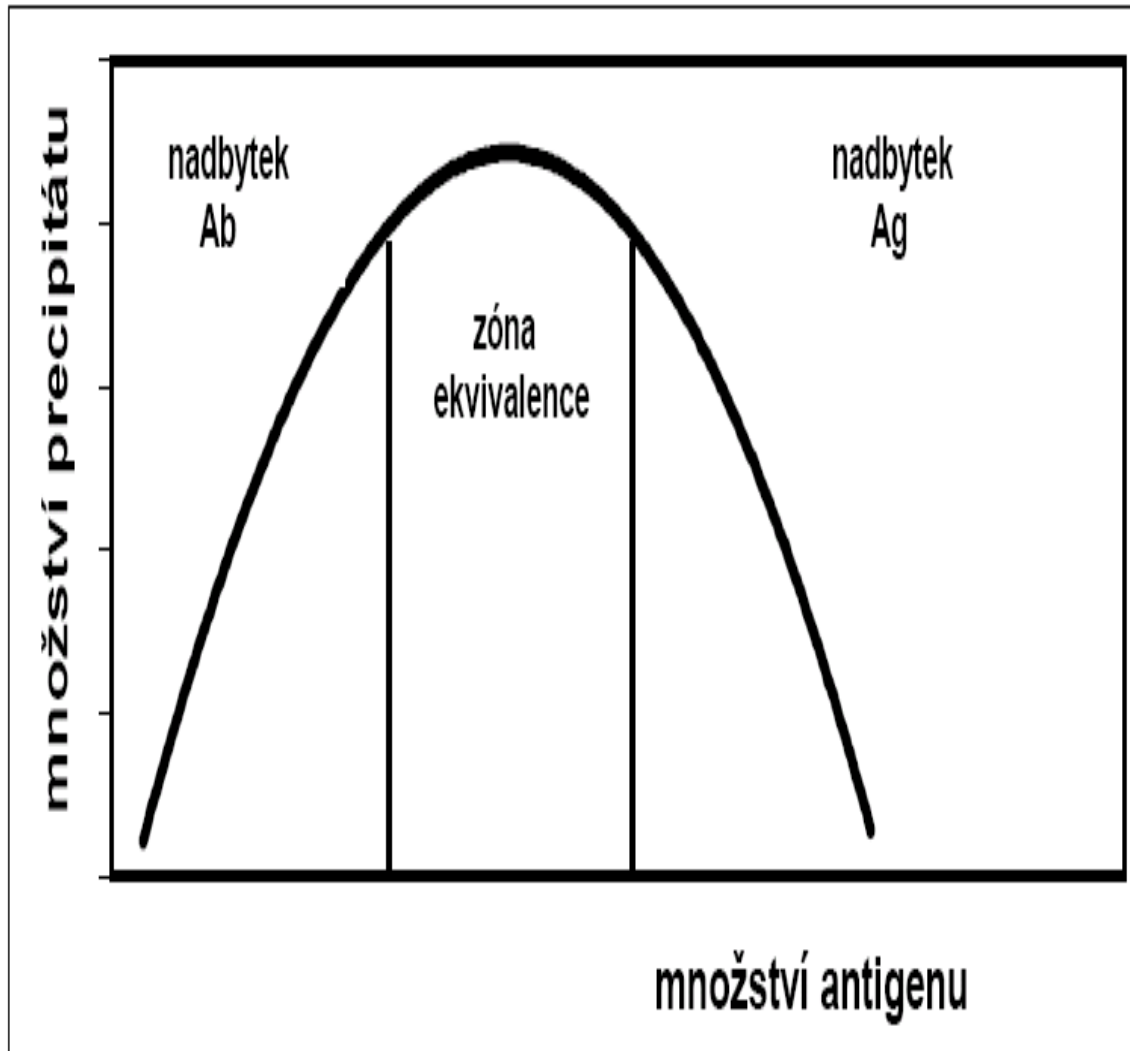
# Nefelometrie

- **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

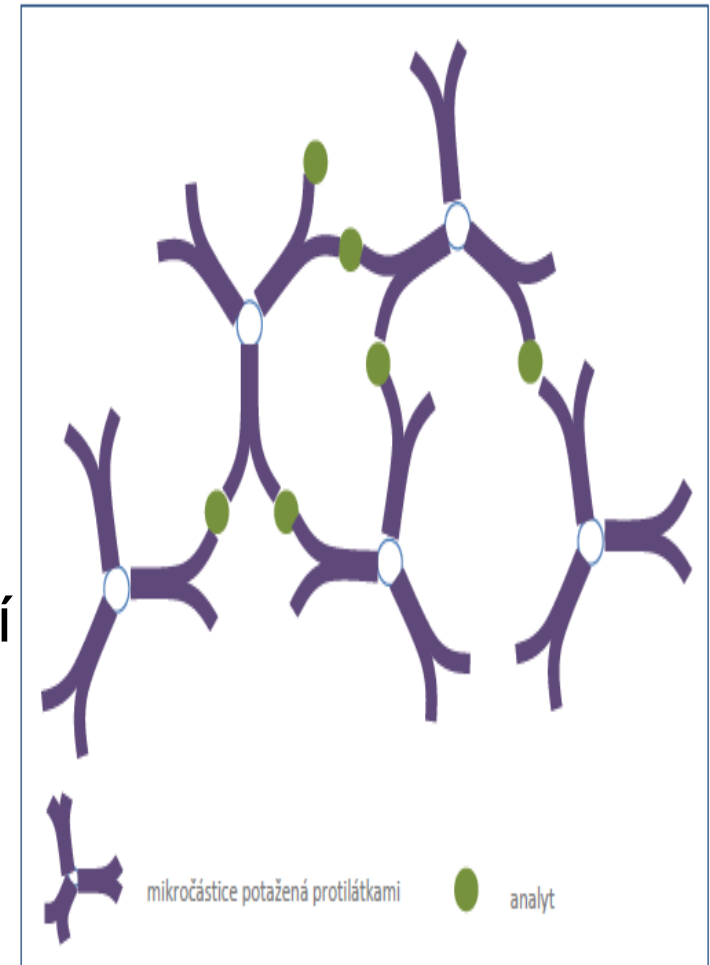
• **Oblast nadbytku antigenu**

**Ab - protilátka**

**Ag - antigen**

# PETIA - Particle Enhanced Turbidimetric Immunoassay

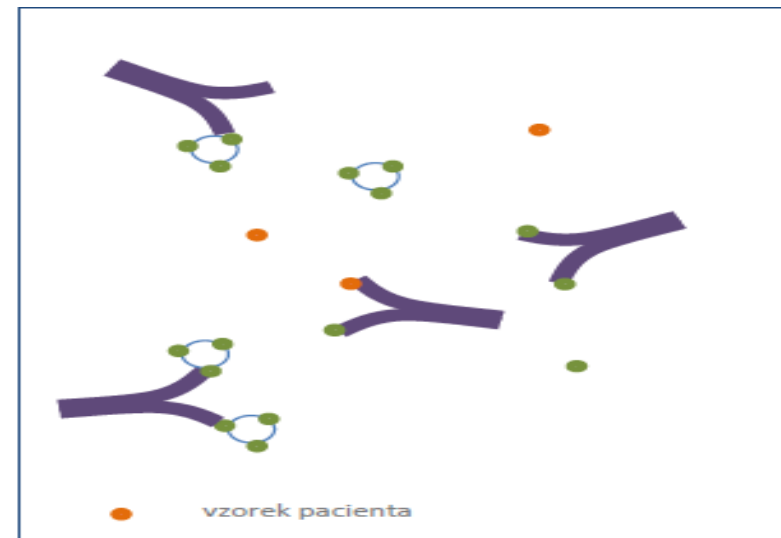
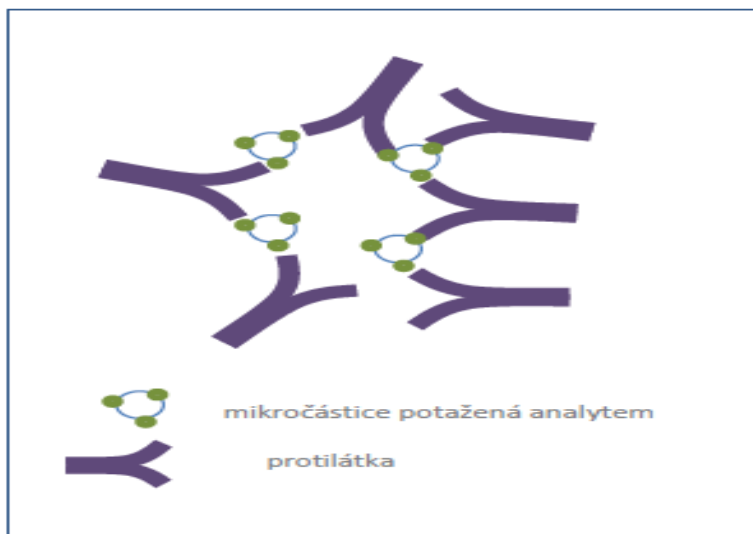
- zesílení turbidance je možné dosáhnout pomocí mikročástic. Mikročástice lze „potáhnout“ protilátkami.
- při reakci těchto mikročástic s analytem dochází k tvorbě zesíťovaného kompaktního precipitujícího komplexu a k naměření vyšších hodnot turbidance.
- Takto je pomocí (mikro) částic (*particles*) posíleno (*enhanced*) turbidimetrické imunostanovení (*turbidimetric immunoassay*).





# PETINIA - Particle Enhanced Turbidimetric Inhibition Immunoassay

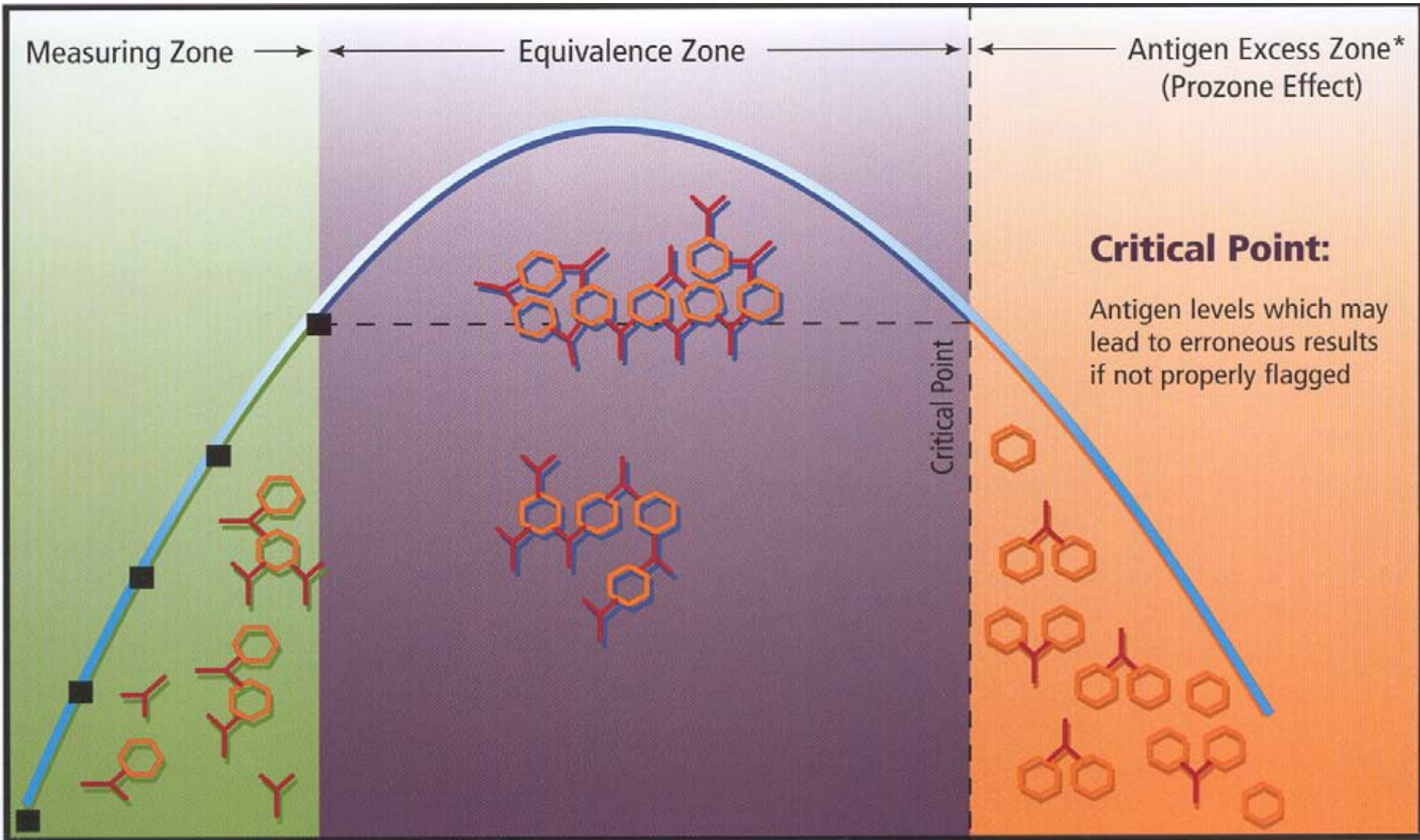
- příliš malé molekuly, které samy o sobě nemohou s protilátkami tvořit nerozpustné komplexy lze „upevnit“ na mikročástice, zvětšit tímto způsobem jejich velikost a „posílit“ (*enhance*) tak metodu (v daném případě inhibici turbidimetrického stanovení (*turbidimetric inhibition immunoassay*)).
- mikročástice „potažené“ malými molekulami (analytem) tvoří s protilátkami zesíťované, nerozpustné komplexy. Je-li však ve vzorku pacienta přítomen analyt, soupeří tento s analytem na mikročástečích o vazebné místo na protilátce a protože sám není schopen tvorby komplexů, ruší (inhibuje) tuto tvorbu. Výsledná turbidita je mnohem nižší, než by byla bez volného analytu.



# 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



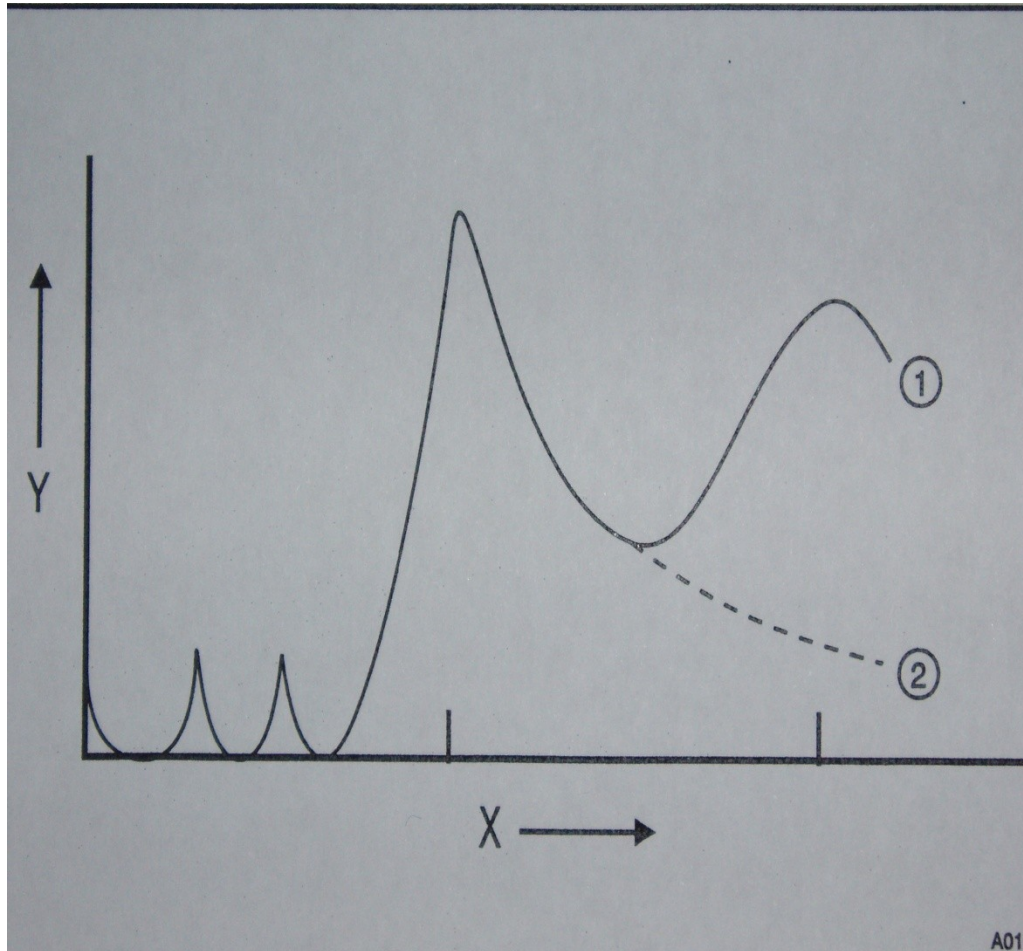


# Detekce nadbytku antigenu

## 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 stojáneků 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 °**

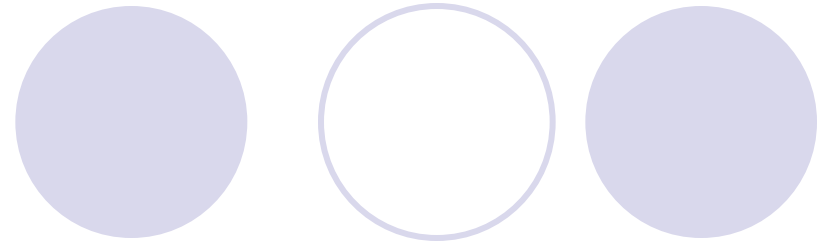


# Automatizovaný nefelometr BN Pro Spec

- **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

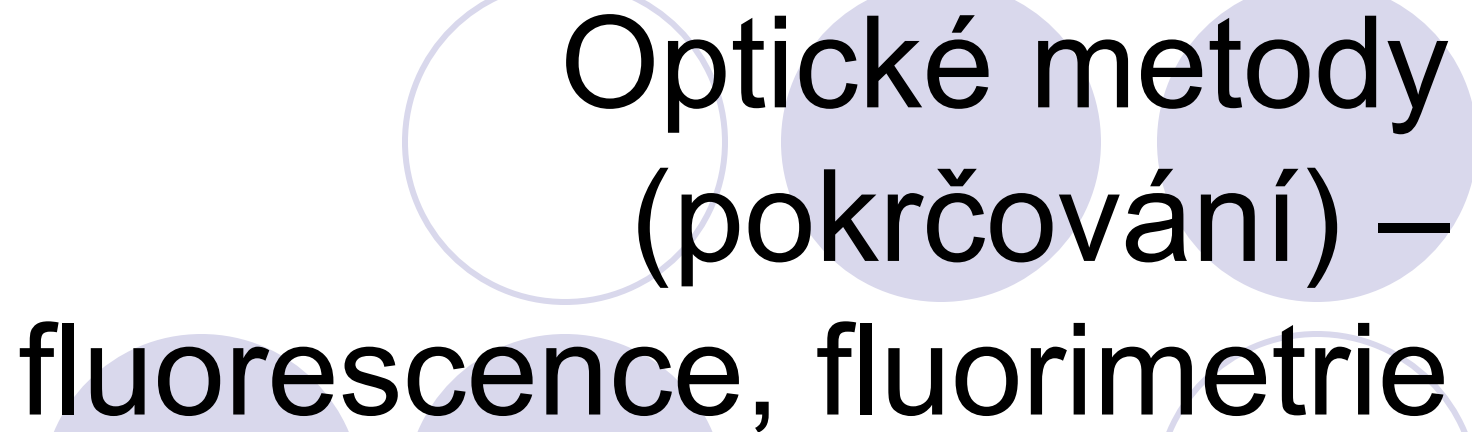
- Výrobce Radim
- Zdroj světla laser (670 nm)
- K dispozici 100 metod
- Rychlost 150 analýz za hod. (startovací čas 30 min., ukončovací čas 15 min. !)
- Reagenční část: 54 pozic pro reagensie, chlazená
- Reakční část: 120 omyvatelných kyvet, temperovaných na 37 °C
- Vzorková část: pro 80 vzorků



# 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:**

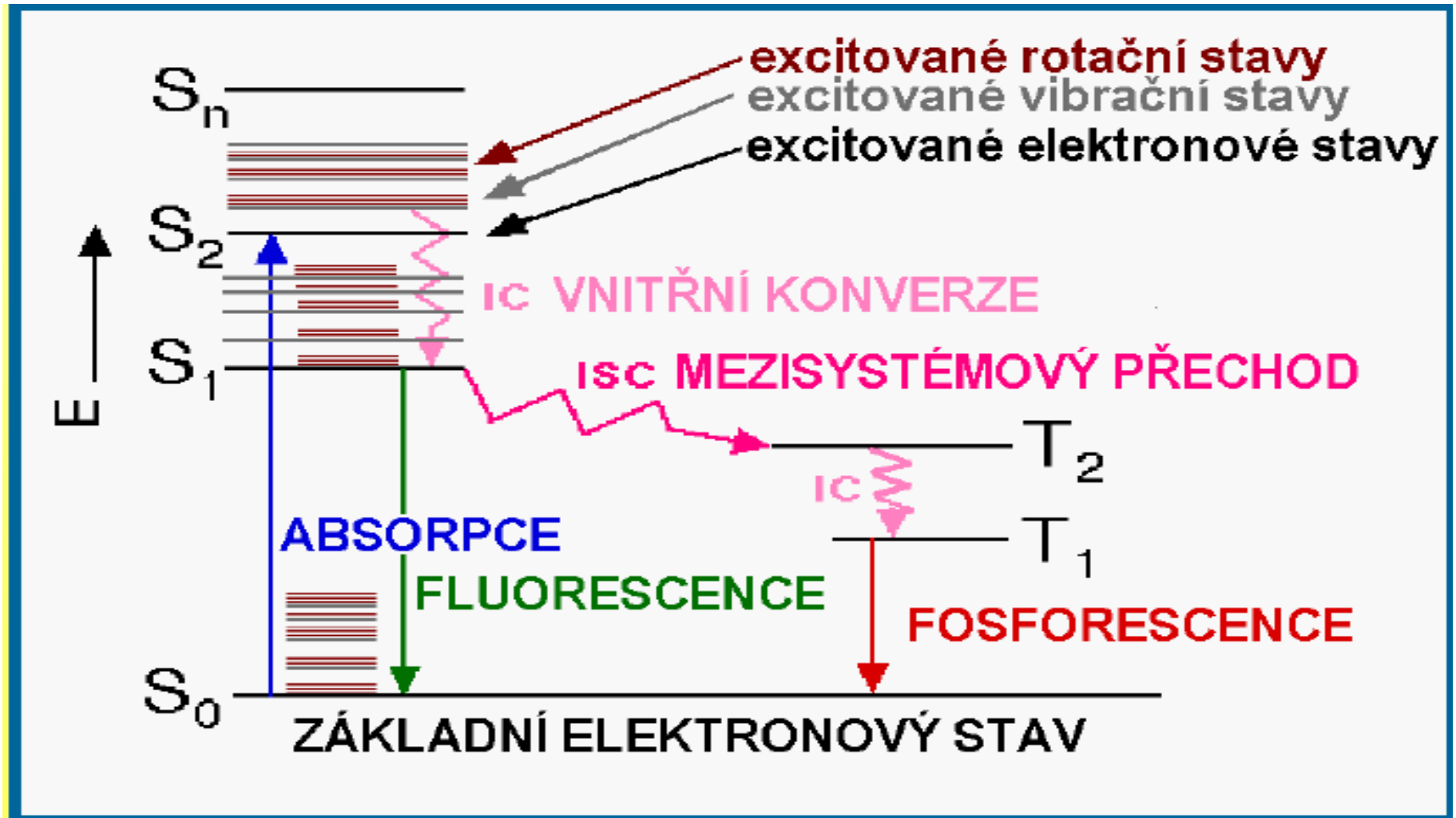
- způsobem aktivace elektronu do excitovaného stavu
- způsobem vyzáření energie

# 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)

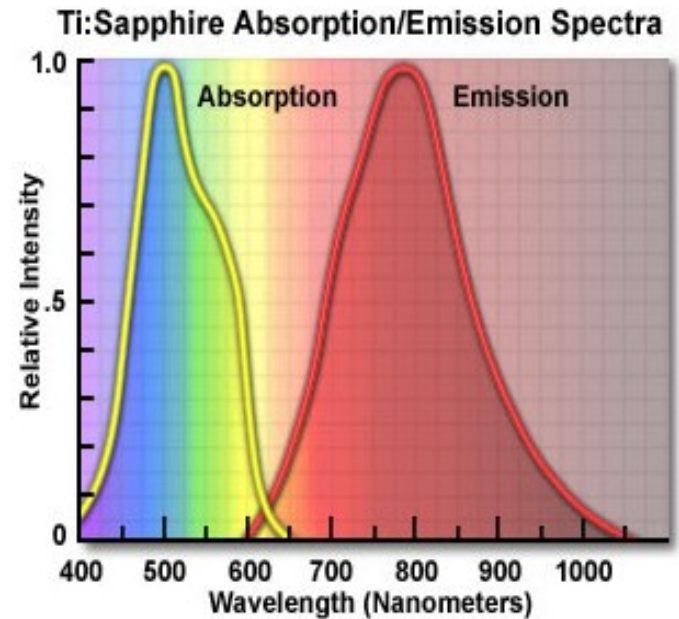
# Fluorescence a fosforescence





# Fluorescence

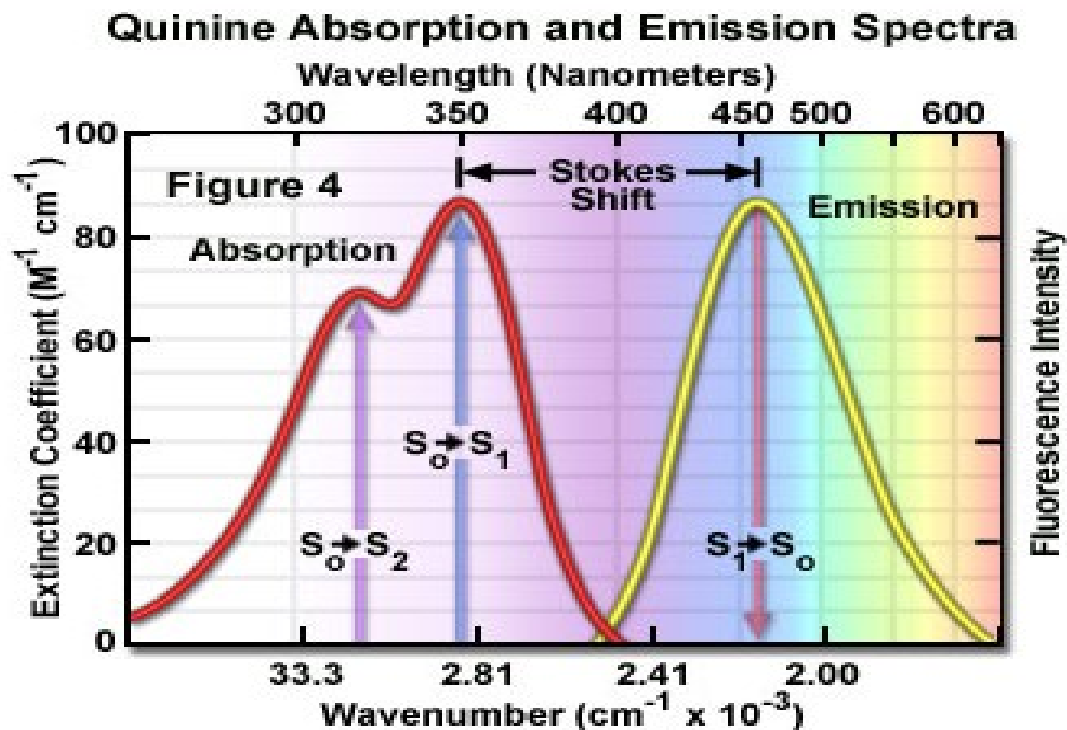
- Při excitaci se molekuly dostanou na vyšší energetickou hladinu a při návratu do základního stavu se část energie vyzáří také ve formě tepla.
- Proto má emitované záření fluoreskujících sloučenin vždy vyšší vlnovou délku (tj. méně energie) než excitační záření, vyvolávající fotoluminiscenci



# Fluorescence

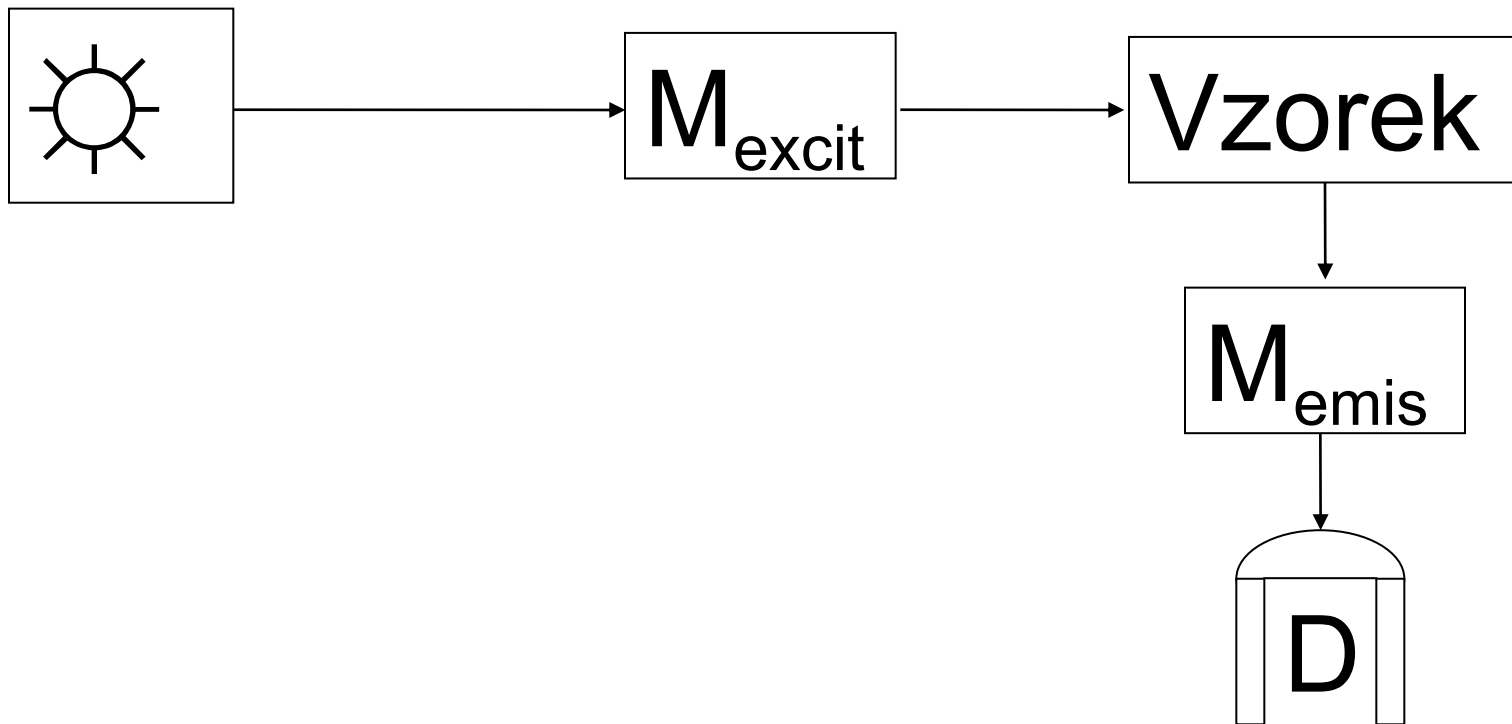
## Stokesův posun

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



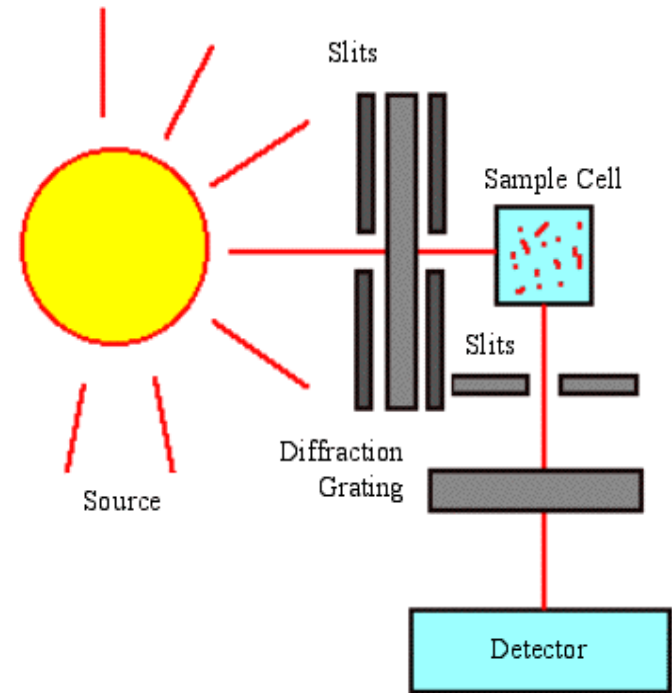
# Fluorimetrie

- 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)

The text is centered on a white background. It is surrounded by six light purple circles of varying sizes and styles. Two circles are solid, and four are hollow outlines. They are arranged in a loose, decorative pattern around the text.

**Děkuji za pozornost**