

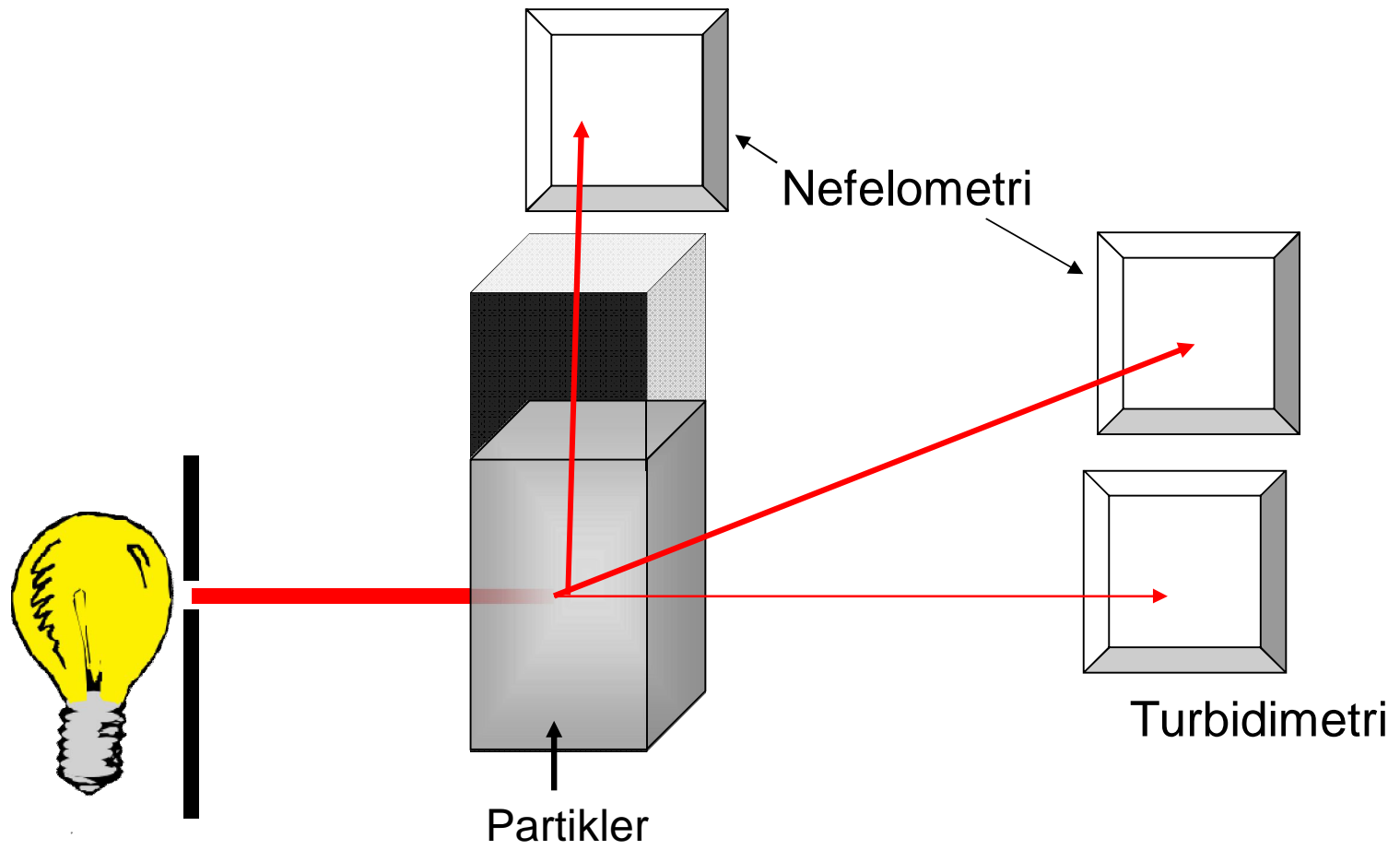
Turbidimetri og nefelometri

Olav Klingenberg

Overlege, dr.med

Avdeling for medisinsk biokjemi

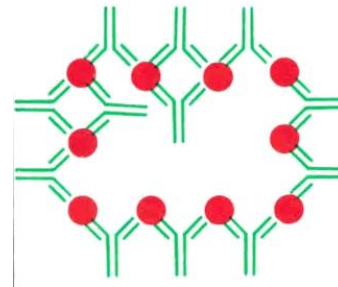
OUS-Rikshospitalet



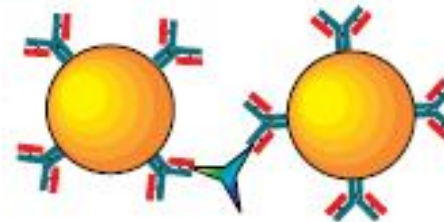
Hva slags partikler sprer lys?

- Molekyler
 - Gassmolekyler (<1 nm)
 - Proteiner (albumin 7 nM, IgG 10-15 nM)

- Immunkomplekser



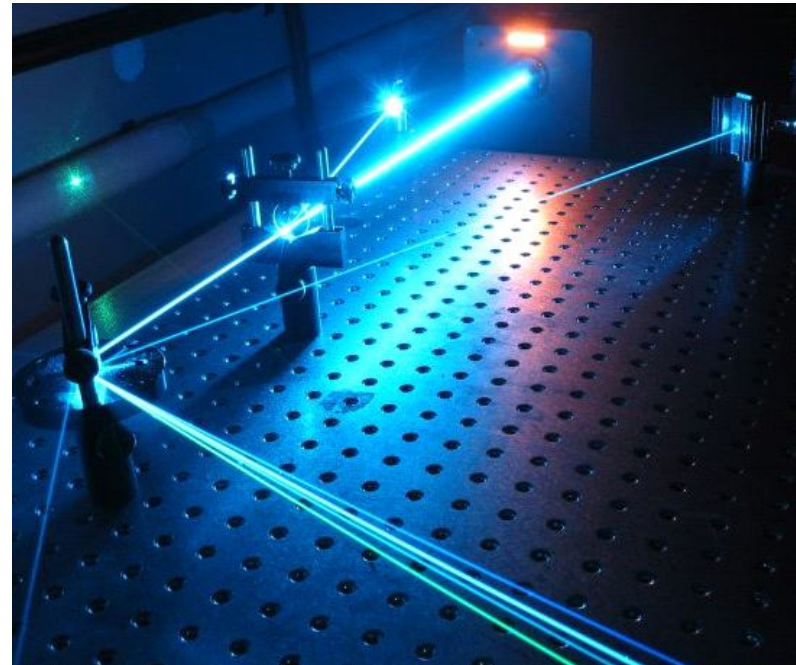
- Latexpartikler, agglutinerte



Aktuelle
for oss

Hva slags lys?

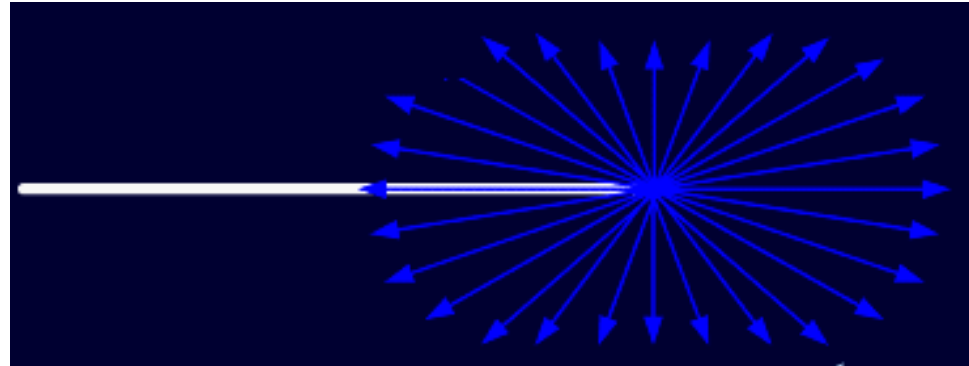
- Ofte laser, ulike kilder
- Nefelometri krever intenst lys
- Spenn i bølgelengder, synlig lys (++)
- BN ProSpec: 840 nm



Lysspredning

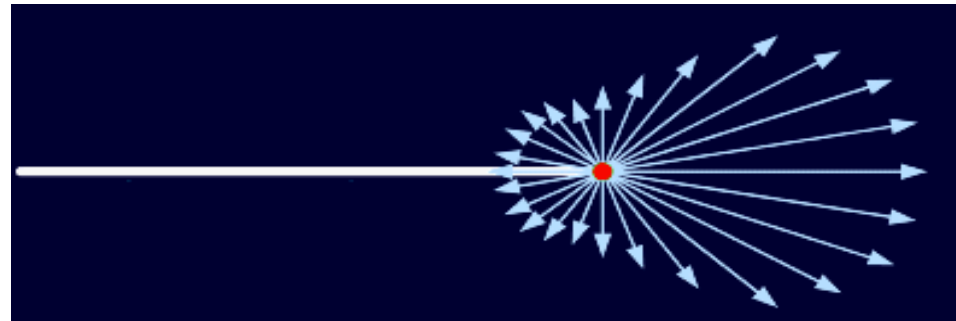
-Rayleigh spredning

- små partikler i forhold til bølgelængde ($< \lambda/10$)



-Rayleigh-Debye

- ($\lambda - \lambda/10$)



-Mie spredning

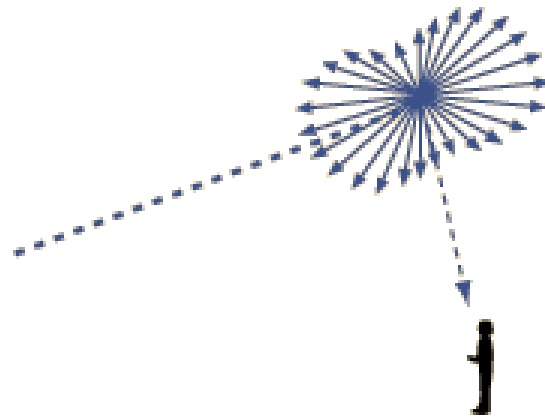
- store partikler i forhold til bølgelængde ($> \lambda$)



Rayleigh spredning

$$I = I_0 \frac{1 + \cos^2 \theta}{2R^2} \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}\right)^2 \left(\frac{d}{2}\right)^6$$

- Intensitet omvendt proporsjonal med lysets bølgelengde i 4. potens



Derfor er himmelen blå.
(Vårt øye er mindre følsomt for fiolett lys)

- Proporsjonal med partikkeldiameter i 6. potens
- Mie-spredning mer kompleks matematikk...

Nefelometri

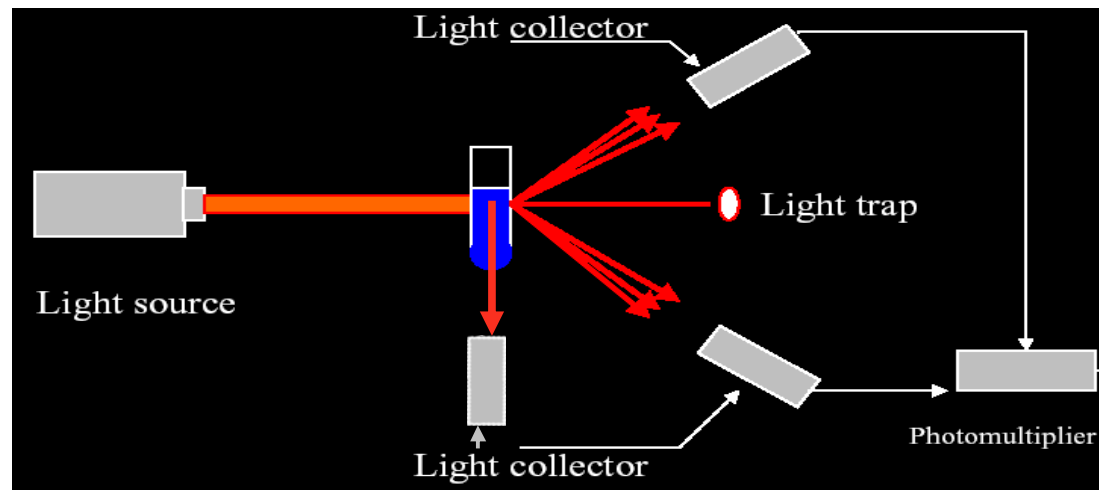
Kan måle ved 90 grader ($<\lambda/10$) eller mindre vinkler ($>\lambda$)

Liten målevinkel teknisk krevende, skilles fra innfallende lys

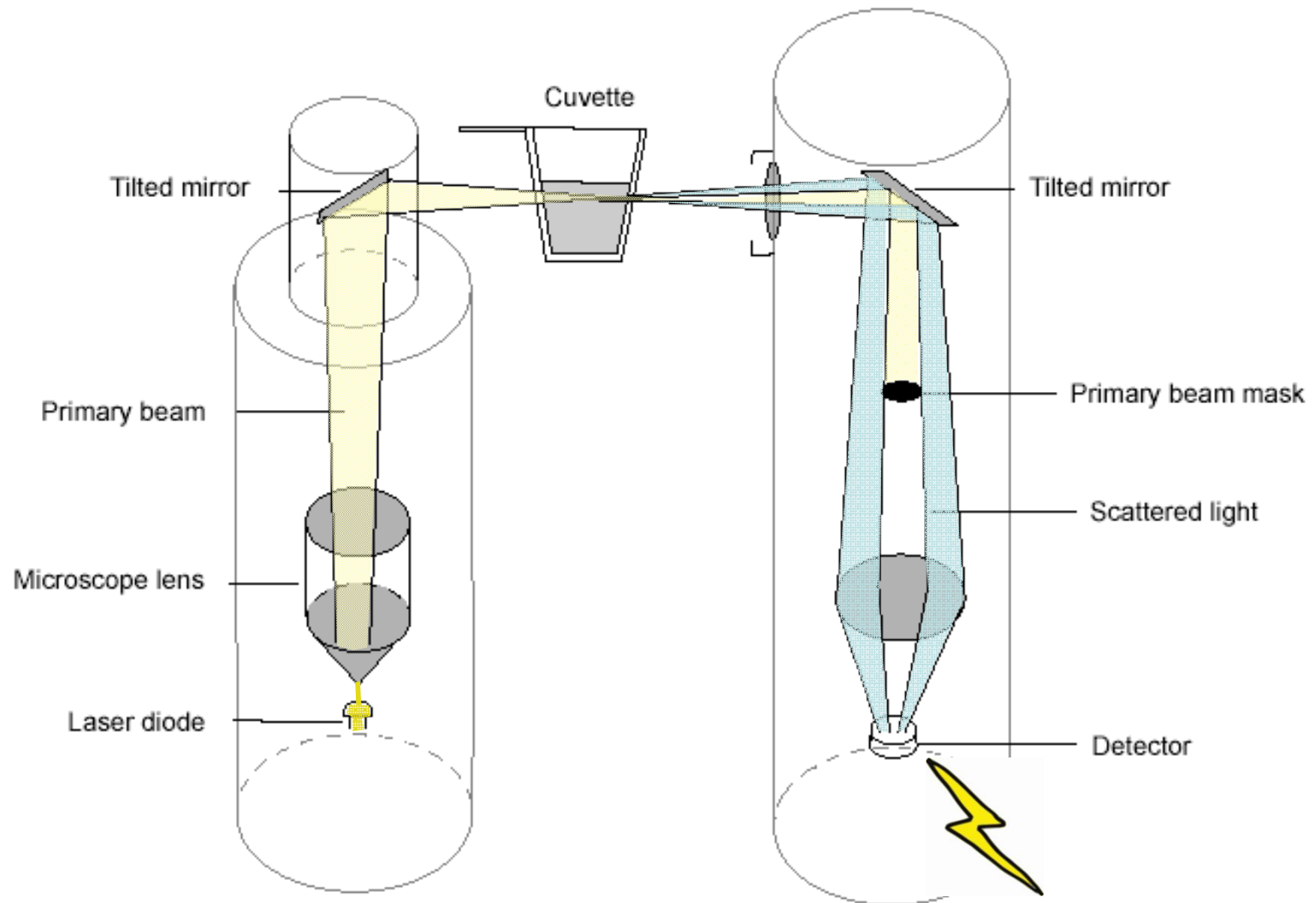
BN ProSpec: Immunkomplekser (latex-partikler) >1000 nM

→Mie spredning, måler ved 13-28 graders vinkel

Nefelometri - lav partikkelkonsentrasjon

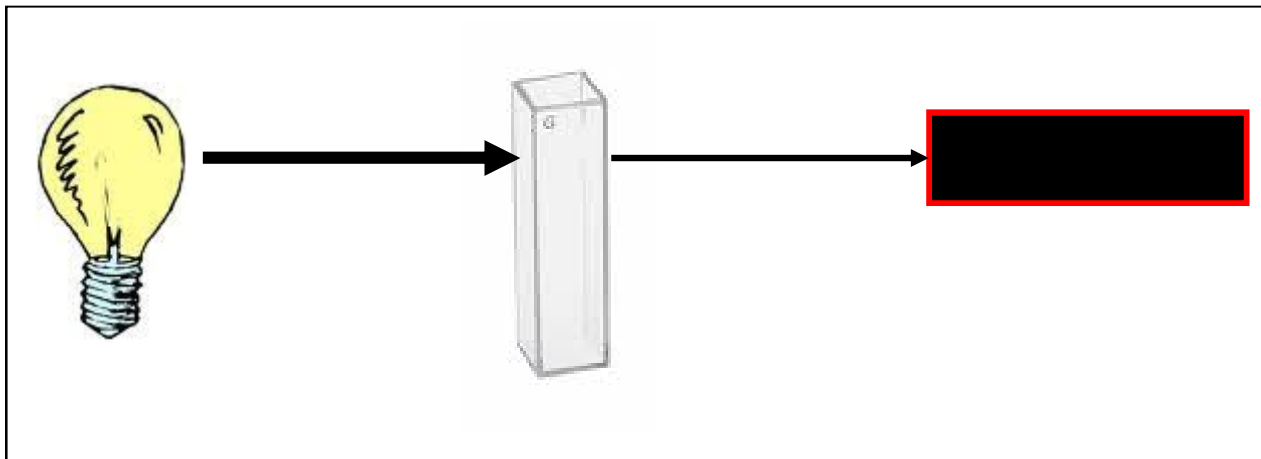


Optikk - BN ProSpec



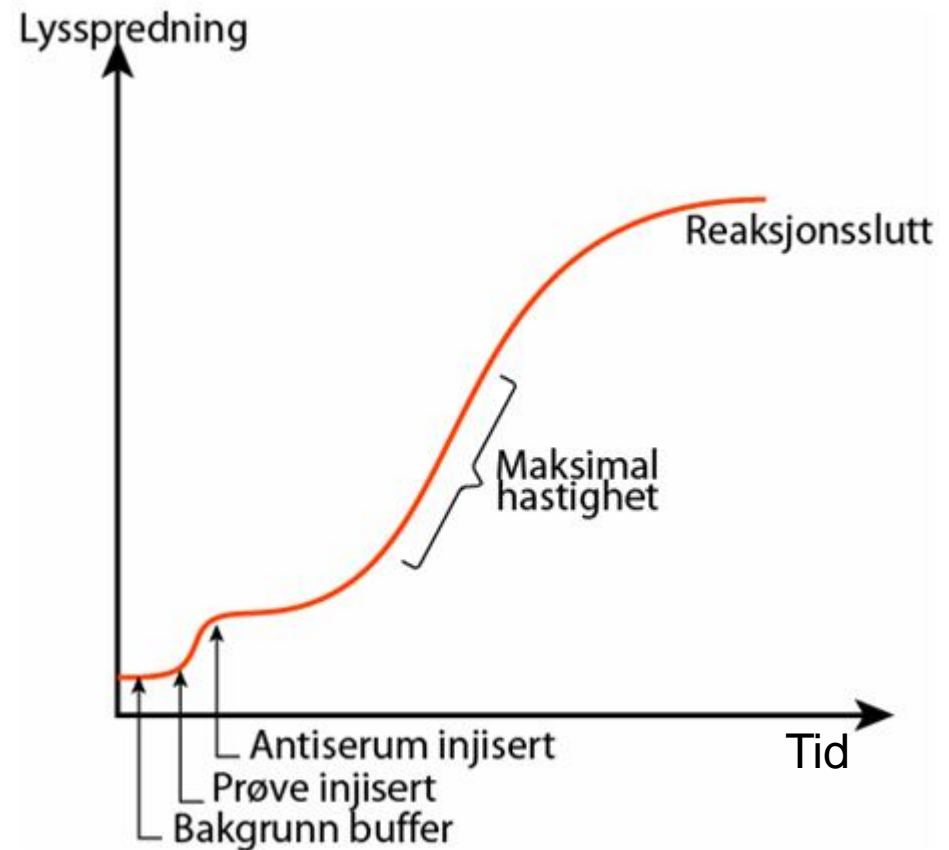
Turbidimetri

- Måler reduksjon i gjennomfallende lys
 - Absorpsjon, lysspredning
 - Enklere instrumentering, spektrofotometer
 - På klinisk kjemiske storinstrumenter
 - Relativt høy partikkelkonsentrasjon

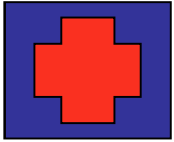


Type analyse

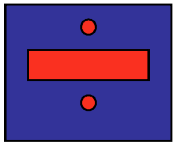
- Endepunktsanalyse
- "Fixed-time" analyse
- Kinetisk analyse



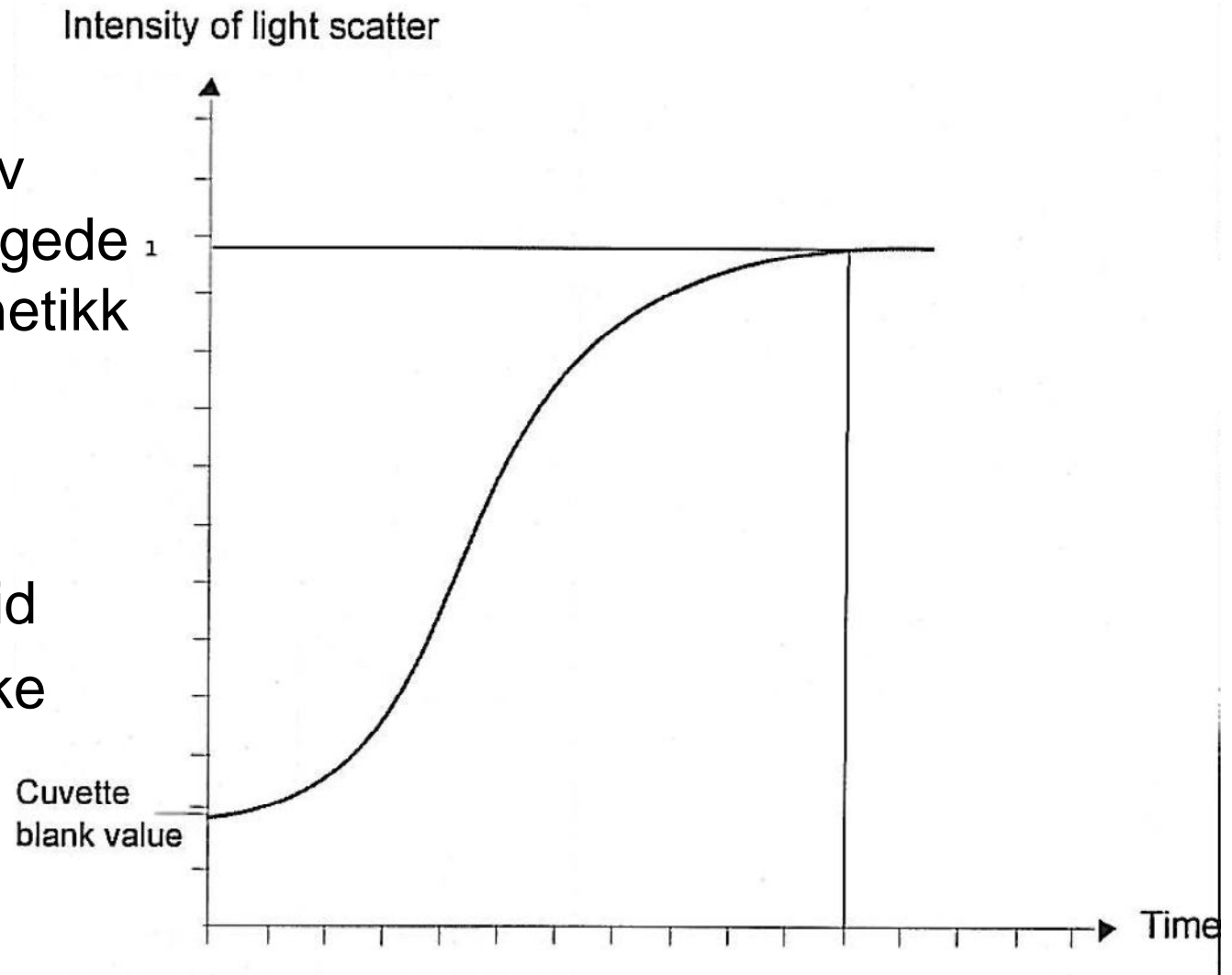
Endepunktsanalyse



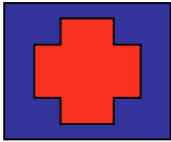
- Enkel
- Uavhengig av matriks betingede ulikheter i kinetikk



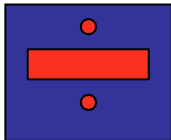
- Lang analysetid
- Monitorerer ikke reaksjon



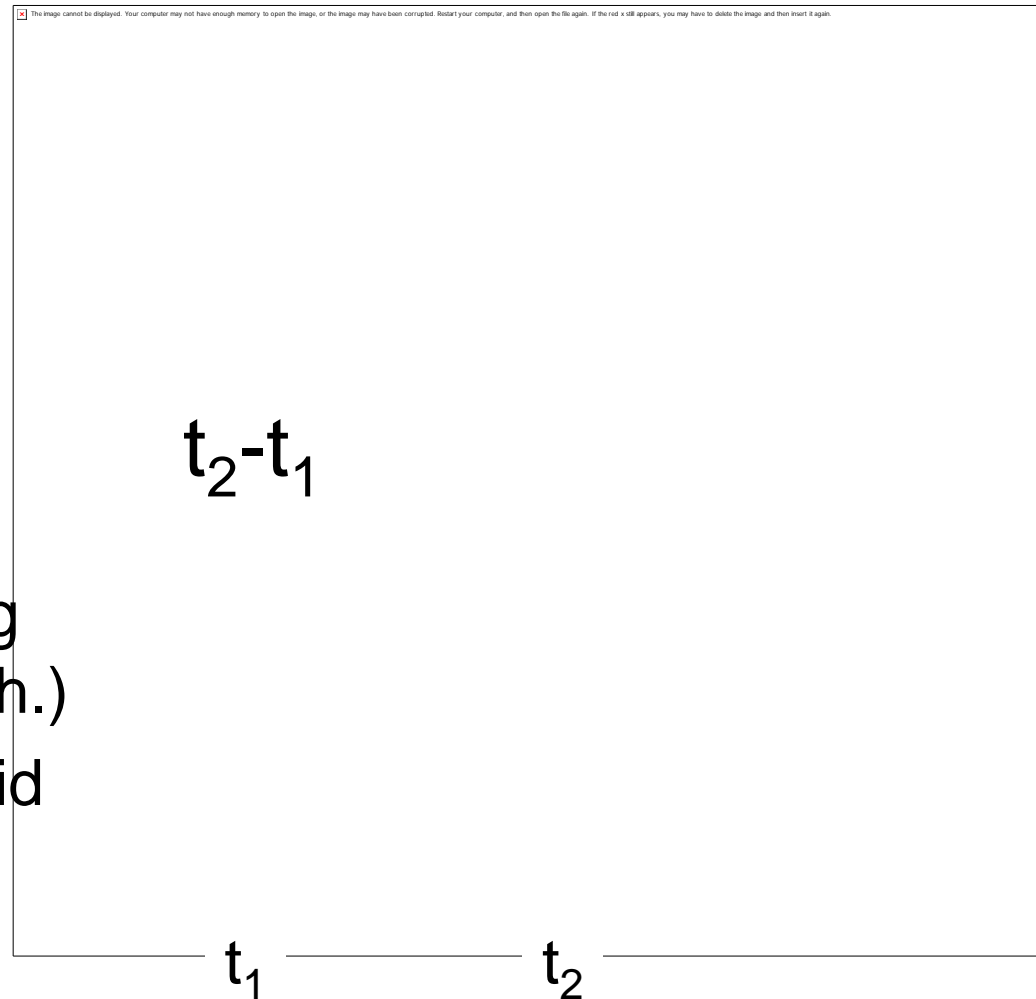
”Fixed-time” analyse



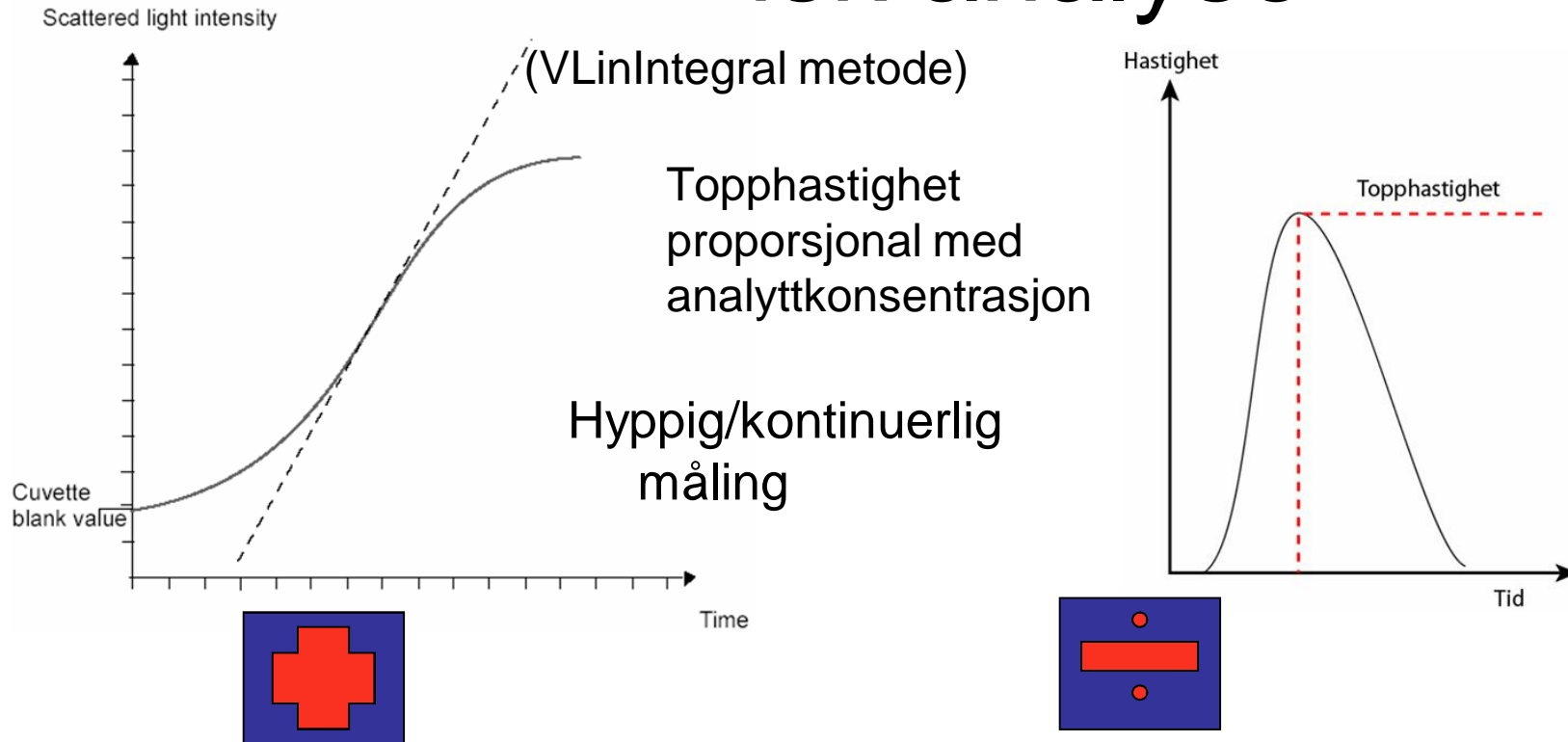
- Teknisk enkelt
- Bakgrunn fratrukket



- Ulik kinetikk i prøve og kalibrator (ag-kons.avh.)
- Ganske lang analysetid
- Ikke monitorering



Kinetisk analyse



- Kort analysetid
- Monitorere → muligheter
- Spesifisitet (høyaffinitets-ast.)

- Litt lavere sensitivitet
- Krever mer av instrument, tidspunkt varierer med konsentrasjon
- Mer følsomt for pH, effekt av ioner

Reagens-betraktninger

- Buffer

- Ioner -

- Chaotrope: hemmer Ag-Ast-binding

- Polyetylenglykol -

- øker reaksjonshastighet (ekskluderer andre molekyler fra >8x sitt eget volum)

SCN⁻, ClO₄⁻, NO₃⁻, Br, Cl⁻, F⁻, SO₄²⁻, HPO₃⁻, PO₄³⁻

NH₄⁺, K⁺, Na⁺, Li⁺, Mg²⁺, Ca²⁺

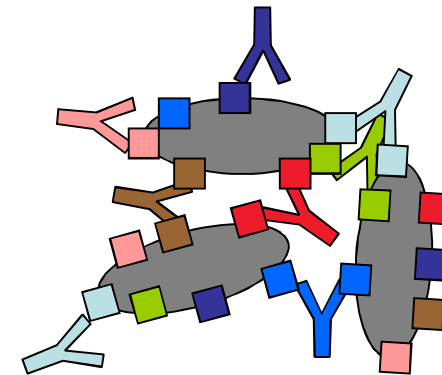
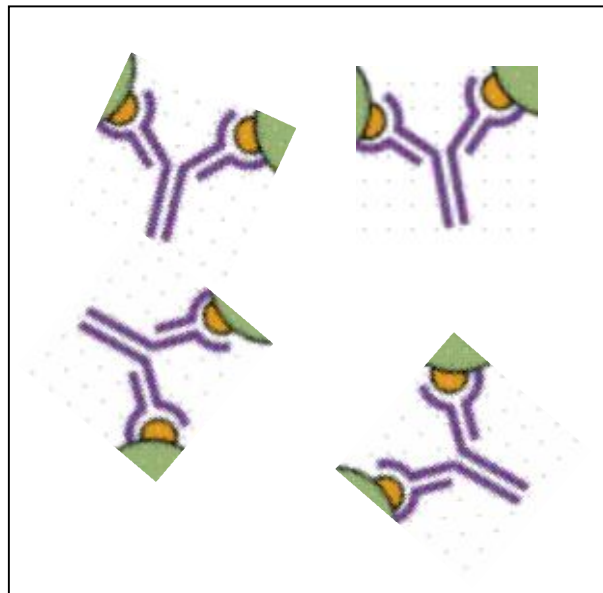
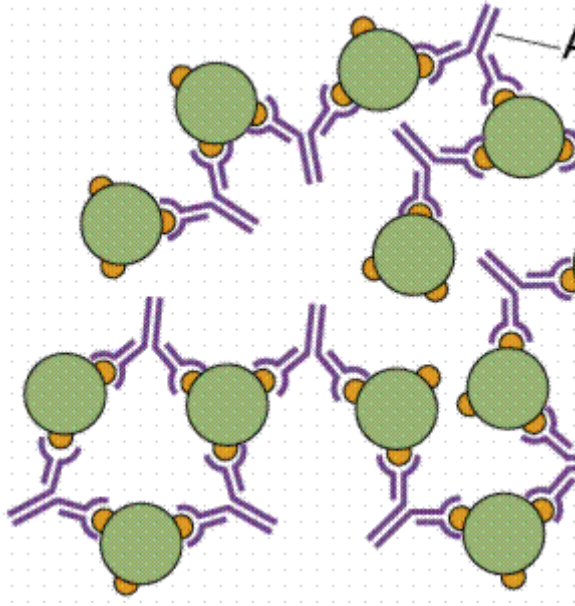
Chaotrope

Antichaotrope

Reagens-betraktninger

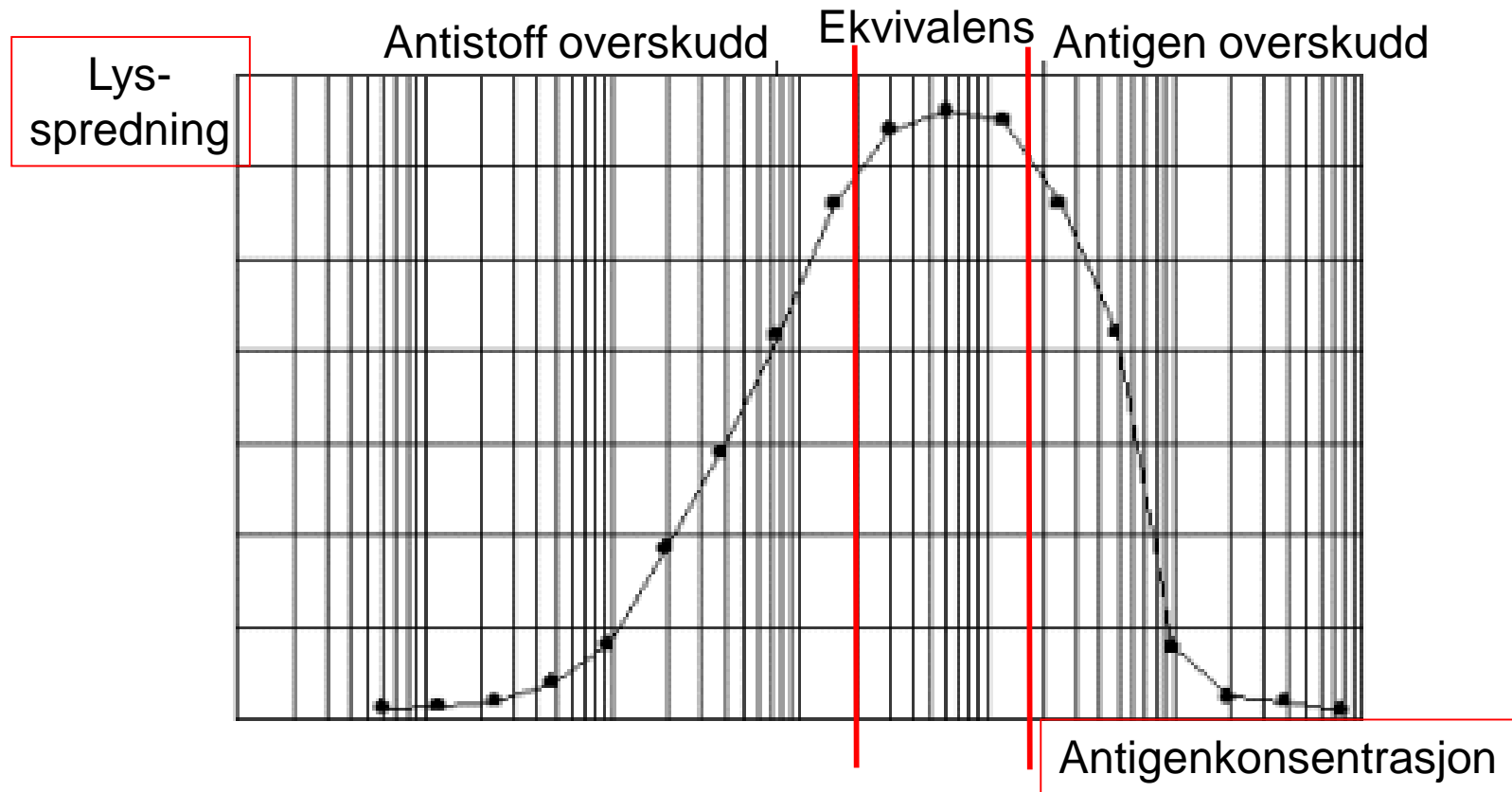
- Antistoff

- Monoklonalt (epitoptall, mix) - polyklonalt

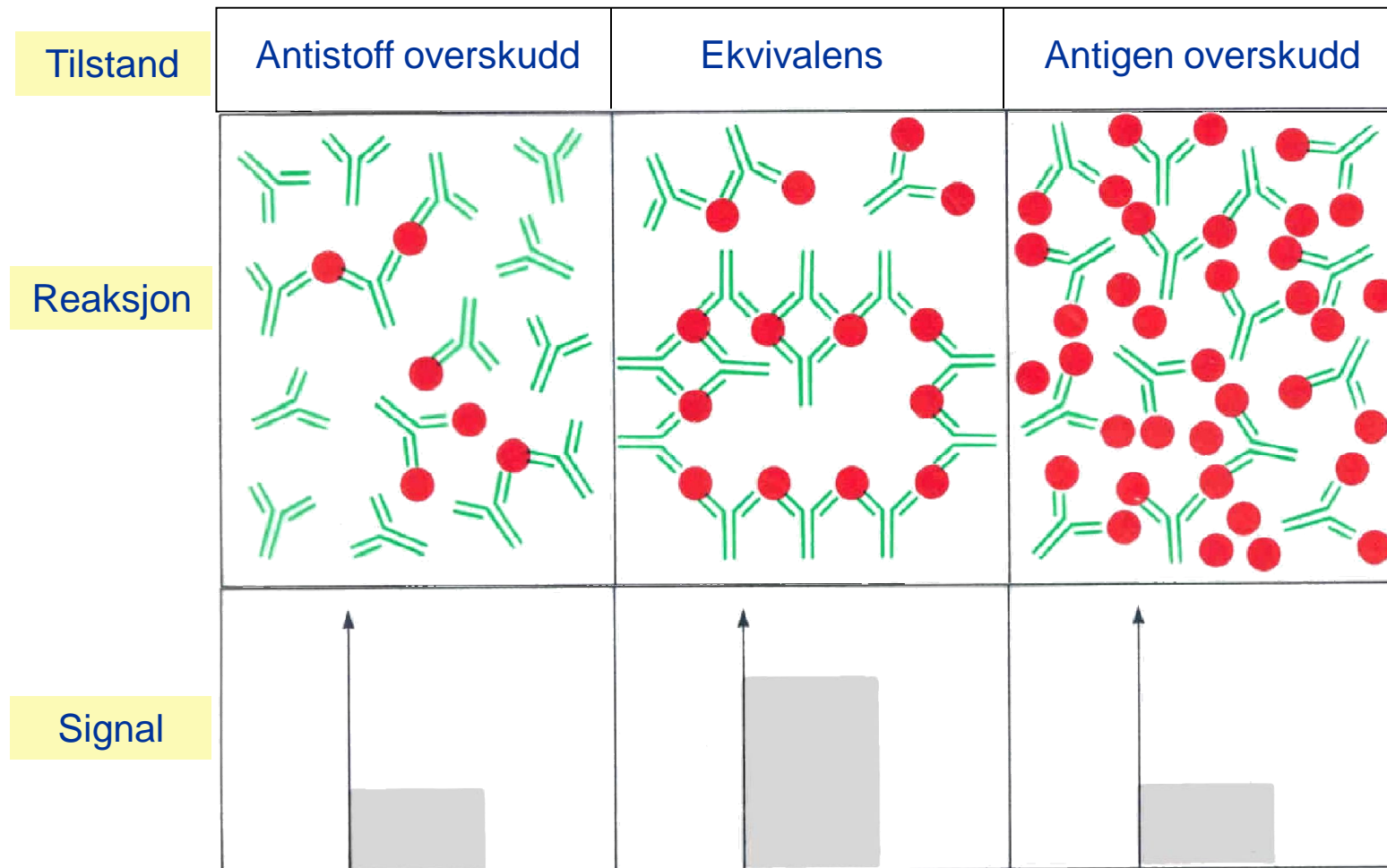


Antigen excess

- Heidelberg-Kendall kurve



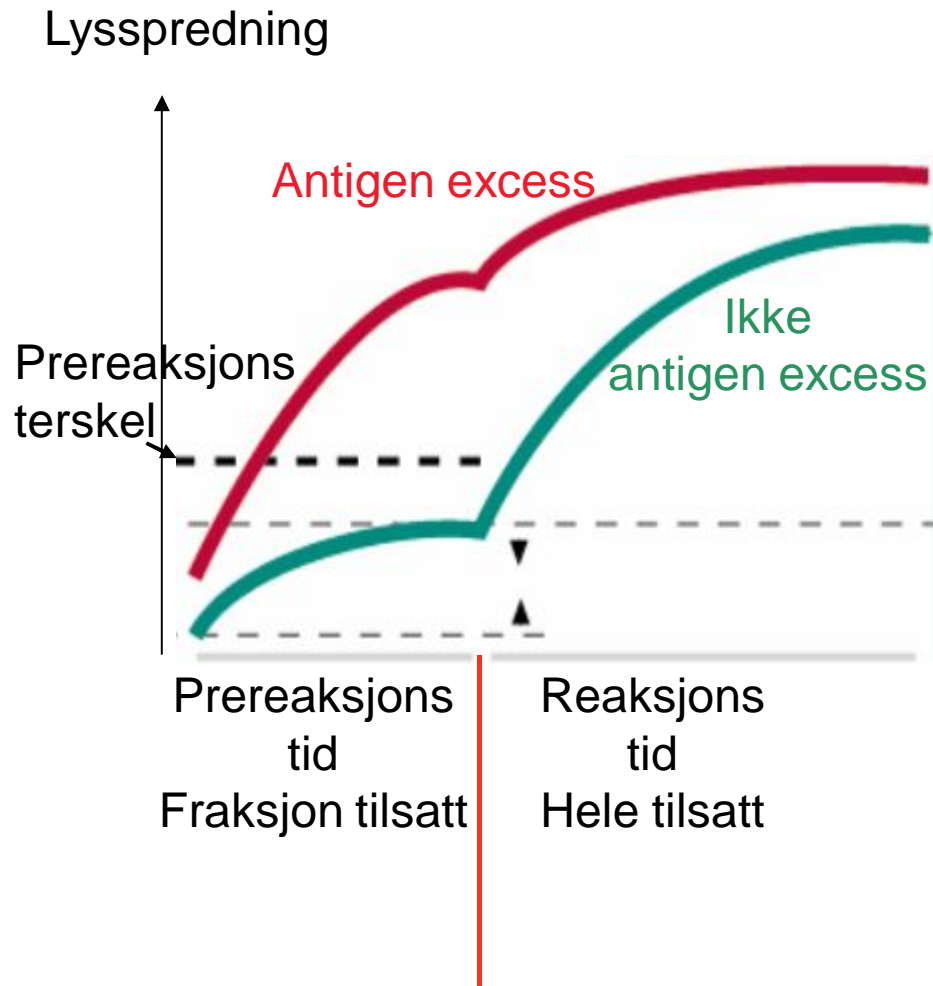
NB! Dette er ikke en reaksjonskurve, men måling av prøver med ulik konsentrasjon



Ved antigen excess binder antistoffmolekylene hver sine antigenmolekyler. Det dannes lite kryssbindinger, partikkeldiameteren blir liten, og lysspredning lav.

Deteksjon av antigen excess

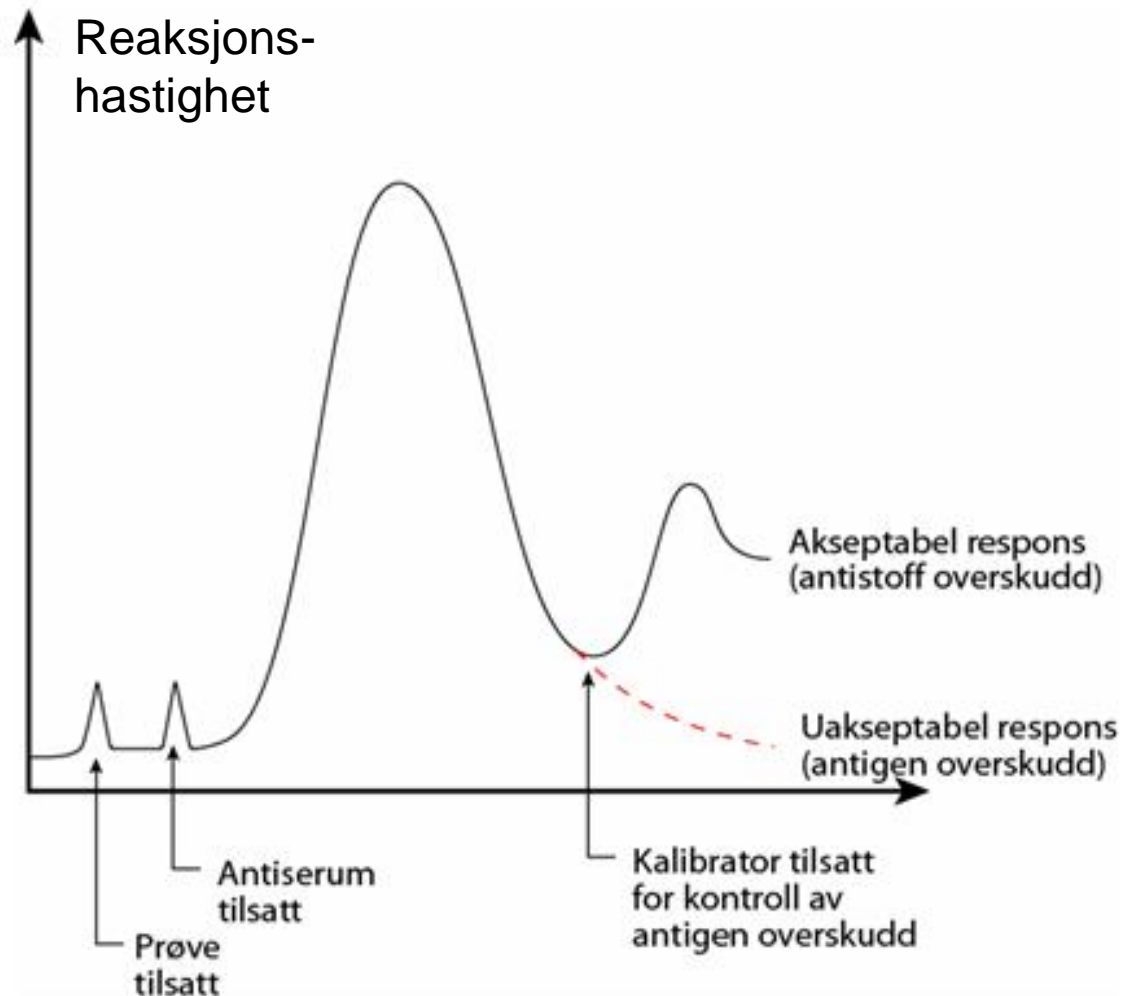
- Prereaksjon



- Liten del av prøvevolum tilsettes først. Hvis signal høyere enn terskel
→ antigen excess
→ høyere fortynning

Deteksjon av antigen excess

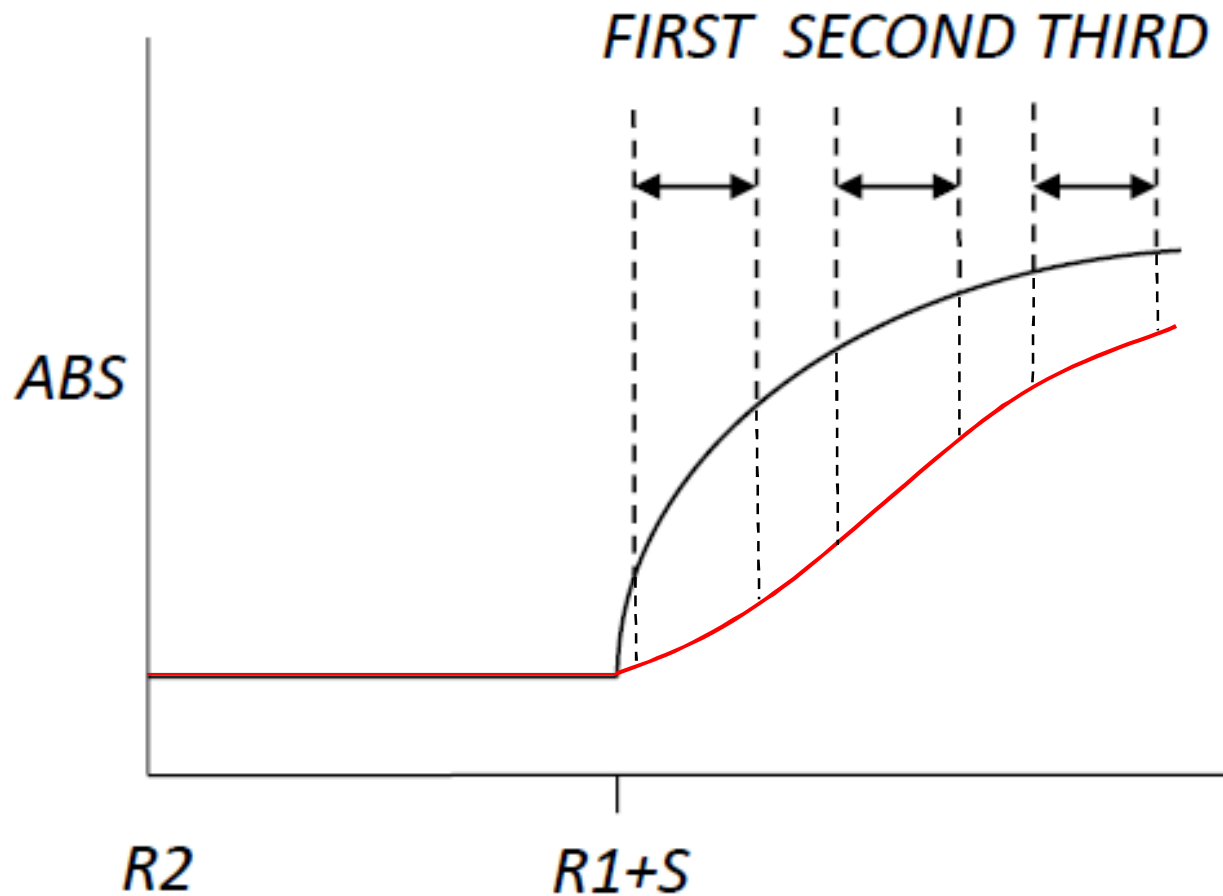
-Tilsats av kalibrator



- Evt. mer prøve tilsettes i stedet for kalibrator

Deteksjon av antigen excess

- Vurdering av kinetikk



- Tidlig vs. sen økning

- F.eks. Ratio
First/Second
First/ Third

Hvilken kurve
representerer
antigen excess?

Deteksjon av antigen excess

...siste utvei

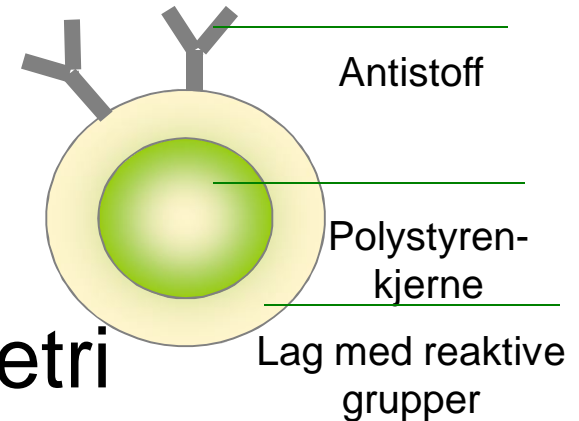
- Reanalyse av alle prøver i høyere prøvefortynning
 - dyrt
 - tidkrevende

Interferens

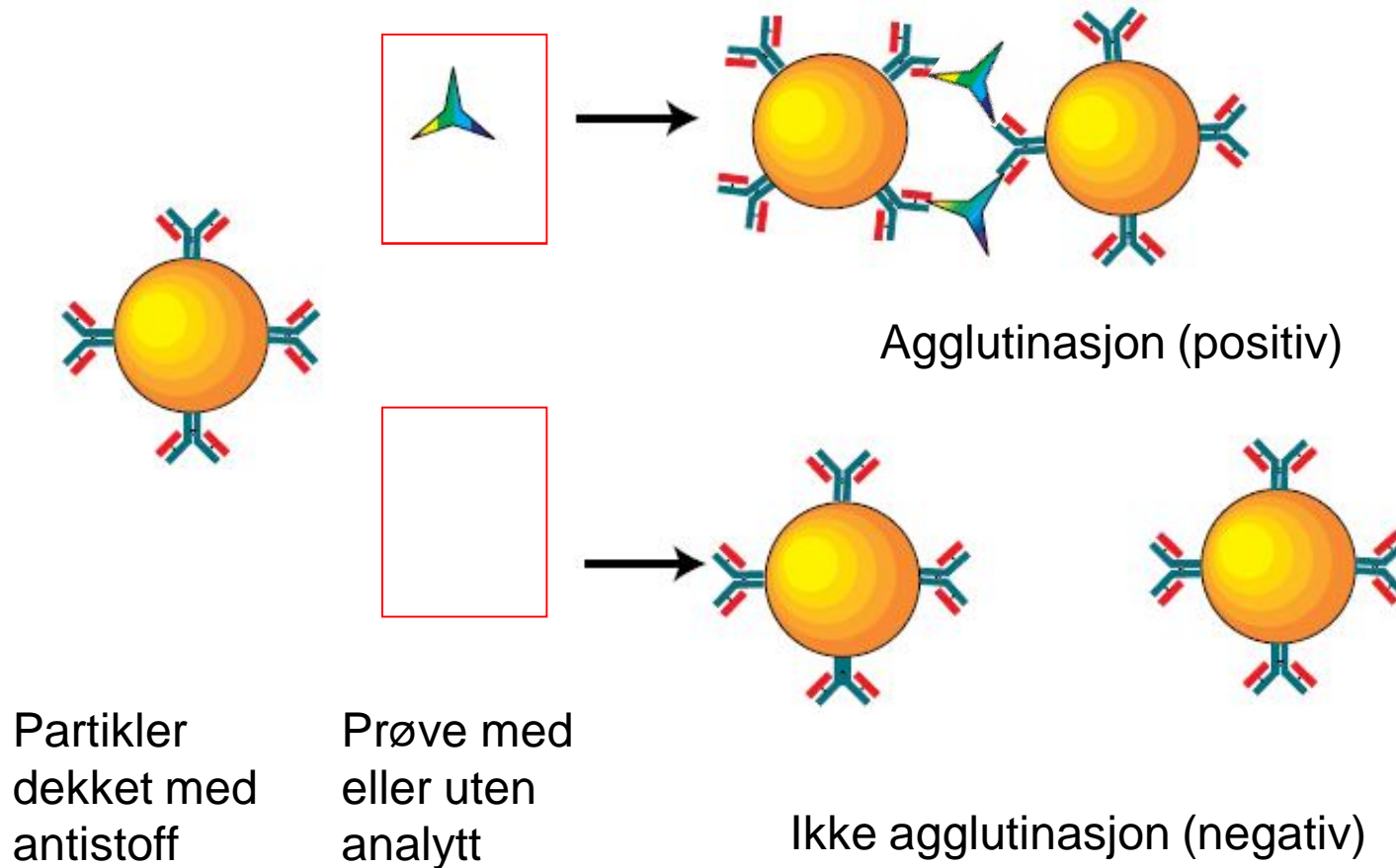
- Gunstig med høy prøvefortynning
- Lipemi - sentrifugere/rensende substans
 - hemolyse, hyperbilirubinemi, medikamenter - lite problem ved nefelometri
- Heterofile antistoffer / RF
 - fortynning
 - blokkerende substanser
 - Fc-frie reagenser

Partikkelforsterkede assays

- Gir høyere sensitivitet
(x 100-1000)
- Både turbidimetri og nefelometri
- Små partikler (20- 700 nm)
 - Diameter - bølgelengde
 - FLC: 184 nm
 - CRP: 180 nm
- Mulighet for ulike assays...

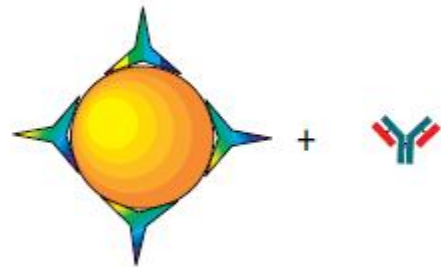


Direkte agglutinasjon



Konkurrerende hemming

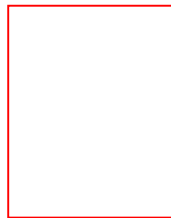
Særlig aktuelt for monovalent antigen



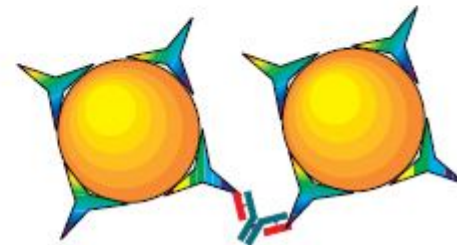
Partikler
dekket med
antigen (analytt) Antistoff



Ikke agglutinasjon (positiv)

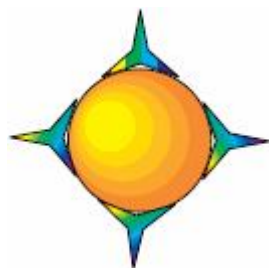
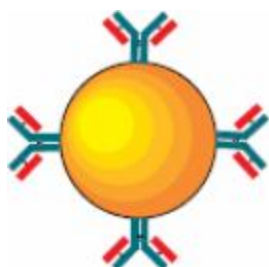


Agglutinasjon (negativ)

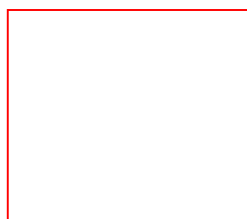
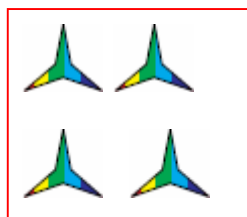


Prøve med
eller uten
analytt

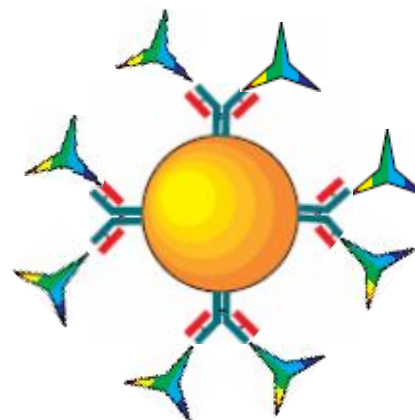
Konkurrerende hemming, dobbel partikkel



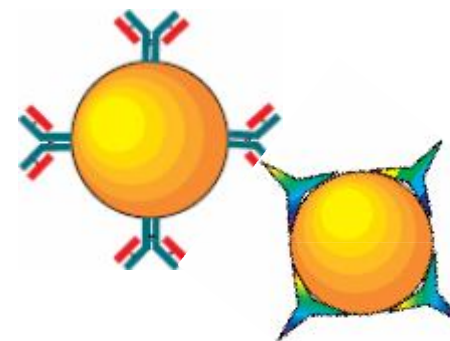
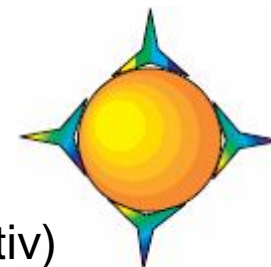
To typer partikler,
dekket med
antigen eller
antistoff



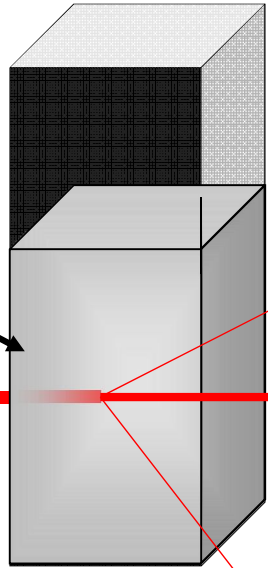
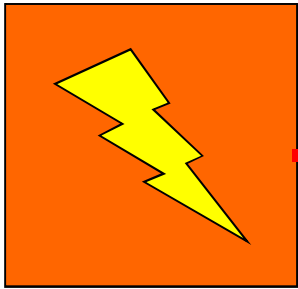
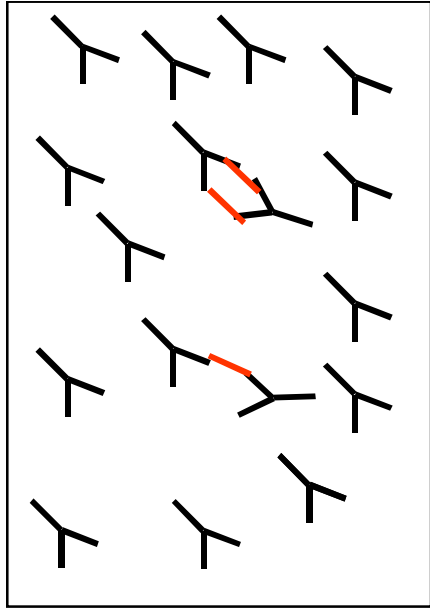
Prøve med
eller uten
analytt



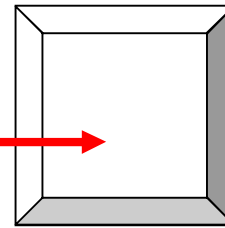
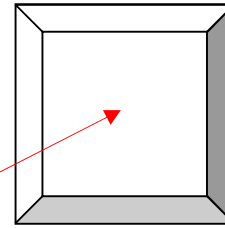
Ikke agglutinasjon (positiv)



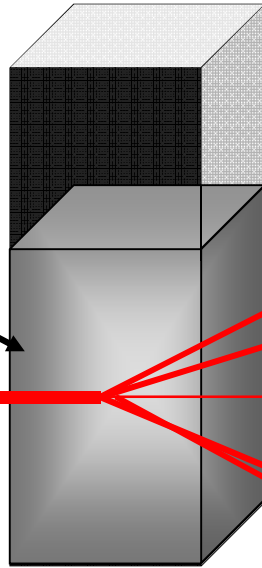
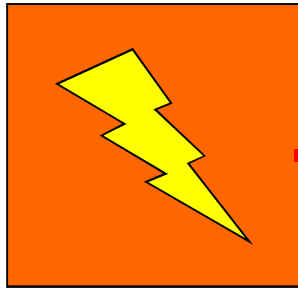
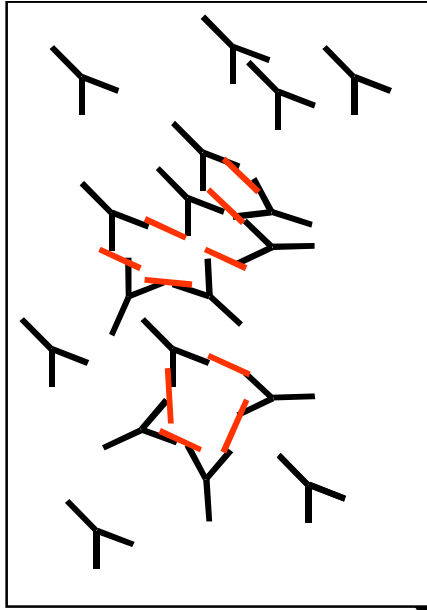
Agglutinasjon (negativ)



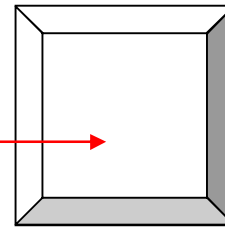
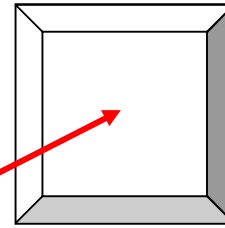
Nefelometri



Turbidimetri



Nefelometri



Turbidimetri