

## **Imunonefelometrija i imunoturbidimetrija: teorijski principi, instrumenti i primena**

**Vesna Kuntić<sup>1</sup>, Zorica Stojić-Vukanić<sup>\*2</sup>**

<sup>1</sup>Institut za fizičku hemiju, <sup>2</sup>Institut za mikrobiologiju i imunologiju,  
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450,  
11000 Beograd, Srbija

---

### **Kratak sadržaj**

Nefelometrija i turbidimetrija su metode koje se zasnivaju na rasipanju svetlosti: pri prolasku kroz disperzionu sredinu, svetlost se rasipa na česticama disperzione faze. Intenzitet rasute svetlosti može se meriti pod nekim uglom (uobičajeno, ali ne i obavezno, pod pravim uglom), što predstavlja nefelometriju ili u pravcu upadne svetlosti, što predstavlja turbidimetriju.

Primenom nefelometrije i turbidimetrije u imunologiji, razvile su se imunonefelometrija i imunoturbidimetrija, kao savremene tehnike za određivanje proteina i peptida, koje su zamenile klasične, dugotrajne, precipitacione tehnike u gelu. U ovom radu objašnjene su teorijske osnove rasipanja svetlosti, prikazane su sheme i delovi instrumenata nefelometra i turbidimetra i opisane su imunonefelometrija i imunoturbidimetrija koje su u širokoj upotrebi u savremenim kliničkim laboratorijama.

**Ključne reči:** nefelometrija, turbidimetrija, rasuta svetlost,  
imunonefelometrijski i imunoturbidimetrijski testovi

---

\* Autor za korespondenciju: e-mail: zoricav@pharmacy.bg.ac.rs (Tel: +381113951224)

## 1. Uvod

Imunonefelometrija i imunoturbidimetrija predstavljaju imunotestove kojima se detektuju antigen-antitelo kompleksi u rastvoru, a bazirane su na merenju intenziteta rasute (rasejane) svetlosti. Ove tehnike, namenjene za određivanje proteina i peptida, intenzivno su se razvile poslednjih decenija i brzo zamenile precipitacione tehnike u gelu.

U ovom radu dato je fizičko-hemijsko objašnjenje nastanka rasute svetlosti i prividne apsorpcije, data je shema i objašnjeni su delovi nefelometra i turbidimetra i prikazana je primena imunonefelometrije i imunoturbidimetrije u savremenoj kliničkoj laboratorijskoj praksi.

## 2. Nefelometrija i turbidimetrija

### 2.1. Teorijski princip nastanka rasute svetlosti

Rasipanje svetlosti je proces u kome upadno zračenje indukuje dipolni moment u molekulima, koji se onda menja frekvencijom istom kao što je frekvencija svetlosti koja ga je izazvala. Oscilovanje dipola dovodi do (re)emisije svetlosti u svim pravcima, što se naziva rasuta (ili rasejana) svetlost. Rasuta svetlost ima istu talasnu dužinu kao i upadna.

Rasipanje svetlosti u koloidnim i mutnim sredinama, koje imaju finu, nehomogenu strukturu, poznato je kao **Tindalov (Tyndal) efekat** i nastaje usled difrakcije svetlosnih talasa na centrima rasejanja, koji imaju indeks prelamanja različit od sredine u kojoj se nalaze. U homogenim optičkim sredinama, sa konstantnim indeksom prelamanja (kao npr. u čistoj vodi), rasipanje je zanemarljivo.

**Rejli (Rayleigh)** je 1871. godine pokazao da intenzitet rasute svetlosti ( $I_\theta$ ), meren pod uglom ( $\theta$ ) u odnosu na smer upadne svetlosti na rastojanju ( $r$ ), zavisi od broja čestica ( $N$ ) u jedinici zapremine, talasne dužine upadne svetlosti ( $\lambda$ ) i polarizabilnosti molekula ( $\alpha$ ) prema sledećoj relaciji:

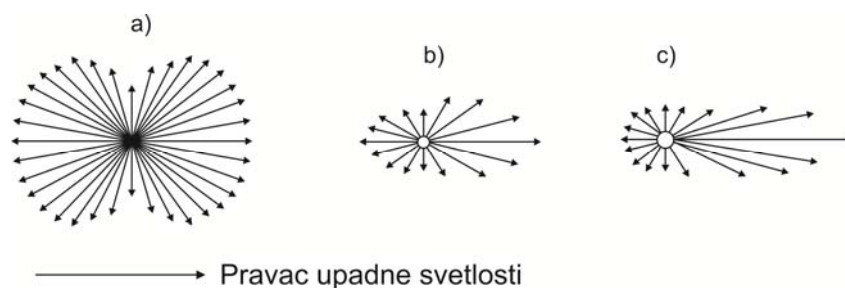
$$\frac{I_\theta r^2}{I_0} = R_\theta = 8\pi^4 \alpha^2 \frac{N}{\lambda^4} (1 + \cos^2 \theta) \quad (1)$$

Veličina  $R_\theta$  zove se **koeficijent rasipanja** ili **Rejljev odnos**. Izraz (1) može se napisati u pojednostavljenom obliku:

$$I_\theta = \frac{K}{\lambda^4} \quad (2)$$

odakle je evidentno da se najviše rasipa svetlost male talasne dužine<sup>1</sup>.

Izraz (2) važi pod uslovom da su koloidne čestice (centri rasejanja) znatno manje od talasne dužine upadne svetlosti (prečnik čestice mora biti 1/10 talasne dužine upadne svetlosti, ili još manji). Čestice ovih dimenzija rasipaju svetlost simetrično u svim pravcima, ali najmanje pod uglom od  $90^\circ$  (slika 1a), što se naziva **Rejlijevo rasipanje**.



**Slika 1. Rasipanje svetlosti u zavisnosti od veličine čestice koje je rasipaju:**

- a) male čestice pokazuju Rejlijevo rasipanje – svetlost je rasuta simetrično, ali najmanje pod uglom od  $90^\circ$ ;
- b) velike čestice pokazuju Rejli-Debajevo rasipanje – svetlost je rasuta više u smeru upadnog zraka;
- c) veoma velike čestice pokazuju Mijeovo rasipanje – svetlost je rasuta maksimalno u smeru upadnog zraka.

Ako se kao upadna svetlost koristi vidljivi deo spektra, talasnih dužina oko 400 nm, onda čestice za koje važi Rejlijevo rasipanje moraju biti dimenzija oko 40 nm. Mnogi proteini plazme, kao što su imunoglobulini,  $\beta$ -lipoproteini i albumini, ovih su dimenzija.

Ako su čestice veće, u intervalu od 40 do 400 nm, tj. reda talasnih dužina upadne svetlosti, Rejljeva jednačina ne važi u potpunosti. Neki proteini plazme, kao što su antitela IgM klase, hilomikroni i antigen-antitelo agregati spadaju u ovu kategoriju čestica. Rasipanje svetlosti od strane čestica ovih dimenzija naziva se **Rejli-Debajevo (Rayleigh–Debye) rasipanje** (slika 1b).

<sup>1</sup> Boja neba je posledica rasipanja svetlosti. U toku dana, nebo izgleda plavo kada se posmatra suprotno od Sunca, pošto rasuta svetlost, koja dolazi do posmatrača, sadrži najviše plave svetlosti. Međutim, pri zalasku, Sunce i njegova neposredna okolina izgledaju crveni, jer do posmatrača dolazi u najvećem procentu svetlost najveće talasne dužine, koja se najmanje rasipa.

Još veće čestice, čije su dimenzije veće od talasne dužine upadne svetlosti (u intervalu od 400 do 40.000 nm), kao što su eritrociti i bakterije, pokazuju drugačiju zakonitost pri rasipanju svetlosti, što se naziva **Mijeovo (Mie) rasipanje**. Na česticama ovih dimenzija, rasipanje je maksimalno u smeru upadne svetlosti. Može se izračunati, npr. da čestice prečnika oko 1 μm rasipaju svetlost maksimalno pod uglom od 10° (slika 1c).

### 2.1.1. Prividna apsorbcija

Pošto s povećanjem koncentracije čestica raste i intenzitet rasute svetlosti, koncentracije rastvora mogu se određivati pomoću metoda koje su zasnovane na eksponencijalnom zakonu, koji važi kada nema apsorpcije svetlosti:

$$I = I_0 e^{-tb}, \quad (3)$$

gde je:

$I$  – intenzitet svetlosti posle prolaska kroz koloidni rastvor;

$I_0$  – intenzitet upadne svetlosti, koja nije  $\lambda_{\max}$  ;

$b$  – debljina sloja rastvora kroz koju svetlost prolazi;

$\tau$  – **turbiditet** ili **stepen замуćenosti rastvora**, koji zavisi od talasne dužine upadnog zračenja, koncentracije i osobina čestica (veličine, oblika, prozračnosti, indeksa prelamanja čestica i okoline) koje dovode do rasipanja.

Iz eksponencijalne jednačine (3) može se izvesti linearna jednačina (4):

$$A_{priv} = \log \frac{I_0}{I} = k b c, \quad (4)$$

gde je:

$A_{priv}$  – **prividna apsorbcija**,

$k$  – koeficijent turbiditeta,

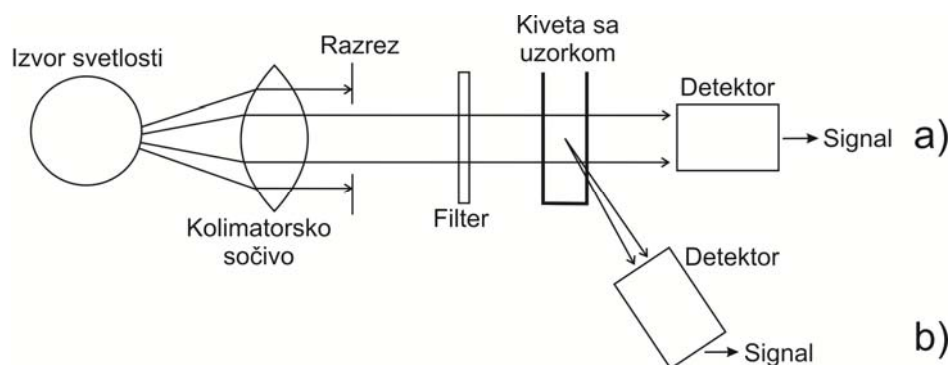
$c$  – koncentracija koloidnog rastvora.

Iako je izraz (4) potpuno analogan Lamber-Berovom (Lambert–Beer) zakonu, koji je osnova kvantitativne analize kod apsorpcione spektroskopije, treba razumeti da su apsorpcija i rasipanje u suštini dve sasvim različite pojave. Pri apsorpciji, jedan deo svetlosti se apsorbuje i transformiše u neki oblik unutrašnje energije, tako da nikad ne izađe iz uzorka. Naprotiv, pri rasipanju, praktično sva upadna svetlost izlazi iz uzorka, ali je usmereni snop upadne svetlosti rasejan u svim pravcima. Zbog toga se u smeru njegovog prostiranja zapaža prividno smanjenje intenziteta, slično apsorpciji, zbog čega se i govori o

**prividnoj apsorpciji.** Jednačina (4) važi samo kada se koristi upadna svetlost one talasne dužine koju rastvor minimalno apsorbuje (1-3).

## 2.2. Nefelometri i turbidimetri

Nefelometrima se meri rasuta svetlost pod različitim uglom u odnosu na upadnu svetlost. Uobičajeno, meri se rasuta svetlost pod uglom od  $90^\circ$  u odnosu na upadni zrak, pošto je takva geometrija konstruktivno najpovoljnija. Turbidimetrima se meri prividna apsorbcija, odnosno intenzitet propuštene svetlosti, koja je oslabljena zbog rasipanja, pod uglom od  $180^\circ$  u odnosu na upadni zrak, što je analogno merenju apsorbcije kod UV-VIS spektrofotometara. Zbog toga se za turbidimetrijska merenja mogu koristiti UV-VIS spektrofotometri, kao i fluorimetri koji imaju linearni raspored, kod kojih se izvor svetlosti, uzorak i detektor nalaze na istom pravcu. Šema turbidimetra, odnosno nefelometra, prikazana je na slici 2.



**Slika 2. Šema turbidimetra (geometrijski raspored a) i nefelometra (geometrijski raspored b)).**

Osnovni delovi nefelometara i turbidimetra su: izvor svetlosti, kolimatorski sistem, monohromator ili filter, kivete sa uzorkom i fotodetektor. Kao izvori zračenja mogu se koristiti kvarcna halogena lampa, ksenonova lampa, a danas se koriste laseri, koji daju usmerenu (koherentnu) monohromatsku svetlost velikog intenziteta, pa stoga nisu potrebni kolimatori ni filtri. Laseri daju svetlost tačno određenih talasnih dužina, što ponekad može biti ometajući faktor, kada je potrebno promeniti radne talasne dužine. U biohemijskoj praksi, gde se kao uzorci koriste razblaženi serum i krvna plazma, radne talasne dužine su uobičajeno u intervalu od 320 do 380 nm i od 500 do 650 nm, pošto proteini apsorbuju svetlost talasnih dužina ispod 300 nm, dok porfirini apsorbuju od 400 - 425 nm.

Kao detektori koriste se fotomultiplikatori. Detektor može biti postavljen pod različitim uglom u odnosu na upadni zrak. Opcija a) na slici 2 predstavlja raspored kod turbidimetra, a b) kod nefelometra. Mnogi savremeni uređaji imaju detektore koji se mogu okretati oko kivete sa uzorkom, gde je fotodetektor postavljen na rotirajući nosač, što omogućuje merenje rasute svetlosti pod bilo kojim uglom u odnosu na upadni zrak. Instrumenti za merenje u kliničkim laboratorijama uglavnom imaju fiksirani raspored svih delova.

Osnovni uslov za rad na ovakvim instrumentima jeste savršena čistoća, pošto bi se i neznatne čestice prašine ponašale kao centri rasejanja i rasipale svetlost, što bi dalo pogrešne rezultate (1-3).

### **2.3. Primena nefelometrije i turbidimetrije**

Nefelometrija i turbidimetrija se koriste za analizu stabilnih homogenih disperznih koloidnih sistema (veličina dispergovanih čestica je 1-100 nm), koji mogu biti neorganskog, organskog i biološkog porekla. Poznata je primena kod određivanja niza anjona i katjona, kao i za određivanje čistoće (mutnoće) vode, piva, voćnih sokova, alkoholnih pića, plastičnih materijala, lekova (penicilina) i mnogih farmaceutskih proizvoda. Turbidimetrija se primenjuje u mikrobiologiji za određivanje rasta bakterijskih kultura, što je standardna metoda u mikrobiološkoj kontroli lekova. Merenja se uobičajeno vrše na talasnoj dužini oko 630 nm, da bi se eliminisala apsorpcija koja potiče od medijuma u kojem rastu bakterije (hranljivi medijumi su obično braon do braonkasto-žute boje) (1-3).

## **3. Imunonefelometrija i imunoturbidimetrija**

### **3.1. Imunotestovi zasnovani na reakciji antigen-antitelo**

Otkriće i rutinska primena monoklonskih antitela uvela je imunotestove u savremene kliničke laboratorije. Suština svih imunotestova jeste da specifično antitelo reaguje sa odgovarajućim antigenom pri čemu nastaje kompleks antigen-antitelo koji može da se detektuje različitim metodama, na osnovu čega se dokazuje prisustvo antigena ili određuje njegova koncentracija. Nastanak kompleksa antigen-antitelo tokom reakcije rastvorljivog antigena i antitela, pod određenim uslovima, može se pratiti nefelometrijski ili turbidimetrijski, pošto novonastali rastvorljivi precipitati kompleksa antigen-antitelo predstavljaju centre rasejanja, a količina rasute svetlosti srazmerna je koncentraciji antigena. Stoga su nefelometri i turbidimetri našli svoje mesto u savremenim kliničkim laboratorijama i imaju veoma veliku primenu u određivanju antigena, koji mogu biti bilo koji proteini ili peptidi, uključujući mnoge hormone, lipoproteine, onkoproteine, antigene patogena i specifična antitela. Imunotestovi koji se

zasnivaju na detekciji antigen-antitelo kompleksa u rastvoru, a na osnovu količine rasute svetlosti, nazivaju se imunonefelometrijski odnosno imunoturbidimetrijski testovi (4-6).

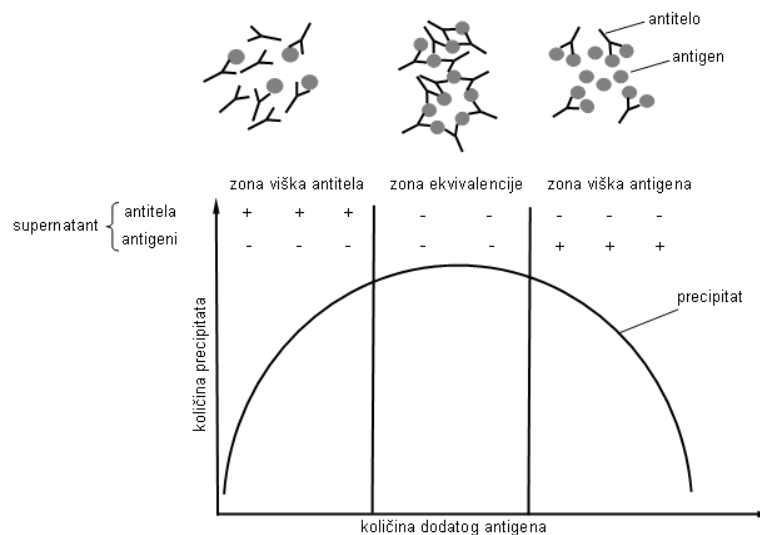
### **3.2. Karakteristike precipitacijske reakcije u imunonefelometrijskim i imunoturbidimetrijskim testovima**

Imunoprecipitacija je reakcija između rastvorljivog antigena i odgovarajućeg specifičnog antitela. U smeši rastvora antitela, čiji molekuli imaju najmanje dva antigen vezujuća mesta (viševalentno antitelo) i makromolekulskih antigena, koji imaju veći broj antigenskih determinanti po molekulu, dolazi do njihovog međusobnog izukrštenog povezivanja u trodimenzionalnu mrežu, tj. kompleks koji pod određenim uslovima pH, koncentracije jona i temperature, postaje nerastvoran i izdvaja se u rastvoru u vidu precipitata. Jedan od najvažnijih činioca koji utiču na stvaranje precipitata su relativne koncentracije antigena i antitela. Prema Hajdelbergeru i Kendalu (Heidelberger i Kendall), ako se u seriju epruveta razlije ista količina antitela i u njih dodaju rastuće koncentracije antigena, a zatim izmeri količina nastalih precipitata, uočiće se da kriva ima oblik kao na slici 3. Uočljivo je da količina precipitata raste u prvom delu niza epruveta u kome je koncentracija antigena mala, te se reakcija odigrava u višku antitela („zona viška antitela”). Zatim količina precipitata dostiže maksimalnu vrednost pri čemu je postignut optimalan odnos koncentracije antigena i antitela („zona ekvivalencije”). Dalje povećanje koncentracije antigena dovodi do smanjenja količine precipitata sve do potpune inhibicije njihovih formiranja. Ova pojava se opisuje kao formiranje rastvorljivih imunskih kompleksa u „zoni viška antigena”. Naime, uočeno je da se rastvorljivi (neprecipitirajući) imunski kompleksi formiraju duž cele prikazane krive, ali je njihova koncentracija najveća u zoni viška antigena. Smatra se da se u zoni viška antitela za jedan multivalentni molekul antigena vezuje više molekula antitela, da antitela mogu „premostiti” i nekoliko molekula antigena te se formiraju različite kategorije malih, precipitirajućih kompleksa. U zoni optimalnih međusobnih odnosa formira se molekulska rešetka u kojoj je obuhvaćen najveći broj reaktanata. Međutim, u zoni viška antigena svi paratopi biće zasićeni sa po jednim molekulom antigena, a ovakvi imunski kompleksi ne mogu formirati bilo kakve rešetke.

Ovakav tip reakcije antigen-antitelo (krive) istovremeno objašnjava i poznati laboratorijski „fenomen prozone”. Pod ovim fenomenom podrazumevaju se vrlo slabe ili čak negativne reakcije koje se dobijaju u nepodešenim odnosima antigen-antitelo. Iz krive je uočljivo da se prozona jače ispoljava u višku antigena (post zona), ali da se može uočiti i u velikom višku

antitela (pre zona). Zbog toga je neophodno koristiti različita razblaženja antitela u reakciji sa određenom količinom antigena (7).

Za nefelometrijske i turbidimetrijske imunotestove je karakteristično da se, za razliku od drugih imunoprecipitacijskih testova koji se odvijaju u zoni ekvivalencije (slika 3), obavljaju u zoni viška antitela, pri čemu je koncentracija antitela konstantna tako da količina formiranih kompleksa antigen-antitelo zavisi direktno od koncentracije antigena u smeši. S obzirom da se u ovom testu precipitacijska reakcija antigena sa antitelom odvija u zoni viška antitela, stvaraju se imunski kompleksi koji ostaju u rastvoru i dovode do zamućenja rastvora, što izaziva povećano rasejanje svetlosti. Što je više imunskih kompleksa, rasipanje svetlosti je veće, tako da je stepen rasipanja upadne svetlosti direktno proporcionalan koncentraciji antigena (jer je koncentracija antitela koja se dodaju u svaki uzorak konstantna) (7,8).



**Slika 3. Reakcije rastvorljivog antigena sa antitelom – šematizovana Hajdelberger-Kendalova (Heidelberger-Kendall) precipitacijska kriva**

Da bi se ubrzala reakcija imunoprecipitacije, često se koriste neka polimerna jedinjenja. Poželjno je da polimeri budu velike molekulske mase i da se dobro rastvaraju u vodenim rastvorima. Najefikasnijim se pokazao polietilenglikol (PEG) molekulske mase 6000 Da (PEG 6000) u čijem prisustvu se znatno smanjuje vreme reakcije i do deset puta povećava brzina nastanka antigen-antitelo kompleksa.



### **3.3. Praćenje reakcije antigen-antitelo na osnovu detekcije rasute svetlosti**

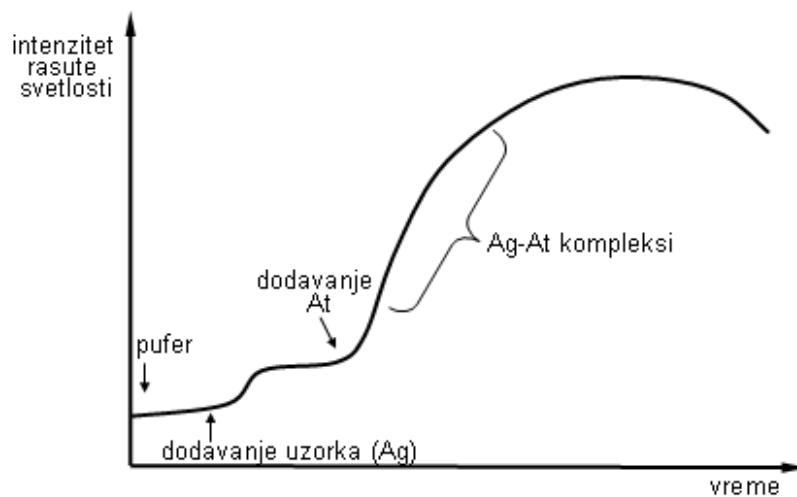
Dve metode koje se najčešće koriste za kvantifikaciju imunoprecipitacijske reakcije pomoću rasute svetlosti su: (i) kinetička i (ii) „endpoint” imunonefelometrija i/ili imuniturbidimetrija.

#### ***3.3.1. Kinetička imunonefelometrija i imuniturbidimetrija***

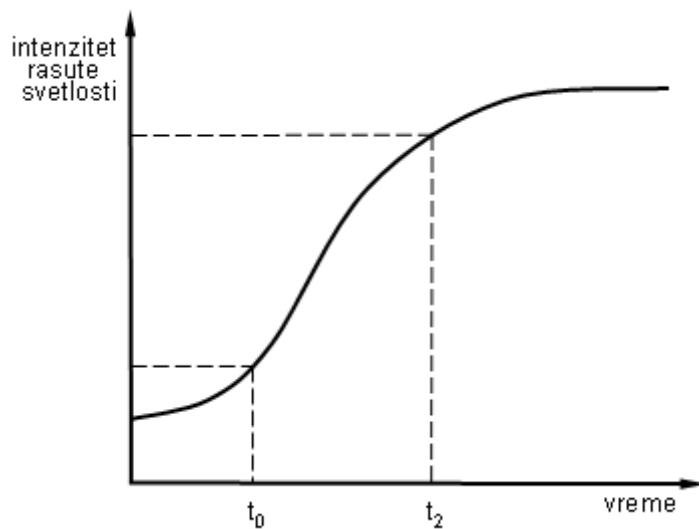
Metodama kinetičke imunonefelometrije i imuniturbidimetrije meri se nastanak maksimalne količine rastvorljivih imunokompleksa tokom vremena (slika 4). Snop upadne svetlosti usmerava se kroz protočnu ćeliju koja sadrži pufer, razblaženi serum (antigen) i antiserum koji je specifičan za odgovarajući analit tj. antigen (antitela). Na početku testa prisutno je malo, ali merljivo rasejanje svetlosti koje potiče od pufera (početni deo krive na slici 4). Dodavanjem seruma i antiseruma signal rasejane svetlosti postepeno raste, dok će nastanak kompleksa antigen-antitelo znatno pojačati signal koji se meri. Kada se formira maksimalan broj imunskih kompleksa, intenzitet rasejane svetlosti dostiže svoj maksimum (pik, plato) i počinje da opada, jer veći imunski kompleksi počinju da se talože. Koncentracija antigena (analita) u nepoznatom uzorku izračunava se iz standardne krive formirane korišćenjem referentnih standarda koji sadrže poznate koncentracije antigena koji se testira (5,6,8).

#### ***3.3.2. „Endpoint” imunonefelometrija i imuniturbidimetrija***

Za razliku od kinetičkih testova imunonefelometrije i imuniturbidimetrije, „endpoint” testovi mere rasejanu svetlost odmah nakon dodavanja antitela ( $t_0$ ) i posle određenog vremenskog intervala kada je reakcija antigena i antitela postigla ravnotežno stanje ( $t_2$ ). Kao što se uočava na slici 5, reakcija antigena i antitela zahteva određeno vreme inkubacije ( $t_2$ ) koje ponekad može biti i do nekoliko časova. Modifikaciju ove metode predstavlja test u kome se  $t_2$  meri posle nekog fiksnog, uvek istog vremenskog intervala, a ne čeka se postizanje ravnotežnog stanja. Ovako modifikovan test je mnogo praktičniji, jer je brži i time primenljiviji u kliničkim laboratorijama. Intenzitet rasejane svetlosti očitava se odmah nakon započinjanja reakcije ( $t_0$ ) i nakon fiksnog vremena ( $t_2$ ). Razlika između te dve vrednosti se, na osnovu standardne krive, prevodi u jedinice koncentracije (5,6,8).



Slika 4. Kinetička imunonefelometrija i imunoturbidimetrija



Slika 5. „Endpoint” imunonefelometrija i imunoturbidimetrija.  
 $t_0$ - trenutak dodavanja antitela;  $t_2$ -trenutak kada je postignuta ravnoteža u reakciji antitelo-antigen, odnosno izabrani, fiksni interval.

### 3.4. Supstance koje se određuju imunonefelometrijom i imunoturbidimetrijom

U savremenim kliničkim laboratorijama imunonefelometrijom i imunoturbidimetrijom omogućeno je brzo i jednostavno merenje koncentracije mnogih solubilnih proteina u biološkim tečnostima (Tabela I). Ove metode omogućuju merenje koncentracije ukupnih i pojedinačnih klasa i subklasa imunoglobulina (preko 87% laboratorija u SAD koriste nefelometriju za merenje imunoglobulina), komponenti sistema komplementa (npr. C3, C4, faktora B), C-reaktivnog proteina (CRP) i mnogih drugih serumskih proteina. Komercijalno su dostupni brojni instrumenti kojima je moguće odrediti pomenute supstance jednom ili drugom metodom (imunonefelometrijom ili imunoturbidimetrijom). Takođe, moguće je istu supstancu određivati obema metodama (5,8,9).

**Tabela I** Supstance čija se koncentracija može određivati imunonefelometrijom i imunoturbidimetrijom\*

---

<b>Proteini seruma</b>	<b>Proteini plazme</b>
Albumin	Antitrombin III
Alfa <sub>2</sub> makroglobulin	Fibrinogen
Antistreptolizin O	Fibronektin
Apolipoprotein A <sub>2</sub>	Plazminogen
Apolipoprotein B	Protrombin
Beta <sub>2</sub> makroglobulin	
Celuloplazmin	<b>Proteini urina</b>
Cirkulišući imunski kompleksi	Albumin
Komplement C3	Alfa <sub>1</sub> mikroglobulin
Komplement C4	Imunoglobulin G
C-reaktivni protein	Transferin
Haptoglobin	
Imunoglobulini A, G, M i E	<b>Proteini cerebrospinalne tečnosti</b>
Imunoglobulini G1-G4	Ukupni proteini
Kapa - laki lanac	Albumin
Lambda - laki lanac	Alfa <sub>2</sub> makroglobulin
Mioglobin	Imunoglobulini A, G i M
Properidin faktor B	
Reumatoidni faktor	<b>Drugi</b>
Ukupni proteini	Feritin
Transferin	B12
	Kortizol

---

\*Raznolikost palete supstanci, kao i broj testova, zavisi od komercijalnog proizvođača opreme i može biti bitan činilac opredeljenja za nefelometrijska u odnosu na turbidimetrijska određivanja.

### **3.5. Osetljivost nefelometrijskih i turbidimetrijskih imunotestova**

Da li će se za određenu analizu primeniti imunonefelometrija ili imunoturbidimetrija, zavisi od mnogih faktora, prvenstveno od veličine ispitivanih čestica (centara rasejanja). Do skoro je imunonefelometrija bila metoda izbora, kao osetljivija (detekcioni limit ispod 10 µg/mL) u odnosu na imunoturbidimetriju (20 do 30 µg/mL). Kod razblaženih rastvora, koji propuštaju preko 95% upadne svetlosti, vrednosti prividne apsorbancije su isuviše male i ne mogu se precizno izmeriti, pa je obavezno korišćena nefelometrijska metoda. Međutim, sa razvojem novih instrumenata sa monohromatorima visoke rezolucije, imunoturbidimetrijska merenja su postala ravnopravna u svojoj osetljivosti imunonefelometrijskim metodama, naročito u određivanju koncentracije serumskih proteina.

Osetljivost imunonefelometrijskih tehnika znatno je poboljšana tokom poslednjih godina, naročito od kada je ceo proces automatizovan. Za ovo poboljšanje, bar delom, zaslužno je uvođenje polimera u cilju ubrzavanja formiranja imunoprecipitata, kao i razdvajanje pozadinskog signala i signala koji nastaju kao posledica rasejavanja svetlosti na formiranim antigena-antitelo kompleksima. „Endpoint” nefelometrijom moguće je izmeriti koncentracije proteina od 1-10 ng/L a vreme inkubacije je od 20 minuta do nekoliko sati, dok je kinetičkim nefelometrijskim testovima moguće izmeriti koncentracije manje od 1 ng/L pri čemu test ne traje duže od 1 minuta (4, 6, 8).

### **3.6. Prednosti i ograničenja nefelometrijskih i turbidimetrijskih imunotestova**

Nefelometrijski imunoprecipitacijski testovi koji se koriste za kvantifikaciju proteina imaju brojne prednosti: a) potpuno su automatizovani, b) kratko traju, c) lako se izvode, d) koriste se male zapremine uzorka i reagenasa (1-10 µl), e) visoke su osetljivosti (manje od 1 ng/L), i f) velike preciznosti. I pored manje osetljivosti, značajna prednost imunoturbidimetrije nad imunonefelometrijom je u tome da se u kliničkim laboratorijama može izvoditi u analizatorima, koji u suštini predstavljaju spektrofotometre ili fluorimetre, uz minimalnu optimizaciju procesa.

Jedno od glavnih ograničenja nefelometrije i naročito turbidimetrije, a o čemu je već bilo reči, jeste rasipanje svetlosti koja nastaje kao posledica prisustva nekih drugih čestica, npr. lipoproteina u lipemičnim serumima, ili pak čestica prašine u uzorku. Zamućenja koja nastaju kod lipemičnih uzoraka znatno premašuju vrednost od 3 optičke jedinice, što inače predstavlja najvišu vrednost koju najbolji spektrofotometri mogu da izmere. Ovaj problem može se izbeći ultracentrifugiranjem na minimum 20.000 obrtaja/min, što znatno

produžava vreme pripreme biološkog uzorka. Takođe, jedno od ograničenja ovih testova je da se ne mogu koristiti za određivanje haptena tj. malih molekula već samo velikih antigena. Ovaj problem danas se uspešno prevazilazi imunonefelometrijskim i imuniturbidimetrijskim testovima u kojima se antitelo ili antigen vezuje za male čestice tačno određene veličine (npr. latex čestice, neorganske koloidne čestice i dr.). Ovom modifikacijom dobija se nova vrsta imunotestova sa mikročesticama (eng. microparticle-enhanced nephelometric and turbidimetric immunoassay) koji su osetljiviji u odnosu na standardne imunonefelometrijske i imuniturbidimetrijske testove i kojima je moguće odrediti relativno niske koncentracije analita (4,6,8). Takođe, važno je napomenuti da ako se ovim metodama prati koncentracija nekog proteina, naročito u odnosu na primenjenu terapiju, neophodno je određivanje vršiti uvek istom metodom, jer postoje značajne razlike u referentnim vrednostima između različitih metoda.

#### **4. Zaključak**

Nefelometrija i turbidimetrija, kao i njihove imuno modifikacije, imunonefelometrija i imuniturbidimetrija, zahvaljujući veoma visokoj osetljivosti i specifičnosti, mogućnošću potpune automatizacije i kratkom vremenu trajanja, danas su široko prihvaćene metode koje se primenjuju u velikom broju različitih, kako kliničkih, tako i istraživačkih laboratorija (biologija, biohemija, imunologija, zaštita životne sredine, fizička hemija i dr.).

## Literatura

1. Tietz NW. *Fundamental of Clinical Chemistry*, WB Saunders Co, 1998.
2. Kaplan LA, Pesce AJ, Kazmierczak SC. *Clinical chemistry, theory, analysis, correlation*, Mosby Inc, 2003.
3. Kuntić V. *Odabrane instrumentalne metode u medicinskoj biohemiji*. Beograd: Farmaceutski fakultet, Beograd, 2009.
4. Gosling JP. A decade of development in immunoassay methodology. *Clin Chem* 1990; 36: 1408-27.
5. Price CP, Spencer K, Whicher J. Light-scattering immunoassay of specific proteins. *Ann Clin Biochem* 1983; 20: 1-14.
6. Whicher JT, Price CP, Spencer K. Immunonephelometric and immunoturbidimetric assays for proteins. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1983; 18: 213-60.
7. Arsenović-Ranin N, Stojić-Vukanić Z, Bufan B. *Priručnik za praktičnu nastavu iz imunologije i imunoheemije*. Beograd: Farmaceutski fakultet, 2007.
8. Diamandis EP, Christopoulos TK, eds. *Immunoassay*, Academic Press, 1996.
9. Ledue TB, Collins MF, Ritchie RF. Development of immunoturbidimetric assays for fourteen human serum proteins on the Hitachi 912™. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 520-8.

# **Immunonephelometry and immunoturbidimetry: theoretical principles, instruments and application**

**Vesna Kuntić<sup>1</sup>, Zorica Stojić-Vukanic<sup>\*2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy,

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy,  
University of Belgrade, Vojvode Stepe 450,  
11000 Belgrade, Serbia

---

## **Summary**

Nephelometry and turbidimetry are methods based on the phenomenon whereby light, passing through a medium with dispersed particles is attenuated in intensity by scattering. The intensity of the scattered light is measured at right angle (usually, but not necessarily) to the incident light beam (nephelometry) or at a forward angle (turbidimetry).

Based on nephelometry and turbidimetry, immunonephelometric and immunoturbidimetric assays for the measurement of proteins have developed and expanded rapidly in recent years, progressively replacing the time-honoured gel precipitation techniques. In this study, the theoretical background of light scattering theory, instrumental systems for nephelometry and turbidimetry, the nature and kinetics of the antibody-antigen reaction in fluid, and the application of immunonephelometric and immunoturbidimetric assays for specific proteins in the clinical laboratory are described.

**Key words:** nephelometry, turbidimetry, scattered light, immunonephelometric and immunoturbidimetric assays

---

\* Corresponding author: e-mail: zoricav@pharmacy.bg.ac.rs (Tel: + 381113951224)