Masarykův onkologický ústav

Parametry metody na automatickém analyzátoru

Andrea Wagnerová

Žlutý kopec 7, 656 53 Brno
www.mou.cz

T +420 543 136 704
@ andrea.wagnerova@mou.cz

Poskytovatel zdravotních služeb akreditovaný Organizací evropských onkologických ústavů (OECI) a Českou společností pro akreditaci ve zdravotnictví.

Biochemický analyzátor

- dle definovaného algoritmu provádí jednotlivé kroky analýzy (transport vzorku, pipetování vzorku, dávkování reagencií, míchání, inkubace, měření absorbance, výpočet výsledné koncentrace)
- součástí bch analyzátorů je tzv. ISE modul (Na, K, Cl)

- Současné moderní bch analyzátory patří do generace diskrétních selektivních analyzátorů, které pracují po vzorcích pacientů a umožňují výběr metod.

Součásti analyzátoru

Vzorkový pipetor: skládá se z ramene pipetoru a vzorkové jehly (přenáší vzorek na dno reakční kyvety), součástí této jehly je detekční systém pro detekci hladiny a sraženiny.

Mycí stanice: vzorková jehla i reagenční pipetory jsou oplachována z vnějšku i zevnitř před nasátím nového vzorku/reagencie.

Součástí analyzátoru II

Reagenční prostor: chlazený prostor pro uložení reagencií

Reagenční pipetory: dávkují reagencie do reakční kyvety (vypouštění nad reakční kyvetou)

Ultrazvukové míchačky: promíchání reakční směsi (homogennost směsi)

Inkubační lázeň: naplněna deionizovanou vodou, 37 °C

Součásti analyzátoru III

Fotometr: k měření absorbancí reakční směsi v kyvetě

Paprsek ze zdroje světla prochází kyvetou se vzorkem, poté monochromátorem, dopadá na detektor diodového pole (pole fotodiod). Je zaznamenána změna absorbance reakční směsi (na základě parametrů metody) a vypočítán výsledek. Naměřená absorbance je přímoúměrná množství sledovaného analytu ve vzorku.

U každé kyvety je před reakcí změřena absorbance (0, tzv. blank → voda).

Součásti analyzátoru IV

ISE prostor: pro analýzu Na, K, Cl

Stanovení sodíku, draslíku a chloridů na základě rozdílu potenciálů jednotlivých iontově selektivních elektrod a referenční elektrody.

Parametry metody

- nutné pro analytickou definici metody

Nastavení v analyzátoru:

- manuálně (dnes již méně využívané),
- instalace metody stažením konkrétních parametrů z aplikace výrobce.

Příklady parametrů metody

Typ vzorku: sérum/plazma, moč, CSF

Pipetovací objem vzorku: 1,5–35 µL

Pipetovací objem reagencií: 5–180 µL

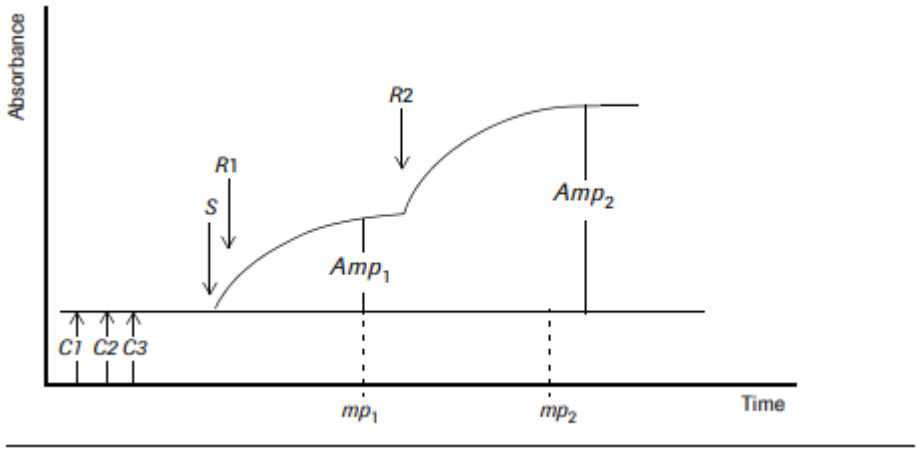
Reakční teplota: 37 ± 0,1 °C

Vlnové délky: běžně 12 vlnových délek (340, 376, 415, 450, 480, 505, 546, 570, 600, 660, 700, 800 nm)

Optický režim: monochromatický, bichromatický

Sledování reakce

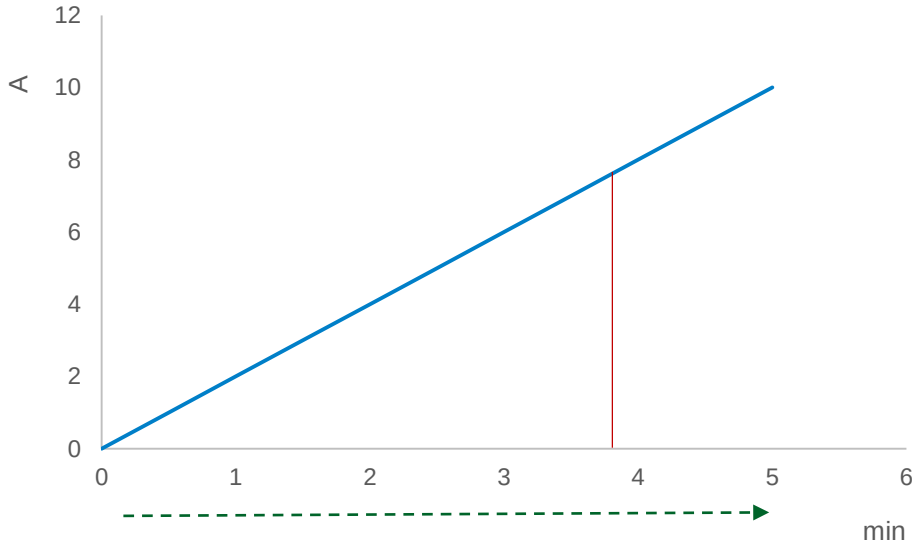
- absorbance v reakční směsi je měřena během celé doby reakce (každých 8 sekund)
- u každé kyvety je také změřen blank s vodou (absorbance 0)
- pro výpočet koncentrace může být využito více měřících bodů



Průběh reakce (Uživatelská příručka Roche Diagnostics)

Měření v konstantním čase

Měří se absorbance za určitý časový úsek (po uplynutí určité doby). Je možné využít zastavení reakce přidáním inhibitoru po inkubaci vzorku. Automatický analyzátor měří absorbanci v definovaném intervalu, tj. od času 0 do 10 apod.

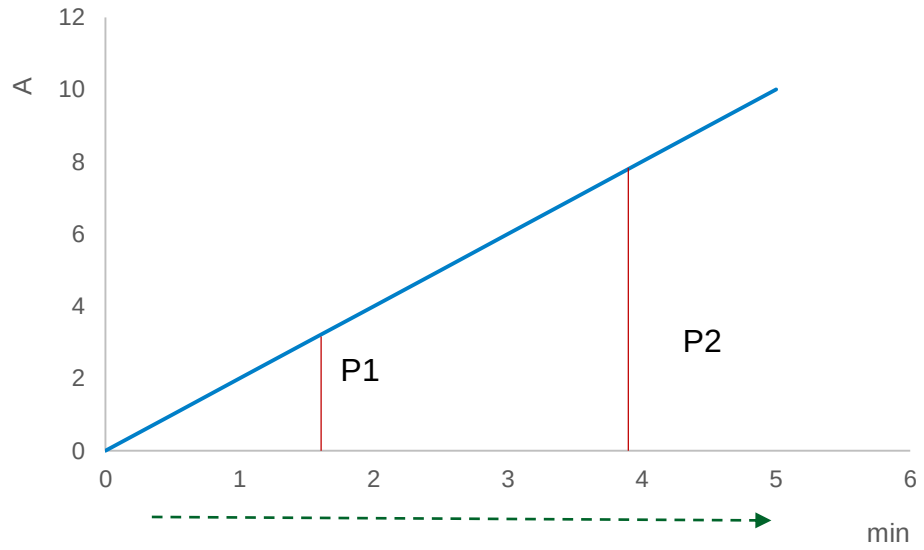


Dvoubodové měření (bichromatické)

Je obdobou měření v konstantním čase. Měření nezačíná však v čase 0, tj. na počátku reakce, ale až po uplynutí určité doby, v měřicím bodě P1 (těsně po přidání vzorku).

Při analýze na automatických analyzátorech je běžně využíváno dvoubodové měření:

- první měřící bod je po přidání vzorku,
- druhý měřící bod po určité době (konstantní čas) nebo po dosažení rovnováhy (end point).



Dvoubodové měření

Měření při dvou vlnových délkách.

Výsledná hodnota měření se vypočítá z rozdílu absorbance obou měření, je tak kompenzována:

- variabilita světelné emise,
- citlivost fotodiody,
- částečky („nečistoty“) při průchodu světla.

Hlavní vlnová délka je dána absorpčním maximem reakční směsi.

Dvoubodové měření

- vlnová délka v oblasti absorpčního maxima
- vlnová délka mimo absorpční maximum

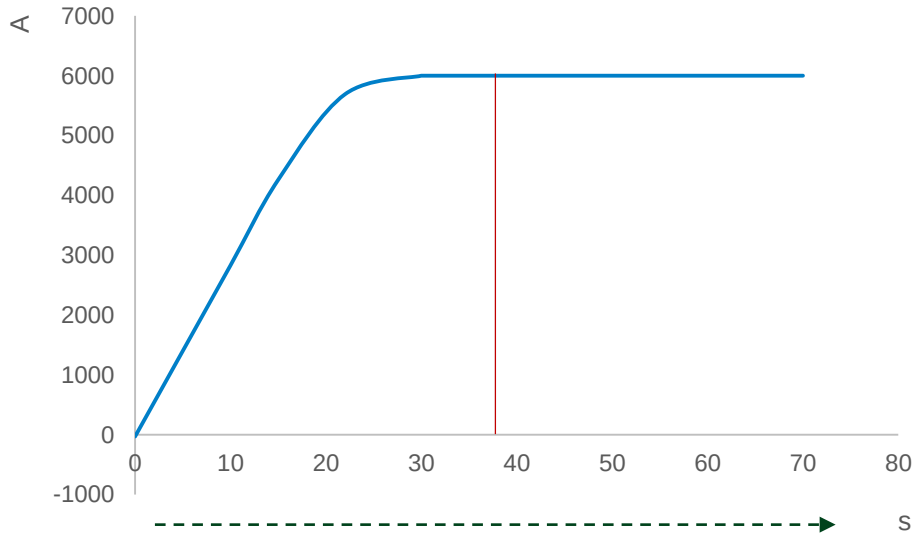
Využití:

- pro reakční směs, ve které se vyskytuje látka, která rovněž absorbuje záření o vybrané vlnové délce (tzv. interferující látka),
- zamezení falešně zvýšeného výsledku měření.

End-point metoda

K měření dochází po doběhnutí reakce nebo jejím zastavení.

Reakce dosáhne po určité době tzv. koncového bodu (end-point). Měří se hodnota absorbance dosažená v tomto koncovém bodu po různě dlouhé inkubaci, která se pak již nemění.



Kinetická metoda

Stanovení, při němž se stanovují parametry v průběhu reakce, tj. absorbance je měřena opakovaně v průběhu reakce.

Je vybrán časový úsek, kdy je narůst absorbance lineární. Rychlost změny je přímo úměrná koncentraci analytu vzorku, která je analyzována.

Také známá jako rate měření.

- pokles nebo nárůst absorbance za časovou jednotku (nejčastěji 1 min)
- podmínkou pro kinetické měření je lineární průběh závislosti absorbance na čase
- např. ALT, AST

Kalibrace

Činnost, která za specifikovaných podmínek v prvním kroku stanoví vztah mezi hodnotami veličiny s nejistotami měření poskytnutými etalony a odpovídajícími indikacemi s přidruženými nejistotami měření a ve druhém kroku použije tyto informace ke stanovení vztahu pro získání výsledku měření z indikace (VIM3).

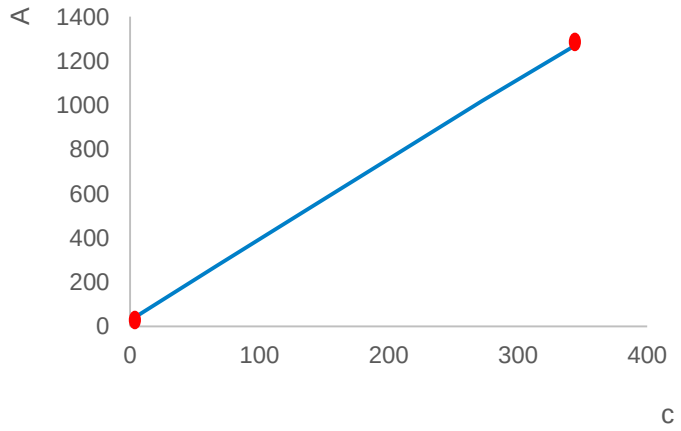
- u bch analyzátorů slouží k sestrojení kalibrační křivky (standardy o různé koncentraci)

Provádí se: při zavedení metody, nové šarže reagencií, zásah do optické části analyzátoru, v souladu s požadavky na frekvenci kalibrace metody dané výrobcem

Lineární závislost

- kalibrační křivku představuje přímka

Měříme standardní roztoky (roztoky o známé koncentraci) se vzrůstající koncentrací stanovovaného analytu.



Obrázek: Přímka (příklad 2 bodové kalibrace metody CREA, Roche)

Výpočet koncentrace

Je-li kalibrační křivka lineární, je možné vypočítat neznámou koncentraci stanovovaného analytu ve vzorku.

$$C_{vz} = \frac{A_{vz}}{A_{st}} \times c_{st}$$

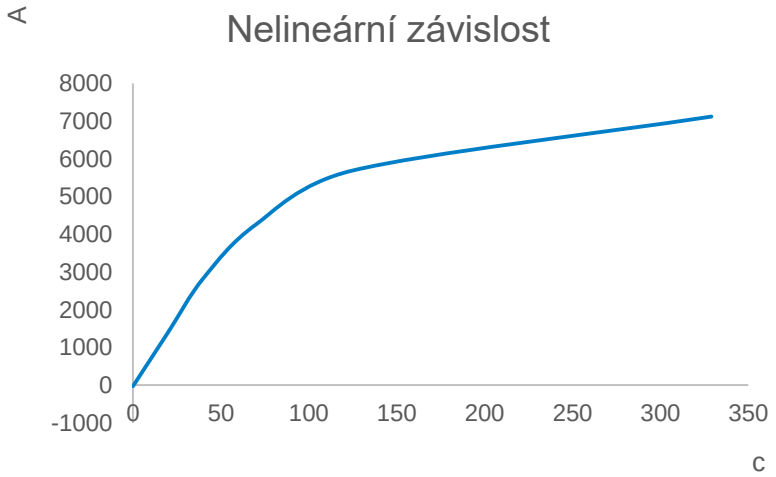
Vyjádřením kalibrace je kalibrační faktor, můžeme zjistit koncentraci analytu pomocí faktoru.

Kalibrační faktor f: **f = c/A**. Upravenou rovnicí pak lze vypočítat koncentraci stanovovaného analytu ve vzorku: c = A×f.

Nelineární závislost

- kalibrační křivku představuje křivka odlišná od přímky

Obvykle se používá standardní roztok o nulové koncentraci stanovovaného analytu a 5 dalších standardů pro celý pracovní rozsah metody.



Obrázek: Spline křivka (příklad kalibrace metody CRP, Roche)

Měřicí rozsah metody

Soubor hodnot veličin stejného druhu, které mohou být měřeny daným měřidlem nebo měřicím systémem se specifikovanou přístrojovou nejistotou za definovaných podmínek.

- **v jakém koncentračním rozsahu lze měřit a v jakém rozsahu je kalibrační závislost lineární**

Mez detekce (LOD): nejmenší množství analytu, které lze spolehlivě prokázat

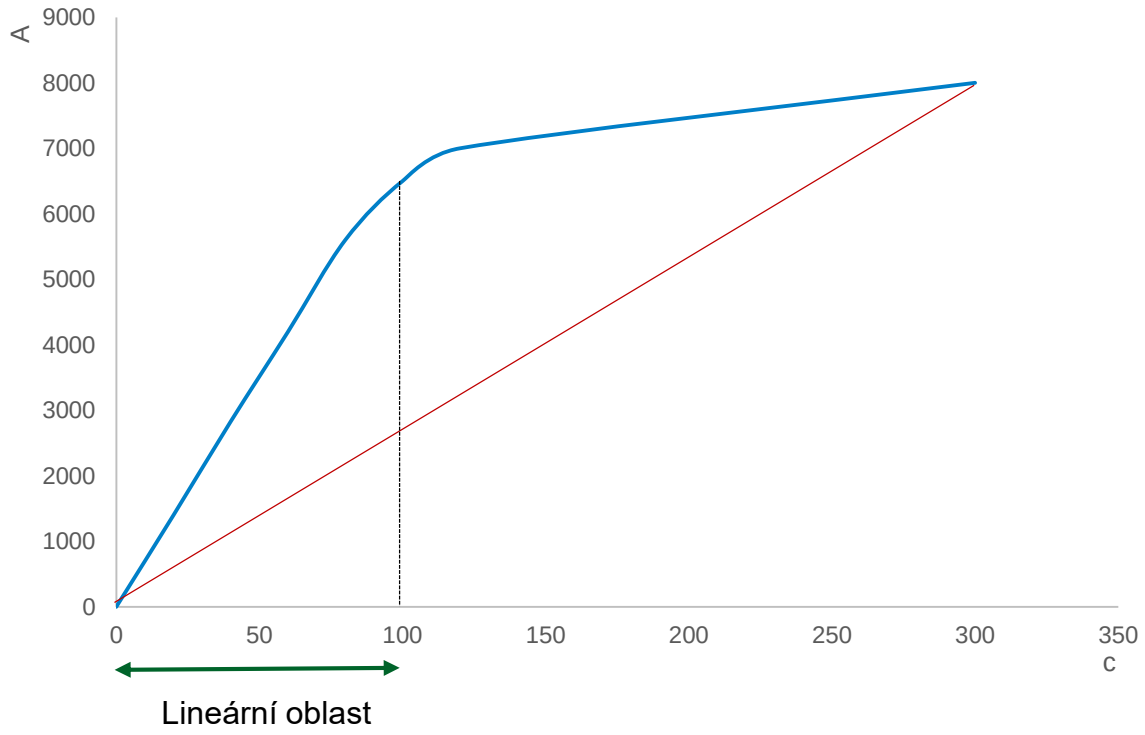
Mez stanovitelnosti (LOQ): nejnižší množství analytu, které lze s definovanou přesností ještě stanovit nebo nejnižší bod kalibrační křivky

Průběh kalibrační křivky

Lineární průběh: pro sestrojení kalibrační křivky se využívá kalibrátoru s nulovou hodnotou stanovovaného analytu a kalibrátorů s určitou hodnotou tohoto analytu. U metod, kde byla lineární závislost opakovaně ověřena, lze využít kalibraci s nižším počtem kalibrátorů, např. 2.

Nelineární průběh: používá se kalibrátor o nulové hodnotě stanovovaného analytu a (minimálně) pět dalších standardních roztoků (kalibrátorů) s koncentracemi pokrývajícími pracovní rozsah.

Lineární oblast kalibrační křivky



Při kvantitativních výpočtech musí být použito takové ředění vzorku, aby leželo v lineárním úseku křivky. Vzorky ležící nad lineárním úsekem křivky závislosti se musí zředit a znovu analyzovat.

Hook efekt

„nadbytek protilátek“

Při vysokých koncentracích stanovovaného analytu mohou být vazebná místa saturována antigenem a protilátka nemůže vytvářet komplex Ag x Ab. Výsledky analýzy jsou podhodnocené.

Analyzátory mají různé postupy, jak Hook efekt rozpoznat, např. přidání více Ag do rekce v případě, že narůst reakční křivky je příliš rychlý (odpovídá vysoké koncentraci stanovovaného analytu).

Hook efekt II

Po proběhlé reakci přístroj do vzorku přidá opět antigen.

Zvýšení absorbance po přídavku Ag: měření proběhlo v oblasti nadbytku protilátky (tvoří se nové imunokomplexy) → pro výpočet koncentrace analytu lze použít naměřené hodnoty absorbance a původní měření.

Bez nárůstu absorbance po přídavku Ag: protilátka byla spotřebována (mnoho antigenu) → analýza musí být opakována s vyšším ředěním vzorku.

Základní metrologické pojmy, ověření metody

- Mezinárodní metrologický slovník, nyní VIM3

Anglický termín	Český ekvivalent (dříve)	Český ekvivalent (terminologie VIM3)
Measurement trueness	pravdivost měření	pravdivost měření
Measurement accuracy	správnost měření	přesnost měření
Measurement precision	přesnost měření	preciznost měření

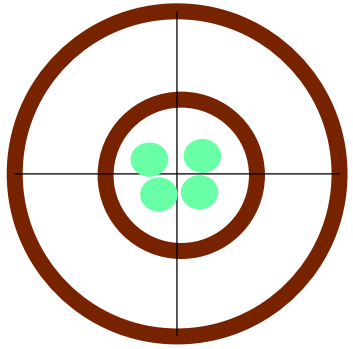
Tabulka 1: Změny v metrologickém slovníku

Přesnost měření

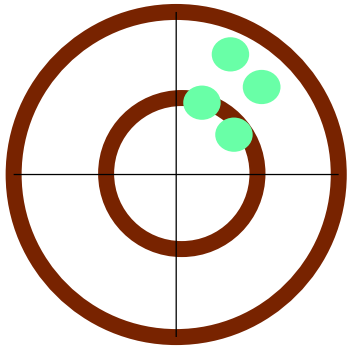
Je těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a pravou hodnotou měřené veličiny.

- přesnější měření = měření s menší chybou.

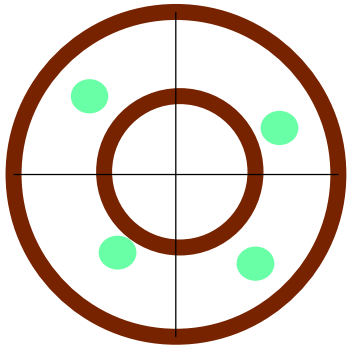
Termín přesnost měření se vztahuje k preciznosti i pravdivosti měření, tj. vlivu náhodných i systematických chyb. Vztah mezi precizností a přesností měření:



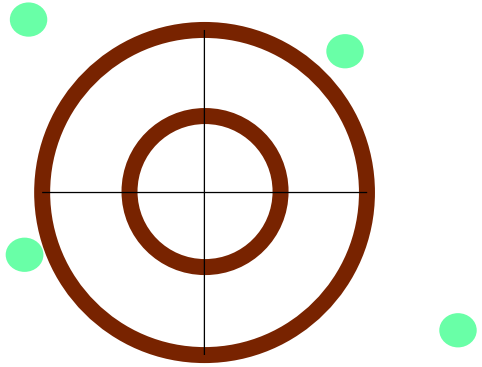
precizní a přesné



precizní a nepřesné



neprecizní a přesné



neprecizní a nepřesné

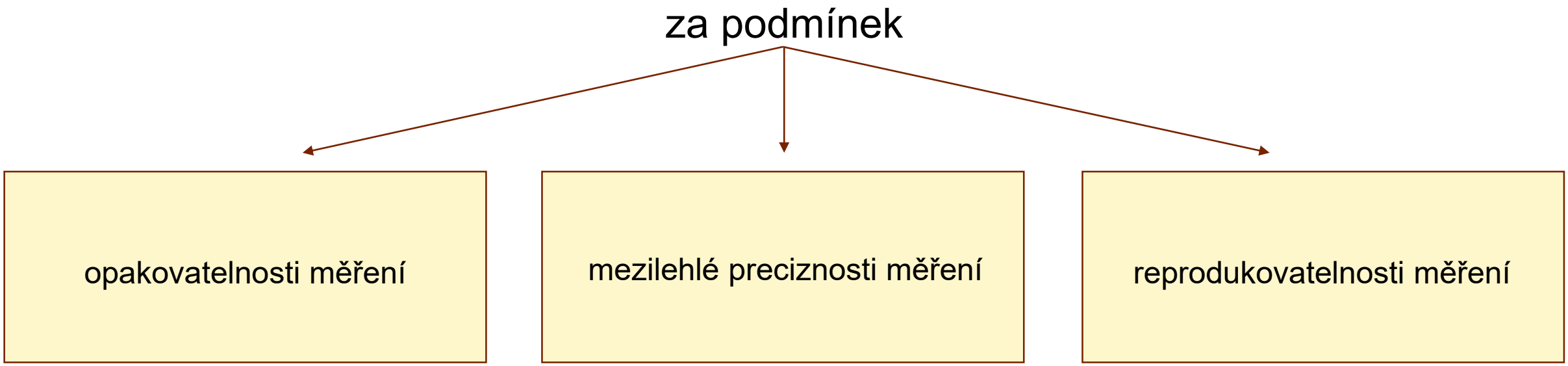
Preciznost měření

Je těsnost shody mezi indikacemi nebo naměřenými hodnotami veličiny získanými ***opakovanými měřeními na stejném objektu*** *nebo na podobných objektech* ***za specifikovaných podmínek.***

- vyjádřena číselně mírami nepreciznosti, tj. např. směrodatnou odchylkou, CV za specifikovaných podmínek,
- nemá vztah ke skutečné hodnotě,
- závisí pouze na náhodných chybách měření.

Specifikované podmínky: podmínky opakovatelnosti měření, mezilehlé preciznosti měření, reprodukovatelnosti měření.

Preciznost měření



Opakovatelnost měření

Je souborem podmínek měření, který zahrnuje ***stejný postup měření, stejný obslužný personál, stejný měřící systém, stejné pracovní podmínky, stejné místo a opakování měření na stejném objektu v krátkém časovém intervalu.***

Příkladem je opakování měření je měření jednoho analytu jednoho vzorku 10× těsně za sebou.

Mezilehlá preciznost měření

*Je souborem podmínek měření, který zahrnuje **stejný postup měření, stejné místo** a opakování měření na stejném objektu nebo podobných objektech **v rozšířeném časovém úseku**, ale smí obsahovat další podmínky **zahrnující změny**.*

- změny mohou zahrnovat nové kalibrace, kalibrátory, obslužný personál, meřící systémy

Příkladem je dlouhodobé měření referenčních materiálů, tj. měření referenčního materiálu (tzv. kontrolního – každý den) jako součást IKK.

Reprodukovatelnost měření

*Je souborem podmínek měření, který zahrnuje **různá místa, obslužný personál**, měřící systémy a opakování měření na stejném nebo podobném objektu.*

Příkladem je porovnání výsledků měření při analýze téhož kontrolního materiálu v různých laboratořích, tj. porovnání výsledků v rámci EHK.

Zdroje

- Terminologie v oblasti metrologie_DEF.pdf (unmz.cz)
- Uživatelská příručka Roche Diagnostics
- Nezbeda P, Klinická biochemie, Analytická fáze

Masarykův onkologický ústav

Děkuji za pozornost.

RNDr. Andrea Wagnerová

Žlutý kopec 7, 656 53 Brno
www.mou.cz