

# **Parametry metod automatické fotometrické analýzy**

*Miroslava Beňovská*

*KLM LF MU*

# Parametry metod automatické fotometrické analýzy

- aplikační kód (**jednoznačná definice metody**)
- název metody
- biologický materiál (sérum, plazma, moč...)
- typ měření změn absorbance (end-point, kinetické měření)
- délka inkubace – doba trvání reakce ( do 10 min)
- měřící body reakce
- vlnová délka
- objem pipetovaného vzorku,
- objem pipetovaných reagensů (R1, R2, R3...)
- podmínky při opakování analýzy s menším, stejným nebo větším objemem vzorku
- způsob/typ kalibrace
- parametry pro zajištění validní kalibrace (limity pro citlivost a opakovatelnost)
- pracovní rozsah metody a další parametry k ověření integrity výsledku (absorbanční limit, limit pro kontrolu linearitu průběhu reakce)

# Parametry metod automatické imunochemické analýzy

- Obdobné
- Některé parametry jako **typ měření, měřící body reakce, vlnová délka** atd. jsou vynechané

# Parametry metod automatické analýzy

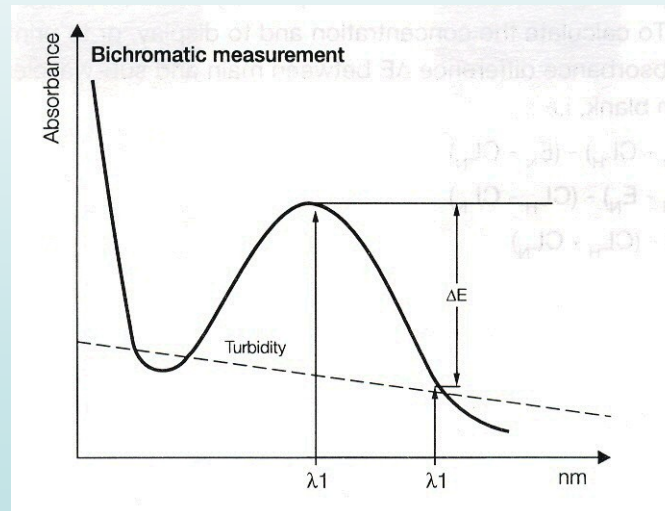
## Způsoby zadávání:

- **Kompletní aplikace od výrobce – instalace přes web nebo pomocí čárového kódu, možnost úpravy pouze některých parametrů**
- **Manuální vkládání jednotlivých parametrů  
(ustupuje, možnost chyby, používá se u metod a reagensy jiného výrobce než je výrobce analyzátoru)**

# Popis významných parametrů

# Vlnové délky, bichromatické měření

Všechny testy pro klinickou chemii jsou v současné době měřeny simultánně při dvou vlnových délkách – hlavní a vedlejší



# Bichromatické měření

Koncentrace se počítá z rozdílu absorbance obou měření.

Výhodné, neboť kompenzuje :

- variace světelné emise fotometru
- citlivost fotodiod
- bublinky nebo částičky v cestě světla

Hlavní vlnová délka je dána absorpčním maximem reakce

Vedlejší vlnová délka je zvolena tak, aby

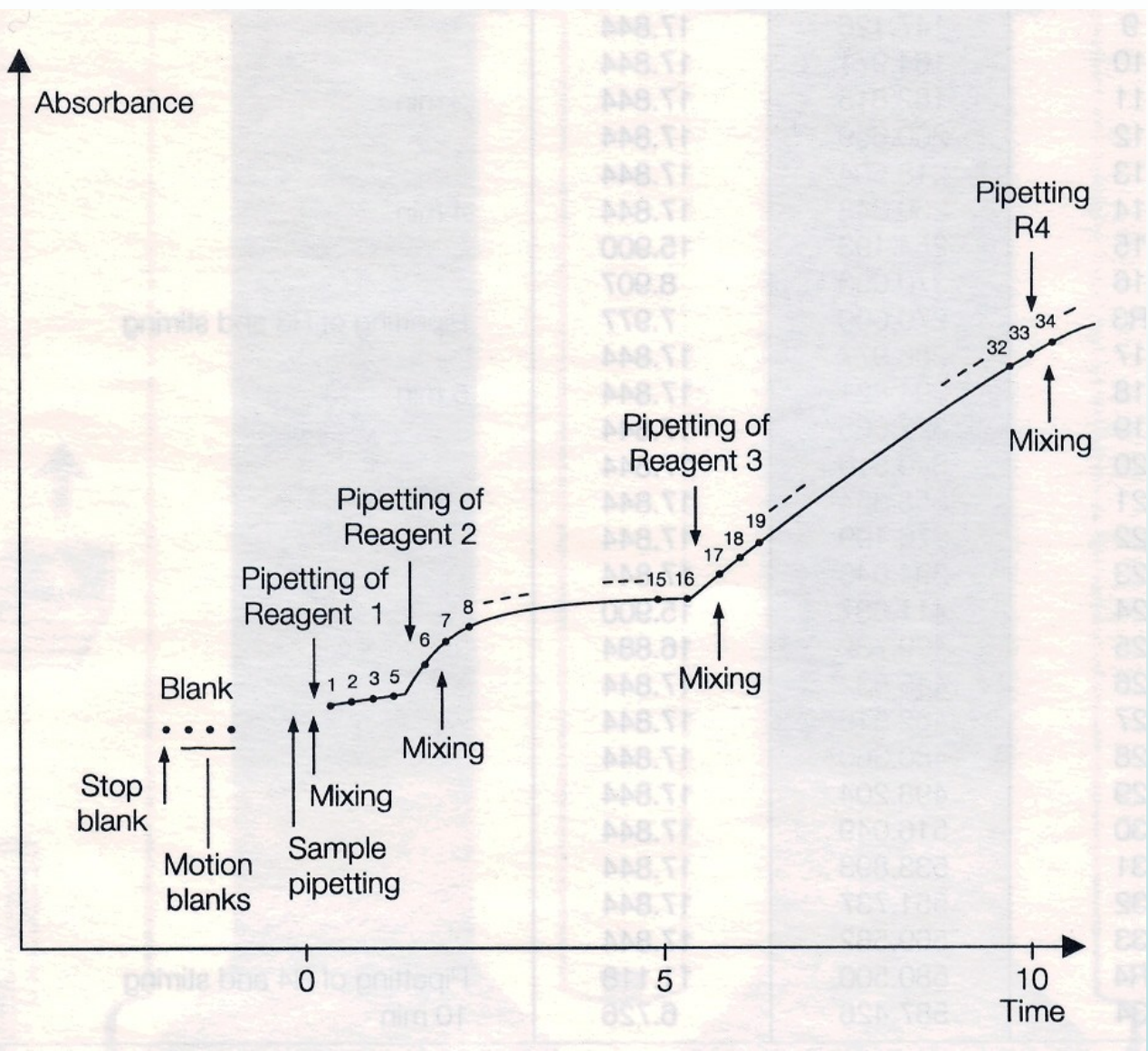
- rozdíl absorbancí mezi hlavní a vedlejší  $\lambda$  byl co největší
- současně se při ní musí minimálně uplatňovat interference
- současně má být co nejblíže k hlavní  $\lambda$

Na analyzátorech bývá běžně možnost využívat pro různé metody 12-14 vlnových délek

# Měřicí body reakce

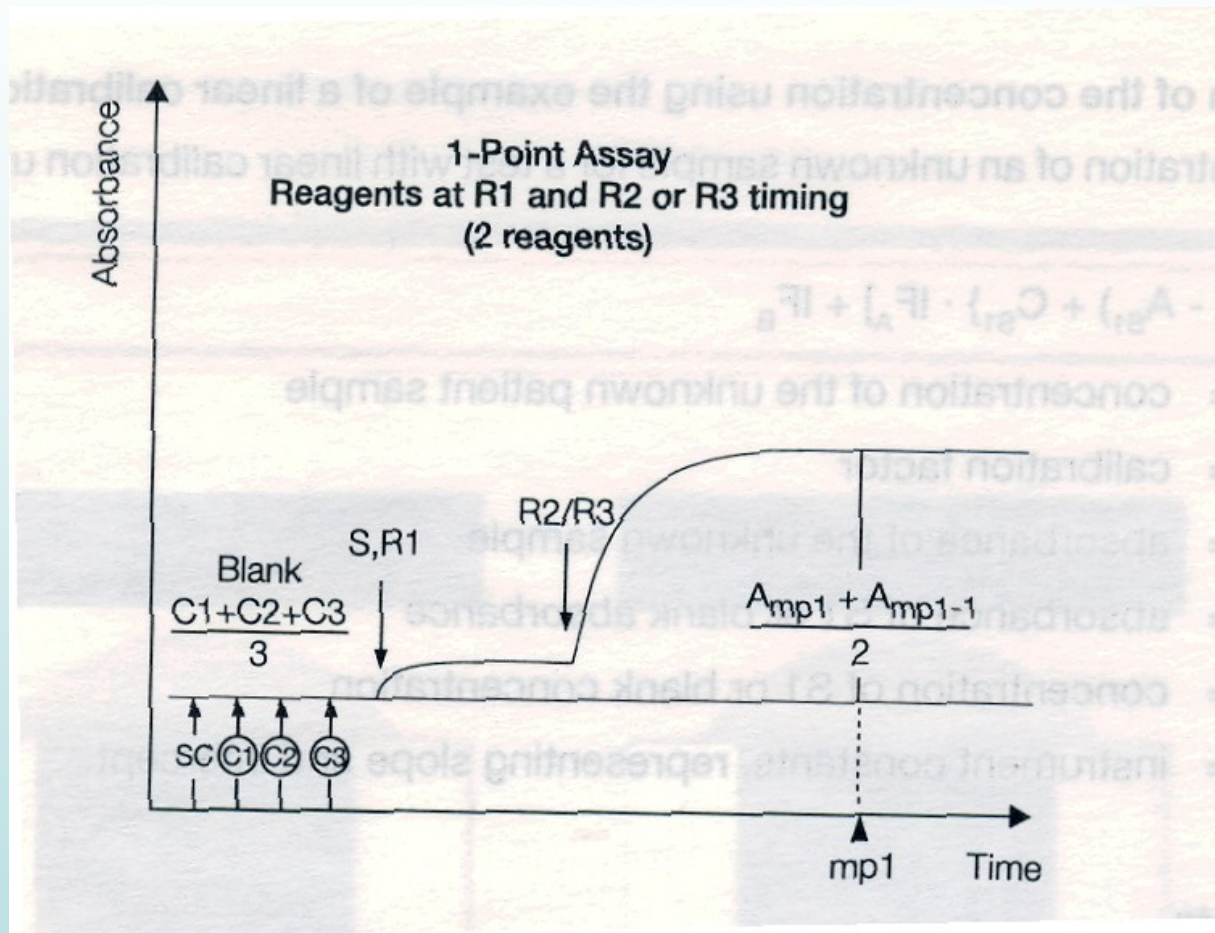
- **Absorbance reakčních roztoků v kyvetě je periodicky měřena po každém cyklu přístroje (kolem 20s) během reakčního času (10 minut)**
- **Přístroje jsou schopny přidávat vzorky a činidla v určité fázi reakčního času dle typu prováděného měření**
- **Přesná specifikace měřícím bodem**



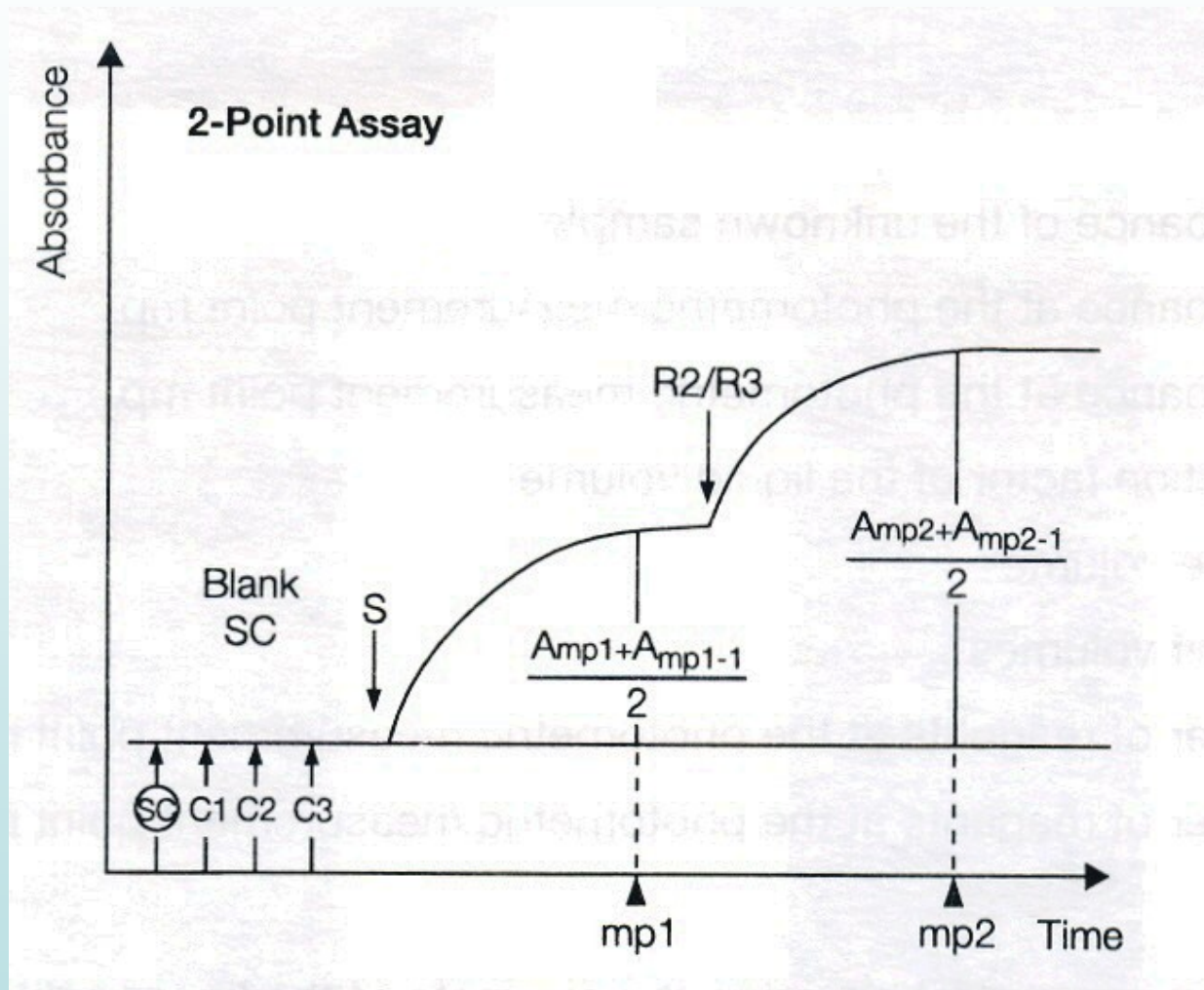


# Typy měření:

End point – jednobodové (měří se absorbance na konci reakce)



# End point - dvojbodové (blank + konec reakce)

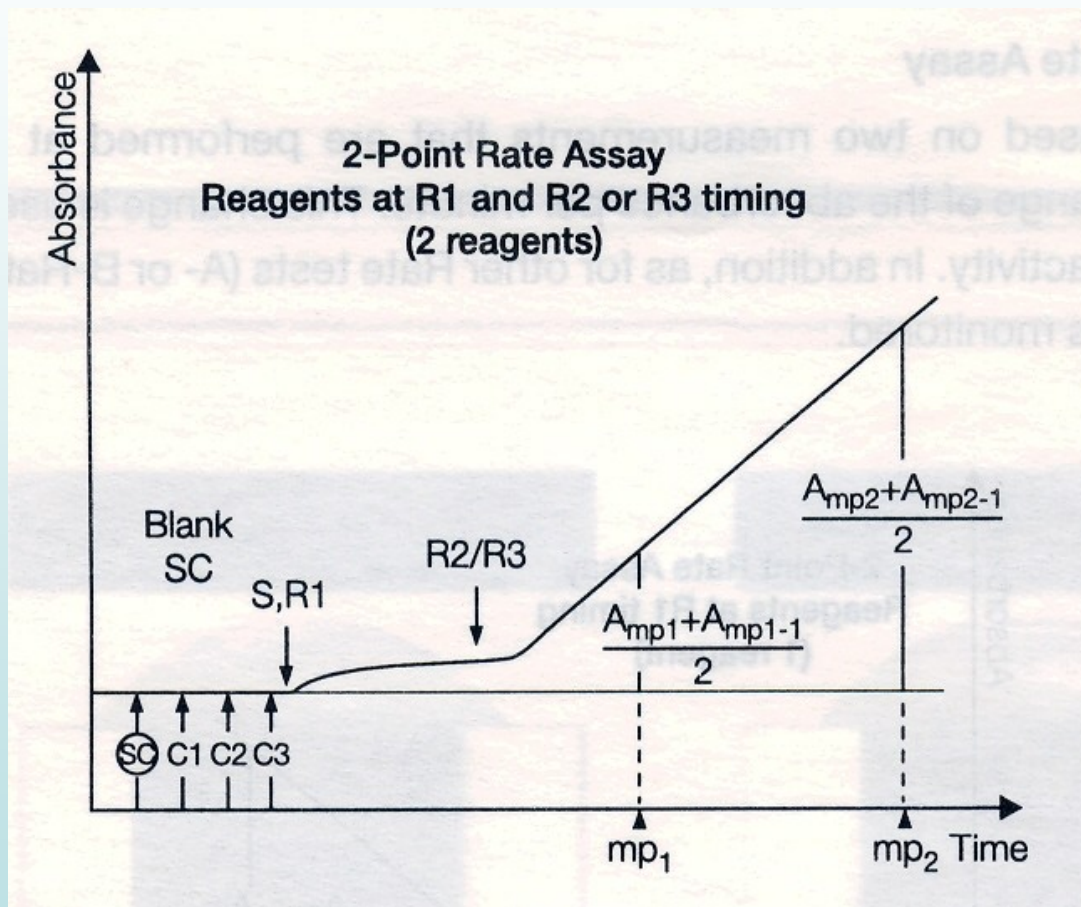


End point - tříbodové (např. pro ISE)



Kinetické (rate) – měří se změna absorbance za časovou jednotku

Při reakci dochází k nárůstu (stanovení CK) či poklesu absorbance (stanovení ALT, AST)



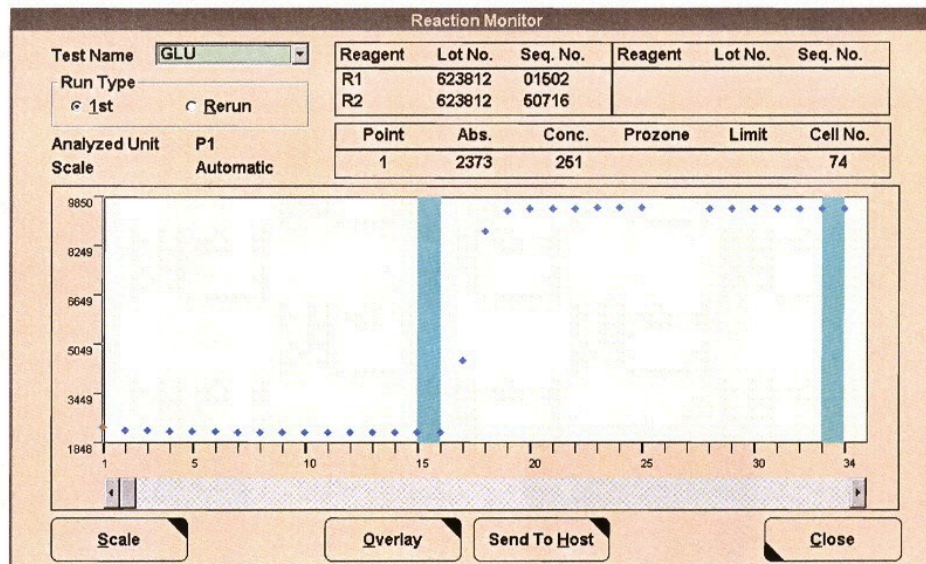


Figure G-88    Reaction Monitor window (P module)

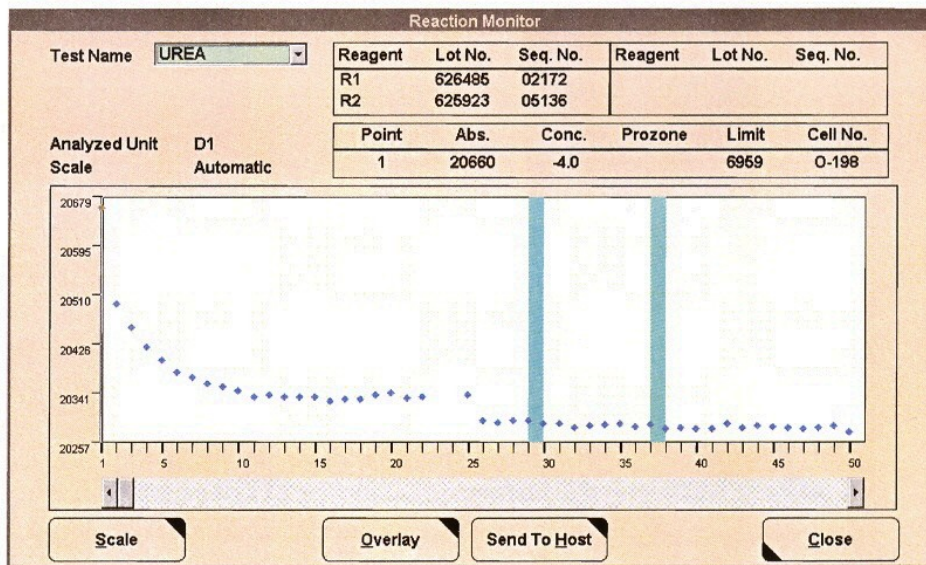


Figure G-89    Reaction Monitor window (D module)

Remote Control

Stand By

ruti

30/09/2015 19:27



Workplace

Reagent

Calibration

QC

Utility

Overview

Test Selection

Data Review

Calib. Review



Logoff



S.Stop



Alarm



Monitor



Print



Start

Reaction Monitor

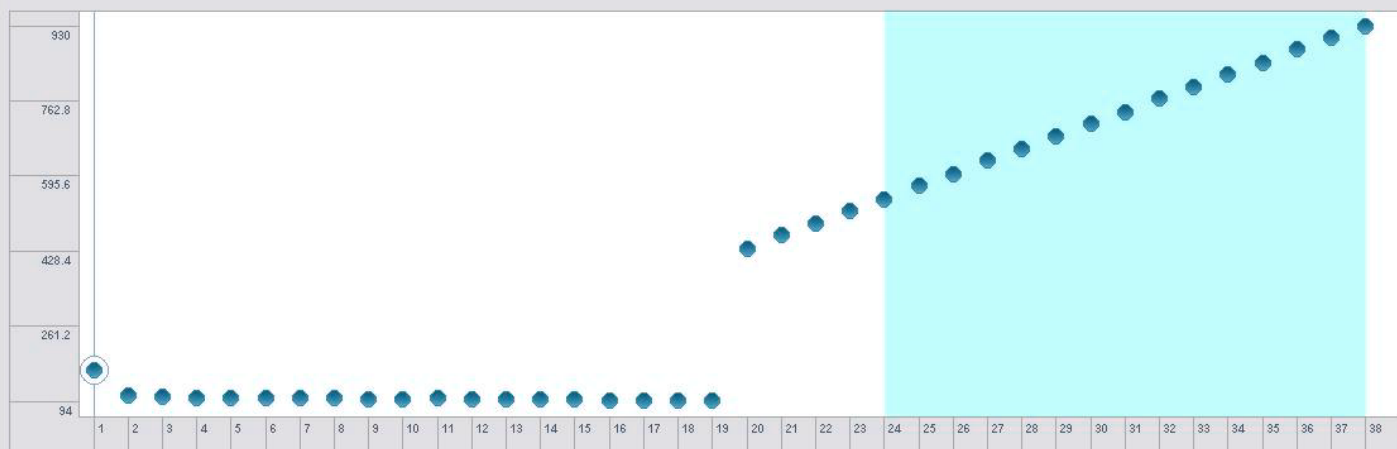
Test

ALP2L

Run Type

 1st Rerun

Scale: Automatic



Point	Abs.	Conc.	Prozone	Limit	Cell No.	A. U.	Run Type	Reagent	R. Pack Lot ID	R. Pack Seq. No.
1	163	1.90		8706	250	C1-B	1st	R1	615618	0027309
								R3	615618	0027309

Scale

Overlay

Send to DM

Close

Select a test from the

Kinetické měření

# Způsoby kalibrace

**Automatické analyzátory umožňují např. tyto typy kalibrace:**

- Lineární dvoubodovou – pro fotometrické metody
- Nelineární – pro turbidimetrické, imunoturbidimetrické metody

Příklady: Spline

Logit-log 5P

RCM2T2 exponenciální funkce



# Ověření integrity výsledku

- Aby se zabránilo vydání nesprávného výsledku při extrémní koncentraci, analyzátory automaticky provádí zkoušky na ověření správnosti výsledku
- Není-li výsledek po technické stránce v pořádku, je označen chybovým hlášením a ve většině případů automaticky naředěn
- Používají se následující zkoušky: **test na linearitu**, **test na dodržení absorbančního limitu**, **test na kontrolu vyčerpání substrátu**, **test detekující Hook efekt**

## **Test na linearitu**

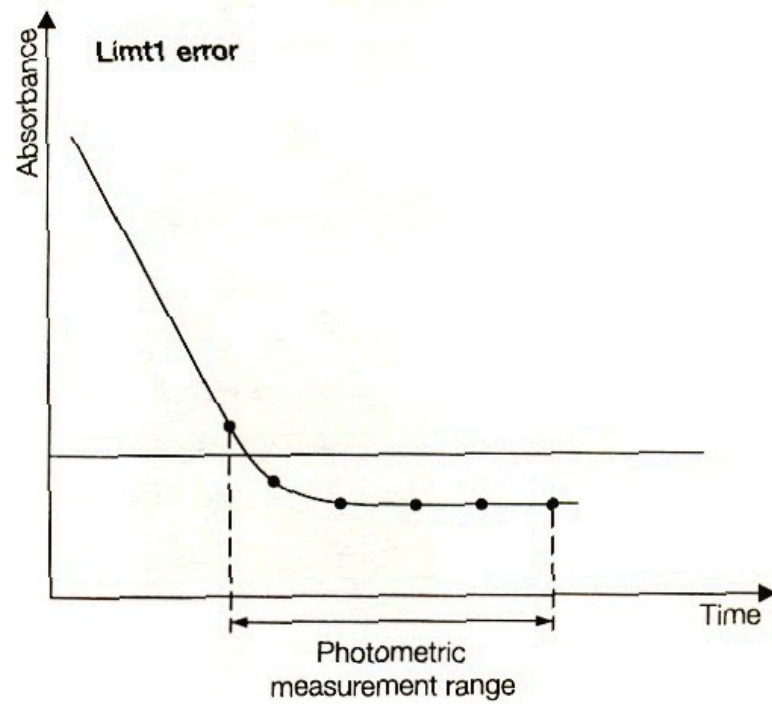
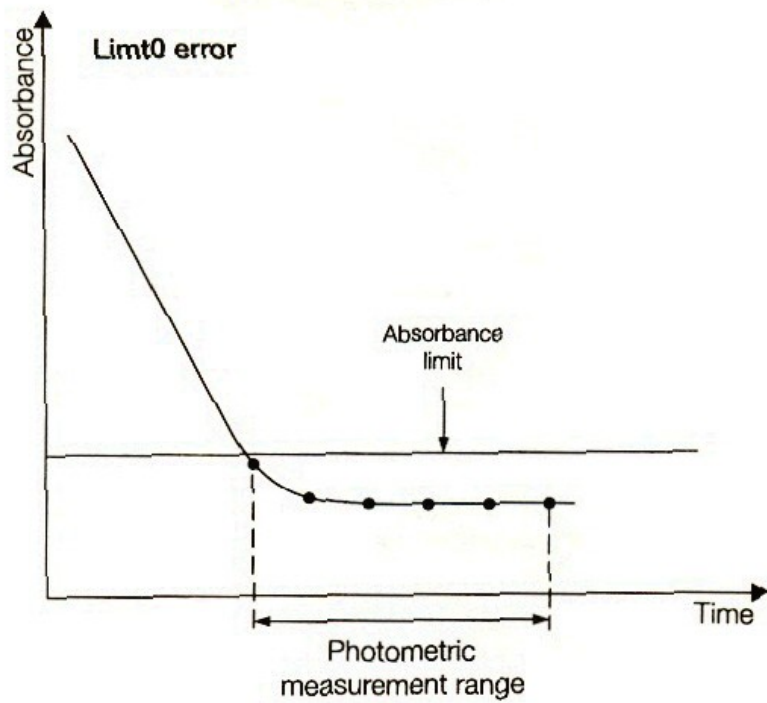
- Je prováděn automaticky u všech kinetických metod
- Linearita je kontrolována pomocí lineární regresní analýzy. Není-li splněna, vzorek je označen chybovým hlášením (př. Lin.)

## **Test na dodržení absorbančního limitu**

- Naměřená absorbance vzorku je tak vysoká, že nelze zajistit spolehlivé výsledky
- U vzorků se objeví chybové hlášení a musí se ředit
- Integrita výsledku je zajištěna nastavením absorbančního limitu

## **Test na kontrolu vyčerpání substrátu**

- Uplatňuje se absorpční limit i kontrola linearity
- Není-li reakce lineární, do výpočtu jsou zahrnuty pouze body z lineární oblasti





Workplace		Reagent		Calibration		QC		Utility					
System		Maintenance		Application		Calc. Test		Special Wash		Report Format		Module Set	
Test		Analyze		Calib.		Range		Others					
Urine		Assay/Time/Point		2 Point Rate		10		20		25		0 0	
CSF		Wavelength (2nd/Primary)		700		340							
D Ser/PI		Sample Volume											
5 LDH P Ser/PI		Normal		3.0		0.0		0		Reagent Volume			
D Ser/PI		Decrease		2.0		0.0		0		R1		180 0 418 28 Timing	
6 MG P Ser/PI		Increase		6.0		0.0		0		R2		0 0 418 0 T2	
Urine		Diluent								R3		110 0 418 28 T3	
7 S.I. P Ser/PI		Water								R4		0 0 418 0	
8 TG P Ser/PI		Diluent		418		0							
D Ser/PI		Abs. Limit		6500		Decrease							
9 UREA P Ser/PI		Prozone Limit		0		0 0 0 0		Lower					
Urine		Cell Detergent		Detergent 1									
D Ser/PI		Twin Test		Cancel						Barsheet Version 1		Save	
10 OPI3Q P Urine													
11 IGG P Ser/PI													
12 ALB P Ser/PI													
D Ser/PI													
87 Na Ser/PI													
Urine													

Delete      Read Barsheet

? Help      Select the test from the list box.

NUM

- Stop
- Logoff
- S. Stop
- Alarm
- Print
- Start

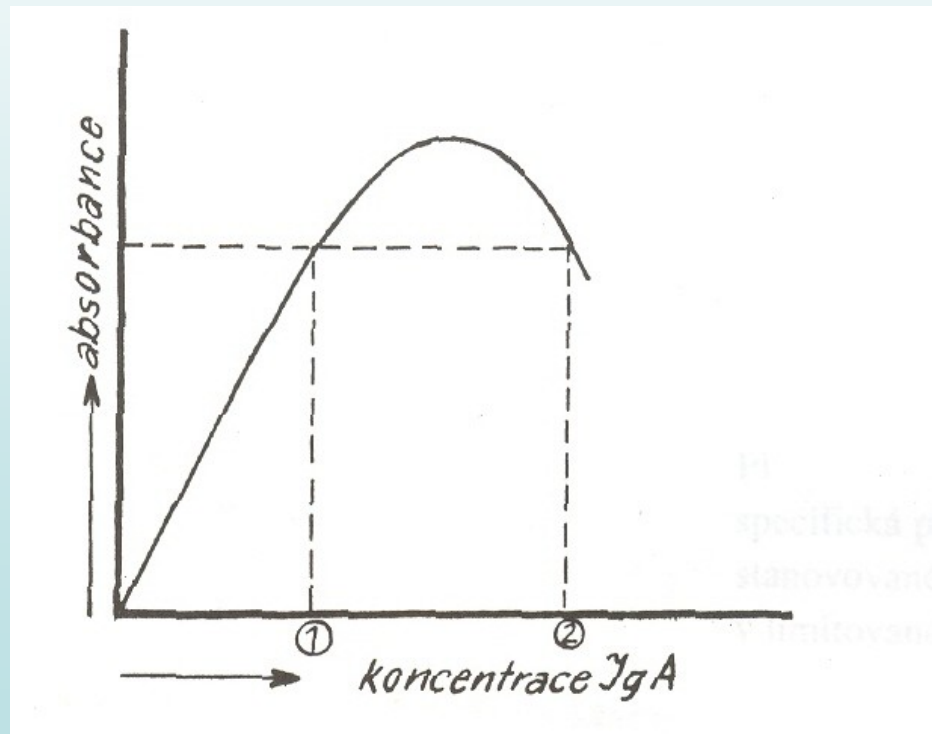
Figure G-284 Analyze sub-screen (Photometric Tests)

# Test detekující Hook efekt

- Objevuje se u imunoturbidimetrických stanovení
- Koncentrace stanovovaného analytu ve vzorku vysoká
- Leží na pravé straně Heidelbergovy křivky
- Chybně stanovená nízká koncentrace měřením absorbance je s využitím Prozone Check detekována a označena chybovým hlášením
- Stanovení je pak znovu provedeno z menšího objemu nebo z naředěného vzorku
- **Prozone Check** je nejčastěji proveden následovně: Po skončení reakce se stoupající směrnici absorbance je přidán další definovaný objem antigenu. Absorbance je měřena před i po přidání antigenu (viz 1-Point Assay)
- Používá se výjimečně – postup je zpravidla nahrazen automatickým ředěním již od nižších koncentrací

# Test detekující Hook efekt

- při nadbytku antigenu u imunoturbidimetrických stanovení (Prozone Check)
- koncentrace antigenu je tak vysoká, že dochází k rozpouštění precipitátu





**Pracovní rozsah (technický limit)** – výsledky, které leží mimo technický limit jsou označeny chybovým hlášením a nesmí být vydány dokud nejsou změřeny bez chybového hlášení - nejčastěji po naředění – souvisí s rozsahem kalibrace

**Repeat limit** – výsledky mimo repeat limit jsou technicky správně, jsou pouze mimo limit zvolený laboratoří pro opakování (silně patologické hodnoty)

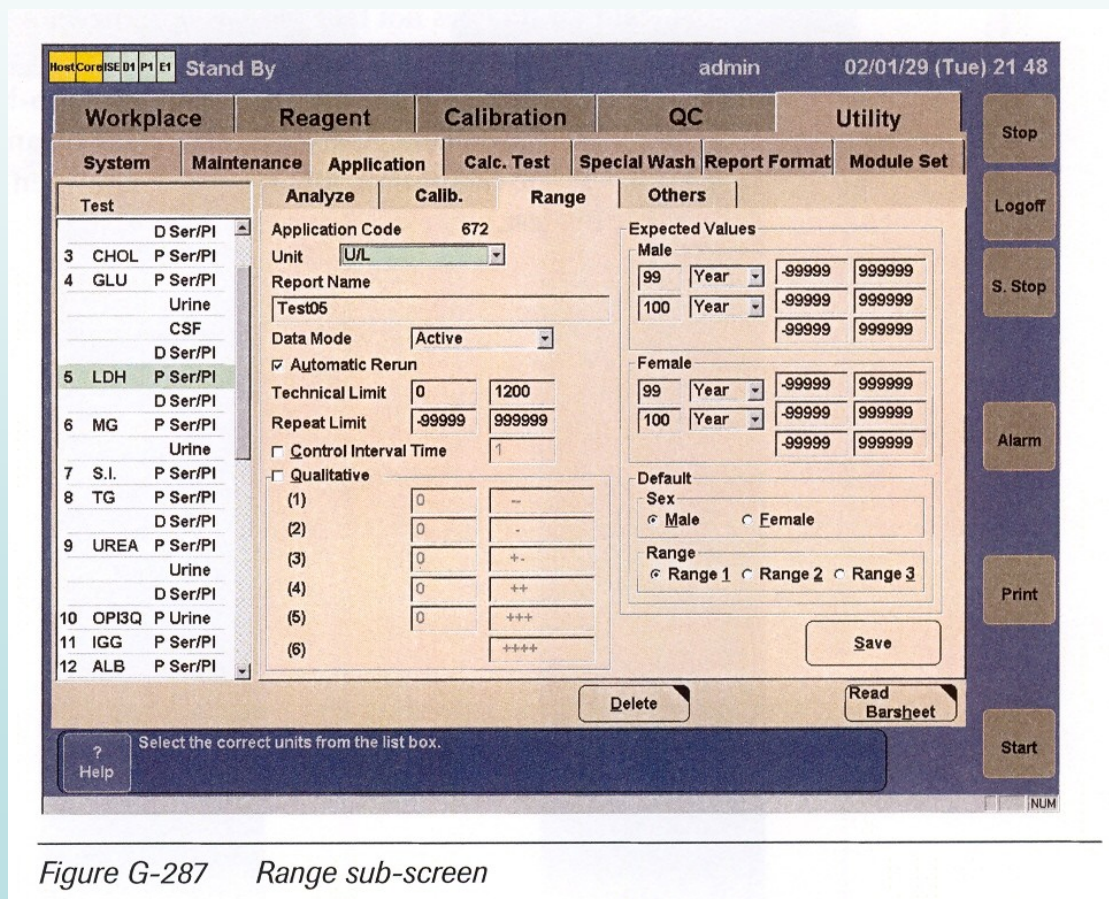


Figure G-287 Range sub-screen

# Instalace metod jiného dodavatele (než dodavatel analyzátoru)

cu ( 192.168.1.1, 172.18.38.230 ) - service mode

Rack Supply Complete 18:56:02      mina      23/11/2018 12:10      ?      Help

Workplace    Reagent    Calibration    QC    Utility    Overview

System    Maintenance    Application    Special Wash    System Configuration

Chemistry    Immune

Analyze

Assay / Time / Point:    Rate A    10    41    47    0    0

Wavelength (Sec./Pri.):    415    340

Sample Volume:      R. Pack Configuration:

Norm.    13.9    0.0    0      R1    87    0    Inactive

Dec.    13.9    13.9    50      R2    0    0

Inc.    27.8    0.0    0      R3    87    0

Dilution:

Water      R. Packs Setting

Diluent    0    1

Linearity Limit:    0    %    0    %    0    0

Prozone Limit:    0    0    0    0    0    0    In    0    0

Abs. Limit:    32000    Increase

Cell Detergent:    Detergent1      Stirring Level    2

Stirring Setting      M1      M2      M3

Up    Stirring    Low    Stirring    Stirring    Stirring

Version: 04.10 - 201

Delete    Download    Save

Stop

Logoff

S.Stop

Alarm

Monitor

Print

Start

Touch the screen, click the mouse or press a key.

R. Pack Type B

Pos.	Reag.		Tests	Vol.
A	R1	M	165	19.50
B	R1	S	165	0.00
C	R3	S	165	18.00



# Vkládání reagenscií od jiného dodavatele (než dodavatel analyzátoru)

Rack Supply Complete 18:53:57      mina

Workplace    Reagent    Calibration    QC    Utility

Setting      Status

Module: C1

Mark	Position	Test	Available Tests
A-30		CRP	322(70)
A-31		ZLUCK	66(10)
A-32		MANNI	5(5)
A-33			
A-34		CRP	322(70)
A-35		CA2	347(30)
A-36		LD	206(50)
A-37		SI2	764(70)
A-38		GGT	144(50)
A-39			
A-40		MG	129(25)
A-40		MGU	129
A-41			
A-42		COC	104(15)
A-43		ETH	80(20)

Development Channel (C1)

Test	App. Code	Status
ACE	314	Assigned
ADA	313	Assigned
AMIK	311	Assigned
KOTIN	316	Assigned
LACTU	318	
MANNI	317	Assigned
NGAL	315	
ZLUCK	312	Assigned

Delete    Reserve

OK    Cancel

# Mez stanovitelnosti

- **Spodní hranice pracovního rozsahu**  
(Chemiluminiscenční a fluorescenční techniky patří k nejcitlivějším metodikám - řádově fento až zeptomoly ( $10^{-15}$  až  $10^{-21}$  molu))

# Vybrané charakteristiky automatických metod

## Minimální reakční objem:

- Významná charakteristika analyzátoru
- Dříve se od něho odvíjela cena
- V současnosti asi 100  $\mu\text{l}$  - šetrné k životnímu prostředí
- Některé stroje reagencie předředují. Pracují pak s menším objemem (Avia 1650, Siemens)

## Minimální pipetovací objem – 1 $\mu\text{l}$ :

- Minimální objem se týká vzorku, kontrolních a kalibračních materiálů
- Reagencie jsou pipetovány proti vzorku většinou minimálně v desetinásobném nadbytku
- Při potřebě provést analýzu z menšího objemu vzorku než 1  $\mu\text{l}$  se vzorek předředí

# Příklady parametrů používaných u automatické analýzy

## Analyzátor na klinickou chemii:

- Minimální reakční objem: 100  $\mu$ l
- Objem vzorku: 2 – 25  $\mu$ l
- Vlnové délky: 340, 376, 415, 450, 480, 505, 546, 570, 600, 660, 700, 800 nm
- Reakční teplota: 37°C
- Reakční čas: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 minut

## Stanovení ISE:

- Metody: Na, K, Cl
- Objem vzorku: 15  $\mu$ l
- Objem diluentu:: 450ul/vzorek
- Ředění: 1 : 31
- Objem vnitřního standardu: 1050 ul/vzorek
- Referenční roztok: 130 ul/vzorek

# Možnost korekce na nespecifické výsledky

- Existuje možnost vložit korekční faktory – např. pro kreatinin, kdy se u Jaffého metody projevuje vliv reakce proteinů

# Pořadí přidávání reakčních komponent

## Existují dva typy pipetování

1. Nejdříve se pipetuje vzorek (jehla se musí dotknout dna) a potom činidlo - př. analyzátory řady Cobas, Roche
2. Nejprve se pipetuje činidlo (výplach jehly vodou), potom vzorek – př. analyzátory Integra, Roche

# Chyba přenosem – carry over

- **Chybové hlášení u vzorku s nízkou koncentrací po vzorku s vysokou koncentrací (automatické opakování u imunochemických analyzátorů)**
- **Test na tuto chybu**

# Močový mikroskopický analyzátor

- Výběr jednotek
  - $\mu\text{l/ml}$
  - na zorné pole (není doporučeno)
- Založení kategorie od určitého počtu elementů –  
např. kvasinky > 5  
spermie > 3
- Instalace jednotlivých šarží kontrol a kalibrátorů
- Chybová hlášení