

# **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

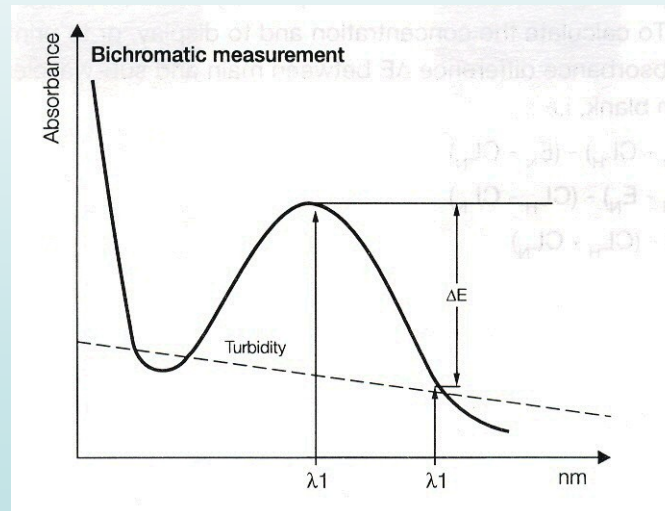
## Způsoby zadávání:

- **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 reagensyemi 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

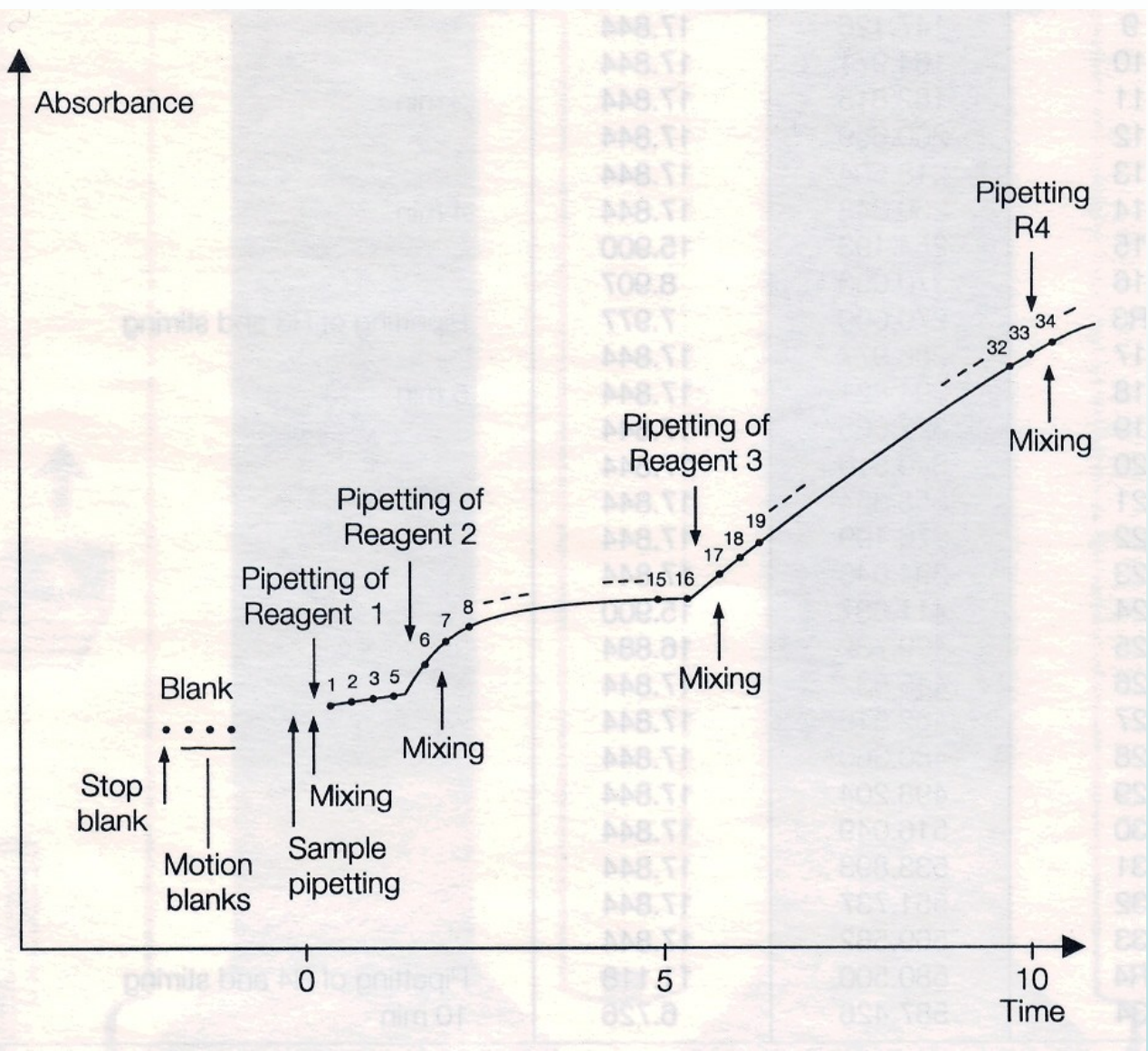
- rozdíl absorbancí mezi hlavní a vedlejší  $\lambda$  byl co největší
- současně se při ní musí minimálně uplatňovat interference
- současně má být co nejblíže k hlavní  $\lambda$

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

# Měřicí body reakce

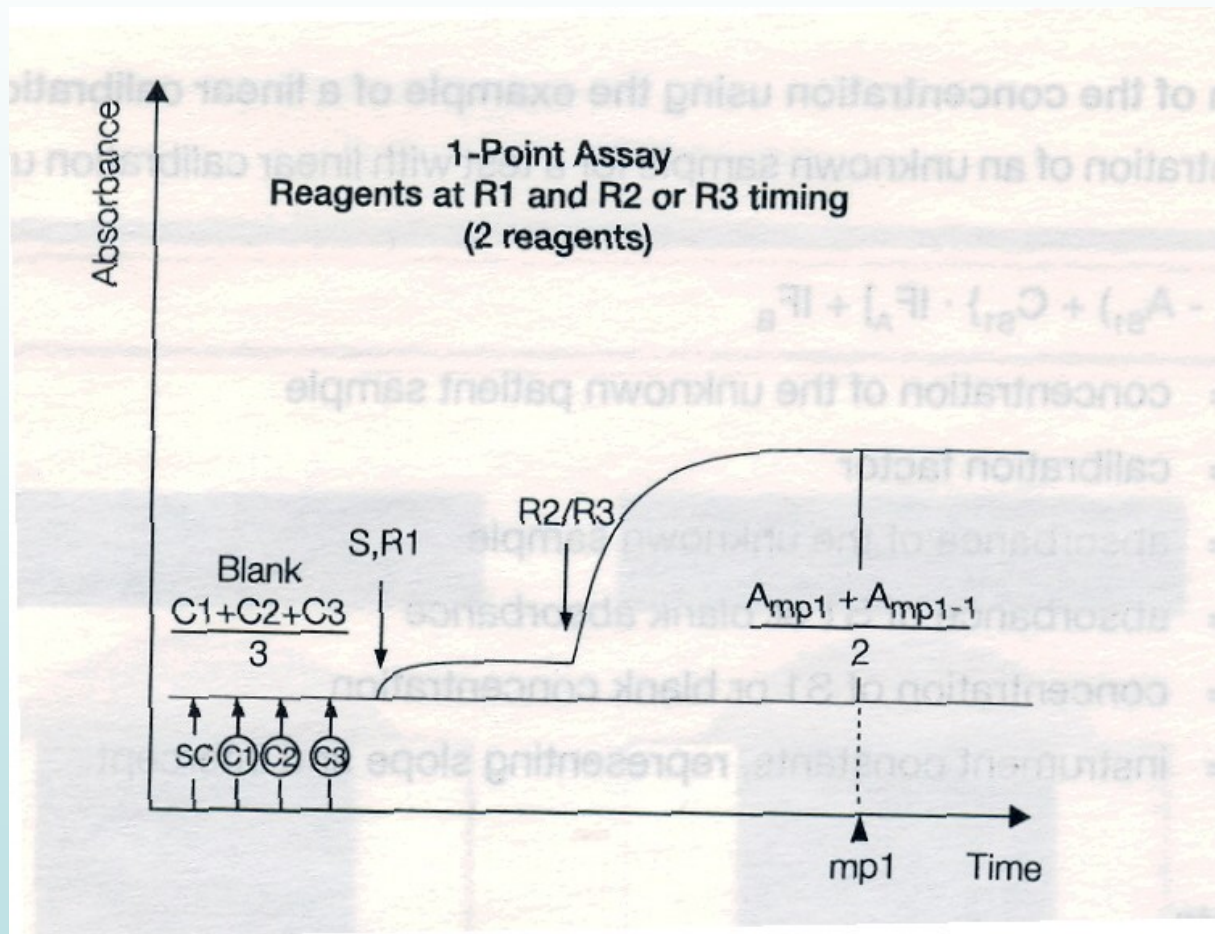
- **Absorbance reakčních roztoků v kyvetě je periodicky měřena po každém cyklu přístroje (kolem 20s) během reakčního času (10 minut)**
- **Přístroje jsou schopny přidávat vzorky a činidla v určité fázi reakčního času dle typu prováděného měření**
- **Přesná specifikace měřícím bodem**



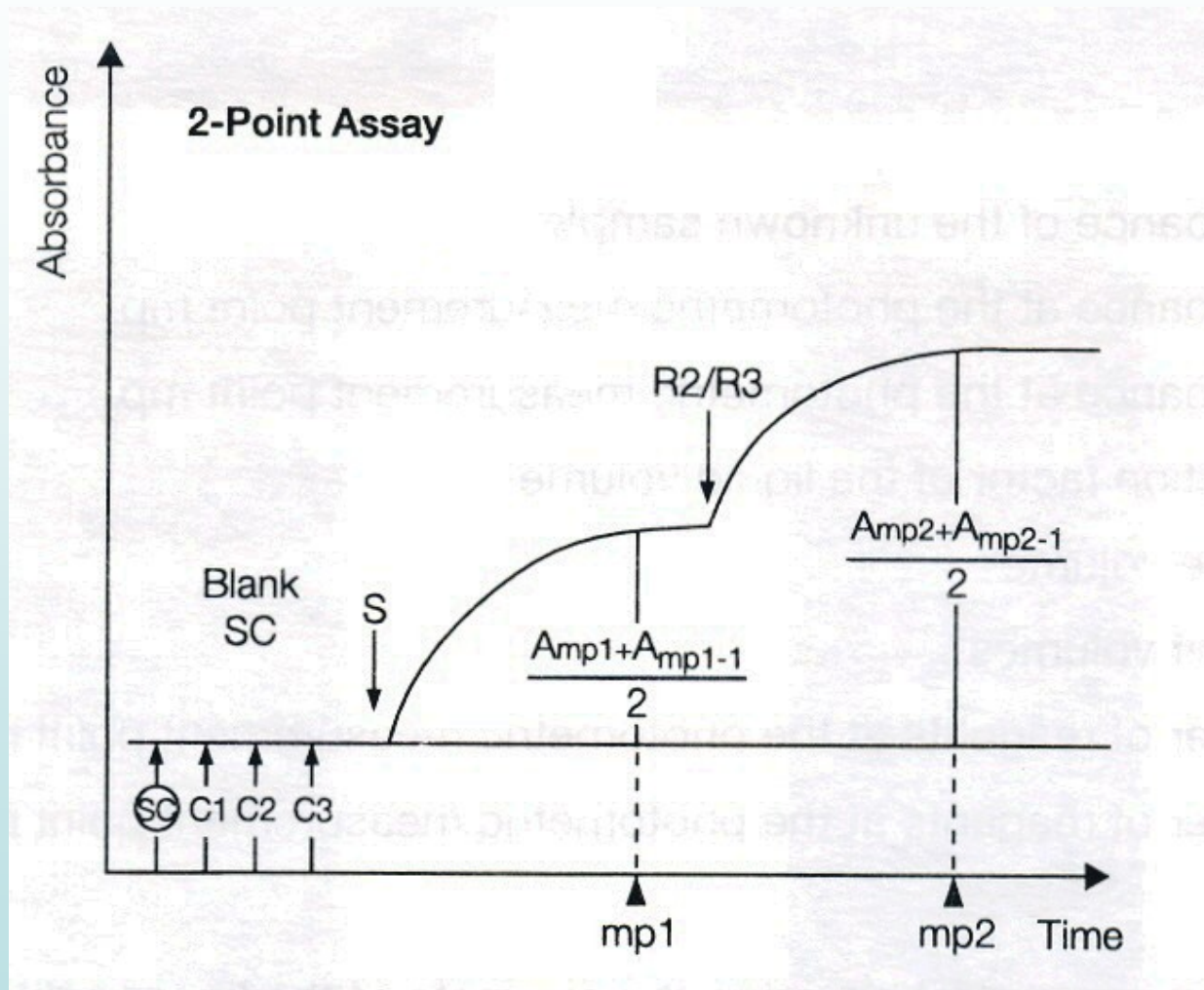


# Typy měření:

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



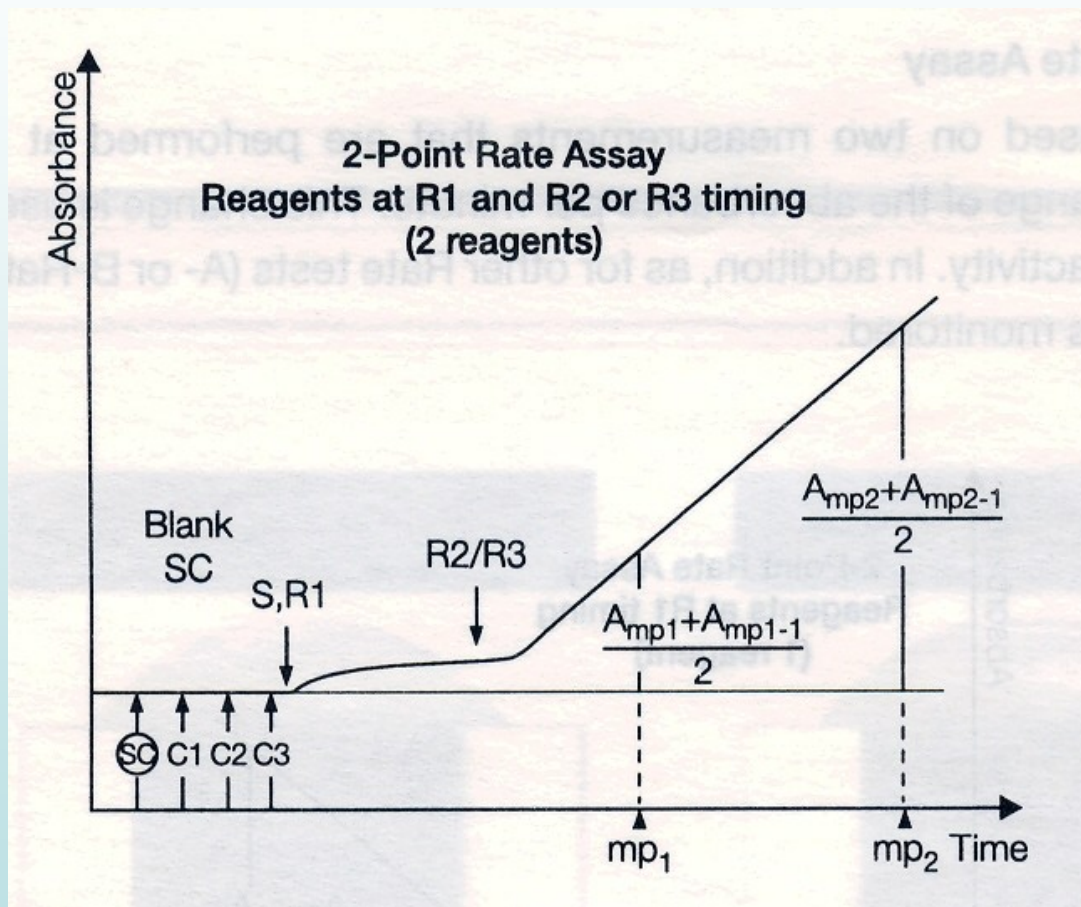
# End point - dvojbodové (blank + konec reakce)



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)



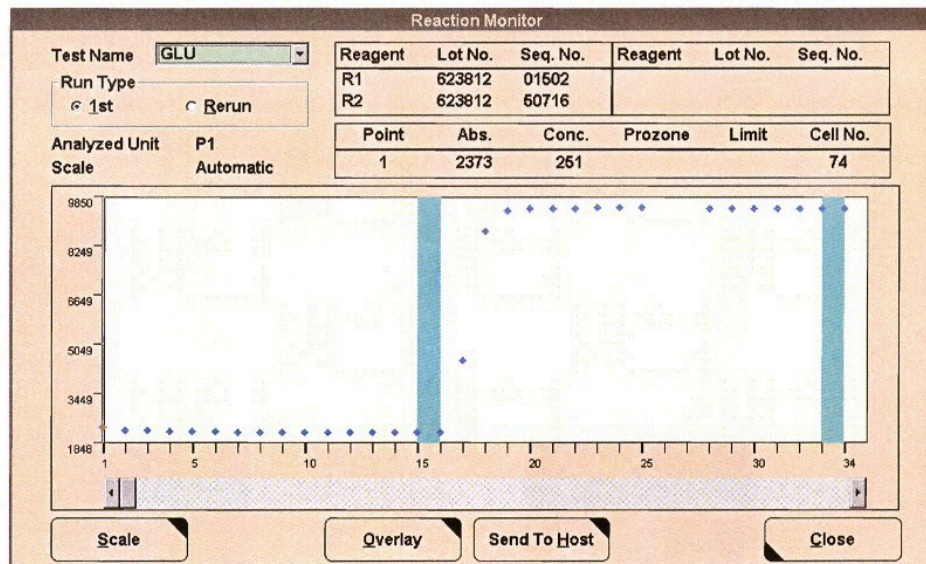


Figure G-88    Reaction Monitor window (P module)



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

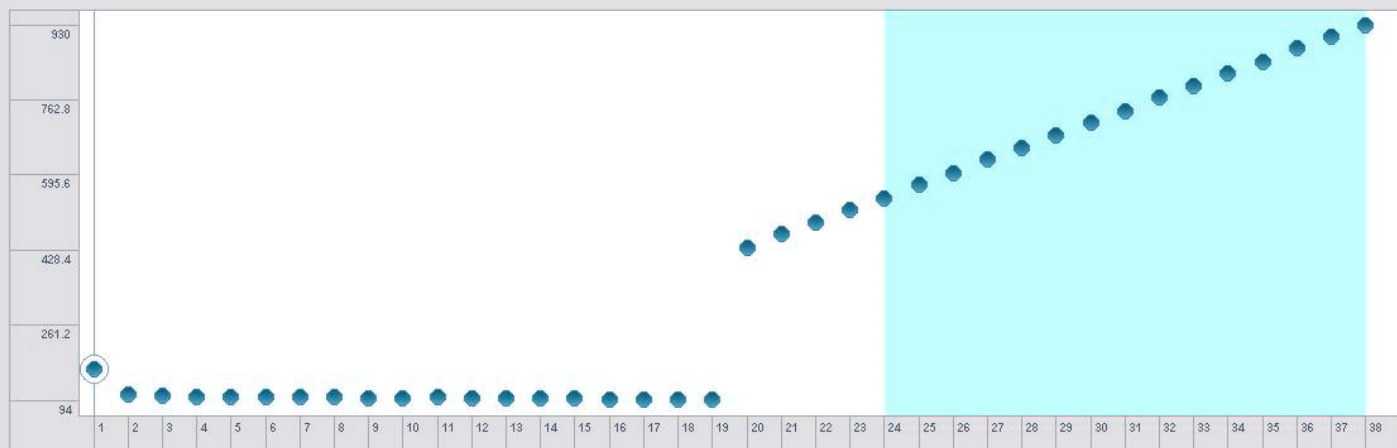
Test

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**

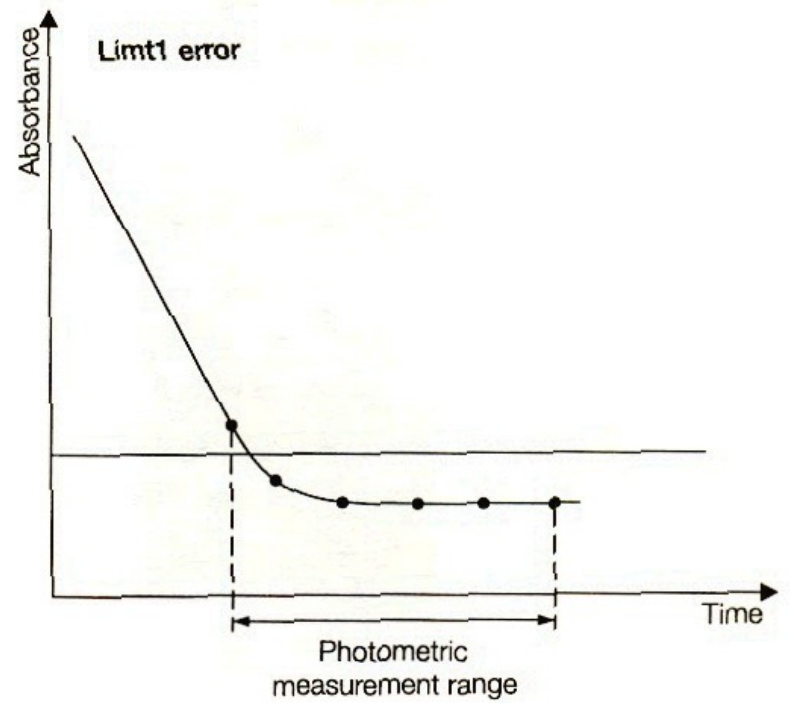
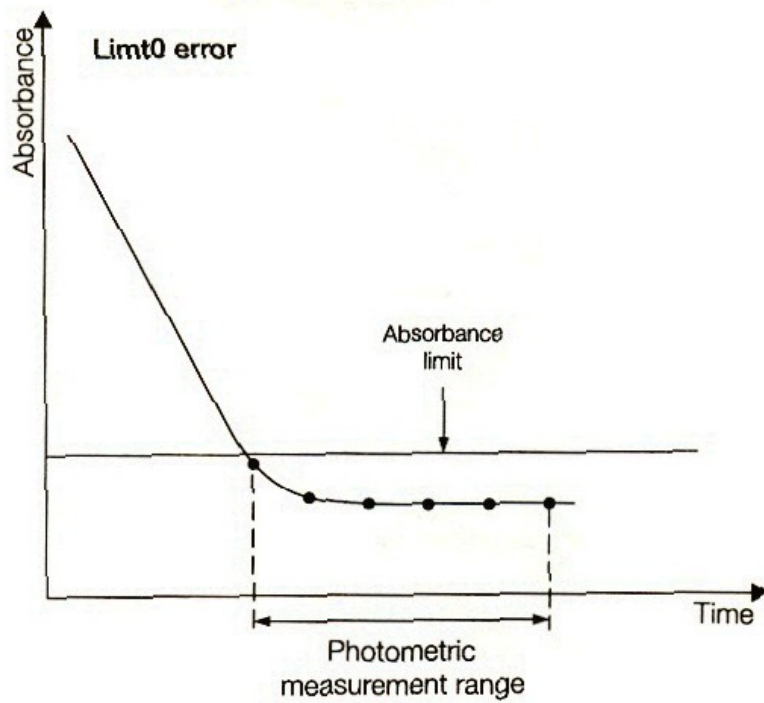
- Je prováděn automaticky u všech kinetických metod
- Linearita je kontrolována pomocí lineární regresní analýzy. Není-li splněna, vzorek je označen chybovým hlášením (př. Lin.)

## **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

- Urine
- CSF
- D Ser/PI
- 5 LDH P Ser/PI
- D Ser/PI
- 6 MG P Ser/PI
- Urine
- 7 S.I. P Ser/PI
- 8 TG P Ser/PI
- D Ser/PI
- 9 UREA P Ser/PI
- Urine
- D Ser/PI
- 10 OPI3Q P Urine
- 11 IGG P Ser/PI
- 12 ALB P Ser/PI
- D Ser/PI
- 87 Na Ser/PI
- Urine

Analyze

Calib.

Range

Others

Assay/Time/Point

2 Point Rate

10

20

25

0

0

Wavelength (2nd/Primary)

700

340

Sample Volume

Normal

3.0

0.0

0

Decrease

2.0

0.0

0

Increase

6.0

0.0

0

Diluent

Water

Diluent

418

0

Abs. Limit

6500

Decrease

Prozone Limit

0

0

0

0

0

Lower

Cell Detergent

Detergent 1

Twin Test

Cancel

Barsheet Version 1

Save

Delete

Read Barsheet

? Help

Select the test from the list box.

Stop

Logoff

S. Stop

Alarm

Print

Start

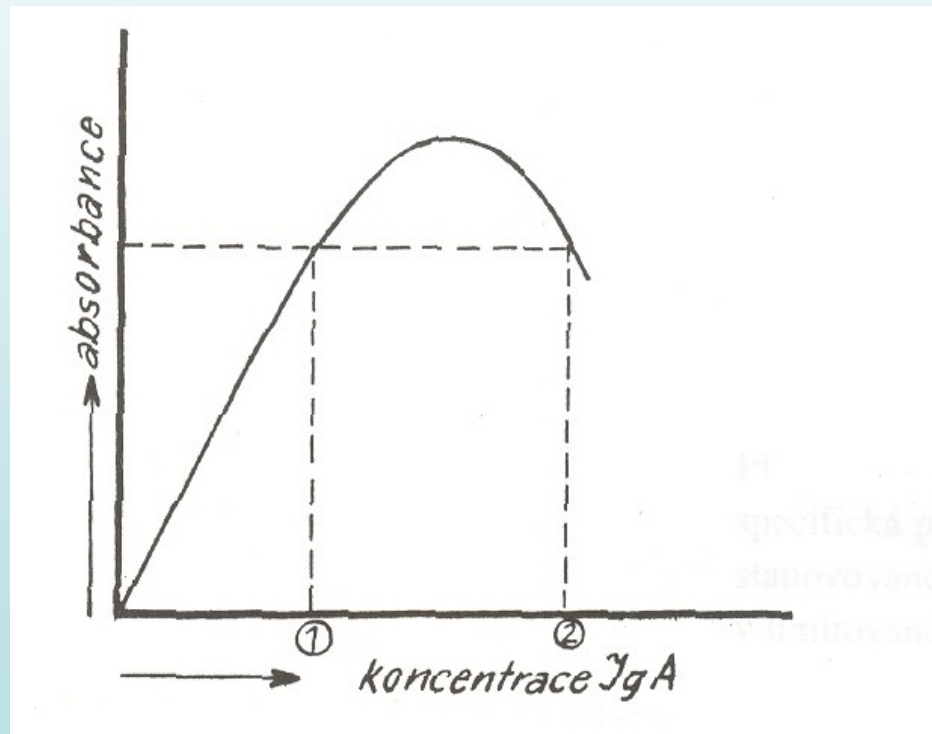
Figure G-284 Analyze sub-screen (Photometric Tests)

# 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)

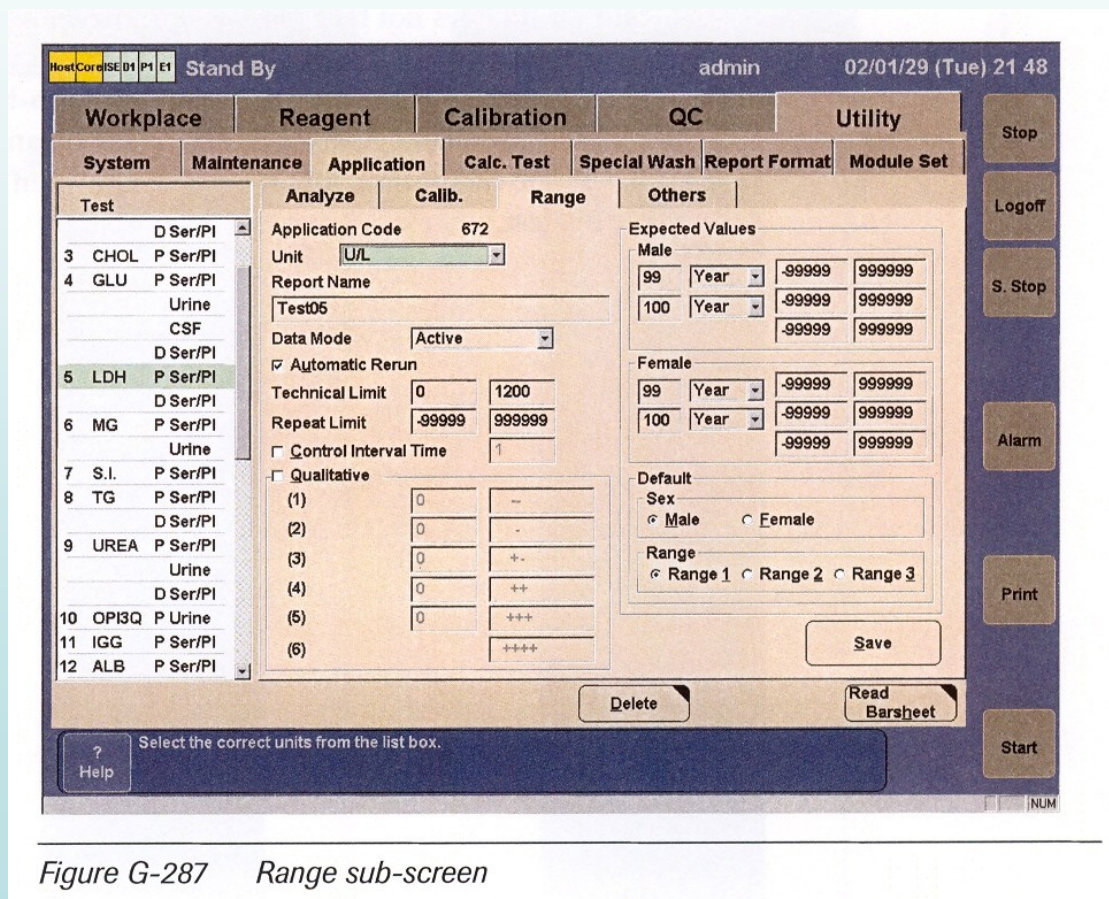


Figure G-287 Range sub-screen

# 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