

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

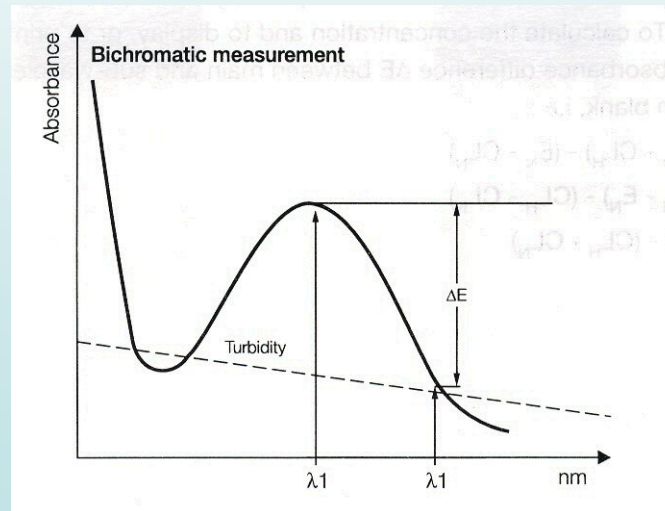
Způsoby zadávání:

- **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

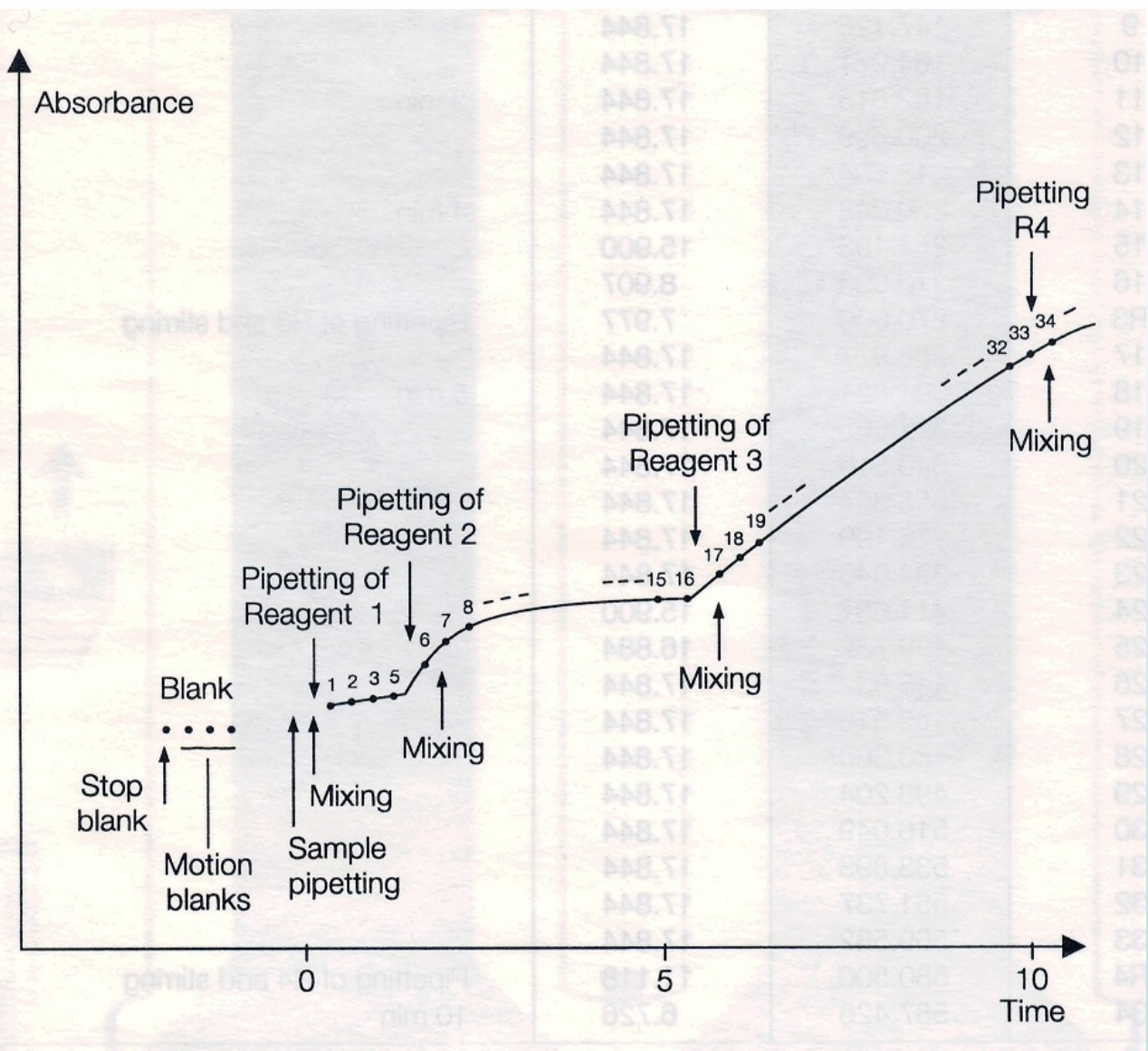
Vedlejší vlnová délka je zvolena tak, aby

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

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

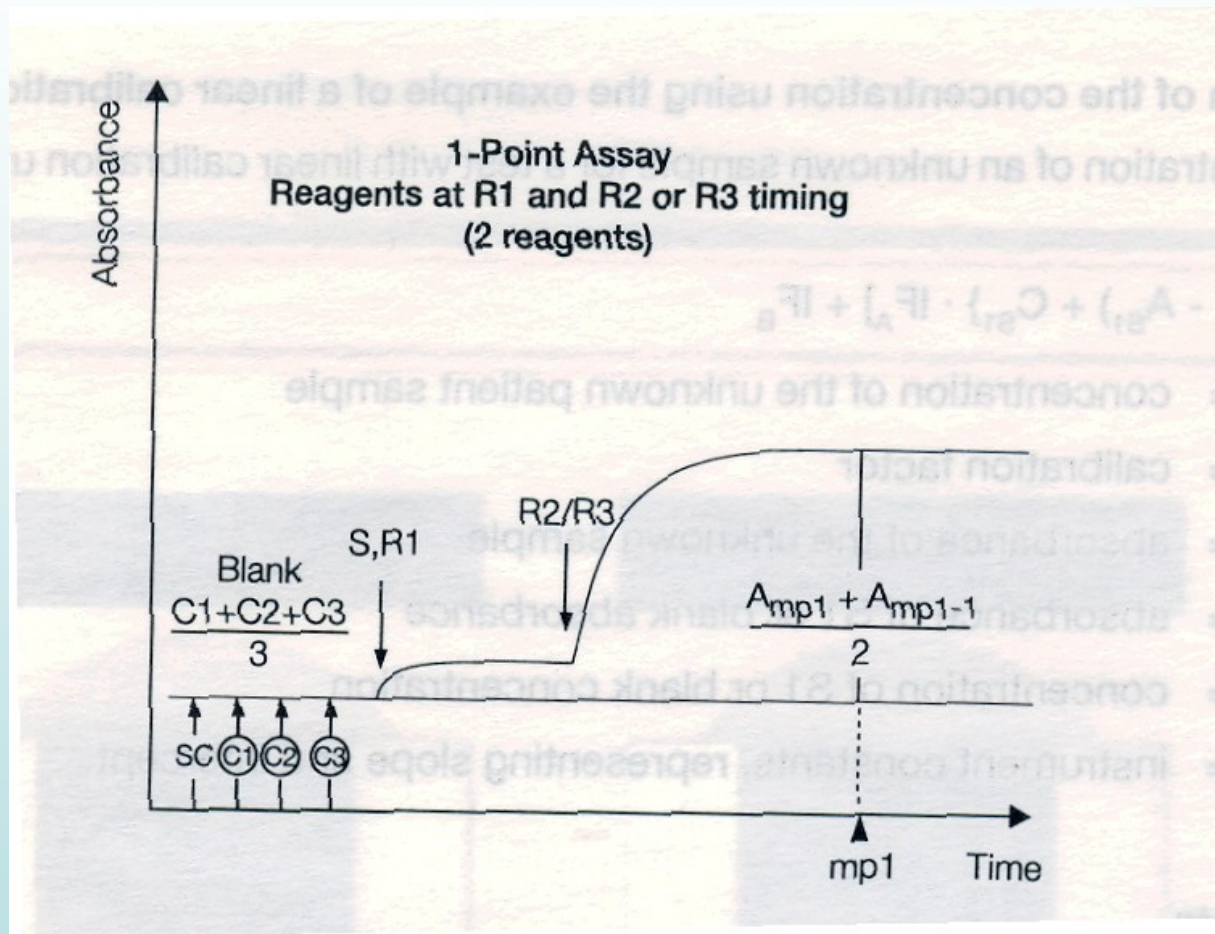
Měřicí body reakce

- **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**

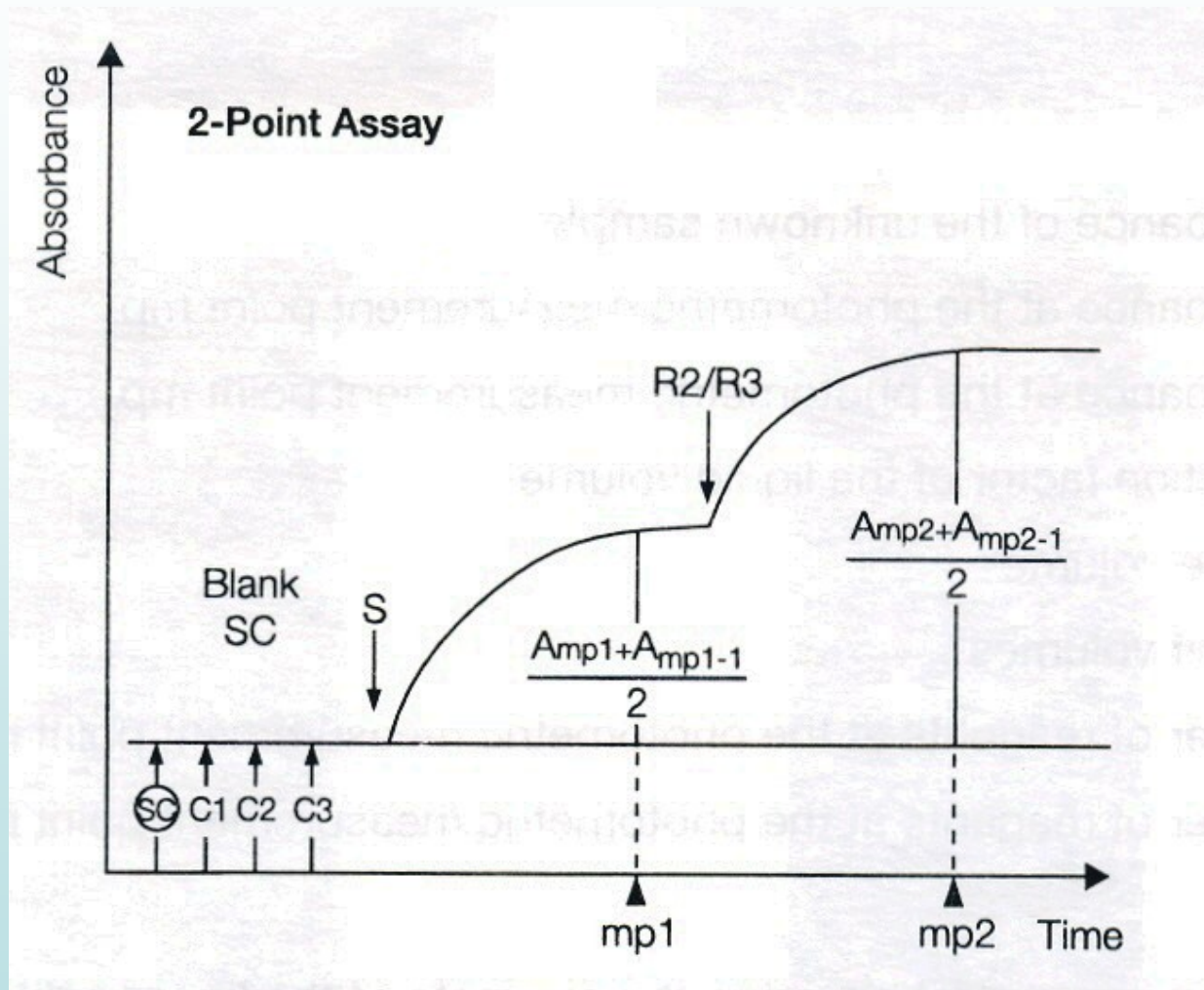


Typy měření:

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



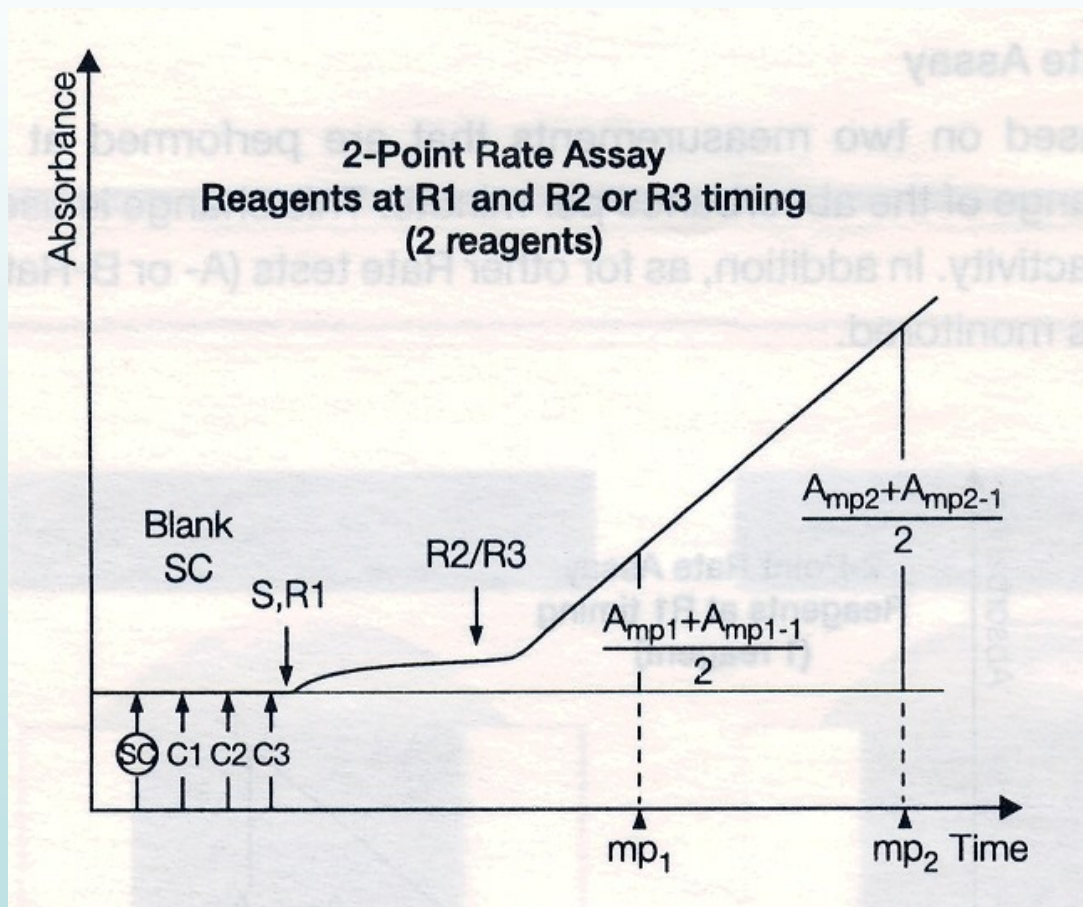
End point - dvojbodové (blank + konec reakce)



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)



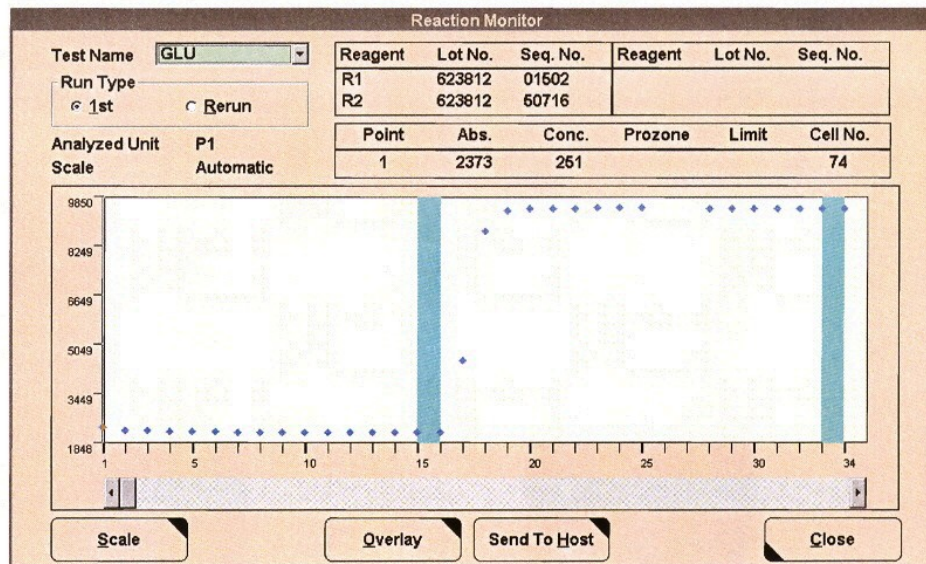


Figure G-88 Reaction Monitor window (P module)



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



Stop



Logoff



S.Stop



Alarm



Monitor



Print



Start

Reaction Monitor

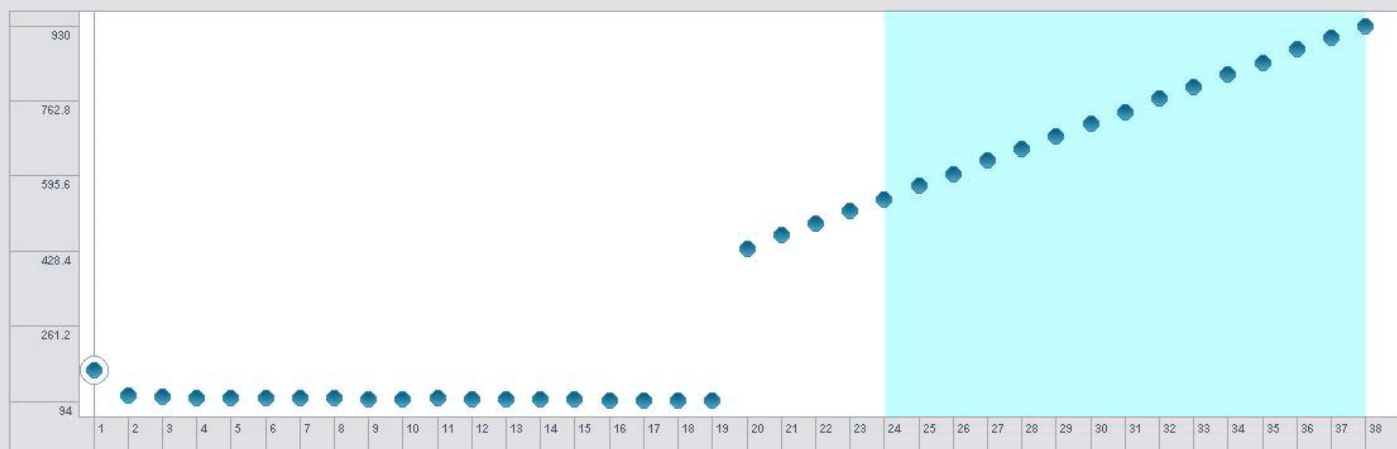
Test

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

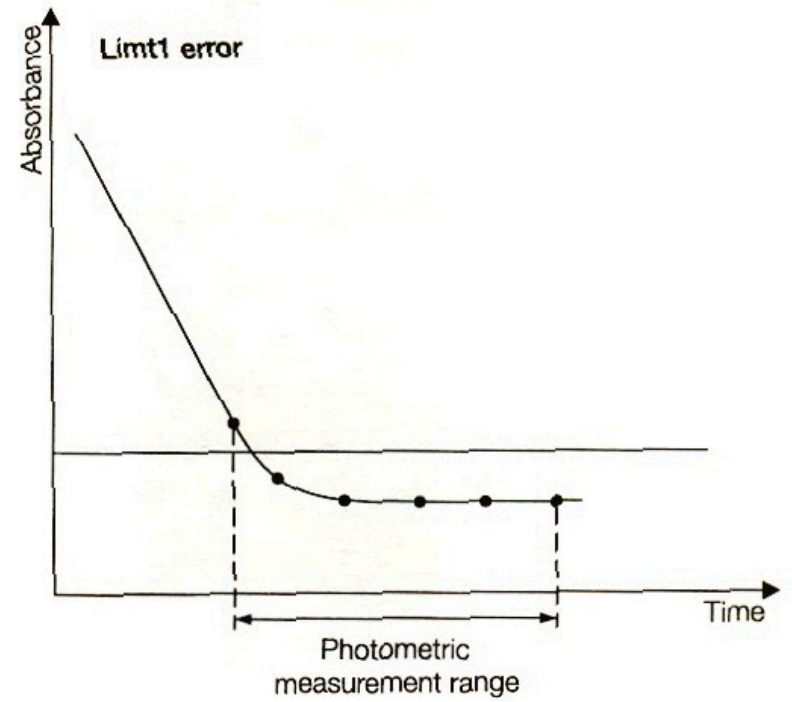
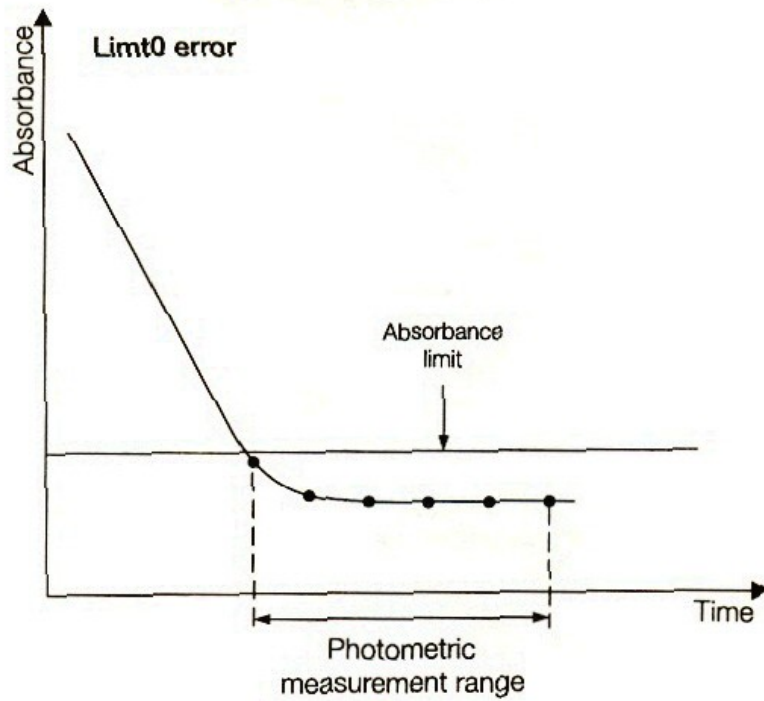
- Je prováděn automaticky u všech kinetických metod
- Linearita je kontrolována pomocí lineární regresní analýzy. Není-li splněna, vzorek je označen chybovým hlášením (př. Lin.)

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 linearitu
- 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

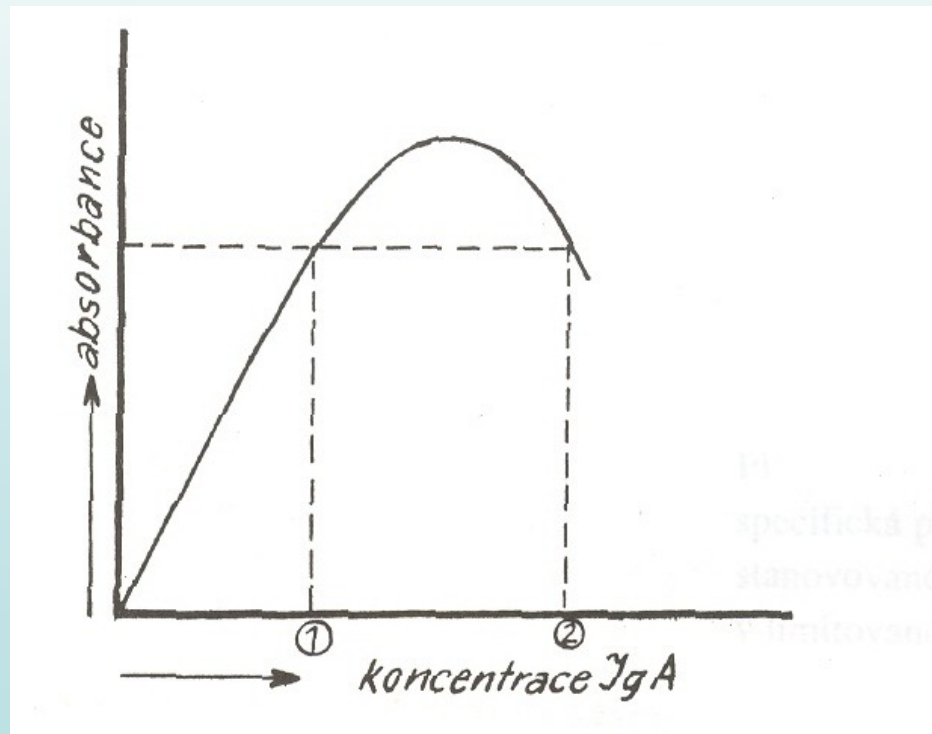
Figure G-284 Analyze sub-screen (Photometric Tests)

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)

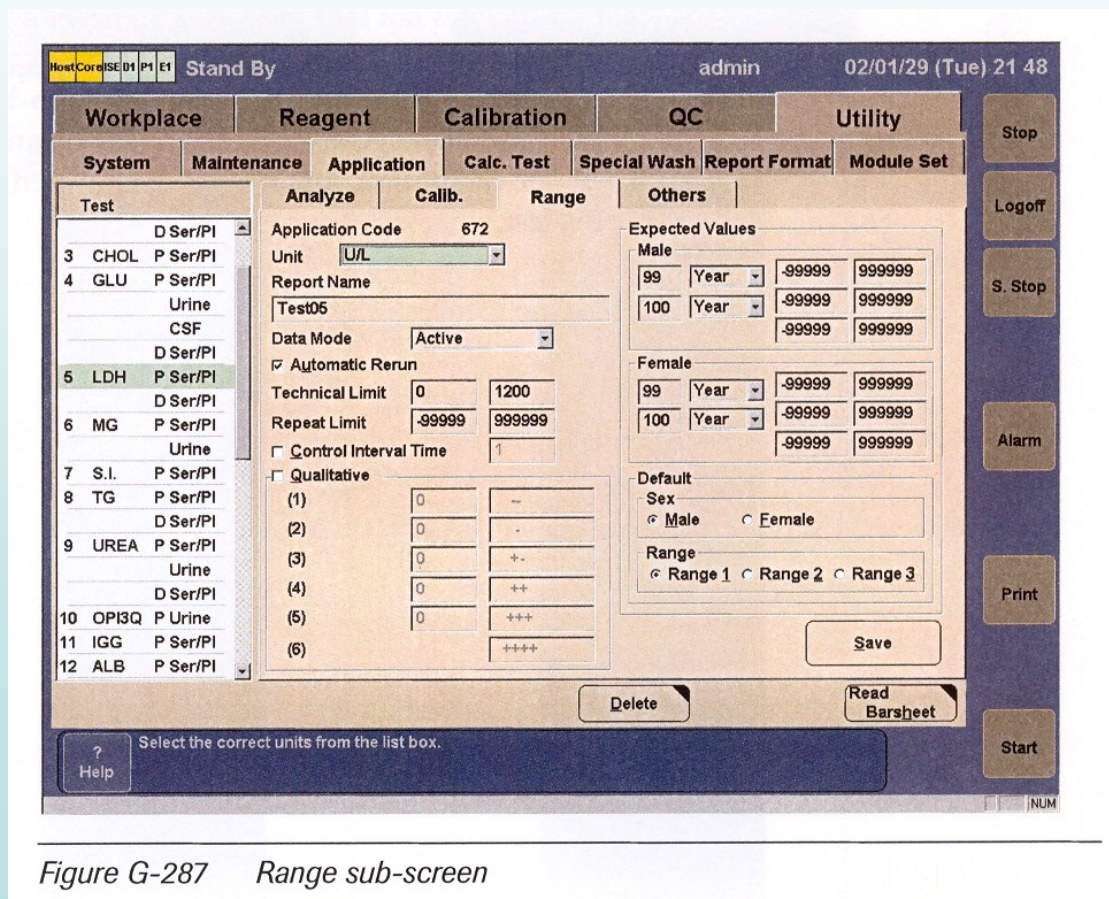


Figure G-287 Range sub-screen

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 μl - šetrné k životnímu prostředí
- Některé stroje reagencie předředují. Pracují pak s menším objemem (Avia 1650, Siemens)

Minimální pipetovací objem – 1 μl :

- 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 μl se vzorek předředí

Příklady parametrů používaných u automatické analýzy

Analyzátor na klinickou chemii:

- Minimální reakční objem: 100 μ l
- Objem vzorku: 2 – 25 μ 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 μ 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