

# Parametry metod automatické fotometrické analýzy

Každá metoda prováděná automatickým biochemickým analyzátozem má v softwaru řídicího počítače nadefinované parametry:

- číslo (aplikační kód) 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 analýzy

Parametry definují analytickou metodu.

Zadávají se do automatických analyzátorů

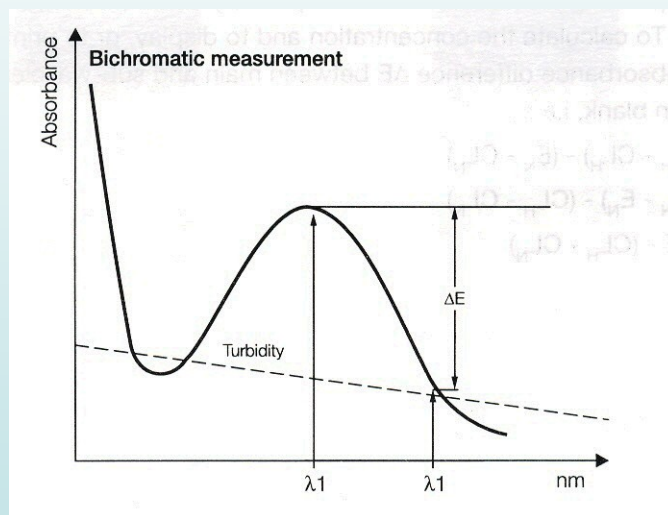
takto:

- Manuální vkládání jednotlivých parametrů  
(ustupuje, možnost chyby)
- Kompletní aplikace od výrobce – instalace z diskety, čárovým kódem nebo přes web, možnost úpravy pouze u některých parametrů

# 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

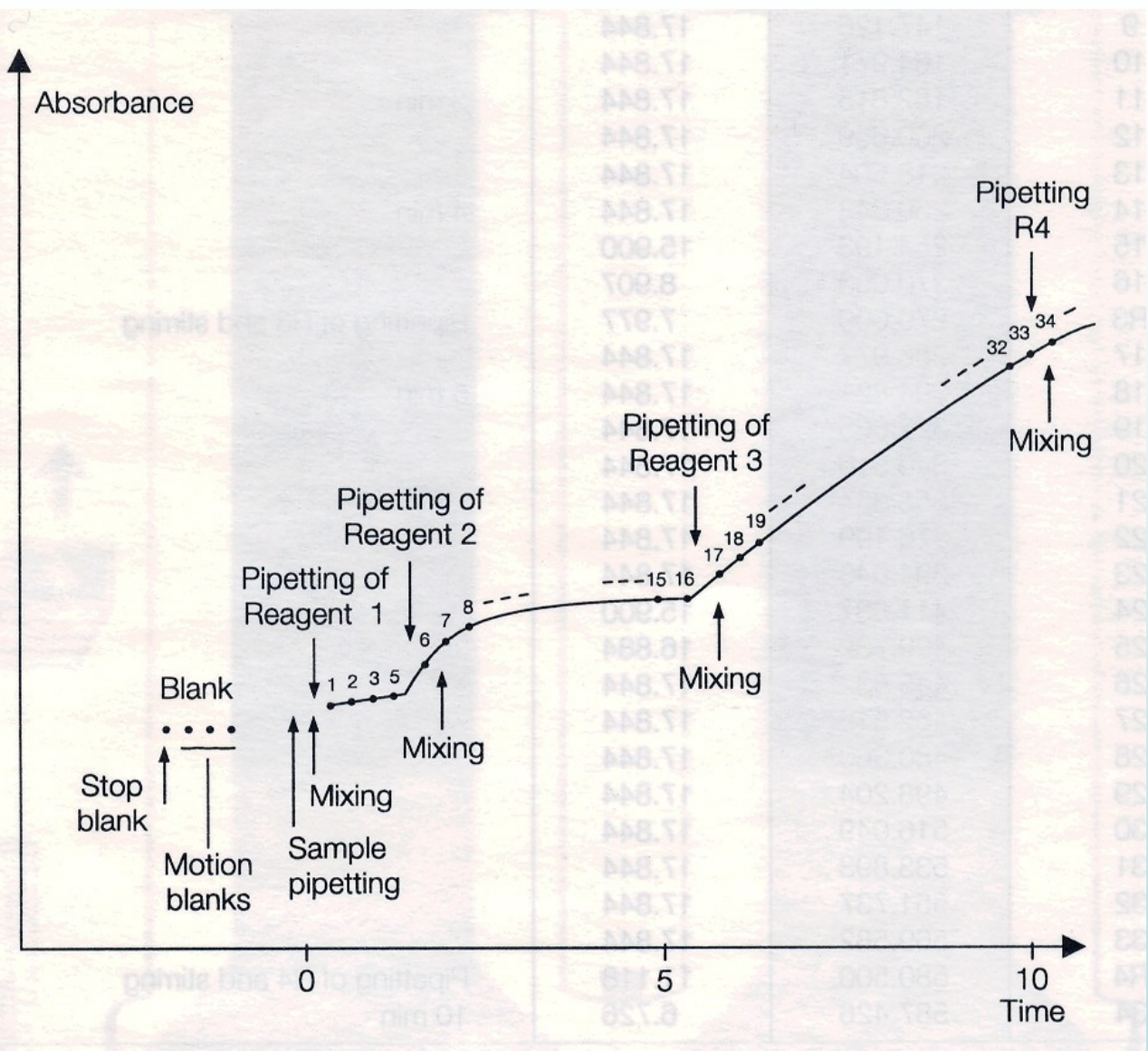
Vedlejší vlnová délka je zvolena tak, aby

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

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

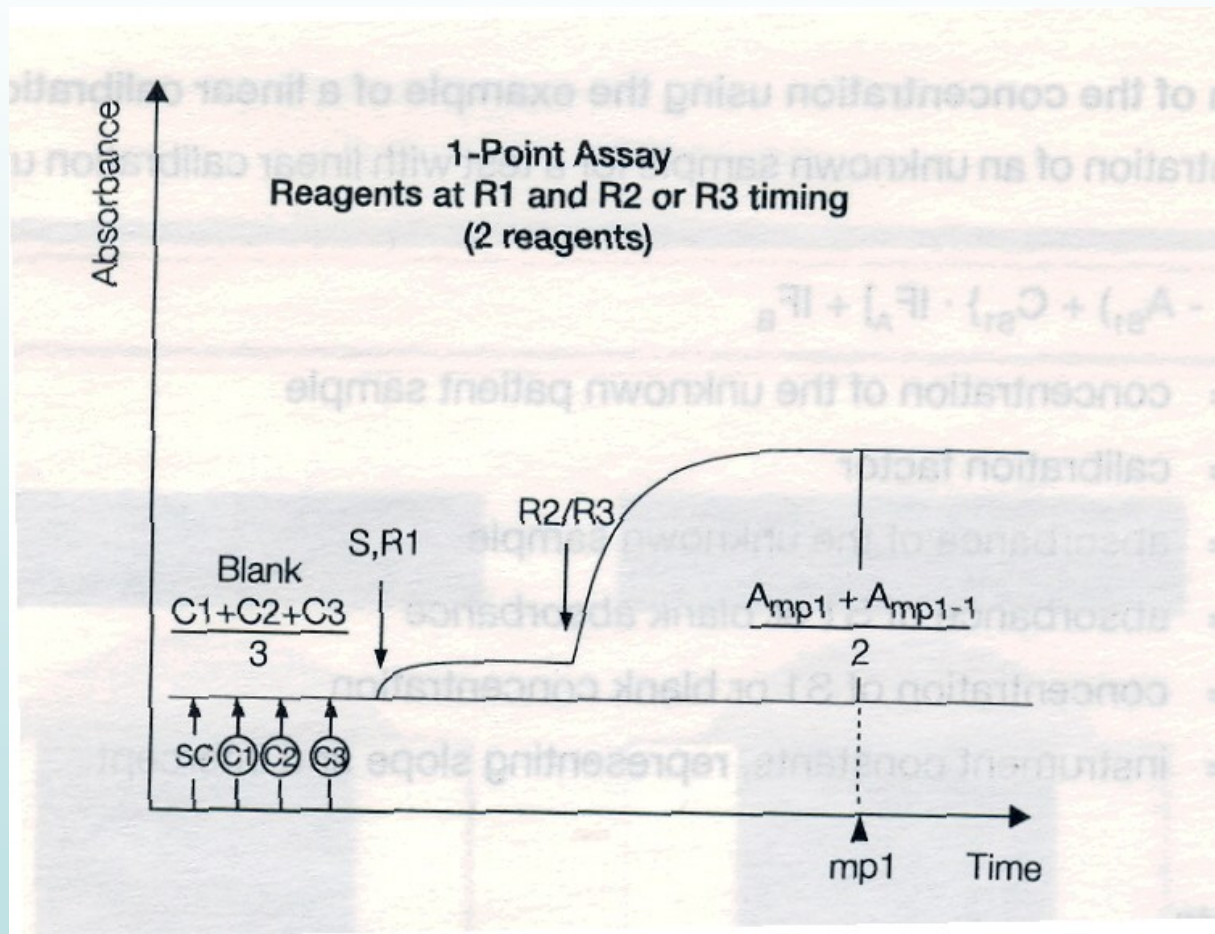
## Měřící body reakce:

- Absorbance reakčních roztoků v kyvetě je periodicky měřena po každém cyklu přístroje (kolem 20s) během reakčního času ( 3 – 10 minut)
- Přístroje jsou schopny přidávat vzorky a činidla v určité fázi reakčního času dle typu prováděného měření
- Přesná specifikace měřícím bodem



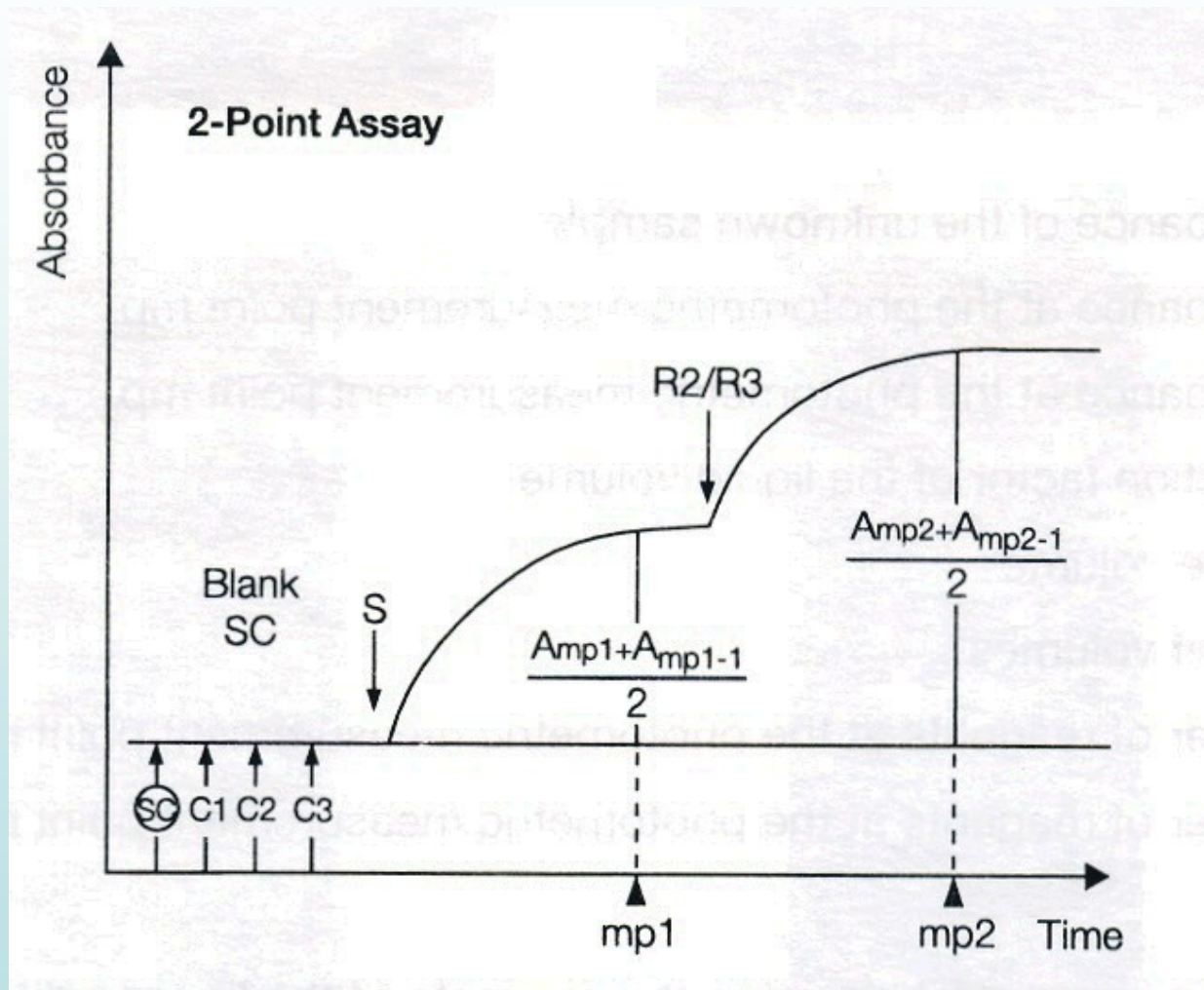
# Typy měření:

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





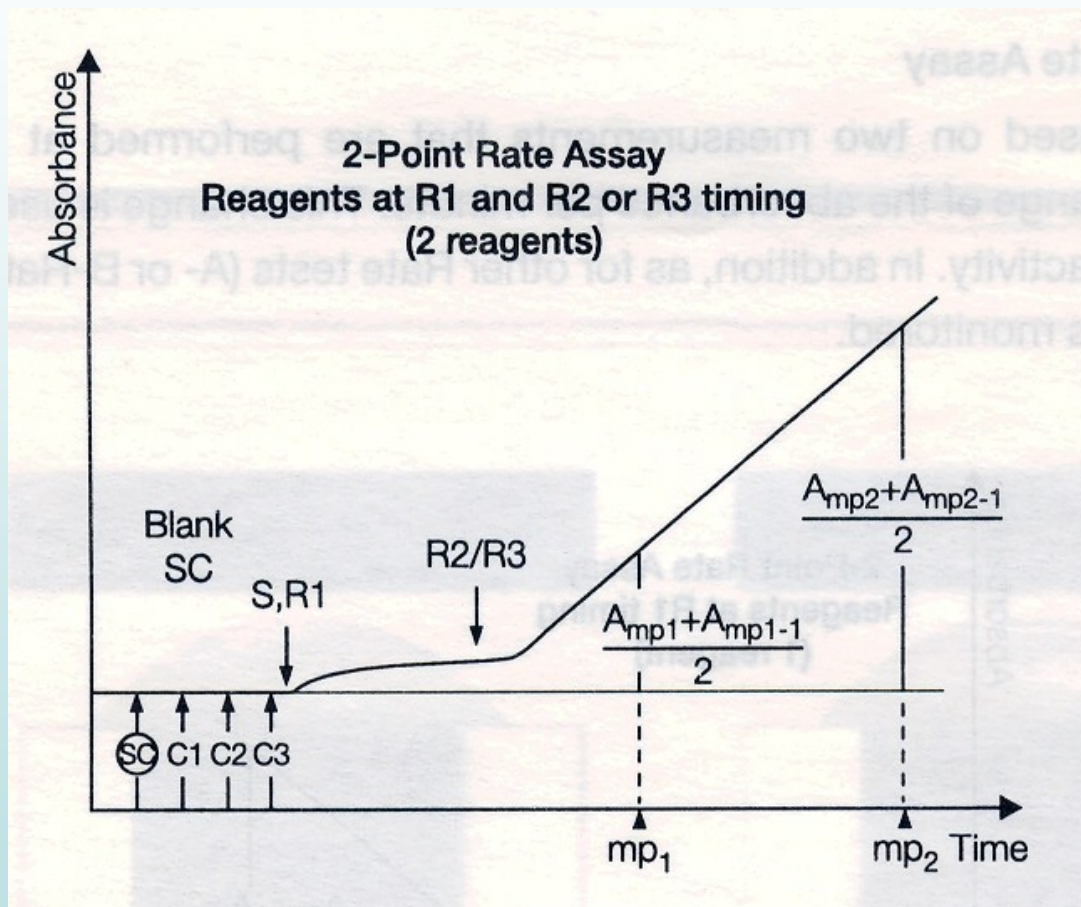
# End point - dvojbodové (blank + konec reakce)



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)



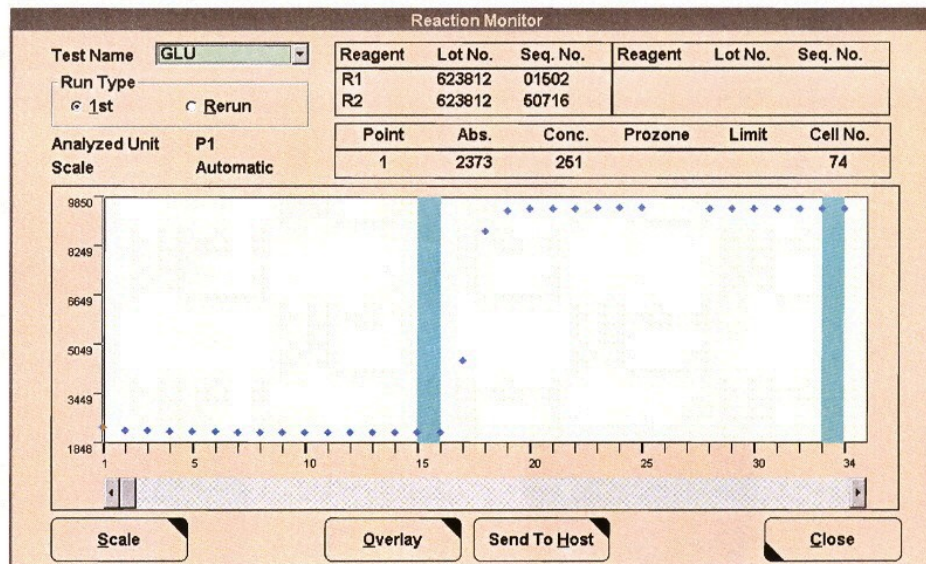


Figure G-88    Reaction Monitor window (P module)



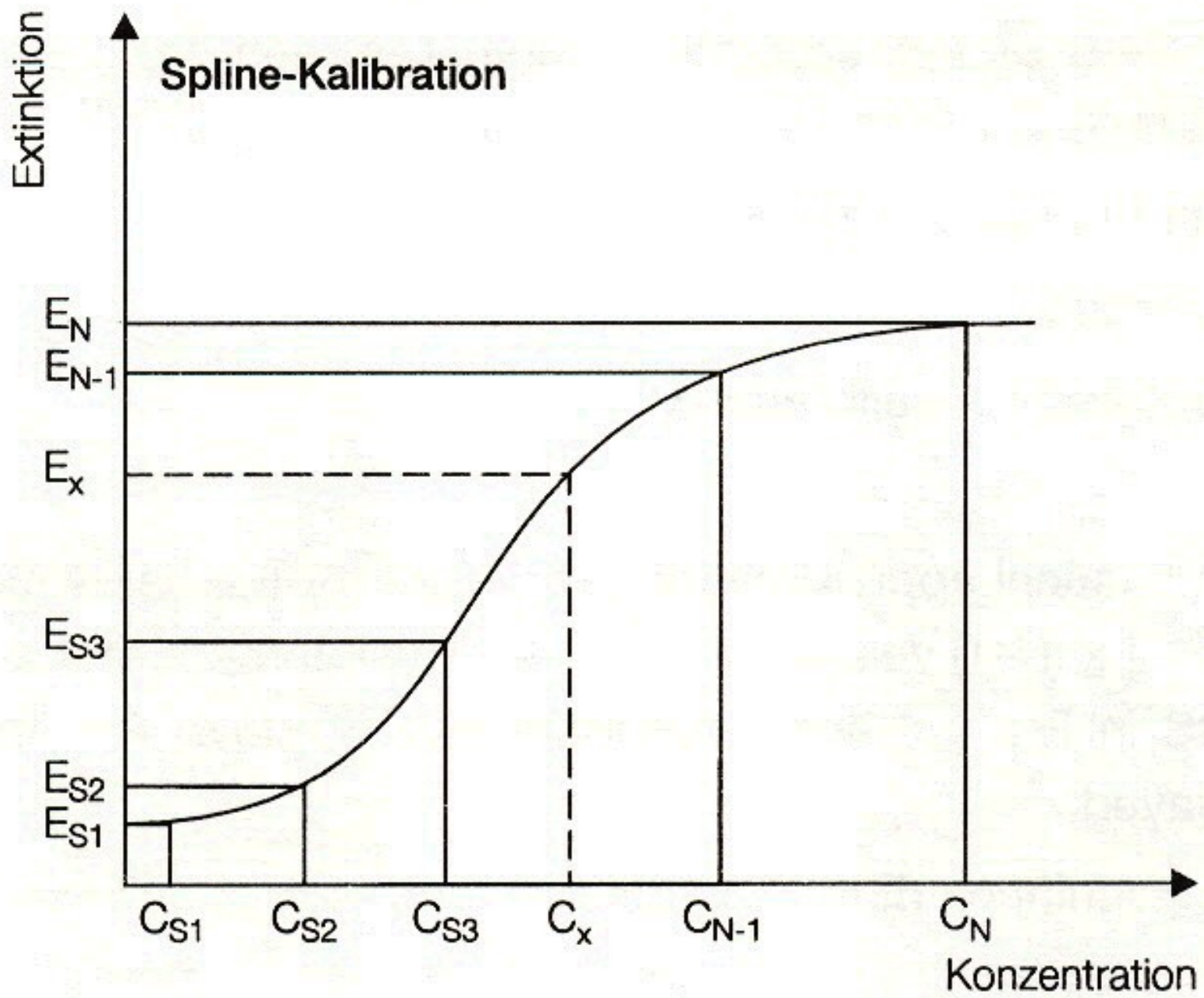
Figure G-89    Reaction Monitor window (D module)

# Způsoby kalibrace:

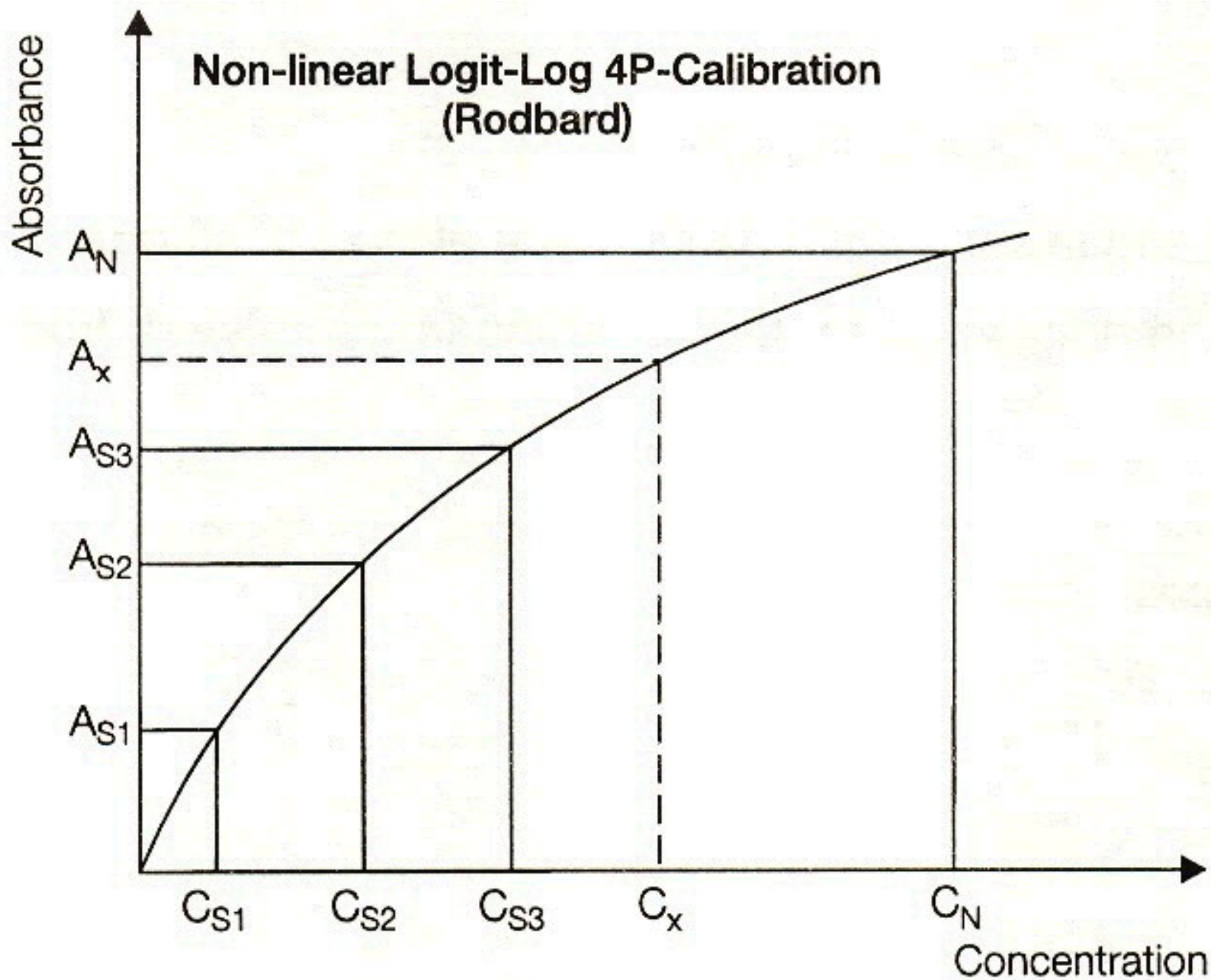
## **Automatické analyzátory umožňují např. tyto typy kalibrace:**

- Lineární dvoubodovou – pro fotometrické metody
- Nelineární Logit-log 3P
- Nelineární Logit-log 4P
- Nelineární Logit-log 5P – pro turbidim. a imunoturb.m.
- Nelineární exponenciální
- Nelineární Spline
- Isoenzym P
- Isoenzym Q
- Nelineární Point to Point
- ISE (tříbodová)





# Non-linear Logit-Log 4P-Calibration (Rodbard)





Workplace

Reagent

Calibration

QC

Utility

System

Maintenance

Application

Calc. Test

Special Wash

Report Format

Module Set

Test	
	D Ser/PI
3	CHOL P Ser/PI
4	GLU P Ser/PI
	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

Analyze

Calib.

Range

Others

Calibration Type

Point

Span

Weight

Update Type

Isozyme Q Channel

Auto Calibration

Timeout

Blank

Span

2 Point

Full

SD Limit

Duplicate Limit  %  Abs.

Sensitivity Limit

S1 Abs. Limit

Auto Masking

Changeover

Module

Lot

Bottle

Save

Delete

Read Barsheet

Help

Select the test from the list box.



Stop

Logoff

S. Stop

Alarm

Print

Start

NUM

Figure G-286 Calib sub-screen (Photometric Test)



Touch the Status tab on the Calibration screen to display the Status screen.

Host Core ISE D1 P1 E1 Stand By admin 02/01/28 (Mon) 22 30

Workplace Reagent Calibration QC Utility

Status Calibrator Install

Module: All Remaining Time: 20

Module	Dt	Test	Calib. method	Cause
D1	P1	ALT	2 Point	Timeout
D1	E1	LDH		
D1	ISE	AST		
D1	4	UREA		
D1	5	GLU		
P1	1-1	CHOL	Blank	Calib Now
P1	1-2	GLU	2 Point	Timeout
P1	1-3	GLU	2 Point	Calib Now
P1	1-5	CHOL	Blank	Calib Now
P1	1-6	GLU	2 Point	Calib Now
P1	1-7	S.I.		
P1	1-8	OPI3Q		
P1	1-9	LDH	2 Point	Timeout
P1	1-12	MG	2 Point	Timeout

Method

Blank

2 Point

Full

Span

Start Up

S. Stop

Alarm

Print

Reject Release

Calib Trace Calibration Result Reaction Monitor Instrument Factor Start Up Setting Save

Help Select the module from the list box.

NUM

Figure G-92 Status screen



Workplace

Reagent

Calibration

QC

Utility

System

Maintenance

Application

Calc. Test

Special Wash

Report Format

Module Set

Test

- D Ser/PI
- 3 CHOL P Ser/PI
- 4 GLU P Ser/PI
- 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

Analyze

Callb.

Range

Others

Standards

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Calibrator Code	501	401	0	0	0	0
Concentration	0.0	470				
Rack No. - Pos.	S0002-1	S0002-2				
Sample Volume	5.0	5.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Diluted S. Volume	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Diluent Volume	0	0	0	0	0	0

Save

Delete

Read Barsheet

? Help

Select the test from the list box.

Stop

Logoff

S. Stop

Alarm

Print

Start

Figure G-288 Others sub-screen



Calibration Result (Photometry)

Calibration Type

Linear

Reagent

R1

Lot No.

624528

Seq. No.

34560

Position

1-1

Test	Module	S1 Abs.	K	A	B	C	L	H	I
ALT	D1	-2	-56477						
ALT	P1	4	-54500						
CHOL	P1	1436	5590						
CHOL	P1	1427	5547						
GLU	D1	28	323						
GLU	P1	28	325						
GLU	P1	11	329						

S1 Abs.

K

1436

5590

Cancel

Working  
Information

Update

OK

Figure G-269 Calibration Result (Photometry) window

# 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**

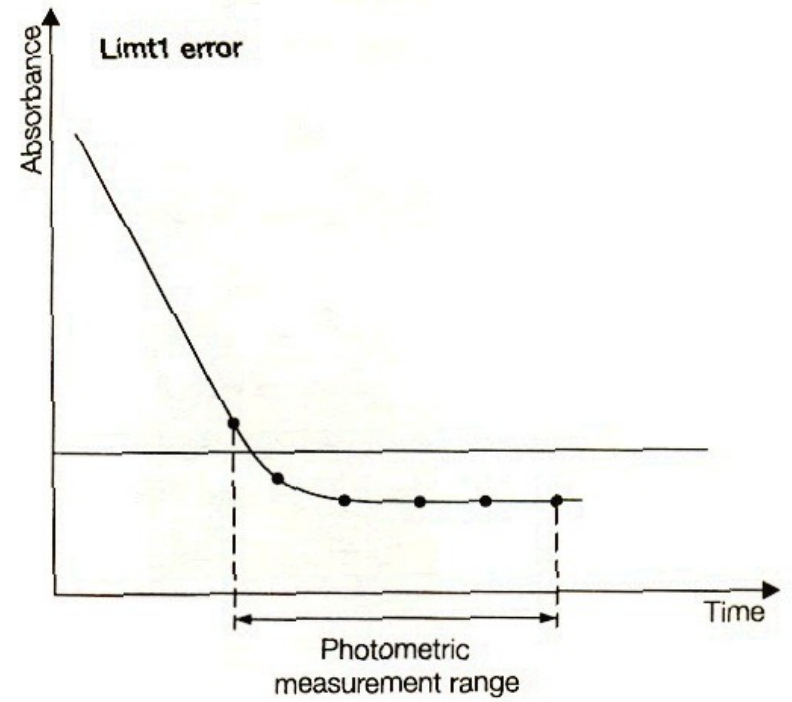
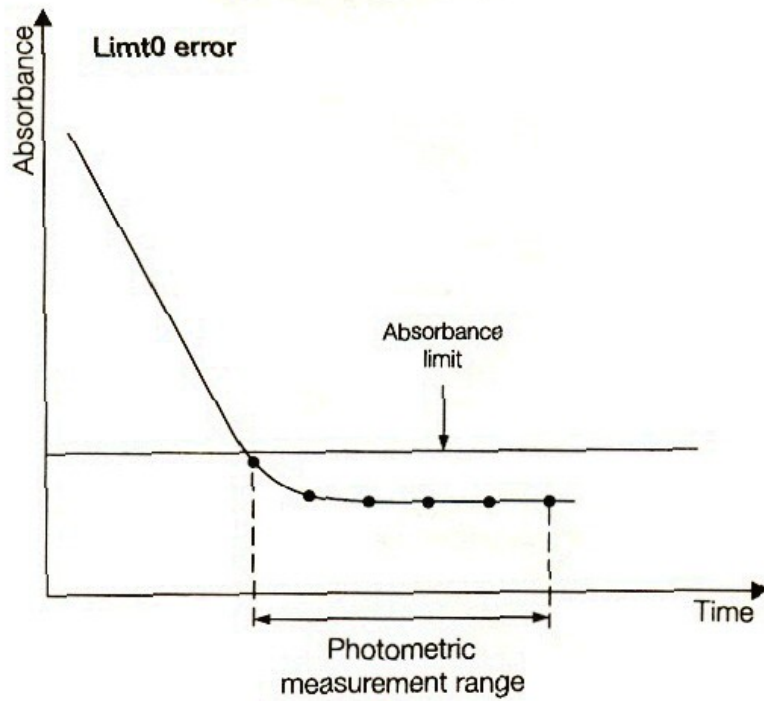
- Je prováděn automaticky u všech kinetických metod
- Linearita je kontrolována pomocí lineární regresní analýzy. Není-li splněna, vzorek je označen chybovým hlášením (př. Lin.)

## **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

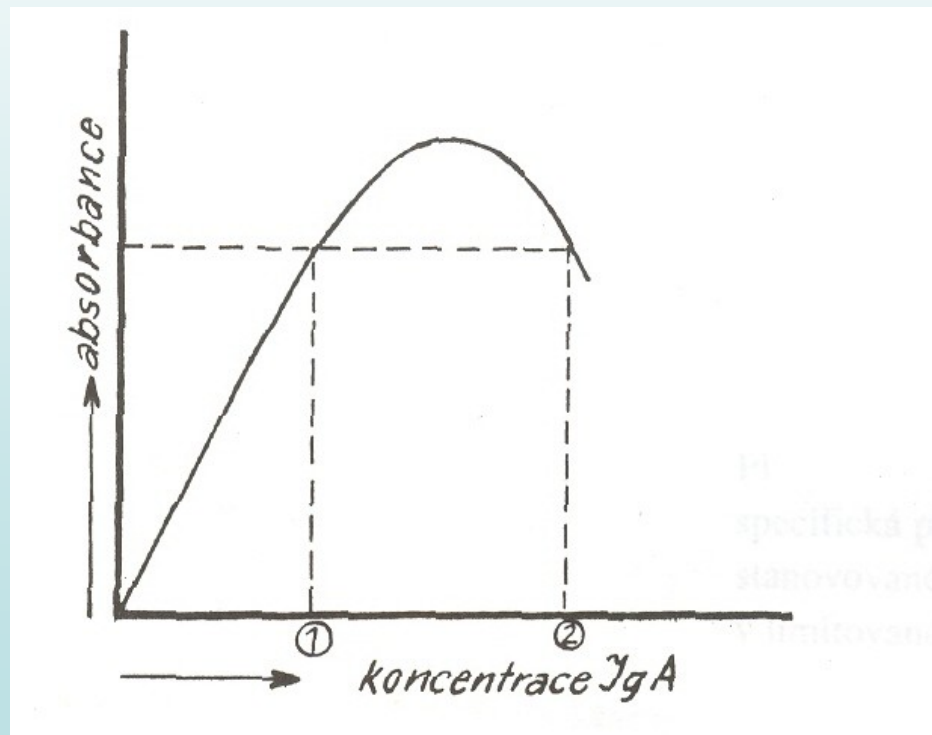
Print

Start

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

# Test detekující Hook efekt

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





# Test detekující Hook efekt

- Objevuje se u imunoturbidimetrických stanovení
- Koncentrace ve vzorku vysoká
- Leží na pravé straně Heidelbergovi 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)
- Vyjíměčně – zpravidla stačí pracovní rozsah metody

# Vybrané charakteristiky automatických analyzátorů

## Minimální reakční objem:

- významná charakteristika analyzátoru
- Odvíjí se od něj cena za analýzu jednoho testu (100 – 180 ul - pro R1 činidlo)
- Některé stroje reagentie předředují. Pracují pak s menším objemem a minimálními náklady (Avia 1650, Siemens)

## Minimální pipetovací objem – 2 ul:

- Minimální objem se týká vzorku, kontrolních a kalibračních materiálů
- Reagentie jsou pipetovány proti vzorku většinou minimálně v desetinasobném nadbytku
- Při potřebě provést analýzu z menšího objemu vzorku (ředění) se vzorek předředí

# 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
- Jednoreagenční metody jsou označovány jako „Sample start“ a dvoureagenční jako „Substrate start“

**Technický limit** – výsledky, které leží mimo technický limit jsou označeny chybovým hlášením a nesmí být vydány dokud nejsou zopakovány - nejčastěji po naředění

**Repeat limit** – výsledky jsou technicky správně, jsou pouze mimo limit zvolený laboratoří pro opakování

Host: CoreISE D1 P1 E1 Stand By admin 02/01/29 (Tue) 21 48

Workplace Reagent Calibration QC Utility

System Maintenance Application Calc. Test Special Wash Report Format Module Set

Test Analyze Callb. Range Others

Test	Application Code	Unit	Report Name	Data Mode	Technical Limit	Repeat Limit	Control Interval Time	Qualitative	Expected Values
3 CHOL P Ser/PI	672	U/L	Test05	Active	0	999999	1	(1) 0 --	Male: 99 Year -99999 999999
4 GLU P Ser/PI								(2) 0 -	Female: 99 Year -99999 999999
5 LDH P Ser/PI								(3) 0 +-	100 Year -99999 999999
6 MG P Ser/PI								(4) 0 ++	-99999 999999
7 S.I. P Ser/PI								(5) 0 +++	
8 TG P Ser/PI								(6) 0 ++++	
9 UREA P Ser/PI									
10 OP3Q P Urine									
11 IGG P Ser/PI									
12 ALB P Ser/PI									

Default Sex: Male Female Range: Range 1 Range 2 Range 3

Save Delete Read Barsheet

? Help Select the correct units from the list box.

NUM

Figure G-287 Range sub-screen

# Příklady parametrů používaných u automatické analýzy:

## Analyzátor na klinickou chemii:

- Minimální reakční objem: 180  $\mu$ l
- Objem vzorku: 2 – 35  $\mu$ 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

## Sérové indexy

- Stupeň potenciální interference způsobené bilirubinem, hemoglobinem nebo lipémií lze stanovit - tzv. sérové indexy
- Test je založen na měření nařaděných vzorků při různých vlnových délkách

# Sérové indexy

