Miroslava Beňovská

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 reagencií (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 linearity 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 pomocí čárového kódu nebo přes web, možnost úpravy pouze u některých parametrů**

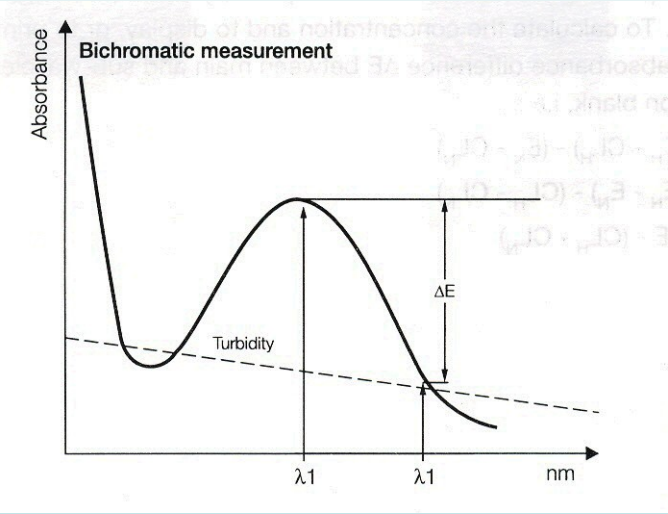
- **Manuální vkládání jednotlivých parametrů**

  (ustupuje, možnost chyby)

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 částečky v cestě světla**

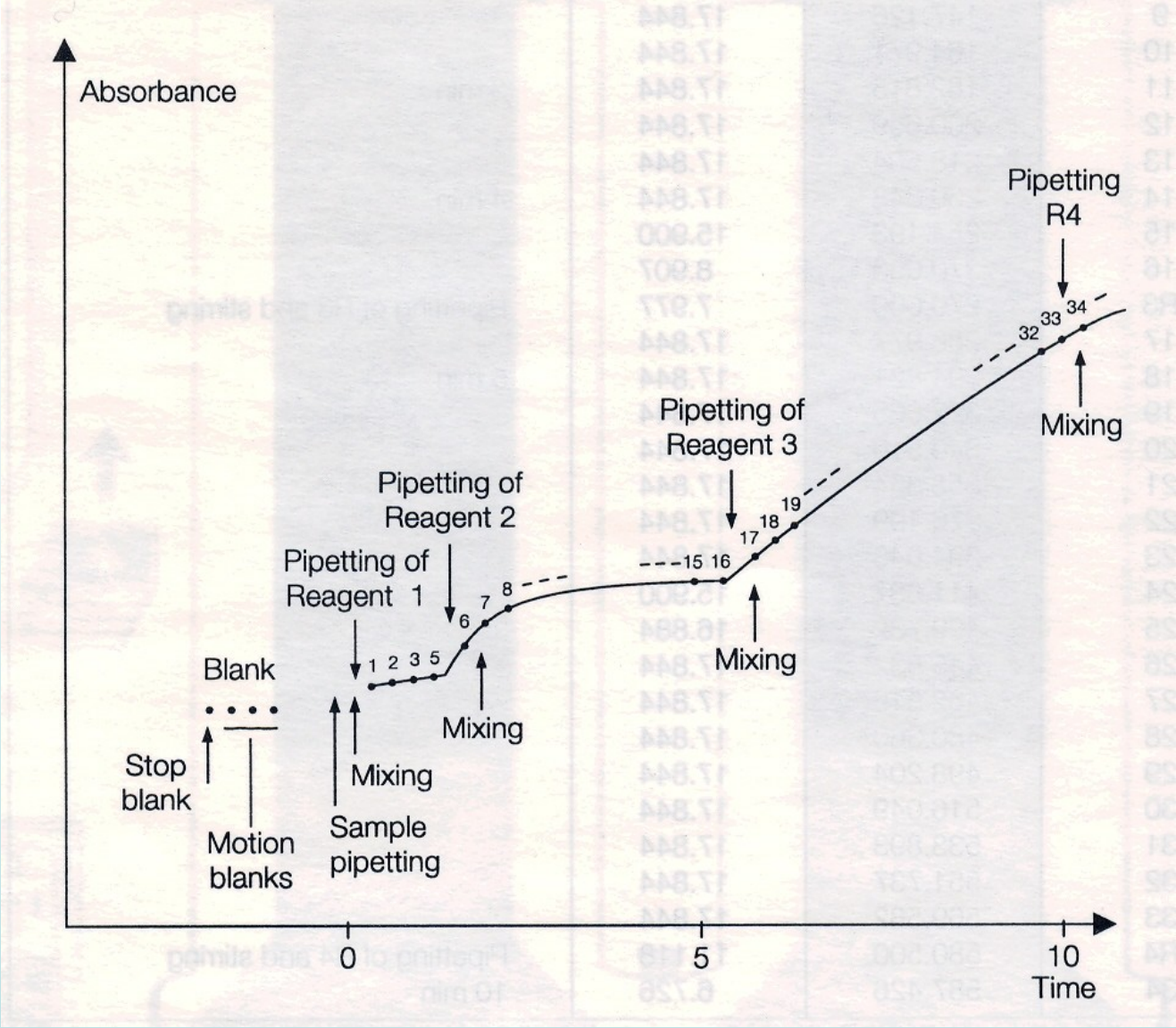
Hlavní vlnová délka je dána absorpčním maximem reakce
Vedlejší vlnová délka je zvolena tak, aby

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

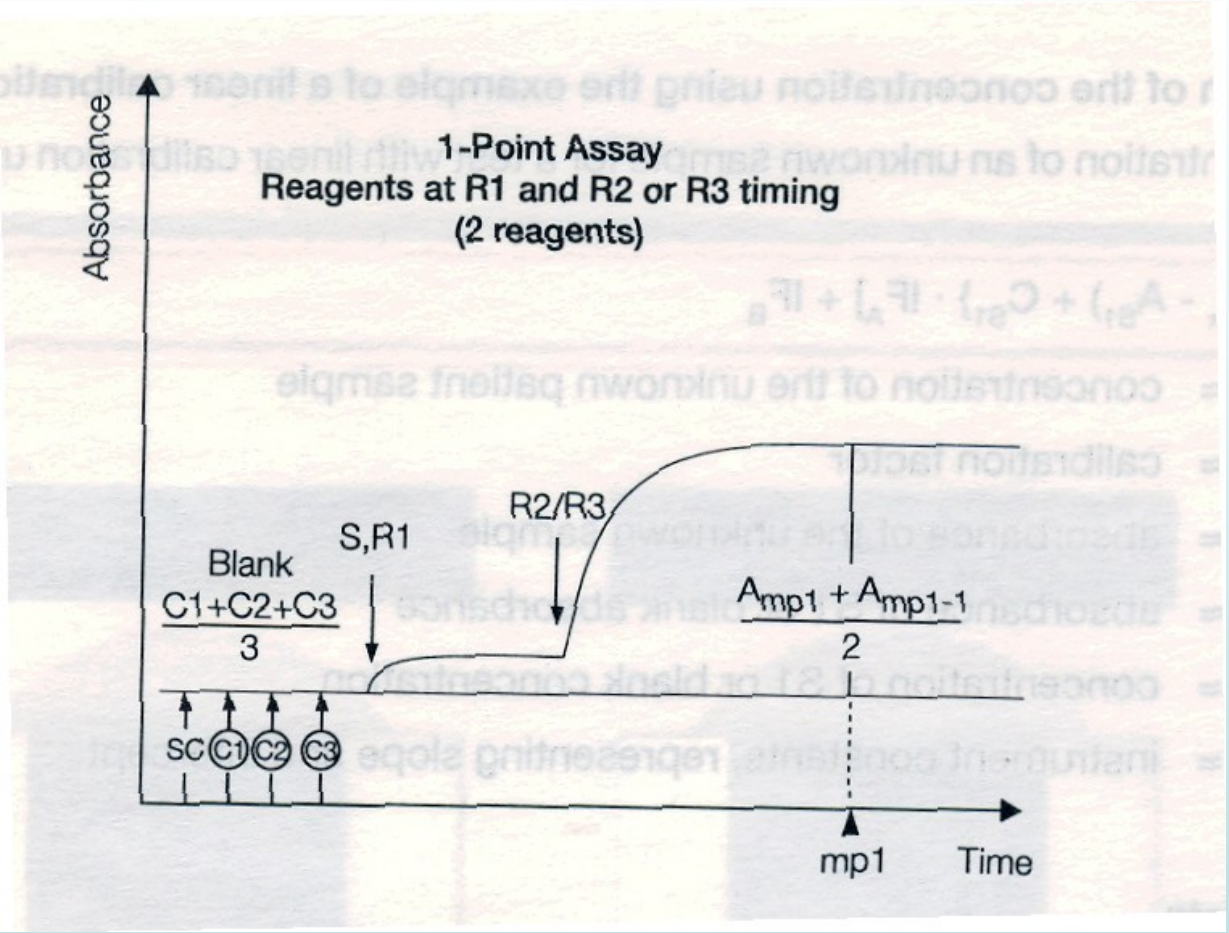
Měřící body reakce

- **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**

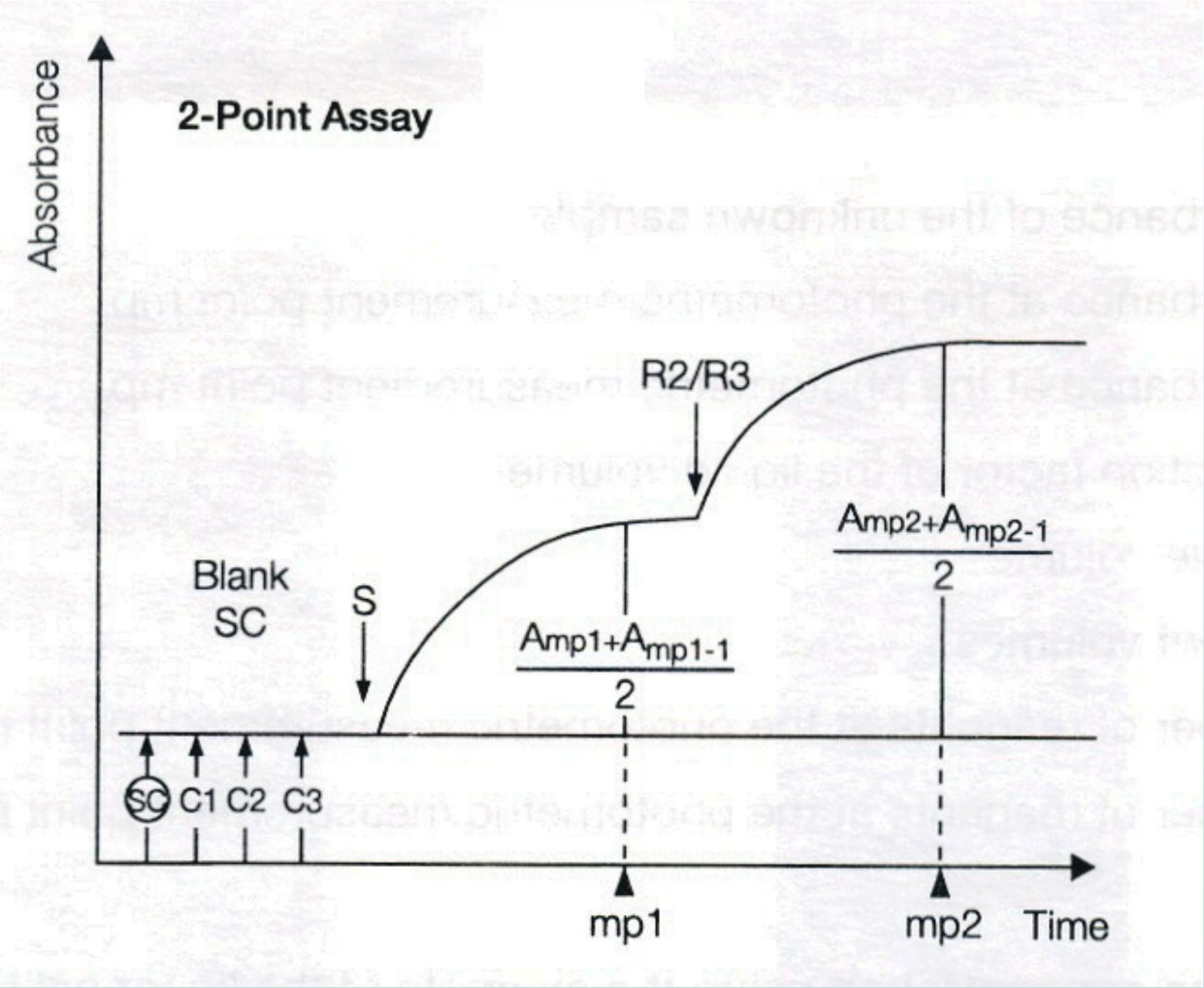

Absorbance
Pipetting
R4
32
33
34
Mixing
Pipetting of
Reagent 3
19
18
17
15 16
Mixing
Pipetting of
Reagent 2
Pipetting of
Reagent 1
6
7
8
1 2 3 5
Blank
Mixing
Stop
blank
Mixing
Sample
pipetting
Motion
blanks
0
5
10
Time

Typy měření:

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



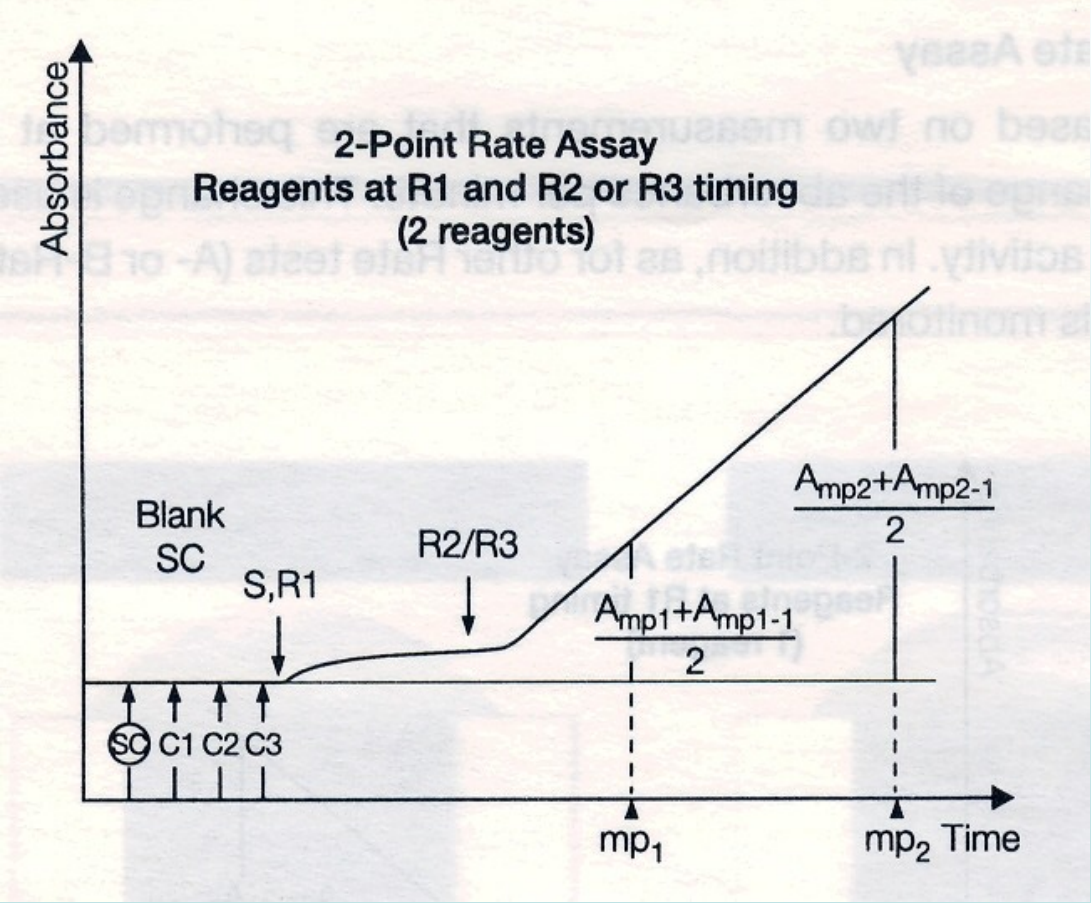
End point - dvojbodové (blank + konec reakce)



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)



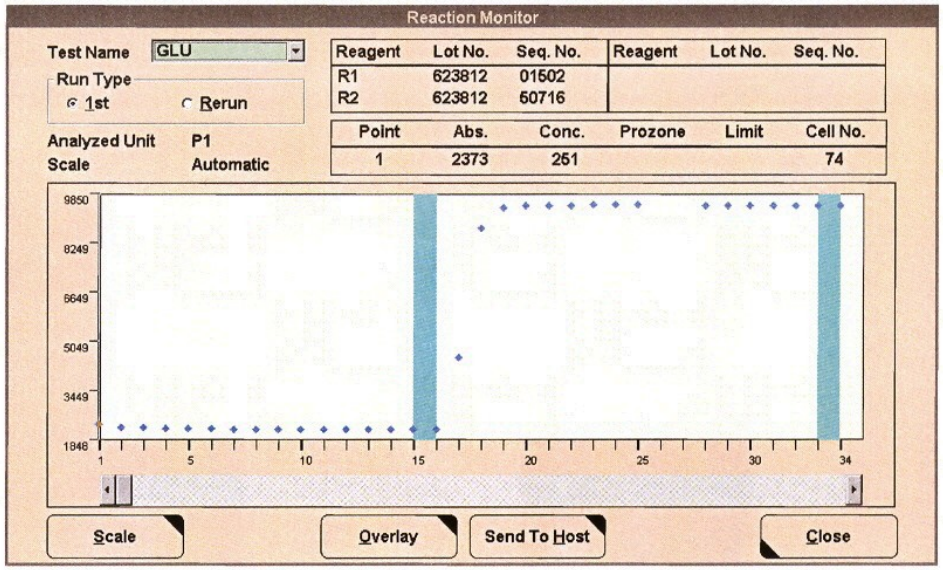


Figure G-88 Reaction Monitor window (P module)

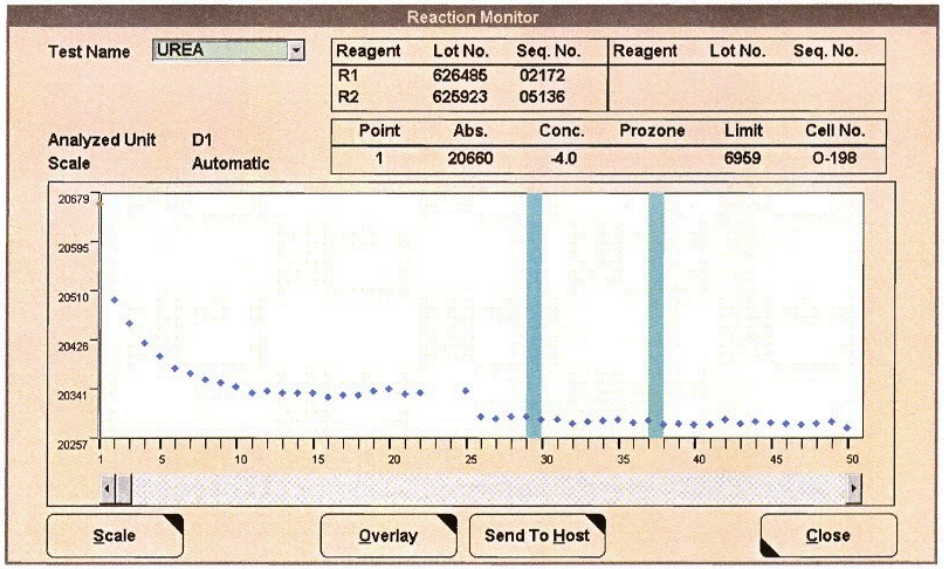
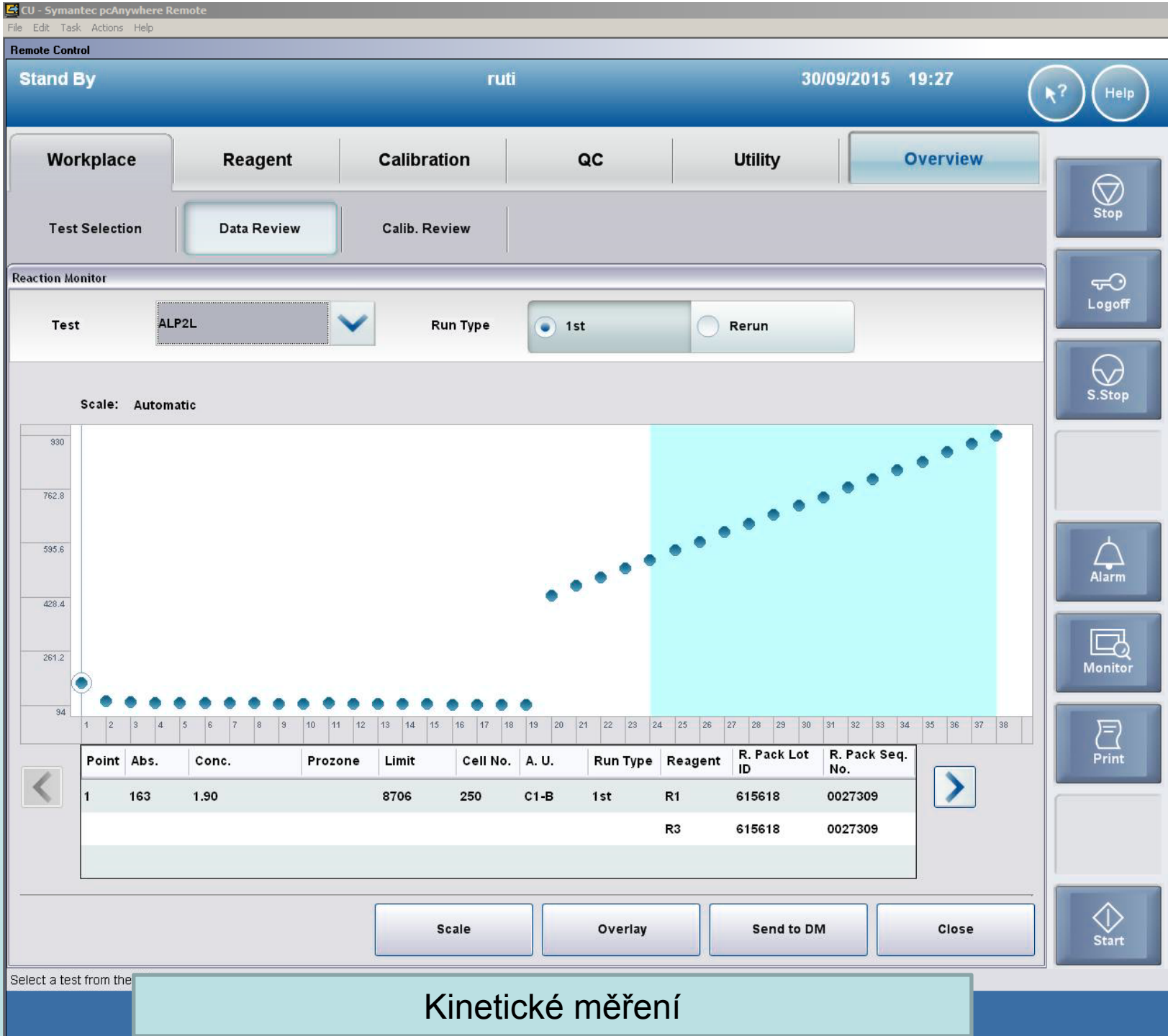


Figure G-89 Reaction Monitor window (D module)



Kinetické měření

Způsoby kalibrace

Automatické analyzátory umožňují např. tyto typy kalibrace:

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

  Příklady: Logit-log 4P
  Logit-log 5P
  RCM2T2 exponenciální funkce
- ISE (tříbodová)

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

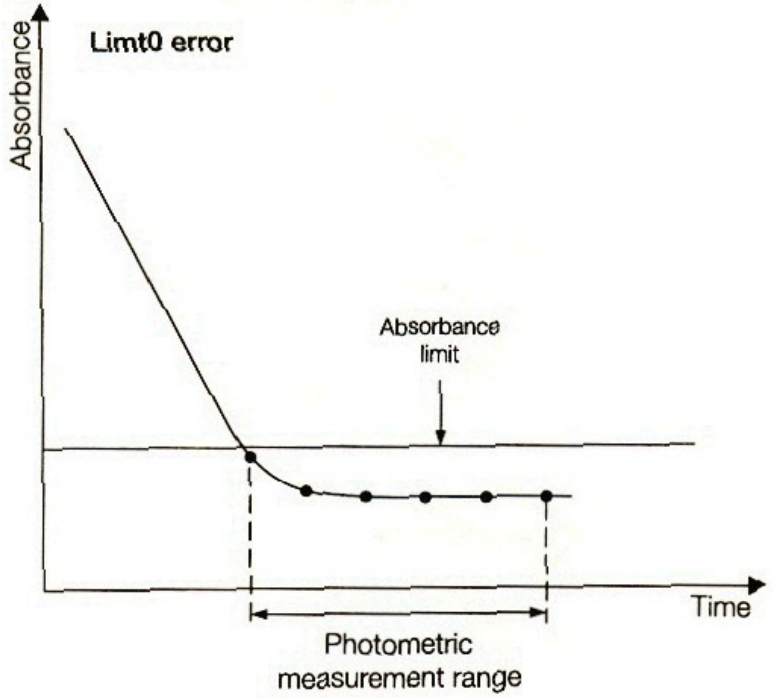
- Je prováděn automaticky u všech kinetických metod
- Linearita je kontrolována pomocí lineární regresní analýzy. Není-li splněna, vzorek je označen chybovým hlášením (př. Lin.)

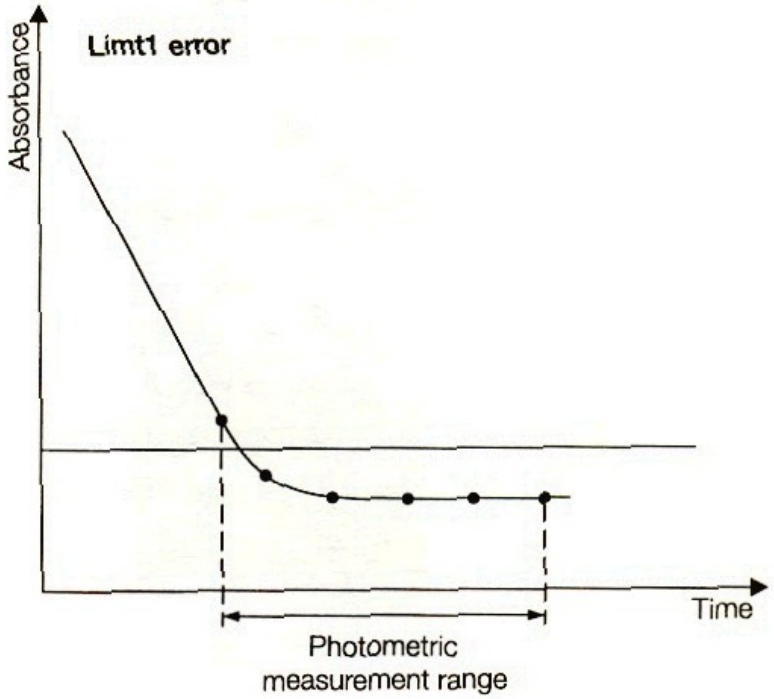
Test na dodržení absorbančního limitu

- 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


Limt0 error
Absorbance
Absorbance limit
Time
Photometric measurement range


Limt1 error
Absorbance
Time
Photometric measurement range

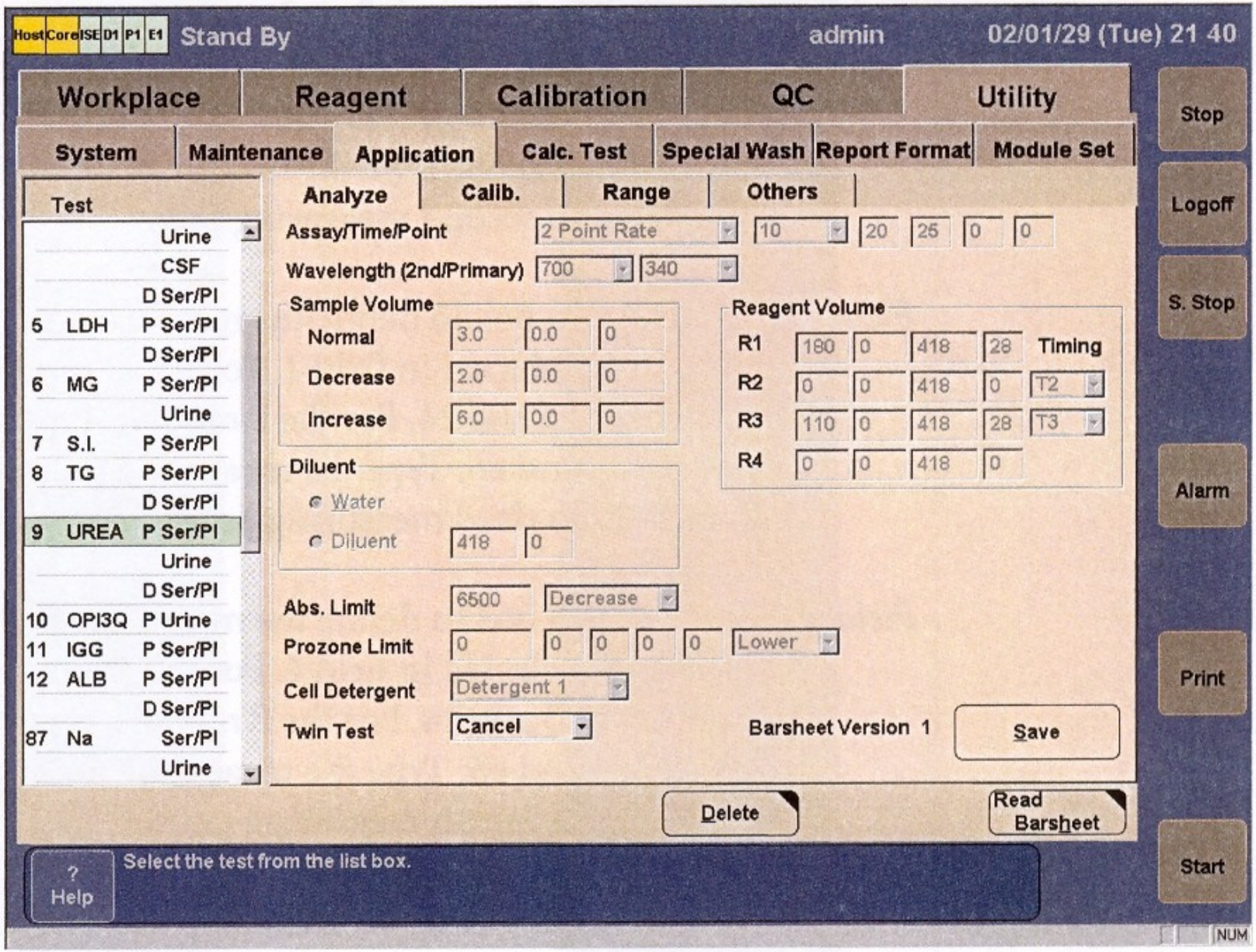


Figure G-284 Analyze sub-screen (Photometric Tests)

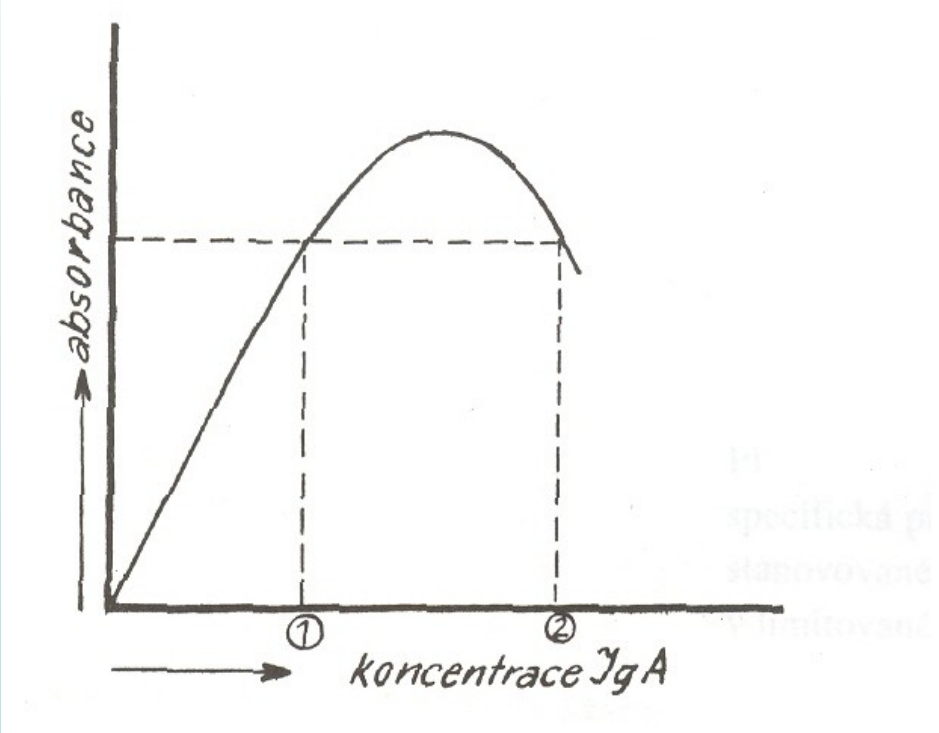
Test detekující Hook efekt

- Objevuje se u imunoturbidimetrických stanovení
- Koncentrace 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 směrnicí 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)

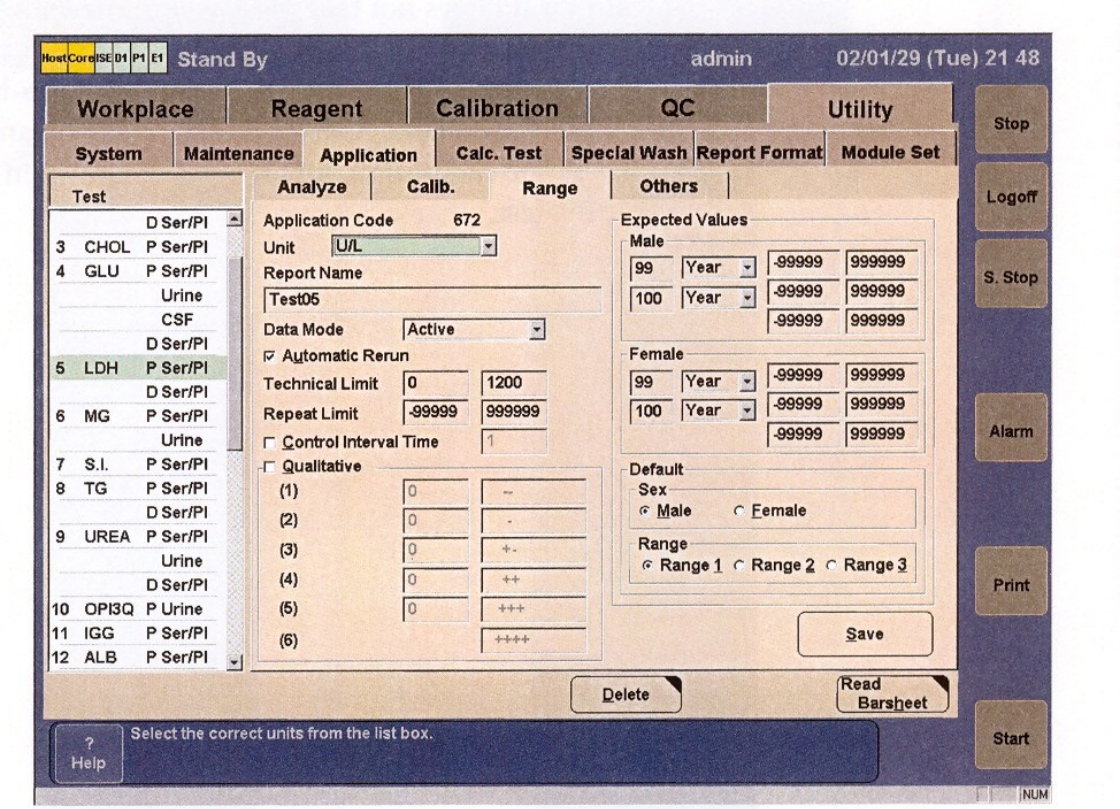


Figure G-287 Range sub-screen

Detekční limit

- **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 asi100 ul - šetrné k životnímu prostředí
- Některé stroje reagencie předřeďují. Pracují pak s menším objemem (Avia 1650, Siemens)

Minimální pipetovací objem – 1 ul:

- 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 ul se vzorek předředí

Příklady parametrů používaných u automatické analýzy

Analyzátor na klinickou chemii:

- **Minimální reakční objem: 180 µl**
- **Objem vzorku: 2 – 35 µl**
- **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 µl**
- **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