

Biochemické analyzátory

Biochemické analyzátory vstoupily do klinické laboratorní praxe v 70. letech minulého století jako pokračování procesu mechanizace laboratorních činností. Prvky mechanizace představovaly použití pístových pipet a pístoventilových dávkovačů k odměřování biologického materiálu a dávkování reagensů, nalévací nebo průtokové kyvety fotometrů a různý stupeň matematického zpracování změřeného signálu (absorbance) kalibrátorů a vzorků s tiskem výsledné koncentrace změřeného analytu. V současné době, vedle biochemických analyzátorů využívaných v rutinním provozu klinicko-biochemické laboratoře, se používají také přenosné stolní analyzátory různých typů. Slouží pro rychlá, stanovení v malých laboratorních provozech, v ordinacích praktických lékařů, specialistů, případně přímo u lůžka pacienta. Poslední jmenované uplatnění představuje značně obsáhlý, různorodý a stále se rozvíjející systém POCT (Point of care testing). Specifickým rysem POCT analyzátorů je jejich jednoduchý způsob obsluhy, vysoce rozvinutý systém autodiagnostiky s minimálním požadavkem na kalibraci, kontrolu a údržbu ze strany laboratorně neškoleného zdravotnického personálu. Obvyklým řešením je tzv. kazetový systém (cartridge), kdy vložená kazeta obsahuje všechny potřebné reagensie, kalibrační a kontrolní materiály, případně další potřebné jednorázové součásti jako např. měřicí elektrody. POCT analyzátory podléhají tzv. supervizní činnosti laboratorních pracovníků. Ta je usnadněna jejich on-line zapojením do nemocničních sítí, což umožňuje dálkovou správu, monitorování jejich funkce, vyhodnocování automaticky prováděných kontrolních analýz a přenos naměřených dat do laboratorních a nemocničních informačních systémů. Cenou za rychlou dostupnost a jednoduchou obsluhu jsou výrazně vyšší finanční náklady ve srovnání s klasickým laboratorním vyšetřením.

Automatické analyzátory

Automatické analyzátory byly schopny, bez zásahu obsluhy, provádět jednotlivé kroky biochemické analýzy podle předem naprogramovaného algoritmu. Jednalo se o transport analytického vzorku, pipetování, dávkování reagensů, promíchání, inkubaci, měření změn absorbance, výpočet koncentrace za použití kalibračních standardů, zobrazení a tisk výsledku biochemické analýzy, případně jeho přenesení v elektronické podobě do laboratorního informačního systému. Vedle základního spektrofotometrického principu měření změn absorbance využívají analyzátory mnohé další měřicí principy, jako imunoturbidimetrii, chemiluminiscenci, enzymoimunoanalýzu na mikročásticích, fluorescenční polarizační imunoanalýzu apod. Standardní součástí biochemických automatických analyzátorů je modul s iontově selektivními elektrodami (ISE) na stanovení Na^+ , K^+ a Cl^- .

Hlavní součásti automatického analyzátoru:

1. transportní systém dopravující vzorky ve stojáncích k sérovému pipetoru,
2. rotor v chlazeném prostoru pro kalibrátory, kontroly a statimové vzorky,
3. rotor s reakčními kyvetami uložený ve vodní lázni temperované na 37 °C,
4. reagensie (R1, R2) v nádobkách značených čárovým kódem; chlazený prostor je za provozu uzavřen víkem,
5. sérový pipetor,
6. reagenční pipetor – dávkovač,
7. rotační míchadlo,
8. mycí stanice reakčních kyvet.



Pohled na pracovní plochu analyzátoru.

Současné automatické biochemické analyzátory patří do generace selektivních random access analyzátorů, které umožňují u jednoho vzorku volný výběr z desítek metod. Rozdílný je hodinový výkon různých typů analyzátorů. Hodnoty se pohybují od 100 do několika tisíc analýz za hodinu. Pro výkon je důležitý tzv. **takt analyzátoru**, tj. čas v sekundách, po kterém se pravidelně pozastavuje reakční kyvetor a umožňuje tak pipetovat další vzorek. Při taktu 4 s je to 15 testů za minutu a 900 testů za hodinu. Pravidelnou funkcí analyzátorů je možnost přednostního provedení analýz v tzv. **statimovém vzorku**. Časová odezva na tyto vzorky se počítá v minutách. Popsané úkony jsou různými výrobci řešeny různě, někdy unikátně za použití patentovaných postupů. S vědomím určitého zjednodušení se v dalším textu omezíme na popis příkladu standardního řešení.

Součásti analyzátoru

Transportní systém dopravuje analytické vzorky ze vstupu analyzátoru do pracovního prostoru pipetoru a po napipetování na výstup z analyzátoru. Nejčastěji je zajištěn posunem stojánek se vzorky lineárním nebo otáčivým pohybem. Na vstupu analyzátoru je umístěna laserová čtečka čárových kódů. Čárový kód jednoznačně identifikuje vzorek pro spojení s údaji pacienta v laboratorním informačním systému a současně informuje analyzátor o typu analyzovaného materiálu (sérum, plazma, moč, likvor aj.).

Pipetor zajišťuje pipetování vzorku do reakční kyvety. Pipetovací jehla je vyrobena z inertního materiálu a je opatřena hladinovým senzorem (vodivostní, kapacitní, radiofrekvenční systém), který při kontaktu jehly s povrchem vzorku zastaví vertikální pohyb pipetoru a nasátí vzorku se tak uskuteční těsně pod hladinou. Pipetovací objemy se pohybují v rozsahu 2–20 µl. Aby se zabránilo kontaminaci, přenosu (carry over), je pipetovací jehla při přechodu na

další vzorek zevně i vnitřně omyta v mycí stanici. Tam, kde se měří velmi nízké koncentrace, měřený analyt se vyskytuje v širokém koncentračním rozmezí a je tak velké nebezpečí kontaminace s falešně pozitivním výsledkem, používají analyzátory pipetovací špičky, které se automaticky mění při přechodu na další vzorek.

Dávkače reagentů pracují na stejném principu včetně hladinových senzorů a mycí stanice k zabránění vzájemné kontaminace reagentů. Dávkané objemy jsou programovatelné v rozsahu odpovídajícím objemu reakční kyvety, např. 20–300 µl. Přesné odměřování objemu vzorku a dávkování reagentů zajišťují pístové dávkače, které jsou s koncovými pipetory spojeny hadičkami. Objemové změny při pohybu teflonových pístů se přenášejí na koncové jehly pipetorů.

Reakční kyvety se liší podle použitého materiálu, tvaru, objemu a způsobu použití buď jako jednorázové, které se po použití odstraní do odpadu, nebo opakovaně používané po automatickém vymytí. Základním požadavkem je propustnost materiálu kyvet pro UV záření, což splňují syntetické materiály a křemenné sklo. Postupná miniaturizace vede ke kyvetám o obsahu menším než 100 µl.

Inkubační lázeň je prostředí, ve kterém jsou umístěny reakční kyvety. Inkubační teplota, důležitá především pro stanovení katalytické koncentrace enzymů, je udržována na 37 °C s přesností $\pm 0,1$ °C. Homogenní teplotní prostředí zajišťuje v inkubační lázni cirkulující voda, olej nebo vzduch.

Zdroj světelného záření – monochromátor – absorpční prostředí – detektor. Jako zdroj světelného záření se většinou používá halogenová nebo xenonová výbojka, světelný paprsek spojitého spektra je po průchodu absorpčním prostředím (kyvetou) rozložen monochromátorem (optickou mřížkou) na paprsky s definovanou vlnovou délkou (monochromatické záření), které dopadají na detektor, většinou diodové pole (**diode array**). Změny absorbance reakční směsi v kyvetě jsou monitorovány (zaznamenávány) při každém průchodu kyvety paprskem optického systému.

Reagencie. Automatické biochemické analyzátory standardně umožňují použití dvou reagentů na jednu metodu (dvoustupňové metody), je možné použít i 3 až 4 reagenty. Reagenty mohou být v tekuté podobě (**liquid-ready to use**), u méně stabilních činidel se připravují před vložením do analyzátoru rozpuštěním práškové nebo tabletové formy. V analyzátoru jsou uloženy v chlazených prostorách pro zvýšení jejich stability a snížení odparu. Nádobky s reagenty jsou většinou označeny čárovým kódem, který analyzátor registruje a nezáleží tak na poloze jejich uložení v reagenčním prostoru. Před dávkováním reagenty do kyvety se příslušná nádobka nastaví do pipetovací polohy příslušného dávkače.

Míchadlo zajišťuje promíchání reakční směsi v kyvetě, například rotačním pohybem lopatky míchadla ponořeného krátce do reakční kyvety, možné je i promíchání vibracemi, ultrazvukem nebo probubláním vzduchem.

Mycí stanice odsává po skončení měření reakční směs a opakovaným propláchnutím kyvety vodou s konečným vysušením ji připraví k dalšímu použití.

Parametry-definice metod. Každá metoda má definované parametry: způsob měření (end point, kineticky), vlnové délky, objem pipetovaného vzorku a dávkaných reagentů, určení měřených bodů pro výpočet koncentrace, měření vzestupu nebo poklesu absorbance, mezní hodnoty pro opakování analýzy s větším nebo menším objemem vzorku při příliš vysoké nebo naopak příliš nízké koncentraci.

Zobrazení a přenos výsledků. Výsledky analýz jsou průběžně znázorňovány na obrazovce analyzátoru, tištěny na tiskárně analyzátoru, při on-line spojení přenášeny do laboratorního informačního systému, případně dále v elektronické formě do nemocničního informačního systému do dokumentace pacienta.

Průběh reakce. Změny absorbance reakční směsi v kyvetě jsou průběžně monitorovány a graficky zaznamenány (reakční monitor). Grafický záznam po celou dobu inkubace je důležitý zvláště u stanovení katalytické koncentrace enzymů, kdy umožňuje odhalit vyčerpání substrátu při vysoké aktivitě enzymu, nelineární, případně jinak změněný průběh reakce.

Chybová hlášení, autodiagnostika. Všechny činnosti a funkce analyzátoru jsou naprogramované v softwaru řídicího počítače. Pohyb pohyblivých součástí analyzátoru zajišťují většinou přesné krokové motory. Správná funkce pohyblivých součástí je trvale monitorována pomocí speciálních čidel, které kontrolují koncovou polohu i čas potřebný k jejímu dosažení. Při nedodržení nastavených poloh a časových limitů se analyzátor zastaví s příslušným chybovým hlášením. Voda je v analyzátoru poháněna pomocí čerpadel a odsávána vakuem, které je řízeno magnetickými ventily.

Současné elektronicky řízené automatické biochemické analyzátory mají často značně sofistikovaný software. Běžné je statistické vyhodnocování kontrolních analýz v číselné i přehledné grafické podobě a nástroje vnitřní kontroly kvality umožňující výběr a kombinací **Westgardových pravidel**. Jinou softwarovou aplikací je např. tzv. **reflex mode**, který umožňuje automatické provedení doplňkových analýz při patologické hodnotě ordinovaného testu.

Charakteristickým znakem vývoje automatizovaných analytických systémů v posledních letech byla konstrukce hybridních systémů spojujících analyzátory využívajících různé spektrofotometrické principy s imunochemickou (homogenní i heterogenní) imunoanalýzou. Oba typy analyzátorů byly spojeny různým dopravníkovým systémem k transportu biologických vzorků a naměřená data byla soustředěna do jednoho výsledkového listu.

V poslední době se výrobci automatizovaných laboratorních systémů zaměřili na vývoj a výrobu automatizovaných a robotizovaných linek, které pokrývají preanalytickou a postanalytickou fázi laboratorních procesů. Reálnou a relativně dostupnou se tak stala tzv. **totální laboratorní automatizace**.

Preanalytický proces v laboratoři tvoří:

- příjem a identifikace biologického vzorku,
- centrifugace,
- odzátkování,
- rozpipetování – aliquoting,
- označení aliquotů štítky s čarovým kódem – labeling,
- roztřídění primárních a sekundárních vzorků (aliquotů) – sorting,
- u on-line připojení přímý vstup do dopravníkového systému analytické části.

Postanalytickým procesem se rozumí:

- validace analytických výsledků,
- elektronický přenos do laboratorního informačního systému,
- archivace primárních případně alikvotních vzorků.