



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΠΕΤΡΟΣ Λ. ΚΑΡΚΑΛΟΥΣΟΣ

Δρ. Βιολόγος – Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ
ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΑΝΑΛΥΤΕΣ

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ

ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

ΑΙΓΑΛΕΩ 2017

Έκδοση Πέμπτη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΦΩΤΟΜΕΤΡΩΝ, ΤΩΝ ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

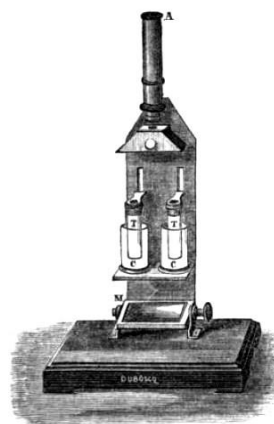


Εικόνα 1.1 Ο Ισαάκ Νεύτων (1642 – 1712), από τους πρωτεργάτες φυσικούς στη μελέτη του φωτός.

Οι χρωματομετρικές αναλύσεις οφείλουν το όνομα τους στο γεγονός ότι για την προσδιορισμό της άγνωστης συγκέντρωσης ενός διαλύματος χρωματίζουν το δείγμα με κατάλληλη χρωστική. Η ένταση του χρώματος του διαλύματος είναι ανάλογη με την ποσότητα της ουσίας που βρίσκεται στο δείγμα του ασθενούς και αντέδρασε με το αντιδραστήριο. Μέχρι την δεκαετία του 1920 η ένταση του χρώματος η οποία προσδιορίζονταν με το μάτι ήταν και ο μοναδικός τρόπος εκτίμησης της συγκέντρωσης ενός δείγματος. Οι πρωτεργάτες της ανάλυσης αίματος (Benedict, Kovarsky, Fehling κ.α.) πρότειναν την δημιουργία σειράς αραιώσεων δείγματος γνωστής συγκέντρωσης. Ο εργαστηριακός σύγκρινε το χρώμα του άγνωστου δείγματος με τα χρώματα των γνωστών συγκεντρώσεων.

Σήμερα η ένταση του χρώματος προσδιορίζεται με μια συσκευή που ονομάζεται **φωτόμετρο** (photometer) ή παλαιότερα **χρωματόμετρο** (colorimeter). Τα χρωματόμετρα χρησιμοποιούνταν στα κλινικά εργαστήρια μέχρι και την δεκαετία του 1940. Είχαν ανακαλυφθεί πολύ νωρίτερα το 1854 από τον Jules Duboscq (Εικόνα 1.2) και βασίζονταν στην οπτική παρατήρηση (Εικόνα 1.3) της χρωματικής αντίδρασης που προκαλούν διάφοροι μεταβολίτες και ένζυμα. Το 1933 κυκλοφόρησε το πρώτο ηλεκτρικό φωτόμετρο στις Ηνωμένες Πολιτείες από την General Electric. Τα πρώτα φωτόμετρα μετρούσαν μόνο στο φάσμα του ορατού φωτός. Αργότερα (1942)

προστέθηκε η μέτρηση στο υπεριώδες και στο υπέρυθρο φάσμα από την εταιρεία Beckmann (Εικόνα 1.4)

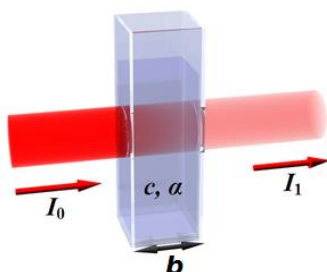


Εικόνα 1.2 - 1.3. Ο Γάλλος επιστήμονας Jules Duboscq (1817 – 1986). Εφευρέτης του φωτόμετρου, του στερεοσκόπιου, του ηλιοστάτη και άλλων οπτικών συσκευών. Αριστερά το πρώτο χρωματόμετρο που κατασκευάστηκε από τον Jules Duboscq το 1854. Χρησιμοποιούνταν για τον υπολογισμό της ποσότητας της καραμέλας στο σιρόπι.

Στα κοινά φωτόμετρα το φως παράγεται από μια απλή λυχνία ορατού ή υπεριώδους φωτός και κατόπιν περνά διαμέσου ενός **φίλτρου** ή **πρίσματος**. Στη περίπτωση που χρησιμοποιηθεί **πρίσμα** (Αγγλικά: spectrum) η συσκευή ονομάζεται σπεκτροφωτόμετρο (spectrophotometer). Το φίλτρο ή το πρίσμα απομονώνουν την πλειοψηφία των χρωμάτων και αφήνουν ελεύθερο μόνο ένα χρώμα. Το μονοχρωματικό αυτό φως (έντασης I_0) διαπερνά το έγχρωμο διάλυμα της αντίδρασης (Εικόνα 1.5). Ένα μέρος του απορροφάται από αυτό ($I_1 - I_0$) και το υπόλοιπο (I_1) φωτίζει ένα φωτοανιχνευτή (photodetector) που μετατρέπει την φωτεινή ενέργεια σε ηλεκτρική. Η διαφορά δυναμικού (V) που αναπτύσσεται στο φωτοανιχνευτή είναι ανάλογη με το φως που προσπίπτει σε αυτόν. Σήμερα τα φωτόμετρα των βιοχημικών αναλυτών χρησιμοποιούν κυρίως πέντε φίλτρα (340, 405, 450, 540, 630) (Πίνακας 2).



Εικόνα 1.4. Ο Arnold Beckmann ο κατασκευαστής του πρώτου φωτομέτρου. Αριστερά μια από τις πρώτες διαφημίσεις για φωτόμετρα.



Εικόνα 1.5. Η απορρόφηση του φωτός ($I_1 - I_0$) από ένα διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης (c) και μοριακής απορροφητικότητας (α). Το διάλυμα βρίσκεται μέσα σε μία κυβέττα γνωστής επίσης συγκέντρωσης (l).



Εικόνα 1.6. Ο Ελβετός Johan Heinrich Lambert (1728 – 1777), μαθηματικός, φυσικός και αστρονόμος. Η ανακάλυψή του ότι η απορρόφηση του φωτός είναι ανάλογη με την απόσταση που διανύει συνδυάστηκε αργότερα με την ανακάλυψη ότι η απορρόφηση του φωτός από ένα διάλυμα είναι ανάλογη με την συγκέντρωσή του. Η τελευταία ανακάλυψη έγινε από τον Γερμανό φυσικό, χημικό και μαθηματικό August Beer (1825 – 1863). Οι δύο αυτές προτάσεις αποτέλεσαν αργότερα τον γνωστό νόμο των Lambert-Beer.

Η ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΩΝ – ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΑ

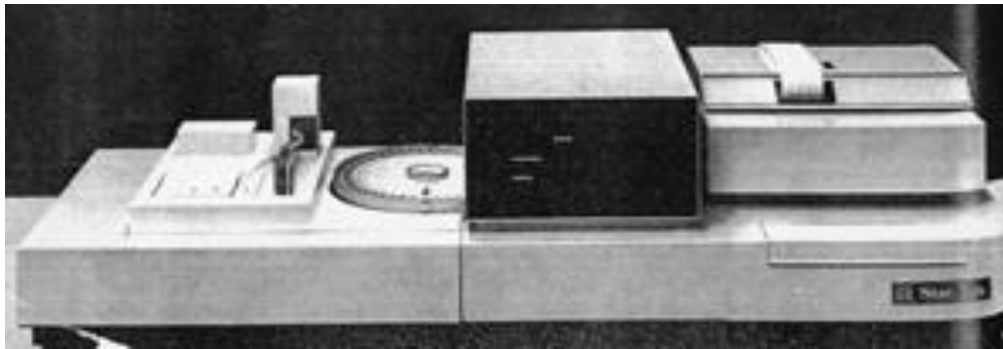
Ως ηλεκτροχημεία καλείται η μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα ηλεκτρόδιο προς μία άλλη φάση υγρή ή στέρεα η οποία αποτελεί το δείγμα. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας τόσο τα ηλεκτρόδια όσο και το δείγμα μεταβάλλονται χημικά και ηλεκτρικά. Αυτές οι δύο μεταβολές μετρώνται με **ηλεκτροχημικούς αισθητήρες** (electrochemical sensors). Στη κλινική ανάλυση οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες χρησιμοποιούνται σε ποικίλες μετρήσεις στις οποίες υπεισέρχεται η μέτρηση ιόντων. Τέτοιες μετρήσεις αφορούν τις μετρήσεις ηλεκτρολυτών, αερίων αλλά και αμινοξέων, ενζύμων και νουκλεϊνικών οξέων. Στους βιοχημικούς αναλυτές η χρήση των ηλεκτροχημικών αισθητήρων περιορίζεται στη μέτρηση των ηλεκτρολυτών με τα **ΙΟΝΤΟΕΠΙΛΕΚΤΙΚΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑ** (ion-selective electrodes – ISE).

Η αρχή μεθόδου των ιοντοεπιλεκτικών ηλεκτροδίων στηρίζεται στη γνωστή εξίσωση του Nernst ο οποίος έθεσε τα θεμέλια της ποτενσιομετρίας (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7. Ο Γερμανός φυσικός Walther Hermann Nernst (1864 - 1941). Ο Nernst εισηγήθηκε τον τρίτο νόμο της θερμοδυναμικής για τον οποίο και τιμήθηκε με το Νόμπελ χημείας το 1920. Επιπλέον καθιέρωσε την γνωστή εξίσωση Nernst για τις ποτενσιομετρικές μετρήσεις.

Οι πρώτοι πολυκάναλοι αναλυτές της Technicon (SMA 6/60, 1965) μετρούσαν τους ηλεκτρολύτες με φλογοφωτόμετρο. Η ποτενσιομετρία, άμεση και έμμεση, εμφανίστηκε λίγο αργότερα (Εικόνα 1.8). Τα γνωστά σήμερα ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια πρωτοχρησιμοποιήθηκαν στον αναλυτή της SMAC το 1974 (Weinstein and Laurie n.d.). Σήμερα όλοι οι βιοχημικοί αναλυτές μετρούν ιόντα με ενσωματωμένες μονάδες ISE (ISE Module) (Εικόνα 1.9a).



Εικόνα 1.8. Ένας από τους πρώτους αναλυτές ιόντων (1974)



Εικόνα 1.9. Ο αναλυτής ιόντων της Easylite



Εικόνα 1.9α. Δεξιά ηλεκτρόδια ISE σύγχρονου βιοχημικού αναλυτή και αριστερά η θέση τους μέσα στον αναλυτή.

Η ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες αναπτύχθηκαν από διάφορες εταιρείες αυτόματοι βιοχημικοί αναλυτές με θαυμαστές ιδιότητες. Παρόλο την εκπληκτική τους ταχύτητα, επαναληψιμότητα και ακρίβεια η λειτουργία τους βασίζονται σε σχετικά απλές αρχές: στη λειτουργία του φωτομέτρου, στην αναρρόφηση και χρήση εξαιρετικά μικρών ποσοτήτων ορού και αντιδραστηρίων, στην κατάλληλη ανάμιξή τους, στην επώαση για ορισμένο χρονικό διάστημα και στην μέτρηση της απορρόφησης του παραγόμενου έγχρωμου προϊόντος σε καθορισμένο μήκος κύματος.

Δύο ειδών βιοχημικοί αναλυτές έχουν καθιερωθεί. Οι αναλυτές φουρνιάς και οι αναλυτές τυχαίας προσπέλασης.

Οι **αναλυτές φουρνιάς** (batch analyzers) αναλύουν ένα συστατικό κάθε φορά, και προχωρούν στην συνέχεια στο επόμενο. Το χαρακτηριστικό αυτό το συναντάμε σπάνια σήμερα στους βιοχημικούς αναλυτές αφού έχει περιοριστεί κυρίως σε ανοσοενζυμικούς και ραδιοανοσολογικούς αναλυτές. Γενικά σήμερα οι αναλυτές φουρνιάς έχουν σχεδόν εκλείψει. Υπάρχουν μόνο σε μικρούς ημιαυτόματους αναλυτές.

Αντίθετα οι αναλυτές **τυχαίας προσπέλασης** (random access analyzers) έχουν επικρατήσει στη παγκόσμια αγορά. Οι αναλυτές τυχαίας προσπέλασης δίνουν την δυνατότητα στον χρήστη να επιλέξει όποιες εξετάσεις επιθυμεί για κάθε ασθενή αλλά και να παρεμβάλει επείγοντα δείγματα (**STAT**).

Παλαιότερα οι αναλυτές διακρίνονταν σε τρεις κατηγορίες: α) συστήματα **συνεχούς ροής**, β) **ασυνεχή συστήματα** και γ) **φυγοκεντρικούς αναλυτές**. Στις τεχνολογίες αυτών των συστημάτων θα αναφερθούμε στη συνέχεια.

Η ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

Όπως ειπώθηκε σήμερα πλέον όλοι οι νέοι βιοχημικοί αναλυτές είναι τυχαίας προσπέλασης. Αντικατέστησαν τους αναλυτές φουρνιάς που εκτελούσαν το ίδιο είδος αναλύσεων για όλους τους ασθενείς.

Οι αναλυτές φουρνιάς έρχονται από το παρελθόν όπου μεσουρανούσαν κατά σειρά οι αναλυτές συνεχούς ροής (continuous-flow analyzers), οι αναλυτές διακριτού δείγματος (discrete-sample analyzers) και οι φυγοκεντρικοί αναλυτές (centrifugal analyzers).

Οι πολυκάναλοι αναλυτές συνεχούς ροής

Οι πρώτοι αναλυτές που κυκλοφόρησαν (L. T. Skeggs 1957) ήταν οι λεγόμενοι «πολυκάναλοι αναλυτές». Οφείλουν το όνομά τους στην εκτέλεση όλων των επιμέρους προσδιορισμών σε διαφορετικά «κανάλια» δηλαδή σε διαφορετικά επιμέρους συστήματα ανάμιξης και επώασης του αντιδραστηρίου μίγματος. Κάθε κανάλι εκτελούσε και ένα διαφορετικό προσδιορισμό, π.χ. πέντε κανάλια ισοδυναμούσαν σε πέντε διαφορετικές εξετάσεις. Αρχικά οι αναλυτές αυτοί είχαν μόνο ένα κανάλι (single-channel analyzers), γρήγορα όμως προστέθηκαν και άλλα κανάλια (multi-channel analyzers) οπότε αυξήθηκαν και οι εξετάσεις που μπορούσαν να εκτελέσουν ταυτόχρονα. Μάλιστα οι πρώτοι πολυκάναλοι αναλυτές ανέφεραν στην ονομασία τους τον αριθμό των καναλιών τους αφού αυτός ισούταν με τον αριθμό των αναλύσεων που ήταν σε θέση να εκτελέσουν ταυτόχρονα. Η φωτομετρική μονάδα ήταν κοινή καθώς επίσης και η καταγραφή των αποτελεσμάτων σε απλό καταγραφικό χαρτί αρχικά και σε ηλεκτρονικό υπολογιστή αργότερα. Τα πιο προηγμένα μοντέλα συνοδεύονταν και από ένα φλογοφωτόμετρο για τον προσδιορισμό ηλεκτρολυτών.

Η δημιουργία και εξέλιξη των πολυκάναλων αναλυτών συνεχούς ροής

Η ονομασία «πολυκάναλοι αναλυτές συνεχούς ροής» οφείλεται στον εφευρέτη τους, τον Αμερικανό βιοχημικό Leonard Skeggs (1918 – 2002). Ο Skeggs (Εικόνα 1.10) εργαζόμενος στις αρχές της δεκαετίας του 50 ως διευθυντής στο βιοχημικό εργαστήριο μεγάλου νοσοκομείου προσπάθησε να αντιμετωπίσει ριζικά το πρόβλημα της έλλειψης προσωπικού αλλά και των πολλών εργαστηριακών λαθών. Έτσι ξεκίνησε μόνος τους την κατασκευή μιας αυτόματης συσκευής που θα του επέτρεπε να εκτελεί γρήγορα και με επαναλήψιμα αποτελέσματα τις αναλύσεις εργαστηρίου του. Έτσι, με τη βοήθεια δανείου, που του παραχώρησε φίλος του ολοκλήρωσε το 1954 την κατασκευή του πρώτου αυτόματου αναλυτή στην ιστορία (Εικόνα 1.11).

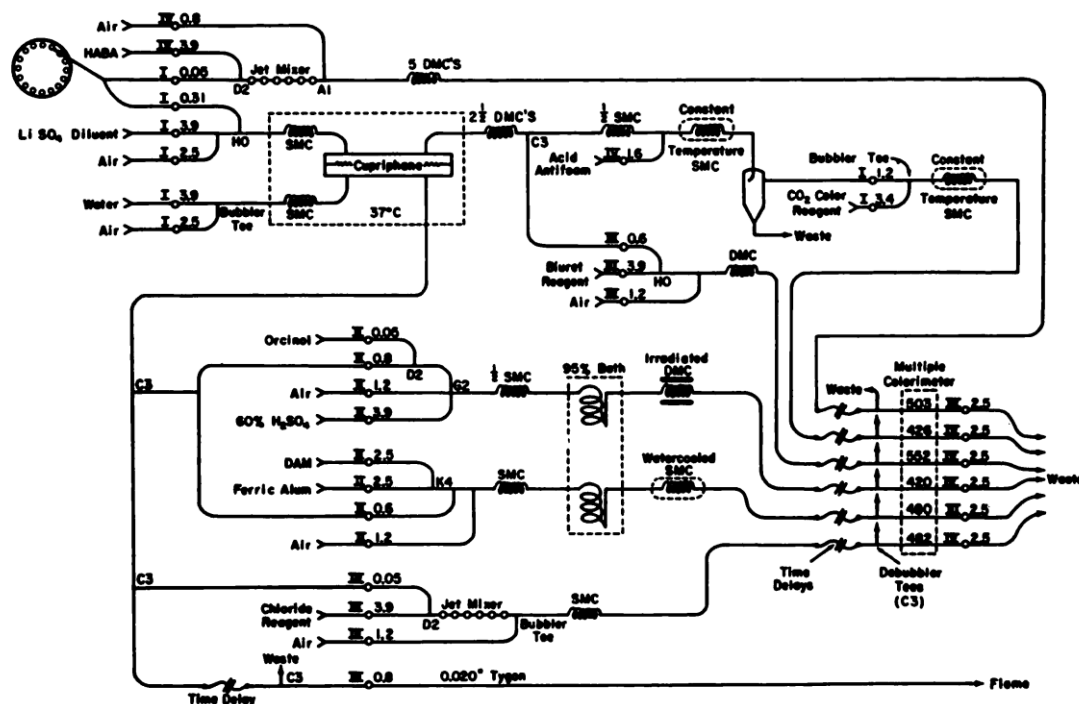


Εικόνα 1.10. Η φωτογραφία του Leonard Skeggs (1918 – 2002) με την γυναίκα του Jean Skeggs. Πριν από την κατασκευή του πρώτου πολυκάναλου αναλυτή το 1957 ο Skeggs είχε ήδη συμμετάσχει στη κατασκευή μίας συσκευής τεχνητού νεφρού. Ως βιοχημικός ασχολήθηκε διεξοδικά (1951 – 1988: 37 χρόνια) με το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης σε υπερτασικούς ασθενείς.



Εικόνα 1.11. Ο πρώτος πολυκάναλος αναλυτής στο εργαστήριο του Leonard Skeggs. Ο πρόγονος όλων των βιοχημικών αναλυτών (AutoAnalyzer I) λίγο πριν κυκλοφορήσει στο εμπόριο από την Technicon Corporation.

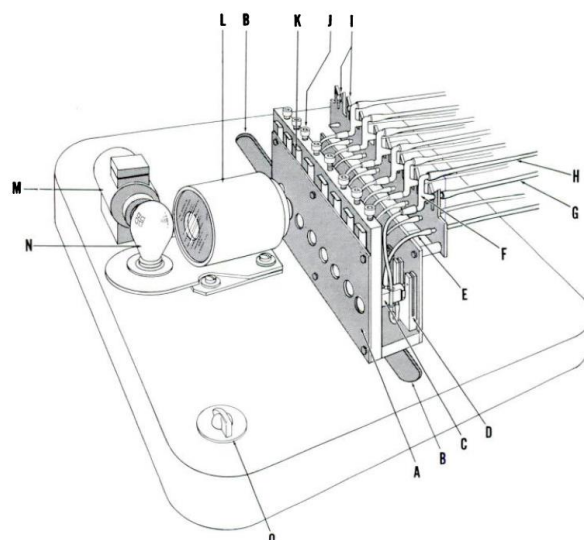
Τα δικαιώματα του αναλυτή τα παραχώρησε ο ίδιος στη εταιρεία ιατρικών αυτοματισμών Technicon Corporation. Ο πρώτος μονοκάναλος αυτόματος αναλυτής κυκλοφόρησε στο εμπόριο με την επωνυμία Autoanalyzer I. Ο αναλυτής αυτός γνώρισε πολύ μεγάλη επιτυχία και γρήγορα πολλά εργαστήρια απέκτησαν περισσότερους από ένα αναλυτές για τις πιο συχνές εξετάσεις που διενεργούσαν (ένας αναλυτής – μία εξέταση). Μαζί με την ταχύτητα αυξήθηκε υπέρμετρα και το κόστος των εργαστηρίων. Για τον λόγο αυτό ο Skeggs προχώρησε γρήγορα στη κατασκευή του πρώτου πολυκάναλου αναλυτή (αρχικά δικάναλου) με τον συνάδελφό του στο ίδιο νοσοκομείο Harry Horschstrasser (Skeggs και Horschstrasser 1964).



Εικόνα 1.12. Το μηχανολογικό σχέδιο ενός πολυκάναλου (εξακάναλου) αναλυτή. Αριστερά κάτω φαίνονται τα έξι κανάλια και τα αντίστοιχα φίλτρα για τις σχετικές μετρήσεις.

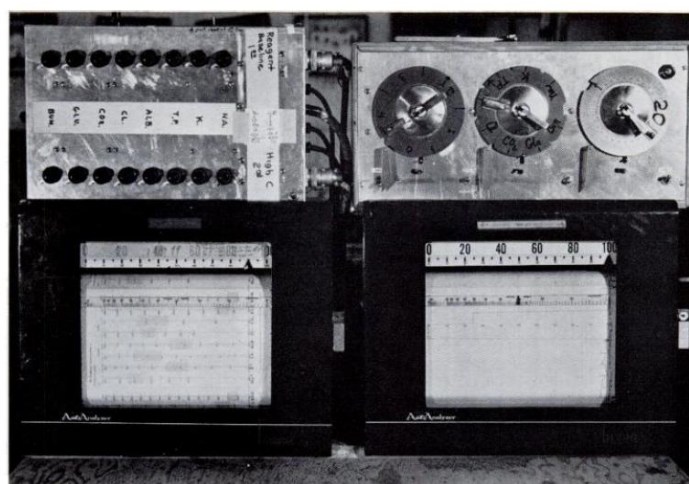
Τα κανάλια στους αναλυτές συνεχούς ροής ήταν προσαρμοσμένα για συγκεκριμένες αναλυτικές συνθήκες δηλαδή για κάθε μία εξέταση χωριστά. Ο χρήστης όμως μπορούσε να παρέμβει στις συνθήκες αντίδρασης (Bigat and Saifer 1972) (Εικόνα 1.14).

Η καταγραφή των αποτελεσμάτων γίνονταν αρχικά σε καταγραφικό χαρτί (Εικόνα 1.15) και αφορούσε όλες τις εξετάσεις ακόμα και αυτές που δεν χρειαζόνταν αλλά εκτελέστηκαν. Τα κανάλια στους πολυκάναλους αναλυτές αυξάνονταν διαρκώς⁴ (SMA-2, SMA-6, SMA-12, SMAC-20) μέχρι και το 1972 οπότε κυκλοφόρησε ο τελευταίος και πιο προηγμένος πολυκάναλος αναλυτής ο SMAC-20 με 20 κανάλια. Ο SMAC-20 εκτελούσε 20 διαφορετικούς προσδιορισμούς, διέθετε ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια για τον προσδιορισμό ηλεκτρολυτών και ελέγχονταν από ηλεκτρονικό υπολογιστή (Εικόνα 1.16). Στην Ελλάδα τέτοια μοντέλα βρίσκονταν σε λειτουργία μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1990 (Εικόνα 1.17).



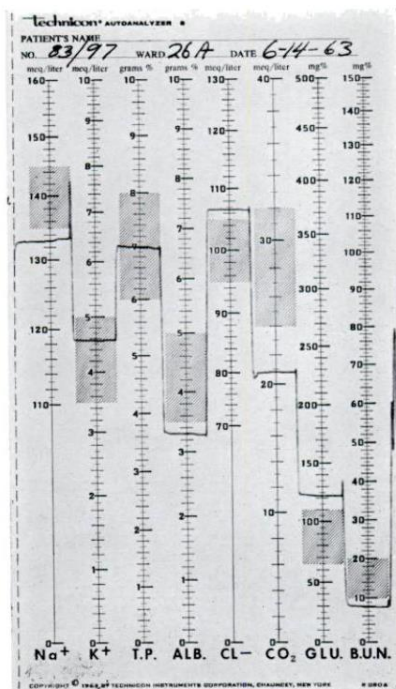
Εικόνα 1.13. Η φωτομετρική μονάδα ενός οκτακάναλου αναλυτή (Skeggs και Horchstrasser 1964). Ξεκινώντας από δεξιά διακρίνονται οι σωλήνες που μεταφέρουν αντιδραστήρια και δείγματα (H, G, F). Τα μίγματα οδηγούνται (E) στους χώρους αντίδρασης (C) που υποστηρίζονται μέσα σε μία μεταλλική θήκη (A) με μηχανισμούς στήριξης (D). Ολόκληρος αυτός ο μηχανισμός κινείται πάνω σε μία ειδική βάση (B).

Καθώς κινείται κάθε μία οπή από τις οκτώ αποσφραγίζεται και δέχεται φως από την οπτική μονάδα (L, N, M). Διαφορετικά φίλτρα (L) εφαρμόζονται σε κάθε οπή έτσι ώστε να εξασφαλίζεται το διαφορετικό μήκος κύματος κάθε αντίδρασης. Η ένταση του φωτός ελέγχεται από ένα ποτενσιόμετρο (O).



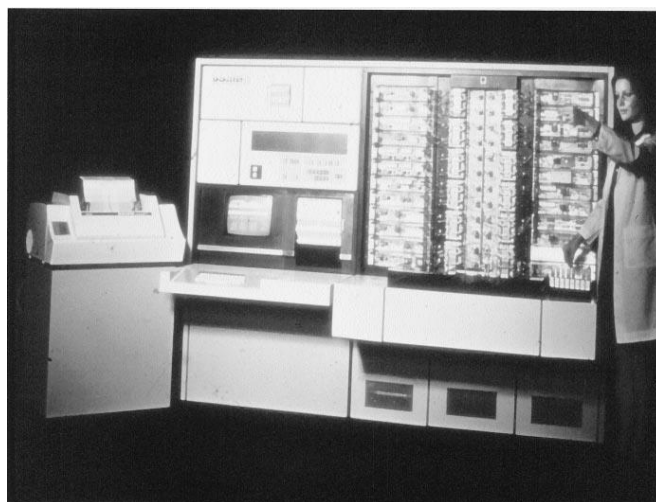
Εικόνα 1.14. Μία τυπική πλευρά ενός οκτακάναλου αναλυτή. Δεξιά πάνω φαίνονται τα οκτώ κανάλια όπου γίνονται οι σχετικές μετρήσεις (Na, K, TP, ALB, Cl, CO₂, GLUC, BUN). Κάτω φαίνονται τα καταγραφικά των απαντήσεων και αριστερά πάνω οι διακόπτες ρύθμισης του

χρόνου επώασης, βαθμονόμησης και του ελέγχου ποιότητας. Όπως και σήμερα οι χειριστές αυτών των «αρχαίων» αναλυτών μπορούσαν να μεταβάλλουν την «χημεία» των μηχανημάτων τους όχι φυσικά πληκτρολογώντας αλλά γυρίζοντας σχετικούς διακόπτες.



Εικόνα 1.15. Το καταγραφικό δελτίο των απαντήσεων οκτακάναλου αναλυτή (δηλαδή αναλυτή που εκτελεί οκτώ διαφορετικές αναλύσεις). Με γραμμοσκόπηση διακρίνονται τα εύρη των τιμών αναφοράς κάθε εξέτασης.

Στους πολυκάναλους αναλυτές τα δείγματα και τα αντιδραστήρια κατευθύνονταν στο χώρο αναμίξεως μέσω κοινών σωλήνων. Μέσω ειδικών μεμβρανών επιτυγχάνονταν η αποπρωτείνωση απαλλάσσοντας τον χειριστή από την ανάγκη φυγοκέντρησης και φιλτραρίσματος. Τόσο τα δείγματα όσο και τα αντιδραστήρια που προορίζονταν για διαφορετικές αναλύσεις χωρίζονταν μεταξύ τους από σταγόνες αέρα που παρεμβάλλονταν μεταξύ τους. Κατά συνέπεια η μεγαλύτερη πρόκληση των αναλυτών συνεχούς ροής ήταν το πρόβλημα της επιμόλυνσης (carry-over) εξαιτίας όχι μόνο του τρόπου αναρρόφησης αλλά και των κοινών κυβεττών που χρησιμοποιούνταν. Μία άλλη πρόκληση των αναλυτών συνεχούς ροής ήταν η διαφορετική επώαση των διαφόρων αναλύσεων. Το πρόβλημα αυτό του «συγχρονισμού» λύθηκε είτε με ελαφρά μείωση των απαιτήσεων ακρίβειας για τις βραδύτερες αναλύσεις, είτε με την γενική επιβράδυνση της λειτουργίας του αναλυτή κατά την αναμονή των βραδύτερων αναλύσεων.



Εικόνα 1.16. Ο αναλυτής SMAC, από τους πλέον προηγμένους πολυκάναλους αναλυτές συνεχούς ροής της Technicon Corporation με είκοσι κανάλια. Κυκλοφόρησε το 1972.

Οι αναλυτές διακριτού δείγματος

Οι αναλυτές διακριτού δείγματος εκτελούσαν σε κάθε δείγμα μόνο τις αναλύσεις που ζητούνταν. Αποτελούσαν τους προγόνους των σημερινών αναλυτών τυχαίας προσπέλασης. Επινοήθηκαν από τον Hans Baruch το 1959 (Εικόνα 1.17). Ο πρώτος αναλυτής διακριτού δείγματος ήταν ο Robot Chemist που πρωτοκυκλοφόρησε το 1963 από την Research Specialties Co. (Εικόνα 1.18). Λίγο αργότερα ακολούθησε ο Autochemist από την AGA (Εικόνα 1.18). Αντίθετα με τον ανταγωνιστή του, τον Autoanalyzer της Technicon, ο Robot Chemist εκτός από διαφορετική τεχνολογία διέθετε το πρώτο σύστημα αποπρωτείνωσης αλλά και ψηφιακής εκτύπωσης.



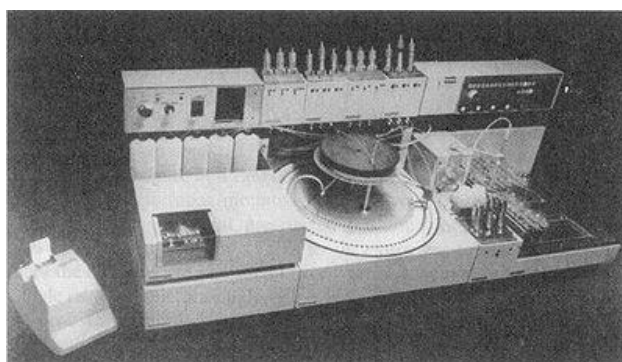
Εικόνα 1.17. Ένα από τα μοντέλα πολυκάναλων αναλυτών συνεχούς ροής της Technicon Corporation. Η τεχνολογία της Technicon πουλήθηκε στη Revlon το 1980 και κατόπιν στη Bayer σημερινή Siemens Diagnostics.



Εικόνα 1.18. Ο Hans Baruch ο εφευρέτης των αναλυτών διακριτού δείγματος. Γεννήθηκε στο Αμβούργο της Γερμανίας το 1925 και μετανάστευσε στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1938. Κατά την διάρκεια του Δευτέρου Παγκοσμίου πολέμου πολέμησε στο Ευρωπαϊκό μέτωπο όπου και διακρίθηκε. Επέστρεψε στις ΗΠΑ όπου αρχικά ασχολήθηκε με την φυσιολογία και αργότερα με την βιολογία και χημεία.

Παρά την προχωρημένη τους τεχνολογία οι αναλυτές διακριτού δείγματος δεν γνώρισαν εμπορική επιτυχία (η εμπορία τους διακόπηκε το 1969). Ο κύριος λόγος της αποτυχίας ήταν η πολυπλοκότητα της κατασκευής τους η οποία απαιτούσε πολύ καλή εκπαίδευση των χρηστών και τεχνική υποστήριξη χωρίς να μπορεί αντίστοιχα η κατασκευάστρια εταιρεία να ανταποκριθεί. Παρόλα αυτά οι αναλυτές διακριτού δείγματος εν τέλει επικράτησαν μια που από αυτούς προήλθαν οι σύγχρονοι αναλυτές τυχαίας προσπέλασης.

Μια ειδική κατηγορία αναλυτών διακριτού δείγματος ήταν οι φυγοκεντρικοί αναλυτές που ακολουθούν.



Εικόνα 1.18. Ο πρώτος αναλυτής διακριτού δείγματος, ο Robot Chemist, από τον Hans Baruch. Ο πρώτος αναλυτής κυκλοφόρησε στο εμπόριο το 1959 ύστερα από εργασία τριών ετών. Ο αναλυτής αυτός ήταν ιδιαίτερα ογκώδης και γι' αυτό το 1963 αντικαταστάθηκε από ένα μικρότερο (φωτογραφία).



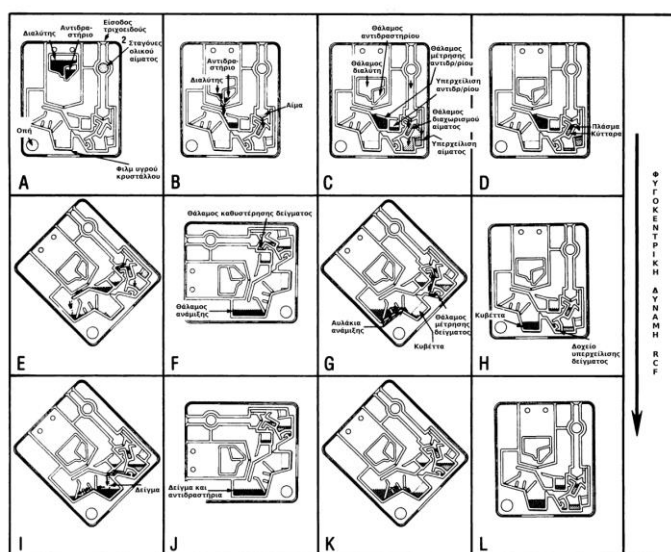
Εικόνα 1.19. Ο αναλυτής διακριτού δείγματος AutoChemist. Κυκλοφόρησε το 1964 και αν και διέθετε πολλά πρωτοποριακά χαρακτηριστικά δεν γνώρισε εμπορική επιτυχία όπως άλλωστε και ο Robort Chemist της Research Specialties Co. Εφευρέτες τους ήταν τα αδέρφια Gunnar και Jungner που εργάζονταν στην Σουηδική δημόσια επιχείρηση AGA AB. Το τελευταίο κομμάτι πουλήθηκε το 1979 οπότε και τα δικαιώματα του αναλυτή αγόρασε η Αμερικανική εταιρεία Boehringer Mannheim. Αυτή με την σειρά του πούλησε τα δικαιώματα του αναλυτή στη Synergy Int (1984).

Φυγοκεντρικοί αναλυτές

Οι φυγοκεντρικοί αναλυτές χρησιμοποιούσαν τη φυγόκεντρο δύναμη για την ανάμιξη αντιδραστηρίων και δειγμάτων (Schultz, et al. 1985). Λειτουργούσαν ως αναλυτές φουρνιάς (batch analyzers) δηλαδή εκτελούσαν από μία εξέταση κάθε φορά σε ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Παρόλα αυτά ήταν εξαιρετικά γρήγοροι και οι πιο εξελιγμένοι από αυτούς μπορούσαν να προσδιορίσουν πολλά διαφορετικά συστατικά ταυτόχρονα. Το ακριβώς αντίθετο δηλαδή από τους πολυκάναλους αναλυτές οι οποίοι εκτελούν κάθε φορά όλους τους προσδιορισμούς σε κάθε δείγμα. Ο πρώτος φυγοκεντρικός αναλυτής πουλήθηκε το 1970 από την «Oak Ridge National Laboratory». Εφευρέτης του ήταν ο Norman Anderson (Εικόνα 1.20), επιστήμονας της NASA ο οποίος έφτιαξε το πρωτότυπό του το 1967. Ακολούθησε μία δεύτερη γενιά φυγοκεντρικών αναλυτών το 1975 που ενσωμάτωναν την πρόοδο της εποχής στη πληροφορική.



Εικόνα 1.20. Ο Norman Anderson εργάζεται πάνω στην ανάπτυξη του πρώτου φυγοκεντρικού αναλυτή (1969).

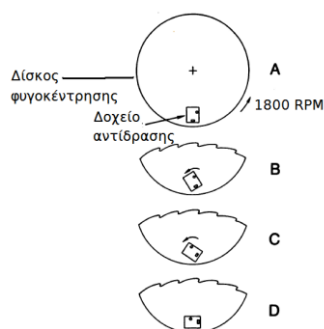


Εικόνα 1.21. Σχεδιάγραμμα του «δοχείου ανάλυσης» (test pack) ενός φυγοκεντρικού αναλυτή (Vision™ System). Μέσα στο δοχείο ανάλυσης εισάγονται ολικό αίμα και αντιδραστήρια. Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρωσης του δίσκου τους απομονώνονται ο ορός, τα αντιδραστήρια αναμιγνύονται με τον ορό, γίνεται αντίδραση, επώαση, μεταφορά του χρωμογόνου διαλύματος σε ειδικό θάλαμο και φωτομέτρηση σε ειδικό μήκος κύματος. Για να γίνουν όλα αυτά τα υγρά μίγματα μετακινούνται από τον ένα θάλαμο στον άλλο με την επίδραση της φυγοκέντρου δύναμης.

Η αρχή λειτουργίας τους ήταν η εξής:

Δείγμα και αντιδραστήριο τοποθετούνταν μέσα σε ένα ειδικό δοχείο πάνω στο αναλυτή που ονομάζονταν «δοχείο αντίδρασης» (test pack). Το δοχείο αυτό χωρίζονταν σε πολλά επιμέρους διαμερίσματα ένα εκ των οποίων είναι και η κυβέττα μέσα στην οποία γίνονταν η φωτομέτρηση (Εικόνα 1.21).

Δείγμα και αντιδραστήριο μετακινούνται διαμέσου των διαμερισμάτων όπου αναμιγνύονται, αντιδρούν, επωάζονται και μετρούνται. Η δύναμη που τα μετακινούσε ήταν η φυγόκεντρος δύναμη αφού όλα τα δοχεία αντίδρασης (κάθε φυγόκεντρικός αναλυτής διαθέτει περισσότερα από ένα δοχεία αντίδρασης) βρίσκονταν πάνω σε ένα δίσκο ο οποίος γύριζε χιλιάδες στροφές ανά λεπτό (Εικόνα 1.22). Σημαντικό είναι ότι τα δοχεία αντίδρασης πάνω στο φυγόκεντρικό δίσκο δεν μένουν ακίνητα όπως συμβαίνει στη κλασική φυγοκέντρωση. Αντιθέτως γυρίζουν και αυτά οδηγώντας δείγμα και αντιδραστήριο από το ένα διαμέρισμα στο άλλο (Εικόνα 1.23). Πλεονέκτημα των φυγόκεντρικών αναλυτών είναι ότι επειδή διέθεταν δικό τους μηχανισμό φυγοκέντρωσης μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν ως δείγμα το ολικό αίμα. Ο ορός διαχωρίζονταν από τα ερυθρά μέσα σε ειδικό διαμέρισμα που διέθετε επί τούτου το δοχείο αντίδρασης.



Εικόνα 1.22. Σχεδιάγραμμα του δίσκου φυγοκέντρωσης ενός φυγόκεντρικού αναλυτή. Πάνω στο δίσκο βρίσκονται ένα ή περισσότερα «δοχεία αντίδρασης» (test packs). Κατά την φυγοκέντρωση ο δίσκος κινείται αλλά και τα δοχεία αντίδρασης κινούνται χωριστά και διαγράφουν γωνία 90°.

Αναλυτές τυχαίας προσπέλασης

Σήμερα όλοι οι βιοχημικοί αναλυτές που κατασκευάζονται είναι τυχαίας προσπέλασης (random access). Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να κάνουν όποιο προσδιορισμό θέλει ο χρήστης σε οποιοδήποτε δείγμα επιθυμεί.

Πρόγονος τους ήταν κυρίως οι αναλυτές διακριτού δείγματος. Ο πρώτος αναλυτής που διέθετε δυνατότητες τυχαίας προσπέλασης ήταν ο Automatic Clinical Analyzer (ACA) της DuPont ο οποίος κυκλοφόρησε το 1970. Ο αναλυτής αυτός διέθετε και δυνατότητα χρήσης δειγμάτων STAT.

Βασικός λόγος ανάπτυξης των αναλυτών τυχαίας προσπέλασης ήταν η παράλληλη ταχύτατη εξέλιξη των ηλεκτρονικών υπολογιστών και ιδιαίτερα των μικροεπεξεργαστών (chips) τα οποία αν και ανακαλύφθηκαν την δεκαετία του 1970

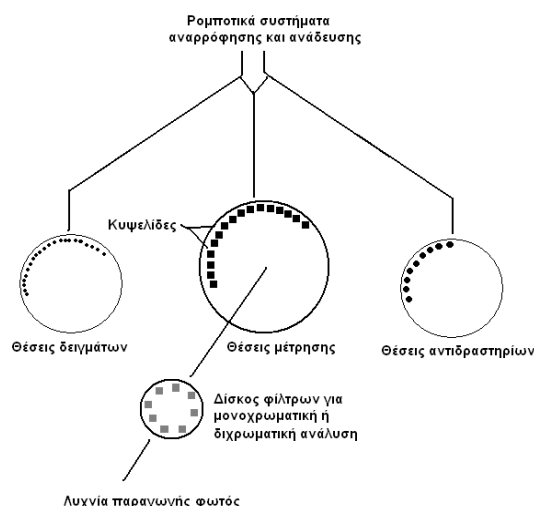
η χρήση τους γενικεύτηκε την δεκαετία του 1980 με την ανάπτυξη των προσωπικών υπολογιστών (PC). Οι μικροεπεξεργαστές προσαρτήθηκαν στους βιοχημικούς αναλυτές και έδωσαν την δυνατότητα στο χρήστη να ελέγξει στο μέγιστο πλέον βαθμό την λειτουργία τους. Παράλληλα με το υλικό εξελίχτηκε και το λογισμικό. Οι πρώτοι αναλυτές χρησιμοποιούσαν ως λειτουργικό σύστημα κυρίως το Unix ή ακόμα και το DOS και ο κώδικάς τους ήταν γραμμένος με γλώσσες πρώτων γενεών όπως ήταν η Pascal, η Fortran και η Cobol.

Η δεύτερη καινοτομία που οδήγησε στη εξέλιξη των αναλυτών τυχαίας προσπέλασης ήταν η ανάπτυξη της **ρομποτικής**. Τα πρώτα ρομποτικά συστήματα άρχισαν να χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία από την δεκαετία του 1960 (Joseph Engelberger, 1961). Από την δεκαετία του 1970 όμως θα αποτελέσουν το μακρύ χέρι, μεταφορικά και κυριολεκτικά, των μικροεπεξεργαστών των βιοχημικών αναλυτών στη γενική προσπάθεια μείωσης του ανθρώπινου παράγοντα έτσι ώστε να αυξηθεί η παραγωγικότητα, η αξιοπιστία και να μειωθούν τα ανθρώπινα λάθη.

Η τρίτη καινοτομία ήρθε από την χημική βιομηχανία η οποία προτυποποίησε τις αναλυτικές μεθόδους έτσι ώστε από το στάδιο της επιτόπου παραγωγής των αντιδραστηρίων να περάσουμε στην ανάπτυξη των λεγόμενων «**kits**» (Burtis 1987). Τα kits περιέχουν έτοιμα σε μικρά μπουκαλάκια όλα τα χημικά υποστρώματα και ένζυμα που χρειάζονται για τις αναλύσεις στους βιοχημικούς αναλυτές. Τοποθετούνται ως έχουν επάνω στο δίσκο αντιδραστηρίων και η αναγνώριση της θέσης τους γίνεται αυτόματα από τον αναλυτή με την χρήση γραμμωτού κώδικα.

Στην αυτονομία και την αυτοματοποίηση των αναλυτών τυχαίας προσπέλασης συνέτεινε και η χρήση συστημάτων ψύξης των αντιδραστηρίων. Σήμερα τα συστήματα ψύξης που χρησιμοποιούνται βασίζονται στο φαινόμενο **Peltier** ή και σε κοινά ψυγεία με φρέον. Η συντήρηση των αντιδραστηρίων πάνω στον αναλυτή βελτίωσε κατά πολύ την παραγωγικότητα και τον χρόνο χρήσης των αναλυτή.

Η πραγματική όμως τυχαία προσπέλαση των ομώνυμων αναλυτών δεν θα μπορούσε να επιτευχθεί χωρίς την χρήση του **γραμμωτού κώδικα** (bar codes). Ο γραμμωτός κώδικας είναι μια παλαιότερη επινόηση (Bernard Silver, 1948) με εφαρμογές αρχικά στο λιανικό εμπόριο. Από τις αρχές του 1980 όμως άρχισε να χρησιμοποιείται και στους βιοχημικούς αναλυτές. Η χρήση του αρχικά στα αντιδραστήρια και αργότερα στα δείγματα κατέστησε τους βιοχημικούς αναλυτές πραγματικά τυχαίας προσπέλασης, ταχύτατους και παραγωγικούς.



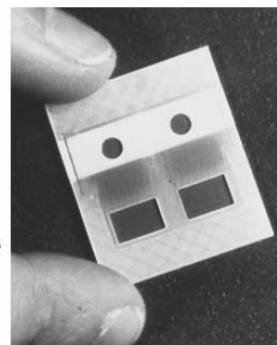
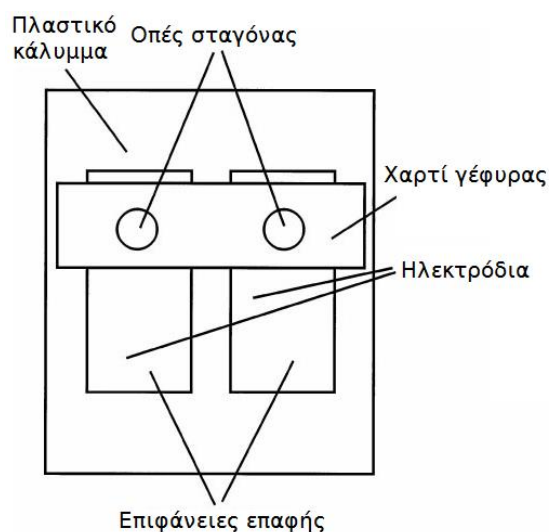
Εικόνα 1.23 Τα βασικά τμήματα που ενός αναλυτή τυχαίας προσπέλασης. Οι θέσεις αντιδραστηρίων ψύχονται με σύστημα Peltier. Οι θέσεις δειγμάτων μπορεί να βρίσκονται πάνω σε ρότορα όπως στο σχήμα ή να κινούνται με την βοήθεια ιμάντα. Επιλέγονται στρογγυλά συστήματα αποθήκευσης δειγμάτων, αντιδραστηρίων και κυβεττών για την μείωση του όγκου του μηχανήματος.

Η εξέλιξη των βιοχημικών αναλυτών από το 1980 και μετά

Η εξέλιξη των βιοχημικών αναλυτών συνεχίζεται. Νέοι αυτοματισμοί αυξάνουν την ταχύτητα, την παραγωγικότητα και την αξιοπιστία. Ενδεικτικά αναφέρονται η ανάπτυξη των αναλυτών ξηράς χημείας (Kodak Ektachem 400, 1985) οι οποίοι αντί για υγρά αντιδραστήρια χρησιμοποιούν αντιδραστήρια ξηράς χημείας με την μορφή ειδικών slides (Εικόνα 1.24).



Εικόνα 1.24. Ο αναλυτής ξηράς χημείας Kodak & Vitros



Εικόνα 1.25. Το slide προσδιορισμού των ηλεκτρολυτών του αναλυτή Kodak Ektachem 400 της εταιρείας οπτικών Kodak. Η τεχνολογία τους χρησιμοποιείται σήμερα από τους αναλυτές της σειράς Vitros της Ortho Clinical Diagnostics.

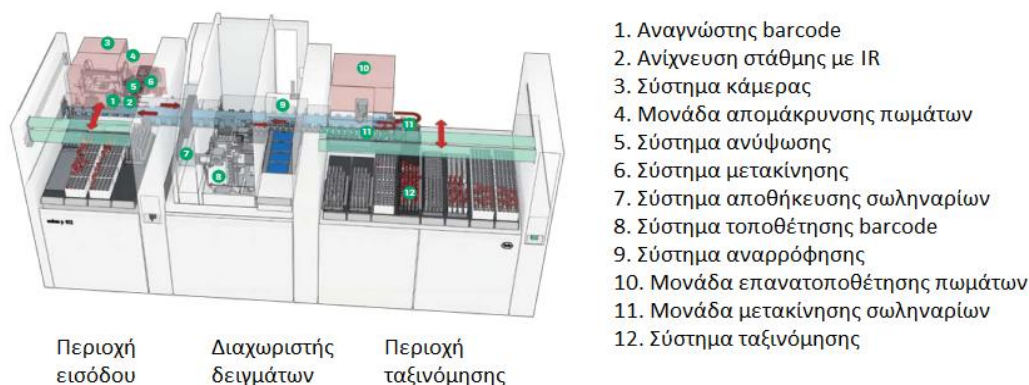
Άλλη καινοτομία ήταν η δημιουργία βιοχημικών αναλυτών που είναι ταυτόχρονα και ανοσοχημικοί αναλυτές (Dimension RXL, 1997). Οι αναλυτές αυτοί συνδυάζουν χρωματομετρικές/ποτενσιομετρικές αναλύσεις με ανοσοενζυμικούς προσδιορισμούς (Εικόνα 1.26).



Εικόνα 1.26. Ο βιοχημικός και ανοσοενζυμικός αναλυτής RxL Dimension της Dade Behring (σημερινή Siemens Diagnostics).

Τέλος από την δεκαετία του 2000 ο αυτοματισμός των βιοχημικών αναλυτών φτάνει πλέον σε πολύ υψηλά επίπεδα. Πλέον πολλά εργαστήρια προμηθεύονται τα λεγόμενα «προαναλυτικά συστήματα» (preanalytical systems) ή αλλιώς «αρθρωτά

συστήματα» (modular systems) (Εικόνα 1.27). Τα αρθρωτά συστήματα συνδυάζουν πολλούς διαδοχικούς αναλυτές, συστήματα λήψης δειγμάτων από τα σωληνάρια αιμοληψίας, φυγοκέντρους, ψυγεία για την αποθήκευση των ορών, συστήματα ανάδευσης, συστήματα απομάκρυνσης αλλά και επανατοποθέτησης δειγμάτων κ.α. Όλα αυτά σε ένα και μόνο μηχάνημα εξασφαλίζοντας έτσι για το εργαστήριο μεγάλη οικονομία σε εργατικό κόστος και αντιδραστήρια.



Εικόνα 1.27α. Το προ-αναλυτικό σύστημα της Roche



Εικόνα 1.28β. Το αναλυτικό σύστημα της Roche



1. Είσοδος - έξοδος
2. Κάμερα αναγνώρισης είδος και μεγέθους σωληναρίων
3. Σύστημα τοποθέτησης και απομάκρυνσης πωμάτων
4. Ψυγείο δειγμάτων
5. Χώρος τοποθέτησης αποβλήτων
6. Σύστημα σύνδεσης με το προ-αναλυτικό σύστημα
7. Σύστημα γενικού ελέγχου

Εικόνα 1.29γ. Το μετα-αναλυτικό σύστημα της Roche

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΟΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

Οι αναλυτικές μέθοδοι που μπορούν να διεκπεραιώσουν οι βιοχημικοί αναλυτές είναι οι ακόλουθοι:

A. Χρωματομετρικές για τους μεταβολίτες της κλασικής κλινικής χημείας (π.χ. γλυκόζη, ουρία, ηλεκτρολύτες κ.α.).

B. Ποτενσιομετρικές για τους ηλεκτρολύτες (K, Na, Cl).

Γ. Θολωσιμετρικές για πολυπεπτιδία (π.χ. ανοσοσφαιρίνες, φερριτίνη, CRP κ.α.).

Η ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

Οι χρωματομετρικές αναλύσεις οφείλουν το όνομα τους στο γεγονός ότι για την προσδιορισμό της άγνωστης συγκέντρωσης ενός διαλύματος χρωματίζουν το δείγμα με κατάλληλη χρωστική. Η ένταση του χρώματος του διαλύματος είναι ανάλογη με την ποσότητα της ουσίας που βρίσκεται στο δείγμα του ασθενούς και αντέδρασε με το αντιδραστήριο.

Η μαθηματική σχέση που συνδέει την απορρόφηση του φωτός με την συγκέντρωση της μετρούμενης ουσίας είναι ο γνωστός νόμος των Lambert – Beer (Εικόνα 2.1).

$$A = \log \frac{I_0}{I_1} = -\log T = abc_{g/l} = \epsilon bc_{mol/l} \quad \text{Εξίσωση 2.1}$$

Όπου:

A: Απορρόφηση του φωτός μέσα στη κυβέττα

I₀: Ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας

I₁: Ισχύς εξερχόμενης ακτινοβολίας

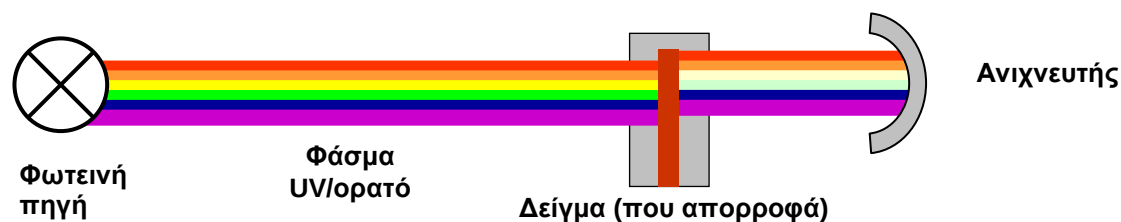
a: Απορροφητικότητα, σταθερά αναλογίας όταν η c εκφράζεται σε g/L

ε: Σταθερά αναλογίας όταν η c εκφράζεται σε mol/L

b: Απόσταση που διανύει το φως μέσα στην κυψελίδα

C: Συγκέντρωση της μετρούμενης ουσίας

Όταν $b = 1 \text{ cm}$ η απορρόφηση ονομάζεται οπτική πυκνότητα και συμβολίζεται ως OD (optical density).



Εικόνα 2.1. Μία απλή φωτομετρική διάταξη

Επειδή όμως το χρώμα του διαλύματος δεν οφείλεται αποκλειστικά στην προς μετρούμενη ουσία η συνολική απορρόφηση του διαλύματος $A_{ολ}$ ισούνται με:

$$A_{ολ} = abc_1 + abc_2 + \dots + abc_3 \quad \text{Εξίσωση 2.2}$$

Για την εξουδετέρωση των υπολοίπων ουσιών που προσμετρούνται χρησιμοποιείται η μέτρηση του **λευκού** (παλαιότερα **τυφλού**) του οποίου η απορρόφηση (A_{blank}) αφαιρείται από την μέτρηση κάθε δείγματος (βλ. παρακάτω).

$$A = A_{ολ} - A_{blank} \quad \text{Εξίσωση 2.3}$$

Πίνακας 1. Τα μήκη κύματος των αναλύσεων των βιοχημικών αναλυτών

	Περιοχή	Χρώμα	Μέτρηση βιοχημικού αναλυτή
< 220	Υπεριώδης	Αόρατο	Όχι
220 - 380	Εγγύς υπεριώδης	Αόρατο	Ναι
380 - 440	Ορατή	Ιώδες	Ναι
440 - 500	Ορατή	Μπλε	Ναι
500 - 580	Ορατή	Πράσινο	Ναι
580 - 600	Ορατή	Κίτρινο	Ναι
600 - 620	Ορατή	Πορτοκαλί	Ναι
620 - 750	Ορατή	Κόκκινο	Ναι
750 - 2000	Εγγύς υπέρυθρη	Αόρατο	Όχι

Πίνακας 2. Τα μήκη κύματος των αναλύσεων των βιοχημικών αναλυτών

	340	405	492	510	546	578	630	710
GLUC				+	+			
UREA UV	+							
UREA BUN						+		
CREAT			+					
UA				+	+			
CHOL				+	+			
TRIG				+	+			
HDL				+	+			
LDL					+			
TP					+			
ALB					+			
TBILI					+			
DBILI					+			
IRON							+	
CA						+		
PHOS	+							
GOT	+							
GPT	+							
γGT		+						
ALP		+						
LDH-P UV	+							
CK-NAC UV	+							
CK-MB UV	+							
CHE		+						
Mg					+			

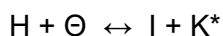
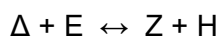
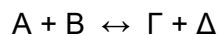
Η ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ

Κάθε χημική αντίδραση στους βιοχημικούς αναλυτές περιλαμβάνει δύο ή περισσότερες αντιδρώσες ουσίες και καταλήγει σε προϊόντα, ένα των οποίων, στην καλύτερη περίπτωση, απορροφά μονοχρωματικό φως. Το προϊόν αυτό καλείται **χρωμογόνο**.

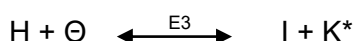
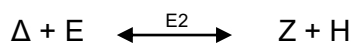
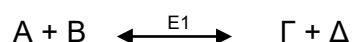
Η λέξη «χρωμογόνο» δεν αναφέρεται υποχρεωτικά σε έγχρωμο προϊόν. Συχνά υπάρχουν στον ορό ουσίες ξένες προς την αντίδραση, που είναι έγχρωμες και παρεμβάλλονται στην φωτομέτρηση, οπότε είναι υποχρεωτική η συνέχιση των αντιδράσεων ως τον σχηματισμό άλλου χρωμογόνου, που απορροφά σε διαφορετικό μήκος κύματος.



Πολύ συχνά η πρώτη αντίδραση (και, συχνότερα, οι πρώτες 2-3) δεν παράγει χρωμογόνο προϊόν, και, έτσι, απαιτείται ο συνδυασμός πολλών, αλληπάλληλων αντιδράσεων, ως την δημιουργία του.



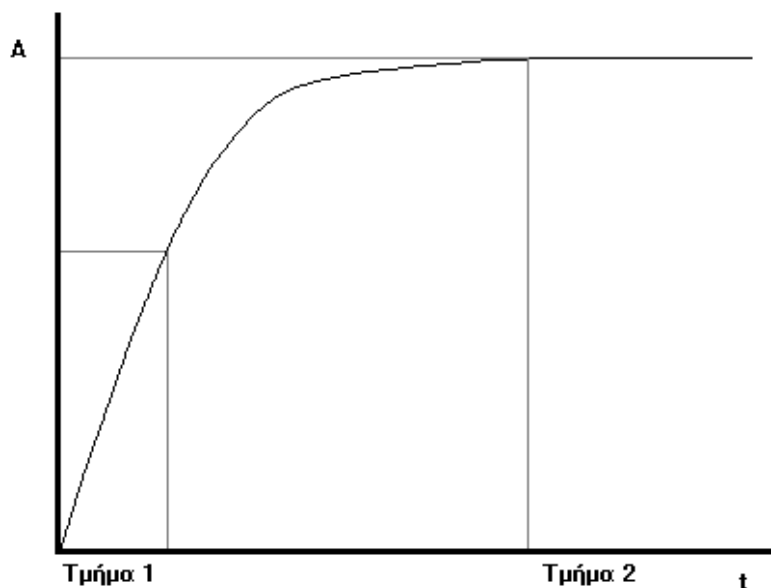
Οι αντιδράσεις είναι δυνατόν να είναι **εξώθερμες**, δηλαδή να γίνονται αυτόματα, μόλις έλθουν σε επαφή οι αντιδρώσες ουσίες, με την ανάδευση δείγματος και αντιδραστηρίων. Αυτό όμως στις αναλύσεις των βιοχημικών αναλυτών τυχαίνει σπάνια. Το συνηθέστερο είναι μία ή περισσότερες αντιδράσεις να απαιτούν κατάλυση, μέσω συνδυασμού ενζύμων και συνενζύμων για να ολοκληρωθούν.



E1, E2, E3 : Ένζυμα

Όλες οι χημικές αντιδράσεις ακολουθούν την γενική πορεία της εικόνας 2.2. Υπάρχει ένα τμήμα σχεδόν σταθερής ταχύτητας (τμήμα 1), όπου η αντίδραση φαίνεται να είναι γραμμική και κατόπιν η ταχύτητα μειώνεται σταδιακά, μέχρι να μηδενιστεί (τμήμα 2).

Οι αντιδράσεις που χρησιμοποιούνται στην Κλινική Χημεία καταχωρούνται σε τρεις βασικές κατηγορίες, ανάλογα με το **μαθηματικό μοντέλο**, με το οποίο γίνεται η επεξεργασία της καμπύλης της αντίδρασης. Ο λόγος ύπαρξης αυτών των μεθόδων είναι ότι είμαστε αναγκασμένοι ανάλογα με το είδος και τις χημικές ιδιότητες της προς προσδιορισμό ουσίας να εκμεταλλευόμαστε και διαφορετικό τμήμα της καμπύλης, ώστε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση ή την ενεργότητα.



Εικόνα 2.2. Γραφική αναπαράσταση της γενικής πορείας αντιδράσεων Κλινικής Χημείας

A = Οπτική απορρόφηση, t = χρόνος.

Τμήμα 1 ή τμήμα σταθερής ταχύτητας

Χρησιμοποιείται για την μέτρηση της συγκέντρωσης ουσιών στις **τεχνικές πρώτης τάξης ή τεχνικές σταθερού χρόνου** και για την μέτρηση της ενεργότητας ενζύμων με **τεχνικές μηδενικής τάξης ή κινητικές τεχνικές**.

Το χαρακτηριστικό του τμήματος αυτού είναι ότι η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης. Οι κατασκευαστές των αντιδραστηρίων και των αναλυτών με προσεκτική σύνθεση ενζύμων και υποστρωμάτων κατορθώνουν να παρατείνουν το τμήμα 1 έτσι ώστε η ταχύτητα να παραμείνει σταθερή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και να δοθεί έτσι χρόνος για να υπολογιστεί η ενεργότητα των ενζύμων (βλ. παρακάτω κινητικές τεχνικές).

Τμήμα 2 ή τμήμα μηδενικής ταχύτητας

Στο τμήμα αυτό η αντίδραση έχει πλέον τελειώσει (στην πραγματικότητα υπάρχει μόνο κατάσταση ισορροπίας). Οι **τεχνικές τελικού σημείου** χρησιμοποιούνται μόνο για τον υπολογισμό της **συγκέντρωσης** ουσιών.

Η εξίσωση Michaelis-Menten

Η εξίσωση των Michaelis - Menden (Εικόνα 2.3) προσδιορίζει την κατανάλωση του υποστρώματος σε μία ενζυμική αντίδραση και έχει την παρακάτω μορφή:

$$V = V_o[S]/K_m + [S] \quad \text{Εξίσωση 2.4}$$

Όπου:

V = Ταχύτητα της αντίδρασης σε μία χρονική στιγμή

V_o = Μέγιστη θεωρητική ταχύτητα της αντίδρασης

$[S]$ = Η συγκέντρωση του υποστρώματος την στιγμή της μέτρησης της ταχύτητας

K_m = Η σταθερά Michaelis

Ο τύπος επιλύεται ως εξής:

1. Αρχικά στάδια της αντίδρασης

$$V = (V_o/K_m + [S]) / [S]$$

άρα η ταχύτητα (V) εξαρτάται από την συγκέντρωση του υποστρώματος ($[S]$)

2. Περίσσεια υποστρώματος $[S] \gg K_m$.

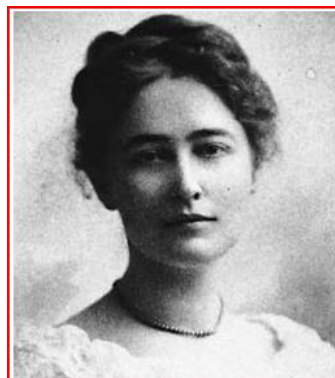
$$V = V_o ([S]/[S]), \text{ άρα } V = V_o$$

Η ταχύτητα διατηρείται σταθερή, τουλάχιστον για όσο χρόνο η συγκέντρωση του υποστρώματος θα είναι κατά πολύ μεγαλύτερη της σταθεράς Michaelis ($[S] > 10K_m$).

3. Πλήρης κατανάλωση υποστρώματος, τέλος αντίδρασης

$$[S] = 0, \text{ άρα } V = 0$$

Η ταχύτητα (V) είναι μηδενική, η αντίδραση έχει τελειώσει, καθώς δεν υπάρχει διαθέσιμο υπόστρωμα



Εικόνα 2.3. Αριστερά ο Γερμανός χημικός Leonor Michaelis (1875 – 1949) και δεξιά η Καναδή χημικός Maud Leonora Menten (1879 – 1960).

ΟΙ ΧΡΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

Στις χρωματομετρικές αναλύσεις πραγματοποιούνται κυρίως δύο ειδών μετρήσεις, οι μετρήσεις τελικού σημείου (end point) και οι κινητικές μετρήσεις (kinetics). Παραλλαγή της κινητικής μέτρησης είναι η μέτρηση σταθερού χρόνου (fixed time).

Η μέτρηση τελικού σημείου

Στις μετρήσεις **τελικού σημείου** η μέτρηση της απορρόφησης του χρωμογόνου γίνεται στο στάδιο ισορροπίας της ενζυμικής αντίδρασης. Στο σημείο αυτό η απορρόφηση είναι ανάλογη με την συγκέντρωση σύμφωνα με τον γνωστό νόμο των Lambert και Beer (Εξίσωση 1). Για τον προσδιορισμό όμως της συγκέντρωσης του εξεταστέου δείγματος (C_{sample}) είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της απορρόφησης ενός προτύπου δείγματος (A_{standard}) δηλαδή ενός δείγματος γνωστής συγκέντρωσης (C_{standard}). Από τις τιμές αυτές αφαιρείται η απορρόφηση του λευκού (A_{blank}). Από τις τιμές A_{standard} και C_{standard} υπολογίζεται ένας συντελεστής (factor) επί τον οποίο πολλαπλασιάζεται η απορρόφηση κάθε αγνώστου δείγματος (A_{sample}).

Από τις εξισώσεις 1, 2 και 3 προκύπτει ότι η απορρόφηση του δείγματος είναι:

$$A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}} = a b C_{\text{std}}$$

Εξίσωση 2.5

Αντίστοιχα η απορρόφηση του προτύπου δείγματος είναι:

$$A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}} = a b C_{\text{std}} \quad \text{Εξίσωση 2.6}$$

Οι εξισώσεις 5 και 6 μπορούν να εκφραστούν και ως αναλογία σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα:

$$\frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{std}} - A_{\text{blank}}} = \frac{abC_{\text{sample}}}{abC_{\text{std}}} \quad \text{Εξίσωση 2.7}$$

Αν αφαιρεθούν οι κοινές παράμετροι a και b από το δεύτερο μέρος της εξίσωσης η εξίσωση 6 θα γίνει ως εξής:

$$\frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{std}} - A_{\text{blank}}} = \frac{C_{\text{sample}}}{C_{\text{std}}} \quad \text{Εξίσωση 2.8}$$

$$\text{ή} \quad C_{\text{sample}} = \left(\frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{std}} - A_{\text{blank}}} \right) C_{\text{std}} \quad \text{Εξίσωση 2.9}$$

Η εξίσωση αυτή είναι παρόμοια με την εξίσωση που χρησιμοποιείται στα απλά φωτόμετρα η οποία έχει την γενική μορφή: $C_{\text{sample}} = A_{\text{sample}} / A_{\text{standard}} \times C_{\text{standard}}$. Η διαφορά είναι δηλαδή ότι δεν αφαιρείται η απορρόφηση του τυφλού από τον τύπο επειδή έχει ήδη αφαιρεθεί κατά τον μηδενισμό του οργάνου.

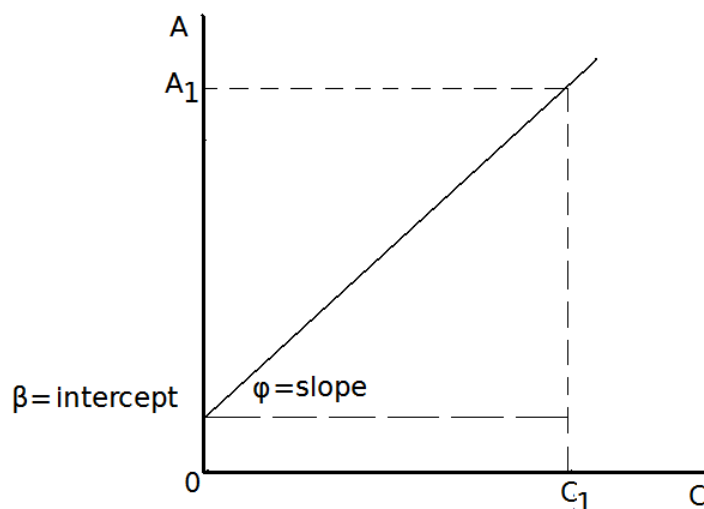
Η εξίσωση 8 μπορεί να γραφτεί και ως εξής:

$$C_{\text{sample}} = \left(\frac{C_{\text{std}}}{A_{\text{std}} - A_{\text{blank}}} \right) (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \quad \text{Εξίσωση 2. 10}$$

Στην εξίσωση 10 το κλάσμα $C_{\text{std}} / (A_{\text{std}} - A_{\text{blank}})$ μπορεί να αντικατασταθεί από τον συντελεστή («**Factor**»).

$$C_{\text{sample}} = \text{Factor} (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \quad \text{Εξίσωση 2.11}$$

Η μορφή της εξίσωσης 5 είναι παρόμοια με την απλή γραμμική εξίσωση $y = ax$ και θα μπορούσε να παρασταθεί και γραφικά (Εικόνα 2.4, 2.5, 2.6). Ο Factor της εξίσωσης 5 ισούνται με το συντελεστή a της γραμμικής εξίσωσης $y = ax$.



Εικόνα 2.5. Αναπαράσταση της εξίσωσης βαθμονόμησης μιας ενζυμικής αντίδρασης τελικού σημείου. Η εξίσωση έχει την γενική μορφή $y = ax + \beta$ όπου το β ισούνται με το «intercept» και το a με το «slope» των πρωτοκόλλων στους βιοχημικούς αναλυτές. Το y είναι η άγνωστη συγκέντρωση του δείγματος και x η απορρόφησή του. Το a είναι η κλίση της ευθείας και ισούνται με την συνεφαπτομένη της γωνίας ϕ .

Οι μετρήσεις τελικού σημείου χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των υποστρωμάτων Creat, HDL, Glu, TBIL κ.α.

Η εξίσωση αναφοράς ως γραμμική παλινδρόμηση

Η καμπύλη αναφοράς στις χρωματομετρικές αναλύσεις εκφράζεται με την εξίσωση: $y = \hat{a}x + \hat{b} + e$ όπου $E(e) = 0$. Το e είναι το σφάλμα της μεθόδου το οποίο πρέπει να έχει αλγεβρικό άθροισμα ίσο με το μηδέν. Γι' αυτό τον λόγο επιλέγονται κατάλληλα a και b .

Ισχύει:

$$\hat{a} = \frac{n \sum_1^n x_i y_i - \sum_1^n y_i \sum_1^n x_i}{n \sum_1^n x_i^2 - (\sum_1^n x_i)^2} \quad \text{ή}$$

$$\hat{a} = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

Εξίσωση 2.12

Όπου:

$$S_{xx} = \sum_1^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

Το $\hat{\beta}$ υπολογίζεται από την σχέση: $\hat{\beta} = \bar{y} - \hat{\alpha}\bar{x}$

Εξίσωση 2.13

Η ποιότητα του συντελεστή συσχέτισης εξαρτάται από την σταθερά του Pearson r η οποία ισούνται με:

$$r = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - (\sum_{i=1}^n x_i)(\sum_{i=1}^n y_i)}{\sqrt{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2} \sqrt{n \sum_{i=1}^n y_i^2 - (\sum_{i=1}^n y_i)^2}}$$

Εξίσωση 2.14

Τιμές $r > 0$ σημαίνουν θετική συσχέτιση δηλαδή όσο αυξάνουν οι τιμές x αυξάνουν και οι τιμές y

Τιμές $r < 0$ σημαίνουν αρνητική συσχέτιση δηλαδή όσο αυξάνουν οι τιμές x ελαττώνονται οι τιμές y

Τιμές r κοντά το 1 σημαίνει τέλεια συσχέτιση. Π.χ. όταν $r = 0,95$ σημαίνει ότι το 95% των τιμών ερμηνεύεται από την εξίσωση $y = \hat{\alpha}x + \hat{b} + e$.

Παράδειγμα

Έστω ότι κάνουμε βαθμονόμηση στην εξέταση PHOS σε ένα σύγχρονο βιοχημικό αναλυτή που χρησιμοποιεί για την εξέταση αυτή 4 βαθμονομητές. Στη πράξη όμως είναι 5 αν υπολογιστεί και το αποσταγμένο νερό που χρησιμοποιείται ως τυφλό. Οι συγκεντρώσεις των 5 βαθμονομητών είναι οι ακόλουθες:

A/A	Calibrator (mg/dL)
1	0
2	1,2
3	2,5
4	3,6
5	5,3

Από κάθε βαθμονομητή μετρώνται 3 απορροφήσεις:

	Calibrator (mg/dL)	A1	A2	A3
1	0	0,01	0,03	0,015
2	1,2	0,156	0,165	0,162
3	2,5	0,289	0,279	0,281
4	3,6	0,421	0,432	0,431
5	5,3	0,654	0,689	0,687

Υπολογίζεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση και ο συντελεστής μεταβλητότητας των τριών απορροφήσεων. Η διασπορά των απορροφήσεων δεν πρέπει να υπερβεί το $CV = 5\%$.

	Calibrator (mg/dL)	A1	A2	A3	Mean	SD	CV%
1	0	0,01	0,03	0,015	0,02	0,01	56,77
2	1,2	0,156	0,165	0,162	0,16	0,00	2,85
3	2,5	0,289	0,279	0,281	0,28	0,01	1,87
4	3,6	0,421	0,432	0,431	0,43	0,01	1,42
5	5,3	0,654	0,689	0,687	0,68	0,02	2,90

Κανονικά ο βαθμονομητής 1 με συγκέντρωση 0 δεν θα πρέπει να συμμετάσχει στη κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Θα πρέπει δηλαδή ή να απορρίψουμε την μέση τιμή τους ή να απορρίψουμε μια από τις τρεις απορροφήσεις ή ακόμα και ολόκληρη την καμπύλη. Τέτοιες μεγάλες διασπορές είναι συνηθισμένες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Ονομάζουμε τις συγκεντρώσεις των βαθμονομητών ως μεταβλητή y_i και τη μέση τιμή των απορροφήσεων μεταβλητή x_i .

Υπολογίζουμε αρχικά την μεταβλητή S_{xx} του συντελεστή a της εξίσωσης αναφοράς.

	A1	A2	A3	Mean (x_i)	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
1	0,01	0,03	0,015	0,02	-0,29	0,08
2	0,156	0,165	0,162	0,16	-0,15	0,02
3	0,312	0,279	0,281	0,29	-0,02	0,00
4	0,421	0,432	0,431	0,43	0,12	0,01
5	0,654	0,689	0,687	0,68	0,37	0,13
			$\bar{x} =$	0,31	$S_{xx} =$	0,26

Μετά υπολογίζουμε την μεταβλητή S_{xy} του συντελεστή a της εξίσωσης αναφοράς.

	Cals (y_i)	A1	A2	A3	Mean (x_i)	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$
1	0	0,01	0,03	0,015	0,02	-0,29	-2,52	0,73
2	1,2	0,156	0,165	0,162	0,16	-0,15	-1,32	0,20
3	2,5	0,289	0,279	0,281	0,28	-0,03	-0,02	0,00
4	3,6	0,421	0,432	0,431	0,43	0,12	1,08	0,13
5	5,3	0,654	0,689	0,687	0,68	0,37	2,78	1,03
$\bar{y} =$	2,52			$\bar{x} =$	0,31		$S_{xy} =$	2,09

Οπότε το $\hat{a}$ ισούνται με: $\hat{a} = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} = \frac{2,09}{0,26} = 8,03$

Το $\hat{\beta}$ ισούνται με: $\hat{\beta} = \bar{y} - \hat{a}\bar{x} = 2,52 - 8,03 \times 0,31 = 0,13$

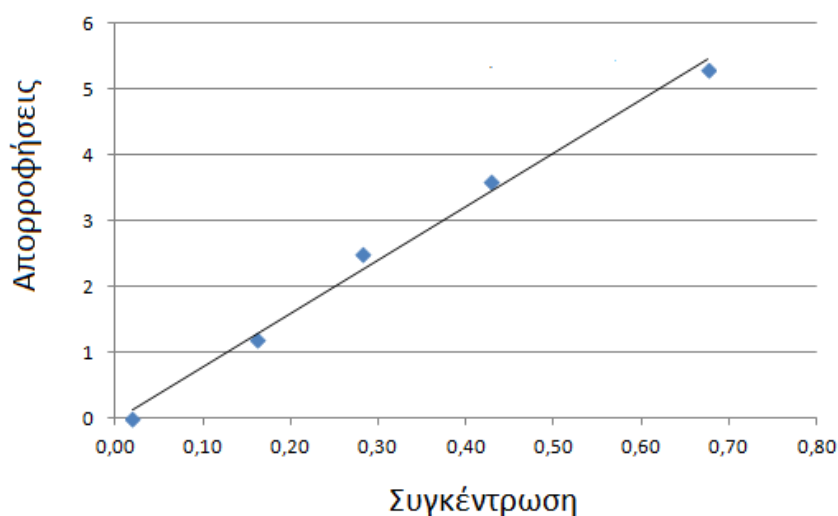
Κατά συνέπεια οι συγκεντρώσεις των αγνώστων δειγμάτων θα υπολογίζονται από την σχέση:

$$Conc = 8,03 \times A + 0,13$$

Έστω για παράδειγμα ότι η απορρόφηση ενός δείγματος είναι 0,500.

Η συγκέντρωσή του θα είναι: $Conc = 8,03 \times A + 0,13 = 8,03 \times 0,500 + 0,13 =$

4,1 mg/dL



Το r της μεθόδου είναι 0,99. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει πολύ καλή παλινδρόμηση της συγκέντρωσης από την απορρόφηση, δηλαδή μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση από την απορρόφηση.

Η μέτρηση του λευκού στους βιοχημικούς αναλυτές

Ο βιοχημικός αναλυτής μετράει την απορρόφηση του **λευκού**¹ διαλύματος όπως γίνεται και στα φωτόμετρα. Η απορρόφηση αυτή συμβολίζεται A_{blank} και αποτελεί την απορρόφηση του φωτός που προκαλείται από το διάλυμα εργασίας, τον διαλύτη ακόμα και από την κυψελίδα όπου βρίσκεται το διάλυμα.

Η μέτρηση του λευκού έχει δύο κύριες χρησιμότητες:

- A. Η απορρόφηση του λευκού (A_{blank}) αφαιρείται από οποιαδήποτε άλλη μέτρηση (βλ. εξίσωση 3). Με την αφαίρεση αυτή η απορρόφηση του φωτός από τα διαλύματα των δειγμάτων οφείλεται αποκλειστικά στην ουσία που θέλουμε να μετρήσουμε (ουρία, γλυκόζη κ.τ.λ.).
- B. Οι κυψελίδες, όπου γίνονται οι φωτομετρικές μετρήσεις, με τον καιρό «λερώνονται» και θέλουν έτσι πλύσιμο με ειδικό πλυστικό διάλυμα ή αποσταγμένο νερό ή ακόμα και αντικατάσταση. Η τιμή της απορρόφησης του λευκού πληροφορεί τον αναλυτή για τον αν χρειάζεται πλύσιμο ή αντικατάσταση της κυψελίδας.

¹ Το λευκό διάλυμα (blank) παλαιότερα ονομάζονταν τυφλό (blind) δηλαδή άγνωστης συγκέντρωσης. Σήμερα ο όρος λευκό έχει επικρατήσει και χαρακτηρίζει το διάλυμα που δεν έχει μετρήσιμη ουσία (διάλυμα ή standard) παρά μόνο το αντιδραστήριο εργασίας και τον διαλύτη.

```

+
```

Όπου:

V_r : Όγκος αντιδραστηρίου

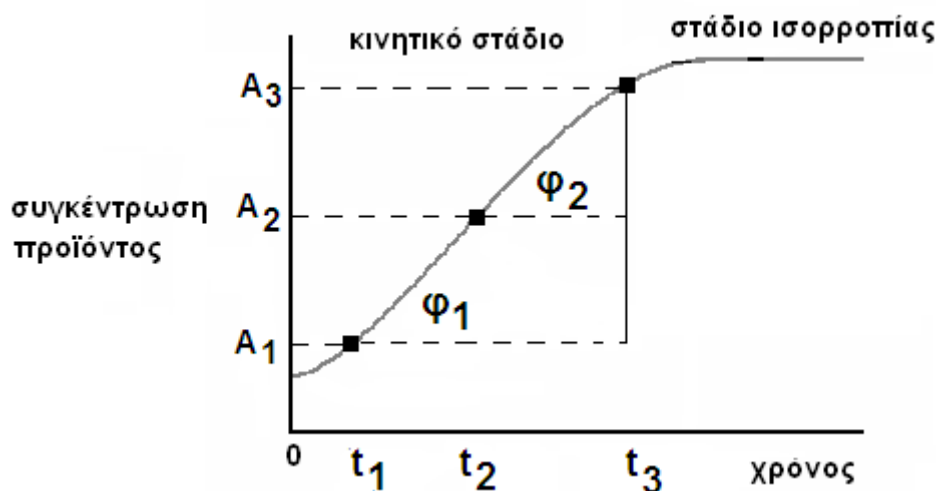
V_s : Όγκος δείγματος

b : Διαδρομή του φωτός διαμέσου της κυβέτας

α : Απορροφητικότητα (εξαρτάται από την εξέταση και το μήκος κύματος)

t : Διάρκεια της ανάλυσης

T : Συντελεστής διόρθωσης της θερμοκρασίας



Εικόνα 25a. Οι τρεις μετρήσεις οπτικής απορρόφησης A_1 , A_2 , A_3 σε διαφορετικούς χρόνους t_1 , t_2 , t_3 στις κινητικές χρωματομετρικές μεθόδους.

Οι κινητικές μετρήσεις χρησιμοποιούνται για τον **προσδιορισμό των ενζύμων** (GOT, GPT, γGT κ.α.). Παλαιότερα οι προσδιορισμοί των ενζύμων δεν βαθμονομούνταν. Ο προσδιορισμός της ενεργότητάς τους γίνονταν με τις εξισώσεις 12 και 13. Σήμερα όμως η Ευρωπαϊκή οδηγία 98/79 EC απαιτεί και για ένζυμα να γίνεται βαθμονόμηση οπότε θα πρέπει και αυτά να προσδιορίζονται με εξίσωση παρόμοια με την 9 όπου αντί για απορρόφηση θα χρησιμοποιείται η μέση διαφορά της απορρόφησης των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.

$$Activity_{sample} = \frac{(\Delta A_{sample} - \Delta A_{blank})}{(\Delta A_{std} - \Delta A_{blank})} Activity_{std} \quad \text{Εξίσωση 17}$$

Οι προσδιορισμοί σταθερού χρόνου

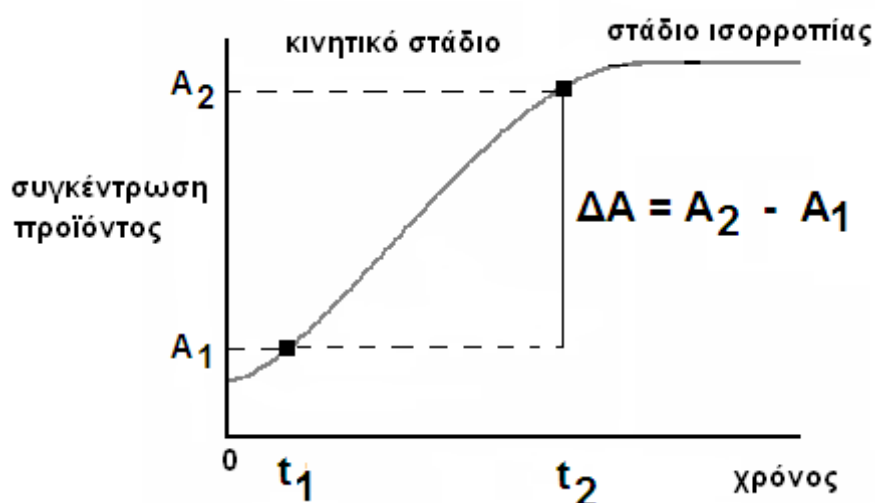
Παραλλαγή της προηγούμενης μεθόδου είναι η μέτρηση **σταθερού χρόνου** (Εικόνα 2.6). Σε αυτή ο αναλυτής ο αναλυτής κάνει δύο μετρήσεις απορρόφησης A_1 και A_2 σε δύο διαφορετικά σημεία του κινητικού σταδίου της ενζυμικής αντίδρασης. Κατόπιν μετράται η διαφορά των δύο απορροφήσεων $\Delta A = A_1 - A_2$. Η συγκέντρωση του δείγματος προέρχεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$C_{sample} = [(Slope_{sample} 60) - (Slope_{blank} 60) Factor] \quad \text{Εξίσωση 2.18}$$

Ο Factor υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο στο οποίο συμμετέχουν οι μετρήσεις του βαθμονομητή και συγκεκριμένα η τυπική απόκλιση των διαδοχικών μετρήσεων της συγκέντρωσης του καθώς και η κλίση ($Slope_{std}$) του κινητικού σταδίου της ενζυμικής αντίδρασης του βαθμονομητή.

$$Factor = \frac{SD_{συγκέντρωσης} \cdot Slope_{std}}{Slope_{std} 60 - Slope_{blank} 60} \quad \text{Εξίσωση 2.19}$$

Οι μετρήσεις σταθερού χρόνου χρησιμοποιούνται μόνο σε **υποστρώματα** στις περιπτώσεις όπου οι αντιδρώντες ουσίες έχουν **πολύ έντονο χρωματισμό**, τέτοιο ώστε να είναι δυσχερής η σωστή μέτρηση των προϊόντων στο στάδιο ισορροπίας. Τέτοια περίπτωση είναι η μέτρηση της **κρεατινίνης** με την μέθοδο Jaffe.



Εικόνα 2.6. Τα σημεία μέτρησης σταθερού χρόνου κατά την διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης.

Στις μετρήσεις σταθερού χρόνου δεν χρειάζεται μηδενισμός με λευκό αλλά ούτε και βαθμονόμηση του αναλυτή.

Οι διχρωματικές αναλύσεις

Σήμερα οι βιοχημικοί αναλυτές χρησιμοποιούν σε μεγάλο βαθμό τις λεγόμενες διχρωματικές αναλύσεις (bichromatic analysis), δηλαδή, μετρήσεις σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος (Hahn, et al. 1979). Οι διχρωματικές αναλύσεις χρησιμοποιούνται για την εξουδετέρωση των προβλημάτων που προκαλούν τα αιμολυμένα, ικτερικά και λιπαιμικά αίματα. Όπως γνωρίζουμε από το σχετικό κεφάλαιο οι μετρήσεις που χρησιμοποιούν μήκος κύματος που απορροφούν το κόκκινο (γύρω στα 400 nm) ή το κίτρινο χρώμα (340 με 500 nm) θα βγάλουν εσφαλμένα αυξημένες ή μειωμένες τιμές. Για τον σκοπό αυτό οι αναλυτές λαμβάνουν πρόνοια για να απομακρύνουν τις μετρήσεις από τα «επικίνδυνα» μήκη κύματος.

Στην διχρωματική ανάλυση ο αναλυτής κάνει δύο μετρήσεις σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος (λ_1 και λ_2). Το πρώτο (λ_1) είναι αυτό που απαιτεί η ανάλυση και το δεύτερο (λ_2) ένα διαφορετικό μήκος κύματος μακριά από τα «επικίνδυνα» μήκη κύματος των αιμολυμένων και ικτερικών δειγμάτων αίματος. Σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση του δείγματος είναι ανάλογη με την διαφορά των δύο απορροφήσεων.

Έστω ότι αυτές οι απορροφήσεις είναι A_1 και A_2 για τα δύο διαφορετικά μήκη κύματος λ_1 και λ_2 αντίστοιχα. Στις μετρήσεις τελικού σημείου ο γνωστός νόμος του Lambert-Beer (εξίσωση 1) παίρνει την εξής μορφή:

$$A_1 = \alpha'_{\text{sample}} b C_{\text{sample}} + \alpha'_{\text{blank}} b C_{\text{blank}} \quad \text{Εξίσωση 2.20}$$

$$A_2 = \alpha''_{\text{sample}} b C_{\text{sample}} + \alpha''_{\text{blank}} b C_{\text{blank}} \quad \text{Εξίσωση 2.21}$$

Όπου:

A_1 : η απορρόφηση στο πρώτο μήκος κύματος λ_1

A_2 : η απορρόφηση στο δεύτερο μήκος κύματος λ_2

α' : η απορροφητικότητα στο πρώτο μήκος κύματος λ_1

α'' : η απορροφητικότητα στο δεύτερο μήκος κύματος λ_2

b : η απόσταση που διανύει το φως μέσα στην κυβέττα

C_{sample} : η συγκέντρωση του δείγματος

C_{blank} : η συγκέντρωση του τυφλού η οποία ισούνται με το μηδέν

Αν αφαιρέσουμε τις δύο εξισώσεις προκύπτει:

$$A_2 - A_1 = C_{\text{sample}} (\alpha''_{\text{sample}} - \alpha'_{\text{sample}}) \quad \text{Εξίσωση 2.22}$$

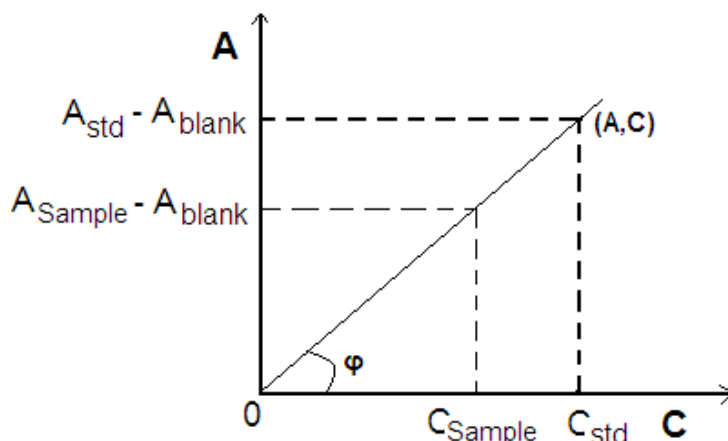
Κατά συνέπεια η συγκέντρωση το δείγματος δίνεται από την σχέση:

$$C_{\text{sample}} = \frac{A_2 - A_1}{\alpha''_{\text{sample}} - \alpha'_{\text{sample}}} \quad \text{Εξίσωση 2.23}$$

Η καμπύλη βαθμονόμησης και η προσαρμογή της

Από την εξίσωση 9 και 17 ο βιοχημικός αναλυτής υπολογίζει την συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων. Ο «φάκτορας» (Factor) που υπολογίζεται με την βοήθεια του βαθμονομητή αποθηκεύεται στη μνήμη του αναλυτή και χρησιμοποιείται κάθε φορά σε κάθε νέα μέτρηση αγνώστου δείγματος χωρίς να χρειάζεται κάθε φορά βαθμονόμηση. Στους βιοχημικούς αναλυτές η **διαδικασία της βαθμονόμησης ή της καμπύλης δεν χρειάζεται κάθε φορά που τρέχουν άγνωστα δείγματα.**

Η βαθμονόμηση ονομάζεται και καμπύλη εξ' αιτίας του γεγονότος ότι παλαιότερα οι χρήστες των αναλυτών έκαναν πολλούς υπολογισμούς χειρονακτικά. Συγκεκριμένα κατασκεύαζαν κατάλληλη γραφική παράσταση που περιείχε στον οριζόντιο άξονα τιμές συγκέντρωσης και στον κάθετο άξονα τιμές απορρόφησης. Ο χρήστης σημείωνε πάνω στο διάγραμμα το σημείο όπου συναντώνται συγκέντρωση και απορρόφηση (A, C). Στην συνέχεια χάρασαν μια γραμμή που ένωνε το σημείο (A, C) με το σημείο 0 στην αρχή των αξόνων. Αυτή η γραμμή ονομάζονταν **καμπύλη βαθμονόμησης**. Η καμπύλη βαθμονόμησης μπορούσε στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της συγκέντρωσης αγνώστων δειγμάτων. Σε κάθε νέο δείγμα μετριόνταν η απορρόφηση του ($A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}$) ή ($\Delta A_{\text{sample}} - \Delta A_{\text{blank}}$) και τοποθετούνταν πάνω στο διάγραμμα. Στη συνέχεια βρίσκονταν η αντιστοιχία του σημείου αυτού με τον άξονα των συγκεντρώσεων όπου και η συγκέντρωση του δείγματος (C_{sample}).



Εικόνα 2.7. Η καμπύλη βαθμονόμησης στη φωτομέτρηση τελικού σημείου

Η ευθεία της εικόνας 2.7 περιγράφεται στα μαθηματικά με την εξίσωση:

$$Y = \beta + \alpha x \quad \text{Εξίσωση 2.24}$$

Όπου:

Y: η άγνωστη παράμετρος που ψάχνουμε, εδώ η συγκέντρωση C_{sample}

β: το σημείο όπου η ευθεία συναντά τον κάθετο άξονα, εδώ είναι το μηδέν

x: η τιμή της γνωστής μεταβλητής, εδώ της απορρόφησης: $A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}$

α: η συνεφαπτομένη της γωνίας ϕ , δηλαδή $\sigma\phi\phi$.

Στους αναλυτές το σημείο β δηλώνεται ως σταθερά b ή **intercept** και το α δηλώνεται ως α ή **slope (κλίση)**.

Η εξίσωση 9 μπορεί να μετατραπεί στην εξής:

$$C_{\text{sample}} = \alpha (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \quad \text{Εξίσωση 2.25}$$

Ο συντελεστής α τριγωνομετρικά αντιστοιχεί στον ορισμό της συνεφαπτομένης των δύο τριγώνων της εικόνας 2.7. Σύμφωνα με την τριγωνομετρία η συνεφαπτομένη μιας γωνίας ισούνται με το πηλίκο της προσκείμενης κάθετης προς την απέναντι κάθετη. Δηλαδή ισχύει:

$$\sigma\phi\phi = \frac{C_{\text{std}}}{A_{\text{std}} - A_{\text{blank}}} = \text{κλίση} \quad \text{Εξίσωση 2.26}$$

Στο παράδειγμα της προηγούμενης εικόνας οι τιμές απορρόφησης βρίσκονταν στον κάθετο άξονα και οι τιμές συγκέντρωσης στον οριζόντιο. Για τον λόγο αυτό η

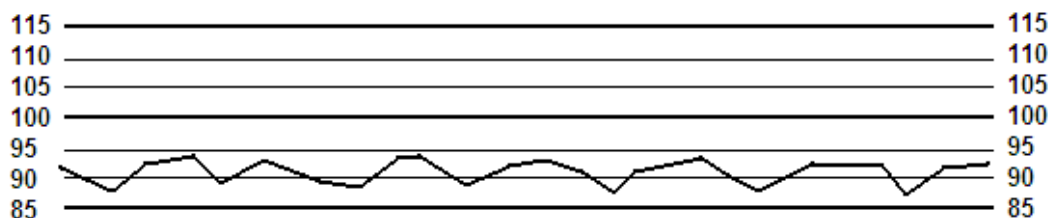
κλίση της γωνίας υπολογίζεται από την συνεφαπτομένη. Συνήθως όμως η συγκέντρωση βρίσκεται στον κάθετο άξονα και η απορρόφηση στον οριζόντιο. Τότε η κλίση υπολογίζεται από την **εφαπτομένη**.

Αλλάζοντας επομένως την κλίση της γωνίας ϕ μπορούμε να αλλάξουμε τις τιμές που προσδιορίζονται με την βαθμονόμηση.

Ας δούμε εδώ ένα παράδειγμα διόρθωσης των τιμών ενός προσδιορισμού. Έστω ότι από το διάγραμμα ελέγχου η Levey-Jennings (βλ. παρακάτω) παίρνουμε την παρακάτω εικόνα 2.8. Στο διάγραμμα φαίνεται να υπάρχει ένα σοβαρό συστηματικό σφάλμα αφού όλες οι ημερήσιες τιμές ελέγχου είναι κάτω από την μέση τιμή των ορίων ελέγχου (βλ. επόμενο κεφάλαιο). Συγκεκριμένα οι τιμές των controls έχουν μετακινηθεί από την τιμή 100 (τιμή στόχος) στην τιμή 90 (περίπου). Απαιτείται επομένως διόρθωση του σφάλματος προκειμένου να επανέλθουν οι τιμές γύρω στο 100.

Οι ενέργειες που θα κάνουμε είναι οι εξής:

Παρατηρήστε ότι η μετατόπιση ήταν 10 μονάδες αφού από την μέση τιμή 100 οι τιμές πήγαν κοντά στο 90 δηλαδή $100 - 90 = 10$ μονάδες. Υπήρξε επομένως μείωση των τιμών κατά 10%. Στο ίδιο ποσοστό θα πρέπει τώρα οι τιμές να ανέβουν. Έτσι αν ο φάκτορας ήταν πριν την διόρθωση π.χ. 1,456 τώρα θα πρέπει να ανέβει 10% και να γίνει 1,6.



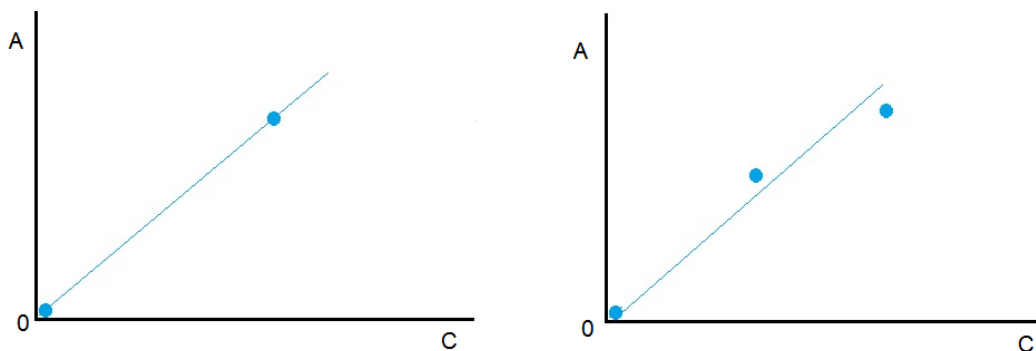
Εικόνα 2.8. Διάγραμμα Levey-Jennings με συστηματικό σφάλμα.

Βαθμονόμηση τελικού σημείου με πολλούς βαθμονομητές

Στις δια χειρός (manual) μεθόδους τελικού σημείου φαίνεται ότι η βαθμονόμηση γίνεται με ένα μόνο βαθμονομητή. Για να σχεδιαστεί όμως μία γραμμή χρειάζονται δύο σημεία. Το δεύτερο ήταν η τιμή μηδέν, δηλαδή υπήρχε τυπικά ένα ακόμα βαθμονομητής που ήταν ίσος με το κενό. Έτσι στις δια χειρός μεθόδους η εξίσωση $Y = \beta + \alpha x$ έχει β (intercept) = 0 δηλαδή $Y = \alpha x$.

Στις βαθμονομήσεις όμως στους αυτόματους αναλυτές υπάρχουν σε πολλές εταιρείες τρεις ή περισσότεροι βαθμονομητές καθώς επίσης λαμβάνονται δύο τουλάχιστον τιμές απορρόφησης για κάθε ένα από αυτούς. Για τη κατασκευή τότε της

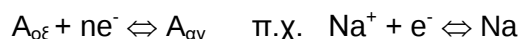
καμπύλης βαθμονόμησης χρησιμοποιούνται οι μέσες τιμές των δύο/τριών απορροφήσεων κάθε βαθμονομητή. Από τα τρία σημεία σχεδιάζεται ευθεία που περνάει εγγύτερα προς τα περισσότερα και υπολογίζεται η εξίσωση $Y = \beta + \alpha x$ σύμφωνα με τη στατιστική μεθοδολογία της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων. Οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται σε αυτή την περίπτωση είναι οι 12, 13, 14.



Εικόνα 2.9. Καμπύλη βαθμονόμησης με ένα (αριστερά) και δύο (δεξιά) βαθμονομητές διαφορετικής συγκέντρωσης – υπάρχει και ένας ακόμα βαθμονομητής που είναι το κενό.

Η ΠΟΤΕΝΣΙΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΟΥΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥΣ ΑΝΑΛΥΤΕΣ

Όπως ειπώθηκε στο πρώτο κεφάλαιο οι βιοχημικοί αναλυτές μπορούν και μετρούν και ιόντα και συγκεκριμένα τους ηλεκτρολύτες (Na^+ , K^+ , Cl^-). Πάνω στα ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια ο ιονισμός των μετρούμενων ηλεκτρολυτών γίνεται με την μορφή οξειδοαναγωγικής ημιαντιδράσεως η οποία έχει την γενική μορφή:



Το ηλεκτρικό φορτίο που προκαλείται από την κίνηση των ηλεκτρονίων αυτής της οξειδοαναγωγικής ημιαντιδράσεως ονομάζεται **δυναμικό ηλεκτροδίου** και υπολογίζεται από τον γνωστό νόμο του Nernst (Εικόνα 2.7).

$$E = E^o - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{A}_{\text{av}}]}{[\text{A}_{\text{ox}}]} \quad \text{Εξίσωση 2.27}$$

E^o: Τυπικό δυναμικό του ηλεκτροδίου σε volts, δηλαδή η τιμή του E όταν οι μοριακές συγκεντρώσεις του οξειδωτικού και του αναγωγικού είναι ίσες με την μονάδα.

R: Παγκόσμια σταθερά των αερίων 8,31441 volt coulomb $^{\circ}\text{K}^{-1} \text{mol}^{-1}$

T: Απόλυτη θερμοκρασία (σε $^{\circ}\text{K}$)

F: Σταθερά του Faraday (96485,38 coulombs/eq)

n: Αριθμός των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην αντίδραση (eq/mol)

α_{Aav} : Ενεργότητα της ανηγμένης μορφής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους

α_{Aox} : Ενεργότητα της οξειδωμένης μορφής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους

Τα ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια είναι μικρές διατάξεις που περιέχουν δύο ηλεκτρόδια τα ηλεκτρόδια αναφοράς και τα ενδεικτικά ηλεκτρόδια. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς διακρίνονται ανάλογα με την κατασκευή τους στα ηλεκτρόδια καλομέλανος, αργύρου-χλωριούχου αργύρου και υδρογόνου. Τα ενδεικτικά ηλεκτρόδια διακρίνονται στα **μεταλλικά** και στα **ηλεκτρόδια μεμβράνης**. Τα συνηθέστερα στους βιοχημικούς αναλυτές είναι τα ηλεκτρόδια μεμβράνης επειδή είναι εκλεκτικά ως προς ένα είδος ιόντος (K^+ , Na^+ , Cl^-).

Τα ενδεικτικά ηλεκτρόδια μπορούν και απορροφούν τα ιόντα του δείγματος τόσο με βάση το φορτίο τους (έχουν αντίθετο φορτίο και έλκουν τα ιόντα) όσο και ως προς την διαπερατότητα τους από αυτά. Μόλις το ενδεικτικό ηλεκτρόδιο απορροφήσει το ιόν που μπορεί να περάσει από την μεμβράνη του, φορτίζεται αντίστοιχα (π.χ. θετικά για τα ιόντα καλίου και νατρίου και αρνητικά για τα ιόντα χλωρίου). Το αποτέλεσμα είναι

να δημιουργείται μια διαφορά δυναμικού μεταξύ του ενδεικτικού ηλεκτροδίου και του ηλεκτροδίου αναφοράς. Λόγω της διαφοράς δυναμικού κυκλοφορούν ηλεκτρόνια από το ένα ηλεκτρόδιο στο άλλο και εμφανίζεται έτσι ηλεκτρικό ρεύμα. Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση του ρεύματος τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των ιόντων. Το τυπικό δυναμικό ηλεκτροδίου υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$E = E_{\text{ενδ}} - E_{\text{αναφ}} + E_j$$

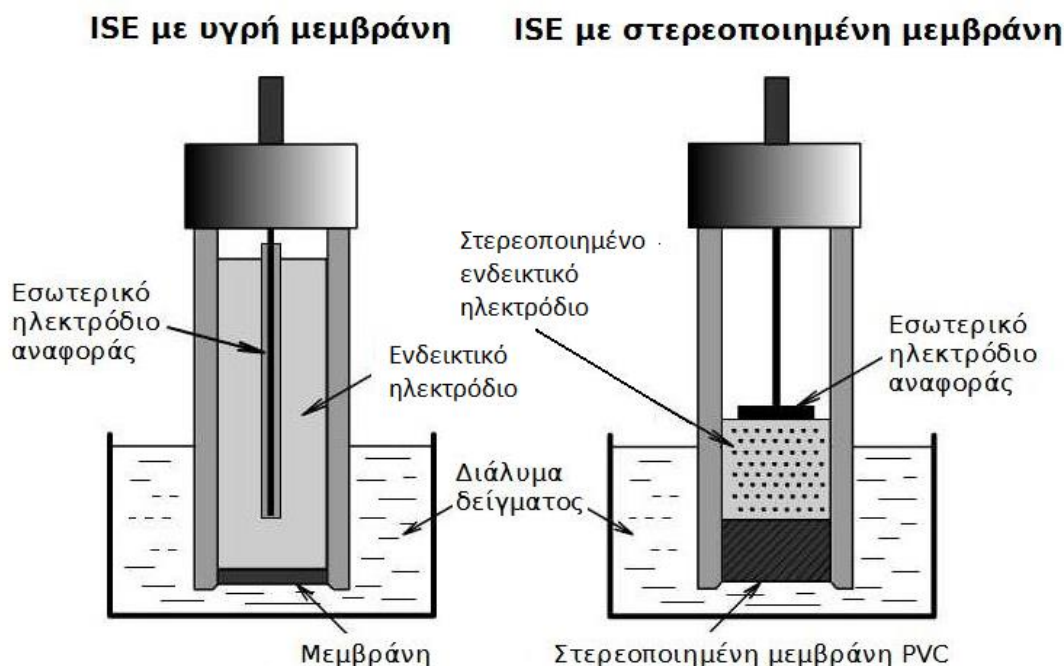
Εξίσωση 2.28

$E_{\text{ενδ}}$: Ηλεκτρεγερτική δύναμη του ενδεικτικού ηλεκτροδίου

$E_{\text{αναφ}}$: ηλεκτρεγερτική δύναμη του ηλεκτροδίου αναφοράς

E_j : Ονομάζεται δυναμικό διάχυσης και διατηρείται σταθερό κατά την διάρκεια των μετρήσεων.

Σήμερα τα ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια απέχουν πολύ από τις διατάξεις ηλεκτροδίων που βλέπουμε στα πεχάμετρα (Εικόνα 2.10) αισθητήρες που καλούνται διεθνώς **CHEMFETS** (Chemically sensitive Field - Effect transistors) και ISFETS (Ion-Sensitive Field - Effect Transistors). Πρόκειται για συνδυασμό ιοντοεπιλεκτικών ηλεκτροδίων μεμβράνης και ηλεκτρονικών transistors εξαιρετικά ευαίσθητων στη κίνηση των ηλεκτρονίων χρησιμοποιώντας ελάχιστη ποσότητα δείγματος.



Εικόνα 2.10. Πιθανές διατάξεις ιοντοεπιλεκτικών ηλεκτροδίων (ISE)

Η ΘΩΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑ ΣΤΟΥΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥΣ ΑΝΑΛΥΤΕΣ

Η θωλωσιμετρική μέθοδος χρησιμοποιείται στους βιοχημικούς αναλυτές για την μέτρηση της συγκέντρωσης μεγάλων πολυπεπτιδίων. Τέτοια είναι ορμόνες, καρκινικοί δείκτες, πρωτεΐνες οξείας φάσης, ανοσοσφαιρίνες κ.α. Αν και τα πολυπεπτίδια αυτά μπορούν να μετρηθούν χωριστά σε ανοσοχημικούς αναλυτές και νεφελόμετρα η θωλωσιμετρία προτιμάται γιατί μπορεί να γίνει πάνω στο βιοχημικό αναλυτή περιορίζοντας έτσι το κόστος του εξοπλισμού.

Στην θωλωσιμετρική μέθοδο τα αντιδραστήρια περιέχουν αντισώματα και συνδέονται με τους αντίστοιχους επιτόπους των πολυπεπτιδίων και σχηματίζουν ανοσοσυμπλέγματα (Εικόνα 2.11). Τα ανοσοσυμπλέγματα είναι σωματίδια μεγάλης διαμέτρου και προκαλούν θόλωση στο δείγμα. Όταν το μονοχρωματικό φως που εκπέμπεται από την φωτεινή πηγή (I_0) πέσει επάνω στα ανοσοσυμπλέγματα σκεδάζεται και ένα μέρος μόνο αυτού (I) φτάνει στον φωτοανιχνευτή της οπτικής μονάδας του αναλυτή. Κατά συνέπεια η μείωση της ακτινοβολίας που μετρά ο φωτοανιχνευτής δεν οφείλεται στη απορρόφηση του φωτός, όπως στις χρωματομετρικές αναλύσεις, αλλά στη συνολική σκέδαση του φωτός (θολερότητα).

Η σκέδαση του φωτός (S) συνδέεται με την συγκέντρωση των ανοσοσυμπλεγμάτων (C) με μία εξίσωση που προσομοιάζει αυτή του νόμου των Lambert-Beer.

$$S = -\log \frac{I}{I_0} = kbC \quad \text{Εξίσωση 2.31}$$

Όπου:

b: Διαδρομή του φωτός μέσα στη κυβέτα

τ: Συντελεστής θολερότητας. Ισούνται με $\tau = s \lambda^{-1}$.

Το **s** είναι μία σταθερά εξαρτώμενη από το όλο σύστημα.

Το **λ** είναι το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός.

Το **t** εξαρτάται από το μέγεθος των ανοσοσυμπλεγμάτων. Εάν αυτά είναι πολύ μικρότερα από το μήκος κύματος του φωτός το **t** ισούνται με το 4. Εάν αντίθετα ισούνται με το μήκος κύματος του φωτός τότε το **t** ισούνται με 2.

$$k = 2,303 \tau/C$$

Η εξίσωση που συνδέει την θολερότητα με το προσπίπτον και μετρούμενο φως καθώς και με την συγκέντρωση του ανοσοσυμπλέγματος είναι:

$$I = I_0 e^{-bt}$$

Εξίσωση 2.32

Όπου:

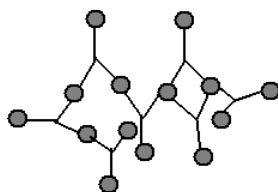
t = η τιμή της θολερότητας

b = η διαδρομή του φωτός μέσα στη κυβέττα

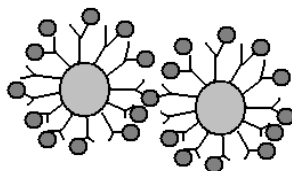
I₀ = ένταση προσπίπτοντος φωτός

I = ένταση μετρούμενου φωτός

Στην περίπτωση όπου τα ανοσοσυμπλέγματα είναι μικρά, η θόλωση που προκαλούν δεν είναι επαρκή για την μέτρηση. Σε αυτή την περίπτωση η θόλωση αυξάνεται με την χρήση αντιδραστηρίων τύπου latex πάνω στα οποία έχουν προσκολληθεί τα αντισώματα του αντιδραστηρίου. Τότε σφαιρίδια latex, αντισώματα και πολυπεπτίδια δημιουργούν μεγάλα ανοσοσυμπλέγματα που προκαλούν επαρκή θόλωση (Εικόνα 2.12).

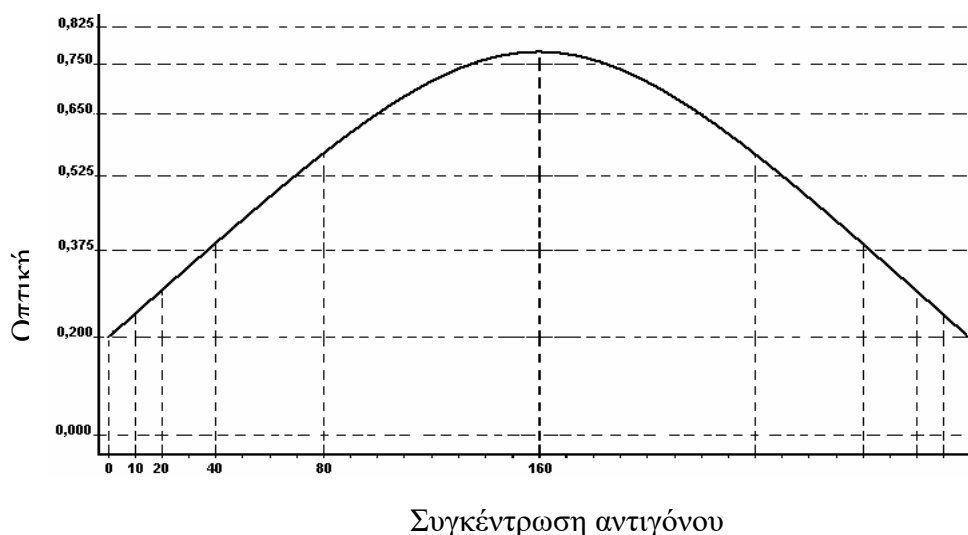


Εικόνα 2.11. Δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων



Εικόνα 2.12. Δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων από αντιγόνα, αντισώματα και σφαιρίδια latex

Η καμπύλη σύνδεσης αντιγόνου – αντισώματος έχει το σχήμα της εικόνας 2.10. Σε αυτήν είναι προφανές ότι κάθε φωτομετρικό αποτέλεσμα αντιστοιχεί σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιγόνου. Χρειάζεται πολύ προσεκτικός σχεδιασμός του αντιδραστηρίου, ώστε να είναι βέβαιο ότι υπό συνήθεις πειραματικές συνθήκες εργαζόμαστε στο αριστερό τμήμα της καμπύλης.



Εικόνα 2.13. Δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων από αντιγόνα, αντισώματα και σφαιρίδια latex

Η εξίσωση αναφοράς της θολωσιμετρίας ως εκθετική παλινδρόμηση

Η καμπύλη αναφοράς στις θολωσιμετρικές αναλύσεις εκφράζεται με την εξίσωση: $y = \hat{a}x \hat{b} e$ όπου $E(e) = 0$. Το e είναι το σφάλμα της μεθόδου το οποίο πρέπει να έχει αλγεβρικό άθροισμα ίσο με το μηδέν. Γι' αυτό τον λόγο επιλέγονται τα κατάλληλα a και b .

Η εξίσωση υπολογισμού της συγκέντρωσης είναι:

$$y = ae^{bx} \quad \text{Εξίσωση 2.33}$$

Όπου:

x : Η μέση τιμή του σήματος των μετρήσεων

y : Η συγκέντρωση του αναλύτη

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n x_i \ln(y_i) - \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n \ln y_i}{n} \right)}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}} \quad \text{Εξίσωση 2.34}$$

$$a = e^{(\bar{y} - b\bar{x})} \quad \text{Εξίσωση 2.35}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Εξίσωση 2.36}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n \ln y_i}{n} \quad \text{Εξίσωση 2.37}$$

Παράδειγμα

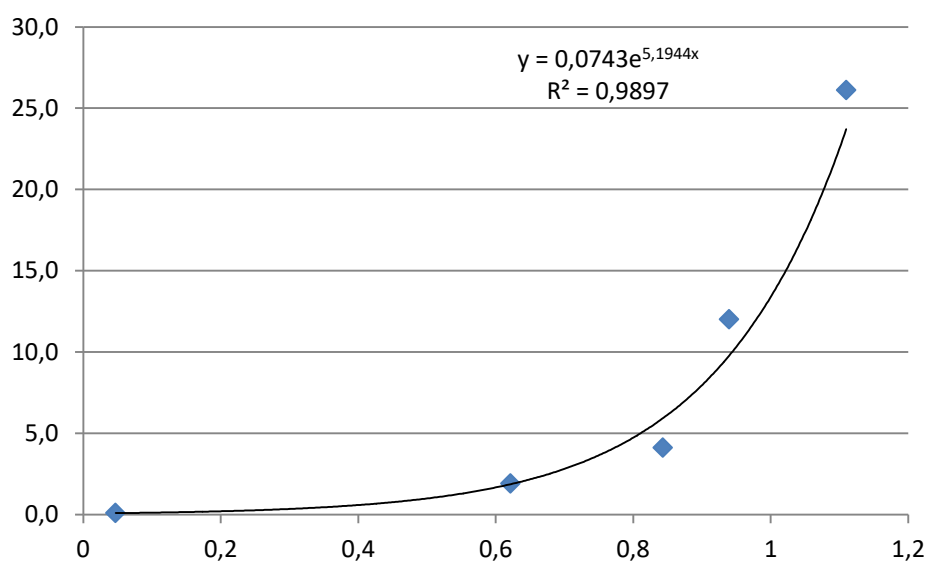
Έστω ότι θέλουμε να υπολογίσουμε τις συγκεντρώσεις του CRP σε ένα βιοχημικό αναλυτή χρησιμοποιώντας την μέθοδο της θολωσιμετρίας. Οι συγκεντρώσεις των βαθμονομητών αλλά και το σήμα που πήραμε από δύο διαδοχικές μετρήσεις της θολερότητας είναι:

Calibrators (mg/dL)	Sign 1	Sign 2
0,1	0,08	0,01
1,9	0,62	0,62
4,1	0,83	0,86
12,0	0,91	0,97
26,1	1,09	1,13

Υπολογίζουμε την μέση τιμή του σήματος:

Calibrators (mg/dL)	Sign 1	Sign 2	Μέση τιμή σήματος
0,1	0,08	0,01	0,05
1,9	0,62	0,62	0,62
4,1	0,83	0,86	0,84
12,0	0,91	0,97	0,94
26,1	1,09	1,13	1,11

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης θα κατασκευαστεί μία λογαριθμική καμπύλη.



Εικόνα 2.14. Η καμπύλη αναφοράς στην θολωσιμετρία.

Η εξίσωση αναφοράς είναι $y = 0,0743 e^{5,194x}$

Με θολωσιμετρία μετρώνται όλοι αναλύτες που προσδιορίζονται στους βιοχημικούς αναλυτές και δεν είναι υποστρώματα ή ένζυμα. Τέτοιοι αναλύτες είναι π.χ. οι CRP, RF, ASTO, IgM, IgA, IgG, C₃, C₄, TSH κ.α. δηλαδή μεγάλα πολυπεπτίδια (αντισώματα, ορμόνες κ.α.).

n	Calibrators (mg/dL) y_i	Μέση τιμή σήματος x_i	$\ln y_i$	$\ln y_i^2$	x_i^2	$x_i \ln y_i$
1	0,1	0,05	-2,30	-4,61	0,00	-0,12
2	1,9	0,62	0,64	1,28	0,38	0,40
3	4,1	0,84	1,41	2,82	0,71	1,19
4	12	0,94	2,48	4,97	0,88	2,34
5	26,1	1,11	3,26	6,52	1,23	3,62
Μέση τιμή:	8,84	0,712	1,10	2,20	0,64	1,48

Η εξίσωση αναφοράς είναι $y = 0,0743 e^{5,194x}$ και υπολογίζεται από τις εξισώσεις 2.23 έως 2.37.

Στο παράδειγμα η συγκέντρωση βρίσκονταν στον κάθετο άξονα. Αν στον κάθετο άξονα βρίσκονται οι τιμές του σήματος τότε η συγκέντρωση είναι η μεταβλητή x .

Ισχύει: Αν $y = a e^{\beta x}$, λογαριθμώντας: $\ln(y) = \ln(a) + \beta x$,

οπότε: $x = [\ln(y) - \ln(a)]/\beta$

Ο συντελεστής συσχέτισης R^2 υπολογίζεται από την σχέση:

$$R^2 = 1 - \frac{SSE}{SST}$$

Εξίσωση 2.38

Όπου:

SST: Το άθροισμα $\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$

SSE: Το άθροισμα $\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$. Το $\hat{y}_i$ («εκτιμώμενο y ») είναι το y που υπολογίζεται από την εξίσωση 2.33 και αφαιρείται από το y που δίνεται από την εκφώνηση.

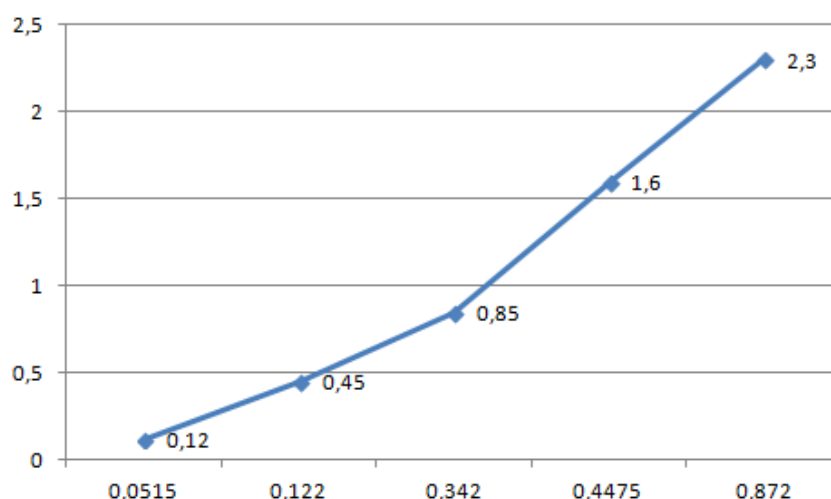
ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ**Η μέθοδος point to point (σημείο προς σημείο)**

Σε περιπτώσεις όπου η καμπύλη αναφοράς είναι εξαιρετικά πολύπλοκη ως προς την εξίσωσή της, μία λύση είναι η μέθοδος σημείο προς σημείο (point to point). Σε αυτή την περίπτωση αντί να λύνεται μια συγκεκριμένη εξίσωση ενώνονται τα διαδοχικά σημεία (για τον λόγο αυτό ονομάζεται point to point) και στην συνέχεια υπολογίζονται οι διαδοχικές εξισώσεις $y = \beta + \alpha x$ και επιλέγεται η κατάλληλη εξίσωση για την απορρόφηση του δείγματος. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε αναλύσεις θολωσιμετρίας, νεφελομετρίας και ανοσοχημείας.

Ας δούμε το ακόλουθο παράδειγμα που αφορά τον προσδιορισμό π.χ. του CRP:

Βαθμονομητής	Συγκέντρωση βαθμονομητών	Σήμα 1	Σήμα 2	Μέση τιμή σήματος
1	0,12	0,054	0,049	0,0515
2	0,45	0,125	0,119	0,122
3	0,85	0,328	0,356	0,342
4	1,6	0,458	0,437	0,4475
5	2,3	0,865	0,879	0,872

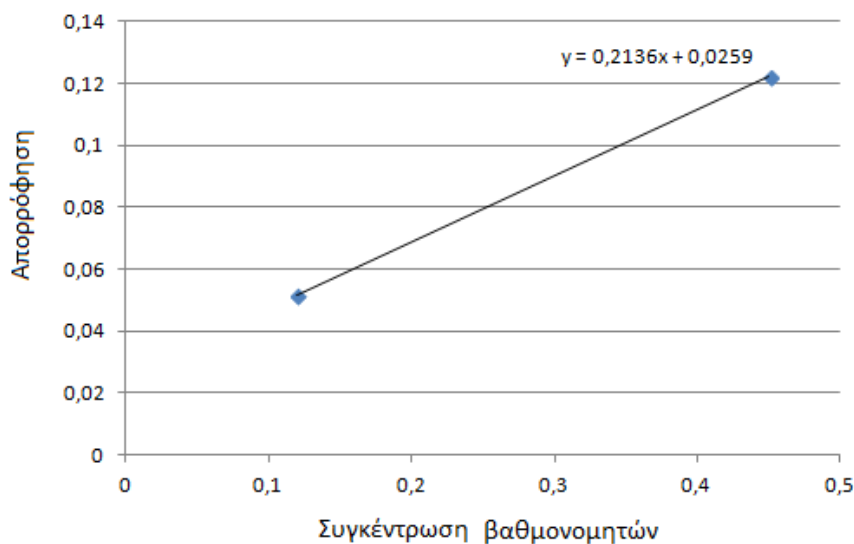
Η καμπύλη αναφοράς σύμφωνα με την μέθοδο point to point είναι:



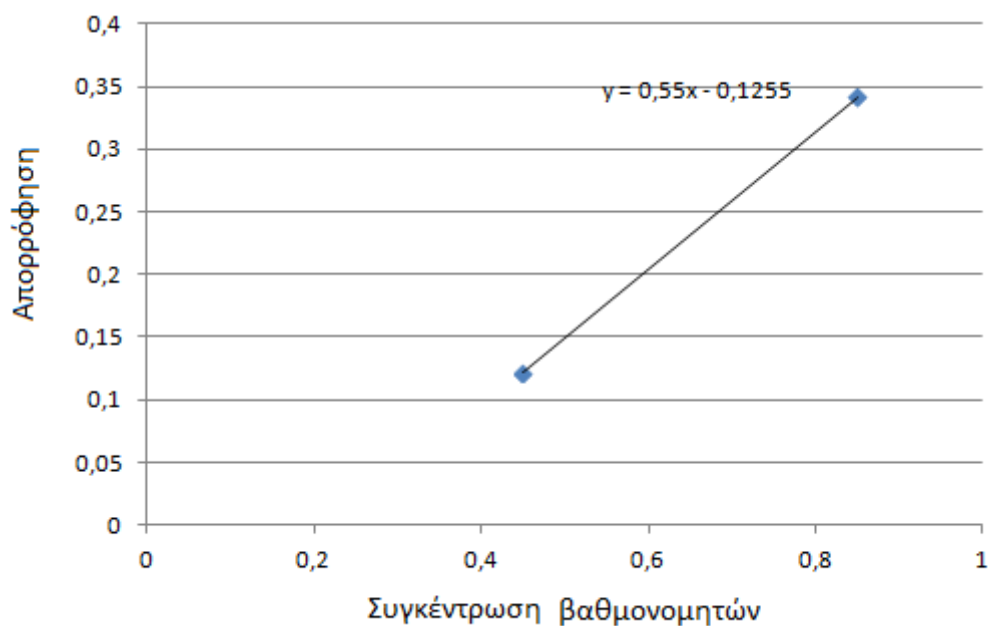
Εικόνα 2.15. Τα σημεία της καμπύλης αναφοράς τύπου point to point.

Παρατηρήστε τις διαδοχικές γραμμές (οι τιμές πάνω στα σημεία δείχνουν τις τιμές στον κάθετο άξονα) που ενώνουν τα 5 σημεία της εξίσωσης αναφοράς. Αυτό που

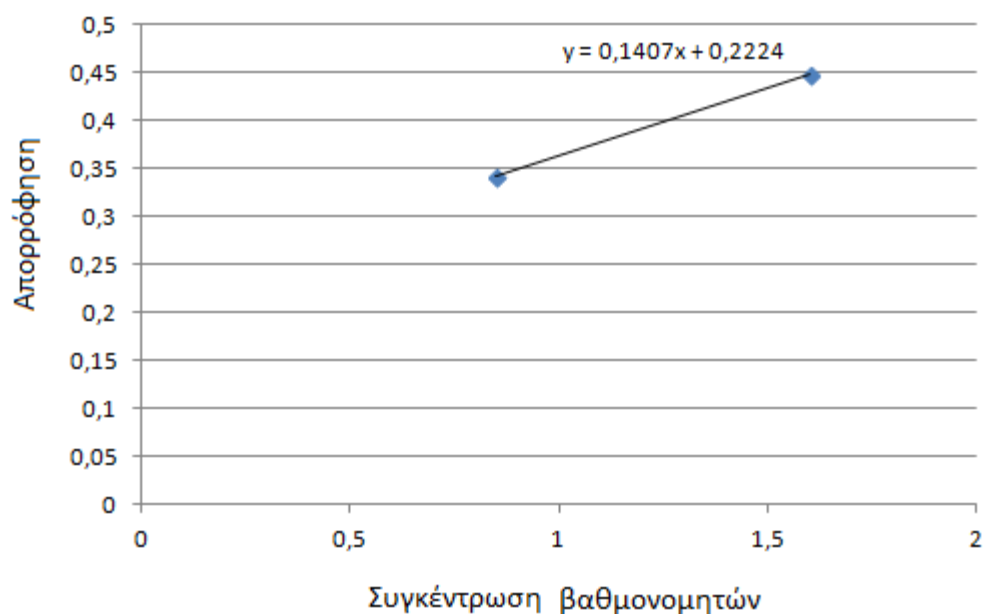
μένει είναι να υπολογιστούν οι 4 διαδοχικές εξισώσεις που ενώνουν τα 5 σημεία. Για τον λόγο αυτό κατασκευάζονται 4 διαδοχικές εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης και υπολογίζονται τα διαφορετικά σημεία α και β.



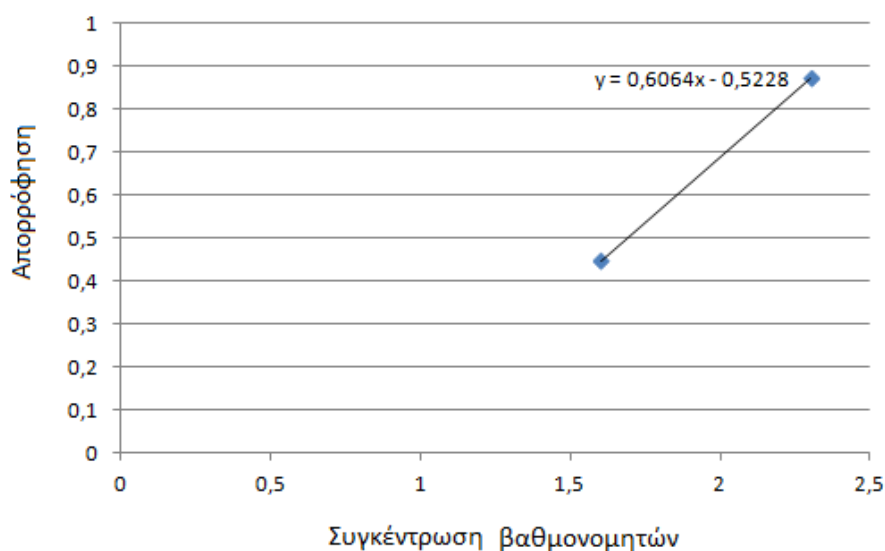
Εικόνα 2.16. Η παραπάνω εξίσωση αφορά τους βαθμονομητές 0,12 και 0,45 mg/dL.



Εικόνα 2.17. Η εξίσωση του προηγούμενου διαγράμματος αφορά τους βαθμονομητές 0,45 και 0,85 mg/dL



Εικόνα 2.18. Η εξίσωση του προηγούμενου διαγράμματος αφορά τους βαθμονομητές 0,85 και 1,6 mg/dL



Εικόνα 2.19. Η εξίσωση του προηγούμενου διαγράμματος αφορά τους βαθμονομητές 1,6 και 2,3 mg/dL

Π.χ. Αν το σήμα είναι 0,623 θα χρησιμοποιηθεί η εξίσωση της εικόνας 2.19 δηλαδή η εξίσωση $y = 0,6064x - 0,5228$.

Το x είναι η συγκέντρωση [CRP] και y η απορρόφηση 0,623.

Άρα η συγκέντρωση είναι: $[CRP] = (0,623 + 0,5228)/0,6064 = 1,89 \text{ mg/dL}$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΤΩΝ ΣΥΓΧΡΟΝΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

Δυνατότητες και σύγχρονα μοντέλα βιοχημικών αναλυτών

Η ποιότητα και οι δυνατότητες των βιοχημικών αναλυτών εξαρτώνται από πολλές παραμέτρους.

Βασική παράμετρος είναι η ταχύτητα με την οποία δουλεύουν. Αυτή συνήθως μετράται με το κλάσμα **δείγματα ανά ώρα**. Ο χρόνος που απαιτείται για να βγει το αποτέλεσμα μιας εξέτασης ονομάζεται **χρόνος απόδοσης αποτελέσματος**. Συμβολίζεται ως **TAT** (από τα αρχικά των λέξεων: Turn Around Time). Ο χρόνος TAT διαφέρει ανά εξέταση ανάλογα με τον χρόνο επώασης της αλλά και τον τρόπο μέτρησης της (π.χ. τελικού σημείου, κινητικές). Σε ότι αφορά τις αναλύσεις τους αυτές αξιολογούνται ως προς την **επαναληψιμότητα** τους², την **αναλυτική τους ευαισθησία**³, και το **εύρος μέτρησής ή γραμμικότητά**⁴ τους.

Στην αγορά υπάρχουν σήμερα πολλά μοντέλα βιοχημικών αναλυτών. Υπάρχουν μοντέλα μικρών και μεγάλων δυνατοτήτων (ανάλογα τα δείγματα/ώρα), μικρού ή μεγάλου αυτοματισμού. Π.χ. μια από τις διαφορές σε ότι αφορά τον αυτοματισμό είναι ο τρόπος με τον οποίο καθαρίζονται οι κυψελίδες. Στα μικρά μοντέλα αυτές αντικαθίστανται αυτόματα ή χειρονακτικά μετά από κάθε χρήση. Αντίθετα στα μεγάλα μοντέλα οι κυψελίδες πλένονται αυτόματα με αποσταγμένο νερό, χωρίς να απαιτείται η παρεμβολή του χειριστή.

Οι βιοχημικοί αναλυτές διαθέτουν ειδικό λογισμικό εντοπισμού τυχαίων και συστηματικών αναλυτικών σφαλμάτων σύμφωνα με τις αρχές του **στατιστικού ελέγχου ποιότητας** (βλ. αντίστοιχο κεφάλαιο). Για τον σκοπό αυτό εμφανίζουν στις οθόνες τους διαγράμματα ελέγχου, χρησιμοποιούν κριτήρια ελέγχου και διαθέτουν δυνατότητα αυτόματης εισαγωγής των τιμών των controls με σάρωση γραμμωτού κώδικα (**bar code**).

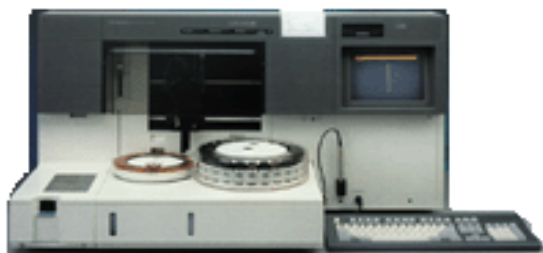
Όλες οι πληροφορίες που αφορούν την αναλυτική μέθοδο είναι αποθηκευμένες μέσα στους βιοχημικούς αναλυτές. Οι πληροφορίες αυτές αφορούν την ποσότητα των αντιδραστηρίων, την ποσότητα του δείγματος, τον χρόνο επώασης, το μήκος κύματος

² Την διασπορά τους κατά τις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις τους.

³ Την ικανότητα τους να μετρούν πολύ μικρές ποσότητες.

⁴ Η ελάχιστη και μέγιστη ποσότητα της ουσίας που μπορεί να μετρηθεί.

της φωτομέτρησης κ.α. Όλες αυτές οι πληροφορίες μαζί αποτελούν το λεγόμενο **πρωτόκολλο ή χημεία** της εξέτασης.



Εικόνα 3.1. Αριστερά ο βιοχημικός αναλυτής Excess plus της Bayer. Δεξιά ο Olympus AU 480 της Beckmann Coulter.



Εικόνα 3.2. Αριστερά ο βιοχημικός αναλυτής Pentra 400 της HORIBA ABX Diagnostics και δεξιά ο Hitachi 902 της Roche.



Εικόνα 3.2α. Αριστερά ο βιοχημικός αναλυτής ACE της Alfa Wassermann και δεξιά ο Medilyser (Ελληνικής κατασκευής) της Medicon,.

ΤΑ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΣΥΓΧΡΟΝΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

Ένα σύγχρονος βιοχημικός αναλυτής αποτελείται, κατά κανόνα, από τα παρακάτω μέρη:

- Σταθμός εργασίας (ξεχωριστός Η/Υ ή ενσωματωμένος στον αναλυτή)
- Περιοχή φόρτωσης δειγμάτων – Διακίνηση δειγμάτων*
- Ρύγχος δειγμάτων
- Ρύγχος αντιδραστηρίων
- Χώρος αντιδραστηρίων
- Χώρος πραγματοποίησης αντίδρασης
- Μονάδα ανίχνευσης σήματος
- Μονάδα επεξεργασίας σήματος – Αποτέλεσμα
- Διαχείριση Δεδομένων και Επικοινωνία με ΕΠΣ

Σταθμός εργασίας (ξεχωριστός Η/Υ ή ενσωματωμένος στον αναλυτή)

Ο σταθμός εργασίας αποτελεί το ΚΝΣ του σύγχρονου αναλυτή. Η αλληλεπίδραση του χειριστή με τον αναλυτή γίνεται μέσω του Η/Υ. Μέσω αυτού δίνονται εντολές για την καθημερινή λειτουργία.

Διαχείριση Δεδομένων και Επικοινωνία με ΕΠΣ

Τα παραγόμενα αποτελέσματα αντιστοιχίζονται:

- με τα δείγματα των εξεταζομένων και
- με άλλα «ειδικά» δεδομένα (π.χ. ταυτότητα χειριστή, ημερομηνία και ώρα ανάλυσης, αποτελέσματα ελέγχου ποιότητας, παρτίδες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν)

Επίσης τα αποτελέσματα αξιοποιούνται με διαφορετικούς τρόπους:

- Τοπική αποθήκευση στο σκληρό δίσκο, zip drive, δισκέτα ή άλλο αποθηκευτικό μέσο του αναλυτή
- Εκτύπωση από τον εκτυπωτή του αναλυτή
- Αποστέλλονται και αποθηκεύονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε άλλα συστήματα (DAM, WAM, LIS, HIS). Οι περισσότερες πλατφόρμες αναλυτών υποστηρίζουν επικοινωνία με πρωτόκολλα όπως τα HL7, ASTM και παραλλαγές τους ή άλλα εξειδικευμένα πρωτόκολλα. Η σύνδεση υλοποιείται

με έναν ή περισσότερους από τους παρακάτω τρόπους: RS-232, universal serial bus (USB), IR, TCP-IP (Ethernet), Bluetooth και IEEE 802.11.

Περιοχή φόρτωσης δειγμάτων – Διακίνηση δειγμάτων



Modular Analytics SWA, 5θέσιοι φορείς δειγμάτων (Roche)



Advia 1800 καρουσέλα δειγμάτων (Siemens)



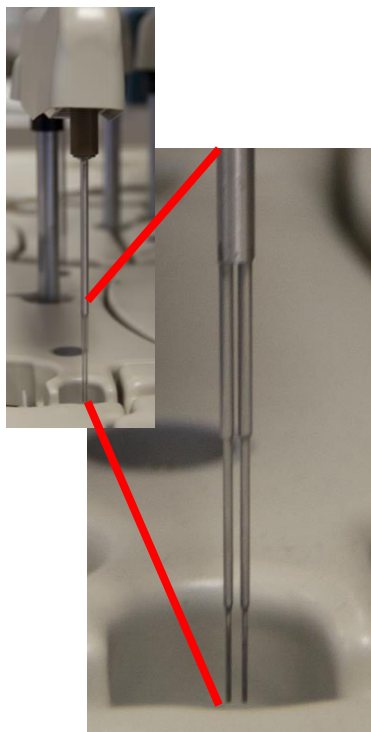
Αναλυτής AU 2700, δεκαθέσιοι φορείς δειγμάτων (Beckman Coulter)



Νεφροειδής φορέας δειγμάτων Medilyzer F (Medicon)

Εικόνα 3.3. Φορείς διακίνησης δειγμάτων μέσα στο βιοχημικό αναλυτή. Τα δείγματα μπορεί να φορτώνονται από τους χειριστές, από κινούμενα robot, από άλλους αναλυτές με ιμάντες ή ακόμα και με ρομποτικούς βραχίονες και από προαναλυτικά συστήματα τα οποία μπορεί να είναι μεμονωμένα ή συνδεδεμένα με τους αναλυτές

Ρύγχοι δειγμάτων



AU 2700. Ρύγχος δειγμάτων με διπλή απόληξη (Beckman Coulter)



Medilyzer F. Κοινό ρύγχος δειγμάτων - αντιδραστηρίων (Medicon)



Advia 1200. Ρύγχος δειγμάτων (Siemens)

Εικόνα 3.4. Ρύγχη δειγμάτων. Η βασική λειτουργία του ρύγχους δείγματος είναι να μεταφέρει μικροποσότητα δείγματος (aliquot) από τον περιέκτη του στο χώρο αντίδρασης.

Μονάδα ανίχνευσης και επεξεργασίας σήματος

Οι προσδιορισμός της συγκέντρωσης του άγνωστου διαλύματος γίνεται έμμεσα με την βοήθεια της καμπύλης βαθμονόμησης. Για το σχεδιασμό της καμπύλης βαθμονόμησης προσδιορίζονται οι απορροφήσεις σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

Ρύγχη αντιδραστηρίων



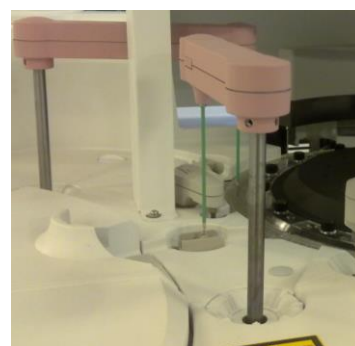
Ρύγχη αντιδραστηρίων σε Architect c8000 (Abbott)



Ρύγχη αντιδραστηρίων Αναλυτής AU 640. (Beckman Coulter)



Κοινό ρύγχος δειγμάτων – αντιδραστηρίων του Medilyzer F. (Medicon)



Ρύγχος αντιδραστηρίων Modular Analytics SWA (Roche)



Ρύγχη αντιδραστηρίων σε UniCel DxC 800 (Beckman Coulter)



Ρύγχη αντιδραστηρίων σε D-module (Roche)



Ρύγχη αντιδραστηρίων Αναλυτή Hitachi 902. (Roche)



Ρύγχη αντιδραστηρίων Αναλυτή AU 2700. (Beckman Coulter)

Εικόνα 3.5. Ρύγχη αντιδραστηρίων. Η βασική λειτουργία του ρύγχους αντιδραστηρίου είναι η αναρρόφηση αντιδραστηρίου από τον περιέκτη του στο χώρο αντιδραστηρίων και η διανομή του στο χώρο αντίδρασης.

Χώρος αντιδραστηρίων



Απλός (κενός) περιέκτης



Διάφοροι περιέκτες αντιδραστηρίων



Περιέκτης αντιδραστηρίου Flex για τη σειρά αναλυτών Dimension (Siemens)



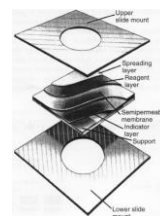
Περιέκτης αντιδραστηρίων για τη σειρά αναλυτών UniCel DxC (Beckman Coulter)



Περιέκτης αντιδραστηρίου με RFID για τη σειρά αναλυτών cobas 8000 (Roche)



ACA. Πακέτο εξέτασης με binary code σε μια ράβδο στην κορυφή. (Du Pont - Dade Behring - Siemens)



Vitros slide με πολλαπλά στρώματα που περιέχει όλο το σύστημα αντιδραστηρίων - αντίδρασης. (OCD)

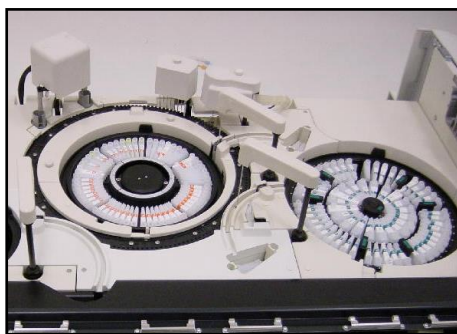
Εικόνα 3.6. Διάφοροι περιέκτες αντιδραστηρίων. Χώρος στον οποίο φυλάσσονται τα αντιδραστήρια και στον οποίο έχουν πρόσβαση τα ρύγχη αντιδραστηρίων για αναρρόφηση της απαιτούμενης κάθε φορά ποσότητας (επίσης υπάρχουν και συστήματα με ροή αντιδραστηρίων από μεγάλα δοχεία).



Δίσκος αντιδραστηρίων UniCel DxC 800 (Beckman Coulter).



Λεπτομέρεια από δίσκο αντιδραστηρίων Modular Analytics SWA (Roche)



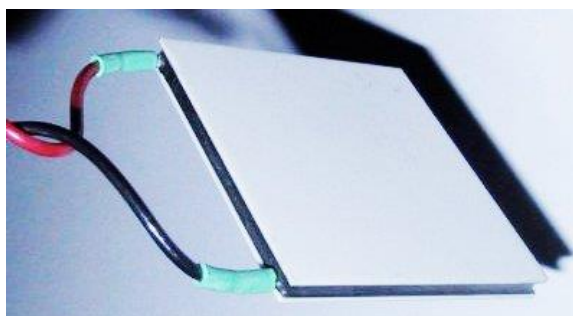
Δίσκοι αντιδραστηρίων Architect C8000 (Abbott)



Δίσκοι αντιδραστηρίων Advia 1800 (Siemens)

Εικόνα 3.7. Δίσκοι αντιδραστηρίων

Ο χώρος όπου φυλάσσονται τα αντιδραστήρια στους σύγχρονους αναλυτές είναι ψυχόμενος. Εκτός από τη κλασική τεχνολογία για ψύξη σε μερικούς αναλυτές που απαιτείται θερμοστάτηση η ρύθμιση της θερμοκρασίας γίνεται με στοιχεία Peltier.



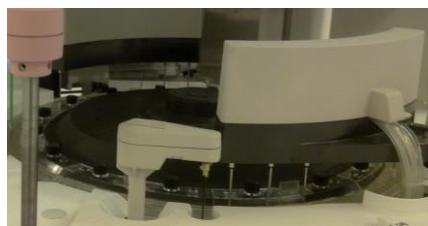
Εικόνα 3.8. Σύστημα Peltier. Το φαινόμενο Peltier είναι η μεταβολή της θερμοκρασίας λόγω της μεταβολής της πολικότητας μια τάσης. Στηρίζεται στη χρήση ενός κυκλώματος που αποτελείται από υλικά διαφορετικών ιδιοτήτων. Η διάταξη Peltier στη κλασική μορφή της αποτελείται από μία τετράγωνη ηλεκτρική κατασκευή τα κυκλώματα της οποίας βρίσκονται ανάμεσα από δύο λεπτά κεραμικά πλακίδια. Ανάλογα με την πολικότητα των καλωδίων που εισέρχονται στη διάταξη καθορίζεται και η θερμοκρασία που αναπτύσσεται στις δύο πλευρές της. Εάν αυτή αντιστραφεί π.χ. από + - γίνει - + τότε αντιστρέφεται και η θερμοκρασία. Τότε η κατασκευή αντί να θερμαίνεται ψύχεται ή το αντίστροφο.

Χώρος πραγματοποίησης αντίδρασης

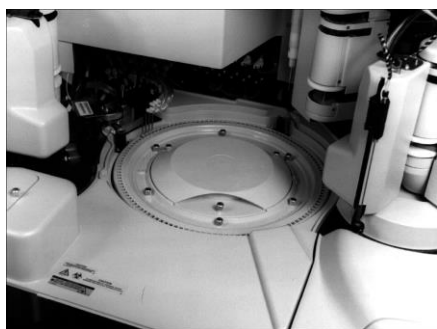
Στην πλειοψηφία των σύγχρονων αναλυτών η αντίδραση πραγματοποιείται σε κυβέττα. Εκεί λαμβάνει χώρα η ανάμιξη αντιδρώντων, και η επώασή τους υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και για συγκεκριμένο χρόνο. Οι κυβέττες μπορεί να είναι μιας ή πολλαπλών χρήσεων. Φορτώνονται απευθείας στον αναλυτή είτε δημιουργούνται από αυτόν. Στην περίπτωση που οι κυβέττες είναι πολλαπλών χρήσεων δηλαδή πλενόμενες, υπάρχουν ειδικές συσκευές που μετά το πέρας της αντίδρασης αδειάζουν το περιεχόμενό τους, τις πλένουν, τις στεγνώνουν, τις γεμίζουν με νερό και τις ελέγχουν για τις οπτικές τους ιδιότητες πριν τις ξαναχρησιμοποιήσουν. Υπάρχουν επίσης αναλυτές που χρησιμοποιούν μια ταινία για τη δημιουργία αναλώσιμων κυβεττών από ένα καρούλι από ειδικό πολυμερές υλικό και οι οποίες σφραγίζονται μετά τη χρήση ελαττώνοντας έτσι τον κίνδυνο έκθεσης σε χημικά και βιολογικά υγρά. Φυσικά υπάρχουν και αναλώσιμες κυβέττες μιας χρήσης που φορτώνονται απευθείας στον αναλυτή, ελέγχονται για τις οπτικές τους ιδιότητες και κατόπιν χρησιμοποιούνται για την προσθήκη δείγματος και αντιδραστηρίων.



Δίσκος αντίδρασης Medilyzer F (Medicon)



Δίσκος αντίδρασης Modular Analytics (Roche)



Δίσκος αντίδρασης Unicel DxC 800 (Beckman Coulter)



Δίσκος αντίδρασης Advia 1800 (Siemens)

Εικόνα 3.9. Δίσκοι αντίδρασης σε διάφορα μοντέλων σύγχρονων αναλυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

Στα επόμενα κεφάλαια θα ασχοληθούμε με την βαθμονόμηση και τον έλεγχο ποιότητας των βιοχημικών αναλυτών. Εδώ θα ασχοληθούμε με τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για τη βαθμονόμηση και τον έλεγχο ποιότητας.

Με τον όρο βαθμονόμηση ή **καμπύλη** (Αγγλικά: **calibration**) εννοούμε τον τρόπο **μετατροπής της απορρόφησης σε συγκέντρωση**. Η μετατροπή αυτή γίνεται με την βοήθεια ειδικών εξισώσεων⁵ σαν αυτές που είδαμε στα προηγούμενα κεφάλαια. Το υλικό το οποίο χρησιμοποιείται για την βαθμονόμηση είναι ένα ειδικό υγρό διάλυμα που ονομάζεται **βαθμονομητής**⁶ ή **πρότυπο διάλυμα**⁷.

Ως έλεγχος ποιότητας

Παλαιότερα χρησιμοποιούνταν για τη βαθμονόμηση δείγματα ορού από ζώα (κυρίως από βοοειδή) ή ακόμα και απλά χημικά διαλύματα. Στη τελευταία περίπτωση επρόκειτο για υδατικά ή άλλα διαλύματα και που περιείχαν συγκεκριμένη ποσότητα της ουσίας που επρόκειτο να βαθμονομηθεί. Η μέθοδος εγκαταλείφθηκε διότι τα χημικά διαλύματα δεν έχουν τις ίδιες χημικές ιδιότητες με το ανθρώπινο ή ζωικό αίμα. Έτσι αργότερα άρχισαν να χρησιμοποιούνται οροί από ζώα οι οποίοι και αυτοί εγκαταλείφθηκαν για τον ίδιο λόγο καθώς και διότι υπήρχε ο κίνδυνος για την μετάδοση ανθρωποζωνόσων. Σήμερα χρησιμοποιούνται **ανθρώπινοι οροί** οι οποίοι ελέγχονται από τους κατασκευαστές ως προς βασικά λοιμώδη νοσήματα (**ηπατίτιδα Β και C, σύφιλη**).

Σήμερα στη διεθνή αγορά διατίθενται οροί ελέγχου και βαθμονομητές σε δύο φαρμακοτεχνικές μορφές:

1. Λυόφιλα παρασκευάσματα που απαιτούν ανασύσταση πριν την χρήση και έχουν μικρό χρόνο ζωής.
2. Οροί σε υγρή μορφή, έτοιμοι προς χρήση.

Και οι δύο τύποι έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

⁵ Οι εξισώσεις αυτές προέρχονται από τον σχηματισμό γραφικών παραστάσεων εξου και το ορολογία «καμπύλη».

⁶ Στα Αγγλικά λέγεται Calibrator (καλιμπρέιτορ) και με αυτή την ονομασία χρησιμοποιείται ευρέως και στα Ελληνικά Εργαστήρια.

⁷ Στα Αγγλικά λέγεται Standard (στάνταρντ). Στα Ελληνικά εργαστήρια χρησιμοποιείται κυρίως αυτή η ονομασία.

Λυοφιλωμένοι οροί ελέγχου ή βαθμονομητές

Απαιτούν **ανασύσταση** η οποία πρέπει να γίνει πολύ προσεκτικά και με πιστή τήρηση των οδηγιών του κατασκευαστή. Η ανασύσταση γίνεται συνήθως με παγωμένο αποσταγμένο νερό (2 – 8°C) ή με ειδικό διαλύτη που προτείνει ο κατασκευαστής (π.χ. οι οροί ελέγχου του Hitachi 902). Η δοσομέτρηση θα πρέπει να γίνεται με **ογκομετρική πιπέττα**⁸ και όχι με αυτόματη πιπέττα ή σύριγγα. Ένα χρονικό διάστημα 20 – 30 λεπτών με συχνή και προσεκτική ανάδευση είναι συχνά απαραίτητο για την πλήρη διάλυση. Τα περισσότερα ένζυμα αναστέλλονται σε επαφή με μεμβράνες, γι' αυτό **θα πρέπει να αποφεύγεται ο σχηματισμός αφρού**.

Έχουν μικρό χρόνο ζωής μετά την ανασύσταση, και ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί σε παραμέτρους όπως η χολερυθρίνη και η αλκαλική φωσφατάση. Η διατήρηση του ορού στο σκοτάδι είναι απαραίτητη για την προστασία της χολερυθρίνης. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην **αλκαλική φωσφατάση**. Η τιμή στόχου της επιτυγχάνεται **μετά από μία περίπου ώρα** από την προσθήκη του αποσταγμένου νερού και διατηρείται επί δύο περίπου ώρες. Η διατήρηση του ανασυνταμένου ορού στο ψυγείο ή στην κατάψυξη έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των τιμών.

Ανασυστήνονται συνήθως με όγκο διαλύτη 5 ml, ποσότητα πολύ μεγάλη για μια χρήση. Για λόγους οικονομίας τα εργαστήρια συνηθίζουν να φυλάσσουν τον ανασυστημένο ορό για χρήση επί μία περίπου εβδομάδα. Για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα τοποθετούνται σε ψύξη (καλύτερα στους -20° C) σε μικρά μερίδια (aliquots) των 0,5 έως 1 ml. Η απόψυξη πρέπει να γίνει αβιάστα, στο σκοτάδι και να ακολουθείται απαραίτητα από προσεκτική ανάδευση (vortex) πριν την διανομή σε δειγματοληπτικά κύπελλα. Ποτέ δεν πρέπει να φυλάσσεται πάλι στην κατάψυξη ορός που έχει αποψυχθεί.

Οι λυοφιλοποιημένοι οροί (πριν την ανασύσταση) είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί στις υψηλές θερμοκρασίες αν και κανονικά διατηρούνται στο ψυγείο.

Υγροί οροί ελέγχου ή βαθμονομητές

Οι υγροί οροί ελέγχου έχουν το μεγάλο πλεονέκτημα **να μην απαιτούν ανασύσταση**, οπότε **αποφεύγονται σφάλματα ογκομέτρησης** και δεν παρατηρούνται φαινόμενα μη αντιστρεπτής αδρανοποίησης συστατικών.

⁸ Πρόκειται για τη γυάλινη πιπέττα που έχει την μικρή φούσκα στη μέση.

Φυλάσσονται συνήθως στη κατάψυξη (-20°C). Η σταθερότητα των συστατικών τους σε διάλυμα επιτυγχάνεται με την αντικατάσταση μέρους του νερού του αρχικού διαλύματος με αιθυλενογλυκόλη ή γλυκερόλη, οπότε αποφεύγεται και ο σχηματισμός παγοκρυστάλλων σε θερμοκρασίες συντήρησης -20°C . Εντούτοις η παραμονή στη κατάψυξη μπορεί να αλλοιώσει την εικόνα του ορού οπότε μετά την απόψυξη απαιτείται πολύ καλή ομογενοποίηση.

Σε γενικές γραμμές έχουν πολύ μεγαλύτερους χρόνους ζωής, συγκρινόμενοι με τα λυόφιλα υλικά, και επιτρέπουν την επί μακρόν διατήρηση της ενεργότητας ενζύμων (ALP, CK, GPT) καθώς και της συγκέντρωσης ευαίσθητων ουσιών όπως η χολερυθρίνη και τα τριγλυκερίδια.

Παρόλα αυτά τα πλεονεκτήματα, έχουν και ορισμένα μειονεκτήματα. Λόγω των συντηρητικών που περιέχουν συχνά δεν συμπεριφέρονται όπως τα δείγματα των ασθενών ειδικά μεταξύ διαφορετικών μεθόδων προσδιορισμού ενζύμων (π.χ. μεταξύ IFCC, DGKC).



Βαθμονομητές του αναλυτή ιόντων IOLYTE. Οι βαθμονομητές για τον αναλυτή ιόντων κατασκευάζονται από σταθερά χημικά διαλύματα αφού είναι αδύνατη η παρασκευή βιολογικών δειγμάτων με σταθερή σύσταση ιόντων.

Προδιαγραφές ορών ελέγχου

Σήμερα οι οροί ελέγχου, οι βαθμονομητές, τα αντιδραστήρια καθώς και οι ίδιοι οι αναλυτές ελέγχονται από διεθνείς νόρμες η σημαντικότερη από τις οποίες που αφορά την Ελλάδα είναι η **Ευρωπαϊκή οδηγία 98/79 EC**. Σε ότι αφορά τους ορούς ελέγχου θα πρέπει να τηρούνται τα εξής:

- **Οι οροί ελέγχου θα πρέπει να έχουν κατασκευασθεί από ανθρώπινο ορό.** Η χρήση καλών εργαστηριακών πρακτικών και ο αυστηρός έλεγχος των κατασκευαστών ελαχιστοποιούν τους κινδύνους από την χρήση

τέτοιων ορών που κρίνεται απαραίτητη γιατί τα δείγματα ελέγχου πρέπει να μοιάζουν με τα δείγματα ασθενών.

- **Οι τιμές των ορίων ελέγχου θα πρέπει να καλύπτουν τις μεθόδους του εργαστηρίου.** Αν και το κάθε εργαστήριο ενθαρρύνεται να υπολογίσει τις δικές του τιμές αναφοράς, η αναγραφή από τον κατασκευαστή των αναμενόμενων τιμών ελέγχου για τις μεθόδους που αυτό χρησιμοποιεί, αποτελεί πολύτιμο βοήθημα.
- Θα πρέπει να περιλαμβάνονται τιμές για όλες τις εξετάσεις.
- Θα πρέπει να υπάρχουν **τουλάχιστον δύο οροί ελέγχου** για κάθε εξέταση. Οι τιμές των ορίων ελέγχου θα πρέπει διαφέρουν σαφώς μεταξύ των δύο ορών ελέγχου.

Παρατηρήσεις επί την κατασκευή των βαθμονομητών

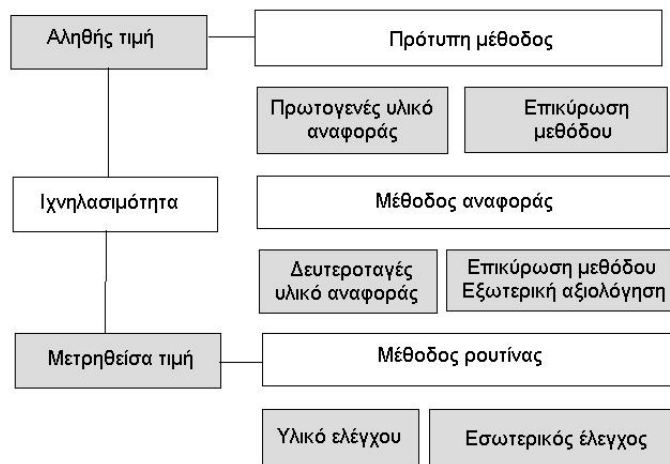
Για την κατασκευή των βαθμονομητών απαιτούνται οι ίδιες προδιαγραφές με τους ορούς ελέγχου. Επιπλέον όμως οι βαθμονομητές θα πρέπει να τηρούν αυστηρές προδιαγραφές σε ότι αφορά την **ιχνηλασιμότητα**.

Ως ιχνηλασιμότητα ονομάζεται η σύνδεση του αποτελέσματος μιας μέτρησης με ένα αυστηρά καθορισμένο πρότυπο. Τέτοια πρότυπα είναι υλικά αναφοράς που έχουν κατασκευαστεί από διεθνείς οργανισμούς όπως είναι ο WHO (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας), ο NIST (Εθνικός Οργανισμός Υγείας των ΗΠΑ) και άλλοι.

Η οδηγία 98/79 EC ορίζει ότι η «ιχνηλασιμότητα των τιμών που αποδίδονται σε βαθμονομητές και υλικά ελέγχου πρέπει να επιβεβαιώνεται μέσω διαθέσιμων μεθόδων αναφοράς και/ή διαθέσιμων υλικών αναφοράς υψηλότερης τάξης». Η σχετική διαδικασία περιγράφεται στην εικόνα 42.

Σύμφωνα με την εικόνα 42 οι τιμές των βαθμονομητών προσδιορίζονται με **πρότυπες μεθόδους** δηλαδή με μεθόδους πολύ μεγάλης ακρίβειας που διενεργούνται από λίγα κατάλληλα εξοπλισμένα εργαστήρια. Τα ειδικά αυτά εργαστήρια διανέμουν τις πρότυπες αυτές ουσίες σε όλους τους κατασκευαστές αναλυτών παγκοσμίως. Οι κατασκευαστές αναλυτών χρησιμοποιούν αυτά τα πρότυπα που ονομάζονται **πρωτογενές υλικό αναφοράς** για να φτιάξουν δικά τους πρότυπα χρησιμοποιώντας τις μεθόδους ρουτίνας που εμπορεύονται. Με τις μεθόδους ρουτίνας κατασκευάζουν **δευτερογενές υλικό αναφοράς** το οποίο και διανέμουν στους πελάτες τους. Οι τιμές της συγκέντρωσης των βαθμονομητών αυτών είναι γνωστές στους αγοραστές αφού είναι γραμμένες σε ένα εσώκλειστο φυλλάδιο που συνοδεύει την συσκευασία.

Χάρη σε αυτούς τους βαθμονομητές αν ένας ασθενής μετρήσει μία ουσία του σε ένα Ελληνικό εργαστήριο περιμένει να βγάλει την ίδια τιμή και σε οποιοδήποτε άλλο εργαστήριο σε ολόκληρο τον κόσμο (φυσικά αν δεν υπάρχει εργαστηριακό σφάλμα).



Εικόνα 4.1. Η εξασφάλιση της ιχνηλασιμότητας ορών ελέγχου και βαθμονομητών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ο ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

Επίδραση των αναλυτικών σφαλμάτων στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων

Τα αναλυτικά σφάλματα επηρεάζουν την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου.

Ως **επαναληψιμότητα** ορίζεται η διασπορά των τιμών που παράγονται ύστερα από την εκτέλεση επανειλημμένων προσδιορισμών του ίδιου δείγματος μέσα στην ίδια ημέρα, στον ίδιο αναλυτή. Η επαναληψιμότητα εξαρτάται από την ποιότητα των αντιδραστηρίων και μηχανημάτων καθώς και από την ποιότητα εργασίας του προσωπικού.

Ως **αναπαραγωγιμότητα** ορίζεται η διασπορά των τιμών που παράγονται από την ανάλυση του ίδιου δείγματος σε διαδοχικές ημέρες, με διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίου.

Ως **ακρίβεια** ορίζεται η συμφωνία των αποτελεσμάτων με την **πραγματική** ποσότητα της ουσίας που υπάρχει στο δείγμα.

Αναλυτικά σφάλματα

Τα αναλυτικά σφάλματα διακρίνονται στα τυχαία και συστηματικά.

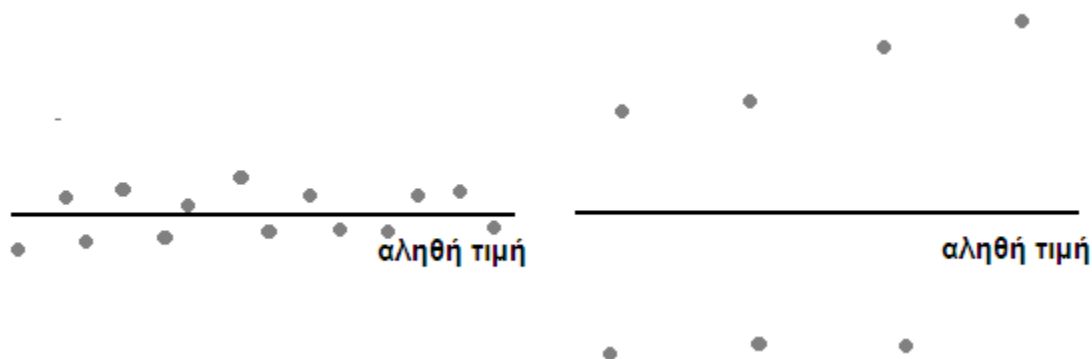
Τα **τυχαία σφάλματα** προσβάλλουν κυρίως την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα αφού προκαλούν μικρές ή μεγάλες εκτροπές από την «αληθή τιμή»⁹.

Τα τυχαία σφάλματα είναι αδύνατο να εκμηδενιστούν αφού ακόμα και σε τέλειες εργαστηριακές συνθήκες υπάρχουν πάντα έστω μικρά τυχαία σφάλματα που ονομάζονται **ενδογενές σφάλμα**. Το ενδογενές σφάλμα ισούνται με την **αναλυτική μεταβλητότητα** δηλαδή την μεταβλητότητα που έχουν οι τιμές που παράγονται από

⁹ Η έννοια της πραγματικής ή αληθούς τιμής στην κλινική χημεία έχει κυρίως μεταφορική έννοια. Είναι αδύνατο να γνωρίζουμε ποια είναι η πραγματική τιμή παρά μόνο αν εφαρμόσουμε ειδικές εργαστηριακές μεθόδους που ονομάζονται **οριστικές** μέθοδοι και εφαρμόζονται από λίγα εξειδικευμένα εργαστήρια παγκοσμίως.

τον συγκεκριμένο αναλυτή εξαιτίας της τεχνολογίας του και των χημικών μεθόδων που χρησιμοποιεί.

Αίτια των τυχαίων σφαλμάτων: μεταβολή των συνθηκών της αντιδράσεως (θερμοκρασία επώασης, χρόνος επώασης κ.α.), ακάθαρτα σκεύη (κυβέττες, πιπέτες κ.α.), λάθος υπολογισμοί (σε αραιώσεις, μετατροπές μονάδων μέτρησης κ.α.), ανθρώπινη απροσεξία, βλάβη αναλυτή (π.χ. βουλωμένη βελόνα αναρρόφησης), ακατάλληλο δείγμα (ικτερικός, αιμολυμένος ορός κ.α.)



Εικόνα 5.1. Το ενδογενές σφάλμα (αριστερά) και τα τυχαία σφάλματα (δεξιά).

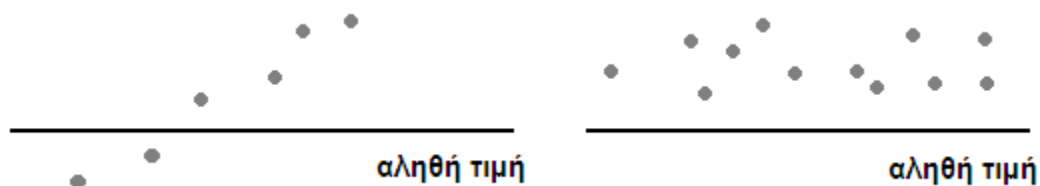
Συστηματικά σφάλματα

Στα συστηματικά σφάλματα διατηρείται η επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου, αλλοιώνεται όμως η ακρίβεια της αφού παράγονται αποτελέσματα περιορισμένα σε μία στενή περιοχή η οποία όμως απέχει σημαντικά από την «αληθή τιμή».

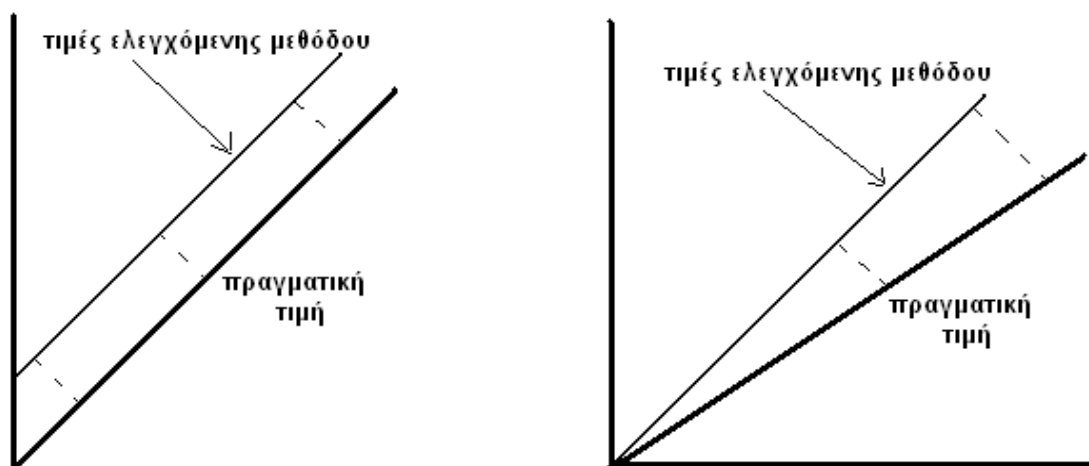
Τα συστηματικά σφάλματα διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες.

Όπως:

1. **Συστηματικές μετατοπίσεις:** οι τιμές του αναλυτή έχουν μετατοπιστεί σε υψηλότερο ή χαμηλότερο επίπεδο από την «αληθή τιμή».
2. **Συστηματικές εκτροπές:** οι τιμές του αναλυτή μετατοπίζονται βαθμιαία πάνω ή κάτω από την «αληθή» τιμή.
3. **Σταθερά συστηματικά σφάλματα:** οι τιμές της μεθόδου απέχουν από την αληθή τιμή με σταθερό τρόπο ανεξάρτητα από την τιμή της μεθόδου.
4. **Αναλογικά συστηματικά σφάλματα:** οι τιμές της μεθόδου αποκλίνουν σταδιακά από την «αληθή» τιμή.



Εικόνα 5.2. Συστηματικά σφάλματα: εκτροπή (αριστερά) και μετατόπιση (δεξιά).



Εικόνα 5.3. Συστηματικά σφάλματα: σταθερό (αριστερά) και αναλογικό (δεξιά)

Τα συστηματικά σφάλματα οφείλονται πάντα σε συγκεκριμένα αίτια. Π.χ. βαθμονόμηση οργάνων, λάθος υπολογισμός του λευκού, αλλοίωση προτύπων βαθμονομήσεως, αλλοίωση αντιδραστηρίων, λάθος μήκος κύματος, χαλασμένη αντλία αναλυτή κ.α.

Ως εκ τούτου τα **συστηματικά σφάλματα διορθώνονται ευκολότερα από τα τυχαία**. Η διόρθωση επιτυγχάνεται είτε με εξάλειψη των αιτιών που το προκαλούν (π.χ. χαλασμένο φωτόμετρο, αντλία αναρρόφησης δειγμάτων) είτε με μαθηματικό τρόπο (π.χ. αλλαγή της καμπύλης βαθμονόμησης).

Ο στατιστικός έλεγχος ποιότητας

Τα αναλυτικά σφάλματα, τυχαία και συστηματικά, μπορούν πολύ εύκολα να εντοπιστούν και κατά συνέπεια να εξουδετερωθούν εφαρμόζοντας τις επιταγές του στατιστικού ελέγχου ποιότητας¹⁰.

Ο **στατιστικός έλεγχος ποιότητας** είναι το σύνολο των διαδικασιών που βασίζονται στην στατιστική και σκοπό έχουν να βοηθήσουν το εργαστήριο να παράγει αξιόπιστα αποτελέσματα. Με την βοήθεια του στατιστικού ελέγχου ποιότητας εξασφαλίζεται η καλύτερη δυνατή επαναληψιμότητα, αναπαραγωγικότητα και ακρίβεια των αναλύσεων μας.

Ο στατιστικός έλεγχος ποιότητας διακρίνεται σε δύο είδη: τον εσωτερικό και τον εξωτερικό.

Ο **εσωτερικός έλεγχος ποιότητας** εκτελείται καθημερινά από τους χειριστές των αναλυτών και ελέγχει την επαναληψιμότητα των τιμών.

Ο **εξωτερικός έλεγχος ποιότητας** εκτελείται περιοδικά αλλά ταυτόχρονα σε πολλούς διαφορετικούς αναλυτές διαφορετικών εργαστηρίων και ελέγχει την ακρίβεια των εκτελούμενων προσδιορισμών.

Τα υλικά ελέγχου (controls)

Ο στατιστικός έλεγχος ποιότητας (εσωτερικός και εξωτερικός) βασίζεται ως επί το πλείστον στην χρήση ειδικών δειγμάτων που ονομάζονται **δείγματα ελέγχου** ή **υλικά ελέγχου**¹¹. Οι τιμές που προκύπτουν από την ανάλυση αυτών των δειγμάτων ονομάζονται **τιμές ελέγχου**.

Τα δείγματα ελέγχου μπορεί να είναι ορός, ολικό αίμα, ούρα, αρθρικό υγρό και γενικά οποιοδήποτε δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κάποιο προσδιορισμό. Κυκλοφορούν στο εμπόριο σε **λυοφιλοποιημένη**¹² ή υγρή μορφή και παρασκευάζονται από την **ανάμιξη πολλών δειγμάτων** παρόμοιων συγκεντρώσεων και γι' αυτό ονομάζονται επίσης **δεξαμενές δειγμάτων** (pools). Αν και οι δεξαμενές δειγμάτων μπορούν να προέρχονται είτε από ανθρώπους είτε από

¹⁰ Ο στατιστικός έλεγχος ποιότητας ελέγχει μόνο τα αναλυτικά σφάλματα. Για να περιοριστούν τα προαναλυτικά και μετααναλυτικά σφάλματα το εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει άλλες διαδικασίες οι οποίες φέρουν τον γενικό τίτλο «ολική διασφάλιση ποιότητας».

¹¹ Έχει επικρατήσει να ονομάζονται «controls» και στα Ελληνικά εργαστήρια.

¹² **Λυοφιλοποίηση** ονομάζεται η μετατροπή ενός διαλύματος σε σκόνη με ειδική διαδικασία αποξήρανσης. Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται για την διατήρηση επί μακρόν τόσο αντιδραστηρίων όσο και των controls και των calibrators. Προκειμένου τα λυοφιλοποιημένα διαλύματα να ξαναχρησιμοποιηθούν θα πρέπει να προηγηθεί η διαδικασία της «**ανασύστασης**», η προσθήκη, δηλαδή, σε αυτά ίσης ποσότητας διαλύτη με αυτή που αποξηράνθηκε.

ζώα προτιμώνται τα ανθρώπινα δείγματα για να μοιάζουν όσο είναι δυνατό με τα δείγματα των ασθενών.

Σε γενικές γραμμές τα controls είναι έτσι παρασκευασμένα ώστε να μην διαφέρουν, όσο είναι εφικτό, από τα αντίστοιχα ανθρώπινα δείγματα. Περιέχουν ουσίες που μας ενδιαφέρουν, π.χ. ουρία, σάκχαρο, αλλά και διάφορες άλλες χημικές ουσίες (π.χ. συντηρητικά) που απλά βοηθούν στην διατήρησή τους για μακρό χρονικό διάστημα. Τα controls που περιέχουν τις ίδιες ουσίες αλλά διαφορετικών συγκεντρώσεων ονομάζονται **επίπεδα**. Στα εργαστήρια για τον έλεγχο ποιότητας των διαφόρων εξετάσεων χρησιμοποιούνται δύο ή τρία διαφορετικά επίπεδα τα οποία περιέχουν ουσίες σε φυσιολογικές και παθολογικές συγκεντρώσεις. Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται δύο επίπεδα παθολογικών συγκεντρώσεων ένα κάτω από τα όρια αναφοράς και ένα πάνω από αυτά.

Οι συγκεντρώσεις των ουσιών που περιέχονται στα επίπεδα είναι γραμμένες μέσα σε ένα φυλλάδιο που συνοδεύει την συσκευασία τους. Το φυλλάδιο περιέχει την τιμή στόχο και τα όρια ελέγχου κάθε εξέτασης.

Π.χ. σε ένα βιοχημικό αναλυτή το φυλλάδιο που συνοδεύει τα control θα μπορούσε να είναι ως εξής:

Επίπεδο Α (φυσιολογικό)				
	Τιμή στόχος	Τυπική απόκλιση	Κάτω όριο	Άνω όριο
Chol	195	3,3	185	205
ALP	60	1,7	55	65
Ca	9,4	0,2	8,7	10,1
Creat	1,1	0,1	0,9	1,3
Na	145	1,7	140	150

Επίπεδο Β (παθολογικό)				
Τιμή στόχος	Τυπική απόκλιση	Κάτω όριο	Άνω όριο	Μονάδες μέτρησης
290	3,3	280	300	mg/dl
210	5,0	195	225	IU/ml
18	0,7	16	20	mg/dl
1,7	0,1	1,4	2	mg/dl
160	1,7	155	165	mEq/l

Ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας

Όπως είπαμε ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας διενεργείται καθημερινά μέσα στο εργαστήριο. Κάθε μέρα ο χειριστής του αναλυτή «τρέχει» στον αναλυτή του όλα τα επίπεδα controls που διαθέτει. Όταν ο αναλυτής βγάλει τα αποτελέσματα του ο χειριστής ελέγχει αν αυτά είναι αποδεκτά.

Έστω ότι οι τιμές που πήρε είναι οι ακόλουθες:

	Επίπεδο A	Επίπεδο B
Chol	220 mg/dl	320 mg/dl
ALP	61 IU/ml	208 IU/ml
Ca	8 mg/dl	23 mg/dl
Creat	1,2 mg/dl	1,9 mg/dl
Na	142 μ mol/l	158 μ mol/l

Καθημερινά ο χειριστής του αναλυτή ελέγχει αν τα αποτελέσματα του βρίσκονται μέσα τα όρια ελέγχου του φυλλαδίου. Το τέλειο αποτέλεσμα είναι να συμπίπτουν με τις τιμές στόχους. Αυτό όμως είναι αρκετά σπάνιο. Στο προηγούμενο παράδειγμα οι τιμές της χοληστερίνης και του ασβεστίου είναι εκτός ορίων ελέγχου σε αντίθεση με τις υπόλοιπες που είναι μέσα στα όρια. Υπάρχει όμως μεταξύ χοληστερίνης και ασβεστίου μια σημαντική διαφορά.

Και οι δύο τιμές της χοληστερίνης, δηλαδή του επιπέδου A και B, έχουν υπερβεί τα ανώτατα όρια. Όταν συμβαίνει αυτό, δηλαδή όταν οι τιμές ελέγχου όλων των επιπέδων έχουν υπερβεί τα ίδια ανώτατα όρια το σφάλμα είναι **συστηματικό**. Αντίθετα στο ασβέστιο συμβαίνει το ανάποδο. Στο επίπεδο A η τιμή ελέγχου είναι κάτω από το κατώτερο όριο και στο επίπεδο B η αντίστοιχη τιμή ελέγχου είναι πάνω από το ανώτερο όριο. Όταν οι τιμές ελέγχου υπερβαίνουν ταυτόχρονα τα κατώτερα και ανώτερα όρια δύο επιπέδων το σφάλμα είναι **τυχαίο**. Όπως είπαμε τα τυχαία και συστηματικά σφάλματα οφείλονται σε διαφορετικά αίτια. Έχει σημασία λοιπόν να γνωρίζουμε αν το σφάλμα είναι τυχαίο ή συστηματικό για να το αντιμετωπίσουμε αποτελεσματικά.

Η σύγκριση επομένως των τιμών ελέγχου των δύο διαφορετικών επιπέδων μπορεί να μας πληροφορήσει για το αν το σφάλμα είναι τυχαίο ή συστηματικό. Υπάρχει όμως και άλλος πιο έγκυρος τρόπος.

Η δημιουργία των ορίων ελέγχου

Οι εταιρείες παρασκευής των controls ακολουθούν σε γενικές γραμμές την ακόλουθη διαδικασία.

Συγκεντρώνουν μεγάλες ποσότητες αίματος (ληγμένα αίματα αιμοδοσίας) τα οποία αναμιγνύουν δημιουργώντας «δεξαμενές δειγμάτων» (**pool samples**). Στη συνέχεια μικρά δείγματα από αυτή τη δεξαμενή στέλνονται για ανάλυση σε έξι ή περισσότερους αναλυτές του ίδιου τύπου προκειμένου τα όρια ελέγχου που θα προσδιοριστούν να είναι κατάλληλα για αυτούς.

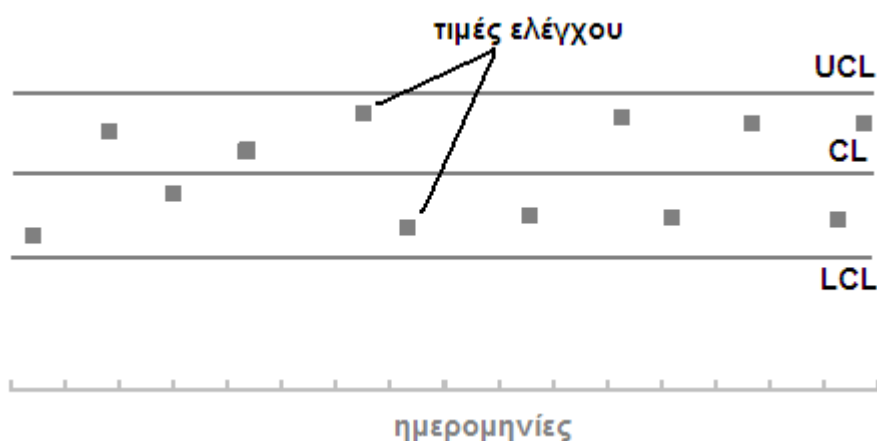
Σε κάθε αναλυτή γίνονται τουλάχιστον 20 προσδιορισμοί για όλες τις εξετάσεις για τις οποίες προσδιορίζεται το control. Όλες αυτές οι τιμές (τουλάχιστον 120) συγκεντρώνονται και υπολογίζεται για αυτές η μέση τιμή (μ) και η τυπική απόκλιση (s). Στη συνέχεια υπολογίζεται το εύρος $\mu \pm 3s$. Στη συνέχεια ελέγχεται αν κάποιες από τις αρχικές 120 τιμές υπερβαίνουν το εύρος $\mu \pm 3s$. Εάν όντως υπάρχουν, αυτές οι τιμές απορρίπτονται και υπολογίζεται ξανά η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση και το νέο εύρος $\mu \pm 3s$. Και πάλι ελέγχονται οι εναπομείναντες τιμές για το αν υπερβαίνουν το εύρος $\mu \pm 3s$. Εάν υπάρχουν πάλι τιμές που υπερβαίνουν το νέο και πιο «στενό» εύρος και αυτές με την σειρά τους απορρίπτονται. Υπολογίζεται πάλι νέα μέση τιμή και τυπική απόκλιση και η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι τελικά καμία τιμή να μην υπερβαίνει το εύρος $\mu \pm 3s$.

Τα όρια αυτά θα είναι τελικά τα όρια έλεγχου για την συγκεκριμένη εξέταση, χημική μέθοδο και αναλυτή.

Τα διαγράμματα ελέγχου

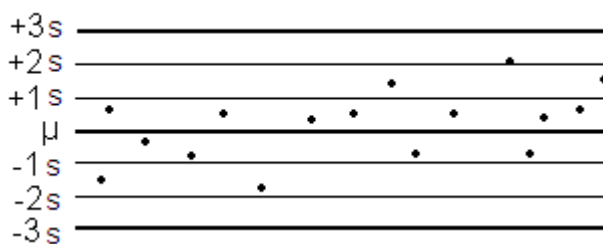
Τα διαγράμματα ελέγχου είναι ειδικά διαγράμματα που ελέγχουν την παρουσία συστηματικών ή τυχαίων σφαλμάτων. Σχηματίζονται αυτόματα από τους σημερινούς σύγχρονους αναλυτές και μας βοηθούν αποτελεσματικά στο καθημερινό έλεγχο ποιότητας. Το πιο απλό διάγραμμα ελέγχου είναι αυτό που αποτελείται από τρεις οριζόντιες γραμμές, την τιμή στόχο και την ανώτερη και κατώτερη τιμή.

Ένα τέτοιο διάγραμμα ελέγχου ονομάζεται διάγραμμα **μέσης τιμής** ή αλλιώς διάγραμμα **Shewhart** από το όνομα του στατιστικού επιστήμονα που πρώτος το εισήγαγε στην βιομηχανία των ΗΠΑ την δεκαετία του 1930.



Εικόνα 5.4. Ένα τυπικό διάγραμμα ελέγχου «μέσης τιμής» που δεν έχει τυχαία ή συστηματικά σφάλματα. Η ανώτερη τιμή (UCL), η κεντρική τιμή (CL) και η κατώτερη τιμή (LCL) δίνονται από τον κατασκευαστή του control σύμφωνα με το προηγούμενο κεφάλαιο.

Αν και το διάγραμμα μέσης τιμής χρησιμοποιείται σε πολλούς αναλυτές (κυρίως αιματολογικούς και ανοσοενζυμικούς) στους βιοχημικούς αναλυτές χρησιμοποιείται κυρίως το διάγραμμα **Levey-Jennings**¹³. Ένα τέτοιο διάγραμμα έχει επτά οριζόντιες γραμμές και έχει την δυνατότητα όχι μόνο να εντοπίζει τυχαία και συστηματικά σφάλματα αλλά και να αξιολογεί την σοβαρότητα αυτών.



Εικόνα 5.5. Ένα τυπικό διάγραμμα Levey-Jennings χωρίς τυχαία ή συστηματικά σφάλματα

Το διάγραμμα Levey-Jennings

Για να κατανοήσουμε το διάγραμμα Levey-Jennings θα πρέπει να καταλάβουμε με ποιο τρόπο υπολογίζονται από την βιομηχανία τα όρια ελέγχου για τα οποία μιλήσαμε σε προηγούμενο κεφάλαιο.

Όπως είπαμε οι βιομηχανίες που παρασκευάζουν controls συγκεντρώνουν και αναμιγνύουν μεγάλες ποσότητες ορού, τις λεγόμενες δεξαμενές ορού. Το επόμενο στάδιο είναι να υπολογίσουν τα όρια ελέγχου. Για τον λόγο αυτό κάνουν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του συγκεκριμένου control και συγκεντρώνουν όλες τις τιμές σε ένα πίνακα.

Π.χ. έστω ότι θέλουμε να φτιάξουμε control για την γλυκόζη. Για τον σκοπό αυτό υπολογίστηκαν ογδόντα τιμές οι οποίες είναι οι ακόλουθες:

90	89	90	89	89	92	90	89	90	90
90	88	88	89	89	94	91	91	88	92
86	91	89	91	88	87	90	95	89	91
88	88	88	88	86	90	91	93	90	87
93	90	90	89	90	93	94	93	90	89
90	93	90	91	91	89	90	91	91	89
87	94	90	92	91	93	89	90	89	92
90	91	89	93	90	95	89	86	90	88

¹³ Το διάγραμμα αυτό επινοήθηκε από τους βιοχημικούς Levey και Jennings την δεκαετία του 1950 και έκτοτε χρησιμοποιείται ευρέως στα βιοχημικά κυρίως εργαστήρια.

Το επόμενο βήμα είναι να υπολογιστεί η μέση τιμή. Όπως ξέρουμε η μέση τιμή υπολογίζεται από το άθροισμα όλων των τιμών δια το πλήθος τους. Στη στατιστική επιστήμη η μέση τιμή υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} = 90 \text{ mg/c}$$

Όπου: μ : το σύμβολο της μέσης τιμής

N : ο αριθμός των τιμών (εδώ $N = 80$)

x_i : κάθε τιμή του συνόλου π.χ. $x_1 = 90$, $x_2 = 89$, $x_3 = 90$, $x_4 = 89 \dots$

$\sum_{i=1}^N x_i$: το άθροισμα όλων των τιμών (το Σ συμβολίζει άθροισμα)

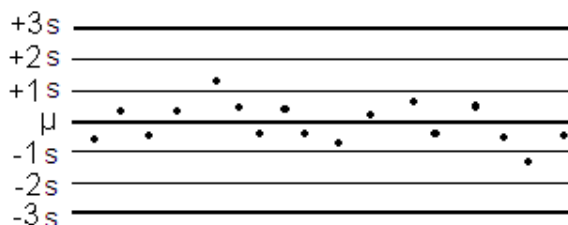
Στη συνέχεια υπολογίζεται η τυπική απόκλιση η οποία συμβολίζεται ως s ή SD. Η τυπική απόκλιση μετρά την διασπορά των τιμών γύρω από την μέση τιμή. Υπολογίζεται από τον τύπο:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N-1}} = 1,95 \text{ ng/c}$$

Τα όρια ελέγχου μπορούν πλέον να υπολογιστούν. Στους βιοχημικούς αναλυτές συνήθως είναι $\mu \pm 2s$ ενώ στους ανοσοενζυμικούς $\mu \pm 3s$. Στατιστικά όμως σωστότερο είναι να χρησιμοποιούνται τα όρια $\mu \pm 3s$. Έτσι για την γλυκόζη τα όρια ελέγχου θα είναι $90 \pm 3 \times 1,95 \text{ mg/dl}$ ή από 84,2 έως 95,8 mg/dl¹⁴.

Ερμηνεία του διαγράμματος Levey-Jennings

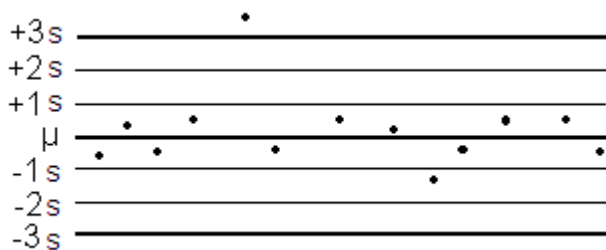
Θα μελετήσουμε την ερμηνεία του διαγράμματος Levey-Jennings μέσα από διάφορα παραδείγματα:



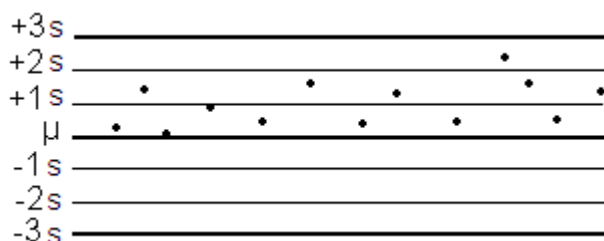
Πολύ καλό διάγραμμα Levey-Jennings. Υπάρχει μόνο το ενδογενές τυχαίο σφάλμα και κανένα σημαντικό τυχαίο ή συστηματικό σφάλμα.

¹⁴ Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση ορίζουν μία **κανονική κατανομή** ή **αλλιώς κατανομή Gauss** όπως αλλιώς είναι γνωστή. Σε αυτή οφείλονται οι ιδιότητες του διαγράμματος Levey-Jennings και η σημασία του στον έλεγχο ποιότητας. Συγκεκριμένα:

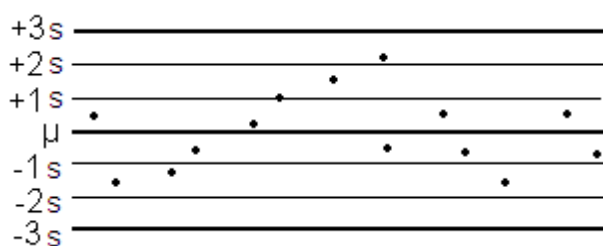
- Το όριο $\mu \pm s$ θα πρέπει να περιλαμβάνει το 68% των τιμών ελέγχου.
- Το όριο $\mu \pm 2s$ θα πρέπει να περιλαμβάνει το 95% των τιμών ελέγχου δηλαδή 19 στις 20 τιμές.
- Το όριο $\mu \pm 3s$ θα πρέπει να περιλαμβάνει το 99% των τιμών ελέγχου δηλαδή πρακτικά όλες τις τιμές.



Υπάρχει **τυχαίο σφάλμα**. Προτείνεται επανάληψη του control πριν γίνουν άλλες ενέργειες. Αν και η νέα τιμή ελέγχου είναι εκτός ορίων τότε το σφάλμα θα είναι συστηματικό και θα πρέπει να αντιμετωπιστεί αρχικά με βαθμονόμηση.

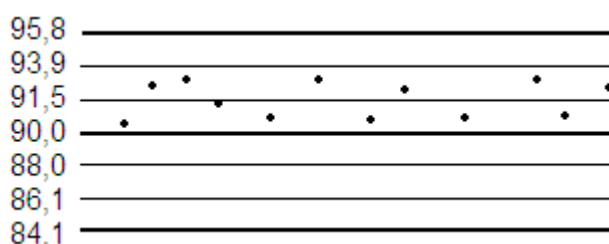


Υπάρχει **συστηματικό σφάλμα** (τύπου μετατόπισης) αφού όλες οι τιμές είναι πάνω από την μέση τιμή. Θα πρέπει να γίνει νέα βαθμονόμηση αφού προηγουμένως εξαλειφθούν διάφορα αίτια π.χ. χαλασμένο αντιδραστήριο ή βλάβη στη φωτομετρική μονάδα του αναλυτή. Μπορεί να γίνει και διόρθωση του factor της ανάλυσης για να μειωθούν οι τιμές.

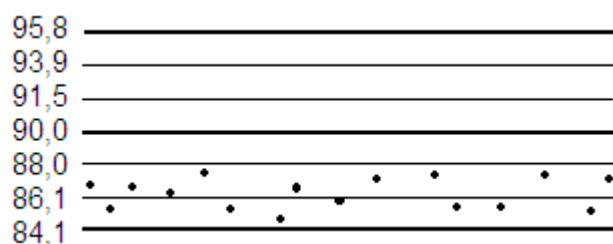


Υπάρχει **συστηματικό σφάλμα** αφού επτά συνεχόμενες τιμές ανεβαίνουν προς τα πάνω. Στην συνέχεια το σφάλμα έγινε αντιληπτό και ο χειριστής το διόρθωσε. Αυτό το σφάλμα δεν διορθώνεται με βαθμονόμηση παρά με διόρθωση κάποιου τεχνικού προβλήματος (πιθανότατα το αντιδραστήριο αλλοιώνεται γρήγορα).

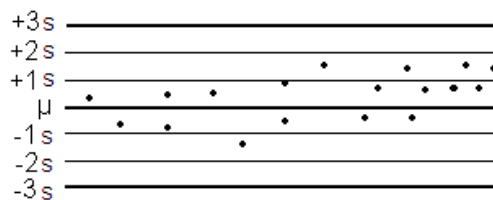
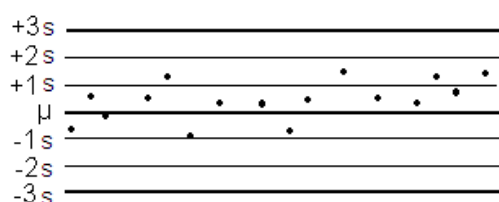
Ποια είναι όμως η σημασία των πρόσθετων γραμμών $\pm 1s$, $\pm 2s$; Η απάντηση είναι ότι οι γραμμές αυτές μας πληροφορούν για την βαρύτητα των συστηματικών σφαλμάτων. Για την κατανόηση αυτού θα δούμε παραδείγματα Levey-Jennings για το προηγούμενο παράδειγμα της γλυκόζης με μέση τιμή $\mu = 90 \text{ mg/dl}$ και τυπική απόκλιση $s = 1,95 \text{ mg/dl}$.



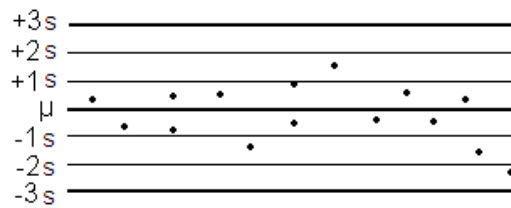
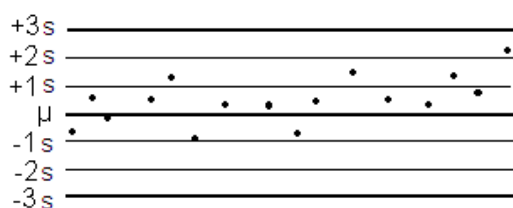
Υπάρχει συστηματικό σφάλμα τύπου μετατόπισης. Οι τιμές είναι συγκεντρωμένες γύρω από την γραμμή $\mu + 1s$ δηλαδή $91,5 \text{ mg/dl}$. Κατά συνέπεια υπάρχει συστηματικό σφάλμα μεγέθους $1,5 \text{ mg/dl}$ ($91,5 - 90 = 1,5 \text{ mg/dl}$).



Υπάρχει και εδώ συστηματικό σφάλμα τύπου μετατόπισης. Οι τιμές είναι συγκεντρωμένες γύρω από την γραμμή $\mu - 2s$ δηλαδή $86,1 \text{ mg/dl}$. Κατά συνέπεια υπάρχει συστηματικό σφάλμα μεγέθους $6,1 \text{ mg/dl}$ ($90 - 86,1 = 3,9 \text{ mg/dl}$).



Τα δύο διαγράμματα Levey-Jennings (διαφορετικών επιπέδων A και B) δείχνουν ότι υπάρχει συστηματικό σφάλμα αφού συγκεντρώνονται στην άκρη τους τιμές γύρω στο $\mu \pm 1s$. Αν και κάθε διάγραμμα από μόνο του δεν δηλώνει συστηματικό σφάλμα και τα δύο μαζί δείχνουν συστηματικό σφάλμα και αυτό φυσικά πρέπει να εξαλειφθεί.

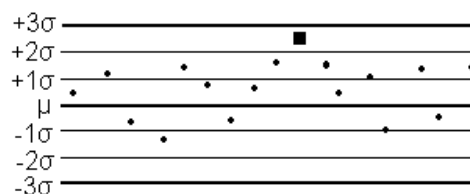


Τα δύο προηγούμενα διαγράμματα είναι φυσιολογικά χωρίς συστηματικό ή τυχαίο σφάλμα. Αν μελετήσουμε όμως και τα δύο μαζί υπάρχει τυχαίο σφάλμα αφού στο ένα διάγραμμα η τελευταία τιμή είναι πάνω από $\mu + 2s$ και στο άλλο η αντίστοιχη τιμή είναι κάτω από $\mu - 2s$.

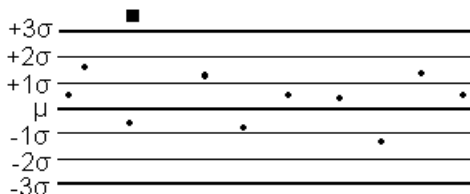
Κριτήρια Westgard

Για την καλύτερη ερμηνεία του διαγράμματος Levey-Jennings χρησιμοποιούνται σήμερα στους αυτόματους αναλυτές τα κριτήρια Westgard. Τα κριτήρια Westgard είναι ένα σύστημα έξι κανόνων με το οποίο ερμηνεύεται με τρόπο αντικειμενικό το διάγραμμα Levey-Jennings. Τα κριτήρια αυτά παρουσιάζονται και ερμηνεύονται στα ακόλουθα παραδείγματα (Εικόνα 51).

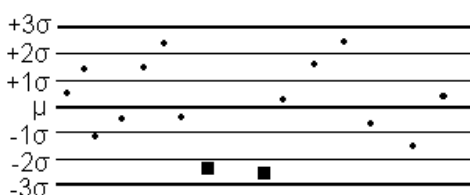
1_{2s}. Μία τιμή ελέγχου είναι έξω από το όριο $\mu \pm 2\sigma$. Θεωρείται **προειδοποίηση** και πρέπει να γίνει περαιτέρω έλεγχος.



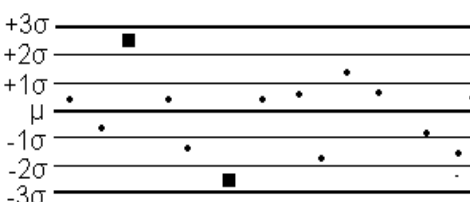
1_{3s}. Δηλώνει **τυχαίο σφάλμα**. Εμφανίζεται όταν μια τιμή ελέγχου υπερβεί το όριο $\mu \pm 3\sigma$. Δεν πρέπει να δίνονται αποτελέσματα στους ασθενείς πριν διορθωθεί το σφάλμα.



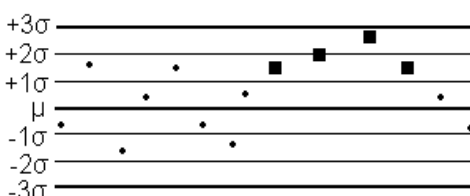
2_{2s}. Δηλώνει **συστηματικό σφάλμα**. Εμφανίζεται όταν δύο συνεχόμενες τιμές κυμαίνονται μεταξύ $\mu + 2\sigma$ και $\mu + 3\sigma$ ή μεταξύ $\mu - 2\sigma$ και $\mu - 3\sigma$. Δεν πρέπει να δίνονται αποτελέσματα στους ασθενείς πριν διορθωθεί το σφάλμα.



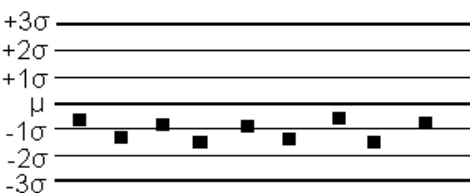
R_{4s}. Δηλώνει **τυχαίο σφάλμα**. Εμφανίζεται όταν μια τιμή ελέγχου υπερβεί την τιμή $\mu + 2\sigma$ και μια άλλη τιμή όχι απαραίτητα συνεχόμενη υπερβαίνει την τιμή $\mu - 2\sigma$. Δεν πρέπει να δίνονται αποτελέσματα στους ασθενείς πριν διορθωθεί το σφάλμα.



4_{1s}. Δηλώνει **συστηματικό σφάλμα**. Εμφανίζεται όταν τέσσερις συνεχόμενες τιμές ελέγχου βρίσκονται πάνω από την τιμή $\mu + 1\sigma$ ή κάτω από την τιμή $\mu - 1\sigma$. Δεν πρέπει να δίνονται αποτελέσματα στους ασθενείς πριν διορθωθεί το σφάλμα.



10_x. Δηλώνει **συστηματικό σφάλμα**. Εμφανίζεται όταν μια δέκα συνεχόμενες τιμές ελέγχου βρίσκονται πάνω ή κάτω από την μέση τιμή. Δεν πρέπει να δίνονται αποτελέσματα στους ασθενείς πριν διορθωθεί το σφάλμα.



Άλλες μέθοδοι εσωτερικού ελέγχου ποιότητας

Εκτός από τα διαγράμματα Shewhart, Levey-Jennings και τα κριτήρια Westgard υπάρχουν και πολλές άλλες στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είτε σε ειδικές κατηγορίες αναλυτών (π.χ. ο αλγόριθμος Bull για την ανίχνευση συστηματικών σφαλμάτων τους αιματολογικούς αναλυτές), είτε για την ανίχνευση ειδικών σφαλμάτων (π.χ. το διάγραμμα Cusum και EWMA για την ανίχνευση μικρών συστηματικών σφαλμάτων).

Όλες οι προηγούμενες μέθοδοι ανιχνεύουν αναλυτικά σφάλματα κυρίως με την χρήση controls. Τι γίνεται όμως με τα προαναλυτικά ή μετααναλυτικά σφάλματα; Η απάντηση είναι ότι υπάρχουν μέθοδοι που μπορούν να βοηθήσουν στον εντοπισμό τους χωρίς όμως και να τα εξαλείψουν. Τέτοιες μέθοδοι είναι οι τιμές πανικού και οι διαφορές δέλτα.

Οι **τιμές πανικού** ή αλλιώς **κρίσιμες τιμές** είναι οι τιμές ασθενών που θέτουν την ζωή τους σε άμεσο κίνδυνο. Στην περίπτωση όπου ο αναλυτής υπολογίσει κάποια τέτοια τιμή θα πρέπει το εργαστήριο να ειδοποιήσει επείγοντως τον ιατρό του ασθενή για να ληφθούν επείγοντες δράσεις. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου οι τιμές πανικού οφείλονται σε βλάβη του αναλυτή. Π.χ. η αναρρόφηση μεγάλης ποσότητας δείγματος ή αντιδραστηρίου ή ακόμα και η αναρρόφηση αέρα μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή τιμών πανικού. Επιπλέον τα αιμολυμένα αίματα μπορούν επίσης να οδηγήσουν στον υπολογισμό υπερβολικά υψηλών τιμών¹⁵. Πριν δοθεί απάντηση που περιέχει τιμή πανικού θα πρέπει οπωσδήποτε να γίνει έλεγχος για τυχόν σφάλμα στην ανάλυση.

Οι **διαφορές δέλτα (delta check)** συγκρίνουν τις τρέχουσες τιμές του ασθενούς με παλαιότερες τιμές. Συγκεκριμένα αφορούν την διαφορά:

Διαφορά δέλτα: Τρέχουσα τιμή – Παλαιότερη τιμή

Εξίσωση 5.1

Όταν η διαφορά δέλτα κάποιας εξέτασης είναι μεγαλύτερη από την **βιολογική διακύμανση**¹⁶ της αυτό σημαίνει είτε σημαντική βελτίωση ή επιδείνωση

¹⁵ Στο τέλος των σημειώσεων υπάρχουν πίνακες με τις σημαντικότερες τιμές πανικού και την σημασία τους.

¹⁶ Η βιολογική διακύμανση είναι η διακύμανση που έχει κάποια ουσία μέσα σε ένα υγιή ανθρώπινο οργανισμό. Εκφράζεται σε ποσοστό (%) και αφορά τόσο την ενδοατομική διακύμανση, δηλαδή μέσα σε κάθε άνθρωπο χωριστά είτε την πληθυσμιακή διακύμανση δηλαδή την διακύμανση μέσα σε ένα σύνολο ανθρώπων. Σήμερα έχει υπολογιστεί η

της υγείας του ασθενούς είτε κάποιο σφάλμα. Το σφάλμα αυτό μπορεί να είναι προαναλυτικό, αναλυτικό ή μετααναλυτικό.

Πολλά σύγχρονα πληροφοριακά συστήματα εργαστηρίων υπολογίζουν απευθείας τις τιμές πανικού και τις διαφορές δέλτα μεταξύ των τιμών που παράγονται από τους αναλυτές.

Ο έλεγχος επιμόλυνσης (carry over)

Η επιμόλυνση είναι η μεταφορά ουσιών από ένα δείγμα στο άλλο και συγκεκριμένα από ένα δείγμα υψηλής συγκέντρωσης σε ένα δείγμα χαμηλής συγκέντρωσης. Πρόκειται για αναλυτικό σφάλμα που προκαλεί αύξηση στις τιμές των μετρήσεων και είναι δύσκολο να προβλεφθεί από τις τιμές των controls. Οφείλεται είτε σε μηχανικό σφάλμα (π.χ. η βελόνα δεν διεισδύει μέσα στο πλυστικό διάλυμα που παρεμβάλλεται μεταξύ διαδοχικών μετρήσεων) είτε σε χημικά αίτια (π.χ. στην αλλοίωση του πλυστικού διαλύματος λόγω πολυκαιρίας).

Ο μόνος τρόπος για να εντοπιστεί είναι είτε από τα «περίεργα» υψηλά αποτελέσματα είτε με την εκτέλεση συγκεκριμένου πειράματος το οποίο περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

1. Τρέχουμε στον αναλυτή το δείγμα ελέγχου υψηλών συγκεντρώσεων (High) τρεις συνεχόμενες φορές. Οι τιμές χαρακτηρίζονται ως H1, H2 και H3.
2. Αμέσως μετά τρέχουμε το δείγμα ελέγχου χαμηλών συγκεντρώσεων (Low) τρεις συνεχόμενες φορές. Οι τιμές χαρακτηρίζονται ως L1, L2 και L3.
3. Η επιμόλυνση υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{Carry-Over} = (L1 - L3)/(H3 - L3) \times 100.$$

Εξίσωση 5.2

Μετρίεται με μονάδες εκατοστιαίας αναλογίας (%).

Πολλοί κατασκευαστές προτείνουν συγκεκριμένα όρια Carry-Over για τις παραμέτρους των αναλυτών τους. Τα όρια αυτά δεν πρέπει να παραβιαστούν από τους αναλυτές. Αν δεν υπάρχουν τέτοια όρια ο χρήστης του αναλυτή θα πρέπει να ορίσει δικά του..

Ο εξωτερικός έλεγχος ποιότητας

Όπως είπαμε ο εσωτερικός έλεγχος ποιότητας ελέγχει την επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα των αναλυτών. Αντίθετα η ακρίβεια τους ελέγχεται με την διαδικασία του εξωτερικού ελέγχου ποιότητας.

Ο εξωτερικός έλεγχος ποιότητας δεν γίνεται καθημερινά αλλά **περιοδικά** (κάθε μήνα, κάθε δύο μήνες ή σπανιότερα ανάλογα με την φύση των εργαστηριακών μεθόδων). Για να πραγματοποιηθεί θα πρέπει να συνεργαστούν πολλά διαφορετικά εργαστήρια. Ένα από αυτά είναι το συντονιστικό κέντρο το οποίο αποστέλλει ταυτόχρονα σε όλα τα υπόλοιπα εργαστήρια δύο controls διαφορετικών επιπέδων. Κάθε εργαστήριο αναλύει τα δύο controls σαν να είναι άγνωστα δείγματα ασθενών και ταχυδρομεί τα αποτελέσματα στο συντονιστικό κέντρο. Το συντονιστικό κέντρο συλλέγει όλες τις τιμές και υπολογίζει για κάθε επίπεδο τιμή στόχο και όρια ελέγχου αφού πρώτα **ομαδοποιήσει** τα εργαστήρια με βάση τον αναλυτή και την εργαστηριακή μέθοδο. Οι στατιστικές αναλύσεις που ακολουθούν είναι παρόμοιες με αυτούς που περιγράφηκαν στον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας.

Έστω ότι σε ένα πρόγραμμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας συμμετέχουν σαράντα εργαστήρια. Τα εργαστήρια αυτά δέχονται από το συντονιστικό κέντρο ένα δείγμα ελέγχου, το αναλύουν και στέλνουν τα αποτελέσματα στο συντονιστικό κέντρο. Δύο από αυτά δεν μπόρεσαν να κάνουν την ανάλυση μέσα στο προβλεπόμενο χρονικό διάστημα και κατά συνέπεια δεν έστειλαν αποτελέσματα για ανάλυση. Οι τιμές π.χ. της γλυκόζης των τριάντα οκτώ εργαστηρίων που απέμειναν ήταν οι ακόλουθες:

Εργαστήριο	Τιμές	Εργαστήριο	Τιμές
1	75	21	89
2	79	22	76
3	85	23	78
4	90	24	84
5	76	25	83
6	80	26	95
7	85	27	95
8	90	28	76
9	110	29	78
10	80	30	96
11	80	31	56
12	87	32	114
13	84	33	90
14	97	34	116
15	76	35	130
16	90	36	97
17	84	37	80

18	85	38	84
19	120		
20	87		

- Στην συνέχεια το συντονιστικό κέντρο υπολογίζει την μέση τιμή και την τυπική απόκλιση όλων των τιμών. Τα αποτελέσματα είναι: $\mu = 88,34 \text{ mg/dl}$ και $s = 14,23 \text{ mg/dl}$.
- Υπολογίζεται το εύρος $\mu \pm 2s$. Αυτό είναι από 59,9 μέχρι 116,8 mg/dl. Όσα εργαστήρια έχουν τιμές έξω από αυτό το όριο θεωρούνται ότι έχουν **ακραίες τιμές** που θα πρέπει άμεσα να διορθωθούν. Αποστέλλεται σε αυτά ειδοποίηση για αυτό. Στο παράδειγμα τα εργαστήρια που θα πρέπει να αποσυρθούν από την περαιτέρω διαδικασία είναι τα 31, 19 και 35.
- Μετά την απόσυρση των 31, 19 και 35 εργαστηρίων υπολογίζεται εκ νέου η μέση τιμή, τυπική απόκλιση και το νέο εύρος $\mu \pm 2s$. Η νέα μέση τιμή είναι $\mu = 87,2$, η τυπική απόκλιση $s = 10,4$ και το εύρος από 66,4 μέχρι 107,9 mg/dl.
- Όλα τα εργαστήρια που βρίσκονται έξω από αυτό το εύρος θεωρούνται εκτός ορίων, είναι εξαιρετικά ανακριβή και θα πρέπει οπωσδήποτε να διορθώσουν τις τιμές τους πριν την επόμενη αξιολόγηση.

Η διαδικασία εκτίμησης της ακρίβειας που περιγράφηκε ονομάζεται μέθοδος της «**συμφωνημένης τιμής**» (στα Αγγλικά consensus mean ή peer group method).

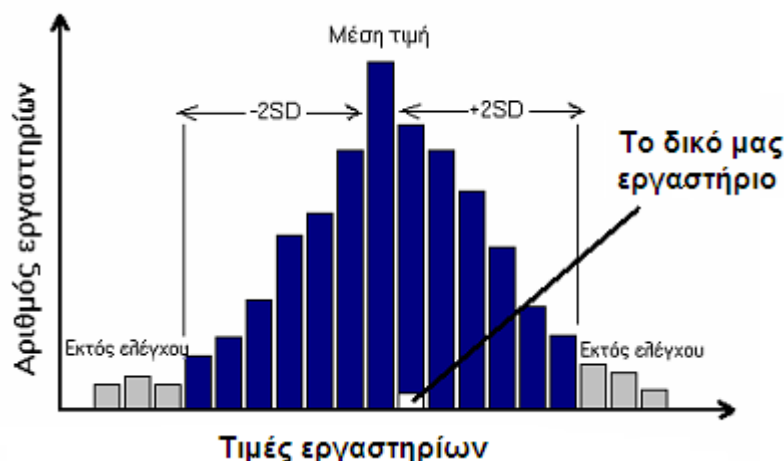
Αποτελέσματα									
223 3ο ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΙΚΑ ΑΘΗΝΩΝ									
7ος Κύκλος - 5η Αποστολή									
Ημ/νια: 28/02/2007									
Παράμετρος		ΟΡΟΣ Α				ΟΡΟΣ Β			
			M.O.	Δ%	SDI		M.O.	Δ%	SDI
[GLU] Γλυκόζη	mg/dL	147.0	156,27	-5,93	-1,31	207.0	213,27	-2,94	-0,60
[UREA] Ουρία	mg/dL	71.0	76,32	-6,97	-1,26	99.5	105,92	-6,06	-1,15
[CREA] Κρεατινίνη	mg/dL	1.85	1,86	-0,65	-0,09	2.45	2,48	-1,15	-0,17
[Na+] Νάτριο	mmol/L	134.0	131,82	1,65	0,71	122.5	121,91	0,49	0,17
[K+] Κάλιο	mmol/L	4.52	4,63	-2,42	-0,84	3.51	3,56	-1,44	-0,43
[T.PROT] Ολικά Λευκώματα	g/dL	5.9	5,97	-1,22	-0,30	6.8	6,90	-1,46	-0,33
[ALB] Αλβουμίνη	g/dL	3.5	3,60	-2,75	-0,50	4.2	4,08	3,07	0,56
[CHOL] Χοληστερόλη	mg/dL	179.0	186,89	-4,22	-0,79	230.0	236,04	-2,56	-0,51
[HDL] HDL-Χοληστερόλη	mg/dL	40.0	33,04	21,06	1,35	48.0	41,23	16,42	0,97
[TRIG] Τριγλυκερίδια	mg/dL	141.0	142,02	-0,72	-0,13	181.0	179,96	0,58	0,10
[URAC] Ουρικό οξύ	mg/dL	5.9	5,78	2,02	0,33	7.7	7,51	2,55	0,45
[TBIL] Χολερυθρίνη ολική	mg/dL	1.3	1,41	-8,08	-0,58	0.85	0,97	-12,69	-0,59
[Ca] Ασβέστιο	mg/dL	9.05	9,35	-3,18	-0,72	7.75	8,06	-3,85	-0,67
[P] Φωσφόρος	mg/dL	3.90	3,75	3,92	0,44	3.10	2,91	6,48	0,41
[Mg] Μαγνήσιο	mg/dL	2.88	2,80	2,89	0,29	3.49	3,44	1,60	0,17
[Fe] Σίδηρος	μg/dL	112.0	112,48	-0,43	-0,05	146.0	142,09	2,75	0,33

[AST] (SGOT)	U/L	92.5	107,21	-13,72	-2,02	61.5	67,46	-8,83	-1,13
[ALT] (SGPT)	U/L	76.5	83,72	-8,62	-1,14	106.0	111,77	-5,16	-0,76
[ALP] Αλκαλική Φωσφατάση	U/L	179.0	169,80	5,42	0,44	72.5	227,05	-68,07	-4,91
[GGT] γ-GT	U/L	114.5	120,91	-5,30	-0,39	242.5	76,73	216,06	14,91
[LDH] LDH	U/L	344.0	337,48	1,93	0,19	465.0	451,89	2,90	0,31
[CK] CK	U/L	192.0	185,61	3,44	0,27	286.5	272,26	5,23	0,41
[AMY] Αμυλάση	U/L	512.5	481,62	6,41	0,49	724.0	670,31	8	

Εικόνα 5.6. Αποτελέσματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας εργαστηρίου της Αθήνας. Οι τιμές SDI που αναφέρονται είναι το πηλίκο: (τιμή εργαστηρίου – μέση τιμή) / τυπική απόκλιση. Αν το SDI μεγαλύτερο από ± 2 τότε το εργαστήριο θεωρείται ότι πάσχει από έλλειψη ακρίβειας και θα πρέπει να πάρει επιδιορθωτικά μέτρα.

Τα αποτελέσματα που εκδίδει το συντονιστικό κέντρο του εξωτερικού ελέγχου ποιότητας δεν είναι μόνο πίνακες σαν τον προηγούμενο αλλά και διαγράμματα που απεικονίζουν τις τιμές κάθε εργαστηρίου σε σχέση με τα υπόλοιπα.

Ένα τέτοιο διάγραμμα είναι το **διάγραμμα κανονικής κατανομής**. Στο διάγραμμα αυτό απεικονίζονται (ομαδοποιημένα σε μπάρες) όλα τα εργαστήρια που συμμετέχουν στο ίδιο πρόγραμμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας. Αν η τιμή του δικού μας εργαστηρίου βρίσκεται έξω από το εύρος των δύο τυπικών αποκλίσεων (SD) τότε θα πρέπει να πάρουμε επιδιορθωτικά μέτρα.



Εικόνα 5.7. Διάγραμμα κανονικής κατανομής των εργαστηρίων που συμμετέχουν σε σχήμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας.

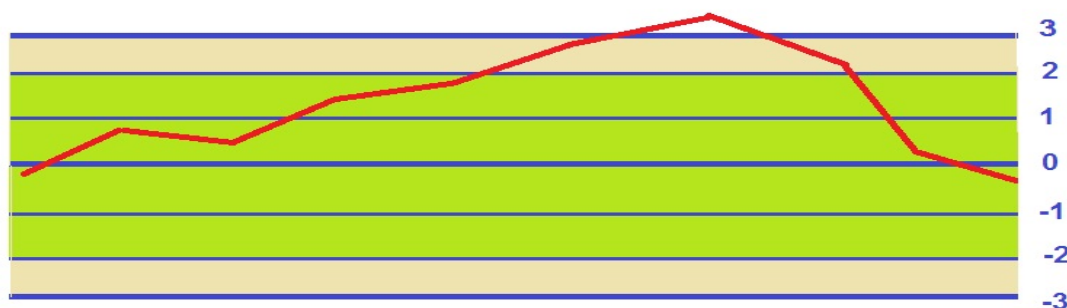
Στα σχήματα του εξωτερικού ελέγχου ποιότητας χρησιμοποιούνται επίσης διαγράμματα τύπου **Levey-Jennings** με κάποιες όμως σημαντικές διαφορές. Τα όρια ελέγχου είναι διαφορετικά από το κλασικό διάγραμμα Levey-Jennings αλλά και οι τιμές ελέγχου που τοποθετούνται πάνω σε αυτό. Συγκεκριμένα πάνω στο διάγραμμα

δεν τοποθετούνται αυτούσιες οι τιμές ελέγχου αλλά «τυποποιημένες τιμές» που συνήθως συμβολίζονται **SDI** (Standard Deviation Index) που υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$SDI = \frac{\text{Τιμή εργαστηρίου} - \text{Μέση τιμή εργαστηρίων}}{\text{Τυπική απόκλιση εργαστηρίων}}$$

Εξίσωση 30

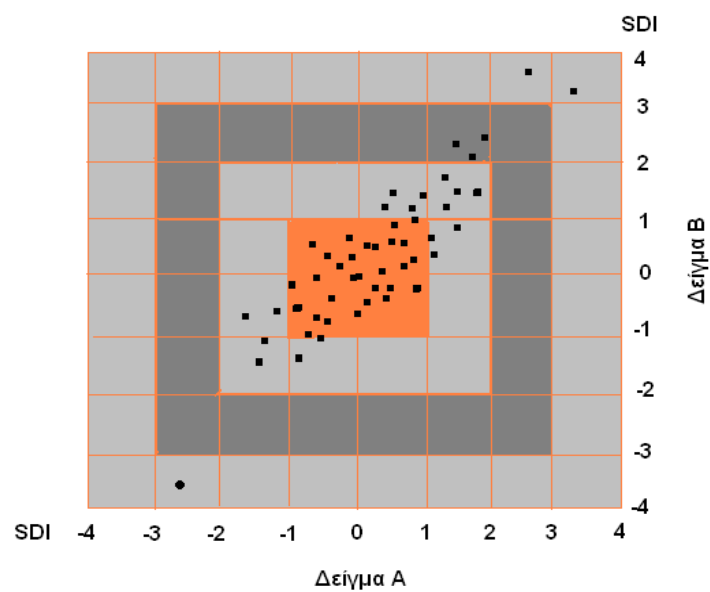
Τιμή $SDI > \pm 2$ θεωρείται ότι είναι εκτός ορίων ελέγχου και θα πρέπει να ληφθούν επιδιορθωτικά μέτρα. Με βάση την τιμή SDI οι τιμές του διαγράμματος Levey-Jennings στον εξωτερικό έλεγχο ποιότητας διαμορφώνονται σε -3, -2, -1, 0, 1, 2, 3. Η τιμή στόχος είναι το μηδέν (0).



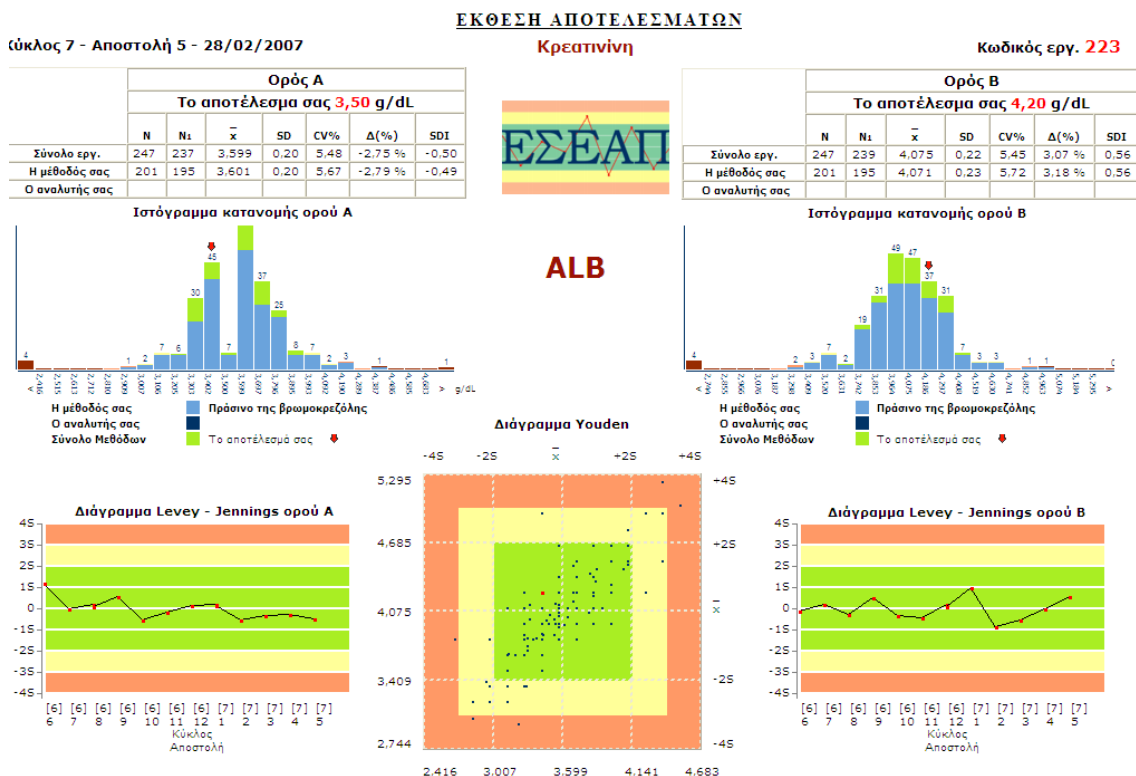
Εικόνα 5.8. Διάγραμμα Levey-Jennings που περιέχει τιμές SDI αντί για τις πραγματικές τιμές ελέγχου. Χρησιμοποιείται στα σχήματα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας όπου δείχνουν την απόδοση της μεθόδου σε βάθος χρόνου.

Άλλο διάγραμμα είναι το **διπλό διάγραμμα** ή διάγραμμα **Youden**. Πρόκειται για ένα τετράγωνο διάγραμμα στο κέντρο του οποίου βρίσκονται οι μέσες τιμές και των δύο control A και B. Με το διάγραμμα αυτό ελέγχονται ταυτόχρονα και τα δύο επίπεδα ελέγχου και έτσι υπάρχει καλύτερη εικόνα για την ακρίβεια του εργαστηρίου. Κάθε κουκίδα συμβολίζει ένα εργαστήριο. Όταν η κουκίδα του δικού μας εργαστηρίου βρίσκεται έξω από τις πλευρές που ορίζουν τα $\pm 2SDI$ τότε το εργαστήριο μας έχει κακή ακρίβεια και θα πρέπει να παρθούν επιδιορθωτικά μέτρα.

Το διάγραμμα Youden δίνει επίσης πληροφορίες και για την αναπαραγωγιμότητα μεταξύ των εργαστηρίων. Όταν οι κουκκίδες όλων των εργαστηρίων είναι πάνω στη διαγώνιο τότε η αναπαραγωγιμότητα είναι καλή. Εάν εμφανίζουν μεγάλη διασπορά η αναπαραγωγιμότητα είναι κακή.



Εικόνα 5.9. Διάγραμμα Youden των εργαστηρίων που συμμετέχουν σε σχήμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας.



Εικόνα 5.10. Έκθεση αποτελεσμάτων εξωτερικού ελέγχου ποιότητας¹⁷. Πριν την στατιστική ανάλυση των τιμών προηγήθηκε η ομαδοποίηση των τιμών με βάση την χημική μέθοδο. Ομαδοποίηση με βάση τον αναλυτή δεν έγινε γιατί δεν υπήρχε μεγάλος αριθμός ιδίων μοντέλων. Τα εργαστήρια ανέλυσαν δύο ορούς τους Α και Β. Τα ιστογράμματα κατανομής έχουν δύο διαφορετικά χρώματα. Το πράσινο χρώμα (επάνω) αναφέρεται στο σύνολο των εργαστηρίων και το μπλε χρώμα (κάτω) αναφέρεται στα εργαστήρια που χρησιμοποιούν την ίδια μέθοδο (πράσινο της βρωμοκρεζόλης). Τα διαγράμματα Levey-Jennings δείχνουν τις τιμές SDI σε βάθος χρόνου βοηθώντας το εργαστήριο να εντοπίσει συστηματικά σφάλματα.

¹⁷ Το παράδειγμα αφορά έκθεση αποτελεσμάτων του Ελληνικού προγράμματος εξωτερικού ελέγχου ποιότητας που ονομάζεται ΕΣΕΑΠ (Εθνικό Σύστημα Εξωτερικής Αξιολόγησης Ποιότητας) που διοργανώνεται από την Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας – Κλινικής Βιοχημείας.

Τιμές πανικού για τους βιοχημικούς αναλυτές

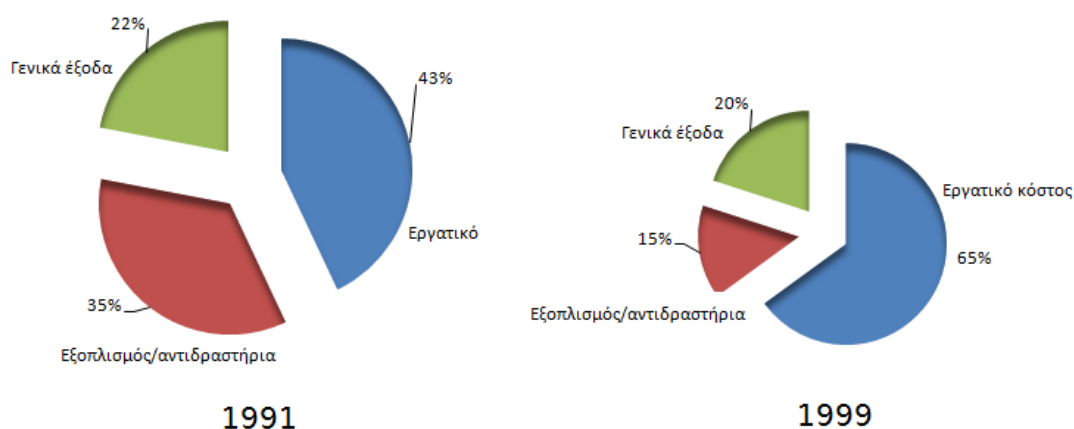
Εξετάσεις	Τιμή	Πότε εμφανίζεται
Φώσφορος	< 1,0 mg/dl	Μυϊκή αδυναμία, μυϊκός πόνος, παρενέργειες στο κεντρικό νευρικό σύστημα, αποπροσανατολισμός, σύγχυση, σπασμοί, κώμα κ.α., αναπνευστικά προβλήματα με μεταβολική οξέωση.
	> 9,0 mg/dl	Σύνδρομο οξείας λύσεως όγκων και τελική νεφρική ανεπάρκεια.
Χολερυθρίνη	> 15 mg/dl	Ηπατοχολική νόσος προκαλούμενη κυρίως από ηπατοτροπικούς ιούς.
Κρεατινίνη	> 7,4 mg/dl	Οξεία νεφρική ανεπάρκεια ή σήψη.
Γλυκόζη	< 45 mg/dl	Νευροπογλυκαιμικά συμπτώματα που ποικίλουν από εξασθένηση των γνωστικών λειτουργιών μέχρι την έλλειψη τα συνείδησης.
	> 500 mg/dl	Διαβητικό κώμα που οφείλεται σε ανεπάρκεια ινσουλίνης. Ωσμωτική διούρηση με οξεία αφυδάτωση και διαβητική κετονοξέωση.
Ουρία	> 214 mg/dl	Ένδειξη οξείας νεφρικής ανεπάρκειας, προ- και μετα-νεφρική ηπατική ανεπάρκεια, παράλληλη αύξηση της ουρίας συγκρινόμενη με την κρεατινίνη στα ούρα.
BUN	> 100 mg/dl	
Ουρικό οξύ	> 13 mg/dl	Οξεία ουρική νεφροπάθεια με απόφραξη ουροφόρων σωληναρίων και νεφρική ανεπάρκεια.
CK	> 1000 U/l	Η τιμή της εξαρτάται από την φυσική κατάσταση του ασθενούς.
LDH	> 1000 U/l	Η τιμή της εξαρτάται από την φυσική κατάσταση του κάθε ασθενούς.
GOT/GPT	> 1000 U/l	Απαιτείται έγκαιρη ειδοποίηση του ιατρού ανάλογα με την κλινική εικόνα του ασθενούς.
Μαγνήσιο	< 1,0 mg/dl	Χαρακτηριστικά συμπτώματα είναι η παραισθησία, κράμπες, ερεθιστικότητα, και αθετωσικός τέτανος. Οι ασθενείς συχνά εμφανίζουν καρδιακή αρρυθμία σε συνδυασμό με υποκαλιαιμία.
	> 4,9 mg/dl	Μείωση της μετάδοσης του νευρομυϊκού παλμού που οδηγεί σε υπνηλία, υποαερισμός με αναπνευστική οξείδωση, μυϊκή αδυναμία και μειωμένα αντανάκλαστικά στους τένοντες.
Λιπάση	> 700 U/l	Οξεία παγκρεατίτιδα.
Χλώριο	< 75 mmol/l	Ένδειξη σημαντικής μεταβολικής αλκάλωσης.
	> 125 mmol/l	Ένδειξη βαριάς πρωταρχικής μεταβολικής οξείδωσης ή ψευδουπερχλωραιμία για την περίπτωση δηλητηρίασης από βρωμίδιο.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Είναι ολοφάνερο ότι οι εξελίξεις στα αναλυτικά συστήματα τα τελευταία 50 χρόνια ήταν καταγιστικές με βασικά ορόσημα τους πρώτους αυτόματους αναλυτές και περί τα τέλη της δεκαετίας του '90 τη συγχώνευση διαφορετικών αναλυτικών τεχνολογιών όπως ιοντοεπιλεκτικά ηλεκτρόδια, κλασική φωτομετρία, (ανοσο)θολοσιμετρία, χημειοφωταύγεια και διάφορες εκδοχές της, φθοροπολωσιμετρία, νεφελομετρία, LOCI και πλειάδα άλλων μεθοδολογιών σε μεγάλες αναλυτικές πλατφόρμες. Σε ένα υπερσύγχρονο αναλυτή είναι δυνατόν να εκτελούνται παράλληλα περισσότερες από 200 μέθοδοι και η παραγωγικότητα να υπερβαίνει ακόμα και τα 10.000 αποτελέσματα ανά ώρα.

Οι τάσεις της αγοράς σήμερα είναι προς διαρκώς μεγαλύτερα συστήματα ενώ παράλληλα δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στη διαχείριση των δεδομένων και στην αυτοματοποίηση του περι-αναλυτικού έργου (προ-αναλυτικής και μετα-αναλυτικής φάσης).

Ωστόσο η αυτοματοποίηση δεν είναι πανάκεια. Και ενώ τα οφέλη στην ποιότητα και την μείωση της μεταβλητότητας/διακύμανσης είναι προφανή το πόσο αποδοτική είναι μια τέτοια λύση απαιτεί εμπειριστατωμένη μελέτη και εξαρτάται από τις ιδιαιτερότητες του κάθε εργαστηρίου. Όλα αυτά συντελούν σε τεράστιες αλλαγές στο τρόπο λειτουργίας του βιοχημικού εργαστηρίου. Η συνολική μείωση του κόστους ανά εξέταση αλλά και η ανακατανομή του είναι ενδεικτική των μεγάλων αλλαγών που έχουν επέλθει.



Εικόνα 55. Η κατανομή των εξόδων σε Αμερικάνικα κλινικά εργαστήρια μέσα σε μία οκταετία. Η μείωση του κόστους για εξοπλισμό και αντιδραστήρια μεταφέρθηκε στο εργατικό κόστος.

Βιβλιογραφία

- ΕΥΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΣ Α, ΒΑΛΛΙΑΝΟΥ Ν, ΒΟΓΙΑΤΖΑΚΗΣ Ε. Η συμβολή των συστημάτων πληροφορικής στην υποβοήθηση, την επιτάχυνση και τη διασφάλιση της αξιοπιστίας των εργαστηριακών διαγνωστικών διαδικασιών και αποτελεσμάτων. *Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας*, (2007), 52(3): 146 - 157.
- ΚΑΡΚΑΛΟΥΣΟΣ Π, ΕΥΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΣ Α. Οι “VIPs” του ελέγχου ποιότητας των αναλύσεων των αυτόματων αναλυτών. *Ενημερωτικό Δελτίο ΕΕΚΧ-ΚΒ*, Οκτ.-Νοε.-Δεκ. 2009.
- ΜΗΤΡΟΠΟΥΛΟΣ Σ. Πρότυπα Υλικά και Μέθοδοι – Οροί Ελέγχου. Ο έλεγχος της ποιότητας στο εργαστήριο κλινικής χημείας, 2ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο ΕΕΚΧ-ΚΒ (2003), 14-25.
- ΕΥΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΣ Α. ΚΑΡΚΑΛΟΥΣΟΣ Π. Παρελθόν, παρόν και τάσεις στον αυτοματισμό του βιοχημικού εργαστηρίου, 14ο Σεμινάριο ΕΕΚΧ-ΚΒ (2011), 7-41.
- ANDERSON NG. Adventures in Clinical Chemistry and Proteomics: A Personal Account. *Clin. Chem.* 2010, 56 (2): 154-160
- BIGAT T, SAIFER A. Some Methodological Modifications of the Technicon “SMA 12/60 AutoAnalyser” System. *Clin Chem* (1972), 18(7): 630-642.
- BOYD JC, YOUNG DS. Automation in the clinical laboratory, Chapter 10 in: Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, 3rd Edition, W.B. SAUNDERS COMPANY, pp 226 – 261.
- BURTIS C. Advanced technology and its impact on the clinical laboratory. *Clin Chem* (1987), 33(3): 352-357.
- DATI F. The new European directive on in vitro diagnostics. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003, 41:1289-1298.
- HAHN B, VLASTELICA D, SNYDER L, FURDA J, RAO K. Polychromatic analysis: New applications of an old technique. *Clin Chem* (1979), 25:951-959.
- International Union of Pure and Applied Chemistry: Nomenclature for Automated and Mechanised Analysis (Recommendation 1989). *Pure and Applied Chemistry*, 67:1657-1664, 1989.
- LEVIN J. The AutoAnalyzer and the Revolution in Diagnostic Testing. AACC 2007 Annual Meeting.
- LEWIS J, DAVIS J. Computer Interface for Data Acquisition and Control of an SMA 12/60. *Clin Chem* (1975), 21(9): 1221-1224.
- MORAIS I, TOTH I, RANGEL A. Turbidimetric and Nephelometric Flow Analysis: Concepts and Applications. *Spectroscopy Letters* (2006), 39: 547-579.

- RICOS C, ALVAREZ V., CAVA F., GARCIA-LARIO JV., HERNANDEZ A., JIMENEZ CV., MINCHINELA J., PERICH C, SIMON M. Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1999, 59(7):491-500.
- ROBERTS W. Principles of Clinical Chemistry Automation, Chapter 5 in: Clinical Chemistry. Principles, Procedures, Correlations. Michael L. Bishop, Edward P. Fody, Larry Schoeff, 5th Edition, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS. pp 124 – 143.
- RONALD H N, ALTAFFER M, ITO R., STATLAND B. The Technicon RA-1000 Evaluated for Measuring Sodium, Potassium, Chloride, and Carbon Dioxide. Clin Chem. 1985 31(3): 435-438.
- ROSENFELD L. A Golden Age of Clinical Chemistry: 1948–1960. Clin Chem (2000), 46(10): 1705–1714. SKEGGS L. An automatic method for colorimetric analysis. Am J Clin Path 1957;28:311-22.
- SCHULTZ S, HOLEN J, DONOHUE J, FRANCOEUR T. Two-Dimensional Centrifugation for Desk-Top Clinical Chemistry. Clin Chem (1985), 31(9): 1457-1463.
- SCOTT C, BURTIS C, JOHNSON W, THACKER L, TIFFANY T. A small portable centrifugal fast analyzer system. Clin Chem (1974), 20(8): 1003-1008.
- SKEGGS L. Persistence ... and Prayer: From the Artificial Kidney to the AutoAnalyzer. Clin Chem. 2000, 46(9):1425-1436.
- SKEGGS L., HORCHSTRASSER H. Multiple Automatic Sequential Analysis. Clin Chem (1964), 10 (10): 918-936.
- WANG Y., XU H., ZHANG J, LI G. Electrochemical sensors for clinical analysis, Sensors (2008), 8: 2043-2081.
- WU A. Analytic Techniques and Instrumentation, Chapter 4 in: Clinical Chemistry. Principles, Procedures, Correlations. Michael L. Bishop, Edward P. Fody, Larry Schoeff, 5th Edition, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS. pp 90 – 96.

Αγγλοελληνικό λεξιλόγιο για τους βιοχημικούς αναλυτές

Absorbance	Απορρόφηση
Optical density	Οπτική πυκνότητα
Absorptivity	Απορροφητικότητα
Analytical sensitivity	Αναλυτική ευαισθησία
Bar code	Γραμμωτός κώδικας
Batch analyzer	Αναλυτής φουρνιάς
Bichromatic analysis	Διχρωματική ανάλυση
Blank dilution	Τυφλό ή λευκό διάλυμα
Calibration	Βαθμονόμηση
Chemistry	«Χημεία» ή «πρωτόκολλο»: η χημική μέθοδος
Colorimetric analysis	Χρωματομετρική ανάλυση
Curve	Καμπύλη
Cuvette	Κυβέττα ή κυψελίδα
End point measurement	Μέτρηση τελικού σημείου
Factor	«Φάκτορας»: Συντελεστής μετατροπής
Fixed time	Σταθερού σημείου
Kinetic method	Κινητική μέθοδος
Measuring range	Εύρος μέτρησης
Linearity	Γραμμικότητα
Photodetector	Φωτοανιχνευτής
Photometer	Φωτόμετρο
Random access analyzer	Αναλυτής τυχαίας προσπέλασης
Standard	Βαθμονομητής
Slope	Κλίση της ευθείας βαθμονόμησης
STAT	Επείγον δείγμα
Substrate	Υπόστρωμα
Transmittance	Διαπερατότητα
Turbidimetry	Θολωσιμετρία
Turn around time	Χρόνος απόδοσης αποτελέσματος
Potentiometer	Ποτενσιόμετρο
Wavelength	Μήκος κύματος

Worklist

Λίστα εργασίας