

# IMMULITE: CB DOC

## Table of contents

Function -> System -> Function Description -> Theory of Operation .....	2
1 Introduction .....	2
2 Overview of Test Process .....	2
3 Internal Calculations .....	3
4 IMMULITE 2000/2000 XPi Chemiluminescent Reaction .....	4
Формула для анализов с конкурентным связыванием .....	6
Формула для иммунометрических анализов (сэндвич-анализов) .....	6
Построение кривой по точкам .....	6
Контрольные анализы, проведённые непосредственно после калибровки .....	8
Наклон калибровки при первоначальной калибровке .....	8
Пример расчёта допустимого диапазона наклона .....	8
Точка пересечения калибровки для иммунометрического анализа (сэндвич-анализа) .....	9
Точка пересечения калибровки для анализов с конкурентным связыванием .....	9
Сводная информация по валидации калибровки .....	9
Перекалибровка .....	10
Угловые коэффициенты перекалибровки .....	10
Значения точки пересечения при перекалибровке .....	10
Приведение LAB-сигнала к эталонной системе .....	12
Интерпретация .....	12

## Function -> System -> Function Description -> Theory of Operation

### 1 Introduction

**IMMULITE 2000 / 2000 XPi** — иммунохимический анализатор с произвольным доступом (**random-access immunoassay analyzer**), основанный на проприетарной технологии быстрого и эффективного отмывания твёрдой фазы (**solid phase**) в виде микросферы (**bead**).

Полистирольная микросфера диаметром **0,635 см (0.25 inch)** фиксируется внутри реакционной пробирки (**reaction tube**), которая используется как единый сосуд для всех стадий анализа, включая инкубации (**incubations**), отмывки (**washes**) и формирование сигнала (**signal development**).

После инкубации образца (**sample**) с реагентом, меченным щелочной фосфатазой (**alkaline phosphatase-labeled reagent**), быстрое разделение и эффективная отмывка микросферы и реакционной пробирки достигаются за счёт высокоскоростного вращения реакционной пробирки вокруг вертикальной оси (**high-speed spinning on its vertical axis**). Жидкое содержимое полностью переносится в коаксиальную камеру-сборник (**coaxial sump chamber**) моечной станции (**wash station**).

Четыре отмывки (**four washes**) выполняются в течение нескольких секунд, что обеспечивает равномерную последовательную обработку реакционных пробирок и оставляет микросферу без остаточного несвязанного меченого реагента (**unbound label**).

Количество связанной метки (**bound label**) определяется с использованием диоксетанового субстрата (**dioxetane substrate**) или триггер-реагента (**trigger reagent**), которые инициируют образование света (**light production**). Интенсивность светового излучения хемилюминесцентного субстрата (**chemiluminescent substrate**), реагирующего со связанной меткой, пропорциональна количеству аналита (**analyte**), присутствующего в образце.

### 2 Overview of Test Process

Пользовательский интерфейс оператора (**operator interface**) является очень простым. До **90** первичных и вторичных пробирок со штрихкодами (**bar-coded primary and secondary tubes**), содержащих образцы пациентов (**patient specimens**), контроли (**controls**), корректоры (**adjusters**) или дилуенты (**diluents**), загружаются в штативы для образцов (**sample racks**).

Максимум **24** реагентных клина (**reagent wedges**) и набора микросфер (**bead packs**), специфичных для соответствующих тестов (**assay-specific**), со штрихкодами вручную загружаются в соответствующие карусели с охлаждением (**refrigerated carousels**) или осушением (**dehumidified carousels**).

После ввода рабочего списка (**work list**) система **IMMULITE 2000 / 2000 XPi** автоматически начинает выполнение тестирования. Процесс включает: - внесение одной микросферы, специфичной для анализа (**single assay-specific bead**), в реакционную пробирку (**reaction tube**); - дозирование как образца (**sample**), так и меченого реагента, специфичного для анализа (**labeled, assay-specific reagent**), на микросферу; - перенос реакционной пробирки в инкубационную часть процессора пробирок (**incubator portion of the tube processor**).

Реакционная пробирка подвергается непрерывному перемешиванию (**continuous agitation**) при температуре **37 °C (37°C)** в течение времени от **30 до 180 минут (30–180 minutes)**, в зависимости от конкретного теста (**assay**).

После завершения периода инкубации реакционная пробирка отмывается (**washed**), добавляется субстрат (**substrate**) или триггер (**trigger**), и количество сгенерированного света измеряется фотоумножителем (**photomultiplier tube, PMT**).

Автоматическое ослабление светового сигнала (**automatic attenuation of the light signal**) увеличивает динамический диапазон фотоумножителя в **100 раз (a hundredfold)**, что обеспечивает точные измерения как при чрезвычайно высоких, так и при чрезвычайно низких концентрациях аналита (**analyte concentrations**).

### 3 Internal Calculations

В данном разделе приводится пошаговое описание внутренних вычислений (**internal calculations**), выполняемых системой **IMMULITE 2000 / 2000 XPi** при определении результатов тестов (**test results**).

Поскольку прибор использует ультрачувствительные тесты (**ultrasensitive assays**), формирующие сигнал до нескольких сотен миллионов отсчётов в секунду (**counts per second, CPS**), перед фотоумножителем (**photomultiplier tube, PMT**) используется ослабляющий диск (**attenuator disk**) для обеспечения точных измерений в очень широком диапазоне световых сигналов. Ослабляющий диск имеет три положения:

- **Closed** — полностью блокирует PMT
- **Attenuated** — устанавливает нейтральный светофильтр (**neutral density filter**) перед PMT
- **Open** — положение без фильтра (**unfiltered position**)

Ослабляющий фильтр прибора ограничивает количество фотонов (**photons**), попадающих на PMT, обеспечивая точный подсчёт даже в случаях, когда фактические значения CPS настолько высоки, что превышают линейный диапазон PMT (**PMT linear range**).

Для каждого образца (**sample**) прибор выполняет односекундное измерение (**one-second reading**) в закрытом положении — тёмный счёт (**dark count**), а также односекундное измерение в ослабленном положении — решающее измерение (**decision count**).

Если односекундное измерение в ослабленном положении составляет менее **1 000 CPS**, ослабляющий диск переводится в открытое положение; в противном случае диск остаётся в ослабленном положении во время выполнения измерений.

Прибор выполняет **пять односекундных измерений (five one-second readings)** и затем возвращает ослабляющий диск в закрытое положение.

Тёмные отсчёты (**dark counts**) вычисляются как среднее значение последних десяти измерений (**last ten reads**). Это среднее значение вычитается из каждого из пяти измерений. (Измерение тёмного счёта выполняется только тогда, когда реакционная пробирка (**reaction tube**) находится в позиции считывания (**read position**).)

Если измерения выполнялись в ослабленном режиме (**attenuated**), среднее значение пяти отдельных измерений умножается на прибороспецифичный коэффициент ослабления (**instrument-specific attenuation factor**) для получения полного неослабленного значения CPS (**total unattenuated CPS**):

$$\text{cps(unattenuated)} = \text{cps(attenuated)} \times \text{attenuation factor}$$

Для определения концентраций аналита (**analyte concentrations**) программное обеспечение прибора использует параметры мастер-кривой, специфичные для лота (**lot-specific master curve parameters**), которые вводятся в систему через двумерный штрихкод набора (**2-D kit bar code**).

#### 4 IMMULITE 2000/2000 XPi Chemiluminescent Reaction

В данном разделе приводится краткий обзор хемилюминесцентной реакции (**chemiluminescent reaction**), используемой в системе **IMMULITE 2000 / 2000 XPi**.

На первом этапе конъюгат щелочной фосфатазы (**alkaline phosphatase conjugate**, reagent) связывается с микросферой (**bead**) внутри реакционной пробирки (**reagent tube**) в ходе иммунологической реакции (**immunological reaction**). Количество захваченной щелочной фосфатазы является пропорциональным концентрации аналита в образце пациента (**patient sample**) для сэндвич-анализа (**sandwich assay**) либо обратно пропорциональным для конкурентного анализа (**competitive assay**).

После отмывки реакционной пробирки (**reaction tube**) в неё добавляется люминогенный субстрат (**luminogenic substrate**), после чего пробирка перемещается на транспортную ленту люминометра (**luminometer belt**).

Через **пять минут** реакционная пробирка поступает в позицию перед фотоумножителем (**photomultiplier tube, PMT**), где измеряется свет, генерируемый люминогенной реакцией (**luminogenic reaction**). В отличие от хемилюминесцентных реакций с использованием акридиниевых эфиров (**acridinium esters**), которые дают кратковременную вспышку света (**flash of light**), фермент-усиленная реакция (**enzyme-amplified reaction**) в данном приборе формирует продолжительное свечение (**prolonged glow**), как показано на рис. Figure 1.

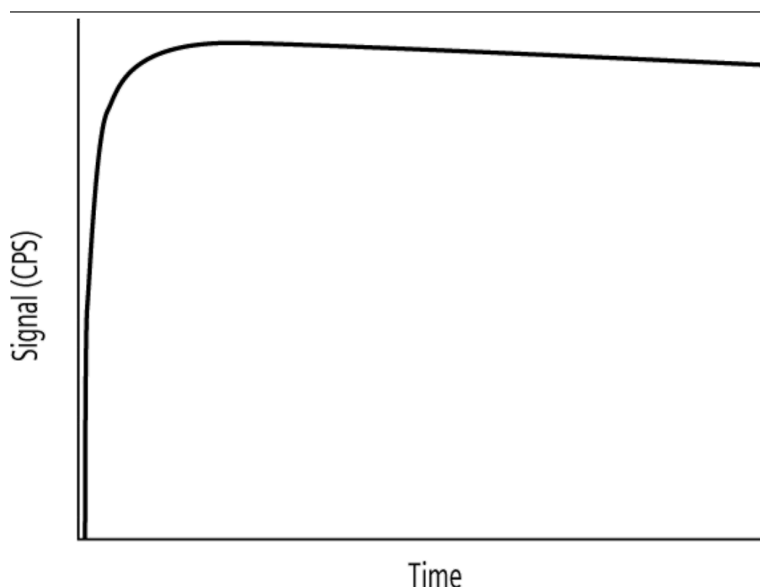


Figure 1: IMMULITE 2000/2000 XPi Enzyme-Amplified Luminescence

В ходе люминогенной реакции (**luminogenic reaction**; см. Figure 2) субстрат — адамантилфосфат диоксетана (**adamantyl dioxetane phosphate**) — дефосфорилируется до нестабильного анионного интермедиата (**unstable anion intermediate**) под действием конъюгата щелочной фосфатазы (**alkaline phosphatase conjugate**), захваченного на микросфере (**bead**). Нестабильный интермедиат при распаде испускает фотон (**photon**). Количество испускаемого света напрямую пропорционально количеству связанной щелочной фосфатазы.

По сравнению с другими методами детекции (**means of detection**), хемилюминесценция (**chemiluminescence**) обеспечивает наивысший уровень чувствительности. Во многих случаях её чувствительность на несколько порядков превышает чувствительность, достижимую при использовании радиоиммуноанализов (**radioimmunoassays**).

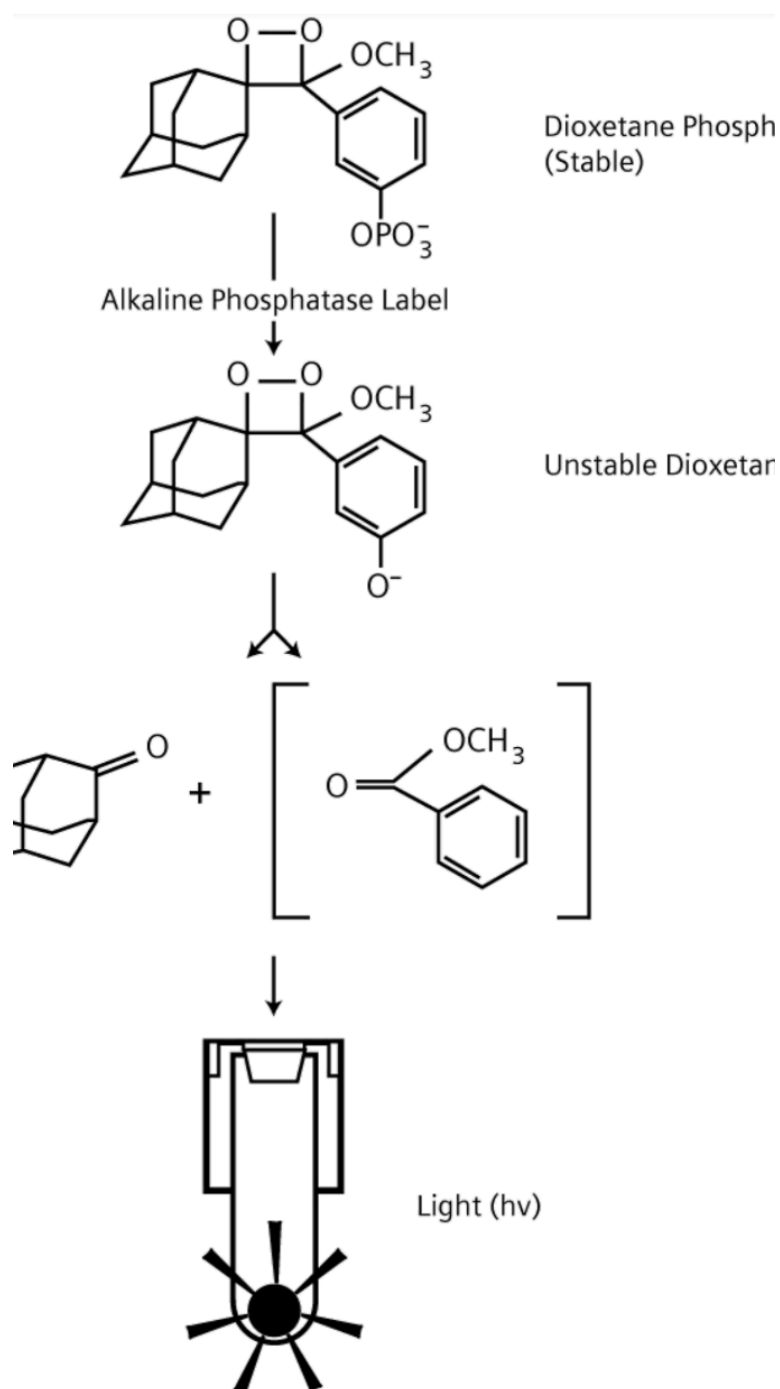


Figure 2: IMMULITE 2000/2000 XPi Chemiluminescent Substrate

## **i** Логистическая модель с четырьмя параметрами

При использовании логистического метода с четырьмя параметрами построенная эталонная кривая представляет собой уравнение, описывающее график, наилучшим образом соответствующий данным, использованным для построения эталонной кривой.

### **Примечание.**

Числовые значения четырёх параметров уравнения отличаются для разных партий реактива. Эти значения закодированы в штрих-коде на этикетке набора. Средние значения CPS для калибраторов с высоким и низким содержанием, которые анализировались одновременно со стандартными образцами, использованными для построения эталонной кривой, также кодируются в штрих-коде на этикетке набора.

Система использует две различные формулы общего логистического уравнения с четырьмя параметрами.

### **Формула для анализов с конкурентным связыванием**

$$CPS = P1 + \frac{P2}{1 + \exp(-(P3 + P4 \times \ln(\text{доза})))}$$

где:

- **P1** — максимальное значение CPS ( $B_0$ )
- **P2** — минимально-максимальное CPS ( $NSB - B_0$ )
- **P3** — точка пересечения графика логит-лог
- **P4** — угловой коэффициент графика логит-лог

### **Формула для иммунометрических анализов (сэндвич-анализов)**

$$CPS = P2 + \frac{P1 - P2}{1 + \left(\frac{\text{доза}}{P3}\right)^{P4}}$$

где:

- **P1** — максимальное значение CPS
- **P2** — минимальное значение CPS ( $NSB$ )
- **P3** — доза, соответствующая половине максимального значения CPS
- **P4** — угловой коэффициент графика логит-лог

### **Построение кривой по точкам**

В модели построения кривой по точкам калибровочная кривая формируется путём соединения точек, соответствующих каждому стандарту, прямыми линиями.

## ! Двухточечная калибровка

Поскольку данные калибровки, используемые для построения эталонной кривой (**master curve**), получают с применением одной аналитической системы, сигнал (**counts per second, CPS**) для любой другой лабораторной системы должен быть приведён в соответствие с сигналом системы, использованной для построения эталонной кривой. Это необходимо для возможности прямого использования эталонной кривой при расчёте результатов.

Так как ни один фотоумножитель (**photomultiplier tube, PMT**) не воспроизводит в точности одинаковые значения CPS при поступлении на него одного и того же количества света, сигнал каждой лабораторной системы требует калибровки. Целью этой калибровки является приведение сигнала пользовательской системы в соответствие с сигналом эталонной системы, чтобы эталонная кривая могла применяться на всех приборах. Данная задача решается с помощью **двухточечного калибровочного процесса (two-point calibration)**.

При использовании полностью стандартной кривой как на эталонной системе, так и на системе пользователя, взаимосвязь между измеренными значениями CPS для этих двух систем является **линейной**. Например, возможные результаты анализа шести стандартов могут выглядеть следующим образом:

Стандарт	CPS эталонной системы	CPS системы пользователя
A	85 176	75 112
B	329 714	293 703
C	1 079 469	961 223
D	5 112 318	4 568 847
E	10 125 798	9 050 371
F	25 087 126	22 424 222

Эта линейная зависимость используется для модификации (коррекции) значения CPS, измеренного на системе пользователя, с целью достижения соответствия значениям эталонной кривой. Поскольку зависимость между значениями CPS эталонной и пользовательской систем описывается прямой линией, для её характеристики достаточно **двух точек**.

Эти две точки определяются с использованием **двух калибраторов**. Сравнение среднего значения CPS, полученного при анализе калибраторов на эталонной системе (значения закодированы в штрих-коде на этикетке набора), со значениями CPS, полученными на системе пользователя в ходе калибровки, позволяет вычислить: - угловой коэффициент линейной зависимости, - точку пересечения с осью CPS.

Полученные значения используются для приведения CPS любого образца к эквивалентному значению CPS, которое было бы получено при анализе этого образца на эталонной системе, согласно следующему уравнению:

$$CPS_{\text{эталон}} = CPS_{\text{неизвестн.}} \times \text{угловой коэффициент} + \text{точка пересечения}$$

Скорректированное значение CPS затем используется для расчёта результата непосредственно по эталонной кривой.

Целью **первичной калибровки** новой партии набора является установление корреляции между значениями CPS, полученными на лабораторной системе, и значениями эталонной системы. **Последующие перекалибровки** выполняются для обновления этой корреляции с учётом изменений активности фермента реагента с течением времени.

## ! Оценка валидности калибровки

Для оценки успешности проведения калибровки могут использоваться следующие параметры, перечисленные в порядке убывания важности:

1. **Контрольные значения**, полученные при анализе непосредственно после калибровки.
2. **Наклон калибровки** (угловой коэффициент).
3. **Точка пересечения калибровки**.

Если калибровка не соответствует установленным требованиям, может потребоваться её повторное выполнение.

### Примечание.

Распечатка отчёта о калибровке содержит информацию об угловом коэффициенте, точке пересечения и о том, была ли калибровка полной.

## Контрольные анализы, проведённые непосредственно после калибровки

Результаты анализа образцов для контроля качества (**quality control, QC**), выполненные непосредственно после калибровки, являются основными параметрами валидации калибровки и должны находиться в пределах установленных допустимых значений.

Следует уделять особое внимание ситуациям, при которых все результаты контроля качества располагаются в одной части допустимого диапазона (высокой или низкой), поскольку это может указывать на наличие ошибки калибровки.

## Наклон калибровки при первоначальной калибровке

Первоначальный угловой коэффициент калибровки соответствует первому значению наклона, полученному для новой партии набора (**reagent lot**). Как правило, этот показатель находится в пределах  $\pm 20\%$  от среднего углового коэффициента для данной системы.

Средний угловой коэффициент рассчитывается как среднее значение **не менее чем десяти** первоначальных угловых коэффициентов калибровки, полученных на одной системе при использовании одного из следующих подходов: - первоначальные калибровки с применением более одного типа анализа, за исключением анализов с одиночными калибраторами; - первоначальные калибровки с применением более одной партии реагента при использовании одного типа анализа.

### Примечание.

Если выполнено менее десяти калибровок, средний угловой коэффициент всё равно может быть рассчитан, однако такое значение следует рассматривать как предварительное и пересчитать после выполнения десяти калибровок.

## Пример расчёта допустимого диапазона наклона

1. Средний угловой коэффициент рассчитывается по формуле:

$$\text{Среднее} = \frac{\sum \text{угловых коэффициентов}}{10} = 0,96$$

2. Допустимое отклонение  $\pm 20\%$  от среднего:

$$\text{Отклонение} = 0,96 \times 0,20 = 0,19$$

3. Диапазон допустимых значений:

- верхний предел:

$$0,96 + 0,19 = 1,15$$

- нижний предел:



$$0,96 - 0,19 = 0,77$$

**! Точка пересечения калибровки и перекалибровка**

### Точка пересечения калибровки для иммунометрического анализа (сэндвич-анализа)

Большое значение точки пересечения (**intercept**) оказывает влияние на вычисление результатов только при **очень низких концентрациях** аналита. Допустимые значения точки пересечения могут быть интерпретированы следующим образом:

Абсолютное значение точки пересечения должно быть не более:

$$CPS_{\text{низкий калибратор, эталон}} \times 30\%$$

Под значением CPS для калибратора с низким содержанием понимаются данные CPS, отображаемые на экране **Kit (Набор)** или в распечатке отчёта о калибровке, **а не** значение CPS, определённое в ходе самой калибровки.

**Пример:**

- CPS для калибратора с низким содержанием = 83 000
- Допустимое значение точки пересечения:

$$83\,000 \times 0,30 = 24\,900$$

Максимально допустимое значение точки пересечения равно **24 900**.

### Точка пересечения калибровки для анализов с конкурентным связыванием

Для анализов с конкурентным связыванием большое значение точки пересечения может влиять на результаты **по всей кривой**, особенно в области **очень высоких значений**.

Допустимое значение точки пересечения для таких анализов должно составлять **не более 2 %** от параметра кривой **P1**, отображаемого на экране **Kit (Набор)**:

$$\text{Intercept} \leq P1 \times 0,02$$

**Пример:**

- P1 = 61 500 000
- Допустимое значение точки пересечения:

$$61\,500\,000 \times 0,02 = 1\,230\,000$$

### Сводная информация по валидации калибровки

- Результаты контрольных анализов, выполненных непосредственно после калибровки, должны находиться в пределах допустимых значений.
- Наклон калибровки должен попадать в диапазон **±20 %** от среднего углового коэффициента для системы.
- Значение точки пересечения калибровки, как правило, должно быть ниже максимально допустимого значения.
- Если на основании этих параметров калибровка признаётся невалидной, может потребоваться **перекалибровка**.

## **Перекалибровка**

Для каждого анализа требуется проведение **периодической перекалибровки** в соответствии с инструкциями по применению набора с целью коррекции изменений, обусловленных нормальным снижением активности реагента с течением времени.

### **Угловые коэффициенты перекалибровки**

Угловые коэффициенты перекалибровки должны отклоняться **не более чем на  $\pm 10$  %** от значений, полученных при предыдущей калибровке.

### **Примечание.**

Вариации углового коэффициента обусловлены: - нормальной статистической вариабельностью анализа; - снижением активности фермента на **10–15 %** в течение срока годности набора.

### **Значения точки пересечения при перекалибровке**

Значения точки пересечения при перекалибровке оцениваются в соответствии с теми же критериями, которые применяются для первичной калибровки.

## Калибровка (корректировка) для тестов классических “сэндвич-тестов” с прямой зависимостью.

На производстве строится логистическая 4PL-модель для каждого лота реагента. Числовые значения четырёх параметров уравнения отличаются для разных партий реактива. Эти значения закодированы в штрих-коде на этикетке набора. Средние значения CPS для калибраторов с высоким и низким содержанием, которые анализировались одновременно со стандартными образцами, использованными для построения эталонной кривой, также кодируются в штрих-коде на этикетке набора.

💡 Формула для иммунометрических анализов (сэндвич-анализов)

$$CPS = P2 + \frac{P1 - P2}{1 + \left(\frac{доза}{P3}\right)^{-P4}}$$

где:

- **P1** — максимальное значение CPS
- **P2** — минимальное значение CPS (NSB)
- **P3** — доза, соответствующая половине максимального значения CPS
- **P4** — угловой коэффициент графика логит-лог

В лаборатории выполняется 2-х точечная калибровка для оценки смещения от заводской кривой и линейной корректировки полученных значений в лаборатории, используя рассчитанный SLOPE и INTERCEPT.

### ПРИМЕР

1. Исходные заводские данные (IGF, lot 247) Для к

P1 = 12 318 775

P2 = 29 114

P3 = 954.8026

P4 = 1.529563

Заводские CPS калибраторов (из Kit):

Low calibrator (factory): 61 043 CPS

High calibrator (factory): 5 157 707 CPS

2. Лабораторные данные калибраторов (пример)

Low calibrator (lab mean): 77 982 CPS

High calibrator (lab mean): 5 594 193 CPS

3. Расчет

### **i** Расчёт параметров двухточечной калибровки (slope и intercept)

После выполнения калибровки для каждого из двух калибраторов (Low и High) известны значения сигнала **CPS**, измеренные:

- на лабораторной системе (**LAB**);
- на эталонной заводской системе (**FACTORY**, master).

Для этих данных строятся две **независимые линейные зависимости** по концентрации калибраторов:

- **LAB LR (linear regression):**  $CPS_{LAB} = a_{LAB} \cdot conc + b_{LAB}$
- **FACTORY LR (linear regression):**  $CPS_{FACTORY} = a_{FACTORY} \cdot conc + b_{FACTORY}$

Параметры  $a$  и  $b$  для каждой зависимости определяются линейной регрессией по двум калибраторным точкам.

#### **Приведение LAB-сигнала к эталонной системе**

Цель двухточечной калибровки — привести значения CPS, измеренные на лабораторной системе, к значениям, которые были бы получены на эталонной (заводской) системе.

Это достигается путём приведения одной линейной зависимости к другой, в результате чего вычисляются параметры пересчёта:

$$CPS_{FACTORY} = slope \cdot CPS_{LAB} + intercept$$

где:

$$slope = \frac{a_{FACTORY}}{a_{LAB}}$$

$$intercept = b_{FACTORY} - slope \cdot b_{LAB}$$

#### **Интерпретация**

- **slope** отражает относительную чувствительность детектора лабораторной системы по сравнению с эталонной;
- **intercept** компенсирует систематический сдвиг сигнала между двумя системами;
- сама форма аналитической кривой (4PL) при этом **не изменяется**.

Двухточечная калибровка корректирует только линейное искажение сигнала CPS, обеспечивая сопоставимость результатов между различными приборами и лабораториями.

#### **Параметры LR после калибровки:**

##### **Расчёт текущей двухточечной калибровки:**

4PL-функция (заводская)