

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 микросфера (**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**), отмычки (**washes**) и формирование сигнала (**signal development**).

После инкубации образца (**sample**) с реагентом, меченным щелочной фосфатазой (**alkaline phosphatase-labeled reagent**), быстрое разделение и эффективная отмычка 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**) моющей станции (**wash station**).

Четыре отмычки (**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 связанный 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 дилюенты (**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 анализа в образце пациента (**patient sample**) для сэндвич-анализа (**sandwich assay**) либо обратно пропорциональным для конкурентного анализа (**competitive assay**).

После отмычки 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.

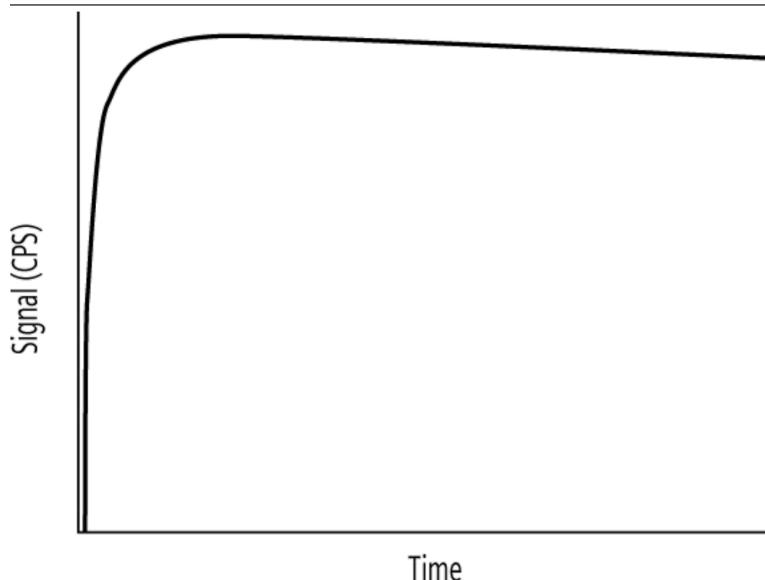


Figure 1: IMMULITE 2000/2000 XPi Enzyme-Amplified Luminescence

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**).

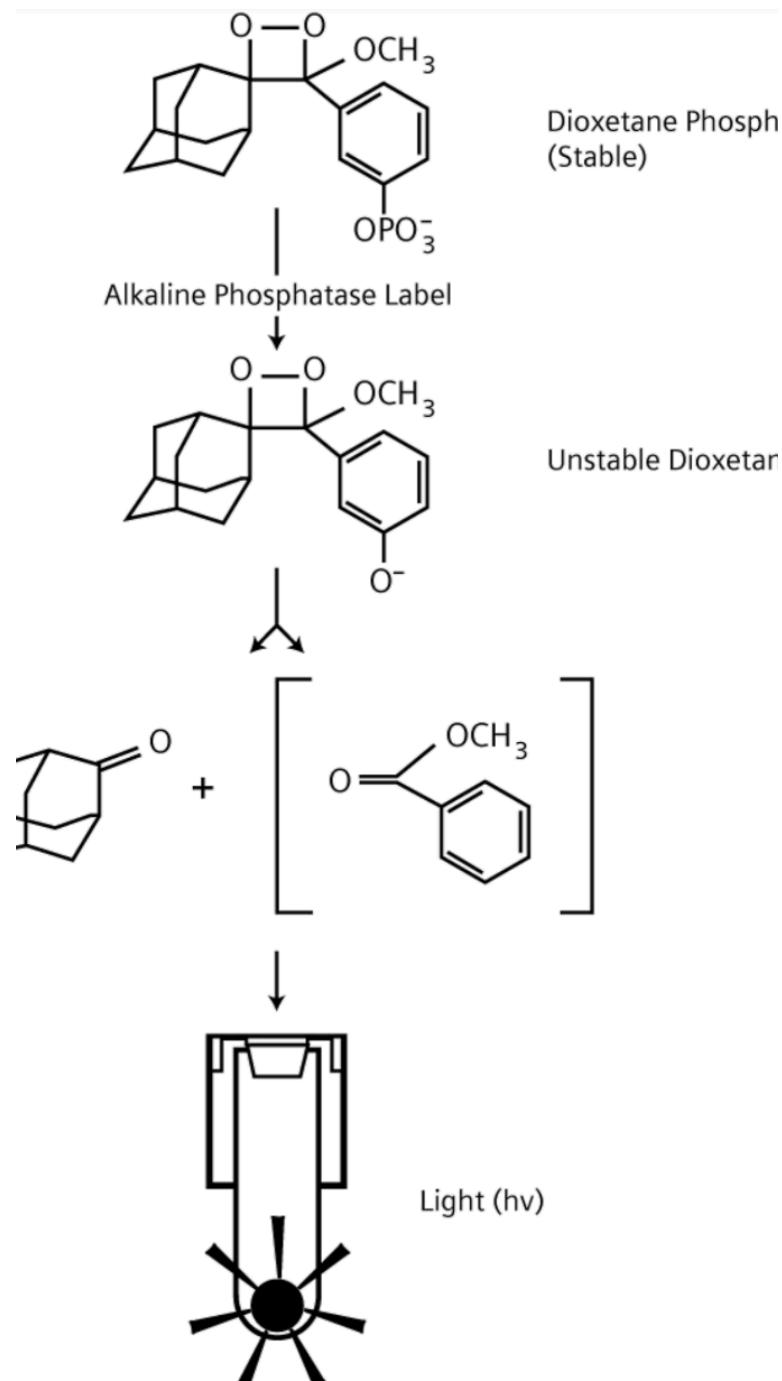


Figure 2: IMMULITE 2000/2000 XPi Chemiluminescent Substrate

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

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

где:

- **P1** — максимальное значение CPS (Bo)
- **P2** — минимально-максимальное CPS (NSB – Bo)
- **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 **±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 **±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_{низкий калибратор, эталон} × 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 Р1, отображаемого на экране **Kit (Набор)**:

Intercept $\leq P1 \times 0,02$

Пример:

- $P_1 = 61\ 500\ 000$
 - 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 $\pm 20\%$ 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 ±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 иммуноанализов (сэндвич-анализов)

$$CPS = P_2 + \frac{P_1 - P_2}{1 + \left(\frac{\text{доза}}{P_3}\right)^{-P_4}}$$

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:

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

где:

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

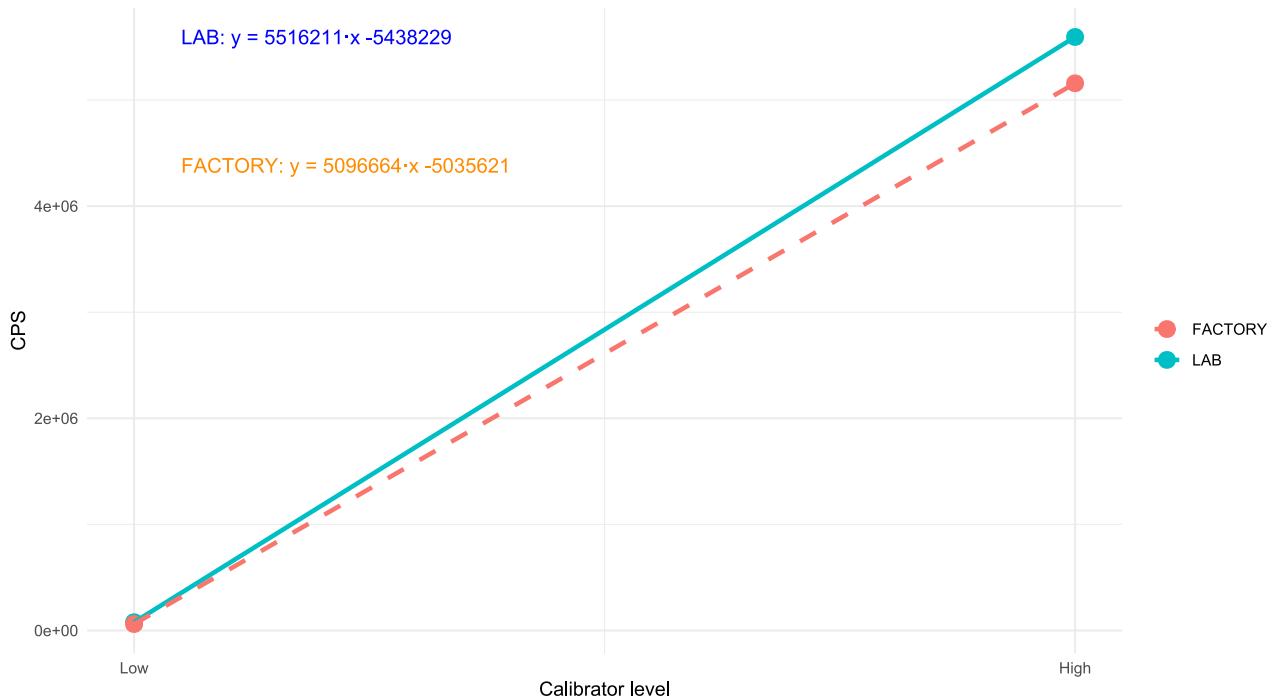
$$\text{intercept} = b_{FACTORY} - \text{slope} \cdot b_{LAB}$$

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.

Two-point calibration: LAB vs FACTORY CPS
Каждая линия построена по своим CPS после калибровки



Параметры LR после калибровки:

LAB LR: $Y(\text{CPS}) = a(\text{slope}) * x (\text{conc}) + b (\text{intercept})$:

$a_{\text{lab}} (\text{slope}_{\text{lab LR}}) = 5516211.000$
 $b_{\text{lab}} (\text{intercept}_{\text{lab LR}}) = -5438229.000$

FACTORY LR:

$a_{\text{factory}} (\text{slope}_{\text{factory LR}}) = 5096664.000$
 $b_{\text{factory}} (\text{intercept}_{\text{factory LR}}) = -5035621.000$

Расчёт текущей двухточечной калибровки:

Factory CPS = slope \times Lab CPS + intercept

slope = $(a_{\text{factory}} / a_{\text{lab}}) = 0.923943$

intercept = $(b_{\text{factory}} - \text{slope} * b_{\text{lab}}) = -11007.9$

4PL-функция (заводская)

IMMULITE — 4PL curves with CAL data
Calibration points and linear approximation (LR) shown

