

Instrumentalanalyse, Automation und Robotics in der Klinischen Chemie

Dieter J. Vonderschmitt*

Instrumental Analysis, Automation and Robotics in Clinical Chemistry

Abstract: Clinical chemistry is probably the part of analytical chemistry which is under the greatest pressure with respect to productivity. This results in methods completely different from those used in classical analytical chemistry. Separation methods and the determination of the concentrations of the separated components are usually not possible because of the inherent slowness of the procedures. This is true except in situations where closely related substances that occur as mixtures in biological fluids are to be measured (amino acids, proteins, sugars, fatty acids, drugs and their metabolites). For these special conditions GC-MS, LC-MS and other instrumental methods can be used. For the bulk of tests, however, chemical (photometric), enzymatic, immunological and genetic methods are applied. The components to be measured are specifically determined within the complex biological matrix without prior separation. The often complicated reactions lead to products that can be assessed by photometry, turbidometry, nephelometry or fluorometry. Samples (serum, plasma, urine) are processed in automated devices with high test frequency. Characteristic data are: sample volume 5 to 10 µl, time of analysis 8 to 10 min, test frequency 200 to 300 tests per hour. For the determination of simple ions ion-selective electrodes are used. Increasingly, robots are engaged for sample preparation, reading of sample identification, centrifugation, decapping of test tubes, aliquoting and identification of aliquot tubes. Instrumental analysis, automation and robotics would be useless without laboratory information systems. Such systems allow the doctor to order the tests from his office terminal. According to the request, barcodes are printed to identify the sample tubes. The samples with barcode but without any accompanying form are taken to the laboratory and the reading of the barcode triggers the download of the request into the laboratory system.

Keywords: Automation · Clinical chemistry · Instrumental analysis · Robotics

Die Klinische Chemie befasst sich mit der Entwicklung und Durchführung von analytischen Methoden mit dem Ziel, Prävention, Diagnose, Therapie und Prognose von Krankheiten zu unterstützen. Diese Definition ist sehr weit gefasst und sagt zunächst nichts aus darüber, welche Analyten überhaupt zu bestimmen seien. Es lässt sich aus dieser Aussage aber ableiten, dass es um eine schnelle und zuverlässige Analytik geht und – im Hinblick auf die heutige Kostensituation – um eine wirtschaftliche. Schnelligkeit, Zuverlässigkeit und Wirtschaftlichkeit verhalten sich aber antagonistisch. Dies bedeutet, dass die Analytik nach den drei genannten Faktoren zu optimieren sei

(Fig. 1). Das Gebot der Schnelligkeit führt dazu, dass alle Trennschritte nach Möglichkeit eliminiert werden. Trennschritte sind inhärent langsam. Sowohl die Einstellung der Gleichgewichte an Phasengrenzen als auch die Trennung der Phasen sind langsame Prozesse. Die Massenspektrometrie macht hier eine Ausnahme, kann aber ohne eine vorhergegangene Trennung kaum angewandt werden.

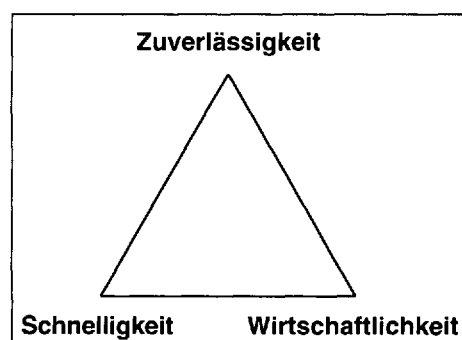


Fig. 1

In der Klinischen Chemie haben sich deshalb Methoden etabliert, welche die Analyten in der komplizierten biologischen 'Suppe' spezifisch nachzuweisen und zu messen vermögen. Dabei kommen physikalische, (selten) chemische, enzymatische, immunologische und molekularbiologische Verfahren zur Anwendung. Fast immer aber ist die Reaktionsfolge so angelegt, dass die letzte Reaktion oder Indikatorreaktion optisch (spektrophotometrisch, fluorometrisch oder turbidimetrisch und nephelometrisch) verfolgt werden kann. Die weitaus grösste Zahl der klinisch-chemischen Bestimmungen fallen unter diese Kategorie, was dadurch begünstigt wird, dass optische Methoden sich relativ einfach automatisieren lassen. Daneben gibt es allerdings auch (nicht einfach zu automatisierende) Instrumentalmethoden und Trennmethode.

Im Folgenden möchte ich nun einige wenige Beispiele herausgreifen, um das

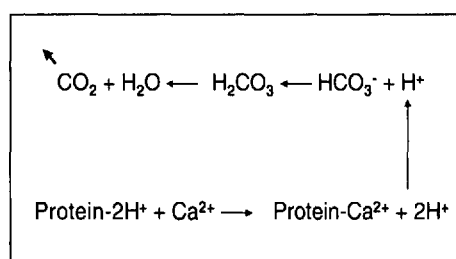
*Korrespondenz: Prof. Dr. D.J. Vonderschmitt
Institut für Klinische Chemie
Universitätsspital
CH-8091 Zürich
Tel.: +41 1 255 2260
Fax: +41 1 255 4590
E-Mail: dvo@ikc.unizh.ch

Gesagte zu illustrieren. Wo eine grössere Zahl verwandter Analyten bestimmt werden muss (Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, Proteine, Medikamente und deren Metaboliten), drängen sich natürlich chromatographische und elektrophoretische Verfahren auf. Kritisch ist bei den oft sehr geringen Analytkonzentrationen die Detektionsmethode. GC-MS, LC-MS und ICP-MS beginnen sich hier als Methoden der Wahl zu etablieren oder haben sich bereits etabliert. Aus einer Reihe von Anwendungen greife ich hier ein etwas exotisches, aber interessantes Beispiel heraus:

Das Bakterium *Helicobacter pylori* infestiert sich in der Magen- und Darmschleimhaut, wird für die Entstehung von Ulcera und möglicherweise Magenkrebs verantwortlich gemacht und ist relativ häufig. Es produziert das Enzym Urease, welches Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid spaltet, und schafft sich so eine gepufferte Umgebung. Gibt man einem Patienten mit einem Testdrink eine kleine Menge Harnstoff, welcher das stabile, nicht radioaktive Isotop ^{13}C enthält, so muss das bei Anwesenheit des Bakteriums entstehende Kohlendioxid ebenfalls ^{13}C enthalten. Dieses wird von der Schleimhaut resorbiert und in der Atemluft ausgeschieden. In der Atemluft lässt sich aber mittels Massenspektrometrie das Verhältnis von ^{12}C zu ^{13}C sehr einfach und zuverlässig messen. Das Prozedere ist für den Patienten sehr einfach und nicht invasiv (angenehmer jedenfalls als eine Gastroskopie).

Zu den physikalischen Methoden zähle ich all jene, denen keine chemische Reaktion (im Sinne von Zugabe von Reagenzien) vorangeht. Beispiele sind Emissions- und Absorptionsspektroskopie und elektrochemische Messungen, z.B. Potentiometrie mit Hilfe von ionenselektiven Elektroden. Ionenselektive Elektroden haben den Vorteil, dass sie Aktivitäten messen, was eine Bestimmung im Vollblut prinzipiell erlauben würde. Tatsächlich werden pH, CO_2 , Na, K, Ca, Cl und Li auch auf diese Weise gemessen. Gerade beim Calcium ist der Vorteil der Elektroden evident. Calcium liegt nämlich zu rund 50% in komplexierter Form und nur zu 50% als freies Ion vor. Biochemisch relevant ist aber der ionisierte Teil bzw. die Aktivität von Calcium. Nun ergeben sich aber bei dieser Messung erhebliche Schwierigkeiten. Venöses Blut, welches das hauptsächlichste Untersuchungsmaterial darstellt, weist einen höheren Partialdruck von Kohlendioxid auf als die umgebende Luft. Deshalb entweicht beim Öffnen eines Probengefäs-

ses CO_2 , wodurch sich der pH erhöht (Schema). Bei höherem pH wird aber mehr Calcium komplex an Proteine (vor allem Albumin) gebunden, was das Gleichgewicht zwischen ionisiertem und gebundenem Calcium stört. Es ist leicht einsehbar, dass sich eine solche Messung schlecht für die Automation eignet. Aber auch bei den weniger kritischen Ionen ergeben sich Schwierigkeiten. Wie schon erwähnt, stellen sich Gleichgewichte an Phasengrenzen nur relativ langsam ein. Die Elektroden sprechen deshalb langsam an. Dazu kommt, dass sich an der Oberfläche der Elektroden Proteine, Lipoproteine und vielleicht gar Thrombozyten ablagern können. Dies führt in kurzer Zeit zu Störungen. In der Praxis wird mit ionenselektiven Elektroden in Automaten deshalb nur 'indirekt potentiometrisch', d.h. nach starker Verdünnung gemessen. Dies wiederum macht den ganzen Vorteil der Aktivitätsmessung zunichte, weil sich bei der Verdünnung die Aktivität stark ändert.



Schema

Die 'chemischen' Methoden sind in der Klinischen Chemie praktisch verschwunden, weil sie viel zu wenig spezifisch für einzelne Analyte sind. Die Bestimmung von Phosphat, Eisen, Kreatinin und Bilirubin gehören noch zu den wenigen resistenten Bestimmungen, wo keine vernünftigen und wirtschaftlichen Alternativen existieren. Auch die Totalkonzentration von Protein wird mit einer chemischen Reaktion bestimmt, weil man hier bewusst eine unspezifische Bestimmungsart sucht.

Bei den enzymatischen Methoden verwendet man die Enzyme als spezifische Reagenzien. Die Glucose-Dehydrogenase z.B. oxidiert spezifisch D-Glukose zu Gluconolaktone. Als Oxidationsmittel dient NAD^+ , welches zum optisch erfassbaren NADH reduziert wird. Die Enzymaktivität selbst ist aber auch Gegenstand der Analytik. Aktive Enzyme werden normalerweise nur in den Zellen gebildet und gespeichert. Sterben Zellen aufgrund einer Krankheit (oder einer Vergiftung) ab, so gelangt deren Inhalt in die Blutbahn. Es lässt sich in der Folge im Blut

eine erhöhte Enzymaktivität messen. Die Messung geschieht dabei durch die optische Messung der Geschwindigkeit des Substratumsatzes. Oft werden mehrere Enzymreaktionen in Serie geschaltet, bis ein optisch messbares Produkt erzeugt oder Substrat umgesetzt wird. Da ein Enzym sehr viele Substratmoleküle pro Zeiteinheit umsetzen kann, sind diese Methoden sehr empfindlich. Davon macht man auch bei den immunologischen Reaktionen Gebrauch, indem Enzymreaktionen als Indikatorreaktionen eingesetzt werden.

Bei den immunologischen Methoden reagieren sehr spezifische Antikörper mit den Analyten, welche die Antigene darstellen. Es gibt eine nahezu unüberblickbare Zahl von Möglichkeiten, diese Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen. Reaktionen von Proteinen mit Antikörpern etwa führen zu Komplexen, welche wegen ihrer Grösse Kolloide bilden und nephelometrisch erfassbar sind. Antikörper lassen sich aber auch mit Enzymen markieren. In einem Beispiel (Fig. 2) wird das Antigen von einem ersten matrixgebundenen Antikörper fixiert. Ein zweiter Antikörper, welcher das Enzym 'alkalische Phosphatase' trägt, wird mit dem Antigen zur Reaktion gebracht. Nach Auswaschen des Überschusses gibt man als Substrat nicht fluoreszierendes Umbelliferylphosphat zu, welches durch die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase zum fluoreszierenden Umbelliferol verseift wird. Mit Hilfe der immunologischen Reaktionen und entsprechenden Indikatorreaktionen lassen sich Antigene (und Haptene) im Bereich von pMol/Liter nachweisen.

Auf die molekularbiologischen Methoden soll hier nicht weiter eingetreten werden. Die Automation ist zwar gerade für diese Methoden ausserordentlich wichtig, weil es darum geht – wegen der Empfindlichkeit des Nachweises – alle Möglichkeiten, welche zu einer Kontamination führen können, auszuschliessen. Vieles ist hingegen noch im Fluss und die Methoden sind noch nicht zur grossen Routine geworden.

Nach dem bisher Gesagten zeichnet sich ab, dass die optischen Methoden den weitaus grössten Teil der automatisierten Analysen ausmachen. Moderne Analysengeräte offerieren deshalb die Möglichkeit, etwa folgende Messmethoden zu implementieren: Photometrie, Turbidimetrie und indirekte Potentiometrie. Ein typischer Analysenautomat umfasst Probenzuführung (Rack-System), Barcode-Leser, Probennehmer (sampler), Reagen-

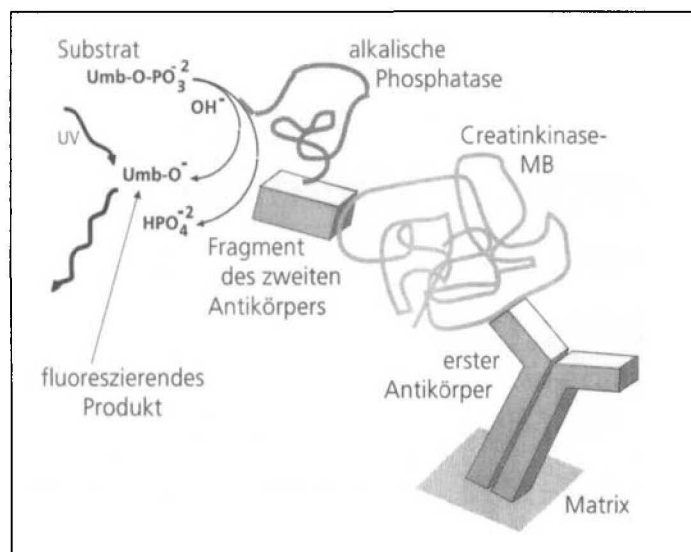


Fig. 2

ziendosierung, Messkuvette und Optik, Photosensor mit Verstärker und A/D Wandler, ionenselektive Elektroden (Durchfluss-System) und Potentiometer, Printer und LIS-Interface. Bei der Probenzuführung werden die Serum- oder Plasmaröhrchen in Probenracks eingegeben und dem Probenehmer zugeführt. Dabei wird die Identifikation der Probe gelesen und der entsprechende Analysenauftrag vom LIS heruntergeladen. Die Nadel des Probenehmers taucht ganz wenig unter die Oberfläche der Probe ein und aspiriert die Probenmenge, welche den aus dieser Probe auszuführenden Tests entspricht. Probe und Reagenzien werden in die Messkuvette dosiert, gemischt, thermostatisiert und inkubiert. Dann wird die Extinktion (für Turbidimetrie oder Absorbanz) bei der entsprechenden Wellenlänge einmal oder – bei kinetischen Messungen in definierten Zeitabständen – mehrmals gemessen. Die Proben für die potentiometrische Messung werden verdünnt und in die Messkammern gepumpt. Die Signale werden in digitaler Form zwischengespeichert und umgerechnet in Massen- oder Mengenkonzentrationen oder Aktivitäten (Enzyme) an den Ausgangsspeicher gegeben, von wo sie wieder vom LIS übernommen und dem Patienten zugeordnet werden. Probenadel, Kuvetten, Dosiersystem und Elektroden müssen nach jedem Zyklus gewaschen werden, um Verschleppungen zu verhindern. Daneben fallen verschiedene Flags (Warnungen) und Indices an: z.B. Wert ausserhalb des Messbereichs, zu wenig Probe, hämolytische, ikterische oder lipämische Probe. Manche Geräte führen bei Werten ausserhalb des Messbereichs automatisch eine Probenverdünnung aus. Anhand von Kontrollproben werden Richtigkeit und Prä-

zision der Messwerte überprüft und die Resultate auf diese Weise technisch validiert. Am Laborinformations-System schliesst dann eine medizinische Validation an (Vergleich mit Vorwerten, Plausibilität).

Grossautomaten, welche klinisch-chemische Parameter aus Plasma, Serum oder Urin messen, haben typischerweise einen Probendurchsatz von 200 Proben/h bei einem Durchschnitt von 5 Tests pro Probe. Auf dem Gerät sind Reagenzien für bis zu hundert verschiedene Tests verfügbar, sodass aus jeder Probe eine Testauswahl durchgeführt werden kann, welche schliesslich nur durch die Menge der vorhandenen Probe limitiert ist. Typische Probenvolumina sind 5–10 μl . Typische Variationskoeffizienten liegen zwischen 1–5% für chemische Konstituenten und bei rund 10% bei Enzymaktivitäten und Hormonbestimmungen.

Der automatische Ablauf der Analytik ist allerdings nur ein Teil des ganzen Prozessablaufs. Dieser beginnt mit der Gewinnung des Spezimen beim Patienten. Das Labor kann zwar Instruktionen geben, wie das Spezimen gewonnen werden soll, hat aber keine direkte Weisungsbefugnis und Kontrollmöglichkeit bei den Ausführenden (meist Pflegerinnen und Pfleger). Beim Transport ins Laboratorium ist eine gewisse technische Unterstützung möglich für 'in house' Aufträge (z.B. im Spital). Dort können Transportanlagen und Rohrpost eingesetzt werden. Sind die Transportwege länger, müssen die Spezimen durch Kurier oder mit der Post transportiert werden. Dies verlangt in der Regel bei Blutproben, dass sie am Ort der Entnahme zentrifugiert werden, um Serum oder Plasma von den Blutkörperchen zu trennen (Blutkörperchen leben noch und ver-

stoffwechseln noch bestimmte Substanzen, wie z.B. Glukose). Im Laboratorium wird die Probe entgegengenommen und registriert. Die Probe kommt entweder mit einem entsprechenden Auftragsformular, oder der Auftrag wird elektronisch übermittelt und kann ins LIS heruntergeladen werden, sobald der identifizierende Barcode eingelesen wird. Treffen die Proben laufend ein, sollte es möglich sein, sie kontinuierlich dem Analysengerät zuzuführen. Leider ist es aber nicht möglich (mit ganz wenigen Ausnahmen), die Analysen im Vollblut, also im Beisein der korpuskulären Bestandteile durchzuführen. Das Blut muss zuerst zentrifugiert werden – ein langsamer (Phasentrennung) und diskontinuierlicher Prozess. Das Zentrifugieren ist ein typischer Batch-Prozess. Es werden heute grosse Anstrengungen unternommen, auch diese präanalytischen Schritte mit Hilfe von Robotern zu mechanisieren. So können Proben von einem Roboter identifiziert werden. Die Systemsoftware kann aufgrund der Identifikation entscheiden, ob die Probe überhaupt zentrifugiert werden muss und welches Analysenprofil gefragt ist. Je nach Entscheidung muss nämlich nach der Zentrifugation ein Aliquot der Probe entnommen werden, um dieses an einem nicht automatisierten Arbeitsplatz zu bearbeiten oder es auf einen andern Automaten zu geben. Die Zentrifuge kann mit Hilfe eines Roboters beladen werden, welcher auch das Austarieren übernehmen kann. Auch das anschliessende Entfernen der Stopfen und das Aliquotieren kann von einem Robotersystem bewältigt werden und selbst der Transport ist über eine Probenstrasse (Laufband) möglich. Sehr grosse Laboratorien, vor allem in Japan, in den USA und (wenige) in Europa, sind heute schon mit derartigen Analysenstrassen ausgerüstet.

Automation und Robotics sind derzeit eine grosse Herausforderung für die Diagnostika-Industrie und die grossen Laboratorien. Es steht ausser Zweifel, dass im Optimierungsdreieck von Zuverlässigkeit, Schnelligkeit und Wirtschaftlichkeit die Robotisierung ihren Platz einnehmen wird. Dadurch werden keine Arbeitsplätze verloren gehen, weil für die Entwicklung und Durchführung einer neuen Generation von Tests (Molekularbiologie, LC-MS-MS) dringend Personal gebraucht wird. Der klinischen Chemie insgesamt steht eine spannende Zeit bevor.