

B. PHƯƠNG PHÁP MIỄN DỊCH PHÁT QUANG VÀ HỆ THỐNG XÉT NGHIỆM MIỄN DỊCH

MỤC TIÊU

1. Trình bày được nguyên lý của phương pháp hóa phát quang và điện hóa phát quang.
2. Trình bày được cấu trúc cơ bản của hệ thống máy xét nghiệm miễn dịch.
3. Trình bày được các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm hóa phát quang và điện hóa phát quang và các biện pháp khắc phục.

1. TỔNG QUAN

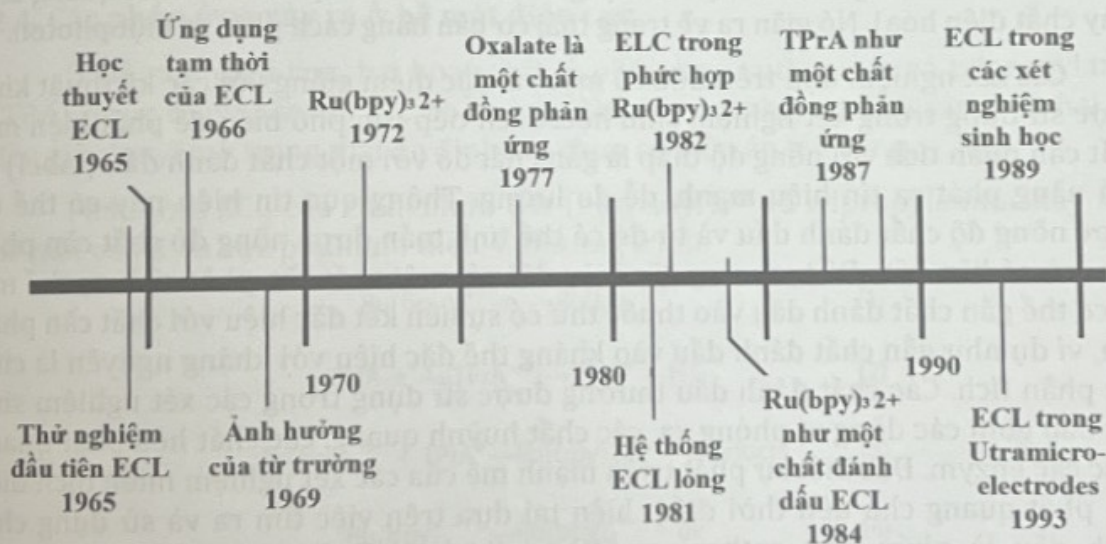
Trong suốt thập kỷ qua, xét nghiệm miễn dịch hóa phát quang (CLIA-Chemiluminescent Immunoassay) và miễn dịch điện hóa phát quang (Electrochemiluminescence Immunoassay ECLIA) ngày càng thu hút nhiều sự chú ý trong nhiều lĩnh vực khác nhau như khoa học đời sống, an toàn thực phẩm, phân tích dược phẩm và xét nghiệm lâm sàng vì độ nhạy cao, độ đặc hiệu tốt và phạm vi ứng dụng rộng rãi.

Những định nghĩa sơ khai nhất về phát quang đã được đề cập đến từ hàng trăm năm trước khi các nhà khoa học nghiên cứu và phát hiện các hiện tượng phát quang trong tự nhiên. Phân tích sâu hơn về bản chất của sự phát quang. Sự phát quang được định nghĩa là sự bức xạ được phát ra bởi một phân tử hoặc nguyên tử khi chúng trở về trạng thái cơ bản từ trạng thái kích thích. Theo nguồn tác nhân kích thích, hiện tượng phát quang có thể được phân loại là quang phát quang (huỳnh quang, lân quang) khi nguồn năng lượng kích thích là năng lượng từ ánh sáng hấp thụ, hoặc phát quang hóa học với nguồn kích thích từ các phản ứng hóa học hay phát quang sinh học khi tác nhân là các phản ứng sinh học trong cơ thể.

Mặc dù hiện tượng phát quang có niên đại từ những năm 300 trước công nguyên, nhưng sự phát triển của các ứng dụng phân tích dựa trên CL chỉ thực sự được phát triển trong khoảng 30 năm gần đây. Các thiết bị đo đơn giản và tính linh hoạt cao để xác định nhiều loại hợp chất đã cho phép các kỹ thuật dựa trên CL phát triển thành một kỹ thuật phân tích có độ nhạy cao và hữu ích nhất. Ứng dụng đầu tiên của CL như một công cụ phân tích được thực hiện vào đầu những năm 1950 sử dụng một số chất như luminol, lophine và lucigenin làm chất chỉ thị để phân tích. Các nghiên cứu về tiềm năng của CL đối với các phân tích thông thường bắt đầu vào những năm 1970 cho các phản ứng pha khí và từ những năm 1980 cho các phản ứng pha lỏng. Cùng với các phản ứng CL cổ điển, các chiến lược mới đã được đề xuất, xem xét không chỉ ảnh hưởng của các ion vô cơ như chất oxy hóa, chất khử, chất xúc tác hoặc chất ức chế mà còn sử dụng các phản ứng gắn kết, kỹ thuật phân tích theo thời gian, phân tích bề mặt rắn.

Trong vài năm qua, các ứng dụng CL đã tăng lên, chủ yếu trong lĩnh vực y sinh, do sự phát triển hơn nữa của công nghệ gen và việc sử dụng các phương pháp mới khác nhau để nghiên cứu CL ở cấp độ phân tử. Ví dụ, tiền chất CL đã được sử dụng từ những năm 1970 đến nay làm nhãn thay thế nhạy cảm cho ghi nhãn đồng vị, thay thế đồng vị phóng xạ và cung cấp một chiến lược mới, tốt hơn đáng kể về độ nhạy và an toàn, trong xét nghiệm miễn dịch. Theo nghĩa này, sự quan tâm ngày càng tăng đã được tập trung vào các sản phẩm CL cho nghiên cứu khoa học đời sống. Ví dụ, các dẫn xuất isoluminol và acridinium ester đã được chứng minh là thành công trong việc phát triển các bộ dụng cụ thương mại trong chẩn đoán lâm sàng. Vào những năm 1980, việc phát hiện ra khả năng tăng cường năng suất ánh sáng khi luciferase của đom đóm tình cờ được thêm vào hỗn hợp peroxidase, luminol và hydrogen peroxide đã đánh dấu sự khởi đầu của kỷ nguyên phân tích rất thành công đối với xét nghiệm miễn dịch và các ứng dụng phân tích đa dạng (protein, DNA, và RNA). Gần đây hơn, một công nghệ mới sử dụng các este acridan mới làm thuốc thử tín hiệu hóa học đã chứng minh tính phù hợp của nó trong xét nghiệm miễn dịch.

Trong khi đó, phương pháp ECL đầu tiên được mô tả bởi Hercules và Bard vào khoảng năm 1965, mặc dù các báo cáo liên quan đến sự phát xạ ánh sáng xảy ra trong quá trình điện phân bắt đầu từ những năm 1920 bởi Harvey. Sau khoảng 40 năm nghiên cứu, ECL đã trở thành một kỹ thuật phân tích rất mạnh mẽ và được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như xét nghiệm miễn dịch, kiểm tra thực phẩm và nguồn nước, phát hiện các tác nhân vũ khí sinh học. ECL cũng đã được ứng dụng thành công trong các kỹ thuật phân tích dòng chảy (Flow Injection Analysis - FIA), sắc ký lỏng cao áp (High-performance liquid chromatography - HPLC), điện di mao dẫn. Hình dưới minh họa dòng thời gian của các sự kiện trong sự phát triển của ECL:



Hình 10.17. Các giai đoạn phát triển của phương pháp điện hóa phát quang

2. NGUYÊN LÝ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Hóa phát quang

Miễn dịch hóa phát quang dựa trên nguyên lý miễn dịch kháng nguyên kết hợp với kháng nguyên kháng thể có gắn với chất phát quang. Sự phát quang bản chất là các bức xạ có thể nhìn thấy được hoặc gần nhìn thấy được được tạo ra khi một điện tử chuyển từ trạng thái kích thích sang trạng thái cơ bản. Thế năng được sinh ra trong nguyên tử được giải phóng dưới dạng ánh sáng. Phát quang hóa học được áp dụng cho các kỹ thuật xét nghiệm xét nghiệm miễn dịch thường xác định các phản ứng hóa học là nguồn năng lượng thích hợp nhất để tạo ra trạng thái kích thích điện tử.

Phương pháp dị thể là phương pháp xét nghiệm phát quang hóa học được sử dụng rộng rãi hơn cả. Các phương pháp phát quang hóa học sử dụng có thể là trực tiếp – sử dụng các chất phát quang hoặc gián tiếp – sử dụng các dấu hiệu enzyme. Trong phương pháp phát quang hóa học trực tiếp, chất đánh dấu luminophore được sử dụng là các este acridinium và ruthenium, trong khi các chất đánh dấu enzyme được sử dụng trong phương pháp gián tiếp là các phosphatase kiềm với chất nền adamantyl 1,2-dioxetane aryl phosphate (AMPPD) và horseradish peroxidase với luminol hoặc dẫn xuất của nó làm chất nền.

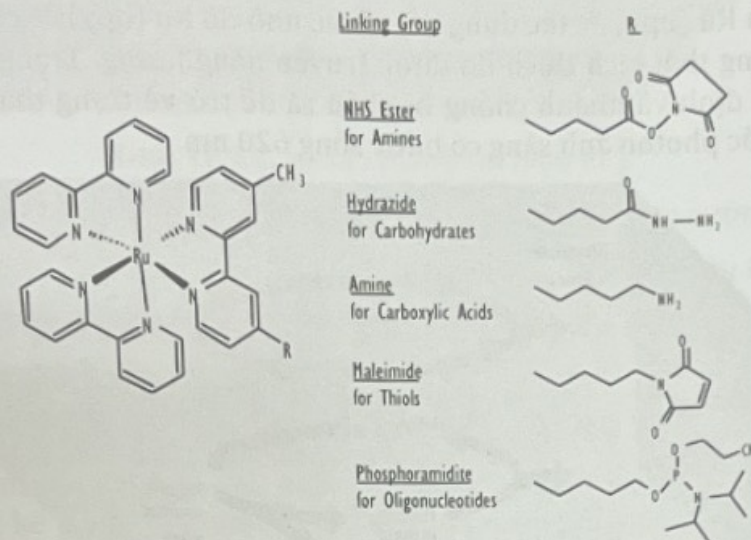
2.2. Điện hóa phát quang

Điện hóa phát quang (ECL), là sự tạo ra ánh sáng bởi một loại chất phát quang bị kích thích (một nguyên tử, một thực thể phân tử hoặc một hạt nano) được tạo ra trong một phản ứng điện hóa. Điều này có nghĩa là ECL luôn bắt đầu bằng phản ứng chuyển điện tử ở bề mặt điện cực. Bước điện hóa ban đầu này kích hoạt một chuỗi các phản ứng hóa học của các chất trung gian phản ứng trải qua các phản ứng chuyển điện tử đồng nhất để tạo ra trạng thái kích thích điện tử của chất quang điện (hay chất điện hóa). Nó giãn ra về trạng thái cơ bản bằng cách phát ra một photon.

Các xét nghiệm dựa trên ECL có một vài đặc điểm giống với các kỹ thuật khác được sử dụng trong xét nghiệm sinh học. Cách tiếp cận phổ biến để phát hiện một chất cần phân tích với nồng độ thấp là gắn chất đó với một chất đánh dấu (label) có khả năng phát ra tín hiệu mạnh, dễ đo lường. Thông qua tín hiệu này có thể đo được nồng độ chất đánh dấu và từ đó có thể tính toán được nồng độ chất cần phân tích mà nó liên kết. Để tạo ra sự đặc hiệu đối với một chất cần phân tích cụ thể nào đó có thể gắn chất đánh dấu vào thuốc thử có sự liên kết đặc hiệu với chất cần phân tích, ví dụ như gắn chất đánh dấu vào kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên là chất cần phân tích. Các chất đánh dấu thường được sử dụng trong các xét nghiệm sinh học bao gồm các đồng vị phóng xạ, các chất huỳnh quang, các chất hóa phát quang hoặc các enzym. Đặc biệt sự phát triển mạnh mẽ của các xét nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang cho đến thời điểm hiện tại dựa trên việc tìm ra và sử dụng chất đánh dấu là phức hợp ruthenium (II)-tris(bipyridyl) $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ cùng với tripropylamine (TPA).

2.3. Phức hợp Ruthenium

Ruthenium (Ru) là một kim loại hiếm chuyển tiếp thuộc nhóm bạch kim của bảng tuần hoàn các nguyên tố hoá học. Như các kim loại khác thuộc nhóm này, Ru trở đối với hầu hết các hoá chất khác. Nhưng ở dạng phức hợp chelate ruthenium(II)-tris(bipyridyl) ($[Ru(bpy)_3]^{2+}$) nó có thể được biến đổi dễ dàng để kết hợp với nhiều nhóm phản ứng khác nhau. Điều này cho phép công nghệ ECL có thể áp dụng cho nhiều loại chất phân tích.



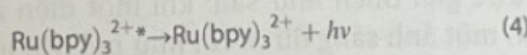
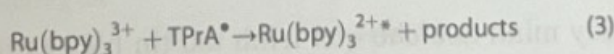
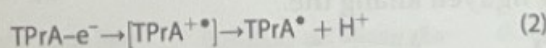
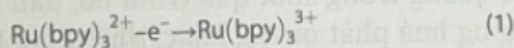
Hình 10.18. Các chức năng khác nhau của $Ru(bpy)_3^{2+}$

Đối với các xét nghiệm miễn dịch, este N-hydroxysuccinimide (NHS) của phức hợp $Ru(bpy)_3$ được sử dụng nhiều nhất vì nó có thể dễ dàng kết hợp với các nhóm amino của protein, haptens và các acid nucleic trong chất phân tích.

2.4. Các phản ứng xảy ra ở bề mặt điện cực

Ở bề mặt điện cực, hai hoạt chất là phức hợp ruthenium và tripropylamine (TPA) được tham gia vào các phản ứng dẫn đến sự phát xạ ánh sáng. Cả hai chất đều giữ nguyên ở trạng thái ổn định khi chưa có điện áp tác động.

Phản ứng ECL của ruthenium-tris (bipyridyl) $_3^{2+}$ và tripropylamine xảy ra tại bề mặt của điện cực platinum theo 4 phương trình:

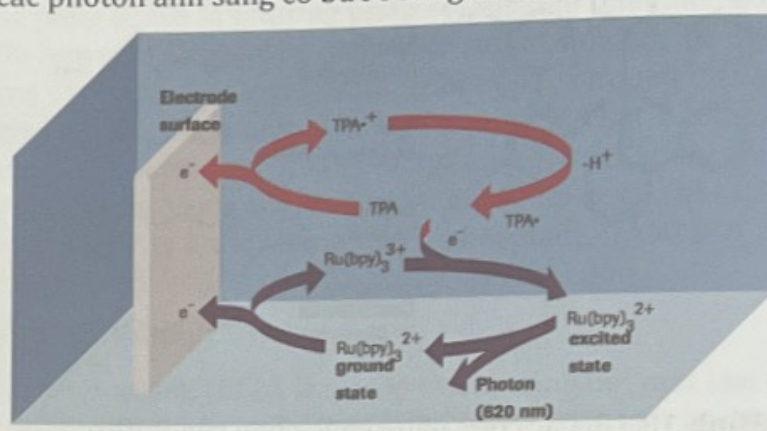


Hình 10.19. Các phản ứng ELC ở bề mặt điện cực Platinum

Khi điện áp được đặt vào hệ thống tạo ra một điện trường, TPA bị oxy hóa tại điện cực, giải phóng một electron và tạo thành một gốc tự do TPA trung gian, rồi sau đó nhanh chóng tiếp tục phản ứng giải phóng ra một proton (H^+) để tạo thành một gốc $TPA^{\bullet}$.

Trong khi đó, phức hợp ruthenium cũng bị oxy hoá giải phóng một electron ở bề mặt của điện cực để tạo thành cation $Ru(bpy)_3^{3+}$. Cation ruthenium này là thành phần phản ứng thứ hai cho phản ứng ECL xảy ra sau đó với gốc TPA.

$TPA^{\bullet}$ và $Ru(bpy)_3^{3+}$ tác dụng với nhau, nhờ đó $Ru(bpy)_3^{3+}$ chuyển thành $Ru(bpy)_3^{2+}$ ở trạng thái kích thích do được truyền năng lượng. Trạng thái kích thích này không ổn định và nhanh chóng bị phân rã để trở về trạng thái ban đầu bằng cách phát ra các photon ánh sáng có bước sóng 620 nm.



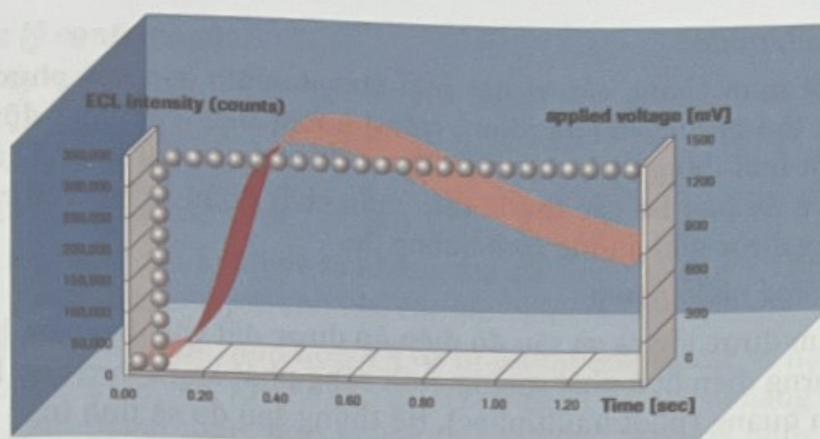
Hình 10.20. Phản ứng ECL trên bề mặt điện cực

Chu trình phản ứng sau đó lại được bắt đầu. Các sản phẩm phụ từ gốc tripropylamine tạo ra ở phản ứng 3 không ảnh hưởng đến quá trình quang hoá này. Do TPA được sử dụng tối đa nên cần có số lượng lớn. Phản ứng được điều khiển theo sự khuếch tán của TPA và lượng phức hợp ruthenium. Trong điện trường, TPA bị giảm đi nên cường độ tín hiệu (ánh sáng) sẽ giảm dần sau khi đạt tới giá trị cực đại.

Mặc dù TPA bị cạn kiệt trong quá trình phản ứng, phức hợp ruthenium lại được tái tạo liên tục. Điều này có nghĩa là phức hợp ruthenium có thể thực hiện nhiều chu trình phát quang trong suốt quá trình đo, dẫn đến độ nhạy của ECL cao hơn so với các hệ thống hoá phát quang khác. Nhiều photon có thể được tạo ra từ một phức hợp kháng nguyên kháng thể.

2.5. Tạo tín hiệu ECL

Hình vẽ dưới đây minh hoạ cho quá trình tạo tín hiệu ECL. Theo quan điểm điện tử, phản ứng được giải thích như sau: khi một điện áp cấp vào điện cực của buồng đo sẽ xuất hiện một ánh sáng được coi như một tín hiệu ECL.



Hình 10.21. Sự tạo thành tín hiệu ECL

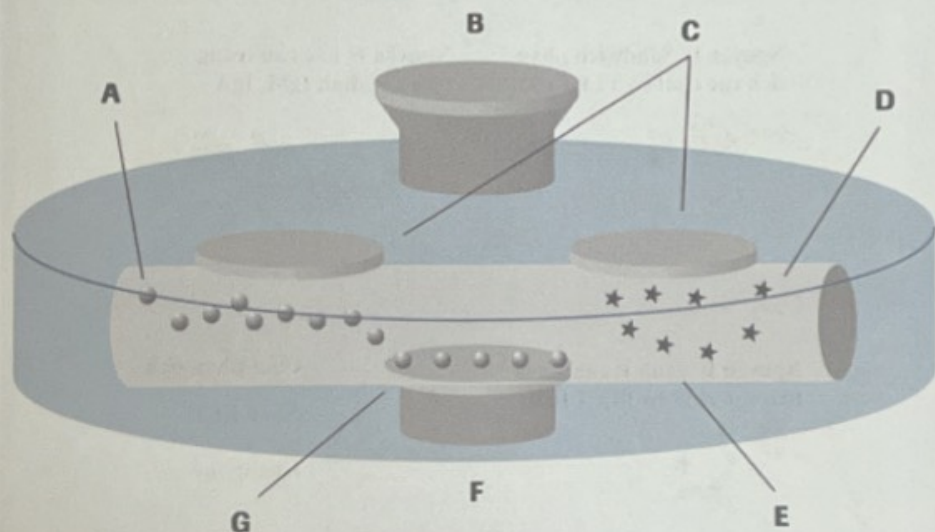
Vùng nằm dưới đường cong đo được trong khoảng giới hạn cường độ tối đa.

Đường chấm cho biết điện áp đặt vào điện cực để tạo ra tín hiệu ECL.

Đường nét liền cho biết ánh sáng thực ở đầu ra được đo bằng cảm biến nhân quang.

2.6. Quá trình đo ECL

Trung tâm của hệ thống xét nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang là buồng đo, được thiết kế giống như một thiết bị đo lưu lượng dòng chảy. Về cơ bản, có 3 quá trình kế tiếp nhau xảy ra trong buồng đo:



A. Các vi hạt từ gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể

B. Ống nhân quang

C. Điện cực electron

D. Kháng thể không gắn

E. Kênh dòng chảy

F. Nam châm

G. Điện cực hoạt động

Hình 10.22. Cấu tạo buồng đo quang máy ECL

Tách hạt gắn kết/tự do

Bằng một nam châm, các vi hạt phủ streptavidin gắn với phức hợp kháng nguyên kháng thể bị hút và lắng đọng trên bề mặt điện cực hoạt động (working electrode). Một loại dung dịch được sử dụng để rửa các hạt không gắn trên điện cực làm việc và để loại bỏ các thuốc thử, mẫu chất phân tích dư thừa và các sản phẩm phản ứng được giải phóng có ở buồng đo.

Phản ứng điện hoá phát quang

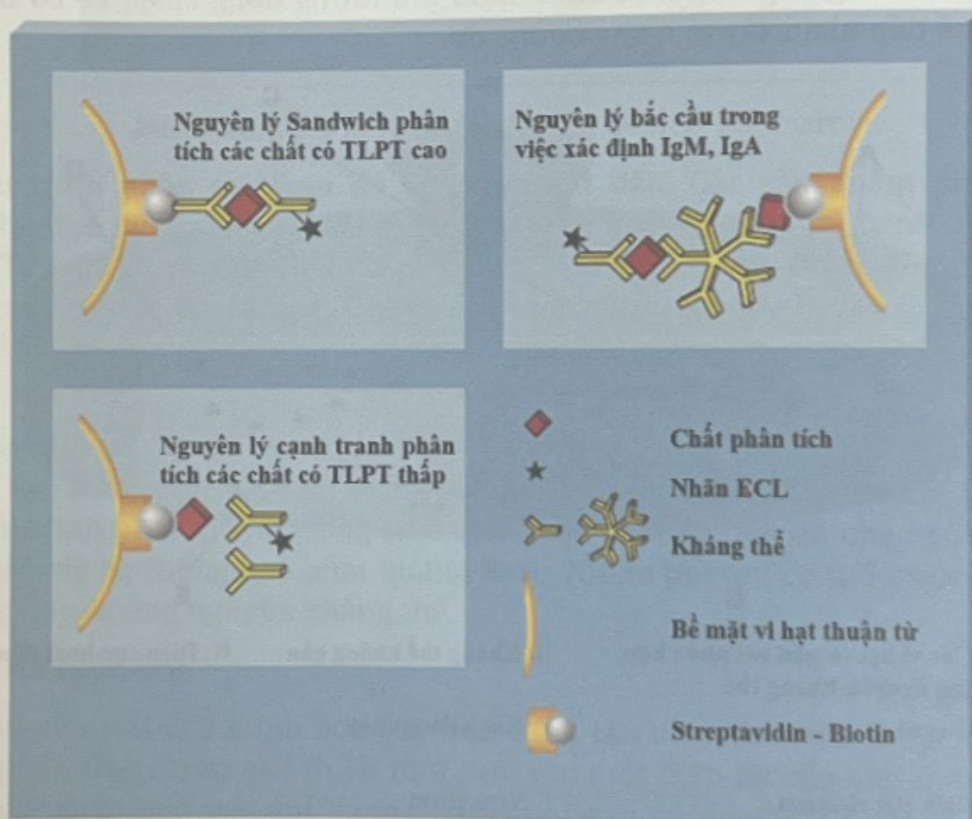
Nam châm được lấy ra và sau đó điện áp được đặt vào điện cực hoạt động để bắt đầu phản ứng điện hoá phát quang. Ánh sáng phát xạ ra được đo bằng một bộ cảm biến nhân quang (photomultiplier). Hệ thống sau đó sẽ tính toán kết quả phù hợp dựa trên cường độ tín hiệu ánh sáng phát ra.

Giải phóng vi hạt và làm sạch buồng đo

Khi việc đo lường kết quả được hoàn thành, các vi hạt từ tính sẽ được rửa sạch khỏi bề mặt điện cực bằng dung dịch làm sạch đặc biệt. Bề mặt của buồng đo được khôi phục lại bằng cách thay đổi điện thế trên điện cực và sẵn sàng cho một quá trình mới.

2.7. Các nguyên lý miễn dịch của xét nghiệm

Các xét nghiệm miễn dịch ECL sử dụng 1 trong 3 nguyên lý: cạnh tranh, sandwich và bắc cầu.



Hình 10.23. Nguyên lý ECL

2.7.1. Nguyên lý cạnh tranh

Nguyên lý cạnh tranh áp dụng cho việc phân tích các phân tử có khối lượng thấp và kích thước vô cùng nhỏ như: T3, T4, FT3, FT4, cortisol, testosterone, estradiol...

Quá trình bao gồm các bước (VD với T3):

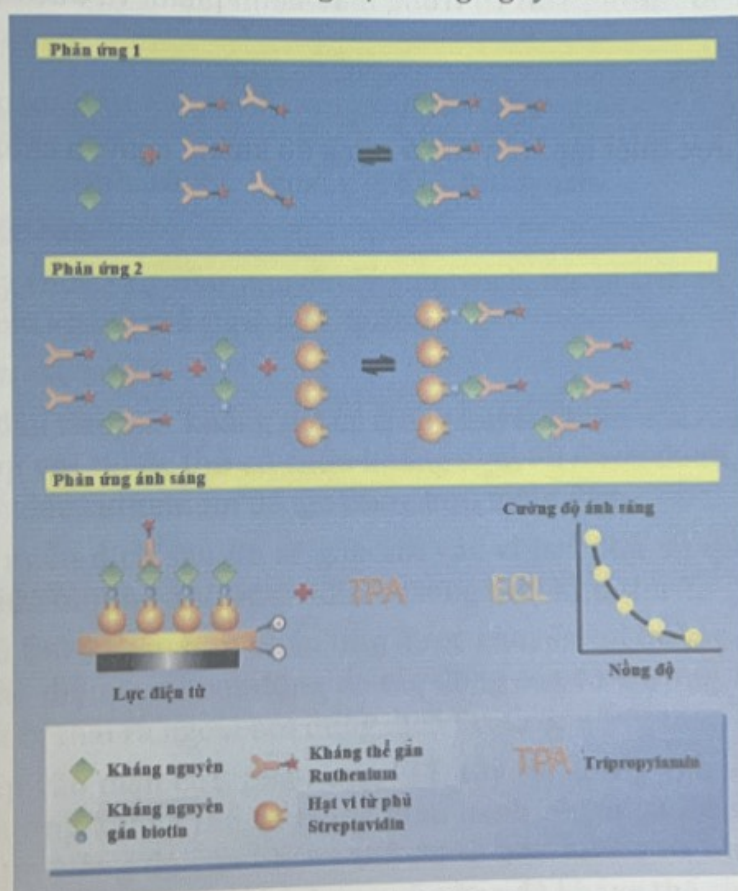
- Đầu tiên, mẫu xét nghiệm và kháng thể đặc hiệu kháng T3 được đánh dấu bằng phức hợp ruthenium được cho vào cốc xét nghiệm (Assay cup).

- Sau bước ủ lần đầu, hỗn hợp T3 đã bị biotin hoá và các vi hạt từ tính phủ streptavidin được thêm vào. Khi đó các vị trí chưa gắn kết trên kháng thể đánh dấu bị chiếm giữ hình thành phức hợp kháng thể-hapten. Toàn bộ phức hợp này trở nên gắn kết với pha rắn thông qua sự tương tác giữa biotin và streptavidin.

- Sau bước ủ lần 2, hỗn hợp phản ứng được đưa vào trong buồng đo. Các vi hạt đối từ bị bắt giữ vào điện cực hoạt động do tác động của từ trường. Những thành phần không gắn kết bị thải ra ngoài bởi dung dịch ProCell.

- Cho điện áp vào điện cực, phản ứng ECL xảy ra, lượng ánh sáng được tạo ra tỉ lệ nghịch với lượng kháng nguyên có trong mẫu bệnh phẩm và được đo bằng bộ khuếch đại quang tử.

Nồng độ của kháng nguyên được ước lượng và tính toán thông qua đường cong chuẩn được thiết lập trên cơ sở nồng độ kháng nguyên chuẩn đã biết.



Hình 10.24. Nguyên lý ECL cạnh tranh

2.7.2. Nguyên lý sandwich

Nguyên lý sandwich sử dụng cho phân tích những chất có kích thước lớn hơn như TSH, FSH, LH, HbsAg,...

Quá trình bao gồm các bước; (VD TSH)

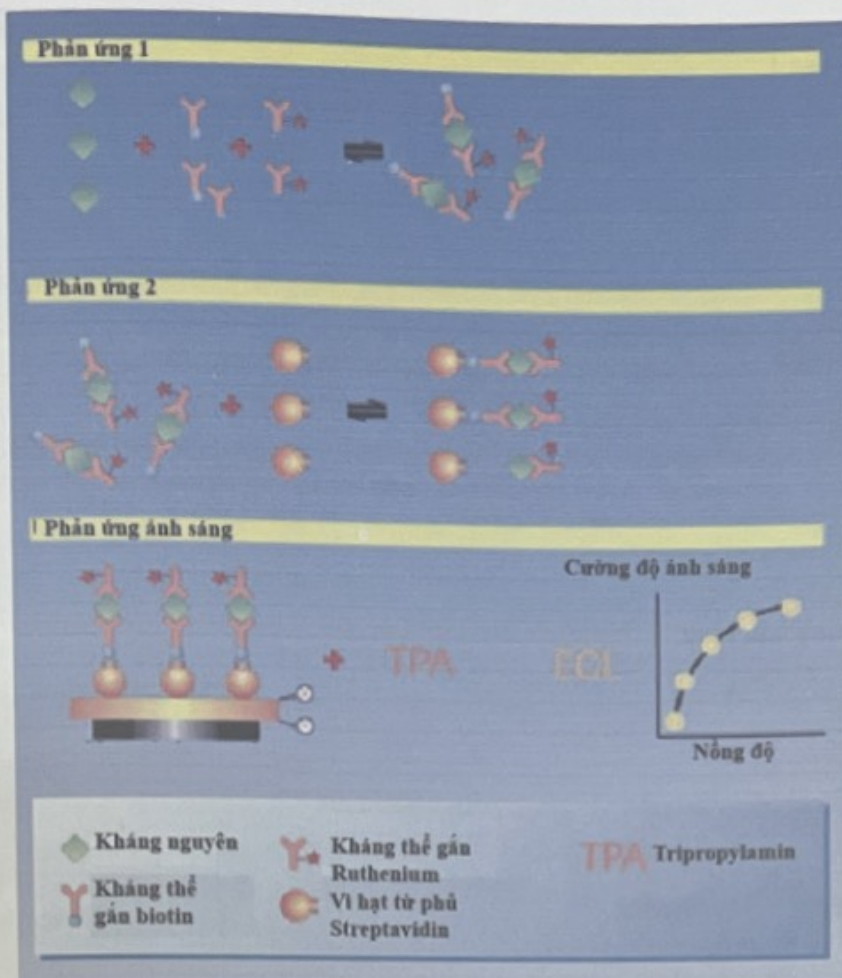
- Thời kỳ ủ đầu tiên, mẫu xét nghiệm được kết hợp với thuốc thử có chứa kháng thể kháng TSH đánh dấu biotin và kháng thể kháng TSH đánh dấu ruthenium trong cùng 1 cốc xét nghiệm. Trong quá trình ủ 9 phút này, 2 loại kháng thể sẽ bắt cặp với TSH có trong mẫu bệnh phẩm để tạo thành phức hợp miễn dịch bắt cặp.

- Thời kỳ ủ thứ 2, các vi hạt phủ streptavidin được thêm vào. Trong 9 phút ủ, phức hợp miễn dịch trên trở nên gắn kết với pha rắn thông qua sự tương tác giữa biotin và streptavidin.

- Sau bước ủ thứ 2, hỗn hợp phản ứng được chuyển tới buồng đo. Các vi hạt đối từ bị bắt giữ vào điện cực hoạt động do tác động của từ trường. Những thành phần không gắn kết bị thải ra ngoài bởi dung dịch ProCell.

- Cho điện áp vào điện cực, phản ứng ECL xảy ra, lượng ánh sáng được tạo ra tỉ lệ thuận với lượng TSH có trong mẫu bệnh phẩm và được đo bằng bộ khuếch đại quang tử.

Nồng độ của kháng nguyên được ước lượng và tính toán thông qua đường cong chuẩn được thiết lập trên cơ sở nồng độ kháng nguyên chuẩn đã biết.



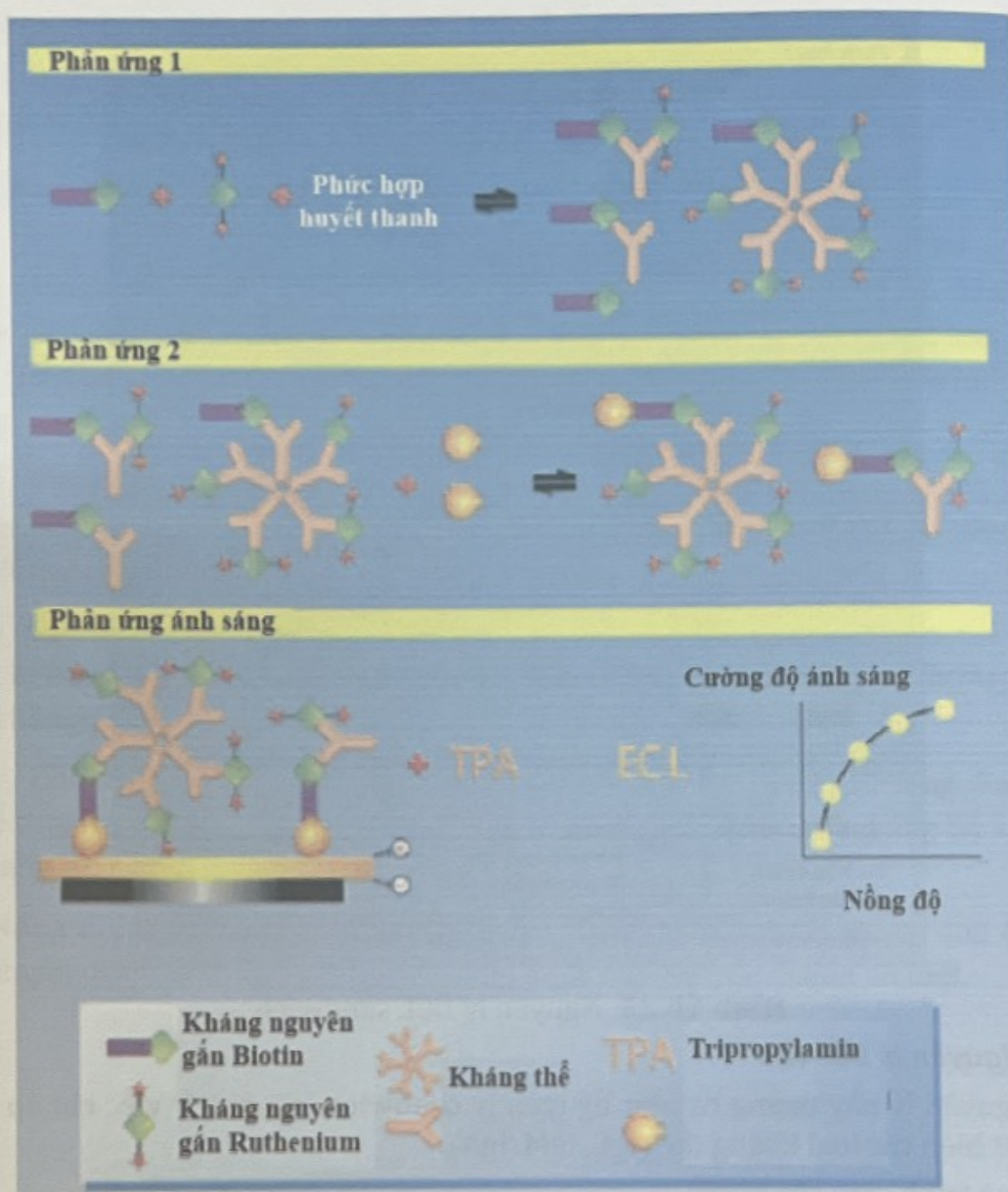
Hình 10.25. Nguyên lý ECL sandwich

2.7.3. Nguyên lý bắc cầu

Nguyên lý này tương tự như nguyên lý sandwich, ngoại trừ việc chỉ áp dụng cho phát hiện các loại kháng thể (IgG, IgM, IgA).

Quá trình gồm các bước:

- Thời kỳ ủ đầu tiên, các kháng thể có trong huyết thanh của mẫu xét nghiệm sẽ được cho kết hợp với thuốc thử có chứa kháng nguyên được đánh dấu biotin và kháng nguyên đánh dấu ruthenium để tạo phức hợp miễn dịch.
- Phức hợp miễn dịch sau đó sẽ gắn với các vi hạt phủ streptavidin thông qua sự tương tác giữa biotin và streptavidin ở trong thời kỳ ủ thứ 2.
- Sau bước ủ thứ 2, hỗn hợp phản ứng được chuyển tới buồng đo. Các vi hạt đối từ bị bắt giữ vào điện cực hoạt động do tác động của từ trường. Những thành phần không gắn kết bị thải ra ngoài bởi dung dịch ProCell.
- Cho điện áp vào điện cực, phản ứng ECL xảy ra, lượng ánh sáng được tạo ra tỉ lệ thuận với lượng kháng thể có trong mẫu bệnh phẩm và được đo bằng bộ khuếch đại quang tử. Nồng độ của kháng thể được ước lượng và tính toán thông qua đường cong chuẩn được thiết lập trên cơ sở nồng độ kháng thể chuẩn đã biết.



Hình 10.26. Nguyên lý ECL bậc cầu

3. CẤU TRÚC VÀ NGUYÊN LÝ HOẠT ĐỘNG CỦA HỆ THỐNG XÉT NGHIỆM MIỄN DỊCH TỰ ĐỘNG

Trải qua một quá trình phát triển và cải tiến qua nhiều thế hệ, đã có nhiều thay đổi trong tính năng và năng lực thực hiện xét nghiệm. Tuy nhiên, nhìn chung về cơ bản cấu trúc của một thiết bị phân tích xét nghiệm ứng dụng công nghệ xét nghiệm điện hóa phát quang về cơ bản bao gồm các thành phần cơ bản: bộ phận điều khiển, bộ phận vận chuyển và phân phối mẫu, bộ phận thực hiện xét nghiệm.

3.1. Phân hệ điều khiển

Đây là phân hệ chịu trách nhiệm điều khiển, phân phối và kiểm soát sự vận hành của toàn bộ hệ thống. Phân hệ điều khiển lựa chọn các xét nghiệm được thực hiện cho

từng mẫu từ hệ thống thông tin xét nghiệm tự động LIS. Kỹ thuật viên cũng có thể can thiệp dữ liệu lựa chọn xét nghiệm. Phân hệ điều khiển quản lý các phân hệ khác bằng việc gửi các lệnh và thông tin điều khiển thông qua các bus điều khiển.

Phân hệ điều khiển của máy xét nghiệm miễn dịch tự động hoạt động theo cách trực tiếp. Phân hệ bao gồm bộ xử lý có nhiệm vụ điều khiển và giám sát quá trình thực hiện xét nghiệm mẫu trong máy. Dữ liệu xét nghiệm như loại xét nghiệm, quy trình xét nghiệm, thông số hoạt động của máy và các thông tin liên quan khác. Ngoài ra, khối điều khiển sẽ hiển thị các kết quả xét nghiệm và thông tin trạng thái trên thiết bị đầu ra. Các thành phần xét nghiệm như mẫu xét nghiệm, hoá chất,... được đưa vào hệ thống và được quản lý bởi phân hệ điều khiển thông qua giao diện người sử dụng.

Bên cạnh đó, phân hệ điều khiển còn đóng vai trò quan trọng trong việc chỉ phối cho các khối chức năng khác như rửa, ủ, cảm biến... trong trường hợp xét nghiệm ưu tiên. Xét nghiệm ưu tiên cao hơn sẽ được thực hiện tại bất kỳ thời điểm nào. Trong khi đó các xét nghiệm đang, sắp được tiến hành đều bị tạm dừng chờ tới khi xét nghiệm ưu tiên được thực hiện. Chương trình điều khiển đảm bảo cho các xét nghiệm ưu tiên được tiến hành song không làm phá vỡ hay tổn hao các mẫu đang được xử lý.

3.2. Phân hệ vận chuyển và phân phối mẫu

Hoạt động của hệ thống này chịu sự chỉ phối của hệ thống điều khiển, tùy theo mong muốn và yêu cầu của người vận hành thông qua hệ thống điều khiển thực hiện việc phân phối mẫu đến các vị trí phản ứng để thực hiện xét nghiệm. Sự cải tiến và phát triển của khoa học kỹ thuật và công nghệ dẫn đến sự ra đời của ngày càng nhiều các máy xét nghiệm hiện đại với nhiều modun tích hợp và hệ thống vận chuyển và phân phối tiên tiến, cho phép thực hiện đồng thời nhiều xét nghiệm, loại xét nghiệm cùng lúc nâng cao hiệu suất và chất lượng của phòng xét nghiệm.

3.3. Phân hệ thực hiện xét nghiệm

3.3.1. Phân hệ ủ

Ống xét nghiệm được đưa vào hệ thống ủ tại khu vực chuyển giao. Ống xét nghiệm có thể chứa thuốc thử pha sẵn hoặc để trống di chuyển tới bộ phận vận chuyển là đai ủ. Ở đai ủ, các ống xét nghiệm được định vị tại tâm của mỗi mắt đai để loại trừ sự thay đổi tốc độ dịch chuyển của ống tại các góc vòng của đai.

Ống xét nghiệm sau đó được đưa tới trạm pipet để bổ sung chất lỏng. Chất lỏng này có thể là các mẫu bệnh phẩm như máu, nước tiểu hoặc là mẫu bệnh phẩm đã pha loãng hay thuốc thử dạng lỏng. Loại và lượng chất lỏng bổ sung tùy thuộc vào loại xét nghiệm được thực hiện. Ống xét nghiệm sẽ dịch chuyển vòng quanh đai ủ theo một khoảng thời gian riêng cho từng xét nghiệm.

Vì ống xét nghiệm dịch chuyển dọc theo đai ủ nên ống được khuấy trộn bởi một hoặc nhiều đầu khuấy trộn. Buồng ủ được bao phủ trong một lớp vỏ dày để duy trì nhiệt độ bên trong ở $37^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Ống xét nghiệm liên tục dịch chuyển theo đai ủ cho tới khi được đưa vào trạm rửa hoặc trạm chuyển tiếp.

Mỗi đai ủ sẽ kết hợp với ít nhất một trạm rửa và một trạm chuyển tiếp tùy thuộc vào cấu trúc tổng thể của buồng ủ. Trạm rửa có nhiệm vụ loại bỏ đi những chất nổi trên bề mặt của dung dịch phản ứng nhưng giữ lại các thành phần phản ứng pha rắn, bổ sung dung dịch rửa (như nước), loại bỏ dung dịch rửa... lặp lại với quá trình rửa pha rắn và sau đó đưa ống xét nghiệm quay trở lại đai ủ về vị trí cũ. Nhiệm vụ của trạm chuyển tiếp là dịch chuyển ống xét nghiệm từ một đai ủ tới một khu vực chức năng khác như một đai ủ khác (trong hệ thống có nhiều đai ủ) hay tới buồng đo quang. Đôi khi, trạm rửa và trạm chuyển tiếp được kết hợp với nhau, ví dụ như một ống xét nghiệm được đưa vào trạm rửa để rửa đi các thành phần phản ứng pha rắn, sau đó ống lại được dịch chuyển ra ngoài trạm rửa để đưa tới khu vực khác ngoài đai ủ đó. Như vậy, ống xét nghiệm được rửa và chuyển tiếp từ một trạm kết hợp.

3.3.2. Phân hệ đo quang

Phân hệ đo quang thực hiện đo lường cường độ sáng được phát ra và sự thay đổi màu sắc để định lượng thành phần trong ống xét nghiệm.

Phân hệ chuyển tiếp truyền các ống xét nghiệm tới phân hệ đo quang sau khi đã được rửa một hoặc nhiều lần. Phân hệ chuyển tiếp nạp các ống xét nghiệm vào các đai đo quang. Đai này quay theo chiều kim đồng hồ hoặc ngược lại theo lệnh của phân hệ điều khiển. Cơ chất và/hoặc hoá chất thử được cho vào ống và dịch chuyển dọc theo đai đo quang và được lắc bởi bộ phận khuấy trộn. Khi có lệnh từ phân hệ điều khiển, ống được chuyển tới vị trí đọc. Tại đây, ống được đọc bởi cơ cấu cảm biến và sau đó được đưa tới máng đổ.

Để tránh ánh sáng bên ngoài, cơ cấu cảm biến được kết nối với khu đọc thông qua một ống đã được bịt kín. Ống này cho phép đĩa suy giảm dịch chuyển tới trạm đọc trong khi ngăn chặn ánh sáng bên ngoài xâm nhập vào cơ cấu cảm biến.

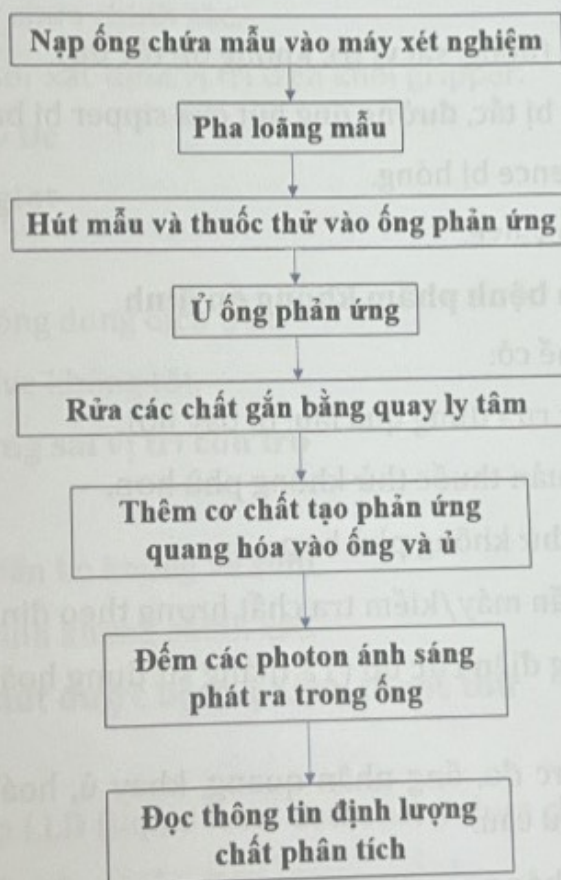
Trạm đọc và đai đo quang được tách rời với nhau cho phép mỗi lần nạp sẽ có thêm nhiều ống được đưa vào phân hệ đo quang và đợi trên đai trong các khoảng thời gian khác nhau. Như vậy, các ống không cần phải nạp theo cách nối tiếp nhau vào trạm đọc. Nhờ cấu trúc tách biệt quá trình dịch chuyển ống và đọc ống, các ống xét nghiệm có thể được khuấy trộn trong khi một ống khác đang được đọc. Ngoài ra, do xét nghiệm được thực hiện trên từng ống nên các ống có thể duy trì trên đai trong các khoảng thời gian ngắn hơn hoặc lâu hơn. Một số xét nghiệm có thể yêu cầu kéo dài thời gian giữa thời điểm hoá chất thử bám vào chất gắn trên hạt để tạo ra sự quang hoá và thời điểm cơ cấu cảm biến phát hiện ra sự quang hoá. Ngoài ra, một số xét nghiệm có thể được ưu tiên và sẽ được xử lý nhanh hơn tại thời điểm đo quang tới cơ cấu cảm biến. Vì vậy, phân hệ điều khiển được lập trình để điều khiển thứ tự khi một ống xét nghiệm được chuyển tiếp giữa đai đo quang và trạm đọc; nó có thể thực hiện điều khiển này bằng cách dò vị trí của ống trên đai đo quang. Như vậy, mỗi ống xét nghiệm có khoảng nghỉ cần thiết riêng trên đai đo quang và khoảng thời gian này có thể được điều khiển dựa trên loại xét nghiệm đang tiến hành cũng như quyền ưu tiên tùy theo lệnh từ phân hệ điều khiển.

Trạm đọc chất phân tích hoạt động theo kiểu ngẫu nhiên. Phương pháp này cho phép thay đổi khoảng thời gian từ khi đưa hoá chất vào mẫu xét nghiệm để có phản ứng tạo màu hoặc phát quang tới khi từng mẫu được đặt dưới cơ cấu cảm biến. Như vậy, khoảng thời gian cần thiết cho từng xét nghiệm khác nhau sẽ được tối ưu hoá.

Ống xét nghiệm được đưa vào trạm đọc từ đai đo quang ở vị trí cửa vào. Ống thường được quay ngược chiều kim đồng hồ để tới vị trí đọc. Tại đây, ống được đọc bởi cơ cấu cảm biến. Cơ cấu cảm biến được bảo vệ bằng ống ngăn sáng. Trạm đọc được che chắn bằng các lớp vỏ che chắn bên trên, dưới đáy và xung quanh. Lớp chắn xung quanh chỉ mở ra tại vị trí lối vào, lối ra và vị trí đọc. Lớp chắn này ngăn chặn rò rỉ ánh sáng ra ngoài trạm đọc. Ống xét nghiệm tại vị trí đọc được đặt nghiêng hướng ra vành ngoài của trạm đọc.

Do đó, mỗi ống xét nghiệm sẽ được đặt cách cơ cấu cảm biến một khoảng cố định. Đĩa suy giảm đặt giữa trạm đọc và cơ cấu cảm biến có dạng hình thang xoay quanh một trục có nhiệm vụ ngăn chặn ánh sáng. Khi đứng trước vị trí đọc, cơ cấu cảm biến không nhận được ánh sáng từ ống xét nghiệm. Tín hiệu điện được tạo ra lúc này sẽ là tín hiệu nền và được trừ đi khi đo sáng. Nhờ vậy, kết quả thu được có độ chính xác cao hơn.

4. CÁC QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM TRONG MÁY XÉT NGHIỆM MIỄN DỊCH TỰ ĐỘNG



Hình 10.27. Quy trình thực hiện xét nghiệm ECL

Như trong hình trên, quá trình xét nghiệm bắt đầu từ bước nạp ống xét nghiệm vào máy. Phân hệ điều khiển thực hiện nhận dạng các thành phần khác nhau của mẫu (thể tích mẫu, nhận biết thuốc thử, lựa chọn hạt...). Mẫu sau đó sẽ được pha loãng (nếu cần) và cho thuốc thử vào ống xét nghiệm.

Tuỳ vào từng loại xét nghiệm cụ thể, thời gian ủ kéo dài khác nhau từ vài phút tới vài chục phút. Sản phẩm sau ủ khuấy trộn có thể tiếp tục được bổ sung thuốc thử để lại được khuấy trộn lần nữa hoặc đưa tới bước rửa và loại bỏ đi mẫu và thuốc thử không cần thiết. Sau bước rửa, sản phẩm có thể lại được bổ sung thuốc thử và ủ lần nữa hoặc đưa tới bước đo lường. Phép đo được tiến hành và cuối cùng là hiển thị kết quả.

5. MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM

5.1. Kết quả xét nghiệm sai

Nguyên nhân có thể có:

- Có bọt trong dung dịch nước rửa, thuốc thử hay mẫu bệnh phẩm.
- Mẫu bệnh phẩm bị đông.
- Hoá chất lỏng.
- Phần cứng:
- + Mixer trục trặc (hỏng, sai vị trí, không đủ tốc độ).
- + Kim hút sipper bị tắc, đường ống hút của sipper bị bán tắc.
- + Điện cực Reference bị hỏng.
- + Hỏng dây pinch valve.

5.2. Kết quả control và bệnh phẩm không ổn định

Nguyên nhân có thể có:

- Dung dịch nước rửa dùng quá lâu, bị bay hơi.
- Điều kiện bảo quản thuốc thử không phù hợp.
- Nhiệt độ thuốc thử không phù hợp.
- Không chạy chuẩn máy/kiểm tra chất lượng theo định kỳ.
- Phần cứng: Hỏng điện cực đo (12 tháng sử dụng hoặc đo được 50000 mẫu tuỳ điều kiện nào trước).
- + Nhiệt độ điện cực đo, ống nhân quang, khay ủ, hoá chất hệ thống không nằm trong dải yêu cầu.
- + Ống nhân quang hỏng.

5.3. Không thể thực hiện chạy chuẩn hoá chất được

Nguyên nhân có thể có:

- Thuốc thử và chất chuẩn không có trên máy.
- Chất chuẩn hết hạn.
- Mã vạch của thuốc thử/chất chuẩn hỏng.
- Lot của Thuốc thử và chất chuẩn không phù hợp.
- Chất chuẩn 1 và 2 không đặt liền nhau.
- Phần cứng: Đầu đọc mã vạch chưa được chỉnh chỉnh xác.

5.4. Máy báo nhiệt độ khay thuốc thử ngoài dải

Nguyên nhân có thể có:

- Thermistor hỏng.
- Peltier hỏng.

5.5. Gripper không gấp được cup/tip trong quá trình đo mẫu

Nguyên nhân:

- Chỉnh gripper chưa chính xác.
- Sai, hỏng sensor xác định vị trí trên khối gripper.
- Đứt cầu chì 5v Dc.

5.6. Kim sipper nhỏ giọt

Nguyên nhân:

- Bán tắc hệ thống dung dịch thải.
- Dây pinch valve không tốt.

5.7. Màn hình cảm ứng sai vị trí con trỏ

Nguyên nhân:

- Màn hình bị bẩn ko không vệ sinh.
- Chuẩn màn hình không chính xác.

5.8. Kim hút không hút được bệnh phẩm, thuốc thử

Nguyên nhân:

- Chỉnh điện áp LLD (liquid level detection) chưa chính xác.
- S/R probe bắn gây nhiễu điện.
- Có bọt khí trên cup bệnh phẩm, thuốc thử.

5.9. Phần nhiều lỗi trên đây xuất phát từ phía kỹ thuật viên

- Thực hiện các thao tác pha hỗn hợp thuốc thử không đúng kỹ thuật làm cho kết quả xét nghiệm không chính xác.
- Lớp mã vạch trên các bình thuốc thử bị bụi phủ nên máy không nhận dạng được thuốc thử tới đưa tới các cảnh báo.
- Không thay rotor thuốc thử định kỳ nên các bộ phận truyền động làm việc không chính xác.
- Không sử dụng thuốc thử phù hợp với xét nghiệm cần tiến hành.
- Không thay màng lọc định kỳ.
- Không tiến hành kiểm tra chất lượng xét nghiệm định kỳ.
- Không nghiên cứu kỹ tài liệu hướng dẫn sử dụng dẫn tới việc sắp xếp trật tự các xét nghiệm không phù hợp gây ra tình trạng xung đột thời gian làm cho máy bị treo tạm thời.
- Nguồn nước cấp cho máy không được xử lý kỹ làm cho hệ thống ống dẫn bị lắng cặn.
- Các bình thuốc thử không được lưu trữ trong môi trường thích hợp.
- Không vệ sinh máy định kỳ.

Một số lỗi do máy:

- Máy bị treo do xung đột dữ liệu. Khi kỹ thuật viên tiến hành đồng thời nhiều loại xét nghiệm với thời gian khác nhau, chương trình điều khiển của máy bị xung đột dữ liệu dẫn tới quá trình vận hành máy bị tạm ngừng. Vì vậy, các nhà sản xuất phải liên tục nâng cấp chương trình phần mềm điều khiển. Đây cũng là một trong những điểm khác biệt của các hệ thống xét nghiệm miễn dịch giữa các hãng.
- Máy xét nghiệm có rất nhiều hệ thống truyền động nên cũng hay xảy ra các sự cố với các động cơ bước.
- Hệ thống trộn vi hạt hoạt động không đúng như thống số máy.

5.9.1. Bảo trì, bảo dưỡng máy

Bảng 10.2. Nội dung công việc bảo trì bảo dưỡng máy xét nghiệm

Thời gian	Công việc
Hàng ngày	Làm sạch kim hút mẫu/thuốc thử và kim sipper
Hàng tuần	- Làm sạch kim nhỏ khoang chứa bình và thay bình nhỏ ProCell/CleanCell - Làm sạch bộ trộn PreClean và trạm rửa riêng - Làm sạch buồng ủ - Làm sạch bộ trộn vi hạt. - Làm sạch trạm rửa
Mỗi 2 tuần	Làm sạch điện cực
Mỗi quý	Thay thế kẹp van ống
Mỗi 6 tháng	Làm sạch miếng lọc nước đầu vào
Khi cần	- Làm sạch ống hút và lọc hóa chất rửa - Làm sạch giá chứa bình hóa chất rửa - Làm sạch khay thuốc thử và ngăn - Làm sạch ngăn chứa chất thải rắn - Làm sạch bề mặt máy

Bên cạnh đó, một vấn đề thường gặp tại các phòng xét nghiệm của các bệnh viện là các kỹ thuật viên thường bỏ qua khâu chuẩn máy và kiểm tra chất lượng máy. Vì vậy, việc nâng cao ý thức sử dụng máy một cách khoa học và có trách nhiệm với kết quả vận hành là việc rất cần thiết. Xét nghiệm miễn dịch đặc biệt quan trọng vì kết quả xét nghiệm có liên quan trực tiếp tới quá trình điều trị của bệnh nhân. Nó liên quan tới vấn đề sức khỏe, tính mạng của người bệnh nên cần tuyệt đối tránh những sai sót do chủ quan. Ngoài ra, hệ thống nước sạch cung cấp cho các bệnh viện cũng cần được nâng cao chất lượng. Tại nhiều bệnh viện, máy xét nghiệm thường xuyên bị lỗi một phần nguyên nhân thường gặp là do hiện tượng nước chưa được xử lý tốt làm ảnh hưởng tới hệ thống ống dẫn của máy, gây tắc nghẽn làm máy vận hành không chính xác hoặc thậm chí không hoạt động.