

Der economic Glucoseanalyser – Evaluationsergebnisse

The economic glucose analyzer – results of evaluation

D. Bachg¹, H. Reinauer¹

Zusammenfassung

Die Leistungsdaten eines vollmechanisierten Glucoseanalysators mittels membrangebundener Glucoseoxidase werden vorgestellt. Vergleichsmessungen zum bestehenden Analysensystem ACP 5040 ergaben gute Korrelationen. Die Richtigkeit wurde anhand von Referenzmethodenwerten beurteilt und als gut bewertet. Präzisionsstudien weisen das System in der Serie und von Tag zu Tag als präzise und zuverlässig aus. Ein weiterer Vorteil des economic liegt in seiner komfortablen Bedienung.

Schlüsselwörter

Glucose, Blut – Glucoseoxidase – Enzymelektrode

Summary

Performance data of a fully mechanized glucose analyser using membrane-bound glucose oxidase are presented. Method comparison to the currently used ACP 5040 system was performed and good correlations were obtained. The evaluation of accuracy was performed with samples the target values of which were determined by reference methods. Studies on precision pointed out a precise and reliable instrument. The comfortable handling is a further advantage of the economic.

Key words

glucose, blood – glucose oxidase – enzyme electrode

Einleitung

Ziel aller Automatenentwicklungen für das klinisch-chemische Laboratorium ist eine Verringerung der Proben- und Analysenkosten bei Steigerung von Analysenfrequenz und Analysenqualität. Die Realisierung dieses Ziels trifft insbesondere für die Blutzuckerbestimmung zu, denn dieser Analyt wird häufig mit niedrigem Proben- und Analysenvolumen (Kapillarblut) bestimmt. Eigentümlicherweise gibt es nur wenige Systeme auf dem Markt zur Analyse des Blutzuckerspiegels aus Kapillarblut.

Der nachfolgende Beitrag stellt die Leistungsdaten eines vollmechanisierten Glucoseanalysators vor, der die Erfahrungen der Bio-Sensorik mit den technischen Möglichkeiten der Elektronik vereinigt. Die Bestimmung der Glucosekonzentration im Hämolyt erfolgt in einer Durchflußzelle mit Hilfe membrangebundener Glucoseoxidase. Das bei der Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid wird amperometrisch erfaßt und dient als Maß für die Glucosekonzentration. Zum Vergleich wurde das bestehende Analysensystem ACP 5040 mit der Hexokinase-Methode verwendet. Außerdem wurden Richtigkeitskontrollproben, deren Zielwerte durch die Referenzmethode bestimmt worden waren, zur Überprüfung des Systems eingesetzt.

Methoden

Geräte

Das Funktionsprinzip des economic¹ beruht auf einem Enzymsensor, der aus einer mit einer dünnen Membran bespannten Elektrode besteht, die gebundene Glucoseoxidase (GOD) enthält. Die Enzymmoleküle sind in Polyurethan eingeschlossen. Das immobilisierte Enzym kann aus der Membran nicht herausgewaschen werden, und nur niedermolekulare Verbindungen wie Glucose, Wasserstoffperoxid und Sauerstoff können aus der Probelösung durch die enzymhaltige Membran diffundieren. Das Enzym GOD katalysiert die Umwandlung von β -D-Glucose in D-Glucosyl-Lacton und Wasserstoffperoxid. Das entstehende Wasserstoffperoxid wird an der Elektrode gespalten und gibt zwei Elektronen pro Molekül ab. Es fließt ein Strom, welcher der H_2O_2 -Konzentration proportional ist.

¹ Abteilung für Klinische Biochemie, Diabetes-Forschungsinstitut an der Heinrich-Heine-Universität, Auf'm Hennekamp 65, D-40225 Düsseldorf Fax: x49-211-33 40 06

¹ Care diagnostica, D-46562 Voerde

Vor der Glucosebestimmung in Patientenproben wird die Enzymelektrode zunächst mit einer Lösung bekannter Glucosekonzentration kalibriert.

Nach der Messung wird die Enzymmembran mit neutraler, salzhaltiger Pufferlösung gespült. Dadurch wäscht man alle vorher eindiffundierten Substanzen und auch Produkte der GOD-Reaktion aus. Der Sensor ist damit regeneriert und erneut meßbereit.

Am ACP 5040 wurde das Prinzip der enzymatischen Messung von Glucose in einer gekoppelten Reaktion mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase angewendet. Nach diesem Verfahren wird die Glucose in Anwesenheit von Hexokinase mit ATP zu Glucose-6-phosphat (G-6-P) phosphoryliert. G-6-P reagiert mit NADP unter Bildung von 6-Phosphogluconat und NADPH, die Reaktion wird durch die G-6-P-Dehydrogenase katalysiert. Meßgröße ist NADPH, die NADPH-Zunahme wird spektrophotometrisch bei 334 nm verfolgt. Die ermittelte Zunahme der Absorbanz ist proportional der Glucosekonzentration im Testansatz. Die Methode ist bei Abwesenheit von G-6-P spezifisch für D-Glucose. Vor der Messung wird das Gerät mittels eines Glucosestandards überprüft.

Untersuchte Personen

Für die Vergleichsmessungen wurden 368 Patientenproben aus der Ambulanz und von den Stationen des Diabetes-Forschungsinstituts eingesetzt. Die Proben wurden mittels 20 µl-Kapillarröhrchen aus der Fingerbeere abgenommen, in 1,0 ml Hämolyselösung gegeben und die Analyse im Hämolysat vorgenommen. Zur Herstellung des Hämolysats wurde das Kapillarblut mit Hämolyse-reagenz der Fa. Care, bestehend aus einem Dextran-Phosphat-Puffer mit Fluorid-Ionen als Glykolysehemmer, versetzt. Das Mischungsverhältnis betrug 50+1. Die Analysen wurden mit beiden Analysengeräten innerhalb von 2 h vorgenommen.

Präzision und Richtigkeit

Für die Ermittlung von Präzision und Richtigkeit wurden Kontrollproben (Precinorm U und Precipath P; Fa. Boehringer Mannheim) in zwei Konzentrationsbereichen eingesetzt. Für die Ermittlung der Präzision im hohen Konzentrationsbereich wurde die Kontrollprobe mit einer wäßrigen GlucosestammLösung aufgestockt, während sie für den niedrigen Konzentrationsbereich entsprechend verdünnt wurde.

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden Ringversuchsproben eingesetzt und die Unrichtigkeit anhand der Abweichung von den Referenzmethodenwerten erfaßt. Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurden 40 Wiederholungsmessungen bei beiden Konzentrationen vorgenommen. Die Ermittlung der Präzision zwischen den

Serien erfolgte durch 55 Messungen an 14 Untersuchungstagen in einem Zeitraum von 28 Tagen. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse des Gerätevergleichs wurde das Verfahren der linearen Regressionsrechnung eingesetzt.

Ergebnisse

Vergleichsmessungen von economic und ACP 5040

Die Vergleichsmessungen von 368 Patientenproben wurden mit den zwei Analysesystemen mit voneinander unterschiedlichen Meßmethoden durchgeführt. Neben der Auswertung der Gesamtdaten wurden die Werte im hypoglykämischen und unteren Referenzbereich separat ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und in den Abbildung 1 und 2 dargestellt. Der Vergleich der Analysenwerte ergab eine gute Korrelation über den gesamten Meßbereich ($r = 0,99$ bzw. $0,97$).

Tabelle 1. Methodenvergleich economic gegen ACP 5040. Berechnung der linearen Regression.

	gesamter Meßbereich	unterer Meßbereich
Steigung	1,013	1,014
Achsenabschnitt (mg/dl)	9,641	2,191
Korrelationskoeffizient	0,992	0,973
Anzahl der Proben	368	41

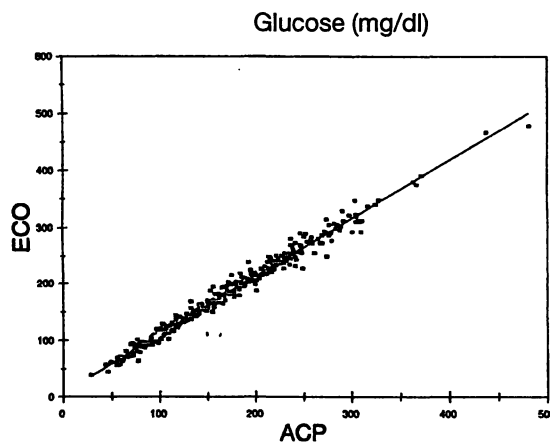


Abb. 1. Vergleichsmessungen economic gegen ACP 5040. $r = 0,99$.

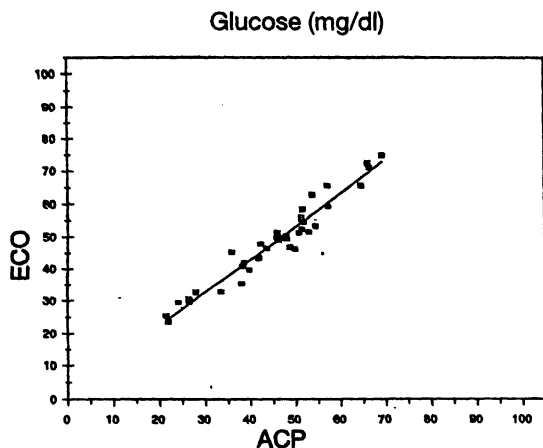


Abb. 2. Vergleichsmessungen economic gegen ACP 5040 im hypoglykämischen bzw. unteren Referenzbereich. $r = 0,97$.

Präzision in der Serie

Die Präzisionsmessungen ($n = 82$) wurden an je 41 Proben bei den Konzentrationen von 717 mg/dl und 34 mg/dl vorgenommen. Tabelle 2 faßt die Daten zur Präzision in der Serie zusammen. Es wurden Variationskoeffizienten von 0,70 % bis 1,51 % gefunden.

Tabelle 2. Glucosebestimmung mit dem economic-System. Präzision in der Serie und Präzision zwischen den Serien

Parameter	Präzision in der Serie	Präzision zwischen den Serien
n	41	41
$\bar{x}$ (mg/dl)	717	34
s (mg/dl)	4,99	0,51
Vk (%)	0,70	1,51

Präzision von Tag zu Tag

Die Daten zur Präzision zwischen den Serien sind ebenfalls in Tabelle 2 dargestellt. Die über eine Zeitspanne von 28 Tagen beobachtete Unpräzision zeigt einen Variationskoeffizienten von 2,95 %.

Richtigkeit

Die Bestimmung der Richtigkeit wurde an Ringversuchsproben in zwei Konzentrationsbereichen ermittelt und als Abweichung des Mittelwertes vom Referenzmethodenwert ausgedrückt. Die Daten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Durch diese Untersuchung wurden keine größeren Unrichtigkeiten aufgezeigt.

Tabelle 3. Ermittlung der Richtigkeit mit Kontrollproben.

	Probe 1	Probe 2
Mittelwert (mg/dl)	118,3	246,9
Referenzmethodenwert (mg/dl)	114	247
Abweichung (%)	3,8	0,04

Linearität

Zur Bestimmung des Linearitätsbereichs wurde eine native Probe mit einer Glucoselösung entsprechend dem Standard-Additions-Verfahren hergestellt und analysiert. Die höchste Testkonzentration von 800 mg/dl und die niedrigste von 12,5 mg/dl lagen noch im Linearitätsbereich. Die graphische Auswertung ist in Abbildung 3 dargestellt.

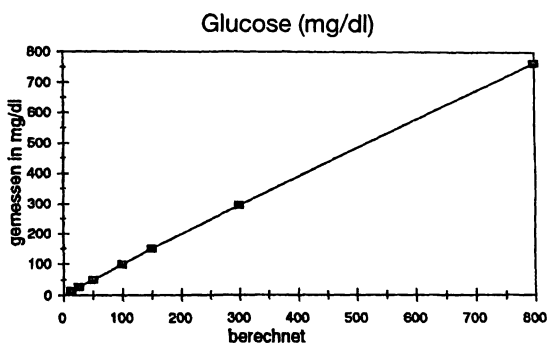


Abb. 3. Linearitätsprüfung der Glucosebestimmung. Verglichen wurden die errechneten und die gemessenen Werte.

Carry-over Effekt

Die Analyse von Proben mit hoher Konzentration kann mit der von Proben mit niedriger Konzentration interferieren bzw. umgekehrt. In Anlehnung an Broughton [1] wurde dieser Effekt quantifiziert, indem 2 aufeinander folgende Proben mit hoher Konzentration gefolgt von 2 aufeinander folgenden Proben mit niedriger Konzentration analysiert wurde. Der carry-over wurde nach folgender Formel berechnet:

$$K = \frac{l_1 - l_2}{h_2 - l_2} \quad (n = 19)$$

Abkürzungen: l_1 = Probe 1 niedriger Konzentration
 l_2 = Probe 2 niedriger Konzentration
 h_2 = Probe 2 hoher Konzentration

Aus 19 Sequenzen wurde der Mittelwert für K bestimmt und als Interaktion in % ($I \% = K \cdot 100$) ausgedrückt. Der carry-over-Effekt unserer Untersuchungen betrug demnach 0,1 %. Die Daten sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Es ergab sich somit kein praktisch relevanter Verschleppungseffekt.

Tabelle 4. Carry-over Effekt

	Glucose
Hohe Konzentration (mg/dl)	749
Niedrige Konzentration (mg/dl)	31
Carry-over-Ratio (%)	0,1

Kosten

Ein nicht zu unterschätzender Aspekt bei der Konzeption des economic liegt in der Wirtschaftlichkeit. Neben dem günstigen Anschaffungspreis wurde das Gerät so entwickelt, daß der Verbrauch der zur Messung notwendigen Hilfsstoffe, wie Pufferlösung, Standardlösung, Membran und Reinigungsstäbe, niedrig ist, wodurch der Betriebskostenanteil minimal wird. Es wird zwar empfohlen die Verbrauchsmaterialien direkt vom Vertreiber zu beziehen, grundsätzlich jedoch ist der economic ein offenes System.

Arbeitsaufwand

Die Bedienung des economic ist komfortabel und sehr einfach. Die Bedienung, Messung und Überwachung im Gerät wird durch einen Mikroprozessor gesteuert. Alle Signale der eingesetzten Sensoren werden im Mikroprozessor verarbeitet, Fehlermeldungen und Informationen, wie z. B. das notwendige Ersetzen von Verbrauchsmaterialien, werden dem Anwender durch Klartextangaben in Deutsch angezeigt. Die Wartung ist auf ein Minimum reduziert. Das Auswechseln der Membran ist sehr einfach und erfolgt nach frühestens 4 Wochen.

Diskussion

Das Gerät economic erstellt zuverlässige und präzise Analysenergebnisse und entspricht in seiner Leistungsfähigkeit langjährig am Markt eingeführten Systemen. Die von uns erhobenen Daten zur Präzision und Richtigkeit sind unter Berücksichtigung der verbindlichen Vorgaben im Sinne der Anlage 1 der Richtlinien der Bundesärztekammer als gut zu bewerten. Die Messungen anhand von Ringversuchsproben von INSTAND ergaben für die Präzision einen VK von 0,7 % und für die Richtigkeit eine mittlere Abweichung vom Referenzmethodenwert von 3,8 % bzw. 0,04 % (s. Tabelle 3). Die Vergleichsmessungen zum ACP 5040 ergaben eine gute Vergleichbarkeit der Methoden (Korrelationskoeffizient = 0,99).

Der Meßbereich des economic erstreckt sich über einen so weiten Bereich, daß alle uns zur Verfügung stehenden Blutproben von Diabetikern bedenkenlos gemessen werden konnten. Weiterhin zeichnet sich der economic durch eine extrem niedrige Verschleppung aus. Selbst bei unmittelbarer Aufeinanderfolge von Proben mit hoher Konzentration und niedriger Konzentration muß nicht mit Verfälschungen des nachfolgenden Meßergebnisses gerechnet werden.

Das economic-System ist ein kompaktes Gerät mit wenig Platzbedarf im Labor. Die Bedienung ist komfortabel und sehr einfach. Eilproben lassen sich jederzeit messen. Das Gerät kehrt nach jeder Eilprobe direkt zur Routine zurück. Die Probengefäße werden bei geschlossenem Deckel abgearbeitet. Die Reagenzienbeschickung ist unproblematisch.

Durch Produktion zuverlässiger, verschleppungsfreier, reproduzierbarer Ergebnisse bei schneller Ergebniserstellung, niedrige Kosten und Wartungsfreundlichkeit realisiert der economic die an eine Routine-Methode gestellten Anforderungen für eine moderne Diabetes-Therapiesprechstunde und die Erfordernisse des Klinikalltags.

Literatur

1. Broughton PMG, Gowenlock AH, McCormack JJ, Neill DW (1974) A revised scheme for the evaluation of automatic instruments for use in clinical chemistry. *Ann Clin Biochem* 11, 207–218