

De ontwikkeling van de Centrifugaal Fast Analyzers, in het bijzonder de Multistat III van Instrumentation Laboratory*

H. PEEK¹ en P.N.M. DEMACKER²

In de jaren 70 en 80 van de vorige eeuw was de centrifugaal fast analyzer (CFA) het werkpaard voor het klinisch chemische laboratorium voor de talrijke tests die toen gedaan werden. Als opvolger van de Technicon AutoAnalyzer, de allereerste chemie auto-maat werkend volgens het continuous flow principe, was de CFA veel flexibeler in het uitvoeren van een specifieke test voor een specifiek monster, speciaal in combinatie met de toen beschikbaar komende enzym-kits. Het oorspronkelijke concept werd bedacht door Dr. N.G. Anderson. Centraal stond een 15 cuvets-rotor; monsters en reagens werden apart ingepipeteerd, gemengd bij hogere g-waarden, waarna de reactie startte gevolgd door extinktieregistratie in de 15 compartimenten. De introductie van een computer maakte later een snelle berekening van de resultaten mogelijk; daarnaast was er een controlerende taak in de procesgang. De gelijke start van de reacties in de cuvetrotor maakte het mogelijk voor elk monster een reagens blanco te registreren; handig bij zowel eindpunts- als kinetische metingen. Verdere perfectie-ring was gericht op miniaturisering, optimalisering van de cuvetrotor en automatisering van het pipetteren. Zoals gebruikelijk verliep de optimalisatie in vele stappen neergelegd in patenten en artikelen.

Veel werk werd gestoken in perfectieoning van de cuvettenkrans van multicompartment tot disposable. Steeds andere cuvetrotoren, ontworpen door medewerkers zoals Burtis en Tiffany, leverden winst in capaciteit (tot 82 monsters in één run) of in efficiëntie. Miniaturisering in combinatie met een efficiënte sample/reagens loader maakten het mogelijk om 1-10 µl monster onverdund te kunnen analyseren. Een trigger tot verdere miniaturisering was de mogelijke inzet bij ruimtevluchten (Spacelab). De enorme behoefte aan grotere analysecapaciteit in de geneeskunde was echter de grootste trigger. De verkoop kwam echter pas goed op gang nadat een verdere miniaturisering had plaatsgevonden rondom een 32 cuvets disposable rotor met volledige UV doorlaatbaarheid en daardoor ook geschikt voor fluorimetrische analyses.

CFA's, in combinatie met de toenemende beschikbaarheid vanaf 1980 van enzymatische en immunologische reagentia, staan aan de basis van een bloeitijd in de klinische chemie. Zelfs routinelaboratoria

waren nu in staat voor de meeste analyses te voldoen aan de strenge kwaliteitscriteria.

Klinisch chemische analyses zijn manueel uitgevoerd veelal bewerkelijk; (semi)-automatisering van 'chemische methodes' was noodzaak. Om een voorbeeld te noemen: de manuele chemische bepaling van de triglyceriden (TG) vraagt 8 pipetteerstappen, 1 extractie, 2 incubaties bij 40 °C/koelen gevolgd door een extinctie-meting (1). De capaciteit was 18 duplo bepalingen per dag, met pas op het eind de zekerheid dat de analyse ook daadwerkelijk gelukt was. Semi-automatisering door toepassing van glascapillair pipetten en pipetors voor grotere volumina leverde enige verlichting in werklust.

Autoanalyzers volgens het 'continuous flow principe' waren rond 1975 in de Angelsaksische landen massaal in gebruik. Er wordt in deze constructies gebruik gemaakt van een continu stroom van reagentia, lucht en reactiemengsels door teflon slangen van verschillende diameter. Er wordt een lucht-gesegmenteerde vloeistofstroom gecreëerd welke het monster langs een serie stations of posities door de slangen voortstuwt waar op samenvoegpunten reagens wordt toegevoegd of waar processen plaatsvinden zoals: verwarming, dialyse, incubatie, filtratie, of extinctiemeting. Gebruik van deze systemen heeft het aantal analyses dat uitgevoerd kan worden in een bepaald tijdsbestek en op een bepaald monster enorm vergroot. Per dag werden, bij continu gebruik, zo aardig wat bepalingen verricht, dit was kosteneffectief wat betreft reagentia en de personeelsfactor.

Uiteindelijk kwamen de enzymatische methodes in opmars, aanvankelijk weer manueel uitgevoerde macrobepalingen en dat met reagens dat prijzig was. Een van de eerste enzymautomaten voor microbepalingen (ε-340nm registratie in minimaal 0,4 ml mengsel) was de LKB8600. Hierin werd startenzym toegevoegd aan een mengsel van serum en reagens waarna de disposable cuvet enkele keren 360° gedraaid werd in een vortextbeweging. Qua kosten kregen voor de routine geautomatiseerde chemische methodes de voorkeur en voor micro-analyse, wat de kosten kon drukken, was het wachten op andere hardware.

Hoe ontstond het idee van analyses tijdens centrifugeren?

Dr. Norman G. Anderson van het Oak Ridge National

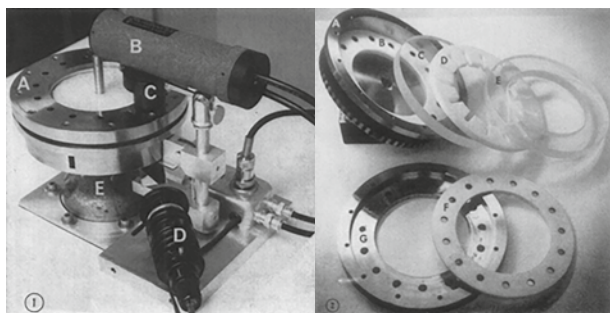
Voormalig product specialist bij Instrumentation Laboratory Benelux BV¹ en voormalig hoofd lab Interne Geneeskunde, Radboud UMC Nijmegen². Secretaris¹ en lid² van de Historische Commissie NVKC

E-mail: hpeek@concepts.nl

* Dit artikel is gedeeltelijk gebaseerd op een manuscript in bewerking: 'The first fifty years of IL. Instrumentation Laboratory 1959-2009' door Han Peek.

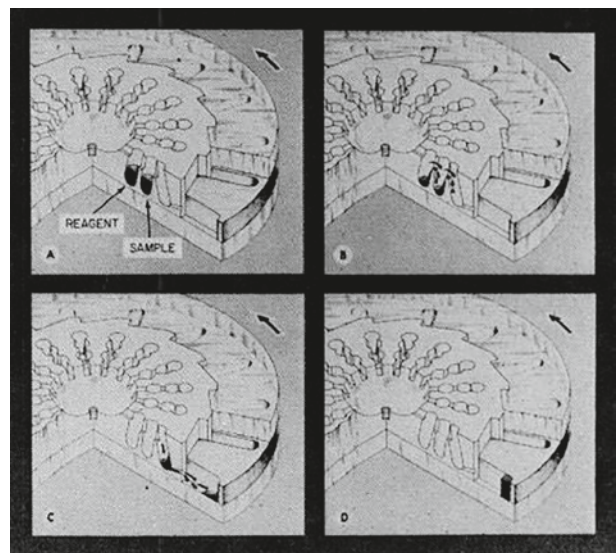
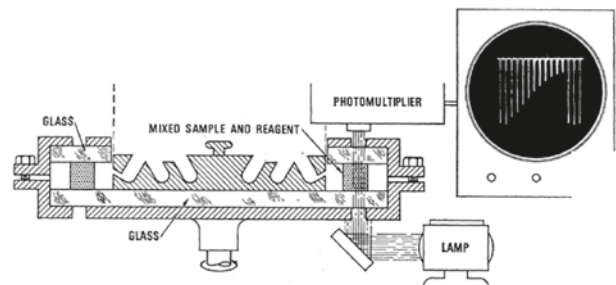
Laboratory, Tennessee, USA (ORNL; een soort TNO). is dé pionier van CFA. Dat zelfs de grote man op Auto-Analyzer-gebied, Dr. Leonard Skeggs, opriep tot de ontwikkeling van nieuwe snelle analytische systemen en ook medici (Dr. Robert Melville van het National Institute of General Medical Sciences in Bethesda, Maryland) de urgentie hiervan bevestigden, motiveerde Anderson tot de ontwikkeling van een instrument dat sneller, selectiever en nauwkeuriger het steeds groeiende aantal monsters in laboratoria kon analyseren. Medefinanciering door Melville was uiteraard een stimulus. Aldus ontstond het samenwerkingsverband GeMSAEC, wat staat voor General Medical Sciences/Atomic Energy Commission. Nog geen jaar later lag er al een patentaanvraag en 3 jaar later een tweede, toegekend aan de Atomic Energy Commission (AEC) (Bijlage A, no's 1-2).

Inspiratie putte Anderson uit zijn dagelijkse werk met zonale rotoren voor de isolatie van microorganismen waarvan aantal/activiteit in de vele fracties bepaald moest worden via microbiologische kweek en GC en HPLC analyse. Anderson kwam, vanuit zijn ervaring met zonale centrifugatie (2, 3), op het idee om de kracht van centrifugeren te gebruiken voor de transfer van reagens en monster; hiervoor was geen pomp nodig zoals bij continuous flow analysis. Anderson redeneerde dus als volgt: als ik die multiple ultracentrifugebuizen in mijn rotor meer horizontaal krijg; die buizen gebruik als cuvetten en ik stuur daar van boven af een lichtstraal doorheen, zoals bij analytische ultracentrifugatie de praktijk was, dan ben ik na centrifugatie een aantal stoorfactoren kwijt zoals lucht-bellen en sediment gevende troebelingen. Met deze experimentele G-I rotor zijn inleidende experimenten gedaan. Voor meer definitieve studies werd een 15 cuvet rotor (G-II) ontworpen, dit is een rotor die uit 7 onderdelen bestaat en die elke keer gedemonteerd moest worden om te reinigen (figuur 1). Anderson heeft diverse rotortypes geëvalueerd, veelal multicomponent rotoren met boringen in verschillende helling, diepte en radiaal (3-5), echter we concentreren ons nu vooral op de G-II rotor in de GeMSAEC analyser (2,6). De eerste resultaten hiermee gedaan stimuleerden tot verdere voortgang op deze weg. Anderson benoemde de volgende positieve punten:



Figuur 1. 1. De G2 cuvet rotor. A) cuvet rotor; B) fotomultiplierhuls; C) houder voor de filters; D) lichtbron met diafragma; E) drive van de centrifuge. 2. gedemonteerde G-II rotor: A) onderste rotorbodemp; B) onderste dichtring (pakking); C) onderste Pyrexplaat; D) Teflon cuvet'spacer'; E) bovenste Pyrex ring; F) bovenste Teflon dichtring; G) bovenste RVS eindplaat.

- door een gemeenschappelijk startpunt verlopen alle reacties parallel; het levert tevens de mogelijkheid op om voor elk monster een blanko te bepalen en hiervoor te corrigeren
- het principe is voor elke seriegrootte geschikt
- de analist is erg betrokken; het werk is snel en flitsend vergeleken met het slaapverwekkende tempo in de continuous flow, het volgen van de reacties maakt tussentijds ingrijpen mogelijk
- de CFA is zuinig met monster en reagens
- monster en reagens zijn nauwkeurig te pipetteren (vooralsnog als een 10-voudige verdunning)
- de volgorde van de bepalingsstappen is goed te vertalen in een CFA
- datareductie laat de betrouwbaarheid onverlet maar verbetert de efficiëntie
- geen carry-over
- op alle fronten is via de CFA een vereenvoudiging van het analyseren mogelijk



Figuur 2. Boven. Schematische voorstelling van de GeMSAEC rotor GIIIA met een extra boring voor de incubatie van het reactiemengsel dan wel voor gelzuivering. Na nog een run pelleteert het precipitaat waarna het supernatant naar de cuvet vloeit. Het stationaire optische systeem is in deze rotor goed zichtbaar met lichtbron, filter en fotomultiplier. Onder. Kinetiek van de transfer. a) reagens reeds gedeeltelijk overgevloeid naar het monster; b) transferproces naar mengkamer; c) transfer van mengsel naar mengkamer compleet; men ziet een onderstroom naar de meetcuvet; d) het mengsel is aangekomen op de meetlocatie; de extintie wordt van boven gemeten (soms van de zijkant, vooral bij fluorimetrie). Aan de bovenzijde ziet men dat alle boringen met een pipet toegankelijk zijn (deksel verwijderd).

Met de G-II rotor (figuur 1, 2) draaiend in een GeMSAEC analyser (fig 1 ref 6) kon Anderson aantonen dat de monsters 'goed' mengden met het reagens, mits niet te visceus. Acceleratie gevolgd door deceleratie stimuleerde de menging. Er werd voor het registreren nog gebruik gemaakt van een oscilloscoop; van het beeld werden foto's gemaakt ter berekening van de piekoppervlakte (piekhoogte x breedte op halve hoogte). De GeMSAEC werd getest voor de biureetreactie (6). De resultaten waren reproduceerbaar; prachtige ijklijnen werden er verkregen! Er werd al gespeculeerd dat een vaste rotor handig zou zijn; het schoonmaken van de G-II rotor was geen sinecure. Met sifons kon men later de rotor leegzuigen en na inspuiten van wasvloeistof zelfs wassen (7, 8). Het daarvoor benodigde vacuüm bleek aan het begin van de analyse, vlak na menging van monster met reagens, te leiden tot luchtbelletjes die verdere menging stimuleerden. Ook werd vastgesteld dat acceleratie/abrupte stop de menging verbeterde.

Deze research leidde einde 1968/begin 1969 tot de opstart van niet minder dan 3 commerciële projecten gestimuleerd door het ORNL. Volgens een betrokkene vanaf 1971 wilde Dr. Anderson heel graag de commerciële potentie van zijn uitvinding aantonen en deze veronderstelt dan ook dat de 'Note added in proof' (pg 562 van ref 2) meer voorbarige publiciteit dan realiteit was¹. Zo kwamen de volgende apparaten op de markt (zie figuur 1 ref 7):

- De eerder gemelde GeMSAEC van ElectroNucleonics Inc (ENI). Deze firma, actief op het gebied van nucleaire installaties, had zich ook al gericht op de ontwikkeling en fabricage van zonale centrifuges. ENI zou het analyzer project onder het acroniem GeMSAEC als compensatie hebben gekregen nadat het gepasseerd was bij een grote opdracht van de AEC voor een nucleaire installatie.
- De computertechnologie afdeling van Tennecomp Inc, een lokale spin-off van ORNL ook uit Oak Ridge, ontwikkelde een analyzer welke de 'Anderson Automatic Analyzer' van Tennecomp-American Instruments Co. werd genoemd. Dit werd later de Rotochem van Aminco.
- De Centrifichem van Union Carbide (Union Carbide voerde voor de Atomic Energy Commission het beheer over het Oak Ridge National Laboratory). Union Carbide verkocht de licentie voor commercialisatie aan Roche. Toen bleek dat Roche zeer succesvol was en dus veel geld verdiende, werd deze licentie weer teruggenomen na afloop van de overeengekomen periode. Daarna bracht Roche de zelf ontwikkelde Cobas-Bio op de markt.

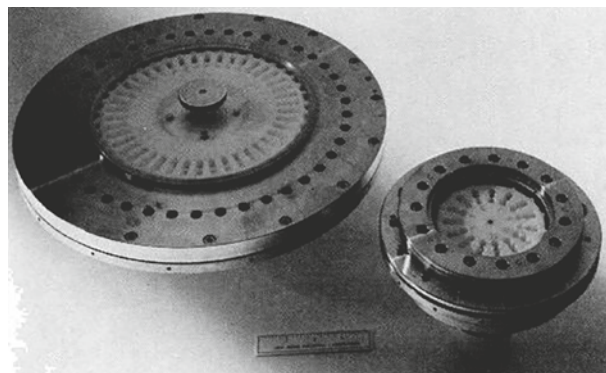
Het principe is er, maar wat kun je er nu allemaal mee?

Anderson als enige auteur (4) beschrijft als een echte wetenschapper vele fundamentele onderzoeken over wat er allemaal mogelijk is met CFA. Daaronder evaluatie van allerlei rotorvarianten waarmee, na menging

van monster en reagens, het gevormde precipitaat verwijderd wordt, of het monster met een gel voorgezuiverd wordt met toepassing van een extra boring als incubatiecuvet (figuur 2). Met een dergelijke rotor kon ook plasma van cellen worden gescheiden waarna een kleine plasmafractie naar een reactie wordt geleid (4, 5). Los van de 'kwalitatieve' rotor experimenten werden in (4) ook vele technische vorderingen beschreven. Dit betreft; onder andere, de overgang van analoog (direct display oscilloscoop) naar digitaal (computer). Met aanpassing van softwareprogramma's ontleend aan analytische ultracentrifugering, was een significante datareductie mogelijk met winst in de mechanisatie en controle van de apparatuur (feedback controle en monitoring). De monster-blanke waarde kon veel sneller worden berekend, voorheen kostte een dergelijke analyse 20 minuten. Bovenstaande hints om tot een goede menging te komen (acceleratie/deceleratie; vacuüm) werden ingebouwd en hadden inderdaad het gewenste resultaat, zelfs voor monsters met een verhoogde dichtheid of viscositeit. Opgemerkt werd dat luchtballen die normaal aan de cuvettrand bleven hangen nu afwezig waren; troebelingen waren als een sediment zichtbaar. Tot slotte nog even aandacht voor een cassette in carrouselformatie (figuren 10 en 11 ref 4), die nauwelijks nog aan een rotor deed denken maar veel leek op de latere cuvetten-carrousel van de Cobas Bio. Voor het eerst paste men hier drempels toe om, vóór het centrifugeren, monster en reagens gescheiden van elkaar te houden. Om nog een keer terug te komen op de rotor: er werd gewerkt met Pyrex glas dat bruikbaar was voor metingen tot 340 nm. In het diepere UV werden kwarts cuvetten gebruikt. Deze Science publicatie (4) bevestigt dat Anderson als geestelijke vader van de CFA kan worden gezien. Voor verdere perfectivering van de CFA zorgden Anderson's assistenten; vooral Burtis en Tiffany. De resultaten van beiden op het gebied van CFA zijn neergelegd in diverse publicaties in Clinical Chemistry en patenten (Bijlage A no's 3-5, resp. Bijlage A no 6).

Naar een verdere toepassing in de klinisch chemische analyse, de periode Burtis

Nog steeds op de GeMSAEC richtten Burtis e.a vooral de aandacht op kwantitatieve aspecten. Het bleek dat het tempo van het analyseren direct evenredig was met



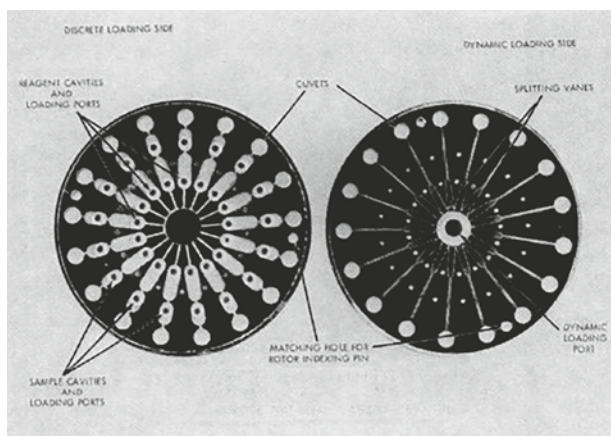
Figuur 3. Vergelijking van rotoren. Rechts: de klassieke en kleine GIIc rotor (capaciteit 15 plaatsen) met links de G-IIIA rotor (capaciteit 42 plaatsen). Ook deze rotor bestond uit losse schijfdelen zoals getoond in figuur 1 onder.

¹ Persoonlijke mededeling van Tom Tiffany: per e-mail van 9 juni 2014

het aantal cuvetten, zo werd er een vergelijk gedaan van 15, 16, 30 en vooral 42 plaatsen, deze laatste rotor (figuur 3) kreeg de naam: rotor G-III A (9). De rotor maakte allereerst een aanpassing van de software nodig omdat nu 42 monsters tegelijk geanalyseerd moesten worden. De grotere rotor vereiste een sterkere motor van 1 pk in plaats van ¼ pk; vooral ook om een goede menging van monster en reagens te verkrijgen via acceleratie en stop. Verder werd er een 'washer' ingebouwd; de rotor draait in een RVS 'pan' die zowel bedoeld was als schild maar ook voor de afvoer van spoelvloeistof. Bovendien houdt deze pan licht en stof buiten. De rotor wordt gekoppeld op een holle schacht, voor de aanvoer van lucht, vacuüm en water. Om terug te gaan naar de G-III A rotor; deze was van RVS, glas en teflon; hier geen Pyrex window maar een van 'Chemcor' glas (Corning Glass Works; ook toegepast in de Lunar Landing Module). Dit is sterker zonder aan optische kwaliteit in te boeten (werkt tot <330nm). De rotor had ten behoeve van de temperatuur monitoring 2 thermistors ingebouwd (5, 10).

Burtis e.a. zetten stevig in op verdere opwaardering van de analyzer ten behoeve van de klinische chemie. Standaard is er nu een programma voor calibratie, kinetische- en eindpuntsmetingen.

Men test de inzet van kleinere volumina: 10 tot 50 µl monster welke met 400 µl reagens geanalyseerd worden. Het is een probleem om 10 µl direct te pipetteren. Het monster wordt daarom 20 keer verdund waarbij men 200 µl inzet met een Oxford handpipet. Dit mengt men dan met 400 µl reagens welke met een Hamilton precisie dispenser wordt ingepipetteerd. Burtis e.a. voelen dus een sterke behoefte aan een autosampler (12); deze zou kosteneffectief zijn omdat men met 5 keer minder van het dure reagens kan volstaan. De capaciteit van de G-III A rotor ligt bij 123 tot 164 monsters/uur, afhankelijk van de bepaling. De uiteindelijke analyse is dan als volgt: na inpipetteren van monster en reagens in gescheiden compartimenten,



Figuur 4. De ORNL 17 cuvetrotor. Bovenaanzicht toont de radialen met daarop openingen voor het introduceren van reagens (meer centraal) en monster (decentraal). Na centrifugeren belandt alles in de cuvetten (uiterst decentraal). Het is duidelijk te zien dat de openingen zowel radiaal (binnen een cuvet) als concentrisch gerangschikt zijn (alle cuvetten omvattend). De onderkant toont de spleetvenen voor dynamisch introductie vanaf de centrale as van vloeistoffen om na analyse de rotor te wassen. De diameter van de rotor is 9 cm.

draait men allereerst bij 300 rpm voor het 'tempereeren', vervolgens versnelt men direct naar 1100 rpm, zet de motor uit waardoor deze afremt tot 500 rpm; bij vacuümtrekken ontstaan luchtbelletjes wat menging stimuleert; vervolgens versnelt men weer tot 1500 rpm gevolgd door afremmen tot 500 rpm weer gevolgd door vacuümzuigen. Na analyse (bij 500 rpm) wordt de rotor vacuüm leeggezogen, daarna wordt spoelwater geïntroduceerd en weggezogen. Experimenteel bleek één wascyclus voldoende te zijn, maar de auteurs geven toe dat het allemaal efficiënter kan. De precisie uitgedrukt als CV's bedraagt: 0,5% tot 5,9% (bij hoge respectievelijke lage concentraties). In ruime mate worden er nu ook enzymactiviteiten bepaald, gebruik makend van het kinetische rekenprogramma.

De miniatuur GeMSAEC ontwikkeld door Burtis e.a.

In een volgend artikel zijn Burtis en collega's inmiddels overgegaan op de miniatuur analyzer met een omvang van 0,3 m³, verder uitgerust met een miniatuur fotomultiplier tube en een dito oscilloscoop (12). De rotor draait langs een stationair optisch systeem. De uiteraard ook nieuwe rotor is een 17 cuvet plastic rotor (figuur 4), veel goedkoper ook in gebruik, omdat de lange was- en droogstap overbodig is. De rotor bestaat uit een bodem van zwart acrylplastic en vensters van UV doorlaatbaar acrylplastic samengelijmd (Rohm and Haas Philadelphia, USA)

Deze miniatuur analyzer verwerkt monstervolumina van slechts 1 tot 10 µl waarbij reagensvolumina nodig zijn van 70 tot 110 µl. Monster zowel als reagens worden discreet via 2 concentrische gaten in de 'wells' gepipetteerd, nog wel manueel. Men heeft de precision liquid dispenser van Hamilton inmiddels leren waarderen; echter om 10 µl monster te kunnen analyseren verdund men nog steeds 5 keer waarna men dus 50 µl analyseert. Na analyse wordt de rotor vacuüm leeggezogen, daarna gewassen met aqua dest, gespoeld met methanol en gedroogd aan de lucht

De start van de analyse is tot 500 rpm vertraagd om spetteren te voorkomen, daarna zijn er 2 snelle 'accelerating/stop' stappen, elk voor 10 sec, wat afdoende menging oplevert. De analysetijd is afhankelijk van het soort bepaling en bedraagt minimaal 2 en maximaal 12 minuten per run wat een totale capaciteit oplevert van 200 respectievelijk 40 monsters per uur met een VC van 1 tot 4%. De data worden 'real time' verwerkt met een on-line Digital computer 8kRam/64kB met bestaande GeMSAEC software.

Het goed functioneren van de miniatuur analyzer legt nog eens de vinger op een zere plek; de grote behoefte aan een automatische diluter/sampler. Bijna aan het eind van het hele GeMSAEC project slagen Burtis e.a.(12) er in hier een doorbraak te forceren met toepassing van al op de markt beschikbare maar gemodificeerde 'Inlap Automatische Diluter-Sampler' (Natl. Instr.Labs, Inc., Rockville, Maryland) met daaraan toegevoegd een 'Precision Liquid Dispenser' (Hamilton Co. Whittier, California). Om deze diluter/sampler te incorporeren zijn er uiteraard weer wijzigingen in de analyzer nodig en wel in de pomp en draaitafel; ook komt er een monstercarrousel bij. Met deze automa-

tische sampler diluter wordt een flinke tijds winst geboekt; wat manueel 15 min vraagt kan nu in 3,5 min. Helaas, in de benodigde slangen en pomp treedt een extra carry over op: -range 4,7% tot 0,8% bij een diluent-to sample ratio van 1:1 tot 5: 1; daarentegen is bij een ratio > 4 de carry-over verwaarloosbaar.

Het is zeker vermeldenswaardig dat nu een 3 keer betere precisie kan worden verkregen van rond de 0,5% bij het analyseren van vooral serum, dat is wat visceuuzer dan waterige oplossingen. Dit verklaart waarom men vanaf nu geen primaire standaarden meer meeneemt maar serum calibratoren. Niet alleen een veel betere precisie is hiermee verzekerd maar ook worden hier matrix effecten mee gecontroleerd.

In het slot van het 1972 artikel (12) stellen Burtis e.a. ten aanzien van de applicatie: "useful in diverse areas such as emergency wards, small clinics, under emergency conditions, and even as an on-board analyzer for use in an orbiting space laboratory" (aan het pipetteren van vloeistoffen in de ruimte was kennelijk nog geen aandacht besteed). De gedachten over een mogelijk toepassing in de ruimte ontstonden dus pas 4 jaar na het basis concept van Norman G. Anderson; de hoge werkdruk vanwege de grote behoefte aan nieuwe analyzerconcepten was de werkelijke aanleiding. Hiermee is de mythe rond de primaire ontwikkeling voor een toepassing in de ruimtevaart doorgeprikt. In het verlengde van de speculatie door Burtis e.a. suggereerde Dr. Anderson toen aan Dr. Sherman P. Vinograd, hoofd van de Medical Research Division van het 'Directorate of Space Medicine' van NASA, dat "de CFA's nuttig zouden kunnen zijn in de ruimte, aangezien ze hun eigen zwaartekracht verzorgden in een zwaartekrachtloze omgeving". Dit is kennelijk bij een korte visionaire suggestie gebleven, aangezien er pas in 1993 een serieuze publicatie verscheen (13). Hierbij ging men overigens uit van de droge chemie, zoals ontwikkeld en toegepast door Eastman- Kodak. In dit verband is het vermeldenswaardig dat Dr. E. Harris en Dr. S.R. Pool van de NASA bedankt werden voor 'het technische advies en de opbouwende kritiek'.

Nieuwe berekeningsprogramma's, de periode Tiffany

In 1974 komt ten slotte Dr. T Tiffany met een artikel over de theorie en toepassing van de kinetische- en eindpunt snelheidsanalyse. In FOCAL (Digital Equipment Co) worden 2 berekeningsprogramma's gemaakt; enerzijds voor enzymatische- (inclusief monster blanco's) en anderzijds voor een eindpunts-analyse, daarnaast berekent dit programma ook een ijklijn op basis van referentiestandaarden (14). Tot slot geeft dit programma informatie over actuele datum, naam van de analist, de benodigde tijd voor de opstart van de analyses, de reactietijd, aantal readings en de concentraties van de standaarden (indien gebruikt), etc. Dit stelde een laboratorium in staat onafhankelijk van de ziekenhuiscomputer te functioneren. In plaats van ijksera wordt aangetoond dat ook de molaire absorptiecoëfficiënt kan worden gebruikt om de gevonden extinctieverschillen om te rekenen in concentraties.

Dit alles sluit nauw aan bij de nieuwe mogelijkheden die de enzymatische methodes verschaffen.

Tiffany maakt gebruik van een 15-cuvets rotor system met kwarts vensters. Uiteraard zijn er ook nu weer wijzigingen in de analyzer, nu genoemd; G-IIC-system (figuur 4), zoals een sterke gradiënt monochromator (Bausch & Lomb 33-86-07; 200-700 nm) voor metingen tussen 340 nm en 620 nm, resp. in het UV <340-nm en een nieuwe recording spectrophotometer. Pas in 1977 wordt dan door Dr. Tiffany e.a. een rotor beschreven en gepatenteerd die het ei van Columbus blijkt.

Reagens ontwikkeling door Tiffany

De totaal eiwitbepaling met het biureetreagens was veelal de eerste test die op deze miniatuur analyzers geapliceerd werd. Dr. Tiffany ontwikkelde snelle twee-punts, eerste orde kinetische reacties voor ureum, creatinine, totaal eiwit, urinezuur e.d. (14, 15)². Echter, vooral de enzymatische meetmethoden droegen sterk bij aan de verdere popularisering van de CFA. Steeds sneller werden de chemische methodes vervangen door enzymatische, niet alleen bij 'single tube substraat-testen' maar ook bij enzymactiviteitsmetingen. Vele andere testen zoals nefelometrische en fluorimetrische testen zouden volgen t.b.v. bloedgroepen en immunologische parameters (15). De klinische chemie bereikte hiermee de volwassenheid; de vele testen konden nu snel en met een goede kwaliteit op één en hetzelfde apparaat worden uitgevoerd. Het hoeft dan ook niet te verbazen dat vanaf 1980 er steeds meer aandacht kwam voor kwaliteitsbewakingsprogramma's.

De commercialisering van de (voorlopers) van de Multistat III: een spannend avontuur op onbekend terrein

Op de Oak Ridge Conference in 1973 sprak Dr. Tom Tiffany met Dr. Gilbert Manning, klinisch chemicus van het Sacred Heart Medical Centre in Spokane, Washington.. De zeer geïnteresseerde Dr. Manning stelde toen de vraag: wie gaat de miniatuur CFA commercialiseren? Toen hij enkele maanden later de vraag opnieuw stelde werd hij door Tiffany voorgesteld aan zijn naaste collega's bij het ORNL (o.a. Dr. Anderson en Dr. Burtis). Tiffany gaf de stappen aan om toestemming te krijgen van de AEC om de ONRL miniatuur CFA commercieel te ontwikkelen.

De CFA was ontwikkeld met geld van de Atomic Energy Commission; Amerikaanse bedrijven kregen daarom kosteloos een licentie van de AEC, terwijl niet-Amerikaanse bedrijven een vergoeding moesten betalen, zoals het Zwitserse Roche dat de eigen Cobas-Bio ging ontwikkelen. In mei 1974 werd toen de Micro Biochemical Research Corporation (MBRC) opgericht met Manning, Tiffany, Coelho en Thayer allen als directeur/eigenaar en Smith-Kline Diagnostics (SKD) als medefinancier. De teamleden spendeerden al hun vrije tijd aan de ontwikkeling van een prototype van de Micro Centrifugal Analyzer (MCA). Deze kwam binnen 2 maanden (eind juli 1974) beschikbaar.

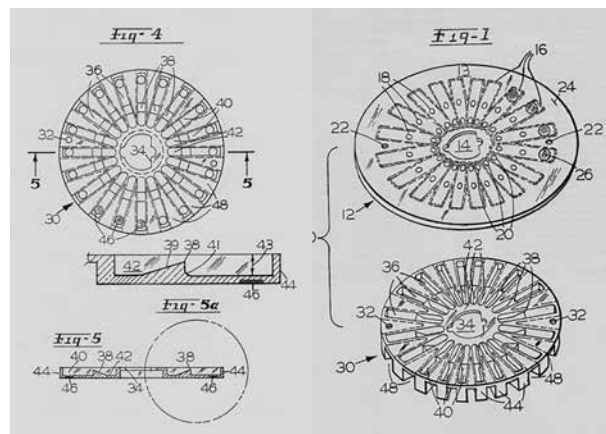
² Persoonlijke mededeling van Tom Tiffany: telefonisch op 29 juli 2006 en per e-mail op 8 september 2006

Vertegenwoordigers van Smith-Kline Diagnostics reisden toen naar Spokane om de MCA te bekijken. De eerste ORNL CFA's hadden nog een acryl rotor uit drie delen op basis van zwart acryl, met ruimten voor monsters en reagentia. De rotorbasis werd handmatig gemaakt met de hulp van een precisie freesmachine. Deze basis kon ook in Spokane gemaakt worden, maar men realiseerde zich dat de CFA met handgemaakte rotoren nooit een commercieel succes kon worden. Verdere brainstorming door het team van vier resulteerde in een tweedelige 20 cuvettes acrylrotor, met toepassing van het spuitgiet-proces. Het onderste deel bevatte de cuvet en de ruimtes voor monster- en reagens, het bovenste was een ultraviolet doorlaatbare deksel. Beide delen werden ultrasoon aan elkaar geseald (Bijlage A patent 6) (figuur 5).

Het MBRC team ontwikkelde vervolgens een tweede CFA prototype dat al erg leek op de latere Multistat III. Helaas, specialisten van medefinancier Smith-Kline Diagnostics, bekend met kleine chemie-automaten, vonden dit prototype toch veel te groot en te gecompliceerd. Smith-Kline Diagnostics haakte af bij het nieuws dat Roche een concurrerend product aan het ontwikkelen was, nl. de Cobas Bio. Dat was noodgedwongen omdat Union Carbide had besloten de verkoop van de Centrifichem weer in eigen hand te nemen. Men zag met lede ogen de winsten van Roche met 'hun' Centrifichem aan. Bij deze ongunstige verwachtingen annuleerde Smith-Kline Diagnostics de bestaande contracten, waarna MBRC zich weer, na terugkoop, eigenaar van alle rechten kon noemen. Een daaropvolgende inventarisering van de markt, leidde niet tot een samenwerking met enige verkooppartner tot in november 1976 het tij keerde.

Het tij mee: een aparte divisie van IL met wereldwijde verkoop

Getipt door een eigen marketingmedewerker van IL bezochten Tom Kelley en Steve Malin (resp. Manager Applied Research en Manager Advanced Development Services van Instrumentation Laboratory) de firma MBRC in Spokane. Volgens een persoonlijk verslag van Dr. Tom Kelley³: 'In ruim een halve dag raakten wij (Kelley en Malin) erg onder de indruk van het getoonde, werkende prototype, waarna we onze directie positief adviseerden'. Ruim een maand later (midden december) kwam een niet meer verwacht verzoek van IL om eind december het prototype met de nieuwe rotoren in hun bedrijf in Lexington, Massachusetts (een afstand van ruim 4.000 km) te komen demonstreren. Het MBRC team landde in Boston in een hevige sneeuwstorm. Eenmaal geland, werden ze door Tom Rosse, de directeur-eigenaar van IL, persoonlijk afgehaald waarna men direct doorging naar één van de researchlaboratoria van IL in Lexington. Het prototype werd uit de ijskoude verpakking gehaald en op een tafel geplaatst samen met het pipetteerstation. De analysator was zo koud dat er niet eens een temperatuur op het informatie-



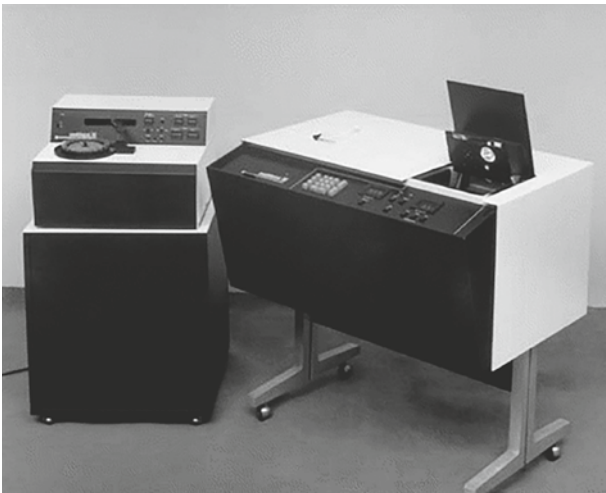
Figuur 5. De Tiffany disposable cuvetrotor. Links boven; bovenaanzicht; met de 20 cuvettes radiaal gelegen met de UV doorlaatbare plek (no 46) voor de extinctiemeting. Links midden; dwarsdoorsnede van een radiaal, met in het midden een barrière die voorkomt dat het monster (links) (42) spontaan mengt met het reagens (rechts); pas bij >500 rpm stroomt het monster naar de reagenskant alwaar een extinctiemeting mogelijk is (43 en 46). Rechts boven; bovenaanzicht met de pipitteenopeningen voor monster en reagens georiënteerd in een kleine- respectievelijk een grote concentrische ring van openingen. Rechts onder; hier ziet men duidelijk de driehoekige wigvormige cuvetten (44); (32) is de UV meetplek.

Er zijn gepaarde optische vensters in zowel boven- als onderkant, ze zijn axiaal gerangschikt boven de buitenste (reagens)kamer. Dit vormt een lichtweg door de kamers. Daarnaast is er een soortgelijk venster in de cirkelvormige buitenkant van elke cuvetkamer voor het meten in die kamer van lichtverstrooiing of fluorescentie. In het deksel lopen 2 concentrische ringen met een gat boven elke cuvet voor het injecteren van monsters respectievelijk het reagens. Na het pipetteren zorgt de wigvormige drempel ervoor dat beide gescheiden blijven tot dat de rotor 500 rpm heeft bereikt.

scherm van de Multistat kon worden afgelezen. Tom Tiffany bereidde een glucosereagens en draaide een serie controles, 20 tests inclusief een waterblanko. De resultaten hadden een CV van ca. 1%. Dit maakte zo veel indruk op Tom Rosse dat hij groen licht gaf om MBRC over te nemen. De contracten werden spoedig daarna getekend, echter alle vier de eigenaren werden verplicht stafmedewerkers van IL te worden en naar Lexington te verhuizen, terwijl ze alle vier al een full-time baan hadden in Spokane. Dit werd opgelost door de nieuw gevormde Micro Chemical Division in Spokane te houden. De Multistat III werd geïntroduceerd van 3-10 maart 1977 tijdens de bijeenkomst van de American Association of Clinical Pathologists in het Miami Beach Convention Center in Miami, Florida (figuur 6). Tussen april 1977 tot april 1980 werden met dan 400 Multistat's III verkocht; de Multistat III met Fluorescentie, geïntroduceerd in 1980, werd in het eerste jaar al meer dan 140 keer verkocht. Ook de Nederlandse klinisch chemische laboratoria lieten zich niet onbetuigd als afnemers, daarbij geholpen door een verdere verlaging van de analyseprijs. Dit nadat een Nederlandse firma met een cuvettenwasher kwam, die hergebruik van deze disposable cuvettenrotor mogelijk maakte.

De verkoop van de Multistat III werd in 1986 beëindigd, evenals die van de Multistat III met Fluorescentie.

³ Persoonlijke mededeling van Tom Kelley: per e-mail op 20 september 2006 en telefonisch op 26 maart 2007



Figuur 6. De Multistat III met links de autopipettor/diluter voor het inpipetteren van de monsters en het reagens in de rotor.

In 1985 kwam IL met een opvolger: de Monarch. Deze had een rotor met 39 plaatsen en een geautomatiseerd laad- en transportstation voor een aantal rotoren. Bovendien was toen ook de Hitachi 705 op de markt gekomen.

Discussie

Dit artikel is een aardig tijdsdocument, het geeft inzicht hoe inventieve onderzoekers werkzaam in grote overheidsinstituten financieel goed gesteund worden en profiteren van andere uitvindingen gedaan in een periode van veel innovatie. In deze instituten werkte men jarenlang samen met dezelfde medewerkers van verschillende expertise. Ook de Nederlandse Universiteiten beschikten toen over goed geoutilleerde mechanica-afdelingen welke nu wegbezuinigd zijn met als argument dat; instrumentontwikkeling een toegenomen expertise vroeg.

Dr. Norman G. Anderson kan als de geestelijke vader van de CFA worden gezien wat onderstreept wordt door zijn solo-publicatie in Science (4). Anderson blijkt een inventief wetenschapper die op 5 thema's 253 publicaties scoorde. Het komt ons voor dat deze onderzoeker met de vele rotor uitboorexperimenten de realiteit enigszins kwijt was. Echter, Anderson was gedreven om de verwisseling van monsters tijdens een analyse te minimaliseren. Het precies afstemmen van helling en volume van deze boorgaten vraagt veel tijd. Afwijkingen van de scheidingsdetails lijken ons al snel problemen te geven. In de lijn van het doel werden er zelfs rotoren ontworpen waarbij voorafgaande aan de analyse een precipitatie-reactie of kolomzuivering geschiedde. Dit vereiste een extra incubatiecuvet waar het mengsel de tijd krijgt om te reageren. De grote dreiging van hepatitisbesmettingen op het laboratorium verklaart mogelijk dat deze analyseerrotoren met voorafgaande zuiveringsstap en alle andere cuvetrotoren pas toekomst hadden als ze ook disposable waren. Toch zijn ook hier diverse publicaties over geschreven. Het artikel toont aan dat het lang wachten was op een autosampler/diluter met een aanvaardbare CV. Later werd aangetoond dat glascapillaire cuvetten veel accurater en precieser zijn dan pipetten met

Uit dit project kwamen de volgende patenten voort:

- 1) Anderson NG.: Multistation, single channel analytical photometer and method of use. Patentaanvraag op 18-12-1968, toegekend op 12-10-1971 met patentnummer 3,555,2843.
- 2) Anderson NG et al.. Compact dynamic multistation photometer utilizing disposable rotor. Patentaanvraag op 6-10-1972, toegekend op 19-03-1974 met patentnummer 3,798,459.
- 3) Burtis CA et al: Whole blood analysis rotor assembly having removable cellular sedimentation bowl. Patentaanvraag op 30-07-1974, toegekend op 26-08-1975 met patentnummer 3,901,658.
- 4) Burtis CA et al. Rotor assembly and method for automatically processing liquids. Patentaanvraag op 30-05-1989, toegekend op 22-12-1992 met patentnummer 5,173,262.
- 5) Burtis CA. et al: Automated sample-reagent loader. Patentaanvraag op 13-04-1973, toegekend op 17-12-1974 met patentnummer 3,854,508.
- 6) Tiffany TO et al. 'Disposable multi-cuvette rotor'. Patentaanvraag op 29-08-1977 toegekend op 7-10-1980 met patentnummer 4,226,531.

een disposable punt, tenzij men deze voorspoelt (16). Geheel onafhankelijk van deze klassieke waarnemingen bleek dat serumcalibrators ipv water/detergent gebaseerde standaarden de CV behoorlijk verbeterden. Het lijkt er dus op dat de 'winst' in precisie t.g.v. de geïntroduceerde autosampler/diluter vooral op het conto is te schrijven van materiaalkeuze wat betreft pipetten en serumcalibrators (16).

Anderson's assistent Burtis speelde een voorname rol in de uiterst belangrijke afrondingsfase. Zijn talenten komen ook tot uiting in aan hem verleende patenten. Carol A. Burtis werd later klinisch chemicus en co-editor van het bekende Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier Health Sciences, 2012. In de tweede druk is hij er voor verantwoordelijk dat het hoofdstuk gewijd aan de continuous flow analyse vervangen wordt door een over CFA's. Duidelijk is dat Dr. Gilbert Manning de aanzet gaf en de drijvende kracht was achter het commercialiseren, waarbij Dr. Tom Tiffany een unieke bijdrage leverde in de ontwikkeling van de disposable rotor. Eerder beschreven we dat Anderson in een kunststofrotor al een drempel had aangebracht. Echter monster en reagens werden sequentieel na elkaar ingepipetteerd wat meer tijd kost. Het patent aan Tiffany op de uiteindelijke rotor werd 5 jaar later verleend dan dat aan Burtis, bovendien in een geheel andere setting werkend, nl bij MBRC met een contract met SmithKline Diagnostics.

Literatuur

1. Demacker PNM, van Oppenraay JBHA, Baadenhuizen H, Jansen AP. An improved semi-automated method for the colorimetric determination of triglycerides in serum. *Clin Chim Acta*. 1975; 64: 45-50.
2. Anderson NG, et al. Analytical techniques for cell fractions. XII. A multiple-cuvet rotor for a new microanalytical system. *Anal Biochem*. 1969; 28: 545-462.
3. zie: bibliografie Norman Gulack Anderson op Google en ook http://www.viraldefense.org/bibliography_nga.htm; al waar de papers onderverdeeld zijn in de onderwerpen: virus isolation and characterization; centrifuge technology development, centrifugal clinical analyzers, proteomics en miscellaneous.
4. Anderson NG. Computer Interfaced Fast Analyzers. *Science* 1969; 166: 317-324.
5. Anderson NG, et al. Analytical techniques for cell fractions. XVI. Preparation of protein-free supernatants with a 'Z'-path rotor. *Anal Biochem*. 1969; 31: 272-278.
6. Hatcher DW, Anderson NG. GeMSAEC: a new analytic tool for clinical chemistry. Total serum protein with the biuret reaction. *Am J Clin Path*. 1969; 52: 645-650.
7. Anderson NG. Analytical techniques for cell fractions. XIV. Use of drainage syphons in a fast-analyzer cuvet-rotor. *Anal Biochem*. 1969; 32: 59-69.
8. Mashburn DN, Steven, RH, Willis DD, Elrod LH, Anderson NG. Analytical techniques for cell fractions. XVII. The G-IIC fast analyzer system. *Anal Biochem*. 1970; 35: 98-112.
9. Burtis CA, Johnson WF, Attrill JE, Scott CD, Cho N, Anderson NG. Increased rate of analysis by use of a 42-cuvet GeMSAEC fast analyzer. *Clin Chem*. 1971; 17: 686-695.
10. Brantley JN, Willis DD, Breillatt JP, Gibson RF, Patrick LC, Anderson NG. K-series centrifuges IV. Measurement and control of temperature. *Anal Biochem*. 1970; 36: 434-442.
11. Burtis CA, Johnson WF, Mailen JC, Attrill JE. Automated sample-reagent loader for use with the GeMSAEC fast analyzer. *Clin Chem*. 1972; 18: 433-439.
12. Burtis CA, Mailen JC, Johnson WF, Scott CD, Tiffany TO, Anderson NG. Development of a miniature fast analyzer. *Clin Chem*. 1972; 18: 753-760.
13. Wu AH, Gornet O, Smith-Cronin L, Graham GA, Tonnesen AS, McKinley BA. Preliminary evaluation of an experimental clinical chemistry analyzer developed for space medicine. *Clin Chem*. 1993; 39: 37-44.
14. Tiffany TO, Burtis CA, Anderson NG. Fast analyzers for biochemical analysis. *Methods Enzymol*. 1974; 31(Pt A): 790-833.
15. Price CP, Spencer K. Centrifugal analysers in clinical chemistry. Praeger special studies, Praeger scientific. *Methods in laboratory medicine*. 1980; vol 1: 329-362; 395-410; (ISBN: 003910286-6).
16. Demacker PNM, Vos-Janssen HE, Baadenhuijsen H, van 't Laar A, Jansen AP. Selection of methods for the determination of cholesterol. Thesis Hyperlipoproteinemia: A study on diagnostic methods. Nijmegen 1978. Krips Repro Meppel.

Summary

Peek H, Demacker PMN. *The development of centrifugal fast analyzers, in particular the Multistat III of Instrumentation Laboratory*. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk*. 2015; 40: 257-264.

In the 70s and 80s of last century, the centrifugal fast analyzer (CFA) was the workhorse in the clinical chemistry laboratory for the numerous tests that were done then. As successor to the Technicon Auto Analyzer, the first chemistry machine operating according to the continuous flow principle, the CFA was much more flexible in performing a specific test for a specific sample, especially in combination with enzymatic kits becoming increasingly available. The original concept was devised by Dr. N. G. Anderson. Central was a 15 cuvet rotor where samples and reagents separately were pipetted in. At higher g-values they were mixed, after which the reaction took place with frequent registration of the absorbance in the 15 compartments. Fortunately, the computer became just available, which not only led to a rapid calculation but it also received a supervisory role in the procedures. Further perfecting focused on miniaturization, optimization and automation of cuvet rotor pipetting.

In all of these steps results were achieved as evidenced by the many articles and granted patents. The simultaneous start of the reactions in the cuvet rotor made it possible for each sample to register a reagent blank; convenient for both end-point and kinetic measurements.

A lot of work was put into perfecting the cuvet rotor; in the beginning assembling it from multi components to later as an unity and disposable. Larger cuvet rotors designed by co-workers as Burtis and Tiffany yielded gains in capacity (up to 82 samples in one run), or efficiency. Miniaturization in combination with an efficient sample / reagent loader made it possible to analyse 1-10 µl undiluted sample. A trigger to further miniaturization was the possible deployment in space missions (Spacelab). The enormous need for greater capacity for analysis in medicine, however, was the most important trigger. The sale, however, had just come on stream after a further miniaturization occurred around a 32 cuvet disposable rotor; with full UV transmittance and suitable for fluorimetric analysis.

CFA's, coupled with the increasing availability from 1980 on of enzymatic and immunological reagents, are the basis of a heyday in clinical chemistry. Even routine laboratories were now able to meet the limits for quality control for most analytes.