

Praktické cvičení č.
Letní semestr

datum _____ jméno _____

Téma praktika:

Instalace turbidimetrické a nefelometrické metody

Teoretický úvod:

Nefelometrie a turbidimetrie se používají ke stanovení koncentrací specifických proteinů krevního séra, plazmy, moče a mozkomíšního moku. Reakcí analytu (stanovované bílkoviny) s protilátkou (zpravidla polyklonální) vznikají imunokomplexy, které rozptylují dopadající světlo. (Někdy se hovoří o „imuno“nefelometrii, resp. –turbidimetrii, přičemž předponou „imuno-“ se vyjadřuje použití reakce antigen-protilátka.) Měřit lze buď úbytek intenzity světla dopadajícího ze zdroje na kyvetu (pod úhlem 0° - turbidimetrie), nebo přímo rozptýlené světlo (pod úhlem $15 - 90^\circ$ podle typu přístroje – nefelometrie). Hodnotit lze buď maximální změnu intenzity signálu (end-point), resp. změnu intenzity signálu v čase, kdy se blíží maximální (dvoubodové měření – před a po reakci), nebo rychlost změny intenzity signálu pomocí jeho měření v krátkých časových intervalech (kinetické měření – „rate“).

Závislost signálu na koncentraci stanovovaného analytu je u těchto metod vždy nelineární. Ke kalibraci se používá více bodů, které jsou proloženy křivkou podle programu výrobce (4-parametrová – sigmoidní, kvadratická, kubická či funkce „spline“). Zpravidla se nepoužívá „nulový“ kalibrátor.

Na OKB ÚLM FN Brno jsou specifické proteiny v séru/plazmě stanovovány imunoturbidimetricky na hlavním biochemickém analyzátoru (Cobas 8000). Některé méně frekventované analýzy v séru/plazmě (ceruloplazmin, alfa2-makroglobulin, revmatoidní faktor), stanovení nízkých koncentrací bílkovin v mozkomíšním moku (albumin, IgG, IgA, IgM) a v moči (albumin, IgG, transferin, alfa1-mikroglobulin, alfa2-makroglobulin) jsou prováděna **imunonefelometricky** na analyzátoru **Image 800** (firmy Beckman Coulter) na úseku specifických proteinů a likvorologie. Volné lehké řetězce kappa a lambda v séru jsou na tomto úseku stanovovány **imunoturbidimetricky** na analyzátoru **Optilite** (firmy The Binding Site).

Metody výrobce na analyzátoru Image 800 jsou kalibrovány mnohanásobným proměřením intenzity signálu pro 8 až 12 různých koncentrací analytu. Z těchto údajů je konstruována kalibrační křivka, jejíž parametry jsou obsaženy v čárovém kódu kalibrátoru. Uživatel provede pouze korekci této křivky čtyřnásobným změřením koncentrace jediného kalibrátoru. Analyzátor umožňuje i použití uživatelem definovaných metod/reagencií (UDR – user defined reagent), v takovém případě musí uživatel provést plnou kalibraci (nejméně 4 kalibrátory).

Na analyzátoru Optilite se měří šest kalibračních bodů. Do přístroje se vkládá jediný kalibrátor, který je v analyzátoru automaticky nařazen na šest různých koncentrací. Pro každý bod se provádí jediné měření.

Analyzátor Immage 800 je v březnu 2023 nahrazován analyzátozem **Atellica NEPH 630**. Jedná se o nefelometrický analyzátor firmy Siemens Healthineers, pracující na principu nefelometrie (2-bodové měření s kinetickou kontrolou). Zdrojem světla (840 nm) jen LED (light-emitting diode).

Poznámka 1: Je-li počet měření volitelný, je s výhodou volit při kalibraci dvě měření pro každou koncentraci kalibrátoru.

Poznámka 2: Uživatelem definované metody se v klinických laboratořích používají jen výjimečně – pouze v případě nedostupnosti originální metody výrobce u raritních analýz nebo v oblasti výzkumu. Na validaci uživatelem definovaných metod pro rutinní klinické diagnostické použití jsou totiž v současnosti kladeny akreditačními orgány velmi vysoké nároky.

Okruhy k nastudování a dotazy:

1. Zopakujte si, co je to Heidelberger-Kendalova křivka, ujistěte se, že umíte správně popsát osy x a y grafu a uvědomte si, které tři oblasti na ní rozlišujeme. V jaké oblasti této křivky pracujeme při stanovení specifických bílkovin v biologických tekutinách metodami (imuno)turbidimetrie a (imuno)nefelometrie?
2. Proč je důležité, aby přístroj dokázal detekovat nadbytek antigenu ve vzorku? Znáte nějakou metodu použitelnou pro detekci nadbytku antigenu?
3. Hypoteticky předpokládejme, že pro výzkumné účely chcete vyzkoušet použitelnost nefelometrické metody na stanovení nízkých koncentrací alfa2-makroglobulinu v likvoru na analyzátoru Immage 800 s využitím reagensů pro stanovení alfa2-makroglobulinu v séru. (Pokud nám vše půjde dobře, tak si to v praktickém cvičení zkusíme.) Výrobce udává koncentraci analytu v kalibrátoru **218 mg/dL**. Analyticky očekávané koncentrace alfa2-makroglobulinu v likvoru (normálním nebo patologickém) se pohybují přibližně v rozmezí 0,1 mg/L až 20 mg/L. Použijeme sedm kalibrátorů, přičemž po zředění kalibrátoru výrobcem *Diluentem 1* (Kal 7) budeme dále ředit „dvojkovou řadou“ až ke Kal 1 (viz Tabulka níže). Navrhněte výchozí ředění kalibrátoru výrobce o výše uvedené koncentraci tak, aby bylo možné stanovit koncentraci alfa2-makroglobulinu v likvoru alespoň v těch případech, kdy jsou patologicky zvýšené.

	μL kalibrátoru	μL Diluentu	Výsledná koncentrace příslušného kalibrátoru (mg/L)
Kal 7 (výchozího)	
Kal 6	200 (Kal 7)	200	
Kal 5	200 (Kal 6)	200	
Kal 4	200 (Kal 5)	200	
Kal 3	200 (Kal 4)	200	
Kal 2	200 (Kal 3)	200	
Kal 1	200 (Kal 2)	200	

Přístroje a pomůcky:

Analyzátor Optilite, Binding Site
Analyzátor Immage 800, Beckman

Úkoly:

Účelem praktického cvičení je rámcové seznámení se s imunochemickými analyzátory Optilite (The Binding Site) a Immage 800 (Beckman Coulter) a s postupem při zavádění metody na těchto analyzátorech. Nejprve se seznámte s příbalovým letákem/letáky souprav, které budete používat. Poté proveďte kalibraci vybraného analytu. Změřte kontrolní vzorky a posuďte, zda jejich výsledky leží v povoleném rozmezí. Výsledky pro alespoň jeden vybraný analyt zapište do Tabulky níže. V závěru stručně shrňte svou práci během cvičení.

Pracovní postup:

Varianta 1) Analyzátor Optilite – stanovení volných lehkých řetězců kappa a lambda:

1. Odvíčkujte lahvičky s kalibrátorem a kontrolními vzorky a ujistěte se, že v nich nejsou bubliny/film. Vložte kalibrátory a kontrolní vzorky do stojánku na kalibrátory a kontroly a ujistěte se, že čárový kód směřuje dopředu a je nastaven na lince.
2. Stiskněte tlačítko na krytu prostoru pro vzorky; když kontrolka trvale svítí modře, kryt otevřete. Vložte stojánek a kryt zavřete. Počkejte, až se stojánek nače.
3. Vyberte **F4** → **1 Výběr kal./QC** → **Kalibrace**.
4. Vyberte **Test** a poté klikněte na ikonu **Kalibrovat**.
5. Klikněte na číslo šarže reagentie → **OK** – stav kalibrace se změní na „**Čeká na spuštění**“
6. Přejděte na úvodní obrazovku a vyberte **Spustit**.

Cílové hodnoty kalibrátoru a kontrol jsou obsaženy v čárových kódech na lahvičkách a po vložení reagentie do analyzátoru a načtení kódu se automaticky aktualizují.

Varianta 2) Analyzátor Immage – stanovení IgM v likvoru

Jedná se o metodu výrobce, používáme novou šarži kalibrátoru, kterou je nutné nejprve načíst.

1. Vložíme reagentie do reagenčního karuselu.
2. Kartu s čárovým kódem reagentie zasuneme do drážky prázdného **vzorkového** stojanu. Karta musí být obrácena stejně jako štítek s čárovým kódem stojanu. Načtěte kartu reagentie: z nabídky Menu vyberte **Rgts/Cal** a **Read Cards (F8)**.
3. Z nabídky Menu zvolte v Rgts/Cal **Read Reagent (F1)** a potvrďte OK.
4. Napipetujte 200 μ L kalibrátoru do zkumavky označené čárovým kódem kalibrátoru.
5. Pokud se jedná o nový kalibrátor, musí být nejprve načtena karta kalibrátoru. Kartu s čárovým kódem kalibrátoru zasuneme do drážky prázdného **kalibračního** stojanu. Karta musí být obrácena stejně jako štítek s čárovým kódem stojanu. Z nabídky Menu vyberte **Rgts/Cal** a **Read Cards (F8)**.
6. Nalevo označte metodu, kterou chcete kalibrovat, a zvolte **Request Cal (F4)**, zadejte číslo kalibračního stojánku, zvolte pozici, vyberte LOT kalibrátoru a potvrďte **Save**.
7. Kalibraci spustíme z hlavní obrazovky stisknutím **Run**.

Pokud kalibrace proběhla úspěšně, status Request Cal se změní na **Calibrated**. Výsledky kalibrace je možné vytisknout v **Print Report (F8)**.

**Varianta 3) Modifikace praktického cvičení 15. 3. 2022:
Nefelometr Atellica NEPH 630 firmy Siemens**

Úkol: Proved'te kalibraci metod pro stanovení IgA a IgM ve vzorcích likvoru. Postupujte podle příbalového letáku k reagensiím N Latex IgA (N IGA), kat. č. OQA/11 a N Latex IgM (N IGM), kat. č. OQAC11 (N IGA).

Po úspěšné kalibraci změřte příslušné kontroly. Kontroly u těchto souprav jsou součástí balení (u většiny ostatních souprav se objednávají zvlášť).

Vždy po provedení kalibrace měříme kontrolní materiál.

Výsledky

Metoda:				
Kontrolní vzorky	Váš výsledek	Cílová hodnota	Směrodatná odchylka	z-skóre
LQC				
HQC				

Metoda:				
Kontrolní vzorky	Váš výsledek	Cílová hodnota	Směrodatná odchylka	z-skóre
LQC				
HQC				

Závěr: _____

Literatura:

Štern P. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klin Biochem Metab* 2006; 14(35): No.3, 146-151. (volně dostupné např. přes <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>)

Analyzátor Image – stanovení alfa2-makroglobulinu v likvoru: zadání uživatelem definované metody**Definování údajů pro kalibraci UDR metody**

Spodní mezí povoleného rozsahu hodnot pro protokol je zadaná (nastavovací) koncentrace nejnižšího nenulového kalibrátoru. Horní mezí povoleného rozsahu hodnot pro protokol je zadaná (nastavovací) koncentrace nejvyššího kalibrátoru.

1. Na straně 3 obrazovky Define/Edit User-Defined Chemistry zadejte do pole Levels počet hladin kalibrátoru. Můžete zadat čtyři až devět hladin. V našem případě budeme pracovat se sedmi (7) hladinami.
2. Do pole **Replicates** zadejte počet opakování, která se mají pro každou hladinu kalibrátoru provést. Můžete zadat jedno až devět opakování. V našem případě zadáme dvě (2) opakování.
3. Do pole **Update Level** zadejte číslo hladiny kalibrátoru, pro kterou se má provádět aktualizace jednobodové kalibrace. Můžete zadat číslo od jedné do devíti.
4. Do pole **Replicates** zadejte počet opakování, která se mají pro aktualizaci hladiny provést. Můžete zadat číslo od jedné do devíti.
5. Do každého z polí **Cal Setpoint** zadejte příslušnou zadanou hodnotu koncentrace. Hodnoty koncentrace musejí být uspořádány vzestupně, přičemž hladině číslo 1 odpovídá nejnižší koncentrace. Do každého pole lze zadat nejvýše 7 číslic nebo 6 číslic a desetinnou čárku (tečku).
6. Zvolte **Save** [F9] pro uložení protokolu a údajů o kalibraci.
7. Jděte do obrazovky **User-Defined Chemistries** a zvolte funkční tlačítko **Chem Config** [F9], abyste mohli UDR metodu nakonfigurovat.
8. V obrazovce **Chemistry Configuration** zvolte **UDR Main** [F9] pro návrat do obrazovky User-Defined Chemistries.

Při definování metody budeme vycházet z obdobné metody pro stanovení tohoto analytu v moči. Postup kalibrace je dále podobný jako v předchozím případě. Po proběhnutí kalibrace je však nutné kalibraci přijmout pomocí **Approve Cal (F5)**. V nabídce Select Model (F1) vybereme požadovaný model a potvrdíme OK.

Vždy po provedení kalibrace měříme kontrolní materiál.

Výsledky

Metoda:				
Kontrolní vzorky	Váš výsledek	Cílová hodnota	Směrodatná odchylka	z-skóre
LQC				
HQC				

Metoda:				
Kontrolní vzorky	Váš výsledek	Cílová hodnota	Směrodatná odchylka	z-skóre
LQC				
HQC				

Závěr: _____

Literatura:

Štern P. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klin Biochem Metab* 2006; 14(35): No.3, 146-151. (volně dostupné např. přes <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>)

**Modifikace praktického cvičení 15. 3. 2022:
Nefelometr Atellica NEPH 630 firmy Siemens**

Úkol: Provedte kalibraci metod pro stanovení IgA a IgM ve vzorcích likvoru. Postupujte podle příbalového letáku k reagensům N Latex IgA (N IGA), kat. č. OQA/11 a N Latex IgM (N IGM), kat. č. OQAC11 (N IGA).

Po úspěšné kalibraci změřte příslušné kontroly. Kontroly u těchto souprav jsou součástí balení (u většiny ostatních souprav se objednávají zvlášť).

Stanovení celkové bílkoviny v moči a likvoru metodou poměrové kinetické nefelometrie

Reagencie pro stanovení obsahuje 2,4M kyselinu trichloroctovou

Sample Dilution Volume	1:1 (undiluted)			
Sample or Dilution Volume	15			
Reaction Buffer Volume	0			
Compartment A volume	165 µL			
Compartment B volume	0			

Literatura:

Reiber H. Eine schnelle und einfache nephelometrische Bestimmungsmethode für Protein im Liquor cerebrospinalis. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980; 18: 123-127.