

Mari Eline Solberg

Implementering av Tecan SPARK plateleser til forskning og undervisning

Implementation of Tecan SPARK Plate Reader for Research and Education

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Eli Kjøbli og Kristin Gabestad Nørsett

Mai 2022

Mari Eline Solberg

Implementering av Tecan SPARK plateleser til forskning og undervisning

Implementation of Tecan SPARK Plate Reader for Research and Education

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Eli Kjøbli og Kristin Gabestad Nørsett
Mai 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne bacheloroppgaven ble gitt som en avsluttende oppgave på bioingeniørstudiet ved NTNU i Trondheim. Oppgaven ble gitt av Institutt for bioingeniørfag ved NTNU Trondheim, der det var et ønske om å starte bruken av instituttets nyinnkjøpte plateleser Tecan SPARK.

Jeg vil rette en stor takk til førstelektorene Eli Kjøbli og Kristin Gabestad Nørsett for både faglig og praktisk veiledning til denne oppgaven. Takk til bioingeniørutdanningen ved NTNU, førsteamanuensis Toril Holien og førstelektor Wenche Prestvik for overtakelse av prøvemateriale som ble brukt til utprøvingene av instrumentprotokollen og prosedyrene.

Jeg ønsker også å takke produktspesialist Morten Thorsholt ved Bergman Diagnostika som har vært tilgjengelig for mine spørsmål om Tecan SPARK.

Mari Eline Solberg

Mari Eline Solberg

Trondheim, 19.05.2022

Sammendrag

Bakgrunn: Formålet med denne oppgaven var å starte bruken av plateleseren Tecan SPARK ved instituttet, inkludert å utarbeide en instrumentprotokoll og prosedyrer til instrumentet.

Metode: Til utformingen av instrumentprotokollen og prosedyrene ble det brukt maler for kvalitetssikring av laboratoriearbeid ved NTNU. Innholdet i instrumentprotokollen og prosedyrene ble hentet fra instrumentmanualen og programvaremanualen som ble levert med instrumentet. Prosedyrene og instrumentprotokollen ble utprøvd ved forsøk som hadde til formål å undersøke effekten av ulike innstillinger som ble beskrevet i prosedyrene og instrumentprotokollen.

Resultater: Det ble utarbeidet en instrumentprotokoll, samt prosedyrer for måling av absorbans, fluorescens, kjemiluminescens, celletelling, celleviabilitet og cellekonfluens. Gjennom utprøvingene ble det gjort ulike erfaringer med målemetodene og innstillingene som Tecan SPARK tilbyr. Instrumentprotokollen og prosedyrene var velegnet for utprøving av instrumentet og vil være til stor hjelp ved bruk av instrumentet framover.

Konklusjon: Tecan SPARK har mange målemetoder, hvorav flere har blitt undersøkt og implementert igjennom denne bacheloroppgaven. Prosedyrene og instrumentprotokollen har lagt til rette for måling av absorbans, fluorescens, kjemiluminescens, celletelling, celleviabilitet og cellekonfluens.

Abstract

Background: The purpose of this bachelor thesis is to start the use of Tecan SPARK Plate Reader, including preparation of an instrument protocol and procedures for the use of the instrument.

Method: The preparation of the instrument protocol and the procedures for use of the instrument were based on templates for laboratory quality assurance at NTNU. The contents of the instrument protocol and the procedures were taken from the instrument manual and the software manual delivered with the instrument.

Results: An instrument protocol and procedures for absorbance, fluorescence, chemiluminescence, cell counting, cell viability and cell confluence were established. During testing of the protocol and procedures experiences were made with the different measurement techniques and settings offered by Tecan SPARK. The instrument protocol and procedures proved to be well suitable for operation of Tecan SPARK and will be of great help for the use of the instrument going forward.

Conclusion: Tecan SPARK offers a wide range of measurement techniques, many of which have been explored and implemented by this bachelor thesis. These measurement techniques include absorbance, fluorescence, chemiluminescence, cell counting, cell viability and cell confluence.

Innhold

Forord	i
Sammendrag	ii
Abstract	iii
1. Innledning	1
1.1 Vanlige teknologier i en plateleser	2
1.1.1 Absorbans	2
1.1.2 Luminescens	3
1.2 Måleteknikker og optikk i Tecan SPARK plateleser	7
1.2.1 Programvaren Spark Control Dashboard	7
1.2.2 Absorbansmålinger	10
1.2.3 Fluorescensmålinger	12
1.2.4 Luminescensmålinger	17
1.2.5 “Bright field Imaging” for celledetelling, måling av cellelevabilitet og cellekonfluens	20
1.3 Hensikten med denne oppgaven	24
2. Materiale og metode	25
2.1 Utforming av protokoll og prosedyrer	25
2.2 Utprøvinger av Tecan SPARKs avlesningsfunksjoner og prosedyrer	25
2.2.1 Utprøving av prosedyre for absorbansmåling	25
2.2.2 Utprøving av prosedyre for fluorescensmåling	27
2.2.3 Utprøving av prosedyre for luminescensmåling	29
2.2.4 Utprøving av prosedyre for celledetelling og cellelevabilitet	30
2.2.5 Utprøving av prosedyre for cellekonfluens	31
3. Resultater	33
3.1 Prosedyrer og instrumentprotokoll	33
3.1.1 Instrumentprotokoll Tecan SPARK	34
3.1.2 Prosedyre for absorbansmålinger	39
3.1.3 Prosedyre for fluorescensmåling	43
3.1.4 Prosedyre for luminescensmålinger	49
3.1.5 Prosedyrer for celledetelling	55
3.1.6 Prosedyre for måling av cellelevabilitet	57
3.1.7 Prosedyre for måling av cellekonfluens	59
3.2 Resultat av forsøk for utprøving av prosedyrer	62
3.2.1 Lik absorbansmåling ved bruk av Tecan SPARK og Tecan Sunrise fotometer	62

3.2.2	Fluorescensmålinger viste nedgang i % CV ved bruk av «Multiple Reads per Well»	62
3.2.3	Regresjonsanalyse av luminescensavlesninger viste proporsjonal feil mellom Tecan SPARK og Victor	64
3.2.4	Celletelling viste god korrelasjon i tofoldsfortynninger, men upresisjon ved celleviabilitetsmåling.....	65
3.2.5	Høyere cellekonfluensverdier ved brønmmålinger ift. sentrumsmålinger	69
4.	Diskusjon	72
4.1	Prosedyre og utprøving av metode for absorbanmålinger	72
4.2	Prosedyre og utprøving av metode for fluorescensmålinger	73
4.3	Prosedyre og utprøving av metode for luminescensmålinger.....	74
4.4	Prosedyre og utprøving av metode for celleviabilitetsmålinger og celletelling	75
4.5	Prosedyre og utprøving av cellekonfluensmålinger	76
4.6	Forslag til videre arbeid	77
4.7	Konklusjon.....	78
5.	Referanser	79
6.	Vedlegg	80
	Vedlegg 1: Pakningsvedlegg MONOLISA Anti-HBs.....	81
	Vedlegg 2: Data fra fluorescensmålinger	85
	Vedlegg 3: Data fra luminescensmålinger.....	87
	Vedlegg 4: Data fra celletellingsforsøk	88
	Vedlegg 5: Data fra cellekonfluensforsøk	89

1. Innledning

Innenfor både diagnostikk og forskning sees en utbredt anvendelse av analyseplattformer der man kan analysere mange prøver samtidig. Platelesere er en slik analyseplattform, der avlesningen foregår i en mikrotiterplate med brønner som fungerer som prøveholdere. Ulike prøver pipetteres i forskjellige brønner og analyseringen av alle prøvene skjer i en og samme operasjon. Analyseringen muliggjøres av et avansert optikkssystem, sammen med et programvareprogram som er designet for prosessering og tolkning av signalene. Muligheten til å analysere mange prøver på kort tid bidrar til effektivt laboratoriearbeid, og er nyttig både innen forskning og diagnostikk.

Tecan SPARK er en mikrotiter plateleser som er tilegnet bruk i forskningslaboratorier og er vist i Figur 1. Avhengig av instrumentets konfigurasjon kan instrumentet benyttes til måling av absorbans, fluorescens, «time resolved fluorescence», fluorescens polarisering og luminescens av biologiske og ikke-biologiske prøver, samt billedtaking av fluorescensbilder og «bright field» bilder. Sammen med dette kan avleseren brukes til endepunktsanalyser og kinetiske målinger. Instrumentet leveres sammen med en SparkControl-programvare, som gir brukerkontroll over instrumentet og behandler data fra målingene.



Figur 1: Bilde av plateleseren Tecan SPARK (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 1).

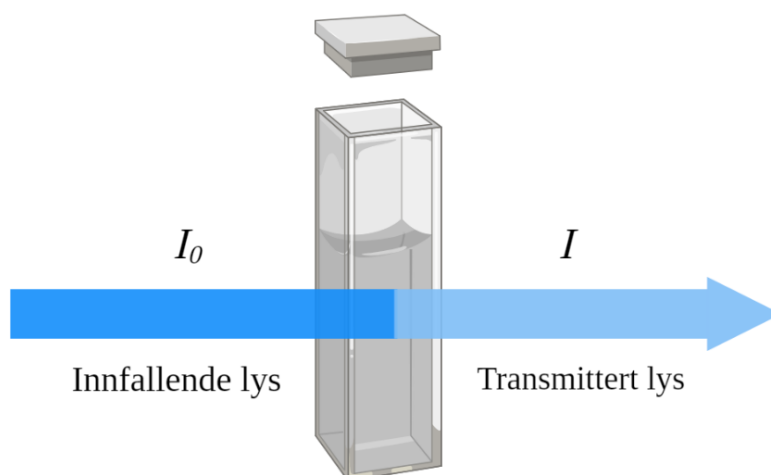
1.1 Vanlige teknologier i en plateleser

1.1.1 Absorbans

Absorbans defineres som mengden av innfallende lys som en løsning vil absorbere ved lyseksposering (Burtis & Burns, 2015, s. 131). Ulike kromoforer har spesifikke og karakteristiske bølgelengder for absorpsjon, og absorpsjonen vil derfor avhenge av bølgelengden til det innfallende lyset. Absorbans og transmisjon er relativt til hverandre, da transmisjon er et mål på mengden lys som passerer gjennom løsningen. Transmisjonen T illustreres i formel (1), der I_0 representerer det innfallende lyset og I representerer intensiteten av det transmitterte lyset.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

Forholdet mellom innfallende lys og transmittert lys er også illustrert i Figur 2.



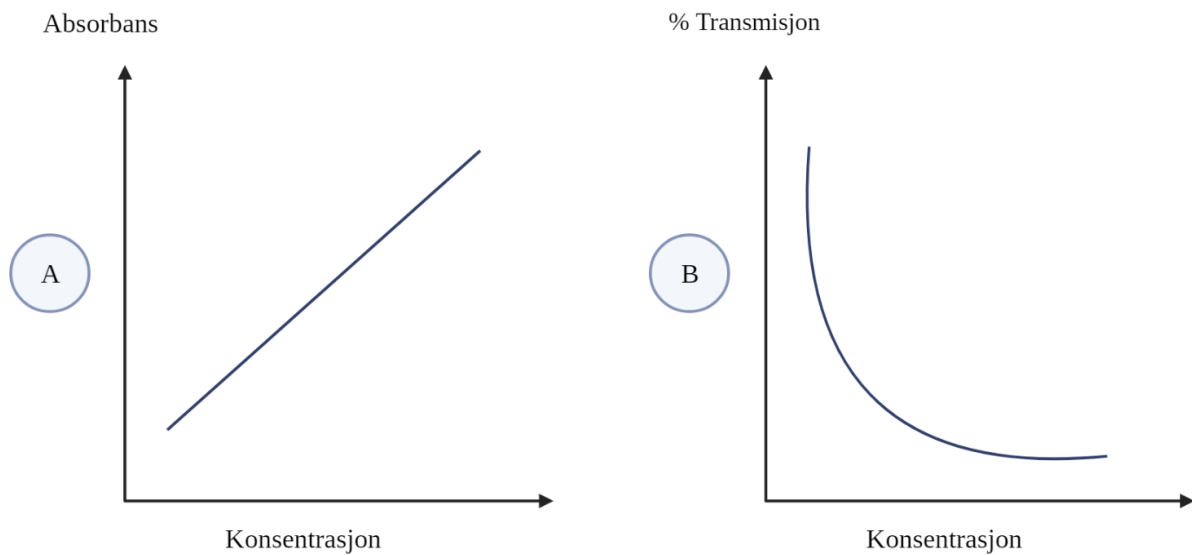
Figur 2: Viser forholdet mellom innfallende lys (I_0) og transmittert lys (I) ved en absorberende løsning. Figuren ble lagd i programmet BioRender.com.

Siden mengden lys som blir absorbert og transmisjon er avhengige av hverandre, kan transmisjonen brukes til å beskrive absorpsjonen A (Burtis & Burns, 2015, s. 131). Dette forholdet er gitt i formelen (2).

$$A = -\log T \quad (2)$$

Ved måling av en analytts konsentrasjon i en løsning benyttes absorbans i stedet for prosentvis transmisjon. Grunnen til dette er at absorpsjonen er lineær med konsentrasjonen av

kromoforen, mens prosentvis transmisjon vil være eksponentiell med analyttkonsentrasjonen. Denne forskjellen er vist i Figur 3.



Figur 3: Graf A viser et lineært forhold mellom absorbans og konsentrasjon, mens graf B viser det eksponentielle forholdet mellom konsentrasjon og prosentvis transmisjon. Figuren ble lagd i BioRender.com.

Den lineære proporsjonaliteten ved absorbansmålingene gjør at man kan benytte Beers lov ved konsentrasjonsutregning (Burtis & Burns, 2015, s. 132). Beers lov viser også at absorbansen vil avhenge av kromoforens molare absorptivitet ϵ , som er en konstant for kromoforens absorberende evne ved en bestemt bølgelengde gitt bestemte forhold mellom løsningsmiddel, temperatur og pH. Lysveien b representerer kuvettelengden, og oppgis i centimeter (Burtis & Burns, 2015, s. 132). Beers lov er vist i formel (3).

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (3)$$

1.1.2 Luminescens

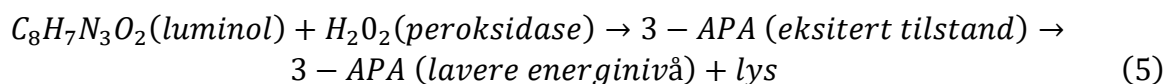
Luminescens er emisjon av lys som resultat av en kjemisk, biologisk eller elektrokjemisk reaksjon (Burtis & Burns, 2015, s. 146). Det finnes flere typer luminescens, som varierer med hvilken påvirkning eller reaksjon som kreves for å danne lysemisjonen. Fluorescens og kjemiluminescens er ulike typer luminescens, og vil beskrives nærmere i dette kapitlet.

Kjemiluminescens

Kjemiluminescens finner sted når et atom eller molekyl returnerer fra et høyere energinivå tilbake til et lavere energinivå som følge av en kjemisk reaksjon (Burtis & Burns, 2015, s.146). Eksiteringen kommer av oksideringsreaksjon, ofte forårsaket av en kjemisk reaksjon med forbindelser som luminol, isoluminol, acridiumestere, hydrogenperoksidaser, hypokloritt eller oksygen. Slike reaksjoner forekommer ved katalysatorer som enzymer, for eksempel alkalisk fosfatase, pepperrot peroksidase og mikroperoksidase. Metallioner og metallkomplekser kan også katalysere en oksidasjonsreaksjon, eksempelvis kan toverdige kobberioner og treverdige jernioner katalysere (Burtis & Burns, 2015, s. 146).

Kjemiluminescens er dermed ikke avhengig av en spesifikk eksitasjonsbølgelengde for innsending av lys, slik som absorbans og fluorescens er. Likevel vil kjemiluminescensemisjonen ha et spesifikt bølgelengdeområde der emisjonen er høyest. Hvilken bølgelengde som gir høyest luminescenssignal avhenger av hvilket luminescerende substrat (luminoforer) som blir benyttet.

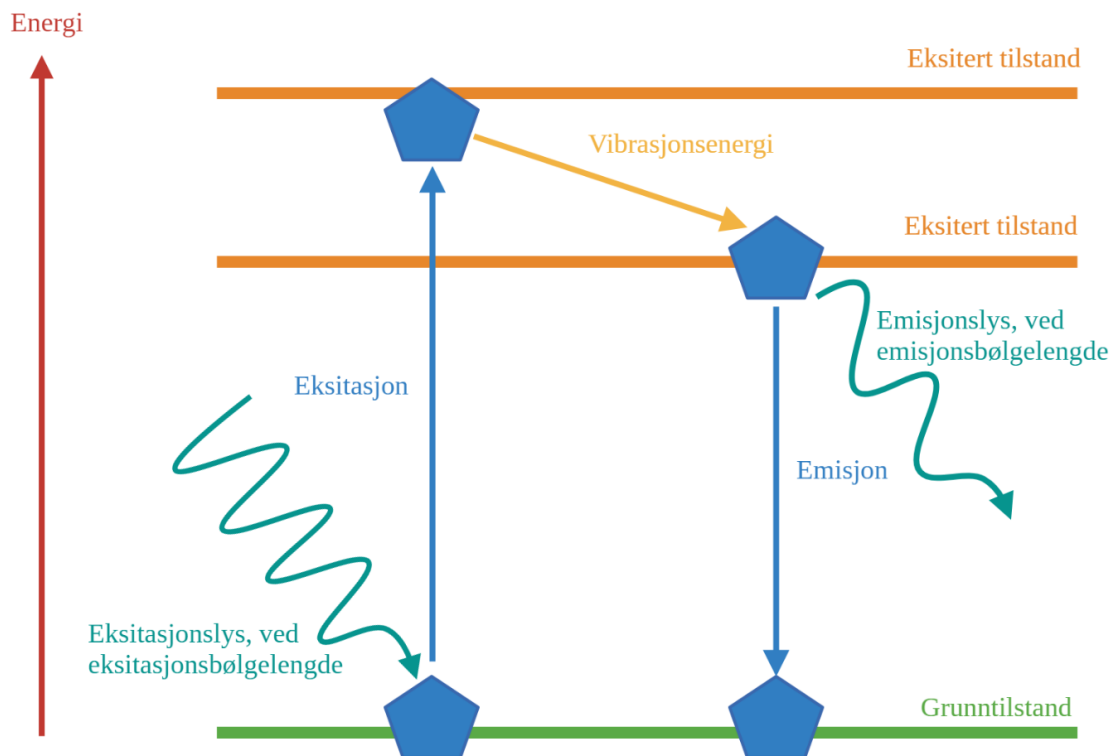
Et eksempel på en slik kjemiluminescensreaksjon, er luminol og 3-aminofatsyre (3-APA). I nærvær av hydrogenperoksid vil denne reaksjonen danne blått lys etter formel (5) (White et al., 1964). Her er det ingen forskjell i kjemisk struktur mellom mellomproduktet og produktet, men det er forskjell i energinivå.



Luminescensbaserte metoder blir i dag ofte brukt til å måle aktiviteten til enzymmerkede forbindelser (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 119). Da vil luminoforer som blir dekomponert av enzymer sende ut luminescensemisjonen. Signalet tolkes som proporsjonalt til antallet av enzymmerkede forbindelser gitt tilstrekkelig med substrat. Luminescens brukes ofte som en paraplybetegnelse for emisjonstyper som ikke krever termisk stråling. Tecan definerer derimot luminescens som emisjonstyper der det ikke kreves bølgelengdeeksitasjon, noe som utelukker fluorescens fra luminescensbegrepet hos Tecan (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 119). Videre referanser til luminescens vil ta utgangspunkt i Tecans definisjon av luminescens, kjemiluminescens vil derfor havne innenfor denne kategorien.

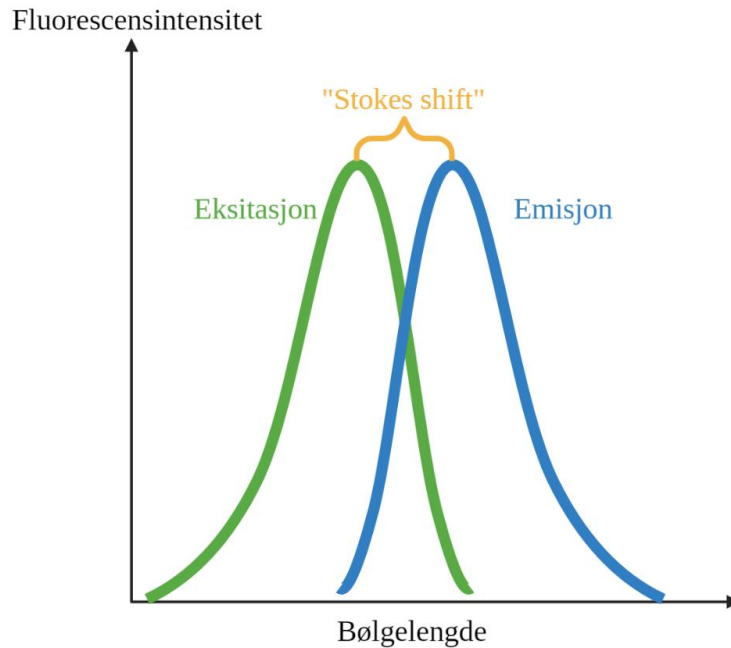
Fluorescens

Fluorescens finner sted når et molekyl absorberer lysenergi på en bestemt bølgelengde, for så å emittere lys i form av fotoner på en lengre bølgelengde (Burtis & Burns, 2015, s. 139). Et atom eller et molekyl som har evnen til å fluoresisere betegnes som en fluorofor. Når en fluorofor belyses med lys av eksitasjonsbølgelengde vil elektroner eksiteres, og fluoroforen vil oppnå høyere energi. Energien frigis delvis som vibrasjonsenergi, men også som fotoner som gir fluorescensen. Denne prosessen er fremstilt i Figur 4.



Figur 4: Viser en skjematisk fremstilling av fluorescensdannelse. Femkanten representerer en fluorofor som blir eksitert og får høyere energi, for så å emittere fotoner og gi fluorescens. Figuren ble lagd i programmet BioRender.com

Forskjellen mellom eksitasjonsbølgelengden og emisjonsbølgelengden kalles «Stokes shift». Dette er en konstant som betegner energitapet mellom fluoroforens eksiterte tilstand til den når grunntilstanden igjen, der det dannes både fluorescens og vibrasjonsenergi. Dette energitapet er grunnen til at emisjonsbølgelengden er lengre enn eksitasjonsbølgelengden (Burtis & Burns, 2015, s. 139). Forskjellen i bølgelengder er illustrert i Figur 5.



Figur 5: Viser forskjell i fluorescensintensitet ved økende bølgelengde, for eksitasjon og emisjon. «Stokes shift» konstaterer forskjellen mellom bølgelengden for eksitasjon og emisjon. Figuren er lagd i BioRender.com

Forholdet mellom konsentrasjonen c og intensiteten av fluorescensemisjonen F kommer av Beers lov, og er illustrert i formel (4). Her kan man se at fluorescensemisjonen avhenger av fluorescenseffektivitet ϕ , eksitasjonslysets intensitet I_0 , molar absorptivitet ε som er karakteristisk for fluoroforen, lysvei b og konsentrasjon av fluoroforen c .

Fluorescenseffektiviteten uttrykkes som ratioen mellom lyset som eksiteres og lyset som emitteres (Burtis & Burns, 2015, s. 140). Hvis forholdet mellom mengden eksitert lys er tilnærmet likt mengden av emisjonslys, så vil dette gi et høyere fluorescenssignal. Hvis dette forholdet er mindre, vil det resultere i et lavere fluorescenssignal.

$$F = \phi \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (4)$$

Det lineære forholdet mellom konsentrasjon og fluorescensemisjon er gitt at løsningen ikke absorberer mer enn 2 % av eksitasjonslyset (Burtis & Burns, 2015, s. 145). Hvis absorbansen overstiger 2 % vil ikke denne sammenhengen være lineær lenger, på grunn av fenomenet indre filter effekt. Fenomenet opptrer når eksitasjonslyset absorberes av fluoroforer gjennom lysveien, slik at eksitasjonsintensiteten dempes gjennom kuvetten. Dermed vil høye konsentrasjoner av fluoroforer gjøre at absorbansen av eksitasjonslyset øker, men deler av eksitasjonsintensiteten vil gå tapt gjennom lysveien. Konsekvensen av dette er at emisjonsmålingene blir falskt for lave (Burtis & Burns, 2015, s. 145).

1.2 Måleteknikker og optikk i Tecan SPARK plateleser

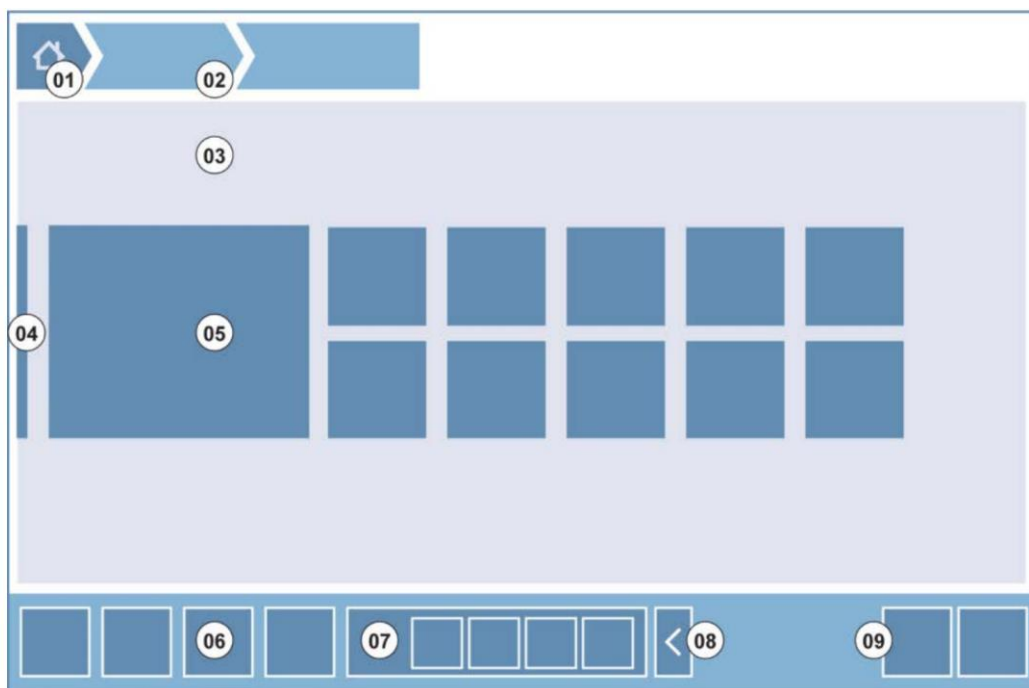
SPARK er et plateavlesningsinstrument fra Tecan. En plateleser brukes i laboratoriet for å måle fysiske, biologiske og kjemiske reaksjoner i brønner i mikrotiterplater. Mikrotiterplatene fungerer som prøvebeholder der ulike prøver pipetteres i forskjellige brønner. En plate kan inneholde mange brønner og gir dermed mulighet til å analysere et stort antall prøver på kort tid. SPARK har kun ett målehode som flyttes fra en brønn og detekterer signalet der, før det så beveges til neste brønn og gjør det samme der. Sammenlignet med standard spektrofotometere der man kun måler én prøve av gangen, gir mikrotiterplatene og platelesere mulighet for å analysere et større antall prøver på kortere tid.

Instrumentet er beregnet for bruk i forskningslaboratorier og har en rekke måleteknikker. Blant disse måleteknikkene finner man en absorbansmodul og en kuvette modul for absorbansmålinger, samt målinger av absorbansskan. Sammen med dette finner man både en toppmodul og en bunnmodul for avlesningen av fluorescens. Toppmodulen kan stilles inn etter en standard innstilling og en forbedret innstilling («Enhanced Module»), der sistnevnte er beregnet for svakere fluorescenssignaler. Det er også mulighet til å avlese fluorescensskan gjennom toppmodulen og bunnmodulen. Luminescensmålinger kan gjennomføres i en standardmodul og en forbedret modul som også er egnet for svakere luminescenssignaler. Instrumentet har ulike funksjoner for billedtaking av celler i kultur, som brukes for å vurdere cellekonfluens og celleviabilitet, og kan gjennomføre celledetelling. Alle måleteknikkene og funksjonene ovenfor vil gjennomgå i det følgende kapittelet. Programvaren som gjør disse måleteknikkene mulig vil også presenteres i dette kapittelet.

1.2.1 Programvaren Spark Control Dashboard

SPARK-instrumentet styres gjennom programvaren SparkControl Dashboard eller SparkControl Magellan. Alle prosedyrer tar utgangspunkt i SparkControl Dashboard, og det er denne programvaren som vil beskrives i dette kapittelet. Ved å bruke SparkControl Dashboard kan man kommunisere med det tilkoblede instrumentet, starte målinger og følge med på pågående målinger (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 93). En oversikt over SparkControl Dashboard er gitt i Figur 6. 01 Hjemknappen brukes for å vise hjemskjermen. 02 Viser navigasjonshistorie i programvaren når det åpnes ulike applikasjoner. 03

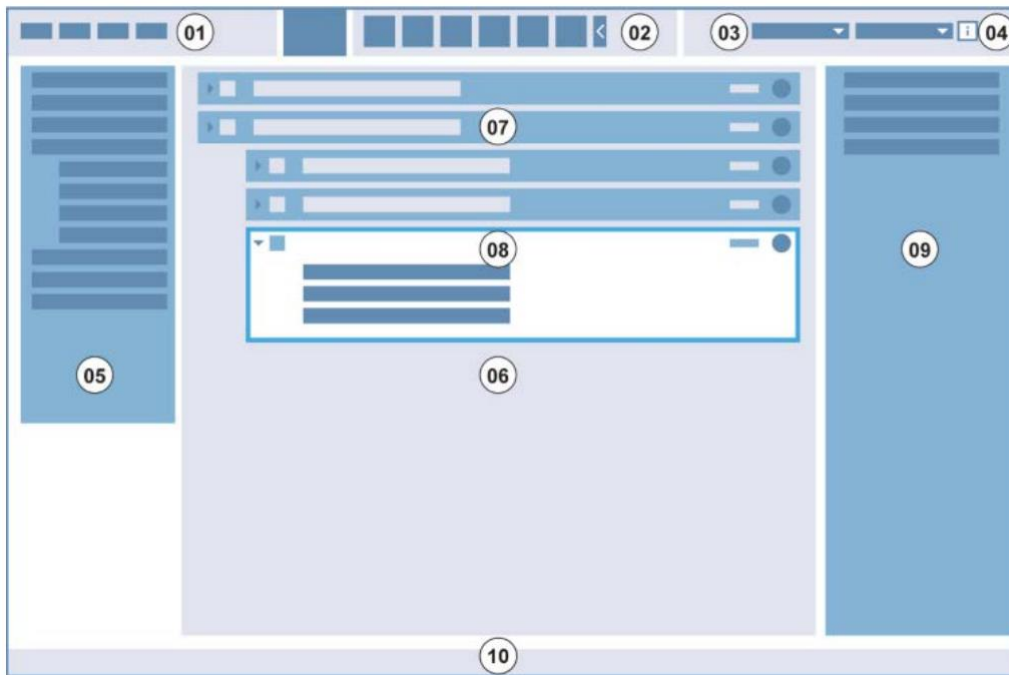
Arbeidslisterute viser arbeidslisten til instrumentet. 04 Navigasjonsverktøyet på venstre side brukes til å bytte til andre SparkControl komponenter, for eksempel «Method Editor». 05 Metodeknappene kan velges ut ifra hvilke metoder som er satt opp og lagret i programvaren. Her finner man også informasjon om hvilket instrument som er koblet til og hvilke moduler som er tilgjengelig. Eksempelvis kan «Method Editor» (vist i Figur 7) åpnes gjennom en av disse knappene. Om man trykker på Instrument-ikonet med serienummeret nede til venstre vil knappene 06, 07, 08 og 09 bli tilgjengelig. Dette er en gruppe knapper som er designet for instrumentinnstillinger som kontroller gassnivåene og temperaturen i instrumentet. Filter og speil kan også byttes ut gjennom disse knappene, og injektorprosedyrer kan også settes i gang her (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 94).



Figur 6: Viser ulike elementer i SparkControl Dashboard. 01 Hjemknapp, 02 Navigasjonsrute, 03 Arbeidslisterute, 04 Navigasjonsrute, 05 Metodeknapper og instrumentoversikt. Knappene 06, 07, 08 og 09 brukes til instrumentinnstillinger, disse blir tilgjengelige ved å trykke på knappen med Instrumentikonet (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 93)

Gjennom programvaren kan nye målemetoder opprettes i «Method Editor» (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 72), illustrert i Figur 7. «Method Editor» brukes til å sette opp en arbeidsliste. Under 01 Menu verktøyet ligger redaktør- og avleserfunksjoner, som Innstillinger og Filvisning. 02 Verktøy viser ikoner for vanlige brukte redaktørfunksjoner som Ny og Lagre. I 03 Nedtrekksmeny velges funksjoner relatert til programvareapplikasjonen og det instrumentet som er tilkoblet. 04 er en knapp for å åpne 09 Inforute, der man får tilleggsinformasjon om arbeidslisten. Arbeidslisten lages ved å trekke prosesser (eksempelvis

«Absorbance Spectrum» for analyse av absorbansspektrum) fra 05 Kontrollverktøyet til området 06 Arbeidslisterute. Her legges innstillinger for hver av målemetodene inn. 07 Viser en analyse som er lagt inn i 06 arbeidslisten, og 08 viser et utvidet felt for en analysemetode som er lagt inn i arbeidslisten, der innstillingene for metoden legges inn. 10 Status gir informasjon om det tilkoblede instrumentet (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 72).



Figur 7: 01 Menu verktøy, 02 Verktøy, 03 Nedtrekksmeny, 04 Knapp for å åpne 09 Inforuten, 05 Kontrollverktøyet, 06 Arbeidslisterute, 07 Analysemetode i arbeidslisten, 08 Utvidet analysemetode i arbeidsliste, 10 Status (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 72)

Innstillinger som kan legges inn under 08 er funksjonen «Multiple reads per well» og innstilling av antall lysglimt («flashes»). Normalt vil målingene skje i sentrum av brønnen, men med funksjonen for «Multiple reads per well» vil det gis ulike avlesningsposisjoner i brønnen (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 91). Hvilke og hvor mange posisjoner bestemmes i programvaren, det gjør også størrelsen på de ulike posisjonene og avstanden til kanten av brønnen. Instrumentet beregner et gjennomsnitt og standardavvik basert på avlesningsposisjonene. På denne måten tar instrumentet høyde for eventuelle signalforskjeller innad i samme brønn. Denne funksjonen er spesielt aktuell ved cellebaserte målemetoder, da cellene kan fordele seg ujevnt i brønnen. «Multiple reads per well» er tilgjengelig for absorbansmålinger, fluorescensmålinger og luminescensmålinger (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 91). Antallet lysglimt bestemmer hvor mange lyseksposeringer hver brønn får før det

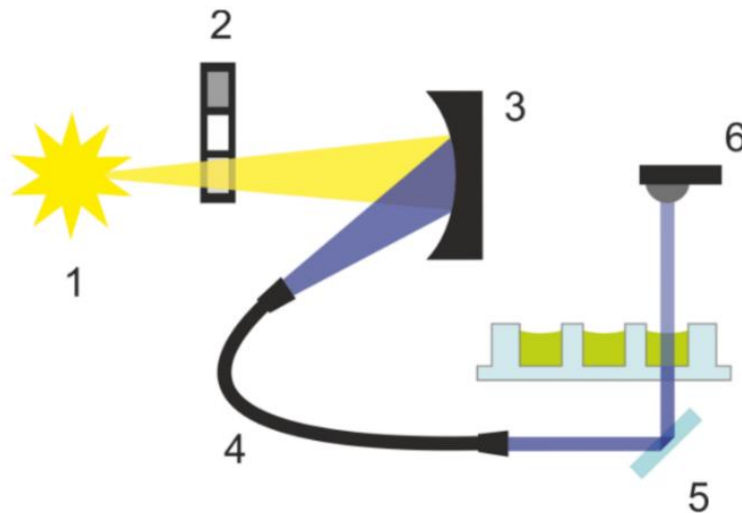
dannes en gjennomsnittsverdi av disse som utgis som svar (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 176). Dette kan justeres ved fluorescensmålinger og absorpsjonsmålinger.

1.2.2 Absorpsjonsmålinger

Absorpsjonsmålingene kan foretas i en absorpsjonsmodul for mikrotiterplater der et større antall prøver analyseres parallelt. Her anbefales det å benytte transparente mikrotiterplater (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 148). Prøvene som analyseres i kuvette-modulen kan bare analyseres individuelt, der kun én og én prøve kan analyseres om gangen. Absorpsjonsoptikken som benyttes til plateavlesningene og kuvetteavlesningene er relativt likt bygd opp. Det benyttes optiske fibre som dirigerer lyset fra monokromatoren til absorpsjonsoptikken. De optiske fibre er tynne og transparente fibre av plast, kvarts eller glass som har en lav brytningsindeks. Brytningsindeksen gjør at lyset reflekteres innad i fiberen og gir totalrefleksjon som transmitterer lyset gjennom den optiske fiberen (Burtis & Burns, 2015, s. 136). Gjennom absorpsjonsoptikken fokuseres lyset mot brønnene i platen eller kuvetten. Det transmitterte lyset blir målt med en fotodiode bestående av silisium. Silisium er en halvleder som kan absorbere lys i bølgelengdeområdet som blir benyttet til i begge absorpsjonsmodulene. Før målingen i platen blir gjort vil det tas en referansemåling, der platebæreren («plate carrier») er borte fra lysstrålen og ikke interferer i målingen (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 146).

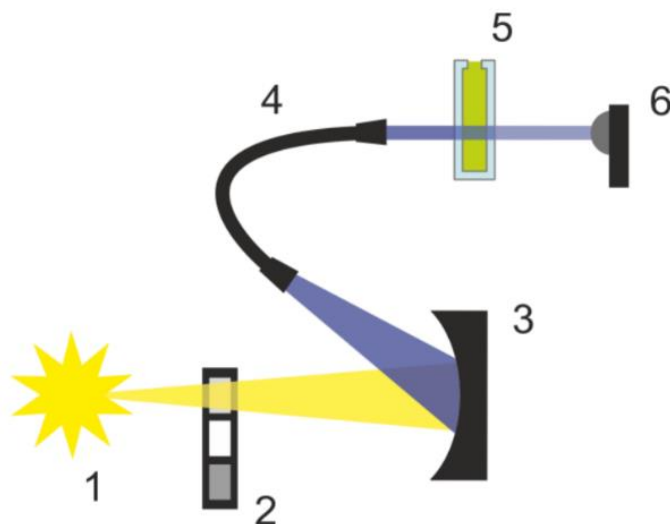
Monokromatoren muliggjør målinger som baserer seg på monokromatisk lys, der lyset som sendes mot prøven kun består av en bestemt bølgelengde (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 163). Hensikten med dette er å fjerne uønskede bølgelengder som kan interferere med målingen. Monokromatoren består av en inngangsspalte, et optisk gitter som sprer lyset og en utgangsspalte. Inngangsspaltene til monokromatoren mottar hvitt lys med mange bølgelengder, mens kun bestemte bølgelengder slipper ut gjennom utgangsspaltene. Hvilken bølgelengde som slipper gjennom utgangsspaltene bestemmes av vinkelen mellom lyset som treffer inngangsspaltene og det optiske gitteret. Ved å rotere gitteret kan ulike bølgelengder velges og isoleres (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 163). Båndbredden bestemmes av vidden på utgangsspaltene, og er fiksert til 3,5 nm for absorpsjonsmålingene.

Standardmodulen for absorbansavlesningen består av en lampe, en monokromator, et absorbansfilter og en fotodiode, se Figur 8 (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 146). Her vil lyset fra en Xenon-lampe (1) gå gjennom et «order sortering filter» (2) som selekterer primærbølgelengden og filtrerer vekk lys av høyere orden. Lyset fokuseres på inngangspalten til monokromatoren. Ved å rotere på det optiske gitteret (3) kan man velge bølgelengde for målingen. Lyset går inn gjennom absorbansfibre (4), som dirigerer lyset til prøven gjennom et elliptisk speil (5). En del av lyset reflekteres på en referansefotodiode (denne er ikke illustrert i figuren under). Funksjonen til referansefotodioden er å overvåke lyskilden over lenger tid, og kan eventuelt gi «feedback»-signaler til lyskilden for å normalisere målingene. Etter dette blir lyset samlet av en linse, og fokuseres på fotodioden som brukes til den faktiske målingen av prøven (6). Dette er en silikonfotodiode som brukes til måling av transmittert lys og er sensitiv for et vidt spekter av bølgelengder (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 146).



Figur 8: Skjematisk framstilling av det optiske systemet i absorbansmodulen. Xenon-lampe (1), «order sorting filter» (2), optiske filter (3), absorbansfiber (4), elliptisk speil (5) og fotodiode (6). (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 146)

Kuvettemodulen har flere likheter med standard absorbansmodulen, se Figur 9. Forskjellen mellom de to modulene er at man ikke benytter et speil for å sende lyset inn mot fotodioden. I kuvettemodulen dirigerer absorbansfibrene (4) lyset direkte til kuvetten (5) for deretter at lyset føres inn mot fotodioden (6) og måles (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 147).



Figur 9: Skjematisk fremstilling av absorbansoptikk ved kuvettemodulen. Viser lyskilden (1), «order sorting filter» (2), optisk filter (3), absorbansfilter (4), kuvette (5) og fotodiode (6). (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 147).

Det er også mulighet for analyse av absorbansspektrum ved SPARK (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 145). Absorbansspektrumet vil gi informasjon om løsnings absorbans eller transmittans som en funksjon av tid som et reaksjonforløp eller i funksjon av bølgelengde (Burtis & Burns, 2015, s. 137). Når man måler absorbans som funksjon av bølgelengden vil man observere absorbanstopper over grafen. Dette kan være nyttig i tilfeller der man har en prøve med ukjent innhold av en analytt. Ved å måle absorbansspektrumet og sammenligne absorbanstoppene som dannes med absorbanstopper til kjente analytter, kan man få en indikasjon på hvilke analytter prøven kan inneholde (Burtis & Burns, 2015, s. 137). Dette kan også være nyttig om man ikke har bestemt riktig bølgelengde før absorbansmåling. Ut fra absorbanstoppene i grafen kan man finne egnet bølgelengde for avlesning ved absorbansmaksimum (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 145).

1.2.3 Fluorescensmålinger

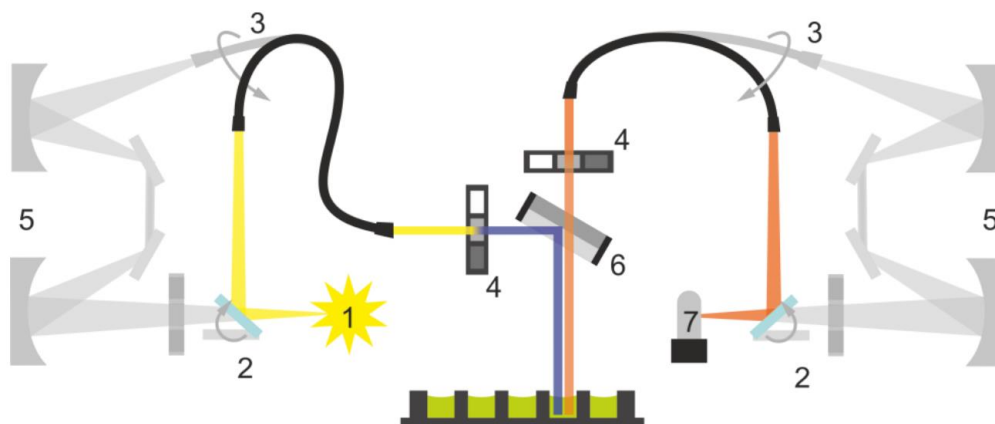
Målingen av fluorescensintensiteten i emisjonslyset bestemmer mengden av fluorescerende forbindelser i prøven (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 161). Fluorescens kan oppstå gjennom fluorescenseresonans energioverføring, «Fluorescence Resonance Energy Transfer» (FRET). Dette er overføring av eksitasjonsenergi fra et donormolekyl til et akseptormolekyl uten å emittere et foton. Om akseptormolekylet og donormolekylet er i nærheten av hverandre, kan akseptormolekylet motta eksitasjonsenergi fra donoren. I disse tilfellene vil emisjonsspektrumet til donormolekylet overlappe med eksitasjonsspektrumet til akseptoren.

Fluorescenseintensitets-modulen er satt opp slik at bølglengdeseleksjonen for emisjonen og eksitasjonen kan foretas gjennom en monokromator eller gjennom et filter (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 162). Disse kan også kombineres for valg av emisjonsbølglengde og eksitasjonsbølglengde, og gir stor fleksibilitet for avlesningen av signalet.

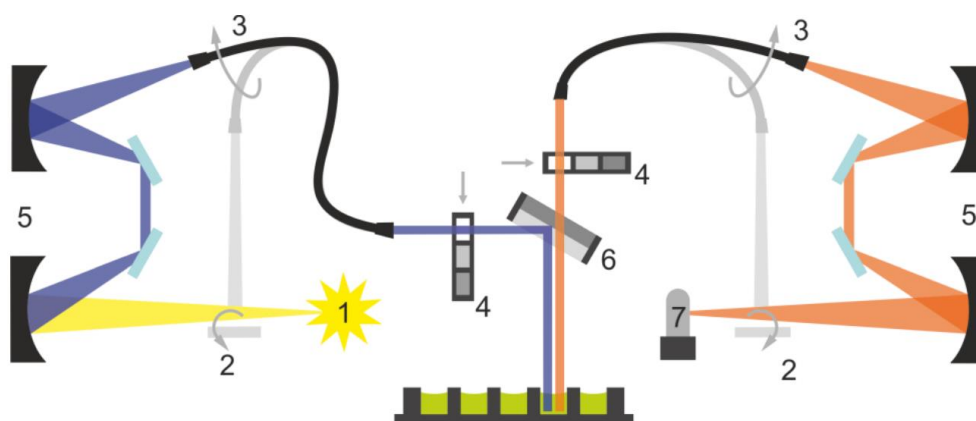
Fluorescenssignalene kan også måles fra toppen eller bunnen av brønnen. Ved både toppmodulen og bunnmodulen anbefales det å benytte sorte mikrotiterplater (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 190).

For målinger som skal finne sted fra toppen av brønnen benyttes en lampe som lyskilde, monokromatorer og/eller filtre for bølglengdeseleksjon, et målehode for toppavlesning og en fotomultiplikator som detektor (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 164). En skjematisk fremstilling av dette kan sees i Figur 10 og Figur 11. Ved disse målingene kan man velge mellom forbedret modul og standardmodul, avhengig av sensitiviteten som kreves for målingene. Standardmodulen er illustrert i Figur 10, der er den forbedrede modulen er vist i grått. I metoder som krever større sensitivitet vil det være en fordel å benytte den forbedrede modulen, denne er vist i Figur 11 hvor standardmodulen er markert i grått.

Lampen (1) som benyttes er en Xenon-lampe (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 164). Målehodet er koblet til eksitasjons- og emisjonsmodulen gjennom optiske fibre. Emisjonslyset og eksitasjonslyset blir dirigert direkte til fiberbuntene ved å rotere speilet (2) og fiberenden (3). Bølglengdeseleksjonen kan enten gjøres gjennom bruk av filtre (4) i målehodet eller ved bruk av doble monokromatorer (5). Målehodets avstand til brønnen bestemmes av en Z-posisjon, som kan beregnes av instrumentet eller defineres i programvaren. Speilet (6) i målehodet kan justeres mellom ulike speilinnstillinger, der man velger mellom 50 % speil eller dikromatiske speil («dichroic mirror») i standardmodulen. I forbedret modul («Enhanced Module») er det mulighet for fem ulike speilinnstillinger, siden man der har flere dikromatiske speil enn ved standardmodulen. I standardmodulen vil emisjonslyset passere et nytt filter (4) før deteksjon, mens dette utgår ved bruk av doble monokromatorer i den forbedrede modulen. En fotomultiplikator (7) fungerer som detektor i begge modulene. Deteksjonssignalet multipliseres med en «Gain»-faktor som kan beregnes av instrumentet eller defineres i programvaren og utgir resultatet i «relative fluorescence units».

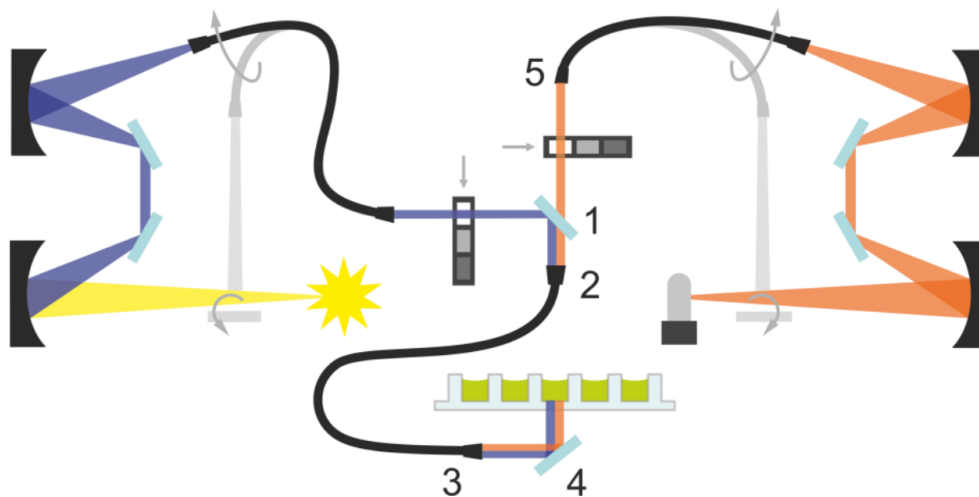


Figur 10: Viser standardmodulev fluorescens toppavlesning med bruk av filter til bølgelengdeseleksjon. Lampe (1), speil (2), optiske fibre (3), filter (4), speil i målehodet (6) og fotomultiplikator (7). (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 164).



Figur 11: Viser forbedret modul ved fluorescens toppavlesning med bruk av monokromator til bølgelengdeseleksjon. Lampe (1), speil (2), optiske fibre (3), monokromator (5), speil i målehodet (6) og fotomultiplikator (7). Merk at filtrene (4) utgår ved denne modulen. (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 164).

Modulen for bunnavlesningene av fluorescens er bygd opp på lignende måte som optikken ved toppavlesning, se Figur 12. Det dikromatiske speilet (1) dirigerer eksitasjonslyset via optiske fibre (2) til målehodet (3). Bunnspeilet (4) reflekterer lyset til prøven. Emisjonslyset går samme vei tilbake før det fokuseres til emisjonsfibre (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 166).



Figur 12: Fluorescens bunnavlesning ved bruk av monokromator til bølglengdeseleksjon, dikromatisk speil (1), optiske fibre (2), målehpdet (2), bunnspeil (4) og optiske fibre (5) (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 166).

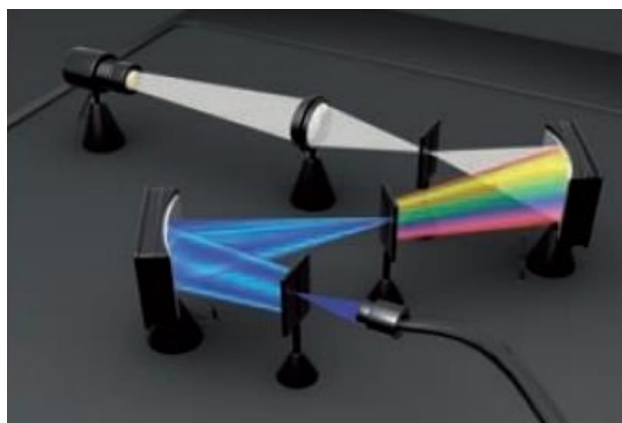
Fluorescenslyset er mye svakere enn eksitasjonslyset, og det stilles derfor høye krav til bølglengdeseleksjonen til instrumentet (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 163). Det er derfor viktig at overlappen mellom eksitasjonsspekteret og emisjonsspekteret er minimal. Ved standardmodulmålinger er båndbredden fiksert på 20 nm for både eksitasjonsbølglengden og emisjonsbølglengden. Ved den forbedrede fluorescensmodulen kan man velge åtte ulike båndbredder, varierende fra 5 til 50 nm. For å unngå at avstanden mellom eksitasjonsspekteret og emisjonsspekteret blir for liten, er programvaren utstyrt med en «Minimal Distance Rule» (MDR). Denne regelen bestemmer at det skal være en viss avstand mellom bølglengdene som velges for eksitasjon og emisjon. Hvis denne avstanden ikke er til stede vil programvaren gi et varsel før analysen kan kjøres. Grunnen til dette er at en overlapp mellom eksitasjonsspektrumet og emisjonsspektrumet vil gjøre at eksitasjonslyset kan tolkes som fluorescens, og man vil få forhøyede bakgrunnsmålinger. For å etablere denne avstanden skal båndbredden (BW) for eksitasjon og emisjon adderes med 5 nm, illustrert i formel (5). Verdien fra formel (5) skal være lik eller mindre enn forskjellen i bølglengder (BL), gitt i formel (6).

$$MDR = BW_{Eksitasjon} + BW_{Emisjon} + 5 \text{ nm} \quad (5)$$

$$(BL_{Emisjon} - BL_{Eksitasjon}) \geq MDR \quad (6)$$

Om kravene fra formel (5) og (6) oppfylles, vil avstanden mellom eksitasjonsspekteret og emisjonsspekteret være tilstrekkelig og analysen kan kjøres.

For å kunne blokkere mest mulig av eksitasjonslyset benytter instrumentet også to monokromatorer, også kjent som en dobbel monokromator (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 163). Her vil utgangsspalten fra den første monokromatoren fungere som inngangsspalte til den andre monokromatoren, se Figur 13. Dette gir en blokkeringsfaktor på 10^6 , en faktor som tilsvarer bruk av interferensfiltre.



Figur 13: Illustrasjon av den doble monokromatoren (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 163)

Optiske filtre kan også benyttes for å blokkere uønskede bølgelengder (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 167). Her bruker man ulike filtre for emisjonslyset og eksitasjonslyset, som benyttes i par. Instrumentet kommer med seks slike filterpar som kan brukes for ulike fluorescensmålinger. Disse installeres og byttes ut etter behov manuelt på instrumentet.

Det er også mulig å lage fluorescensskann ved bruk av instrumentet (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 167). For å danne et emisjonsspektrum holdes eksitasjonslyset på en konstant bølgelengde, mens forskjellige bølgelengder av emittert lys fra prøven detekteres i monokromatoren. Ved registrering av et eksitasjonsspektrum blir emisjonslyset registrert på en fast bølgelengde, og eksitasjonslyset blir skannet gjennom faste bølgelengder. Man kan også generere et tredimensjonalt emisjonsspekter som resultat av flere eksitasjonsbølgelengder, og kombinerer disse sammen. Man får da en tredimensjonal fremstilling av emisjonen av fluorescenslyset, som en funksjon av både eksitasjon- og emisjonsbølgelengder (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 167).

1.2.4 Luminescensmålinger

SPARKs ulike måleteknikker for luminescens er glødeluminescens («glow luminescens»), blitsluminescens («flash luminescens») og flerfarget luminescens («multicolor luminescens») (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 119). Ved glødeluminescens måles stabile luminescenssignaler over lenger tid. Her benyttes substrat som kan gi stabile lyssignaler over flere timer. Ved blitsluminescens dannes et svært kortvarig luminescenssignal. Målingen vil derfor starte enten rett før man tilsetter aktiverende reagenser eller rett etter at reagensene har blitt tilsatt. Siden disse signalene er svært kortvarige, kan det være en fordel å bruke injektorer til disse målingene. Injektornålene rommer løsninger på 500 µL, 1000 µL og 2500 µL, og kan fordele volumet i mikrotiterplater med én til 384 brønner (med unntak av 384 brønners mikrotiterplater med små volumer) (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 281). Ved flerfarget luminescens tar man høyde for flere ulike lysemitterende forbindelser, som da gir ut emisjonslys på to eller flere bølgelengder (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 119).

Det finnes to ulike moduler for målingen av luminescens på instrumentet, en standard luminescensmodul og en forbedret modul («Enhanced luminescens module») (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 120–121). Ved begge modulene kan man bruke plater opptil 384 brønner. Her anbefales det å benytte hvite mikrotiterplater til avlesning (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 129).

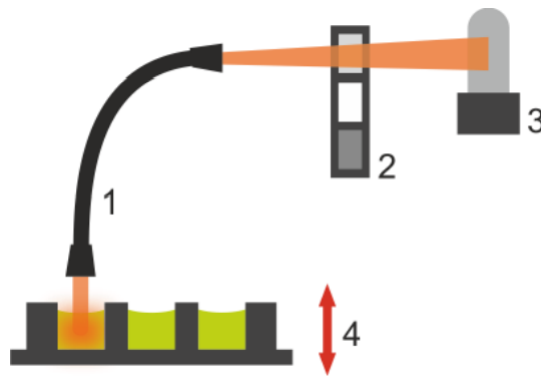
Figur 14 viser en skjematisk fremstilling av optikken som blir brukt ved en standard luminescensmåling. Luminescensoptikken består av luminescensefiber (1), et filterhjul med ulike filtre (2) og en deteksjonsenhet (3) (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 120).

Luminescensfibrene dirigerer luminescenslyset fra prøven til deteksjonsenheten.

Sensitiviteten til deteksjonssystemet krever demping av høye luminescenssignaler.

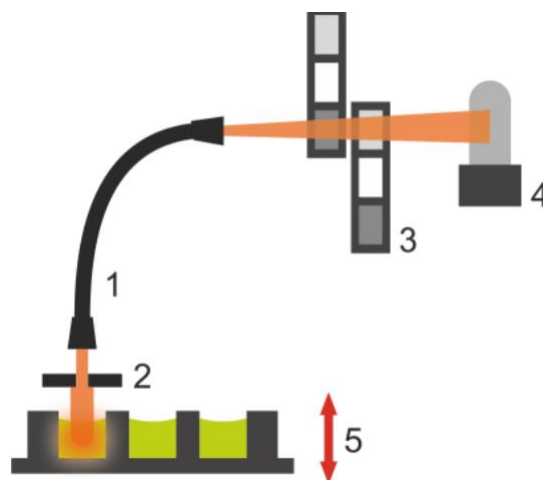
Dempingen skjer gjennom to absorbansfiltre på OD1 og OD2 som er installert i filterhjulet.

Hvis man bruker filteret OD1 vil signalet dempes med en faktor på 10, hvis man bruker et OD2 filter vil det dempes med en faktor på 100. Man kan velge hvilket av de to filterne som skal brukes via programvaren tilkoblet instrumentet. Z-posisjonen (4) bestemmer avstanden mellom brønnen og målehodet, dette er for å maksimere signalet og minimere interferens mellom ulike prøver. Justering av denne posisjonen blir gjort automatisk når man velger hvilken type plate som skal brukes i programvaren (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 120).



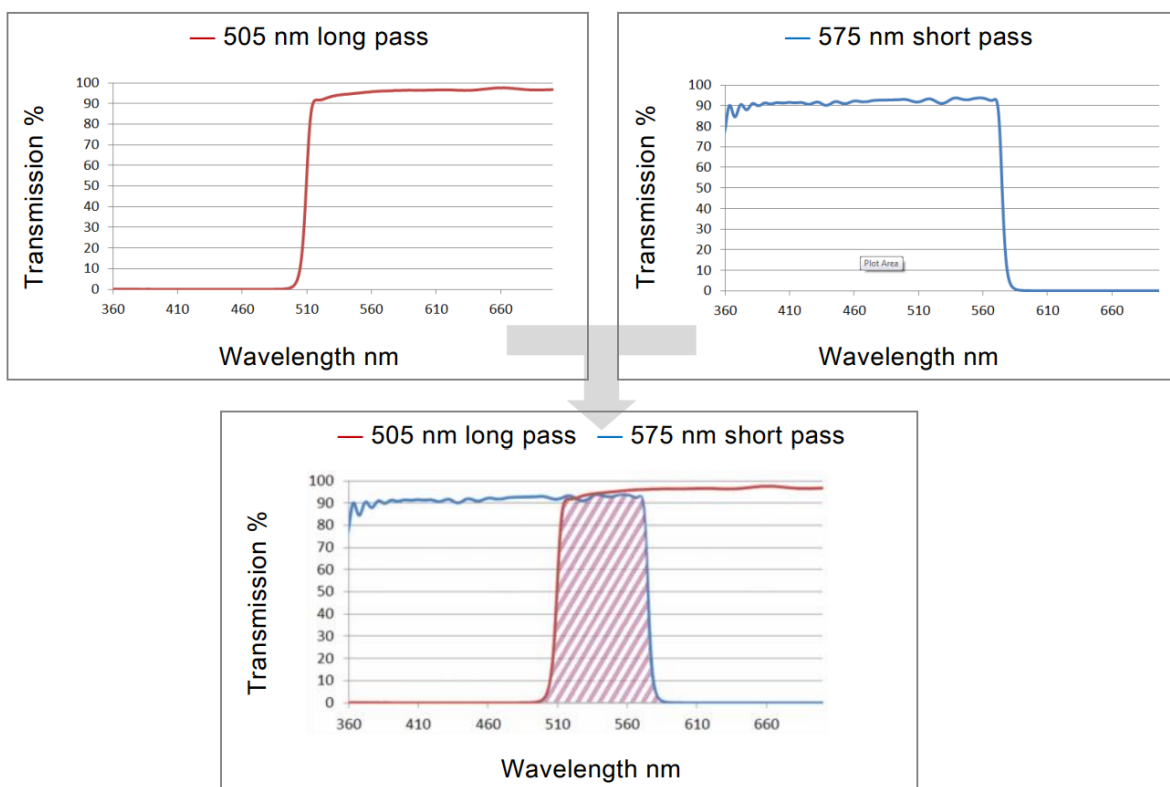
Figur 14: Skjematisk framstilling av det optiske systemet til standard luminescensmodulen. Luminescensfiber (1), filterhjul (2), deteksjonsenhet (3) og "Z-drive" for platetransporten (4). (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 120).

Optikken ved «Enhanced Luminescens Optics» er noe lik optikken ved standardmodulen, og inneholder optiske fibre (1), detektor (4) og «Z-drive» for platetransport (5), på samme måte som standardmodulen (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 121). Forskjellen ligger i at den forbedrede modulen inneholder en aparturblander (2) og to filterhjul (3). Dette er illustrert i Figur 15. Luminescensfibrene dirigerer luminescenslyset fra prøven til deteksjonsenheten, der lyset møter lavpass- og høypassfiltre på vei til detektoren. Filterhjulet brukes for spektral diskriminasjon av luminoforer og seleksjon av uønskede bølgelengder. Aperturhjulet har samme størrelse som brønnen for å forhindre interferens prøvene imellom. Sensitiviteten til målingene avhenger av demping av høye luminescensmålinger. Dempingen skjer med de samme filtrene som benyttes i standardmodulen. Her kan man også kombinere filtrene OD1 og OD2, og da få et OD3 filter som demper luminescensen med en faktor på 1000 (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 121).



Figur 15: Skjematisk framstilling av "Enhanced Luminescens" optikk. Inneholder optiske fibre (1), aparturblander (2), filterhjul (3), detektor (4) og Z-drive for platetransport (5). (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 123).

I forbedret modul er det to sett av 19 spektrale filtre som er bygget inn i to filterhjul. Et filterhjul inneholder høypassfiltre som slipper gjennom bølgelengder over viss grense, mens de lave bølgelengdene blokkeres. Det andre filterhjulet inneholder lavpassfiltre som slipper gjennom bølgelengder lavere enn en viss grense, samtidig som de høye bølgelengdene blokkeres. Ved å kombinere disse to filtrene kan man selektere bort uønskede bølgelengder, slik at kun de ønskede bølgelengdene benyttes til målingen. Dette er vist i Figur 16.



Figur 16: Viser bølgelengdeseleksjonen ved bruk av lavpassfiltre og høypassfiltre. Seleksjonen gir et bølgelengdeområde på 505-575 nanometer for målingen av luminescens (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 122).

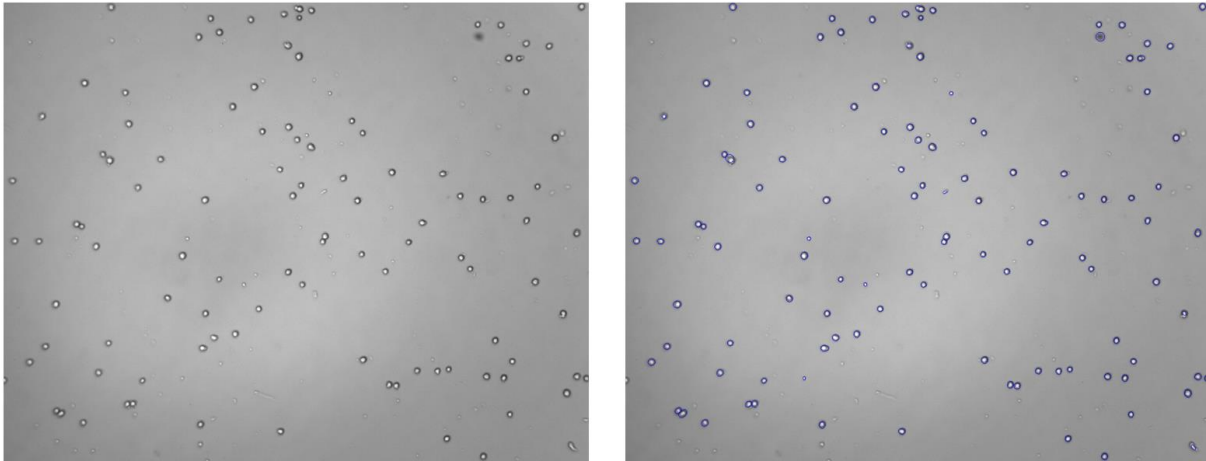
Deteksjonen av signal ved bruk av standard luminescensmodulen og forbedret modul foregår på samme måte (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 123). Her benyttes en fotomultiplikator der fotoner telles som luminescenssignal. Teknikken gir et stort dynamisk område for avlesning, noe som er ideelt for luminescensmålinger som har stor variasjon i intensitet.

Luminescensskann kan også måles ved SPARK, der man måler emisjonsspekteret fra luminoforene (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 120). Luminescensintensiteten vil variere

avhengig av instrumentets målekarakteristikk (spektral sensitivitet og filtertransmisjon) og bølgelengde. Eksempelvis kan emisjonsspekteret til luciferase måles for å bestemme emisjonsmaksimumet og bølgelengde for senere avlesning. Man kan også benytte luminescensskann til å studere hvordan miljøfaktorer som pH, løsningsmiddel eller buffere fungerer på luminescensdannelsen.

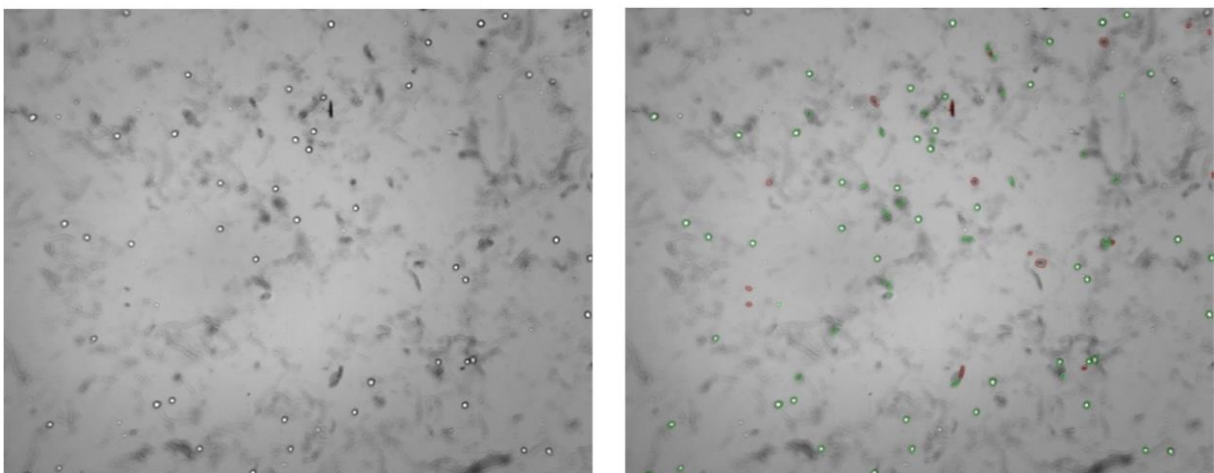
1.2.5 “Bright field Imaging” for celletelling, måling av celleviabilitet og cellekonfluens
SPARK kan utstyres med cellemodul for «Bright Field Imaging», som kan benyttes til celletelling og vurdering av cellekonfluens for adherente celler (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 213). Modulen avhenger av en kontrastforskjell mellom cellene og vekstmediet for å skille mellom strukturene i dyrkningsskåla. Kontrasten dannes ved å sende lys mot brønnene og lyset absorberes ulikt hos cellene og i mediet. Forskjellen i lysabsorpsjon utnyttes for å skille strukturene.

Instrumentet teller celler og bestemmer levedyktigheten til disse cellene ved bruk av engangstellekammer (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 213). Disse funksjonene kan benyttes til å utføre daglige kvalitetssjekker av cellekulturer. Ved celletelling vil cellesuspensjonen tilsettes i tellekammerne på 10 µL før tellekammeret plasseres i et adapter, som så settes inn på instrumentes platebærer på samme måte som ved plateavlesning. Hvilket eller hvilke kammere som skal telles velges i programvaren. Antallet bilder som celletellingen og celleviabilitetsmålingen skal basere seg på, bestemmes også i programvaren. Modulen kan telle celler i størrelsesområdet 4-90 µm, men kan justeres etter ønsket størrelsesområde gjennom programvaren. Konsentrasjonen av celler oppgis mellom 10^4 og 10^7 celler/mL. Resultatet gir flere parametere som gjennomsnittlig cellestørrelse, antall celler som har blitt telt med mer. Ytterligere parametere blir gitt i Excel-filen og pdf-filten som blir generert med måleresultatene. Det blir også tatt bilde fra tellekammeret, et eksempel på dette er vist i Figur 17.



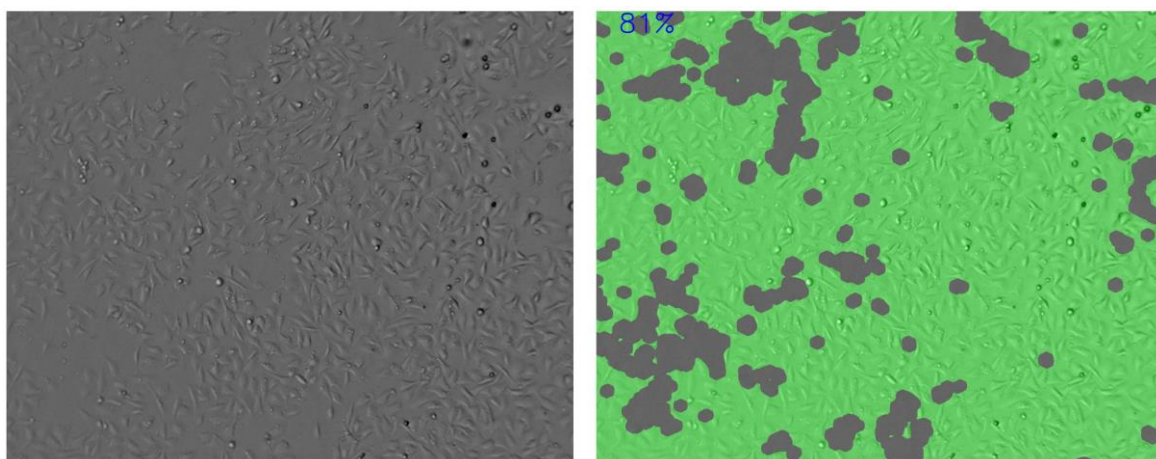
Figur 17: Bildet til venstre viser celler i et tellekammer, bildet til høyre viser de samme cellene med en blå markering. Markeringen viser hvilke celler som har blitt telt ut fra det definerte størrelsesområdet for analysen.

Ved å tilsette fargestoffet trypan blå kan celledelingen også gi informasjon om celleviabiliteten (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 333). Levende celler med intakte cellemembraner vil ikke ta opp fargestoffet, og vil derfor ha en klar cytoplasmafarge. De døde cellene har ikke intakte cellemembraner og vil dermed ta opp fargestoffet, noe som gir et blåfarget cytoplasma. Forskjellen i cytoplasmafarge kan dermed brukes til å telle levende og døde celler hver for seg. Cellesuspensjonen tilsettes trypan blå i forholdet 1:1. Denne fortyningen blir automatisk tatt med i beregningen av resultatet. Resultatet gis ut som prosentvis celleviabilitet, antall levende celler som har blitt telt og en gjennomsnittlig størrelse for disse cellene i resultatvinduet i programvaren. Ytterligere parametere gis i Excel-filen og pdf-filen som blir generert med måleresultatene. Instrumentet tar også bilde av cellene for å gi et visuelt bilde av tellekammeret, dette er vist i Figur 18.

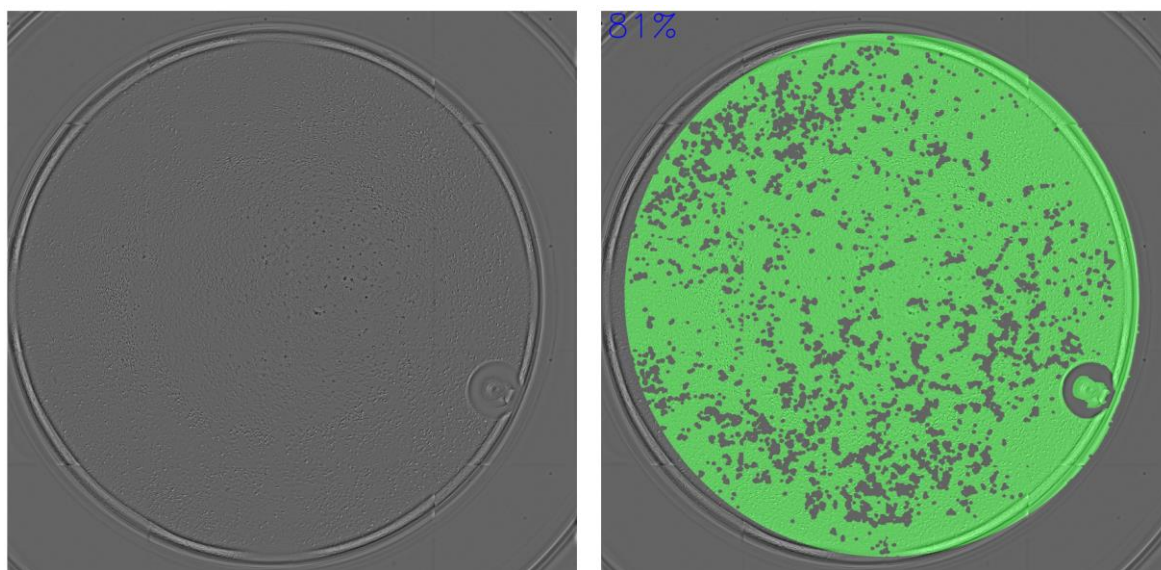


Figur 18: Viser to bilder fra det samme tellekammeret. Bildet til venstre er uten markering. Bildet til høyre viser levende celler med en grønn ring og de døde cellene markeres med en rød ring.

Cellekonfluens kan undersøkes i mikrotiterplater fra seks brønner og opp til 96 brønner, men er optimalisert for 96-brønners mikrotiterplater (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 213). Grad av konfluens gir informasjon om hvor stor andel av brønnens overflate som er dekket av adherente celler og oppgis i prosent. Hvis cellene blir konfluente vil cellene slutte å dele seg som følge av plassmangel i dyrkningsskåla (Freshney, 2005, s. 41). Hvilket område og mønster man vil måle konfluens i bestemmes i programvaren, der kan man velge om man vil gjøre avlesninger i sentrum av brønnen, i hele brønnen eller i egendefinerte områder gjennom «User defined». Figur 19 viser en måling gjort i sentrum av brønnen, der cellene dekker 81 % av overflaten. I Figur 20 har det blitt gjort en måling av hele brønnen, der cellene også dekker 81 % av overflaten i brønnen.

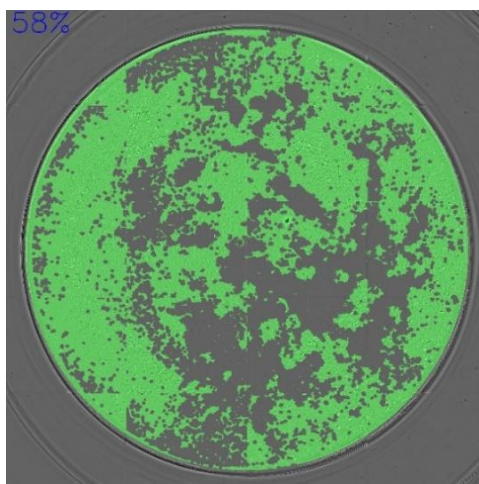


Figur 19: Viser bilde fra en cellekonfluensmåling gjort i sentrum av brønnen, med og uten farging. Bildet til venstre er uten farging. I det fargede bildet til høyre illustrer grønnfargen hvor cellene ligger, mens gråfargen illustrer områder uten celler.



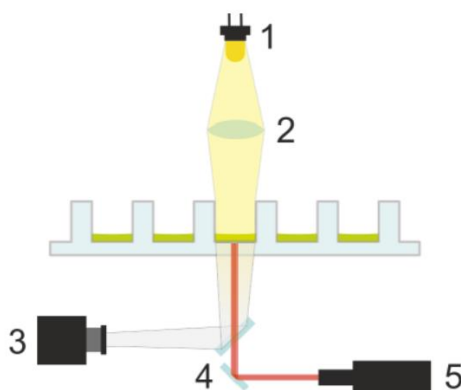
Figur 20: Viser bilde fra en cellekonfluensmåling av hele brønnen, med og uten farging. Bildet til venstre er uten farging. I det fargede bildet til høyre illustrer grønnfargen hvor cellene ligger, mens gråfargen illustrer områder uten celler.

Ved å aktivere funksjonen for «Well border detection» vil instrumentet bestemme brønngrensen, for så å plassere alle målingene innenfor denne (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 219). I brønnmålingen vist i Figur 21 er denne funksjonen aktivert.



Figur 21: Brønnmåling med funksjonen "Well border detection" aktivert.

Cellemodulen består av en belysningsmodul og en kameramodul (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 213). Prøvene blir belyst fra toppen, mens bildetakingen skjer fra bunnen av, se Figur 22 . Belysningsmodulen består av lysemitterende diode (LED), et aperturhjul og et linsesystem. LED-lampen fungerer som lyskilde (1), lysstrålen blir formet av aperturer i aperturhjulet og linsesystemet (2) dirigerer lyset inn i prøven. Kameramodulen består av et objektiv, et kamera og en laserdiode. Lyset blir samlet av et objektiv (blå plate under brønn, ikke nummerert i figuren) og reflekteres til kameraet (3) av et speil (4). Laserdioden (5) blir brukt til autofokusering (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 213).



Figur 22: Skjematisk framstilling av optikk til celledetelling og måling av cellekonfluens. LED (1), aperturhjul og linsesystem (2), kamera (3), speil (4) og laserdiode (5). (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 213).

1.3 Hensikten med denne oppgaven

Institutt for bioingeniørfag (IBF) ved Norges Teknologiske og Naturvitenskapelige Universitet (NTNU) gikk til innkjøp av analyseinstrumentet Tecan SPARK i november 2021. Hensikten med denne oppgaven er å starte bruken av og utarbeide arbeidsmetoder for dette instrumentet. Protokoller og prosedyrer er nødvendig for å operere et slikt instrument, fremstillingen av disse er dermed en viktig del av bacheloroppgaven.

2. Materiale og metode

I denne bacheloroppgaven ble det utarbeidet en instrumentprotokoll for Tecan SPARK, samt prosedyrer for absorbanmålinger, luminescensmålinger, fluorescensmålinger, celledelling, måling av celleviabilitet og cellekonfluens. De ulike avlesningsmetodene ble prøvd ut, og prosedyrene ble utarbeidet parallelt med utprøvingene.

2.1 Utforming av protokoll og prosedyrer

Instrumentprotokollen og prosedyrene ble utformet etter maler som brukes for kvalitetssikring av laboratoriearbeid ved Institutt for bioingeniørfag ved NTNU. Opplysningene i prosedyrene og instrumentprotokollen baserer seg på instrumentmanualen kalt «TECAN Instructions for Use – Reference Guide SPARK» som ble levert sammen med instrumentet. Produktspesialist Morten Thorsholt ved Bergman Diagnostika har vært tilgjengelig for spørsmål om instrument og programvare. Instrumentet kan kontrolleres gjennom programvarene Spark Control Magellan eller Spark Control (Dashboard). Prosedyrene og instrumentprotokollen som har blitt utarbeidet tar utgangspunkt i Spark Control (Dashboard), men inneholder henvisninger til Spark Control Magellan.

2.2 Utprøvinger av Tecan SPARKs avlesningsfunksjoner og prosedyrer

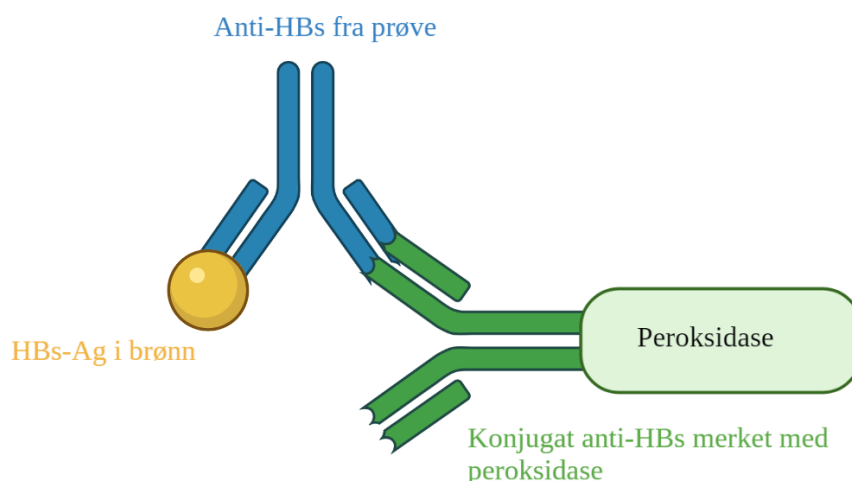
Utprøvingene av prosedyrene ble gjort ved forsøk med formål om å teste moduler for avlesning, samt å undersøke effekten av ulike funksjoner som er beskrevet i prosedyrene. I utprøvingen av prosedyrene for celledelling, celleviabilitet, cellekonfluens og fluorescens ble det utarbeidet egne forsøk og prøvemateriale. I utprøvingen av luminescensprosedyren og absorbanprosedyren ble det utlevert prøvemateriale som hadde blitt lagd i forbindelse med andre laboratorieforsøk. I disse tilfellene ble avlesningen gjennomført på Tecan SPARK og sammenlignet med avlesninger gjort på andre platelesere. Måledatene fra alle forsøkene ble behandlet i dataprogrammet Excel, og er framstilt i ulike tabeller og diagrammer.

2.2.1 Utprøving av prosedyre for absorbanmåling

For å prøve ut absorbanprosedyren og absorbanmodulen til Tecan SPARK ble det gjort avlesninger av MONOLISA Anti-HBs PLUS test (Bio-Rad Laboratories) på serumprøver. Formålet i dette forsøket var å undersøke om Tecan SPARK og Tecan Sunrise filterfotometer

gir samme prøveresultat. Oppsettet ble utført i et laboratoriekurs for studenter ved bioingeniørutdanningen ved NTNU. Mikrotiterplaten ble avlest på Tecan Sunrise plateleser. Etter laboratoriekurset ble mikrotiterplatene avlest på Tecan SPARK, og absorbansverdier og prøveresultater fra disse to instrumentene ble sammenlignet. Avlesningen på begge instrumentene ble gjort to dager etter at analysen ble utført. Sammenligningen tok utgangspunkt i absorbansverdier, «cut off»-verdi, kontrollresultater og prøveresultater for hver av instrumentene.

MONOLISA Anti-HBs PLUS test er en enzymimmunanalyse som brukes til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av antistoffer mot hepatitt B-antigen (anti-HBs) i humant serum eller plasma (se pakningsvedlegg i vedlegg 1). Antistoffene påvises gjennom «sandwich»-prinsippet, illustrert i Figur 23. Mikrotiterplatens brønner er dekket med hepatitt B antigen (HBs-Ag), som vil binde til eventuelle anti-HBs som finnes i prøven. Etter dette tilsettes et konjugat som inneholder nye anti-HBs merket med peroksidase, som vil binde seg til antigen-antistoff-komplekset. Alt ubundet materiale fjernes i et vasketrinn, før substratløsningen med tetrametylbenzidin (TMB) tilsettes og prøvene inkuberes. Om prøven ikke inneholder anti-HBs vil substratløsningen forbli fargeløs. Hvis prøven inneholder anti-HBs, vil peroksidase katalysere en fargeendring av TMB som blir blå. Ved tilsats av en stoppløsning som inneholder svovelsyrling, vil blåfargen bli gul. Utviklingen av gulfargen er proporsjonal med mengden anti-HBs i prøven (vedlegg 1).



Figur 23: Viser ELISA-prinsippet for påvisning av eventuelle hepatitt B-antistoffer (Anti-HBs) fra prøven. Anti-HBs vil binde til hepatitt B antigen (HBs-Ag) fra brønnen. Denne bindingen påvises med konjugat anti-HBs merket med peroksidase som danner en fargereaksjon med substratet. Fargeutviklingen er proporsjonal med mengden anti-HBs i prøven. Figuren ble lagd gjennom programmet BioRender.com.

Testen kan enten gjennomføres kvalitativt eller kvantitativt. I forsøket gjennomført på Institutt for bioingeniør ble den kvalitative metoden benyttet. Der ble det brukt en anti-HBs negativ kontroll, en kalibrator med en anti-HBs konsentrasjon på 10 mLU/mL og en positiv kontroll med en anti-HBs konsentrasjon på 1000 mLU/mL. Kontrollene og de tre pasientprøvene ble satt opp i én parallell, mens kalibratoren ble satt opp i tre paralleller. Avlesningene ble gjort ved 405 nm.

Absorbansverdiene til pasientprøvene ble sammenlignet med en «cut off»-verdi for å bestemme om pasienten har utviklet en tilstrekkelig mengde anti-HBs som gir immunitet. «Cut off»-verdien defineres som den gjennomsnittlige absorbansverdien til de tre kalibratorparallellene. Det ble også beregnet en «Cut off»-sone eller gråsone, et område som indikerer usikre resultater med stor fare for falskt positive eller falskt negative prøvesvar. Gråsonen ble beregnet ved å addere og subtrahere absorbansverdien til den negative kontrollen til absorbansverdien ved «cut off». Dette er vist i formel 7.

$$\text{Absorbansområde gråsone} = [\text{Absorbans}_{\text{Cut off}} \pm \text{Absorbans}_{\text{Neg.ktl}}] \quad (7)$$

Den negative kontrollen godkjennes hvis absorbansverdiene måles mellom 0.000 og 0.070. Den positive kontrollen godkjennes hvis absorbansverdien er over 0.400. Gjennomsnittet av absorbansavlesningene for kalibratoren på 10 mLU/U kalibratorene skal komme innenfor absorbansområdet 0.050-0.200 for å godkjennes. Hvis absorbansmålingene av både den negative og positive kontrollen samt «cut off»-verdien faller innenfor disse områdene, så kan analyseoppsettet godkjennes. Pasientprøvenes absorbansverdi vurderes opp mot «cut off» og gråsone. Positive prøveresultater har absorbansverdier over «cut off» og indikerer tilstrekkelig anti-HBs nivå i prøven for immunitet. Negative prøvesvar har absorbansverdier under «cut off» og indikerer utilstrekkelig mengde av anti-HBs i prøven. Prøver med absorbansverdier i gråsonen betraktes som usikre, og skal analyseres en gang til.

2.2.2 Utprøving av prosedyre for fluorescensmåling

For å teste Tecan SPARKs fluorescensmålinger ble markeringstusj i ulike farger påført brønnbunnene til en transparent mikrotiterplate. Hensikten med dette forsøket er å undersøke effekten av ulike funksjoner nevnt i prosedyren. Rosa markeringstusj ble påført i A- og B-

raden, grønn markeringstusj ble påført i C- og D-raden, oransje markeringstusj ble påført i E- og F-raden, mens gul markeringstusj ble påført i G- og H-raden. Mikrotiterplaten med markeringstusj er vist i Figur 24.



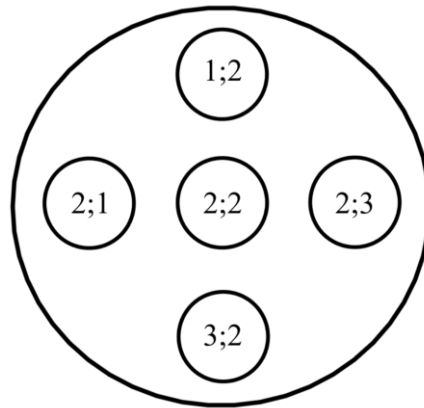
Figur 24: Viser platen som ble benyttet til fluorescensforsøket, med rosa markeringstusj i A- og B-brønnene, grønn markeringstusj i C- og D-brønnene, oransje markeringstusj i E- og F-brønnene, og gul markeringstusj i G- og H-brønnene.

Forsøket ble gjennomført via toppavlesningsmodulen. Eksitasjonsbølgelengden ble satt til 485 nm, mens emisjonsbølgelengden ble målt til 535 nm. Båndbredden ble valgt til 20 nm for begge bølgelengdene. Ved disse bølgelengdene og båndbreddene følges «Minimum Distance Rule» og spektral overlapp unngås.

«Gain» ble satt til «Optimal» og «Z-position» ble satt til «Automatic», der instrumentet beregner egnet multiplikasjonsfaktor og avstand mellom brønn og målehodet. Disse innstillingene var felles for alle målingene som ble gjennomført i forsøket. Det ble utført av fire målinger. Her ble innstillingene for antall lysglimt («flashes») per brønn, samt en funksjon for ulike avlesningsposisjoner i hver brønn («Multiple Reads per Well»), variert. Antallet lysglimt bestemmer hvor mange lyseksponeringer hver brønn får før det dannes en gjennomsnittsverdi av disse som utgis som svar. Ved den første målingen ble det benyttet 30 lysglimt, da dette anbefales for optimale resultater (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 176). For å undersøke dette ble den første målingen sammenlignet med den andre, der det ble benyttet 5 lysglimt per brønn.

I Figur 24 kan man se at markeringstusjen ble noe ujevnt fordelt utover brønnens bakside, der noen steder i brønnen har en sterkere farge enn andre. For å undersøke om ujevn påføring av markeringstusjen kan ha påvirket prøvesvarene ble funksjonen «Multiple reads per Well» benyttet på to nye målinger i kombinasjon med 5 lysglimt og 30 lysglimt.

Avlesningsposisjonene i brønnen er vist i Figur 25.



Figur 25: Illustrerer en brønn med fem ulike avlesningsposisjoner, henvist til som 1;2, 2;1, 2;2, 2;3 og 3;2.

Databehandlingen ble gjort i dataprogrammet Microsoft Excel, der det ble gjort beregninger av gjennomsnitt, standardavvik og % CV av fluorescensmålingene på 5 lysglimt, 30 lysglimt, 5 lysglimt med «Multiple reads per well» og 30 lysglimt med «Multiple reads per well». Excelprogrammet ble også brukt til utarbeidelse «dotplot»- og stolpediagram for sammenligning av fluorescensmålingene.

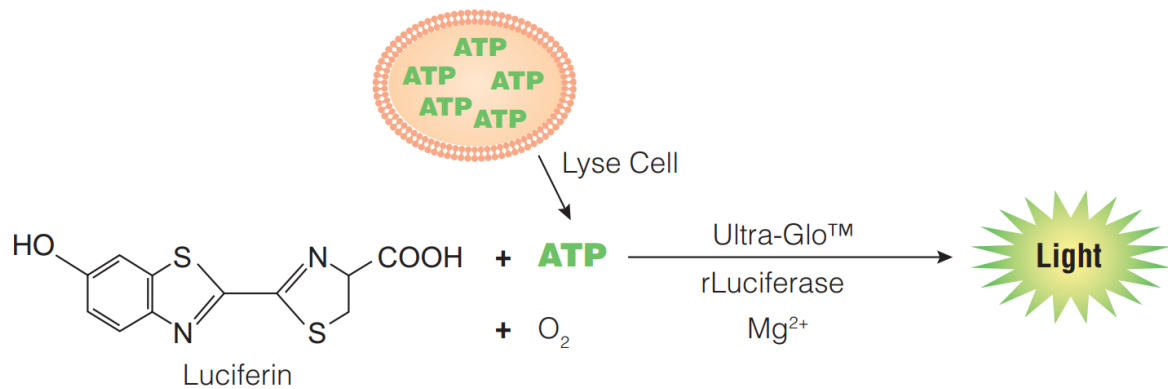
2.2.3 Utprøving av prosedyre for luminescensmåling

Til utprøvingen av luminescensprosedyren ble det benyttet en metode kalt «CellTiter-Glo One Solution Assay» (ProMega, USA) som danner luminescens ved adenintrifosfat (ATP)-innhold i en celledøsning. Det ble lagd et regresjonsplott for å sammenligne måldata fra Tecan SPARK og plateleseren Victor (Perkin Elmer).

Prøvematerialet som ble avlest i dette forsøket ble lagd i forbindelse med et forskningsprosjekt ved instituttet (Førsteamanuensis Toril Holien). Avlesningene ble først utført på plateleseren Victor. Etter at forsøket deres var fullført ble mikrotiterplaten avlest på Tecan SPARK. Luminescenssignalene målt på de to instrumentene ble sammenlignet i et

regresjonsplott og i regresjonsanalyse i Excel for å vurdere hvorvidt de to målesettene samsvarte.

«CellTiter-Glo One Solution Assay» er en homogen metode som blir brukt til å bestemme antallet ATP til stede i en cellesuspensjon, og gir dermed en indikasjon på metabolsk aktivitet blant cellene i løsningen (Promega, 2011). Når cellene lyses vil ATP bli frigjort og kan bindes til det luminescerende stoffet luciferin, se Figur 26. Bindingen gir en stabil glødeluminescens, som er direkte proporsjonal med mengden ATP i løsningen (Promega, 2011). Cellene i dette forsøket ble eksponert for ulike faktorer som nedsetter levedyktigheten, noe som vil reflekteres i et lavere luminescenssignal fra disse brønnene.



Figur 26: Illustrasjon av reaksjonen mellom ATP og luminescens (Promega, 2011)

Luminescensmålingene ble gjort i en hvit mikrotiterplate med transparent bunn. Målingene på Tecan SPARK ble gjort med standardmodulen uten demping av signalene med filter, og med en integreringstid på 1000 millisekunder. Avlesningen på Victor ble gjort 11 minutter før avlesningen på Tecan SPARK.

2.2.4 Utprøving av prosedyre for celledelling og celleviabilitet

Til utprøving av SPARKs funksjoner for celledelling og celleviabilitet, ble det utført et forsøk der en cellesuspensjon av melanomcellelinjen WM239 ble fortynnet med «Minimum Essential Medium Eagle» (Sigma Life Science, Storbritannia) tilsatt 10% føtalt kalveserum, antibiotikaene penicillin og streptomycin, samt L-glutamat. Det ble brukt fire celfortynninger av ulik konsentrasjon, disse ble lagd ved tofoldsfortynninger.

Cellesuspensjonene ble målt to ganger, en celledelling gjennom funksjonen «Cell Counting» og en celleviabilitetsmåling gjennom funksjonen «Cell Viability». Ulike størrelsesområder for celledelingen eller målingen av celleviabilitetsmålingen ble variert, og ble deretter sammenlignet for å finne optimalt størrelsesområde for målingene.

Hensikten med celledelingen er å undersøke om cellekonsentrasjonen følges av tofoldsfortynninger. 10 µL cellesuspensjonen av hver fortynning ble tilsatt i forskjellige kammerer i tellekammeret («Cell Chip», Tecan). Antallet bilder som tas av tellekammeret ble satt til 1. Etter avlesningen ble det lagd et regresjonsplott i Excel, og resultatene ble vurdert ut fra r-verdi.

Formålet med celleviabilitetsforsøket var å undersøke om celleviabiliteten i ulike fortynninger av samme cellesuspensjon var konstant. De samme cellesuspensjonene som ble brukt til celledellingsforsøket ble brukt til å måle celleviabilitet. Trypan blå ble tilsatt cellesuspensjonene i forholdet 1:1 og 10 µL ble tilsatt i tellekammeret. Instrumentet beregner cellekonsentrasjonen med denne fortynningsfaktoren automatisk. Antallet bilder som tas av tellekammeret ble satt til 1.

2.2.5 Utprøving av prosedyre for cellekonfluens

Formålet med konfluensforsøket var å undersøke om ulike avlesningsmønstre i brønnen gir forskjellig konfluensresultat. En cellesuspensjon av melanomcellelinjen WM239 ble fortynnet med «Minimum Essential Medium Eagle» (Sigma Life Science, Storbritannia), tilsatt 10 % føtalt kalveserum, antibiotikaene penicillin og streptomycin, samt L-glutamat. Det ble lagd åtte cellefortynninger via tofoldsfortynning, som ble målt over tre dager med to forskjellige avlesningsmønstrene Hele brønnen («Whole well») og Sentrum («Central») av brønnen. 200 µL av hver cellefortynning ble pipettert i brønnene til en 96-brønners transparent mikrotiterplate.

Konfluensmålingene ble utført 18 ganger. Målingene ble gjort rett etter utsåing, etter 2, 4, 6, 8, 10, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 44, 46, 48, 50, 52 og 54 timers inkubasjon ved 37 grader Celsius, med en karbondioksidkonsentrasjon på 5 %. Under avanserte innstillinger ble «Focus offset

(μm)» og «Settle time» satt til 0, mens «Data analysis included» ble aktivert for begge avlesningsene. For målingene som ble gjort i hele brønnen var «Well border detection» inaktivert. Målingene ble behandlet i Excel, der gjennomsnittet av celledensiteten i tre paralleller ble utregnet og satt inn i et linjediagram.

3. Resultater

I dette kapitlet presenteres prosedyrene og instrumentprotokollen som ble utarbeidet, samt resultatene fra de forsøkene som har blitt gjennomført for utprøvingen av prosedyrene og instrumentet.

3.1 Prosedyrer og instrumentprotokoll

I sidene som følger vil instrumentprotokollen og prosedyrene presenteres.

3.1.1 Instrumentprotokoll Tecan SPARK

KVALITETSSIKRING AV LABORATORIENE

NTNU Institutt for bioingeniørfag	INSTRUMENTPROTOKOLL
	TECAN SPARK

Revisjonsnr. 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 04.05.2022
-------------------	------------	--------------------------------------	-----------------	---------------------

1.0 INSTRUMENTOPPLYSNINGER

- Fabrikasjonsnavn og nummer: SPARK, 30086376
- Forhandler/Kontaktperson: Bergman Diagnostika AS
- Innkjøpt mnd./år: 11/2021
- Innkjøpssum: 880 000 kr. eks. mva.
- Serienummer: 2111013996
- Nummer på instrumentet.: Ikke registret
- Plassering av instrumentet: Celledyrkning, LK24
- Instrumentansvarlig:

2.0 KALIBRERINGSRUTINER

Ingen faste kalibreringsrutiner, servicepersonell sørger for kalibrering av instrumentet når instrumentansvarlig finner det nødvendig.

3.0 BRUKSANVISNING

3.1. Oppstartsrutiner:

1. Start PC, logg inn med passordet «Tecan123»
2. Skru på instrumentet ved «Av/På»-knappen på høyre side av instruments forside. Instrumentet vil lyse blått på venstre side fram til det kobles til PCen.
3. Det finnes to måter for å koble instrumentet til PCen. Hvilken du velger avhenger av hvordan du vil ha måleresultatene presentert. Spark Control Magellan er et datanalyseprogram som kan brukes til å behandle data fra avlesningen og kan brukes til å lage kalibreringskurver, definere positive/negative resultater osv. Se instrumentmanualen merket med «SPARKCONTROL Magellan» ved siden av instrumentet for instruksjoner på hvordan dette gjøres. Måleresultater som gjøres i Spark Control Dashboard eksporteres kun Excel, videre beregninger må derfor gjøres manuelt her.
 - a. Åpne SparkControl Magellan. Instrumentet og PCen vil nå kobles sammen. I vinduet SparkControl Magellan vil gå fra «Configuring» til «Fully Configured», trykk OK. Platebæreren vil komme ut av instrumentet og instrumentet vil lyse lilla på venstre side, instrumentet og PCen er nå koblet sammen. Velg «Method Editor» for å sette opp en målemetode.
 - b. Åpne SparkControl Dashboard. Instrumentet vil være koblet til PC-en når instrumentets serienummer kommer opp på skjermen, sammen med ulike funksjoner. Instrumentets lys på venstre side vil gå fra blått til lilla. Velg ønsket «Method Editor» for å sette opp en målemetode. Se egne prosedyrer for luminescensmålinger, fluorescensmålinger og absorbansmålinger ved instrumentet.

NTNU Institutt for bioingeniørfag	INSTRUMENTPROTOKOLL
	TECAN SPARK

Revisjonsnr. 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 04.05.2022
-------------------	------------	--------------------------------------	-----------------	---------------------

3.2. Bruk av injektorsystem: Se kapittel 16 «Injectors», side 281 i instrumentmanualen.

3.3. Definisjon av “Plate layout” i “Spark Control Dashboard, “Method Editor”:

1. Under «Plate» i venstremenyen kan man velge om man skal bruke en plate, en del av en plate, eller en brønn.
 - a. Hvis plate; velg hvilket Brett som skal benyttes i nedtrekksmenyen.
 - b. Skal prøvene analyseres med lokk? Velg dette i nedtrekksmenyen.
 - c. Har prøvene en fuktighetskasset? Velg dette i nedtrekksmenyen.
 - d. «Smooth mode»: Senker hastigheten på platetransportbevegelsene, forhindrer søl og krysskontaminering.
2. Marker de brønnene du ønsker å benytte. For å definere innholdet i hver av de markerte brønnene velges «Plate Layout»
 - a. I vinduet «Plate Layout» velges hvilket materiale som brønnen skal inneholde.
 - i. «Identifiser-No. Start at»: Her kan du velge hvilket nummer materiale skal ha. Det vil automatisk begynne på 1.
 - ii. «No. of replicates»: Fylles inn ved flere paralleller.
 - iii. «Direction»: Velg hvilken retning parallellene på mikrotiterplaten som prøvene skal fylles inn. Står automatisk på horisontalt.
 - b. Velg hvilket materiale brønnene inneholder under «Identifiers». Se tabellen under for informasjon om hver av forkortelsene. Trykk «Fill selection»

Forkortelse	Materiale
SM	Prøve
BL	Blankprøve
ST	Standard
PC	Positiv kontroll
NC	Negativ kontroll
LPC	Lav positiv kontroll
HPC	Høy positiv kontroll
CL	Kalibrator
BF	Blank for polariseringsreferanse
RF	Referanse

NTNU Institutt for bioingeniørfag	INSTRUMENTPROTOKOLL
	TECAN SPARK

Revisjonsnr. 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 04.05.2022
-------------------	------------	--------------------------------------	-----------------	---------------------

3.4. Lagring av Excel-filer fra «Spark Control Dashboard Metode Editor» med måledata:

Når avlesningen er ferdig vil Excel-filen legges under:

I filutforsker: This PC > OSDisk > Users > Public > Avlesninger på Tecan SPARK

Din avlesning vil lagres etter en standardmal på:

Method 1_*Dagens dato*_ *Klokkeslett for avlesning*

Alle mappene som ligger i «Public» skal kun bestå av navn på den som har gjort avlesningen, og målingen du har gjort skal legges inn under din mappe.

Hvis du ikke har en egen mappe: Åpne en ny mappe ved å velge «Home» øverst i venstre hjørne, og så velge «New folder», merk den nye mappen med ditt eget navn. Høyreklikk på din måling og dra den inn i din egen mappe.

Overføring til USB og egen PC: Hvis du ønsker å overføre måledataene til egen PC kan det gjøres gjennom en USB-penn. I filutforsker finner du måledataene dine etter beskrivelsen gitt ovenfor. Høyreklikk på den målingen du vil overføre, og dra den over til USB-pennen på venstre side av filutforsker. Måledataene vil da kopieres til USB-pennen. Løs ut USB-pennen og overfør dataen til egen pc.

3.5. Avslutningsrutiner:

1. Sjekk at platebæreren er tom.
2. Avhengig av programvare:
 - a. I SparkControl Magellan: Trykk «Exit SparkControl Magellan».
 - b. I SparkControl Dashboard: Velg «Shut Down» via navigasjonsverktøyet på venstre side av hovedmenyen.
3. Skru av instrumentet med knappen på høyre side av instrumentet og PC. Instrumentet vil blinke blått noen ganger før det skrur seg av.

4.0 VEDLIKEHOLDSRUTINER

Service rutiner: Utføres ved behov av servicepersonell fra Bergman Diagnostika.

Daglig og ukentlig vedlikehold skal utføres av alle som bruker instrumentet, dette fylles ut i vedlikeholdsskjemaet.

Utover tellekammeradapteret og injektorsystemet er det ikke behov for daglig vedlikehold eller ukentlig vedlikehold av instrumentet.

4.1. Daglig vedlikehold:

Inspiser prøveområdet for søl: Bytt benkepapir ved behov.

Ved håndtering av søl på instrumentet: Skru alltid av instrumentet før det skal fjernes søl.

1. Søllet skal tørkes opp og kastes i henhold til avfallshåndteringsreglene ved St. Olavs.

NTNU Institutt for bioingeniørfag	INSTRUMENTPROTOKOLL
	TECAN SPARK

Revisjonsnr. 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 04.05.2022
-------------------	------------	--------------------------------------	-----------------	---------------------

2. Vask instruments overflate med et mildt vaskemiddel. Ved smittefarlig søl skal instrumentets overflate også vaskes med ordinær desinfeksjonsprosedyre
3. Tørk det vaskede området slik at det blir tørt.

Injektorsystem: Se kapittel 16.3 «Injector Cleaning and Maintenance», side 289 i instrumentmanualen.

1. Sjekk nålene og ledningene for lekkasjer.
2. Skyll gjennom hele systemet ved destillert eller deionisert vann hver gang etter bruk eller når nålen ikke er i bruk. Hvis dette ikke gjøres, kan det forårsake krystallisering av reagenser i injektorsystemet og resultere i lekkasjer. Dette er også viktig for å unngå kontaminering av reagensene.

4.2. Ukentlig vedlikehold:

Injektorsystem: Se kapittel 16.3 «Injector Cleaning and Maintenance», side 289 i instrumentmanualen.

Injektorsystemet må vaskes ukentlig for å fjerne eventuelle utfellinger av salt og for å eliminere bakterievekst. Følg stegene under for å vaske nåle/injektorsystemet med 70 % etanol

1. Avhengig av brukeres applikasjon, rens instrumentet med buffer eller destillert vann, før det renses med 70 % EtOH.
2. Rens nåla og injektorsystemet ved å la den stå i 70 % EtOH i 30 minutter.
3. Skyll så nåla og injektorsystemet med destillert eller deionisert vann. La det være væske i væskeveien under henstand.
4. Rengjør enden av injektornålene med en bomullspinne med 70 % EtOH eller isopropanol.

4.3. Vedlikehold og rengjøring av tellekammeradapter:

Se kapittel 13.3.3 «Maintenance and Cleaning of the Cell Chip Adapter», side 215 i instrumentmanualen.

1. Bruk engangshansker, briller og beskyttelsestøy.
2. Tøm tellekammeretadapteret
3. Tørk forsiktig overflatene på adapteret med et lofritt papir med 70 % etanol og la adapteret tørke.

5.0 FEILSØKING

Flere «Spark Control»-feilmeldinger er listet opp i instrumentmanualen kapittel 21 «Troubleshooting», side 345.

Om feilmeldingene ikke løses kan Morten Thorsholt fra Bergman Diagnostika kontaktes. E-post: morten.thorsholt@bergmandiag.no

NTNU Institutt for bioingeniørfag	INSTRUMENTPROTOKOLL
	TECAN SPARK

Revisjonsnr. 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 04.05.2022
-------------------	------------	--------------------------------------	-----------------	---------------------

6.0 DOKUMENTASJON

Instrumentmanual:

Tecan Austria GmbH. (2019). Instructions for Use—Reference Guide SPARK
No.30124664, Operation of SPARK with SparkControl Software: Bd. 1.7.

Programvaremanual:

Tecan Austria GmbH. (2022). TECAN Instructions for Use—Reference Guide SPARK
(1.8).

3.1.2 Prosedyre for absorbansmålinger

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	ABSORBANSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.: 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 14.05.2022
--------------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

Antall kopier:

Distribueres til:

1.0 HENSIKT

Formålet med denne prosedyren er på sikre riktig fremgangsmåte for absorbansmålinger på Tecan Spark.

2.0 OMFANG

Prosedyren omfavner mikrotiterplateavleseren Tecan SPARK og personer som skal benytte seg av instrumentet, både i forbindelse med forskning og utdanning.

Instrumentprotokollen til Tecan SPARK er også involvert i denne prosedyren.

3.0 GRUNNLAGSINFORMASJON

Absorbans defineres som mengden av innfallende lys som en løsning vil absorbere ved lyseksponering. Ulike kromoforer har spesifikke og karakteristiske bølgelengder for absorpsjon, og absorpsjonen vil derfor avhenge av bølgelengden til det innfallende lyset. Absorbans kan måles i Tecan SPARK.

Her vil gode rutiner for absorbansmålinger gi best måleresultater, noe som er formålet med denne prosedyren.

4.0 ANSVAR

Alle som benytter instrumentet Tecan SPARK.

5.0 HANDLINGSMØNSTER

5.1 VALG AV PLATER

Absorbansmålingene skjer gjennom mikrotiterplateavlesning, der det er viktig å benytte plater med en transparent bunn. Her kan det benyttes plateformat med opptil 1536 brønner, med og uten lokk. Merk at lokkene kan øke bakgrunnsmålingene, og en nullstilling etter en blankprøve er derfor å anbefale i slike tilfeller.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 1 of 4
----------	------------	----------	-------	-------------

GRÅ TEKST OG GRÅ SKRAVERING: Fylles ikke ut

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	ABSORBANSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.: 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 14.05.2022
--------------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

Tabell 1: Viser anbefalte mikrotiterplater til ulike målinger
(<https://www.tecan.com/knowledge-portal/which-plate-for-which-measurement>)

Mikrotiterplate	Kommentar
Transparent, flat bunn	Standardplatene ved absorpsjonsmålinger.
Transparent, U- eller V-formet bunn	Brukes ved målinger som man ønsker skal foregå i midten av brønnen.
Svart, transparent bunn	Brukes når fluorescens- og absorpsjonsmålinger kombineres, eller ved høye absorpsjonsverdier.
Hvit, transparent bunn	Brukes når absorpsjons- og luminescensmålinger kombineres
UV transparent	Må brukes ved målinger i UV-spekteret (under 300 nm)

5.2. VOLUM VED ULIKE MIKROTITERPLATER

Unngå å fylle brønnene med større volum enn i tabellen nedenfor. Hvis disse volumene overstiges, kan det forekomme krysskontaminering mellom brønnene. «Smooth mode» kan kompensere for dette, men da må maksimum fyllingsvolum optimaliseres gjennom metodevalidering. «Smooth mode» velges automatisk ved mikrotiterplater som har mindre enn 96-brønner. Ved væsker som har mindre viskositet enn vanndige løsninger, bør prøvevolumet optimaliseres gjennom metodevalidering.

Tabell 2: Angir maksimalt volum til mikrotiterplater med ulikt antall brønner

Mikrotiterplate	Volum
1-brønners plate	15 000 µL
4-brønners plate	4500 µL
6-brønners plate	2000 µL
12-brønners plate	1200 µL
24-brønners plate	1000 µL
48-brønners plate	400 µL
96-brønners plate	200 µL
384-brønners plate	100 µL
1536-brønners plate	10 µL

5.3. OPPSETT AV MÅLEMETODER

5.3.1. Absorbans

- Under «Detection» i menyen på venstre side velges målemetode. Velg «Absorbance», trekk målemetoden inn mot midtskjermen (under platen) for å legge den inn i arbeidslisten.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 2 of 4
----------	------------	----------	-------	-------------

GRÅ TEKST OG GRÅ SKRAVERING: Fylles ikke ut

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	ABSORBANSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.: 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 14.05.2022
--------------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

2. For definisjon av «Plate Layout», se instrumentprotokollen kapittel 3.2, Definisjon av «Plate layout» i «Spark Control Dashboard Method Editor».
3. Gi målingen et navn under «Name». Vær oppmerksom på at dette ikke blir navnet på Excel-fila med resultatene, og at dette navnet må endres etterpå. Se instruksjoner i instrumentprotokollen, kapittel 3.3 Lagring av Excel-filer med måledata.
4. Velg ønsket bølgelengde for målingen, ved «Measurement wavelength (nm)».
 - a. Hvis man ønsker en måling på en referansebølgelengde, hukes det av for «Reference». Skriv referansebølgelengde i feltet.
5. «Bandwidth»: Båndbredden er fiksert på 3,5 nm.
6. Under «Show Advanced settings»: For optimale måleresultat, anbefales det å bruke de automatiske innstillingene.
 - a. «Flashes»: Angir antall lysglimt som sendes mot brønnen.
 - b. «Settle time (ms)»: Angir tiden fra mikrotiterplaten er i bevegelse til målingen starter. Forhindrer vibrasjoner i væsken når måling finner sted.
 - c. «Multiple reads per well»:
 - i. «User defined»: Angir ulike avlesningsposisjoner i brønnen, avhengig av antall «flashes» som er satt ovenfor. Måleresultatet blir gitt som et gjennomsnitt av de ulike avlesningsposisjonene, med et standardavvik. Velges for å definere «Type», «Size» og «Border».
 - ii. «Area Scan»: Gir et fingranulert bilde av absorbansforskjeller innad i brønnen.
 - iii. «Not defined»: Avlesningsposisjonen vil være den samme for alle lysglimtene.
 - d. Pathlength correction:
 - i. «Defined»: Alle målinger blir korrigert til en lysvei på 1cm.
 - ii. «Not defined»: Målingene vil ikke korrigeres.
9. Trykk Start i verktøymenyen for å starte analyseringen.

5.3.2. Absorbansspektrum

1. Under «Detection» i menyen på venstre side velges målemetode. Velg «Absorbance Scan», trekk målemetoden inn mot midtskjermen (under platen) for å legge den inn i arbeidslisten.
2. For definisjon av «Plate Layout», se instrumentprotokollen kapittel 3.2, Definisjon av «Plate layout» i «Spark Control Dashboard Method Editor».
3. Gi målingen et navn under «Name». Vær oppmerksom på at dette ikke blir navnet på Excel-fila med resultatene, og at dette navnet må endres etterpå. Se instruksjoner i instrumentprotokollen, kapittel 3.3 Lagring av Excel-filer med måledata.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 3 of 4
----------	------------	----------	-------	-------------

GRÅ TEKST OG GRÅ SKRAVERING: Fylles ikke ut

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	ABSORBANSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.: 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 14.05.2022
--------------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

4. «Wavelength»:
 - a. Velg bølgelengdeområde for avlesningen ved «From» og «To»
 - b. «Bandwidth»: Båndbredden er fiksert på 3,5.
 - c. «Step size»: Antall nm økning for hver måling i spektrumet.
5. Trykk Start i verktøymenyen for å starte analyseringen.

5.4. OPTIMALISERING AV ABSORBANSMÅLINGER

- Justere antall lysglimt: Øk antall lysglimt for å oppnå nøyaktige resultater.
- Justering av «Settle Time»: Som følge av platebærerens bevegelser kan løsningsene i brønnene vibrere når signalintegrasjonen starter. Vibrasjonene kan føre til upresise målinger, og det anbefales å sette tiden mellom platebærerens bevegelse til signalintegrasjon mellom 100 og 300 ms.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 4 of 4
----------	------------	----------	-------	-------------

GRÅ TEKST OG GRÅ SKRAVERING: Fylles ikke ut

3.1.3 Prosedyre for fluorescensmåling

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	FLUORESCENSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 12.05.2022
--------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

Antall kopier:

Distribueres til:

1.0 HENSIKT

Formålet med denne prosedyren er på sikre riktig fremgangsmåte for fluorescensmålinger på Tecan Spark.

2.0 OMFANG

Prosedyren omfavner Tecan SPARK og personer som skal benytte seg av instrumentet, både i forbindelse med forskning og utdanning. Instrumentprotokollen til Tecan SPARK er også involvert i denne prosedyren.

3.0 GRUNNLAGSINFORMASJON

Fluorescens finner sted når et molekyl absorberer lysenergi på en bestemt bølgelengde, for så å emitte lys i form av fotoner på lengre bølgelengde. Dette fenomenet kan måles på flere måter i Tecan Spark, der gode rutiner for fluorescensmålingene gir best resultater.

4.0 ANSVAR

Alle som benytter instrumentet Tecan SPARK.

5.0 HANDLINGSMØNSTER

5.1. VALG AV PLATER

Hvilken plate man skal velge avhenger av hvilken fluorescensmodul og målemetode man vil benytte.

5.1.1. Ved fluorescens toppmodul og fluorescenspolarisering:

Disse målingene skjer ovenfor brønnen, slik at brønner som ikke er transparente kan brukes uten at det påvirker avlesningen. Det anbefales likevel å benytte svarte mikrotiterplater, da materiale i brønnen absorberer refleksjoner og har mindre autofluorescens og reduserer signal/støy-ratioen. Transparente plater bør ikke brukes med fluorescensmålinger, da refleksjoner eller uspesifikke signaler kan påvirke sensitiviteten. Platene kan ha lokk, men dette reduserer også sensitiviteten. Ved svært svake signaler kan det være en fordel å bruke hvite plater.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 1 of 6
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	FLUORESCENSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 12.05.2022
--------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

Tabell 1: Viser anbefalte mikrotiterplater til ulike målinger

Mikrotiterplate	Kommentar
Svarte	Ideell for fluorescensmålinger gjennom toppmodulen og måling av fluorescens polarisering
Svarte med transparent bunn	Brukes der absorban- og fluorescensmålinger kombineres. Kan redusere sensitiviteten noe.
Hvite	Brukes for svært svake signaler.

5.1.2. Ved fluorescens bunnmodul:

Målingen skjer fra bunnen av mikrotiterplaten og en transparent bunn er obligatorisk for denne modulen. Her anbefales det å bruke plater med svarte vegger og transparent bunn.

Tabell 2: Viser anbefalte mikrotiterplater til fluorescensmålinger som skjer gjennom bunnmodulen.

Mikrotiterplate	Kommentar
Svart, transparent bunn	Ideell for fluorescens bunnmålinger

5.2. VOLUM VED ULIKE MIKROTITERPLATER

Unngå å fylle brønnene med større volum enn i tabellen nedenfor. Hvis disse volumene overstiges, kan det forekomme krysskontaminering mellom brønnene. «Smooth mode» kan kompensere for dette, men da må maksimum fyllingsvolum optimaliseres gjennom metodevalidering. «Smooth mode» velges automatisk ved mikrotiterplater som har mindre enn 96-brønner. Ved væsker som har mindre viskositet enn vandige løsninger, bør prøvevolumet optimaliseres gjennom metodevalidering.

Tabell 3: Angir maksimalt volum til mikrotiterplater med ulikt antall brønner

Mikrotiterplate	Volum
1-brønners plate	15 000 µL
4-brønners plate	4 500 µL
6-brønners plate	2 000 µL
12-brønners plate	1 200 µL
24-brønners plate	1 000 µL
48-brønners plate	400 µL
96-brønners plate	200 µL
384-brønners plate	100 µL
1536-brønners plate	10 µL

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 2 of 6
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	FLUORESCENSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 12.05.2022
--------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

5.3. OPPSETT AV MÅLEMETODE

5.3.3. Fluorescensintensitet

1. Under «Detection» i menyen på venstre side velges målemetode. Velg «Fluorescence Intensity», trekk målemetoden inn mot midtskjermen (under platen) for å legge den inn i arbeidslisten.
2. For definisjon av «Plate Layout», se instrumentprotokollen kapittel 3.2, Definisjon av «Plate layout» i «Spark Control Dashboard Method Editor».
3. Gi målingen et navn under «Name». Vær oppmerksom på at dette ikke blir navnet på Excel-fila, og at dette navnet må endres etterpå. Se instrumentprotokollen, kapittel 3.3 Lagring av Excel-filer med måledata.
4. Under «Mode» velges hvilken fluorescensmodul som skal benyttes:
 - a. Velg «Top» ved homogene fluoriserende løsninger
 - b. Velg «Bottom» ved adherente celler
5. «Fluorophore»: Hvilken fluorofor som blir benyttet i målingen kan velges her. Egnede bølgelengder for eksitasjon og emisjon vil velges deretter automatisk, men kan justeres. Velg «Other» om du ikke finner fluorofor du benytter i listen.
6. Bølgelengdeseleksjonen kan skje enten ved bruk av monokromatorer eller ved bruk av filter, eller ved en kombinasjon av begge:
 - a. Monokromator: Velg bølgelengde og ønsket båndbredde. Ved standard fluorescensmålinger er båndbredden satt til 20 nm for både emisjon og eksitasjon. Ved forbedret fluorescensmodul kan båndbredden velges. I slike tilfeller bør det være minimum 45 nm mellom eksitasjons- og emisjonsbølgelengdene for å forhindre interferens.
 - b. Filter: Filtrene installeres i filterslides på framsiden av instrumentet. Hver slide inneholder 6 filtre, disse byttes manuelt. Bruk funksjonene for bytte av filtrene i «Tool Bar» som ligger øverst, midt på skjermen. Filtrene kan også tas ut ved å trykke piltasten med F på, på høyre side av instrumentet.
7. Under «Show Advanced Settings»: For optimal avlesningen, velg de automatiske innstillingene.
 - a. «Flashes»: Angir antall lysglimt som sendes mot brønnen.
 - b. «Gain»: Angir en multipliseringsfaktor for signalene som detektoren plukker opp.
 - i. «Optimal gain»: Velges når brønnen med mest fluorescens er ukjent. Instrumentet finner brønnen og bestemmer RFU-verdien til denne først, for så bestemme «Gain»-verdien som skal brukes i resten av målingene.
 - ii. «Calculate from well»: Velges når man vet hvilken brønn som har fluorescens. «Gain»-verdien til den valgte brønnen brukes til målingen i de resterende brønnene.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 3 of 6
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	FLUORESCENSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 12.05.2022
--------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

- iii. «Extended dynamic range»: Velges når man vet at platen inneholder prøver med svært høyt og svært lavt fluorescenssignal. Instrumentet bruker to separate «Gain»-verdier for å måle prøvene, en høy og en lav. Resultatene fra begge målingene korreleres og vises som et datasett.
 - iv. «Manual gain»: «Gain»-verdien bestemmes av operatøren, i området 0 til 255.
 - c. «Mirror»:
 - i. «Automatic»: Instrumentet bestemmer hvilket speil er best egnet til bølgelengdene som har blitt valgt ovenfor.
 - ii. «Select manually»: Hvilket speil som brukes velges av operatøren.
 - d. «Z-position (µm)»: Angir avstanden fra målehodet til brønnen.
 - i. «Manual»: Definer en verdi som skal brukes målingene.
 - ii. «Calculated from well»: Velg en brønn som skal benyttes til bestemmelse av Z-posisjonen. Den utregnede verdien brukes til resten av målingene.
 - e. «Settle time (ms)»: Angir tiden fra mikrotiterplaten er i bevegelse til målingen starter. Brukes for å unngå vibrasjoner i væsken når måling finner sted.
 - f. «Multiple reads per well»:
 - i. «User defined»: Angir ulike avlesningsposisjoner i brønnen, avhengig av antall «flashes» som er satt ovenfor. Velges for å definere «Type», «Size» og «Border». Avlesningsresultatet gis ut som en gjennomsnittsverdi (med standardavvik) av disse målingene.
 - ii. «Not defined»: Avlesningen skjer i samme posisjon.
8. Trykk Start i verktøylinjen for å starte analyseringen.

5.3.4. Fluorescensspektrum

1. Under «Detection» i menyen på venstre side velges målemetode. Velg «Fluorescence Intensity Scan», trekk målemetoden inn mot midtskjermen (under platen) for å legge den inn i arbeidslisten.
1. For definisjon av «Plate Layout», se instrumentprotokollen kapittel 3.2, Definisjon av «Plate layout» i «Spark Control Dashboard Method Editor».
2. Gi målingen et navn under «Name». Vær oppmerksom på at dette ikke blir navnet på Excel-fila med resultatene, og at dette navnet må endres etterpå. Se instruksjoner i instrumentprotokollen, kapittel 3.3 Lagring av Excel-filer med måledata.
3. «Scan selection»: Velg
 - a. «Excitation Scan»: For eksitasjonsspektrum
 - b. «Emission Scan»: For emisjonsspektrum

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 4 of 6
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	FLUORESCENSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 12.05.2022
--------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

- c. «3D Scan»: For 3D-spektrum. Generer et emisjonsspektrum som et resultat av eksitasjonsbølgelengder, og kombinerer disse.
 4. «Mode»: Velg hvilken modul du vil benytte for avlesninga. Velg
 - a. «Top» for toppavlesninger: Homogene fluoriserende løsninger
 - b. «Bottom» for bunnavlesninger: Adherente celler
 5. «Excitation wavelenght (nm)»:
 - a. «Excitation scan/3D scan»: Definer eksitasjonsområdet ved «From» og «To».
 - b. «Emission scan»: Definer eksitasjonsbølgelengden.
 - c. «Bandwidth»: Velg båndbredde
 - d. «Step size»: Angir antall nm økning for hvert punkt i spektrumet.
 6. «Emission wavelenght (nm)»:
 - a. «Excitation scan»: Definerer emisjonsbølgelengden. Ved «Fusion Optics system»; velg enten «Monochromator» eller «Filter Mode».
 - b. «Emission scan/3D scan»: Definer emisjonsområde ved «From» og «To».
 - c. «Bandwidth»: Ved bruk av monokromatoren, velges båndbredden for eksitasjonen og emisjonen.
 - d. «Step size»: Angir antall nm økning for hvert punkt i spektrumet.
 7. «Show advanced settings»: Se punkt 13 under kapittel 5.3.3
Fluorescensintensitet for beskrivelse av «Flashes», «Gain», «Mirror», «Z-position (µm)» og «Settle time (ms)»
 - a. «Signal integration (µs)»:
 - i. «Lag time»: angir tiden mellom lysglimtene og starten av signalintegrasjonen.
 - ii. «Integration time»: Bestemmer varigheten av målingene per brønn.

5.3.5. Optimalisering av fluorescensmålinger:

Se kapittel 12.14 “Optimizing Fluorescence and Fluorescence Polarization Measurements”, side 185 i instrumentmanualen

- Justere «Gain»: «Gain»-verdien defineres som multiplikasjonsfaktoren som detektoren bruker for å konvertere lys til elektrisk strøm. Signal/støy-ratio en og lineariteten til målingene avhenger av «Gain»-verdien. «Gain»-verdier under 40 bør unngås, og bør bestemmes ut ifra den brønnen med høyest fluorescenssignalene for å unngå «OVER»-flagg i måleresultatene. Dette gjøres ved å benytte funksjonene «optimal gain» eller «calculate gain from well».
- Skan av Z-posisjon: Z-posisjonen kan optimaliseres i «Method Editor» eller via SparkControl Dashboard. Her velges brønnene man ønsker at Z-posisjonen skal optimaliseres mot. Trykk «Scan» for å starte optimaliseringen. Etter

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 5 of 6
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	FLUORESCENSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 12.05.2022
--------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

målingen vil man få en Z-posisjonkurve med korresponderende Z-posisjonsverdier. Velg Z-posisjon og trykk «Apply».

- «Max Signal/Blank Ratio»: Tilgjengelige for fluorescensintensitetsmålinger og fluorescensspektrum. Krever to brønner, en med fluoroforen som skal måles (signal) og en fylt med buffer (blank). Begge brønnene blir skannet, og det resulterende signal/blank forholdet blir vist i en graf. Z-posisjonen kan nå settes til den maksimale S/B-ratioen.
- Justere antall lysglimt («Flash Settings»): Et økt antall lysglimt gir mer nøyaktige måledata.
- «Settle time»: Platebærerens bevegelser kan gi væskevibrasjoner under målingene, og kan gi variasjoner i måleresultatene. «Settle time» angir tiden fra siste platebevegelse til første lysglimt. Det anbefales å bruke en «settle time»-verdi mellom 100 og 300 ms for fluorescens polariseringsmålinger og fluorescensmålinger i plateformat med mindre enn 96 brønner.
- «Multiple reads per well»: Tilgjengelig for fluorescensmålinger gjennom toppmodulen og bunnmodulen med fiksert båndbredde. Denne funksjonen er egnet for cellebaserte målinger, da fordelingen av celler i brønnen kan være ujevn. «
- «G-factor»: Se kapittel 12.12.2 «Fluorescence Polarization Detection/G-Factor Detection», side 189

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 6 of 6
----------	------------	----------	-------	-------------

3.1.4 Prosedyre for luminescensmålinger

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	LUMINESCENSMAÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.: 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 04.05.2022
--------------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

Antall kopier:

Distribueres til:

1.0 HENSIKT

Formålet med denne prosedyren er på sikre riktig fremgangsmåte for luminescensmålinger på Tecan Spark.

2.0 OMFANG

Prosedyren omfavner mikrotiterplateavleseren Tecan SPARK og personer som skal benytte seg av instrumentet, både i forbindelse med forskning og med utdanning.

Instrumentprotokollen til Tecan SPARK er også involvert i denne prosedyren.

3.0 GRUNNLAGSINFORMASJON

Luminescens er emisjon av lys som resultat av en kjemisk, biologisk eller elektrokjemisk reaksjon. Kjemiluminescens finner sted når et elektron returner fra et høyere energinivå tilbake til et lavere energinivå. Dette fenomenet kan måles i Tecan SPARK, der man skiller mellom glødeluminescens ("glow luminescens"), blitsluminescens ("flash luminescens") og flerfarget luminescens ("multicolor luminescens"). Ved glødeluminescens vil det måles stabile luminescenssignaler over lengre tid, mens ved blitsluminescens vil det dannes et svært kortvarig luminescenssignal. Ved flerfarget luminescens vil man ta høyde for flere ulike lysemitterende forbindelser. Disse kan måles med to moduler, en standardmodul og en forbedret modul («Enhanced Module») egnet for svakere signaler.

Her vil gode rutiner for luminescensmålinger gi best måleresultater, noe som er formålet for denne prosedyren.

4.0 ANSVAR

Alle som benytter instrumentet Tecan SPARK til måling av luminescens.

5.0 HANDLINGSMØNSTER

5.1. VALG AV PLATER

Hvite platene er best egnet til luminescensmålingene. Det hvite materialet reflekterer lys som blir emittert av prøva, og kan derfor øke sensitiviteten. Vær sikker på at du velger riktig «plate definition file» i programvaren, da dette gir en optimal måling. Hvite plater med transparent bunn kan benyttes hvis luminescensmålingen skal kombineres med en absorbansmåling, eller om

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 1 of 6
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	LUMINESCENSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.: 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 04.05.2022
--------------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

prøvene skal sjekkes visuelt med mikroskop. Den transparente bunnen øker risikoen for interferens (da kan slukking av signal etter måling være et alternativ). Hvit teip kan brukes for å dekke platebunnen og forhindre interferenser, men påvirkningen kan likevel være signifikant. Ikke bruk helt transparente plater eller plater med lokk, det vil resultere i interferens brønnene imellom.

Tabell 1: Viser anbefalte mikrotiterplater til ulike målinger
(<https://www.tecan.com/knowledge-portal/which-plate-for-which-measurement>)

Mikrotiterplate	Kommentar
Hvit	Ideell for måling av luminescens.
Hvit med transparent bunn	Brukes vanligvis hvis man skal kombinere luminescensmålinger med absorbansmålinger. Brønnene kan interfare med hverandre.
Hvit, med transparent bunn og hvit teip på platebunnen.	Gir en økt interferens med transparent bunn, men denne er likevel mindre enn uten teip.

5.2. VOLUM VED ULIKE MIKROTITERPLATER

Unngå å fylle brønnene med større volum enn i tabellen nedenfor. Hvis disse volumene overstiges kan det forekomme krysskontaminering mellom brønnene. «Smooth mode» kan kompensere for dette, men da må maksimum fyllingsvolum på nytt optimaliseres gjennom metodevalidering. «Smooth mode» velges automatisk ved mikrotiterplater som har mindre enn 96-brønner. Ved væsker som har mindre viskositet enn vandige løsninger, bør prøvevolumet optimaliseres gjennom metodevalidering.

Tabell 2: Angir maksimalt volum til mikrotiterplater med ulikt antall brønner

Mikrotiterplate	Volum
1-brønners plate	15 000 µL
4-brønners plate	4500 µL
6-brønners plate	2000 µL
12-brønners plate	1200 µL
24-brønners plate	1000 µL
48-brønners plate	400 µL
96-brønners plate	200 µL
384-brønners plate	100 µL
1536-brønners plate	10 µL

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 2 of 6
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	LUMINESCENSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.: 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 04.05.2022
--------------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

5.3. BLITSLUMINESCENS («FLASH LUMINESCENCE») OG BRUK AV INJEKTORMODUL

På grunn av varigheten av blitsluminescenssignalene bør målingen skje idet reagensene blir tilsatt eller rett etter at reagensene har blitt tilsatt. Det er derfor hensiktsmessig å benytte injektorene som instrumentet er utstyrt med.

Injektormodulen er en ekstern enhet fra instrumentet, bestående av to nåler. Injektornålene kan romme volum på 500 µL, 1000 µL og 2000 µL, og kan brukes på mikrotiterplater med opptil 384 brønner.

Når injektoren brukes i en måleprosedyre, er det viktig at injektorholderen er korrekt plassert på instrumentet. Se instruksjoner i kapittel 16 «Injectors», side 281 i instrumentmanualen.

1. Fjern injektordummyen som sitter i instrumentet. Erstatt denne med injektorholderen.
2. Press injektorholderen forsiktig på plass i inngangen for å låse den til instrumentet. Instrumentet har sensorer som vil gjenkjenne injektoren, men om denne ikke er korrekt installert så vil ikke instrumentet gjenkjenne injektoren. Injektoren vil bli deaktivert, men prosedyrer som rensing og priming kan likevel fortsatt gjennomføres. Hvis disse prosedyrene settes i gang og injektoren ikke er korrekt installert, kan det skade instrumentet. Det er derfor viktig å undersøke om injektoren er korrekt installert før man setter i gang priming og rensing.
3. Før injeksjonssystemet kan benyttes er det viktig å prime injeksjonsnåla. For prosedyrer på priming og rensing, se instrumentmanualen side 285.
4. For oppsett av målemetode med injektorer, se side 291 i instrumentmanualen.
5. Når måleprosedyren er ferdig, skal injektordummiene settes på plass i instrumentet igjen. Dette er for å sikre en korrekt atmosfære og gi instrumentet stabilitet.

5.4. OPPSETT AV MÅLEMETODE

Før måling av luminescens, anbefales det at instrumentet har stått på i 15 minutter. Dette gir stabile forhold for luminescensavlesningen.

5.4.1. Måling av luminescens ved standardmodul

1. Under «Detection» i menyen på venstre side velges målemetode. Velg «Luminescence», trekk målemetoden inn mot midtskjermen (under platen) for å legge den inn i arbeidslisten.
2. For definisjon av «Plate Layout», se instrumentprotokollen kapittel 3.2, Definisjon av «Plate layout» i «Spark Control Dashboard Method Editor».
3. Gi målingen et navn under «Name». Vær oppmerksom på at dette ikke blir navnet på Excel-fila med resultatene, og at dette navnet må endres etterpå. Se instruksjoner i instrumentprotokollen, kapittel 3.3 Lagring av Excel-filer med måldata.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 3 of 6
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	LUMINESCENSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.: 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 04.05.2022
--------------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

4. «Type»
 - a. «Attenuation»: Målinger med ingen bølgelengdeseleksjon. Velg om og hvordan luminescenssignalene skal dempes.
 - i. «None»: Ingen filtre bli valgt, ingen demping av signaler.
 - ii. «OD1»: Signalintensiteten blir dempet med en faktor på 10.
 - iii. «OD2»: Signalintensitet blir dempet med en faktor på 100.
 - iv. «Automatic»: Dempingsinnstillingene blir definert for hver brønn.
 - b. «Filter settings»: Målinger med bølgelengdeseleksjon. Velg bølgelengdene du vil måle ved å justere på fargespekteret. Sentral bølgelengde og båndbredde velges automatisk deretter. Alternativt: Trykk evt. på Liste-symbolet i høyre hjørne, her kan du legge inn ønskede bølgelengder i feltene.
5. “Integration time”: Angir tid før signalintegring av den første brønnen starter.
6. Under «Show advanced settings»:
 - a. «Settle time»: Definerer tiden fra platebevegelse til starten av signalintegrasjonen. Hindrer at vibrasjoner i prøveløsningen skal påvirke måleresultatet.
 - b. «Output»: Angi ønsket måleenhet, «counts» eller «counts/s»
7. Trykk Start i verktøylinjen for å starte analyseringen.

5.4.2. Måling av flerfarget luminescens (“Multicolor Luminescence”):

1. Under «Detection» i menyen på venstre side velges målemetode. Velg «Luminescence», trekk målemetoden inn mot midtskjermen (under platen) for å legge den inn i arbeidslisten.
2. For definisjon av «Plate Layout», se instrumentprotokollen kapittel 3.2, Definisjon av «Plate layout» i «Spark Control Dashboard Method Editor».
3. Gi målingen et navn under «Name». Vær oppmerksom på at dette ikke blir navnet på Excel-fila med resultatene, og at dette navnet må endres etterpå. Se instruksjoner i instrumentprotokollen, kapittel 3.3 Lagring av Excel-filer med måledata.
4. «Application»: Velg
 - a. «New»: For å velge en ny applikasjon.
 - b. «BRET1/BRET2/BRET3/Chroma-Glo»: For å bruke definerte filterinnstillinger mer optimalisert for hver applikasjon.
5. Trykk så «Add» for legge denne til i arbeidslista.
6. «Color»: Antallet «Label» indikerer de luminiserende forbindelser som skal måles. Antallet må være mellom to og fem luminiserende forbindelser for å benytte denne målemetoden.
7. «Name»: Navngi de ulike fluoriserende forbindelsene.
8. «Filter settings»: Definer hvilket båndpassfilter som skal bli brukt til deteksjon av hver de luminescerende forbindelsene.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 4 of 6
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	LUMINESCENS MÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.: 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 04.05.2022
--------------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

- c. Velg bølgelengdeområde ved å justere «From» og «To» med å dra i grensene i fargespekteret. Sentral bølgelengde og båndbredde velges automatisk deretter.
Alternativt: Trykk evt. på Liste-symbolet i høyre hjørne, her kan du sette inn ønskede bølgelengder i feltene.
9. «Integration time (ms)»: Angir tid for signalintegrasjonen.
10. «Show advanced setting»: Se punkt 6, kapittel 5.4.1 Måling av luminescens ved standardmodul.
11. «Delete»: Fjerner en av de luminiserende forbindelsene i målingen.

5.4.3. Luminescensspektrum

- Under «Detection» i menyen på venstre side velges målemetode. Velg «Luminescence», trekk målemetoden inn mot midtskjermen (under platen) for å legge den inn i arbeidslisten.
- For definisjon av «Plate Layout», se instrumentprotokollen kapittel 3.2, Definisjon av «Plate layout» i «Spark Control Dashboard Method Editor».
- Gi målingen et navn under «Name». Vær oppmerksom på at dette ikke blir navnet på Excel-fila med resultatene, og at dette navnet må endres etterpå. Se instruksjoner i instrumentprotokollen, kapittel 3.3 Lagring av Excel-filer med måldata.
- Velg «Central bølgelengde (nm)»: Definer område for den sentrale bølgelengden som skal brukes i målingen.
 - Juster «From» og «To» med å dra i grensene i fargespekteret.
 - Alternativ; trykk på Listeikonet i høyre hjørnet og skriv inn bølgelengdene i feltene.
 - «Bandwidth»: Fiksert til 25 nm.
 - «Step size»: Fiksert til 15 nm.
- «Integration time (ms)»: Angir tid for signalintegrasjonen.
- «Show advanced setting»: Se punkt 12, kapittel 5.4.1 Måling av luminescens ved standardmodul.
 - Corrected spectra: Hukes av for korrigeringsdata.

5.4.4. Optimaliseringen av luminescensmålinger:

- Justering av «Integration Time»: Ved veldig lav lysintensitet vil målte fotoner per sekund være proporsjonale med lysintensiteten. Ved å øke måletiden per brønn, vil man øke nøyaktigheten på grunn av irregulær fotoninnvirkning («irregular photon impact»).
- Justering av lysdempingen («Light Attenuation»): Hvis fotonene kommer inn mot fotontellemodulen og modulen ikke klarer å skille mellom distinktive fotoner, vil resultatene bli markert som «OVER». Signalene kan dempes ved å bruke absorpsjonsfiltre i lysveien. OD1, OD2 (og

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 5 of 6
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	LUMINESCENSMÅLINGER PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.: 1	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 04.05.2022
--------------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

kombinert som OD3) kan brukes til å dempe høye lysnivåer med faktorer på 10, 100 og 1000.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 6 of 6
----------	------------	----------	-------	-------------

3.1.5 Prosedyrer for celledelling

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	CELLETELLING PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 12.05.2022
--------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

Antall kopier:

Distribueres til:

1.0 HENSIKT

Formålet med denne prosedyren er på sikre riktig fremgangsmåte for celledelling på Tecan Spark.

2.0 OMFANG

Prosedyren omfavner Tecan SPARK og personer som skal benytte seg av instrumentet, både i forbindelse med forskning og utdanning. Instrumentprotokollen til Tecan SPARK er også involvert i denne prosedyren.

3.0 GRUNNLAGSINFORMASJON

Celledellingsfunksjonen til Tecan SPARK gir informasjon om cellekonsentrasjon i celler/mL, gjennomsnittlig størrelse på cellene i tellekammeret, minste og største cellediameter av cellene i tellekammeret.

4.0 ANSVAR

Alle som benytter instrumentet Tecan SPARK.

5.0 HANDLINGSMØNSTER

5.1. OPPSETT AV MÅLEMETODE

1. Åpne «Spark Control Dashboard», trykk på knappen med «App Cell Chip, Cell Counting».
2. Velg hvilke kamre som skal telles.
3. «Cell size» (nede i venstre hjørne): Velg størrelsesområdet på cellene du ønsker skal telles.
4. «Images» (nede i venstre hjørne): Velg antall bilder du ønsker at tellingen skal basere seg på, enten 1, 4 eller 8 bilder.
5. «Duplicates» (nede i venstre hjørne): Kan defineres om det er samme prøve i begge prøvekammer i tellekammeret. Huk av for det aktuelle tellekammeret.

5.2. PRØVEFORBEREDELSE

Til celledelling må tellekammer og tellekammeradapter benyttes. Tellekammeret er til engangsbruk og inneholder to prøvekammer som hver rommer 10 µL. Opptil fire tellekamre kan plasseres i tellekammeradapteret.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 1 of 2
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	CELLETELLING PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 12.05.2022
--------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

1. Fyll et prøvekammer med 10 µL av celleduspensjonen. Unngå luftbobler når prøvekammeret fylles, dette kan gi en ujevn fordeling av cellene.
2. Plasser tellekammeret i tellekammeradapteret. Forsikre deg om at tellekammeret er plassert riktig, øverste høyre per slipt for gi riktig orientering av tellekammeret.
3. Plasser tellekammeradapteret i platebæreren slik at kammer A1 ligger lengst inn til venstre i instrumentet.
4. Trykk «Start» ved nede i høyre.
5. Kast tellekammeret i egnet beholder når analyseringen er ferdig.

5.3. OPTIMALISERING AV CELLETELLINGENE:

Se kapittel 13.6 “Optimizing Cell Counting Measurements”, side 218 i instrumentmanualen.

- Øke antallet bilder: Celletellingene og målingene av celleviabilitet blir gjort på små volum. Ved cellekonsentrasjoner under 10 000 celler/mL vil antallet celler per bilde være lavt, og cellene vil ofte har en irregulær fordeling i tellekammeret. For å kompensere for dette anbefales det å ta 4 eller 8 bilder av celleduspensjoner med så lav konsentrasjon.
- Bruk av «Live Viewer»: Fungerer som et mikroskop og gir informasjon om cellenes tilstand. Ved bruk av «Live Viewer» i oppsettet av metoden kan autofokus-posisjonen bli korrigert av en «off set»-verdi som bestemmes.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 2 of 2
----------	------------	----------	-------	-------------

3.1.6 Prosedyre for måling av celleviabilitet

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	MÅLING AV CELLEVIABILITET PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 12.05.2022
--------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

Antall kopier:

Distribueres til:

1.0 HENSIKT

Formålet med denne prosedyren er på sikre riktig fremgangsmåte for måling av celleviabilitet på Tecan Spark.

2.0 OMFANG

Prosedyren omfavner Tecan SPARK og personer som skal benytte seg av instrumentet, både i forbindelse med forskning og utdanning. Instrumentprotokollen til Tecan SPARK er også involvert i denne prosedyren.

3.0 GRUNNLAGSINFORMASJON

Celleviabilitet defineres som bestemmelsen av levende og døde celler og kan undersøkes ved bruk av fargestoffet trypan blå i Tecan SPARK. Levende celler med intakte cellemembraner ikke vil ta opp fargestoffet og vil derfor ha en klar cytoplasmafarge. De døde cellene som ikke har intakte cellemembraner vil ta opp fargestoffet, noe som gir et blåfarget cytoplasma. Forskjellen i cytoplasmafarge kan derfor brukes til å telle levende og døde celler hver for seg.

Celleviabilitetesfunksjonen i Tecan SPARK gir informasjon om konsentrasjonen av totalt antall celler (celler/mL) og konsentrasjonen av levende og døde celler (celler/mL). Det gis også informasjon om gjennomsnittlig størrelse på de levende og de døde cellene, samt størrelse på den største og minste cellen som har blitt telt av hver av disse gruppene. Måling av celleviabilitet kan brukes til kontroll av cellekulturer.

4.0 ANSVAR

Alle som benytter instrumentet Tecan SPARK.

5.0 HANDLINGSMØNSTER

5.1. OPPSETT AV MÅLEMETODE

1. Åpne «Spark Control Dashboard», trykk på knappen med «App Cell Chip, Cell Viability».
2. Velg hvilke kamre som skal telles.
3. «Cell size» (nede i venstre hjørne): Velg størrelsesområdet på cellene du ønsker skal telles. Dette størrelsesområdet gjelder både for de levende og de døde cellene.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 1 of 2
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	MÅLING AV CELLEVIABILITET PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 12.05.2022
--------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

4. «Images» (nede i venstre hjørne): Velg antall bilder du ønsker at tellingen skal basere seg på, enten 1, 4 eller 8 bilder.
5. «Duplicates» (nede i venstre hjørne): Kan defineres om det er samme prøve i begge prøvekammerene i telekammeret. Huk av for det aktuelle tellekammeret.

5.2. PRØVEFORBEREDELSE

Til celletellingen må tellekammer og tellekammeradapter benyttes. Tellekammeret er til engangsbruk og inneholder to prøvekammer som hver rommer 10 µL. Opptil fire tellekamre kan plasseres i tellekammeradapteret.

1. Fortynn en celleduspensjon med trypan blå i forholdet 1:1. Fyll et prøvekammer med 10 µL av trypan blå-celleduspensjonen. Unngå luftbobler når prøvekammeret fylles, dette kan gi en ujevn fordeling av cellene.
2. Plasser tellekammeret i tellekammeradapteret. Forsikre deg om at tellekammeret er plassert riktig, øverste høyre er slipt for gi riktig orientering av tellekammeret.
3. Plasser tellekammeradapteret i platebæreren slik at kammer A1 ligger lengst inn mot venstre i instrumentet.
4. Trykk «Start» ved nede i høyre.
5. Kast tellekammeret i egnet beholder når analyseringen er ferdig.

5.3. OPTIMALISERING AV CELLETELLINGENE:

Se kapittel 13.6 “Optimizing Cell Counting Measurements”, side 218 i instrumentmanualen.

- Øke antallet bilder: Celletellingene og målingene av celleviabilitet blir gjort på små volum. Ved cellekonsentrasjoner under 10 000 celler/mL vil antallet celler per bilde være lavt, og cellene vil ofte ha en irregulær fordeling i tellekammeret. For å kompensere for dette anbefales det å ta 4 eller 8 bilder av celleduspensjoner med så lav konsentrasjon.
- Bruk av «Live Viewer»: Fungerer som et mikroskop og gir informasjon om cellenes tilstand. Ved bruk av «Live Viewer» i oppsettet av metoden kan autofokus-posisjonen bli korrigert av «off set»-verdi som bestemmes.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 2 of 2
----------	------------	----------	-------	-------------

3.1.7 Prosedyre for måling av cellekonfluens

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	MÅLING AV CELLEKONFLUENS PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 12.05.2022
--------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

Antall kopier:

Distribueres til:

1.0 HENSIKT

Formålet med denne prosedyren er på sikre riktig fremgangsmåte for måling av cellekonfluens på Tecan Spark.

2.0 OMFANG

Prosedyren omfavner Tecan SPARK og personer som skal benytte seg av instrumentet, både i forbindelse med forskning og utdanning. Instrumentprotokollen til Tecan SPARK er også involvert i denne prosedyren.

3.0 GRUNNLAGSINFORMASJON

Ved celledyrkningsforsøk er måling av cellekonfluens viktig. Grad av konfluens gir informasjon om hvor stor andel av brønnens overflate som er dekket av adherente celler og oppgis i prosent. Hvis cellene blir konfluente, vil cellene slutte å dele seg som følge av plassmangel i dyrknings-skåla.

4.0 ANSVAR

Alle som benytter instrumentet Tecan SPARK.

5.0 HANDLINGSMØNSTER

5.1. VALG AV MIKROTITERPLATE

Måling i av cellekonfluens kan gjøres i 6- til 96-brønners miktotiterplater, men målingen er optimalisert for 96-brønners mikrotiterplater. Unngå mikrotiterplater med lokk på eller bruk av fuktighetskassett.

5.2. VOLUM VED ULIKE MIKROTITERPLATER

Unngå å fylle brønnene med større volum enn i tabellen nedenfor. Hvis disse volumene overstiges, kan det forekomme krysskontaminering mellom brønnene. «Smooth mode» kan kompensere for dette, men da må maksimum fyllingsvolum optimaliseres gjennom metodevalidering. «Smooth mode» velges automatisk ved mikrotiterplater som har mindre enn 96-brønner. Ved væsker som har mindre viskositet enn vandige løsninger, bør prøvevolumet optimaliseres gjennom metodevalidering.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 1 of 3
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	MÅLING AV CELLEKONFLUENS PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 12.05.2022
--------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

Tabell 1: Angir maksimalt volum til mikrotiterplater med ulikt antall brønner

Mikrotiterplate	Volum
1-brønners plate	15 000 µL
4-brønners plate	4 500 µL
6-brønners plate	2 000 µL
12-brønners plate	1 200 µL
24-brønners plate	1 000 µL
48-brønners plate	400 µL
96-brønners plate	200 µL
384-brønners plate	100 µL
1536-brønners plate	10 µL

5.3. OPPSETT AV MÅLEMETODE

- Under «Detection» i menyen på venstre side velges målemetode. Velg «Cell Confluence», trekk målemetoden inn mot midtskjermen (under platen) for å legge den inn i arbeidslisten.
- For definisjon av «Plate Layout», se instrumentprotokollen kapittel 3.2, Definisjon av «Plate layout» i «Spark Control Dashboard Method Editor».
- Gi målingen et navn under «Name». Vær oppmerksom på at dette ikke blir navnet på Excel-fila, og at dette navnet må endres etterpå. Se instrumentprotokollen, kapittel 3.3 Lagring av Excel-filer med måledata.
- Under «Pattern» velges ønsket avlesningsmønster i brønnen. Velg
 - «Center»: For målinger som skal gjøres i sentrum av brønnen.
 - «Whole well»: For målinger som skal gjøres i hele brønnen.
«Well border detection»: Instrumentet leser av brønnavgrensningen og legger alle avlesningene innenfor denne.
 - «User defined»: Definer posisjonene i brønnen du vil at avlesningene skal skje.
- Under «Advanced Settings»
 - «Focus offset (µm)»: Legg inn en verdi manuelt eller bruke «Live Viewer».
 - «Settle time (ms)»: Angi tid mellom platebevegelse og starten av signalintegrasjonen.
 - «Data analysis included»: Huk av for at bildene fra konfluensmålingen skal analyseres og resultatene skal bli tilgjengelige etter måling.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 2 of 3
----------	------------	----------	-------	-------------

Institutt for bioingeniørfag NTNU	PROSEDYRE FOR:
	MÅLING AV CELLEKONFLUENS PÅ TECAN SPARK

Revisjonsnr.	Erstatter:	Utarbeidet av: Mari Eline Solberg	Godkjent av:	Dato: 12.05.2022
--------------	------------	--------------------------------------	--------------	---------------------

5.4. OPTIMALISERING AV CELLEKONFLUENSMÅLINGER:

Se kapittel 13.7 «Optimizing Cell Confluence Measurements», side 219 i instrumentmanualen.

- Bruk av «Well Border Detection»: Konfluensmålingene avhenger av en korrekt platetransport og posisjonering. Mikrotiterplatenes dimensjoner kan variere og for å kompensere for dette kan «Well Border Detection» aktiveres i programvaren. Dette gir en nøyaktig analyse av adherente celler opptil brønnavgrensningen, men merk at dette forlenger analysetiden. Hvis denne funksjonen ikke aktiveres kan brønnavgrensningen inkluderes i analysen og kan gi falske konfluensverdier.
- Bruk av «Live Viewer»: Fungerer som et mikroskop og gir informasjon om cellenes tilstand. Ved bruk av «Live Viewer» i oppsettet av metoden kan autofokus-posisjonen bli korrigert av en «focus offset»-verdi som bestemmes manuelt.
 - o Valg av mikrotiterplate ved «Live Viewer»: Unngå mikrotiterplater med lokk på eller bruk av fuktighetskassett.
 - o Ny autofokus kalkulering i «Live Viewer»: Velg «Repeat Autofocus». Autofokus-verdien kan også tilpasses «focus offset»-verdien. Definer en verdi og velg «Set to Instrument». Programvaren vil tilpasse autofokusposisjonen og gi et nytt bilde. Ved å trykke på «Apply» vil den definerte «focus offset»-verdien blir brukt til målemetode.

Rev. nr.	Dok.klasse	Avdeling	Dato:	Page 3 of 3
----------	------------	----------	-------	-------------

3.2 Resultat av forsøk for utprøving av prosedyrer

I dette kapittelet vil resultatene fra utprøving av prosedyrer og instrumentprotokollen presenteres.

3.2.1 Lik absorbansmåling ved bruk av Tecan SPARK og Tecan Sunrise fotometer
For å undersøke Tecan SPARKs fluorescensfunksjon ble avlesningen av en MONOLISA Anti-HBs PLUS mikrotiterplate lest av på både Tecan SPARK og Tecan Sunrise filterfotometer. Avleste absorbansverdier og beregnede resultater er sammenlignet i Tabell 1.

Tabell 1: Absorbansavlesning på Tecan SPARK og Tecan Sunrise ved 405 nm.

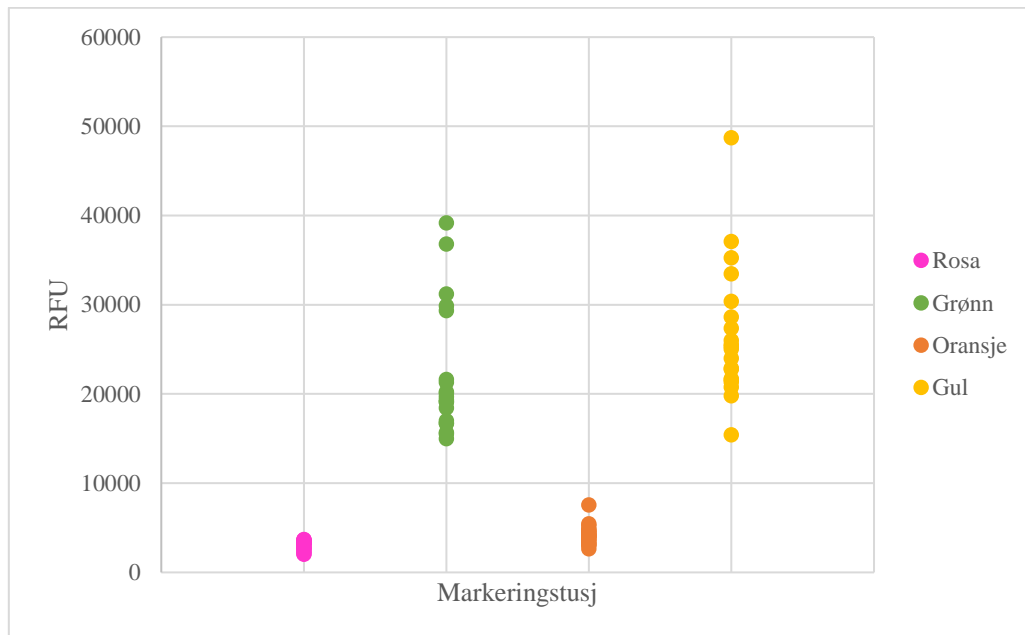
Materiale	Absorbansverdi Tecan SPARK	Absorbansverdi Tecan Sunrise	%-avvik	«Cut off» Tecan SPARK	«Cut off» Tecan Sunrise	Resultat Tecan SPARK	Resultat Tecan Sunrise
Negativ kontroll	0,0604	0,056	7,6	-	-	Negativ	Negativ
Kalibrator 10 mLU/mL,	0,0666	0,064	3,0	0.0891	0.0870	-	-
	0,0667	0,062	7,3			-	-
	0,1340	0,135	0,7			-	-
Positiv kontroll	0,4404	0,453	2,8	-	-	Positiv	Positiv
Pasientprøve 1	0,4783	0,497	3,8	-	-	Positiv	Positiv
Pasientprøve 2	0,4700	0,513	8,7	-	-	Positiv	Positiv
Pasientprøve 3	0,4194	0,441	5,0	-	-	Positiv	Positiv

Forskjellen i avlest absorbans mellom de to plateleserne var i gjennomsnitt på 5 % avvik, og ingen avvik var større enn 8 %. Tecan SPARK ble «cut off» beregnet til 0.0891 og Tecan Sunrises «cut off» ble beregnet til 0.0870, begge faller innenfor kravet på 0.050-0.200. Beregnet gråsoner ble henholdsvis på [0.0287-0.1495] og [0.0313-0.1433]. Alle prøver og kontroller fikk samme resultat på de to plateleserne.

3.2.2 Fluorescensmålinger viste nedgang i % CV ved bruk av «Multiple Reads per Well»

For å teste fluorescensmålingene i Tecan SPARK plateleser ble brønnbunnene på en transparent mikrotiterplate dekket med markeringstusj av ulike farger. Fluorescensmålingen ble gjort med en eksitasjonsbølglengde på 485 nm og emisjonsbølglengde på 535 nm. «Gain» ble satt til «Optimal», «Z-position» ble satt til «Automatic». Figur 27 viser

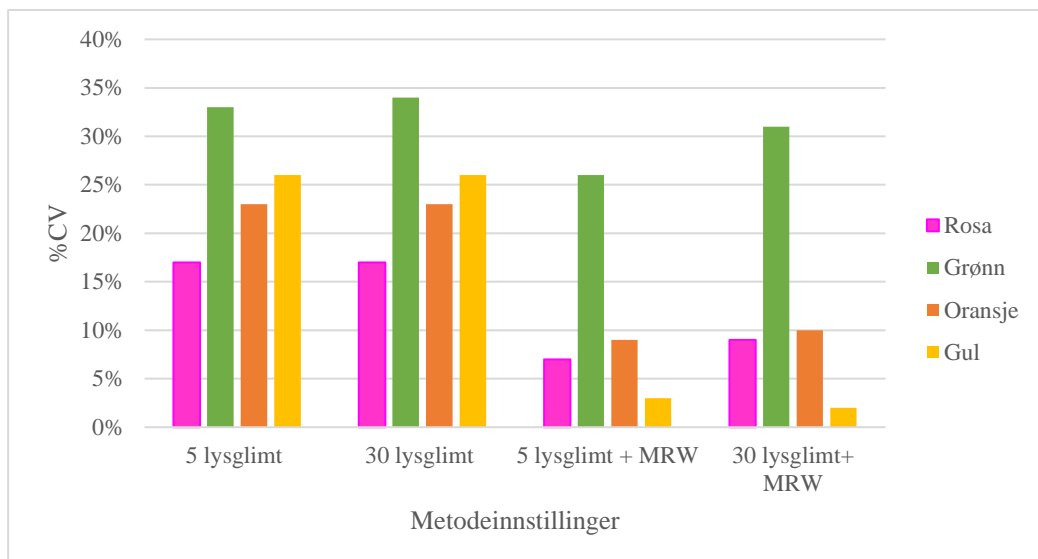
måleresultatene for målingen med 30 lysglimt per brønn, uten funksjonen «Multiple reads per well». Rådatene er vist i vedlegg 2. Resultatet er gitt i «Relative Fluorescence Units» (RFU).



Figur 27: Diagrammet viser grupperinger av fluorescens mellom de ulike fargene av markeringstusj. Dataene er tatt fra målingen med 30 lysglimt uten funksjonen «Multiple reads per well»

Fluorescensmålingene viste tydelige forskjeller mellom markeringstusjefargene, samt at grønn og gul markeringstusj eksiteres og danner fluorescens i større grad enn rosa og oransje markeringstusj ved bølgelengdene som ble valgt for avlesningen. Ujevn påføring av tusj gjenspeiles i stor spredning mellom avlesninger av brønner med samme markeringstusjfarge.

For å undersøke om antallet lysglimt ved avlesning på ulike steder i brønnene med «Multiple reads per well», hadde noen effekt på % CV ble avlesningene av mikrotiterplaten utført med både 5 og 30 lysglimt, med og uten funksjonen «Multiple reads per well». En sammenligning av % CV ved de ulike målingene er gitt i Figur 28, «Multiple reads per well» er forkortet MRW i figuren.

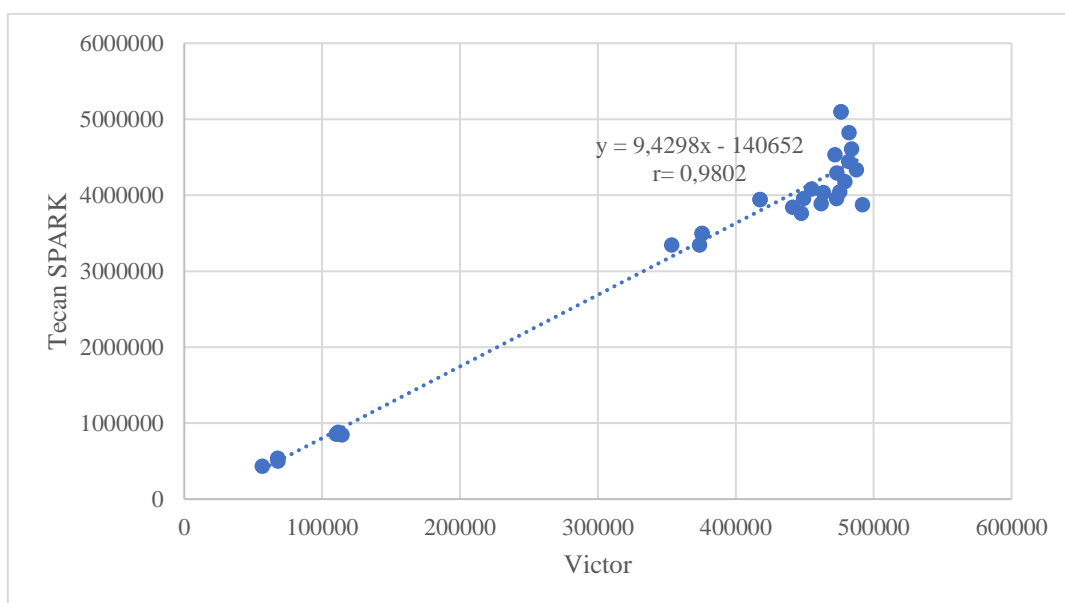


Figur 28: Viser nedgang i % CV ved bruk av funksjonen "Multiple Reads per Well" (MRW), både for målinger ved 5 og 30 lysglimt

Ved bruk av funksjonen «Multiple reads per well» ble % CV generelt lavere, sammenlignet med målinger der denne funksjonen ikke ble benyttet. Dette gjaldt for målinger med både 5 og 30 lysglimt. Rådatene brukt i dette diagrammet er gitt i vedlegg 2.

3.2.3 Regresjonsanalyse av luminescensavlesninger viste proporsjonal feil mellom Tecan SPARK og Victor

For å sammenligne luminescensmålingene til Tecan SPARK og Victor ble resultatene fra forsøket mål ved hjelp av begge instrumenter satt opp i et regresjonsplott i Excel, dette er vist i Figur 29. Måledataene er gitt i vedlegg 3.



Figur 29: Viser et regresjonsplott av målingene gjort på plateleseren Victor og på Tecan SPARK.

r-verdien ble utregnet til 0.9802, noe som indikerer en relativt sterk positiv lineær sammenheng mellom måledataene fra Tecan SPARK og Victor. Regresjonslinjen ble bestemt til formel (9), og viser at avlesningen på Victor gir svært mye lavere luminescensverdier sammenlignet med avlesningen på Tecan SPARK.

$$y = 9.4298x - 140652 \quad (9)$$

Konfidensintervallet på 95 % for skjæringspunktet ble bestemt til å være mellom -440091 og 158787, noe som inkluderer et skjæringspunkt i 0. Dette indikerer at det kan være et lite konstant avvik i måledataene. Konfidensintervallet på 95 % for stigningstallet ble bestemt til å være mellom 8.7 og 10.2, her ekskluderes 1. Dette indikerer et proporsjonalt avvik i måledataene mellom Victor og Tecan SPARK. Regresjonsstatistikken er gitt i vedlegg 3. Det observeres også en metning av luminescenssignal mellom 400 000 og 500 000 på Victor, da det er opphopning av avlesninger i dette området i stedet for å spres langs regresjonslinjen.

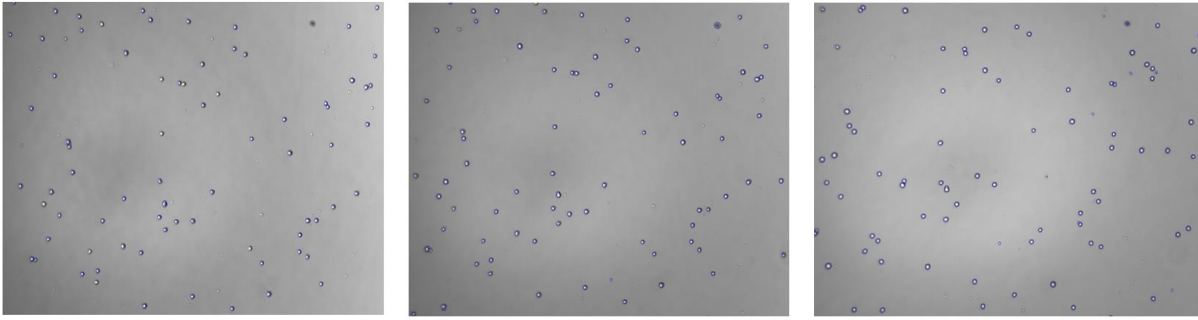
3.2.4 Celletelling viste god korrelasjon i tofoldsfortynninger, men upresisitet ved celleviabilitetsmåling

Funksjonene for celletelling og måling av celleviabilitet ble undersøkt ved å avlese tofoldsfortynninger på Tecan SPARK. For å undersøke hvilket størrelsesområde som er egnet for de to forsøkene ble en celletelling gjennomført i tre forskjellige størrelsesområder. Cellesuspensjon B ble målt i størrelsesområdene 10-25 µm, 8-30 µm og 4-35 µm, målt cellekonsentrasjon fra disse målingene er gitt i Tabell 2.

Tabell 2: Viser cellekonsentrasjon målt ved ulike størrelsesområde

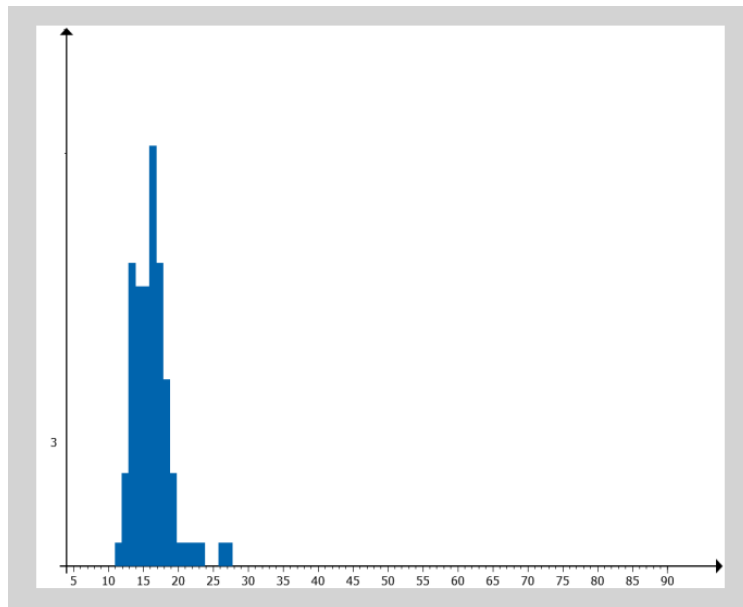
	Første avlesning	Andre avlesning	Tredje avlesning
Størrelsesområdet (µm)	10-25	8-30	4-35
Konsentrasjon (celler/mL)	$3.05 \cdot 10^5$	$3.50 \cdot 10^5$	$3.95 \cdot 10^5$
Antall celler telt	67	77	87
Tid etter første avlesning (minutter)	0	5	28

Bilder fra hver av celletellingene er gitt i Figur 30.



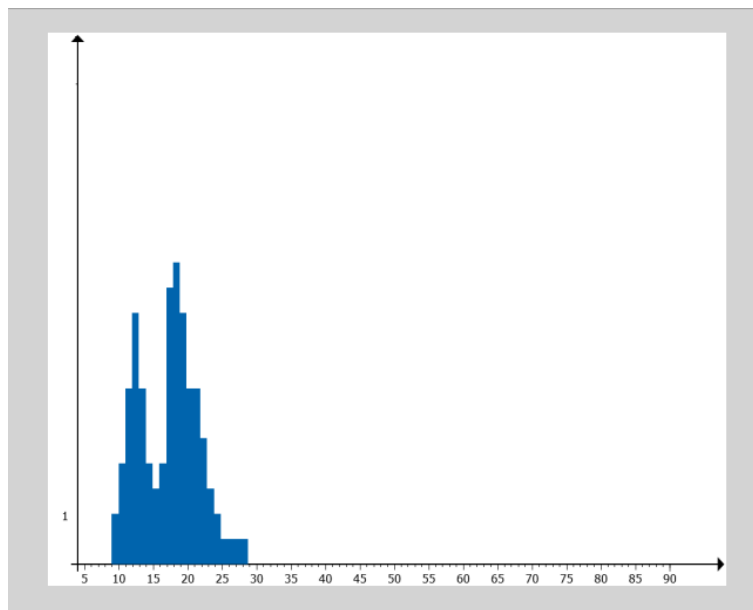
Figur 30: Viser tre bilder av samme cellesuspensjon, telt i tre forskjellige størrelsesområder. De blå sirklene markerer cellene som har blitt inkludert i celletellingen. Bildet til venstre viser celletellingen gjort i størrelsesområdet 10-25 μm . Bildet i midten viser celletellingen gjort i størrelsesområdet 8-30 μm . Bildet til høyre ble tatt av tellingen gjort i størrelsesområdet 4-35 μm .

Ved å velge et bredere størrelsesområde har flere celler blitt inkludert i tellingen, dette resulterer i en høyere cellekonsentrasjon. Fordelingen av cellene som har ble telt er gitt i histogrammene under. Figur 31 viser de 67 cellene som ble telt i målingen som ble gjort i størrelsesområdet 10-25 μm .



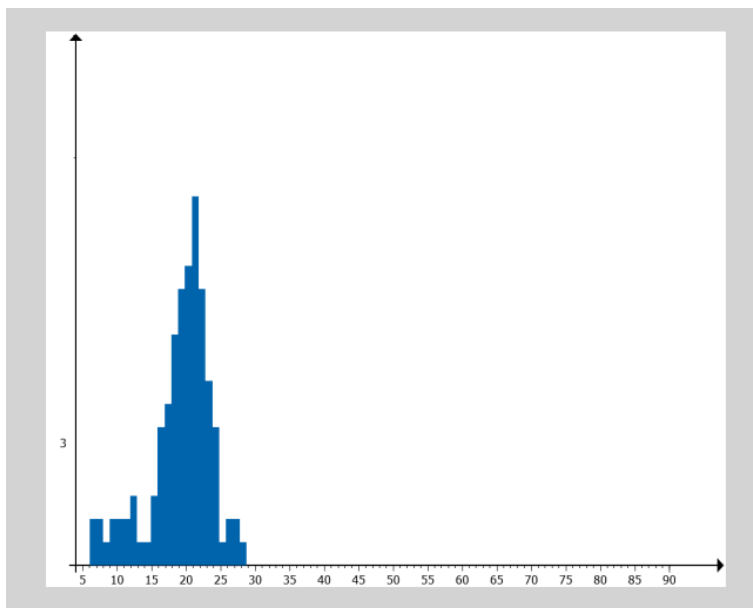
Figur 31: Viser fordelingen av de 67 cellene som ble telt i størrelsesområdet 10-25 μm

Figur 32 viser de 77 cellene som ble telt i størrelsesområdet 8-30 μm .



Figur 32: Viser fordelingen av de 77 cellene som ble telt i størrelsesområdet 8-30 μm

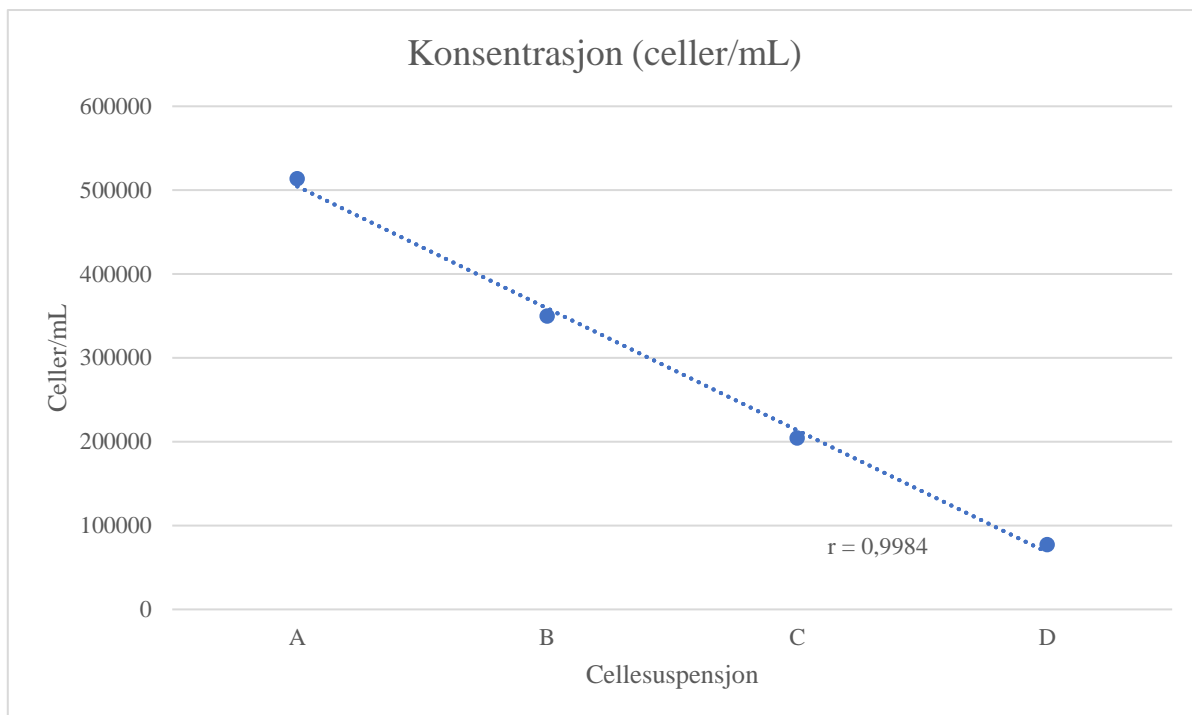
Figur 33 viser de 87 cellene som ble telt i størrelsesområdet 4-35 μm .



Figur 33: Viser fordelingen av de 87 cellene som ble telt i størrelsesområdet 4-35 μm

De tre histogrammene viste størst cellepopulasjon i størrelsesområdet 8-28 μm , og størrelsesområdet 8-30 μm ble valgt for måling av cellekonsentrasjonen.

Cellekonsentrasjonene avlest i instrumentet ble framstilt mot fortyningene på 8-30 μm , se Figur 34. Dataene fra forsøket er gitt i vedlegg 4.



Figur 34: Viser endringer i cellekonsentrasjonen etter tofoldsfortynninger

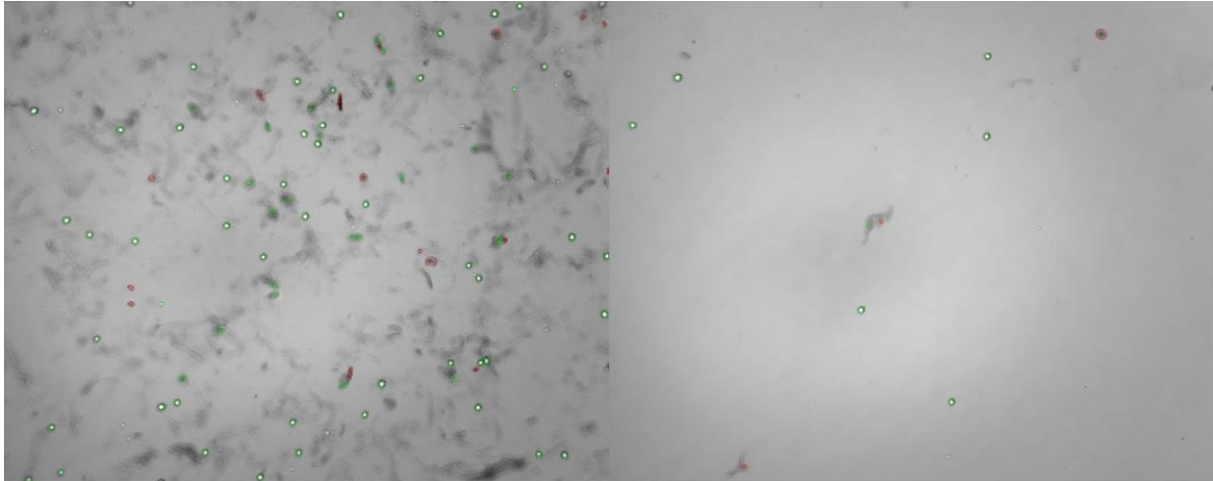
Figuren ovenfor viser endringen i cellekonsentrasjon etter fortynningene. r-verdien på 0,9984 indikerer en sterk lineær sammenheng mellom fortynningene og cellekonsentrasjonen.

I celleviabilitetsforsøket ble fargestoffet trypan blå tilsatt for å telle antallet levende celler opp mot antall døde celler i cellefortynningene. Resultatene fra dette er gitt i Tabell 3.

Tabell 3: Viser resultatet fra celleviabilitetsforsøket

Cellesuspensjon	Total konsentrasjon (celler/mL)	Konsentrasjon levende (celler/mL)	Konsentrasjon døde (celler/mL)	Celleviabilitet (%)
A	690909	590909	100000	85
B	518182	390909	127273	75
C	872727	536364	336364	61
D	109091	100000	9091	91

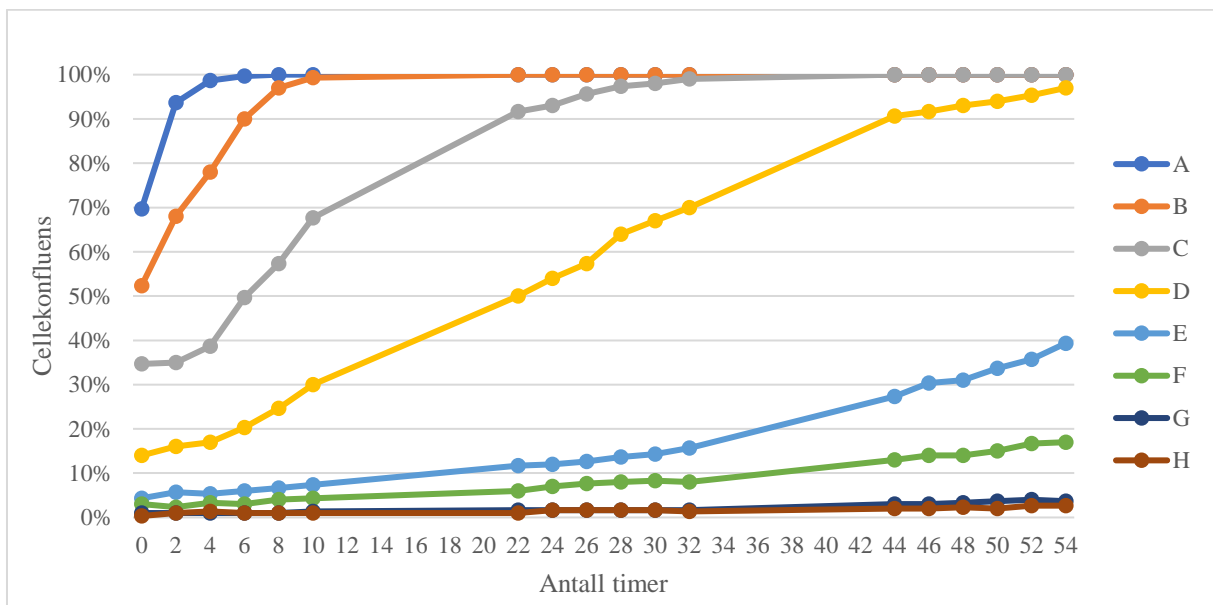
Resultatene viser at prosentvis celleviabilitet varierer mellom 61 og 91 %. Figur 35 viser bilder som ble tatt under celledelingen av cellesuspensjon A og D.



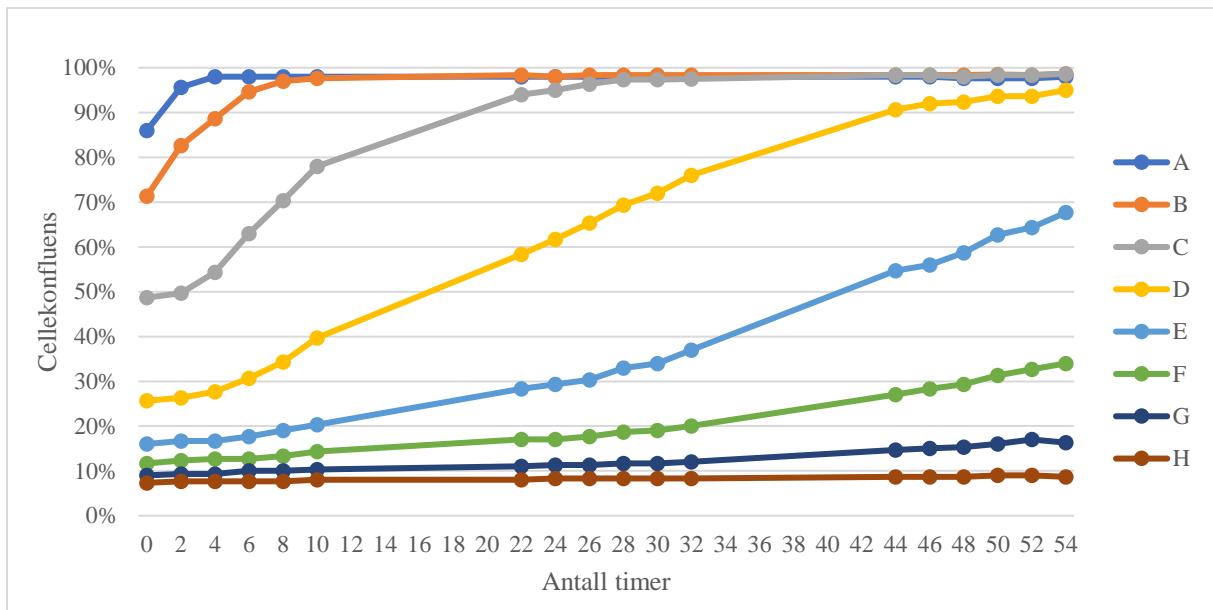
Figur 35: Bildet til venstre er av celleduspensjon A med høyest cellekonsentrasjon, bildet til høyre er av celleduspensjon D med lavest cellekonsentrasjon. Rød markering indikerer døde celler, mens grønn markering indikerer levende celler

3.2.5 Høyere cellekonfluensverdier ved brønnmålinger ift. sentrummålinger

For å undersøke om ulike avlesningsmønstre ved konfluensmålinger kan gi ulikt avlesningsresultat ble konfluensutvikling målt i åtte suspensjoner med ulik cellekonsentrasjon. Målingene ble gjort over tre dager, der det ble gjort seks avlesninger hver dag i totimers intervaller. Konfluensutviklingen ved måling i sentrum av brønnen er vist i Figur 36, der måledata er gitt i vedlegg 5. Konfluensutviklingen ved måling av hele brønnen er vist i Figur 37, hvor måledata kan sees i vedlegg 5.



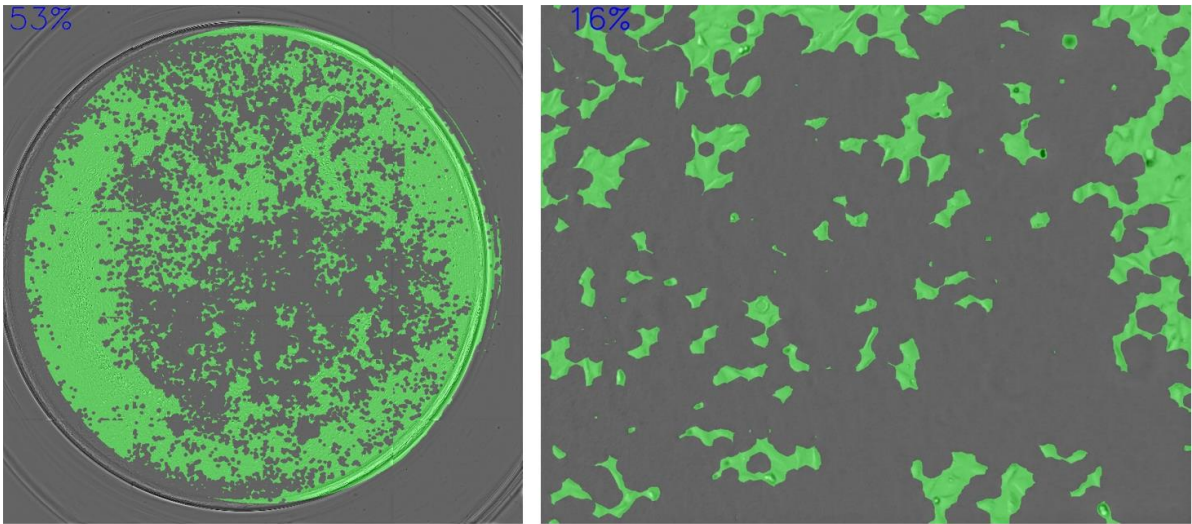
Figur 36: Viser konfluensutviklingen i åtte suspensjoner med ulik cellekonsentrasjon av melanomceller i en 96-brønners mikrotiterplate, der målingen er gjort i sentrum av brønnen.



Figur 37: Viser konfluensutviklingen i åtte suspensjoner med ulik cellekonsentrasjon av melanomceller i en 96-brønners mikrotiterplate, der målingen ble gjort i hele brønnen.

Resultatet viste flere forskjeller mellom konfluensmålingene som ble målt i hele brønnen og målingene som ble gjort i sentrum av brønnen. Brønnmålingene nådde aldri 100 % konfluens, men stopper i et konfluensnivå på 98-99 %. Sentrumsmålingene derimot nådde 100 % konfluens.

Samtlige målinger viste at konfluensnivået ble høyere da hele brønnen ble målt, sammenlignet målingene som ble gjort i senter av brønnen. Et eksempel på dette er at celsuspensjon A starter på 70 % konfluens i sentrumsmålingen ved første avlesning, mens den samme suspensjonen starter på 86 % ved første avlesning i brønnmålingen. Forskjellen ble også observert på brønnnivå. Et eksempel på dette er brønn E1 vist i Figur 38, der begge målingen ble gjort etter 50 timer. Ved måling av hele brønnen ble konfluensnivået bestemt til 53 %, mens det ved sentrumsmålingen ble bestemt et konfluensnivået på kun 16 %.



Figur 38: Viser to bilder av samme brønn. Konfluensmålingen til venstre ble gjort i hele brønnen, mens målingen på bildet til høyre ble gjort i sentrum av brønnen.

4. Diskusjon

For et komplekst analyseinstrument som Tecan SPARK er gode prosedyrer og en god instrumentprotokoll viktig for den daglige driften. Prosedyrene og instrumentprotokollen skal brukes både i forskning og i undervisning, noe som betyr at de skal favne et bredt kompetansespekter av operatører. Dette ble tatt i betraktning ved utarbeidelsen av prosedyrer og protokoll. Tecan SPARK og programvaren Spark Control framstår generelt som enkle å bruke, og vil i mange tilfeller virke intuitivt forståelig. Likevel er det tilfeller der instrumentets funksjoner og innstillinger ikke er selvforklarende, der det er nødvendig med en beskrivende prosedyre og/eller instrumentprotokoll. For å bekrefte eller avkrefte mitt inntrykk av SPARK hadde det vært av interesse å lese en vitenskapelig artikkel der det ble gjort en vurdering av instrumentet, eventuelt en sammenligning av Tecan SPARK med andre platelesere. Dette ser så langt ikke ut til å ha blitt gjort. Diskusjonen i dette kapittelet vil derfor omhandle utprøvingen og forsøkene som ble gjort i forbindelse med utarbeidelsen av instrumentprotokoll og prosedyrer.

4.1 Prosedyre og utprøving av metode for absorbansmålinger

Problemstillingen for dette forsøket var om Tecan SPARK og Tecan Sunrise filterfotometer ville gi samme prøveresultat på MONOLISA Anti-HBs test. Gjennom forsøket ble det vist at de to plateleserne hadde et meget godt samsvar mellom avleste absorbansverdier. «Cut off»-verdien ble 0.0891 på Tecan SPARK og 0.0870 på Tecan Sunrise, mens beregnet gråsoner ble bestemt til [0.0287-0.1495] og [0.0313-0.1433]. Resultatene på den negative og positive kontrollen ble like, det ble også resultatene for de tre pasientprøvene.

Ifølge pakningsvedlegget for MONOLISA Anti-HBs test skal avlesningene skje innen 30 minutter etter at prøvematerialet har blitt lagd (vedlegg 1), men i dette forsøket ble avlesningen gjort på prøver som var to dager gamle. På tross av at det gikk to døgn mellom prøveforberedelse og avlesning, ble absorbansverdiene for dette forsøket gyldige.

Instrumentprotokollen og prosedyren fungerte godt under utprøvingen. Hovedinnstillingene er intuitivt forståelige, men under avanserte innstillinger var det flere begreper som krevde forklaring. Dette var spesielt «Pathlength correction» og «Multiple reads per well», der det

var behov for nøyaktige beskrivelser i prosedyren. Det ble derfor gitt en utfyllende forklaring av «Pathlength correction» og «Multiple reads per well» i absorbansprosedyren. Programvaren gir ikke informasjon om hvordan absorbansmålingen kan optimaliseres, dette ble derfor inkludert i prosedyren.

4.2 Prosedyre og utprøving av metode for fluorescensmålinger

Gjennom fluorescensforsøket ble det vist at antall lysglimt ikke påvirket % CV, mens % CV generelt ble lavere ved bruk av «Multiple reads per well». Dette indikerer at markeringstusjen ble påført ujevnt på tvers av brønnen, og at det var variasjoner i fargeintensitet på brønnbunnen. Nedgangen i % CV ser ut til å være mindre for grønn markeringstusj, sammenlignet med de andre markeringstusjene. Grunnen til dette kan være at det var større variasjoner i påføringen av denne markeringstusjen i forhold til gul, grønn og rosa markeringstusj.

Forsøket viste også tydelige forskjeller i fluorescensdannelsen til markeringstusjene. Eksitasjonen og emisjonen vil avhenge av markeringstusjens farge, da det er variasjoner i hvilket bølglengdeområde som kreves for fluorescensdannelsen. Grønn og gul markeringstusj har bølglengder i nærheten av eksitasjonsbølglengden og emisjonsbølglengden som ble valgt i dette forsøket. Dette forklarer hvorfor grønn og gul markeringstusj dannet fluorescens i større grad enn det oransje og rosa markeringstusj gjorde i forsøket. Om det hadde blitt valgt andre eksitasjons- og emisjonsbølglengder i bølglengdeområder for rosa og oransje lys, ville fluorescensdannelsen vært større for disse markeringstusjene.

Til fluorescensmålinger ved Tecan SPARK anbefales det å benytte svarte mikrotiterplater (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 190). Det svarte materialet vil absorbere refleksjoner og gi mindre autofluorescens, og i tillegg redusere signal/støy-ratioen. I dette forsøket ble det benyttet transparente mikrotiterplater, for å kunne påføre markeringstusj på brønnens underside som likevel kunne danne fluorescens. Ved bruk av transparente mikrotiterplater kan det oppstå refleksjoner og uspesifikke signaler som kan påvirke målingen. Det kan ikke utelukkes at dette har påvirket målingene gjort i dette forsøket.

Ved fluorescensprosedyren var det flere begreper som ble forklart i detalj, sammenlignet med absorbansprosedyren. Hovedinnstillingene for metoden er relativt intuitivt forståelig, men flere av begrepene under avanserte innstillinger krevde en forklaring. Det ble derfor gitt en utdypende forklaring av de ulike innstillingene for «Gain» og «Z-position», samt «Multiple reads per well». En forklaring på hvordan fluorescensmålingene kan optimaliseres er ikke gitt i programvaren, dette ble derfor beskrevet i detalj i prosedyren.

4.3 Prosedyre og utprøving av metode for luminescensmålinger

Luminescensforsøket viste at avlesningene på Victor var svært mye lavere enn avlesningene på Tecan SPARK. Resultatene viste også at luminescenssignalene oppnådde metning ved luminescenssignaler på 400 000-500 000. Innstillingene på Victor og Tecan SPARK var like, der begge avlesningene ble gjennomført uten bruk av filter. Årsaken til dette avviket og metningen av signaler ved avlesningen i Victor er uviss og bør undersøkes nærmere.

«Cell-Titer Glo» danner en glødeluminescens som har en halveringstid på mer enn tre timer, avhengig av celletypen og hvilket medium som blir benyttet (Promega, 2011, s. 1). Ifølge prosedyren skal avlesningen skje tolv minutter etter at «CellTiter-Glo» har blitt tilsatt i brønnen. Hvis tiden mellom tilsettelse og avlesningen blir for lang, vil luminescenssignalet avta med halveringstiden. Avlesningen på Victor ble gjort elleve minutter før avlesningen på Tecan SPARK, og kan ha gitt noe svakere målesignaler på avlesningene fra SPARK. Dette kan likevel ikke forklare forskjellen mellom luminescenssignalene på Tecan SPARK og Victor, da luminescenssignalene er vesentlig høyere på Tecan SPARK og ikke motsatt.

Ved luminescensmålinger på Tecan SPARK anbefales det å benytte hvite mikrotiterplater, der brønnen har både hvite vegger og hvit bunn (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 129). I dette forsøket ble en mikrotiterplate med hvite vegger med transparent bunn benyttet. De transparente brønnbunnene gir større sannsynlighet for interferens av signaler på tvers av brønner, sammenlignet med mikrotiterplater der både brønnbunnen og brønnveggene er hvite. Det kan derfor ikke utelukkes at dette har påvirket målingene. Likevel kan det ikke forklare forskjellen i avlesningene til Victor og Tecan SPARK da den samme mikrotiterplaten ble brukt til begge avlesningene.

Instrumentprotokollen og prosedyren fungerte godt under utprøvingen. De fleste hovedinnstillingene var intuitivt forklarende, men det gis forklaring på hvordan og med hvilken faktor luminescenssignalene kan dempes. Dette kan gjøres på to måter, som begge er beskrevet i detalj i prosedyren for luminescensprosedyren. Forklaring av hvordan man kan optimalisere luminescensmålingene er heller ikke gitt i programvaren, dette ble derfor beskrevet i prosedyren.

4.4 Prosedyre og utprøving av metode for celleviabilitetsmålinger og celledetellinger

Hvilket størrelsesområde som er egnet for celledetellingen og celleviabilitet vil variere med hvilken celledetype som skal måles, og størrelsesområdet må derfor stilles inn deretter. I dette forsøket viste celledetellingen at et bredere størrelsesområde ga en høyere cellekonsentrasjon. Cellepopulasjonen var størst i området 8-28 μm , og størrelsesområdet 8-30 μm ble derfor valgt til målingen av celleviabilitet og celledetellingen. I Figur 33 kan populasjonen under 8 μm være celledetbris eller deler av ødelagte celler. I samme figur kan populasjonen over 25 μm være celler i ferd med å gjennomføre celledeling i telofase. Celledetellingen i størrelsesområdet 8-30 μm viste at cellekonsentrasjonen vil følge tofoldsfortynningene som ble gjort i forsøket. r-verdien på 0.9984 indikerer en sterk lineær korrelasjon mellom cellekonsentrasjon og fortynningene, dette betyr at både fortynningen og tellingen ble gjennomført korrekt.

Celledetellingen i størrelsesområdet 10-25 μm ble gjort 5 minutter før tellingen i størrelsesområdet 8-30 μm og 28 minutter før tellingen i størrelsesområdet 4-35 μm . Ventetiden kan ha forårsaket fordamping i tellekammeret, noe som kan ha bidratt til konsentrasjonsøkningen i de bredere størrelsesområdene. Det kan observeres noen forandringer i celledetfordelingen i Figur 30, spesielt i størrelsesområdet 4-35 μm . Forandring i celledetfordeling kan være et tegn på fordamping, og man kan derfor ikke utelukke at dette kan ha bidratt til konsentrasjonsøkningen ved tellingen.

Ved tofoldsfortynningene forventes en relativt konstant prosentvis celleviabilitet i de ulike cellekonsentrasjonene. I forsøket som ble gjort her viste prosentvis celleviabilitet en variasjon mellom 61 % og 92 %. Dette kan indikere at tofoldsfortynningene er en noe upresis måte å måle funksjonen på. Det finnes flere muligheter for å forbedre celleviabilitetsmålingene og

celletellingene på (Tecan Austria GmbH, 2020, s. 218). Celletellingen og celleviabilitetsmålingene som ble gjort i forsøket baserte seg på kun ett bilde. Det overføres små volum av cellefortynningene til hvert tellekammer, kun 5 μL i celleviabilitetsmålingen. Avviket kan forklares av en preanalytisk feil i tofoldsfortynningene, der celledensitasjonene og dyrkningmediet ikke ble blandet tilstrekkelig, eventuelt at celledensitasjonen ikke ble vendt før overføring til en ny fortynning eller til tellekammeret. Lave celledensitasjoner gir ujevn fordeling av celler i tellekammeret, og det bør derfor tas flere bilder som målingene kan basere seg på. Dette kan sees i Figur 35, der bildet av celledensitasjon D viser svært få celler. I celleviabilitetsforsøket ble det kun tatt ett bilde av hvert tellekammer, og det ble bare satt opp én parallell av hver av cellefortynningene. Ved å øke antallet paralleller for hver cellefortynning og øke antallet bilder som blir tatt av tellekammeret, kunne dette avviket vært forbedret. Dette ble ikke gjort i forsøket som det gjennomført i forbindelse med utprøvingen av instrumentet.

Instrumentprotokollen og prosedyren fungerte godt ved utprøvingen. Programvaren i «App Chip Cell Counting» og «App Chip Cell Viability» framsto som nærmest selvforklarende, i større grad enn det «Method Editor» som de andre prosedyrene tar utgangspunkt i gjorde. Den eneste innstillingen som krevde en nærmere forklaring var «Duplicates», denne ble derfor inkludert i de to prosedyrene. Prøveforeberedelsene for målingen på celleviabilitet og celledetelling sto likevel ikke beskrevet i programvaren, og utførelsen av denne er derfor beskrevet i detalj i prosedyren. Programvaren gir ingen informasjon om hvordan målingene skal optimaliseres, dette ble derfor inkludert i prosedyren.

4.5 Prosedyre og utprøving av cellekonfluensmålinger

I cellekonfluensforsøket ble det vist at hvilket avlesningsmønster som ble valgt for metoden hadde innvirkning på konfluensresultatet, da samtlige av brønnmålingene viste et høyere konfluensnivå sammenlignet med sentrumsmålingene. Figur 38 viste at konfluensnivået i sentrum av brønnen ikke gjenspeiler konfluensnivået i hele brønnen. Dette er ikke overraskende, da det ofte kan observeres celleaggregater nær kanten av brønnen, i midten av brønnen, eller en kombinasjon av disse. Skjevfordelingen kan komme fra utsåingen da det kan være utfordrende å få en jevn fordeling av celler i brønnen, eller av bevegelse i

mikrotiterplaten før cellene har blitt adherente (Reynolds et al., 2018). Dette er viktig å ta i betraktning ved valg av avlesningsmønster for konfluensmålingen.

Brønnmålingene er sensitive for bobler i cellesuspensjonen, da boblene kan interferere med konfluensmålingen. Dette kan sees i Figur 20. Om cellesuspensjonen i brønnen inneholder mange bobler kan det derfor være en fordel å velge en sentrumsmåling framfor en brønnmåling. Et annet problem med brønnmålingene er at avlesningen ble feil posisjonert i forhold til brønnens kant, dette kan også sees i Figur 20. Der er det tydelig at det ikke ble gjort avlesninger i venstre ytterkant av brønnen, mens det ble gjort avlesninger over brønngrensen på høyre kant. Boblene og feilposisjoneringen av avlesningen i brønnmålingene kan være grunnen til at brønnmålingene ikke nådde 100 % i konfluensnivå. Denne feilposisjoneringen kunne blitt kompensert for ved å aktivere funksjonen «Well border detection». Ved brønnmålingen vist i Figur 21 er denne funksjonen aktivert. Dersom funksjonen «Well border detection» hadde blitt aktivert for brønnmålingene som ble gjort i forsøket, kan det tenkes at det hadde blitt mindre forskjell mellom sentrumsmålingene og brønnmålingene i konfluensnivå. Dette hadde imidlertid gått på bekostning av tidsbruken.

Instrumentprotokollen og prosedyrene var godt egnet til forsøket og utprøvingen. Programvaren er enkel, med få innstillinger som skal defineres før avlesning. Programvaren gir ingen informasjon om hvordan konfluensmålingene kan optimaliseres, dette ble derfor inkludert i prosedyren.

4.6 Forslag til videre arbeid

Gjennom arbeidet med denne oppgaven var det to moduler ved Tecan SPARK som ikke ble undersøkt. Dette er injektormodulen og gassmodulen som instrumentet på Institutt for bioingeniørfag er utstyrt med. Injektormodulen og injektorene kan brukes til tilsetning av reagenser i fluorescensmålinger, absorbanmålinger og luminescensmålinger. Gassmodulen har en gassinngang for oksygen og en for karbondioksid. Dette gjør at instrumentet kan brukes som inkubator til dyrkning av eukaryote celler, anaerobe bakterier og gjærsopp. I cellekonfluensforsøket som ble gjort i denne oppgaven ble det ikke gjort avlesninger på nattestid, noe som førte til to tolvtimers perioder uten målinger. Disse periodene ville vært

unngått om instrumentet hadde en fungerende gassmodul som kunne erstattet inkubasjonen i et separat inkubasjonsskap. Både injektormodulen og gassmodulen kan være nyttige i laboratoriearbeidet, og det anbefales derfor å arbeide videre med disse modulene.

4.7 Konklusjon

Gjennom denne oppgaven ble det lagd prosedyrer for fluorescensmålinger, absorbansmålinger, luminescensmålinger, celletelling, måling av cellekonfluens og celleviabilitet, samt en instrumentprotokoll for Tecan SPARK. Disse ble utprøvd gjennom ulike forsøk der det har blitt gjort flere erfaringer. Funksjonen «Multiple reads per well» vil forbedre % CV ved ujevn fordeling av prøvematerialet i brønnen ved luminescens-, absorbans- og fluorescensmålinger. Ved celletelling og måling av celleviabilitet er avgrensningen i størrelsesområdet til cellene som skal telles avgjørende for konsentrasjonsbestemmelsen. I målingen av cellekonfluens ble det vist at brønnmålingene ga høyere konfluensnivå enn det sentrumsmålingene gjorde. Dette kunne ha blitt kompensert for ved bruk av funksjonen «Well border detection». Brønnmålingene er også sensitive for bobler i brønnen. Alt dette er alle viktige betraktninger ved videre bruk av instrumentet. Ved videre arbeid med instrumentet bør i tillegg celleviabilitetsfunksjonen og luminescensmålingene undersøkes nærmere, da disse resultatene ikke ble konklusive. Celleviabilitetsfunksjonen bør i så fall undersøkes med forslagene for optimalisering gitt under diskusjonen av dette forsøket.

5. Referanser

- Burtis, C. A., & Burns, D. E. (2015). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (7. utg.). Elsevier Saunders.
- Freshney, I. R. (2005). *Culture of Animal Cells—A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (5. utg.). Wiley-Liss, John Wiley & Sons Inc. Publication.
- Promega. (2011). *Technical Bulletin CellTiter-Glo One Solution Assay. Instructions for Use of Products G8461 and G8462*. Promega Corporation.
- Reynolds, P. M., Holzmann Rasmussen, C., Hansson, M., Dufva, M., Riehle, M. O., & Gadegaard, N. (2018). Controlling fluid flow to improve cell seeding uniformity. *PLoS one*, 13(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207211>
- Tecan Austria GmbH. (2020). *TECAN Instructions for Use—Reference Guide SPARK* (1.8).
- White, E. H., Zafiriou, O., Kagi, H. H., & Hill, J. H. (1964). Chemiluminescence of luminol: The chemical reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 86(5), 940–941. <https://doi.org/10.1021/ja01059a050>

6. Vedlegg

Vedlegg 1: Pakningsvedlegg MONOLISA Anti-HBs, side 81.

Vedlegg 2: Data fra fluorescensmålinger, side 85.

Vedlegg 3: Data fra luminescensmålinger, side 87.

Vedlegg 4: Data fra celledellingsforsøk, side 88.

Vedlegg 5: Data fra cellekonfluensforsøk, side 89.

Vedlegg 1: Pakningsvedlegg MONOLISA Anti-HBs

BIO-RAD

Monolisa® Anti-HBs PLUS

192 tests

72566

ENZYMIMMUNANALYSE (EIA) TIL BESTEMMELSE OG NIVEAUBESTEMMELSE AF ANTISTOFFER MOD HEPATITIS B-OVERFLADEANTIGENET (ANTI-HBS) I HUMANT SERUM ELLER PLASMA

NY FØLGESEDEL !

Ændringerne er fremhævede med gråt

IVD

Producentens kvalitetskontrol

Alle producerede og kommercialiserede reagenser er underlagt et komplet kvalitetssystem lige fra modtagelsen af råmateriale til den endelige kommercialisering af produktet. Hvert parti sendes til kvalitetskontrol og frigives kun til markedet, hvis det opfylder de fastsatte godkendelseskriterier. Dokumentationen i forbindelse med produktion og kontrol af hvert parti opbevares i virksomheden.

INDHOLDSFORTEGNELSE

1. FORMÅL
2. PRÆSENTATION AF TESTEN
3. TESTPRINCIP
4. SÆTTETS SAMMENSÆTNING
5. FORHOLDSREGLER
6. SUNDHEDS- OG SIKKERHEDSMÆSSIGE FORHOLDSREGLER
7. KRÆVET MATERIALE, DER IKKE MEDFØLGER
8. FORBEREDELSE AF REAGENSER
9. OPBEVARING OG VALIDITET
10. PRØVE
11. ANALYSEPROCEDURE
12. VALIDERING AF RESULTATERNE TIL KVALITATIV OG KVANTITATIV METODE
13. BEREGNING OG FORTOLKNING AF RESULTATERNE
14. SPEKTROFOTOMETRISK KONTROL AF PRØVE- OG REAGENSPIPETTERING
15. TESTENS BEGRÆNSNINGER
16. YDEEVNE
17. REFERENCER

99 100

1 - FORMÅL

MONOLISA® Anti-HBs PLUS er en enzymimmunanalyse, som er indikeret til anvendelse ved kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af totale antistoffer til hepatitis B-overfladeantigenet (anti-HBs) i humant serum eller plasma.

2 - PRÆSENTATION AF TESTEN

Forekomsten af antistoffer til hepatitis B-overfladeantigenet er en vigtig faktor i diagnosticering og prognostisering af hepatitis B-virusinfektion (HBV). Hos patienter med akut hepatitis B-infektion, findes anti-HBs i næsten 80 % af patienterne 1 til 3 måneder efter forekomsten af hepatitis B-overfladeantigenet (HBs Ag). Anti-HBs anvendes til epidemiologisk overvågning, til vurdering af tidligere tilfælde af Hepatitis B hos potentielle Hepatitis B-vaccinerede, til overvågning af vaccinationer og til udvælgelsen af plasma med store antistofkoncentrationer til klargøringen af specifikke immunoglobuliner.

MONOLISA® Anti-HBs PLUS er en direkte antistofenzymimmunanalyse af "sandwich"-typen, der anvender polystyrenmikrobrønde, der er dækket med oprindelig HBs Ag (fra undertyperne ad og ay) som fast fase og et konjugat, der indeholder HBsAg (humant, undertyper ad og ay), der er mærket med peroxidase fra peberrod. Bestemmelsen af anti-HBs-niveauer er blevet standardiseret ved brug af WHO Anti-HBs Reference Preparation, der udtrykkes i milli-internationale antiheder/milliliter (mIU/ml). En værdi, der er større end eller lig med 10 mIU/ml, betragtes generelt som standard for post-vaccinationsbeskyttelse mod HBV. Verifikationen af mindst et anti-HBs-titer på 10 mIU/ml, dvs. et immunforsvarskæltiter, er afgørende for den korrekte behandling af vaccinerede personer, som efterfølgende kan udsættes for HBs Ag-positive væsker og prøvematerialer.

3 - PROCEDUREPRINCIP

I analyseproceduren inkuberes patientprøver og kontroller med antigen-dækkede mikrobrønde. Såfremt der findes antistoffer til HBs i en prøve eller en kontrol, binder de sig til antigenet. Overskydende prøvemateriale fjernes med et vasketrin. Konjugatet tilsættes derefter mikrobrøndene. Konjugatet binder sig til ethvert antigen-antistof-kompleks, der findes i mikrobrøndene. Det overskydende konjugat fjernes ved et vasketrin, og en kromogen-/substratopløsning tilsættes mikrobrøndene og inkuberes.

Såfremt en prøve indeholder anti-HBs, forårsager det bundne enzym (HRP) farvningen af tetrametylbenzidin (TMB) i kromogenopløsningen, som bliver blå. Den blå farve bliver gul efter tilsætning af en stopopløsning.

Såfremt en prøve ikke indeholder HBs, forbliver kromogen-/substratopløsningen i brønden farveløs under inkubationen af substrat og efter tilsætning af stopopløsningen. Farvens intensitet, som måles spektrofotometrisk, er proportional med mængden af anti-HBs i prøven.

Aflæsningen af absorptionsværdier til patientprøver sammenlignes med en cutoff-værdi, som bestemmes af kalibratoren på 10mIU/ml.

4 - SÆTTETS SAMMENSÆTNING

Alle reagenser anvendes udelukkende til in vitro-diagnosticering.

ETIKET	REAGENSSTYPE	PRÆSENTATION
R1	MIKROPLADE 12 strimler med 8 brønde, der er sensibiliseret af en blanding af Hepatitis B-overfladeantigen, undertype ad og undertype ay af human oprindelse	2 mikroplader
R2	KONCENTRERET VASKEOPLØSNING (10 x) Tris NaCl-buffer pH 7,4 Konservingsmiddel : natriumterciat (0,01 %)	1 flaske 240 ml
C0	NEGATIV KONTROL TIL ANTI-HBS Buffer med serum fra kalvefostre og proteinstabilisatorer Konservingsmiddel : ProClin™ 300 (0,5 %)	1 flaske 2,2 ml
C1	10 mIU/ml KALIBRATOR * Buffer med Anti-HBs-antistoffer af human oprindelse, serum fra kalvefostre, proteinstabilisatorer og prøveindikatorfarvestof Konservingsmiddel : ProClin™ 300 (0,5 %)	1 flaske 3 ml
C2	100 mIU/ml KALIBRATOR - POSITIV KONTROL Buffer med Anti-HBs-antistoffer af human oprindelse, serum fra kalvefostre, proteinstabilisatorer og prøveindikatorfarvestof Konservingsmiddel : ProClin™ 300 (0,5 %)	1 flaske 2,2 ml
C3	400 mIU/ml KALIBRATOR Buffer med Anti-HBs-antistoffer af human oprindelse, serum fra kalvefostre, proteinstabilisatorer og prøveindikatorfarvestof Konservingsmiddel : ProClin™ 300 (0,5 %)	1 flaske 2,2 ml
C4	1000 mIU/ml KALIBRATOR Buffer med Anti-HBs-antistoffer af human oprindelse, serum fra kalvefostre, proteinstabilisatorer og prøveindikatorfarvestof Konservingsmiddel : ProClin™ 300 (0,5 %)	1 flaske 2,2 ml
R6	PRØVEFORTYNDER Buffer med serum fra kalvefostre, proteinstabilisatorer og prøveindikatorfarvestof Konservingsmiddel : ProClin™ 300 (0,1 %)	1 flaske 27 ml
R7a	KONCENTRERET KONJUGAT (11 x) Buffer med HBsAg (humant, undertyper ad og ay) dækket med peroxidase og proteinstabilisatorer Konservingsmiddel : ProClin™ 300 (0,5 %)	1 flaske 2,5 ml
R7b	KONJUGATFORTYNDER Buffer med kalveserum og proteinstabilisatorer Konservingsmiddel : ProClin™ 300 (0,1%)	1 flaske 25 ml
R8	SUBSTRATBUFFER Citronsyre og natriumacetatopløsning pH 4,0, som indeholder H ₂ O ₂ (0,015 %) og DMSO (4 %)	1 flaske 60 ml
R9	KROMOGEN Opløsning, der indeholder tetrametylbenzidin (TMB)	1 flaske 5 ml
R10	STOPOPLØSNING 1 N-svovlsyreopløsning	1 flaske 28 ml
	SELVKLEBEDE FILM TIL MIKROPLADER	8

* Kontrollerne kalibreres i henhold til en intern reference, som kalibreres i henhold til 1. IRP WHO 1977-referencen.

Opbevar sættet ved 2-8°C. Lad reagenserne i sættet, undtagen konjugatkoncentratet, opnå stuetemperatur (18-30°C) før brug. Nedkøl reagenserne til 2-8°C øjeblikkeligt efter brug. Opbevar alle ubrugte strimler/plader i posen, og forsej den igen. Fjern ikke terræmidlet. Opbevar strimmelpladerne ved 2-8°C.

101

102

5 - FORHOLDSREGLER

Kvaliteten af resultatene afhænger af følgende regler for god laboratoriepraksis :

- Navnet på og et specifikt id for testen skrives på hver mikrotiterplades ramme. Dette specifikke id er ligeledes angivet på hver strimmel.
- Monolisa® Anti-HBs PLUS : Specifikt id = 63.
- Verificer det specifikke id før brug. Såfremt der mangler et id, eller det er forskelligt fra det angivne id, som svarer til den analyse, der skal testes, må strimlen ikke bruges.
- Brug ikke reagenser efter udløbsdatoen.
- Bland ikke reagenser fra forskellige partier i samme testkørsel.
BEMÆRK! Det gælder for vaskeopløsning (R2, etiketidentifikation : 10 x farvet blå), peroxidase-substrat-buffer (R8, etiketidentifikation : TMB-buffet, farvet blå), kromogen (R9, etiketidentifikation : TMB 11x, farvet lilla) og stopopløsning (R10, etiketidentifikation : 1N farvet rød), at det er muligt at bruge andre partier end dem i sættet under forudsætning af, at det samme parti bruges inden for en given testkørsel. Disse reagenser kan anvendes sammen med en række andre produkter fra vores virksomhed. Kontakt vores tekniske serviceafdeling for at få detaljerede oplysninger.
- Vent 30 minutter, før reagenserne tages i brug, så de kan stabilisere sig ved stuetemperatur.
- Rekonstituer reagenserne forsigtigt for at undgå kontaminering.
- Undgå at udføre testen i nærheden af reaktive dampe (syre, alkaliske dampe og aldehyddampe) eller støv, der kan ændre konjugatets enzymaktivitet.
- Bønyttede engangsmaterialer, eller hvis dette ikke er muligt, udstyr af glas, som er vasket grundigt og skyllet med demineraliseret vand.
- Undgå, at mikropladen tørrer i perioden mellem rengøringen og fordelingen af reagensstoffet.
- Den enzymatiske reaktion er meget følsom over for metaller eller metalioner. Undgå derfor, at metalelementer kommer i berøring med de forskellige opløsninger, der indeholder konjugat- eller substratopløsning.
- Udviklingsopløsningen (substratbuffer + kromogen) skal være farvet lyserød. Hvis den lyserøde farvning ændrer sig nogle få minutter efter rekonstitueringen, kan reagenset ikke anvendes og skal udskiftes.
- Forberedelsen af udviklingsopløsningen kan udføres i en ny engangsplastikbakke eller en glasbeholder, der først er vasket med 1N HCl og derefter skyllet grundigt med destilleret vand og tørret. Dette reagens skal opbevares i mørke.
- Brug en ny fordelingspids for hvert serum.
- Grundig rengøring er et afgørende punkt i denne procedure : Overhold det anbefalede antal afvaskninger, og kontroller, at alle brønde bliver helt fyldt og derefter helt tomt. Forkert afvaskning kan medføre unøjagtige resultater.
- Brug aldrig den samme beholder til at fordele konjugat- og udviklingsopløsninger.

6 - SUNDHEDS- OG SIKKERHEDSMÆSSIGE FORHOLDSREGLER

Nogle reagenser indeholder ProClin™ 300 (0,1% eller 0,5%)



R43 : Kan fremkalde irritation ved hudkontakt.
S28-37 : Efter hudkontakt afvaskes stoffet straks med rigeligt vand og sæbe.
Brug passende beskyttelsesøj.

- Monolisa® Anti-HBs PLUS indeholder humane blodkomponenter, der er blevet testet og fundet ikke-reaktive for hepatitis B-overfladeantigenet (HBsAg), antistoffer til hepatitis C-virus (HCV) og antistoffer til HIV (HIV-1 og HIV-2 Ab). Eftersom der ikke er kendskab til en testmetode, der med garanti kan sikre, at der ingen smitstoffer forekommer, skal reagenser og patientprøver håndteres, som om de kan overføre smitsomme sygdomme.
- Betragt alt materiale, der har været i direkte kontakt med prøver og reagenser af human oprindelse, samt rengøringsopløsninger som smittefarligt materiale.
- Undgå at spilde prøver eller opløsninger, der indeholder provemateriale.
- Bønyttede engangshandsker, når du håndterer reagenserne og prøverne, og vask hænderne grundigt efter håndteringen.
- Undgå at pipettere med munden.

103

Forbered en fortynding i forholdet 1:11 til hver strimmel, der skal testes (eksempel : tilsæt 100 µl konjugatkoncentrat (R7a) pr. 1 ml konjugatfortyndelsesmiddel (R7b) i et rent polypropylenrør). Brug nedenstående tabel som vejledning. Bland grundigt, men forsigtigt for at undgå skumdannelse. Konjugatopløsningen skal være grøn. Den forbliver stabil i 15 timer ved stuetemperatur og 1 måned ved +2-8°C.

Konjugatopløsning kan forberedes ved hjælp af pipettering af hele indholdet af flasken med konjugatkoncentrat (R7a) ned i konjugatfortyndelsesmiddel (R7b). Bland altid arbejdsopløsningen ved at vende den umiddelbart inden brug.

Sæt ubrugt konjugatkoncentrat (R7a) i køleskabet igen umiddelbart efter brug.

Anvend rene handsker, og undgå at berøre pipettespidser for at undgå kontaminering af konjugatet.

Forberedelse af konjugatopløsning ved strimmel

Antal strimler, der skal bruges	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12*	24**
Mængde koncentrat konjugat R7a (µl)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200	2400
Mængde konjugatfortyndelsesmiddel R7b (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	24

* 1 fuld plade ** 2 fulde plader

Fortyndt substratopløsning (R8 + R9)

Lad kromogen (R9) og substratbuffer (R8) opnå stuetemperatur.

Vend kromogenet og substratbuffer for at blande det for brug.

Opløs kromogenet (R9) i forholdet 1:11 i substratbufferen (R8) til hver strimmel, der skal testes (eksempel : tilsæt 1 ml R9-reagens i 10 ml R8-reagens). Der skal bruges 10 ml til 1 til 12 teststrimler. Homogeniser.

Bland den fortyndede arbejdssubstratopløsning forsigtigt før brug. Vent 5 minutter før brug. Den fortyndede arbejdssubstratopløsning skal anvendes inden for 8 timer efter forberedelsen og opbevares på et mørkt sted ved stuetemperatur.

Kromogen (R9) skal være lyserød. En anden farve angiver kontamination af reagenset : i dette tilfælde må kromogenet ikke anvendes. Forbered kun den mængde reagens, der skal bruges inden for 6 timer, idet det sikres, at der vil være tilstrækkeligt fortyndet reagens til hele kørslen. Brug nedenstående tabel som vejledning :

Forberedelse af den fortyndede arbejdssubstratopløsning ved strimmel

Antal strimler, der skal bruges	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12*	24**
Kromogenmængde R9 (µl)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1200	2400
Substratbuffermængde R8 (ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	24

* 1 fuld plade ** 2 fulde plader

9 - OPBEVARING OG VALIDITET

Opbevar sættet ved +2-8°C for brug.

- **R1** : Efter åbning forbliver strimler, som opbevares ved +2-8°C i en omhyggeligt forseglet pose stabile i 1 måned.
 - **R2** : Efter forberedelse forbliver fortyndt vaskeopløsning stabil i 2 uger ved +2-8°C.
 - **R7a + R7b** : Konjugatopløsningen forbliver stabil i 15 timer ved stuetemperatur (+18-30°C) og i 1 måned, hvis den opbevares ved 2-8°C.
 - **R8 + R9** : Efter forberedelse forbliver fortyndt arbejdssubstratopløsning stabil i 6 timer ved stuetemperatur (+18-30°C) et mørkt sted.
- Efter åbning er alle andre reagenser stabile indtil den udløbsdato, der står på kassen, når de opbevares ved +2-8°C.

105

- Prøver, reagenser af human oprindelse, kontamineret materiale og produkter skal kasseres efter desinficeringen
- enten ved nedsænkning i blegemiddel med en slutkoncentration på 5 % natriumhypoklorit (1 mængde blegemiddel til 10 mængder kontamineret væske eller vand) i 30 minutter
- eller ved autoklavering ved 121°C i mindst 2 timer.
- Autoklavering ved 121°C, i 1 time er den bedste metode til deaktivering af HIV- og HBV-vira.
- ADVARSEL! UDGÅ AF PLACERE OPLØSNINGER, DER INDEHOLDER NATRIUMHYPOCHLORIT, I AUTOKLAVEN.
- Hvis du spilder materiale, skal du rense efter med blegemiddel i en opløsning på 10 %. Hvis den kontaminerende væske er en syre, skal det spildte materiale først neutraliseres med natriumbicarbonat, derefter rengøres med blegemiddel og tørres op med sugende papir. Det materiale, der anvendes til rengøringen, skal kasseres og placeres i en beholder til kontamineret affald.
- Husk at neutralisere og/eller autoklavere opløsningerne, affald fra rengøringsprocessen eller enhver væske, der indeholder biologisk provemateriale, før du hælder dem i afløbet.
- Sikkerhedsdataarket udleveres efter anmodning.

7 - KRÆVET MATERIALE, DER IKKE MEDFØLGER

- Destillat eller demineraliseret vand.
- Natriumhypoklorit (blegemiddel) og natriumbicarbonat.
- Automatiske eller halvautomatiske justerbare eller faste pipetter, der kan levere 10 µl til 200 µl samt 1 ml, 5 ml og 10 ml.
- Graduerede cylindere med en kapacitet på 25 ml, 100 ml og 1.000 ml.
- Beholder til kontamineret affald.
- Vandbad eller varmeskab med termostatindstilling til 37°C ± 1°C.
- Automatisk, halvautomatisk eller manuelt rengøringsystem til mikropulader.
- Løsehed til mikropulader (forsynet med filtre på 490, 450 og 620 nm).
- Sugende papir.
- Engangshandsker.
- Rene beholdere af polypropylen til forberedelse af TMB.

8 - FORBEREDELSE AF REAGENSER

Før reagenserne i Monolisa® anti-HBs PLUS-analysesættet tages i brug, skal de stabiliseres ved stuetemperatur i 30 minutter.

1) Brugsklare reagenser

Mikroplade (R1)

Før den forseglede pose åbnes, skal mikropladen stabiliseres ved stuetemperatur i beskyttelsesposen for at undgå kondensvand i brøndene. Læg straks alle ubrugte teststrimler tilbage i posen. Luk omhyggeligt posen igen, når du har trykket luften ud af den, og forseg den med klæbebånd. Opbevar ved +2 -8°C.

Prøvefortynder (R6)

Negativ kontrol (C0) for Anti-HBs

10 ml/mil kalibrator (C1)

100 ml/mil kalibrator – positiv kontrol (C2)

400 ml/mil kalibrator (C3)

1000 ml/mil kalibrator (C4)

Homogeniser reagenserne for brug i en Vortex-mixer, eller vend dem forsigtigt.

2) Reagenser til rekonstituering

Koncentreret vaskeopløsning (R2)

Fortynd vaskeopløsningen R2 i forholdet 1:10 i destilleret vand. Homogeniser.

Konjugatopløsning (R7a + R7b)

Lad konjugatfortyndelsesmiddel (R7b) opnå stuetemperatur.

Vend konjugatfortyndelsesmiddel (R7b, farveløs eller lysegul) og konjugatkoncentrat (R7a, grøn) for at blande det for brug.

104

10 - PRØVER

Tag en blodprøve i overensstemmelse med gældende praksis.

Testen skal udføres på serum eller plasma. Kun følgende prøver er blevet testet: serum, der er indsamlet i standardrør, eller rør, der indeholder separationsgel, plasma, som er indsamlet med EDTA, eller heparin. I tilfælde af brug af plasma, der er indsamlet med citrat eller ACD, er resultaterne lavere end de resultater, der opnås med serum for 20%.

Prøver med aggregater skal renses ved centrifugering forud for testen. Oplømmede fibrinaggregater eller -partikler kan give fejlagtige positive resultater.

Prøverne skal opbevares ved +2-8°C, hvis screeningen udføres inden for syv dage, eller dybfrysning ved -20°C. Undgå gentagne nedfrysning/optøning. Hvis prøverne skal sendes, skal de pakkes ifølge de gældende bestemmelser angående transport af ætiologiske agenser. Send dem helst i frosset stand.

BEMÆRK! Prøver, der indeholder op til 90 g/l albumin og 100 mg/l bilirubin, lipæmiske prøver, der indeholder mængder op til det, der svarer til 36 g/l triglycerider, og hæmolyserede prøver, der indeholder op til 2,55 g/l hæmoglobin, påvirker ikke resultaterne.

Prøver må ikke anvendes i 30 minutter efter behandling ved 56°C.

11 - ANALYSEPROCEDURE

Følg fremgangsmåden nøje. Brug negative og positive kontrolsera til hver test for at vurdere kvaliteten af testen. Anvend god laboratoriepraksis.

Metoder

1. Fastlæg prøvefordelingen og identifikationsoversigten omhyggeligt.
2. Lad alle reagenserne opnå stuetemperatur inden påbegyndelse af analyseproceduren.
3. Forbered konjugatopløsningen (R7a + R7b), den fortyndede arbejdssubstratopløsning (R8 + R9) og den fortyndede vaskeopløsning (R2).
4. Tag mikropladerammen og -strimler (R1) ud af beskyttelsesposen. Fjern strimler, der ikke skal bruges til analysen, og udskift dem med mærkede ikke-sensibiliserede strimler efter behov.
5. Fortynd prøver, kalibratore og kontroller i forholdet 3:4 i prøvefortynder R6, ved at følge en af de nedenstående procedurer :

a. Prøver, kalibratore og kontroller kan fortyndes i en brønd (tilsæt først 25 µl prøvefortynder R6 til hver brønd, derefter 75 µl prøve- eller kontrolmateriale inden for 15 minutter, og bland det derpå forsigtigt med mindst 2 opsvingninger for at undgå skumdannelse).

b. Prøver, kalibratore og kontroller kan fortyndes i forholdet 3:4 i prøvefortynder R6 for tilsætning til brønden (fortynd f.eks. 150 µl provemateriale i 50 µl prøvefortynder R6, bland det forsigtigt for at undgå skumdannelse, og overfør derefter 100 µl til brønden).

BEMÆRK! Efter tilsætning af prøven skifter fortynderen fra lilla til blå. Du kan kontrollere, at prøverne findes i brøndene ved hjælp af en spektrofotometrisk læsning ved 620 nm (Se afsnit 14 : SPEKTROFOTOMETRISK KONTROL AF PROVE- OG REAGENSPIPETTERING).

6. Tilsæt direkte, uden at skylle pladen først, og i rækkefølge, afhængigt af den valgte metode:

* Kvalitativ bestemmelse

- Anti-HBs – negativ kontrol (C0) i brønd A1,
- 10 ml/mil kalibrator (C1) i brøndene B1, C1 og D1,
- 100 ml/mil kalibrator – positiv kontrol (C2) i brønd E1,
- Prøver i brøndene F1, G1, osv.

Kvantitativ bestemmelse

- Anti-HBs – negativ kontrol (C0) i brønd A1,
- 10 ml/mil kalibrator (C1) i brøndene B1 og C1,
- 100 ml/mil kalibrator – positiv kontrol (C2) i brønd D1,
- 400 ml/mil kalibrator (C3) i brønd E1,
- 1000 ml/mil kalibrator (C4) i brønd F1,
- Prøver i brøndene G1, H1, osv.

* 7. Tildæk, om muligt, brøndene med selvklæbende film, og sørg for at dække hele overfladen for at sikre en tæt tillukning.

106

8. Mikropladen inkuberes i 60 ± 5 minutter ved $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
9. Fjern den selvklæbende film. Sug indholdet af alle brønde op i en vaskbeholder, og tilsæt øjeblikkeligt min. 0,375 ml rengøringsopløsning til hver brønd. Gennemvæd hver brønd 30 til 60 sekunder mellem hver vaskecyklus. Sug indholdet op igen. Gentag rengøringsstrinnet 4 gange (mindst 5 skyllinger). Restmængden skal være mindre end 10 µl (hvis det er nødvendigt, kan du tørre pladen ved at lægge den på hovedet på sugende papir).
10. Hvis der anvendes en automatisk vasker, skal du benytte samme procedure.
11. Tilsæt hurtigt 100 µl konjugatopløsning (R7a + R7b) til hver brønd. Tildæk, hvis det er muligt, brøndene med ny selvklæbende film, og inkuber i 60 ± 5 minutter ved $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.
- BEMÆRK! Konjugatet er farvet grønt. Du kan kontrollere, at konjugatet findes i brøndene ved hjælp af en spektrofotometrisk læsning ved 620 nm (Se afsnit 14: SPEKTROFOTOMETRISK KONTROL AF PROVE- OG REAGENSPIPETTERING).*
12. Fjern den selvklæbende film. Sug indholdet af alle brønde op i en beholder til flydende affald, og tilsæt øjeblikkeligt min. 0,375 ml rengøringsopløsning til hver brønd. Gennemvæd hver brønd 30 til 60 sekunder mellem hver vaskecyklus. Sug indholdet op igen. Gentag rengøringsstrinnet 4 gange (mindst 5 skyllinger). Restmængden skal være mindre end 10 µl (hvis det er nødvendigt, kan du tørre pladen ved at lægge den på hovedet på sugende papir).
13. Hvis der anvendes en automatisk vasker, skal du benytte samme procedure.
14. Tilsæt hurtigt 100 µl af den fortyndede arbejdsstratopløsning (R8 + R9) til hver brønd. Lad reaktionen foregå i mørke i 30 ± 5 minutter ved stuetemperatur ($18 - 30^\circ\text{C}$). Undgå at bruge selvklæbende film under inkubationen.
- BEMÆRK! Den fortyndede arbejdsstratopløsning er farvet lyserød. Du kan kontrollere, at konjugatet findes i brøndene ved hjælp af en spektrofotometrisk læsning ved 490 nm (Se afsnit 14: SPEKTROFOTOMETRISK KONTROL AF PROVE- OG REAGENSPIPETTERING).*
15. Tilsæt 100 µl stopopløsning (R10) i samme rækkefølge og med samme fordelingsfrekvens som for den fortyndede arbejdsstratopløsning. Homogeniser reaktionsblandingen.
16. Tør undersiden af pladen omhyggeligt af. Mindst fire minutter efter tilsætning af stopopløsningen og senest 30 minutter efter at reaktionen er stoppet, aflæses den optiske densitet ved 450/620-700 nm og 405/620-700 nm ved hjælp af en mikropladeaflæser.

12 - VALIDERING AF RESULTATERNE TIL KVALITATIV OG KVANTITATIV METODE

Den gennemsnitlige absorbans af 10 µl/ml kalibrator (C1) er analysens cutoff-værdi.

Anti-HBs - negativ kontrol (C0)
Den målte absorbansværdi skal være større end 0,000 og mindre end eller lig med 0,070 ($0,000 < OD_{C0} \leq 0,070$).

For positiv kontrol (C2) gælder
Den målte absorbansværdi skal være større end eller lig med 0,400 ($OD_{C2} \geq 0,400$).
For negativ kontrol (C0) og positiv kontrol (C2) gælder, at hvis et af de ovennævnte kriterier ikke opfyldes til kvalitativ og kvantitativ metode, er analysen ikke gyldig, og den skal gentages.

For 10 µl/ml kalibrator (C1) gælder
Den målte absorbansværdi skal være større end eller lig med 0,050 og mindre end eller lig med 0,200 ($0,050 < OD_{C1} \leq 0,200$).
Hver enkelt målt absorbansværdi skal være større end eller lig med 1,5 gange OD af den negative kontrols (C0) absorbansværdi: $OD_{C1} \geq (1,5 \times OD_{C0})$.

I tilfælde af anvendelse af kvalitativ metode
Såfremt en af cutoff-kalibratorværdierne på 10 µl/ml ligger uden for det acceptable område (den målte absorbansværdi skal være større end eller lig med 0,050 og mindre end eller lig med 0,200), skal den gennemsnitlige absorbans udregnes på basis af de to resterende absorbansværdier. Analysen er gyldig.
Såfremt adskillige målte OD_{C1} -værdier ligger uden for det acceptable område, er analysen ugyldig og den skal gentages.

107

14 - SPEKTROFOTOMETRISK KONTROL AF PROVE- OG REAGENSPIPETTERING (VALGFRIT)

KONTROL AF PRØVEFYNDEREN (R6) OG PRØVEPIPETTERING

Efter tilsætning af prøven, skifter prøvefynderen R6 farve fra lilla til blå.
Forekomsten af prøve og prøvefynder (R6) i brønden kan kontrolleres ved en spektrofotometrisk aflæsning ved 620 nm: OD-værdien af hver brønd, der indeholder prøve eller kontrol, der er fortyndet i prøvefynderen, skal være større end eller lig med 0,150 (en lavere værdi angiver en manglende fordeling af prøvematerialet eller kontrollen).

KONTROL AF KONJUGATOPPLØSNINGSPIPETTERING (R7a + R7b)

Konjugatopløsningen (R7a + R7b) er farvet grøn.
Forekomsten af konjugatopløsning i brønden kan kontrolleres ved en spektrofotometrisk aflæsning ved 620 nm: OD-værdien for hver brønd skal være større end eller lig med 0,070 (en lavere værdi angiver manglende fordeling af konjugatopløsningen).

KONTROL AF PIPIETTERINGEN AF DEN FORTYNDTE ARBEJDSSTRATOPPLØSNING (R8 + R9)

Den fortyndede arbejdsstratopløsning (R8 + R9) er farvet lyserød.
Du kan bekræfte forekomsten af den lyserøde udviklingsopløsning i brønden ved hjælp af automatisk aflæsning ved 490 nm: den optiske densitet for en brønd med udviklingsopløsning skal være større end 0,100 (lavere OD angiver dårlig fordeling af udviklingsopløsningen). Der er en betydelig farveændring i de tomme brønde fra ufarvet til lyserød efter tilsætningen af den fortyndede arbejdsstratopløsning.

15 - TESTENS BEGRÆNSNINGER

- Testprocedure og tolkning af resultater skal følges ved test af serum eller plasmaprøver for forekomst af antistoffer mod HBs. Det anbefales brugeren af sættet at læse pakkens indlægsseddel grundigt, før testen udføres. Især skal testproceduren følges omhyggeligt hvad angår prøve- og reagenspipettering, vask af plader og lidsbestemmelse af inkubationstrinene.
- Undlader man at tilsætte prøvemateriale eller reagens efter instruktionerne i proceduren, kan det give falske negative resultater. Det anbefales at gentests prøver, hvis der er mistanke om procedurerelaterede fejl.
- Faktorer, som kan påvirke resultaternes validitet, er bl.a. at undlade at tilsætte prøvemateriale i brønden, utilskikkelig afvaskning af mikroplader, at undlade at følge de opgivne inkubationstider og -temperaturer, tilsætning af forkerte reagenser i brøndene, tilstedeværelse af metaller eller stænk af blegemiddel i brøndene.
- Det anbefales at fortolke resultater med lav værdi omhyggeligt på grund af forskelle i patienters immunreaktioner, både efter HBV-infektion og efter yderligere vaccination eller indsprøjtning af immunoglobuliner til behandling.

16 - YDEEVNE

Nedenstående analysedele er opnået i løbet af analyseevalueringen af Monolisa® Anti-HBs PLUS. Resultater, der er opnået i et laboratorium, kan afvige fra disse.

1. Reproducerbarhed for den interne analyse

der er blevet udført tripletestet af fem positive prøver og en negativ prøve 10 gange inden for samme serie.

Prøve	Gennemsnitsforhold	SD	CV %
Anti-HBs Negativ	0,023	0,003	13,6
Anti-HBs Positive - 20 mIU/ml	0,143	0,005	3,4
Anti-HBs Positive - 50 mIU/ml	0,358	0,012	3,3
Anti-HBs Positive - 100 mIU/ml	0,715	0,019	2,6
Anti-HBs Positive - 150 mIU/ml	1,231	0,037	3,0
Anti-HBs Positive - 300 mIU/ml	1,982	0,048	2,4

109

I tilfælde af anvendelse af kvantitativ metode

Såfremt en af de to målte OD_{C1} -værdier ligger uden for det acceptable område (den målte absorbansværdi skal være større end eller lig med 0,050 og mindre end eller lig med 0,200), er analysen ikke gyldig, og den skal gentages.

13 - BEREGNING OG FORTOLKNING AF RESULTATERNE

For hver prøve gælder, at sammenligning af den målte absorbansværdi og den beregnede cutoff-værdi gør bestemmelsen af forekomst eller fravær af anti-HBs-antistoffer mulig.

1. Kvalitativ metode

Beregn gennemsnittet af de målte absorbansværdier for 10 µl/ml-kalibratoren (C1)

Eksempel: 10 µl/ml-kalibrator (C1)

B1	0,078
C1	0,079
D1	0,089
I alt =	0,246

Gennemsnitlig $OD_{C1} = 0,246 / 3 = 0,082$

Såfremt en af de målte absorbansværdier ligger uden for det acceptable område (den målte absorbansværdi skal være større end eller lig med 0,050 og mindre end eller lig med 0,200), skal den gennemsnitlige absorbans udregnes på basis af de to resterende absorbansværdier.

Beregning af cutoff-værdi (CO)

Den gennemsnitlige absorbans af 10 µl/ml-kalibratoren (C1) er analysens cutoff-værdi: $CO = \text{Gennemsnitlig } OD_{C1}$

Fortolkning af resultaterne

Prøver med absorbansværdier, der er større end eller lig med cutoff-værdien, betragtes som reaktive. Prøver med absorbansværdier, som er mindre end cutoff-værdien, betragtes som ikke-reaktive. De, der har værdier, som overskrider aflæserens øvre lineære grænser, skal rapporteres som reaktive. *BEMÆRK! På grund af mangfoldigheden af antistoffer og antigen, der anvendes i hver analyse, kan resultaterne variere, afhængigt af analysen.*
Vaccinationsstrategier: der foreslås forskellige anbefalinger, afhængigt af pågældende regioner og lande.

I tilfælde af ændret analysemetode i løbet af vaccinationsopfølgningen, skal anti-HBsantistofkoncentrationen bestemmes med begge metoder i en overgangsperiode.

2. Kvantitativ metode:

Følgende Anti-HBs-kalibrator skal anvendes for at bestemme koncentrationen af anti-HBs-antistoffer i serum og plasmaprøver: C0 (0 mIU/ml), C1 (10 mIU/ml), C2 (100 mIU/ml), C3 (400 mIU/ml) og C4 (1000 mIU/ml). Der tilsættes kalibratoren direkte i hver brønd, uden at skylle pladen først og i rækkefølge, som beskrevet i analyseproceduren (Se afsnit 11: ANALYSEPROCEDURE).

Aflæs den optiske densitet ved 450/620-700 nm ved hjælp af en mikropladeaflæser (A450). Gør følgende for at få flere prøver med absorbansværdier (A450) større end eller lig med C3 målt absorbansværdi: A450 > OD_{C3} , aflæses den optiske densitet ved 405/620-700 nm. A450 af fire kalibratore C0, C1, C2 og C3 fremstilles grafisk i forhold til deres tildelede koncentrationer ved at anvende en polynom (kvadratisk) regression. Bemærk venligst, at 1000 mIU/ml-kalibratoren (C4) A450 ikke kan anvendes i denne graf, da denne absorbansværdi skal ligge uden for spektrofotometerets område, deraf nødvendigheden af endnu en graf. Prøver med målte absorbansværdier, som er mindre end OD_{C3} , fortolkes med den graf, der er opnået med A450.

A405 af kalibratorene C3 (400 mIU/ml) og C4 (1000 mIU/ml) fremstilles grafisk i forhold til deres tildelede koncentrationer ved at anvende punkt til punkt-kurver. Der tegnes en lige linje gennem punkterne. Derefter aflæses anti-HBs-koncentrationen (mIU/ml) for hver prøve ved de respektive absorbansværdiers skæringspunkt. A405-kurven anvendes til at bestemme koncentrationerne af serum eller plasmaprøver, hvis koncentrationer er større end 400 mIU/ml og mindre end eller lig med 1000 mIU/ml.

Prøver med anti-HBs-koncentrationer, der er større end 1000 mIU/ml, kan fortyndes ved anvendelse af den fortyndede vaskeopløsning (R2) og genanalyseres.

108

2. Reproducerbarhed for krydskontrolleret analyse

3 positive prøver og en negativ prøve blev testet 2 gange om dagen i dobbeltkørsler i løbet af 20 dage i henhold til EP5 NCCLS-proceduren (National Committee for Clinical Laboratory Standards)

Prøve	Gennemsnitsforhold	SD	CV%
Anti-HBs Negativ	0,023	0,004	15,5
Anti-HBs Positive - 20 mIU/ml	0,146	0,008	5,5
Anti-HBs Positive - 150 mIU/ml	1,284	0,060	4,9
Anti-HBs Positive - 300 mIU/ml	2,015	0,067	3,6

3. Nøjagtighed

Kvantitative resultater angives i mIU/ml og kalibreres i henhold til en intern reference, som kalibreres i henhold til I. IRP WHO Reference Standard 1977.

Der er udført en korrelationsundersøgelse ved at teste koncentrationerne 0, 10, 100, 400 og 1000 mIU/ml, som er opnået med international WHO-standard i forhold til sætkalibratoren.

Den opnåede korrelationslinjes korrelationskoefficient og hældning er $R2 = 0,99$ og $-0,96$.

4. Den analytiske sensitivitet var mindre end 2 mIU/ml i henhold til NCCLS-proceduren.
BEMÆRK! Analytisk sensitivitet svarer til den nedre detektionsgrænse, hvilket svarer til den lavest målelige analytkoncentration, som adskiller sig fra nul, beregnet ud fra gennemsnits- og standardafvigelse, der er opnået med punkterne 0 og 10 mIU/ml.

5. Metodelinearitet

5 Anti-HBs Ab-højpositive prøver (924 mIU/ml, 330 mIU/ml, 326 mIU/ml, 544 mIU/ml og 857 mIU/ml) er blevet dobbeltfortyndet op til 1/32 eller 1/64. Dækningsgradene ligger mellem 92 % og 116 %.

6. Hook-effekt

Der er testet 4 ufortyndede prøver med store anti-HBs-antistofkoncentrationer (20000 mIU/ml, 5500 mIU/ml, 28.000 mIU/ml og 9000 mIU/ml).

Koncentration	20000 mIU/ml	28000 mIU/ml	9000 mIU/ml	5500 mIU/ml
DD 450	Aflæst ved 405 nm	Aflæst ved 405 nm	Aflæst ved 405 nm	Aflæst ved 405 nm
DD 405	1,342	1,596	1,629	1,310
Resultat	>1000 mIU/ml	> 1000 mIU/ml	> 1000 mIU/ml	> 1000 mIU/ml

Enhver hook-effekt er vist under evalueringen af ydeevne.

7. Specificitet

a) 179 patienter, der viser forskellige sygdomme (hepatitis A, hepatitis C, VIH1, VIH2, HTLV, HSV, EBV, rubella, toxoplasmose, myeloma (IgG, IgM), RF, ANA, HAMA, cirrhose og multitransfusion), er testet med Monolisa® Anti-HBs PLUS.

21 prøver blev fundet positive med Monolisa® Anti-HBs PLUS og to andre CE-mærkede anti-HBs påvisningsanalyser. 1 ANA-positiv prøve er udelukkende fundet positiv til anti-HBs Ab med Monolisa® Anti-HBs PLUS. 2 andre prøver (1 HIV1 og HIV2) er fundet positive til anti-HBs Ab med Monolisa® Anti-HBs PLUS og en anden konkurrerende analyse.

b) Monolisa® Anti-HBs PLUS-testens specificitet er bestemt ved analyse af prøver fra bloddonorer og tilfældigt valgte kliniske patienter.

	Sted 1 Donorer & indlagte	Sted 2 Donorer	Sted 3 Indlagte,	I alt
Hb-prøver	511	300	240	1051
Hb-Positiv	3	0	3	6
Specificitet i %	99,4%	100%	98,7%	99,4%

Specificiteten er 99,4% (98,8% til 99,8% med 95% konfidensinterval).

8. Sensitivitet

654 prøver fra forskellige populationer af vaccinerede eller naturligt inficerede patienter er blevet testet med Monolisa® Anti-HBs PLUS og en anden anti-HBs-analyse. Uoverensstemmende prøver er blevet genanalyseret med en tredje CE-mærket teknik.

Patientprofil	N	Monolisa®-konkordans	
		Test 1 CE-mærket	Test 2 CE-mærket*
Vaccineret	347	98,8%	99,1%
Fordelt hepatitis B	71	95,8%	100%
Kronisk hepatitis B	37	100%	-
Indlagte patienter	199	98,6%	-
I alt	654	98,8%	99,5%

Blandt disse 654 testede patienter, er 617 fundet anti-HBs-positive og 37 negative (kronisk hepatitis-angrebne patienter) med test1. For disse 617 patienter er konkordansen 98,4% (97% til 99,2% med konfidensinterval på 95%).

* Efter analyse af uoverensstemmende prøver med test 2 er sensitiviteten for Monolisa® Anti-HBs PLUS 99,2% (98,1% til 99,7% med 95% konfidensinterval).

17 - REFERENCER

Se den franske udgrave. ↓

1. Lai CL, Ratziu V, Yuen M-F, Poynard T: Viral hepatitis B. Lancet 362 : 2089-2094, 2003.
2. Maddrey WC: Hepatitis B : an important public health issue. J Med Virol 61: 362-366, 2000.
3. Delmonico FL, Snydman DR: Organ donor screening for infectious diseases. Transplantation 65 : 603-610, 1998.
4. Centers for Disease Control : Recommendations for preventing transmission of infections among chronic hemodialysis patients. MMWR 50 (No. RR-5): 1-43, 2001.
5. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A : The hepatitis B virus. Nature 317: 489-495, 1985.
6. Lee WM: Hepatitis B infection. New Engl J Med 337 : 1733-1745, 1997.
7. Mushahwar IK, Dienstag JL, Polesky HF, McGrath LC, Decker RH, Overby LR Interpretation of various serological profiles of hepatitis B virus infection. Am J Clin Pathol 76: 773-777, 1981.
8. McMahon BJ, Atward WLM, Hall DB, et al.: Acute hepatitis B infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. J Infect Dis 151: 599-603, 1985.
9. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM: Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. Semin Liver Dis 11: 73-83, 1991.
10. Centers for Disease Control: Hepatitis B vaccination—United States, 1982-2002. MMWR 51(No. 25): 549-563, 2002.
11. Yu AS, Cheung RC, and Keefe EB : Hepatitis B vaccines. Clin Liver Dis 8: 283-300, 2004.
12. Bos ES, van der Doelen AA, van Rooy N, Schuur AHWM : 3,3',5,5' - tetramethylbenzidine as an ames test negative chromogen for horseradish peroxidase in enzyme immunoassay. J Immunoassay 2 : 187-204, 1981.
13. Garner RC, Walpole AL, Rose FL : Testing of some benzidine analogues for microsomal activation to bacterial mutagens. Cancer Letters 1 : 39-42, 1975.
14. Bond WW, Favero MS, Petersen NJ, Ebert JW : Inactivation of hepatitis B virus by intermediate-to-high-level disinfectant chemicals. J Clin Microbiol 18: 535-538, 1983.
15. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste : EPA Guide for Infectious Waste Management, Washington D.C., 1987. (USG PO 530-SW-86-014).
16. Schulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, Melnick JL : Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. Appl and Envi Microbiol 42 : 762-767, 1981.

Vedlegg 2: Data fra fluorescensmålinger

Tabell 4: Viser fluorescenssignal i «Relative Fluorescence Units» ved ulike markeringstusjer. Måledatane ble brukt i Figur 27.

Rosa	Grønn	Oransje	Gul
3706	39192	4112	25536
3219	36799	4816	21685
3400	31224	3078	21361
2104	29882	5227	22888
3440	15681	3188	23987
3321	20226	4396	21578
2899	19328	5463	30398
3548	18445	4788	25039
3245	19686	3773	20782
3483	14994	4588	33467
3392	15517	3939	28616
3579	16709	7571	48705
3654	21646	3536	19784
3395	21311	2643	15436
3351	19104	4228	35267
2027	16709	4005	22795
2812	16997	3505	26007
2403	19105	3097	25311
2720	29341	4072	27362
2518	20080	4450	37086

Tabell 5: Viser utregnet av gjennomsnitt, standardavvik og %CV ved fluorescensmålingen gjort med lysglimt på 5 og uten «Multiple reads per well». Resultatet er gitt i «Relative Fluorescens Units». Måledatene ble brukt i Figur 28.

Brønner	Gjennomsnitt	Standardavvik	%CV
Rosa markeringstusj	3377	560	17 %
Grønn markeringstusj	26032	8635	33 %
Oransje markeringstusj	4843	1119	23 %
Gul markeringstusj	30172	7707	26 %

Tabell 6: Viser utregnet gjennomsnitt, standardavvik og %CV ved fluorescensmålingen gjort med 30 lysglimt og uten «Multiple reads per well». Resultatet er gitt i «Relative Fluorescens Units». Måledatene ble brukt i Figur 28.

Brønner	Gjennomsnitt	Standardavvik	%CV
Rosa markeringstusj	3053	508	17 %
Grønn markeringstusj	22484	7540	34 %
Oransje markeringstusj	4273	995	23 %
Gul markeringstusj	26224	6884	26 %

Tabell 7: Viser utregnet gjennomsnitt, standardavvik og %CV ved fluorescensmålingen gjort med 5 lysglimt og «Multiple reads per well». Resultatet er gitt i «Relative Fluorescens Units». Måledatene ble brukt i Figur 28.

Brønner	Gjennomsnitt	Standardavvik	%CV
Rosa markeringstusj	4163	277	7 %
Grønn markeringstusj	23128	6070	26 %
Oransje markeringstusj	6145	564	9 %
Gul markeringstusj	30361	938	3 %

Tabell 8: Viser utregnet gjennomsnitt, standardavvik og %CV ved fluorescensmålingen gjort med 30 lysglimt og «Multiple reads per well». Resultatet er gitt i «Relative Fluorescens Units». Måledatene ble brukt i Figur 28.

Brønner	Gjennomsnitt	Standardavvik	%CV
Rosa markeringstusj	3658	344	9 %
Grønn markeringstusj	19872	6117	31 %
Oransje markeringstusj	5323	550	10 %
Gul markeringstusj	26836	453	2 %

Tabell 9: Viser en sammenligning av % CV for hver av markeringstusjene. Målingene ble gjort med 30 og 5 lysglimt per brønn, og med og uten funksjonen «Multiple Reads per Well» (MRW). Måledatene ble bruk i Figur 28.

Markingstusj	%CV			
	5 lysglimt	30 lysglimt	5 lysglimt + MRW	30 lysglimt + MRW
Rosa	17 %	17 %	7 %	9 %
Grønn	33 %	34 %	26 %	31 %
Oransje	23 %	23 %	9 %	10 %
Gul	26 %	3	3 %	2 %

Vedlegg 3: Data fra luminescensmålinger

Tabell 10: Viser avlesningsresultater for luminescens gjort på Tecan SPARK. Måledataen er brukt til Figur 29.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	5094937	4820794	4532945	4290742	4044391	3954213	4036331	4332869	4606758	5094937
B	3940983	3955381	3840988	854006	877171	842957	3872196	4178687	4443752	3940983
C	3495909	3343982	3341564	535827	431036	497862	3761380	3888469	4082280	3495909

Tabell 11: Viser luminescensavleninger for luminescens av Victor. Måledataene er brukt i Figur 29.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	476137	481921	471865	473223	475249	472968	463353	487287	483931	476137
B	417575	449072	441242	110135	111409	114247	491844	478899	481817	417575
C	375418	373661	353490	67691	56430	67792	447426	461884	454799	375418

Tabell 12: Viser regresjonstatistikken som ble brukt i regresjonsanalysen av luminescensmålingne gjort på Tecan SPARK og Victor.

	Koeffisienter	Standardfeil	t-Stat	P-verdi	Nederste 95%	Øverste 95%
Skjæringspunkt	-140651,63	146181,326	-0,9621723	0,34419936	-440090,5	158787,243
Victor	9,42977701	0,36047732	26,1591409	3,2028E-21	8,69137269	10,1681813

Vedlegg 4: Data fra celledtellingsforsøk

Tabell 13: Viser cellekonsentrasjonen ved de ulike cellefortynningene som ble telt i celledtellingsforsøket. Måledata brukt til Figur 34.

Cellesuspensjon	Konsentrasjon (celler/mL)
A	513636
B	350000
C	204545
D	77273

Vedlegg 5: Data fra cellekonfluensforsøk

Tabell 14: Viser konfluensutvikling i åtte ulike cellesuspensjoner ved sentrumsmålinger i brønnen. Måledataen som blir brukt i Figur 36. Verdiene som er oppgitt her er gjennomsnitt av tre paralleller.

	A	B	C	D	E	F	G	H
0	70 %	52 %	35 %	14 %	4 %	3 %	1 %	0 %
2	94 %	68 %	35 %	16 %	6 %	2 %	1 %	1 %
4	99 %	78 %	39 %	17 %	5 %	3 %	1 %	1 %
6	100 %	90 %	50 %	20 %	6 %	3 %	1 %	1 %
8	100 %	97 %	57 %	25 %	7 %	4 %	1 %	1 %
10	100 %	99 %	68 %	30 %	7 %	4 %	1 %	1 %
22	100 %	100 %	92 %	50 %	12 %	6 %	2 %	1 %
24	100 %	100 %	93 %	54 %	12 %	7 %	2 %	2 %
26	100 %	100 %	96 %	57 %	13 %	8 %	2 %	2 %
28	100 %	100 %	97 %	64 %	14 %	8 %	2 %	2 %
30	100 %	100 %	98 %	67 %	14 %	8 %	2 %	2 %
32	100 %	100 %	99 %	70 %	16 %	8 %	2 %	1 %
44	100 %	100 %	100 %	91 %	27 %	13 %	3 %	2 %
46	100 %	100 %	100 %	92 %	30 %	14 %	3 %	2 %
48	100 %	100 %	100 %	93 %	31 %	14 %	3 %	2 %
50	100 %	100 %	100 %	94 %	34 %	15 %	4 %	2 %
52	100 %	100 %	100 %	95 %	36 %	17 %	4 %	3 %
54	100 %	100 %	100 %	97 %	39 %	17 %	4 %	3 %

Tabell 15: Viser konfluensutvikling i åtte ulike cellesuspensjoner ved målinger som er gjort i hele brønnen. Måledataen som blir brukt i Figur 37. Verdiene som er oppgitt her er gjennomsnitt av tre paralleller.

	A	B	C	D	E	F	G	H
0	86 %	71 %	49 %	26 %	16 %	12 %	9 %	7 %
2	96 %	83 %	50 %	26 %	17 %	12 %	9 %	8 %
4	98 %	89 %	54 %	28 %	17 %	13 %	9 %	8 %
6	98 %	95 %	63 %	31 %	18 %	13 %	10 %	8 %
8	98 %	97 %	70 %	34 %	19 %	13 %	10 %	8 %
10	98 %	98 %	78 %	40 %	20 %	14 %	10 %	8 %
22	98 %	98 %	94 %	58 %	28 %	17 %	11 %	8 %
24	98 %	98 %	95 %	62 %	29 %	17 %	11 %	8 %
26	98 %	98 %	96 %	65 %	30 %	18 %	11 %	8 %
28	98 %	98 %	97 %	69 %	33 %	19 %	12 %	8 %
30	98 %	98 %	97 %	72 %	34 %	19 %	12 %	8 %
32	98 %	98 %	98 %	76 %	37 %	20 %	12 %	8 %
44	98 %	98 %	98 %	91 %	55 %	27 %	15 %	9 %
46	98 %	98 %	98 %	92 %	56 %	28 %	15 %	9 %
48	98 %	98 %	98 %	92 %	59 %	29 %	15 %	9 %
50	98 %	99 %	98 %	94 %	63 %	31 %	16 %	9 %
52	98 %	98 %	98 %	94 %	64 %	33 %	17 %	9 %
54	98 %	99 %	99 %	95 %	68 %	34 %	16 %	9 %

