

Opinnäytetyö (AMK)

Bio-ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2015

Saara Sirkiä

STREPTAVIDIINIPINNAN BIOTIININ- SITOUTUMISKAPASITEETIN TUTKIMINEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma | Biotekniikka

Syky 2015 | 53 sivua

Ohjaajat Anne Hautala, process leader; Paula Salonen, prosessipäällikkö; Ilari Suominen, yliopettaja

Saara Sirkiä

STREPTAVIDIINIPINNAN BIOTIININ- SITOUTUMISKAPASITEETIN TUTKIMINEN

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia irtokaivoon pinnoitetun streptavidinikerroksen biotiinin sitoutumiskapasiteettia osana DHR Finland Innotrac Diagnostics Oy:n tuotantoprosessia. Sitoutumisreaktio vaikuttaa yrityksen lopputuotteen, immunodiagnostisen testin, suorituskykyyn ja laatuun. Opinnäytetyö aloittaa yrityksessä avatun ongelmanselvityksen, joka pyrkii sulkemaan pois tuotteen tasaiseen laatuun ja suorituskykyyn vaikuttavia kriittisiä tekijöitä.

Opinnäytetyöhön valittiin kaksi tutkittavaa kriittistä tekijää: streptavidiiniliuoksen inkubointiaika sekä streptavidiinilla pinnoitettujen irtokaivojen kuivaus. Molemmista tekijöistä valittiin testattavaksi kaksi äärimmäistä ilmiötä. Näiden erien streptavidinikaivot valmistettiin kahdella analyytillä lopputuotteeksi, ja kaseteilla suoritettiin in-house -kontrolliliuoksien lineaarisuusajo AQT 90 Flex – immunoanalysaattorilla.

Alhaisella sitoutumiskapasiteetilla ei todettu olevan vaikutusta lopputuotteen suorituskykyyn. Huolimatta suuresta tuloserosta sitoutumiskapasiteettitestissä molemmat streptavidinierät antoivat samantasoisia tuloksia lineaarisuusajoissa. Työssä suoritettujen kokeiden perusteella voidaan sitoutumiskapasiteetin hyväksyntärajan laskemista harkita.

ASIASANAT:

immunodiagnostiikka, streptavidiini, biotiini, vasta-aine, laadunvalvonta

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Food technology and biotechnology | Biotechnology

Fall 2015 | 53 pages

Instructors Anne Hautala, Process Leader; Paula Salonen, Process Manager; Ilari Suominen, Principal Lecturer

Saara Sirkiä

STUDY OF BIOTIN BINDING CAPACITY OF STREPTAVIDIN SURFACE

The objective of this thesis was to study the biotin binding capacity of a streptavidin substrate layer coated in a single well at the production facility of DHR Finland Innotrak Diagnostics, Ltd. The reaction is linked to the analytical performance level of the end product, an immunodiagnostic test. The thesis commences a problem solving project to rule out critical factors affecting the quality of the product.

Two critical factors were examined in the thesis: the incubation time of the streptavidin solution during the coating process and drying of the wells after the streptavidin coating. Of both parameters two extremes were selected for testing, and the streptavidin wells of the two batches were processed into analytical intermediate products of two separate analytes and furthermore packed into end product form. The cartridges were used to determine the linearity level of the product with in-house control solutions analysed with an AQT 90 Flex immunoanalyser.

The results of the study do not indicate to have any effect of the weaker binding capacity on the chemical performance level of the end product. Despite the significant difference in the binding capacity values of the two batches studied, the linearity levels of the batches were considered to be similar. On the grounds of the tests performed during the project, lowering the approval limit of the binding capacity in quality control can be considered.

KEYWORDS:

immunodiagnosics, streptavidin, biotin, antibody, quality control

SISÄLTÖ

SANASTO JA LYHENTEET	7
1 JOHDANTO	8
2 BIOTIININ SITOUTUMINEN STREPTAVIDIINIIN	9
2.1 Biotiini	9
2.2 Streptavidiini	9
2.3 SA-biotiini -sitoutuminen	10
2.4 Sovellukset diagnostiikassa	11
3 VASTA-AINEET JA NIIDEN KÄYTTÖ IMMUNOMÄÄRITYKSESSÄ	13
3.1 Vasta-aine	13
3.2 Vasta-aineen biotinylointi	14
3.3 Fluoroimmunomääritys	15
3.4 Lantanoidikelaatit vasta-ainemäärityksissä	17
3.5 AQT 90 Flex -immunoanalysaattori	18
4 DIAGNOSTISEN TESTIN TUOTANTOPROSESSI ITD:SSA	20
4.1 SA-kaivojen valmistus	20
4.2 SA-kaivojen työstäminen lopputuotteeksi	21
4.3 Kaivojen pakkaaminen lopputuotteeksi	22
4.4 SA-kaivojen laadunvalvonta	24
4.5 Lopputuotteen laadunvalvonta	26
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	28
5.1 Kaivojen valmistuksen kriittiset tekijät	28
5.2 Tutkimuksessa käytetyt reagenssit	29
5.3 Vasta-aineen biotinylointi BITC:n avulla	30
5.4 Vasta-aineen leimaus europiumkelaatilla	32
5.5 SA-kaivojen erikoiserän valmistus tutkimuskäyttöön	33
5.6 Analyyttikaivojen valmistus lopputuotteen testejä varten	34
5.7 SA-kaivojen laboratoriotestit	34
5.8 Analyyttikaivojen laboratoriotestit	36
6 TULOKSET	39

6.1 SA-kaivojen laadunvalvontamääritykset	39
6.2 Analyttikaivojen laadunvalvontamääritykset	40
7 JOHTOPÄÄTÖKSET	47
7.1 Inkubointiajan ja kuivauksen vaikutus sitoutumiskapasiteettiin	47
7.2 Analyttilevyjen homogeenisuus	47
7.3 Taustamääritys AQT 90:llä	48
7.4 Lineaarisuus	48
8 LOPPUPÄÄTELMÄT	50
9 LÄHTEET	51

LIITTEET

Liite 1. Lineaarisuustestien tulokset laadunvalvontarajoihin.

KUVAT

Kuva 1. Vasta-aineen geneerinen rakennekuva. (Thermo Fisher Scientific, 2015)	14
Kuva 2. Biotiini-isotiosyanaatin (BITC) valmistus. (2D Sketcher, ITD 2015 ₁)	15
Kuva 3. Lantanoidikelaatin pidempi fluoresenssiaika mahdollistaa mittauksen taustasignaalin vaimennuttua.	16
Kuva 4. AQT-kasetin läpileikkaus. (Radiometer 2015)	23

KUVIOT

Kuvio 1. SA-kouttaus. (ITD 2015 ₄)	21
Kuvio 2. SA-kaivojen tausta- ja homogeenisuustestin geneerinen prosessikaavio.	25
Kuvio 3. Vasta-aineen biotinylointi BITC:llä. (ITD, 2015 _{2,3})	32
Kuvio 4. Esimerkki näytteiden pitoisuuksien ristiinverrannosta.	38
Kuvio 5. Tnl-lineaarisuusmääritysten tulosten suhteellinen poikkeama target-arvoista.	42
Kuvio 6. Tnl:n sisäisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 1B standardisuoraa vasten.	433
Kuvio 7. Tnl:n kaupallisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 1B standardisuoraa vasten.	43
Kuvio 8. Tnl:n sisäisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 2A standardisuoraa vasten.	44

Kuvio 9. Tnl:n kaupallisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 2A standardisuoraa vasten.	44
Kuvio 10. Myo:n sisäisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 1B standardisuoraa vasten.	45
Kuvio 11. Myo:n kaupallisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 1B standardisuoraa vasten.	45
Kuvio 12. Myo:n sisäisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 2A standardisuoraa vasten.	46
Kuvio 13. Myo:n kaupallisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 2A standardisuoraa vasten.	46

TAULUKOT

Taulukko 1. SA-biotiini -sidokselle määritettyjä dissosiaatiovakioita. (Välimaa, 2008)	11
Taulukko 2. AQT-kasetteihin pakattavat kaivot kasettityypeittäin. (ITD 2015 ₆)	23
Taulukko 3. SA-kaivojen erikoiserän valmistuksen parametrit sekä eräjaot koodeineen ja tavoiteaikoineen.	33
Taulukko 4. SA-laadunvalvontatestien kokoomalevy.	34
Taulukko 5. SA-kaivojen laadunvalvontamääritysten tulokset.	39
Taulukko 6. SA-kaivojen laadunvalvontamääritysten uusinta.	40
Taulukko 7. Analyyttikaivojen homogeenisuustestien tulokset hyväksyntärajoineen.	40
Taulukko 8. Tnl-analyyttikaivojen AQT-taustamäärittelyn tulokset hyväksyntärajoineen.	41
Taulukko 9. Myo-analyyttikaivojen AQT-taustamäärittelyn tulokset hyväksyntärajoineen.	41

SANASTO JA LYHENTEET

Affiniteetti	Liittyminen, sitoutuminen; esim. antigeenin ja vasta-aineen sitoutuminen toisiinsa.
Assosiaatio	Yhteenliittyminen, sidoksen muodostuminen
Autokalibrointi	AQT 90:n sisäinen eräkohtainen ohjelmointi
BITC	Biotiini-isosyanaatti; vasta-aineen biotinylointiin käytetty reagenssi
CKMB	Kreatiinikinaasi M (muscle) B (brain); akuutti sydänkohtauksen merkkiaine
CRP	C-reaktiivinen proteiini; tulehduksen merkkiaine diagnostiikassa määrityksessä
Dissosiaatio	Irtoaminen; sidoksen hajoaminen
EFl	Engl. Europium Fluorescence Intensifier
Eu	Europium; fluoresoiva, lantanoideihin lukeutuva alkuaine
Fluorofori	Fluoresoiva yhdiste, joka kykenee absorboimaan valoa ja emittoimaan sen takaisin tunnetulla aallonpituudella
ITD	Innotrac Diagnostics
Kouttaus	Tuotannon prosessi; polystyreenikaivon päällystäminen biologisesti aktiivisella komponentilla (engl. coating)
MC	Multi-CHECK; ITD:ssa valmistettu, useaa analyyttiä sisältävä kontrolliliuos AQT-laitteelle. Multi-CHECKiä valmistetaan kolmea tasoa: level 1 (L1), level 2 (L2) ja level 3 (L3).
Myo	Myoglobiini; sydäninfarktin merkkiaine
SA	Streptavidini
SDS-PAGE	Proteiinien erotusmenetelmä, joka perustuu molekyylien kulkeutumiseen analyttisessä geelissä sähkövarauksen voimalla molekyylipainostaan riippuvan matkan
Stäkkeri	Irtokaivolevyjen teline, johon pinotaan korkeintaan 46 kpl 96-irtokaivolevyä kerrallaan
Tnl	Troponiini I; sydäninfarktin merkkiaine
VK	Välikerros; irtokaivolle annosteltava suojaava liuos

1 JOHDANTO

Streptavidiinin ja biotiinin luontainen kyky muodostaa voimakas, eikovalenttinen sidos on runsaasti hyödynnetty ilmiö fluoroimmunomäärityksissä. Streptavidiinin taipumus sitoutua stabiilisti esimerkiksi polystyreenipinnalle sekä vasta-aineen biotinylointi luovat yhdessä edullisen ja helposti siirreltävän analyysiympäristön fluoroimmunomääritykselle.

Innotrac Diagnosticsilla polystyreenikaivo pinnoitetaan streptavidiinilla SA-kouttausprosessissa. SA-kouttaus mahdollistaa biotinyloidun vasta-aineen immobilisoinnin kaivon pohjalle, joka yhdessä leimatun vasta-aineen kanssa muodostaa lopputuotteen immunodiagnostisen analyysiympäristön.

SA-kaivojen laadunvalvonnassa keskeinen tutkittava tekijä on SA-pinnan biotiinin sitoutumiskapasiteetti, joka mittaa kaivon kykyä sitoa biotinyloitua vastaainetta. Vaihtelut sitoutumiskapasiteetin tasossa eräkohtaisesti ovat aiheuttaneet epävarmuutta tuotteen tasalaatuisuudesta. Sitoutumiskapasiteetin lasketua ajoittain hyväksyntärajan alle avattiin yrityksessä ongelmanselvitys juurisyyn ja todellisen seurauksen selvittämiseksi. Mikäli sitoutumiskapasiteettiarvon ajoittainen laskeminen ei vaikuta lopputuotteen laatuun, voidaan hyväksyntärajaakin mahdollisesti laskea.

Tässä opinnäytetyössä keskitytään kahteen kriittiseen tekijään: SA-liuoksen inkubaatioajan sekä SA-kouttauksen jälkeiseen kaivojen kuivauksen vaikutukseen sitoutumiskapasiteettiin sekä sen johdosta lopputuotteen laatuun. Opinnäytetyössä myös esitellään valmistuksen prosessit pääpiirteittäin, puolivalmisteen pakkaaminen lopputuotteeksi sekä laadunvalvonnan testit. Lopuksi myös pohditaan mahdollisia syitä saaduille tuloksille sekä ongelmanselvityksen seuraavia kohteita.

Opinnäytetyön toimeksiantaja on DHR Finland Innotrac Diagnostics Oy, jonka tuotantotiloissa koko työ suoritettiin.

2 BIOTIININ SITOUTUMINEN STREPTAVIDIINIIN

Biotiinin ja streptavidiinin sitoutuminen toisiinsa on nopea ja voimakas reaktio, jota hyödynnetään laajalti immunodiagnostiikassa. Seuraavissa kappaleissa käsitellään streptavidiinin ja biotiinin sitoutumiseen liittyviä yleisiä tekijöitä ja reaktion luontaisia piirteitä.

2.1 Biotiini

Biotiini, toiselta nimeltään H-vitamiini, on vesiliukoinen ja rikkiptoinen vitamiini. Sitä esiintyy laajalti kaikkialla luonnossa, ja se on todettu välttämättömäksi ravintoaineeksi kaikille eliöille. Biotiini osallistuu elimistössä koentsyyminä karboksyyliyhymien kuljetukseen. (Ensminger & Esminger, 1993)

Biotiini on ensimmäisen kerran havaittu ravitsemuksellisissa tutkimuksissa, joiden päämääränä oli löytää liiallisen munanvalkuaisen nauttimisen johtamaan puutostilaan. Sairaus todettiin biotiinin puutokseksi, joka johtui munanvalkuaisen sisältämän avidiinin taipumuksesta sitoa itseensä biotiinimolekyylejä, poistaen sen elimistön toimintojen käytöstä. Biotiinin puutos ilmenee erilaisina oireina eri eliöillä, mutta yleisimpiin oireisiin lukeutuu vakavat iho-oireet. (Combs, Jr., 2007)

2.2 Streptavidiini

Streptavidiini on tetrameerinen proteiini, joka syntyy erityyväenä proteiinina *Streptomyces avidinii* – bakteerista. Se on suurikokoinen, kooltaan noin 60 000 daltonia. Streptavidiini havaittiin ensimmäisen kerran 1960-luvulla tarkasteltaessa *S. avidinii* fermentoinnin sivutuotteita. Proteiini nimettiin streptavidiiniksi, sillä kananmunan valkuaisesta saatavan avidiinin tavoin sillä on luontainen ominaisuus sitoa itseensä neljä biotiinimolekyyleä. (Välimaa, 2008)

Streptavidiinin täydellinen muoto on noin 180 aminohappoa pitkä sekvenssi, joista 24 ensimmäistä aminohappoa koodaa uloserittyvyyttä. Biotiinin sitovuuden kannalta merkittävä vaihe on kuitenkin translaation jälkeiset muutokset streptavidiinin rakenteeseen, joista vastaavat *S. avidiiniin* proteaasit. Nämä kykenevät muokkaamaan proteiinin täydestä muodosta niin kutsutun ydinstreptavidiinin, jonka biotiinin sitomiskapasiteetti on huomattavasti pitkäketjuista streptavidiinia korkeampi, ja suurin osa kaupallisista streptavidineista onkin translaation jälkeen muunneltua muotoa. Muun muassa pepsiinillä ja kymotrypsinogeenillä voidaan saada samanlainen muutos aikaa streptavidiinin rakenteessa kuin *S. avidiiniin* omalla proteaasilla. (Välimaa, 2008)

Streptavidiinin käyttö diagnostisissa menetelmissä perustuu SA:n kyvylle immobilisoitua kiinteälle pinnalle. SA:n pinnalla olevat hydrofobiset alueet mahdollistavat tarttumisen esimerkiksi polystyreenipinnalle, jolloin saadaan aikaan kiinteä tarttumapinta biotiinijohdannaisille. (Ylikotila *et al.*, 2009)

2.3 SA-biotiini -sitoutuminen

Streptavidiinin ja biotiinin muodostama sidos on yksi voimakkaimmista tunnetuista ei-kovalenttisista sidoksista. Sidoksen hajoaminen vaatii ankarat olosuhteet. Kuitenkin jotkin kemialliset liuokset yhdistettynä kuumennukseen kykenevät irrottamaan SA:n ja biotiinin toisistaan, esimerkiksi 95 % formamidin ja EDTA:n tai natriumasetatin seos 90 °C lämpötilaan kuumennettuna. (Välimaa, 2008)

Sitoutuessaan streptavidiinisiin biotiini sitoutuu SA:n alayksikön sisään, joka on rakenteeltaan kahdeksanjuosteinen β -tynnyriproteiini. Biotiiniligandi tasapainottaa jo ennestään stabiilia streptavidiinia. Avidiini-biotiini – kompleksin sulamispisteeksi on määritetty olevan noin 112 °C, ja se kestää useimpia pintaaktiivisten aineiden liuoksia (mm. Tween 20 ja 40) sekä kuumennusta 95,6 °C lämpötilaan viiden minuutin ajaksi. (Hytönen, 2005)

SA:n ja biotiinin sitoutumisessa keskeinen ja runsaasti tutkittu suure on affiniteetti. Affiniteetti voidaan jakaa kahteen vaiheeseen, joille molemmille voidaan

määrittää oma vakio: assosiaatio - ja dissosiaatiovakio. Tutkimuksissa määritetyt assosiaatio- ja dissosiaatiovakiot vaihtelevat tutkimusolosuhteista sekä lähtöaineiden alkuperästä ja laadusta riippuen. Natiivilla streptavidiinilla on luontaisesti korkeampi affiniteetti kuin muunnellulla SA:lla. Myös biotiinimolekyylin koostumus ja alkuperä, samoin kuin mittaustilasto vaikuttavat saatuun tulokseen. (Välimaa, 2008)

Assosiaatiovakion määrittäminen on jo lähtökohtaisesti haastavaa, sillä SA:n ja biotiinin sitoutumisreaktio on hyvin nopea ja saavuttaa korkean affiniteettiarvon. Assosiaatioaffiniteetiksi on määritetty virtauspysäytyspektrometrisesti $7,5 \cdot 10^7 \text{ M s}^{-1}$. Dissosiaatiovakiolle on määritetty useita arvoja eri tutkimuksissa. Tulokset vaihtelevat $2,4 \cdot 10^{-6}$ ja $4,3 \cdot 10^{-5}$ välillä. Korkein tulos on saatu käyttämällä toisena lähtöaineena natiivia streptavidinia ja teettämällä reaktio + 37 °C lämpötilassa. (Välimaa, 2008)

Taulukko 1. SA-biotiini -sidokselle määritettyjä dissosiaatiovakioita. (Välimaa, 2008)

Dissosiaatiovakio	Määrittämisselmpötila °C	Määrittäjät, vuosi
$2,4 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	+25	Piran ja Riordan, 1990
$5,4 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	+25	Chilkoti ja Stayton, 1995
$4,3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	+37	Klumb <i>et al.</i> , 1998

Muunnellun SA:n ja biotiinin sitoutuminen on laajemmin tutkittu ilmiö kuin natiivin SA:n ja biotiinin sitoutuminen. Käytettyjä tutkimusmenetelmiä ovat muun muassa tasapainodialyysi ja ultrasuodatus, radiometrinen kilpaileva sitoutuvuus ja muokattu ELISA. (Välimaa, 2008)

2.4 Sovellukset diagnostiikassa

SA-biotiini – sitoutuminen on laajalti käytetty ilmiö diagnostiikassa, erityisesti vasta-ainemääritysten teollisessa tuotannossa. Biotiinin kiinnittämistä vasta-aineeseen tai antigeeniin kemiallisen reaktion avulla kutsutaan biotinyloinniksi

(ks. kpl 3.2). Biotinyloinnin avulla vasta-aine tai antigeeni voidaan kiinnittää SA-pinnalle, joka puolestaan voidaan annostella esimerkiksi polystyreenikaivoon tai vastaavaan siirrettävään analyysiympäristöön. (Välimaa, 2008)

Fluoresoivien merkkiaineiden käyttö yhdessä spesifisten vasta-aineiden kanssa on hyvin tyypillinen tapa käyttää SA-biotiini – rakennetta diagnostisessa määrittämisessä. Kompleksin hyöty mainitaan myös muissa diagnostiikan tutkimuksissa, kuten immunohistokemiallisten menetelmien herkkyyden kasvattamisessa. (Dabbs, 2013)

Myös affiniteettikromatografiassa on hyödynnetty (strept)avidini-biotiini – sidosta, vaikka se onkin lujutensa vuoksi vaikea purkaa denaturoimatta avidiinia samalla. Biotinyloitujen proteiinien kvantitatiivista määrittämistä käyttämällä SDS-PAGEa proteiinien erotusmenetelmänä on myös tutkittu sopivana entsyymaattisena vaihtoehtona fluoroforien käytölle. (McMahon, 2008)

3 VASTA-AINEET JA NIIDEN KÄYTTÖ IMMUNOMÄÄRITYKSESSÄ

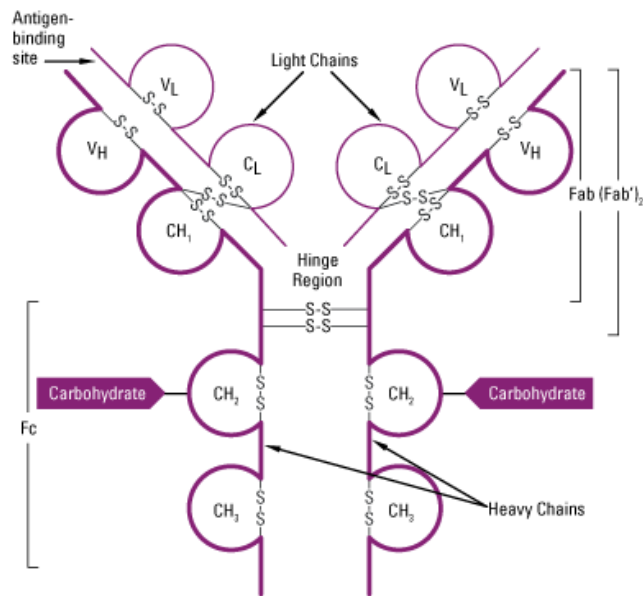
Ihmiskehon tuottamat vasta-aineet ja niiden biotinylointi mahdollistavat vasta-aineen kiinnittämisen streptavidiinipintaan. Seuraavissa kappaleissa esitellään eri vasta-ainetyypit, niiden käsittely vasta-ainemäärittämisä varten sekä niiden rooli immunomäärittämisissä.

3.1 Vasta-aine

Vasta-aine, toiselta nimeltään immunoglobuliini, on immuunijärjestelmän tuottama vaste elimistössä. Vasta-aineen tarkoitus on suojata kehoa elimistöön ulkopuolelta tunkeutuvilta vierasyhdisteiltä, antigeeneiltä. Vasta-aineet tunnistavat spesifisti tietyn tyyppisen antigeenin ja kiinnittyvät näihin poistaakseen ne elimistöstä. (Encyclopaedia Britannica, 2015)

Vasta-aineet koostuvat yhdestä tai useammasta yksiköstä, joihin on jokaiseen kiinnittynyt neljä polypeptidiketjua. Yksiköihin kiinnittyneet ketjut ovat keskenään erilaisia: neljästä ketjusta kaksi on ns. kevyitä ketjuja ja kaksi on raskaita ketjuja. Kussakin kevyessä ketjussa on yksi variaabeli domeeni (kuva 1, VL) ja yksi pysyvä domeeni (kuva 1, CL). Raskas ketju sisältää yhden variaabelin (kuva 1, VH) ja kolme pysyvää domeenia (kuva 1, CH). Ketjut nimetään molekyylipainon mukaan: raskaan ketjun peptidiketjujen yhteispaino on noin kaksinkertainen kevyen ketjun molekyylipainoon, eli noin 50 000 g/mol. Koko immunoglobuliinin yhteispaino on yleensä noin 150 000 g/mol). (Thermo Fisher Scientific, 2015)

Vasta-aineita on viittä eri lajia: IgG, IgM, IgA, IgD ja IgE. Vasta-aineet luokitellaan niiden raskaan ketjun mukaan: γ -ketjut IgG:ssä, α -ketjut IgA:ssa, μ -ketjut IgM:ssä, δ -ketjut IgD:ssä ja ϵ -ketjut IgE-immunoglobuliinissa. Ihmisen seerumissa yleisin vasta-aine on IgG, joka on myös yleisimmin käytetty vasta-aine immunomäärittämisissä. (Thermo Fisher Scientific, 2015)



Kuva 1. Vasta-aineen geneerinen rakennekuva. (Thermo Fisher Scientific, 2015)

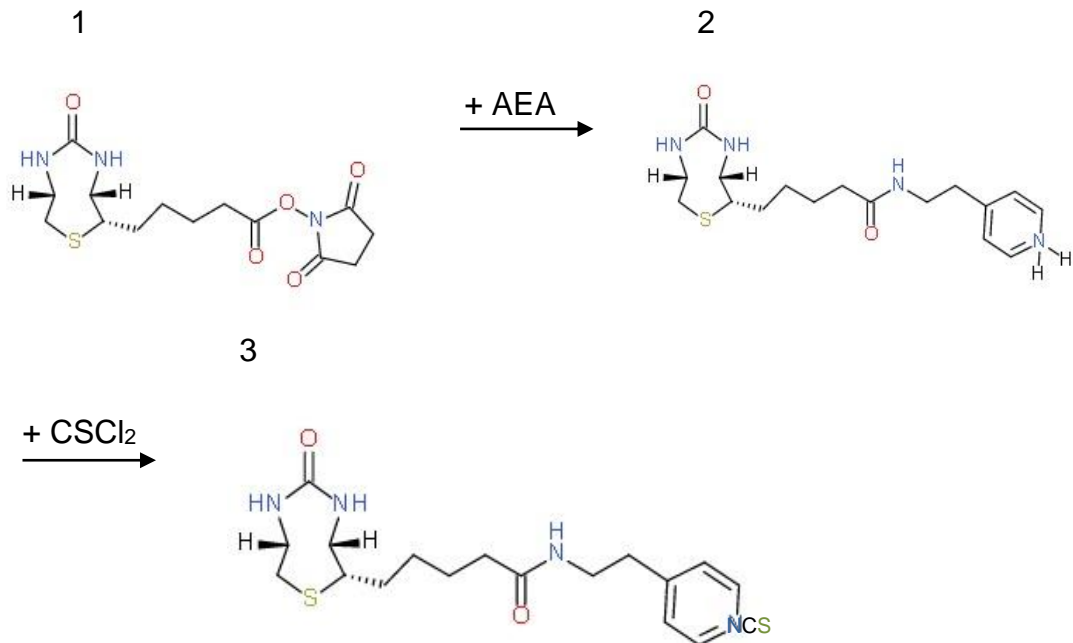
3.2 Vasta-aineen biotinylointi

Biotinyloidut vasta-aineet muodostava ei-kovalenttisen kompleksin streptavidiin kanssa, kuten mainittiin kappaleessa 2.4. Biotinyloinnissa käytetään yleensä biotiinista syntetisoituja reaktiivisia johdannaisia, kuten esimerkiksi biotiini-NHS:ää (ks. seuraava kappale), johon jatkokäsittelyssä lisätään välikappaleeksi jokin orgaaninen happo (spacer arm). Tämä lisää välimatkaa kahden funktionaalisen ryhmän välille ja helpottaa biotiinin kiinnittämistä vasta-aineen pinnalle kemiallisen reaktion avulla. Biotiinijohdannainen reagoi useimmiten immunoglobuliinin primaarisen aminoryhmän kanssa, mutta joissain tapauksissa kiinnittyminen tapahtuu immunoglobuliinin tioli- tai hiilihyaattihännän kanssa. (Wilson, Walker, 2000)

Seuraavissa kappaleissa kuvataan Innotracilla käytetyn biotinylointireagenssin valmistusprosessi sekä itse biotinylointi.

ITD:ssa vasta-aineen biotinyloinnissa käytetään biotiini-isotiosyanaattireagenssia (lyh. BITC), joka valmistetaan synteettisesti orgaani-

sen kemian laboratorioissa biotiini-N-hydroksisukkidinimiesteristä (biotiiini-NHS) (kuva 2, yhdiste 1) ja 2-(4-aminofenyyl)-etyyliamiinista (AEA) (kuva 2, yhdiste 2). Syntyneen biotiini-AEA:n aminoryhmä muutetaan tiofosgeenillä reaktiiviseksi isotiosyanaattiryhmäksi (kuva 2, yhdiste 3). (ITD 2015₁)



Kuva 2. Biotiini-isotiosyanaatin (BITC) valmistus. (2D Sketcher, ITD 2015₁)

3.3 Fluoroimmunomääritys

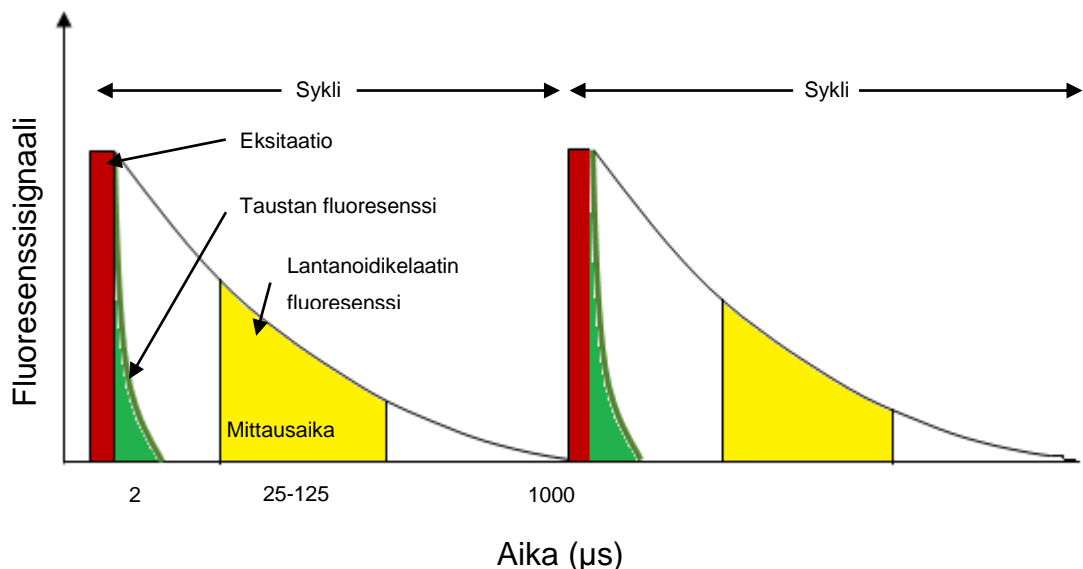
Immunomääritykset ovat analyttisiä menetelmiä, joilla määritetään tietty analytti tai sen pitoisuus näytteestä. Analyttinä voi toimia esimerkiksi antigeeni, joka havaitaan spesifin vasta-aineen avulla. Fluoroimmunomääritys (eng. fluoroimmunoassay, lyh. FIA) perustuu vasta-ainemäärityksen käyttöön yhdessä fluoroforin eli fluoresoivan alkuaineen kanssa. (Darwish, 2006)

Fluoroimmunomääritykset voidaan jakaa kilpaileviin ja ei-kilpaileviin määrityksiin riippuen siitä, lisätäänkö näyte ja leimattu vasta-aine määritysastiaan yhtä aikaa vai ei. Ne voidaan jakaa määritystavaltaan myös homogeenisiin ja heterogeenisiin määrityksiin. Homogeenisessä määrityksessä sitoutumatonta ainetta ei tar-

vitse erottaa sitoutuneesta, mitattavista komplekseista ennen mittausta, toisin kuin heterogeenisessä määrittäyksessä. (Daghestani, 2015)

Fluoroimmunomäärityksen toimintaperiaatteen ytimessä on siis mittaamisen mahdollistava leima-aine, eli fluorofori. Näitä ovat esimerkiksi lantanoidikelaatit, joista kerrotaan seuraavassa kappaleessa. Lantanoideja käytetään usein aikaerotteisen fluoroimmunomäärityksen (engl. time-resolved fluoroimmunoassay, lyh. TR-FIA) yhteydessä. Aikaerotteinen fluoresenssi ja lantanoidikelaatit sopivat hyvin yhteen perusominaisuuksiensa vuoksi: Aikaerotteisessa fluoresenssissa näytteen signaali mitataan taustasignaalin vaimennuttua, jolloin signaali-tausta – suhde luodaan mahdollisimman suureksi ja määrittäyksen herkkyys paranee. Lantanoidileima-aineilla on erityisen pitkä fluoresenssiaika, jolloin signaali-tausta – suhde on optimaalinen (ks. kuva 3). (Ngo, 2012)

Myös Innotracin AQT 90 Flex – immunoanalyyttorin (ks. kpl. 3.5) kemia perustuu aikaerotteiseen fluoresenssiin ja lantanoidikelaattien käyttöön leima-aineena.



Kuva 3. Lantanoidikelaatin pidempi fluoresenssiaika mahdollistaa mittauksen taustasignaalin vaimennuttua.

3.4 Lantanoidikelaatit vasta-ainemäärityksissä

Lantanoidit ovat 15 alkuaineen ryhmä alkuaineiden jaksollisessa järjestelmässä, jotka saavat nimensä ryhmän ensimmäisestä alkuaineesta, lantanumista. Kaikki ryhmän alkuaineet ovat hyvin samanlaisia keskenään, ja niitä on siksi vaikeaa erottaa toisistaan. Nykyteknologiassa tunnetaan useita käyttökohteita lantanoidien erityispiirteille. (Beatty, 2007)

Yksi näistä piirteistä on lantanoidi-ionien fotoluminesenssi, eli kyky absorboida ja emittoida valoa tietyllä aallonpituudella. Erityisesti europiumin, terbiumin, samariumin ja dysbrosiumin kelaattien pitkät Stokesin siirtymä- ja eksitaatioajat tekevät niistä optimaalisia leima-aineita diagnostiseen käyttöön. Biologisia näytteitä mitatessa taustan häiriötekijät ovat erityinen ongelma. Silloin määrityksen herkkyys riippuu pitkälti siitä, kuinka pitkään leima-aine emittoi valoa taustasignaalin hävittyä. (Hemmilä, 1995)

Lantanoidin käyttö leima-aineena edellyttää kuitenkin sen saattamista sopivaan molekulaariseen muotoon. Stabiilius, yhteensopivuus muiden yhdisteiden kanssa, liukoisuus veteen ja valoemissiovoimakkuus ovat kriittisiä tekijöitä leima-aineiden kehityksessä. Lantanoidin sitouttaminen sopivaan kelaattiin mahdollistaa niin lantanoidi-ionin stabiiliuden kuin kovalenttisen sidoksen muodostamisen biologiseen yhdisteeseen, esimerkiksi vasta-aineeseen. Kelaatin tulee kuitenkin olla kaikin tavoin yhteensopiva biologisen vastakappaleen kanssa, eikä se saa häiritä määrityksen herkkyyttä tai vaikuttaa muiden molekyylien liukoisuuteen tai affiniteettiin. (Hemmilä, 1995)

Diagnostisiin määrityksiin on nykyään tarjolla useampia kaupallisia lantanoidikelaatteja, ja yksi näistä on europiumionin sisältävän kelaatin eri muodot. Innotrac Diagnostics valmistaa itse synteiesien avulla kelaatit, joihin Eu-ioni kompleksoidaan.

3.5 AQT 90 Flex -immunoanalysaattori

AQT 90 Flex on diagnostinen laite, jolla voidaan määrittää kvantitatiivisesti ihmisen immuunijärjestelmässä ilmeneviä merkkiaineita. Näytteenä voi käyttää kokoverta tai veriplasmaa. AQT 90 Flex on sekä suhteellisen nopea: laitteella voi suorittaa 30 rinnakkaista määrittystä eri analyyteillä. Laitteen herkkyys on riittävä akuuttien diagnoosien määrittämiseen esimerkiksi sairaalan päivystyksessä. (Radiometer 2015)

Kemiallinen analyysi tapahtuu irtokaivossa, jotka on pakattu 16 kappaleen kasetiksi. Useimpien analyyttien kaseteissa on 16 analyysikuppia. CRP:n ja D-dimeerin pitoisuusmäärittämiseen valmistetuissa kaseteissa on 8 analyysikuppia sekä 8 näytteen laimennoskuppia. Kaivot valmistetaan kappaleissa 4 ja 5 kuvatuissa tuotantoprosesseissa. Laitteeseen voi syöttää kerralla 16 kasettia. Kerralla laitteeseen syötettävien kasettien ei tarvitse sisältää saman analyytin kaivoja. Kasetteja on kolmea tyyppiä: kalibraatio-, testi- ja blank-kasetteja. Blank-kasetit sisältävät tyhjiä kuppeja, ja niitä käytetään neulanpuhdistukseen ja laitteen tarkistussajoihin ennen kalibroinnin tai testin aloitusta. Myyntierälle valmistetaan sekä omia kalibraatio- että testikasetteja. Jokainen valmistettu myyntierä sekä asiakkaan käyttämä laite antaa uniikkia, vaihtelevan tasoista fluoresenssisignaalia, mikä johtaa vaihteleviin pitoisuustuloksiin ilman eräkohtaista kalibrointia. Tätä korjaamaan on ennen erän vapautusta määritetty tunnetuilla standardeilla standardisuora, jota vasten on määritetty kalibraatiokaivojen sisältämän anti-geenin määrä. Pitoisuus ilmoitetaan asiakkaalle kalibraatioviivakoodina, jonka avulla asiakas kalibroi laitteen antaman tulostason oikeaksi. Kun laite on suorittanut hyväksytysti kalibroinnin, voi kyseisen erän analyysikaseteilla suorittaa määrittämiä. Kalibrointi on voimassa kasettierän viimeiseen käyttöpäivään asti, minkä jälkeen sitä ei voi enää käyttää. Laite ei tunnista testikasettien viivakoodia ilman voimassa olevaa kalibrointidataa. (Radiometer 2015)

Jokainen analyysikasetti on analyyttikohtainen. Määritettäviä analyyttejä on useita muun muassa sydäntautien (Troponiini I ja T, myoglobiini), veren hyyty-

misen (D-dimeeri) sekä verenmyrkytyksen (PCT) merkkiaineiden joukosta.
(Radiometer, 2015)

4 DIAGNOSTISEN TESTIN TUOTANTOPROSESSI

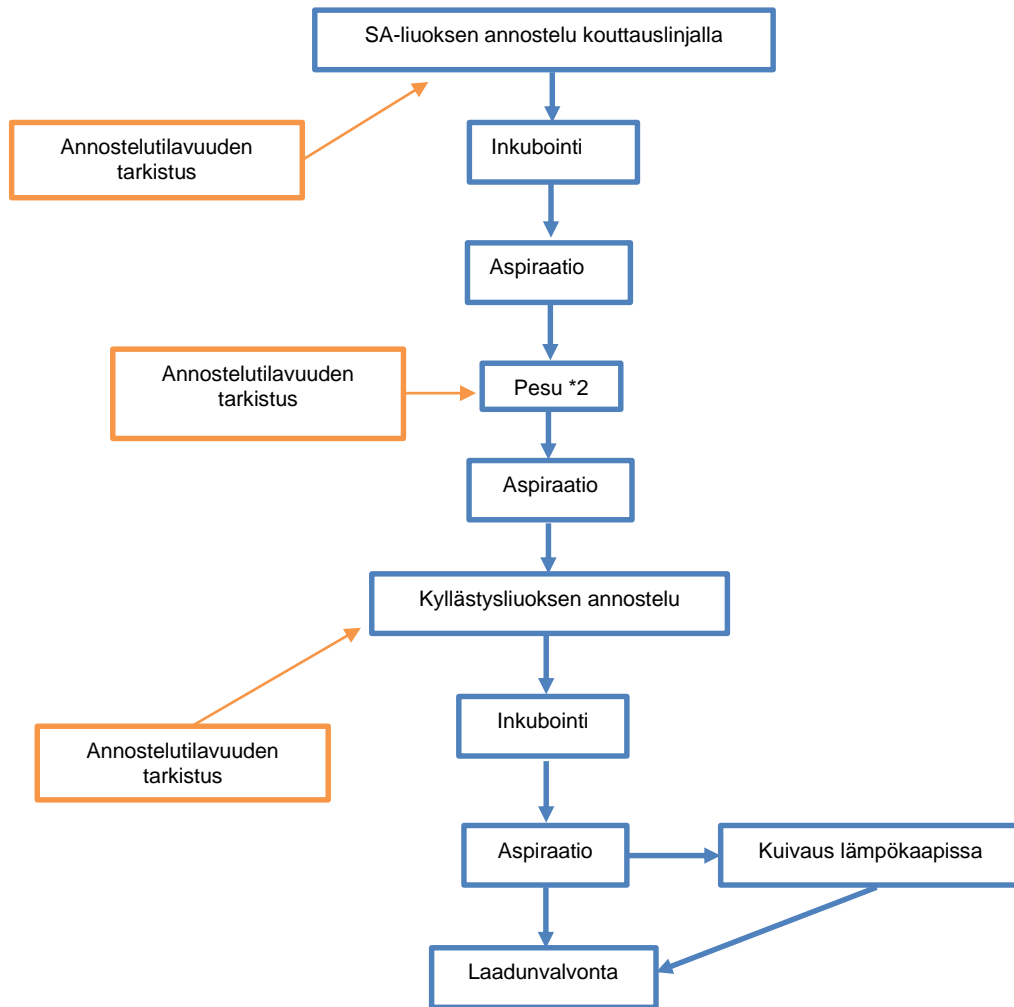
ITD:SSA

Diagnostisen testin tuotanto alkaa streptavidiinilla pinnoitettujen kaivojen valmistuksesta, josta kaivot siirtyvät analyttikouttauksen kautta leima-annosteluun ja loppupakkaukseen. Seuraavissa kappaleissa esitellään tuotantoprosessin vaiheet sekä niihin liittyvät laadunvalvontamääritykset.

4.1 SA-kaivojen valmistus

Irtokaivojen päällystäminen streptavidiiniliuoksella suoritetaan puoliautomaattisella Promector-kouttauslaitteistolla. Laitteisto annostelee ja aspiroi liuokset asetusten mukaisesti ja oikeassa järjestyksessä ohjelmoidusti. Levyjen ja liuosten syötöstä huolehtivat koulutetut operaattorit. 96-irtokaivolevyt syötetään kouttauslinjalle stäkkereissä, joihin levyt myös pinotaan niiden poistuessa kouttauslinjalta. Myös inkuboinnit suoritetaan levyjen ollessa pinottuina stäkkeritelineisiin. Jokaisen annostelun jälkeen Promector aspiroi liuoksen kaivoista ennen seuraavaa vaihetta. Vain pesuliuosta ei inkuboida levyillä, vaan aspirointi suoritetaan heti pesun jälkeen. Annostellun liuoksen määrää kontrolloidaan kouttauksen aikana punnituslevyillä. (ITD 2015₄)

Kouttauksen ensimmäinen vaihe on SA-liuoksen annostelu irtokaivoille. SA-liuosta inkuboidaan stäkkerikaapissa 16–29 tuntia ennen liuoksen aspirointia irtokaivoilta. Tämän jälkeen kaivot pestään pesuliuoksella kahdesti. Pesun jälkeen kaivoihin annostellaan kyllästysliuos, joka vähentää epäspesifistä sitoutumista. Kyllästysliuosta inkuboidaan ohjeen mukainen aika ennen aspirointia. Tämän jälkeen levyt joko kootaan varastoon odottamaan laadunvalvontatestejä, tai levyt kuivataan lämpökaapissa. Tietyt analyytit vaativat levyjen kuivauksen ennen analyttikouttausta. (ITD 2015₄)



Kuvio 1. SA-kouttaus. (ITD 2015₄)

4.2 SA-kaivojen työstäminen lopputuotteeksi

Analyttikouttaus suoritetaan vastaavalla laitteistolla kuin kappaleessa 4.1 kuvattu SA-kouttaus. Prosessin aikana aiemmin valmistettuihin SA-kaivoihin annostellaan biotinyloitu vasta-aine, joka on sekoitettu puskuriliuokseen. SA-kaivoit syötetään Promectoriin 96-levyinä, ja annostelun jälkeen pinotut levyt inkuboidaan ohjeen parametreja noudattaen. Inkuboinnin päätyttyä levyt syötetään jälleen Promectoriin, joka aspiroi kaivoista vasta-aineliuoksen ja pesee ne kahdesti. Seuraavassa vaiheessa kaivoihin annostellaan joko suojaava, analyttikohtainen välikerros tai kalibraatioliuos (kalibraatiolevyt, joista pakataan

kalibraatiokasetteja). Annostelun jälkeen kaivot kuivataan kuivauskaapeissa. (ITD 2015₄)

Analyttikouttauksen jälkeen kaivoihin annostellaan Eu-leimattu vasta-aine. Annostelu suoritetaan puoliautomaattisella Cavro-ruiskuilla varustetulla linjalla. Laite annostelee kuhunkin kaivoon 1 µl europiumleimaliuosta, jonka jälkeen levyt siirretään visuaalisen tarkastuksen kautta loppukuivaukseen. Laadunvalvontaa varten joka erästä kerätään tasaisin välein talteen sekä kokonaiset levyt (ei loppukuivaukseen, vaan kuivatilasäilytykseen) että kokoomalevyt, joissa on 24 kaivoa poimittuna neljältä levytä. (ITD 2015₄)

Loppukuivauksen jälkeen kuivauskaapin parametrit muutetaan sopiviksi säilytyskuivaukselle, ja erästä poimitaan tasaisesti eräkoon vaatimusten mukainen määrä taustatestilevyjä. Taustalevyt pakataan kaseteiksi manuaalisesti siirtämällä kaivot yksi tai kaksi saraketta kerrallaan vakuumpoimijalla kasettiainehioihin. Näillä kaseteilla määritetään erän taustasignaalin taso kuudella AQT-laitteella (kts kpl 3.5: AQT 90 Flex -immunoanalysaattori). (ITD 2015₄)

4.3 Kaivojen pakkaaminen lopputuotteeksi

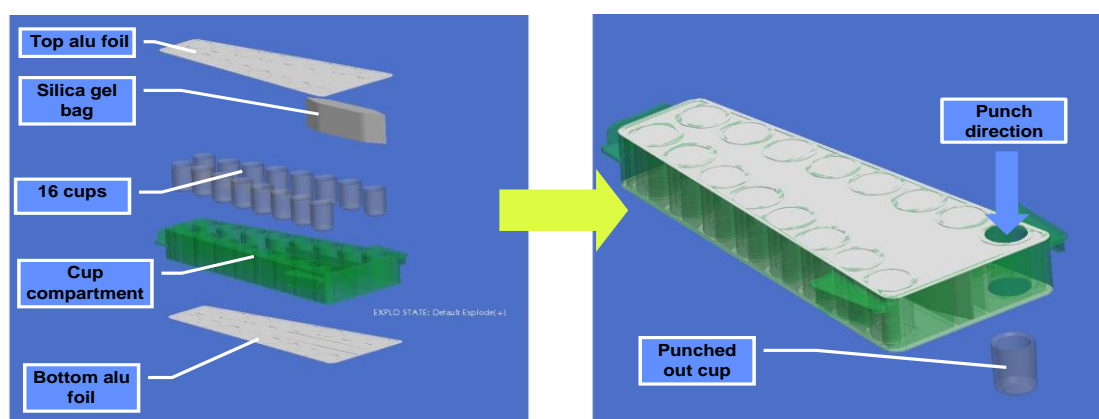
Valmiit kaivot pakataan niin kutsutuksi AQT-kasetiksi, jonka tehtävä on ohjata irtokaivot AQT-laitteeseen. Kasetti myös suojaa kaivoa ulkopuolisilta kontaminaatioilta, kuten pölyltä, sekä kosteudelta. Kasetti koostuu muovisesta kasettiainehiosta, johon mahtuu 16 kaivoa, adsorbenttipussista, sekä kansi- ja pohjalaminaatista. Pohjalaminaatissa on laserointi pinnan heikentämiseksi, jotta AQT-laitte kykenee työntämään kaivon ulos kasetista. AQT-kasettiin voidaan tarkoituksesta riippuen pakata erityyppisiä kaivoja laitteen kalibrointia, immunomäärittämiä tai taustan mittaamista varten (ks. taulukko 2). (ITD 2015₆)

Taulukko 2. AQT-kasetteihin pakattavat kaivot kasettityypeittäin. (ITD 2015₆)

Kasettityyppi	Käyttötarkoitus	Pakattavat kaivot ja kappalemäärä
Kalibraatiokasetti	Erän kalibrointi AQT-laitteelle	8 kalibraatiokaivoa ja 8 taustakaivoa
Testikasetti	Analyyttikohtaiset pitoisuusmääritykset	16 analyyttikaivoa
Testikasetti laimennoskaivoilla	Pitoisuusmääritykset analyteillä, jotka vaativat laimennoksen ennen määrittystä	8 analyyttikaivoa, 8 kouttaamatonta kaivoa
Taustakasetti (blank)	Laitteen toiminnantarkistus ennen työn aloittamista	16 kouttaamatonta kaivoa

AQT-kasetteja on kolmea eri lajia: testi-, kalibraatio- ja blank-kasetti. Testikasetissa on kahdeksan tai 16 kaivoa, joihin on annosteltu analyttikohtainen biotinyloitu vasta-aine sekä Eu-vasta-aine. Kalibraatiokasetissa on 8 taustakaivon lisäksi 8 kalibraatiokaivoa, joissa on leimatun vasta-aineen lisäksi tunnettu pitoisuus analyttikohtaista antigeeniä. Blank-kasetissa on 16 tyhjää kuppia AQT-laitteen tarkistusmäärittystä sekä neulanpuhdistusta varten. (ITD 2015₆)

Myyntierien kalibraatio- ja testikasetit pakataan linjalla, taustamäärittelyn kasetit pakataan manuaalipakkaussolussa. Kuvassa 4 nähdään AQT-kasetin rakenne läpileikkauksena. (ITD 2015₆)



Kuva 4. AQT-kasetin läpileikkaus. (Radiometer 2015)

Pakattaessa kasetteja manuaalisesti kaivot siirretään levyltä pohjalaminoituun kasettiahioon vakuuimismisellä kaivotarttujalla. Tarttujassa on käyttötarkoituksen mukaan joko 8- tai 16-päinen kampa. 8-päisellä kammalla siirretään kaivoja levytä yksi sarake kerrallaan. 16-päinen kampa poimii levytä kaksi saraketta kerrallaan, esimerkiksi sarakkeet 1 ja 3 yhtäaikaan. (ITD 2015₇)

Pohjalaminoidun kasettiahion päälle asetetaan kasettiasetti, jonka ylle kaivot tuodaan kaivotarttujalla. Asetti ohjaa kaivot tarttujasta kasettiin, kun vakuuimirtarttujan läpivirtausaukko vapautetaan. Silloin muodostunut vakuuimipurkautuu ja kaivot putoavat kasettiin. Lopuksi kasetit kansilaminoidaan ja varustetaan analyttikohtaisilla viivakoodietiketeillä. (ITD 2015₇)

4.4 SA-kaivojen laadunvalvonta

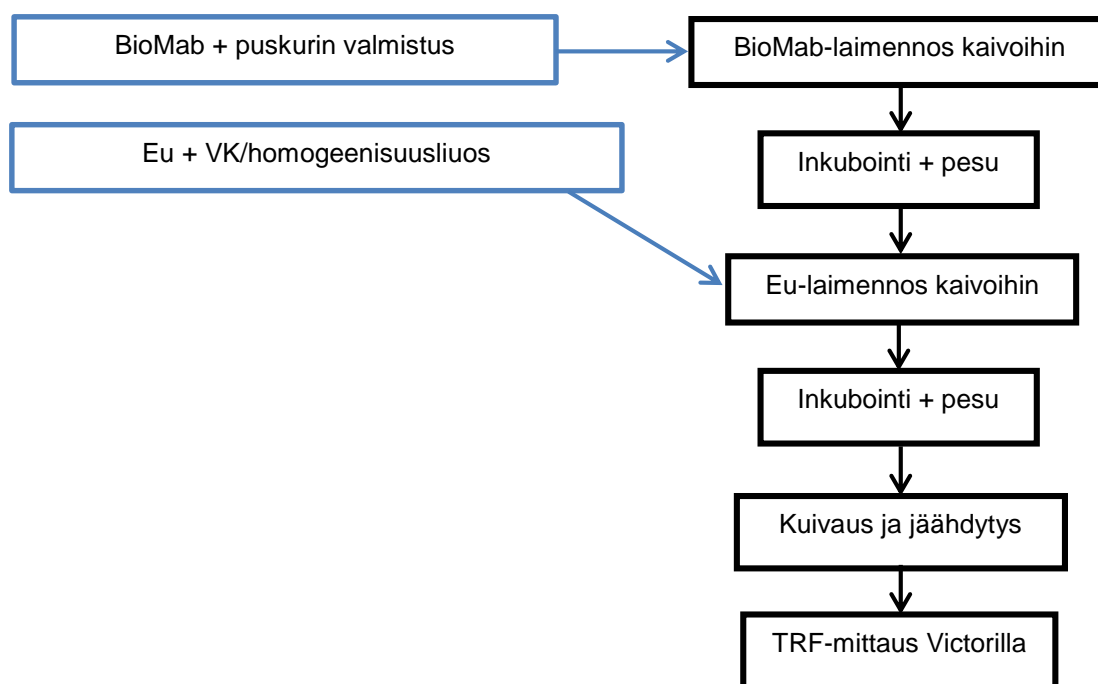
SA-kaivojen antaman signaalin tasalaatuisuus määritetään homogeenisuustestillä. Määrityksessä käytettävä analytti on aina ohjeen mukaisessa suorituksessa CKMB.

Testi suoritetaan SA-irtokaivolevyillä, jotka on poimittu erästä tasaisin välein. Testiä varten valmistetaan puskuriliuokseen biotinyloidun vasta-aineen laimennos sekä välikerrosliuoksesta, homogeenisuusliuoksesta ja Eu-leimatusta vasta-aineesta laimennos. Irtokaivoihin pipetoidaan ensin biotinyloidun vasta-aineen laimennos. Kaivoja inkuboidaan sekoituksessa, jotta biotinyloitu vasta-aine kiinnittyy streptavidiniin. Inkuboinnin jälkeen kaivot pestään levypesurilla ja niihin pipetoidaan Eu-vasta-aine -laimennos. Kaivot inkuboidaan sekoituksessa vasta-aineen kiinnittymisen maksimoinniksi Tämän jälkeen kaivot pestään, kuivataan kuumalla ilmalla ja annetaan jäähtyä ennen mittaamista. Kaivojen aikaerotteinen fluoresenssisignaali määritetään monileimalukija Victorilla, ja levyjen raakatulosten suhteellinen variaatio lasketaan Excel-pohjalla.

SA-kaivojen taustasignaali määritetään testillä, jonka analyttinä on ohjeen mukaisessa määrityksessä Tnl. Testiä varten valmistetaan biotinyloidun vasta-aineen laimennos puskuriliuokseen sekä Eu-leimatun vasta-aineen laimennos analyttille sopivaan välikerrosliuokseen, kuten CKMB-homogeenisuudessa –

poikkeavana tekijänä analyytti TnI. Kaivoja inkuboidaan sekoituksessa SA-biotiini – sitoutumisen optimoinniksi. Eu-leimattu vasta-aine laimennetaan vasta hieman ennen ensimmäisen levyn inkuboinnin päättymistä huonon säilyvyyden vuoksi. Inkuboinnin jälkeen kaivoihin pipetoidaan Eu-vasta-aine -laimennos, jota inkuboidaan sekoituksessa leimatun vasta-aineen tarttumisen maksimoimiseksi. Inkuboidut kaivot pestään, kuivataan ja jäähdytetään. Kaivojen aikaerotteinen fluoresenssi mitataan Victorilla, ja tulokset käsitellään kuten CKMB-homogeenisuuden tulokset.

Alla kuvio 2 esittää SA-kaivojen tausta- ja homogeenisuustestin kulun prosessikaaviona.



Kuvio 2. SA-kaivojen tausta- ja homogeenisuustestin geneerinen prosessikaavio.

SA-irtokaivojen biotiininsitomiskapasiteetin määrittäminen suoritetaan kappaleessa 5.2 kuvatun Bio-Tekes-Eu:n avulla. Reagenssista valmistetaan määrittäystä varten yhdeksänportainen laimennossarja, jota pipetoidaan levypesurilla pestyille kaivoille. Jokaista laimennosta pipetoidaan kuuteen rinnakkaiseen kaivoon, ja kaivot inkuboidaan sekoituksessa Bio-Tekes-Eu:n sitoutumisen maksimoimiseksi.

Inkuboinnin päätyttyä kaivot pestään sitoutumattoman reagenssin poistamiseksi. Pestyihin kaivoihin annostellaan EFI-kehitysliuosta DELFIA-levyannostelijalla. Kehitysliuosta inkuboidaan sekoittaen, jotta sitoutunut europium irtoaa sitoutuneesta Bio-Tekes-Eu:sta. Inkuboinnin jälkeen levyt mitataan Victorilla kaivojen sisältämän EFI-liuoksen aikaerotteisen fluoresenssin määrittämiseksi. (ITD 2015₅)

4.5 Lopputuotteen laadunvalvonta

Lopputuotteen homogeenisuuden varmistamiseksi myyntierästä poimitaan leima-annostelun aikana tasaisin välein kokonaisia laadunvalvontalevyjä sekä yksittäisiä kaivoja tyhjille kokoomakehyksille. Testattaville levyille ei ole tarvetta annostella biotinyloitua eikä leimattua vasta-ainetta, kuten SA-kaivojen laadunvalvontatesteissä, sillä analyttikouttauksen ja leima-annostelun jälkeen kaivojen tulisi jo sisältää molempia komponentteja.

Määrittystä varten valmistetaan analyttikohtaista antigeeniä sisältävän homogeenisuusliuoksen laimennos, jota pipetoidaan jokaiseen kaivoon. Kaivoja inkuboidaan sekoituksessa antigeenin tarttumisen takaamiseksi. Inkuboidut kaivot pestään, kuivataan ja jäähdytetään. Kaivojen aikaerotteisen fluoresenssin signaali mitataan Victorilla, ja tulosten suhteellinen variaatio lasketaan Excel-tulospohjalla. (ITD 2015₅)

Lopputuotteen taustasignaalin määrittämiseksi myyntierästä otetaan loppukuivauksen päätyttyä taustatestilevyt tasaisesti läpi erän. Levyt pakataan manuaalisesti AQT-kaseteiksi ja varustetaan analyttikohtaisella taustatestiviivakoodilla, jotka on valmistettu vain talon sisäiseen käyttöön. Viivakoodit luetaan tulospohjaan, johon tulokset siirretään määrittämisen aikana ja sen jälkeen.

Ennen määrittystä on varmistettava, että kyseinen eränumero on ns. autokalibroitu käytettäviin AQT-laitteisiin. Autokalibrointi on laitteen itsensä suorittama sisäinen ohjelmointi, jonka avulla se tunnistaa käytettävien kasettien eränumeron ja kykenee lukemaan kasettien viivakoodit. Kasetit syötetään autokalibroituihin AQT-laitteisiin ja laitteilla ajetaan puskuriliuosta, kunnes laitteet ovat

käyttäneet kaikki taustakaseteissa olevat kaivot. Tulokset siirtyvät tiedostokansioihin, joista tuloksiin päästään käsiksi tietokoneella. Tulokset käsitellään ja siirretään Excel-tulosohjelmalla. (ITD 2015₉)

Analyttikaivojen antaman pitoisuuden luotettavuus määritellään tässä työssä AQT 90:llä suoritettavan lineaarisuustestin avulla. Määritys mukailee myyntierillä tehtävää viivakoodausta, jolloin erän antama signaalitaso määritetään tunnetuilla pitoisuuksilla 3-6 laitteella. Informaatio siirretään myyntierän mukana toimittavalle kalibraatioviivakoodille.

Lineaarisuusmäärityksen aikana ajetaan kolmella AQT-laitteella standardisuora sekä myyntierän ohjeen määräämät potilaskontrollit ja kaupalliset kontrollit nousuvassa pitoisuusjärjestyksessä. Tulokset käsitellään PisaCalc – ohjelmalla, joka määrittää kontrollien pitoisuudet standardisuoraa vasten. Tuloksia verrataan kontrolleille määritettyjen target-pitoisuuksien sekä tulosten suhteelliselle variaatiolle määritettyihin raja-arvoihin. (ITD 2015₁₀)

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Seuraavissa kappaleissa käsitellään tuotantoprosessin kriittiset tekijät, laadunvalvontaan liittyvät menetelmät sekä opinnäytetyön testeissä käytetyt materiaalit.

5.1 Kaivojen valmistuksen kriittiset tekijät

SA-kouttauksen ja analyttikouttauksen jokaisen vaiheen onnistuminen on tärkeää lopputuotteen korkean laadun takaamiseksi. Opinnäytetyössä tutkittaviksi kriittisiksi tekijöiksi on valittu SA-liuoksen sekoitus- ja inkubointiaika sekä kaivojen kuivaaminen SA-kouttauksen jälkeen.

SA:n sekoitus puskuriliuokseen on valmistusprosessin ensimmäinen tarkkailtava vaihe. Sekoitukselle on määritelty vähimmäiskesto, mutta pidentyneen sekoitusajan vaikutusta ei ole tarkasti tutkittu. Sekoitusaikoja vertailtiin taulukoimalla vanhojen erien ohjeisiin dokumentoituja aikoja muiden olosuhteiden sekä laadunvalvontatulosten kanssa.

Tärkeäksi kriittiseksi tekijäksi tutkimuksessa on nostettu SA-liuoksen inkubointiaika. Inkubointiajan ala- ja ylärajalla on eroa 13 tuntia, ja keston vaihtelulla saattaa olla vaikutusta korkeamman sitoutumiskapasiteetin syntyyn. Vaikutusta selvitettiin opinnäytetyön kokeellisen osan avulla valmistamalla SA-kaivoja, joilla on joko mahdollisimman lyhyt tai pitkä inkubointiaika ohjeen hyväksyntärajojen puitteissa. Inkubointiajan vaikutuksen suuruus sitoutumiskapasiteettiin osoitettiin laadunvalvontamäärittäyksillä.

Tutkintaa kaipaava olosuhde on myös kaivojen kuivaaminen. Useimmille analyyteille ei ole koettu olevan tarvetta kuivatuille SA-kaivoille, mutta sillä arvellaan olevan joka tapauksessa vaikutusta sitoutumiskapasiteettiin. Opinnäytetyön aikana verrattiin myös kuivattujen ja kuivaamattomien SA-kaivojen sitoutumiskapasiteettia kuivaamalla osa sekä lyhyellä että pitkällä inkubointiajalla valmistetuista SA-kaivoista.

5.2 Tutkimuksessa käytetyt reagenssit

Useat laadunvalvontatesteissä käytetyt reagenssit ja liuokset valmistetaan itse kaupallisista sekä alusta asti itse valmistetuista komponenteista.

Bio-Tekes-Eu on reagenssi, jota käytetään SA-kaivojen biotiinin sitomiskapasiteetin määrittämiseen aikaerotteisen fluoresenssin avulla. Se on Innotrac Diagnosticsin itse valmistama, biotinyloitu europiumkelaatti. Se on suhteellisen pienikokoinen molekyyli, jonka moolimassa on noin 1700 g/mol. Yhdiste valmistetaan orgaanisen synteessin kautta α -gal-9-D-amino -kelaatista sekä biotiini-isosyanaatista (BITC). Reaktioympäristönä toimii pyridiini-trietyyliemiini-vesi -seos. Yhdiste puhdistetaan HPLC:llä, liuotetaan asetonitriliin ja saostetaan natriumkloridilla. Lopputuotteesta valmistetaan kantaliuos liuottamalla Bio-Tekes-Eu puhdistettuun veteen. (ITD 2015₈)

Vasta-aineet biotinyloidaan yrityksessä itse kappaleen kuvauksen 5.3 mukaan. Myös Eu-kelaatit valmistetaan talon orgaanisessa laboratoriossa. Biotiini sen sijaan on kaupallinen tuote, josta biotiini-isotiosyanaatti BITC valmistetaan.

Määrittämissä käytetty homogeenisuusliuos on analyttikohtaisen antigeenin ja joko puskuriliuoksen tai seerumin seos, joka myös valmistetaan itse tuotannon määrityksiä varten. Homogeenisuusliuoksen tehtävä on tuoda tunnettu määrä vasta-aineeseen sitoutuvaa antigeeniä mukaan määrityksiin.

Valmistetuista SA-kaivoista osa lähetettiin Tnl:n ja osa Myo:n analyttikouttaukseen ja leima-annosteluun. Tnl valittiin toiseksi analyttiksi, sillä se on erityisen herkkä analytti ja reagoi helposti poikkeaviin olosuhteisiin tuotannon prosessissa ja laadunvarmistuksessa. Silloin sitoutumiskapasiteetin muutosten aiheuttama hajonta on helposti havaittavissa tuloksista. Toiseksi analyttiksi valittiin Myo, sillä se vaatii SA-kaivoilta korkeaa sitoutumiskapasiteettia. Sitoutumiskapasiteetin muutosten vaikutus näkyy siis selkeinä pitoisuuseroina Myo-erien testituloksia verrattaessa.

Lineaarisuusmäärittämissä käytetyt standardit ja kontrollit valmistetaan useimmille analyteille itse ITD:ssa. Sekä Tnl:n että Myo:n testeissä käytetyt kontrollit

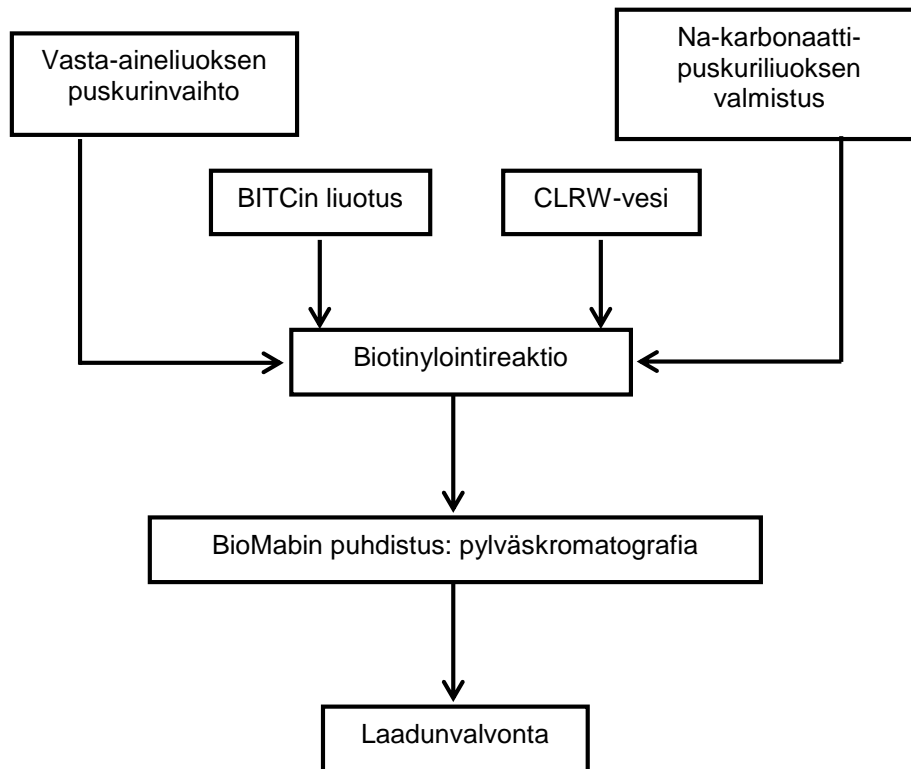
(Low, Med, High) valmistetaan laimentamalla potilaspoolia tai antigeeniä puskuriliuoksella tai seerumilla tavoitepitoisuuteen. Multi-CHECK-kontrollit valmistetaan kaupallisista reagensseista laimentamalla tai sekoittamalla analyyttejä sisältäviä liuoksia sopivassa suhteessa target-pitoisuuden aikaansaamiseksi.

5.3 Vasta-aineen biotinylointi BITC:n avulla

Prosessia, jonka aikana vasta-aineeseen kiinnitetään kemiallisen reaktion avulla biotiinijohdannainen kuten BITC, kutsutaan biotinyloinniksi. Biotinylointireagenssi BITC liuotetaan ensin molekyyliseulalla kuivattuun dimetyyliformamidiin ennen reaktorin rakentamista. Mikäli liuotin ei ole kuivattua, saattaa reaktiivinen isotiosyanaattiryhmä hajota, jolloin BITC:istä tulee inaktiivista. Vastaaineliuoksen puskuriliuos vaihdetaan geelisuodatuksella 0,9 % NaCl:n vesiliuokseen. Vasta-aineet ostetaan valmiiksi liuotettuina, ja ennen biotinylointireaktiota tämä puskuriliuos vaihdetaan reaktiolle sopivaan 0,9 % NaCl-liuokseen. Samalla poistetaan kaupallisen liuoksen sisältämä, reaktiota haittaava säilöntäaine natriumatsidi. Vasta-aineen pitoisuus määritetään UV-spektrometrisesti aallonpituudella 280 nm. Vasta-aineen pitoisuuden avulla lasketaan se ainemäärä, jonka perusteella taas lasketaan biotinylointireaktiossa tarvittava BITC-määrä. Biotinylointireaktioon lisätään BITC:iä aina ylimäärin. Käyttämällä BITC:iä ylimäärin reaktiossa voidaan varmistaa, että vasta-aineen pinnalle saadaan kiinnitettyä riittävän monta biotiinimolekyyliä (saavutetaan riittävä biotinylointiaste). Biotinylointireaktio tapahtuu astiassa, johon lisätään vastaaine, BITC, puskuria sekä puhdistettua vettä. Puskuriliuos ylläpitää reaktiolle suotuisia olosuhteita. (ITD 2015_{2,3})

Biotinylointireaktion jälkeen biotinyloitunut vasta-aine puhdistetaan erottamalla se reagoimattomasta biotiinista geelisuodatuspylväskromatografian avulla. Biotinyloitu vasta-aine eluoidaan ulos pylvästä TSA-puskurin avulla (pylväs tasapainotetaan ennen puhdistuksen aloittamista ajamalla siitä läpi TSA-puskuria). Puhdistusajoa seurataan UV-detektorin avulla, joka mittaa liuoksen absorbanssia aallonpituudella 280 nm. Laitteisto piirtää puhdistuskromato-

grammin mitatun absorbanssin perusteella mitatun ajan funktiona. Pylväästä ulos eluoitunut liuos kerätään tietyn suuruisiin fraktioihin. Puhdistuksen jälkeen biotinyloitua vasta-ainetta sisältävät fraktiot yhdistetään puhdistuskromatogrammin perusteella. Biotinyloidun vasta-aineen pitoisuus määritetään UV-spektrofotometrillä mittaamalla liuoksen absorbanssi 280 nm. Lopuksi biotinyloidun vasta-aineen toimivuus käyttötarkoituksessaan varmistetaan sitoutumiskapasiteetti- ja immunomäärityksellä. Kuviossa 3 sivulla 32 esitetään vasta-aineen biotinylointi BITC:llä kaaviomuodossa. (ITD 2015_{2,3})



Kuvio 3. Vasta-aineen biotinylointi BITC:llä. (ITD, 2015_{2,3})

5.4 Vasta-aineen leimaus europiumkelaatilla

Vasta-aineen leimausprosessi on kokonaisuutena samankaltainen kuin vasta-aineen biotinylointiprosessi (kuvattu kappaleessa 5.3). Leimauksessa reaktioon lisätään BITC:in sijaan puskuriliuokseen liuotettu europiumkelaatti.

Ennen reaktion kokoamista vasta-aineen puskuriliuos vaihdetaan ja sen vasta-ainepitoisuus määritetään. Vasta-aineen ainemäärän perusteella lasketaan reaktioon lisättävän kelaatin määrä. Kelaattia lisätään reaktioon ylimäärin, jotta reaktiossa saavutetaan riittävän korkea leima-aste. (ITD 2015₈)

Reaktion päätyttyä leimattu vasta-aine erotetaan reagoimattomasta kelaatista pylväskromatografisesti TSA-puskurin avulla. Kromatografialaitteisto piirtää käyrän pylvästä poistuvasta eluentista mitatun absorbanssin perusteella. Leimattun vasta-aineen piikki kromatogrammissa osoittaa, koska leimattu vasta-aine on tullut ulos pylvästä. Leimattua vasta-ainetta sisältävät fraktiot yhdistetään kromatogrammin perusteella puuliksi. Puulin Eu-pitoisuus määritetään 100 nM Eu-standardista valmistettua laimennossarjaa vasten. Leimatun vasta-aineen

pitoisuus määritetään UV-spektrofotometrillä mittaamalla liuoksen absorbanssi aallonpituudella 280 nm. Leimatun vasta-aineen toimivuus määritetään leima-aste- ja immunomäärityksellä. (ITD 2015₈)

5.5 SA-kaivojen erikoiserän valmistus tutkimuskäyttöön

Opinnäytetyössä käytettävät SA-kaivot valmistettiin myyntierän ohella erikoistilauksena. Kouttauserän valmistuksessa viimeinen stäkkeri otettiin hyväksyntärajojen täytyessä mahdollisimman nopeasti SA-inkuboinnista (noin 16 tuntia) ja ensimmäistä stäkkeriä inkuboitii mahdollisimman pitkään (noin 29 tuntia). Kolmas stäkkeri otettiin referenssieräksi tavanomaisen SA-inkuboinnin läpikäyneiden joukosta. Stäkkerit jaettiin puoliksi muodostaen kuusi erää. Erät nimettiin ja merkittiin levykohtaisesti koodeilla 1A-3B. Kouttauksen päätyttyä kustakin stäkkeristä puolet (1A, 2A ja 3A) kuivattiin kuivauskaapissa ohjeen määräämä aika. Taulukossa 3 on yhteenveto erikoiserän parametreista. Valmiit kaivot säilytettiin kuivatilassa tiiviissä muovilaatikoissa laadunvalvontatestejä ja jatkoprosessointia varten.

Taulukko 3. SA-kaivojen erikoiserän valmistuksen parametrit sekä eräjaot koodeineen ja tavoiteaikoineen.

	SA-inkubointi	Stäkkerien jako kahteen	Kuivaus
Stäkkeri-nro	Kulunut aika (hh:mm) Tavoiteaika 16–29 h	Erä-koodi (1-3 + A = kuivataan tai B = ei kuivata)	Kuivaukseen kulunut aika (h:mm) Tavoiteaika 3 h
85	15:28 (lyhyt)	1A	3:07
		1B	-
1	29:36 (pitkä)	2A	3:07
		2B	-
42	24:00 (normaali)	3A	3:07
		3B	-

5.6 Analyyttikaivojen valmistus lopputuotteen testejä varten

Analyyttikaivojen tuotantoprosessiin valittiin SA-laadunvalvontatestien perusteella erät 1A-2B sekä referenssiksi vanhat myyntierät, joille oli määritetty matala sitoutumiskapasiteetti. Eristä laitettiin levyjä kahden eri analyytin, TnI:n ja Myo:n, tuotantoprosessiin yhteensä 46 levyä/prosessi. Jokaisesta erästä poimittiin kaksi laadunvalvontalevyä leima-annostelun jälkeen homogeenisuustestejä varten, ja loput pakattiin manuaalisesti kaseteiksi loppukuivauksen jälkeen kappaleen 4.3 kuvauksen mukaisesti.

5.7 SA-kaivojen laboratoriotestit

SA-kaivoille tehtiin homogeenisuustesti kaivoille kappaleen 4.4 kuvauksen mukaan. Levyt testattiin kahdella tavalla: yksi levy määritettiin kokonaisuena jokaisesta erästä, ja muut levyt jaettiin kokoomiksi niin, että kussakin levyssä oli kaksi saraketta jokaisesta erästä (ks. taulukko 4 alla). Yhteensä testattavia levyjä oli 12 kpl.

Taulukko 4. SA-laadunvalvontatestien kokoomalevy.

	1)				2)				3)			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1A		1B		2A		2B		3A		3B	
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Biotinyloidusta CKMB-vasta-aineesta (CKMB-bioMab) sekä CKMB-homogeenisuusliuoksesta valmistettiin laimennokset. CKMB-bioMab – laimennosta pipetoitiin 50 µl kaikkiin kaivoihin, joita sitten inkuboitiin 30 min sekoituksessa huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen kaivot pestiin levypesurilla. Leimatusta CKMB-vasta-aineesta (CKMB-Eu) valmistettiin laimennos välikerrosliuokseen ennen ensimmäisen levyn inkuboinnin päättymistä, ja pipetoitiin 30 µl

leimalaimennosta kaivoihin. Kaivoja inkuboitiin uudelleen lämpöinkubaattorissa 20 min (36 °C, 900 rpm ravistelu). Inkuboidut kaivot pestiin ja kuivattiin kuumailmakuivaimella. Kaivojen jäähtyttyä mitattiin aikaerotteinen fluoresenssi Victorilla.

SA-kaivoille suoritettiin taustamääritys kappaleen 4.4 kuvauksen mukaan. Taustatestiin otettiin sama määrä levyjä ja koottiin kokoomalevyt samalla tavalla kuin homogeenisuustestiin (ks. edellinen kappale ja taulukko 4).

Biotinyloidusta Tnl:stä (Tnl-bioMab) valmistettiin laimennos BioMab-puskuriliuokseen. Pipetoitiin kaivoihin 50 µl Tnl-bioMab -laimennosta ja inkuboitiin 30 min sekoituksessa huoneenlämmössä. Leimatun Tnl:n (Tnl-Eu) laimennos valmistettiin välikerrosliuokseen ennen ensimmäisen levyn inkuboinnin päättymistä, ja pipetoitiin 30 µl leimalaimennosta kaivoihin. Kaivoja inkuboitiin lämpöinkubaattorissa 20 min (36 °C, 900 rpm ravistelu). Inkuboinnin jälkeen kaivot pestiin levypesurilla ja kuumailmakuivaimella. Kaivojen jäähtyttyä mitattiin aikaerotteinen fluoresenssi Victorilla.

SA-kaivoille tehtiin sitoutumiskapasiteettitesti kappaleen 4.4 kuvauksen mukaan. SA-levyjä otettiin testiin kaksi kappaletta jokaisesta erästä, yhteensä 12 kpl.

Bio-Tekes-Eu:n kantaliuoksesta valmistettiin työlaimennos BioMab -puskuriliuokseen. Työlaimennos toimi kantaliuoksena yhdeksänportaiselle laimennossarjalle, jonka sisältämä Bio-Tekes-Eu -määrä oli 0-8 pmol. Kutakin laimennosta pipetoitiin kaivoihin 150 µl kuuteen rinnakkaiseen kaivoon. Kaivoja inkuboitiin 1 h ravistelussa huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen kaivot pestiin ja niihin annosteltiin EFI (Europium Fluorescence Intensifier)-liuosta DELFIA-levyannostelijalla 200 µl/kaivo. EFIä inkuboitiin 30 min ravistelussa huoneenlämmössä ennen mittausta Victorilla.

5.8 Analyyttikaivojen laboratoriotestit

Homogeenisuustestit suoritettiin kappaleen 4.5 kuvauksen mukaan. Analyyttikaivoja valmistettiin kahdella eri analytyillä, Tnl ja Myo, joiden testiparametrit poikkeavat toisistaan.

Tnl:

Tnl:n homogeenisuusliuoksesta valmistettiin käyttölaimennos BioMab-puskuriliuokseen. Homogeenisuuslaimennosta pipetoitiin haravapipetillä 30 µl kaikkiin kaivoihin. Kaivoja inkuboitii 45 min lämpökubaattorissa (36 °C, 900 rpm ravistelu). Inkuboidut kaivot pestiin levypesurilla ja kuivattiin kuumailma-kuivaimella 4 min. Kaivojen jäähtyttyä mitattiin aikaerotteinen fluoresenssi Victorilla.

Myo:

Myon testi suoritettiin kuten Tnl:n, kuitenkin Myo:n homogeenisuusliuoksesta valmistetulla käyttölaimennoksella. Laimennoksen pipetoinnin jälkeen kaivoja inkuboitii 20 min samoissa olosuhteissa. Myös jatkotoimenpiteet olivat samat kuin Tnl:n homogeenisuustestissä.

Analyyttikaivot pakattiin kaseteiksi kappaleen 4.3 kuvauksen mukaisesti taustaja lineaarisuusmäärittystä varten. Tnl-kasetit varustettiin Tnl:n viivakoodilla ja Myo-kasetit Myo:n viivakoodeilla. Kunkin analyytin viivakoodit ovat taustatesti-viivakoodeja, jotka autokalibroidaan käytettäville AQT-laitteille. Testejä ei siis suoriteta tietyn myyntierän kalibraatiota vastaan.

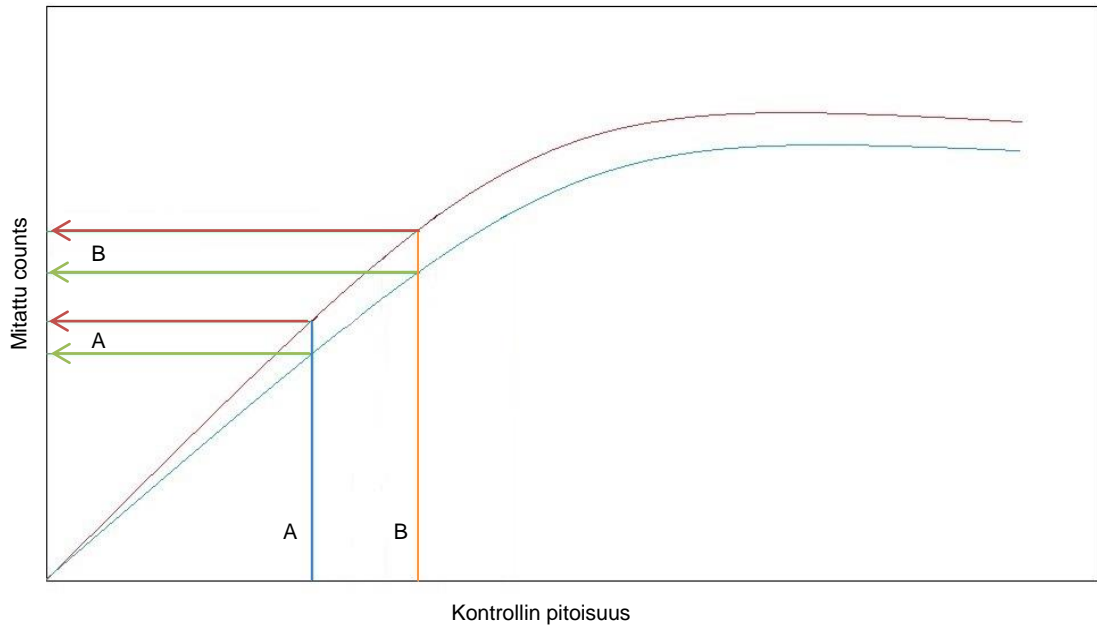
Kasetit syötettiin laitteisiin (yksi levy/laitte) ja niillä ajettiin AS-laimennosta, kunnes kaikki kaivot oli kulutettu. Tulokset siirrettiin taustatestin Excel-tulospohjaan. Lineaarisuusmäärittys suoritettiin kappaleen 4.5 kuvauksen mukaan. Tnl:lle ja Myo:lle on valmistettu omat työstandardit sekä in-house-kontrollit (ks. kpl. 5.2), jotka ajettiin AQT-laitteella kasvavassa pitoisuusjärjestyksessä. Tulokset siirrettiin Excel-tulospohjaan, josta nähdään testin onnistuneisuus standardien ja kontrollien ajon sisäisestä variaatiosta.

Molempien erien pitoisuustulokset syötettiin PisaCalc-laskentaohjelmaan, jonka avulla muodostettiin standardisuora. Lineaarisuusajon kontrollien pitoisuus määritetään standardisuoraan vasten. Tuloksista määritettiin, ovatko saadut pitoisuudet ohjeiden hyväksyntärajojen sisällä.

Lineaarisuustestien tulokset käsiteltiin PisaCalcilla ”ristiin”, eli erän 1B standardisuoraan verrattiin kaikkia 2A:n tuloksia, ja 2A:n standardisuoraan verrattiin 1B:n ajojen tuloksia. Tuloksista arvioitiin erien samankaltaisuus.

Kun näytteen pitoisuus määritetään vertaamalla lineaariseen standardisuoraan, kasvava counts-arvo johtaa kasvavaan pitoisuuteen. Matalampi sitoutumiskapasiteetti saattaa siis johtaa matalampiin tuloksiin. Ristiin verrattaessa kahden eritasoisen määrityksen tuloksia korkeamman sitoutumiskapasiteetin kaivoilla määritetyt kontrollit voivat johtaa liian korkeisiin tuloksiin, kun standardisuora on ajettu matalan sitoutumiskapasiteetin kaivoilla. Ero tulisi näkymään voimakkaimmin korkean pitoisuuden kontrollien tuloksissa. Sivulla 3 kuvio 4 esittää esimerkkikäyrää, joka havainnollistaa ristiinvertailutilannetta.

Ristiin vertailu ei ole rutiininomainen tulostenkäsittelytapa ITD:ssa, vaan opinäytetyötä varten tehty lisäharjoitus. Tällä haluttiin tarkastella rinnakkaisten erien määritysten samankaltaisuutta, kun erät oli valmistettu eri kapasiteetin omaavilla SA-kaivoilla.



Kuvio 4. Esimerkki näytteiden pitoisuuksien ristiinverrannosta.

6 TULOKSET

Opinnäytetyön kokeellisen osan tuloksiin lukeutuivat SA-kaivoille ja analyttikaivoille suoritettut laadunvalvontatestit sekä analyttikaivojen taustasignaalit ja lineaarisuustestien antamat pitoisuudet kontrolleille.

6.1 SA-kaivojen laadunvalvontamääritykset

Taulukossa 5 on yhteenveto SA-erien laadunvalvontamääritysten tuloksista hyväksyntärajoineen. Sitoutumiskapasiteettitesti päätettiin uusilla erillä 1B ja 2A, jotta kyseisiltä eriltä saadaan vertailuun tulokset samalta testipäivältä. Erä 2A valittiin erän 3A sijaan huolimatta yhtä suuresta tuloserosta, sillä juuri erillä 1B ja 2A on myös eniten toisistaan sekä rutiininomaisista tuotannon käytännöistä poikkeavat olosuhteet. Seuraaviin testeihin valittiin tulosten perusteella erät 1A ja 1B matalan sitoutumiskapasiteetin kaivoina sekä erät 2A ja 2B korkean sitoutumiskapasiteetin kaivoina.

Taulukko 5. SA-kaivojen laadunvalvontamääritysten tulokset.

Pvm.	SA-inkubointiaika (hh:mm)	Erä (1A-3B)	Kuivattu	Homo-geenisuus % CV (raja ≤ 8.0)	Homo-geenisuus counts (raja ≥ 5000)	Tausta counts (raja ≤ 623)	Sitoutumiskap. pmol (raja ≥ 3 pmol)
21.4.2015	15:28	1A	Kyllä	3.5	21118	370	3.0
		1B	Ei	3.8	21262	374	2.6
22.4.2015	29:36	2A	Kyllä	4.4	20756	350	3.8
		2B	Ei	3.1	21246	379	3.3
24.4.2015	24:00	3A	Kyllä	3.2	21173	380	3.8
		3B	Ei	5.7	21383	367	3.1

Punainen = korkea tulos

Sininen = matala tulos

Testin uusinnassa tuloksilla ei ollut yhtä huomattavaa eroa kuin ensimmäisellä määrittyskerralla, mutta ero oli jälleen havaittavissa. Uusinnassa kummankaan erän sitoutumiskapasiteetti ei ylitä hyväksyntärajaa, joten tulosten poikkeavuus

alkuperäisistä (taulukko 5) voi johtua määrittelyn aikana tapahtuneesta laimenosvirheestä. Taulukossa 6 seuraavalla sivulla on yhteenveto uusinnan tuloksista hyväksyntärajoineen.

Taulukko 6. SA-kaivojen laadunvalvontamäärittelyjen uusinta.

Pvm.	SA-inkubointiaika (hh:mm)	Erä (1A-3B)	Kuivattu	Sitoutumis-kap. pmol (raja \geq 3 pmol)
4.5.2015	15:28	1B	Ei	1.8
4.5.2015	29:36	2A	Kyllä	2.7

6.2 Analyyttikaivojen laadunvalvontamäärittelyt

Tnl:n homogeenisuustestissä olivat mukana erät 1A-2B sekä referenssierä 10160. Myo:n homogeenisuustestissä olivat mukana samoista SA:n erikoiseristä valmistetut Myo-analyyttikaivot sekä referenssierä 10090. Testi suoritettiin kappaleen kuvauksen 4.5 mukaan. Taulukossa 7 on yhteenveto testin tuloksista hyväksyntärajoineen.

Taulukko 7. Analyyttikaivojen homogeenisuustestien tulokset hyväksyntärajoineen.

Pvm	Analyytti	Erä	% CV (hyv. raja \leq 9,1 %)
13.5.2015	Tnl	1A	4,0
		1B	4,9
		2A	3,8
		2B	5,6
		10160	6,0
13.6.2015	Myo	1A	2,8
		1B	4,5
		2A	2,5
		2B	3,8
		10090	4,0

Analyyttikaivojen taustamäärittelytesteissä olivat mukana erät 1A-2B, jotka olivat käyneet läpi joko Tnl:n tai Myo:n analyttikouttauksen ja leima-annostelun.

Taustamäärittystä varten pakattiin kasetteja yksi levy, eli kuusi kasettia, per erä. AQT-kasetit pakattiin kappaleen 4.3 kuvauksen mukaisesti. Taustatestit suoritettiin kappaleen 4.5 kuvauksen mukaan. Taustamäärittelyn tulospohja laskee levyn tulosten keskinäisen 95-persentiilimediaanin sekä mediaanin, joiden tulee pysyä asetetuissa hyväksyntärajoissa. Taulukossa 8 on yhteenveto TnI:n taustamäärittelytuloksista hyväksyntärajoineen, ja taulukossa 9 Myo:n taustamäärittelytulokset hyväksyntärajoineen.

Taulukko 8. TnI-analyyttikaivojen AQT-taustamäärittelyn tulokset hyväksyntärajoineen.

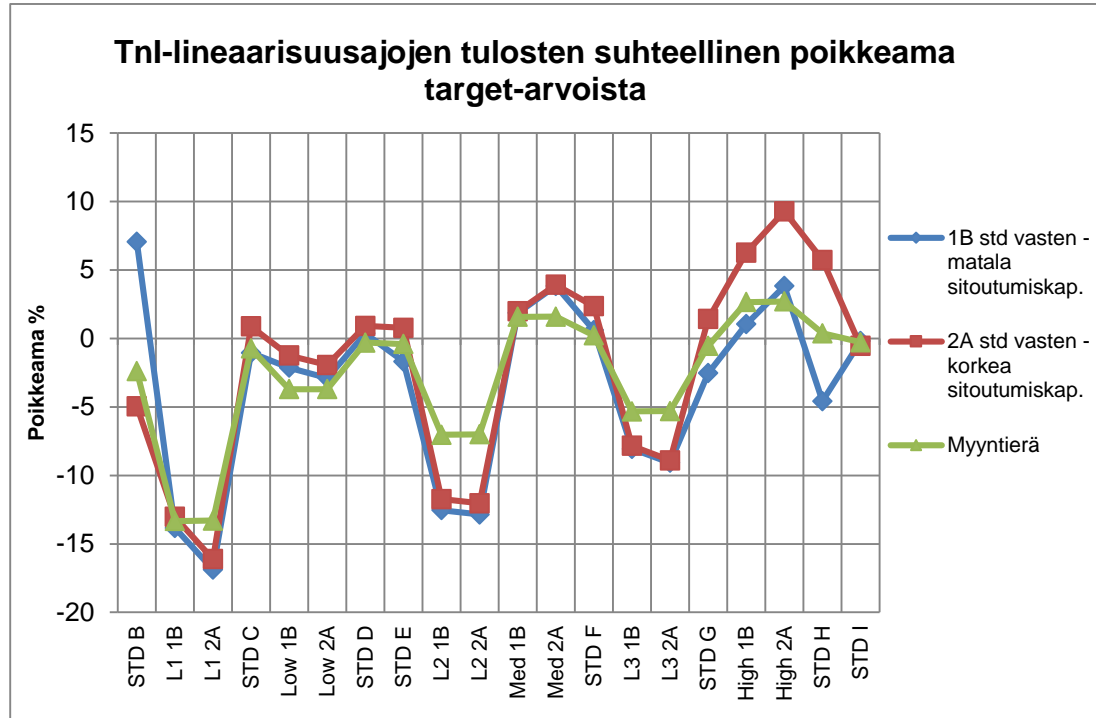
Pvm	Analyytti	Erä	95 % - mediaani (raja ≤ 138)	Mediaani (raja ≤ 600)
22–27.5.2015	TnI	1A	56	422
		1B	55	338
		2A	79	405
		2B	43	269

Taulukko 9. Myo-analyyttikaivojen AQT-taustamäärittelyn tulokset hyväksyntärajoineen.

Pvm	Analyytti	Erä	95 % -mediaani (raja ≤ 190)	Mediaani (raja ≤ 550)
17.6.2015	Myo	1A	36	208
		1B	43	191
		2A	40	262
		2B	40	177
		1A	36	208

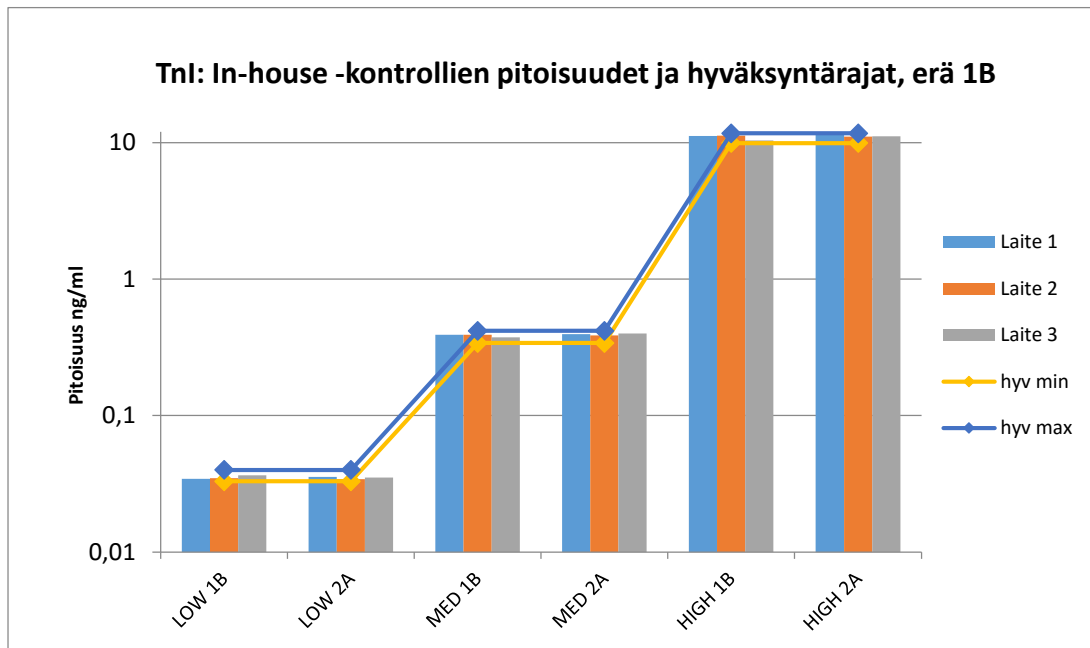
AQT 90:llä suoritettiin TnI:n ja Myo:n erille 1B ja 2A lineaarisuusajot kolmella laitteella myyntierän määrittelyohjeen tapaan. Tuloksia verrattiin myyntierän ohjeen mukaisesti tulosten suhteellisen poikkeaman sekä pitoisuuden ohjaus- ja hyväksyntäarvoihin. Kuten mainittu kappaleessa 5.6.3, erien tulokset käsiteltiin laskentaohjelmalla ”ristiin” (erän 1B standardisuoraa verrattiin kaikki erän 2A tulokset ja erän 2A standardisuoraa kaikkiin 1B:n tuloksiin) ja tuloksia verrattiin suhteellisesti standardeille ja kontrolleille määritettyihin pitoisuuksiin. Kuviossa 5 alla on esitetty TnI:n lineaarisuusajojen sekä myyntierän tulosten suhteellinen

poikkeama target-arvoista. Liitteessä 1 on nähtävissä lineaarisuusmääritysten tulokset taulukoituina ohjaus- ja hyväksyntärajoineen.

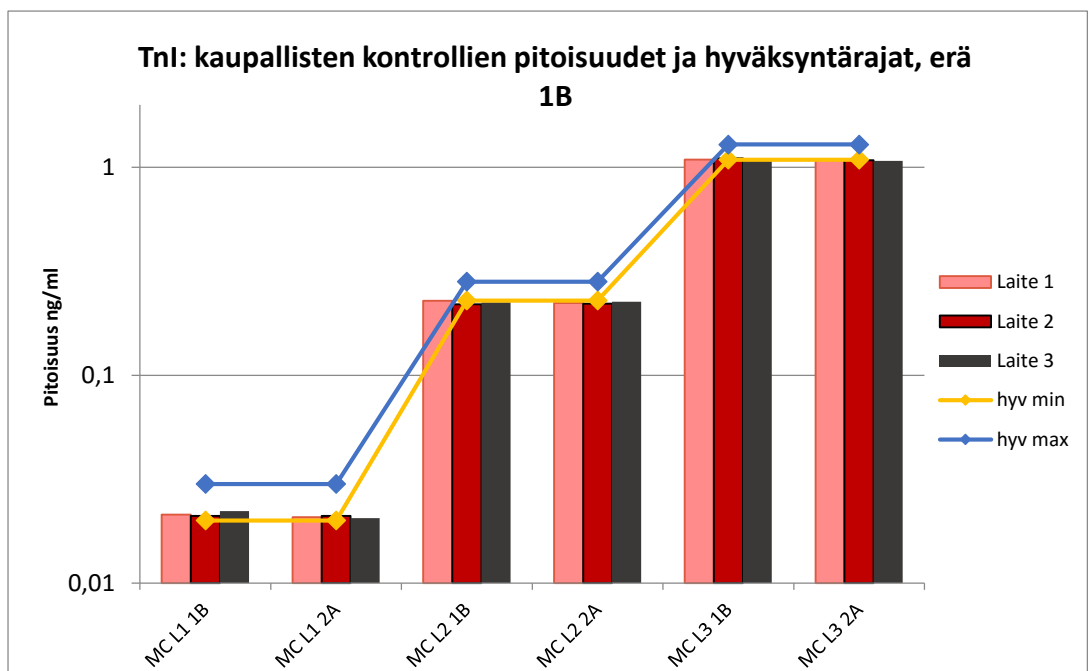


Kuvio 5. Tnl-lineaarisuusmääritysten tulosten suhteellinen poikkeama target-arvoista.

Kuvioissa 6 ja 7 sivulla 43 on esitetty Tnl:n lineaarisuusmäärittelyn kontrollien pitoisuudet erän 1B standardisuoraan vastaan: kuviossa 6 on esitetty sisäiset kontrollit ja kuviossa 7 kaupalliset kontrollit.

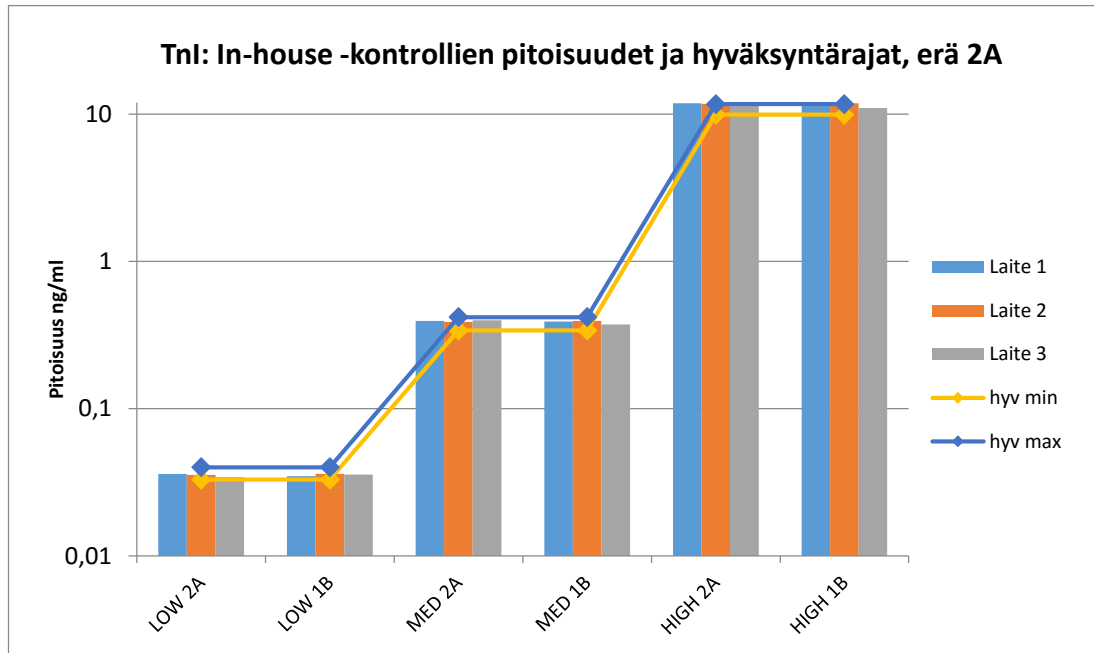


Kuvio 6. Tnl:n sisäisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 1B standardisuoraa vasten.

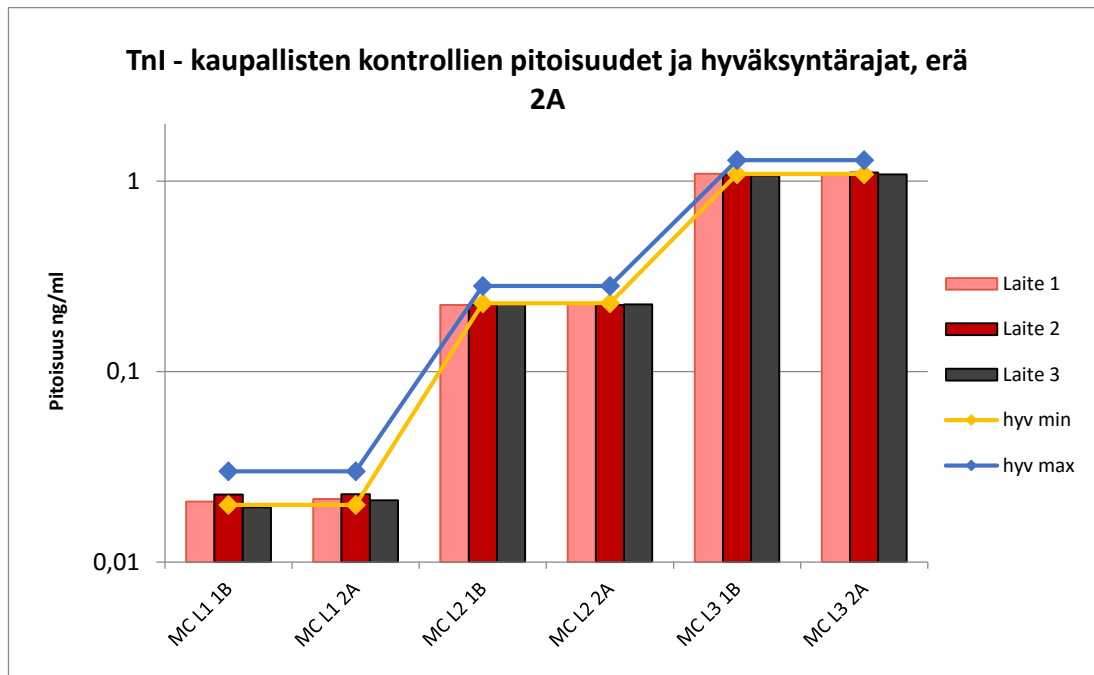


Kuvio 7. Tnl:n kaupallisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 1B standardisuoraa vasten.

Sivulla 44 kuvioissa 8 ja 9 on Tnl:n kontrollien pitoisuudet erän 2A standardisuoraa vastaan: kuviossa 8 on esitetty sisäiset kontrollit ja kuviossa 9 kaupalliset kontrollit.

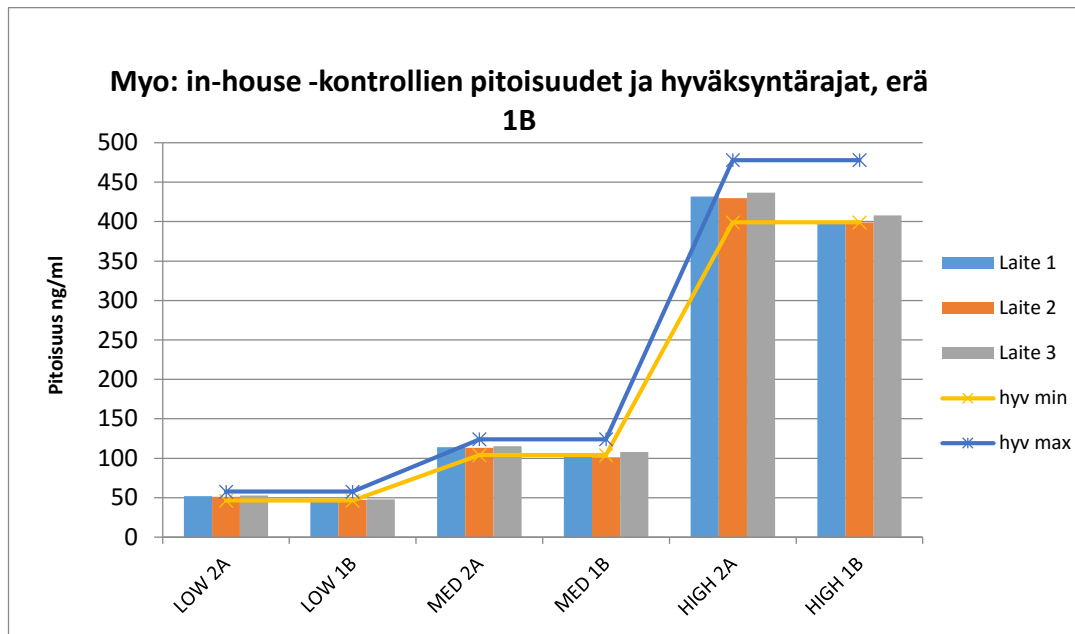


Kuvio 8. Tnl:n sisäisten kontrollien pitoisuudet erän 2A standardisuoraan vasten.

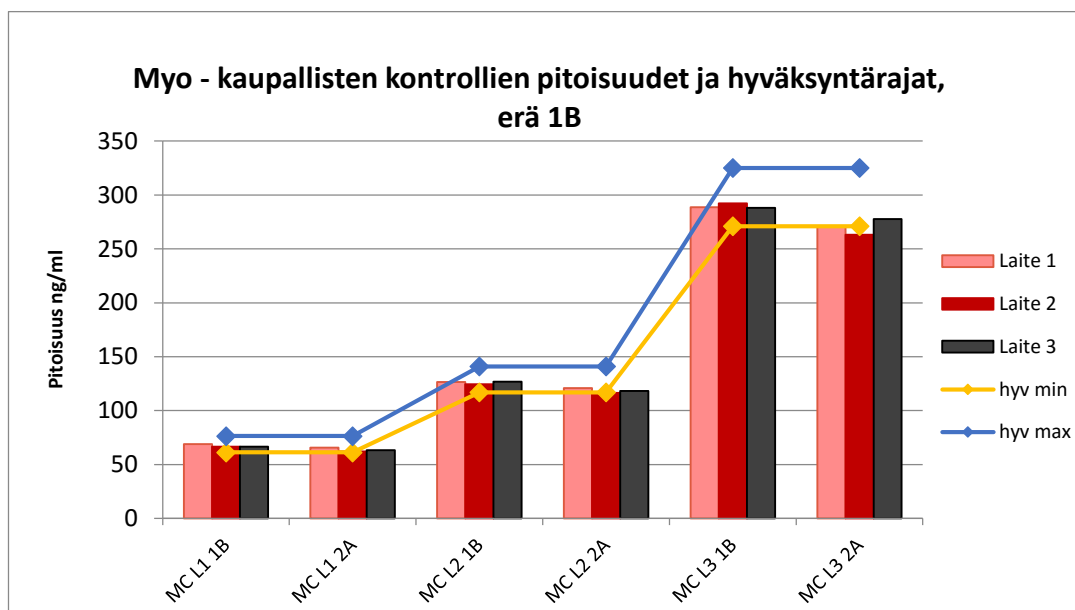


Kuvio 9. Tnl:n kaupallisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 2A standardisuoraan vasten.

Kuvioissa 10 ja 11 sivulla 45 esitetään Myo:n kontrollien pitoisuudet erän 1B standardisuoraan vasten: kuviossa 10 on esillä sisäisten kontrollien pitoisuudet ja kuviossa 11 kaupallisten kontrollien pitoisuudet.

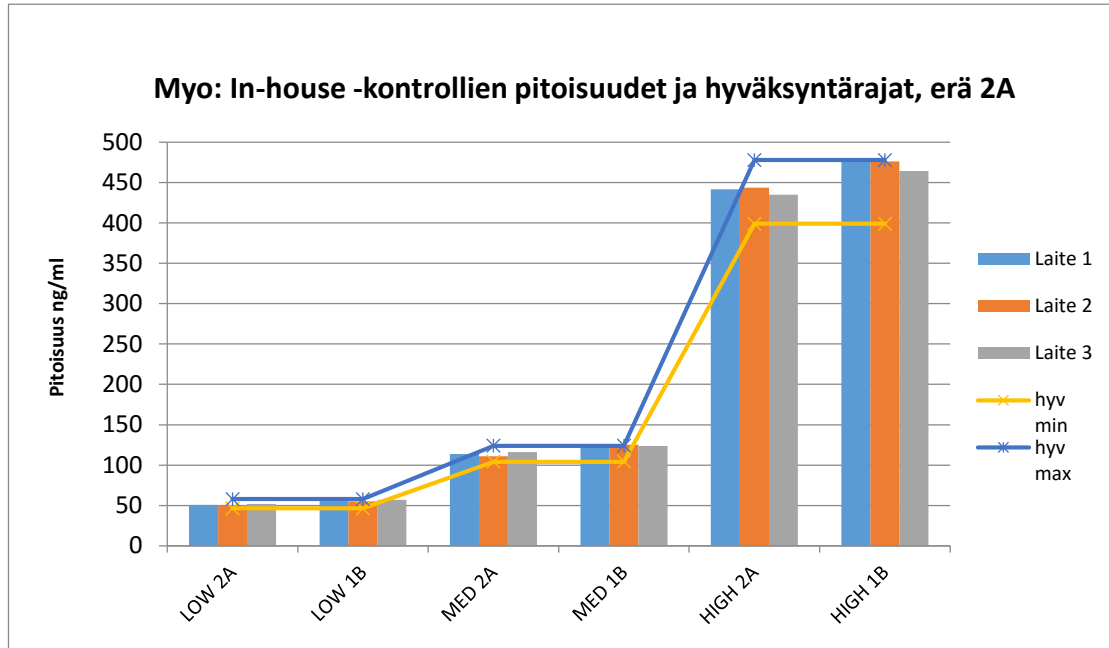


Kuvio 10. Myo:n sisäisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 1B standardisuoraa vasten.

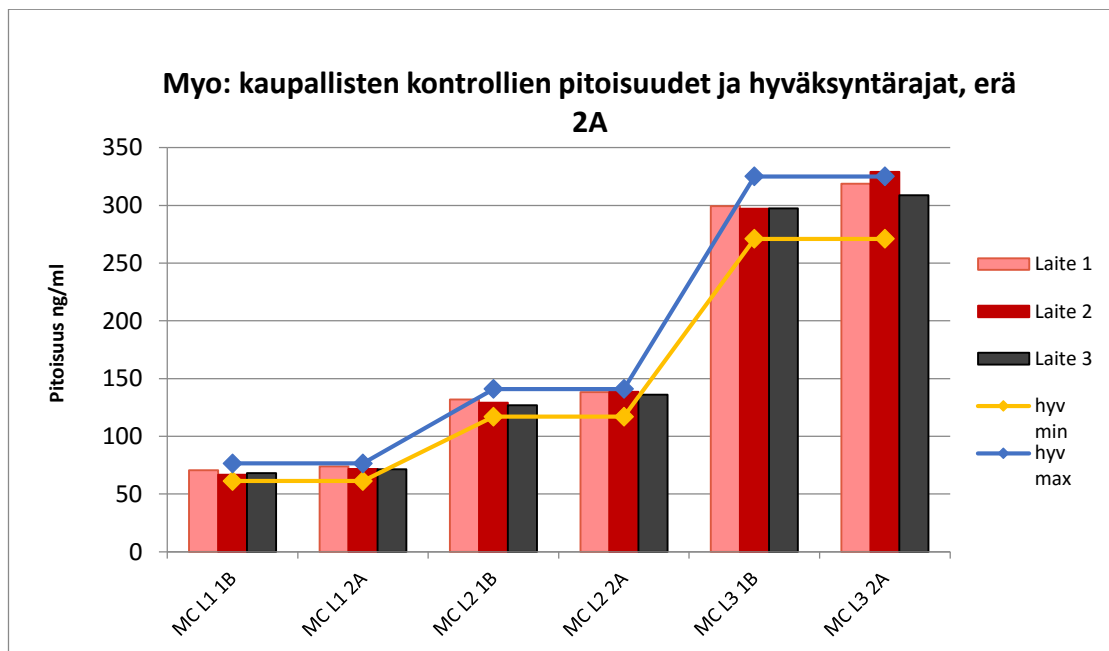


Kuvio 11. Myo:n kaupallisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 1B standardisuoraa vasten.

Kuvioissa 12 ja 13 sivulla 46 on esitetty Myo:n kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 2A standardisuoraa vasten: kuviossa 12 on sisäisten kontrollien pitoisuudet ja kuviossa 13 kaupallisten kontrollien pitoisuudet.



Kuvio 12. Myo:n sisäisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 2A standardisuoraa vasten.



Kuvio 13. Myo:n kaupallisten kontrollien pitoisuudet ja hyväksyntäraajat erän 2A standardisuoraa vasten.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Johtopäätöksissä käsitellään testitulokset tutkittavien kriittisten tekijöiden ja laadunvalvontamääritysten hyväksyntärajojen valossa.

7.1 Inkubointiajan ja kuivauksen vaikutus sitoutumiskapasiteettiin

Tuloksista taulukoissa 5 ja 6 havaitaan inkubaatioajan sekä kuivauksen vaikutus sitoutumiskapasiteettiin. Pidemmällä inkuboinnilla ja kuivauksella käsitellyt kaivot antavat määrittämissä selvästi korkeamman sitoutumiskapasiteetin arvon kuin lyhyen inkuboinnin läpikäyneet kaivot, joita ei kuivattu kuivauskaapissa. Vaikka myös erä 3A (inkubointi myyntierän mukaan, kuivattu) antoi korkeamman tuloksen sitoutumiskapasiteettitestissä, keskitytään opinnäytetyössä äärimmäisten inkubaatioaikojen aiheuttamiin muutoksiin. Siksi erät 1B ja 2A valittiin lineaarisuustestien vertailuun, jotta voidaan tarkastella sitoutumiskapasiteetin vaihtelun vaikutusta AQT-määrittämiseen.

7.2 Analyyttilevyjen homogeenisuus

Sekä TnI:n että Myo:n analyyttilevyjen homogeenisuustestit täyttivät myyntierille asetetut hyväksyntävaatimukset. TnI:n testitulosten variaatio on hieman korkeampi kuin Myo:n, mikä johtuu TnI:n määrittämisen yksittäisten tulosten suuremmasta keskinäisestä vaihtelusta. Tämä oli havaittavissa raakadatasta levykohtaisena, alueellisena vaihteluna tulosten counts-tasossa. Syynä tähän voi olla pipetointiepävarmuus TnI-homogeenisuustestissä. Myo:n homogeenisuustestin suoritti toinen määrittäjä, jonka pidempi työkokemus laadunvalvontatestien parissa saattoi vaikuttaa tulosten tasaisuuteen. Erien 1B ja 2A tulosten välillä ei ollut huomattavaa eroa, jonka voisi päätellä johtuvan erosta sitoutumiskapasiteetissa.

7.3 Taustamääritys AQT 90:llä

Molempien analyyttien taustamääritysten tulokset pysyivät hyväksyntärajoissa kaikilla erillä. TnI:n kasetit oli pakattu vääränlaista pohjalaminaattia käyttäen, jolloin normaalisti kasettiin kuuluvat pohjalaseroinnit jouduttiin korvaamaan skalpellilla tehdyillä viilloilla. Kasettien viiltely käsin saattoi vahingoittaa kaivoja, mikä voi johtaa korkeisiin tuloksiin määrittäksessä. Joitakin korkeita counts-arvoja oli havaittavissa raakadatassa, mutta lopullisiin tuloksiin ne eivät vaikuttaneet. Myo:n kasetit pakattiin ohjeen mukaan, eikä tuloksissa ollut havaittavissa mitään poikkeavaa.

7.4 Lineaarisuus

TnI:n lineaarisuustestien tulokset, jotka ovat numeerisesti nähtävillä liitteessä 1, sisälsivät useita pitoisuuden hyväksyntärajojen ylityksiä sekä alituksia. Virheellisissä tuloksissa on kuitenkin havaittavissa symmetriaa erien 1B ja 2A välillä. Poikkeavat tulokset on saatu samoista näytetasoista samoilla laitteilla molemissa erissä, jolloin voidaan päätellä poikkeavuuksien johtuvan muista syistä kuin testistä itsestään. Sitoutumiskapasiteetin vaikutus analyyttikaivojen laatuun voidaan myös sulkea pois mahdollisista virhelähteistä näissä määrittäksissä. Tämän vuoksi syitä poikkeamiin lineaarisuustesteissä voidaan pitää tuotannollisina, eikä SA-kaivojen valmistuksen erityisolosuhteiden aiheuttamina.

Kuviossa 5 havaitaan TnI:n pitoisuuksien suhteellisessa poikkeamassa suurempaa hajontaa korkeapitoisuuksisten standardien ja kontrollien tuloksissa (High-kontrolli, H-standardi). Kuten kappaleessa 5.7 kuvattiin, tulisi tämä ilmiö tulkita matalamman sitoutumiskapasiteetin aiheuttamina korkeina tuloksina. Hajonnan kasvava trendi ei kuitenkaan jatku korkeimpiin pitoisuuksiin asti, vaan tulosten suhteellinen hajonta laskee jälleen I-standardin tuloksissa. Voidaan siis olettaa, ettei variaatio johdu sitoutumiskapasiteetin vaihtelusta. Kappaleessa 6 esiintyvistä kuvioista 5 havaittavasta kaikkien erien seuraamasta samansuun-

taisesta trendistä voidaan myös päätellä erien 1B, 2A ja myyntierän määritysten ongelmien johtuvan samoista tuotannollisista syistä.

Myo:n lineaarisuusmääritysten tulokset olivat hyväksyntärajoissa ja olisivat myyntieränäkin täyttäneet asetetut vaatimukset. Erien 1B ja 2A välillä havaittiin vain pientä vaihtelua pitoisuustulosten välillä samoja kontrollitasoja verratessa keskenään, ja hyväksyntärajojen ylitykset sekä alitukset ilmenivät samoilla kontrollitasoilla molemmissa erissä.

Erien välisissä pitoisuustuloksissa on havaittavissa systemaattista eroavuutta. Matalan sitoutumiskapasiteetin erä antaa huomattavasti pienempiä pitoisuustuloksia. Korkean kapasiteetin erän pitoisuudet taas ovat lähellä hyväksynnän ylärajaa. Molemmat erät ovat kuitenkin eroista huolimatta hyväksyntärajoissa.

8 LOPPUPÄÄTELMÄT

Sitoutumiskapasiteetin vaihtelun alle nykyisen hyväksymisrajan ei havaittu vaikuttavan negatiivisesti lopputuotteen kemialliseen suorituskykyyn. Tehtyjen havaintojen pohjalta voidaan kuitenkin kysyä, miksei sitoutumiskapasiteetin muutos vaikuta voimakkaammin AQT-laitteen määrittämään pitoisuuteen. Mikäli sitoutumiskapasiteettisesti ei suoraan ilmennä biotinyloidun vasta-aineen mahdollisuutta sitoutua SA-pinnalle, on tutkittava mahdollisesti loogisen jatkumon rikkovia kriittisiä tekijöitä. Eräs mahdollinen tekijä on Bio-Tekes-Eu:n ja biotinyloidun vasta-aineen kokoero. Laadunvalvonnan sitoutumiskapasiteettisesti ei välttämättä anna luotettavaa tulosta biotinyloidun vasta-aineen todellisesta sitoutumismahdollisuudesta Bio-Tekes-Eu:n ollessa moolimassaltaan lähes sata kertaa biotinyloitua vasta-ainetta pienempi.

Toisaalta, AQT-määritysten tulosten täyttäessä asetetut spesifikaatiot, voidaan kyseenalaistaa sitoutumiskapasiteetin nykyinen minimivaatimustaso. Jos alle 3 pmol sitoutumiskapasiteetilla saadaan aikaan riittävän laadukas tuote, voidaan Bio-Tekes-Eu:n sitoutumiskapasiteetin alarajaa laskea. Vaikkei testeissä saatu aikaan huomattavaa eroa erien välille, antavat Myo:n tulokset viitteitä sitoutumiskapasiteetin alarajan saavuttamisesta.

Eräs tutkinnan tarpeessa oleva kriittinen tekijä on Bio-Tekes-Eu:n valmistusprosessi. Reagenssi valmistetaan itse yrityksen orgaanisen kemian laboratoriossa monivaiheisella prosessilla, joka sisältää useita orgaanisia synteesejä. Koska minkään vaiheen reaktiotuotteita ei ole mahdollista hankkia kaupallisena, olisi syytä varmistua valmistuksen kriittisten pisteiden vaikutuksesta lopputuotteen. Myös reagenssin pitoisuusmäärittäminen mahdolliset virhelähteet tulisi tarkentaa. Pitoisuusmäärittäminen virheellisellä tuloksella saattaa olla harhaanjohtava vaikutus sitoutumiskapasiteettiin sekä käsitykseen kapasiteetin minimitarpeesta.

9 LÄHTEET

Beatty, Richard, 2007, The Lanthanides, Marshall Cavendish

Combs, Jr., E., 2012, The Vitamins, Academic Press

Dabbs, D.J., 2013, Diagnostic Immunohistochemistry, Elsevier Health Sciences

Daghestani, Introduction to Immunoassays. Viitattu 10.5.2015.

<http://faculty.ksu.edu.sa/9106/zoo%20534/Introduction%20to%20Immunoassays.pdf>

Darwish, I.A., Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances, *International Journal of Biomedical Science*, 2006 Sep; 2(3): 217–235

Encyclopedia Britannica, Antibody. Viitattu 10.7.2015

<http://global.britannica.com/science/antibody>

Ensminger, M.E., Ensminger, A.H., 1993, Foods & Nutrition Encyclopedia, 2nd Edition, Nide 1, CRC Press

Hemmilä, I., Luminescent Lanthanide Chelates – a way to more sensitive diagnostic methods, *Journal of Alloys and Compounds* 225 (1995), s. 480-485

Hemmilä, I., Development of Luminescent Lanthanide Chelate Labels for Diagnostic Assays, *Journal of Alloys and Compounds* 249 (1997), s. 158-162

ITD 2015₁, valmistusohje: BITC

ITD 2015₂, valmistusohje: biotinylointi, geneerinen ohje

ITD 2015₃, yleisohje: biotinylointi

ITD 2015₄, prosessiohje: SA-irtokaivot

ITD 2015₅, yleisohje: QC-määrittäykset ja niihin käytettävät laitteet

ITD 2015₆, prosessiohje: AQT-kasettipakkaus

ITD 2015₇, prosessiohje: Kaivojen manuaalipakkaaja

ITD 2015₈: prosessiohje: Leimausten yleiset toimintatavat ja tuotannon leimausten yleisohje

ITD 2015₉, valmistusohje: Analyytti- ja kalibraatiokaivot, QC-testaus

ITD 2015₁₀, valmistusohje: Kuivakalibraattorin pitoisuuden määrittäminen AQT 90:llä

McMahon, R.J., 2008, Avidin-Biotin Interactions: Methods and Applications, Springer Science & Business Media

Ngo, T., 2012, Nonisotopic Immunoassay, Springer science & Business Media

Radiometer 2015, Overview of Manufacturing Process at ITD, PPTX-tiedosto

Thermo Fisher Scientific, Structure of Immunoglobulins. Viitattu 10.8.2015.

<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/antibody-structure-classes.html>

Välimaa, L., 2008, Streptavidin - A Versatile Binding Protein for Solid-Phase Immunoassays, Turun Yliopisto

Wilson, K., Walker, J., 2000, Principles and Techniques of Practical Biochemistry, Cambridge University Press

Ylikotila, J., Välimaa, L., Takalo, H., Pettersson, K., Improved Surface Stability and Biotin Binding Properties of Streptavidin Coated On Polystyrene, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 70 (2009), s. 271-277

Liite 1: Linearisuustestien tulokset laadunvalvontarajoiheen

Tnl pitoisuudet 1B								
	AQT 1	AQT 2	AQT 3	ohjaus min	ohjaus max	hyv. min	hyv. max	hyv. rajoissa x/-, kpl ylityksiä
LOW_1B	0.034	0.035	0.037	0.034	0.039	0.033	0.04	x
MED_1B	0.392	0.392	0.375	0.352	0.405	0.34	0.418	x
HIGH_1B	11.2	11.2	10.3	10.0	11.6	9.91	11.7	x
MC_Level_1_1B	0.021	0.021	0.022	0.021	0.028	0.02	0.03	x
MC_Level_2_1B	0.228	0.219	0.224	0.238	0.274	0.229	0.282	3
MC_Level_3_1B	1.09	1.11	1.09	1.11	1.28	1.09	1.29	x
LOW_2A	0.035	0.034	0.035	0.034	0.039	0.033	0.04	x
MED_2A	0.395	0.386	0.400	0.352	0.405	0.34	0.418	x
HIGH_2A	11.5	11.1	11.1	10	11.6	9.91	11.7	x
MC_Level_1_2A	0.021	0.021	0.021	0.021	0.028	0.02	0.03	x
MC_Level_2_2A	0.223	0.221	0.226	0.238	0.274	0.229	0.282	3
MC_Level_3_2A	1.09	1.08	1.08	1.11	1.28	1.09	1.29	2

Tnl pitoisuudet 2A								
	AQT 1	AQT 2	AQT 3	ohjaus min	ohjaus max	hyv. min	hyv. max	hyv. rajoissa x/-, kpl ylityksiä
LOW_1B	0.036	0.036	0.034	0.034	0.039	0.033	0.04	x
MED_1B	0.394	0.389	0.399	0.352	0.405	0.34	0.418	x
HIGH_1B	11.9	11.7	11.8	10.0	11.6	9.91	11.7	2
MC_Level_1_1B	0.021	0.023	0.019	0.021	0.028	0.02	0.03	x
MC_Level_2_1B	0.223	0.225	0.227	0.238	0.274	0.229	0.282	3
MC_Level_3_1B	1.09	1.09	1.07	1.11	1.28	1.09	1.29	1
LOW_2A	0.035	0.036	0.036	0.034	0.039	0.033	0.04	x
MED_2A	0.392	0.394	0.374	0.352	0.405	0.34	0.418	x
HIGH_2A	11.6	11.9	11.0	10	11.6	9.91	11.7	x
MC_Level_1_2A	0.021	0.023	0.021	0.021	0.028	0.02	0.03	x
MC_Level_2_2A	0.229	0.224	0.225	0.238	0.274	0.229	0.282	3
MC_Level_3_2A	1.10	1.11	1.08	1.11	1.28	1.09	1.29	1

Punainen = rajan ylitys

Sininen = rajan alitus