

Opinnäytetyö (YAMK)

Kemiantekniikka ja bioteknologia

2022

Niina Kemppi

**ANTIGEEENIN VAIHTO SISÄISIIN  
CRP-STANDARDEIHIN  
JA -KONTROLLEIHIN SEKÄ  
CRP-IMMUNOMÄÄRITYKSEN  
KALIBRAATIOKASETTEIHIN**

Opinnäytetyö (YAMK) | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Kemiantekniikka ja bioteknologia

2022 | 65 sivua

Niina Kemppi

## Antigeenin vaihto sisäisiin CRP-standardeihin ja -kontrolleihin sekä CRP-immunomäärityksen kalibraatiokasetteihin

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia Radiometer Turku Oy:ssä käytettävälle CRP-antigeenille korvaavia vaihtoehtoja nykyantigeenin saatavuuden päättymisen vuoksi. CRP-antigeenia käytetään sisäisissä standardeissa ja kontrolleissa sekä kalibraatiokaseteissa, jotka ovat immunomäärityksen metrologisen jäljitettävyyden muodostamiseen tarvittavia materiaaleja.

Tutkimuksessa selvitettiin kolmen kaupallisen CRP-antigeenin toimivuutta standardeissa ja kontrolleissa erilaisilla stabiilisuutta, rasiituksen kestoa, lineaarisuutta ja siirtymää mittaavilla laboratoriotesteillä. Kalibraatiokasetteja varten selvitettiin kahden antigeenin toimivuutta kalibraatioliuoksessa stabiilisuus- ja sekoitustestein sekä valmistamalla antigeeneista kalibraatiokaivoja.

Testitulosten perusteella kaikki kolme antigeenia olivat toimivuudeltaan potentiaalisia ehdokkaita nykyisin käytettävän CRP-antigeenin korvaajaksi standardeihin ja kontrolleihin. Lisäksi kahdesta testatusta antigeenista onnistuttiin valmistamaan toimivia kalibraatiokasetteja, mutta aihe vaatii vielä lisättestausta. Tutkimuksen perusteella nykyantigeenin korvaajaksi löytyi useampi toimiva vaihtoehto, joten lopullisessa valinnassa on mahdollista ottaa huomioon toimivuuden lisäksi myös muita toimeksiantajayrityksen kannalta merkittäviä tekijöitä.

Asiasanat: Immunomääritys, antigeeni, metrologinen jäljitettävyys, kalibraatio

Master's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Chemical Engineering and Biotechnology

2022 | 65 pages

Niina Kemppi

## Antigen change in CRP in-house standards and controls and calibration cartridges for CRP immunoassay

The aim of the present Master's thesis is to study replacement options for CRP antigen used in Radiometer Turku Oy, due to the discontinuation of the currently used antigen by the manufacturer. CRP antigen is used in in-house standards and controls and calibration cartridges which are materials needed for creating the metrological traceability of CRP immunoassay.

In the present study, the functionality of three commercial CRP antigens was examined by laboratory tests measuring stability, the effect of mechanical stress, dilution linearity and carry-over. In terms of calibration cartridges, the functionality of two CRP antigens was studied by stability tests and mixing tests in calibration solution, and by preparing calibration cartridges containing the antigens.

According to the test results, all the three CRP antigens were, based on their functionality, potential options for replacing the currently used CRP antigen in standards and controls. In addition, functioning calibration cartridges were prepared with both CRP antigens tested for this purpose. However, more testing is still needed. Based on the study, more than one option for replacing the current CRP antigen exist, so it will be possible to consider also other factors than antigen functionality when making the final decision on the new CRP antigen.

Keywords: Immunoassay, antigen, metrological traceability, calibration

# Sisältö

<b>Käytetyt lyhenteet</b>	<b>7</b>
<b>1 Johdanto</b>	<b>8</b>
<b>2 Immunomääritys</b>	<b>10</b>
2.1 Antigeenin määrää mittaava immunometrinen immunomääritys	11
2.2 Immunomääritys AQT90 FLEX -immunoanalysaattorilla	13
2.3 C-reaktiivinen proteiini eli CRP	15
<b>3 Immunomäärityksen metrologinen jäljitettävyys</b>	<b>17</b>
3.1 Metrologisen jäljitettävyyden muodostaminen	17
3.2 Immunomäärityksen kalibrointi	21
3.3 AQT90 FLEX -analysaattorilla tehtävän immunomäärityksen kalibrointi	22
3.4 Analyytti referenssimateriaaleissa	22
3.5 Referenssimateriaalien matriisi	23
3.6 Radiometer Turku Oy:n standardit	24
3.7 Kontrollimateriaalit	25
3.8 Radiometer Turku Oy:n kontrollit	26
<b>4 Tutkimusmenetelmät ja materiaalit</b>	<b>27</b>
4.1 Antigeenit	27
4.2 Matriisit	29
4.3 Tutkimusmenetelmät	30
4.3.1 Standardit ja kontrollit	30
4.3.2 Kalibraatiokaivot	35
<b>5 Tulokset</b>	<b>41</b>
5.1 Standardit ja kontrollit	41
5.1.1 Valmistusprosessin aikainen stabiilisuus	41
5.1.2 Käyttöstabiilisuus ja pakastus-sulatussyklin vaikutus	46
5.1.3 Mekaanisen rasituksen kesto	48
5.1.4 Lineaarisuus	50

5.1.5 Antigeenin siirtymä ja neulanpuhdistuksen vaikutus	52
5.2 Kalibraatiokaivot	54
5.2.1 Kalibraatioliuoksen stabiilisuus	54
5.2.2 Kalibraatioliuoksen sekoitustestaus	55
5.2.3 Homogeenisuus	56
5.2.4 Kalibraatiokaivojen signaalijakauma	59
<b>6 Loppupäätelmät</b>	<b>61</b>
<b>Lähteet</b>	<b>64</b>

## Kuvat

Kuva 1. Antigeenin määrää mittaavan immunometrisen immunomäärityksen rakenne (Wild 2013, 7. Muokattu.).	13
Kuva 2. Immunomääritys AQT90 FLEX -analysaattorilla (AQT90 FLEX Käyttöohjeet 2019, 165. Muokattu.).	15
Kuva 3. CRP-pentameeri (Volanakis 2001, 189–197).	16
Kuva 4. Referenssimateriaalien hierarkia. (Barwick ym. 2001, 3.)	19
Kuva 5. Antigeenista 1 valmistettujen kalibraatioplevyjen homogeenisuustulokset kuivauskaapin peltipositioissa esitettynä. Punainen ja sininen väri kuvaavat yksittäisen kaivon signaalin eroa kaikkien kaivojen signaalikeskiarvoon.	57
Kuva 6. Antigeenista 2 valmistettujen kalibraatioplevyjen homogeenisuustulokset kuivauskaapin peltipositioissa esitettynä. Punainen ja sininen väri kuvaavat yksittäisen kaivon signaalin eroa kaikkien kaivojen signaalikeskiarvoon.	58
Kuva 7. Referenssitestikaivojen, referenssikalibraatiokaivojen ja antigeeneista 1 ja 2 valmistettujen kalibraatiokaivojen kahdeksan kaivon keskiarvosignaali-jakaumat kaivon pohjan suhteen.	59

## Kuviot

Kuvio 1. Antigeenien 1, 2 ja 3 eri tuotantoerien valmistusprosessin aikainen stabiilisuus puskuriliuoksessa RT:ssä.	41
Kuvio 2. Antigeeni 1:n valmistusprosessin aikainen stabiilisuus kolmessa LiHep-plasmaerässä, kolmessa EDTA-plasmaerässä ja yhdessä seerumierässä.	43
Kuvio 3. Antigeeni 2:n valmistusprosessin aikainen stabiilisuus yhdessä LiHep-plasmaerässä, kolmessa EDTA-plasmaerässä ja yhdessä seerumierässä.	44
Kuvio 4. Antigeeni 3:n valmistusprosessin aikainen stabiilisuus LiHep-plasmassa, EDTA-plasmassa ja seerumissa.	45
Kuvio 5. Potilasnäyttemateriaalin sisältämän antigeenin valmistusprosessin aikainen stabiilisuus kolmessa LiHep-plasmaerässä ja yhdessä seerumierässä.	46
Kuvio 6. Antigeenien 1 ja 2 stabiilisuus välikerrosliuoksessa RT:ssä.	55

## Taulukot

Taulukko 1. Testatut antigeenien ja matriisien yhdistelmät.	31
Taulukko 2. Pakastus-sulatussyklin vaikutus antigeenien 1, 2 ja 3 sekä potilasnäyteantigeenin pitoisuuteen eri matriiseihin valmistetuissa näytteissä.	48
Taulukko 3. Antigeenien mekaanisen rasituksen keston testitulokset, sulussa pitoisuuden prosentuaalinen muutos suhteessa referenssinäytteeseen.	49
Taulukko 4. Antigeeni 1:n lineaarisuustestitulokset.	50
Taulukko 5. Antigeeni 2:n lineaarisuustestitulokset.	51
Taulukko 6. Antigeeni 3:n lineaarisuustestitulokset.	52

## Käytetyt lyhenteet

Lyhenne	Lyhenteen selitys
AQT90 FLEX	Radiometer Medical Aps:n valmistama immunoanalysaattori
BSA	naudan seerumin albumiini ( <i>engl. bovine serum albumin</i> )
CRP	C-reaktiivinen proteiini; kliininen merkkiaine, jonka määrä elimistössä kasvaa esimerkiksi tulehdustilassa
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo, antikoagulantti eli hyytymisenestoaine
LiHep	litiumhepariini, antikoagulantti eli hyytymisenestoaine
RT	huoneenlämpö

# 1 Johdanto

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia Radiometer Turku Oy:ssä käytettävälle CRP-antigeenille korvaavia vaihtoehtoja CRP-immunomäärityksen sisäisiin standardeihin ja kontrolleihin sekä kalibraatiokasettien valmistukseen. Radiometer Turku Oy on diagnostiikka-alan yritys, joka valmistaa immunomääritystestejä terveydenhuollon toimijoiden käyttöön. Immunomäärityksiä käytetään yleisesti määrittäessä erilaisten kliinisesti merkittävien molekyylien esiintymistä ihmisperäisissä näytteissä, ja saatuja testituloksia käytetään potilaan sairauden diagnosointiin ja tukena hoitopäätöksiä tehtäessä.

Metrologisen jäljitettävyyden ansiosta immunomäärityksestä saadaan samantasoisia tuloksia riippumatta määrittäjäsuorituspaikasta, ajankohdasta tai mittausmenetelmästä, mikä mahdollistaa esimerkiksi yleisten viitearvojen käytön tulosten tulkinnassa (Wild 2013, 11). Radiometer Turku Oy:n sisäisten standardien tarkoituksena on toimia osana immunomäärityksen metrologisen jäljitettävyyden ketjua kansainvälisesti tunnustettuun referenssimateriaaliin. Standardien avulla muodostettua kalibraatiodataa ja immunomääritystestien eräkohtaisia kalibraatiokasetteja käytetään AQT90 FLEX -immunoanalysaattorin kalibrointiin oikeaan tulostasoon. Prosessin virheettömyys varmennetaan vielä laadunvarmistustoimenpiteenä käytettävien sisäisten kontrollien määrittämisellä. Antigeenin käyttö standardeissa ja kontrolleissa asettaa omat vaatimuksensa antigeenimateriaalille sekä toiminnallisten ominaisuuksien osalta, mutta myös luotettavan metrologisen jäljitettävyyden ketjun muodostumisen suhteen.

Radiometer Turku Oy:n CRP-analyysin standardeissa ja kontrolleissa sekä kalibraatiokaseteissa käytettävälle antigeenille tutkitaan korvaavia vaihtoehtoja, koska nykyisin käytössä oleva antigeeni on poistumassa toimittajan valikoimasta. Koska antigeeni on kriittinen ainesosa immunomääritystestien tuotannossa, antigeenin vaihdolla mahdollistetaan toimeksiantajan CRP-immunomäärityskittien tuotannon jatkuminen myös nykyisin käytössä olevan antigeenin saatavuuden päättymisen jälkeen.

Tutkimuksessa selvitettiin kolmen kaupallisen CRP-antigeenin toimivuutta standardeissa ja kontroleissa, ja lisäksi matalinta kontrollitasoa varten antigeenin lähteenä testattiin kaupallisesti saatavilla olevia plasmapohjaisia korkean CRP-pitoisuuden potilasnäytteitä, joista koottiin testausta varten useamman potilasnäytteen yhdistelmä. Kalibraatiokasetteja varten tutkittiin toistaiseksi kahta CRP-antigeenia. Tutkittavista kaupallisista antigeeneista yksi oli tuotettu rekombinantti-DNA-tekniikalla ja kaksi muuta oli valmistettu biologisesta materiaalista puhdistamalla. Tässä tutkimuksessa selvitettiin antigeenien toimivuutta ja täten soveltuvuutta käyttötarkoituksiinsa erilaisilla laboratoriotesteillä, mutta korvaavan antigeenin lopulliseen valintaan voivat vaikuttaa tutkimustulosten lisäksi myös muut toimeksiantajayrityksen kannalta olennaiset tekijät, kuten esimerkiksi antigeenin alkuperä, toimittajaan ja tuotteen toimitukseen liittyvät arvioidut riskit, tuotteen hinta ja muut hankintakustannukset.

## 2 Immunomääritys

Immunomääritykset ovat immunokemiallisia analyysimenetelmiä, joita käytetään yleisesti laboratoriolääketieteessä määrittäessä biologisista näytteistä kliinisesti merkittäviä molekyyliä, kuten proteiineja, peptidejä, hormoneja, eräitä lääkeaineita tai vitamiineja. Immunomääritysten eri sovelluksia on käytössä sekä suurissa keskuslaboratorioissa että vieritestauksessa. (Sztefko 2011, 3.) Vieritestauksella (POCT, *engl. point-of-care testing*) tarkoitetaan laboratoriotutkimusta, joka tehdään potilaan lähellä tai odottaessa, esimerkiksi sairaalan teho-osastolla (Nichols 2020, 323–336).

Kaikki immunokemialliset analyysimenetelmät perustuvat antigeenin ja vasta-aineen väliseen spesifiin reaktioon, jossa antigeeni sitoutuu epitoopiksi kutsutusta kohdastaan vasta-ainemolekyylin antigeenia sitovaan alueeseen. Reaktion spesifisyys tarkoittaa antigeenin sitoutumista vain tiettyyn, juuri kyseisen antigeenin tunnistavaan vasta-ainemolekyyliin. Koska immunomäärityksen tarkoitus on useimmiten tutkittavan molekyylin kvantitatiivinen määrittäminen näytteessä, tarvitaan immunomääritykseen antigeenin ja vasta-aineen lisäksi myös leimattu komponentti, määrittämisestä riippuen joko leimattu antigeeni tai leimattu vasta-aine, jonka tehtävänä on muuttaa vasta-aineen ja antigeenin välinen sitoutumisreaktio mitattavaan muotoon. (Sztefko 2011, 3.)

Immunomäärityksessä tärkeinä komponentteina toimivat vasta-aineet eli immunoglobuliinit ovat proteiineja, joita syntyy elimistön immuunireaktionä sinne päätyneen immunogeenin, kuten vieraan antigeenin vaikutuksesta (Koistinen & Stenman 2014, 8). Kemialliselta rakenteeltaan vasta-aineet koostuvat kahdesta kevyestä ja kahdesta raskaasta polypeptidiketjusta, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa disulfididisidoksilla muodostaen Y-kirjaimen muotoisen rakenteen (Sztefko 2011, 3–4; Koistinen & Stenman 2014, 8). Tässä rakenteessa on kaksi antigeenia sitovaa aluetta, jotka muodostuvat kumpikin yhdestä kevyestä ja yhdestä raskaasta polypeptidiketjusta. Jokainen vasta-aine on ainutlaatuinen

spesifisyydeltään tiettyä antigeenia kohtaan ja voi tunnistaa hyvinkin pieniä eroja antigeenien kemiallisessa rakenteessa. (Sztefko 2011, 3–4.)

Immunomäärityksen toinen olennainen komponentti on antigeeni. Antigeeniksi voidaan määritellä mikä tahansa molekyyli, jolla on kyky sitoutua tiettyyn vasta-aineeseen. Vasta-aineiden yhteydessä mainitaan usein myös termi 'immunogeeni'. Immunogeenillä tarkoitetaan mitä tahansa ainesta, esimerkiksi proteiinia tai kantajamateriaaliin kiinnitettyä molekyyliä, joka saa aikaa vasta-aineiden tuotannon päätyessään vieraaseen organismiin. Kaikki antigeenit eivät sellaisenaan saa aikaan immuunireaktiota eivätkä näin ollen lukeudu immunogeeneihin, mutta kaikki immunogeenit ovat antigeeneja, sillä niillä on kyky sitoutua tiettyyn vasta-aineeseen. (Sztefko 2011, 7.)

Immunomääritysten laajaa käyttöä on edistänyt niille ominainen spesifisyys tutkittavan molekyylin suhteen, suuri analyyttinen herkkyys eli kyky mitata hyvinkin pieniä analyyttipitoisuuksia näytteessä sekä määritysten automatisointi, joka tekee niistä helppokäyttöisiä ja suhteellisen edullisia kustannuksiltaan (Sztefko 2011, 3; Koistinen & Stenman 2014, 7). Lisäksi immunomääritysten kansainvälinen standardointi mahdollistaa tulosten vertailukelpoisuuden muissa laboratorioissa ja muilla menetelmillä saatuihin tuloksiin tai suhteessa normaalipopulaatiolle määritettyihin viitearvoihin, minkä vuoksi tuloksia on helppo hyödyntää diagnostiikan tukena (Wild 2013, 11).

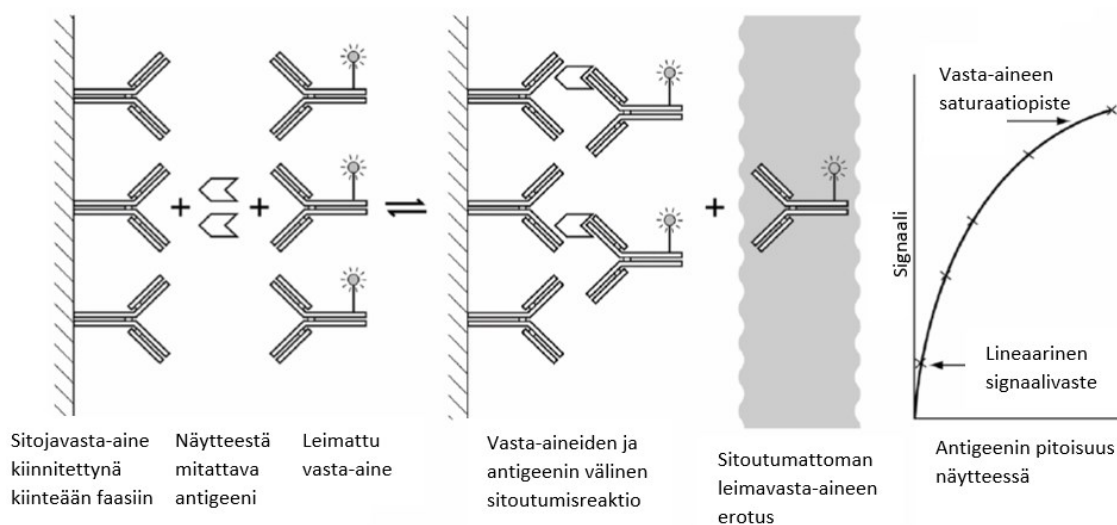
## 2.1 Antigeenin määrää mittaava immunometrinen immunomääritys

Immunomäärityksiä voidaan muodostaa usealla eri tavalla, joista tavallisin ja yksinkertaisin on immunometrinen immunomääritys, jota kutsutaan rakenteensa vuoksi myös sandwich-määritykseksi. Immunometrisillä immunomäärityksillä voidaan mitata näytteestä joko antigeenia tai vasta-ainetta, ja kohdemolekyylistä riippuen määritys koostetaan eri komponenteista. (Wild 2013, 7.)

Antigeenia mittaavan immunomäärityksen muodostamiseen tarvitaan kaksi eri vasta-ainetta. Toinen vasta-aineista toimii näytteen antigeenia sitovana komponenttina, ja määritystä rakennettaessa tämä sitojavasta-aine kiinnitetään

kiinteään faasiin kuten esimerkiksi mikrotiitterilevyn kaivon muovipintaan. Sitojavasta-aineen lisäksi määrittämiseen tarvitaan antigeenin toiseen epitooppiin kiinnittyvä vasta-aine, joka leimataan signaalia tuottavalla reagenssilla. Tämän leimavasta-aineen tehtävänä on muuttaa antigeenin määrä näytteessä mitattavaan muotoon eli signaaliksi. (Wild 2013, 7.) Immunomäärityksissä signaalia tuottavana molekyylinä voidaan käyttää esimerkiksi eräiden alkuaineiden radioaktiivisia isotooppeja (jodi-125, koboltti-57), entsyymejä, kemiluminisioivia merkkiaineita tai fluoresoivia merkkiaineita kuten lantanoidikelaatteja (Sztefko 2011, 14).

Immunomääritystä tehtäessä analysoitava näyte lisätään mikrotiitterilevyn kaivon tai muuhun immunomääritykseen tarvittavat reagenssit sisältävään toteutukseen ja sitä inkuboidaan, kunnes näytteen sisältämä antigeeni on kokonaan sitoutunut määrittämisen vasta-aineiden kanssa (Wild 2013, 7). Ylimääräinen sitoutumaton leimavasta-aine pestään kaivosta pois, jolloin jäljelle jäävät ainoastaan antigeenin kanssa sidoksia muodostaneet vasta-aineet. Tämän erotusvaiheen onnistuminen on kriittinen tekijä määrittämisen herkkyyden kannalta. (Sztefko 2011, 15.) Lopuksi määrittämisen tuottama signaali mitataan käytetylle leima-aineelle soveltuvalla menetelmällä. Mitattu signaalitaso on verrannollinen näytteessä olleen antigeenin määrään. (Wild 2013, 7.) Näytteestä antigeenin määrää mittaavan immunometrisen immunomäärityksen rakenne on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Antigeenin määrää mittaavan immunometrisen immunomäärityksen rakenne (Wild 2013, 7. Muokattu.).

Edellä kuvatun kaltaisessa immunomäärityksessä pitoisuuden kvantitatiiviseen määrittämiseen tarvitaan lisäksi standardisuora, joka koostuu sarjasta kohdeantigeenia sisältäviä liuoksia, joiden antigeenipitoisuudet tunnetaan. Näiden kalibraattoreiksi kutsuttujen näytteiden avulla luodaan kalibraatiokäyrä, jota vasten määrittämisestä mitattava signaali saadaan muunnettua antigeenin pitoisuudeksi näytteessä. (Wild 2013, 9–10.)

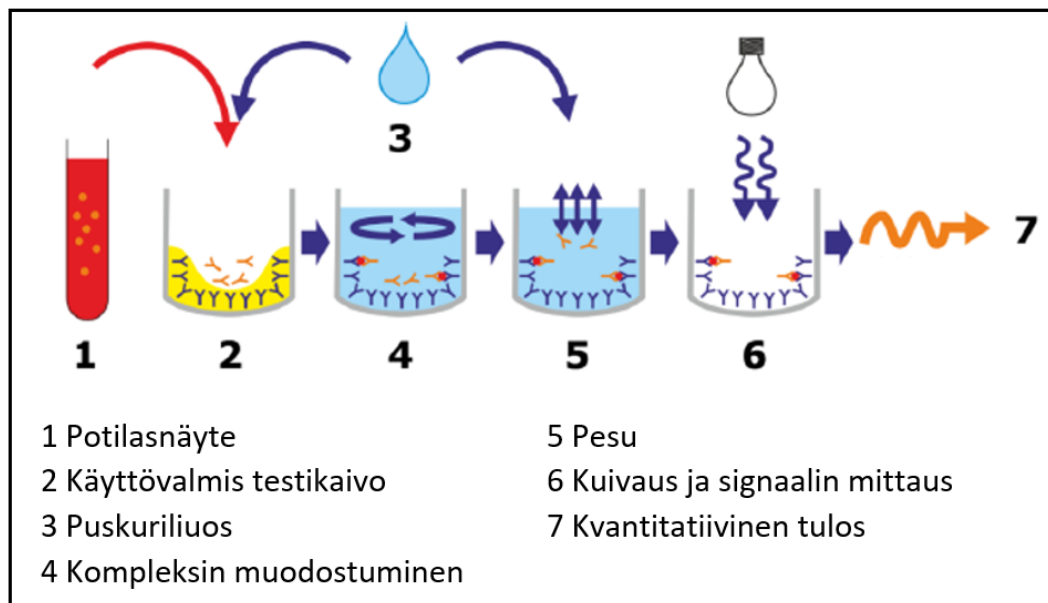
## 2.2 Immunomääritys AQT90 FLEX -immunoanalysaattorilla

AQT90 FLEX on immunoanalysaattori, jolla määritetään kliinisesti merkitsevien molekyylien pitoisuuksia potilaan kokoveri- tai plasmanäytteistä. Analysaattorilla tehtävät immunomääritykset ovat rakenteeltaan immunometrisiä immunomäärityksiä. AQT90 FLEX -immunoanalysaattori on tarkoitettu käytettäväksi vieritestauksessa ja laboratorioissa. (AQT90 FLEX Käyttöohjeet 2019, 165–167.)

AQT90 FLEX -analysaattorilla tehtävät immunomääritykset perustuvat kuivakemiaan, jossa kaikki reagenssit ovat käyttövalmiina testikaivon pinnalle kuivattuina. Testikaivojen kemia muodostuu sitojavasta-aineena toimivasta

biotinyloidusta vasta-aineesta, joka on kiinnitetty muovikupin pinnalle streptavidinikerroksen avulla, eristävistä välikerroksesta ja sen pinnalle annostellusta lantanoidikelaatilla leimatusta mitattavan antigeenin vasta-aineesta. Eristävän välikerroksen tehtävänä on estää sitoja- ja leimavasta-aineiden suora kosketus toisiinsa säilytyksen aikana. Testikaivot ovat määritys- eli analyttikohtaisia ja ne syötetään analysaattoriin joko 16 tai 8 testikaivoa sisältävän kasetin muodossa. Määrityksestä riippuen testikasetti voi sisältää testikaivojen lisäksi myös 8 tyhjää kuppia määritysprotokollaan kuuluvaa näytteen esilaimennusta varten. (AQT90 FLEX Käyttöohjeet 2019, 165–167.)

AQT90 FLEX -analysaattorilla merkkiaineita voidaan määrittää suoraan kokoverestä, joka on kerätty antikoagulanttia sisältävään näyteputkeen, tai kokoverestä erotellusta plasmasta. AQT90 FLEX -analysaattorilla näytteen analysointi tapahtuu automaattisesti näyteputken laitteeseen asettamisen ja testiparametrien valinnan jälkeen. Kun määritys on käynnistetty, analysaattori aloittaa prosessin sekoittamalla näyteputkea ensin näytekarusellissa, minkä jälkeen se irrottaa suoritettavan immunomäärityksen mukaisen testikaivon testikasetista ja siirtää sen inkubaattoriin. Analysaattori annostelee testikaivoon reagenssipakkauksesta puskuriliuosta ja tarvittavan määrän potilasnäytettä näyteputkesta. Näyteannostelua seuraa inkubointivaihe, jossa testikaivoa myös ravistellaan samanaikaisesti. Inkuboinnin aikana määrityksen sitojavasta-aineet ja leimavasta-aineet pääsevät kosketuksiin toistensa kanssa ja muodostavat sandwich-kompleksin näytteessä olevan antigeenin kanssa. Seuraavaksi testikaivosta pestään puskuriliuoksella pois ylimääräiset vasta-aineet, sitoutumattomat näytteen osat ja muu materiaali, jolloin vain sandwich-kompleksi jää testikuppiin. Lopuksi analysaattori mittaa kuivatun testikaivon pinnalta leimatun sandwich-kompleksin signaalin aikaerotteisen fluoresenssin menetelmällä. (AQT90 FLEX Käyttöohjeet 2019, 165–167.) Analysaattorin suorittaman immunomäärityksen vaiheet on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Immunomääritys AQT90 FLEX -analysointilaitteella (AQT90 FLEX Käyttöohjeet 2019, 165. Muokattu.).

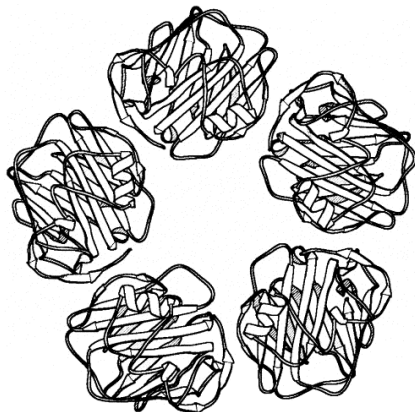
Analyytin eli mitattavan antigeenin pitoisuus näytteessä on suoraan verrannollinen mitattuun signaalitasoon. Mitattu signaali muutetaan pitoisuudeksi käyttämällä apuna tehtaalla muodostettuja kalibraatiokäyriä, joiden tiedot on tallennettu analysointilaitteen muistiin laitekohtaisen kalibraation säädön yhteydessä. Laitekohtaisen kalibraation säätöön käytetään antigeenia sisältäviä eräkohtaisia kalibraatiokasetteja. (AQT90 FLEX Käyttöohjeet 2019, 165–167.)

AQT90 FLEX -immunoanalysointilaitteella voidaan määrittää seuraavia analyyttejä: TnI, TnT, CKMB, Myo, NT-proBNP, CRP, PCT,  $\beta$ hCG ja D-dimeeri.

### 2.3 C-reaktiivinen proteiini eli CRP

C-reaktiivinen proteiini eli CRP on akuutin vaiheen proteiini, jonka määrä potilaan elimistössä kohoaa erilaisten tulehdustilojen, infektioiden ja kudonsvaurioiden seurauksena. C-reaktiivista proteiinia muodostuu pääasiassa maksan hepatosyyteissä, mutta myös esimerkiksi sileissä lihassoluissa, makrofageissa, endoteelisoluissa, lymfosyyteissä ja adiposyyteissä. Natiivi CRP-proteiini (nCRP) on rakenteeltaan polypeptidiketjuista koostuva pentameeri eli viisiosainen

rengas, jota kuitenkin esiintyy kehossa myös peruuttamattomasti CRP-monomeereiksi (mCRP) pilkkoutuneena. (Sproston & Ashworth, 2018.) CRP-molekyylin pentameerirakenne on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3. CRP-pentameeri (Volanakis 2001, 189–197).

C-reaktiivisen proteiinin tärkein biologinen tehtävä elimistössä liittyy patogeenien ja vioittuneiden solujen tunnistamiseen ja niiden eliminoimiseen aktivoimalla immuunipuolustuksen komplementtijärjestelmän ja fagosyyttien eli syöjäsolujen toiminnan (Volanakis 2001, 189–197).

C-reaktiivisen proteiinin kvantitatiivista määrittystä käytetään apuna tulehdussairauksien, bakteeri-infektioiden ja kudonsvaurioiden diagnosoinnissa. Lisäksi kohonneen CRP-pitoisuuden on havaittu toimivan vahvana viitteenä sydän- ja verisuonisairauksista oireettomilla potilailla. CRP:n pitoisuus elimistössä voi nousta myös esimerkiksi autoimmuunisairauksien, reumasairauksien, pahanlaatuisten kasvainten, trauman tai kirurgisen toimenpiteen seurauksena. Terveillä ihmisillä normaali CRP-pitoisuus seerumissa ja plasmassa on noin 1 mg/L ja tulehdustilan tai muun ärsykkeen seurauksena pitoisuus voi nousta jopa yli arvon 500 mg/L. C-reaktiivista proteiinia alkaa muodostua elimistössä 4–6 tunnin kuluttua ärsykkeen ilmenemisestä ja pitoisuuden huippuarvo saavutetaan 36–50 tunnissa. Ärsykkeen poistuttua CRP-pitoisuus laskee eksponentiaalisesti 18–20 tunnin kuluessa. (Sproston & Ashworth, 2018; Iskandar ym. 2018.)

### 3 Immunomäärityksen metrologinen jäljitettävyys

Laboratoriolääketieteessä immunomäärityksillä tutkitaan erilaisten molekyylien esiintymistä ihmisperäisissä näytteissä, ja saatuja tuloksia käytetään kliinisiin tarkoituksiin kuten sairauden diagnosointiin sekä hoitopäätösten tekemiseen. Jotta potilasnäytteelle tehtyjen analyysien tulokset olisivat kliinisesti käyttökelpoisia, tulee samasta näytteestä saatujen tulosten olla toisiaan vastaavia riippumatta siitä, missä laboratorioissa tai millä testimenetelmällä näyte on analysoitu (Sztefko 2011, 17; Caroli & Záray 2012, 67; Wild 2013, 315; SFS-EN ISO 17511:2021:en, viii.) Tulosten keskinäinen vertailukelpoisuus mahdollistaa esimerkiksi yleisten viitearvojen käytön tulosten tulkinnassa ja potilaskohtaisen pitkäaikaisseurannan lääketieteellisen hoidon tukena (SFS-EN ISO 17511:2021:en, viii.) Vertailukelpoisuuden lisäksi kyse on myös potilasturvallisuudesta, sillä esimerkiksi testimenetelmien väliset erot viitearvoissa lisäävät riskiä potilaan testitulosten virheellisestä tulkinnasta ja siitä johtuvasta väärästä diagnoosista (Sztefko 2011, 24; Wild 2013, 315).

Potilasnäytteiden analysoinnissa keskenään vertailukelpoisia tuloksia voidaan tuottaa muodostamalla katkeamaton vertailuketju potilasnäytetuloksen ja korkeimman saatavilla olevan kansainvälisesti tunnustetun referenssijärjestelmän osatekijän välille. Tätä vertailuketjua kutsutaan potilasnäytetuloksen metrologiseksi jäljitettävyudeksi. (SFS-EN ISO 17511:2021:en, viii.)

#### 3.1 Metrologisen jäljitettävyuden muodostaminen

Metrologista jäljitettävyyttä voidaan kuvata vertailuketjuna tai hierarkiana, joka muodostuu arvonsiirtoon käytetyistä referenssimateriaaleista ja referenssimenetelmistä. Kansainvälisen standardisoimisjärjestö ISO:n referenssimateriaalien termiopas määrittelee referenssimateriaalin (RM, *engl. reference material*) materiaaliksi, joka on valmistettu vastaamaan tiettyyn käyttötarkoitukseen mittausprosessissa, ja joka on riittävän homogeeninen ja

stabiili yhden tai useamman ominaisuutensa suhteen. Referenssimateriaalin käyttötarkoituksia voivat olla esimerkiksi mittausmenetelmän kalibrointi, arvonsiirto muille materiaaleille tai laadunvarmistuskontrollina toimiminen. (ISO Guide 30:2015(en) Reference materials – Selected terms and definitions 2015.) Käytännössä sana 'referenssimateriaali' voidaan nähdä yleisterminä, jonka alla referenssimateriaaleja voidaan luokitella erilaisiin alaluokkiin niiden tarkempien ominaisuuksien mukaisesti. Tällaisia alaluokkia ovat primäärinen standardi, sekundäärinen standardi ja sertifioitu referenssimateriaali. (Barwick ym. 2001, 2–3.)

Sertifioitu referenssimateriaali (CRM, *engl. certified reference material*) on referenssimateriaali, jonka ominaisuuksista yksi tai useampi on määritetty metrologisesti pätevällä menetelmällä, ja jolla on olemassa referenssimateriaalisertifikaatti, joka sisältää tiedot materiaalin kohdeominaisuuksien mitatuista arvoista, niiden mittausepävarmuudesta ja materiaalin metrologisesta jäljitettävyydestä. (ISO Guide 30:2015(en) Reference materials – Selected terms and definitions 2015.) Korkeinta olemassa olevaa referenssimateriaalia puolestaan kutsutaan primääristandardiksi ja sen arvo on yleensä määritetty primäärisellä referenssimenetelmällä tai definiitiivisellä menetelmällä. Primääristandardin arvo on yleisesti hyväksytty ilman linkitystä muihin referenssimateriaaleihin. Sekundääriseksi standardiksi kutsutaan standardia, jonka arvo on määritetty vertaamalla sitä samantasoiseen primääriseen standardiin. (Barwick ym. 2001, 2–3; ISO/IEC Guide 99:2007(en) 2007; Caroli & Záray 2012, 61.) Referenssimateriaalien hierarkia on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4. Referenssimateriaalien hierarkia. (Barwick ym. 2001, 3.)

Metrologisen jäljitettävyyden muodostamisessa käytettävät primääriset referenssimenetelmät ovat mittausten menetelmiä, joilla halutulle ominaisuudelle saadaan määritettyä arvo ilman linkitystä saman mittasuureen standardiin. Yksinkertaistettuna esimerkkinä primäärisestä referenssimenetelmästä voidaan pitää tilavuuden mittausta punnitsemalla ja tilavuuden laskemista aineen tunnetun tiheyden avulla. (ISO/IEC Guide 99:2007(en) 2007.) Primäärinen referenssimenetelmä tai definiitivinen menetelmä ovat referenssimenetelmiä, jotka mittaavat tutkittavaa analyyttiä erittäin suurella tarkkuudella varmistaen näin lopullisen potilasnäytetuloksen olevan niin lähellä todellista arvoa kuin mahdollista. (Caroli & Záray 2012, 61.) Definiitivinen menetelmä on yksin sellaisenaan tieteellisesti riittävän tarkka menetelmä referenssimateriaalin halutun ominaisuuden määrittämiseen. Tällainen menetelmä perustuu vankkaan teoreettiseen pohjaan, ja sen systemaattisen virheen tulee olla mitätön käyttötarkoitukseen suhteutettuna. Definiitivinen menetelmä yhdessä referenssimateriaalin kanssa on ensisijainen menetelmä, kun halutaan luoda jäljitettävyys mittaustuloksille. Referenssimenetelmällä saaduissa mittaustuloksissa sen sijaan voi olla pieniä, mutta tarkoin arvioituja epätarkkuuksia suhteessa käyttötarkoituksen asettamiin vaatimuksiin. Referenssimenetelmän tarkkuus todennetaan vertaamalla sitä suoraan definiitiviseen menetelmään tai primääriseen referenssimateriaaliin. (Currie 1999, 105–126.)

Immunomäärityksen metrologinen jäljitettävyys alkaa hierarkian ylimmältä askelmalta primäärisestä referenssimenetelmästä ja referenssimateriaalista eli primäärystandardista. (Caroli & Záray 2012, 68.) Käytännössä metrologisen jäljitettävyyden hierarkian korkein osatekijä määräytyy tapauskohtaisesti sen mukaan, mikä on korkein mitattavalle molekyylille saatavilla oleva referenssimittausmenetelmä ja referenssimateriaali. (SFS-EN ISO 17511:2021:en, viii.) Hierarkian toinen taso muodostuu sekundäärisestä referenssimenetelmästä ja sekundäärisestä referenssimateriaalista (sekundäärinen standardi). Seuraavalla tasolla on valmistajan master- ja tuotekalibraattorit. Alimmalla hierarkiatasolla on loppukäyttäjän suorittama rutiinimittaus ja saatu potilasnäytetulos. (Caroli & Záray 2012, 68.)

Käytännössä metrologisen jäljitettävyyden ketju on sarja peräkkäisiä standardimittauksia ja kalibrointeja, joiden avulla mittaustulos linkitetään korkeimpaan mahdolliseen referenssiin metrologisen jäljitettävyyden hierarkiassa (ISO/IEC Guide 99:2007(en) International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM) 2007; Caroli & Záray 2012, 68). Kun metrologisen jäljitettävyyden hierarkian tasoilla siirrytään alaspäin, mittausepävarmuus kasvaa. (Caroli & Záray 2012, 68.)

Metrologisen jäljitettävyyden muodostamisessa on myös omat rajoituksensa, sillä useat kliinisiin tarkoituksiin analysoitavat molekyylit ovat rakenteeltaan monimutkaisia ja voivat esiintyä elimistössä erilaisissa rakennemuodoissa, joiden esiintyvyyssuhde toisiinsa nähden ei ole vakio. Mikäli metrologisen jäljitettävyyden muodostamiseen käytettyjen mittausmenetelmien selektiivisyys ei täysin sovellu käyttötarkoitukseensa, potilasnäytteen ominaisuuksista johtuvat tekijät voivat johtaa virheellisiin tuloksiin, vaikka jäljitettävyys metrologisen hierarkian korkeimpaan referenssimateriaaliin olisikin muodostettu. (SFS-EN ISO 17511:2021:en, viii.) Lisäksi useille heterogeenisille molekyyleille ei ole lainkaan saatavilla määrityksen referenssimenetelmää, joten referenssimateriaalin pitoisuuden määrittäminen perustuu tällöin lähinnä yleiseen konsensukseen. (Sztefko 2011, 20.)

### 3.2 Immunomäärityksen kalibrointi

Immunomäärityksen metrologisen jäljitettävyyden luomiseen kuuluu prosessi, jota kutsutaan kalibroinniksi. Kalibroinnilla immunomäärityksen mitattu signaali muunnetaan pitoisuusarvoksi siten, että sen metrologinen jäljitettävyys korkeimpaan saatavilla olevaan referenssimateriaaliin säilyy. (Sztefko 2011, 27; Wild 2013, 315.)

Kalibroinnissa näytteestä mitattu signaali muutetaan pitoisuudeksi käyttämällä apuna standardisarjaa eli kalibraattoreita (Sztefko 2011, 27; Wild 2013, 315.). Uuden immunomäärityksen kalibrointiin käytetään yleensä korkeinta metrologisen jäljitettävyyden hierarkiassa saatavilla olevaa referenssimateriaalia, jonka avulla valmistetaan ensin käyttöä varten sarja standardeja, joilla puolestaan määritetään pitoisuudet rutiinikäytössä oleville kalibraattoreille. Immunomäärityksen valmistajan omat standardit toimivat ikään kuin pitoisuuden välittäjänä kansainvälisesti tunnustetun referenssimateriaalin ja tuotekalibraattorien välillä. (Wild 2013, 320–321.) Kalibraattorisarja koostuu yleensä 5–8 eritasoisesta kalibraattorista, joiden analyttipitoisuudet tunnetaan. Kalibraattorit määritetään analysaattorilla ja niistä saadun mittausdatan avulla muodostetaan kalibraatiokäyrä, jonka avulla voidaan matemaattisin menetelmin määrittää tuntemattomalle näytteelle pitoisuus. (Sztefko 2011, 27).

Nykyisin kalibraatiodata siirretään useilla immunoanalysaattoreilla kalibraattoreista analysaattorille tehtaalla luotujen kalibraatiokäyrien avulla (*engl. master calibration curves*) (Sztefko 2011, 27; Wild 2013, 321–322). Kalibraatiokäyrä muodostetaan valmistajan laboratoriossa erikseen jokaiselle testierälle ja kalibraatiodata muutetaan viivakoodiksi, jonka tiedot laitteen käyttäjä lukee analysaattorille viivakoodinlukijalla. Yleensä tällaiseen kalibrointiin kuuluu lisäksi jonkinlaiset käyttäjän erikseen ajamat kalibraattorit, joiden perusteella kalibraatiokäyrää vielä säädetään analysaattorikohtaisten erojen kompensoimiseksi. (Wild 2013, 321–322.)

### 3.3 AQT90 FLEX -analysaattorilla tehtävän immunomäärityksen kalibrointi

AQT90 FLEX -analysaattorin CRP-määritykset kalibroidaan valmistajan laboratoriossa käyttämällä 8-pisteistä kalibrointia. Kalibraatiodata toimitetaan käyttäjälle viivakoodin muodossa, jonka tiedot siirretään analysaattorille viivakoodinlukijalla. Kalibraatiodata on eräkohtainen viitekuvaaja eli kalibraatiokäyrä, jonka käyttäjä säätää analysaattorikohtaiselle signaalitasolle kalibroimalla analysaattorin testieräkohtaisella kalibraatiokasetilla. Kalibraation säädöllä varmistetaan mittaustulosten tarkkuus ja luotettavuus. (CRP-testaussarjan kitti-insertti, 38–41.)

Kalibraatiokaivot ovat AQT90 FLEX -analysaattorin laitekohtaisen signaalitason säätöön tarvittavia materiaaleja. CRP-immunomäärityksen kalibraatiokaivot ovat osa kalibraatiokasettia, joka koostuu kahdeksasta CRP-antigeenia sisältävästä kalibraatiokaivosta ja kahdeksasta analyttikohtaisesta taustakupista. Kalibraatiokaivot sisältävät analyttikohtaisesti määritellyn, tunnetun pitoisuuden antigeenia. Muita tärkeimpiä ainesosia kalibraatiokaivossa ovat CRP-analyytin sitojavasta-aine ja leimattu vasta-aine. (CRP-testaussarjan kitti-insertti, 38–41.)

### 3.4 Analyytti referenssimateriaaleissa

Immunomäärityksen toimivan metrologisen jäljitettävyyden ja kalibroinnin aikaansaamiseksi eri hierarkiatasojen referenssimateriaalien komponenttien valintaan on kiinnitettävä erityistä huomiota. Pyrkimyksenä on, että referenssimateriaalin mitattavat molekyylit olisivat identtisiä biologisen näytteen sisältämän analyytin kanssa kemialliselta ja fysikaaliselta koostumukseltaan, ominaisuuksiltaan ja heterogeenisuudeltaan. Tämän lisäksi referenssinä käytettävien analyttimolekyylien epitooppien eli immunomäärityksessä käytettyjen sitoja- ja leimavasta-aineiden tunnistuskohtien tulisi olla identtisiä potilasnäytteen analyttimolekyylin kanssa. Koska immunokemiallisia menetelmiä voidaan hyödyntää laajalti hyvin erilaisten analyyttien mittaamiseen pienistä ja kemiallisesti yksinkertaisista molekyyleistä monimutkaisempiin,

heterogeenisiin makromolekyyleihin, voi toimivan standardisoinnin toteuttaminen olla haasteellista tai joskus jopa lähes mahdotonta. (Sztefko 2011, 17.)

Molekyylipainoltaan suurten analyttien kuten proteiinien primäärisenä referenssimateriaalina eli primääristandardina käytettävää materiaalia voidaan tuottaa joko puhdistamalla sitä biologisesta materiaalista, kuten kudoksista tai seerumista, tai valmistamalla sitä rekombinantti-DNA-tekniikkaa hyödyntämällä. Toimivan referenssimateriaalin valmistamisessa haasteita saattaa kuitenkin tuottaa proteiinien luontaisesti heterogeeninen ja täten vaikeasti määriteltävä rakenne. Biologisesta materiaalista puhdistettujen proteiinien kohdalla ongelmia voi seurata itse puhdistusprosessista, joka saattaa aiheuttaa analytille rakennemuutoksia ja joskus jopa kontaminoida näytteen. Lisäksi mikäli proteiinia esiintyy luontaisesti useassa eri molekyyli muodossa, ei rekombinantti-DNA-tekniikalla tuotettujen tai biologisesta materiaalista puhdistettujen proteiinien molekyyli rakenne välttämättä muistuta täysin proteiinin luontaista esiintymismuotoa, ja niiden antigeeniaktiivisuus voi poiketa toisistaan. Elimistössä luontaisesti esiintyvien proteiinien eri muotojen suhde voi myös merkittävästi vaihdella eri yksilöiden välillä ja jopa saman yksilön kohdalla esimerkiksi sairauden aikana. Seurauksena molekyylien luontaisesta heterogeenisuudesta ja rakenteellisista eroista puhdistetut, rekombinantit ja luonnollisessa muodossaan rutiininäytteessä esiintyvät natiivit proteiinit voivat käyttäytyä eri tavoin jopa samaa vasta-ainetta sisältävissä immunomäärityksissä. (Sztefko 2011, 18.)

### 3.5 Referenssimateriaalien matriisi

Standardeissa ja kalibraattoreissa käytettävän analyttimateriaalin lisäksi referenssimateriaalin matriisi tulee valita huolellisesti. Potilasnäytteen tuloksille voidaan luotettavasti saavuttaa metrologinen jäljitettävyyys vain, kun määritettävä analytti käyttäytyy samoin sekä standardimatriisissa, kalibraattorimatriisissa että potilasnäytteessä (Sztefko 2011, 29). Tarkoitukseen soveltuvalla matriisillä voidaan asettaa erityisesti seuraavat kaksi vaatimusta: matriisilla ei saa esiintyä eräkohtaista vaihtelua ja sen tulee käyttäytyä taustavaikutukseltaan identtisesti

potilasnäytematriisiin verrattuna. Käytännön toteutuksen kannalta nämä vaatimukset voivat helposti olla keskenään ristiriidassa. Eräkohtaisen vaihtelun poistamiseksi ihanteellinen matriisi standardeille ja kalibraattoreille olisi esimerkiksi naudan seerumin albumiinia (BSA) sisältävä puskuriliuos, mutta sen koostumus ei kuitenkaan ole täysin potilasnäytematriisia vastaava. Toisaalta esimerkiksi potilasnäytematriisia paremmin vastaavalla seerumilla voi todennäköisemmin esiintyä eräkohtaista vaihtelua. Lisäksi seerumin tai plasman kanssa ongelmaksi voi muodostua kalibraattorisarjaan kuuluvan, analyyttia sisältämättömän kalibraattoritason valmistus, sillä useita analyytteja esiintyy jo luontaisesti ihmisen normaaliseerumissa. (Wild 2013, 321–322.)

Matriisivaikutusta tarkasteltaessa on hyvä huomioida, että immunomäärityksessä tapahtuvaan vasta-aineen ja antigeenin väliseen reaktioon vaikuttavat monet tekijät, kuten esimerkiksi pH, ionivahvuus ja erilaisten proteiinien kuten immunoglobuliinien tai autovasta-aineiden esiintyminen näytteessä. Lisäksi lopulliseen tulokseen vaikuttaa myös mahdollinen interferenssi, jonka lähteet potilasnäytteessä ovat aina tapauskohtaisia. (Sztefko 2011, 29.)

### 3.6 Radiometer Turku Oy:n standardit

Radiometer Turku Oy:n standardit ovat sarja ennalta määritettyihin antigeenipitoisuuksiin valmistettuja puskuriliuos pohjaisia näytteitä. Standardien avulla immunomäärityksen oikea tulostaso saadaan siirrettyä metrologisen jäljitettävyyden ketjussa alemmille hierarkiatasoille. Radiometer Turku Oy:ssä on käytössä kahden hierarkiataason standardeja, joita ovat master-standardit ja työstandardit. Master-standardit toimivat pitoisuuden välittäjänä metrologisen jäljitettävyyden hierarkiassa korkeimman saatavilla olevan referenssimateriaalin ja kalibraattorien eli työstandardien välillä. Työstandardeja käytetään tehtaalla määritettävän testieräkohtaisen kalibraatiokäyrän luomiseen. Viivakoodimuotoon muutettua kalibraatiokäyrää käytetään AQT90 FLEX -immunoanalysaattorin kalibrointiin oikeaan tulostasoon.

CRP-työstandardisarja koostuu seitsemästä eritasoisesta näytteestä, joiden pitoisuudet kattavat koko CRP-määrityksen mitta-alueen (tasot B–H). CRP-määrityksen mitta-alue eli pitoisuusalue, jolle sijoittuvalle näytteelle AQT90 FLEX -immunoanalysaattori antaa tuloksena numeroarvon on 5,0–500 mg/L. Matalin työstandardeista sijoittuu tasoltaan alle mitta-alueen ja korkein työstandardi määrityksen mitta-alueen yläpuolelle. Lisäksi standardisarjaan kuuluu yksi taustan tasoinen näyte (taso A).

### 3.7 Kontrollimateriaalit

Laboratoriotulosten mittausepävarmuuteen ja analyttiseen vaihteluun vaikuttavat monet tekijät, kuten esimerkiksi kalibrointi, reagenssien stabiilisuus ja eräkohtaiset vaihtelut reagensseissa ja kalibraattoreissa. Kontrollimateriaalit ovat materiaaleja, joilla tätä mittausepävarmuutta voidaan hallita. (Caroli & Záray 2012, 59.)

Kontrollimateriaaleja mitataan tavallisesti potilasnäytemääritysten yhteydessä, mutta niitä voidaan käyttää myös sisäisen laadunvarmistuksen toimenpiteenä muissa yhteyksissä. Mitattavan analyytin pitoisuudet kontrollimateriaaleissa on ennalta määritetty, joten kontrollimäärityksen poikkeava tulos kertoo mahdollisesta virheestä analyttisessä prosessissa. Kontrollimateriaaleja tulisi olla saatavilla kattavasti mitta-alueen eri pitoisuuksissa, esimerkiksi matalan, keskitason ja korkean pitoisuuden kontrollitasoina. (Caroli & Záray 2012, 62–63.)

Kontrollimateriaalit voidaan valmistaa biologisista tai synteettisistä komponenteista niin matriisin kuin analyytinkin osalta, mutta kuten kalibraattorien kohdalla, myös kontrollimateriaalien samankaltaisuuteen potilasnäytteen kanssa tulisi kiinnittää huomiota matriisivaikutuksen välttämiseksi. (Caroli & Záray 2012, 62–63.)

Kontrollimateriaaleja käytetään esimerkiksi analysaattorin, kalibraation ja reagenssien oikean toiminnan seuraamiseen, analyttisen prosessin virheiden havaitsemiseen, analyttisen tarkkuuden todentamiseen ja reagenssien ja kalibraattorien eräkohtaisen vaihtelun havaitsemiseen. Kontrollimateriaaleja tulisi

määrittää erityisesti virhealttiissa ja kriittisissä vaiheissa, kuten kalibraation tai analysaattorin huollon jälkeen. (Caroli & Záray 2012, 62–63.)

### 3.8 Radiometer Turku Oy:n kontrollit

Radiometer Turku Oy:n sisäiset kontrollit ovat kolmetasoinen näytesarja, jota käytetään tehtaalla luodun testieräkohtaisen kalibraatioviivakoodin oikeellisuuden varmentamiseen. Kontrolleja on saatavilla kolmessa eri tasossa, jotka ovat LOW, MED ja HIGH. Näytetasojen pitoisuudet ovat noin 10 mg/L, 50 mg/L ja 300 mg/L.

## 4 Tutkimusmenetelmät ja materiaalit

Tutkimuksen kohteena oli kolme kaupallista CRP-antigeenia ja lisäksi antigeenin lähteenä käytettiin useista kaupallisista potilasnäytteistä koottua yhdistelmäateriaalia, joka sisälsi korkean pitoisuuden natiivia CRP-antigeenia. Antigeenien lisäksi olennaisia materiaaleja tutkimuksessa olivat erilaiset näytematriisit, kuten puskuriliuos, plasma ja seerumi.

Tutkimusmenetelmien osalta tehty tutkimus oli kaksiosainen. Antigeenien soveltuvuutta standardeihin ja kontroleihin selvitettiin erilaisin stabiilisuustestein sekä mekaanisen rasituksen kestoja, lineaarisuutta ja antigeenin mittalaittekohtaista siirtymää tutkimalla. Kalibraatiokasetteja varten antigeeneja tutkittiin kalibraatioliuoksessa, ja lisäksi valmistettiin kuivakemiaa sisältäviä kalibraatiokaivoja, joista tutkittiin homogeenisuutta ja signaalijakaumaa.

### 4.1 Antigeenit

Tutkimuksen kohteena oli kolme eri CRP-antigeenia, joita kutsutaan tässä opinnäytetyössä numeroin 1, 2 ja 3. Kaikki kolme antigeenia tulivat eri toimittajilta.

Antigeeni 1 oli alkuperältään rekombinantti eli tuotettu rekombinantti-DNA-tekniikan avulla. Tutkimuksen alkuvaiheessa käytetty antigeeni oli valmistajallaan vielä tuotekehitysvaiheessa oleva tuote. Tämä antigeeni oli kylmäkuivattu ja sen säilytyslämpötila oli  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ennen käyttöä kylmäkuivattu antigeeni liuotettiin laboratoriolaatuiseen veteen (CLRW), jolloin käyttöliuoksen CRP-pitoisuus oli noin 1000 mg/L. Myöhemmin tutkimuksen aikana valmistajalta saatiin myös tuotanto-olosuhteissa valmistettua antigeenia. Tämä antigeeni oli nestemäisessä muodossa puskuriliuoksessa, jonka antigeenipitoisuus oli noin 4000 mg/L. Käytettävissä oli antigeenia kahdesta eri tuotantoerästä.

Antigeeni 2 oli tuotettu ihmisperäisestä lähteestä puhdistamalla. Tuote toimitettiin puskuriliuoksessa noin pitoisuudessa 3000 mg/L. Käytettävissä oli antigeenia kolmesta eri tuotantoerästä.

Antigeeni 3 oli myös tuotettu ihmisperäisestä lähteestä puhdistamalla. Se toimitettiin puskuriliuoksessa pitoisuudessa 2000–3000 mg/L. Käytettävissä oli antigeenia neljästä eri tuotantoerästä.

Tutkimus aloitettiin antigeeneilla 1 ja 2, joten niiden osalta oli mahdollista tehdä kattavampi testaus kuin antigeenin 3 osalta, joka saatiin testattavaksi vasta myöhemmässä vaiheessa tutkimusta. Kaikkien antigeenien osalta tutkimusta oli kuitenkin tarvittaessa mahdollista jatkaa toimeksiantajayrityksessä vielä opinnäytetyön jälkeen.

Edellä mainittujen antigeenien 1, 2 ja 3 lisäksi tutkimuksessa käytettiin CRP-antigeenia sisältäviä, kaupallisesti saatavilla olevia LiHep-plasmapohjaisia potilasnäytteitä. Tutkimusta varten 22 potilasnäytettä sentrifugoitiin ja yhdistettiin potilasnäytemateriaaliksi, jota käytettiin aluksi sellaisenaan ja myöhemmin suodatettuna 0,2 µm seerumisuodattimella (Serum Acrodisc 0.2 µm, Pall Corporation). Jälkimmäinen tapa on käytössä tuotannon kontrollivalmistuksessa, joten tutkimuksessa potilasnäytemateriaali käsiteltiin ensimmäisiä testejä lukuun ottamatta tuotannon prosessien kanssa yhtenevällä tavalla. Useista näytteistä kootun potilasnäytemateriaalin CRP-pitoisuus oli noin 300 mg/L, ja sen soveltuvuutta tutkittiin ainoastaan pitoisuudeltaan matalimpaan kontrollitasoon.

Teoriassa potilasnäytteistä peräisin olevaa antigeenia voisi pitää parhaana vaihtoehtona korvaavaksi antigeeniksi standardeihin ja kontrolleihin sen mahdollisimman identtisten ominaisuuksien suhteen verrattuna loppukäyttäjän määrittämään potilasnäytteeseen. Käytännössä korkean pitoisuuden potilasnäytettä ei kuitenkaan ole sen määrällisesti suuren tarpeen ja rajallisen saatavuuden vuoksi mahdollista käyttää kaikkien standarditasojen ja kontrollien valmistukseen. Osa standarditasoista on myös pitoisuudeltaan korkeampia kuin pelkkä laimentamaton potilasnäytemateriaali. Näiden tekijöiden vuoksi uudeksi antigeeniksi CRP-standardeihin ja kontrolleihin sekä kalibraatiokasetteihin tutkittiin ensisijaisesti kaupallisesti saatavilla olevia rekombinantti-DNA-tekniikalla ja biologisesta materiaalista puhdistamalla tuotettuja antigeeneja. Potilasnäytemateriaalia olisi mahdollista käyttää lähinnä matalimman

kontrollitason valmistukseen, mikäli kontrolleihin halutaan mukaan potilasnäytettä mahdollisimman identtisesti vastaava antigeenimateriaali.

#### 4.2 Matriisit

Testeissä käytetyt matriisit olivat standardien osalta puskuriliuos ja kontrollien osalta litiumhepariinilla käsitelty normaaliplasma, EDTA:lla käsitelty normaaliplasma sekä normaaliseerumi. Standardien matriisina käytetään naudan seerumin albumiinia (BSA) sisältävää puskuriliuosta sen vähäisen eräkohtaisen vaihtelun vuoksi. Kontrollimatriisiksi puolestaan halutaan ensisijaisesti potilasnäytematriisia paremmin vastaava vaihtoehto, kuten plasma tai seerumi, joissa antigeeneja tutkitaan mahdollisen matriisivaikutuksen selvittämiseksi.

Testeissä käytetty puskuriliuos valmistettiin itse tutkimusta varten Radiometer Turku Oy:n tuotekehityslaboratoriossa. Naudan seerumin albumiinia (BSA) sisältävän puskuriliuoksen pH oli noin 7,75.

Käytetyt plasmamatriisit olivat litiumhepariinilla käsitelty, usealta luovuttajalta kerätty normaaliplasma eli LiHep-plasma ja EDTA:lla (etyleenidiamiini-tetraetikkahappo) käsitelty, usealta luovuttajalta kerätty normaaliplasma eli EDTA-plasma. Kummallakin antikoagulantilla käsiteltyä plasmaa oli käytössä valmistajan kolmesta eri tuotantoerästä. Kaikki käytetyt plasmat suodatettiin ennen käyttöä (AcroPak 500 0.8/0.45 µm, Pall Corporation).

Testeissä seerumina käytettiin kahta eri seerumituotetta. Toisesta oli poistettu lipidit ja toisesta lipidejä ei ollut poistettu. Yhteensä käytössä oli viisi eri seerumia valmistajan eri tuotantoeristä. Kaikki seerumit suodatettiin ennen käyttöä seerumisuodattimella (Serum Acrodisc 0.2 µm, Pall Corporation).

Kalibraatiokasetteja varten tehdyissä testeissä matriisina käytettävä liuos oli nykyisissäkin CRP-kalibraatiokaivoissa käytettävä välikerrosliuos. Kyseessä on puskuriliuos, joka sisältää immunomäärityksen toiminnan kannalta olennaisia komponentteja, ja johon lisättyä antigeeni annostellaan sitojavasta-aineella päällystettyihin kuppeihin kalibraatiokaivojen valmistusprosessissa.

Testauksissa käytetty välikerrosliuos oli valmistettu Radiometer Turku Oy:n tuotannossa.

### 4.3 Tutkimusmenetelmät

Tutkimus koostui kahdesta erilaisia testejä sisältävästä osasta, sillä vaihdettavaa CRP-antigeenia käytetään standardien ja kontrollien valmistuksessa sekä CRP-immunomäärityksen kalibraatiokaseteissa. Kumpikin näistä käyttötarkoituksista asettaa antigeenille omanlaisensa vaatimukset.

#### 4.3.1 Standardit ja kontrollit

Tutkimuksen kohteena olevien antigeenien soveltuvuutta CRP-standardeihin ja kontroleihin selvitettiin testaamalla antigeenien stabiilisuutta eri matriiseissa, antigeenien mekaanisen rasituksen kestoa, antigeenilaimennosten lineaarisuutta, antigeenien mittalaitekohtaista siirtymää (*engl. carry-over*) sekä analysaattorin sisäisen puhdistustoimenpiteen vaikutusta sen jälkeen ajettuihin antigeeninäytteisiin. Erilaisilla testeillä oli tarkoitus hankkia tietoa antigeenien käyttökelpoisuudesta standardeissa ja kontroleissa, mihin kuuluivat myös tutkittaville antigeeneille sopivat käsittelyolosuhteet, säilyvyysajat ja mahdolliset erityisohjeet, joita antigeenien käyttö tuotannon prosesseissa vaatisi.

### **Valmistusprosessin aikainen stabiilisuus**

Valmistusprosessin aikaisen stabiilisuuden (*engl. in-process stability*) testauksen tarkoituksena oli selvittää, kuinka kauan antigeeni säilyy stabiilina standardien ja kontrollien valmistusprosessin asettamissa vaatimuksissa. Käytännössä tämä tarkoittaa, että antigeenipitoisuuden tulee säilyä näytteessä ajan, joka kuluu standardi- tai kontrollitason pitoisuuden määrittämisestä AQT90 FLEX -analysaattorilla siihen asti, kunnes liuos on annosteltu lasiputkiin ja siirretty  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :seen esipakastukseen. Antigeenin on säilyttävä stabiilina vähintään 1000 näyteputken valmistukseen tarvittavan ajan.

Standardeja varten antigeeneista 1, 2 ja 3 valmistettiin näytteet puskuriliuokseen ja kontrolleja varten matriisina testattiin LiHep-plasmaa, EDTA-plasmaa ja seerumia. Antigeenien lisäksi kontrolleja varten testattiin korkean CRP-pitoisuuden potilasnäyttemateriaalia, josta valmistettiin näytteet LiHep-plasmaan. Testeihin sisällytettiin sekä matalan (10–30 mg/L) että korkean (noin 100 mg/L) antigeenipitoisuuden näytteitä, jotta havaittaisiin mahdollinen matriisivaikutus eri pitoisuuksissa. Testeissä valmistettiin rinnakkaisia näytteitä 2–3 eri antigeenierästä. Lisäksi matriiseina käytettiin 3–5 eri plasma- tai seerumierää mahdollisen matriisierien välisen vaihtelun vaikutuksen havaitsemiseksi. Standardeja ja kontrolleja varten testattujen antigeenien ja matriisien yhdistelmät on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Testatut antigeenien ja matriisien yhdistelmät.

Käyttötarkoitus	Testattu antigeeni ja matriisi
Standardit	Antigeeni 1 puskuriliuoksessa Antigeeni 2 puskuriliuoksessa Antigeeni 3 puskuriliuoksessa
Kontrollit	Antigeeni 1 LiHep-plasmassa Antigeeni 1 EDTA-plasmassa Antigeeni 1 seerumissa Antigeeni 2 LiHep-plasmassa Antigeeni 2 EDTA-plasmassa Antigeeni 2 seerumissa Antigeeni 3 LiHep-plasmassa Antigeeni 3 EDTA-plasmassa Antigeeni 3 seerumissa Potilasnäyteantigeeni LiHep-plasmassa Potilasnäyteantigeeni seerumissa

Valmistetut näytteet jaettiin lasiputkiin, ja näytteiden pitoisuudet määritettiin eri aikapisteissä AQT90 FLEX -analysaattorilla käyttäen CRP-testikasetteja. Referenssipitoisuudet määritettiin heti näytevalmistuksen jälkeen. Loput

näyteputket säilytettiin huoneenlämmössä ja niistä määritettiin valituissa aikapisteissä testikohtaisesti joko 5 tai 10 rinnakkaista näytettä. Puskurinäytteille tehtiin valmistusprosessin aikaisen stabiilisuuden testausta 7 vuorokauden aikapisteeseen asti, koska standardien valmistusprosessissa käytettävien antigeeniapulaimeiden halutaan mielellään olevan käyttökelpoisia koko seitsemän standarditason valmistusprosessin ajan. Plasma- ja seerumimatriiseissa valmistusprosessin aikaista stabiilisuutta testattiin 24 tuntiin asti, koska kontrollien valmistusprosessissa kaikki näytetasot valmistetaan yhden työpäivän aikana.

### **Käyttöstabiilisuus ja pakastus-sulatussyklin vaikutus**

Käyttöstabiilisuuden (*engl. in-use stability*) testauksessa tutkittiin antigeeneista valmistettujen näytteiden käyttöaikaa standardien ja kontrollien käyttöolosuhteissa eli pakastuksen ja sulatuksen jälkeen. Lisäksi tutkittiin pakastus-sulatussyklin vaikutusta antigeeninäytteiden pitoisuuksiin, jotta saatiin selville mahdollinen tarve kompensoida pitoisuuden laskua valmistamalla näytteet haluttua korkeampaan pitoisuuteen. Vaatimus antigeenien pakastuksen ja sulatuksen kestolle tulee standardien ja kontrollien valmistusprosessista, johon kuuluu valmiiden näyteputkien esipakastaminen  $-20\text{ °C}$ :ssa ja pitkäaikaissäilytys  $-70\text{ °C}$ :ssa, josta näyteputkia sulatetaan käyttöä varten. Sulaneiden näytteiden tulisi säilyä stabiileina jääkaappilämpötilassa vähintään 1,5 tuntia pakastimesta ottamisen jälkeen.

Antigeeninäytteet valmistettiin eri matriiseihin kuten edellä valmistusprosessin aikaisen stabiilisuuden testauksessa (taulukko 1), eli standardeja varten näytteet valmistettiin puskuriliuokseen ja kontrolleja varten LiHep- ja EDTA-plasmoihin ja seerumiin. Potilasnäyttemateriaalista valmistettiin näytteet LiHep-plasmaan ja seerumiin. Rinnakkaisia näytteitä valmistettiin kuhunkin testattuun matriisiin 1–3 eri tuotantoerästä ja käyttäen antigeeneja 2–3 eri tuotantoerästä. Näytteiden pitoisuudet olivat 10–20 mg/L ja noin 100 mg/L.

Referenssimääritykset tehtiin pakastamattomilla näytteillä heti niiden valmistuksen jälkeen. Loput näyteputket esipakastettiin  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa ja pakastuneet putket siirrettiin  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ :seen. Testipäivänä näytteet sulatettiin huoneenlämmössä vesihauteessa, minkä jälkeen näytteiden säilytys jatkui huoneenlämmössä ennalta määriteltyihin aikapisteisiin asti, jolloin uusi näyteputki laitettiin määritykseen AQT90 FLEX -analysaattoriin. Kussakin aikapisteessä määritettiin testikohtaisesti joko 5 tai 10 rinnakkaista näytettä. Aikapisteitä mitattiin matriisista riippumatta 24 tuntiin asti, sillä sulaneiden näytteiden maksimikäyttöajan oletettiin olevan korkeintaan saman työpäivän sisällä.

### **Mekaanisen rasituksen kesto**

Antigeenien mekaanista rasitusta tutkittiin alustavasti standardien ja kontrollien valmistusprosessia varten. Standardi- ja kontrollivalmistuksessa antigeeni lisätään valittuun matriisiin astiassa, sekoitetaan magneettisekoittajalla tai tasosekoittajalla, ja sen tulee sekoittua homogeeniseksi ennen lasiputkiin annostelua. Tuotantovaiheessa valmistettavan liuoksen tilavuus tulee olemaan noin 750 mL. Suuren materiaalikulutuksen vuoksi sekoitustestausta kyseisellä liuostilavuudella ei sisällytetty vielä tähän tutkimusvaiheeseen, vaan antigeenien mekaanisen rasituksen kestoa päätettiin selvittää alustavasti vorteksoimalla näyteputkia.

Mekaanisen rasituksen testaus tehtiin valmistamalla kaikista kolmesta antigeenista näytteet puskuriliuokseen ja potilasnäyttemateriaalista seerumiin ja LiHep-plasmaan. Lasiputkiin annosteltuja näytteitä vorteksoitiin joko 10 tai 30 sekuntia ennen pitoisuusmääritystä. Käytetty vortex oli MS2 Minishaker (IKA Works, Inc.) ja sekoitusasetus 1400/min. Referenssiputkia ei vorteksoitu. Näytteiden pitoisuudet määritettiin AQT90 FLEX -analysaattorilla CRP-testikaseteilla.

## Lineaarisuus

Lineaarisuustestauksen tarkoituksena oli selvittää antigeenien laimentumisen lineaarisuutta pitoisuussarjalla. Tietoa antigeenien laimennuslineaarisuudesta tarvitaan standardien valmistuksessa, kun antigeenin avulla valmistetaan näytteitä eri pitoisuuksiin lähtien mitta-alueen alarajoilta ylärajoille asti (5–500 mg/L).

Lineaarisuustestaus tehtiin valmistamalla ensin antigeenista korkea näyte puskuriliuokseen noin pitoisuuteen 490 mg/L. Tästä korkeasta antigeeninäytteestä ja puskuriliuoksesta valmistettiin sitten seitsemästä näytepitoisuudesta koostuva, koko CRP:n mitta-alueen kattava näytesarja yhdistämällä liuoksia ennalta määritellyissä suhteissa. Nämä seitsemän eritasoista lineaarisuusnäytettä jaettiin lasiputkiin ja pitoisuudet määritettiin AQT90 FLEX -analysointilaitteella 5 rinnakkaisella CRP-testillä per näyte. Saatuja määrittelytuloksia verrattiin näytteiden laskennallisiin pitoisuuksiin lineaarisuuden selvittämiseksi.

## Antigeenin siirtymä ja neulanpuhdistuksen vaikutus

Antigeenien mittalaittekohtaista siirtymää (*engl. carry-over*) tutkimalla pyrittiin selvittämään, siirtyykö AQT90 FLEX -analysointilaitteesta ajatusta antigeenia sisältävästä korkeasta näytteestä antigeenia seuraavaan, heti edellisen perään ajettuun näytteeseen. Antigeenin siirtymä seuraavaan näytteeseen aiheuttaisi virheellisiä tuloksia, ja mikäli siirtymää ilmenee, voitaisiin ottaa käyttöön AQT90 FLEX -analysointilaitteelle erikseen määriteltävä neulan puhdistusprotokolla korkean CRP-pitoisuuden näytteiden ajamisen jälkeen.

Antigeenin siirtymää testattiin valmistamalla ensin antigeeneista korkean pitoisuuden (300 mg/L, kontrollitason HIGH pitoisuus) näytteet LiHep-plasmaan, EDTA-plasmaan ja seerumiin. Puskuriliuokseen näytteet valmistettiin pitoisuuteen 500 mg/L, jotta näytepitoisuus oli mahdollisimman lähellä korkeinta CRP-standarditason pitoisuutta sijoittuen kuitenkin vielä CRP-

immunomäärityksen mitta-alueelle. Näitä näytteitä määritettiin AQT90 FLEX -analysaattorilla peräkkäin antigeenia sisältämättömien puskurinäytteiden kanssa, jolloin puskurinäytteissä havaittaisiin mahdollinen antigeenin siirtymä. Antigeeneilla 1 ja 2 testit tehtiin kaikissa mainituissa matriiseissa, mutta antigeenilla 3 toistaiseksi vain puskurissa ja seerumissa. Antigeeni 3:n siirtymää LiHep-plasmassa ja EDTA-plasmassa on tarkoitus testata vielä myöhemmin.

Neulanpuhdistus on AQT90 FLEX -analysaattorille käyttöohjeen mukaan säännöllisin väliajoin suoritettava rutiinitoimenpide. Testeissä tutkittiin neulanpuhdistuksen vaikutusta sen jälkeen ajettuihin matalan ja korkean antigeenipitoisuuden näytteisiin. Näytteet valmistettiin puskuriliuokseen, LiHep-plasmaan, EDTA-plasmaan ja seerumiin. Referenssinäytteiden pitoisuusmääritykset tehtiin ennen neulanpuhdistustoimenpidettä ja testinäytteet määritettiin sen jälkeen, jolloin voitiin havaita mahdollinen puhdistusprotokollan vaikutus sitä seuraavaan näytteeseen.

#### 4.3.2 Kalibraatiokaivot

Tutkittavista antigeeneista vaihtoehdoille 1 ja 2 tehtiin testausta niiden soveltuvuudesta CRP-kalibraatiokaivojen valmistukseen. Antigeeni 3 ei ollut alusta asti tutkimuksessa käytettävissä, joten se jäi vielä tässä vaiheessa kalibraatiokaivoja varten tehtävien testausten ulkopuolelle. Toimeksiantajayrityksessä on kuitenkin vielä myöhemmin mahdollista testata myös antigeeni 3:n soveltuvuutta kalibraatiokaivoihin.

Antigeenien 1 ja 2 soveltuvuutta CRP-kalibraatiokaivoihin tutkittiin testaamalla antigeenien stabiilisuutta kalibraatiokaivoissa käytettävässä välikerrosliuoksessa. Lisäksi antigeenia sisältävälle välikerrokselle eli kalibraatioliuokselle tehtiin sekoitustestausta, ja kalibraatioliuoksesta valmistettiin kuivakemiaa sisältäviä kalibraatiokaivoja CRP-testien tuotantoerän yhteydessä. Kalibraatiokaivoille puolestaan tehtiin homogeenisuustestausta levymuodossa. Valmiita kalibraatiokaivoja pakattiin myös kaseteiksi analysaattorilla määrittämistä varten, ja kaseteista tutkittiin kalibraatiokaivojen signaalijakauman

muotoa kaivon pohjan pinta-alan suhteen ja sen samankaltaisuutta testikaivojen signaalijakaumaan verrattuna.

### **Kalibraatioliuoksen stabiilisuus**

Antigeenin stabiilisuutta testattiin puskuriliuoksessa, johon lisättyä antigeeniannostellaan sitojavasta-aineella päällystettyihin kaivoihin CRP-immunomäärityskaivojen valmistusprosessissa. Käytettävä liuos on nimeltään välikerrosliuos, jota kutsutaan antigeenilisäyksen jälkeen kalibraatioliuokseksi. Kalibraatioliuos valmistetaan tavallisesti tuotannon aamuvuoron aikana ja liuoksen annostelu suoritetaan viimeistään iltavuoron loppupuolella, joten valmis kalibraatioliuos voi joutua odottamaan kaivoihin annostelua useita tunteja. Tämän odotusajan liuoksen pitoisuuden tulisi säilyä ennalta määritellyissä rajoissa. Lisäksi valmiiden kalibraatiokaivojen tasalaatuisuuden kannalta on erityisen tärkeää, että kalibraatioliuos säilyy stabiilina koko erän kalibraatiolevyjen annosteluvaiheen ajan. Tällä hetkellä CRP-kalibraatiolevyjen maksimieräkoon mukainen annostelu-aika tuotannon kalibraatioannostelijalla on noin 3 tuntia. Valmistusprosessin kannalta ensisijainen vaihtoehto olisi kalibraatioliuoksen säilytys huoneenlämmössä, mutta myös kylmäsäilytys odotusaikoina ja jäähauteen käyttö annostelun aikana on mahdollista.

Kalibraatioliuoksen stabiilisuutta testattiin valmistamalla antigeeneista 1 ja 2 näytteet välikerrosliuokseen. Näytteiden pitoisuus oli 0,03 mg/L, joka on myös nykyprosessin mukainen antigeenin pitoisuus CRP-kalibraatioliuoksessa. Referenssinäytteet määritettiin heti valmistuksen jälkeen AQT90 FLEX -analysaattorilla, ja loput näyteputket säilytettiin huoneenlämmössä ennen pitoisuusmäärittystä. Loput määrittäykset tehtiin yhden tunnin välein 5 tunnin aikapisteeseen asti. Analysaattorin CRP-määrittäyksen mitta-alueen alle sijoittuvan näyteenpitoisuuden vuoksi jokaisesta näytteestä tehtiin 10 rinnakkaista määrittäystä tulosten luotettavuuden lisäämiseksi. Näytteiden hyvin matalan antigeenipitoisuuden takia mittaukset tehtiin lisäksi analysaattorin WithOutDilution-asetuksilla (WOD) eli ilman normaaliin testiprotokollaan kuuluvaa näytteen esilaimennusvaihetta.

## **Kalibraatioliuoksen sekoitustestaus**

Kalibraatiokaivoja valmistettaessa tuotannossa maksimikokoiseen erään tarvittavan kalibraatioliuoksen tilavuus on noin 1120 mL. Kalibraatioliuoksen tavoitepitoisuus on 0,03 mg/L. Sekoitustestauksella selvitettiin kalibraatioliuokselle sopivaa sekoitusmenetelmää ja riittävää sekoitusaikaa, jonka jälkeen antigeeni on tasaisesti sekoittunut välikerrosliuokseen.

Kalibraatioliuoksen sekoitustestauksessa valmistettiin antigeeneista 1 ja 2 kalibraatioliuokset välikerrosliuokseen pitoisuuteen 0,03 mg/L. Liuostilavuus oli kummastakin antigeenista valmistetulla liuksella tuotannon maksimieräkoon mukainen. Liuokset valmistettiin tilavuudeltaan 2 litran dekanttereihin, joihin lisättiin 6 cm:n pituinen magneetti, ja liuksia sekoitettiin magneettisekoittajalla (2mag MIX 1 XL) sekoitusnopeudella 200 rpm huoneenlämmössä. Kalibraatioliuoksista otettiin pipetillä kaksi näytettä liuosastian pohjalta ja kaksi näytettä liuoksen pinnalta sekä 30 että 60 minuutin sekoituksen jälkeen. Jokaisesta näytteestä määritettiin AQT90 FLEX -analysaattorilla viisi rinnakkaista tulosta. Näyteajoissa käytettiin WithOutDilution-asetusta (WOD) eli määrittys suoritettiin ilman näytteen erillistä esilaimennusvaihetta.

## **Kalibraatiokaivojen valmistus**

Antigeeneista 1 ja 2 valmistettiin kalibraatiokaivoja tuotannon CRP-kaivoerän valmistuksen yhteydessä. Kalibraatioliuoksina käytettiin sekoitustestauksen yhteydessä valmistettuja kalibraatioliuksia. Immunomäärityskaivojen valmistusprosessissa kaivot ovat levymuodossa, 96 kaivoa yhdellä levyllä. Sitojavasta-aine lisättiin kuppien pintaan tuotantoerän valmistuksen yhteydessä, jonka jälkeen kalibraatioliuksia annosteltiin kaivoihin tunnettu määrä 12-kanavaisella haravapipetillä. Annostelun jälkeen levyjä ravisteltiin 60 sekuntia levyravistelijalla (Delfia Plate Shake 1296-003, Wallac). Ravistelun jälkeen kalibraatiolevyt aseteltiin peltien päällä samaan kuivauskaappiin tuotantoerän levyjen kanssa. Kalibraatiolevyjen valmistusprosessi jatkui normaalin CRP-kaivojen tuotantoprosessin mukaisesti, eli kuivauksen jälkeen kaivoihin

annosteltiin leimavasta-aine ja levyille tehtiin tämän jälkeen vielä toinen kuivaus. Kummastakin antigeenista valmistettiin 28 levyä kalibraatiokaivoja eli kuivauskaapin yhden kuivaustason eli pellin verran.

### **Kalibraatiokaivojen homogeenisuustestaus**

Valmiiden kalibraatiokaivojen on oltava keskenään homogeenisia eli kaikista valmistuserän kaivoista tulee saada samansuuruisia signaalia. Signaalitason suuruus riippuu antigeenin määrästä kuivakaivossa ja antigeenin stabiilisuudesta kalibraatiokaivojen valmistusprosessin aikana. Kaivojen signaalitasoja testattiin homogeenisuusmäärityksellä.

Homogeenisuustestiin valittiin levyjä kuivauskaapin pellin eri positioista, kuten reunoilta ja keskeltä peltiä. Kaivoihin annosteltiin tunnettu määrä määrityspuskuria 12-kanavaisella haravapipetillä. Määrityspuskuri on vastaava liuos kuin AQT90 FLEX -analysaattorin reagenssipakkauksen sisältämä puskuriliuos, jota analysaattori käyttää kalibraatiokasetin määritysprotokollassa. Levyjä inkuboitii lämpöinkubaattorissa (iEMS Incubator/Shaker, Labsystems), minkä jälkeen levyjen annettiin jäähtyä ja levyt pestiin määrityspuskurilla käyttäen levypesuria (1296-026 Delfia Platewash, Wallac). Pesun jälkeen kaivot kuivattiin QC-kuivaimella. Kuivattujen levyjen annettiin jäähtyä, minkä jälkeen kaivojen signaalitasot mitattiin Victor X4 -levylukijalla (PerkinElmer). Testiprotokolla ja testissä käytetyt laitteet olivat samoja kuin CRP-tuotantoerän kalibraatiokaivoille tehdyssä homogeenisuustestissä, jolloin tuotantoerän homogeenisuustulokset toimivat referenssinä antigeeneista 1 ja 2 valmistetuille kalibraatiokaivoille. Tutkittavista antigeeneista valmistettujen kalibraatiokaivojen signaalitasoja verrattiin referenssikaivojen signaalitasoon, ja kaivokohtaisten signaalien eroa tarkasteltiin suhteessa koko kalibraatiokaivoerän signaalien keskiarvoon.

Homogeenisuustestaus tehtiin kahdessa osassa. Ensimmäisen testin tulosten perusteella valittiin joitakin levyjä lisätestaukseen. Kaiken kaikkiaan antigeenista 1 valmistetuista kalibraatiokaivoista yhteensä 12 levyä ja

antigeenista 2 valmistetuista kalibraatiokaivoista yhteensä 13 levyä testattiin homogeenisuustestissä.

### **Kalibraatiokaivojen pakkaus kaseteiksi ja signaalijakauman mittaus**

Osa loppuista kalibraatiolevyistä pakattiin kaseteiksi, jotta niitä voitiin määrittää AQT90 FLEX -analysaattorilla. Yhteen kalibraatiokasettiin pakattiin kahdeksan kalibraatiokaivoa ja kahdeksan taustakaivoa, kasettiin asetettiin kuivauspussi ja kasetti saumattiin umpeen kansilaminaatilla. Kasettipakkaus tehtiin tuotekehityksen manuaalikasettipakkauslinjalla. Kaseteiksi pakattuja kalibraatiokaivoja käytettiin kaivojen signaalijakauman mittaukseen. Kaivojen toiminnan kannalta on olennaista, että kalibraatiokaivojen signaalijakauma muistuttaa testikaivojen signaalijakaumaa. Signaalijakauma on tärkeä tekijä sen kannalta, miten kalibraatiokaivot toimivat analysaattorin kalibraation säädössä.

Antigeenia 1 ja antigeenia 2 sisältävistä kalibraatiokaseteista kalibroitiin kummastakin yksi kasetti AQT90 FLEX -analysaattorilla. Yhdestä kasetista saatiin kahdeksan rinnakkaista näytettä eli määrittämisprotokollan läpikäynyttä kaivoa. Analysaattori suorittaa kalibraatioajon automaattisesti kasetin laitteeseen syöttämisen ja kalibraatioviivakoodin skannaamisen jälkeen. Tässä testissä kalibraatioviivakoodin eräkohtaisella oikeellisuudella ei ollut merkitystä, koska analysaattorin mittaustuloksia ei käytetty tulosten tulkintaan. Lisäksi referenssinäytteiden saamiseksi suoritettiin kalibrointi yhdellä nykyisin käytössä olevaa antigeenia sisältävällä tuotantoerän kalibraatiokasetilla sekä määritettiin yhdellä tuotantoerän testikasetilla tunnetun CRP-pitoisuuden sisältävä näyte. Myös näistä referenssikaseteista saatiin kummastakin kahdeksan rinnakkaista määrittämisprotokollan läpikäynyttä kaivoa näytteiksi.

Kalibraatioprotokollan tai normaalin testiprotokollan mukaisen määrittämisprotokollan läpikäyneet kalibraatio- ja testikaivot kerättiin analysaattorin reagenssipakkauksesta ja aseteltiin levykehyselle. Kaivojen signaalit mitattiin Victor X4 -levylukijalla (PerkinElmer). Mittaustulosten perusteella levyllä olevista kaivoista pystyttiin erottelemaan kalibraatiokasetin kalibraatiokaivot tai

testikasetin testikaivot kasetin sisältämistä taustakupeista. Kalibraatiokaivojen signaali oli noin 400-kertaista taustakuppeihin verrattuna. Kalibraatiokaivot asetettiin skannauslevykehysille vähintään yhden kaivopaikan välein toisistaan ja skannattiin Victor X4 -levylukijalla. Skannausohjelma suoritti 200 signaalitason mittausta jokaiselle kalibraatiokaivolle siten, että mittaukset kohdistuivat säännönmukaisesti kaivon pohjan eri alueille kattaen sen kokonaan. Tulosten perusteella tarkasteltiin signaalijakauman muotoa ja sijaintia kaivon pohjalla, ja verrattiin kalibraatiokaivojen signaalijakaumaa testikaivoihin.

## 5 Tulokset

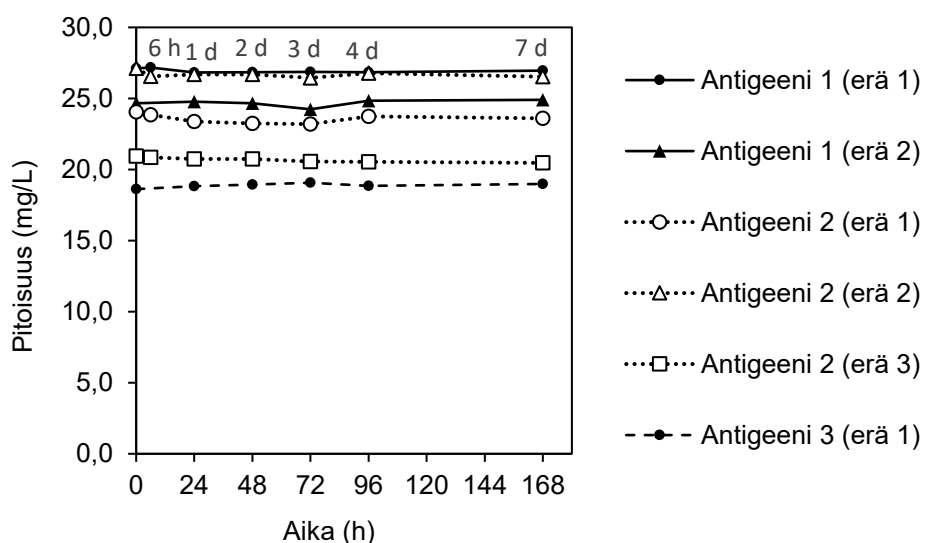
Tärkeimmät testitulokset antigeenien soveltuvuudesta standardeihin ja kontrolleihin sekä kalibraatiokasetteihin on esitetty alla testikohtaisina kokonaisuuksinaan.

### 5.1 Standardit ja kontrollit

Standardeja varten antigeeneja 1, 2 ja 3 testattiin puskuriliuoksessa. Kontrolleja varten antigeeneja testattiin LiHep-plasmassa, EDTA-plasmassa ja seerumissa. Lisäksi matalinta kontrollitasoa varten testattiin korkean CRP-pitoisuuden potilasnäyttemateriaalia LiHep-plasmassa ja seerumissa.

#### 5.1.1 Valmistusprosessin aikainen stabiilisuus

Antigeenien 1, 2 ja 3 valmistusprosessin aikaista stabiilisuutta (*engl. in-process stability*) puskuriliuoksessa testattiin huoneenlämmössä 7 vuorokauden aikapisteeseen asti. Antigeeninäytteistä mitatut pitoisuudet mittausajankohdan suhteen on esitetty kuviossa 1.



Kuvio 1. Antigeenien 1, 2 ja 3 eri tuotantoerien valmistusprosessin aikainen stabiilisuus puskuriliuoksessa RT:ssä.

Antigeeni 1:n pitoisuus puskuriliuoksessa laski 7 vuorokaudessa RT:ssä ensimmäisen testatun valmistuserän osalta 0,53 % ja aikapisteissä mitattujen 10 rinnakkaisen tuloksen variaatiokertoimet olivat suuruudeltaan 1,4–4,7 %. Toisen antigeeni 1:n testatun valmistuserän osalta pitoisuus nousi 7 vuorokaudessa RT:ssä 0,99 % ja aikapisteissä mitattujen 10 rinnakkaisen tuloksen variaatiokertoimet olivat suuruudeltaan 2,0–3,6 %.

Antigeeni 2:n pitoisuus puskuriliuoksessa laski 7 vuorokaudessa RT:ssä ensimmäisellä testatulla antigeenin valmistuserällä 1,92 % ja aikapisteissä mitattujen 10 rinnakkaisen tuloksen variaatiokertoimet olivat 1,4–4,6 %. Antigeeni 2:n toisen valmistuserän osalta pitoisuus laski 2,12 % ja variaatiokertoimet olivat 2,0–3,7 %. Kolmannen testatun antigeenivalmistuserän pitoisuus laski 2,30 % ja variaatiokertoimet olivat 2,4–4,3 %.

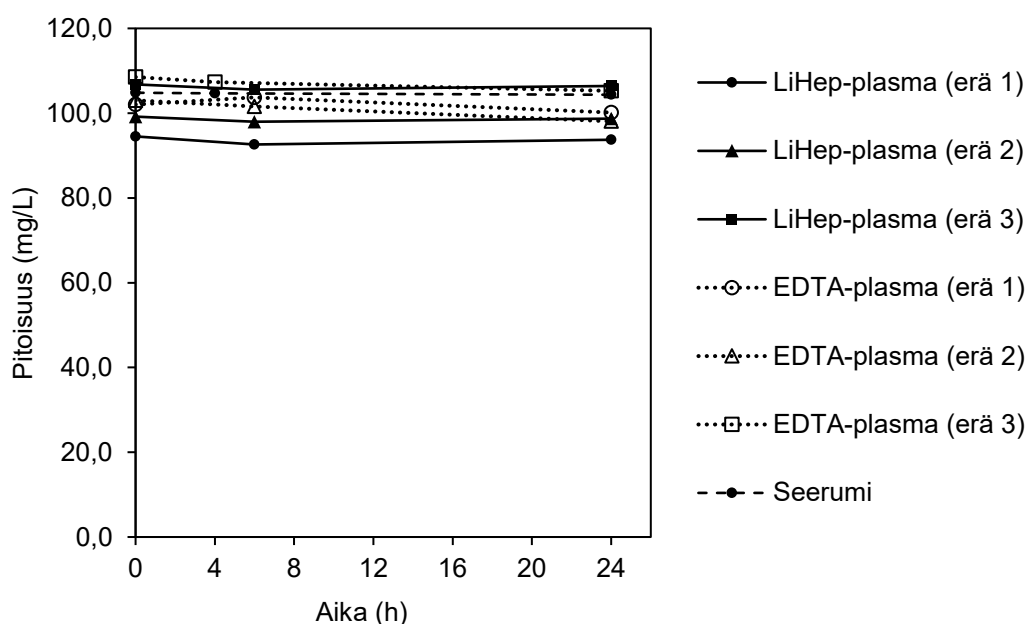
Antigeeni 3:n stabiilisuutta puskuriliuoksessa RT:ssä testattiin antigeenilla yhdestä valmistuserästä. Sen pitoisuus nousi 1,93 % 7 vuorokaudessa ja aikapisteissä mitattujen rinnakkaisten tulosten variaatiokertoimet olivat suuruudeltaan 2,1–3,1 %.

Kaikkien testattujen antigeenien osalta antigeenipitoisuuden muutos puskuriliuoksessa 7 vuorokauden aikana RT:ssä oli pienempi kuin samoissa aikapisteissä mitattujen rinnakkaisten tulosten sisäinen variaatio. Antigeenien 7 vuorokauden stabiilisuustulosten voidaan näin ollen todeta myös sijoittuvan normaalin vaihtelun rajoihin. Myöskään antigeenien eri valmistuserien välillä ei havaittu merkittävää eroa stabiilisuudessa. Näin ollen testitulosten perusteella voidaan todeta, että kaikki kolme antigeenia 1, 2 ja 3 olivat stabiileja puskuriliuoksessa vähintään 7 vuorokautta huoneenlämmössä säilytettynä.

Standardien valmistusprosessissa antigeenin on oltava stabiili vähintään 1000 näyteputken valmistuksen ajan eli noin 2 tuntia. Kaikki kolme testattua antigeenia täyttivät tämän vaatimuksen. Lisäksi standardien valmistusprosessissa käytetään antigeeniapulaimennoksia, joiden säilyvyys useamman vuorokauden ajan mahdollistaa saman antigeenilaimennoksen käyttämisen useamana standarditasojen valmistuspäivänä. Koska kaikki kolme testattua antigeenia

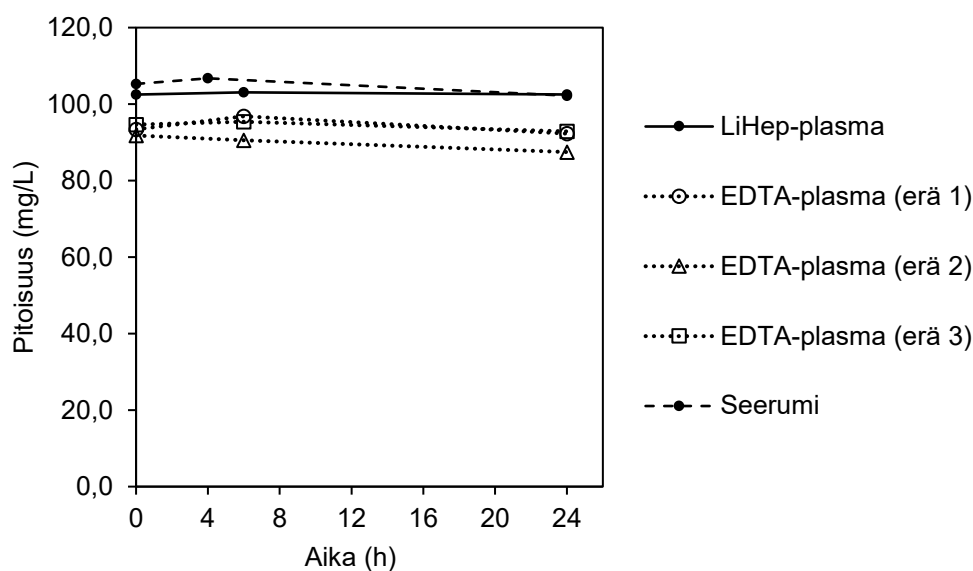
olivat stabiileja puskuriliuoksessa vähintään 7 vuorokautta, niistä tehtyä apulaimennosta on mahdollista käyttää useampana päivänä standardisarjan eri tasojen valmistamiseen.

Lisäksi kontrolleja varten antigeenien 1, 2 ja 3 valmistusprosessin aikaista stabiilisuutta testattiin LiHep-plasmassa, EDTA-plasmassa ja seerumissa 24 h aikapisteeseen asti näytteitä huoneenlämmössä säilyttäen. Antigeenista 1 valmistettujen korkean pitoisuuden näytteiden mittaustulokset ajan suhteen on esitetty kuviossa 2. Antigeeni 1:n pitoisuus laski LiHep-plasmassa 24 h aikana RT:ssä 0,3–0,8 %, EDTA-plasmassa 1,9–4,8 % ja seerumissa 0,5 %. Antigeenia testattiin myös matalammissa näytepitoisuuksissa ja niistä saadut tulokset vastasivat kuviossa 2 esitettyä stabiilisuusdataa. Tulosten perusteella antigeenin 1 valmistusprosessin aikaisen stabiilisuusajan pääteltiin olevan LiHep-plasmassa, EDTA-plasmassa ja seerumissa vähintään 24 h huoneenlämmössä. Eräkohtaista vaihtelua stabiilisuudessa antigeenierien tai matriisierien välillä ei havaittu.



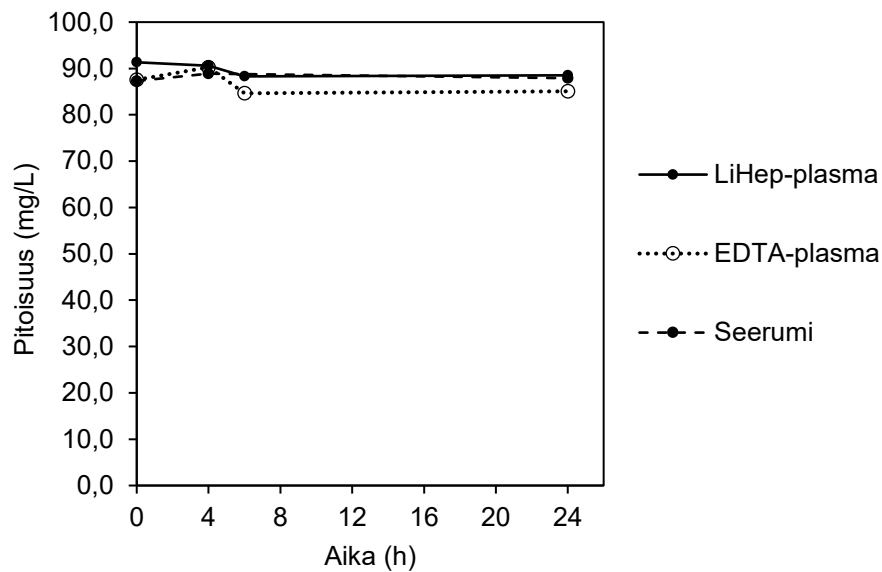
Kuvio 2. Antigeeni 1:n valmistusprosessin aikainen stabiilisuus kolmessa LiHep-plasmaerässä, kolmessa EDTA-plasmaerässä ja yhdessä seerumierässä.

Antigeeni 2:n korkean näytepitoisuuden stabiilisuustulokset on esitetty kuviossa 3. Antigeeni 2:n valmistusprosessin aikainen pitoisuus LiHep-plasmassa RT:ssä laski 24 h aikana 0,0 %, EDTA-plasmassa 1,2–4,7 % ja seerumissa 2,9 %. Tätäkin antigeenia testattiin lisäksi matalammissa pitoisuuksissa ja tulokset vastasivat korkean pitoisuuden näytteistä saatua stabiilisuusdataa. Tulosten perusteella antigeeni 2:n valmistusprosessin aikaiseksi stabiilisuusajaksi pääteltiin LiHep-plasmassa, EDTA-plasmassa ja seerumissa vähintään 24 h huoneenlämmössä. Eräkohtaista vaihtelua stabiilisuudessa antigeenierien tai matriisierien välillä ei havaittu.



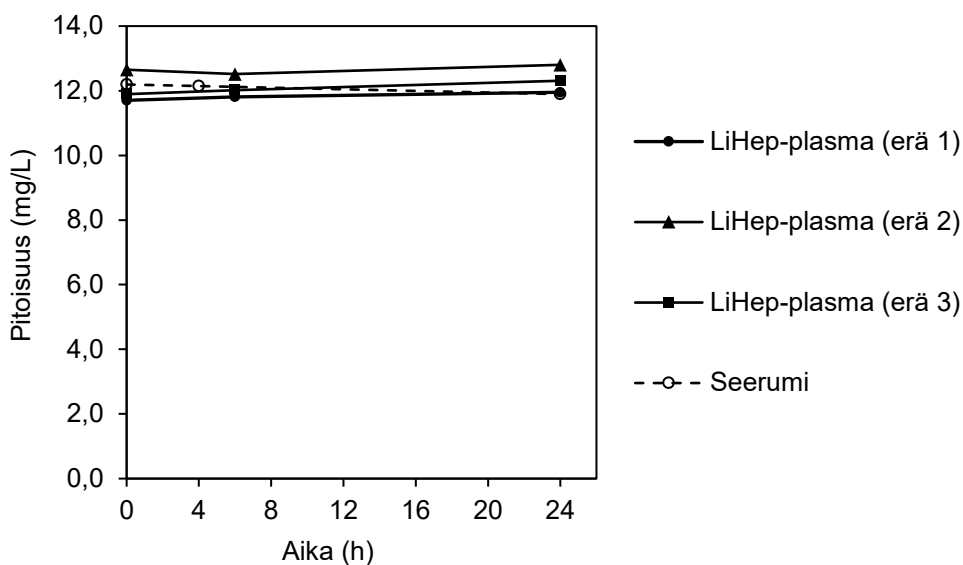
Kuvio 3. Antigeeni 2:n valmistusprosessin aikainen stabiilisuus yhdessä LiHep-plasmaerässä, kolmessa EDTA-plasmaerässä ja yhdessä seerumierässä.

Antigeeni 3:n korkean pitoisuuden näytteiden stabiilisuustulokset on esitetty kuviossa 4. Antigeeni 3:n pitoisuus laski LiHep-plasmassa 24 tunnin aikana RT:ssä 3,1 %, EDTA-plasmassa 2,8 % ja seerumissa pitoisuus nousi 0,7 %. Todellisuudessa antigeenipitoisuus näytteissä ei voi nousta, vaan kyse on määrittystulosten normaalista vaihtelusta. Antigeeni 3:sta valmistettujen matalampien näytteiden stabiilisuusdata oli vastaavaa kuin korkeilla näytepitoisuuksilla. Tulosten perusteella antigeeni 3:n valmistusprosessin aikaiseksi stabiilisuusajaksi LiHep-plasmassa, EDTA-plasmassa ja seerumissa pääteltiin vähintään 24 h huoneenlämmössä.



Kuvio 4. Antigeeni 3:n valmistusprosessin aikainen stabiilisuus LiHep-plasmassa, EDTA-plasmassa ja seerumissa.

Kaupallisten antigeenien lisäksi testattiin potilasnäyttemateriaalin sisältämän natiivin CRP-antigeenin stabiilisuutta LiHep-plasmassa ja seerumissa. Potilasnäyttemateriaalin stabiilisuustulokset on esitetty kuviossa 5. Potilasnäyttemateriaalin sisältämän antigeenin pitoisuus LiHep-plasmassa nousi 24 tunnin aikana RT:ssä 1,2–3,5 % ja laski seerumissa 2,4 %. Käytännössä antigeenin määrä ei kuitenkaan ajan myötä kasva näytteissä, vaan kyse on normaalista tulosten vaihtelusta. Potilasnäyttemateriaalista näytteet valmistettiin vain matalaan pitoisuuteen. Testitulosten perusteella potilasnäyttemateriaalin sisältämän antigeenin valmistusprosessin aikaisen stabiilisuusajan LiHep-plasmassa ja seerumissa pääteltiin olevan vähintään 24 h huoneenlämmössä.



Kuvio 5. Potilasnäyttemateriaalin sisältämän antigeenin valmistusprosessin aikainen stabiilisuus kolmessa LiHep-plasmaerässä ja yhdessä seerumierässä.

### 5.1.2 Käyttöstabiilisuus ja pakastus-sulatussyklin vaikutus

Antigeenien 1, 2 ja 3 käyttöstabiilisuutta (*engl. in-use stability*) testattiin puskuriliuoksessa, LiHep-plasmassa, EDTA-plasmassa ja seerumissa 24 tunnin aikapisteeseen asti. Käyttöstabiilisuutta testattiin näytteiden pakastuksen ja sulatuksen jälkeen säilyttäen näytteitä huoneenlämmössä. Lisäksi testattiin pakastus-sulatussyklin vaikutusta antigeenin pitoisuuteen eri matriiseihin valmistetuissa näytteissä.

Pakastus-sulatussyklin läpikäyneen antigeeni 1:n pitoisuus nousi 24 h aikana RT:ssä puskuriliuoksessa 4,55 % ja laski LiHep-plasmassa 0,48 %, EDTA-plasmassa 1,91 % ja seerumissa 2,05 %.

Pakastus-sulatussyklin läpikäyneen antigeeni 2:n pitoisuus nousi 24 h aikana RT:ssä puskuriliuoksessa 5,09 % ja laski LiHep-plasmassa 0,69 %, EDTA-plasmassa 0,75 % ja seerumissa 3,35 %.

Pakastus-sulatussyklin läpikäyneen antigeeni 3:n pitoisuus nousi 24 h aikana RT:ssä puskuriliuoksessa 0,38 % ja laski LiHep-plasmassa 0,03 %, EDTA-plasmassa 3,61 % ja seerumissa 1,52 %.

Pakastus-sulatussyklin läpikäyneen potilasnäyteantigeenin pitoisuus nousi 24 h aikana RT:ssä LiHep-plasmassa 1,44 % ja seerumissa 0,91 %. Käytännössä antigeenin määrä ei kuitenkaan kasva näytteissä, vaan tulos selittyy normaalilla vaihtelulla.

Käyttöstabiilisuuden testitulokset vastasivat hyvin edellä esitettyjä valmistusprosessin aikaisen stabiilisuuden testauksesta saatuja tuloksia. Tulokset antigeenipitoisuuden noususta selittyvät tässäkin tapauksessa normaalilla vaihtelulla, minkä rajoihin myös muiden tulosten voidaan katsoa sopivan. Testattujen antigeenien 1, 2 ja 3 käyttöstabiilisuusajaksi pääteltiin puskurissa, LiHep-plasmassa, EDTA-plasmassa ja seerumissa vähintään 24 h RT:ssä, kun näytteet olivat tätä ennen läpikäyneet pakastuksen ja sulatuksen. Vaihtelua antigeenien valmistuserien tai matriisierien välillä ei havaittu. Lisäksi potilasnäyteantigeenin käyttöstabiilisuusajaksi pääteltiin myös vähintään 24 h RT:ssä sekä LiHep-plasmassa että seerumissa. Kaikkien antigeenien stabiilisuusajaksi pakastuksen ja sulatuksen jälkeen oli riittävä, jotta näytteiden käyttö osana tuotannon prosesseja onnistuu sujuvasti.

Lisäksi testattiin pakastus-sulatussyklin vaikutusta antigeenien pitoisuuksiin eri matriiseihin valmistetuissa näytteissä, ja näiden testien tulokset on esitetty taulukossa 2. Testitulosten perusteella pakastus-sulatussyklin läpikäyneiden näytteiden antigeenipitoisuudet laskivat pakastus-sulatussyklissä antigeeni 1:n osalta enimmillään 4,16 %, antigeeni 2:n osalta enimmillään 3,85 %, antigeeni 3:n osalta enimmillään 2,37 %. Tulosten mukaan potilasnäyteantigeenin määrä näytteissä lisääntyi pakastus-sulatussyklissä, mutta käytännössä kyse on kuitenkin testitulosten normaalista vaihtelusta. Myös muiden antigeenien osalta saatua tulosten voidaan katsoa sisältyvän normaalin vaihtelun rajoihin. Näin ollen testitulosten perusteella voitiin todeta, että millään testatuista antigeeneista pakastus-sulatussyklin läpikäyminen ei vaikuttanut antigeenipitoisuuteen, eikä standardi- ja kontrollitasojen valmistuksessa ole tarvetta valmistaa näytteitä

haluttua lopullista pitoisuutta korkeampaan tasoon pakastus-sulatussyklin vaikutuksen kompensoimiseksi.

Taulukko 2. Pakastus-sulatussyklin vaikutus antigeenien 1, 2 ja 3 sekä potilasnäyteantigeenin pitoisuuteen eri matriiseihin valmistetuissa näytteissä.

Näyte	Pitoisuus ennen pakastusta ja sulatusta (mg/L)	Pitoisuus pakastuksen ja sulatuksen jälkeen (mg/L)	CV	Pitoisuuden muutos
Antigeeni 1 puskurissa	10,38	10,42	3,2 %	0,43 %
Antigeeni 1 LiHep-plasmassa	11,48	11,52	2,9 %	0,38 %
Antigeeni 1 EDTA-plasmassa	12,22	12,16	3,2 %	-0,50 %
Antigeeni 1 seerumissa	13,20	12,65	3,6 %	-4,16 %
Antigeeni 2 puskurissa	10,44	10,42	3,9 %	-0,21 %
Antigeeni 2 LiHep-plasmassa	11,89	11,79	2,2 %	-0,89 %
Antigeeni 2 EDTA-plasmassa	12,44	11,96	2,6 %	-3,85 %
Antigeeni 2 seerumissa	12,94	12,51	3,1 %	-3,26 %
Antigeeni 3 puskurissa	9,75	9,85	1,8 %	0,81 %
Antigeeni 3 LiHep-plasmassa	10,47	10,54	3,6 %	0,67 %
Antigeeni 3 EDTA-plasmassa	10,89	10,64	3,1 %	-2,37 %
Antigeeni 3 seerumissa	11,39	11,37	2,7 %	-0,12 %
Potilasnäytemateriaali LiHep-plasmassa	13,13	13,15	2,4 %	0,16 %
Potilasnäytemateriaali seerumissa	12,98	13,20	3,4 %	1,65 %

### 5.1.3 Mekaanisen rasituksen kesto

Antigeenien 1, 2 ja 3 mekaanisen rasituksen kestoa puskuriliuoksessa tutkittiin alustavasti standardien valmistusprosessin sekoitusvaihetta varten. Antigeeninäytteitä vorteksoitiin ennen pitoisuusmäärittystä 10 tai 30 sekuntia. Näytteistä mitatut pitoisuudet ja niiden prosentuaalinen muutos suhteessa referenssinäytteeseen on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Antigeenien mekaanisen rasituksen keston testitulokset, suluissa pitoisuuden prosentuaalinen muutos suhteessa referenssinäytteeseen.

Näyte	Referenssi-näytteen pitoisuus	10 s vorteksoitu näyte, pitoisuus	30 s vorteksoitu näyte, pitoisuus
Antigeeni 1 puskuriliuoksessa	21,49 mg/L	21,15 mg/L (-1,59 %)	21,96 mg/L (2,16 %)
Antigeeni 2 puskuriliuoksessa	19,60 mg/L	19,92 mg/L (1,67 %)	20,37 mg/L (3,97 %)
Antigeeni 3 puskuriliuoksessa	19,09 mg/L	19,31 mg/L (1,19 %)	19,08 mg/L (-0,05 %)
Potilasnäytemateriaali LiHep-plasmassa	21,25 mg/L	21,23 mg/L (-0,12 %)	21,66 mg/L (1,91 %)
Potilasnäytemateriaali seerumissa	19,82 mg/L	20,12 mg/L (1,52 %)	20,09 mg/L (1,37 %)

Testitulosten perusteella 30 sekuntia vorteksoitujen antigeeninäytteiden pitoisuusero referenssinäytteeseen verrattuna oli -0,05–3,97 %. Potilasnäytemateriaalin osalta pitoisuuden ero referenssiin oli 1,37–1,91 %. Kustakin näytteestä mitattiin viisi rinnakkaista tulosta ja niiden sisäisen vaihtelun todettiin olevan suurempaa kuin ero vorteksoitujen ja referenssinäytteiden välillä, sillä rinnakkaisten tulosten variaatiokertoimet olivat suuruudeltaan 1,4–4,5 %. Näin ollen testissä havaittujen näytteiden välisten pitoisuuserojen voidaan todeta olevan normaalin vaihtelun rajoissa, eli antigeenit 1, 2 ja 3 sekä potilasnäytematriisin sisältämä natiivi antigeeni eivät olleet alustavan testauksen perusteella herkkiä mekaaniselle rasitukselle.

Tuotantoerää valmistettaessa liuoksen sekoitus tehdään liuosastiassa joko magneettisekoittajaa tai tasosekoittajaa käyttäen, joista kummankin sekoitustavan voi katsoa olevan testattua näyteputkessa vorteksointia hellävaraisempia menetelmiä antigeenin kannalta. Testin perusteella antigeenien voidaan päätellä kestävän standardi- ja kontrollivalmistuksen vaatiman liuoksen sekoituksen.

#### 5.1.4 Lineaarisuus

Antigeenien laimentumisen lineaarisuutta puskuriliuoksessa tutkittiin standardisarjan valmistusta varten. Standardien valmistuksessa näytetasoja valmistetaan eri pitoisuuksiin CRP-immunomäärityksen koko mitta-alueella, minkä onnistumiseen antigeenin laimennuskäyttäytyminen vaikuttaa. Antigeenien 1, 2 ja 3 lineaarisuutta tutkittiin käyttäen kutakin antigeenia 1–2 valmistuserästä.

Antigeeni 1:n lineaarisuustulokset yhden antigeenierän osalta on esitetty taulukossa 4. Antigeenilaimennosten mitattujen pitoisuuksien suhde laskennallisiin pitoisuuksiin on esitetty taulukon sarakkeessa 'Recovery'.

Taulukko 4. Antigeeni 1:n lineaarisuustestitulokset.

Näyte	Laskennallinen pitoisuus (mg/L)	Mitattu pitoisuus (ka, mg/L)	CV	Recovery
LIN 01 BU	0	0,003	712,6 %	-
LIN 02 BU	5,09	5,71	2,5 %	112,2 %
LIN 03 BU	21,2	21,6	2,4 %	101,9 %
LIN 04 BU	106	103	3,4 %	97,1 %
LIN 05 BU	212	210	1,7 %	99,3 %
LIN 06 BU	318	323	2,0 %	101,5 %
LIN 07 BU	424	425	0,8 %	100,2 %

Edellä esitettyssä taulukossa antigeeninäytesarjan matalimmat mitatut pitoisuudet erosivat keskimääräistä enemmän laskennallisesta pitoisuudesta, esimerkiksi alla esitettyjen tulosten osalta lineaarisuusnäyte 2:n mitattu pitoisuus erosi laskennallisesta pitoisuudesta 12,2 %. Näytteen laskennallinen pitoisuus oli 5,09 mg/L eli kyse oli CRP-määrityksen mitta-alueen alarajoilla olevasta pitoisuudesta. Muiden lineaarisuusnäytteiden osalta ero mitatun ja laskennallisen pitoisuuden välillä oli enimmillään 2,9 %. Näytesarjan matalan pään mittaustulosten suuremman eron laskennallisiin pitoisuuksiin verrattuna voi olettaa johtuvan esimerkiksi pipetoinnin suuremmasta suhteellisesta virheestä

pipetoitaessa hyvin pieniä pitoisuuksia tai immunomäärityksen matalien pitoisuuksien spesifisen signaalin suhteellisen pienestä määrästä verrattuna taustasignaaliin. Näin ollen näytesarjan matalan pään tuloksista huolimatta antigeeni 1:n voidaan päätellä laimentuvan lineaarisesti mitta-alueella (5–500 mg/L).

Antigeeni 2:n lineaarisuustulokset yhden antigeenierän osalta on esitetty taulukossa 5. Antigeenilaimennosten mitattujen pitoisuuksien suhde laskennallisiin pitoisuuksiin on esitetty taulukon sarakkeessa 'Recovery'.

Taulukko 5. Antigeeni 2:n lineaarisuustestitulokset.

Näyte	Laskennallinen pitoisuus (mg/L)	Mitattu pitoisuus (ka, mg/L)	CV	Recovery
LIN 01 BU	0	0,03	113,3 %	-
LIN 02 BU	5,04	5,69	3,1 %	112,9 %
LIN 03 BU	21,0	23,1	2,1 %	110,1 %
LIN 04 BU	105	110	3,0 %	105,2 %
LIN 05 BU	210	217	2,7 %	103,1 %
LIN 06 BU	315	329	3,3 %	104,4 %
LIN 07 BU	420	424	2,3 %	101,1 %

Tulokset antigeeni 2:n osalta olivat hyvin samankaltaisia edellä esitettyjen antigeeni 1:n lineaarisuustestitulosten kanssa eli myös antigeeni 2:lla näytesarjan matalammassa päässä on nähtävillä mitatun näytepitoisuuden suurempi ero laskennalliseen pitoisuuteen kuin sarjan korkeassa päässä. Tässäkin tapauksessa eron kuitenkin oletettiin johtuvan hyvin pienten tilavuuksien pipetoinnin suuremmasta suhteellisesta virheestä ja spesifisen signaalin suhteellisen pienestä määrästä matalissa pitoisuuksissa taustasignaaliin verrattuna. Lisäksi antigeeni 2:n toisen testatun antigeenierän lineaarisuustestitulokset olivat vastaavia tässä esitettyjen tulosten kanssa. Testitulosten perusteella pääteltiin myös antigeeni 2:n laimentuvan hyvin lineaarisesti eikä merkittävää eroa antigeenien valmistuserien välillä havaittu.

Antigeeni 3:n lineaarisuustulokset yhden antigeenierän osalta on esitetty taulukossa 6. Taulukon sarakkeessa 'Recovery' on esitetty antigeenilaimennosten mitattujen pitoisuuksien suhde laskennallisiin pitoisuuksiin.

Taulukko 6. Antigeeni 3:n lineaarisuustestitulokset.

Näyte	Laskennallinen pitoisuus (mg/L)	Mitattu pitoisuus (ka, mg/L)	CV	Recovery
LIN 01 BU	0	0,016	81,7 %	-
LIN 02 BU	5,85	6,38	4,3 %	109,0 %
LIN 03 BU	24,4	27,2	3,0 %	111,6 %
LIN 04 BU	122	128	2,3 %	104,9 %
LIN 05 BU	244	246	2,8 %	101,0 %
LIN 06 BU	366	371	3,0 %	101,5 %
LIN 07 BU	488	489	2,1 %	100,3 %

Tälläkin antigeenilla tuloksen vastasivat edellä esitettyjen antigeenien 1 ja 2 lineaarisuustestituloksia eli sama ilmiö näytesarjan matalan pään suuremmasta eroista laskennalliseen pitoisuuteen verrattuna on nähtävillä myös antigeenilla 3 saaduissa tuloksissa. Testi myös toistettiin toisen valmistuserän antigeenilla ja tulokset vastasivat ensimmäisen testatun antigeenierän tuloksia. Tämänkin antigeenin osalta suuremman eron näytesarjan matalassa päässä oletettiin johtuvan pipetoinnista ja spesifisestä signaalista, ja antigeeni 3:n pääteltiin myös laimentuvan hyvin lineaarisesti koko mitta-alueella.

#### 5.1.5 Antigeenin siirtymä ja neulanpuhdistuksen vaikutus

Antigeenien 1 ja 2 siirtymää (*engl. carry-over*) ja analysaattorin neulanpuhdistuksen vaikutusta sitä seuraaviin näytteisiin tutkittiin puskuriliuokseen, LiHep-plasmaan, EDTA-plasmaan ja seerumiin valmistetuilla antigeeninäytteillä. Antigeenilla 3 testit tehtiin toistaiseksi vain puskurissa ja

seerumissa, mutta testaus on tarkoitus tehdä myöhemmin myös LiHep-plasmaan ja EDTA-plasmaan valmistetuilla antigeeninäytteillä.

Testitulosten perusteella antigeeni 1:llä korkean antigeeninäytteen jälkeisen puskurinäytteen suurin havaittu pitoisuusero verrattuna puskuritaustaan oli korkean antigeenia sisältäneen puskurinäytteen jälkeen 0,0568 mg/L, LiHep-plasmanäytteen jälkeen 0,5994 mg/L, EDTA-plasmanäytteen jälkeen 0,8307 mg/L ja seeruminäytteen jälkeen 0,2218 mg/L.

Antigeeni 2:llä korkean antigeeninäytteen jälkeisen puskurinäytteen suurin havaittu pitoisuusero verrattuna puskuritaustaan oli korkean antigeenia sisältäneen puskurinäytteen jälkeen 0,0778 mg/L, LiHep-plasmanäytteen jälkeen 0,1368 mg/L, EDTA-plasmanäytteen jälkeen 0,1164 mg/L ja seeruminäytteen jälkeen 0,9988 mg/L. Antigeenilla 2 korkean seeruminäytteen jälkeistä tulosta voidaan pitää korkeahkona, mutta se ei kuitenkaan toistunut kahdella muulla saman analysaattorin testikiirroksella, joiden tulokset olivat alle 0,0261 mg/L, eikä kahdella muulla testissä käytetyllä analysaattorilla, joiden tulokset olivat alle 0,3473 mg/L.

Antigeeni 3:llä suurin havaittu pitoisuusero korkean näytteen jälkeisellä puskurinäytteellä verrattuna puskuritaustaan oli korkean antigeenia sisältäneen puskurinäytteen jälkeen 0,0267 mg/L ja seeruminäytteen jälkeen 1,0503 mg/L. Tässäkään tapauksessa seeruminäytteen jälkeinen korkeahko tulos ei toistunut saman analysaattorin muilla testikiirroksilla, joiden tulokset olivat alle 0,0385 mg/L, eikä kahdella muulla testissä käytetyllä analysaattorilla, joiden tulokset olivat alle 0,1639 mg/L.

Koska CRP-immunomäärityksen mitta-alue AQT90 FLEX -analysaattorilla alkaa pitoisuudesta 5 mg/L ja CRP-määrityksen matalin luotettavasti taustanäytteestä erotettava näytepitoisuus on  $< 1$  mg/L (LoD, *engl. limit of detection*), voidaan todeta, ettei millään testatuista antigeeneista ollut havaittavissa neulanpuhdistuksen vaativaa siirtymää testatuissa matriiseissa.

Samassa yhteydessä tehtyjen säännöllisen neulanpuhdistuksen vaikutusta selvittävien testien perusteella antigeenilla 1 neulanpuhdistuksen jälkeinen tulos

erosi sitä edeltäneistä tuloksista kaikilla matriiseilla enintään 2,8 %, antigeenilla 2 ero oli 3,9 % ja antigeenilla 3 3,2 %. Näin ollen todettiin, että analysaattorin neulanpuhdistus ei vaikuttanut merkittävästi sitä seuraavien määritysten tuloksiin millään testatuista antigeeneista ja matriiseista, eikä näin ollen erillistä neutralointitoimenpidettä neulanpuhdistuksen jälkeen tarvita.

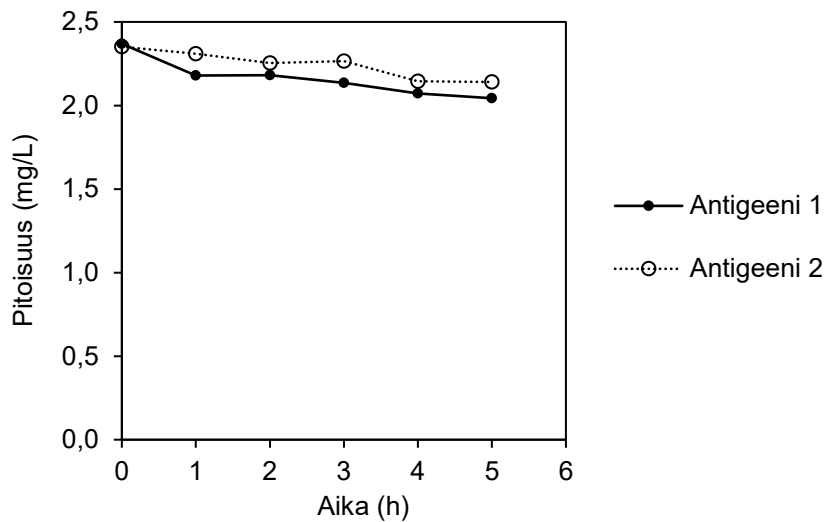
## 5.2 Kalibraatiokaivot

Antigeenin soveltuvuutta kalibraatiokaivoihin testattiin alustavasti antigeeneilla 1 ja 2. Aluksi testattiin kalibraatioliuoksen stabiilisuutta ja sekoittumista, ja sen jälkeen kummastakin antigeenista valmistettiin kalibraatiokaivoja, joista testattiin kaivojen välistä homogeenisuutta ja signaalijakauman muotoa ja sijaintia kaivon pohjalla. Tarkemmat testitulokset on esitetty alla.

### 5.2.1 Kalibraatioliuoksen stabiilisuus

Antigeenien 1 ja 2 stabiilisuutta testattiin välikerrosliuoksessa. Testattu liuoksen antigeenipitoisuus oli 0,03 mg/L. Matalan näytepitoisuuden takia mittaukset tehtiin ilman normaaliprotokollaan kuuluvaa näytteen esilaimennusta. Laimennusvaiheen ohittamisesta huolimatta mitatut pitoisuudet olivat alle CRP-määrityksen mitta-alueen alarajan, joka on 5 mg/L, mikä saattaa heikentää tulosten luotettavuutta.

Testitulosten perusteella antigeeni 1:n pitoisuus välikerrosliuoksessa laski 5 tunnissa 13,8 % ja suurin lasku tapahtui ensimmäisen tunnin aikana, jolloin pitoisuus laski 8,0 %. Aikapisteissä mitattujen 10 rinnakkaisen tuloksen sisäiset variaatiokertoimet olivat 2,0–4,5 %. Antigeeni 2:n pitoisuus laski 5 tunnissa 9,0 %. Aikapisteissä mitattujen 10 rinnakkaisen tuloksen variaatiokertoimet olivat 3,4–4,3 %. Kummankin testatun antigeenin osalta vaihtelu oli matalasta näytepitoisuudesta riippumatta suuruudeltaan normaalia, mikä lisää tulosten luotettavuutta. Kalibraatioliuosten pitoisuuden lasku ajan suhteen on esitetty kuviossa 6.



Kuvio 6. Antigeenien 1 ja 2 stabiilisuus välikerrosliuoksessa RT:ssä.

Kalibraatioliuoksen käytön kannalta olennaista on, että liuos on homogeeninen koko levyrän kaivoihin annostelun ajan eli vähintään 3 tuntia. Kalibraatioliuoksen stabiilisuutta testattiin säilyttäen näytteitä huoneenlämmössä, mutta stabiilisuutta voisi mahdollisesti parantaa vielä säilyttämällä liuosta jäähauteessa levyille annostelun aikana. Tulosten perusteella päätettiin vielä testata kalibraatioliuosten stabiilisuutta kylmäsäilytyksessä ennen antigeenin lopullista valintaa.

### 5.2.2 Kalibraatioliuoksen sekoitustestaus

Sekoitustestissä molemmilla testatuilla antigeeneilla 1 ja 2 kalibraatioliuoksen tilavuus oli maksimieräkoon mukainen eli 1120 mL. Liuosten riittävän sekoitusajan selvittämiseksi testissä mitattiin pohja- ja pintanäytteet 30 ja 60 minuutin sekoituksen jälkeen.

Antigeenilla 1 samassa aikapisteessä liuosastian pohjalta ja pinnalta otettujen näytteiden välillä havaittiin maksimissaan 0,9 % ero pitoisuuksissa. 30 ja 60 minuutin aikapisteiden välillä mitattu pitoisuusero oli 2,3 %.

Antigeenilla 2 samassa aikapisteessä liuosastian pohjalta ja pinnalta otettujen näytteiden välillä havaittiin maksimissaan 0,4 % ero pitoisuuksissa. 30 ja 60 minuutin aikapisteiden välillä mitattu pitoisuusero oli 3,3 %.

Kummallakaan antigeenilla pohja- ja pintanäytteiden välillä ei havaittu merkittävää eroa eli liuokset olivat tasaisesti sekoittuneet molemmissa aikapisteissä. Kummassakin aikapisteessä näytteitä otettiin kaksi sekä liuoksen pohjalta että pinnalta, jolloin aikapistettä kohden mitattiin yhteensä 10 rinnakkaista pintamittausta ja 10 pohjamittausta, mikä lisää tulosten luotettavuutta. Myöskään aikapisteiden välillä ei havaittu merkittävää pitoisuuseroa kummallakaan testatuista antigeeneista. Ero aikapisteiden välillä oli kuitenkin suurempi kuin ero mitattujen pinta- ja pohjanäytteiden välillä, mikä voi mahdollisesti johtua antigeenien stabiilisuudesta välikerrosliuoksessa.

Testitulosten perusteella antigeeneilla 1 ja 2 kalibraatioliuoksen sekoitusajaksi voidaan ohjeistaa 30–60 minuuttia magneettisekoittajalla sekoitusnopeudella 200 rpm. Minimieräkoon mukaiselle kalibraatioliuosmäärälle tulee tehdä vielä erikseen sekoituskarakterisointi.

### 5.2.3 Homogeenisuus

Antigeeneista 1 ja 2 valmistetuille kalibraatiolevyille tehtiin homogeenisuustesti siten, että mukana oli levyjä kuivauskaapin peltien reunoilta ja keskeltä. Yksittäisistä kaivoista mitattuja signaaleja verrattiin kunkin kalibraatiolevyerän kaikkien homogeenisuustestattujen kaivojen signaalien keskiarvoon. Tuloksista muodostettiin levyjen peltisijainnin mukaiset levykartat, joissa kaivokohtainen signaaliero suhteessa keskiarvoon on esitetty sekä lukuarvolla että värein. Antigeenista 1 valmistettujen kalibraatiokaivojen homogeenisuustulokset on esitetty kuvassa 5 ja antigeenista 2 valmistettujen kaivojen tulokset kuvassa 6. Punaiset ruudut kuvaavat keskiarvosignaalia korkeampaa signaalia antaneita kalibraatiokaivoja ja siniset ruudut keskiarvosignaalia matalampaa signaalia antaneita kalibraatiokaivoja. Tummemmat ruudut kuvaavat suurempaa signaaliero kuin vaaleat. Kuvissa valkoisina esitettyille levyille ei tehty

homogeenisuustestausta. Kuvien levymuodostelmassa ylimpänä olevat levyt ovat sijainneet kuivauksen aikana lähimpänä kuivauskaapin takaseinää ja alimpana kuvassa esitetyt levyt ovat sijainneet kuivauskaapin oven puoleisessa reunassa.

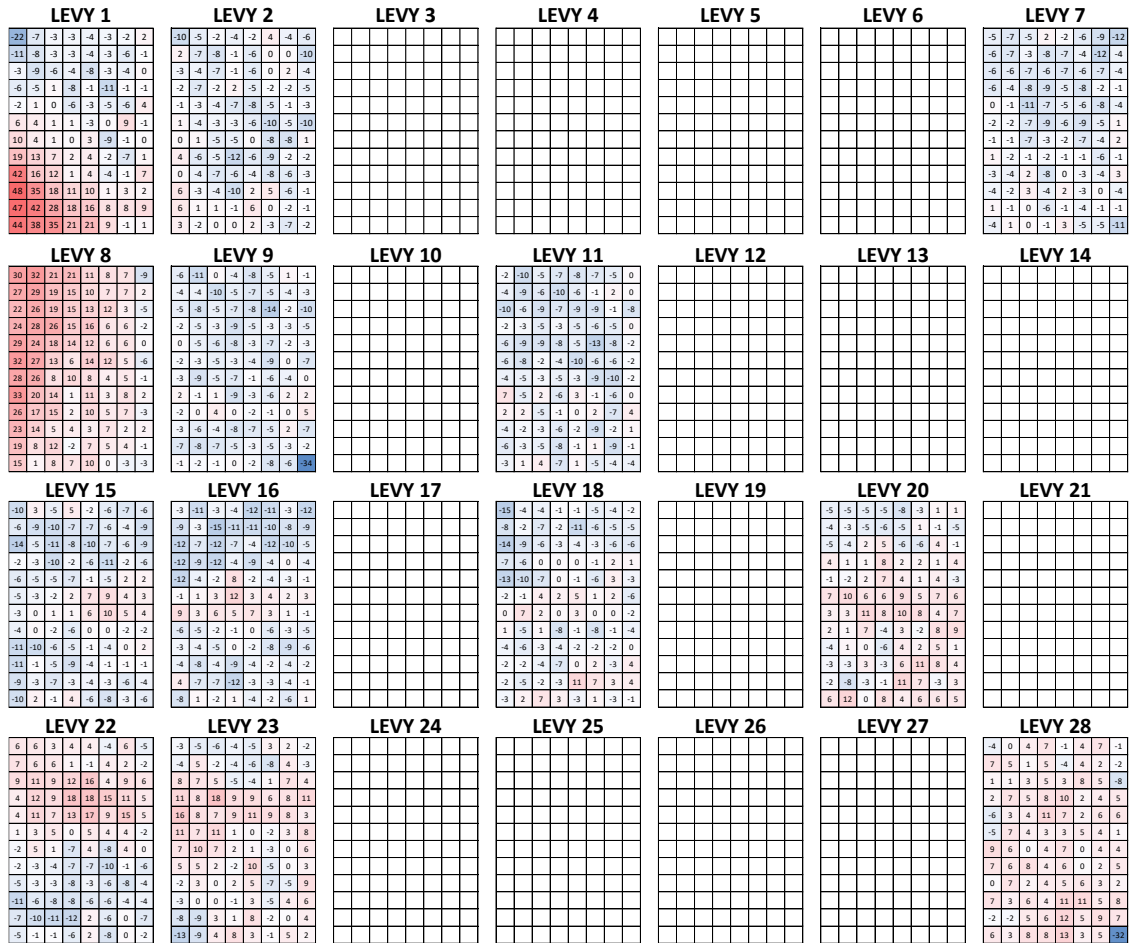
### KUIVAUSKAAPIN TAKAOSA

LEVY 1	LEVY 2	LEVY 3	LEVY 4	LEVY 5	LEVY 6	LEVY 7		
-4 -1 5 5 9 1 1 6 -5 -1 -1 1 0 1 1 7 -1 -4 -9 -7 -6 -5 3 -2 0 -3 -7 -10 0 4 7 3 -3 -3 -7 -10 -4 -3 -1 8 5 -4 9 -3 7 6 16 4 21 14 10 0 6 0 3 4 59 29 21 14 5 0 1 3 43 37 33 24 15 9 4 10 41 39 38 19 16 12 9 38 30 24 23 22 13 11 4 39 32 25 24 20 10 10 4	-4 -2 0 1 4 3 7 0 -1 -1 19 -3 -1 0 6 -5 -5 -8 -3 0 8 -6 4 -7 -5 -7 -7 3 3 4 4 0 -1 -2 -6 3 0 -1 3 0 1 0 -3 -2 3 -2 -4 1 -1 -5 -3 -4 -1 -7 -2 4 -1 -4 -3 -9 -6 -4 0 -3 -1 -4 -8 -3 -1 -2 -5 0 -5 -6 -5 -5 -1 -4 -4 1 -2 -5 -5 -6 -2 -4 -2 -4 1 0 0 1 4 -7 -1 -3					-3 0 -5 1 -4 1 2 2 -10 -4 -2 -3 -5 -3 -1 0 -6 -4 -4 -3 -5 -6 4 2 -3 -5 0 9 2 -2 4 4 2 1 -5 -1 2 2 0 3 2 -2 6 -1 -1 -2 4 4 -7 -4 -3 -6 0 -1 3 4 0 -3 -4 -6 -1 0 2 5 -5 -1 -3 -2 -1 -1 0 3 -6 -4 -1 -2 -3 -1 1 -1 -10 -7 1 -4 -1 -2 -6 0 -5 -3 3 -1 -3 1 -4 0		
LEVY 8	LEVY 9	LEVY 10	LEVY 11	LEVY 12	LEVY 13	LEVY 14		
34 33 29 27 16 8 15 2 43 35 26 24 11 7 9 1 30 39 22 18 11 7 5 4 25 34 17 20 13 4 1 9 32 23 16 14 8 7 7 1 29 27 8 13 2 5 3 2 26 21 15 9 9 0 0 5 19 18 11 10 5 -1 4 3 14 7 7 3 5 1 -1 0 9 2 -1 1 2 1 -2 -2 4 1 0 -4 4 3 -2 -5 -4 -4 3 -2 4 5 4 -3	12 4 0 4 6 10 0 4 10 -1 -5 0 -2 -3 -1 5 2 1 -3 -2 1 0 2 4 4 4 2 -4 1 -3 3 3 5 -2 -1 -2 -3 -3 -4 0 2 -3 1 1 -6 1 2 5 -2 2 -2 -2 -1 -6 5 2 1 -2 -2 -1 0 0 -1 6 -5 0 -6 -3 -2 -5 -1 3 -10 -9 -7 -6 -6 -6 -3 -3 -8 -6 -6 -10 -7 -6 -8 -1 1 -2 0 -5 -3 -7 -5 -5		-8 6 5 7 -3 3 4 2 1 -3 -5 -5 -2 -4 3 6 0 -3 -7 -7 -2 -2 0 6 -5 -1 -10 -2 -4 -4 -3 5 -1 -10 -6 -3 -2 0 1 -3 -10 -5 -1 -1 -1 0 0 8 -10 -2 -7 -4 1 -1 1 3 -6 -10 -5 -4 -1 -7 1 3 -10 -4 -3 -4 -6 -4 -7 4 -12 -9 -7 -4 -3 -8 3 2 -10 -7 -3 -6 -4 -4 -5 -5 -4 -6 4 1 1 -8 -5 1					
LEVY 15	LEVY 16	LEVY 17	LEVY 18	LEVY 19	LEVY 20	LEVY 21		
4 6 10 13 8 6 -2 5 4 7 10 16 3 2 2 -4 10 19 8 9 12 -2 1 -8 11 22 26 20 4 2 5 -5 29 36 28 12 -7 4 4 8 43 34 39 14 5 4 7 0 41 35 30 10 8 -8 -5 3 39 27 10 1 -3 -7 -3 0 30 11 -2 0 -4 -5 -5 2 17 8 -3 -5 -8 -8 -6 -6 5 2 -3 -1 -8 -5 -9 -2 3 -3 -6 -14 -1 -6 -5 -7			-8 -7 -4 -5 -2 -7 -2 -6 1 -5 -11 -11 -8 -5 2 -5 -6 -7 -7 1 -1 -5 -1 -4 -4 -2 -6 -5 -14 -4 -2 1 -3 4 6 7 5 -4 1 -2 -3 4 3 3 -7 -7 -1 -3 -8 -7 -10 -6 -8 -1 -5 -1 -9 -9 9 -6 -13 -6 -3 -1 -8 -15 -9 -9 -2 -4 -7 -10 -9 -9 -8 -6 -2 -6 -6 -1 -9 -7 -5 -7 2 -5 -3 -1 0 -7 3 5 0 -2 -7 0			-1 6 -3 3 -1 -2 0 -1 9 9 -1 1 4 -6 -6 0 4 -3 -2 4 4 -7 2 -2 2 4 -5 -4 6 -1 4 2 1 -10 -8 1 -2 -7 4 0 6 -2 2 3 3 -6 3 6 -1 -3 -8 0 -7 -9 1 2 0 -2 -3 -2 -5 0 5 -1 -8 0 -3 3 0 3 -10 -4 -3 -5 -1 0 -9 1 -2 1 -10 -7 0 1 -4 0 9 -2 4 -3 3 2 1 0		
LEVY 22	LEVY 23	LEVY 24	LEVY 25	LEVY 26	LEVY 27	LEVY 28		
3 -2 5 0 2 -6 -34 -2 14 3 -5 -2 -18 -12 -1 -8 -3 -3 -10 -6 -2 -3 0 -2 -3 2 -4 -5 -14 1 -3 -6 -6 -4 -11 -9 -8 -14 -7 -13 -9 -9 -6 -10 -11 -13 -11 -7 -1 -18 -13 -11 -13 -12 -14 -5 24 -10 -4 -16 -8 -15 -9 -8 -6 -7 -10 -11 -2 -9 -14 -7 -9 -14 -10 -12 0 -7 9 1 -3 -7 -8 0 -5 -8 -7 -1 -6 -1 -1 -2 3 -3 0 -4	-6 -3 -11 -1 -6 -4 -8 -6 -12 -9 -13 -3 -10 -1 -10 -8 -4 -9 -2 -6 -11 -8 -10 -10 -6 -4 -9 -8 -6 -5 -5 -6 -9 -6 -6 -18 -6 -7 -8 -4 -4 -7 -7 -9 -5 -11 -9 0 -3 -6 -9 -11 1 -9 -1 -1 -11 -6 -7 -6 -6 -7 -4 -2 -13 -5 -2 -4 -5 -2 2 7 -11 -9 -7 -8 4 -6 -1 -4 -7 -2 -7 -6 3 -14 -1 -5 -9 5 1 2 2 -7 2 6					-1 4 5 0 5 2 4 -5 3 1 1 -1 -1 -1 1 -2 -1 -8 -2 -5 0 -18 1 7 0 -6 -1 2 -3 -2 6 5 2 -17 -1 -2 0 -2 -5 7 2 -2 -1 -2 -8 -6 -3 2 2 -9 2 -2 1 -6 1 0 6 -6 0 -17 -4 -2 -2 1 -2 -5 -1 -3 -1 5 1 2 1 -6 -1 -4 4 0 0 -3 5 -14 -1 -4 -6 3 3 -2 4 -3 6 2 5 6 3 0 7		

### KUIVAUSKAAPIN ETUOSA

Kuva 5. Antigeenista 1 valmistettujen kalibraatiolevyjen homogeenisuustulokset kuivauskaapin peltipositioissa esitettynä. Punainen ja sininen väri kuvaavat yksittäisen kaivon signaalin eroa kaikkien kaivojen signaalikeskiarvoon.

## KUIVAUSKAAPIN TAKAOSA



## KUIVAUSKAAPIN ETUOSA

Kuva 6. Antigeeniasta 2 valmistettujen kalibraatiolevyjen homogeenisuustulokset kuivauskaapin peltipositioissa esitettynä. Punainen ja sininen väri kuvaavat yksittäisen kaivon signaalin eroa kaikkien kaivojen signaalikeskiarvoon.

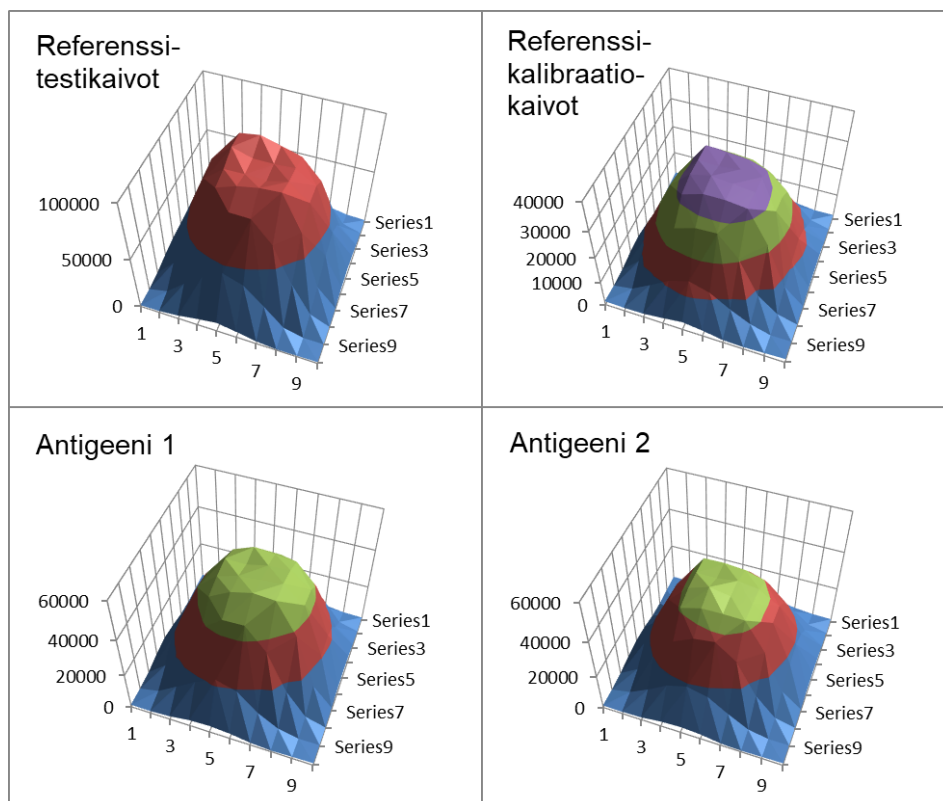
Tulosten perusteella havaittiin molempien kalibraatiokaivoerien signaalitasojen olevan tasaista läpi erän lukuun ottamatta kuivauskaapin pellin vasemmassa reunassa kuivauksen aikana olleita kalibraatiolevyjä. Antigeeni 1:n osalta poikkeavat levyt olivat 1, 8 ja 15 ja antigeeni 2:n osalta 1 ja 8. Signaalitasoltaan muista poikkeavien levyjen syyksi pääteltiin kuivauskaapin ilmvirtaus, joka tulee pellille kaapin vasemmasta reunasta.

Keinoja välttää pellin vasemman reunan poikkeavilta tuloksilta tulee vielä tutkia lisää. Mahdollisia ratkaisuja voisivat olla esimerkiksi kaapin reunapositionissa

kuivattujen levyjen poistaminen erästä, reunaposition jättäminen tyhjäksi tai niiden täyttäminen hukkalevyillä kuivauksen ajaksi.

#### 5.2.4 Kalibraatiokaivojen signaalijakauma

Antigeeneista 1 ja 2 valmistettuja kalibraatiokaivoja skannattiin levylukijalla signaalijakauman muodon ja sijainnin selvittämiseksi kaivon pohjan suhteen. Signaalijakauman muotoa ja sijaintia tarkasteltiin sekä yksittäisten kaivojen että kahdeksan määritetyn ja skannatun kaivon keskiarvosignaalien avulla. Referenssinä käytettiin tuotantoerän kalibraatiokaivoja ja testikaivoja. Tuloksista muodostettiin signaalitason suuruuden ja mittapisteen sijainnin perusteella kuvaajat, jotka on esitetty yhteen koottuna kuvassa 7.



Kuva 7. Referenssitestikaivojen, referenssikalibraatiokaivojen ja antigeeneista 1 ja 2 valmistettujen kalibraatiokaivojen kahdeksan kaivon keskiarvosignaalijakaumat kaivon pohjan suhteen.

Signaalijakauman muoto antigeeneista 1 ja 2 valmistettujen kalibraatiokaivojen pohjalla oli samankaltainen kuin referenssikaivoissa sekä yksittäisiä kaivoja että keskiarvokuvaajia tarkasteltaessa eli korkeimmat signaalitasot mitattiin kaivon pohjan keskialueelta. Kaivon pohjan reuna-alueilla signaalitasot olivat matalimmillaan. Kalibraatiokaivojen signaalijakauman samankaltaisuus verrattuna testikaivoihin on olennaista AQT90 FLEX -analysointilaitteen signaalitason mittaussäätöjen toimivuuden kannalta.

## 6 Loppupäätelmät

Standardeihin ja kontroleihin testattiin kolmea kaupallisesti saatavilla olevaa antigeenia, joista yksi oli alkuperältään rekombinantti ja kaksi muuta biologisesta materiaalista puhdistettuja antigeeneja. Testitulosten perusteella kaikki kolme antigeenia olivat toimivuutensa osalta potentiaalisia vaihtoehtoja korvaamaan nykyisen CRP-antigeenin standardeissa ja kontroleissa. Korvaavan antigeenin valinnassa on kuitenkin otettava huomioon myös muut kuin testeissä todetut antigeenien toiminnalliset ominaisuudet.

Erityisesti standardien tehtävä metrologisen jäljitettävyyden ketjussa pitoisuusarvon välittäjänä kansainvälisen referenssimateriaalin ja potilasnäytteen välillä on olennainen tekijä analyyttimateriaalin valinnassa. Standardeissa käytettävän antigeenin tulisi olla mahdollisimman identtinen potilasnäytteessä esiintyvän antigeenin kanssa, jotta metrologinen jäljitettävyys voidaan saavuttaa mahdollisimman luotettavasti. Biologisesta, ihmisperäisestä materiaalista puhdistettujen antigeenien 2 ja 3 voisi arvioida olevan samankaltaisempia potilasnäytteessä esiintyvän antigeenin kanssa kuin rekombinantti-DNA-tekniikalla tuotettu antigeeni 1. Toisaalta biologista alkuperää olevan antigeenin osalta materiaalissa saattaa todennäköisimmin esiintyä luontaista vaihtelua, kun taas rekombinantti-DNA-tekniikalla tuotetun antigeenin etuna on tuotteen tasalaatuisuus. Testit kuitenkin osoittivat, että kumpaakin alkuperää olevat antigeenit soveltuivat käyttötarkoitukseensa yhtä hyvin.

Sisäisissä kontroleissa käytettävän analyyttimateriaalin suhteen pätee myös vaatimus samankaltaisuudesta potilasnäytteessä esiintyvään natiiviin antigeeniin verrattuna. Kontrollien tehtävänä on toimia laadunvarmistustoimenpiteenä kalibraatiokäyrien luomisessa, jolloin viimeistään niiden tulisi loppukäyttäjän määrittämää potilasnäytettä vastaavina varmistaa, ettei prosessissa ole tapahtunut virheitä. Kontrollien osalta antigeenien 1, 2 ja 3 lisäksi testattiin myös kaupallisista potilasnäytteistä yhdistettyä korkean CRP-pitoisuuden potilasnäytemateriaalia matalimman kontrollitason valmistukseen. Potilasnäytemateriaalin sisältämän antigeenin käyttö kontrollien valmistukseen

olisi perusteltua, sillä se on vastaavuudeltaan paras mahdollinen vaihtoehto loppukäyttäjän määrittämään näytteeseen verrattuna. Potilasnäytteitä ei kuitenkaan ole mahdollista tarvittavan suuren määrän vuoksi käyttää kaikkiin kolmeen kontrollitasoon, joten kaupallista antigeenia tarvitaan joka tapauksessa vähintään kahden korkeamman kontrollitason valmistukseen. Kontrollien osalta valinta täytyy tehdä analyyttimateriaalin lisäksi myös matriisin suhteen. Myös sen valinnassa pätee vaatimus vastaavuudesta potilasnäytematriisiin kanssa. Testeissä toimivuudeltaan kontrolleihin sopiviksi vaihtoehdoiksi todettiin kaikki testatut matriisit eli normaaliseerumi, litiumhepariinilla käsitelty normaaliplasma ja EDTA:lla käsitelty normaaliplasma.

Kalibraatiokasetteihin testattiin rekombinanttia antigeenia 1 ja biologisesta materiaalista puhdistettua antigeenia 2. Kummastakin antigeenista onnistuttiin valmistamaan toimivia kalibraatiokaivoja nykyistä CRP-kalibraatiokaivojen valmistusprosessia mukaillen. Lisätestattavaksi kuitenkin jäi vielä esimerkiksi antigeenien stabiilisuuden parantaminen kalibraatioliuoksessa kylmäsäilytyksellä ja toimenpiteiden testaaminen homogeenisuustesteissä havaittujen poikkeavien levyjen syntymisen estämiseksi. Lisäksi biologisesta materiaalista puhdistetun antigeeni 3:n soveltuvuus kalibraatiokasetteihin on vielä testaamatta. Antigeenien 1 ja 2 osalta jo saadut tulokset olivat kuitenkin positiivisia ja toistaiseksi kumpaakin antigeeneista voidaan pitää toimivuutensa puolesta potentiaalisena ehdokkaana nykyisen CRP-antigeenin korvaajaksi kalibraatiokaseteissa. Kuten standardeihin ja kontrolleihin, myös kalibraatiokasetteihin käytettävän korvaavan antigeenin valintaan voivat kuitenkin vaikuttaa myös muut kuin toimivuuteen liittyvät tekijät.

Testitulosten lisäksi muita valintaan vaikuttavia tekijöitä voivat olla esimerkiksi tuotteen toimittajaan liittyvät seikat, kuten kyky toimittaa tarvittavia määriä antigeenia toivotulla aikataululla. Myös toimittajan sijainnilla voi olla merkitystä sen kannalta, kuinka suureksi riski tuotteen toimituksessa mahdollisesti aiheutuvista ongelmista arvioidaan. Antigeenit vaativat kylmäsäilytyksen myös toimituksen aikana, ja viivytysten ilmaantuessa riski kylmäketjun katkeamisen aiheuttamalle tuotteen vioittumiselle kasvaa. Näin ollen esimerkiksi Euroopan

sisäinen toimitus voisi olla vähemmän riskialtis vaihtoehto kuin mannertenvälinen lähetys. Toimittajan ja onnistuneen tuotetoimituksen luotettavuus on erityisen tärkeää, sillä antigeenin saatavuus on kriittinen tekijä toimeksiantajayrityksen oman tuotannon kannalta. Lisäksi lopulliseen antigeenin valintaan voivat vaikuttaa taloudelliset seikat kuten tuotteen hinta ja muut kustannukset kuten toimitusmaksut, jotka saattavat muodostaa hyvinkin merkittävän osan erityistoimitusta tai monitoroituja kuljetusolosuhteita vaativien tuotteiden kokonaiskustannuksista.

## Lähteet

AQT90 FLEX Käyttöohjeet ohjelmistoversiosta 8.12 alkaen. 2019. Versio 201908K. Radiometer Medical ApS.

Barwick, W.; Burke, S.; Lawn, R.; Roper, P. & Walker, R. 2001. Applications of Reference Materials in Analytical Chemistry, United Kingdom: Royal Society of Chemistry.

Caroli S. & Záray G. (toim.) 2012. Analytical Techniques for Clinical Chemistry: Methods and Applications. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Incorporated.

CRP-testaussarjan kitti-insertti. 994-745P. Radiometer Medical Aps.

Currie, L. 1999. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). Analytica Chimica Acta. Vol. 391, Issue 2. Elsevier ScienceDirect.

Iskandar, A.; Susianti, H.; Anshory, M. & Somma, S. 2018. Biomarkers Utility for Sepsis Patients Management. Biomarker - Indicator of Abnormal Physiological Process. IntechOpen. Viitattu 06.08.2022.

<https://www.intechopen.com/chapters/60889>

ISO Guide 30:2015(en) Reference materials – Selected terms and definitions. 2015. Viitattu 20.10.2022. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:guide:30:ed-3:v1:en>

ISO/IEC Guide 99:2007(en) International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM). 2007. Viitattu 20.10.2022. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:guide:99:ed-1:v2:en>

Koistinen, H. & Stenman, U. 2014. Novel Approaches in Immunoassays. Lontoo: Future Medicine Ltd.

Nichols J. 2020. Contemporary Practice in Clinical Chemistry. 4. painos. United States & United Kingdom: Academic Press / Elsevier Inc.

SFS-EN ISO 17511:2021:en In vitro diagnostic medical devices. Requirements for establishing metrological traceability of values assigned to calibrators,

trueness control materials and human samples (ISO 17511:2020). Helsinki: Suomen Standardoimisliitto SFS ry.

Sproston, N. & Ashworth, J. 2018. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Frontiers in Immunology*, Vol. 9. Viitattu 14.08.2022. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00754/full>

Sztefko, K. 2011. *Immunodiagnosics and Patient Safety*. Berliini: De Gruyter, Inc.

Volanakis, J. E. 2001. Human C-reactive protein: Expression, structure, and function. *Molecular Immunology*, Vol. 38, No. 2–3.

Wild, D. (toim.) 2013. *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. 4. painos. Oxford: Elsevier Science & Technology.