



**TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
ÅBO YRKESHÖGSKOLA**

Opinnäytetyö

**LEIMA-ANNOSTELUN JA
KUIVAUKSEN VAIKUTUS
KUIVAKAIVOMÄÄRITYKSEN
TAUSTAAN**

Janina Lehtonen

Laboratorioala

2009

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU TIIVISTELMÄ

Laboratorioala	
Tekijä: Janina Lehtonen	
Työn nimi: Leima-annostelun ja kuivauksen vaikutus kuivakaivomäärityksen taustaan	
Ohjaajat: Innotrac Diagnostics Oy: Piitu Jauria FM, Panu Hendolin FT, Turun AMK: Jouko Vihanto, FT	
Opinnäytetyön valmistumisajankohta Marraskuu 2009	Sivumäärä 42
<p>Innotrac Diagnostics Oy on turkulainen yritys, joka valmistaa patentoidulla menetelmällä kuivakaivokuppeja immunodiagnostisiin määrittäyksiin. Vuonna 2006 tanskalainen Radiometer AB osti Innotrac Diagnostics Oy:n, jolloin kuivakaivoteknologia siirrettiin Aio!-immunoanalyyttisäätöjärjestelmästä Radiometerin valmistamaan AQT Flex 90 –immunoanalyyttisäätöjärjestelmään.</p> <p>Innotrac Diagnostics Oy pyrkii parantamaan kuivakaivokuppien stabiilisuutta ottamalla käyttöön lisäkuivausprosessiin kuivakaivokuppien valmistusprosessissa.</p> <p>Aikaisemmin on myös huomattu, että leimatipan sijainnilla kuivakaivokupissa on merkitystä, sillä levinneistä leimatipoista on saatu liian korkeita tuloksia. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on vahvistaa tätä havaintoa sekä tutkia, vaikuttaako tuotannon kuivakaivovalmistukseen lisättävä lisäkuivaus testikuppien taustamäärityksen tulokseen.</p> <p>Opinnäytetyössä käytettiin tuotannon valmistamia kolmelle eri analytyille tarkoitettuja kuivakaivokuppeja, joihin annosteltiin europiumleimalluosta tuotannossa käytettävällä leima-annostelijalla (Cavrolla) erilaisin asetusarvoin, jolloin saatiin sekä oikeanlaisia että levinneitä leimatippoja. Osa leima-annostelluista kupeista lisäkuivattiin ja osa säilytettiin huoneenlämmössä taustamäärityksiä varten. Taustamääritykset tehtiin Aio!-immunoanalyyttisäätöjärjestelmällä automatisoidun näytteensyöttäjän avulla. Tuloksia tarkasteltiin sekä visuaalisesti kuvaajien avulla että tilastotieteellisesti SAS-tilasto-ohjelmalla.</p> <p>Tulokset vahvistivat havaintoa siitä, että levinneet leimatipat antavat korkeampia tuloksia. Samalla todettiin, että oikein leima-annostellut kupit ovat samankaltaisia lisäkuivattuina ja ilman lisäkuivausta, mutta korkeita tuloksia saadaan huomattavasti enemmän lisäkuivatuista kupeista, joiden leimatippa on levinnyt, kuin levinneistä leimatipoista ilman lisäkuivausta.</p>	
Hakusanat: kuivakaivokemia, immunodiagnostiikka	
Säilytyspaikka: Turun ammattikorkeakoulun kirjasto, Lemminkäisenkatu	

Degree Programme: Laboratory Technology	
Author: Janina Lehtonen	
Title: Effect of label dispensing and drying on background of dry cup measurements	
Instructors: Innotrac Diagnostics Oy: Piitu Jauria M.Sc., Panu Hendolin Ph.D., Turku University of Applied Sciences: Jouko Vihanto, Ph.D.	
Date: November 2009	Total number of pages: 42
<p>Innotrac Diagnostics Oy is a Turku-based company that uses a patented system to produce dry-cup immunoassays for measurements. In the year 2006 Innotrac Diagnostics Oy was acquired by Danish Radiometer AB. At that point dry cup technology was transferred from the Aio! immunoanalyzer to the AQT Flex 90 analyzer.</p> <p>One of the main goals of Innotrac Diagnostics Oy is to improve the stability of the dry cup. The aim is to achieve this by adding an extra drying process into the production of dry cups.</p> <p>It has also been noticed that the alignment of the label droplet in the dry cup is relevant because spread labels give excessive results, also known as “outliers”. The purpose of this study was to confirm this discovery and find out if the extra drying of dry cups during production has any effects on the results background measurement.</p> <p>Dry cup batches for three different analytes were used. Europium label was dispensed into the cups using different settings of Cavro and both good and spread labels. Some of the label cups were extra dried and some were left in room temperature for background measurements. The results were examined both visually by figures and statistically with the SAS statistics computer program.</p> <p>These results confirmed that spread labels give higher results. Dry cups labeled in the right way are similar with or without extra drying but a significantly greater number of high results was obtained by extra dry cups with spread label than non-extra dried cups with spread label.</p>	
Keywords: dry cups, immunoassay	
Deposit at: TUAS library	

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	6
2	ELIMISTÖN PUOLUSTUSMEKANISMIT	8
3	VASTA-AINEIDEN RAKENNE JA TOIMINTA	9
4	IMMUNODIAGNOSTIIKKA	12
5	KUIVAKAIVOJEN KEMIA	14
	5.1 Kuivakaivojen valmistus	15
	5.2 Kuivakaivojen toiminta	16
	5.3 Aikaerotteinen fluorometria	17
6	LEIMA-ANNOSTELU JA LISÄKUIVAUS	20
	6.1 Opinnäytetyössä tutkitut analyytit	20
	6.2 Työn suoritus	21
7	TULOKSET	23
	7.1 Koriongonadotropiinin (hCG) tulokset	23
	7.1.1 hCG:n tulosten tilastollinen tarkastelu	27
	7.2 C-reaktiivisen proteiinin (CRP) tulokset	30
	7.2.1 CRP:n tulosten tilastollinen tarkastelu	32
	7.3 Troponiini I:n (TnI) tulokset	35
	7.3.1 TnI:n tulosten tilastollinen tarkastelu	37
8	LOPPUPÄÄTELMÄT	40

KUVIOT

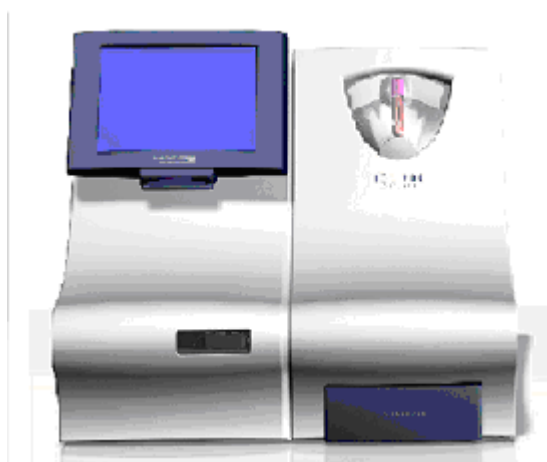
Kuva 1. AQT Flex 90 -immunoanalysaattori. ²	6
Kuva 2. Antigeenin rakenne. ²	9
Kuva 3. IgG:n reaktiiviset kohdat osoitettuna nuolilla. ²	10
Kuva 4. Avain-lukko -malli. ²	11
Kuva 5. sandwich-tekniikka: vasta-aine 1 on kiinteään kantajaan sidottu vasta-aine ja vasta-aine 2 on leimattu vasta-aine. ²	13
Kuva 6. Aio!-kynä. ²	14
Kuva 7. Innotracs AiO! -immunoanalysaattori. ⁵	14
Kuva 8. Kuivakaivojen valmistus. ⁵	15
Kuva 9. AQT Flex kasetti. ²	16
Kuva 10. Immunomääritys kuivakaivomenetelmällä. ²	17
Kuva 11. Stokesin siirtymä. ²	18
Kuva 12. Mittaussykli. ²	19
Kuva 13. Tausta ilman lisäkuivausta erilaisilla leimatipoilla.	23
Kuva 14. Tausta lisäkuivauksella erilaisilla leimatipoilla.	24
Kuva 15. Uusinnan tulokset.	24
Kuva 16. hCG:n tausta ilman lisäkuivausta kaikilla leimatipoilla.	25
Kuva 17. hCG:n tausta lisäkuivauksella kaikilla leimatipoilla.	26
Kuva 18. hCG:n kaikki leimatipat samassa kuvassa.	26
Kuva 19. hCG:n leimatipan muodon tarkastelu.	27
Kuva 20. hCG:n lisäkuivauksen tarkastelu.	28
Kuva 21. hCG:n kaikkien leimatippojen tarkastelu.	29
Kuva 22. hCG:n kaikkien leimatippojen tarkastelu, uusintatesti.	30
Kuva 23. CRP:n tausta ilman lisäkuivausta kaikilla leimatippamuodoilla.	31
Kuva 24. CRP:n tausta lisäkuivauksella kaikilla leimatipoilla.	31
Kuva 25. CRP:n kaikki pienet leimatipat samassa kuvassa.	32
Kuva 26. CRP:n leimatipan muodon tarkastelu.	33
Kuva 27. CRP:n lisäkuivauksen tarkastelu.	34

Kuva 28. Kaikkien CRP-tulosten tarkastelu.	35
Kuva 29. TnI:n leimatipat ilman lisäkuivausta.	36
Kuva 30. TnI:n leimatipat lisäkuivauksella.	36
Kuva 31. TnI:n kaikki leimatipat samassa kuvassa.	37
Kuva 32. TnI:n leimatippojen muodon tarkastelu.	38
Kuva 33. TnI:n lisäkuivauksen tarkastelu.	38
Kuva 34. TnI:n kaikkien leimatippamuotojen vertailu.	39

1 JOHDANTO

Innotrac Diagnostics Oy on vuonna 1995 perustettu turkulainen yritys ja sen toiminta perustui Innotrac Aio! –immunoanalysaattorilla tehtyihin troponiini I-, CK-MB- ja myoglobiinimäärityksiin. Määritykset perustuivat immunodiagnostiikkaan ja kuivakemiaan.¹

Vuonna 2006 tanskalainen Radiometer AB osti Innotrac Diagnostics Oy:n, jolloin Innotracin kuivakemiateknologia siirrettiin Radiometerin valmistamaan instrumenttiin AQT Flex 90 -immunoanalysaattoriin (kuva 1).



Kuva 1. AQT Flex 90 –immunoanalysaattori.²

Testikasetit valmistetaan kuivakemian periaatteen mukaisesti ja ne sisältävät immunodiagnostisessa määrityksessä tarvittavat reagenssit, mm. antigeenispesifiset vasta-aineet, jotka sitoutuvat antigeenin epitooppihin muodostaen ns. sandwich-rakenteen. Kuivakaivoissa on myös europiumleima, joka mahdollistaa kuivakaivojen määrittämisen aikaerotteisella fluoresenssilla.²

Leimatipan sijainnilla kuivakaivossa on havaittu olevan vaikutusta taustamäärityksen tulokseen, koska väärin sijoittuneet leimatipat antavat liian korkeita taustatuloksia.

Opinnäytetyön tarkoituksena on varmistaa tämä havainto sekä tutkia, vaikuttaako valmistusprosessiin lisättävä kuivausvaihe taustamäärityksen tulokseen.

2 ELIMISTÖN PUOLUSTUSMEKANISMIT

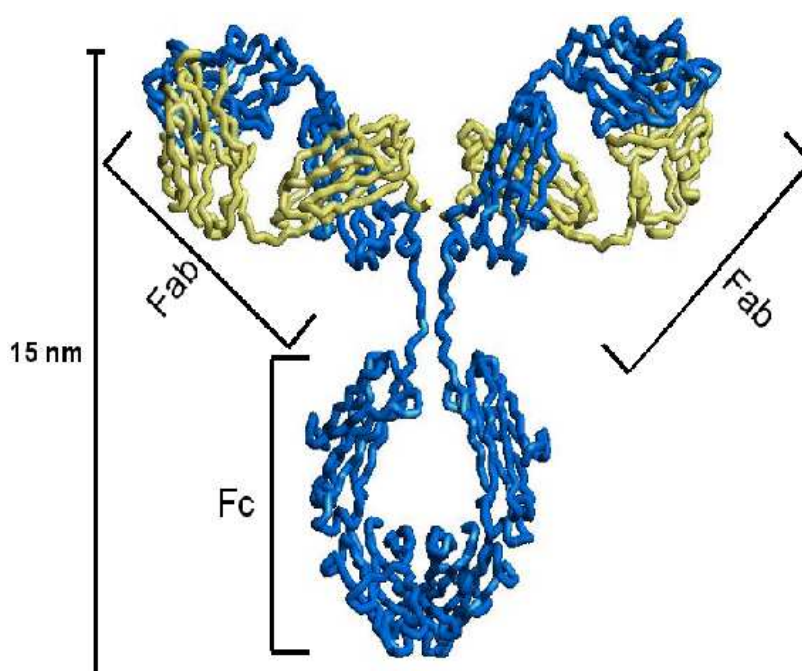
Ihmisen puolustusjärjestelmä eli immuunijärjestelmä jakautuu kahteen eri järjestelmään: epäspesifiset puolustusmekanismit ja spesifiset puolustusmekanismit. Nämä järjestelmät puolustavat elimistöä erilaisilta vierailta ja haitallisilta tekijöiltä, esimerkiksi bakteereilta. Puolustusjärjestelmät täydentävät toisiaan ja täydellisen immuunivasteen saamiseksi molempien järjestelmien on toimittava normaalisti.³

Epäspesifiset puolustusmekanismit ovat synnynnäisiä ja ne pystyvät toimimaan tehokkaasti ilman, että elimistön on aikaisemmin pitänyt olla kosketuksissa mikrobiin. Järjestelmän toiminta ei myöskään tehostu, jos se kohtaa myöhemmin saman mikrobin. Epäspesifisen puolustusjärjestelmän kaikki osatekijät reagoivat useisiin eri mikrobeihin toisin kuin spesifinen puolustusjärjestelmä. Epäspesifisen puolustusjärjestelmän päätehtävä on estää haitallisten mikrobien pääsy elimistöön ja elimistöön päässeiden haitallisten mikrobien leviämisen estäminen. Epäspesifinen puolustusjärjestelmä jaetaan ulkoiseen puolustukseen (iho ja limakalvot) sekä sisäiseen puolustukseen (epäspesifiset solutason puolustusmekanismit ja solunulkoiset tekijät).³

Spesifinen immunitetti kehittyy syntymän jälkeen ja sen toiminta perustuu imusolujen eli lymfosyyttien toimintaan. Ihmisen elimistössä on paljon erilaisia lymfosyyttiryhmiä, klooneja, jotka oppivat kypsymisprosessissa, mihin rakenteisiin niiden pitää reagoida. Osasta lymfosyyteistä muodostuu muistisoluja, jolloin spesifinen puolustusjärjestelmä toimii nopeammin ja voimakkaammin saman mikrobin hyökätessä uudelleen elimistöön.³

3 VASTA-AINEIDEN RAKENNE JA TOIMINTA

Aktivoituneet B-lymfosyytit tuottavat vasta-aineita. Vasta-aineet ovat hiilihydraattia sisältäviä suuria valkuuaisaineita eli glykoproteiineja. Vasta-aineita kutsutaan yhteisnimellä immunoglobuliinit. Immunoglobuliinit ovat sähköisesti neutraaleita ja kulkevat elektroforeesissa muita proteiineja hitaammin. Vasta-ainemolekyylä koostuu neljästä aminohappoketjusta, joista kaksi on suurempaa nk. raskasta H-ketjua ja toiset kaksi ovat nk. kevyttä L-ketjua. Nämä peptidiketjut ovat kiinni toisissaan kysteiniaminohappojen muodostamalla rikkisillalla. Immunoglobuliinin aminohappoketjut muodostavat yhdessä symmetrisen, Y:n muotoisen molekyylin, jonka sakaroita kutsutaan Fab-osaksi ja vartta Fc-osaksi. Alla olevassa kuvassa 2 H-ketjut eli raskaat ketjut on kuvattu sinisellä ja L-ketjut eli kevyet ketjut keltaisella.⁴



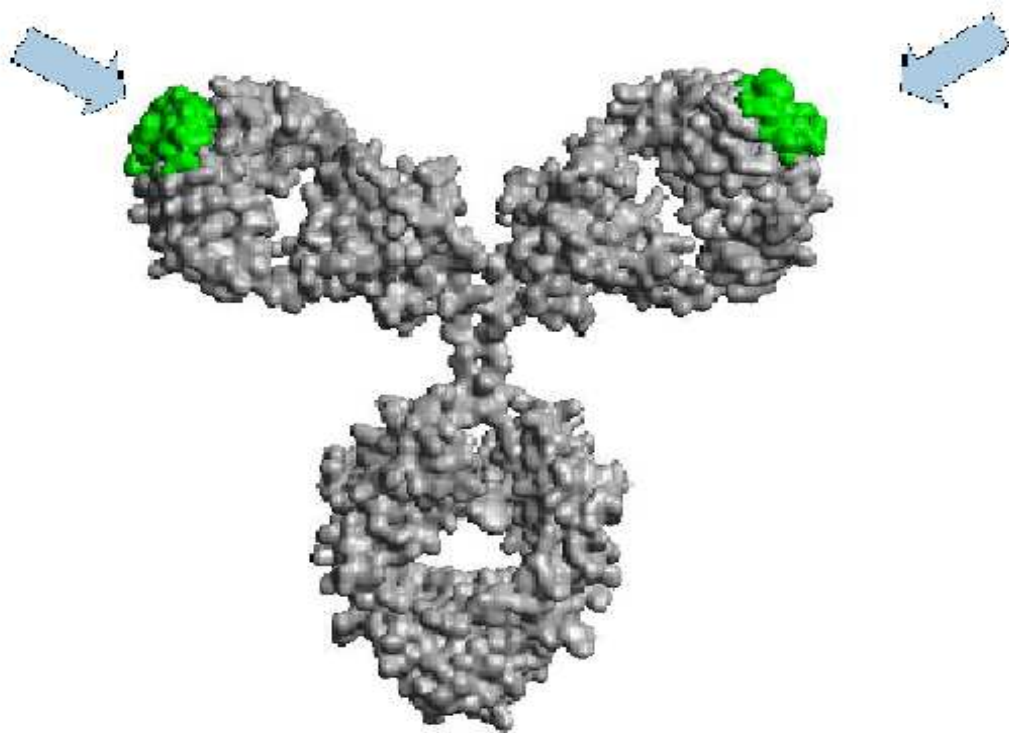
Kuva 2. Antigeenin rakenne.²

Fab-osan kärki on molekyylin reaktiivinen kohta, jolla se tarttuu kiinni antigeenideterminantiin eli epitooppiin. Tavallisessa neljän polypeptidiketjun

muodostamassa vasta-ainemolekyylissä on kaksi reaktiivista kohtaa. Fc-osallaan vasta-ainemolekyyli voi kiinnittyä joidenkin solujen pintaan.⁴

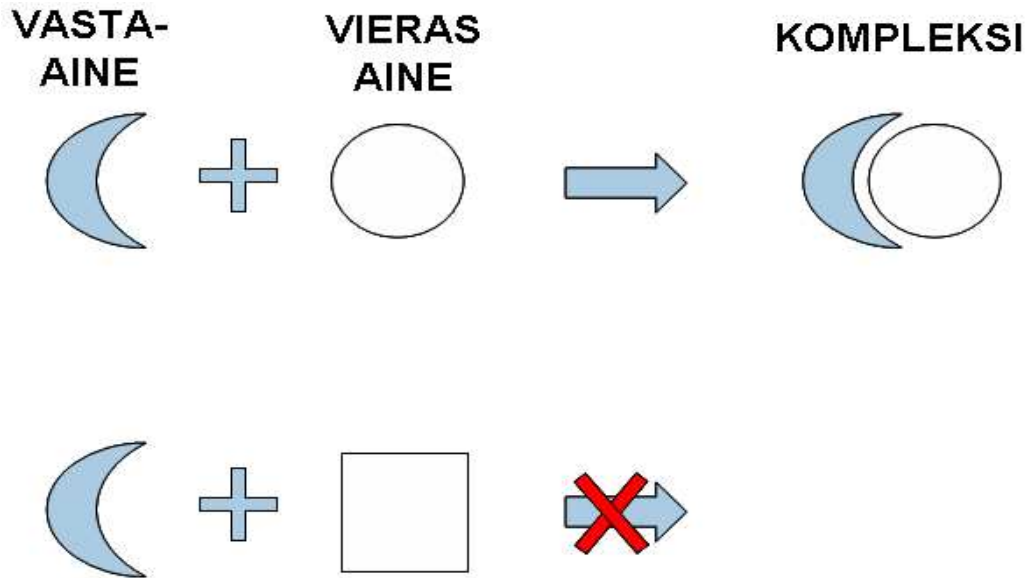
Immunoglobuliiniluokkia on viisi: IgG, IgM, IgA, IgE ja IgD. Ne eroavat toisistaan raskaiden H-ketjujen rakenteen mukaan. Kevyitä L-ketjuja on vain kahta luokkaa: kappa ja lambda ja näitä ketjuja on jokaisessa immunoglobuliiniluokassa.⁴

Immunoglobuliiniluokista IgG on yleisimmin immunodiagnostiikassa käytössä oleva. IgG:ssä on kaksi raskasta ja kaksi kevyttä ketjua sekä kaksi reaktiivista kohtaa (Kuva 3). Sen molekyylipaino on noin 150 kDa.⁴



Kuva 3. IgG:n reaktiiviset kohdat osoitettuna nuolilla.²

Yleisesti voidaan todeta, että kaikki ne aineet, jotka saavat elimistön tuottamaan vasta-aineita, ovat antigeeneja. Tunnusomaista vasta-aineille on suuri spesifisyys. Antigeenin pinnalla oleva epitooppi eli tunnistekohta stimuloi juuri tietyn vasta-aineen tuotannon lukko-avain-mallin periaatteella (kuva 4).²



Kuva 4. Avain-lukko -malli.²

Antigeeni on yleensä suhteellisen suuri molekyylikooltaan, mutta joskus se voi olla niin pieni, ettei se yksin saa aikaan immuunimuodostusta. Tällaista pientä molekyyliä kutsutaan hapteeniksi. Antigeenien avulla elimistö myös tunnistaa, onko solu, jonka pinnalla antigeeni on, oma vai tuhottava solu.⁴

Ihmisen elimistö tuottaa itsekin erilaisia antigeeneja, jotka voivat kertoa paljon ihmisen terveydentilasta. Esimerkiksi troponiini I:tä (TnI) on ihmisen elimistössä, mutta kohonnut määrä TnI:tä viittaa saadusta tai tulossa olevasta sydäninfarktista. Ihmisen kudoksista vereen erittymien antigeenien määrästä voidaan tutkia taudin kehittymistä.^{2,5}

4 IMMUNODIAGNOSTIIKKA

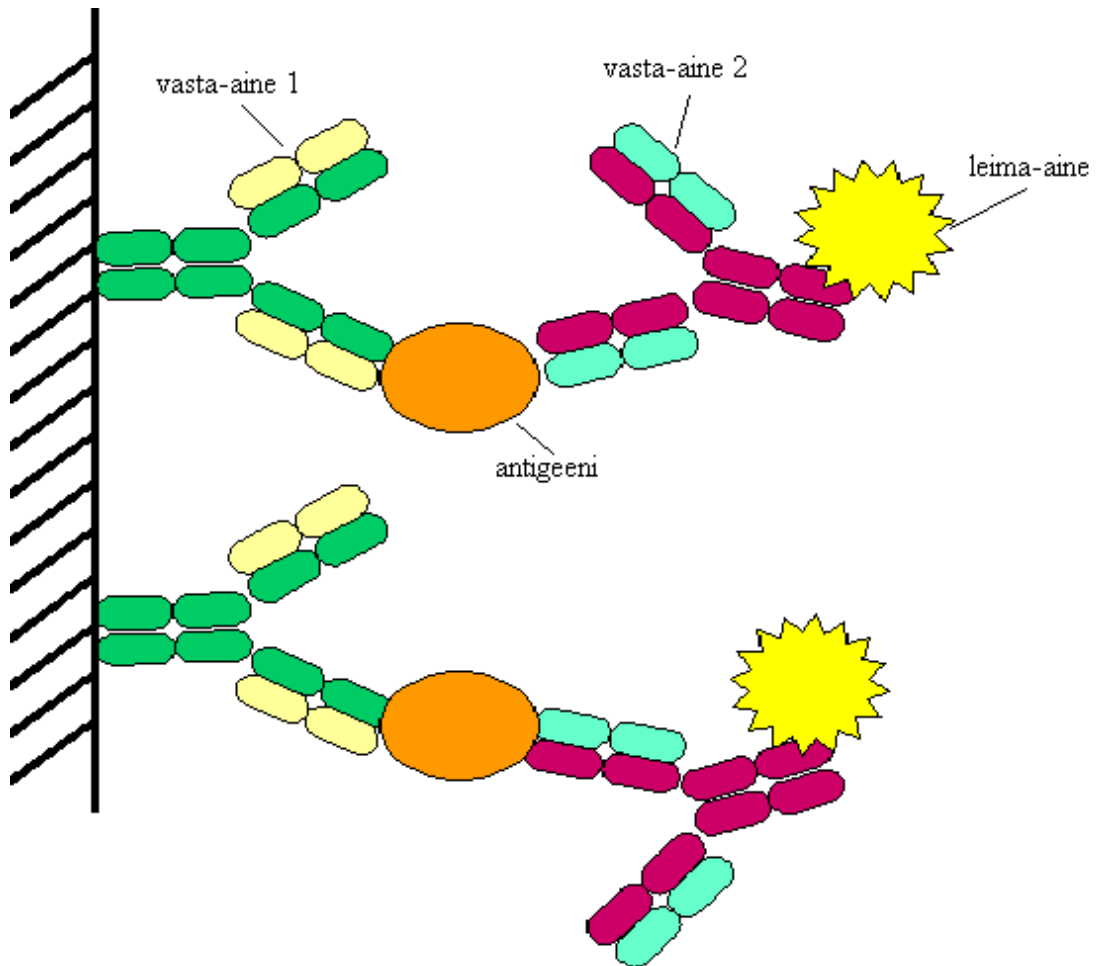
Immunodiagnostiikka perustuu vasta-aineen ja antigeenin väliseen spesifiseen reaktioon, joka muistuttaa entsyymien ja substraatin sitoutumista toisiinsa. Antigeenin ja vasta-aineen sitoutumiseen toisiinsa vaikuttavat hydrofobiset ja elektrostaattiset voimat. Nämä voimat ovat kuitenkin suhteellisen heikkoja, joten reaktio voi tapahtua myös vastakkaisuuntaisesti.⁶

Immunomäärityksellä voidaan näytteestä määrittää tietyn molekyylin tai yhdisteen pitoisuus. Immunomääritys voidaan tehdä plasmasta, kokoverestä tai seerumista. Esimerkiksi verinäytteestä voidaan analysoida vasta-aineita tai huumeiden pitoisuuksia.²

Immunologiset määritykset jaetaan kilpaileviin ja ei-kilpaileviin määrityksiin. Kilpailevaa määritystä käytetään pienten (< 10 kDa) molekyylien määrittämiseen esimerkiksi huumaussaineiden määrityksessä. Kilpailevassa määrityksessä vasta-ainetta on vähemmän kuin antigeenejä. Siinä näytteessä oleva antigeeni ja leimattu antigeeni kilpailevat sitoutumisesta vasta-aineeseen. Pienempi leimaamaton antigeeni sitoutuu helpommin vasta-aineeseen. Kun kaikki leimaamattomat antigeenit ovat sitoneet osuutensa verran vasta-ainetta, leimattu antigeeni sitoutuu vapaana oleviin vasta-ainemolekyyleihin. Reaktion jälkeen reaktioastia pestään, jolloin sitoutumattomat leimatut antigeenit huuhtoutuvat pois ja jäljelle jäävästä osuudesta voidaan mitata signaali. Kilpailevan immunomäärityksen kalibraatiosuora on laskeva, sillä mitä enemmän näytteessä on leimaamatonta eli määritettävää antigeeniä, analyyttiä, sitä pienempi signaali saadaan.^{2,5,6}

Ei-kilpailevassa immunomäärityksessä vasta-ainetta on enemmän kuin antigeenia. Ei-kilpailevassa immunomäärityksessä käytetään kahta eri vasta-ainetta, joilla on samassa antigeenissa eri epitoopit eli tunnistekohdat. Tällöin antigeeni sitoutuu molempiin vasta-aineisiin muodostaen ns. sandwich'in. (Kuva 5) Pesun yhteydessä

ylimäärä vasta-ainetta huuhtoutuu pois, jolloin signaalin määrä on suoraan verrannollinen antigeenin pitoisuuteen eli kalibraatiosuora on nouseva.²



Kuva 5. sandwich-tekniikka: vasta-aine 1 on kiinteään kantajaan sidottu vasta-aine ja vasta-aine 2 on leimattu vasta-aine.²

Ei-kilpaileva immunomääritys on huomattavasti herkempi kuin kilpaileva määritys, koska perustason signaali on nolla. Kilpailevassa määrityksessä suuri nollatason signaali aiheuttaa suuren vaihtelun, jolloin tarvitaan suuri muutos analyytin pitoisuudessa, jotta signaali eroaisi nollatasosta. Ei-kilpaileva immunomääritys tehdään yleensä aina kun se on mahdollista eli aina silloin kun antigeeni on riittävän suurikokoinen.²

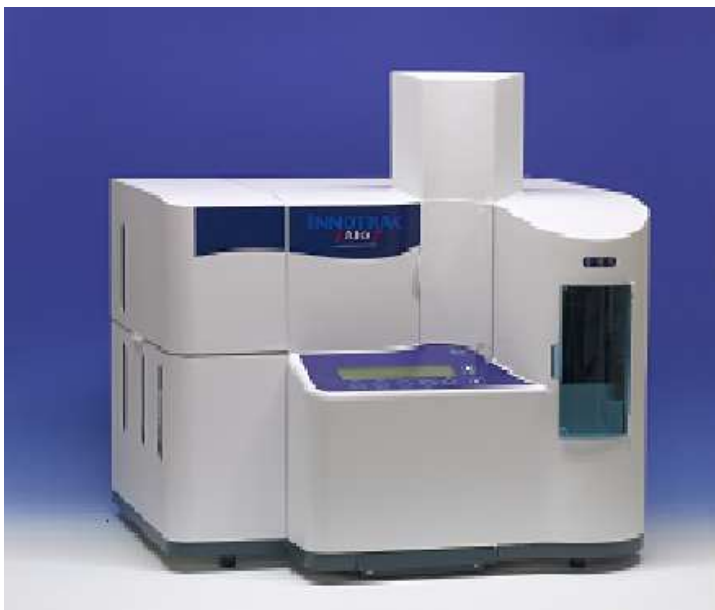
5 KUIVAKAIVOJEN KEMIA

Innotrac Diagnostics Oy:n testikaseteissa on jokaisessa 16 testikuppia, joista jokaisesta kupista voidaan tehdä yksi määrittys tietylle antigeenille. Esimerkiksi TnI-testikasetilla voidaan tehdä yhteensä 16 TnI-määrittystä. Aiemmin käytetyssä Aio!-immunoanalysaattorissa analyyttikupit pakattiin kyniin (kuva 6), joihin mahtui kuhunkin 12 analyyttikuppia, jolloin yhdestä kynästä voidaan tehdä 12 määrittystä. Pakkaustavaltaan kasetti ja kynä eroavat siten, että kasettiin 16 kuppia pakataan kahteen riviin rinnakkain, kun kynään kuppeja pakataan 12 kpl päällekkäin.²



Kuva 6. Aio! kynä.²

Opinnäytetyössä kuivakaivokupit määritettiin AiO!-immunoanalysaattorilla (kuva 7), koska kyniin pakkaaminen on helpompaa kuin kasetteihin pakkaaminen ja koska AiO!-immunoanalysaattori on näytteensyötöltään automatisoidumpi kuin AQT Flex 90 –immunoanalysaattori.

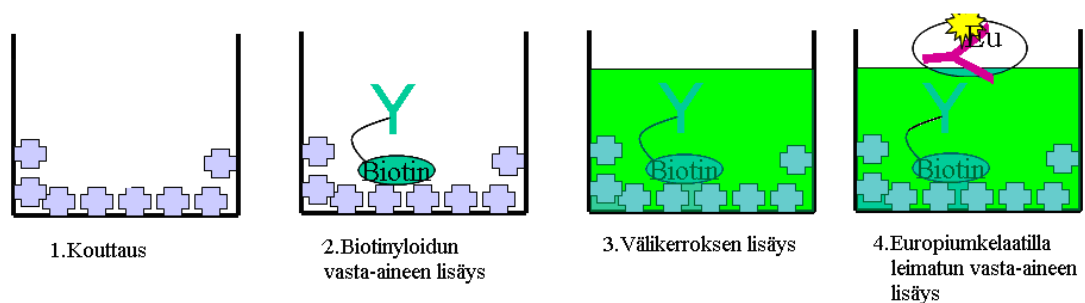


Kuva 7. Innotrac AiO! - immunoanalysaattori.⁵

5.1 Kuivakaivojen valmistus

Kuivakaivojen valmistus aloitetaan tyhjän muovisen kaivon päällystämistä (kouttaamisesta). Kaivot päällystetään streptavidiinilla passiivisen absorptio avulla.² Streptavidiini eristetään *Streptomyces avidinii* -bakteerista. Se on homotetrameerinen proteiini, jolla on erinomainen kyky sitoa erilaisia biomolekyylejä.⁶ Seuraavaksi kaivoihin lisätään biotinyloitu vasta-aine, joka sitoutuu pohjaan biotiini-streptavidiinii -sidoksella. Tämä sidos on voimakkaimpia ei-kovalenttisia sidoksia. Biotinyloidun vasta-aineen lisäyksen jälkeen kaivoihin lisätään nestemäinen välikerros, jonka annetaan kuivua. Välikerros suojaa biotinyloitua vasta-ainetta kuivumisen jälkeen sekä estää leimattua vasta-ainetta reagoimasta epäspesifisesti kaivomateriaalin kanssa. Viimeisenä kaivoon lisätään europiumkelaatilla leimattu vasta-aine. Europiumkelaatti on itsestään fluoresoiva yhdiste, jolloin ei tarvita minkäänlaisia kehitysliuoksia.²

Alla olevassa kuvassa 8 on esitettyä kuivakaivojen valmistus.



Kuva 8. Kuivakaivojen valmistus.⁵

Leima-aineen lisäyksen jälkeen kuivakaivot kootaan kasetteihin siten, että jokaiseen kasettiin tulee 16 kuivakaivokuppia. Alla olevassa kuvassa 9 on Innotracs Diagnostics Oy:n valmistama analyttikasetti. Kasetin sisällä on adsorbentti kosteuden sitojana, jotta kuivakaivokupit pysyisivät mahdollisimman kuivina.²



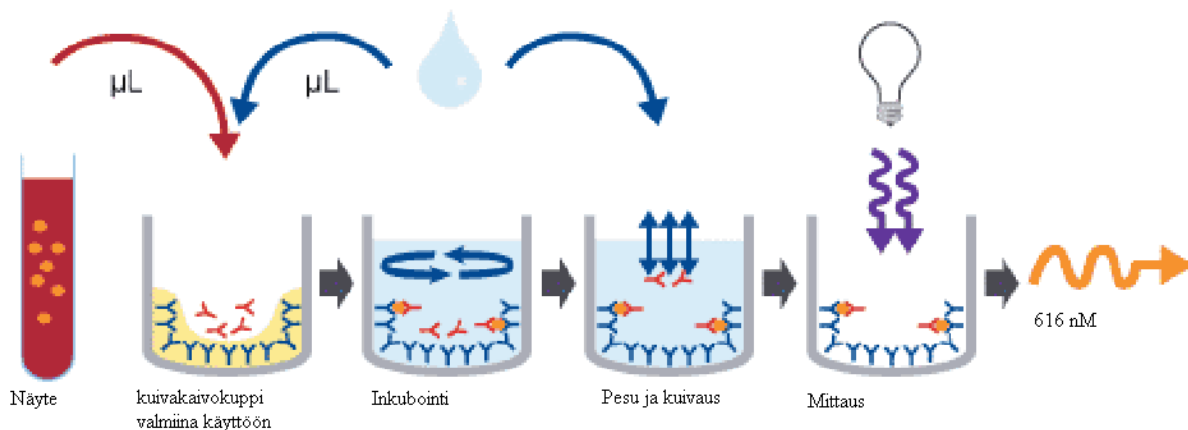
Kuva 9. AQT Flex kasetti.²

5.2 Kuivakaivojen toiminta

Vaikka analyttikaivot pakataan nykyään kasetteihin ja kasetit määritetään AQT Flex 90 -analyysaattorilla, on kaivojen määrittysperiaate samankaltainen kuin kynään pakatuilla kaivoilla, jotka määritetään AiO!-immunoanalyysaattorilla. (T. Hautamäki, Innotrac Diagnostics Oy, henk.koht.tiedonanto)

Määrittäksessä immunoanalyysaattori injektioi näytettä tietyn määrän kaivon pohjalle. Näytteenä on määrittettävän analyytin antigeeni. Kupissa antigeeni ja vasta-aineet reagoivat keskenään tietyn analyyttikohtaisen ajan muodostaen sandwich-rakenteen.⁵

Inkuboinnin jälkeen immunoanalyysaattorissa ylimäärä eli sitoutumaton vasta-aine pestään pois ja kaivo kuivataan. Kuivauksen jälkeen kaivoihin jääneen leimatun vasta-aineen määrä mitataan aikaerotteisella fluorometrialla. Koska vasta-aineet ja antigeeni muodostavat sandwich-rakenteen, on määrittäminen ei-kilpaileva, eli saatu signaali on suoraan verrannollinen antigeenin pitoisuuteen näytteessä. Alla olevassa kuvassa 10 on esitettyä immunomäärittäminen kuivakaivomenetelmällä.^{2,5}

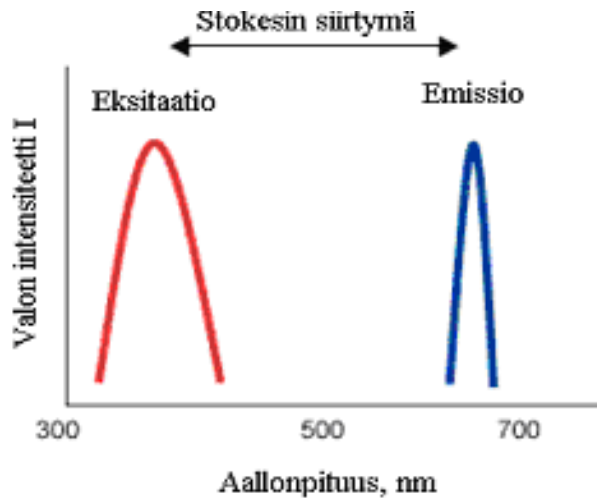


Kuva 10. Immunomääritys kuivakaivomenetelmällä.²

5.3 Aikaerotteinen fluorometria

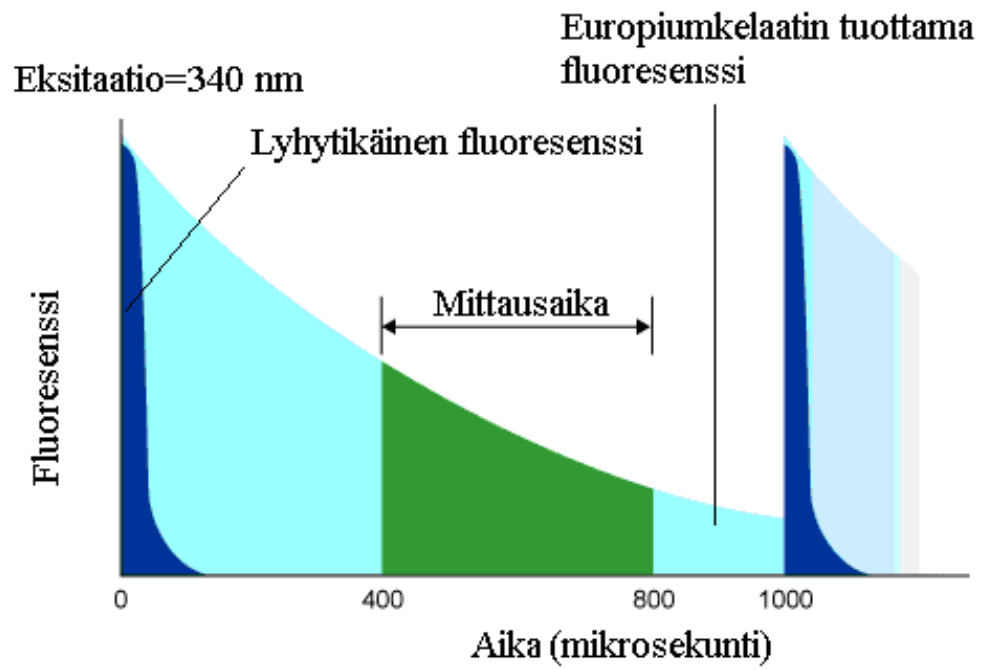
Europium kuuluu harvinaisiin maametalleihin eli lantanideihin. Muita lantanideja ovat samarium (Sm), terbium (Tb) ja dysprosium (Dy). Lantanideilla on voimakas ja pitkäikäinen fluoresenssi, mutta niiden molaarinen absorptiokerroin on niin pieni, että yksinään lantanidit eivät sovi fluoresenssimittauksiin leimoiksi. Kun lantanidi ja kelaatti muodostavat yhdessä orgaanisen kompleksin, saadaan lantanidin molaarista absorptiokerrointa parannettua, jolloin lantanidikelaatteja voidaan käyttää leimana fluoresenssimittauksissa. Lantanidikelaatti ei myöskään vaikuta leimatun vasta-aineen biologisiin ominaisuuksiin.²

Immunomäärityksessä Aio! ja AQT 90 Flex –immunoanalysaattorit mittaavat europiumkelaatin tuottamaa signaalia aikaerotteisena fluoresenssina. Aikaerotteinen fluorometria (TR-FIA, Time-resolved fluorometry) on suomalainen keksintö, jossa mitataan lantanidikelaatin, tässä tapauksessa europiumkelaatin, pitkäaikaista fluoresenssia viiveajan jälkeen, jolloin näytteen taustafluoresenssi on sammunut. Lantanidien suuri Stokesin siirtymä (kuva 11), eli suuri ero eksitaatio- ja emissioaallonpituuksissa sekä niiden kapea emissiopeikki lisäävät herkkyyttä erottamalla selvästi lantanidikelaatin signaalin taustasta.⁶



Kuva 11. Stokesin siirtymä.²

Sekä Aio!- että AQT 90 Flex –immunoanalysaattoreilla tehtävissä mittauksissa europiumkelaatti viritetään aallonpituudella 340 nm ja emissio mitataan aallonpituudella 616 nm. Europiumin fluoresenssin elinikä on noin yksi millisekunti, kun taas tavallisilla fluoresenssiyhdisteillä fluoresenssin elinikä on muutamia nanosekunteja. Itse mittaus näytteestä tapahtuu 400-800 μ s eksitaatiopulssista, jolloin muiden kuin europiumkelaatin tuottama fluoresenssi on emittoitunut. Mittaussykli kestää kokonaisuudessaan 1000 μ s ja tämä sykli toistetaan 1000 kertaa, jolloin mittauksen kokonaiskesto on 1 sekunti. Alla olevassa kuvassa 12 on esitettyä immunoanalysaattorissa tapahtuva mittaussykli.⁵



Kuva 12. Mittaus sykli.²

6 LEIMA-ANNOSTELU JA LISÄKUIVAUS

6.1 Opinnäytetyössä tutkitut analyytit

Leimatipan muotoa ja sijaintia sekä lisäkuivauksen vaikutusta kuivakaivojen taustaan tutkittiin kolmella eri analyytillä, hCG, CRP ja TnI. Nämä analyytit valittiin opinnäytetyöhön, koska niiden välikerrosten koostumus sekä leimaliuoksen koostumus eroavat toisistaan. (P.Jauria, Innotrac Diagnostics Oy, henk.koht.tiedonanto)

Koriongonadotropiini (hCG, human chorionic gonadotropin) on hiilihydraattipitoinen proteiini eli glykoproteiini, jota erittyy naisessa eniten raskauden ensimmäisen kolmanneksen aikana. hCG estää keltarauhasta surkastumasta ja keltarauhasen steroidit estävät kuukautisvuodon, jolloin raskaus ei keskeydy. Raskauden aikana hCG:tä on naisen veressä ja sitä erittyy myös virtsaan, jolloin raskaustestin teko on mahdollinen kummasta tahansa. Innotrac Diagnostics Oy:n hCG-testikaseteilla raskaus määritetään verestä.⁷

CRP on maksan erittämä C-reaktiivinen proteiini. CRP:n määrä ihmisen elimistössä lisääntyy nopeasti bakteeri-infektion, muun tulehdusreaktion tai solutuhon vaikutuksesta. CRP:n määrä lisääntyy erityisen nopeasti reuman ja monen pahanlaatuisen kasvaimen yhteydessä.⁷ CRP:n määrä myös laskee nopeasti taudin parantuessa. Aikaisemmin CRP:tä on käytetty vain tulehdusten määrittämiseen eli ihmisestä on mitattu vain korkeita CRP pitoisuuksia (> 10 mg/L) mutta nyt on huomattu, että pieni CRP:n nousu muuten terveellä henkilöllä (3-10 mg/L) on merkki suurentuneesta sydäninfarktin riskistä.²

Troponiini on pelkästään lihassoluissa oleva valkuaisaine eli proteiini. Troponiini I inhiboi eli estää aktomyosiinin ATPaasia ja siten myös lihassupistuksen kalsiumin puuttuessa. Sydänlihaksen troponiini I poikkeaa rakenteeltaan muiden lihasten troponiineista niin paljon, että sen vasta-aineet ovat erittäin spesifisiä sydänlihakselle. Troponiini I – määrityksellä voidaan todeta tuleva tai tapahtunut sydäninfarkti.²

6.2 Työn suoritus

Työ aloitettiin leima-annostelemalla hCG-kuivakaivoja käsin pipetoimalla siten, että osaan kupeista leimatippa pipetoitiin ns. oikein eli samaan kohtaan kuppia kuin tuotannon prosessissa, osa kupeista leima-annosteltiin siten, että saatiin leimatipat leviämään ja osalla kupeista leimatippa annosteltiin keskelle kupin pohjaa. Leima-annostelun jälkeen puolet kupeista siirrettiin lisäkuivaukseen ja puolet jätettiin huoneenlämpötilaan odottamaan kyniin pakkaamista ja määrittämistä.

Kun lisäkuivausaika oli päättynyt, kaikki kupit pakattiin kyniin ja ne määritettiin Aio!-immunoanalysaattorilla. Saadut tulokset vaihtelivat satunnaisesti, eikä tuloksista voinut vetää minkäänlaisia johtopäätöksiä. Leima-annostelut uusittiin yhdellä varalevyllä siten, että annettiin leimaliuoksen olla kupeissa liuosmuodossaan saman ajan, kuin se olisi liuksena tuotannon prosessissakin. Uusinnassa käytetyt kupit leima-annosteltiin samoin kuin aiemminkin eli osa kupeista pipetoitiin oikein, osa oli levinneitä ja osaan leima pipetoitiin keskelle kupin pohjaa. Uusinnassa kuppeja ei lisäkuivattu, vaan ne määritettiin seuraavana päivänä AiO!-immunoanalysaattorilla. Saadut tulokset olivat parempia, mutta niissäkin oli liikaa keskinäisiä eroavaisuuksia, joten päädyttiin siihen, että leimatipat annostellaan Cavro-annostelijalla, jota käytetään tuotannon leima-annosteluissa.

Seuraavana vuorossa oli CRP:n leima-annostelu. Leima-annostelu tehtiin Cavro-annostelijalla siten, että osa kupeista annosteltiin samoilla asetuksilla kuin tuotannon annostelut. Osaan kupeista leima-annostelijan asetuksia muokattiin, jotta annostelukärjet siirtyivät ja saatiin levinneitä ja keskellä kuppia olevia leimatippoja. Osa kupeista siirrettiin lisäkuivaukseen ja osa jätettiin huoneenlämpötilaan. Kaikki kupit pakattiin ja määritettiin Aio!-immunoanalysaattorilla samana päivänä.

CRP:n jälkeen leima-annosteltiin Cavro-annostelijalla TnI. Leimatipat tehtiin taas samoin kuin CRP leimauksessa ja osa kaivoista jätettiin huoneenlämpöön ja osa siirrettiin lisäkuivaukseen. TnI:n jälkeen uusitaan vielä kerran hCG mutta tällä kertaa sekin annostellaan cavro-annostelijalla. Sekä TnI- että hCG-kaivoista osa

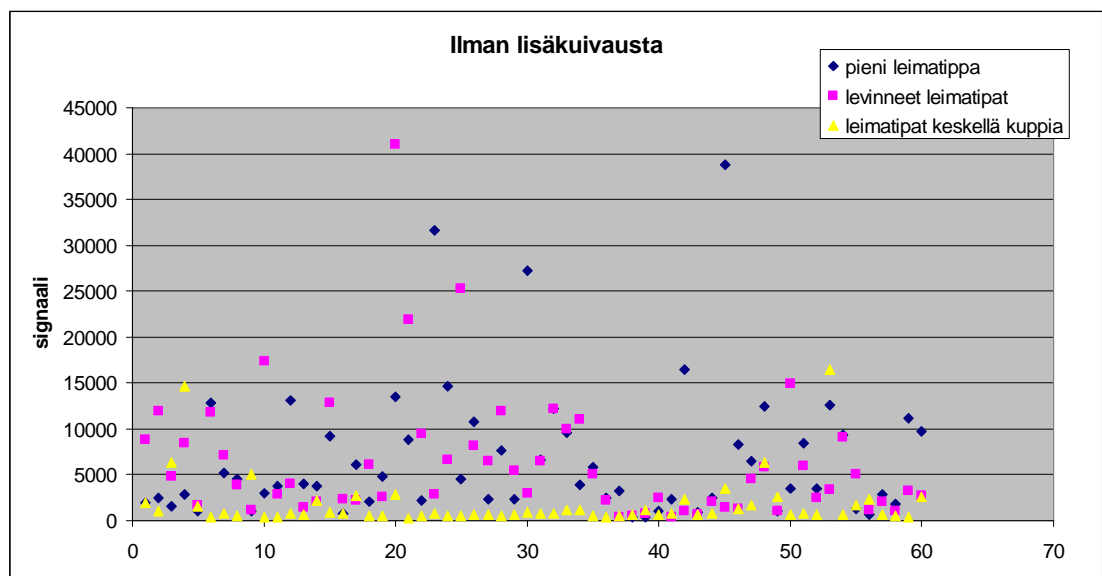
lisäkuivattiin, minkä jälkeen kaikki saman analyysin kuivakaivokupit määritettiin Aio!-immunoanalysaattorilla saman päivän aikana.

7 TULOKSET

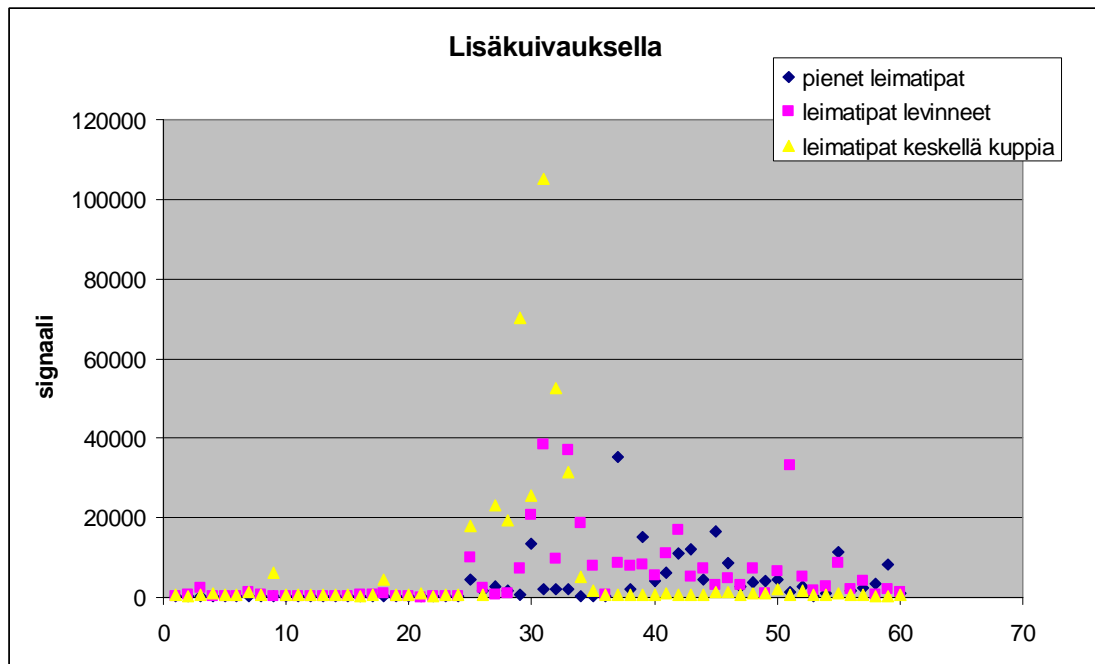
Kaikkia tuloksia tarkasteltiin sekä Excelillä tehtyjen kuvaajien pohjalta visuaalisesti että SAS-ohjelmalla tilastomatematisesti. SAS-ohjelmassa käytettiin Tukeyn ja Kramerin menetelmää yksisuuntaisena, jolloin ohjelma kertoo, ovatko tulokset erilaisia keskenään. Luottamusrajana käytettiin 95 %:a.

7.1 Koriogonadotropiinin (hCG) tulokset

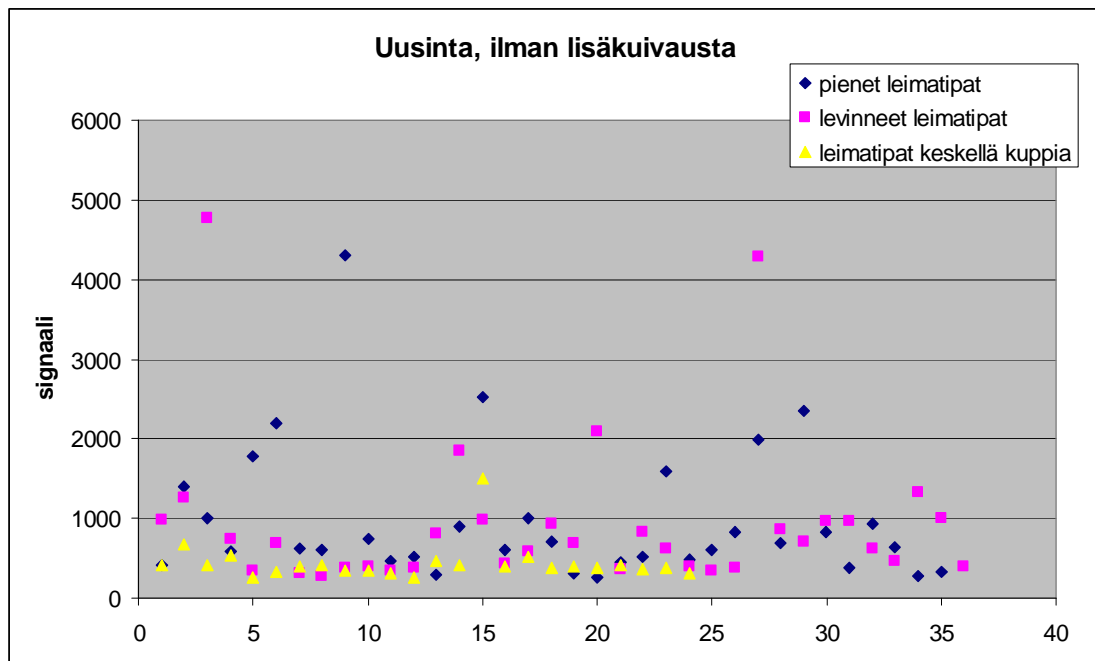
Ensimmäiseksi suoritettiin leima-annostelu käsin. Alla olevissa kuvaajissa 13, 14 ja 15 on näiden testien tulokset. Kaikkien kuvaajien x-akseleina on esitetty näytteiden lukumäärä.



Kuva 13. Tausta ilman lisäkuivausta erilaisilla leimatipoilla.



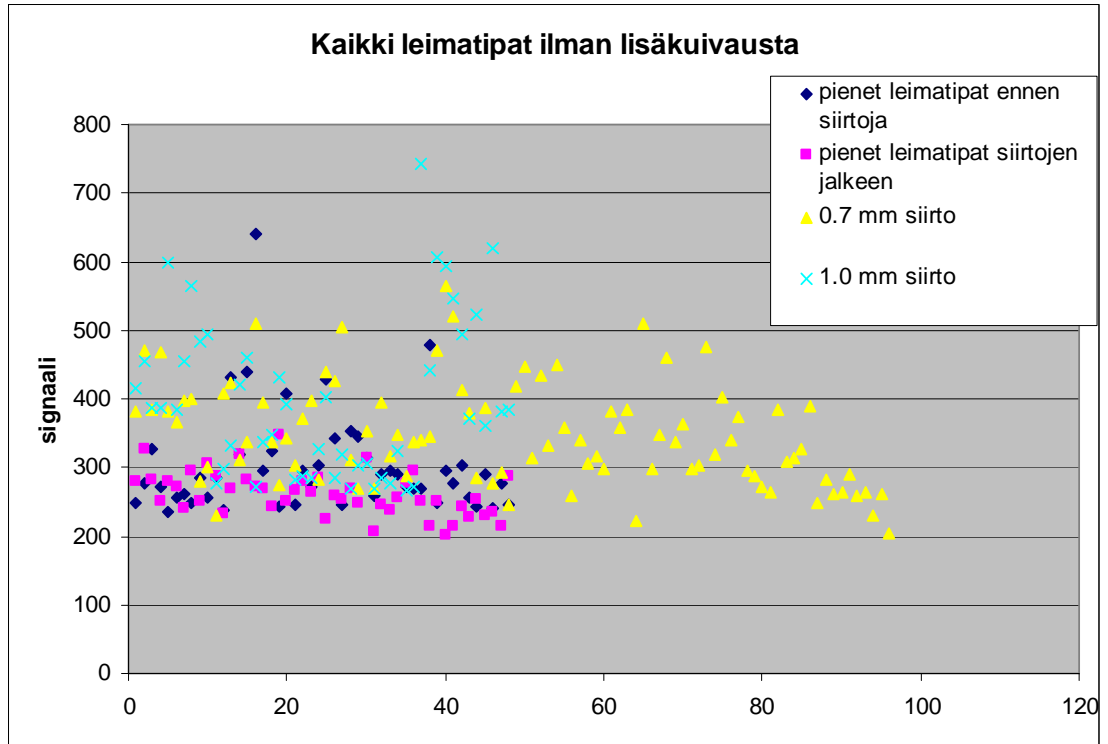
Kuva 14. Tausta lisäkuivauksella erilaisilla leimatipoilla.



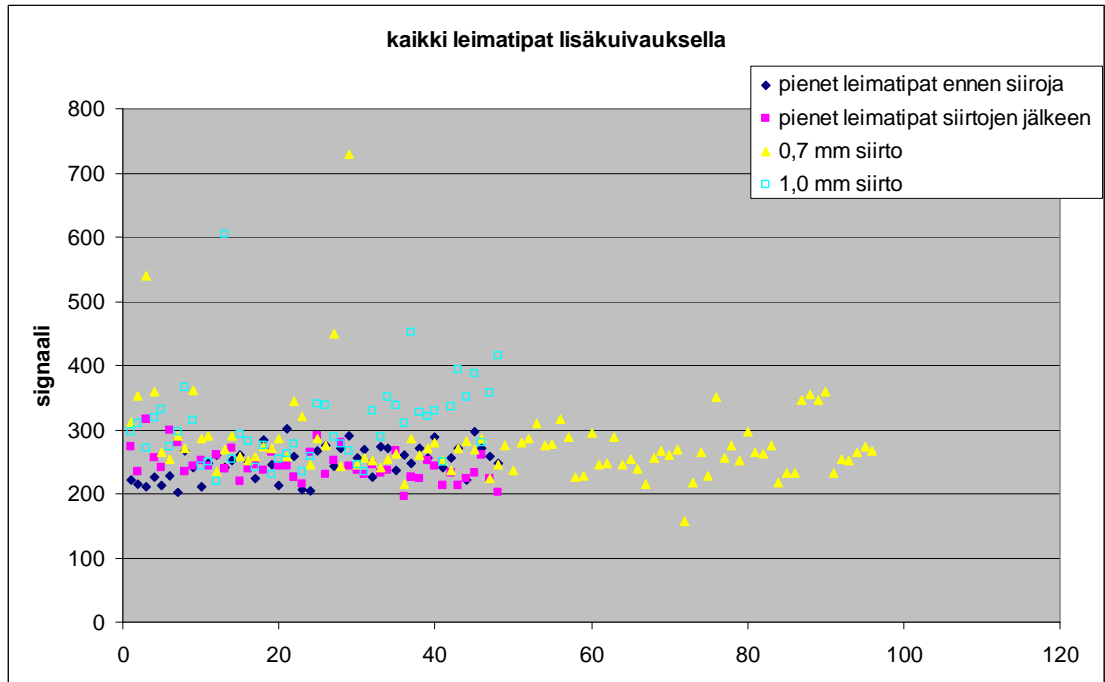
Kuva 15. Uusinnan tulokset.

Mitkään tuloksista eivät olleet käyttökelpoisia, joten loput leima-annosteluista suoritettiin Cavro-leima-annostelijalla. Alla olevissa kuvissa 16 ja 17 on näiden määrittysten tulokset. Koska leima-annostelu suoritettiin Cavrolla, kuvaa 0,7 mm:n

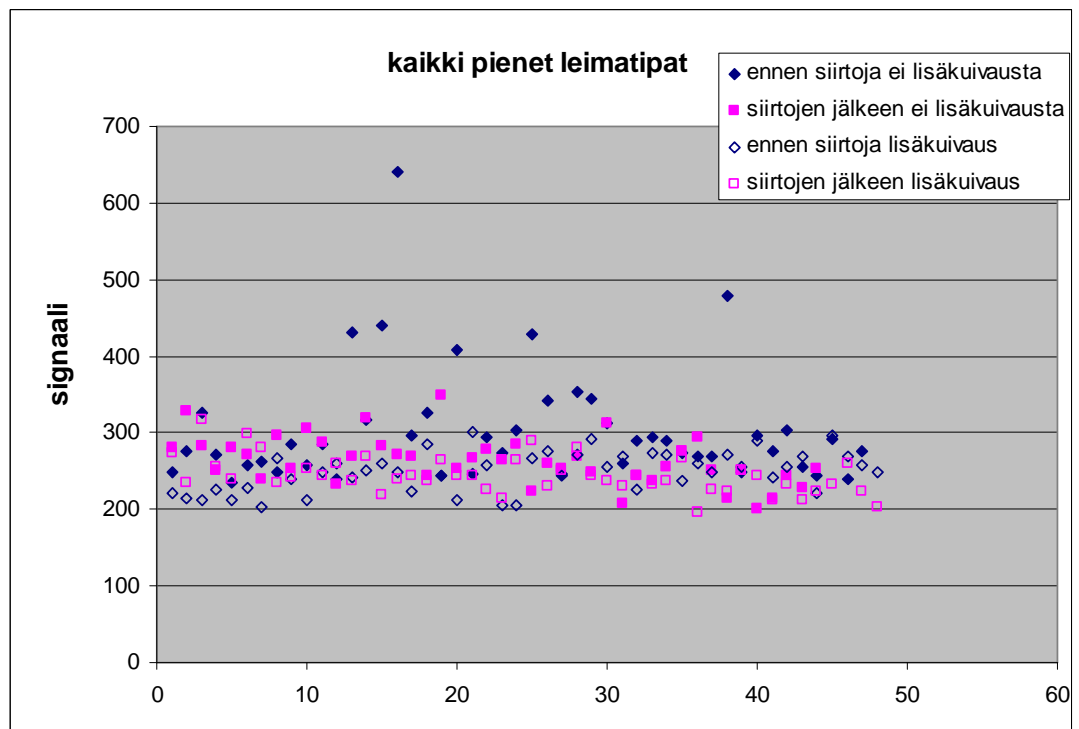
siirto levinnyttä leimatippaa ja 1,0 mm:n siirto kupin keskellä olevaa leimatippaa. Leimatipat oikein tarkoittaa, että leimatipat on annosteltu samoin kuin tuotannon prosessissa. Kuvassa 18 on kaikki pienet leimatipat lisäkuivauksella tai ilman lisäkuivausta samassa kuvassa.



Kuva 16. hCG:n tausta ilman lisäkuivausta kaikilla leimatippamuodoilla.

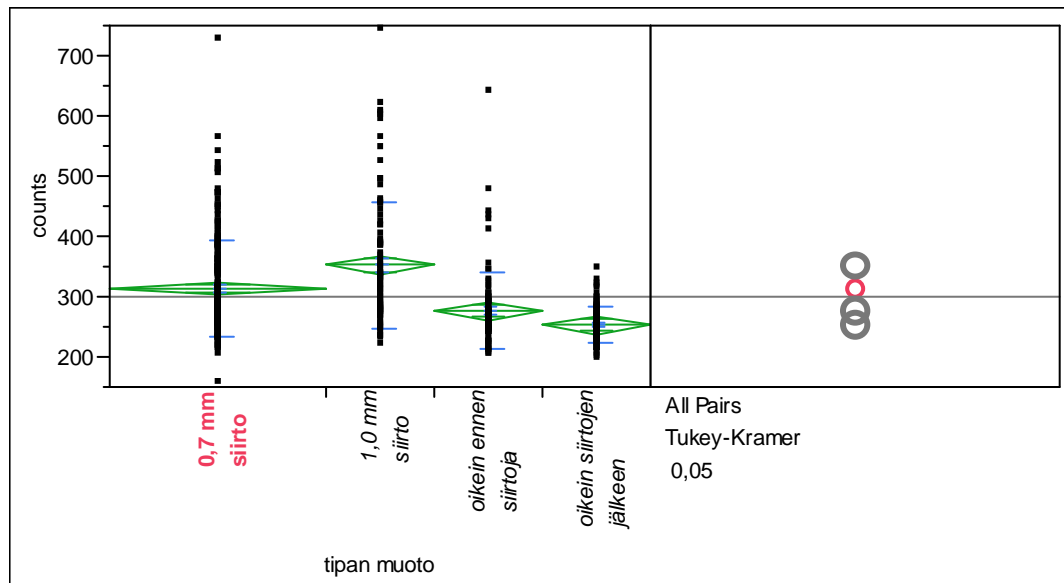


Kuva 17. hCG:n tausta lisäkuivauksella kaikilla leimatippamuodoilla.



Kuva 18. hCG:n kaikki pienet leimatipat samassa kuvassa.

7.1.1 hCG:n tulosten tilastollinen tarkastelu

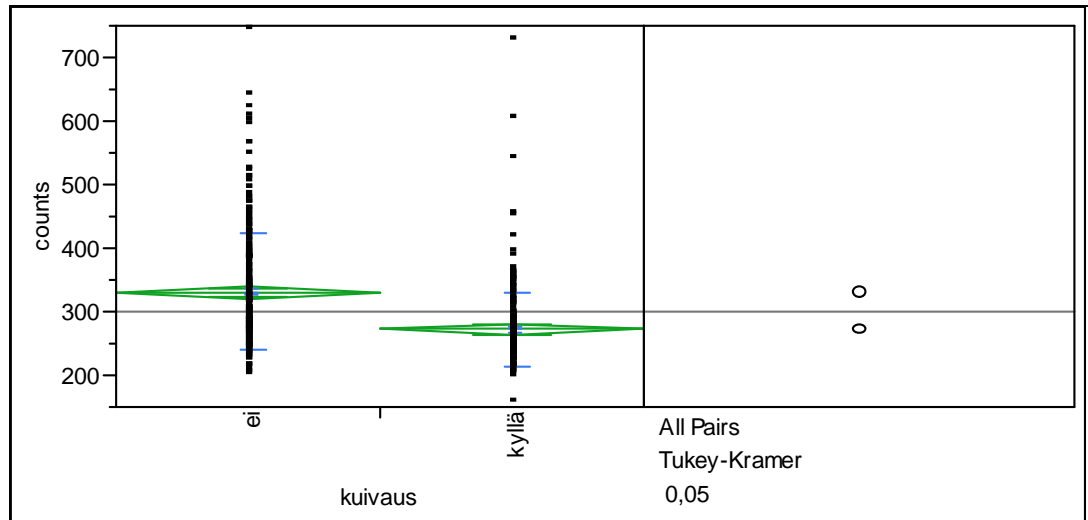


Level			
1,0 mm siirto	A		
0,7 mm siirto		B	
oikein ennen siirtoja			C
oikein siirtojen jälkeen			C

Kuva 19. hCG:n leimatipan muodon tarkastelu.

Ensimmäisessä testissä katsottiin, ovatko *oikein ennen siirtoja* ja *oikein siirtojen jälkeen* samanlaisia sekä eroavatko ne *0,7 mm* ja *1,0 mm* siirroista. Koska yllä olevassa kuvassa 19 oikealla puolella olevista palloista kaksi alimmaista ovat osittain toistensa päällä sekä ryhmät *leimatippa oikein ennen siirtoja* ja *oikein siirtojen jälkeen* on merkitty samalla kirjaimella, tiedetään, että nämä kaksi ovat samanlaisia. Koska *0,7 mm siirron* ja *1,0 mm siirron* pallot ovat erillään muista palloista ja niiden kirjaimet eivät ole samat, todetaan myös, että nämä muodostavat omat joukkonsa, jotka eivät ole samankaltaisia muiden joukkojen kanssa.

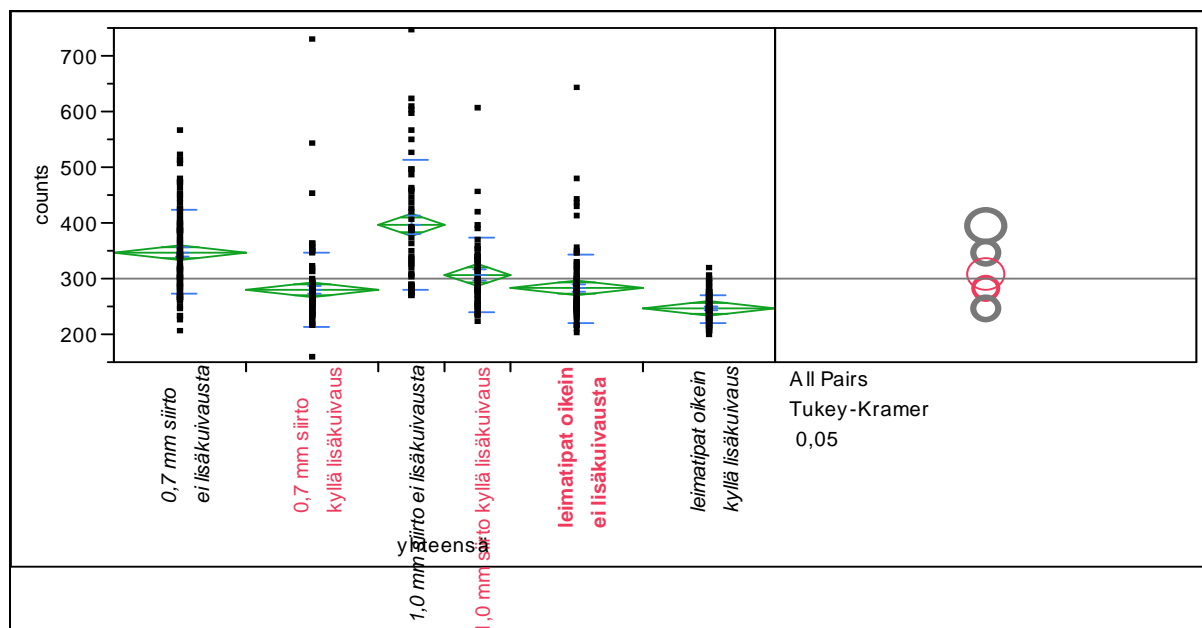
Seuraavassa testissä tutkittiin, eroavatko *lisäkuivatut* ja *ilman lisäkuivausta* kupit toisistaan. Alla olevassa kuvasta 20 todetaan, että nämä eroavat toisistaan, koska kuvassa 20 oikealla olevat pallot eivät kosketa toisiaan ja niiden kirjaimet eivät ole samat.



Level		
ei	A	
kyllä		B

Kuva 20. hCG:nlisäkuivauksen tarkastelu.

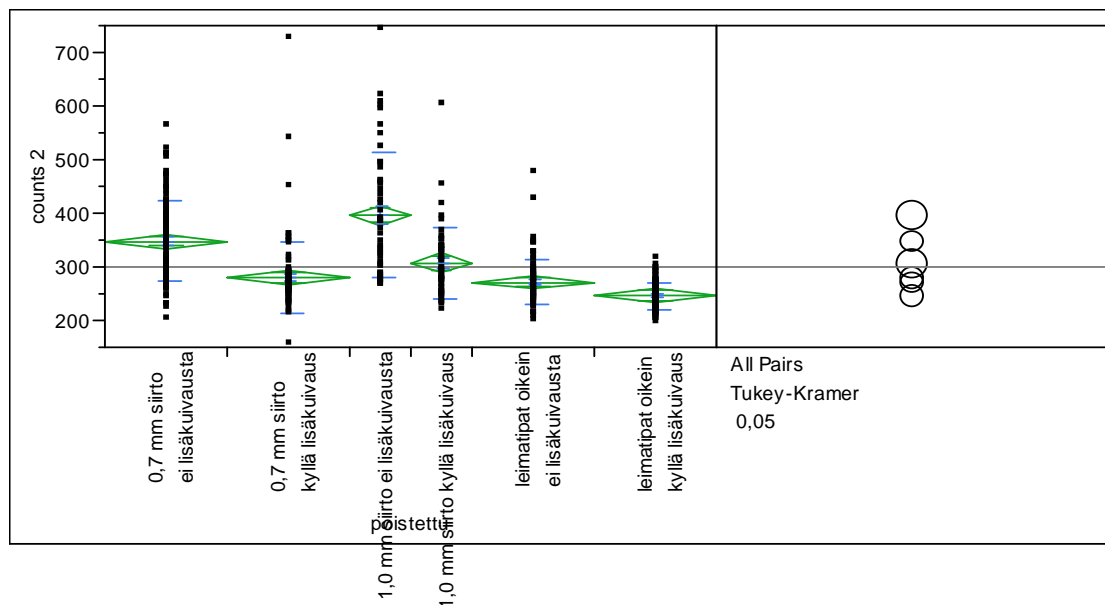
Viimeisessä testissä tarkasteltiin kaikkien tulosten eroavuutta. Alla olevassa kuvassa 21 on yhdistetty ilman lisäkuivausta oikein ennen siirtoja ja ilman lisäkuivausta oikein siirtojen jälkeen sekä lisäkuivatut oikein ennen siirtoja sekä lisäkuivatut oikein siirtojen jälkeen, koska ensimmäisellä testillä todistettiin näiden joukkojen olevan samanlaiset.



Level				
1,0 mm siirto ei lisäkuivausta	A			
0,7 mm siirto ei lisäkuivausta		B		
1,0 mm siirto kyllä lisäkuivaus			C	
leimatipat oikein ei lisäkuivausta			C	
0,7 mm siirto kyllä lisäkuivaus			C	
leimatipat oikein kyllä lisäkuivaus				D

Kuva 21. hCG:n kaikkien leimatippojen tarkastelu.

Kuvasta 21 nähdään, että samanlaisia joukkoja ovatkin 0,7 mm siirto lisäkuivauksella, 1,0 mm siirto lisäkuivauksella sekä leimatipat oikein ilman lisäkuivausta. AiO! -immunoanalysointorilla määritettyjä tuloksia tarkasteltiin uudelleen ja todettiin, että yksi kynä tuloksissa oikein ennen siirtoja ilman lisäkuivausta oli muista poikkeava. Tämä on johtunut Cavro-leima-annostelijan yhdestä annostelupillistä, joka on jostain syystä annostellut leimatipan eri tavalla kuin pitäisi. Näitä tuloksia ei otettu huomioon, kun suoritettiin kaikkien leimatippojen tarkastelutesti SAS-ohjelmalla uudelleen. Alla olevassa kuvassa 22 on tulokset uudelleen suoritetusta testistä.



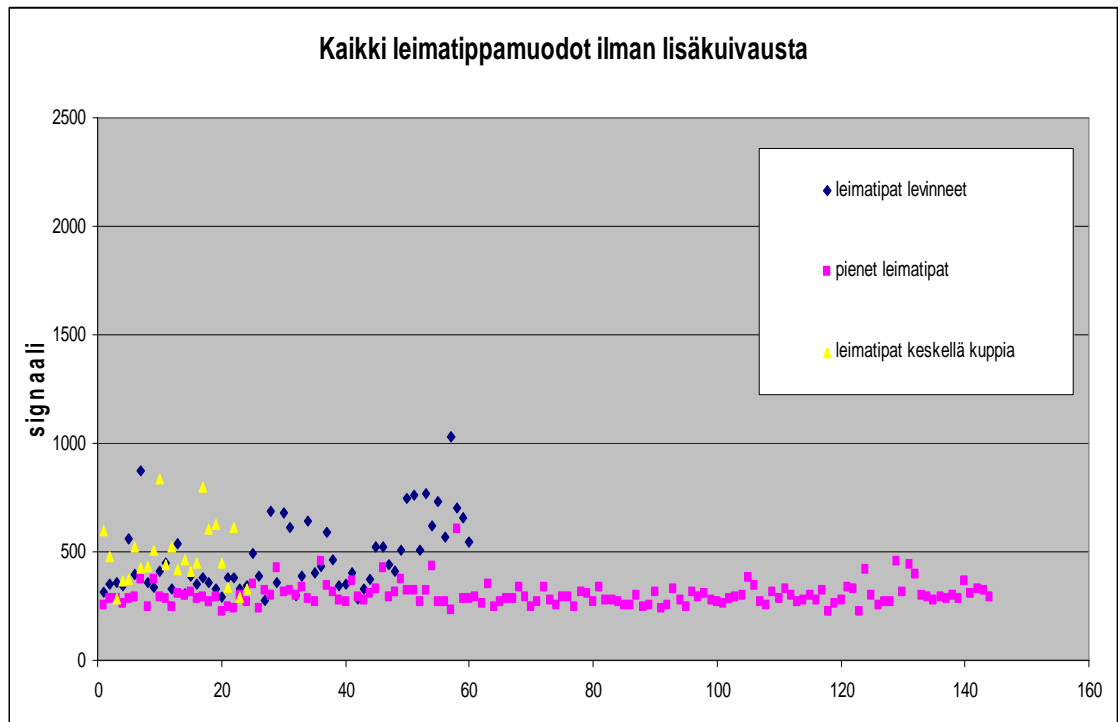
Level					
1,0 mm siirto ei lisäkuivausta	A				
0,7 mm siirto ei lisäkuivausta		B			
1,0 mm siirto kyllä lisäkuivaus			C		
0,7 mm siirto kyllä lisäkuivaus			C	D	
leimatipat oikein ei lisäkuivausta				D	E
leimatipat oikein kyllä lisäkuivaus					E

Kuva 22. hCG:n kaikkien leimatippon tarkastelu, uusintatesti.

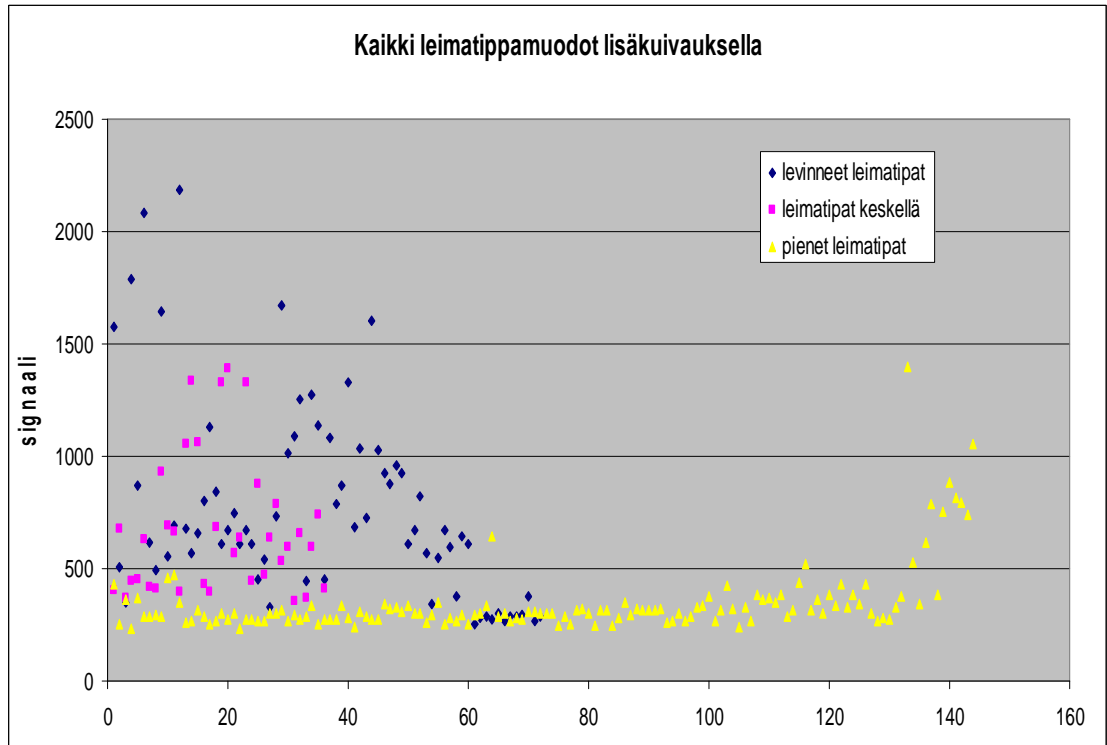
Uusintatestistä todetaan, että *leimatipat oikein lisäkuivauksella ja ilman lisäkuivausta* eivät poikkea toisistaan. Samalla voidaan myös todeta, että muitakin keskenään samankaltaisia joukkoja on mutta nämä eivät ole opinnäytetyön aiheen kannalta olennaisia huomioita.

7.2 C-reaktiivisen proteiinin (CRP) tulokset

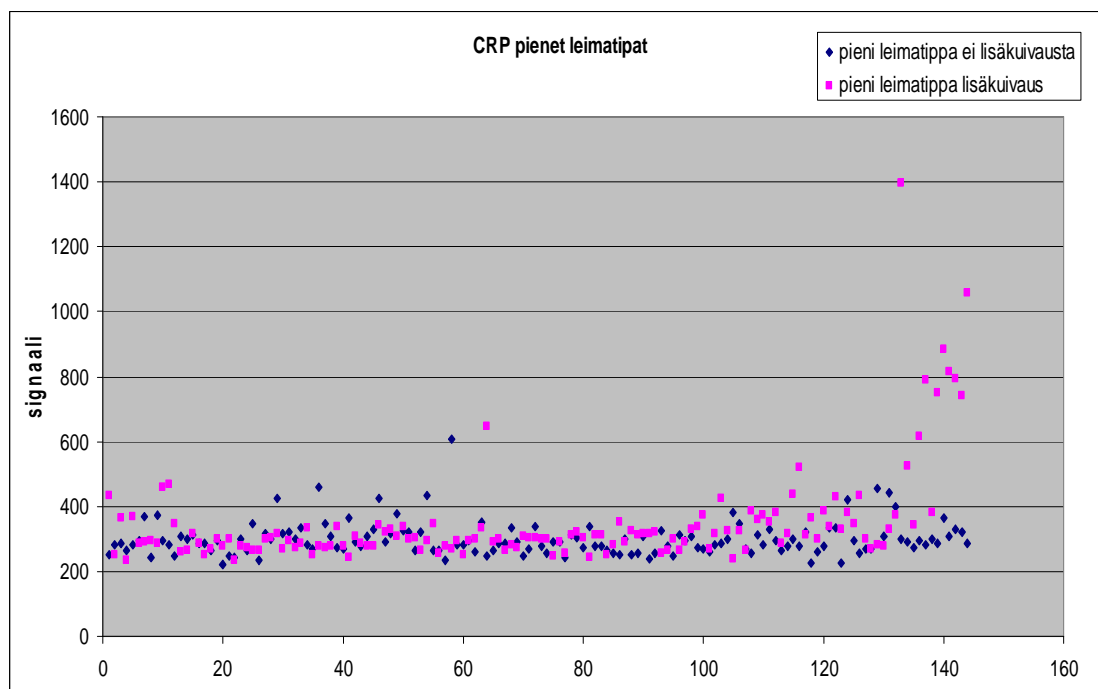
CRP:n leima-annostelu suoritettiin Cavo-annostelijalla. Alla olevassa kuvassa 23 on kaikki leimatippamuodot ilman lisäkuivausta ja kuvassa 24 on kaikki leimatippamuodot lisäkuivauksella. Kuvassa 25 on kaikki pienet leimatipat lisäkuivauksella tai ilman lisäkuivausta.



Kuva 23. CRP:n tausta ilman lisäkuivausta kaikilla leimatippamuodoilla.



Kuva 24. CRP:n tausta lisäkuivauksella kaikilla leimatippamuodoilla.



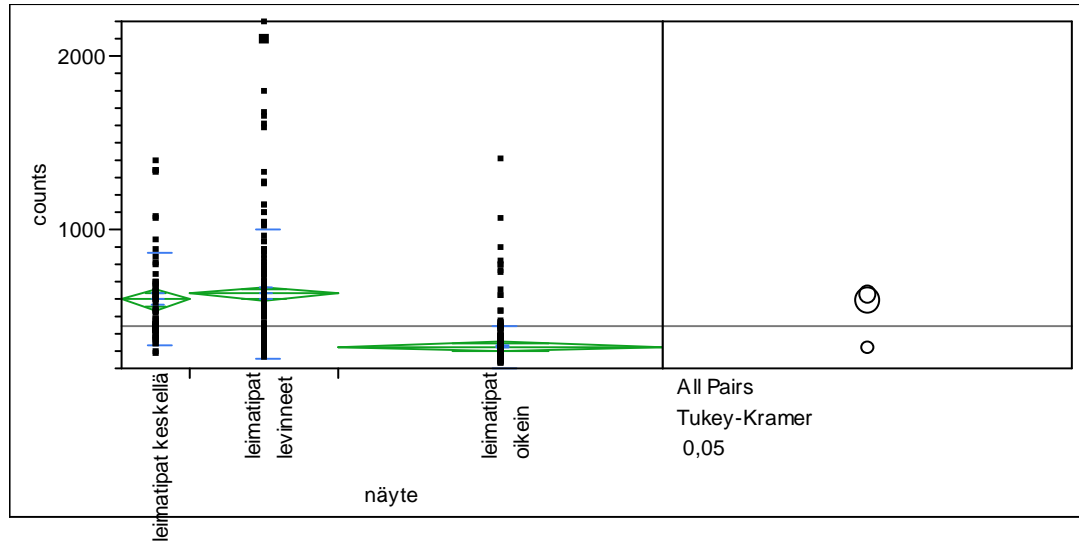
Kuva 25. CRP:n kaikki pienet leimatipat samassa kuvassa.

Visuaalisesti tarkasteltuna huomataan, että lisäkuivauksessa osa oikein leimaannostelluista tuloksista on antanut korkeampia tuloksia (kuva 24 ja kuva 25). Kun tarkasteltiin sekä kuvaajia että raakadataa, huomattiin, että tulokset ovat saman kynän kupeista, jolloin nämä kupit on annostellut sama leimapilli. Tulokset eroavat muusta populaatiosta, mutta syytä ei tiedetä. Tulokset käydään läpi SAS-ohjelmalla tarkempien tulosten saamiseksi.

7.2.1 CRP:n tulosten tilastollinen tarkastelu

Ensimmäisessä testissä tutkittiin, ovatko *leimatipat levinneet* ja *leimatipat keskellä* samanlaisia ja eroavatko ne *leimatipat oikein* -joukosta. Alla olevasta kuvasta 26 nähdään, että *leimatipat keskellä* ja *leimatipat levinneet* ovat keskenään samanlaisia mutta eroavat *leimatipat oikein* -joukosta, koska *leimatipat levinneet* ja *leimatipat keskellä* on merkattu samalla kirjaimella A mutta *leimatipat oikein* on merkattu kirjaimella B, jolloin se ei kuulu samaan joukkoon. Sama nähdään myös oikealla

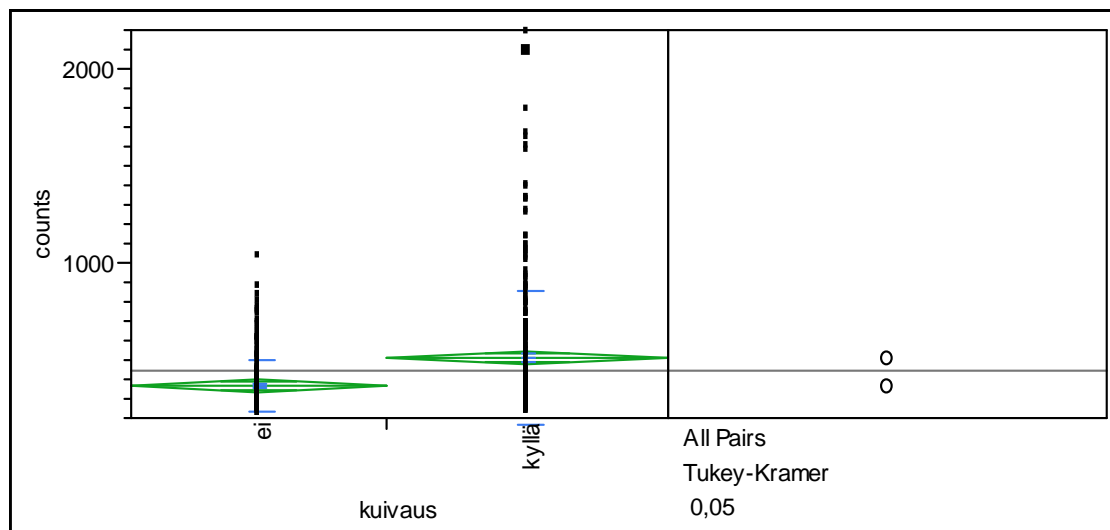
olevista palloista, joissa *leimatipat levinneet* ja *leimatipat keskellä* –joukkojen pallot ovat osittain päällekkäin mutta *leimatipat oikein* on erillään toisista palloista.



Level		
leimatipat levinneet	A	
leimatipat keskellä	A	
leimatipat oikein		B

Kuva 26. CRP:n leimatipan muodon tarkastelu.

Seuraavaksi tutkittiin, kuuluvatko *lisäkuivatut* ja *ilman lisäkuivausta* samaan joukkoon. Alla olevasta kuvasta 27 todetaan, että ne eroavat toisistaan samoin perustein kuin edellisessä testissä.

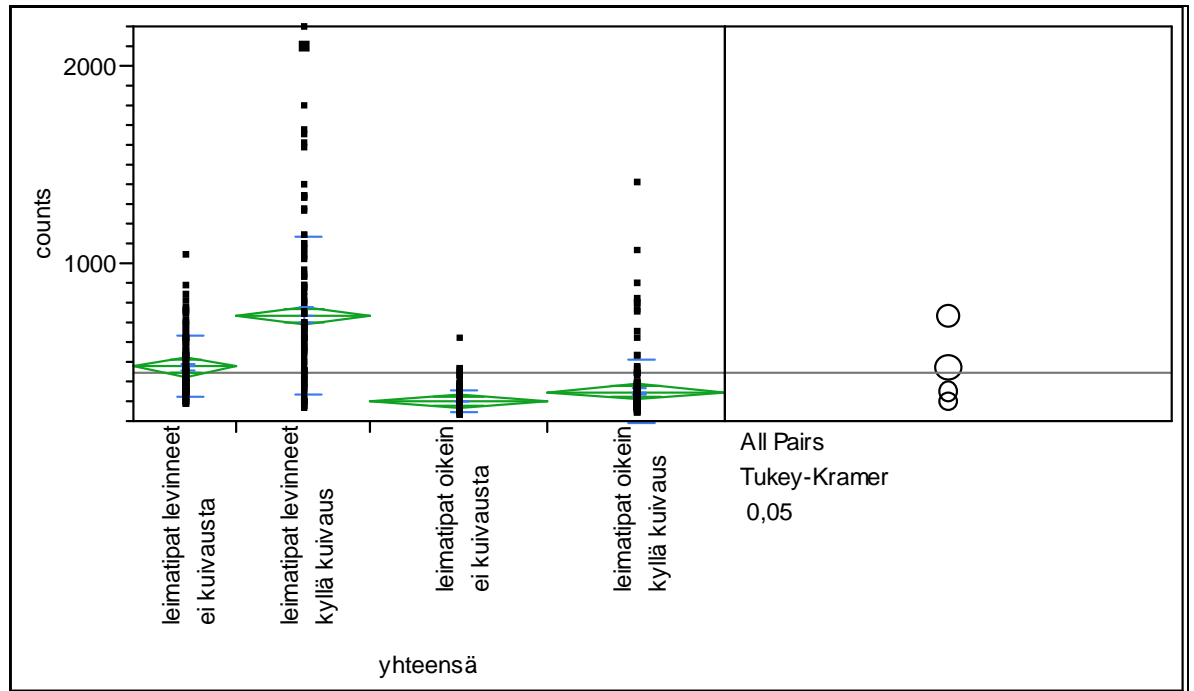


Level		
kyllä	A	
ei		B

Kuva 27. CRP:n lisäkuivauksen tarkastelu.

Viimeisenä tutkitaan kaikkien leimatippamuotojen lisäkuivauksella tai ilman eroavuutta toisistaan. Ensimmäisessä testissä todettiin, että *leimatipat levinneet* ja *leimatipat keskellä* eivät eroa toisistaan, mitä epäiltiin jo kupprien visuaalisessa tarkastelussa, sillä kupit olivat niin samannäköisiä, koska leimatippa leviää niin laajalle alueelle.

Nämä tulokset yhdistettiin viimeisessä testissä *leimatipat levinneet lisäkuivauksella* ja *leimatipat levinneet ilman lisäkuivausta* –nimisiksi ryhmiksi. Kupprien visuaalisessa tarkastelussa jo nähtiin, että kupit olivat samannäköisiä, koska leimatippa leviää niin laajalle alueelle.



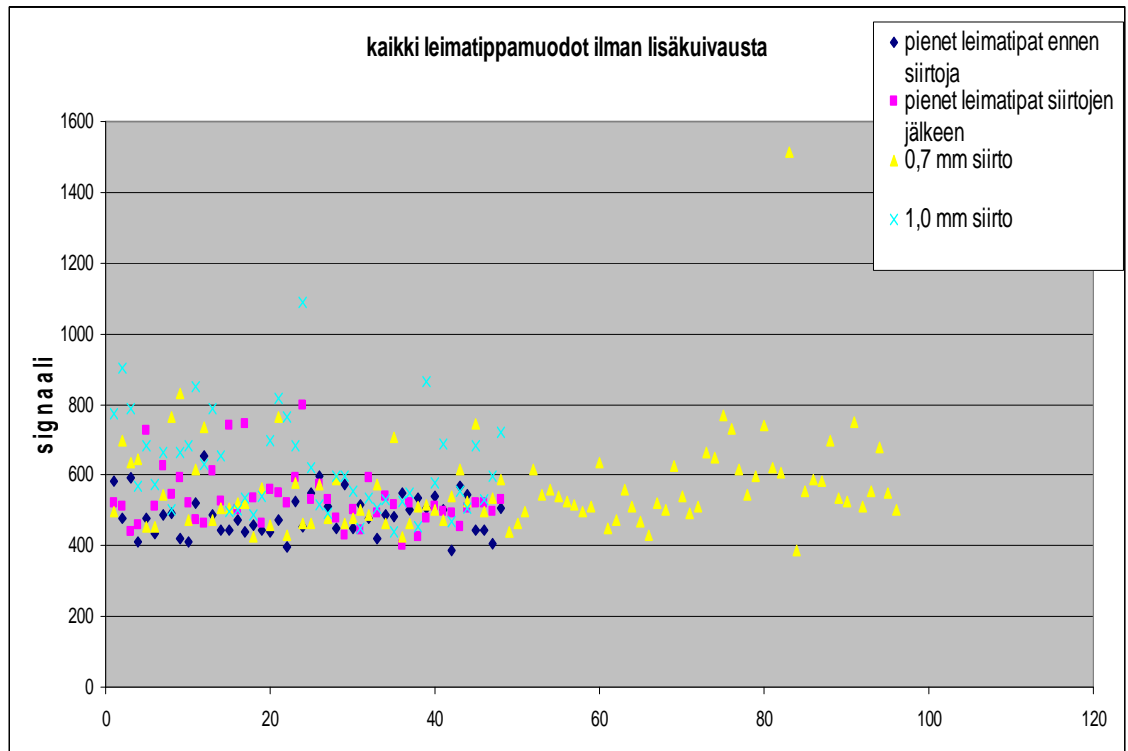
Level			
leimatipat levinneet kyllä kuivaus	A		
leimatipat levinneet ei kuivausta		B	
leimatipat oikein kyllä kuivaus			C
leimatipat oikein ei kuivausta			C

Kuva 28. Kaikkien CRP-tulosten tarkastelu.

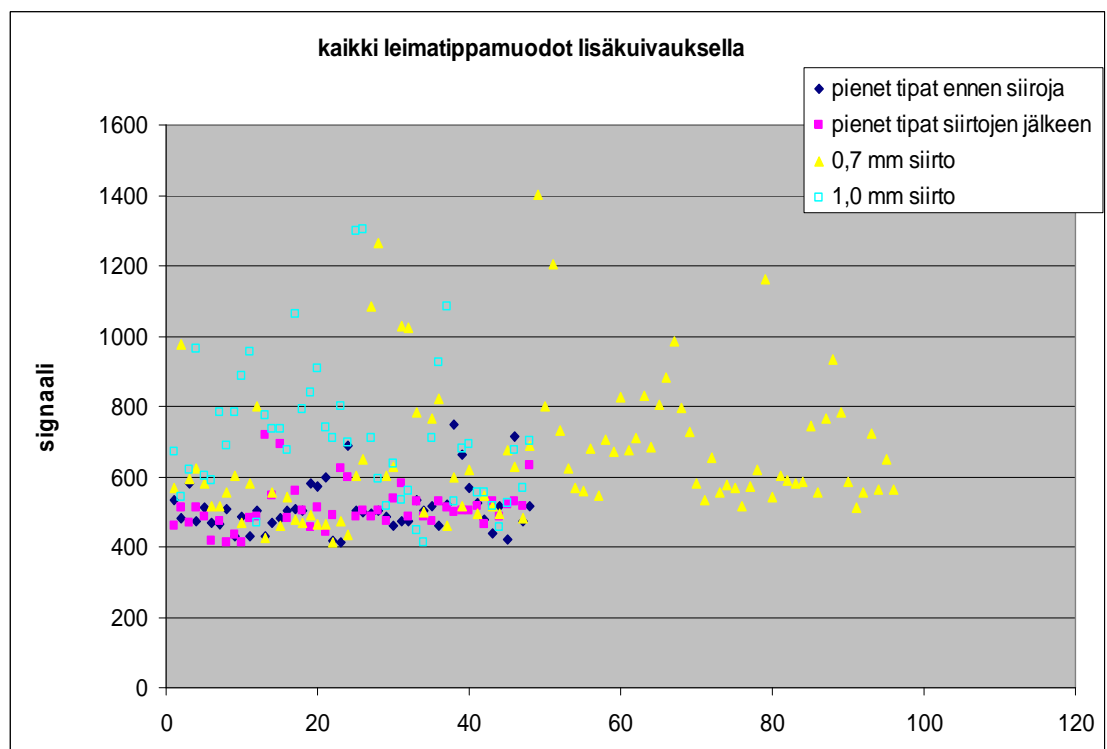
Yllä olevasta kuvasta 28 todetaan, että *leimatipat oikein lisäkuivauksella* tai *ilman lisäkuivausta* eivät eroa toisistaan. Tulosta tarkastellaan samoin perustein kuin edellisissäkin testeissä.

7.3 Troponiini I:n (TnI) tulokset

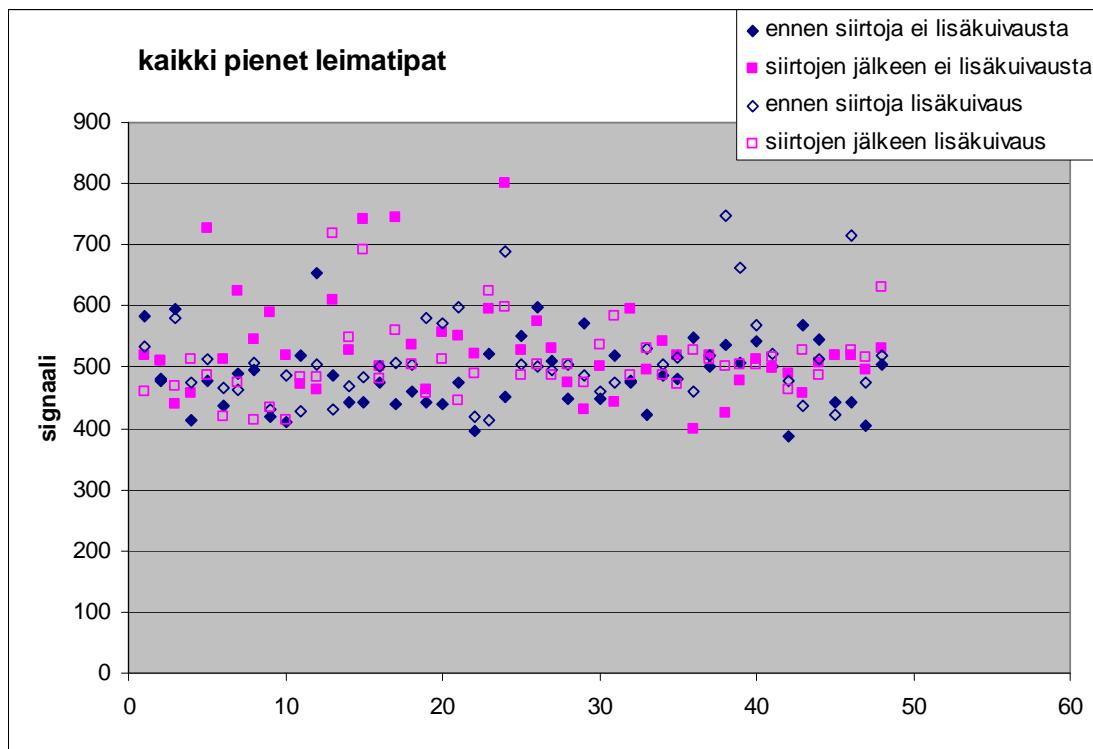
Myös TnI:n leima-annostelu suoritettiin Cavrolla, jolloin 0,7 mm siirto tarkoittaa levinneitä leimatippoja ja 1,0 mm siirto leimatippa keskellä kuppia. Alla olevassa kuvassa 29 on kaikkien leimatippojen *ilman lisäkuivausta* –tulokset ja kuvassa 30 leimatippojen *lisäkuivauksella* –tulokset. Kuvassa 31 on kaikki pienet leimatipat yhdistettynä.



Kuva 29. *TnI:n* leimatipat ilman lisäkuivausta.



Kuva 30. *TnI:n* leimatipat lisäkuivauksella.

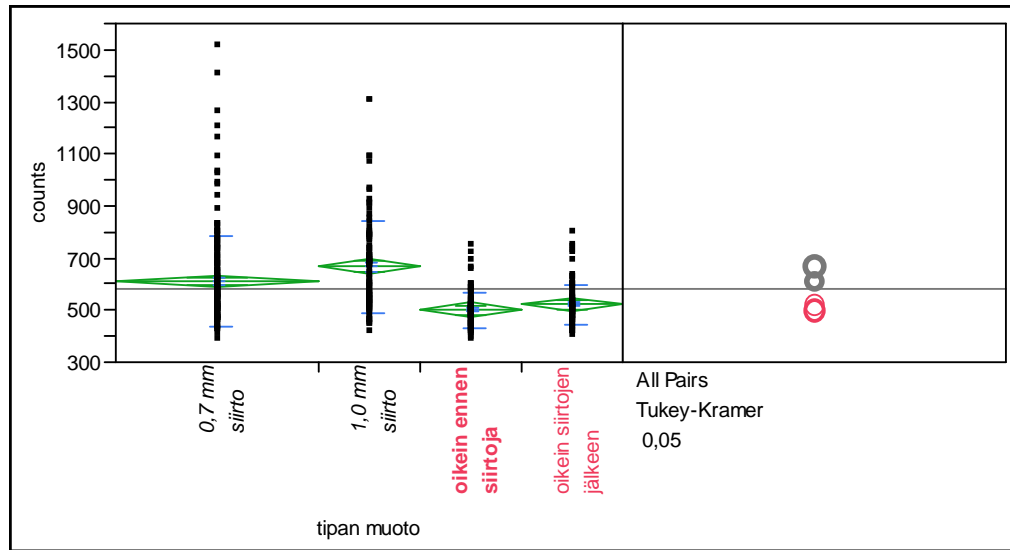


Kuva 31. TnI:n kaikki leimatipat samassa kuvassa.

Visuaalisesti tarkasteltuna huomataan, että lisäkuivatut leimatipat antavat kaikilla leimatippamuodoilla hiukan korkeampia signaalia kuin ilman lisäkuivausta olevat kupit. Tuloksia tarkastellaan vielä SAS-ohjelmalla.

7.3.1 TnI:n tulosten tilastollinen tarkastelu

Ensimmäisellä testillä tarkastellaan, eroavatko erilaiset leimatippamuodot toisistaan. Alla olevassa kuvassa 32 on testin tulokset.

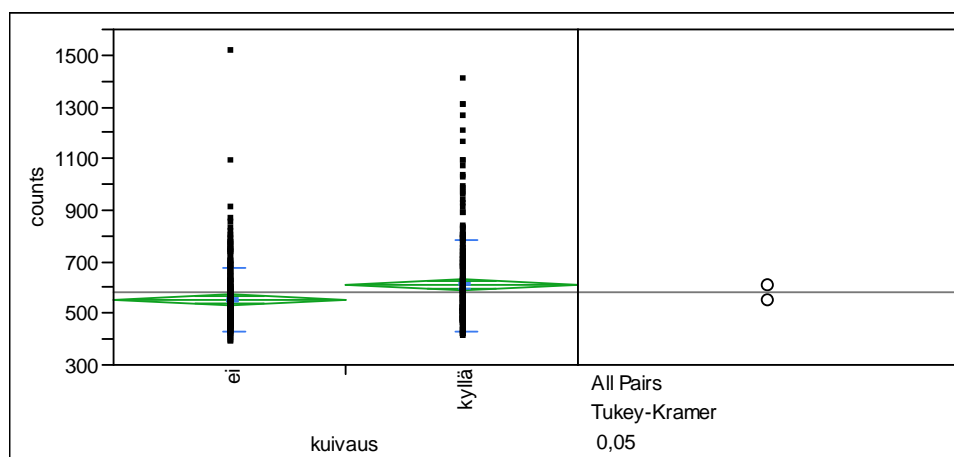


Level			
1,0 mm siirto	A		
0,7 mm siirto		B	
oikein siirtojen jälkeen			C
oikein ennen siirtoja			C

Kuva 32. TnI:n leimatippon muodon tarkastelu.

Tuloksesta nähdään, että leimatippa oikein ennen siirtoja ja siirtojen jälkeen eivät eroa toisistaan mutta eroavat 1,0 mm siirto ja 0,7 mm siirto tuloksista, jotka eroavat myös toisistaan.

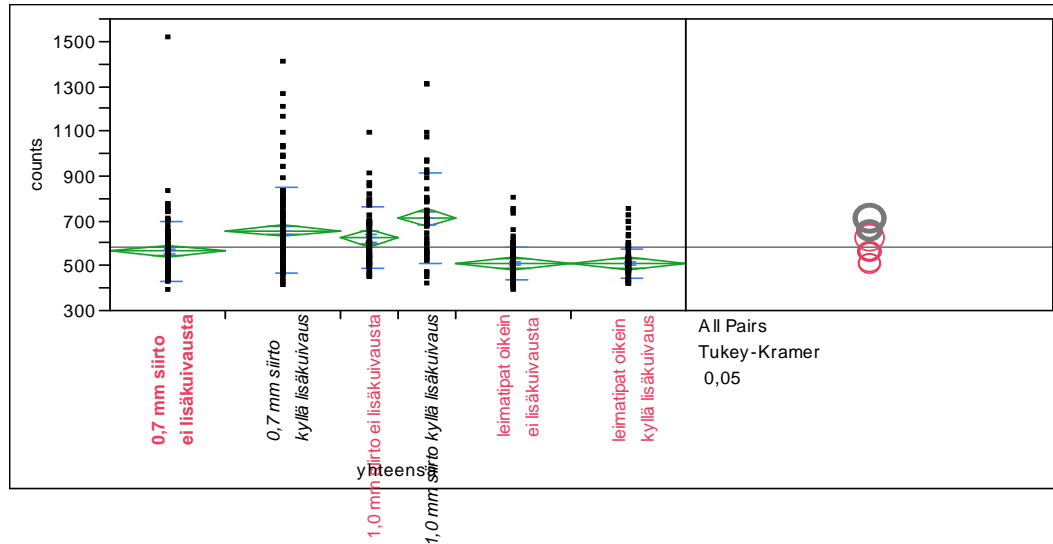
Seuraavalla testillä tarkasteltiin, eroavatko lisäkuivatut ja ilman lisäkuivausta kupit toisistaan. Alla olevasta kuvasta 33 nähdään, että ne eroavat toisistaan.



Level		
kyllä	A	
ei		B

Kuva 33. TnI:n lisäkuivauksen tarkastelu.

Kolmannella testillä tarkasteltiin kaikkia tuloksia siten, että *oikein ennen siirtoa ilman lisäkuivausta* ja *oikein siirron jälkeen ilman lisäkuivausta* –tulokset sekä *oikein ennen siirtoa lisäkuivauksella* ja *oikein siirron jälkeen lisäkuivauksella* –tulokset yhdistettiin omiksi ryhmiksi ensimmäisen testin tuloksen perusteella.



Level				
1,0 mm siirto kyllä lisäkuivaus	A			
0,7 mm siirto kyllä lisäkuivaus	A	B		
1,0 mm siirto ei lisäkuivausta		B	C	
0,7 mm siirto ei lisäkuivausta			C	D
leimatipat oikein kyllä lisäkuivaus				D
leimatipat oikein ei lisäkuivausta				D

Kuva 34. TnI:n kaikkien leimatippamuotojen vertailu.

Yllä olevasta kuvasta 34 huomataan, että *leimatipat oikein lisäkuivauksella* tai *ilman* eivät eroa toisistaan mutta niiden kanssa samankaltainen on myös *0,7 mm siirto ilman lisäkuivausta*. Muissakin tuloksissa oli samankaltaisuutta, mutta se ei ole opinnäytetyön kannalta tärkeää.

8 LOPPUPÄÄTELMÄT

Käsin leima-annosteltaessa saadut tulokset olivat aivan liian korkeita ja variaatiokertoimet liian suuria. Kun leima-annostelussa kiinnitettiin huomiota aikaan, jonka leimaliuos on kuivakaivossa välikerroksen päällä liuosmuodossa, saatiin tuloksista parempia mutta niiden variaatio oli silti liian iso. Suuret erot tuloksissa eivät kuitenkaan johdu vain pipetoinnista vaan signaaliin vaikutti vielä jokin, jota ei tiedetä.

Jokaiselle analyyttille tehtiin kolme testiä SAS-ohjelmalla. Näiden tilastomatemaattisten tulosten pohjalta voidaan todeta, että kun leima-annostelu on suoritettu oikein eli siten kuin tuotannon prosessissa leima-annostelu tehdään, kuppien taustaan ei vaikuta se, onko kuppeja lisäkuivattu vai ei.

Jos leimatipat ovat kuitenkin levinneet kupeissa, tulokset eroavat oikein leima-annostelluista kupeista, joten lisäkuivauksen tullessa mukaan kuivakaivokuppien tuotantoon, pitää leimatippon leviäminen tarkastaa visuaalisesti entistä paremmin. CRP:n kohdalla levinneiden leimatippon ja oikein leima-annosteltujen tulosten välinen ero on suurin. Tämä johtuu CRP:n leimaliuoksen suuremmasta leviämisestä, sillä levinnyt leimatippa CRP:n kupissa kattaa > 90 % kupin pinta-alasta, kun taas TnI:llä ja hCG:llä leviäminen on paljon pienempää pinta-alan nähden.

9 LÄHTEET

1. <http://www.innotrac.fi/>
2. Innotrac Diagnostics Oy:n sisäinen koulutusmateriaali
3. Bjålie, Jan G.; Hang, Egil; Sand, Olav; Sjaastad, Øystein V.; Toverud, Kari C 2002. Ihminen fysiologia ja anatomia. 1.-2. painos. Helsinki: WSOY
4. Leikola, Juhani 1987. Verensiirtojen immunologia: immunoematologian opaskirja opiskelijoille ja laboratorioilla. Helsinki: Suomen punainen risti.
5. Vahomäki, K. (2008) AQT 90 Flex-immunoanalysointilaitteen testikasettien stabiilisuus. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu, bioalat.
6. Siltanen, A. (2008) Immunomäärityslaitteen kvalifioinnin kehittäminen. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu, bioalat.
7. Nienstedt, Walter; Hänninen, Osmo; Arsila, Antti; Björkqvist, Stig-Eyrik 2002. Ihmisen fysiologia ja anatomia. Porvoo: Bookwell Oy