

Salla-Maria Saavola

Alustava tutkimus uuden analyytin käyttö- mahdollisuudesta kvantitatiivisiin mittauksiin QuikRead go -vieritestilaitteella

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

28.11.2018

<p>Tekijä Otsikko</p> <p>Sivumäärä Aika</p>	<p>Salla-Maria Saavola Alustava tutkimus uuden analyytin käyttömahdollisuudesta kvantitatiivisiin mittauksiin QuikRead go -vieritestilaitteella</p> <p>39 sivua 28.11.2018</p>
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioala
Ohjaajat	<p>Lehtori Tiina Soininen Tuotekehitysasiantuntija Heikki Eräsalo</p>
<p>Opinnäytetyö suoritettiin Orion Diagnostica Oy:n tuotekehitysyksikössä, jossa kehitetään kliinisen diagnostiikan testejä QuikRead go -vieritestilaitteelle. Työn tarkoituksena oli alustavasti tutkia, voidaanko uuden analyytin pitoisuuksia näyteliuoksessa mitata QuikRead go -vieritestilaitteella. QuikRead go -laitteen mittaussuomenetelmä perustuu vasta-aineen ja anti-geenin sitoutumisreaktiosta aiheutuvan saostuman mittaamiseen.</p> <p>Uutta analyyttiä on tutkittu eräässä sairaudessa merkkiaineena, joka ilmaisee sairauden akuutin vaiheen. Nyt haluttiin tutkia sen merkkiaineominaisuuksia bakteeri- ja virusinfektioiden erottamisessa toisistaan. Orion Diagnostica Oy on kehittänyt QuikRead go -laitteelle vieritestin, jossa C-reaktiivista proteiinia hyödynnetään, kun halutaan erottaa bakteeri-infektio virusinfektiosta. Tämän testin rinnalle haluttiin selvittää uuden analyytin kykyä samankaltaisena merkkiaineena.</p> <p>Tutkimuksia varten vasta-aineita valittiin viisi erilaista monoklonaalista vasta-ainetta ja yksi polyklonaalinen vasta-aine. Vasta-aineet kiinnitettiin lateksipartikkelin pinnalle, jolloin vasta-ainekompleksin koko kasvoi ja se oli herkemmin mitattavissa QuikRead go -laitteella.</p> <p>Mittauksissa huomattiin, että yksinään monoklonaalinen vasta-aine ei anna mitattavaa signaalia, mutta yhdistettynä toisen monoklonaalisen vasta-aineen kanssa mitattava signaali muodostui. Polyklonaalinen vasta-aine ei tarvinnut vasta-aineparia vaan antoi mitattavaa signaalia yksinäänkin.</p> <p>Tutkimuksissa todettiin uuden analyytin soveltuvan QuikRead go -vieritestilaitteella tapahtuviin mittauksiin. Tarvitaan kuitenkin lisätietoa analyytistä, jotta voidaan päätellä, soveltuuko se käytettäväksi diagnostisissa testeissä apuna bakteeri-infektion erottamiseen virusinfektiosta.</p> <p>Tutkittavan analyytin yksityiskohtaiset tiedot pidetään salassa Orion Diagnostica Oy:n pyynnöstä.</p>	
Avainsanat	Vasta-aine, immunoturbidimetrinen menetelmä, fotometrinen menetelmä, QuikRead go, vieritesti, alustava tutkimus

Author Title	Salla-Maria Saavola Preliminary Investigation of the Usability of a New Analyte for Quantitative Measurements with QuikRead go Point-of-care Instrument
Number of Pages Date	39 pages 28 November 2018
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Tiina Soininen, Senior lecturer Heikki Eräsalo, R&D Specialist
<p>This study was carried out at Orion Diagnostica's research and development laboratory. Orion Diagnostica develops diagnostic tests for QuikRead go point-of-care instrument. The purpose of this study was to preliminary investigate the possibilities to measure concentrations of a new analyte in sample solution with QuikRead go point-of-care instrument. Measuring method of QuikRead go instrument is based on resultant change in the turbidity of the solution that is caused by interactions between antibodies and antigens.</p> <p>The new analyte has been studied as a marker to indicate an acute phase of a certain disease. In this study, the purpose was to study its use as a marker to separate bacterial and viral infection. Orion Diagnostica has developed a test for quantitative determination of C-reactive protein (CRP) with QuikRead go instrument. It is used as a diagnostic tool for separation of bacterial and viral infection. Along with this test, it was intended to investigate the potency of the investigated analyte as a similar marker.</p> <p>There were five different monoclonal antibodies and one polyclonal antibody chosen for the practical work. Antibodies were conjugated with latex particles so that antibody complex grew bigger and was easier to measure with QuikRead go instrument.</p> <p>Studies showed that a monoclonal antibody alone was not measurable but when coupled with another monoclonal antibody, they formed a signal that was measurable. Polyclonal antibody was measurable without a couple.</p> <p>The conclusion is that the new analyte is measurable with QuikRead go instrument. Additional studies are needed to gain more information of the analyte and its potential as a marker in diagnostic tests for separation of bacterial and viral infection.</p> <p>Details of this investigated analyte are confidential on request of Orion Diagnostica.</p>	
Keywords	Antibody, immunoturbidimetric method, photometric method, QuikRead go, point-of-care, preliminary investigation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Mikrobit taudinaiheuttajina	3
2.2	Immuunipuolustus	4
2.2.1	Vasta-ainevälitteinen immunitetti	5
2.2.2	Vasta-aineet	6
2.2.3	Antigeenit	8
2.3	Vasta-aineiden hyödyntäminen diagnostiikassa	9
2.4	Esikäsittely vasta-aineille ennen analyysimittauksia	11
2.4.1	Kouttaus, vasta-aineen kiinnittäminen lateksipartikkelin pinnalle	11
2.4.2	Kylmäkuivaus	12
2.5	C-reaktiivinen proteiini	13
2.6	QuikRead go -mittalaite	15
3	Käytännön työ	17
3.1	Partikkelin kiinnitys valmiiksi dialysoituun lateksiin	17
3.2	Mittaus QuikRead go -laitteella	19
3.3	Vasta-aineiden kylmäkuivaus	20
4	Tulokset	22
4.1	Lateksiin kiinnitetyt vasta-aineet ja vasta-aineparien testaus	22
4.2	Kylmäkuivaus	32
5	Yhteenveto	35
	Lähteet	36

Lyhenteet

BSA	Bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini
CRP	C-reaktiivinen proteiini
CV	Coefficient of variation, variaatiokerroin
DLS	Dynamic Light Scattering, Dynaaminen valonsironta
ET	Epitoppi
Ig	Immunoglobuliini, vasta-aine
mAb	Monoklonaalinen vasta-aine
MRSA	Metisilliinille resistentti <i>Staphylococcus aureus</i> -bakteeri
pAb	Polyklonaalinen vasta-aine
PEG	Polyetyleeniglykoli
PT	Paratoppi
QR CRP	QuikRead go C-reaktiivinen proteiini
STDEV	Standard deviation, keskihajonta
SVBC	Styreenivinylibentsyylikloridi

1 Johdanto

Opinnäytetyö suoritettiin Orion Diagnostica Oy:n Espoossa sijaitsevassa tuotekehityksyksikössä. Orion Diagnostica Oy kehittää, valmistaa ja markkinoi testejä kliiniseen diagnostiikkaan sekä hygienian seurantaan. Sen päätuotteita ovat vieritestaukseen tarkoitetut ratkaisut. [1; 2.]

Opinnäytetyön tavoite oli tutkia alustavasti, voidaanko uutta analyyttiä mitata kvantitatiivisesti Orion Diagnostica Oy:n kehittämällä QuikRead go -laitteella. QuikRead go -laite on tarkoitettu perusterveydenhuollon käyttöön vieritestaukseen, jolloin laboratoriotutkimus voidaan tehdä samassa tilassa, jossa näyte otetaan, esimerkiksi hoitokäynnin yhteydessä.

Analyyttiä on aikaisemmissa tutkimuksissa tutkittu eräässä sairaudessa merkkiaineena, joka ilmaisee sairauden akuutin vaiheen. Nyt haluttiin tutkia sen merkkiaineominaisuuksia bakteeri- ja virusinfektioiden erottamisessa toisistaan. Analyytin käyttö vieritestauksessa voisi nopeuttaa diagnosointia bakteeri- ja virusinfektioiden erottamisessa toisistaan, koska sen pitoisuus veressä nousee todennäköisesti nopeammin kuin C-reaktiivisen proteiinin, jota yleensä käytetään tähän tarkoitukseen. Uuden analyytin käyttö kvantitatiivisiin mittauksiin QuikRead go-laitteella mahdollistaisi uuden vieritestin bakteeri- ja virusinfektioiden erottamiseksi toisistaan jo olemassa olevien testien rinnalle.

Infektiotaudin aiheuttaja on tärkeä saada selville, ettei antibioottikuureja määrättäisi turhaan virusinfektioihin. Turhaan syödyt antibioottikuurit lisäävät riskiä antibioottiresistenteille bakteereille. Antibioottiresistentit bakteerit ovat vaaraksi ihmisille, jos ne pääsevät yleistymään. Silloin tavallisetkin bakteeri-infektiot voivat olla hengenvaarallisia, jos niihin ei ole tepsiviä lääkkeitä. [3.]

Orion Diagnostica Oy:n pyynnöstä opinnäytetyössä käytettyjen analyyttien ja reagenssien yksityiskohtaiset tiedot pidetään salassa. Tutkittavaa analyyttiä kutsutaan työssä nimellä analyytti x.

2 Teoria

Immunokemiallinen analyysi on yleisnimitys menetelmille, jotka on kehitetty pääasiassa määrittämään vasta-aineiden ja antigeenien vuorovaikutusta. Immunokemiallisia analyysejä voidaan käyttää muun muassa bakteerille, virukselle tai parasiitille spesifisen vasta-aineen tai antigeenin tunnistamiseen kokoverestä, seerumista, plasmasta tai muista eritteistä. Analyysit perustuvat vasta-aineen ja antigeenin spesifiseen sitoutumiseen. Vasta-aineen tyyppi ja sen affiniteetti antigeeniin määrittää analyysin herkkyyden ja spesifisyyden. Analyysin tulos voi olla kvalitatiivinen tai kvantitatiivinen. Immunokemia tarjoaa kliiniselle laboratoriolle yksinkertaisen ja nopean analyysimenetelmän, joka on myös herkkä. [4; 5.]

Immunokemiallisia menetelmiä voidaan käyttää muun muassa bakteeri- ja virusinfektioiden erottamiseksi toisistaan, joka auttaa vähentämään turhien antibioottikuurien määräämistä virusinfektioihin. Riski antibioottiresistenteille bakteereille lisääntyy, kun antibioottikuureja syödään turhaan. Antibioottiresistentit bakteerit ovat kehittäneet vastustuskyvyn mikrobilääkkeille ja saattavat siten aiheuttaa ongelmia, koska niitä ei voi helposti tuhota. Tällainen superbakteeri on muuan muassa sairaalabakteerina tunnettu MSRA. MRSA on metisilliinille resistentti *Staphylococcus aureus* -bakteeri, joka leviää käsien välityksellä haavoista ja aiheuttaa ihoinfektioita ja keuhkokuumetta. [6; 7, s. 265–266; 8; 9.]

Antibioottiresistentit bakteerit ovat vaaraksi ihmisille, jos ne pääsevät yleistymään. Silloin tavallisetkin bakteeri-infektiot voivat olla hengenvaarallisia, jos niihin ei ole tepsiviä lääkkeitä. Antibioottiresistenttejä bakteereita on ollut lähes yhtä kauan kuin antibioottejakin. 1920-luvulla Alexander Fleming löysi penisilliinin homesienestä ja 1940-luvulla löydettiin sille ensimmäinen resistentti bakteeri. Bakteerit ovat nopeita sopeutumaan ja niiden lisääntyminen on nopeaa. Lisääntyessään niiden on mahdollista saada antibioottiresistentti geeni, jolloin uusien antibioottiresistenttien bakteerikantojen leviäminen on mahdollista. Antibioottiresistenttejä bakteereita vastaan voidaan taistella muun muassa vähentämällä turhia antibioottikuureja. Se edesauttaa resistenttien bakteerin määrän vähenemistä, koska ympäristössä, jossa ei ole antibiootteja, bakteeri ei tarvitse sille resistenttejä geenejä eikä niitä tarvitse monistaa seuraaville bakteerikannoille. [3.]

2.1 Mikrobit taudinaiheuttajina

Virukset, bakteerit ja sienet eli yhteisnimitykseltään mikrobit ovat mikroskooppisen pieniä eliöitä. Patogeeniset mikrobit aiheuttavat tulehdustiloja, joita kutsutaan infektioitaudeiksi. Kaikki mikrobit eivät aiheuta infektioita elimistössä. Infektion käynnistymiseen vaikuttaa elimistön yksilöllinen vastustuskyky, mikrobien määrä sekä niiden taudinaiheuttamiskyky. Taudinaiheuttajamikrobeilla on niille ominainen määrä, joka tarvitaan, jotta infektio syntyy. Määrä voi olla esimerkiksi yhdestä mikrobista sataan tuhanteen mikrobiin. Mikrobien virulenssitekijät määrittävät, kuinka herkästi tartunta johtaa infektiosairauteen ja kuinka vakava sairaus tartunnasta aiheutuu. [10.]

Yleisimmin mikrobit tarttuvat ihmisestä toiseen. Usein infektiotaudin oireet eivät johdu itse mikrobista vaan elimistön reaktiosta niihin. Mikrobin pääsystä elimistöön aiheutuu tulehdusreaktio, jonka oireita voivat olla kipu, punotus, kuumotus ja turvotus, jonka aiheuttaa valkosolujen ilmaantuminen ja lisääntyminen. Valkosolut erittävät sytokiineja, tulehdushormoneja, jotka aiheuttavat esimerkiksi huonoa oloa, lihassärkyä ja lämmön nousua. Tulehdusreaktiot voivat ilmetä myös paikallisesti esimerkiksi hengitysteiden limakalvoilla. [7, s. 263; 11.]

Mikrobitartunta voi olla joko välitön tai välillinen. Välitön tartunta on suora, jolloin mikrobit tarttuvat ihmisestä toiseen käsien kautta kosketuksen välityksellä tai pisaroina muuan muassa aivastuksesta. Välillinen eli epäsuora tartunta voi tapahtua, kun tartunnan lähde siirtää mikrobin ympäristöönsä, esimerkiksi ovenkahvaan. Mikrobit voivat levitä myös suun kautta ruoan tai juoman mukana tai veren välityksellä. Mikrobit tarvitsevat elinympäristön, jossa ne pysyvät hengissä isäntien, tartunnan kohteiden, välissä. Ne voivat varastoitua esineiden pinnoille, maaperään, veteen tai ruokaan. [7, s. 263; 10.]

Bakteerit lisääntyvät suvuttomasti jakautumalla kahtia. Suvuton lisääntyminen on nopeaa, bakteerien uusi sukupolvi voi kasvaa jo minuuteissa. Virukset eivät osaa lisääntyä itsenäisesti, vaan ne tarvitsevat solujen perimää, jotta ne voisivat monistua uusiksi viruksiksi. Infektiossa virus tarttuu suureen määrään isäntäsoluja ja monistuessaan ne voivat muuntautua, jolloin muodostuu uusia mutaatioita viruksista. [7, s. 82, 287; 12, s. 14; 13.]

Bakteerien aiheuttamia infektioitauteja vastaan on kehitetty antibioottilääkkeet. Antibiooteiksi kutsutaan toisten mikrobien tuottamia yhdisteitä tai luontaisesti tuotettujen yhdisteiden johdannaisia. Ne tappavat bakteereja tai estävät niiden lisääntymisen, mutta ne

eivät tuhoa viruksia, koska niiden rakenne on erilainen kuin bakteereilla. Antibiootit ovat toksisia patogeeneille, mutta eivät isännälle, koska ne kohdistuvat mikrobin ja isännän biokemiallisiin eroihin. Eri antibiootit vaikuttavat eri tavalla. Jotkut ovat spesifisiä vain tietyille mikrobeille ja toiset ovat laajakirjoisia eli vaikuttavat laajempaan mikrobiryhmään. [7, s. 84, 265, 296; 8.]

Viruksille kehitetyt lääkkeet voivat estää virusta tunkeutumasta solun sisään tai lisääntymästä solun sisällä tai ne voivat tappaa koko infektoituneen solun. Ihmisen sairastuessa influenssavirukseen tai kun hänet rokotetaan influenssavirusta vastaan, ihmisen veressä muodostuu vasta-aineita. Influenssaviruksia on erilaisia ja vasta-aineet ovat spesifisiä niiden pinnalla oleville antigeeneille. Samat influenssarokotukset eivät siis suojaa kaikilta influenssatyypeiltä. [7, s. 296; 12, s. 99.]

2.2 Immuunipuolustus

Immuunipuolustusjärjestelmä puolustaa kehoa infektioita aiheuttavia mikrobeja vastaan. Immuunipuolustusjärjestelmä pystyy erottamaan kehon omat mikrobit vieraista mikrobeista. Se tunnistaa myös oman kehon muuntuneet rakenteet, kuten syöpäsolut. Immuunipuolustusjärjestelmä on jakautunut luontaiseen immunitettiin ja opittuun immunitettiin. Luontainen immunitetti on synnynnäistä ja opittu immunitetti tarkoittaa esimerkiksi rokotuksen aikaansaamaa immuunivastetta. [14, s. 395; 15, s. 12–13.]

Luontainen immunitetti reagoi nopeasti vieraan mikrobin päästessä elimistöön. Sen tehtävä on tuhota ja poistaa kehoon joutuneita mikrobeja ja välittää tulehdusreaktioita. Luontaiseen immunitettiin kuuluvat pääosin veren proteiineista koostuva komplementtijärjestelmä, fagosyytit eli syöjäsolut ja molekyylejä, jotka tunnistavat muun muassa bakteerien soluseinärakenteita. Fagosyytit erittävät myös sytokiineja eli välittäjäaineita, jotka saavat maksasolut tuottamaan C-reaktiivista proteiinia (CRP), joka on akuutin vaiheen proteiini. Epäspesifisenä tulehdusmerkkiaineena tunnetun CRP:n pitoisuutta voidaan mitata verestä, jolloin saadaan viitteitä, onko infektion aiheuttaja bakteeri vai virus. Infektion aiheuttajan spesifisempään tunnistamiseen CRP:tä ei voi käyttää. [14, s. 395; 15, s. 12–13.]

Opittu immunitetti reagoi antigeeneihin, jotka se on oppinut tunnistamaan joko aiemman infektion kautta tai rokotuksesta saadun vasteen takia. Opitun immunitetin toiminta

on hitaampaa kuin luontaisen immunitetin, koska kohdatessaan antigeenin ensimmäisen kerran, se kehittää sille spesifisen immuunivasteen. Seuraavalla kerralla reaktio on jo nopeampi ja tehokkaampi, koska ensimmäisestä kontaktista on jäänyt muistijälki. [14, s. 395; 15, s. 12–13.]

2.2.1 Vasta-ainevälitteinen immunitetti

Vasta-ainevälitteinen immunitetti on osa opittua immunitettia. Vasta-ainevälitteisen immunitetin toiminta perustuu siihen, että se tunnistaa elimistön omat rakenteet ja kohtelee kaikkea muuta vieraana, joka pitää torjua. Vieraaksi rakenteeksi sen pitää tunnistaa myös elimistön omat muuntuneet rakenteet, jolloin ne voidaan tuhota. Vasta-ainevälitteisen immunitetin tarkoitus on estää mikrobien aiheuttamia infektioita syntymästä. Se voi tuhota tai opsonoida mikrobin, estää mikrobin sitoutumisen ihmisen soluihin tai aiheuttaa yliherkkyyssreaktion. Vasta-aineet voivat myös estää infektion syntymisen neutraloimalla mikrobin estämällä sen kiinnittymisen elimistön pinnalle. [15, s. 101–102.]

Vasta-ainevälitteistä immunitettia hyödynnetään biotieteellisissä ja biolääketieteellisissä tutkimuksissa. Vasta-aineita käytetään hyödyksi muun muassa infektio- ja autoimmuunitautien diagnostiikassa. Vasta-ainelääkkeet ovat tulleet viime vuosina käyttöön passiivisen ja aktiivisen immunisaation rinnalle. Passiivisella immunisaatiolla tarkoitetaan vasta-aineen antamista yksilölle ilman yksilön oman vasta-ainetuotannon käynnistämistä. Passiivisessa immunisaatiossa voidaan esimerkiksi antaa veren seerumia sellaiselta henkilöltä, jolla vasta-aineita on paljon. Tällaista hoitokeinoa voidaan käyttää esimerkiksi jäykkäkouristuksen tai vesikauhun hoitoon. [15, s. 134.]

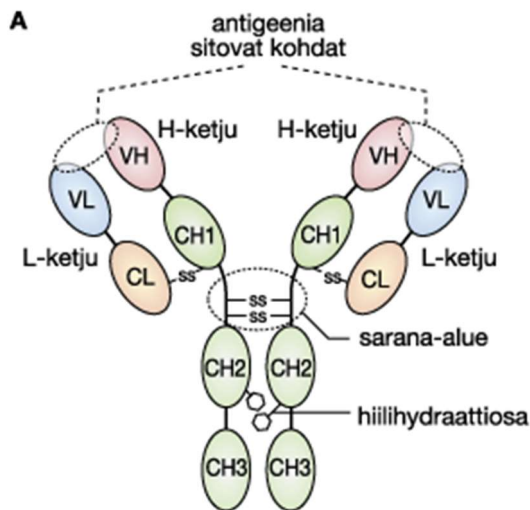
Aktiivisessa immunisaatiossa yksilön oma vasta-ainetuotanto käynnistetään tiettyä anti-geenia vastaan, esimerkiksi rokottaen. Vasta-ainepohjaisissa lääkkeissä käytetään monoklonaalisia vasta-aineita. Lääkkeissä käytetyt vasta-aineet on muokattu ihmisen vasta-aineita paremmin vastaaviksi, ettei potilas immunisoidu niille. Vasta-aineeseen on voitu myös liittää reseptorimolekyyliä, jotka tunnistavat elimistölle haitallisen molekyylin. Tällaista vasta-ainetta on käytetty sitomaan esimerkiksi TNF- α -sytokiinia, proteiinia, joka toimii tulehduksissa välittäjäaineena ja jolla on yhteys muun muassa autoimmuunitautiin [16]. [15, s. 134.]

2.2.2 Vasta-aineet

Vasta-aineet eli immunoglobuliinit (Ig) ovat proteiineja, joita esiintyy selkärankaisten veressä ja eritteissä. Vasta-aineilla on spesifinen antigeeniä sitova kohta. Sitoutuessaan toisiinsa vasta-aineet ja antigeenit eli vasta-aineiden kohderakenteet muodostavat stabiileja komplekseja ei-kovalenttisin sidoksin. [17.]

Vasta-aineita alkaa muodostua elimistössä, kun B-lymfosyytin pinnalla oleva antigeenireseptori tunnistaa antigeenin epitoopin eli osan, jonka vasta-aine spesifisesti tunnistaa. Antigeenin aktivoima B-lymfosyytti alkaa jakautua, kasvaa ja muuttua vasta-ainetta tuottavaksi plasmasoluksi. Tuotetuilla vasta-aineilla on samanlainen antigeenireseptori, joka tunnistaa antigeenin epitoopin ja sitoutuu siihen. Vasta-aineen tehtävät määräytyvät sen mukaan, mihin immunoglobuliiniluokkaan ne kuuluvat ja mihin epitooppiin ne sitoutuvat. Ne voivat muun muassa neutraloida mikrobin ja siten estää infektion etenemisen. Vasta-aineet auttavat myös fagosyyttejä tunnistamaan mikrobeja tarttumalla niihin, jolloin fagosyytit tunnistavat IgG-luokan vasta-aineen Fc-alueen, vaikka eivät pystyisikään tunnistamaan mikrobia. Vasta-aine voi myös antigeeniin sitoutuessaan aktivoida immuunipuolustukseen kuuluvan komplementtijärjestelmän, joka tuhoaa ja poistaa kehoon joutuneita vieraita mikrobeja. Vasta-aine osallistuu myös vasta-ainevälitteiseen solutappoon, jossa vasta-aine on sitoutunut yleensä elimistön omaan muuntuneeseen tai infektointuneeseen soluun ja aktivoi luonnollisen tappajasolun (NK-solu) suorittamaan solutapon. IgE-luokan vasta-aineet, jotka ovat syöttösolun pinnassa, voivat aiheuttaa tulehdusreaktion, joka havaitaan yliherkkyyssreaktiona, kun ne kohtaavat allergeenin. [14, s. 398; 15, s. 103.]

Immunoglobuliinin perusyksikössä, joka on Y-kirjaimen muotoinen, on proteiinirunko ja siihen kiinnittynyt hiilihydraattiosa (kuva 1).



Kuva 1. IgG-luokan vasta-aineen rakenne muodostuu vaihtelevista antigeenia sitovista kohdista (VL ja VH) ja muuttumattomista vakio-osista (CL ja CH1-3). [15, s. 104.]

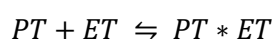
Immunoglobuliinin perusyksikkö koostuu neljästä polypeptidiketjusta, kahdesta identtisestä raskasketjusta (H-ketju) ja kahdesta identtisestä kevytaketjusta (L-ketju). Ketjut ovat kiinnittyneet toisiinsa kysteiiniaminohappojen muodostamilla rikkisilloilla. Raskasketjut ovat kiinni toisissaan kahdella tai useammalla rikkisillalla. Kumpikin kevytketju on kiinni raskasketjussa yhdellä rikkisillalla. Kärkiosa muodostuu kevyt- ja raskasketjujen vaihtelevista, antigeeneja sitovista tarttumiskohdista, joita kutsutaan paratoopeiksi (VL ja VH) ja muuttumattomista osista (CL ja CH1), jotka ovat kiinnittyneet raskasketjun "häntäosaan" (CH2-3). "Häntäosaa" hyödynnetään vasta-aineiden luokittelemiseen sen rakenteellisten erojen perusteella. Vasta-aineen perusyksikön voi pilkkoa papaiinilla, jolloin muodostuu kaksi identtistä Fab-fragmenttiä ja Fc-fragmentti. Fab-fragmentti muodostuu vasta-aineen antigeeniin sitoutuvasta osasta (VL ja VH) ja vakio-osasta (CL ja CH1). Fc-fragmentti koostuu vasta-aineen "häntäosasta" (CH2-3). Fc-fragmenttissa ovat ne osat vasta-aineesta, jotka osallistuvat komplementin klassisen tien aktivaatioon. Jos vasta-aine pilkotaan pepsiinillä, muodostuu Fc-fragmentin lisäksi $F(ab')_2$ -fragmentti, jossa kaksi identtistä Fab-fragmenttiä ovat kiinni toisissaan rikkisillalla. $F(ab')_2$ -fragmenttiä voidaan käyttää liittämään kaksi samanlaista antigeeniä yhteen, jolloin saadaan aikaan agglutinaatioreaktio eli esimerkiksi punasolujen sakkautuminen. [14, s. 398; 15, s. 105; 20.]

Immunoglobuliinit jaetaan viiteen eri luokkaan (IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM) rakenteellisten ja biologisten ominaisuuksien mukaan. Eri luokkien immunoglobuliineilla on erilaiset fysiologiset vaikutukset ja roolit immuunipuolustuksessa. Se, mihin luokkaan immunoglobuliini kuuluu, vaikuttaa vasta-aineen puolustustoiminnan tehoon. Immunoglobuliinien

luokka määräytyy raskasketjun vakioalueen mukaan ja se myös määrää, yhdistyykö vasta-aine muiden saman luokan vasta-aineiden kanssa vai toimiiko se yksin. IgG-luokan vasta-aineita, joita tässä opinnäytetyössä on käytetty, on 2/3-osaa kaikesta immuunoglobuliinista. IgG-vasta-aine koostuu yhdestä perusyksiköstä eli se on monomeerinen. Se on tehokas neutraloimaan toksiineja ja se pystyy aktivoimaan komplementtijärjestelmän. Äidiltä saadut IgG-vasta-aineet suojaavat myös vastasyntyntä lasta noin puolen vuoden ajan. Äidin IgG-vasta-aineet läpäisevät istukan raskauden aikana ja lapsi saa suojan niiltä infektioilta, joita vastaan äidillä on ollut vasta-aineita. [14, s. 400; 20; 15, s. 110.]

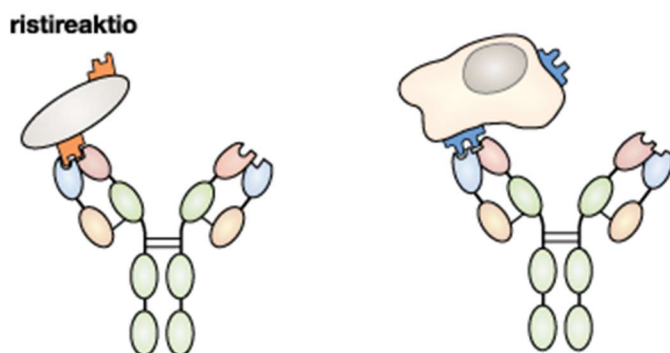
2.2.3 Antigeenit

Vasta-aineiden kohderakenteita kutsutaan antigeeneiksi. Antigeeni on elimistölle vieras rakenne. Se voi olla esimerkiksi mikrobi, toksiini tai elimistön oma muuntunut solu. Antigeenit aiheuttavat elimistössä immuunijärjestelmän aktivaation. [14, s. 395.] Vasta-aine tunnistaa antigeenin epitoopin, joita voi yhdessä antigeenissa olla useita erilaisia. Epitoopit muodostuvat proteiini- tai hiilihydraattirakenteista. Vasta-aineet ovat spesifisiä tiettyille epitoopeille. Vasta-aine sitoo antigeenin Fab-alueella olevilla paratoopeilla. Vasta-aineen antigeenia sitova rakenne muodostuu aminohapposekvensseistä, joiden koostumus ja aminohappomäärä vaihtelevat. Se mahdollistaa rakenteen monet kolmiulotteiset muodot, joihin erilaiset antigeenit voivat tarttua. Myös rakenteen ominaisuudet kuten varaus, hydrofobisuus ja vetysidosten muodostamiskyky voivat vaihdella erilaisten sekvenssien myötä. Tähän vaihteluun perustuu vasta-ainediversiteetti. [15, s. 105.] Vasta-aineen sitoutumiskohdan ominaisuudet vaikuttavat siihen, kuinka voimakkaasti antigeenin epitoopit sitoutuvat siihen. Affiniteetti eli sitoutumisvoimakkuus on voimakkaampi, jos vasta-aineen sitoutumispaikan ja epitoopin muoto ja muut ominaisuudet vastaavat toisiaan. Vasta-aineen ja antigeenin epitoopin välinen sidos toimii kemiallinen tasapainoreaktion mukaisesti (Kaava 1). Affiniteettivakio on sitä suurempi, mitä paremmin epitoopin (ET) rakenne sopii paratoopin (PT) rakenteeseen [14, s. 400]. Reaktio on reversiibeli eli voi tapahtua myös päinvastaiseen suuntaan, mutta vasta-aineen ja antigeenin sidos ei todennäköisesti aukea enää sitoutumisen jälkeen, jos affiniteetti on suuri. [18, s. 88.]



$$K_{affiniteetti} = \frac{[PT*ET]}{[PT][ET]} \quad (1)$$

Vaikka vasta-aineet ovat yleensä spesifisiä vain antigeenin yhdelle epitoopille, ne voivat myös sitoutua toisiin samankaltaisiin epitooppeihin. Jos vasta-aineen ja kahden erilaisen epitoopin affiniteetti on lähellä toisiaan, on kyseessä ristireaktio (kuva 2). Kliinisessä diagnostiikassa ristireaktiot voivat tuottaa ongelmia mittaustuloksien tulkinnassa.



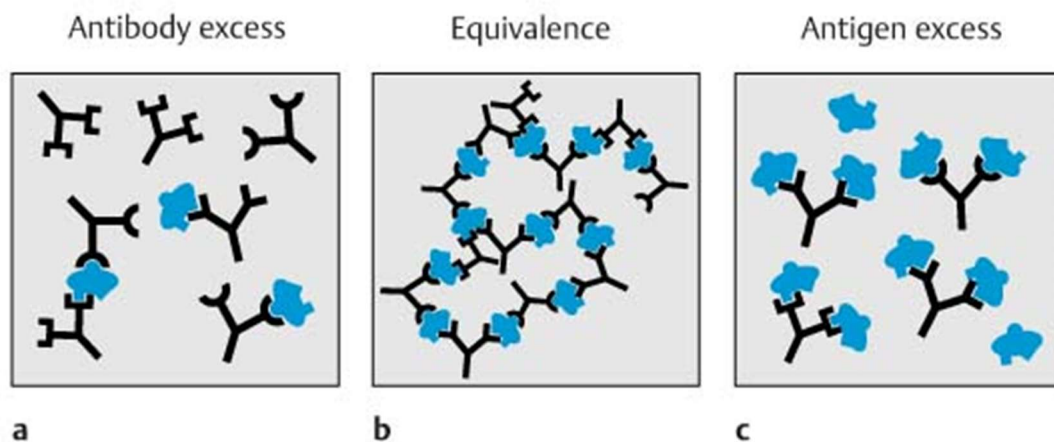
Kuva 2. Esimerkki vasta-aineiden Fab-alueella olevien samanlaisten sitoutumiskohtien tunnistamisesta samankaltaisista epitoopeista. Sitoutuminen on tapahtunut kahden erilaisen molekyylin kanssa. [15, s. 109.]

2.3 Vasta-aineiden hyödyntäminen diagnostiikassa

Vasta-aineita hyödynnetään useissa diagnostisissa testeissä. Vasta-aineina testeissä käytetään usein spesifisesti tuotettuja monoklonaalisia tai polyklonaalisia vasta-aineita. Polyklonaaliset vasta-aineet tuotetaan eläimessä, joka immunisoidaan määriteltävällä yhdisteellä, jolloin eläimen B-lymfosyytit alkavat tuottaa vasta-ainetta jokaista antigeenin epitooppia vastaan. Immunisoitu eläin tuottaa siis useita erilaisia antigeenille spesifisiä vasta-aineita, joiden paratoopit poikkeavat toisistaan. [14, s. 90.]

Yleensä diagnostiikassa käytetään soluviljely- ja hybridomatekniikoilla tuotettua monoklonaalisia vasta-aineita, joissa on vain yksi tietylle antigeenille spesifinen paratooppi. Monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan vain yhdessä kloonissa, jolloin vasta-aineet ovat identtisiä keskenään. Tämä vähentää muun muassa ristireaktioiden mahdollisuutta verrattuna polyklonaaliseen vasta-aineeseen. Monoklonaalisten vasta-aineiden ennustettavuus reaktiossa on myös parempi kuin polyklonaalisten vasta-aineiden. Immunokemiallisia analyysejä varten vasta-aineeseen liitetään usein lateksipartikkeleita, jolloin varsinkin pienimolekyylisten yhdisteiden määrittäminen herkityy. [14, s. 90, 99; 15, s. 135.]

Immunoturbidimetrinen ja immunonefelometrinen menetelmä ovat fotometrisiä menetelmiä, jotka perustuvat vasta-aineen ja antigeenin reaktion muodostaman saostuman mittaamiselle. Menetelmiä käytetään seerumin, virtsan ja selkäydinnesteen spesifisten proteiinien pitoisuuksien mittaamiseen. Nefelometrisellä menetelmällä mitataan valon siroamista sen läpäistessä näytekyvetissä olevan näyteliuoksen. Nefelometrissa valodetektor on $15-90^\circ$:n kulmassa valonlähteeseen nähden, kun taas turbidimetrissä valonlähde ja detektor ovat suorassa linjassa. Turbidimetri mittaa valon vähenemistä sen läpäistessä näyteliuoksen. Vasta-aineiden ja antigeenien sitoutuessa toisiinsa ne muodostavat verkkorakenteen, joka näkyy näyteliuoksen sameutena. Kun vasta-aineiden ja antigeenien määrä on tasapainossa, sameus lisääntyy tiettyyn rajaan asti, jonka jälkeen liuos alkaa kirkastua. Ilmiötä kutsutaan antigeeni- tai vasta-aineylimääräksi (kuva 3). Jos reaktiossa on liikaa vasta-aineita tai antigeeneja, mittaustulokset eivät ole luotettavia, vaan jäävät alhaisiksi. Immunoturbidimetrisessä menetelmässä vasta-aineen ja antigeenin välistä saostumisreaktiota voidaan nopeuttaa lisäämällä puskuriliuokseen polyetyleeniglykolia (PEG). PEG:n lisäys nopeuttaa reaktiota, joka muuten voi kestää jopa tunteja. [14, s. 70–72, 92, 99.]



Kuva 3. A) Kun reaktiossa on vasta-aineita ylimäärin, verkkorakennetta ei muodostu vasta-aineen ja antigeenin välille. B) Vasta-aineen ja antigeenin sitoutumisreaktiossa muodostunut verkkorakenne, kun vasta-aineiden ja antigeenien määrä on tasapainossa. C) Antigeeniyliäärässä antigeenia on liikaa eikä reaktiossa muodostu verkkorakennetta. [19.]

2.4 Esikäsittely vasta-aineille ennen analyysimittauksia

2.4.1 Kouttaus, vasta-aineen kiinnittäminen lateksipartikkelin pinnalle

Kouttauksen tarkoituksena oli kiinnittää vasta-aineet raakalateksipartikkeliin käyttäen menetelmänä happo-emässitoutumista. Lateksipartikkeli, johon vasta-aine on kiinnittynyt, on aktiivinen immunologisissa reaktioissa. Reaktiivinen yhdiste koostuu vasta-aineesta tai antigeenistä ja kiinteästä partikkelista. Kiinnitettävä vasta-aine voi olla monoklonaalinen tai polyklonaalinen, kokonainen vasta-aine tai sen osa. Menetelmä mahdollistaa vasta-aineiden ja antigeenien käytön immunologisissa analyyseissä ja näiden analyysien toteuttamisen korkealla spesifisyydellä ja tarkkuudella. Menetelmässä vasta-aine kiinnitetään kahdessa vaiheessa polymeeripartikkeliin anionisen surfaktantin läsnä ollessa. Polymeeripartikkeli voi olla homopolymeerinen tai kopolymeerinen. Homopolymeeri koostuu polymeeristä, jossa on vain yhtä monomeeriä ja kopolymeerissä on kahta tai useampaa polymeeriä. Tässä työssä käytetty raakalateksi oli kopolymeeristä styreenivinylibentsyylikloridia (SVBC). [20, s. 341, 349; 21.]

Ensimmäisessä vaiheessa vasta-aineiden kiinnittyminen tapahtuu nopeasti pääosin hydrofobisessa vuorovaikutuksessa. Valmiiksi dialysoituun raakalateksiliuokseen lisätään ensin surfaktantti, pinta-aktiivinen aine. [21.] Surfactanttimolekyylin pinta-aktiivisuus perustuu siihen, että se on samaan aikaan hydrofiilinen (poolinen) ja hydrofobinen (pooliton). Sen hydrofobinen pää, jossa on hiilivetyryhmä, vetää vesimolekyyliä puoleensa vain vähän, mutta vetysidoksista muodostuva hydrofiilinen pää vetää vesimolekyyliä voimakkaasti puoleensa. Poolisuutensa ansiosta surfaktantti sijoittuu liuoksessa vesimolekyylien väliin pienentäen veden pintajännitystä. [20, s. 336.] Liuoksen pH alennetaan lisäämällä suolahappoa (HCl), jolloin liuoksen pH saadaan pienemmäksi kuin vasta-aineen isoelektrinen piste. Isoelektrisessä pisteessä molekyylin varaus on nolla. [22.] Molekyyliille halutaan positiivinen tai negatiivinen varaus, jolloin se liikkuu kohti vastakkaista varausta. Tässä työssä positiivisesti varautuneen vasta-aineen halutaan hakeutuvan negatiivisesti varautuneen lateksin luokse.

Välittömästi ensimmäistä vaihetta seuraavassa toisessa vaiheessa kiinnittyminen tapahtuu kovalenttisesti, kun vinyylidikloridiryhmä reagoi vasta-aineen primaarisen tai sekundaarisen aminoryhmän kanssa. Kovalenttinen sitoutuminen on melko hidas prosessi, joka vaatii emäksiset olosuhteet (pH 8-11). Liuoksen pH:ta nostetaan emäksisellä booraatilla. Kovalenttisessa sidoksessa molekyylit jakavat valenssielektronin, jolloin syntyy

vahva sidos. [21; 23.] Liuokseen lisätään vielä puskuriliuosta, jossa on BSA:ta (Bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini), jolla saadaan estettyä ei-haluttu partikkelien sitoutuminen.

Vasta-aineen kiinnittymisen jälkeen suoritetaan puskurinvaihto lateksinpesupuskurilla. Liuosta sentrifugoimalla saadaan lateksisakka ja supernatantti erottumaan. Sentrifugointi suoritetaan useaan otteeseen, jotta erottuminen olisi mahdollisimman tehokasta. Lopuksi lateksi suspensoidaan sakkaroosia sisältävään loppupuskuriin.

Kun lateksisakka on erotettu ja säilötty loppupuskuriin, liuosta sonikoidaan ultraäänellä aggregaattien eli toisiinsa takertuneiden lateksipartikkelien irrottamiseksi. Sonikoinnin jälkeen partikkelien koko mitataan partikkelikokomittarilla, joka käyttää DLS-tekniikkaa (Dynamic Light Scattering) partikkelien määrittämiseen. Valonlähteenä käytetty laser valo siroaa, kun se osuu liuoksessa oleviin partikkeleihin, jotka liikkuvat Brownin liikkeen mukaisesti. Kasvitieteilijä Robert Brown havaitsi vuonna 1827, että pienet partikkelit liikkuvat nesteessä sattumanvaraisesti. Pienet partikkelit levittäytyvät ympäristöönsä nopeammin kuin suuret. Laservalo siroaa eri intensiteetillä riippuen partikkelin liikkeestä. Analysoimalla intensiteetin vaihtelua saadaan selville Brownin liikkeen nopeus ja sitä kautta partikkelin koko käyttämällä Stokes-Einsteinin yhtälöä, joka kuvaa pyöreiden partikkelien leviämistä nesteessä pienillä Reynoldsin luvuilla. Reynoldsin luku ilmaisee näennäisvoiman suhdetta viskositeettiin. [24; 25; 26; 27.]

Sonikoinnin tarkoituksena on saada partikkelikoko ja polydispersiteetti-indeksi halutuiksi. Polydispersiteetti-indeksillä kuvataan partikkelikokojakaumaa. Se kertoo massakeskimääräisen molekyylimassan ja lukukeskimääräisen molekyylimassan suhteen eli kuinka tasakokoisia partikkelit ovat. Sonikointia jatketaan pienissä erissä, kunnes molemmat arvot ovat halutulla tasolla.

2.4.2 Kylmäkuivaus

QuikRead go -laitteella mitattavissa CRP:n kvantitointiin perustuvissa testeissä reagenssiaine reagenssikorkeissa on kylmäkuivattu. Tässä opinnäytetyössä haluttiin testata, voidaanko myös analyytti x:n koutattuja vasta-aineita kylmäkuivata reagenssikorkeihin ja vaikuttaako kylmäkuivaus testituloksiin. Analyytti x:n vasta-aineiden kylmäkuivauksen onnistuminen oli erityisen tärkeää testin jatkokehityksen kannalta, koska se mahdollistaa tuotannollistettavuuden.

Kylmäkuivaus eli lyofilisaatio on menetelmä, jota käytetään materiaalin kuivaamiseen jäädyttämällä. Kylmäkuivaus parantaa materiaalin säilyvyyttä ja pienentää bakteerien ja entsyymien toimintaa. Kylmäkuivausprosessissa materiaali jäädytetään ensin kylmäkuivauslaitteessa, joka on suljettu tiiviisti. Kun materiaalissa oleva vesi on jäätynyt kiinteään olomuotoon, sen molekyylit ovat irtautuneet materiaalin molekyyleistä, jolloin materiaali jää koskemattomaksi prosessin edetessä. Seuraavaksi kylmäkuivauslaitteen ilmanpainetta lasketaan, jotta saadaan aikaan tyhjiö ja sublimaatio voi alkaa, kun lämpötilaa nostetaan vähitellen. Sublimation aikana veden kiinteä olomuoto muuttuu höyryksi, koska tyhjiössä vesi ei voi olla nestemäisessä muodossaan. Höyry suodatetaan ulos kylmäkuivauslaitteesta. Kuivausprosessi kestää useista tunneista vuorokausiin riippuen kuivatettavasta materiaalista. Prosessin päätteeksi lämpötilaa nostetaan kosteuden haihduttamiseksi. Prosessi on hidas, jotta materiaalin ominaisuudet tai rakenne ei muutu kuumentamisen johdosta. [28.]

2.5 C-reaktiivinen proteiini

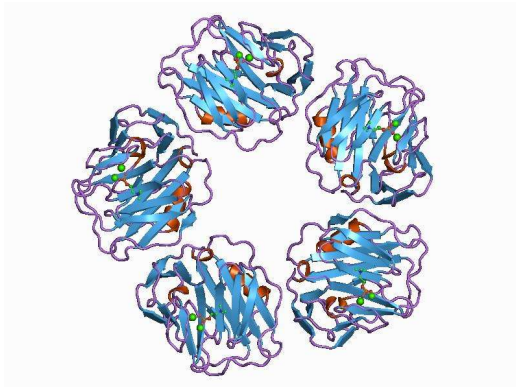
C-reaktiivista proteiinia (CRP) käytetään tulehdussairauksien diagnostiikassa. Tässä opinnäytetyössä CRP:tä käytettiin vertailuanalyysinä tutkittavalle analyyttille x:lle. Työssä käytettiin kokoverta ja plasmaa, jonka CRP-pitoisuus on tunnettu. Kokoverestä mitatun analyytin x:n pitoisuutta verrattiin CRP-pitoisuuteen, jolloin saatiin vertailumateriaalia analyytin x:n kyvystä toimia tulehdusmerkkiaineena.

Bakteeri-infektiossa CRP:n määrä nousee korkeammaksi kuin virusinfektioissa laajempien kudosaurioiden takia. Tämän takia CRP onkin hyvä merkkiaine erottamaan bakteeri- ja virusinfektion toisistaan. Sitä ei kuitenkaan voi käyttää epäspesifisyytensä takia tarkempaan mikrobin tunnistamiseen. CRP on akuutin vaiheen proteiini, jonka pitoisuus veressä voi nousta monikymmenkertaiseksi akuutissa infektiossa. CRP:n tehtävänä on paikallistaa infektio ja toimia yhdessä immuunijärjestelmän kanssa niin, että infektion eteneminen saataisiin estettyä. Maksasolujen tuottaman CRP:n määrä kasvaa jo muutamassa tunnissa erilaisten infektioiden alkamisesta. Sen puoliintumisaika on myös nopea, jolloin sitä voidaan käyttää määrittämään antibioottilääkityksen tehoamista bakteeri-infektion hoitoon. Bakteeri- ja virusinfektioiden erotusrajana käytetään tavallisesti pitoisuutta 20-40 mg/l. Terveiden ihmisten CRP-pitoisuus veressä on alle 10 mg/l. CRP-pi-

toisuuden kohoaminen voi myös kertoa tilasta, jossa on kudostuhhoa tai tulehdusta johtuen sydäninfarktista tai akuutista kihtihohtauksesta. [14, s. 211; 15, s. 34; 18, s. 32; 29; 30; 31.]

CRP on saanut nimensä, koska se reagoi pneumokokin pinnalla olevan C-polysakkaridin kanssa. Reaktio tarvitsee kalsiumioneja ja johtaa komplementtijärjestelmän klassisen tien aktivaatioon. Klassisen tien aktivaatiossa vasta-aineet huolehtivat mikrobien tunnistamisesta ja se johtaa lopulta solun kuolemaan. CRP sitoutuu fosforyylikoliinia sisältäviin, negatiivisesti varautuneisiin sokerirakenteisiin. Myös omien kudoksiemme solukalvoissa esiintyy C-polysakkaridin kaltaista fosforyylikoliinirakennetta. Kudosvaurioiden yhteydessä CRP osallistuu vaurioalueiden puhdistamiseen sitoutumalla fosfolipideihin ja auttaa siten fagotsytoosia. [15, s. 34, 53; 32.]

CRP kuuluu pentameeristen proteiinien ryhmään, pentraksiineihin. Se on pentameeri, joka koostuu viidestä ei-kovalenttisin sidoksin yhdessä olevasta monomeerista (kuva 4). CRP:n koko pentameerina on noin 115 kDa. [33.]



Kuva 4. C-reaktiivisen proteiinin molekyylirakenne [34.]

2.6 QuikRead go -mittalaite

Tässä opinnäytetyössä analyyttien mittaamiseen käytettiin Orion Diagnostica Oy:n kehittämää QuikRead go -laitetta (kuva 5).



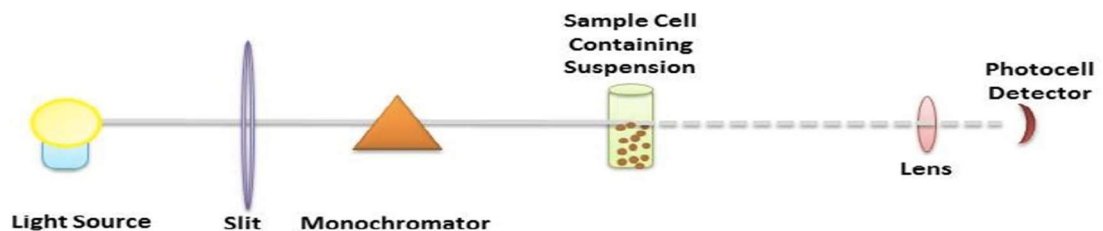
Kuva 5. Orion Diagnostica Oyn kehittämä QuikRead go -laite vieritestaukseen. [35.]

QuikRead go on terveydenhuollossa käytettävä vieritestijärjestelmä. Sitä käytetään kvantitatiivisiin ja kvalitatiivisiin mittauksiin in vitro -diagnostiikassa auttamaan diagnosiin tekemisessä ja hoidon valinnassa. QuikRead go -laitteella voidaan tällä hetkellä määrittää kvantitatiivisesti CRP kokoverestä, seerumista ja plasmasta sekä hemoglobiini kokoverestä. Laitetta käytetään myös streptokokki A -bakteerin toteamiseen nielunäytteestä ja piilevän veren kvantitatiiviseen ja kvalitatiiviseen määrittämiseen ulosteesta mahasuolikanavan verenvuodon toteamiseksi QuikRead go -laite tekee mittaukset fotometrisellä ja immunoturbidimetrisellä menetelmällä. QuikRead go -laitteen testit perustuvat näytekyvetissä tapahtuvaan saostumisreaktioon. Reaktion aiheuttama samentuma mitataan QuikRead go -laitteella ja arvo muutetaan kvalitatiiviseksi tai kvantitatiiviseksi testitulokseksi riippuen käytössä olevasta testistä. [36; 37.]

Fotometrillä mitataan valon aiheuttamaa säteilyenergiaa, joka etenee aaltomaisesti. Valoaaltojen välistä etäisyyttä kutsutaan aallonpituudeksi. Aallonpituus määrää valon värin. Kun valo absorboituu tietyllä aallonpituudella, se heijastuu toisena värinä, esimerkiksi sininen valo absorboituneena näkyy ihmiselle keltaisena. QuikRead go -laite koostuu

mittauskammiosta, kolmesta led-valosta, jotka lähettävät valoa eri aallonpituuksilla ja valodetektoreista. Laite lähettää valon mittauskammion läpi, osa valosta absorboituu näytteeseen ja näytteen läpäissyt, transmittoutunut valo mitataan detektorilla. [14, s. 66; 37.]

Turbidimetri mittaa näytteen läpi lähetetyn valon vähenemistä. Laitteessa on suorassa linjassa valonlähde, mittauskammiossa oleva näytekyveti ja valodetektori (kuva 6). Detektorin mittaaman valon määrään vaikuttaa näytteestä mitattavan yhdisteen pitoisuus ja partikkelikoko. [14, s. 71.] Immuniturbidimetrisellä menetelmällä mitataan vasta-aineen ja antigeenin sitoutumisen aiheuttamaa saostumaa näyteliuoksessa. Yhdisteen, esimerkiksi CRP:n, pitoisuus on suoraan verrannollinen saostuman määrään.



Kuva 6. Turbidimetrin valonlähde lähettää valon monokromaattorin ja näytekyvetin läpi valodetektorille, joka mittaa näyteliuoksen läpi päässeän valon määrän. [38.]

3 Käytännön työ

Opinnäytetyön käytännön työn osuus suoritettiin pääosin Orion Diagnostica Oy:n tuotekehitysyksikön laboratorioissa. Joitakin osioita, kuten kouttaus, suoritettiin tuotannon laboratorioissa siellä olevan tarvittavan laitteiston takia.

Opinnäytetyön testauksiin oli valittu kuusi kaupallista vasta-ainetta analyylille x. Vasta-aineet kiinnitettiin raakalateksiin ennen mittauksia QuikRead go -laitteella. Näistä vasta-aineista etsittiin optimaalisinta yhdistelmää sekä näytteen ja vasta-aineen suhdetta kvantitatiivisia mittauksia varten. Kun sopivimmat vasta-aineyhdistelmät oli löydetty, niiden pitoisuuksia ruvettiin optimoimaan yhdessä näytematriisin kanssa. Näytematriisina käytettiin kaupallista kalibraatiokittiä ja potilasverinäytteitä kokoverenä sekä plasmana.

Työ suoritettiin käyttäen seuraavia laitteita (taulukko 1).

Taulukko 1. Työssä käytetyt laitteet ja niiden valmistajat

Laite	Valmistaja	Malli
Tasoravistelijä	Labline	Orbit shaker
Mikrosentrifugi	Tomy Seiko co., Ltd	Capsule HF-120
pH-mittari	Mettler Toledo	Seven easy
Sentrifugi	Thermo Fisher Scientific	Heraeus Multifuge 3SR+
Sonikointilaite	Cole-Parmer	Ultrasonic homogenizer 4710 series
Partikkelikokomittari	Malvern Panalytical	Zetasizer Nano series S90
Mittalaite	Orion Diagnostica Oy	QuikRead go
Kylmäkuivuri	Christ	Epsilon 2-6D LSC Plus
Pipetit	Thermo Fisher Scientific	FinnPipette

3.1 Partikkelin kiinnitys valmiiksi dialysoituun lateksiin

Testaukseen valitut partikkelit, kaupalliset vasta-aineet, kiinnitettiin valmiiksi dialysoidun lateksin pinnalle, jolloin QuikRead go -laitteella tehdyissä mittauksissa antigeenin kanssa sitoutunut vasta-ainemolekyyli näkyisi reaktiossa paremmin ja signaali olisi herkempi. Työssä käytetyt reagenssit, vasta-aineita lukuun ottamatta, olivat Orion Diagnostica Oy:n valmistamia, ja niiden tarkempi koostumus on salainen.

Kouttausputkeen pipetoitiin 556 µl valmiiksi dialysoitua 9-prosenttista SVBC-raakalateksiliuosta, jonka lateksin partikkelikoko oli 215 nm ja 70 µl 0,9 % Rhodafac-liuosta ja niiden annettiin sekoittua tasoravistelijassa 20 minuuttia. Liuoksen pH:ta alennettiin lisäämällä 0,1 ml 0,2 M HCl-liuosta, jonka jälkeen lisättiin 1 ml 5 mg/ml vasta-aineliuosta ja liuoksen annettiin sekoittua tasoravistelijassa 20 minuuttia. Liuoksen pH mitattiin, kun vasta-aineen lisäämisestä oli kulunut vähintään 5 minuuttia. Liuoksen pH:n tuli olla pienempi kuin 5,7, jolloin se on pienempi kuin vasta-aineen isoelektrinen piste. Liuoksesta tehtiin emäksinen lisäämällä 1,2 ml 0,1 M boraattiliuosta. Liuoksen pH mitattiin uudestaan, kun boraattiliuoksen lisäämisestä oli kulunut vähintään 5 minuuttia. Liuoksen pH:n tuli tässä vaiheessa olla yli 8. Liuoksen annettiin sekoittua tasoravistelijassa noin 6 tuntia, jonka jälkeen sinne lisättiin 100 µl 30 mM glysiinipuskuria, jonka BSA-pitoisuus oli 6 %. BSA blokkasi lateksin vapaat kohdat. Liuos jätettiin sekoittumaan tasoravistelijaan yön yli.

Seuraavana aamuna suoritettiin puskurinvaihto sentrifugoimalla liuosta ensin 30 minuuttia (2-8 °C, ~7000 g). Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti dekantoitiin ja lateksisakka suspensoitiin 5 ml:iin lateksinpesupuskuria, jonka jälkeen lisättiin vielä 10 ml lateksinpesupuskuria. Tämän jälkeen liuosta sentrifugoitiin uudestaan 30 minuuttia (2-8 °C, ~7000 g), supernatantti dekantoitiin ja lateksisakka suspensoitiin 15 ml:iin lateksinpesupuskuria. Liuosta sentrifugoitiin vielä kerran 30 minuuttia (2-8 °C, ~7000 g), supernatantti dekantoitiin ja lateksisakka suspensoitiin 5 ml:iin loppupuskuria.

Liuosta sonikoitiin ultraäänilaitteella 20 sekuntia partikkelikoon ja polydispersiteettiindeksin pienentämiseksi, jonka jälkeen partikkelikoko mitattiin Malvern-partikkelikokomit-tarilla. Partikkelikoko mitattiin lasikyvetissä lateksinpesupuskurissa, joka oli suodatettu 0,2 µm:n ruiskusuodattimen läpi. Jos partikkelikoko tai polydispersiteetti-indeksi oli liian iso, sonikointia jatkettiin 20 sekunnin jaksoissa, kunnes partikkelikoko ja polydispersiteetti-indeksi oli haluttu. Partikkelikoon tavoite oli raakalateksin koko + 15 nm. Polydispersiteettiindeksin haluttiin olevan alle 0,050.

Vasta-aineista mAb1, mAb2-1, mAb2-2 ja mAb5 oli koutattu aiemmin. Vasta-ainetta mAb2 koutattiin kahteen otteeseen. Nämä on nimetty mAb2-1 ja mAb2-2. Vasta-aineita mAb3 koutattiin kolmeen otteeseen. Ne on nimetty mAb3, mAb3M, mAb3-2 ja mAb3-3, joista mAb3M on sonikoitu vasta seuraavana päivänä puskurinvaihdosta. Myös mAb4 koutattiin kolmeen otteeseen, ne on nimetty mAb4, mAb4-2 ja mAb4-3. Polyklonaalista vasta-ainetta koutattiin vain kerran ja se on nimetty pAb1 (taulukko 2).

Taulukko 2. Vasta-aineiden nimikointi ja kouttauskerrat

Lyhenne	Vasta-aine
mAb1	Monoklonaalinen vasta-aine 1
mAb2-1	Monoklonaalinen vasta-aine 2
mAb2-2	Monoklonaalinen vasta-aine 2, kouttauserä 2
mAb3	Monoklonaalinen vasta-aine 3
mAb3M	Monoklonaalinen vasta-aine 3, myöhemmin sonikoitu
mAb3-2	Monoklonaalinen vasta-aine 3, kouttauserä 2
mAb3-3	Monoklonaalinen vasta-aine 3, kouttauserä 3
mAb4	Monoklonaalinen vasta-aine 4
mAb4-2	Monoklonaalinen vasta-aine 4, kouttauserä 2
mAb4-3	Monoklonaalinen vasta-aine 4, kouttauserä 3
mAb5	Monoklonaalinen vasta-aine 5
pAb1	Polyklonaalinen vasta-aine 1

3.2 Mittaus QuikRead go -laitteella

Kouttauksen jälkeen vasta-ainepartikkeleja testattiin QuikRead go -laitteella. QuikRead go -laitteella suoritettu testaus perustui kaupalliseen QuikRead go CRP -testiin. Tässäkin testauksessa testikyvetyssä oli puskuriliuosta, johon näyte lisättiin. Tämän jälkeen kyveti laitettiin QuikRead go -laitteeseen, jossa laite mittasi ensin blankin, jota vasten reaktion saostumisen aiheuttamaa muutosta absorbanssiin verrataan. QuikRead go CRP -testistä poiketen laite antoi blankin mittaamisen jälkeen kyvetin pois laitteesta, jolloin kyvetiin lisättiin manuaalisesti vasta-aineliuos. Vasta-aineen lisäämisen jälkeen laite mittasi mittausohjelman mukaisesti saostumisreaktion aiheuttamaa muutosta absorbanssiin. Kvantitatiivinen tulos saatiin, kun absorbanssia verrattiin kaupallisen kalibraatiokitin reagensseilla mitattuun standardisuoraan.

Monoklonaaliset vasta-aineet (mAb1-5) mitattiin yksitellen ja pareittain, niin että jokainen yhdistelmä tuli mitattua. Polyklonaalista vasta-ainetta (pAb1) ei mitattu muiden kanssa parina. QuikRead go -laitteen mittauksissa käytettiin esitäyttämätöntä kyvetiä, johon pipetoitiin QR CRP -puskuria, näytettä ja vasta-ainetta tai vasta-ainesekoitusta. Näytteenä käytettiin kaupallisen kalibraatiokitin reagensseja tai potilasverinäytteitä. Kalibraatiokitin reagenssien pitoisuudet olivat 50 ng/ml - 3000 ng/ml. Nollanäytteenä käytössä oli 0,9-prosenttinen NaCl-liuos. Näytteen tilavuus kyvetissä oli 15 - 20 µl. Vasta-ainetta tai vasta-ainesekoitusta kyvetissä oli 20 - 40 µl. Reagenssien kokonaistilavuus puskurin kanssa oli 800 µl. QuikRead go -laitteelle oli ohjelmoitu valmiiksi mittausohjelma, jonka

perusteella mittaukset suoritettiin. Ensin kyvettiin pipetoitiin QR CRP -puskuria ja näytettä. Kyveti asetettiin QuikRead go -laitteeseen, joka suoritti näytteen sekoituksen puskurin ja blankin mittaamisen. Blankin mittaamisen jälkeen laite ohjasi kyvetin ulos ja kyvetiin lisättiin pipetoimalla vasta-ainetta tai vasta-ainesekoitusta. Laite sekoitti reagenssit uudestaan ja mittasi absorbanssin muutosta viiden minuutin ajan. Näiden mittausten tuloksista valittiin parhaat vasta-aineyhdistelmät jatko-optimoitaviksi. Potilasverinäytteillä testattiin, saadaanko niistä mitattua analyytti x:n pitoisuutta. Potilasverinäytteillä testattiin myös, vaikuttaako näytteen seisottaminen kyvetissä puskuriliuoksessa mittaustulokseen.

Vasta-aineyhdistelmät mitattiin vain kertaalleen alustavan tutkimusvaiheen mittauksissa. Lupaavimpia vasta-aineyhdistelmiä mitattiin useammin, samalla mahdollisesti muokaten vasta-aineen ja näytteen määrää.

3.3 Vasta-aineiden kylmäkuivaus

Kylmäkuivausta varten kyveteissä käytettyihin reagenssikorkkeihin pipetoitiin kahden vasta-aineen sekoitusta 40 µl (20 µl vasta-ainetta mAb3-2 + 20 µl vasta-ainetta mAb4-2) eli sama määrä kuin mittauksissa oli käytetty. Korkkeihin lisättiin stopperit niin, että kosteus pääsi kylmäkuivauksen aikana poistumaan ilma-aukoista. Kylmäkuivauslaitteelle suoritettiin ensin laitteen käyttöä valmisteleva warm up, jolloin laitteessa olevat hyllyt ja kuivauksessa käytettävä alusta jäähdytettiin +4 °C:seen. Tämän jälkeen esitäytetyt korkit asetettiin alustalle ja alusta asetettiin kylmäkuivauslaitteeseen ylimmälle hyllylle. Kuivaus suoritettiin ohjelmalla, joka oli ohjelmoitu toisen partikkelin kylmäkuivaimiselle. Ohjelma jäädyytti korkit ensin tunnissa -44 °C:seen, jossa se pysyi kaksi tuntia. Kun korkit olivat olleet tunnin ajan -44 °C:ssa, laite aloitti ohjelman mukaisesti ilmanpaineen laskemisen luodakseen tyhjiön. Kun tyhjiö oli luotu, lämpötila nostettiin -37 °C:seen 12 tunniksi. Ohjelman lopuksi lämpötila nostettiin +20 °C:seen kolmen tunnin aikana. Korkeissa olevia, kuivauksen takia auki jätettyjä ilma-aukkoja ei voitu sulkea stoppereilla kylmäkuivurissa ennen vakuumin purkua, koska alusta, jossa korkit olivat, oli sijoitettu ylimmälle hyllylle. Vain laitteen alimpia hyllyjä voidaan liikuttaa, jolloin stopperit saadaan asetettua paikoilleen puristamalla hyllyt kiinni toisiinsa. Korkit otettiin alustalla ulos kylmäkuivauslaitteesta ja korkit suljettiin manuaalisesti mahdollisimman nopeasti.

Kylmäkuivatut korkit testattiin QuikRead Go -laitteella, pipetoimalla kyvetteihin ensin puskuri ja näyte. Laitteessa ollut mittausohjelma painoi stopperin alas korkissa, jolloin korkin alaosassa oleva luukku aukesi ja korkissa ollut vasta-ainesekeitus tipahti pusku-riin ja reaktio näytteen kanssa alkoi. Vertailusarjana mitattiin ensin yhdestä näytteestä kymmenen rinnakkaista mittausta, joissa vasta-aine pipetoitiin kyvetiin, jonka jälkeen samaa näytettä mitattiin uudelleen kymmenen rinnakkaisen mittauksen sarjana, mutta tällä kertaa vasta-aine oli kuivattuna korkeissa.

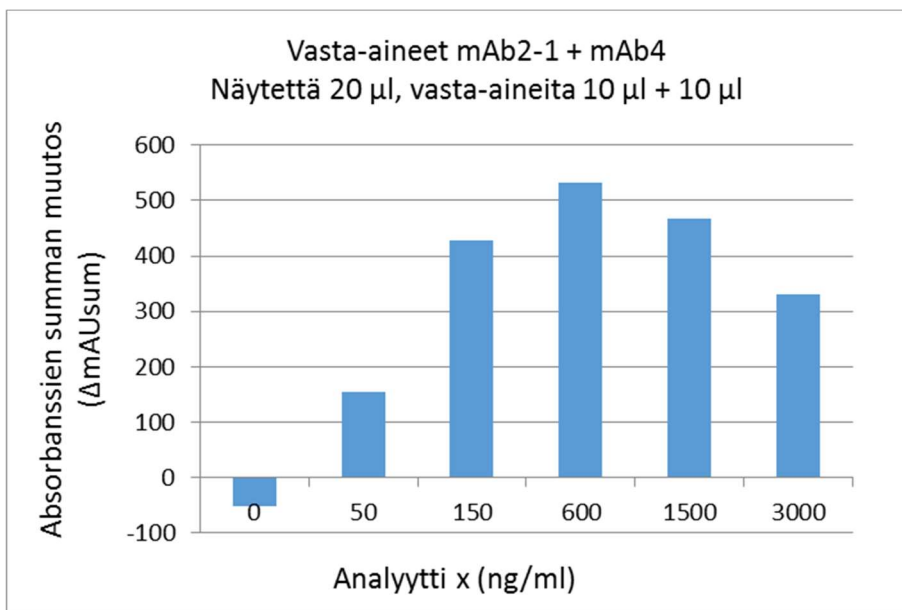
4 Tulokset

4.1 Lateksiin kiinnitetyt vasta-aineet ja vasta-aineparien testaus

Monoklonaaliset vasta-aineet (mAb1-5) mitattiin yksittäin ja yhdistelminä, niin että jokainen vasta-aine testattiin pareittain ja kahden tai kolmen muun vasta-aineen kanssa. Polyklonaalista vasta-ainetta (pAb1) mitattiin vain yksittäin eikä sitä yhdistetty muiden vasta-aineiden kanssa. Mittausten tuloksena saaduista absorbanssiarvoista tehtiin kuvaajat, joista voitiin arvioida vasta-aineiden käyttökelpoisuutta testissä. Kuvaajaa varten absorbanssin muutos laskettiin vähentämällä mittauksen loppuabsorbanssista absorbanssiarvo ajanhetkellä mittausajan alkupäästä, kun näyte oli sekoitettu puskuriin. Näytteen sekoittaminen puskuriin aiheuttaa vaahtoamista, joka vaikuttaa absorbanssiarvoon ja sen takia ensimmäisiä absorbanssiarvoja ei oteta huomioon tulosten laskemisessa. Kolmen eri valonlähteen absorbanssiarvot summattiin yhteen ja niistä tehtiin kuvaaja.

Yksittäin mitatuista monoklonaalisista vasta-aineista ei tullut kunnollista mitattavaa signaalia, koska yhdellä monoklonaalisella vasta-aineella ei saatu riittävää agglutinaatiota mitattavaa signaalia varten. Absorbanssiarvot näyttivät negatiivisilta, mikä voi johtua kyvetin pohjalle sakkautuneista partikkeleista.

Vasta-aineiden mAb2-1 ja mAb4 yhdistelmän, jossa näytemäärä oli 20 µl ja molempia vasta-aineita 20 µl, tuloksissa signaali matalammilla näytepitoisuuksilla oli hyvä, mutta korkeammilla pitoisuuksilla näytti olevan antigeeniyliäärästä johtuvaa signaalin piene-
nemistä (kuva 7). Antigeeniyliäärää näkyi myös muiden vasta-aineyhdistelmien mittaustuloksissa, joissa vasta-ainetta oli liian vähän suhteessa antigeenin määrään.



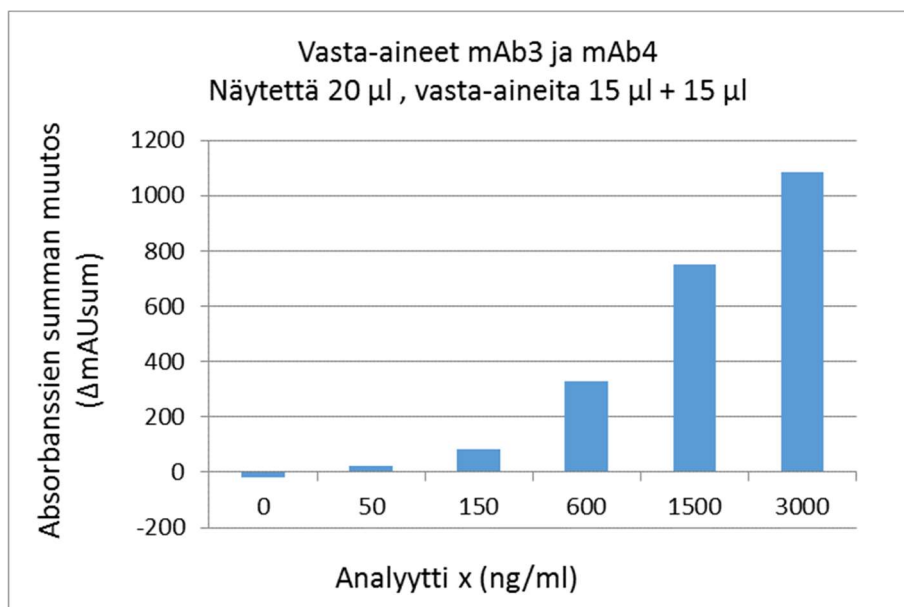
Kuva 7. Esimerkki antigeeniyliäärän vaikutuksesta tuloksiin. Matalampien näytepitoisuuksien signaali nousee odotetusti, mutta korkeampien pitoisuuksien signaali laskee. Absorbanssiarvojen summien muutos on laskettu kolmen eri aallonpituuden absorbanssiarvosta.

Vasta-aineiden yhdistelmässä mAb2-1, mAb4 ja mAb5 (näytemäärä 15 µl ja vasta-ainetta mAb2-1 4 µl, mAb4 15 µl ja mAb5 15 µl) vasta-aineen ja antigeenin suhde vaikutti hyvältä, vaikka yhden aallonpituuden signaali laski ennenaikaisesti. Muissa yhdistelmissä signaalit matalammilla näytepitoisuuksilla eivät erottuneet tai korkeammilla näytepitoisuuksilla signaalissa näkyi antigeeniyliäärä (näytemäärät näissä mittauksissa olivat 15 µl - 20 µl ja vasta-aineiden yhteenlasketut määrät 20 µl - 37 µl).

Vasta-aine mAb2-2 käyttäytyi mittauksissa haastavasti. Se antoi muita vasta-aineita korkeampaa pohja-absorbanssia, joka todennäköisesti johtui kouttauksen aikana tapahtuneesta epäspesifisestä sitoutumisesta ja blokkausongelmasta, josta aiheutui muita vasta-aineliuoksia tiheämpi suspensio. Tämän takia mAb2-2 jätettiin pois lopuista testeistä.

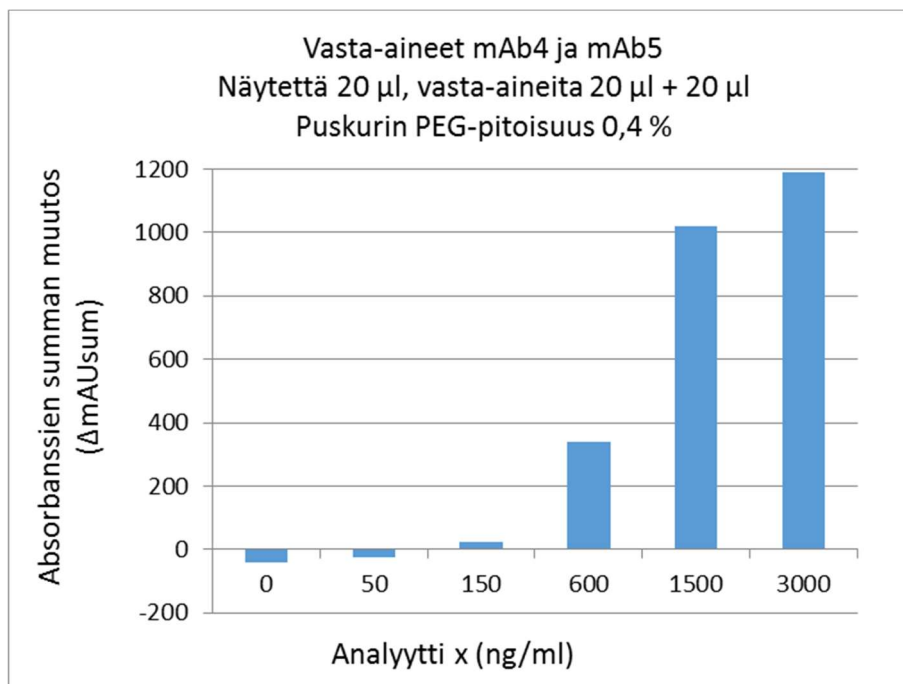
Vasta-aine mAb3 toimi mittauksissa suurimmaksi osaksi hyvin. Muiden vasta-aineiden ongelmat, kuten mAb2-2:n suuri pohja-absorbanssi, näkyivät mittauksissa. Vasta-aineen mAb4:n kanssa mittaustulokset olivat lupaavimpia. Kun näytemäärä oli 20 µl ja molempien vasta-aineiden määrä 10 µl, koko mitta-alueen signaali oli selkeä, vaikka matalam-

pien näytepitoisuuksien kohdalla signaalit olivat pienet. Vasta-aineiden määrää lisäämällä (näytemäärä 20 µl ja molempia vasta-aineita 15 µl) saatiin signaalit erottumaan paremmin (kuva 8). Tämä yhdistelmä valittiin jatko-optimoitavaksi.



Kuva 8. Vasta-aineiden mAb3 ja mAb4 yhdistelmässä näytepitoisuudet alkavat erottua.

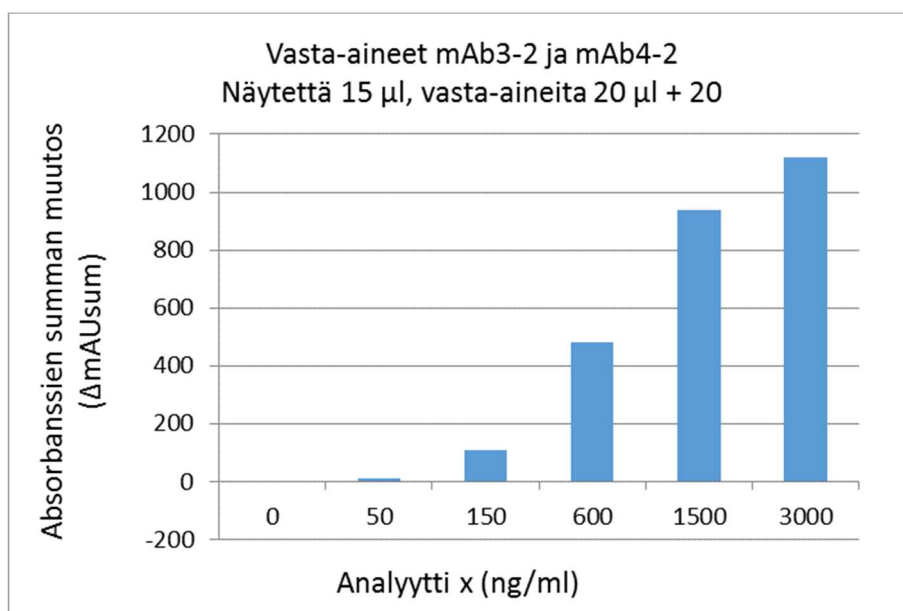
Vasta-aineiden mAb4 ja mAb5 yhdistelmässä, jossa näytemäärä oli 20 µl ja molempia vasta-aineita 10 µl, signaalit olivat mitattavissa ja ne kasvoivat näytepitoisuuksien kasvun myötä. Vasta-ainemäärää lisättäessä matalien näytepitoisuuksien signaalit eivät kuitenkaan nousseet odotetusti. Signaaleja yritettiin parantaa puskurin PEG-pitoisuutta lisäämällä, mutta se ei auttanut (kuva 9).



Kuva 9. Vasta-aineiden mAb4 ja mAb5 yhdistelmässä matalampien näytepitoisuuksien signaalit eivät erottuneet.

Vasta-aineet mAb4 ja mAb5 toimivat parina hyvin, mutta muiden vasta-aineiden kanssa mAb5 oli ongelmallinen, sen pienimmän lateksitiheyden takia. Vasta-aineiden mAb2-1, mAb4 ja mAb5 kombinaatiolla (näytettä 20 µl, kaikkia vasta-aineita 8 µl) kuin myös vasta-aineiden mAb1, mAb3, mAb4 ja mAb5 kombinaatiolla (näytettä 20 µl, kaikkia vasta-aineita 6 µl) saatiin mitta-alueen matalammilla pitoisuuksilla hyvä signaali, mutta korkeammilla pitoisuuksilla signaali laski mahdollisen antigeeniyliäärän takia. Yhdistelmä vasta-aineista mAb3, mAb4 ja mAb5 (näytemäärä 20 µl, kaikkia vasta-aineita 8 µl) ei tunnistanut pieniä näytepitoisuuksia, vaikka pareittain nämä vasta-aineet olivat toimineen lupaa-vasti. Tämä vahvisti ajatusta, että kahden vasta-aineen yhdistelmä toimii paremmin kuin usean vasta-aineen yhdistelmä.

Parhaimmat tulokset saatiin mAb3:n ja mAb4:n yhdistelmistä, joita ruvettiin optimoimaan. Testausten määrästä johtuen vasta-aineita mAb3 ja mAb4 piti koutata useamman kerran. Niitä koutattiin kolmena eri kertana ja jokaisen eri koutauksen mittaustulokset vastasivat toisiaan. Vasta-aineet mAb3 ja mAb4 näyttivät toimivan parhaiten, kun niiden sekoitusta oli 40 µl (mAb3 20 µl + mAb4 20 µl), näytettä 15 µl ja puskuria 745 µl (kuva 10). Loput mittaukset näillä vasta-aineilla tehtiin näillä suhteilla.



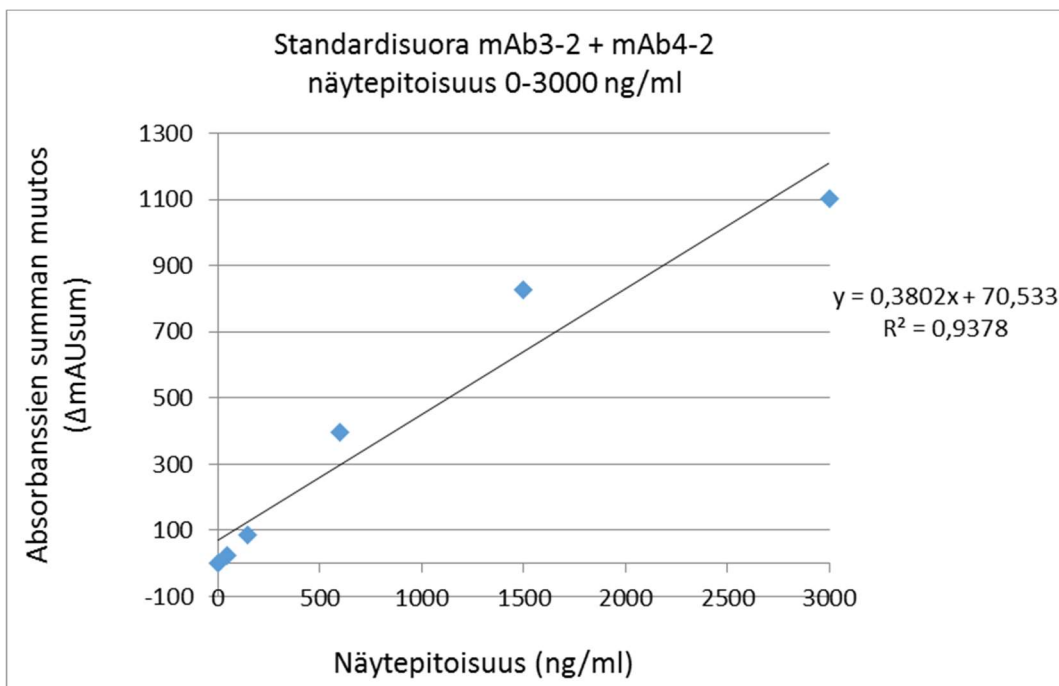
Kuva 10. Vasta-aineet mAb3 ja mAb4 toimivat testissä parhaiten.

Kun paras vasta-aineyhdistelmä ja sen suhde antigeeniin oli selvitetty, mitattiin yhdistelmä viidesti, jolloin tuloksista saatiin muodostettua standardisuora. Standardisuora on laskettu viiden rinnakkaisen mittauksen keskiarvosta, joista on myös laskettu toistettavuuden variaatiokerroin (CV %) ja keskihajonta (STDEV) (taulukko 3).

Taulukko 3. Vasta-aineiden mAb3-2 ja mAb4-2 rinnakkaismittausten keskiarvo, keskihajonta ja variaatio.

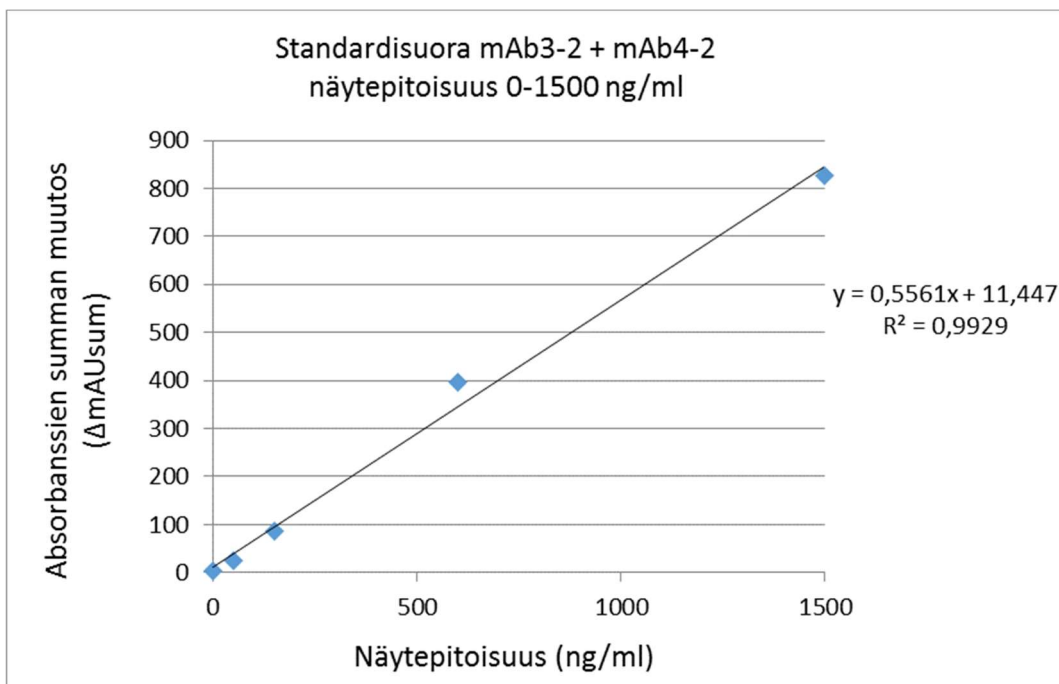
Näytepitoisuus (ng/ml)	0	50	150	600	1500	3000
ΔmAUsum keskiarvo	2,18	24,54	86,15	397,32	826,09	1101,80
Keskihajonta STDEV	1,66	7,44	15,25	48,21	68,39	21,28
Variaatio CV %	76,16	30,31	17,70	12,13	8,28	1,93

Standardisuorasta huomattiin, että korkein näytepitoisuus ei ole linjassa muiden pitoisuuksien kanssa (kuva 11).



Kuva 11. Vasta-aineiden mAb3-2 ja mAb4-2 mittausten perusteella tehty standardisuora.

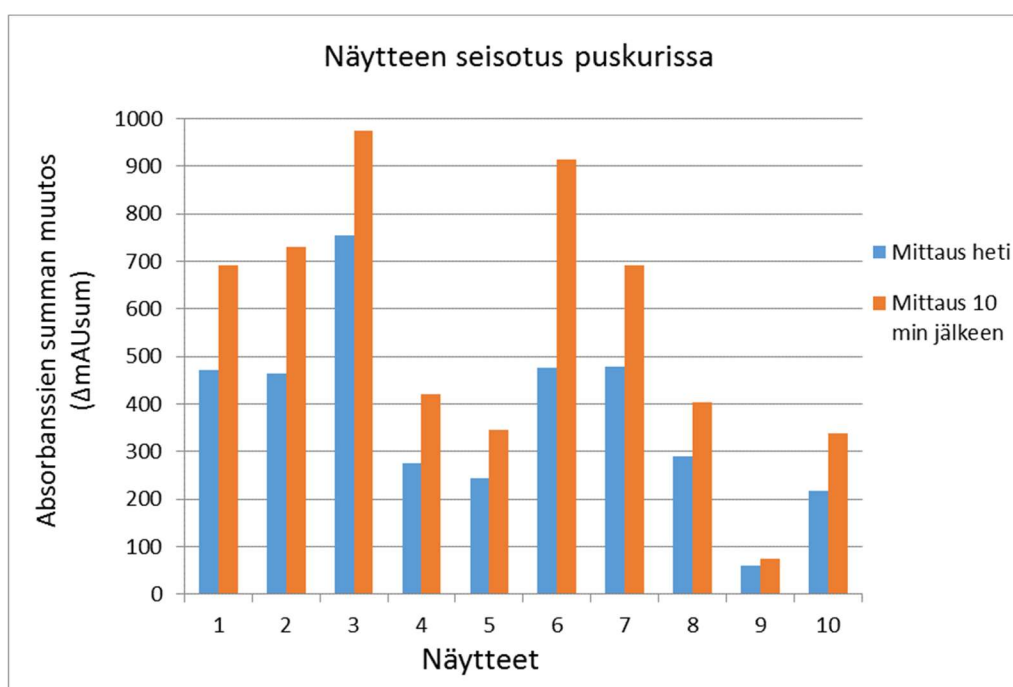
Kun standardisuorasta jätettiin pois korkein näytepitoisuus (3000 ng/ml), suora on jo lineaarisempi ja korrelaatiokerroin R^2 parempi. Mitä lähempänä arvoa 1 korrelaatiokerroin on, sitä lineaarisemmin pisteet suoralla ovat (kuva 12).



Kuva 12. Vasta-aineiden mAb3-2 ja mAb4-2 standardisuora ilman korkeinta näytepitoisuutta.

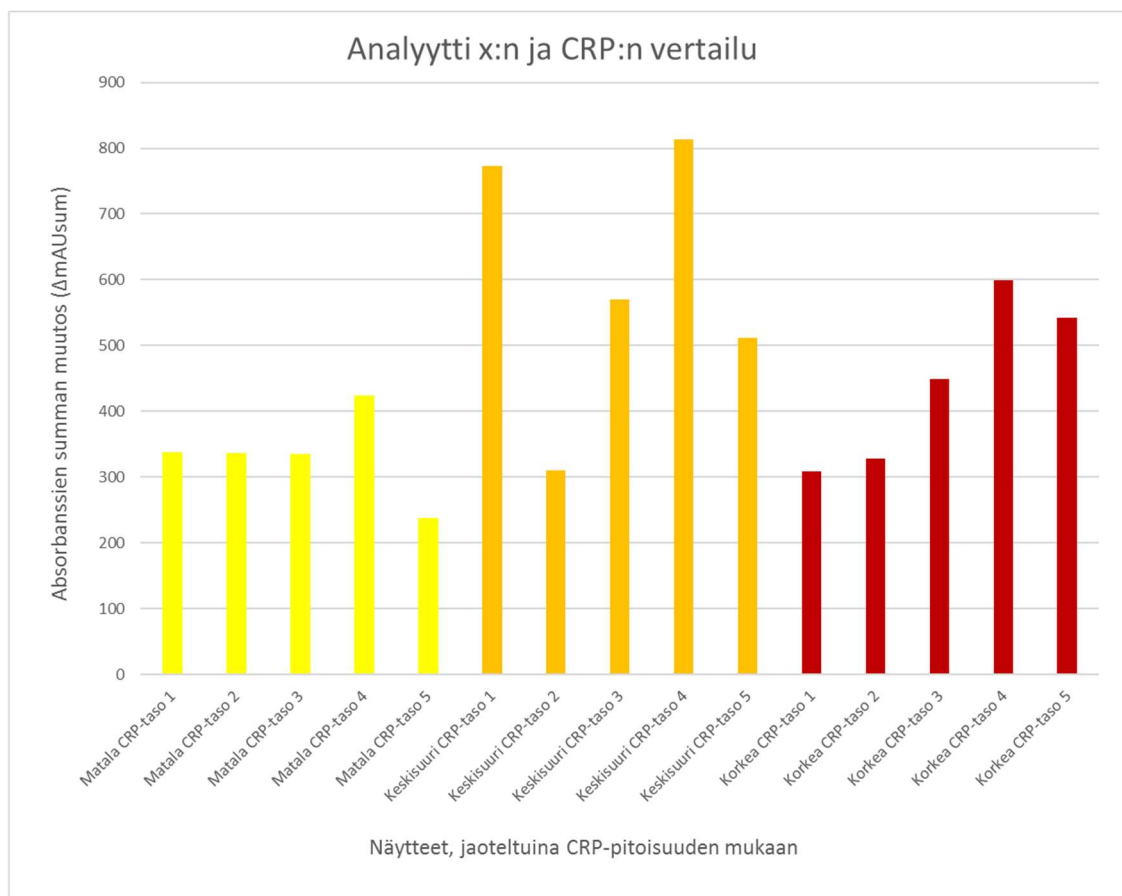
Monoklonaalisilla vasta-aineilla mAb3 ja mAb4 testattiin myös puskurin PEG-pitoisuuden vaikutusta mittaustuloksiin. Vasta-aineita ja kaupallisen kalibraatiokitin reagensseja oli optimaalinen määrä ja vain PEG-pitoisuus puskurissa muuttui. 0- ja 0,1-prosenttisen PEG-liuoksen signaalit eivät erottuneet toisistaan. 0,2-prosenttisen PEG-liuoksen tuloksissa oli hieman nousua, mutta se ei vielä tehostanut signaalia tarpeeksi. 0,3-prosenttinen PEG-liuos vaikutti parhaalla pitoisuudelta, koska tästä isommissa pitoisuuksissa yläpään signaalit alkoivat saturoida. PEG-pitoisuutta testattiin 2 %:iin asti.

Vasta-aineita mAb3 ja mAb4 testattiin myös potilasverinäytteiden kanssa. Signaalit olivat hyvät. Potilasverinäytettä käytettiin kokoverenä jokaiseen mittaukseen saman verran kuin kaupallisen kalibraatiokitin näytettäkin eli 15 µl. Potilasverinäytteillä huomattiin, että kun näytteen antaa seisoa puskurissa vähintään viisi minuuttia ennen mittaamista, signaali kasvoi verrattuna heti mitattuun näytteeseen (kuva 13). Näiden kymmenen mitatun näytteen signaali nousi keskimäärin 48 %. Tämä johtui todennäköisesti siitä, että puskurissa ollessaan verisolut hajosivat puskurin ainesosien vaikutuksesta, ja analyyyti x pääsi sieltä vapautumaan. Potilasverestä tehtiin myös plasma, jotka mitattiin vertailuna kokoveriin. Plasman seisotus puskurissa ei nostanut signaalia, mikä tukee verisolujen hajoamista puskurissa. Tässä vaiheessa tutkimusta ei vielä voida arvioida, onko signaalin nousu hyvä vai huono asia, koska analyyyti x:ää ei ole tutkittu tarpeeksi.



Kuva 13. Mittauksen signaali nousee, kun kokoverinäytteen annetaan seisoa puskurissa ennen mittausta.

Analyytti x:n ja CRP:n pitoisuudet mitattiin 50 potilasverinäytteestä vertailua varten. Näistä 50 mitatusta potilasverinäytteestä on valittu esitettäväksi 15 kappaletta (kuva 14). Kaavioon on valittu sattumanvaraisesti viisi näytettä kolmelta eri CRP-tasolta, jotka ovat matala (CRP < 20 mg/l), keski-suuri (CRP 20-60 mg/l) ja korkea (CRP > 60 mg/l).

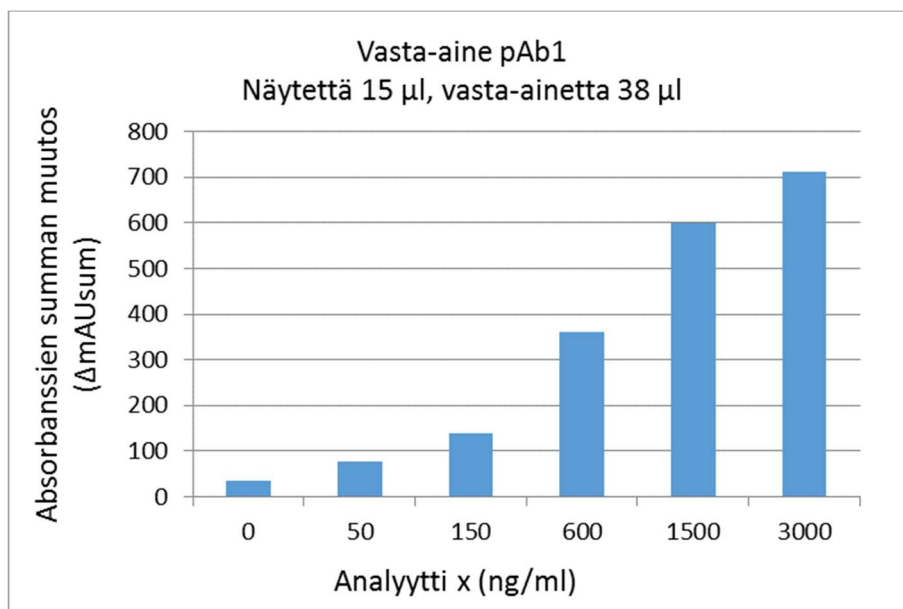


Kuva 14. Analyytti x:n ja CRP:n pitoisuudet potilasverinäytteissä eivät korreloi keskenään. Syynä on todennäköisesti se, että analyytti x:n pitoisuus veressä nousee infektiossa nopeammin kuin CRP:n.

Kun näytteiden analyytti x:n ja CRP:n tasoja vertailtiin, huomattiin, että analyytti x:n pitoisuus veressä ei ole suoraan verrannollinen CRP-pitoisuuteen. Tämä voi selittyä sillä, että analyytti x:n ja CRP:n aktivoitumisen ja hajoamisen aikakehys on erilainen eikä niiden pitoisuudet nouse tai laske samassa tahdissa. On mahdollista, että analyytti x:n pitoisuus on jo ehtinyt laskea siihen mennessä, kun CRP-pitoisuus on huipussaan. Kaaviossa huomataan, että keski-suuren CRP-tason näytteiden analyytti x:n pitoisuus on korkea. Se voi johtua siitä, että näiden näytteiden analyytti x:n pitoisuus on jo noussut huip-

puunsa, kun CRP-pitoisuus on vasta nousussa. Näytteistä ei kuitenkaan tiedetä näytteenottoajankohtaa eikä muita potilastietoja, joten varmojen johtopäätösten tekeminen näiden näytteiden perusteella on haasteellista.

Polyklonaalinen vasta-aine pAb1 antoi yksinäänkin hyvää signaalia. Tälläkin vasta-aineella haettiin optimaalisinta vasta-aineen ja näytteen suhdetta. Näytemäärällä 20 µl ja vasta-aineen määrällä 30 µl korkeammilla näytepitoisuuksilla muodostui antigeeniylimäärä, joka näkyi mitattavan signaalin laskuna korkeammilla näytepitoisuuksilla. Vasta-aineen pAb1 ja antigeenin optimaalisin määrä reaktiossa oli 38 µl koutattua vasta-ainetta, 15 µl näytettä ja 747 µl puskuria (kuva 15). Tässäkin mittauksessa yksi aallonpituuksista kääntyi laskuun korkeammilla pitoisuuksilla.



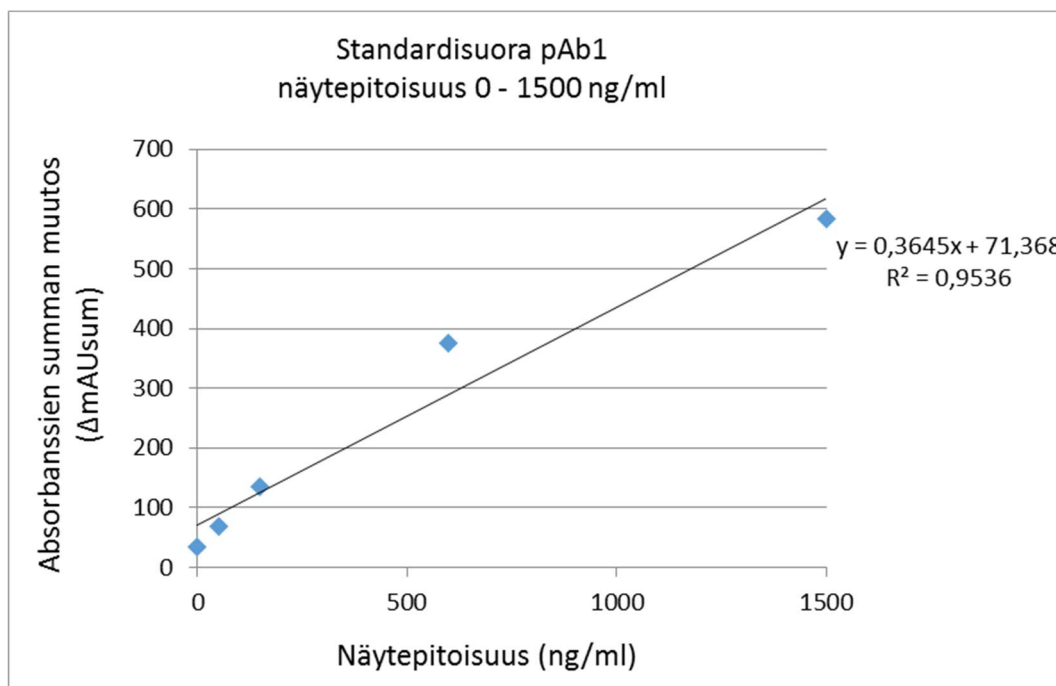
Kuva 15. Vasta-aineen pAb1 signaaleista on poistettu yksi aallonpituus, jolloin se korreloi hyvin näytepitoisuuksia.

Polyklonaalisen vasta-aineen pAb1 mittauksista tehtiin myös standardisuora, joka laskettiin neljästä rinnakkaismittauksen keskiarvosta (taulukko 4).

Taulukko 4. Vasta-aineen pAb1 rinnakkaismittausten keskiarvo, keskihajonta ja variaatio.

Näytepitoisuus (ng/ml)	0	50	150	600	1500
ΔmAUsum keskiarvo	33,61	68,39	134,59	374,34	584,25
Keskihajonta STDEV	4,32	9,96	10,75	10,99	17,78
Variaatio CV %	12,87	14,57	7,99	2,94	3,04

Standardisuoran kuvaajasta on jätetty pois korkein näytepitoisuus (3000 ng/ml) ja yksi aallonpituuksista, koska sen signaali laski korkeilla pitoisuuksilla (kuva 16). Korrelaatio-kerroin parani näillä toimenpiteillä.



Kuva 16. Polyklonaalisen vasta-aineen pAb1 standardisointisuora näytepitoisuuksilla 0-1500 ng/ml.

Polyklonaalisella vasta-aineella pAb1 testattiin myös puskurin PEG-pitoisuuden vaikutusta mittaustuloksiin. Puskurin PEG-pitoisuutta testattiin 0,4-prosentin pitoisuuteen asti ilman, että huomattiin oleellista muutosta tuloksissa. 0,4-prosenttinen PEG-pitoisuus nosti matalien näytepitoisuuksien signaalia hieman, mutta korkeimmilla näytepitoisuuksilla signaalit laskivat.

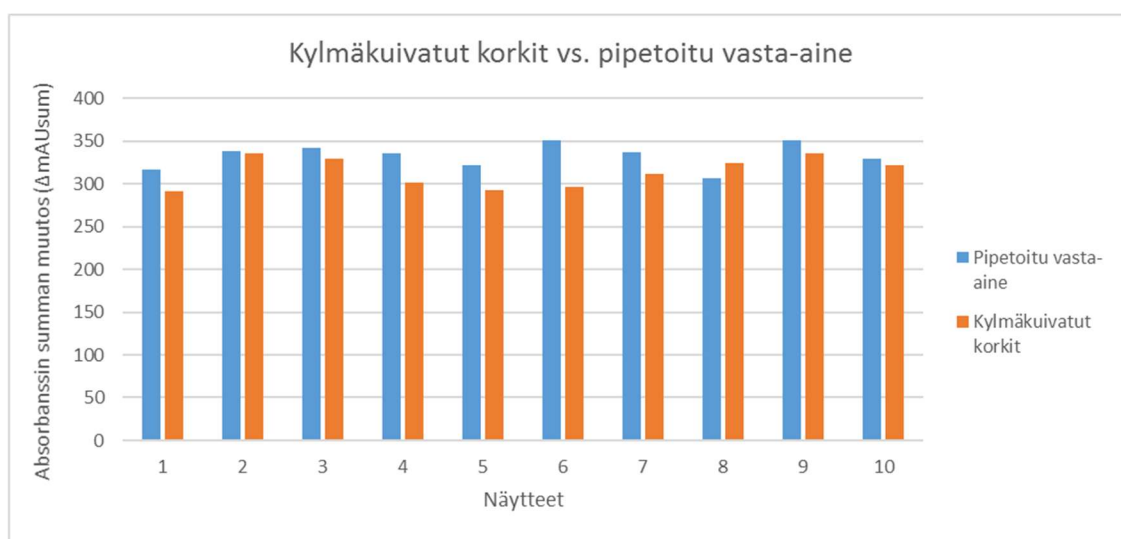
Myös polyklonaalisella vasta-aineella pAb1 mitattiin potilasverinäytteitä. Tällä vasta-aineella mittaustulokset olivat korkeampia kuin monoklonaalisten vasta-aineiden yhdistelmällä mAb3-2 ja mAB4-2. Seitsemän potilasverinäytettä mitattiin molemmilla vasta-aineyhdistelmillä. Vasta-aineella pAb1 saatiin keskimäärin 55 % suurempia signaaleja kuin yhdistelmällä mAb3-2 ja mAB4-2 (taulukko 5). Vertailtujen näytteiden määrä oli vähäinen eikä signaalin kasvu ollut yhdenmukainen, joten mittauksia pitäisi tehdä enemmän, jotta voidaan verrata tarkemmin polyklonaalisen vasta-aineen ja monoklonaalisten vasta-aineiden eroja analyysiti x:n mittauksissa.

Taulukko 5. Monoklonaalisten vasta-aineiden yhdistelmän ja polyklonaalisen vasta-aineen signaalit potilasverinäytteiden vertailumittauksista ja kuinka monta prosenttia vasta-aineen pAb1 signaali on suurempi kuin vasta-aineyhdistelmän mAb3-2+mAb4-2.

Näyte	1	2	3	4	5	6	7
ΔmAU_{sum} mAb3-2+mAb4-2	367,99	304,61	451,73	543,91	189,57	469,9	844,24
ΔmAU_{sum} pAb1	561,69	532,87	624,88	914,42	352,64	709,63	939,39
ΔmAU_{sum} ero (%)	53	75	38	68	86	51	11

4.2 Kylmäkuivaus

Kylmäkuivattujen korkkien vertailua varten pipetoitua vasta-ainetta vastaan mitattiin yhdestä näytteestä kymmenen rinnakkaista mittausta niin, että vasta-aine pipetoitiin kyvetiin mittauksen aikana. Näytteenä käytettiin kaupallisen kalibraatiokitin näytettä, jonka pitoisuus oli 600 ng/ml. Kylmäkuivatuista korkeista toistettiin samanlainen kymmenen rinnakkaisen mittauksen sarja. Tulokset olivat hyvin samanlaiset, mutta kylmäkuivattujen korkkien mittaustulokset olivat hieman matalammat kuin vertailusarjan tulokset (kuva 17). Kylmäkuivaus hukkaa keskimäärin 6 % vasta-ainetta prosessin aikana.



Kuva 17. Kylmäkuivattujen korkkien ja vertailuna mitattujen pipetoitujen vasta-aineiden signaalit ovat yhteneväiset.

Mittaustulosten keskiarvo oli 6 % pienempi kylmäkuivatuilla korkeilla. Mittausten keskihajonta ja CV % taas ovat hieman suurempia kuin pipetoiduilla vasta-aineilla tehdyillä mittauksilla (taulukko 6).

Taulukko 6. Kylmäkuivattujen korkkien ja pipetoiduilla vasta-aineilla mitattujen rinnakkaismittausten erot.

Rinnakkaismittaukset	Pipetoidut vasta-aineet (ΔmAU_{sum})	Kylmäkuivatut korkit (ΔmAU_{sum})
1	317,15	291,07
2	338,69	335,77
3	342,14	329,62
4	335,88	301,63
5	321,52	292,3
6	350,26	296,06
7	337,16	311
8	306,38	323,89
9	350,75	335,04
10	329,78	322,13
Keskiarvo	332,971	313,851
Keskihajonta STDEV	14,36	17,66
Variaatio CV %	4,31	5,62

Rinnakkaismittauksista pipetoitujen vasta-aineiden tulokset olivat normaalijakautuneita, mutta kylmäkuivattujen korkkien mittaustulokset eivät olleet normaalijakautuneita. Tuloksista laskettiin tästä huolimatta parittaisella kahden otoksen testillä keskiarvoille, onko keskiarvojen ero tilastollisesti merkitsevä.

$P(0,01) < 0,05$, jonka perusteella keskiarvojen ero on tilastollisesti merkitsevä 95 %:n luottamustasolla (taulukko 7).

Taulukko 7. Parittainen kahden otoksen testi keskiarvolle.

t-Test: Paired Two Sample for Means

	<i>Pipetoitu vasta-aine</i>	<i>Kylmäkuivattu vasta-aine</i>
Mean	332,97	313,85
Variance	206,28	311,65
Observations	10,00	10,00
Pearson Correlation	0,27	
Hypothesized Mean Difference	0,00	
df	9,00	
t Stat	3,09	
P(T<=t) one-tail	0,01	
t Critical one-tail	1,83	
P(T<=t) two-tail	0,01	
t Critical two-tail	2,26	

5 Yhteenveto

Opinnäytetyön tarkoitus oli tutkia, voiko QuikRead go -laitteella mitata analyytti x:n pitoisuuksia näyteliuoksessa. Testauksia varten hankittiin erilaisia analyytti x:n vasta-aineita ja esikäsiteltiin ne kiinnittämällä ne lateksipartikkeleihin. Vasta-aineiden kiinnittäminen lateksipartikkeleihin onnistui suurimmaksi osaksi hyvin. Kahden vasta-aineen kohdalla kouttauksessa tapahtui epäspesifistä sitoutumista, mikä vaikutti mittaustuloksiin.

Analyytti x antoi kaupallisen kalibraatiokitin näytteillä heti ensimmäisten mittausten kohdalla mitattavaa signaalia QuikRead go -laitteella. Mittauksissa yksittäinen monoklonaalinen vasta-aine ei toiminut, mutta kun vasta-aineen yhdisti toisen monoklonaalisen vasta-aineen kanssa, muodostui mitattava signaali. Polyklonaalinen vasta-aine antoi yksinäänkin mitattavan signaalin. Monoklonaalinen vasta-aine valikoitui kuitenkin jatkomittauksiin, koska sen tuottaminen on tasalaatuisempaa kuin polyklonaalisen vasta-aineen.

Analyytti x:ää tutkittiin myös potilasverinäytteillä, joiden CRP-pitoisuus oli tunnettu. Tutkimuksissa selvisi, että analyytti x:n pitoisuus ei ole suoraan verrannollinen CRP-pitoisuuden kanssa. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että analyytti x:n ja CRP:n aktivoitumisen ja hajoamisen aikakehys on erilainen. On mahdollista, että analyytti x:n pitoisuus on ehtinyt kääntyä jo laskuun, kun CRP-pitoisuus vasta nousee. Tätä pitäisi kuitenkin tutkia lisää potilasverinäytteillä, joiden näytteenottoajankohta on tarkasti tiedossa.

Kylmäkuivaus ei vaikuttanut vasta-aineiden ominaisuuksiin mittauksissa. Mittaukset kylmäkuivaetuilla korkeilla antoivat keskimäärin 6 % pienempää signaalia kuin ne mittaukset, joissa vasta-aine pipetoitiin kyvetiin. Tulosten tilastollinen ero laskettiin parittaisella kahden otoksen testillä keskiarvoille. Mittausten keskiarvojen ero on tilastollisesti merkitsevä 95 %:n luottamustasolla. Kylmäkuivaus hukkaa vasta-ainetta prosessin aikana ja siihen voisi varautua kylmäkuivaamalla korkkeihin enemmän vasta-ainetta. Kylmäkuivauksen onnistuminen oli kuitenkin tärkeää testin jatkokehityksen ja tuotannollistettavuuden kannalta.

Tutkimuksissa selvisi, että analyytti x:n pitoisuus näyteliuoksessa on kvantitatiivisesti mitattavissa QuikRead go -laitteella. Analyytti x:n ominaisuuksia merkkiaineena pitää kuitenkin vielä tutkia, jotta analyytistä voidaan kehittää luotettava merkkiaine diagnostisiin testeihin.

Lähteet

- 1 Orion Diagnostica. Verkkoaineisto. Orion Diagnostica Oy.
<<http://www.oriondiagnostica.fi/Yritys>>. Luettu 29.8.2018.
- 2 Innovatiivisia ratkaisuja terveydenhuoltoon ja hygienian seurantaan. Verkkoaineisto. Orion Diagnostica Oy.
<<http://www.oriondiagnostica.fi/Yritys/Innovatiivisia-ratkaisuja-terveydenhuoltoon-ja-hygienian-seurantaan/>>. Luettu 29.8.2018.
- 3 Entä jos menetämme antibiootit? Verkkoaineisto. Tiede.
<https://www.tiede.fi/artikkeli/jutut/uusimmat/enta_jos_menetamme_antibiootit>. Luettu 7.10.2018.
- 4 Koivunen, Marja E. & Krogsrud, Richard L. 2006. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. Verkkoaineisto. LabMedicine 08/20016.
<<http://www.dbt.univr.it/documenti/Avviso/all/all226092.pdf>>. Luettu 6.10.2018.
- 5 Rosner, Mitchell H. & Grassman, Jean A. & Haas, Robert A. 1991. Immunochemical Techniques in Biological Monitoring. Verkkoaineisto. Environmental Health Perspectives 1991.
<<https://ehp.niehs.nih.gov/cms/attachment/863f6271-4b13-4ca6-9228-3f99ff29673d/ehp.94-1567961.pdf>>. Luettu 6.10.2018.
- 6 Mitä ovat Staphylococcus aureus ja MRSA? Verkkoaineisto. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos.
<<https://www.thl.fi/fi/web/infektiotaudit/taudit-ja-mikrobit/bakteeritaudit/mrsa>>. Luettu 29.8.2018.
- 7 Sojakka, Kirsi & Välimäki, Maija-Liisa. 2011. Ammatillinen mikrobiologia. Helsinki: Opetushallitus.
- 8 Tutkimus patistaa vähentämään antibiootteja. Verkkoaineisto. Yle Uutiset 23.7.2008.
<<https://yle.fi/uutiset/3-5844892>>. Luettu 31.8.2018.
- 9 Superbakteerit yleistyvät, pitääkö niitä pelätä? – Viisi tärkeintä faktaa superbakteereista. Verkkoaineisto. Yle 12.3.2018.
<<https://yle.fi/aihe/artikkeli/2018/03/12/superbakteerit-yleistyvat-pitaako-niita-pelata-viisi-tarkeinta-faktaa>>. Luettu 31.8.2018.
- 10 Infektioiden tartunta, taudin synty ja leviäminen. Verkkoaineisto. Duodecim terveyskirjasto.
<http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_teos=&p_artikkeli=dlk00569>. Luettu 27.8.2018.

- 11 Infektiotaudit. Verkkoaineisto. Duodecim terveyskirjasto.
<http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_teos=&p_artik-keli=skl00009>. Luettu 27.8.2018.
- 12 Vuento, Matti. 2016. Virukset näkymättömät viholliset. Helsinki: Gaudeamus Oy.
- 13 Hannula, Pekka & Somerma, Päivö & Fagerstedt, Kurt & Haahtela, Kielo. 2006. Biologia 5: Biotekniikka. Helsinki: Haahtela-Kehitys Oy.
- 14 Penttilä, Ilkka (toim.). 2003. Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö.
- 15 Hedman, Klaus & Heikkinen Terho & Huovinen, Pentti & Järvinen, Asko & Meri, Seppo & Vaara, Martti. 2011. Immunologia: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- 16 Tuumorinekroositekijä, alfa, seerumista. Verkkoaineisto. Huslab.
<<https://huslab.fi/ohjekirja/4282.html>>. Luettu 3.10.2018.
- 17 Vasta-aineet. Verkkoaineisto. Solunetti.
<<http://www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/>>. Luettu 14.8.2018.
- 18 Hedman, Klaus & Heikkinen Terho & Huovinen, Pentti & Järvinen, Asko & Meri, Seppo & Vaara, Martti. 2011. Infektiosairaudet: Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- 19 Principles of Analytical Methods. Verkkoaineisto. Neupsy Key.
<<https://neupsykey.com/principles-of-analytical-methods/>>. Luettu 6.10.2018.
- 20 Mortimer, Charles E. 1997. Kemia. Helsinki: Opetushallitus.
- 21 Luotola, Juhani & Malassu, Martti. 1996. Method of coupling ligands to a solid phase in acidic solution and anionic surfactant. Verkkoaineisto.
<<https://patents.google.com/patent/EP0946871B1/en>>. Luettu 2.8.2018.
- 22 Stryer, Lubert. 1999. Biochemistry. New York: W.H. Freeman and Company.
- 23 Molekyyilirakenteinen yhdiste – kovalenttinen sidos. Verkkoaineisto. Otavan Opisto.
<http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/ke/ke2/03._molekyyilirakenteinen_yhdiste_kovalenttinen_sidos?C:D=1921163>. Luettu 11.8.2018.
- 24 Zetasizer Nano series. Verkkoaineisto. Hosmed.
<<https://hosmed.fi/wp-content/uploads/2016/10/Zetasizer-Nano-series-incl-ZSP.pdf>>. Luettu 18.8.2018.

- 25 The Brownian Movement. Verkkoaineisto. The Feynman lectures on physics.
<http://www.feynmanlectures.caltech.edu/I_41.html>. Luettu 18.8.2018.
- 26 Dynamic Light Scattering (DLS). Verkkoaineisto. Malvern Panalytical.
<https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering?gclid=EAlaIQobChMItpWvI7zI1wl-Vwo4YCh3iCwx1EAAYAyAAEgJXsfD_BwE>. Luettu 18.8.2018.
- 27 Reynolds number. Verkkoaineisto. NASA.
<<https://www.grc.nasa.gov/WWW/BGH/reynolds.html>>. Luettu 18.8.2018.
- 28 An In Depth Look At the Freeze Drying Process. Verkkoaineisto. Ready Store.
<<https://www.thereadystore.com/food-storage/2813/an-in-depth-look-at-freeze-drying-the-origins-and-process>>. Luettu 21.8.18.
- 29 Schaenzler, Nicole & Faist Eugen. 2011. Piilevät tulehdukset. Helsinki: Tammi.
- 30 Mustajoki, Pertti & Kaukua, Jarmo. 2008. Senkka ja sata muuta tutkimusta. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- 31 Tulehdusmerkkiaine (P-CRP). Verkkoaineisto. Nordlab.
<<https://www.nordlab.fi/fi/tulehdusmerkkiaine-p-crp>>. Luettu 30.9.2018.
- 32 Mäkelä, Olli & Tiilikainen, Anja S. & Vaara, Matti & Vaheri, Antti & Valtonen, Ville. 1993. Lääketieteellinen mikrobiologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- 33 Okemefuna, Azubuike I. et al. C-reactive Protein Exists in an NaCl Concentration-dependent Pentamer-Decamer Equilibrium in Physiological Buffer. Verkkoaineisto. JBC.
<<http://www.jbc.org/content/285/2/1041.full>>. Luettu 10.10.2018.
- 34 Human C-reactive protein complexed with phosphocholine. Verkkoaineisto. Protein Data Bank in Europe.
<<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1b09>>. Luettu 10.10.2018.
- 35 QuikRead go -laite. Verkkoaineisto. Orion Diagnostica Oy.
<<http://www.oriondiagnostica.fi/tuotteet/QuikRead-go/QuikRead-go--laite/#popupcontent1>>. Luettu 31.8.2018.
- 36 QuikRead go. Verkkoaineisto. Orion Diagnostica Oy.
<<http://www.oriondiagnostica.fi/tuotteet/QuikRead-go>>. Luettu 31.8.2018.
- 37 QuikRead go -laite. Verkkoaineisto. Orion Diagnostica Oy.
<http://www.oriondiagnostica.fi/globalassets/documents-and-materials/quikread-go/quikread-go-instrument/135930_qr_go_instrument_ifu_fi_se_no_dk.pdf>. Luettu 31.8.2018.

- 38 Turbidimetry & nefelometry. Verkkoaineisto. Semantic Scholar.
<<https://pdfs.semanticscholar.org/presentation/0ee1/672d54a009751acad6b973336ab6f2e701f7.pdf>>. Luettu 11.10.2018.

