

Opinnäytetyö (YAMK)

Kemiantekniikka ja bioteknologia

2021

Annina Siltanen

NOPEA PCT MÄÄRITYS IMMUNOANALYSAATTORISSA INKUBAATIOAIKAA LYHENTÄMÄLLÄ

Annina Siltanen

NOPEA PCT MÄÄRITYS IMMUNOANALYSAATTORISSA INKUBAATIOAIKAA LYHENTÄMÄLLÄ

Tämän Radiometer Turku Oy:n tuotekehitykselle tehdyn tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää, pystytäänkö uusien biotinylointireagenssien sekä uuden kehitteillä olevan immunoanalysaattorin yhdistelmällä parantamaan Prokalsitoniini (PCT) immunomäärityksen läpimenoaikaa, ilman että se vaikuttaa määrityksen keskeisiin toimivuusparametreihin. PCT määrityksen läpimenoaika AQT90 FLEX immunoanalysaattorissa on tällä hetkellä 20 min 18 s ja sen määrityksen herkkyyksivaatimus on 0.033 ng/L.

Opinnäytetyössä testattiin viisi uutta biotinylointireagenssia PCT vasta-aineeseen konjugoituna. Näiden biotinyloitujen vasta-aineiden avulla valmistettiin immunoanalysaattoriin sopivia kuivareagenssikaivoja käyttäen referenssi leimavasta-aineen lisäksi kahta uudella fluoresoivalla Europium-kelaatilla leimattua vasta-ainetta. Kuivareagenssikaivot testattiin uudella kehitteillä olevalla immunoanalysaattorilla ja tuloksia verrattiin AQT90 FLEX referenssi PCT määritykseen. Tulosten vertailussa käytettiin määrityksen keskeisiä toimintaparametreja, kuten määrityksen herkkyyttä sekä sen variaatiokerrointa.

Opinnäytetyön PCT määrityksestä saadut tulokset haluttiin varmistaa myös Troponiini I (TnI) määrityksellä. Yksi parhaimmalta vaikuttaneen biotinylointireagenssin avulla konjugoitujen TnI vasta-aineiden avulla valmistettiin kuivareagenssikaivoja, joiden toimivuus testattiin uudella kehitteillä olevalla immunoanalysaattorilla.

Tulosten perusteella kaikki uusilla biotinylointireagensseilla valmistetut kuivareagenssikaivot referenssi leimavasta-aineella antoivat paremman herkkyyden kuin PCT referenssimääritys. Kahdella uudella leimavasta-aineella ei ollut vaikutusta PCT määrityksen herkkyyteen. Kaksi parhaimmalta vaikuttaneista biotinylointireagensseista, sekä PCT referenssimääritys testattiin uuden immunoanalysaattorin lyhyimmällä mahdollisella inkubaatioajalla. Tulosten mukaan näiden kaikkien kolmen reagenssikaivon herkkyyks riittää PCT herkkyyksivaatimuksen 0.033 ng/L täyttämiseen, ollen referenssimäärityksellä 0.019 ng/L ja kahdella testatulla määrityksellä 0.011 ng/L ja 0.010 ng/L. Tämä tarkoittaa, että uusilla biotinylointireagensseilla PCT määritykseen saadaan kaksi kertaa parempi herkkyyks. Tällöin PCT määrityksen läpimenoajaksi saadaan 7 min 50 s. TnI määrityksessä uudella biotinylointireagenssilla nähtiin myös etua sen antaman noin 12 % korkeamman signaalitason vuoksi referenssimääritykseen nähden, mutta määritys vaatii vielä optimointia variaation vähentämiseksi.

ASIASANAT:

Immunomääritys, vasta-aine, biotiini, konjugointi, geelikromatografia.

Annina Siltanen

RAPID PCT ASSAY IN IMMUNOANALYZER BY REDUCING INCUBATION TIME

The purpose of the present study commissioned by Radiometer Turku's R&D department was to determine whether the combination of new biotinylation reagents and a new immunoanalyzer could improve the turnaround time (TAT) of the procalcitonin (PCT) immunoassay without affecting the key performance parameters. The TAT for the PCT assay on the AQT90 FLEX Immunoassay analyzer is currently 20 min 18 s and the assay has a sensitivity requirement of 0.033 ng/L.

Five new biotinylation reagents conjugated to PCT antibody were tested in the study. These biotinylated antibodies were used to prepare dry reagent wells suitable for the immunoassay analyzer. In addition to the reference labeled antibody, two new fluorescent Europium chelates labeled with the antibody were used. The reagent wells were tested with a new immunoanalyzer and the results were compared with the reference PCT assay in AQT90 FLEX. The key performance parameters of the assay, such as the sensitivity of the assay and its coefficient of variation, were used to compare the results.

The results of the PCT assay in the study were also confirmed with the Troponin I (TnI) assay. Dry reagent wells were prepared using TnI antibody conjugated to one of the best-performing biotinylation reagents and tested for functionality with a new immunoanalyzer.

Based on the PCT results, all dry reagent wells prepared using new biotinylation reagents with the reference Eu-labeled antibody had better sensitivity results than the PCT reference assay. The two new Eu-chelate labeled antibodies had no effect on the sensitivity of the PCT assay. Two of the best-performing biotinylation reagents, as well as the PCT reference assay, were tested with the shortest possible incubation time for the new immunoanalyzer. The results show that the sensitivity of all three reagent well alternatives is sufficient to meet the PCT sensitivity requirement of 0.033 ng/L, with 0.019 ng/L for the reference assay and 0.011 ng/L and 0.010 ng/L for the two assays tested. The results show that the new biotinylation reagents provide twice the sensitivity for the PCT assay. Based on results, the TAT of the PCT assay is 7 min 50 s. The TnI assay with the new biotinylation reagent also had an advantage due to its approximately 12 per cent higher signal level over the reference assay, but the assay still requires optimization in order to reduce variation.

KEYWORDS:

Immunoassay, antibody, biotin, conjugation, chromatography.

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	7
2 IMMUNOMÄÄRITYKSEN PERUSTEITA	8
2.1 Vasta-aine	8
2.2 Analyytin eli antigeenin sitoutuminen vasta-aineeseen	11
2.3 Immunomääritys	12
2.4 Aikaerotteinen fluoresenssi	13
3 AQT90 FLEX IMMUNOANALYSAATTORI	15
3.1 Immunomääritys kuivatuilla reagenssikaivoilla	15
3.2 AQT90 FLEX immunoanalysaattorin toimintaperiaate	16
3.3 Kehitteillä oleva uusi AURA immunoanalysaattori	19
3.4 Prokalsitoniini ja Troponiini biomarkkerina	20
4 KONJUGOINTIKEMIA	21
5 MENETELMÄT JA MATERIAALIT	26
5.1 Vasta-aineen biotinylointiprosessi	26
5.1.1 Konjugointireaktio	26
5.1.2 Konjugoidun vasta-aineen puhdistus	27
5.1.3 Biotinyloidun reagenssin testaus	29
5.2 Leimareagenssien testaus	32
5.3 Kuivareagenssikaivojen valmistus	33
5.3.1 Prokalsitoniini reagenssikaivojen valmistusprosessi	33
5.3.2 Troponiini I reagenssikaivojen valmistusprosessi	34
5.3.3 Reagenssikaivojen pakkaus kasetteihin	35
5.4 5.4 Reagenssikaivojen testaus immunoanalysaattorilla	36
5.4.1 Prokalsitoniinikaivojen testaus	36
5.4.2 TnI reagenssikaivojen testaus	38
6 TULOKSET	39
6.1 Biotinyloitujen reagenssien testaustulokset	39
6.2 Leimattujen vasta-aineiden testaustulokset	40
6.3 Kuivareagenssikaivojen testaustulokset	42
6.3.1 PCT reagenssikaivojen tulokset	42

6.3.2 Tnl kuivareagenssikaivojen tulokset	47
---	----

7 PÄÄTELMÄT	50
--------------------	-----------

LÄHTEET	54
----------------	-----------

KAAVAT

Kaava 1. Antigeenin ja vasta-aineen kineettinen perusyhtälö (Wild, 2013: 29).	11
Kaava 2. Isotiosyanaatin sitoutuminen vasta-aineen aminoryhmään (Radiometer Turku Oy perehdytysmateriaali).	22
Kaava 3. Vasta-aineen pitoisuuden laskukaava (Stephenson, 2003: 244).	29
Kaava 4. Reaktion saanto-% laskukaava.	29
Kaava 5. Keskihajonnan (SD) laskentakaava.	31
Kaava 6. Variaatiokertoimen (CV) laskentakaava.	32
Kaava 7. Prosentuaalisen variaatiokertoimen (CV %) laskentakaava.	32
Kaava 8. Näytteen spesifisen signaalin laskentakaava.	32
Kaava 9. Määrityksen herkkyyden laskentakaava.	32
Kaava 10. RMS (Root Mean Square) CV:n laskentakaava (Wild, 2013:13).	37

KUVAT

Kuva 1. IgG vasta-aineen rakenne (Hermanson, 2013: 868, muokattu).	8
Kuva 2. Monoklonaalisten vasta-aineiden (MAb) valmistusprosessi (Wild, 2013: 250).	10
Kuva 3. Immunometrisen määrityksen komponentteja (Wild, 2013: 7, muokattu).	12
Kuva 4. Erään orgaanisen fluoroforin sekä europium-kelaatin eksitaatio- ja emissiovalojen erot (Radiometer Turku Oy perehdytysmateriaali, muokattu).	14
Kuva 5. Kuivatun reagenssikaivon kokoonpano (Radiometer Turku Oy perehdytysmateriaali).	15
Kuva 6. AQT90 FLEX reagenssikasetti (AQT90 FLEX esite, 2018).	17
Kuva 7. AQT90 FLEX immunoanalysaattori (AQT90 FLEX esite, 2018).	17
Kuva 8. AQT90 FLEX immunomääritys (Radiometer Turku Oy perehdytysmateriaali).	18
Kuva 9. BITC biotinylointireagenssin rakennekaava (Radiometer Turku Oy perehdytysmateriaali).	21
Kuva 10. TCEP reagenssin toimintaperiaate (Thermo Scientific, TCEP-HCl Instructions manual).	22
Kuva 11. diSH-biotinylointireagenssin pelkistetty rakennekaava.	23
Kuva 12. Divalentin diSH-biotinylointireagenssin toimintaperiaate.	24
Kuva 13. BMCC-Biotiinin rakennekaava (Thermo Scientific, EZ-Link BMCC-Biotin Instructions manual).	24
Kuva 14. BMCC biotinylointireagenssin toimintaperiaate.	25
Kuva 15. diSH-BIO-1 kromatografia-ajon kromatogrammi.	28

KUVIOT

Kuvio 1. PCT potilasnäytesignaalien korrelaatio referenssiin Kaivo2 reagenssikaivoilla.	45
Kuvio 2. PCT potilasnäytesignaalien korrelaatio referenssiin Kaivo6 reagenssikaivoilla.	45
Kuvio 3. PCT LOW Ctrl -näytteen laimennosten antamat signaalitasot.	47

TAULUKOT

Taulukko 1. AQT90 FLEX immunoanalysaattorin analyytit ja niiden läpimenoaika.	16
Taulukko 2. Opinnäytetyössä tehtävien biotinylointireaktioiden kokoonpanot.	27
Taulukko 3. PCT-kuivareagenssikaivojen kokoonpanot.	34
Taulukko 4. Tnl-kuivareagenssikaivojen kokoonpanot.	35
Taulukko 5. Kaivo1-ref, Kaivo2 ja Kaivo6 reagenssikaseteilla määritetyt potilasnäytteet.	37
Taulukko 6. Biotinyloitujen vasta-aineiden testaustulokset.	39
Taulukko 7. PCT immunomääritystuloksista lasketut toimintaparametrit.	40
Taulukko 8. Tnl immunomääritystuloksista lasketut parametrit.	40
Taulukko 9. Leima-vasta-aineiden immunomäärityksistä lasketut parametrit (PCT välikerros).	41
Taulukko 10. Leimavasta-aineiden immunomäärityksistä lasketut parametrit (tuotekehityksen Tnl välikerros).	41
Taulukko 11. PCT määritysten toimivuusparametrit AURA inkubaatioaikasloteilla 6, 3 ja 1 sekä AQT90 FLEX analysaattorilla.	43
Taulukko 12. Potilasnäytteiden herkkyydet reagenssivaihtoehdoilla AQT PCT, Kaivo2 ja Kaivo6.	44
Taulukko 13. Reagenssikaivojen Kaivo1-ref, Kaivo2 ja Kaivo6 RMS CV arvot.	46
Taulukko 14. Reagenssikaivojen Kaivo7-Kaivo12 toimivuusparametrit.	46
Taulukko 15. Reagenssikaivojen Kaivo13 sekä AQT PCT (ref) toimivuusparametrit.	46
Taulukko 16. Reagenssikaivojen Kaivo14-ref ja Kaivo15 toimivuusparametrit inkubaatioaikasloteilla 4, 3 ja 1.	48
Taulukko 17. Reagenssikaivojen Kaivo14-ref ja Kaivo15 RMS CV arvot.	49

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö toteutettiin Radiometer Turku Oy:n tuotekehitykselle. Tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää, pystytäänkö uusien biotinylointireagenssien sekä uuden kehitteillä olevan immunoanalysaattorin yhdistelmällä parantamaan immunomäärityksen läpimenoaikaa ilman että se vaikuttaa määrittämisajan keskeisiin toimintaparametreihin. Testattavista viidestä biotinylointireagensseista neljä oli syntetisoitu Radiometer Turku Oy:n organisaatiossa laboratoriossa ja yksi oli kaupallinen.

Radiometer Turku Oy valmistaa immunomääritysreagensseja AQT90 FLEX immunoanalysaattoriin. AQT90 FLEX analysaattoreita käytetään sairaaloissa ja keskuslaboratorioissa määrittämään potilaan verestä erilaisia sairauksiin liittyviä analyyttejä. Opinnäytetyön taustalla on asiakaskyselyn pohjalta määritelty tavoite parantaa Prokalsitoninimäärityksen (PCT) läpimenoaikaa. Määrityksen läpimenoajalla tarkoitetaan aikaa, joka kuluu näytteen syöttämisen ja tuloksen saamisen välillä. Tällä hetkellä PCT määrityksen läpimenoaika AQT90 FLEX analysaattorissa on 20 minuuttia ja 18 sekuntia.

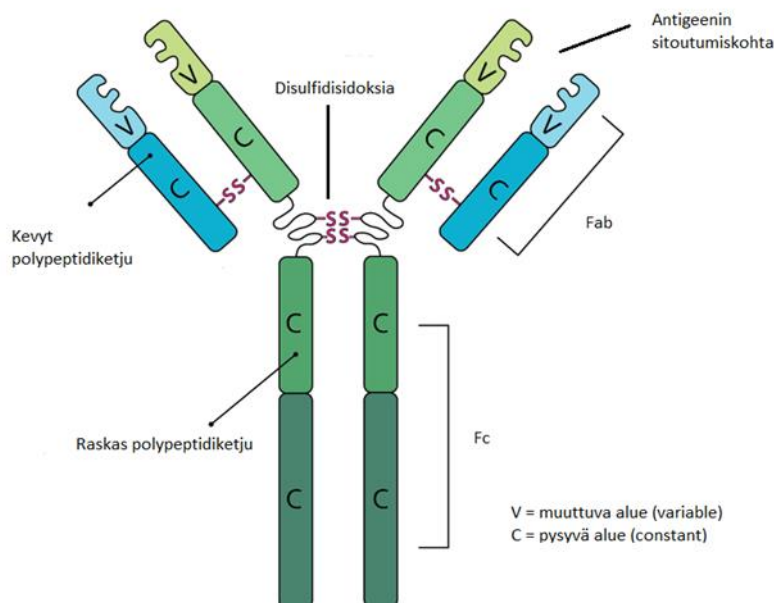
Immunomäärityksen keskeisiä toimintaparametreja ovat muun muassa määrityksen herkkyys sekä variaatio. PCT määrityksen herkkyys AQT90 FLEX analysaattorissa tulee olla vähintään 0.033 ng/L ja variaatiokertoimen mahdollisimman pieni, mutta enintään 10 % PCT pitoisuudessa 0.05 ng/L. Opinnäytetyön tuloksia verrattiin näihin raja-arvoihin. Määrityksen läpimenoaikaa voidaan laskea vähentämällä inkubaatioaikaa, mutta se usein vaikuttaa näihin toimintaparametreihin heikentävästi. Tutkittavien uusien biotinylointireagenssien odotetaan nopeuttavan määrityksen kinetiikkaa sekä laskevan määrityksen taustasignaalia, jolloin inkubaatioajan vähentäminen uskotaan olevan mahdollista vaikuttamatta määrityksen toimintaparametreihin. Myös uuteen immunoanalysaattoriin on tehty parannuksia AQT90 FLEX immunoanalysaattoriin verrattuna.

Tutkimuksessa testattiin kaikkia viittä uutta biotinylointireagenssia PCT analyytillä. Käytettävä biotinylointimenetelmä ja sen olosuhteet sekä käytettävä immunomääritys olivat ennalta määritellyjä yrityksen toimesta, joten ne pysyivät muuttumattomina tämän työn aikana. Biotinylointireagenssien toimivuutta testattiin myös kahden Radiometer Turku Oy:n organisaatiossa laboratoriossa syntetisoidun kirkkaamman leimareagenssin kanssa. Yksi tutkimusten mukaan parhaimmalta vaikuttaneista biotinylointireagensseista testattiin lopuksi myös Troponiini I analyytillä.

2 IMMUNOMÄÄRITYKSEN PERUSTEITA

2.1 Vasta-aine

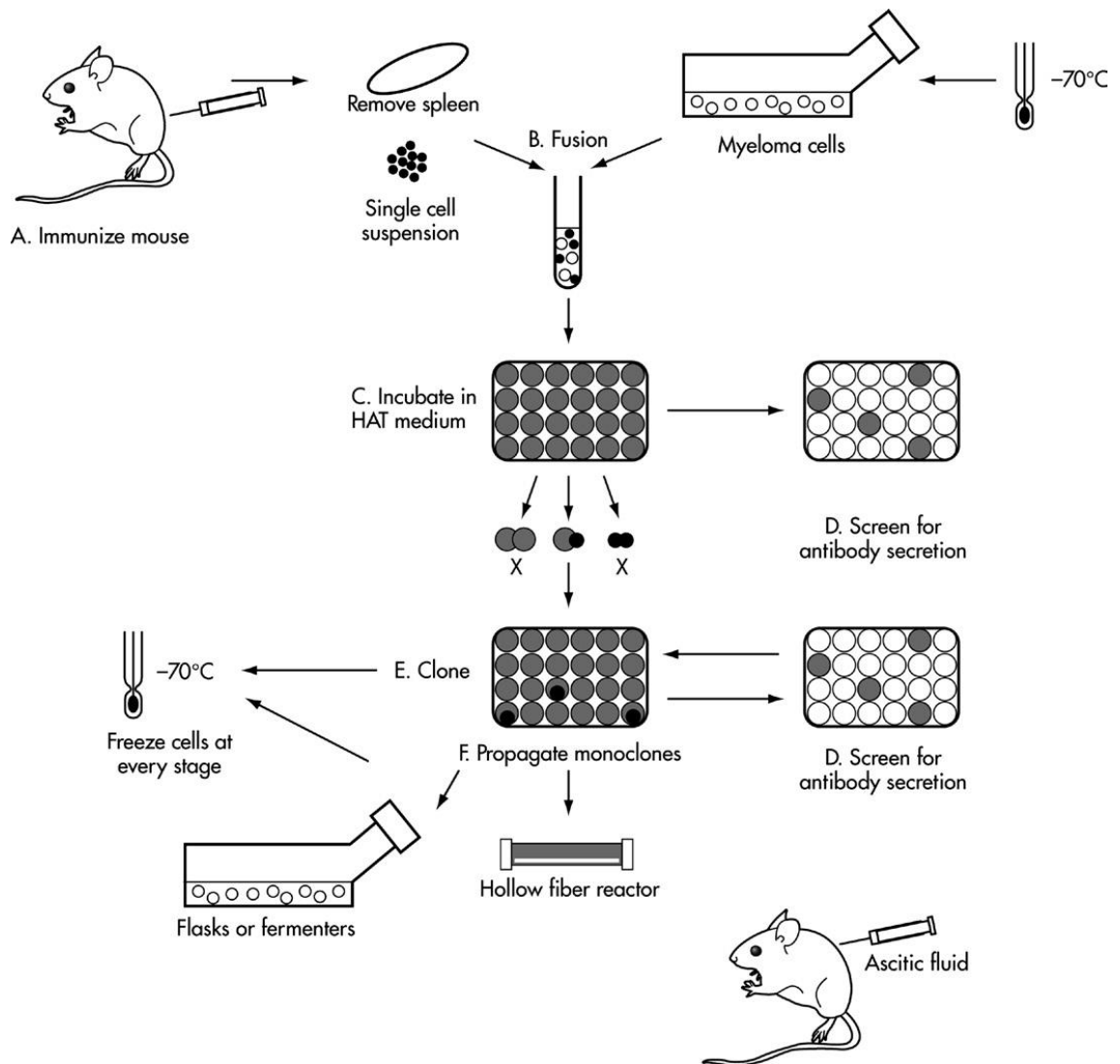
Vasta-aine on glykoproteiini, joka koostuu kahdesta kevyestä ja kahdesta raskaasta polypeptidiketjusta. Raskas ketju jakautuu kahteen osaan, joiden välissä on taipunut sara-alue. Ketjut ovat kiinnittyneet toisiinsa disulfidi- eli rikkisidoksella. Vasta-aine jakautuu kolmeen fragmenttiin, kahteen antigeenin sitoutumisalueeseen (Fragment anti-gen binding region, Fab) ja yhteen kiteytettävissä olevaan alueeseen (Fragment crystallizable region, Fc). Jokaisessa vasta-aineessa on kaksi antigeenin sitoutumiskohtaa. Sitoutumiskohta voi sitoutua koko antigeeniin tai tiettyyn osaan antigeenistä, kuten sen pintamolekyyliin. Vasta-aineet kuuluvat immunoglobuliineihin, joilla on useita erilaisia alatyyppejä. Yleisin immunomäärityksissä käytettävä vasta-ainetyyppi on Immunoglobuliini G eli IgG. IgG:n käyttö immunomäärityksissä perustuu sen korkeaan tuottoasteeseen, korkeaan affiniteettikykyyn, stabiilisuuteen puhdistusprosessien aikana sekä sen useaan funktionaaliseen sitoutumiskohtaan. (Wild 2013: 7, 245; Sztefko 2011: 3-4). Kuva 1 on esitetty tyypillisen IgG vasta-aineen rakenne. Opinnäytetyössä tutkittavien biotinyloitireagenssien tarkoituksena on sitoutua raskaiden ketjujen välisiin disulfidi- eli rikkisidoksiin.



Kuva 1. IgG vasta-aineen rakenne (Hermanson, 2013: 868, muokattu).

Kaupallisia vasta-aineita voidaan tuottaa synteettisesti tai immunisoimalla laboratorio-eläimiä immunogeenillä. Immunogeeni on molekyyli, joka saa aikaan immuunivasteen elimistöön injektoiduna. Immuunivaste taas aktivoi eläimen immuunijärjestelmän B-lymfosyytit tuottamaan haluttua vasta-ainetta. Yleisimmin immunomäärityksessä käytetään polyklonaalisia, monoklonaalisia tai rekombinantteja vasta-aineita. Polyklonaalisilla vasta-aineilla tarkoitetaan antiseerumia, joka sisältää heterogeenisen seoksen erilaisia vasta-aineita. Antiseerumi erotetaan immunisoidun eläimen verestä ja sen koostumus vaihtelee jokaisen eläimen ja jokaisen veren keräyskerran välillä. (Wild, 2013: 248-249). Usein polyklonaalista antiseerumia voidaan käyttää sellaisenaan, mutta jotkut analyttiset tekniikat vaativat ainakin jonkinlaisen esipuhdistuksen, jotta vältetään ei-haluttujen proteiinien sitoutumiselta (Sztefko 2011:4).

Monoklonaaliset vasta-aineet (MAb) sisältävät ainoastaan yhtä haluttua vasta-ainetta. Tämä voidaan mahdollistaa käyttämällä hybridisoluja, jotka ovat yhden B-lymfosyyttisolulinjan ja myeloomasolun fuusioita. B-lymfosyytit kestävät huonosti elimistön ulkopuolella, joten yhdistämällä ne kestäviin myeloomasoluihin, saadaan soluviljelyolosuhteisiin sopiva hybridisolulinja. Nämä hybridisolut tuottavat vain yhdenlaista, eli monoklonaalista vasta-ainetta ja niiden tuotantomäärät ovat helposti nostettavissa kaupallista valmistusta vastaaviin määriin. Kuvassa 2 on esitetty monoklonaalisten vasta-aineiden tuotantoprosessi. Kuvan kohdassa A. immunisoidaan laboratorioeläin, jonka perna otetaan talteen syntyneen immuunivasteen jälkeen. Pernasta eristetään B-lymfosyyttisolut, jotka fuusoidaan myeloomasolujen kanssa ja kasvatetaan eläinsoluviljelyyn sopivassa kasvatusliuoksessa (kohta B ja C). Seulonnalla (D) kasvatetuista soluista erotetaan haluttua vasta-ainetta tuottavat hybridisolut, jotka kloonataan (E). Kloonattujen hybridisolujen avulla voidaan tuottaa haluttua vasta-ainetta erilaisilla soluviljelytekniikoilla (F). (Wild, 2013: 250). Opinnäytetyössä käytettiin kaupallisia, monoklonaalisia, immunisoidun hiiren pernasolujen ja myeloomasolujen hybridien avulla valmistettuja Prokalsitoniini (PCT) ja Troponiini I (TnI) vasta-aineita (Hytest Datasheet 4C10; Hytest Datasheet 4T21).



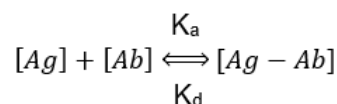
Kuva 2. Monoklonaalisten vasta-aineiden (MAb) valmistusprosessi (Wild, 2013: 250).

Rekombinantit vasta-aineet ovat synteettisesti in vitro valmistettuja vasta-aineita, joiden tuottamiseen ei tarvita eläimiä. Niiden kysyntä diagnostiikkamarkkinoilla kasvaa koko ajan, koska niiden avulla pystytään räätälöimään tarvittava spesifisyys sekä affiniteetti kohdeantigeenia kohtaan. Rekombinantti-DNA-tekniikassa vasta-aineita voidaan valmistaa esimerkiksi hiivasoluissa, gram-negatiivisissa ja -positiivisissa bakteerisoluissa, hyönteissoluissa tai siirtogeenisissä kasvi- tai eläinsoluissa. Rekombinantit vasta-aineet ovat yleensä vain vasta-aineen osia. Pienin biologisen aktiivisuuden omaava vasta-aineen osa on sen V (variable) -alue, eli antigeenin sitoutumiskohta (Kuva 1). Se tarvitsee kuitenkin koossa pysyäksään esimerkiksi aminohappopeptidilinkkerin tai siihen voidaan liittää C (constant) -alue, jotta vasta-aineen Fab -osio säilyy. (Frenzel & Hust & Schirrmann, 2013).

2.2 Analyytin eli antigeenin sitoutuminen vasta-aineeseen

Immunomäärityksessä analyyttiä, johon vasta-aine sitoutuu, kutsutaan antigeeniksi (Wild, 2013: 8). Antigeeni voi olla mikä tahansa aine, jonka antigeenisuus perustuu sen molekyylirakenteessa olevaan alueeseen, eli epitooppiin. Vasta-aineessa oleva vastaava antigeenin sitoutumiskohta tunnistaa antigeenin epitoopin. Antigeeni toimii yleensä myös immunogeeninä, joka aikaansaa immuunivasteen jälkeisen vasta-ainetuotannon laboratorioeläimessä. Antigeenin ja vasta-aineen sitoutumisreaktiossa on mukana erilaisia voimia, kuten elektrostaattisia voimia, Wan der Waalsin dipoli-dipoli vuorovaikutuksia sekä hydrofobisia voimia. Lisäksi reaktiossa syntyy vetysidoksia, kun elektronegatiiviset atomit, kuten typpi ja happi jakavat vetyioneja. Mitä paremmin antigeenin epitooppi sopii vasta-aineen sitoutumiskohtaan, sitä voimakkaampi ei-kovalenttinen sidos niiden välille syntyy. Vasta-aineen sitoutumiskohdan sitoutumisvoimakkuutta sitä vastaavaan antigeenin sitoutumiskohtaan kutsutaan affiniteetiksi. Aviditeetillä puolestaan tarkoitetaan kaikkien vasta-aine-antigeenisidosten yhteisesti aiheuttamaa sidosvoimaa. (Sztefko, 2011: 7). Spesifinen sitoutuminen on yksi vasta-aineen tärkeimmistä ominaisuuksista (Hemmilä, 1991: 13).

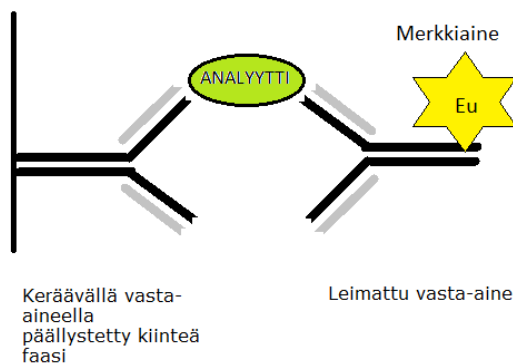
Vasta-aineen ja antigeenin sitoutumisreaktio voi saavuttaa tasapainon jo sekunneissa, tai se voi viedä useita tunteja. Reaktioaikaan vaikuttaa muun muassa immunomäärityksen olosuhteet, kuten pH tai lämpötila. Nykyään kaupallisilta immunomäärityksiltä vaaditaan nopeaa reaktioaikaa, jolloin reaktio ei välttämättä edes ehdi saavuttaa tasapainoa. Antigeenin (Ag) ja vasta-aineen (Ab) reaktiota voidaan kuvata joukkotoimintalakiin perustuvana kineettisenä perusyhtälönä (Kaava 1), jossa $[Ag - Ab]$ on antigeeni-vasta-ainekompleksi, K_a assosiaationopeusvakio ja K_d dissosiaationopeusvakio. (Wild, 2013: 29).



Kaava 1. Antigeenin ja vasta-aineen kineettinen perusyhtälö (Wild, 2013: 29).

2.3 Immunomääritys

Immunomääritys on biokemiallinen testi, jossa näytteessä olevan analyytin eli antigeenin määrää mitataan siitä saatavan signaalin avulla. Analyytti ei itsessään tuota signaalia, vaan määrittäminen vaatii toimiakseen jonkin signaalia tuottavan tekniikan, kuten kolorimetrian, fluoresenssin tai kemiluminesenssin. Immunometrisessä määrittämisessä näytteestä mitattava analyytti sitoutuu yleensä muovipintaan kiinnitettyyn vasta-aineeseen. Määrittämyksen toinen, signaalia tuottava, merkkiainetta sisältävä vasta-aine sitoutuu analyytin toiseen sitoutumiskohtaan. Muovipintaan sitoutuneesta vasta-aineesta voidaan käyttää termiä keräävä vasta-aine (capture antibody) ja signaalia tuottavasta vasta-aineesta termiä leimattu vasta-aine (labeled antibody). (Wild, 2013: 7-8). Immunomääritys itsessään perustuu vasta-aineen ja antigeenin spesifiseen sitoutumiseen. Vasta-aineessa on sille tyypillinen sitoutumiskohta, johon ainoastaan siihen sopivan epitopin omaava antigeeni pystyy sitoutumaan. Määrittämisessä käytettävä vasta-aine sitoo siis ainoastaan haluttua antigeeniä. Tämä tekee immunomäärityksestä spesifisen, vaikka näytteessä olisi läsnä useita eri antigeenejä. (Sztefko, 2011: 7). Kuvassa 3 on esitetty immunometrisen määrittämyksen eri komponentit. Määrittäystä voidaan kutsua myös Sandwich -määrittämykseksi.



Kuva 3. Immunometrisen määrittämyksen komponentteja (Wild, 2013: 7, muokattu).

Heterogeenisessä immunomäärittämisessä sitoutumisreaktion jälkeen sitoutumattomat leimatut vasta-aineet pestään pois puskuriliuoksella. Ilman sitoutumattomien leimavasta-aineiden pesua, määrittämisestä saataisiin aina sama signaali riippumatta analyytin määrästä näytteessä. Pesun jälkeen muovipintaan muodostuneista keräävä vasta-aine – analyytti – leimattu vasta-aine komplekseista voidaan mitata signaali. On myös niin sanottuja homogeenisiä immunomäärittämyksiä, joissa signaali muodostuu vain sitoutuneissa leimavasta-aineissa ja tällöin sitoutumattomien komponenttien pesua ei tarvita. Immu-

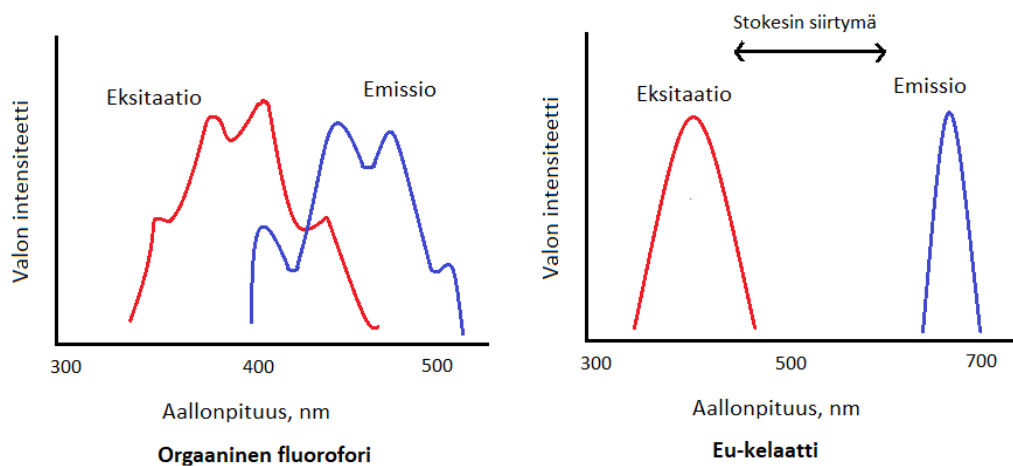
nometrisessä määityksessä näytteestä saatu signaali on suoraan verrannollinen näytteen pitoisuuteen nähden. Näytteen konsentraatio saadaan vertaamalla näytteestä saatavaa signaalia standardikäyrään. Standardikäyrä muodostuu tiedetyn analyytin pitoisuuden omaavasta liuoksesta tehtyjen laimennosten, eli standardien antamista signaaleista. (Wild, 2013: 7-8).

2.4 Aikaerotteinen fluoresenssi

Eri immunomääityksissä on käytössä useita erilaisia merkkiaineita. Ensimmäiset käytetyt merkkiaineet olivat radioaktiivisia, mutta radioaktiivisen materiaalin käytön rajoitukset ovat edesauttaneet vähemmän ongelmallisten merkkiaineiden käyttöönottoa. (Hemmilä, 1991: 39). Nykyään uusien merkkiaineiden kehityksellä pyritään saamaan yhä herkempiä määityksiä nostamalla määityksen signaalitasoa ja laskemalla sen taustasignaalia. Lisäksi erityisesti immunometrisissä määityksissä on tärkeää minimoida leimatun immunoreagenssin epäspesifinen sitoutuminen. Aikaerotteiseen fluoresenssiin perustuva määitys käyttää merkkiaineena fluoresoivaa molekyyliä. Esimerkki fluoresoivasta molekyylistä on europium-kelaatti, joka voidaan konjugoida vasta-aineeseen. (Wild, 2013: 275-276). Opinnäytetyössä käytettävän AQT90 FLEX immunoanalysaattorin sekä kehitteillä olevan uuden immunoanalysaattorin toiminta perustuu aikaerotteiseen fluoresenssiin.

Mitattava signaali saadaan aikaan tietyn aallonpituuden omaavalla eksitaatiovalolla. Tavanomaisen fluoresenssimääityksen haittapuolena voidaan pitää taustasignaalin aiheuttamaa interferenssiä. Kun määityksen kaikkia komponentteja viritetään valolla, myös muut kuin halutut komponentit emittoivat valoa takaisin. Aikaerotteisissa fluoresenssissa eksitaation eli virityksen ja kelaatin lähettämän signaalin mittauksen välillä on aikaväli. Määityksessä käytettävä fluoresoiva lantanidi-ioni, kuten Europium, absorboi valohiukkasen ja virittyy sen antamasta energiasta. Absorboitu valohiukkanen on lyhyempää aallonpituutta kuin valohiukkanen, jonka lantanidi emittoi signaalina. Tätä absorboidun valon aallonpituuden ja emittoidun valon aallonpituuden eroa kutsutaan Stokesin siirtymäksi. (Wild, 2013: 275-276). Stokesin siirtymä mahdollistaa herkän määityksen, koska viritysväli sammuu ennen kuin kelaatti emittoi sitä. Näin saadaan mitattua koko emissiovalopiikki, ilman että viritysväli näkyy mittauksessa interferenssinä. Esimerkiksi europiumilla Stokesin siirtymä on yli 200 nm ja sen emittoima valopiikki on asettunut erittäin suppealle aallonpituudelle. Näin taustasignaalin aiheuttama interferenssi voidaan

poistaa kokonaan. Lisäksi määrittelyn herkkyyttä lisää se, että vasta-aineeseen voidaan kiinnittää useita Europium-kelaatteja, jolloin määrittäyksestä saadaan enemmän signaalia. Europiumilla on myös monia muita etuja muihin lantanideihin verrattuna, kuten sen emittoiman signaalin pitkä hajoamisaika (>500 ns) sekä sen korkea kvanttisaanto, eli sen absorboimien ja emittoimien fotonien suhde. (Hemmilä & Laitala, 2005). Kuvassa 4 on esitetty erään orgaanisen fluoroforin eksitaatio- ja emissiovalopiikit sekä Europium-kelaatin pitkä Stokesin siirtymä.

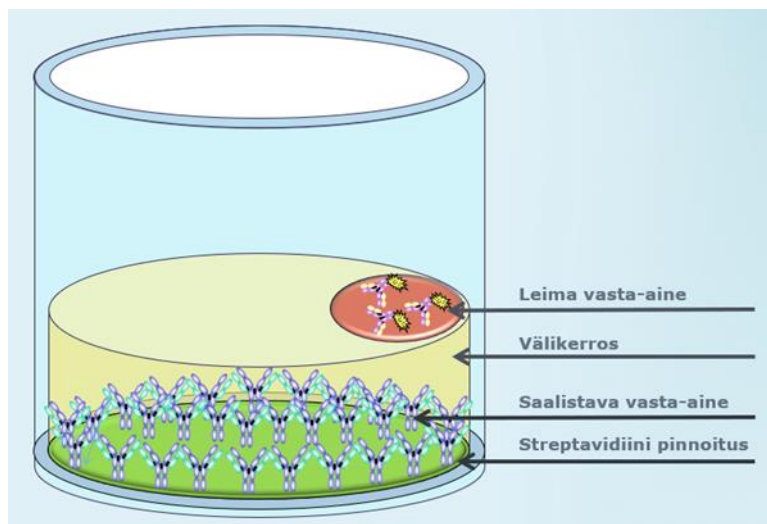


Kuva 4. Erään orgaanisen fluoroforin sekä europium-kelaatin eksitaatio- ja emissiovalojen erot (Radiometer Turku Oy perehdytysmateriaali, muokattu).

3 AQT90 FLEX IMMUNOANALYSAATTORI

3.1 Immunomääritys kuivatuilla reagenssikaivoilla

AQT90 FLEX immunoanalaysaattorin toiminta perustuu yksittäisille mikrotiitterikaivoille kuivattuihin reagensseihin. Immunomääritys voidaan siis tehdä yhdellä, kaikki analyytispesifiset komponentit sisältävällä, stabiileilla kuivatuilla reagenssikaivolla. Ainoastaan näyte ja kaikille analyyteille yhteisesti sopiva pesuliuos lisätään määrittelykseen. Määritys tapahtuukin täysin automatisoidusti immunoanalaysaattorissa käyttäen aikaerotteista fluoresenssia signaalin mittaukseen. Itsestään fluoresoiva ja stabiili Europiumkelaatti on ollut edellytyksenä kuivakemian käyttöönotossa immunomäärityksissä. Kelaatilla leimattu vasta-aine erotetaan reagenssikaivon saalistavasta vasta-aineesta välikerroksella. Välikerros sisältää puskuroivien aineiden lisäksi muun muassa proteiineja ja sokereita, jokaisen eri analyytin vaatimilla pitoisuuksilla. Sen sisältämät ainesosat suojaavat herkkiä vasta-aineita kuivausprosessin aikana, sekä toimivat estoaineina näytteen häiritseviä tekijöitä kohtaan. Välikerros voi myös laskea määrittelyn taustaa, jolloin määrittelyn herkkyyks paranee. (Lövgren & al, 1996). Kuva 5 esittää kuivatun immunoreagenssikaivon sisältämät komponentit.



Kuva 5. Kuivatun reagenssikaivon kokoonpano (Radiometer Turku Oy perehdytysmateriaali).

3.2 AQT90 FLEX immunoanalysaattorin toimintaperiaate

Immunomäärityksiä tehdään jatkuvasti kliinisissä laboratorioissa, joten täysin automatisoidulle määrityslaitteelle on markkinoilla ollut tarvetta (Lövgren & al, 1996). AQT90 FLEX on potilaan vierihoitoon kehitetty immunoanalysaattori, jota käytetään sen herkän määrityksen vuoksi myös sairaaloiden keskuslaboratorioissa. Analysaattorin käyttö on tehty mahdollisimman helpoksi, eikä esimerkiksi näytteen esipipetointia tarvita, vaan potilaan verinäyte voidaan syöttää suoraan laitteeseen keräysputkessaan. Immunoanalysaattorin suljettu ja automaattinen systeemi antaa tuloksen maksimissaan viidestä eri analyytistä yhdessä näyteajossa. Taulukossa 1 on esitetty AQT90 FLEX analysaattorin tunnistamat analyytit sekä niiden läpimenoajat. (AQT90 FLEX esite, 2018).

Taulukko 1. AQT90 FLEX immunoanalysaattorin analyytit ja niiden läpimenoaika.

Tauti tai tila	Analyytti	Läpimenoaika (min:s)
Sydäninfarkti	Troponiin I	18:19
	Troponiini T	12:18
	CKMB	18:09
	Myoglobin	18:09
Sydämen vajaatoiminta	NT-proBNP	10:10
Infektio	CRP	12:11
	PCT	20:18
Laskimotukos	D-Dimer	20:10
Raskaus	βhCG	18:09

AQT90 FLEX immunoanalysaattori käyttää siis määrityksessään yksittäisille mikrotiitterilevyn kaivoille kuivattuja analyyttikohtaisia reagensseja. Kuivatut reagenssikaivot pakataan RTKU:n tuotannossa joko 16 tai kahdeksan reagenssikaivoa sisältäviin reagenssikasetteihin (Kuva 6). Kasetit syötetään analysaattoriin ennen määritystä ja ne säilyvät laitteen sisällä 10 – 31 vuorokautta analyytistä riippuen. (AQT90 FLEX esite, 2018).



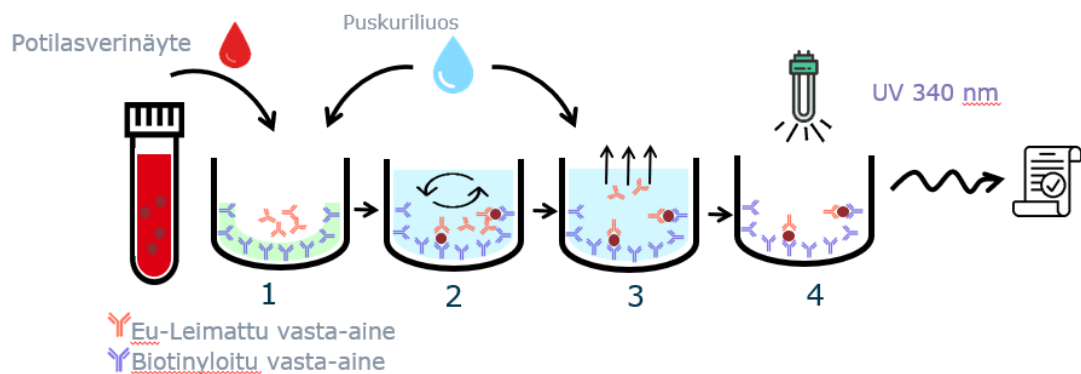
Kuva 6. AQT90 FLEX reagenssikasetti (AQT90 FLEX esite, 2018).

Reagenssikaivojen pesuun tarvittava puskuriliuos saadaan laitteeseen syötettävästä liuospakkauksesta. Liuospakkaukseen kerätään myös kaikki analysaattorin tekemä jäte, kuten pesuihin käytetty puskuriliuos sekä käytetyt reagenssikaivot. Yhden liuospakkauksen kanssa voidaan määrittää noin 200 reagenssikaivoa. Potilaan näyte syötetään sille varattuun putkitelineeseen, josta laitteen neula pipetoi tarvittavan määrän näytettä. Kuva 7 on esitetty AQT90 FLEX immunoanalysaattori.



Kuva 7. AQT90 FLEX immunoanalysaattori (AQT90 FLEX esite, 2018).

AQT90 FLEX määrittäksessä näytteen syöttäjä valitsee analysaattorin näytöltä potilasnäytteestä testattavat analyytit. Analysaattorin carvo-pumpullinen neula läpäisee potilasnäyteputken septumin ja ottaa näytettä analyylille spesifisen määrän. Samalla analysaattori hakee halutun analyytin reagenssikasetista yhden reagenssikaivon, johon neula injektoidaan näytteen. Kaivoon lisätään myös puskuriliuosta laimentamaan näytettä. Tämän jälkeen analysaattori inkuboi määrittäyskaivoa ravistelemalla. Inkuboinnin jälkeen reagenssikaivon sitoutumattomat komponentit pestään pois ja kaivo kuivataan. Tämän jälkeen analysaattorin optinen yksikkö virittää määrittäyskaivon vasta-aineeseen sitoutuneen kelaatin UV valolla ja kaivon antama signaali luetaan. Optisen yksikön viritysaallonpituus on 340 nm ja kelaatti emittoi luettavan signaalin aallonpituudella 616 nm (Rodenko & al. 2016). Kalibroidulla analysaattorilla saatu signaali voidaan muuttaa analyytin pitoisuudeksi näytteessä. (Kuva 8).



Kuva 8. AQT90 FLEX immunomääritys (Radiometer Turku Oy perehdytysmateriaali).

AQT90 FLEX analysaattorin optinen yksikkö käyttää kelaatin viritykseen xenon salamalamppua. Mitä pidempi virityksen ja emission välillä oleva Stokesin siirtymä on, sitä parempi signaali-taustasuhte näytteestä saadaan. Signaali-taustasuhte taas edesauttaa määrittäksen herkkyyttä. Sen vuoksi AQT90 FLEX reagenssikaivojen leimattu vasta-aine sisältää europium-kelaattia, jonka Stokesin siirtymä on tunnetusti pitkä. Salamalampun huonona puolena voidaan nähdä siitä aiheutuvaa valon jälkiloistetta, joka huonontaa signaali-taustasuhdetta rajoittaen samalla määrittäksen herkkyyttä. (Rodenko & al. 2016).

AQT90 FLEX analysaattori ajoittaa automatisoidut toimintansa aikaslotteihin. Yksi aikaslotti tarkoittaa 2 minuutin aikajaksoa. Laitteen toimiessa se tarvitsee yhden aikaslotin näytteen pipetointiin, yhden tai useamman aikaslotin näytteen inkubointiin ja yhden ai-

kaslotin näytteen pesuun, kuivaukseen sekä signaalin mittaukseen. Näin ollen laitteen prosessoiman näytteen minimiläpimenoaika on kolme aikaslottia. Lisäksi laite tarvitsee tietyn ajan muuhun prosessointiin. Tässä opinnäytetyössä referenssinä käytettävä nykyinen tuotannossa oleva PCT määrittäminen käyttää määrittämisskaivon inkubointiin 8 aikaslottia, eli 16 minuuttia. Asiakasvaatimusten perusteella läpimenoaikaa halutaan nopeuttaa uudessa kehitteillä olevassa immunoanalyysointilaitteessa.

3.3 Kehitteillä oleva uusi AURA immunoanalyysointilaitte

Markkinoilla olevilta immunomäärittämlaitteilta vaaditaan nopeutta sekä määrittäksen herkkyyttä. Herkkyydellä tarkoitetaan sitä, että yhä pienempiä määriä kohdeanalyyyttiä pystytään määrittämään potilaan verestä. Tällaisia erittäin herkkiä immunomäärittämlaitteita onkin saatu markkinoille, mutta ne ovat keskittyneet sairaaloiden keskuslaboratoriolaitteiksi. AQT90 FLEX analyysointilaitteen kehitystyötä onkin jatkettu päämääränä saavuttaa markkinoille vieläkin nopeampi ja herkempi vierihoidolaite. (Rodenko & al. 2017).

AQT90 FLEX immunoanalyysointilaitte käyttää siis optisessa yksikössään xenon salamavaloa kelaatin virittämiseen. Tutkimusten mukaan kelaatin viritykseen käytetyllä UV LED valolla voidaan saada määrittäkseseen lisää herkkyyttä. LED valoa on käytetty muun muassa virtausytometriassa sekä fluoresenssimikroskopiassa aallonpituudella 365 nm. Tämä viritysaallonpituus ei kuitenkaan ole optimaalinen aikaerotteisessa fluoresenssissa käytettävälle lantanidikelaateille. Tutkimuksissa on nyt saatu kehitettyä optinen yksikkö, jonka toimintaperiaate on sama kuin xenon salamalampulla, mutta se käyttää viritykseen UV LED valoa aallonpituudella 340 nm. (Rodenko & al. 2017). Opinnäytetyössä käytettiin kehitysvaiheessa olevaa uutta immunoanalyysointilaitte määrittämään työssä valmistettavia kuivareagenssikaivoja. Uutta kehitteillä olevaa immunoanalyysointilaitte kutsutaan opinnäytetyössä nimityksellä AURA. AURA laitteessa aikaslottit ovat eri pituisia kuin AQT90 FLEX analyysointilaitteessa. Yksi AURA analyysointilaitteen aikaslotti on pituudeltaan 2 min 29 s ja se tarvitsee yhden näytteen käsittelyyn vähintään kolme aikaslottia, kuten AQT90 FLEX analyysointilaitte. Opinnäytetyössä käytettävän referenssi AQT PCT määrittäksen inkubaatioaika uudessa analyysointilaitteessa on 6 aikaslottia, eli 14 min ja 54 s. Lisätestausten referenssi Tnl määrittäksen inkubointiaika uudessa analyysointilaitteessa on 4 aikaslottia, eli 9 min 56 s.

Optiseen yksikköön tehtyjen muutosten lisäksi AURA-laitteeseen on tehty muitakin parannuksia AQT90 FLEX analyysointilaitteeseen verrattuna. Ulkoasun lisäksi inkuboinnin aikaista

ravistelua on tehostettu, sekä määrityskaivojen pesuun tarkoitettua pesuria muutettu. Analysaattorin käyttämän pesupuskurin reseptiä on myös muokattu lisäämällä pesua tehostavia aineita.

3.4 Prokalsitoniini ja Troponiini biomarkkerina

Prokalsitoniini (PCT) on 116 aminohaposta muodostuva peptidi, jota muodostuu ihmisen kilpirauhas- ja rasvakudoksessa. Sitä vapautuu pienissä määrissä myös terveeseen ihmiseen elimistössä, mutta yleistulehduksellisessa tilassa, sepsiksessä, sen pitoisuus potilaan veressä kohoaa nopeasti. Mikrobin aiheuttamassa sepsiksessä tai trauman jälkeisessä monielinvauriassa elimistön tulehdusvaste stimuloi voimakkaasti elimistöä tuottamaan Prokalsitoniinia. Terveen ihmisen veressä PCT:n pitoisuus jää alle 0.1 ng/ml, kun taas sepsiksessä pitoisuus ylittää 2 ng/ml. Vakava sepsis diagnosoidaan veren PCT pitoisuuden ollessa 2-10 ng/L ja septinen shokki pitoisuuden ylittäessä 10 ng/L. (Rowland, Hilliard & Barlow, 2015; Meisner, 2010).

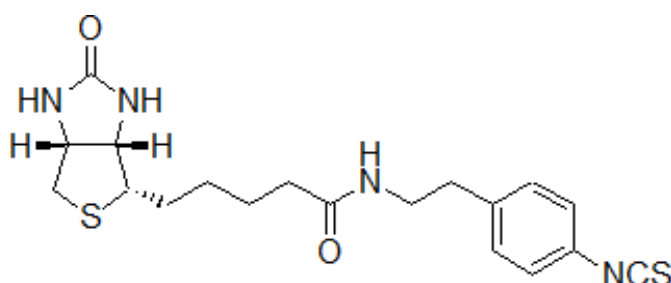
Sepsis on vakava yleistulehduksellinen tila, joka vaatii aina potilaan tehohoitoa. Sepsiksen, eli verenmyrkytyksen vakavat oireet johtuvat suurelta osin elimistön puolustusreaktiosta veressä olevaa mikrobia vastaan. Vuonna 2001 Yhdysvalloissa tehdyn tutkimuksen mukaan tehohoidosta huolimatta sepsiksen kuolleisuusprosentti on keskimäärin 28 %. Potilaan ikä on tärkein kuolleisuuteen vaikuttava tekijä ja yli 85 vuotiaista sepsis-potilaista jo 38 % kuolee. Sepsiksen hoito tuo myös merkittäviä kustannuksia. Yhdysvalloissa sepsispotilaiden hoitokustannukset vuonna 2001 olivat noin 17 miljardia dollaria ja kustannusten oletetaan kasvavan 1.5 % vuosivauhtia. Diagnoosin viivästyminen vaikeuttaa potilaan toipumista ja lisää terveydenhuollon kustannuksia. Sen vuoksi nopea diagnoosi on avain asemassa sepsiksen hoidossa. (Angus & al, 2001).

Troponiini I (TnI) on 209 aminohaposta muodostuva peptidi. Se on maailmanlaajuisesti käytetyin biomarkkeri sydäninfarktin diagnosoinnissa (Rodenko & al. 2017). Sydäninfarktissa TnI analyyttiä vapautuu verenkiertoon kuolioon menneestä sydänlihaksesta, jolloin se voidaan havaita potilaan verestä. TnI määrittäviä tehdään potilaan vierihoidon tarkoitettuilla laitteilla sekä sairaaloiden laboratorioissa. Määritykset eroavat toisistaan muun muassa herkkyiden osalta, ja markkinat vaativatkin yhä herkempiä troponiinimäärityksiä. (Vylegzhana & al. 2017; Chenevier-Gobeaux & al. 2018). AQT90 FLEX immuonalyysaattorilla PCT ja TnI pitoisuudet voidaan mitata potilaan kokoverestä tai siitä erotetusta plasmasta tai seerumista (AQT90 FLEX esite. 2018).

4 KONJUGOINTIKEMIA

Vasta-aineen biotinylointiprosessissa biotinylointireagenssi konjugoidaan eli yhdistetään vasta-aineeseen, jolloin saadaan immunomäärityksessä tarvittava keräävä vasta-aine. Biotinylointireagenssin sitoutuminen ei kuitenkaan saa vaikuttaa antigeenin sitoutumiskohtaan, jotta vasta-aineen biologinen aktiivisuus säilyy (Hermanson, 2013: 867). Opinäytetyössä testattiin viittä uudenlaista biotinylointireagenssia (diSH-1 - diSH-4 ja BMCC) sekä yhtä referenssibiotinylointireagenssia (BITC) vasta-aineeseen konjugoituina. Uudenlaisia biotinylointireagensseja voidaan kutsua paikkaspesifisiksi, koska ne sitoutuvat ennalta määrättyyn kohtaan vasta-aineessa. Referenssibiotinylointireagenssi taas sitoutuu satunnaisesti vasta-aineen pinnalla oleviin aminoryhmiin. Myös opinäytetyössä testattavat uudenlaiset biotinylointireagenssit voidaan jakaa kahteen eri ryhmään niiden konjugointitekniikan perusteella. Referenssibiotinylointireagenssi mukaan lukien opinäytetyössä käytettiin siis kolmea erilaista konjugointitekniikkaa. Tarkoituksena oli selvittää tuoko vasta-aineen paikkaspesifinen biotinylointi etuja immunomäärityksen herkkyyteen verrattuna satunnaisesti sitoutuvaan biotinylointireagenssiin.

Satunnaisesti sitoutuva referenssibiotinylointireagenssi, eli BITC, sitoutuu vasta-aineen pinnalla oleviin aminoryhmiin. BITC reagenssi on käytössä AQT PCT määrityksessä. Vasta-aineen pinnalla voi olla jopa 90 aminoryhmää, mutta vain 20-30 näistä voidaan konjugoida (Hermanson, 2013: 867). Tämä tarkoittaa, että biotinyloidussa vasta-aineliuoksessa on määrittelemätön määrä erilaisia vasta-ainemolekyyliä. BITC reagenssin konjugointi vasta-aineeseen tapahtuu sen päässä olevan isotiosyanaatti (NCS) -ryhmän avulla (Kuva 9). Rakennekaavassa vasemmalla on nähtävissä biotinylointireagenssin biotiinipää, jonka tarkoituksena on kiinnittää biotinyloitu vasta-aine streptavidinilla pinnoitetun mikrotiitterilevyn kaivon pohjalle.



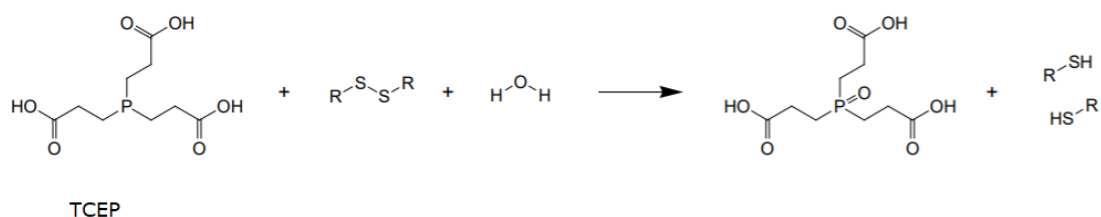
Kuva 9. BITC biotinylointireagenssin rakennekaava (Radiometer Turku Oy perehdytysmateriaali).

Vasta-aineen pinnalla olevat aminoryhmät (NH₂) reagoivat isotiosyanaatin kanssa ja sitovat biotinylointireagenssin vasta-aineen pintaan. Tämä reaktioyhtälö on esitetty Kaavassa 2, jossa R₁ kuvaa isotiosyanaattiin kiinnitettyä biotinylointireagenssia ja R₂ tässä tapauksessa vasta-ainetta. Biotinylointireagenssi voidaan sitoa mihin tahansa proteiiniin, jossa esiintyy vapaita aminoryhmiä.



Kaava 2. Isotiosyanaatin sitoutuminen vasta-aineen aminoryhmään (Radiometer Turku Oy perehdytysmateriaali).

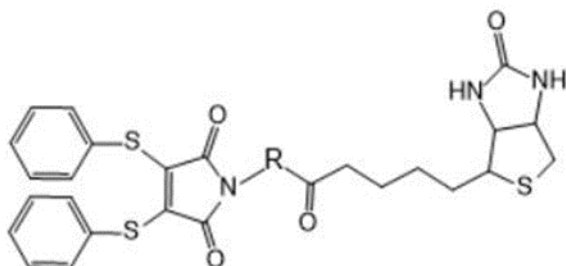
Uusilla paikkaspesifisillä biotinylointireagensseilla on mahdollisuus aikaansaada yksi tai korkeintaan muutama homogeeninen vasta-ainemolekyyli. Näiden reagenssien toimintaperiaatteena on sitoutua vasta-aineiden fragmenttien välisiin rikkisiltoihin. Ennen konjugointireaktiota, nämä rikkisillat avataan pelkistävällä reagenssilla. Tässä opinnäytetyössä vasta-aineiden pelkistykseen käytettiin TCEP-HCl (20490, Thermo Scientific) pelkistysreagenssia. TCEP-HCl reagenssi on trialkyylyfosfiini, jossa fosforiin on sitoutuneena kolme alkyylyryhmää. Trialkyylyfosfiini pelkistää ainoastaan disulfididoksia, eikä ole reaktiivinen proteiinien muita funktionaalisia ryhmiä kohtaan (Thermo Scientific, TCEP-HCl Instructions manual). Kuvassa 10 on esitetty TCEP reagenssin toimintaperiaate. R kuvaa pelkistettävän proteiinin rakennekaavaa, opinnäytetyön tapauksessa tämä proteiini on vasta-aine.



Kuva 10. TCEP reagenssin toimintaperiaate (Thermo Scientific, TCEP-HCl Instructions manual).

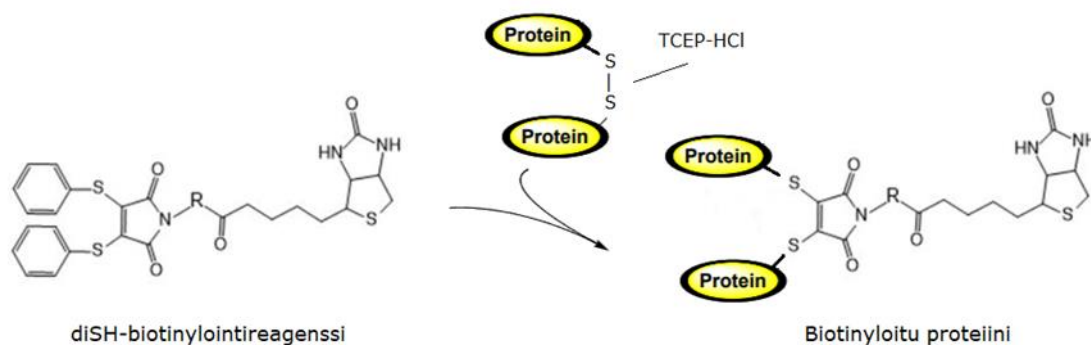
Neljä opinnäytetyössä testatuista uusista biotinylointireagensseista oli syntetisoitu RTKU:n orgaanisessa laboratoriossa, näiden reagenssien nimityksinä käytetään diSH-Bio-1, diSH-Bio-2, diSH-Bio-3 ja diSH-Bio-4. Kuvassa 11 on esitetty diSH-biotinylointi-reagenssin pelkistetty rakennekaava. R kuvaa alifaattista käsivartta, joka on jokaisella

syntetisoidulla diSH-bioreagenssilla erilainen. diSH-biotinylointireagenssit koostuvat funktionaalisesta, vasta-aineeseen sitoutuvasta 3,4-ditiofenolimaleimidi -ryhmästä (kuvassa vasemmalla) sekä määrityskaivon streptavidiniin sitoutuvasta biotiinista (kuvassa oikealla) (Schumacher & al. 2014).



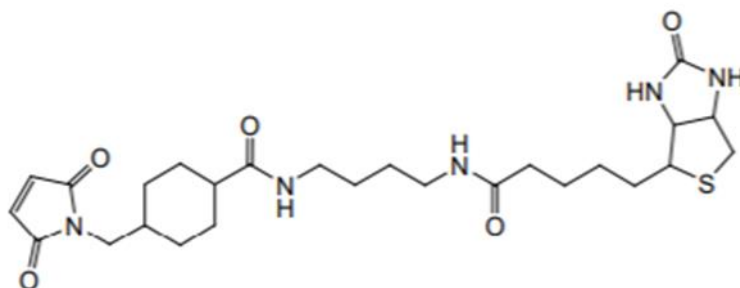
Kuva 11. diSH-biotinylointireagenssin pelkistetty rakennekaava.

Biotinylointireagensseja kutsutaan crosslinkereiksi, eli silloittajiksi, koska niiden tarkoitus on sitoa reaktiivisten ryhmien avulla kaksi biomolekyyliä yhteen (Hermanson, 2013: 867). diSH-biotinylointireagenssien paikkaspesifisyys perustuu niiden kykyyn sitoutua vasta-aineeseen funktionaalisen 3,4-ditiofenolimaleimidi -ryhmän kautta. Konjugointireaktiossa näiden bioreagenssien maleimidiryhmään sitoutuneet rikkiatomit irtautuvat fenoli-ryhmistä ja sitoutuvat vasta-aineen rikkisiltoihin. Ennen diSH-reagenssien konjugointireaktiota, vasta-aineen fragmenttien väliset rikkisidokset avataan pelkistävällä TCEP-HCl-reagenssilla. Näin syntyvät tioliryhmät ovat vapaana bioreagenssin sitoutumista varten. Koska diSH-biotinylointireagenssit ovat divalenttisiä, oletuksena on, että ne pystyvät sitoutumaan kahden rikkisidoksen väliin vasta-aineessa. Näin vasta-aineen eri fragmentit pysyvät yhdessä. (Schumacher & al. 2014). Kuvassa 12 on esitetty pelkistetysti diSH-biotinylointireagenssin sitoutuminen proteiinin SH-ryhmään. Ennen konjugointireaktiota proteiinien väliset rikkisidokset avataan pelkistysreaktiossa. Divalenttina diSH-reagenssi pystyy sitoutumaan kahteen avonaiseen rikkisiltaan.



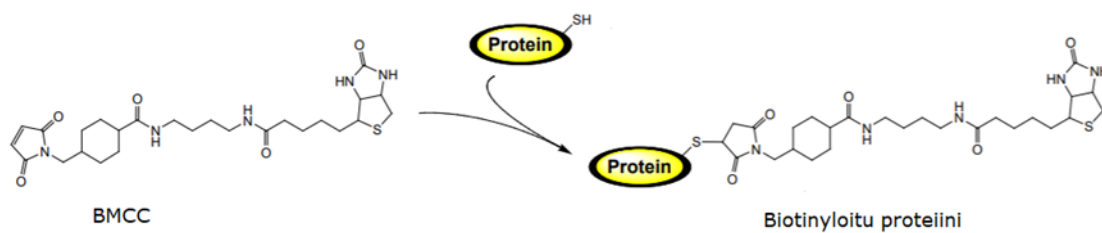
Kuva 12. Divalentin diSH-biotinylointireagenssin toimintaperiaate.

Myös BMCC biotinylointireagenssi on paikkaspesifinen sen sitoutuessa vasta-aineen vapaaseen tioliryhmään. Opinnäytetyössä testattava EZ-Link™ BMCC-Biotin (Thermo Scientific, 21900) on kaupallinen tuote. Kuvassa 13 on esitetty sen rakennekaava (Thermo Scientific, EZ-Link BMCC-Biotin Instructions manual). BMCC reagenssi koostuu funktionaalisesta, vasta-aineeseen sitoutuvasta maleimidi-ryhmästä (kuvassa vasemmalla) sekä määrittyskaivon streptavidiniin sitoutuvasta biotiinista (kuvassa oikealla).



Kuva 13. BMCC-Biotiinin rakennekaava (Thermo Scientific, EZ-Link BMCC-Biotin Instructions manual).

BMCC sitoutuu vain yhteen vapaaseen tioliryhmään, jolloin pelkistys- ja konjugointireaktion jälkeen vasta-ainemolekyylin raskaat ketjut eivät ole enää toisissaan kiinni. Tämä ei kuitenkaan vaikuta vasta-aineen biologiseen aktiivisuuteen, kunhan sen raskas- ja kevytpolypeptidiketjut pysyvät yhdessä (Hermanson, 2013: 867). Myös BMCC:n konjugointi vasta-aineeseen vaatii, että vasta-aineen fragmenttien väliset rikkisidokset avataan pelkistävällä TCEP-HCl-reagenssilla. Kuvassa 14 on esitetty pelkistetystä BMCC-reagenssin sitoutuminen proteiinin vapaaseen SH-ryhmään.



Kuva 14. BMCC biotinylointireagenssin toimintaperiaate.

Biotinyloidun vasta-aineen vaikutus määrityksen toimivuusparametreihin on kriittinen, joten biotinylointiprosessin optimointiin kannattaa panostaa. (Wild, 2013: 279). Tässä opinäytetyössä ei kuitenkaan optimoitu biotinylointiprosessia, vaan mukailtiin tuotekehityksessä aiemmin testattua biotinylointiprotokollaa.

5 MENETELMÄT JA MATERIAALIT

5.1 Vasta-aineen biotinylointiprosessi

Opinnäytetyön ensimmäisessä vaiheessa biotinyloitiin viisi uutta biotinylointireagenssia PCT vasta-aineeseen (4C10, Hytest). Referenssinä käytettiin BITC biotinylointireagenssia PCT vasta-aineeseen konjugoituna. Referenssi-BIO-PCT on käytössä AQT PCT määrittelyssä ja se saatiin valmiina RTKU:n tuotannosta (3-178). Opinnäytetyön toisessa vaiheessa kolme erilaista Tnl vasta-ainetta (19C7, MF4 ja 560cc, Hytest) biotinyloitiin diSH-BIO-1 reagenssilla. Toisin kuin PCT immunomäärityksessä, Tnl määrittelyssä käytetään kolmea keräävää vasta-ainetta yhden sijaan. Referenssinä Tnl määrittelyssä käytettiin RTKU:n tuotekehityksessä valmistettuja BMCC biotinylointireagenssilla konjugoituja Tnl vasta-aineita.

5.1.1 Konjugointireaktio

Konjugointireaktion alussa tehtiin vasta-aineiden puskurinvaihto ja pitoisuusmääritys. Uusien divalenttien diSH-biotinylointireagenssien konjugointireaktio tapahtuu 5 mM natriumboraattipuskurissa, joka sisältää 25 mM NaCl ja 1 mM EDTA, pH 8.00 (Schumacher & al. 2014). BMCC biotinylointireagenssin konjugointi PCT vasta-aineeseen tapahtuu 0.5 M fosfaattipuskurissa, pH 7.2 (Thermo Scientific, EZ-Link BMCC-Biotin Instructions manual). PCT ja Tnl vasta-aineiden säilytysliuoksena käytetään natriumfosfaattipuskuria, pH 7.4. Puskuriin on lisätty säilöntäaineksi 0.09 % NaN₃ ((Hytest Datasheet 4C10; Hytest Datasheet 4T21). diSH-biotinylointireagensseilla konjugoitavien vasta-aineiden säilytysliuos vaihdettiin 5 mM boraattipuskuriin käyttäen kertakäyttöisiä Illustra NAPTM 5 (GE Healthcare) puhdistuspylväitä. BMCC-reagenssilla konjugoitaessa puskurinvaihtoa ei tehty.

Tnl vasta-aineet konsentroitiin minimipitoisuuteen 6.5 mg/ml käyttäen Amicon Ultra-15 30 K (Merck Millipore Ltd) -konsentraattoria. PCT vasta-aineiden konsentraatio oli riittävä ilman konsentroitua.

Puskurinvaihdon ja konsentroidin jälkeen vasta-aineliuosten konsentraatio mitattiin absorbanssimittauksella UV-1800 (Shimadzu) UV-Vis -spektrofotometriä käyttäen, aallonpituudella 280 nm.

Konjugointireaktion seuraavassa vaiheessa avattiin vasta-aineen rikkisillat pelkistysreagenssilla sekä konjugoitiin biotinylointireagenssi vasta-aineen vapaaseen tioliryhmään. diSH- sekä BMCC biotinylointireagensseilla konjugoitavat PCT vasta-aineet pelkistettiin TCEP-HCl liuksella reaktiopitoisuudessa 0.2 mM. diSH-BIO-1 biotinylointireagenssilla konjugoidut Tnl vasta-aineet pelkistettiin TCEP-HCl liuksella reaktiopitoisuudessa 0.05 mM.

Pelkistysreaktiota ei inkuboitu, vaan heti TCEP-HCl lisäyksen jälkeen reaktioliuokseen lisättiin biotinylointireagenssi. Biotinylointireagenssit liuotettiin Dimetyylisulfoksidiin (102952, Merck) ennen reaktion kokoamista. Taulukossa 2 on esitetty opinnäytetyössä tehtyjen konjugointireaktioiden kokoonpanot. Bioreagenssin molaarinen ylimäärä on laskettu vasta-aineen reaktiossa olevan moolimäärän mukaan. Tnl vasta-aineita biotinyloitiin kolme erilaista, mutta kaikki samalla reaktiokokoonpanolla. Yhteensä opinnäytetyössä tehtiin kahdeksan erilaista biotinylointireaktiota.

Taulukko 2. Opinnäytetyössä tehtävien biotinylointireaktioiden kokoonpanot.

Reagenssin reaktiopitoisuus	PCT- diSH- BIO-1	PCT- diSH- BIO-2	PCT- diSH- BIO-3	PCT- diSH- BIO-4	PCT- BMCC	Tnl- diSH- BIO-1
Vasta-aine (mg/ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
TCEP-HCl (nM)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.05
Bioreagenssin molaarinen ylimäärä	10 X	20 X	20 X	40 X	100 X	10 X

Biotinylointireaktion kokoamisen jälkeen reaktioliuoksia inkuboitii huoneenlämmössä O/N (16 – 24 h).

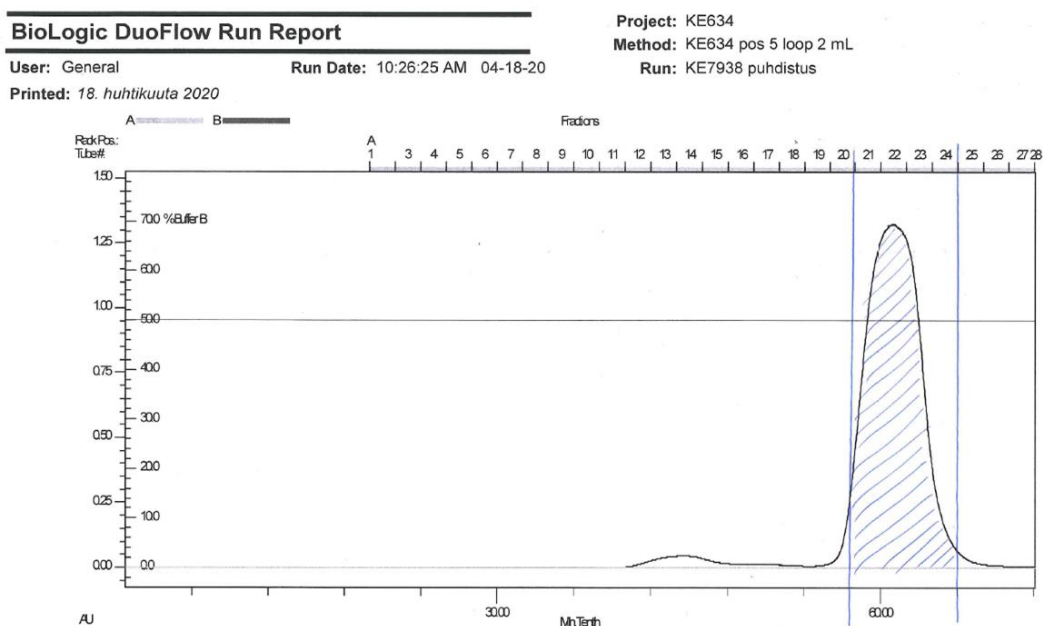
5.1.2 Konjugoidun vasta-aineen puhdistus

Immunomäärityksen toimivuusparametreja voidaan parantaa konjugoidun vasta-aineen puhdistuksella. Kromatografisia menetelmiä käytetään yleisimmin konjugaattien puhdistusmenetelmänä. Se perustuu liuoksen eri komponenttien erotteluun esimerkiksi molekyylikoon perusteella. Opinnäytetyössä konjugaattien puhdistuksessa käytettiin geelikromatografiapylvästä. Pylvään sisällä oleva huokoinen geelimatriisi päästää

suuremmat molekyylit nopeammin läpi, koska pienet molekyylit jäävät kulkiessaan huokoisen materiaalin onkaloihin pidemmäksi aikaa kiinni. Tällöin suurimolekyyliset vasta-aine-konjugatit läpäisevät pylvään ennen vasta-aineen kanssa reagoimattomia biotinylointi-reagenssimolekyylejä. (Hermanson, 2013: 895-896).

Kaikki opinnäytetyössä biotinyloidut vasta-aineet puhdistettiin HiLoad 16/600 Superdex (GE Healthcare Bio Sciences AB) geelikromatografiapylväällä. Käytetty kromatografia-laitteisto oli BioLogic Duo Flow. Eluointiliuoksena käytettiin RTKU:n tuotannon valmistamaa 500 mM TSA puskuria (3-2) laimennettuna käänteisosmoosin avulla puhdistettuun veteen suhteessa 1:10.

Kromatografialaitteisto mittaa geelipylvästä tulevan eluointiliuoksen absorbanssia aallonpituudella 280 nm ja piirtää puhdistusajosta kromatogrammin. Koska vasta-aine absorboi aallonpituudella 280 nm, kromatogrammista nähtiin missä vaiheessa ajoa talteen kerättävä liuos sisälsi halutun vasta-aine-konjugantin. Eluointiliuos ohjattiin numeroituihin näyteputkiin, eli fraktioihin. Vasta-ainetta sisältävät fraktiot yhdistettiin kromatogrammin perusteella. Kuvassa 15 on esimerkki diSH-BIO-1 kromatografia-ajon kromatogrammista sekä yhdistetyistä näyteputkista (kuvassa viivoitettu alue).



Kuva 15. diSH-BIO-1 kromatografia-ajon kromatogrammi.

5.1.3 Biotinyloidun reagenssin testaus

Biotinyloidun reagenssin testaus aloitettiin vasta-aineen pitoisuusmäärittelyllä. Jokaisen fraktioista yhdistetyn reagenssin vasta-ainepitoisuus mitattiin liuoksesta absorbanssimit-tauksella UV-1800 (Shimadzu) UV-Vis-spektrofotometriä käyttäen, aallonpituudella 280 nm. Absorbanssituloksesta laskettiin vasta-aineen pitoisuus käyttämällä vasta-aineen molaarista absorptiokerrointa ϵ , jonka arvo määritetään tunnetun vasta-aineen pitoisuuden mukaan. ϵ -kerroin kertoo kuinka paljon valoa vasta-aine absorboi tietyllä aallonpituudella (Stephenson, 2003: 243-244). Opinnäytetyössä käytetyn vasta-aineen ϵ oli RTKU:n tuotekehityksessä etukäteen määritetty olevan 1.34 (ml/mg*cm). Vasta-aineen pitoisuus voidaan laskea Kaavan 3 avulla.

$$c \text{ (vasta - aine)} = \frac{A(280 \text{ nm})}{\epsilon}$$

Kaava 3. Vasta-aineen pitoisuuden laskukaava (Stephenson, 2003: 244).

Reaktion saanto-% kertoo, kuinka paljon vasta-aineesta saatiin puhdistuksesta talteen. Vasta-aineen pitoisuudesta laskettiin tilavuutta apuna käyttäen vasta-aineen massa. Massasta voidaan laskea biotinylointireaktion saanto-% vertaamalla sitä reaktion alussa olevan vasta-aineen massa. Saanto kertoo, kuinka paljon alussa olevasta vasta-aineesta on konjugointireaktion ja geelikromatografiapuhdistuksen jälkeen tallella. Saanto-% lasketaan Kaavan 4 mukaisesti.

$$\text{Saanto} - \% = \frac{m(\text{MAb, loppu})}{m(\text{MAb, alku})}$$

Kaava 4. Reaktion saanto-% laskukaava.

Immunomäärittelyssä yleensä ainakin yksi reaktiokomponentti on sitoutuneena kiintokantajaan ja opinnäytetyön kuivareagenssikaivojen valmistuksessa käytettävä biotiini-streptavidiniisidos on voimakkain tunnettu ei-kovalenttinen sidos (Wild, 2013:19). Sitoutumiskapasiteettimäärittelyssä tutkittiin kuinka suuri osa biotinyloidussa reaktioliuoksessa olevista vasta-aineista sitoutuu streptavidiinillä pinnoitettuun määrittelyskaivoon. Tästä voidaan päätellä, kuinka monta prosenttia vasta-aineista on sitoutunut biotiinin sisältävään biotinylointireagenssiin. Onnistuneen biotinylointireaktion lopputuotteella on hyvä sitoutumiskapasiteetti. Sitoutumiskapasiteettimäärittely on RTKU:n spesifinen määrittelyprosessi.

Sitoutumiskapasiteettimäärityksessä biotinyloidut vasta-aineet laimennettiin RTKU:n tuotannosta saatavaan BioMAb-puskuriin pitoisuuksissa 1.25 ng/μl ja 0.25 ng/μl. Valmistettuja laimennoksia inkuboitii levyravistelijassa (RT, 2 h) RTKU:n tuotannosta saatavissa streptavidiinilla pinnoitetuissa määrityskaivoissa (3-182) 200 μl / kaivo. Inkuboinnin jälkeen streptavidiiniiin sitoutumattomasta vasta-aineliuoksesta siirrettiin 100 μl DELFIA® anti-mouse IgG kaivoihin (4007-0010, PerkinElmer), jonka pintaan liuoksen vasta-aineet sitoutuivat sitä seuraavan inkuboinnin aikana (RT / 1 h, levyravistelijassa). Sitoutumatomat vasta-aineet pestiin pois RTKU:n tuotannosta saatavalla pesupuskurilla (3-99) ja kaivoihin lisättiin fluoresoivaa merkkiainetta sisältävää DELFIA® Eu-Rabbit-anti-mouse IgG liuosta (AD0124, PerkinElmer) 200 μl / kaivo. Inkuboinnin (RT, 2 h, levyravistelijassa) jälkeen sitoutumaton merkkiaine pestiin pois ja tilalle kaivoihin lisättiin 200 μl DELFIA® Enhancement Solution -kehitysluosta (1244-105, PerkinElmer), joka kehittää fluoresoivan merkkiaineen. Biotinyloiduista vasta-aineliuoksista tehtiin myös standardisuora DELFIA® anti-mouse IgG kaivoille, joita käsiteltiin samalla tavalla kuin streptavidiinikaivoissa inkuboituja näytteitä. Kehitetystä määrityskaivoista mitattiin fluoresoiva signaali käyttäen VICTOR Multilabel Plate Reader -laitetta (PerkinElmer). Biotinyloitujen vasta-aineiden sitoutumiskapasiteettiprosentit laskettiin vertaamalla näytteiden signaaleja standardisuoran signaaleihin.

Sitoutumiskapasiteetin perusteella laskettiin biotinyloitujen vasta-aineliuosten biotinyloitujen vasta-aineiden pitoisuudet kertomalla pitoisuusmäärityksestä saatu pitoisuus sitoutumiskapasiteettiprosentilla. Näitä pitoisuuksia käytettiin tulevassa manuaalisessa immunomäärityksessä sekä varsinaisessa reagenssikaivojen valmistuksessa.

Opinnäytetyössä valmistettuja biotinyloitua vasta-aineita käytettiin myös manuaalisessa immunomäärityksessä, jotta varmistutaan niiden toimivuudesta ennen varsinaisten reagenssikaivojen valmistusta. Manuaalisessa immunomäärityksessä käytettävät reagenssit ovat liuosmuodossa, joten testausmenetelmästä käytetään myös nimitystä märkämääritys. Manuaalinen määritys antaa jonkun käsityksen reagenssien toimivuudesta, mutta lopullinen testaus tehdään aina kuivareagenssimuodossa. Manuaalinen immunomääritys on RTKU:n spesifinen määritysprosessi.

Immunomääritys tehtiin irtokaivoilla 96-kuoppalevyllä (Single Well, Nunc). Immunomäärityksessä biotinyloidut vasta-aineet laimennettiin RTKU:n tuotannosta saatavaan BioMAb-puskuriin (3-143) pitoisuudessa 6.0 ng/μl. Yhdessä PCT immunomäärityksessä käytettiin yhtä biotinyloitua vasta-ainetta ja TnI määrityksessä kolmea biotinyloitua vasta-ainetta. Laimennoksia inkuboitii levyravistelijassa RTKU:n tuotannosta saaduissa

streptavidiinilla pinnoitetuissa määrittyskaivoissa 50 µl / kaivo (RT, 0.5 h). Sitoutumaton vasta-aine pestiin pois RTKU:n tuotannosta saatavalla pesupuskurilla (3-99). Määrittyskaivoihin lisättiin standardinäytteitä A-F 20 µl / kaivo, jotka sisälsivät haluttua analyyyttiä tiedetyissä pitoisuuksissa välillä 0 - 82.7 ng/L (PCT) ja 0 - 228 623 ng/ml (TnI). Standardeja A-B pipetoitiin 12 rinnakkaisnäytettä ja standardeja C-F 6 rinnakkaisnäytettä. Näytteet on valmistettu RTKU:n tuotannossa (PCT 2-110, TnI 2-70) ja niiden analyyttipitoisuudet on määritetty AQT immunoanalysaattorissa. Leimavasta-aine lisättiin määrittyspitoisuudessa 10.0 ng/µl (PCT, TEKES-Eu) ja 3.0 ng/µl (TnI, Leima2) analyyttispesifiseen välikerrosliuokseen laimennettuna 10 µl / kaivo. PCT välikerros saatiin RTKU:n tuotannosta (3-177) ja TnI välikerros RTKU:n tuotekehityksestä. Määrittyskaivoja ravisteltiin levyinkubaattorissa +36 °C:ssa 20 min. Inkuboinnin jälkeen määrittyskaivot pestiin pesupuskurilla (3-99) ja niiden pinta kuivattiin levykuivaimessa +64 °C:ssa. Lämpötilatemperoinnin jälkeen määrittyskaivoista mitattiin Europiumin fluoresoiva signaali käyttäen VICTOR Multilabel Plate Reader -laitetta (PerkinElmer).

Immunomäärittystuloksista määritettiin taustasignaali sekä laskettiin keskihajonta (Standard Deviation, SD), variaatiokerroin (Coefficient of Variation, CV %), spesifinen signaali sekä herkkyys oletetulla 10 % variaatiokertoimella. Saatuja tuloksia verrattiin referenssimäärittymiseen. Taustasignaali on analyyyttiä sisältämättömän näytteen (std A) signaalien keskiarvo. Spesifinen signaali saadaan vähentämällä taustasignaalien keskiarvo näytteen signaalien keskiarvosta.

Keskihajonnan, eli SD laskentakaava on esitetty Kaavassa 5, jossa n = aineiston lukumäärä ja $x_i - \bar{x}$ = aineiston arvojen poikkeama keskiarvosta. Keskihajonta kertoo kuinka kaukana keskiarvosta näytteen antamat signaalit ovat.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

Kaava 5. Keskihajonnan (SD) laskentakaava.

Variaatiokertoimen, eli CV:n laskukaava on esitetty Kaavassa 6, jossa KA_{signaali} tarkoittaa näytteen antamien signaalien keskiarvoa. Variaatiokertoimella voidaan vertailla kahden eri määrittymisen signaalien hajontaa. Opinnäytetyössä variaation vertailuun käytetään prosentuaalista variaatiokerrointa (CV %), jonka laskukaava on esitetty Kaavassa 7.

$$CV = \frac{SD}{KA_{\text{signaali}}}$$

Kaava 6. Variaatiokertoimen (CV) laskentakaava.

$$CV \% = \frac{SD}{KA_{\text{signaali}}} \times 100$$

Kaava 7. Prosentuaalisen variaatiokertoimen (CV %) laskentakaava.

Spesifinen signaali kertoo, kuinka paljon näytteestä saadaan signaalia, kun siitä on vähennetty taustasignaalin osuus. Kaava 8 esittää spesifisen signaalin laskukaavan.

$$\text{Spesifinen signaali} = KA_{\text{signaali}} - KA_{\text{taustasignaali}}$$

Kaava 8. Näytteen spesifisen signaalin laskentakaava.

Määrittelyn herkkyydellä tarkoitetaan sitä analyysin pitoisuutta, joka määrittelyllä yhden näytteen perusteella on mahdollista määrittää. Kaava 9 esittää herkkyyden laskentakaavan. Opinnäytetyössä herkkyys lasketaan käyttäen oletusta, että määrittelyn prosentuaalinen variaatiokerroin 10 %. Tällöin pystytään eliminoimaan esimerkiksi manuaalisen määrittelyn pipetoinnista johtuvat variaatioerot.

$$\text{Herkkyys} = \frac{2 * CV * KA_{\text{taustasignaali}} * C_{\text{näyte}}}{\text{Spesifinen signaali}}$$

Kaava 9. Määrittelyn herkkyyden laskentakaava.

5.2 Leimareagenssien testaus

Biotinylointireagenssien toimivuutta testattiin myös kolmella eri leimareagenssilla. Leimareagenssien konjugointiin käytettiin PCT vasta-ainetta (4C10, Hytest). Määrittelyssä käytettiin keräävänä vasta-aineena RTKU:n tuotannon PCT-BIO reagenssia (3-178). Referenssinä käytettävä PCT leima-vasta-aine (3-179) saatiin RTKU:n tuotannolta. Tätä leimareagenssia kutsutaan opinnäytetyössä TEKES-Eu. Testattavat kaksi uudenlaista leimareagenssia saatiin RTKU:n tuotekehitykseltä. Niitä kutsutaan opinnäytetyössä nimityksillä Leima1 ja Leima2. Leima2 on käytössä opinnäytetyön Tnl -määrittelyssä. Leima2 toimivuus NT-proBNP analyysillä on testattu YAMK opinnäytetyössä ja todettu sen olevan neljä kertaa kirkkaampi kuin referenssinä käytettävä leimareagenssi (Jaakkola,

2018). Oletuksena siis oli, että uusilla leimareagensseilla saadaan PCT määrittelyn signaalitasoa nostettua, jolloin myös herkkyys paranee.

Leimareagenssit Leima1 ja Leima2 testattiin manuaalisella PCT immunomäärityksellä käyttäen samoja parametrejä kuin biotinylointireagenssien testauksessa. TEKES-Eu leimavasta-ainetta käytettiin immunomäärityksessä referenssileimana. Leima1 ja Leima2 reagenssien laimentamiseen testattiin kahta eri välikerrosta, PCT-määrittelyn referenssivälikerrosta (3-177) sekä tuotekehityksen Tnl-määrittelyn välikerrosta.

5.3 Kuivareagenssikaivojen valmistus

Opinnäytetyön PCT ja Tnl kuivareagenssikaivot valmistettiin RTKU:n tuotekehityksen pilottilaitteilla. Kappaleessa 3.1 on esitetty kuivattujen reagenssikaivojen kokoonpano.

5.3.1 Prokalsitoniini reagenssikaivojen valmistusprosessi

PCT reagenssikaivojen referenssinä käytettiin RTKU:n tuotannon valmistamia AQT PCT reagenssikaivoja (51-27). Opinnäytetyön PCT reagenssikaivojen valmistuksen ensimmäisessä vaiheessa keräävät vasta-aineet kiinnitettiin RTKU:n tuotannossa valmistettujen streptavidiinilla pinnoitettujen mikrotiitterikaivojen (3-182) pintaan. Kaivot olivat 96-kuoppalevyllä. Opinnäytetyössä biotinyloidut uudet keräävät vasta-aineet sekä referenssivasta-aine (PCT-BIO, 3-178) laimennettiin BioMab puskuriin (3-143) pitoisuudessa 8 ng/μl. Laimennoksia inkuboitettiin streptavidiinikaivoissa huoneenlämmössä O/N 50 μl / kaivo. Inkuboinnin jälkeen kaivot pestiin levypesurilla (PerkinElmer) RTKU:n tuotannosta saatavalla pesupuskurilla (3-99). Pestyihiin kaivoihin annosteltiin kahta eri välikerrospuskuria 40 μl / kaivo, riippuen valmistettaviin kaivoihin myöhemmin annosteltavasta leimavasta-aineesta. Välikerros kuivattiin kaivoihin O/N käyttäen kuivauskaappia olosuhteissa +32 °C/ RH 5%.

Kuivattuihin PCT reagenssikaivoihin annosteltiin leimavasta-aine RTKU:n tuotekehitykselle valmistetulla leima-annostelijalla. Leima-annostelu tapahtui kuivatilassa, jossa ilman suhteellinen kosteus on alle 10 %. Kaivoihin annosteltiin 1 μl joko PCT referenssileimavasta-ainetta (3-179) tai Leima1- tai Leima2-vasta-ainetta. Leimavasta-aineet laimennettiin ennen annostelua leimapuskuriin, joka koottiin RTKU:n tuotannosta saatavista reagensseista, pitoisuudessa 300 ng/μl. Leima-annostellut reagenssikaivot kuivattiin

3 vuorokautta kuivauskaapissa olosuhteissa +35 °C/RH 0%. Taulukossa 3 on esitetty valmistettujen PCT-kuivareagenssikaivojen kokoonpanot.

Taulukko 3. PCT-kuivareagenssikaivojen kokoonpanot.

Nimike	Keräävä vasta-aine	Leimavasta-aine	Välikerros
AQT PCT	PCT-BIO	PCT-TEKES-Eu	PCT (3-177)
Kaivo2	PCT-diSH-BIO-1	PCT-TEKES-Eu	PCT (3-177)
Kaivo3	PCT-diSH-BIO-2	PCT-TEKES-Eu	PCT (3-177)
Kaivo4	PCT-diSH-BIO-3	PCT-TEKES-Eu	PCT (3-177)
Kaivo5	PCT-diSH-BIO-4	PCT-TEKES-Eu	PCT (3-177)
Kaivo6	PCT-diSH-BMCC	PCT-TEKES-Eu	PCT (3-177)
Kaivo7	PCT-BIO	PCT-Leima1	Tnl tuotekehitys
Kaivo8	PCT-diSH-BIO-1	PCT-Leima1	Tnl tuotekehitys
Kaivo9	PCT-diSH-BIO-2	PCT-Leima1	Tnl tuotekehitys
Kaivo10	PCT-diSH-BIO-3	PCT-Leima1	Tnl tuotekehitys
Kaivo11	PCT-diSH-BIO-4	PCT-Leima1	Tnl tuotekehitys
Kaivo12	PCT-diSH-BMCC	PCT-Leima1	Tnl tuotekehitys
Kaivo13	PCT-BIO	PCT-Leima2	Tnl tuotekehitys

5.3.2 Troponiini I reagenssikaivojen valmistusprosessi

Tnl reagenssikaivojen referenssinä käytettiin RTKU:n tuotekehityksen valmistamia Tnl reagenssikaivoja, joissa keräävät vasta-aineet ovat biotinyloitu BMCC-reagenssilla ja leimavasta-aineena on käytetty Leima-2 reagenssia. Troponiini I reagenssikaivojen valmistuksessa keräävä vasta-aine kiinnitettiin kaupallisten streptavidiinilla pinnoitettujen mikrotiiterikaivojen pintaan. Kaivot olivat 96-kuoppalevyllä. Näiden streptavidiinikaivojen valmistajaa ei opinnäytetyössä mainita. Tnl reagenssikaivoissa käytettiin kolmea eri keräävää vasta-ainetta laimennettuna BioMab puskuriin (3-143) pitoisuudessa 29.4 ng/μl. Laimennoksia inkuboitii 2 μl streptavidiinikaivoissa 30 min, jonka jälkeen kaivot pestiin levypesurilla (PerkinElmer) RTKU:n tuotannosta satavalla pesupuskurilla (3-99). Pestyihin kaivoihin annosteltiin RTKU:n tuotekehitykseltä saatua Tnl spesifistä välikerrospuskuria 40 μl / kaivo. Välikerros kuivattiin kaivoihin O/N käyttäen kuivauskaappia olosuhteissa +32 °C/ RH 5%.

Kuivattuihin reagenssikaivoihin annosteltiin leimavasta-aine RTKU:n tuotekehitykselle valmistetulla leima-annostelijalla, 1 µl / kaivo. Leima-annostelu tapahtui kuivatilassa, jossa ilman suhteellinen kosteus on alle 10 %. Kaivoihin annosteltiin Leima-2 -reagenssilla leimattua Tnl vasta-ainetta, joka saatiin RTKU:n tuotekehityksestä. Leima-vasta-aine laimennettiin leimapuskuriin, joka koottiin RTKU:n tuotannosta saatavista reagensseista, pitoisuudessa 30 ng/µl. Leima-annostellut reagenssikaivot kuivattiin O/N kuivauskaapissa olosuhteissa +35 °C/ RH 0%. Taulukossa 4 on kuvattu valmistettujen Tnl reagenssikaivojen kokoonpanot. Kaivo14-ref on RTKU:n tuotekehityksessä kehitteillä olevan Tnl määrityksen reagenssikaivokokoonpano.

Taulukko 4. Tnl-kuivareagenssikaivojen kokoonpanot.

Nimike	Keräävät vasta-aineet	Leimavasta-aine	Välikerros
Kaivo14-ref	Tnl 1-BMCC	Leima-2	Tnl tuotekehitys
	Tnl 2-BMCC		
	Tnl 3-BMCC		
Kaivo15	Tnl 1-diSH-BIO-1	Leima-2	Tnl tuotekehitys
	Tnl 2-diSH-BIO-1		
	Tnl 3-diSH-BIO-1		

5.3.3 Reagenssikaivojen pakkaus kasetteihin

Leima-annostelun jälkeisen kuivauksen jälkeen PCT ja Tnl kuivareagenssikaivot pakattiin 96-kuoppalevytä AQT90 FLEX analysaattoriin sopiviin reagenssikasetteihin. Jokaiseen reagenssikasettiin pakattiin 16 reagenssikaivoa RTKU:n tuotekehityksen pakkauslinjalla. Pakkaus tapahtui kuivatilassa, jossa ilman suhteellinen kosteus on alle 10 %. Reagenssikasetti koostuu muovisesta aihioista, johon reagenssikaivot annostellaan. Aihion keskelle asetetaan adsorbentti, jonka tarkoituksena on poistaa mahdollinen kosteus kuivatuista reagenssikaivoista. Aihion molemmat pinnat laminoitiin umpeen. Kasetteihin tulostettiin viivakoodillinen etiketti, jossa oli jokaisen valmistetun eränumeron tiedot. Jokainen kasetti pakattiin erilliseen adsorbentin sisältävään foliopussiin, jotta ympäristön kosteus ei pääse vaikuttamaan reagenssikaivojen säilyvyyteen.

5.4 5.4 Reagenssikaivojen testaus immunoanalysaattorilla

Jokainen reagenssikasettivariaatio (AQT PCT, Kaivo2 - Kaivo15, Taulukko 3 ja Taulukko 4) testattiin uudella kehitteillä olevalla AURA immunoanalysaattorilla. Tarkoituksena oli verrata uusien biotinylointireagenssien tuloksia referenssimäärittelyyn (AQT PCT ja Kaivo14-ref).

5.4.1 Prokalsitoniinikaivojen testaus

Opinnäytetyön ensimmäisessä vaiheessa testattiin TEKES-Eu-leimavasta-aineella valmistetut reagenssikasetit (reagenssinimitykset AQT PCT (ref), Kaivo2 – Kaivo6). Testaus tehtiin uudella kehitteillä olevalla AURA immunoanalysaattorilla käyttäen inkubaatioaikana referenssinä olevaa inkubaatioaikaslottia 6 (14 min 56 s). Lisäksi reagenssivaihtoehtojilla AQT PCT, Kaivo2 ja Kaivo6 testattiin myös lyhyempiä inkubaatioaikaslotteja 3 (7 min 27 s) ja 1 (2 min 29 s). Määrittelyssä käytettiin RTKU:n tuotannon valmistamia PCT standardeja A-K (2-108) pitoisuuksissa 0-119 ng/L. Rinnakkaisnäytteiden määrä standardeilla A-B oli 6 ja muilla standardeilla 4. Lisäksi AURA määrittelyssä käytettiin RTKU:n tuotannosta saatavia PCT LOW -kontrolleja (2-111, 0.66 ng/L) sekä RTKU:n tuotekehityksessä valmistettuja näytteitä HPL3 (0.085 ng/L) sekä EPL3 (0.053 ng/L), rinnakkaisnäytteiden määrän ollessa 4. Standardien, kontrollin sekä näytteiden pitoisuudet oli määritetty AQT90 FLEX analysaattorilla, kalibroidulla PCT määrittelyllä. Samat näytteet testattiin myös AQT90 FLEX analysaattorilla käyttäen kalibroitua AQT PCT määrittelyä. Standardeissa ja LOW kontrollissa PCT antigeeninä on käytetty kaupallista antigeeniä (Hytest) ja HPL3 ja EPL3 näytteissä antigeeni on natiivia, eli peräisin potilasnäytteistä (PromedDx).

Reagenssinimityksillä AQT PCT, Kaivo2 ja Kaivo6 testattiin lisäksi potilasnäytteitä (PromedDx) Taulukon 5 mukaisesti. Taulukossa on esitetty jokaisella inkubaatioaikaslotilla testattujen rinnakkaisnäytteiden lukumäärä. Lukumäärään vaikutti näytteen riittävyys. Potilasnäytteet määritettiin uudella kehitteillä olevalla AURA immunoanalysaattorilla inkubaatioaikasloiteilla 6 ja 1 sekä AQT90 FLEX analysaattorilla kalibroidulla PCT määrittelyllä. AQT90 FLEX määrittelystä saatuja pitoisuuksia käytettiin potilasnäytteiden todellisina pitoisuuksina ja niiden avulla laskettiin määrittelyjen herkkyys.

Taulukko 5. Kaivo1-ref, Kaivo2 ja Kaivo6 reagenssikaseteilla määritetyt potilasnäytteet.

Potilasnäyte, PCT pitoisuus	Kaivo1-ref		Kaivo2		Kaivo 6		AQT
	Slot 6	Slot 1	Slot 6	Slot 1	Slot 6	Slot 1	Slot 8
P1, 0.14 ng/L	2	2	2	2	2	2	2
P2, 3.69 ng/L	2	2	2	2	2	2	2
P3, 6.24 ng/L	1	2	2	2	2	2	2
P4, 73.7 ng/L	2	2	1	2	2	2	2
P5, 0.18 ng/L	–	–	2	2	2	2	1
P6, 0.37 ng/L	–	–	2	2	2	2	2
P7, 1.18 ng/L	–	–	2	2	2	2	1
P8, 2.15 ng/L	–	–	2	2	2	2	1
P9, 29.8 ng/L	–	–	2	2	2	2	1

Herkkyyden lisäksi yhtenä vertailtavana toimintaparametrina käytettiin määrittelyn variaatiota. Määrittelysten variaatiokertoimien avulla laskettiin määrittelysten RMS (Root Mean Square) CV arvot. RMS CV kuvaa määrittelysten keskimääräisen variaation paremmin kuin variaatiokertoimista laskettu keskiarvo. RMS CV voidaan laskea Kaavan 10 avulla (Wild, 2013:13), jossa CV kuvaa määrittelyn variaatiokerrointa testiajosta 1 testiajoon n ja N kuvaa yhdessä testiajossa olevien rinnakkaisnäytteiden lukumäärää.

$$RMS\ CV = \sqrt{\frac{CV_1^2 N_1 + CV_2^2 N_2 + \dots + CV_n^2 N_n}{N_1 + N_2 + \dots + N_n}}$$

Kaava 10. RMS (Root Mean Square) CV:n laskentakaava (Wild, 2013:13).

Uusia leimareagensseja sisältävät PCT reagenssikasetit (Kaivo7-Kaivo13) testattiin uudella kehitteillä olevalla AURA analysaattorilla, standarditasolla A, 0 ng/L (tausta) sekä PCT LOW kontrollilla (0.66 ng/L). Näitä tuloksia verrattiin AURA analysaattorilla määritettyyn referenssimäärittelyyn AQT PCT. Lisäksi reagenssikaseteilla AQT PCT ja Kaivo7 tehtiin lisätestejä laimennetulla PCT LOW kontrollilla. Laimennoksia tehtiin RTKU:n proteiinipuskuriin (3-142) suhteissa 1:2 (0.33 ng/L) ja 1:4 (0.165 ng/L). Lisätestauksessa haluttiin selvittää uusien leimareagenssien mahdollisesti aiheuttama interferenssi. Immunomäärittelyksessä epäspesifistä sitoutumista voi aiheuttaa joko näytteen tai itse reakt-

tion reagenssin sisältämä komponentti (Meulenberg, 2014). Epäspesifiseen sitoutumiseen liittyvät testaukset tehtiin uudella kehitteillä olevalla immunoanalysaattorilla käyttäen inkubaatioaikana aikaslottia 6.

5.4.2 Tnl reagenssikaivojen testaus

Opinnäytetyössä valmistetut Troponiini I reagenssikasetit (Kaivo14-ref ja Kaivo15) testattiin uudella AURA immunoanalysaattorilla tuotekehityksen Tnl määrityksen referenssi-inkubaatioaikaslotilla 4 (9 min 56 s) sekä pienemmillä inkubaatioaikasloiteilla 3 (7 min 27 s) ja 1 (2 min 29 s). Määritykset tehtiin RTKU:n tuotekehityksessä valmistetuilla standardeilla A-J, joiden Tnl pitoisuudet olivat välillä 0-58.6 ng/ml. Rinnakkaisnäytteiden määrä standarditasoilla A-E oli 10 ja standardeilla F-J 5 rinnakkaista. Lisäksi reagenssikasetit testattiin tuotekehityksessä valmistetuilla natiivia antigeeniä sisältävillä näytteillä HPL1-HPL4 (0.4-7.3 ng/ml) sekä EPL1-EPL3 (0.5-0.9 ng/ml). Näillä näytteillä testattujen rinnakkaisnäytteiden määrä oli 5. Tnl reagenssikasettien tuloksista laskettiin näytteiden spesifiset signaalit, määrityksen herkkyys sekä RMS CV.

6 TULOKSET

6.1 Biotinyloitujen reagenssien testaustulokset

Biotinyloitujen reagenssien toimivuuden testauksessa laskettiin jokaisen reagenssin pitoisuudet (Kaava 3) ja saanto (Kaava 4), sekä määritettiin niiden sitoutumiskapasiteetit. Lisäksi suoritettiin manuaalinen immunomääritys luvun 5.1.3 mukaisesti. Biotinylointi-reagenssin kokonaispitoisuudella tarkoitetaan vasta-aineen pitoisuutta reagenssiliuoksessa ja saannolla vasta-aineen määrää liuoksessa reaktion alkuun verrattuna. Sitoutumiskapasiteettimäärityksessä testattiin kuinka suuri osa biotinyloiduista vasta-aineista pystyy sitoutumaan streptavidini-kaivon pinnalle. Sitoutumiskapasiteettiprosentin perusteella laskettiin biotinyloitujen reagenssien todelliset pitoisuudet. Todellisella pitoisuudella tarkoitetaan reagenssiliuoksessa olevien konjugoituneiden vasta-aineiden pitoisuutta. Taulukossa 6 on esitetty opinnäytetyössä biotinyloitujen PCT ja TnI vasta-aineiden pitoisuudet, saantoprosentit sekä todelliset biotinyloitujen vasta-aineiden pitoisuudet.

Taulukko 6. Biotinyloitujen vasta-aineiden testaustulokset.

Biotinyloitu vasta-aine	Vasta-aineen pitoisuus (mg/ml)	Saanto-%	Sitoutumiskapasiteetti	Biotinyloidun vasta-aineen pitoisuus (mg/ml)
PCT-diSH-BIO-1	1.2	65 %	49 %	0.6
PCT-diSH-BIO-2	1.3	51 %	58 %	0.7
PCT-diSH-BIO-3	1.0	54 %	47 %	0.5
PCT-diSH-BIO-4	1.0	68 %	32 %	0.3
PCT-BMCC	0.4	69 %	95 %	0.4
TnI1-diSH-BIO-1	0.9	48 %	33 %	0.3
TnI2-diSH-BIO-1	1.4	73 %	13 %	0.1
TnI3-diSH-BIO-1	1.8	60 %	13 %	0.2

Manuaalisten immunomääritysten tuloksista laskettiin jokaisen määrityksen taustasignaalin keskiarvo sekä jokaisen näytteen prosentuaalinen variaatiokerroin (Kaava 7) ja spesifinen signaali (Kaava 8). Standardi A taustasignaalin, näytteen spesifisen signaalin

sekä näytteen pitoisuuden avulla laskettiin määrittelyn herkkyys 10 % variaatiokertoimella (Kaava 9). Standardin B (PCT 0.2 ng/L, TnI 19.3 ng/ml) herkkyyttä käytettiin vertailutekijänä eri biotinylointireagenssien välillä. Taulukossa 7 ja Taulukossa 8 on esitetty PCT ja TnI manuaalisista immunomääritystuloksista lasketut standardi B variaatiot, spesifiset signaalit sekä herkkyydet 10 % variaatiokertoimella. Troponiinimäärityksessä käytettiin kaikkia kolmea biotinyloitua vasta-ainetta (TnI1-TnI3) yhdessä määrittelyssä.

Taulukko 7. PCT immunomääritystuloksista lasketut toimintaparametrit.

	Ref. PCT	diSH-BIO-1	diSH-BIO-2	diSH-BIO-3	diSH-BIO-4	BMCC
Määrittelyn taustasignaali	642	891	905	744	874	711
Std B variaatio (CV %)	6.5	15.8	11.2	6.7	10.9	11.9
Std B spesifinen signaali	351	237	270	280	232	352
Herkkyys (10 % CV) ng/L (std B)	0.062	0.127	0.113	0.090	0.128	0.068

Taulukko 8. TnI immunomääritystuloksista lasketut parametrit.

	BMCC (ref)	diSH-BIO-1
Määrittelyn taustasignaali	549	553
Std B variaatio (CV %)	10.5	1.9
Std B spesifinen signaali	2 496	2 485
Herkkyys (10 % CV) ng/ml (std B)	0.850	0.861

6.2 Leimattujen vasta-aineiden testaustulokset

RTKU:n tuotekehityksessä valmistettujen leimattujen PCT vasta-aineiden Leima-1 ja Leima-2 toimivuus testattiin manuaalisella immunomäärityksellä kappaleen 5.2 mukaisesti. Immunomääritysten tuloksista laskettiin määrittelyn taustasignaalin keskiarvo, sekä jokaisen näytteen prosentuaalinen variaatiokerroin (Kaava 7) ja spesifinen signaali (Kaava 8). Standardi A taustasignaalin, näytteen spesifisen signaalin sekä näytteen pi-

toisuuden avulla laskettiin määrittelyn herkkyys 10 % variaatiokertoimella (Kaava 9). Standardin B (0.2 ng/L) herkkyyttä käytettiin vertailutekijänä eri leimareagenssien välillä. Taulukossa 9 on esitetty leimareagenssien PCT manuaalisten immunomäärittysten tulok-
sista lasketut standardi B variaatiot, spesifiset signaalit sekä herkkyydet 10 % variaatio-
kertoimella. Tässä määrittelyssä käytettiin PCT spesifistä välikerrosta (3-177).

Taulukko 9. Leima-vasta-aineiden immunomäärittelyksistä lasketut parametrit (PCT väli-
kerros).

	TEKES-Eu (ref)	Leima-1	Leima-2
Määrittelyn taustasignaali	642	4 169	5 146
Std B variaatio (CV %)	6.5	17.1	15.3
Std B spesifinen signaali	351	-1 591	-2 041
Herkkyys (10 % CV)			
ng/L (std B)	0.062	-0.085	-0.089

Uusilla leimareagensseilla havaittiin, että niiden taustasignaali oli suurempi kuin std B signaali. Tämän vuoksi testattiin määrittelyä myös tuotekehityksen Tnl välikerroksella. Tämä välikerros sisältää epäspesifistä sitoutumista vähentäviä estoaineita. Taulukossa 10 on esitetty uudella välikerroksella tehtyjen immunomäärittysten toimivuusparametrit. Tämän testin perusteella myös uusien leimareagenssien avulla valmistettujen PCT kui-
vareagenssikaivojen valmistuksessa käytettiin tuotekehityksen Tnl spesifistä väliker-
rosta.

Taulukko 10. Leimavasta-aineiden immunomäärittelyksistä lasketut parametrit (tuotekehi-
tyksen Tnl välikerros).

	TEKES-Eu (ref)	Leima-1	Leima-2
Määrittelyn taustasignaali	479	306	1 215
Std B variaatio (CV %)	7.8	13.0	15.3
Std B spesifinen signaali	451	999	1 286
Herkkyys (10 % CV)			
ng/L (std B)	0.043	0.010	0.032

6.3 Kuivareagenssikaivojen testaustulokset

Opinnäytetyössä valmistetut kuivareagenssikaivot testattiin uudella AURA immu-noanalysaattorilla kappaleen 5.4 mukaisesti. Tarkoituksena oli verrata uusien biotinylointireagenssien toimivuusparametreja referenssimääritykseen (AQT PCT ja Kaivo14-ref). Opinnäytetyön varsinainen tulos uusien biotinylointireagenssien osalta saadaan vertaamalla uudella analysaattorilla määritettyjen tulosten toimintaparametreja (herkkyys ja variaatiokerroin) keskenään.

6.3.1 PCT reagenssikaivojen tulokset

PCT vasta-aineella biotinyloituja reagensseja testattiin kolmella eri leimareagenssivaihtoehdolla. Referenssi TEKES-Eu leimareagenssia käyttämällä valmistetut kuivareagenssikaivot (AQT PCT, Kaivo2-Kaivo6) testattiin kappaleen 5.4.1 mukaisesti käyttäen inkubaatioaikaslottia 6 (ref). Lisäksi inkubaatioaikasloteilla 3 ja 1 testattiin reagenssivaihtoehdot AQT PCT, Kaivo2 ja Kaivo6. Samoilla näytteillä testattiin myös AQT PCT käyttäen kalibroitua AQT90 FLEX analysaattoria. Kuivareagenssien kokoonpanot ovat nähtävissä Taulukossa 3. Kuivakaivovaihtoehdoilla AQT PCT, Kaivo2-Kaivo6 saadut toimivuusparametritulokset ovat nähtävissä Taulukossa 11. Samassa taulukossa on nähtävillä myös AQT90 FLEX analysaattorilla saadut tulokset. Vertailtavina toimivuusparametreinä käytettiin näytteiden PCT LOW kontrolli (0.66 ng/L), HPL3 (0.085 ng/L) ja EPL3 (0.053 ng/L) herkkyksiä 10 % variaatiokertoimella.

Taulukko 11. PCT määrittysten toimivuusparametrit AURA inkubaatioaikasloteilla 6, 3 ja 1 sekä AQT90 FLEX analysaattorilla.

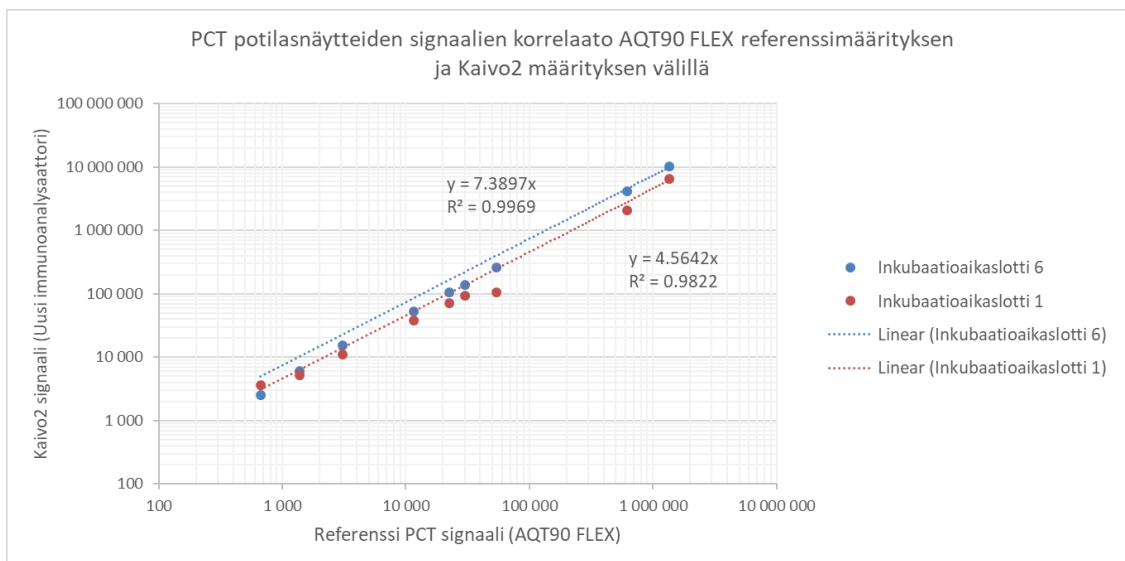
	Inkubaatioaikaslotti 6						Inkubaatioaikaslotti 3			Inkubaatioaikaslotti 1			AQT
	AQT PCT	Kaivo2	Kaivo3	Kaivo4	Kaivo5	Kaivo6	AQT PCT	Kaivo2	Kaivo6	AQT PCT	Kaivo2	Kaivo6	AQT PCT
Taustasignaali	3 849	2 089	2 382	2 342	2 205	2 454	3 174	1 913	1 935	2 738	1 953	1820	683
LOW Ctrl													
spesifinen signaali	27 616	24 693	29 059	20 580	25 357	29 748	30 871	24 691	33 374	23 028	21 342	28 237	4 313
LOW Ctrl herkkyys (10 % CV, ng/L)	0.015	0.009	0.009	0.012	0.009	0.009	0.014	0.010	0.008	0.015	0.010	0.009	0.021
HP L3 spesifinen signaali	2 749	3 192	2 256	2 343	2 504	3 153	2 434	3 468	3 101	2 137	3 285	2 686	433
HP L3 herkkyys (10 % CV, ng/L)	0.024	0.011	0.018	0.017	0.015	0.013	0.022	0.009	0.011	0.021	0.010	0.011	0.027
EP L3 spesifinen signaali	1 345	2 203	2 065	1 189	1 642	1 880	1 296	2 190	1 978	1 371	1 769	1828	229
EP L3 herkkyys (10 % CV, ng/L)	0.030	0.010	0.012	0.021	0.014	0.014	0.026	0.009	0.010	0.020	0.012	0.010	0.032
Herkkyksien KA (10 % CV, ng/L)	0.023	0.010	0.013	0.017	0.013	0.012	0.021	0.009	0.010	0.019	0.011	0.010	0.027

Potilasnäytteet (Taulukko 5) testattiin uudella AURA analysaattorilla PCT kuivakaivo- vaihtoehtoilla AQT PCT, Kaivo2 ja Kaivo6 inkubaatioaikasloiteilla 6 ja 1. Kalibroidun AQT90 FLEX PCT määrittelyn tuloksia käytettiin potilasnäytteiden pitoisuuksina. Jokaisesta potilasnäytteestä laskettiin herkkyys 10 % variaatiokertoimella (Kaava 9). Taulukossa 12 on esitetty testattujen potilasnäytteiden herkkyydet.

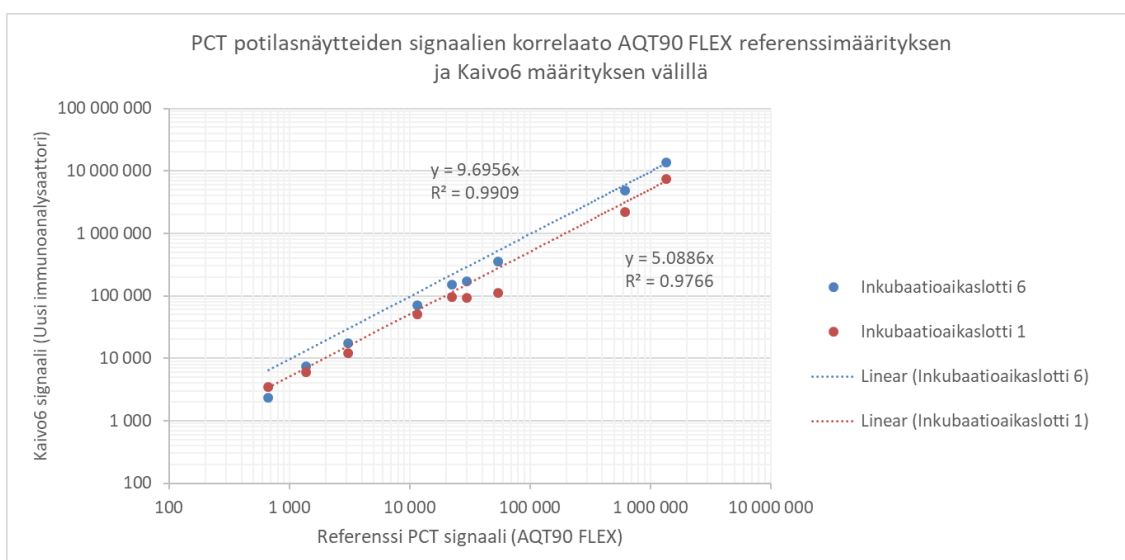
Taulukko 12. Potilasnäytteiden herkkyydet reagenssivaihtoehtoilla AQT PCT, Kaivo2 ja Kaivo6.

Potilasnäyte	AQT PCT		Kaivo2		Kaivo 6	
	Slot 6	Slot 1	Slot 6	Slot 1	Slot 6	Slot 1
P1, 0.14 ng/L	0.072	0.026	0.023	0.015	0.030	0.014
P2, 3.69 ng/L	0.017	0.023	0.011	0.016	0.011	0.014
P3, 6.24 ng/L	0.012	0.028	0.010	0.023	0.009	0.019
P4, 73.7 ng/L	0.004	0.007	0.003	0.004	0.003	0.003
P5, 0.18 ng/L	–	–	0.013	0.014	0.012	0.011
P6, 0.37 ng/L	–	–	0.010	0.013	0.010	0.011
P7, 1.18 ng/L	–	–	0.009	0.012	0.008	0.008
P8, 2.15 ng/L	–	–	0.008	0.012	0.007	0.008
P9, 29.8 ng/L	–	–	0.003	0.006	0.003	0.005
Herkkyysien KA (10 % CV)	0.026	0.021	0.010	0.013	0.010	0.010

Kaivo2 ja Kaivo3 määrittysten potilasnäytesignaalien korrelaatio AQT90 PCT määrittelyn signaaleihin verrattuna on nähtävillä Kuvio 1 ja Kuvio 2. Korrelaation avulla voidaan nähdä mittaako uudet määrittykset uudella AURA immunoanalyyttorilla samaa kuin referenssimäärittys AQT90 FLEX analysaattorissa. Mitä lähempänä korrelaatiokerroin R2 on lukua 1.0, sitä vahvempi määrittysten välinen korrelaatio on.



Kuvio 1. PCT potilasnäytesignaalien korrelaatio referenssiin Kaivo2 reagenssikaivoilla.



Kuvio 2. PCT potilasnäytesignaalien korrelaatio referenssiin Kaivo6 reagenssikaivoilla.

Koska herkkyys lisäksi yhtenä vertailtavana toimintaparametrina käytettiin määrityksen variaatiota, laskettiin AQT PCT, Kaivo2 ja Kaivo6 määritysten RMS CV arvot. RMS CV laskettiin Kaava 10 avulla. Taulukossa 13 on esitetty näiden määritysten RMS CV arvot. Arvojen laskemiseen on käytetty näytteiden LOW PCT Ctrl, HPL3 ja EPL3 variaatiokertoimet inkubaatioaikasloiteilla 6, 3 ja 1.

Taulukko 13. Reagenssikaivojen Kaivo1-ref, Kaivo2 ja Kaivo6 RMS CV arvot.

	Kaivo1-ref	Kaivo2	Kaivo6
RMS CV	4.5	10.1	3.6

PCT reagenssikaivot uusilla leimavasta-aineilla (Kaivo7-Kaivo13) testattiin kappaleen 5.4.1. mukaisesti. Reagenssikaivovaihtoehdoilla Kaivo7-Kaivo12 leimavasta-aineena käytettiin reagenssia Leima-1 ja vaihtoehdolla Kaivo13 reagenssia Leima-2 (Taulukko 3). Testaus tehtiin uudella AURA immunoanalysaattorilla käyttäen inkubaatioaikaslottia 6 ja referenssinä käytettiin AQT PCT AURA-tuloksia. Taulukossa 14 on esitetty PCT reagenssikaivojen toimivuusparametrit leimavasta-aineella Leima-1 ja Taulukossa 15 leimavasta-aineella Leima-2 sekä vertailuna AQT PCT tulokset.

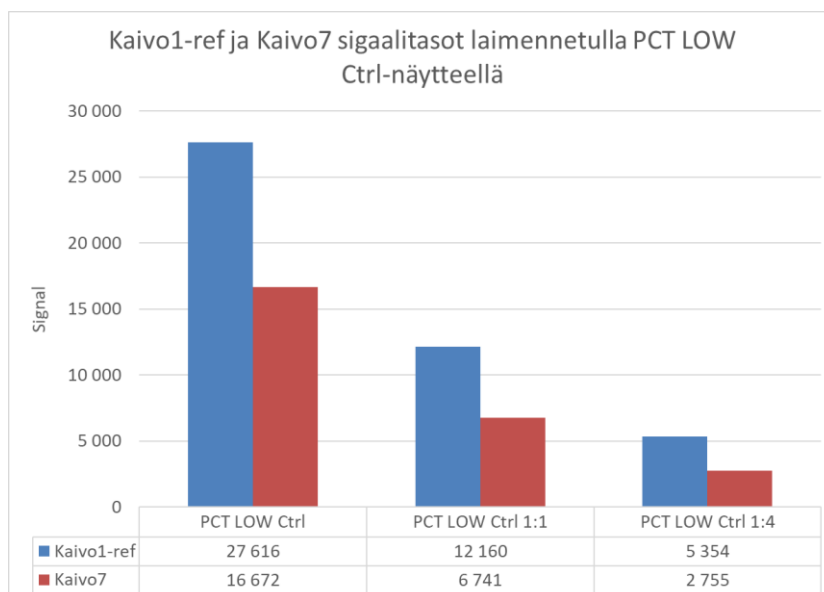
Taulukko 14. Reagenssikaivojen Kaivo7-Kaivo12 toimivuusparametrit.

	Kaivo7	Kaivo8	Kaivo9	Kaivo10	Kaivo11	Kaivo12
Taustasignaali	3 071	2 620	2 505	2 421	2 394	2 718
LOW Ctrl CV%	7.6	0.3	3.2	3.8	4.5	2.9
LOW Ctrl spesifinen signaali	16 672	16 762	17 477	14 155	15 854	20 543
LOW Ctrl herkkyys (10 % CV, ng/L)	0.020	0.017	0.015	0.018	0.016	0.014

Taulukko 15. Reagenssikaivojen Kaivo13 sekä AQT PCT (ref) toimivuusparametrit.

	Kaivo13	AQT PCT
Taustasignaali	2 657	3 849
LOW Ctrl CV%	7.1	2.3
LOW Ctrl spesifinen signaali	13 203	27 616
LOW Ctrl herkkyys (10 % CV, ng/L)	0.024	0.015

Koska aiemman tutkimuksen (Jaakkola, 2018) mukaan uudet leimareagenssit Leima-1 ja Leima-2 antoivat NT-proBNP analyysillä korkeampaa spesifistä signaalia kuin referenssinä käytetty TEKES-Eu, testattiin uudella analysaattorilla AQT PCT ja Kaivo7 PCT LOW Ctrl:sta tehdyillä laimennoksilla. Tämän testin perusteella voitiin määrittää, johtuuko uusien leimavasta-aineiden alhainen signaalitaso määrittelyn epäspesifisestä sitoutumisesta. Kuviossa 3 on nähtävissä näytteen laimentamisen vaikutus määrittysten signaalitasoon.



Kuvio 3. PCT LOW Ctrl -näytteen laimennosten antamat signaalitasot.

6.3.2 Tnl kuivareagenssikaivojen tulokset

Opinnäytetyössä valmistettujen Troponiini I reagenssikaivojen kokoonpanot on esitetty Taulukossa 4. Tnl reagenssikaivot testattiin kappaleen 5.4.2 mukaisesti. Reagenssikavovaihtoehdot Kaivo14-ref ja Kaivo15 testattiin standardeilla ja näytteillä käyttäen inkubaatioaikasloittia 4 (ref), 3 ja 1. Saadut tulokset on esitetty Taulukossa 16. Vertailtavina toimivuusparametreinä käytettiin näytteiden HPL1-HPL4 sekä EPL1-EPL3 spesifisiä signaaleja sekä herkkyyksiä 10 % variaatiokertoimella (Kaava 9).

Taulukko 16. Reagenssikaivojen Kaivo14-ref ja Kaivo15 toimivuusparametrit inkubaatio-aikaslotteilla 4, 3 ja 1.

	Inkubaatioaikaslotti 4		Inkubaatioaikas- lotti 3		Inkubaatioaikas- lotti 1	
	Kaivo14- ref	Kaivo15	Kaivo14- ref	Kaivo15	Kaivo14- ref	Kaivo15
Taustasignaali	397	351	339	351	303	313
HPL1 spesifinen signaali	542	848	411	649	208	319
HPL1 herkkyys (10 % CV, ng/ml)	0.065	0.037	0.073	0.048	0.129	0.087
HPL2 spesifinen signaali	724	908	541	723	281	382
HPL2 herkkyys (10 % CV, ng/ml)	0.069	0.049	0.079	0.061	0.136	0.103
HPL3 spesifinen signaali	923	1 068	700	900	347	406
HPL3 herkkyys (10 % CV, ng/ml)	0.076	0.058	0.086	0.069	0.154	0.136
HPL4 spesifinen signaali	6 933	7 273	4 927	6 369	2 196	2 699
HPL4 herkkyys (10 % CV, ng/ml)	0.084	0.071	0.101	0.081	0.202	0.169
EPL1 spesifinen signaali	466	573	353	501	177	216
EPL1 herkkyys (10 % CV, ng/ml)	0.083	0.060	0.093	0.068	0.166	0.140
EPL2 spesifinen signaali	664	775	483	670	229	273
EPL2 herkkyys (10 % CV, ng/ml)	0.085	0.064	0.099	0.074	0.187	0.162
EPL3 spesifinen signaali	771	930	589	768	288	341
EPL3 herkkyys (10 % CV, ng/ml)	0.090	0.066	0.101	0.080	0.184	0.161
Herkkyksien KA (10 % CV, ng/ml)	0.080	0.059	0.090	0.069	0.165	0.137

Testattujen Tnl reagenssikaivojen keskimääräisen variaation selvittämiseksi reagenssi-kaivovaihtoehtojen Kaivo14-ref ja Kaivo15 RMS CV arvot (Kaava 10) laskettiin kaikista määritetyistä HPL ja EPL näytteistä, käyttäen kaikkia testattuja inkubaatioaikaslotteja 4, 3 ja 1. Laskuissa käytettyjen rinnakkaisnäytteiden lukumäärä N on 5. Tnl reagenssikai-
vovaihtoehtojen lasketut RMS CV arvot on esitetty Taulukossa 17.

Taulukko 17. Reagenssikaivojen Kaivo14-ref ja Kaivo15 RMS CV arvot.

	Kaivo14-ref	Kaivo15
RMS CV	3.4	7.4

7 PÄÄTELMÄT

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia, pystytäänkö uusien biotinylointireagenssien sekä uuden kehitteillä olevan immunoanalysaattorin yhdistelmällä nopeuttamaan PCT määrittelyn läpimenoaikaa. Tavoitteen toteutumisen edellytyksenä oli, ettei määrittelyn nopeutuminen vaikuttaisi sen tärkeimpiin toimintaparametreihin, kuten herkkyyteen tai variaatioon. Herkkyyden raja-arvona pidettiin AQT90 FLEX analysaattorin PCT herkkyysvaatimusta, joka on 0.033 ng/L. Variaation tulee olla mahdollisimman alhainen, mutta ehdoton vaatimus sille oli AQT90 FLEX analysaattorin PCT variaatiokerroinvaatimus, alle 10 % CV PCT pitoisuudessa 0.05 ng/L.

AQT90 FLEX referenssiajoissa saavutettiin testatuilla näytteillä PCT herkkyyden keskiarvoksi 0.027 ng/L (Taulukko 11). Referenssimäärittelyn inkubaatioaikaslottina käytettiin nykyisen PCT määrittelyn vaatimaa inkubointiaikaa, eli inkubaatioaikaslottia 8. Näin ollen AQT referenssimäärittelyn inkubaatioaika oli 16 min. Uudella kehitteillä olevalla immunoanalysaattorilla testatun PCT referenssimäärittelyn inkubaatioaikana käytettiin inkubaatioaikaslottia 6, eli 15 min 54 s. Tälle määrittelykselle saatiin herkkyyden keskiarvoksi 0.023 ng/L (Taulukko 11).

Manuaalisessa immunomäärittelyssä, jossa reagenssit olivat liuosmuotoisina, uusilla biotinylointireagensseilla ei nähty etua määrittelyn herkkyydessä (Taulukko 7). Syytä tähän ei varmasti tiedetä, mutta näyttäisi siltä, että uudet biotinylointireagenssit kestävät kuivausta paremmin kuin referenssimäärittely. Opinnäytetyön tavoitteena olikin nähdä, toimiiko uudet reagenssit paremmin kuivakaivoissa. Uusien biotinylointireagenssien avulla ja referenssi TEKES-Eu leimavasta-aineella valmistettujen kuivareagenssikaivojen määrittystulokset näyttivät olevan herkkyyden osalta parempia kuin referenssimäärittely. Inkubaatioaikaslotilla 6 testattujen uusilla biotinylointireagenssien avulla valmistettujen kuivareagenssikaivojen (Kaivo2-Kaivo6) herkkyydet vaihtelivat välillä 0.010–0.017 ng/L referenssimäärittelyn herkkyyden ollessa 0.023 ng/L (Taulukko 11).

Jatkotesteihin inkubaatioaikasloiteilla 3 ja 1 valittiin diSH-BIO1 -reagenssilla sekä BMCC -reagenssilla valmistetut PCT reagenssikuivakaivot (Kaivo2 ja Kaivo6). Jatkotesteihin valintaan vaikuttivat herkkyyden lisäksi biotinylointireaktion onnistuminen sekä reagenssin syntetisoinnin helppous. BMCC reagenssi on kaupallinen, joten sitä ei tarvitse syntetisoida RTKU:n laboratoriossa. Lisäksi sen biotinylointireaktion saanto-% oli korkea (Taulukko 6) sekä sitoutumiskapasiteetti hyvä, koska sille on jo aiemmin tehty optimoin-

tia RTKU:n tuotekehityksessä. diSH-BIO1 syntetisoidaan itse, mutta sen syntetisointiprosessi oli helpompi muihin biotinylointireagensseihin verrattuna. Lisäksi myös sen biotinylointireaktion saanto-% on korkeahko.

Inkubaatioaikaslotilla 3 määritettyjen näytteiden herkkyysien keskiarvot näillä kuivakäivovaihtoehtoilla olivat välillä 0.009–0.010 ng/L, referenssin herkkyys ollessa 0.021 ng/L (Taulukko 11). Uuden analysaattorin määrittämisessä inkubaatioaikaslotilla 3 tarkoittaa inkubaatioaikaa 7 min 29 s. Inkubaatioaikaslotilla 1 testattujen AQT PCT referenssin sekä diSH-BIO1 (Kaivo2) ja BMCC (Kaivo6) määrittämis tulokset uudella immunoanalysaattorilla näyttivät olevan herkkyysien osalta samaa tasoa kuin inkubaatioaikaslotilla 6 ja 3 testatut näytteet. Referenssimäärittämis AQT PCT herkkyysien keskiarvon ollessa 0.019 ng/L, Kaivo2 määrittämis herkkyys oli 0.011 ng/L ja Kaivo6 määrittämis herkkyys oli 0.010 ng/L (Taulukko 11). Uuden analysaattorin määrittämisessä inkubaatioaikaslotilla 1 tarkoittaa inkubaatioaikaa 2 min 29 s. Suurin tekijä määrittämis hyvän herkkyysien pysyvyyteen inkubaatioajasta riippumatta liittyy määrittämis taustasignaaliin. Kaikilla testatuilla kuivakäivovaihtoehtoilla myös määrittämis taustasignaali laski inkubaatioajan laskeudessa. Määrittämis herkkyysien laskukaava (Kaava 9) huomioi näytteen spesifisen signaalin lisäksi myös määrittämis taustasignaalin. Inkubaatioajan laskeudessa, tunnetusti myös näytteestä saatava signaali pienenee. Opinnäytetyössä testatuilla kuivakäivoilla määrittämis tausta näytti kuitenkin laskevan samassa suhteessa näytteen signaalien kanssa, joten vaikutus herkkyysien oli pieni.

PCT potilasnäytteiden antamien signaalien korrelaatio AQT90 FLEX referenssimäärittämiseseen verrattuna oli hyvät molemmilla testatuilla reagenssikäivovaihtoehtoilla Kaivo2 ja Kaivo6 (Kuvio 1 ja Kuvio 2). Korrelaatiokertoimet inkubaatioaikaslotilla 6 olivat $R^2 = 0.9969$ (Kaivo2) ja $R^2 = 0.9909$ (Kaivo6) ja inkubaatioaikaslotilla 1 korrelaatiokertoimet olivat $R^2 = 0.9822$ (Kaivo2) ja $R^2 = 0.9766$ (Kaivo6). Korrelaatio on sitä voimakkaampi, mitä lähempänä lukua 1.0 se on. Saatujen korrelaatiokertoimien perusteella voidaan päätellä, että opinnäytetyössä valmistetut PCT reagenssikäivot mittaavat reagenssikäivosta samaa kuin referenssimäärittämis.

Uusilla leimareagensseilla ei saatu odotettua parannusta määrittämis herkkyysien. Aiempien tutkimusten (Jaakkola, 2018) perusteella kuivakäivojen näytteestä antaman spesifisen signaalin odotettiin Leima1 ja Leima2 reagensseilla olevan kaksi kertaa korkeampia kuin referenssileima TEKES-Eu:lla. Näin ei kuitenkaan ollut, vaan uudet leimareagenssit antoivat vain noin 60 % referenssileimalla valmistettujen kuivakäivojen signaalista (Taulukko 14 ja Taulukko 15). Tämä ei ilmeisesti kuitenkaan johtunut määrittä-

sen epäspesifisestä sitoutumisesta, koska siinä tapauksessa näytteen antaman signaalin olisi pitänyt nousta referenssimääritystä voimakkaammin näytettä laimennettaessa (Kuvio 3). Uusien leimareagenssien mahdollinen käyttö tulevaisuudessa PCT määrittelyssä vaatiikin vielä lisätästä ja optimointia esimerkiksi vasta-aineeseen konjugoinnin osalta. Opinnäytetyössä saatiin kuitenkin optimoitua Leima1 ja Leima2 reagenssien avulla suoritettavaa PCT määrittelyä vaihtamalla PCT spesifinen välikerros tuotekehityksen Tnl spesifiseen välikerrokseen. Näin saatiin määrittelyn taustaa laskettua huomattavasti (Taulukko 9 ja Taulukko 10). Uusien leimareagenssien tutkimusta tämän opinnäytetyön puitteissa ei kuitenkaan jatkettu, koska ne eivät antaneet referenssi TEKES-Eu -leimaa parempia tuloksia.

Opinnäytetyössä haluttiin myös testata, saadaanko diSH-BIO1 biotinylointireagenssilla etua tuotekehityksessä olevaan Tnl määrittelyyn, jossa käytössä on BMCC biotinylointireagenssi. Inkubaatioaikasloiteilla 4, 3 ja 1 testattujen Kaivo14-ref (BMCC) ja Kaivo15 (diSH-BIO1) tulosten perusteella nähtiin, että diSH-BIO1 biotinylointireagenssin avulla valmistettujen kuivareagenssikaivojen antamien spesifisten signaalien taso on keskimäärin noin 12 % korkeampi kuin BMCC:n (Taulukko 16). Tämä parantaa Kaivo15 määrittelyn herkkyyttä verrattuna referenssimääritykseen Kaivo14-ref. Inkubaatioaikaslotilla 4 mitattujen herkkyyksien keskiarvot olivat 0.08 ng/ml (Kaivo14-ref) ja 0.06 ng/ml (Kaivo15). Inkubaatioaikaslotilla 3 testattujen määrittelysten keskimääräiset herkkyydet olivat 0.09 ng/ml sekä 0.07 ng/ml ja inkubaatioaikaslotilla 1 enää 0.165 ng/ml ja 0.137 ng/ml. Herkkyyksien heikentymiseen inkubaatioajan laskiessa näyttäisi vaikuttavan jo alun perin matala taustasignaali. Taustasignaalin lasku verrattuna näytteiden signaalitason laskuun ei ole riittävä ylläpitämään määrittelyn herkkyyttä. Tuotekehityksen Tnl määrittelyn tärkeimpänä toimintaparametrinä nähdään sen herkkyys, eikä määrittelyn läpimenoaika ole tarvetta laskea. Näin ollen diSH-BIO1 reagenssi näyttäisi hyvältä vaihtoehdolta BMCC reagenssiin verrattuna. Toisaalta diSH-BIO1 biotinylointireaktion huonompi saanto-% ja sitoutumiskapasiteettitulo (Taulukko 6) sekä määrittelyn suurempi variaatio (Taulukko 17) BMCC reagenssiin verrattuna tarkoittaa, että sen käyttöönotto vaatii useiden eri prosessien optimointia.

Määrittelysten herkkyyksien laskemiseen käytetty kaava (Kaava 9) käyttää oletusvariaatiokertoimen arvoa 10 % CV. Todellisuudessa määrittelyn herkkyyteen vaikuttaa myös sen variaatio, joten variaatiokertoimen halutaan olevan mahdollisimman pieni. Tässä opinnäytetyössä referenssimäärityksinä käytettiin RTKU:n tuotannon valmistamia PCT reagenssikuivakaivoja ja RTKU:n tuotekehityksen valmistamia Tnl reagenssikaivoja,

joiden valmistusprosesseja on optimoitu pitkälle. Opinnäytetyössä valmistettujen biotinyloitujen vasta-aineiden tai kuivareagenssikaivojen valmistusprosessia ei ollut millään tavalla optimoitu, joten niistä aiheutuvien variaatiolähteiden oletetaan olevan suurempia kuin referenssimääritysten. Tämän vuoksi päädyttiin vertailemaan 10 % CV variaatiokertoimella laskettuja herkkyyksiä. Määrityksistä laskettujen RMS CV arvojen (Taulukko 13 ja Taulukko 17) perusteella voidaan kuitenkin nähdä, että diSH-BIO1 rea-genssilla valmistettujen kuivareagenssikaivojen variaatio oli muita vertailtuja biotinylointi-reagensseja korkeampi läpi testien. Tämä luultavasti tarkoittaa, että diSH-BIO1 biotinylointireaktio vaatii vielä optimointia.

Loppupäätelmänä voidaan sanoa, että opinnäytetyön tarkoituksena ollut PCT määrityksen läpimenoajan nopeuttaminen uudella immunoanalysaattorilla on mahdollista. Testien avulla laskettujen herkkyyksien perusteella PCT määrityksen inkubaatioajaksi joko diSH-BIO1 tai BMCC biotinylointireagenssien sekä uuden analysaattorin yhdistelmällä riittää yksi inkubaatioaikaslotti. Tällöin PCT määrityksen inkubaatioajaksi jää 2 min 29 s ja läpimenoajaksi 7 min 50 s. Nykymäärityksen läpimenoaika AQT90 FLEX analysaattorissa on 20 min 18 s, joten parannusta läpimenoaikaan saadaan 12 min 28 s. Myös PCT referenssimäärityksellä päästään herkkyyksivaatimukseen 0.033 mg/L inkubaatioaikaslotilla 1, mutta diSH-BIO1 ja BMCC reagensseilla määrityksen herkkyyks näyttäisi samalla inkubaatioajalla olevan noin kaksi kertaa parempi. BMCC reagenssin biotinylointireaktion toimivuus, sekä sillä valmistettujen reagenssikaivojen pieni variaatio tekee siitä diSH-BIO1 reagenssiin nähden paremman vaihtoehdon. On kuitenkin otettava huomioon, että opinnäytetyössä testattujen näytteiden ja rinnakkaisnäytteiden lukumäärä on suhteellisen pieni, joten varmuuden saamiseksi tarvitaan vielä lisätestausta. Tämän tutkimuksen luotettavuutta kuitenkin lisää se, että tulokset ovat olleet saman suuntaisia läpi tutkimuksen.

LÄHTEET

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G., Carcillo J., Pinsky MR. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29(7):1303-1310.

AQT90 FLEX esite. 2018. Point-Of-Care biomarker testing made simple. Viitattu 26.10.2020. Radiometer Medical ApS, 2700 Brønshøj, Denmark. Saatavilla verkosta: <https://www.radiometer.com/-/media/radiometer/corporate/files/campaigns/aqt90-flex-brochure.pdf>

Chenevier-Gobeaux, C., Deweerdt, L., Canteroc, A-V., Renaud, B., Desmaizière, B., Charpentier, S., Lerou, A., Adelaïde, E., Collin-Chavagnac, D., Bonnefoy-Cudraz, E., Estepak, L., Chekroun, A., Bascom, S., Andrieu, S., Bourgeois, S., Costat, M-A., Vallejo, C., Robert, T., Ouahab, S., Baudint, B., Beneteau-Burnatt, B., Gorce-Dupuy, A-M., Ray, P., Dehoux, M., Lefèvre, G. 2018. Multi-centre evaluation of recent troponin assays for the diagnosis of NSTEMI. *Practical Laboratory Medicine* 11 (2018) 23–32.

Frenzel, A., Hust, M., Schirrmann, T. 2013. Expression of Recombinant Antibodies. *Frontiers in Immunology* 2013, Vol.4, p.217-217.

Hemmilä, I. & Laitala, V. 2005. Progress in Lanthanides as Luminescent Probes. *Journal of Fluorescence*, Volume 15, Issue 4, 529-542.

Hemmilä, I. 1991. Applications of fluorescence in immunoassays. United States of America. John Wiley & Sons, Inc.

Hermanson, G. 2013. Bioconjugate Techniques. 3rd edition. United Kingdom. Elsevier Science & Technology

Hytest. Datasheet Monoclonal mouse anti-cardiac troponin I (cTnI) (4T21 / 4T21cc). Viitattu 26.10.2020. Saatavilla verkosta: https://shop.hytest.fi/spree/products/3168/4T21_Anti-cTnI.pdf?1589372413

Hytest. Datasheet Monoclonal mouse anti-human calcitonin (4C10 / 4C10cc). Viitattu 26.10.2020. Saatavilla verkosta: https://shop.hytest.fi/spree/products/3520/4C10_Anti-Calcitonin.pdf?1592987866

Lövgren, T., Meriö, L., Mitrunen, K., Mäkinen, M.L., Mäkelä, M., Blomberg, K., Palenius, T. & Pettersson, K. 1996. One-step all-in-one dry reagent immunoassays with fluorescent europium chelate label and time-resolved fluorometry. *Clinical Chemistry*, Volume 42, Issue 8, Part 1, 1196-1201.

Meisner M., 2010. Procalcitonin - Biochemistry and Clinical Diagnosis. 1st edition. UNI-MED Science.

Meulenberg E. 2012. Antibodies Applications and New Development. 1st edition. The Netherlands. Bentham Science Publishers.

Mikael Jaakkola. 2018. Fluoresoivilla europium-kelaateilla leimatun vasta-aineen toimivuus NT-proBNP-immunomäärityksessä. Opinnäytetyö (YAMK) Turun Ammattikorkeakoulu.

Radiometer Turku Oy perehdytysmateriaali. Viitattu 03.10.2020.

Rodenko, O., Eriksson, S., Tidemand-Lichtenberg, P., Trolborg, C. P., Fodgaard, H., Van Os, S., Pedersen, C. 2017. High-sensitivity detection of cardiac troponin I with UV LED excitation for use in point-of-care immunoassay. *Biomedical Optics Express*, 8(8), 3749-3762.

Rodenko, O., Fodgaard, H., Tidemand-Lichtenberg, P., Petersen, P. M., Pedersen, C. 2016. 340 nm pulsed UV LED system for europium-based time-resolved fluorescence detection of immunoassays. *Optics Express*. Volume 24, Issue 19.

Rowland, T., Hilliard, H., Barlow, G. 2015. Procalcitonin: Potential Role in Diagnosis and Management of Sepsis. *Advances in Clinical Chemistry*, Volume 68. Elsevier Inc.

Schumacher, F., Nunes, J., Maruani, A., Chudasama, M., Smith, M., Chester, K., Baker, J., Cad-dick S. 2014. Next generation of maleimides enable the controlled assembly of antibody – drug conjugates via native disulfide bond bridging. *Organic & Biomolecular Chemistry* 2014, 12, 7261.

Stephenson, F. 2003. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory*. Amsterdam; Boston: Academic Press.

Sztefko, K. 2011. *Immunodiagnostics and Patient Safety*. De Gruyter Inc.

Thermo Scientific. EZ-LinkBMCC-Biotin (21900) Instructions manual. MAN0016375. Rev. A.0. Pub. Part No. 2160466.4. Viitattu 12.11.2020. Saatavilla verkosta: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0016375_2160466_EZ_Link_BMCC_Biotin_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTo-gRVotTGlualyBCTUNDLUJpb3RpbG==

Thermo Scientific. TCEP-HCl (20490) Instructions manual. 0647.5. Viitattu 12.11.2020. Saatavilla verkosta: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011306_TCEP_HCl_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogIFRDRVAgSENs

Vylegzhanina, A., Kogan, A., Katrukha, I., Antipova, O., Kara, A., Berezikova, A., Koshkina, E., Katrukha, A. 2017. Anti-Cardiac Troponin Autoantibodies Are Specific to the Conformational Epitopes Formed by Cardiac Troponin I and Troponin T in the Ternary Troponin Complex. *Clinical Chemistry* 63:1, 343–350.

Wild D. 2013. *The Immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques*. 4th edition. United Kindom. Elsevier Inc.

