

Opinnäytetyö (AMK)

Insinööri

NBIELS11

2017

Tytti Teerimäki

ANTIGEENILIUOSANNOSTELI- JAN KARAKTERISOINTI

Tytti Teerimäki

ANTIGEEENILIUOSANNOSTELIJAN KARAKTERISOINTI

Opinnäytetyössä tutkittiin Troponiini I ja Troponiini T antigeenien käyttäytymistä Multidrop™ Combi reagenssiannostelijaa käytettäessä. Työn tavoitteena oli saada Radiometer Turku Oy:n tuotantoon uusi antigeeniliuosannostelija. Laitteelle oli tarvetta, koska edellinen antigeeniliuosannostelija ei enää vastannut vaatimuksia. Multidropin soveltuvuutta testattiin karakterisoinnin periaatteiden mukaisesti.

Tutkimus toteutettiin Radiometerin tuotantotiloissa, kuivakaivovalmistuksessa, jossa edellinen antigeeniliuosannostelija on käytössä. Opinnäytetyö tehtiin tuotannon myyntierien rinnalla, jotta tuloksista saatiin mahdollisimman vertailukelpoisia. Troponiini I:tä tutkittiin kahdessa erässä ja Troponiini T:tä yhdessä erässä.

Karakterisointiin kuuluen määritettiin laitteen kapasiteetti tarkkaan annosteluun. Määrittystä varten tehtiin esiannosteluja muilla halvemmilla liuksilla. Pyrittiin saamaan mahdollisimman paljon tietoa laitteen eri parametrien käyttömahdollisuuksista ja sen kautta määritettiin parhaat asetukset laitteelle.

Testierät annosteltiin Multidropilla samanaikaisesti kuin referenssinä toimivat myyntierän kuoppalevyt annosteltiin vanhalla antigeeniliuosannostelijalla. Antigeenin jälkeen kuoppalevyille annosteltiin Europiumilla leimattua vasta-ainetta. Europiumin fluoresoivan vaikutuksen avulla pystyttiin määrittämään sitoutuneen antigeenin määrä homogeenisuustesteissä.

Homogeenisuustestien tuloksia analysoitiin SAS-ohjelmalla. Ohjelmaa käytettiin muun muassa t-testien tekemiseen ja p-arvojen laskemiseen tuloksille. Olennaista analyysissä oli näytteiden ja referenssien vertailu. Troponiini I:n ja Troponiini T:n tiedettiin poikkeavan monilta osin toisistaan, joten niiden välinen keskinäinen vertailu ei ollut mahdollista.

Analyysin perusteella Multidropilla annostellut levyt ovat vähintään yhtä hyviä kuin referenssit. Troponiini I:n tulokset olivat yhtä hyvät ja Troponiini T:n tulokset jopa paremmat kuin referensseillä. Karakterisoinnissa päästiin johtopäätökseen, että laite soveltuu antigeeniliuosannosteluun. Tulevaisuuden suunnitelmiksi päätettiin jatkaa laitteen laadunhallinnallisen prosessin loppuun viemistä.

ASIASANAT:

Antigeeni, Europium, karakterisointi, Troponiini I, Troponiini T, vasta-aine

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology

2017 | 34 pages

Tytti Teerimäki

CHARACTERIZATION OF ANTIGEN SOLUTION DISPENSER

The behavior of Troponin I and Troponin T antigens dispensed with a Multidrop™ Combi reagent dispenser was studied in this bachelor's thesis. The objective of the thesis was to provide a new antigen solution dispenser for Radiometer Turku Oy's production line. The device was needed because previous antigen solution dispenser no longer came up to expectations. The suitability of Multidrop was tested according to the principles of characterization.

The study was conducted at Radiometer's production facilities, in dry well manufacturing, where the former antigen solution dispenser is used. Thesis was conducted alongside sale batches in order for the results to be as comparable as possible. Troponin I was studied in two batches and Troponin T in one batch.

Concerning characterization, the capability of the device for precise dispensation was determined. For the evaluation, a series of pre-dispensations were conducted using cheaper solutions. As much information as possible about the use of the device parameters was sought and employed when determining optimal settings for the device.

The Multidrop test batches and the sale batches dispensed with the old antigen solution device were dispensed simultaneously. After the antigen, Europium labelled antibody was dispensed into the plates. Due to the fluorescing effect of Europium, it was possible to determine the quantity of bound antigen with homogeneity tests.

The results of the homogeneity tests were analyzed with Statistical Analysis Software. The software was used among other things to conduct t-tests and to determine p-values for the results. Essential in the analysis was to compare samples and references. It was recognized that the two troponins differ from each other, so the reciprocal comparison of the two was not possible.

According to the analysis, plates dispensed with Multidrop are at least as good as the references. The results for Troponin I were as good those for the references and the results for Troponin T were even better than those for the references. In characterization, the conclusion was drawn that the device is suitable for antigen solution dispensing. For the future, the decision to conclude the quality control process was made.

KEYWORDS:

Antibody, antigen, characterization, Europium, Troponin I, Troponin T

SISÄLTÖ

SANASTO	7
1 JOHDANTO	8
2 KARAKTERISOINTI OSANA LAADUNHALLINTAPROSESSIA	9
2.1 Laadunhallintaprosessi	9
2.2 Karakterisointi	9
2.3 Karakterisointisuunnitelma	10
2.4 Testimenetelmät	10
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	11
3.1 Kaivojen käyttötarkoitus	11
3.2 Troponiini I	12
3.3 Troponiini T	12
3.4 Antigeeniliuos	13
3.5 Leimavasta-aine	13
3.6 Multidrop Combi reagenssiannostelija	14
3.7 Parametrien testaus	15
3.8 Kuolleen tilavuuden määrittäminen	16
3.9 Annostelutilavuuden tarkistus	16
4 TYÖN SUORITUS	18
4.1 Laitteen alustus	18
4.2 Annostelu	18
4.3 Loppupesut	19
4.4 Leimavasta-aineannostelu	19
4.5 Homogeenisuusmäärittäminen	19
4.6 Tilastollinen analyysi	20
5 TULOKSET	21
5.1 Parametrien testaus	21
5.2 Annostelutilavuuksien tarkistukset	21
5.3 Ensimmäisen Troponiini I-erän tulokset	23
5.4 Toisen Troponiini I-erän tulokset	26
5.5 Troponiini T:n tulokset	28

6 JOHTOPÄÄTÖKSET	30
6.1 Parametrit	30
6.2 Määritykset	30
6.3 Käyttöönotto	31

7 LÄHDELUETTELO	32
------------------------	-----------

LIITTEET

Liite 1. Punnituslevyt.

KAAVAT

Kaava 1. Tipan tilavuus.	17
Kaava 2. Keskiarvo.	17
Kaava 3. Keskihajonta.	17
Kaava 4. Variaatiokerroin.	17

KUVAT

Kuva 1. Näytteen määrittäminen AQT-laitteessa (Eriksson, 2017).	12
Kuva 2. Multidrop Combi reagenssiannostelija (Thermo Fisher Scientific).	14
Kuva 3. Multidrop Combin annostelukasetti (Thermo Fisher Scientific).	14
Kuva 4. SAS-vertailu ensimmäiselle TnI-erälle.	25
Kuva 5. Ekvivalenssitesti ensimmäiselle TnI-erälle.	25
Kuva 6. SAS-vertailu toiselle TnI-erälle.	27
Kuva 7. Ekvivalenssitesti toiselle TnI-erälle.	27
Kuva 8. SAS-vertailu TnT-erälle.	29
Kuva 9. Ekvivalenssitesti TnT-erälle.	29

KUVIOT

Kuvio 1. Annostelutilavuuden stripsikohtainen vertailu, CLRW.	23
Kuvio 2. Annostelutilavuuden stripsikohtainen vertailu, välikerrosliuos.	23
Kuvio 3. Ensimmäisen TnI-testierän signaalitaso.	24
Kuvio 4. Ensimmäisen TnI-referenssierän signaalitaso.	24
Kuvio 5. Toisen TnI-testierän signaalitaso.	26
Kuvio 6. Toisen TnI-referenssierän signaalitaso.	27

Kuvio 7. TnT-testierän signaalitaso.	28
Kuvio 8. TnT-referenssierän signaalitaso.	29

TAULUKOT

Taulukko 1. Irtokaivopunnitus välikerrosliuksella.	15
Taulukko 2. Välikerrosannostelun uusintatesti.	16
Taulukko 3. CLRW-annostelu.	22
Taulukko 4. Välikerrosliuosannostelu.	22
Taulukko 5. Ensimmäinen TnI-erän homogeenisuustulokset.	24
Taulukko 6. Toisen TnI-erän homogeenisuustulokset.	26
Taulukko 7. TnT-erän homogeenisuustulokset.	28

SANASTO

<i>Antigeeni</i>	Molekyyli, joka aiheuttaa elimistössä immuunireaktion. Vasta-aine sitoutuu antigeeniin.
<i>AS-liuos</i>	Immunomäärityksissä käytettävä määritysliuoskonsentraatti.
<i>Biotiini</i>	Vesiliukoinen B-vitamiini, joka sitoutuu streptavidiniin voimakkaasti.
<i>Europium-kelaatti</i>	Europium-kelaatti-kompleksin avulla saadaan parannettua Europiumin absorptiokerrointa, jolloin sitä voidaan käyttää leimana fluoresenssimittauksissa.
<i>Saturointi</i>	Maksimikapasiteetti, jonka yli materiaali ei voi enää kyllästyä.
<i>Streptavidini</i>	Proteiini, jota saadaan <i>Streptomyces avidinii</i> -bakteerista.
<i>Troponiini I</i>	Sydänlihaksen rakenneproteiini, jota erittyy vereen sydäninfarktin alkuvaiheessa.
<i>Troponiini T</i>	Sydänlihaksen rakenneproteiini, jota esiintyy veressä vielä pitkään sydäninfarktin jälkeenkin.
<i>Vasta-aine</i>	Immuunijärjestelmään kuuluva proteiini, joka tunnistaa sille spesifin antigeenin.
<i>Välikerrosliuos</i>	Suojaa vasta-ainetta irtokaivossa ja estää sitä reagoimasta leimavasta-aineen kanssa. Lisäksi muodostaa sopivat olosuhteet vasta-aine-antigeenireaktiolle liuetessaan. Antigeeni annostellaan kaivoihin välikerrosliuoksessa.

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehdään Radiometer Turku Oy:n tuotannossa. Tuotannossa on tarvetta uudelle antigeeniliuoksen annostelijalle, koska nykyisellä laitteella ei pystytä annostelemaan kaikkia haluttuja liuoksia. Tuotantomäärien kasvaessa nykyinen laite on myös liian hidas. Uuden laitteen käyttöönottamiseksi tarvitaan karakterisointi, jotta voidaan todentaa sen olevan alustavasti yhtä hyvä tai parempi kuin edellinen laite. Tämän jälkeen laite voidaan validoida käyttöön.

Karakterisoinnissa tarkoituksena on selvittää laitteen soveltuvuutta haluttuun käyttöön. Laite, jolle karakterisointi tehdään, on Multidrop™ Combi reagenssiannostelija. Multidrop on ollut Radiometerilla aikaisemmassa käytössä tuotekehityksessä, joten sen tiedetään olevan helppokäyttöinen ja nopea. Tämän vuoksi se on optimaalinen tuotantokäyttöön. Tietoa siitä, miten antigeeni käyttäytyy Multidropin kanssa, ei kuitenkaan ole ennen testattu. Lähdeaineistona käytetään paljon Radiometerin sisäisiä koulutusmateriaaleja.

Opinnäytetyössä tutkitaan kahden antigeenin, Troponiini I:n (TnI) ja Troponiini T:n (TnT) käyttäytymistä annosteltuna irtokaivolle. Antigeeniliuoksen annostelussa otetaan erityisesti huomioon liuoksen ominaisuudet. Haasteina ovat liuoksen onnistunut saturointi silikoniletkuihin sekä oikeanlaisen tipan muodostaminen kaivon pohjalle. Annostelun haasteena on myös antigeenin mahdollinen vaurioituminen, esimerkiksi mekaanisesta rasituksesta. Saturoinnin onnistumista ja antigeenin säilymistä testataan homogeenisuustestien avulla.

Tavoitteena on saada yhtä hyviä tai parempia homogeenisuustuloksia kuin nykyisellä laitteella. Referensseinä toimivat samanaikaisesti nykyisellä laitteella annostellut myyntierässä käytetyt kaivot.

2 KARAKTERISOINTI OSANA LAADUNHALLINTAPROSESSIA

Karakterisoinnilla tarkoitetaan laitteen soveltuvuuden määrittämistä haluttuun tarkoitukseen. Laitteen rakenne tai toiminta saattavat asettaa rajoitteita, joiden vuoksi laitetta ei voida käyttää toivotusti. Tällaiset esteet eivät ole aina ylitettävissä ja niiden varhaisella havaitsemisella säästytään resurssien tuhlaamiselta.

2.1 Laadunhallintaprosessi

Laitteen käyttöön saattaminen on prosessi, joka koostuu monesta eri vaiheesta. Prosessi aloitetaan karakterisoinnilla. Jos karakterisoinnissa päästään johtopäätökseen, että laite soveltuu käyttöön, aloitetaan laitteen kvalifiointi. Kvalifioinnissa varmistetaan, että laite täyttää laadulliset kriteerit, jotka ovat erityisen tärkeitä diagnostiikkateollisuudessa. Kvalifiointi on yleisesti jaettu neljään eri vaiheeseen; suunnitelman tarkastukseen (design qualification, DQ), asennus- ja vastaanottotarkastukseen (installation qualification, IQ), toiminnan tarkastukseen (operational qualification, OQ) ja suorituskyvyn tarkastukseen (performance qualification, PQ). Laitteen kvalifioinnin yhteydessä voidaan aloittaa myös prosessin validointi (Sippola, 2004). Kaikki nämä laadunhallinnalliset toimenpiteet ovat osa suurempaa kansainvälistä laatujärjestelmää. Opinnäytetyössä tutkitaan karakterisointia, mutta koko laadunhallinnallisen prosessin tunteminen on tärkeää mahdollisia tulevia toimenpiteitä varten.

2.2 Karakterisointi

Karakterisoinnissa otetaan huomioon laitteen ja annosteltavan liuoksen lisäksi ympäröivät olosuhteet. Lopputuotteen halutaan olevan mahdollisimman puhdas, joten tuotanto suoritetaan kontrolloidussa tilassa. Ilmanpaine ja lämpötila vaikuttavat liuoksen ominaisuuksiin, joten karakterisoinnin on tapahduttava myös samoissa olosuhteissa ja samassa tilassa. Antigeeni ja vasta-aineet kontaminoituvat herkästi, joten niiden käsittelyssä tulee noudattaa erityistä varovaisuutta. Karakterisoinnissa otetaan huomioon myös tuotannolliset asiat, kuten erä koko. Karakterisoinnissa on tiedettävä, kuinka suuri määrä on mahdollista valmistaa laitteella. Opinnäytetyössä tutkittavan antigeeniliuok-

sen maksimi erä koko on 151 kuoppalevyä. Karakterisoinnissa käytetään samaa le-
vymäärää. (Hautala, 2016)

2.3 Karakterisointisuunnitelma

Karakterisointi aloitetaan laitteeseen tutustumisella ja karakterisointisuunnitelman kir-
joittamisella. Suunnitelmassa määritetään karakterisoinnin tavoitteet. Tavoitteina on
tunnistaa mahdolliset haasteet ja varautua niihin, sekä saada laite tulevaisuudessa
käyttöön. Haasteena on Troponiini I-kompleksin herkkyys lämmölle ja mekaaniselle
rasitukselle. Suunnitelmassa esitetään myös liuoslaskut, joiden avulla arvioidaan ka-
rakterisoinnissa tarvittavien liuosten ja astioiden tilavuudet. (Hautala, 2016)

2.4 Testimenetelmät

Käytettävät testit karakterisoinnissa ovat kaivojen punnitustarkastukset, kaivojen visu-
aalinen tarkastelu sekä homogeenisuusmääritykset. Karakterisoinnin kannalta on hyvä,
että laitteen asetukset ovat helposti säädettävissä ja näin ollen tutkittavissa. Multidropin
kaikki parametrit ovat säädettävissä manuaalisesti. Parametrit ovat annostelutilavuus, -
nopeus, -korkeus ja esiannostelun tilavuus. Parametrien testausvaiheessa tutustutaan
laitteeseen niin hyvin, että lopulliset asetukset ovat jo tiedossa liuosten annostelutila-
vuuden tarkastuksissa. Tällöin pystytään sulkemaan pois mahdolliset laitteesta johtuvat
viat ja havaitsemaan muut vaikuttavat asiat. Parametrien testaus on esitetty seuraava-
vassa luvussa.

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

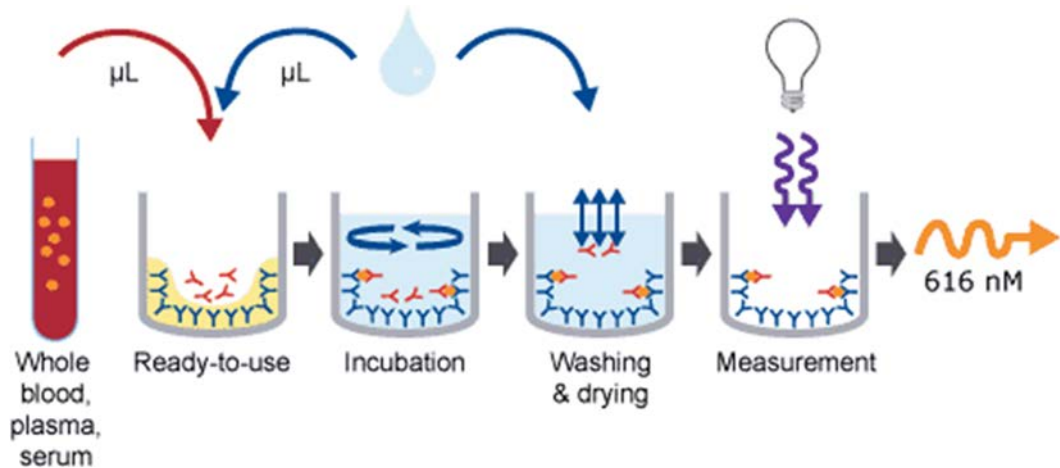
Osiassa esitetään antigeenikaivojen käyttötarkoitus. Kerrotaan käytetyt reagenssit sekä niiden kemiallinen tarkoitus prosessissa. Esitetään myös aikaisemmin prosessissa tehdyt työvaiheet kaivoille. Tnl- ja TnT-kaivojen prosessoinnit ennen antigeeniannostelua eroavat toisistaan, joten selkeyden vuoksi ne on käsitelty erikseen. Tutustutaan Multidropiin laitteena ja esitellään käytetyt testimenetelmät.

3.1 Kaivojen käyttötarkoitus

Radiometer Turku valmistaa diagnostisia analyytti- ja kalibraatiokaivoja eli kuppeja käytettäväksi AQT90 Flex-immunoanalysaattorissa. Markkinoilla on tarjolla yhdeksälle eri analyyttille soveltuvaa testiä. Analyyttikuppi koostuu seuraavissa kappaleissa esitellyistä reagensseista, mutta antigeeniliuoksen tilalla on käytetty välikerrosliuosta. Analyyttikupin avulla voidaan diagnosoida potilaan tila nopeasti suoraan verinäytteestä. Potilaan vereen erittyvä antigeeni sitoutuu kupissa olevaan vasta-aineeseen ja leimavastaineen avulla määritetään antigeenin määrä. (Kuva 1.) Kyseessä on ei-kilpaileva määrittystapa, jolloin vasta-aineet ja antigeeni muodostavat ”sandwich-rakenteen” kupissa (Cox, 2012).

Sandwich-rakenteen avulla mahdollinen antigeeni määritetään nopeasti verestä ja saadaan diagnoosi. Opinnäytetyössä tutkitaan Troponiini I ja Troponiini T antigeenien annostelua. Näiden analyyttien diagnosoimisessa aika on erityisen tärkeä tekijä, koska ne ovat sydäninfarktimarkkereita. Sydänkohtauksen sattuessa pienikin säästetty aika on tärkeä. Tämän vuoksi AQT-laitteita on käytössä muun muassa paikoissa, jossa välimatkat sairaaloihin ovat pitkiä. Kuppien säilymisen parantamiseksi, pakkauksissa käytetään silikageeliä. Silika eli piioksidi on mineraali, joka sitoo voimakkaasti kosteutta. Silikaa käytetään yleisesti muun muassa lääketeollisuudessa adsorbenttina. (Sorbent Systems, 2014)

Analyyttikupissa olevien reagenssien käyttäytyminen saattaa vaihdella eräkohtaisesti, jonka vuoksi AQT90 Flex kalibroidaan oikeille raja-arvoille ennen uuden erän tai analyttin mittausta. Kalibrointi suoritetaan antigeeniliuosta sisältävillä saman erän kalibraatiokuppeilla. Kalibraatiokuppi sisältää sitä antigeeniä, joka potilaan verestä halutaan määrittää.



Kuva 1. Näytteen määrittäminen AQT-laitteessa (Eriksson, 2017).

3.2 Troponiini I

Troponiini I:n tuotantoprosessissa käytettyihin kaivoihin on kuivakaivovalmistuksessa ensin annosteltu streptavidiinia (SA) 150 µl/kaivo. Streptavidini toimii kiinnittymisaineena halutulle vasta-aineelle. Ennen kuin streptavidiinille voidaan annostella biotinyloituja vasta-aineita, on kaivo käsitelty kyllästysliuoksella. Kyllästysliuoksen tarkoituksena on saturoida kaivon pinnat, joihin streptavidini ei ole tarttunut. Tällä estetään epäspesifi sitoutuminen, joka johtaa epähomogeenisiin määrittäytuloksiin.

Haluttu vasta-aine on biotinyloitu, jotta se kiinnittyy streptavidiniin mahdollisimman tiukasti. Biotinyloinnissa biotinylointireagenssi, joka koostuu biotiinista sekä isotiosyanaatista, on kiinnitetty vasta-aineen pinnalla oleviin aminoryhmiin. Biotinylointireaktio tehdään koska biotiinilla ja streptavidiinilla on korkea affiniteetti, joka edesauttaa spesifiä kiinnittymistä. (Katajisto, 2016) Biotinyloituja vasta-aineita on annosteltu 50 µl/kaivo. Sitoutumaton vasta-aine on pesty pois kaivoista.

3.3 Troponiini T

Troponiini T:n tuotantoprosessissa haluttua vasta-ainetta on annosteltu 70 µl/kaivo suoraan irtokaivojen pinnalle. Troponiini T vasta-aine ei kestä biotinylointiprosessia, koska alkaa silloin menettää antigeenitunnistuskäytöksensä (Rainaho, 2016). Koska vasta-aine ei sisällä biotiinia, ei tarvita myöskään SA:ta kaivon pinnalle.

3.4 Antigeeniliuos

Antigeeniliuos koostuu välikerrosliuksesta ja liuotetusta antigeenistä. Jokaisen analyysin valmistukseen käytetään spesifiä välikerrosliosta. Välikerroslioksen tehtävänä on suojata biotinyloitua vasta-ainetta sekä kuivattuna estää leimavasta-aineen reagoimista pohjavasta-aineen kanssa.

Välikerrosliuos sisältää kymmentä eri komponenttia. Tris(hydroksimetyyli)aminometaani toimii pH-puskurina luoden standardit olosuhteet (pH 7,75) reagensseille. pH vaikuttaa proteiinien varauksiin ja näin ollen vasta-aineen ja antigeenin sitoutumiseen. Natriumatsidi estää bakteerien kasvua kaivossa. D-trehaloosi on glykosakkaridi, jonka tehtävänä on pitää vasta-aineet aktiivisena välikerroskuivauksen aikana. Kaseiini muodostaa kolloidisia kaseiinimisellejä liuoksessa. (Eriksson, 2016)

Epäspesifin kiinnittymisen estämiseen käytetään natriumkloridia, joka sisältää 1:1 natriumia ja kloridi-ioneja ja jolla on osmoottinen vaikutus proteiinien liukoisuuteen. Epäspesifin kiinnittymisen estämiseksi käytetään myös naudan seerumin albumiinia, joka myös stabiloi olosuhteita kaivossa. (Eriksson, 2016)

Heterofiilinen interferenssi eli sisäisten vasta-aineiden kiinnittyminen testattavaan vasta-aineeseen estetään härän gammaglobuliinilla. Natiivi ja denaturoitu hiiren vasta-aine G estävät myös heterofiilista interferenssia sekä human-anti-mouse-antibody (HAMA) interferenssia. (Eriksson, 2016) (Bolstad, 2013)

Troponiini I:n välikerroksessa käytetään lisäksi hepariinia estämään veren hyytymistä. Troponiini T:n liuoksessa taas käytetään poly-D-lysiinia stabiloimaan vasta-ainetta, joka muuten heikentyy nopeasti. (Eriksson, 2016)

3.5 Leimavasta-aine

Analyyttikohtainen vasta-aine on leimattu Europium-kelaatilla sen fluoresoivan vaikutuksen vuoksi. Leimattu vasta-aine sitoutuu kaivossa olevaan antigeeniin, joka on sitoutunut kaivon kiinnittyneeseen biotinyloituu vasta-aineeseen. Aikaerotteista fluorometriaa käyttäen voidaan mitata kaivossa olevan leimatun vasta-aineen ja näin ollen, antigeenin määrä. Aikaerotteinen fluorometria perustuu Europiumin eksitaatio- ja emis-

sioaallonpituuksien suureen eroon sekä pieneen emissiopiikkiin. Europium-kelaatti viritetään 340 nm aallonpituudella ja emissio mitataan 616 nm aallonpituudella. (Lehtonen, 2009)

3.6 Multidrop Combi reagenssiannostelija

Multidrop™ Combi on Thermo Fisher Scientificin valmistama reagenssiannostelija. Laite koostuu kahdesta osasta; emoyksiköstä (Kuva 2.), josta säädetään näppäimistön avulla halutut asetukset sekä irrotettavasta ja tarpeen tullen vaihdettavasta kasettiosasta (Kuva 3.).



Kuva 2. Multidrop Combi reagenssiannostelija (Thermo Fisher Scientific).

Kasettiosa asetetaan laitteeseen paikoilleen vetämällä letkuja pitkittäin. Kasettia ei saa asetettua paikoilleen ilman letkujen venyttämistä. Silikoniletkut vaativat venyttämistä, jotta materiaali pääsee optimaaliseen tilaansa. Kasetti irrotetaan laitteesta käytön jälkeen, jotta letkut eivät ole jännitystilassa jatkuvasti. Irrottamisesta huolimatta, letkut kuluvat käytössä ja sen vuoksi kasetin käyttömäärää tulee seurata. (Thermo Scientific, 2005)



Kuva 3. Multidrop Combin annostelukasetti (Thermo Fisher Scientific).

3.7 Parametrien testaus

Alussa valittiin tutkittavaksi vähiten aikaa ja liuosta kuluttavat asetukset. Ne olivat annostelutilavuus 40 µl, -nopeus high, -korkeus 17,00 mm ja esiannostelu 10 µl. Annostelutilavuutta tutkittiin C12-stripsilevyjen lisäksi irtokaivolevyillä. C12-stripsilevy koostuu kahdeksasta kahdentoista kaivon rivistä. Yksittäisten kaivojen punnitsemisella tarkasteltiin stripsin eli kaivorivin sisäistä variaatiota. Testissä havaittiin suurta vaihtelua välikerrosliuoksen irtokaivojen punnitustuloksissa ensimmäisen sarakkeen ja levyn muiden sarakkeiden välillä, mikä on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Irtokaivopunnitus välikerrosliuoksella.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	29	41	40,7	40,7	40,6	40,5	40,4	40,4	40,3	40,1	40,1	40
B	35,8	41,2		41,1	40,8	40,9	41		40,7		40,3	40,2
C	33,8		41		40,8	40,8	40,8	40,5		40,2		40,1
D	32,9	41,3		41,1	41	40,9	40,6		40,6		40,4	40,3
E	28,5		41,4		41,3	41,3	41	41		40,6		40,8
F	29,9	41,6		41,2	41,2	41,2	41		40,9		40,6	40,5
G	28,9		40,9		40,9	40,9	40,8	40,7		40,5		40,2
H	29,2	41,2	40,9	41	40,8	40,7	40,7	40,5	40,6	40,5	40,4	40,1

Annostelu uusittiin C8-stripsilevyille, joka koostuu kahdestatoista kahdeksan kaivon sarakkeesta. C8-levyllä määritetään tilavuuksia sarakkeittain, jonka vuoksi se valittiin kyseiseen määritykseen. Punnitustulos oli testin rajojen sisällä, mutta ensimmäisen sarakkeen arvot ovat edelleen muita selvästi pienempiä. Multidrop annostelee levyn vasemmalta oikealle, joten huonon tuloksen antava sarake on ensimmäisenä annosteltu sarake. Laitteen esiannostelutoiminnon mahdollista vaikutusta testattiin nostamalla esiannostelun tilavuus 20 µl. Taulukosta 2 ilmenee, miten esiannostelun noston myötä sarakkeiden väliset erot tasaantuivat. Päädyttiin käyttämään tulevissa annosteluissa 20 µl tilavuutta esiannosteluna.

Taulukko 2. Välikerrosannostelun uusintatesti.

Sarake	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Esiannostelu 10 µl	37,7	40,1	40,1	40,0	40,0	39,9	39,9	39,8	39,8	39,8	39,7	39,5
Esiannostelu 20 µl	39,7	39,7	39,7	39,6	39,6	39,5	39,5	39,5	39,5	39,5	39,4	39,4
Esiannostelu 20 µl	40,4	40,3	40,1	40,1	40,0	40,0	39,9	39,9	39,8	39,8	39,7	39,5
Esiannostelu 20 µl	40,3	40,2	40,2	40,1	40,0	40,0	39,9	39,9	39,8	39,8	39,8	39,7

Annostelukorkeuden laskemista 16 millimetriin testattiin, mutta visuaalisessa tarkastuksessa havaittiin, että tipat pisaroituivat kaivojen seinille. Päädyttiin pitämään korkeus 17,00 millimetrissä, jossa tippa kohdistui oikein.

3.8 Kuolleen tilavuuden määrittäminen

Käytetty kasetti oli Standard tube-kasetti, jonka maksimi annostelutilavuus oli 50 µl. Antigeeniliuoksen annostelua varten selvitettiin kasetin letkujen tilavuus, jota kutsutaan kuolleeksi tilavuudeksi. Tilavuus selvitettiin alustamalla letkut täyteen vettä ja tyhjentämällä ne mittalasiin "empty"-toiminnolla. Koe toistettiin kolme kertaa. Letkujen tilavuudeksi saatiin 6,2 ml. Kuolleen tilavuuden määrittäminen oli oleellista, jotta pystyttiin varaamaan oikea määrä antigeeniliuosta testejä varten.

3.9 Annostelutilavuuden tarkistus

Ennen Multidropin käyttöä antigeeniliuosannostelussa, tuli varmistaa, että laite ja siihen kuuluva annostelukasetti toimivat. Tämän vuoksi tehtiin annostelutilavuuden tarkistus C12-stripsilevyillä.

Valittiin laitteesta haluttu 40 µl tilavuus ja annosteltiin kuudelletoista punnituille C12-stripsilevyille käännteissuodatettua ja puhdistettua Clinical Laboratory Reagent Water:ia (CLRW). Stripsit punnittiin analyysiväällä käyttäen LabX Direct Balance-ohjelmaa. Punnittavien levyjen välissä annosteltiin hukkaan aina yhdeksän levyä, jotta saatiin yhteensä annosteltujen levyjen määräksi 151, joka on maksimi levymäärä myyntierälle. Laskettiin yhdessä kaivossa olevan tipan tilavuus, x jakamalla stripsin tulos, y (g) kaivo-

jen lukumäärällä, 12 sekä käyttämällä CLRW:n tiheyden korjauskertoimena 0,98. Mikrolitroihin tulos muutettiin kertomalla osamäärä tuhannella.

$$\text{Tipan tilavuus } (\mu\text{l}) = \frac{y}{\frac{12}{0,98}} \times 1000$$

Kaava 1. Tipan tilavuus.

Laskettiin jokaiselle punnitulle stripsilevyille taulukossa 3 esitettävät keskiarvot, keskihajonnat sekä variaatiokertoimet. Levyn keskiarvo laskettiin jakamalla stripsien tilavuuksien summa (μl) stripsien summalla, 8. Tulos ilmoitettiin mikrolitroina kahden desimaalin tarkkuudella, jotta havaittiin vaihtelut tuloksissa.

$$\text{Keskiarvo} = \frac{\text{stripsien tilavuuksien summa}}{\text{stripsien summa}}$$

Kaava 2. Keskiarvo.

Keskihajonta laskettiin varianssin neliöjuuresta.

$$\text{Keskihajonta} = \sqrt{\text{varianssi}}$$

Kaava 3. Keskihajonta.

Variaatiokerroin laskettiin jakamalla levyn keskihajonta levyn keskiarvolla. Tulos ilmoitetaan prosentteina, joten tulos kerrottiin sadalla.

$$\text{Variaatiokerroin } (\%) = \frac{\text{keskihajonta}}{\text{keskiarvo}} \times 100$$

Kaava 4. Variaatiokerroin.

CLRW:llä suoritettujen annostelutilavuuden tarkastuksen jälkeen tarkastus toistettiin välikerrosliuoksella. Näin määritettiin, eroaako välikerrosliuos käyttäytymisellään CLRW:stä. Käytännön osuus suoritettiin samalla tavalla, mutta taulukossa 4 esitettyjen tulosten laskemisessa käytettiin tiheyden korjauskertoimena arvoa 1,03.

4 TYÖN SUORITUS

Työn suorituksella tarkoitetaan antigeeniliuoksella annosteltujen kolmen testierän tekemistä. Käytettävät antigeeniliuokset saatiin valmiina Radiometerin tuotannosta. Troponiini I-kompleksin herkkyuden vuoksi TnI-liuosta pidettiin annostelujen ajan jäähauteessa sekä vältettiin turhaa sekoittamista. Antigeeniliuokset olivat samoja, joita käytettiin referensseinä toimivissa myyntierissä.

4.1 Laitteen alustus

Ennen laitteen käyttöä, suoritettiin alustustoimenpiteet. Ensin valittiin oikeat asetukset laitteesta, jotta kasetti asemoitui oikein. Letkut huuhdeltiin CLRW:llä ulkopuolelta. Kasetti alustettiin huuhtelemalla 20 ml 70 % ETAX A7 letkujen läpi. Etanoli pestiin pois huuhtelemalla letkujen läpi kaksi kertaa 20 ml CLRW:tä niin, että ensimmäisen kerran jälkeen CLRW otettiin uudesta puhtaasta astiasta. Letkut stabiloitiin seisottamalla CLRW:tä niissä 15 minuutin ajan. Tänä aikana kuitenkin suoritettiin neljä 10 sekuntia kestävä huuhtelua. Stabiloinnin jälkeen annosteltiin CLRW:tä hukkaan viisi levyllistä. Lopuksi letkut tyhjennettiin takaisin vesiastiaan.

4.2 Annostelu

Letkut saturoitiin huuhtelemalla niiden läpi kaksi kertaa letkujen tilavuuden verran eli 12,4 ml antigeeniliuosta. Sama saturointitapa on käytössä nykyisellä annostelijalla. Antigeeniliuoksen tilavuus määritettiin käytetyn Erlenmeyr-pullon mitta-asteikosta.

Ennen varsinaista annostelua, annosteltiin kaksi levyä hukkaan mahdollisten ilmakuplien varalta. Ensimmäisenä ja viimeisenä annosteltuna levynä käytettiin tyhjiä irtokaivo-levyjä. Nämä levyt otettiin punnituslevyiksi, joista varmistettiin annostellun tipan tilavuus (Liite 1.). Ensimmäisen erän koko oli 100 levyä, mistä otettiin 10 testilevyä tasaisesti läpi sarjan Multidropille. Kahden viimeisen erän koko oli 127 levyä, mistä otettiin 32 testilevyä tasaisesti läpi sarjan.

Karakterisoinnin kannalta oli tärkeää, että testilevyjen valmisteluprosessi oli mahdollisimman samankaltainen kuin referenssilevyjen. Testilevyt valmistettiin referenssien

ohella, niin ettei tuotantoprosessi eronnut levyjen välillä kuin antigeeniliuoksen annostelun osalta. TnI-referensseille antigeeniliuos annosteltiin haravapipetillä ja TnT-referensseille tuotannon nykyisellä antigeeniliuosannostelijalla samanaikaisesti kuin testilevyille Multidropilla.

Antigeeniliuoksen annostelun jälkeen levyt laitettiin tasolevyravisteluun 15 sekunnin ajaksi, jotta liuos levisi tasaisesti kaivon pohjalle. Valmiit levyt siirrettiin välikerroskuivaukseen kuivauskaappiin 35 °C, 5 % kosteuteen 16-24 tunniksi liuoksen kuivausta varten ennen leimavasta-aineannostelua.

4.3 Loppupesut

Loppupesut tehtiin huuhtelemalla letkujen läpi 30 ml CLRW:tä, 30 ml 70 % ETAX A7, 30 ml CLRW:tä uudesta puhtaasta astiasta ja lopuksi 30 ml 20 % ETAX:ia. Liuosten tilavuudet määritettiin jälleen käytettyjen liuosastioiden mitta-asteikoista.

4.4 Leimavasta-aineannostelu

Europiumilla leimattua vasta-ainetta annosteltiin 1 µl/kaivo, kaivon pohjan reunaan. Reaktion onnistumisen kannalta vasta-aineen annostelussa oli erittäin tärkeää, että tippa annosteltiin oikeaan kohtaan. Homogeenisuusnäytteet kerättiin annostelun jälkeen. Testilevyille käytettiin samaa näytteiden keräystapaa kuin referensseillä. Ensimmäinen ja viimeinen annosteltu levy otettiin kokonaan määritettäväksi, jotta havaittiin tarkemmin mahdollinen signaalin muutos erän alun ja lopun välillä. Lopuista TnI-levystä kerättiin jokaisesta 24 irtokaivoa tyhjälle levykehykselle, kokoomalevyille. TnT-näytteet kerättiin muodostamalla kokoomalevyt niin, että jokaisesta jäljelle jääneestä levystä otettiin kahdeksan kaivoa levykehykselle.

4.5 Homogeenisuusmääritykset

Testilevyihin annosteltiin haravapipetillä 30 µl/kaivo AS-määritysliuosta. TnI-levyjä inkuboitiiin lämmittävässä levyravistelijassa 36 °C 20 minuutin ajan ja TnT-levyjä huoneen lämmössä 30 minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen levyt pestiin AS-liuoksella kuoppalevytypesuria käyttäen. Pesun jälkeen levyjä kuivattiin 63 °C 4 minuutin ajan. Kuivu-

neiden levyjen annettiin jäähtyä huoneen lämmössä 5 minuutin ajan ennen mittausta. Mittaukset suoritettiin Victor-monileimalukijalla kolmen sekunnin mittauksella 616 nanometrin aallonpituudella. Työvaiheet toistettiin referenssilevyille.

4.6 Tilastollinen analyysi

Homogeenisuustuloksia analysoitiin Statistical Analysis Software-ohjelmalla. Signaalien keskiarvoja analysoitiin t-testin avulla. T-testi on tilastollinen testi, joka vertaa kahden ryhmän keskiarvoja toisiinsa, tässä tapauksessa testilevyjä ja referenssejä (Tilastokeskus). Tarkemman tuloksen saamiseksi suoritettiin ekvivalenssitesti. Ekvivalenssi tarkoittaa tässä eroa, jota pienemmät erot käsitetään samanarvoisiksi. Testi käyttää kahta t-testiä erojen jakauman molemmilta puolilta. Jos molemmat testit hylätään tai keskiarvot poikkeavat merkittävästi ekvivalenssiarvosta, joukot ovat samanarvoisia. (Tolonen, 2017)

Tulosten luotettavuutta analysoitiin p-arvon määrittämisellä. Se kertoo todennäköisyyden sille, että näytteiden ja referenssien ero olisi sattumalta yhtä suuri kuin tuloksista havaittu ero. Mitä pienempi p-arvo, sitä todennäköisemmin tuloksista havaittu ero on todenmukainen eikä sattumaa. (Ruohonen, 2011)

5 TULOKSET

Osiossa esitetään eri työvaiheissa saadut tulokset. Tulokset on esitetty taulukoina, kuvina sekä kuvioina, joita tulkitaan ja vertaillaan raja-arvoihin. Tulosten analysoinnissa käytetään apuna teoriaa.

5.1 Parametrien testaus

Taulukossa 1 esitettiin välikerrosliuoksen annostelussa havaittu selvä ero punnituslevyssä ensimmäisen sarakkeen tilavuuksien ja muun levyn välillä. Haluttu liuostilavuus annostelussa on 40 µl ja hyväksyntäkriteeriksi on määritetty 37 µl – 43 µl. Uusintates-tissä ensimmäisen sarakkeen tilavuus oli rajojen sisällä, mutta tulos nosti levyn sisäistä variaatiota. Annostelussa pyrittiin mahdollisimman pieneen variaatioon, joten tulosta parannettiin toimenpiteillä. Taulukossa 2 näkyi, miten variaatio pieneni merkittävästi, kun esiannostelun tilavuutta nostettiin.

5.2 Annostelutilavuuksien tarkistukset

Taulukossa 3 ja 4 esitettyjen keskiarvojen, keskihajontojen ja variaatiokertoimien laskemisen avulla vertailtiin levyn sisäisiä eroja. Keskiarvo ilmoittaa keskikohdan tulosten jakaumalla. Testitulosten keskikohta eli keskiarvo oli lähellä haluttua 40 µl, joten tulos oli hyvä. Keskihajonta kuvaa sitä, kuinka kaukana yksittäiset tilavuuksien arvot ovat keskimäärin tilavuuden keskiarvosta. Keskihajonnan ollessa pieni, ovat kaikki arvot keskimäärin olleet samankaltaisia. Tutkimuksessa saadut keskihajonnan tulokset ovat pieniä, joten hajontaa ei ole ollut paljon. Variaatiokerroin (CV %) on hajontaluku, joka suhteuttaa keskihajonnan tilavuuksien keskiarvoon. (Mattila, 2017) Keskihajonnan ollessa alhainen, myös CV % pysyy alhaisena. Tämä kertoo pienestä vaihtelusta tilavuuksien välillä.

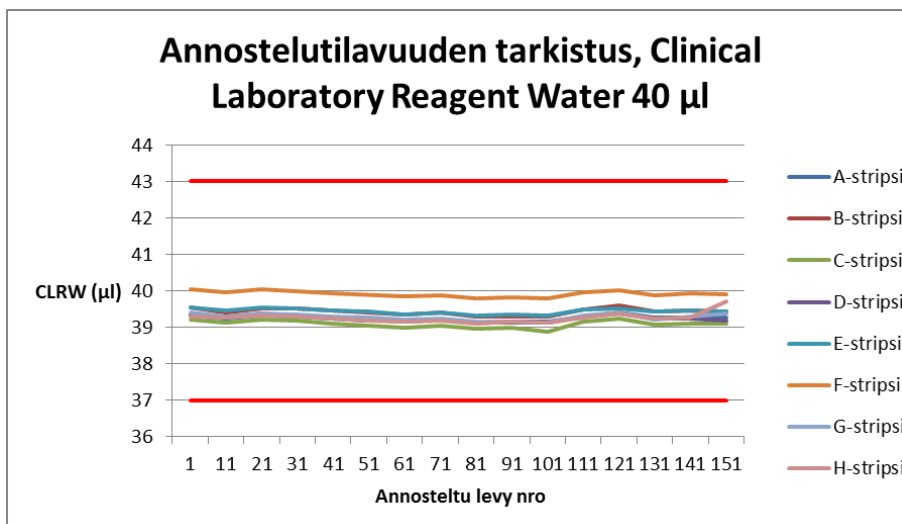
Taulukko 3. CLRW-annostelu.

Levy nro	Keski-arvo (μ l)	Keski-hajonta	CV (%)
1	39,46	0,26	0,66
11	39,38	0,25	0,64
21	39,46	0,26	0,65
31	39,43	0,25	0,64
41	39,37	0,25	0,65
51	39,24	0,13	0,33
61	39,28	0,25	0,65
71	39,32	0,25	0,64
81	39,23	0,25	0,63
91	39,26	0,25	0,65
101	39,22	0,26	0,68
111	39,41	0,25	0,64
121	39,49	0,24	0,61
131	39,34	0,24	0,62
141	39,37	0,25	0,63
151	39,43	0,27	0,69

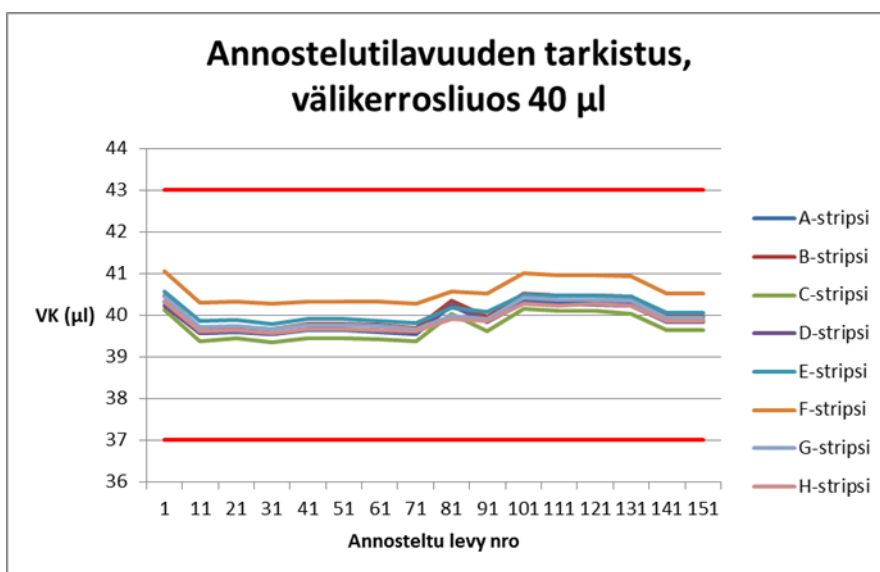
Taulukko 4. Välikerrosliuosannostelu.

Levy nro	Keski-arvo (μ l)	Keski-hajonta	CV (%)
1	40,44	0,28	0,69
11	39,72	0,27	0,68
21	39,75	0,27	0,67
31	39,68	0,26	0,65
41	39,68	0,27	0,68
51	39,78	0,26	0,66
61	39,75	0,26	0,67
71	39,7	0,26	0,66
81	40,19	0,21	0,53
91	39,96	0,26	0,66
101	40,45	0,26	0,65
111	40,4	0,26	0,64
121	40,41	0,25	0,63
131	40,37	0,27	0,66
141	39,96	0,25	0,64
151	39,96	0,25	0,64

Annostelutilavuuden tarkastuksissa levyjä annosteltiin suuri määrä, joten niiden välisiä eroja vertailtiin helpoiten piirtämällä testilevyjen stripsien keskiarvoista kuvioissa 1 ja 2 esitetyt kuvaajat. Kuvioita tarkasteltaessa ei havaita merkittäviä eroja levyjen välillä. Molemmassa kuvioissa F-stripseistä erottuu muista stripseistä suuremmalla tilavuudella. Tämä ei kuitenkaan vaatinut toimenpiteitä, koska eroavan stripsin tulos on lähempänä haluttua 40 μ l tilavuutta kuin muilla stripseillä.



Kuvio 1. Annostelutilavuuden stripsikohtainen vertailu, CLRW.



Kuvio 2. Annostelutilavuuden stripsikohtainen vertailu, välikerrosliuos.

5.3 Ensimmäisen Troponiini I-erän tulokset

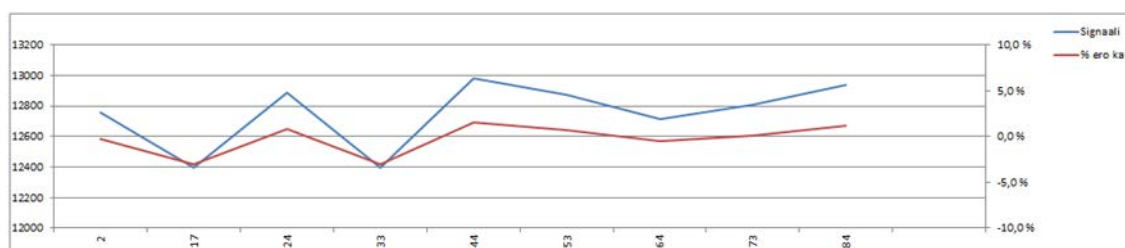
Troponiini I:tä tutkittiin kahdessa erässä. Ensimmäisessä erässä testilevyistä otettiin saman verran homogeenisuusnäytteitä kuin referensseistä. Taulukossa 5 on esitetty homogeenisuustesteissä määritetyt levyjen sisäiset keskiarvot ja CV %. Tulokset ovat lähes samanlaiset signaalitasoltaan ja variaatioltaan. Levyn sisäinen CV % on molemmilla noin 4 % ja TnI:lle määritetyn spesifikaation ollessa 10,9 %, tulokset ovat rajan

sisäpuolella. Testilevyjen välinen CV % oli 1,1 % ja referenssien 0,5 %. Molemmat ovat todella alhaisia ja se kuvaa sitä, että signaalitaso ei vaihdellut erän eri vaiheissa.

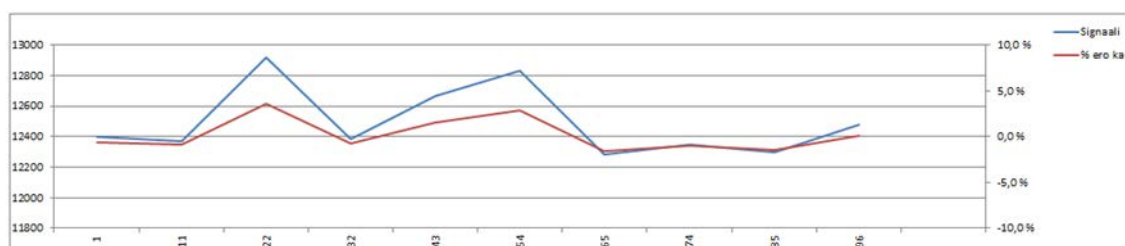
Taulukko 5. Ensimmäinen TnI-erän homogeenisuustulokset.

Erä 1	Levy nro	Signaalin keskiarvo	CV %
Testi	2	12757	3,7
Testi	84	12938	3,6
Testi	Kokooma 1	12618	4
Testi	Kokooma 2	12863	4
Referenssi	1	12396	3,6
Referenssi	96	12477	3,3
Referenssi	Kokooma 1	12482	4,1
Referenssi	Kokooma 2	12540	4,4

Levyjen signaalitasoa erän läpi tarkastellaan kuvion 3 ja 4 avulla. Radiometerillä on käytössä kalibraatiokaivojen analysointia varten Excel-pohja, joka piirtää automaattisesti käyrät signaalitason perusteella. Käyrät kuvaavat sekä signaalitasoa, että signaalin suhteellista eroa keskiarvoon. Kuvaajissa ei ole merkittäviä piikkejä, joten taso on pysynyt tasaisena läpi erän. Testi- ja referenssikäyristä havaitaan, että ne nousevat ja laskevat samoissa kohdissa.

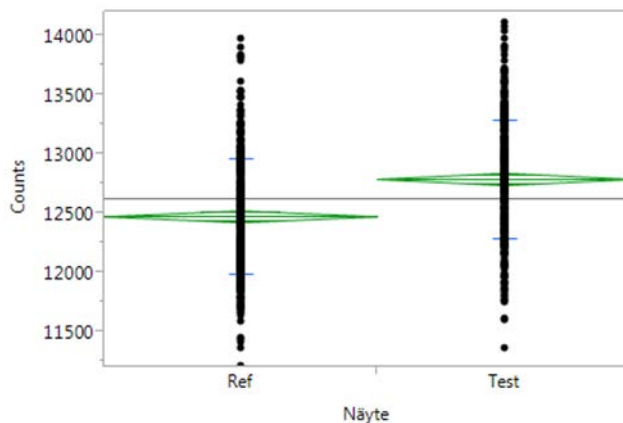


Kuvio 3. Ensimmäisen TnI-testierän signaalitaso.



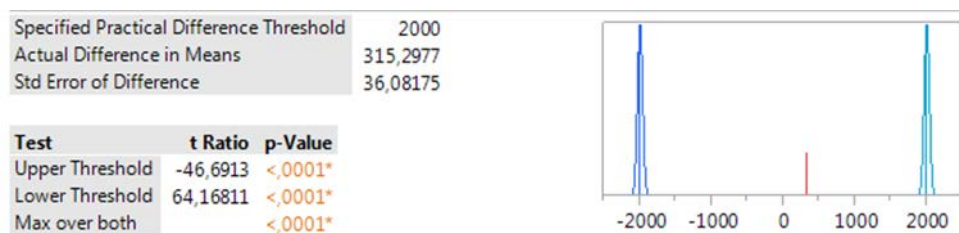
Kuvio 4. Ensimmäisen TnI-referenssierän signaalitaso.

Tilastollista analyysiä varten testilevyjen ja referenssien homogeenisuustulokset syötettiin SAS-ohjelmaan. Kuvassa 4 esitetään testin ja referenssin välinen vertailu. Kuvan avulla pystytään nopeasti vertailemaan tutkimuksen tuloksia. Pystyviiva kuvaa lukujen hajontaa ja vihreä vaakaviiva signaalitason keskiarvoa. Kuvasta havaitaan, että pystyviivalla esitetyt testituloksen arvot ovat jakautuneet suuremmalle välille kuin referenssitulokset. Tämän perusteella testituloksissa on lievästi enemmän hajontaa kuin referenssissä. Testituloksen signaalitaso on lievästi korkeampi.



Kuva 4. SAS-vertailu ensimmäiselle TnI-erälle.

Tuloksille tehtiin kuvassa 5 esitettävä ekvivalenssitesti, jossa ekvivalenssiksi valittiin arvo 2000. Testissä määritetään myös p-arvo. Yleisesti tulosta pidetään tilastollisesti merkitseväenä, jos p-arvo on pienempi kuin 0,05. Tässä analyysissä käytettiin myös 0,05 p-arvoa merkitseväenä. Kyseisen TnI-erän p-arvo oli yli 0,05 eli ero testin ja referenssin välillä ei ollut merkitsevää. (Tolonen, 2017)



Kuva 5. Ekvivalenssitesti ensimmäiselle TnI-erälle.

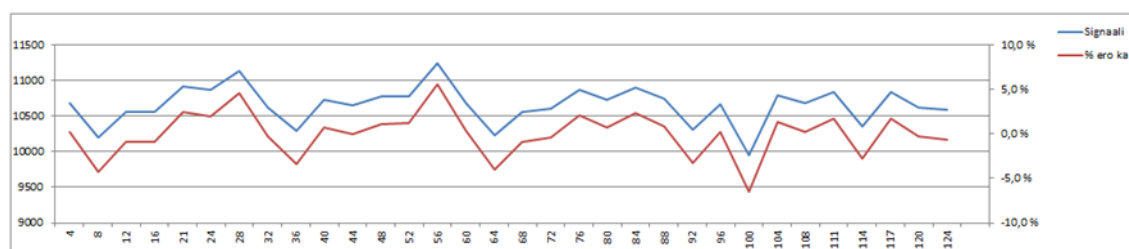
5.4 Toisen Troponiini I-erän tulokset

Toisessa testierässä homogeenisuusnäytteitä kerättiin kolminkertaiselta levy määrältä ensimmäiseen testiin verrattuna. Määrän kasvattamisella saatiin kattavampi kokonaiskuva analyytin ja laitteen käyttäytymisestä. Tässä erässä taulukossa 6 esitettävät levyn sisäiset testi- ja referenssitulokset ovat lähes samalla tasolla. Testilevyjen CV % ovat hieman suurempia kuin referenssien. Tulokset ovat kuitenkin edelleen reilusti alle spesifikaation. Testilevyjen välinen CV % oli 1,6 % ja referenssien 0,8 %. Testilevyjen signaalitasonvaihtelua voidaan selittää suurella näytemäärällä, joka johtaa usein variaation kasvuun.

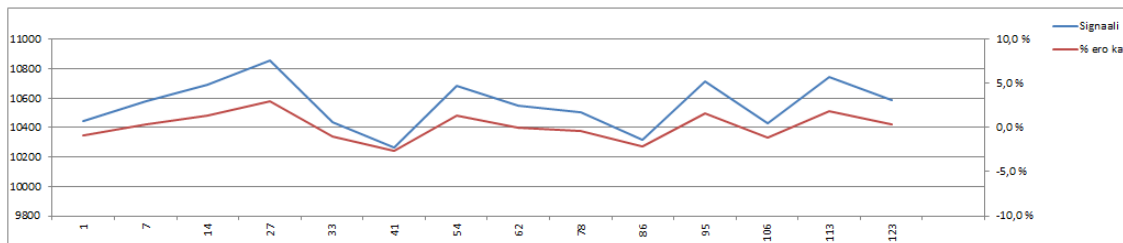
Taulukko 6. Toisen Tnl-erän homogeenisuustulokset.

Erä 2	Levy nro	Signaalin keskiarvo	CV %
Testi	2	10680	4
Testi	84	10588	2,8
Testi	Kokooma 1	10584	4,6
Testi	Kokooma 2	10690	3,9
Testi	Kokooma 3	10721	3,8
Testi	Kokooma 4	10740	4,4
Testi	Kokooma 5	10924	3,8
Testi	Kokooma 6	10688	4,7
Testi	Kokooma 7	10507	4,5
Testi	Kokooma 8	10270	5,3
Referenssi	1	10444	3,1
Referenssi	123	10588	3,4
Referenssi	Kokooma 1	10568	4,2
Referenssi	Kokooma 2	10473	4,3
Referenssi	Kokooma 3	10649	4,4

Toisen Tnl-erän homogeenisuustulosten käyrät ovat lähes samalla tasolla eikä suuria piikkejä havaita. Testilevyjen signaalitasossa on hieman suurempaa vaihtelua kuin referensseissä.

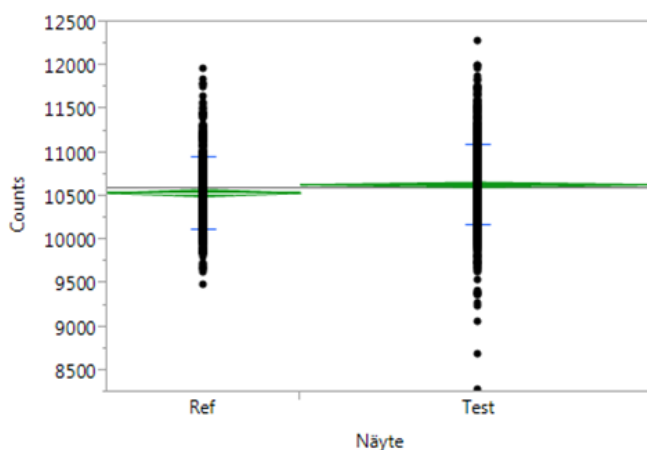


Kuvio 5. Toisen Tnl-testierän signaalitaso.



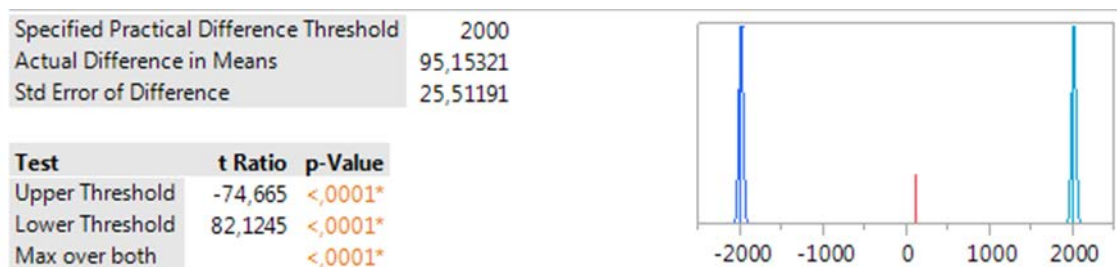
Kuvio 6. Toisen Tnl-referenssierän signaalitaso.

Kuvan 6 vertailusta käy ilmi, että tulosten keskiarvot ovat samalla viivalla. Kuten aikaisemmassa kohdassa havaittiin, testilevyjen hajonta on suurempaa kuin referensseillä. Kuvan 6 tulokset vahvistavat havainnon.



Kuva 6. SAS-vertailu toiselle Tnl-erälle.

Toisessa Tnl-erässä valittiin myös analyysiä varten ekvivalenssitestiin arvo 2000. p-arvo on alle 0,05, jonka perusteella testin ja referenssin ero on lievästi merkitsevä.



Kuva 7. Ekvivalenssitesti toiselle Tnl-erälle.

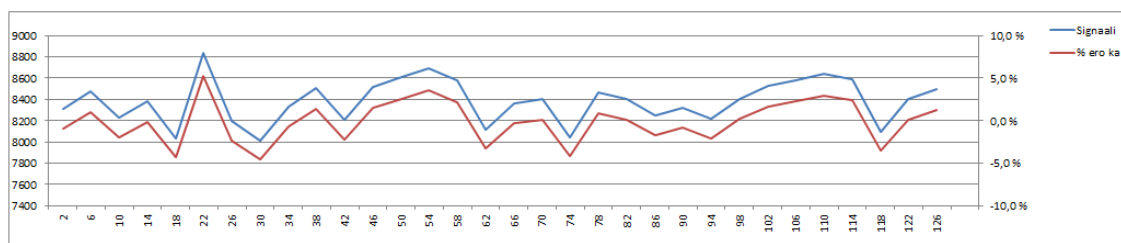
5.5 Troponiini T:n tulokset

Troponiini T-erässä homogeenisuusnäytteet kerättiin jokaisesta levystä, joten myyntierän levymäärän vuoksi referenssejä oli paljon. Taulukosta 7 havaitaan, että testilevyjen signaalitaso on sama läpi erän. Levyn sisäinen CV % testilevyillä on noin 4 % ja referensseillä noin 5 %. TnT:lle on määritetty CV % spesifikaatioksi 10,1 %, joten molemmat ovat rajoissa. Referenssilevyillä on selvästi havaittava ero alku- ja loppulevyn signaalitason välillä. Testilevyjen välinen CV % oli 1,1% ja referenssien 3,2 %. Referenssien korkeampi CV % selittyy suurella näytemäärällä.

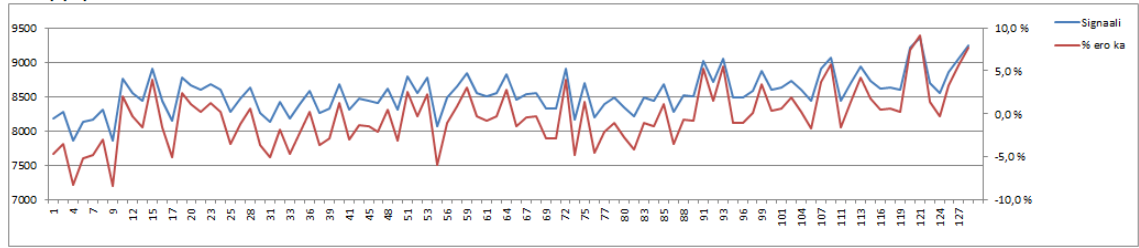
Taulukko 7. TnT-erän homogeenisuustulokset.

Erä	Levy nro	Signaalin keskiarvo	CV %
Testi	2	8313	4
Testi	126	8493	2,8
Testi	Kokooma 1	8329	4,6
Testi	Kokooma 2	8464	3,9
Testi	Kokooma 3	8308	3,8
Referenssi	1	8174	4,4
Referenssi	128	9235	3,8
Referenssi	Kokooma 1	8558	4,7
Referenssi	Kokooma 2	8552	4,5
Referenssi	Kokooma 3	8538	5,3
Referenssi	Kokooma 4	8465	3,1
Referenssi	Kokooma 5	8664	3,4
Referenssi	Kokooma 6	8383	4,2
Referenssi	Kokooma 7	8672	4,3
Referenssi	Kokooma 8	8512	4,4

Kuvion 7 TnT-testierän homogeenisuustulosten käyrä pysyy lähes samalla tasolla koko erän. Kuvion 8 referenssikäyrästä havaitaan signaalitason tasainen nousu erän loppua kohden.

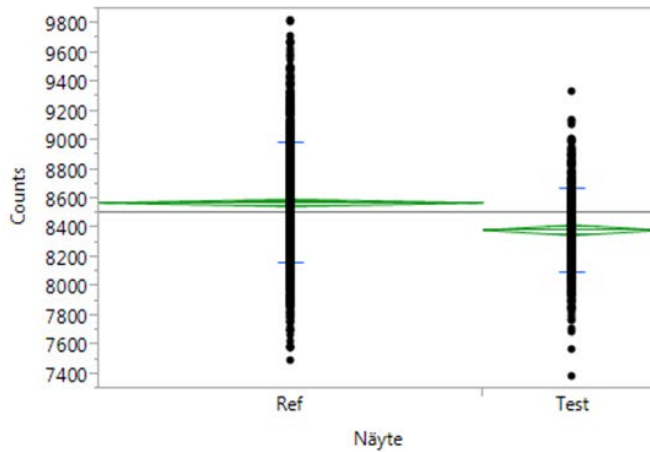


Kuvio 7. TnT-testierän signaalitaso.



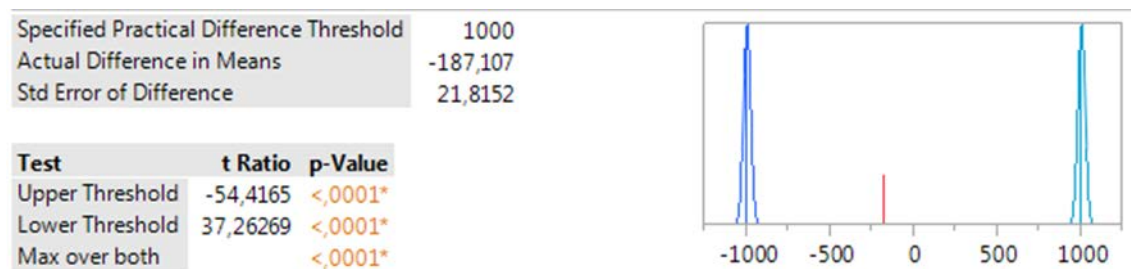
Kuvio 8. TnT-referenssierän signaalitaso.

Kuvan 8 SAS-vertailun perusteella testilevyjen hajonta on huomattavasti pienempää kuin referensseillä.



Kuva 8. SAS-vertailu TnT-erälle.

Troponiini T:n SAS-analysoinnissa ei voitu käyttää samoja arvoja kuin Troponiini I:llä, koska analyttien signaalitasot ja näytteiden määrät eroavat toisistaan. TnT:lle valittiin ekvivalenssiksi arvo 1000 (Tolonen, 2017). Kuvan 9 analyysin perusteella TnT-testilevyt eroavat merkittävästi referensseistä. Tässä tapauksessa se on kuitenkin hyvä, koska ero tarkoittaa pienempää variaatiota.



Kuva 9. Ekvivalenssitesti TnT-erälle.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Osiossa esitetään tuloksien perusteella tehdyt johtopäätökset sekä tulevaisuuden suunnitelmat laitteelle.

6.1 Parametrit

Multidropin asetuksia testattaessa tehdyt huomiot esiannostelun ja annostelukorkeuden vaikutuksista ovat oleellisia laitteen käytön kannalta. Ongelmat ilmenivät vasta välikerrosliuosta annosteltaessa. Tästä voidaan tehdä johtopäätös, että liuksen ominaisuudet saattavat vaikuttaa annosteltuun tilavuuteen. Annostelutilavuuden tarkistuksessa Multidrop annosteli tasaisesti 151 levyä. Määrä on maksimi erä koko, joten laitteen kapasiteetti on riittävä tuotannon eriä varten.

6.2 Määritykset

Homogeenisuusmäärityksissä Troponiini I:n testitulokset olivat yhtä hyviä kuin referenssit. Eroa ilmeni, mutta tilastollisesti se ei ollut merkitsevää. Tuloksista voidaan päätellä, että Multidrop ei rikkonut herkkää TnI-kompleksia annostelussa. Troponiini I annostellaan tällä hetkellä käsin haravapipetillä. Työvaihe kuluttaa henkilöresursseja sekä jättää suuren riskin virheille. Tulokset Multidropilla osoittavat, että laitteen hankkiminen on kannattavaa.

Troponiini T:n testitulokset olivat parempia kuin referenssit. Tästä voidaan päätellä, että Multidrop toimii paremmin kuin nykyinen antigeeniliuosannostelija. Referenssien homogeenisuustuloksissa havaittu signaalitason nousu erän loppua kohden saattaa johtua nykyisen annostelijan letkujen epäonnistuneesta saturoinnista. Nykyinen antigeeniliuosannostelija on hidas, jonka vuoksi edellisessä työvaiheessa joudutaan kuluttamaan ylimääräisiä SA-levyjä. Ylimääräisillä levyillä pidetään yllä tasainen levyjen virtaus edellisessä laitteessa sillä aikaa, kun annostelija annostelee antigeeniliuksen. Turhasta levyjen kulutuksesta voitaisiin luopua Multidropin myötä.

6.3 Käyttöönotto

Tuloksien perusteella karakterisointi osoittaa, että Multidrop on soveltuva Troponiini I:n ja T:n antigeeniliuoksien annosteluun. Jotta laite voidaan ottaa käyttöön, on tehtävä laitteen kvalifiointi sekä annosteluprosessin validointi. Radiometerillä on tällä hetkellä yhdeksän eri analyyttiä markkinoilla. Antigeenit käyttäytyvät eri tavalla analyytistä riippuen, jonka vuoksi validointi on suoritettava jokaiselle analyytille erikseen. Työssä käytetylle liuosten silmämääräiselle mittaustavalle on kehitettävä tarkempi menetelmä ennen laitteen käyttöönottoa.

Karakterisointiin ja validointiin kuuluu myös laitteen pesujen riittävyyden määrittäminen. Pesuilla varmistetaan, ettei antigeeniä jää Multidropin letkuihin annostelun jälkeen. Pesut tulee myös validoida jokaiselle analyytille erikseen. Karakterisoinnissa suoritettu loppupesu on sama, mikä on käytössä nykyisellä annostelijalla. Jatkotoimenpiteenä pesujen riittävyys tullaan määrittämään taustasignaalinmittauksen avulla. Tarpeen vaatiessa pesukäytäntöä muutetaan, esimerkiksi uusilla liuoksilla tai huuhteluiden määrällä.

7 LÄHDELUETTELO

- Bolstad, ym. 2013.** Heterophilic antibody interference in immunometric assays. 2013, Osa/vuosik. 27, 5.
- Cox, ym. 2012.** Immunoassay methods. *Assay Guidance Manual*. 2012.
- Eriksson, Susan. 2016.** *Insulation layers and their function*. 2016.
- Eriksson, Susann. 2017.** *Radiometer Turku -products and their use*. 2017.
- Hautala, Anne. 2016.** 2016.
- Katajisto, Johanna. 2016.** *Leimaus ja biotinylointi*. 2016.
- Lehtonen, Janina. 2009.** Opinnäytetyö. *Leima-annostelun ja kuivauksen vaikutus kuivakaivomäärityksen taustaan*. 2009.
- Mattila, Mikko. 2017.** KvantiMOTV. [Online] 2017. [Viitattu: 20. Kesäkuu 2017.] <http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/hajontaluvut/hajontaluvut.html#keskihajonta..>
- Rainaho, Jarmo. 2016.** *TnT-antigeenin annostelu*. 2016.
- Ruohonen, Keijo. 2011.** *Tilastomatematiikka*. 2011.
- Sippola, Antti. 2004.** *Tuotantolaitteiden kvalifiointi ja prosessin validointi GMP-tuotantoa varten*. Espoo : s.n., 2004.
- Sorbent Systems. 2014.** [Online] 2014. [Viitattu: 25. Kesäkuu 2017.] https://www.sorbentsystems.com/desiccants_types.html#silica.
- Thermo Fisher Scientific.** www.thermofisher.com/order/catalog/product/5840300. [Online] [Viitattu: 14. Syyskuu 2016.]
- Thermo Scientific. 2005.** *Multidrop Combi User Manual*. 2005.
- Tilastokeskus.** T-testi. [Online] [Viitattu: 14. Syyskuu 2016.] http://www.stat.fi/meta/kas/t_testi.html.
- Tolonen, Pertti. 2017.** *SAS/JMP help*. 2017.

Liite 1. Punnituslevyt

Ensimmäisen Troponiini I-erän punnituslevyt

Alku	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	40,21	40,09									39,65	39,52
B		40,32	40,35									
C				39,93	39,86							
D					40,16	40,09						
E							40,43	40,46				
F								40,31	40,26			
G									39,96	39,87		
H	40,41	40,38									39,81	39,72

Loppu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	39,90	39,91									39,55	39,48
B		40,27	40,10									
C				39,75	39,70							
D					40,03	39,92						
E							40,23	40,16				
F								40,02	39,98			
G									39,76	39,74		
H	40,04	40,10									39,69	39,63

Toisen Troponiini I-erän punnituslevyt

Alku	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	40,05	39,90									39,06	39,13
B		40,24	40,17									
C				39,65	39,57							
D					39,75	39,72						
E							40,04	39,92				
F								39,77	39,83			
G									39,64	39,58		
H	39,79	39,67									39,05	39,34

Loppu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	39,99	39,62									39,30	39,11
B		40,12	39,95									
C				39,62	39,53							
D					39,63	39,55						
E							39,81	39,83				
F								37,66	39,92			
G									39,73	39,66		
H	39,71	39,59									39,42	39,35

Troponiini T-erän punnituslevyt

Alku	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	41,06	40,97									40,71	40,43
B		41,17	41,18									
C				40,77	40,85							
D					40,99	41,02						
E							41,65	41,89				
F								41,48	41,43			
G									40,88	41,15		
H	41,12	41,42									40,85	40,9

Loppu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	41,52	41,43									41,27	41,1
B		41,76	41,8									
C				41,48	41,26							
D					41,2	41,55						
E							42,11	42,22				
F								41,76	41,66			
G									41,12	41,54		
H	41,47	41,84									41,17	41,07