

HERKKIEN TROPONIINIMÄÄRITYSTEN HÄIRIÖTEKIJÄT

TkK-tutkielma
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Biotekniikka
Helmikuu 2024
Mira Hyytiäinen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

MIRA HYYTIÄINEN: Herkkien troponiinimääritysten häiriötekijät

Kandidutkielma, 18 s

Biotekniikka

Helmikuu 2024

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Sydänkohtauksen nopea diagnosointi on ensiarvoisen tärkeää potilaan selviytymismahdollisuuksien kannalta. Sydänperäinen troponiini on laajasti käytössä biomerkkiaineena sydäninfarktin toteamisessa. Sitä vapautuu sydänlihaskaurion seurauksena verenkiertoon. Erittäin herkkät troponiinimääritykset (engl. *high-sensitivity cardiac troponin*, hs-cTn) ovat nopeuttaneet sydänkohtauksen diagnosointia huomattavasti.

Hs-cTn-määritykset ovat immunomäärityksiä, eli niiden toimintaperiaate perustuu vasta-ainereaktioihin, minkä takia vasta-aineperäiset häiriötekijät voivat aiheuttaa ongelmia määrityksiin. Vasta-aineperäisten häiriöiden aiheuttajia ovat esimerkiksi heterofiiliset vasta-aineet ja troponiiniautovasta-aineet. Ne voivat aiheuttaa häiriötä sitomalla immunomäärityksessä käytettäviä vasta-aineita virheellisesti tai sitoutumalla määrityksissä käytettävään analyyyttiin, troponiiniin. Vasta-aineiden lisäksi biotiini voi aiheuttaa todellisuudesta poikkeavia tuloksia troponiinimäärityksissä. Myös punasolujen hajoaminen, eli hemolyysi, aiheuttaa ongelmia troponiinimääritysten toimintaan. Häiriötekijöiden läsnäolo näytteessä voi aiheuttaa troponiinimäärityksissä virheellisiä positiivisia tai negatiivisia tuloksia. Eri häiriötekijöiden tunnistaminen on erittäin tärkeää väärin diagnoosien ja turhien lisätutkimuksien välttämiseksi terveydenhuollossa.

Edellä mainittujen häiriötekijöiden aiheuttamat ongelmat ovat johtaneet häiriötekijöiden tutkimiseen. Tutkimuksilla on pyritty selvittämään, mitkä tekijät aiheuttavat häiriötä, miten tekijöiden aiheuttama häiriö syntyy, ja miten on mahdollista estää häiriötekijöiden vaikutukset näytteessä. Mikäli häiriötekijät kyetään tunnistamaan tehokkaammin ja niiden toiminta estämään, on tulevaisuudessa mahdollista kehittää entistäkin tarkempia ja sensitiivisempiä troponiinimäärityksiä.

Asiasanat:

hs-cTn, cTnI, cTnT, heterofiiliset vasta-aineet, makrotroponiini, biotiini, hemolyysi

Sisällys

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | Johdanto | 2 |
| 2 | Troponiinimääritykset..... | 4 |
| 3 | Vasta-aineperäiset häiriötekijät..... | 6 |
| 3.1 | Heterofiiliset vasta-aineet..... | 6 |
| 3.2 | Troponiinautovasta-aineet..... | 7 |
| 3.3 | Vasta-aineperäisten häiriötekijöiden tunnistaminen | 9 |
| 4 | Biotiini häiriötekijänä | 11 |
| 5 | Hemolyysi häiriötekijänä | 13 |
| 6 | Loppuyhteenveto | 15 |
| 7 | Kirjallisuus..... | 16 |

1 Johdanto

Iskeemiset sydänsairaudet ovat johtava kuolinsyy ympäri maailmaa, ja siksi niiden nopea ja tarkka diagnosointi on äärimmäisen tärkeää. Erittäin herkästä sydänperäisestä troponiinista (engl. *high-sensitivity cardiac troponin*, hs-cTn) on tullut viime vuosikymmenien aikana tärkeä työkalu sydäninfarktin tunnistamisessa. Verrattuna perinteisiin sydänperäisiin biomarkkereihin, kuten kreatiinikinaasiin (engl. *creatine kinase*, CKN) ja myoglobiiniin, hs-cTn on lisännyt akuuttia rintakipua kokevien potilaiden diagnosoinnin tarkkuutta. (Lazar ja muut 2022.) Sydäninfarktilla tarkoitetaan jatkuneen iskemian, eli sydänlihaskudoksen hapenpuutteen, aiheuttamaa sydänlihassolujen kuolemaa. Yleisimmin sydäninfarkti voidaan tunnistaa potilashistorian ja sydänsähkökäyrän (engl. *electrocardiogram*, ECG) avulla. Troponiinimääritysten tärkeys sydänperäisten sairauksien tunnistamisessa korostuu Euroopan kardiologisen seuran (engl. *The European Society of Cardiology*, ESC) sydäninfarktin neljännessä universaalissa määritelmässä: ESC:n määritelmän mukaan sydäninfarktin diagnoosin vahvistamiseksi sydänlihassvaurio on määritettävä kohonneella sydänperäisen troponiinin arvolla. (Thygesen ja muut 2019.)

Troponiinit ovat rakenneproteiineja, joita on luuston ja sydänlihasten ohuiden filamenttien troponiinikomplekseissa. Nämä kompleksit muodostuvat kolmesta troponiinialayksiköstä, joita ovat troponiinit I, T ja C. Sydänlihaksen supistuessa kompleksiin sitoutuu myös kalsiumioneja. Troponiinimäärityksissä käytettävät biomerkkaineet ovat sydänperäinen troponiini T (engl. *cardiac troponin T*, cTnT) ja troponiini I (engl. *cardiac troponin I*, cTnI). Suurin määrä troponiinia on löydetty myofibrilleissä kiinni olevista troponiinikomplekseista. Tämän lisäksi troponiinikompleksit voivat esiintyä vapaana sytoplasmassa. Sydänperäisen vaurion tapahtuessa troponiinia vapautuu nopeasti sytoplasmasta sekä rakenteellisista alkuperäiskomplekseista. Troponiinimäärityksissä mitataan veressä olevan troponiinin määrää. Jatkuva sydänperäisen troponiinin vapautuminen viittaa sydänlihaksen kuolioon, sillä troponiinin normaali puoliintumisaika veressä on noin kaksi tuntia. (Lazar ja muut 2022.)

Viimeisimmän sukupolven troponiinimääritykset ovat tehokkaampia analyttiseltä sensitiivisyydeltään ja niiden vastaava suorituskyky alhaisilla cTn-pitoisuuksilla on parempi kuin niitä edeltävillä troponiinimäärityksillä. Entistä herkempien

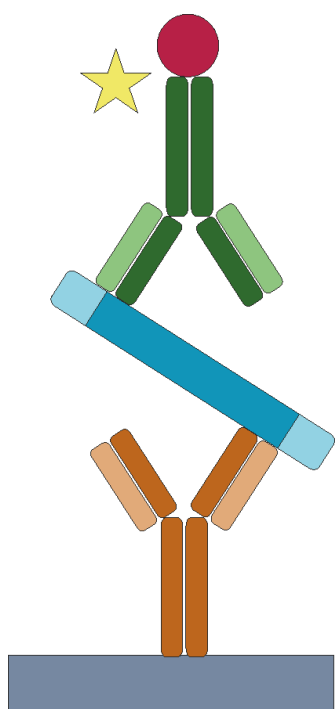
troponiinimääritysten ongelmana kuitenkin on niiden herkkyys myös erilaisille häiriötekijöille. Häiriöt voivat johtua esianalyttisistä tekijöistä, kuten näytteen käsittelystä ja käytetyistä näyteputkista, sekä näytteessä itsessään olevista häiriötekijöistä. Häiriötekijät voivat aiheuttaa troponiinimäärityksissä sekä virheellisen korkeita että matalia tuloksia. (Krintus ja Panteghini 2020.)

Tämän kandidaatintutkielman tarkoitus on esitellä yleisimpiä vasta-aineperäisiä häiriötekijöitä, kertoa niiden vaikutuksesta troponiinimäärityksiin ja esittää, miten häiriöt on mahdollista tunnistaa ja miten niiden aiheuttama vaikutus voidaan estää. Tämän lisäksi tutkielmassa käsitellään myös kahta muuta, ei vasta-aineisiin liittyvää, häiriötekijää. Näitä ovat biotiini ja hemolyysi, joiden aiheuttamaa häiriötä on tutkittu yhdessä ja erikseen.

2 Troponiinimääritykset

Nykyiset troponiinimääritykset perustuvat immunokemiallisiin menetelmiin, joita ovat muun muassa entsyymeihin liittyvä immunomääritys (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA), immunofluoresenssimääritys, radioimmunoanalyysi (engl. *radioimmunoassay*, RIA) sekä immunokemiluminesenssimääritys (Lazar ja muut 2022). Esimerkiksi kemiluminesenssiin perustuvassa troponiinimäärityksessä luminesenssisignaali muodostuu kemiallisen reaktion seurauksena. Määrityksen leima-aineina käytetään tyypillisesti piparjuuriperoksidaasia (engl. *horseradish peroxide*, HRP) tai alkalista fosfataasia. (Han ja Kim 2019.)

Immunomääritysten peruseriaate havainnollistetaan kuvassa 1. Immunologisessa vaiheessa on spesifinen vasta-aine–antigeenivuorovaikutus ja toisessa vaiheessa signaalin tuottava reaktio. Tämä voi olla joko entsyymireaktio tai toinen vasta-aine–antigeenireaktio. Määrityksen viimeisessä vaiheessa mitataan tuotettu signaali käytettävästä menetelmästä riippuvalla tavalla. (Lazar ja muut 2022.)



Kuva 1: Tyypillinen immunomäärityksen toimintaperiaate. Sitojavasta-aine on kuvattu ruskealla ja leimattu vasta-aine vihreällä. Vasta-aineet tunnistavat cTn-molekyylin, joka on kuvattu sinisellä palkilla. (muokattu kuvasta Hammarsten ja muut 2023a).

Hs-cTn-testit ovat helpottaneet sydäninfarktin diagnosoimista ensiavussa. Sydänperäisten vaurioiden herkkä määrittäminen on edesauttanut nopeiden diagnostisten algoritmien kehittämistä ja vahvistamista, minkä ansiosta varhaiset rule-out- ja rule-in strategiat ovat parantuneet. Näiden strategioiden avulla ensiavussa on mahdollista erottaa sydäninfarktin kokevat potilaat niistä potilaista, joilla on samankaltaisia oireita, mutta ei sydänkohtaukseen viittaavia markkereita verenkierrossa. Tämä strategia tehostaa ensiavun toimintaa ja siten myös potilaat, joilla ei ole sydäninfarktia, välttävät turhat ja invasiiviset lisätutkimukset. On kuitenkin äärimmäisen tärkeää, että käytettävät hs-cTn-määritykset on kalibroitu tarkasti sekä pienillä pitoisuuksilla että pienellä analyttisellä vaihtelulla. Jopa suhteellisen pienet muutokset määrityksen suorituskyvyssä voivat vaikuttaa merkittävästi niiden potilaiden osuuteen, jotka tunnustetaan kotiutuskelpoisiksi. (Krintus ja Panteghini 2020.)

Hs-cTn-määritykset ovat diagnostisesti huomattavasti tarkempia verrattuna ei-spesifisiä biomarkkereita käyttäviin määrityksiin. Muiden immunomääritysten tapaan myös hs-cTn-määritykset ovat herkkiä useille erilaisille häiriötekijöille. Jotta hs-cTn testien käyttöä voidaan optimoida, on laboratorioden osattava tunnistaa mahdollisten häiriötekijöiden läsnäolo näytteessä sekä osattava estää niiden vaikutus tuloksiin. On ensiarvoisen tärkeää, että terveydenhuollon ammattilaisten ja laboratorioden välinen kommunikaatio on toimivaa ja tehokasta, jotta terveydenhuollon ammattilaisia voidaan kouluttaa liittyen hs-cTn-määrityksien mahdollisiin esianalyttisiin ja analyttisiin ongelmiin. (Krintus ja Panteghini 2020.)

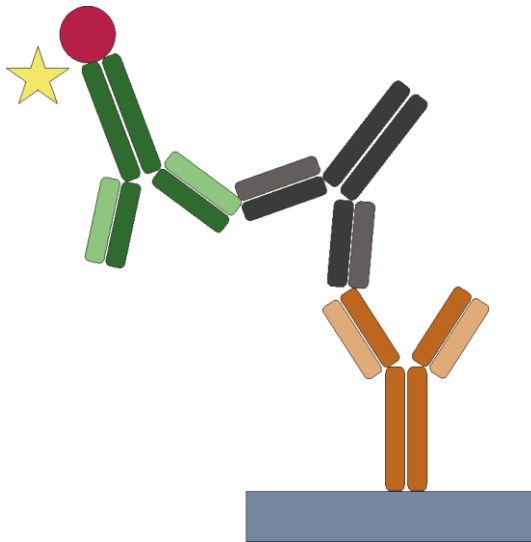
3 Vasta-aineperäiset häiriötekijät

3.1 Heterofiiliset vasta-aineet

Heterofiiliset vasta-aineet jakautuvat niin sanottuihin todellisiin heterofiilisiin vasta-aineisiin ja ihmisen hiiren vasta-aineisiin (engl. *human anti-mouse antibodies*, HAMA). Todelliset heterofiiliset vasta-aineet ovat yleisesti heikkoja, ja niillä on useita multispesifisiä toimintoja. Niitä tuotetaan heikosti määriteltyjä antigeenejä vastaan. HAMA-vasta-aineita sen sijaan tuotetaan hyvin määriteltyjä antigeenejä vastaan, ja siksi niiden aviditeetti on vahva. Hoidot, joissa potilasta hoidetaan eläimen immunoglobuliineilla, aiheuttavat HAMA:n muodostumista. (Lippi ja muut 2013.)

Heterofiilisiä vasta-aineita voi muodostua monen eri tekijän seurauksena. Näitä ovat muun muassa terapeuttisissa ja diagnostisissa tarkoituksissa käytettävät hiiren monoklonaaliset vasta-aineet, autoimmuunisairaudet ja verensiirron tuotteet. (Lakusic ja muut 2021.) Tämän lisäksi myös virusten aiheuttamat infektiot aiheuttavat heterofiilisten vasta-aineiden muodostumista. Näitä ovat esimerkiksi rubella-, entero- ja adenovirusten infektiot, jotka aiheuttavat B-lymfosyyttien polyklonaalisen aktivoinnin virusten oltua vuorovaikutuksessa CR2-komplementtiresptorin kanssa. (Lippi ja muut 2013.)

Heterofiilillä vasta-aineilla on merkittäviä vaikutuksia immunomäärityksiin, kuten troponiinimäärityksiin. Ne aiheuttavat häiriöitä sekä cTnI- että cTnT-testeihin, minkä seurauksena testien mittaama troponiiniarvo on valheellisen korkea ja tulokset ovat vääriä positiivisia. (Lippi ja muut 2013.) CTnI-määritykset, ja myös cTnT-määritykset, ovat yleensä kaksipuolisia määrityksiä, joissa sitojavasta-aine sitoutuu cTnI:hin ja leimavasta-aine sitoutuu sitojavasta-aineen sitomaan cTnI:hin. Tämän avulla voidaan tuottaa mitattava signaali, jonka avulla voidaan määrittää troponiinin määrä näytteessä. Heterofiiliset vasta-aineet muodostavat komplekseja tunnistus- ja leima-vasta-aineiden kanssa. Ne luovat sillan tunnistus- ja leima-vasta-aineiden välille, kuten kuvassa 3 esitetään, jolloin syntyvä mitattava signaali aiheuttaa väärän positiivisen tuloksen testille. (Giannitsis ja muut 2010; Lakusic ja muut 2021.)



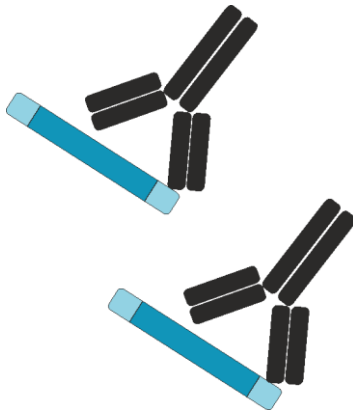
Kuva 3: Heterofiilisen vasta-aineen aiheuttama häiriö hs-cTn testiin. Sitojavasta-aine on kuvattu ruskealla ja leimattu vasta-aine vihreällä. Heterofiilinen vasta-aine, kuvattu mustalla, ristisitoo määrittymisen vasta-aineet ja tuottaa cTn-molekyylistä riippumattomia signaaleja. Tämä johtaa valheellisiin cTn-pitoisuuksien nousuun (muokattu kuvasta Hammarsten ja muut 2023a).

Heterofiilisten vasta-aineiden, HAMA:n tai molempien aiheuttamat häiriöt ovat mahdollisia troponiinimäärityksissä, sillä niiden esiintymistiheys on yleisväestössä 0,1–3,1 %. Tämä prosenttiosuus voi kuitenkin nousta jopa 50 prosenttiin tietyissä potilasryhmissä, esimerkiksi pysyviä infektioita sairastavilla potilailla. Heterofiilisten vasta-aineiden aiheuttamia häiriöitä on tärkeä epäillä aina tapauksissa, joissa troponiinimääritysten tulokset eivät sovi yhteen kliinisten tutkimusten tulosten kanssa. (Lippi ja muut 2013.)

3.2 Troponiiniautovasta-aineet

Makrotroponiini on endogeenisistä sydämen troponiiniautovasta-aineista (engl. *endogenous cardiac troponin autoantibodies*, cTnAABs) ja verenkierron sydämen troponiinista (engl. *cardiac troponin*, cTn) muodostunut immunokompleksi, kuten kuvassa 4 esitetään (Lam ja muut 2020a). Makrotroponiinilla on verenkierrossa pidempi puoliintumisaika verrattuna vapaaseen cTn:ään, minkä takia se aiheuttaa normaalia korkeamman cTn:n vakaan tilan tason, joka ei ole seurausta sydänlihaksen vaurion takia verenkiertoon vapautuvasta troponiinista. Siten makrotroponiini voi aiheuttaa hs-cTn-testeissä vääriä positiivisia tuloksia. (Hammarsten ja muut 2023a.) Tämän lisäksi makrotroponiini voi myös aiheuttaa hyvin poikkeavia troponiinituloksia, jotka johtuvat eroista testien määrittelyherkkyydestä sitä kohtaan (Lam ja Kyle 2023). cTnAAB:eiden

esiintyvyys on cTnI:llä 0–12,7 % ja cTnT:llä 0–9,9 %, mutta nämä arvot voivat olla jopa kolminkertaiset henkilöillä, joilla on vakiintunut sydänsairaus (Lam ja muut 2021).



Kuva 4: Makrotroponiini aiheuttama häiriö hs-cTn testiin. Troponiini-antivasta-aine (kuvattu mustalla) muodostaa cTn-molekyylien (kuvattu sinisellä palkilla) kanssa vasta-aine-cTn-komplekseja. Nämä kompleksit aiheuttavat vakaan cTn-pitoisuuden nousun, joka ei välttämättä ole liitännäinen sydäimestä vapautuvan troponiinin aiheuttamaan cTn-pitoisuuden nousuun (muokattu kuvasta Hammarsten ja muut 2023a).

Makrotroponiinin läsnäolo näytteessä voidaan tunnistaa alhaisella cTnI-pitoisuuden palautumisella immunoglobuliinin poiston jälkeen (Lam ja muut 2020a). Lam työryhmineen (2020a) selvitti makrotroponiinin vaikutuksia cTnI:hin ja cTnT:hen *in vitro*-sekoitustutkimuksilla. Tutkimuksissa sekoitettiin kahta koostumukseltaan erilaista cTnI-standardia, jotka joko sisälsivät cTnT:tä tai eivät, yhteen näytteiden kanssa, jotka joko sisälsivät makrotroponiinia tai eivät. Tuloksien perusteella työryhmä päätteli, että makrotroponiini voi joillakin potilailla liittyä sekä cTnI:hin että cTnT:hen, mikä häiritsee cTnI:tä ja cTnT:tä määrittäviä hs-cTn-testejä. Tutkimuksessa makrotroponiinin läsnäolo näytteissä johti negatiiviseen analyttiseen häiriöön, mutta vaikutuksen voimakkuus riippui potilaasta ja käytetystä määrittämisestä. Lam työryhmineen esitti tulosten perusteella oletuksen, jonka mukaan sekoituksessa cTnAAB:t sitoutuvat sydänperäiseen troponiiniin, mikä johtaa kriittisten cTn-epitopien peittämiseen. Kyseessä ovat ne epitopit, jotka reagenssivasta-aineet tunnistavat cTn-määrittäyksissä. Tästä johtuu tutkimuksessa havaittu negatiivinen analyttinen häiriö. (Lam ja muut 2020a.)

Vylegzhana työryhmineen (2017) tutki, miten cTnAAB:t vaikuttavat cTnI:n tunnistamiseen testeillä, joiden tiedetään olevan herkkiä cTnAAB:ille. Tutkimuksessa käytettiin sydämen troponiinia neljässä eri muodossa: cTnI:nä, cTnT:nä, kolmiosisaisena sydämen troponiinikompleksina (engl. *ternary cardiac troponin complex*, I-T-C) ja binaarisena sydämen troponiinikompleksina (engl. *binary cardiac troponin complex*, I-

C). Tulosten perusteella työryhmä vahvisti, että cTnAAB:t vuorovaikuttavat vain I-T-C:n kanssa eivätkä I-C:n tai vapaiden cTnI-molekyylien. CTnAAB:t vaikuttavat myös cTnT-testeihin, jos cTnT on näytteessä I-T-C-muodossa. Vaikutusta vapaan cTnT:n mittaamiseen ei kuitenkaan ole. Tutkimuksen perusteella työryhmä selvitti, että cTnAAB:t vaikuttavat negatiivisesti I-T-C:tä mittaaviin testeihin. Tämän takia cTnI:n pitoisuus sydänkohtauspotilaiden varhaisissa näytteissä saatetaan aliarvioida 5–10 %:lla sydänkohtauspotilaista. (Vylegzhanina ja muut 2017.)

3.3 Vasta-aineperäisten häiriötekijöiden tunnistaminen

Vasta-aineperäisiä häiriötekijöitä epäillään tilanteissa, joissa kliininen epäily sydänsairaudelle on matala. Hammarsten työryhmineen (2023a) käsittelee artikkelissaan erilaisia menetelmiä, joiden avulla troponiinimääritysten häiriötekijöitä pystytään tunnistamaan ja estämään, kuten taulukossa 1 on esitetty. Ensimmäinen menetelmä on analyysin toistaminen toisella määrityksellä. Jos alkuperäisen ja uuden määrityksen tulokset ovat ristiriidassa keskenään, on mahdollista, että näytteessä on häiritseviä tekijöitä. Tätä tukevat erilaiset tekijät, kuten cTn:n pitoisuus alle yläviiterajan (engl. *upper reference limit*, URL) vaihtoehtoisella testillä tai kahdella eri testillä analysoitujen cTn:n konsentraatiot eroavat toisistaan 3–5- kertaisesti. Vaikka häiriötekijöitä voidaan rajata pois analyysin toistamisella, on mahdollista, että häiriötekijä vaikuttaa molempiin analyysimenetelmiin. (Hammarsten ja muut 2023a.)

Toinen tapa häiriötekijöiden tunnistamiseen on polyetyleeniglykolisaostaminen (engl. *polyethylene glycol precipitation*, PEG percipitation). Menetelmä saostaa useimmat plasmaproteiinit, mukaan lukien immunoglobuliinit, joten menetelmää käytetään vasta-aineiden aiheuttamien häiriöiden tunnistamiseen. Häiriötekijät tunnistetaan cTn:n konsentraation mittaamisella ennen ja jälkeen PEG-käsittelyn. Vasta-aineiden aiheuttamaa häiriötä voidaan epäillä, jos cTn:n konsentraatio laskee mittauksissa enemmän kuin 80 prosenttia tai, jos lasku eroaa huomattavasti rutiinikontrollinäytteistä. PEG:tä käytettäessä on huomioitava, että sen läsnäolo vaikuttaa eri cTn-määrityksiin eri tavoin, mikä voi häiritä määrityksen tulkitsemista. (Lafrenière ja muut 2023.)

Heterofiilisten vasta-aineiden aiheuttamat häiriöt saadaan selvitettyä heterofiilisiä vasta-aineita estävällä reagensseilla (HBR). Reagenssin lisäämisestä seuraava cTn-

konsentraation merkittävä laskeminen viittaa ristisitivien vasta-aineiden aiheuttamaan virheelliseen cTn-konsentraation kasvuun. (Lippi ja muut 2013.) Reagenssin avulla selvitettyjä häiriöitä ei voida kuitenkaan lopullisesti selvittää, sillä reagenssin koostumus on omistusoikeudellista tietoa (Hammarsten ja muut 2023a.)

Vasta-aineiden aiheuttamia häiriöitä voidaan tunnistaa myös immunoglobuliinin poistolla. IgG-proteiini voidaan poistaa tutkittavasta näytteestä proteiini A tai proteiini G resiineillä. cTn:n konsentraatio mitataan ennen käsittelyä ja sen jälkeen. Jos cTn:n konsentraatio laskee yli 60 prosenttia IgG-proteiinin poistamisen jälkeen tai, jos konsentraation lasku eroaa merkittävästi rutiinikontrollinäytteistä, voidaan epäillä vasta-aineen aiheuttamaa virheellistä cTn-konsentraation nousua. (Lam ja muut 2020b; Hammarsten ja muut 2023b)

Viimeinen tapa tunnistaa vasta-aineiden aiheuttamia häiriöitä troponiinimäärityksissä ovat mitatun cTn:n natiiviin molekulaariseen painoon perustuvat menetelmät. CTn:n molekulaarinen paino on alle 40 kDa. Sen sijaan makrotroponiinia aiheuttavien vasta-aine-cTn-kompleksien ja häiritsevien vasta-aineiden molekulaarinen paino on 150 kDa. Nämä häiritsevät tekijät voidaankin erottaa troponiinista niiden molekulaarisen painon perusteella. Molekulaarisen painon selvittämiseen käytettäviä tekniikoita ovat geelisuodatuskromatografia sekä sakkaroosigradienitiultrasentrifugointi. Nämä menetelmät ovat huomattavasti työlämpiä kuin muut yllä mainitut menetelmät, ja siksi niitä tulisi käyttää vain niissä tilanteissa, joissa immunoglobuliinin poistosta proteiineilla A tai G tai PEG-saostuksella saadut tulokset eivät ole selkeitä. (Hammarsten ja muut 2023a.)

Taulukko 1: Tapoja, joilla voidaan tutkia mahdollisia häiriöitä cTn-määrityksissä (muokattu taulukosta Hammarsten ja muut 2023a).

| Menetelmä | Toimintatapa | Analyysoaika | Edut | Haitat |
|---|--|--------------|---|---|
| Vaihtehtoinen hs-cTn-määritys | Vaihteleva | alle 1h | Helppo, nopea ja edullinen. | cTn-häiriöitä saattaa jäädä huomaamatta. |
| PEG-saostus | Suurien molekyylien, kuten immunoglobuliinin, saostus. | 1h | Helppo, nopea ja edullinen. | PEG:n läsnäolo näytteessä vaikuttaa eri tavoin eri cTn-määrityksiin. |
| Proteiini A/G spin-kolonne | IgG-proteiinin poistaminen. | 1h | Helppo, nopea ja edullinen. IgG:n spesifinen poistaminen. | Tunnistaa vain IgG:n aiheuttamat häiriöt. |
| Heterofiilisiä vasta-aineita estävä reagenssi | Ristisitivien vasta-aineiden estäminen. | alle 1h | Helppo, nopea ja edullinen. | Ei tunnista makrotroponiinia. |
| Geelisuodatuskromatografia | Molekyylipainoon perustuva erotus. | 24h | Löytää minkä tahansa vasta-aineen aiheuttaman häiriön. | Hidas ja työläs. Vain yksi näyte voidaan tutkia kerralla. Vaatii hyviä laboratoriotaitoja sekä erityistä laitteistoa. |
| Sukroosigradienitiultrasentrifugaatio | Molekyylipainoon perustuva erotus. | 24h | Löytää minkä tahansa vasta-aineen aiheuttaman häiriön. Useita näytteitä voidaan tutkia samanaikaisesti. | Hidas ja työläs. Vaatii hyviä laboratoriotaitoja sekä erityistä laitteistoa. |

4 Biotiini häiriötekijänä

Biotiini on B-vitamiinikompleksin jäsen, ja se toimii kofaktorina viidelle biotiiniriippuvaiselle karboksylaasille, joten sillä on kriittinen rooli glukogeenisissä, rasvahapposynteesissä ja aminohappokataboliassa (Dasgupta 2022). Ilman reseptiä myytävien biotiinivalmisteiden myynti on kasvanut runsaasti, johtuen biotiiniin väitetyistä hyödyistä liittyen kauneudenhoitoon, esimerkiksi hiusten ja kynsien hyvinvointiin liittyen (Frame ja muut 2019). Biotiinin liiallinen käyttö voi kuitenkin johtaa häiriöihin immunomäärityksissä, erityisesti biotinyloituja vasta-aineita käyttävissä määrityksissä. Kilpailevissa immunomäärityksissä biotiini voi aiheuttaa positiivisia häiriöitä, mutta kaksipuolisissa immunomäärityksissä se aiheuttaa negatiivista häiriötä. (Dasgupta 2022.)

CTn-testeissä käytetään kaksipuolisia määrityksiä, joissa sitoja-vasta-aine on biotinyloitu ja toinen vasta-aine on kytketty reporterimolekyyliin. Biotinyloidut sitojavasta-aineet immobilisoidaan kiintokantajaan biotiinistreptavidiinivuorovaikutusten avulla. Liiallinen biotiini saattaa sitoutua streptavidiniin, ja näin estää sitojavasta-aineen sitoutumisen kiintokantajaan. Tämän seurauksena cTn:n pitoisuus näytteessä saatetaan aliarvioida, mikä johtaa diagnosoimattomaan sydänkohtaukseen. (Frame ja muut 2019.)

Frame työryhmineen (2019) selvitti tutkimuksessaan biotiinin vaikutuksia kolmeen cTn-määritykseen. Tutkimuksessa käytettävät määritykset olivat Gen 5 cTnT-määritys, nykyaikainen cTnT-määritys sekä tutkimukseen perustuva cTnI-määritys. Nykyaikaisilla troponiinimäärityksillä tarkoitetaan erittäin herkkiä määrityksiä edeltäneitä määrityksiä (Apple ja muut 2017). Gen 5 cTnT ja nykyaikainen cTnT-määritys käyttävät streptavidiniin ja biotiinin vuorovaikutusvaihetta, johon biotiini saattaa vaikuttaa aiheuttaen vääriä negatiivisia tuloksia. Tutkimuksessa terveet potilaat nauttivat biotiinia, jonka jälkeen heidän plasmanäytteisiinsä sekoitettiin tunnettu määrä cTn:ää, ja tämän jälkeen näytteet tutkittiin edellä mainituilla määrityksillä. Tulosten perusteella biotiini aiheutti huomattavaa häiriötä Gen 5 cTnT-testiin, mutta nykyaikaiset cTnT- ja hs-cTnI-määritykset eivät häiriintyneet tutkimuksessa käytetystä biotiiniannoksesta. (Frame ja muut 2019.)

Harley työryhmineen (2021) tutki biotiinin vaikutuksia yhdeksään hs-cTn-määritykseen. Tutkimuksen perusteella yksi käytetyistä määrityksistä, Roche Cobas e 411 cTnT, oli

herkin biotiinin vaikutuksille. Ilman reseptiä saatava biotiiniannos on 5–10 mg, ja potilaat, jotka käyttävät tämän määrän biotiinilisää päivittäin, voivat saavuttaa 50–100 ng/ml biotiinipitoisuuden plasmassa. Työryhmän tutkimuksen perusteella tämä voi aiheuttaa 15–35 % virheellisesti alhaisen cTn-tason palautumisen Roche Cobas e 411 cTnT-määrityksellä. Muut tutkimuksessa käytetyt määritykset eivät häiriintyneet, jos biotiinipitoisuus oli alle 3,500 ng/ml. Tämä on enimmäispitoisuus, jota Yhdysvaltojen FDA suosittelee valmistajia sisällyttämään biotiinihäiriöiden arviointiinsa. Tutkimuksessa saatujen tulosten perusteella kaikissa, paitsi yhdessä käytetystä hs-cTn-määrityksestä, biotiinin häiriökynnykset olivat vastaavat tai korkeammat kuin valmistajien väittämät. (Harley ja muut 2021.)

Jos potilaan tiedetään käytettävän suuria annoksia biotiinilisää tai sitä epäillään, kun määrityksen tulokset ovat ristiriidassa potilaan kliinisen tilan kanssa, on selvitettävä biotiinin mahdollinen häiriö määritykseen ja pyrittävä estämään sen vaikutus. Yksi tapa tähän on toistaa testi sellaisella määrityksellä, joka ei ole herkkä biotiinin vaikutukselle. Toinen tapa on ylimääräisen biotiinin adsorptio streptavidiinilla päällystetyillä mikrohiukkasilla. Tämä tekniikka kuitenkin vaatii lisävalidointia laboratoriossa ennen käyttöön ottamista. (Saenger ja muut 2019.)

5 Hemolyysi häiriötekijänä

Hemolyysi, eli punasolujen hajoaminen, on yksi suurimmista esianalyttisistä häiriötekijöistä. Se aiheuttaa jopa 40–70 % kaikista näytteiden hylkäyksistä. (Saenger ja muut 2019.) Verisolut voivat vaurioitua esimerkiksi nopeiden kiihdytyksien, säteittäisten painovoimien tai ilmanpaineen muutoksien seurauksena, mikä johtaa näytteen hemolysoitumiseen. Näytteen kuljetus on suurin syy *in vitro* tapahtuvalle hemolyysille. (Wei ja muut 2019.)

Hemolyysin tiedetään aiheuttavan häiriötä hs-cTn-määrittämissä. Yksinkertaisin syy on hemolyysin aiheuttama muutos tutkittavan analyysin pitoisuuteen. Hemolyysissä vapautuvat yhdisteet, kuten hemoglobiini, rakenteelliset proteiinit, entsyymit ja lipidit, voivat sitoutua analyysiin ja siten tukkia vasta-aineen sitoutumiskohdan. Tämän lisäksi hemolyysi voi aiheuttaa häiriötä myös vaientamalla havaitsemismenettelyssä käytettyjä reaktioita. (Snyder ja muut 2004.) Sen aiheuttama häiriö voi johtaa sekä väärin negatiivisiin että väärin positiivisiin tuloksiin. Molemmat tapaukset voivat estää yksittäisten arvojen tai sarja-arvojen tulkinnan. Hemolyysin läsnäolo näytteessä voidaan tutkia joko manuaalisesti eli visuaalisella tai kvalitatiivisella arvioinnilla, tai käyttää automaattista tunnistusta eli kvantitatiivista tai semi-kvantitatiivista arviointia. Automaattista tunnistamista tuetaan hyvän laboratoriokäytännön vertailuarvona, koska se lisää luotettavuutta ja tarkkuutta tulosten raportointiin laboratorioissa. Kaikilla määritysalustoilla tai vierihoidollaitteilla ei kuitenkaan ole mahdollista suorittaa automaattista hemolyysin tunnistamista, mikä aiheuttaa mahdollisesti ongelmia potilasturvallisuuteen tarkkojen cTn-tulosten ilmoittamisessa. Tämän lisäksi hemolyysiä ei ole mahdollista havaita kokoverta käytävistä näytteistä. (Saenger ja muut 2019.)

Pneumaattista putkijärjestelmää (engl. *pneumatic tube system*, PTS) käytetään sairaaloissa työmäärän vähentämiseksi ja kliinisten laboratorioiden läpimenoajan lyhentämiseksi. PTS kuljettaa moniasemien välillä tehokkaasti laboratorionäytteitä ja laboratorioraportteja. Hemolyysi on pääsyy esianalyttisille häiriöille PTS:ssä. (Wei ja muut 2019.) Wei työryhmineen (2019) tutki PTS:n vaikutusta hs-cTn-määrittämissä. Tulosten perusteella hemolyysin ilmaantuvuus PTS:ssä oli 7,26 %, mutta pidemmällä reitillä tämä osuus nousi 56,7 %:iin. Tutkimuksen perusteella hs-cTnT väheni virheellisesti PTS-näytteiden kokonaismäärässä. Tämän lisäksi työryhmä havaitsi, että PTS näytteistä vapautunut vapaa plasmahemoglobiini aiheutti negatiivista häiriötä

määrityksiin. Työryhmän tuloksien perusteella hemolyysi liittyi vahvasti hs-cTnT:n virheelliseen vähenemiseen ensiavun potilailla. (Wei ja muut 2019.)

Myös Harley työryhmineen (2021) tutki hemolyysin vaikutuksia hs-cTn-määrityksiin. Tutkimuksessa käytetystä yhdeksästä hs-cTn määrityksestä kaksi, Roche Cobas e 411 ja Cobas 411 V2 cTnT-määritykset, olivat alttiimpia hemolyysin aiheuttamille häiriöille. Molemmat määrityksistä osoittivat cTn-arvon heikompaa palautumista hemoglobiinipitoisuuden kasvaessa näytteissä. Tutkimuksessa havaittiin hemolyysin aiheuttavan vain negatiivista häiriötä hs-cTn-määrityksiin. Hemolyysin aiheuttaman häiriön lisäksi työryhmä tutki myös hemolyysin ja biotiinin yhteisvaikutusta hs-cTn-määrityksiin. Tulosten perusteella näiden tekijöiden yhteisvaikutus aiheutti joissakin biotiiniherkissä määrityksissä biotiinin häiriökynnyksen laskua, kun hemolyysin pitoisuus kasvoi. Tämä osoittaa biotiinin ja hemolyysin aiheuttamien häiriöiden mahdollisen additiivisen vaikutuksen. (Harley ja muut 2021.)

6 Loppuyhteenveto

Erittäin herkäät troponiinimääritykset ovat mahdollistaneet sydänkohtausten nopeamman ja tarkemman havaitsemisen, minkä ansiosta sydänkohtauspotilaiden hoito on voitu aloittaa aiempaa tehokkaammin. Nämä määritykset eivät kuitenkaan ole täydellisiä, vaan erilaiset häiriötekijät voivat vaikuttaa niillä saatavien tuloksien oikeellisuuteen. Häiriötekijöiden tunnistaminen on erittäin tärkeää hs-cTn-määritysten diagnostisen tarkkuuden parantamista varten tulevaisuudessa. Kun häiriötekijät ovat tiedossa, on testejä mahdollista kehittää siten, että ne eivät enää reagoi kyseisiin tekijöihin.

Erilaiset näytteessä olevat häiriötekijät tai näytteen käsittelystä seuraavat häiriöt voivat aiheuttaa vääriä positiivisia tai vääriä negatiivisia tuloksia määrityksessä. Siksi onkin ensiarvoisen tärkeää, että laboratoriohenkilökunta ja hoitohenkilökunta osaavat epäillä häiriötekijöiden läsnäoloa näytteessä, jos testitulokset ja potilaan kokemat oireet eivät ole yhtäläiset. Eri toimijoiden välinen toimiva ja tehokas kommunikaatio on tärkeää häiriötekijöiden huomaamiselle. Lisäksi on tärkeää kouluttaa sekä laboratorio- että hoitohenkilökuntaa liittyen mahdollisiin häiriötekijöihin ja niiden aiheuttamiin ongelmiin tuloksissa.

Hs-cTn-testien kehittämisestä hyötyvät monet eri mittakaavan tahot, mukaan lukien yhteiskunta, hoitohenkilöstö ja potilaat. Tarkoilla testeillä voidaan välttää mahdolliset turhat ja invasiiviset lisätutkimukset, ja toisaalta myös välttää sydänkohtausoireita kokevien potilaiden enneaikainen kotiuttaminen. Näin potilasturvan parantaminen edistyy. Hoitohenkilökunta säästää aikaa ja resursseja, kun lisätestausta ja turhia hoitoja ei tarvita. Lisäksi vältetään mahdollisilta vääriltä diagnooseilta. Samalla yhteiskunta säästää rahaa, kun kalliita lisätutkimuksia ei tarvita. Myös ensiavun kuormittuminen vähenee, kun potilaat voidaan kotiuttaa tai ottaa sisälle oikealle osastolle nopeammin.

Kaikkia hs-cTn-määritysten häiriötekijöitä ei vielä tunneta, tai niiden aiheuttamien häiriöiden mekaniikkaa ei vielä tiedetä tarkasti. Siksi on tärkeää tehdä lisää tutkimusta liittyen häiriötekijöihin, niiden mekaniikkaan ja niiden aiheuttamien vaikutuksien estämiseen liittyen.

7 Kirjallisuus

- Apple, F. S., Sandoval, Y., Jaffe, A. S. & Ordonez-Llanos, J. (2017) Cardiac Troponin Assays: Guide to Understanding Analytical Characteristics and Their Impact on Clinical Care. *Clin Chem* **63**:73–81.
- Dasgupta, A. (2022) Immunoassay design and biotin interference. Teoksessa *Advances in Clinical Chemistry* (Vsk. 109, ss. 165–183). Elsevier.
- Frame, I. J., Joshi, P. H., Mwangi, C., Gunsolus, I., De Lemos, J. A., Das, S. R., Sarode, R., Balani, J., Apple, F. S., Muthukumar, A. (2019) Susceptibility of Cardiac Troponin Assays to Biotin Interference. *Am J Clin Pathol* **151**:486–493.
- Giannitsis, E., Kurz, K., Hallermayer, K., Jarausch, J., Jaffe, A. S. & Katus, H. A. (2010) Analytical Validation of a High-Sensitivity Cardiac Troponin T Assay. *Clin Chem* **56**:254–261.
- Hammarsten, O., Warner, J. V., Lam, L., Kavsak, P., Lindahl, B., Aakre, K. M., Collinson, P., Jaffe, A. S., Saenger, A. K., Body, R., Mills, N. L., Omland, T., Ordonez-Llanos, J., Apple, F. S. (2023a) Antibody-mediated interferences affecting cardiac troponin assays: Recommendations from the IFCC Committee on Clinical Applications of Cardiac Biomarkers. *Clin Chem Lab Med CCLM* **61**:1411–1419.
- Hammarsten, O., Becker, C. & Engberg, A. E. (2023b) Methods for analyzing positive cardiac troponin assay interference. *Clin Biochem* **116**:24–30.
- Han, G.-R. & Kim, M.-G. (2019) Design, Synthesis, and Evaluation of Gold Nanoparticle-Antibody-Horseradish Peroxidase Conjugates for Highly Sensitive Chemiluminescence Immunoassay (hs-CLIA). *Biotechnol Bioprocess Eng* **24**:206–214.
- Harley, K., Bissonnette, S., Inzitari, R., Schulz, K., Apple, F. S., Kavsak, P. A. & Gunsolus, I. L. (2021) Independent and combined effects of biotin and hemolysis

- on high-sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Chem Lab Med CCLM* **59**:1431–1443.
- Krintus, M. & Panteghini, M. (2020) Laboratory-related issues in the measurement of cardiac troponins with highly sensitive assays. *Clin Chem Lab Med CCLM* **58**:1773–1783.
- Lafrenière, M. A., Tandon, V., Ainsworth, C., Nouri, 'Kazem, Mondoux, S. E., Worster, A. & Kavsak, P. A. (2023) Storage conditions, sample integrity, interferences, and a decision tool for investigating unusual high-sensitivity cardiac troponin results. *Clin Biochem* **115**:67–76.
- Lakusic, N., Sopek Merkas, I., Lucinger, D. & Mahovic, D. (2021) Heterophile antibodies, false-positive troponin, and acute coronary syndrome: A case report indicating a pitfall in clinical practice. *Eur Heart J - Case Rep* **5**:ytab018.
- Lam, L., Heron, C., Aspin, L., Ha, L. & Kyle, C. V. (2020a) Change in troponin concentrations in patients with macrotroponin: An in vitro mixing study. *Clin Biochem* **85**:43–48.
- Lam, L., Aspin, L., Heron, R. C., Ha, L. & Kyle, C. (2020b) Discrepancy between Cardiac Troponin Assays Due to Endogenous Antibodies. *Clin Chem* **66**:445–454.
- Lam, L., Ha, L., Gladding, P., Tse, R. & Kyle, C. (2021) Effect of macrotroponin on the utility of cardiac troponin I as a prognostic biomarker for long term total and cardiovascular disease mortality. *Pathology (Phila)* **53**:860–866.
- Lam, L. & Kyle, C. (2023) Practical approaches to the detection of macrotroponin. *Ann Clin Biochem Int J Lab Med* 00045632231197301.
- Lazar, D. R., Lazar, F.-L., Homorodean, C., Cainap, C., Focsan, M., Cainap, S. & Olinic, D. M. (2022) High-Sensitivity Troponin: A Review on Characteristics, Assessment, and Clinical Implications. *Dis Markers* **2022**:1–13.

- Lippi, G., Aloe, R., Meschi, T., Borghi, L. & Cervellin, G. (2013) Interference from heterophilic antibodies in troponin testing. Case report and systematic review of the literature. *Clin Chim Acta* **426**:79–84.
- Saenger, A. K., Jaffe, A. S., Body, R., Collinson, P. O., Kavsak, P. A., Lam, C. S. P., Lefèvre, G., Omland, T., Ordóñez-Llanos, J., Pulkki, K., Apple, F. S. (2019) Cardiac troponin and natriuretic peptide analytical interferences from hemolysis and biotin: Educational aids from the IFCC Committee on Cardiac Biomarkers (IFCC C-CB). *Clin Chem Lab Med CCLM* **57**:633–640.
- Snyder, J. A., Rogers, M. W., King, M. S., Phillips, J. C., Chapman, J. F. & Hammett-Stabler, C. A. (2004) The impact of hemolysis on Ortho-Clinical Diagnostic's ECI and Roche's elecsys immunoassay systems. *Clin Chim Acta* **348**:181–187.
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., White, H. D., ESC Scientific Document Group (2019) Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J* **40**:237–269.
- Vylegzhanina, A. V., Kogan, A. E., Katrukha, I. A., Antipova, O. V., Kara, A. N., Bereznikova, A. V., Koshkina, E. V., Katrukha, A. G. (2017) Anti-Cardiac Troponin Autoantibodies Are Specific to the Conformational Epitopes Formed by Cardiac Troponin I and Troponin T in the Ternary Troponin Complex. *Clin Chem* **63**:343–350.
- Wei, J., Wu, Y., Ling, Y., Chen, X., Zhu, Q. & Xu, J. (2019) False decrease of high-sensitivity cardiac troponin T assay in pneumatic tube system samples. *Clin Chim Acta* **495**:507–511.