

SYDÄNPERÄISEN TROPONIINI I:N KORKEAN HERKKYYDEN VIERITESTIT

TkK-tutkielma
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Biotekniikka
Huhtikuu 2024
Sanni Uusitupa

*Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin
OriginalityCheck -järjestelmällä*

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

SANNI UUSITUPA: Sydänperäisen troponiini I:n korkean herkkyuden vieritestit

Tutkielma, 22 s.

Biotekniikka

Toukokuu 2024

Sydäninfarkti on maailmanlaajuisesti yleisin kuolinsyy. Sen diagnosoinnissa hyödynnetään sydänperäisen troponiinin (cardiac troponin I, cTnI, tai T, cTnT) mittausta verinäytteestä. Diagnoosi on tärkeää saada nopeasti, joten troponiineille on pyritty kehittämään nopeasti toteutettavia, erityisherkkiä vieritestejä. Tutkielmassa esitellään kolme kliinisessä käytössä olevaa ja kolme viime vuosina kehitettyä vielä tutkimusvaiheessa olevaa korkean herkkyuden cTnI-testiä.

Siemens ATELLICA VTLi hs-cTnI, LSI Medience PATHFAST hs-cTnI ja Quidel/Alere TriageTrue hs-cTnI ovat kaupallisia korkean herkkyuden vieritestejä cTnI:lle. Siemens ATELLICA VTLi -testissä mittaaminen perustuu optomagneettiseen biosensoriin, LSI Medience PATHFAST -testissä kemiluminesenssiin ja Quidel/Alere TriageTrue -testissä fluoresenssiin. Testit mahdollistavat cTnI:n mittaamisen kädessä pidettävällä tai pöydälle sopivalla laitteella 8–20 minuutissa 0,7–2,3 ng/l herkkyysrajalla.

Viime vuosina cTnI:n vieritestaukseen on kehitetty AlGaAs/GaAs korkean elektroniliikkuvuuden transistoriin (high electron mobility transistor, HEMT) perustuva testi, mikrofluidiikkaan perustuva useaa merkkiainetta samaan aikaan mittaava testi ja pintatehostettuun Raman-sirontaan (surface-enhanced Raman scattering, SERS) perustuva kvantitatiivinen lateraalivirtaustesti. Testit pystyvät mittamaan cTnI-pitoisuuden 0,5–20 minuutissa 1,0–20,0 ng/l herkkyysrajalla.

Nykyiset kaupalliset hs-cTnI-testit ovat toimivia, mutta testejä voi kehittää yhä paremmiksi. Tulevaisuudessa voisi olla mahdollista saada sydäninfarktin diagnosointiin testi, joka antaa tuloksen lähes saman tien. Testeillä voisi myös mitata useampaa sydäninfarktin merkkiainetta yhtä aikaa. Ylipäätään sydäninfarktin diagnosoinnissa hs-cTn-vieritestit tulevat todennäköisesti yleistymään.

Asiasanat: sydäninfarkti, vieritesti, troponiini, herkkä

Sisällys	
1	Johdanto 2
2	Käytössä olevat testit 4
2.1	Optomagneettiseen biosensoriin perustuva testi 4
2.2	Kemiluminesenssiin perustuva testi 7
2.3	Fluoresenssiin perustuva testi 8
3	Kehitteillä olevat testit 10
3.1	Transistoriin perustuva testi 11
3.2	Useaa merkkiainetta samaan aikaan mittaava testi 12
3.3	Kvantitatiivinen lateraalivirtaustesti 14
4	Yhteenvedo 16

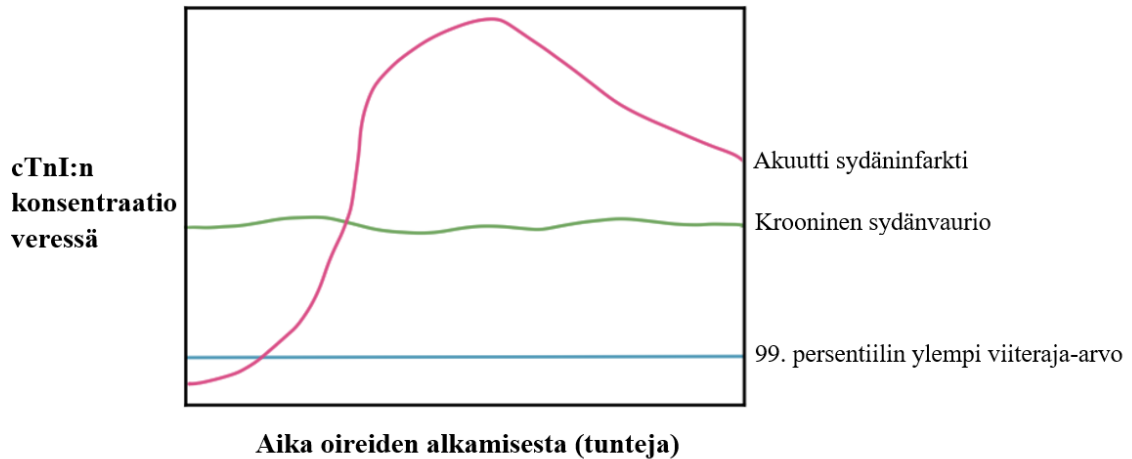
1 Johdanto

Sydäninfarkti on maailmanlaajuisesti yleisin kuolinsyy. Se vaikuttaa varsinkin kehittyneiden maiden vanhempaan väestöön. (Salari ja muut 2023.) Sydäninfarkti johtuu sydämen hapensaannin heikkenemisestä (Thygesen ja muut 2018). Hapenpuute johtuu yleensä jonkinlaisesta tukkeumasta verisuonissa. Sydäninfarktia ei voi diagnosoida pelkkien oireiden perusteella, koska ne voivat viitata myös moniin muihin sairauksiin. Usein diagnosoimisessa käytetään sydänsähkökäyrää eli elektrodiagrammia (EKG). Vain sydämen kammioden alaosiin vaikuttava sydäninfarkti näkyy EKG-käyrällä, joten sydäninfarktin diagnosoimisessa käytetään myös verinäytteistä havaittavia merkkiaineita. (Twerenbold ja muut 2017.)

Troponiinit ovat proteiineja, jotka osallistuvat lihaksen supistumiseen. Sydänperäinen troponiini I (cardiac troponin I, cTnI), sydänperäinen troponiini T (cardiac troponin T, cTnT) ja troponiini C muodostavat kompleksin, joka osallistuu sydänlihaskudoksen säätelyyn. Troponiineista cTnI:tä ja cTnT:tä ilmenee vain sydänlihaksessa. (Katrukha 2013.) Nykyisin sydäninfarktin diagnosoimisen kultaisena standardina pidetään cTnI:n mittaamista (Thygesen ja muut 2018). Sen taso verenkierrossa nousee sydäninfarktin alkaessa ja saavuttaa huippunsa noin 12 tuntia oireiden alkamisen jälkeen. cTnI-taso voi pysyä koholla useamman päivän. (Hillis ja Fox 1999.)

Kun havaitaan cTn-taso, joka on korkeampi kuin terveiden 99. persentiilin viiteraja-arvo, voidaan diagnosoida sydänlihaskudon vaurio. Joillain ihmisillä on sairaus, jonka takia cTn-taso on kroonisesti koholla. Tämän takia sydänlihaskudon vauriota voi kutsua akuutiksi vain, jos muutaman tunnin sisällä toistetussa mittauksessa havaitaan cTn-tason nousu tai lasku. Kuvassa 1 on havainnollistettu cTnI:n tason muutos sydäninfarktissa.

Sydäninfarktin diagnosoimiseen tarvitaan cTn-mittausten lisäksi jokin muu siihen viittaava tekijä, esimerkiksi tyypillisiä sydäninfarktin oireita tai EKG:ssä näkyviä muutoksia. (Thygesen ja muut 2018.)



Kuva 1. *cTnI:n määrän muutokset veressä ajan funktiona. Pinkillä on kuvattu suunnilleen cTnI-konsentraation muutos akuutin sydäninfarktin oireiden alkamisesta, vihreällä cTnI-konsentraatio kroonisessa sydänvammassa ja sinisellä 99. persentiilin ylempi viitearvo. (Muokattu kuvasta Thygesen ja muut 2018)*

Korkean herkkyuden testit (high sensitivity test, hs-testit) pystyvät havaitsemaan hyvin pieniä pitoisuuksia mitattavaa molekyyliä. Jotta cTn-testiä voi kutsua hs-testiksi, sen pitää pystyä havaitsemaan cTn-pitoisuus ainakin 50 %:lla terveistä ihmisistä ja terveiden 99. persentiilin tuloksen vaihtelukerroin saa olla enintään 10 %. Mitä pienempiä pitoisuuksia testi havaitsee, sitä aikaisemmassa vaiheessa diagnoosi voidaan tehdä. (Thygesen ja muut 2018.) Hs-testeissä cTn:n mittauksen pitäisi tapahtua ensimmäisen kerran heti, kun mahdollista, ja toisen mittauksen kahden tunnin sisällä ensimmäisestä mittauksesta. Tulokset pitäisi saada tunnin sisällä näytteen ottamisesta. (AlHabeeb ja muut 2022.)

Vieritestit ovat testejä, joiden avulla diagnoosi voidaan tehdä potilaan lähellä ja nopeasti. Ne eivät sijaitse keskuslaboratoriossa vaan niitä voi käyttää päivystyksessä heti näytteenoton jälkeen. Sydäninfarktin diagnoosi nopeutuu varsinkin, jos testillä voi tehdä ensimmäisen mittauksen jo ambulanssin kyydissä. Nopea diagnosointi sydäninfarktissa on erityisen tärkeää, koska sairaalaan pääsyn jälkeen hoitamaton potilas kuolee usein alle 24 tunnissa (Wu ja muut 2019).

Tässä tutkielmassa selvitetään, millaisia sydänperäisten troponiinien havaitsevia korkean herkkyuden vieritestejä on jo olemassa ja millaisia parannuksia uudet tekniikat

voivat niihin tuoda. Luvussa 2 esitellään kliinisessä käytössä olevat testit ja luvussa 3 esitellään kolme kehitteillä olevaa testimenetelmää.

2 Käytössä olevat testit

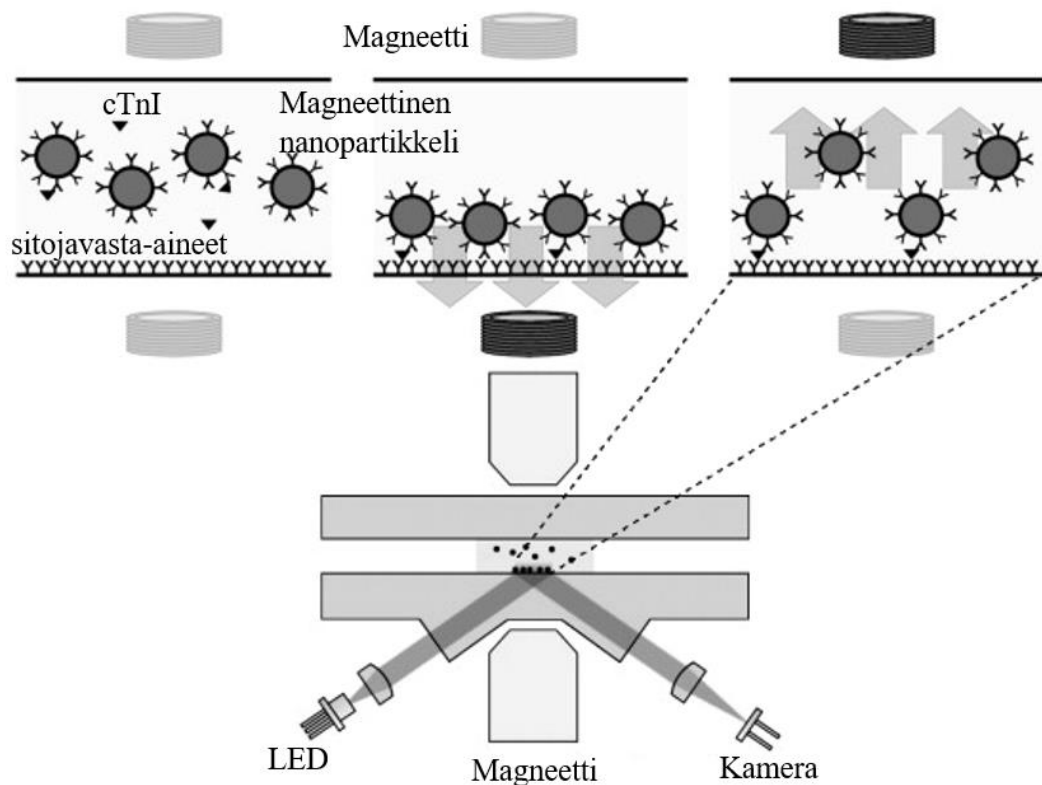
Kliiniseen käyttöön on hyväksytty kolmen eri yrityksen sydänperäisen troponiinin hs-vieritestit. Nämä ovat Siemens ATELLICA VTLi hs-cTnI -vieritesti, LSI Medience PATHFAST hs-cTnI -vieritesti ja Quidel/Alere TriageTrue hs-cTnI -vieritesti. (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2023.) Ne kaikki perustuvat ei-kilpailevaan immunomääritykseen ja määrittävät cTnI:n pitoisuutta. Toisin sanoen cTnI kiinnittyy sekä sitojavasta-aineeseen että signaalia tuottavaan leimattuun vasta-aineeseen. Laitteiden toimintaperiaatteet eivät kuitenkaan ole samanlaiset. Eroja on esimerkiksi leimatekniikoissa, laitteen koossa ja mittausajassa. (Dittmer ja muut 2010; Quidel Cardiovascular Inc. 2018; U.S. Food and Drug Administration 2018.) Tässä luvussa esitellään kliinisessä käytössä olevien hs-cTnI-vieritestien toimintaperiaatteet ja ominaisuudet.

2.1 Optomagneettiseen biosensoriin perustuva testi

Siemens ATELLICA VTLi hs-vieritestissä cTnI:n mittaaminen perustuu optomagneettiseen biosensoriin. Testissä käytetään nanopartikkeleita, joiden pintaan on kiinnitetty paljon anti-cTnI-vasta-ainetta. Testikasetin mittauspinta on päällystetty anti-cTnI-vasta-aineilla ja sen molemmin puolin löytyy sähkömagneetit, joita kytketään päälle ja pois. Testimenetelmä esitellään kuvassa 2. Näyte laitetaan testikasettiin, jossa ovat tarvittavat reagenssit. Testin molemmin puolin olevia magneetteja laitetaan päälle vuorotellen, jolloin nanopartikkelit liikkuvat vaihtaen suuntaa aina kohti päällä olevaa magneettia, jolloin nanopartikkelien pinnalla olevat vasta-aineet sitoutuvat näytteestä tulleisiin cTnI-molekyyleihin. Sekoittumisen jälkeen sensorin puolella oleva magneetti

laitetaan päälle, jolloin se ohjaa partikkelit anti-cTnI-vasta-aineella päällystetylle pinnalle. Pintaan kiinnitetyt anti-cTnI-vasta-aineet sitoutuvat cTnI:n eri epitooppiin kuin magneettisten partikkelien pinnalla olevat vasta-aineet. Lopuksi alempi magneetti laitetaan pois päältä ja ylempi kytketään päälle, jolloin sitoutumattomat partikkelit liikkuvat pois mitattavan alueen päältä.

Mittauspinnalle kiinnittyneiden nanopartikkelien määrä selvitetään kohdistamalla mittauspintaan valoa tietyssä kulmassa testikasetin alapuolelta. Mittauspinnalta heijastuvan valon määrää havaitaan CCD-kameralla. Mittauspinnalla olevat nanopartikkelit saavat heijastuvan valon määrän vähenemään. Nanopartikkelien määrä mittauspinnalla ja samalla cTnI:n konsentraatio näytteessä saadaan selville mittaamalla, paljonko heijastuvan valon määrä on vähentynyt. (Dittmer ja muut 2010.)



Kuva 2. Optomagneettiseen biosensoriin perustuvan cTnI-testin toimintaperiaate.

Ylhäällä vasemmalla on kuvattu tilanne, jossa magneetit eivät ole toiminnassa. cTnI-molekyylit sitoutuvat magneettisten nanopartikkelien pinnalla oleviin vasta-aineisiin. Ylhäällä keskellä alempi magneetti vetää nanopartikkelit puoleensa, jolloin niihin kiinnittyneet cTnI-molekyylit sitoutuvat sitojavasta-aineisiin. Ylhäällä oikealla ylempi magneetti vetää nanopartikkelit, joihin ei ole sitoutunut cTnI-molekyylitä, pois

mittauspinnalta. Alhaalla on kuvattu, kuinka LED-valolla valaistaan mittauspinnalle sitoutuneita magneettipartikkeleita, jolloin takaisin heijastunut valo päätyy kameralle, jonka avulla heijastuneen valon määrä mitataan (Muokattu kuvista Dittmer ja muut 2010).

Testilaitetta pystyy kantamaan kädessä ja siinä on akku, joka voi täyteen ladattuna tekemään noin 60 testiä. Testilaitteen koko on 25 cm x 5,2 cm x 8,5 cm ja paino akun kanssa 780 grammaa. (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 2021.) Näytteenä voi käyttää kokoverta tai plasmää (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2023). Laite antaa tuloksen noin kahdeksassa minuutissa. (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 2021.) Laitteen ulkoasu on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3. *Siemens ATELLICA VTLi hs-vieritesti. Vasemmalla on tarvittavat reagenssit sisältävä testikasetti, johon näyte ladataan. Oikealla on analyysilaitte, johon kasetti syötetään (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 2022).*

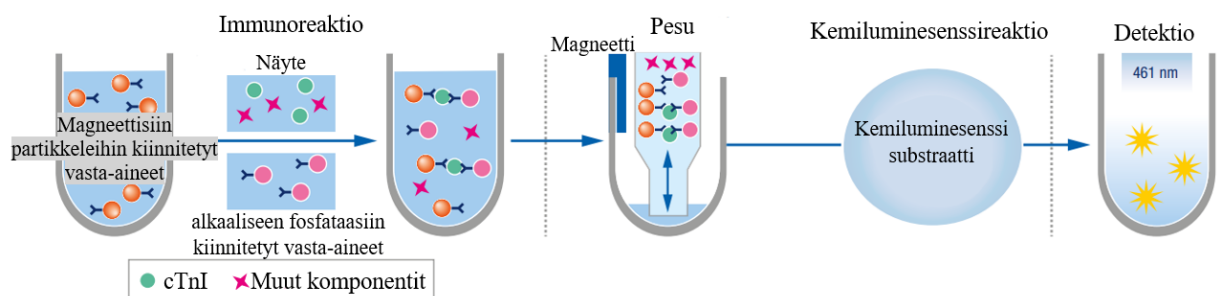
International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) on raportoinut Siemens ATELLICA VTLi hs-vieritestin nollanäytteen rajaksi 0,55 ng/l sekä havaitsemisrajaksi plasmalla 1,2 ng/l ja kokoverellä 1,6 ng/l. Testillä pystyttiin havaitsemaan cTnI:tä terveistä henkilöistä 84 %:lla. Testin 99. persentiilin 22,9 ng/l, jossa sen vaihtelukerroin on plasmalla 6,5 % ja kokoverellä 6,1 %. (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2023)

2.2 Kemiluminesenssiin perustuva testi

LSI Medience PATHFAST hs-cTnI-testissä cTnI:n mittaaminen perustuu kemiluminesenssiin. Myös tässä testissä käytetään magneettisia partikkeleja, jotka on pinnoitettu monoklonaalisella anti-cTnI-vasta-aineella. Ne laitetaan reaktioputkeen alkaaliseen fosfataasiin kiinnitettyjen anti-cTnI-vasta-aineiden, pinta-aktiivista ainetta sisältävän puskurin ja näytteen kanssa. Näytteen cTnI sitoutuu magneettisiin partikkeleihin kiinnitettyihin anti-cTnI-vasta-aineisiin ja alkaaliseen fosfataasiin konjugoidut vasta-aineet sitoutuvat cTnI:n eri epitooppiin. (U.S. Food and Drug Administration 2018.) Testimenetelmä esitellään kuvassa 4.

Sitoutuneiden cTnI-molekyylien erottelu muusta liuoksesta suoritetaan käyttäen Magtration-tekniikkaa. Magtratioissa pesu suoritetaan kertakäyttöisessä kärjessä magneettisesti. Kärjessä on säiliö, väliosa ja ohut kärki. Reaktioliuos imetään säiliöön. Erottelu tehdään väliosassa. Magneettiset partikkelit saadaan pysymään välitilassa sen ulkopuolelle tuodun magneetin avulla. Magtraatioissa tarvitaan vähemmän osia kuin monissa muissa vastaavissa tekniikoissa, joten se on niihin verrattuna yksinkertaisempi ja halvempi. (Obata ja muut 2001.)

Magneettisen pesun jälkeen testiputkeen lisätään kemiluminesenssinen substraatti, joka reagoi alkaalisen fosfataasin kanssa tuottaen valoa. Valo mitataan luminometrillä ja sen määrä on suoraan verrannollinen cTnI:n konsentraatioon. (U.S. Food and Drug Administration 2018.)



Kuva 4. LSI Medience PATHFAST hs-cTnI -testin toimintaperiaate. Testiputkessa ovat magneettisiin partikkeleihin kiinnitetty vasta-aineet. Putkeen lisätään näyte ja alkaaliseen fosfataasiin kiinnitetty vasta-aineet. cTnI-molekyylit sitoutuvat magneettisiin partikkeleihin konjugoituneisiin vasta-aineisiin ja alkaaliseen fosfataasiin konjugoituneisiin vasta-aineisiin. Magneettinen pesu tapahtuu kertakäyttöisessä

kärjessä, josta alkaaliseen fosfataasiin sitoutuneet cTnI-molekyylit vapautetaan toiseen reaktioputkeen. Sinne lisätään kemiluminesenssi substraatti, joka reagoi alkaalisen fosfataasin kanssa tuottaen valoa, joka mitataan. (Polymedco 2020)

Kaikki reagenssit ladataan kertakäyttökasetille, joka laitetaan pöytätasolle laitettavan analyysilaitteen sisään. Laitteella voi ajaa kuusi testiä yhtä aikaa. (Kurihara ja muut 2008.) Laitteen koko on 34 cm x 57 cm x 47 cm ja paino 28 kg (Polymedco 2020). Laitteeseen voi ladata myös muiden molekyylien mittaamiseen tarkoitettuja kasetteja (Kurihara ja muut 2008.) Kasetin ja analyysilaitteen ulkoasut näkyvät kuvassa 5. Näytteenä voi käyttää kokoverta tai plasmaa (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2023). Analyysi kestää noin 17 minuuttia (Kurihara ja muut 2008).

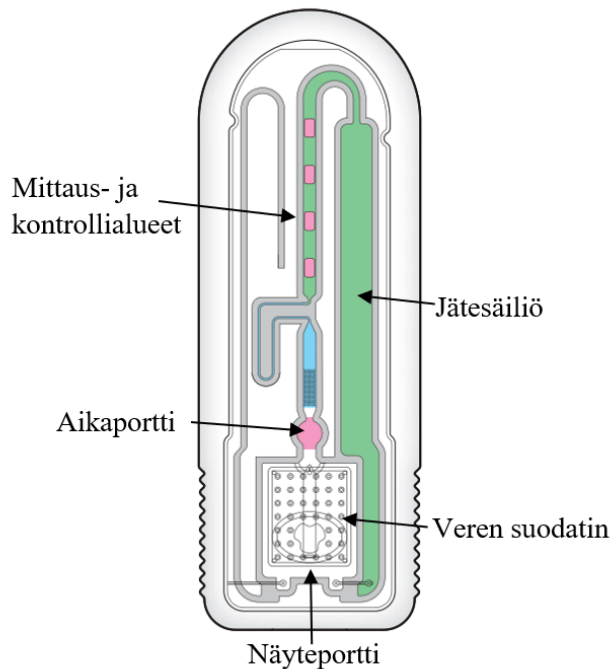


Kuva 5. LSI Medience PATHFAST hs-cTnI-testi. Oikealla on testikasetti, johon näyte ladataan. Vasemmalla on analyysilaitte, johon kasetti syötetään (Polymedco 2020).

IFCC on raportoinut LSI Medience PATHFAST hs-cTnI-testin nollanäytteen rajaksi 1,23 ng/l sekä havaitsemisrajaksi 2,33 ng/l. Terveistä 66,3 %:lla havaittiin cTnI:tä. Testin 99. persentiili on 27,9 ng/l, jossa sen vaihtelukerroin on 6,1 %. (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2023.)

2.3 Fluoresenssiin perustuva testi

Quidel/Alere TriageTrue hs-cTnI-vieritestissä cTnI:n mittaaminen perustuu fluoresenssiin. Testissä fluoresoiviin aineisiin konjugoidut anti-cTnI-vasta-aineet reagoivat cTnI:n kanssa. Vasta-aineet, joihin cTnI on sitoutunut, liikkuvat kertakäyttöisellä testikasetilla kapillaarivoimien avulla niille spesifisille alueille. Testikasetin osat esitellään kuvassa 6.



Kuva 6. Näyte kulkee näyteportin kautta testikasetille. Käytettäessä kokoverta veren suodatin suodattaa punasolut pois näytteestä. Näyte kulkee kapillaarivoimien avulla testissä eteenpäin. Näyteportin muoto varmistaa, että näyte kulkee sopivalla nopeudella. Näytteen mitattavat komponentit sitoutuvat mittaus- ja kontrollialueille. Loput näytteestä päätyy jätesäiliöön (Muokattu kuvasta Quidel 2020).

Näyte kulkee testikasetilla, mutta sen analysoimiseen tarvitaan suurempi laite, johon kasetti syötetään. Testikasetin ja analyysilaitteen ulkoasut näkyvät kuvassa 7.

Analysointi tapahtuu Triage MeterPro -laitteessa. (Quidel Cardiovascular Inc. 2018).

Laite käyttää laser diodia viritysvalonlähteenä. Laserin valo osuu laitteen sisällä olevaan testiin, jolloin testissä oleva fluoresenssiväriaine tuottaa fluoresenssia. Tuotetut fotonit menevät valodetektorille, jossa silikoninen fotodiodi havaitsee fluoresenssin. (U.S. Food and Drug Administration 2019.) Laite mittaa fluoresenssin sekä testin mittaus- että kontrollialueilta. Mittausalueen fluoresenssi suhteutetaan kontrollialueen

fluoresenssiin. Suhteutettu fluoresenssi on suoraan verrannollinen cTnI:n konsentraatioon. (Quidel Cardiovascular Inc. 2018.)



***Kuva 7.** Quidel/Alere TriageTrue hs-cTnI-vieritesti. Vasemmalla on testikasetti, johon on kuivatettu tarvittavat reagenssit ja johon näyte ladataan (Quidel Corporation 2023a). Oikealla on analyysilaitte, johon kasetti syötetään (Quidel Corporation 2023b).*

Triage MeterProta on mahdollista kantaa ja sitä voi käyttää myös muiden analyyttien mittaamiseen (Quidel 2020). Laitteen koko on 15 cm x 9,5 cm x 17 cm (Aspromonte ja muut 2023). Näytteenä käytetään kokoverta tai plasmata. Kokoverta käyttäessä punasolut erotetaan plasmasta testilaitteen sisällä olevan suodattimen avulla. Tulos saadaan 20 minuutissa. (Quidel Cardiovascular Inc. 2018.)

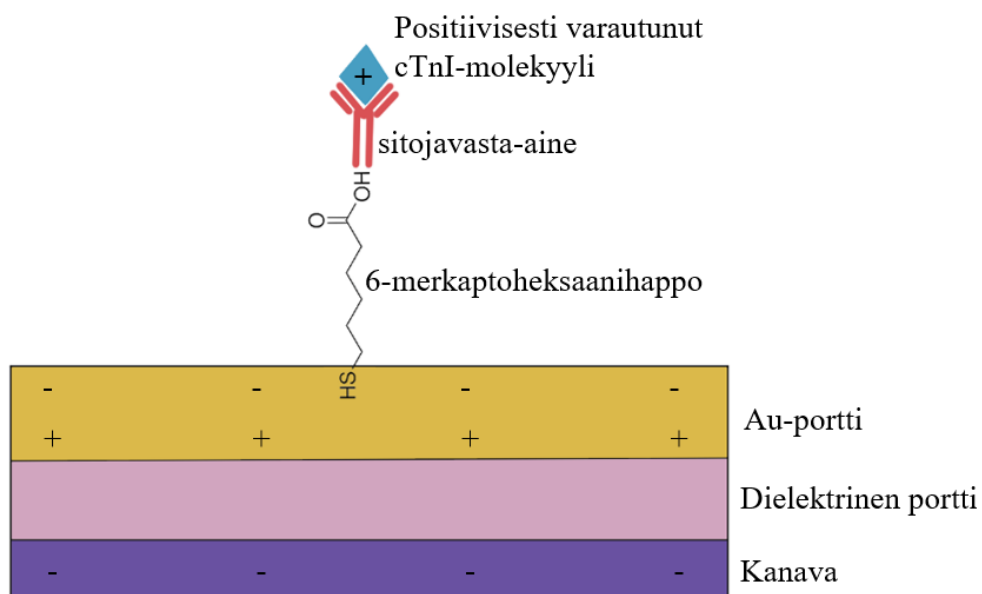
IFCC on raportoinut Quidel/Alere TriageTrue hs-cTnI-vieritestin nollanäytteen rajaksi plasmalle 0,4 ng/l ja kokoverelle 0,5–0,8 ng/l sekä havaitsemisrajaksi plasmalle 0,7–1,6 ng/l ja kokoverelle 1,5–1,9 ng/l. Terveistä yli 50 %:lla havaittiin cTnI:tä. Testin 99. persentiiliksi ilmoitettiin 20,5 ng/l, jossa vaihtelukerroin on plasmalle 5,0–5,9 % ja kokoverelle 5,9–6,5. (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2023.)

3 Kehitteillä olevat testit

Erilaisia hs-cTnI-testejä on kehitetty vuosien varrella useita ja uusia menetelmiä kehitetään jatkuvasti. Hs-cTnI-testien kehittämiseksi pyritään mahdollisimman herkkiin, nopeisiin ja pieniin ratkaisuihin. Tässä luvussa esitellään kolme erilaista hs-cTnI-testimenetelmää, jotka on kehitetty viime vuosina, mutta joita ei ole vielä kaupallistettu.

3.1 Transistoriin perustuva testi

Luo ja muut (2020) ovat kehittäneet erittäin nopean testin, joka perustuu AlGaAs/GaAs korkean elektroniliikkuvuuden transistoriin (high electron mobility transistor, HEMT). HEMT:ssä on kanava korkean tiheyden kaksikulotteiselle elektronikaasulle. Testin rakenne on esitetty pääpiirteittäin kuvassa 8. Kanava on lähellä HEMT:n pintaa, jolloin sen johtavuuteen voidaan vaikuttaa ulkoisilla keinoilla. HEMT koostuu kuudesta kerroksesta: 300 nm:n puskurikerroksesta, 15 nm:n kanavakerroksesta, 4 nm:n eristekerroksesta, piistä muodostuvasta δ -kerroksesta, 25 nm:n raja-alueesta ja 30 nm:n peitekerroksesta. HEMT:n päällä on sähkövirran lähteen ja nielun välissä Au-portti, johon vaikuttamalla muutetaan sähköjohtavuutta. Testissä käytettiin 6-merkaptiheksaanihappoa yhdistämään anti-cTnI-vasta-aineet Au-porttiin.



***Kuva 8.** HEMT-biosensoriin perustuvan cTnI-testin toimintaperiaate. Positiivisesti varautunut cTnI-molekyylit sitoutuu vasta-aineeseen, joka on 6-merkaptotetrahydropyridinon kautta kiinnitetty Au-porttiin. Positiivisesti varautunut cTnI saa Au-portin ja sen alla olevan dielektrisen portin polarisoitumaan. Dielektrinen polarisaatio vähentää HEMT-kanavassa kulkevan sähkövirran määrää (Muokattu kuvista Luo ja muut 2020).*

Kiinnittyessään tunnistavalle alueelle sähköiset biomolekyylit saavat aikaan vastakkaisen varauksen HEMT:n kanavassa, mikä muuttaa kanavan konduktanssia. Analyysin pitoisuus saadaan selville mittaamalla HEMT:ssä kulkeva sähkövirta. cTnI-pitoisuuden ollessa suurempi HEMT:n lähteen ja nielun välillä kulkeva sähkövirta muuttuu pienemmäksi. Näytteen lisäämisen jälkeen sähkövirran määrä ensin lisääntyy nopeasti ja sitten tasaantuu sellaiseksi, että sen voi mitata. Alussa havaittava nousu johtuu liuoksen lisäämisen aiheuttamasta mekaanisesta värähtelystä. Luo ja muut (2022) pitivät sähkövirtaa tarpeeksi tasaisena, jos sen vaihtelu oli alle 1 μA 10 sekunnin aikana.

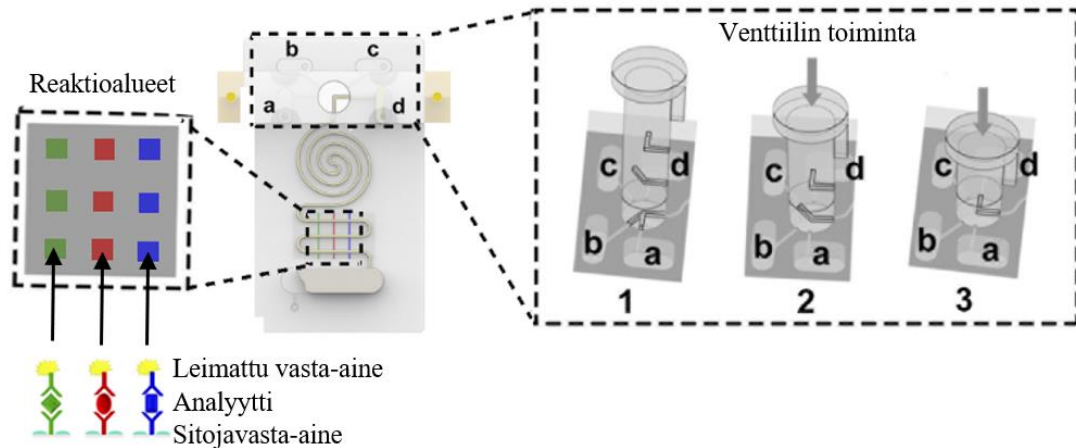
Laitetta testattiin naudan seerumin albumiinilla, terveen ihmisen seerumilla ja sydäninfarktipotilaiden seerumeilla. Testi havaitsi pitoisuuksia 1–10 000 ng/l ja tulos saatiin alle 30 sekunnissa. cTnI:n mittaukseen on kehitetty myös Si-FET-testi ja GaN-HEMT-testi. Niiden havaitsemisrajoiksi on määritetty 5 ng/l ja 6 ng/l, joten GaAs-HEMT on niitä herkempi. Transistoriin perustuvan menetelmän voi yhdistää mikroelektronikkatekniikkaan, minkä takia laitteesta saa pienen. (Luo ja muut 2020.)

3.2 Useaa merkkiainetta samaan aikaan mittaava testi

Yin ja muut (2021) ovat kehittäneet testin, joka cTnI:n lisäksi mittaa samanaikaisesti näytteestä kahta muuta sydäninfarktin merkkiainetta: kreatiini kinaasi-MB:tä (creatine kinase-MB, CK-MB) ja myoglobiinia. CK-MB:tä vapautuu verenkiertoon 3 tuntia sydäninfarktin alkamisen jälkeen ja se saavuttaa huippunsa suunnilleen 24 tunnin kohdalla. Myoglobiinia vapautuu noin tunti sydäninfarktin alkamisen jälkeen ja se saavuttaa huippunsa noin 6 tunnin sydäninfarktin alkamisesta.

Merkkiaineiden havaitsemisessa käytetään aritmeettisen spiraalin muotoista mikrofluidista kasettia. Laitteessa on kaksi polydimetyylioksaanikerrosta, joiden

ulkopuolilla on mikrokanavat ja keskellä silikonifilmi. Filmi on päällystetty kolmenlaisilla vasta-aineilla, joista jokainen tunnistaa eri merkkiainetta. Näyte kulkee kasetilla mekaanisen venttiilin kautta. Testin säiliöitä vaihdetaan painetyyppisellä vivulla. Vivun toimintaperiaate on kuvattuna kuvassa 9.



Kuva 9. Useaa sydäninfarktin merkkiainetta mittaavan mikrofluidisen kasetin osat.

Venttiili yhdistää ensimmäisessä asennossa säiliöt a ja b kanavaan, toisessa asennossa säiliön c ja kolmannessa säiliön d. Kasetilla reagenssit kulkevat spiraalin muotoisen mikrokanavan kautta reaktioalueella mutkittellevalle mikrokanavalle, jossa analyytit päätyvät niille spesifisille reaktioalueille. Vihreällä on merkitty cTnI:n, punaisella CK-MB:n ja sinisellä myoglobiinin sitoutumisalueet (Muokattu kuvista Yin ja muut 2021).

Kun venttiili on ensimmäisessä asennossa, se yhdistää vasta-aineiden ja näytteen säiliöt pääkanavaan. Spiraalin mallisessa kanavassa tapahtuu sekoitus, jonka jälkeen neste kulkee reaktioalueen poikki mutkittellevaan kanavaan. Nesteen pumppaus lopetetaan ja liuosta inkuboidaan 15 minuuttia, minkä jälkeen pumppu avataan ja neste päättyy poistokammioon. Venttiili laitetaan toiseen asentoon, jolloin 0,5 %:n fosfaattipuskuroitu suolaliuos (0,5 % Phosphate-buffered saline solution, PBST) menee pääkanavaan. Tästä seuraa 15 s pesua, jonka jälkeen PBST poistetaan.

Venttiilin kolmannessa asennossa kemiluminesenssisubstraatti pääsee mikrokanavaan, jossa se reagoi vasta-aineisiin kiinnitettyjen entsyymien kanssa ja sitoutumaton substraatti päättyy jätekammioon. Kuten kuvasta 9. näkyy, kolme poikittaista mikrokanavaa risteää kolmen pitkittäisen vasta-aine liuskan kanssa silikonifilmillä eli havaitsemiskohtia on yhteensä yhdeksän. Havainnointi tehdään kemiluminesenssikuva-

analyysijärjestelmän avulla. Jokaisen merkkiaineen konsentraatio lasketaan kolmen alueen keskiarvojen avulla.

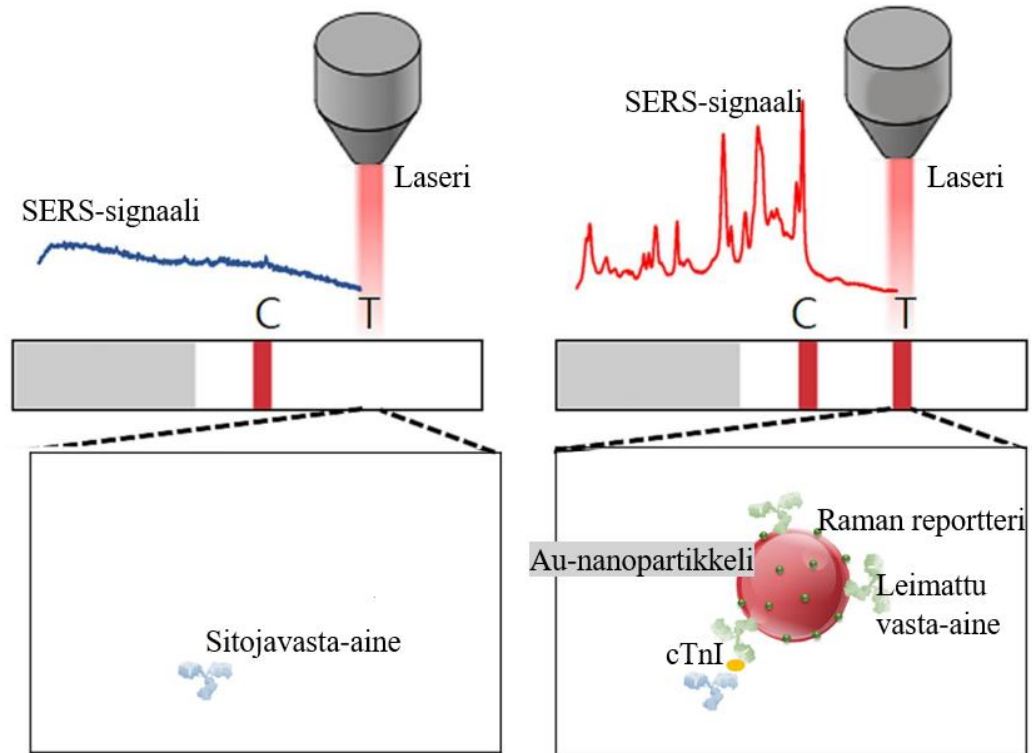
Laite on pieni ja sen voi valmistaa 3D-tulostuksen avulla, mikä on halvempaa kuin litografia ja monet muut menetelmät. Testin herkkyysraja cTnI:lle on 1,02 pg/ml. Herkkyysrajat CK-MB:lle ja myoglobiinille ovat 1,37 pg/ml ja 4,15 pg/ml. Testin tulos saadaan alle 20 minuutissa. (Yin ja muut 2021)

3.3 Kvantitatiivinen lateraalivirtaustesti

Song ja muut (2022) ovat kehittäneet lateraalivirtaustestin, joka perustuu pintatehostettuun Raman-sirontaan (Surface-enhanced Raman scattering, SERS). Lateraalivirtaustesti on laajasti käytetty vieritestimenetelmä. Yleensä lateraalivirtaustestejä käytetään kvalitatiivisissa mittauksissa, jolloin ne eivät sovellu hyvin cTnI-mittauksiin sydäninfarktin diagnosoinnissa.

Raman-sirontavaikutuksen saavat aikaan lasersäteet, jotka osuvat molekyyliihin. SERS:iin perustuvassa lateraalivirtaustestissä havaitaan analyytteja käyttämällä nanopartikkeleita, jotka tehostavat Raman-sirontaa. Metallisten nanopartikkelien ympärille muodostuu sähkömagneettinen kenttä laserin osuessa niihin. Tällaisia nanopartikkeleita kutsutaan SERS tageiksi.

Songin ja muiden (2022) ei-kilpailevassa immunomäärityksessä signaali saadaan anti-cTnI-vasta-aineisiin konjugoiduista Au-nanopartikkeleista, joihin on sitoutunut Raman reporttereita. Raman-sironnan aikaansaama SERS-signaali eli sironneen valon taajuuden muutos mitataan. Kuvassa 10. on kuvattu, kuinka signaalin mittausta toimii.



Kuva 10. SERS-signaalin mittaukseen perustuvan lateraalivirtaustestin toimintaperiaate. Vasemmalla on kuvattuna tilanne, jossa tulos on negatiivinen ja oikealla tilanne, jossa tulos on positiivinen. Negatiivisessa testissä laser osuu testiviivalla vain sitojavasta-aineisiin. Positiivisessa testissä sitojavasta-aineisiin on sitoutunut cTnI-molekyylejä, jotka ovat sitoutuneet SERS-tageihin. SERS-tagit muodostuvat Au-nanopartikkeleista, joiden pinnalla on anti-cTnI-vasta-aineita ja Raman reporttereita (Song ja muut 2023).

Song ja muut (2022) testasivat eri aallonpituuksien ja tehokkuuksien lasereita. Tutkimuksen perusteella 638 nm ja 3mW laser oli paras testilaitetta varten. Lisäksi 50 nm Au-nanopartikkelin SERS-tagilla havaittiin paras signaalin intensiteetti.

Alin cTnI-pitoisuus, joka testillä voitiin havaita, oli 20 ng/l. Ilman SERS:iä tehdyllä lateraalivirtaustestillä alin havaittu pitoisuus oli 156 ng/l ja fluoresenssiin perustuvalla lateraalivirtaustestillä 49 ng/l. Testissä ei tarvita erillisiä pesuja. Lateraalivirtaustestin tulosviivan intensiteetin perusteella pystyttiin laskemaan cTnI:n konsentraatio, joten se toimii myös kvantitatiivisena testinä.

Testiä testattiin myös muilla proteiineilla. Tutkimuksessa ei havaittu vääriä positiivisia tuloksia. Testitulokset saatiin 15 minuutissa. (Song ja muut 2023) Testiperiaate on

yhteensopiva mikrofluidisten ja paperiin perustuvien immunomääritysten kanssa. Menetelmää voi käyttää muutenkin kuin lateraalivirtaustesteissä. (Saviñon-Flores ja muut 2022)

4 Yhteenveto

Tässä tutkielmassa esiteltiin yhteensä kuusi sydäninfarktin diagnosoimiseen tarkoitettua korkean herkkyyden cTnI-testiä. Kolme testeistä oli kliinisessä käytössä olevia ja kolme vielä kehitysvaiheessa. Taulukkoon 1. on koottu kaikkien tutkielmassa esiteltyjen kliinisten ja taulukkoon 2. kehitysvaiheessa olevien hs-cTnI-testien keskeisimmät ominaisuudet. Kaupallisilla testeillä saadaan tulokset 8–20 minuutissa ja havaitsemisraja on 0,7–2,33 ng/l. Siemens ATELLICA VTLi hs-cTnI on nopein ja pienikokoinen, mutta LSI Medicene PATHFAST hs-cTnI - ja Quidel/Alere TriageTrue hs-cTnI -testien analyysilaitteilla voidaan testata muitakin merkkiaineita kuin cTnI:tä. PATHFAST-analysointilaitteella voidaan mitata kuutta näytettä yhtä aikaa (Kurihara ja muut 2008).

Luon ja muiden (2020) kehittämä HEMT-transistoriin perustuvalla testilaitteella tulos saadaan alle minuutissa, mikä on nykyisiä testejä selvästi nopeampaa. Testin herkkyys on samaa luokkaa käytössä olevien laitteiden kanssa. Tekniikassa ei myöskään tarvita leima-aineita, kuten muissa tutkielmassa esiteltyissä menetelmissä.

Yinin ja muiden (2021) useampaa sydäninfarktin merkkiainetta mittaava testi on kestoltaan ja herkkyydeltään samaa luokkaa nykyisten testien kanssa. Erona nykyisiin testeihin sillä pystytään mittaamaan kolmea sydäninfarktin merkkiainetta samaan aikaan. Merkkiaineet ovat koholla eri aikaan, joten testillä saadaan varmempi tulos pidemmän aikavälin aikana. Lisäksi krooniset sairaudet, joiden takia jokin merkkiaineista on aina koholla, häiritsevät testitulosta vähemmän. Haittapuolena useamman merkkiaineen testaamisessa on se, että testeissä tarvitaan jokaiseen merkkiaineeseen sitoutuvat vasta-aineet, mikä lisää reagenssien määrää.

Taulukko 1. Tutkielmassa esiteltyjen kaupallisten hs-cTnI vieritestien ominaisuudet

	Siemens ATELLICA VTLi hs-cTnI	LSI Medience PATHFAST hs-cTnI	Quidel/Alere TriageTrue hs-cTnI
Kesto	8 minuuttia	17 minuuttia	20 minuuttia
Osat	Kädessä kulkeva laite ja testikasetti	Pöydällä seisova analyysilaitte ja testikasetti	Pöydällä seisova kannettava analyysilaitte ja testikasetti
Havaitsemisraja	1,2–1,6 ng/l	2,33 ng/l	0,7–1,9 ng/l
Periaate	Optomagneettinen biosensori	Kemiluminesenssi ja magratio	Fluoresenssi ja kapillaarivoimat
Kertakäyttöiset osat	Nanopartikkelit, vasta-aineet, puskuriliuos, testikasetti	Kemiluminesenssi substraatti, vasta-aineet, puskuri, magneettiset partikkelit, testikasetti	Vasta-aineet, puskuri, fluoresoivat aineet, testikasetti
Monikäyttöisyys	vain cTnI	Kasetilla vain cTnI, analyysilaitteella useat siihen sopivat analyytit ja kuusi näytettä kerralla	Sirulla vain cTnI, analyysilaitteella useat siihen sopivat analyytit

Taulukko 2. Tutkielmassa esiteltyjen tutkimusvaiheessa olevien hs-cTnI vieritestien ominaisuudet

	Luo ja muut (2020) HEMT-testi	Yin ja muut (2021) useamman merkkiaineen testi	Song ja muut (2022) SERS-testi
Kesto	Alle 30 sekuntia	Alle 20 minuuttia	15 minuuttia
Osat	HEMT-biosensori ja sähkövirtaa mittaava laite	Testikasetti ja kemiluminesenssi-kuva-analyysi-järjestelmä	Lateraalivirtaustesti ja Raman-spektrin mittaava laite
Havaitsemisraja	1 ng/l	1,02 ng/l	20 ng/l
Periaate	AlGaAs/GaAs korkean elektroniliikkuvuuden transistori	Kemiluminesenssi ja mikrofluidiikka	Pintaparenneltu Raman-sironta ja lateraalivirtaus
Kertakäyttöiset osat	Puskuri	Vasta-aineet, PBST, kemiluminesenssisubstraatti, puskuri	Vasta-aineet, puskuri, SERS-tagit
Monikäyttöisyys	HEMT:llä vain cTnI, analyysilaitteella sähkövirta	Sirulla useat kolme merkkiainetta, analyysilaitteella kemiluminesenssi	Testillä vain cTnI, analyysilaitteella Raman-sironta

Songin ja muiden (2022) kehittämä SERS-mittaukseen perustuva lateraalivirtaustesti on nopeudeltaan samaa luokkaa käytössä olevien testien kanssa. Testin herkkyys on huonompi kuin muiden testien, mutta parempi kuin lateraalivirtaustestien yleensä. Testi

toimii kvalitatiivisena myös ilman analyysilaitetta. Tämä ei riitä sydäninfarktin diagnosointiin, mutta sen poissulkeminen voisi olla mahdollista ilman analyysilaitetta.

Tulevaisuudessa sydäninfarktin analysoimiseen voisi olla mahdollista saada testejä, joilla tulos saadaan lähes saman tien. Lisäksi on mahdollista tehdä testi, jolla voidaan mitata useampia merkkiaineita samasta näytteestä, jolloin tulos on varmempi.

Lateraalivirtaustestit eivät vielä sovellu sydäninfarktin diagnosointiin yhtä hyvin kuin käytössä olevat tekniikat, mutta niistäkin on mahdollista kehittää kvantitatiivisia.

Sydäninfarktia hoidetaan lääkkeillä ja mahdollisesti pallolaajennuksella (Lu ja muut 2015), mutta ilman tehokasta diagnosointia potilas voi kuolla ennen kuin ehtii saamaan hoitoa. Korkean herkkyyden vieritestien avulla sydäninfarktipotilaiden diagnosoinnista voidaan saada tarkempaa ja nopeampaa, jolloin potilaat voivat saada hoitoa aikaisemmassa vaiheessa. Kuitenkin diagnosointiin tarvittavan kahden mittauksen takia jopa alle 10 minuutin testillä voi kestää tunteja ennen kuin diagnoosi on tehty. Lisäksi vieritestit tuovat paljon kuluja sairaanhoidolle. Uusilla tekniikoilla aikaa voitaisiin lyhentää entisestään ja tulokset voisivat olla varmempia. Lisäksi voitaisiin panostaa mahdollisimman halpoihin ratkaisuihin. Tässä tutkielmassa esitellyt uudet testimenetelmät vaativat kuitenkin paljon jatkokehittelyä ennen kuin ne voidaan kaupallistaa. Tulevaisuudessa korkean herkkyyden vieritestit tulevat todennäköisesti jatkamaan yleistymistään ja auttamaan potilaiden hoitoa entistä enemmän.

Lähteet

- AlHabeeb, W., Tash, A. A., Almutari, F., Ghalayini, K. A., Alqaseer, M., Alshamiri, M., ... AlKashkari, W. (2022) Saudi Heart Association Position Statement on the Use of Biomarkers for the Management of Heart Failure and Acute Coronary Syndrome. *J Saudi Heart Assoc* **34**:114–123.
- Aspromonte, N., Zaninotto, M., Aimo, A., Fumarulo, I., Plebani, M. & Clerico, A. (2023) Measurement of Cardiac-Specific Biomarkers in the Emergency Department: New Insight in Risk Evaluation. *Int J Mol Sci* **24**:15998.
- Dittmer, W. U., Evers, T. H., Hardeman, W. M., Huijnen, W., Kamps, R., De Kievit, P., ... Martens, M. F. W. C. (2010) Rapid, high sensitivity, point-of-care test for cardiac troponin based on optomagnetic biosensor. *Clin Chim Acta* **411**:868–873.
- Hillis, G. S. & Fox, K. A. A. (1999) Cardiac troponins in chest pain. *BMJ* **319**:1451–1452.
- International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (2023, toukokuuta) Point of Care Cardiac Troponin I and T Assay Analytical Characteristics Designated by Manufacturer IFCC Committee on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers (C-CB). International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Noudettu osoitteesta <https://pub-180a8d00f517477ba49634e6b2b147e3.r2.dev/2023/09/Point-of-Care-Cardiac-Troponin-I-and-T-Assay-Analytical-Characteristics-Designated-By-Manufacturer-v052023.pdf>
- Katrakha, I. A. (2013) Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochem Mosc* **78**:1447–1465.

- Kurihara, T., Yanagida, A., Yokoi, H., Koyata, A., Matsuya, T., Ogawa, J., ...
Miyamoto, D. (2008) Evaluation of cardiac assays on a benchtop
chemiluminescent enzyme immunoassay analyzer, PATHFAST. *Anal Biochem*
375:144–146.
- Lu, L., Liu, M., Sun, R., Zheng, Y. & Zhang, P. (2015) Myocardial Infarction:
Symptoms and Treatments. *Cell Biochem Biophys* **72**:865–867.
- Luo, J., Li, S., Xu, M., Guan, M., Yang, M., Ren, J., ... Zeng, Y. (2020) Real-time
detection of cardiac troponin I and mechanism analysis of AlGaAs/GaAs high
electron mobility transistor biosensor. *AIP Adv* **10**:115205.
- Obata, K., Segawa, O., Yakabe, M., Ishida, Y., Kuroita, T., Ikeda, K., ... Tajima, H.
(2001) Development of a novel method for operating magnetic particles,
Magtration Technology, and its use for automating nucleic acid purification. *J*
Biosci Bioeng **91**:500–503.
- Polymedco (2020) PATHFAST Cardiac Biomarker Analyzer. Pathfast. Noudettu
osoitteesta
[https://www.pathfast.com/_files/ugd/2b7e95_b2e733e72bf3453fa9beb46ad38b2
5aa.pdf](https://www.pathfast.com/_files/ugd/2b7e95_b2e733e72bf3453fa9beb46ad38b25aa.pdf)
- Quidel (2020) High Sensitivity Troponin I Test. Quidel. Noudettu osoitteesta
<https://www.quidel.com/sites/default/files/BR9760002EN00.pdf>
- Quidel Cardiovascular Inc. (2018, joulukuuta) TriageTrue High Sensitivity Troponin I
Test. Quidel. Noudettu osoitteesta
<https://www.quidel.com/sites/default/files/X42D2KY3GBANDCMA5O.pdf>
- Quidel Corporation (2023a) Triage MeterPro. Quidel. Noudettu osoitteesta
<https://www.quidel.com/immunoassays/triage-test-kits/triage-meterpro>

- Quidel Corporation (2023b) TriageTrue High Sensitivity Troponin I Test. Quidel.
Noudettu osoitteesta <https://www.quidel.com/immunoassays/triage-test-kits/triage-high-sensitivity-troponin-i-test>
- Salari, N., Morddarvanjoghi, F., Abdolmaleki, A., Rasoulpoor, S., Khaleghi, A. A., Hezarkhani, L. A., ... Mohammadi, M. (2023) The global prevalence of myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord* **23**:206.
- Saviñon-Flores, A. I., Saviñon-Flores, F., Trejo, G., Méndez, E., Țălu, Ș., González-Fuentes, M. A. & Méndez-Albores, A. (2022) A review of cardiac troponin I detection by surface enhanced Raman spectroscopy: Under the spotlight of point-of-care testing. *Front Chem* **10**:1017305.
- Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (2021, maaliskuuta) Atellica VTLi Patient-side Immunoassay Analyser. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Noudettu osoitteesta <https://pocinnovators.com/wp-content/uploads/2021/10/40-21-DX-525-76-Atellica-VTLiProduc-Spec-Sheet-Siemens-Healthineers-Point-Of-Care-Innovators.pdf>
- Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (2022) A Solution for Overcrowded Emergency Departments for Patient with Symptoms of Heart Attack. Siemens Healthineers. Noudettu osoitteesta <https://www.siemens-healthineers.com/point-of-care-testing/featured-topics-in-poct/cardiac-featured-topics/poc-hsctni>
- Song, E., Kim, I., Jeon, C. & Pyun, S. (2023) Development and optimization of surface-enhancement Raman scattering-based lateral flow immunoassays for the ultrasensitive detection of cardiac troponin I. *Microchem J* **193**:108962.

- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A. & White, H. D. (2018) Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol* **72**:2231–2264.
- Twerenbold, R., Boeddinghaus, J., Nestelberger, T., Wildi, K., Rubini Gimenez, M., Badertscher, P. & Mueller, C. (2017) Clinical Use of High-Sensitivity Cardiac Troponin in Patients With Suspected Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* **70**:996–1012.
- U.S. Food and Drug Administration (2018, joulukuuta 6) 510(k) k172783 Decision Summary. Noudettu osoitteesta https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K172783.pdf
- U.S. Food and Drug Administration (2019, kesäkuuta 19) 510(k) k182719 Decision Summary. Noudettu osoitteesta https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K182719.pdf
- Wu, J., Hall, M., Dondo, T. B., Wilkinson, C., Ludman, P., DeBelder, M., ... Gale, C. P. (2019) Association between time of hospitalization with acute myocardial infarction and in-hospital mortality. *Eur Heart J* **40**:1214–1221.
- Yin, B., Wan, X., Qian, C., Sohan, A. S. M. M. F., Wang, S. & Zhou, T. (2021) Point-of-Care Testing for Multiple Cardiac Markers Based on a Snail-Shaped Microfluidic Chip. *Front Chem* **9**:741058.