

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja kemiantekniikan koulutus

2023

Emilia Kravt

GSP® Neonatal hTSH kit
leimavasta-aineen eräkoon
kasvatuksen verifiointi



Opinnäytetyö (AMK) | Tiivistelmä

Turun ammattikorkeakoulu

Bio- ja kemiantekniikan koulutus

2023 | 42 sivua

Emilia Kravt

GSP® Neonatal hTSH kit leimavasta-aineen eräkoon kasvatuksen verifiointi

Opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida GSP® Neonatal hTSH kit leimavasta-aineen eräkoon kasvatusleimavalmistuksen tuotantolinjalla. Verifiointia avulla kantaliuoksen eräkoko kasvatettiin vastaamaan kaupallista kysyntää, samalla vapauttaen tuotanto- ja laadunvalvontakapasiteettiä.

GSP® Neonatal hTSH kit on vastasyntyneiden perinnölliseen kilpirauhasen vajaatoiminnan seulontaan tarkoitettu tuote, jonka avulla vastasyntyneen verestä voidaan analysoida kilpirauhasen vajaatoimintaan viittaavan hTSH-hormonin pitoisuus. Tuote on suunniteltu käytettäväksi yhdessä GSP® -määrityslaitteen kanssa.

Verifiointissa testattiin uuden maksimieräkoon toimivuutta kantaliuoksen laadunvalvontakriteerien ja kombinaatiotestin vaatimusrajojen täyttymisen avulla. Hyväksytyt verifiointierä vapautettiin kaupalliseen käyttöön.

Asiasanat:

Verifiointi, Vasta-aineen leimaus, Immunomääritys, DELFIA

Bachelor's Thesis | Abstract

Turku University of Applied Sciences

Biotechnology and Chemical Engineering

2023 | 42 pages

Emilia Kravt

Verification of increase in batch size of GSP® Neonatal hTSH kit's europium-labelled antibody solution

The purpose of the thesis was to verify the increased batch size of GSP® Neonatal hTSH kit's europium-labelled antibody solution. The purpose of the verification was to respond to product demand and release productional resources in tracer manufacturing.

The GSP® Neonatal hTSH kit is a product used to screen for congenital hypothyroidism in newborn infants. The tendency for congenital hypothyroidism can be analyzed by quantitative determination of human thyroid stimulating hormone from an infant's blood sample. The kit is designed to be used with the GSP® instrument.

In the verification process, an increased batch size was manufactured. Tracer manufacturing quality control and release testing quality control were performed on the manufactured batch. The verification batch was released for commercial use after approval of the fulfilment of quality control criteria.

Keywords:

Verification, Labelled antibodies, Immunoassay, DELFIA

Sisältö

Käytetyt lyhenteet tai sanasto	7
1 Johdanto	8
2 IVD-lääkinnällisten laitteiden säännöstely	9
2.1 IVD-laitteiden säännöstely Suomessa	10
2.2 IVDR-asetus 2017/746	11
2.3 FDA:n laatu järjestelmäsäädös	12
3 Wallac Oy:n laadunhallintajärjestelmä (QMS)	13
3.1 Muutostenhallinta	13
3.2 Muutoksen verifiointi	13
3.3 Poikkeamien hallinta	14
4 GSP® Neonatal hTSH kit – tuote ja sen toimintaperiaate	16
4.1 Kilpirauhasen vajaatoiminta	16
4.2 Näytteenotto	17
4.3 GSP® Immunomäärityksen toimintaperiaate	17
5 DELFIA-teknologia	19
5.1 AutoDELFIA®	22
5.2 GSP®	22
5.3 Lantanoidikelaattien muodostuminen	23
6 Kantaliuoksen valmistusprosessi	24
6.1 Leimausprosessi	25
6.2 Puhdistus pylväskromatografilla	27
6.3 Laadunvalvonta ja pullotus	29
7 Kantaliuoksen eräkoon kasvatuksen verifiointiprosessi	31
7.1 Isoelektrinen fokusointi	31
7.2 Kantaliuoksen valmistus ja laadunvalvontatulosten poikkeamaselvitys	32
7.3 Loppulaadunvalvonnan kombinaatiotesti	33

8 Verifioinnin tulokset	34
8.1 Kantaliuoksen laadunvalvontatestin tulokset	36
8.2 Kombinaatiotestin tulokset	36
8.3 Verifiointiprosessin yhteenveto	37
9 Yhteenveto	38
Lähteet	40

Kaavat

Kaava 1, yhdistettyjen fraktioiden IgG-saanto (Wallac, 2020).	28
Kaava 2, leimatun vasta-aineseoksen Eu-pitoisuus (Wallac, 2020).	28
Kaava 3, Lambertin-Beerin laki (Jerome James Workman, Jr, 2016).	29

Kuvat

Kuva 1, GSP® Neonatal hTSH immunomäärityksen periaate (mukaillen PerkinElmer, 2021).	18
Kuva 2, Europium lantanoidin fluorensenssin purkautuminen (mukaillen PerkinElmer, 2022A).	20
Kuva 3, Stokesin siirtymä europium lantanoidin fluorensenssin mittauksessa (mukaillen PerkinElmer, 2022B).	21
Kuva 4, Immunoglobuliinin tyypillinen rakenne (mukaillen Cytiva, 2021).	24
Kuva 5, Eu-leimatun hTSH kantaliuoksen valmistuksen vuokaavio. (Wallac, 2020)	26
Kuva 6, Kromatografialaitteiston antaman pylväskromatogrammin esimerkkikuvaaja (mukaillen Wallac Oy, 2022E).	27
Kuva 7, pulloitetavan leimalaimennoksen valmistuksen työvaiheet (Wallac Oy, 2023C)	30
Kuva 8, geelielektroforeesiajon jälkeen densitomterillä skannattu IEF-geeli. Geelin näytelinjoissa 1 ja 15 on ajettuna standardit, näytelinjassa 2 on ajettuna	

testattava vasta-aine ja näytelinjassa 3 on ajettuna referenssinä toimiva vasta-aine. Muissa näytelinjoissa ajetut näytteet eivät liity verifiointiprosessiin.	34
Kuva 9, testattavan anti-TSH vasta-ainenäytteen isoelektrinen profiili.	35
Kuva 10, referenssinä toimivan anti-TSH vasta-ainenäytteen isoelektrinen profiili.	35

Taulukot

Taulukko 1, Standardien tunnistettavat vyöhykkeet. (Wallac Oy, 2022F)	32
Taulukko 2, Neonatal hTSH – kit tuotteen potilasnäytteiden määrittystulosten raja-arvot (PerkinElmer, 2021A).	33
Taulukko 3, AutoDELFIA® -määrittelyn laadunvalvonnan hyväksymiskriteerit ja tulokset (Wallac, 2020).	36
Taulukko 4, Kombinaatiotestin loppulaadunvalvonnan kontrollien pitoisuuden keskiarvon tulokset.	36

Käytetyt lyhenteet tai sanasto

CGMP	Current good manufacturing practices, nykyiset hyvät tuotantokäytännöt
DELFLIA	Dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay
DTPA	Dietyleenitriamiinipenta-asettaatti
DTTA	Dietyleenitriamiinitetra-asettaatti
FDA	Food And Drug Administration, Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto
GMP	Good manufacturing practice, hyvät tuotantokäytännöt
GSP	Genetic Screen Processor
hTSH	Human thyroid stimulating hormone, tyreotropiini
ISO	International Organization for Standardization, kansainvälinen standardisoimisjärjestö
IVD	In vitro -diagnostiikka
IVDR	In vitro- Diagnostics Directive, In vitro-diagnostisia lääkinnällisiä laitteita koskeva asetus
Ln	Lantanoidi
MD	Medical device, lääkinnällinen laite
MDR	Medical Device Regulation, asetus lääkinnällisistä laitteista
QMS	Quality Management System, laadunhallintajärjestelmä
SOP	Standard Operation Procedure, vakiintunut toimintaohje

1 Johdanto

Wallac Oy on Turussa sijaitseva Revvity Inc. -konserniin kuuluva yritys, joka suunnittelee, valmistaa ja jakelee In vitro- diagnostisia lääkinällisiä instrumentteja, komponentteja ja ohjelmistotuotteita. Valmistettavien tuotteiden käyttökohteita ovat vastasyntyneiden synnyntäisten sairauksien seulonta, raskaudenaikaisen terveydentilan seuranta ja virusinfektioiden, endokrinologisten ja naistentautien sekä syövän diagnosointi ja seuranta. (Wallac Oy, 2023A.)

Opinnäytetyön toimeksianto GSP® Neonatal hTSH kit leimavasta-aineen eräkoon kasvatuksen verifiointi suoritettiin leimavalmistuksen tuotantolinjalla, tavoitteena kasvattaa kantaliuoksen eräkokoja kaupallisen kysynnän sekä tuotanto- ja laadunvalvontakapasiteetin vapauttamisen vuoksi. GSP® Neonatal hTSH kit on vastasyntyneiden perinnölliseen kilpirauhasen vajaatoiminnan seulontaan tarkoitettu tuote, jonka avulla vastasyntyneen verestä voidaan analysoida kilpirauhasen vajaatoimintaan viittaavan hTSH-hormonin pitoisuus GSP® -määrityslaitteella. (PerkinElmer, 2021.)

Opinnäytetyön teoriaosuudessa käsitellään IVD-lääkinällisten laitteiden säännöstelyä, Wallac Oy:n laadunhallintajärjestelmää, GSP® Neonatal hTSH kit – tuotetta ja sen toimintaperiaatetta, DELFIA-teknologiaa sekä kantaliuoksen valmistusta, laadunvalvontaa ja pullotusta. Opinnäytetyön käytännön osuudessa käsitellään verifiointiprosessin suunnittelua ja toteuttamista, saatuja laadunvalvonnallisia tuloksia ja lopuksi yhteenvetoa toimeksiannon tavoitteiden saavuttamisesta.

2 IVD-lääkinnällisten laitteiden säännöstely

Lääkinnällinen laite on mikä tahansa instrumentti, väline, koje, materiaali, ohjelmisto, implantti, In Vitro-reagenssi, laite, laitteisto tai vastaava tarvike, jolla voi olla yksi tai useampi käyttötarkoitus seuraavista: lääkinnälliseen tarkoitukseen suunnattua laitetta voidaan käyttää sairauden tai vamman diagnosoitiin, tarkkailuun, lievitykseen tai hoitoon sekä vamman kompensointiin. Lääkinnällinen laite voi toimia anatomisen tai fysiologisen toiminnon tukena, muunteluna tai korvaavana osana. Muita käyttötarkoituksia lääkinnälliselle laitteelle voivat olla tutkimustoiminta, elintoimintojen ylläpito ja tukeminen sekä hedelmöitymisen säätely. Lääkinnällisiä laitteita voidaan hyödyntää toisten lääkinnällisten laitteiden ja tarvikkeiden desinfiointissa sekä In Vitro-tutkimusdatan keruussa ihmisperäisistä näytteistä. (Suomen Standardisoimisliitto SFS, 2016.)

In vitro -diagnostisiksi lääkinnällisiksi laitteiksi (IVD) luokitellaan ihmiskehon ulkopuolella (In vitro) suoritettavissa tutkimuksissa käytettäviä laitteita. IVD-laitteiden tarkoituksena on analysoida ihmiskehosta otettuja näytteitä patologisen tai fysiologisen toiminnon tai tilan, älyllisen kehitysvamman, synnyntäisen fyysisen vamman sekä taudin tai sairauden sairastumismahdollisuuden selvittämiseen. IVD-laitteita käytetään myös yhteensopivuuden ja turvallisuuden määrittämiseen vastaanottajien kesken, hoitovasteen tai reaktioiden ennustamiseen sekä hoitotoimenpiteiden määrittämiseen tai tarkkailemiseen. IVD-laitteiksi luokitellaan kalibraattorit, vertailumateriaalit, ohjelmistot, laitteet, instrumentit, diagnostiikkasarjat, laitteiston osat ja järjestelmät sekä reagenssit ja reagenssituotteet, joita voidaan käyttää yksinään tai yhdessä muiden lääkinnällisten laitteiden kanssa. (Euroopan parlamentti ja neuvosto, 2017.) Invasiiviseen näytteenottoon tai suoraan ihmiskehosta näytteen keräämiseen tarkoitettut tuotteet eivät ole IVD-tuotteita, jonka takia ne luokitellaan MDR-asetuksen 2017/745 mukaan lääkinnällisiksi laitteiksi (Pitkänen ym. 2020).

Wallac Oy noudattaa toiminnassaan EN ISO 13485:2016-laadunhallintajärjestelmästandardia, Suomen lakia; Laki eräistä EU-direktiivissä säädetyistä lääkinnällisistä laitteista (629/2010) ja Laki lääkinnällisistä laitteista 719/2021, Euroopan IVD 98/79/EY-direktiiviä, soveltavasti Euroopan IVDR 2017/746 asetusta, amerikkalaisen FDA:n laatujärjestelmäsäädöksiä (QSReg) ja Kanadalaisen CMDR:an SOR/98–282 asetusta sekä tarpeen mukaan muita maakohtaisia viranomaismääräyksiä (Wallac Oy, 2023A).

EN ISO 13485:2016 on ISO 9001:2015-johtamisjärjestelmästandardiin perustuva kansainvälinen standardi, joka määrittelee vaatimukset säännönmukaisesti asiakkaiden ja viranomaisten vaatimuksia täyttävälle, lääkinnällisiä laitteita ja palveluita tuottavalle organisaatiolle. Standardi sisältää vaatimukset tuotteen toteuttamiseen, resurssien hallintaan, johdon vastuuseen sekä seuranta-, mittaus-, analysointi- ja parantamisprosesseihin liittyen. (Suomen Standardisoimisliitto SFS, 2016.)

2.1 IVD-laitteiden säännöstely Suomessa

Suomessa lääkinnällisten laitteiden turvallisuuden ylläpitoa ja edistystä ajaa laki eräistä EU-direktiiveissä säädetyistä lääkinnällisistä laitteista 629/2010. Lakia sovelletaan IVD-laitteiden ja mahdollisten lisälaitteiden suunnittelu- ja valmistusprosesseihin sekä markkinoille saattamiseen tarvittaviin toimenpiteisiin, kuten sterilointiin, asennukseen, käyttöönottoon, markkinointiin, huoltoon, jakeluun ja laitteiden suorituskyvyn arviointiin liittyviin tutkimuksiin. (Finlex, 2010.)

Laki lääkinnällisistä laitteista 719/2012 sisältää säädökset lääkinnällisten laitteiden ja niiden lisälaitteiden sekä IVD-laitteiden markkinoinnista ja markkinoinnin jälkeisestä valvonnasta, ammattimaisesta huollosta ja asennuksesta, vaaratilanteiden valvonnasta sekä talouden sisäisten ja ulkoisten toimijoiden ja laitosten rekisteröinnistä (Finlex, 2021).

2.2 IVDR-asetus 2017/746

In vitro-diagnostisia lääkinällisiä laitteita koskeva IVD 98/79/EY-direktiivi on korvattu Euroopan parlamentin ja neuvoston IVDR-asetuksella 2017/746. Asetuksen avulla pyritään turvaamaan In vitro -diagnostisten lääkinällisten laitteiden moitteeton toiminta potilaiden ja käyttäjien terveyden suojelun tason kannalta, huomioiden pienet ja keskisuuret organisaatiot. Asetus tuo myös mukanaan korkeat turvallisuus- ja laatuvaatimukset. (Euroopan parlamentti ja neuvosto, 2017.)

IVDR-asetuksen 2017/746 yksi merkittävimmistä muutoksista on lääkinällisten laitteiden uusi luokitusjärjestelmä, jonka tavoitteena on määrittää valmistajalle luokituksen mukaiset menettelyt ja laadunhallintajärjestelmän tason voidakseen saada lääkinällisen laitteen markkinoille. Ennen laiteluokittelua tuotteen on oltava kvalifioitu lääkinälliseksi laiteeksi tai In vitro- diagnostiseksi lääkinälliseksi laiteeksi. MDR asetuksen 2017/745 mukaiset MD-laitteet voidaan luokitella riskitasossa kasvaviin luokkiin I-III ja IVD-tuotteet luokkiin A-D. Luokan A laitteiden vaatimustenmukaisen toiminnan valvonta on organisaation omalla vastuulla, lukuun ottamatta steriileiksi määriteltyjä tuotteita, jolloin laadunhallintajärjestelmien auditointi suoritetaan viranomaisvalvonnan alaisena ISO 13485-standardin mukaan. (Pitkänen ym. 2020.)

Läkinällisen tuotteen vapauttamiseksi kaupalliseen käyttöön Euroopassa, tuotteella pitää olla CE-merkintä, jonka mukaan tuotteen on vastattava MDR- ja IVDR-asetuksia sekä mahdollisia muita säännöksiä ja EU-direktiivejä koskien tuotteen käyttötarkoitusta. Sellaisissa tilanteissa, joissa viranomaistaho ei valvo CE-merkinnän vaatimuksen täyttymistä tuotteelle, kantaa valmistaja vastuun vaatimusten toteutumisesta itse. (Pitkänen ym. 2020.)

2.3 FDA:n laatujärjestelmäsäädös

Lääkinnällisten laitteiden valmistajien on noudatettava Amerikkalaisen FDA:n laatujärjestelmäsäädöstä (QSReg) voidakseen vapauttaa tuotteensa kaupalliseen tarkoitukseen USA:ssa. Myyntitarkoitukseen soveltuva lääkinällinen laite tai lisälaite on määritelty 21 CFR 820.3(l) -standardissa käyttöön soveltuvaksi tai funktionaaliseksi laiteeksi, joka on pakkaustavasta, merkinnöistä ja mahdollisesta steriloinnista riippumaton laite. Jotkin komponentit, kuten veriputket ja diagnostiset röntgenkomponentit on valmistettava QSReg-asetuksen mukaan, sillä ne toimivat osana lääkinällisiä laitteita. (U.S. Food And Drug Administration FDA, 2022.)

Varmistuaan tuotteen vaatimusten täyttymisestä valmistajan on perustettava laatujärjestelmä. FDA: n sääntelemien tuotteiden, kuten lääkkeiden, biologisten aineiden, laitteiden ja elintarvikkeiden tuotantoa käsittelevät laatujärjestelmät tunnetaan nykyisinä hyvinä tuotantokäytäntöinä (CGMP current good manufacturing practices). (U.S. Food And Drug Administration FDA, 2022.) Nykyiset hyvät tuotantokäytännöt (CGMP) keskittyvät jatkuvaan parantamiseen ja laadunvalvontaan hyödyntäen uusimpia standardeja ja tekniikoita. Hyvät tuotantokäytännöt (GMP), ovat joukko periaatteita, jotka auttavat valmistajia kehittämään prosesseja laadun varmistamiseksi (Ascendia Pharmaceuticals, 2021.)

FDA:n liittovaltion rekisterin 21 CFR 862-892 -regulaation mukaan lääkinälliset laitteet ovat vapautettu GMP-vaatimuksista. Vapautus GMP-vaatimuksista ei vapauta laitevalmistajia yleisistä rekistereitä koskevista vaatimuksista tai valitustiedostojen säilyttämisestä. Tutkintalaittepoikkeuksen (IDE) mukaisesti valmistettuja lääkinällisiä laitteita ei ole vapautettu QS-asetuksen 21 CFR 820.30 -mukaisista valvontavaatimuksista. (U.S. Food And Drug Administration FDA, 2022.)

3 Wallac Oy:n laadunhallintajärjestelmä (QMS)

Wallac OY:n laadunhallintajärjestelmä (QMS) perustuu toisiinsa linkitettyihin prosesseihin, joiden avulla saadaan varmuus valmistettavien tuotteiden ja palveluiden toimivuudesta ja turvallisuudesta sekä asiakkaiden ja viranomaisten asettamien vaatimusten täyttymisestä (Wallac Oy, 2023A).

3.1 Muutostenhallinta

Muutostenhallinta on prosessisarja, jonka avulla varmistetaan tuotteen tehokkuuden ja turvallisuuden säilyminen vaatimusten mukaisena muutoksen jälkeen. Syitä muutoksille ovat mahdollinen ongelmanratkaisu, Audit-havainnot, prosessiparannukset, tuotteen kehitys, korjaavat ja ehkäisevät toimenpiteet sekä uudet tuotteet ja muuttuneet vaatimukset. (Wallac Oy, 2022A.)

Muutostenhallintaprosessi voidaan jakaa viiteen eri vaiheeseen. Prosessi alkaa muutoksen suunnittelusta ja muutoksen vaikutuksen arvioinnista lopputuotteen kannalta. Tämän jälkeen muutokselle tehdään dokumentoitu arvio verifiointin tai validoinnin tarpeesta. Muutettavien kohteiden tiedot ja muutokseen liittyvä data sisällytetään muutosehdotukseen, jonka jälkeen muutosehdotus arvioidaan, kommentoidaan ja hyväksytään. Hyväksytty muutos otetaan käyttöön tiedottamisen ja tarvittavien henkilöstökoulutusten jälkeen. (Wallac Oy, 2022A.)

3.2 Muutoksen verifiointi

Verifiointi on kertaluontoinen varmistuminen tuotteen vaatimusten täyttymisestä tarkastuksen tai testauksen muodossa. Täydellisessä verifiointinissa prosessin tuottamalle tuotteelle tehdään 100 % tutkimukseen ja testaukseen perustuva analyysi vaatimusten täyttymisestä, jolloin prosessi ei vaadi erillistä validointia. (Wallac Oy, 2022B.)

Validointi on ennalta hyväksytyyn suunnitelman mukaan toteutettu, objektiiviseen näyttöön perustuva osoitus validoitavan kohteen käyttötarkoituksen perusteella asetettujen vaatimusten täytymisestä toistettavasti. IVD-tuotteiden valmistukseen liittyvät prosessit, jotka eivät ole verifioitavissa on validoitava. Validoinnin laajuus määräytyy riskiperusteisesti kattaen valmistus- ja puhdistusprosessit, laitteet, tilat, hyödykkeet, ohjelmistot, testimenetelmät ja tietojärjestelmät. (Wallac Oy, 2022B.)

Tehtäessä muutoksia validoidussa tilassa olevaan prosessiin tai tuotteeseen, arvioidaan uudellevalidoinnin tarve riskiperusteisesti. Mikäli riskiarvion perusteella toistettavuuden osoitus ei ole tarpeellinen, voidaan validointi suorittaa verifointina, jolloin riittää varmuus verifioitavan kohteen vaatimusten säilymisestä. Vastaavuusverifointi on objektiiviseen näyttöön perustuva osoitus siitä, että testimenetelmään tehtävä muutos ei vaikuta menetelmän toimivuusparametrien spesifikaatioihin. Vastaavuusverifoinnin toimivuusparametrien osoitus ei ole yhtä laaja kuin validoinnissa. (Wallac Oy, 2022C.)

3.3 Poikkeamien hallinta

Poikkeama on tila, jolloin jonkin tuotteen tai prosessin vaatimukset ovat jääneet täyttymättä tai prosessin kulussa on ilmennyt jotakin poikkeavaa.

Poikkeamakäsittelyn avulla pyritään tunnistamaan, keräämään, analysoimaan, dokumentoimaan ja arvioimaan mahdollista materiaalin tai tuotteen vaatimuksenmukaisuutta koskevaa tietoa. Ohjeistettu poikkeamakäsittely on nopea ja järjestelmällinen prosessi, jonka avulla pyritään välttämään ja/tai minimoimaan poikkeamasta johtuvat seuraukset tehokkaiden korjaavien toimenpiteiden avulla. Tilanteissa, joissa esimerkiksi jonkin tuotteen laadunvalvontatulokset eivät täytä sille asetettua hyväksymiskriteeriä, tulos käsitellään OOS-prosessin (Out Of Specifications) kautta. Esimerkiksi tilanteissa, joissa OOS-tulokselle on selkeä syy, kuten esimerkiksi käyttäjä- tai laitevika, tulos voidaan mitätöidä, jolloin määrittelyn laadunvalvonta uusitaan.

Jos OOS-tulos on todellinen, eikä selkeää syytä poikkeavalle tulokselle ole, tuloksen käsittelyssä siirrytään poikkeamaprosessiin. (Wallac Oy, 2022G.)

Poikkeamienhallinta toimii osana CAPA-järjestelmää (Corrective and Preventive actions), jonka tavoitteena on tunnistaa prosesseja ja tuotteiden vaatimustenmukaisuutta tukevia muutoksia auditointitulosten, laatukatselmuksien, poikkeamakäsittelytulosten, tiedon analysoinnin ja markkinoille saattamisen jälkeisen seurannan avulla. (Wallac Oy, 2023D.)

Poikkeamaselvityksen laatii toiminnon asiantuntija, jonka perusteella asiantuntija ja laatu luovat toimintaohjausjärjestelmään dokumentoidun riskiarvion. Poikkeaman käyttöpäätöksen hyväksymisestä vastaa laatu. Poikkeamaselvitys voidaan sulkea laatuspesialistin toimesta, kun vaadittavat toimenpiteet, kuten muutoksen hyväksyminen tai vaadittava koulutus on pidetty sekä käsittely oheisissa prosesseissa, kuten validointi, toimittajavalituksen käsittely tai säilyvyystestaus ovat suoritettu. (Wallac Oy, 2022G.)

4 GSP® Neonatal hTSH kit – tuote ja sen toimintaperiaate

Seulontojen avulla pyritään löytämään suurentuneen riskin omaavat, seulottavaan tautiin sairastuvat yksilöt. Vastasyntyneiden lasten seulonta mahdollistaa tarpeeksi aikaisen hematologisten, immunologisten ja aineenvaihdunnallisten sairauksien havaitsemisen ja sitä kautta riittävän aikaisen hoidon saamisen, joka turvaa lapsen henkisen ja fyysisen kehityksen. Seulontojen avulla pystytään estämään kuolemia ja parantamaan väestön elämänlaatua. (Lapatto ym. 2018.)

4.1 Kilpirauhasen vajaatoiminta

Tyreotropiini (hTSH human thyroid stimulating hormone) on glykoproteiineista rakentuva hormoni, joka erittyy aivolisäkkeen etulohkossa. Thyreotropiini stimuloi kilpirauhasen toimintaa, kuten tyroksiinin (T₄) ja 3,5,5'-trijodityroniinin (T₃) synteesiä ja eritystä. Thyreotropiini määrää elimistössä säätelee hypotalamuksen tuottama thyreotropiinia vapauttava hormoni (TRH). Lisäksi thyreotropiinin säätelyyn vaikuttaa kilpirauhashormonien ominaisuus heikentää tyrotrooppisten solujen reaktiokykyä TRH-hormoniin. (PerkinElmer, 2021.)

Hypotyreoosi eli kilpirauhasen vajaatoiminta on synnynnäinen endokrinologinen sairaus, joka aiheutuu kilpirauhashormonien tuotannon puutteesta tai kilpirauhasen kehityshäiriöstä. Suomessa syntyy keskimäärin yksi hypotyreoosia sairastava lapsi 35 000 syntynyttä lasta kohti. Vastasyntyneen kilpirauhanen voi olla alikehittynyt, kehittynyt väärään paikkaan tai puuttua kokonaan. Kilpirauhashormonien tuotannosta johtuva vajaatoiminta on osana aivolisäkkeen yleistä vajaatoimintaa, jonka yhteydessä yleensä esiintyy myös muita aivolisäkeperäisten hormonien tuotannon häiriöitä. (Riikka Kurkijärvi, 2015.)

Sikiön hTSH-hormonin erittyminen alkaa ensimmäisen raskauskolmanneksen aikana, jolloin hTSH-hormonin pitoisuuden kasvu on huomattava. Sikiön

kilpirauhasen toiminta on äidistä riippumatonta, sillä kilpirauhashormonit eivät pysty kulkeutumaan istukan kautta. Heti syntymän jälkeen sikiön elimistössä tapahtuu suuri hTSH-hormonin pitoisuuden kasvu, joka stabilisoituu normaalille tasolle muutaman vuorokauden kuluttua, mikäli lapsella ei ole synnynnäistä kilpirauhasen vajaatoimintaa. Kohonnut hTSH-hormonin pitoisuus vastasyntyneen veressä mahdollistaa herkkyyden ja spesifisyytensä vuoksi aikaisen taudin diagnosoinnin ja lääkityksen aloittamisen. (PerkinElmer, 2021.)

Kilpirauhashormonit ovat suuressa osassa lapsen kasvun, hermoston kehityksen ja aineenvaihdunnan säätelyssä. Hoitamaton kilpirauhasen vajaatoiminta voi johtaa vakaviin kehityshäiriöihin ja pahimmillaan pysyvään kehitysvammaisuuteen. (Riikka Kurkijärvi, 2015.)

4.2 Näytteenotto

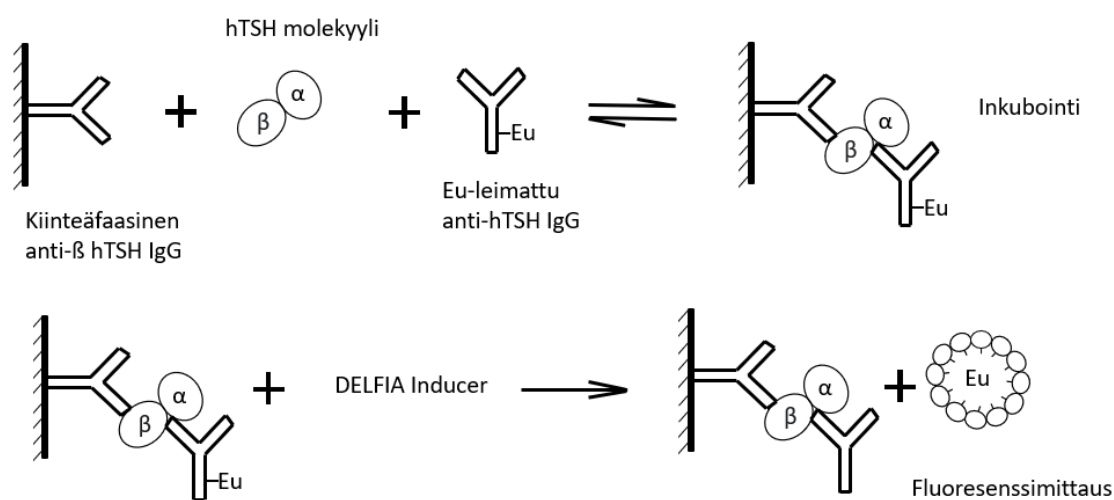
GSP® Neonatal hTSH kit -tuote on tarkoitettu vastasyntyneiden perinnölliseen kilpirauhasen vajaatoiminnan seulontaan. Näytteenotossa vastasyntyneen kantapäältä kerätään verinäyte filtteripaperille, jota ilmakeivataan suojassa suoralta valolta vähintään 3 tuntia +18 – +25 °C asteessa. Kuivuneesta filtteripaperista analysoidaan potilaan veren sisältämä hTSH-pitoisuus GSP® -määrityslaitteella. (PerkinElmer, 2021.)

4.3 GSP® Immunomäärityksen toimintaperiaate

GSP® Neonataali hTSH määrittäminen on ”Sandwich”-tekniikkaan perustuva kiinteäfaasinen fluoroimmunometrinen määrittäminen, jossa kaksi monoklonaalista vasta-ainetta ovat kohdistettuna kahta hTSH-molekyylin antigeenideterminanttia vasten. GSP® Neonatal hTSH kit -tuotteen hTSH-hormonia sisältävät kontrollit, testinäytteet sekä kalibraattorit reagoivat samanaikaisesti mikrotiiterikuoppalevyyn kiinnitettyjen monoklonaalisten vasta-aineiden β hTSH-alyksiköiden ja määrityspuskurissa olevien europiumilla leimattujen

monoklonaalisten vasta-aineiden α - ja β hTSH-alayksiköiden kanssa.
(PerkinElmer, 2021.)

GSP® Neonataali hTSH määrittämissä käytettävä ”Sandwich”-tekniikka perustuu ei-kilpailevaan aikaerotteiseen fluoresenssimääritykseen (IFMA), jossa europium alkuaineella leimatut vasta-aineet eivät kilpaile sitoutumispaikoista näytteen kanssa (PerkinElmer, n.d A).



Kuva 1, GSP® Neonatal hTSH immunomäärityksen periaate (mukaillen PerkinElmer, 2021).

GSP® Neonataali hTSH määrittämissä käytettävä määrittämisspuskuri uutaa filteripaperille kuivatuista veritäplistä hTSH-hormonia mikrotiitterikuoppalevyn kaivoihin. Mikrotiitterikuoppalevyä inkuboidaan, jonka jälkeen DELFIA® Inducerin lisäyksen myötä europium-ionit irroitetaan leimatuista vasta-aineista, jolloin muodostuu voimakkaasti fluoresoivia kelaatteja. Jokaisen mikrotiitterikuoppalevyn kaivon fluoresenssi on suoraan verrannollinen hTSH-hormonin pitoisuuteen näytteessä. (PerkinElmer, 2021.)

5 DELFIA-teknologia

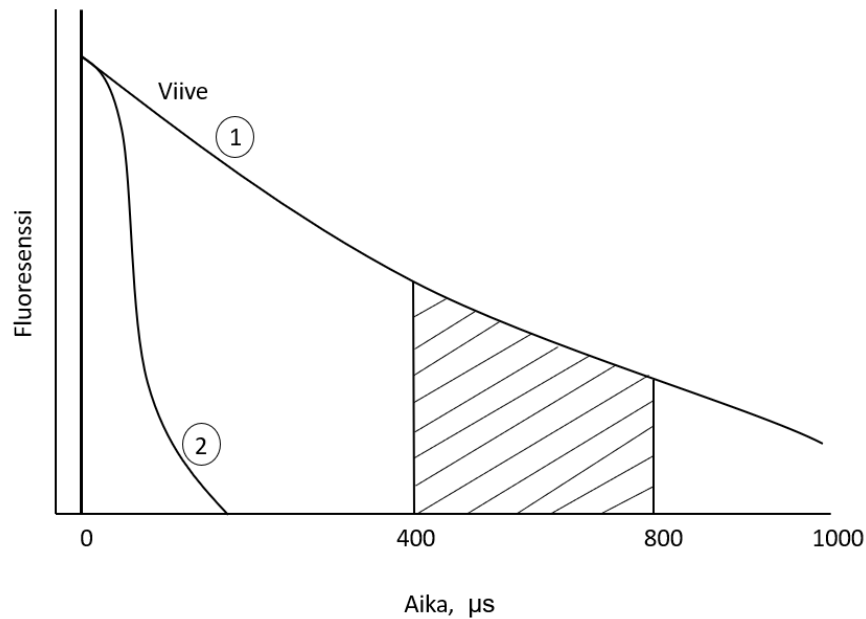
Immunomääritysten avulla sairautta indikoivan proteiinin määrä näytteessä voidaan määrittää radioisotoopeilla, luminiforeilla tai entsyymeillä leimattujen vasta-aineiden avulla. Verrattuna moniin fluoroforeihin, lantanoidikompleksit mahdollistavat huomattavasti suuremman herkkyuden omaavan määrittämisen suorittamisen fluoresenssin pitkäikäisyyden vuoksi. Lantanoidit ovat myös huomattavasti pienempiä molekyyliä kuin perinteisesti käytetyt fluoroforit, jonka ansiosta ne eivät vaikuta biologisen molekyylin rakenteeseen.

(A.K.Hagan & T.Zuchner, 2011.)

DELFIA (dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay) on aikaerotteiseen fluoresenssiin (TRF) perustuva teknologia, jonka avulla voidaan havaita yhdisteitä ja biomolekyyliä käyttäen kelaattileimattuja reagensseja. Sitoutumattomat reagenssit erotetaan pesuvaiheiden avulla. DELFIA-määritys perustuu kelaattien sisältämien lantanoidien, kuten europiumin, samariumin ja terbiumin, ominaisuuteen fluoresoida. Käytettävien lantanoidien fluoresenssin purkautumisaika on huomattavasti pidempi verrattuna perinteisesti käytettyihin fluoroforeihin, mikä mahdollistaa autofluoresoivan taustasignaalin pienentämisen tehokkaan ajallisen resoluution hyödyntämisen ansiosta.

(PerkinElmer, n.d B.)

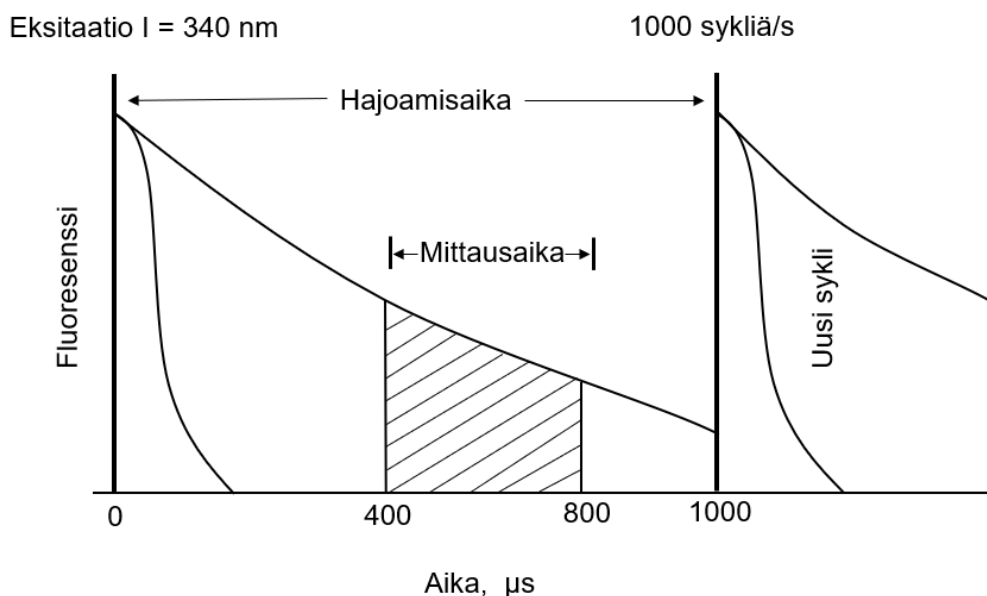
Lantanoidien käyttö immunomäärityksissä edellyttää niiden sisällyttämisen immunokompleksiin käyttäen kelatoivia aineita joko suoralla leimauksella tai epäsuoralla leimauksella sekundaaristen reagenssien leimaamisen kautta. Immunomäärityksessä käytettävä lantanoidikelaatti koostuu lantanoidi-ionin kelatoivasta ja kohteena olevaan biomolekyyliin kiinnittyvästä ryhmästä. Immunokompleksin on kyettävä korkeaan valon absorptioon, energiansiirtoon ja emissioon. (A.K.Hagan & T.Zuchner, 2011.)



Kuva 2, Europium lantanoidin fluorensenssin purkautuminen (mukaillen PerkinElmer, 2022A).

Aikaerotteisessa fluorometriassa biologisten fluoroforien äkillisesti purkautuva taustasäteily (kuvan 2 kuvaaja 2) ei häiritse mittausta huomattavasti hitaammin purkautuvan lantanoidileiman tuottaman säteilyn ansiosta (kuvaaja 1).

Fluoroforien 1–20 mikrosekunnin purkautumisaikaan verrattuna lantanoidileiman purkautumisaika on 10–1000 mikrosekuntia, jolloin mittausta häiritsevä taustasäteily on ehtinyt purkautua. Fluoresenssin mittaus tapahtuu 400–800 mikrosekunnin aikaikkunan sisällä. (PerkinElmer, 2022A.)



Kuva 3, Stokesin siirtymä europium lantanoidin fluorensenssin mittauksessa (mukaillen PerkinElmer, 2022B).

Stokesin siirtymä eli siirtymäero viritys eli eksitaatio- ja purkautumis- eli emissioaallonpituuksien välillä on yksi merkittävimmistä tekijöistä DELFIA-tekniologiassa. Fluorensenssin mittaus tapahtuu 400 μs kuluttua eksitaatiosta, jolloin ei-spesifinen taustasäteily on ehtinyt purkautua. Mitä leveämpi on Stokesin siirtymä, sen suurempi on mittauksen herkkyys. (PerkinElmer, 2022B.) Stokesin siirtymän lisäksi kapeat emissiopiikit lisäävät taustakohinan ja signaalin suhdetta, mikä vaikuttaa mittauksen herkkyyteen. Määrityksen herkkyyttä lisää myös dissosiaatio-lisäys-periaate, jossa lantanoidikelaatin dissosioituessa DELFIA® Enhancement-, DELFIA® Enhancer- tai DELFIA® Inducer-kehitysluoksen lisäyksen seurauksena muodostuu voimakkaasti fluoresoiva kelaatti suojaavaan misellaariliuokseen. (PerkinElmer, n.d B.)

5.1 AutoDELFI[®]

AutoDELFI[®] on täysin automatisoitu immunomääritysjärjestelmä, jota käytetään neonataali- ja prenataaliseulontaan. AutoDELFI[®] -laite koostuu ohjaavasta tietokoneesta, potilasnäytteitä käsittelevästä näyteprosessorista ja reagenssien annostelusta sekä levyjen inkuboinnista, pesusta ja mittauksesta vastaavasta levyprosessorista. Näyteprosessori on automaattinen nesteenkäsittely-yksikkö, joka aspiroi kalibraattorit, näytteet ja kontrollit sekä annostelee ne 96 kuopan mikrotiitterikuoppalevyille. Käsiteltävät näytteet ovat tyypillisesti seeruminäytteitä. Levyprosessori on AutoDELFI[®] -laitteen pääosa, joka mahdollistaa reagenssien annostelun, pesuvaiheen, inkuboinnin ja näytteen sekä merkkiaineen laimennuksen ja näytteen mittauksen aikaerotteisella fluorometrillä. AutoDELFI[®] -laitteella on mahdollista mitata europiumin, terbiumin ja samariumin aikaerotteiset fluoresenssit samasta mikrotiitterikuoppalevystä. (PerkinElmer, 2022A.)

5.2 GSP[®]

GSP[®] -laite on vastasyntyneiden seulonnan kvalitatiiviseen ja kvantitatiiviseen analyysiin tarkoitettu suuren suoritustehon omaava analysaattori. Täysin automatisoitu GSP[®] -laite pystyy suorittamaan samanaikaisesti useampia toimintoja, kuten inkuboida lämpökontrolloiduissa olosuhteissa, annostella reagensseja, suorittaa mittauksia ja pestä mikrotiitterikuoppalevyjä. Filtrpaperille kerätyt vastasyntyneiden analysoitavat näytteet GSP[®] -laitteella leikataan AutoPuncher -laitteella 96 kuoppaisten mikrotiitterikuoppalevyjen kaivoihin sopiviksi ympyrän muotoisiksi paloiksi. GSP[®] -laitteella on mahdollista mitata europiumin aikaerotteisen fluoresenssin lisäksi absorbanssia, luminesenssiä ja prompt fluoresenssia. (PerkinElmer, 2022B.)

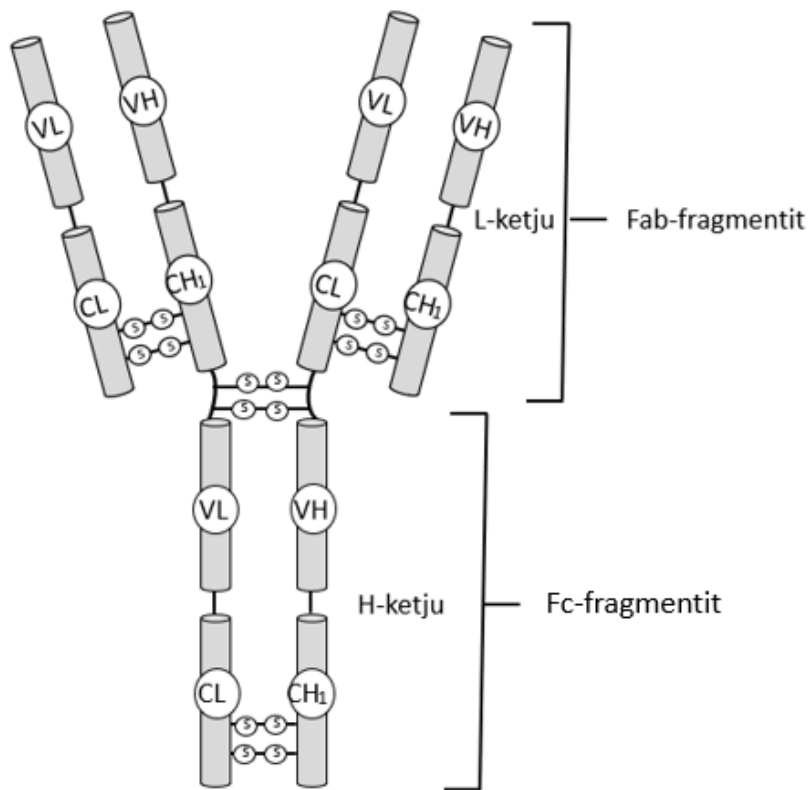
5.3 Lantanoidikelaattien muodostuminen

DELFI[®]-määrityksissä lantanoidit sitoutuvat vasta-aineiden tai substraattien kanssa dietyleenitriamiinitetra-asetattiin (DTTA) muodostaen Ln-DTTA-kelaatteja, jotka dissosioituvat 3,2 pH:n omaavassa 2-naftoyylitrifluoriasetonia (2-NTA) sisältävässä mittaliuoksessa, jolloin muodostuu voimakkaasti fluoresoivia Ln-2-NTA-komplekseja. Korkeat Cu²⁺-, Ca²⁺-, Zn²⁺- ionien, sitraatin ja EDTA:n pitoisuudet voivat häiritä Ln-DTTA-kelaatteja vapauttaen Ln-leiman ennenaikaisesti johtaen vääristyneeseen mittaustulokseen. (Fingerhut & Torresani, 2013.)

GSP[®]-laitteella suoritettavissa määrityksissä käytetään dietyleenitriamiinipenta-asetattia (DTPA) Ln-leiman sitomiseen vasta-aineeseen, jolloin syntyy Ln-DTPA-kelaatteja. Ln-DTPA-kelaatit ovat Ln-DTTA-kelaatteja vakaampia, eivätkä ne reagoi Cu²⁺-, Ca²⁺-, Zn²⁺- ionien, sitraatin tai EDTA:n kanssa. Ln-DTPA hajoaminen vaatii 2,3 pH:n omaavan mittaliuoksen, mutta 2-NTA ei muodosta stabiileja komplekseja Ln-DTPA-kelaattien kanssa kyseisessä pH:ssa. Kompleksien stabiilisuuden lisäämiseksi käytetään 1-(2-bentsofuryyli)-4,4,5,5,5-pentafluori-1,3-pentadionia (BFPP) sisältävää mittaliuosta. EDTA ei häiritse GSP[®]-laitteella suoritettavia immunomäärityksiä, jolloin tulosten vääristymisiä ei ilmene. (Fingerhut & Torresani, 2013.)

6 Kantaliuoksen valmistusprosessi

Immunoglobuliinit eli vasta-aineet ovat B-solujen membraaneilla ja plasmasoluissa esiintyviä, antigeenejä sitovia proteiineja. Verenkiertoon erittyneet vasta-aineet toimivat immuniteetin efektoreina neutraloimalla tai eliminoimalla selektiivisesti mahdolliset antigeenit. Kaikkia immunoglobuliineja yhdistää samankaltaiset tekijät, kuten rakenteelliset ominaisuudet, kyky kiinnittyä antigeeneihin ja osallistuminen määrättyyn määrään erilaisia efektoritoimintoja. Suurin osa veressä esiintyvistä vasta-aineista ovat IgG:tä eli immunoglobuliini G:tä, jolla on erityisen suuri merkitys sikiön kehittämisessä ja suojelemisessa mahdollisilta taudinaiheuttajilta. (Kuby, 1994.)



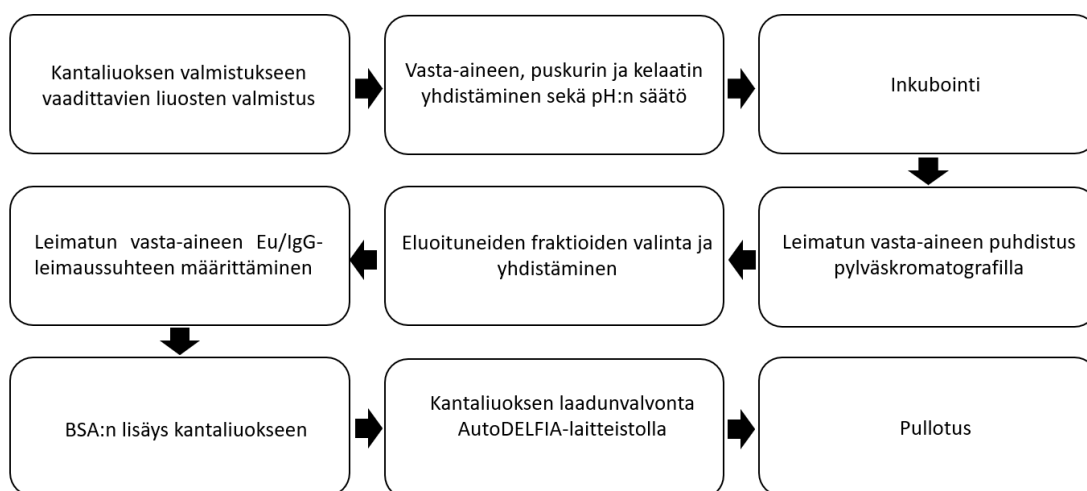
Kuva 4, Immunoglobuliinin tyypillinen rakenne (mukaan Cytiva, 2021).

Immunoglobuliinit voidaan jakaa H-ketjun komponenttien perusteella viiteen pääluokkaan, joita ovat IgG, IgA, IgM, IgD ja IgE. Fab-fragmentin jokainen H- ja L-ketju sisältää 100–110 aminohaposta koostuvan, antigeenin sitoutumiskohtana toimivan V-alueen, joka tyypillisesti vaihtelee vasta-aineiden välillä. Immunoglobuliinimolekyylin Fc-fragmentin alueella esiintyy rajoittunutta rakenteellista variaatiota, jonka mukaan L-ketju määräytyy joko κ - tai λ -tyyppiseksi ketjuksi sekä H-ketju määräytyy μ -, γ -, α -, δ - tai ϵ -tyyppiseksi ketjuksi. Taittuneet H- ja L-ketjut muodostavat disulfididisidoksista rakentuvia domaineja, joista jokainen sisältää noin 110 aminohapon ylijäämän. (Kuby, 1994.)

GSP® Neonatal hTSH kit -tuotteessa, kuten useimmissa Wallacissa valmistettavissa tuotteissa, on kaksi spesifistä IgG vasta-ainetta. Nämä ovat hiiren hybridomasoluissa tuotettuja monoklonaalisia vasta-aineita. Hybridomasolulinja on eristettyjen plasmisolujen esiasteiden ja kuolemattomien solujen hybridi. Monoklonaalinen hybridomasolulinja tuottaa vain yhdenlaista eli monoklonaalista vasta-ainetta, koska kaikki solulinjan solut periytyvät samasta solukloonista. (Cytiva, 2021.)

6.1 Leimausprosessi

Leimavalmistuksessa valmistetaan biotiinilla, europiumilla ja samariumilla leimattuja vasta-aineliuoksia, antigeenejä, leimastandardeja sekä leimapareja (Wallac Oy, 2022D). Leimakannan valmistuksen eri osa-alueet voidaan jakaa kuvan 5 mukaisesti valmistusvaiheisiin, joista kerrotaan tarkemmin seuraavissa kappaleissa.



Kuva 5, Eu-leimatun hTSH kantaliuoksen valmistuksen vuokaavio. (Wallac, 2020)

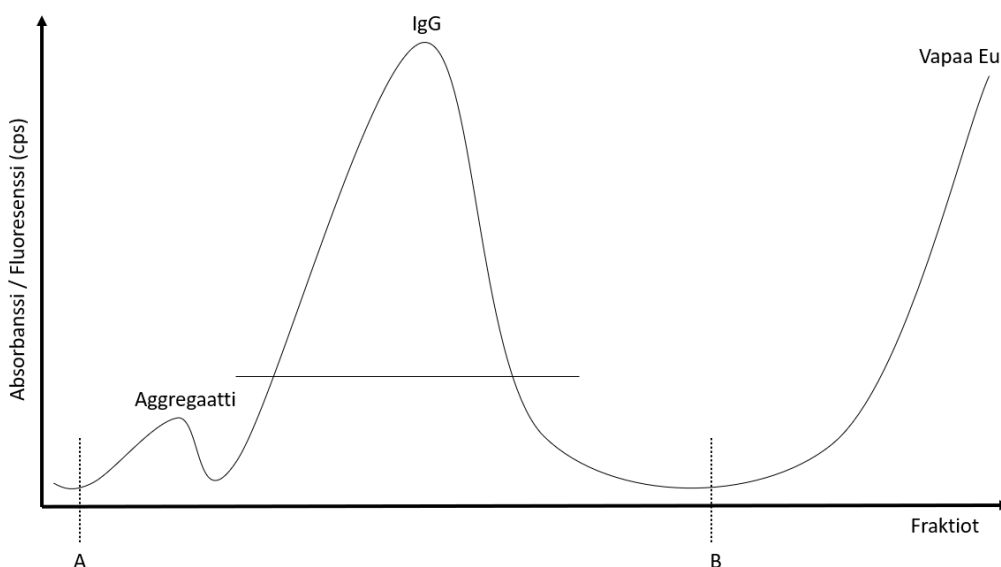
Kantaliuoksen valmistusprosessi alkaa leimausprosessia ja kromatografista puhdistusta edellyttävien liuosten valmistuksella, käytettävän kromatografialaitteiston kolonnin tasapainotuksella ja vasta-aineen sulattamisella. Vasta-ainetta voidaan tarvittaessa yhdistää toisen erän kanssa, jolloin yhdistetylle vasta-aineseokselle lasketaan uusi pitoisuus. Eri kannoista yhdistetylle kantaliuokselle suoritetaan laadunvalvonta pullotuksen jälkeen. (Wallac Oy, 2022D.)

Leimausastiaan mitattuun vasta-aineeseen lisätään tarvittavat leimausprosessin liuokset ja viimeisenä veteen liuotettu leimausreagenssi. Seoksen pH mitataan ja tarvittaessa säädetään oikeaksi, jonka jälkeen leimattava vasta-aineseos siirretään inkuboitavaksi kontrolloituihin olosuhteisiin inkubointikaappiin analyyttikohtaisen ajan ja lämpötilan mukaisesti. Inkuboitunut seos puhdistetaan välittömästi inkubointikaapista poisoton jälkeen. (Wallac Oy, 2022D.)

Leimausprosessin kannalta merkittävimpiä kriittisiä tekijöitä ovat leimauslämpötila, pH-arvo, aika sekä vasta-aineen ja kelaatin konsentraatiot (PerkinElmer, 2008).

6.2 Puhdistus pylväskromatografilla

Kantaliuoksen puhdistus perustuu kokoeksklusiokromatografiaan eli molekyylikoosta riippuvaiseen erotukseen. Pienempien molekyylien hitaampi eluoituminen isompiin molekyylihin verrattuna perustuu niiden tarttumiseen geelin huokosiin. Erotus toteutetaan isokraattisesti käyttäen samaa puskuria läpi ajon. Näyte eluoituu liikkuvan faasin mukana. (Cytiva, 2020.) Kantaliuoksen puhdistuksessa käytetään 50/60 kokoista Superdex 200 -geelillä pakattua kolonnia, jonka tilavuus on 1080 ml ja suurin käsiteltävä näytemäärä on 50 ml (Wallac Oy, 2022E).



Kuva 6, Kromatografialaitteiston antaman pylväskromatogrammin esimerkkikuvaaja (mukaillen Wallac Oy, 2022E).

Kuvassa 6 on mallinnettuna pylväskromatografialaitteistolla suoritettavan leimatun vasta-aineseoksen puhdistuksen kuvaaja, jossa ensimmäisenä eluoituu käytettävän vasta-aineen mahdollinen IgG-aggregaatti, leimautunut monomeeri-IgG ja viimeisenä vasta-aineeseen leimautumaton Eu-leimausreagenssi. Yhdistettävät fraktiot valitaan absorbanssi- ja fluoresenssikäyrän avulla jakamalla kuvaaja viiteen yhtä korkeaan osaan, joista valitaan neljä korkeinta osaa. Fraktiot, jotka osuvat päällekkäin IgG-aggregaatin

tai sitoutumattoman Eu-leimausreagenssin kanssa hylätään. (Wallac Oy, 2022E.)

Jokaisesta valitusta fraktiosta tehdään laimennos käyttäen DELFIA® Induceria. Valmistetuista laimennoksista mitataan fluoresenssiarvot, jonka avulla lasketaan leimakannan IgG-saanto kaavalla 1. (Wallac, 2020.)

Kaava 1, yhdistettyjen fraktioiden IgG-saanto (Wallac, 2020).

$$\frac{\text{cps (yhd.)}}{\text{cps}} \times \text{applikoitu proteiinimäärä} = \text{mg, jossa}$$

Cps (yhd.) = Yhdistettyjen fraktioiden yhteenlaskettu fluoresenssi

Cps = Kaikkien fraktioiden yhteenlaskettu fluoresenssi

Applikoitu proteiinimäärä = Vasta-aineen määrä (mg)

Valitut fraktiot yhdistetään yhdeksi leimatuksi vasta-aineseokseksi. Yhdistetystä vasta-aineseoksesta ja Eu-standardiliuoksesta tehdään laimennokset DELFIA® Inducerin kanssa. Valmistetuista näytteistä mitataan fluoresenssiarvot, joiden perusteella lasketaan leimatun vasta-aineseoksen Eu-pitoisuus kaavalla 2. (Wallac, 2020.)

Kaava 2, leimatun vasta-aineseoksen Eu-pitoisuus (Wallac, 2020).

$$\frac{\text{Laimennoskerroin} \times \text{cps (pooli)} \times 100 \text{ nM}}{\text{cps (Eu - standardi)}} = \text{nM}$$

Kantaliuoksen IgG-pitoisuuden määrittäminen suoritetaan spektroskopisen analyysin avulla. Mittaus perustuu Lambertin-Beerin lakiin, jonka mukaan absorptio amplitudi määräytyy mitattavan aineen sisältävien molekyylien absorptiokykyyn, määrään ja aineessa kulkevan valon matkaan.

Absorboituneen valon määrä on suoraan verrannollinen mitattavan aineen konsentraatioon ja valon kulkemaan matkaan. Lambertin-Beerin laki voidaan ilmaista kaavalla 3. (Jerome James Workman, Jr, 2016.)

Kaava 3, Lambertin-Beerin laki (Jerome James Workman, Jr, 2016).

$$A(\lambda) = \varepsilon cl, \text{ jossa}$$

ε = molaarinen absorptiviteetti ($L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

c = konsentraatio (mol/L)

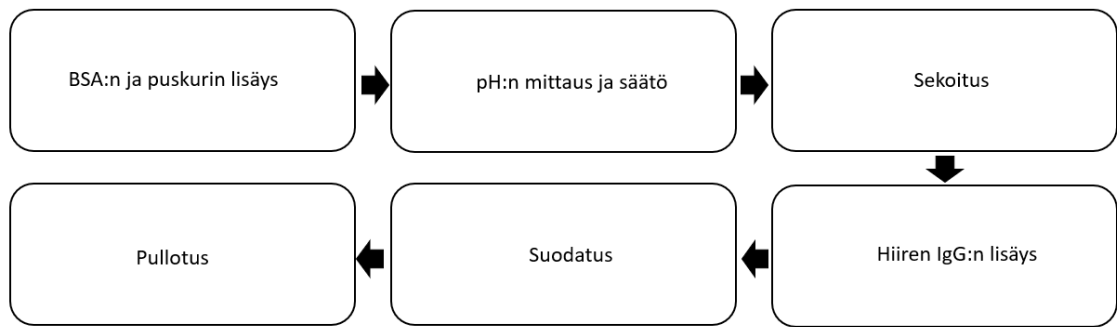
l = Valon kulkema matka kyvetissä (cm)

Leimatulle vasta-aineseokselle lasketaan absorbanssiarvoon ja fluoresenssiin perustuen leimaussuhde Eu/IgG . Mikäli leimaussuhde ei ole analyttikohtaisten rajojen sisällä, voidaan kantaliuos mahdollisesti silti hyväksyä laadunvalvontakriteerien täytyttyä. (Wallac, 2020.)

6.3 Laadunvalvonta ja pullotus

AutoDELFI[®] -laitteella suoritettavaa kantaliuoksen laadunvalvontaa varten valmistetaan kantaliuoslaimennos. Referenssileimana käytetään aiemmin hyväksyttyä leimaerää. Määrittäessä tehdään standardikuvaaja käyttäen aiemmin hyväksyttyä GSP Neo TSH-leimakomponenttia 25 ng anti-TSH-Eu/kuoppa ja referenssikäyrä käyttäen mikrotiiterikuoppalevyille annosteltavia, filteripaperille kuivattuja kalibraattoreita. Kantaliuoksen laadunvalvonnassa tarkasteltavia kriteerejä ovat näytteen signaali, taustasignaali sekä signaalien välinen suhde ja herkkyys. (Wallac, 2020.)

Kantaliuos siirtyy pullotettavaksi laadunvalvonnan tulosten ollessa hyväksymisrajoissa. Pullotettavan leimalaimennoksen valmistuksen eri osat voidaan jakaa kuvan 6 mukaisesti vaiheisiin.



Kuva 7, pullotettavan leimallaimennoksen valmistuksen työvaiheet (Wallac Oy, 2023C)

GSP® Neonatal hTSH kit -tuotteen toimivuus testataan kombinaatiotestin avulla loppulaadunvalvonnan toimesta käyttäen hyväksytyä komponenttien yhdistelmää.

7 Kantaliuoksen eräkoon kasvatuksen verifiointiprosessi

Eu-leimatun anti-hTSH kantaliuoksen eräkoon kasvatuksen verifiointissa kantaliuoksen alkuperäinen eräkoko 40 mg nostettiin 135 mg:aan kantaliuoksen kaupallisen kysynnän sekä tuotanto- ja laadunvalvontakapasiteetin tehostamisen ja vapauttamisen vuoksi. Verifiointin tarve ja laajuus arvioitiin suunnitelmaan riskiperusteisesti. Kantaliuoksen eräkoon kasvatus voitiin suorittaa uudelleenvalidoinnin sijasta verifiointiprosessina perustuen muutoksen tuomaan matalaan riskiasteeseen, samansuuruisten kantaliuosten rutiiniomaiseen olemassa olevaan tuotantoon ja valmistusprosessin säilymiseen ennallaan. Eräkoon kasvatus voidaan pitää matalariskisenä muutoksena, koska leimausprosessin olosuhteet, kuten aika, lämpötila, puskuri ja leiman pitoisuus säilyvät samoina. Eli leimausprosessin kriittiset tekijät pysyvät muuttumattomina. Verifiointierä testattiin inkuboinnin minimiajalla.

Verifiointi toteutettiin ennalta hyväksytyyn suunnitelmaan ja siihen liittyvien DRAFT-työohjeiden mukaan, joiden hyväksymisprosessiin osallistuivat verifiointivastaava, tuotannon edustaja sekä validointi- ja laatuasiantuntija. Verifiointiprosessiin liittyvä dokumentaatio hyväksyttiin laatujärjestelmä- ja viranomaisvaatimuksia vasten. Kyseinen muutos ei vaatinut rekisteröintitoimenpiteitä.

7.1 Isoelektrinen fokusointi

Saapuneelle vasta-aineelle tehtiin isoelektrinen fokusointi, jonka tarkoituksena oli verrata testattavan ja aiemmin hyväksytyyn, referenssinä toimivan vasta-aineen samankaltaisuus (Wallac Oy, 2022F). Isoelektrinen fokusointi perustuu amfoteeristen molekyylien, kuten peptidien, entsyymien ja proteiinien isoelektrisistä pisteistä johtuvaan erottumiseen toisistaan. Erottuminen tapahtuu, kun geeliin luodaan pH gradientti, jolloin positiivisesti varautuneet proteiinit liikkuvat kohti katodia ja negatiivisesti varautuneet proteiinit liikkuvat

kohti anodia, kunnes ne saavuttavat itselleen tyypillisen, isoelektrisen eli varauksettoman pH arvon. (Reiner Westermeier, 2016.) Geelin proteiinit värjätään Coomassie blue-värillä. Densitometri detektoi sinisen värin intensiteetin näyteriveittäin. Kuvassa 8 on elektroforeesiajon jälkeen skannattu geeli. Skannatusta geelistä analysoitiin testattavan näytteen, referenssinä toimivan näytteen ja standardien ajautuneet proteiinibandit laadunvalvontakriteerien mukaisesti. standardien vyöhykkeet tunnistettiin taulukon 1 mukaan. (Wallac Oy, 2022F.)

Taulukko 1, Standardien tunnistettavat vyöhykkeet. (Wallac Oy, 2022F)

Vyöhykenumero	Analysoitava vyöhyke	IEP (pI)
1.	Lentil lectin	8.2
2.	Lentil lectin	7.8
3.	Human carbonic anhydrase	6.5
4.	Bovine carbonic anhydrase	6.0
5.	β - Lactoglobulin B	5.1
6.	Phycocyanin	4.7

Analysoitavan anti-TSH-vasta-aineen IEF-profiili on kuvassa 9 ja referenssinä toimivan vasta-aineen IEF-profiili on kuvassa 10. Laatuvastraavan antaman käyttö päätöksen ja dokumentaation hyväksynnän perusteella testattava vasta-aine-erä hyväksyttiin kantaliuoksen valmistukseen.

7.2 Kantaliuoksen valmistus ja laadunvalvontatulosten poikkeamaselvitys

Verifioitava kantaliuoserä valmistettiin leimavalmistuksen tiloissa aiemmin hyväksytyn työ-ohjeen DRAFT-version mukaan käyttäen europiumille tarkoitettuja välineitä, kolonneja ja astioita sekä kvalifioituja laitteistoja. Poikkeavasta tuloksesta aloitettiin poikkeamaselvitys, jonka osana kantaliuoksesta valmistettiin lisätestinä koepullotus ja kombinaatiotesti.

Kantaliuoksen koepullotus ja kombinaatiotesti suoritettiin nimikkeiden työohjeiden mukaisesti.

7.3 Loppulaadunvalvonnan kombinaatiotesti

GSP® Neonatal hTSH kit – tuote muodostuu hyväksytyistä kittikomponenttien yhdistelmästä, joiden spesifikaatioiden mukainen toimivuus ja kemiallinen yhteensopivuus testataan loppulaadunvalvonnan toimesta kombinaatiotestin avulla. Kombinaatiotestissä tarkasteltavia parametreja ovat testattavan ja referenssinä toimivan yhdelmän kontrollien pitoisuudet, ero tavoitepitoisuudesta, testattavan yhdelmän tavoitepitoisuus ja ero tavoitepitoisuudesta 95 %:n rajalla sekä hajonta. Määritys suoritetaan kahdella eri laitteella laitekohtaisen hajonnan vuoksi. (Wallac Oy, 2023E.)

Kombinaatiotestissä käytettävät kontrollit käyttäytyvät määrityksessä potilasnäytteiden kaltaisesti. Kontrollien arvojen perusteella saadaan varmuus lopputuotteen toimivuudesta käyttötarkoituksessaan. Asiakkaalle ilmoitettavat eri tulostyyppien raja-arvot hTSH-hormonin pitoisuudelle veressä ovat kuvattuna taulukossa 2.

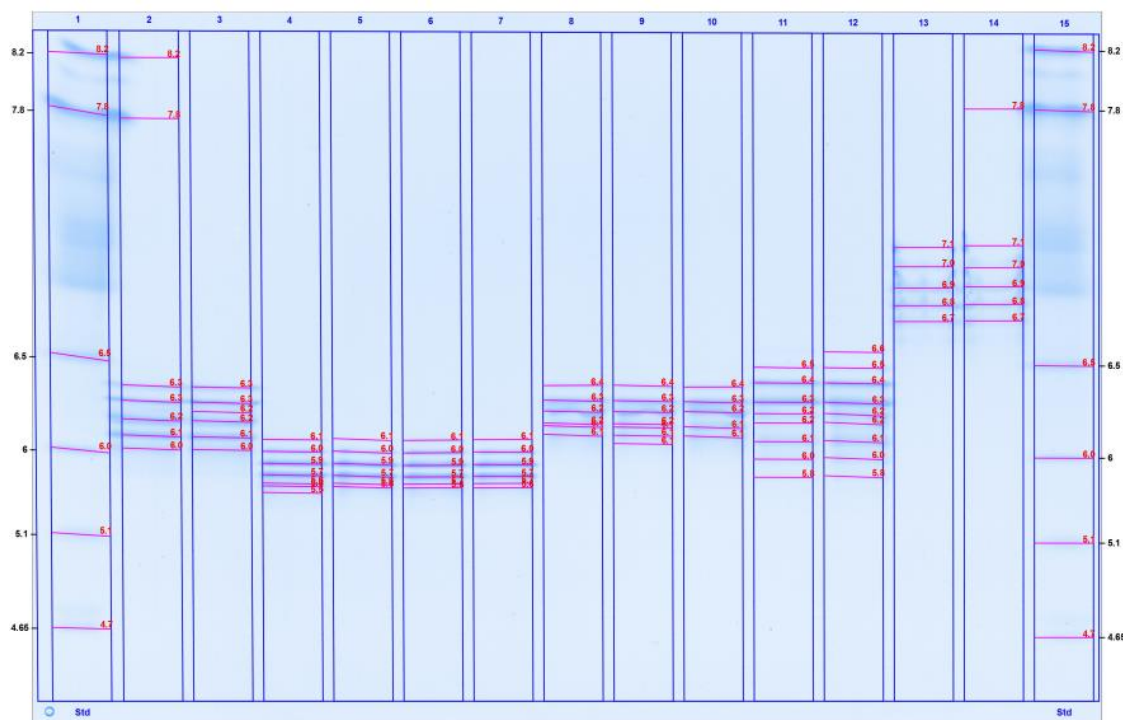
Taulukko 2, Neonatal hTSH – kit tuotteen potilasnäytteiden määritystulosten raja-arvot (PerkinElmer, 2021A).

Neonatal hTSH kit – tuotteen testattavien näytteiden tulostyyppien raja-arvot		
Negatiivinen tulos	Epämääräinen tulosalue	Positiivinen tulos
<9.0 µU/mL	9.0-18.0 µU/mL	>18.0 µU/mL

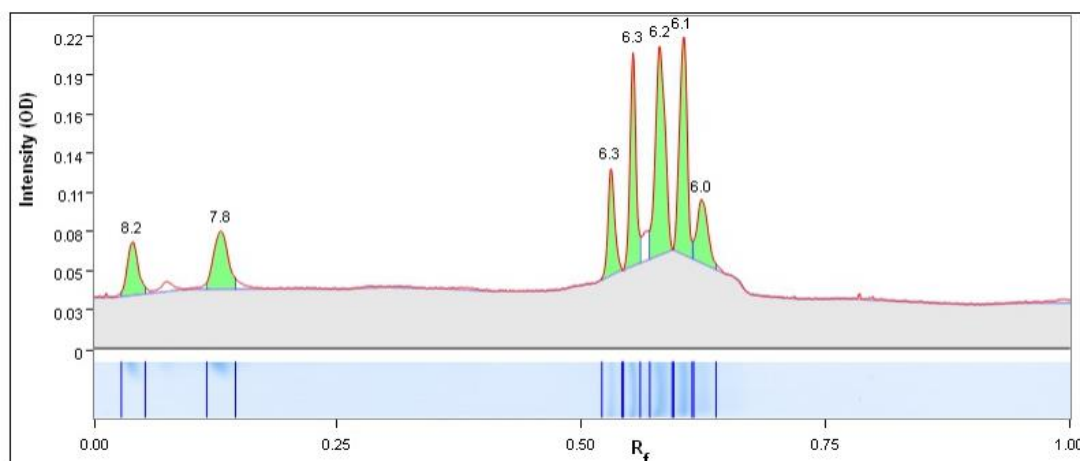
8 Verifiointin tulokset

Saapuneesta vasta-aineesta analysoitiin ennakkonäyte IEF-menetelmällä.

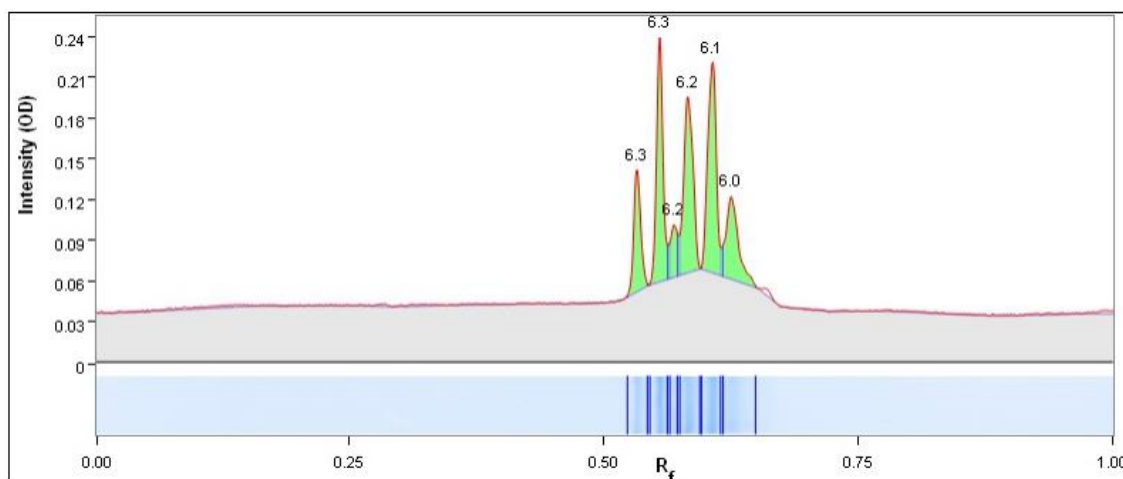
Standardia sisältävät näytelinjat täyttivät laadunvalvontakriteerit



Kuva 8, geelielektrofooresiajon jälkeen densitomterillä skannattu IEF-geeli. Geelin näytelinjoissa 1 ja 15 on ajettuna standardit, näytelinjassa 2 on ajettuna testattava vasta-aine ja näytelinjassa 3 on ajettuna referenssinä toimiva vasta-aine. Muissa näytelinjoissa ajetut näytteet eivät liity verifiointiprosessiin.



Kuva 9, testattavan anti-TSH vasta-ainenäytteen isoelektrinen profiili.



Kuva 10, referenssinä toimivan anti-TSH vasta-ainenäytteen isoelektrinen profiili.

Testattavan ja referenssinä toimivan vasta-aineen isoelektriset profiilit vastasivat TSH vasta-aineelle asetettuja vaatimuksia.

8.1 Kantaliuoksen laadunvalvontatestin tulokset

Kantaliuoksen AutoDELFI[®] -laitteella suoritettavan laadunvalvonnan hyväksymiskriteerit ja tulokset ovat taulukossa 3.

Taulukko 3, AutoDELFI[®] -määrityksen laadunvalvonnan hyväksymiskriteerit ja tulokset (Wallac, 2020).

MITTAUS		RAJOISSA
Signaali	Taustasignaali	Kyllä
	Signaali	Poikkeama*
Signaalien suhde		Kyllä
Herkkyys		Kyllä

*Testattavan näytteen signaalitaso on alle hyväksymisrajan, hyväksytty poikkeamalla.

8.2 Kombinaatiotestin tulokset

GSP[®] Neonatal hTSH kit – tuotteen kombinaatiotestin tulokset ovat taulukossa 4.

Taulukko 4, Kombinaatiotestin loppulaadunvalvonnan kontrollien pitoisuuden keskiarvon tulokset.

Kontrolli	Tavoite- pitoisuus μU/mL	Tulos μU/mL (Testattava)	Tulos μU/mL (Referenssi)	Ero tavoite- pitoisuudesta % (Testattava)	Ero tavoite- pitoisuudesta % (Referenssi)
C1 Kit kontrolli	15.0	15.0	15.4	2.5	0.2
C2 Kit kontrolli	59.2	62.4	63.9	7.9	5.3
QA1 kontrolli	15.7	15.6	15.9	1.2	-0.8
QA2 kontrolli	64.6	65.3	65.1	0.7	1.2

8.3 Verifointiprosessin yhteenveto

Valmistetun kantaliuoksen Eu/IgG-suhde täytti laadunvalvontakriteerit. Testattavan kantaliuosnäytteen laadunvalvontatuloksissa oli todellinen OOS-tulos näytteen signaalitasossa. Lisätestinä suoritettavan kombinaatiotestin tulosten perusteella, leimalaimennos täytti signaalivaatimukset osana lopullista käyttötarkoitustaan. Hyväksyty leimalaimennos siirrettiin pullotettavaksi pullotuspalvelun linjastolle. Kombinaatiotestissä testattavat kontrollit ja tasokalibraattorit täyttivät niille asetetut kriteerit. Vaatimukset täyttänyt verifointierä vapautettiin kaupalliseen käyttöön muutoksen hyväksymisen jälkeen.

9 Yhteenveto

Opinnäytetyön tavoitteena oli todentaa Eu-leimatun anti-hTSH kantaliuoksen uuden maksimieräkoon toimivuus verifiointiprosessin avulla. Verifiointissa testattiin hyväksytysti kantaliuoksen valmistusta minimiajalla ja isomman kolonnin toimivuutta puhdistusvaiheessa. Valmistetulle kantaliuokselle suoritettiin laadunvalvonta AutoDELFLIA[®] -laitteella.

Kantaliuoksen laadunvalvontatuloksista avattiin poikkeamaselvitys testattavan näytteen signaalitason alittaessa vähäisesti hyväksymisrajan. Osana poikkeamaselvitystä, kantaliuoksesta valmistettiin lisätestinä suoritettava kombinaatiotesti. Lisätestin hyväksymisrajoissa olevien tulosten perusteella, kantaliuos voitiin siirtää pulloitettavaksi. Pulloitettu leimalaimennos testattiin hyväksytysti osana lopullista GSP[®] Neonatal hTSH kit – tuotetta. Testattavan leiman loppulaadunvalvonnan signaalitason vaatimus täyttyi. Valmistettu verifiointierä ei vaatinut säilyvyydestä valmistettävien komponenttien koostumuksien ja valmistusprosessien ennallaan säilymisen vuoksi. Verifiointiprosessissa ei syntynyt uusia riskejä komponenttien valmistusprosessien ja lopullisen tuotteen käyttötarkoituksen kannalta. Liian matalan signaalitason välttämiseksi jatkossa, on pyrittävä käyttämään inkuboinnin minimiajasta suurempaa sallittua leimausaikaa.

Verifiointi hyväksyttiin aiemmin laaditun suunnitelman ja komponenttien valmistusprosesseihin liittyvien DRAFT-työohjeiden mukaan. Suunnitelman ja työohjeiden hyväksymiseen osallistuivat verifiointivastaava, tuotannon edustaja sekä validointi- ja laatuasiantuntija. Kaikki verifiointiin vaadittava dokumentaatio hyväksyttiin laatujärjestelmä- ja viranomaisvaatimuksia vasten. Verifiointin tuoma muutos ei aiheuttanut uudelleen rekisteröinnin tarvetta.

Kombinaatiotestitulosten perusteella valmistettu erä voitiin vapauttaa kaupalliseen käyttöön verifiointiin liittyvän dokumentaation ja siihen liittyvän muutoksen hyväksymisen jälkeen.

Opinnäytetyölle asetetut tavoitteet saavutettiin onnistuneesti. Muutoksesta voidaan raportoida työaikasäästöä, eikä kantaliuoksen valmistusta tarvitse tehdä jatkossa yhtä usein.

Lähteet

A.K.Hagan & T.Zuchner, 2011. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays. Viitattu 08.06.2023. Saatavilla sähköisesti osoitteessa:

[Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays - PMC \(nih.gov\)](#)

Ascendia Pharmaceuticals, 2021. cGMP vs GMP: What's the Difference?

Viitattu 01.06.2023. Saatavilla sähköisesti osoitteessa: [Federal Register :: Medical Devices; Quality System Regulation Amendments](#)

Cytiva, 2020. Size Exclusion Chromatography. Viitattu 15.06.2023. Saatavilla

osoitteessa: [Size Exclusion Chromatography, Principles and Methods \(cytivalifesciences.com\)](#)

Cytiva, 2021. Affinity Chromatography. Viitattu 12.06.2023. Saatavilla

osoitteessa: <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11660-original>

Fingerhut, R. & Torresani, T., 2013. Evaluation of the genetic screening

processor (GSP™) for newborn screening. Analytical Methods, Issue 18. (Sivut 4769-4770)

Finlex, 2010. 629/2010. Viitattu 29.05.2023. Saatavilla sähköisesti osoitteessa:

[Laki eräistä EU-direktiiveissä säädetyistä... 629/2010 - Ajantasainen lainsäädäntö - FINLEX®](#)

Finlex, 2021. 719/2021 Laki lääkinnällisistä laitteista. Viitattu 31.05.2023.

Saatavilla sähköisesti osoitteessa: [Laki lääkinnällisistä laitteista 719/2021 - Säädökset alkuperäisinä - FINLEX®](#)

Kuby, J., 1994. Immunology. New York: W. H. Freeman and Company. (sivut

109-113, 129)

Lapatto, R., Niinikoski, H., Näntö-Salonen, K. & Mononen, I., 2018. Viitattu

24.05.2023. Saatavilla sähköisesti osoitteessa: [duo14149.pdf \(duodecimlehti.fi\)](#)

PerkinElmer, 2008. GSP neo TSH projekti.

PerkinElmer, 2021A. GSP® Neonatal hTSH kit insert

PerkinElmer, 2022A, AutoDELFIA 3.0 Instrument Manual. Viitattu 07.06.2023. Saatavilla sähköisesti osoitteessa: [ifu-autodelfia-3-0-instrument-manual-1235-9639-06-english.pdf \(perkinelmer.com\)](https://www.perkinelmer.com/files/ifu-autodelfia-3-0-instrument-manual-1235-9639-06-english.pdf)

PerkinElmer, 2022B. GSP Instrument Manual, Viitattu 05.06.2023. Saatavilla sähköisesti osoitteessa: [ifu-gsp-instrument-manual-2021-9010-13-english.pdf \(perkinelmer.com\)](https://www.perkinelmer.com/files/ifu-gsp-instrument-manual-2021-9010-13-english.pdf)

PerkinElmer, n.d A. DELFIA Immunoassays. Viitattu 24.05.2023. Saatavilla sähköisesti osoitteessa: [DELFIA Immunoassays | Application Support Knowledgebase | Lab Products & Services | PerkinElmer](https://www.perkinelmer.com/knowledgebase/lab-products-services/perkinelmer-delfia-immunoassays-application-support)

PerkinElmer, n.d B. DELFIA Time-Resolved Fluorescence Assays. Viitattu 05.06.2023. Saatavilla sähköisesti osoitteessa: [DELFIA Time-Resolved Fluorescence \(TRF\) Assay \(perkinelmer.com\)](https://www.perkinelmer.com/knowledgebase/lab-products-services/perkinelmer-delfia-time-resolved-fluorescence-trf-assay)

Pitkänen, H., Rauni, L., Santavaara, I. & Ståhlberg, T., 2020. European medical device regulations MDR & IVDR : A guide to market. Viitattu 31.05.2023. Saatavilla sähköisesti osoitteessa: [European Medical Device Regulations MDR & IVDR - A Guide to Market \(leanentries.com\)](https://leanentries.com/european-medical-device-regulations-mdr-ivdr-a-guide-to-market)

Reiner Westermeier, 2016. Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations. Ebook Central. (Sivut 63-64)

Riikka Kurkimäki, 2015. Synnyynnäisen hypotyreoosin seulonta napaveren TSH-määrityksin. Moodi. (Sivut 64-65)

Suomen Standardisoimisliitto SFS, 2016. SFS-EN ISO 13485 Terveystieteiden laitteet ja tarvikkeet. Laadunhallintajärjestelmät. Vaatimukset viranomaismääräyksiä varten.

U.S. Food And Drug Administration FDA, 2022. Quality System (QS) Regulation/Medical Device Good Manufacturing Practices. Viitattu 01.06.2023. Saatavilla sähköisesti osoitteessa: [Quality System \(QS\) Regulation/Medical Device Good Manufacturing Practices | FDA](https://www.fda.gov/oc/quality-system-qs-regulation-medical-device-good-manufacturing-practices)

Wallac Oy, 2020. Työ-ohje, leimattu anti-hTSH, kantaliuos 13806267/04.

Wallac Oy, 2022A. Muutostenhallinta SOP 13902276/24.

Wallac Oy, 2022B. Validointipolitiikka ja -menettelyt SOP 13903492/17.

Wallac Oy, 2022C. Prosessi- ja testimenetelmävalidoinnit SOP 13909674/01.

Wallac Oy, 2022D. Leimavalmistuksen yleiset menettelyt SOP 13901122/10.

Wallac Oy, 2022E. Kromatografialaitteiston käyttöohje SOP 13901616/05.

Wallac Oy, 2022F. Isoelektrinen fokusointi SOP 1390361/07.

Wallac Oy, 2022G. Poikkeamien hallinta SOP 13905711/22.

Wallac Oy, 2023A. Laatukäsikirja SOP 13905076/34.

Wallac Oy, 2023B. Laatukäsikirja SOP 13905076/35.

Wallac Oy, 2023C. Anti-hTSH-Eu-tracer pullotus SOP 13806268/12.

Wallac Oy, 2023D. Korjaavat ja ehkäisevät toimenpiteet SOP 13902473/15.

Wallac Oy, 2023E. DELFIA-, AutoDELFIA-, GSP-, DELFIA Xpress-, NCS- ja EnLite-tuotteiden loppulaadunvalvonnan periaatteet SOP 13906011/09.

Workman, J.J., 2016. Concise Handbook Of Analytical Spectroscopy, The: Theory, Applications, And Reference Materials (In 5 Volumes). (Sivut 27-28)