

Koriongonadotropiini (hCG)- ja huumausainetestien luku Drug panel- liuskalukulaitteella.

Tekijä(t)	Åse Karttunen
Otsikko	Koriongonadotropiini (hCG)- ja huumausainetestien luku Drug panel-liuskalukulaitteella.
Sivumäärä	47 sivua + 3 liitettä 07.05.2012
Tutkinto	Bioanalyytikko
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaajat	Dosentti Eino Puhakainen Yliopettaja Riita Lumme
<p>Huumausaineinесеula- sekä koriongonadotropiini (hCG)-hormoniin perustuva raskausmääritys ovat immunokemiallisia virtauskromatografisia vieritestejä, joiden tulos perustuu värillisten viivojen muodostumiseen ja niiden visuaaliseen tulkintaan. Molemmat määrytykset ovat käytössä HUSLAB:issa.</p> <p>Opinnäytetyön tein HUSLAB:ille. Työn tarkoituksena oli selvittää voidaanko korvata määrytysten silmämääräinen analyysi Drug panel-lukulaiteella tehdyllä mittauksella, joka perustuu kaksikulotteisen kuvaanturin tulkintaan. Laitemittauksella oli tarkoitus määrittää testien eräkohtainen vaihtelu, määrytyksien toistettavuus sekä määrittää testikasettien reflektanssin vaihtelua. Suuri osa raskauksista keskeytyy ennen kliinisiä merkkejä raskaudesta ja näitä kutsutaan biokemiallisiksi raskauksiksi. Jotta näitä ei diagnosoitaisi, pyrittiin säätämään laitemittauksessa positiivisen raskauden rajaksi 25 IU/l, jota pidetään raskauden optimaalisena havaitsemisrajana.</p> <p>Tutkimukseen kerättiin hCG-positiivisia virtsa- ja seerumiraskausnäytteitä sekä virtsanäytteitä, jotka olivat olleet yhdestä tai useammasta huumausaineesta tai huumausaineryhmästä positiivisia. Tämän lisäksi kerättiin seerumi- ja virtsanäytteitä, jotka olivat negatiivisia testattavien yhdisteiden suhteen. Määrytyksissä käytettiin Installertin ja Innovaconin kaupallisia vieritestejä hCG:n ja huumausaineiden seulonnassa. Jokaisesta Drug panel-lukulaiteella tehdystä mittauksesta tallennettiin valokuva mittauksesta ja tekstitiedosto.</p> <p>Työn perusteella voitiin todeta, että Drug panel-lukulaitteen ja siihen kuluva ohjelmiston käyttö on helppoa ja tarjoaa objektiivisen tulkinnan tuloksista. Molemmissa määrytyksissä erien välillä esiintyi merkittävää vaihtelua. Tämän vuoksi erän vaihtuessa on suositeltavaa kalibroida laite. Laitteella tehtävän mittauksen herkkyys ei ollut riittävä, jotta voitaisiin välttää diagnosoimasta myös alkuraskaudessa spontaanisti päättyviä biokemiallisia raskauksia. Huumausaineiden seulontatesteissä sen sijaan laite voisi olla hyödyllinen. Huomioitava on kuitenkin että testi ei pysty tunnistamaan kaikkia relevantteja yhdisteitä.</p>	
Avainsanat	vieritesti, hCG, huumausaineinесеula, raskausmääritys, reflektanssi

Author(s) Title	Åse Karttunen Analyzing Chorionic Gonadotrophin (hCG) and Multiple Drugs of Abuse Tests by Drug Panel Reader 47+ 3 appendices 7 May 2012
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation	
Instructors	Docent Eino Puhakainen Principal lecturer Riita Lumme
<p>Pregnancy tests based on chorionic gonadotrophin (hCG) hormone and multiple drugs of abuse screening tests are onsite performed point-of-care (POC) tests that are used in HUSLAB. These tests are lateral flow chromatographic immunoassay tests where specimen can be rapidly detected by colored lines. Test lines are commonly detected by sight, introducing subjective aspects for each interpretation of the test results.</p> <p>My Final thesis was made for HUSLAB. The purpose of this study was to determine the usability and reproducibility of the Drug panel reader, which sample measurement is based on two-dimensional image sensor. The aim was to determine the variation from batch to batch of tests, the repeatability of the test and determine the variation of the reflectance between individual test cartridges. A large part of pregnancies are interrupted before clinical signs of pregnancy and is called biochemical pregnancy. To avoid diagnoses of those pregnancies the aim was to set the cutoff for positive pregnancy test to 25 IU/l.</p> <p>For the study were collected serum and urine samples from pregnancy positive individuals and urine samples tested positive for one or more drugs. In addition we used also samples negative for the tested compounds. The tests used were Installer and Innovacon pregnancy and Multi-Drug ten panel strip tests.</p> <p>The results indicated that the reproducibility was not sufficient to avoid testing positive for biochemical pregnancies. The sensitivity for multiple drugs of abuse tests was sufficient. The batch to batch difference was significant and threshold values are crucial to adjust when starting on a new batch of tests.</p>	
Keywords	onsite performed point-of-care (POC) tests, hCG, multiple drugs of abuse screening tests, pregnancy tests, reflectance

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	KORINGONATROPIINI (hCG)	2
	2.1 hCG:n merkitys raskaudessa	3
	2.2 hCG virtsassa ja seerumissa raskauden aikana	3
	2.3 hCG:n merkitys raskausdiagnostiikassa	4
3	HUUMSAINEET	6
	3.1 Huumausainediagnostiikka	6
	3.2 Virtsa näyttemateriaalina huumausainediagnostiikassa	7
	3.3 Immunologiset huumausainemääritykset	9
	3.4 Huumausaineiden kvantitatiivinen määrittäminen kaasukromatografia- massaspektrometrialla (GS-MS)	10
4	ANALYYSILAITTEET LATERAALISTEN TESTIEN MÄÄRITYKSISSÄ	11
5	TUTKIMUSTYÖN TAVOITTEET	13
6	TYÖN SUORITTAMINEN	15
	6.1 Työprosessin kuvaus	15
	6.2 Aineisto	15
	6.3 Välineet ja reagenssit	15
	6.4 Drug panel-lukulaite	16
	6.5 hCG-määrityksen suoritus ja luku Drug panel-lukulaitteella	17
	6.6 Huumeseulamäärityksen periaate, suoritus ja luku Drug panel- lukulaitteella	18
	6.7 Tulosten analysointi	20
7	TULOKSET	21
	7.1 Ajan vaikutus raskaustestien reflektanssiin	21
	7.2 Reflektanssin vaihtelu raskausmäärityksien erien välillä	22
	7.3 Toistettavuuden määrittely HCG määrityksille	24
	7.4 Virtsan matriisin vaikutus hCG-määritykseen	25
	7.5 Seeruminäytteiden hCG-pitoisuuden vaikutus reflektanssiin	27
	7.6 Drug panel-lukulaite aiheuttaa vaihtelua hCG-määrityksen reflektanssiin	29
	7.7 Ajan vaikutus huumausainemäärityksien reflektanssille	29
	7.8 Huumausaineiden raja-arvon säätö Drug panel-lukulaitteella sekä mittauksen toistettavuus kahdella eri rinnakkaisella laitteella	31

7.9	Positiivisten Huumausainenäytteiden analysointi	32
8	POHDINTA JA TULOSTEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI	36
	LÄHTEET	43

1 JOHDANTO

Meilahden sairaalan laboratoriossa suoritetaan huumausaineiden vieritestiseula (HUSLAB tutkimusohjekirja: Huumeseulonta, kvalitatiivinen, virtsasta) sekä raskauden osoittamiseksi koriongonadotropiinin (HUSLAB tutkimusohjekirja: Koriongonadotropiini (kval), seerumista; Koriongonadotropiini (kval), virtsasta) vieritestit.

Raskaus lasketaan alkaneeksi edellisten kuukautisten alkamispäivästä lähtien. hCG:tä muodostavat raskauden alkaessa ensin sikiö ja myöhemmin istukan trofoblastisolut. Sen määrä kaksinkertaistuu joka toinen päivä 4-8 raskausviikoilla. HUSLAB:ssa raskauden osoittamiseen käytetään kaupallisia vieritestejä. Näitä vieritestejä suositellaan suoritettavan aikaisintaan raskausviikolla 5 eli silloin, kun seuraavan kuukautisten olisi pitänyt alkaa. Määritysten herkkyys on ilmoitettu 25 IU/l, mitä pidetään optimaalisena havaitsemisrajana onnistuneesta raskaudesta. Käytännössä nämä ovat kuitenkin usein ilmoitettua herkempiä.

Huumausaineiden vieritestiseulassa ovat mukana tärkeimmät huumausaineet, sisältäen myös huumaavia psyykenlääkkeitä ja vierotushoidossa käytettäviä lääkeaineita. Virtsanäytteestä useimmat huumausaineet voidaan jäljittää vähintään kahden päivän ajan käytön lopetuksen jälkeen. Monet huumausaineet voivat erittyä sellaisenaan virtsaan, mutta valtaosassa erityis tapahtuu elimistössä tapahtuneen aineenvaihdunnan seurauksena. Jotkut ravintoaineet ja lääkkeiden ainesosat tai näiden metaboliatuotteet voivat antaa väärän positiivisen tuloksen. Tästä syystä positiivinen huumausaineseulan tulos tarkistetaan tavallisesti selektiivisellä menetelmällä, mikä useimmiten on kaasukromatografiamassaspektrometria (GS-MS).

HUSLAB:ssa suoritettavat sekä huumausaineseulamääritykset että raskauden vieritestit ovat immunokemiallisia virtauskromatografisia vieritestejä. Näytemateriaalina käytetään huumausainetestissä virtsaa, kun taas hCG:n määrityksessä käytetään joko seerumia tai virtsaa. Määritykset luetaan visuaalisesti.

Työn tarkoituksena oli korvata näiden määritysten silmämääräinen analyysi Drug panel-lukulaiteella tehdyllä mittauksella, joka perustuu kaksiulotteisen kuva-anturin tulkintaan. Laiteella on myös mahdollista saada kuvallinen ja numeraalinen dokumentti määrityksestä sekä siirtää tiedot MULTILAB tietojärjestelmään. Laitemittauksella oli

tarkoitus määrittää testien eräkohtainen vaihtelu, määriytysten toistettavuus sekä määrittää testikasettien reflektanssin vaihtelu. Lisäksi tällä laiteella haluttiin säädellä mittaustulos positiiviseksi hCG pitoisuuksille, jotka ylittävät 25 UI/L. Säättämällä hCG:n raja-arvoa haluttiin sulkea pois ne raskaudet jotka päättyvät hyvin varhain, usein jo samalla viikolla kuin seuraavien kuukautisten pitäisi alkaa.

Opinnäytetyön tein Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiriin (HUS) kliinisen kemian ja hematologian laboratoriossa sekä Naistenklinikan sairaalan laboratoriossa. Lisäksi osan laboratoriokokeista suoritin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) huumetutkimusyksikön laboratoriossa.

2 KORINGONATROPIINI (hCG)

Ihmisen istukkahormoni eli koriongonadotropiini (hCG) kuuluu gonadotropiineihin, johon kuluvat myös luteinisoiva hormoni (LH) ja follikkelia stimuloiva hormoni (FSH). hCG ja LH sitoutuvat samaan hCG/LH reseptoriin. Raskauden alkaessa hCG syrjäyttää LH:n progesteronin tuoton säätelyssä. (Cole 2010: 654-655.) hCG on heterodimeerinen glykoproteiini, joka koostuu 244 aminohaposta. Se koostuu α -alaysiköstä, jonka rakenne on identtinen FSH:n ja LH:n gonadotropiineiden α -ketjun kanssa, sekä β -alaysiköstä, jonka geenisekvenssi on yksilöllinen istukkahormonille. Alaysiköt sitoutuvat toisiinsa ei-kovalenttisesti. Kolmasosa hCG:n massasta koostuu kahdeksasta hiilihydraattimolekyylistä, joista kuusi on kiinnitetty hCG β :aan ja kaksi hCG α :an. hCG on kaikkein glykosyloitunein glykoproteiini mitä tunnetaan. (Cole 2010: 653-654.) Nykyään tiedetään että hCG esiintyy viitenä itsenäisenä molekyylinä, joiden rakenne ja biologinen toiminta vaihtelee suuresti. Näillä kaikilla on identtinen aminohapposekvenssi. Niiden rakenteellinen erilaisuus johtuu erilaisista hiilihydraattien sivuketjuista ja siitä, miten α - ja β -alaysiköt yhdistyvät toisiinsa. hCG:llä, hyperglykolysoitu hCG:llä ja sulfatoidulla hCG:llä on kaikilla erilainen hiilihydraattirakenne. Muut itsenäiset hCG molekyylit, hCG β ja hyperglykolysoitu hCG β eroavat toisistaan alaysiköiden yhdistymisen ja hiilihydraattirakenteen perusteella. Sulfatoitu hCG on tärkeä kuukautiskieron säätelyssä ja se edistää ovulaatiota. hCG:ta ja hyperglykolysoitua hCG:ta ilmenee raskauden aikana, mutta hyperglykolysoitu hCG voi olla myös merkki sukusolujen syövästä tai koriokarsinoomasta. hCG β :ta ja hyperglykolysoitua hCG β :tä ilmenee monissa muissa syöväissä. (Cole LA. 2010: 653-654.)

2.1 hCG:n merkitys raskaudessa

Ihmisen istukkahormoni eli koriongonadotropiini (hCG) muodostuu raskauden alkaessa ensin sikiön solujen ja myöhemmin istukan trofoblastisolujen syntetisoimana. Raskaus lasketaan alkaneen edellisten kuukautisten alkamispäivästä lähtien. Raskaudessa viikoilla 3-5 hyperglykosoitunut hCG on vallitseva muoto, minkä jälkeen koko loppuraskauden aikana tavallinen hCG esiintyy hallitsevana muotona. (Cole 2010: 654-655.)

Hyperglykosyloiduin hCG:n isommat hiilihydraattirakenteet estävät $\alpha\beta$ -dimeerin täydellistä pakkautumista. Tällöin tavallisesti piilossa oleva peptidialue tulee esiin, joka sitoutuu transformoivaan kasvutekijä beetaan (TGF β). On esitetty, että interaktio TGF β :n kanssa edistää alkion kiinnittymistä kohdun seinään, mitä kutsutaan implantaatioksi. (Cole 2009b: 4-8.) hCG ja hyper-glykosoitunut hCG toimivat yhdessä edistäessään alkion uloimman kerroksen trofoblastisolujen kasvua ja erilaistumista istukan mikrovillukseksi. Puute hyperglykosoituneesta hCG:stä alkuraskauden aikana, johtaa epätäydelliseen implantaatioon ja raskauden keskeytymiseen. Tavallisesti tällöin myös kokonais hCG:n määrä on alhaisempi kuin normaalissa raskaudessa. (Cole 2010: 654-655.) Noin 20-30% kaikista raskauksista päättyy alkuraskaudessa keskenmenoon, joka usein tapahtuu ennen kuin raskaus on kliinisesti todettu (Wilcox ym 1988: 189-192). Nämä raskaudet pystyttiin diagnosoimaan, kun nopeat ja herkäät hCG määritykset otettiin kliniseen käyttöön. Aluksi kohonneet hCG arvot nuorilla naisilla ilman merkkejä raskaudesta luokiteltiin vääriksi positiivisiksi. (Seppälä ym 1980: 165-166.) Nykyisin tämä tila on hyvin tunnettu ja sitä kutsutaan ”biokemialliseksi raskaudeksi”.

Seuraavat kolme viikkoa implantaatiosta hCG edistää progesteronin tuotantoa. hCG:llä on monia tehtäviä raskauden aikana. Se edistää raskauden aikana angiogeneesia kohdun verisuonissa varmistaakseen riittävään verenkierron kasvavalle istukalle. Raskauden aikana se valvoo istukan, kohdun ja sikiön kasvua ja erilaistumista. hCG osallistuu immuunijärjestelmän vaimentamiseen, jotta äidin keho ei hylkisi sikiötä. (Cole 2010: 654-655.)

2.2 hCG virtsassa ja seerumissa raskauden aikana

hCG :n määrä seerumissa ja virtsassa vaihtelee paljon eri yksilöiden välillä. Tämän takia hCG-konsentraatiosta ei voida päätellä raskauden ajankohtaa. Viidennellä

raskausviikolla hCG voi vaihdella välillä 20-8000 IU/l seerumissa. Virtsassa määrä vaihtelee tätäkin enemmän, koska rakko aika vaikuttaa virtsan konsentroitumiseen. Itse implantaation ajankohdassa raskauden alussa on suuria yksilöllisiä vaihteluja. Vastedes julkaistussa tutkimuksessa osoitettiin implantaation tapahtuvan 16-32 päivää raskauden alkamisesta. Tällöin hCG konsentraatio virtsassa oli 1-12 IU/l, mikä nousi viikossa 31-4020 IU/l. Tutkimukseen otettiin mukaan vain ne raskaudet, jotka jatkuivat onnistuneesti raskausajan loppuun. (Cole 2011b: 1-6).

Normaalissa raskaudessa virtsasta ja seerumista löytyy hCG :n ja hyperglykosoidun hCG:n lisäksi erilaisia elimistön metaboliassa syntyviä hCG molekyyliä, kuten vapaa hCG:n α -alaisyksikö (hCG α), pilkottu hCG (hCG β n), pilkottu hCG β (hCG β n) ja β -alaisyksikkö (hCG β) (Cole 2009b: 4-10). Lisäksi virtsassa esiintyy hCG β cf:tä, mikä on vapaa β -ketju, joka syntyy munuaisten hajoamistuotteena hCG:stä ja hCG β :stä. hCG β cf :n osuus hCG:stä on alhainen raskauden alkuvaiheessa, mutta sen osuus kasvaa merkittävästi viidennen raskausviikon jälkeen, jolloin se on runsaimmin esiintyvä hCG-muoto virtsassa. (Montagnana ym 2011: 1517-1518.)

Virtsanäytteiden hCG:n vastainen immunoreaktiivisuus laskee merkittävästi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n säilytyksessä osassa näytteissä. Tämä osoitettiin vastikään ilmestyneessä julkaisussa. (Lempiäinen ym 2011: 1-5.) Tästä syystä virtsanäytteitä suositellaan säilytettävän ennen määrittystä, joko lyhyen ajan $4\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa tai pitkäaikaisessa säilytyksessä $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Syy immunoreaktiivisuuden laskuun arvellaan johtuvan, siitä että virtsan urea aiheuttaa hCG-molekyylien pilkkoutumista ja tuhoutumista. (Lempiäinen ym 2011: 1-5.) Virtsanäytteissä esiintyy suuria eroja mm. urean ja muiden yhdisteiden konsentraatioissa. Tämä voi johtua virtsan väkevyydestä sekä yksilöllisestä vaihtelusta. Tästä syystä virtsanäytteen matriisi voi merkitsevästi vaikuttaa immunologisen hCG-määrityksen tuloksiin. Siksi kvantitatiivinen hCG tunnistus suoritetaan pääosin seerumista. (Lempiäinen ym 2011: 1-5; Stenmaan ym 1997: 1293-1294.)

2.3 hCG:n merkitys raskausdiagnostiikassa

Ensimmäinen hCG määrittäminen perustui osittain virtsasta puhdistetun hCG:n biologiseen aktiivisuuteen (Cole 2009b: 2). Vähitellen immunologiset määritykset korvasivat biologiset testit. (Wide ja Gemzell 1960: 261-267.; Vaitukaitis ym 1972: 751-8). Ensimmäinen immunologinen raskaustesti perustui hemagglutinaation estoon, sen havaitsemisrajana oli 500 UI/L (Wide ja Gemzell 1960: 261-267).

Lähes kaikissa nykypäivänä käytössä olevissa hCG-määrittelyissä käytetään monoklonaalisia vasta-aineita tai yhdistelmiä monoklonaalisista vasta-aineista ja polykonaalisista vasta-aineista. Monoklonaalisia vasta-aineita, joiden epitooppien spesifisyys tunnetaan, voidaan käyttää eri hCG-isomuotojen tunnistuksessa. Suurin osa epitoopeista ei ole riippuvaisia eroista hiilihydraattikoostumuksessa, mutta käytössä on myös joitakin harvoja vasta-aineita, jotka tunnistavat hyperglykosoidun hCG:n hiilihydraattiketjut. (Stenman ym, 2006: 773-777.) Monoklonaalisten vasta-aineiden avulla on pystytty kehittämään spesifisiä määrittelyksiä, jotka tunnistavat hCG:n alayksiköt ja sen erilaiset metaboliassa syntyneet muodot. Tällöin on voitu ottaa huomioon erilaisten hCG-muotojen esiintyminen virtsassa ja seerumissa. Useimmat seerumista tehtävät määrittelykset on nykyisin suunniteltu mittaamaan sekä hCG:ta että hCG β :ta, koska nämä isomuodot ovat vallitsevia raskaudessa. Virtsan hCG-määrittelyksien vasta-aineet on suunniteltu tunnistamaan hCG, hCG β sekä hCG β cf, jonka osuus virtsan hCG-muodoista kasvaa nopeasti viidennen raskausviikon jälkeen. (Montagnana ym 2011: 1515-1518.)

Immunologinen totaali-hCG määrittely pystyy tunnistamaan erilaisia hCG-molekyylejä, ja se onkin hCG-diagnostiikassa nykyisin yleisesti käytössä. Riippuen valmistajasta testien herkkyys tunnistaa useita kliinisesti tärkeitä hCG-molekyylejä vaihtelee suuresti. Tämän takia näiden testien valmiudessa havaita mm. aikainen raskaus ja kohdunulkoinen raskaus on suuria eroja. (Cole 2011a: 1-2.)

Sekä terveydenhuollossa ja kotitesteinä käytetään yleisesti raskauden osoittamiseksi hCG-hormonia mittaavia immunologisia vieritestejä. Näissä määrittelyissä käytetään joko seerumia tai virtsaa. Virtsasta tehtävät määrittelykset ovat monesti huomattavasti herkempiä kuin valmistajan ilmoittama 25 IU/l. Niiden analyttinen herkkyys voi jopa alittaa 10 IU/l. (Montagnana ym 2011: 1517-1518.) Herkkä raskaustesti havaitsee raskauden aikaisemmin, mutta koska hCG:tä saattaa esiintyä seerumissa ja virtsassa pitoisuuksina, joka jopa ylittää 10 IU/l ei raskaana olevilla naisilla, optimaalisena havaitsemisrajana pidetään noin 25 IU/l. (Stenman ja Alfthan 2003: 18-19.)

hCG:n kaksinkertaistumismäärittelyä käytetään nykyisin, kun halutaan tunnistaa raskausongelmia, jotka liittyvät riskiin raskauden keskeytymisestä tai kohdunulkoisen raskauteen. Normaalisessa raskaudessa hCG:n määrä kaksinkertaistuu joka toinen päivä 4-8 raskausviikoilla. Tämän testin herkkyys on kuitenkin rajallinen ja väärin

positiivisten ja negatiivisten tuloksien määrät ovat korkeat. (Sutton-Riley ym 2006: 682-683.) Tutkimuksissa, jossa on selvitetty hyperglykosyloidun hCG:n ja hCG:n suhdetta alkuraskaudessa, on pystytty ennustamaan biokemiallisia raskauksia ja spontaaneja abortteja huomattavasti tarkemmin kuin hCG:n kaksinkertaisuusmäärityksellä. (Sasaki ym 2008: 1781-1785.)

Vääriä positiivisia seeruminäytteitä on arvioitu esiintyvän noin 1/1000 näytteestä ja niiden ajatellaan aiheutuvan useimmiten heterofiilistä vasta-aineista. Muut tekijät, kuten mm. luteinisoiva hormoni (LH) tai reumatekijä voivat olla syynä tähän. Vääriä negatiivisia tuloksia voidaan saada, jos testi tehdään liian aikaisin tai hyvin korkeissa hCG-pitoisuuksissa, jolloin määrittämissä olevat spesifiset vasta-aineet ylisaturoituvat ligandilla. (Montagnana 2011: 1517-1518.)

3 HUUMAUSAINHEET

Suomessa huumausaineeksi luokitellaan aineet, joilla on lamauttavia, päihdyttäviä tai aistiharhoja tuottavia keskushermostovaikutuksia ja jotka valtioneuvosto on määritellyt huumausaineiksi (FINLEX 2010). Yleisimpiin huumausaineisiin voidaan laskea opiaatit (morfiini, heroini), amfetamiini, kokaiini, metamfetamiini, ekstaasi (metyleenidioksimetamfetamiini), kannabinoidit, opiaattiriippuvaisten vierotus-, korvaus- ja ylläpitohoidossa käytettävät metadoni ja buprenorfiini sekä masennuslääkkeisiin kuuluvat bentsodiatsepiinit ja trisykliset antidepressantit.

3.1 Huumausainediagnostiikka

Ensimmäiset huumausainetestit tehtiin lähinnä kuolinsyntyntutkimusten yhteydessä. Nykyään huumausainetestejä käytetään monissa eri sovelluksissa ja tarkoituksissa, mm työntekijöiden tai -hakijoiden testauksessa, kipupotilaiden seurannassa, humalatilän syytä ja huumausaineiden väärinkäyttöä epäiltäessä. Huumausainetestaus tehdään tavallisesti ensin immunologisella seulontatestillä. Positiivisen tuloksen oikeellisuus tarkistetaan selektiivisellä menetelmällä, mikä useimmiten on kaasukromatografi-massaspektrometria (GS-MS).

3.2 Virtsa näytemateriaalina huumausainediagnostiikassa

Näytemateriaalina virtsa on yleisin huumausainemäärityksessä. Muita mahdollisia näytemuotoja ovat mm. hiki, seerumi, hiukset ja sylki. Pisimpään huumeet säilyvät hiuksissa. Verestä, plasmasta ja syljestä huumausaineita voidaan jäljittää enintään joitakin päiviä (Pil ja Verstraete 2008: 196-201 ; Barroso ym 2009: 978-979) ja esim. verestä kannabiksen vaikuttava aine tetrahydrokannabinoli (THC) on todettavissa vain joitakin tunteja, kun taas virtsasta sitä voi löytyä käytön jälkeen jopa useita viikkoja (Westin 2011: 577). Virtsanäytteestä useimmat huumausaineet voidaan jäljittää vähintään kahden päivän ajan käytön lopetuksen jälkeen. Lisäksi ne esiintyvät pääosin korkeampina pitoisuuksina virtsassa kuin veri- ja sylkinäytteessä (Barroso ym 2009: 978-979).

Muuttujia, jotka vaikuttavat määritysten tuloksiin ovat raja-arvon valinta, farmakodynamiikka, farmakokinetiikka, farmakogenetiikka sekä näytteen käsittely. Matala raja-arvo lisää testin herkkyyttä, mutta samalla kasvaa riski vääristä positiivista tuloksista. Tämän lisäksi huumausaineiden metabolia ja aika, jolloin ne ovat jäljitettäviä virtsassa, vaihtelee merkittävästi yksilöiden välillä. Metabolinen profiili eri tyyppisten näytteiden välillä vaihtelee, mikä on otettava huomioon analyysissä. (Christo ym 2011: 126-130.)

Monet huumausaineet voivat erittyä sellaisenaan virtsaan, mutta valtaosassa erityis tapahtuu elimistössä tapahtuneen aineenvaihdunnan seurauksena. Monien huumausaineiden vaikuttavat aineet ovat lipofiilisiä, ja tämän takia niitä ei voida poistaa munuaisten kautta. Huumausaineita katalysoivat entsyymit voivat muuntaa tällaiset yhdisteet vesiliukoisemmiksi. Nämä jaotellaan I-vaiheen ja II-vaiheen entsyymeihin. I-vaiheen entsyymit katalysoivat hapetus-, pelkistys- ja hydrolyysireaktioita. Aineiden vesiliukoisuus yleensä lisääntyy, mutta pääsääntöisesti nämä reaktiot eivät vielä lisää aineiden poistumista elimistöstä. II-vaiheen entsyymit katalysoivat yleensä hyvin vesiliukoisten konjugaattien liittämistä yhdisteisiin. Monet huumausaineet erittyvät glukuronideina, jotka syntyvät elimistössä kun aineisiin liitetään glukuronihappo. Glukuronihappo ei ainoastaan lisää huumausaineiden vesiliukoisuutta, vaan tavallisesti se myös inaktivoi huumausaineen farmakologiset vaikutukset. (Kaeferstein 2009: S22-S2.)

Heroiini, amfetamiini, metamfetamiini, kannabinoidit ja kokaiini ovat huumausaineita, joita yleisesti testataan virtsasta seulontakokeissa. 70-80 % heroiiniannoksesta erittyy virtsaan. Elimistössä heroiini metaboloituu nopeasti di-asetyyli-morfiini-6-asetyyli morfiiniksi (6-MAM), seuraavaksi morfiiniksi, ja tämän jälkeen morfiini-6-glukoroinidiksi. Kaikilla näillä molekyyileillä on lyhyt puoliintumisaika. Virtsasta 6-MAM on todettavissa 4-12 tuntia, morfiini 8 tuntia ja morfiini-6-glukoroinidi 48 tuntia. (Tenore 2010: 439-440.) Kokaiinista (bentsoyylikgoniinin metyyliesteri) suurin osa metaboloituu ekogniini metyyliesteriksi (EM) ja bentsoyylikogniiniksi (BE). Pieni osa kokaiinista erittyy muuttumattomana ja se voidaan mitata enintään 24-36 tunnin ajan, kun taas sen merkittävimmät metaboliitit ovat mitattavissa 6-14 vrk:n ajan. (Barroso ym. 2009: 978-979.) Amfetamiinista osa erittyy ilman metabolointia ja on todettavissa pari vuorokautta. Metamfetamiini erittyy virtsaan pääosin amfetamiinina ja sen aineenvaihduntatuotteina, mutta osa erittyy myös muuttumattomana. Sitä voidaan osoittaa joitakin vuorokausia virtsasta. (Li ym 2010: 187-191.) Kannabiksen tärkein vaikuttava aine on delta-9-tetrahydrokannabinoli (THC). THC erittyy virtsaan konjugoituna, erityisesti glukuronihapon kanssa (Mazur ym 2009: 1496-1497). Trisykliset antidepressantit voidaan määrittää 10 vuorokauden ajan. Buprenorfiinista kolmasosa erittyy virtsaan ja bentsodiatsepiinit löytyvät virtsassa konjugoituneina. (Nicholls ym 2010: S15-S18.)

Virtsan pH vaikuttaa merkittävästi tiettyjen virtsaan erittyvien huumausaineiden ja niiden metaboliittien pitoisuuksiin. Esimerkiksi metadonin erityis lisäänty happamassa virtsassa, kun taas pH ei vaikuta EDDP (2-etyyli 1,5-dimetyyli 3,3-difenyylipyrrolidiini)-metaboliittiin. Hyvin proteiinipitoinen ruokavalio aiheuttaa hapanta virtsaa, kun taas kasvissyöjällä se voi olla alkaalinen. Bakteeri-infektio virtsateissä voi nostaa pH:n emäksiselle puolelle (pH > 8). Lisäksi piilevät taudit, kuten diabetes, asidoosi ja uremia voivat laskea virtsan pH:n happamalle puolelle (pH < 6). (Christo ym 2011: 129.)

Virtsan etuihin näyttemateriaalina kuuluu se, että siinä ei esiinny määritystä häiritseviä endogeenisiä yhdisteitä. Lisäksi se on kustannustehokas ja suhteellisen helppo ottaa. Huonoja puolia on se, että näytteenoton on tapahduttava valvotusti, minkä asiakas voi kokea loukkauksena omaa yksityisyyttään kohtaan. Virtsassa tehtävän analyysin perusteella ei voida määrittellä tarkasti huumausaineen annoksen kokoa ja ajankohtaa, jolloin aine on nautittu. Lisäksi näytteestä saattaa vielä löytyä huumausainejäämiä senkin jälkeen, kun niiden farmakologinen vaikutus on loppunut. Tästä syystä virtsa ei ole oikea näytteenmuoto, kun halutaan selvittää, onko kuljettaja huumeiden

vaikutuksen alaisena rattijuopumusepäilyssä. Tällöin luotettavampia näytemuotoja ovat sylki tai verinäyte. (Barroso 2009: 978-979.)

3.3 Immunologiset huumausainemääritykset

Sairaanhoidossa on suuri tarve luotettavasta, helposta, kustannustehokkaasta ja nopeasta huumausainetestistä. Immunologiset määritykset ovat laajasti käytössä sairaanhoidossa. Määrityksissä olevat spesifiset vasta-aineet reagoivat näytteessä olevien huumausainemolekyylien ja/tai metaboliatuotteiden kanssa. Käytössä on sekä automatisoituja mittauslaitteita, jotka on tarkoitettu isoille näytemäärille sekä nopeita vieritestejä. Vieritesteissä on yleisesti käytössä lateraalivirtauskromatografiaan perustuva kastotesti, missä huumausaineet kilpailevat testitikulla olevien antigeenien kanssa spesifisistä vasta-aineista. Immunologisella vieritestillä vastaus saadaan nopeasti, mikä on tärkeätä kiireellisissä tapauksissa, esim. kun epäillään huumeiden tai rauhoittavien lääkkeiden yliannostusta. Nämä määritykset ovat kustannustehokkaita, helppoja suorittaa ja niissä määritetään monesti samanaikaisesti useita eri huumeita ja huumeaineryhmiä. Näiden testien heikkouksiin voidaan laskea niiden rajallinen herkkyys, sekä pääsääntöisesti ryhmäspesifinen tunnistus. Ne eivät myöskään mittaa kaikkia toksikologisesti relevantteja huumausaineita. (Tenore PL; 2010: 436-445.)

Vaikka tulokset immunologisista testeistä ovat pääsääntöisesti oikeita, negatiivisia ja positiivisia väriä tuloksia huumeaineista/huumeaineryhmistä esiintyy. Bagøien:in psykiatrisen sairaalan potilaiden virtsanäytteistä tehdyssä tutkimuksesta, yksi neljästä immunologisesta ryhmäspesifisestä testissä antoi virheellisiä tuloksia joidenkin huumeiden/huumeidenryhmien osalta. (Bagøien G ym 2009: G248-253.) Tämä on paljolti linjassa aikaisempien tutkimuksien tulosten mukaan (Buchan 1998: 395-399; Leino 2001: 325-331; Peace 2000: 589-594). Tämä voi johtua antigeenien ristireagoimisesta huumausaineiden samankaltaisen rakenteen omaavien aineiden kanssa tai metabolointi reaktioissa syntyvien tuotteiden samankaltaisuudesta. Joissakin tapauksissa vasta-aine voi sitoutua epitooppiin, jonka rakenne ei muistuta vasta-aineen omaa antigeenia. (Bagøien ym 2009: 252-253.)

Opaatit esim. morfiini, on yksi ryhmä, jossa väärät positiiviset tulokset ovat kohtalaisen yleisiä. Tämä voi johtua unikonsiementen tai yskänlääkkeen käytöstä, koska molemmat sisältävät kodeiinia. Kodeiini eli metyyliormiini kuulu opiaatteihin ja se metaboloituu elimistössä morfiiniksi. Hyvin korkeat morfiinitasot näytteessä, jotka ylittävät 15 000

ng/L, johtuvat pääsääntöisesti heroiinin käytöstä, mutta se ei ole vielä absoluuttinen todiste heroiinin käytöstä. Jos virtsanäyte on positiivinen di-asetyyli-morfiini-6-asetyyli morfiinin (6-MAM) osalta, joka on yksi heroiinin metaboloitumisen tuotteista, se on todiste heroiinin käytöstä. 6-MAM ollessa negatiivinen, voidaan myöhemmin ottaa uusi näyte tai analysoida morfiini: kodeiinisuhde, joka on spesifinen heroiinin metaboloinnissa. (Tenore 2010: 440-441.) Jotkut Fluorokinoloniantibiootit voivat aiheuttaa positiivisen opiaatti-tuloksen. Näiden antibioottien rakenne eroaa täysin morfiinista. Morfiinispesifiset vasta-aineet voivat ristireagoida näiden kanssa ja syytä tähän ei tiedetä. (Shafiq ja Mutgi 2010: 1644; Tenore 2010: 443.) Amfetamiinin positiivisen tuloksen syynä voi olla esimerkiksi lääkeaineiden norpseudoefedriini tai fenyylipropanoliamiini (Braham 2010: 1345). Tulehduskipulääkkeiden kuten ibuprofeenin ja naprokseenin on raportoitu antavan joskus vääriä positiivisia kannabinoidituloksia (Braham et al., 2010).

Immunologisissa määryksissä esiintyvien epävarmuustekijöiden takia niitä suositellaan käytettäväksi seulontamenetelminä, joka tarjoaa lähinnä alustavia tuloksia. Positiivinen testi edellyttää vahvistusta selektiivisemmällä menetelmällä, yleensä käytetään kaasukromatografia-massaspektrometriaa (GC-MS). (Tenore 2010: 437-438.)

3.4 Huumausaineiden kvantitatiivinen määrittäminen kaasukromatografia-massaspektrometrialla (GC-MS)

Luotettava määrittäminen virtsanäytteessä olevista huumausaineista ja niiden pitoisuuksista suoritetaan tavallisesti kaasukromatografia-massaspektrometrialla (GC-MS). GC-MS:ssä näyte höyrystetään ja ruiskutetaan portista kaasukromatografiaan, missä se sekoittuu kuumaan virtaavaan kantokaasuun kapillaaripylväessä. Pienet molekyylit liikkuvat nopeammin kuin raskaammat ja tällöin erottelu tapahtuu. Näytteen yhdisteet ionisoidaan, jonka seurauksena niistä muodostuu varattuja hiukkasia (ioneja). Ionit erotellaan niiden massan ja varauksen perusteella analysaattorin sähkömagneettisessa kentässä. Ionin signaali prosessoidaan massaspekttriaksi. Näitä massaspektrejä vertaillaan tietokantaan, missä on tuhansien yhdisteiden massaspektrit ja näiden avulla spesifinen huumausaine identifioituu (esim. morfiini). (Tenore 2010: 437-438.)

Joitakin vuosia sitten GC-MS oli vielä pääasiallinen menetelmä kvantitatiivisissa huumausainemääryksissä. Uudet näytetyypit kuten hius tai sylki, synnyttivät tarpeen yhä herkemmissä määrittämenetelmistä. Tässä nestekromatografia-

massaspektrometria (LC-MS), joka mahdollistaa pienten pitoisuuksien määrittämisen monimutkaisista näytemateriaaleista, on osoittautunut tehokkaaksi. (Barroso 2009: 980-992). Menetelmänä se yhdistää nestekromatografian fyysiset ominaisuudet MS-määrittämiseen.

4 ANALYYSILAITTEET LATERAALISTEN TESTIEN MÄÄRITYKSISSÄ

Viimeisen kuluneen 10 vuoden aikana vieritestien immunomäärittämisen sovellukset ovat lisääntyneet merkittävästi. Tällä hetkellä suurin osa kaikista kaupallisesti saatavilla olevista immunologisista vieritesteistä ovat ns. lateraalisia määrittämiä. Näiden toimintaperiaate on manuaalinen immunokromatografia. Määrittämissä tutkittavat molekyylit ja vasta-aineiden (tai antigeenien) konjugaatit liikkuvat kapillaarivoimien avulla alueelle, jossa vastaanottaja- ja kontrolli-vasta-ainealueet muodostavat visuaalisia viivoja, tyypillisesti 2-10 minuutin sisällä. Nämä määrittämiset ovat pääosin kvalitatiivisia. Vasta-aineisiin liitettyinä merkkiaineina on eniten käytetty värillisiä latex- tai kultapartikkeleita, joiden kolorimetrinen tunnistus on kvalitatiivinen tai korkeintaan semikvantitatiivinen. Näitä käytetään, kun tutkittava metaboliitti esiintyy suhteellisen korkeina pitoisuuksina. Herkempi tunnistus ja parempi kvantitatiivisuus voidaan saavuttaa, kun käytetään mm. metalli-ioni-kelaatteja, ioni-ladattuja liposomeja tai fluoresoivia merkkiaineita. (Lode 2005: 594-596.)

Määrittämiset suoritetaan tavallisesti lähellä asiakasta ja monesti testin suorittajalla ei ole laboratorioalan koulusta, vaan hän voi olla esimerkiksi lääkäri tai hoitaja. Terveystieteissä riittävä analyttinen laatu määrittämissä on erittäin tärkeää, riippumatta siitä, missä määrittämiset tehdään. Kaikki analyysit eivät edellytä kvantitatiivisia tuloksia, mutta yleisesti tärkeiden lääketieteellisten päätösten ei pitäisi perustua tuloksiin, joiden metodologinen epätarkkuus ylittää 15 %. Ihanteellisesti vieritesti on niin luotettava, että toista varmistavaa testiä ei tarvita. (Lode 2005: 594-596.)

Immunologisille vieritesteille on kehitetty omia analyysilaitteita. Näin on pyritty lisäämään testien luotettavuutta ja vähentämään lukijasta johtuvaa subjektiivista vaihtelua. Vieritestauksessa käytettävän analyysilaitteen pitäisi olla helppokäyttöinen, koska vähänkin monimutkaisempi tekninen laite johtaa helposti virheelliseen määrittämiseen johtuen käyttäjän virheistä. Muita toivottavia ominaisuuksia laitteelle ovat että ne pystyvät tutkimaan monia eri analyyttejä. Matriisina voisi olla erilaisia näytemuotoja kuten esimerkiksi virtsa ja seerumi. Laite saisi myös olla helposti kytkettävissä laboratorion tietoverkkoon. Tämän lisäksi on monia muita ominaisuuksia,

jotka on listattu taulukossa 1. Kaikkia näitä ominaisuuksia ei kuitenkaan ole vielä onnistuttu yhdistämään yhteen laiteeseen. Nykyiset vieritestit perustuvat tavallisesti kertakäyttöisiin välineisiin, kuten kasetteihin ja tavallisesti näille ei suoriteta samantyyppisiä eräkohtaisia laatukontroleja, joita on käytössä kliinisissä laboratorioissa. Tällöin vieritestianalysilaitte voi aiheuttaa merkittäviä lisäkustannuksia, jos eräkohtaiset laadunvalvontamääritykset ovat laajoja ja potilaille tehtäviä määrittäviä suoritetaan harvakseltaan. (Lode 2005: 594-596.)

Käyttämällä yksinkertaisia lukijoita, jotka perustuvat reflektointiin, on saavutettu mittaustarkkuus joka vastaa 5 pmol/L, mutta CV % alittaa harvoin 10 % (Lode 2005:594-96). Fluoresenssin aallonpituutta mittaavalla skannerilla on saavutettu jopa 1 pmol/L tarkkuus ja 5-10 % toistettavuutta (Wu 2004: 214-218). Lupaavia immunokromatografisia tuloksia on myös saatu kvanttipisteiden paramagneettisilla hiukkasilla sekä elektroluminesenssilaitteilla (Lode 2005: 594-596).

TAULUKKO 1. Vierianalytiikassa käytettävälle analyysilaitteelle asetettuja vaatimuksia (Muokattu Lode 2005: 595).

- Pieni koko (mieluiten kannettava)
- Helppo käyttää minimaalisella koulutuksella; mutkaton käyttöliittymä
- Vähäinen huoltotarve
- Täsmällinen, tarkka, herkkä; analyysilaatu verrattavissa kliinisen laboratorion menetelmään
- Leveä mittausalue
- Useiden eri analyyttien mittausmahdollisuus
- Edullinen käyttää
- Hyväksyy monia erilaisia näytteitä
- Suorittaa automaattisen kalibraation
- Hälyttää jos näytteessä, laadunvalvonnassa tai laitteessa on vika
- Yhteydessä laboratorion/sairaalan tietoverkkoon
- Sietää värinää sekä kosteutta ja lämpötilan muutoksia

5 TUTKIMUSTYÖN TAVOITTEET

Tässä työssä oli tarkoitus selvittää uuden Drug panel-lukulaiteen soveltuvuus huumausaineen seulonta- ja raskausmääritysten tulosten tulkinnassa. Nämä molemmat ovat immunokemiallisia lateraalisia virtauskromatografisia vierimääryksiä, jotka ovat käytössä HUSLAB:in laboriodiagnostiikassa. Molemmissa määryksissä näytemateriaalina on virtsa ja raskaustestin voi lisäksi suorittaa seerumista. Testien määrytys perustuu visuaaliseen tulkintaan. Oikein tehdyssä määryksessä ilmestyy sekä kontrolliviiva että testiviiva positiivisessa raskaustestissä ja negatiivisessa huumausainetestissä.

Työn tavoitteena oli selvittää:

- Voisiko Drug panel-lukulaite korvata määryksien visuaalisen arvioinnin. Tällä toivottiin saavutettavan kohennusta lukemisen toistettavuudessa. Tällöin lukijan subjektiivinen arvio testiviivasta ei vaikuttaisi tulokseen. Lisäksi mittaus tapahtumasta jäisi dokumentti, johon voisi tarvittaessa palata.
- Voisiko määryksien eräkohtaiset vaihtelut poistaa Drug panel-lukulaitteella suoritettulla kalibroinnilla.
- Miten määryksien inkubaatioaika vaikuttaa Drug-panel lukijan reflektanssiin.
- Voisiko Drug panel-lukulaitteella säätää raskaustestissä positiiviseksi raja-arvoksi 25 IU/l niin tarkasti, että näytteet joiden hCG-pitoisuus on 15 IU/l ovat selvästi negatiivisia ja näytteet, joiden hCG-pitoisuus on 35 IU/l ovat selkeästi positiivisia.
- Mikä vaikutus virtsan matriisilla on raskaustestin testiviivan intensiteettiin ja Drug panel-lukulaitteella mitattuun reflektanssiin. Selvitystä varten oli tarkoitus laimentaa kolmen raskaana olevan naisen virtsaa kolmeen hCG-negatiiviseen virtsaan ja mitata näiden HCG-pitoisuus kvantitatiivisesti uudestaan sekä suorittaa raskauden vieritestit ja mitata nämä Drug panel-lukulaitteella.

- Miten hCG-pitoisuus virtsa- ja seeruminäytteissä vaikuttaa raskaustestin testiviivan intensiteettiin ja Drug panel-lukulaitteella mitattuun reflektanssiin.
- Kuinka paljon Drug panel-lukulaitteen lukutapahtuma vaikuttaa mittauksen vaihteluun. Selvitys oli tarkoitus suorittaa toistettavilla mittauksilla raskausmäärityksistä, joiden testi-ikkunaan on piirretty lyijykynällä viivat T- ja C-viivojen kohdalle.
- Huumausainemäärityksen luvun luotettavuutta, kun mitataan virtsaan laimennettuja huumausaineita ja raja-arvoa +50 % tai -50 % -pitoisuuksina.
- Mittauksen vaihtelu, kun samat huumausainemääritykset luettiin kahdella eri Drug panel-lukulaiteella.
- Drug panel-lukulaitteen luotettavuutta, kun mittauksessa oli autenttisia potilasnäytteitä, joiden huumausaineiden pitoisuus oli tarkistettu GS-MS:llä.

6 TYÖN SUORITTAMINEN

6.1 Työprosessin kuvaus

Työ suoritettiin marraskuun 2010 ja toukokuun 2011 välisenä aikana HUSLAB:n Kliinisen kemian ja hematologian laboratoriossa, Naistenklinikan sairaalan laboratoriossa sekä Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) huumeutkimusyksikön laboratoriossa.

6.2 Aineisto

Raskausmäärittystä varten kerättiin hCG-positiivisia virtsa- ja seerumiraskausnäytteitä, HUSLABin hCG-määrittämisestä virtsasta (HUSLAB tutkimusohjekirja: Koriongonadotropiini (kval), virtsasta U-hCG-O) ja HUSLABin hCG-määrittämisestä seerumista (HUSLAB tutkimusohjekirja: Koriongonadotropiini (kval), seerumista S - hCG-O).

Huumeaineseulatus tutkimusta varten kerättiin virtsanäytteitä, jotka olivat olleet positiivisia yhden tai useamman huumeaineen tai huumeaineryhmän suhteen (HUSLAB tutkimusohjekirja: Huumeaineseulonta U-Huum-O). Huumeaineseula on kvalitatiivinen määrittäminen, joka tunnistaa amfetamiinia, eri bentsodiatsepiinejä, buprenorfiinia, kannabista, kokaiinia, metadonia sekä opiaatteja.

Lisäksi käytettiin laboratoriossa työskenteleviltä ihmisiltä saatuja virtsa- ja seeruminäytteitä, jotka olivat negatiivisia testattavien yhdisteiden suhteen. Raskausmäärittäystä varten kerätyt näytteet säilytettiin 4 °C:ssa ja huumeainemäärittäysten näytteet -20 °C:ssa.

6.3 Välineet ja reagenssit

Drug panel-lukulaitteet saatiin lainaksi Abcell Oy:lta (Suomi). Innovacon Multi-Drug 10 panel strip testit (Inovacon, Inc, USA) ja Innovaconin raskausmäärittäykset (Inovacon, Inc, USA) tulivat Abcell Oy:stä. Lisäksi hankittiin 10 panel Installert huumeaineseula määrittäykset (Inovacon, Inc, USA) ja Installertin raskausmäärittäykset (Inovacon, Inc, USA) ostettiin Triolab Oy:stä. D, L-amfetamiini, oksatsepaami, morfiini, metadoni, nortriptyliini, oksikodoni, buprenorfiini, betsoyyliekogniini, 3,4-metyleenidioksimetamfetamiini (MDMA) ja 11-nor-9-carboxy-delta-9-

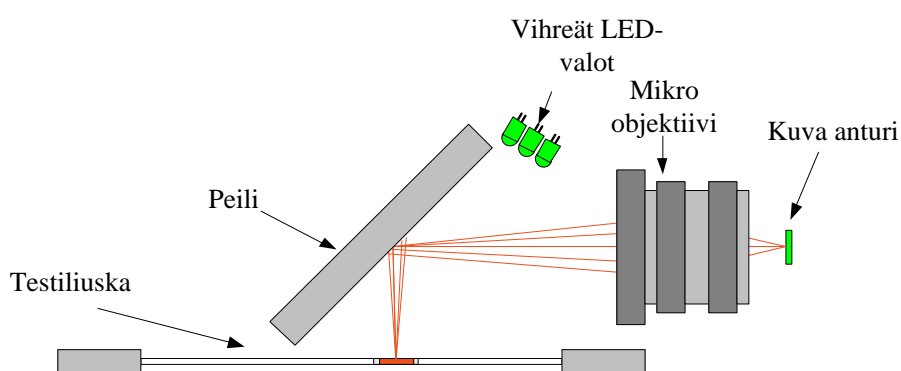
tetrahydrokannabinoli (11-nor-delta9-THC-9-COOH) tulivat THL:n huumetutkimusyksikön laboratorion.

6.4 Drug panel-lukulaite

Drug panel-lukijalaitteen prototyyppiä on kehitetty VTT:n teknisessä tutkimuskeskuksessa yhteistyössä Abcell Oy:n kanssa. Laite on kehitetty immunokemiallisten virtauskromatografisten liuskatestien lukulaitteeksi. Huumausaineseula- sekä hCG liuskatesteille oli suunniteltu oma kansi, jonka aukko on sopiva kyseisille testiliuskoille. Kuviossa 1 laite on varustettu huumausainetestiliuskalle tarkoitetulla kannella. Mittaus perustuu kaksikulotteisen kuva-anturin tulkintaan. (Mannila ym 2007: 1-9.) Testiliuska valaistaan vihreällä LED-valolla. Etupinnalla oleva peili heijastaa kuvan mikro-objektiiville, joka muodostaa kuvan kuva-anturille (Kuvio 1B).



1A



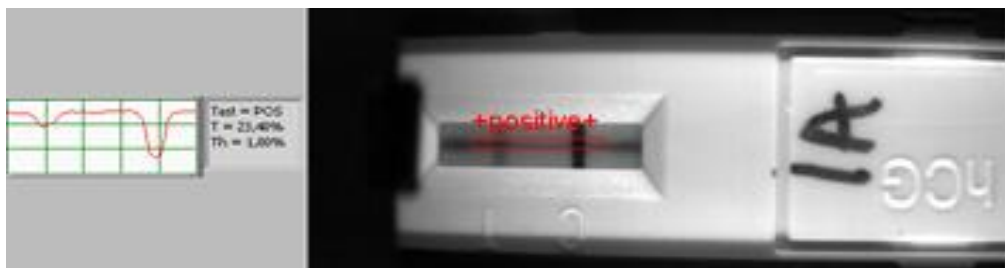
1B

Kuvio 1A-B. Lateraalisen liuskatestien prototyypin optiikan rakenne (A) ja kuva Drug panel-lukija laitteesta (B). Laitteessa testiliuskan tarkasteluikkuna valaistaan vihreällä LED-valolla ja peili heijastaa kuvan mikro-objektiiville, joka muodostaa kuvan kuva-anturille (A) Kuva muokattu (Muokattu Mykkänen ym., 2011).

Muodostuneen kuvan perusteella tiedosto määrittelee valotusajan, kuvan koon ja tallennetun kuvan paikan suhteessa kuva-anturiin. Hajavallo ja mahdollinen taustasäteily huomioidaan ottamalla tumma kuva, kun kaikki LED valot ovat sammutettuna. Reflektanssin laite ilmoittaa pronsenttiarvona, jossa maksimaalinen värin intensiteetti vastaa 100 % ja väritön 0 %. Lukijamoduulilla on oma prosessorinsa, jolla se kontrolloi kuvan ottamista ja LED-valoja. Tiedot siirretään lukijamoduulista tietokoneeseen USB-liitännän kautta. Aineiston kuva-analyysi suoritettiin Drug panel-lukulaitteen kuva-analyysiohjelmistolla. Ohjelmalla voidaan säätää manuaalisesti jokaisen mitattavan yhdisteen kynnyksarvoa.

6.5 hCG-määrityksen suoritus ja luku Drug panel-lukulaitteella

Testauksena käytettiin hCG:n kvalitatiivisesti mittaavia Inovacon- (Inovacon, Inc, USA) ja Installert (Inovacon, Inc, USA)-raskausvieritestejä. Näiden määritysten toimintaperiaatteet ovat samankaltaiset ja niitä suositellaan käytettäväksi aikaisen raskauden toteamisessa. Nämä määritykset on standardoitu WHO:n kansanvälisen standardin mukaan. Se kattaa seuraavat hCG-isomuodot; hCG, hCG α , hCG β , hCGn, hCG β n ja hCG β cf. (Birken ym 2003: 144-52.) Inovaconin ja Installertin raskausmääritykset osoittavat hCG-pitoisuuden virtsasta tai seerumista, kun hCG-pitoisuus on vähintään 25 IU/l. Näytteinä käytettiin seerumi- tai virtsanäytteitä. Positiivisessa määrittelyssä muodostuu värillisinä kontrolli (C)- ja testi (T) –viiva (Kuvio 2). T-viiva muodostuu antigeenistä sekä yhdistelmästä vasta-aineita, jotka koostuvat spesifisesti hCG:n tunnistavasta monoklonaalisesta vasta-aineesta, vuohen polyklonaalisista vasta-aineista ja kolloidisista partikkeleista. Viiva syntyy kun antigeeni liikkuu kapillaarivoimalla membraania pitkin ja reagoi värillisen konjugaatin kanssa. C-viiva osoittaa että määrittely on toiminut luotettavasti. (1144813502 efective date 2009-08-04.)



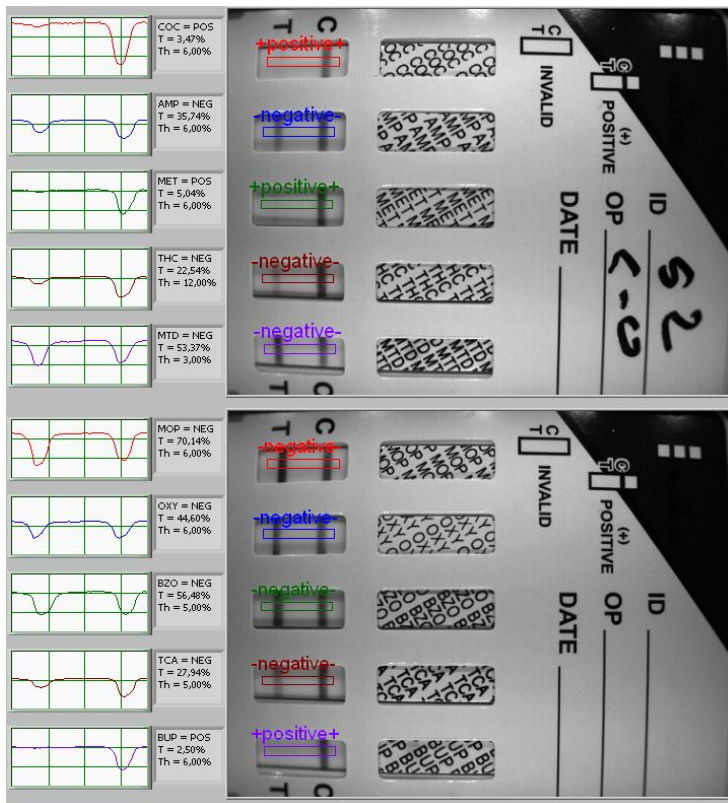
Kuvio 2. Drug panel-lukulaitteen ottama valokuva positiivisesta Installertin raskausmäärityksestä (Inovacon, Inc, USA). Positiivisessa määrittelyssä testi-ikkunassa on sekä C-viiva että T-viiva.

Määrityksessä näytteiden annettiin lämmetä huoneenämpöiseksi. Kasetin näytekaivoon lisättiin 100 µl näytettä, joko ohjeen mukaan lisäämällä 3 tippaa pakkauksessa olevalla pumpetilla tai pipetoimalla. Tulos luettiin 3 minuutin kuluttua, kun testi tehtiin virtsasta ja 5 minuutin kuluttua, kun näytemateriaali oli seerumi. Testi luettiin sekä silmämääräisesti että Drug panel-lukulaitteella. Tämän lisäksi haluttiin mitata T-viivan intensiteetin kasvua ajan kanssa. Virtsasta ja seerumista määritykset luettiin 3, 5, 7, 10 ja 15 minuutin inkubaation jälkeen. Virtsasta suoritettiin tämän lisäksi vielä mittaus 30 minuutin aikapisteestä. Huomioitava on, että valmistaja ei suosittele yli 10 minuutin inkubaatioaikoja. (1144813502 efective date 2009-08-04.)

6.6 Huumeseulamäärityksen periaate, suoritus ja luku Drug panel-lukulaitteella

Innovacon- (Inovacon, Inc, USA) ja Installert (Inovacon, Inc, USA)-huumetestiseulat ovat virtauskromatooraafisia testejä. Menetelmä sisältää seuraavia kvalitatiivisia määrityksiä; amfetamiini (AMP), metamfetamiini, bentsodiatepiinit (BZO), buprenorfiini (BUP), kannabis (THC), kokaiini (COC), metadoni (MTD), opiaatit, trisykliset antidepressantit (TCA), ja oksikodoni (OXY). Testikasetin tyyny sisältää virtsaan erittyneiden metaboliittien vasta-aineita, joista osa on monoklonaalisia ja osa polyklonaalisia. Nämä vasta-aineet ovat päällystetty värillisillä latex- tai kultapartikkeleilla. Negatiivisessa näytteessä vasta-aineet sitoutuvat tarkasteluikkunassa oleviin huumemetaboliitteihin ja vyöhyke muuttuu värilliseksi. Positiivisessa määrityksessä ei muodostu viivaa, koska vasta-aineet ovat saturoituja antigenista ja vasta-aineet kulkevat vapaasti kyseisen vyöhykkeen yli (Kuvio 3). Toisena viivana muodostuu kontrolliviiva, joka varmistaa, että määritys on teknisesti onnistunut.

Määrityksissä käytettiin testikaseteissa testattavia yhdisteitä, jotka laimennettiin huumeaineista vapaaseen virtsaan. Ristikontaminaation välttämiseksi kymmentä eri yhdistettä laimennettiin kahteen eri liuokseen, missä yhdessä oli D, L-amfetamiini, oksatsepaami, morfiini, metadoni, nortriptyliini ja oksikodoni ja toisessa buprenorfiini, betsoyyliekogniini, 3,4-metyleenidioksimetamfetamiini (MDMA) ja 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrokannabinoli (11-nor-delta9-THC-9-COOH) (Taulukko 2). Näiden lisäksi huumausaineiden mittaus suoritettiin myös pienelle joukolle potilasnäytteitä, joiden virtsa oli positiivinen yhden tai useamman määrityksessä mukana oleville huumausaineen suhteen.



Kuvio 3. Drug panel-lukulaitteen ottama valokuva Installertin huumemäärityksessä (Inovacon, Inc, USA). Positiivisessa määrittäyksessä testi-ikkunassa on C-viiva mutta ei T-viiva. Kuvassa COC, MET ja TCA ovat positiivisia.

Määrittäykset tehtiin valmistajan ohjeen mukaisesti. Korkki poistettiin testikortista ja testikortin liuskat upotettiin pystysuoraan virtsanäytteeseen 15 sekunniksi. Korkki laitettiin takaisin, testitikka asetettiin pöydällä vaakatasolle, minkä jälkeen käynnistettiin aika. Tulos luettiin 5 minuutin kuluttua Drug panel-lukulaiteella. Koska testikaseteissa määrittäykset sijaitsevat molemmilla puolilla, kasettia käännettiin kerran mittauksen välillä Drug panel-lukulaitteessa. Tämän lisäksi tehtiin myös koe, missä testiliuska luettiin 3, 4, 5, 8, 10, 12 ja 15 minuutin inkubaation jälkeen.

TAULUKKO 2. Huumausaineiden puhtasaineista virtsaan tehtyjen laimennosten pitoisuudet.

Yhdiste	Ryhmä	raja-arvo (ng/ml)	raja-arvo +50% (ng/ml)	raja-arvo -50 % (ng/ml)
D, L-Amfetamiini	AMP	1000	1500	500
Oksatsepaami	BZO	300	450	150
Morfiini	MOP	300	450	150
Metadoni	MTD	300	450	150
Nortriptyliini	TCA	1000	1500	500
Oksikodoni	OXY	100	150	50
Buprenorfiini	BUP	10	15	5

Bentsoyyliekgoniini	COC	300	450	150
3,4-metyleenidioksimet- amfetamiini (MDMA)	MET	1000	1500	500
11-nor-delta9-THC-9-COOH	THC	50	75	25

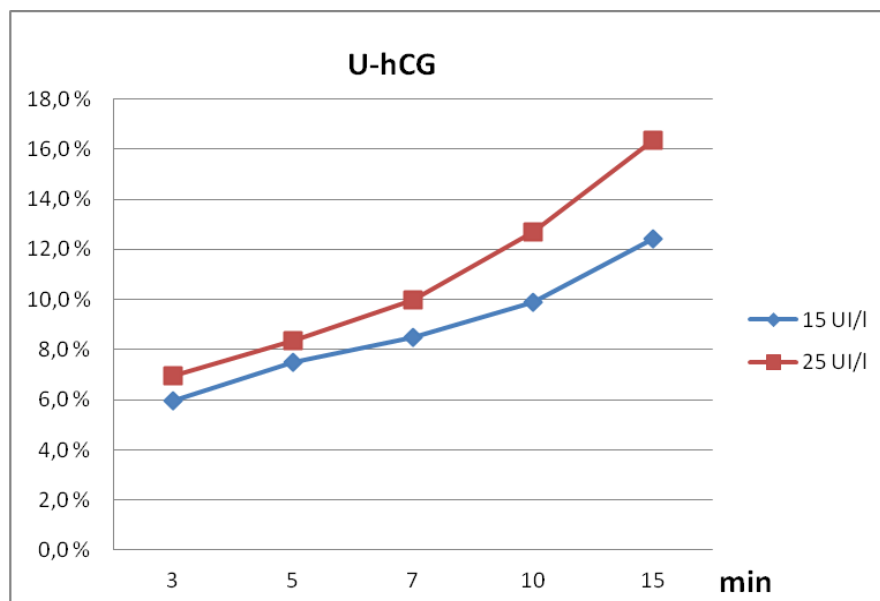
6.7 Tulosten analysointi

Jokaisesta Drug panel-lukulaitteella tehdystä mittauksesta tallennettiin valokuva png- ja pdf-tiedostona. Lisäksi määrittämisestä tallennettiin teksti-tiedosto. Numeraaliset tiedostot teksti-tiedostosta siirrettiin Microsoft Excel (Versio 2010; Microsoft, WA) -ohjelmistoon, missä rinnakkaisista määrittämisistä laskettiin keskiarvo (Ka), vaihteluväli ja variaatiokerroin (CV) prosentteina.

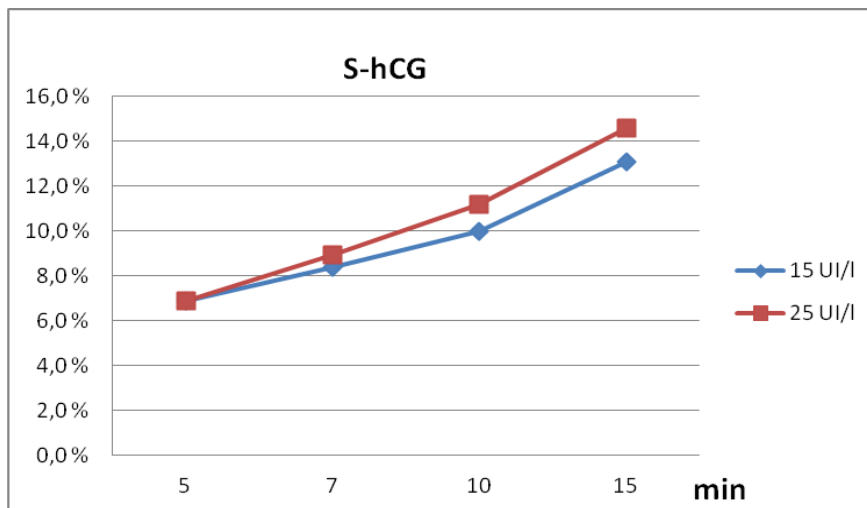
7 TULOKSET

7.1 Ajan vaikutus raskaustestien reflektanssiin

Installert- (Inovacon, Inc, USA) ja Innovacon- (Inovacon, Inc, USA) hCG- määrittelyissä positiivisessa testissä muodostuu kontrolliviiva ja testiviiva. Ajan vaikutus testiviivan intensiteettiin määritettiin lukemalla kasetit eri inkubaatioaikojen jälkeen. Määrittelyissä käytettiin virtsaa ja seeruminäytteitä, joiden hCG pitoisuus oli lähellä 25 IU/l ja 15 IU/l. Jokaisesta näytetyypistä tehtiin kolme rinnakkaista määrittelyä. Virtsaista tehdyistä määrittelyistä luettiin 3, 5, 7, 10 ja 15 minuutin inkubaation jälkeen. Seeruminäytteet luettiin 5, 7, 10 ja 15 minuutin inkubaation jälkeen. Testiviivan intensiteetti lisääntyi merkittävästi pidentäessä inkubaatioaikaa, mikä näkyi kasvavana reflektanssina (Kuvio 4). Tulosten perustella päätettiin jatkossa käyttää valmistajan suosittelemaa inkubaatioaikaa, joka on 3 minuuttia virtsanäytteelle ja 5 minuuttia seeruminäytteelle.



A



B

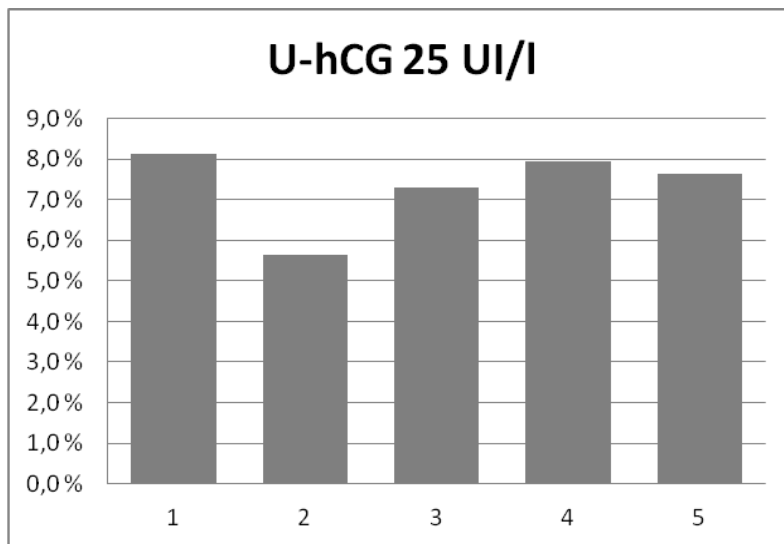
Kuvio 4 A ja B. Ajan vaikutus reflektanssiin virtsasta (A) ja seerumista (B) suoritetuissa raskausteissä.

7.2 Reflektanssin vaihtelu raskausmäärityksien erien välillä

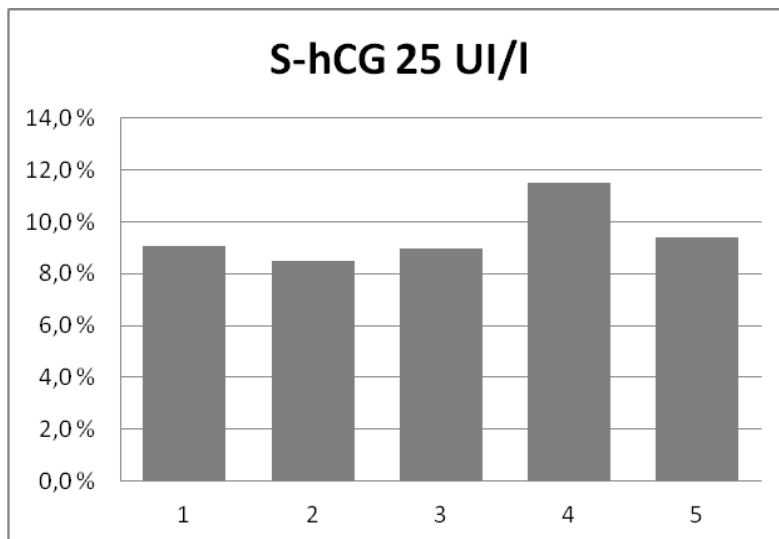
On mahdollista että hCG-vieritestien määrityksissä esiintyy eräkohtaista vaihtelua. Drug panel-lukulaitteella haluttiin määrittää, onko ero erien välillä merkittävä. Tätä varten testattiin neljä eri erää Installertin (Inovacon, Inc, USA)- ja yhtä erää Innovaconin (Inovacon, Inc, USA) raskauden osoitukseen käytettäviä vieritestejä. Näytteenä oli virtsa- ja seeruminäytteitä, joiden hCG-pitoisuus oli säädetty lähelle 25 IU/l. Kaikista eristä käytettiin 5 testikasettia. Poikkeuksena olivat virtsanäytteille käytetyt Innovaconin erät, joissa oli käytössä ainoastaan 4 testikasettia. Jokaiselle testatusta erästä laskettiin mittausten reflektanssin keskiarvo, variaatiokerroin ja vaihteluväli (Kuvio 5A-B).

Virtsanäytteestä testatuista eristä kaksi ja kolme (Kuvio 5A) saatiin pienimmät keskimääräiset reflektanssiarvot. Näistä löytyi silmämääräisesti tulkittuna kolme negatiivista määritystä. Näiden reflektanssiarvot olivat 4,80-5,22 %. Parin minuutin lisäinkubaation jälkeen näidenkin testien testi-ikkunaan ilmestyi T-viiva. Erien CV % mittauksista oli yli 10 % ja joidenkin jopa yli 20 % (Taulukko 3 a-b). Virtsanäytteistä suoritettujen raskaustestien eri erien reflektanssin keskiarvot erosivat toisitaan jopa 44,2 %. Seeruminäytteille ero erien välillä oli suurimmillaan 35,5%.

Näiden tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että erien keskimääräisten reflektanssin vaihtelu on merkittävä. Suositeltavaa on, että raskaustestierän vaihtuessa suoritetaan tarvittava kalibrointi Drug panel-lukulaitteella.



A



B

Kuvio 5 A-B Virtsaasta (A) ja seerumista (B) suoritettujen raskaustestien viiden erän erot Ka-reflektanssin suhteen.

TAULUKKO 3a-b. Virtsaasta (a) tai seerumista (b) suoritettujen raskaustestien eri erien erot (viiden testin Ka, vaihteluväli ja CV%).

3a

Erä	Ka	Vaihteluväli	CV%
1. Installert	8,12 %	[6,90 %, 9,62 %]	12,2 %
2. Installert	5,63 %	[4,80 %, 6,89 %]	14,0 %
3. Installert	7,29 %	[4,67 %, 10,28 %]	31,2 %
4. Installert	7,96 %	[6,39 %, 9,43 %]	13,6 %
5. Innovacon	7,65 %	[6,09 %, 9,82 %]	20,8 %

3b

Erä	Ka	Vaihteluväli	CV%
1. Installert	9,08 %	[6,31 %, 12,41 %]	24,3 %
2. Installert	8,48 %	[7,16 %, 9,43 %]	13,4 %
3. Installert	8,98 %	[7,76 %, 10,22 %]	10,4 %
4. Installert	11,49 %	[9,40 %, 14,17 %]	15,0 %
5. Inovacon	9,38 %	[7,94 %, 11,19 %]	12,5 %

7.3 Toistettavuuden määrittely hCG-määrityksille

Raskausmääritysten toistettavuutta Drug panel-lukulaitteen analyysillä haluttiin määrittää. Laitteella toivottiin saavutettavan kvantitatiivinen mittaustarkkuus, joka vastaa hCG:n 10 IU/l pitoisuuseroa näytteissä. Samalla tavoitteena oli määrittää laitteella positiivisen määrityksen raja-arvoksi 25 IU/l, jota pidetään raskauden optimaalisena havaitsemisrajana. (Stenman ja Alfthan 2003: 18-19.) Tämä testattiin toistettavuuskokeilla, missä samaa näytettä testattiin kymmenellä rinnakkaisella Installertin hCG-määrityksellä (Inovacon, Inc, USA). Näytteinä oli sekä virtsa- että seeruminäytteitä, joiden hCG pitoisuus oli lähellä 15 IU/l, 25 IU/l ja 35 IU/l. Mittauksista laskettiin keskiarvo (Ka), variaatiokerroin (CV %) sekä merkittiin mittausten vaihteluväli (taulukko 4). Sekä seerumista että virtsasta tehdystä määrityksistä CV % ylittää reilusti 10 %. Mittausten reflektanssin keskiarvo nousi hCG-pitoisuuden lisääntyessä. Tarkastamalla näytesarjojen vaihteluväliä keskenään, havaitaan kuitenkin, että mittausten reflektanssiarvot ovat osittain samansuuruisia, eri hCG-pitoisuutta omaavien näytteiden välillä. Pääsääntöisesti näytteitä, jotka eroavat toisistaan 10 IU/l tai vähemmän, ei voida luotettavasti erottaa toisistaan reflektanssin perusteella (Taulukko 4). Ainoana poikkeuksena on virtsassa 16 IU/l ja 26 IU/l näytteet, missä kuitenkin 16 IU/l (maksimiarvo 6,29 %) ja 26 IU/l (minimiarvo 6,31 %) ovat hyvin lähellä toisiaan. Sekä virtsa- että seeruminäytteessä hCG-pitoisuuden ero näytteiden välillä on suurimmillaan 16 IU/l (Taulukko 4). Tarkasteltaessa näiden näytteiden vaihteluväliä havaitaan, että toistettavuusmittauksissa isomman hCG-pitoisuuden omaavan näytteen reflektanssi on aina isompi kuin pienempää pitoisuutta sisältävän näytteen reflektanssi (Taulukko 4).

Näiden tulosten perusteella vaikuttaa siltä että Drug panel-lukulaitteella tehdyllä mittauksella voidaan luotettavasti erottaa näytteitä toisistaan kunhan näytteet eroavat hCG-pitoisuudeltaan 16 IU/l tai enemmän. Laitteen herkkyys ei kuitenkaan näytä

riittävään toivottuun 10 IU/l mittauseron todentamiseen ja 25 IU/l-rajaa ei voida asettaa luotettavasti niin että huomattavasti pienempää hCG pitoisuutta sisältävät näytteet eivät olisi positiivisia.

TAULUKKO 4. Virtsa- (A) ja seerumi (B)-näytteistä tehdyt toistettavuuskokeet eri hCG- pitoisuuksista.

A.

U-hCG (IU/l)	Ka	Vaihteluväli	CV%
16	5,28 %	[4,65 %, 6,29 %]	14,0 %
26	7,18 %	[6,31 %, 9,45 %]	12,5 %
32	8,67 %	[7,54 %, 11,14 %]	17,6 %

B.

S-hCG (IU/l)	Ka	Vaihteluväli	CV%
15	5,32 %	[3,75 %, 6,88 %]	18,6 %
25	6,67 %	[5,06 %, 8,48 %]	16,4 %
31	11,25 %	[7,29 %, 15,88 %]	24,7 %

7.4 Virtsan matriisin vaikutus hCG-määritykseen

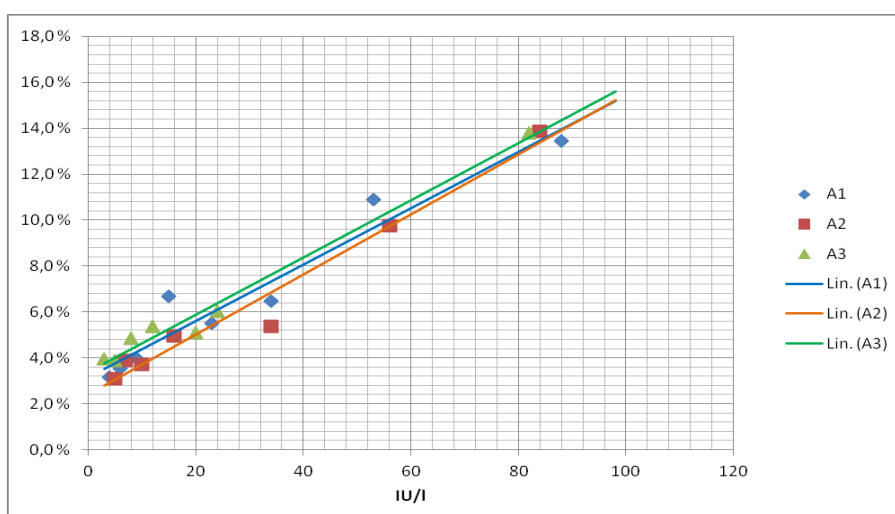
Virtsanäytteiden matriisin tiedetään vaikuttavan hCG-määrityksen tuloksiin (Stenmaan ym 1997: 1293-1294). Matriisin vaikutusta virtsanäytteiden raskaudenmäärityksessä tutkittiin laimentamalla kolmea hCG:tä sisältävää virtsanäytettä (A-C) kolmeen eri hCG-negatiiviseen virtsanäytteeseen (1-3) käyttämällä 8 eri laimennosta, joiden laskennallinen hCG-pitoisuus oli isommasta pienempään 6-100 IU/l (Taulukko 5). Laimennokset mitattiin uudestaan viikon seisonnan jälkeen +4 °C:ssa immunofluoresenssisella Delfia menetelmällä (Wallac Finland Oy) (Taulukko 5). Näytteistä suoritettiin Installertin raskausmääritys. Jokaisesta laimennoksesta tehtiin kaksi rinnakkaisista määritystä. Määritykset luettiin Drug panel-lukulaitteella ja laskettiin molempien mittausten keskimääräinen reflektanssi. Jokaista näytettä verrattiin Excelissä pistekuvioista ja regressiosuoralla kolmen eri matriisin vaikutusta näytteen reflektanssiin (Kuvio 6 A-C).

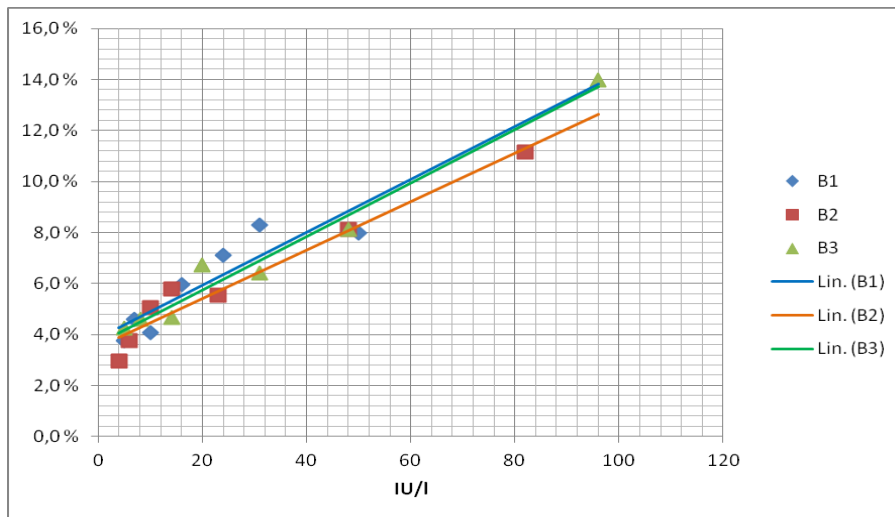
Pääsääntöisesti jokaisesta näytteestä suoritettujen rinnakkaisien laimennosten näyttivät olevan hyvin lähellä toisiaan hCG pitoisuudeltaan. Ainoastaan C2- ja C3-laimennokset poikkesivat huomattavasti muista laimennoksista, mutta keskenään ne eivät eronneet

paljon toisistaan (Taulukko 5). Drug panel-lukulaitteen mittauksissa reflektanssi oli kaikilla näytteillä korkeampi isoimmissa hCG-pitoisuuksissa (Kuvio 6). Näytteiden hCG-määritysten reflektanssarvojen vertailussa näyttää siltä, että näytteet jotka oli laimennettu laimennusvirttsalla 2, omaavat hieman matalampana kulkevan regressiosuoran, kuin muihin laimennosvirtsoihin laimennetut näytteet (Kuvio 6 A-C). Huomattava kuitenkin on, että näytteiden A ja B regressiosuorat eivät eroa paljon toisistaan (Kuvio 6 A-B). Myöskään C2- ja C3-laimennoksien hCG-pitoisuudet eivät eroa toisistaan merkittävästi (Kuvio 6 C). B- ja C-näytteessä laimennosvirtsat 1 ja 3 eivät aiheuttaneet merkittävää eroa reflektanssiarvoille ja C-näytteen osalta C1- ja C2-laimennussarjat erosivat liikaa toisistaan, että ne olisivat olleet vertailukelpoisia (Kuvio 6 B-C).

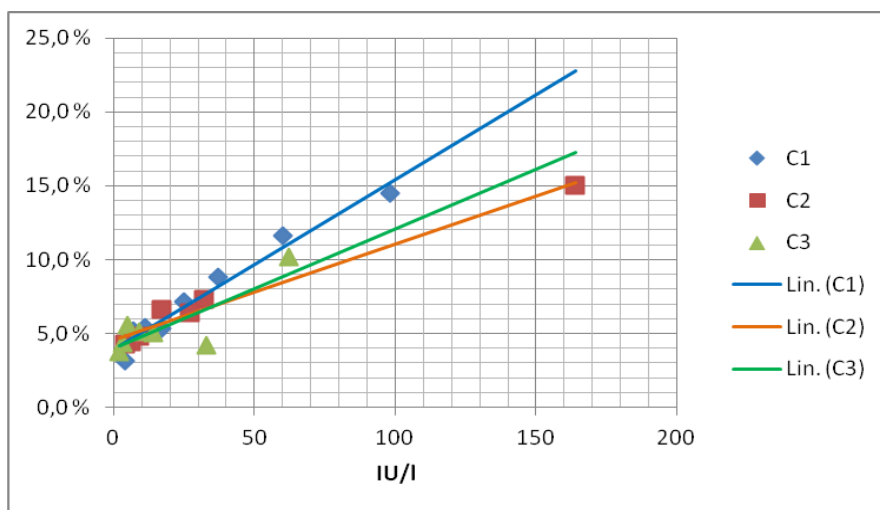
TAULUKKO 5. Kolme raskauden suhteen positiivista virtsanäytettä laimennettuna kolmeen hCG-negatiiviseen virtsanäytteeseen. Näytteiden laskennalliset laimennokset (9-100 IU/l) ja näiden todelliset hCG-pitoisuudet mitattuna Delfia menetelmällä.

	Näyte 1			Näyte 2			Näyte 3		
Laimennokset	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
100	88	84	82	84	82	96	98	164	162
67	53	56	42	50	48	48	60	32	33
45	34	34	24	31	32	31	37	27	22
30	23	25	20	24	23	20	25	17	14
20	15	16	12	16	14	14	17	9	9
13	9	10	8	10	10	9	11	6	5
9	6	7	5	7	6	5	7	6	3
6	4	5	3	5	4	3	4	4	2





6B



6C

KUVIO 6 A-C. Kolme hCG-positiivista virtsanäytettä (A-C) laimennettiin kolmella hCG-negatiivisella virtsanäytteellä (1-3). Näiden matriisien vaikutusta hCG-tuloksiin verrattiin reflektanssi arvojen perustella

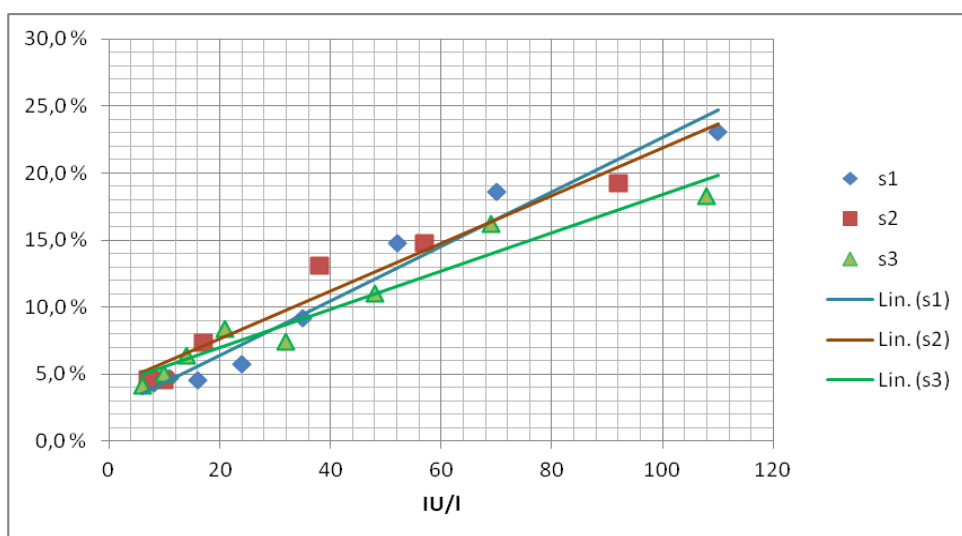
7.5 Seeruminäytteiden hCG-pitoisuuden vaikutus reflektanssiin

Installertin raskaustestin testiviivan intensiteetti on riippuvainen seeruminäytteen hCG-pitoisuudesta. Mittaamalla testitikkua Drug panel-lukulaitteella haluttiin määrittää, miten hCG-pitoisuus näytteissä vaikuttaa laitteen antamaan reflektanssiin. Tätä varten laimennettiin kolme hCG-positiivista seeruminäytettä hCG-negatiivisilla seeruminäytteillä 8 laimennokseen, joiden laskennallinen hCG-pitoisuus oli isommasta pienempään 6-100 IU/l (Taulukko 6). Laimennoksien todellinen hCG-pitoisuus mitattiin tämän jälkeen Delfia menetelmällä (Wallac Finland Oy) (Taulukko 6). Laimennoksista suoritettiin kaksi rinnakkaista mittausta Drug panel-lukulaitteella kaikista näytteiden

laimennoksista, joiden hCG-pitoisuus oli 6-110 IU/l. Näistä laskettiin keskiarvo ja näiden perusteella piirrettiin regressiosuora (Kuvio 7). Reflektanssi oli kaikilla näytteillä, trendinomaisesti kasvava (Kuvio 7).

TAULUKKO 6. Kolme raskauden suhten positiivista seeruminäytettä laimennettiin hCG-negatiiviseen seerumiin. Näytteiden laskennalliset laimennokset (6-100 IU/l) ja näiden todelliset hCG-pitoisuudet (s1-s3).

Laimennokset	Näyte		
	s1	s2	s3
100	110	144	108
67	70	92	69
45	52	57	48
30	35	38	32
20	24	26	21
13	16	17	14
9	11	10	10
6	8	7	6



KUVIO 7. Kolme hCG-positiivista seeruminäytettä (s1-s3) laimennettiin hCG-negatiivisella seeruminäytteellä. Drug reader panel-lukulaiteella mitatut näytteiden reflektanssit ja näiden perusteella piirretyt regressiosuorat.

7.6 Drug panel-lukulaite aiheuttaa vaihtelua hCG-määrityksen reflektanssiin

On mahdollista että itse mittaustapahtuma Drug panel-lukulaitteella aiheuttaa vaihtelua määrityksen reflektanssiarvoihin. Tätä ei pysty määrittämään autenttisesta näytteestä tehtävästä määrityksestä, koska testiliuskan ikkunassa olevan T-viivan intensiteetti lisääntyy vahvasti ajan funktiona. Tämän takia piirrettiin kolmeen Installertin hCG-määrityksen (Inovacon, Inc, USA) testi-ikkunan T-viivan ja C-viivan paikalle lyijykynällä viivat. Mittaus suoritettiin poistamalla mittauskasetti laitteesta mittausten välillä. Jokaisesta testitikusta suoritettiin kymmenen mittausta. Keskimääräiset reflektanssiarvot olivat lähellä niitä arvoja, joita saatiin määrityksistä, mitä tehtiin 15-35 IU/l hCG:tä sisältävistä näytteistä (Taulukko 4 A-B). Tuloksista voitiin todeta että reflektanssiarvoissa esiintyy laitteesta johtuvaa vaihtelua ja se on CV %; 3,25 % - 4,31 % (Taulukko 7).

TAULUKKO 7. Kolmen Installertkasetin raskausmääritys (Inovacon, Inc, USA) mihin piirretty C- ja T-viivan paikalle lyijykynällä viivat keskimääräiset reflektanssi arvot (Ka), vaihteluväli ja CV %.

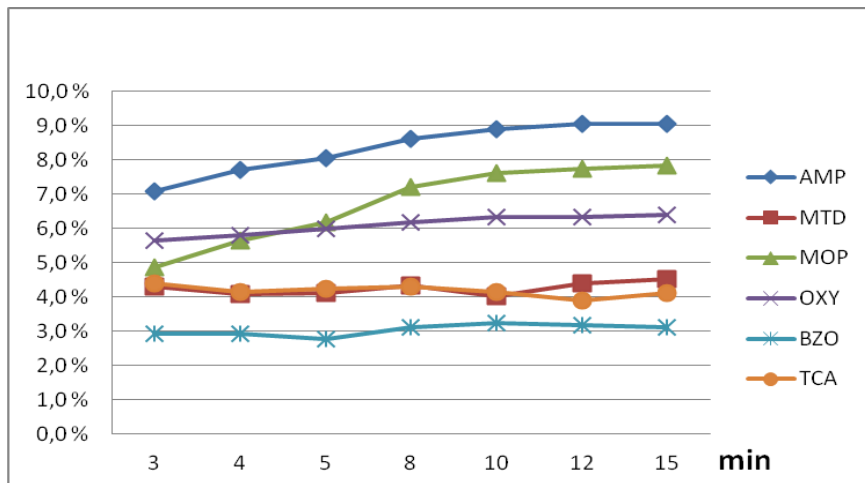
	Ka	Vaihteluväli	CV%
1.	6,52 %	[6,20 %, 6,93 %]	3,9 %
2.	8,10 %	[7,66 %, 8,37 %]	3,2 %
3.	9,47 %	[8,88 %, 10,09 %]	4,3 %

7.7 Ajan vaikutus huumausainemäärityksien reflektanssille

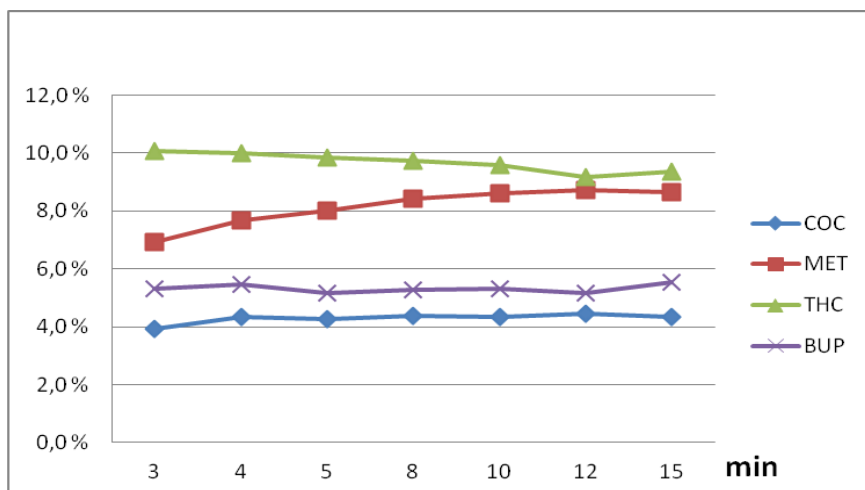
Installert- (Inovacon, Inc, USA) ja Innovacon (Inovacon, Inc, USA)-huumeiden määrityksissä positiivisessa testissä muodostuu kontrolliviiva ja testiviiva ei muodostu. Valmistajien ohjeiden mukaan määritystä suositellaan luettavan 5 minuutin inkubaation jälkeen, mutta määritystä ei pitäisi enää lukea yli 10 minuutin jälkeen. Testataksemme, mikä vaikutus ajalla on testiviivan intensiteettiin, käytettiin määrityksessä testattavia huumausaineita raja-arvopitoisuuksilla laimennettuna huumausaineista negatiivisen virtsaan. Testiliuska kastettiin virtsan laimennettuihin huumausaineisiin ja ne luettiin 3, 4, 5, 8, 10, 12 ja 15 minuutin inkubaation jälkeen Drug panel-lukulaitteella. Reflektanssi vaihteli joidenkin huumeiden osalta merkittävästi

5-10 minuutin inkubaation aikana (Kuvio 8 A-D). Tänä aikana nähtiin kuitenkin kokaiinin, metamfetamiinin ja morfiinin kohdalla hieman kasvavaa reflektanssia. Kun vielä inkubaatioaikaa jatkettiin 15 minuuttiin, havaittiin että tässä ajassa reflektanssi vaihteli merkittävästi enemmän aikapisteiden välissä useilla huumausaineilla verrattuna aikaisempiin aikapisteisiin (Kuvio 8 A-D). Huomioitava on kuitenkin, että valmistaja suosittelee, että testiä ei pidä lukea 10 minuutin jälkeen.

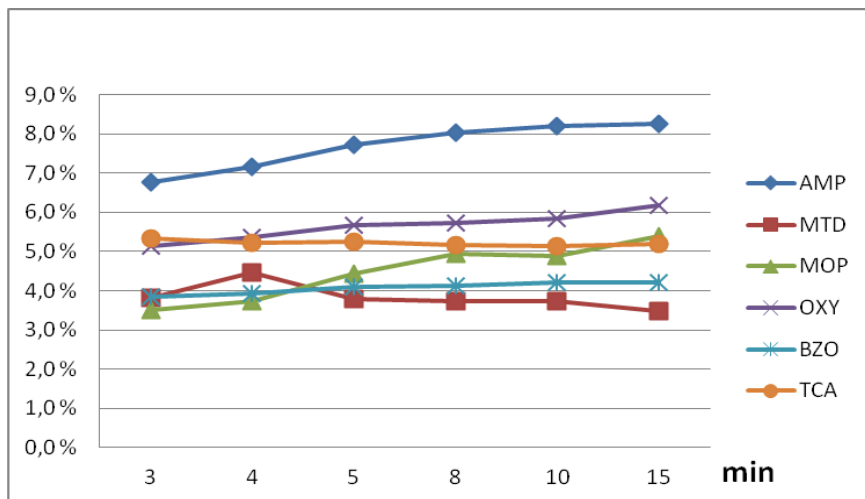
Tulokset näyttivät, että testiviivan intensiteetti lisääntyy merkittävästi ajan funktiona. Tämä merkitsee, että määryksien toistettavuuden takia on tärkeitä mitata määrykset aina saman inkubaationajan jälkeen. Jatkossa päätettiin käyttää valmistajan suosittelemaa 5:tä minuuttia.



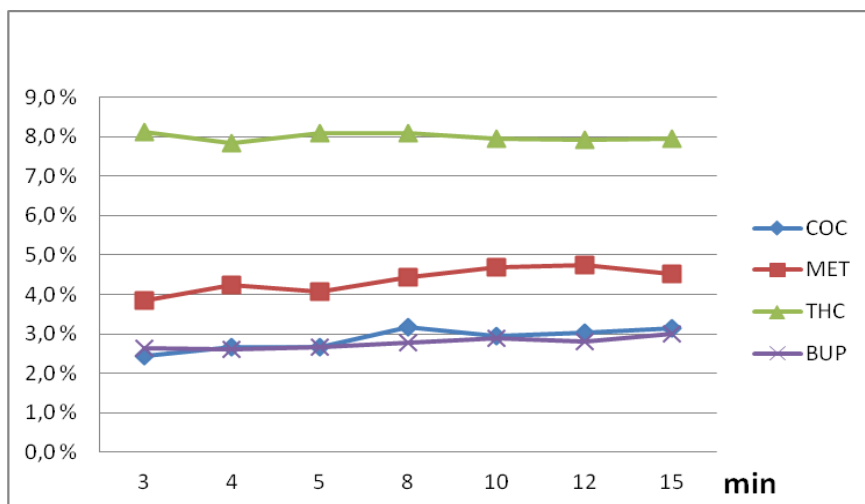
8A



8B



8C



8D

Kuvio 8 A-D. Ajan vaikutus reflektanssiin, kahdella eri huumausainevieri-testillä.

7.8 Huumausaineiden raja-arvon säätö Drug panel-lukulaitteella sekä mittauksen toistettavuus kahdella eri rinnakkaisella laitteella

Installert- (Inovacon, Inc, USA) ja Inovacon (Inovacon, Inc, USA)-huumeiden määrityksissä valmistaja on ilmoittanut raja-arvon positiivisesta tuloksesta jokaiselle määrityksessä olevalle huumausaineelle ja huumausaineryhmälle (Liite 2). Näitä samoja raja-arvoja haluttiin määrittää Drug panel-lukulaitteella. Tätä varten huumausaineista vapaaseen virtsan oli liuotettu huumausaineita pitoisuuksina jotka vastasivat testissä määritettyjä raja-arvoja (Taulukko 2) sekä raja-arvoja 50 % pienemmät ja suuremmat määrät. Koeasetelmassa käytettiin sekä Installertin että Inovaconin huumausainemäärityksiä. Määritykset suoritettiin viidelle eri erälle, joista kolme oli Installertin ja kaksi Inovaconin testikasetteja. Kaikista huumausainelaimennoksista tehtiin viisi rinnakkaista määrittystä. Poikkeuksena oli kaksi

Installertin erää, joissa ei ollut riittävää määrää kasetteja. Ensimmäisestä erästä tehtiin neljä rinnakkaista ja toisesta kaksi rinnakkaista määrittystä. Lisäksi näistä kahdesta erästä ei myöskään tehty määrittystä huumausaineista, jotka olivat laimennettu raja-arvoa 50 % suurempina pitoisuuksina. Testiliuskat luettiin viiden minuutin kuluttua Drug panel-lukulaitteella.

Mittausten keskiarvon perusteella laskettiin raja-arvo positiivisesta tuloksesta jokaisen erän osalta sekä reflektanssi 50 % suuremmista ja pienemmistä laimennoksista (Liite1). Osalla mitatuista yhdisteistä reflektanssit erosivat merkittävästi erien välillä. Tämä koski erityisesti kokaiinia, metamfetamia ja kannabista (Liite 3). Sen sijaan metadoni, morfiinin ja oksikodonin raja-arvon tason heijastusarvot vaihtelivat vain hieman eri erien välillä (Liite 3). Nämä tulokset osoittivat, että laite on kalibroitava aina erän vaihtuessa.

Tämän lisäksi haluttiin vielä mitata kahden eri Drug panel-lukulaitteen mittauksen toistettavuutta. Kaikki testiliuskat luettiin ensin yhdellä laitteella ja heti perään toisella laitteella. Rinnakkaisilla mittauksilla kahdella erillisellä Drug panel-lukulaitteella ei havaittu merkittävää eroa reflektanssissa seuraavien huumausaineiden suhteen; buprenorfiini, bentsodiatsepiini, oksikodoni, morfiini, metadoni, amfetamiini ja kokaiini (Liite 2). Joitakin eroja havaittiin kannabiksen ja trisyklisen masennuslääkkeiden kaikkien erien osalta. Lisäksi metamfetamiinin ja bentsodiatsepiinin osalta havaittiin joitakin eroja erästä 3, jossa tehtiin vain kaksi rinnakkaista määrittystä (Liite 2).

7.9 Positiivisten huumausainenäytteiden analysointi

Drug reader-laite oli optimoitu antamaan positiivinen tulos huumausaineista jotka ylittävät testin määrittämät raja-arvot. Laitteen luotettavuuden testausta varten kerättiin 30 autenttista huumausainepositiivista virtsanäytettä HUSLAB:in huumausaineseulasta (HUSLAB tutkimusohjekirja: Huumeseulonta 4221 U-Huum-O). Näytteistä oli löytenyt opiaatteja, tetrahydrocannabinolic happoa, bentsodiatsepiinejä, metadonia ja buprenorfiinia. Näistä 11 yhdistettiin useammasta näytteestä, jotka sisälsivät useita huumausaineita ja kuutta näytettä käytettiin sellaisenaan tutkimuksessa. Näiden huumausainepitoisuus määritettiin vielä kvantitatiivisesti GC-MS THL:ssä (Taulukko 8). Tämän jälkeen näytteistä suoritettiin Installertin huumausainetestit ja testiliuskat luettiin Drug panel-lukulaitteella. Näytteistä määritettiin amfetamiini, metamfetamiini, metaadoni, bentsodiatsepiinit, buprenorfiini, tetrahydrokannabinoli ja morfiini.

TAULUKKO 8. Tetrahydrokannabinoli (THC), metadonia (MTD), Amfetamiinia (AMP), buprenorfiinia (BUP), morfiini (MOP) ja metamfetamiinia (MET) sisältävät näytteet ja niiden pitoisuus GS-MS:lla. Näytteistä tehdyt jatkolaimennokset on merkitty kirjaimella L. Drug panel-lukulaite on merkitty kirjaimella DP ja testin tulos on merkitty joko negatiiviseksi (-) tai positiiviseksi (+).

Näyte	THC ng/ml	DP
1.	1000	+
L 1	300	+
L 2	36	-
2.	71	+
L 1	50	+
3.	110	+
L 1	50	+
L 2	32	+
4.	30	+
5.	150	+
6.	50	+
L 1	15	+
7.	50	+
L 1	17,5	-

Näyte	MTD+EDDP ng/ml	DP
1.	1350	+
L 1	300	-
2.	14000	+
3.	490	+
4.	-	-
5.	1300	+
6.	960	+
7.	2510	+
8.	710	+
9.	1990	+

Näyte	AMP ng/ml	DP
1.	7110	+
L 1	1026	+
L 2	342	-
2.	1020	+
L 1	397	-
3.	3000	+
4.	2300	+
5.	1500	+
6	760	+
7	2100	+

Näyte	BUP ng/ml	DP
1.	28	+
L1	10	-
2.	26	+
L 1	10	-
3.	607	+
4.	143	+
5.	75	+
6.	62	+
7.	252	+

Näyte	MOP ng/ml	DP
1.	neg	+
2.	neg/110	+

Näyte	MET ng/ml	DP
1.	1700	+

Kuudessa näytteessä oli amfetamiinia (AMP), jonka pitoisuus ylitti liuskatestin raja-arvoa (1000 ng/ml) sekä yksi näyte jossa oli AMP:tä 760 ng/ml. Nämä olivat määrityksissä kaikki positiivisia. Lisäksi laimennettiin joitakin näytteitä alle raja-arvon. Nämä olivat kaikki odotetusti negatiivisia (taulukko 8).

Yhdeksässä näytteessä oli metadonia (MTD) sekä sen aineenvaihduntatuote 2-etylideeni-1,5-diimetyyli-3,3-difenyylipyrrolidiini (EDDP). Näissä oli mitattavaa yhdistettä raja-arvon (300 ng/ml) verran tai enemmän ja nämä olivat kaikki odotetusti positiivisia (taulukko 8). Poikkeuksena oli yksi raja-arvoa lähellä oleva laimennettu näyte, joka oli negatiivinen (Taulukko 8). Huomioitava on, että näytteessä 4 (taulukko 8), joka oli sekä GS-MS:lla että Drug panel-lukulaiteella mitattuna negatiivinen, oli

ollut metadonin osalta positiivinen HUSLAB:in huumausaineseulassa (HUSLAB tutkimusohjekirja: Huumeseulonta U-Huum-O).

Seitsemän näytettä sisälsi buprenorfiinia yli raja-arvon (10 ng/ml). Aine esiintyi näytteissä pääosin norbuprenorfiini metaboliittina, mutta myös buprenorfiinina. Nämä olivat kaikki positiivisia (taulukko 9). Kaksi näistä näytteistä laimennettiin edelleen 10 ng/ml. Nämä olivat molemmat negatiivisia määrittämisessä.

Kaikki näytteet, jotka sisälsivät tetrahydrokannabinolia (THC) pitoisuudeltaan raja-arvon lähellä (50 ng/ml) tai sen yli, olivat positiivisia (taulukko 8). Näytteet ja näytteiden laimennokset, jotka sisälsivät 15-36 ng/ml THC:tä, mikä on alle yhdisteen raja-arvo, olivat vielä positiivisia (taulukko 8). Vasta kun kolmea näytettä laimennettiin edelleen, niin että THC pitoisuus alitti 10 ng/ml, kaikki näytteet olivat testissä negatiivisia (tuloksia ei näytetä).

HUSLAB:in huumausaineseulasta (HUSLAB tutkimusohjekirja: Huumeseulonta U-Huum-O) kerättiin kaksi näytettä, jotka olivat positiivisia opiaattien suhteen. Drug panel-lukulaitteen mittauksessa nämä molemmat näytteet olivat selvästi positiivisia morfiinin osalta. GS-MS:ssa molemmat näytteet olivat kuitenkin negatiivisia. Toinen sisälsi pienen määrän morfiinia (100 ng/ml), joka on selvästi alle Installertin huumeaineseulan (Inovacon, Inc, USA) raja-arvon (300 ng/ml) (taulukko 8).

TAULUKKO 9. Bentsodiatsepiinien suhteen positiiviset näytteet, jotka on analysoitu GS-MS:llä. Näytteiden laimennokset on merkitty L:llä. Drug panel-lukulaite on merkitty DP:llä ja tulos on merkitty joko negatiiviseksi (-) tai positiiviseksi (+). Ne näytteet, joiden ainepitoisuus on alle määrittämissä raja-arvon, on merkitty keltaisella.

Näyte	Bentsodiatsepiinit	GS-MS ng/ml	raja-arvo ng/ml	DP
1.	nordiatsepaami	74	390	
	oksatsepaami	410	300	
	tematsepaami	220	98	
	Yhteensä	704		+
L 1		420		+
L 2		50		-
2.	oksatsepaami	160	300	+
L 1	Yhteensä	120		+
3.	7-aminonitratsepaami	800	-	
	nordiatsepaami	1000	390	
	oksatsepaami	3700	300	
	tematsepaami	4300	98	
	Yhteensä	9800		+
L 1		7200		+

L 2		2500		+
4.	nordiatsepaami	890	390	
	tematsepaami	130	98	
	Yhtensä	1020		
L 1		459		+
L 2		300		+
5.	nordiatsepaami	250	390	
	oksatsepaami	1700	300	
	tematsepaami	8900	98	
	Yhteensä	10850		+
L 1		7378		+
6.	nordiatsepaami	660	390	
	oksatsepaami	1300	300	
	tematsepaami	1800	98	
	alfahydroksimidatsolaami	3900	1262	
	alfahydroksialpratsolaami	1200		
	alpratsolaami	210	196	
	Yhteensä	39770		+
L 1		9070		+
L 2		532		+
L 3		107		+
7.	nordiatsepaami	250	390	
	oksatsepaami	12000	300	
	tematsepaami	500	98	
	Yhteensä	12750		+

Seitsemän näytettä oli positiivisia bentsodiatsepiinien suhteen. Näistä tehtiin vielä laimennoksia huumeaineista negatiiviseen virtsaan. Näistä löytyi GS-MS-analyysissä useita eri bentsodiatsepiinejä (Taulukko 9). Kaikki näytteet, jotka olivat pitoisuudeltaan lähellä raja-arvoa tai sen yli, olivat positiivisia (Taulukko 9). Osa näytteistä ja laimennoksista olivat pitoisuudeltaan alle raja-arvon. Näistä ainoastaan yksi oli määrittäksessä negatiivinen (taulukko 9).

Insallertin testikasettien tuloksista tehtiin myös silmämääräinen arvio positiivisista ja negatiivisista tuloksista, jotka eivät eronneet Drug panel-lukulaitteella saaduista tuloksista.

Näiden tulosten perusteella voidaan todeta, että Drug panel-lukulaitteella saadut tulokset määrittäksistä olivat positiivisia, kun määritettävän huumeaineen pitoisuus näytteessä oli vähintään raja-arvon suuruinen. Joidenkin yhdisteiden kohdalla kuten THC:n, AMP:n ja BZO:n kohdalla määrittäks oli huomattavasti herkempi kuin mitä Insallert (Inovacon, Inc, USA) testin ohjeessa oli määritetty. Näytteiden positiivinen ja negatiivinen huumeainemäärittäks visuaalisesti ei eronnut Drug panel-lukulaitteen arviosta.

8. POHDINTA JA TULOSTEN LUOTETTAVUUDEN ARVIOINTI

Terveydenhuollossa on käytössä monia erilaisia vieritestejä. Määryksiä suorittaa laboratoriohenkilökunnan lisäksi monia terveydenhuollon ammattilaisia, joilla ei ole laboratorioalan koulutusta. Tämän takia määryksien on oltava helppoja suorittaa ja testien ei pitäisi antaa vääriä positiivisia tai negatiivisia analyysituloksia. Monet määryksistä, kuten myös tutkimuksessa mukana olevat hCG hormoniin perustuva raskausmääryty ja huumausaineseulamääryty, ovat lateraalisia virtauskromatografisia määryksiä, joiden tulos perustuu värillisten viivojen muodostumiseen ja niiden tulkintaan. Positiivisessa raskaustestissä ja negatiivisessa huumeseulamäärytyksessä muodostuu kaksi viivaa, kontrolliviiva ja testiiviiva. Käytännössä hyvin himmeä tai osittainen testi-viiva saattaa olla toisille näkyvä ja toisille näkymätön. Lisäksi tällaisen viivan näkyvyys voi olla riippuvainen paikalla olevasta valaistuksesta (Bagøien G et al 2009). Drug panel-lukulaitteella, joka mittaa viivan intensiteettiä, on mahdollista poistaa tekijästä riippuvaa vaihtelua testiiviivan tulkinnessa. Lisäksi tuotteiden eri erien välillä saattaa olla vaihtelua.

Raskaus ja huumausaineseulatestikasettien ohjeissa on suositeltu tiettyä aikaa jolloin testi luetaan ja aikaa, jonka jälkeen tulokset eivät enää ole luotettavia. Ajan vaikutus testiiviivan intensiteettiin ja Drug-panel lukulaitteella mitattuun reflektanssiin määritettiin lukemalla kasetit eri inkubaatioajan jälkeen. Molemmista visualisesti arvioitavan testiiviivan intensiteetti ja laitteen mittaava reflektanssi lisääntyivät merkittävästi ajan funktiona. Huumausaineseulassa pidennetty inkubaatioaika johti joidenkin yhdisteiden kuten amfetamiinin, metamfetamiinin ja morfiinin reflektanssin kasvuun, kun taas toisten yhdisteiden kohdalla vaikutus reflektanssiin oli vähäinen (Kuvio 8). Näiden tulosten perusteella määrytysten toistettavuuden kannalta oli perusteltua mitata testikasettia aina saman inkubaatioajan jälkeen. Tätä pidemmät inkubaatioajat lisäsivät riskiä vääristä positiivisista raskausmäärytyksistä ja negatiivisista huumausainemäärytyksistä. Inkubaatioaikana päätettiin käyttää valmistajan suosittelemaa viittä minuuttia huumausaineseulassa, raskaustesteissä kolmea minuuttia virtsanäytteiden ja seeruminäytteiden osalta viittä minuuttia.

On mahdollista että huumausaineseulan ja raskausmäärytysten hCG-vieritestien eri erissä on vaihtelua. Tällä hetkellä HUSLAB:issa näitä määryksiä luetaan visuaalisesti ja mahdollista eroa eri erien herkkyydessä on vaikeata huomioida. Erän vaikutusta

tuloksiin määritettiin viidellä eri Installertin ja Innovaconin erillä käyttäen molempia määriä. Mitattavien erien keskiarvot erosivat huomattavasti toisistaan ja ero oli molemmilla määriä suurimmillaan reilusti yli 30 %. Tästä syystä voitiin tehdä johtopäätös, että ero yksittäisten erien välillä on merkittävä ja suositeltavaa olisi että erän vaihtuessa suoritetaan kalibraatio Drug panel-lukulaitteella.

Suuri osa raskauksista keskeytyy varhain ilman merkkejä raskaudesta. Raskaus keskeytyy, kun alkion kiinnittyminen kohtuun epäonnistuu. Tällöin raskaus pystytään havaitsemaan ainoastaan hyvin herkällä raskaudenmääriä. Määriä ovat monesti huomattavasti herkempiä kuin valmistajan ilmoittama 25 IU/l, ja niiden analyttinen herkkyys voivat jopa alittaa 10 IU/l. Näitä ns. biokemiallisia raskauksia haluttiin seuloa pois määrittämällä raskaustestin raja-arvo Drug panel-lukulaitteella mittauksessa 25 IU/l:an. Tätä pidetään raskauden optimaalisena havaitsemisrajana. (Stenman ja Alfthan 2003: 18-19.) Laitteella toivottiin saavutettavan kvantitatiivinen mittaustarkkuus, joka vastaa hCG 10 IU/l pitoisuuseroa näytteissä. Tämä testattiin toistettavuuskokeilla, missä samaa näytettä testattiin kymmenellä rinnakkaisella raskausmääriä. Näytteinä oli joko virtsa tai seerumi. Sekä seerumista että virtsasta tehdyistä määriä CV % ylitti reilusti 10 % ja pääsääntöisesti määriästen herkkyys ei riittänyt erottelemaan 10 IU/l-pitoisuuseroja näytteissä. Tämä on linjassa aikaisemman tutkimuksen kanssa, jossa on osoitettu että CV% harvoin alittaa 10 %, kun käytetään liuskatestien lukijoita jotka perustuvat reflektioon (Lode 2005:594-96). Tarkasteltaessa tuloksia vaikutti kuitenkin siltä, että Drug panel-lukulaitteella tehdyllä mittauksella voitiin luotettavasti erottaa näytteitä toisistaan, kunhan näytteet eroavat hCG-pitoisuudelta 16 IU/l tai enemmän. Tämä tarkoittaa kuitenkin sitä, että pyrittäessä välttämään biokemiallisten raskauksien diagnosointia, olisi positiivisen raskaustestin rajaksi määritettävä huomattavasti korkeampi arvo kuin toivottu 25 IU/l. Silloin lisääntyisivät todennäköisesti huomattavasti väärät negatiiviset raskausmääritystulokset onnistuneista raskauksista.

Virtsassa esiintyy suurempaa hCG-molekyyliden heterogeenisuutta kuin seerumissa. Virtsamatriisilla tiedetään olevan vaikutusta hCG-määriästen tuloksiin (Stenman ym 1997: 1293-1294). Virtsanmatriisin sisältävien eri aineiden pitoisuuksilla voi olla vaikutusta eri hCG-molekyyliden esiintymiselle näytteessä. Tiedetään, että virtsassa oleva urea voi johtaa immunorektiivisuuden laskuun tuhoamalla hCG-molekyyliden rakennetta. (Lempiäinen ym 2011: 1-5.) Virtsamatriisin vaikutusta virtsanäytteiden raskaudenmääriäksessä tutkittiin laimentamalla kolmea hCG:tä sisältävää

virtsanäytettä kolmeen eri hCG-negatiiviseen virtsanäytteeseen. Laimennoksien hCG-pitoisuus mitattiin uudestaan viikon seisotuksen jälkeen immunofluoresenssiin perustuvalla Delfia- menetelmällä (Wallac Finland Oy). Pääsääntöisesti jokaisesta näytteestä suoritettut rinnakkaiset laimennokset eri virtsamatriiseihin eivät näyttäneet eroavan toisistaan merkittävästi. Poikkeuksena oli näyte jonka kahden virtsamatriisin laimennoksen sarjan pitoisuus erosi huomattavasti muista, mutta keskenään nämä eivät eronneet paljon toisistaan (Taulukko 5). Näytteistä suoritettiin Installertin raskausmääritys ja ne luettiin Drug panel-lukulaitteella. Näytteiden reflektansseista muodostettiin Excel-pistekuvion perusteella regressiosuorat kolmen eri matriisin vaikutuksesta näytteiden reflektanssiin. Regressiosuoria tarkastelemalla vaikutti siltä, että ne näytteet, jotka oli laimennettu toiseen virtsamatriisiin, omasivat trendinomaisesti hieman pienempiä hCG-pitoisuuksia, kuin muihin laimennosvirtsoihin laimennettut näytteet. (Kuvio 6 A-C). Tämä tulos oli ristiriidassa Delfia-menetelmällä mitattuihin hCG-pitoisuuksiin. Näiden tulosten perusteella tämän virtsamatriisin laimennettujen näytteiden hCG-pitoisuus ei ollut pääsääntöisesti pienempi, kuin rinnakkaisista toisilla virtsamatriiseilla laimennettujen näytteiden (taulukko 5). Mahdollinen syy tähän voi olla se, että tässä matriisissa esiintyvät hCG-tuotteet omaavat matalamman immunoreaktiivisuuden Installertin raskausmäärityksessä, kuin toisissa matriisissa laimennettut näytteet. Huomioitavaa on kuitenkin, että ero oli pieni ja yhden positiivisen raskausnäytteen osalta kaksi laimennussarjaa eroavat liikaa toisistaan, jotta ne olisivat vertailukelpoisia.

Seerumilla ei ole osoitettu olevan matriisiin perustuvaa vaihtelua kuten virtsanäytteillä. Selvittääksemme hCG-pitoisuuden vaikutusta Drug panel lukulaitteella mitattuun reflektanssiin, kolme seeruminäytettä raskaana olevilta naisilta laimennettiin hCG-negatiiviseen seerumiin. Laimennoksien todellinen hCG-pitoisuus mitattiin tämän jälkeen Delfia menetelmällä (Wallac Finland Oy) (Taulukko 6). Odotetusti reflektanssi oli kaikilla laimennussarjoilla nouseva hCG-pitoisuuden kasvaessa. Huomioitava on kuitenkin, että näistä laimennussarjoista yhdellä on trendinomaisesti pienempiä hCG-pitoisuuksia, verrattuna toisiin laimennussarjoihin (Kuvio 7). Tämä voisi mahdollisesti johtua näytteen hCG-molekyylien yhdistelmästä, joka omaa matalamman immunoreaktiivisuuden kuin Installert:in raskausmäärityksessä.

Sekä huumeainemäärityksissä että hCG määrityksissä toistettavuus mittauksista Drug panel-lukulaitteella saatiin CV%-arvoja jotka selkeästi ylittivät 10 %. Mittausten välillä reflektanssin vaihtelu saman pitoisuuden omaavista näytteistä voi johtua monista

syistä. Mittauksesta oli pyrkimys poistaa ajan vaikutus mittaukseen mittaamalla lukukasettia aina saman aikaan. Muita syitä voivat olla vaihtelut kasettien rakenteissa ja niissä olevista reagensseista. Lisäksi itse mittaustapahtuma laitteella voi olla mahdollinen vaihteluiden lähde. CV % hCG-mittauksissa kymmenellä rinnakkaisella näytteellä oli 12,46 – 17,58 % virtsasta tehdyllä analyysillä ja 18,60 % – 24,68 %, kun näytteenä oli seerumia. Virtsasta tehdyssä huumausaineseulussa CV % oli pääosin 10-30 % ja jopa yli 40% arvoja mitattiin (Liite 1). Huomioitava on, että huumausaineista CV% on laskettu viidestä eri mittauskerrasta toisin kuin virtsasta tehdyistä mittauksista. Lisäksi huumausainemittausten CV %:n vaihtelu oli aina isompaa kuin hCG määrityksen mittauksessa, mikä voi johtua siitä, että häviävän viivan pienikin vaihtelu antaa suhteellisesti isomman arvovaihtelun kuin värillisen viivan muodostuminen ja tummuminen.

Laiteesta johtuvaa mahdollista mittausvaihtelua testattiin piirtämällä Installertin hCG-määrityksen (Inovacon, Inc, USA) testi-ikkunan T-viivan ja C-viivan paikalle lyijykynällä viivat. Toistettavilla mittauksilla voitiin päätellä että laitteesta johtuvaa vaihtelua oli CV%:eina 3,25 % - 4,31 %. Mittaus tehtiin poistamalla testikasettia lukijasta, mikä mahdollisesti aiheuttaa sen että testitikku sijaitsee hieman eri paikassa suhteessa laitteen mittausoptiikkaan. Huomioitavaa on kuitenkin että tämä on laitteessa pyritty minimoimaan rakentamalla jokaiselle testitikulle oma kansi, mihin testitikku istuu napakasti. Mittausta missä testitikku ei olisi poistettu mittauksen välillä, ei kuitenkaan suoritettu. Lisäksi muita teoreettisia mahdollisia vaihtelun lähteitä voivat olla laitteen sisäinen optiikan vaihtelu ja kuvankäsittely.

Näistä tuloksista voidaan päätellä, että tuloksien vaihtelu johtuu todennäköisesti pääosin testikasettien laadullisesta vaihtelusta. Määrityksissä oli merkkiaineena värillisiä latex- tai kultapartikkeleita, joiden kolorimetrinen tunnistus on kvalitatiivinen tai parhaimmillaan semikvantitatiivinen. Näiden mittaustarkkuus yksinkertaisilla lukijoilla ylittää pääosin 10 % mikä todennäköisemmin selittää tutkimuksessa saatuja tuloksia (Lode 2005:594-96). Suorituksesta voi myös aiheutua jonkin verran vaihtelua, vaikka se oli pyritty minimoimaan mm. mittaamalla testikasettia aina saman inkubaatioajan jälkeen sekä näytemäärän vakioinnilla tarkalla pipetoinnilla. Itse mittaustapahtuma vaikutti aiheuttavan jonkin verran vaihtelua tulokseen, mutta sen merkitys oli selvästi pienempi kuin testikasetista johtuva laadullinen vaihtelu.

Eri laitteiden välinen vaihtelu mittauksissa haluttiin myös selvittää. Tätä varten testattiin kahden eri Drug panel-lukulaitteen mittauksen toistettavuutta keskenään (Liite 2). Laitteiden mittauksissa havaittiin merkittävää eroa kannabiksen ja trisyklisten masennuslääkkeiden yhdisteissä. Aikaisemmalla tutkimuksella, jossa käytettiin kolmea rinnakkaista Drug panel lukulaitetta ja huumausaineseulan vierimääritystä, osoitettiin myös, että eri laitteiden mittauksissa esiintyy vaihtelua joidenkin huumausaineiden osalta. (Myykänen ym 2011:1.). Huomioitava on kuitenkin, että toistoja erää kohtaan oli korkeintaan viisi ja ainoastaan kahta laitetta verrattiin keskenään. Jotta tulokset olisivat luotettavia, olisi tehtävä isompi otos samasta erästä ja verrattava useampaa kuin kahta laitetta keskenään.

Drug panel-lukulaitteen luotettavuus testattiin käyttämällä autenttisia huumausainepositiivisia virtsanäytteitä määrityksissä. Näytteet kerättiin HUSLAB:in huumausaineseulasta (HUSLAB tutkimusohjekirja: Huumeseulonta U-Huum-O). Näistä näytteistä oli löytynyt opiaatteja, tetrahydrocannabinolic happoa, bentsodiatsepiinejä, metadonia ja buprenorfiinia. Installerin huumausaineseulassa olevat testattavat yhdisteet, trisykliset antidepressantit, jotka kuluvat vanhemman polven antidepressivisiin lääkkeisiin ja kokaiini ei löytynyt näistä näytteistä. Näiden yhdisteiden puuttuminen voi johtua näiden aineiden vähäisestä käytöstä huumausaineina Suomessa. Esim. kokaiini on Euroopassa yleinen huumausaine, mutta Suomessa se on vielä pysynyt hyvin pienen marginaalisen ryhmän ongelmana (Tanhua ym 2011: 57-62). Näytteiden huumausainepitoisuus määritettiin kvantitatiivisesti GC-MS:lla, minkä jälkeen näytteistä suoritettiin Installertin huumausaineseulamääritykset. Tämä jälkeen testikasetit luettiin Drug panel-lukulaitteella.

Amfetamiini, buprenorfiini ja metadoni olivat huumausainemäärityksissä johdonmukaisesti positiivisia näytteissä, joissa aineet olivat pitoisuudeltaan selkeästi yli raja-arvojen. Näytteet, jotka olivat pitoisuudeltaan lähellä raja-arvoa, olivat joko positiivisia tai negatiivisia. Ne näytteet, jotka olivat pitoisuudeltaan reilusti alle raja-arvon, olivat odotetusti kaikki negatiivisia.

Tetrahydrokannabinolista (THC), amfetamiinista (AMP) ja bentsodiatsepiineista (BZO) olivat positiivisia huumausainemäärityksissä, vaikka nämä alittivat selkeästi valmistajan ilmoittamat raja-arvot. Tämä voi johtua siitä, että määrittäminen on oikeasti herkempi kuin mitä testin ohjekirjassa on ilmoitettu, tai herkkyys vaihtelee eri metaboolitien välillä. Sen sijaan raja-arvoltaan positiivisissa näytteissä ei ollut vääriä negatiivisia. Aikaisemmissa tutkimuksissa on myös osoitettu immunologisten huumausaineseulojen

määrityksien omaavan rajallista herkkyyttä ja osoitettu, että väärät negatiiviset ja positiiviset tulokset eri huumeaineista/huumeaineryhmistä eivät ole harvinaisia (Bagøien G ym 2009: G248-253.). Tämä voi johtua antigeenien ristireagoimisesta huumausaineiden samankaltaisen rakenteen omaavien aineiden kanssa tai metabolisissa reaktioissa syntyvien tuotteiden samankaltaisuudesta. Joissakin tapauksissa vasta-aine voi sitoutua epitopppiin, jonka rakenne ei muistuta vasta-aineen omaa antigeenia. (Bagøien ym 2009: 252-253.) Tämän takia positiivinen huumausainemääritys varmistetaan yleensä GC-MS:lla. (Tenore 2010: 437-438.). Alle raja-arvon olevat positiiviset määritykset THC:sta, AMP:sta ja BZO:sta voivat johtua sitä, että määritys on joidenkin näiden ryhmän yhdisteiden tai aineenvaihdunnantuotteiden osalta herkempi kuin mitä valmistaja on ilmoittanut. Samankaltaisia tuloksia saatiin myös tutkimuksessa, jossa käytettiin saman valmistajan Innovacinin huumausaineseulaa (Myykänen ym 2011:1). On myös mahdollista, että virtsanäytteessä on ollut yhdisteitä, jotka ovat ristireagoineet huumausainespesifisten vasta-aineiden kanssa. Tulehduskipulääkkeiden kuten ibuprofeenin ja naprokseenin on raportoitu antavan joskus vääriä positiivisia kannabinoidituloksia. (Brahm et al., 2010.) Varsinkin opiaatit ovat ryhmä, jossa väärät positiiviset määritykset ovat kohtalaisen yleisiä. Kodeinia on sekä unikonsiemenissä että yskänlääkkeessä. Se on metyyylimorfiini ja kuuluu opiaatteihin. Elimistössä kodeiini metaboloituu morfiiniksi ja voi johtaa positiiviseen tulokseen huumausainemäärityksessä. Tämän lisäksi voivat jotkut fluorokinoloniantibiootit ristireagoida morfiinispesifisten vasta-aineiden kanssa, vaikka näiden rakenne eroaa täysin morfiinista. (Shafiq ja Mutgi 2010: 1644; Tenore 2010: 443.). Installertin huumausaineseulamäärityksessä oli pari näytettä, jotka olivat positiivisia morfiinista, vaikka nämä näytteet olivat negatiivisia morfiinin suhteen MS-GS analyysissä. On mahdollista, että tämä johtui jonkun yllä mainitun kaltaisen yhdisteen ristireagoinnista.

Installertin huumausaineseulan testikasetit arvioitiin myös visuaalisesti. Positiivinen ja negatiivinen huumausainemääritys ei eronnut visuaalisesti Drug panel-lukulaitteella saaduista tuloksista. Tästä voidaan olettaa, että väärät positiiviset tulokset johtuvat pääosin immunologisten testien herkkyydestä eikä Drug-panel lukulaitteen reflektanssi mittausten vaihtelusta. Tutkimuksen potilasnäytteiden otos oli pieni. Jostakin huumausaineseulasta oli vain pari näytettä ja jotkut yhdisteet puuttuivat kokonaan testauspaletista. Tästä syystä näitä tutkimustuloksia voidaan pitää korkeintaan suuntaa antavana.

Drug panel-lukulaitteen ja siihen kuuluvan ohjelmiston käyttö on helppoa ja tarjoaa objektiivisen tulkinnan tuloksista. Sähköinen tiedonsiirto mahdollistaa lisäksi tulosten tallentamisen ja niiden jäljitettävyyden. Raskaudenosoituksen osalta mittauksen toistettavuuden tarkkuus ei ollut riittävä. Tällöin on mahdollista, että diagnosoidaan myös alkuraskaudessa spontaanisti päättyviä biokemiallisia raskauksia. Huumausaineiden immunologisissa seulontatesteissä sen sijaan laite voisi olla hyödyllinen. Rajoituksia laitteen käytössä antavat kuitenkin väärät positiiviset ja negatiiviset tulokset, jotka johtuvat testikaseteista ja määrittysten eräkohtaisista eroista. Testierän vaihtuessa on syytä kalibroida laite, koska merkittävää eräkohtaista vaihtelua todettiin sekä raskaustesteissä että huumausaineseulassa. Lisäksi on huomioitava, että huumeseulatesti ei pysty tunnistamaan kaikkia relevantteja yhdisteitä.

LÄHTEET

- Alan, Wu – Smith, Andrew – Christenson, Robert – Murakami, MaryAnn – Apple, Fred
2004: Evaluation of a point-of-care assay for cardiac markers for patients
suspected of acute myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta* 346 (2). 211-9.
- Bagøien, Gunnhild – Morken, Gunnar – Zahlsen, Kolbjørn – Aamo, Trond – Spigset,
Olav 2009: Evaluation of a urine on-site drugs of abuse screening test in
patients admitted to a psychiatric emergency unit. *Journal of Clinical
Psychopharmacology* 29 (3). 248-254.
- Barroso, Madalena – Gallardo, Enrique – Queiroz, João 2009: Bioanalytical methods
for the determination of cocaine and metabolites in human biological samples.
Bioanalysis 2009:1 (5). 977-1000.
- Birken, Steven – Berger, Peter – Bidart, Jean-Michel – Weber, Matthias – Bristow,
Adrian – Norman, Rob – Sturgeon, Catharine – Stenman, Ulf-Håkan 2003:
Preparation and characterization of new WHO reference reagents for human
chorionic gonadotropin and metabolites. *Clinical Chemistry* 49 (1). 144-154.
- Brahm, Nancy. C. – Yeager, Lynn L. – Fox, Mark D. – Farmer, Kevin C. – Palmer, Tony
A. 2010: Commonly prescribed medications and potential false-positive urine
drug screens. *Am J Health Syst Pharm.* 67 (16). 1344-1350.
- Buchan, Betty J. – Walsh, Judith M. – Leaverton, Paul E. 1998: Evaluation of the
accuracy of on-site multi-analyte drug testing devices in the determination of
the prevalence of illicit drugs in drivers. *Journal of Forensic Sciences* 43 (2).
295-299.
- Christo Paul J. – Manchikanti, Laxmaiah – Ruan, Xiulu – Bottros, Michael – Hansen,
Hans – Solanki, Daneshvari R. – Jordan, Arthur E. – Colson, James 2011: Urine
drug testing in chronic pain. *Pain Physician* 14 (2). 123-143.
- Cole, Laurence A. 2009b: New discoveries on the biology and detection of human
chorionic gonadotropin. *Reproductive Biology Endocrinology* 7 (8). 1-37.
- Cole, Laurence A. 2010: Biological functions of hCG and hCG-related molecules.
Reproductive Biology Endocrinology 8 (102). 1-37.

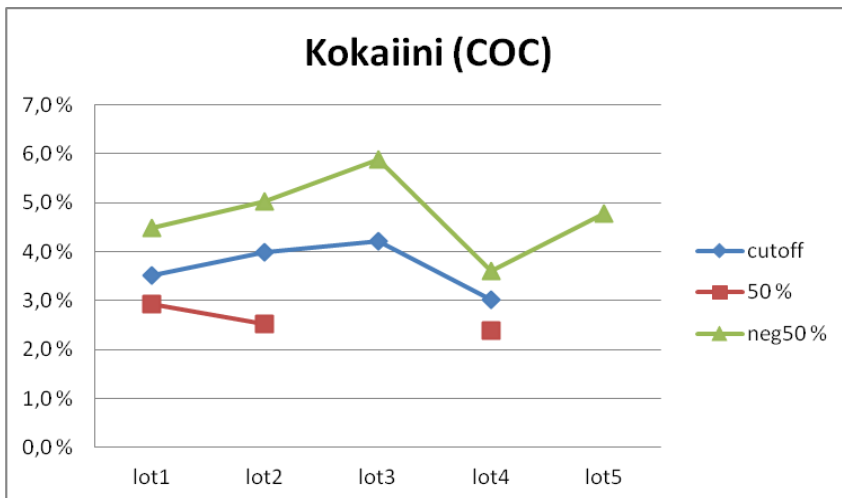
- Cole, Laurence A. 2011b: Individual deviations in human chorionic gonadotropin concentrations during pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 204 (4). 349.e1-7.
- Cole, Laurence A. – Dutoit, Stephen – Higgins Trefor N. 2011: Total hCG tests. *Clinica Chimica Acta* 412 (23-24). 2216-2222.
- Cole, Laurence A. – Gutierrez, Jose M. 2009a: Production of human chorionic gonadotropin during the normal menstrual cycle. *Journal of Reproductive Medicine* 54(4). 245-50.
- FINLEX 2010 Valtioneuvoston asetus huumaussaineina pidettävistä aineista, valmisteista ja kasveista Verkkodokumentti. <http://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2008/20080373_28.8.2008/543>. Luettu 07.01.2011.
- HUSLAB tutkimusohjekirja: Huumeseuonta, kvalitatiivinen, virtsasta Verkkodokumentti. <http://www.huslab.fi/ohjekirja/4221.html> Luettu 05.06.2011.
- HUSLAB tutkimusohjekirja: Koriogonadotropiini (kval), seerumista S - hCG-O Verkkodokumentti. <http://www.huslab.fi/ohjekirja/3449.html> Luettu 05.06.2011.
- HUSLAB tutkimusohjekirja: Koriogonadotropiini (kval), virtsasta U-hCG-O Verkkodokumentti. <http://www.huslab.fi/ohjekirja/2124.html> Luettu 05.06.2011.
- Kaferstein, Herbert 2009: Forensic relevance of glucuronidation in phase-II-metabolism of alcohols and drugs. *Legal Medicine* 11 (1). S22-6.
- Leino, Aila – Saarimies, Juha – Grönholm, Mikaela – Lillsunde, Pirjo 2001: Comparison of eight commercial on-site screening devices for drugs-of-abuse testing. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 61(4): 325-331.
- Lempiäinen, Anna – Hotakainen Kristina – Alfthan, Henrik – Stenman Ulf-Håkan. 2011: Loss of human chorionic gonadotropin in urine during storage at -20°C. *Clinica Chimica Acta*. 1-6.

- Mannila, Rami – Pulli, Timo – Saari, Heikki – Tappura, Kirsi – Tuppurainen, Jussi – Välimäki, Hannu – Niskanen, Aimo 2007: Fluorescence based fast diagnostics platform for the direct and indirect immunodiagnostic analysis methods - art. no. 66280Q. Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine Iv. D. Schweitzer and M. Fitzmaurice. Bellingham, Spie-Int Soc Optical Engineering. 6628. Q6280-1- Q6280-10.
- Mazur, Anna. – Lichti, Cheryl F. – Prather, Paul L. – Zielinska, Agnieszka K. – Bratton, Stacie M. – Gallus-Zawada, Anna – Finel, Moshe – Miller, Grover P. – Radomińska-Pandya, Anna – Moran, Jeffrey H. 2009: Characterization of human hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferase enzymes involved in the metabolism of classic cannabinoids. *Drug Metabolism and Disposition* 37 (7).1496-504.
- Montagnana, Martina – Trenti, Tommaso – Aloe, Rosalia – Cervellin, Gianfranco – Lippi, Giuseppe 2011: Human chorionic gonadotropin in pregnancy diagnostics. *Clinica Chimica Acta* 412 (17-18). 1515-1520.
- Mykkänen Sirpa, – Karttunen Åse, – Puhakainen Eeino. – Gunnar Teemu 2011: Interpretation of Lateral Flow Immunoassay Drug Test Results: Evaluation of the Drug Panel Reader. Abstrakti. Joint Meeting of the Society of Forensic Toxicologists (SOFT)- The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) International Conference & Exposition on Forensic & Analytical Toxicology. San Francisco, California august 2011
- Nicholls, Lance – Bragaw, Lisa – Ruetsch, Charles 2010: Opioid dependence treatment and guidelines. *Journal of Managed Care* 16 (1 Suppl B). S14-21.
- Peace, Michelle R. – Tarnai Lisa D. – Poklis Alphonse 2000: Performance evaluation of four on-site drug-testing devices for detection of drugs of abuse in urine. *Journal of Analytical Toxicology* 24 (7). 589-94.
- Pil, Kristof – Verstraete, Alain 2008: Current developments in drug testing in oral fluid. *Therapeutic Drug Monitoring* 30 (2). 196-202.
- Sasaki, Yasushi – Ladner, Donald G. – Cole, Laurence A. 2008: Hyperglycosylated hCG the source of pregnancy failures. *Fertility and Sterility* 89 (6). 1781-1786.

- Seppälä, Markku – Tontti, K. – Ranta, Tapio – Stenman, Ulf-Håkan – Chard, Tim 1980: Use of a rapid hCG-beta-subunit radioimmunoassay in acute gynaecological emergencies. *Lancet* 1 (8161). 165-166.
- Shafiq, Qaiser – Mutgi, Anand 2010: Urine opiate screening: false-positive result with levofloxacin. *CMAJ* 182 (15). 1644-1645.
- Stenman, Ulf-Håkan – Alfthan, Henrik 2003: Optimal sensitivity for pregnancy tests. *In Vitro Diagnostics Technologi* 9: 18-19.
- Stenman, Ulf-Håkan – Tiitinen, Aila – Alfthan, Henrik – Valmu, Leena 2006: The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG. 12 (6). 769-784.
- Sutton-Riley, Jaime M. – Khanlian, Sarah A. – Byrn, Francis W. – Cole, Laurence A. 2006: A single serum test for measuring early pregnancy outcome with high predictive value. *Clinical Biochemistry* 39:682-687.
- Tanhua, Hannele – Virtanen, Ari – Knuuti, Ulla – Leppo, Anna – Kotovirta, Elina 2011: Huumetilanne suomessa THL Raportti 62/2011: 1-172.
- Tenore, Peter L. 2010: Advanced urine toxicology testing. *Journal of Addictive Diseases* 29 (4). 436-448.
- Vaitukaitis, Judith L. – Braunstein, Glenn D. – Ross, Griff T. 1972: A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 113 (6). 751-758.
- Wide Leif – Gemzell Carl A. (1960). An immunological pregnancy test. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1960 Oct;35:261-7.
- Wilcox, Allen J. – Weinberg, Clarice R. – O'Connor, John F. – Baird, Donna D. – Schlatterer, John P. – Canfield, Robert E. – Armstrong, Glenn E. – Nisula Bruce C. 1988: Incidence of early loss of pregnancy. *The new England journal of medicine* 319 (4). 189-194.
- Westin, Andreas A. 2011: Cannabis og urinprøver. *Tidsskrift for Den norske lægeforening*. 131(6). 577-580.

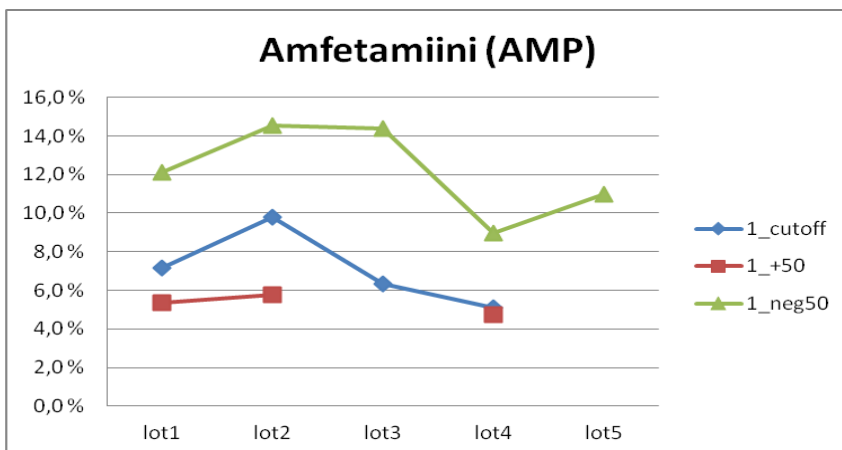
von Lode, Pii 2005: Point-of-care immunotesting: approaching the analytical performance of central laboratory methods. *Clinical Biochemistry* 38 (7). 591-606.

Huumausainemäärityksissä eri huumausaineiden ja viiden eri erän (lot 1-5) erot reflektanssissa. Taulukossa mukana mittausten keskimääräinen (Ka) reflektanssi sekä CV%.



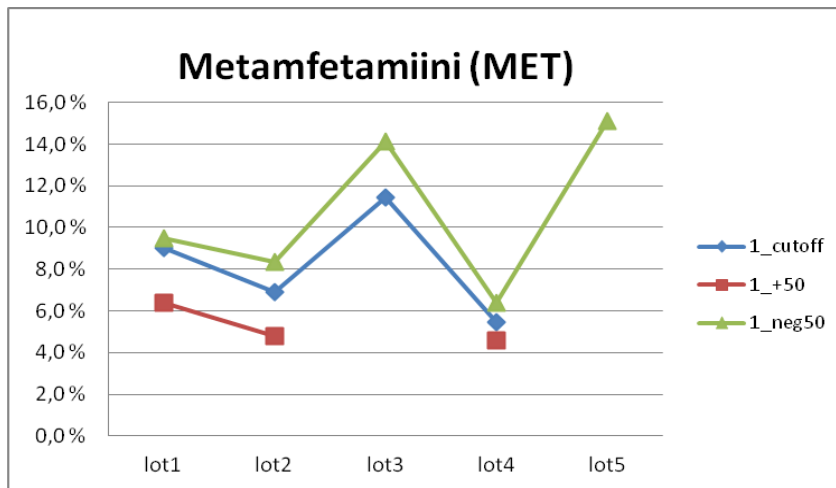
Ka	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cutoff	3,51 %	4,00 %	4,22 %	3,03 %	
50	2,92 %	2,53 %		2,39 %	
neg50	4,49 %	5,02 %	5,89 %	3,60 %	4,79 %
CV%					
cutoff	17,66 %	44,25 %	33,41 %	13,86 %	
50	30,82 %	19,76 %		23,43 %	
neg50	16,70 %	20,00 %	24,79 %	21,94 %	17,33 %

A



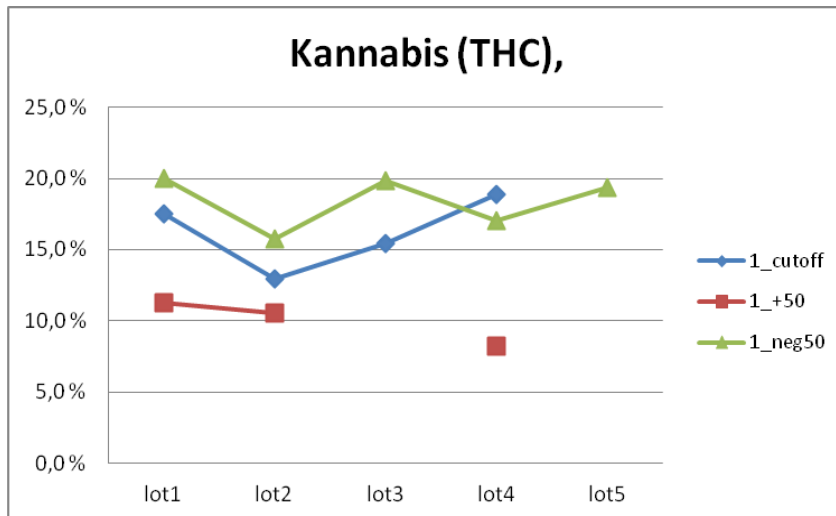
Ka	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cutoff	3,51 %	4,00 %	4,22 %	3,03 %	
+50	2,92 %	2,53 %		2,39 %	
neg50	4,49 %	5,02 %	5,89 %	3,60 %	4,79 %
CV%					
cutoff	17,66 %	44,25 %	33,41 %	13,86 %	
+50	30,82 %	19,76 %		23,43 %	
neg50	16,70 %	20,00 %	24,79 %	21,94 %	17,33 %

B



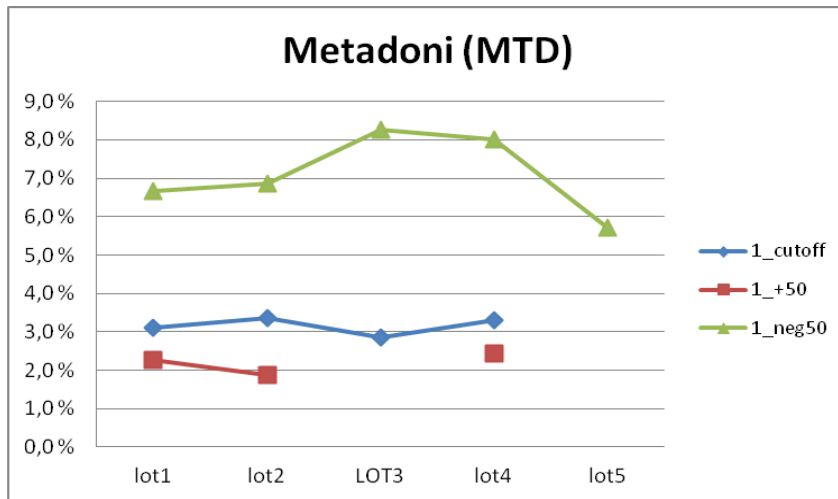
	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cuttoff	9,03 %	6,90 %	11,42 %	5,47 %	
+50	6,38 %	4,77 %		4,59 %	
neg50	9,49 %	8,34 %	14,13 %	6,40 %	15,10 %
CV%	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cuttoff	14,95 %	15,80 %	0,79 %	20,29 %	
+50	20,22 %	13,00 %		4,58 %	
neg50	14,96 %	17,27 %	7,22 %	14,84 %	33,31 %

C



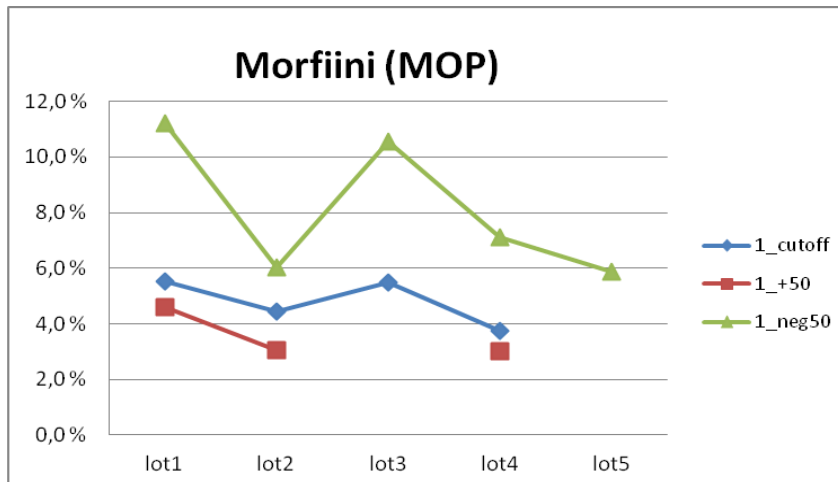
	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cuttoff	17,52 %	12,92 %	15,39 %	18,85 %	
+50	11,26 %	10,53 %		8,21 %	
neg50	20,01 %	15,73 %	19,81 %	17,00 %	19,35 %
CV%	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cuttoff	22,55 %	19,35 %	38,34 %	22,65 %	
+50	11,46 %	20,98 %		24,12 %	
neg50	20,79 %	15,38 %	39,88 %	36,53 %	8,63 %

D



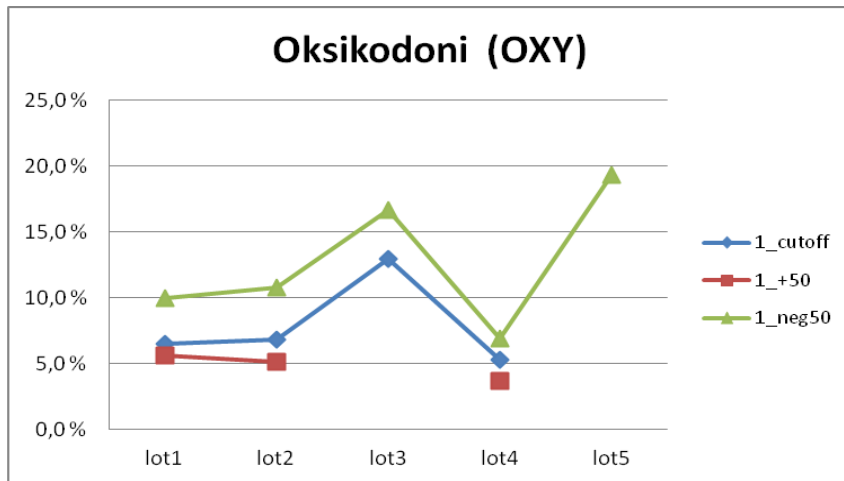
	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cuttoff	3,10 %	3,36 %	2,84 %	3,30 %	
+50	2,26 %	1,86 %		2,43 %	
neg50	6,66 %	6,87 %	8,27 %	8,00 %	5,71 %
CV%	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cuttoff	29,68 %	19,35 %	22,89 %	32,42 %	
+50	34,07 %	11,29 %		14,40 %	
neg50	21,32 %	29,84%	26,00 %	7,25 %	11,38 %

E



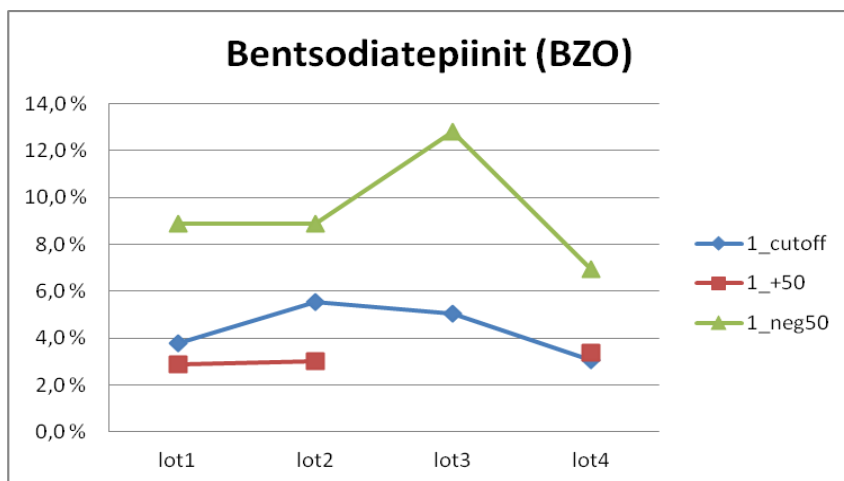
Ka	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cuttoff	5,51 %	4,46 %	5,47 %	3,74 %	
+50	4,61 %	3,06 %		3,00 %	
neg50	11,22 %	6,04 %	10,54 %	7,12 %	5,86 %
CV%	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cuttoff	19,06 %	11,43 %	7,86 %	20,32 %	
+50	35,57 %	15,36 %		18,33 %	
neg50	11,41 %	18,54 %	15,09 %	20,22 %	12,63 %

F



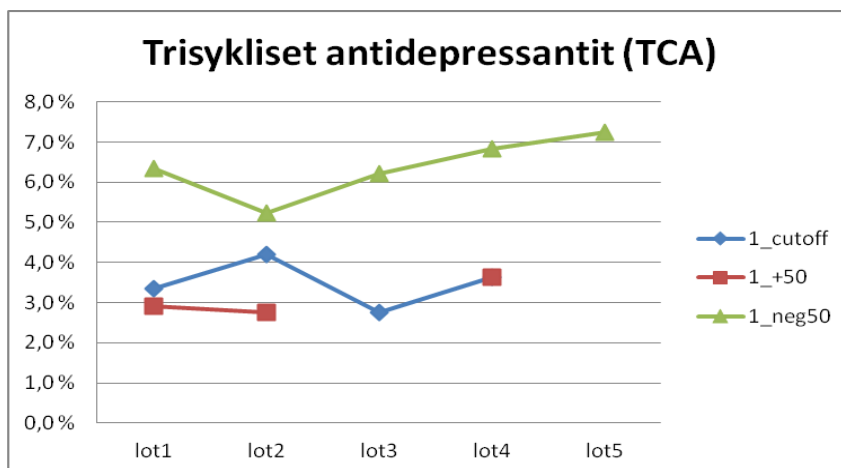
	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cutoff	6,55 %	6,85 %	12,96 %	5,32 %	
50	5,59 %	5,11 %		3,71 %	
neg50	9,97 %	10,81 %	16,71 %	6,93 %	19,29 %
CV %	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cutoff	29,58 %	32,96 %	66,91 %	19,25 %	
50	27,55 %	36,93 %		18,33 %	
neg50	25,58 %	45,20 %	30,83 %	15,59 %	92,66 %

G



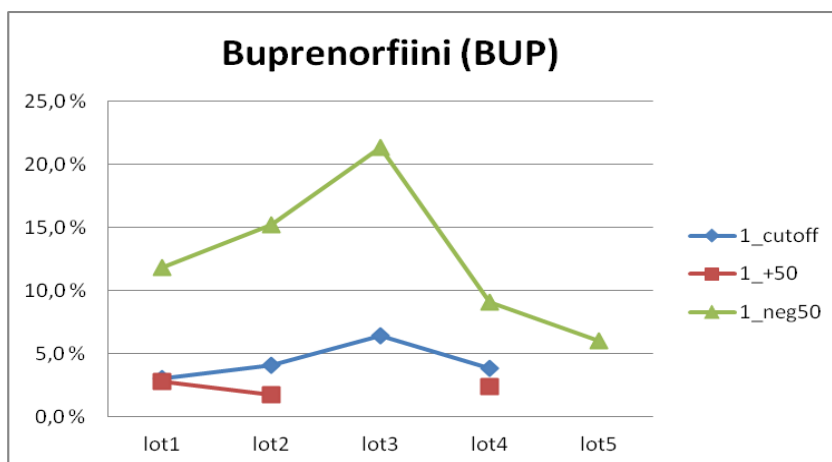
	lot1	lot2	lot3	lot4
cutoff	3,80 %	5,53 %	5,06 %	3,08 %
+50	2,86 %	3,00 %		3,36 %
neg50	8,90 %	8,88 %	12,81 %	6,95 %
CV%	lot1	lot2	lot3	lot4
cutoff	42,37 %	17,54 %	20,75 %	22,08 %
+50	24,48 %	22,00 %		11,31 %
neg50	24,04 %	23,87 %	16,86 %	24,89 %

H



Ka	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cuttoff	3,34 %	4,20 %	2,76 %	3,62 %	
+50	2,90 %	2,76 %		3,63 %	
neg50	6,35 %	5,22 %	6,21 %	6,82 %	7,24 %
CV%	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cuttoff	24,85 %	45,48 %	23,91 %	38,40 %	
+50	34,14 %	10,51 %		14,88 %	
neg50	34,33 %	23,75 %	31,24 %	25,51 %	49,59 %

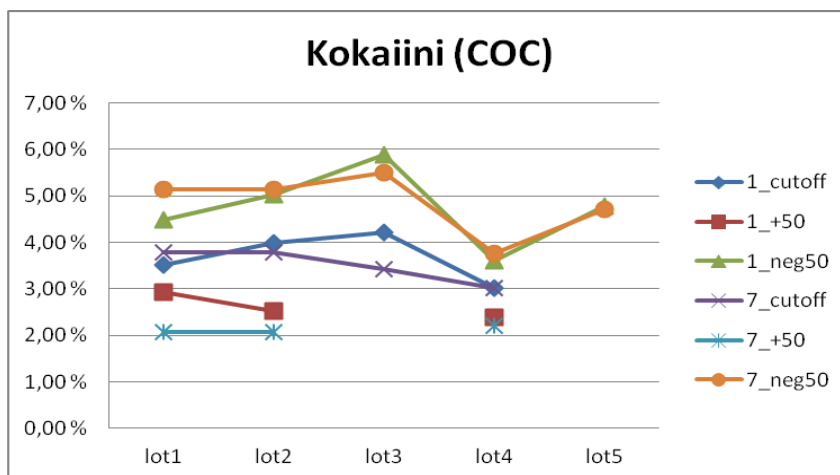
I



Ka	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cuttoff	3,06 %	4,06 %	6,43 %	3,83 %	
+50	2,84 %	1,74 %		2,43 %	
neg50	11,82 %	15,19 %	21,32 %	9,12 %	6,07 %
CV%	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
cuttoff	26,14 %	15,27 %	35,93 %	39,69 %	
+50	14,44 %	22,99 %		9,47 %	
neg50	36,80 %	23,70 %	19,23 %	18,64 %	10,51 %

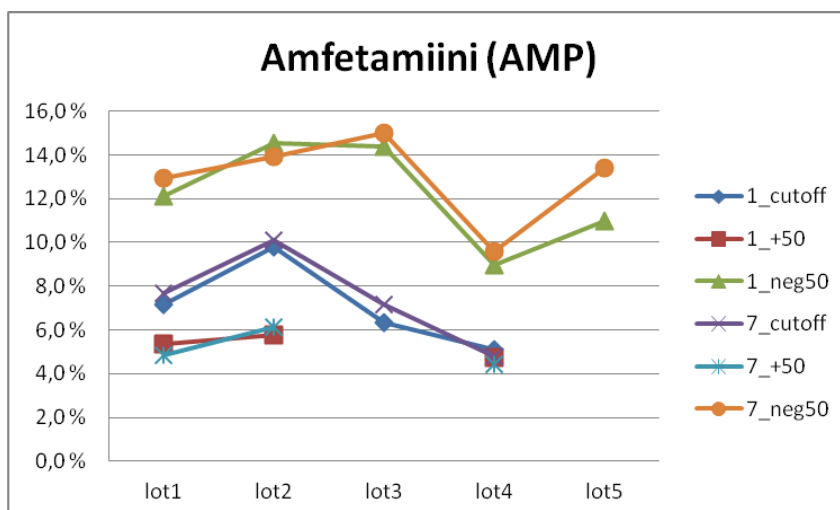
J

Kahden Drug panel-lukulaitteen (1 ja 7) ero jossa verrattu huumausaineseulan eri huumausaineiden ja viiden eri erän (lot 1-5) ero reflektanssissa. Taulukossa mukana mittausten keskimääräinen (Ka) reflektanssi.



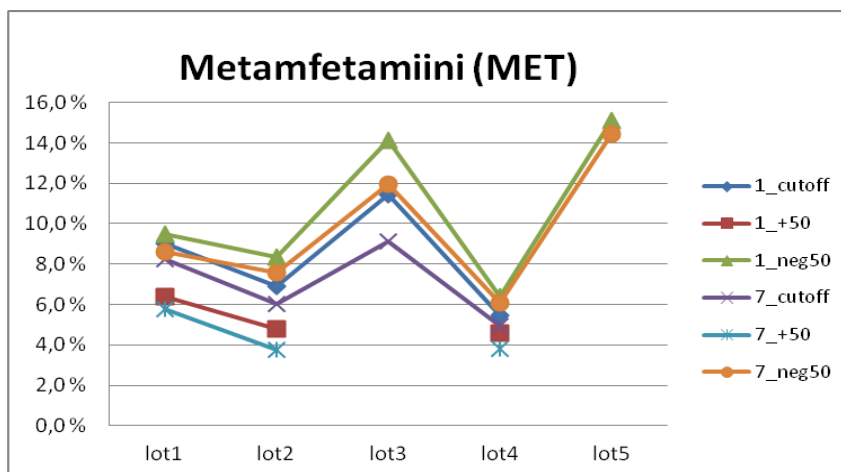
	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
1_cutoff	3,51 %	4,00 %	4,22 %	3,03 %	
1_+50	2,92 %	2,53 %		2,39 %	
1_neg50	4,49 %	5,02 %	5,89 %	3,60 %	4,79 %
7_cutoff	3,78 %	3,78 %	3,42 %	3,01 %	
7_+50	2,08 %	2,08 %		2,20 %	
7_neg50	5,14 %	5,14 %	5,51 %	3,77 %	4,72 %

A



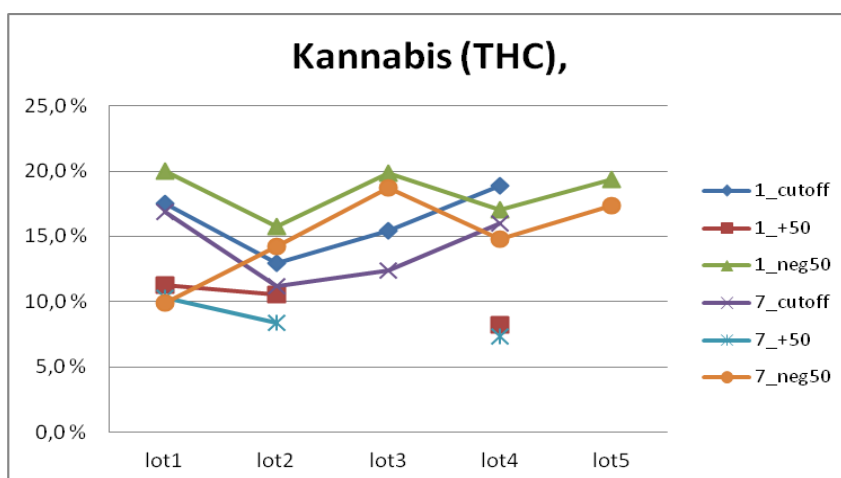
	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
1_cutoff	7,16 %	9,81 %	6,33 %	5,12 %	
1_+50	5,34 %	5,78 %		4,73 %	
1_neg50	12,09 %	14,55 %	14,39 %	8,97 %	11,00 %
7_cutoff	7,70 %	10,12 %	7,15 %	4,78 %	
7_+50	4,83 %	6,15 %		4,43 %	
7_neg50	12,92 %	13,92 %	15,00 %	9,60 %	13,38 %

B



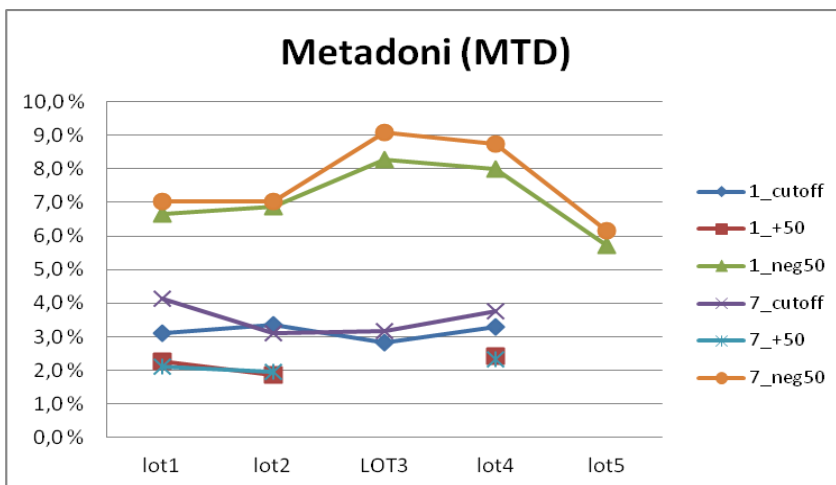
	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
1_cutoff	9,03 %	6,90 %	11,42 %	5,47 %	
1_+50	6,38 %	4,77 %		4,59 %	
1_neg50	9,49 %	8,34 %	14,13 %	6,40 %	15,10 %
7_cutoff	8,27 %	6,02 %	9,14 %	4,96 %	
7_+50	5,77 %	3,74 %		3,79 %	
7_neg50	8,59 %	7,59 %	11,98 %	6,08 %	14,46 %

C



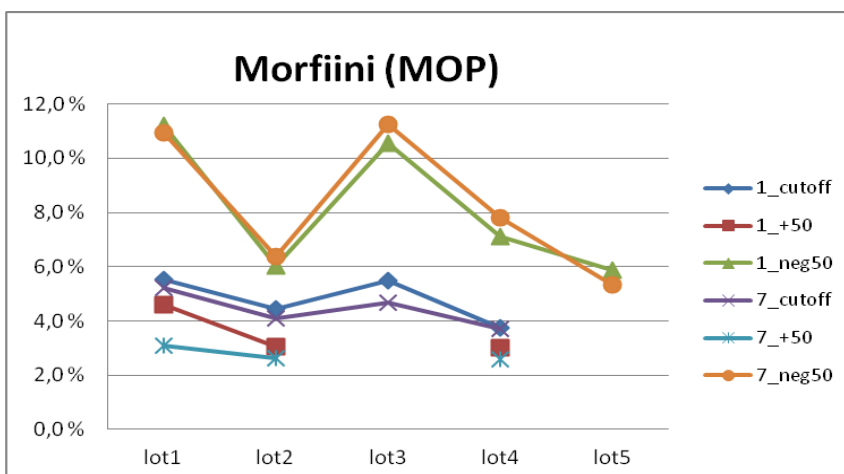
	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
1_cutoff	17,52 %	12,92 %	15,39 %	18,85 %	
1_+50	11,26 %	10,53 %		8,21 %	
1_neg50	20,01 %	15,73 %	19,81 %	17,00 %	19,35 %
7_cutoff	16,89 %	11,14 %	12,39 %	16,02 %	
7_+50	10,27 %	8,40 %		7,31 %	
7_neg50	9,89 %	14,24 %	18,75 %	14,80 %	17,39 %

D



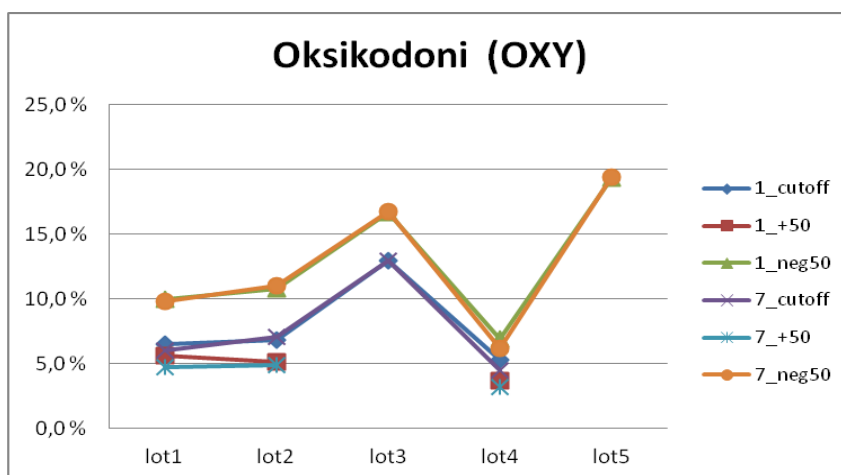
	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
1_cutoff	3,10 %	3,36 %	2,84 %	3,30 %	
1_+50	2,26 %	1,86 %		2,43 %	
1_neg50	6,66 %	6,87 %	8,27 %	8,00 %	5,71 %
7_cutoff	4,13 %	3,12 %	3,17 %	3,77 %	
7_+50	2,10 %	1,95 %		2,34 %	
7_neg50	7,03 %	7,03 %	9,10 %	8,75 %	6,16 %

E



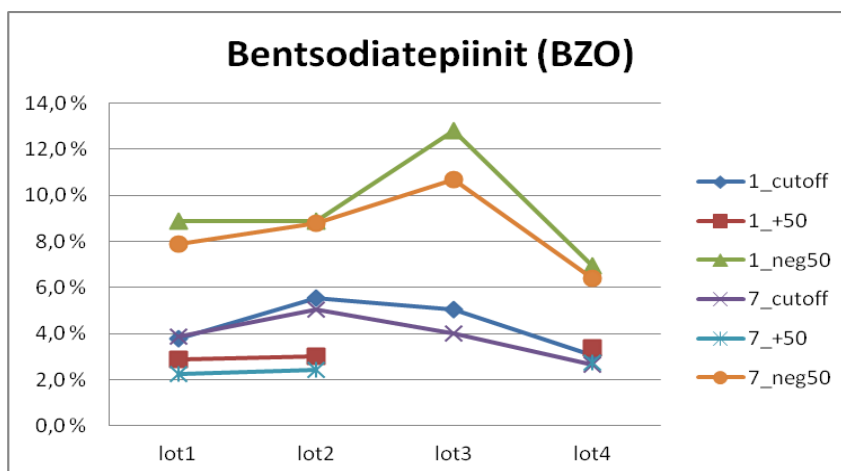
	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
1_cutoff	5,51 %	4,46 %	5,47 %	3,74 %	
1_+50	4,61 %	3,06 %		3,00 %	
1_neg50	11,22 %	6,04 %	10,54 %	7,12 %	5,86 %
7_cutoff	5,20 %	4,11 %	4,67 %	3,72 %	
7_+50	3,09 %	2,64 %		2,57 %	
7_neg50	10,95 %	6,39 %	11,27 %	7,79 %	5,34 %

F



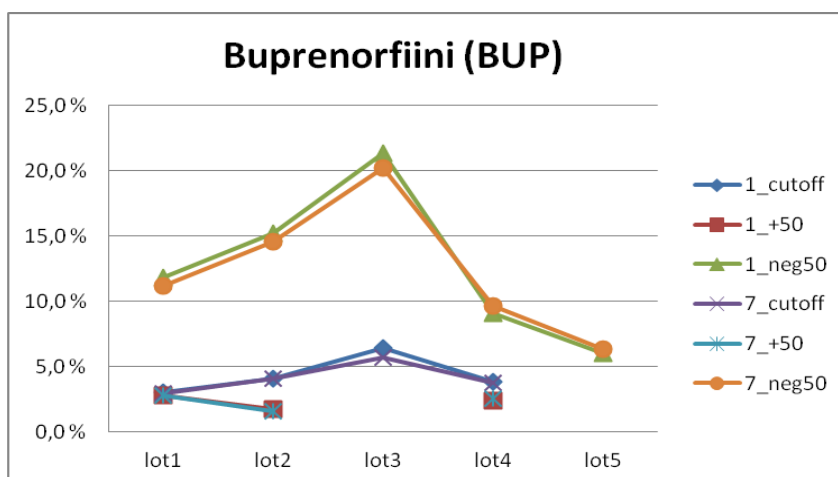
	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
1_cutoff	6,55 %	6,85 %	12,96 %	5,32 %	
1_+50	5,59 %	5,11 %		3,71 %	
1_neg50	9,97 %	10,81 %	16,71 %	6,93 %	19,29 %
7_cutoff	6,02 %	7,04 %	12,96 %	4,51 %	
7_+50	4,75 %	4,94 %		3,22 %	
7_neg50	9,80 %	11,04 %	16,73 %	6,16 %	19,43 %

G



	lot1	lot2	lot3	lot4
1_cutoff	3,80 %	5,53 %	5,06 %	3,08 %
1_+50	2,86 %	3,00 %		3,36 %
1_neg50	8,90 %	8,88 %	12,81 %	6,95 %
7_cutoff	3,87 %	5,04 %	4,03 %	2,65 %
7_+50	2,24 %	2,44 %		2,73 %
7_neg50	7,89 %	8,78 %	10,67 %	6,39 %

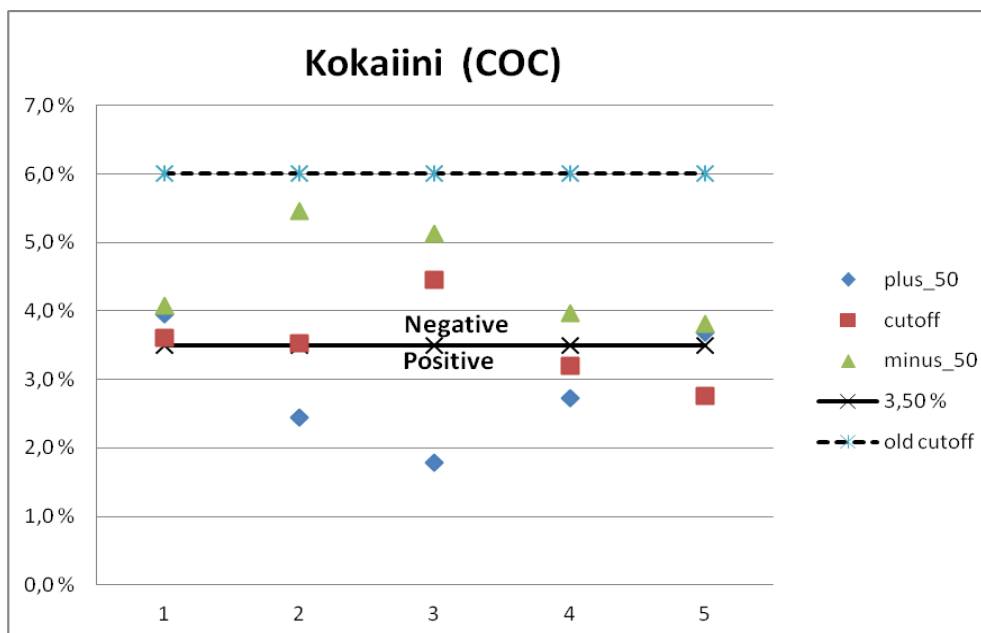
H



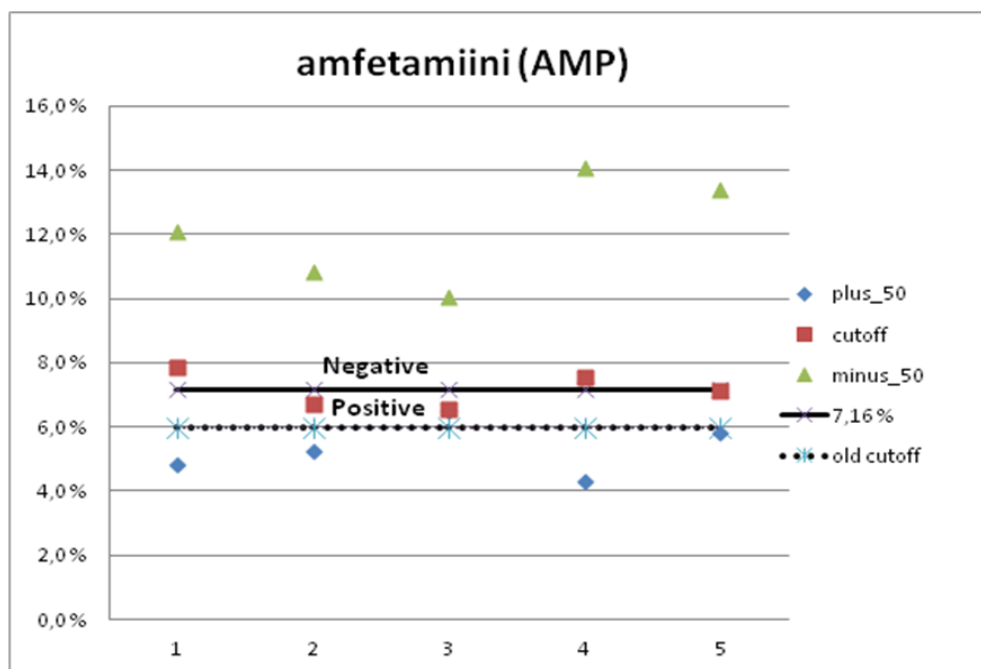
	lot1	lot2	lot3	lot4	lot5
1_cutoff	3,06 %	4,06 %	6,43 %	3,83 %	
1_+50	2,84 %	1,74 %		2,43 %	
1_neg50	11,82 %	15,19 %	21,32 %	9,12 %	6,07 %
7_cutoff	3,00 %	4,13 %	5,70 %	3,74 %	
7_+50	2,82 %	1,57 %		2,59 %	
7_neg50	11,22 %	14,60 %	20,22 %	9,62 %	6,38 %

I

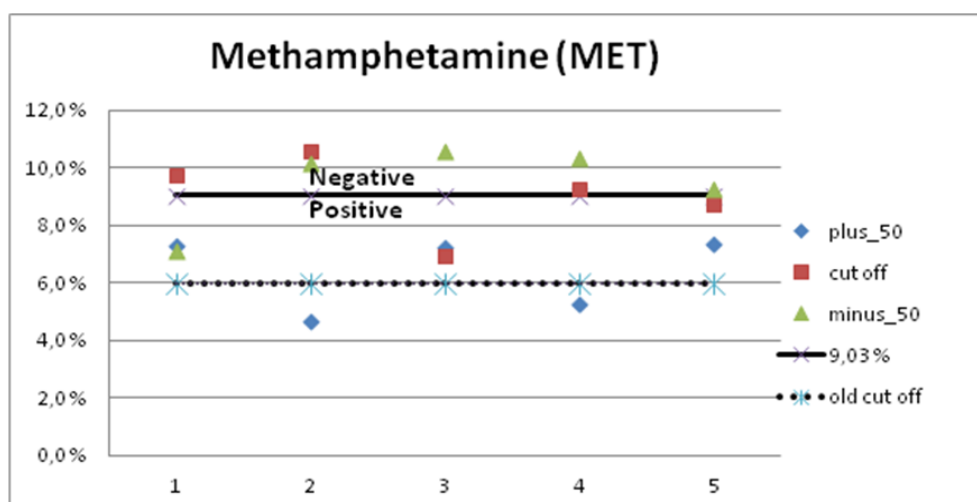
Drug panel-lukulaiteella tehty huumausainemääritys jossa eri huumausaineiden pitoisuus vastaa testiyhdisteiden raja-arvoa. Kahden erän eroa eri yhdisteiden reflektanssissa on verrattu.



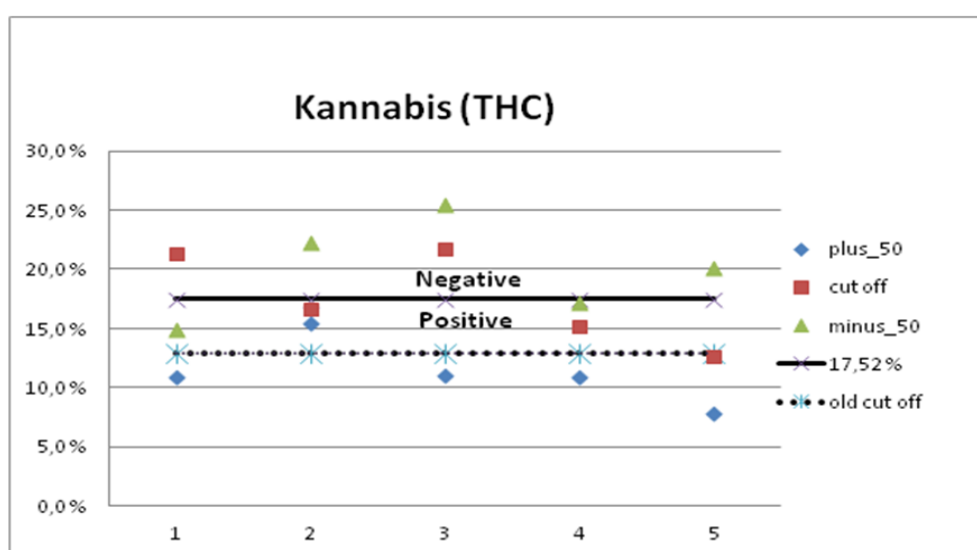
A



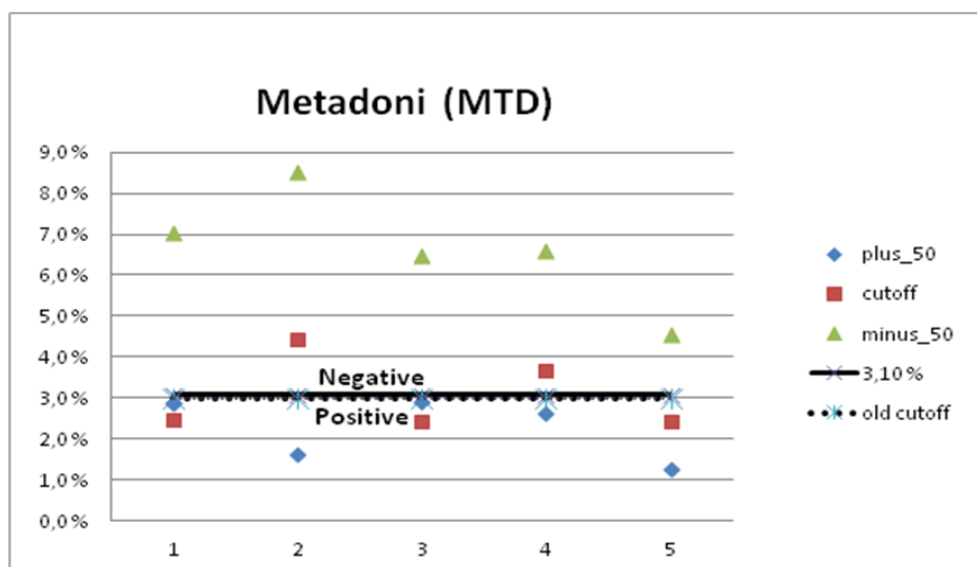
B



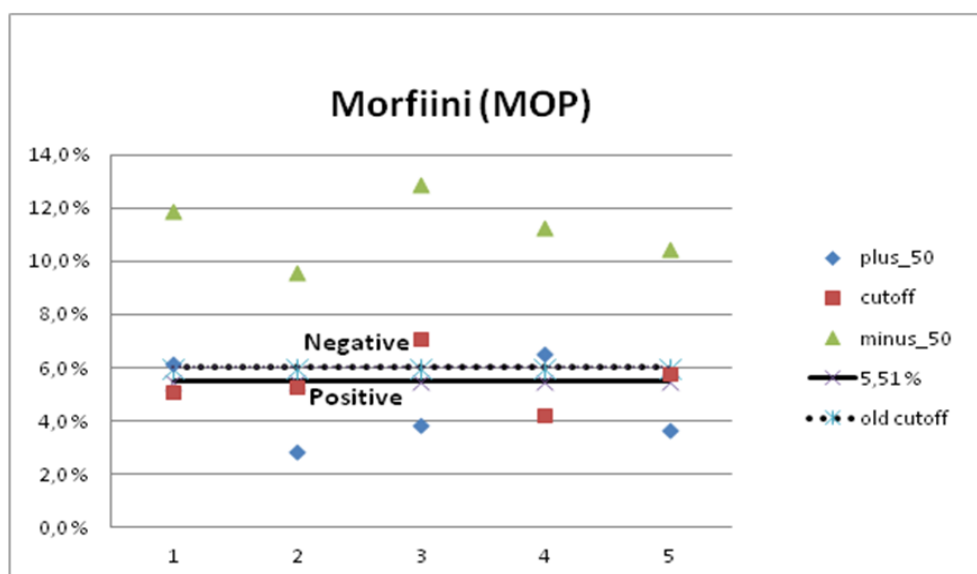
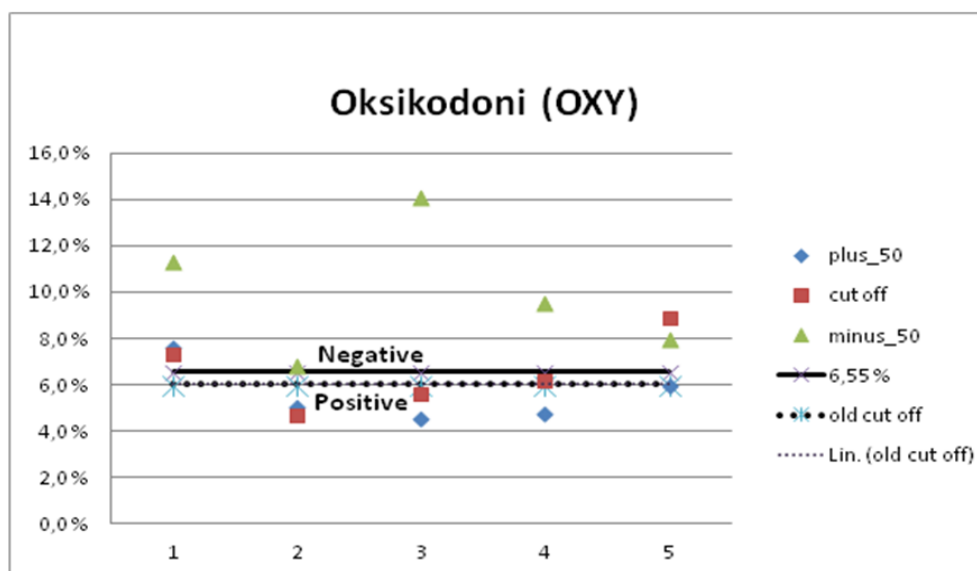
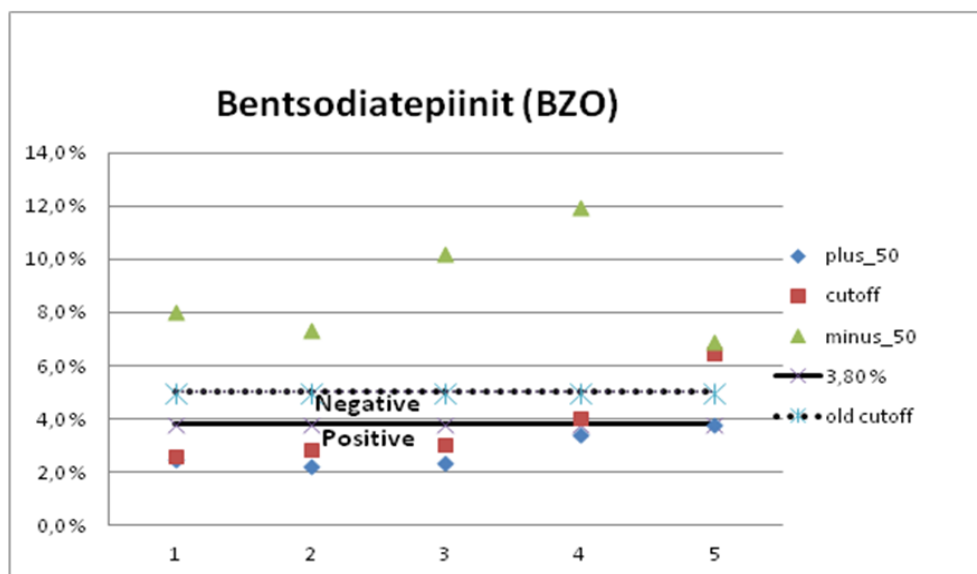
C

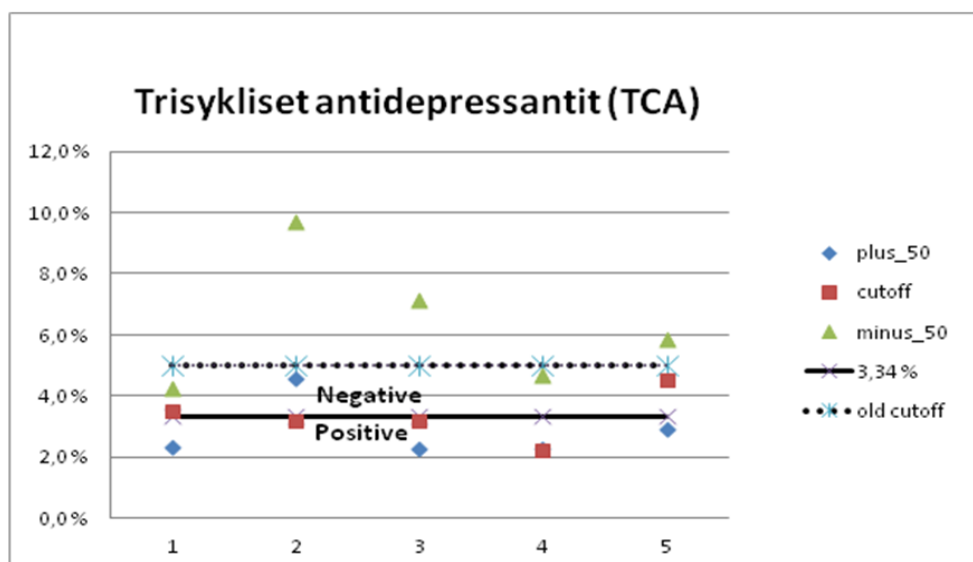
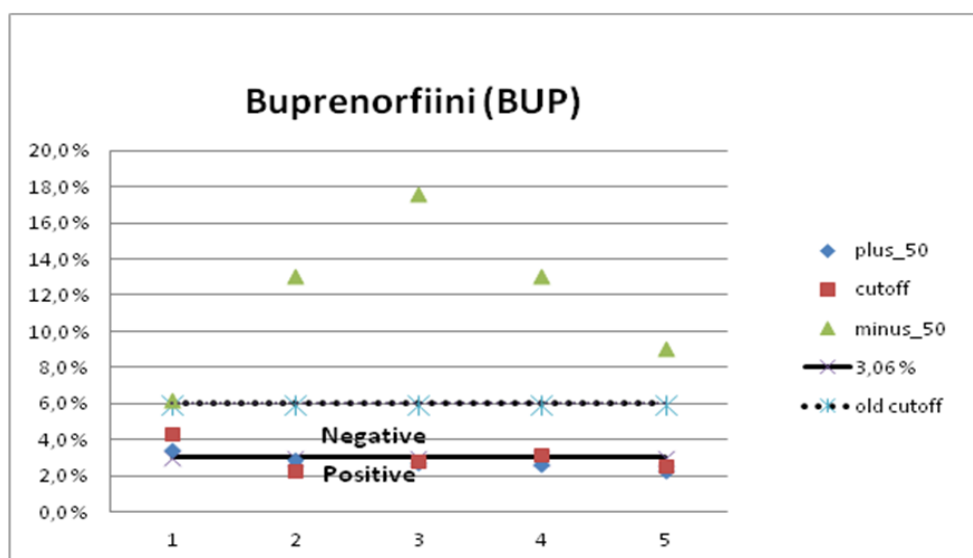


D



E

**F****G****H**

**I****J**