



SAVONIA

OPINNÄYTETYÖ - AMMATTIKORKEAKOULUTUTKINTO
SOSIAALI-, TERVEYS- JA LIIKUNTA-ALA

U-BUPRE-MENETELMÄN VERIFIOINTI JA TYÖOHJEET

TEKIJÄT:

Katja Salmi
Noora Räsänen

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Tutkinto-ohjelma Bioanalyytikon tutkinto-ohjelma	
Työn tekijät Katja Salmi ja Noora Räsänen	
Työn nimi U-Bupre-menetelmän verifiointi ja työohjeet	
Päiväys 2.5.2021	Sivumäärä/Liitteet 56/3
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Savonia-ammattikorkeakoulu ja Itä-Suomen laboratorokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä (ISLAB)	
Tiivistelmä <p>Huumausaineiden käytön jatkuva lisääntyminen edellyttää toimivia ja riittävän tarkkoja menetelmiä pienten huumausainepitoisuuksien havaitsemiseen virtsanäytteestä. Huumausaineanalytiikka kuuluu erikoiskemian osa-alueeseen ja on suotavaa päästä harjoittelemaan analysoinnin tekemistä laboratorioharjoitustunneilla. Huumausaineanalytiikassa hyödynnetään immunologisia menetelmiä, jotka perustuvat vasta-aineen ja anti-geenin välisiin immunologisiin reaktioihin.</p> <p>Toimeksiantaja opinnäytetyössä oli Savonia-ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida U-Bupre-menetelmä ja tehdä työohjeet sen suorittamiseen Savonia-ammattikorkeakoulun Indiko™ Plus -analyysaattorille opiskelijoiden kliinisen kemian laboratorioharjoitustunneille käyttöön. Opinnäytetyön tavoitteena oli antaa opiskelijoille tietoa huumausaineanalytiikassa käytettävistä menetelmistä ja niiden periaatteista. Verifiointi toteutettiin määrällisenä tutkimuksena vertaamalla Indiko™ Plus -analyysaattorin käyttämän CEDIA-menetelmän tuloksia ISLABin EMIT-menetelmän tuloksiin. Näytteet kerättiin talvella 2020 ISLABin toimesta ja analysoitiin oppilaitoksen tiloissa tammikuussa 2021. Näytteet ajettiin kolmena sarjana. Tulosten yhteneväisyyttä arvioitiin ja keskiarvoja verrattiin ISLABin tuloksiin.</p> <p>Tuloksia analysoitiin tilastollisin menetelmin laskemalla korrelaatiot, keskiarvot ja hajontakuviot laitteiden välisille tuloksille. Indiko™ Plus antoi toistettavia tuloksia vertailulaboratorion tulosten kanssa ja tuloksia voidaan pitää luotettavana. Menetelmä soveltuu opiskelijoiden käyttöön kliinisen kemian harjoitustunneille. Opinnäytetyön avulla voi perehtyä laajasti huumausaineanalytiikkaan.</p>	
Avainsanat buprenorfiini, Cobas, huumeselonta, Indiko™ Plus, työohje, verifiointi, kliininen kemia, huumeanalytiikka	

Field of Study Social Services, Health and Sports	
Degree Programme Degree Programme in Biomedical Laboratory Science	
Author(s) Katja Salmi and Noora Räsänen	
Title of Thesis U-Bupre method verification and work instructions	
Date 2.5.2021	Pages/Appendices 56/3
Client Organisation /Partners Savonia University of applied sciences and ISLAB	
<p>Abstract</p> <p>The constant increase in drug use requires efficient and sufficiently accurate methods for detecting low levels of drugs in a urine sample. Drug analytics belongs to the field of specialty chemistry and it is desirable to get to practice analysis in laboratory practice classes. Drug analysis utilizes immunological methods based on immunological reactions between antibody and antigen.</p> <p>The client in the thesis was Savonia University of Applied Sciences. The purpose of the thesis was to verify the U-Bupre method and to make work instructions for its performance on the Indiko™ Plus analyzer of Savonia University of Applied Sciences for use in students' clinical chemistry laboratory classes. The aim of the thesis was to provide students with information about the methods used in drug analysis and their principles. The verification was performed as a quantitative study by comparing the results of the CEDIA method used by the Indiko™ Plus analyzer with the results of the ISLAB EMIT method. Samples were collected in the winter of 2020 by ISLAB and analyzed at the institution's premises in January 2021. Samples were run in three series. The consistency of the results was assessed and the means were compared with the results of ISLAB.</p> <p>The results were analyzed by statistical methods by calculating correlations, means and scatter plots for the results between the devices. Indiko™ Plus gave reproducible results with the results of the reference laboratory and the results can be considered reliable. The method is suitable for use by students in clinical chemistry classes. With the help of the thesis, one can get acquainted with drug analysis extensively.</p>	
<p>Keywords buprenorphine, Cobas, drug screening, Indiko™ Plus, working instruction, verification, clinical chemistry, drug analysis</p>	

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	6
2	OPIOIDIT JA OPIOIDIRIIPPUUUS	7
2.1	Buprenorfiini ja sen toimintatavat elimistössä	7
2.2	Opioidiriippuvuus ja opioidireseptorit	8
3	MENETELMÄN VERIFIOINTI JA LAADUNVARMISTUS	10
3.1	Validointi ja verifiointi	10
3.2	Laadunvarmistus kliinisessä laboratoriossa	12
4	HUUMAUSAINEDIEN LABORATORIOTUTKIMUSPROSESSI	13
4.1	Terveydenhoidollinen ja valvonnallinen huumeettestaus	13
4.2	Laboratoriotutkimusprosessin vaiheet	14
4.3	Yleisimmät huumausainetutkimukset	16
5	ENSIVAIHEEN SEULONNASSA JA VARMISTUSANALYYSISSÄ KÄYTETTYJÄ MÄÄRITYSMENETELMIÄ	18
5.1	Immunologiset määritysmenetelmät	18
5.2	Varmistusanalyysin määritysmenetelmät	20
6	TUTKIMUKSESSA KÄYTETYT MÄÄRITYSMENETELMÄT	22
6.1	Käytetyt reagenssit	22
6.2	CEDIA-menetelmä	23
6.3	EMIT vertailumenetelmä	24
7	TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSKYSYMYKSET	26
8	TUTKIMUSMENETELMÄ JA TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	27
8.1	Kvantitatiivinen tutkimus	27
8.2	Näytteiden keruu ja käsittely	27
8.3	Tilastolliset menetelmät	28
8.4	Tutkimuksen eteneminen	30
9	TULOKSET	32
9.1	Analyysitulosten vertailu	32
9.2	Graafinen vertailu	33
10	POHDINTA	35
10.1	Tulosten tarkastelu	35
10.2	Tutkimuksen eettisyys ja luotettavuus	37

10.3 Ammatillinen kehittyminen	39
10.4 Jatkotutkimusaiheet ja johtopäätökset	40
LÄHTEET	41
LIITE 1: TYÖOHJEET	49
LIITE 2: ANALYYSIKOHTAISET TULOKSET NG/ML.....	53
LIITE 3: NÄYTEKOHTAISET LASKENNALLISET TULOKSET	55

1 JOHDANTO

Huumeiden yliannostuksesta johtuvat kuolemantapaukset ovat lisääntyneet aina 1980-luvulta vuoteen 2016 asti, ylittäen aseiden, HIV:n ja auto-onnettomuuksien aiheuttamat kuolemat (Petrides & Melanson 2019, 8–12). Lisääntynyt huumeiden käyttö Suomessa näkyy huumetestien määrän kasvuna. Huumemyrkytyskuolemien syynä ovat yleisimmin opioidit ja tärkein löydös huumemyrkytyskuolemissa on buprenorfiini, joka on vaikuttava aine Suomessa korvaushoidossa käytettävässä Suboxonessa sekä laittomasti ulkomailta tuodussa Subutexissa. Huumeiden väärinkäyttö kasvaa edelleen ja vuonna 2018 opioideihin liittyviä riippuvuuksia hoidettiin ennätysmäärä. Buprenorfiini oli toiseksi yleisin takavarikoitu huumausaine vuosina 2009–2018, mikä kertoo sen suosioista päihteiden väärinkäytössä. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2020, 56–57, 73–74, 80.)

Huumetestaus voidaan jakaa sekä terveydenhoidolliseen että valvonnalliseen huumetestaukseen. Terveydenhoidollista testausta käytetään diagnoosin ja erotusdiagnoosin saamisessa esimerkiksi myrkytyksissä ja ongelmakäytön varhaisessa tunnistamisessa ja hoidossa. Valvonnallista testaamista käytetään oikeuslääketieteellisissä tapauksissa sekä huumausaineiden väärinkäytön selvittämisessä. (Gunnar 2018.)

Savonia-ammattikorkeakoulu on ottanut opetuskäyttöön U-Bupre-tutkimuksen immunokemiallisella menetelmällä ja sen myötä on tullut tarve selvittää menetelmän käyttökelpoisuus ja luotettavuus oppilaitosympäristössä. Savonia-ammattikorkeakoulu tilasi Indiko™ Plus -analyysointilaitteen verifiointiin U-Bupre-menetelmälle sekä työohjeet bioanalytiikko tutkinto-ohjelman opiskelijoille työn suorittamiseksi harjoitustunneille. Kliinisen kemian analytiikkaan liittyvä aihe on yhteiskunnallisesti tärkeä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli verifioida U-Bupre-menetelmä ja tehdä työohjeet sen suorittamiseen Savonia-ammattikorkeakoulun Indiko™ Plus -analyysointilaitteille opiskelijoiden kliinisen kemian laboratorioharjoitustunneille käyttöön. ISLABilta saadut kliiniset asiakasnäytteet on analysoitu käyttäen kilpailevaa homogeenistä entsyymi-immunologista menetelmää (EMIT). Verifiointi toteutetaan verraten Indiko™ Plus -analyysointilaitteen tuloksia ISLABin Cobas6000 -analyysointilaitteella saatuihin tuloksiin. Opinnäytetyön tavoitteena oli antaa opiskelijoille tietoa huumausaineanalytiikassa käytettävistä menetelmistä ja niiden periaatteista.

2 OPIOIDIT JA OPIOIDIRIIPPUUUS

Opioidit ovat kipua lievittäviä ja ahdistuneisuuden tunnetta vähentäviä lääkeaineita, jotka tuottavat voimakasta mielihyvää eli euforiaa. Tästä syystä niitä käytetään myös päihtymystarkoituksessa. Opioidia määrätään usein voimakkaissa kiputiloissa sekä akuutin että pitkäaikaiseen kivunlievitykseen, kuten leikkauksien tai syövän aiheuttaman kivuliaisuuden hoitoon. Opioidit vaikuttavat kipua estävästi selkäytimessä, keskiaivoissa, aivorungossa ja aivokuorella sijaitsevien opioidireseptorien välityksellä. (Kalso, Paakkari & Forsell 2009, 20–24.)

Opioidit luokitellaan heikkoihin, keskivahvoihin ja vahvoihin opioideihin. Luokittelu perustuu niiden kemialliseen rakenteeseen, reseptoreiden toiminnalliseen vaikutukseen sekä kivunlievitykseen. Heikkoihin opioideihin kuuluvat kodeiini ja tramadoli. Ainoa Suomessa käytössä oleva keskivahva opioidi on buprenorfiini. Vahvoihin opioideihin lukeutuvat morfiini, oksikodoni, fentanyl, hydromorfon ja metadoni. (Kalso, Paakkari & Forsell 2009, 20–24.) Opioidi myrkytyksessä ja yliannostuksissa voidaan käyttää naloksonia, joka on opioidireseptoreiden antagonistiksi eli vasta-aine, joka kiinnittyy opioidireseptoreihin estäen niiden aktivoitumisen ja siten pelastaa yliannostuksen aiheuttamalta hengityskatkokselta (National Institutes of Health 2020).

2.1 Buprenorfiini ja sen toimintatavat elimistössä

Buprenorfiini on puolisynteettinen opioidikipulääke, joka on oopiumin komponentista tebainista johdettu. Buprenorfiini muistuttaa rakenteellisesti morfiinia, mutta sillä on sekä antagonistisia että agonistisia ominaisuuksia ja buprenorfiinin vaikutusaika on pidempi kuin morfiinilla (Thermo Fisher 2018). Agonistinen lääkeaine vaikuttaa sille spesifisen reseptorin välityksellä (Duodecim 2020). Buprenorfiini kuuluu keskivahvoihin opioideihin ja sillä on sekä kipua lievittäviä että euforiaa tuottavia vaikutuksia. Sitä käytetään muun muassa vaikeiden syöpäkipujen hoidossa sekä yhdistelmävalmisteena opioidiantagonisti naloksonin kanssa opioidiriippuvaisten henkilöiden vieroitus- tai korvaushoidossa. Niiden vaikutukset välittyvät opioidireseptoreiden kautta. Buprenorfiinin kivunlievitys perustuu sen sitoutumiskykyyn keskushermoston kivun aistimusratoihin ja perifeeristen tuntohermojen opioidireseptoreihin. Mesolimbisen dopamiinirata on hermorata, joka ulottuu keskiaivoista etuivoihin. Sen hermosolut vapauttavat päätteistään dopamiinia, eli keskushermoston välittäjäaineita, ja tämän uskotaan olevan keskeinen riippuvuuksien kehittymisessä (Aalto, ym. 2018). Euforiaa tuottavat ja riippuvuutta edistävät vaikutukset perustuvat siis mesolimbisen dopamiiniradan aktiivisuuden lisääntymiseen epäsuorasti opioidireseptorien välityksellä. (Joutsa & Kianmaa 2018.)

Buprenorfiinin lääkevalmisteiden kauppanimiä ovat Buprefarm, Buprenophine, Norspan, Subuxone, Subutex ja Temgesic. Buprenorfiinin Suomessa käytettyjä lääkevalmisteita ovat yleisimmin Temgesic ja buprenorfiinin sekä naloksonin yhdistelmävalmiste Suboxone. Nämä ovat resoritabletteja eli ne liukenevat kielen alla, jolloin vaikuttava aine imeytyy suun limakalvojen kautta elimistöön. Sublinguaalisen lääkkeen antotavan lisäksi buprenorfiinia voidaan käyttää transdermaalisesti laastarin muodossa, jolloin lääkeainetta vapautuu elimistöön ihon kautta säädellysti. Kyseiset lääkevalmisteet ovat myös yleisimmin käytettyjä opioideja suomalaisten huumeidenkäyttäjien parissa. Päihdekäytössä buprenorfiinia käytetään usein suoneen injektoimalla eli pistämällä. Buprenorfiini voi väärinkäytet-

tynä aiheuttaa suoniin erilaisia vaurioita ja tulehduksia, sillä siinä esiintyy muun muassa maissitärkkelystä ja erilaisia sidosaineita. Sidosaineet voivat injektoidessa aiheuttaa vakavia silmänpohjan muutoksia, joiden seurauksena voi olla näkökyvyn heikentyminen. Toinen väärinkäyttötapa on annostella ainetta nenän limakalvojen kautta, mutta limakalvot ovat herkkiä ja ne voivat myös vaurioitua. (Hietalahti, Niinivaara & Koivunen 2015.)

Subutex on korkeamman annoksen buprenorfiinivalmiste, joka on laajasti käytössä sekä Euroopassa että muualla maailmassa opiaattiriippuvaisten korvaushoitona. Buprenorfiinin yliannostukseen voi kuolla, kun sitä käytetään laskimonsisäisesti yhdessä muiden psykotrooppisten lääkkeiden kanssa. (Thermo Fisher 2018.)

CYP3A4-entsyymien saadessa aikaan N-dealkylaation buprenorfiini metaboloituu sen aktiiviseksi aineenvaihduntatuotteeksi norbuprenorfiiniksi maksassa ja ohutsuolessa. Muuttumaton buprenorfiini ja sen metaboliitit eli aineenvaihduntatuotteet erittyvät 30-prosenttisesti virtsaan ja 70-prosenttisesti ulosteeseen. (John, Renner, Levounis & LaRose 2017, 42–45.) Buprenorfiini voidaan osoittaa virtsasta pikatestillä tai muulla immunologisella analyysillä 1–7 vuorokauden kuluessa sen käytöstä, mutta pitkäaikaisessa korkean annoksen käytössä se voi näkyä jopa 21 vuorokautta (Gunnar 2018).

2.2 Opioidiriippuvuus ja opioidireseptorit

On kolme erilaista opioidireseptoria, joiden kautta opioidien vaikutukset välittyvät: myy- (μ), delta- (δ) ja kappa-reseptoreiden (κ), jotka voidaan jakaa vielä alaryhmiin (Kalso 2018). Opioidireseptorit sijaitsevat mesolimbisissä dopamiinisoluja hermottavien GABA-välitteisten hermosolujen kalvoilla sekä radan alkukohdassa keskiaivojen tegmentumin alaosassa, että accumbes-tumakkeen päätealueella (Joutsa & Kiiänmaa 2018). Accumbes-tumake on etuaivoissa ja sillä on keskeinen osa riippuvuuksien kehittymisessä (Aalto, Alho & Niemelä 2018). Opioidireseptoreiden olemassaolo on löydetty erilaisilla sitoutumiskokeilla vuonna 1973. Buprenorfiini on myyreseptorin osittaisagonisti, eli se aktivoi reseptorin vain osittain ja tämän vaikutuksen ansioista lääkettä on turvallista käyttää. (Kalso 2018.)

Riippuvuuden kehittymiseen vaikuttavat sosiaalisen ympäristön laatimat arvot ja rajat sekä geneettinen alttius. Riippuvuuden kehittymisen kannalta keskeisiä ovat keskushermostovaikutukset. Opiaattiriippuvuuden syntymiseen ja sen säätelyyn osallistuvat aivojen eri alueilla hermosolujen sisäiset ja hermojärjestelmien väliset toiminnat. Opioidireseptoreiden myyreseptorit (μ) ovat keskeisessä osassa opioidien aiheuttamaan riippuvuuteen sekä fyysisiin vieroitusoireisiin. Reseptorialatyyppien merkitys riippuvuuden aiheuttamisessa on vielä epäselvää. (Meririnne & Seppälä 2004.)

Opioidiriippuvuuden hoidossa onnistunut lääkitys muodostaa tärkeän osan potilaan hoitoa. Solunsisäiset ja hermosolujen väliset järjestelmät osallistuvat keskushermostossa opiaattiriippuvuuden välittämiseen ja säätelyyn. Opioidien käytön kontrolloinnin vaikeutta selittää se, että käyttäjä tietää käytöstä tulevat haitat, mutta elimistössä ilmenevien yhteistoiminnan käytäntöjä sekä niistä tulevaa merkitystä opiaattiriippuvuuden eri vaiheissa ei vielä kunnolla ymmärretä. Säännöllisen käytön lopettaminen voi aiheuttaa vatsakipua, ripulia, pahoinvointia ja oksentelua sekä flunssankaltaisia oireita. Lihaskouristuksia ja lihaskipuja levottomuuden ja masennuksen ohella esiintyy myös usein. (Meririnne & Seppälä 2004.) Toistuva opiaattialtistus voi muuttaa pysyvästi hypotalamus-aivolisäkelisämunuaisjärjestelmän (HPA-järjestelmä) toimintaa. HPA-järjestelmää hypotalamuksessa säätelee

kortikotropiinia vapauttava neuropeptidi, joka on elimistön stressireaktiota välittävä keskeinen tekijä. Opioidiriippuvuuden kannalta keskeisiltä limbisiltä aivoalueilta löytyy myös kyseistä neuropeptidiä. (Logrip, Koob & Zorrilla 2001.)

Vieroitusoireiden aikana opioidien vaikutuksen puuttuessa hermosolujen toiminta yliaktivoituu, koska opioidien vaikutus on usein estävä yksittäistä hermosolua kohden. Tässä tilanteessa välittäjäaineita vapautuu enemmän ja voidaan puhua katekoliaminergisestä kriisistä. Katekoliamiini on noradrenaliini ja se on useimmiten liitetty opioidien vieroitusoireisiin. Klonidiini on vieroitusoireita lievittävä lääkeaine, jonka vaikutus perustuu noradrenergisen aktiivisuuden vähentämiseen (Merinne & Seppälä 2004.)

3 MENETELMÄN VERIFIOINTI JA LAADUNVARMISTUS

Akkreditoitu kliininen laboratorio täyttää kansainvälisiin kriteereihin perustuvat laadunvarmistusmenettelyt, joilla voidaan osoittaa tutkimustulosten oikeellisuus ja vertailukelpoisuus. Akkreditointia eli pätevyyden toteamista voi hakea Suomessa FINAS-akkreditointipalvelusta, jonka palveluista on säädetty laissa 920/2005 Laki vaatimustenmukaisuuden arviointipalvelujen pätevyyden toteamisesta. Kaikki suurimmat kliiniset laboratoriot Suomessa ovat akkreditoituja. (FINAS 2016.)

Laadukas toiminta ohjaa laboratoriossa työskentelyä ja se on alati huomion kohteena. Suurimmalla osalla laboratorioista on käytössä laatukäsikirjat, joissa eritellään laboratorioprosessin sisältö kyseisen yksikön tarpeiden ja toiminnan mukaisesti. Henkilökunnan tulee noudattaa laboratorion työ- ja toimintaohjeita niin työturvallisuuden, laitteiden toiminnan kuin luotettavien tutkimustulosten saannin kannalta. (Grönroos & Koskinen 2014.)

3.1 Validointi ja verifiointi

Validointi eli oikeellisuus ja tulostason tarkistus tarkoittavat kelpuutusta ja se perustuu objektiivisen näytön varmistumiseen siitä, että tietynlaista soveltamista tai käyttämistä koskevat säännökset on täytetty (SFS-EN ISO 15189). Uuden menetelmän sopivuus ja kyky suoriutua haluttuun käyttötarkoitukseen osoitetaan validoinnissa. Validoinnissa käyttöön valittua testiä verrataan laboratoriomenetelmään, jonka tulotason ero kansainväliseen referenssitason tunnetaan ja jonka toistotarkkuus sekä oikeellisuus ovat vertailumenetelmäksi riittäviä. (Labquality 2020.) Lisäksi varmennetaan, että testitulokset täyttävät lain ja säännöksen vaatimukset sekä ovat oikeanlaisia. Menetelmän ja laitteen toimivuutta sekä suorituskykyä arvioidaan tiettyyn käyttötarkoitukseen. Nämä vaatimukset tulee asettaa tapauskohtaisesti, sillä ne vaihtelevat menetelmän ja käyttötarkoituksen mukaan. Validoinnin vaiheisiin kuuluu validointisuunnitelma, mittaukset, tulosten tilastollinen arviointi ja dokumentointi. Menetelmän luotettavuutta kuvataan tuottamalla vertailuarvoja erilaisilla parametreillä. (Hägg 2016, 7–18.)

Thermo Fisher on validoinut opinnäytetyössämme käytetyn CEDIA-menetelmän. Validoinnissa näytteisiin lisättiin buprenorfiinia virtsaan, jossa lääkeainetta ei ollut, raja-arvolla sekä 25 %, 50 %, 75 % ja 100 % raja-arvon ylä- ja alapuolella, ja tämä testattiin kvalitatiivisesti ja puolikvalitatiivisesti CLSI-protokollaa (Clinical Laboratory and Standards Institute) hyödyntäen. Näytteet testattiin kahdesti kaksi kertaa päivässä 20 päivän ajan eli yhteensä 80 kertaa. Virtsanäytteitä oli 153 kappaletta ja ne analysoitiin CEDIA Buprenorphine II Assay -menetelmällä ja tuloksia verrattiin LC-MS/MS-menetelmään. (Thermo Fisher 2020.)

Verifiointi eli toimivuuden varmentaminen on objektiivisen näytön osoittamista siitä, että tietty kohde täyttää asetetut vaatimukset. Mittausmenetelmän ollessa jo käytössä ja validoituna muualla valmistajan puolesta, verifiointi suoritetaan käyttöönotettaessa tämä menetelmä. Verifiointi tulee suorittaa myös silloin, kun aiemmin validoituun menetelmään tehdään muutoksia esimerkiksi tietojärjestelmissä, näytematriisissa, laitteissa tai näytteen käsittelyssä. (Hägg 2016, 7–18.) Verifiointi voidaan suorittaa esimerkiksi varmennetun vertailumateriaalin avulla. Näytemateriaaliksi tulee valita sama näytelaatu kuin verrattavaan menetelmään käytetty näytemateriaali. Verifiointiin valittujen potilas-

näytteiden tulee olla diagnostisessa mielessä sellaisia, että ne sopivat käyttötarkoitukseen. Tutkimuksessamme näytelaatuna on virtsa, josta tutkitaan buprenorfiinia. Verifiointin suorittamisen keskeisinä käsitteinä yleensä toimii menetelmän herkkyys, mittausalue, mittausepävarmuus, tarkkuus, toistettavuus ja spesifisyys.

Pienten vaihtelujen havaitseminen ja toteaminen tutkittavien analyttien eli tutkittavien aineiden pitoisuuksissa asetetussa näyttemateriaalissa kertovat menetelmän herkkyydestä. Tämä on ominaisuutena keskeistä, kun menetelmiä vertailee toisiinsa. Kemiallisissa menetelmissä tämä perustuu suoran kulmakertoimen käyttämiseen lineaarisessa kalibroinnissa. Kalibraatiosuoran jyrkkyys kertoo menetelmän herkkyydestä. Herkässä menetelmässä, pienikin muutos pitoisuudessa johtaa suureen muutoksen vasteeseen. (Hägg 2016, 21.)

Analyytin pitoisuusalue tai suureen vaihtelualue tarkoittaa menetelmän mittausaluetta, jossa käyttötarkoitukseen asetetulle tarkkuudelle voidaan tätä käyttää. Pitoisuusalueen ollessa hyvä, on kalibrointisuora lineaarinen. Mittausalueen alussa on rajaavana elementtinä menetelmän toteamis- tai määrittäysraja ja lopussa taas mittalaitteen kyvykkyys observoida analyytin pitoisuuden tai suureen vaihtelua. Mittausalueeksi otetaan tavallisesti lineaarinen alue ja alhaisempaa pitoisuutena on menetelmän luotettavasti saatu määrittäysraja. Eri pitoisuuksilla tehdyt useat mittaukset standardiyhdisteillä määrittävät lineaarisen alueen. Lineaarisuus päätellään regressiosuorasta. Kemiallisissa menetelmissä käytetään mittanormaaliliuoksia eli standardiliuoksia, vakioliuoksia ja kalibraattoreita, joiden pitoisuudet tunnetaan. Mittausalue voi olla suurempi kuin lineaarinen alue tai se voidaan erotella eri alueisiin. (Hägg 2016, 23.)

Mittausepävarmuudella esitetään mittaustulosten muuttuvuutta ja se on asetettu raja-arvojen avuun. Näyteprosessin eri vaiheissa tapahtuneet virheet vaikuttavat menetelmän epävarmuuteen. Siinä asetetaan rajat, jonka välillä oikea arvo on. Tämä muodostuu mittauksessa olevasta systemaattisesta ja satunnaisesta virheestä. Satunnaista virhettä kuvaa sisäinen toistotarkkuus ja välitason toistotarkkuus, kun taas systemaattista virhettä kuvaa menetelmän oikeellisuus. Satunnaisella hajonnalla on pieni vaikutus analyysissä. (Hägg 2016, 23–24.)

Tarkkuuteen liittyvät virheet jaotellaan systemaattisiin virheisiin ja satunnaisvirheisiin. Satunnaisvirheitä voidaan alentaa toistamisen avuun, mutta systemaattinen virhe antaa aina nollasta eroavan luvun. Tavoitteena menetelmän käyttöönotossa on, ettei systemaattisia virheitä tapahtuisi ja satunnaisvirheen luku on niin pieni kuin mahdollista. (Hägg 2016, 31.)

Toistettavuus on saatujen tulosten välinen samankaltaisuus (Hägg 2016, 31). Toistettavuutta voidaan mitata näytteiden, standardiliuosten ja nollanäytteiden analysoinnin avuun. Nollanäytteitä tulee käyttää siinä tilanteessa, kun halutaan tarkastella hajontaa lähellä raja-arvoa olevista pitoisuuksista. (Heikkilä 2014.) Luotettavuutta lisää se, kun määrittäykset toteutetaan lyhyen ajan sisällä samankaltaisessa laboratorioympäristössä samalla analysaattorilla, satunnaisessa järjestyksessä, samasta näyttemateriaalista, samalla menetelmällä ja samojen tekijöiden tekemänä. Samaa pitoisuutta ei tule määrittää peräkkäisinä näytteinä. Toistettavuutta osoitetaan suorittamalla rinnakkaismäärittäyksiä eri pitoisuuksia omaavilta näytteiltä. Pitoisuuksien keskiarvo määritetään näytteiden tuloksista. (Hägg 2016, 31.)

Menetelmän spesifisyys tarkoittaa sitä, että se antaa vasteen vain tutkittavalle yhdisteelle tai analyysille häiritsevästä elementeistä riippumatta. Kaikilla menetelmillä on omat spesifisyyteen vaikuttavat ongelmat, joten menetelmän hyvä tuntemus on olennaista analyysien suunnittelussa ja tekemisessä. Esimerkkinä kromatografiset menetelmät, sillä ne eivät ole spesifisiä. Analyysin alussa voi määrittää nollanäytteitä tai näytematriiseja, joissa ei ole tutkittavaa yhdistettä. Seuraavaksi määritetään analyysin pitoisuus sekä mahdollisuuksien mukaan samanlaisia yhdisteitä, mitkä voivat olla analyysissä ja jollain tavalla häiritä sitä. Näytemateriaalissa mahdollisten yhdisteiden takia ei täysin onnistunutta spesifisyyttä saavuteta. Tässä on hyväksyttävä selektiivisyys ja sen ollessa tarpeeksi riittävä aiottuun käyttötarkoitukseen voidaan prosessia jatkaa. Muussa tapauksessa menetelmää ei voi hyväksyä ja tätä on korjattava. Mahdolliset häiriötekijät ja niiden vaikuttavuus menetelmään tulee selvittää. (Hägg 2016, 30.)

3.2 Laadunvarmistus kliinisessä laboratoriossa

Sisäisellä ja ulkoisella laadunvarmistuksella tarkkaillaan menetelmän toimivuutta. Laadunvarmistukseen sisältyy laaduntarkkailu, laadunauditointi ja laboratorion asiantuntijoiden laaduntarkkailun seurannat. Nämä pitävät sisällään erilaisia toimenpiteitä ja niiden yhteisenä tavoitteena on varmistaa, että määritelty laatutaso on kelvollinen ja se saavutetaan. Laaduntarkkailuohjelmistoihin on määritetty jokaiselle tutkimukselle omat säännöt, joita ohjelmisto käsittelee ja reagoi mikäli tulos ei vastaa laatukriteereihin asetettuja arvoja. (Grönroos & Koskinen 2014.)

Sisäisessä laaduntarkkailussa toimintaa kontrolloidaan, kontrollien tuloksia arvioidaan ja jos näistä seuraa toimenpiteitä, niihin reagoidaan. Laaduntarkkailussa kaupallisten kontrolliliuoksien taso tunnetaan ja ne ovat ilmoitettuna, mutta vaihteluväli voidaan määritellä joissain laboratoriossa myös itse. Kontrollitulosten arviointiin kuuluu lisäksi määrittämiseen käytettävien reagenssien ja laitteen luotettavan toiminnan varmistus. Kontrollimäärittäykset tulee tehdä hyväksytysti ennen potilasnäytteen määrittäystä. Kontrollitiheys määritellään potilasnäytteiden analysointi tiheyden mukaan. (Labquality 2020) Tämän lisäksi laboratoriot osallistuvat laadunvarmistusohjelmiin, jotka sisältyvät ulkoiseen laaduntarkkailuun. Ohjelmassa tutkitaan laaduntarkkailunäytteitä ja verrataan yksikössä saatuja tuloksia ulkopuolisista laboratorioista saatuihin tuloksiin. Ohjelman tulosraportista ja mahdollisista korjaavista toimenpiteistä vastaa laboratorion asiantuntija, kuten esimerkiksi kemisti. Tällä katsotaan, että tulos-
tasot vastaisivat toisiaan samaa menetelmää käyttäessä sekä laitteiden ja reagenssien toimivuus tutkimusta analysoitaessa. (Grönroos & Koskinen 2014.)

4 HUUMAUSAINOIDEN LABORATORIOTUTKIMUSPROSESSI

Huume-testaus on tehokas keino seurata määrättyjen lääkeaineiden käyttöä ja mahdollista väärinkäyttöä sekä hoitomyyntyvyyttä vieroitushoidon aikana (Petrides & Melanson 2019, 8–12). Huume-testauksen tavoitteet ja käyttötarkoitukset tulee ottaa huomioon testausta suunniteltaessa. Selvitetään, onko tavoitteena saada selville päihtymystila vai päihteiden käyttö pidemmältä aikaväliltä. Huume-testin sisältö riippuu testin käyttötarkoituksesta. Selvitetäänkö yksittäisiä aineita ja tarvitaanko tulos nopeasti. Lisäksi näyttemateriaalin valinta riippuu testin luonteesta sekä siitä mitä halutaan testillä selvittää. Virtsasta tehtävän tutkimuksen perustella ei voida päätellä huumausaineenpitoisuutta tai vaikutusta elimistössä näytteenottohetkellä, joten mittaus tulee tehdä kvalitatiivisesti. Verestä tehtävän tutkimuksen perusteella voidaan arvioida elimistössä olevan aineen määrää sekä käytettyjä annoksia. (Leinonen 2018, 28–30.)

Virtsa on yleisin käytetty näyttemateriaali huume-seulonnessa. Huumausaineet tai niiden aineenvaihduntatuotteet voivat näkyä useista päivistä jopa viikkoihin virtsassa, joten mahdollinen käyttö näkyy pitkältä aikaväliltä. Veri- ja sylkinäytteitä käytetään useimmiten akuutin käytön toteamiseen, sillä huumeiden toteamisaika näissä on lyhyt. (Lillsunde 2019.) Plasmasta, verestä ja syljestä on todettavissa huumausaineita joitakin nanogrammoja millilitrassa enintään muutaman vuorokauden ajan. Veri- ja sylkinäytteet kuvaavat äskettäistä huumeiden käyttöä paremmin ja niiden valvominen on helpompaa kuin virtsanäytteen. Pisimpään huumeet ovat todettavissa hiuksista. (Pil & Verstraete 2008.) Huume-testejä voidaan lisäksi tehdä myös ihokarvoista, hengitysilmaasta ja hiestä (Leinonen 2018, 28–30).

Laboratorion tulee valita paras mahdollinen huumausaineanalytiikkaan soveltuva menetelmä. Kvalitatiiviset eli laadulliset tulokset (positiivinen tai negatiivinen) antavat usein riittävästi tietoa, mutta positiivinen tulos tulee aina varmistaa varmistusanalyysillä. Kvantitatiivinen eli määrällinen tulos antaa mahdollisuuden tutkia kreatiniinin määrän, erottaa aineenvaihduntatuotteet ja lääkeaineen epäpuhtaudet sekä määrittää nautitun lääkeaineen ja sen pitoisuus numeerisesti. Esimerkiksi potilailta, joille on määrätty buprenorfiinia, voidaan seurata buprenorfiinin ja sen metaboliitin norbuprenorfiinin suhdetta. (Petrides & Melanson 2019, 8–12.) Päivystykselliset tutkimukset käyttävät usein immunologisia menetelmiä. Pikatestien käyttö huumausaineiden tutkimiseksi on yleistynyt vuoden 2010 alusta alkaen. (Pil & Verstraete 2008.)

4.1 Terveydenhoidollinen ja valvonnallinen huume-testaus

Huumeiden laboratoriotestaaminen jaetaan terveydenhoidolliseen ja valvonnalliseen testaukseen. Terveydenhoidollisessa testauksessa selvitetään potilaan diagnoosi tai erotusdiagnoosi. Valvonnallinen testaus sisältää joko työpaikkojen päihdeohjelmaan, sosiaalitoimen vapaaehtoisuuteen perustuvaan tai hallintopakoon, johon kuuluu muun muassa lastensuojelu, mielenterveyslaki, vankeinhoito, rikosepäilyt ja puolustusvoimat, liittyvää testaamista. Työelämässä tehtäviä huume-testejä tehdään yleensä rekrytoinnin yhteydessä työnhakijoille tai epäiltäessä päihteiden väärinkäyttöä tai päihderiippuvuutta. Työterveyshuollon testeille on asetettu erityisvaatimuksia mahdollisten sosiaalisten ja taloudellisten seuraamusten takia. (Niemelä & Pulkki 2010, 351–357.)

Terveydenhoidollisia huumetestejä tehdään tilanteissa, joissa huumeidenkäyttöä epäillään potilaan oireiden syyksi. Testaamisen tulee aina edistää potilaan hoitoa. Tällaisia tilanteita ovat esimerkiksi myrkytykset, psykiatriset sairaudet, potilaan taudinmääritys tai hoidon seuranta. (Niemelä & Pulkki 2010, 351–357.) Näihin tilanteisiin ei tulisi liittyä sosiaalisia, taloudellisia tai oikeudellisia seuraamuksia. Rajatuissa tapauksissa voidaan testauksessa käyttää kevyempääkin menettelyä, jos sillä on potilaan terveydentilan kannalta edistävää vaikutus. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2020.)

Työelämän huumetestien tekemistä määrittää Valtioneuvoston asetukset ja Sosiaali- ja terveystieteiden ministeriön suositukset (Valtioneuvoston asetus huumausainetestien tekemisestä 218, 2005). Nämä sisältävät tarkat ohjeet koko testausprosessista, muun muassa lähetteet ja todistukset, testaukseen osallistuvien henkilöiden pätevyysvaatimukset, näytteenoton suorittamisen, analysoinnin ja tulosten tulkin. Koska testitulokset voi vaikuttaa potilaan henkilökohtaiseen elämään, tulee testausprosessin olla ehdottoman luotettava. (Leinonen 2018, 28–30.) Terveydenhoidollisista huumetestauksista ei ole erillistä lainsäädäntöä, mutta suosituksia ja ohjeita löytyy (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2015). Käypähoito suosituksesta löytyy tietoa testaukseen soveltuvista näytematriiseista, näytteenotosta, testausmenetelmistä, tulosten vastaamisesta, tulkitsemisesta sekä dokumentoinnista (Huumeprobleemien hoito: Käypä hoito -suositus, 2018).

4.2 Laboratoriotutkimusprosessin vaiheet

Huumausaineiden laboratoriotutkimusprosessi sisältää preanalyttisen, analyttisen ja postanalyttisen vaiheen. Jokainen vaihe vaikuttaa omalla tavallaan tutkimustuloksen laatuun ja luotettavuuteen. Preanalyttinen vaihe sisältää kaikki ne työvaiheet, jotka tapahtuvat potilaalle tai tutkittavalle näytteelle ennen sen analysointia. Tässä tapahtuvat virheet voivat johtaa vääriin tutkimustuloksiin. Valvonnallisen huumetestauksen suorittavilta ammattihenkilöiltä edellytetään perehtyminen huumetestaukseen ja kirjallinen dokumentti sen suorittamisesta. Pääsääntöisesti huumetestauksen edellytyksenä on siihen osallistuvan henkilön suostumus. Poikkeustilanteita ovat päivitykselliset tutkimukset, joissa turvataan potilaan terveydentila. (Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2015.) Henkilöllisyys tulee aina todentaa kuvallisesta voimassa olevasta henkilöllisyystodistuksesta tai saattajan toimesta. Jos kuvallista henkilötodistusta ei ole, tulee tämä merkata lähetteen tietoihin. Tulostetuista tutkimusnäytetarroista tarkistetaan henkilöllisyys uudelleen pyytämällä näytteenantajan kertomaan oma nimensä ja henkilötunnuksensa. Tutkimukseen osallistuvan tulee olla tietoinen tutkimuksen sisällöstä ja näytteenannon kulusta. (ISLAB 2016.)

Valvonnallinen virtsanäytteenanto tulee suorittaa sille laaditun ohjeistuksen mukaisesti. Virtsanäytteenantoon käytetään siihen soveltuvaa tilaa, jossa tulee huomioida muun muassa yksityisyyden suoja, työturvallisuus ja näytteen mahdollisen manipuloinnin ehkäisyn toimenpiteet. Näytteenotto- tarvikkeet valitaan tutkittavan testin mukaan näytteenantajan nähden ja tämän itse valitsemana, jolla todetaan niiden koskemattomuus. Näytteen kelpoisuus tarkistetaan heti tai viimeistään neljän minuutin sisällä näytteen antamisesta lämpötilaindikaattorista. Lämpötilan tulisi olla 32–38 asteen välillä. Virtsan koostumusta ja väriä katsotaan silmämääräisesti, ja jos siinä havaitaan jotain poikkeavaa, tulee tämä kirjoittaa läheteeseen. Virtsa siirretään testin mukaisiin näyteputkiin, jotka sietäviä. (ISLAB 2016.)

Huumausainetutkimuksiin liittyvä laboratoriotutkimusprosessin analyttinen vaihe sisältää näytteen analyysin suorittamisen ja siihen liittyvän laadunvarmistuksen. Käytössä tulee olla analyysin suorittamiseen soveltuvat menetelmät, joista voidaan tarkkailla myös laboratorioden välistä tulosten yhteneväisyyttä. Menetelmien suorituskyvyn tulee vastata tutkimuksen tarvetta eli tarvitaanko päivystyksellisesti nopea tulos vai kenties varmistustulos, joka voi vaikuttaa potilaan henkilökohtaiseen elämään. Lisäksi suorituskyky käsittää sen, kuinka paljon tietyn tyyppisiä tutkimuksia tehdään ja keskitetäänkö tutkimukset tietyille tekopäiville. Analyysin suorittaa koulutettu henkilökunta, joka ymmärtää ja osaa käyttää laboratorion käytössä olevia laitteita ja menetelmiä potilastutkimuksiin. Laitteiden tulee olla asianmukaisesti huollettuja ja tilojen vastata analytiikan tarpeita. Virhelähteiden aikainen tunnistaminen estää virheiden tapahtumisen. Analyttisessä vaiheessa virheitä sattuu noin 7–13 % kaikista laboratoriotutkimusprosessin virheistä. Analytiikan virhelähteistä yleisimpinä pidetään näyteputkien sekoittumista ja analyttistä virhettä esimerkiksi näytteen väärin suoritettu esikäsittely sekä laitteen tai henkilön tekemää laskentavirhettä. (Niemelä & Pulkki 2010, 351–357.)

Huumausainetutkimuksiin liittyvään laboratoriotutkimusprosessin postanalyttinen vaihe sisältää kaiken sen, mitä tapahtuu analysoinnin jälkeen. Tähän sisältyvät tuloksen tarkastelu ja sen hyväksyminen, tuloksen välittäminen eteenpäin tilaajalle, tuloksen dokumentoinnin ja arkistoinnin, näytteiden säilyttämisen mahdollista uusinta- tai jatkotutkimuksia varten, hoitohenkilökunnan tulkinnan tuloksesta ja sen arviointi. (Tuokko, Rautajoki & Lehto 2009, 7–13.) Näytteiden analysoijan tulee osata arvioida tuloksen oikeellisuutta ja luotettavuutta. Laboratorioissa voi olla käytössä autovalidointi eli automaattinen lukija tarkistaa myös tuloksen. Postanalytiikkaan liittyviä poikkeamia tapahtuu noin 10–20 % kaikista laboratoriotutkimusprosessiin liittyvistä virheistä. Yleisiä virheitä ovat muun muassa tuloksen kirjausvirhe, joka voidaan välttää tarkistamalla laitteen antamat tulokset. Potilaan lääkähoidon tulee olla tiedossa, ettei näytteitä lähetetä turhaan varmistusanalyysiin. Raskaus ja vuorokaudenaika ei suoraan vaikuta huumeanalytiikan tutkimustuloksiin. Tutkittavan huumeaineen ottamisen ajankohta vaikuttaa yksilöllisen aineenvaihdunnan myötä. Tutkimusmenetelmän ja viitearvojen tulee olla oikeat ja arvioidaan, soveltuuko kyseinen tutkimus käyttötarkoitukseensa. (Niemelä & Pulkki 2010, 351–357.)

Lääkeaineiden keskinäinen vuorovaikutus, geneettinen vaihtelu, farmakokinetiikka ja lääkeainevaihdunta ja puhdistuma sekä potilaan kliininen tila ovat muuttujia, jotka voivat vaikuttaa lääkeaineden ja metaboliittien pitoisuuksiin virtsasta. Kvantitoinnin alaraja sekä havaitsemisen alarajat helpottavat huumeiden väärinkäytön havaitsemisessa. Se vähentää vääriä negatiivisia tuloksia muun muassa laimennetuissa virtsoissa tai matriisivaikutuksissa. Opioidien metabolian ymmärtämisen ongelmat ja immunomääritysten ristireagointi vaikeuttaa huumeiden tulkintaa virtsasta. (Petrides & Melanson 2019, 8–12.) Ristireagointi syntyy tietyn tutkitun aineen samankaltaisen yhdisteen takia (Duodecim 2020).

Huumeainediagnostiikassa lääkeaineiden testauksella on tärkeä rooli laillisen- ja laittoman huumeidenkäytön seurannassa sekä oikeudellisessa ja kliinisessä tarkoituksessa. Suurin diagnostiikan ongelma on virtsan manipulointi kemiallisilla aineilla väärän negatiivisen tuloksen tuottamiseksi. (Fu 2016.) Kotitalouskemikaaleja, kuten valkaisuainetta, pöytäsuolaa, pyykinpesuainetta, etikkaa, sitruu-

namehua ja silmätippoja käytetään virtsanäytteen tuloksen väärentämiseen (Dasgupta 2007). Lisäksi on myös useita kaupallisia aineita, joita on saatavilla helposti internetin kautta. Nämä aineet voivat mitätöidä seulontatutkimuksen tuloksen, varmistustuloksen tai jopa molemmat. Tämän torjumiseksi lääkeainelaboratoriot ovat kehittäneet useita menetelmiä virtsanäytteen manipuloinnin havaitsemiseen. (Fu 2016.) Näitä ovat kreatiniini, pH, lämpötila ja ominaispaino. Joitain manipulaatioon käytettyjä aineita, kuten silmätippoja, ei kuitenkaan voida näillä testeillä havaita. Ne peittävät huumausaineen ja pitoisuuksien tulokset ovat negatiivisia. (Dasgupta 2007.)

Huumetestien tuloksia tulee pääsääntöisesti tulkita terveydenhuollon ammattihenkilö tai tarvittaessa riittävän perehdytyksen saanut henkilö, jonka tulee ymmärtää testaukseen tavallisesti liittyvät virhelähteet. Lopuksi lääkäri arvioi, mistä positiivinen tulos johtuu. Edellytyksenä arvioinnille on riittävä huumeiden farmakologian ymmärtäminen sekä käytettyjen tutkimusmenetelmien ominaisuuksien tuntemus. (Leinonen 2018, 28–30.)

4.3 Yleisimmät huumausainetutkimukset

Immunologiset seulontatestit (U-Huum-O ja U-Huum-Ct) sisältävät vain osan huumausaineista, joita käytetään päihdetarkoitukseen. Tästä syystä joudutaan usein pyytämään laaja huumeseulonta (muun muassa U-HuumLCt, B-HuumLCt tai U-HuumTOF). Näytepyynnön tulee löytyä sekä laboratorion tietojärjestelmästä että paperisena. Poikkeuksena toimii U-Huum-O, johon riittää tietojärjestelmässä oleva pyyntö. (ISLAB 2016.) Virtsanäytteistä tutkitaan huumausaineiden lisäksi väri visuaalisesti, kreatiniinipitoisuus, ominaispaino ja pH-arvo, joilla arvioidaan virtsan mahdollista manipulointia. Varmistusmääritys tulee tehdä aina positiivisen seulontatuloksen jälkeen, sillä kyseessä on immunologinen tutkimus ja vasta-aineet saattavat reagoida ristiin muiden aineiden kanssa. Varmistusmääritys tehdään alihankintana Terveyden- ja hyvinvoinninlaitoksen (THL) hyväksymässä akkreditoitussa laboratoriossa. (HUSLAB 2020.)

Kvalitatiivinen huumeseulonta virtsasta (U-Huum-O) sisältää kannabiksen, kokaiinin, bentsodiatsepiinin, ekstaasin, opiaatit ja amfetamiinin sekä sen johdannaiset. Huumausaineet määritetään semikvantitatiivisesti käyttäen menetelmänä fotometrisesti mitattavaa immunologista reaktiota, mikä on yksi yleisimmin käytetyistä biologisista menetelmistä kvalitatiivisen tuloksen antavien immunokromatografisten pikatestien ohella. (HUSLAB 2020.) Semikvantitatiivinen tutkimus antaa sekä numeerisen (kvantitatiivisen), että positiivisen tai negatiivisen (kvalitatiivisen) tuloksen (Labquality 2020). Osoitusmenetelmä ei vaadi valvottua näytteenantoa. Huumeosoitusta virtsasta voidaan pyytää yhdessä -Ct:n tai -LCt:n kanssa, jolloin näytteenanto voidaan valvoa ja tällöin putket sinetöidään.

Varmistettu huumeseulonta (U-Huum-Ct) sisältää seulonnan lisäksi varmistuksen akkreditoitussa laboratoriossa niistä positiivisista näytteistä, joihin ei ole erikseen merkitty varmistuksen tarpeettomuutta. Tutkimus osoittaa amfetamiinin, buprenorfiinin, bentsodiatsepiinin, kokaiinin, opiaatit, metadonin ja kreatiniinin. Kreatiniini lisää tutkimuksen luotettavuutta, sillä 2 mmol/l tulos on epätavallisen laimea ja alle 0,45 mmol/l tulos kertoo, että näyte todennäköisesti ei ole virtsaa ollenkaan. Matala arvo voi johtua esimerkiksi runsaasta veden juonnista. Laimeudesta tulee kirjata lausunto. Virtsaa siirretään 3 x 10 ml ja 1 x 4 ml lisääineettomiin putkiin. Näytteenanto suoritetaan valvotusti, jolloin putket sinetöidään. Tulokset tulevat yleensä seuraavana arkipäivänä, mutta positiivisen tuloksen

varmistuksen vastaus tulee kahden viikon kuluessa. Positiivinen tulos saadaan ennalta sovitulla pienimmällä pitoisuudella. Negatiivinen tulos kertoo suhteellisen luotettavasti, ettei kyseistä huumausainetta ole käytetty lähipäivien aikana. (ISLAB 2020a.)

Laajat huumausaine- ja lääkeainetutkimukset (U-HuumLCt tai B-HuumLCt) antavat tuloksen noin 300 tavanomaiselle huumausaineelle, 9 (18) muuntohuumeelle ja väärinkäytettävälle lääkeaineelle. Tutkittavien lääkeaineiden joukkoa päivitetään jatkuvasti vastaamaan käytettyjä huumausaineita. Virtsa siirretään 2 x 10 ml lisäaineettomiin putkiin tai otetaan kokoverta 2 x 10 ml seerumiputkiin. Virtsanäyte annetaan valvottuna ja näyteputket tulee sinetöidä. Tutkimuksen tulokset ovat saatavissa neljän viikon kuluessa. Analysointimenetelmänä on kromatografismassaspektrometria. Näytteenantajalla on mahdollisuus riitauttaa tulos, jolloin varmistus tulee tehdä kakkosputkesta ja pyynnön oltava tehtynä kahden viikon kuluessa seulontatuloksen saapumisesta. (ISLAB 2020b.)

5 ENSIVAIHEEN SEULONNASSA JA VARMISTUSANALYYSISSÄ KÄYTETTYJÄ MÄÄRITYSMENETELMIÄ

Ensivaiheen analysointi on nopea immunologista menetelmää hyödyntävä seulonta ja varmistusanalyysi on huumausaineet luotettavasti identifioiva massaspektrometrinen-mittausmenetelmä. Immunologiset menetelmät perustuvat huumausaineen tunnistavan vasta-aineen käyttöön ja ne soveltuvat ainoastaan ensivaiheen seulontaan, jossa testien laajuus koetaan riittäväksi. Testejä on sekä vieriteinä että laboratorioympäristöön tarkoitettuina testeinä. Kliinisen toteamisen kannalta on määritelty merkitykselliset toteamisen raja-arvopitoisuudet (engl. cut-off value), joissa negatiiviseksi tulokseksi tulkitaan raja-arvoa pienemmät tulokset. Immunologisissa testeissä voi tulla vääriä positiivisia tuloksia esimerkiksi eri aineryhmien ristireaktioiden takia, ja tästä syystä positiivinen tulos tulee varmentaa. Seulottu lääkeaine identifioidaan tavallisesti kaasukromatografimassaspektrometrillä (GC/MS). (Kuoppasalmi, Heinälä & Lönn 2019.)

Immunologiset menetelmät perustuvat yleensä yksittäisen aineen tai aineryhmän tunnistavaan vasta-aineen käyttöön. Todentaminen huumausaineen sitoutumisesta vasta-aineeseen vaihtelee. Vasta-aine voi reagoida myös jonkin toisen aineen kanssa antaen väärän positiivisen tuloksen tai olla tunnistamatta kaikkia samaan aineryhmään kuuluvia aineita, jolloin tulos on väärä negatiivinen. Immunologisen testin tarkkuus ei sovellu kvantitatiiviseen mittaukseen. (Leinonen 2014, 214–216.) Immunokromatografiset testit luetaan visuaalisesti silmällä, jolloin ei saada lainkaan numeerista arvoa. Immunologisissa menetelmissä käytettäviä leimamenetelmiä voidaan jaotella muun muassa käytettävän merkkiaineen mukaan.

Tehokkaimpina ja luotettavimpina menetelminä pidetään massaspektrometrisiä mittausmenetelmiä, joissa käytetään yleisemmin nestekromatografian ja massaspektrometrin yhdistelmää. Massaspektrometriset menetelmät ovat herkkiä ja helposti päivitettävissä mittaustarpeiden mukaan. Kaasukromatografian ja massaspektrometrin yhdistelmään liittyy enemmän rajoituksia kuin massaspektrometrin ja nestekromatografian yhdistelmään, mutta se toimii erinomaisesti haihtuvien yhdisteiden mittaamiseen. Massaspektrometrisiä menetelmiä voidaan käyttää varmistusanalyysien lisäksi ensivaiheen analyysinä seulontaan niiden laajemman kattavuuden, herkkyyden ja spesifisyyden takia. (Leinonen, 2018.) Tutkimuksessa käytetyt menetelmät avataan myöhemmin opinnäytetyössä.

5.1 Immunologiset määritysmenetelmät

Mikropartikkeli-immunomääritys eli KIMS (engl. kinetic interaction of microparticles in solution) on homogeeninen mikropartikkeliagglutinaatiomenetelmä, jolla lääke- ja huumausaineita voidaan analysoida. Homogeeninen on tasalaatuinen ja yhtenäinen seos, jossa osasia ei voida havaita, mutta voidaan erottaa esimerkiksi tislamalla (Niemelä & Pulkki 2010, 351–357). Menetelmässä tutkittava analyyyti kilpailee sitoutumisesta vasta-aineeseen latex-mikropartikkeliin sidotun konjugaatin kanssa. Ristikkorakenne muodostuu vasta-aineen sitoutuessa konjugaattiin ja vasta-aineen sekä latex-mikropartikkelien välille muodostuu sillat. Valon absorbanssi mitataan turbidometrisesti, joka tarkoittaa partikkeleista siroavan, heijastuvan tai absorboituvan valon mittaamista spektrofotometrisesti. (Armbruster, Schwarzhoff, Hubster & Liserio 1993, 2137–2146.) Valon absorbanssin lisääntyminen osoittaa, että tutkittavaa analyyyttiä ei ole. Analyytin sitoutuessa vasta-aineeseen, estyy ristikkorakenteen muodostuminen, mikä johtaa absorbanssin vähenemiseen. Absorbanssin saavuttaessa raja-arvon,

näyte tulkitaan positiiviseksi tutkittavalle analyyttille. (Lyons, ym. 2001.) Analyytin pitoisuus on siis kääntäen verrannollinen agglutinaation määrään, koska tämän esiintyminen estää agglutinaation muodostumisen (Armbruster, ym. 1993, 2137–2146).

Immunologisia merkkiaineanalyyseja suoritetaan radioaktiivisilla yhdisteillä, joilla voidaan leimata joko mitattava yhdiste tai vasta-aine. Radioimmunomääritys eli RIA (engl. radioimmunoassay) on heterogeeninen menetelmä, jossa sitoutumaton merkkiaine on ennen mittaamista eroteltava (Halonen 2004, 90–100). Heterogeeninen tarkoittaa sekalaatuista ja epäyhtenäistä seosta, jossa voidaan havaita eri kerroksia tai faaseja, joiden komponentteja voidaan erottaa toisistaan (Niemelä & Pulkki 2010, 351–357). Mitattava yhdiste leimataan ja määritys perustuu antigeenin ja sille spesifisen vasta-aineen reaktioon (Halonen 2004, 90–100). Antigeeni on aine, joka sitoutuu sille spesifiseen vasta-aineeseen (Sanastokeskus 2015). Menetelmä käyttää määrityksessä radioaktiivista merkkiainetta, joka kilpailee näytteen tutkittavan yhdisteen kanssa vasta-aineeseen sitoutumisesta. Merkitsemättömät ja merkityt antigeenit kilpailevat rajallisesta määrästä vasta-ainemolekyylejä antigeeni-vasta-ainekompleksien muodostamiseksi. (Chu 2003.) Näin ollen vasta-aineeseen sitoutuneen aktiivisuuden määrä kiinteässä faasissa liittyy käänteisesti näytteen tutkittavan yhdisteen pitoisuuteen. Reaktion lopussa vasta-aineisiin sitoutuneet ja vapaat antigeenit erotellaan sopivalla menetelmällä, esimerkiksi pesuvaiheilla sitoutumattomat antigeenit pestään pois. Radioaktiivisuutta mitataan gammalaskijalla. (Sharma, Pillai, Gautam & Hajare 2014.)

Fluoresenssi polarisaatioimmunomääritys eli FPIA (engl. fluorescence polarization immunoassay) on homogeeninen kilpailevaa sitoutumista hyödyntävä menetelmä, jota on käytetty lääkeaine- ja huumausaineiden määrittämiseen. Leimana käytetään antigeeniin sidottua fluoresoivaa fluorokromi konjugaattia, jota viritetään tasapolarisoivalla valolla. Valo polarisoituu suodattimen avulla ja loistaa osaan fluorokromimolekyylä, joka fluoresoi säteilemällä pidemmän aallonpituuden valoa ja jonka signaali tallennetaan. Emittoiva valo pysyy polarisoituneempina suurikompleksisessa liuoksessa, jossa kompleksit kääntyvät hitaammin kuin pienemmät leimatut molekyylit. (Ragain, ym. 2003, 915–921.) Lämpöliike saa molekyylit värähtelemään ja ne alkavat pyöriä. Kun vasta-aine sitoutuu leimattuun antigeeniin, sen liike hidastuu ja valon emissio voidaan havaita ja mitataan. Valon intensiteetti lasketaan yhdensuuntaisesti ja sitten polarisaattorin kiertämisen jälkeen kohtisuoraan, jolloin sekä vapaan että vasta-aineeseen sitoutuneen antigeeni-leima-konjugaatin suhde voidaan laskea intensiteettien suhteesta. (O'Kennedy & Murphy 2017, 408–410.) Reaktioseos valmistetaan pienestä määrästä analyttispesifiä vasta-ainetta ja leimattua antigeeniä sekä tutkittavaa analyyttiä. Leimattu antigeeni kilpailee analyytin kanssa vasta-aineen sitoutumispaikoista. Mitä enemmän reaktioseoksessa on mitattavaa analyyttiä, sitä vähemmän leimattu antigeeni pääsee sitoutumaan vasta-aineeseen, jolloin mitattavan analyytin pitoisuus on kääntäen verrannollinen havaittuun polarisoituneeseen valoon. Mikäli näytteessä ei ole tutkittavaa analyyttiä, pääsee suurempi osa leimattua antigeeni-konjugaattia sitoutumaan vasta-aineeseen. (Halonen 2004, 90–100.)

Entsyymi-immunoanalyysi eli EIA (engl. enzyme immunoassay) on entsyymattisen reaktion avulla näkyväksi saatu antigeenin ja vasta-aineen välinen reaktio. Entsyymi-immunoanalyysissa käytetään entsyymejä merkkiaineena ja katalysoimaan kemiallista reaktiota. EIA voidaan jakaa kilpailevan sitoutumisen tekniikoihin ja kaksoisvasta-aine tekniikoihin. Entsyymillä voidaan leimata antigeeni,

vasta-aine, substraatti tai hapteeni. Hapteeni on molekyyli, joka sitoutuessaan suurempaan kantajamolekyyliin, voi toimia antigeeninä. (Kurstak 1986, 86–88.) Mitatun analyytin pitoisuus muodostuu entsyymi-substraattireaktiosta syntyvien reaktiotuotteiden avulla. Substraatin pitoisuus on verrannollinen reaktionopeuteen sen pienillä pitoisuuksilla, kun taas suurilla pitoisuuksilla voidaan saada virheellisiä tuloksia. Vasta-aineen määrä saadaan selville joko pysäyttämällä entsyymi-substraatti reaktio tai kineettisellä mittauksella seurataan entsyymisubstraattikompleksien muodostumisen nopeutta. Entsyymiaktiivisuus saadaan selville mittaamalla sen katalysoimia lopputuotteita fotometrisesti tai kolorimetrisesti. Entsyymileimana käytetään usein HRP- (horseradishperoxidase) tai alkaalifosfataasi-entsyymejä. (Halonen 2004, 90–100.)

5.2 Varmistusanalyysin määrittämenetelmät

Kaasukromatografiin (GC) ja nestekromatografiin (LC) yhdistettyjä massaspektrometri (MS) -menetelmiä käytetään yleensä immunologisen positiivisen seulontatuloksen varmentamiseen. Yhdisteen tunnistus perustuu kromatografiseen liikkuvuuteen väliaineen läpi eli retentioaikaan sekä massaspektrometriseen pilkkoutumiseen (ionit ja ionisuhteet). (Leinonen 2014, 214–216.) GC- ja MS -yhdistelmässä kromatografi vastaa analysoidavan näytteen erottamisesta ja massaspektrometri vastaa näytteessä olevien kemiallisten yhdisteiden havaitsemisesta ja tunnistamisesta (Ekman, ym. 2009, 106–107, 121). Mittaustietoa verrataan saman analyysisarjan vertailunäytteisiin, joka mahdollistaa sekä luotettavan tunnistuksen että pitoisuuden mittaamisen luotettavasti. Ilmaisimena käytetään matalan erotuskyvyn massaspektrometrejä (MS), tandem-massaspektrometrejä (MS/MS) ja enenevissä määrin korkean erotuskyvyn massaspektrometrejä (HRMS), joiden avulla voidaan mitata tarkasti molekyyliä tutkittavista yhdisteistä. (Leinonen 2014, 214–216.)

Massaspektrometrin osia ovat ionilähde, massa-analysointilinja ja detektori eli ilmaisimena. Lisäksi massa-analysointilinja käyttää pumppujärjestelmää luodakseen alhaisen paineen. Massaspektrometrin mittausten menetelmässä tutkittava näyte ionisoidaan ensin ionisaattorissa, jolloin näyte hajoaa massan mukaan eri kokoisiksi fragmenteiksi eli kappaleiksi. Ionit kiihdytetään lentämään sähkö- ja magneettikentässä massa-analysointilinjassa, jolloin ionit erottuvat varauksensa ja massan perusteella detektorille eri pisteisiin. Varatun hiukkasen liikerata magneettikentässä vaikuttaa magneettikentän voimakkuus, hiukkasen massa, varaus ja nopeus. Tietokoneohjelmaan yhdistettynä detektorille saapuneet signaalit saadaan tallennettua. Samanpainoiset ja -varaukselliset hiukkaset saapuvat detektorille samaan pisteeseen. Detektori rekisteröi ionien lukumäärän ja massan, joista se piirtää massaspekttrin. Spekttrin vaaka eli x-akselilla on m/Z -arvo, joka kuvaa molekyyliä painoa ja pysty eli y-akseli kuvaa molekyyliä määrää. (Ekman ym. 2009, 106–107, 121)

Kromatografiin yhdistettynä näyte syötetään joko kaasui- tai nestekromatografista massaspektrometriin. Kromatografi koostuu liikkuvasta ja liikkumattomasta faasista, jonka avulla näytteen eri komponentit saadaan eroteltua toisistaan nesteen tai kaasun avulla, jolloin fragmentit voidaan analysoida erikseen. Molekyylin kulkeutuminen kromatografisen väliaineen läpi riippuu sen fysikaaliskemiallisista ominaisuuksista. Nestekromatografian liikkuva faasi on neste ja kiinteä faasi muodostuu huokoisista hiukkasista, joilla on suuri pinta-ala, esimerkiksi silica-geeli. Näyttemolekyylit kulkeutuvat geelin läpi, jonka kanssa ne ovat vuorovaikutuksessa. Voimakkaassa vuorovaikutuksessa olevat näy-

temolekyylit kulkeutuvat hitaammin kromatografisen järjestelmän läpi, eli niillä on pidemmät retentioajat. Kaasukromatografiassa liikkuvana faasina käytetään kaasua (yleensä typpi, helium tai vety) ja kiinteä faasi on useimmiten nesteellä päällystetty kantaja. Kaasukromatografi koostuu kolonnista ja kapillaaripylvästä, jotka voidaan päällystää sisäisesti nestemäisellä tai kiinteällä stationäärifaasilla. GC:ssä näytekemponenttien ja kaasun välillä ei tapahdu mitään vuorovaikutuksia, siksi myöskään eluutioaikaa ei voida hallita muuttamalla liikkuvan faasin (kaasun) koostumusta, toisin kuin nestekromatografiassa. LC- ja MS-yhdistelmällä voidaan analysoida useampia yhdisteitä kuin GC- ja MS-yhdistelmällä. Näytteen ionisointi voidaan tehdä kemiallisesti kaasun avulla, elektronipommituksella tai sähkösumutus-ionisoinnilla sekä erillistä hohtopurkauslamppua käyttämällä. (Ekman, ym. 2009, 106–107, 121)

Nestekromatografian ja korkean erottuvuuden massaspektrometrin (LC-HRMS) -menetelmät, kuten lentoaikamassaspektrometriaan eli TOF (engl. time-of-flight) perustuva analyysimenetelmä saa kerättyä näytteestä koko massaspektrometriin kulkeutuvan ionivirran ilman esivalintaa tutkittavista yhdisteistä. Huumausaineet voidaan tunnistaa analysoinnin jälkeen tapahtuvan tietokantahaun perusteella, jossa huumausaineiden ja niiden jäänteiden tarkasti mitattuja massoja verrataan tietokannassa oleviin tarkkoihin tietoihin. (Sundström 2017, 31–37.) Sundströmin (2017, 31–37) väitöskirjan mukaan pelkästään massaspektrometriseen menetelmään pohjautuva tunnistustapa, joka perustuu vertailuaineen avulla tuotettuun spektriin, ei ole riittävä muuntohuumeiden kohdalla. Väitöstutkimus on osoittanut, että muuntohuumeiden sisällyttäminen huumetestaukseen on kuitenkin erittäin tärkeää. LC mahdollistaa erityisesti vähemmän haihtuvien ja polaaristen virtsan metaboliittien havaitsemisen, kun taas GC soveltuu parhaiten haihtuvien yhdisteiden erotteluun. (Sundström 2017, 31–37.)

LC-MS/MS käyttää kvadrupolianaalysaattoria, joka on neljän sauvan muodostelma. Siinä käytetään jännitettä, jolloin ionit kulkevat läpi törmäämättä sauvoihin. Kvadrupolianaalysaattorissa on ioniloukku, jossa näyte ionisoituu elektronipurkauksen avulla. Yhdisteille voidaan laskea empiirinen kaava käyttämällä sen riittävän tarkkaa ionin mittausta. Suuren massatarkkuus tiedon hankkiminen vaatii korkean resoluution massa-analyysin, jossa käytetään muun muassa lentoajan mittausta, kiertorataa ja magneettisektoria sekä Fourier-muunnos-ioni-syklotroniresonanssia. (Sundström 2017, 31–37.) Massaerottelun yleisimmät tekniikat ovat ioniloukku, kvadrupoli ja lentoajan analysointi (Ekman ym., 2009). Yhdisteen identifiointi perustuu useimmiten molekyyli-rakenteen automaattiseen määrittämiseen tietokannoista (kirjastoista) etsimällä tarkkoja monoisotooppisia massoja, sekä isotooppikuvion vastaavuutta ja ionimassan tarkkuutta. Yhdiste voidaan identifioida myös tarkalla massamittauksella ionimassaspektrien vertaamiseen tietokannan kirjastospektreihin, joka sisältää analyysin kohteena olevien yhdisteiden tunnistamistiedot. (Sundström 2017, 31–37.)

6 TUTKIMUKSESSA KÄYTETYT MÄÄRITYSMENETELMÄT

Laboratoriomenetelmien valinnassa on huomioitava, että positiivinen tulos voi johtaa oikeuskäsittelyyn, jossa käytetty laboratoriomenetelmä voidaan kyseenalaistaa. Positiivinen tulos on varmistettava akkreditoitussa laboratoriossa massaspektrometrillä menetelmällä, mikäli sillä on taloudellisia, sosiaalisia tai oikeudellisia seurauksia. Immunologisella määrityksellä saatu positiivinen tulos voidaan kyseenalaistaa oikeudessa sen väärin positiivisten tulosten vuoksi. Edellä mainituissa tilanteissa koko testausprosessin analytiikka mukaan lukien, on oltava erittäin luotettavaa ja huolellisesti dokumentoitua.

Savonia-ammattikorkeakoulun analysaattori on Thermo Scientificin täysautomaattinen Indiko™ Plus -analysaattori. Analysaattori on pöytämallinen kliinisen kemian analysaattori, jota voidaan käyttää muun muassa kliinisen kemian huume- ja lääkeaineanalytiikan määrittämiseen. Analysaattori on nopea ja analysointinopeus on maksimissaan 350 testiä tunnissa. Laite on yksinkertainen käyttää ja omaa nopeat päivittäiset käynnistys- ja huoltotoimenpiteet. Näytteiden, kyvetien ja reagenssien syöttäminen mahdollistuu myös keskeyttämättä testausprosessia. Analysaattori käyttää kertakäyttöisiä kyvettejä, joka mahdollistaa käyttäjälle turvallisen ja kontaminoitumattoman analysoinnin. (Thermo Fisher 2018.)

6.1 Käytetyt reagenssit

Analysoinnissa on käytetty Thermo Fisherin kaupallista CEDIA™ Buprenorphine Assay kittiä, joka on suunniteltu Indiko analysaattoreille.

Reagenssit:

1 EA Reconstitution Buffer on liuotuspuskuri, joka sisältää puskurisuoloja, 0,35 mg/l hiiren monoklonalista buprenorfiinivasta-ainetta, stabilointiaineen ja säilöntäaineen. Monoklonaalinen tarkoittaa hiiressä immunisoimalla tuotettua ja eristettyä vasta-ainetta, joka on yhdelle antigeenin tietylle epitopille spesifinen (Thermo Fisher 2020).

1a EA Reagenssi on kuiva-aine, joka sisältää 0,171 g/l entsyymin vastaanottajaa, joka on mikrobia, puskurisuoloja sekä säilöntäaineen.

2 ED Reconstitution Buffer eli liuotuspuskuri, joka sisältää puskurisuoloja, stabilointiaineen ja säilöntäaineen.

2a ED Reagenssi on kuiva-aine, joka sisältää 25 µg/l entsyyminluovuttajaa (mikrobi), joka on konjugoituna buprenorfiiniin, 1,67 g/l klorofenolipuna-beeta-D-galaktopyranosidia, stabilointiaineita ja säilöntäaineita.

Kalibraattoreina CEDIA Buprenorphine negative ja CEDIA Buprenorphine 5 ng/ml.

Kontrolleina CEDIA Buprenorphine Low ja High kontrollit. (Thermo Fisher, 2018.)

Vertailulaboratorio on käyttänyt Cobas6000 -analysaattorille Rochen valikoimaan kuuluvia reagensseja, jotka tilataan Rochen kautta. Paketista löytyy oma kasetti reagensseille.

Reagenssit:

R1: hiiren monoklonaalista anti-buprenorfiinivasta-ainetta, G6P, NAD, stabilisaattoria ja säilöntäainetta (natriumatsidia 0.9%)

R2: Buprenorfiinilla leimattu G6PDH, puskurissa (natriumatsidia 0.9 %)

Kalibraattoreina Buprenorphine Semi-Quantitative Calibrators Set:

1 x 5 mL Negative Calibrator (0 ng/mL)

1 x 5 mL Low/Cutoff Calibrator 1# (5 ng/mL)

1 x 5 mL BUP Cutoff Calibrator 2# (10 ng/mL)

1 x 5 mL BUP Intermediate Calibrator #1 (20 ng/mL)

1 x 5 mL Intermediate Calibrator #2 (40 ng/mL)

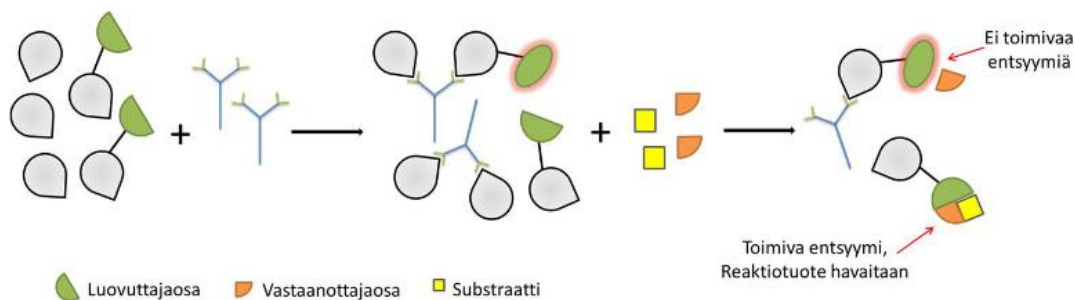
1 x 5 mL BUP High Calibrator (75 ng/mL)

Vakiomateriaalina on käytetty norbuprenorfiinia.

6.2 CEDIA-menetelmä

Indiko™ Plus -analyyttori käyttää CEDIA-menetelmää (engl. cloned enzyme donor immunoassay). Kyseessä on homogeeninen kilpailevaa sitoutumista hyödyntävä menetelmä. Menetelmän avulla voidaan havaita molekyylipainoltaan pieniä analyyttejä ja se on yleisesti käytetty lääkeaineiden ja huumausaineiden seulonnoissa. (Thermo Fisher 2019.)

Opinnäytetyössämme CEDIA Buprenorphine Assay-menetelmä käyttää yhdistelmä DNA-tekniikan avulla tuotettua homogeenistä entsyymi-immunomääritystä, joka on saatu aikaan käyttäen *Escherichia Coli* LaC-operonin Z-geeniä. Geeni koodaa suurta entsyymaattisesti inaktiivista polypeptidiä, joka aggregoituu spontaanisti ja taittuu muodostaen aktiivisen beeta-galaktosidaasin. Rekombinantti-DNA tekniikan avulla beetagalaktosidaasiproteiini on muokattu suureksi (vastaanottaja fragmentti) ja pieneksi (luovuttaja fragmentti) inaktiiviksi polypeptidiksi. Ne voivat muodostaa entsyymaattisesti aktiivisen polypeptidin, joka määritysmenetelmässä pilkkoo substraatin tuottaen värimuutoksen, joka voidaan havaita spektrofotometrisesti. Määrityksessä haptenei tai analyytti on kiinnitetty luovuttajaan ja analyyttispesifiä vasta-ainetta käytetään estämään aktiivisen entsyymin muodostuminen. Määrityksessä näytteen analyytti (kuva 1) kilpailee sitoutumispaikoista inaktiivisen galaktosidaasiin konjukoidun eli sitoutuneen luovuttajafragmentin kanssa. (Henderson, Friedman, Harris, Manning & Zoccoli 1986, 1637–1641.) Antigeenin ja vasta-aineen sitoutumisreaktio johtaa muutokseen mitattavan merkkiaineen aktiivisuudessa (Thermo Fisher, 2019). Menetelmää hyödyntämällä voidaan määrittää kvalitatiivisesti tai semikvantitatiivisesti buprenorfiinin läsnäolo nopeasti ja yksinkertaisesti ihmisen virtsasta raja-arvossa 5 ng/ml (Thermo Fisher 2018).



KUVA 1. CEDIA-menetelmä, jossa aktiivinen entsyymi muodostuu inaktiivisista luovuttaja- ja vastaanottajafragmenteista (Heikkinen, Moilanen & Virén 2014, 29). Lisää kuvia immunokemiallisista menetelmistä löytyy Heikkinen, Moilanen ja Virén (2014) Immunokemialliset menetelmät kliinisen kemian analytiikassa opinnäytetyöstä.

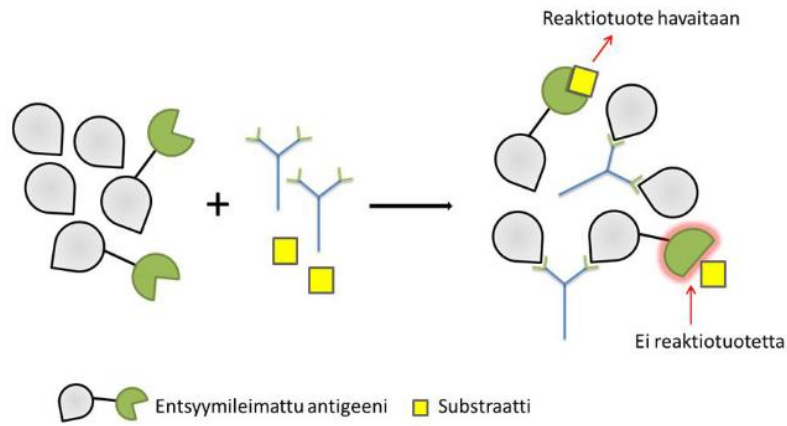
Jos näytteessä on tutkittavaa analyyttiä, se pääsee sitoutumaan vasta-aineeseen, jolloin inaktiivinen luovuttajaentsyymifragmentti voi muodostaa aktiivisen entsyymin vastaanottajafragmentin kanssa. Mikäli näytteessä ei ole tutkittavaa analyyttiä, vasta-aine sitoutuu inaktiiviseen konjugoituun luovuttajafragmenttiin estäen näin inaktiivisten galaktosidaasifragmenttien uudelleen yhdistymisen, eikä aktiivista entsyymiä pääse muodostumaan. (Thermo Fisher 2018.) Reaktiotuote havainnoidaan mittaamalla reaktioseoksessa olevaa entsyymiaktiivisuutta sekä sen tuloksena olevaa absorbanssin muutosta, joka on suoraan verrannollinen näytteessä olevan analyytin määrään (Jeon, Yang & Andrade 2004).

6.3 EMIT vertailumenetelmä

Entsyymi-immunologinen määrittely eli EMIT (engl. enzyme-multiplied-immunoassay) on yksinkertainen ja nopea kilpailevan sitoutumisen homogeeninen menetelmä, jonka yleisiä käyttöaiheita ovat lääkeaine- ja hormonimääritykset. Sitä käytetään monien pienten molekyylien havaitsemiseen. Menetelmä perustuu vasta-aineen kykyyn estää entsyymin aktiivisuutta, kun se on sidottuna antigeeniin, joka on yhdistynyt entsyymiin. Vapaa antigeeni kilpailee antigeenikonjugoituneen entsyymin kanssa vasta-aineeseen sitoutumisesta, jolloin sitoutunut antigeeni lisää entsyymaattista aktiivisuutta. (Milone 2012, 1–4, 8.)

Ensimmäisissä EMIT-menetelmissä käytettiin bakteerilysootsyymiä ja mitattiin kuolleiden bakteerien solususpension sameutta, mutta tämä entsyymijärjestelmä oli ongelmallinen monesta syystä. Vaihtoehtoisia entsyymijärjestelmiä etsittiin ja nykyisissä EMIT-menetelmässä käytetään glukoosi-6-fosfaattidehydrogenaasiota (G6PDH). G6PDH-entsyymin käyttö mahdollistaa sen, että määrittely on helpposti muunneltavissa kliinisiin analysaattoreihin. (Milone 2012, 1–4, 8.)

Määrittely käyttää G6PDH-entsyymiin kytkettyä antigeeniä. Tämä vasta-aineeseen sitoutumaton entsyymi hapettaa glukoosi-6-fosfaatin glukonolaktoni-6-fosfaatiksi ja pelkistää kofaktorin NAD:n NADH:ksi. Buprenorfiinin osoituksessa reaktiossa kilpailevat näytteessä vapaana oleva buprenorfiini ja G6PD-entsyymillä leimattu buprenorfiini vasta-aineen sitoutumispaikoista (kuva 2).



KUVA 2. EMIT-menetelmä, jossa entsyymin molekyyli rakenne muuttuu immunokompleksin muodostuessa, jolloin substraatti ei voi kykene sitoutumaan (Heikkinen, Moilanen & Virén 2014, 28).

G6PDH-entsyymin aktiivisuus pienenee, kun entsyymillä leimattu buprenorfiini sitoutuu vasta-aineeseen. Reaktiota mitataan spektrofotometrisesti. Mitä enemmän näytteessä on buprenorfiinia, sitä aktiivisempi on G6PDH. EMIT-menetelmän etuna on pitkä sarjojen säilyvyys ja kyky mitata sitoutunutta lääkettä erottamatta sitoutumatonta analyyttiä. Huomattava haitta on kuitenkin häiriöiden mahdollisuus matriisin ristireagoivista komponenteista. (Phipps & Cone 2013.)

7 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSKYSYMYKSET

Tutkimuksen tarkoituksena oli verifioida U-Bupre-menetelmä ja lisäksi tehtiin työohjeet sen suorittamiseksi. Verifiointissa verrattiin kliinisten potilasnäytteiden avulla Indiko™ Plus -analysaattorin kilpailevaa entsyymi-immunologista määritysmenetelmää (CEDIA), ISLABin referenssimenetelmänä toimivan Cobas6000 -analysaattorin homogeenista entsyymi-immunologistamääritystä (EMIT) käytävään menetelmään. Tutkimuksen tavoitteena oli antaa opiskelijoille tietoa huumausaineanalytiikassa käytettävistä menetelmistä ja niiden periaatteista.

Verifiointi toteutettiin kvantitatiivisena tutkimuksena, joka antaa määrällistä tietoa menetelmän soveltuvuudesta Savonia-ammattikorkeakoulun opiskelijoiden kliinisen kemian harjoitustunneille Indiko™ Plus -analysaattorilla.

Tutkimuskysymykset:

1. Seulooko CEDIA-menetelmä luotettavasti negatiiviset näytteet positiivisista?
2. Saadaanko Indiko™ Plus -analysaattorilla yhteneväisiä tuloksia ISLABin Cobas6000 -analysaattorin kanssa buprenorfiinin määrittämiseksi?

8 TUTKIMUSMENETELMÄ JA TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

Teimme U-Bupre-menetelmän käyttöönoton eli verifiointin Savonia-ammattikorkeakoulun Indiko™ Plus -analysaattorille. Valmistaja Thermo Fisher on validoinut menetelmän, jonka verifioimme eli varmistamme menetelmän luotettavan toimivuuden Savonian laiteympäristössä. Buprenorfiinin määrittämiseen käytettävä menetelmä on semikvantitatiivinen ja tutkimuksemme antaa sekä kvalitatiivista että kvantitatiivista tietoa buprenorfiinista.

Opinnäytetyö toteutettiin määrällisenä tutkimuksena ja lisäksi tehtiin työohjeet bioanalytiikan opiskelijoille U-Bupre-menetelmälle. Työohjeiden avulla opiskelijat voivat turvallisesti perehtyä käytännössä huumausaineanalytiikkaan kliinisen kemian harjoitustunneilla. Opinnäytetyön raportointiosuus tuo ilmi ammattiteoriaan perehtymisen ja auttaa opiskelijoita ymmärtämään huumausaineisiin liittyvää analytiikkaa teoriassa.

8.1 Kvantitatiivinen tutkimus

Kyngäksen, Mikkosen ja Kääriäisen (2019) mukaan kvantitatiivisella tutkimuksella on vahva teoreettinen pohja ja vaatii tutkijaa asettamaan tutkimuskysymyksiä ja hypoteeseja. Kvantitatiivisia menetelmiä voidaan siksi käyttää yleistettävän tiedon tuottamiseen. Asetimme tutkimuskysymykset tutkimuksemme alussa, jonka kautta pohdimme saatuja tuloksia. Hypoteesimme työssä on, että CEDIA- ja EMIT-menetelmät tuottavat yhteneväisiä tuloksia ja CEDIA seuloo negatiiviset pitoisuudet positiivisista luotettavasti. Siirrettävyys tarkoittaa lukijan mahdollisuutta soveltaa tietoa omiin tilanteisiinsa ja yleistäminen tarkoittaa tulosten laajentamista otoksesta laajempaan väestöön. Kvantitatiivisia tutkimuksia tehdään tapahtumien selittämiseksi ja ennustamiseksi analysoimalla tietoja tilastollisilla menetelmillä. (Kyngäs, Mikkonen & Kääriäinen 2019.)

Kvantitatiivinen tutkimus alkaa aiemman tiedon keräämisellä. Tästä syystä jokainen hyvä kvantitatiivinen tutkimus sisältää kattavan kirjallisuuskatsauksen ja huolellisesti määritellyn kirjallisuushaun. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa tutkimuskysymykset ja hypoteesit pohjautuvat teoreettiseen pohjatyöhön ja objektiiviset mittaukset perustuvat aiempaan tietoon. Kvantitatiivinen tutkimus painottaa muuttujien välisten suhteiden mittaamista ja analysointia, jossa tutkija tekee tuloksista johtopäätöksiä. (Kyngäs, ym. 2019.)

Kvantitatiivisella tutkimuksella on usein luonteeltaan jäykkä rakenne, yksityiskohtainen teoreettinen viitekehys tai kirjallisuuskatsaus, jota seuraa menetelmä osio ja tutkimuksen tulokset sekä niistä tehdyt johtopäätökset. Tulokset, jotka perustuvat tilastollisiin analyysiin esitetään numeerisina arvoina. (Kyngäs, ym. 2019.) Tutkimuksemme sisältää kvalitatiivisen tutkimuksen rakenteen piirteitä. Rakenne sisältää laajan teorian menetelmistä, tutkimuksen tuloksista ja niiden pohdinnasta.

8.2 Näytteiden keruu ja käsittely

Tutkimuksen aineisto saatiin ISLABin kliinisen kemian laboratorion kautta. Tutkimusnäytteiden keräys oli aloitettu ISLABin toimesta joulukuussa 2020 ja lopetettu tammikuun alussa 2021. Tutkimukseen tarvittavat kliiniset virtsanäytteet oli kerätty terveydenhuollon yksiköissä ja lähetetty laboratorioon huumaiden testausta varten. Näytteet olivat Itä-Suomen alueelta. Menetelmän verifiointiin arvioitiin tar-

vittavan noin 40–60 näytettä ja näytteitä saatiin yhteensä 56 kappaletta. Kaikki näytteet olivat positiivisia ja niistä oli poistettu valmiiksi kaikki henkilötiedot. Tutkimusnäytteet olivat jo analysoituja ja pakastettuja, eikä niillä ollut enää arvoa potilaan hoidon kannalta. Näytteiden buprenorfiini pitoisuus oli määritetty Cobas -analysaattorilla EMIT-menetelmää käyttäen. Alkuperäisen pitoisuuden lisäksi näytteisiin oli merkattu näytteen anto- ja analysointiajankohta.

Virtsanäytteen tulee pysyä kemiallisesti muuttumattomana sen määrittämiseen asti. Näytteet säilyvät kylmäsäiliössä 2–8 °C:ssa 30 päivää. Pidempiaikaisessa säilytyksessä ennen ja jälkeen analysoinnin, tulee näytteet sijoittaa –20 °C:een. Buprenorfiinianalyytit voivat säilyä tutkimusten mukaan virtsassa jopa 85 päivää –20 °C:ssa. Jotta näyte on laadukasta, se ei saa toistuvasti jäätymä ja sulaa, eikä siihen saa muodostua vaahtoa. Ennen analysointia jäädytetyt näytteet sulatetaan, sekoitetaan sekä tarvittaessa sentrifugoidaan. (Thermo Fisher 2018.)

Haimme näytteet 15.1. ISLABin päivystyslaboratoriosta sovittuna ajankohtana. Kuljetimme ne kylmäsäilytyksessä koulullemme kliinisen kemian harjoituslaboratorioluokan pakastimeen. Pakastimen lämpötila oli –20 °C, joka oli näytteille sopiva. Tulimme 16.1 koululle suorittamaan analysoinnin. Annoimme näytteiden ensin sulaa, jonka jälkeen sekoitimme ja sentrifugoimme ne työohjeiden mukaisesti.

8.3 Tilastolliset menetelmät

Kvantitatiivisen aineiston analysointiin käytetään kuvailevaa tilastoanalyysia tai tilastollista päättelyä. Kuvaileva tilastoanalyysi kuvailee ja tiivistää määrällisen muuttujan jakauman tai usean määrällisen muuttujan vaihtelua yleistämättä tuloksia isompaan perusjoukkoon. Mikäli vain yksi muuttuja on kohteena, voidaan käyttää kuvailuun muuttujien keski- tai hajontalukuja. Usean muuttujan kohdalla käytetään korrelaatiokertoimia kuvaamaan muuttujien yhteisvaihtelua. (Kvantitatiivisen tutkimuksen verkkokäsikirja 2013.) Tutkimukseen pyrittiin saamaan riittävästi tietoa, jotta menetelmän ja vertailulaboratorion aineiston jakauman luotettavuutta pystyttiin tutkimaan. Vertailun apuna käytimme korrelaatiokertoimia selittämään aineistossa tapahtuvaa tulosten vaihtelua analyysikertojen välillä.

Tilastollista päättelyä tarvitaan arvioimaan sitä, miten onnistuneesti otoksesta saadut tulokset pitävät tutkittavassa perusjoukossa paikkaansa ja miten todennäköisesti voidaan yleistää tulokset perusjoukkoa koskeviksi. Yhden muuttujan analyysissa mielenkiinto on muuttujan jakaumassa. Jakaumaa voidaan tarkastella graafisilla kuvioilla tai tiivistää jakaumaa kuvaava informaatio tunnuslukujen avulla. Tunnuslukuina käytetään keski- ja hajontalukuja. Keskiluvut kuvaavat muuttujien arvojen keskimääräistä suuruutta ja hajontaluvut vaihtelua muuttujan arvoissa. Keskilukuja ovat moodi, mediaani ja aritmeettinen keskiarvo. Hajontalukuja ovat variaatiosuhde, vaihteluväli, vaihteluvälin pituus, keskihajonta ja variaatiokerroin. (Kvantitatiivisen tutkimuksen verkkokäsikirja 2013.) Graafinen kuvaaja auttoi havainnoimaan tulosten jakaumaa. Lisäksi tunnuslukujen avulla saatiin selville muuttujien keskimääräistä vaihtelua. Hyödyksi käytimme mediaania ja aritmeettista keskiarvoa, joiden avulla nähtiin yhtäläisyyksiä vertailuaineiston kanssa.

Hajontaluvut kertovat muuttujien arvojen vaihtelusta tietyn keskiluvun ympärillä. Muuttujan jakaumaa kuvailtaessa kannattaakin esittää sopiva keskiluku ja hajontaluku. Variaatiosuhde vaihtelee

nollan ja yhden välillä. Mikäli arvo on nolla, moodiluokassa ovat kaikki muuttujan arvot. Tällöin vaihtelua ei ole muuttujan arvoissa. Mikäli variaatiosuhteen arvo on lähempänä yhtä, sitä enemmän vaihtelua on hajontaa. Vaihteluväli ilmoittaa pienimmän ja suurimman muuttujan arvon välin. Hajontalukuna käytetään yleensä keskihajontaa. Keskihajonta kuvaa keskimäärin, kuinka kaukana yksittäiset muuttujan arvot ovat muuttujan aritmeettisesta keskiarvosta. Variaatiokerrointa taas käytettiin kahden eri otoksen keskihajontojen keskinäiseen vertailuun. (Kvantitatiivisen tutkimuksen verkkokäsikirja 2013.) Variaatiokerroin oli apuna arvioimaan jokaisen analyysikerran välistä yhteyttä ja mahdollisia eroja pitoisuuksissa sarjojen välillä.

Rinnakkaismääritysten avulla voidaan arvioida toistettavuutta. Mikäli rinnakkaismäärityksiä ei tehdä, voidaan toistettavuutta määrittellä analysoimalla näytteet useampina eri päivinä. Tuloksille lasketaan siten keskiarvo sekä suhteellinen keskihajonta. Toistettavuutta voidaan arvioida rinnakkaismääritysten avulla analysoimalla eri pitoisuudellisia näytteitä pareittain, jonka jälkeen tuloksille lasketaan suhteellinen keskihajonta, keskihajonta sekä keskiarvo. (Heikkilä 2014.) Toistettavuutta arvioitiin kolmen analyysikerran avulla riittävän tiedon saantiin, jolloin tuloksia analysoitiin tilastollisesti laske-
malla keskihajonta ja keskiarvot näytteille.

Todellisen perusjoukon tunnusluvun arvoa tietyllä todennäköisyydellä kuvataan luottamusvälillä. Pidetään todennäköisenä, että perusjoukon todennäköisyysarvo on lähellä otoksesta saatua arvoa. Todennäköisyyden perusjoukkoa kuvaavan tunnusluvun jollain tietyllä luottamusvälillä kertoo luottamustaso. Luottamusväli ja -taso ovat toisistaan riippuvaisia. (Kvantitatiivisen tutkimuksen verkkokäsikirja 2013.)

Satunnaisvirheen luottamusväli (95 % todennäköisyydellä) voidaan laskea t-testillä. Todennäköisyys riippuu käytössä olevien määritysten lukumäärästä. Tulosten hajonta määrittää sen, kuinka monta sarjaa voidaan käyttää toistettavuuden arvioinnissa. Rinnakkaisnäytteiden määrä tulee pitää pienenä ja sarjojen määrä suurena, kun sarjojen sisäinen hajonta on pienempi kuin sarjojen välinen hajonta. Esimerkiksi kaksi rinnakkaista määritystä 10 näytteen sarjalla. Sarjojen sisäisen hajonnan ollessa suurempi kuin sarjojen välinen, rinnakkaisia tehdään esimerkiksi neljä ja sarjoja viisi. (Heikkilä 2014.) Tarkasteltaessa otokseen merkitystä tilastollisessa päättelyssä voidaan tarkasteltaessa käyttää muuttujan keskiarvon keskivirheen kaavaa. Otokseen neliöjuuri on jakajana, eli tarkoittaa sitä, että otokseen ollessa suurempi, keskivirhe pienenee ja luottamusvälit pienenevät valitussa luottamustasossa. (Kvantitatiivisen tutkimuksen verkkokäsikirja 2013.) Tilastollisen päättelyn avulla laskettiin keskiarvoille keskivirheet, mutta nämä tulokset eivät olleet merkityksellisiä tutkimuksen kannalta.

Korrelaatiolla tutkitaan kahden muuttujan välistä tilastollista riippuvuutta ja se muodostaa perustan muuttujien välisten riippuvuuksien ymmärtämiselle. Muuttujien välisten yhteyksien tutkimiseen käytetään erilaisia korrelaatiokertoimia. (Tilastokeskus 2016.) Korrelaatiokertoimen arvo on yleensä arvojen -1 ja 1 välillä. Riippuvuuden suunta osoitetaan muuttujien välillä etumerkillä ja tämän avulla nähdään, pieneneekö vai suureneeko toisen muuttujan arvo toisen kasvaessa. Kertoimen arvon ollessa positiivinen, suuntautuu muuttujien arvot samaan suuntaan. Jos taas kertoimen arvo on negatiivinen, toisen muuttujan arvojen kasvaessa toisen arvot pienenevät. Lineaarista riippuvuutta ei ole, jos kertoimen arvo on 0. Voimakas yhteys muuttujien välillä näkyy arvon nousemisena lähemmäksi lukua 1. Havaintoparien määrä huomioiden katsotaan, onko korrelaatiokerroin merkitsevä eli onko

poikkeavuutta nolasta tarpeeksi. Korrelaation ollessa pieni (merkitsevyystaso pienempi kuin 0,05), voi nolasta poikkeavuus johtua sattumasta. Muuttujien välillä on havaittavissa lievää korrelaatiota (merkitsevyystaso suurempi kuin 0,05), kun korrelaatiokerroin poikkeaa paljon nolasta. (Heikkilä 2014.) Tutkimuksessamme tarkastelimme korreloivatko CEDIA- ja EMIT- menetelmän tulokset keskenään, erityisesti tuloksien korrelaatiota matalalla tasolla.

Hajontakuvion avulla saadaan tietoa muuttujien keskinäisestä riippuvuudesta. Havaintoyksiköt sijoitetaan kahden muuttujan muodostamaan koordinaatistoon, josta on mahdollista tarkastella muuttujien välisen yhteyden voimakkuutta ja muodostumista. Hajontakuviossa havaintoja kuvataan koordinaatistoon sijoitettujen pisteiden avulla. (Tilastokeskus 2020.)

8.4 Tutkimuksen eteneminen

Opinnäytetyön suunnittelu alkoi opintojen toisena vuotena keväällä 2020 ja teimme kumpikin opinnäytetyön ohjaus- ja hankkeistamissopimuksen. Opinnäytetyön teorian tiedon kasaaminen alkoi keuhällä 2020 ja kirjoittaminen alkoi syksyllä 2020. Alkupalvasta saimme työsuunnitelman valmiiksi. Sovimme yhteistyöstä ISLABin kanssa ja teimme tutkimus- ja opinnäytetyölupahakemuksen. Suunnittelimme opinnäytetyön valmistuvan keuhlukukaudella 2021, jolloin valmistuisimme etuajassa. Teoriaosuus valmistui suurilta osin 2020 vuoden lopulla. Raporttia varten näytteiden analysointi tapahtui tammikuussa 2021. Osallistuimme useaan työpajaan opinnäytetyöprosessin aikana, joista saimme hyvää tukea ja ajatuksia työn eteenpäin viemiseen.

Teoriaosuuden tiedonkeruu alkoi perehtymällä laajasti aiempaan teorian tietoon ja tutkimuksiin. Keski-tyimme tiedonhaussa ajantasaiseen tietoon, joissa pääosassa oli englanninkielinen materiaali. Haku- materiaaliksi rajasimme opiaateista ja tarkemmin buprenorfiinista kertovaa kirjallisuutta, sekä huume- seulontaan liittyviä tutkimuksia ja analytiikkaa. Erityisen tärkeänä pidimme laadunhallintaan pe- rehtymistä ja eettisyys omana osanaan sekä opinnäytetyössämme käytössä oleva tutkimusmene- telmä vaati tiedon hankintaa. Lisätiedon haussa hyödynsimme katsausartikkelien lähdeluetteloita ja uutta aineistoa haettiin kirjoittamisen ohessa. Teorian tiedon kirjoittaminen oli pääasiassa itsenäistä kirjoittamista, lisäen kommentteja ja huomioita tekstin yhteyteen ja korjaten vanhaa sekä tiivistäen tietoa sopivalla tavalla.

Teoriaosuuden rakentaminen alkoi suunnitteleamalla, mitä kokonaisuuksia omaan opinnäytetyöomme aiheeseen liittyi. Jaottelimme otsikoita tämän mukaan. Näiden alle syntyi kuin itsestään tarkempia alaotsikoita kirjoittamisen ohella. Opinnäytetyöomme keskittyi tarkemmin buprenorfiiniin ja sen vaikutustapoihin ihmisen elimistössä, huumeaineiden tutkimiseen liittyviin menetelmiin sekä klinisen laboratorion laadunvarmistusta ja klinisen kemian tutkimuksiin käytettävän täysautomaattisen ana- lyysointilaitteen käyttöönottoa klinisessä laboratoriossa.

Näytteiden analysointi toteutettiin tammikuun ensimmäisellä Savonia-ammattikorkeakoulun labora- torioharjoitusluokkien tiloissa. Analysointi vaiheen aloitimme tutustumalla Indiko™ Plus -analysointilaitteen käyttöön ja sen toimintaan sekä buprenorfiinin määrityksen työhjeisiin. Suoritimme ensin Indi- kon alustamisen ja harjoitusanalysoinnin koululla olevilla positiivisilla ja negatiivisilla buprenorfiini virtsanäytteillä. Näin teimme laadunvarmistuksen Indiko™ Plus -analysointilaitteen toiminnan luotetta- vuudesta ennen virallisen määrityksen toteutusta.

Analysointiin käytettävät kliiniset virtsanäytteet numeroimme juoksevilla numeroinnilla. Missään työn vaiheessa emme käsitelleet henkilötietoja, vaan ne oli poistettu ISLABin toimesta. Käsittelemättömät virtsanäytteet analysoitiin kolmesti Indiko™ Plus -analysaattorilla käyttäen CEDIA-määritysmenetelmää valmistajan raja-arvojen mukaisesti.

Teimme työohjeista selkeä lukuiset, jotta analysoinnin suorittaminen ohjeiden avulla olisi vaivatonta. Laadimme työohjeet Thermo Scientific: Cedia Buprenophine Assay (2018) -analyysiohjeiden sekä Indiko™ Plus -analysaattorin laiteohjeiden (Thermo Fisher 2016) pohjalta. Rakenteeksi valitsimme taulukon, sillä se on visuaalisesti helppolukuinen. Hyvän työohjeen kriteereihin kuuluu huomioida sen kohderyhmä ja tehdä siitä käyttäjäystävällinen. Pidimme mielessämme työohjetta tehdessä kohderyhmämme eli bioanalyttikko-opiskelijat, ja halusimme laatia heille helposti tulostettavat ohjeet harjoitustunneille. Työohjeemme on ytimekäs ja opinnäytetyömme toimiikin teoriaosuudeltaan pohjana analyysin suorittamiseen. Analyysi on suoritettavissa ohjeita noudattaen toistettavasti ja turvallisesti. Kaksi opiskelijaryhmää suoritti analyysin onnistuneesti työohjeiden mukaan, josta voimme todeta sen sisältävän siihen tarvittavat tiedot. Opiskelijoilta saatujen kommenttien perusteella teimme korjauksia työohjeeseen. Reagenssien liuotusohjeisiin toivottiin kuvat tueksi ja laitoimme nämä ohjeisiin. Lisäksi lisäsimme virtsanäytteen antamiseen ohjeen, reagenssien käyttöturvallisuustiedotteen tarkemmat lähdemerkinnät sekä selkeytimme työn suorituksen ohjeistusta.

9 TULOKSET

Sekä ISLABin Cobas6000 -analysointilaitteella että Savonian käyttämä Indiko™ Plus -analysointilaitteella käytävät molemmat bubrenorfiinin määrittämiseen virtsasta immunologista kilpailevan sitoutumisen menetelmää, joka jo aiempaan teoriaan viitattujen tutkimusten mukaan on todettu olevan epätarkka menetelmä antamaan tarkkoja numeerisia arvoja ja siten luotettavia tuloksia. Immunologisen menetelmän positiivinen tulos tulee tarkistaa verifioidulla mittausmenetelmällä, joka on usein kromatografian ja massaspektrometrin yhdistelmä.

Analyysisarjan tulokset ovat laadullisesti yhteneväisiä ISLABin tulosten kanssa, yhdestä negatiivisesta tuloksesta huolimatta. Väärien negatiivisten ja positiivisten tulosten mahdollisuus on aina olemassa immunologisia menetelmiä hyödynnettäessä. Mikäli potilaasta voidaan epäillä väärää negatiivista tulosta, kuten analyysisarjamme näyte numero 14, tulos tulee varmistaa toisella menetelmällä. (liite 2).

9.1 Analyysitulosten vertailu

Tulokset eri analyysisarjoille ja ISLABin tuloksille ovat esitettyinä liitteessä 2. Vaihteluvälin avulla esitettiin suurimman ja pienimmän havainnon erotus taulukossa 1. Variaatiokertoimen avulla verrattiin ISLABin tuloksia Indiko™ Plus -analysointilaitteen kolmen analysointikerran keskiarvoon. Variaatiokertoimen avulla verrattiin siten kahden eri analysointilaitteella tehdyn määrittelyn välistä keskihajontaa (liite 3).

TAULUKKO 1. Analyysikohtaiset keskiarvot, mediaanit ja analyysikertojen korrelaatio ISLABin tuloksiin. Lisäksi analyysisarjojen pienin ja suurin tulos sekä keskihajonta.

	1. analyysi	2. analyysi	3. analyysi	ISLAB
Keskiarvo	63,9	64,5	64,9	52,2
Mediaani	71,3	72,9	72,3	51,9
Korrelaatio	0,35	0,36	0,36	0,36
Minimi	3,1	3,4	2,8	5,7
Maksimi	99,9	102,1	101,8	211,5
Keskihajonta	32,1	32,2	32,1	34,5

Keskihajonta kertoi, että kolmen eri analysointikerran tulosten välillä ei ole kovin suurta vaihtelua, mutta keskihajonta poikkesi keskiarvosta paljon. Varianssia tarkasteltiin laskemalla keskihajonta korotettuna toiseen potenssiin, koska se on suosittu useissa tilastotieteen sovelluksissa. Varianssi on suurin niissä, missä tuloksemme poikkeaa ISLABin tuloksista. Keskihajontaa kokeiltiin jakaa keskiarvolla, jolloin saatiin selville kuinka paljon prosentteina keskihajonta on keskiarvosta ja siten verrattua hajonnan suuruutta. Keskiarvo kaikille näytteille omien analysointisarjojen (63,9–64,9 ng/ml) välillä sekä ISLABin (52,2) kaikkien tulosten välillä olivat kuitenkin suhteellisen vastaavat keskenään. Keski-

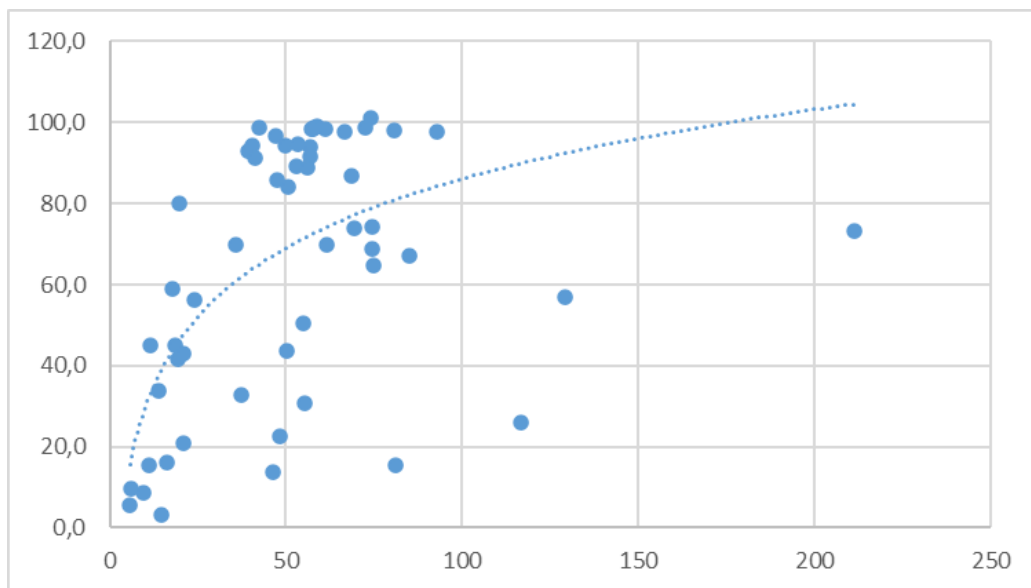
hajonta omien tulosten välillä oli 32,1 ng/ml ja ISLABin 34,5 ng/ml, jotka osaltaan kertovat, että hajonta oli samaa suuruusluokkaa (taulukko 1). Liitteessä 3 keskihajonta on esitetty laskemalla jokaiselle näytteelle oma analyysikohtainen keskihajonta.

T-testillä saatu p-arvo eli todennäköisyys on 0,02 eli melkein merkitsevä, minkä myötä voitiin myös päätellä, että mittaukset poikkesivat ISLABin tuloksista. Korrelaatiokertoimen avulla saadut tulokset viittasivat siihen, ettei korrelaatiota ole lainkaan eli lineaarista yhteyttä vertailulaboratorion tuloksiin ei ole. Havaintoja (56) voisi kuitenkin sanoa olleen tarpeeksi (liite 3).

Varianssin (kovarianssin) avulla on esitetty taulukossa 2 analyysisarjojen keskiarvon ja ISLABin tulosten suhde. Tämän avulla saatiin näiden muuttujien suunta sekä voimakkuus selville. Matalat arvot kertoivat, ettei tulosten välillä ole juurikaan yhteyttä. Arvot olivat kaikki positiivisia ja muutama nolla tai lähellä nollaa, jotka tarkoittivat, ettei tulosten välillä ole yhteyttä. Jokaiselle näytteelle laskettiin keskipoikkeama käyttämällä kolmen analysointikerran laskettuja keskiarvoja ja vertaamalla tätä tulosta ISLABin tulokseen. Keskipoikkeamien laskennallisista tuloksista pääteltiin, että käytetyssä aineistossa on paljon vaihtelua eri näytteiden välillä. Kaikista näytteistä (56) noin 15 näytteellä oli suhteellisen alhainen keskipoikkeaman tulos. Osassa analyyseista Indiko™ Plus antoi hyvinkin samansuuruisen tuloksen kuin Cobas6000. Tuloksista nähtiin selvästi tämä immunologisten analyysien suuri riski väärille negatiivisille tai positiivisille tuloksille. Pääasiassa Indiko™ Plus tulkitse kvalitatiivisesti näytteet oikein. Positiivisiksi tulkitut tulokset tulisi joka tapauksessa lähettää varmistukseen akkreditoituun laboratorioon (liite 3).

9.2 Graafinen vertailu

Sirontakuvioiden (kuva 3) avulla tulkittiin sekä analyysisarjojen keskiarvojen että ISLABin tulosten hajontaa ng/ml. Analyysisarjoista saadut tulokset hajosivat hyvin laajaksi pilveksi ja osin myös kauaksi suhteessa ISLABilta saatuihin tuloksiin.



KUVA 3. Sirontakuvioiden esittämien analyysisarjojen keskiarvojen ja ISLABin tulosten hajonta ng/ml. X-akselilla ISLABin EMIT tulokset ja y-akselilla CEDIA.

Sirontakuviosta (kuva 3) havainnointiin analyysien keskiarvojen ja ISLABin tulosten hajontapilveä. Tuloksista suurin osa sijoittui y-akselin suunnassa 80–100 ng/ml rajoille, kun taas x-akselin suunnassa kolme havaintoa ylitti 100 ng/ml.

10 POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli verifioida U-Bupre-menetelmä ja tehdä työohjeet sen suorittamiseen Savonia-ammattikorkeakoulun Indiko™ Plus -analyysointilaitteille opiskelijoiden kliinisen kemian laboratorioharjoitustunneille käyttöön. Indiko™ Plus -analyysointilaitteen U-Bupre-menetelmän verifiointilla selvitettiin, tuottaako menetelmä toistettavia ja vertailumenetelmän antamiin arvoihin verrattavissa olevia tuloksia. Tutkimuksen tavoitteena oli antaa opiskelijoille tietoa huumausaineanalytiikassa käytettävistä menetelmistä ja niiden periaatteista. Tutkimuksessa analysoitiin kolme kertaa buprenorfiinin pitoisuus jokaisesta viidestäkymmenestäkuudesta virtsanäytteestä. Tällä selvitettiin, antaako Indiko™ Plus -analyysointilaitteille keskenään verrattavissa olevia tuloksia. Saaduista tuloksista nähdään, että tulokset ovat keskenään yhteneväisiä lähes kaikilla analysointikerroilla ja todetaan, että Indiko™ Plus -analyysointilaitteet antavat Savonia-ammattikorkeakoulun laiteympäristössä luotettavia tuloksia. Poikkeuksena on näyttenumero 14, joka Indiko™ Plus -analyysointilaitteella antoi negatiivisen tuloksen, kun taas Cobas6000 -analyysointilaitteella tulos on ollut positiivinen. Verrattessa näytteille lasketta keskiarvoa ISLABin tuloksiin todetaan, että tulokset eivät ole suurilta osin yhteneväisiä Indiko™ Plus -analyysointilaitteen ja Cobas6000 -analyysointilaitteen välillä, vaan tulostasoissa on eroja yksittäisten näytteiden välillä paljonkin. Käyttöönottotestauksen myötä voimme todeta, että työohjeet ovat yksinkertaiset ja helposti kliinisen kemian harjoitustunneille mukaan tulostettavat. Työohjeet ovat selkeät, joita tarkasti noudattamalla ei virheitä tapahdu analyysia suorittaessa. Opiskelijan tulee tutustua myös laitteen käyttöohjeisiin sekä reagenssien käyttöturvallisuustiedotteisiin ennen tämän analyysin suorittamista.

10.1 Tulosten tarkastelu

Näytteet säilytettiin asianmukaisesti analyysiin saakka. ISLABilta emme saaneet yhtään negatiivista näytettä. Toivoimme eri pitoisuuksilla varustettuja näytteitä ja olisimme voineet heille tarkentaa, että tarvitsemme myös negatiivisia. Negatiivisten vertailunäytteiden avulla olisimme saaneet mahdollisesti suurempaa hajontaa tulosten välille ja enemmän vertailua tuloksien oikeellisuudessa. Näytetulokset, jotka ylittivät korkean arvon kalibraattorin olisi pitänyt laimentaa negatiivisella virtsakalibraattorilla ja testata uudelleen. Näin olisimme saaneet ISLABin tulokset lähemmäksi raja-arvoa, jolloin tuloksien luotettavuus kasvaa. Opinnäytetyömme avulla emme siten saaneet vastausta CEDIAN kysymykseen seuloa luotettavasti negatiiviset näytteet, koska negatiivisia tai raja-arvoa lähellä olevia näytteitä ei ollut käytössä. Kontrolli Low ei mennyt asetettuihin viitearvoihin. Tarkastimme, että se oli kaikilla aiemmilla analyysikerroilla antanut poikkeavan arvon. QC-sääntö ei saisi poiketa enempää kuin +/- 1 ng/ml arvosta 3 ng/ml. Low oli meillä 4,5 ng/ml ja edellisellä harjoitusanalysointi kerralla se oli ollut 4,2 ng/ml, jonka silloinkin hyväksyimme.

ISLABin tuloksiin verrattuna muutamien näytteiden kohdalla poikkeamat voivat johtua satunnaisvirheistä sekä laitteisiin liittyvistä eroista. Lisäksi huomioidaan, että ISLABin Cobas6000 -analyysointilaitteet käyttävät eri toimittajan reagensseja kuin Indiko™ Plus -analyysointilaitteet. Lääkeaineiden keskinäinen vuorovaikutus on voinut myös vaikuttaa siihen, että tammikuussa osaltaan saatiin erilaisia tuloksia kuin mitä ISLAB on saanut. Kaikki saadut näytteet oli tulkittu aiemmin positiivisiksi ISLABin menetelmällä ja näytteen 14 tulos negatiiviseksi tarkoittaa, että riittävää värimuutosta ei ole päässyt analyysi-

sisä tapahtumaan, koska entsyymireaktiota ei ole tapahtunut Indiko Plus -analysointilaitteella. Analyysin tekijän tulee muistaa, että kyseessä on seulontatutkimus, eikä menetelmä kykene tarkasti mittaamaan näytteessä olevaa buprenorfiinia. Toisin sanoen seulontamenetelmän tarkkuus riittää vain antamaan kvalitatiivisen tuloksen. Voidaan myös arvella, että kyseisessä virtsanäytteessä 14 on jokin muuta analyysia häiritsevää tekijää, joka on muuttanut reaktiota. Valmistajan validointiprosessissa todettuja rajoittavia tekijöitä ovat muun muassa muiden aineiden ristireagointi sekä biologisten tekijöiden vaikutus testin tulokseen.

ISLABin näytteistä olisi ollut hyvä saada tietoon, mikäli potilaan tiedetään käyttäneen buprenorfiinia. Tämä antaisi tutkijoille tietoa siitä onko kyseessä todella positiivinen tulos. Lisäksi olisi hyvä tietää varmistusanalyysiin lähetettyjen näytteiden lopullinen tulos, onko kyseessä oikeasti positiivinen vai kenties väärä positiivinen tulos buprenorfiinin osalta. Eroavat kalibraatiot menetelmien välillä voivat osaltaan myötävaikuttaa laitteiden kykyyn havaita pitoisuuksia. CEDIAN cut-off-raja voi mahdollisesti antaa epätarkkoja tuloksia verrattuna ISLABin EMIT-menetelmän usean eri pitoisuuden kalibraattoreihin. Lisäksi näytteet, jotka antoivat korkeita tuloksia verrattuna ISLABin tuloksiin, voitaisiin laimentaa ja tämän jälkeen tarkastella, onko laimentamisella vaikutusta tuloksen tarkkuuteen ja tarkastella vastaako laimennetun näytteen tulos vertailulaboratorion tulokseen. Tässä tilanteessa laimennetuille tuloksille olisi voinut laskea tulosten välisen variaatiokertoimen ja mitatun arvon poikkeaman teoreettisesta arvosta. Tutkimusta voitaisiin myös pidentää siten, että näytteitä analysoidisiin pidemmällä aika välillä ja kerättäisiin aina uudet vertailunäytteet. Tulokset voitaisiin sitten analysoida tilastollisesti jokaiselle analysointikerroille, sekä verrata näitä tuloksia kokonaisuuteen. Menetelmän toistettavuutta olisi voitu mitata tarkemmin käyttämällä mahdollisimman eripitoisia näytteitä. Lisäksi rinnakkaismäärittämisä olisi kannattanut tehdä myös vertailulaitteella, jolloin tämän tulokset olisi mahdollista analysoida tilastollisesti ja sitten verrata Indikon tuloksiin.

Työohje on laadukas, kun se tarjoaa opiskelijalle haasteita ja tekee oppimisen näkyväksi ja tietoiseksi. Opiskelijan tulee pystyä työskentelemään vaivatta opiskeltavan aiheen parissa niin, että työskentely motivoi ja tuottaa haluttuja tuloksia. Työohjeiden käytettävyydellä tarkoitetaan rakenteen ja käytännön toteutuksen sujuvuutta. Yksi työohjeiden perustavoitteista on käytettävyys, sillä käyttäjä turhautuu esimerkiksi epäselvään ilmaisuun tai ohjeiden puutteeseen. (Högman 2006.) Työohje tulee laatia ajatellen lukijan ja tekijän näkökulmaa työn suoritukseen. Ohjeiden selkeyteen voi vaikuttaa kokonaisrakenteella ja väliotsikoiden valinnalla. Työohjeista teimme selkeät ja helposti seurattavat. Pidimme tekstin lyhyenä, jotta niiden lukeminen ei turhauta lukijaa tai aiheuta epäselvyyksiä. Lisäksi sanamuotojen oikea valinta ja käskymuodon käyttö työohjeessa selventää lukijalle mitä hänen tulee tehdä. (Kotimaisten kielten keskus 2021.) Ohjeen laatuun vaikuttavat esimerkiksi kohderyhmän hyvä tuntemus, sisällön oikeanlainen rajaus ja asian ilmaisun hallinta (Högman 2006). Valitsimme työohjeisimme käskymuodon, jota käytimme läpi ohjeen. Tunsimme kohderyhmämme hyvin, joten pystyimme laatimaan tämän kautta opiskelijaystävälliset ohjeet.

Ohjeesta tulee selkeästi ilmetä kaikki tarvittava tieto työn suorittamiseen tehokkaasti sekä tehtävään työhön tarkoitettavat menettelytavat ja ohjeistus vaihe vaiheelta. Työohjeen suunnittelussa tulee huomioida työn suorittaminen turvallisesti ja mahdolliset reagenssikohtaiset turvallisuustiedotteet on oltava työn tekijän saatavilla. Työohjeissa on työturvallisuuden osio, jossa kehotamme perehtymään

laitteen käyttöohjeisiin, reagenssien käyttöturvatiedoissa ja huolehtimaan työturvallisuudesta. Reagenssien käyttöturvatiedoissa löytyä lähdemerkintöjen avulla opinnäytetyömme lähdeluettelosta. Minimalistisesti tuotettu ytimekäs työohje on johdonmukainen käyttäjälleen. Näin työohjeeseen sisällytetään vain asiaan kuuluva olennainen tieto työn suorittamiseksi. Minimalistinen työohje toimii laboratorioympäristössä siten, ettei ole paljon selattavia sivuja vaan kaikki tieto on yhdellä silmäyksellä nähtävissä. Liian pitkä teksti voi estää työn tekijää huomioimasta olennaisia asioita työn suorittamiseksi. Tuotetun työohjeen rakenteeseen tulee kiinnittää huomiota, että se on kohderyhmälle helppo lukuinen ja tarpeellinen tieto on nopeasti löydettävissä. (Suomen standardisoimisliitto, SFS-EN IEC/IEEE 82079, 2020.) Työohjeista tuli neljä sivuiset, mutta tämä johtuu valitusta taulukkorakenteesta. Ohjeiden teksti on tiivis ja se sisältää kaiken onnistuneeseen analysointiin tarvittavan.

Ohjeen käyttämiseen liittyvät mahdolliset riskit minimoidaan tuottamalla perinpohjainen työohje, joka toimii käyttöympäristössään. Kirjoitusasu on oltava virheetöntä ja on suotavaa käyttää tiiviitä sanamuotoja sekä huomioida terminologian soveltuvuus käyttäjäryhmälle. Kun ohjeita laaditaan, tulee ne suunnitella sellaisiksi, että työn suorittaminen on helposti toistettavissa. Työohjeen suunnittelussa huomioidaan tulevalta käyttäjäryhmältä vaadittavat tiedot ja taidot työn suorittamiseksi. Käyttäjäryhmän ominaisuuksista on hyvä huomioida ainakin kieli, työympäristö, aiemmin hankittu tieto ja osaaminen. Työohjeen laatimisprosessi sisältää tiedon hankinnan ja työohjeen ulkoisen rakenteen suunnittelun, tiedon soveltamisen kirjallisesti ytimekkääksi, käytettävyydestä ja tiedon tallentamisen kohdeyleisön saataville. (Suomen standardisoimisliitto, SFS-EN IEC/IEEE 82079, 2020.)

10.2 Tutkimuksen eettisyys ja luotettavuus

Tieteellinen tutkimus suoritetaan hyvien tieteellisten käytäntöjen edellyttämien ehtojen mukaisesti, jotka perustuvat lainsäädäntöön ja tiedeyhteisön kansainvälisiin sekä kansallisiin tutkimuseettisiin periaatteisiin ja suosituksiin (Arene 2020). Hyvien tieteellisten käytäntöjen mukaan toimimalla voidaan arvioida tutkimuksen ja siitä saatujen tulosten olevan myös eettisesti hyväksyttäviä, jolloin tulokset ovat luotettavia. Tutkimustyössä kunnioitetaan tiedeyhteisön tunnustamia toimintatapoja, joihin luokitellaan tarkkuus, rehellisyys ja riittävä huolellisuus työskentelyssä. Toimintatapoja noudatetaan koko tutkimuksen ajan. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2019.)

Tutkijoilla on eettisiä ja moraalisia velvoitteita tutkimukseen osallistuvia henkilöitä kohtaan, sekä tutkimusyhteisöä, omaa ammattikuntaa ja yhteiskuntaa kohtaan. Tutkijoina tutkimus toteutetaan siten, ettei tutkimuksesta aiheudu haittaa tai vahinkoja tutkittavina oleville. Tutkimuksen kohteena olevien näyttöjen antajien yksityisyydensuoja on huomioituna tuloksia julkaistaessa. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2019.) Tutkijat huomioivat henkilötietojen käsittelyn ja tietosuojan toteutumisen. Henkilötietoja käsiteltäessä on huomioitava tutkimuseettisten ohjeiden mukainen tietojen keräys, tietojen tallentaminen, säilyttäminen sekä tuhoaminen. Henkilötiedot, joista voi tunnistaa henkilön suoraan sekä tiedot, joista henkilön voi tunnistaa epäsuoraan, tulee muuttaa tunnistamattomiksi. Erityisten henkilötietoryhmien käsittely on kiellettyä, ja niihin kuuluu muun muassa rotu tai etninen alkuperä. (Arene 2020.) Tutkijoilla on vastuu tutkimuksesta ja tutkijoiden tulee hankkia tutkimusta varten tarvittavat tutkimusluvut (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2019).

Eettisten periaatteiden toteutuminen tutkimusprosessin aikana varmistetaan siten, että tutkimusprosessi kunnioittaa tutkimuksen osallistujia ja tuo samanaikaisesti yhteiskunnallista hyötyä (Kyngäs ym. 2019). Tutkijoille itsemme oman ammatillisen kasvun hyöty sekä bioanalytiikan opiskelijoille saatava hyöty tulevissa opinnoissa. Kyngäs, Mikkonen ja Kääriäinen (2019) mainitsevat, että eettinen viitekehys sisältää yhteistyökumppanuuden, sosiaaliset arvot, tieteellisen pätevyyden, oikeudenmukaisen osallistujavalinnan, suotuisan riski-hyötysuhteen, riippumattoman arvioinnin, tietoisien suostumuksen ja itsenäisen henkilön kunnioittamisen. Tutkimuksessa käytetty aineisto ja tulokset talletetaan avoimesti saataville julkisena Theseus-tietokantaan, jonka myötä toteutamme tieteen avoimuutta. Tekijänoikeudet kuuluvat työn tekijöille sekä Savonia-ammattikorkeakoululle.

Opinnäytetyön kaikissa vaiheissa on huomioitu Suomen Bioanalyttikoliiton (2017) eettiset periaatteet. Tutkijoina olemme käyttäneet tieteellisin menetelmin tutkittuja ja hyväksytyjä toimintatapoja perehtyen ammattitoimintaamme koskeviin säädöksiin ja määräyksiin. Olemme huolehtineet laboratoriotutkimusten laadusta ja luotettavuudesta koko tutkimusprosessin kaikissa vaiheissa. Arenen (2020) muistilistojen hyödyntäminen opinnäytetyötä kirjoittaessa tekee työstä eettisesti hyväksyttävän. Ohjaus- ja hankkeistamissopimuksen allekirjoittaminen tilaajan Savonia-ammattikorkeakoulun kanssa edellyttää että toimitaan sopimusehtojen mukaisesti. Savonia-ammattikorkeakoulu vastaa opinnäytetyön ohjaamisesta ja opiskelijat tutkijoina vastaavat työn valmistumisesta.

Luotettavuuden arviointi opinnäytetyössä on tärkeä osa koko prosessin ajan. Lähteinä käytetään aiheeseen liittyvää ammattialan ja tieteenalan kirjallisuutta, tutkimusaineistoa sekä muita asianmukaisia tiedonlähteitä. Jotta tieto olisi mahdollisimman muuttumatonta, tulisi käytettyjen lähteiden olla mahdollisimman tuoreita ja alkuperäisiä (Vilka 2015, 25–35, 124–126). Hyödynsimme soveltaen opinnäytetyössämme useaa erilaista lähdetä ja pyrimme käyttämään mahdollisimman uutta ja luotettavaa tietoa. Lähteemme ovat rajattu pääosin vuosilta 2015–2020 ja mukaan tuli muutama 2000-luvun alkupuolelta. Lisäksi meillä on lähteenä vuosilta 1993 ja 1986 peräisin olevaa kirjallisuutta. Olemme käyttäneet näitä lähteitä harkiten ja todenneet niiden olevan melko ajantasaiset kliinisen kemian menetelmistä kerrottuun teoretiseen tietoon. Lähteitä haettiin sekä kotimaisista että kansainvälisistä tieteellisistä tietokannoista huumausaineanalytiikkaan liittyviä hakusanoja käyttäen.

Plagiointi on luvaton lainaamista ja se on tekijänoikeuslaissa kielletty (Arenen 2020). Plagiointi tarkoittaa toisen tekijän ajatusten, tekstin, tutkimustulosten tai muun aineiston esittämistä omanaan. Tämä voi esiintyä vääränlaisena lähdeviittauksena tai suoraan tekijän tekstistä kopioituna omaan työhön. (Saloheimo 2015.) Olimme koko opinnäytetyöprosessin ajan motivoituneita tiedonhakemisessa työhömmme ilman vilpillistä toimintaa. Lähdeviittaukset laitoimme ohjeiden mukaisesti tekstiin ja lähdeluetteloon. Opinnäytetyö ladattiin Turnitin-plagioinnintarkastusohjelmaan, jonka tuloksena yhtäläisyyksiä muihin lähteisiin oli 10 %. Tästä 6 % suurin osa kohdistui viittauksiin sekä lähdeluetteloon, pieni osa opinnäytetyön raporttipohjaan liittyviin otsikointeihin sekä lähteissä käytettyihin fraaseihin. Kun jättää vertailusta pois lähdeluettelon ja viittaukset, on tuloksena 1 % vastaavuus. Tuotetuissa työohjeissa ei ollut lainkaan vastaavuutta muihin lähteisiin. Turnitin-tarkastusohjelman raportista nähdään, että raportti on kokonaisuudessaan tekijöidensä kirjoittama.

Mittaustulosten luotettavuutta ja tutkimuksen onnistumista kuvataan validiteetilla ja reliabiliteetilla. Luotettavan tutkimuksen kannalta on otoksen oltava edustava ja kattava sekä tutkimuskysymysten tulee antaa mittauksilla haluttuun tutkimusongelmaan vastaukset. (Heikkilä 2014.) Validiteetti kertoo sen, kuinka hyvin tutkimukseen käytetty mittausmenetelmä mittaa sitä ominaisuutta, mitä on tarkoituskin mitata. Reliabiliteetti taas osoittaa sen, miten luotettavasti ja toistettavasti menetelmä mittaa tutkittavaa ominaisuutta. (Vilka 2015, 25–35, 124–126.) Meillä oli analysoinnissa näytemateriaalina ainoastaan pitoisuudeltaan positiivisia näytteitä. Toistettavuus ilmeni positiivisten näytteiden analysoimisella kolme kertaa. Emme voi näin ollen todeta CEDIA-menetelmän luotettavuutta negatiivisten näytteiden seulonnassa, mutta positiiviset näytteet menetelmä seuloo riittävän luotettavasti.

Tuotimme työohjeet bioanalyttikotutkinto-ohjelman opiskelijoille harjoitustunneille ja ymmärrämme vastuun oppimateriaalin tuottamisesta. Suoritimme itse ensin analysoinnin työohjeiden mukaisesti, ohjeiden toimivuuden varmistamiseksi. Tämän jälkeen luotettavuuden lisäämiseksi kaksi bioanalyttikko-opiskelijoiden ryhmää suoritti analyysin kliinisen kemian harjoitustunneilla. Opiskelijoilta saimme rakentavaa palautetta sekä hyviä huomioita työohjeiden parantamiseksi. Saadun palautteen perusteella teimme korjauksia työohjeisiin. Korjauksien jälkeen työohjeita ei ole testattu, joten lopullista toimivuutta emme voi todeta.

10.3 Ammatillinen kehittyminen

Opinnäytetyö on eräänlainen oppimisprosessi, joka edistää opiskelijan asiantuntijuutta, ammatillista kehittymistä ja työelämätaitoja (Arene 2020). Opinnäytetyön tavoite on, että opiskelija tutkijana kykenee itsenäiseen tiedonhankintaan ja sen analysointiin kriittisesti. Opiskelija kykenee soveltamaan tieteellistä tietoa ja harjoittaa ongelmanratkaisukykyä ja argumentointitaitojaan sekä kykenee selkeään tieteelliseen kirjalliseen viestintään toteuttaen samalla työelämäläheistä tutkimusta tilaajan tarpeisiin. Opiskelija käyttää aiheeseen soveltuvia tutkimusmenetelmiä, joiden avulla laatii selkeän loogisesti rajatun raportin sekä osaa arvioida opinnäytetyöprosessiaan huomioiden sen eettisyyden ja luotettavuuden ammatillisen kasvun mukaan lukien. (Savonia-ammattikorkeakoulu 2020.)

Opinnäytetyön avulla opimme kuinka menetelmän verifiointi suoritetaan käytännössä.

Tarkastelimme ja vertailimme tuloksia sekä kahta erilaista menetelmää ja niiden periaatteita toisiinsa. Työelämässä vastuuhoidajat päivittävät laboratorion työohjeet ajantasalle, joten työmme ansiosta pääsimme tekemään konkreettisesti työohjeet opiskelijoille. Työohjeista teimme helppolukuiset, jotta työohjeen käyttäjälle ei sattuisi virheitä analyysin suorittamisessa. Kliinisen kemian menetelmät tulivat tutuiksi, erityisesti huumausainediagnostiikkaan liittyvät seulonta- ja varmistusmenetelmät.

Ammatillinen kehittyminen ilmenee hakemalla itsenäisesti tietoa ja tiedon luotettavuuden arvioimisella sekä ottamalla vastuuta omasta tutkimuksesta. Meidän joustaminen opinnäytetyöprosessin aikana aikataulusta lisäsi kykyemmä sopeutua muuttuviin tilanteisiin työelämässä, kun suunnitelmista joudutaan poikkeamaan. Kliininen laboratoriotutkimuksen sisältö ja sen vaiheiden ymmärtäminen tuli hyvin tutuksi kauttaaltaan. Määritysmenetelmien, tiedon soveltaminen ja luotettavuuden arviointi kasvatti ammatillista osaamistamme. Bioanalyttikon tutkinto-ohjelman opintosuunnitelman osaamistavoitteet koetaan kaikenkaikkiaan siten täytyneiksi.

10.4 Jatkotutkimusaiheet ja johtopäätökset

Immunologiset menetelmät ovat tarpeellisia tilanteissa, joissa niiden tarkkuus määritellään riittäväksi. Positiivinen tulos immunologisesta menetelmästä tulee aina varmistaa siihen soveltuvalla tarkemmalla menetelmällä, jotta mahdolliset virheet ensivaiheen analysoinnissa sekä näytteiden sekaantuminen tai kontaminoituminen voidaan sulkea pois. Varmistusmenetelmä identifioi tutkittavan yhdisteen luotettavasti.

Verifioinnissamme käytetyt menetelmät ovat samankaltaisia immunologisia menetelmiä. Tutkimusta voisi viedä eteenpäin siten, että tuloksia vertaa erilaista menetelmää käyttävän analyysin tuloksiin. Immunologisten tulosten luotettavuudesta kertoo paljon, kun immunologisella menetelmällä saatuja tuloksia verrataan akkreditoitun laboratorion massaspektrometriaa hyödyntäviin tuloksiin. Opinnäytetyössä käyttämämme CEDIA-menetelmä antaa kuitenkin riittävän tarkan tuloksen erottamaan positiivisen ja negatiivisen tuloksen toisistaan.

Oikean tutkimusmenetelmän valinta opioidien seulonnassa on oleellista. Tulee pohtia, tarvitaanko kvantitatiivisia vai kvalitatiivisia tuloksia sekä missä tilanteissa voidaan valita immunologinen määrittäminen ja milloin voidaan valita suoraan kromatografian ja massaspektrometrian yhdistelmä. Vaikka massaspektrometriaa hyödyntävää menetelmää sanotaan tarkimmaksi menetelmäksi, tulee silti joissain tilanteissa immunologinen seulonta ensin tarpeeseen antamaan nopeasti alustavan vastauksen huumien käytöstä. (Kwong, Magnani & Moore 2017, 433–445.)

Spesifisyys immunologisella menetelmällä opioideille ei ole riittävä ja siksi tarvitaan lopullinen testaus nestekromatografisella tandem massaspektrometrillä. Ameritoxin tekemä tutkimus vuosina 2006–2009 osoittaa korkean väärin positiivisten määrän useille immunologisella menetelmällä seulotuille lääkkeille, mukaan lukien buprenorfiini. Tämän vuoksi suositellaan laadullisten tulosten raportointia, näytteille suoritettavaa hydrolyysia sekä tavanomaisia raja-arvoja. (Kwong, Magnani & Moore 2017, 433–445.)

LÄHTEET

- Aalto, Mauri, Alho, Hannu & Niemelä, Saija (toim.) 2018. Sanasto. Duodecim Oppiportti. Huume- ja lääkeriippuvuudet. https://www.oppiportti.fi/op/hlr00290/do?p_haku=mesolimbinen%20dopamiinirata#q=mesolimbinen%20dopamiinirata. Viitattu 15.2.2021.
- Arene 2020. Ammattikorkeakoulujen opinnäytetöiden eettiset suositukset. Ammattikorkeakoulujen rehtorineuvosto Arene ry. Pdf-tiedosto. Julkaistu 9.1.2020. <http://www.arene.fi/wp-content/uploads/Raportit/2020/AMMATTIKORKEAKOULUJEN%20OPINN%C3%84YTET%C3%96IDEN%20EETTISET%20SUOSITUKSET%202020.pdf?t=1578480382>. Viitattu 13.12.2020.
- Armbruster, David A., Schwarzhoff, Robert H., Hubster, Edward C. & Liserio, Monica K. 1993. Enzyme Immunoassay, Kinetic Microparticle Immunoassay, Radioimmunoassay, and Fluorescence Polarization Immunoassay Compared for Drugs-of-Abuse Screening. *Clinical Chemistry* 39 (10), 2137-2146.
- Chu, F.S. 2003. Radioimmunoassay and Enzyme Immunoassay. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. Pdf-tiedosto. Julkaistu joulukuu 2003. <https://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/3-s2.0-B012227055X00626X/first-page-pdf>. Viitattu 21.1.2021.
- Dasgupta, Amitava 2007. The effects of adulterants and selected ingested compounds on drugs-of-abuse testing in urine. National Center for Biotechnology Information. Verkkojulkaisu. PubMed. Päivitetty syyskuu 2007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17709324/>. Viitattu 12.12.2020.
- Duodecim 2020. Agonisti. Lääketieteen sanasto. Duodecim Terveyskirjasto. Verkkojulkaisu. Kustannus Oy Duodecim. <https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti>. Viitattu 17.1.2021.
- Ekman, Rolf, Silberring, Jerzy, Westman-Brinkmalm & Kraj, Agnieszka 2009. Mass Spectrometry. Instrumentation, Interpretation, and Applications. s. 106-107, 121. ProQuest Ebook Central. <https://ebookcentral-proquest-com.ezproxy.savonia.fi/lib/savoniafi/reader.action?docID=406467&query=Mass+Spectrometry%3A+Instrumentation%2C+Interpretation%2C+and+Applications>. Viitattu 6.1.2021.
- FINAS 2016. Akkreditointi. Verkkojulkaisu. Finnish Accreditation Service. Päivitetty 27.10.2016. <https://www.finas.fi/akkreditointi/Sivut/default.aspx>. Viitattu 16.12.2020.
- Fu, S. 2016. Adulterants in Urine Drug Testing. Verkkojulkaisu. PubMed. National Center for Biotechnology Information. Päivitetty 11.5.2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27645818/>. Viitattu 12.12.2020.
- Grönroos, Paula & Koskinen, Pertti 2014. Potilasturvallisuuden perusteet. Kliinisten laboratoriotutkimusten luotettavuus. Verkkokirja. Kustannus Oy Duodecim. <https://www.oppiportti.fi/op/ptp00207/do>. Viitattu 16.12.2020.
- Gunnar, Teemu 2018. Huumetestien aikarajoja. Verkkojulkaisu. Käypä hoito. Päivitetty 12.4.2018. <https://www.kaypahoito.fi/nix00462>. Viitattu 8.12.2020.

- Halonen, T. 2004. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Julkaisussa: Penttilä, I.(toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY. Sivut 90-100.
- Heikkilä, Tarja 2014. Tilastollinen tutkimus. Verkkokirja. Saatavissa: Ellibslibrary.com. Helsinki: Edita Publishing Oy. Viitattu 12.1.2021.
- Heikkinen, Sini, Moilanen, Laura, Virén, Annika 2014. Immunokemialliset menetelmät kliinisen kemian analytiikassa – Oppimateriaali bioanalytiikko-opiskelijoille. Opinnäytetyö. Bioanalytiikon tutkinto-ohjelma. Savonia-ammattikorkeakoulu. https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/82689/Heikkinen_Sini_Moilanen_Laura_Viren_Annika.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Viitattu 11.5.2021.
- Henderson, D., R., Friedman, S., B., Harris, J., D., Manning, W., B., & Zoccoli, M., A. 1986. Clinical Chemistry. CEDIA, a new homogeneous immunoassay system. Clinical Chemistry. Osa/vuosik. Volume 32, Issue 9. Sivut 1637–1641.
- Hietalahti, Anne, Niinivaara, Kristiina & Koivunen, Virpi 2015. Buprenorfiini päihdekäytössä. Verkkojulkaisu. Päihdekliniikka.fi. <https://paihdelinkki.fi/fi/tietopankki/tietoiskut/laakkeet/buprenorfiini-paihdekaytossa>. Viitattu 15.2.2021.
- Holler, Justin, Bosty, Thomas, Klette, Kevin, Wiegand, Russel, Jemionek, John & Jacobs, Aaron 2004. Comparison of the Microgenics CEDIA® Heroin Metabolite (6-AM) and the Roche Abuscreen® ONLINE Opiate Immunoassays for the Detection of Heroin Use in Forensic Urine Samples. Journal of Analytical Toxicology. Volume 28. Issue 6. Julkaistu 1.9.2004. <https://academic.oup.com/jat/article/28/6/489/904286>. Viitattu 16.12.2020.
- HUSLAB 2020. Huumeseuronta, kvalitatiivinen, virtsasta U-Huum-O. Verkkojulkaisu. Tutkimusohjekirja. Päivitetty 6.2.2020. <https://huslab.fi/ohjekirja/4221.html>. Viitattu 16.12.2020.
- HUSLAB 2021. Buprenorfiini, varmistus, virtsasta. Verkkojulkaisu. Tutkimusohjekirja. Päivitetty 2.1.2021. <https://huslab.fi/ohjekirja/1822.html>. Viitattu 5.1.2021.
- Hägg, Margareta 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Pdf-tiedosto. Teknologian ja validoinnin tutkimuskeskus VTT Oy. Julkaistu 1.10.2016. s. 7-18, 31-31. <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2016/T276.pdf>. Viitattu 12.12.2020.
- Högman, Eija 2006. Verkkoppimateriaalin laatukriteerit. Verkkojulkaisu/Pdf-tiedosto. Opetushallitus ja tekijät (työryhmän raportti). Moniste 1/2006. <http://www.mit.jyu.fi/ope/kurssit/TIES462/Materiaalit/laatukriteerit.pdf>. Viitattu 26.1.2021.
- ISLAB 2016. Huumetestauksen valvottu näytteenotto. Pdf-tiedosto. Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä. Julkaistu 16.12.2016. <https://www.islab.fi/documents/7350541/7406959/HUUMETESTAUKSEN+VALVOTTU+N%C3%84YTTEEN-OTTO.pdf/d8c09987-b336-4f67-ac9c-87c5f5b2069a>. Viitattu 13.1.2021.
- ISLAB 2020a. U-HuumCt. Verkkojulkaisu. Tutkimusohjekirja. Itä-Suomen laboratoriokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä. Päivitetty 6.5.2020. <http://webohjekirja.mylabservices.fi/ISLAB/index.php?test=55023>. Viitattu 16.12.2020

ISLAB 2020b. U-HuumLCT. Verkkojulkaisu. Tutkimusohjekirja. Itä-Suomen laboratorokeskuksen liikelaitoskuntayhtymä. Päivitetty 6.5.2020.

<http://webohjekirja.mylabservices.fi/ISLAB/index.php?test=21550>. Viitattu 16.12.2020.

Sang, Jeon, Xiaoyun, Yang & Joseph, Andrade 2004. Modeling of homogeneous cloned enzyme donor immunoassay. Verkkojulkaisu. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Analytical Biochemistry. Saatavissa: PubMed. Julkaistu 1.10.2004. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15351290/>. Viitattu 12.2.2021.

John, A., Renner, Jr., Levounis, Petros & LaRose, Anna 2017. Office-Based Buprenorphine Treatment Of Opioid Use Disease. American Psychiatric Publishing. Saatavissa ProQuest Ebook Central Julkaistu 12.5.2017. <https://ebookcentral-proquest-com.ezproxy.savonia.fi/lib/savoniafi/reader.action?docID=5294185>. Viitattu 11.12.2020.

Joutsa, Juho ja Kiianmaa, Kalervo 2018. Huume- ja lääkeaineriippuvuudet. Ainekohtaiset huumeiden vaikutustavat. Kustannus Duodecim Oy. Julkaistu 15.11.2018.

https://www.oppiortti.fi/op/hlr00099/do?p_haku=ainekohtaiset%20huumeiden%20vaikutustavat#q=ainekohtaiset%20huumeiden%20vaikutustavat. Viitattu 11.12.2020.

Kalso, Eija 2018. Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia. Opioidireseptorit. Kustannus Duodecim oy. Julkaistu 3.12.2018 <https://www.oppiortti.fi/op/lft00093/do>. Viitattu 11.12.2020.

Kalso, Eija, Paakkari, Pirkko & Forsell, Marja (toim.) 2009. Opioidit pitkäkestoisessa kivussa. Pdf-tiedosto. FIMEA Lääkelaitos. https://www.fimea.fi/documents/160140/753095/17160_opioidit-opas.pdf. Viitattu 14.12.2020.

Kotimaisten kielten keskus 2021. Vinkkejä ohjetekstin tekijöille. Verkkojulkaisu. Suomen kielen lautakunnan suosituksia, nimistösuunnittelun ohjeita ja virkakieliohjeita, tietoa Kielitoimiston kieli- ja nimiohjeista, testeistä. Kotus.

https://www.kotus.fi/ohjeet/virkakieliohjeita/ohjeita_ohjeiden_tekijoille. Viitattu 19.1.2021.

Kuoppasalmi, Kimmo, Heinälä, Pekka & Lönnqvist, Jouko 2019. Psykiatria. Päihdehäiriöiden kliininen kuva. Kustannus Duodecim Oy. Haettu: Oppiortti Duodecim.

https://www.oppiortti.fi/op/pkr01806/do?p_haku=huumausaine%20diagnostiikka#q=huumausaine%20diagnostiikka. Viitattu 12.12.2020.

Kurstak, Edouard 1986. Elsevier Science & Technology. Enzyme Immunodiagnosis. Saatavissa ProQuest Ebook Central.

Kvantitatiivisen tutkimuksen verkkokäsikirja 2013. Kvantitatiivisten menetelmien tietovaranto. Verkkojulkaisu. Menetelmäopetuksen tietovaranto. Päivitetty 14.5.2013.

<https://www.fsd.tuni.fi/menetelmaopetus/intro.html>. Viitattu 10.1.2021.

Kwong, Tai, Magnani, Barbarajean & Moore, Christine 2017. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences (CRIT REV CLIN LAB SCI). Urine and oral fluid drug testing in support of pain management. EBSCO host. 54(6): 433-445. (13p). Julkaistu 1.9.2017.

<http://web.a.ebscohost.com.ezproxy.savonia.fi/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=3&sid=dedae02a-69e5-4e7b-bfdb-e09476abf7a5%40sessionmgr4006>. Viitattu 6.12.2020.

Kyngäs, Helvi, Mikkonen, Kristina & Kääriäinen, Maria 2019. The Application of Content Analysis in Nursing Science Research. Verkkojulkaisu. Springer International Publishing AG, Julkaistu 14.11.2019. Saatavissa ProQuest Ebook Central. <https://ebookcentral-proquest-com.ezproxy.savonia.fi/lib/savoniafi/reader.action?docID=5969468&ppg=13>. Viitattu 4.12.2020.

Huumeongelmaisten hoito. Käypä hoito -suositus. Lääkäriseura Duodecim ja Päihdelääketieteenyhdistyksen asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen lääkärisseura Duodecim, 2018. <https://www.kaypahoito.fi/hoi50041>. Viitattu 21.12.2020.

Labquality 2020. Laadunvarmistus. Verkkojulkaisu. Vieritestisuositus. Päivitetty 2020. https://www.labquality.fi/vieritestisuositus/luotettava_vieritesti/laadunvarmistus/. Viitattu 16.12.2020.

Leinonen, Antti 2014. Huumausaineanalytiikka tänään. Moodi. Teema: Kliininen kemia. S. 214–216. Viitattu 5.1.2021.

Leinonen, Antti 2018. Huumetestauksesta ja sen suorittamisesta. Moodi. Labquality Oy. S. 28–30. https://digiplus.fi/www/Moodi/2018_Moodi_02/page_28.html. Viitattu 14.12.2020.

Lillsunde, Pirjo 2009. Huumeiden pikatestit yleistyvät. Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim. Numero 14/2009. <https://www.duodecimlehti.fi/duo98169>. Viitattu 17.12.2020.

Logrip, Marian, Koob, George & Zorrilla, Eric 2001. Role of Corticotropin-Releasing Factor in Drug Addiction: Potential for Pharmacological Intervention. Verkkojulkaisu. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Pharmacol Rev. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3273042/>. Viitattu 15.12.2020.

Lyons, Timothy, Okano, Katherine, Kuhnle, Judith & Bruins, Mark 2001. A Comparison of Roche Kinetic Interaction of Microparticles in Solution (KIMS®) Assay for Cannabinoids and GC-MS Analysis for 11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 25. https://www.researchgate.net/publication/11749984_A_Comparison_of_Roche_Kinetic_Interaction_of_Microparticles_in_Solution_KIMSR_Assay_for_Cannabinoids_and_GC-MS_Analysis_for_11-nor-9-Carboxy-D9-Tetrahydrocannabinol. Viitattu 7.2.2021.

Meririnne, Esa ja Seppälä, Timo 2004. Opiiaattiriippuvuuden neurobiologiaa. Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim. Suomalainen Lääkärisseura Duodecim. Numero 8/2004. <https://www.duodecimlehti.fi/duo94225>. Viitattu 15.12.2020.

Milone, Michael C. 2012. The Immunoassay Handbook (Fourth Edition), Enzyme Multiplied Immunoassay Technique. Analytical Techniques used in Therapeutic Drug Monitoring. s. 1-4, 8. Saatavissa ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/enzyme-multiplied-immunoassay-technique/pdf>. Viitattu 12.12.2020.

National Institutes of Health 2020. Opioid Overdose Reversal with Naloxone (Narcan, Evzio). Verkkojulkaisu. National Institute on Drug Abuse Advancing Addiction Science. NIH. Päivitetty

- 20.2.2020. <https://www.drugabuse.gov/drug-topics/opioids/opioid-overdose-reversal-naloxone-narcan-evzio>. Viitattu 14.12.2020.
- Niemelä, Onni & Pulkki, Kari 2010. Laboratoriolääketiede - Kliininen kemia ja hematologia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.
- O'Kennedy, Richard & Murphy, Caroline 2017. Development, Applications and Future Trends. Immunoassays. Saatavissa ProQuest Ebook Central. s.l. : Jenny Stanford Publishing.
- Petrides, Athena & Melanson, Stacy 2019. Urine Drug Testing: Debates Over Best Practices to Assess Compliance and Manage the Opioid Crisis. EBSCO host. Saatavissa Cinahlista. Clinical Laboratory News Jan/Feb2019; 45(1): 8–12. (5p). <http://web.a.ebscohost.com.ezproxy.savonia.fi/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=5&sid=7e9341fe-bf4d-47b6-9184-b900e54a0eb7%40sdc-v-sessmgr01>.
- Phipps, Rebecca Jufer & Cone, Edward J. 2008. The Immunoassay Handbook (Fourth Edition). Enzyme Multiplied Immunoassay, Forensic Science. Saatavissa ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/enzyme-multiplied-immunoassay-technique/pdf>. Viitattu 9.12.2020.
- Pil, Kristof & Verstraete, Alain 2008. Current developments in drug testing in oral fluid. Therapeutic Drug Monitoring; 30(2):196–202. Saatavissa Pubmed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18367980/>. Viitattu 20.12.2020.
- Ragain, James C., Cullum, Malford E., Lininger, Linda A., Schade, Sylvia Z., Cope, Stanton E. & Simonson, Lloyd G. 2003. Department of Applied of Laboratory Sciences. Diagnosis of militarily relevant diseases using oral fluid and saliva antibodies: fluorescence polarization immunoassay. Military Medicine. Saatavissa Cinahlista. <http://web.b.ebscohost.com.ezproxy.savonia.fi/ehost/detail/detail?vid=3&sid=2b6df247-fe36-4417-96ef-a598ba276325%40pdc-v-sessmgr03&bdata=JkF1dGhUeXBIPWlwLHNoaWImbGFuZz1maSZzaXRIPWVob3N0LWxpdmU%3d#AN=106734275&db=ccm>. Viitattu 21.1.2021.
- Reito, Aleks, Raittio, Lauri & Helminen, Olli 2020. Tutkimustulokset eivät toistu - missä syy? Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim. Numero 10/2020. <https://www.duodecimlehti.fi/duo15580>. Viitattu 10.1.2021.
- Saloheimo, Pertti 2015. Kliinisen tutkimuksen etiikka. Muiden töihin viittaaminen, lainaaminen ja plagiointi. Kustannus Oy Duodecim. Saatavissa Oppiportti Duodecim. <https://www.oppiportti.fi/op/kte01811/do>. Viitattu 8.1.2021.
- Sanastokeskus 2015. TEPA-termipankki. Verkkojulkaisu. Erikoisalojen sanastojen ja sanakirjojen kokoelma - Sanastokeskus TSK. Kielikone Ltd. Päivitetty 8.12.2020. <https://termipankki.fi/tepa/fi/>. Viitattu 17.1.2021.

- Savonia-Ammattikorkeakoulu 2020. Bioanalyytikon opetussuunnitelma. Verkkojulkaisu. Savonia.fi. <https://www.savonia.fi/opiskele-tutkinto/tutkinnot-ja-hakeminen/opetussuunnitelmat/?yks=KS&krtid=1155&tab=6>. Viitattu 13.12.2020.
- Sharma, Pillai, Gautam & Hajare 2014. Radioimmunoassay. MYCOTOXINS: Immunological Techniques for Detection and Analysis. Saatavissa Sciencedirect. <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/radioimmunoassay>. Viitattu 21.1.2021.
- Solunetti 2006. Ääreishermosto I. perifeerinen. Verkkojulkaisu. Suomen virtuaaliyliopisto. <https://www.solunetti.fi/fi/histologia/aareishermosto/>. Viitattu 15.2.2021.
- Sundström, Mira 2017. Urine testing and abuse patterns of drugs and new psychoactive substances : Application of comprehensive time-of-flight mass spectrometry. Väitöskirja: Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto. Julkaistu 20.10.2017. <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/224605/urinetes.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Viitattu 5.1.2021.
- Suomen Bioanalytikkoliitto ry. 2017. Bioanalyytikon, laboratoriohoitajat eettiset ohjeet. Verkkojulkaisu. Bioanalytikkoliitto. Päivitetty 26.8.2017. <https://www.bioanalytikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+ohjeet+-suomi+2011.pdf>. Viitattu 13.12.2020.
- Suomen standardisoimisliitto 2009. LÄÄKETIETEELLISET LABORATORIOT. TURVALLISUUSVAATIMUKSET. Standardi. SFS-ISO 15190. SFS-Online. SUOMEN STANDARDISOIMISLIITTO SFS, 14. 12 2009. Saatavissa SFS-Online palvelusta. Viitattu 10.1.2021.
- Suomen standardisoimisliitto 2020. TUOTTEIDEN KÄYTTÖOHJEIDEN LAATIMINEN. OSA1: PERIAATTEET JA YLEISET VAATIMUKSET. Standardi. SFS-EN IEC/IEEE 82079. SFS-Online. SUOMEN STANDARDISOIMISLIITTO SFS, 17. 4 2020. Saatavissa SFS-Online palvelusta. Viitattu 19.2.2021.
- Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2015. Suositus terveydenhoidollisesta huumetestauksesta, asianmukaiset menettelytavat sosiaali- ja terveydenhuollon yksikölle. Verkkojulkaisu. Julkari, STM:n hallinnonalan avoin julkaisuarkisto. Julkaistu 5/2015. https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/126298/URN_ISBN_978-952-302-488-5.pdf?sequence=1. Viitattu 7.10.2020.
- Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2020. Päihdetilastollinen vuosikirja 2019. Verkkojulkaisu. Alkoholi ja huumeet. Julkari, STM:n hallinnonalan avoin julkaisuarkisto. PunaMusta Oy. https://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/139083/P%3%a4ihdetilastollinen%20vuosikirja%202019_verkkoon.pdf?sequence=7&isAllowed=y.
- Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2020. Terveydenhoidollinen päihdetestaus. Alkoholi, tupakka ja riippuvuudet. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. Päivitetty 4.9.2020. <https://thl.fi/fi/web/alkoholi-tupakka-ja-riippuvuudet/paihetestaus/terveydenhoidollinen-paihetestaus>. Viitattu 9.1.2021.

Thermo Fisher 2016. Operation manual Gallery Plus, version 6.0. Pdf-tiedosto. Thermo Scientific. Julkaistu 10/2016. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Man-N12274-DA-Gallery-Plus-ManN12274-EN.pdf>. Viitattu 5.2.2021.

Thermo Fisher 2017. Käyttöturvallisuustiedote. CEDIA® Buprenorphine Assay. Pdf-tiedosto (Fisher, 2017). Thermo Fisher Scientific Oy. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/msds/2016gwi/10018485SDS-CEDIA-Technology-Group-1A_MTR-EUTS_FI.pdf. Viitattu 23.4.2021.

Thermo Fisher 2018. CEDIA® Buprenorphine Assay. Pdf-tiedosto. Thermo Fisher Scientific Oy. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CDD/Package-Inserts/10007988-CEDIA-Buprenorphine-Assay-EN.pdf>. Viitattu 11.12.2020.

Thermo Fisher 2018. Indiko and Indiko Plus clinical and specialty chemistry analyzers. Pdf-tiedosto. Thermo Fisher Scientific Inc. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CDD/brochures/Indiko%20and%20Indiko%20Plus%20Brochure.pdf>. Viitattu 4.1.2021.

Thermo Fisher 2019. CEDIA™ Therapeutic Drug Monitoring (TDM) Assays. Verkkajulkaisu. Thermo Fisher Scientific Oy. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/100002TS#/100002TS>. Viitattu 5.12.2020.

Thermo Fisher 2021. Immunoglobulin Structure and Classes. Verkkajulkaisu. Thermo Fisher Scientific Oy. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-methods/immunoglobulin-structure-classes.html#polyclonal>. Viitattu 4.1.2021.

Tilastokeskus 2016. 4.3 Korrelaatio. Johdatus tilastotieteeseen. Verkkajulkaisu. Päivitetty 5/2016. https://tilastokoulu.stat.fi/verkkokoulu_v2.xql?course_id=tkoulu_tilaj&lesson_id=4&subject_id=3&page_type=sisalto. Viitattu 12.1.2021.

Tilastokeskus 2020. Hajontakuvio. Verkkajulkaisu. Tietoa tilastoista (käsitteet). <https://www.tilastokeskus.fi/meta/kas/hajontakuvio.html>. Viitattu 26.1.2021.

Tuokko, Seija, Rautajoki, Anja & Lehto, Liisa 2008. Kliiniset laboratorionäytteet: opas näytteiden ottoa varten. Helsinki : Tammi, 2008.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2019. Ihmiseen kohdistuvan tutkimuksen eettiset periaatteet ja ihmistieteiden eettinen ennakoarviointi Suomessa. Pdf-tiedosto. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan julkaisuja. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohje. Julkaistu 3/2019. https://tenk.fi/sites/tenk.fi/files/Ihmistieteiden_eettisen_ennakoarvioinnin_ohje_2019.pdf. Viitattu 12.12.2020.

Valtioneuvoston asetus huumausainetestien tekemisestä 7.4.2005/218. <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2005/20050218>. Viitattu 21.12.2020.

Vilkka, Hanna 2015. Tutki ja kehitä. Määrällinen tutkimusmenetelmä käytännössä. Helsinki: PS-kustannus. <https://www.ellibrary.com/reader/9789524517560>. Viitattu 12.12.2020.

LIITE 1: TYÖOHJEET


Tutkimuksen nimi	U-Bupre, Buprenorfiini virtsasta
Kuvaus	Buprenorfiini on puolisynteettinen euforisoiva opioidikipulääke, joka on johdettu oopiumin komponentista tebaiinista.
Indikaatio	Buprenorfiinin seulonta virtsasta. Väärinkäytön tai lääkeainemyrkytyksen selvittäminen.
Laitteisto	Indiko™ Plus -analysaattori, fotometria.
Menetelmä	Kilpaileva entsyymi-immunologinen määrittämenetelmä (CEDIA).
Työturvallisuus	Perehdy laitteen käyttöohjeisiin ja reagenssien käyttöturvatiedotteisiin (kts. Thermo Fisher 2017: Käyttöturvallisuustiedote, CEDIA® Buprenorphine Assay) sekä huolehdi työturvallisuudesta työn kaikissa vaiheissa. Käsittele tutkimusnäytteitä tartuntavaarallisina.
Näyte ja näytteen käsittely	<p>Virtsanäyte otetaan ilman alapesuja virtsanäyteastian. Virtsanäyte siirretään säilöntäaineettomaan 10 ml virtsanäyteputkeen.</p> <p>Näytettä voi säilyttää huoneenlämmössä 8 tuntia ja jääkaapissa (+2–8) 30 vrk. Pidempiaikaista säilytystä varten näyte on pakastettava.</p> <p>Buprenorfiinianalyytit voivat säilyä tutkimusten mukaan virtsassa jopa 85 päivää –20 °C:ssa.</p> <p>Ennen analysointia sekoita ja sentrifugoi näyte vähintään 5 minuuttia 1500 rpm (500G).</p>
Reagenssit	<p>Valmiiksi liuotetut reagenssit:</p> <p>R2 Enzyme Donor solution R1 Enzyme acceptor solution</p> <p>Poista pakkaukset kylmäsäiliöstä (2–8 °C), sekoita 2–3 kertaa, poista tarvittaessa ilmakuplat esim. pipetinkärjellä ja aseta analysaattorin reagenssilokeroon.</p> <p>Liuotusohje reagensseille:</p>



- 1 EA Reconstruction Buffer (valkoinen korkki)
- 1a EA Reagent (valkoinen korkki)
- 2 ED Reconstitution Buffer (musta korkki)
- 2a ED Reagent (musta korkki)

Poista pakkaus kylmäsäilöstä (2–8 °C) juuri ennen liuosten valmistelua. Kontaminaation välttämiseksi valmista liuokset kuvatussa järjestyksessä ja katso lisäksi kuvallinen ohje liuottamisesta:

1. Ota pullo pari kerrallaan reagenssipakkauksesta.
2. Aloita Reagenssi 2:sta (musta korkki, 2 ED Reconstitution Buffer).
3. Aukaise korkki ja kumitulppa varovasti mustasta pullosta (2a ED Reagent) veto-kaapissa. Aseta liitin paikoilleen.
4. Aseta musta korkillinen Reagenssipullo 2 muoviadapterin toiseen päähän ja sekoita varovasti kääntämällä pulloja. Vältä vaahdon muodostumista.
5. Varmista, että kuivamateriaali on liuenut. Poista sitten liitin ja lasipullo.
6. Laita mustakorkki paikoilleen liuotetun reagenssin reagenssipulloon.
7. Toista ohje Reagenssi 1 kanssa, eli valkoisin korkein varustetut pullot.
8. Merkitse pulloihin päivämäärät ja anna seistä huoneenlämmössä 5 minuuttia. Sekoita pullot vielä kertaalleen ja poista tarvittaessa ilmakuplat esim. pipetinkärjellä.
9. Aseta pullot suoraan analyysointilokeroon tai kylmäsäiliöön. Anna seistä 30 minuuttia ennen käyttöä.

	
<p>Kalibrointi</p>	<p>CEDIA Buprenorphine Negative Calibrator (1 x 15 mL) CEDIA Buprenorphine 5 ng/mL Calibrator</p> <p>Säilytys +2–8 asteessa, ei saa pakastaa. Käyttövalmiita. Sekoita varovasti 2–3 kertaa ennen käyttöä välttämällä kuplien muodostumista.</p>
<p>Kontrollit ja laadunvarmistus</p>	<p>CEDIA Buprenorphine Low 3 ng/mL CEDIA Buprenorphine High 7 ng/mL</p> <p>Säilytys +2–8 asteessa, ei saa pakastaa. Käyttövalmiita. Sekoita varovasti 2–3 kertaa ennen käyttöä.</p> <p>Varmista, että kontrollitulokset ovat ohjeissa määritettyjen vakiintuneiden rajojen sisällä.</p>
<p>Suoritus</p>	<p>Käynnistä ja alusta Indiko™ Plus -analysaattori ohjeiden mukaisesti.</p> <p>Sekoita reagenssit ja poista niiden pinnalta ilmakuplat esim. pipetinkärjellä ennen syöttämistä laitteelle. Paina luukun avausnappia, avaa luukku ja aseta reagenssi paikoilleen pidempi viivakoodi ulospäin.</p>

	<p>Pyydä tarvittaessa kalibrointi ja huomioi, että laite tekee sen yhteydessä myös kontrollit. Sekoita kalibraattoreita 2–3 kertaa. Tiputa pulloista kalibraattoreita omiin 0,5 ml:n näytekippeihin ja laita ne räkkiin. Lisää rakin tiedot laitteelle. Syötä rakit laitteeseen.</p> <p>Jos kalibrointia ei tarvitse tehdä, tee pyynnöt vain kontrolleille.</p> <p>Sekoita kontrolleja 2–3 kertaa. Tiputa pulloista kontrolleja omiin 0,5 ml:n näytekippeihin ja laita ne räkkiin. Lisää rakin tiedot laitteelle. Syötä rakit laitteeseen. Vertaa tuloksia määritettyihin tavoitearvoihin.</p> <p>Näytteet voidaan analysoida joko näytekipossa (määrä väh. 200 µl) tai näyteputkissa. Näytteet voidaan analysoida sarjana. Lisää näytteen tiedot laitteelle. Syötä näytteet räkissä laitteeseen.</p> <p>Mittaus 570 nm.</p>
Tulos	<p>Reaktioseoksessa olevaa entsyymiaktiivisuutta sekä sen tuloksena oleva absorbanssin muutos ovat suoraan verrannollisia näytteen sisältämän analyytin määrään. Positiivinen tulos osoittaa, että näytteessä on mitattava määrä buprenorfia tai sen metaboliittia. Alle 5 ng/ml tulos vastataan negatiivisena ja yli 5 ng/ml positiivisena.</p>
Viitearvot	Negatiivinen

LIITE 2: ANALYYSIKOHTAISET TULOKSET NG/ML

Näytenu- mero	1. analyysi	2. analyysi	3. analyysi	Keskiarvo	Cut-off raja 5 ng/ml	Islabin tu- los
1	5,7	5,2	5,6	5,5	Pos	5,7
2	9,3	9,7	9,9	9,6	Pos	6,1
3	94,1	94,9	94,1	94,4	Pos	49,8
4	51,2	48,4	51,9	50,5	Pos	54,8
5	93,1	93,2	92,6	93,0	Pos	39,3
6	44,6	45,4	45,4	45,1	Pos	18,4
7	97,9	99,9	99,8	99,2	Pos	58,8
8	98,3	99,1	99,2	98,9	Pos	58,2
9	96,3	97,2	97,0	96,8	Pos	47,3
10	41,7	41,6	42,0	41,8	Pos	19,2
11	98,3	98,5	98,0	98,3	Pos	61,3
12	98,4	98,4	99,0	98,6	Pos	72,5
13	85,7	87,4	87,5	86,9	Pos	68,8
14	3,1	3,4	2,8	3,1	Neg	14,6
15	80,7	79,3	80,3	80,1	Pos	19,9
16	55,5	56,4	56,6	56,2	Pos	24,0
17	93,1	94,5	94,8	94,1	Pos	57,0
18	14,8	15,5	16,1	15,5	Pos	81,0
19	90,3	91,7	92,7	91,6	Pos	57,0
20	99,9	102,1	101,8	101,3	Pos	74,0
21	42,5	44,1	44,8	43,8	Pos	50,2
22	99,2	97,5	99,5	98,7	Pos	42,4
23	65,6	72,4	71,3	69,8	Pos	35,8
24	89,5	88,5	89,2	89,1	Pos	52,9
25	97,8	98,9	98,2	98,3	Pos	57,2
26	98,2	97,5	99,7	98,5	Pos	57,6
27	24,4	26,6	27,2	26,1	Pos	116,8
28	64,4	63,3	66,6	64,8	Pos	74,7
29	14,3	15,5	16,2	15,3	Pos	11,2
30	57,4	59,9	59,5	58,9	Pos	17,9
31	66,8	65,2	69,6	67,2	Pos	85,2
32	66,1	69,3	71,1	68,8	Pos	74,6
33	20,3	20,0	22,0	20,8	Pos	20,9
34	41,6	43,0	44,5	43,0	Pos	20,9
35	73,0	73,8	75,8	74,2	Pos	74,6
36	85,5	85,3	86,3	85,7	Pos	47,7
37	33,4	34,5	34,0	34,0	Pos	13,7
38	30,0	30,8	31,0	30,6	Pos	55,4
39	9,0	8,7	8,7	8,8	Pos	9,6
40	98,1	99,6	96,7	98,1	Pos	80,8
41	70,1	70,4	68,8	69,8	Pos	61,7
42	83,3	84,6	84,5	84,1	Pos	50,8
43	32,4	32,7	33,2	32,8	Pos	37,4
44	94,3	93,3	95,2	94,3	Pos	40,6

jatkuu

45	94,7	94,8	95,0	94,8	Pos	53,5
46	44,6	44,8	45,9	45,1	Pos	11,7
47	72,5	73,7	73,3	73,2	Pos	211,5
48	91,8	90,4	91,5	91,2	Pos	41,1
49	97,7	97,7	97,8	97,7	Pos	66,7
50	22,6	21,4	23,5	22,5	Pos	48,1
51	15,8	15,8	16,4	16,0	Pos	16,4
52	13,5	14,1	13,2	13,6	Pos	46,4
53	89,4	90,3	87,1	88,9	Pos	56,0
54	56,6	57,6	56,6	56,9	Pos	129,3
55	96,8	98,1	98,4	97,8	Pos	92,7
56	73,5	73,3	74,6	73,8	Pos	69,3

LIITE 3: NÄYTEKOHTAISET LASKENNALLISET TULOKSET

Näyte	Keskiarvo	Islab	Keskipoikkeama	Keskihajonta	Variaatiokerroin	Varianssi	p-arvo	Korrelaatio
1	5,5	5,7	0,1	0,3	0,05	0,07	0,02	0,36
2	9,6	6,1	1,8	0,3	0,03	0,09	0,02	0,36
3	94,4	49,8	22,3	0,5	0,00	0,21	0,02	0,36
4	50,5	54,8	2,2	1,9	0,04	3,43	0,02	0,36
5	93,0	39,3	26,8	0,3	0,00	0,10	0,02	0,36
6	45,1	18,4	13,4	0,5	0,01	0,21	0,02	0,36
7	99,2	58,8	20,2	1,1	0,01	1,27	0,02	0,36
8	98,9	58,2	20,3	0,5	0,00	0,24	0,02	0,36
9	96,8	47,3	24,8	0,5	0,00	0,22	0,02	0,36
10	41,8	19,2	11,3	0,2	0,00	0,04	0,02	0,36
11	98,3	61,3	18,5	0,3	0,00	0,06	0,02	0,36
12	98,6	72,5	13,1	0,3	0,00	0,12	0,02	0,36
13	86,9	68,8	9,0	1,0	0,01	1,02	0,02	0,36
14	3,1	14,6	5,8	0,3	0,10	0,09	0,02	0,36
15	80,1	19,9	30,1	0,7	0,01	0,52	0,02	0,36
16	56,2	24,0	16,1	0,6	0,01	0,34	0,02	0,36
17	94,1	57,0	18,6	0,9	0,01	0,82	0,02	0,36
18	15,5	81,0	32,8	0,7	0,04	0,42	0,02	0,36
19	91,6	57,0	17,3	1,2	0,01	1,45	0,02	0,36
20	101,3	74,0	13,6	1,2	0,01	1,42	0,02	0,36
21	43,8	50,2	3,2	1,2	0,03	1,39	0,02	0,36
22	98,7	42,4	28,2	1,1	0,01	1,16	0,02	0,36
23	69,8	35,8	17,0	3,7	0,05	13,32	0,02	0,36
24	89,1	52,9	18,1	0,5	0,01	0,26	0,02	0,36
25	98,3	57,2	20,6	0,6	0,01	0,31	0,02	0,36
26	98,5	57,6	20,4	1,1	0,01	1,26	0,02	0,36
27	26,1	116,8	45,4	1,5	0,06	2,17	0,02	0,36
28	64,8	74,7	5,0	1,7	0,03	2,82	0,02	0,36
29	15,3	11,2	2,1	1,0	0,06	0,92	0,02	0,36
30	58,9	17,9	20,5	1,3	0,02	1,80	0,02	0,36
31	67,2	85,2	9,0	2,2	0,03	4,96	0,02	0,36
32	68,8	74,6	2,9	2,5	0,04	6,41	0,02	0,36
33	20,8	20,9	0,1	1,1	0,05	1,16	0,02	0,36
34	43,0	20,9	11,1	1,5	0,03	2,10	0,02	0,36
35	74,2	74,6	0,2	1,4	0,02	2,08	0,02	0,36
36	85,7	47,7	19,0	0,5	0,01	0,28	0,02	0,36
37	34,0	13,7	10,1	0,6	0,02	0,30	0,02	0,36
38	30,6	55,4	12,4	0,5	0,02	0,28	0,02	0,36
39	8,8	9,6	0,4	0,2	0,02	0,03	0,02	0,36
40	98,1	80,8	8,7	1,5	0,01	2,10	0,02	0,36
41	69,8	61,7	4,0	0,9	0,01	0,72	0,02	0,36
42	84,1	50,8	16,7	0,7	0,01	0,52	0,02	0,36
43	32,8	37,4	2,3	0,4	0,01	0,16	0,02	0,36
44	94,3	40,6	26,8	1,0	0,01	0,90	0,02	0,36

jatkuu

45	94,8	53,5	20,7	0,2	0,00	0,02	0,02	0,36
46	45,1	11,7	16,7	0,7	0,02	0,49	0,02	0,36
47	73,2	211,5	69,2	0,6	0,01	0,37	0,02	0,36
48	91,2	41,1	25,1	0,7	0,01	0,54	0,02	0,36
49	97,7	66,7	15,5	0,1	0,00	0,00	0,02	0,36
50	22,5	48,1	12,8	1,1	0,05	1,11	0,02	0,36
51	16,0	16,4	0,2	0,3	0,02	0,12	0,02	0,36
52	13,6	46,4	16,4	0,5	0,03	0,21	0,02	0,36
53	88,9	56,0	16,5	1,7	0,02	2,72	0,02	0,36
54	56,9	129,3	36,2	0,6	0,01	0,33	0,02	0,36
55	97,8	92,7	2,5	0,9	0,01	0,72	0,02	0,36
56	73,8	69,3	2,1	0,7	0,01	0,49	0,02	0,36