

Steroidihormonien määrittäminen ihmisen seerumista ja niihin liittyvät analyttiset haasteet

Biotekniikka / Bioteknologian laitos

Kandidaatintutkielma

Sami Fakhri

22.4.2026

Turku

Kandidaatintutkielma

Koulutusohjelma, oppiaine: Biotekniikka

Tekijä(t): Sami Fakhri

Otsikko: Steroidihormonien määrittäminen ihmisen seerumista ja niihin liittyvät analyttiset haasteet

Ohjaaja(t): Väitöskirjatutkija Ida Bäckström

Sivumäärä: 20 sivua

Päivämäärä: 22.4.2025

Testosteroni ja 17β -estradioli ovat kliinisesti merkittäviä steroidihormoneja, joiden luotettava määrittäminen seerumista on tärkeää sekä diagnostiikassa että hoidon seurannassa. Tässä kandidaatintutkielmassa tarkastellaan testosteronin ja estradiolin keskeisiä määrittämenetelmiä, immunomäärittämiä ja nestekromatografiaan kytkettyä tandem-massaspektrometriaa (LC-MS/MS), sekä niihin liittyviä analyttisiä haasteita. Vertailun painopisteinä ovat menetelmien herkkyys matalilla pitoisuuksilla, spesifisyys, matriisivaikutukset, standardointi, jäljitettävyyden ja käytännön käyttökelpoisuus kliinisessä laboratoriotyössä.

Immunomäärittäykset ovat nopeita, automatisoituja ja suuren läpimenon menetelmiä, jonka vuoksi ne soveltuvat hyvin rutiinidiagnostiikkaan. Niiden luotettavuus heikkenee kuitenkin erityisesti matalilla testosteroni- ja estradiolipitoisuuksilla, joilla ristiinreagointi, matriisivaikutukset ja menetelmäkohtainen vaihtelu voivat aiheuttaa kliinisesti merkittäviä tuloseroja. LC-MS/MS tarjoaa paremman analyttisen herkkyyden, spesifisyyden ja jäljitettävyyden, mutta sen käyttöä rajoittavat korkeammat kustannukset, vaativampi näytevalmistelu ja rajallisempi automaatio.

Tutkielman perusteella menetelmät eivät ole toistensa suoraa korvaajia, vaan niiden vahvuudet painottuvat eri käyttötarkoituksiin. Käytännöllisin ratkaisu on työnjako, jossa immunomäärittämiä käytetään suuren volyymin seulontaan ja LC-MS/MS-menetelmää erityisesti matalien pitoisuuksien, epävarmojen tulosten ja kliinisesti vaativien tilanteiden varmistamiseen. Steroidihormonimäärittämen kehityksessä keskeisiä tavoitteita ovat parempi herkkyys, automaatio, standardointi ja laboratorioden välinen vertailtavuus.

Avainsanat: LC-MS/MS, immunomäärittäykset, testosteroni, estradioli, steroidihormonit

Sisällysluettelo

1	Johdanto	2
2	Testosteronin ja estradiolin immunomääritykset	4
2.1	Menetelmän periaate	4
2.2	Analyyttinen herkkyys matalilla pitoisuuksilla	5
2.3	Spesifisyys ja matriisivaikutukset	6
2.4	Standardointi ja jäljitettävyys	7
2.5	Käytännön näkökulmat	8
3	Testosteronin ja estradiolin LC-MS/MS-määritykset	9
3.1	Menetelmän periaate	9
3.2	Analyyttinen herkkyys matalilla pitoisuuksilla	10
3.3	Spesifisyys ja matriisivaikutukset	11
3.4	Standardointi ja jäljitettävyys	13
3.5	Käytännön näkökulmat	14
4	Menetelmien vertailu	15
5	Yhteenveto	17
	Lähteet	19

1 Johdanto

Testosteronin (T) ja 17 β -estradioli (E2) ovat elimistön toiminnalle keskeisiä steroidihormoneja. Niillä on suuri rooli sukupuolikehityksessä ja lisääntymistoiminnoissa, mutta ne vaikuttavat myös muun muassa luustoon, verenkiertoelimistöön, aineenvaihduntaan ja kehon koostumukseen. Kun T:n ja E2:n tuotanto vähenee iän myötä tai sairauksien seurauksena, aineenvaihdunnan häiriöiden ja verisuonisairauksien riski kasvaa (Mauvais-Jarvis ja Lindsey 2024). Tämän vuoksi niiden luotettava mittaaminen on tärkeää sekä kliinisessä diagnostiikassa että tutkimuksessa.

Seerumin testosteronin ja estradiolin määrittämisessä käytetään pääasiassa kahta menetelmäryhmää: immunomääritykset ja LC-MS/MS. Immunomääritykset ovat vakiintuneet rutiinilaboratoriotyöhön suuren läpimenon, nopeuden ja automatisoinnin vuoksi. Niiden ongelmat liittyvät kuitenkin erityisesti mataliin pitoisuuksiin, joissa spesifisyys, herkkyys ja tulosten vertailtavuus heikkenevät. Nämä puutteet tuotiin esiin *The Endocrine Society*n kannanotoissa testosteronin määrittämisestä vuonna 2007 ja estradiolin määrittämisestä vuonna 2013, joissa korostettiin tarvetta parantaa menetelmien tarkkuutta, toistettavuutta ja standardointia. (Rosner ja muut 2007; Rosner ja muut 2013).

LC-MS/MS, eli nestekromatografiaan kytketty tandem-massaspektrometria, tarjoaa paremman analyttisen spesifisyyden ja herkkyuden varsinkin tilanteissa, joissa hormonipitoisuudet ovat matalia tai immunomäärityksen tulos on muuten epävarma (Vesper ja muut 2014). Kuitenkin tätä menetelmää rajoittavat matalampi läpimeno ja korkeampi asiantuntijanosaamisen tarve, sekä kustannukset (Zhang ja Rockwood 2015). Tämän tutkielman tavoitteena on vertailla näitä kahta menetelmää testosteronin ja estradiolin seerumimäärityksissä sekä tarkastella niihin liittyviä analyttisiä haasteita, erityisesti herkkyyttä, spesifisyyttä, standardointia ja kliinistä käyttökelpoisuutta.

Jotta tutkielmassa esitettävien pitoisuuksien tulkinta olisi helpompaa, kokonaistestosteronin ja estradiolin viitearvot on koottu taulukoihin 1 ja 2.

Taulukko 1. Kokonaistestosteronin viitearvot eri väestöryhmissä

Ryhmä	Viitearvo (nmol/l)
Miehet	10–38
Naiset	0,4–2,0

Lähde: HUS Diagnostiikkakeskus (2025a).

Taulukko 2. Estradiolin viitearvot eri väestöryhmissä

Ryhmä	Viitearvo (pmol/l)
Miehet yli 18 v	<130
Naiset, follikkelivaihe	80–920
Naiset, ovulaatiovaihe	140–2380
Naiset, luteaalivaihe	80–1150
Naiset, postmenopausi	<100

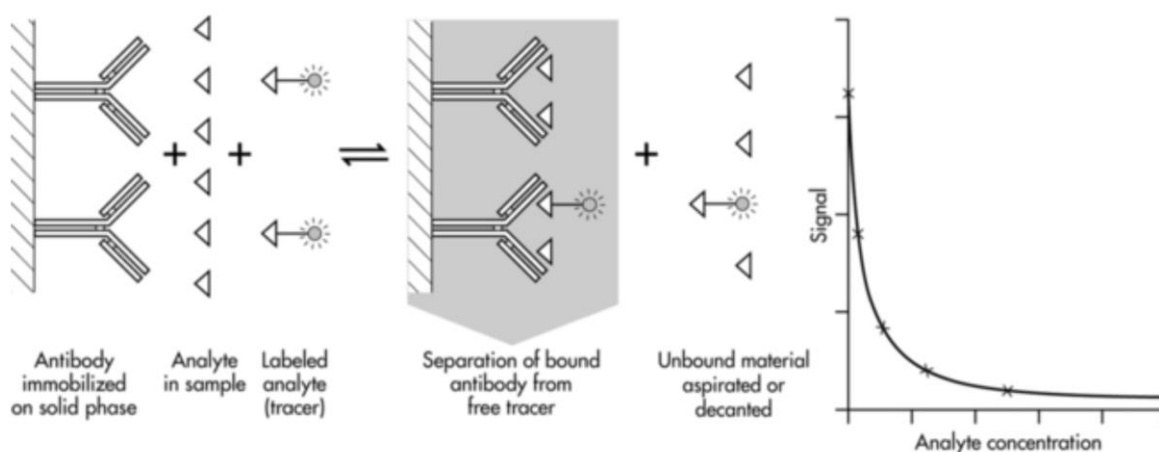
Lähde: HUS Diagnostiikkakeskus (2025b).

2 Testosteronin ja estradiolin immunomääritykset

2.1 Menetelmän periaate

Immunomääritykset perustuvat vasta-aineen ja mitattavan analyytin (tässä tapauksessa steroidihormonin) väliseen sitoutumiseen, joka muunnetaan mitattavaksi signaaliksi. Immunomääritykset voidaan jakaa periaatteensa perusteella ei-kilpaileviin ja kilpaileviin menetelmiin. Ei-kilpailevat immunomääritykset soveltuvat erityisesti suuremmille analyytteille, joilla on useita vasta-aineen tunnistamia kohtia, eli epitooppeja. Tällöin määrittäminen voidaan toteuttaa niin sanotulla sandwich-menetelmällä, jossa analyytti sitoutuu kahden eri vasta-aineen väliin. Ensimmäinen vasta-aine sitoo analyytin määrittämisalustalle, ja toinen, merkitty vasta-aine tunnistaa siihen sitoutuneen analyytin ja tuottaa signaalin. Tällöin signaalin voimakkuus kasvaa analyytin pitoisuuden kasvaessa. (Wild 2013.)

Pienille, alle 500 Da:n kokoisille molekyyleille, kuten testosteronille ja estradiolille, tällainen ei-kilpaileva sandwich-määrittäminen ei kuitenkaan yleensä toimi, koska niissä ei ole riittävästi erillisiä sitoutumiskohtia kahdelle vasta-aineelle. Siksi niiden määrittämisessä käytetään tavallisesti kilpailevia immunomäärityksiä. Tällöin analyytti ja merkitty analogi kilpailevat samoista vasta-aineen sitoutumiskohdista, jolloin signaali on kääntäen verrannollinen analyytin pitoisuuteen, kuten on esitetty kuvassa 1 (Karashima ja Osaka 2022).



Kuva 1. Kilpailevan immunomäärityksen periaate kiinteäfaasissa. Signaali on kääntäen verrannollinen analyytin pitoisuuteen (Wild 2013).

Kliinisessä kemiassa steroidien määrittäminen on siirtynyt pitkälti karsinogeenisistä radioimmunomäärityksistä suoriin, automatisoituihin kemiluminesenssi- ja entsyymipohjaisiin menetelmiin (Karashima ja Osaka 2022; Vesper ja muut 2014).

2.2 Analyttinen herkkyys matalilla pitoisuuksilla

Matalilla steroidipitoisuuksilla varsinainen signaali lähestyy taustakohinaa, mikä heikentää mittauksen tarkkuutta. Tässä yhteydessä tarkkuutta kuvataan variaatiokertoimella (*CV, coefficient of variation*), joka määritellään kaavalla $CV (\%) = 100 \times SD / \text{keskiarvo}$. Muut keskeiset herkkyysparametrit ovat pienin pitoisuus, joka voidaan erottaa taustasta (*LoD, limit of detection*), sekä pienin pitoisuus, joka voidaan mitata hyväksyttävällä tarkkuudella ja toistettavuudella (*LoQ, limit of quantification*). Käytännössä steroidimääritysten suorituskykyä arvioidaan funktionaalisen herkkyyden avulla. Sillä tarkoitetaan alinta pitoisuutta, jolla analyytti voidaan mitata variaatiokertoimen rajoissa, tyypillisesti CV:n ollessa enintään 20 %. Funktionaalinen herkkyys poikkeaa LoD:sta siten, että LoD kuvaa ainoastaan pienintä pitoisuutta, joka voidaan erottaa taustasignaalista, mutta ei ota huomioon mittauksen tarkkuutta. Funktionaalinen herkkyys puolestaan kuvaa pitoisuustasoa, jolla määrittäminen tuottaa vielä kliinisesti käyttökelpoisia tuloksia. Tämän vuoksi se on keskeinen suure erityisesti matalilla steroidipitoisuuksilla. (La'ulu ja muut 2018.)

Viiden testosteroni-immunomääritysalustan vertailussa funktionaalinen herkkyys vaihteli huomattavasti alustojen välillä: parhaimillaan alle 0,14 nmol/l ja heikoimillaan 3,49 nmol/l. Esimerkiksi E170-alusta ei saavuttanut omaan ilmoittamaan 0,42 nmol/l funktionaalisen herkkyyden rajaukseensa. Tämä osoittaa, että valmistajien ilmoittama LoQ ei aina vastaa käytännössä saavutettua suorituskykyä ja että immunomääritysalustojen välillä voi olla yli kertaluokan eroja matalassa pitoisuusalueessa. (La'ulu ja muut 2018.)

Miesten viitealueella sijoittuvissa laadunvalvonta- eli QC-näytteissä (4,66; 20,11 ja 43,18 nmol/l) kaikkien alustojen viiden päivän kokonais-CV jäi alle 9 prosentin, joka osoittaa, että näitä menetelmiä on optimoitu erityisesti keskialueen pitoisuuksille. Kun mittaukset verrattiin NIST:n *Standard Reference Material* (SRM) 971 -vertailumateriaaliin ja tarkasteltiin matalia pitoisuuksia, erot alustojen välillä kasvoivat kuitenkin selvästi. Suurimmat virheet ja poikkeavuudet havaittiin naisilla, lapsilla ja ryhmässä T < 1,9 nmol/l, eli juuri niissä potilasryhmissä, joissa herkkyyttä eniten tarvitaan. (La'ulu ja muut 2018.)

Estradiolin osalta Handelsman ja muut (2014) vertasivat viittä suoraa E2-immunomääritystä LC-MS-menetelmään miehillä. Tulokset osoittivat, että immunomääritysten ongelmat korostuivat miesten matalilla E2-pitoisuuksilla. Kaikki immunomääritysalustat eivät tuottaneet tulosta kaikista näytteistä, ja verrattuna LC-MS-menetelmään harha oli kauttaaltaan positiivinen (12–53 %). Lisäksi biologisesti odotetut korrelaatiot estradiolin, testosteronin ja SHBG:n välillä säilyivät vain LC-MS-mittauksissa. Tulokset viittaavat siihen, että immunomääritysten rakenteellinen validiteetti heikkenee etenkin matalalla pitoisuusalueella. (Handelsman ja muut 2014.)

2.3 Spesifisyys ja matriisivaikutukset

Steroideja mittaavissa immunomäärityksissä interferenssi on yleistä erityisesti silloin, kun näytteessä on rakenteeltaan mitattavaa hormonia muistuttavia yhdisteitä. Koska testosteronin ja estradiolin määrittäminen perustuu yleensä kilpailevaan muotoon, tuloksen spesifisyys on voimakkaasti riippuvainen käytetyn vasta-aineen selektiivisyydestä. Häiriöitä voivat aiheuttaa esimerkiksi lääkkeet, endogeeniset steroidiesiasteet ja muut metaboliitit. (Krasowski ja muut 2014.)

Krasowski ja muut 2014 osoittivat, että testosteronimäärityksissä useat rakenteellisesti samankaltaiset steroidit voivat aiheuttaa kliinisesti merkittävää ristiinreagointia. Naisten matalilla testosteronitasoilla esimerkiksi metyyli-testosteroni ja norestisteroni voivat johtaa virheellisesti korkeisiin tuloksiin, varsinkin ehkäisyväkkeitä käyttävillä naisilla. Toisaalta estradiolin määrityksissä ristiinreagointi oli suppeampaa, mutta se ei poista ongelmaa, sillä estradiolimittauksissa herkkyys ja toistettavuus ovat jo lähtökohtaisesti heikompia ja herkempiä matalalla pitoisuusalueella (Handelsman ja

muut 2014). Eli vaikka ristiinreagointi on yleensä vähäisempää kuin testosteronimäärityksissä, niiden spesifisyys seuraa pitkälti steroidirakenteen samankaltaisuutta. Tämä korostaa sitä, että vasta-aineeseen perustuva tunnistus on rakenteellisesti rajallista, erityisesti silloin kun eroteltavat yhdisteet muistuttavat toisiaan hyvin läheisesti (Krasowski ja muut 2014).

Toinen merkittävä interferenssiluokka ovat heterofiiliset vasta-aineet, jotka voivat sitoutua epäspesifisesti määrityksen reagensseihin ja aiheuttaa joko virheellisesti korkeita tai matalia tuloksia. Maharjan ja muut (2019) kuvasivat estradiolimäärityksiä, joissa reagenssissa käytettyä alkalista fosfataasia vastaan muodostuneet vasta-aineet vääristivät tuloksia selvästi. Tällaisia häiriöitä on vaikea ennustaa pelkkien potilastietojen perusteella.

Myös SHBG-pitoisuus sekä tietyt matriisitekijät voivat vaikuttaa immunomääritysten tarkkuuteen. La'ulu ja muut (2018) raportoivat, että poikkeavat SHBG-tasot ja esimerkiksi bilirubiini voivat vääristää testosteronituloksia erityisesti silloin, kun pitoisuudet ovat matalia. Spesifisyyteen vaikuttavat myös itse vasta-aineiden rakenteelliset erot. Tämä tuli esiin kristallografisessa analyysissä, jossa kahta estradiolivasta-ainetta verrattiin toisiinsa: ligandien orientaatio, sitoutumiskolot sekä aminohapposekvenssit erosivat selvästi. Kohdennettu mutageneesi voi olla käyttökelpoinen keino parantaa vasta-aineiden spesifisyyttä jatkossa. (Krasowski ja muut 2014.)

2.4 Standardointi ja jäljitettävyys

Standardoinnin ja jäljitettävyyden puutteet näkyvät immunomäärityksissä myös laboratorioden välisenä vaihteluna. Vesper ja muut (2014) osoittivat, että sama näyte saattoi antaa eri laboratorioissa selvästi toisistaan poikkeavia tuloksia, eikä alle 10 prosentin vertaisryhmä-CV toteutunut matalilla testosteronipitoisuuksilla yhdelläkään immunomääritysalustalla. Osa vaihtelusta selittyy muilla tekijöillä, kuten reagenssierien eroilla, näytteiden stabiiliudella ja käsittelyvirheillä, mutta nämä eivät yksin selitä havaittua epätarkkuutta (Vesper ja muut 2014).

Standardoinnin ongelmaa pahentaa se, ettei immunomääritysten ristiinreagoinnin arvioinnille ole yhtenäistä käytäntömenetelmä. Valmistajien interferenssitaulukot ovat usein laajoja, mutta eivät aina kata kaikkia kliinisesti merkittäviä yhdisteitä.

Esimerkkinä tästä ovat mifepristonin, eli antiprogestiinin toimivan raskaudenkeskeytlääkkeen, aiheuttamat häiriöt testosteroni- ja estradiolimittauksissa, joita ei ilmoitettu valmistajan materiaaleissa. (Krasowski ja muut 2014.) Tästä syystä immunomääritysten tulosten vertailtavuus jää usein heikommaksi kuin LC-MS/MS-menetelmissä, joita voidaan sitoa CDC:n HoSt-ohjelmaan (*Hormone Standardization Program*), CAP:n (*College of American Pathologists*) tarkkuuteen perustuviin pätevyystesteihin ja NIST:n vertailumateriaaleihin (French 2023).

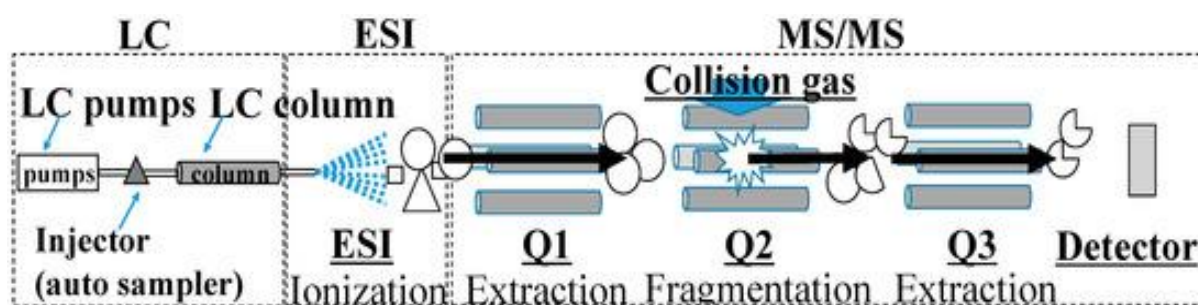
2.5 Käytännön näkökulmat

Käytännössä immunomääritysten vahvuuksia ovat nopeus, suuri läpimeno ja täysi automatisoitavuus. Niiden avulla steroidimääritykset ovat siirtyneet erikoislaboratorioista rutiinidiagnostiikkaan, jossa kustannukset ja vasteaika ovat tärkeitä. Samalla niiden analyttiset rajoitukset tulevat esiin juuri niissä potilasryhmissä, joissa hormonipitoisuudet ovat hyvin matalia, joka korostaa tarvetta kehittää immunomääritysten herkkyyttä ja tarkkuutta edelleen. (Demers 2008).

3 Testosteronin ja estradiolin LC-MS/MS-määritykset

3.1 Menetelmän periaate

Ensimmäiset massaspektrometriset steroidimääritykset tehtiin kaasukromatografian avulla, mutta nykyään korkean läpimenon nestekromatografia-tandem-massaspektrometria (LC-MS/MS) on vakiintunut ensisijaiseksi menetelmäksi (French 2023). Menetelmä yhdistää nestekromatografisen erotuksen ja tandemmassaspektrometrin massaselektiivisen detektion. Steroidimäärityksissä käytetään yleensä kolmoiskvadrupolilaitteistoa, jossa analyytit erotellaan ensin nestekromatografisesti ja tunnistetaan sen jälkeen massa-varaus-suhteen sekä fragmentaatiokuvion perusteella. (Karashima ja Osaka 2022). Keskeiset vaiheet ovat havainnollistettu kuvassa 2.



Kuva 2. LC-MS/MS:n vaiheet: nestekromatografinen erotus (LC), ionisaatio ja kolmosainen kvadrupolijärjestelmä, jossa Q1 valitsee lähtöionin, Q2 fragmentoi sen törmäyskaasussa ja Q3 valikoi tunnistettavat fragmentit massaspektrometriseen detektiin (Karashima ja Osaka 2022)

MS-menetelmä on analyttisesti erittäin herkkä, ja sen hyvä analyttinen suorituskyky riippuu huolellisesta näytevalmistelusta. Näytteestä poistetaan proteiineja, kuten SHBG, ja muita matriisikomponentteja esimerkiksi uuttovaiheella. Siihen lisätään varhaisessa vaiheessa isotooppimerkitty sisäinen standardi, joka korjaa ionisaation vaihtelua ja muita matriisivaikutuksia. (Singh 2008.)

Nestekromatografiassa steroidit erotetaan tyypillisesti C18-kolonnissa. Tämä erotus auttaa poistamaan häiritseviä yhdisteitä ja erottaa rakenteellisia isomeerejä, kuten estriolia ja estronia estradiolin tapauksessa omalla retentioajallaan.

Massaspektrometrissä vaiheessa seurataan analyytin ennalta määritettyjä siirtymiä

lähtöionista yhteen tai useampaan fragmentti-ioniin. Kullekin siirtymälle muodostuu kromatografinen piikki, jonka pinta-ala on verrannollinen pitoisuuteen. Kvantifiointi tehdään vertaamalla analyytin ja sisäisen standardin signaalisuhdetta kalibraatiokäyrään, joka on määritetty tunnetuista standardipitoisuuksista. Kalibraattoreiden tulisi olla jäljitettävissä sertifoituihin vertailumateriaaleihin, jotta tulostasot vastaavat referenssilaboratorioiden tuottamia arvoja ja ovat metrologisesti vertailukelpoisia. (Bertelsen ja muut 2020.)

Menetelmän selektiivisyys perustuu siten sekä retentioaikaan että fragmentti-ionien tunnistukseen, joka erottaa sen olennaisesti vasta-ainepohjaisista menetelmistä. (Xie ja muut 2017; Bertelsen ja muut 2020.)

3.2 Analyyttinen herkkyys matalilla pitoisuuksilla

Testosteronin ja estradiolin LC-MS/MS-menetelmillä voidaan saavuttaa määrittärajat (LoQ) matalalla pikomolaarialueella tai sen alapuolella, mikä on selvästi parempi kuin useimmilla immunomäärityksillä (French 2023). Brouillard ja muut (2025) tutkimuksessa estradiolille raportoitiin funktionaalisen herkkyyden noin 1,10 pmol/l LC-MS/MS-menetelmän avulla, CV:n ollessa alle 20 %. Tämä on kliinisesti tärkeä erityisesti postmenopausaalisilla naisilla, lapsilla ja aromataasinestäjähoitoa saavilla potilailla, joiden pitoisuudet voivat usein olla alle 2 pmol/l (French 2023).

Esimerkiksi testosteronille on raportoitu funktionaalisen herkkyyden arvoja selvästi alle 0,1 nmol/l, mikä kattaa hyvin naisten viitealueen (kts. taulukko 2), jossa useimmat immunomääritykset menettävät tarkkuutta. Lisäksi CV-arvo pysyi alle 20 prosentin tasolla pitoisuuden ollessa näin matala. (Xie ja muut 2017.)

Lisäksi LC-MS/MS-menetelmille on kuvattu hyvä lineaarisuus estradiolin osalta ($r^2 = 0,9997$). Menetelmän *carryover* eli edellisen korkean näytepitoisuuden jäännösignaali oli 0,16 prosenttia, joka on hyvin vähäisempi kuin hyväksymiskriteerin arvo, <1%.

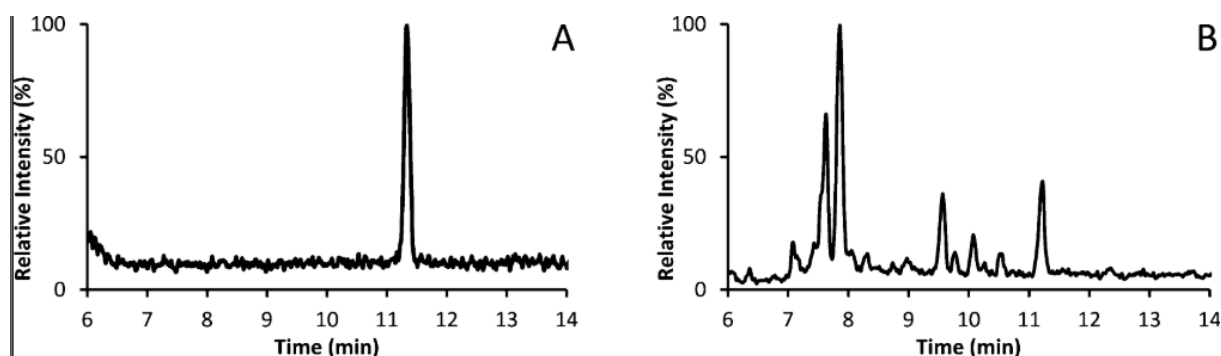
Yhdessä funktionaalisen herkkyyden ja CV-tulosten kanssa tämä viittaa siihen, että LC-MS/MS menetelmän suorituskyky alimmilla pitoisuuksilla rajoittuu pääasiassa signaali-kohinasuhteeseen, ei esimerkiksi kalibraatiokäyrän epälineaarisuuteen tai näytteiden väliseen kontaminaatioon. (Won ja muut 2023.)

3.3 Spesifisyys ja matriisivaikutukset

LC-MS/MS:n spesifisyys on yleensä immunomäärityksiä parempi, mutta sekään ei ole täysin ongelmaton. Menetelmä on herkkä kalibraattoreiden puhtaudelle, näytevalmistelulle ja ionisaatio-olosuhteille, ja esimerkiksi putkissa muovimateriaaleista liukenevät yhdisteet, kuten ftalaattiyhdisteet, voivat muokata steroidien rakennetta ja näin ollen vääristää tuloksia. (Karashima ja Osaka 2022.)

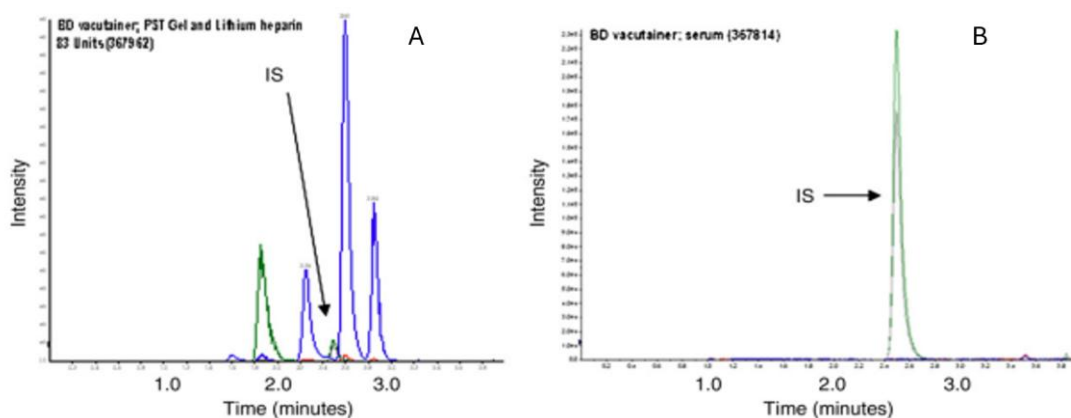
Estradiolin analyysi on LC-MS/MS:lle rakenteen puolesta erityisen vaativa, koska ei-polaarisen yhdisteen ionisaatio on esimerkiksi polaarista testosteronia hankalampaa. Herkkyyttä tässä tapauksessa voidaan parantaa esimerkiksi liikkuvan faasin optimoinnilla (lisäämällä modifioijia) tai derivatisoinnilla. Derivatisoinnilla liitetään esimerkiksi varattuja tai fluoresoivia ryhmiä hormoniin, joka parantaa haihtuvuutta ja havaittavuutta. Kuitenkin nämä ratkaisut lisäävät samalla menetelmän teknistä vaativuutta ja virheenlähteitä. (Won ja muut 2023; Demers 2008.)

Estradiolilla matriisivaikutukset korostuvat etenkin silloin, kun näytteessä on samanaikaisesti suuria eksogeenisten estrogeenien, kuten etinyyliestradiolin, tai muiden eluoituvien yhdisteiden pitoisuuksia. Kuten kuvasta 3 nähdään, puhdas estradiolikalibraattori tuottaa yhden selkeän E2-huipun (kromatogrammi A), kun taas natiivista seerumista mitatussa kromatogrammissa näkyy useita lähellä eluoituvia huippuja, jotka vaativat riittävää erotuskykyä ja ionisuhteiden tarkistamista (kromatogrammi B). (Botelho ja muut 2016.)



Kuva 3. Puhdas kalibraattori tuottaa yhden selkeän E2-huipun (A), kun taas natiivi seeruminäyte sisältää useita lähellä eluoituvia yhdisteitä (B), jotka edellyttävät riittävää kromatografista erotuskykyä ja ionisuhdekriteerien tarkistamista luotettavaa kvantifiointia varten (Botelho ja muut 2016).

Myös preanalyttiset tekijät voivat heikentää tulosten luotettavuutta. Shi ja muut (2012) osoittivat, että verinäytteenotossa käytetyt putkimateriaalit voivat aiheuttaa ionisupressiota ja testosteronin retentioajan lähelle osuvia häiritseviä huippuja. Tämä näkyy kuvassa 4, A kromatogrammissa, jossa geeliä sisältävä hepariiniputki tuottaa useita ylimääräisiä huippuja retentioajan ympärillä, kun taas vertailuna käytetty seerumiputki tuottaa ainoastaan sisäisen standardin signaalin.



Kuva 4. Gel/Li-hepariiniputkesta valmistettu näyte (A) sisältää useita testosteronin retentioajan lähellä eluoituvia häiritseviä huippuja, joka viittaa putkimateriaalista liueneisiin yhdisteisiin. Vertailuna seerumiputki (B) tuottaa vain sisäisen standardin (IS) signaalin ilman ylimääräisiä huippuja, joka osoittaa, ettei putkesta aiheudu menetelmää häiritsevää kontaminaatiota (muokattu kuvasta Shi ja muut 2012)

Tämän vuoksi putkityyppi, kalibraattorien matriisi ja eräkohtainen vaihtelu on syytä huomioida validoinnissa. Lisäksi tulisi käyttää matriisiltaan mahdollisimman näytemäisiä (matrix-matched) kalibraattoreita ja kontrollinäytteitä, sekä lasisia tai lisäaineiltaan mahdollisimman yksinkertaisia muoviputkia aina kun mahdollista. (Shi ja muut 2012.)

3.4 Standardointi ja jäljitettävyys

LC-MS/MS-menetelmien vahvuus näkyy myös standardoinnissa ja jäljitettävydessä. Testosteronille ja estradiolille on kehitetty referenssimenetelmiä ja tarkkuuteen perustuvia pätevyystestejä, joiden avulla tulokset voidaan sitoa CDC:n HoSt-ohjelmaan ja vertailumateriaaleihin. Tämä on parantanut laboratorioden välistä vertailtavuutta erityisesti testosteronimäärityksissä. (French 2023; Zhang ja Rockwood 2015.)

Estradiolille kehitetyt referenssimenetelmät on suunnattu erityisesti tilanteisiin, joissa pitoisuudet ovat matalia. CDC:n ohjelmassa massaspektrometriaa käyttävän vertaisryhmän mediaani oli lähellä referenssiarvoa (27,3 pg/mL), kun taas immunomääritysten mediaanit poikkesivat siitä selvästi enemmän, kuten näkyy taulukossa 3. (French 2023.)

Taulukko 3. CAP:n Accuracy-Based Proficiency Survey -tulokset estradiolille. Taulukossa esitetään eri immunomääritysalustojen ja massaspektrometrinen menetelmän ilmoittamat E2-pitoisuudet samasta näytemateriaalista (27,3 pg/mL). Immunomääritysmenetelmien tuloksissa mediaanien sekä minimi- ja maksimiarvojen välinen vaihtelu on suurempaa kuin massaspektrometrissä menetelmissä (French 2023).

Assay number	n	ABS-04 median concentration (pg/mL)	Minimum reported concentration (pg/mL)	Maximum reported concentration (pg/mL)
IA 1	7	33	15	36
IA 2	6	29	25	36
IA 3	4	34	31	34
IA 4	3	31	28	35
IA 5	3	35	30	37
Mass spectrometry	12	25	23	28

Myös, kuten osiossa 3.3 todettiin, LC-MS/MS-kalibraattoreiden ja kontrollien matriisi on merkityksellinen. Kaupallisissakin ihmisseerumiin perustuvissa perusmatriiseissa voi olla jäljellä pieniä steroidipitoisuuksia, jotka voivat olla kliinisesti merkittäviä silloin, kun tarkastellaan hyvin matalia pitoisuuksia (Shi ja muut 2021).

3.5 Käytännön näkökulmat

LC-MS/MS:n käytännön haittoja ovat korkeat laite- ja ylläpitokustannukset, vaativa näytevalmistelu ja erikoistuneen osaamisen tarve. Menetelmä ei siksi ole yhtä helposti integroitavissa suuren tilavuuden rutiinidiagnostiikkaan kuin immunomääritykset. (Zhang ja Rockwood 2015; Krasowski ja muut 2014). Läpimenoa rajoittavana pullonkaulana on kromatografinen vaihe, joka vie useita minuutteja per näyte ja voi kokonaisuudessaan pidentää analyysi-aikaa lähelle 10 minuuttia (Zhang ja Rockwood 2015). Varsinainen MS/MS-detektio kestää vain murto-osan tästä ajasta, tyypillisesti noin 0,4 sekuntia (Xie ja muut 2017).

Kromatografista läpimenoa voidaan parantaa useilla tavoilla. Yksi tapa on usean kromatografisen etupään kytkeminen yhteen MS/MS-järjestelmään, jolloin järjestelmä voi lisätä näytesyöttöä 2–4-kertaiseksi. Toinen vaihtoehto on näytemultipleksointi, jossa samaan aioon injektoidaan useampia näytteitä, esimerkiksi steroidipaneeleissa. Tällä keinolla läpimenoa on pystytty kasvattamaan noin 60 näytteestä jopa 300 näytteeseen tunnissa, mutta menetelmä edellyttää derivatisointia, joka lisää riskinlähteitä. Näiden lisäksi osittain ”walk-away”-tyyppinen käyttö on lisääntynyt automatisoitujen uuttojärjestelmien ja integroidun ohjelmiston ansiosta. Nämä kaikki ovat parantaneet menetelmän käytännön toteutettavuutta kliinisessä ympäristössä. (Zhang ja Rockwood 2015.)

4 Menetelmien vertailu

Testosteronin ja estradiolin immunomääritysten ja LC-MS/MS-menetelmien erot näkyvät pääasiassa siinä, mitä niillä saadaan käytännössä tarkasti mitattua ja millä hinnalla. Suorien automaattisten immunomääritysten vahvuuksia ovat suuri läpimeno, nopeus, matalammat kustannukset ja helppo käyttö rutiinilaboratoriossa. Ongelmat tulevat esiin erityisesti matalilla pitoisuuksilla, jolloin menetelmäkohtainen vaihtelu kasvaa, ristiinreagointi lisääntyy ja tulosten jäljitettävyyks heikkenee. Tämä on kliinisesti tärkeää etenkin silloin, kun testosteronia mitataan naisilta, lapsilta ja hypogonadisilta miehiltä tai estradiolia miehiltä, postmenopausaalisilta naisilta ja aromataasinestäjähoitoa saavilta potilailta. (La'ulu ja muut 2018; Handelsman ja muut 2014; Krasowski ja muut 2014; Vesper ja muut 2014.)

LC-MS/MS-menetelmien keskeisiä vahvuuksia ovat parempi analyyttinen herkkyys, korkeampi spesifisyys sekä parempi jäljitettävyyks ja laboratorioden välinen vertailtavuus. Erityisesti matalilla testosteroni- ja estradiolipitoisuuksilla ne tuottavat immunomäärityksiä luotettavampia tuloksia. Haittapuolina ovat korkeammat hankinta- ja käyttökustannukset, vaativampi näytevalmistelu, suurempi asiantuntijaosaamisen tarve ja immunomäärityksiä rajallisempi automaatio. Tämän vuoksi immunomääritykset soveltuvat paremmin suuren tilavuuden rutiinidiagnostiikkaan, kun taas LC-MS/MS on parempi valinta tilanteissa, joissa pitoisuudet ovat erittäin matalia tai tuloksen analyyttinen varmuus on kliinisesti erityisen tärkeä. (Vesper ja muut 2014; French 2023; Zhang ja Rockwood 2015.)

Merkittävimmät erot on koottu taulukkoon 4.

Taulukko 4. Testosteronin ja estradiolin immunomääritysten ja LC-MS/MS-menetelmien vertailu

Ominaisuus	Immunomääritykset	LC-MS/MS
Peruseriaate	Vasta-aineeseen perustuva tunnistus	Massaan ja fragmentaatioon perustuva tunnistus

Analyyttinen herkkyys matalilla pitoisuuksilla	Heikompi, virheet korostuvat matalalla alueella	Erittäin hyvä myös matalilla pitoisuuksilla
Spesifisyys	Rajoittunut ja ristireagointi on mahdollista	Korkea
Matriisivaikutukset ja interferenssit	Herkkä esimerkiksi heterofiilisille vasta-aineille, SHBG:n vaikutuksille, bilirubiinille ja lääkkeiden ristireaktioille.	Herkkä preanalyttisille ja ionisaatioon liittyville häiriölle.
Kalibrointi ja jäljitettävyys	Vaihtelee alustojen ja valmistajien välillä	Voidaan sitoa referenssimenetelmiin ja standardoituihin vertailumateriaaleihin
Laboratorioiden välinen vertailtavuus	Heikompi, etenkin matalissa pitoisuuksissa	Yleensä parempi standardoinnin ansiosta
Läpimeno ja automaatio	Suuri läpimeno, joka on täysin automatisoitavissa	Rajallisempi läpimeno, vaikka automaatio kehittyy
Kustannukset	Matalammat per näyte	Korkeammat
Tyypillinen käyttökonteksti	Rutiinidiagnostiikka ja suuret näytemäärät	Varmistumääritykset ja tilanteet, joissa pitoisuudet ovat hyvin matalia

5 Yhteenveto

Tässä tutkielmassa tarkasteltiin kahta keskeistä analyttistä menetelmää testosteronin ja estradiolin määrittämiseen ihmisen seerumista ja vertailtiin niitä erityisesti matalien hormonipitoisuuksien näkökulmasta. Tarkoituksena ei ollut nimetä yhtä “parasta” menetelmää, vaan jäsentää, missä tilanteissa suorat automaattiset immunomääritykset tai LC-MS/MS toimivat kliinisesti riittävän hyvin ja missä ne epäonnistuvat.

Immunomääritysten vahvuuksia ovat nopeus, suuri läpimeno ja käytännöllisyys rutiinilaboratorioissa. Niiden heikkoudet korostuvat kuitenkin matalilla pitoisuuksilla, joilla menetelmäkohtainen harha, ristiinreagointi ja puutteellinen standardointi voivat johtaa kliinisesti merkittäviin eroihin. Tämän nähtiin viiden testosteronin suoraimmunomääritysalustan vertailussa, jossa todettiin, että näitä menetelmiä on käytännössä optimoitu terveiden miestien pitoisuusalueelle. (La’ulu ja muut 2018). LC-MS/MS puolestaan tuottaa herkempiä ja spesifisempiä tuloksia, mutta menetelmä on kalliimpi, teknisesti vaativampi ja hitaampi toteuttaa laajassa rutiinikäytössä (Krasowski ja muut 2014; Zhang ja Rockwood 2015). Moniin steroidien analyttisiin ongelmiin on olemassa tekninen ratkaisu, mutta sen laajamittainen käyttöönotto on vielä kesken.

Immunomääritysten osalta kehitystyö saattaa kohdistua entistä spesifisempien vasta-aineiden suunnitteluun, esimerkiksi paratooppien kohdennetun mutageneesin avulla (Krasowski ja muut 2014). Näillä voidaan todennäköisesti vähentää ristireaktiivisuutta. Kuitenkin on epärealistista odottaa, että immunomääritykset yltaisivät täysin samaan selektiivisyyteen kuin massaspektrometria, jossa yhden hormonin tunnistus perustuu toistettaviin, tarkasti määriteltyihin massafragmentteihin eikä biologisesti vaihtelevaan vasta-aineseokseen. Siksi suurin kehityspotentiaali immunomäärityksissä liittyy standardointiin, eli kalibroinnin jäljitettävyyteen korkeimman tason referenssimenetelmiin, hyvien ja luotettavien vertailumateriaalien käyttöön ja laajempaan osallistumiseen tarkkuuteen perustuviin ulkoisiin laadunarviointeihin, joilla voidaan pienentää menetelmien välisiä eroja (French 2023). LC-MS/MS:n osalta näytevalmistelun ja mittausprosessin automatisointi sekä esimerkiksi monianalyttiset steroidipaneelit voivat parantaa läpimenoa ja alentaa kynnystä tuoda MS-pohjaiset

menetelmät osaksi jokapäiväistä kliinistä työtä myös erikoislaboratorioiden ulkopuolella (Zhang ja Rockwood 2015).

Käytännöllisin ratkaisu voisi olla työnjako, jossa immunomääritykset toimivat suuren volyymin seulontamenetelmänä ja LC-MS/MS varataan refleksimääritykseen silloin, kun pitoisuudet ovat hyvin matalia tai tulos on ristiriidassa kliinisen kuvan kanssa. Tällainen lähestymistapa yhdistää immunomääritysten käytännöllisyyden ja LC-MS/MS:n analyttisen varmuuden.

Keskeinen johtopäätös on, että steroidihormonien määritysten parempi standardointi, herkkyys (immunomäärityksillä), automatisointi (LC-MS/MS:llä) ja vertailtavuus ovat välttämättömiä oikeudenmukaiselle diagnostiikalle. Sama potilas ei saisi saada olennaisesti erilaisia tuloksia pelkästään käytetyn menetelmän tai laboratorion vuoksi.

Lähteet

- Bertelsen, B.-E., Kellmann, R., Viste, K., Bjørnevik, A. T., Eikesdal, H. P., Lønning, P. E., ... Almås, B. (2020) An Ultrasensitive Routine LC-MS/MS Method for Estradiol and Estrone in the Clinically Relevant Sub-Picomolar Range. *J Endocr Soc* 4:bvaa047.
- Botelho, J. C., Ribera, A., Cooper, H. C. & Vesper, H. W. (2016) Evaluation of an Isotope Dilution HPLC Tandem Mass Spectrometry Candidate Reference Measurement Procedure for Total 17- β Estradiol in Human Serum. *Anal Chem* 88:11123–11129.
- Brouillard, A., Davignon, L.-M., Cernik, R., Giguère, C.-É., Findlay, H., Juster, R.-P., ... Marin, M.-F. (2025) Comparing immunoassay and mass spectrometry techniques for salivary sex hormone analysis. *Psychoneuroendocrinology* 174:107379.
- Demers, L. M. (2008) Testosterone and estradiol assays: Current and future trends. *Steroids* 73:1333–1338.
- French, D. (2023) Clinical utility of laboratory developed mass spectrometry assays for steroid hormone testing. *J Mass Spectrom Adv Clin Lab* 28:13–19.
- Handelsman, D. J., Newman, J. D., Jimenez, M., McLachlan, R., Sartorius, G. & Jones, G. R. D. (2014) Performance of Direct Estradiol Immunoassays with Human Male Serum Samples. *Clin Chem* 60:510–517.
- HUS Diagnostiikkakeskus (2025a) S -Testo Testosteroni, seerumista. Saatavilla: <https://diagnostiikka.hus.fi/tutkimus?id=2735>. Viitattu 29.4.2026.
- HUS Diagnostiikkakeskus (2025b) Estdio Estradioli, seerumista. Saatavilla: <https://diagnostiikka.hus.fi/tutkimus?id=1366>. Viitattu 29.4.2026.
- Karashima, S. & Osaka, I. (2022) Rapidity and Precision of Steroid Hormone Measurement. *J Clin Med* 11:956.
- Krasowski, M. D., Drees, D., Morris, C. S., Maakestad, J., Blau, J. L. & Ekins, S. (2014) Cross-reactivity of steroid hormone immunoassays: Clinical significance and two-dimensional molecular similarity prediction. *BMC Clin Pathol* 14:33.
- La'ulu, S. L., Kalp, K. J. & Straseski, J. A. (2018) How low can you go? Analytical performance of five automated testosterone immunoassays. *Clin Biochem* 58:64–71.
- Maharjan, A. S., Wyness, S. P., Ray, J. A., Willcox, T. L., Seiter, J. D. & Genzen, J. R. (2019) Detection and characterization of estradiol (E2) and unconjugated estriol (uE3)

- immunoassay interference due to anti-bovine alkaline phosphatase (ALP) antibodies. *Pract Lab Med* 17:e00131.
- Mauvais-Jarvis, F. & Lindsey, S. H. (2024) Metabolic benefits afforded by estradiol and testosterone in both sexes: Clinical considerations. *J Clin Invest* 134:e180073.
- Rosner, W., Auchus, R. J., Azziz, R., Sluss, P. M. & Raff, H. (2007) Utility, Limitations, and Pitfalls in Measuring Testosterone: An Endocrine Society Position Statement. *J Clin Endocrinol Metab* 92:405–413.
- Rosner, W., Hankinson, S. E., Sluss, P. M., Vesper, H. W. & Wierman, M. E. (2013) Challenges to the Measurement of Estradiol: An Endocrine Society Position Statement. *J Clin Endocrinol Metab* 98:1376–1387.
- Shi, J., Bird, R., Schmeling, M. W. & Hoofnagle, A. N. (2021) Using mass spectrometry to overcome the longstanding inaccuracy of a commercially-available clinical testosterone immunoassay. *J Chromatogr B* 1183:122969.
- Shi, R. Z., Van Rossum, H. H. & Bowen, R. A. R. (2012) Serum testosterone quantitation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Interference from blood collection tubes. *Clin Biochem* 45:1706–1709.
- Singh, R. J. (2008) Validation of a high throughput method for serum/plasma testosterone using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Steroids* 73:1339–1344.
- Vesper, H., Botelho, J. & Wang, Y. (2014) Challenges and improvements in testosterone and estradiol testing. *Asian J Androl* 16:178.
- Wild, D. (toim.) (2013) *The Immunoassay Handbook*, 4. painos. Elsevier, Amsterdam.
- Won, E. J., Yi, A. & Ko, Y. J. (2023) Analytical Performance Evaluation for Estradiol using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Clin Biochem* 113:59–63.
- Xie, X., Van Natta, K., Wijeratne, N. & Martins, C. (2017) Quantitative analysis of estradiol and testosterone in plasma for clinical research using the TSQ Altis triple quadrupole mass spectrometer. Thermo Fisher Scientific, Technical Note 64973, San Jose, CA. <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Technical-Notes/tn-64973-lc-ms-estradiol-testosterone-tsq-altis-tn64973-en.pdf>>. (Luettu 17.11.2025).
- Zhang, Y. V. & Rockwood, A. (2015) Impact of automation on mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 450:298–303.