



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

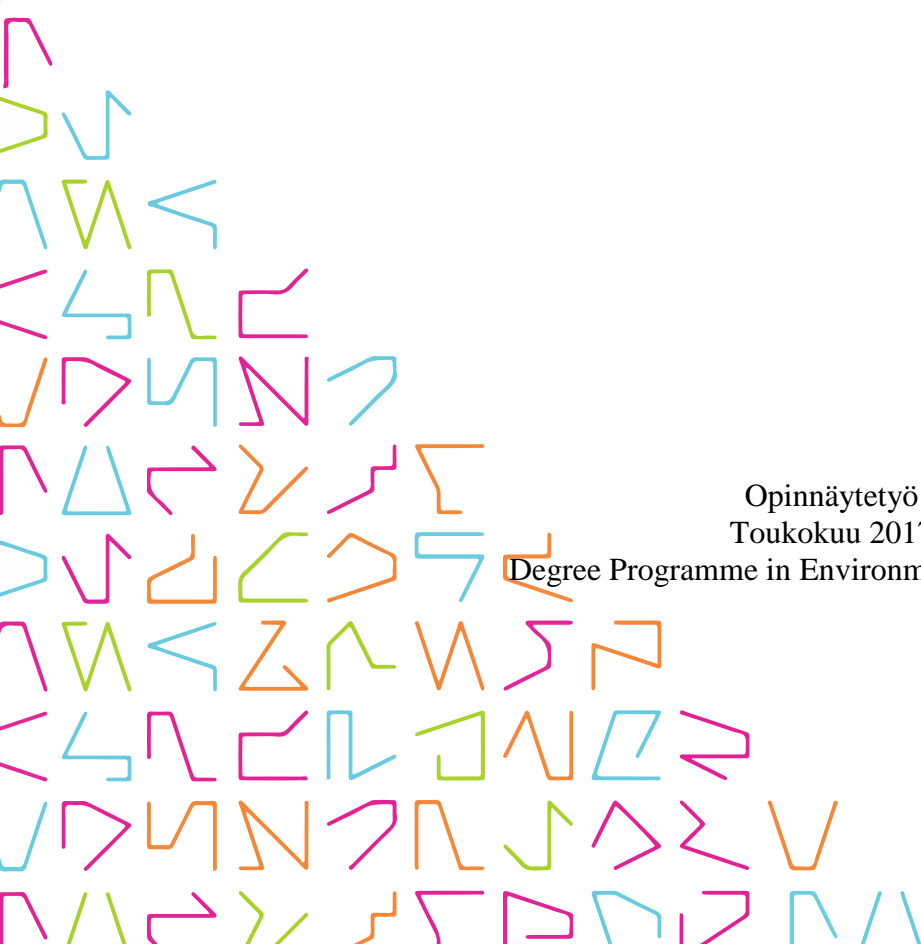
MIKROKYSTIINI-LR:N MÄÄRITYS ELISA- MENETELMÄLLÄ

Menetelmän validointi Kokemäenjoen vesistön
vesiensuojeluyhdistys ry:lle

Riina Ruususaari

Opinnäytetyö
Toukokuu 2017

Degree Programme in Environmental Engineering



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Degree Programme in Environmental Engineering

RUUSUSAARI, RIINA:

Mikrokystiini-LR:n määrittäminen ELISA-menetelmällä

Menetelmän validointi Kokemäenjoen vesistön vesiensuojeluyhdistys ry:lle

Opinnäytetyö 48 sivua, joista liitteitä 6 sivua

Toukokuu 2017

Sinilevien eli cyanobakteerien seurannalla on Suomessa vakiintunut asema, ja sinilevien tuottamien toksien esiintyminen erityisesti järvivesissä on ajankohtainen aihe kesäisin. Nykyinen seurantajärjestelmä perustuu sinilevähavaintojen keräämiseen viranomais- ja kansalaisvoimin ja niistä tiedottamiseen, mutta varsinaista käytäntöä fykotoksiinien määrittämiseen järvivesistä ei ole vielä syntynyt. Immunologisiin menetelmiin kuuluva ELISA perustuu antigeenin - tässä tapauksessa mikrokystiinin - ja vasta-aineen reaktioon, jossa antigeeni kilpailee sidoksesta vasta-aineeseen entsyymillä leimatun antigeenin kanssa. Tuloksena on värillinen lopputuote, jonka absorbanssi on kääntäen verrallinen näytteen mikrokystiinikonsentraatioon.

Opinnäytetyön aihe on immunologisen ELISA-menetelmän validointi KVVY:lle, jolla tähdätään fykotoksiini mikrokystiini-LR:n kvantitatiiviseen määrittämiseen raakavesinäytteistä. Menetelmä on tyypiltään pikakitti, joka sisältää tarvittavat reagenssit, mutta vaatii tulosten kvantitointimiseksi fotometrisen mittauslaitteen. Tavoitteena oli saada menetelmä validoitua kesäkauden 2017 alkuun.

Validointia varten laadittiin validointisuunnitelma KVVY:n omien laatustandardien ja VTT:n validointiohjeiden pohjalta yhdenmukaistamalla ja tarkastamalla validointia varten valittavat parametrit. Menetelmän validointimenettelyn yhteydessä otettiin käyttöön spektrofotometri tulosten kvantitointimiseksi ja tarkasteltiin analyysin suoritukseen liittyviä tekijöitä määrittämisen optimoimiseksi. Validointimittaukset suoritettiin hyväksytyyn validointisuunnitelman mukaan ja tulokset käsiteltiin tilastollisesti, minkä jälkeen tehtiin johtopäätökset menetelmän käyttöönotosta ja lisäkäsittelyn tarpeesta.

Validoinnin tuloksista oli pääteltävissä, että menetelmä ei toteudu täysin valmistajan antamissa raja-arvoissa. Useampi validoinnin parametri ei saavuttanut sille asetettua tavoitearvoa, ja analyysiketjun loppuvaiheessa tarvittava spektrofotometri asetti haasteita analyysin suoritukseen lisäämällä epävarmuustekijöitä ylimääräisen työvaiheen muodossa sekä värillisen lopputuotteen siirtämisessä kyvetteihin määrätyn aikarajan sisällä.

Menetelmänä ELISA soveltuu hyvin mikrokystiinin kaltaiselle antigeenille, mutta työn tulosten perusteella suositellaan lisämittausten lisäksi joko valmistajan omaan fotometriin siirtymistä tai vaihtoehtoisesti uudempiaikaisen, samalla periaatteella toimivan kuoppalevymenetelmän käyttöönottoa.

Asiasanat: ympäristöanalytiikka, sinilevät, mikrokystiini, validointi

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Environmental Engineering

RUUSUSAARI, RIINA:

Detection of Microcystin-LR by Using an ELISA Method

Validation of the method for the Water Protection Association of the River Kokemäenjoki

Bachelor's thesis 48 pages, appendices 6 pages

May 2017

Cyanobacteria, also known as the blue green algae, have long been monitored in Finnish water bodies as a potential health hazard especially during the summer season. In spite of monitoring programme aimed at informing the general public of the extent of blooms, there's no regulation for quantitation of phycotoxins such as microcystins in the lake water. The ELISA method is based on immunologic reactions between antibodies and antigens – in this context, microcystin – the antigen competes for the binding location of the antibody with an enzyme-linked antigen. The end product is a colorful solution that has absorbance which is invertedly proportional to the microcystin concentration in the solution.

Topic of this thesis is a validation of immunologic ELISA method aimed at quantitative determination of microcystin-LR where the sample matrix is lake water. The method is ready to use since it is a kit which contains all necessary reagents, but requires an external photometric device to detect the signal given by the samples. The topic was provided by KVVY, who wished the method could be validated and ready for use in the summer of 2017.

A validation plan was formulated based on KVVY's own quality standards and VTT's validation guidebook by streamlining relevant parameters to be tested. During the validation process, a spectrophotometer was deployed for the purpose of quantitation of the results and variables related to the analysis process were observed and optimized where suitable. Validation measurements were carried out according to the approved plan and results were statistically processed, after which conclusions on validation of the method and further processing were made.

From the results it was deduced that the method does not fully comply with the specifications given by the manufacturer. More than few of the parameters' goal values were not met, and usage of the spectrophotometer added an extra step and uncertainty in the analysis chain as the end product had to be transferred from tubes to the cuvettes within a given timeline.

The ELISA method is well suitable for an antigen such as microcystin, but based on the results further validation steps are recommended along with possibly switching to manufacturer's own photometer. Alternatively newer 96-well assay plate method could be considered.

Key words: environmental analytics, cyanobacteria, microcystin, validation

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	TAUSTA	9
2.1	Mikrokystiini-LR	9
2.2	Mikrokystiinejä tuottavat syanobakteerit vesiekosysteemeissä.....	9
2.3	Syanobakteerien toksiset ominaisuudet	10
2.4	Fykotoksiinien seuranta Suomessa	12
3	MENETELMÄT JA LAITTEET	14
3.1	Microcystins Tube Kit	14
3.1.1	Kitin tekniset ominaisuudet.....	15
3.1.2	Analyysien suunnittelun rajoitukset.....	16
3.2	ELISA	17
3.2.1	Pikakitin ELISA-sovellus	18
3.2.2	4-PL kalibrointikuvaaja.....	19
3.3	UV-VIS spektrofotometri	21
3.3.1	Laitteen käytön soveltaminen	22
3.3.2	Tulosten käsittelyn soveltaminen.....	22
4	VALIDOINTI.....	23
4.1	Immunologisen menetelmän validointi	23
4.2	Validointisuunnitelma.....	24
4.2.1	Saannon ja laimennoslinearisuuden tarkastelu.....	24
4.2.2	Toistettavuus ja uusittavuus	25
4.2.3	Systemaattinen virhe	25
4.2.4	Funktionaalinen herkkyys	26
4.2.5	Mittausepävarmuus	26
4.2.6	Toteamis- ja määrittäysraja.....	27
4.2.7	Hälytys- ja toimintaraja.....	27
5	VALIDOINNIN TULOKSET.....	29
5.1	Validointimittausten tulokset.....	29
5.1.1	Saannon ja laimennoslinearisuuden tarkastelu.....	29
5.1.2	Toistettavuus ja uusittavuus	31
5.1.3	Systemaattinen virhe	32
5.1.4	Funktionaalinen herkkyys	33
5.1.5	Mittausepävarmuus	34
5.1.6	Toteamis- ja määrittäysraja.....	35
5.1.7	Hälytys- ja toimintaraja.....	36
5.2	Analyysiprosessin optimointi	36

6 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA	38
LÄHTEET	40
LIITTEET	43
Liite 1. Esimerkki yksittäisen kitin mittaussuunnitelmasta	43
Liite 2. Esimerkki yksittäisen kitin tuloksista	44
Liite 3. Kittien kalibrointisuorien data 1/2	45
Liite 3. Kittien kalibrointisuorien data 2/2	46
Liite 4. Ajan vaikutus kalibrointiliuosten absorbanssiin ja konsentraatioon.....	47
Liite 5. Kitin kalibrointisuorien vertailu valmistajan ilmoittamiin arvoihin	48

LYHENTEET JA TERMIT

Fykotoksiini	Haitalliseksi määriteltyjen kasviplanktonlajien tuottama toksinen yhdiste
Kongeneerit	Yhdisteitä, joilla on keskenään samankaltainen rakenne ja kemialliset ominaisuudet
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
MC-LR	Mikrokystiinin LR-kongeneeri
Kromogeeni	Aine, joka kemiallisessa reaktiossa muuttaa väriä
SSE	Squared Sum of Errors, pienimmän neliösumman regressio
CRM	Certified Reference Material, varmennettu vertailumateriaali
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography, korkean erotuskyvyn nestekromatografia

1 JOHDANTO

Vesistöissä esiintyvät sinilevät eli syanobakteerit ovat olleet tarkkailun alaisena Suomessa jo pitkään haitallisten ominaisuuksiensa vuoksi. Erityisesti kesäisin seurataan esiintymien sijainteja ja esiintymistiheyttä niin viranomais- kuin kansalaisvoimin (esim. JärviWiki havaintojen tietokantana). Toistaiseksi seuranta on keskittynyt nimenomaan esiintymien havainnointiin, levien tunnistamiseen ja niistä tiedottamiseen, mutta varsinaisia fykotoksiiniseurantoja ei tehdä kuin Itämerellä. (Rapala, Kilponen, Järvinen & Lahti 2012, 54.) Yleinen suuntaus on kuitenkin mahdollisesti muuttumassa siten, että tulevaisuudessa myös sisävesillä mikrokystiinipitoisuuksia määritettäisiin muun seurannan ohessa, jotta saadaan kvantitatiivisia tuloksia vedenlaadun tarkkailuun.

Tämän opinnäytetyön tarkoitus on validoida ELISA-pikakitti Kokemäenjoen Vesistön Vesiensuojeluyhdistyksen (KVVY) toimeksiantona. Validoitavalla menetelmällä mitataan kvantitatiivisesti tiettyjen syanobakteerien tuottamaa hepatotoksista eli maksalle myrkyllistä mikrokystiini-LR-yhdistettä, ja sitä sovelletaan tulevaisuudessa raakavesimatriisinäytteisiin. KVVY on suomalainen voittoa tavoittelematon organisaatio, jolla on pitkä historia toimialueellaan kokonaisvaltaisten ympäristöpalvelujen tuottajana. Tampereen laboratoriossa tehdään muun muassa jätevesi-, raakavesi-, metalli- ja ekotoksikologisia määrittäyksiä, joista jälkimmäisen osaksi tässä työssä validoitava menetelmä ryhmittyy. Tavoitteena on, että tätä määrittäystä voidaan hyväksyttävästi tehdä laboratoriossa kesällä 2017.

Työn laajuus rajautuu teoriapohjaltaan käsittelemään sekä mikrokystiinien ilmenemistä luonnonvesissä että menetelmän toimintaperiaatetta (suorasti kilpaileva ELISA), mutta myös ajankohtaista lainsäädäntöä ja velvoiteseurantaa; käytännön osuus koostuu validointisuunnitelman laatimisesta, määrittäskitin testaamisesta laboratorio-olosuhteissa positiivisen kaupallisen kontrollin avulla sekä tulosten käsittelystä taulukkolaskentaohjelmassa ja validointiraportin laatimisesta.

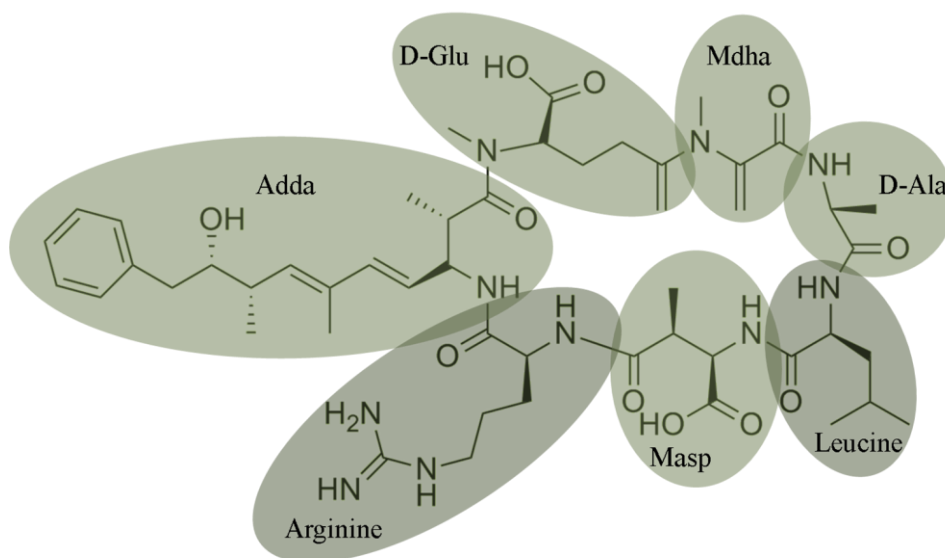
Fykotoksiiniesiintymien lukumäärän arvellaan kasvavan ilmastonmuutoksen johdosta, kun olosuhteet muuttuvat yhä suotuisammiksi tietyille syanobakteereille (Kankaanpää 2011, 1355; Ferrão-Filho 2013). Siksi opinnäytetyö tarjoaa tarpeellista tietoa ja testaus-

dataa harkittaessa mikrokystiinin määrityksen ottamista osaksi ympäristöanalyttisiä palveluja.

2 TAUSTA

2.1 Mikrokystiini-LR

Mikrokystiini-LR on eräs hepatotoksinen mikrokystiinin kongeneeri eli rakenteellisesti samankaltainen yhdiste, joita on identifioitu yhteensä arviolta 70. Mikrokystiinit ovat syklisiä heptapeptidejä, joiden nimeämisessä käytetään kaksikirjamista päätettä nimen loppuosassa osoittamaan varianttiaminohappojen tyyppi (kuva 1). Rakenteeltaan mikrokystiinit koostuvat seitsemästä aminohaposta, jotka ovat liittyneet toisiinsa peptidisidoksilla – näistä kaksi vaihtelee kongeneerista riippuen (kuvassa 1 varianttiaminohapot ovat arginiini ja leukiini). Ominaisuuksiltaan mikrokystiinin kongeneerit vaihtelevat hieman, sillä mikrokystiini-LR on toksisin variantti. Tutkimuksissa on havaittu, että toksiineja tuottava syanobakteerisuku tuottaa usein useampia kuin yhtä kongeneeria kerrallaan. (Gago-Martinez 2007, 251-253; Puddick ym. 2014.)



KUVA 1. Mikrokystiini-LR (Wikimedia Commons, muokattu)

2.2 Mikrokystiinejä tuottavat syanobakteerit vesiekosysteemeissä

Syanobakteerit, puhekielessä yhä usein sinilevät, ovat yhteyttämään kykeneviä eli autotrofisia organismeja, joita esiintyy luonnossa moninaisissa ympäristöissä. Sivosen ja Jonesin mukaan (1999) järvi- ja meriympäristössä sekä murtovesien ja kuumien lähteiden

den ekosysteemeissä ne muodostavat usein osan paikallista kasviplanktonia tai fyto-ben-tosta eli vesistön pohjassa elävää levää. Ristiriita kyseisen organismin taksonomisesta asemasta ja siten nimeämisestä johtuu sen erityisistä ominaisuuksista, jotka biologisessa mielessä asettavat sen osin bakteerien ja osin levien kategoriaan (Chorus & Bertram 1999, 12; Sivonen 2009, 291). Syanobakteerit ovat prokariotteja eli esitumallisia, kun taas levät ovat eukarioottisia eli aitotumallisia (Marler & Gault 2009, 105; Sapp 2009, 98).

Mikrokystiinien kongeneerit päätyvät vesistöihin eri syanobakteerien sekundaaristen aineenvaihduntaprosessien johdosta; muun muassa lajien ja sukujen *Anabaena lemmermannii*, *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria aghardii* (nyk. *Planktothrix aghardii*) ja *Nostoc* on havaittu tuottavan mikrokystiiniä järviympäristössä (Kankaanpää 2011, 1336; Puddick ym. 2013). Tutkijoiden Park ym. (1998) mukaan syanobakteerien kukintakauden vaihe vaikuttaa vesistöstä löytyvän mikrokystiinin esiintymiseen: tutkittaessa eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa olevia syanobakteerilauttoja sisältäneitä järvi-vesinäytteitä valtaosa mikrokystiineistä oli yhä solujen sisällä, kun taas elinkaarensa lopussa olevista esiintymiä sisältäneistä näytteistä havaittiin korkeampia solunulkoisia mikrokystiinipitoisuuksia. Kokonaismikrokystiinimäärityksen ollessa tavoitteena on vesinäytteet silti aina käsiteltävä mikrokystiinien vapauttamiseksi solujen sisältä. Myös järvien rehevyystaso ja lämpötila vaikuttavat mikrokystiinien määrään: syanobakteerit valtaavat herkemmin rehevöityneitä ja rehevöityviä vesistöjä näiden tarjotessa enemmän ravinteita, erityisesti fosforia, optimilämpötilan ollessa 20–25 °C, ja osa syanobakteereista kykenee myös sitomaan typpeä ilmakehästä mikä antaa niille edun muihin leviin nähden (Sivonen & Jones 1999, 291, 303; Puddick ym. 2013; Elintarvikkeiden ja talousveden kemialliset vaarat 2013, 118). Suomessa syanobakteerien kukinta alkaa keväällä ja saavuttaa huippunsa heinä-elokuussa (Kettunen, Mäkelä & Heinonen 2008, 31).

2.3 Syanobakteerien toksiset ominaisuudet

Vaikka syanobakteerien aikojen saatossa kehittynyt kyky tuottaa happea fotosynteesin tuotteena on kiistatta ollut hyödyllinen ilmakehän kehittymisen kannalta, niiden vaikutus hydrosfääriin on usein negatiivinen (Sivonen & Jones 1999, 291). Massaesiintyminä vesistöissä ilmenevät sinilevälautat eli kukinnat (kuva 2), saattavat tuottaa haitallisia yhdisteitä (Joosten 2006, 18; Gago-Martinez 2007, 251; Kankaanpää 2011, 1335). Kirjallisuudessa (Bácsi, B-Beres & Vasas 2013, 2–3) on spekuloitu syanobakteerien tuotta-

van mikrokystiiniä osin siksi, että niistä on hyötyä eloonjäämisen kannalta: allelopatia eli organismin positiivinen tai negatiivinen biokemiallinen vaikuttaminen ympäristöönsä yhdisteitä tuottamalla saattaa olla osallisena syanobakteerien syödyksi tulemisen estomekanismeissa.



KUVA 2. Rannalle ajautunutta syanobakteerimassaa. (Kuva: Cousins 2007).

Näistä kasviplanktonin tuottamista haitallisista yhdisteistä käytetään termiä fykotoksiinit, jotka on jaettu vaikutusalueidensa mukaisesti kategorioihin kuten esimerkiksi hepatoksiinit eli maksavaaralliset myrkyt, neurotoksiinit eli hermomyrkyt ja äyriäisperäiset myrkyt jotka aiheuttavat esimerkiksi ripulia (Kankaanpää 2011). Sinileväesiintymät eivät silti välttämättä sisällä juuri niitä kantoja, jotka tuottavat fykotoksiineja, vaan niissä esiintyy yhdistelmiä fykotoksiineja tuottavista sekä ei-tuottavista kannoista; Suomessa ja globaalisti tehdyn tutkimuksen perusteella kuitenkin suhteellisen usea havainto sisältää toksisia yhdisteitä, kun maailmanlaajuisesti 56 % havainnoista arvioidaan sisältävän toksiineja (Bácsi, B-Beres & Vasas 2013, 1; Rantala ym. 2016).

Syanobakteerien tuottamille toksiineille altistumisen on Suomessa raportoitu aiheuttavan oireita vakavimmillaan koti- tai villieläinten kuolemantapauksiin asti, mutta yleisimmät oireet ovat altistumistavasta ja toksiinin tyypistä riippuen allergiset reaktiot, maksatoksisuus ja ruoansulatuskanavan toiminnalliset häiriöt (Chorus 2012; Rapala ym. 2012, 59).

2.4 Fykotoksiinien seuranta Suomessa

Valviran ohjeistuksen (2016, 5–6) mukaan järvestä otetusta vedestä eli raakavedestä seurataan vedenottolaitoksilla fykotoksiineja tuottavien sukujen *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Planktothrix* ja *Woronichinia* mahdollisesti tuottamia mikrokystiinejä siten, että lasketaan näytteiden sisältämät leväsolut ja biomassa, kun laitokselle tulleesta vedestä on havaittu kyseisten sukujen edustajia. Siinä tapauksessa, että leväsolujen määrä ylittää arvon 5000 solua/ml ja biomassa arvon 1 mg/l, on vedestä määritettävä kokonaismikrokystiinipitoisuus. Näiden arvojen ylitys johtaa myös viikoittaiseen raakaveden tarkasteluun mikroskopoimalla ja leväsukuja identifioimalla. (Valvira 2016, 5.)

Suomessa ei ole velvoitetta seurata fykotoksiinipitoisuuksia järvivedestä (Kankaanpää 2011, 1337; Järvinen 2017), mutta Suomen merenhoidon käsikirjan mukaan (Ympäristöministeriö n.d.) Itämerestä seuranta on tehty osana Suomen merenhoitosuunnitelmaa vuodesta 2016 lähtien. Vedenottolaitoksilla kuitenkin seurataan Valviran ohjeistuksen mukaan mikrokystiinien ja muiden levätoksiinien pitoisuuksia raakavedestä ja talousvedestä niiltä osin, kun toimenpiderajat ylittyvät. Talousveden eli puhdistetun raakaveden sisältäessä <1 µg/l mikrokystiinejä määritetään toksiinipitoisuus sekä raaka- että talousvedestä että aloitetaan vedenkäsittelyn tehostus- ja tiedotustoimenpiteet yhdessä terveysuojeluviranomaisten kanssa. Mikäli pitoisuus nousee ajoittain yli arvon >1 µg/l, harkitaan edellä mainittujen toimenpiteiden lisäksi kieltoa veden käyttämiseen ruoanlaiton tarpeisiin ja juomavedeksi. (Valvira 2016, 6–7.)

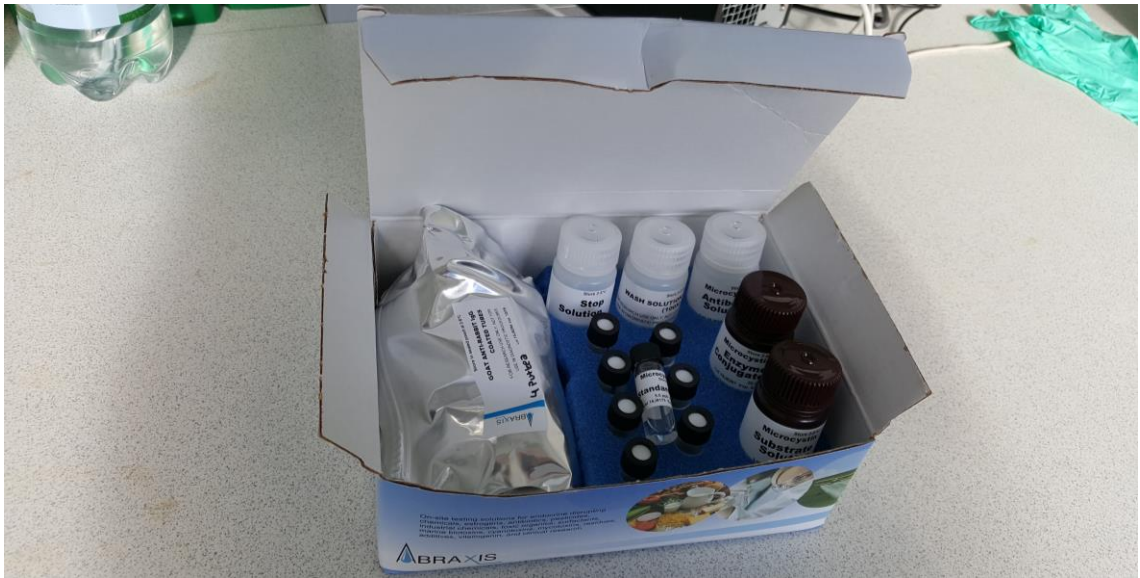
Globaalisti raja-arvo on määritetty vain mikrokystiini-LR-kongeneerille johtuen riittämättömistä tutkimustuloksista muiden kongeneerien osalta (Cyanobacterial Toxins: Microcystin in Drinking Water 2003, 10). WHO on antanut ohjeistuksen mikrokystiini-LR:n osalta siten, että korkein hyväksyttävä pitoisuus on 1 µg/l juomavesille ja 0,4 ng/kg/rp (ruumiinpaino) päivässä (Guidelines for Drinking Water Quality 2011; Elin-
tarvikkeiden ja talousveden kemialliset vaarat 2013). Esimerkiksi Saksassa mikrokystiinejä seurataan uimavesistä ensin visuaalisin keinoin Secchi-mittausten avulla, jonka jälkeen määritetään vesinäytteen klorofylli-a konsentraatio: mikäli arvo on >40 µg/l, määritetään mikrokystiinipitoisuus HPLC- tai ELISA-menetelmin. Varsinaista raja-arvoa ei ole asetettu juomavedelle tehokkaan vedenkäsittelysystemin ansiosta, mutta

virkestysalueiden uimavesistä määritetyn mikrokystiinikonsentraation ylittäessä 100 µg/l suositetaan alueen hetkellistä rajaamista pois käytöstä. (Chorus 2012, 64–63.)

3 MENETELMÄT JA LAITTEET

3.1 Microcystins Tube Kit

Microcystins Tube Kit on tyypillinen pikakitti, joka sisältää analyysiin tarvittavat reagenssit ja standardit mutta vaatii erillisen laitteen signaalin fotometriseen detektoimiseen (kuva 3). Testi soveltuu valmistajan mukaan (Microcystins Tube Kit n. d.) mikrokystiinien ja nodulariinien kvantitatiiviseen sekä kvalitatiiviseen määrittelyyn juoma- ja luonnonvesistä otetuista näytteistä.



KUVA 3. Microcystins Tube Kit (Kuva: Riina Ruususaari 2017)

Kitin toimintaperiaate pohjautuu kilpailevan ELISAn toimintaperiaatteelle: vasta-aine sitoutuu sille spesifiseen antigeeniin tilanteessa, jossa sekä näytteen antigeenit että entsyymillä leimatut antigeenit reagoivat. Mikäli vasta-aine sitoo enemmän leimattuja antigeenejä, värinmuutos on voimakkaampi entsyymien muuttaessa substraattimolekyylejä värilliseksi lopputuotteeksi: syntyvän värin intensiteetti on kääntäen verrannollinen mikrokystiinkonsentraatioon. (Microcystins Tube Kit n.d; Wild 2013, 267). Toimintaperiaate käsitellään laajemmin kappaleessa 3.1.3. Analyysin tulokset suositetaan laskemaan 4-PL-sovituksella (Microcystin Tube Kit n.d.), koska mittausvasteen ja konsentraation suhde ei ole lineaarinen ELISA-määrittelyssä, ja tulosten oikeellisuuden kannalta on tärkeää valita todellista mittauskäyriä parhaiten jäljittelevä funktio (Wild 2013, 323).

3.1.1 Kitin tekniset ominaisuudet

Valmistajan toimesta määrityskitistä on testattu toteamisraja, käänneaste eli kalibrointisuoran se piste, jonka jälkeen kaarevuussuunta vaihtuu, toistettavuus sekä mittausarjan sisällä että mittausarjojen välillä, saanto ja spesifisyys (taulukko 1). Kyseisiä arvoja verrataan validoinnista saataviin vertailuarvoihin niiltä osin, kun testattavat parametrit ovat samoja.

TAULUKKO 1. Määrityskitin ominaisuudet (Microcystins Tube Kit n.d., modifioitu)

Standardit & nolla	0 (1), 0,15 (2), 0,4 (3), 1,0 (4), 2,0 (5), 5,0 (6) ppb					
Kontrollit	HA 0,30 ± 0,07 ppb		C 0,75 ± 0,19 ppb			
LOD, toteamisraja yhdisteelle Microcystin-LR	n. 0,09 ppb (µg/l)		90 % B/B ₀			
Käänneaste (IC ₅₀)	n. 0,719 ppb (µg/l)		50 % B/B ₀			
Testin toistettavuus						
Toistotarkkuus						
Kontrollit	%CV Mittausarjan sisällä		%CV Mittausarjojen välillä			
(1) ka: 0,518 ppb n = 15, mittauspäiviä 3, rinnakkaisia 5	11,1		6,5			
(2) ka: 1,590 ppb n = 15, mittauspäiviä 3, rinnakkaisia 5	8,0		5,4			
(3) ka: 3,134 ppb n = 15, mittauspäiviä 3, rinnakkaisia 5	11,3		7,6			
Saanto						
Pitoisuudet*	0,25	0,50	1,5	3,0		
ka	0,247	0,527	1,560	3,179		
%CV	14,1	9,1	9,9	9,2		
%saanto	98,8	105,4	104,0	106,0		
*Tulkittu manuaalista, ei määritely						
Spesifisyys						
Ristiinreagoimisprosentti (Cross-reactivity, %)						
MC-LR	Nodularins	MC-RR	MC-LA	MC-LW	MC-YR	MC-LF
100 %	104 %	75 %	64 %	64 %	58 %	42 %

3.1.2 Analyysien suunnittelun rajoitukset

Yksi pakkaus sisältää 6 standardiliuosta kalibrointisuoran tekoon, 2 kontrollia, HRP-entsyymikonjugaatin, primaarisen vasta-aineen mikrokystiinille, substraatin, pysäytysliuoksen ja 40 sekundaarisella vasta-aineella päällystettyä analyysiputkea, joissa reaktiot tapahtuvat. Analyysejä suunniteltaessa on otettava huomioon, että kalibrointisuoran teko rinnakkaisena kontrolleineen jokaiselle mitattavalle sarjalle vaatii 14 putkea, jolloin näytteitä varten jää 26 putkea (taulukko 2). Mikäli samasta kitistä tehdään pidemmän aikavälin kuluessa kaksi määritystä, kalibrointisuorien tekoon tarvittavien putkien määrä nousee 28 putkeen ja vastaavasti näytteille jää 12 putkea. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että optimaalisin tapa on määrittää kerrallaan 1-5 näyterinnakkaista tai yhdellä kerralla ≤ 13 näyterinnakkaista.

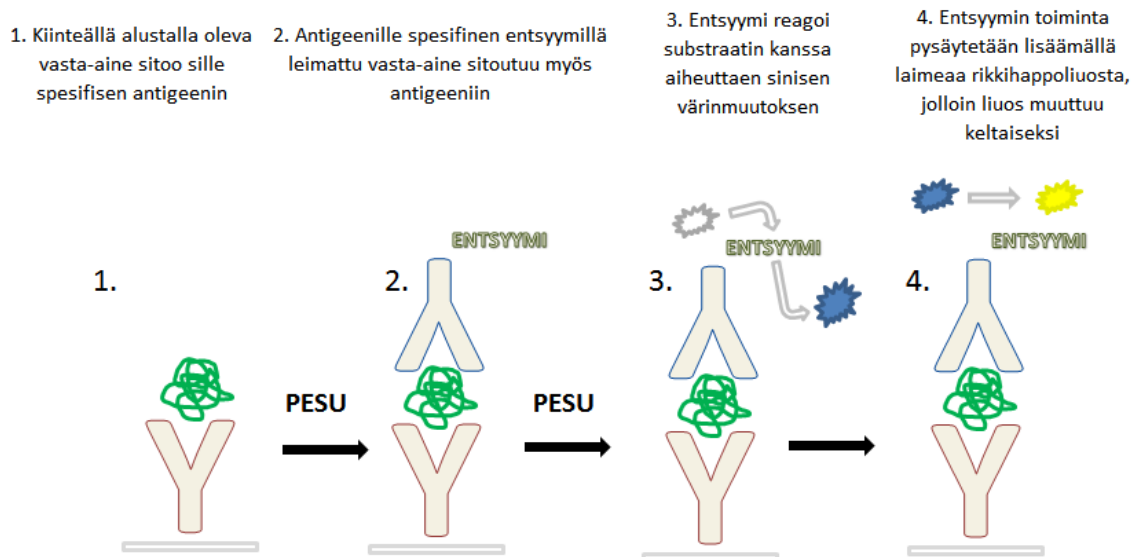
TAULUKKO 2. Kitin määritysputkien laskenta (optimoitu)

Tehtäessä koko kitti kerralla: 1 standardisuora			
Putkia per kitti			40
Putkia tarvitaan standardeihin + kontrolleihin			14
Jää näytteille			26
Näyterinnakkaisia voidaan tehdä 1 analyysikerralla			13
Tehtäessä kitti kahdella analyysikerralla: 2 standardisuoraa			
Putkia per kitti			40
Putkia tarvitaan standardeihin + kontrolleihin			28
Jää näytteille			12
Näyterinnakkaisia voidaan tehdä 2 analyysikerralla			6
Esim. jos näytteitä 6, tehdään ensin 1 rinnakkaisena ja sitten 5 rinnakkaisena			
1. analyysikerta		2. analyysikerta	
Putkia	40	Putkia	24
Tarvitaan st + C	14	Tarvitaan st + C	14
Näytteitä	1	Näytteitä	5
Näyteputkia tarvitaan	2	Näyteputkia tarvitaan	10
Putkia otetaan	16	Putkia otetaan	24
Putkia jää	24	Putkia jää	0

3.2 ELISA

Immunologisiin menetelmiin kuuluva ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) on spesifinen, sensitiivinen ja helposti muokattava menetelmä hyvin pienien pitoisuuksien tuottaman signaalin mittaamiseen sellaisista matriiseista, jotka sisältävät useita komponentteja (Wild 2013, 7). Se voidaan jakaa toimintaperiaatteeltaan useisiin eri tyyppeihin, joihin kuuluvat esimerkiksi epäsuora ELISA (indirect ELISA), sandwich ELISA sekä suora (direct) ELISA. Crowtherin mukaan (2009, 11) kyseiset menetelmät voidaan luokitella kilpaileviksi (Competitive) ELISA-menetelmiksi, joskin ELISA-menetelmien nimeäminen ja kategorisointi toimintaperiaatteen mukaan vaihtelee kirjallisuudessa.

Pääpiirteittäin edellä mainitut ELISAn alalajit hyödyntävät immunologisia reaktioita kvantitointiin, joka on sekä tarkkaa että spesifistä valitun analyytin suhteen. Yhteistä menetelmille on reagenssin (antigeeni tai vasta-aine) kiinnitys kiinteälle pinnalle, sitoutuneen ja sitoutumattoman reagenssin erottelu pesuvaiheen avulla, sitoutuneen reagenssin leimaus entsyymillä värinmuutosreaktion katalysoimiseksi sekä kvantitointi mittamalla optisen signaalin arvoja. (Crowther 2009, 11–17; Wild 2013, 3.)



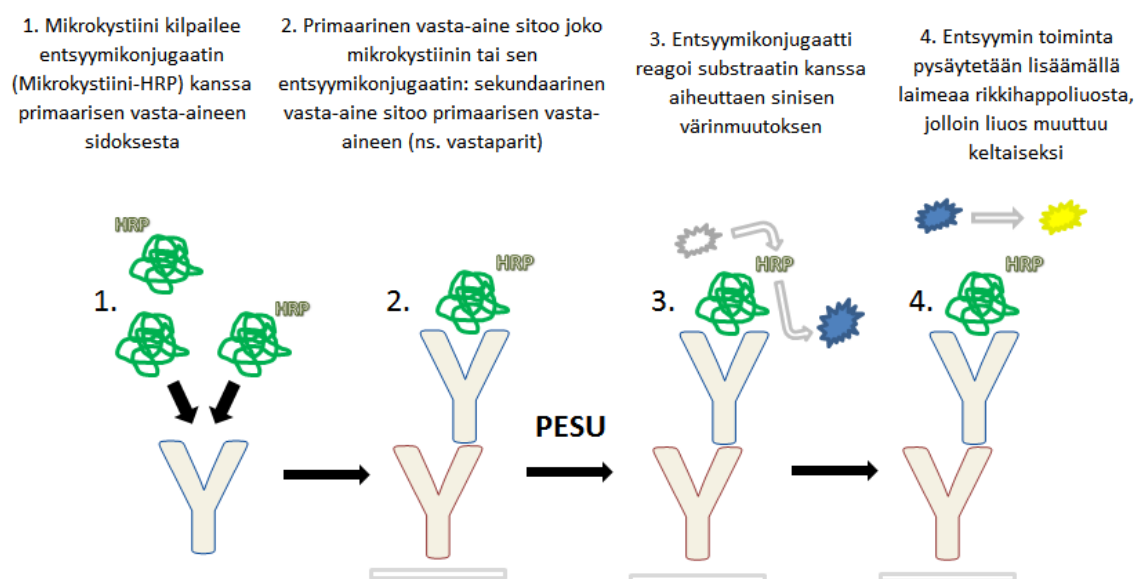
KUVIO 1. Direct sandwich ELISA (Crowther 2009, 17 (muokattu))

Heterogeenisen menetelmän tapauksessa reagenssit lisätään vaiheittain ja sidottu analytti erotetaan reagoimatta jääneestä pesuvaiheen avulla, kun taas homogeenisen mene-

telmän tapauksessa reagenssit lisätään samanaikaisesti (Crowther 2009). Siten validoitava menetelmä voidaan luokitella myös kirjallisuuden pohjalta heterogeeniseksi suorasti kilpailevaksi ELISA-menetelmäksi tietyin poikkeuksin: kuviossa 1 on esitelty tyyppillinen suorasti kilpaileva sandwich ELISA, joka läheisimmin vastaa validoitavan menetelmän sovellusta. Yleisin alusta on 96-paikkainen kuoppalevy, joka on valmistettu erilaisista muovityypeistä tarvittavista ominaisuuksista riippuen. (Crowther 2009, 9, 44.)

3.2.1 Pikakitin ELISA-sovellus

Validoitava menetelmä perustuu antigeenin, antigeenin entsyymikonjugaatin ja vasta-aineiden reaktioon, joka tuottaa mitattavan signaalin: värillisen lopputuotteen (kuvio 2). Sekundaarisella vasta-aineella pinnoitetussa putkessa tapahtuu reaktio, jossa antigeenin entsyymikonjugaatti ja antigeeni kilpailevat sidoksista primaariseen vasta-aineeseen (Microcystins Tube kit, n.d., 1). Kyseinen primaarinen vasta-aine sitoutuu vuorostaan sekundaariseen vasta-aineeseen, jolla putket on pinnoitettu. Kyseessä on niin sanotut vastaparit – vuohen sekundaarinen vasta-aine jänikselle sitoo jäniksen primaarisen vasta-aineen mikrokystiinille; usein kyseiset vastaparit kehitetään altistamalla isäntäeläin, kuten vuohi, jäniksen kehittämälle mikrokystiinivasta-aineelle (Wild 2013, 389). Tämä reaktio tapahtuu määrätyn pituisen inkuboinnin aikana, minkä jälkeen putket tyhjenetään ja pestään huolellisesti reagenssijäämien poistamiseksi.



KUVIO 2. Yksinkertaistettu kaavio immunoentsyymireaktiosta (Riina Ruususaari 2017)

Putkiin lisätään kromogeenista substraattiliuosta (Tetramethyl Benzidine, TMB), joka reagoi primaariseen vasta-aineeseen kiinnittyneiden entsyymikonjugaattien entsyymiosan (Horse Radish Peroxidase, HRP) kanssa – yksi entsyymi voi hapettaa usean substraattimolekyylin vetyperoksidin läsnä ollessa tuottaen diimineja jotka ovat havaittavissa sinisenä värinmuodostuksena (Wild 2013, 381; Indiana University 2013, 4); tällöin mitattava signaali vahvistuu lyhyessä ajassa. Reaktion tulee tapahtua valolta suojattuna heti substraattilisäyksen jälkeen mittausvirheen minimoimiseksi sen takia, että näkyvän valon sekä fluoresoivan valon on havaittu vaikuttavan värinmuodostukseen (Martin, Mufson & Mesulam 1984; Microcystins Tube Kit n.d.). Kun määrätyn pituinen inkubointiaika on ohi, putkiin lisätään laimeaa rikkihappoa joka denaturoi entsyymit ja siten pysäyttää reaktion (Wild 2013, 390), jonka jälkeen putkissa oleva liuos mitataan aallonpituudella 450 nm 15 minuutin sisällä stop-liuoksen lisäämisestä. Mittauksen yhteydessä käytetään pesureagenssia blank-näytteenä (Abraxis n.d.).

3.2.2 4-PL kalibroitikuvaaja

Yleisin tilastollinen työkalu ELISAn sigmoidaalisen vaste-konsentraatiokäyrän mallintamiseen on käyttää regressioanalyysia pienimmän neliöjuuren summa (Sum of Squared Errors eli SSE). Menetelmässä lasketaan residuaali eli mitatun pisteen etäisyys suorasta y-akselilla, josta otetaan neliöjuuri – syntyvät luvut lasketaan yhteen neliösummaksi. Tavoitteena on sovitus, joka toteuttaa pienimmän mahdollisen SSE-arvon ja siten mukalee parhaiten todellista vaste-konsentraatiokäyrää. (Wild 2013, 325.) 4-PL eli 4-parameter logistic on funktio, jota käytetään yleisesti epälineaaristen kalibroitisuorien mallintamiseen (Findlay & Dillard 2007, 261).

Kalibroitisuoran sovitusyhtälö 4-PL on muotoa (1) (Findlay & Dillard 2007, 261).

$$Y = D + \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)} \quad (1)$$

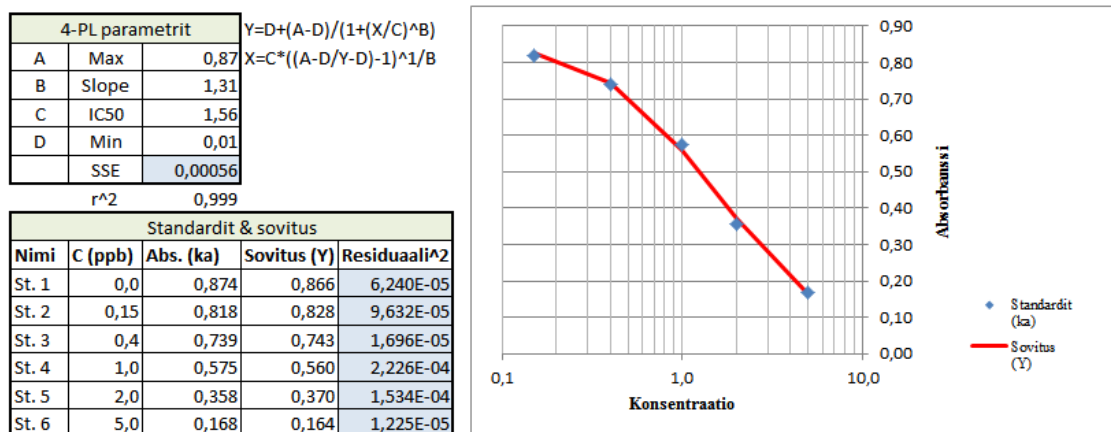
Jossa

Y = vaste A = vaste konsentraation ollessa 0 B = kulmakerroin, slope

C = käännealue (IC₅₀) D = vaste konsentraation ollessa infiniitti

x = analyytin konsentraatio

Kalibrointikuvaajassa konsentraatio esitetään 10-pohjaisen logaritmin muodossa x-akselilla ja vaste y-akselilla, jolloin edellä mainittu vaste-konsentraatiokäyrä ottaa sigmoidaalisen muodon. 4-PL-mallin tapauksessa toteutuu iteratiivinen uudelleenlaskusykli funktion hakiessa pienintä SSE-arvoa: yhtälön x parametrit A, B, C ja D muuttuvat laskuprosessin mukana, kunnes paras sovitus eli pienin arvo SSE:lle on saavutettu (Wild 2013, 327). Laskenta voidaan toteuttaa tietokoneella esimerkiksi Excel-makron avulla syöttämällä yhtälöön soveltuvat aloitusarvot parametreille A, B, C, D ja ratkaisemalla SSE-arvo Solver-työkalun avulla (ks. kuvio 3).



KUVIO 3. Esimerkki 4-PL-sovituksesta ELISA-menetelmälle Excelin avulla (Riina Ruususaari 2017)

Kun parametrit ovat saavuttaneet optimiarvot, voidaan näytteiden konsentraatio ratkaista niiden absorbanssiarvojen perusteella soveltamalla yhtälöä (1) muodossa (2) (Wild 2013, 327):

$$x = C \cdot \left(\left(\frac{A - D}{Y - D} \right) - 1 \right)^{\frac{1}{B}} \quad (2)$$

Jossa

Y = näytteen antama vaste

A = vaste konsentraation ollessa 0

B = kulmakerroin, slope

C = käänne piste (IC₅₀)

D = vaste konsentraation ollessa

infiniitti

x = analyytin konsentraatio

Tehtäessä analyyseja, joissa sovelletaan 4-PL mallinnusta, suositellaan standardien valmistusta rinnakkaisina tai jopa useampina rinnakkaisina kohinan huomioimiseksi ja

mahdollisten rinnakkaisten epäonnistumisten varalta (outliers). Usein menetelmälle määritetään myös korjauskerroin, joka korjaa mallin heteroskedastista eli epätasaisesti vasteen mukaan muuttuvaa varianssia siten, että kalibrointisuora mukailee lähemmin pienemmän varianssin pisteitä kuin niitä, joiden varianssi on suurempi. (Findlay & Dillard 2007, 263.)

3.3 UV-VIS spektrofotometri

Spektrofotometrin toiminta absorbanssin mittaamisen osalta perustuu mitattavan aineen absorboiman elektromagneettisen säteilyenergian ja valonlähteen tuottaman säteilyenergian suhteen mittaamiseen tietyllä aallonpituudella. Ilmiötä kuvaa Beer-Lambertin laki (3), jossa absorbanssi esitetään näytteeseen saapuvan ja näytteen läpäisseen valon suhteen logaritmina (Pavia, Lampman & Kriz 2001, 356). Näytteessä olevien molekyylien kyky absorboida eli virittäytyä matalammalta energiatasolta korkeammalle energiatasolle vaikuttaa siten, että näytteessä olevien molekyylien määrän kasvaessa absorboitu säteilyenergia kasvaa. Laki pätee vain monokromaattisen eli yhdellä aallonpituudella tapahtuvan säteilyn ollessa kyseessä. (Pavia et al. 2001, 353-356.)

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon c l \quad (3)$$

Jossa A = absorbanssi I_0 = näytteeseen kohdistetun valon intensiteetti

I = näytteen läpi kulkeneen valon intensiteetti ϵ = molaarinen absorptiokerroin

c = näytteen konsentraatio l = valon kulkema matka näytteessä

Yleisimmät häiriöt spektrofotometrin toiminnassa johtuvat joko näytteen kemiallisten ominaisuuksien tai laitteen asettamista rajoituksista. Kemiallisiin rajoituksiin kuuluu esimerkiksi tutkittavan aineen konsentraatio, joka suurissa pitoisuuksissa aiheuttaa valon heijastumista ja siten vääristää absorbanssilukemaa. Kemiallisia rajoituksia ovat myös suhteellisen virheen kasvu mitattaessa erittäin pieniä tai suuria pitoisuuksia absorbanssin ja transmittanssin logaritmisesta suhteesta johtuen sekä näytteelle soveltumaton tausta eli matriisi joka osaltaan vääristää absorbanssiarvoja. Laitteen toimintaan liittyen mitattujen absorbanssiarvojen tulisi olla välillä 0,1–1,5 logaritmisten virheiden minimoimiseksi. (Heiskanen 2016, 21–22.)

3.3.1 Laitteen käytön soveltaminen

Määrityskitin absorbanssitulokset pyritään mittaamaan laboratoriossa olevalla UV-1650 PC-spektrofotometrillä, joka kalibroidaan ennen validointimittausten aloitusta. Menetelmän alustavan testauksen ja ongelmakohtien, kuten riittämättömän näytetilavuuden identifioinnin jälkeen, mittauskyyveiksi valitaan muoviset, kertakäyttöiset 1 cm valo-
tiellä varustetut kyvetit. Nämä soveltuvat 1 ml:n näytteille valitulla 450 nm aallonpituudella.

3.3.2 Tulosten käsittelyn soveltaminen

Koska spektrofotometrin rooli analyysiketjussa on ainoastaan absorbanssiarvon tuottaminen standardeille ja näytteille, mikrokystiinin määrittämiselle ei luoda ohjelmaan UV-Probe omaa menetelmää, vaan tulokset voidaan mitata fotometrisellä menetelmällä asettamalla mittausaallonpituudeksi 450 nm ja sijoittamalla saadut tulokset taulukkolaskentapohjaan konsentraatioiden määrittämiseksi.

4 VALIDOINTI

4.1 Immunologisen menetelmän validointi

Validoinnin tarkoitus on osoittaa, että menetelmä toimii hyväksyttävästi sillä käyttöalueella, jolle se on tarkoitettu; validointi on osa laadunvalvontaa. Riippuen validoinnin laajuudesta ja menetelmän taustasta valitaan parametrit, joita mittaamalla saadaan tietoa menetelmän oikeellisuudesta (Hägg 2016, 7). Kuitenkin kaupallisten kittien kohdalla puhutaan yleisemmin verifiointista validoinnin sijaan, jolloin varmistetaan se, että menetelmä on otettu käyttöön oikein. Validoinnin ohjekirjan mukaan (Hägg 2016) immunologisesta menetelmästä tulisi tarkistaa vähintään toistettavuus, uusittavuus, herkkyys, spesifisyys ja näytematriisin vaikutus. KVVY:n omien laatustandardien mukaan (Laboratoriomenetelmien ja laitteiden validointi 2016; Tulosten jäljitettävyyden, laadunohjaus ja mittausepävarmuus 2016) validoitavasta menetelmästä tarkistetaan mittausalue, lineaarisuus, toteamis- ja määrittäysraja, laboratorion sisäinen uusittavuus, systemaattinen virhe sekä menetelmän oikeellisuus ja luotettavuus. Validointiparametrit tarkastetaan, yhdenmukaistetaan ja valitaan tarvittavan validointilaajuuden mukaan.

Kvalitatiivisten ja immunologisten kaupallisten testien osalta absoluuttista validoinnin tavoitetta on vaikea asettaa. Testien valmistajien ilmoittamat herkkyys- ja spesifisyysluvut ovat yleensä niin hyviä, että niitä ei ole käytännössä mahdollisuus saavuttaa. (Hägg, 2016, 14.)

Johtuen rajoitetusta ajasta jolloin validointi voidaan suorittaa tekijän toimesta, valitaan suppeampi validointityyppi joka koskee vain menetelmän oikeellisuuden tarkastelua varmennetun vertailumateriaalin avulla luonnonnäytteiden sijasta. Laboratoriossa voidaan tulevaisuudessa jatkaa validointimenettelyä laajemman kaavan mukaan. Tämän opinnäytetyön kattava validointi tehdään tekijän toimesta siten, että tekijä suunnittelee työnantajan ohjauksessa validointisuunnitelman, laatii validointimittaukset jotka suoritetaan pääosin itsenäisesti, osin yhdessä laboratorion vastuuhenkilön kanssa, ja kirjoittaa validointiraportin työnantajan ohjauksessa. Mittausepävarmuuden laskemisen osalta tekijä saa ohjausta MUKIT-ohjelman käyttöön tekniseltä vastuuhenkilöltä.

4.2 Validointisuunnitelma

Validointia varten laaditaan validointisuunnitelma, jossa määritetään mitattavat parametrit ja validoinnin laajuus. Koska kyseessä on kaupallinen, epälineaarilla 4-PL-mallinnuksella tulkittava menetelmä, validointia varten testattaviksi parametreiksi valitaan seuraavat kokonaisuudet: saannon ja laimennoslineaarisuuden tarkastelu lisäysmenetelmällä, toistettavuus ja uusittavuus, systemaattinen virhe, funktionaalinen herkkyys, mittausepävarmuus sekä toteamis- ja määrittämissärajat että kitin omien kontrollien vertailu kitin ilmoitettuihin arvoihin. Myös hälytys- ja toimintarajat tarkistetaan. Analyysissä tarvittava spektrofotometri UV/VIS 1650 tarkistetaan varmennettujen vertailumateriaalien avulla. Menetelmää validoitaessa ei tarkastella spesifisyyttä, koska valmistaja on jo määritellyt sen useammalle mikrokystiinin kongeneerille. Johtuen menetelmän mallinnukseen käytettävästä 4-PL-mallinnuksesta, lineaarisuuden määrittäminen kalibrointisuoran sovituksella (r^2) ei ole suositeltavaa, vaan testataan lisäysmenetelmällä (Findlay & Dillard 2007, 265) ja standardien residuaaliarvojen jakautumista graafisella esityksellä. Niiden tulisi sijoittua tasaisesti nollan molemmiin puolin (Hägg 2016, 23). Jokaiselle kitille tehdään oma mittausuunnitelma, jossa määritetään mitattavat sarjat (liite 1).

4.2.1 Saannon ja laimennoslineaarisuuden tarkastelu

Laimennoslineaarisuus kertoo analyysin tarkkuudesta eri konsentraatitasoilla; ELISAn lineaarisuuden määrittäminen konventionaalisin tavoin ei ole mahdollista epälineaarista kalibrointisuorasta johtuen ja tulokset tulee laskea absorbanssiarvojen sijaan konsentraatioarvoista (Thermo Fischer 2015, 2), jolloin verrataan laimennoksia kalibrointisuoraa vasten. Saannon sekä laimennoslineaarisuuden määrittämiseksi voidaan määrittää sarja tunnetun pitoisuuden näytteen eksponentiaalisista sarjalaimennoksista (esimerkiksi 1:2, 1:4, 1:8) valitulla näytematriisilla ja halutulla mittausalueella.

Näytematriisiin lisätään tunnettu määrä mikrokystiini-LR-analyyttiä (CRM, certified reference material), josta tehdään yllä kuvatut laimennokset. Saatujen tulosten avulla lasketaan sekä saanto että sarjalaimennosten mitattujen konsentraatioiden yhtäpitävyys. Mikäli saanto tai laimennosten lineaarisuus ei pysy tavoitearvoissa tai muuttuu, näytematriisi aiheuttaa todennäköisesti detektiohäiriöitä poikkeamalla standardien diluentista. Havaitun analyytin pitoisuuden tulee olla välillä 80 – 120 % lisätystä. (Thermo Fischer 2015). Myös oikeellisuutta voidaan tarkastella tämän parametrin pohjalta (Hägg 2016,

27). Näytematriisiksi valitaan paikallinen raakavesi. KVVY:n asiantuntijan mukaan (Paakkinen 2017) suurin osa mikrokystiinimäärytykseen tulevista vesinäytteistä on tyy-piltään juuri raakavesiä, jotka ovat oletusarvoisesti kirkasvetisiä, hyvälaatuisia vesiä.

Laaditun validointisuunnitelman mukaan lisätään haluttuun näytematriisiin tunnettu määrä analyyttiä, tehdään sarjalaimennokset, jotka kattavat koko mittausalueen ja mitataan sarjan konsentraatioarvot. Tuloksista lasketaan saanto ja laimennosten lineaarisuus. Sarjoja tehdään alustavasti yhteensä 3, kahdesta eri kitistä, 6 konsentraatorinnakkaisella.

4.2.2 Toistettavuus ja uusittavuus

Analyysin muuttujien pysyessä samoina (tekijä, laitteet, analyysipäivä etc) tulosten suhteellisen keskihajonnan laskemisesta (%CV) voidaan päätellä toistettavuus mittaussarjan sisällä sekä mittaussarjojen välillä, jolloin jokin analyysin muuttuja on eri. Jälkimmäisestä käytetään myös termiä uusittavuus (Hägg 2016, 32).

Toistettavuus ja uusittavuus määritetään mittaamalla 3 sarjaa tunnetun pitoisuuden rinnakkaisnäytteitä (6 pitoisuutta), joiden suhteellinen keskihajonta lasketaan toistettavuuden määrittämiseksi. Uusittavuus mittaussarjojen välillä testataan muuttamalla analyysin tekijää; kolmas sarja 6 pitoisuuden rinnakkaisnäytteistä tehdään eri kitistä. Tavoitteeksi voidaan määrittää esimerkiksi <15 %CV mittausalueen sisällä ja <20 %CV määrittäysrajalla (Hägg 2016, 45). Mittauksiin käytetään samoja sarjalaimennoksia kuin kohdassa 4.2.1.

4.2.3 Systemaattinen virhe

Systeemiatteinen virhe, *bias*, ilmaisee mitatun tuloksen ja teoreettisen arvon poikkeamaa (Hägg 2016, 23). KVVY:n ohjeistuksen mukaan systemaattinen virhe lasketaan varmennetun vertailumateriaalin tuloksista kaavojen (4) – (7) avulla (Tulosten jäljitettävyy... 2016, 10):

$$u(\text{bias}) = \sqrt{\text{bias}^2 + \left(\frac{S_{\text{bias}}}{\sqrt{n}}\right)^2 + u(\text{Cref})^2} \quad (4)$$

Jossa n = näytteiden lukumäärä

$$bias = \frac{c_{mitattu} - c_{ref}}{c_{ref}} \cdot 100 \% \quad (5)$$

$$s_{bias} = \text{tulosten keskihajonta} \quad (6)$$

$$u(c_{ref}) = \frac{\text{luottamusväli (95\% tasolla)}}{1,96} \quad (7)$$

Jossa luottamusväli = varmennetun pitoisuuden luottamusväli, esim: 10,2 ± 0,4 (CRM, MC-LR) = 0,4

Koska tiedossa on, että valmistajan mukaan menetelmän tarkkuus on riippuvainen tulosten läheisyydestä kalibraatiokäyrän käännepesteseen (IC50), tarkastellaan mittauksissa konsentraation vaikutusta systemaattiseen virheeseen mittaamalla varmennetun näytteen rinnakkaisia usealla eri konsentraatiotasolla. Tähän käytetään myös kohdan 4.2.1 rinnakkaisia 6 eri pitoisuustasolla.

4.2.4 Funktionaalinen herkkyys

Immunologiselle menetelmälle herkkyys voidaan määrittää funktionaalisenä herkkyytteenä eli sellaisena pitoisuutena, jossa %CV on <20 (Wild 2009, 11). Funktionaalinen herkkyys on yhtä kuin kvantitointiraja eli alin pitoisuus matriisissa mitattuna, jolle voidaan määrittää mittausepävarmuus (Wild 2009, 400; Hägg 2016, 26). Määritysrajalla absoluuttisen mittausepävarmuuden tulisi olla korkeintaan 60 % määritysrajan arvosta (Tulosten jäljitettävyys... 2016).

Mittauksia tehdessä testataan funktionaalinen herkkyys kyseisen standardin (0,15 ppb) lähelle sijoitetuilla tunnetun pitoisuuden rinnakkaisilla.

4.2.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus ilmaisee mittaustulosten vaihtelua, ja se koostuu satunnaisesta virheestä sekä systemaattisesta virheestä. Jokainen analyttinen menetelmä on altis mittausepävarmuudelle, ja määrittämällä mitattavan suureen antamien tulosten vaihtelu voi-

daan määrittää rajat, joiden sisällä oikea arvo on tietyllä todennäköisyydellä. (Hägg 2016, 23–24.)

Mittausepävarmuus määritetään alustavasti validointimittausten tuloksista (toistettavuus, systemaattinen virhe) käyttäen MUKIT-mittausepävarmuusohjelmaa. Ohjelma perustuu Nordtest raporttiin TR 537 (Tulosten jäljitettävyy... 2016), jossa määritetään kriteerit mittausepävarmuuden laskemiseksi.

4.2.6 Toteamis- ja määrittäysraja

Nollanäytteen rinnakkaismittauksista voidaan laskea toteamisraja ja määrittäysraja kaavoin (8), (9) keskiarvojen (\bar{k}) ja keskihajonnan (s) avulla (Tulosten jäljitettävyy... 2016):

$$TR = 3 \cdot s_{\text{nollanäyte}} \quad (8)$$

$$DL = 9 \cdot s_{\text{nollanäyte}} \quad (9)$$

Nollanäytteenä voidaan käyttää myös matriisia, jonka tiedetään sisältävän hyvin vähän analyyttiä (tässä tapauksessa raakavesimatriisi) (Hägg 2016, 20).

Toteamis- ja määrittäysrajan määrittämiseksi mitataan useita (5) nollanäytteitä rinnakkaisineen, jotka valmistetaan Milli-Q-vedestä. Tuloksista lasketaan keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta. Samoin toimitaan raakavesimatriisinollien suhteen, joskin tavoite on lähinnä tarkastaa millainen poikkeama on raakaveden ja ultrapuhdun veden arvoissa. Tuloksia verrataan valmistajan ilmoittamiin rajoihin ($TR = LOD = n. 0,09$ ppb, määrittäysraja = alin standardi = $0,15$ ppb).

4.2.7 Hälytys- ja toimintaraja

Rajat voidaan laskea kontrollinäytteiden tuloksista määrittäysten keskiarvojen (\bar{k}) ja keskihajonnan (s) mukaan seuraavasti (Tulosten jäljitettävyy... 2016):

$$YTR = \text{Tavoitearvo} + 3s \quad ATR = \text{Tavoitearvo} - 3s$$

$$YHR = \text{Tavoitearvo} + 2s \quad YHR = \text{Tavoitearvo} - 2s$$

Hälytys- ja toimintarajan määrittämiseksi mitataan kitin omien kontrollien rinnakkaisnäytteitä, joista lasketaan keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta. Mittauksia tehdään yhteensä väh. 20 kertaa kyseisten kontrollien rinnakkaisnäytteille. Tuloksia myös verrataan valmistajan ilmoittamiin rajoihin ($C = 0,75 \pm 0,19$ ppb, $HA = 0,3 \pm 0,07$ ppb).

5 VALIDOINNIN TULOKSET

5.1 Validointimittausten tulokset

Validointi suoritettiin alkuperäisen validointisuunnitelman mukaan, mutta lisämittauksia suunniteltiin ja toteutettiin työnantajan pyynnöstä alkuperäisten mittausten lisäksi (esimerkki yksittäisen kitin tuloksista liitteessä 2). Valmistajan ohje analyysin suorittamiseksi käännettiin suomeksi ja analyysi suoritettiin jokaisella mittauskerralla ohjeen mukaisesti. Eri kittien kalibrointisuorat rinnakkaisine standardeineen ja residuaaliarvot on koottu liitteeseen 3. Näistä tuloksista oli havaittavissa, että kalibrointisuorien valmistus jokaiselle analyysikerralle on välttämätöntä standardien absorbanssiarvojen vaihdellessa kittien välillä, ja rinnakkaisena valmistaminen ohjeiden mukaisesti suotavaa kohinan vähentämiseksi. Residuaaleja vertailemalla nähdään eri kiteille tehdyn sovituksen hyvyys ja osin epäsäännöllinen residuaalien jakautuminen nollan molemmin puolin. Mitä tulee kitin spesifikaatioiden vertailuun mittaustulosten kanssa, liitteessä 5 on verrattu kalibrointisuoralle ilmoitettuja B/B_0 -arvoja mitattujen kanssa ja havaittu, että arvot jäävät huomattavasti korkeammalle kuin valmistajan ilmoittamat arvot.

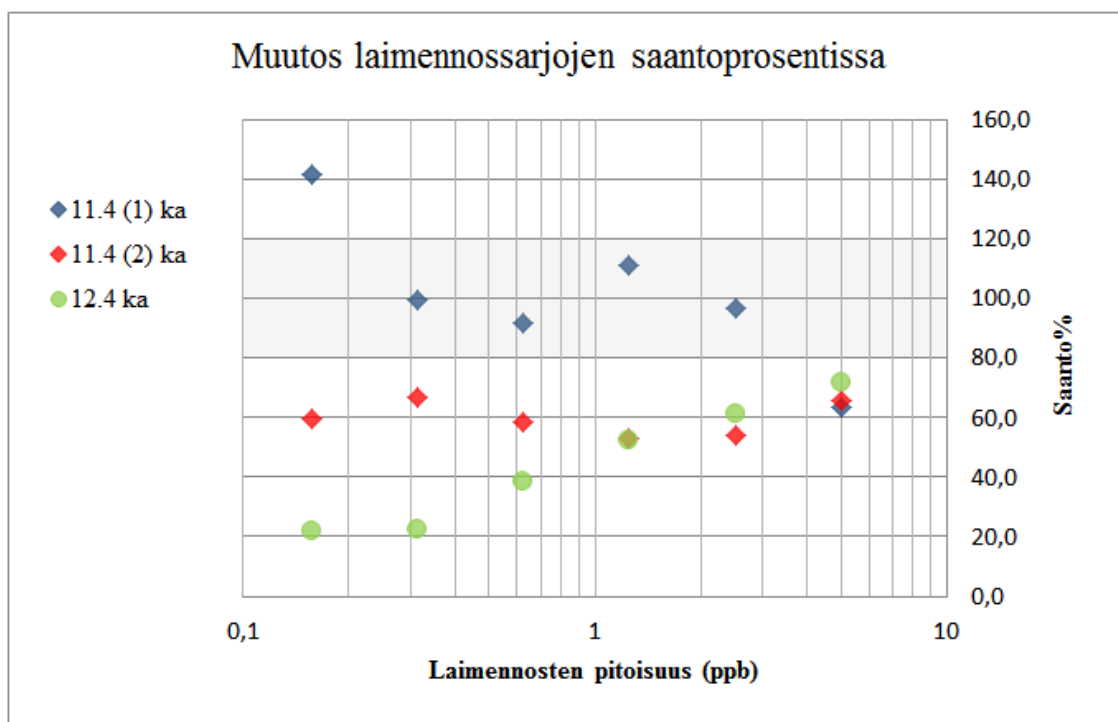
5.1.1 Saannon ja laimennoslinearisuuden tarkastelu

Varmennetusta vertailumateriaalista valmistettujen kuuden konsentraation laimennosarjoista kaksi (11.4 (1) ja 11.4 (2)) määritettiin samasta kitistä lyhyen aikavälin (noin 2h) sisällä, kun taas kolmas (12.4) määritettiin seuraavana päivänä eri kitistä. Saantoprosentti laskettiin jakamalla määritetty pitoisuus lisätyllä pitoisuudella ja kertomalla sadalla, ja laimennosten mitattu konsentraatio on kerrottu niiden laimennoskertoimella laimennoslinearisuuden vertailemiseksi. Yhteiset tulokset on koottu taulukkoon 3.

TAULUKKO 3. Saannon ja laimennoslinearisuuden vertailu

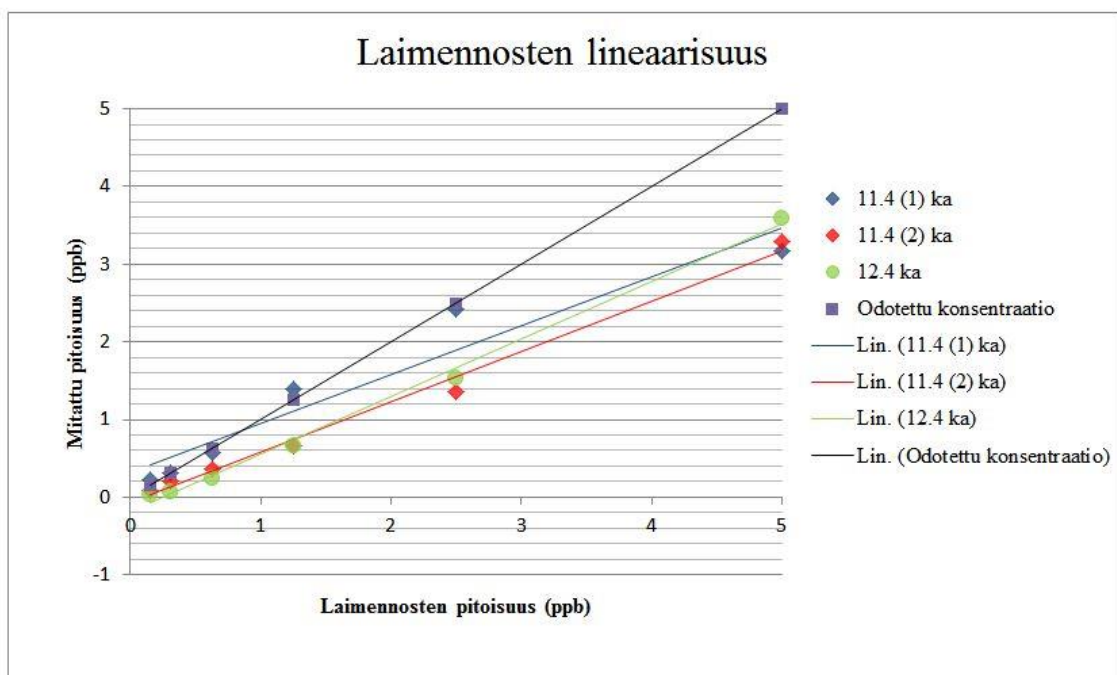
		11.4. (1)		11.4. (2)		12.4.	
Laimennoskerroin (Df)	Odotettu C (ppb)	C x Df (ppb)	Saanto (%)	C x Df (ppb)	Saanto (%)	C x Df (ppb)	Saanto (%)
1	5	3,167	63,3	3,287	65,7	3,591	71,8
2		4,840	96,8	2,714	54,3	3,062	61,2
4		5,564	111,3	2,645	52,9	2,630	52,6
8		4,581	91,6	2,937	58,7	1,935	38,7
16		4,983	99,7	3,328	66,6	1,119	22,4
32		7,087	141,7	2,967	59,3	1,098	22,0

Tuloksista (havainnollistettu kuviossa 4) on nähtävissä, että erityisesti matalammilla pitoisuuksilla tapahtui konsentraation pieneneminen ajan funktiona – ainoastaan 11.4. (1) määritetyn sarjan voidaan katsoa olevan hyväksytysti rajoissa kaikkien muiden konsentraatioiden osalta paitsi mittausalueen (0,15 – 5 ppb) laidalla sijaitsevien. Koska eri sarjojen tulokset poikkeavat toisistaan suuresti, on mittauksen perusteella vaikeaa päätellä onko virhelähteen syynä jokin tekijä raakavesimatriisissa, muutos varmennetun vertailumateriaalin pitoisuuksissa tai mahdollisesti kummankin tekijän vaikutus. Näin ollen näiden tulosten vertailu kitin ilmoitettuihin saantotuloksiin ei ole mielekästä.



KUVIO 4. Laimennossarjojen saantotulokset

Laimennoslineaarisuuden tulokset viittaavat myös siihen, että konsentraatiot eivät ole yhtäpitäviä kuin neljällä konsentraatitasolla 11.4 (1) mitatussa sarjassa, vaan laskevat odotusarvostaan seuraavaksi tehdyillä laimennossarjoilla (kuvio 5). Laimennossarjojen lineaarisuuden tarkastelusta voidaan alustavasti todeta, että mittausjärjestely tulisi uusaa lisäaineiston saamiseksi ja virhelähteen identifioimiseksi, mutta sarjan 11.4 (1) perusteella näytteitä voidaan tarvittaessa laimentaa dynaamisella mittausalueella konsentraation muuttumatta. Parempi oikeellisuus voidaan mahdollisesti saavuttaa laimentamalla näytteitä, jotka laimentamattomana sijoittuisivat kalibrintisuoran ylämääritysrajalle (5 ppb).



KUVIO 5. Laimennossarjojen lineaarisuuden tulokset

5.1.2 Toistettavuus ja uusittavuus

Toistettavuus ja uusittavuus määritettiin edellä mainittujen laimennossarjojen tuloksia vertailemalla siten, että toistettavuus on määritetty samasta kitistä tehtyjen kahden laimennossarjan konsentraatitulosten suhteellisen keskihajonnan avulla ja uusittavuus on määritetty kahdesta eri kitistä tehtyjen laimennossarjojen konsentraatitulosten suhteellisen keskihajonnan avulla. Tulokset on koottu taulukkoon 4.

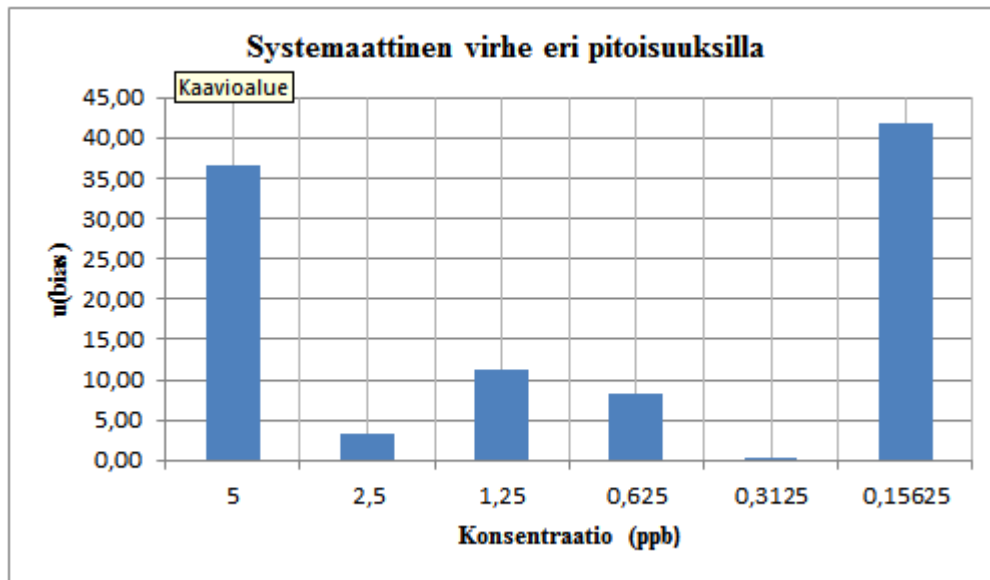
Taulukko 4. Toistettavuus ja uusittavuus kitin sisällä sekä kittien välillä

CV% kitin sisällä (toistettavuus)				CV% kittien välillä (uusittavuus)			
C (ppb)	Keskiarvo (Ka)	Keskihajonta (SD)	CV%	C (ppb)	Keskiarvo (Ka)	Keskihajonta (SD)	CV%
5	3,2271	0,085	2,6	5	3,4089	0,257	7,5
2,5	1,8885	0,752	39,8	2,5	1,7098	0,253	14,8
1,25	1,0261	0,516	50,3	1,25	0,8418	0,261	31,0
0,625	0,4699	0,145	30,9	0,625	0,3559	0,161	45,3
0,3125	0,2597	0,073	28,2	0,3125	0,1648	0,134	81,4
0,1563	0,1571	0,091	57,9	0,1563	0,0957	0,087	90,7

Tuloksista on havaittavissa, että toistettavuus kitin sisällä ei toteudu asetetussa <15 CV% tavoitteessa, vaan kasvaa konsentraation pienentyessä. Sama ilmiö toistuu uusittavuuden suhteen, jossa suhteellisen keskihajonnan nousu mitatun konsentraation pienentyessä on jyrkempi. Myös toistettavuuden ja uusittavuuden määrittämiseksi tulisi mittausjärjestely toisintaa, sillä validoinnin tavoitearvoja ei saavutettu ja mahdollinen varmennetun vertailumateriaalin pitoisuuden laskeminen raakavesimatriisissa olisi selvitettävä.

5.1.3 Systemaattinen virhe

Systemaattisen virheen alustavaksi arvioimiseksi käytettiin laimennossarjan 11.4 (1) rinnakkaisten mitatun konsentraation tuloksia, jotka sijoitettiin kappaleessa 4.2.3 esitettyihin yhtälöihin. Tulokset on koottu kuvioon 6.



KUVIO 6. Systemaattisen virheen vaihtelu eri konsentraatioilla

Kuviosta on nähtävissä, että systemaattinen virhe kasvaa määrittämisalueen rajoilla odotetusti, joskin kalibrointisuoran ilmoitetun käänne pisteen (0,719 ppb) lähellä virhe on suurempi kuin sitä seuraavilla konsentraatio tasoilla. Määrittämisalueen ylärajalla virheen kasvu on osin selitettävissä sillä, että käänteisessä menetelmässä suurimmalla analyyttipitoisuudella on pienin absorbanssi. Myös systemaattisen virheen laskemisen suhteen lisämittaukset olisivat suotavia, jotta nähtäisiin kuinka tulokset jakautuvat.

5.1.4 Funktionaalinen herkkyys

Funktionaalisen herkkyyden arvioimiseksi hyödynnettiin edellä mainittujen laimennos-sarjojen alimpien konsentraatorinnakkaisten tuloksia, joille laskettiin CV% ja absoluuttinen mittausvirhe. Tulokset on koottu taulukkoon 5.

Kahden ensimmäisen sarjan CV%-arvo on hyväksyttävällä tasolla (<20 CV%), joille laskettu 60% absoluuttinen mittausvirhe on myös pääosin rajoissa. Viimeisen sarjan, 12.4, tulokset ylittävät molemmat ehdot – tätä selittää mahdollisesti laimennossarjan mittauksen virhetekijät eikä tulos tältä osin ole vertailukelpoinen. Tuloksia voidaan verrata määrittämisrajan määrittämisen yhteydessä saatuihin tuloksiin.

TAULUKKO 5. Funktionaalisen herkkyden määrittäminen

Sarja	Teoreettinen konsentraatio (ppb)	Mitattu konsentraatio (ppb)	CV%	Abs. Mittausv.	Sallittu absoluuttinen mittausvirhe (60% määrittämissarjan arvosta) = $\pm 0,0938$
11.4 (1)	0,1563	0,2504	18,47	0,0942	Ei toteudu
		0,1926		0,0363	Toteutuu
11.4. (2)	0,1563	0,1023	14,65	0,0539	Toteutuu
		0,0831		0,0731	Toteutuu
12.4.	0,1563	0,0441	40,28	0,1122	Ei toteudu
		0,0245		0,1317	Ei toteudu

5.1.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus määritettiin MUKit-ohjelmalla kahden eri harhan määrittäjän avulla vertailun vuoksi (kuvio 7 ja 8). Kuviossa 7 esitetyn tuloksen osalta harhan määrittämiseen käytettiin 11.4 (1) saantokokeiden tuloksia ja uusittavuuden määrittämiseen kitin omien kontrollin (0,75 ppb ja 0,30 ppb) rinnakaistuloksia.

Pitoisuusalue ($\mu\text{g/l}$)	Uusittavuuden määrittäminen	u (Rw) (%)	Harhan määrittäminen	u (bias) (%)	Yhdistetty standardiepävarmuus (%)	Laajennettu mittausepävarmuus (%)
-	Kontrollinäytteistä ja rutiininäytteiden rinnakaistuloksista	0,17	Saantokokeet	25,90	25,90	52

KUVIO 7. Mittausepävarmuusestimaatti saantokokeiden perusteella, sarja 11.4 (1)

Kuviossa 8 esitetyn tuloksen osalta harhan määrittämiseen käytettiin varmennetun vertailumateriaalin kahta eri konsentraatiotasoa (1,0 ppb ja 0,5 ppb) rinnakaistuloksia ja uusittavuuden määrittämiseen kitin oman kontrollin (0,75 ppb) rinnakaistuloksia sillä oletuksella, että kyseinen kontrolli kattaa koko analyttisen prosessin.

Pitoisuusalue ($\mu\text{g/l}$)	Uusittavuuden määrittäminen	u (Rw) (%)	Harhan määrittäminen	u (bias) (%)	Yhdistetty standardiepävarmuus (%)	Laajennettu mittausepävarmuus (%)
0,15-5	Kontrollinäyte joka kattaa koko analyttisen prosessin	0,11	Varmennetun vertailumateriaalin tai kontrollinäytteen tuloksista	37,96	37,96	76

KUVIO 8. Mittausepävarmuusestimaatti varmennetun vertailumateriaalin perusteella

Tulokset ovat luonteeltaan alustavia arvioita mahdollisesta laajennetusta mittaasepävarmuudesta, ja menetelmää kehittäessä tulee päättää mistä harhan määrittäjästä lasketuna annetaan luotettavin kuva todellisesta mittaasepävarmuudesta. Huomioon tulee ottaa myös mittaasepävarmuuden laskeminen erikseen eri konsentraatiotasolle, jossa tapauksessa ohjelmaan syötetään ainoastaan niiden konsentraatiotasojen tulokset, joille epävarmuus halutaan laskea (Mattsson 2017). Mikäli laajennettu mittaasepävarmuus asettuu prosenttiin 60 % esimerkiksi konsentraatioalueella 0,5 – 1,0 ppb, mittaustulokselle 0,60 ppb ilmoitettaisiin tulokseksi $0,60 \pm 0,36$ ppb, jolloin voitaisiin vielä luotettavasti todeta konsentraation olevan alle 1,0 ppb.

5.1.6 Toteamis- ja määrittäysraja

Toteamis- ja määrittäysraja arvioitiin 10 nollanäytteen tuloksista, joista yhdeksälle oli mahdollista laskea pitoisuus sekä 8 nollastandardin tuloksista, joista viidelle oli mahdollista laskea pitoisuus. Nollanäytteet valmistettiin Milli-Q-vedestä ja ajettiin omana sarjanaan, nollastandardit on ajettu osana jokaisen kitin kalibrointisuoraa. Tulokset ja vertailu kitin valmistajan esittämiin rajoihin sekä kittien omien nollastandardien tuloksiin on esitetty taulukossa 6.

TAULUKKO 6. Toteamis- ja määrittäysrajan arviointi

	Nollastandardi	Nollanäyte		
n tuloksia	5	9	Kitin rajat	
C (ka)	0,03	0,05		
Keskihajonta	0,02	0,04		
Toteamisraja (ppb)	0,06	0,12		0,09
Määrittäysraja (ppb)	0,18	0,37		0,15

Molemmat nollanäytteiden tilastollisella käsittelyllä lasketut rajat ovat ratkaisevasti korkeampia kuin valmistajan ilmoittamat, määrittäysrajan ollessa noin 60 % korkeampi ja toteamisrajan noin 27 % korkeampi ilmoitetusta, kun taas nollastandardien tulos on määrittäysrajan osalta vain noin 16 % korkeampi ja toteamisraja alle valmistajan rajan. On mahdollista, että menetelmän toteamis- ja määrittäysrajoja määrittäessä ei voida käyttää nollanäytemenetelmää, vaan rajat voidaan määrittää nollastandardin tuloksista.

5.1.7 Hälytys- ja toimintaraja

Alustava arvio hälytys- ja toimintarajoista on koottu taulukkoon 7. Mittaustulosten käsittelyyn mennessä 20 vaaditusta mittauksesta 14 on suoritettu kummankin kontrollin osalta, joten arvion muuttuminen on odotettavissa. Kontrollien tarkat arvot liitteessä x. Kontrolleille laskettujen rajojen ero on huomattava valmistajan antamiin hyväksytyihin rajoihin nähden kontrollin HA (0,23 – 0,37 ppb) kohdalla: laskettu alempi hälytysraja on 0,072 ppb ja ylempi 0,528 ppb, toimintarajan alarajan ollessa negatiivisen luvun puolella. Myös suhteellinen keskihajonta CV% on korkeampi kuin kontrollin C kohdalla.

TAULUKKO 7. Hälytys- ja toimintarajan arviointi kontrollien tuloksista

Kontrolli	Keskiarvo (ppb)	Keskihajonta	%CV	AHR	YHR	ATR	YTR
C (0,75 ±0,19 ppb)	0,654	0,117	17,87	0,516	0,984	0,400	1,100
HA (0,30 ± 0,07 ppb)	0,355	0,114	32,20	0,072	0,528	-0,043	0,643

5.2 Analyysiprosessin optimointi

Uutta menetelmää käyttöön ottaessa pyritään siihen, että menetelmällä käsitellään tulevaisuudessa optimaalinen määrä näytteitä viikkotasolla sekä kehitetään työtapo, joka vastaa parhaita käytäntöjä. Tässä prosessissa havaittiin, että käsittelyaikojen kannalta parhaita tapoja on kiinnittää putket alustaan, jolloin ne voidaan ravistella samanaikaisesti pesun yhteydessä sekä sekoittaessa ennen inkubointivaiheita. Pesuvaihe toteutetaan nokallisella pullolla, jonka käyttö lyhentää putkien täyttämiseen kuluva aikaa ja yhdenmukaistaa yhden putken altistusaikaa pesureagenssille.

Näytteiden lukeminen laboratorion omalla spektrofotometrillä on yhä vaihe, jonka yksinkertaistamista tulisi harkita, jotta sarjojen käsittely olisi aina yhdenmukaista. Käsiteltävien putkien määrä on jokaisella analyysikerralla rajattu siten, että tulosten tulee olla luettuna viidentoista minuutin kuluttua viimeisen reagenssin lisäyksestä – käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että jokainen putki on kaadettava omaan kyvetiinsä mahdollisimman tarkasti, vältettävä kuplien muodostumista ja kyvetin pintojen tahraamista sekä puhdistettava kyveti ennen sen asettamista laitteeseen. Erityisesti putkimäärän ollessa yli 20 putkea per analyysisarja, on viimeisten näytteiden kohdalla hyvin todennäköistä että aikaraja ylittyy. Validoinnin yhteydessä seurattiin pesunesteen absorbanssin muu-

toksia mitattaessa 1 ml samaa liuosta eri kyveteillä, jolloin havaittiin absorbanssiarvojen pieniä muutoksia – tämä indikoi mahdollisesti kyvetin materiaalin (muovin) sopimattomuutta (Mattsson 2017; liite 3).

Validointiprosessin edetessä analyysiketjuun liittyviä tekijöitä arvioitiin näytteiden käsittelyn näkökulmasta myös siten, että näytteiden lukemiseen kulunut aika mitattiin ja myöhemmässä vaiheessa tarkasteltiin absorbanssin laskemista ajan funktiona (liite 4). Tuloksista on havaittavissa, että jo vartin viive tulosten lukemisessa laskee absorbanssiarvoja, jotka teoreettisesta konsentraatiopitoisuudesta riippuen nostavat laskettua konsentraatiota merkittäväällä prosenttiluvulla.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET JA POHDINTA

Validointimittausten edetessä ja tulosten käsittelyn yhteydessä havaittiin, että menetelmä on altis usealle mittausepävarmuutta lisäävälle tekijälle. Usean eri reagenssin pipetointi käsin, vaade käsitellä jokainen putki identtisesti analyysiketjun edetessä sekä validointimenettelyn osana toteutettu spektrofotometrin sovitus analyysiketjuun tulosten lukemiseen liittyvän aikarajoituksen yhteydessä näyttäytyvät pääasiallisina tekijöinä. Osansa tulosten epävarmuuteen antaa se, ettei varmennettua vertailumateriaalia käyttämällä saatu tarpeeksi vertailukelpoista aineistoa, vaan osa mittauksista on mahdollisesti tehtävä uudelleen. Tämän opinnäytetyön puitteissa ei aikakysymyksen vuoksi kuitenkaan enää käsitellä mahdollisia tulevia mittauksia, vaan ehdotukset tehdään saatujen tulosten ja kokemusten pohjalta.

Menetelmänä kyseinen ELISA-sovellus sopii alustavasti raakavesimatriisissa olevan mikrokystiini-LR kongeneerin määrittämiseen, jos tarkastellaan vain laimennossarjaa 11.4 (1) ja kahdella eri pitoisuudella (0,5 ppb ja 1,0 ppb) tehtyjen mittausten tuloksia. Lisää mittauksia voisi mahdollisesti tehdä oikeista luonnonnäytteistä, jotta päästään havainnoimaan valmistajan suositamaa jäädytys-sulatussyklin vaikutusta konsentraatioon esimerkiksi eri kertoja pakastettuja näytteitä spiikkaamalla ja laskemalla raakaveden ja lisäysnäytteen erotus.

Kitin reagenssien pakkausratkaisuista on havaittavissa, että reagensseja voi pipetoida injektoimalla injektiokorkkien johdosta – myöhemmin valmistajan sivuilta löytyi laite, jonka avulla koko analyysin voi suorittaa automatisoituna. Tässä valossa koko analyysiketjun suoritus manuaalisena toimenpiteenä herättää kysymyksen siitä, kuinka paljon virtaviivaisempi ja ajallisesti yhtenäinen menetelmä olisi automatisoituna. Mahdollisesti samalla kerralla käsiteltävien näytteiden määrää voisi nostaa ja yhden työvaiheen mahdollisine virhelähteineen (kyvetit) poistaa, jos spektrofotometri korvattaisiin valmistajan juuri tätä menetelmää varten kehittämällä fotometrillä.

Eräs vaihtoehto ja suurempien näytemäärien kerralla käsittelyn mahdollistava suunta on vaihtaa kyseinen putkimenetelmä kuoppalevymenetelmään, joka on yleisempi näistä kahdesta. Opinnäytetyön tiedonkeruuvaiheessa kävi ilmi, että ainakin yhdessä suomalaisessa laboratoriossa käytetään akkreditoitua kuoppalevymenetelmää mikrokystiini-

LR:n määrittämiseen, mutta muilta osin tiedonkeruu Suomessa käytössä olevista menetelmistä ei ollut menestyksekkästä.

Yhteenvetona työstä voidaan sanoa, että kyseisen menetelmän validointi osoittautui haastavaksi kokonaisuudeksi: osin epäkonventionaalisen kalibrointisuoran ja immunologisen toimintamekanismin vuoksi ja osin siksi, että lähdemateriaalit viittaavat useammin biologisten näytteiden analysointiin kuin fykotoksiinien analysointiin, jolloin menetelmää validoitaessa ei välttämättä ole otettu huomioon kaikkia analyysille tyypillisiä tekijöitä. Menetelmässä voidaan kuitenkin ajatella olevan potentiaalia korkean spesifisyytensä vuoksi, ja tulevaisuudessa validointimenettely voidaan saattaa loppuun.

LÄHTEET

Abraxis. n.d. Microcystin detailed flow chart. [Työohjekaavio]. Tuntematon julkaisupäivä. Luettu 1.3.2017. http://www.abraxiskits.com/wp-content/uploads/2015/03/Microcystin_PN520012A_TB.pdf

Bácsi, I., B-Béres, V. & Vasas, G. 2013. Possible Roles of Cyanotoxin Species Interactions of Phytoplankton Assemblages. Teoksessa Ferrão-Filho, A. Da S. (toim.) 2013.

Cyanobacteria: Ecology, Toxicology and Management. 2013. New York: Nova Science Publishers.

Bertram, J (toim.) Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management. 1999. Englanti, Lontoo: The World Health Organization, E & FN Spon.

Chorus, I. & Bertram, J. (toim.) 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management. Englanti, Lontoo: The World Health Organization, E & FN Spon.

Chorus, I. (toim.) 2012. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Text 63/2012. Germany, Dessau-Roßlau: Federal Environment Agency (Umweltbundesamt).

Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water. 2003. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Julkaistu alunperin julkaisussa Guidelines for drinking-water quality, 2. painos. Addendum to Vol. 2: Health criteria and other supporting information. Geneva: World Health Organization

Elintarvikkeiden ja talousveden kemialliset vaarat. 2013. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira.

Ferrão-Filho, A. Da S. (toim.) 2013. Cyanobacteria: Ecology, Toxicology and Management. New York: Nova Science Publishers.

Findlay, J. W.A & Dillard, R. F. 2007. Appropriate Calibration Curve Fitting in Ligand Binding Assays. The AAPS Journal 9 (2), 260-267.

Gago-Martinez, A. 2007. Hepatotoxic Cyanobacteria. Teoksessa Botana, L. M. (toim.). 2007. Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry. Iowa: Blackwell Publishing

Guidelines for drinking-water quality. 2011. Health criteria and other supporting information. 4. painos. Geneva: World Health Organization

Heiskanen, N. 2016. Spektrofotometrin historiaa, toiminta ja sovelluksia – esimerkkinä klorofyllin määrittäminen. Helsingin Yliopisto. Kemian laitos. Kandidaatin tutkielma.

Hägg, M. (toim.) 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Espoo: Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy

- Indiana University. 2013. Enzyme Reactions. [Kurssimateriaali]. Julkaistu 2013. [Ei päivitystietoja]. Luettu 24.3.2017.
- Joosten, A. 2006. Flora of the Blue-Green Algae of the Netherlands. Utrecht, The Netherlands: KNNV Publishing.
- Järvinen, M. 2017. Filosofian tohtori, dosentti. Kysely sinilevätoksiineihin liittyen. Sähköposti. Marko.Jarvinen@ymparisto.fi. Luettu 6.3.2017.
- Kankaanpää, H. 2011. Haitalliset levät ja terveys [Harmful algae and health]. Duodecim; lääketieteellinen aikakauskirja 127(13), 1335-40.
- Kettunen, I., Mäkelä, A. & Heinonen, P. 2008. Ympäristöopas 2008: Vesistötietoa näyttöönottajille. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Laboratoriomenetelmien ja laitteiden validointi. 2016. Kokemäenjoen Vesistön Vesien-
suojeluyhdistys Ry. Toimintaohje LM17, versio T4.
- Marler, H. & Gault, P. (toim.) 2009. Handbook on Cyanobacteria: Biochemistry, Biotechnology and Applications. New York: Nova Science Publishers.
- Martin, T. L., Mufson, E. J., Mesulam, M. M. 1984. The light side of horseradish peroxidase histochemistry. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 32 (7), 793.
- Mattsson, R. Kemisti. 2017. Mukit-ohjelmaan tutustuminen. 26.4.2017. Henkilökohtainen tiedonanto. Kokemäenjoen Vesistön Vesien-
suojeluyhdistys, Tampere.
- Microcystins Tube Kit. n.d. Abraxis Inc. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Determination of Microcystins and Nodularins in Water Samples. [Kaupallisen kitin manuaali]. Luettu 17.2.2017.
- Paakkinen, M. Vesistötutkija. 2017. Haastattelu 22.3.2017. Haastattelija Ruusu Vuori, R. Kokemäenjoen Vesistön Vesien-
suojeluyhdistys, Tampere.
- Park, H., Iwami, C., Watanabe, M., Harada, K., Okino, T. & Hayashi, H. 1998. Temporal Variabilities of the Concentrations of Intra- and Extracellular Microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan. Environmental Toxicology and Water Quality 13 (1), 61–72.
- Pavia, D. L., Lampman G. M., Kriz, G. S. 2001. Introduction to spectroscopy. United States of America: Thomson Learning, Inc.
- Puddick, J., Prinsep, M. R., Wood, S. A., Kaufononga, S., Cary, S. C. & Hamilton, D. 2014. High Levels of Structural Diversity Observed in Microcystins from *Microcystis* CAWBG11 and Characterization of Six New Microcystin Congeners. Marine Drugs 12 (11), 5372-5395.
- Rantala, A., Rajaniemi-Wacklin, P., Lyra, C., Lepistö, L., Rintala, J., Mankiewicz-Boczek, J. & Sivonen, K. 2006. Detection of Microcystin-Producing Cyanobacteria in Finnish Lakes with Genus-Specific Microcystin Synthetase Gene E (mcyE) PCR and Associations with Environmental Factors. Applied and Environmental Microbiology 72(9), 6101-6110.

Rapala, J., Kilponen, J., Järvinen, M. & Lahti, K. 2012. Teoksessa Chorus, I. (toim.) Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Text 63/2012. Germany, Dessau-Roßlau: Federal Environment Agency (Umweltbundesamt).

Sapp, J. 2009. The New Foundations of Evolution: on the Tree of Life. New York : Oxford University Press.

Sivonen, K. & Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. Teoksessa Chorus, I &

Sivonen, K. 2009. Cyanobacterial Toxins. Teoksessa Schaechterm, M. (toim.), Encyclopedia of Microbiology. 2009. 290-307. Englanti, Oxford: Elsevier.

Ympäristöministeriö. n.d. Suomen merenhoidon seurantakäsikirja. [Tausta-asiakirja Suomen merenhoitosuunnitelman seurantaohjelmaehdotukselle]. Tuntematon julkaisupäivä. Luettu 23.5.2017.

Thermo Fischer. 2015. Spike-and-recovery and linearity-of-dilution assessment.[Tuotekirjallisuus, Tech tip #58]. Julkaistu 19.1.2015. Luettu 14.2.2017.

Tulosten jäljitettävyyys, laadunohjaus ja mittausepävarmuus. 2016. Kokemäenjoen Vesistön Vesiensuojeluyhdistys Ry. Toimintaohje LM18, versio T6.

Tulosten jäljitettävyyys, laadunohjaus ja mittausepävarmuus. 2016. Kokemäenjoen Vesistön Vesiensuojeluyhdistys Ry. Toimintaohje LM18, versio T6.

Valvira. 2016. Toimintatavat talousveden laadun turvaamiseksi: sinilevät ja niiden tuottamat toksiinit. [Ohje]. Julkaistu 4.4.2016. [Dnro 1716/06.10.01/2016] Luettu 18.4.2017.

Wild, D. 2013. The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. 4. painos. Oxford: Elsevier.

KUVAT

Mary Cousins. 2007. Scum from cyanobacteria. CC-lisenssi: CC-BY-SA-3.0,2.5,2.0,1.0. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cyanobacterial_Scum.JPG Haettu 28.2.2017.

Wikimedia Commons. 2012. This picture depicts how microcystin-LR is made up of several different amino-acids. Public Domain. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microcystin-LR-amino-acids.png?uselang=fi>. Haettu 24.3.2017.

LIITTEET

Liite 1. Esimerkki yksittäisen kitin mittaussuunnitelmasta

VALIDOINTIMITTAUKSET					
Pvm	Kitti	Q	Kit lot	17A1927	
Mitataan 1 sarja kalibrointisuoraa, 1 sarja väh. 10 nollaa (MilliQ) sekä 1 sarja kalibrointiliuoksia 0, 0,4 ja 5 ja kontrollien rinnakkaisia. Kalibrointiliuokset 0, 0,4 ja 5 mitataan näytteinä ja testataan värikompleksin hajoamista mittaamalla liuokset tietyin intervaleihin spektrofotometrillä (15 min). Liuokset pidetään pöydällä mittausten välillä normaalien mittaolosuhteiden simuloimiseksi. Nollien tuloksista tarkastellaan määrittys- ja toteamisrajaa, kontrollien tuloksista hälytys- ja toimintarajaa.					
Mittausjärjestelyt & tarvittavat reagenssit					
Mittauksille tarvitaan			Putkia		40
			Standardirinnakkaiset (0-5 ppb)		12
Pesuliuos	1100 ml		Kontrollirinnakkaiset (0,75 ppb, 0,30 ppb)		4
C	3 ml		Tarvitaan putkia kalibrointisuoraan		16
HA	3 ml		Jää putkia		24
MilliQ	5 ml		Nollarinnakkaiset (Milli-Q)		10
			Näyterinnakkaiset (0 ppb, 0,4 ppb, 5 ppb) + C, HA		6
SARJA 1	Putkia	SARJA 2	Putkia	SARJA 3	Putkia
Standardit & kontrollit		Nollasarja		Näyttest. & kontrollit	
0,0 (a)		1. Nolla(MilliQ)	1	0,0 (a)	
0,0 (b)	2	1. Nolla(MilliQ)	1	0,0 (b)	2
0,15 (a)		2. Nolla(MilliQ)	1	0,4 (a)	
0,15 (b)	2	2. Nolla(MilliQ)	1	0,4 (b)	2
0,4 (a)		3. Nolla(MilliQ)	1	5,0 (a)	
0,4 (b)	2	3. Nolla(MilliQ)	1	5,0 (b)	2
1,0 (a)		4. Nolla(MilliQ)	1	C (a)	
1,0 (b)	2	4. Nolla(MilliQ)	1	C (b)	2
2,0 (a)		5. Nolla(MilliQ)	1	HA (a)	
2,0 (b)	2	5. Nolla(MilliQ)	1	HA (b)	2
5,0 (a)		Yht.	10	C (a) 2	
5,0 (b)	2			C (b) 2	2
C (a)				HA (a) 2	
C (b)	2			HA (b) 2	2
HA (a)					
HA (b)	2			Yht.	14
Yht.	16				
<p>1. Ajetaan sarja 1 (16 putkea), otetaan tulokset talteen. 2. Ajetaan nollasarja (10 putkea), otetaan tulokset talteen. 3. Ajetaan sarja3 (14 putkea), mitataan näyttestandardit 0, 0,4 ja 5 uudelleen 10 min intervaleihin välein absorbanssin muutoksen selvittämiseksi. Kontrollirinnakkaisten tulokset kerätään hälytys- ja toimintarajojen laskemiseen. Sarjojen 1 ja 3 absorbanssieroista voidaan päätellä, vaikuttaako aikaero mittauksissa tuloksiin.</p>					

Liite 2. Esimerkki yksittäisen kitin tuloksista

VALIDOINTIMITTAUKSET									
Pvm	27.4.2017	Kit lot	17A1927	Kesto	7 h	20 °C			
Tekijä	RR	Kit (Q)	(Kitt Q)	Lämpötila					
SARIA 1. Standardit, kontrollit									
Nimi	C (ppb)	Abs.	Ka	SD	%CV (RSD)	B/Bo	C (mitattu)	#LUKU	WS ABS
St. 1 (a)	0,0	0,771	0,802	0,0431	5,382	100 %	0,052482		0,219
St. 1 (b)		0,832							
St. 2 (a)	0,15	0,716	0,717	0,00141	0,197	89 %			
St. 2 (b)		0,718							
St. 3 (a)	0,4	0,599	0,600	0,00141	0,24	75 %			
St. 3 (b)		0,601							
St. 4 (a)	1,0	0,427	0,423	0,00566	1,337	53 %			
St. 4 (b)		0,419							
St. 5 (a)	2,0	0,281	0,293	0,01626	5,560	36 %			
St. 5 (b)		0,304							
St. 6 (a)	5,0	0,148	0,144	0,00636	4,43	18 %	C (mitattu)		
St. 6 (b)		0,139					0,841756		
C (a)	0,75	0,463	0,471	0,01131	2,402	59 %	0,777536		
C (b)		0,479					0,448262		
HA (a)	0,30	0,581	0,578	0,00495	0,857	72 %	0,467299		
HA (b)		0,574							
SARIA 2. Nollat (Milli-Q)									
Nimi	C (ppb)	Abs.	Ka	SD	%CV (RSD)	C (mitattu)	WS ABS		
NollatMO	0	0,782	0,7895	0,0106	1,343	0,0343	0,220		
NollatMO		0,797				0,0094			
NollatMO	0	0,839	0,8155	0,0332	4,0753	#LUKUI	Huomi Vain mitattu		
NollatMO		0,792				0,0178			
NollatMO	0	0,801	0,7675	0,0474	6,1728	0,0026			
NollatMO		0,734				0,1160			
NollatMO	0	0,739	0,7585	0,0276	3,6358	0,1072			
NollatMO		0,778				0,0409			
NollatMO	0	0,757	0,768	0,0156	2,0256	0,0760			
NollatMO		0,779				0,0392			

4-PL parametrit										
	Max	0,80	Slope	1,04	IC50	1,12	Min	0,01	SSE	0,0001
r^2 = 1,000										
Standardit & sovitus										
Nimi	C (ppb)	Abs. (ka)	Sovitus (Y	Sq. Res.						
St. 1	0,0	0,802	0,715	3,06E-06						
St. 2	0,15	0,717	0,715	2,18E-05						
St. 3	0,4	0,6	0,599	2,88E-07						
St. 4	1,0	0,423	0,428	2,18E-05						
St. 5	2,0	0,2925	0,288	2,41E-05						
St. 6	5,0	0,1435	0,145	2,47E-06						

Residuaalitestit									
Nimi	Abs. (ka)	Sovitus (Y	Residuaali						
St. 1	0,802	0,802	-0,0009						
St. 2	0,717	0,715	0,0017						
St. 3	0,600	0,599	0,0005						
St. 4	0,423	0,428	-0,0047						
St. 5	0,293	0,288	0,0049						
St. 6	0,144	0,145	-0,0016						

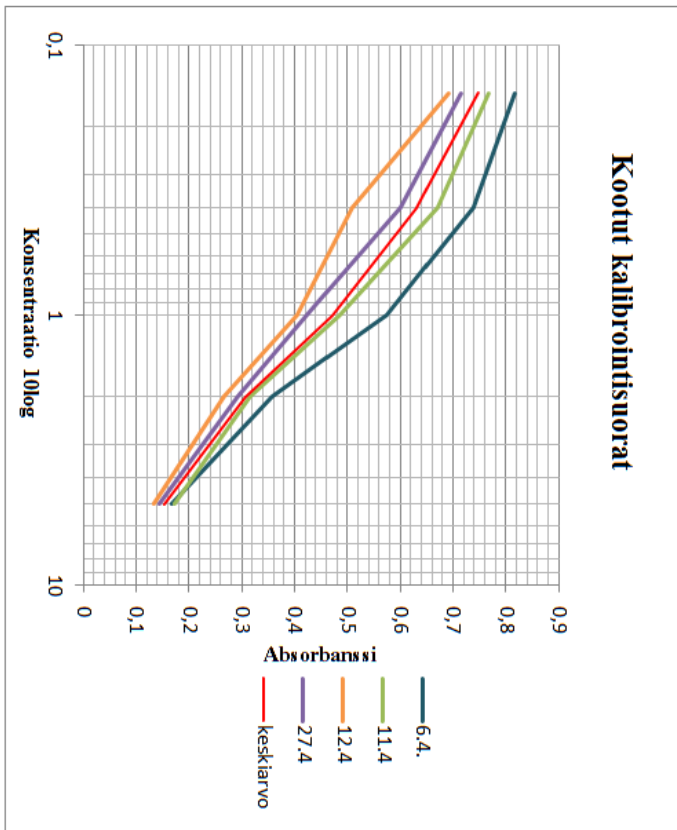
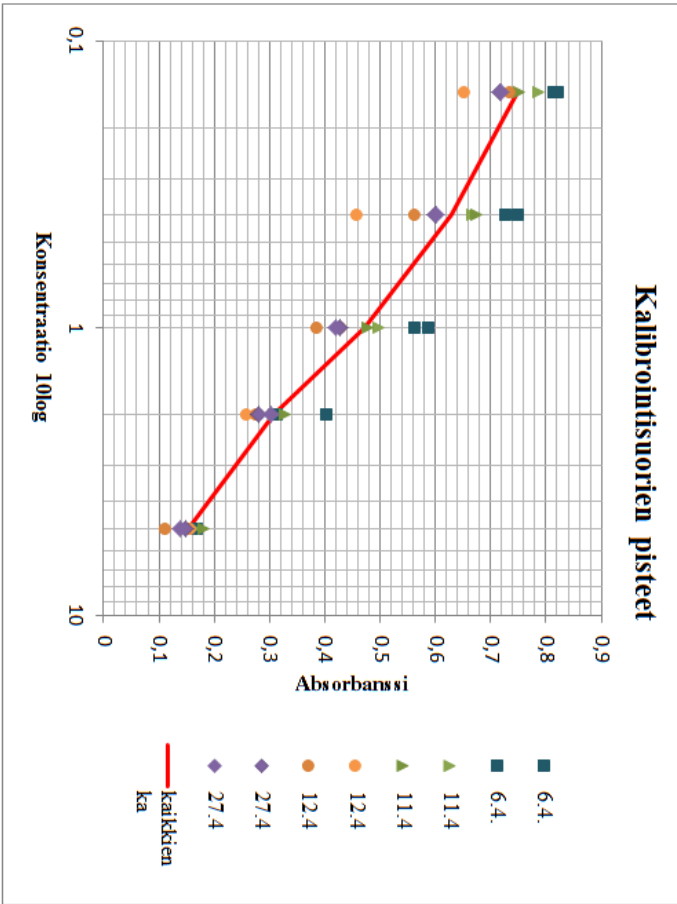
Scatter plot showing the relationship between concentration (C) and absorbance (Abs). The x-axis is logarithmic, ranging from 0.1 to 10.0 ppb. The y-axis is linear, ranging from 0.000 to 0.800. A red line represents the fit, and blue diamonds represent the data points. The plot shows a clear linear relationship on the log scale.

Bar chart titled "Kalibrointikuvaajan residuaalit" showing the residuals for each standard. The x-axis is labeled 1 to 6, corresponding to standards St. 1 to St. 6. The y-axis ranges from -0.0060 to 0.0060. The bars show the following approximate values: St. 1: -0.0009, St. 2: 0.0017, St. 3: 0.0005, St. 4: -0.0047, St. 5: 0.0049, St. 6: -0.0016.

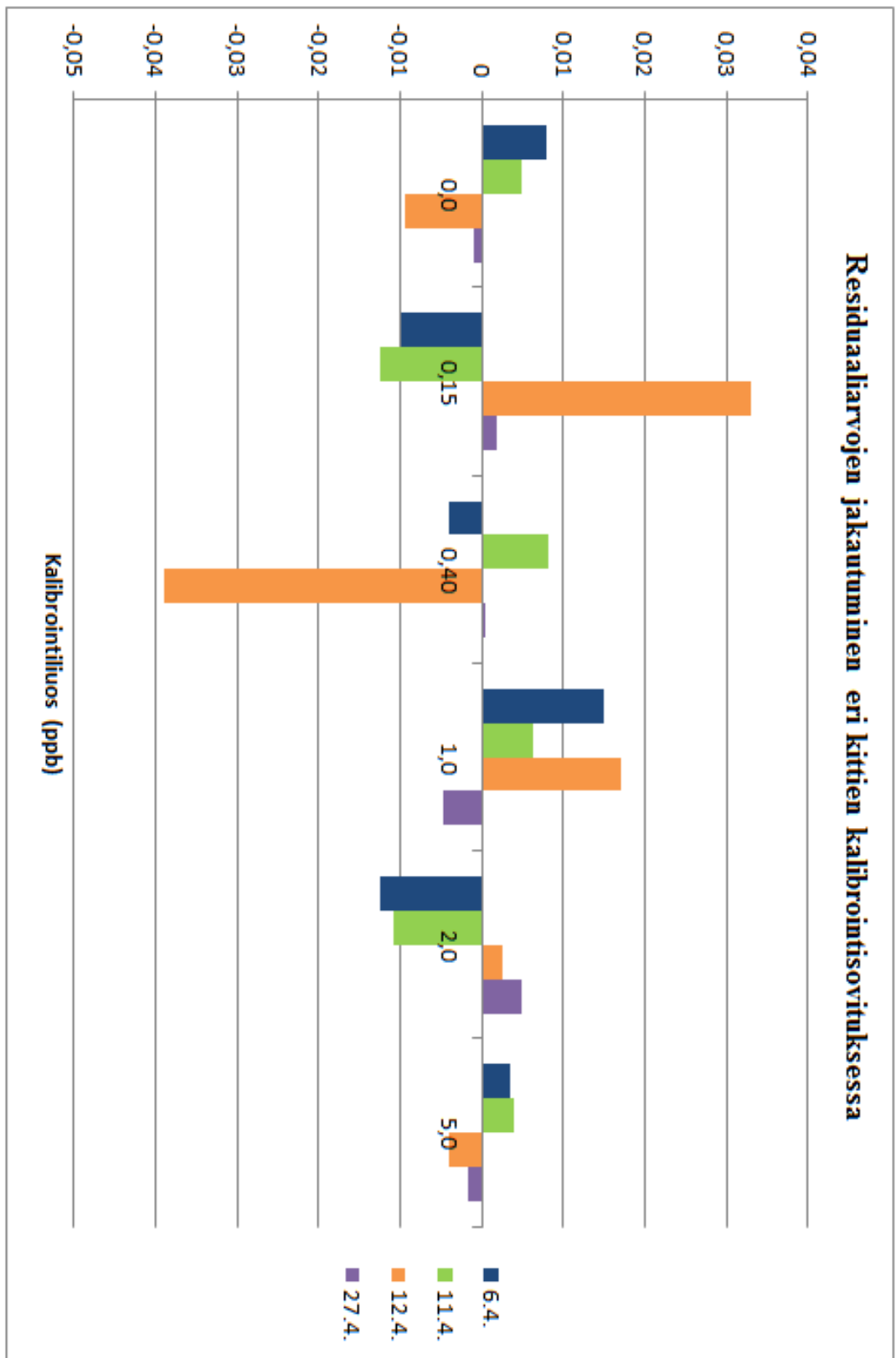
Liite 3. Kittien kalibrointisuorien data 1/2

KIT LOT: 17A1927

C	6.4.			11.4.			12.4.			27.4.			
	r1	r2	ka	r1	r2	ka	r1	r2	ka	r1	r2	ka	kaikkinen ka
0	0,855	0,893	0,874	0,850	0,894	0,872	0,741	0,736	0,7385	0,771	0,832	0,8015	0,822
0,15	0,814	0,822	0,818	0,787	0,751	0,769	0,653	0,734	0,6935	0,716	0,718	0,717	0,749
0,4	0,750	0,727	0,7385	0,668	0,675	0,672	0,457	0,563	0,51	0,599	0,601	0,600	0,630
1,0	0,562	0,587	0,5745	0,497	0,478	0,488	0,428	0,385	0,4065	0,427	0,419	0,423	0,473
2,0	0,312	0,403	0,3575	0,307	0,328	0,318	0,257	0,275	0,266	0,281	0,304	0,2925	0,308
5,0	0,167	0,168	0,1675	0,164	0,182	0,173	0,157	0,112	0,1345	0,148	0,139	0,1435	0,155
	WS ABS	0,222		WS ABS	0,235		WS ABS	0,221		WS ABS	0,219		



Liite 3. Kittien kalibrointisuorien data 2/2



Liite 4. Ajan vaikutus kalibrointiliuosten absorbanssiin ja konsentraatioon

Muutos absorbanssissa

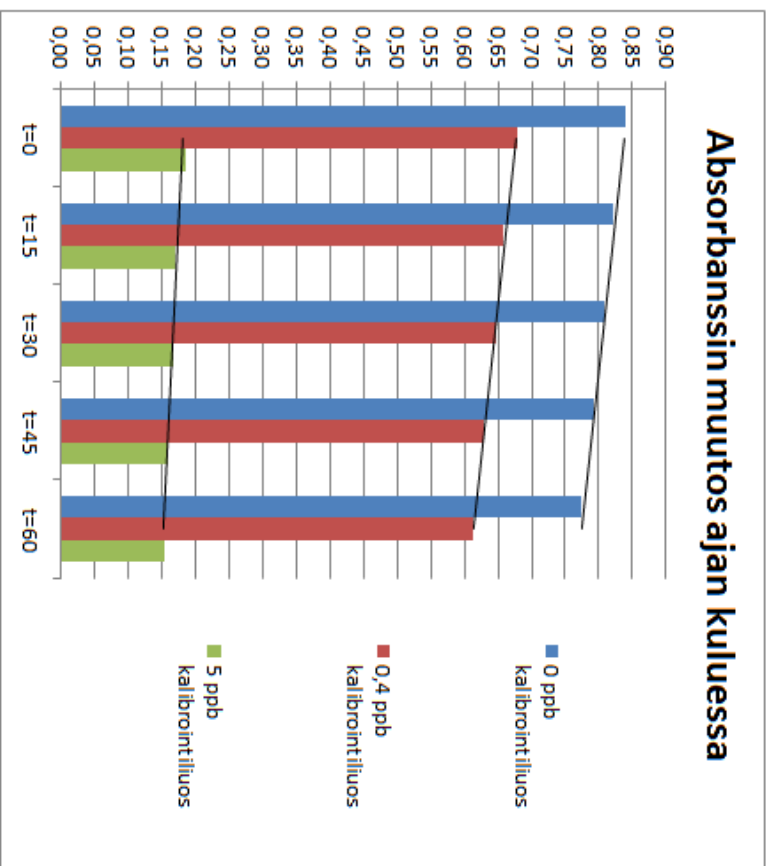
	0 ppb	Muutos%	0,4 ppb	Muutos%	5 ppb	Muutos%
t=0	0,839		0,679		0,1855	
t=15	0,821	2,1	0,659	3,0	0,170	8,4
t=30	0,808	3,7	0,647	4,8	0,1665	10,2
t=45	0,791	5,7	0,630	7,3	0,161	13,2
t=60	0,773	7,8	0,613	9,7	0,155	16,4

Muutos konsentraatiossa

	0 ppb*	Muutos%	0,4 ppb	Muutos%	5 ppb	Muutos%
t=0	ei luet.		0,220		3,677	
t=15	0,009		0,263	19,3	4,109	11,8
t=30	0,029	210,2	0,289	31,1	4,218	14,7
t=45	0,059	526,1	0,327	48,6	4,398	19,6
t=60	0,086	813,2	0,366	66,4	4,611	25,4

*Laskettu 1 rinnakkaisesta

Standardit 0, 0,4 ja 5 ppb mitattiin tunnin ajan vartin välein mainitussa järjestyksessä. Ajanlasku aloitettiin heti, kun ensimmäisellä (t=0) mittauskerralla kaikki oli mitattu (huom. Mittausaika 6 min). Muutos% vertaa muutosta arvoon hetkellä t=0.



Liite 5. Kitin kalibrointisuorien vertailu valmistajan ilmoittamiin arvoihin

