

Kaisa Rinta-Harri

# Immunokemiallisen biosiruteknologian soveltu- vuuden testaus ja alustava validointi kas- vunedistäjien seulontaan lihamatriisista

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinööryö

12.12.2017

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Kaisa Rinta-Harri Immunokemiallisen biosiruteknologian soveltuvuuden testaus ja alustava validointi kasvunedistäjien seulontaan lihamatriisista 34 sivua 12.12.2017
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bio- ja kemianteekniikka
Ammatillinen pääaine	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Tutkija Martina Jonsson Erikoistutkija Annikki Welling Tutkintovastaava Carola Fortelius
<p>Kasvunedistäjät ovat lihantuotantoa tehostavia ja nopeuttavia aineita, kuten anabolisia steroideja, joilla on mahdollisia terveyshaittoja ihmiselle. Kasvunedistäjien käyttö lihantuotannossa on EU-lainsäädännöllä kielletty; EU:n sisämarkkinoilla niiden valvontavelvollisuus on aina lihantuottaja tai -maahantuojamaalla. Kasvunedistäjien käytön valvonnasta Suomessa vastaa Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran vierasainevalvonta. Evira tarkkailee kasvunedistäjäjämiä juomavedestä ja suoraan tuotantotiloilta saaduista virtsanäytteistä, mutta tällä hetkellä käytössä olevat menetelmät eivät täysin sovellu kasvunedistäjien seulontaan lihasta.</p> <p>Tämän insinööriyön tarkoituksena oli testata ja alustavasti validoida Eviran kemian yksikölle menetelmä kasvunedistäjien seulontaan lihamatriisista. Validoitu menetelmä oli Randox Laboratories'in kehittämä immunokemiallinen biosiruteknologia, joka perustuu kilpailevaan ELISA:an. Perinteisiin ELISA-menetelmiin verrattuna biosiruilla pystytään määrittämään saman aikaisesti yhdeksän eri analyysin pitoisuuksia näytteestä samanaikaisesti. Työn suorituksessa käytettiin Randoxin Growth Promoters Immunoaffinity Columns ja Growth Promoter Multiple Matrix Screen (GPMMS) -kittejä sekä Evidence Investigator -lukulaitetta, joilla esikäsiteltiin ja analysoitiin 22 lihaskudosnäytettä. Validoinnin parametreina käytettiin osoituskykyä, kynnysarvoa, Cut off -tasoa sekä saantoa.</p> <p>Saatujen tulosten perustella todettiin, että menetelmä soveltuu boldenonin, zeranolin, dekametasonin, trenbolonin, raktopamiinin sekä stanozololin seulontaan lihamatriisista. Nandrolonin, klenbuterolin ja heksestrolin seulontaan menetelmä ei osoituskyvyn, Cut off -tason tai <math>\beta</math>-virheen puolesta sovellu. Kattavan validoinnin suorittamiseksi tulisi työtä jatkaa useammilla näytteillä, käyttäen nollanäytteinä todettuja negatiivisia näytteitä. Mittauksista tulisi suorittaa toistoja lyhyellä ja pitkällä aikavälillä, jotta voitaisiin luotettavasti todeta menetelmän toistettavuus ja uusittavuus.</p> <p>Työn aikana huomattiin menetelmän olevan melko aikaa vievä ja työläs. Se ei täytä vaadittuja kriteerejä kaikkien analyyttien osalta, minkä lisäksi tutkittavien analyyttien joukosta puuttuu joitakin oleellisia aineita. Menetelmän testausta jatketaan uusilla näytteillä ennen päätöstä sen käyttöönotosta.</p>	
Avainsanat	biosiru, seulontamenetelmä, validointi, kasvunedistäjä

Author Title	Kaisa Rinta-Harri Suitability testing and preliminary validation of immunochemical biochip technology for screening growth promoters from meat matrix
Number of Pages Date	34 pages 12 December 2017
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Martina Jonsson, Researcher Annikki Welling, Senior Researcher Carola Fortelius, Head of the Department
<p>Growth promoters are substances, such as anabolic steroids, fed to livestock to enhance and accelerate meat production. Use of growth promoters in meat production is prohibited by EU legislation due to their potential adverse health effects on humans. In EU internal market every country has an obligation to monitor the levels of growth promoters from meat produced or imported there. Supervision of growth promoters in Finland is under the Food Safety Authority Evira's foreign valence control. Evira monitors growth promoter residues directly from drinking water and urine samples gathered from production sites, but the methods currently used are not fully compatible for meat matrix.</p> <p>The aim of this thesis was to test and preliminary validate a screening method for growth promoters from meat matrix to Evira's Chemistry Unit. The method validated was a competitive ELISA -based immunochemical biochip technology developed by Randox Laboratories. In contrast to traditional ELISA methods, bioships can be used to measure concentrations of nine different analytes from one sample simultaneously. The experimental part of the work was performed by using Randox Growth Promoters Immunoaffinity Columns and Growth Promoter Multiple Matrix Screen (GPMMS) kits and Evidence Investigator for the pretreatment and analysis of 22 muscle tissue samples. Validation parameters used were detection capability, threshold value, cut-off level and yield.</p> <p>As a conclusion made from the results, it can be said that the biochip method is suitable for screening boldenone, zeranol, dexamethasone, trenbolone, ractopamine and stanozolol residues from meat matrix. As for screening nandrolone, clenbuterol and hexestrol, the method is not applicable to detection capacity, cut-off level or <math>\beta</math> error. To achieve a comprehensive validation of the biochip method, work should be continued with more samples, using real negative samples as blank samples. There should be more measurement repeats to define reproducibility and repeatability.</p> <p>During the thesis project it was noticed that the biochip method consumes time and work power more than expected. It also lacks some important analytes to be monitored. Testing the biochip method is being continued with new samples before making the decision of taking it in use at EVIRA's laboratories.</p>	
Keywords	biochip, screening method, validation, growth promoter

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kasvunedistäjät	3
2.1	Lainsäädäntö	3
2.2	Tutkitut kasvunedistäjät	5
3	Seulontamenetelmän validointi	7
4	Materiaalit ja menetelmät	10
4.1	ELISA	11
4.2	Randox Growth Promoter Multiple Matrix Screen (GPMMS) -menetelmä	12
4.3	Biosirut	13
4.4	Näytteet ja spiikkaus	15
4.5	Kitit	17
4.6	Näytteiden esikäsittely ja puhdistus	18
4.7	Näytteiden analysointi	19
4.8	Datan analysointi	21
5	Tulokset	24
6	Tulosten tarkastelu	27
7	Yhteenveto	32
	Lähteet	33

## Lyhenteet

CRL	Community Reference Laboratories. EU-rahoitteinen referenssilaboratorio.
Evira	Finnish Food Safety Authority. Elintarviketurvallisuusvirasto.
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay. Biokemiallinen menetelmä vasta-aineen tai antigeenin määrittämiseen näytteestä.
GPMMS	Growth Promoter Multiple Matrix Screen. Usean matriisin kasvunedistäjäseulonta.
MRL	Maximum Residue Limit. Jäämien enimmäismäärä.
MRPL	Minimum Required Performance Limits. Pienin vaadittu tunnistettava pitoisuus.
STC	Screening Target Concentration. Seulonnan kohdepitoisuus.

## 1 Johdanto

Kasvunedistäjät käsittävät joukon erilaisia aineita, joilla voidaan parantaa eläinten ravinteiden hyödyntämistä ja lihasmassan kasvattamista. Kasvunedistäjien käyttö lihantuotannossa nopeuttaa eläinten lihasmassan kasvua ja laskee näin tuotannon kustannuksia, mutta tuottaa samalla terveystarpeita sekä tuotantoeläimelle että lihan kuluttajalle [1, s. 5]. Kasvunedistäjien käyttö tuotantoeläinten kasvun tehostamiseksi on kielletty monissa maissa, mukaan lukien Euroopan unionin maat, vedoten terveystarpeisiin ja eettisiin kysymyksiin. Kaikista kasvunedistäjien käytön vaikutuksista ei myöskään ole tarpeeksi kattavaa tutkimusta, jotta ne voitaisiin luokitella ihmiselle harmittomiksi. [1, s. 5; 2.]

Kasvunedistäjien käyttö ei kuitenkaan ole kiellettyä kaikissa lihantuottajamaissa. Esimerkiksi Yhdysvalloissa, Australiassa ja useimmissa Aasian maissa tiettyjen kasvunedistäjien käyttö on tavanomaista. Käyttöä saattaa olla säännösteltyä ja rajoitettua, mutta ei täysin kiellettyä. [1, s. 5; 2.] EU:n alueelle tuodaan vuosittain yli 500 000 kilogrammaa naudanlihaa kolmansista maista, mikä tekee riskin kasvunedistäjien päätyemisestä lautasillemme mahdolliseksi [2].

Euroopan unionin sisällä jokaisella maalla on velvollisuus valvoa omassa maassaan tuotetun sekä EU:n ulkopuolelta maahantuodun lihan kasvunedistäjäpitoisuuksia. Tästä johtuen EU:n sisämarkkinoilla lihaa ei enää tutkita, vaan esimerkiksi Suomeen tuotu puolalainen liha oletetaan turvalliseksi ja säännösten mukaiseksi. [2.] Kasvunedistäjien käytön valvonta Suomessa kuuluu Elintarviketurvallisuusvirasto Eviralle, ja se tapahtuu yleensä suoraan lihantuottajajärjestöiltä otetuista virtsanäytteistä, joihin kasvunedistäjät ja niiden metaboliitit erittyvät [3; 1, s. 5]. Virtsaasta kasvunedistäjäjäämiä voidaan seuloa perinteisin ELISA-menetelmin, mutta Eviralla tällä hetkellä käytössä olevat menetelmät eivät täysin sovellu lihamatriisille [3].

Tämän insinööriyön toimeksiantaja oli Eviran kemianyksikön koostumus ja alkuperä - jaosto. Työn tarkoitus oli testata käytännössä Eviran tarkoituksiin sopivaa kasvunedistäjien seulontamenetelmää lihamatriisille, ja alustavasti validoida se. Toimiessaan biosiruja voisivat käyttää myös muut Eviran yksiköt.

Testattu menetelmä oli diagnostisia menetelmiä kehittävän ja myyvän Randox Laboratories Limitedin kehittämä immunobiosiruteknologia. Biosirut ovat kiinteään faasin laitteita, joiden analyysit perustuvat kilpailevaan ELISA-menetelmään. Siruilla on joukko erillisiä testialueita, jotka sisältävät eri kasvunedistäjille spesifisiä immobilisoituja vasta-aineita. Biosirut analysoidaan kemiluminesenssin avulla Randoxin immunosiruanalysointilaitteella, Evidence Investigatorilla. Menetelmällä pystytään määrittämään samanaikaisesti yhdeksää eri analyyttiä ja niiden kautta analyyttien kanssa ristireagoivia analyyttejä viidestä eri ryhmästä, ja säästämään näin aikaa verrattaessa perinteiseen ELISA-menetelmään. [1, s. 1.]

Randoxin menetelmä valittiin Eviran kemianyksikön kokeiluun sen oletetun nopeuden, multimatriisiominaisuuden sekä monipuolisen analyysitarjonnan vuoksi [3]. Validoinnin aikana määritettiin menetelmän saanto, kynnyisarvo, osoituskyky CC $\beta$  sekä Cut off -taso ja -arvo. Tuloksissa tarkasteltiin myös menetelmän toistettavuutta. Työn aikana kerättiin tietoa myös menetelmän käytettävyydestä ja yleisestä soveltuvuudesta Eviran laboratoriopalveluiden kemian yksikölle. Verrattaessa perinteisiin ELISA- ja massaspektrometriin menetelmiin biosiruteknologia on kallis, joten sen käyttöarvon täytyi olla korkeiden kustannusten veroinen.

## 2 Kasvunedistäjät

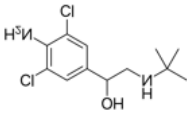
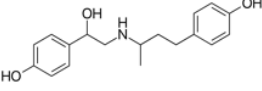
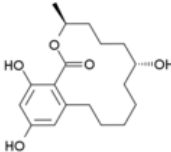
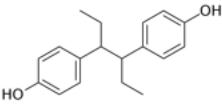
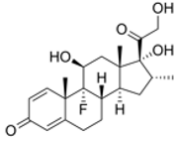
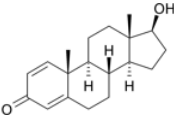
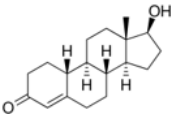
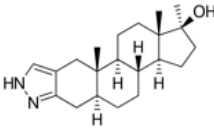
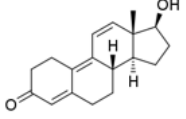
Kasvunedistäjillä tarkoitetaan kirjoa erilaisia aineita, kuten steroideja ja beeta-agonisteja, joilla pystytään parantamaan lihakarjan tuotannossa eläinten ravinteiden hyödyntämistä ja lihasmassan kasvattamista. Kasvunedistäjiä käyttämällä lihaa pystytään tuottamaan normaalia nopeammin, ja siten myös edullisemmin. [1 s. 5.] Niiden vaikutus voi perustua esimerkiksi lihasten valkuaisainepitoisuuksien lisäämiseen ja tuotannon kiihdyttämiseen, lihasten ja luuston vahvistamiseen tai lihasten glykokeenin ja elimistön rasvan polttoon [4; 5]. Kasvunedistäjien käyttöön ruvettiin kiinnittämään huomiota 1970 – 1980-luvuilla, kun vakavista sairastumistapauksista löydettiin yhteys lihojen kasvunedistäjäjäämiin. Tämän jälkeen niiden käyttöä on maista riippuen vahvasti rajoitettu tai kielletty kokonaan lihatuotannossa. [1, s. 5.]

### 2.1 Lainsäädäntö

Euroopan unionissa kasvuhormoneiden käyttö tuotantoeläinten kasvun tehokkuuden parantamiseksi on kielletty kokonaan, mutta sen ulkopuolelta tuodun lihan tuottamiseen niitä on saatettu käyttää [2]. Jokaisella EU:n maalla on velvollisuus monitoroida omassa maassaan tuotettujen sekä EU:n ulkopuolelta maahantuotujen lihatuotteiden kasvunedistäjäpitoisuuksia, jotta EU:n sisämarkkinoilla myytävä liha olisi turvallista [2; 3].

Suomen ulkopuolelta tuodun lihan kasvunedistäjäpitoisuuksien valvonnassa käytetään tutkittavana matriisina lihakudosta, koska virtsaa ja ulosteita ei ole saatavilla [3]. Community Reference Laboratories (CRL) on laatinut suositellut seulonnan kohdepitoisuudet (Screening Target Concentration, STC) aineille, joille ei ole määritelty erikseen jäämien enimmäismääriä, (Maximum Residue Limits, MRL), koska niiden käyttö tuotantoeläimillä on Euroopan Unionissa kokonaan kielletty. Suositellut kohdepitoisuudet antavat ohjeen pienimmästä pitoisuudesta, jonka käytettävän seulontamenetelmän on tunnistettava kutakin analyyyttiä, jotta näyte voidaan todeta puhtaaksi. Rajat vaihtelevat hieman eri matriisien (kudos, virtsa, maito) sekä eri eläinlajien välillä. [6.] Taulukkoon 1 on koottu tässä menetelmävalidoinnissa tarkastellut kasvunedistäjät, niiden molekyyli rakenne sekä suositellut seulonnan kohdepitoisuudet. Suositellut kohdepitoisuudet ilmaistaan yksiköiden µg/kg tai µg/l sijaan yksikössä ppb (parts per billion) eri matriisien vertailun vuoksi.

Taulukko 1. Työssä tutkitut kasvunestäjät sekä CRL:n luomat ohjepitoisuudet virtsa- ja kudsmatriiseille [6].

Kasvunestäjä	Molekyyli rakenne	STC, virtsa	STC, kudos
Klenbuteroli		0,2 ppb	0,1 ppb (MRL raja nauta- ja hevoseläimille 0,1 ppb poikkeuksellisissa lääkintäpauksissa, 96/22/EC)
Raktopamiini		1 ppb	1 ppb
Zeranoli		2 ppb	1 ppb
Heksestroli		2 ppb	1 ppb
Deksametasoni		2 ppb	MRL raja hoidetulla eläimellä
Boldenoni		1 ppb	1 ppb
Nandroloni		1 ppb	1 ppb
Stanozololi		2 ppb	1 ppb
Trenboloni		2 ppb	1 ppb

MRL-arvot perustuvat EU-neuvoston direktiivin 96/23/EC asetukseen (EC) No 2377/90. Community Reference Laboratories'in asettamien arvojen perustana on direktiivi 96/22/EC ja asetus (EEC) No 2377/90. EU-komissio on tehnyt päätöksen myös pienimmistä vaadituista tunnistusrajoista (Minimum Required Performance Limits, MRPL), päätöksellään 2205/34 (EC). Toisin kuin MRL- ja MRPL-arvot, CRL:n laatimat suositellut

STC-rajat eivät perustu lainsäädännön vaatimuksiin, vaan ovat ohjeena jäämien kontrollointiin analyttisissä menetelmissä. [6.]

## 2.2 Tutkitut kasvunedistäjät

Työssä tutkittiin menetelmän kykyä tunnistaa lihamatriisista klenbuterolin, deksametasonin, nandrolonin, heksestrolin, zeranolin, boldenonin, raktopamiinin, stanozololin sekä trenbolonin jäämiä. Tutkitut analytit kuuluivat viiteen eri ryhmään: beeta-agonisteihin, steroideihin, kortikosteroideihin, stilbeneihin ja laktaanihappoihin. Ristireaktioiden kautta menetelmän voidaan sanoa tunnistavan yhteensä 39 analyyttiä. Kun menetelmä antaa positiivisen tuloksen esimerkiksi beeta-agonisteihin kuuluvalla klenbuterolilla, voi tulos oikeasti olla syntynyt joko klenbuterolista, tai jostain sen kanssa ristireagoivasta yhdisteestä, kuten brombuterolista.

Klenbuteroli ja raktopamiini ovat beeta-agonisteihin kuuluvia anabolisia lääkkeitä [1, s. 5, 9]. Klenbuterolia voidaan käyttää eläinlääketieteessä hengityselinsairauksien hoitoon, mutta liian suurina annoksina se toimii raktopamiinin tavoin kasvunedistäjänä kasvattaen lihasmassaa ja vähentäen rasvan kertymistä [7; 1, s. 5]. Raktopamiinin käyttö on sallittua siiankasvatuksessa esimerkiksi USA:ssa, EU:ssa kaikkien beeta-agonistien käyttö on lihantuotannossa kielletty [1, s. 5, 9]. Klenbuterolin jäämät kertyvät lihaan ja maksaan, ja niiden nauttimisesta voi seurata ruokamyrkytys [7]. Raktopamiini absorboituu ja erittyy nopeasti virtsaan, minkä vuoksi se ei kerry lihaskudokseen suurina pitoisuuksina [1, s. 9].

Deksametasoni kuuluu kortikosteroideihin, ryhmään luonnollisia ja synteettisiä hormoneja, jotka ovat samankaltaisia aivolisäkkeen erittämien hormoneiden kanssa [1, s. 7]. Deksametasonia käytetään tulehduksenestolääkkeenä, mutta sillä on myös moninaisia hormonillisia ja metabolisia vaikutuksia, minkä vuoksi sitä voidaan käyttää luvattomana kasvunedistäjänä [8; 1, s. 7].

Zeranolin on synteettinen ei-steroidinen laktonihappo, jolla on anabolisia ja estrogeenisia vaikutuksia. Zeranolin on hiirikokeilla havaittu parantavan verenkiertoa ja estävän luukatoa; haittavaikutuksiksi on todettu munasarjojen normaalitoiminnan häiriöt sekä DNA-vauriot. Kasvunedistäjänä zeranolin käyttö on sallittua esimerkiksi Pohjois-Amerikassa, koska sen haittoja ei ole vielä täysin määritelty; EU:ssa sen käyttö on kielletty samasta

syystä. Zeranolin metaboliittia zearalenonia voivat tuottaa myös luonnollisesti *Fusarium*-suvun punahomeet mykotoksiininina, joten sen löytyminen eläinkudoksesta ei välttämättä ole rikkomus. [9.]

Heksestroli on stilbeeni, steroideihin kuulumaton synteettinen estrogeeni, jota voidaan käyttää laittomasti kasvunedistäjänä tuotantoeläimillä, sekä eläinlääketieteessä estrogeenin puutosvaurioiden hoidossa. Heksestroli voi ihmisellä häiritä normaaleja fysiologisia prosesseja. Hormonilla on myös havaittu olevan mutageenisia sekä karsinogeenisiä vaikutuksia. [10.]

Nandroloni on testosteronia muistuttava anabolinen steroidi, jota väärinkäytetään yleisesti urheilusuoritusten parantamiseen. Sitä voidaan käyttää lääketieteellisesti luuydinheikkouden ja lihasrappeuman hoitoon proteiinisynteesiä parantavien ominaisuuksiensa vuoksi. Nandrolonin haittavaikutuksia ovat esimerkiksi lisääntynyt aggressiivisuus, masennus sekä heikentyneet kognitiiviset taidot. [11.]

Boldenoni on anabolinen steroidi, joka eroaa testosteronista korkeammalla anabolisella ja matalammalla androgeenisella aktiivisuudellaan. Boldenonilla pyritään parantamaan lihasmassan kasvua sekä tuotantoeläimillä että urheilijoilla, mutta useissa maissa, mukaan lukien EUmaat, se on kielletty kaikessa lääketieteellisessä käytössä. Boldenonin käytöstä seuraavaa hedelmättömyyttä voidaan perustella esimerkiksi veriseerumin muuttuneilla proteiini-, globuliini- ja follikkeleita stimuloivien hormonien tasoilla. [12.]

Stanozololi on testosteronin kaltainen synteettinen anabolinen steroidi, jota voidaan eläinlääketieteessä käyttää koirille ja kissoille sekä hevosille, jotka eivät päädy ihmisen ravinnoksi [1, s. 10]. Lääketieteessä stanozolia voidaan määrätä ihmisille perinnöllisen angioödeeman tai osteoporoosin hoitoon, mutta maksatoksisten aineiden vuoksi se voi aiheuttaa maksan vajaatoimintaa. Kasvunedistäjänä steroidi parantaa lihasmassan kasvua ja vähentäen rasvan kertymistä, minkä vuoksi sitä käytetään myös laittomasti kehönrakennuksessa. [1, s. 10; 13.]

Trenboloni on testosteronin kaltainen synteettinen anabolinen steroidi, joka nopeuttaa lihashudoksen muodostumista eläimillä [1, s. 12]. Se toimii nisäkkäillä voimakkaana androgeenireseptoreiden agonistina. Joissain maissa, kuten USA:ssa ja Kanadassa, trenbolonin käyttö on sallittua ja hyvin yleistä naudanlihatuotannossa, jossa sitä käytetään kasvunedistäjäimplanteissa. [14.]

### 3 Seulontamenetelmän validointi

Validoinnilla tarkoitetaan tutkimusmenetelmän, uuden käyttöönotettavan tai vanhan merkittäviä muutoksia kokeneen, testausjärjestelmää. Testausjärjestelmällä varmistetaan menetelmän soveltuvuus käyttötarkoitukseensa, sen antamien tulosten luotettavuus sekä niiden vertailukelpoisuus. Seulontamenetelmän olennaisin tarkoitus on pystyä luotettavasti havaitsemaan tutkittu analyytti valitulla seulonnan kohdepitoisuudella (Screening Target Concentration, STC), välttämällä vääriä negatiivisia tuloksia. Validointi tulee suorittaa erikseen jokaiselle analyyttille, joita laboratorioissa tutkitaan. [15.]

Eviran laboratoriopalvelut on Elintarviketurvallisuusviraston sisäinen akkreditoitu laboratorio-osasto. Akkreditoitujen laboratorioiden toimintaa ja menetelmien pätevyyttä valvoo FINAS-akkreditointipalvelu. Kaikkien Evirassa käytössä olevien menetelmien tulee olla FINAS-tarkastettuja ja -hyväksytyjä.

Validointia aloitettaessa valitaan ensin käytetyt näytteet ja niiden määrä. Optimaalinen positiivisten tulosten määrä kontrollinäytteistä riippuu tulokselle vaaditusta tilastollisesta tasosta. Mitä matalampi seulonnan kohdepitoisuus on verrattuna asetettuun vähimmäispitoisuuden havaitsemisraja-arvoon, sitä vähemmän toistoja vaaditaan antamaan sama varmuus seulontamenetelmän luotettavuudesta. Jos seulonnan kohdepitoisuus on puolet tai alle vähimmäispitoisuuden havaitsemisraja-arvosta, yksi tai ei yhtään väärää negatiivista tulosta ja sitä seuraavat 20 oikeaa positiivista tulosta on riittävä määrä osoittamaan, että detektiokapasiteetti on vähemmän kuin vähimmäispitoisuuden havaitsemisraja. [15.]

Jos tutkituille analyyteille ei ole asetettu MRL- tai MRPL-rajoja (Maximum Residue Limit, Minimum Required Performance Limits), kuten tässä tutkimuksessa, validoinnissa käytetään ohjerajoina Community Reference Laboratories'in laatimia raja-arvoja. STC tulisi olla sama tai pienempi, kuin CRL:n laatima raja-arvo. Tarpeeksi matalalla STC:lla varmistetaan, että testi antaa positiivisen tuloksen, mikäli näyte sisältää kohdeanalyyttiä. Tässä alustavassa validoinnissa seulonnan kohdepitoisuuksia oli kaksi: klenbuterolille 0,05 ja muille tutkituille analyyteille 0,5. Pitoisuudet olivat puolet CRL:n laatimista STC-pitoisuuksista (klenbuterolille 0,1 ja muille 1). Mitä pienemmäksi STC asetetaan, sitä matalampi on väärien negatiivisten tulosten todennäköisyys, ja sitä luotettavampana voidaan menetelmää pitää. [15.]

Tässä työssä validointi suoritettiin 22 näytteellä, koska menetelmällä saavutetut havaitsemispitoisuudet olivat selvästi suositeltuja vähimmäishavaitsemispitoisuuksia matalammat. Työssä käytettiin ohjeista poiketen kahta eri pitoisuutta, varsinaisessa validoinnissa kaikki pitoisuudet tulisi tutkia erikseen 20 näytteellä. Menetelmän korkeiden kustannusten sekä työn käytettävissä olevan rajallisen ajan vuoksi toistoja tehtiin vain vaadittu vähimmäismäärä. Käytetyt validointiparametrit olivat osoituskyky  $CC\beta$ , Cut off -taso ja -arvo, sekä saanto, jotka määritettiin erikseen jokaiselle yhdeksälle analyyttille. Tuloksissa tarkasteltiin myös menetelmän toistettavuutta sekä havaitsemis- ja määrittäysrajoja, mutta toistojen määrän takia niitä ei voitu huomioida luotettavina tuloksina.

Osoituskyky  $CC\beta$  kertoo pienimmän määrän, jota analyyttiä voidaan havaita, tunnistaa, tai määrittää näytteestä virhemahdollisuudella  $\beta$ .  $\beta$ -virhe on se todennäköisyys, jolla testitulokset on todellisesti väärä, vaikka se olisi mitattu positiiviseksi. Seulontatesteissä  $\beta$ -virhe, eli väärin negatiivisten määrä näytteistä, tulee olla alle 5 %. Tässä validoinnissa  $CC\beta$  on matalin spiikattu konsentraatio, jolla menetelmä voi havaita analyytin. Osoituskyky tulee määrittää vaadittujen analyyttien osalta erikseen jokaiselle matriisille. [15.]

Cut off -taso on se spiikattujen näytteiden vaste seulontatestissä, joka kertoo, että näytteen sisältämä tutkitun analyytin pitoisuus on saman verran tai vähemmän kuin STC. Validointiprosessin aikana taso voidaan määrittää analysoimalla matriisin nollanäytteitä (negatiivinen kontrolli), sekä samoja näytteitä spiikattuna STC:lla. Tässä työssä taso määritettiin vertaamalla nollanäytteiden keskiarvoja spiikattujen näytteiden keskiarvoihin. Cut off -tasoksi asetettiin pienin spiikattujen näytteiden pitoisuus, joka ylitti korkeimman nollanäytteiden pitoisuuden. Cut off -arvo määritettiin laskukaavalla, käyttäen hyväksi spiikattujen näytteiden keskiarvoja ja -hajontoja. Arvoa käytettiin väärin positiivisten tulosten määrittämisessä. [15.]

Kynnysarvo ( $T_m$ , Threshold value) mittaa väärin positiivisten tulosten määrää. Väärät positiiviset tulokset eivät ole seulontamenetelmän kannalta kriittisiä, mutta tuottavat turhaa lisätyötä ja kuluttavat näin resursseja. Kynnysarvo mitataan nollanäytteiden keskiarvoista ja -hajonnoista. Sitä verrataan mitattuun Cut off -arvoon, jolloin voidaan määrittää väärin positiivisten tulosten määrä tarkkuudella yli tai alle 5 %.

Saanto mittaa menetelmän tehokkuutta havaita tutkittavan analyytin kokonaismäärä näytteestä. Se kertoo menetelmällä havaitun aineen prosentuaalisen osuuden sen oikeasta konsentraatiosta. Saanto lasketaan jakamalla näytteestä mitattu pitoisuus siihen

spiikatulla pitoisuudella. [17.] Tässä työssä saanto korjattiin korjauskertoimella, ja siinä otettiin huomioon mahdolliset nollanäytteiden pitoisuudet.

Havaitsemisraja LOD (Limit of Detection) on pienin pitoisuus, jolla voidaan luotettavasti todeta analyytin läsnäolo näytteestä ja joka merkittävästi eroaa nollanäytteestä. Havaitsemisraja määritetään tutkimalla taustan hajontaa analysoimalla nollanäytteitä. Rinnakkaisille nollanäytteille lasketaan keskiarvo- ja hajonta. Havaitsemisraja on se analyytin pitoisuus, jonka vaste vastaa nollanäytteiden vasteiden keskiarvoa lisätynä kolminkertaisella keskihajonnalla. Havaitsemisrajalla analyytillä määritetyn pitoisuuden pitää olla niin suuri, ettei sen voida katsoa johtuvan taustan satunnaisvaihtelusta. [16.] Toisin kuin CC $\beta$ , LOD ei huomio negatiivisten ja positiivisten tulosten määrää yhtäaikaisesti, joten tässä työssä sitä ei huomioitu tulosten tarkastelussa [3].

Määritys- eli kvantitointiraja LOQ (Limit of Quantitation) on kvantitatiivisen määrittämisen matriisille mitattu pitoisuusalaraja, jolle voidaan esittää epävarmuusarvio. Määritysraja lasketaan havaitsemisrajan perusteella halutulla kertoimella, joka on yleensä 2–10. Tässä työssä kertoimeksi valittiin 2, koska kyseessä on seulontamenetelmä. Havaitsemis- ja määritysrajojen väliin jää harmaa alue, jolla analyytti voidaan luotettavasti todeta, mutta tulos jää epävarmaksi. [3; 16.]

Kattavassa validoinnissa tärkeitä parametreja ovat toistettavuus ja uusittavuus. Toistettavuus määritetään mittaamalla näytteitä lyhyellä aikavälillä samoissa olosuhteissa, samoilla näytteillä ja samalla tekijällä. Uusittavuuden määrittämiseksi näytteitä mitataan pitkällä aikavälillä. Tämän työn validointiosuudessa ei pystytty kattavasti suorittamaan rinnakkaisia mittauksia eikä tutkimaan mittaustulosten yhtäpitävyyttä pitkällä aikavälillä, joten toistettavuutta ja uusittavuutta ei voitu huomioida tuloksissa.

Validoinnissa tarvitaan aina negatiivinen ja positiivinen kontrolli. Negatiivisena kontrollina käytetään näytteitä eläimistä, jotka tiedettävästi eivät ole altistuneet tutkittaville aineille. Jos sellaisia näytteitä ei ole saatavilla, voidaan käyttää aiemmin fysiokemiallisin menetelmin negatiivisiksi todettuja näytteitä, jotka eivät sisällä lainkaan jäämiä tutkituista aineista. [15.] Tässä työssä negatiivisena kontrollina käytettiin kaikkia tutkittujen näytteiden nollamatriiseja, jotka analysoitiin sekä sellaisinaan että spiikattuina positiivisella kontrollilla. Varsinaista todettua negatiivista kontrollia ei validoinnissa ollut saatavilla.

Positiivinen kontrolli on negatiivinen kontrolli, joka on spiikattu testattavalla analytyillä seulonnan kohdepitoisuudella. Se voi myös olla positiiviseksi todettu näyte, tai sertifioitu referenssimateriaali. [15.] Tässä validoinnissa positiivisena kontrollina käytettiin negatiivisia kontroleja, jotka oli spiikattu Randox Evidence Investigator GPMMS -kitin positiivisella kontrolliliuoksella, joka sisälsi tunnetut pitoisuuden kaikkia tutkittuja kasvunedistäjiä. Spiikkauksella tarkoitetaan tutkitun analytyin lisäystä tunnetussa pitoisuudessa näytteeseen. Ohjeista poiketen tämä validointi suoritettiin käyttäen näytteinä eri lihamatriiseja (nauta, sika, hevonen, kalkkuna, broileri, ankka, jänis) yhden sijaan. Näytteet olivat kolmasmaa- ja EU-sisämarkkinalihanäytteitä. Spiikkaus toteutettiin kolmella eri pitoisuudella poiketen ohjeiden yhdestä pitoisuudesta.

#### **4 Materiaalit ja menetelmät**

Seulontamenetelmät on määritelty Komission päätöksessä 2002/657 menetelmiksi, joita käytetään analytyin tai analytyiryhmän havaitsemiseen halutulla tasolla. Näillä menetelmillä on kapasiteetti korkeaan suoritustehoon ja suurten potentiaalisesti positiivisten näyttemäärien seulontaan. Seulontamenetelmät on suunniteltava välttämään vääriä negatiivisia tuloksia. [15.]

Seulontamenetelmät voidaan luokitella detektioperiaatteen mukaan tai sen perusteella, ovatko ne kvalitatiivisia, semikvalitatiivisia vai kvantitatiivisia. Detektioperiaatteen mukaan menetelmät jaotellaan biologisiin, biokemiallisiin sekä fysiokemiallisiin menetelmiin. Tässä työssä käytetty immunosiru analysaattori kuuluu biokemiallisiin menetelmiin, koska se perustuu kaikkien ELISA-menetelmien tavoin molekylaaristen vuorovaikutusten havaitsemiseen analytyin ja vasta-aineiden välillä. Menetelmä luetaan semikvalitatiiviseksi, koska se antaa likimääräisen arvion oletetun analytyin konsentraatiosta. [15.]

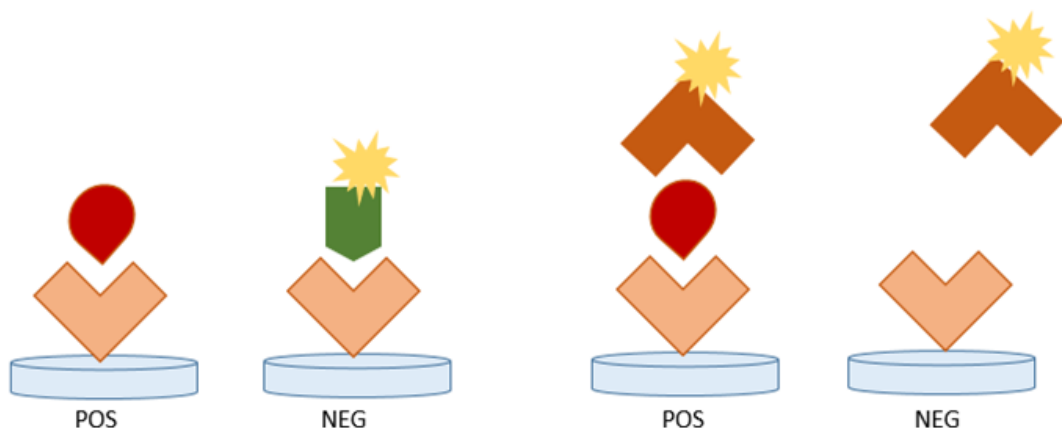
Mikäli validoitu menetelmä otetaan käyttöön, seulonnan jälkeen positiivisiksi todetut näytteet tutkitaan massaspektrometrisesti analytyin läsnäolon varmentamiseksi. Massaspektrometria on analytytinen mittaustekniikka, joka perustuu orgaanisten tai epäorgaanisten molekyylien ionisointiin, jossa molekyylit erotellaan toisistaan massan ja varauksen ( $m/z$ -arvo) perusteella. Lopuksi eri  $m/z$ -arvojen intensiteetit määritetään kvantitatiivisesti tai kvalitatiivisesti, jolloin voidaan todentaa tutkitun analytyin määrä tai läsnäolo alkuperäisessä näytteessä. [18, s. 15.]

## 4.1 ELISA

Biosiruteknologian pohjana on kilpaileva ELISA-menetelmä. ELISA on biokemiallinen menetelmä vasta-aineen tai antigeenin määrittämiseen näytteestä. ELISA:sta on useita variaatioita, kuten suora, kilpaileva ja sandwich [19.] RANDOX:in biosiruteknologia perustuu kilpailevaan ELISA-menetelmään [1, s. 1].

Suorassa ELISA-menetelmässä tutkittava analyytti tarttuu vasta-aineeseen, joka on kiinnitetty ELISA-levylle (kuva 1). Muodostuneeseen yhdistelmään linkitetään toinen vasta-aine, indikaattori. Mikäli näytteessä ei ole tutkittavaa analyyttiä, toinen vasta-aine huuhtoutuu pois pesussa. Jos analyyttiin on linkittynyt toinen vasta-aine, yhdiste muodostaa substraatin lisäyksen jälkeen mitattavan valon, joka kuvastaa analyytin konsentraatiota alkuperäisessä näytteessä. [19.]

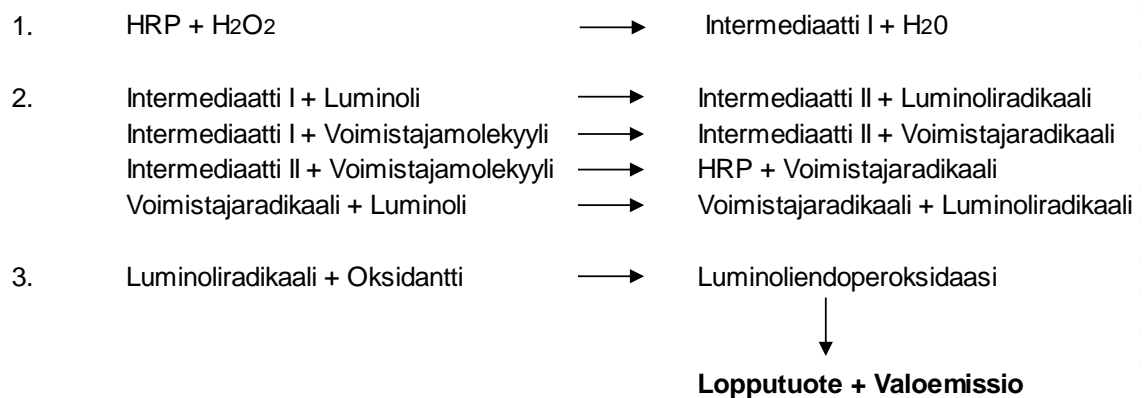
Kilpailevassa ELISA-menetelmässä levylle, tässä menetelmässä biosirulle, on kiinnitetty vasta-aine. Vasta-aine tunnistaa sekä tutkittavan analyytin että lisättävän konjugaatin, joka on indikaattori leimattu analyytti (kuva 1). Näytteen sisältämä analyytti kilpailee konjugaatin kanssa kiinnittymisestä vasta-aineeseen. Kun sirulle lisätään luminolia, joka hapettuu peroksidaasin toimesta tuottaen valoemissiota, voidaan valon tuotosta laskea analyytin määrä alkuperäisessä näytteessä. Toisin kuin suorassa ELISA-menetelmässä, valon määrä laskee tutkitun analyytin konsentraation noustessa. Kilpailevaa ELISA-menetelmää käytetään usein havaitsemaan molekyylejä, joilla on matala molekyylipaino ja vähän funktionaalisia ryhmiä, joihin vasta-aine voi sitoutua. [19.]



Kuva 1. Kilpaileva ELISA (vasemmalla) ja suora ELISA (oikealla). Kilpailevassa ELISA-menetelmässä näytteen sisältämä analyytti ja indikaattori leimattu konjugaatti kilpailevat kiinnittymisestä ELISA-levylle kiinnitettyyn vasta-aineeseen. Luminolin lisäys

aiheuttaa indikaattoriensyymien hapettumisen, jolloin syntyy mitattava luminesenssi emissio. Suorassa ELISA-menetelmässä tutkittava analyytti kiinnittyy levyille immobilisoituun vasta-aineeseen. Muodostuneeseen yhdisteeseen linkitetään indikaattoriensyymi. Analyytin tarttumaton indikaattoriensyymi huuhtoutuu pesussa pois, kiinni jäänyt muodostaa substraatin lisäyksen ansiosta mitattavan valon. Kilpailevassa ELISA-menetelmässä valon määrä laskee analyytin määrän kasvaessa, suorassa ELISA-menetelmässä valon määrä päinvastoin nousee analyytin määrän kasvaessa. [19.]

Analyytin määrittäminen näytteestä perustuu ELISA-menetelmissä kemiluminesenssin mittaamiseen. Kemiluminesenssi mekanismi perustuu hapetus-pelkistysreaktioihin, jotka tuottavat vapaita radikaalikomponentteja ja valoemissiota. Piparjuuriperoksidaasi (Horseradish Peroxidase, HRP) reagoi peroksidin kanssa, jolloin muodostuu intermediaatti I, joka reagoi luminolin (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftaaliatsiinidioni) kanssa muodostaen luminoliradikaalin, joka hajoo oksidaasin toimesta 428 nm:n pituiseksi valoksi. Voimistajamolekyylit regeneroivat vapaita radikaaleja, jotka avustavat kemiluminesenssi reaktiota [3; 19, s. 29.] Kemiaaliset reaktiot kokonaisuudessaan etenevät seuraavasti:



Tehostettu kemiluminesenssi parantaa biosirujen pinnoilla olevien pienten testialueiden sensitiivisyyttä ja näin analyysin tarkkuutta [19, s. 29].

#### 4.2 Randox Growth Promoter Multiple Matrix Screen (GPMMS) -menetelmä

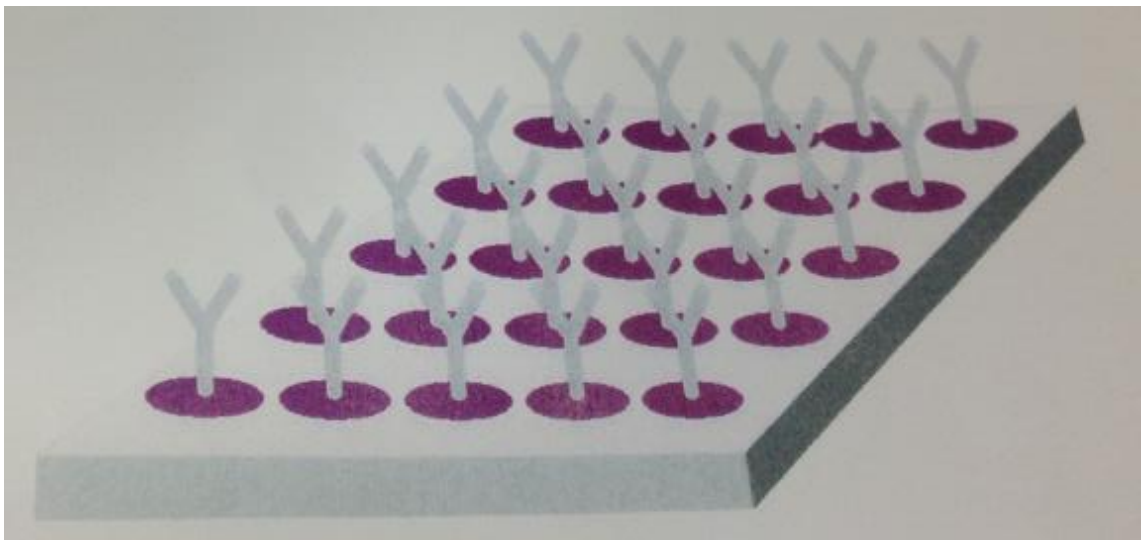
Randoxin valmistama Evidence Investigator on biosiruanalyysille kehitetty analyysaattori, joka yhdistää immunoanalyysin ja molekyyli diagnostiikan yhdelle alustalle. Yhdistettynä Randoxin kehittämään Biochip Array -teknologiaan Evidence Investigatorilla voidaan määrittää samanaikaisesti rinnakkain kvantitatiivisesti useita analyyttejä samasta näytteestä. Analyysaattorilla voidaan tutkia useita eri matriiseja, kuten rehua, virtsaa ja

kudosta. [1, s. 1.] Laite on CE-sertifioitu, ja se täyttää standardin EN 61326:2006 mukaiset vaatimukset elektroniselle laitteelle mittaukseen, kontrolliin ja laboratorio käyttöön [19, s.14].

Laitteeseen yhdistetään sopivat biosirut riippuen tutkittavasta analyytistä [1, s. 1]. Evidence investigatoria ja biosiruja käytettiin tässä työssä kasvunedistäjäpitoisuuksien määrittämiseen lihakudoksenäytteistä. Työssä Growth Promoter Multiple Matrix Screen (GPMMS) -siruja, jotka on suunniteltu kasvunedistäjien seulontaan.

### 4.3 Biosirut

Biosiruteknologian perustana ovat 9 x 9 mm:n biosirut, jotka toimivat kiinteän faasin alustoina. Siruilla on valmiina joukko erillisiä testialueita, jotka tässä tapauksessa sisältävät kasvunedistäjille spesifisiä immobilisoituja vasta-aineita (kuva 2). Siruilla on oma testialue jokaiselle mitattavalle analyytille. [18.]

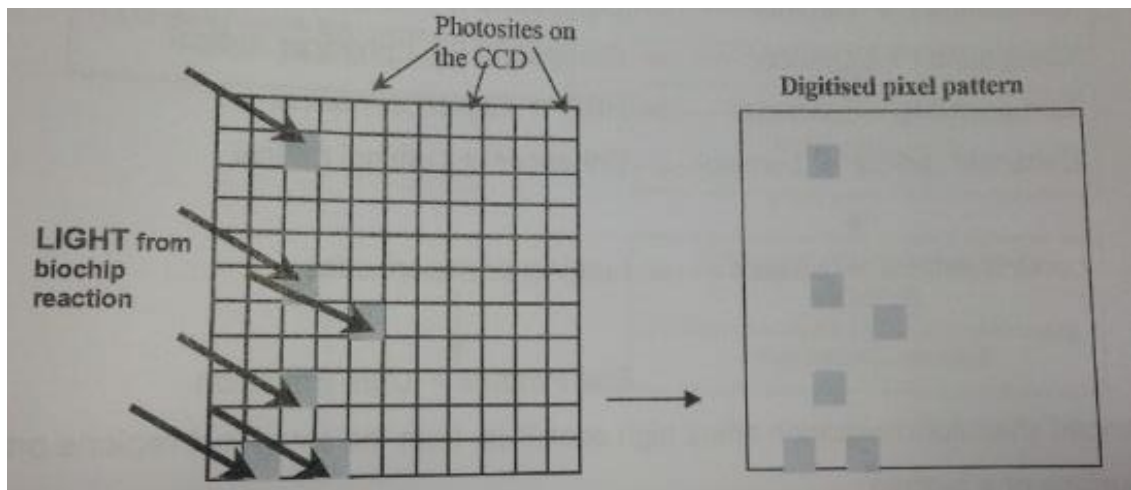


Kuva 2. Biosirun pinta toimii kiinteän faasin alustana, jossa on kiinnitettynä erillisille testialueille immobilisoituja kasvunedistäjille spesifisiä vasta-aineita. Jokainen testialue tunnistaa omaa analyyttiään. [18, s. 20.]

Yhtä sirua voidaan käyttää yhden näytteen mittaamiseen, tuottaen kerralla yhdeksän testitulosta. Sirun pinta on päällystetty kemiallisesti käyttäen Randoxin patentoimaa silanointiprosessia, jonka tarkoitus on mahdollistaa testien yhdenmukaisuus ja uusittavuus sekä vasta-aineiden kontrolloitu kiinnittyminen. Jokaisella biosirulla on sisäisiä kontrollipaikkoja, joille on asetettu tietyt kohdetasot tunnistamaan mahdollisia ongelmia. Jos

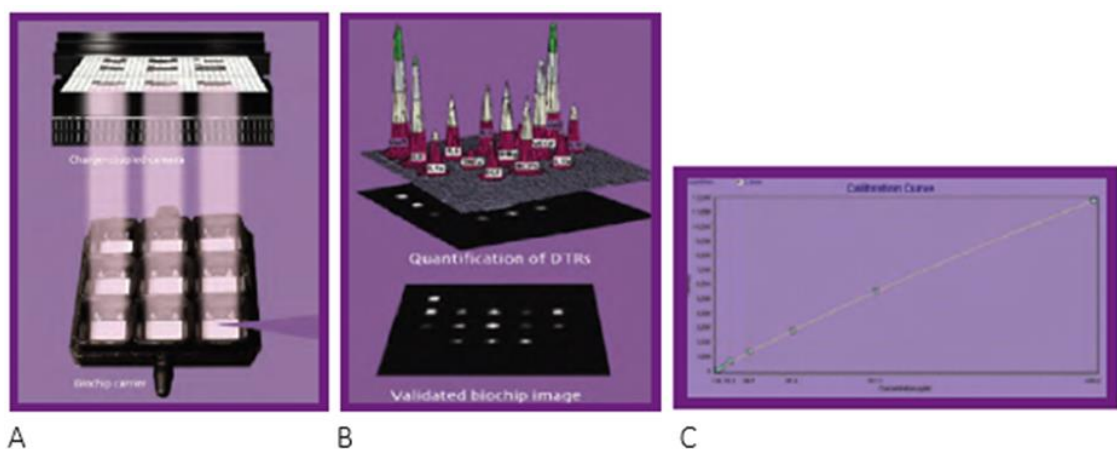
kontrollipaikkojen tasot ovat määritetyn kohdepitoisuuden ulkopuolella, mittaustuloksen sijaan menetelmä antaa virhekoodin, joka kertoo epätarkasta tuloksesta. [20.]

Tulosten määrittäminen biosirulta perustuu indikaattoriensyömiin katalysoimaan kemialliseen reaktioon, jossa syntyy kemiluminesenssisignaali. Kemiluminesenssi reaktion emittoima valo sirun testialueilta havaitaan ja mitataan Charge-Coupled Device (CCD) -kameralla. Kemiluminesenssisignaalin muuntaminen digitaalseksi kuvaksi esitetään kuvassa 3. [18.]



Kuva 3. Biosirujen lukeminen perustuu indikaattoriensyömiin katalysoimaan kemialliseen reaktioon, joka synnyttää kemiluminesenssisignaalin. Signaali havaitaan ja mitataan pikseleittäin CCD (Charge-Coupled Device) -kameralla ja muutetaan digitaalseksi kuvaksi. [18.]

CCD rakentuu toisiaan lähellä sijaittujen polysilikonisiirtoelektrodien paneeleista, jotka on pinnoitettu silikonisubstraatille ja eroteltuina oksidieristekerroksella. CCD-kamerassa on valoherkkiä diodeja, jotka muuntavat kemiluminesenssisignaalin biosirun testialueilta elektroniseksi varaukseksi jokaisessa CCD-kameran pikselissä. [18.] Varauksen määrä muutetaan tietokoneohjelmalla analyysin konsentraatioksi kuvan 4 mukaan.



Kuva 4. Biosirujen analysointi CCD-kameralla vaiheittain. Varauksen määrä pikseleissä muunnetaan valon intensiteetin mukaan elektroniseksi signaaliksi (A). Pikseleistä tuotetaan

valoemission määrän mukaan kuva, jolle suoritetaan kuva-analyysejä signaalituoton kvantifioinniksi (B). Lopuksi kalibroitikäyrää hyödyntäen tutkitun analyytin konsentraatio määritetään tietokoneohjelmalla (C). [19.]

Varauksen määrä pikseleissä muunnetaan elektroniseksi signaaliksi, joka kuvaa havaittua valon intensiivisyyttä (kuva 4 A). Valoemission määrän mukaan jokaisesta pikselistä tuotetaan kuva, jolle suoritetaan kuva-analyyseja signaalituoton kvantifioinniksi (kuva 4 B). Lopuksi tietokoneohjelma määrittää kalibroitikäyrän avulla tutkitun analyytin konsentraation alkuperäisestä näytteestä (kuva 4 C). [19, s. 30.]

#### 4.4 Näytteet ja spiikkaus

Menetelmän ensisijaiseksi käyttötarkoitukseksi oli suunniteltu kasvunedistäjien määrittäminen lihasta, joten validointi suoritettiin käyttäen matriisina lihaa. Menetelmän käyttöönottovaiheessa matriisina käytettiin myös virtsaa, koska virtsalle ja lihalle vaadittiin erilaiset esikäsittelyt, ja työssä haluttiin kerätä tietoa koko menetelmän käytettävyydestä. Validoinnissa käytettiin 22 eri lihanäytettä (taulukko 2), jotka ostettiin tarkoitusta varten helsinkiläisistä elintarvikekaupoista. Näytteistä kaksi olivat poikkeuksellisesti Eviraan tulleita rajavalvontanäytteitä.

Taulukko 2. Validoinnissa käytetyt näytteet ja niiden alkuperämaat.

Eläin	Alkuperämaa
Kalkkuna	Puola, pakaste
Broileri	Liittua, pakaste Ranska, rintafilee
Ankka	Ranska, rintafilee
Nauta	Uusi-Seelanti, pakaste Uruguay, rajavalvontanäyte Australia, sisäpaisti Australia, flank steak Brasilia, ulkofilee Saksa, jauheliha Saksa, palapaisti Saksa, sisäpaisti Alankomaat, vasikan kyljys Alankomaat, vasikan sisäpaisti Alankomaat, sisäpaisti
Sika	Espanja, pakaste Saksa, kinkkusuikale Tanska, sisäfilee
Härkä	Uusi-Seelanti, kassler Uruguay, ulkofilee
Hevonen	Argentiina, rajavalvontanäyte
Jänis	Uruguay, paisti

Näytteitä spiiattiin GPMMS-kitin positiivisella kontrollilla, joka sisälsi tunnetut määrät kaikkia tutkittuja kasvunedistäjiä (taulukko 3). Spiikkaus tarkoittaa tutkitun analyytin lisäämistä tunnetussa pitoisuudessa näytteeseen, jotta voidaan tarkastella menetelmän kykyä havaita sitä.

Menetelmän testaus aloitettiin spiiikaamalla näytteitä viidellä eri positiivisen kontrollin pitoisuudella (1:10, 1:20, 1:40, 1:100 ja 1:1000), käyttäen laimenteena etanolia. Kun eri pitoisuuksien analysointi osoittautui toimivaksi, jatkettiin validointia käyttäen kolmea pienintä pitoisuutta. Validoinnin aika kuitenkin todettiin, ettei menetelmällä pystytä kaikkien analyyttien osalta havaitsemaan pienintä käytettyä pitoisuutta, joten validointia jatkettiin käyttäen vain toiseksi ja kolmanneksi pienimpiä pitoisuuksia.

Taulukko 3. Näytteiden spiiikkauksessa käytetyn Randox GPMMS -kitin positiivisen kontrollin ja sen laimennosten sisältämät ilmoitetut kasvunedistäjäpitoisuudet.

Kasvunedistäjä	Pitoisuus ppb, positiivinen kontrolli	Pitoisuus 1:40, ppb	Pitoisuus 1:100, ppb	Pitoisuus 1:1000, ppb
Boldenoni	47,78	1,19	0,48	0,048
Zeranoli	61,99	1,55	0,62	0,062
Raktopamiini	58,18	1,45	0,58	0,058
Deksametasoni	48,03	1,20	0,48	0,048
Nandroloni	120,99	3,02	1,21	0,120
Heksestrol	56,54	1,40	0,57	0,056
Trenbloni	58,36	1,45	0,58	0,058
Stanozololi	54,91	1,35	0,55	0,055
Klenbuteroli	46,10	1,15	0,46	0,046

Kasvunedistäjäpitoisuuksia haluttiin pystyä havaitsemaan puolet annetuista seulonnan kohdepitoisuuksista. Pienin pitoisuus 1:1000 valikoitiin klenbuterolin STC:n mukaan (0,05 ppb), toiseksi pienin 1:100 muiden analyyttien STC:n (0,5 ppb) mukaan. Suurin pitoisuus 1:40 oli vaadittu kohdepitoisuus (1 ppb) muille kuin klenbuterolille.

Näytteiden spiiikkaus toteutettiin homogenisoimalla liha mahdollisimman pieneksi yleiskoneella, minkä jälkeen yhteen grammaan näytettä pipetoitiin 50 tai 100 µl kasvunedistäjäliuosta, riippuen halutusta pitoisuudesta. Spiikattu näyte sekoitettiin hyvin käyttäen koeputkiravistelijaa. Näytteet spiiattiin aina samana päivänä kuin ne esikäsiteltiin, jotta yhdisteitä ei hajoaisi ennen analysointia. Spiikattujen näytteiden annettiin seistä jääkaapissa noin 15 minuuttia ennen esikäsitelyä jatkamasta. Jokaisesta spiiikatusta näytteestä esikäsiteltiin ja analysoitiin myös nollanäyte.

#### 4.5 Kitit

Randoxin Evidence Investigator GPMMS EV3726 -kitti on tarkoitettu kasvunedistäjien havaitsemiseen kudosisäily- ja virtsanäytteistä, jotka esikäsitellään ja puhdistetaan ensin Randoxin Growth Promoters Immunoaffinity Columns GP 1821 -kitin avulla.

Growth Promoter Multiple Matrix Screen (GPMMS) -kitti sisälsi

- GPMMS-biosirut vaunuissa, 6 x 9 kappaletta
- DIL ASY -analyysilaimenne, pH 8,0 puskuriliuos
- GPMMS konjugaattikonsentraatti, pH 7,2 puskuriliuos, joka sisältää kasvunedistäjille spesifisiä piparjuuriperoksidaasilla merkittyjä konjugaatteja
- DIL CONJ -konjugaattilaimenne, pH 8,0 puskuriliuos
- GPMMS-kalibraattorit, kitillä mitattavat kasvunedistäjät yhdeksässä eri konsentraatiossa
- LUM – EV841 -luminoli ja peroksidi
- pesupuskurikonsentraatti, pH 7,4
- GPR-positiivinen kontrolli, kitillä mitattavat kasvunedistäjät määritetyissä konsentraatioissa
- Rapid Urine Buf Rec -konsentraatti, jota ei käytetty tässä työssä.

Growth Promoters Immunoaffinity Columns -kitti sisälsi

- immunoaffiniteetti pylväät, 5 kappaletta
- pylväiden pesupuskuriliuos, 20-kertainen konsentraatti
- pylväiden varastointipuskuriliuos, 5-kertainen konsentraatti.

Lisäksi tarvittavat reagenssit ja varusteet:

- ionivaihdettu vesi
- 1 M natriumhydroksidi
- metanoli
- etanoli
- alumiinioksidi
- jääetikkahappo pH:n säätöön
- mikropipetit 20–200 µl, 30–300 µl ja 500–5000 µl
- sentrifugi, ravistelija, koeputkiravistelija ja typpihaihdutin
- -20 °C:n pakastin
- Randox-termosekoittaja biosiruille ja Evidence Investigator -lukulaite.

#### 4.6 Näytteiden esikäsittely ja puhdistus

Näytteet esikäsiteltiin ja puhdistettiin menetelmän kehittäjän tarjoamien ohjeiden (Randox Investigator EV3726 ja MANUAL GP 1821) mukaan. 1 g:aan homogenisoitua näytettä lisättiin 1 g alumiinioksidia parantamaan uuttoa. Näytteille suoritettiin kaksi kiinteä-nesteuuttoa käyttäen 99:1 metanoli/1 M natriumhydroksidia. Uutot käsittivät kahden minuutin ravistelun, 15 minuutin sekoittelun sekä 15 minuutin sentrifugoinnin nopeudella 3000 rpm. Uuttojen jälkeen supernatantit kerättiin talteen ja yhdistettiin. Supernatantit pakastettiin kahdeksi tunniksi, minkä jälkeen niitä sentrifugoitiin 15 minuutin ajan nopeudella 3000 rpm. Supernatantit liuotettiin laimennettuun pylväiden pesupuskuriliuokseen suhteessa 1:9.

Uuttojen ja liuotuksen jälkeen näytteet puhdistettiin Randoxin immunoaffiniteettipylväillä. Affiniteettipylväiden käyttö vähentää analyysiin vaadittua aikaa ja puhdistaa näytteen. Pylväissä on 1 ml:n kerros geeliä, joka sisältää kasvunedistäjille spesifisiä immobilisoituja vasta-aineita. Geelikerroksen sitomiskapasiteetti on 25 ng tutkittavaa analyyyttiä kohden. [21, s. 3.]



Kuva 5. Näytteiden puhdistus immunoaffiniteettipylväillä toteutettiin käyttäen apuna laitteistoa, jossa nesteiden virtausta pystyttiin kontrolloimaan hanoilla ja tarvittaessa avustamaan virtausta alipainetta hyödyntäen.

Affiniteettipylväspuhdistuksessa käytettiin apuna kuvassa 5 näkyvää pylväslaitteistoa. Laitteistolla nesteiden virtausta saatiin kontrolloitua hanojen avulla ja tarvittaessa avustettua alipaineella, mikäli virtaus oli hitaampaa kuin maksiminopeus 2 ml/min. Pylväiden käyttö aloitettiin valuttamalla niistä pois varastointipuskuriliuos. Tyhjät pylväät pestiin ennen näytteen lisäystä valuttamalla niistä läpi 20 ml:a pylväspesupuskuria, 4 ml:a etanolia ja 5 ml:a ionivaihdettua vettä. Pylväisiin lisättiin 20 ml:a näytteitä, joissa ovat analyytit

sitoutuivat geelikerrokseen. Näytteen lisäyksen jälkeen pylväät huuhdottiin 8 ml:lla pylväsvesupuskuria, 5 ml:lla ionivaihdettua vettä ja 15 ml:lla 10:90 etanoli-vesiliuosta, minkä jälkeen näytteet kerättiin talteen etanolilla.

Talteen kerätyt näytteet haihdutettiin kuivaksi typpihaihduttimella 60 °C lämmössä 10 psi:n paineessa. Haihdutuksen jälkeen näytteet resuspensoitiin uudelleen 500 mikrolitraan Growth Promoter assay -diluuttia koeputkiravistelijan avulla, jolloin ne olivat valmiit biosiruille.

#### 4.7 Näytteiden analysointi

Näytteiden analysointi toteutettiin kuvassa 6 näkyvillä Randoxin biosiruilla sekä Evidence Investigator -lukulaitteella. Kilpailevan ELISAn analyysikierto oli seitsemän vaiheinen:

1. Reagenssin lisäys: Reaktiokaivoihin käänteispiipetoitiin 100 µl DIL ASY -analyysilaimennetta, varmistaen, että se levittyy tasaisesti koko pohjan alalle.
2. Näytteen lisäys: Kaivoihin pipetoitiin 100 µl näytettä tai positiivista kontrollia. Biosiruvaunua inkuboitiin termosekoittajassa 37 °C:ssa 30 minuuttia kierrosnopeudella 370 rpm.
3. Reagenssin lisäys: Kaivoihin käänteispiipetoitiin 100 µl konjugaattia.
4. Inkubointi: Biosiruvaunua inkuboitiin termosekoittajassa 37 °C:ssa 60 minuuttia kierrosnopeudella 370 rpm.
5. Pesu: Biosirut pestiin pesupuskuriliuoksella kuusi kertaa, joista neljä liotuksen kanssa.
6. Signaalin lisäys: Kaivoihin lisättiin 250 µl signaalin antavaa luminoli-peroksidiliuosta ja inkuboitiin kaksi minuuttia huoneenlämmössä valolta suojattuna.
7. Kuvannus: Biosiruvaunu siirrettiin lukulaitteeseen, jossa kemiluminesenssisignaali luettiin ja kvantifioitiin.



Kuva 6. Radox biosiruvaunu siruineen (vasemmalla) ja tietokoneeseen yhdistetty Evidence Investigator -lukulaite (oikealla). Biosirut toimivat alustana kilpailivalle ELISA:lle kasvunestäjäpitoisuuksien määrittämisessä näytteistä. Biosirut analysoidaan Evidence Investigator -lukulaitteella, joka siirtää datan siihen liitettyyn tietokoneeseen.

Lukulaite siirsi tulokset suoraan siihen liitettylle tietokoneohjelmalle, josta tuloksia pystyttiin tarkastelemaan valittu näyte kerrallaan (kuva 7). Tulokset esitettiin yksikössä ppb/alukuperäinen näyte. Laimennuskerroin (DFactor, dilution factor) otti huomioon käytetyn näytematriisin, kalibrintiliuoksen tai kontrollin laimennussuhteen. Mikäli lukulaite ei pystynyt tuottamaan tulosta näytteelle, se antoi virhekoodin, joka kertoi syyn mittaus tuloksen puuttumiseen.

#### -Selected Samples Results View

Sample Code : Sample 1, A spiked

Date : 10/26/2017 13:04:07

Analyte	Units	Result	Error	DFactor
BOLDENONE	ppb	0.53	0	2.5
ZERANOL	ppb	0.61	0	2.5
RACTOPAMINE	ppb	0.28	0	2.5
CORTICOSTEROIDS	ppb	0.46	0	2.5
MANDROLONE	ppb	1.27	0	2.5
STILBENES	ppb	0.51	0	2.5
TRENBOLONE	ppb	0.45	0	2.5
STANZOLOL	ppb	0.38	0	2.5
BETAAGONISTS	ppb	0.00	0	2.5

Kuva 7. Evidence Investigator -ohjelman tulosten tarkastelu -näkökulma. Evidence Investigator -lukulaite siirtää datan siihen liitettyyn tietokoneeseen ja datan lukemiseen kehitettyyn Evidence Investigator -ohjelmaan. Ohjelma kertoo tulokset analyteittäin yksikössä ppb, ilmoittaen myös käytetyn laimennuskertoimen (DFactor) sekä mahdollisen virhekoodin.

Ennen validointia menetelmä kalibroitiin käyttäen Evidence Investigator GPMMS -kitin kalibroitiliuoksia. Kalibrointi suoritettiin analysoimalla kalibroitiliuokset biosiruilla samalla tavoin, kuin näytteet. Kalibrointi toteutettiin yhdeksän pisteen kalibroitina ja hyväksyttiin, mikäli kuusi mitattua pistettä osui kalibroitisuoralle. Kaikissa validoinnin mitauksissa käytettiin samaa kalibroitisuoraa.

Validoinnissa mukana olleet näytteet esikäsiteltiin ja analysoitiin kuudessa erässä viiden viikon aikana. Saatu data kerättiin Exceliin jatkotarkastelua ja -käsittelyä varten.

#### 4.8 Datan analysointi

Evidence Investigatorilla saatu data analysoitiin käyttäen parametreina osoituskyky  $CC\beta$ :a, Cut off -tasoa ja arvoa, kynnsarvoa sekä saantoa.

Osoituskyky  $CC\beta$ :lla mitataan väärin negatiivisten tulosten suhdetta näytteiden kokonaismäärään. Mikäli tutkittaville analyyteille olisi asetettu MRL-rajat, voitaisiin  $CC\beta$  laskea  $CC\alpha$ :n kautta seuraavilla kaavoilla:

$$CC\alpha = MRL + 1,64 \times SD_{MRL} \quad (1)$$

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times SD_{MRL}, \quad (2)$$

jossa  $\alpha$ -virhe kuvaa vääriä positiivisia ja  $\beta$ -virhe vääriä negatiivisia tuloksia,  $SD$  on keskihajonta.

Tässä työssä osoituskykyä ei voitu laskea sille osoitetulla kaavalla, sillä analyyteille ei ole asetettu MRL-rajaja, vaan se määritettiin laskemalla väärin negatiivisten tulosten prosentuaalinen osuus kaikista tuloksista. Sallittu väärin negatiivisten tulosten määrä seulontamenetelmille on yleensä alle 5 %.

Cut off -arvo määritetään spiikattujen näytteiden mittaustuloksista käyttäen hyväksi keskiarvoa ja keskihajontaa. Kilpailevassa ELISA:ssa, jossa tuotettu signaali laskee mitatun pitoisuuden noustessa, Cut off -arvo lasketaan kaavalla:

$$Fm = \frac{x^1 + \dots + x^n}{n} + 1,64 \times SD, \quad (3)$$

jossa  $x$  on spiikatun näytteen mittaustuloksen arvo,  $n$  havaintojen lukumäärä ja  $SD$  spiikattujen näytteiden mittaustulosten keskihajonta.

Cut off -arvo boldenonille pitoisuudelle 0,5 ppb laskettiin seuraavasti:

$$Fm_{\text{Boldenoni}} = \frac{8,8946}{22} + 1,64 \times 0,3320 \approx 0,979$$

Mikäli kyseessä olisi menetelmä, jossa signaalin tuotto nousee pitoisuuden kasvaessa, käytettäisiin laskukaavassa ynnäyksen sijaan vähennystä:

$$Fm = \frac{x^1 + \dots + x^n}{n} - 1,64 \times SD$$

Cut off -tason määrittämisellä pyritään minimoimaan väärin positiivisten ja negatiivisten tulosten määrä. Taso määritettiin vertailemalla suurinta nollanäytteestä mitattua pitoisuutta pienimpään spiikatun näytteen pitoisuuteen. Cut off -taso määritettiin erikseen molemmille käytetyille spiikkaustasoille. Mikäli matalin spiikatusta näytteestä mitattu pitoisuus on suurempi, kuin korkein nollanäytteestä mitattu pitoisuus, voidaan todeta, että kaikki tämän pitoisuuden ylittävät mittaustulokset ovat oikeita positiivisia, Cut off -tasoksi ilmoitetaan matalin spiikatusta näytteestä mitattu tulos.

Kynnysarvo ( $Tm$ ) lasketaan nollanäytteiden keskiarvon ja keskihajonnan avulla kaavalla:

$$Tm = \frac{x^1 + \dots + x^n}{n} + 1,64 \times SD, \quad (4)$$

jossa  $x$  on nollanäytteen mittaustuloksen arvo,  $n$  havaintojen lukumäärä ja  $SD$  nollanäytteiden mittaustulosten keskihajonta.

Kynnysarvo boldenonille laskettiin seuraavasti:

$$Tm_{\text{Boldenoni}} = \frac{0,0360}{22} + 1,64 \times 0,0365 \approx 0,089$$

Saanto kertoo, kuinka suuren osan näytteessä olevasta analyytistä menetelmä tunnistaa. Se määritetään mitatun pitoisuuden ja spiikatun pitoisuuden suhteesta. Tässä työssä spiikkaus suoritettiin menetelmän valmistajan tarjoamalla positiivisella kontrollilla, jolle oli määritetty analyyttien pitoisuudet. Käytännössä positiivisen kontrollin sisältämät

analyttipitoisuudet olivat ilmoitettuja pienemmät, joten spiikkauspitoisuudet korjattiin seuraavan kaavan mukaan:

$$C_{korjattu} = \frac{PC_t}{PC_m} \times C_t, \quad (5)$$

jossa  $PC_t$  on positiiviselle kontrollille ilmoitettu teoreettinen arvo,  $PC_m$  positiivisen kontrollin menetelmällä mitattu arvo, ja  $C_t$  näytteeseen spiikattu teoreettinen pitoisuus.

Kun spiikkauspitoisuus oli laskennallisesti korjattu, siihen lisättiin mahdollinen nollanäytteen pitoisuus, jotta se ei vaikuttaisi saannon määrään. Prosentuaalinen saanto laskettiin kaavalla

$$Saanto\% = \left( \frac{c_m}{c_k} + x_0 \right) \times 100, \quad (6)$$

jossa  $c_m$  on näytteestä mitattu pitoisuus,  $c_k$  korjattu spiikkauspitoisuus, ja  $x_0$  nollanäytteestä mitattu pitoisuus.

Mikäli korjattua spiikkausta ja nollanäytteen tuloste ei olisi huomioitu, olisi saanto laskettu teoreettisella spiikkauspitoisuudella ja mitatulla pitoisuudella käyttäen kaavaa

$$Saanto\% = \left( \frac{c_m}{PC_t} \right) \times 100 \quad (7)$$

Mikäli näytteistä olisi tehty rinnakkaisia testejä, voitaisiin menetelmän toistettavuudesta tehdä päätelmiä laskemalla variaatiokerroin spiikattujen tulosten keskihajonnan ja keskiarvon avulla. Toistoja tehtiin kuitenkin vain yhdestä näytteestä, joten menetelmän toistettavuutta ei voida luotettavasti määrittää, mutta ne on huomioitu tuloksissa.

## 5 Tulokset

Tuloksissa huomioitiin spiikkauksessa käytetyn positiivisen kontrollin sisältämät todellista matalammat pitoisuudet. Positiivisen kontrollin sisältämät kasvunedistäjäpitoisuudet korjattiin laskennallisesti vastaamaan todellisia arvoja (Taulukko 4). Todelliset arvot olivat oletettuja noin 30 % pienemmät.

Taulukko 4. Korjatut spiikkauspitoisuudet kahdelle pitoisuudelle analyteittäin.

Kasvunedistäjä	Ilmoitettu pitoisuus 1:40	Todellinen pitoisuus 1:40	Ilmoitettu pitoisuus 1:100	Todellinen pitoisuus 1:100
Boldenoni	1,2	0,8	0,5	0,3
Zeranol	1,6	1,1	0,6	0,4
Raktopamiini	1,5	1,0	0,6	0,4
Deksametasoni	1,2	1,0	0,5	0,4
Nandroloni	3,0	1,8	1,2	0,7
Heksestroli	1,4	1,0	0,6	0,4
Trenboloni	1,5	1,2	0,6	0,5
Stanozololi	1,4	0,9	0,6	0,4
Klenbuteroli	1,2	0,7	0,5	0,3

Yksi seulontamenetelmän tärkeimmistä ominaisuuksista on matala väärin negatiivisten mittaus. Vääriä negatiivisia tuloksia olivat tässä testissä kaikki spiikkattujen näytteiden tulokset, jotka olivat alle korkeimman nollanäytteistä mitatun tuloksen. Vääriksi negatiivisiksi todettujen näytteiden määrät on kirjattu taulukkoon 5. Tarkastelussa ei otettu huomioon kolmea pienimmällä pitoisuudella spiikkattua näytettä, jotka alittivat reilusti niille asetetut rajat. Tutkituista yhdeksästä analyytistä vääriä negatiivisia tuloksia saatiin nandrolonille, heksesterolille, stanozololille ja klenbuterolille.

CC $\beta$  mittaa menetelmän osoituskykyä. Jos kaikki tämän testin spiikatut näytteet ovat positiivisia, analyytin CC $\beta$  on pienempi kuin spiikkaustaso, ja  $\beta$ -virhe alle 5 %. Mikäli CC $\beta$  on suurempi kuin spiikkaustaso,  $\beta$ -virhe on yli 5 %, eikä osoituskykyä voida todeta käytetylle pitoisuudelle. Taulukossa 5 on kerrottu menetelmän osoituskyky ja  $\beta$ -virhe, käyttäen rajana viittä prosenttia. Kun  $\beta$ -virhe ylittää sille sallitun 5 %, ei osoituskykyä voida määrittää, eikä tarkan  $\beta$ -virheen määrittästä ole tarpeen laskea.

Cut off -taso, eli pienin arvo tietylle spiikkaukselle, joka ylittää nollanäytteiden tulokset, määritettiin kahdella eri pitoisuudella (noin 1 ja 0,5 ppb, taulukko 5). Boldenonille, raktopamiinille, deksametasonille ja trenbolonille taso määritettiin matalammalla pitoisuudella (0,5 ppb), eikä niille mitattu yhtään väärää negatiivista tulosta. Zeranolille, nandrolonille

ja stanozololille Cut off -taso määritettiin korkeammalla spiikkauspitoisuudella (1 ppb), eikä niistä sillä pitoisuudella mitattu vääriä negatiivisia tuloksia. Heksestrolille ja klenbuterolille tasoa ei pystytty määrittämään, niille mitattiin myös useita vääriä negatiivisia molemmista pitoisuuksista.

Taulukko 5. Näytteiden väärin negatiivisten määrät,  $\beta$ -virheet sekä Cut off -tasot määritettynä kahdella pitoisuudella (1 ppb ja 0,5 ppb).

Kasvunestäjä	Väärät negatiiviset (1 ja 0,5 ppb)	CC $\beta$	$\beta$ -virhe	Cut off -taso (0,5 ppb)
Boldenoni	0	< 0,296	< 5 %	0,17
Raktopamiini	0	< 0,391	< 5 %	0,18
Deksametasoni	0	< 0,371	< 5 %	0,24
Trenboloni	0	< 0,460	< 5 %	0,23
Kasvunestäjä	Väärät negatiiviset (1 ppb)	CC $\beta$	$\beta$ -virhe	Cut off -taso (1 ppb)
Zeranol	0	< 0,420	< 5 %	0,24
Nandroloni	0	< 0,645	< 5 %	0,87
Stanozololi	0	< 0,349	< 5 %	0,32
Kasvunestäjä	Väärät negatiiviset (1 ja 0,5 ppb)	CC $\beta$	$\beta$ -virhe	Cut off -taso
Heksestrol	10		> 5 %	ei määritetty
Klenbuteroli	5		> 5 %	ei määritetty

Taulukossa 6 esitetyt keskiarvoja ja -hajontoja käytettiin hyväksi saantojen ja kynnysarvojen laskennassa. Spiikattujen näytteiden arvot on laskettu kahdelle eri spiikkaustasolle.

Taulukko 6. Spiikattujen sekä nollanäytteiden keskiarvot ja -hajonnat analyteittäin.

Kasvunestäjä	Spiikatut KA (1 ppb)	Spiikatut SD (1 ppb)	Spiikatut KA (0,5 ppb)	Spiikatut SD (0,5 ppb)	Nollanäytteet KA	Nollanäytteet SD
Boldenoni	0,6333	0,2073	0,4043	0,3320	0,0360	0,0365
Zeranol	0,7433	0,1984	0,3571	0,1467	0,0481	0,0365
Raktopamiini	0,5821	0,1819	0,2643	0,0721	0,0340	0,0598
Deksametasoni	0,6263	0,1106	0,3607	0,0903	0,0521	0,0381
Nandroloni	1,6675	0,8007	1,3186	0,8598	0,2600	0,1524
Heksestrol	0,4566	0,2404	0,3080	0,1832	0,2775	0,1443
Trenboloni	0,7288	0,1671	0,3586	0,0801	0,0257	0,0292
Stanozololi	0,4425	0,1007	0,2257	0,0580	0,0481	0,0610
Klenbuteroli	0,3217	0,1514	0,0871	0,0763	0,09	-

Väerien positiivisten määrä määritetään kynnsarvo (Tm) avulla (taulukko 7). Mikäli Tm on pienempi kuin Cut off -arvo, väerien positiivisten määrä on alle 5 %. Kaikkien, pois lukien klenbuteroli, tässä työssä mitattujen analytyttien kynnsarvot alittivat Cut off -arvot. Klenbuterolille kynnsarvoa ei pystytty määrittämään, koska sen nollanäytteiden tuloksia ei ollut tarpeeksi keskihajonnan laskemiseksi.

Taulukko 7. Näytteiden Cut off -arvot ja kynnsarvot (Tm) kahdelle pitoisuudelle analyteittäin.

Kasvunedistäjä	Cut off -arvo		Tm
Boldenoni	0,978	>	0,089
Zeranoli	0,598	>	0,108
Raktopamiini	0,383	>	0,132
Deksametasoni	0,509	>	0,115
Nandroloni	2,729	>	0,510
Heksestroli	0,608	>	0,514
Trenboloni	0,490	>	0,074
Stanozololi	0,321	>	0,148
Klenbuteroli	0,212		

Menetelmän keskimääräinen saanto oli analytyistä riippuen 41–100 %. Pienimmät saannot olivat heksestrolilla ja klenbuterolilla, joilla oli myös eniten vääriä negatiivisia. Keskimääräiset saannot on lueteltu taulukossa 8, josta näkyy myös saantojen hajonta.

Taulukko 8. Menetelmällä mitatut saantojen keskiarvot ja -hajonnat analyteittäin.

Kasvunedistäjä	Saanto % KA	Saanto % SD
Boldenoni	107	70
Zeranoli	87	74
Raktopamiini	61	17
Deksametasoni	75	20
Nandroloni	116	70
Heksestroli	56	41
Trenboloni	70	24
Stanozololi	57	20
Klenbuteroli	41	45

Saaduista tuloksista laskettiin myös havaitsemisraja LOD ja määritysraja LOQ, jotka on esitetty taulukossa 9. LOD on pienin pitoisuus, joka näytteestä voidaan luotettavasti todeta, LOQ mitattu pitoisuusalaraja, jolle voidaan esittää epävarmuusarvio. LOD on las-

kettu lisäämällä nollanäytteiden keskiarvoon kolminkertainen nollanäytteiden keskiarvo, LOQ on LOD kerrottuna kahdella. Rajoja ei pystytty määrittämään kaikille analyyteille. Nollanäytteiden vähäisten mittaustulosten ja semikvantitatiivisen menetelmän vuoksi LOD ja LOQ rajoja ei huomioitu tulosten tarkastelussa.

Taulukko 9. Menetelmällä mitatut havaitsemis- ja määritysrajat analyyteittäin.

Kasvunedistäjä	LOD ppb	LOQ ppb
Boldenoni	0,1424	0,2848
Zeranoli	0,1672	0,3344
Raktopamiini	0,0362	0,0724
Deksametasoni	0,1407	0,2814
Nandroloni	0,7470	1,4940
Heksestroli	0,7104	1,4208
Trenboloni	0,1149	0,2298
Stanozololi	0,1395	0,2790
Klenbuteroli	-	-

Yksi validoinnissa mukana olleista näytteistä (hollantilainen naudanliha) pystyttiin analysoimaan neljä kertaa, kolmena eri päivänä. Saaduille tuloksille laskettiin keskiarvon ja hajonnan perusteella variaatiokerroin, CV%, jota käytetään toistettavuuden mittaamisessa. Variaatiokerroin boldenonille oli 109 %, deksametasonille 69 %, nandrolonille 85 % ja trenbolonille 79 %. Mitä lähemmäs 100 % variaatiokerroin pääsee, sitä parempi on menetelmän toistettavuus.

## 6 Tulosten tarkastelu

Tämän insinööriyön tarkoitus oli tarkastella Randoxin biosiruteknologiaan perustuvan seulontamenetelmän sopivuutta kasvunedistäjien seulontaan lihamatriisista, ja alustavasti validoida se Eviran kemian yksikölle. Menetelmällä pystyttiin seulomaan samanaikaisesti ristireaktiot huomioiden 39 eri kasvunedistäjää yhdestä näytteestä, minkä vuoksi sillä oli potentiaalia nostaa Eviran valmiuksia analysoida kerralla suuria määriä näytteitä useiden kasvunedistäjien osalta.

Tulosten tarkastelussa ei otettu huomioon näytteitä, joille menetelmä ei antanut lainkaan tulosta. Väärien negatiivisten määrityksessä pois jätettiin myös näytteet, jotka oli spii-kattu matalimmalla pitoisuudella. Matalin spiikauspitoisuus oli selvästi alle menetelmältä vaadittujen suositusrajojen (CRL), pois lukien klenbuteroli.

Vääriä negatiivisia tuloksia mitattiin neljän analyytin, nandroloni, heksestroli, stanozololi ja klenbuteroli, osalta. Väärät negatiiviset tulokset tarkoittavat, ettei menetelmä kykene toteamaan vähintään kyseistä spiiikkausta vastaavia analyyttijämiä näytteestä. Nandrolonille ja stanozololille vääriä negatiivisia todettiin vain matalammalla pitoisuudella spiiikatuissa näytteissä, joten korkeammalla spiiikkauksella suoritettujen näytteiden tulokset olivat väärin negatiivisten osalta hyväksytyjä. Heksesterolille ja klenbuterolille ei pystytty määrittämään Cut off -tasoja, ja ne antoivat vääriä negatiivisia selvästi muita enemmän. Heksesterolin tuloksista lähes puolet olivat vääriä negatiivisia, klenbuterolin tuloksista neljännes. Mikäli menetelmä haluttaisiin validoida myös näiden analyyttien osalta, täytyisi se tehdä käyttäen suurempia pitoisuuksia.

Tutkituille analyyteille asetettu suositeltu tunnistusraja oli 1 ppb, josta haluttiin tunnistaa puolta pienempiä pitoisuuksia (0,5 ppb), poikkeuksena klenbuteroli, jonka tunnistusraja oli 0,1 ppb. Kaikki mitattujen näytteiden pitoisuudet olivat alle seulonnan kohdepitoisuuden 1 ppb, mutta lähelle 0,5 ppb pitoisuuksia löydettiin muutamista näytteistä. Saksalaisesta siasta mitattiin heksestroliä lähes 0,5 ppb, nandrolonia löydettiin saksalaisesta siasta ja australialaisesta naudasta yli 0,5 ppb. Vierasaïnevalvonnan seulonnassa nandrolonia sisältävät näytteet olisi todettu positiivisiksi, ja niiden tarkempi nandrolonipitoisuus olisi määritetty massaspektrometrisesti. Näytteistä mitatut pitoisuudet on esitetty taulukossa 10.

Menetelmällä havaitut pitoisuudet eivät kaikkien analyyttien osalta ole aina merkki laittomien kasvuedistäjien käytöstä lihantuotannossa. Testin vasta-aine nandrolonille (19-Nortestosteroni) ristireagoi luontaisen testosteronin kanssa, jota esiintyy muun muassa uros karjassa. Sen löytymiseen lihasta ei välttämättä ole rikkomus, vaan saattaa olla seuraus kastroimattomasta tai epäonnistuneesti kastroidusta eläimestä. Havaituille zearanoli jäämille saattaa myös olla luontainen selitys; menetelmä ei erota toisistaan syntetistä kasvunedistäjää ja luonnollista mykotoksiinia zearalenonea. Mykotoksiinia tuottava punahome *Fusarium* kasvaa usein eläimille syötetyssä rehussa, ja etenkin sateisina kesinä sitä löydetään myös paljon Suomesta. [3.]

Taulukko 10. Näytteistä mitatut kasvunedistäjäpitoisuudet yksikössä ng/g.

Näyte	Bolde- noni	Ze- ranoli	Rakto- pamiini	Dek- sameta	Nan- droloni	Hek- sestr.	Trenbo- loni	Stano- zololi	Klen- but.
Kalkkuna, PL				0,01					
Broileri, LT	0	0,03		0,05	0,29	0,14	0,04	0,02	
Nauta, NZ	0,02			0,05	0,13	0,26	0,02	0,05	
Sika, ES	0,06	0		0,03	0,03		0,01	0,01	
Vasikka, NL	0,025			0,05			0		
Vasikka, NL	0	0,07 5	0	0,1	0,325		0,025	0,05	
Härkä, NZ	0	0,02 5		0,075	0,25		0,025	0,025	
Härkä, UY		0,02 5	0	0,075	0,175		0	0,05	
Ankka, FR				0,03					
Broileri, FR				0,02					
Sika, DE	0,07	0,11	0,02	0,12	<b>0,52</b>	<b>0,48</b>	0,11	0,1	0,09
Nauta, DE	0,1	0,08	0,01	0,07	0,11	0,23	0,05	0,08	
Nauta, DE	0,08								
Nauta, DE									
Nauta, BR				0,01					
Sika, DK									
Nauta, AU	0			0,04	<b>0,54</b>		0		
Nauta, AU				0,03	0,42		0,02		
Nauta, NL				0,03	0,2		0		
Jänis, UY				0,03	0,23		0,02		
Hevonen, AR	0,04	0,04	0,14	0,15	0,3		0,04	0,21	
Nauta, UY				0,02	0,12				

Menetelmällä todetut osoituskyvyt boldenonille, raktopamiinille, deksametasonille, trenbolonille, zeranolille ja stanozololille olivat kaikki alle halutun rajan 0,5 ppb, sekä nandrolonille alle vaaditun 1 ppb. Kaikkien mainittujen analyyttien  $\beta$ -virheet olivat alle 5 %. Osoituskyvyn ja  $\beta$ -virheen osalta testattu menetelmä on sopiva näiden analyyttien seulontaan. Heksestrolille ja klenbuterolille osoituskykyä ei pystytty määrittämään, niiden  $\beta$ -virheet ylittivät 5 %:n rajan. Mikäli menetelmä haluttaisiin validoida myös niille, täytyisi validointia jatkaa suuremmilla spiikkauspitoisuuksilla, jotta osoituskyky pystyttäisiin vaaditusti todistamaan.

Cut off -tasolla määritetään se raja-arvo, jolla menetelmä erottaa positiivisen ja negatiivisen tuloksen. Cut off -tason ylittävät pitoisuudet voidaan tulkita positiivisiksi ja sen alittavat negatiivisiksi. Boldenonin, raktopamiinin, zeranolin, deksametasonin, trenbolonin ja stanozololin Cut off -tasot olivat alle tavoitellun seulonnan kohdepitoisuuden 0,5 ppb,

kun todellinen spiikkauspitoisuus oli 0,3–0,4 ppb, joten niiden osalta voidaan sanoa Cut off -tason olevan riittävä seulontamenetelmälle. Nandrolonin Cut off -taso ylitti suositellun tunnistuspitoisuusrajan (1 ppb), joten menetelmän ei voida varmuudella sanoa tunnistavan riittävän pieniä pitoisuuksia. Heksestrolille ja klenbuterolille Cut off -tasoa ei pystytty määrittämään, joten niiden osalta validointia tulisi jatkaa suuremmilla spiikkauspitoisuuksilla ja useammilla näytteillä, jotta taso pystyttäisiin määrittämään.

Väerien positiivisten määrä määritettiin kynnsarvon avulla. Väärät positiiviset tulokset tuottavat lisäkustannuksia, koska oikeasti negatiivisia näytteitä joudutaan tarkastamaan turhaan varmistusmenetelmällä. Mitä matalampi on väerien positiivisten määrä, sitä tehokkaampana voidaan seulontamenetelmää pitää ajan ja kustannusten osalta. Kaikkien tässä työssä mitattujen analyyttien kynnsarvot alittivat Cut off -arvot, mikä tarkoittaa, että menetelmä antaa tilastollisesti vääriä positiivisia alle 5 %.

Validoinnissa huomioitiin myös menetelmän antama saanto, joka kuvaa menetelmän tehokkuutta havaita tutkittua analyyttiä. Tällä menetelmällä saavutetut saannot lihalle olivat huomattavasti Eviralla käytössä olevia ELISA-menetelmiä korkeampia. Huonoimmat saannot saatiin heksestrolille, stanozololille ja klenbuterolille, joiden pitoisuuksista havaittiin keskimäärin vain puolet tai alle. Muiden analyyttien osalta saannot olivat hyviä. Saantoon vaikuttavat menetelmän havaitsemistarkkuuden lisäksi monet muut seikat, kuten esikäsitely, ristireaktiot, käytettyjen laitteiden kalibrointi ja mahdolliset epätarkkuudet pipetoinnissa.

Näytteiden esikäsitelyyn käytetyistä immunoaffiniteettipylväistä saanto vaihtelee analyytistä riippuen teoreettisesti 75 prosentista 100 prosenttiin, mikä saattaa yksin vähentää saantoa jopa neljänneksen. Tässä validoinnissa käytetyissä immunoaffiniteettipylväissä oli lisäksi menetelmän valmistajan ilmoittama vika, joka esti niiden käytön stanozololin osalta. Tämä vaikutti osaltaan stanozololin saantoon, jota ei voida pitää täysin luotettavana. Saantoa häiritsi myös positiivisen kontrollin käyttö spiikkauksessa; koska positiivisen kontrollin sisältämät pitoisuudet eivät vastanneet valmistajan antamia arvoja, täytyi niitä jälkeensä muuttaa korjauskertoimilla. Jälkikäteen tehdyt laskennalliset korjaukset tuovat aina epäluotettavuutta tuloksiin.

Klenbuterolin ja heksestrolin huonojen saantojen, väerien negatiivisten ja puuttuvien Cut off -tasojen vuoksi voidaan todeta, että menetelmä ei sovellu niiden seulontaan lihamat-

riisista. Menetelmällä ei myöskään pystytty toteamaan klenbuterolin suositeltua tunnistusrajaa 0,1 ppb vastaavia pitoisuuksia. Tässä työssä käytettyjen näytteiden määrä oli erittäin vähäinen, mikä osaltaan vaikutti tulosten tilastolliseen analysointiin. Luotettavampien tulosten ja kattavan validoinnin saamiseksi näytteiden ja rinnakkaisten mittausten määrää tulisi nostaa CRL ohjeiden mukaiseksi [15].

Validointi tulisi suorittaa erikseen jokaiselle tutkittavalle matriisille ja eläinlajille, jotta sitä voitaisiin pitää validina. Tämän menetelmän validoinnissa oli mukana usean eri eläimen lihaskudosnäytteitä, mikä saattoi vaikuttaa tuloksiin. Mittauksissa käytetyt nollanäytteet eivät myöskään olleet etukäteen tutkittuja ja nollanäytteiksi todettuja, mikä nosti hieman nollanäytteistä mitattujen pitoisuuksien keskiarvoja. Nollanäytteiden keskiarvoja käytettiin hyväksi kynnysarvojen ja väärin negatiivisten määrityksessä.

Mitattuihin pitoisuuksiin vaikuttivat osaltaan analyyttien väliset ristireaktiot. Menetelmän valmistaja on määrittänyt jokaiselle analyylille ristireaktion todennäköisyyden eri analyyttien kanssa, jotka saattavat olla muita menetelmällä mitattavia kasvunedistäjiä, tai analyytin kanssa rakenteeltaan hyvin samanlaisia yhdisteitä. Ristireaktiot saattavat aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia, mikäli mitatuksi analyytiksi mitataan muitakin yhdisteitä. Toisaalta ristireaktiot saattavat aiheuttaa myös vääriä negatiivisia, mikäli esimerkiksi trenboloni tulkitaan nandroloniksi eikä sen jäämiä näytteestä siksi havaita.

Validoinnissa tulisi ottaa huomioon myös menetelmän toistettavuus sekä uusittavuus. Tämä validointi suoritettiin lyhyessä ajassa, eikä kaikista näytteistä pystytty mittamaan rinnakkaisia tuloksia, joten uusittavuutta ei pystytty määrittämään. Suuntaa antava toistettavuus määritettiin yhdestä näytteestä, joka analysoitiin useamman kerran. Saaduista tuloksista laskettiin variaatiokertoimet boldenonille, deksametasonille, nandrolonille sekä trenbolonille. Kaikki variaatiokertoimet olivat lähellä 100 %, mikä indikoi menetelmän hyvästä toistettavuudesta, mutta luotettavan toistettavuuden määrittämiseen tarvittaisiin enemmän toistoja useammasta eri näytteestä.

## 7 Yhteenveto

Menetelmän testauksen parametreina käytettiin osoituskykyä, Cut off -tasoa, kynnyksarvoa ja saantoa. Osoituskyky boldenonille, zeranolille, deksametasonille, raktopamiinille, trenbolonille ja stanozololille oli hyvä, nandrolonille vaadittua korkeampi. Heksestrolille ja klenbuterolille osoituskykyä ei pystytty määrittämään, minkä lisäksi niille mitattiin useita vääriä negatiivisia tuloksia. Vääriä positiivisia oli kaikkien analyyttien osalta tilastollisesti alle 5 %, mikä on seulontamenetelmälle erittäin hyvä. Cut off -tasoa ei pystytty määrittämään heksestrolille ja klenbuterolille. Nandrolonille se oli vaadittua korkeampi, muille analyyteille alle vaaditun. Menetelmän saanto oli pääsääntöisesti erittäin hyvä.

Menetelmällä saatujen tulosten perusteella voidaan sanoa, että menetelmä soveltuu boldenonin, zeranolin, deksametasonin, trenbolonin, raktopamiinin ja stanozololin seulontaan lihamatriisista. Nandrolonin, klenbuterolin ja heksestrolin seulontaan menetelmä ei tämän työn perusteella sovellu. Jotta tuloksiin saataisiin enemmän tilastollista luotettavuutta, täytyisi validointia jatkaa useammilla eri näytteillä, suorittaa spiikkaus vain yhdellä spiikkauspitoisuudella, käyttäen nollanäytteinä tutkittuja negatiivisia näytteitä. Mittauksista tulisi suorittaa toistoja, myös pidemmällä aikavälillä, jotta voitaisiin todeta menetelmän toistettavuus ja uusittavuus.

Työn aikana kerättiin tietoa myös menetelmän käytettävyydestä. Huomattiin, että menetelmä on melko aikaa vievä ja työläs. Se ei täytä vaadittuja kriteerejä kaikkien analyyttien osalta, minkä lisäksi tutkittavien analyyttien joukosta puuttuu joitakin oleellisia aineita, kuten testosteroni. Menetelmän testausta jatketaan vielä uusilla näytteillä, ennen päätöstä sen kattavasta validoinnista ja käyttöönotosta.

## Lähteet

- 1 Growth Promoter Multiple Matrix Screen Evidence Investigator EV 3726. Laitte- ja menetelmäohje. Randox Laboratories Limited.
- 2 Malone, Edward; Elliot, C.T; Kennedy, D.G & Regan, L. 2009. Development of a rapid method for the analysis of synthetic growth promoters in bovine muscle using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 637, s. 112–120.
- 3 Jonsson, Martina. 2017. Tutkija, Evira, Laboratoriopalvelut, Kemian yksikkö, Helsinki. Keskustelu 13.10.2017.
- 4 Klenbuteroli. Verkkoaineisto. Dobinlinkki. <<https://dopinglinkki.fi/doping/dopingaineet/klenbuteroli>>. Luettu 26.9.2017,
- 5 Deca-Durabolin. Verkkoaineisto. terve.fi. <http://www.terve.fi/laakeopas/71995-deca-durabolin>>. Luettu 27.9.2017.
- 6 CRL Guidance paper. 2007. Ohjedokumentti. Community Reference Laboratories'.
- 7 Pleadin, Jelka; Vulic, Ana; Persi, Nina & Vahcic, Nada. 2010. Clenbuterol residues in pig muscle after repeat administration in a growth-promoting dose. *Meat Science*. Vol. 86, s. 733–737.
- 8 Dexamethasone. Verkkoaineisto. Drugs.com. <[www.drugs.com/vet/dexamethasone.html](http://www.drugs.com/vet/dexamethasone.html)>. Luettu 6.10.2017.
- 9 Echarte, Juan; Fernandez, Damian; Chiacchio, Carlos & Torres Leedham, Veronica. 2014. Comparison of a Validated LC/MS/MS Method with a Validated GC/MS Method for the Analysis of Zeranol and its Related Mycotoxin Residues in Bovine Urine Samples Collected During Argentina's Residue Monitoring Control Program (2005-2012). *Journal of AOAC International*. Vol. 97, No. 5.
- 10 Chen, Xuemin; Ma, Yanhui; Chen, Danchao; Ma, Ming & Li, Chunya. 2015. Electrochemical fabrication of polymerized imidazole-based ionic liquid bearing pyrrole moiety for sensitive determination of hexestrol in chicken meat. *Food Chemistry*. Vol. 180, s. 142–149.
- 11 Grönbladh, Alfild; Johansson, Jenny; Kushnir, Mark; Bergquist, Jonas & Hallberg, Mathias. 2013. The impact of nandrolone decanoate and growth hormone on biosynthesis of steroids in rats. *Steroids*. Vol. 78, s. 1192–1199.
- 12 Elmajdoub, Abdelrazzag; Garbaj, Aboubaker; Abolghait, Said & El-Mahmoudy, Abubakr. 2016. Evaluation of boldenone as a growth promoter in broilers: safety and meat quality aspects. *Journal of Food and Drug Analysis*. 24, s. 284–292.

- 13 Conneely, G.; O'Mahony, D.; Lu, H.; Guilbault, G. G. & Pravda, M. 2007. An Immunosensor for the Detection of Stanazolol in Bovine Urine. *Analytical Letters*. 40, s. 1280–1293.
- 14 Forsgren, Kristy; Qu, Shen; Lavado, Ramon; Cwiertny, David & Schlenk, Daniel. 2014. Trenbolone acetate metabolites promote ovarian growth and development in adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 202, s. 1–7.
- 15 Guidelines to validation of screening methods for residues of veterinary medicines. 2010. Ohjedokumentti. Community Reference Laboratories'.
- 16 Ehder, Tapio. 2005. Kemian metrologian opas. J6/2005. Metrologian neuvottelukunta, Kemian ja mikrobiologian jaosto, Kemian työryhmä. Helsinki.
- 17 Hirvelä-Koski, Varpu. 2012. Elisa-testien validointi käyttöönoton yhteydessä (eläintutkimukset). 2Toimintaohje. Evira.
- 18 Ketola, Raimo; Kostianen, Risto; Kotiaho, Tapio & Vainitalo, Pirjo. 2010. Massaspektrometrian perusteet. Helsinki: Hakapaino.
- 19 Evidence Investigator Operatot Manual. 2009. Laitteen käyttömanuaali. Randox Laboratories Limited.
- 20 Biochip Test Platform. Laite- ja menetelmäesite. Randox Laboratories Limited.
- 21 Manual GP 1821. 2017. Immunoaffiniteetti pylväiden ohjemanuaali. Randox Laboratories Limited.