



Kaseiinin määrittäminen elintarvikkeista

Tiia Ruohola

OPINNÄYTETYÖ
Huhtikuu 2022

Laboratoriotekniikka

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikka

RUOHOLA, TIIA:
Kaseiinin määrittäminen elintarvikkeista

Opinnäytetyö 53 sivua, joista liitteitä 4 sivua
Huhtikuu 2022

Opinnäytetyön toimeksiantaja oli KVVY Tutkimus Oy:n elintarvikekemian osasto Porin toimipisteessä. Opinnäytetyön tavoitteena oli sisäänajaa ja validoida menetelmä, jolla pystytään määrittämään kaseiinia erilaisista elintarvikkeista. Menetelmän sisäänajamisen ja validoinnin ansiosta KVVY Tutkimus Oy:n tarjoamien analyysipalveluiden valikoima laajeni ja he saivat käyttöönsä menetelmän elintarvikkeiden kaseiinijäämien analysoimiseen, mikä oli myös toimeksiantajan asiakkaan toive.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kaseiinin eli maitoproteiinin kvantitatiivinen määrittäminen kontrollinäytteestä ja elintarvikkeista kaupallisella Veratox for Casein Allergen -analyysipakkauksella. Menetelmää on tarkoitus käyttää erityisesti kaseiinijäämien määrittämiseen maidottomista elintarvikkeista. ELISA-menetelmää käyttäen mitattiin kuoppalevykijalla kaseiinipitoisuus erilaisista näytematriiseista. Menetelmän validoinnin tarkoituksena oli varmistaa menetelmän soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseen ja menetelmän antamien tulosten paikkansapitävyys.

Menetelmän sisäänajo ja validointi onnistuivat suunnitellusti. Validointiparametrejä olivat lineaarisuus, toteamis- ja määrittämiss raja, toistettavuus, oikeellisuus ja mittausepävarmuus. Kaikista saatiin hyväksyttävät tulokset. Kontrollinäytteen perusteella voitiin todeta, että menetelmä soveltuu hyvin tutkituille elintarvikkeille. Menetelmä voitiin ottaa käyttöön KVVY Tutkimus Oy:n laboratoriossa kaseiinipitoisuuden määrittämiseen.

Menetelmässä käytetty kontrollinäyte soveltui hyvin työhön, mutta sen kyky säilyttää kaseiinipitoisuutensa on huono. Menetelmää voisi jatkossa kehittää ottamalla kyseisen kontrollinäytteen rinnalle toinen näyte tai ottamalla käyttöön kokonaan uusi kontrollinäyte.

Luottamukselliset tiedot on ilmaistu julkisessa raportissa soveltuvin tavoin.

Asiasanat: kaseiini, maitoproteiini, elisa-määrittäminen, validointi

ABSTRACT

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

RUOHOLA, TIIA:
Determination of Casein in Food Products

Bachelor's thesis 53 pages, appendices 4 pages
April 2022

The client of the thesis was KVVY Tutkimus Oy's laboratory of food chemistry located in Pori. The aim of the thesis was to implement and validate a method that enables determination of milk casein in different kinds of food. The range of analysis services offered by KVVY Tutkimus Oy was expanded and they gained access to analyze casein residues in food, which was also the client's customer's wish.

The purpose of the thesis was to conduct a quantitative determination of casein, also known as milk protein, in food products with the help of the commercial Veratox for Casein Allergen analysis kit. The method created in this study will be used in future specifically for determination of casein residues in non-dairy foods. By using the ELISA method, the casein concentration of various sample matrices was measured with a microplate reader. The purpose of the validation was to ensure the suitability of the method for its intended use and the accuracy of the results obtained by the method.

The introduction and validation of this method were successfully completed as planned. The validation parameters included linearity, limit of detection and limit of quantitation, repeatability, trueness, and uncertainty. All results were acceptable. Based on the control sample, the method is very well suited for the foods analysed in this study. The method was taken in use in KVVY Tutkimus Oy's laboratory to determine the casein concentration.

The control sample used in this study was suitable for the method, but its ability to maintain its concentration is poor. The method could be further developed by taking another sample alongside the control sample or a completely new control sample.

Key words: casein, milk protein, elisa test, validation

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	7
2	KASEIINI.....	8
	2.1 Maidon proteiinkoostumus	8
	2.2 Kaseiinille ominaista.....	9
	2.3 Lehmänmaitoallergia	10
3	ELISA-MENETELMÄ	12
	3.1 ELISA-menetelmien periaate	12
	3.1.1 Suora ELISA-menetelmä.....	13
	3.1.2 Epäsuora ELISA-menetelmä	14
	3.1.3 Sandwich-ELISA-menetelmä.....	15
	3.2 Menetelmän häiriötekijöitä	16
	3.3 Kuoppalevyanalytiikka.....	17
	3.3.1 Kuoppalevylukijat.....	18
	3.3.2 Absorbanssimääritys	18
	3.3.3 Lambert-Beerin laki	19
4	VALIDOINTI.....	20
	4.1 Validoinnin tarkoitus	20
	4.2 Validointisuunnitelma- ja raportti	20
	4.3 Validointiparametrit	21
	4.3.1 Lineaarisuus	21
	4.3.2 Toteamis- ja määritysraja	23
	4.3.3 Toistettavuus	24
	4.3.4 Oikeellisuus	24
	4.3.5 Mittausepävarmuus	25
5	MITTAUS- JA MÄÄRITYSMENETELMÄT	27
	5.1 Näytteet.....	27
	5.2 Veratox for Casein Allergen -analyysipakkaus	27
	5.3 Analyysipakkauksen toimintaperiaate	29
	5.4 Kuoppalevylukija	30
6	TYÖN SUORITUS	31
	6.1 Liuosten valmistus.....	31
	6.2 Näytteen esikäsittely	31
	6.3 Analysointi.....	31
	6.4 Validoinnin suoritus	33
	6.4.1 Lineaarisuuden määrittäminen	34
	6.4.2 Toteamis- ja määritysrajan määrittäminen.....	34

6.4.3 Toistettavuuden määrittäminen	34
6.4.4 Oikeellisuuden määrittäminen	35
6.4.5 Mittausepävarmuuden määrittäminen.....	35
7 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	36
7.1 Näytematriisien tulokset	36
7.2 Validoinnin tulokset	37
7.2.1 Menetelmän lineaarisuus.....	37
7.2.2 Menetelmän toteamis- ja määrittämiss raja	40
7.2.3 Menetelmän toistettavuus.....	41
7.2.4 Menetelmän oikeellisuus	42
7.2.5 Menetelmän mittausepävarmuus.....	42
8 POHDINTA	44
LÄHTEET.....	47
LIITTEET	50
Liite 1. Standardien mittaustulokset	50
Liite 2. Nollanäytteen mittaustulokset.....	51
Liite 3. Elintarvikematriisien mittaustulokset.....	52
Liite 4. Kontrollinäytteen mittaustulokset.....	53

LYHENTEET JA TERMIT

AP	alkaalifosfataasi / alkaline phosphatase
ELISA	entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys / enzyme-linked immunosorbent assay
HRP	piparjuuren peroksidaasi / horse-radish peroxidase
Ig	immunoglobuliini / immunoglobulin
LOD	toteamisraja / limit of detection
LOQ	määritysraja / limit of quantitation
MUkit	mittausepävarmuusohjelmisto / measurement uncertainty kit
NFDM	rasvaton maitojauhe / non-fat dry milk
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos / phosphate buffered saline
RSD	suhteellinen keskihajonta / relative standard deviation
SYKE	Suomen ympäristökeskus
TMB	tetrametyylibentsidiini / tetramethylbenzidine
UHP-vesi	Milli-Q-vesi / ultra high purity

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö toteutettiin KVVY Tutkimus Oy:n elintarvikekemian osastolla Porin toimipisteessä. KVVY Tutkimus Oy on kotimainen ympäristötutkimusten ja laboratoriopalveluiden asiantuntija. KVVY:n laboratorio tarjoaa asiakkailleen monipuolisen analyysivalikoiman ympäristö-, elintarvike- ja asumisterveystutkimuksiin. Yritys halusi entisestään kasvattaa tarjoamiensa analyysipalveluiden määrää sisäänajamalla ja validoimalla menetelmän kaseiinin määrittämiseksi elintarvikkeista.

Maitoallergia on immunologinen vasta-ainereaktio, joka voi johtua vuorovaikutuksesta yhden tai useamman proteiinin sekä immuunimekanismin välillä. Maitoallergiassa ihminen on herkistynyt nimenomaan maidon proteiineille, joista suurin osa on kaseiineja. Kaseiinit ovat fosforipitoisia proteiineja, jotka ovat maidon määrällisesti tärkein proteiiniyhmä. Maitoallergiaa aiheuttavat elintarvikkeiden kaseiinijäämät pystytään havaitsemaan ELISA-menetelmällä. (Vaarala, Saukkonen, Savilahti, Klemola & Åkerblom 1995, 918; Hefle & Lambrecht 2004, 1934; Lucey & Horne 2018, 64.)

Opinnäytetyön tavoitteena on sisäänajaa ja validoida menetelmä kaseiinin määrittämiseen elintarvikkeista. Työn tarkoituksena on tutkia, miten kaseiinin määrittäminen onnistuu Veratox for Casein Allergen -analyysipakkauksella valituille kontrollinäytteille ja elintarvikematriiseille. Työssä käytetään ELISA-menetelmää ja mittaukset suoritetaan kuoppalevylukijalla. Validoinnin tarkoituksena on varmistaa menetelmän soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseen sekä menetelmän antamien tulosten paikkansapitävyys. Toimeksiantajalle tulee laatia lisäksi menetelmäohje sekä validointisuunnitelma ja -raportti.

Opinnäytetyö sisältää luottamuksellista tietoa, jota ei ole esitelty julkisessa versiossa. Luottamuksellisiksi tiedoiksi määriteltiin menetelmäohje ja elintarvikkeiden valmistajat.

2 KASEIINI

2.1 Maidon proteiinikoostumus

Maito sisältää runsaasti proteiinia (3–3,5 g/100 g). Proteiinit ovat tärkeitä ruokavalion ainesosia, koska ne ovat pääasiallinen typen ja välttämättömien aminohappojen lähde. Maitoproteiineilla on muihin proteiineihin verrattuna korkea ravintoarvo niiden suhteellisen korkean välttämättömien aminohappopitoisuuksien vuoksi. Maidon proteiinit jaetaan eri luokkiin niiden kemiallisten ja fysikaalisten ominaisuuksien tai biologisen tarkoituksen perusteella. (Thompson, Boland & Singh 2009, 1, 8.)

Suurin osa maidon proteiineista on kaseiineja. Kaseiinit ja heraproteiinit ovat maidon kaksi pääproteiiniryhmää. Kaseiinit edustavat noin 80 % maidon proteiinipitoisuudesta ja heraproteiinit noin 20 %. Loput proteiinit esiintyvät hyvin pieninä pitoisuuksina. (Ventimiglia & Birkenhäger 2012, 124.) Taulukossa 1 on esitetty proteiinien pitoisuudet ja osuudet lehmänmaidossa.

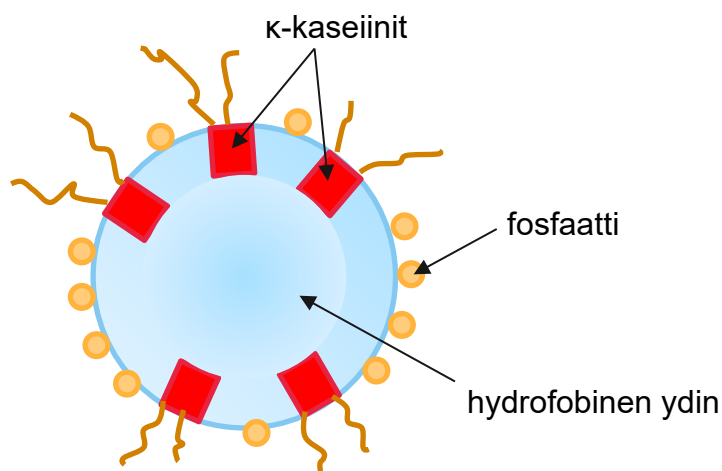
TAULUKKO 1. Proteiinien pitoisuudet ja osuudet maidossa (Bylund 1995, 23).

proteiini	pitoisuus (g/kg)	osuus (%)
α_{S1} -kaseiini	10,0	30,6
α_{S2} -kaseiini	2,6	8,0
β -kaseiini	10,1	30,8
κ -kaseiini	3,3	10,1
kokonaiskaseiini	26,0	79,5
α -laktalbumiini	1,2	3,7
β -laktoglobuliini	3,2	9,8
seerumin albumiini	0,4	1,2
immunoglobuliini	0,7	2,1
sekalaiset	0,8	2,4
kokonaishera	6,3	19,3
kalvoproteiinit	0,4	1,2
kokonaisproteiini	32,7	100

2.2 Kaseiinille ominaista

Kaseiini on juuri maidolle ominaista. Kaseiini syntetisoituu nisäkkäiden maitorauhassoluissa. Kaseiinin synteesiä ei ole havaittu muissa solutyypeissä. (Ventimiglia & Birkenhäger 2012, 2, 4.) Kaseiinit muodostavat maidossa ryhmän, joka sulkee sisäänsä rasvan ja antaa maidolle valkoisen läpinäkymättömän värin. Yhdessä kalsiumin ja fosforin kanssa kaseiini muodostaa kolloidisia suspensiorakenteita, joita kutsutaan kaseiinimiselleiksi. (Lucey & Horne 2018, 64.)

Kaseiinit jaetaan α_{S1} -, α_{S2} -, β - ja κ -kaseiineihin. Kaseiinifraktioiden osuudet kaseiinimiselleissä ovat tyypillisesti noin 37 %, 37 %, 13 % ja 13 %. Kaseiinifraktiolla on omat esiintymisalueensa misellissä. κ -kaseiini esiintyy misellin sisäosan hydrofobisella ja ulkopinnan hydrofiilisella alueella. Ulkopinnalla esiintyy myös polaarisia α - ja β -kaseiineja sekä fosfaattiosia, jotka osallistuvat kalsiumin sitomiseen ja kaseiinimisellin kuljettamiseen (kuvio 1). Misellit pysyvät yhdessä kalsiumfosfaattisidosten ja hydrofobisten vuorovaikutusten ansiosta. (Wal 2001, 36.)



KUVIO 1. Kaseiinin submisellin rakenne (Bylund 1995, 23).

Kaseiinit ovat fosforyloituneita proteiineja, joilla on vapaa tertiäärinen rakenne. Rakenne kestää hyvin lämpökäsittelyä, jonka vuoksi kaseiinit säilyttävät allergenisyytensä kuumentamisen tai muun käsittelyn jälkeenkin. Kaseiini on veteen lähes liukenematon. (Wal 2001, 36.)

2.3 Lehmänmaitoallergia

Lehmänmaitoallergiassa ihminen on herkistynyt nimenomaan maidon proteiineille, kun taas esimerkiksi laktoosi-intoleranssissa ihmisen elimistö ei pysty pilkkomaan maidon sokeria eli laktoosia. Näin ollen maitoallerginen ei voi käyttää laktoosi-intolerantille sopivia vähälaktoosisia tai laktoosittomia maitotuotteita vaan tarvitsee maidottomia tuotteita. (Ruokavirasto 2019, 206, 212; Ventimiglia & Birkenhäger 2012, 61.)

Allergeenit ovat ainesosia, jotka voivat aiheuttaa allergia- tai yliherkkyysoireita. Elintarvikkeissa allergioita aiheuttavat ainesosat tulee aina merkitä tuotteeseen. Elintarvikkeeseen voi kuitenkin joutua kontaminaationa allergisoivia ainesosia esimerkiksi käsistä, työvälineistä tai tuotantolinjalta. (Hefle & Lambrecht 2004, 1933.) Tällöin pakkauksessa tulisi olla merkintä ”Saattaa/voi sisältää pieniä määriä xxxx”. Merkintää ”maidoton” voidaan käyttää vain, jos elintarvikkeessa ei ole maitoa, maidon ainesosia eikä jäämiä maidosta. (Ruokavirasto 2019, 70, 212.)

Lehmänmaitoallergia on immunologinen vasta-ainereaktio, joka voi johtua vuorovaikutuksesta yhden tai useamman proteiinin sekä immuunimekanismin välillä. Maitoallergia kehittyy yleensä varhaisessa iässä. Altistuminen maidolle aiheuttaa terveelle imeväiselle immuunivasteen, johon kuuluu muunmuassa IgG- ja IgA-immunoglobuliiniluokan vasta-aineiden muodostuminen ja T-solujen herkistyminen maidon proteiineja kohtaan. (Vaarala ym. 1995, 918, 921.)

Tutkimusten mukaan lehmänmaitoallergiaa esiintyy noin 2 %:lla ihmisistä. Vaikka allergia maitoproteiineille saattaa olla ohimenevää ja hävitä ensimmäisten elinvuosien aikana, on todettu, että varhainen allerginen herkistyminen voi olla taustalla lisääntyneelle alttiudelle allergisille ilmenemismuodoille myöhemmässä vaiheessa. Geneettisten tekijöiden on tutkittu vaikuttavan maitoallergian kehittymiseen. (Mendoza 2016, 5, 78; Høst 2002, 33.)

Tutkimusten mukaan kaseiini ja β -laktoglobuliini ovat eniten lehmänmaitoallergiaa aiheuttavat proteiinit. Kaseiinin hydrofobinen alue, jossa tapahtuu eniten fosforyloitumista, on immunoreaktiivinen ja vastustuskykyinen ruuansulatuksen vaikutuksille. Maidon suuri allergeenipitoisuus eri proteiineissa on huomattava syy allergian aiheuttamisessa. Kaikki maidon proteiinit voivat aiheuttaa allergiaa, ja yleensä maitoallergikot ovatkin herkistyneitä useammalle eri proteiinille. (Wal 2001, 37.)

3 ELISA-MENETELMÄ

3.1 ELISA-menetelmien periaate

Entsyyvälitteinen immunosorbenttimääritys eli ELISA (enzymelinked immunosorbent assay) on herkkä ja spesifinen immunokemiallinen tekniikka, jota käytetään pääasiassa immunologiassa proteiinien, kuten vasta-aineiden tai antigeenien havaitsemiseen näytteestä. (Hefle & Lambrecht 2004, 1934.)

Antigeenit eli immunogeenit aiheuttavat elimistössä vasta-aineiden muodostumisen tai soluvälitteisen immuunivasteen. Vasta-aineet eli immunoglobuliinit (Ig) ovat immuunijärjestelmän puolustusmekanismeja, jotka havaitsevat antigeenejä. Tietyn antigeenin ja sen vasta-aineen tarttumistaipumus johtuu antigeenin rakenneosan eli epitopin sopivuudesta tiettyyn vasta-aineen rakenneosaan. Vasta-aineita on olemassa viisi erilaista immunoglobuliiniluokkaa (IgA, IgM, IgG, IgD ja IgE). (Mäkelä ym. 1993, 7, 12.)

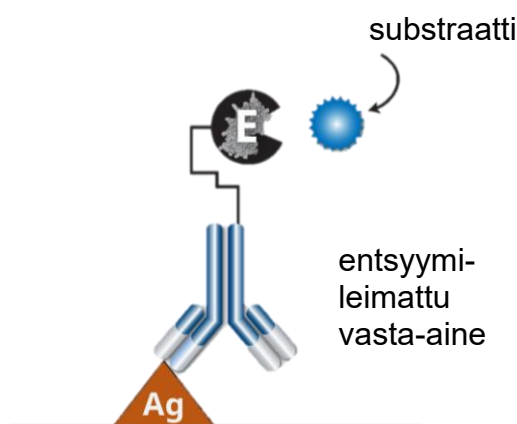
ELISA-menetelmä perustuu antigeeni-vasta-ainereaktioon. ELISA-menetelmässä kiinteälle pinnalle kiinnitetty antigeeni tai vasta-aine pystytään osoittamaan siihen sitoutuvan vasta-aineen tai antigeenin avulla. Kiinteänä pintana voidaan käyttää esimerkiksi muovista valmistettuja näytelevyjä (mikrotiitterilevyjä), kuten 96:n kuopan kuoppalevyjä. Antigeeni-vasta-ainereaktion tapahtuminen voidaan havaita vasta-ainevärijäyksenä, jossa mitataan värin absorboivia ominaisuuksia. Sitoutuneisiin antigeeneihin ja vasta-aineisiin lisätään konjugaatioliuosta, joka tuottaa leimaentsyymejä. Konjugaatiolla tarkoitetaan yhdisteiden sitoutumista toisiinsa. Leimaentsyymit kiinnittyvät vasta-aineisiin ja kun siihen lisätään substraattiliuosta, syntyy väriainereaktio. Väriainereaktiossa muodostuneen kompleksin avulla nähdään, tapahtuuko tutkittavassa näytteessä antigeenin läsnäolon paljastavia reaktioita. Mitä enemmän antigeeniä on tutkittavassa näytteessä, sitä enemmän siihen sitoutuu leimattua vasta-ainereagenssia ja näin ollen muodostunut väri on voimakkaampi. ELISA-menetelmällä tutkittavasta näytteestä siis määritetään kvantitatiivisesti suoraan allergisoivan proteiiniin pitoisuus. (Walker & Rapley 2008, 660–662.)

Allergisoivan proteiinin havaitsemiseen käytetään entsyymileimoja ja kromogeenisiä, kemiluminesoivia tai -fluoresoivia substraatteja. Yleensä entsyyminä käytetään joko piparjuuren peroksidaasia (HRP, horseradish peroxidase) tai alkaali-fosfataasia (AP, alkaline phosphatase), koska ne yhteensopivat monen substraatin kanssa. Substraatin valinta riippuu määrittelyn vaaditusta herkkyydestä ja signaalin havaitsemiseen käytettävästä laitteesta. (Crowther 2001, 64, 70, 395.)

ELISA-menetelmä jaetaan kolmeen eri päätyyppiin: suoraan sekä epäsuoraan ELISA-menetelmään ja kerros-ELISA-menetelmään (engl. sandwich-ELISA). Sandwich-ELISA voidaan taas jakaa suoraan ja epäsuoraan menetelmään. (Mäkelä ym. 1993, 62; Crowther 2009, 11.)

3.1.1 Suora ELISA-menetelmä

Suoraa ELISA-menetelmää voidaan pitää yksinkertaisimpana ELISA-menetelmänä. Suorassa ELISA-menetelmässä määritetään vasta-ainetta. Kiinteälle pinnalle sidotaan antigeeni. Suorassa ELISA-menetelmässä näytteen tutkittava antigeeni laimennetaan puskuriliuokseen, joka yleensä on karbonaatti- tai bikarbonaattipuskuri tai fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS, phosphate buffered saline). Tärkeintä on, että puskuri ei sisällä muita proteiineja, jotka saattaisivat kilpailla tutkittavan antigeenin kanssa kiinnittymisestä muoviseen kiinteään pintaan. Antigeenit ovat luonnossa pääasiassa proteiineja ja ne kiinnittyvät passiivisesti muovin pinnalle inkuboinnin aikana. Inkuboinnin jälkeen ylimääräinen antigeeni pestään pois neutraalilla puskuroidulla liuoksella esimerkiksi PBS:llä. Pesun jälkeen lisätään entsyymileimattu vasta-aine, joka on spesifinen kiinteälle pinnalle sitoutuneen antigeenin kanssa. Tätä voidaan kutsua myös konjugaatiksi. Inkuboinnin aikana vasta-aineet sitoutuvat antigeeniin. Suoritetaan pesuvaihe sitoutumattomien vasta-aineiden poistamiseksi. Lisätään sopiva substraatti tai substraatti-kromogeeniliuos. Substraatilla mahdollistetaan värireaktion tapahtuminen entsyymaattisen katalyyysin avulla. Reaktion annetaan edetä määrätyn ajan, jonka jälkeen reaktio pysäytetään muuttamalla liuoksen pH:ta tai lisäämällä inhiboivaa reagenssia. Lopuksi muodostunut väri mitataan esimerkiksi mittalaitteella käyttäen sopivaa aallonpituutta. (Crowther 2009, 12–14.) Kuviosta 2 nähdään suoran ELISA-menetelmän toimintaperiaate.

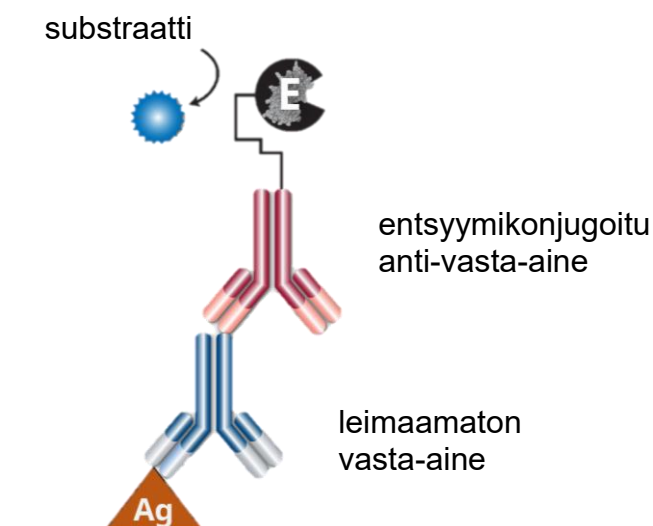


KUVIO 2. Suoran ELISA-menetelmän toimintaperiaate (Cell Signaling Technology n.d., muokattu).

3.1.2 Epäsuora ELISA-menetelmä

Epäsuorassa ELISA-menetelmässä määritetään vasta-ainetta ja kiinteä pinta on päällystetty antigeenillä, kuten suorassa ELISA-menetelmässä. Näytettä, jossa on määritettävä vasta-aine, lisätään kiinteälle pinnalle. Näytteen lisäys sisältää leimaamattomia vasta-aineita, jotka laimennetaan puskuriin estääkseen proteiinien epäspesifisen kiinnittymisen kiinteällä pinnalla. Tätä seuraa inkubointi ja ylimääräisten sitoutumattomien vasta-aineiden peseminen pois. Lisätään entsyymikonjugoitu anti-vasta-aine, jota seuraa jälleen inkubointi ja pesu. Lopuksi lisätään entsyymiin substraatti ja pysäytysliuos, jonka jälkeen värinmuutos voidaan mitata. (Crowther 2009, 14.)

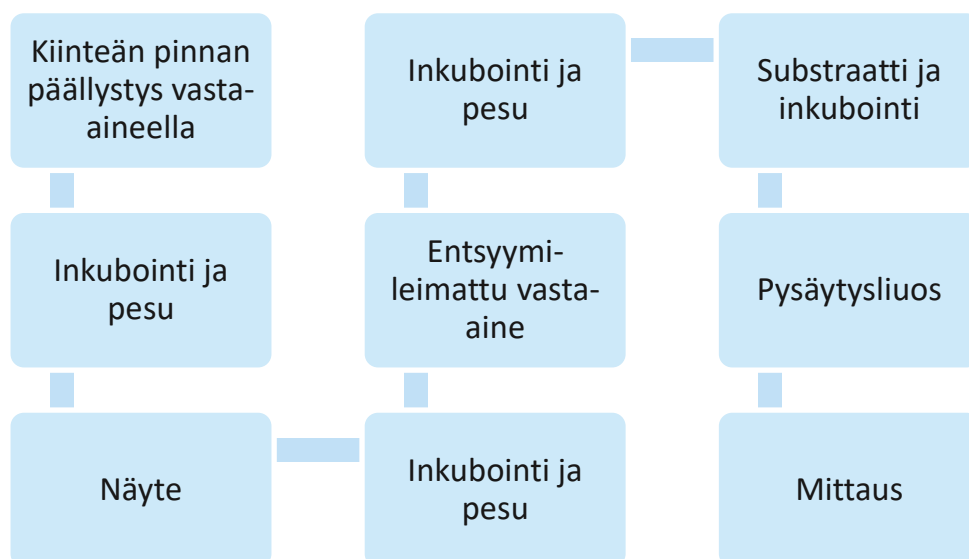
Epäsuora menetelmä on samanlainen kuin suora menetelmä siinä mielessä, että antigeeni on kiinnitettynä suoraan kiinteälle pinnalle ja tutkittavasta näytteestä määritetään vasta-ainetta. Epäsuorassa menetelmässä lisätyt vasta-aineet eivät kuitenkaan ole entsyymileimattuja, vaan ne ovat itse entsyymiin kytkeytyneiden vasta-aineiden kohteena. (Crowther 2009, 14.) Kuvioista 3 nähdään epäsuoran ELISA-menetelmän toimintaperiaate.



KUVIO 3. Epäsuoran ELISA-menetelmän toimintaperiaate (Cell Signaling Technology n.d., muokattu).

3.1.3 Sandwich-ELISA-menetelmä

Sandwich-ELISA-menetelmä voidaan jakaa kahteen eri menetelmään, suoraan sandwich-menetelmään ja epäsuoraan sandwich-menetelmään. Sandwich-menetelmässä määritetään antigeeniä. Kiinteä pinta päällystetään tunnetulla määrällä vasta-ainetta. Nämä kiinteän pinnan sieppausvasta-aineet sitovat tutkittavan näytteen antigeenit. Näyte, jossa tutkittava antigeeni on, laimennetaan puskuriin, jotta vältetään epäspesifinen kiinnittyminen kiinteään faasiin. Puskuri ei saa sisältää antigeenejä, jotka voivat sitoutua sieppausvasta-aineeseen. Inkuboinnin ja pesun jälkeen kiinteälle pinnalle on kiinnittynyt vasta-aine-antigeenikompleksi. Siepattu antigeeni havaitaan lisäämällä sille spesifistä entsyymileimattua vasta-ainetta. Inkuboinnin ja pesun jälkeen lisätään entsyymin substraatti. Reaktio pysäytetään pysäytysliuoksella, jonka jälkeen värinmuutos voidaan mitata. (Crowther 2009, 16–19.) Kuviossa 4 on esitetty suoran sandwich-ELISA-menetelmän työvaiheet.



KUVIO 4. Suoran sandwich-ELISA:n työvaiheet.

Epäsuorassa sandwich-menetelmässä määrittämisen vaiheet ovat melko samantyyppisiä suoran sandwich-menetelmän kanssa. Poikkeavuutena epäsuorassa menetelmässä lisätään antigeenin havaitseva vasta-aine, joka ei ole entsyymileimattu. Jonka jälkeen lisätään entsyymikonjugoitu anti-vasta-aine, jonka tarkoitus on tunnistaa leimaamattoman vasta-aineen rakenneosia. Edellytyksenä tälle menetelmälle on, että entsyymikonjugoitu anti-vasta-aine ei reagoi antigeenin sieppaamiseen käytettyjen vasta-aineiden kanssa. (Crowther 2009, 19–21.)

3.2 Menetelmän häiriötekijöitä

Suurin osa (90 %) ELISA-menetelmässä tapahtuvista häiriöistä on todettu johtuvan menetelmän käyttäjän tekemistä virheistä. Virheiden syinä ovat olleet esimerkiksi puutteellinen menetelmäohjeen noudattaminen, huolimaton työskentely tai huonosti huolletut laitteet. Suurin osa jäljelle jäävästä prosenttiosuudesta on johtunut menetelmään soveltumattomasta huonolaatuisesta vedestä tai pipetointivirheistä. Menetelmässä tulisi käyttää vain erittäin puhdasta tislattua vettä, jotta analyysissä vältetään epäpuhtaudet ja epäsuotuisat pH-olosuhteet. (Crowther 2009, 8, 72.)

Oikealla pipetointitekniikalla minimoidaan pipetoinnista aiheutuneet virheet. Pipettien tulee olla kalibroituja, jotta pipetointilavuus olisi oikea. Pipetinkärjet eivät myöskään saa olla kontaminoituneita. Pipetoitaessa reagensseja kuoppalevyn kuoppiin voi muodostua kuplia, jolloin ne vääristävät mittaustulosta. Tämänkin takia pipetoinnit kannattaa tehdä dublikaatteina eli rinnakkaisina pipetoiteina. Mittaukseen kannattaa ottaa mukaan kontrollinäyte, jonka pitoisuus tunnetaan, varsinkin jos määritetään pitoisuudeltaan tuntematonta näytettä. Substraattiliuoksen lämpötila on myös hyvä huomioida ennen pipetointia, koska lämpötila vaikuttaa värireaktion nopeuteen. (Crowther 2009, 72–73.)

ELISA-menetelmän käyttöä rajoittaa monoklonaalisten vasta-aineiden kallis hinta tai vasta-aineille hankalasti löydettävät spesifiset parit. Sandwich-ELISA-menetelmän rajoittava tekijä on antigeenin soveltuvuus, sillä antigeenillä on oltava vähintään kaksi antigeenistä kohtaa (epitoppia), koska sekä sieppausvasta-aineiden että havaitsevien vasta-aineiden täytyy sitoutua. (Crowther 2009, 18–19.)

ELISA-menetelmään perustuvan analyysipakkauksen valmistajan mukaan konsentroidut ruoka-aineet, värit ja aromit saattavat häiritä ELISA-menetelmää. Myös hydrolysoituja ja fermentoituja proteiineja ei välttämättä pystytä havaitsemaan ELISA-menetelmillä. (Neogen 2021, 3.)

3.3 Kuoppalevyanalytiikka

Monet ELISA-menetelmään perustuvat mittaukset tehdään yhä useammin kuoppalevyillä. Kuoppalevyllä entsyymien katalysoima substraatin reaktiotuote määritetään lähettämällä tietyn aallonpituuden omaavaa valoa näytteen läpi ja mittaamalla näytteen absorboiman valon määrä. Kuoppien mittaukseen on valittava kuoppalevylukijaan sopiva suodatin (filtteri) havaitsemaan oikea aallonpituus riippuen määritettävästä tuotteesta. (Crowther 2009, 70.)

3.3.1 Kuoppalevylukijat

Kuoppalevylukijat, toiselta nimeltään mikrolevylukijat tai monileimalukijat, ovat eräänlaisia fotometrejä, jotka ovat suunniteltu erityisesti useiden näytteiden samanaikaiseen analysointiin kuoppalevyiltä. Fotometriksi kutsutaan laitetta, joka mittaa absorboitunutta valoa. Kolorimetrillä tarkoitetaan perinteistä fotometriä, joka mittaa absorbansseja näkyvän valon alueella (400–700 nm) vaihdettavien suodattimien avulla tietyillä aallonpituuksilla. Kuoppalevylukijoita käytetään näytteiden biologisten, kemiallisten tai fysikaalisten reaktioiden havaitsemiseen kuoppalevyiltä. (Penttilä 2004, 67.)

3.3.2 Absorbanssimääritys

Absorbanssin määrittämistä käytetään kvantitatiivisessa analyysissä, sillä sen arvo on suoraan verrannollinen näytteen pitoisuuteen. Tutkittavan aineen pitoisuus määritetään vertaamalla sille mitattuja absorbanssiarvoja tunnettujen pitoisuuksien absorbanssiarvoihin tietyllä aallonpituudella. Mittaukset suoritetaan aallonpituudella, jolla tutkittavalla aineella on absorptiomaksimi. (Jaarinen & Niiranen 2008, 52, 62.)

Absorbtio havaitaan elektronien liikkeenä, josta mittalaite laskee Lambert-Beerin lain avulla näytteelle absorbanssin arvon. Silloin kun tietyn aallonpituuden omaavan valon kulkema matka näytteen läpi on vakio, absorbanssin ja pitoisuuden arvot muodostavat lineaarisen suoran. Tältä suoralta voidaan määrittää tutkittavan aineen pitoisuus asettamalla sen absorbanssin arvo suoralle. Mitattavan absorbanssin ollessa hyvin pieni, vain pieni osa valosta absorboituu näytteeseen ja sen signaali voi kadota mittauksen taustakohinaan. Absorbanssin ollessa taas hyvin suuri, näytteen läpi menee valoa niin vähän, että se rajoittaa Lambert-Beerin lain mukaista lineaarista suoraa. (Jaarinen & Niiranen 2008, 53, 60.)

3.3.3 Lambert-Beerin laki

Absorptiomittaus perustuu Lambert-Beerin lakiin, joka kuvaa valon intensiteetin vaimenemista tietyllä aallonpituudella sen kulkiessa absorboivan aineen läpi. Lain mukaan läpi pääsevän valon intensiteetti pienenee eksponentiaalisesti absorboivan aineen pitoisuuden kasvaessa. Tämä suhde voidaan muuntaa lineaarisesti riippuvuudeksi soveltamalla läpäisykyvyn negatiivista logaritmia. Lambert-Beerin laki voidaan laskea kaavalla 1, jossa A on absorbanssi, I_0 on valon intensiteetti ennen näytettä ja I on näytteen jälkeen, ε on molaarinen absorptiokerroin, c on absorboivan aineen konsentraatio ja l on valon liuoksessa kulkema matka. (Ruso & Pineiro 2013, 75; Bisswanger 2017, 237–238.)

$$A = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon cl \quad (1)$$

4 VALIDOINTI

4.1 Validoinnin tarkoitus

Validoinnilla tarkoitetaan menettelyä, jonka avulla varmennetaan analyysimenetelmän täyttävän sille asetetut vaatimukset ja osoitetaan sen soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseensa. Menetelmän validointi on tärkeä menettely analyysin antamien tulosten luotettavuuden kannalta. Validoinnilla varmistetaan, että menetelmän suorittamistapa on ymmärretty ja osoitetaan menetelmän olevan tieteellisesti pätevä käyttöolosuhteissaan. (Ehder 2005, 25; Jaarinen & Niiranen 2008, 11.)

Validointi on tarpeen tehdä, kun halutaan todentaa analyysimenetelmän suorituskykyparametrien olevan riittäviä tietyn analyttisen ongelman ratkaisemiseen. Tällaisia tapauksia voivat olla uuden menetelmän kehittäminen tiettyyn tarkoitukseen, käytössä olevan menetelmän uudistaminen tai laajentaminen uusille tutkimusalueille, validoitua menetelmää käytetään toisessa laboratoriossa, kahden eri menetelmän antamien tulosten yhtäpitävyyden osoittaminen tai kun laboratorion laadunvarmistustoimenpiteet osoittavat, että käytettävässä menetelmässä on tapahtunut muutoksia. (Ehder 2005, 26; Hiltunen ym. 2011, 26.)

4.2 Validointisuunnitelma- ja raportti

Validointi koostuu validointisuunnitelmasta, mittausten suorittamisesta, tulosten tilastollisesta arvioinnista ja dokumentoinnista. Validointi pohjautuu validointisuunnitelmaan, joka tehdään ennen validoinnin aloittamista. Validointisuunnitelmasta käy ilmi muun muassa validoinnin laajuus, validointiparametrit ja niiden tavoitearvot sekä koesarjat. Validoinnin laajuuteen vaikuttaa se, onko menetelmä laboratorion itsensä kehittämä, tunnettu sovellus vai standardiin pohjautuva menetelmä. (Mäkinen ym. 1996, 6–7.)

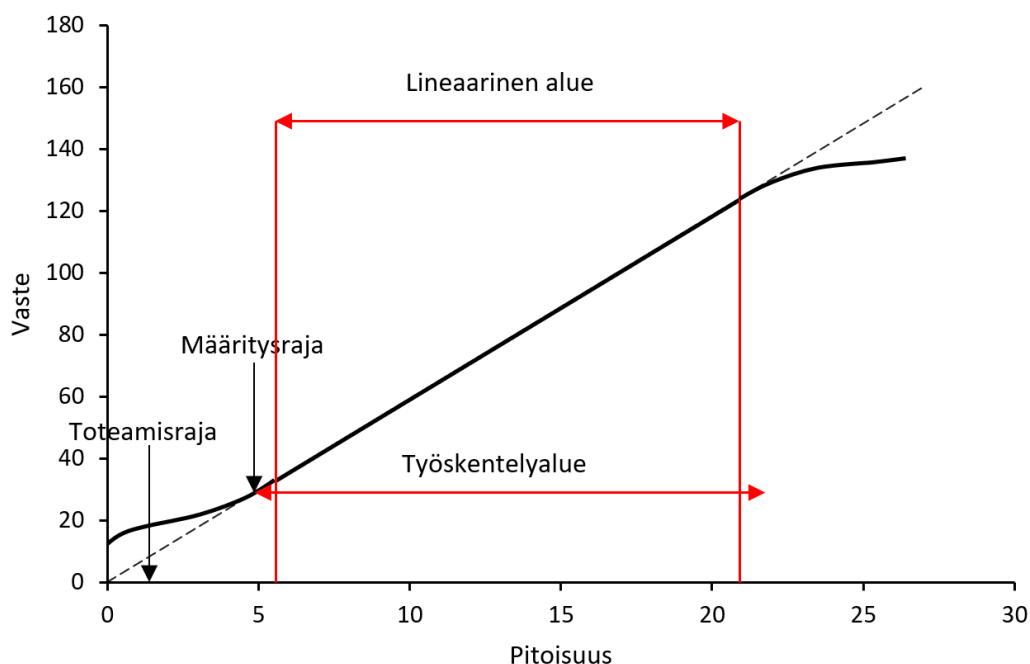
Valmiista validoinnista laaditaan validointiraportti. Raportissa esitetään, miten menetelmä soveltuu käyttötarkoitukseensa ja miten menetelmälle määritellyt kriteerit täyttyvät suorituskykyä kuvaavien parametrien avulla. Validoinnissa määritellyt tuloksen luotettavuuden kriteerit toteutuvat menetelmän suorituksesta laadittua menetelmäohjetta noudattamalla. Menetelmäohjeen tarkoituksena on kuvata työn eri vaiheet kohta kohdalta mahdollisimman tarkasti, minkä avulla voidaan minimoida työssä tapahtuvat virheet. Valmis validointiraportti sisältää myös menetelmän mittausepävarmuuden arvioinnin. (Jaarinen & Niiranen 2008, 14–15; Hiltunen ym. 2011, 27.)

4.3 Validointiparametrit

Validointiparametrejä määrittämällä saadaan tietoa menetelmän luotettavuudesta ja soveltuvuudesta aiottuun käyttötarkoitukseensa. Menetelmän validoinnissa käytettyjä parametrejä ovat esimerkiksi lineaarisuus, toteamis- ja määrittämiss raja, toistettavuus, oikeellisuus ja mittausepävarmuus. (Ehder 2005, 25–26.)

4.3.1 Lineaarisuus

Lineaarisuus kuvaa analyttisen menetelmän kykyä antaa tietyllä alueella lineaarinen korrelaatio menetelmän antaman vasteen ja tutkittavan aineen pitoisuuden välillä. Lineaarisuutta määritetään mittaamalla vähintään viittä eripitoista standardiliuosta, joiden tutkittavan aineen pitoisuus kattaa koko mittausalueen. Mittaus- tuloksien avulla laaditaan standardisuora, jossa menetelmän antama vaste on tutkittavan aineen pitoisuuden funktiona. Standardisuorasta voidaan silmämääräisesti arvioida menetelmän lineaarinen alue. (Ehder 2005, 28–29.) Lineaarinen alue rajoittuu suoran kaartumiseen sen molemmista päistä (kuvio 5). Työskentelyalueella menetelmä antaa hyväksyttäviä tuloksia vielä tietyllä varmuudella. Työskentelyalueen alaraja rajoittuu määrittämiss rajaan (LOQ). (Magnusson & Örne- mark 2014, 27–28.)



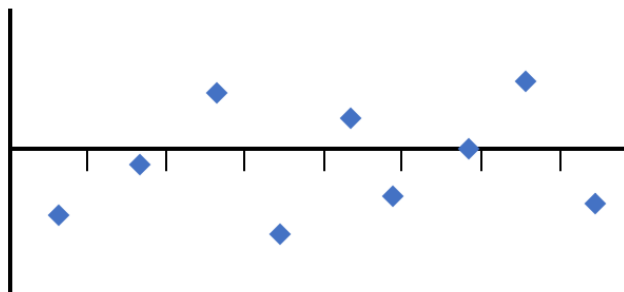
KUVIO 5. Menetelmän lineaarinen alue, työskentelyalue ja toteamis- sekä määrittysraja (Ehder 2005, 29, muokattu).

Menetelmän lineaarisuuden arvioinnissa selvitetään se pitoisuusalue, jossa standardisuora täyttää lineaarisuuden ehdot. Yleisesti standardisuoran sovittamisessa käytetään pienimmän neliösumman suoraa eli ensimmäisen asteen polynomifunktiota, kuten kuviossa 5. Jos kuitenkin todetaan, ettei se sovellu tutkittavaan pistejoukkoon, voidaan muuttujaan kokeilla logaritmi- tai neliöjuurimuunnosta. Toinen tapa on sovittaa pistejoukkoon toisen tai sitä korkeamman asteen polynomifunktiota. Tilastomatematiikan avulla voidaan todeta myös toisen tai sitä korkeamman asteen polynomifunktion olevan lineaarinen muuttujiensa suhteen. (Mäkinen ym. 1996, 16–17.)

Selitysaste (R^2) kuvaa pistejoukon osumista sovitetulle standardisuoralle. Mitä enemmän selitysasteen arvo poikkeaa luvusta 1, sitä enemmän mittauksiin liittyy hajontaa tai mittaus ei ole lineaarinen. Selitysastetta ei kuitenkaan yksinään voida pitää luotettavana menetelmän lineaarisuuden arvioinnissa. (Jaarinen & Niiranen 2008, 25.)

Residuaalien eli muuttujan x jäännösten avulla voidaan arvioida standardisuoran sopivuutta. Residuaali on standardiliuosten mittaustulosten ja mittaustuloksiin sovitetun standardisuoran pisteiden erotus. Graafisesti esitettynä se on mitatun

suureen pystysuora etäisyys standardisuorasta (kuvio 6). Residuaalien satunnainen jakautuminen nollan molemmin puolin vahvistaa menetelmän lineaarisuutta. (Magnusson & Örnemark 2014, 27–28.)



KUVIO 6. Residuaalien jakautuminen tasaisesti nollan molemmin puolin (Jaari-
nen & Niiranen 2008, 26).

4.3.2 Toteamis- ja määrittysraja

Toteamisrajalla (LOD, limit of detection) tarkoitetaan sitä määritettävän aineen pienintä pitoisuutta, joka voidaan luotettavasti todeta ja joka eroaa nollanäytteen antamasta vasteesta merkittävästi. Toteamisraja on siis tutkittavan aineen pitoisuus, jonka vaste vastaa mitatun nollanäytteen vasteiden keskiarvoa x lisättynä kolminkertaisella keskihajonnalla s_0 . Menetelmän toteamisraja lasketaan kaavalla 2. (Ehder 2005, 29–30; Magnusson & Örnemark 2014, 24.)

$$LOD = x + 3s_0 \quad (2)$$

Määrittysraja (LOQ, limit of quantitation) on pienin pitoisuus, joka voidaan kvantitatiivisesti määrittää tarpeeksi luotettavasti. Tyypillisesti määrittysrajaksi asetetaan nollanäytteen keskiarvo x lisättynä kymmenkertainen keskihajonta s_0 , kuten kaavassa 3 on esitetty. (Ehder 2005, 30; Magnusson & Örnemark 2014, 25.)

$$LOQ = x + 10s_0 \quad (3)$$

Nollanäytteen pitoisuuden toistuvalla mittaamisella tutkitaan lisäksi taustan hajontaa, johon tutkittavan aineen toteamisrajan määrittys perustuu (Ehder 2005, 29).

4.3.3 Toistettavuus

Toistettavuus eli mittaustuloksen toistuvuus tarkoittaa suureen mittaamista menetelmän avulla peräkkäin useita kertoja lyhyellä aikavälillä ja samoissa olosuhteissa. Toistuvuusolosuhteet saavutetaan, kun toistomittaukset tehdään samalla menetelmällä, samalla laitteistolla ja saman tekijän toimesta. Toistettavuus määritetään erityyppisten ja eri pitoisten näytteiden rinnakkaismittauksilla. (Mäkinen ym. 1996, 40; Ehder 2005, 37.)

Toistettavuus voidaan esittää mittaustulosten suhteellisena keskihajontana (RSD). Suhteellinen keskihajonta ilmoitetaan prosentteina ja se lasketaan kaavan 4 mukaan, jossa s on mittaustulosten keskihajonta ja x on mittaustulosten keskiarvo. (Ellison & Williams 2012, 54, 100.)

$$RSD = \frac{s}{x} \cdot 100 \% \quad (4)$$

4.3.4 Oikeellisuus

Oikeellisuus on useista mittauksista saatujen tulosten keskiarvon vastaavuus tunnetun arvon kanssa. Vertailumateriaali tai kontrollinäyte, johon mittaustuloksia verrataan, olisi hyvä olla sertifioitu ja sen matriisin tulisi olla samankaltainen tutkittavien näytteiden matriisien kanssa. Oikeellisuuden määrittämisessä sertifioidusta vertailumateriaalista analysoidaan useita kertoja sen pitoisuus ja saaduista mittaustuloksista lasketaan keskiarvo, keskihajonta, suhteellinen keskihajonta ja prosentuaalinen harha. (Ehder 2005, 35; Ellison & Williams 2012, 7.)

Mittauksen oikeellisuus ilmaistaan yleensä analyysimenetelmän prosentuaalisena harhana eli poikkeamana (*bias*). Poikkeama voidaan laskea kaavalla 5, jossa x on mittaustulosten keskiarvo ja T on vertailumateriaalin tosiarvo. (Ehder 2005, 31, 35–36.)

$$bias = \frac{x - T}{T} \cdot 100 \% \quad (5)$$

4.3.5 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus on kvantitatiivinen arvio rajoista, joiden sisäpuolella mittaus-
tulosten oletetaan olevan tietyllä todennäköisyydellä (Ehder 2005, 19). Mit-
tausepävarmuus rakentuu yksittäisistä epävarmuustekijöistä. Menetelmän mit-
tausepävarmuuden määrittämiseen käytetään vertailumateriaalia, josta saadaan
selville systemaattinen virhe ja näytematriiseja, joiden rinnakkaismääritysten
avulla arvioidaan satunnaisvirheen osuus. (Mäkinen ym. 1996, 53–54.)

Laboratorion sisäisellä uusittavuudella $u(R_w)$ tarkoitetaan tietyn menetelmän an-
tamien tulosten välistä yhtäpitävyyttä, kun mittaukset on tehty samassa laborato-
riossa pitkäkhön ajan kuluessa (Mäkinen ym. 1996, 40). Laboratorion sisäinen
uusittavuus määritetään vertailumateriaalista saatujen tulosten keskihajonnan
 s_{RW} ja näytematriiseista saatujen tulosten keskihajonnan s_r avulla kaavan 6 mu-
kaisesti (Magnusson ym. 2017, 15).

$$u(R_w) = \sqrt{s_{RW}^2 + s_r^2} \quad (6)$$

Poikkeama *bias* eli systemaattinen virhe on mittaustuloksen ja tosiarvon välinen
ero. Kemiallisessa analyysimenetelmässä käytettyjen mittalaitteiden poikkeamat
on hyvä tunnistaa mittausepävarmuuden määrittämiseksi. Mittalaitteen aiheut-
tama poikkeama voi johtua mittalaitteen rajallisesta havaitsemistehokkuudesta,
sen epäkuntoisuudesta tai väärällä kalibroinnilla säädetyistä asetuksista. (Ehder
2005, 31.)

Menetelmän validoinnissa on kuitenkin tärkeämpää tietää koko analyysimenetel-
män kokonaispoikkeama kuin yksittäisen mittalaitteen poikkeama. Kokonais-
poikkeama johtuu menetelmään liittyvistä laboratorion riippumattomista teki-
jistä sekä menetelmää käyttävän laboratorion omista virhetekijöistä. (Ehder
2005, 30–31.) Menetelmän ja laboratorion kokonaispoikkeama $u(bias)$ lasketaan
kaavan 7 mukaisesti, jossa *bias* on mittaustulosten prosentuaalinen poikkeama,
 s_{bias} on mittaustulosten keskihajonta, n on mittausten lukumäärä ja $u(c_{ref})$ on
vertailuarvon standardiepävarmuus prosentteina (Magnusson ym. 2017, 19).

$$u(bias) = \sqrt{(bias)^2 + \left(\frac{S_{bias}}{\sqrt{n}}\right)^2 + u(c_{ref})^2} \quad (7)$$

Laskettaessa menetelmän yhdistettyä standardiepävarmuutta u_c käytetään laboratorion sisäistä uusittavuutta $u(R_w)$ sekä menetelmän ja laboratorion kokonaispoikkeamaa $u(bias)$. Yhdistetty standardiepävarmuus lasketaan kaavalla 8.

$$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + u(bias)^2} \quad (8)$$

Mittausepävarmuus ilmaistaan yleensä laajennettuna mittausepävarmuutena U , jossa yhdistetty standardiepävarmuus u_c kerrotaan peittävyyskerroimella $k = 2$, joka tarkoittaa 95 %:n luotettavuusväliä eli 95 % tuloksista on ilmoitettujen mittausepävarmuusrajojen sisällä. Laajennettu mittausepävarmuus U lasketaan kaavan 9 avulla, jossa k on peittävyyskerroin ja u_c on yhdistetty standardiepävarmuus. (Magnusson ym. 2017, 6, 10.)

$$U = k \cdot u_c \quad (9)$$

5 MITTAUS- JA MÄÄRITYSMENETELMÄT

5.1 Näytteet

Menetelmän testaukseen ja validointiin valittiin kattavasti erilaisia elintarvikkeita, jotta voitiin testata mahdollisimman monen eri elintarvikkeen sopivuus menetelmälle. Suurin osa näytteistä oli yhdistelmäelintarvikkeita esimerkiksi valmisruokia. Näytteisiin valittiin eri valmistajien prosessoimia elintarvikkeita. Näytteiksi valittiin 21 eri elintarviketta. Näytteet valikoituivat muun muassa sen perusteella, mitä jatkossa arvioitiin laboratorion analysoivan.

Vaikka menetelmä kehitettiin erityisesti kaseiinijäämien määrittämiseen maidottomista elintarvikkeista maitoallergikkoja varten, moni määrittämiseen valituista elintarvikkeista sisälsi kuitenkin maitoa. Osa valituista tuotteista oli vähälaktoosisia tai laktoosittomia maitotuotteita. Maidottomissa tuotteissa ei oletettavasti ole kaseiinia, jolloin niiden mittaustulos jää alle määrittämissä ja mittausepävarmuus ei tässä tapauksessa päde. Maitoa sisältäviä elintarvikkeita analysoimalla pystyttiin kuitenkin määrittämään menetelmälle mittausepävarmuus.

Elintarvikenäytteiden lisäksi käytössä oli kontrollinäyte validointia varten. Kontrollinäytteenä oli jauhemainen interkalibrointinäyte Fapas Test material 27262 Allergens Cooked Biscuit, jossa on 28,8 % kaseiinia. Veratox for Total Milk -analyysipakkauksen validointiraportin mukaan NFDM (rasvaton maitojauhe) kontrolli sisältää 36 % proteiinia, josta 80 % on kaseiinia, jolloin kaseiinin laskennallinen osuus on 28,8 % kontrollinäytteen proteiinipitoisuudesta. (Neogen 2011, 2.)

5.2 Veratox for Casein Allergen -analyysipakkaus

Kaseiinin määrittämisessä käytettiin Neogen Veratox for Casein Allergen No. 8460-analyysipakkausta. Sisäänajettava menetelmä pohjautuu analyysipakkauksen mukana tulevaan käyttöohjeeseen. Määrittäminen perustuu suoraan sandwich-ELISA-menetelmään. Määrittäminen tehdään kyseistä menetelmää käyttäen, sillä toimipisteessä muutkin allergeenit määritetään juuri ELISA-menetelmien avulla.

Kyseinen analyysipakkaus on kohdennettu nimenomaan kaseiinin erottamiseen tutkittavasta näytteestä. Pakkaus säilytetään 2–8 °C lämpötilassa. Valmistajan määrittämä mittausalue analyysipakkaukselle on 2,5–15 mg/kg ja määritysraja on 2,5 mg/kg. (Neogen 2021, 4–5.) Taulukossa 2 on esitetty pakkauksen sisältö.

TAULUKKO 2. Veratox for Casein Allergen -analyysipakkauksen sisältö.

Sisältö	
1	48 vasta-aineella päällystettyä kaivoa
2	48 punaisella merkittyä siirtokaivoa
3	5 keltaisella merkittyä standardipulloa (0; 2,5; 5; 10; 15 ppm) NFDM (rasvaton maitojauhe) kontrollia
4	4 sinisellä merkittyä pulloa entsyymileimattua vasta-aine HRP (piparjuuren peroksidaasi) konjugaattia
5	1 vihreällä merkitty pullo K-Blue TMB (tetrametyyli-bentsidiini) substraattia
6	1 punaisella merkitty pullo Red Stop-pysäytysliuosta
7	5 foliopakettia 10 mM PBS (fosfaattipuskuroitu suolaliuos) jauhetta uuttoliuoksen tekoon
8	2 pulloa 40 ml PBS-Tween pesupuskurikonsentraattia
9	50 g uuttolisäainetta kupissa
10	muovinen mitta uuttolisäaineen annostelemiseen

Analyysipakkauksen sisältö on esitetty kuvassa 1.



KUVA 1. Veratox for Casein Allergen -analyysipakkauksen sisältö.

5.3 Analyysipakkauksen toimintaperiaate

Veratox for Casein Allergen on entsyymi-immunologinen määrittäminen. Kaseiini eristetään elintarvikenäytteestä fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella. Eristys tapahtuu ravistelemalla näytettä 60-asteisessa vesihauteessa. Eristetystä kaseiinista otetaan näyte vasta-aineella päällystettyihin kaivoihin, joissa se sitoutuu vasta-aineeseen inkuboinnin aikana. Sitoutumaton aines pestään pois ja lisätään kaivoihin toinen vasta-aine, joka on entsyymileimattu. Tämä sitoutuu jo kaivoihin sitoutuneeseen kaseiiniin. Toisen pesun jälkeen lisätään substraatti. Kaivoihin muodostuvan värin voimakkuus riippuu kaseiinin määrästä näytteessä. Lisätään pysäytysreagenssi, jonka jälkeen värin voimakkuus mitataan. Näytteen absorbanssi luetaan kuoppalevylukijalla. Pitoisuuksiltaan tunnettujen standardiliuosten absorbanssit muodostavat standardisuoran ja pitoisuudeltaan tuntemattoman näytteen absorbanssia verrataan suoraan, jolloin saadaan laskettua kaseiinin pitoisuus. (Neogen 2021, 2.)

5.4 Kuoppalevylukija

Mittauksissa käytettiin Tecan Sunrise -kuoppalevylukijaa, josta kuva 2. Mittaukset tehtiin aallonpituudella 650 nm. Kuoppalevylukijan Tecan Magellan -laskentaohjelma laski tulokset suoraan sille luodun menetelmän ja näytekartan avulla. Ohjelmaan luotuun menetelmään määritettiin standardien ja näytteiden paikat sekä standardien pitoisuudet. Tulosteessa oli ilmoitettuna standardeista ja näytteistä mitatut absorbanssiarvot sekä lasketut kaseiinipitoisuudet yksikössä mg/kg (ppm). Tulosteessa oli lisäksi standardien pitoisuuksien ja absorbanssien suhteen piirretty standardisuora.



KUVA 2. Tecan Sunrise -kuoppalevylukija yhdistettynä tietokoneeseen.

6 TYÖN SUORITUS

6.1 Liuosten valmistus

Näytteen esikäsittelyä varten tarvittava uuttoliuos valmistettiin liuottamalla analyysipakkauksen sisältämä foliopaketin jauhe 1000 ml:aan UHP-vettä (ultra high purity). Näytteen analysointia varten tarvittiin laimennettua pesupuskuria, joka valmistettiin laimentamalla analyysipakkauksen sisältämä pesupuskuriliuos 1000 ml:aan UHP-vettä.

6.2 Näytteen esikäsittely

Valmistettu uuttoliuos lämmitettiin 60 °C vesihauteessa. Näyte homogenisoitiin tehosekoittimella. Jauhemaiset ja nestemäiset näytteet voitiin analysoida sellaisenaan. Näytettä punnittiin analyysivaa'alla 5 g 250 ml pulloon. Pulloon lisättiin 1 mitallinen uuttolisäainetta ja 125 ml lämmitettyä uuttoliuosta. Pullon korkki suljettiin ja liuosta uutettiin ravistelemalla 60 °C:ssa 15 minuuttia, jonka jälkeen sen annettiin tasaantua 5 minuuttia. Liuoksen päällimmäisestä nesteosasta erotettiin supernatantti, jota käytettiin näytteenä. Näytteen annettiin vielä jäähtyä huoneenlämpöön ennen analysoinnin aloittamista. Kontrollinäyte kävi läpi kaikki esikäsittelyn vaiheet samalla tavoin kuin muutkin näytteet.

6.3 Analysointi

Ennen analysoinnin aloittamista analyysipakkauksen reagenssien annettiin lämmetä huoneenlämpöön (18–30 °C). Kuoppalevytelineeseen sijoitettiin tarvittava määrä vasta-aineella päällystettyjä kuoppalevyliuskoja. Standardien ja näytteiden paikat dokumentoitiin näytekartalle muistiin sekä kuoppalevylukijan ohjelmaan, jonne luotiin menetelmä kaseiinin määrittämiseksi.

Keltaisella merkittyjä standardipulloja sekoitettiin pyörittelemällä ja jokaista standardia sekä näytettä pipetoitiin automaattipipetillä kahtena rinnakkaisena kuoppalevytelineen kaivoihin 100 µl tehdyn näyttekartan mukaisesti. Kuoppalevytelinettä sekoitettiin varovasti 20 sekuntia liikuttelemalla sitä pöytää vasten edestakaisin. Kaivoja inkuboitiin 10 minuuttia huoneenlämmössä, jonka jälkeen kaivojen sisältö tyhjennettiin viemäriin. Kaivot täytettiin laimennetulla pesupuskurilla pesupulloa käyttäen ja tyhjennettiin jälleen kaivojen sisältö viemäriin. Kuoppalevytelinettä taputettiin pöydällä olevaa paperipyyhettä vasten, jotta kaikki neste poistuisi kaivoista. Kaivojen pesu toistettiin vielä 10 kertaa.

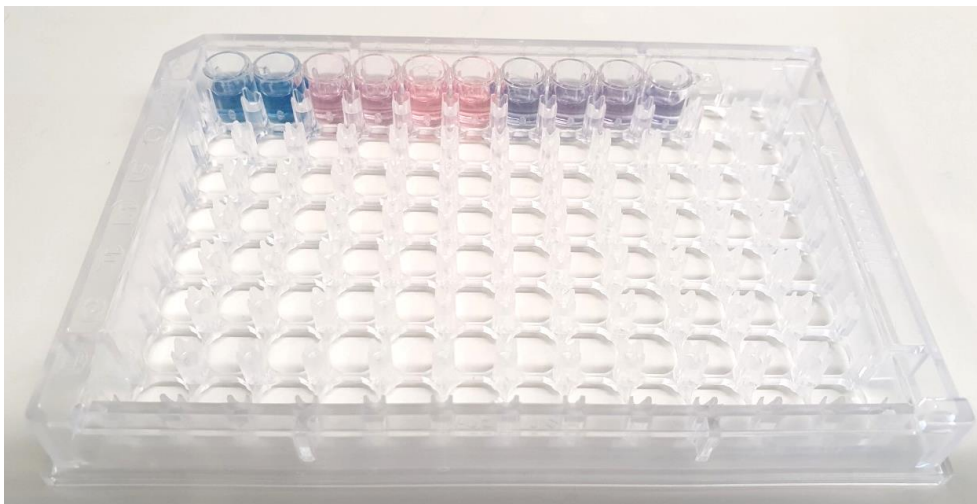
Sinisellä merkitty konjugaattipullo sekoitettiin pyörittelemällä ja konjugaattia pipetoitiin kaikkiin kaivoihin 100 µl. Kuoppalevytelinettä sekoitettiin 20 sekuntia kuten edellä ja annettiin sen jälkeen inkuboitua 10 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen kaivot pestiin samalla tavalla kuin aiemmin.

Vihreällä merkittyä substraattipulloa sekoitettiin ja substraattia pipetoitiin kaikkiin kaivoihin 100 µl. Kuoppalevytelinettä sekoitettiin vielä 20 sekuntia ja annettiin kaivojen inkuboitua 10 minuuttia. Substraatin lisäämisen jälkeen kaivoihin muodostuvan värin voimakkuus riippui vasta-aineen määrästä. Kuvasta 3 voidaan nähdä viiden eri näytteen kuoppiin muodostuva sininen väri.



KUVA 3. Kuoppalevyn kuoppiin muodostunut sininen väri substraattiliuoksen lisäämisen jälkeen.

Inkuboinnin jälkeen sekoitettiin punaisella merkitty Red Stop-pysäytysliuos pullo ja pipetoitiin sitä kaikkiin kaivoihin 100 μ l. Kuoppalevytelinettä sekoitettiin vielä kerran pöytää vasten 20 sekuntia. Kuvasta 4 nähdään pysäytysliuoksen lisäämisen jälkeen viiden eri näytteen kuoppien sinertävän värin muuttuneen tummemman siniseksi mitä enemmän näyte sisälsi kaseiinia ja vaaleanpunaiseksi, jos näytteen kaseiinipitoisuus oli pieni.



KUVA 4. Kuoppalevyn kuoppiin muodostunut tummempi väri pysäytysliuoksen lisäämisen jälkeen.

Kaivojen pohjat pyyhittiin kuivalla paperipyyhkeellä ja kuoppalevy asetettiin kuoppalevylukijan telineeseen. Näytteiden absorbanssit mitattiin kuoppalevylukijalla aallonpituudella 650 nm viimeistään 20 minuutin kuluttua Red Stop-pysäytysliuoksen lisäämisestä.

6.4 Validoinnin suoritus

Validoinnissa määritettäviksi validointiparametreiksi asetettiin lineaarisuus, toteamis- ja määrittäysraja, toistettavuus, oikeellisuus sekä mittausepävarmuus. Seuraavissa kappaleissa on esitetty kyseisten validointiparametrien määrittämis- ja validointimenetelmät. Validointiin käytettiin standardiliuosten, kontrollinäytteen ja elintarvikematriisien mittaustuloksia. Menetelmän mittausepävarmuudelle asetettiin tavoitearvoksi 20 %.

6.4.1 Lineaarisuuden määrittäminen

Menetelmän lineaarisuuden toteamiseksi mitattiin kahteen kertaan analyysipakkauksen pitoisuuksiltaan viittä eripitoista standardiliuosta. Standardien pitoisuudet olivat 0; 2,5; 5; 10 ja 15 mg/kg. Yhtä standardiliuosta pipetoitiin aina kahteen kuoppaan.

Tunnettujen pitoisuuksien ja niiden antamien absorptioiden perusteella laadittiin standardisuora, jolta lineaarisuus voitiin silmämääräisesti määrittää. Standardisuoran avulla määritettiin myös selitysaste (R^2). Lineaarisuutta arvioitiin lisäksi standardisuoran regressioanalyysin avulla, josta nähtiin residuaalien asettuminen jäännöskaaviossa.

6.4.2 Toteamis- ja määrittämissuoran määrittäminen

Toteamis- ja määrittämissuoran määrittämistä varten suoritettiin nollanäytteelle yhteensä 10 mittauskertoa neljänä eri päivänä. Nollanäytteestä mitattiin sen antamaa vastetta. Nollanäytteenä käytettiin analyysipakkauksen pitoisuudeltaan pienintä standardiliuosta 0 mg/kg. Nollanäytettä mitattaessa seurattiin myös taustan mahdollista kohoamista. Nollanäytteen tuloksen noustessa kovin suureksi, saattoi olla, että nollanäyte oli kontaminoitunut tai tausta antoi pitoisuutta mittaukseen, mitä ei saisi tulla.

6.4.3 Toistettavuuden määrittäminen

Menetelmän toistettavuutta testattiin rinnakkaismäärittäysten avulla 21:stä elintarvikematriisista. Yhdestä näytematriisista tehtiin aina 2 rinnakkaismäärittäystä. Mittauksia tehtiin samoissa olosuhteissa kahdeksana eri päivänä. Toistettavuuden arvioinnissa käytettiin myös kontrollinäytteestä saatuja tuloksia.

6.4.4 Oikeellisuuden määrittäminen

Menetelmän oikeellisuutta testattiin mittaamalla kontrollinäytteen kaseiinipitoisuus 19 kertaa menetelmäohjeiden mukaisesti. Mittauksia tehtiin kuutena eri päivänä ja mittaustuloksia verrattiin kontrollinäytteen tunnettuun pitoisuuteen. Kontrollinäytteen mittaustulosten avulla laskettiin menetelmän valvontakorttiin hälytys- ja toimintarajat.

6.4.5 Mittausepävarmuuden määrittäminen

Kontrollinäytteestä ja kaseiinia sisältävistä näytematriiseista saatujen tulosten perusteella voitiin laskea menetelmälle mittausepävarmuus hyödyntäen MUKit (Measurement Uncertainty Kit) -laskentaohjelmaa. MUKit on Suomen ympäristökeskuksen (SYKE) julkaisema mittausepävarmuusohjelmisto, jossa laskenta perustuu Nordtest TR 537 -raporttiin. (SYKE 2021)

7 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

7.1 Näyttematriisien tulokset

Menetelmää testattiin 21:lle elintarvikkeelle. Kaikista elintarvikenäytteistä tehtiin kaksi rinnakkaista mittausta. Kolmen välipalapatukan mittaustulosten hajonnat olivat huomattavasti suurempia verrattuna muihin elintarvikkeisiin. Tästä syystä näitä kolmea välipalapatukkaa ei sisällytetty validointiin. Taulukossa 3 on esitetty validointiin käytettyjen näytteiden kaseiinipitoisuuksien keskiarvot. Maitoa sisältävät näytteet ovat taulukossa tummemmalla pohjalla.

TAULUKKO 3. Menetelmällä testattujen elintarvikkeiden kaseiinipitoisuudet.

Näyte	Matriisi	Pitoisuus (mg/kg)
1	Jauhelihakastike	0,126
2	Lihakeitto	0,135
3	Unelmakääretorttu	0,110
4	Mansikka kääretorttu	0,128
5	Vadelma-mustikkakakku	0,242
6	Chili-bataatti sosekeitto	0,711
7	Minibratwurst	0,020
8	Sienikastike	6,798
9	Porkkanalaatikko	232,100
10	Lanttulaatikko	351,953
11	Maksalaatikko	759,150
12	Tomaattilinssikeitto	526,900
13	Kirjolahikeitto	446,545
14	Kanatuorejuustokeitto	662,720
15	Kevyt maito	3199,625
16	Riisipuuro	665,850
17	Kebab-valkosipulipanini	379,263
18	Tyrnimarenkileivos	739,045

Analysoitujen elintarvikkeiden kaseiinipitoisuus vaihteli 0,02 mg/kg:sta yli 3000:een. Taulukon 7 ensimmäistä elintarviketta olivat maidottomia. Niiden kaseiinipitoisuudet olivat alle 0,242 mg/kg, paitsi näytteen 6 tulos oli 0,711 mg/kg, mutta se sisälsi muista poiketen kookoskermaa. Näytteen 8 ainesosaluettelossa oli merkintä ”saattaa sisältää jäämiä maidosta”, joten sen kaseiinipitoisuus oli edeltäviä tuloksia hieman korkeampi. Taulukon loput elintarvikkeet sisälsivät maitoa, jolloin niiden kaseiinipitoisuudet olivat yli 232 mg/kg. Pitoisuudet vaihtelivat sen mukaan, paljonko niiden valmistamiseen oli käytetty maitoa. Maitoa sisältävistä näytteistä piti tehdä analysointia varten laimennos tai laimennoksia riippuen elintarvikkeeseen käytetyn maidon määrästä, jotta tulos sopi mittausalueelle 2,5–15 mg/kg (Neogen 2021, 5).

7.2 Validoinnin tulokset

Luvuissa 7.2.1–7.2.5 on esitetty menetelmän validointiparametrien tulokset. Validointiparametrejä olivat lineaarisuus, toteamis- ja määrittäysraja, toistettavuus, oikeellisuus ja mittausepävarmuus.

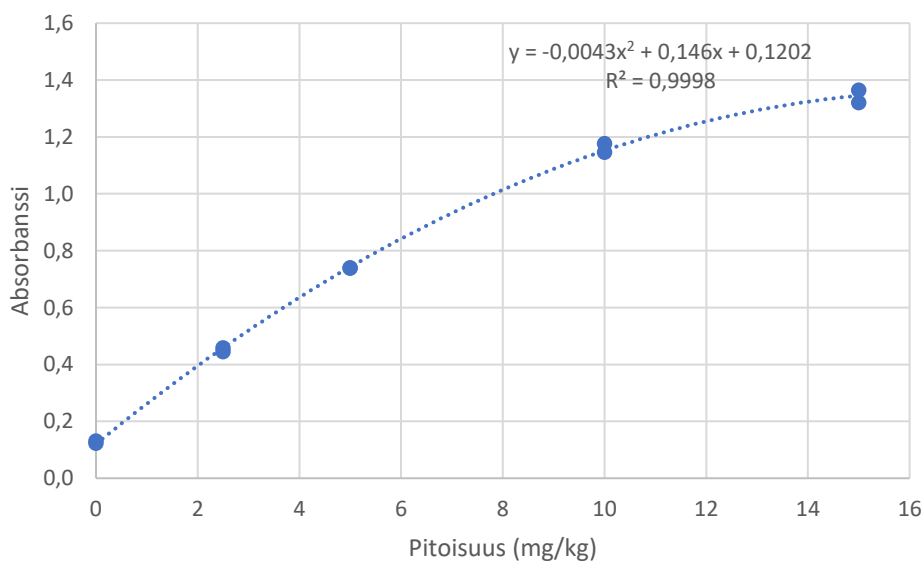
7.2.1 Menetelmän lineaarisuus

Standardien pitoisuudet ja absorbanssit on esitetty taulukossa 4. Standardien tulokset mitattuine pitoisuuksineen on koottu liitteeseen 1.

TAULUKKO 4. Kaseiinistandardien pitoisuudet ja absorbanssit.

Standardi	Pitoisuus (mg/kg)	Absor- banssi
1	0	0,130
1	0	0,123
2	2,5	0,458
2	2,5	0,444
3	5	0,739
3	5	0,738
4	10	1,146
4	10	1,176
5	15	1,364
5	15	1,320

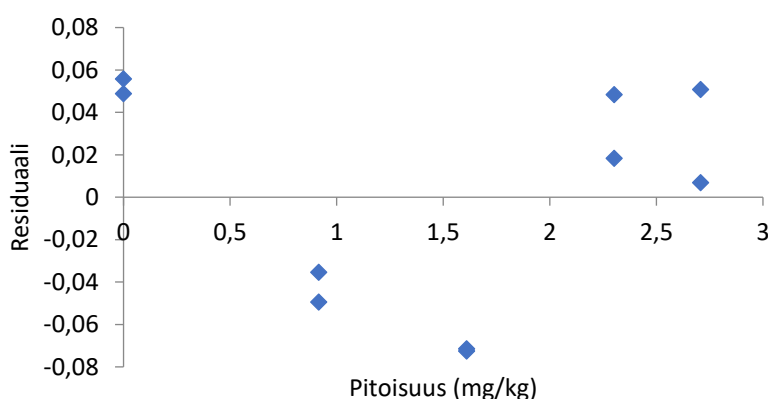
Standardisuoran sovittamisessa todettiin, että tutkittavaan pistejoukkoon soveltuu ensimmäisen asteen polynomifunktiota paremmin toisen asteen polynomifunktio. Myös kuoppalevylukijan ohjelman piirtämä standardisuora oli toisen asteen polynomifunktio. Kuvion 7 standardisuorassa absorbanssi on esitetty pitoisuuden funktiona. Kuviossa näkyvät standardisuoran selitysaste (R^2) ja kuvaajan kaava.



KUVIO 7. Menetelmän lineaarisuus, jossa absorbanssi on pitoisuuden funktiona.

Kuviossa 7 esitettyä standardisuoraa silmämääräisesti arvioidessa, voitiin todeta muuttujien välillä olevan yhteys. Standardisuoran pätevydestä kertoi myös kuvion pisteiden sijoittuminen lähelle suoraa. Standardisuoran, joka tässä tapauksessa oli toisen asteen polynomifunktio, todettiin siis olevan lineaarinen muuttujensa suhteen. Kuvion 7 perusteella todettiin menetelmän olevan lineaarinen välillä 0–15 mg/kg. Standardisuoran selitysasteen arvo on 0,9998 eli malli pystyy selittämään 99,98 % tulosten vaihtelusta. Selitysasteen arvo on hyvin lähellä lukua 1, joten menetelmän voidaan katsoa olevan lineaarinen myös selitysasteen perusteella (Jaarinen & Niiranen 2008, 25).

Menetelmän lineaarisuutta arvioitiin lisäksi residuaalien avulla. Residuaalien jäännöskaavio piirrettiin Excelin regressioanalyysiä apuna käyttäen. Regressioanalyysin avulla voitiin tarkastella toisen asteen polynomifunktion muuttujien välistä yhteyttä käyttämällä regressioanalyysiin pitoisuuden arvojen logaritminmuunnosta (Darlington & Hayes 2017, 370–372). Kuviossa 8 on esitetty regressioanalyysin jäännöskaavio, jossa residuaalit ovat pitoisuuksien funktiona.



KUVIO 8. Standardisuoran residuaalien jäännöskaavio.

Kuviosta 8 nähdään, että mittauspisteet ovat jakautuneet nollan molemmin puolin muodostamatta keskenään selkeää kuviota. Näin ollen menetelmä on lineaarinen myös residuaalien perusteella.

7.2.2 Menetelmän toteamis- ja määrittäysraja

Nollanäytteen absorbanssia mittaamalla saatiin liitteessä 2 esitetyt mittaustulokset. Nollanäytteelle suoritettiin 10 mittausta. Mittaustulosten keskiarvo x ja keskihajonta s_0 on esitetty taulukossa 5.

TAULUKKO 5. Nollanäytteen absorbanssien keskiarvo ja keskihajonta.

x	s_0
0,09470	0,01899

Kun arvot sijoitetaan toteamisrajan kaavaan 2, tulokseksi saadaan 0,15167. Nollanäytteen pitoisuus saadaan laskettua sijoittamalla laskettu nollanäytteen absorbanssin tulos kuvion 7 kaavan yhtälöön $x:n$ paikalle, jolloin menetelmän toteamisrajaksi saadaan 0,14 mg/kg. Laskuesimerkki on esitetty alla.

$$\begin{aligned}
 LOD &= 0,09470 + 3 \cdot 0,01899 \\
 &= 0,15167 \\
 y &= -0,0043 \cdot 0,15167^2 + 0,146 \cdot 0,15167 + 0,1202 \\
 &= 0,14224 \text{ mg/kg}
 \end{aligned}$$

Menetelmän määrittäysrajan määrittämistä varten taulukon 5 arvot sijoitetaan kaavaan 3, jolloin saadaan tulos 0,28460. Tulos halutaan muuttaa pitoisuudeksi mg/kg, jotta sitä voidaan verrata analyysipakkauksen valmistajan ilmoittamaan määrittäysrajaan, joka on ilmoitettu yksikössä mg/kg. Nollanäytteen pitoisuus saadaan laskettua samalla tavalla kuin yllä sijoittamalla tulos kuvion 7 kaavan yhtälöön $x:n$ paikalle. Menetelmän määrittäysrajaksi saadaan 0,16 mg/kg. Laskettu määrittäysraja on pienempi kuin analyysipakkauksen valmistajan ilmoittama määrittäysraja 2,5 mg/kg. Saatu tulos on vain laskennallinen ja menetelmällä tuskin saadaan luotettavasti mitattua alhaisempia pitoisuuksia kuin analyysipakkauksen valmistaja ilmoittaa. Tämän vuoksi menetelmän määrittäysrajana pidetään valmistajan asettamaa pitoisuutta 2,5 mg/kg (Neogen 2021, 5).

7.2.3 Menetelmän toistettavuus

Näytematriisien mittaustuloksille laskettiin keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta kaavalla 4. Tulokset on koottu liitteeseen 3. Kaikkien mitattujen näytematriisien suhteellisten keskihajontojen keskiarvo on 7,8 %. Tämä sisältää myös näytteet, joiden pitoisuus oli alle määritysrajan. Alle määritysrajan olevia tuloksia ei voida pitää täysin luotettavina, minkä vuoksi toistettavuuden arviointiin käytettiin määritysrajan ylittävien näytteiden tuloksia.

Määritysrajan ylittävien näytteiden suhteelliset keskihajonnat olivat 0,4–6,9 %, joista keskiarvo on 4,0 %. Suhteellisen keskihajonnan erot voivat selittyä erityyppisillä näytematriiseilla. Tulosta voidaan pitää toistettavuudeltaan hyvänä, koska se ei ylitä tavoitearvoa 5 %, mutta esimerkiksi suuremmalla näytteiden rinnakkais määrällä olisi todennäköisesti saatu luotettavampi arvio näytematriisien toistettavuudesta (Mäkinen ym. 1996, 47). Näytematriiseista tehtiin nyt kaksi rinnakkaista mittausta.

Menetelmän toistettavuuden arvioinnissa käytettiin lisäksi kontrollinäytettä, jonka kaseiinipitoisuus oli 28,8 %. Liitteessä 4 on esitetty kontrollinäytteen pitoisuuksien mittaustulokset. Taulukossa 6 näkyvät kontrollinäytteen keskiarvo, keskihajonta ja suhteellinen keskihajonta (RSD), joka laskettiin kaavalla 4.

TAULUKKO 6. Kontrollinäytteen tuloksista lasketut toistettavuuden määrittämisessä käytettävät parametrit.

x	s₀	RSD
(mg/kg)	(mg/kg)	%
30,2	2,13	7,1

Kontrollinäytteestä tehtiin 19 mittausta usealla eri mittauskerralla. Suhteellisen keskihajonnan arvoon voi vaikuttaa kontrollinäytteen esikäsitely alusta alkaen jokaisen mittauskerran alussa. Kahdella erillisellä mittaussarjalla selvitettiin, ettei esikäsitellyn kontrollinäytteen kaseiinipitoisuus säily pitkään samana. Tämän vuoksi kontrollinäyte esikäsiteltiin jokaisen mittauskerran alussa ja tällöin monia eri vaiheita sisältävässä näytteen esikäsitelyssä saattoi olla pientä eroa ja vaihtelua eri esikäsitelykertojen välillä. Saman mittauskerran analyysitekijät pysyivät

tällöin muuttumattomina, mutta saattoivat vaihdella eri mittauskertojen välillä. Näin ollen mittauskertojen sisäinen vaihtelu oli kuitenkin mittauskertojen välistä vaihtelua pienempää. (Ehder 2005, 37.)

7.2.4 Menetelmän oikeellisuus

Menetelmän oikeellisuuden arvioinnissa käytetyn kontrollinäytteen mittaustuloksista laskettiin suhteellinen keskihajonta (RSD) kaavalla 4 sekä prosentuaalinen harha (E) kaavalla 5. Tulokset on esitetty taulukossa 7.

TAULUKKO 7. Kontrollinäytteen tuloksista lasketut oikeellisuuden määrittämissä käytettävät parametrit.

RSD	E
%	%
7,1	4,7

Positiivinen arvo kertoo mitatun kontrollinäytteen tuloksen olevan suurempi kuin todellinen tulos. Negatiivinen arvo vastaavasti kertoisi pienemmistä mittaustuloksista verrattuna todelliseen arvoon. Saaduista tuloksista voidaan todeta menetelmän oikeellisuuden olevan prosentuaalisella tasolla hyvä. Mitä pienempi prosentuaalinen harha, sitä lähempänä tulos on oikeaa. Kontrollinäytteen mittaustulokset ovat lähellä tosiarvoa, jolloin ne kertovat myös standardisuoran ja näytematriisien tulosten oikeellisuudesta. (Magnusson & Örnemark 2014, 31–33, 43.)

7.2.5 Menetelmän mittausepävarmuus

Taulukossa 8 on esitetty laboratorion sisäinen uusittavuus $u(R_w)$, menetelmän ja laboratorion kokonaispoikkeama $u(bias)$, yhdistetty standardiepävarmuus u_c ja laajennettu mittausepävarmuus U . Laskuihin hyödynnettiin MUKit-mittausepävarmuusohjelmistoa kertoimella 2, käyttäen laboratorion sisäisen uusittavuuden laskemiseen kaavaa 6, menetelmän ja laboratorion kokonaispoikkeamaan kaavaa

7, yhdistettyyn standardiepävarmuuteen kaavaa 8 ja laajennettuun mittausepävarmuuteen kaavaa 9. Laskuihin käytettiin kontrollinäytteen tuloksia sekä niitä näytematriisien tuloksia, jotka ylittivät määrittämissä rajat.

TAULUKKO 8. MUKit-epävarmuuslaskelman tulokset.

$u(R_w)$	$u(bias)$	u_c	U
%	%	%	%
8,15	4,52	9,32	19

Laboratorion sisäinen uusittavuus eli tulosten välinen yhtäpitävyys on 8,15 % sekä menetelmän ja laboratorion kokonaispoikkeama on 4,52 %. Kokonaispoikkeaman arvo kertoo menetelmään liittyvät laboratoriosta riippumattomat virhetekijät sekä menetelmää käyttävän laboratorion omat virhetekijät. Yhdistetty standardiepävarmuus on alle 10 % ja laajennettu mittausepävarmuus on 19 %. KVVY Tutkimus Oy:n asettama tavoitearvo laajennetulle mittausepävarmuudelle oli 20 %, joten saatu tulos on alle tavoitearvon, minkä vuoksi mittauksia voidaan pitää onnistuneina.

Mittausepävarmuuden avulla on mahdollista kvantitoida tulosten laatua ja luotettavuutta. Menetelmän mittausepävarmuutta voidaan pitää hyvänä, sillä menetelmässä näytteen käsittelyyn sisältyy kuitenkin monia eri vaiheita ja tarkkoja pipe-tointeja, jotka voivat aiheuttaa satunnaisia virheitä. (Mäkinen ym. 1996, 64.)

Mittaustulokseen otetaan huomioon myös mittausepävarmuuden merkitys. Esimerkiksi kontrollinäytteen todellinen tulos ilmoitetaan joko absoluuttisena lukuarvona mittauksen perässä, kuten $(28,8 \pm 5,47)$ mg/kg tai suhteellisenä arvona $28,8 \text{ mg/kg} \pm 19 \%$. Yleensä mittausepävarmuus ilmoitetaan niin sanottuna laajennettuna epävarmuutena, joka saadaan kertomalla yhdistetty standardiepävarmuus kattavuuskertoimella 2. Tällöin oikea mittauksen tulos on ilmoitettujen mittausepävarmuusrajojen sisällä noin 95 % todennäköisyydellä. (Ehder 2005, 19; Finntesting n.d.)

8 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli sisäänajaa ja validoida menetelmä kaseiinin määritykseen elintarvikkeista. Työn tarkoituksena oli tutkia, miten kaseiinin määrittäminen onnistuu Veratox for Casein Allergen -analyysipakkauksella valituille kontrollinäytteille ja elintarvikematriiseille. Validoinnin tarkoituksena oli varmistaa menetelmän soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseen sekä menetelmän antamien tulosten paikkansapitävyys.

Menetelmän soveltuvuutta kaseiinin määrittämiseksi elintarvikkeista saatiin testattua riittävän monta kertaa ja riittävän monelle elintarvikkeelle. Myös menetelmän validoinnin suorittamiseksi saatiin kerättyä tarpeeksi mittausdataa. Määritykset tehtiin onnistuneesti ELISA-menetelmää käyttäen ja mittaukset suoritettiin kuoppalevylukijalla. Määrityksissä pyrittiin toimimaan mahdollisimman huolellisesti, noudattamaan tarkkoja inkubointiaikoja ja lämpötiloja, pipetoimaan oikealla pipetointitekniikalla oikeat näytemäärät, huomioimaan reagenssien olevan huoneenlämpöisiä ja toimimaan muutoinkin analyysipakkauksen käyttöohjeiden mukaisesti.

Saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että menetelmä soveltuu hyvin tutkituille elintarvikkeille. Menetelmä antoi hyvin loogisia tuloksia elintarvikkeiden kaseiinipitoisuuksista, kun saatuja mittaustuloksia ja elintarvikkeiden maitomääriä verrattiin keskenään. Elintarvikkeiden tulosten oikeellisuudesta kertoi kontrollinäytteen lähelle tosiarvoa saadut tulokset. Menetelmän sisäänajo onnistui, sillä menetelmä antoi toistettavia tuloksia, joiden hajonta oli riittävän pientä. Määritysrajan ylittävien elintarvikkeiden toistettavuuden tulokset olivat alle puolet menetelmän laajennetusta mittausepävarmuudesta. Myös kontrollinäytteen prosentuaalinen harha oli reilusti alle puolet laajennetusta mittausepävarmuudesta. Menetelmälle laskettu laajennettu mittausepävarmuus oli 19 %, joka oli hyvin lähellä tavoitearvoa. ELISA-menetelmällä tehtyjen tutkimusten mittausepävarmuudet ovatkin yleensä luokkaa 14–24 % (Suchanek & Robouch 2009, 810; Biswas & Saha 2015, 3). Menetelmän oikeellisuuden arvioinnissa voidaan käyttää myös laboratorioden välisiä vertailumittauksia (Ehder 2005, 35). Saatujen mittaustulosten vertailua muiden laboratorioden välillä ei pystytty kuitenkaan tekemään,

sillä menetelmän interkalibrointi oli tulossa vasta myöhemmin. Kontrollinäytteen mittaustulosten ollessa lähellä tosiarvoa, se kertoi myös standardisuoran ja näytematriisien tulosten oikeellisuudesta (Magnusson & Örnemark 2014, 43). Standardisuoran lineaarisuutta tukivat selitysasteen arvo ja suorasta tehty jäännöskaavio.

Menetelmä voitiin ottaa käyttöön KVVY Tutkimus Oy:n laboratoriossa kaseiinipitoisuuden määrittämiseen. Toimeksiantajalle saatiin laadittua menetelmäohje analyysipakkauksen käyttöä varten sekä menetelmän validointisuunnitelma ja -raportti. Laboratorion käyttöön jäänyt menetelmäohje laadittiin huolella ja siitä tehtiin selkeä sekä johdonmukainen.

Menetelmässä käytetty Fapas Test material 27262 Allergens Cooked Biscuit kontrollinäyte soveltui hyvin työhön, mutta sen kyky säilyttää pitoisuutensa oli huono. Esikäsitellyn kontrollinäytteen pitoisuuden säilyvyyttä testattiin kahteen eri kertaan mittaamalla sitä seuraavana päivänä, kun osaa siitä oli säilytetty huoneenlämmössä ja osaa kylmiössä. Lisäksi pakkaseen laitettiin osa esikäsitellystä kontrollinäytteestä ja sitä mitattiin viikon kuluttua. Kaikissa tapauksissa kontrollinäyte antoi huomattavasti pienempää kaseiinipitoisuutta kuin samana päivänä esikäsitelty ja mitattu sama kontrollinäyte. Pakasteessa kaseiinipitoisuutensa säilyttävä esikäsitelty kontrollinäyte mahdollistaisi sen, ettei kontrollinäytettä tarvitsisi aina menetelmää tehdessä esikäsitellä alusta asti. Kontrollinäytteen esikäsitelyyn tarvittiin hintavaa kontrollinäytejauhetta 5 g ja lopulta analysointiin siitä tarvittiin vain muutama sata mikrolitraa. Jos menetelmässä käytetty esikäsitelty kontrollinäyte olisi säilynyt pakastuksessa, niin sitä olisi voitu pakastaa pienissä erissä ja tällöin käyttää näitä erinä jatkossa analysointiin. Menetelmää voisi jatkossa siis kehittää ottamalla kyseisen kontrollinäytteen rinnalle toinen näyte tai vastaavasti vaihtaa se kokonaan uuteen kontrollinäytteeseen, jonka pitoisuus ei alkaisi hiipumaan pidemmällä aikavälillä. Menetelmässä käytetty kontrollinäyte soveltuu maidon analysoimiseen, mutta esimerkiksi samalta valmistajalta löytyy vielä erikseen kaseiinin analysoimiseen kontrollinäytteitä, kuten Fapas Test material 27264 ja 27288 Infant Soya Formula sekä 27274 Infant Breakfast Cereal (Fapas 2020, 5–6).

Menetelmää testattiin myös kolmelle erilaiselle välipalapatukalle, joiden mittaus- tulosten hajontojen todettiin olevan suuret. Patukoiden ainesosaluetteloiden perusteella todettiin niiden yhteisen tekijän olevan suklaa ja sitä kautta kaakao. Samalla analyysipakkauksen valmistajalla tehtyjen tutkimusten mukaan suklaan on todettu olevan vaikea matriisi sen koostumuksen ja fysikaalisten ominaisuuksien takia. Suklaan korkea rasva-, polyfenoli- ja tanniinipitoisuus voi häiritä ELISA- menetelmien eristys- ja havaitsemismenettelyjä. Suklaan tanniineilla ja poly- fenoliyhdisteillä on korkea sitoutumisaffiniteetti proteiineihin ja toisinaan ELISA- menetelmien vasta-aineisiin. (Khuda & Williams 2015, 667.) Elintarvikenäytteistä tehtiin laimennoksia, mutta kaakaon ruskea väri pysyi näytteessä laimennoksista huolimatta, milloin se oletettavasti häiritä menetelmää. Jatkossa näytteet, jotka sisältävät kaakaota pitäisi esikäsitellä siten, että näytteestä saataisiin mahdolli- simman väritön, jolloin mittaus ei antaisi sen takia virheellisiä tuloksia. Kaakaota sisältävien elintarvikkeiden esikäsitteilyyn pitäisi kehittää jokin vaihe tai reagenssi, joka vähentäisi kaakaon aiheuttamaa häiriötä menetelmälle. Menetelmä tarvitsisi vielä tämän osalta jatkotutkimusta, jos häiriötekijän todetaan jatkossakin olevan nimenomaan kaakao. Menetelmän validointiin käytetyistä elintarvikkeista unel- makääretorttu sisälsi kaakaota ja sen suhteellisen keskihajonnan tulos on myös poikkeuksellisen suuri verrattuna muihin validointiin käytettyihin elintarvikkeisiin. Tarkemmat tulokset on esitetty liitteessä 3. Unelmakääretorttu oli välipalapatu- koista poiketen maidoton, jolloin sen mittaustulokset jäivät alle määritysrajan, mikä voi olla myös syynä suuremmalle hajonnalle.

Maitoallergiaa ilmenee eniten ensimmäisten elinvuosien aikana, milloin imeväi- selle voi eri syistä olla käytössä äidinmaidonkorvikkeet. Tavalliset äidinmaidon- korvikkeet ovat lehmänmaitopohjaisia, jolloin sen sisältämät maitoproteiinit eivät sovi maitoallergiselle. Maitoallergiselle on kuitenkin tarjolla valmisteita, jotka eivät sisällä maitoa. (Ruokavirasto 2019) Kyseisiä valmisteita olisi voinut sisällyttää va- lidointiin, jotta olisi saatu selville myös niiden soveltuvuus menetelmään.

Kaiken kaikkiaan menetelmän sisäänajolle ja validoinnille asetetut tavoitteet to- teutuivat. Määritys onnistui analyysipakkaukselle valituille kontrollinäytteelle ja elintarvikematriiseille. Validoinnin tulosten avulla voitiin osoittaa menetelmän so- veltuvuus käyttötarkoitukseensa sekä menetelmän antamien tulosten paikkansa- pitävyys.

LÄHTEET

Biswanger, H. 2017. Enzyme Kinetics: Principles and Methods. 3. painos. Weinheim, Saksa: Wiley-VCH.

Biswas, S. & Saha, M. K. 2015. Uncertainty of Measurement for ELISA in a Serological Testing Laboratory. *Immunochem Immunopathol: Open Access* 1: 109. West Bengal, Intia: OMICS International.

Bylund, G. 1995. Dairy Processing Handbook. Lund, Ruotsi: Tetra Pak.

Cell Signaling Technology. n.d. Types of ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Tests. Verkkosivu. Viitattu 23.3.2022. <https://www.cellsignal.com/applications/elisa/types-of-elisa-tests>

Crowther, J. R. 2001. The ELISA Guidebook. *Methods in Molecular Biology*, Vol 149. USA: Humana Press.

Crowther, J. R. 2009. The ELISA Guidebook. *Methods in Molecular Biology*, Vol 516. 2. painos. Vienna, Itävalta: Humana Press.

Darlington, R. B. & Hayes, A. F. 2017. Regression Analysis and Linear Models: Concepts, Applications, and Implementation. New York: Guilford Press.

Ehder, T. (toim.) 2005. Kemian metrologian opas J6/2005. Helsinki: Metrologian neuvottelukunta. Luettu 2.3.2022. <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/MIKES/2005-J6.pdf>

Ellison, S. L. R. & Williams, A. 2012. EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3. painos. Luettu 14.3.2022. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf

Fapas. 2020. Proficiency Test List. Luettu 8.4.2022. https://fapas.com/sites/default/files/2019-09/Fapas%20Price%20List%202020%20-%20FULL_1.pdf

Finntesting. n.d. Mittausepävarmuus. Kemian seurat. Verkkosivu. Viitattu 25.3.2022. <https://kemianseurat.fi/finntesting/mittausepavarmuus/>

Hiltunen, E., Linko, L., Hemminki, S., Hägg, M., Järvenpää, E., Saarinen, P., Simonen, S. & Kärhä, P. 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet J4/2011. Espoo: Metrologian neuvottelukunta. Luettu 14.3.2022. <https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/MIKES/2011-J4.pdf>

Hefle, S. L. & Lambrecht, D. M. 2004. Validated Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Casein and Its Application to Retail and Milk-Allergic Complaint Foods. *Journal of Food Protection* Vol. 67 (9), 1933–1938. Nebraska, USA: International Association for Food Protection.

Høst, A. 2002. Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* Vol. 89 (6), 33–37.

- Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 6. painos. Helsinki: Edita.
- Khuda, S. E. & Williams, K. M. 2015. Effect of Processing on Dark Chocolate Composition: A Focus on Allergens. USA: Academic Press. 667–674.
- Lucey, J. A. & Horne, D. S. 2018. Perspectives on casein interactions. International Dairy Journal. Madison: Elsevier. 56–65.
- Magnusson, B., Näykki, T., Hovind, H., Krysell, M. & Sahlin, E. 2017. Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories. Nordtest Report TR 537. 4. painos. Luettu 22.2.2022. <http://kemianseurat.fi/finntesting/wp-content/uploads/2019/10/Handbook-for-Calculation-of-Measurement-Uncertainty-in-Environmental-Laboratories-2017-Nordtest-TR-537-%E2%80%93raportti.pdf>
- Magnusson, B. & Örnemark, U. (toim.) 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2. painos. Luettu 10.3.2022. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf
- Mendoza, L. 2016. Caseins: Properties, Functions and Health Implications. New York: Nova Science Publishers.
- Mäkelä, O., Tiilikainen, A. S., Vaara, M., Vaheri, A. & Valtonen, V. 1993. Lääketieteellinen mikrobiologia. 6. painos. Jyväskylä: Duodecim.
- Mäkinen, I., Suortti, A-M., Saares, R., Niemi, R. & Marjanen, J. (toim.) 1996. Ohjeita ympäristönäytteiden kemiallisten analyysimenetelmien validointiin. Helsinki: Suomen Ympäristökeskus.
- Neogen. 2011. Validation Report – for Veratox for Total Milk. Technical Product Information. 1. tarkistettu painos.
- Neogen. 2021. Veratox Casein Allergen Quantitative Test. Kit Insert. Tulostettu 4.10.2021.
- Penttilä, I. 2004. Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Porvoo: WSOY.
- Ruokavirasto. 2019. Elintarviketieto-opas elintarvikevalvojille ja elintarvikealan toimijoille. Ruokaviraston ohje 17068/2. Luettu 15.3.2022. https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/asiointi/oppaat-ja-lomakkeet/yritykset/elintarvikeala/elintarvikealan-oppaat/elintarviketieto_opas_fi.pdf
- Ruokavirasto. 2019. Maito. Verkkosivu. Viitattu 25.4.2022. <https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/ruoka-allergeenit/yleisimmat-ruoka-allergian-aiheuttajat/maito/>
- Ruso, J. M. & Pineiro, A. 2013. Proteins in Solution and at Interfaces: Methods and Applications in Biotechnology and Materials Science. New Jersey: Wiley.

Suchanek, M. & Robouch, P. 2009. Measurement uncertainty of test kit results – the ELISA example. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* Vol. 47 (7), 808–810. Berlin: Walter de Gruyter.

SYKE, Suomen ympäristökeskus. 2021. Mittausepävarmuusohjelmisto (MUkit). Versio 3.0. Luettu 8.2.2022. https://www.syke.fi/fi-FI/Palvelut/Laatu_ ja_laboratoriopalvelut/Kalibrointipalvelut_ ja_sopimuslaboratorio/MUkit_mittausepavarmuusohjelma

Thompson, A., Boland, M. & Singh, H. 2009. *Milk Proteins: From Expression to Food*. New York: Elsevier.

Vaarala, O., Saukkonen, T., Savilahti, E., Klemola, T. & Åkerblom, H. K. 1995. Development of Immune Response to Cow's Milk Proteins in Infants Receiving Cow's Milk or Hydrolyzed Formula. *Journal of allergy and clinical immunology* Vol. 96 (6), 917–923. Helsinki: Mosby.

Ventimiglia, A. M. & J. M. Birkenhäger. 2012. *Casein: Production, Uses and Health Effects*. 7. painos. New York: Nova Science Publishers.

Wal, J. M. 2001. Structure and function of milk allergens. *Allergy* 56 (Suppl. 67), 35–38.

Walker, J. M. & Rapley, R. 2008. *Molecular Biomethods Handbook*. 2. painos. Hatfield, Englanti: Humana Press.

LIITTEET

Liite 1. Standardien mittaustulokset

TAULUKKO 9. Menetelmän lineaarisuuden määrittämiseen käytetyt mittaustulokset.

Standardi	c (mg/kg)	Absor- banssi	Mitattu c (mg/kg)	x c (mg/kg)
1	0	0,130	0,029	0,028
1	0	0,123	0,027	
2	2,5	0,458	2,616	2,565
2	2,5	0,444	2,513	
3	5	0,739	4,881	4,877
3	5	0,738	4,872	
4	10	1,146	9,926	10,207
4	10	1,176	10,488	
5	15	1,364	14,544	14,310
5	15	1,320	14,075	

Liite 2. Nollanäytteen mittaustulokset

TAULUKKO 10. Menetelmän toteamis- ja määrittämissrajien määrittämiseen käytetyt mittaustulokset.

n	Absor- banssi
1	0,078
2	0,074
3	0,102
4	0,100
5	0,130
6	0,123
7	0,081
8	0,085
9	0,085
10	0,089

Liite 3. Elintarvikematriisien mittaustulokset

TAULUKKO 11. Elintarvikkeiden kaseiinipitoisuuksien mittaustulokset.

Näyte	Matriisi	Tulos 1	Tulos 2	x	s ₀ (mg/kg)	RSD %
		c (mg/kg)	c (mg/kg)	c (mg/kg)		
1	Jauhelihakas- tike	0,118	0,134	0,126	0,012	9,1
2	Lihakeitto	0,142	0,128	0,135	0,010	7,4
3	Unelmakääre- torttu	0,142	0,078	0,110	0,045	41,1
4	Mansikka kääretorttu	0,114	0,142	0,128	0,020	15,7
5	Vadelma- mustikka- kakku	0,271	0,214	0,242	0,040	16,6
6	Chili-bataatti sosekeitto	0,698	0,723	0,711	0,017	2,4
7	Minibratwurst	0,021	0,019	0,020	0,001	4,8
8	Sienikastike	6,683	6,914	6,798	0,164	2,4
9	Porkkanalaa- tikko	243,345	220,855	232,100	15,903	6,9
10	Lanttulaatikko	340,205	363,700	351,953	16,613	4,7
11	Maksalaatikko	736,300	782,000	759,150	32,315	4,3
12	Tomaattilins- sikeitto	519,550	534,250	526,900	10,394	2,0
13	Kirjolahikeitto	470,315	422,775	446,545	33,616	7,5
14	Kanatuore- juustokeitto	677,430	648,010	662,720	20,803	3,1
15	Kevyt maito	3284,700	3114,550	3199,625	120,314	3,8
16	Riisipuuro	640,280	691,420	665,850	36,161	5,4
17	Kebab-valko- sipulipanini	380,230	378,295	379,263	1,368	0,4
18	Tyrnimarenki- leivos	720,210	757,880	739,045	26,637	3,6

Liite 4. Kontrollinäytteen mittaustulokset

TAULUKKO 12. Kontrollinäytteen mittaustulokset validointia varten.

n	c (mg/kg)	Absor- banssi
1	25,384	0,430
2	33,086	0,550
3	29,732	0,506
4	30,942	0,522
5	31,780	0,533
6	27,268	0,473
7	28,383	0,488
8	31,475	0,529
9	29,056	0,497
10	31,933	0,535
11	27,416	0,475
12	31,094	0,524
13	31,246	0,526
14	27,862	0,481
15	29,131	0,498
16	30,336	0,514
17	31,704	0,532
18	32,316	0,540
19	32,624	0,544