

Jenni Rahikainen

## **Raakamaidon aflatoksiinimääritys ELISA-menetelmällä**

Opinnäytetyö

Kevät 2015

SeAMK Elintarvike ja maatalous

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU  
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

## Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: Elintarvike ja maatalous

Tutkinto-ohjelma: Bio- ja elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: Elintarviketeknologia

Tekijä: Jenni Rahikainen

Työn nimi: Raakamaidon aflatoksiinimääritys ELISA-menetelmällä

Ohjaaja: Pekka Maijala

Vuosi: 2015

Sivumäärä: 53

Liitteiden lukumäärä: 10

---

Opinnäytetyön aiheena oli raakamaidon aflatoksiinimääritys ELISA-menetelmällä. Työn tavoitteena oli testata ELISA-menetelmällä suoritettavaa Ridascreen Aflatoxin M1 -menetelmää ja kehittää sitä Seinäjoen Valio Oy:n Aluelaboratorion käyttöön sopivaksi. Työn tarkoituksena oli tutkia maidossa mahdollisesti esiintyvää home-myrkkyä ja näin ollen ylläpitää kuluttajille päätyvän maidon turvallisuutta.

Ridascreen Aflatoxin M1 -menetelmä on entsyymi-immunologinen määrittämenetelmä, joka perustuu antigeenin ja vasta-aineen väliseen spesifiseen reaktioon. Menetelmällä määritettiin lehmän raakamaidosta aflatoksiini M1:n pitoisuutta. Aflatoksiini M1 on aflatoksiini B1:n aineenvaihduntatuote, jota voi esiintyä maidossa tai maitotuotteissa.

Menetelmällä saatujen tuloksien avulla tutkittiin, miten rasva kannattaa poistaa näytteistä, ja miten se vaikuttaa tuloksiin. Raakamaitoon lisättiin itse aflatoksiini M1:stä tutkimuksen eri vaiheissa ja tutkittiin menetelmän saantoprosenttia ja mittausepävarmuutta. Lisäksi tutkittiin Seinäjoen Valiolle saapuneiden maitonäytteiden aflatoksiinipitoisuuksia. Työn tuloksena havaittiin menetelmän soveltuvan hyvin tähän käyttötarkoitukseen. Rasvanpoistolla ei havaittu olevan merkittävää vaikutusta saattuihin tuloksiin. Menetelmällä pystyttiin havaitsemaan kohonneet aflatoksiinipitoisuudet luotettavasti ja sitä kautta pystytään parantamaan kuluttajien maitotuotteiden turvallisuutta tulevaisuudessa.

Avainsanat: maito, aflatoksiinit, ELISA

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

## Thesis abstract

Faculty: School of Food and Agriculture

Degree programme: Biotechnology and Food Processing

Specialisation: Food Technology

Author: Jenni Rahikainen

Title of thesis: Aflatoxin assay for raw milk using the ELISA-method

Supervisor: Pekka Maijala

Year: 2015

Number of pages: 53

Number of appendices: 10

---

The aim of this thesis was to make an aflatoxin assay of raw milk using the ELISA test method. The basic idea of the test was to use ELISA assay with Ridascreen Aflatoxin M1. The objective was to develop this test method so that Valio Oy's Seinäjoki Regional Laboratory can use this in future as a part of the standard analyzes process for raw milk. The goal was to analyze possible mycotoxin existing in the raw milk and hence maintain a high safety level to avoid any contamination risk existing in the milk products.

The Ridascreen Aflatoxin M1 test method is an enzyme immunoassay analysis. The basis of the test is an antigen-antibody specific reaction. This method was used to quantify aflatoxin M1 assay existing in raw milk. Aflatoxin M1 is produced as a metabolite of aflatoxin B1 which can exist in either basic milk or milk products.

The validation target was analyzed on how fat could be removed from raw milk in an effective way and was there any influence on existing fat content in the final results. Aflatoxin M1 was added to raw milk in different phases of the study and at the same time the process yield and measurement uncertainty was calculated. In addition the existing level of aflatoxin in raw milk samples already collected by Valio Oy was analyzed. The results of this thesis showed that the capability of this test detection method was good for this purpose. Removing of fat content has not had any significant effect on the final results. It was showed that the method can detect increased aflatoxin assay reliably and therefore it can be used in future to improve the safety of milk products for customers.

Keywords: milk, aflatoxins, ELISA

# SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä.....	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ .....	4
Kuva-, kuvio- ja taulukkoluettelo .....	6
Käytetyt termit ja lyhenteet .....	8
1 JOHDANTO .....	9
2 RAAKAMAITO .....	10
2.1 Raakamaito mikrobien kasvualustana .....	11
2.2 Raakamaidon mikrobiologinen koostumus .....	12
3 AFLATOKSIINIT .....	14
3.1 Toksisuus.....	14
3.2 Viljojen pilaantuminen .....	15
3.3 Aflatoksiini M1 .....	16
3.4 Lainsäädäntö .....	18
4 IMMUNOLOGISET MENETELMÄT .....	20
4.1 Suora ja epäsuora ELISA .....	20
4.2 Sandwich ELISA .....	21
4.3 Kompetitiivinen ja inhiboiva ELISA.....	22
5 RIDASCREEN AFLATOXIN M1 .....	23
5.1 Menetelmän periaate .....	23
5.2 Menetelmässä käytetyt reagenssit.....	24
5.3 Näytteet .....	24
5.4 Muut menetelmät .....	24
6 MENETELMÄN TESTAUS JA KÄYTTÖÖNOTTO .....	26
6.1 Standardikäyrä.....	26
6.2 Pesuohjelmien testaus.....	27
6.3 Aflatoksiinikontrollin lisääminen näytteisiin .....	27
6.4 Maidon rasvapitoisuuden vaikutus tuloksiin .....	28

6.4.1 Rasvan erotustavat.....	28
6.4.2 Rasvan vaikutus tuloksiin.....	29
6.5 Kuormanäytteiden ja tilakohtaisten näytteiden testaus .....	30
6.6 Mittausepävarmuus.....	31
6.7 Saanto .....	31
6.8 Standardikäyrän käyttö toisella levyllä .....	32
6.9 Laadunvarmistusnäyte .....	32
6.10 Kriittiset pisteet.....	33
<b>7 TULOKSET .....</b>	<b>34</b>
7.1 Standardikäyrä.....	34
7.2 Pesuohjelmien testaus.....	35
7.3 Rasvan erotustavat .....	36
7.4 Rasvan vaikutus tuloksiin.....	37
7.5 Kuormanäytteiden ja tilakohtaisten näytteiden testaus .....	40
7.6 Mittausepävarmuus.....	42
7.7 Saanto .....	42
7.8 Standardikäyrän käyttö toisella levyllä .....	43
7.9 Laadunvarmistusnäyte .....	44
7.10 Kriittiset pisteet.....	45
<b>8 YHTEENVETO.....</b>	<b>47</b>
<b>LÄHTEET .....</b>	<b>50</b>
<b>LIITTEET .....</b>	<b>53</b>

## Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuva 1. Aflatoksiini B1 .....	17
Kuva 2. Aflatoksiini M1 .....	17
Kuvio 1. Standardikäyrä cupic spline -sovituksena .....	35
Kuvio 2. Pesuohjelmien vertailun tulokset.....	36
Kuvio 3. Rasvan erotustapojen vertailu.....	37
Kuvio 4. Kuormanäytteiden vertailun tulokset. ....	38
Kuvio 5. Aflatoksiinistandardia sisältävien näytteiden tulokset (korkeat pitoisuudet). .....	39
Kuvio 6. Aflatoksiinikontrollia sisältävien näytteiden tulokset (pienet pitoisuudet). 40	
Kuvio 7. Kuormanäytteiden tulokset.....	41
Kuvio 8. Tilakohtaisten näytteiden tulokset. ....	42
Kuvio 9. Standardikäyrän käyttö toisella levyllä. ....	44
Taulukko 1. Aflatoksiinien enimmäismäärät viljoissa ja maidossa. ....	19
Taulukko 2. Suunnitelma rasvan erotustapojen vertailusta.....	29
Taulukko 3. Kuormanäytteiden tutkimissuunnitelma. ....	29
Taulukko 4. Aflatoksiinistandardia sisältävien näytteiden tutkimissuunnitelma. ....	30
Taulukko 5. Standardien absorbanssit.....	34
Taulukko 6. Saantoprosenttien tulokset. ....	43

Taulukko 7. Laadunvarmistusnäytteiden tulokset. ....	45
--	----

## Käytetyt termit ja lyhenteet

<b>Absorbanssi</b>	Optinen tiheys. Nesteen läpi kulkeneen, tietyn aallonpituuden omaavan valon läpäisyn logaritmifunktio [Abs]
<b>Aflatoksiini</b>	Homesienten tuottama, terveydelle haitallinen myrkky
<b>Antibody</b>	Vasta-aine, tietyn antigeenin vaikutuksen tuottama proteiini, joka reagoi ominaisesti juuri tämän antigeenin kanssa ja tekee sen usein tehottomaksi
<b>Antigeeni</b>	Proteiini tai hiilihydraatti, joka aiheuttaa elimistössä vasta-aineiden muodostumisen
<b>Bakteriosiini</b>	Yleisnimi bakteerien tuottamille antimikrobisille peptideille
<b>Karsinogeeninen</b>	Syöpää aiheuttava yhdiste
<b>Kvantitatiivinen</b>	Määrällisesti mitattavissa oleva ominaisuus
<b>Ppb</b>	Parts per billion, yksi tuhannesosa ppm:stä. Yksikkö on $\mu\text{g}/\text{kg}$
<b>Ppt</b>	Parts per trillion, yksi tuhannesosa ppb:stä. Yksikkö on $\text{ng}/\text{kg}$



# 1 JOHDANTO

Maidossa tai maitotuotteissa voi esiintyä homeyrkkyä, aflatoksiini M1:stä. Aflatoksiini on homesienten tuottama, terveydelle haitallinen yhdiste. Sitä pidetään voimakkaana karsinogeenina, eli se on syöpää aiheuttava aine. Suomessa aflatoksiinin M1 valvonta kuuluu Suomen kansalliseen vierasaineiden valvontaohjelmaan. (Aflatoksiini 2013.)

Seinäjoen Valio Oy:n Aluelaboratoriossa aloitettiin tutkimaan maidon aflatoksiinin M1 pitoisuutta keväällä 2015. Näytteissä mahdollisesti kohonneiden aflatoksiinipitoisuuksien avulla kyetään selvittämään maitotila, jossa lehmille syötetyt rehut ovat aflatoksiinilla saastuneita.

Tämä opinnäytetyö suoritettiin Seinäjoen Valion Aluelaboratoriossa syksyn 2014 ja talven 2015 aikana. Työn teoriaosassa kerrotaan aluksi raaka-maidosta ja aflatoksiineista yleisesti. Aflatoksiinien osalta niiden toksisuus ja aflatoksiini M1 esitellään tarkemmin. Opinnäytetyön teoriaosaan kuuluu immunologisista menetelmistä, kuten Ridascreen Aflatoxin M1 -menetelmän kertominen. Opinnäytetyön kokeellisessa osassa kerrotaan miten menetelmän testaus ja käyttöönotto suoritettiin, sekä niiden tulokset ja yhteenveto.

Opinnäytetyön tavoitteena oli testata ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) -menetelmällä suoritettavaa Ridascreen Aflatoxin M1 menetelmää ja kehittää sitä Valion käyttöön sopivaksi. Työssä tutkittiin menetelmän soveltuvuutta, saantoa, luotettavuutta ja rasvan poiston vaikutusta tuloksiin.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia maidossa mahdollisesti esiintyvää homeyrkkyä, kehittää luotettava mittausmenetelmä ja käytännön työohjeet Seinäjoen Valio Oy:n Aluelaboratorion käyttöön osana jatkuvaa laadunvarmistusta ja näin ollen ylläpitää kuluttajille päätyvän maidon turvallisuutta.

## 2 RAAKAMAITO

Euroopan parlamentin ja Euroopan unionin neuvoston asetuksen (A 29.4.2004/853) mukaan raakamaidoksi kutsutaan kotieläinten maitoa, jota ei ole kuumennettu yli 40 °C:n lämpötilaan, eikä sitä ole käsitelty muulla vastaavalla tavalla. Maito koostuu seuraavista aineosista: vesi (87,5 %), rasva (3,9 %), proteiinit (3,4 %), hiilihydraatit (4,8 %) ja kivennäisaineet (0,8 %). Aineosien prosenttiosuudet ovat keskiarvoja, koska maidon koostumus voi vaihdella paljonkin erirotuisten lehmien välillä sekä myös samanrotuisten yksilöiden välillä. Maidon koostumukseen vaikuttavat myös laktaatiokauden vaihe, lehmän ikä, ruokinta, ympäristöolot ja lypsyn vaihe. Maidossa on enimmäkseen vettä, ja muut aineosat ovat maidossa joko liuenneena tai hienojakoisesti saostuneena (suspendoituneena). Maito voidaan jakaa vesi- ja rasvaliukoisiin osiin. Vesiliukoisessa osassa (96,1 %) ovat vesi ja rasvaton kuiva aine eli proteiinit ja muut tyyppiyhdisteet, hiilihydraatit, laktoosi, B- ja C-vitamiinit sekä kivennäisaineet. Rasvaliukoisessa osassa (3,9 %) ovat triglyseridit ja muut rasvaliukoiset yhdisteet eli mono- ja diglyseridit, fosfolipidit, sterolit, A-, D-, E- ja K-vitamiinit ja karotenoidit. (Bylund 2003, 22; Milk Works.)

**Rasva** on maidossa öljy-vesi emulsiona. Noin 98 % maitorasvasta on triglyseridejä ja loput 2 % muita rasvaliukoisia yhdisteitä. Triglyseridit muodostuvat glyserolimolekyylistä, johon on esteröitynyt kolme rasvahappoketjua. Maidon rasvahapoista suurin osa on tyydyttyneitä rasvahappoja. Rasvahappokoostumuksen perusteella määrättyvät maidon kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet, esimerkiksi sulamisalue ja ravitsemuksellinen arvo. (Bylund 2003, 22; Milk Works.)

Maidon **proteiinit** voidaan luokitella kaseiineihin (n. 80 %) ja heraproteiineihin (n. 20 %). Kaseiinit esiintyvät maidossa toisiinsa liittyneinä molekyyleinä eli miselleinä, jotka sulkevat sisäänsä rasvan ja antavat maidolle valkoisen värin. Heraproteiinit koostuvat albumiinista ja globuliinista. (Bylund 2003, 25–31; Milk Works.)

Laktoosi eli maitosokeri on maidon pääasiallinen **hiilihydraatti**, mutta myös muita hiilihydraatteja esiintyy pieniä määriä maidossa. Laktoosi on disakkaridi, ja se muodostuu glukoosista ja galaktoosista. Laktoosin makeus on huomattavasti pienempi

verrattuna sakkaroosiin. Maitoa kuumennettaessa laktoosi osallistuu Maillard-reaktioon, missä laktoosi ja proteiinit reagoivat keskenään. (Bylund 2003, 34; Milk Works.)

Maidon merkittävimmät **kivennäisaineet** eli suolat ovat kalsium ja sitraatti. Kalsium osallistuu proteiinien saostumiseen ja sitraatti voiaromin syntyyn. Kivennäisaineet esiintyvät maidossa ioneina, proteiineihin sitoutuneina ioniyhdisteinä tai liuoksissa olevina ioniyhdisteinä. Muita maidossa esiintyviä kivennäisaineita ovat jodi, fosfori, natrium, sinkki, seleeni ja magnesium. (Bylund 2003, 35; Milk Works.)

Maito sisältää sekä vesi- että rasvaliukoisia **vitamiineja**. Maidossa on huomattava määrä rasvaliukoista A-vitamiinia sekä sen esiastetta beetakaroteenia. Muita rasvaliukoisia D-, E- ja K-vitamiineja löytyy pieninä pitoisuuksina. Vesiliukoisia B-ryhmän vitamiineja on useita maidossa, vesiliukoista C-vitamiinia löytyy vain vähän. (Bylund 2003, 35; Milk Works.)

## 2.1 Raakamaito mikrobien kasvualustana

Maito on hyvä kasvualusta mikrobeille, koska se sisältää runsaasti ravintoaineita, sen vesiaktiivisuus ( $a_w$ ) on suuri ja pH on lähellä neutraalia ( $pH = 6,6$ ). Maidon säilyttäminen jäädytettynä estää mikrobien toimintaa. Lisäksi on muitakin kasvua rajoittavia tekijöitä. Maidon sokeria, laktoosia, eivät monetkaan mikrobit pysty hyödyntämään. Maidossa on myös sokerina glukoosia, mitä suurin osa mikrobeista pystyy käyttämään, mutta sen osuus on pieni maidossa. Glukoosi voi olla alku mikrobikasvulle, mutta pienen määrän takia kasvua ei pystytä pitämään yllä. Raakamaidon rasvat ovat suojassa mikrobeilta glyko- ja lipoproteiinien sekä fosfolipidien peittämissä palloissa. Liukoisia heraproteiineja mikrobit eivät yleensä käytä hyväkseen, mutta kaseiinimisellejä mikrobit käyttävät proteolyysin avulla. Maidossa esiintyy myös ei-proteiiniperäisiä typenlähteitä, kuten peptidejä, ureaa ja aminohappoja, mitä mikrobit voivat käyttää hyväksi. (Koort & Sivelä 2007, 205–207.)

Raakamaidon turvallisuutta saadaan parannettua lämpökäsittelyllä. Yleisin lämpökäsittely on pastörinti, jossa maito kuumennetaan  $+72\text{ °C}$  lämpötilaan 15 sekunniksi, jolloin tuhoutuvat mahdollisesti tautia aiheuttavat mikrobit. Maito ei kuitenkaan

ole tällöin täysin bakteeritonta. Pastörintia lievempi lämpökäsittely on termisointi, jolla raakamaito saadaan säilymään kauemmin. UHT-käsittely maito on pastörintia voimakkaampi käsittely. ESL-kuumennus toimii UHT-menetelmän mukaan, mutta keitetyn maidon makua ei synny, ja säilyvyys on pastöroitua maitoa parempi. (Milk Works.)

## 2.2 Raakamaidon mikrobiologinen koostumus

Bakteerit ovat yksisoluisia eliöitä, joita esiintyy kaikkialla luonnossa. Kasvuun tarvittavat ravinteet ne saavat kasveista, maasta, elintarvikkeista, iholta ja suolistosta. Terveen lehmän utareessa muodostuvassa maidossa ei ole bakteereita. Maitoon pääsee ensimmäisen kerran bakteereita vedinkanavassa. Suurin osa bakteereista on peräisin lypsylaitteistosta, tilasäiliöstä, sairaan lehmän utareesta tai vetimistä. Myös lypsäjän hyvä hygienia on tärkeä. Maidon bakteerien lisääntyminen riippuu ajasta, lämpötilasta ja bakteerilajista. Navettailmassa on bakteereita, joista suurin osa on itiönmuodostajia. Maidossa esiintyvistä itiöistä noin 10–20 % on peräisin ilmasta, loput sairastuneen lehmän vetimien ja utareen pinnoilta. (Bylund 2003, 65–66; Milk Works.)

Patogeenisiä eli tautia aiheuttavia mikrobeja voi esiintyä raakamaidossa, riittämättömästi lämpökäsitellyssä maidossa, lämpökäsittelyn jälkeen saostuneessa maidossa tai tällaisesta maidosta valmistetussa tuotteessa. Patogeenit ovat peräisin itse eläimestä, utaretulehduksesta tai ympäristöstä. Maidossa esiintyvät patogeenit voidaan jakaa tarttuvia tauteja aiheuttaviin ja ruokamyrkytyksiä aiheuttaviin. Tarttuvia tauteja aiheuttavat mm. *Salmonellat*, *Listeria monocytogenes* ja *Enterohemorraginen Escheria coli*. Ruokamyrkytyksiä aiheuttavat *Bacillus* ja *Clostridium* – sukujen lajit sekä *Staphylococcus aureus*. Maidossa voi esiintyä myös homeita, esimerkiksi *Penicillum*- ja *Aspergillus*- sukujen lajeja. Homeiden aiheuttama pilaantuminen on yleensä näkyvää kasvustoa, mutta ne voivat myös tuottaa myrkyllisiä, näkymättömiä mykotoksiineja. (Koort & Sivelä 2007, 209–210; Milk Works.)

Maidossa esiintyviä maitohappobakteereita voidaan hyödyntää käytettäväksi hapatteenä. Maitohappokäymisen avulla voidaan lisätä maitotuotteen turvallisuutta, säi-

lyvyyttä ja vaikuttaa tuotteen aistinvaraisiin ominaisuuksiin. Tärkeimmät maitohappobakteerisuvut ovat *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* ja *Lactobacillus* –suvut. Maidossa esiintyy myös aina soluja. Solujen lukumäärä kertoo yleensä lehmän terveydentilasta. Terveellä lehmällä niiden pitoisuus on yleensä 100 000 kpl/ml. Utaretulehdukset nostavat solupitoisuutta. Solupitoisuudella on myös vaikutusta maitotuotteiden laatuun. (Milk Works.)

### 3 AFLATOKSIINIT

Eräät *Aspergillus*-suvun homeet (erityisesti *Aspergillus flavus* ja *Aspergillus parasiticus*) tuottavat terveydelle haitallisia yhdisteitä, joita kutsutaan aflatoksiineiksi. Aflatoksiinia esiintyy varsinkin pähkinöissä, mutta myös viljoissa, maidossa, lihassa, mausteissa, manteleissa ja eläinten tuontirehuissa. Viljelykasveihin aflatoksiinia voi kertyä jo ennen sadonkorjuuta, mutta kertyminen on yleisempää jos viljoissa tai varastointiolosuhteissa on liikaa kosteutta. (Pohjanvirta 2007, 276.) Merkittävimmät aflatoksiinit ovat B1, B2, G1, G2 ja M1. Aflatoksiini M1 on maidossa esiintyvä aflatoksiini B1:n aineenvaihduntatuote. (Bennet & Klich 2003.)

Aflatoksiini B1 on yleisin ja voimakkain kaikista luonnon tunnetuista karsinogeenistä. Se vaurioittaa maksasoluja ja on voimakas muta- ja karsinogeeni. Karsinogeenisuuden pääkohdekudos on maksa, missä vaikutus kohdistuu sappiteiden epiteelisoluihin ja hepatosyytteihin. Sen vaikutuksista ihmisen maksasolusyöpään on saatu selviä epidemiologisia näyttöjä. Lisäksi krooniset hepatiitti-infektiot (B ja C) altistavat aflatoksiinin maksakarsinogeenisuudelle. Koeläintutkimuksissa on selvinnyt, että eri eläinlajeilla on merkittäviä herkkyseroja aflatoksiinien vaikutuksista. (Pohjanvirta 2007, 276–277; Aflatoksiini 2013.)

#### 3.1 Toksisuus

Vuonna 1962 Englannissa kuoli noin 100 000 kalkkunaa tuntemattoman syyn takia (Turkey X Disease). Tutkimusten jälkeen syykin selvisi, kun maapähkinöistä valmistetusta rehusta löydettiin *Aspergillus flavuksen* metaboliitteja eli aflatoksiineja. Tämän tapahtuman yhteydessä aflatoksiineja on saatu ensimmäisen kerran eristettyä ja kuvattua. (Bennet & Klich 2003.) Viimeisin suurin epidemia tapahtui vuonna 2004, kun Keniassa aflatoksiini B1 oli saastuttanut maissin. Satoja ihmisiä sairastui ja yli sata ihmistä menehtyi syötyään kontaminoitunutta maissia. (Markkula 2007, 240–241.)

Aflatoksiinit ovat vaikutusmekanismiltaan genotoksisia karsinogeenisiä. Niiden syöpävaarallisuus pohjautuu yhdisteiden kykyyn aiheuttaa vaurioita solun geneettiseen materiaaliin, deoksiribonukleiinihappoon eli DNA:han. Ne voivat aiheuttaa ihmisille

ja eläimille joko akuuttia tai pitkäaikaista toksisuutta. Akuutit myrkytysoireet voivat johtaa kuolemaan, mutta ne ovat harvinaisempia. Ihmisille merkittävimpiä ovat pitkäaikaisvaikutukset, kuten syöpä, immuniteettihäiriöt ja muut patologiset vaikutukset. Aflatoksiinien on myös todettu aiheuttavan jossain määrin sikiön epämuodostumia. (Bennet & Klich 2003; Aflatoksiini 2013.) Aflatoksiineille ei voida sanoa korkeinta turvallista aikuisen saantilukua, koska yhdisteet ovat genotoksisia, joilla ei ole kynnyksarvoa haittavaikutusten toteamiseksi. (Elintarvikkeiden ja talousveden kemialliset vaarat 2014, 54.)

Altistuminen aflatoksiineille on terveysongelma monissa kehitysmaissa. Ravinnon turvallisuus jää vähemmälle huomiolle ravinnon niukkuuden vuoksi. Viljojen varastointiolosuhteet ovat heikot, sekä kuuma ja kostea ilmasto ovat otollisia aflatoksiinien kasvulle. Esimerkiksi Saharan eteläpuolisessa Afrikassa asukkaat altistuvat aflatoksiineille säännöllisesti. Ihmisten elinkeinoiniin vaikuttaa negatiivisesti aflatoksiinien saastuttama ruoka ja tietämättömyys aiheesta. Altistuminen aflatoksiineille on todettu lyhentävän odotettavissa olevaa elinikää. Kroonisissa maksatulehduksissa (hepatiitti B ja C) on lisääntynyt maksasyövän riski, jolloin aflatoksiinille altistuminen lisää tätä riskiä moninkertaiseksi. Lapsilla aflatoksiineille altistuminen on aiheuttanut hidastunutta kasvua, alipainoa, neurologisia ongelmia, immuunivasteen heikkenemistä ja lapsikuolleisuutta. (Impacts of Aflatoxins on Health and Nutrition 2006.)

Aflatoksiinit B1, B2, G1 ja G2, sekä niiden seokset ovat kansainvälisen syöväntutkimuslaitoksen (International Agency for Research on Cancer, IARC) mukaan luokiteltu ryhmään 1 eli ”ihmisille syöpää aiheuttaviksi aineiksi”. Aflatoksiini M1 on asetettu kuulumaan ryhmään 2B eli ”mahdollisesti ihmiselle syöpää aiheuttavaksi aineeksi”. Aflatoksiini M1:n kyky aiheuttaa syöpää on vain 2-10 % verrattuna aflatoksiini B1:n kykyyn. (Aflatoksiini 2013; International Agency for Research on Cancer 2014.)

### **3.2 Viljojen pilaantuminen**

Viljat voivat kontaminoitua jo pelloilla eri mikrobeista. Nämä peltokontaminantti mikrobit ovat yleensä peräisin maaperästä, eläimistä, hyönteisistä, lannoitteista, muista

kasveista tai kylvösiemenistä. Kosteat ja lämpimät olosuhteet luovat hyvän kasvu-alustan bakteereille ja sienille. Myös viljan rakenteen vaurioituminen tuhoeläimen toimesta, epäsuotuisat kasvuolot ja lakoontuminen edesauttavat viljan pilaantumista jo pelloilla. (Markkula 2007, 235–237.)

Oikein säilytettyinä kuivattua viljaa voidaan varastoida vuosia. Viljojen vesiaktiivisuus ( $a_w$ ) on tärkeää saada 0,6–0,75 välille, riippuen lajikkeesta. Tämä onnistuu kuivaamalla viljat 10–15% kosteuspitoisuuteen puinnin jälkeen. Lisäksi viljojen säilytystilan tulee olla riittävän kuiva. Tällöin mikrobikasvu estyy, eivätkä varastokontaminantit pääse kasvamaan. (Markkula 2007, 235–237.) Aspergillus-homeiden (*flavus ja parasiticus*) kasvun mahdollistama vesiaktiivisuusarvo ( $a_w$ ) on 0,78. Kun vesiaktiivisuusarvo on korkea ja lämpötila ja kosteus sopivia, niin aflatoksiineja voi alkaa muodostumaan. (Markkuja 2007, 236.)

Lehmät syövät karkeaa rehua, esimerkiksi heinää, säiliörehua ja kesällä laidunruohoa tai väkirehua. Homehtunut rehu voi aiheuttaa terveysongelmia lehmille. Tämän vuoksi homehtunutta rehua ei tule syöttää eläimille, vaan saastunut materiaali tulee poistaa ruokinnasta. Seuraukset homeisen rehun syöttämisestä lehmille voivat näkyä myös maidontuottajilla, jos he esimerkiksi juovat tuottamaansa raakamaitoa, johon aflatoksiinia on muodostunut. Saastunutta rehua syövien lehmien oireet voivat olla epämääräisiä ja vaikeasti tunnistettavissa. Homeet voivat aiheuttaa pötsin pieneliöiden toimintahäiriöitä, mistä johtuen ravinteiden pilkkoutuminen heikkenee. Aflatoksiini voi aiheuttaa tuotannon laskua lehmillä. (Kulkas 2012; Homemyrkyt eli mykotoksiinit 2013.)

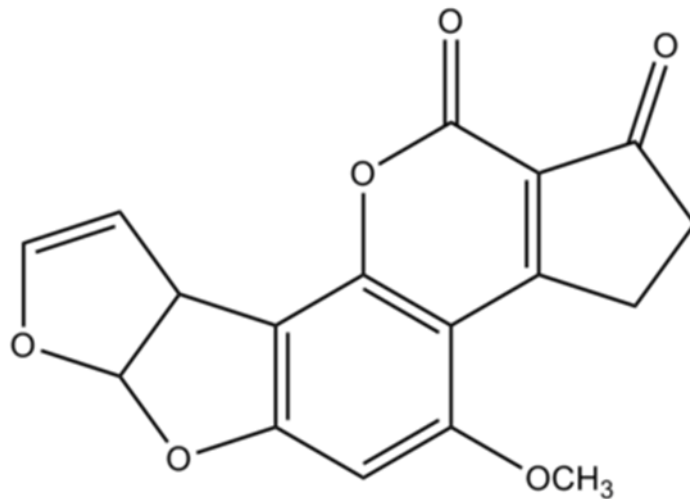
### 3.3 Aflatoksiini M1

Maidossa esiintyvä aflatoksiini on M1, aflatoksiini B1:n aineenvaihduntatuote. Lehmän syödessä aflatoksiini B1:n saastuttamaa rehua, aflatoksiini B1 muuttuu lehmän maksassa sytokromi P450 entsyymien avulla aflatoksiini M1:ksi. Tätä kautta aflatoksiini M1:stä päätyy maitoon 1-2 % verran, loput kulkeutuvat virtsan mukana pois. (Aflatoksiini 2013.) Aflatoksiini M1 ei häviä kuumennettaessa, eikä siten tuotteiden

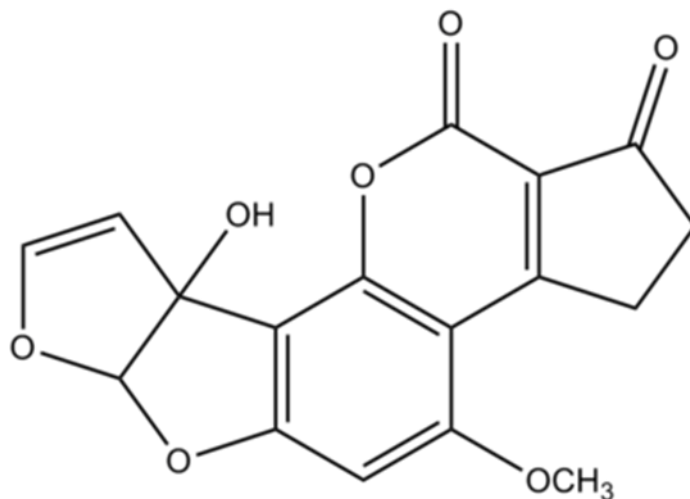


valmistusprosessien aikana. Näin ollen sitä voi esiintyä myös valmiissa lopputuotteissa, esimerkiksi juustoissa. (Dutton ym. 2010; Elintarvikkeiden ja talousveden kemialliset vaarat 2014, 56.)

Kuvissa 1 ja 2 on aflatoksiinien B1 ja M1 kemiallinen rakenne.



Kuva 1. Aflatoksiini B1  
(The aflatoxicosis 2013).



Kuva 2. Aflatoksiini M1  
(The aflatoxicosis 2013).

Aflatoksiini M1:n valvonta kuuluu Suomen kansalliseen vierasaineiden valvontaohjelmaan. Suomessa maidon aflatoksiini M1:n pitoisuudet ovat yleensä pieniä, mutta joskus havaitaan pieniä pitoisuuksia tilakohtaisissa maitonäytteissä. Suomen ilmasto-olosuhteet (kosteus ja lämpötila) eivät ole otollisia rehujen pilaantumiselle,

mutta epäonnistuneen rehusäilönnän seurauksena toksiineja voi esiintyä. Maitotuotteiden suurkuluttajilla, edes riskiryhmiin kuuluvilla, maksasyövän riski on todettu vähäiseksi Euroopassa. Riskiryhmään kuuluvat maksatulehdusta (hepatiitti B ja C) sairastavat henkilöt. Suomessa aflatoksiineja esiintyy yleensä maahan tuoduissa elintarvikkeissa ja rehujen raaka-aineissa. (Aflatoksiini 2013.)

Ympäri maailmaa aflatoksiinin huomataan pilaavan rehua aina silloin tällöin. Esimerkiksi vuonna 2013 Saksaan tuotu serbialainen tuontirehu oli pilaantunut aflatoksiini B1:llä. Pilaantuminen huomattiin vasta, kun saksalainen maidontuottaja löysi maidostaan kohonneita aflatoksiini M1 pitoisuuksia. Pilaantunutta rehua oli päätynyt yli 3000 tilalle. Tapahtuman johdosta melkein tuhat maitotilaa oli maidonlähetyskielossa. Kuluttajille ei tapahtuneesta aiheutunut vaaraa, koska maidon aflatoksiinipitoisuus pienenee meijeriin saapuneiden puhtaiden maitojen avulla. (Schäfer 2013.)

Joissakin maissa aflatoksiinille altistuminen voi olla jokapäiväistä. Esimerkiksi Itä-Afrikassa sijaitsevassa Keniassa viljojen ja maitojen korkeat aflatoksiinipitoisuudet ovat suuri ongelma. Keniassa on viranomaisten asettamia kansainvälisesti hyväksytyjä laatustandardeja, mutta rehujen ja maidon laadunvalvonta on huonosti toteutettu. Nairobien yliopistossa on tehty tutkimus viljojen ja maitojen sisältämästä aflatoksiini B1 ja M1 määrästä. Vuosina 2006–2007 kerättiin vilja- ja maitonäytteitä. Maitonäytteet tutkittiin R-Biopharm Ridascreen Aflatoxin M1 -menetelmällä. Kaupunkien pienviljelijöiden maitonäytteistä 72 % (317/439) oli positiivisia ja 35 % niistä näytteistä sisälsi aflatoksiini M1:stä yli 50 ng/kg (ppt). Näistä näytteistä 2 %:lla tulos oli yli 500 ng/kg. Keskisuurten ja suurten maidontuottajien näytteistä 83 % (71/85) oli positiivisia. Näistä noin 35 % näytteistä (25/71) sisälsi aflatoksiini M1:stä yli 50 ng/kg. Marketissa myydyistä maidoista 99 % (87/89) oli positiivisia. Positiivisista näytteistä 27 % sisälsi aflatoksiinia yli 50 ng/kg. Korkein pitoisuus oli 600 ng/kg. Marketissa myydyt maidot olivat joko kokonaan tai osittain pastöroitu tai iskukuumennettuja. (Kang`ethe & Lang`a 2009.)

### **3.4 Lainsäädäntö**

Homemyrkyille on asetettu lainsäädännössä raaka-ainekohtaisia säädöksiä korkeimmista sallituista pitoisuuksista elintarvikkeissa. Raaka-aineiden tai siitä tehtyjen

valmisteiden raja-arvoihin vaikuttavat se, että ovatko ne tarkoitettu suoraan ihmisravinnoksi tai käytettäväksi elintarvikkeiden ainesosana. Maahantuontivaiheessa riskiraaka-aineita valvotaan tarkasti. Myös Suomen kansallisen vierasaineiden valvontaohjelman avulla seurataan homeyrkyn määrää elintarvikkeissa. (Homeyrkyt 2013.) Taulukossa 1 on Euroopan Komission asetuksen mukaisesti aflatoksiinien sallitut enimmäismäärät viljoissa ja maidossa.

Taulukko 1. Aflatoksiinien enimmäismäärät viljoissa ja maidossa (A.26.2.2010/165).

Aflatoksiinit	Enimmäismäärät (µg/kg, ppb)		
	B1	B1, B2, G1, G2 summa	M1
<b>Viljat</b>			
Vilja ja viljavalmisteet, jalostetut viljavalmisteet (paitsi * merkityt)	2,0	4,0	-
* Maissi, johon on ennen ihmisravinnoksi tai elintarvikkeiden aineosiksi käyttämistä sovellettava lajitte-lumenettelyä tai muita fyysisiä menetelmiä	5,0	10,0	-
* Imeväisten ja pikkulasten viljapohjaiset valmis-ruoat ja muut lastenruoat	0,10	-	-
* Imeväisten erikoisruokavaliovalmisteet lääkinällisiin tarkoituksiin	0,10	-	0,025
<b>Maito</b>			
Raakamaito, lämpökäsitelty maito ja maitopohjais-ten tuotteiden valmistukseen tarkoitettu maito	-	-	0,050
Äidinmaitokorvikkeet ja vieroitusvalmisteet, koko-naan lehmänmaidon proteiinista valmistetut tuot-teet	-	-	0,025

Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (Food and Drug Administration, FDA) on asettanut maidolle aflatoksiini M1:n rajaksi 0,5 µg/kg (500 ppt). (Aflatoxin M1 in milk 2013.)

## 4 IMMUNOLOGISET MENETELMÄT

Elintarvikemikrobiologiassa mikrobien ja niiden tuottamien toksiinien ja bakteriosiinien tunnistamiseen voidaan käyttää immunologisia menetelmiä. Menetelmien periaate perustuu siihen, että mikrobin tai sen tuottama toksiinien, bakteriosiinien tai muun proteiinin määrä saadaan selville spesifisen vasta-aineen avulla suoraan näytteestä. Toisena vaihtoehtona on eristää mikrobi ja tunnistaa se immunologista menetelmää apuna käyttäen. Näiden molempien menetelmien vahvuus on herkkyys ja suuri tarkkuus. Elintarvikemikrobiologiassa käytetään näitä menetelmiä enimmäkseen patogeenibakteerien ja niiden tuottamien toksiinien, home- ja sienitoksiinien sekä viruksien tunnistamiseen ja osoittamiseen. (Heikinheimo, Lindström & Hatakka 2007, 148.)

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) -menetelmä perustuu vasta-aineiden kykyyn sitoutua niille spesifisiin antigeeneihin. Näytteistä saadaan näkyviin signaali eri reagenssien avulla, jolloin tutkittavan analyytin konsentraatio voidaan osoittaa. Peruseriaate ELISA-menetelmässä on, että kiinteälle pinnalle, esimerkiksi mikrotiitteri levyn kaivoihin sidotaan liuos, jossa on joko antigeeni tai vasta-aine. Myöhemässä vaiheessa entsyymikonjugoitu vasta-aine tai antigeeni lisätään ja se sitoutuu spesifisesti kohteena olevaan antigeeniin tai vasta-aineeseen. Kaivoihin lisätään substraatti, mikä reagoi entsyymin kanssa ja syntyvä värituote voidaan mitata spektrofotometrisesti. ELISA-menetelmät voidaan jakaa kolmeen eri menetelmään: suora, epäsuora ja sandwich. Sandwich ELISA voidaan jakaa lisäksi suoraan ja epäsuoraan. Nämä menetelmät ovat pohjana myös kompetitiivisille ja inhiboiville ELISA-menetelmille. (Crowther 2009 11, 43)

### 4.1 Suora ja epäsuora ELISA

Suora menetelmä on yksinkertaisin ELISA-menetelmistä. Menetelmässä käytetään antigeeniä, joka on laimennettu korkean pH:n omaavaan puskuriin. Puskuri ei sisällä muita proteiineja, jotka voisivat häiritä analysoitavan antigeenin sitoutumista kuoppalevyn pohjaan. Inkuboinnin aikana antigeenit kiinnittyvät passiivisesti kaivojen pohjiin. Sitoutumattomat aineet pestään pesupuskurilla pois ja kaivoihin lisätään

entsyymileimattu vasta-aine, mikä on laimennettu blokkausyhdistettä sisältävään pesupuskuriin. Tämän jälkeen levy pestään uudestaan. Kaivoihin lisätään substraatti, joka kiinnittyy vasta-aineessa olevaan entsyymiin. Inkuboinnin aikana entsyymi katalysoi värireaktion. Reaktio pysäytetään inhiboivalla reagenssilla tai muuttamalla pH:ta. Lopullinen värituote mitataan spektrofotometrisesti. (Crowther 2009, 12–14)

Epäsuorassa ELISA:ssa kaivoihin lisätyn antigeenin sitoutumisen jälkeen levyllä lisätään leimaamaton primaarivasta-aine. Inkuboinnin aikana se sitoutuu antigeeniin. Levy pestään, jolloin sitoutumaton aine huuhdotaan pois. Kaivoihin lisätään leimattu sekundaarivasta-aine, joka leimautuu primaarivasta-aineeseen inkuboinnin aikana. Levy pestään ja seuraavaksi määrittäminen jatkuu substraatin lisäyksellä, niin kuin suorassa menetelmässä. (Crowther 2009, 14)

#### **4.2 Sandwich ELISA**

Sandwich-menetelmä voi olla joko suora tai epäsuora ELISA. Suorassa sandwich ELISA:ssa levyn kaivoihin lisätään primaarivasta-aine. Inkuboinnin aikana se kiinnittyy passiivisesti kaivon pohjaan. Levy pestään, jonka jälkeen voidaan käyttää blokkauspuskuriä poistamaan epäspesifistä sitoutumista aiheuttavat kohdat. Levy inkuboidaan ja pestään. Tämän jälkeen lisätään näytteet, jotka ovat laimennettu blokkauspuskuriin. Inkuboinnin aikana määritettävät antigeenit kiinnittyvät primaarivasta-aineeseen. Sitoutumaton näyte pestään pois, minkä jälkeen kaivoihin lisätään entsyymileimattu sekundaarivasta-aine. Inkuboinnin aikana tämä tunnistaa antigeenin ja kiinnittyy siihen. Levy pestään ja lisätään substraatti kaivoihin. Värireaktio pysäytetään stop-liuoksella ja luetaan spektrofotometrisesti. Epäsuorassa sandwich ELISA:ssa käytetään leimaamatonta sekundaarivasta-ainetta. Tämän jälkeen lisätään kaivoihin detektion mahdollistava kolmas vasta-aine, joka ei reagoi primaarivasta-aineen kanssa, mutta kiinnittyy sekundaarivasta-aineeseen. Määrittäminen jatkuu substraatin lisäyksellä ja loppuu stop-liuoksen lisäämiseen. (Crowther 2009, 16–21)

### **4.3 Kompetitiivinen ja inhiboiva ELISA**

Kompetitiivistä ja inhiboivaa menetelmää voidaan käyttää joko antigeenin tai vasta-aineen määrittämiseen. Reaktiossa käytetään tunnettu määrä tiettyä komponenttia, joka häiritsee vasta-aineen sitoutumista antigeenin kanssa tai kilpailee sitoutumispaikoista. Tämä komponentti on leimattu ja sen määrä on kääntäen verrannollinen analysoitavaan yhdisteeseen. (Crowther 2009, 21–37).

## 5 RIDASCREEN AFLATOXIN M1

Näytteiden tutkimiseen tarvittavan reagenssipaketin Ridascreen Aflatoxin M1 toimitti Valiolle Mediq Suomi Oy. Reagenssipaketin valmistuksesta vastaa Saksassa R-Biopharm AG. Ridascreen Aflatoxin M1 on kvantitatiivinen immunologinen testi, jolla voidaan tällä hetkellä tutkia maidosta, maitojauheesta, juustosta tai voista aflatoksiini M1:n määrää. Testi suoritetaan kompetitiivisella ELISA-menetelmällä, ja se on valmistajan mukaan erittäin tarkka (herkkyystaso ng/kg) mittaamaan aflatoksiinin määrää. (Ridascreen 2004, 11.)

### 5.1 Menetelmän periaate

Menetelmä perustuu antigeenin ja vasta-aineen reaktioon. Mikrotiitterilevyn kaivot ovat päällystetty aflatoksiini M1:sen vasta-aineen vasta-aineella. Kaivoihin lisätään aflatoxin M1 vasta-ainetta, joka kiinnittyy levyn kaivoissa olevaan vasta-aineeseen. Inkuboinnin jälkeen levy pestään. Tämän jälkeen lisätään standardit ja näytteet. Toisen inkuboinnin ja levyn pesun jälkeen kaivoihin lisätään entsyymikonjugoitu aflatoksiini M1. Inkuboinnin aikana vapaa ja entsyymikonjugoitu aflatoksiini M1 kilpailee vasta-aineen sitoutumiskohdista (kompetitiivinen ELISA). Kaikki kiinnittymättömät entsyymiinikonjugoidut aflatoksiini M1:set pestään pois. Tämän jälkeen lisätään kaivoihin substraatti/kromogeeni ja inkuboidaan taas. Sitoutuneet entsyymikonjugaatit muuttavat kromogeenin värin vaaleanpunaisesta siniseksi. Viimeiseksi lisätään 0,5 M rikkihappoa pysäyttämään entsyymireaktio. Väri vaihtuu sinisestä keltaiseksi. Mittaaminen tapahtuu spektrofotometrillä 450 nm aallonpituudella. Standardikuvaajaan saadaan absorbanssiarvot vastaaviin standardien pitoisuuksiin. Saadut absorbanssitulokset ovat kääntäen verrannollisia näytteiden aflatoksiini M1 pitoisuuksiin. Eli mitä korkeampi absorbanssitulos on, sitä pienempi aflatoksiinipitoisuus näytteessä on. Pitoisuudet saadaan laskettua standardikuvaajan avulla. (Ridascreen 2004, 12.)

## 5.2 Menetelmässä käytetyt reagenssit

Ridascreen Aflatoxin M1 testipakkaus sisältää mikrotiitterilevyn, standardit, vasta-aineen, konjugaatin, substraatin, pysäytysliuoksen, näytteiden laimennusliuoksen ja suolaliuospussin. Mikrotiitterilevyllä on 96 kaivoa (12 riviä x 8 kaivoa), jotka on päällystetty aflatoxin M1:sen vasta-aineen vasta-aineella. Standardien pitoisuuksia on kuusi erilaista (0; 5; 10; 20; 40; 80 ppt). Vasta-aine ja konjugaatti ovat tiivisteinä, mitkä pitää laimentaa 1 x pesupuskurilla suhteessa 1:11. Konjugaatti on peroksi-daasi-konjugoitu aflatoksiini M1. Substraatti sisältää tetrametyylibenzidiiniä. Pysäytysliuos sisältää 0,5 M rikkihappoa. (Ridascreen 2004, 13.)

Suolaliuospussista laimennetaan kymmenkertainen pesupuskuri ionisoidulla vedellä. Tämä säilyy 2-3 kuukautta huoneenlämmössä. Tästä voidaan laimentaa vielä yksinkertainen pesupuskuri ionisoidulla vedellä suhteessa 1:10. Tämä säilyy 1-1,5 kuukautta huoneenlämmössä. (Ridascreen 2004, 16.)

## 5.3 Näytteet

Testin avulla voidaan tutkia aflatoksiini M1:stä maidosta, maitojauheesta, juustosta tai voista. Eri näytteillä on omat näytekohtaiset esivalmistelut. Menetelmäohjeen mukaan maidon toteamisraja on 5 ppt. Ohjeen mukaan standardit ja näytteet on hyvä pipetoida aina rinnakkaisnäytteinä. (Ridascreen 2004,11–15.)

## 5.4 Muut menetelmät

R-Biopharmilla on muitakin kompetitiivisiä ELISA -menetelmiä aflatoksiinin määrittämiseen näytteistä. Maidosta ja maitojauheesta voidaan tutkia aflatoksiinin M1 määrää Ridascreen Fast Aflatoxin M1 -menetelmällä. Pikatestin inkubointiaika on 15 minuuttia. Verrattuna Ridascreen Aflatoksiini M1 -menetelmällä inkubointiaika on 75 min. (Aflatoxin.)



Kompetitiivisiä ELISA -menetelmiä viljakasvien ja rehujen aflatoksiinipitoisuuksista ovat Ridascreen Aflatoxin B1 30/15 -menetelmä mittaamaan aflatoksiini B1:n määrää. Ridascreen Aflatoxin Total -menetelmällä voidaan määrittää aflatoksiinien (B1, B2, G1 ja G2) määrää. Pikamenetelmä Ridascreen Fast Aflatoxin avulla voidaan määrittää aflatoksiinien määrää. On myös olemassa immunokromatografinen Rida Quick Aflatoxin -menetelmä, millä voidaan määrittää aflatoksiinia jauhetuista ruoka-ainenäytteistä Rida Quick Scan -laitteella. Menetelmä on validoitu maissille. (Aflatoxin.)

## 6 MENETELMÄN TESTAUS JA KÄYTTÖÖNOTTO

Menetelmää testattaessa pipetoitiin jokaiselle levyille aina oma standardikäyrä. Kaikki standardit ja näytteet pipetoitiin rinnakkaisnäytteinä (yhdestä näytteestä kaksi tulosta) menetelmäohjeen mukaan. (Ridascreen 2014, 15.) Työstä laadittiin lyhyt menetelmäohje, mistä näkee työn päävaiheet. Lisäksi laadittiin pidempi työohje, missä on laajemmin työn menetelmäohje sekä laadunvarmistusohje. Liitteessä 10 on pidempi menetelmäohje.

### 6.1 Standardikäyrä

Menetelmäohjeessa on ohje tulosten laskemiseen. Valittiin yhden levyn standardien arvot ja näiden pohjalta laadittiin standardikäyrä ilman ohjelmaa. Ohjeen mukaisesti y-akselilla on normalisoidut absorbanssit, joissa standardi 1:sen arvoksi valitaan 100 % ja muut standardit suhteutetaan standardi 1 absorbanssiin jakamalla absorbanssit standardi 1:sen absorbanssilla ja kertomalla 100 %:lla. X-akselilla on aflatoksiinipitoisuudet (ng/kg) luonnollisen logaritmin asteikkona. Kuvaan sovitetaan cubic spline -käyrä epälineaarisuuden vuoksi. (Ridascreen 2014, 18.)

Cubic spline -menetelmä on tasoitettu pisteestä pisteeseen menetelmä, jossa viereiset kalibrointipisteet yhdistetään kuutiopolynomilla ja yhdistelykohdat optimoidaan mahdollisimman tasaisiksi teräviä kulmia välttämällä. Tulokset lasketaan etsimällä ensin oikea väli ja etsimällä sitten yhtälöstä ratkaisua puolittamismenettelyä käyttäen (Multiskan FC 2009.)

Absorbanssien ja aflatoksiinipitoisuuksien eli kahden muuttujan välisen riippuvuuden voimakkuutta voidaan kuvata korrelaatiokerroimella. Mitä lähempänä korrelaatiokerroin on 1 tai -1, sitä voimakkaampi yhteys on kahden muuttujan välillä. Jos kerroin on lähellä nollaa, tilastollista riippuvuutta ei esiinny. (Jaarinen & Niiranen 2008, 25.)

## 6.2 Pesuohjelmien testaus

Menetelmäohjeessa oli ohjeet käsin suoritettavalle pesulle. Valion laboratoriossa oli kuitenkin Wellwash Microplate -pesuri jo valmiina. Työssä päätettiin käyttää pesuria, koska työvaiheissa on kolme pesua, niin pesurin käyttö tuo sujuvuutta työhön. Luotiin kaksi eri pesuohjelmaa ja tutkittiin onko eri pesuohjelmilla vaikutusta tuloksiin. Menetelmäohjeen mukaan pesu tulee tehdä kolme kertaa analysoinnin aikana.

Käsin suoritettavassa pesussa kaadetaan nesteet pois levyiltä ja kopautetaan puhtaalle paperille kolme kertaa niin, että nesteet poistuvat kokonaan kaivoista. Tämän jälkeen pipetoidaan jokaiseen kaivoon 250 µl 1xpesupuskuria ja kaadetaan liuos pois. Tämä suoritetaan yhteensä kolme kertaa. (Ridascreen 2004, 16.)

Luoduissa pesuohjelmissa (1 ja 2) käytettävän puskurin tilavuus on 250 µl ja pesusykyjen määrä 3. Valitussa pesutavassa kaikki rivit prosessoidaan ennen seuraavaa sykliä. Kaivon muodoksi on valittu tasapohja. 1-pesuohjelmassa suoritetaan pesu ilman imua. 2-pesuohjelman loppuun on lisätty imuvaihe. Imutavaksi on valittu kaksi eri kohtaa kaivon pohjasta ja nopeudeksi korkein mahdollinen. Imuaika on 1 sekunti, ja imukorkeus 2,6 mm. Eri pesuohjelmia tutkittiin tekemällä viisi eri levyä, joihin pipetoitiin standardit rinnakkaisnäytteinä. Tuloksista laskettiin rinnakkaisnäytteiden absorbanssien erotusten keskiarvot ja verrattiin näin pesuohjelmia keskenään.

## 6.3 Aflatoksiinikontrollin lisääminen näytteisiin

Raakamaidon aflatoksiinipitoisuudet ovat yleensä erittäin pieniä. (Aflatoksiini 2013.) Tämän vuoksi raakamaitoon lisättiin itse aflatoksiini M1 standardia, jotta saadaan myös korkeampia pitoisuuksia mitattua. Raakamaito saatiin Seinäjoen Valiolle tulevasta maidosta. Aflatoksiini M1 standardi (Trilogy Analytical Laboratory) toimitettiin kuivattuna. Tämä jauhe vanhenee 24.7.2015. Kuivattuun jauheeseen piti sekoittaa 2 ml asetoniiriä (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N). Tällöin aflatoksiini M1 pitoisuudeksi tuli 1,0 µg/ml. Tämä liuos säilyy 6 kuukautta. Tätä liuosta laimennettiin ionisoidulla vedellä ja sitä käytet-

tiin maitoon tarvittaessa. Laimennus tapahtui siten, että otettiin 1 ml aflatoksiinikontrollia, ja se laimennettiin 1 litraan ionisoitua vettä. Tällöin valmiin liuoksen pitoisuus oli 1,0 µg/kg (1000 ppt).

#### **6.4 Maidon rasvapitoisuuden vaikutus tuloksiin**

Menetelmäohjeen mukaan maitonäytteistä tulee poistaa rasva (Ridascreen 2004, 15). Työssä tutkittiin erilaisia rasvanerotustapoja ja pyrittiin löytämään helpoin ja luotettavin tapa poistaa rasva. Lisäksi tutkittiin rasvan vaikutusta mittaustuloksiin.

##### **6.4.1 Rasvan erotustavat**

Näytteiden aflatoksiinipitoisuudeksi haluttiin noin 20 ppt, mikä onnistuu lisäämällä maitoon aflatoksiini M1 standardia. Työssä oli tarkoituksena saada maidon rasva näytteen pinnalle. Sentrifugoinnilla (10 min, 3500g) saatiin maidon rasva näytteen pinnalle kerroksena. Kun näytteet olivat vielä yön yli kylmiössä, pinnalle muodostunut rasvakerros kovettui hieman lisää, mikä helpotti rasvan poistoa. Maidolle on ominaista, kun se jätetään seisomaan joksikin aikaa, että rasvapallot nousevat pintaan eli kermoittuvat (Milk Works). Osa näytteistä kermoittui yön yli kylmiössä. Pinnalle muodostunut rasva poistettiin kuorimalla lusikalla tai pipetoimalla rasvakerroksen läpi. Työssä määritettiin myös näytteiden aflatoksiinipitoisuus ilman rasvan poistoa.

Työssä tulee näytteiden olla huoneenlämpöisiä lisäyshetkellä (Ridascreen 2004, 15). Heti kun näytteet otettiin huoneenlämpöön, poistettiin niistä rasva kuorimalla tai pipetoimalla rasvakerroksen läpi. Pipetoitu maito siirrettiin toiseen näytepurkkiin odottamaan lämpötilan nousua. Näytettä pipetoitiin enemmän (500 µl), kuin työhön tarvittava määrä (100µl).

Näytteiden tekeminen aloitettiin ottamalla raakamaitoa litran verran. Maitoon lisättiin aflatoksiinistandardia 20 ml, jolloin maidon aflatoksiinipitoisuus olisi noin 20 ppt. Lopullinen määrä riippuu raakamaidossa alun perin olevasta aflatoksiini M1:stä. Maito sekoitettiin tasalaatuiseksi ja jaettiin 30 ml näytepurkkeihin. Näytteitä oli yhteensä

30 kpl. Tuloksia verrattiin keskiarvon (ka) ja keskihajonnan (s) avulla. Keskihajonnan avulla nähdään, miten arvot ovat ryhmittyneet keskiarvon ympärille. Taulukossa 2 on näytteiden ottosuunnitelma.

Taulukko 2. Suunnitelma rasvan erotustapojen vertailusta.

Näytteen valmistusmenetelmä	Määrä (lukumäärä x tilavuus)
Sentrifugointi (yön yli kylmiössä) + kuorinta	6 kpl x 30 ml
Sentrifugointi (yön yli kylmiössä) + pipetointi läpi	6 kpl x 30 ml
Yön yli kylmiössä + kuorinta	6 kpl x 30 ml
Yön yli kylmiössä + pipetointi läpi	6 kpl x 30 ml
Rasvaa ei poistettu	6 kpl x 30 ml

#### 6.4.2 Rasvan vaikutus tuloksiin

**Kuormanäytteiden tutkiminen.** Tutkittiin Valion kuormanäytteiden aflatoksiinipitoisuuksia. Otettiin kuudelta eri reitiltä raakamaitoa ja jokaisesta tehtiin kaksi näytettä. Toisesta näytteestä poistettiin rasva (sentrifugoimalla ja kuorimalla) ja toisesta ei. Taulukossa 3 on esitetty näytteet.

Taulukko 3. Kuormanäytteiden tutkimissuunnitelma.

	Rasva poistettu	Rasvan kanssa
Reitti 1	Näyte 1.1	Näyte 1.2
Reitti 2	Näyte 2.1	Näyte 2.2
Reitti 3	Näyte 3.1	Näyte 3.2
Reitti 4	Näyte 4.1	Näyte 4.2
Reitti 5	Näyte 5.1	Näyte 5.2
Reitti 6	Näyte 6.1	Näyte 6.2

**Aflatoksiinistandardin lisääminen näytteisiin.** Haluttiin tutkia raakamaitoa, joiden aflatoksiinipitoisuus on korkea (noin 50 ppt) ja matala (5-10 ppt). Lisättiin itse maitoon aflatoksiini M1 standardia. Verrattiin tuloksia, kun rasva poistetaan tai ei poisteta. Lisäksi tutkittiin maitonäytteen aflatoksiinipitoisuus ilman aflatoksiinin lisäystä, jotta saadaan laskettua saantoprosentit. Taulukossa 4 on näytteiden ottosuunnitelma.

Taulukko 4. Aflatoksiinistandardia sisältävien näytteiden tutkimissuunnitelma.

Näyte	Määrä (lukumäärä x tilavuus)
Puhdas näyte (rasva poistettu)	1 kpl x 30 ml
Puhdas näyte (rasvan kanssa)	1 kpl x 30 ml
Näyte (rasva poistettu, 50 ppt)	6 kpl x 30 ml
Näyte (rasvan kanssa, 50 ppt)	6 kpl x 30 ml
Näyte (rasva poistettu, 7 ppt)	6 kpl x 30 ml
Näyte (rasvan kanssa, 7 ppt)	6 kpl x 30 ml

Edellisenä päivänä suoritettujen mittausten yhteydessä otettiin raakamaitoa reilun litran verran ja tehtiin tästä kaksi näytettä. Näytteistä mitattiin maidon aflatoksiinipitoisuus, jotta osataan lisätä tarvittava määrä aflatoksiini M1 standardia. Mittaustulos (rinnakkaisnäytteiden keskiarvo) oli 5,5, kun rasvaa ei ollut poistettu näytteestä. Kun rasva oli poistettu, tulokseksi saatiin 6,1. Oletettiin, että maito sisältää noin 5 ppt aflatoksiini M1:stä. Tällöin aflatoksiini M1 kontrollin lisäykset raakamaitoon olivat 45 ppt ja 2 ppt, jotta päästäisiin tavoitearvoihin.

Työ suoritettiin siten, että kaadettiin jo mitattua raakamaitoa kahteen 30 ml näyterpurkkiin. Tämän jälkeen tästä otettiin maitoa 500 ml, mihin seuraavaksi lisättiin aflatoksiini M1 standardia 22,5 ml. Tällöin maidon aflatoksiinipitoisuus lisätyn aflatoksiinin perusteella tulisi olemaan 45 ppt. Maito sekoitettiin tasalaatuiseksi ja kaadettiin 12 merkattuun näyterpurkkiin. Tämän jälkeen otettiin maitoa 500 ml, mihin lisättiin aflatoksiini M1 standardia 1 ml verran. Tällöin lisätyn aflatoksiinin perusteella maidon aflatoksiinipitoisuus olisi 2 ppt. Sekoitettu maito kaadettiin 12 merkattuun näyterpurkkiin. Näytteistä poistettiin rasva sentrifugoimalla (10 min, 3500g). Tämän jälkeen näytteet vietiin kylmiöön. Seuraavana päivänä osasta näytteistä poistettiin rasva lusikalla kuorimalla ja suoritettiin mittaukset.

## 6.5 Kuormanäytteiden ja tilakohtaisten näytteiden testaus

Tutkittiin Seinäjoen kuormanäytteiden (42 kpl) ja tilakohtaisten näytteiden (84 kpl) aflatoksiinin M1 pitoisuuksia. Testit suoritettiin eri päivinä ja näytteistä ei ole rasvaa poistettu. Näytteet saatiin laboratorion omien mittausten jälkeen, josta johtuen näytteet olivat olleet lämpöhauteessa (37 °C) jonkin aikaa. Aflatoksiini M1 ei kuitenkaan tuhoudu kuumennuskäsittelyssä, joten tällä ei oletettavasti ole vaikutusta tuloksiin.

(Elintarvikkeiden ja talousveden kemialliset vaarat 2014, 56). Lisäksi näytteiden puhtaus on koetuksella mittausten ajan analysaattorissa, koska näytteet ovat ilman korkkeja. Oletuksena on, että mahdollisesti korkeat aflatoksiinipitoisuudet erottuvat silti joukosta.

## 6.6 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuus on mittaustulokseen liittyvä parametri, joka kuvaa mittaussuureiden arvojen oletettua vaihtelua. Parametri on tässä tapauksessa rinnakkaisnäytteiden erotusten keskihajonta. Keskihajontaa tarkastellaan vielä 95 % luottamusvälillä, eli ilmoitettujen mittausepävarmuusrajojen sisällä on noin 95 % tuloksista. Tulosten yhteydessä mittausepävarmuuden ilmoittamista tarvitaan esimerkiksi tulosten luotettavuutta arvioitaessa, tehtäessä johtopäätöksiä tuloksista tai verrattaessa tuloksia ja menetelmiä. (Jaarinen & Niiranen 2008, 35–36.)

Koko testauksen aikana saaduista tuloksista otettiin satunnaisesti 16 kappaletta tuloksia, joiden aflatoksiinipitoisuus oli menetelmän mittausalueella (noin 5 ppt tai enemmän). Tulokset ovat eri päivinä tehtyjä ja eri levyiltä. Valituista näytteistä ei ole poistettu rasvaa. Tuloksista laskettiin rinnakkaisnäytteiden erotus (d), joista laskettiin keskihajonta (s). Lisäksi laskettiin erotus ja keskihajonta myös prosentteina. Saatua keskihajontaa tarkasteltiin 95 % luottamusvälillä eli kerrotaan saatu arvo kahdella.

## 6.7 Saanto

Saantokokeessa tutkitaan, onko analysoitavassa näytteessä yhdisteitä, jotka mahdollisesti häiritsevät määrittystä. Kokeessa näytteeseen lisätään tunnettu määrä analyyyttiä. Pitoisuus mitataan alkuperäisestä näytteestä sekä lisäyksen sisältävästä näytteestä. Saantoprosentti voidaan myös laskea, jos menetelmään liittyy esimerkiksi näyteenkäsittelyä. Saanto ilmoitetaan prosentteina tunnetun lisäyksen laskennallisesta arvosta. (Jaarinen & Niiranen 2008, 30–31.)

Saanto (R) lasketaan kaavalla

$$R = (S - U) / C * 100 \% \quad (1)$$

missä

C on lisäyksestä johtuva konsentraation kasvu (tunnettu)

U on näytteen alkuperäinen pitoisuus (mitattu)

S on lisäyksen sisältävän näytteen pitoisuus (mitattu) (Jaarinen & Niiranen 2008, 30–31.)

Työssä laskettiin saantoprosentit samassa yhteydessä, kun tarkasteltiin rasvan vaikutusta tuloksiin lisäämällä aflatoksiinistandardia raakamaitoon. Maidosta mitattiin aflatoksiinipitoisuus ilman aflatoksiinistandardin lisäystä ja verrattiin tätä arvoa, kun maitoon oli lisätty aflatoksiinistandardia 45 ppt:n verran.

## 6.8 Standardikäyrän käyttö toisella levyllä

Verrataan levyn alkuperäisiä tuloksia, kun käytetään toisena päivänä tehdyn levyn standardikäyrää levyn tuloksien laskemiseen. Levyt on mitattu kahtena peräkkäisenä päivänä ja reagenssipakettien erä oli sama. Alkuperäisen levyn tuloksista (60 kpl) laskettiin keskiarvo. Levylle vaihdettiin tulosten laskemiseen toisen levyn standardikäyrä ja saaduista arvoista laskettiin keskiarvo. Lisäksi laskettiin erotus, että paljonko näytteiden tulokset eroavat keskenään. Saatuja keskiarvoja tarkastellaan mittausepävarmuuden kautta. Tuloksista päätellään, että kannattaako henkilön pipetoida standardikäyrä jokaiselle levylle vai voiko käyttää aikaisemmin tehtyä standardikäyrää tulosten laskemisessa.

## 6.9 Laadunvarmistusnäyte

Ridascreen Aflatoxin M1 pakkaukseen ei kuulunut laadunvarmistusnäytettä, joten näyte kehitettiin itse. Laaduntarkkailunäytteessä on tunnettu pitoisuus, ja se on eri alkuperää kuin kalibrintiliuokset. Näyte analysoidaan jokaisen näytesarjan alussa ja tuloksia verrataan aiempiin. (Jaarinen 2008, 38.)



Laadunvarmistusnäyte tehtiin raakamaitoon, johon lisättiin aflatoksiini M1 standardia. Yhteen litraan raakamaitoa lisättiin aflatoksiini M1 standardia 15 ml, jolloin maidon aflatoksiinipitoisuudeksi tulisi 15 ppt. Lukema riippuu kuitenkin maidossa alun perin olleesta, mahdollisesta aflatoksiinimäärästä. Voidaan olettaa, että määrä nousee parin ppt yksikön verran. Seosta kaadettiin näytepurkkeihin (30 ml) noin 15 ml verran. Nämä näytteet säilytetään pakastimessa. Yhdestä näytepurkista saadaan yhden testin/päivän laadunvarmistusnäyte. Näytteitä tehtiin kerralla useamman kuukauden tarpeeseen. Työssä tutkittiin kahtena eri päivänä laadunvarmistusnäytteiden mittaamista. Tämä suoritettiin samalla, kun työntekijöitä opastettiin työhön. Tämän vuoksi mittaukset ovat suorittaneet eri henkilöt, ja sillä voi olla vaikutusta tulosten luotettavuuteen. Tämä kuitenkin vastaa todellista tilannetta Valiolla myös tulevaisuudessa. Näytteistä ei ole poistettu rasvaa. Työssä ei aikataulujen vuoksi tutkita, miten pakastus (useamman kuukauden jälkeen) vaikuttaa laadunvarmistusnäytteiden kuntoon.

Tulevaisuudessa laadunvarmistusnäytteiden seuraamista suoritetaan valvontakortin avulla. Valvontakortissa on graafisessa muodossa keskiarvo näytteelle sekä ylempi ja alempi varoitus- ja valvontaraja. Raja-arvot saadaan laskettua aineiston kertyessä. Ajan kuluessa saadaan myös uusittavuutta testattua. Uusittavuudessa tutkitaan saman mittaussuureen mittaustulosten yhtäpitävyyttä muuttuneissa olosuhteissa. Muuttuneet olosuhteet voivat olla esimerkiksi eri työntekijän toimesta testin suorittaminen. (Jaarinen 2008, 38–39.)

## **6.10 Kriittiset pisteet**

Työn kriittisiä pisteitä määrittämisen kannalta voivat olla esimerkiksi pesut, inkubointiajat, valon vaikutus tai pipetointitekniikat. Menetelmän kriittisiä pisteitä ei tarkasteltu tarkemmin, mutta työssä pesurin käyttö osoittautui yhdeksi kriittiseksi pisteeksi.

## 7 TULOKSET

Tulokset saatiin Skanit for Multiskan FC -ohjelman avulla, mikä oli yhdistetty Thermo Scientificin Multiskan FC fotometriin. Tähän on luotu tulosten saamiseksi oma ohjelma, jota käytetään aina mittauksessa. Ohjelman pohjaan on tallennettu standardikäyrän sovitus cubic spline -menetelmän avulla. Standardien arvoista muodostuneen käyrän konsentraation muutos (y-akseli) on valittu lineaariseksi ja mittausten muutos (x-akseli) logaritmiseksi. Mittausta suoritettaessa tarvitsee vain valita näytteiden lukumäärä.

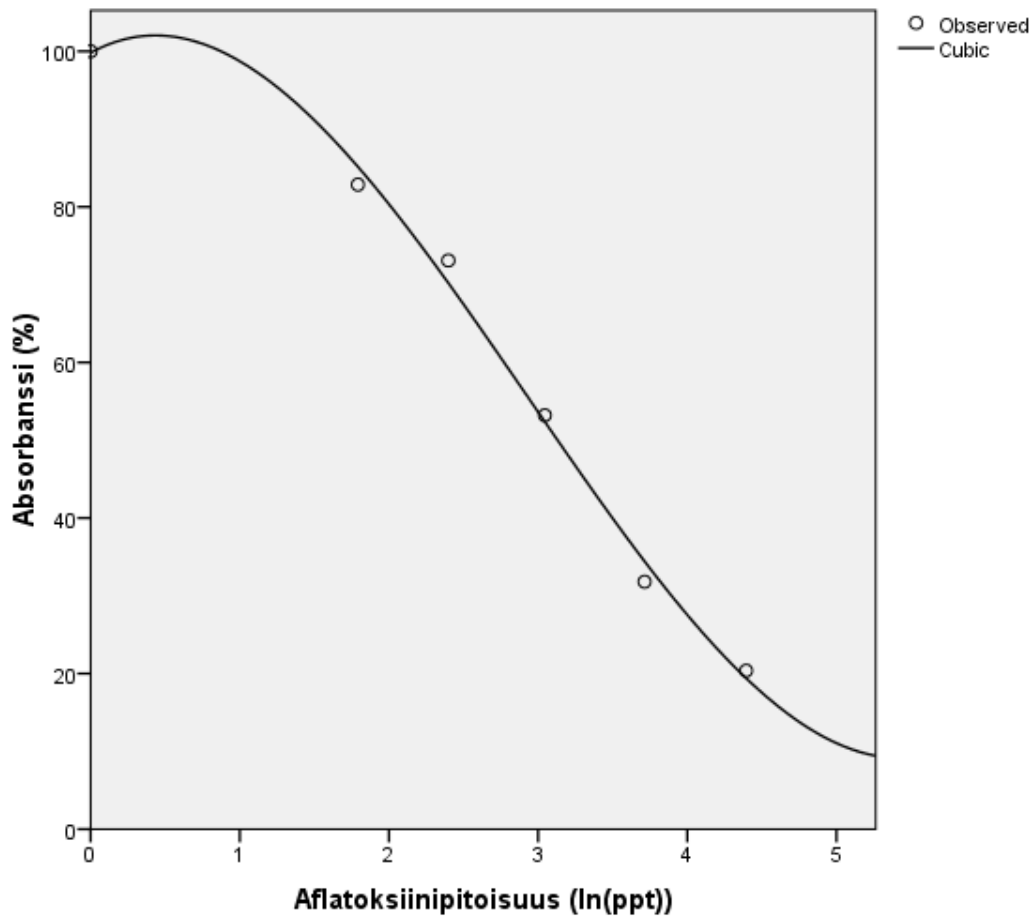
### 7.1 Standardikäyrä

Taulukossa 5 on standardien absorbanssit (rinnakkaisnäytteiden keskiarvot) ja standardien absorbanssit suhteutettuna standardi 1:seen. Standardikäyrä saatiin B/B0 (%) arvojen ja standardien pitoisuuksien avulla (0, 5, 10, 20, 40, 80 ppt).

Taulukko 5. Standardien absorbanssit.

Standardi	Abs (ka)	B/B0 (%)
St1	0,850	100,00
St2	0,704	82,859
St3	0,621	73,108
St4	0,452	53,225
St5	0,270	31,805
St6	0,173	20,384

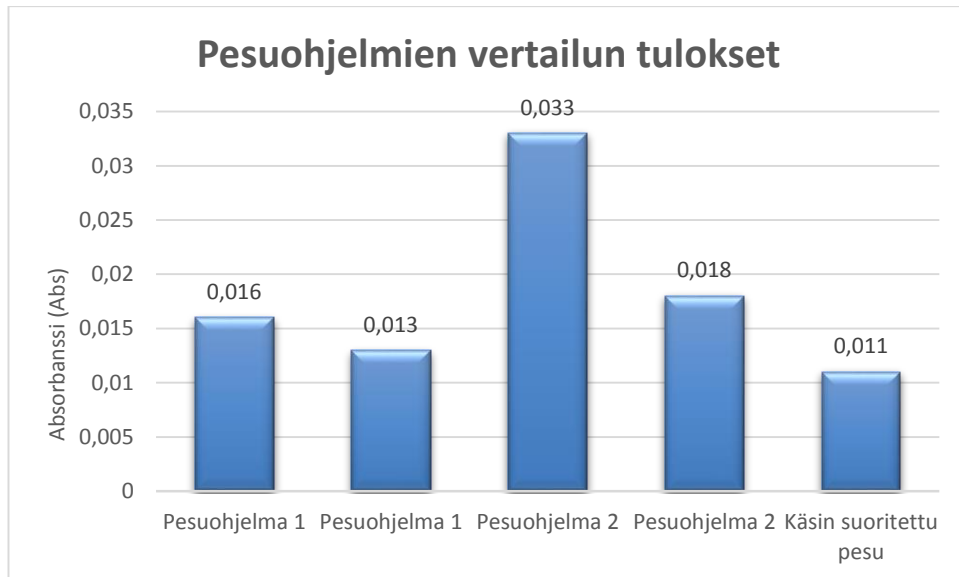
Cubic spline -sovituksen yhtälöksi saatiin  $y=99,81+10,55*x-13,13*x^2+1,49*x^3$ . Absorbanssien ja aflatoksiinipitoisuuksien välinen korrelaatiokerroin on -0,916. Koska arvo on lähellä -1, absorbanssien ja aflatoksiinipitoisuuksien välillä on voimakas negatiivinen yhteys. Tämä tarkoittaa sitä, että mitä pienempi on absorbanssin arvo, sitä suurempi on aflatoksiinipitoisuus näytteessä. Kuviossa 1 on standardikäyrä cubic spline -sovituksella.



Kuvio 1. Standardikäyrä cubic spline -sovituksena

## 7.2 Pesuohjelmien testaus

Eri pesuohjelmien tuloksia verrattaessa nähtiin, että pesuohjelma 1 ja käsin pesu antoivat parhaat tulokset ja pesuohjelma 2 huonoimmat. Pesuohjelma 1 valittiin käytettäväksi, koska standardien rinnakkaisarvojen absorbanssit erosivat vähiten. Käsin suoritettavan pesun tulokset olivat myös hyvät, joten tarvittaessa sitäkin voidaan käyttää. Pesuohjelmien tulokset ovat liitteessä 1. Kuviossa 2 on pesuohjelmien ja käsin suoritettavan pesun standardien rinnakkaisnäytteiden absorbanssien erotusten keskiarvot.



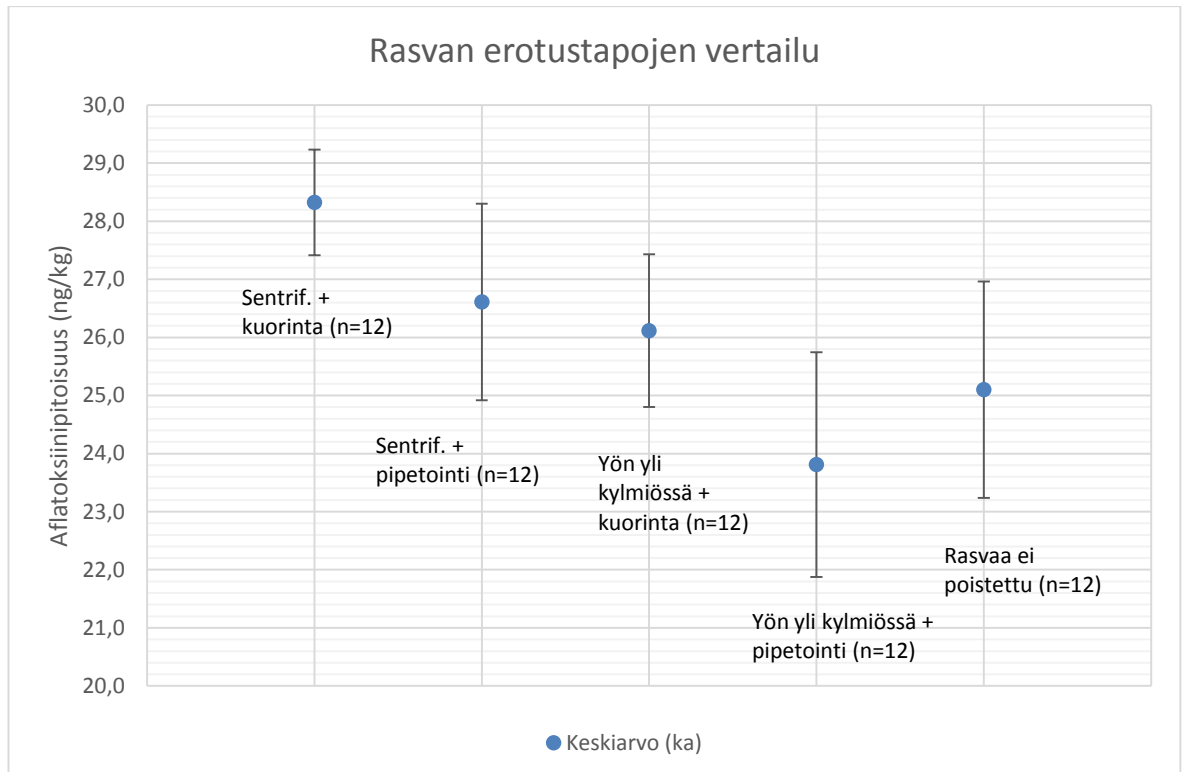
Kuvio 2. Pesuohjelmien vertailun tulokset.

### 7.3 Rasvan erotustavat

Helpoin tapa maidon rasvan poistoon oli näytteen sentrifugoiminen ja sen jälkeen lusikalla rasvakerroksen poistaminen. Muodostunut rasvakerros lähti helposti pois. Sentrifugoidun näytteen rasvakerroksen läpi pipetoiminen ei ollut helppoa, koska pipetin kärki meni yleensä tukkoon rasvasta. Lisäksi näytteen pipetoiminen uuteen purkkiin odottamaan lämpötilan laskemista kuluttaa resursseja ja vie enemmän aikaa.

Sentrifugoimattomien eli seisotettujen näytteiden rasvakerros oli silminnähtävästi muodostunut, mutta se ei ollut kovin kova kerros verrattuna sentrifugoituihin näytteisiin. Rasvakerrosta ei ollut helppo poistaa lusikalla, rasvaa tuntui jäävän maitoon vielä jäljelle. Pipetointi rasvakerroksen läpi ei myöskään onnistunut kovin hyvin, koska pipetin kärkeen jäi rasvaa, mikä sitten saattoi valua uuteen purkkiin pipetoitaessa. Kermoittumisen johdosta syntynyt rasvakerros oli helposti hajoava.

Liitteessä 2 ovat tarkat tulokset rasvan eri erotustavoista ja raakamaidosta, josta rasvaa ei ole poistettu. Tuloksista laskettiin keskiarvot ( $\bar{k}$ ) ja keskihajonnat ( $s$ ). Kuviossa 1 ovat nämä tulokset. Keskiarvot ovat pisteinä merkitty, ja keskihajonnat ovat janana pisteen päällä.



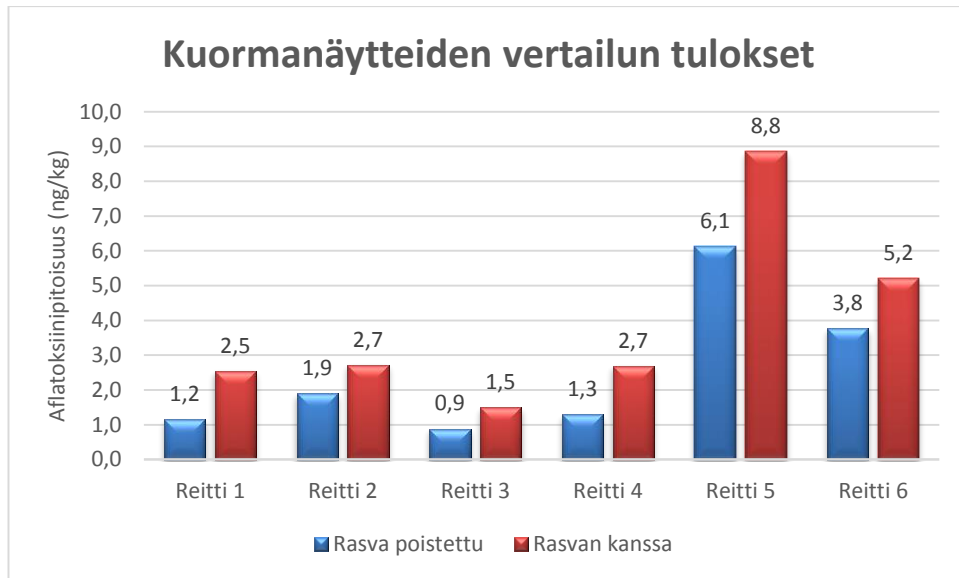
Kuvio 3. Rasvan erotustapojen vertailu.

Näytteisiin lisättiin aflatoksiini M1 standardia 20 ppt:n verran ja maidossa alun perin ollut aflatoksiini nostaa pitoisuutta hieman. Parhaaksi tavaksi rasvanpoistoon on tulostenkin perusteella näytteen sentrifugointi ja rasvakerroksen kuoriminen lusikalla. Näiden näytteiden keskiarvo oli 28,3 ppt, ja keskihajonta oli pienin (0,9). Raakamaitonäytteiden, mistä ei ollut rasvaa poistettu, keskiarvo oli 25,1 ppt ja keskihajonta 1,9. Erotus näytteiden välillä, josta rasva oli poistettu tai ei ollut poistettu, oli 3,2 ppt. Tuloksista nähdään myös, että rasvan poisto kuorimalla pienensi keskihajontaa. Näytteiden lukumäärä on pieni (12 kpl), joten yksikin keskiarvosta suuresti poikkeava arvo suurentaa vaihteluväliä, minkä johdosta keskihajonnan arvo on suurempi. Tämän vuoksi keskihajonnan tarkastelussa tulee olla kriittinen.

#### 7.4 Rasvan vaikutus tuloksiin

**Kuormanäytteiden tutkiminen.** Näytteet, joiden aflatoksiinipitoisuus on pieni (alle 5 ppt), merkitään tuloksissa "alle 5 ppt". Kaikissa muissa reiteissä aflatoksiinipitoisuudet ovat (pyöristettynä kokonaislukuihin) 5 ppt tai alle 5 ppt. Paitsi reitin 5 tulokset ovat 6,1 ppt (näytteestä rasva poistettu) ja 8,8 ppt (näytteestä ei ole poistettu

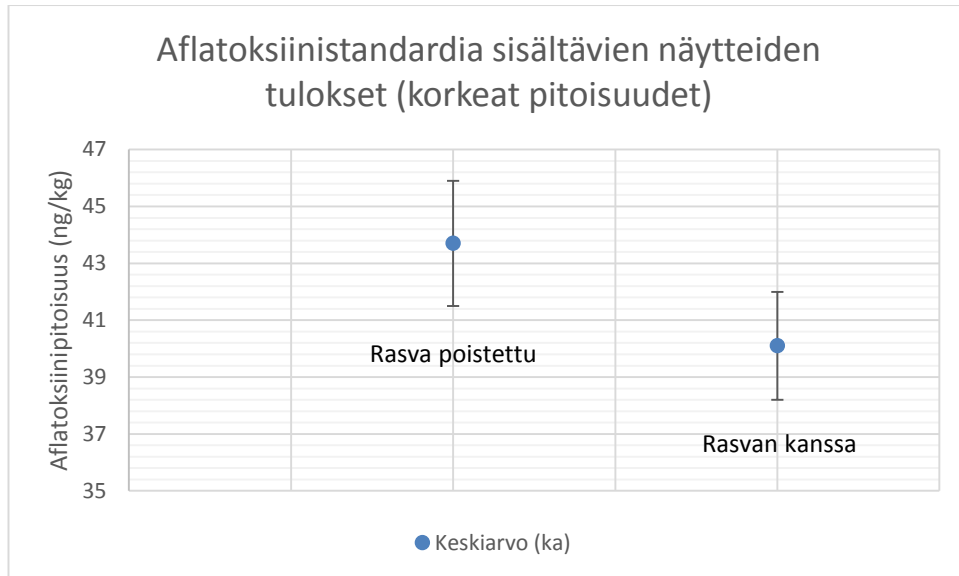
rasvaa). Rasvaa sisältävien reittimaitonäytteiden aflatoksiinipitoisuudet ovat hieman suuremmat, kuin näytteiden, joista rasva on poistettu. Tuloksista nähdään, että rasvalla ei ole suurta merkitystä tuloksiin. Hieman kohonnut arvo (reitti 5) erottuu joukosta, oli rasvaa poistettu tai ei. Liitteessä 3 on työn kuormanäytteiden tarkat tulokset. Kuviossa 4 on eri reittien tulokset.



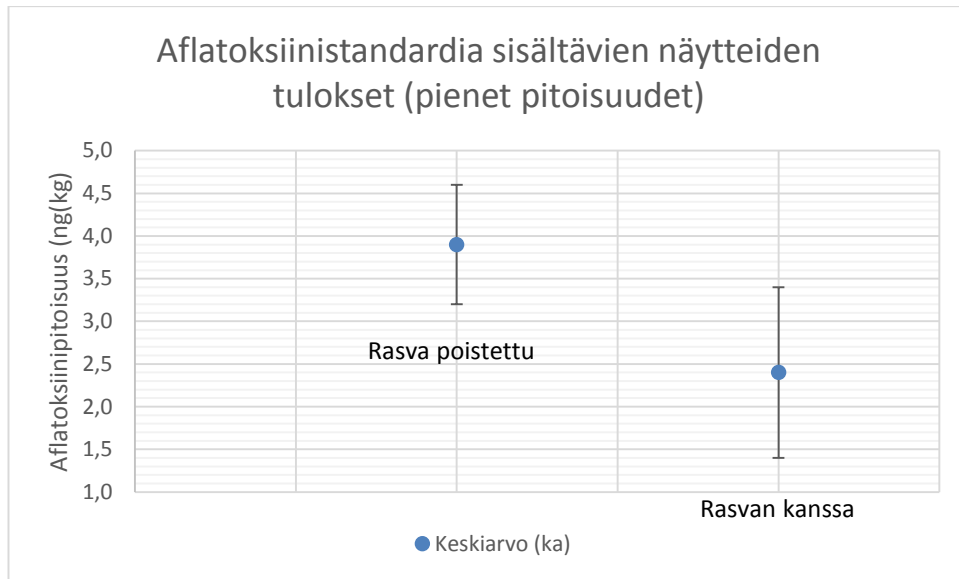
Kuvio 4. Kuormanäytteiden vertailun tulokset.

**Aflatoksiinistandardin lisääminen näytteisiin.** Valmisteltujen näytteiden aflatoksiinipitoisuudet jäivät alle suunnitellusta määrästä (50 ppt ja 7 ppt). Oletettu määrä aflatoksiinia (noin 5 ppt) raakamaidossa ei pitänyt paikkaansa. Puhtaiden maitonäytteiden mukaan aflatoksiinia raakamaidossa oli alun perin noin 2 ppt. Aflatoksiinia olisi pitänyt lisätä enemmän. Varsinkin aflatoksiinipitoisuuden alarajoilla olisi ollut tärkeää päästä yli 5 ppt:n, koska menetelmän toteamisraja on noin 5 ppt. Näytteiden, joissa rasvaa on, keskiarvo on pienempi kuin näytteiden, joista rasva on poistettu. Tämä sama tapahtui sekä korkeissa, että pienissä aflatoksiinipitoisuuksissa. Erotus korkeissa aflatoksiinipitoisuuksissa oli 3,6 ppt ja pienissä 1,5 ppt. Korkeissa ja pienissä pitoisuuksissa keskihajonnan arvoilla ei ole suurta eroa näytteiden välillä. Korkeissa pitoisuuksissa, kun rasva on poistettu, keskihajonta on 2,2 ja rasvan kanssa 1,9. Pienissä pitoisuuksissa, kun rasva on poistettu 0,7 ja rasvan kanssa 1,0.

Liitteessä 4 on tarkemmat mittaustulokset (myös puhtaiden maitonäytteiden tulokset, joiden avulla laskettiin saantoprosentit). Kuvioissa 5 ja 6 on näytteiden tulokset, kun aflatoksiinistandardia lisättiin maitoon. Keskiarvot ovat merkitty pisteenä, ja keskihajonnat ovat janana pisteen päällä.



Kuvio 5. Aflatoksiinistandardia sisältävien näytteiden tulokset (korkeat pitoisuudet).

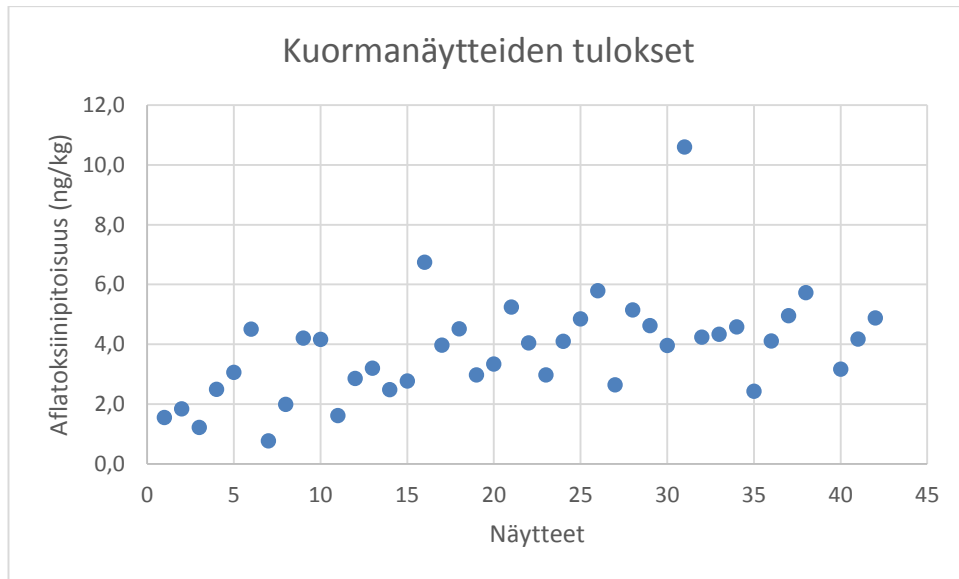


Kuvio 6. Aflatoksiinikontrollia sisältävien näytteiden tulokset (pienet pitoisuudet).

### 7.5 Kuormanäytteiden ja tilakohtaisten näytteiden testaus

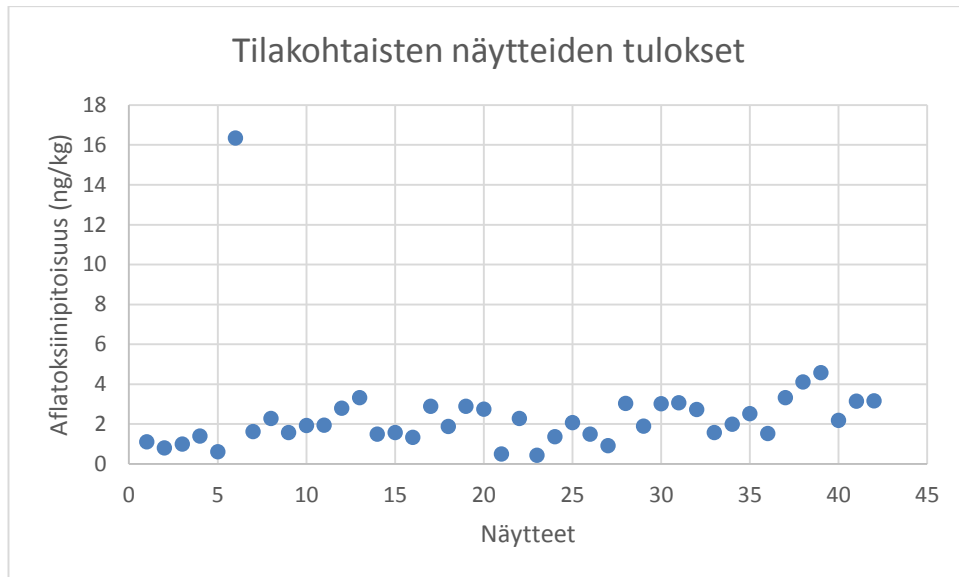
Liitteessä 5 on kuormanäytteiden ja tilakohtaisten näytteiden tulokset. **Kuormanäytteiden** tuloksista suurin osa on alle 5 ppt, eli näytteiden aflatoksiinipitoisuus on erittäin pieni. Yksi hieman kohonnut arvo (10,6 ppt) nousee selvästi esille. Tuloksista on poistettu yksi tulos, jonka arvo jäi alle mittausalueen. Kuviossa 7 on kuormanäytteiden tulokset. Tuloksiin on laskettu rinnakkaisnäytteiden keskiarvot näytteiden aflatoksiinipitoisuuksille.





Kuvio 7. Kuormanäytteiden tulokset.

**Tilakohtaisia näytteitä** tutkittaessa tulosten standardikäyrä oli huono, mikä johtui pesurin pään tukkeutumisesta. Pesurista johtuen standardi nelosen huono rinnakkaisnäyte on poistettu ja tulokset on laskettu ilman sitä. Näytteet joihin pesuri on vaikuttanut tai ne ovat mittausalueen ulkopuolella (yhteensä 22 kpl), ovat poistettu tuloksista. Tilakohtaisten näytteiden tulokset olivat pieniä, yksi suurempi arvo (16,4 ppt) oli huomattavasti suurempi kuin muiden näytteiden. Mutta tämäkin arvo on reippaasti alle lainsäädännön raja-arvon (50 ppt). Kuviossa 8 on tilakohtaisten näytteiden tulokset. Tuloksiin on laskettu rinnakkaisnäytteiden keskiarvot näytteiden aflatoksiinipitoisuuksille.



Kuvio 8. Tilakohtaisten näytteiden tulokset.

## 7.6 Mittausepävarmuus

Mittausepävarmuuden laskemiseen valittujen näytteiden rinnakkaisnäytteiden erotusten keskihajonta oli 1,4 (6,9 %) ja 95 % luottamusvälillä 2,7 (13,8 %). Näytteistä ei ollut poistettu rasvaa, joten näytteessä mahdollisesti epätasaisesti jakautunut rasva voi häiritä mittaustulosta. Näyteotos (16 x 2 kpl näytteitä) on pieni, joten yksikin suurempi erotus voi suurentaa keskihajontaa. Näytteiden pienissä pitoisuuksissa (noin 5 ppt:n kohdalla) keskihajonnan prosenttilukema on suurempi, kuin isoimmissa pitoisuuksissa. Tämä nostaa prosenttilukemaa hieman. Liitteessä 6 on mittausepävarmuuden laskemiseen valittujen näytteiden tulokset.

## 7.7 Saanto

Saantoprosentit laskettiin kaavasta (1). Liitteessä 4 on tarkemmat arvot, mistä laskettiin tulokset. Tulokset ovat taulukossa 6. Näytteiden alkuperäinen aflatoksiinipitoisuus oli näytteissä, joista rasva on poistettu 1,98 ppt. Rasvaa sisältävien näytteiden tulos oli 1,7 ppt. Näytteisiin lisättiin aflatoksiinia 45 ppt:n verran, jolloin saantoprosentiksi saatiin näytteisiin, joista rasva on poistettu 92,7 %. Rasvaa sisältävien näytteiden saantoprosentti on 85,3 %.

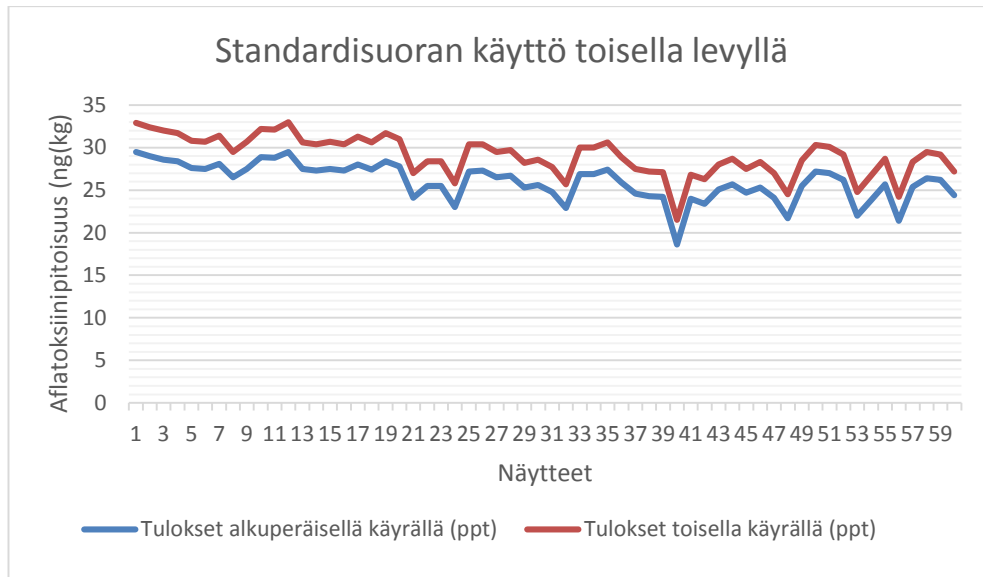
Taulukko 6. Saantoprosenttien tulokset.

Näyte	Määrä (ppt) (n=2)	Lisätty määrä (ppt)	Mitattu määrä (ppt) (n=12)	Saanto-%
Rasva poistettu	1,98	45	43,7	92,7
Rasvan kanssa	1,70	45	40,1	85,3

Tavoiteltu saantoprosentti oli 100 %. Saantoprosentti on suurempi, kun näytteistä on poistettu rasva. Tulosten tarkastelussa voidaan ottaa huomioon, että aflatoksiini M1 standardi laimennettiin ionisoituun veteen ja sitä säilytettiin kylmiössä. Liuoksen aflatoksiinipitoisuus on voinut muuttua hieman säilytyksen aikana, mikä voi sitten hieman vaikuttaa tuloksiin. Saantoa olisi hyvä tutkia useammassa sarjassa, usean rinnakkaismäärityksen avulla. Yksittäisen kokeen perusteella ei voida tehdä suuria johtopäätöksiä. Vaikka saadut saantoprosentit jäivät alle 100 %, niin mahdollisesti kohonneet aflatoksiinipitoisuudet kuitenkin pystytään havaitsemaan menetelmällä, oli rasva poistettu näytteestä tai ei.

## 7.8 Standardikäyrän käyttö toisella levyllä

Liitteessä 7 on tarkemmat tulokset. Alkuperäisen levyn standardien absorbanssi arvot olivat välillä 0,948–0,200. Toisen levyn standardisuora käytettäessä absorbanssit olivat välillä 1,02–0,221. Näytteitä oli yhteensä 30 kpl ja rinnakkaisnäytteet mukaan lukien tuloksia saatiin yhteensä 60 kpl. Alkuperäisellä suoralla tulosten keskiarvo oli 26,0 ppt. ja toisella suoralla 29,0 ppt. Muutoksesta johtuen toisen levyn standardisuora käyttämällä tulosten keskiarvo ja erotus nousivat 3,1 ppt yksikköä. Kuviossa 9 on näytteiden pitoisuuksien avulla piirretyt suorat.



Kuvio 9. Standardikäyrän käyttö toisella levyllä.

Kuviosta huomaa, että suorat ovat symmetrisiä, vain arvot ovat nousseet hieman. Mittausepävarmuuden kautta tarkastellaan rinnakkaisnäytteiden erotusten keskiarvoa, jolloin arvot voisivat vaihdella enintään 2,7 ppt (95 % luottamusvälillä). Tulos on yli tämän, joten toisen levyn standardikäyrää ei tulisi tämän tuloksen perusteella käyttää tulosten laskemiseen.

## 7.9 Laadunvarmistusnäyte

Laadunvarmistusnäyte tehtiin pakkaseen 16.1.2015. Laadunvarmistusnäytteitä analysoitiin kahtena eri päivänä, 20.1.2015 ja 28.1.2015. Näytteistä ei poistettu rasvaa. Ensimmäisellä kerralla laadunvarmistusnäytteitä otettiin 8 kpl pakastimesta huoneenlämpöön sulamaan. Näytteet olivat sulaneet 3 tuntia, mutta testiä aloitettaessa ne olivat vielä kohmeisia. Näytteet siirrettiin lämpökaappiin (37 °C) 10 minuutiksi. Levyn tuloksista huomattiin pesurin vaikutus alarivin tuloksiin. Standardikäyrä oli huono, ja saman rivin tulokset olivat virheelliset, niin kuin edelliselläkin kerralla pesurin vaikuttaessa tuloksiin. Näytteiden aflatoksiinipitoisuudet olivat virheellisen standardikäyrän takia korkeat. Standardikäyrän virheellinen arvo poistettiin, jolloin tulokset olivat hyvät. Tuloksia saatiin 14 kappaletta, koska kaksi tulosta jouduttiin

poistamaan pesurin ongelmien vuoksi. Toisella kerralla laadunvarmistusnäyte otettiin sulamaan noin neljä tuntia ennen testin suorittamista. Samasta näytteestä pipetoitiin kahdelle eri levyille. Tuloksia saatiin 4 kpl. Näytteiden aflatoksiinipitoisuudet olivat hieman pienemmät kuin ensimmäisellä kerralla. Laadunvarmistusnäytteiden tuloksista ei vielä pysty tekemään tarkempia johtopäätöksiä. Aineiston kertyessä nähdään, miten näytteet säilyvät pakkasessa. Taulukossa 7 on tulokset laadunvarmistusnäytteistä.

Taulukko 7. Laadunvarmistusnäytteiden tulokset.

	20.1.2015 (n=14) (ppt)	28.1.2015 (n=4) (ppt)
<b>Keskiarvo (ka)</b>	16,5	14,0
<b>Keskihajonta (s)</b>	0,7	0,8
<b>Suhteellinen keskihajonta (cv-%)</b>	4,3	5,9

### 7.10 Kriittiset pisteet

Työssä osoittautui kriittiseksi pisteeksi pesurin käyttö. Pesurin vaikutus tuloksiin huomattiin, kun samana päivänä tehtiin kaksi levyä (kuormanäytteiden tutkiminen), joissa molemmissa standardikäyrät olivat huonot. Molemmissa levyissä standardi 4 toisen rinnakkaisnäytteen absorbanssi oli normaalia korkeampi. Standardin paikka oli levyn alareunassa. Tuloksia katsottiin levykartan avulla, mistä huomattiin, että kaikki samalla kohdalla olevien näytteiden absorbanssit olivat korkeat (NaN eli mitausalueen ulkopuolella) eli aflatoksiinipitoisuus oli erittäin pieni. Sama toistui myös toisella levyllä. Pesurin päässä oleva yksittäinen kampa pesi alareunan kaivot. Reagenssien pipetoinnissa käytettiin monikanavapipettiä, joten syy olisi voinut olla myös siinä. Mutta pipetoinnissa ja pipetissä ei huomattu vikaa työtä suoritettaessa.

Työtä ohjeistettaessa Valion työntekijälle sama tilanne toistui. Juuri saman standardin tulos oli poikkeava ja saman rivin tulokset olivat myös. Työssä käytettiin eri pipettiä, joten poikkeavat tulokset eivät varmasti johdu pipetistä. Näiden kahden kerran välissä ei pesurin kanssa ollut ongelmaa, kun menetelmän testausta suoritettiin. Pesupäiden irrottaminen ja liottaminen vedessä auttaa tukoksien poistossa. Liitteessä 9 on kuva ensimmäisen levyn (kuormanäytteiden) epäonnistuneesta standardikäyrästä ja levyn tuloksista (absorbanssit ja aflatoksiinimäärät) levykartan

muodossa. Lihavoidulla fontilla on arvot, joihin pesuri on vaikuttanut. Lisäksi samassa liitteessä on epäonnistunut standardikäyrä. Myös korjatun (standardi 4 toinen rinnakkaisnäyte poistettu) standardikäyrän kuva on liitteessä.

## 8 YHTEENVETO

Tutkimuksen tarkoituksena oli testata Ridascreen Aflatoxin M1 ELISA -määritysmenetelmää. Tämä menetelmä on herkkä aflatoksiini M1:n määritysmenetelmä, jolla mitataan aflatoksiinin M1 pieniä pitoisuuksia. ELISA-menetelmä on käsin suoritettava immunologinen määritysmenetelmä, joka perustuu antigeenin ja vasta-aineen spesifiseen reaktioon. Aflatoksiini M1 kiinnittyy mikrotiitterilevyn kaivoissa oleviin vasta-aineisiin. Kaivoihin lisätyt entsyymikonjugoidut aflatoksiini M1:t kilpailevat vasta-aineen sitoutumiskohdista. Substraatin lisäys saa entsyymin kanssa aikaan värinmuodostuksen, joka mitataan spektrofotometrillä. Tutkimus suoritettiin Seinäjoen Valion Aluelaboratoriossa syksyn 2014–talven 2015 aikana.

Menetelmällä määritettiin näytteistä aflatoksiinin M1 määrää. Näytteinä oli lehmästä saatavaa raakamaitoa, joihin tarvittaessa itse lisättiin aflatoksiini M1 standardia nostamaan aflatoksiinipitoisuutta tutkimuksen eri vaiheissa. Ridascreen Aflatoxin M1 ELISA -menetelmällä saatujen tuloksien avulla tutkittiin, miten rasva kannattaa poistaa näytteistä, ja miten sen poistaminen vaikuttaa tuloksiin. Lisäksi tutkittiin menetelmän saantoprosenttia ja mittausepävarmuutta. Menetelmän käyttöönottoa varten tutkittiin Seinäjoen laboratorioon tulleita kuorma- ja tilakohtaisia näytteitä, jotta saadaan käsitys maidon tämän hetkisestä aflatoksiinipitoisuudesta. Laadittiin laadunvarmistusnäyte ja menetelmäohje. Lisäksi kriittisiä pisteitä havainnoitiin menetelmän testauksen aikana.

Menetelmän pesuvaiheisiin luotiin toimiva pesuohjelma Wellwash Microplate -pesuriin. Valitun pesuohjelman tuloksissa ei ollut suurta eroa käsillä suoritettavaan pesuun. Työssä käytössä ollut pesuri osoittautui kriittiseksi pisteeksi, sillä se mahdollisesti vääristää mittaustuloksia pienentämällä näytteen aflatoksiinipitoisuutta. Jos standardikäyrä on huono, tulee aina tarkistaa levykartan avulla näytteiden tulokset, onko niissä epäilyttäviä tuloksia. Näytteiden pipetoiminen rinnakkaisarvoina helpottaa tulosten tarkastelua tällaisessa tilanteessa. Tämän jälkeen kannattaa poistaa huono standardiarvo ja laskea levyn tulokset ilman tätä arvoa, koska tulokset voivat muuttua merkittävästi.

Menetelmäohjeen mukaan näytteistä tulee poistaa rasva, mutta saatujen tulosten perusteella rasva ei häiritse merkittävästi mittaustuloksia. Parhaimmaksi tavaksi

rasvan poistamiseksi havaittiin näytteen sentrifugoiminen ja lusikalla rasvakerroksen kuoriminen. Kun aflatoksiini M1 standardia oli lisätty näytteisiin, niin näytteiden joissa ei ollut rasvaa, arvo oli suurempi kuin näytteiden jossa rasvaa oli. Keskimääräinen erotus oli noin 3 ppt. Kun tutkittiin kuormanäytteiden eri reittejä, niin aflatoksiinipitoisuudet olivat suuremmat näytteissä, joissa oli rasvaa. Näiden näytteiden aflatoksiinipitoisuudet olivat pieniä, suurin osa alle 5 ppt. Pienissä pitoisuuksissa hajontakin on suurempaa. Lisäksi erotus oli vaan noin 1 ppt. Rasvan poisto on kuitenkin työläs työvaihe, joten päädyttiin siihen, että rasvaa ei poisteta näytteistä. Menetelmän tavoitteena on löytää mahdollisesti kohonnut aflatoksiinipitoisuus maidosta, joka havaitaan, vaikka rasvaa ei poisteta näytteistä. Mittausepävarmuus oli vain muutaman ppt:n verran. Tulosten perusteella voidaan olettaa, että rasva vaikuttaa tuloksiin pienentämällä aflatoksiini M1:n määrää hieman, joten ainakaan tämän takia virheellisen korkeita tuloksia ei pitäisi ilmetä. Toisaalta pieneneminen ei ole kuitenkaan ollut niin merkittävää, että se vaarantaisi mahdollisesti vaaralliselle tasolle kohonneiden aflatoksiinipitoisuuksien löytämistä.

Työssä tutkittiin Seinäjoen Valiolle tulleita kuormanäytteitä ja tilakohtaisia näytteitä. Näiden tulosten perusteella maidossa ei esiinny korkeita aflatoksiini M1:n pitoisuuksia. Täytyy kuitenkin ottaa huomioon, että tutkittujen näytteiden lukumäärä on pieni, joten näistä ei voida suuria johtopäätöksiä tehdä. Hieman kohonneita pitoisuuksia ilmeni pari (10,6 ja 16,4 ppt), mutta niidenkin määrät olivat reippaasti alle lainsäädännön. Tulos 10,6 oli kuormanäytteen tulos, joten mahdollisesti reitin jollain tilalla lehmille syötetyissä rehuissa on hieman aflatoksiinia, mikä kuitenkin laimentuu muiden maitojen seassa. Tulos 16,4 oli tilakohtainen näyte, joten tällä tilalla lehmät saavat aflatoksiinilla saastunutta rehua. Tulos ei kuitenkaan ole jatkotoimenpiteitä edellyttävä.

Työssä tutkittiin rinnakkaisnäytteiden erotusten keskihajonnan kautta mittausepävarmuutta. Rinnakkaisnäytteiden erotusten keskihajonnaksi saatiin 1,4 ppt (6,9 %) ja 95 % luottamustasolla 2,7 ppt (13,8 %). Mittausepävarmuuden laskemiseen valituista näytteistä ei ollut poistettu rasvaa. Näytteissä oleva rasva voi suurentaa keskihajontaa.

Saantoprosentiksi saatiin näytteistä, joista rasva poistettiin, 92,7 % ja näytteistä, joista rasvaa ei poistettu, 85,3 %. Näytteiden, joista rasva poistettiin, saantoprosentti



jäi alle ideaalisen saannon (100 %). Saantoprosenttiin on voinut vaikuttaa negatiivisesti aflatoksiini M1 standardin laimentuminen säilytyksen aikana. Näytteistä, joista rasvaa ei ollut poistettu, ei odotettu 100 % saantoa, koska tiedettiin rasvan häiritsevän mittausta. Tämäkin tulos tukee sitä tulosta, että rasva pienentää hieman näytteen aflatoksiinipitoisuutta.

Työssä käytettiin yhden levyn tulosten laskemiseen vertailun vuoksi toisen levyn standardikäyrää. Tulosten erotusten keskiarvo oli 3,1 ppt, eli arvot muuttuivat tässä tapauksessa hieman suuremmiksi. Mittausepävarmuuden kautta tulokset voisivat muuttua enintään 2,7 ppt (95 % luottamusvälillä), joten toisen levyn standardikäyrää ei tulisi käyttää tämän perusteella tulosten laskemiseen. Tulosten erotus oli kuitenkin pieni, joten tulevaisuudessa voisi työtä tehdessä verrata levyn tuloksia, kun vaihdetaan eri päivänä tehdyn standardikäyrän tulosten analysointiin.

Laadunvarmistusnäytteiden laskettu aflatoksiinipitoisuus on 15 ppt, mutta arvo riippuu maidon alkuperäisestä aflatoksiinipitoisuudesta. Myös käytetty aflatoksiini M1 standardi on voinut heikentyä säilytyksen aikana. Ajan kuluessa aineistoa kertyy laadunvarmistusnäytteestä, josta voidaan tutkia menetelmän uusittavuutta.

Menetelmä on käsin suoritettava menetelmä, mikä voi aiheuttaa epävarmuutta tuloksiin, esimerkiksi pipetoinnissa tapahtuneen virheen takia. Virheellisiä tuloksia voi aiheuttaa myös välineiden, kuten pipettien, mittausepävarmuus. Antigeenit ja vastaaineet eivät aina sitoudu täydellisesti, mikä voi myös aiheuttaa virhettä tulokseen. Yhteenvedona voidaan todeta, että menetelmä sopii käyttötarkoitukseen ja täyttää sille asetetut vaatimukset. Seinäjoen Valio Oy:n Aluelaboratoriossa aiotaan ottaa aflatoksiinimääritys ELISA-menetelmällä pysyvään laadunvarmistuskäytäntöön tässä työssä laadittujen toimintaohjeiden mukaisesti. Menetelmällä pystytään havaitsemaan kohonneet aflatoksiinipitoisuudet ja näin ollen ylläpitämään kuluttajille päätyvän maidon turvallisuutta.

## LÄHTEET

- A 26.2.2010/165. Komission asetus tiettyjen elintarvikkeissa olevien vierasaineiden enimmäismäärien vahvistamisesta annetun asetuksen (EY) N:o 1881/2006 muuttamisesta aflatoksiinien osalta.
- A 29.4.2004/853. Euroopan komission asetus eläinperäisiä elintarvikkeita koskevista erityisistä hygieniasäännöistä.
- Aflatoxin. Ei päiväystä. [Verkkosivu]. Saksa: R-Biopharm AG. [Viitattu 2.3.2015]. Saatavana: <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/mycotoxins/aflatoxin>
- Aflatoksiini. Päivitetty 13.6.2013. [Verkkosivu]. Helsinki: Elintarviketurvallisuusvirasto Evira [Viitattu 20.1.2015]. Saatavana: <http://www.evira.fi/portal/fi/tietoa+evirasta/asiakokonaisuudet/vierasaineet/tutkimukset+ja+projektit/aflatoksiini>
- Aflatoxin M1 in Milk. 2013. [Verkkojulkaisu]. Cornell University: Dairy nutrition fact sheet. [Viitattu 2.3.2015]. Saatavilla: <http://www.ansci.cornell.edu/pdfs/2013.Aflatoxin.Facs.pdf>
- Bennet JW. & Klich M. 2003. [Verkkolehtiartikkeli]. Clinical Microbiology Reviews: Mycotoxins. [Viitattu 20.1.2015]. Saatavana: <http://cmr.asm.org/content/16/3/497.full>
- Bylund, G. 2003. Dairy processing handbook. 2 painos. Ruotsi: Tetra Pak Processing Systems AB.
- Crowther, J. 2009. The ELISA Guidebook. 2 painos. Itävalta: Humana Press.
- Dutton, M., Mwanza, M., de Kock, S. & Khilosia, L. 2010. Mycotoxins in South African Foods: A Case Study on Aflatoxin in Milk. [Verkkolehtiartikkeli]. [Viitattu 11.3.15]. Saatavana: <http://en.engormix.com/MA-dairy-cattle/dairy-industry/articles/mycotoxins-in-food-aflatoxin-in-milk-t1591/472-p0.htm>
- Elintarvikkeiden ja talousveden kemialliset vaarat. Päivitetty 12.2.2014. [Verkkojulkaisu]. Helsinki: Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. [Viitattu 2.3.2015]. Saatavana: <http://www.evira.fi/portal/fi/tietoa+evirasta/julkaisut/?a=view&productid=361>
- Heikinheimo, A., Lindström, M. & Hatakka, M. 2007. Mikrobin osoitus- ja tunnistusmenetelmät sekä mikrobiologiset normit. Teoksessa: H. Korkeala. (toim.) Elintarvikehygieniä – ympäristöhygieniä, elintarvike- ja ympäristötoksilogia. Helsinki: WSOY. 140–168.

- Homemyrkyt eli mykotoksiinit. Päivitetty 3.5.2013. [Verkkosivu]. Helsinki: Elintarviketurvallisuusvirasto Evira [Viitattu 4.3.2015]. Saatavana: <http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/hygieniaosaaminen/tietopaketti/elintarvikkeiden+riski-+ja+vaaratekijat/kemialliset+vaaratekijat/homemyrkyt+eli+mykotoksiinit>
- International Agency for Research on Cancer. Päivitetty 23.10.2014. [Verkkosivu]. [Viitattu 1.2.2015]. Saatavana: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
- Impacts of Aflatoxins on Health and Nutrition. 2006. Report of an Expert Group Meeting in Brazzaville 24-27.5.2005.
- Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.-6.painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- Kang`ethe, EK. & Lang`a, KA. 2009. Aflatoxin B1 and M1 contamination of animal feeds and milk from urban centers in Kenya. [Verkkojulkaisu]. African Health Sciences. 9(4): 218–226. [Viitattu 2.3.2015]. Saatavana: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3074399/>
- Koort, J. & Sivelä, S. 2007. Maidon ja maitovalmisteiden mikrobiologia. Teoksessa: H. Korkeala. (toim.) Elintarvikehygienia – ympäristöhygienia, elintarvike- ja ympäristötoksilogia. Helsinki: WSOY. 205–210.
- Kulkas, L. 2012. Maito ja Me: Varo homeista säilörehua. Teema 4/2012. [Verkkosivu]. [Viitattu 1.2.2015]. Saatavana: [http://www.maitojame.fi/laatu12/laatu12\\_j.htm](http://www.maitojame.fi/laatu12/laatu12_j.htm)
- Markkula, A. 2007. Vilja ja viljatuotteet. Teoksessa: H. Korkeala. (toim.) Elintarvikehygienia – ympäristöhygienia, elintarvike- ja ympäristötoksilogia. Helsinki: WSOY. 234–241.
- Milk Works. Ei päiväystä. Hämeen ammatti-instituutti. Oppimateriaali. [Verkkosivu]. [Viitattu 9.2.2015]. Saatavana: <http://www.milkworks.fi/oppimateriaali/Sivut/default.aspx>
- Multiskan FC. 2009. Käyttöohje. Thermo Scientific.
- Ridascreen Aflatoxin M1. 2004. Menetelmäohje. R-Biopharm AG.
- Schäfer, H. 2013. Maidosta löytyi homemyrkyä Saksassa. [Verkkosivu]. Maaseudun tulevaisuus. [Viitattu 2.3.2015]. Saatavana: <http://www.maaseuduntulevaisuus.fi/maatalous/maidosta-l%C3%B6ytyi-homemyrky%C3%A4-saksassa-1.34786>

The Aflatoxicosis and cancer effects of the Aflatoxin. Päivitetty 22.9.2013. [Verkkosivu]. [Viitattu 1.3.2015]. Saatavana: <http://en.wikipedia.org/wiki/User:Alpha30/Sandbox>

## LIITTEET

Liite 1. Pesuohjelmien tulokset

Liite 2. Rasvan erotustapojen tulokset

Liite 3. Rasvan vaikutus tuloksiin: Kuormanäytteiden tulokset

Liite 4. Rasvan vaikutus tuloksiin: Aflatoksiinistandardin lisääminen näytteisiin

Liite 5. Kuormanäytteiden ja tilakohtaisten näytteiden tulokset

Liite 6. Mittausepävarmuus

Liite 7. Standardikäyrän käyttö toisella levyllä

Liite 8. Laadunvarmistusnäytteen tulokset

Liite 9. Kriittiset pisteet

Liite 10. Menetelmäohje

## Liite 1. Pesuohjelmien tulokset

Käsin suoritettava pesu				
	½	2/2	ka	erotus
st1	1,063	1,039	1,051	0,012
st2	0,927	0,939	0,933	0,006
st3	0,867	0,845	0,856	0,011
st4	0,683	0,706	0,694	0,012
st5	0,437	0,411	0,424	0,013
st6	0,266	0,245	0,255	0,011
		erotusten ka =		0,011

Pesuohjelma 1 (1/2)				
	1/2	2/2	ka	erotus
st1	0,978	0,989	0,984	0,006
st2	0,967	0,88	0,924	0,043
st3	0,764	0,793	0,779	0,015
st4	0,623	0,636	0,629	0,007
st5	0,367	0,365	0,366	0,001
st6	0,211	0,219	0,215	0,004
		erotusten ka =		0,013

Pesuohjelma 1 (2/2)				
	1/2	2/2	ka	erotus
st1	1,17	1,178	1,174	0,004
st2	0,952	0,941	0,946	0,005
st3	0,841	0,834	0,837	0,003
st4	0,683	0,769	0,703	0,066
st5	0,385	0,413	0,399	0,014
st6	0,247	0,248	0,248	0,001
		erotusten ka =		0,016

Pesuohjelma 2 (1/2)				
	1/2	2/2	ka	erotus
st1	1,134	1,18	1,157	0,023
st2	0,986	1,028	1,007	0,021
st3	0,906	0,889	0,897	0,008
st4	0,657	0,733	0,695	0,038
st5	0,387	0,414	0,4	0,013
st6	0,237	0,244	0,24	0,003
		erotusten ka =		0,018

Pesuohjelma 2 (2/2)				
	1/2	2/2	ka	erotus
st1	1,121	1,206	1,164	0,042
st2	1,062	1,09	1,076	0,014
st3	0,93	0,926	0,928	0,002
st4	0,714	0,72	0,717	0,003
st5	0,74	0,535	0,638	0,102
st6	0,497	0,422	0,459	0,037
		erotusten ka =		0,033

## Liite 2. Rasvan erotustapojen tulokset

Sentrif. + kuorinta		
	1/2 (ppt)	2/2 (ppt)
<b>Näyte 1</b>	29,5	29,0
<b>Näyte 2</b>	28,6	28,4
<b>Näyte 3</b>	27,6	27,5
<b>Näyte 4</b>	28,1	26,5
<b>Näyte 5</b>	27,5	28,9
<b>Näyte 6</b>	28,8	29,5
<b>ka</b>	28,3	
<b>s</b>	0,9	

Sentrif. + pipetointi		
	1/2 (ppt)	2/2 (ppt)
<b>Näyte 7</b>	27,5	27,3
<b>Näyte 8</b>	27,5	27,3
<b>Näyte 9</b>	28,0	27,4
<b>Näyte 10</b>	28,4	27,8
<b>Näyte 11</b>	24,1	25,5
<b>Näyte 12</b>	25,5	23,0
<b>ka</b>	26,6	
<b>s</b>	1,7	

Yön yli kylmässä + kuorinta		
	1/2 (ppt)	2/2 (ppt)
<b>Näyte 13</b>	27,2	27,3
<b>Näyte 14</b>	26,5	26,7
<b>Näyte 15</b>	25,3	25,6
<b>Näyte 16</b>	24,8	22,9
<b>Näyte 17</b>	26,9	26,9
<b>Näyte 18</b>	27,4	25,9
<b>ka</b>	26,1	
<b>s</b>	1,3	

Yön yli kylmässä + pipetointi		
	1/2 (ppt)	2/2 (ppt)
<b>Näyte 19</b>	24,6	24,3
<b>Näyte 20</b>	24,2	18,6
<b>Näyte 21</b>	24,0	23,4
<b>Näyte 22</b>	25,1	25,7
<b>Näyte 23</b>	24,7	25,3
<b>Näyte 24</b>	24,1	21,7
<b>ka</b>	23,8	
<b>s</b>	1,9	

Rasvaa ei poistettu		
	1/2 (ppt)	2/2 (ppt)
<b>Näyte 25</b>	25,5	27,2
<b>Näyte 26</b>	27,0	26,2
<b>Näyte 27</b>	22,0	23,8
<b>Näyte 28</b>	25,7	21,4
<b>Näyte 29</b>	25,4	26,4
<b>Näyte 30</b>	26,2	24,4
<b>ka</b>	25,1	
<b>s</b>	1,9	

## Liite 3. Rasvan vaikutus tuloksiin: kuormanäytteiden tulokset.

	Rasva poistettu (ppt)			Rasvan kanssa (ppt)		
	1/2	2/2	ka	1/2	2/2	ka
<b>Reitti 1</b>	2,27	0,04	1,2	0,25	4,83	2,5
<b>Reitti 2</b>	2,06	1,74	1,9	3,37	2,06	2,7
<b>Reitti 3</b>	NaN	0,88	NaN	NaN	1,49	NaN
<b>Reitti 4</b>	1,73	0,88	1,3	4,35	1,03	2,7
<b>Reitti 5</b>	5,82	6,42	6,1	8,24	9,46	8,8
<b>Reitti 6</b>	1,28	6,25	3,8	7,13	3,26	5,2



## Liite 4. Rasvan vaikutus tuloksiin: Aflatoksiinistandardin lisääminen näytteisiin.

<b>Rasva poistettu (noin 50 ppt)</b>		
	<b>1/2</b>	<b>2/2</b>
<b>Näyte 1.1</b>	47,7	46,1
<b>Näyte 1.2</b>	42,1	42,9
<b>Näyte 1.3</b>	39,6	42,3
<b>Näyte 1.4</b>	42,4	44,3
<b>Näyte 1.5</b>	46,3	43,4
<b>Näyte 1.6</b>	43,8	43,6
<b>ka</b>	43,7	
<b>s</b>	2,2	
<b>Puhdas maito</b>	2,2	1,8

<b>Rasvan kanssa (noin 50 ppt)</b>		
	<b>1/2</b>	<b>2/2</b>
<b>Näyte 2.1</b>	41,5	40,0
<b>Näyte 2.2</b>	41,9	40,9
<b>Näyte 2.3</b>	39,5	41,4
<b>Näyte 2.4</b>	42,1	40,6
<b>Näyte 2.5</b>	35,8	39,5
<b>Näyte 2.6</b>	40,1	37,5
<b>ka</b>	40,1	
<b>s</b>	1,9	
<b>Puhdas maito</b>	2,3	1,1

<b>Rasva poistettu (noin 7 ppt)</b>		
	<b>1/2</b>	<b>2/2</b>
<b>Näyte 3.1</b>	4,3	4,3
<b>Näyte 3.2</b>	4,7	3,8
<b>Näyte 3.3</b>	3,8	3,4
<b>Näyte 3.4</b>	4,2	2,6
<b>Näyte 3.5</b>	4,3	3,8
<b>Näyte 3.6</b>	4,8	2,4
<b>ka</b>	3,9	
<b>s</b>	0,7	

<b>Rasvan kanssa (noin 7 ppt)</b>		
	<b>1/2</b>	<b>2/2</b>
<b>Näyte 4.1</b>	1,9	3,2
<b>Näyte 4.2</b>	3,8	1,7
<b>Näyte 4.3</b>	1,7	3,7
<b>Näyte 4.4</b>	3,7	2,2
<b>Näyte 4.5</b>	1,0	2,0
<b>Näyte 4.6</b>	1,5	2,4
<b>ka</b>	2,4	
<b>s</b>	1,0	

## Liite 5. Kuormanäytteiden ja tilakohtaisten näytteiden tulokset.

<b>Kuormanäytteet</b>			
<b>Reitti</b>	<b>Määrä (ppt)</b>		
	<b>1/2</b>	<b>2/2</b>	<b>ka</b>
<b>1</b>	0,5	2,6	1,6
<b>2</b>	3,2	0,5	1,8
<b>3</b>	1,7	0,7	1,2
<b>4</b>	2,2	2,8	2,5
<b>5</b>	3,6	2,6	3,1
<b>6</b>	4,7	4,4	4,5
<b>7</b>	0,2	1,4	0,8
<b>8</b>	2,0	2,0	2,0
<b>9</b>	3,3	5,1	4,2
<b>10</b>	3,6	4,7	4,2
<b>11</b>	1,1	2,2	1,6
<b>12</b>	2,6	3,1	2,9
<b>13</b>	3,2	3,2	3,2
<b>14</b>	2,6	2,4	2,5
<b>15</b>	3,0	2,6	2,8
<b>16</b>	6,3	7,1	6,7
<b>17</b>	3,6	4,3	4,0
<b>18</b>	5,0	4,1	4,5
<b>19</b>	2,2	3,7	3,0
<b>20</b>	2,6	4,1	3,3
<b>21</b>	5,0	5,5	5,2
<b>22</b>	5,0	3,1	4,0
<b>23</b>	2,6	3,3	3,0
<b>24</b>	4,9	3,3	4,1
<b>25</b>	4,8	4,9	4,9
<b>26</b>	6,5	5,0	5,8
<b>27</b>	1,6	3,7	2,6
<b>28</b>	5,1	5,2	5,1
<b>29</b>	4,5	4,7	4,6
<b>30</b>	5,9	2,1	4,0
<b>31</b>	10,0	11,1	10,6
<b>32</b>	4,3	4,2	4,2
<b>33</b>	4,4	4,3	4,3
<b>34</b>	4,4	4,8	4,6
<b>35</b>	2,2	2,6	2,4
<b>36</b>	4,0	4,2	4,1
<b>37</b>	4,4	5,5	5,0
<b>38</b>	6,7	4,7	5,7
<b>40</b>	2,4	4,0	3,2
<b>41</b>	2,8	5,6	4,2

42	4,9	4,8	4,9
----	-----	-----	-----

<b>Tilakohtaiset näytteet</b>			
<b>Näyte</b>	<b>Määrä (ppt)</b>		
	<b>1/2</b>	<b>2/2</b>	<b>ka</b>
1	0,7	1,4	1,1
2	1,3	0,4	0,8
3	1,7	0,2	1,0
4	0,9	1,9	1,4
5	0,4	0,8	0,6
6	16,9	15,8	16,4
7	1,9	1,3	1,6
8	2,8	1,8	2,3
9	0,3	2,9	1,6
10	1,2	2,7	1,9
11	2,0	1,9	1,9
12	1,2	4,4	2,8
13	4,1	2,5	3,3
14	0,2	2,8	1,5
15	0,1	3,0	1,6
16	2,1	0,6	1,3
17	1,3	4,5	2,9
18	0,6	3,2	1,9
19	2,4	3,4	2,9
20	2,0	3,5	2,7
21	0,7	0,3	0,5
22	2,8	1,7	2,3
23	0,5	0,4	0,4
24	1,1	1,6	1,4
25	2,3	1,8	2,1
26	1,8	1,2	1,5
27	0,8	1,1	0,9
28	3,7	2,4	3,0
29	1,0	2,8	1,9
30	2,5	3,5	3,0
31	2,4	3,8	3,1
32	3,2	2,3	2,7
33	2,8	0,3	1,6
34	0,3	3,6	2,0
35	4,3	0,8	2,5
36	0,4	2,6	1,5
37	3,6	3,0	3,3
38	2,8	5,5	4,1

<b>39</b>	4,9	4,3	4,6
<b>40</b>	1,3	3,1	2,2
<b>41</b>	3,0	3,3	3,1
<b>42</b>	0,4	5,9	3,2

## Liite 6. Mittausepävarmuus.

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>ka</b>	<b>d (T1-T2)</b>	<b>d%</b>
<b>Näyte 1</b>	6,19	6,09	6,1	0,1	1,6
<b>Näyte 2</b>	4,83	4,87	4,9	0,0	-0,8
<b>Näyte 3</b>	8,24	9,46	8,9	-1,2	-13,8
<b>Näyte 4</b>	25,71	24,66	25,2	1,1	4,2
<b>Näyte 5</b>	25,40	26,40	25,9	-1,0	-3,9
<b>Näyte 6</b>	41,90	40,90	41,4	1,0	2,4
<b>Näyte 7</b>	39,50	41,40	40,5	-1,9	-4,7
<b>Näyte 8</b>	42,10	40,60	41,4	1,5	3,6
<b>Näyte 9</b>	4,35	4,82	4,6	-0,5	-10,3
<b>Näyte 10</b>	41,50	40,00	40,8	1,5	3,7
<b>Näyte 11</b>	27,00	26,20	26,6	0,8	3,0
<b>Näyte 12</b>	22,00	23,80	22,9	-1,8	-7,9
<b>Näyte 13</b>	26,20	24,40	25,3	1,8	7,1
<b>Näyte 14</b>	40,10	37,50	38,8	2,6	6,7
<b>Näyte 15</b>	10,04	11,15	10,6	-1,1	-10,5
<b>Näyte 16</b>	4,35	4,82	4,6	-0,5	-10,3
			<b>ka</b>	<b>0,1</b>	<b>-1,9</b>
			<b>s</b>	<b>1,4</b>	<b>6,9</b>
			<b>2*s (95%)</b>	<b>2,7</b>	<b>13,8</b>

## Liite 7. Standardikäyrän käyttö toisella levyllä.

<b>Tulokset alkuperäisellä suoralla (ppt)</b>	<b>Tulokset toisella suoralla (ppt)</b>	<b>Erotus (ppt)</b>
29,5	32,9	3,4
29,0	32,4	3,4
28,6	32,0	3,4
28,4	31,7	3,3
27,6	30,8	3,2
27,5	30,7	3,2
28,1	31,4	3,3
26,5	29,5	3,0
27,5	30,7	3,2
28,9	32,2	3,3
28,8	32,1	3,3
29,5	33,0	3,5
27,5	30,6	3,1
27,3	30,4	3,1
27,5	30,7	3,2
27,3	30,4	3,1
28,0	31,3	3,3
27,4	30,6	3,2
28,4	31,7	3,3
27,8	31,0	3,2
24,1	27,0	2,9
25,5	28,4	2,9
25,5	28,4	2,9
23,0	25,8	2,8
27,2	30,4	3,2
27,3	30,4	3,1
26,5	29,5	3,0
26,7	29,7	3,0
25,3	28,2	2,9
25,6	28,6	3,0
24,8	27,7	2,9
22,9	25,7	2,8
26,9	30,0	3,1
26,9	30,0	3,1
27,4	30,6	3,2
25,9	28,9	3,0
24,6	27,5	2,9
24,3	27,2	2,9
24,2	27,1	2,9
18,6	21,5	2,9
24,0	26,8	2,8

23,4	26,3	2,9
25,1	28,0	2,9
25,7	28,7	3,0
24,7	27,5	2,8
25,3	28,3	3,0
24,1	27,0	2,9
21,7	24,5	2,8
25,5	28,5	3,0
27,2	30,3	3,1
27,0	30,1	3,1
26,2	29,2	3,0
22,0	24,8	2,8
23,8	26,7	2,9
25,7	28,7	3,0
21,4	24,2	2,8
25,4	28,3	2,9
26,4	29,5	3,1
26,2	29,2	3,0
24,4	27,2	2,8

## Liite 8. Laadunvarmistusnäytteen tulokset.

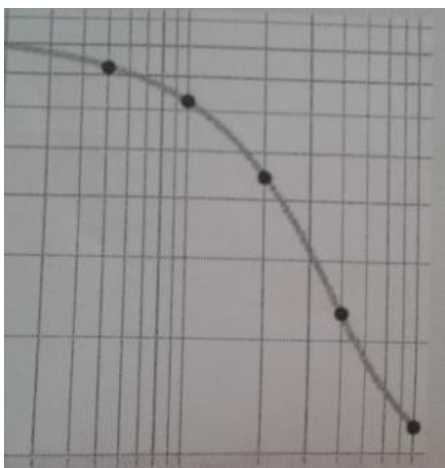
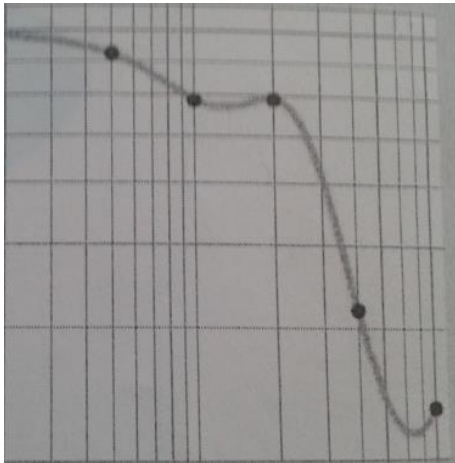
<b>20.1.2015</b>	<b>28.1.2015</b>
16,9	15,0
15,3	14,2
14,8	13,4
17,9	13,2
16,1	
17,4	
17,2	
16,5	
16,0	
12,2	
17,1	
15,2	
17,3	
17,0	



## Liite 9. Kriittiset pisteet.

Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,9268	0,3058	0,9515	0,9568	0,9454	0,8987	0,9247	0,8571	0,8927	0,8923	0,9167	0,9064
B	0,9125	0,3156	0,9181	0,9030	0,8962	0,8771	0,9182	0,8783	0,8590	0,8215	0,8516	0,8482
C	0,8215	0,2014	0,9037	0,9265	0,9299	0,9097	0,5800	0,9023	0,8733	0,8280	0,8724	0,8645
D	0,7969	0,1996	0,8868	0,8815	0,9058	0,9009	0,6006	0,9296	0,8770	0,8622	0,9060	0,8443
E	0,7144	0,9247	0,8907	0,8805	0,9805	0,9448	0,8756	0,9134	0,9325	0,9146	0,8899	0,8748
F	0,7033	0,8772	0,9099	0,9143	0,9312	0,9135	0,8895	0,8545	0,8595	0,8569	0,8200	0,8408
G	0,5295	0,9218	0,9311	0,8835	0,5995	0,8922	0,9084	0,8986	0,8842	0,8527	0,8718	0,9320
H	<b>0,8060</b>	<b>1,2929</b>	<b>1,1157</b>	<b>0,9986</b>	<b>0,9609</b>	<b>1,1851</b>	<b>1,0865</b>	<b>1,1108</b>	<b>1,1302</b>	<b>1,1761</b>	<b>1,2911</b>	<b>1,2433</b>

Fitted conc.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			NaN	NaN	NaN	0,9538	NaN	2,8642	1,2293	1,2477	0,1333	0,6015
B			0,0700	0,7569	1,0685	1,9470	0,0655	1,8918	2,7775	4,4631	3,1148	3,2691
C			0,7249	NaN	NaN	0,4511	25,7086	0,7889	2,1218	4,1757	2,1632	2,5258
D			1,5006	1,7446	0,6289	0,8530	24,6630	NaN	1,9516	2,6311	0,6198	3,4456
E		NaN	1,3212	1,7906	NaN	NaN	2,0160	0,2828	NaN	0,2284	1,3580	2,0528
F		1,9424	0,4419	0,2420	NaN	0,2783	1,3764	2,9828	2,7546	2,8734	4,5290	3,6034
G		NaN	NaN	1,6525	24,7206	1,2523	0,5103	0,9584	1,6203	3,0647	2,1908	NaN
H		NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN



Liite 10. Menetelmäohje.

## RIDASCREEN AFLATOXIN M1

Raja-arvo aflatoksiini M<sub>1</sub>:lle on raakamaidossa 0,05 µg/kg eli 0,05 ppb = 50 ppt. Työssä saadut tulokset ovat ppt (ng/kg) yksikössä.

### Pesuliuokset:

10x pesupuskuriliuos (10 x PBS-Tween) valmistetaan siten, että liuotetaan suolapussin sisältö 100 ml ionisoitua vettä. Tämä liuos säilyy 2-3 kk huoneenlämmössä

1x pesupuskuri eli käyttövalmis pesuliuos laimennetaan suhteessa 1:10. Eli 9 osaan ionisoitua vettä lisätään 1 osa 10x pesupuskuriliuosta. Tämä säilyy 1-1,5 kk huoneenlämmössä.

1x pesupuskuria käytetään pesuihin sekä aflatoxin M<sub>1</sub> conjugaten ja anti-aflatoxin M<sub>1</sub> antibodyn laimentamiseen.

Yhden levyn pesuihin menee noin 240 ml 1xpesupuskuriliuosta. Levyn pesu koneella nostaa pesuliuoksen kulutuksen määrää.

### Standardit:

Työssä käytettävät standardit:

Standardi 1	0 ppt
Standardi 2	5 ppt
Standardi 3	10 ppt
Standardi 4	20 ppt
Standardi 5	40 ppt
Standardi 6	80 ppt

Testin standardi sijoittuu pitoisuuksille 5-80 ppt.

### Työn kulku:

- Ota näytteet huoneenlämpöön 1 ½ tuntia ja reagenssit 1 tunti ennen testin aloittamista. Näytteiden ja reagenssien tulee olla testissä huoneenlämpöisiä.
- Esivalmistele reagenssit:
  - Aflatoxin M<sub>1</sub> conjugate (punainen korkki) liuotetaan (suhteessa 1:11) 1xpesupuskuriliuokseen. Valmis liuos on keltainen. Säilytetään valolta suojattuna kunnes on aika lisätä.
  - Anti-aflatoxin M<sub>1</sub> antibody (musta korkki) liuotetaan (suhteessa 1:11) 1xpesuliuokseen. Valmis liuos on sininen.
  - Ohjeen lopussa on tarkempi taulukko reagenssien esivalmisteluista

3. Aseta tarvittava määrä kaivostrippejä levyille. Standardeihin ja laadunvarmistusnäytteeseen menee 2x7 kaivoa.
  - Ohjeen lopussa on kuva levykartasta.
4. Pipetoi 100 µl anti-aflatoxin M<sub>1</sub> antibodya (sininen esivalmisteltu) jokaiselle kaivolle. Sekoita heiluttelemalla levyä varovaisesti.
5. Inkuboi 15 minuuttia.
6. Pese levy aflu ohjelmalla:
  - Muista huuhdella aluksi pesulinja pesuliuksella painamalla PRIME näppäintä
  - Laita levy laitteeseen ja valitse pestävien rivien määrä numeropainikkeilla
  - Aloita pesu painamalla START
7. Lisää 100 µl standardia/näytettä rinnakkaisnäytteinä levykartan mukaisesti. Sekoita heiluttelemalla levyä varovaisesti.
8. Inkuboi 30 min pimeässä.
9. Pese levy aflu ohjelmalla
10. Pipetoi 100 µl aflatoxin M<sub>1</sub> conjugatea (keltainen esivalmisteltu) jokaiseen kaivoon. Sekoita heiluttelemalla levyä varovaisesti.
11. Inkuboi 15 min pimeässä.
12. Pese levy aflu ohjelmalla.
  - Huuhtelee lopuksi pesulinja ionisoidulla vedellä painamalla PRIME näppäintä
13. Pipetoi 100 µl red chromogen pro liuosta (ruskea korkki) kaikkiin kaivoihin. Sekoita heiluttelemalla levyä varovaisesti.
14. Inkuboidaan 15 min pimeässä.
15. Pipetoi 100 µl stop-liuosta (keltainen korkki) kaikkiin kaivoihin. Sekoita heiluttelemalla levyä varovaisesti.
16. Mittaa absorbanssi (450 nm) 15 minuutin kuluessa stop-liuoksen lisäämisestä.
  - Valitse aflatoksiini (valmiiksi tehty ajo-ohjelma)
  - Avaa välilehti LAYOUT ja valitse sieltä FILL WIZARD
  - Valitse näytteiden määrä:
    - samples: x määrä ↓
    - replicates: 2 ↓
    - paina ADD AND CLOSE
  - Avaa välilehti HOME ja avaa luukku PLATE OUT näppäimellä. Laita levy laitteeseen.
  - Käynnistä ohjelma painamalla START

## Työn suorittaminen

- Ota laadunvarmistusnäyte pakkasesta jo näytteiden tekoa edeltävänä iltana kylmiin sulamaan.
- Tuo reagenssit huoneenlämpöön aina noin tuntia ennen työn aloittamista, näytteet 1 ½ h ennen.
- Säilytä aflatoxin M1 konjugaatti valolta suojattuna, kunnes on aika lisätä.
- Työskentele johdonmukaisesti siten, että jokaisen kaivon seisonta-aika olisi suurin piirtein sama ja ettei kaivot kerkeä kuivua missään työn vaiheessa.
- Sekoita aineet aina ennen inkubointia heiluttaen levyä pöydällä tai kädessä vaakatasossa. Varo ettei aineet läiky yli kaivojen.
- Inkubointiajat ovat tarkat, joten käytä sekuntikelloa. Älä heiluttele levyä inkuboinnin aikana.
- Huolehdi pesurin hyvästä puhdistuksesta.

## Näytteet

- Näytteiden pH tulee olla 6,5–7,5 välillä. (Raakamaidon pH 25 °C:ssa 6,5 – 6,7)
- Vältä näytteiden Vältä näytteiden altistumista suoraan valolle.
- Rasva voidaan poistaa näytteestä sentrifugoimalla (10 min, 3500g) ja lusikalla kuorimalla.

## Työturvallisuus

- Standardit sisältävät aflatoksiini M1, joten reagenssien kosketusta ihoon tulee välttää.
- Työssä tulee käyttää hanskoja.
- Stop-liuos sisältää 0,5 M rikkihappoa, mikä on voimakkaasti syövyttävää.
- Reagenssien käyttöturvallisuustiedotteet ovat tietokoneella.

## Kitin säilytys

- Reagenssipaketti tulee säilyttää 2-8 °C lämpötilassa. Reagensseja ei saa pakastaa.
- Aflatoksiini ja substraatti ovat valolle herkkiä, joten vältä suoraan valolle altistumista.
- Reagensseissä ei ole laatutakuuta viimeisen voimassaolopäivän jälkeen.
- Reagenssejä ei tule vaihtaa eri erien kesken.

## Ongelmatilanteita

- Jos värireaktio puuttuu työtä tehdessä, tarkista reagenssien kunto.  
→ Sekoita 10 µl aflatoxin M1 conjugate ja 100 µl red chromogen pro liuosta.  
→ Väri tulisi muuttua heti värittömästä siniseksi
- Jos standardi 1:sen absorbanssi on alle 0,6, tällöin reagenssit eivät ole enää käytökelpoisia.
- Jos ajatun levyn standardisuora on huono, tarkista standardien absorbanssi arvot. Tarkista myös levykartan avulla näytteiden tuloksia. (Pesuri!)

## Levykartta:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	S5	N2	N6	N10	N14	N18	N22	N26	N30	N34	N38
S1	S5	N2	N6	N10	N14	N18	N22	N26	N30	N34	N38
S2	S6	N3	N7	N11	N15	N19	N23	N27	N31	N35	N39
S2	S6	N3	N7	N11	N15	N19	N23	N27	N31	N35	N39
S3	LV	N4	N8	N12	N16	N20	N24	N28	N32	N36	N40
S3	LV	N4	N8	N12	N16	N20	N24	N28	N32	N36	N40
S4	N1	N5	N9	N13	N17	N21	N25	N29	N33	N37	N41
S4	N1	N5	N9	N13	N17	N21	N25	N29	N33	N37	N41

Reagenssien esivalmistelut				
Strippien lkm	Näytteiden lkm	Tiiviste (µl)	1xpesuliuos (ml)	Yht. (ml)
2	2	200	2	2,2
3	10	300	3	3,3
4	18	400	4	4,4
5	26	500	5	5,5
6	34	600	6	6,6
7	42	700	7	7,7
8	50	800	8	8,8
9	58	900	9	9,9
10	66	1000	10	11
11	74	1100	11	12,1
12	82	1200	12	13,2

Näytteiden lukumäärässä on otettu huomioon jo standardien ja lv-näytteen vaatimat liuosmäärät.