

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Elintarviketekniikka

2017

Tuomas Lampinen

KAURAPOHJAISTEN TUOTTEIDEN GLUTEENIPITOISUUDEN MÄÄRITYS KOLMELLA ERI MENETELMÄLLÄ

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma | Elintarviketekniikka

Kesäkuu 2017 | 38

Ohjaaja: Ilari Suominen

Tuomas Lampinen

KAURAPOHJAISTEN TUOTTEIDEN GLUTEENIPITOISUUDEN MÄÄRITYS KOLMELLA ERI MENETELMÄLLÄ

Keliakia on autoimmuunisairaus, jonka aiheuttaa viljojen sisältämä gluteeni. Tähän päivään mennessä keliakiaan ei ole keksitty mitään muuta parannuskeinoa kuin elinikäinen gluteenittoman ruokavalion noudattaminen. Siksi gluteenittomien tuotteiden valmistaminen on keliakikoiden kannalta elintärkeää.

Tehdyn opinnäytetyön tavoitteena oli käyttöönottaa toimeksiantajayrityksen tehtaalla uusi gluteeninmäärittämenetelmä. Käyttöönottoon liittyen menetelmää validoitiin määrittämällä kaurapohjaisista tuotteista gluteenipitoisuuksia kolmella eri menetelmällä.

Käytettyjä menetelmiä olivat GlutenTox Pro, GlutenTox Sticks Plus ja Ridascreen Gliadin competitive. GlutenTox –menetelmät ovat immunotoksikologisia lateral flow -analyysimenetelmiä, jotka antavat semikvantitatiivisia tuloksia gluteenipitoisuuksista. Ridascreen Gliadin competitive on entsyymi-immunologinen määrittäminen, jolla saadaan tarkkoja tuloksia vertailumateriaaliksi.

Analyysit suoritettiin kauramaidosta, kaurajauhosta ja luomukaurajauhosta. Ridascreenillä mittaukset tehtiin vain kauramaidon kanssa, sillä testikitti ei soveltunut jauhojen analysointiin.

Menetelmän käyttöönotto vaatii validoinnin kannalta vielä lisätutkimuksia. Työssä saavutetut tulokset antavat kuitenkin hyvän pohjan käyttöönottoa ja validointia varten, sekä hyödyllistä tietoa jatkotutkimuksia ajatellen.

ASIASANAT:

Keliakia, gluteeni, kaura, vasta-aine, ELISA, prolamiini, peptidiketju

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Food Technology

June 2017 | 38

Instructor: Ilari Suominen, Principal Lecturer

Tuomas Lampinen

GLUTEN ANALYSIS OF OAT-BASED PRODUCTS WITH THREE DIFFERENT METHODS

Celiac disease is an autoimmune disease, caused by the gluten present in grains. Today there is no remedy for celiac disease other than keeping to a lifelong gluten-free diet. For this reason, the production of gluten-free products is vital for celiac patients.

The goal of this thesis was to introduce a new method to be used by the commissioner's factory for determining gluten present in foods. Regarding the introduction, the method was validated by determining the gluten contents of oat-based products by three different methods.

The methods used were GlutenTox Pro, GlutenTox Sticks Plus and Ridascreen Gliadin competitive. GlutenTox methods are immunotoxic lateral flow methods that give semiquantitative results. Ridascreen Gliadin competitive is an enzyme-linked immunosorbent assay that gives specific results which are used as comparison material.

The analyses were conducted with oat milk, oat flour and organic oat flour. The analyses carried out with Ridascreen were conducted only with oat milk because the method was not suited for flours.

The introduction of the method requires additional studies regarding validation. However, the results gained from the analyses form a good basis for the validation and introduction of the method in addition to providing useful information for follow-up studies.

KEYWORDS:

Celiac disease, gluten, oat, antibody, ELISA, prolamin, peptide sequence

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 GLUTEENI	8
2.1 Gluteenin saanti	9
2.2 Gluteenin terveystaitämät	10
3 KELIAKIA JA VILJA-ALLERGIA	12
3.1 Keliakia	12
3.1.1 Keliakian oireet	14
3.1.2 Keliakian hoito	15
3.2 Vilja-allergia	16
4 KAURA	17
4.1 Aveniini	17
4.2 Kliiniset tutkimukset	17
5 GLUTEENIANALYYSIT	19
5.1 GlutenTox Pro	19
5.1.1 Toimintaperiaate	20
5.1.2 Ajankäyttö ja laboratoriovälineet	22
5.2 GlutenTox Sticks Plus	22
5.2.1 Toimintaperiaate	24
5.2.2 Ajankäyttö ja laboratoriovälineet	24
5.3 Ridascreen Gliadin Competitive	25
5.3.1 Toimintaperiaate	25
5.3.2 Ajankäyttö ja laboratoriovälineet	27
6 TULOKSET	28
6.1 GlutenTox Pro	28
6.2 GlutenTox Sticks Plus	29
6.3 Ridascreen Gliadin Competitive	29
7 TULOSTEN TARKASTELU JA PÄÄTELMÄT	33

LIITTEET

Liite 1. Ridascreen Gliadin competitive tulokset, standardisuorat ja CV %

Liite 2. GlutenTox Pro tulokset

Liite 3. GlutenTox Sticks Plus tulokset

KUVAT

Kuva 1. Ohutsuolen limakalvon vaurion kehittyminen asteittain. V = villus, K = krypta (Kaukinen ym. 2010, 249)	13
Kuva 2. GlutenTox Pro -analyysikitin sisältö	19
Kuva 3. Gluteenianalyysitikun toimintaperiaate (Cunningham 2015)	21
Kuva 4. Negatiivinen tulos gluteenianalyysistä	Error! Bookmark not defined.
Kuva 5. Positiivinen tulos gluteenianalyysistä	22
Kuva 6. GlutenTox Sticks Plus -analyysikitin sisältö	23
Kuva 7. Ridascreen Gliadin Competitive -analyysikitin sisältö	25
Kuva 8. Kuopat ennen (vas.) ja jälkeen pysäytysliuoksen lisäämistä. (Colby, 2014)	26
Kuva 9. Hidex Sense kuoppalevyn lukija	27
Kuva 10. Standardisuora	30
Kuva 11. Cubic spline standardisuora	31

TAULUKOT

Taulukko 1. Muita sairauksia, joihin liittyy normaalia suurempi riski sairastua keliakiaan (Kaukinen ym. 2010, 248)	15
Taulukko 2. Vilja-allergian ja keliakian erot (Evira 2016)	16
Taulukko 3. GlutenTox Sticks Plus Detektorajat (Biomedal Diagnostics, GlutenTox Sticks Plus, 9)	23
Taulukko 4. Gluteenin detektorajat	28
Taulukko 5. Tuloksia 29.3 valmistetun kauramaidon gluteenipitoisuuksista	29
Taulukko 6. Tuloksia luomu jauhun pitoisuuksista	29
Taulukko 7. Tuloksia 29.3 valmistetusta kauramaidosta	32
Taulukko 8. Standardiliuosten CV%	32
Taulukko 9. Näytteiden CV%	32

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Sino Biological Inc.)
LMW -gluteniini	Low-molecular-mass gluteniini, pienen molekyylimassan omaava gluteniini
OMA	Official method of analysis, virallinen analyysimenetelmä. (AOAC international)

1 JOHDANTO

Gluteeni on viljoissa esiintyvää valkuaisainetta, joka aiheuttaa tietyssä joukossa ihmisiä heidän elimistössään vahingollisia oireita. Tätä sairautta kutsutaan keliakiaksi, jonka esiintyvyys on jatkuvassa nousussa maailmanlaajuisesti. Tähän päivään mennessä keliakiaan ei ole keksitty mitään muuta hoitokeinoa kuin elinikäinen gluteenittoman ruokavalion noudattaminen ja siksi gluteenittomien valmisteiden tuottaminen on keliakikoiden kannalta elintärkeää.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli mitata kaurapohjaisten tuotteiden gluteenipitoisuutta kolmella eri menetelmällä, sekä vertailla ja analysoida niistä saatuja tuloksia ja tulosten merkitystä. Opinnäytetyön toimeksiantaja halusi ottaa yritykseen käyttöön uuden gluteenin pikamääritysmenetelmän, sillä gluteenipitoisuuksien määrittämisen ulkoistaminen on kallista ja se voidaan suorittaa halvemmin ja nopeammin käyttäen hyväksi tehtaan omia tiloja.

Työssä mitattiin gluteenipitoisuutta kahdella uudella pikamääritysmenetelmällä, joiden toimivuus haluttiin varmistaa ennen niiden mahdollista käyttöönottoa yrityksessä. Pikamääritysmenetelmiä ovat Biomedal Diagnosticsin valmistamat GlutenTox Sticks Plus ja AOAC -sertifioitu GlutenTox Pro. Vertailumenetelmänä gluteenianalyysi suoritettiin käyttäen AOAC-OMA sertifioitua ja Codex Alimentariuksen hyväksymää R5 competitive ELISA -gluteenianalyysikittiä.

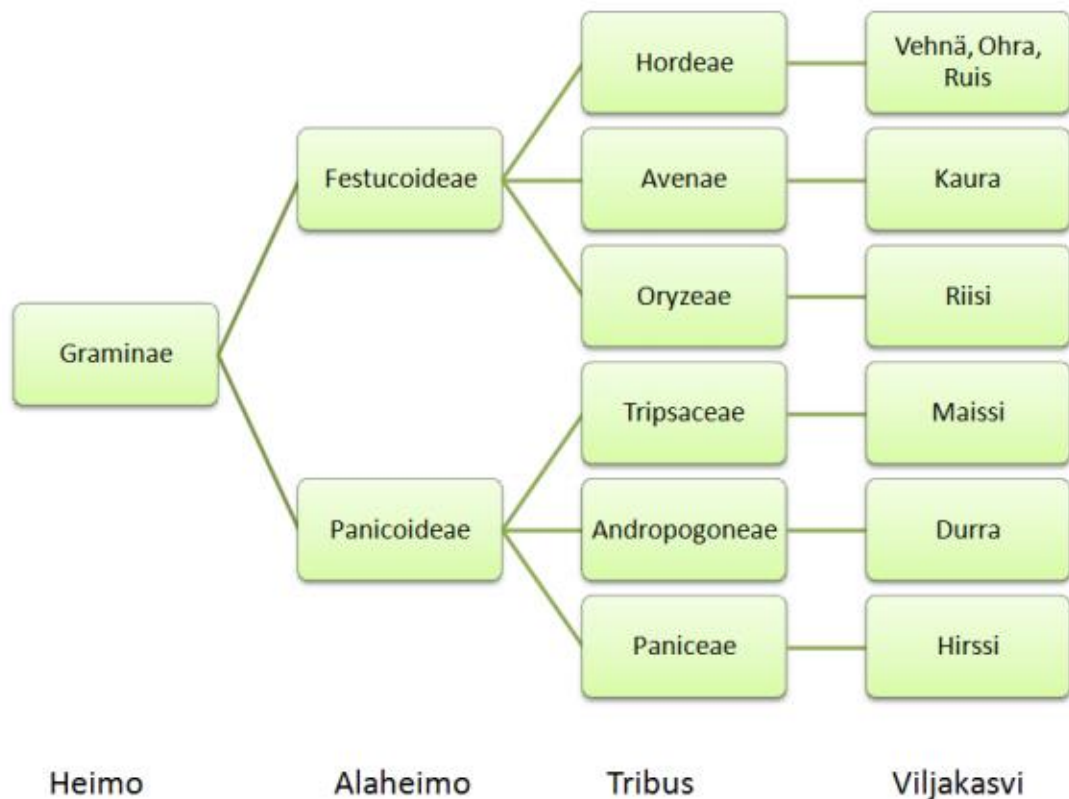
Opinnäytetyön toimeksiantaja oli Bioferme Oy Turussa. Bioferme Oy valmistaa Yosa-tuotemerkillä kauravälipaloja suomalaisesta täysjyväkaurasta. Tuotevalikoimaan kuuluu eri makuisia juotavia jogurtteja sekä muita hapatettuja kauratuotteita.

Näytteet otettiin Kaarinassa sijaitsevalta tehtaalta.

2 GLUTEENI

Gluteenilla tarkoitetaan viljojen ydinosasta poistetun veteen liukenevan tärkkelyksen jälkeen jäljelle jäävää sitkomassaa. Tämä sitkomassa sisältää keliakiaa aiheuttavat valkuaisaineet eli prolamiinit. Kaikilla viljoilla on omat prolamiinifraktionsa ja niillä kaikilla on oma nimensä. Vehnän prolamiineja ovat gliadiini ja gluteeniini, ohran hordeiini, rukiin sekaliini ja kauran aveniini. Vaikka kaura on määritelty gluteenipitoiseksi, se ei aiheuta keliakiaa todennäköisesti erilaisen valkuaisainerakenteensa takia verrattuna vehnään, ohraan ja rukiiseen. Kauran aveniini eroaa vehnän gliadiinista aminohappojärjestykseltään enemmän kuin muut viljat, joka osaltaan vaikuttaa aveniinin vaarattomuuteen keliakikoille. Lisäksi aveniinin on tutkittu hajoavan ohutsuolessa paremmin verrattuna vahingollisiin prolamiineihin eikä tästäkään syystä ole vahingollinen ohutsuolen limakalvolle. (Mäki ym. 2006, 18-19, 98)

Kaikki viljat, jotka aiheuttavat keliakiaa, kuuluvat heinäkasveihin ja ne voidaan luokitella eri heinäkasviheimon alaheimoihin ja edelleen tribuksiin (Mäki ym. 2006, 18). Heinäkasvien sukupuu on esitetty kuviossa 1.



Kuvio 1. Heinäkasvien heimojen sukupuu (Mäki ym. 2006, 19 ; Tammisto 2013, 11)

Gluteeni on tärkein rakenteen muodostava proteiini jauhoissa. Se on vastuussa taikinan elastisista ominaisuuksista ja vaikuttaa myös paistettujen tuotteiden ulkomuotoon ja mururakenteeseen. Prolamiinifraktioista esimerkiksi vehnässä gluteeniini on karkeaa ja kumimaista massaa nesteytettynä, kun taas gliadiini muodostaa viskoosin massan. Viljan gluteenimatriksi siis määrittää pääosin taikinan ja paistettujen tuotteiden tärkeät ominaisuudet kuten sietokyvyn venytykselle ja sekoitukselle, kaasun sitomiskyvyn ja kohoamisen. Siksi gluteenin poistaminen johtaakin suuriin ongelmiin viljatuotteiden valmistajien keskuudessa ja tällä hetkellä monet tarjolla olevat gluteenittomat tuotteet ovat huonolaatuisia, niillä on lyhyt säilyvyys, ne eivät maistu yhtä miellyttävälle kuin gluteenia sisältävät tuotteet ja niiden suutuntuma on huono. (Gallagher 2009)

2.1 Gluteenin saanti

Gluteenia sisältäviksi viljoiksi luokitellaan vehnä, ruis, ohra ja kaura. Vaikka kaura on määritelmän perusteella gluteenipitoinen, se ei tämänhetkisten tietojen mukaan aiheuta keliakiaa. Suomen keliakialiitto onkin vapauttanut kauran keliakikoille sopivaksi viljaksi vuonna 1997. On kuitenkin olemassa yksittäisiä tapauksia, joissa kauran aveniini on aiheuttanut potilaassa tulehdusreaktioita ja limakalvovaurioita. Osassa ilmenneistä tapauksista saattaa taustalla olla yliherkkyys kauraa kohtaan, jolloin samaan aikaan esiintyy myös allergiaoireita. (Mäki ym. 2006, 18, 98)

Viljan jyvä koostuu kolmesta eri elementistä: alkiosta, ydinosasta ja kuorikerroksesta. Keliakiaa aiheuttavat varastoproteiinit eli prolamiinit sijaitsevat jyvän ytimessä. Kuviossa 2 on esitetty vehnänjyvän ytimen rakenne. Esimerkiksi jauhot valmistetaan juuri jyvien ydinosasta, kun taas leseet tehdään kuorikerroksesta, jotka eivät sisällä varastoproteiineja. Lisäksi viljan jyvässä on monia eri entsyymejä ja rakennevalkuaisaineita. Noin 10-15% viljan jyvästä on valkuaisaineita ja loput pääasiassa tärkkelystä. (Mäki ym. 2006, 18-19)



Kuvio 2. Vehnänjyvä ja varastoproteiinit (Mäki ym. 2006, 19)

Kauran käyttö gluteenittoman ruokavalion yhteydessä on keliakikoiden kesken hyvin yleistä ja suositeltavaa. Sitä puoltavat kauran tuoma vaihtelu ruokavalioon, kustannussäästöt raaka-aineita ostettaessa ja sen tuoma lisä gluteenittoman ruokavalion ravintoarvoihin. (Mäki ym. 2006, 98)

Kulutettaessa kauraa on huomioitava, että kauratuotteetkin saattavat sisältää vähäisiä määriä vehnän, rukiin tai ohran sisältämää gluteenia. Jotta kaura olisi varmasti täysin puhdas haitallisesta gluteenista, se täytyy jo viljelyvaiheessa eristää muista viljoista sillä tavalla, että pellolla viljellään ainoastaan kauraa, pellolta on poistettava vieraat tähkät ja sadonkorjuuseen tarvittava kalusto on puhdistettava huolellisesti. Sekaviljely tai epäpuhtaan puimurin käyttö voivat siis olla yhtenä syynä kauran sisältämään haitalliseen gluteeniin. Muita syitä voivat olla jauhatus tai jokin muu valmistusvaihe elintarviketeollisuudessa. (Mäki ym. 2006, 98-99)

2.2 Gluteenin terveystämät

Suomalaiseen ruokavalioon kuuluu yleisesti erilaiset viljatuotteet, jonka seurauksena gluteeni on suurelle osalle suomalaisista päivittäin nautittava valkuaisaine. Gluteeni ei kuitenkaan sovi kaikille, jolloin tätä ainetta sietämättömän henkilön ohutsuoli voi aiheuttaa tulehdusreaktion. Tällaista gluteenin aiheuttamaa sairautta kutsutaan keliakiaksi. Keliakiaa sairastavan syödessä gluteenipitoista ruokaa, ohutsuolen limakalvolla oleva suolinukka tulehtuu, joka heikentää ravintoaineiden imeytymistä ja voi loppujen lopuksi johtaa vakaviin seurauksiin. (Keliakialiitto)

Gluteeni voi aiheuttaa osassa ihmisiä myös gluteeniherkkyyttä. Gluteeniherkkyys aiheuttaa samoja oireita kuin keliakia ja usein myös sekoitetaan siihen. Gluteeniherkkyyttä sairastavan suolinukka pysyy kuitenkin normaalina, eivätkä oireet ole yhtä vakavia kuin keliakiassa. (Kokko 2012)

Gluteenittomassa ruokavaliossa on tärkeää, että tunnetut viljat korvataan gluteenittomalla vaihtoehdolla, sillä viljatuotteet ovat tärkeitä kuidun, raudan ja monien B-vitamiinien lähteitä. Gluteenitonta ruokavaliota noudattavalle voi joskus olla kannattavaa sisällyttää ruokavalioonsa erilaisia ravintolisiä. Ilman viljojen sisältämiä tärkeitä ravintoaineita, ihminen voi sairastua erilaisiin puutostauteihin tai anemiaan. (Mäki ym. 2006, 82-83)

3 KELIAKIA JA VILJA-ALLERGIA

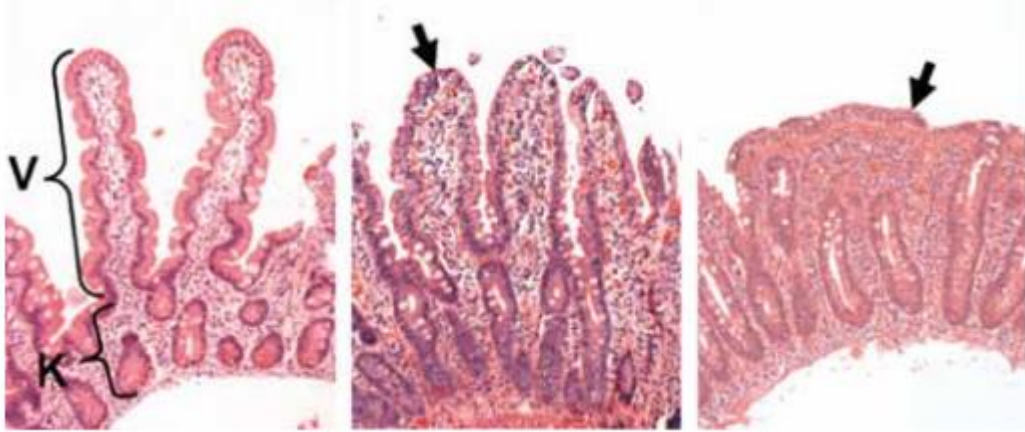
Keliakian ja muiden viljoista peräisin olevien allergioiden esiintyvyys on kaksinkertaistunut viimeisen kahdenkymmenen vuoden aikana. Tänä päivänä se kattaa jo yli 2 % koko Suomen aikuisväestöstä. Kovan kasvun syynä on suurelta osin diagnostiikan kehitys ja viljoista johtuvien sairauksien tietoisuuden lisääntyminen. Tautien oireet ovat usein hyvin samankaltaisia ja lieviä, mikä luo haasteita perusterveydenhuollolle ja elintarviketeollisuudelle. Keliakiaa ja muita allergioita pystytään kuitenkin diagnosoimaan jatkuvasti paremmin tarkkojen vasta-aine testien avulla. (Kaukinen ym. 2010). Keliakia erehdytään sekoittamaan usein vilja-allergiaan, sillä niiden oireet voivat olla samanlaiset. Vaikka oireet muistuttavatkin toisiaan, tautien vaikutukset elimistössä ovat erilaiset. (Kokko 2010)

Keliakian ja viljaperäisten allergioiden hoito on usein samankaltainen, mikä osaltaan vaikuttaa keliakian sekoittamiseen vilja-allergiaksi. Tautien hoitomuoto ei suinkaan ole aina sama, jonka takia ihmisten onkin tärkeää tietää keliakian ja vilja allergian ero. Tietoisuuden levittäminen ja tarkemman ja tehokkaamman diagnostiikan kehittäminen vähentää virheellisiä sairauksien toteamisia ja lisää oikeiden hoitomuotojen määräämistä. (Kokko 2010)

Suomalaisista noin 75 000 sairastaa keliakiaa tietämättään ja se on vahvasti alidiagnosoitu sairaus. Lisäksi vain noin 30 000 kansalaista on diagnosoitu keliakikoiksi. Jotta pystyttäisiin vähentämään alidiagnostiikkaa, keliakian tietoisuuden lisääminen Suo-messa on tärkeässä roolissa. (Kokko 2010)

3.1 Keliakia

Keliakia on perinnöllinen ja elinikäinen autoimmuunisairaus, joka aiheuttaa ajan myötä hoitamattomana ns. litteän limakalvon eli villusatrofian. Villusatrofialla tarkoitetaan sitä, että ohutsuolen limakalvon suolinukka on tuhoutunut ja korkeat villukset ovat madaltuneet litteiksi. Villusatrofiaa edeltää kryptahyperplasia, jossa limakalvon tulehtumisen seurauksena kryptat syventyvät ja aiheuttavat nukan madaltumisen. Kuvasta 1 voidaan nähdä villusatrofian ja kryptahyperplasian vaikutus ohutsuoleen.



Kuva 1. Ohutsuolen limakalvon vaurion kehittyminen asteittain. V = villus, K = krypta (Kaukinen ym. 2010, 249)

Keliakiaa pidettiin ennen vain lasten tautina mutta se tunnetaan nykyään tavallisena sairautena, joka voi puhjeta missä iässä hyvänsä. Vauriot eivät synny hetkessä ja suo-
linukan tuhoutuminen voi kestää kuukausista vuosiin, joissakin tapauksissa jopa vuosikymmeniin. (Green & Cellier 2007)

Keliakian aiheuttaa tietyissä viljoissa esiintyvä gluteeni, joka imeytyessään aiheuttaa
tulehduksen ohutsuolen limakalvolle. Tiedetään, että ruuansulatuksemme ei pysty
pilkkomaan gluteenia täydellisesti, vaan osa siitä kulkeutuu sulamattomana ohutsuoleen.
Esimerkiksi eräs vehnän gliadiinissa esiintyvä peptidi on resistentti vatsahapoille, sekä
haiman ja limakalvon erittämille entsyymeille. Näiden pilkkoutumattomien peptidien
imeytyessä ohutsuolen limakalvon läpi, limakalvo tulehtuu ja aiheuttaa taudin. (Green &
Cellier 2007)

Ohutsuolen mikrovillusten tuottamat entsyymit hajottavat gluteenin aminohapoiksi ja
peptideiksi. Gliadiinipeptidit aiheuttavat muutoksia epiteelikudoksessa luonnollisen
immunitetin takia ja limakalvon tukikerroksessa hankitun immunitetin takia. (Green &
Cellier 2007)

Gliadiini vaurioittaa epiteelikudoksessa epiteelisoluja, joka johtaa interleukiini-15
lisääntyneeseen määrään, joka vuorostaan aktivoi intraepiteelisiä imusoluja. Näistä
imusoluista tulee myrkyllisiä ja ne tappavat enterosyyttejä, jotka ovat vastuussa
ravintoaineiden imeytymisestä ohutsuolessa. (Green & Cellier 2007)

Keliakian aiheuttaman tulehduksen aikana gliadiini pääsee limakalvon tukikerrokseen,
jossa se deamidoituu transglutaminaasin vaikutuksesta. Tällöin se on alttiina

vuorovaikutukselle HLA-DQ2- tai HLA-DQ8-molekyylin kanssa antigeenejä esittelevien solujen pinnalla. Edellä mainitut molekyylit esittelevät gliadiinin T-solureseptorin kautta gliadiinireaktiivisille CD4+ T soluille, joka johtaa haitallisten sytokiinien syntymiseen. Nämä sytokiinit aiheuttavat kudosisaurioita ohutsuolessa ja johtavat loppujen lopuksi villusatrofiaan ja kryptahyperplasiaan. Lisäksi sytokiinit aktivoivat ja laajentavat B-soluja, jotka muodostavat vasta-aineita. (Green & Cellier 2007)

3.1.1 Keliakian oireet

Keliakiaan voi sairastua lapsena, aikuisena tai vasta myöhemmällä iällä. Keliakian klassisia oireita ovat krooninen ripuli, vatsavaivat, laihtuminen, imeytymishäiriöistä aiheutuneet puutostaudit ja lapsilla kasvun hidastuminen. Klassisten oireiden lisäksi keliakiaan on liitetty yli 200 muuta oiretta, mikä tekee taudin diagnosoinnista entistä vaikeampaa. Suurella osalla keliakiaa sairastavista ihmisistä oireita ei esiinny ollenkaan, mutta voivat silti sairastaa keliakiaa ja olla alttiita pitkäaikaisille vakaville oireille. Pitkäaikaisia keliakiaan liittyviä vaikutuksia voivat olla osteoporoosi, raudan puutteesta johtuva anemia, laktoosi-intoleranssi, hedelmättömyys, vitamiinien puutostila, haiman vajaatoiminta ja keskushermostoon liittyvät oireet. (Celiac Disease Foundation)

Keliakia ei ole ainoastaan suolistossa esiintyvä tauti, vaan se voi ilmetä myös ihokeliakian muodossa. Ihokeliakia on rakkulainen ihottuma, jota esiintyy yleisimmin kyynärpäissä, polvilla ja pakaroissa mutta voi paikantua myös hiuspohjaan tai hartioihin. Vaikka useimmilla ihokeliakikoilla ei esiinny suolisto-oireita eikä limakalvovaurioita, on se kuitenkin sama tauti kuin keliakia; kaikilla ihokeliakikoilla on joko selvää nukkalisäkkeiden katoa tai tulehdus limakalvossa. (Reunala 2006)

Kuten mainittu, keliakia ei ole pelkästään suoliston sairaus, vaan se voi johtaa muihin sekundaarisiin tauteihin. On myös tehty tutkimus, jossa esiteltiin sairauksia, joihin liittyy lisääntynyt riski sairastua keliakiaan (Taulukko 1).

Taulukko 1. Muita sairauksia, joihin liittyy normaalia suurempi riski sairastua keliakiaan (Kaukinen ym. 2010, 248)

Yhteys	Tauti	Keliakian esiintyvyys (%)
Varma tai todennäköinen	Tyypin 1 diabetes	4–10
	Kilpirauhasen autoimmuunitaudit	4–5
	Sjögrenin oireyhtymä	4–12
	Downin oireyhtymä	5–10
	Addisonin tauti	5
	Selektiivinen IgA-puutos	7
	Autoimmuunihapatiitti	3–6
	Usea endokriininen tauti yhtä aikaa	10
Mahdollinen (yksittäisiä julkaisuja)	Primaari biliaarinen kirroosi	0–6
	IgA-glomerulonefriitti	0–4
	Alopesia	1–3
	Sarkoidoosi	4
Ilmeisesti sattuma	Astma ja atopia	
	Krooniset tulehdukselliset suolistosairaudet	
	Nivelreuma	
	Migreeni	

3.1.2 Keliakian hoito

Vielä tänäkin päivänä keliakian ainoa hoitomuoto on elinikäinen, täysin gluteeniton ruokavalio. Tämä tarkoittaa sitä, että potilas jättää pois kaikki vehnää, ohraa ja ruista sisältävät tuotteet. On suositeltavaa korvata nämä tuotteet vastaavilla gluteenittomilla vaihtoehtoilla tai muita viljoja sisältävillä tuotteilla, jotta tärkeiden vitamiinien ja ravintoaineiden saanti ei loppuisi. Gluteenittoman ruokavalion alettua, oireet alkavat hellittää jo päivissä tai viikoissa mutta ohutsuolen täydellinen parantuminen voi kestää kuukausia tai jopa vuosia. (Celiac Disease Foundation)

Vaikka gluteenia sisältävät viljat voidaan korvata vaihtoehtoisilla tuotteilla, ne eivät välttämättä sisällä tarpeeksi välttämättömiä ravintoaineita. Tämä voi johtaa siihen, että keliakikon on käytettävä normaalin ruokavalion ohella erilaisia ravintolisiä, välttääkseen ravintoaineiden puutoksesta johtuvia sairauksia. Onkin tärkeää, että potilas käy säännöllisesti lääkärissä tarkistuttamassa itsensä esim. osteoporoosin ja vitamiinien puutostilan varalta. (Green & Cellier 2007)

Gluteenittoman ruokavalion noudattaminen voi olla potilaalle todella haasteellista, sillä viljat kuuluvat länsimaissa tärkeänä osana ihmisen ruokavalioon. Gluteenittomien tuotteiden hinnat vaihtelevat maittain mutta ovat yleensä kalliita verrattuna tavallisiin tuotteisiin. Kehittyvissä maissa gluteenittomat tuotteet ovat erityisen kalliita ja niitä voi olla vaikeaa löytää. (Keliakialiitto)

Suomessa keliakiaa sairastaneet ovat aiemmin voineet hakea ruokavaliokorvausta auttamaan taloudellisesti hoitamaan keliakiaa. Eduskunta on kuitenkin vuonna 2016 hyväksynyt esityksen ruokavaliokorvauksen poistamisesta. Gluteenittomasta ruokavaliosta koituu ylimääräisiä kuluja noin 68 euroa kuukaudessa. (Keliakialiitto)

3.2 Vilja-allergia

Vilja-allergia on hyvin samankaltainen sairaus kuin keliakia ja ne erehdytäänkin usein sekoittamaan keskenään. Vilja-allergian aiheuttaa vehnän, ohran, rukiin ja joskus kauran proteiinit. Erona keliakiaan on se, että myös tärkkelyksessä esiintyvät proteiinit aiheuttavat allergiaa, eikä vain gluteeni. (Holm 2010). Vilja-allergian yleisimmät oireet ovat samat kuin keliakiassa; mm. iho- ja suolisto-oireet, kasvun hidastuminen mutta myös nuha ja hengitysoireet. Taulukossa 2 on eritelty vilja-allergian ja keliakian suurimmat erot. (Evira 2016)

Taulukko 2. Vilja-allergian ja keliakian erot (Evira 2016)

	Vilja-allergia	Keliakia
Oireiden aiheuttaja	Viljan (vehnä/ohra/ruis/kaura) proteiinit	Vehnän, ohran ja rukiin proteiini gluteeni
Oireiden syy	Immunologinen vasta-ainereaktio	Immunologinen reaktio gluteenille, joka vaurioittaa ohutsuolen suolinukkaa ja aiheuttaa ravintoaineiden imeytymishäiriön
Oireet	Iho- ja suolisto-oireet, harvoin hengitystieoireet, kasvun hidastuminen	Vatsavaivat, anemia, väsymys, lapsella kasvun hidastuminen, ihokeliakiassa ihottuma Oireet yksilöllisiä, voi olla vähäoireinen
Hoito	Vältetään yksilöllisesti oireita aiheuttavia ruoka-aineita (määräaikainen)	Elinikäinen gluteeniton ruokavalio
Esiintyvyys ikäryhmissä	Esiintyy pikkulapsilla ja on yleensä ohimenevä. Aikuisilla harvinainen.	Puhkeaa useimmiten aikuisiällä, jonka jälkeen elinikäinen
Periytyvyys	Taipumus periytyvä	Taipumus periytyvä

Hoitona vilja-allergiaan on ruokavalio, jossa kulutetaan viljoja sietokyvyn perusteella. Allergiaa aiheuttavia viljoja voidaan siis käyttää siihen pisteeseen asti, että ne alkavat aiheuttaa oireita. Muut oireita aiheuttavat ruoat korvataan samantyyppisillä korvikkeilla. (Holm 2010)

4 KAURA

Useat tutkimukset kuvaavat kauraa funktionaaliseksi ruoaksi, jolla on kyky alentaa kolesterolitasoja, verensokeria ja verenpainetta, helpottaa laihtumista ja vapauttaa hyödyllisiä antioksidanteja elimistöön. Kaurassa on myös paljon vitamiineja, mineraaleja ja kuitua, jotka ovat kaikki hyödyllisiä terveyden ja ruoansulatuksen kannalta. Kaura ei myöskään useiden tutkimusten mukaan aiheuta tulehdusreaktiota ohutsuolessa ja Suomessa keliakialiitto on hyväksynyt kauran yleisesti käytettäväksi keliakiaa sairastavien keskuudessa. (Comino, Moreno & Sousa 2015)

4.1 Aveniini

Kauran valkuaisaineiden prolamiinifraktiota kutsutaan aveniiniksi. Aveniineja esiintyy niin monomeereinä kuin kovalenttisesti sitoutuneina aggregaatteina. Samoin kuin muidenkin viljojen prolamiinit, aveniinin polypeptidit sisältävät paljon proliinia ja glutamiinia, jotka ovat liitettyinä keliakian syntymiseen. Kuitenkin, jos verrataan aveniinia muiden viljojen prolamiineihin, aveniini eroaa muista sen molekyylikoon ja aminohappokoostumuksensa vuoksi. 10%-20% kauran proteiineista on prolamiineja, kun taas vehnän proteiineista prolamiinit käsittävät jopa 40%-50%. *Triticeae* heimoon kuuluvien viljojen (vehnä, ohra, ruis) aminohapoista noin 70% koostuu proliinista ja glutamiinista kun taas kaurassa lukema vastaa yleensä vain 35%-50%. Vastakohtana *Triticeae* heimon viljosta löytyvälle pitkälle toistuvalla domeenilla kauran aveniini sisältää kaksi lyhyempää domeenia, joissa on korkeampi proliini ja glutamiinipitoisuus. Lisäksi kauran prolamiinien sidosmalli on erilainen kuin vehnän γ -gliadiinilla ja LMW-gluteniinilla. Kauran prolamiineissa vierekkäiset kysteiinimolekyylit muodostavat kovalenttisen sidoksen kun taas vehnän prolamiineissa kaksi vierekkäistä kysteiinimolekyyliä ovat sidoksissa kauempana oleviin kysteiinimolekyyliin. (Comino, Moreno & Sousa 2015)

4.2 Kliiniset tutkimukset

Aveniinin haitallisuudesta keliakikolle on tehty useita tutkimuksia, mutta sitä ei ole vielä pystytty tutkimaan tarpeeksi ja tutkimustulokset ovat suppeita ja ristiriitaisia. Toiset

tutkijat väittävät, että keliakiapotilaat voivat kuluttaa kauraa normaalisti, eivätkä saa siitä oireita. Toiset tutkimukset taas osoittavat, että kauran nauttiminen aiheuttivat suolisto-
oireita tutkimusryhmässä. Tästä syystä kaikki maat eivät vielä ole hyväksyneet kauraa täydentämään keliakikoiden ruokavaliota. Useat maat Suomi mukaan lukien ovat kuitenkin hyväksyneet kauran keliakikoiden nautittavaksi. Vielä ei ole tarkkaa tietoa siitä, kuinka paljon kauraa on keliakikko voi päivittäin syödä mutta suuntaa antavia suosituksia on laadittu. (Comino, Moreno & Sousa 2015)

5 GLUTEENIANALYYSIT

Gluteenianalyysit suoritettiin käyttäen kolmea eri menetelmää: GlutenTox Pro, GlutenTox Sticks Plus ja Ridascreen Gliadin Competitive. Näytteinä analyseissä käytettiin kauramaitoa, kaurajauhoa ja luomu kaurajauhoa. Positiivisena kontrollinäytteenä GlutenTox -menetelmissä käytettiin kikhernejauhoa, joka oli kontaminoitu gluteenilla ja negatiivisena kontrollina käytettiin maissijauhoa. Ridascreen testikitin mukana tuli omat standardiliuokset.

5.1 GlutenTox Pro

Yhtenä kolmesta menetelmästä gluteenipitoisuuksia analysoitiin Biomedal Diagnosticsin GlutenTox Pro (KT-5660) analyysikitillä. Kitin sisältö nähdään kuvasta 2.



Kuva 2. GlutenTox Pro -analyysikitin sisältö

Menetelmä on AOAC sertifioitu, mikä tarkoittaa sitä, että AOAC –tutkimusinstituutti on hyväksynyt menetelmän. AOAC sertifikaatti viestii menetelmän luotettavuudesta.



Kuva 3. AOAC sertifikaatti (Biomedal)

Paketin sisältöön kuuluu 25 analyysiin tarvittavat välineet: 25 uuttoliuospulloa, 25 laimennosliuospulloa, 25 analyysitikkaa, kertakäyttöisiä lusikoita ja pipettejä.

Testikitti on suunniteltu pääasiassa gluteenittomien tuotteiden analysointiin, eikä tarkkoja tuloksia ole mahdollista saavuttaa. Gluteenipitoisuuden detektorajat analyysilla ovat 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm ja 40 ppm riippuen käytetystä laimennoksesta. (Biomedal Diagnostics, GlutenTox Pro)

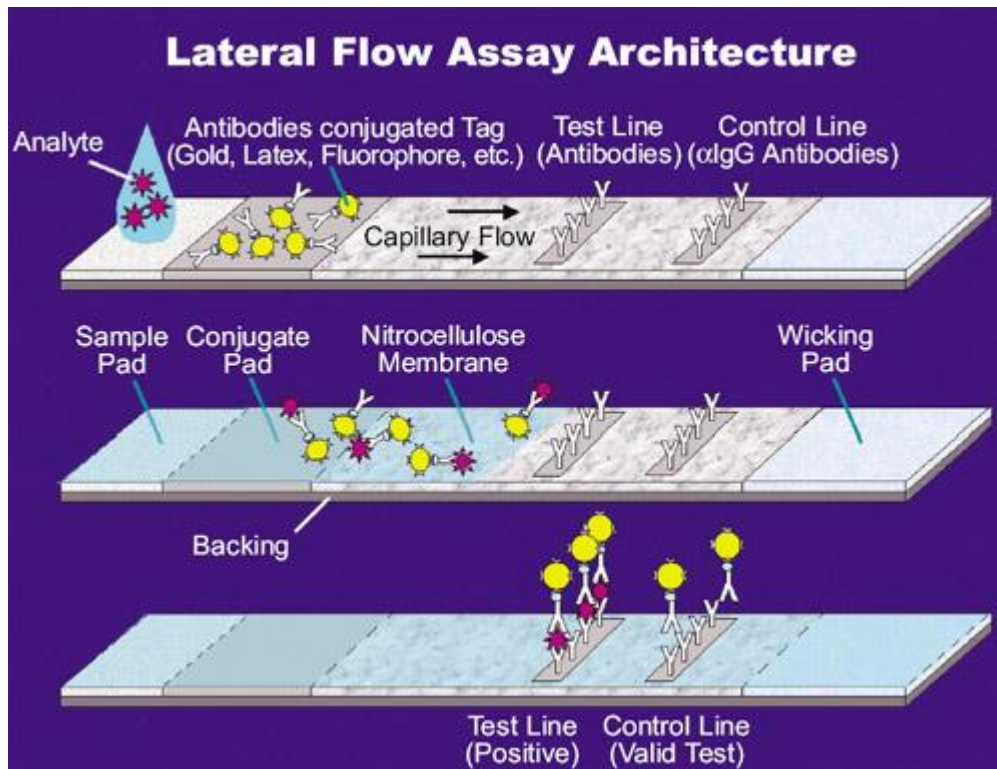
5.1.1 Toimintaperiaate

GlutenTox Pro on helppokäyttöinen immunotoksinen lateral flow -analyysimenetelmä. Menetelmä perustuu G12 vasta-aineen reagoimiseen gluteenin kanssa. Uuden sukupolven G12 vasta-aine tunnistaa vehnän, ohran, rukiin ja useimpien kauratyypien α -gliadiini proteiinista immunotoksisen 33-mer peptidiketjun, joka on syynä keliakian syntyyn. G12 vasta-aine voi myös reagoida saman tyyppisten peptidiketjujen kanssa gluteeniinissa tai muun tyyppisissä gliadiineissa (gamma, beta, omega). (Biomedal Diagnostics)

Analyysi aloitetaan lisäämällä 1g tai 1mL näytettä valmiiseen keltakorkkiseen uuttoliuospulloon (kuva 2). Pulloa ravistetaan voimakkaasti noin 2 minuuttia, jonka jälkeen sen kiintoaineiden annetaan laskeutua noin 5 minuutin ajan riippuen käytetystä näytteestä. Prosessin aikana uuttoliuos irrottaa gluteenin muusta aineksestä. Ennen näytteen lisäämistä, sen tulisi olla mahdollisimman homogeeninen, jotta erotus olisi mahdollista. Tutkimuksessa käytetyt näytteet olivat jo valmiiksi nestemäisessä tai jauhomaisessa muodossa, joten erillistä homogenointia ei tarvinnut suorittaa. Uuttovaiheen jälkeen pullosta otettiin kertakäyttöisellä pipetillä noin 1mL uutetta ja lisättiin 1, 2, 4 tai 10 tippaa siniseen laimennospulloon (kuva 2) riippuen halutusta detektorajasta. Laimennospullostaa otettiin sen jälkeen uudella kertakäyttöpipetillä näytettä ja tiputettiin 6 tippaa saman pullon korkkiin. Lopuksi GlutenTox tikku asetettiin villainen pää edellä korkkiin. 10 minuutin kuluttua tikulta voitiin nähdä onko näytteessä gluteenia vai ei. (Biomedal Diagnostics, GlutenTox Pro)

Kun tikku asetetaan korkkiin, neste imeytyy tikun villaisesta osasta sisään ja alkaa kapillaari-ilmiön ansiosta kulkeutua ylöspäin. Tikun keskiosassa on kontrolliviiva ja tulosviiva. Kontrolliviiva ja tulosviiva sisältävät tiettyä vasta-ainetta, jotka reagoivat näytteen kanssa sen kulkeutuessa tikkaa ylöspäin. Tikun toimintaperiaate on esitetty

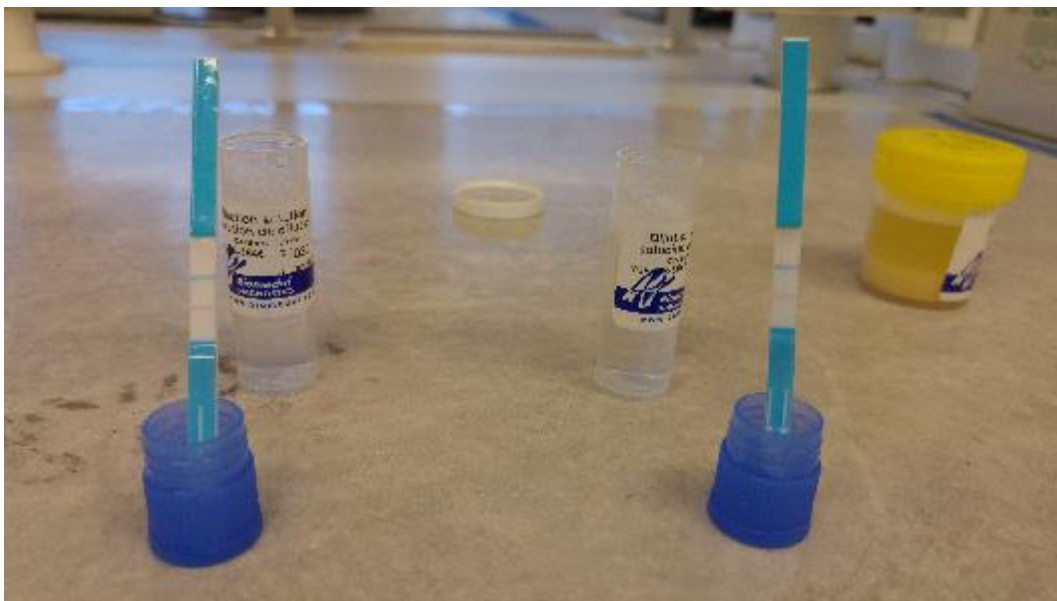
kuvassa 3. Tulosviiva muuttuu punaiseksi jos näytteessä oleva gluteeni on sitoutunut vasta-aineeseen. Tällöin tulos on positiivinen. Jos näytteessä ei ole gluteenia, tulosviivan vasta-aineet eivät reagoi ja punainen viiva ei ilmesty, jolloin tulos on negatiivinen. Kontrolliviiva taas muuttuu siniseksi vasta-aineiden reagoidessa näytteeseen. Kuvasta 4 voidaan nähdä negatiivinen tulos suoritetusta analyysistä ja kuvasta 5 positiivinen. Kontrolliviivalla valvotaan testin onnistumista. Jos sininen kontrolliviiva ei ilmesty tikkuun, testi on epäonnistunut. (Cunningham 2015)



Kuva 3. Gluteenianalyysitikun toimintaperiaate (Cunningham 2015)



Kuva 4. Negatiivinen tulos gluteenianalyysistä



Kuva 5. Positiivinen tulos gluteenianalysistä

5.1.2 Ajankäyttö ja laboratoriovälineet

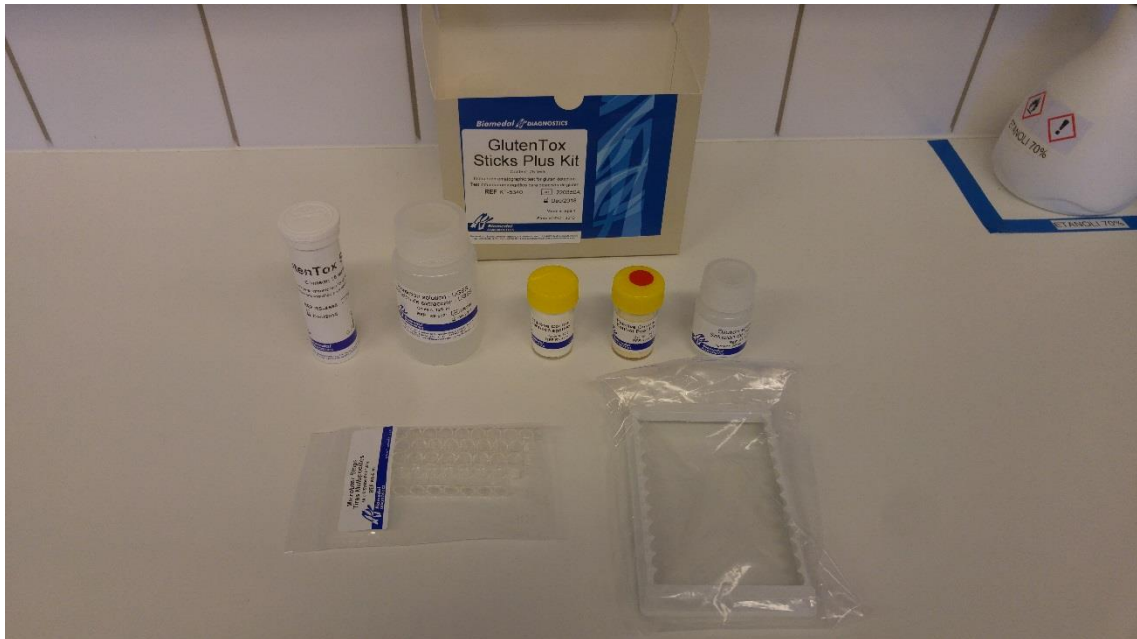
Analyysin suoritti yksin opiskelija käyttäen apunaan kitin mukana tullutta manuaalia. Testi on suunniteltu niin helpoksi, että henkilö kenellä ei ole aiempaa kokemusta laboratoriotyöskentelystä osaa suorittaa analyysin ilman apua. Yksittäisen testin suorittamiseen meni aluksi aikaa yli tunti mutta muutaman ensimmäisen kerran jälkeen analyysin pystyi suorittamaan noin 30 minuutissa. Suurimman osan ajasta vei gliadiinin uutto ja tuloksen odottaminen tikusta.

Menetelmällä oli mahdollista suorittaa 1-25 analyysia yhdellä kertaa, joten vain yhdenkin näytteen analysoiminen kerralla oli taloudellista.

Menetelmässä ei ollut tarpeellista käyttää mitään laboratoriovälineitä. Kaikki analyysiin tarvittava materiaali tuli pakkauksen mukana. Tulosten tarkkuuden maksimoimiseksi näytettä kuitenkin punnittiin pipetillä ja analyysivaa'alla.

5.2 GlutenTox Sticks Plus

Toisena menetelmänä gluteenianalyyseihin käytettiin Biomedal Diagnosticsin GlutenTox Sticks Plus (KT-5340) –analyysikittiä, jonka sisältö nähdään kuvasta 6.



Kuva 6. GlutenTox Sticks Plus -analyysikitin sisältö

Pakettiin kuuluu 25 analyysiin tarvittavat välineet: 25 analyysitikkuja, 125mL uuttoliuosta, 30mL laimennosliuosta, kuoppalevyn pidike ja neljä riviä kuoppalevyjä.

GlutenTox Pron lailla tarkkoja tuloksia tälläkään menetelmällä ei ollut mahdollista saada. Kittiin on mahdollista ostaa erillinen tulosten lukija, jolla saataisiin tarkat tulokset laskettua mutta tätä opinnäytetyötä varten lukijaa ei hankittu. Visuaalisella tulostenluennalla voidaan kuitenkin saada semikvantitatiivisia tuloksia käyttämällä useita eri laimennoskertoimia. Sama pätee GlutenTox Pro -menetelmään. Tällä menetelmällä detektorajat olivat 1ppm, 3ppm, 10ppm, 20ppm, 40ppm ja 100ppm riippuen käytetystä laimennoksesta. Käyttämällä laimennoksia 1:10 ja 1:40 voitiin gluteenipitoisuuden tulokseksi saada esim. > 1ppm, mutta < 3ppm (taulukko 3). (Biomedal Diagnostics, GlutenTox Sticks Plus)

Taulukko 3. GlutenTox Sticks Plus Detektorajat (Biomedal Diagnostics, GlutenTox Sticks Plus, 9)

		Gluten Detection Limit (ppm)					
		Dilutions					
		1:10	1:40	1:100	1:250	1:500	1:1000
Result of the test	Positive	> 1ppm	> 3ppm	> 10ppm	> 20ppm	> 40ppm	> 100ppm
	Negative	< 1ppm	< 3ppm	< 10ppm	< 20ppm	< 40ppm	< 100 ppm

5.2.1 Toimintaperiaate

Molemmat Biomedal Diagnosticsin valmistamat menetelmät perustuivat G12 vasta-aineen reagoimiseen gluteenissa esiintyvän peptidiketjun kanssa ja analyysiin käytettävät tikut olivat täysin samanlaisia. Vain prosessin vaiheet ja näytteen käsittely tapahtuivat eri tavalla.

Suoritus aloitettiin mittaamalla 1mL tai 1g näytettä koeputkeen ja lisäämällä 9mL uuttoliuosta, jonka jälkeen seosta inkuboitii 50 °C vesihautteessa 40 minuuttia välillä ravistaen. Inkuboinnin jälkeen näyte sentrifugoitiin ja saatu supernatantti siirrettiin puhtaaseen koeputkeen. Seuraavaksi näyte laimennettiin käyttäen haluttuun detektorajaan sopivaa laimennoskerrointa. Lopuksi 100 µL laimennosta pipetoitiin kuoppalevyyn ja asetettiin tikku villapuoli edellä nesteeseen. 10 minuutin kuluttua voitiin lukea tulos tikulta.

Jotta menetelmästä saataisiin mahdollisimman paljon tuloksia, kaikki 25 näytettä tulisi analysoida yhdellä kertaa, sillä jokaisella testikerralla standardiliuoksiin käytetään kaksi tikkua ja kuoppaa. Analyysit oli kuitenkin mahdollista jakaa neljään osaan kuoppalevyjen määrän perusteella. Yksittäisiä mittauksia menetelmällä ei ollut järkevää suorittaa.

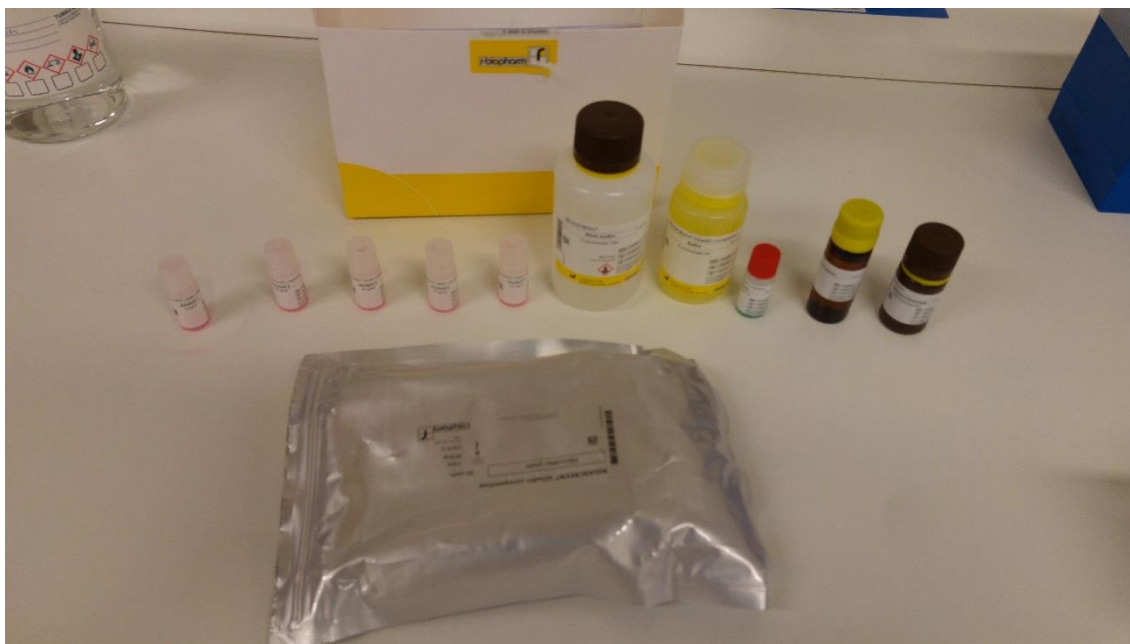
5.2.2 Ajankäyttö ja laboratoriovälineet

Analyysit suoritti opiskelija kitin ohjeiden mukaan. Manuaalin mukaan tulokset oli mahdollista saada alle tunnissa mutta tavoiteaikaan ei koskaan päästy. Näytteiden analysoimiseen meni joka kerralla vähintään kaksi tuntia. Tämä johtunee siitä, että laboratoriolaitteiden käyttämiseen tarvittavat esityöt veivät paljon aikaa. Esimerkiksi yksin vesihautteen lämmittäminen vei aikaa 20 minuuttia ja välillä sentrifugi oli muiden opiskelijoiden käytössä, jolloin siihen piti odottaa vuoroaan. Lisäksi tarkkuutta vaativat punnitukset ja pipetointi veivät oman aikansa.

Työhön tarvittavia laboratoriovälineitä olivat eri tilavuuksia annostelevat pipetit, vesihaude ja Stratos Heraeus sentrifugi.

5.3 Ridascreen Gliadin Competitive

Kolmantena vertailumenetelmänä, jolla oletettiin saatavan oikeat tulokset varmasti käytettiin R-Biopharmin valmistamaa Ridascreen Gliadin Competitivea, jota käytetään hapatettujen ja hydrolysoitujen tuotteiden analysoimiseen.



Kuva 7. Ridascreen Gliadin Competitive -analyysikitin sisältö

Pakettiin kuuluu standardit mukaan lukien 96 näytteen analysoimiseen tarvittavat reagenssit: standardiliuokset, kuoppalevyt ja pidike, pesuliuos, entsyymikonjugaattiliuos, entsyymisubstraattiliuos, laimennosliuos ja pysäytysliuos (Kuva 7).

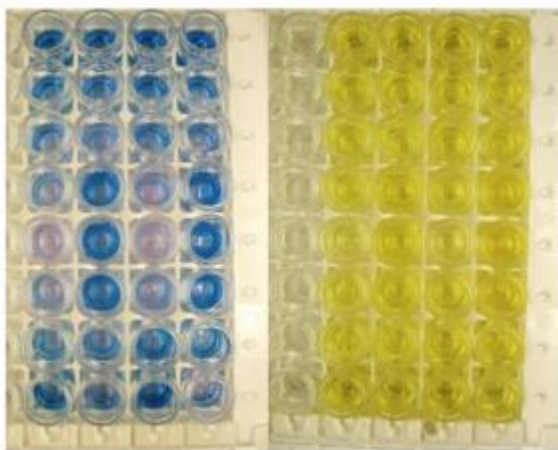
Kitin kvantitointiraja gluteenipitoisuudelle on 10 mg gluteenia / 1 kg näytettä ja detektoriraja 4,6 mg gluteenia / 1 kg näytettä. Menetelmällä voidaan siis tarkasti määrittää kaikki gluteenipitoisuudet, jotka ylittävät 10 ppm rajan. Detektoriraja taas tarkoittaa pienintä määrää, jonka analyysi voi havaita näytteestä mutta tarkkaa arvoa ei voida määrittää. (R-Biopharm manuaali)

5.3.1 Toimintaperiaate

Ridascreen Gliadin Competitive on ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) -testi. Se perustuu monoklonaalisen R5 vasta-aineen reagoimiseen gluteenissa olevan

prolamiinimolekyylin peptidiketjun kanssa. Analyysin perusta on antigeenin ja vasta-aineen välinen reaktio. (R-Biopharm)

Kuoppalevyjen kuopat on pinnoitettu gliadiinilla. Standardit ja näytteet lisätään kuoppiin, jonka jälkeen kuoppiin lisätään entsyymikonjugaatti, joka sisältää R5 vasta-aineen. 30 minuutin inkuboinnin aikana vapaa ja liikkumaton gliadiini kilpailee sidospaikoista vasta-aineessa (Competitive enzyme immunoassay). Sitoutumaton entsyymikonjugaatti poistetaan sen jälkeen kuopista pesemällä kuopat pesuliuksella kolmeen kertaan. Pesun jälkeen kuoppiin lisätään kromogeenia. Aiemmin sitoutunut entsyymikonjugaatti muuttaa 10 minuutin inkuboinnin aikana kromogeenin värin siniseksi. Lopuksi kuoppiin lisätään vielä pysäytysliuosta, joka lopettaa reaktion ja muuttaa nesteen lopullisen värin keltaiseksi. Tämän jälkeen näytteet ovat valmiita absorbanssimittaukseen, joka suoritetaan 450 nm aallonpituudella. Kuvasta 8 nähdään kuopissa olevien liuosten värit analyysin eri vaiheissa. Standardeista muodostetaan kuvaaja, jonka avulla lasketaan näytteiden gliadiinipitoisuus. (R-Biopharm manuaali, 15, 20)



Kuva 8. Kuopat ennen (vas.) ja jälkeen pysäytysliuoksen lisäämistä. (Colby, 2014)

Menetelmällä saadaan tulokseksi gliadiinin määrä näytteessä. Codex Alimentariuksen määritelmän mukaan tulos täytyy vielä kertoa kahdella, jotta saadaan gluteenin määrä laskettua. Lisäksi tuloksessa piti ottaa huomioon käytetty laimennoskerroin, jolloin lopullisen tuloksen laskemisen kaavaksi muodostuu seuraavanlainen laskukaava.

$$\text{Gluteenipitoisuus} = \text{gliadiinipitoisuus} \times \text{laimennoskerroin} \times 2$$

Esimerkiksi jos absorbanssimittauksesta saataisiin tulokseksi 20 ng/ml gliadiinia, tulos kerrottaisiin ohjeen mukaisella laimennoskerroimella (500). Gliadiinin määrä on puolet

gluteenin määrästä joten tulos kerrottaisiin vielä kahdella. Lopputulokseksi saataisiin 20.000 ng/ml (20 ppm) gluteenia.

Kitin mukana tulleet standardit veivät 12 kuoppaa joka analysoinnin yhteydessä, sillä kaikista standardeista ja näytteistä tehtiin rinnakkaisnäyte. Taloudellisuuden kannalta kannattavinta olisi ollut analysoida kaikki näytteet kerralla. Yhdellä kerralla oli siis mahdollista analysoida kaikkiaan 42 näytettä. Opinnäytetyössä jaettiin analyysit kuitenkin neljään osaan, jolloin standardit veivät kokonaisuudessaan 48 testikuoppaa.

5.3.2 Ajankäyttö ja laboratoriovälineet

Kitin ohjeiden mukaan analyysin suorittamiseen kuluisi kaikki vaiheet mukaan lukien 1 h 10 min. Suorittavalta opiskelijalta kului kuitenkin työn tekoon keskimäärin neljä tuntia yhtä mittausta kohden. Tämä johtuu näytteiden ja käytettävien liuosten valmisteluihin kuluvasta ajasta, sekä pipetoinnista, joka oli huomattavan aikaa vievää työtä useiden pipetointia vaatineiden työvaiheiden takia.

Näytteiden valmisteluihin käytettiin Stratos Heraeus sentrifugia ja mittaukset suoritettiin Biohit pipeteillä. Pipetoinnit olisi ollut helpompaa ja nopeampaa suorittaa automaattipipeteillä, joilla olisi voinut suorittaa useampia pipetointeja ilman erillisiä täyttökertoja. Tarkkuuden kannalta päädyttiin kuitenkin uudempiin ja kalibroituuihin Biohit pipetteihin. Absorbanssimittaukset suoritettiin tietokoneeseen liitetyllä Hidex Sense -kuoppalevyn lukijalla (Kuva 9). Laitteeseen ohjelmoitiin itse ohjelma, jossa valittiin halutut parametrit suoritettavalle analyysille. Laite muodosti tuloksista suoraan kuvaajan, laski standardisuoralta tulokset ja muutti tiedot Excel muotoon.



Kuva 9. Hidex Sense kuoppalevyn lukija

6 TULOKSET

Vuonna 2012 astuneen EU:n laatiman asetuksen mukaan raja-arvot gluteenittomalle tuotteelle on 20 ppm ja vähägluteeniselle tuotteelle 100 ppm. (Keliakialiitto)

6.1 GlutenTox Pro

Tikuista saatuja tuloksia analysoitiin värikoodien avulla. Punaisen tulosviivan ilmestyminen ilmoitti siitä, että tuote sisältää gluteenia. Tulosviivan intensiteetistä voidaan päätellä onko tuotteessa paljon vai vähän gluteenia. Tulosten luennassa törmättiin ongelmaan, jossa punainen tulosviiva ilmestyi tikkuun niin himmeänä, että sitä oli melkein mahdotonta nähdä, ellei tuonut tikkaa aivan silmien eteen. Ongelma saatiin kuitenkin ratkaistua ottamalla yhteyttä tikkujen valmistajaan, joka kertoi, että tikun punaisella viivalla on 10 eri intensiteettiä ja tämä on niistä ensimmäinen. Jos tulosviiva on niin himmeä, että sitä on vaikea erottaa, gluteenipitoisuus on juuri detektorajan alapuolella.

Mittauksia suoritettiin kolmena eri päivänä valmistetuista kauramaitonäytteistä, kaurajauhosta ja luomukaurajauhosta. Taulukosta 4 nähdään menetelmän detektorajat. 29.3 ja 31.3 valmistetut kauramaitonäytteet sisälsivät kaikkien mittausten mukaan alle 5 ppm gluteenia. 19.4 valmistettu kauramaito sisälsi analyysien mukaan enemmän kuin 10 ppm mutta vähemmän kuin 20 ppm gluteenia. Tavalliset ja luomujauhot sisälsivät yli 40 ppm gluteenia. Lisäksi suoritettiin mittauksia kauramaidolla johon lisättiin vehnä jauhoa testin toimivuuden varmistamiseksi. Kauramaitoon lisättiin 0,1 g ja 0,5 g vehnä jauhoja. Molemmat testit ilmoittivat gluteenipitoisuudeksi yli 40 ppm. Taulukossa 5 on esitetty yhdellä kertaa tehtyjen mittausten tuloksia 29.3 valmistetusta kauramaidosta.

Taulukko 4. Gluteenin detektorajat

Tippojen määrä	LD
10	5 ppm
4	10 ppm
2	20 ppm
1	40 ppm

Taulukko 5. Tuloksia 29.3 valmistetun kauramaidon gluteenipitoisuuksista

Näyte	Tippojen määrä	Tulos
Pos. Standardi	10	Positiivinen
Pos. Standardi	4	Positiivinen
Neg. Standardi	10	Negitiivinen
Neg. Standardi	4	Negitiivinen
Kauramaito 29.3	10	Negitiivinen (intensiteetti 1)
Kauramaito 29.3	10	Negitiivinen (intensiteetti 1)
Kauramaito 29.3	10	Negitiivinen (intensiteetti 1)
Kauramaito 29.3	4	Negitiivinen
Kauramaito 29.3	4	Negitiivinen
Kauramaito 29.3	4	Negitiivinen

6.2 GlutenTox Sticks Plus

Tulokset luettiin edellä mainitun menetelmän tavoin tikun tulosviivasta. Mittaukset suoritettiin myös samoista näytteistä poislukien 19.4 valmistettu kauramaito. 29.3 ja 31.3 valmistetut kauramaidot antoivat tulokseksi enemmän kuin 1 ppm mutta vähemmän kuin 3 ppm. Molemmat jauhot antoivat gluteenipitoisuudeksi yli 40 ppm mutta vähemmän kuin 100 ppm. Taulukossa 6 on esitetty yhdellä kertaa tehtyjen mittausten tuloksia luomukaurajauhosta. Laimennosten ja detektorajojen suhteet nähdään taulukosta 3.

Taulukko 6. Tuloksia luomu jauhun pitoisuuksista

Näyte	Laimennos	Tulos
Pos standardi	1:300	Pos
Neg standardi	1:10	Neg
Jauho luomu	1:60	pos
Jauho luomu	1:100	pos
Jauho luomu	1:500	pos himmeä
Jauho luomu	1:1000	Neg

6.3 Ridascreen Gliadin Competitive

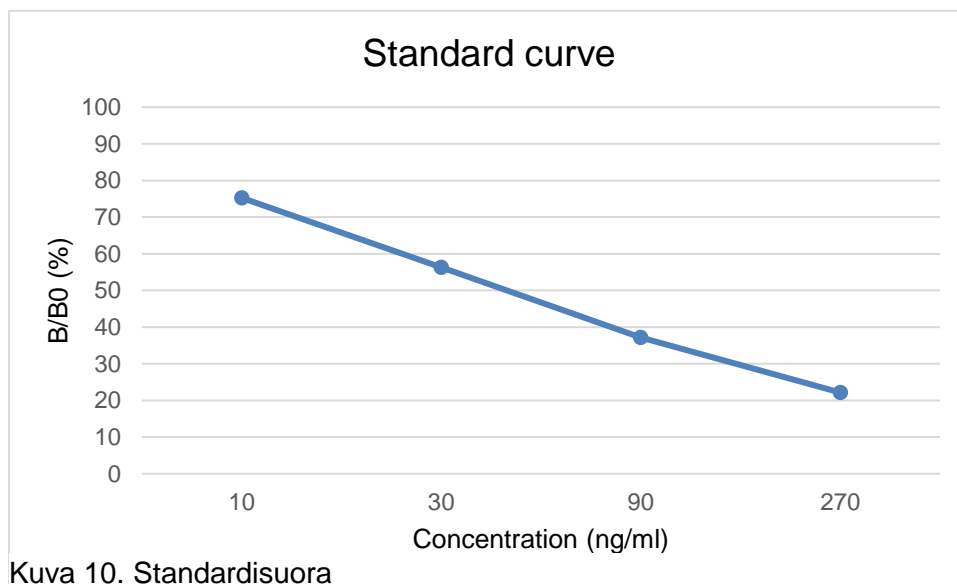
ELISA –menetelmää käytettiin muiden menetelmien ohella ns. tunnettuna vertailumenetelmänä, josta oletettiin saatavan oikeat tulokset. Mittaukset suoritettiin kaikista aiemmin mainituista kauramaitonäytteistä. Laimennossuhteina käytettiin ohjeen

mukaista 1:500, 1:1000 ja 1:2000. Eri laimennokset eivät vaikuttaneet tulokseen. Tulokset laskettiin standardisuoralta käyttäen cubic spline funktiota. Competitive ELISA eroaa sandwich ELISA:sta siinä, että käytettäessä sandwich –menetelmää absorbanssin kasvaessa näytteen tai standardin gluteenipitoisuuskin nousee, jolloin standardisuora on nouseva. Käytettäessä competitive –menetelmää, absorbanssin ollessa suuri, gluteenipitoisuus onkin päinvastaisesti pieni, joten standardisuorasta tulee laskeva. (Elisaanalysis.com 2016)

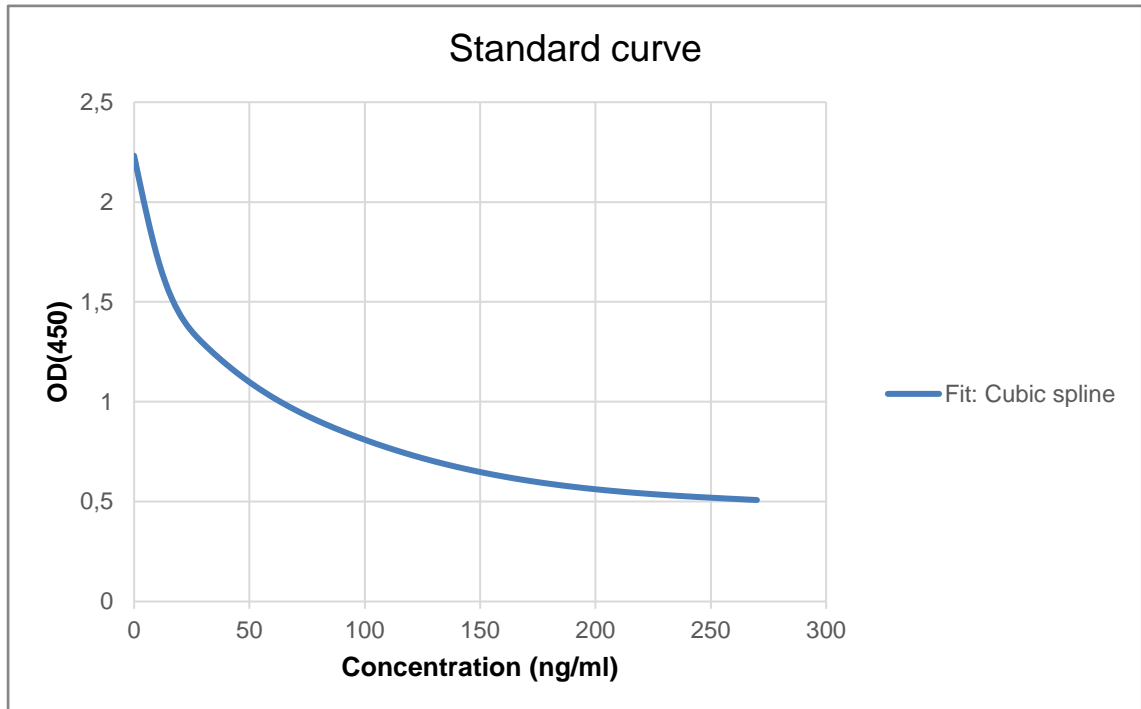
Standardien absorbansseja verrattiin 0 ppm gliadiinia sisältävän näytteen absorbanssiin. Kaikista standardeista laskettiin prosentuaalinen raja-arvo alla olevan kaavan mukaan, jossa B = standardin absorbanssien keskiarvo ja B0 = 0 ppm standardin maksimi absorbanssi.

$$\text{Prosentuaalinen raja - arvo} = \frac{B}{B_0} * 100\%$$

Saaduista arvoista muodostettiin sen jälkeen standardikuvaaja (Kuva 10), josta tulokset laskettiin. Absorbanssien mittauksissa käytetty Hidex Sense kuoppalevynlukija ei osannut suoraan laskea prosentuaalisia osuuksia, joten se antoi standardisuoran käyttäen cubic spline kuvaajaa (Kuva 11). Tulokset olivat samat käyttäen kumpaa tahansa kuvaajaa.



Kuva 10. Standardisuora



Kuva 11. Cubic spline standardisuora

29.3 ja 31.3 valmistetut kauramaidot eivät yltäneet kvantitointirajan yläpuolelle ja antoivat kaikki yhtä tulosta lukuunottamatta alle 5 ppm gluteenipitoisuuden. Taulukossa 7 on esitetty tuloksia 29.3 valmistetulla kauramaidolla tehdyistä mittauksista. 19.4 valmistettu kauramaito antoi tulokseksi kaikilla testikerroilla yli 5 ppm mutta alle 20 ppm gluteenipitoisuuden. Menetelmän kvantitointiraja on 10 ppm gluteenia, joten tuloksien tarkkuus rajan alapuolella ei ole eksakti.

Tulosten toistettavuutta tarkasteltiin laskemalla standardien ja näytteiden variaatiokerroin eli CV %. Pieni CV % osoittaa hyvää toistettavuutta mittauksissa. CV % on hyvällä tasolla silloin, kun $CV \% \leq 10$. Taulukoissa 8 ja 9 on laskettuna standardiliuosten ja näytteiden CV % yhdestä analyysistä. CV % lasketaan alla olevalla kaavalla. (Tammisto 2013, 24)

$$CV \% = \frac{\text{Keskihajonta}}{\text{Keskiarvo}} * 100 \%$$

Taulukko 7. Tuloksia 29.3 valmistetusta kauramaidosta

Näyte	Gluteenipitoisuus
Kauramaito 29.3	4,1 ppm
Kauramaito 29.3	2,8 ppm
Kauramaito 29.3	3,3 ppm
Kauramaito 29.3	2,9 ppm
Kauramaito 29.3	2,7 ppm
Kauramaito 29.3	6,9 ppm

Taulukko 8. Standardiliuosten CV %

Standardiliuokset	Absorbanssi	CV%
ppm		
270	0,505	0,98 %
270	0,512	
90	0,885	5,13 %
90	0,823	
30	1,343	5,58 %
30	1,241	
10	1,732	0,37 %
10	1,723	
0	2,168	4,02 %
0	2,295	

Taulukko 9. Näytteiden CV %

Näyte	Absorbanssi	CV%
Laimennos		
1:500	2,007	2,49 %
1:500	2,079	
1:1000	2,142	0,33 %
1:1000	2,152	
1:2000	2,195	1,89 %
1:2000	1,137	

7 TULOSTEN TARKASTELU JA PÄÄTELMÄT

Opinnäytetyössä saavutetut tulokset antavat hyvän pohjan menetelmän validoinnille ja käyttönotolle. Eri analyyseista saatuja tuloksia vertailtiin keskenään, jotta saataisiin varmuus menetelmien toimivuudesta. Tulosten vertailu on myös tärkeä osa menetelmän validoimista. Aluksi tarkasteltiin GlutenTox –analyysikiteillä saatuja tuloksia toisiinsa. Analyysit suoritettiin jokaisella kerralla samoissa olosuhteissa ja ne antoivat toistettavasti toisiaan vastaavia tuloksia. Toistettavuuden osoittamiseksi samalla näytteellä suoritettiin useita analyyseja samoilla menetelmillä. 29.3 ja 31.3 valmistetut näytteet antoivat kummallakin menetelmällä joka testikerralla toisiaan korreloivia tuloksia. Myös pitoisuuksien noustessa kaurajauhoilla tehdyt mittaukset antoivat jokaisella testikerralla toisiaan vastaavia tuloksia.

GlutenTox –menetelmien tuoksia verrattiin lisäksi Ridascreenin antamiin tarkkoihin tuloksiin. 29.3 ja 31.3 valmistetut kauramaitonäytteet antoivat tälläkin menetelmällä samaa suuruusluokkaa olevia tuloksia kuin GlutenTox –menetelmät. Jauhoilla tehdyt mittaukset eivät olleet vertailukelpoisia, sillä Ridascreen analyysikitti ei ollut suunniteltu jauhojen analysointia varten ja antoi vääristyneitä tuloksia.

GlutenTox Prolla ja Ridascreenilla analysoitiin lisäksi 19.4 valmistettua kauramaitoa. Aluksi analyysit suoritettiin GlutenTox Prolla saaden arvioitua korkeampia gluteenipitoisuuksia. Pitoisuudet olivat toistettavasti yli 10 ppm mutta alle 20 ppm. Ridascreenilla saadut tulokset todistivat kuitenkin näytteen sisältävän noin 12 ppm gluteenia. Tuloksista voitiin päätellä, että näyte oli kontaminoitunut näytteenoton yhteydessä tai prosessin vaiheessa. Tulos ei kuitenkaan ylittänyt gluteenittoman tuotteen raja-arvoja, joten varsinaista ongelmatilannetta ei syntynyt.

Testejä suoritettaessa törmättiin ongelmaan, jossa kaurajauhojen gluteenipitoisuudet saivat huomattavasti korkeamman arvon kuin GlutenTox –menetelmillä mitattuna. Tulos oli lähes 10 kertaa arvioitua suurempi. Ongelma kuitenkin ratkesi lukemalla tarkemmin ohjekirjaa, jossa kerrottiin, että Ridascreen Gliadin competitive on suunniteltu fermentoitujen ja hydrolysoitujen tuotteiden analysoimiseen eikä sovellu jauhoista tehtäviin mittauksiin.

Tulosten laskennan yhteydessä ei aluksi osattu muodostaa oikeanlaista standardikuvaajaa. Lineaarista standardisuuraa käytettäessä standardiliuosten pisteet

eivät osuneet kuvaajaan. Ongelma ratkesi kokeilemalla muun tyyppisiä standardisuoria. Tuloksiin sopi parhaiten cubic spline, jonka myöhemmin todettiin olevan oikea vaihtoehto kyseiselle testimenetelmälle.

Vaikka GlutenTox Pro on AOAC –hyväksytty ja sen perusteella osoittaa jo asianmukaista toimivuutta, saatujen tulosten perusteella ei kuitenkaan yksin voida käyttöönottaa uutta menetelmää. Validoinnin kannalta testit tulisi suorittaa vielä useammalla eri pitoisuuden omaavalla näytteellä. (Anu Johansson, henk. koht. tiedonanto, sähköposti)

Tällä hetkellä ainoa virallisesti hyväksytty vasta-aine gluteenitesteihin on R5 –vasta-aine. Se ei kuitenkaan tarkoita sitä, ettei gluteenitestiä, jossa käytetään muun tyyppistä vasta-ainetta voisi käyttää virallisena menetelmänä. Testeillä tulee perusvalidoinnin lisäksi pystyä osoittamaan, että niillä saadaan vastaavia tuloksia kuin R5 –vasta-aineella. Kauramaidolla tehdyt analyysit ovat todistaneet G12 –vasta-aineen toimivuuden ainakin yhdellä matriisilla. Lisätutkimukset ja erilaisten näytematriisien käyttö on kuitenkin tarpeen lopullisen validoinnin kannalta. (Anu Johansson, henk. koht. tiedonanto, sähköposti)

Gluteenianalyysien uuttoluoksen tulee olla vaatimusten mukainen, sillä gluteenin irrottaminen muusta aineksesta on haastavaa. Uuttoliuoksen tulisi olla tyypiltään Mendezin cocktail. GlutenTox –analyysikittien ohjekirjassa ei kuitenkaan mainita uuttoluoksen tyyppiä. Lisäksi GlutenTox Pro -kitin ohjekirjassa mainitaan, että menetelmä ei sovellu hydrolysoituille tuotteille. Menetelmällä on kuitenkin AOAC –validoituja matriiseja, joista yksi on jogurtti, joka yleensä on hapatettu tuote. (Anu Johansson, henk. koht. tiedonanto, sähköposti)

Opinnäytetyön tavoitteena oli käyttöönottaa uusi gluteenianalyysimenetelmä Bioferme Oy:n tehtaaseen turkuun. Ainoastaan tämän tutkielman perusteella tavoitteeseen ei päästä. Jotta käyttöönotto voidaan suorittaa, tulee aiheesta tehdä vielä lisätutkimuksia ja uusia testejä.

Keskeisimpinä asioina opinnäytetyössä voidaan pitää menetelmän tulosten toistettavuuden todistaminen, sekä menetelmän toimivuuden osoittaminen ainakin yhdellä tuotteella. Tutkimukset antoivat luotettavia ja oikeita tuloksia, joita voidaan hyödyntää myöhemmin menetelmän validoinnissa ja jatkotutkimuksissa. Tulosten luotettavuudesta kertoo paljon se, että kauramaidon gluteenipitoisuus oli jo ennen kokeiden aloittamista tiedossa ja jokaisella testikerralla päästiin saman suuruusluokan

gluteenipitoisuuksiin kaikilla menetelmillä. Lisäksi ELISA testillä saaduista tuloksista lasketut CV % olivat todella pieniä, joka kertoo hyvästä toistettavuudesta.

Tutkimustyön alussa ei oltu tietoisia virallisista vaatimuksista, joita gluteenianalyysin käyttöönottoon liittyy. Opinnäytetyön laajuus rajoitti jatkotutkimuksien tekemistä. Koska Bioferme Oy:n valmistamat tuotteet ovat gluteenittomia tai erittäin vähägluteenisia, sen todistaminen on kyettävä osoittamaan luotettavasti, sillä kyseessä on potentiaalisesti haitallinen asia gluteenia sietämättömille henkilöille. Validointi täytyy siis suorittaa huolellisesti ja yhteen opinnäytetyöhön varattu aika ei siihen riitä.

8 LÄHTEET

- AOAC international. (ei pvm). *Official Methods of Analysis*. Haettu Kesäkuu 2017 osoitteesta AOAC international: <http://www.eoma.aoac.org/>
- Biomedal Diagnostics. (2017). *GlutenTox Sticks Plus - Quick test for the determination of gluten content* (6 p.). Biomedal Diagnostics.
- Biomedal Diagnostics. (ei pvm). *G12 antibody*. Haettu Toukokuu 2017 osoitteesta Biomedal Diagnostics: <http://foodsafety.biomedal.com/products/by-brand/glutentox-home/g12-antibody/>
- Biomedal Diagnostics. (ei pvm). *GlutenTox Pro - Quick test for the detection of gluten in foods and on surfaces*. Biomedal Diagnostics.
- Biomedal. (ei pvm). *GlutenTox Pro – Gluten Test Kit for Commercial Kitchens*. Haettu Toukokuu 2017 osoitteesta GlutenTox: <https://glutentox.com/glutentox-pro/>
- Celiac Disease Foundation. (ei pvm). *Celiac Disease Symptoms*. Haettu Toukokuu 2017 osoitteesta Celiac Disease Foundation: <https://celiac.org/celiac-disease/understanding-celiac-disease-2/celiacdiseasesymptoms/>
- Celiac Disease Foundation. (ei pvm). *Celiac disease treatment and follow up*. Haettu Toukokuu 2017 osoitteesta Celiac Disease Foundation: <https://celiac.org/celiac-disease/understanding-celiac-disease-2/treating-celiac-disease/>
- Colby, C. (2014). *Clarity Ferm Experiment, by Chris Hamilton (Part II: Experiments)*. Haettu Kesäkuu 2017 osoitteesta Beer & Wine Journal: <http://beerandwinejournal.com/clarity-ferm-ii/>
- Comino, I.;Moreno, M. d.;& Sousa, C. (2015). Role of oats in celiac disease. *World Journal of Gastroenterology*, 21(41), 11825–11831.
- Cunningham, B. (Maaliskuu 2015). *Lab-on-Paper Technology Enhances Medical Diagnostics*. Haettu Toukokuu 2017 osoitteesta Comsol Blog: <https://www.comsol.com/blogs/lab-on-paper-technology-enhances-medical-diagnostics/>

- Elisaanalysis.com. (2016). *Data Transformations using control wells, B/B0, Zero wells, NSB wells*. Haettu Kesäkuu 2017 osoitteesta Elisaanalysis.com: <http://elisaanalysis.com/knowledge-base/data-transformations/>
- Evira. (3 2016). *Vilja*. Haettu Toukokuu 2017 osoitteesta Evira: <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/ruoka-allergeenit/yleisimmat-ruoka-allergian-aiheuttajat/vilja/>
- Gallagher, E. (2009). *Gluten-Free Food Science and Technology*. Blackwell Publishing Ltd.
- Green, P. H.;& Cellier, C. (2007). Celiac Disease. *The New England Journal of Medicine*, 357(17), 1731-1743.
- Holm, K. (2010). Keliakia ja vilja-allergia ovat eri sairauksia. *Keliakialiitto*.
- Kaukinen, K.;Collin, P.;& Mäki, M. (2010). Keliakia – diagnostinen ja hoidollinen haaste. *Duodecim*, 126(3), 245-254. Haettu Huhtikuu 2017 osoitteesta https://tampub.uta.fi/bitstream/handle/10024/66046/keliakia-_diagnostinen_ja_2010.pdf?sequence=1
- Keliakialiitto. (ei pvm). *Keliakian hoito*. Haettu Huhtikuu 2017 osoitteesta Keliakialiitto: https://www.keliakialiitto.fi/liitto/gluteeniton_elama/usein_kysyttya/keliakian_hoit_o/
- Keliakialiitto. (ei pvm). *Sosiaaliturva*. Haettu Toukokuu 2017 osoitteesta Keliakialiitto: https://www.keliakialiitto.fi/liitto/keliakia/sosiaaliturvaa_ja_tukea/
- Keliakialiitto. (ei pvm). *Hoitona gluteeniton ruokavalio*. Haettu Toukokuu 2017 osoitteesta Keliakialiitto: https://www.keliakialiitto.fi/liitto/keliakia/keliakian_hoit/
- Kokko, L. (20. Toukokuu 2010). *Kansainvälinen keliakiapäivä viestittää: Keliakia ja vilja-allergia ovat eri sairauksia*. Haettu Huhtikuu 2017 osoitteesta Keliakialiitto: <https://keliakialiitto.fi/liitto/nyt/uutiset/?nid=61&ARC=1&Year=2010>
- Kokko, L. (2012). *Gluteeniherkkyys ilman keliakiaa*.
- Mäki, M.;Collin, P.;Kekkonen, L.;Visakorpi, J.;& Vuoristo, M. (2006). *Keliakia*. Jyväskylä: Kustannus Oy Duodecim.

Prospec. (ei pvm). *Monoclonal antibodies*. Haettu Kesäkuu 2017 osoitteesta https://www.prospecbio.com/Monoclonal_Antibodies

R-Biopharm manuaali. (ei pvm). *Ridascreen Gliadin competitive*. R-Biopharm.

R-Biopharm. (ei pvm). *Ridascreen Gliadin competitive*. Haettu Kesäkuu 2017 osoitteesta R-Biopharm: <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/allergens/gliadin-gluten/item/ridascreen-gliadin-competitive>

Reunala, T. (2006). Ihokeliakia - keliakian toinen esiintymismuoto. Teoksessa M. Mäki;P. Collin;L. Kekkonen;J. Visakorpi;& M. Vuoristo, *Keliakia*. Kustannus Oy Duodecim.

Sino Biological Inc. (ei pvm). *Elisa encyclopedia*. Haettu Kesäkuu 2017 osoitteesta What is ELISA: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction>

Solunetti. (ei pvm). *Sanasto*. Haettu Kesäkuu 2017 osoitteesta Solunetti: <http://www.solunetti.fi/fi/sanasto/kaikki/>

Tammisto, M. (2013). *Gluteenianalyysi ja gluteenittoman kauran tuotanto - Opinnäytetyö*. Turun ammattikorkeakoulu.