

QPCR-MENETELMÄN VALIDOINTI ILMANÄYTTEILLE

Maria Valkonen, Martin Täubel, Kaisa Jalkanen, Asko Vepsäläinen, Anne Hyvärinen
Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, Asuinympäristö ja terveys –yksikkö

TIIVISTELMÄ

Rakennusten kosteus- ja homevaurioiden toteaminen perustuu rakennustekniseen tutkimukseen, jonka yhteydessä voidaan tehdä mikrobiologisia määrittämiä rakennusmateriaaleista ja myös ilmasta. Sisäilman mikrobipitoisuuden ja lajiston määrittämiseen suositellaan kuusivaiheimpatoria ja mikrobien kasvatusta. Mikrobien kasvatusta eli viljelyä on pitkään käytössä ollut menetelmä, jonka heikkouksia ovat kuitenkin näytteen edustavuus liittyen lyhyeen keräysaikaan, hitaus sekä selektiivisyys. Viljelyllä havaitaan ainoastaan käytetyissä olosuhteissa kasvavat, elinkykyiset mikrobit. Tarvetta on mm. menetelmille, jotka sallivat pidemmän näytteenottoajan, ovat nopeampia ja eivät ole riippuvaisia mikrobien elinkyvystä. Tässä tutkimuksessa testasimme kvantitatiivista PCR-menetelmää ilmanäytteissä kosteusvaurioituneen rakennuksen tunnistamiseen.

Havaitimme, että *Penicillium*, *Aspergillus* ja *Paecilomyces variotii*-ryhmät monistava (nk. PenAsp) qPCR-sovellus erottaa kosteusvaurioituneet rakennukset vaurioitumattomista kodeista, myös kesäaikana.

JOHDANTO

Sisäilman mikrobien pitoisuuksien ja mikrobikasvun toteamiseen on perinteisesti käytetty mikrobien elinkykyyn perustuvaa viljelymenetelmää. Koska nopeammille laboratoriomenetelmille on kasvava tarve, on mm. kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio (qPCR, quantitative polymerase chain reaction) menetelmä on mahdollisesti käyttökelpoinen työkalu mikrobivaurion osoittamiseen.

Tässä julkaisussa esittelemme qPCR-sovellusten validointia ilmanäytteistä. Työn tavoitteena oli vertailla kosteusvaurioituneiden kotien, vaurioitumattomien eli kontrollikotien ja ulkoilmanäytteiden mikrobipitoisuuksia. Lisäksi tavoitteena oli tuottaa menetelmälle tulkintaohje, jonka avulla voidaan arvioida kodissa olevan epätavanomainen sieni-itiölähte.

AINEISTO JA MENETELMÄT

Ilmanäytteet kerättiin kosteusvauriokodeista (N=72), kosteusvauriottomista kontrollikodeista (N= 70) sekä ulkoilmasta (N=56). Viljelynäytteet kerättiin Andersen-keräimellä 10 minuutin ajan ja qPCR-analyysiin tulevat näytteet Button-keräimellä suodattimille vähintään 60 minuutin ajan.

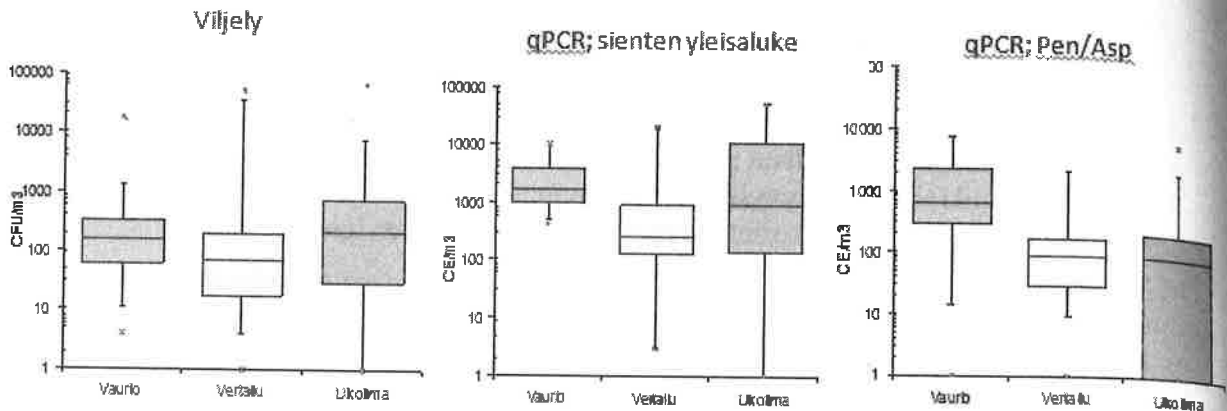
Aineistosta analysoitiin useita (23 kpl) eri qPCR-sovelluksia, mutta useimmissa lajispesifisissä analyyseissä havaittiin erittäin runsaasti alle määrittämissä olevia näytteitä. Keskityimme tässä julkaisussa sienten yleissovellukseen (nk. unifungi) /1/ sekä *Penicillium*, *Aspergillus* ja *Paecilomyces variotii*-ryhmät monistavaan sovellukseen (nk. PenAsp) /2/.

TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

Pitoisuudet eri menetelmillä

Pitoisuudet qPCR-sovelluksella analysoituna olivat yleisesti korkeampia kuin viljelyllä havaitut pitoisuudet (Kuva 1). Tämä selittyy sillä, että qPCR havaitsee myös kuolleita soluja.

Sienten kokonaispitoisuus (unifungi) qPCR:lla määritettynä erottelee vauriokohteet vertailukohteista paremmin kuin viljely (Kuva 1). Pen/Asp qPCR-sovellus erottelee vauriokohteet vertailukohteista vielä unifungi-sovellusta selkeämmin. Tällöin myös ulkoilman pitoisuudet olivat matalammat kuin sisäilmassa, toisin kuin kokonaissienipitoisuuksia mitattaessa (Kuva 1).

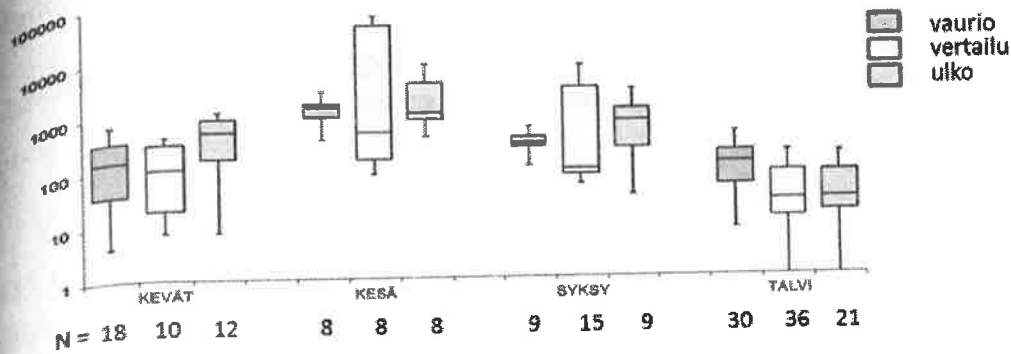


Kuva 1. Sienten kokonaispitoisuus viljelyllä mitattuna, sekä sienten kokonaispitoisuus ja *Penicillium/Aspergillus/Paecilomyces variotii*-ryhmän pitoisuus qPCR:lla mitattuna vauriokodeissa, vertailukodeissa ja ulkoilmassa. Kuvassa max, min, mediaani, 25-prosenttipiste ja 75-prosenttipiste, sekä korkeimmat ja matalimmat yksittäishavainnot.

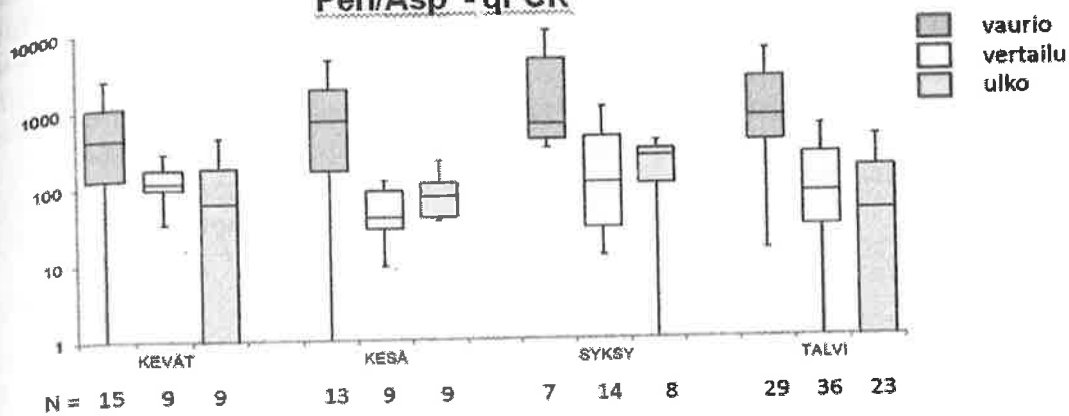
Vuodenaikaisvaihtelu

Vuodenaikaisvaihtelua havaittiin niin viljelyllä kuin qPCR:n avulla määritetyissä pitoisuuksissa. Viljelyllä määritetyt vauriokotien pitoisuudet erottuivat vertailukotien pitoisuuksista ainoastaan talvella, kun tarkasteltiin sienten kokonaispitoisuutta (Kuva 2). Muina vuodenaikoina vaurio- ja vertailukotien pitoisuudet eivät erottuneet viljelyllä toisistaan ja ulkoilmanäytteen sienipitoisuus oli yhtä korkea tai korkeampi kuin sisäilman pitoisuudet. Samankaltainen havainto oli nähtävissä käytettäessä unifungi-sovellusta qPCR:lla. Sen sijaan kun näytteet analysoitiin qPCR:lla käyttäen Pen/Asp-sovellusta, vauriokodit erottuivat selkeästi vertailukodeista kaikkina neljänä vuodenaikana, eikä ulkoilman sienipitoisuus haitannut erottelua samalla tavalla kuin viljelyssä ja unifungi-qPCR-analyysissä.

Sienten kokonaispitoisuus - Viljely



Pen/Asp - qPCR



Kuva 2. Vuodenaikaisvaihtelu viljelymenetelmällä (sienten kokonaispitoisuus) sekä Pen/Asp sovelluksella qPCR:lla vauriokohteissa, vertailukohteissa ja ulkoilmassa.

Tulkintaohje epätavanomaisen sieni-itiölähteen osoittamiseksi

Viljelyaineistoa ja qPCR-aineistoa verrattiin toisiinsa useilla erilaisilla tilastollisilla menetelmillä, mm. ROC -analyysillä (Receiver Operating Characteristic). Tavoitteena oli määrittää, mikä on se qPCR-analyysien arvo, joka erottaa vaurioituneet kodit vaurioitumattomista kodeista eli viittaa epätavanomaiseen sieni-itiölähteeseen sisäilmassa.

Tämän aineiston perusteella havaittiin, että qPCR:lla analysoitaessa Pen/Asp-sovelluksella 250 CE/m^3 vastaa spesifisyydeltään ja sensitiivisyydeltään parhaiten kotien vaurio- ja vertailuasetelmaa. Tämä tulos on alustava ja ilmanäytteiden qPCR-menetelmän validointityötä jatketaan aineistoa kasvattaen.

YHTEENVETO

Yhteenvedona voidaan todeta, että qPCR-sovelluksista erityisesti Pen/Asp näyttää erottavan vauriokodit ei-vaurioituneista viljelymenetelmää paremmin. Näytteenoton vuodenaikalla ei ollut vaikutusta vauriokotien erottamiseen vertailukodeista, kun käytettiin Pen/Asp-sovellusta. Alustavien tulosten perusteella vaurioituneiden kotien sisäilman Pen/Asp- pitoisuus on yleensä yli 250 CE/m^3 . Saatu tulos varmistetaan lisäaineistossa.

LÄHDELUETTELO

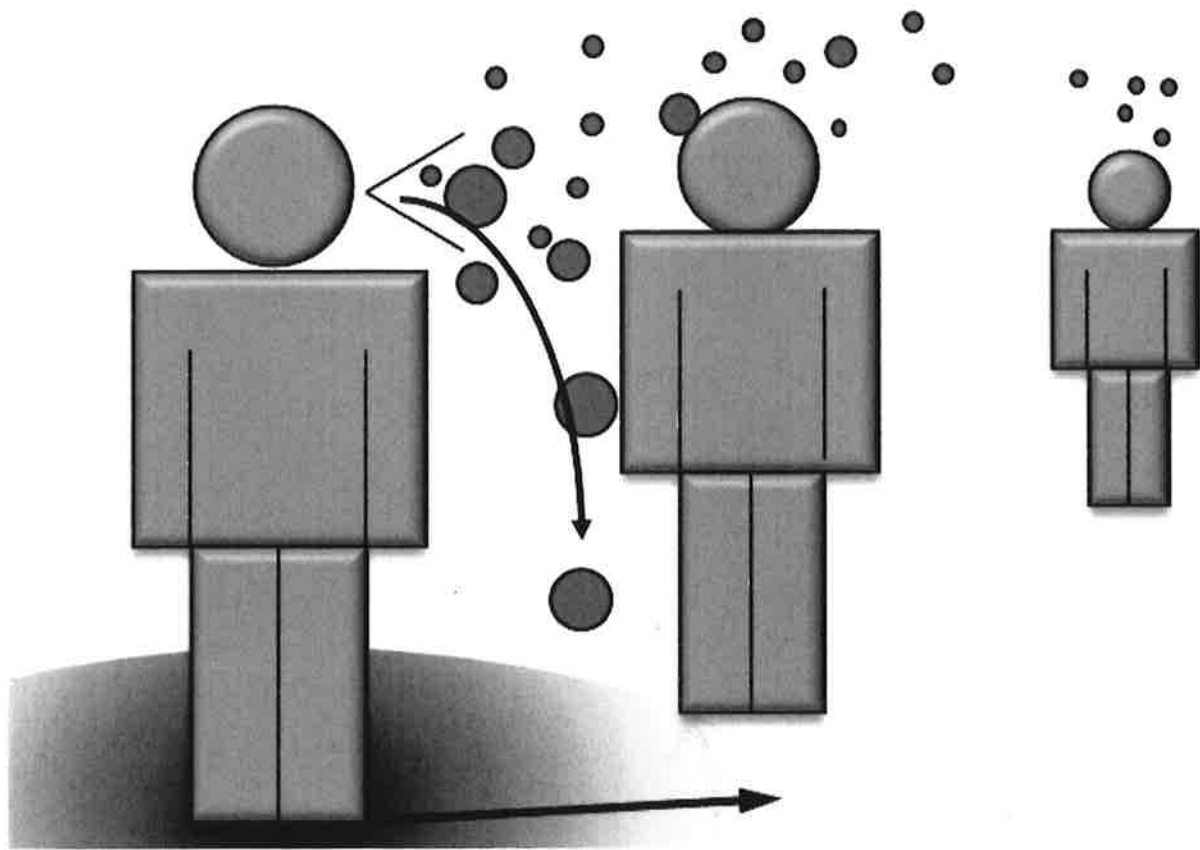
1. Haugland RA, Vesper S. (2002) Method of identifying and quantifying specific fungi and bacteria. US Patent, 2002, 6: 3741-3751.
2. Haugland RA, Varma M, Wymer LJ, Vesper SJ. (2004) Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Syst Appl Microbiol.* 27(2):198-210.

SISÄILMASTOSEMINAARI

2016

Messukeskus, Helsinki

16.3.2016



Sisäilmayhdistys ry
Aalto-yliopisto, Energiatekniikan laitos

Sisäilmäyhdistys ry

Puheenjohtaja prof. Risto Kosonen
Toiminnanjohtaja dipl.ins. Jorma Säteri

Sisäilmäseminaarin ohjausryhmä 2016:

Heidi Salonen, puheenjohtaja

Anne Hyvärinen

Helena Järnström

Paavo Kero

Risto Kosonen

Marjaana Lahtinen

Sami Niemi

Pertti Pasanen

Juha Pekkanen

Anna-Mari Pessi

Jorma Säteri

Marianna Tuomainen

Mika Vuolle

Sisäilmäyhdistys raportti 34

SISÄILMASTOSEMINAARI 2016

Jorma Säteri ja Mervi Ahola (Toim.)

SIY Sisäilmatieto Oy

ISSN 1237-1866

ISBN 978-952-5236-44-6

Painopaikka Bookwell Oy, Juva 2016