

KOTIPÖLYSTÄ SEKVENSOITUJEN SIENTEN YHTEYS ASTMAAN - TULOKSIA SUOMALAISESTA SYNTYMÄKOHORTTITUTKIMUKSESTA

Anne M. Karvonen¹, Martin Täubel¹, Jonna Jalanka^{1,2}, Pirkka V. Kirjavainen^{1,2}, Pauli Tuoresmäki¹, Eija Piippo-Savolainen³, Anne Hyvärinen¹ ja Juha Pekkanen^{1,4}

¹ Terveystieteiden tutkimuskeskus, Kuopio, Suomi

² Itä-Suomen yliopisto, Kuopio, Suomi

³ Kuopion yliopistollinen sairaala, Kuopio, Suomi

⁴ Helsingin yliopisto, Helsinki, Suomi

TIIVISTELMÄ

Tutkimuksessa selvitettiin, onko kodin huonepölystä määritettyjen sienien (homeet ja hiivat) määrät tai koostumus varhaislapsuudessa yhteydessä lapsen myöhempään riskiin sairastua astmaan. Sienet sekvenssointiin ja sienten määrä mitattiin kvantitatiivisella PCR-menetelmällä. Tutkimuksessa seurattiin 361 lasta 10,5-vuoden ikään asti. Astmaan sairastuneiden lasten kotipölyssä oli erilainen sienten koostumus kuin lapsilla, jotka eivät sairastuneet astmaan. Koostumuksesta erottautui 5 sienisukua, jotka suojasivat astmaan sairastumiselta, mutta joiden merkitys hävisi, kun ne vakioitiin samaan aikaan mallissa. Sienten diversiteetti tai määrä ei ollut yhteydessä riskiin sairastua astmaan. Tutkimustulosten perusteella voidaan olettaa, että varhaislapsuuden kodin sienillä ei ole vahvaa vaikutusta astmaan sairastumisessa.

JOHDANTO

Varhaislapsuuden elinympäristön mikrobiotuksella on merkitystä immuunijärjestelmän kehittämisessä /1/. On epäselvää, mitkä elinympäristön mikrobit tai niiden koostumus vaikuttavat allergisten sairauksien kehittymiseen. Karjatiloihin tiedetään olevan runsaasti erilaisia mikrobeja ja mikrobitasot ovat korkeita. Aiemmissä tutkimuksissa on havaittu, että karjatiloihin kasvaneilla lapsilla on vähemmän astmaa ja allergisia sairauksia /2/. Suojaava yhteys näissä tutkimuksissa on pääosin liittynyt bakteereihin tai niiden soluseinämän markkereihin /2-6/, mutta sieniä (homeet ja hiivat) on tutkittu huomattavasti vähemmän. Sieniä on useimmiten tutkittu kosteusvauriorakennuksissa, jolloin ne on yleensä liitetty lisääntyneisiin terveyshaittoihin /7, 8/.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, onko varhaislapsuudessa huonepölystä määritetyt sienisuvut, sienten diversiteetti tai määrä yhteydessä lapsen myöhempään astmaan sairastumisen riskiin.

AINEISTO JA MENETELMÄT

LUKAS-syntymäkohortti

Varhaislapsuuden sisäilman merkitystä lasten astmaan ja allergioihin on tutkittu suomalaisessa LUKAS-syntymäkohorttitutkimuksessa. Pohjois-Savon, Pohjois-Karjalan ja Keski-Suomen alueilla rekrytoitiin 442 odottavaa äitiä vuosina 2002—2005 /9/.

Kohortin ensimmäinen osa (LUKAS1, N=214) kuuluu eurooppalaiseen syntymäkohorttiin, PASTURE /10/, jossa puolet lapsista asui karjatililla ja puolet haja-asutusalueilla. Suomalaisen kohortin lisäosaan (LUKAS2, N=228) kutsuttiin mukaan kaikki odottavat äidit, jotka olivat tulossa synnyttämään Kuopion yliopistolliseen sairaalaan yhden vuoden aikana. Perheistä vain 12 asui maataloilla. Jotta lisäosa olisi samankaltainen ensimmäisen osan kanssa, perheiden asumismuotoa rajattiin: kaikki perheet asuivat omakoti-, rivi- tai paritaloissa rekrytoinnin aikana. Kohortin kaikista perheistä 30 % asui maataloilla ja loput haja-asutusalueilla tai lähiöissä.

Lasten terveyttä seurattiin vuosittaisilla kyselylomakkeilla kuuden ensimmäisen ikävuoden aikana sekä 10,5 vuoden iässä. Astma (n=68) tarkoitti lääkärin diagnosoimaa astmaa tai vähintään kahta lääkärin diagnosoimaa astmaattista/ahtauttavaa bronkiittia missä tahansa vaiheessa 10,5 ikään mennessä. Lapsella oli pysyvä astma 10,5 vuoden iässä (n=27), jos vanhemmat raportoivat astmaan sairastuneen lapsen hengityksen vinkuneen ja/tai hänen käyttäneen lääkkeitä hengityksen vinkunaan 10,5 vuoden kyselyssä viimeisten 12 kuukauden aikana.

Näytteiden keräys ja analysointi

Pölynäyte kerättiin imuroimalla olohuoneen lattiaa tai mattoa 380 kodista, kun lapset olivat 2 kuukauden ikäisiä /11, 12/. Sienimikrobiston (homeet ja hiivat) koostumus määritettiin sekvensoimalla ITS1F/ITS2 kohdesekvenssejä (Illumina MiSeq PA300)/13/. Sekvensointidata käsiteltiin R-ohjelmalla hyödyntäen Dada2-lisäpakettia datan esikäsittelyyn /14/ ja UNITE-tietokantaa taksonomiseen luokitteluun (versio toukokuu 2021) /15/. Sekvensoinnin perusteella määritettiin sienten eri taksonomiatasot, sekä sienten rikkaus ja monimuotoisuus (α -diversiteetti: Chao1 ja Shannon indeksit), sekä laskettiin näytteen sienikoostumuksen samalaisuus / erilaisuus näytteiden välillä (β -diversiteetti). Näytteistä määritettiin kvantitatiivisella PCR-menetelmällä (qPCR) sienten kokonaismäärä /16/.

Tilastoanalyysit

Sienten suhteellisia osuuksia tai diversiteettitasoja verrattiin astmaan sairastuneiden ja ei-astmaan sairastuneiden lasten kotien välillä Mann-Whitney-testillä. Spearmanin järjestyskorrelaatiota käytettiin korrelaatioiden laskemiseen. Näytteiden välinen eroavaisuus (β -diversiteetti) määritettiin Bray-Curtis-menetelmällä, sen tilastollista merkittävyyttä tarkasteltiin PERMANOVA-S -analyysillä /17/ ja havainnollistettiin pääkoordinaatti analyysillä (PCoA). Viiden ensimmäisen PCoA-akseleiden arvojen avulla tutkittiin, olivatko akselit yhteydessä astmaan. Sienten sukujen suhteelliset osuudet sekä PCoA-akseleiden arvot jaettiin kolmeen luokkaan käyttäen luokkarajoina, joissa alin kolmannes oli vertailuluokka. Jos sienisukua ei ollut havaittu (suhteellinen osuus 0 %) yli 33,3 % näytteistä, vertailuluokkana toimi 0 % (ei havaittu) -ryhmä ja loput jaettiin tasan kahteen luokkaan (matala ja korkea luokka).

Analyyseissä käytettiin jaksottaista aikasarjamallia (discrete-time hazard model). Mallit vakioitiin etukäteen valituilla sekoittavilla tekijöillä: kohortilla, sisarusten lukumäärällä, äidin allergisilla sairauksilla, sukupuoliella, äidin raskaudenaikaisella tupakoinnilla ja karjatilalla asumisella. Astma-analyyseissä oli mukana yhteensä 361 havaintoa ja pysyvän astman analyyseissä 300.

TULOKSET

Suurin osa kodin pölynäytteen sienistä kuuluivat Ascomycota (66 %) ja Basidomycota (33 %) sieniin. Astmaan sairastuneiden ja ei sairastuneiden lasten kotipölyssä ei ollut eroja sienikuntakaarien suhteellisissa osuuksissa, α -diversiteetti-indekseissä (rikkaus ja monimuotoisuus) tai sienten kokonaismäärässä (qPCR) ($p > 0.05$).

Astmaan sairastuneiden lasten kotipölyssä oli erilainen sienten koostumus (β -diversiteetti) kuin lapsilla, jotka eivät sairastuneet astmaan (pysyvä astma, $p = 0.10$). Tutkituista viidestä ensimmäisestä akselista neljäs akseli oli tilastollisesti merkitsevästi ($p = 0.05$) ja ensimmäinen ei-tilastollisesti merkitsevästi ($p = 0.20$) yhteydessä astmaan. Testatuista 86 yleisimmistä suvusta (sienen suhteellisen osuuden keskiarvo suurempi kuin 0,1 %), 13 suvun suhteelliset osuudet korreloivat ($r > |0.4|$) vain toisen akselin tai molempien akselien kanssa.

Näistä 13 sienisuvusta, *Mycosphaerella*, *Microdochium* ja *Pyrenochaetopsis* -sukujen korkeammat suhteelliset osuudet kotipölyssä suojasivat ($p < 0.10$) astmaan sekä pysyvään astmaan sairastumiselta. Näiden kolmen sienisuvun lisäksi *Boeremia* ja *Cladosporium* -suvut suojasivat pysyvältä astmalta ($p < 0.05$). Kun nämä kolme astmaan tai viisi pysyvään astmaan yhteydessä olleet sienisuvut vakioitiin samanaikaisesti mallissa tai niiden suhteelliset osuudet summattiin yhteen, ei niistä mikään ollut enää yhteydessä astmaan tai pysyvään astmaan ($p > 0.10$).

POHDINTA

Tässä tutkimuksessa käytettiin aineistona suomalaista syntymäkohorttia, jossa varhaislapsuuden kodin mikrobistoa ja sen yhteyttä lasten astmaan sairastumisen riskiin on tutkittu käyttäen monipuolisesti erilaisia mikrobiologisia menetelmiä.

Tässä tutkimuksessa havaittiin viisi sienisukua (*Cladosporium*, *Boeremia*, *Microdochium*, *Mycosphaerella* ja *Pyrenochaetopsis*), jotka suojasivat astmalta. Nämä sienet ovat pääosin ulkoilman sieniä. Äskettäin julkaistussa tutkimuksessa havaittiin samanlainen suojaava yhteys *Mycosphaerella* -suvun kahdella lajilla /18/ kuten tutkimuksessamme. Useimmissa aiemmissä tutkimuksissa *Cladosporium*illa ei ole havaittu olevan yhteyttä astmaan /18-23/, mutta muutamissa tutkimuksissa se on yhdistetty tuloksistamme poiketen astmariskiä lisääväksi /24,25/. Tutkimuksessamme yksikään tutkituista sienisuvuista ei lisännyt astmaan sairastumisen riskiä, mikä oli ennako-oletustemme vastaista. Havaittujen sienisukujen korkeammat suhteelliset osuudet ja niiden suojaava yhteys astmaan selittyi muilla sienillä, jolloin niiden ei voida katsoa olevan itsenäisesti yhteydessä astmaan. Tulevissa tutkimuksissa olisi suhteellisten osuuksien lisäksi tarkasteltava, mikä merkitys on elinympäristön sienten aktiivisuudella.

Aiemmissä tutkimuksissa on havaittu suojaava yhteys sienten moninaisuuden ja astman tai hengitystieoireiden välillä /21,26/. Uudemmissa sekvenssoitiin perustuvilla menetelmillä yhteyttä ei kuitenkaan ole pystytty toistamaan /18, 19/, kuten ei myöskään pystytty tässä tutkimuksessa. Tämä voi johtua tutkimuksissa käytetyistä erilaisista menetelmistä sekä näytteiden keruusta että analysoinnissa. Vaikka tutkimusmenetelmissä on eroja, voidaan tämän ja aiempien tutkimusten perusteella todeta, että sienten rikkaus ja moninaisuus eivät välttämättä ole yhteydessä astmaan.

Tutkimuksen vahvuutena on pitkittäistutkimusasetelma, jossa kodin sienten koostumus määritettiin kodin pölynäytteestä ennen taudin puhkeamista. Elinympäristön

mikrobialtistuksen vaikutus immuunijärjestelmän kehittymiseen on oletettu olevan voimakkain ensimmäisten elinvuosien aikana, jolloin tutkimuksessa kerätty pölynäyte ja siitä tehty altistuksen arvio voidaan ajatella edustavan tärkeää ajanjaksoa lapsen kehityksessä. Tutkimuksen heikkoutena oli, että mikrobialtistuksen arvioissa käytettiin vain yhtä aikapistettä, jolloin kodin mikrobikoostumuksen muutosta ei voitu havaita. Lisäksi kodin sienet määritettiin lattiapölynäytteestä, josta vain osa on ollut ilmassa: tosin pienillä lapsilla mikrobialtistuminen tapahtuu hengitysteiden lisäksi myös ihon ja suun kautta.

Aiempien tutkimusten ja nyt esitettyjen tutkimustulosten perusteella voidaan olettaa, että varhaislapsuuden kodin sienillä ei ole vahvaa vaikutusta astmaan sairastumisessa.

KIITOKSET

Tätä tutkimusta ovat rahoittaneet Suomen Akatemia (rahoitusnumerot 139021;287675); Juho Vainion säätiö; Yrjö Jahnssonin säätiö; Lastentautitutkimussäätiö; EVO/VTR-tutkimusrahoitus; Päivikki ja Sakari Sohlbergin säätiö; Maatalousyrittäjien eläkelaitos (Mela); Suomen kulttuurirahasto; Euroopan Unioni QLK4-CT-2001-00250; ja Terveystieteiden tutkimuskeskus (THL). Lämmin kiitos tutkimukseen osallistuneille perheille.

LÄHDELUETTELO

Lähdeviitteet numeroidaan tekstissä, esimerkiksi: Ne muodostavat homesienten tavoin rihmastoa ja itiöitä /1/. Lähdeluettelo numeroidaan vastaavasti.

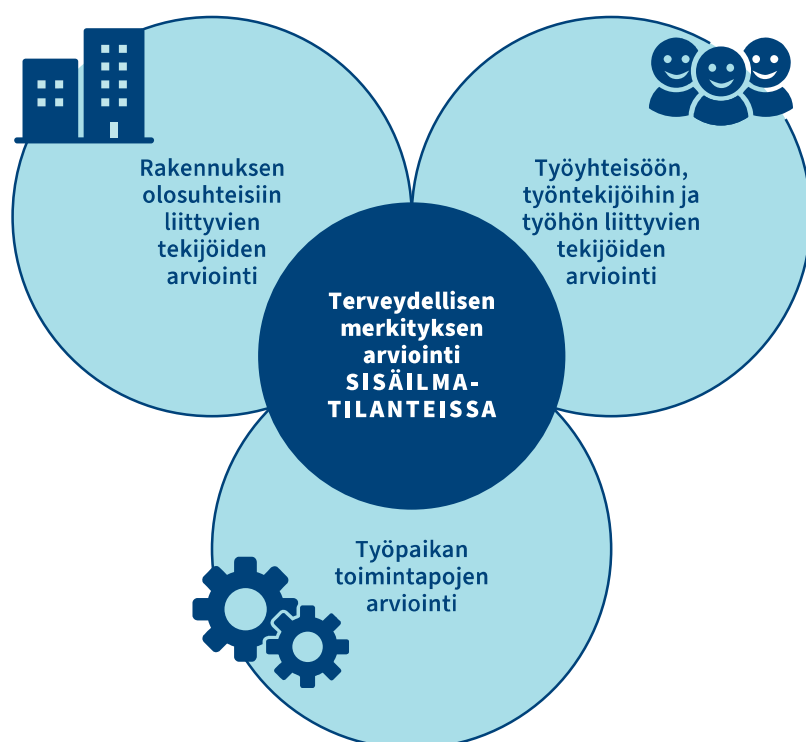
1. von Mutius E. The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137: 680-689.
2. von Mutius E, Vercelli D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 861-868.
3. Deckers J, Marsland BJ, von Mutius E. Protection against allergies: Microbes, immunity, and the farming effect. *Eur J Immunol* 2021; 51: 2387-2398.
4. Stein MM, Hrusch CL, Gozdz J, Igartua C, Pivniouk V, Murray SE, Ledford JG, Marques Dos Santos M, Anderson RL, Metwali N, Neilson JW, Maier RM, Gilbert JA, Holbreich M, Thorne PS, Martinez FD, von Mutius E, Vercelli D, Ober C, Sperling AI. Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. *N Engl J Med* 2016; 375: 411-421.
5. Kirjavainen PV, Karvonen AM, Adams RI, Täubel M, Roponen M, Tuoresmaki P, Loss G, Jayaprakash B, Depner M, Ege MJ, Renz H, Pfefferle PI, Schaub B, Lauener R, Hyvärinen A, Knight R, Heederik DJJ, von Mutius E, Pekkanen J. Farm-like indoor microbiota in non-farm homes protects children from asthma development. *Nat Med* 2019; 25: 1089-1095.
6. Karvonen AM, Kirjavainen PV, Täubel M, Jayaprakash B, Adams RI, Sordillo JE, Gold DR, Hyvärinen A, Remes S, von Mutius E, Pekkanen J. Indoor Bacterial Microbiota and the Development of Asthma: a Birth Cohort Study.
7. Mendell MJ, Mirer AG, Cheung K, Tong M, Douwes J. Respiratory and allergic health effects of dampness, mold, and dampness-related agents: a review of the epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 748-756.

8. Tischer C, Chen CM, Heinrich J. Association between domestic mould and mould components, and asthma and allergy in children: a systematic review. *Eur Respir J* 2011; 38: 812-824.
9. Karvonen AM, Hyvärinen A, Roponen M, Hoffmann M, Korppi M, Remes S, von Mutius, Nevalainen A, Pekkanen J. Confirmed moisture damage at home, respiratory symptoms and atopy in early life: A Birth-Cohort Study. *Pediatrics* 2009; 124(2): E329-E338.
10. Von Mutius E, Schmid S. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy* 2006 Apr;61(4):407-13.
11. Karvonen AM, Hyvärinen A, Rintala H, Korppi M, Täubel M, Doekes G, Gehring U, Renz H, Pfefferle PI, Genuneit J, Keski-Nisula L, Remes S, Lampi J, von Mutius E, Pekkanen J. Quantity and diversity of environmental microbial exposure and development of asthma: a birth cohort study. *Allergy* 2014; 69: 1092-1101.
12. Karvonen AM, Hyvärinen A, Gehring U, Korppi M, Doekes G, Riedler J, Braun-Fahrlander C, Bitter S, Schmid S, Keski-Nisula L, Roponen M, Kaulek V, Dalphin JC, Pfefferle PI, Renz H, Buchele G, von Mutius E, Pekkanen J, Group PS. Exposure to microbial agents in house dust and wheezing, atopic dermatitis and atopic sensitization in early childhood: a birth cohort study in rural areas. *Clin Exp Allergy* 2012; 42: 1246-1256.
13. Wopereis H, Oozeer R, Knipping K, Belzer C, Knol J. The first thousand days - intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatr Allergy Immunol* 2014; 25: 428-438.
14. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 2016; 13: 581-583.
15. Nilsson RH, Larsson KH, Taylor AFS, Bengtsson-Palme J, Jeppesen TS, Schigel D, Kennedy P, Picard K, Glockner FO, Tedersoo L, Saar I, Koljalg U, Abarenkov K. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res* 2019; 47: D259-D264.
16. Hyytiäinen HK, Jayaprakash B, Kirjavainen PV, Saari SE, Holopainen R, Keskinen J, Hameri K, Hyvärinen A, Boor BE, Täubel M. Crawling-induced floor dust resuspension affects the microbiota of the infant breathing zone. *Microbiome* 2018; 6: 25.
17. Tang ZZ, Chen G, Alekseyenko AV. PERMANOVA-S: association test for microbial community composition that accommodates confounders and multiple distances. *Bioinformatics* 2016; 32: 2618-2625.
18. Cox J, Stone T, Ryan P, Burkle J, Jandarov R, Mendell MJ, Niemeier-Walsh C, Roponen T. Residential bacteria and fungi identified by high-throughput sequencing and childhood respiratory health. *Environ Res* 2022; 204: 112377.

19. Adams RI, Leppanen H, Karvonen AM, Jacobs J, Borrás-Santos A, Valkonen M, Krop E, Haverinen-Shaughnessy U, Huttunen K, Zock JP, Hyvärinen A, Heederik D, Pekkanen J, Täubel M. Microbial exposures in moisture-damaged schools and associations with respiratory symptoms in students: A multi-country environmental exposure study. *Indoor Air* 2021; 31: 1952-1966.
20. Valkonen M, Täubel M, Pekkanen J, Tischer C, Rintala H, Zock JP, Casas L, Probst-Hensch N, Forsberg B, Holm M, Janson C, Pin I, Gislason T, Jarvis D, Heinrich J, Hyvärinen A. Microbial characteristics in homes of asthmatic and non-asthmatic adults in the ECRHS cohort. *Indoor Air*. 2018 Jan;28(1):16-27
21. Tischer C, Weigl F, Probst AJ, Standl M, Heinrich J, Pritsch K. Urban Dust Microbiome: Impact on Later Atopy and Wheezing. *Environ Health Perspect* 2016; 124: 1919-1923.
22. Dannemiller KC, Mendell MJ, Macher JM, Kumagai K, Bradman A, Holland N, Harley K, Eskenazi B, Peccia J. Next-generation DNA sequencing reveals that low fungal diversity in house dust is associated with childhood asthma development. *Indoor Air* 2014; 24: 236-247.
23. Sharpe RA, Bearman N, Thornton CR, Husk K, Osborne NJ. Indoor fungal diversity and asthma: a meta-analysis and systematic review of risk factors. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 110-122.
24. Behbod B, Sordillo JE, Hoffman EB, Datta S, Muilenberg ML, Scott JA, Chew GL, Platts-Mills TA, Schwartz J, Burge H, Gold DR. Wheeze in infancy: protection associated with yeasts in house dust contrasts with increased risk associated with yeasts in indoor air and other fungal taxa. *Allergy*. 2013 Nov;68(11):1410-8.
25. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WO, Braun-Fahrlander C, Heederik D, Piarroux R, von Mutius E, Group GTS. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med* 2011; 364: 701-709.

SISÄILMASTOSEMINAARI 2023

Messukeskus
14.3.2023



Sisäilmayhdistys ry

SIY Raportti 41

SISÄILMASTOSEMINAARI 2023

14.3.2023

Toimittajat:

Mervi Ahola
Anna Merikari

Sisäilmayhdistys ry

Puheenjohtaja prof. Risto Kosonen
Toiminnanjohtaja DI Mervi Ahola

Sisäilmastoseminaarin ohjausryhmä 2023:

Mervi Ahola
Ulla Haverinen-Shaughnessy
Kati Huttunen
Anne Hyvärinen
Paavo Kero
Hanna Keränen
Anne Korpi
Hannu Koskela
Risto Kosonen
Katri Leino
Tero Marttila
Sami Niemi
Pertti Pasanen
Juha Pekkanen
Anna-Mari Pessi
Anna Saarinen
Heidi Salonen
Piia Sormunen
Jorma Säteri
Marianna Tuomainen
Katja Tähtinen
Tuula Vasankari
Kirsi Villberg
Aki Vuokko
Mika Vuolle
Leif Wirtanen

Sisäilmayhdistys raportti 41

SISÄILMASTOSEMINAARI 2023
Mervi Ahola ja Anna Merikari (toim.)

Kannen kuva: Terveydellisen merkityksen arvioinnin osa-alueet sisäilmatilanteissa
(*Terveydellisen merkityksen arviointi sisäilmatilanteissa -ohje*, Työterveyslaitos 2022)
artikkelista *Terveydellisen merkityksen arviointi sisäilmatilanteissa*

Artikkeleiden sisällöstä vastaavat kirjoittajat, eikä niitä ole vertaisarvioitu.

SIY Sisäilmatieto Oy
ISSN 1237-1866
ISBN 978-952-5236-54-5
Painopaikka Grano Oy, Vaasa