

Kvantitatiivisen PCR-menetelmän ja viljelyn vertailu määrittäessä mikrobeja rakennusmateriaaleilta

Helena Rintala
KTL, YTOS

Sisäilmastoseminaari 5.3.2008

Taustaa

- Viljelymenetelmä on
 - Selektiivinen, mittaa vain elinkykyisiä
 - hidas, työläs
 - tunnistus riippuvainen kokemuksesta
- DNA-pohjaiset menetelmät
 - mittaavat DNA:ta, sekä elävät ja elinkyvyttömät
 - nopeita, tarkkoja ja pitkälle automatisoitavissa
 - vaativat paljon etukäteistestausta

Työn tarkoitus

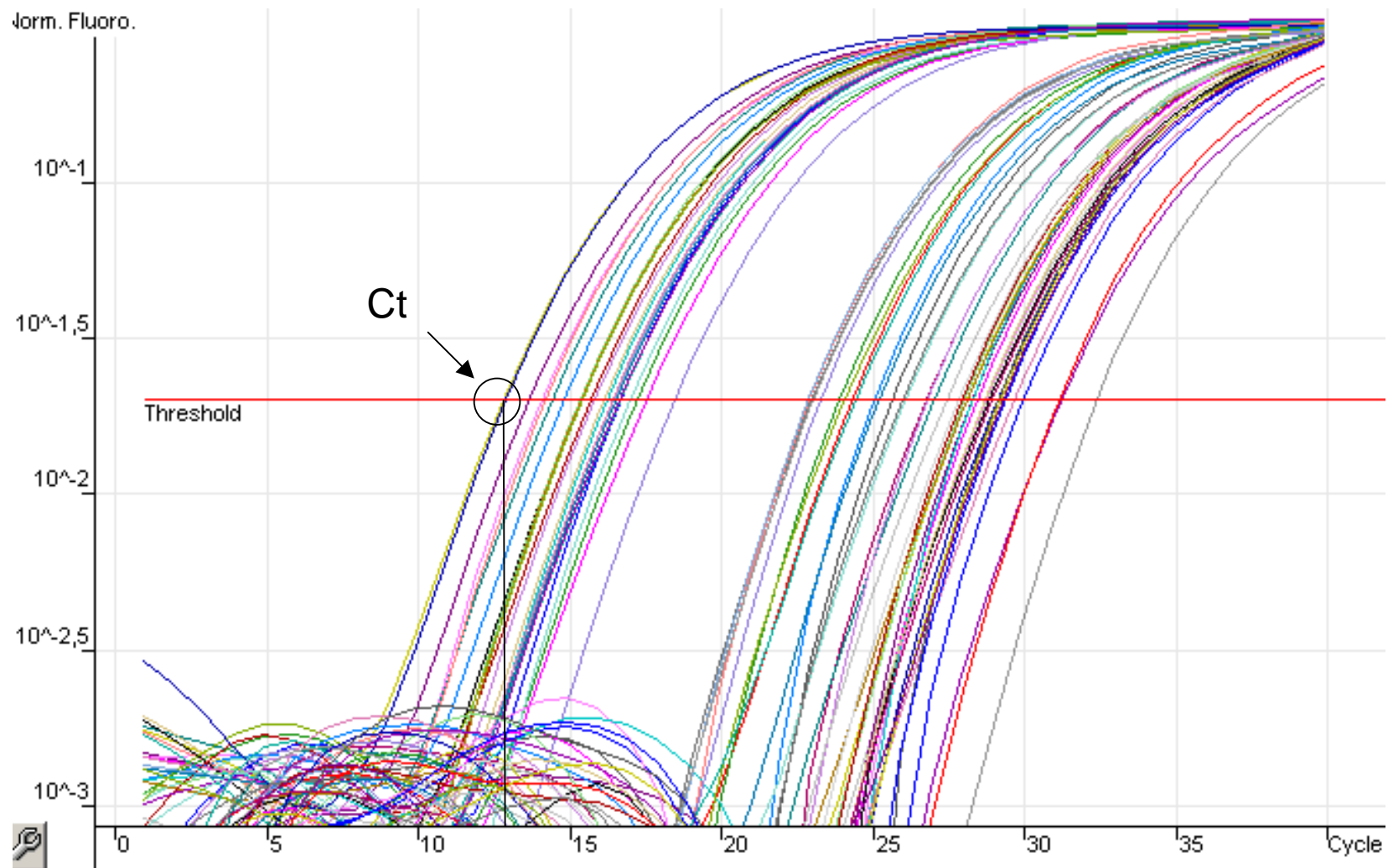
- STM:n ohjeet perustuvat viljelymenetelmään
- Muut menetelmät täytyy validoida
- Tutkimuksen tarkoitus oli verrata viljelyn ja qPCR:n antamia tuloksia rakennusmateriaalinäytteistä

Materiaalit ja menetelmät

- 184 rakennusmateriaalinäytettä
- Viljely M2, DG18, THG
- qPCR:
 - *Aspergillus versicolor* (www.epa.gov)
 - *Aspergillus fumigatus* (www.epa.gov)
 - *Acremonium strictum* (www.epa.gov)
 - *Chaetomium globosum* (www.epa.gov)
 - *Cladosporium* spp. (Kärkkäinen, 20007)
 - *Stachybotrys chartarum* (Haugland ym., 1999)
 - *Trichoderma viride/atroviride/koningii* (www.epa.gov)
 - *Wallemia sebi* (www.epa.gov)
 - *Penicillium/Aspergillus/Paecilomyces variotii* (Haugland ym., 2004)
 - *Streptomyces* spp. (Rintala ja Nevalainen, 2006)

qPCR menetelmä

- DNA-eristys (solujen hajotus helmimyllytyksellä, DNA vapautuu liuokseen ja puhdistetaan)
- PCR-monistus (alukkeet määräävät monistettavan DNA-alueen ja mikrobin – esim. *A. versicolor*)
- PCR-tuotteen monistumista seurataan fluoresoivien väriaineiden avulla
- Kvantitointi standardisuoran avulla
- Sisäisen standardin avulla (lisätään ennen DNA-eristystä) seurataan inhibitiota ja eristyksen onnistumista



qPCR menetelmä

- DNA-eristys (solujen hajotus helmimyllytyksellä, DNA vapautuu liuokseen ja puhdistetaan)
- PCR-monistus (alukkeet määräävät monistettavan DNA-alueen ja mikrobin – esim. *A. versicolor*)
- PCR-tuotteen monistumista seurataan fluoresoivien väriaineiden avulla
- Kvantitointi standardisuoran avulla
- Sisäisen standardin avulla (lisätään ennen DNA-eristystä) seurataan PCR-inhibitiota ja DNA-eristyksen onnistumista

Tulokset

- Tulosten analysoinnin helpottamiseksi näytteet jaettiin neljään ryhmään viljelyllä määritetyn kokonaispitoisuuden perusteella
 - < 100 cfu/g
 - $100 - 10\ 000$ cfu/g
 - $10\ 000 - 1\ 000\ 000$ cfu/g
 - $> 1\ 000\ 000$ cfu/g

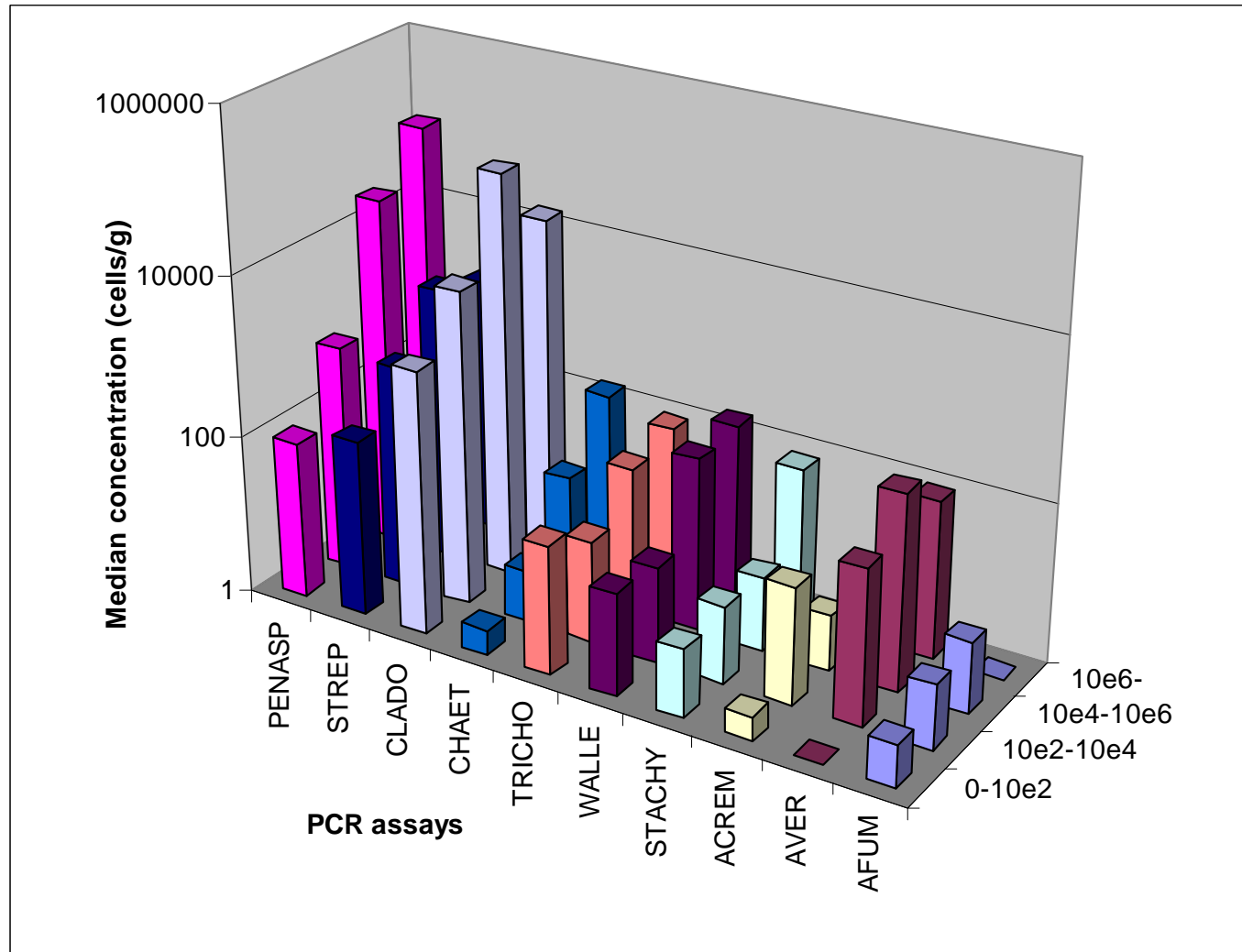
Viljely vs. PCR – prevalenssi (%) viljelyllä

	$< 10^2$	$10^2 - 10^4$	$10^4 - 10^6$	$> 10^6$
<i>Acremonium</i>	0	15	24	28
<i>A. fumigatus</i>	0	0	0	5
<i>A. versicolor</i>	2	32	58	48
<i>Chaetomium</i>	2	12	6	5
<i>Cladosporium</i>	2	12	9	24
<i>Penic./Asperg.</i>	22	78	78	91
<i>Stachybotrys</i>	0	0	0	10
<i>Trichoderma</i>	0	2	9	29
<i>Wallemia</i>	0	7	4	0
Aktinomykeetit	2	4	60	52

Viljely vs. PCR – prevalenssi (%) qPCR:llä

	< 10 ²	10 ² – 10 ⁴	10 ⁴ – 10 ⁶	> 10 ⁶
<i>A. strictum</i>	2	2	6	0
<i>A. fumigatus</i>	6	7	4	0
<i>A. versicolor</i>	0	15	50	24
<i>C. globosum</i>	3	32	24	24
<i>Cladosporium</i>	6	15	4	19
<i>PenAspPae</i> ¹	63	90	95	95
<i>S. chartarum</i>	15	22	36	29
<i>T.vir./atrov./ko</i>	15	27	29	43
<i>W.sebi</i>	6	17	24	24
<i>Streptomyces</i>	36	59	76	95

PCR-positiivisten näytteiden mediaanipitoisuudet luokittain



Tuloksia

- Viljelynegatiivisia näytteitä 44, joista PCR-negatiivisia 13, kahdessa havaittiin melko suuria pitoisuuksia *Cladosporium*-homeetta
- 18%:ssa näytteitä, joissa viljelyssä oli kokonaispitoisuus yli 10 000 cfu/g, löytyi qPCR:llä vain pieniä pitoisuuksia käytetyillä menetelmillä
 - laji- tai sukuspesifisillä menetelmillä ei saada kokonaispitoisuutta
 - täytyy käyttää montaa eri menetelmää

Yhteenveto

- Tässä työssä useimmat viljelytulokset ilmoitettu sukutasolla, PCR-tulokset lajitasolla
- Viljely ja qPCR antavat yleensä samansuuntaisen tuloksen
- PCR-tulos yleensä suurempi kuin viljelytulos
- PCR löytää pienetkin pitoisuudet – merkitys? – homeita esiintyy luonnostaan ympäristössä
- Viljelyllä löytyy materiaaleilta aktiivinen kasvusto, PCR:llä myös kuollut

Yhteenveto

- Viljelyyn perustuvia tulkintaohjeita (STM:n ohjeet) ei pidä käyttää PCR-tuloksille !
- Tarvitaan lisävalidointia PCR-menetelmille, ennen kuin tulkintaohjeita niille voidaan antaa

Kiitokset

- Veli-Matti Pietarinen
- Ulla Lignell
- Anne Hyvärinen
- Päivi Kärkkäinen
- Aino Nevalainen
- Eeva Kauhanen
- Heli Martikainen

- Viite:

Pietarinen V-M, H. Rintala, A. Hyvärinen, U. Lignell, P. Kärkkäinen and A. Nevalainen. 2008. Quantitative PCR of fungi and bacteria in building materials and comparison to culture-based analysis. Journal of Environmental Monitoring. Hyväksytty julkaistavaksi.