



# **BIOPÖLYSPESIFISTEN IGM-VASTA-AINEIDEN VIITEARVOJEN MÄÄRITTÄMINEN OSANA IH-HOUSE ELISA-MENETELMÄN VALIDOINTIA**

**Opinnäytetyö**

**Riikka Haapalahti  
Helena Korhonen**

**Bioanalytiikan koulutusohjelma**

Hyväksytty \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . \_\_\_\_ \_\_\_\_\_

# SAVONIA- AMMATTIKORKEAKOULU

Terveysala, Kuopio

## OPINNÄYTETYÖ

### Tiivistelmä

Koulutusohjelma: Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Suuntautumisvaihtoehto:	
Työn tekijä(t): Haapalahti Riikka, Korhonen Helena	
Työn nimi: Biopölyspesifisten IgM-vasta-aineiden viitearvojen määrittäminen osana In-House ELISA -menetelmän validointia	
Päiväys: 9.12.2009	Sivumäärä / liitteet: 59/7
Ohjaajat: Yliopettaja Sirkka-Liisa Halimaa	
Työyksikkö / projekti: Työterveyslaitos, Kuopion aluetoimipiste	
Ohjaajat: tutkija Sirpa Pennanen, laborantti Mari Haapakoski	
<p>Kosteusvauriot ovat poikkeuksellisen yleisiä Suomessa. Syynä ovat rakentamisessa tehdyt virheet, väärät materiaalivalinnat ja riittämättömät huoltotoimenpiteet. Homevaurio muodostuu, jos kosteusvauriota ei huomata ajoissa ja siihen ei puututa. Kosteus- ja homevauriot saattavat aiheuttaa tiloissa oleskelevalle ihmiselle terveyshaitan. Tavallisia oireita ja sairauksia ovat erilaiset ihon ja limakalvojen ärsytysoireet, hengitystieinfektiot sekä allergiat.</p> <p>Elimistö puolustautuu vieraita aineita ja organismeja vastaan muodostamalla vasta-aineita, jotka sitoutuvat vierasaineeseen (antigeeniin) ja suojaavat elimistöä sen haittavaikutuksilta. Immunologisia analyysimenetelmiä on kehitetty, koska on tärkeää pystyä selvittämään, miten elimistö on reagoinut erilaisia häiriötekijöitä vastaan tai miksi se ei ole reagoinut johonkin häiriötekijään. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) on yleisesti käytetty menetelmä vasta-ainemäärityksissä. Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipiste määrittää biopölyspesifisiä IgG- ja IgE-vasta-aineita In-House ELISA-menetelmällä ja se on aloittanut menetelmän validoinnin IgM-vasta-ainemäärityksiä varten.</p> <p>Tämä opinnäytetyö oli osa Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipisteen aloittamaa In-House ELISA-menetelmän validointia mikrobispesifisten IgM-vasta-aineiden määrittämisessä. Opinnäytetyön tarkoituksena oli määrittää viitearvot IgM-vasta-aineille. Tutkimuksen aineistona oli 200 seeruminäytettä, jotka Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos (THL) on kerännyt Kuopion alueelta. Henkilöt, joilta näytteet ovat peräisin, ovat työikäistä väestöä (25–64-vuotiaita). Tutkimuksessa määritettiin IgM-vasta-ainepitoisuudet kahdeksalle määrän ympäristön mikrobille (6-paneeli) 100:sta seeruminäytteestä ja kahdeksalle kosteusvauriomikrobille (7-paneeli) 100:sta seeruminäytteestä. Viitearvot laskettiin siten, että 90 % terveistä henkilöistä jää 90 % persenttiilin raja-arvon alapuolelle. Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipiste voi verrata tutkittavan potilaan tuloksia viitearvoihin ja arvioida tulosten luotettavuutta.</p>	
Avainsanat: (1-5) biopöly, vasta-aine, kosteusvauriomikrobi, ELISA-menetelmä, viitearvo	
Julkinen <input checked="" type="checkbox"/>	Salainen <input type="checkbox"/>

# SAVONIA UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

## Health Professions Kuopio

### THESIS

#### Abstract

Degree Programme: Biomedical laboratory science

Option:

Authors: Haapalahti Riikka, Korhonen Helena

Title of Thesis: In-House ELISA assay for microbespecific IgM antibodies, determination of reference values

Date: 9.12.2009

Pages / appendices: 59/7

Supervisor: Principal Lecturer Sirkka-Liisa Halimaa

Contact persons: Institute of Occupational Health, Kuopio Regional Office  
Researcher Sirpa Pennanen, Laborant Mari Haapakoski

Moisture damages are unusually common in Finland. There are many reasons for that: mistakes made during construction, false material choices and inadequate maintenance operations. Mold damages will be formed if the moisture damage is not detected and it is not repaired. Exposure to moisture and mold damages may cause health effects. Respiratory infections, nose and throat irritation, skin irritation and allergic reactions are most common symptoms and illnesses that microbes cause.

The human body is exposed to billions of foreign bodies or antigens each and every day. If an antigen enters the body, the body produces antibodies against it. Antibodies bind to antigens and this prevents the antigen doing any harm. It is important to know how the body has reacted against some distraction or why it has not reacted at all. That is why immunological methods have been developed. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) is a common method in detection for human antibodies. Institute of Occupational Health, Kuopio Regional Office determine IgG and IgE antibodies with ELISA method and has started the process of validation the method for IgM antibodies.

The aim of this study was to participate in the project of Institute of Occupational Health Kuopio Regional Institute to validate the method for IgM antibodies and determine reference values for IgM antibodies. The material, 200 human serum samples were collected by National Institute for Health and Welfare. People were 24–64 years old living in Kuopio. In this study the IgM antibody levels for eight wet environment microbes (6-panel) in 100 serum samples and eight moisture damage microbes (7 panel) in 100 serum samples were determined. The reference values were calculated so that 90 % of healthy individuals is 90 % percentile to below the threshold. The Institute of Occupational Health, Kuopio Regional Office may compare the values of patient to these reference values.

Keywords: (1-5) antibody, moisture damage microbe, ELISA, reference value

Public \_X\_

Secure \_

# SISÄLTÖ

JOHDANTO .....	6
2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN VIITEKEHYS .....	9
2.1 Kosteusvaurioiden syntyminen .....	9
2.2 Mikrobit ja niiden kasvun edellytykset .....	10
2.3 Kosteusvaurio- ja märän ympäristön mikrobit.....	12
2.4 Kosteusvauriomikrobien vaikutukset terveyteen .....	16
2.5 Vasta-ainevälitteinen immunitaetti .....	18
2.6 Immunokemialliset menetelmät .....	22
2.7 Menetelmän validointi .....	25
2.8 Viitearvot ja niiden määrittäminen .....	26
2.9 Tilastolliset tunnusluvut viitearvoja määriteltäessä .....	27
3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS .....	29
4 TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN .....	29
4.1 Tutkimusmenetelmä ja tutkimusaineisto .....	29
4.2 Kuvaus vasta-ainemäärityksiä edeltävistä työvaiheista .....	30
4.2.1 Puhdaskantojen viljely .....	30
4.2.2 Antigeenin valmistus.....	31
4.2.3 Antigeenin titraus .....	32
4.2.4 Antigeenin kiinnitys kuoppalevyille .....	33
4.2.5 Standardilevyn valmistaminen .....	33
4.3 IgM-vasta-ainemääritysten suorittaminen.....	34
4.3.1 Standardilaimennossarjan tekeminen.....	34
4.3.2 Näytteiden pipetointi antigeenilevyille .....	35
4.3.3 Konjugaatin lisäys.....	35
4.3.4 Substraatin lisäys.....	36
4.3.5 Pitoisuuden mittaaminen .....	36
4.3.6 Viitearvojen määrittäminen.....	36
5 TUTKIMUKSEN TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU .....	37
6 TUTKIMUKSEN LUOTETTAVUUS .....	39
7 TUTKIMUKSEN EETTISYYS .....	41
8 POHDINTA .....	42
LÄHTEET .....	45

## LIITTEET

LIITE 1. Immunokemialliset menetelmät.

LIITE 2. Antigeenilaimennokset ja pipetointikaavio

LIITE 3. Uuden antigeenierän laimennokset

LIITE 4. Laimennossuhteen tarkistaminen.

LIITE 5. Standardilaimennossarja.

LIITE 6. Kontrollit.

LIITE 7. Viitearvojen vertailutaulukko.

## JOHDANTO

Kosteus- ja homevauriot ovat poikkeuksellisen yleisiä Suomessa. Syynä ovat rakentamisessa tehdyt virheet, väärät materiaalivalinnat sekä tilojen käyttäjien laiminlyönnit. Homevaurio muodostuu, jos rakenteita ei kuivateta kosteusvaurion jälkeen. Joskus homevaurio aiheuttaa tiloissa oleskeleville homepölyaltistumisen ja siihen liittyviä oireita ja sairauksia. Useimmiten nämä johtuvat altistumisesta mikrobeille ja niiden aineenvaihduntatuotteille. (Reijula 2001, 27.) Tavallisia oireita ja sairauksia ovat erilaiset ihon ja limakalvojen ärsytysoireet, hengitystieinfektiot sekä allergiat (Husman 2002, 10–12).

Elimistön kykyä puolustautua vieraita aineita vastaan kutsutaan immuunipuolustukseksi. Se suojelee kehoamme organismien ja vieraiden aineiden hyökkäyksiltä. Vierasaineita ja mikro-organismeja, jotka herättävät elimistön immuunipuolustuksen, kutsutaan antigeeneiksi. (Ericson & Ericson 1992, 108.) Tärkeä osa puolustusjärjestelmää ovat vasta-aineet eli immunoglobuliinit (Ig), joiden tehtävänä on kiinnittyä antigeeneihin ja suojata elimistöä niiden haittavaikutuksilta (Seppälä 1996b, 5). Vasta-aineiden määrittämiseksi on kehitetty immunologisia analyysimenetelmiä, koska on tärkeää pystyä selvittämään yksilötasolla, miten elimistö on reagoanut erilaisia häiriötekijöitä vastaan. Toisaalta on myös pitänyt selvittää, miksi elimistö ei ole reagoanut johonkin häiriötekijään. (Seppälä 1996a, 113.)

Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipiste tekee vasta-ainemääryksiä mären ympäristön mikrobeille ja kosteusvauriomikrobeille sekä muille biologisille altisteille. Määryksissä Työterveyslaitos käyttää kehittämäänsä In-House ELISA-menetelmää. Mittaamalla spesifisen vasta-aineen pitoisuutta seerumissa voidaan selvittää altistumista kyseiselle mikrobille. Vasta-aineiden löytyminen seerumista kertoo elimistön normaalista immuunivasteesta, mutta suurentuneet pitoisuudet viittaavat voimakkaaseen altistumiseen.

Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipiste on tehnyt tähän mennessä määriytyksiä IgG- ja IgE-vasta-aineille. Koska tarvetta oli myös IgM-vasta-ainemääriytyksille, Työterveyslaitos aloitti vuonna 2007 menetelmän validoinnin myös niiden määriytystä varten. Tämä opinnäytetyö on osa projektia. Opinnäytetyön tarkoituksena on osallistua validointiin määrittämällä viitearvot biopölyspesifisille IgM-vasta-aineille. IgM-vasta-aineita esiintyy runsaasti infektion alkuvaiheessa (Laatikainen 2004, 389). Niitä mittaamalla voidaan siis selvittää, onko altistuminen tapahtunut lähiaikoina. Tämän perusteella voidaan myös päätellä, missä henkilö on altistunut.

Viitevälillä tarkoitetaan aluetta, jossa terveiden henkilöiden arvot yleensä ovat. Viitearvojen määrittäminen on tärkeää, jotta voidaan erottaa sairast henkilöt terveistä. (Penttilä 2004, 18.) Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipiste määrittää viitearvot laskemalla mikrobeille raja-arvon, jonka alapuolelle jää 90 % terveistä henkilöistä.

Tässä tutkimuksessa käytettäviä käsitteitä:

vasta-aine	Elimistön puolustusjärjestelmään osallistuvia proteiineja, jotka tunnistavat antigeenejä ja tarttuvat niihin.
biopölyspesifinen vasta-aine	Elimistön tuottama spesifinen vasta-aine, esimerkiksi tiettyä kosteusvauriomikrobia vastaan.
antigeeni	Vierasaine, joka tunkeutuessaan elimistöön aiheuttaa elimistössä immuunivasteen.
primaarivaste	Antigeeni joutuu elimistöön ensimmäisen kerran.
sekundaarivaste	Antigeeni joutuu elimistöön toisen kerran, jolloin se on tuttu puolustusjärjestelmälle.
viitearvo	Ne raja-arvot, joiden välille yksilöiden arvot normaalisti sijoittuvat.
validointi	Jonkin menetelmän tai laitteen soveltuvuus ja kelpoisuus osoitetaan validoinnin avulla.
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay on menetelmä, jolla kiinteään faasiin kiinnitetyn antigeenin tai vasta-aineen avulla voidaan osoittaa siihen sitoutuvan vasta-aineen tai antigeenin pitoisuus.
konjugaatti	anti-ihmis-Ig-vasta-aine, kaksoisvasta-aine
substraatti	entsyymiin sitoutuva aine
reagenssi	aine, joka kemiallisessa reaktiossa muodostaa lopputuotteen tai osan siitä
inkubointi	hauduttaminen tasalämmössä reaktion aikaansaamiseksi
nolla-näyte	Määrittäksessä mukana oleva liuos, joka ei sisällä tutkittavaa komponenttia.
standardiliuos	vertailuliuos näytteiden analysoinnissa
sentrifugointi	partikkeleiden erottaminen toisistaan pyörittämällä suurella nopeudella
In-House	jonkin organisaation/yrityksen sisäiseen käyttöön kehitetty
THG-agar	Tryptoni-hiivauute-glukoosiagar
M2-agar	2 % mallasuuteagar, yleisagar
PBS-puskuri	Phosphate Buffer Saline, fosfaattipuskuroitu suolaliuos
FBS-puskuri	Foetal Bovine Serume, syntymättömän naudan seerumi
Tween 20	Pesuliuos

## 2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN VIITEKEHYS

### 2.1 Kosteusvaurioiden syntyminen

Kosteus- ja homevauriot ovat yleisin vaurio rakennuksissa ja niitä on runsaasti sekä pientaloissa että kerrostaloissa. Myös julkisissa rakennuksissa kosteusvauriot ovat tavallisia ja ne aiheuttavat yhteiskunnalle huomattavia kustannuksia. Kosteusvauriot olisi tärkeää huomata ajoissa, sillä ne lyhentävät rakenteiden käyttöaika ja aiheuttavat home- ja mikrobikasvua, joka muodostaa ihmiselle terveyshaitan. (Malmivaara 2002, 43–47.)

Useimmiten kosteus- ja homeongelmien syyt ovat seurausta rakennusvaiheessa tehdyistä virheistä. Esimerkiksi puutteellinen salaojitus ja pintavesien ohjaus, liitosten ja saumojen vuodot, vesikattovuodot ja tuuletuksen puute alapohjissa ovat yleisiä syitä kosteusvaurioihin. (Malmivaara 2002, 43–47.) Merkittävä tekijä on myös riittämätön ilmastointi. Menneinä vuosina rakennuksiin kohdistuvien energiansäästötoimien vuoksi rakennuksista tehtiin tiiviitä, mutta ilmastointitekniikkaan ei kiinnitetty tarpeeksi huomiota. Myös riittämättömät huoltotoimenpiteet etenkin lamavuosina ovat johtaneet kosteus- ja homevaurioista aiheutuvaan ongelmaan. (Seuri & Reiman 1996, 8–11.) Homevaurio alkaa yleensä kodin kosteista tiloista ja se huomataan yleensä ensimmäiseksi epämiellyttävänä hajuna. Homeongelman korjaaminen ja torjuminen voi olla hyvin vaikeaa. (Haahtela, Nordman & Talikka 1993, 44.)

Kosteusvaurioiden esiintymistä suomalaisissa koulurakennuksissa on tutkittu muun muassa Kansanterveyslaitoksen nykyisin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen, Teknillisen korkeakoulun ja Kuntaliiton tekemissä tutkimuksissa. Kansanterveyslaitoksen tekemässä koulujen kosteusvaurioselvityksessä oli mukana 41 itäsuomalaista koulurakennusta. Kosteus- ja homevauriot ovat yleisiä koulurakennuksissa, sillä jopa 70 %:ssa kouluista havaittiin vaurioita. Näkyvää hometta todettiin yli puolessa rakennuksista ja homeen hajua joka neljännessä rakennuksessa. (Koivisto, Haverinen, Meklin, Halla-aho & Nevalainen 2002, 173–

177.) Kansanterveyslaitoksen selvityksen mukaan yleisin kosteusvaurion syntymisen syy oli materiaalien tekninen vanheneminen, kuten ruostuminen tai mekaaninen murtuminen. Muita syitä olivat rakennuksen ulkopuolelta tuleva kosteus, kuten ulkoilman kosteus, sadevedet ja kapillaarinen kosteus sekä putki- tai viemäriauriot. (Meklin ym. 2007, 7.)

## 2.2 Mikrobit ja niiden kasvun edellytykset

Mikrobit ovat pieneliöitä ja niihin kuuluvat virukset, bakteerit, homesienet, hiivat ja muut pieneliöt. Mikrobeja on kaikkialla luonnossa ja ympäristössä, sekä sisä- että ulkoilmassa. Yleensä nämä ympäristön mikrobit eivät aiheuta haittaa ihmiselle. (Kalso, Vahanen, Puhakka & Viitanen 1996, 73.) Myös ihmisen iholla, limakalvoilla ja suolistossa elää kullekin alueelle tyypillinen, suhteellisen vakaa mikrobikasvusto, niin sanottua normaalifloora (Vaara 1996, 206). Mikrobit vaativat kasvaakseen ja lisääntyäkseen sopivan määrän ravintoa, kosteutta, lämpöä, happea ja happamuutta (Kalso ym. 1996, 81).

Sieniä tunnetaan noin 250 000 lajia. Ne ovat eukaryootteja ja heterotrofisia eli toisenvaraisia. Useimpia sieniä tavataan maaperässä ja mätänevässä kasvimateriaalissa. Sienet vaativat kasvaakseen happea. Sienet jaetaan hiivoihin, rihmasieniin (dermatofyytit ja homeet) sekä dimorfisiin sieniin, jotka voivat esiintyä sekä hiivamuodossa että rihmamuodossa. (Silvennoinen-Kassinen 1996, 440.) Sienet kestävät hyvin kuivuutta ja kuumuutta. Ne pystyvät hajottamaan monia materiaaleja esimerkiksi puuta, paperia ja maalia. (Kalso ym. 1996, 75.)

Homeet kasvavat rihmastoina. Homesieniä esiintyy maaperässä ja lahoavassa kasvimateriaalissa. Ihmisille homesieni-itiöt ja niiden tuottamat myrkylliset yhdisteet voivat aiheuttaa terveyshaittoja. Myrkyllisiä yhdisteitä eli mykotoksiineja tuottavia homeita on muun muassa *Stachybotrys*-, *Aspergillus*-, *Fusarium*- ja *Penicillium* -suvuissa. (Kalso ym. 1996, 75.) Dermatofyytit tunnustetaan niiden muodostamien kuroumien, mikro- ja makrokonidioiden perusteella. Mikrokonidiot ovat yksisoluisia ja makrokonidiot isoja, väliseinäisiä, ohut- tai paksuseinäisiä. (Silvennoinen-Kassinen 1996, 446.)

Hiivasienet esiintyvät pääasiassa yksittäisinä soluina. Ne ovat kooltaan selvästi suurempia kuin bakteerit. Ne lisääntyvät aseksuaalisesti silmikoimalla, jolloin syntyy blastosporeja. Blastosporit kiinnittyvät toisiinsa peräkkäin, jolloin muodostuu pseudorihmaa. Jotkut lajit muodostavat myös todellista sienirihmaa. Jotkut hiivalajit voivat myös muodostaa itiöitä (klamydosporeja ja artrosporeja) ja lisääntyä niiden avulla. (Silvennoinen-Kassinen 1996, 442.)

Bakteerit ovat prokaryootteja eli niillä ei ole tumaa. Bakteerit ovat yksisoluisia, pieniä, keskimäärin noin yhden mikrometrin läpimittaisia. Muodoltaan ne voivat olla hyvin erilaisia. Prokaryootit jaetaan eubakteeri- ja arkkibakteerilinjoihin. (Vaara, Sarvas & Mäkelä 1996, 233.) Rakenteeltaan bakteerit ovat yksinkertaisempia kuin sienet. Ne lisääntyvät jakautumalla kahtia. Sädesienet eli aktinomykeetit kuuluvat bakteereihin. Sädesieni kasvaa sienten tapaan, mutta rihmat ovat homesienirihmastoon verrattuna hennompiä. (Kalso ym. 1996, 81.) Aktinomykeetit ovat grampositiivisia bakteereja, mutta ne muodostavat rihmoja ja itiöitä kuten sienet ja leviävät itiöiden avulla. (Tirri, Lehtonen, Lemmetyinen, Pihakaski & Portin 2001.) Tavallisin kosteusvaurioissa esiintyvä sädesieni on *Streptomyces* (Kalso ym. 1996, 81).

Kosteus on tärkeä edellytys mikrobikasvun syntymiseen, joten kosteusvauriorakennuksessa olosuhteet mikrobien kasvulle ovat ihanteelliset. Mikrobikasvun alkamiseen tarvitaan joko itiöitä tai pieni määrä vanhaa kasvustoa. Sisätiloihin tulevat itiöt eivät kykene aiheuttamaan homekasvua rakennuksissa, joiden suhteellinen kosteus on alhainen. (Kalso ym. 1996, 82–83.) Suhteellisen kosteuden on oltava vähintään 85 %, jotta kosteusvauriomikrobit kykenevät kasvamaan (Seuri & Reiman 1996, 20).

Rakennusmateriaalin ominaisuudet vaikuttavat siihen, mitä mikrobia pinnalla kasvaa. Eri lajit viihtyvät erilaisilla materiaaleilla. Esimerkiksi *Stachybotrus*-sieni viihtyy kipsilevyllä ja *Acremonium* ja aktinomykeetit keraamisilla pinnoilla. Puun pinnalla voivat sen sijaan kasvaa useat lajit. Materiaali vaikuttaa osaltaan mikrobin ominaisuuksiin kuten toksisuuteen. (Nevalainen, Husman & Hirvonen 2004.) Kosteusvauriomikrobeilla on vähäiset ravintovaatimukset. Joillekin kosteusvauriomikrobeille riittää ravinnoksi ilmassa oleva huonepöly. (Seuri & Reiman 1996, 20.)

Useimmat sienet ja bakteerit kasvavat +1 – +15 °C lämpötilassa. Lämpöoloilla ei voida hallita rakennusten homekasvua, koska kaikki mikrobit kykenevät lisääntymään myös optimilämpötilansa ulkopuolella. (Kalso ym. 1996, 83.)

### 2.3 Kosteusvaurio- ja märän ympäristön mikrobit

Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipiste määrittää vasta-aineita kosteusvaurio- ja märän ympäristön mikrobeille sekä muille biologisille altisteille. Kosteusvaurio- ja märän ympäristön mikrobien määrittämisessä käytetään kahta eri paneelia, jotka molemmat sisältävät 8 eri mikrobia. Tutkittavat mikrobit ovat tyypillisimpiä mikrobeja, joita on löydetty kosteusvaurioituneista kohteista ja niiden on todettu aiheuttavan oireilua. Mikrobit on lueteltu taulukossa 1.

Taulukko 1. Märän ympäristön mikrobit ja kosteusvauriomikrobit

Märän ympäristön mikrobit (6-paneeli)	Kosteusvauriomikrobit (7-paneeli)
▪ <i>Acinetobacter sp.</i>	▪ <i>Aspergillus versicolor</i>
▪ <i>Acremonium atrogriseum</i>	▪ <i>Chaetomium globosum</i>
▪ <i>Acremonium kiliense</i>	▪ <i>Fusarium merismoides</i>
▪ <i>Bacillus cereus</i>	▪ <i>Stachybotrys chartarum</i>
▪ <i>Exophiala sp.</i>	▪ <i>Streptomyces albus</i>
▪ <i>Phialophora olivacea</i>	▪ <i>Streptomyces halstedii</i>
▪ <i>Rhodotorula glutinis</i>	▪ <i>Trichoderma citrinoviride</i>
▪ <i>Sporidiobolus johnsonii</i>	▪ <i>Tritirachium oryzae</i>

*Acinetobacter* on ihon normaaliflooraan kuuluva sekä maaperässä ja vesistöissä elävä bakteerikanta (Työterveyskirjasto 2009). Kantaan kuuluvat bakteerit ovat liikkumattomia gramnegatiivisia sauvabakteereja (Renkonen 1996, 398). Akinetobakteerit ovat anaerobibakteereja ja ne fermentoivat eli käyttävät orgaanisia yhdisteitä energian saamiseksi (Towner 1996, 3–4). Akinetobakteerit voivat aiheuttaa sairaalainfektioita vastustuskyvyltään heikoille ihmisille (Työterveyskirjasto 2009).

***Acremonium-lajit.*** Ympäristömikrobiologian laboratorion kokoaman aineiston mukaan *Acremoniumit* ovat toksiinintuottajamikrobeja kosteusvauriorakennuksissa. Mykotoksiinit ovat sienten tuottamia myrkyllisiä aineenvaihduntatuotteita. Mykotoksiineja voi syntyä, kun lämpötila ja kosteus ovat lähellä kunkin lajin optimaalisia kasvuolosuhteita. Myös kasvualusta, happi ja hiilidioksidi vaikuttavat toksiinin tuotantoon. Mykotoksiinia esiintyy itiöissä, rihmastossa tai kasvualustalla. Näin ollen altistuminen itiöille, rihmastonkappaleille tai muille rakennusmateriaalin homekasvustosta irronneille hiukkasille on terveystarve. Tavallisimmin kuvattuja terveyshaittoja ovat iho- ja hengitystieoireet sekä yleisoireet. (Sisäilmayhdistys 2008.)

***Aspergillus versicolor*** on maaperän mikrobi, mutta sitä tavataan myös sisätiloissa. Se kasvaa hyvin kosteissa paikoissa, esimerkiksi kosteilla seinillä. (Ferrala 1999.) *Aspergillus versicolor* tuottaa homesienimyrkkyjä eli mykotoksiineja ja aiheuttaa sairauksia (Haahtela & Reijula 2009). *Aspergillus versicolor* tuottaa seuraavia toksiineja: sterigmatokystiiniä, versicoloriinia, aspercoloriinia, averifiinia ja syklopiazonihappoa (Putus 2006a). *Aspergillus versicolor* on sopeutuvainen ja pystyy elämään ja kasvamaan ympäristössä, jossa vesipitoisuus on alhainen ja lämpötila melko matala. Lisäksi se kestää happamia ja emäksisiä ympäristöjä. (Ranta 2004, 4.)

***Bacillus cereus*** on grampositiivinen sauvabakteeri, jota esiintyy maaperässä, vesistöissä ja kasveissa. Se on luonnossa ja elintarvikkeiden raaka-aineissa hyvin yleinen bakteeri. *Bacillus cereus* tuottaa pastöroinnin ja keittämisen kestäviä itiöitä sekä jopa höyryautoklavoinnin kestävästä toksiinista, kereulidista. (Jääskeläinen 2008.)

***Chaetomium globosum*** on kotelosieni ja sitä esiintyy maaperässä, ilmassa, kasvien jäännöksissä, linnuissa sekä sisätiloissa esimerkiksi kylpyhuoneissa (Steinman 2006). *Chaetomium globosum* on hyvin märässä viihtyvä sekundaari- ja tertiäärivaiheen kosteusvauriomikrobi, ja se kuuluu niin sanotusti indikaattorimikrobeihin eli se viittaa aina mahdolliseen kosteusvaurioon. *Chaetomium globosum* voi allergisoida. Yleisemmin haittavaikutukset välittyvät toksisen vaikutuksen kautta. Mikrobi tuottaa esimerkiksi chaetoglobosiini-nimistä toksiinia. Suomessa *Chaetomiumia globosumia* on löydetty monista kohteista, joissa oleskelevilla on ollut tavallista enemmän autoimmuunisairauksia. (Putus 2006a.)

***Exophiala sp.*** *Exophiala*-suku sisältää useita lajeja. Ne aiheuttavat useita erilaisia infektioita ihmisille, esimerkiksi iho-ongelmia. *Exophiala*-hiivaa kutsutaan mustaksi hiivaksi, koska kasvu maljalla on ruskeaa tai mustaa. Se kasvaa puupinnassa ja maaperässä ja vaatii kasvaakseen runsaasti kosteutta (The University of Adelaide 2008; Reijula 2009).

***Fusarium-lajit*** ovat märässä viihtyviä, heinässä, oljessa ja viljassa kasvavia homeita. *Fusarium*-homeet voivat allergisoida ja ne tuottavat usein toksineja. Toksiineista ainakin zearalenoni ja fumonisiini ovat syöpää aiheuttavia. Fumonisiini aiheuttaa muun muassa ruokatorven syöpää. *Fusarium*-homeen tuottamia toksineja ovat lisäksi trikotekeeni, T-2 toksiini ja DAS. Toksiinit vaurioittavat myös hermokudosta. *Fusarium*-home on *Stachybotryksen* ohella ainoa mikrobi, jolla vaurioituneiden rakenteiden purkutyössä Sosiaali- ja terveysministeriö suosittelee asbestipurkutekniikan käyttöä työntekijöiden ja ympäristön suojelemiseksi, sekä irtaimiston mikrobikontaminaation estämiseksi. (Putus 2006a.)

***Phialophora olivacea*** on runsaasti kosteutta kasvaakseen vaativa home (Reijula 2009). Pesäke on laajentunutta, pumpulimaista ja lähes mustaa (De Hoog, Guarro, Tan, Wintermans & Gene 1995, 187). *Phialophora olivacean* esiintyminen viittaa kosteusvaurioihin ja se on yleinen maaperässä, lahoavassa puumateriaalissa, ilmakostuttimissa ja vesijärjestelmissä. *Phialophora olivacea* voi aiheuttaa allergiaa. (Työterveyslaitos, Kuopion aluetoimipiste 2009.)

***Rhodotorula glutinis*** -hiiva esiintyy hyvin kosteassa ja märässä ympäristössä. Se kasvaa kylpyhuoneiden laattasaumoissa ja muovimatoissa sekä tapeteissa ja lattiakaivoissa. (Putus 2006b.) *Rhodotorula*-lajit muodostavat punaisia pesäkkeitä, joten kasvustot voi havaita värinsä perusteella helposti kosteissa tiloissa (Silvennoinen-Kassinen 1996, 444; Kalso ym. 1996, 76).

***Sporidiobolus johnsonii*** -hiiva vaatii kosteutta kasvaakseen ja lisääntyäkseen. Se kasvaa ilmanvaihto- tai kosteusjärjestelmissä ja on allergisoiva. (Työterveyslaitos, Kuopion aluetoimipiste 2009.) *Sporidiobolus johnsonii* -hiivan pesäkkeen väri on lohenpunainen (De Hoog ym. 1995, 214).

***Stachybotrys chartarum***. *Stachybotrys*-homeet viihtyvät hyvin märässä ympäristössä. *Stachybotrys*-homeen itiöt ovat suurikokoisia ja usein liman peittämiä, joten niitä todetaan äärimmäisen harvoin ilmanäytteissä. Se on hidaskasvuinen ja jää runsaassa kasvustossa maljalla helposti muiden alle. *Stachybotrys chartarum* on selluloosaa hajottava ja se kasvaa harmaana tai mustana kasvuna tapetin ja kipsilevyn pinnalla sekä muissa paperipitoisissa materiaaleissa. (Putus 2006a; Sisäilmayhdistys 2008.) *Stachybotrys*-home voi allergisoida, mutta terveyshaittoja aiheuttavat yleensä toksiinit, esimerkiksi satratoksiini H, roridiini E, sporidesmiini G, trikoverriini sekä verrukaroli. *Stachybotrys*-homeen toksiinit haittaavat solunjakautumista, estävät proteiinisynteesiä ja vaikuttavat veren hyytymistä estävästi. (Putus 2006a.)

***Streptomyces albus* ja *Streptomyces halstedii***. *Streptomyces*-suvun bakteerit ovat maaperän bakteereja, mutta niitä esiintyy myös rehuissa, sedimenteissä, kosteusvauriorakennuksissa ja vesiympäristöissä. Suurina pitoisuuksina niiden on todettu aiheuttavan hengityselinsairauksia. (Rintala 2004.) *Streptomyces*-suvun sädesienet ovat yleisimmin kosteusvaurion yhteydessä todettavia aktinobakteereita. Ne kasvavat hitaammin kuin homeet ja hiivat. Siksi niiden viljely kestää 10–14 vrk. *Streptomyces*-bakteerit ovat allergisoivia ja ne voivat tuottaa terveydelle erittäin haitallisia toksiineja. Sädesienet voivat alkaa kasvaa limakalvoilla ja kudoksissa muodostaen kovan, tuumorimaisen kasvuston. Kokeellisissa tutkimuksissa on havaittu, että *Streptomyces*-bakteerit ja tietyt homeet ovat yhteisvaikutukseltaan haitallisempia kuin kummankaan mikrobin osavaikutusten summa olisi eli niillä on synergistisiä vaikutuksia. Sädesienet voivat kasvaa myös hyvin äärimmäisissä pH-olosuhteissa, jopa pH 10:ssä, jossa muut mikrobit eivät enää kasva. Koska ne ovat myös kuivuutta kestäviä, ne voivat kasvaa hiukan kostean betonin pinnalla. (Putus 2006c.)

***Trichoderma citrinoviride*** on rihmamainen sieni, joka on yleinen maaperässä, kasvillisuudessa ja puussa sekä paperissa ja pahvissa. Sen esiintyminen sisäilmassa kertoo rakennuksen kosteusvauriosta. *Trichoderma citrinoviride* tuottaa mykotoksiinia ja voi aiheuttaa infektiota ihmisillä sekä heikentää immuunijärjestelmää. *Trichoderma*-homesienen kasvusto on rakeinen ja leviävä. Väri voi vaihdella valkeasta kirkkaanvihreään. (Doctor fungus 2007; Kalso & Koukila-Kähkölä 1996, 164.)

*Tritirachium oryzae*. *Tritirachium*-laji kuuluu sieniin. Sitä esiintyy maaperässä ja kasvillisuudessa. Sen ei tiedetä aiheuttavan allergiaoireita, eikä sen tiedetä tuottava myrkyllisiä aineenvaihduntatuotteita. (EMLab 2008.)

#### 2.4 Kosteusvauriomikrobien vaikutukset terveyteen

Kosteus- ja homevaurioiden aiheuttamia terveyshaittoja on tutkittu viime vuosina paljon. Puolijoki (2001) kirjoittaa Suomessa tehdystä laajasta tutkimuksesta, jossa selvitettiin kodin kosteusvaurion yhteyttä allergiaoireisiin ja infektioherkkyyteen 18–25-vuotiailla nuorilla. Postikyselyn kohderyhmänä oli 14 212 ihmistä, joista vastasi 75 %. Tutkimuksessa todettiin, että kosteusvaurio ylläpitää useita allergia- ja astmaoireita, atooppista ihottumaa sekä altistaa todennäköisesti flunssalle. Kosteusvauriokodissa asuvilla esimerkiksi flunssat ovat yli neljä kertaa tavallisempia kuin muilla.

Koululaisille tehdyn tutkimuksen mukaan ihotestein todettu homeallergia on harvinaista. Suurin osa homeille positiivisista ihotestireaktioista esiintyi nuorilla, joilla oli positiivisia ihotestireaktioita myös eläin- ja siitepölyille. Merkittävää yhteyttä positiivisten home-spesifisten ihotestireaktioiden ja homealtistuksen tai astman välillä ei todettu. Keuhkojen toimintakokeissa ei havaittu eroa eri koulujen eikä siten myöskään eri homealtistusryhmien välillä. Keuhkojen toimintakoetuloksilla ei myöskään ollut yhteyttä ihotesteillä todettuun homeallergiaan tai homespesifisiin IgG-vasteisiin. Alustavaa näyttöä saatiin siitä, että keuhkojen ylireaktiivisuus on yhteydessä lisääntyneeseen homealtistukseen. (Immonen 2002.)

Bornehag:n ym. (2005, 3–4) tekemässä tutkimuksessa selvitettiin kosteusvauriorakennuksien aiheuttamia terveysvaikutuksia ruotsalaisten 1–6-vuotiaiden lasten keskuudessa. Tutkimuksessa todetaan, että rakennuksen kosteus on yhteydessä hengitystieoireisiin ja kosteusvauriot lisäävät riskiä sairastua astmaan ja allergisiin sairauksiin. Myös Hägerhed-Engmanin ym. (2009) tutkimuksessa todetaan, että home ympäristössä altistaa allergiaoireille ja astmalle. Haahtela (2007, 380) puolestaan toteaa, että homesienet aiheuttavat allergista herkistymistä harvoin. Homesienten itiöt ja bakteerit kuuluvat luonnolliseen elinympäristöön ja niitä on

kaikkialla, mutta jos rakennuksessa on kosteusvaurio, tietyt homesienet ja bakteerit käyttävät tilaisuutta hyväkseen ja lisääntyvät. Niiden tehtävä on hajottaa kosteuden vaurioittama materiaali. Tiloissa oleskeleva ihminen saattaa altistua sellaisille homesienille, joita ei ole terveen rakennuksen materiaaleissa tai sisäilmassa.

Kosteusvauriorakennuksista johtuvien terveyshaittojen aiheuttajia ei tarkalleen tunneta. Altistus arvioidaan pääasiassa rakennuksen kosteus- ja homevaurioiden perusteella. Oirekuvat ja sairaudet vaihtelevat paljon eri kohteissa. (Nevalainen 2002, 2.) Ei ole olemassa "hometalotautia". Mahdollisia terveysvaikutuksien aiheuttajia on monia: sienet, bakteerit, niiden toksiinit ja allergeenit, rakennusmateriaalien hajoamistuotteet, mikrobi- ja rakenneperäiset haihtuvat orgaaniset yhdisteet ja muu vaurioon kertyvä kasvusto, kuten punkit. Altistumisen arviointia vaikeuttaa myös se, että kosteusvaurioissa on kyseessä elävä ja muuttuva altistumista aiheuttava tekijä. Mikrobikasvuston muuttuessa muuttuvat myös sisäilmaan pääsevät haitalliset tekijät. (Seuri, Nevalainen & Sauni 2007.)

Mikrobit tuottavat kasvaessaan aineenvaihduntatuotteita, esimerkiksi haihtuvia orgaanisia yhdisteitä, jotka saattavat ärsyttää limakalvoja. Mikrobit muodostavat myös ei-haihtuvia yhdisteitä, joista monet ovat toksineja eli myrkyllisiä yhdisteitä. Ne voivat joutua sisäilmaan kasvustosta irtoavien hiukkasten mukana. (Meklin ym. 2007.) Hiukkaspäästöjä ovat esimerkiksi homesienten ja bakteerien itiöt, joista osa jää hengitysteiden yläosiin ja osa taas kulkeutuu syvälle keuhkoihin. Lisäksi mikrobeista tulee hiukkaspäästöjä, jotka sisältävät muun muassa mikrobien soluja tai solujen rakenneosasia, joista jotkut ovat allergiaa aiheuttavia ja jotkut myrkyllisiä. (Helsingin Hengitysyhdistys ry 2008.) Kaikki edellä mainitut yhdisteet saattavat altistaa terveyshaitoille. Lisäksi kosteuden vaikutuksesta hajoavien materiaalien kemialliset hajoamistuotteet, esimerkiksi muovien pehmittimet, voivat lisätä altistumista. (Meklin ym. 2007.)

Altistuminen kosteus- ja homevaurioiden aiheuttamille epäpuhtauksille voi aiheuttaa monenlaisia oireita sekä sairauksia. Henkilöt, joilla on ennestään astmaa tai allergiaa, ovat herkimpiä reagoimaan, mutta oireita saattaa ilmaantua myös ei-allergisille. Useimmiten terveyshaitat ovat epäspesifejä ja ne ovat yleisiä muistakin syistä sekä lapsilla että aikuisilla. (Meklin ym. 2007.) Rakennuksen kosteusvaurioon liittyy aina

rakennuksen käyttäjien terveysriski (Nordman, Toskala-Hannikainen, Kari, Piipari & Uitti 2007, 911).

Yleisimpiä kosteusvauriomikrobeista aiheutuvia oireita ovat silmien ja hengitysteiden ärsytysoireet sekä yleisoireet, kuten väsymys ja päänsärky. Kosteusvauriomikrobien aiheuttamia sairauksia ovat yliherkkyyden nuha, astma, allerginen alveoliitti ja orgaanisen pölyn aiheuttama oireyhtymä eli ODTS-oireyhtymä (Organic Dust Toxic Syndrome eli orgaanisen pölyn aiheuttama toksinen oireyhtymä). (Nordman ym. 2007, 911–917.) Helsingin Hengitysyhdistys ry:n (2008) mukaan tavallisia yleisoireita ovat lihas- ja nivelsäryt, päänsärky, väsymys, pahoinvointi, neurologiset oireet, keskittymisvaikeudet ja muistihäiriöt. Toistuvat tulehdussairaudet kuten flunssat ovat yleisiä altistuneilla henkilöillä. Kosteusvauriomikrobit voivat myös pahentaa monia sairauksia, esimerkiksi atooppista ihottumaa. Kaikkia kosteusvauriomikrobien terveysvaikutuksia ei vielä tiedetä, esimerkiksi kosteusvauriomikrobien osuutta reuman ja kilpirauhassairauksien yhteydessä selvitetään.

Paras ja kiireellinen hoito oireilevan potilaan kohdalla on altistuksen lopettaminen eli korjaustoimenpiteet tai muuttaminen pois. Oireenmukaista lääkitystä ei tulisi käyttää korjausten vaihtoehtona. Kosteusvauriorakennuksissa tulevat oireet ja sairaudet eroavat monista muista sairauksista siltä osin, että ne ovat estettävissä. (Husman & Seuri 2002, 30–31.)

## 2.5 Vasta-ainevälitteinen immunitaetti

Vasta-aineita, jotka tarttuvat antigeeneihin, nimitetään immunoglobuliineiksi. Ne voivat olla joko vapaina elimistön nesteissä tai kiinnittyneinä B-lymfosyytteihin. (Ericson & Ericson 1992, 123.) Immunoglobuliinit ovat spesifisiä proteiineja, joilla on vasta-aineaktiiviteetti. Ne ovat Y-kirjaimen muotoisia ja koostuvat neljästä polypeptidiketjusta; kahdesta kevytketjusta sekä kahdesta raskasketjusta. Immunoglobuliineja tunnetaan viisi pääluokkaa, IgM, IgD, IgG, IgE ja IgA. Immunoglobuliinin luokka määräytyy raskaan ketjun mukaan. Raskasketjujen nimet vastaavassa järjestyksessä ovat mu, delta, gamma, epsilon ja alfa. Immunoglobuliinien keskeisin tehtävä on tunnistaa antigeenejä ja sitoutua niihin.

(Soppi 1992, 5-1-5-3.) Sitoutumalla antigeeniin immunoglobuliinit neutraloivat mikrobeja ja toksiineja eli estävät niitä tarttumasta tai pääsemästä sisälle soluihin. Vasta-aineet myös saavat aikaan opsonisaation eli ne päällystävät mikrobin pinnan molekyyleillä, jotka tekevät mikrobin helpommin fagosytoitavaksi. Lisäksi vasta-aineet voimistavat tulehdusreaktiota. (Seppälä 1996b, 10.)

Antigeenin tullessa elimistöön ensimmäisen kerran, elimistö alkaa tuottaa pääasiassa IgM-luokan vasta-aineita. Kuluu noin 10–14 päivää, ennen kuin seerumissa on mitattava määrä vasta-aineita. Tätä tapahtumaa kutsutaan primaarivasteeksi. Kun sama antigeeni tulee elimistöön uudelleen, puhutaan sekundaarivasteesta. Sekundaarivasteen vasta-aineet kuuluvat pääasiallisesti IgG-luokkaan. Niitä voidaan mitata seerumista jo muutaman päivän kuluttua antigeenin joutumisesta elimistöön. Sekundaarivaste on voimakkaampi kuin primaarivaste. Sekundaarivasteen käynnistävät primaarivasteen aikana syntyneet pitkäikäiset B-solut eli muistisolut. Niillä on pinnallaan spesifisiä antigeenireseptoreja eli antigeenille spesifisiä immunoglobuliineja. (Soppi 1992, 5–6.)

**IgG** on yleisin immunoglobuliini ihmisen seerumissa. Se on pääasiallisesti vasta-aine sekundaarivasteessa. (Brostoff, Male & Roitt 1996, 4–2.) IgG on rakenteeltaan tyypillinen immunoglobuliini, joka neutraloi tehokkaasti toksiineja ja opsonoi mikrobeja. IgG-alaluokkia on neljä. Allergiaa aiheuttavat antigeenit käynnistävät IgG4-luokan vasta-ainetuotannon. (Seppälä 1996b, 11.) IgG:tä muodostuu paikallisissa imusolmukkeissa ja pernassa (Ericson & Ericson 1992, 126).

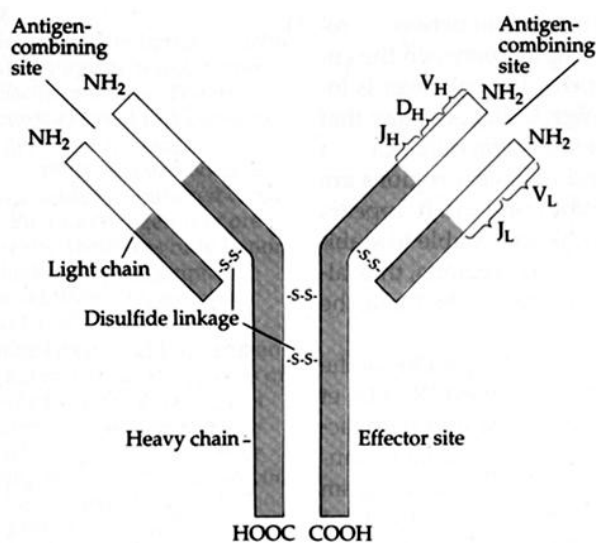
**IgM** poikkeaa monin tavoin muista immunoglobuliineista. Se koostuu viidestä perusyksiköstä. Rakenteensa vuoksi se pystyy sitoutumaan kymmeneen antigeenideterminantiin. IgM-vasta-aineita muodostuu runsaasti immunisaation alussa (primaarivaste). IgM neutraloi toksiineja ja toimii myös B-solujen antigeenireseptorina, jolloin se on eri muodossa. (Seppälä 1996b, 11–14.) Koska IgM-luokan vasta-aineita muodostuu ensimmäisenä antigeenin tullessa elimistöön, IgM-vasta-ainepitoisuuden määrittämisellä voidaan selvittää, missä vaiheessa infektio on saatu. IgM on suurikokoinen ja raskas molekyyli, jota muodostuu paikallisissa imusolmukkeissa ja pernassa. Kokonsa vuoksi IgM ei voi läpäistä verisuonen seinämää ja se vaikuttaakin enimmäkseen veri- ja imusuonistossa. (Ericson & Ericson 1992, 126.) IgM-luokan vasta-aineilla on tärkeä rooli verenkiertoon

joutuvien partikkelien sitomisessa. Harvinaista IgM-puutosta sairastavat potilaat voivat olla erityisen herkkiä nopeasti kehittyvälle sepsikselle. (Soppi 1992, 5–9.)

**IgE:tä** muodostuu limakalvojen alaisessa imukudoksessa. Ne esiintyvät usein kiinnittyneenä kudoksen syöttösoluihin ja veren basofiilisiin granulositytteihin. Normaalisti ihmisellä on alhainen IgE-pitoisuus, mutta allergiasairauksissa (allerginen astma, ihottuma, heinänuha) pitoisuus voi kohota voimakkaasti. Allergisella henkilöllä IgE:t ovat muodostuneet jotakin tiettyä antigeeniä (allergeenia) vastaan. Allergeenin tullessa elimistöön IgE tarttuu siihen, jolloin syöttösolu aktivoituu ja siitä vapautuu histamiinia, joka on voimakas tulehdusta stimuloiva aine. (Ericson & Ericson 1992, 128.)

**IgA** muodostuu limakalvojen alaisessa pinnallisessa imukudoksessa, erityisesti ruuansulatuskanavan ja hengitysteiden limakalvoilla. Sitä tavataan kaikkialla ruuansulatuskanavassa, hengitysteissä, virtsateissä, ihossa, kyynel nesteessä, silmän sidekalvolla sekä rintamaidossa. IgA:n tehtävä on estää vierasaineiden tunkeutuminen ihon ja limakalvojen läpi. (Ericson & Ericson 1992, 126–127.) IgA on rakenteeltaan IgG:n kaltainen. H-ketju on kuitenkin proteiinien osalta erilainen, jotta IgA pystyisi siirtymään kudoksista limakalvoille. IgA saattaa puuttua ihmiseltä, jolloin IgM-vasta-aineet siirtyvät limakalvoille. (Seppälä 1996b, 15.)

**IgD**-vasta-aineita on seerumissa vähän, eikä niiden tehtäviä tunneta. IgD-vasta-aineet toimivat pienten B-lymfosyyttien antigeenireseptoreina. (Laatikainen 2004, 400.)



Kuva 1. Immunoglobuliinin perusyksikön rakenne. (Scott 1997).

Vasta-aineen perusyksikössä (Kuva 1) on kaksi identtistä antigeeniin sitoutuvaa osaa (Fab) sekä ”häntäosa” (Fc). Antigeenissa olevaan epitooppiin sitoutuvaa Fab-osan kohtaa kutsutaan paratoopiksi. Antigeenin epitoopin ja vasta-aineen paratoopin välille muodostunut sidos on reversiibeli (palautuva) ja sille voidaan määrittää sidoksen voimakkuutta kuvaava tasapaino- eli affiniteettivakio. Affiniteetti kuvaa yhden antigeenissa olevan epitoopin ja sille spesifisen vasta-ainemolekyylin välisen sidoksen voimakkuutta. Sen sijaan aviditeetti kuvaa kokonaisen (useita epitooppeja sisältävän) antigeenin sekä antigeeniä vastaan tuotetun antiseerumin välisen vuorovaikutuksen voimakkuutta. (Laatikainen 2004, 398–401.)

Immunoglobuliinien lisäksi vasta-ainevälitteiseen immunitettiin kuuluvat B-solut ja plasmaklorit sekä näiden solujen esiasteet. Immuunivasteen kehittymiseen vaikuttavat osaltaan henkilön terveys, ikä, perimä ja se, onko henkilöllä spesifinen vasta-aine antigeenille. Vastasyntyneellä immuunivaste on huono kehittymättömän immunologisen järjestelmän vuoksi. Myös ikääntyneillä immuunivaste saattaa olla alentunut. Vasta-aine-antigeenireaktion nopeuteen vaikuttavat antigeenin koko, samantyyppiset antigeeniset rakenteet ja antigeenin poikkeavuus omista kudoksista. Immuunivasteen syntyminen nopeutuu, jos antigeenissä on sekä lipidi- että sokeriosia tai jos antigeenin lähde on jakautuva. Huono vasta-ainevaste puolestaan johtuu pienestä antigeenin koosta, elimistön kyvyttömyydestä prosessoida antigeeniä tai siitä, että antigeeni muistuttaa paljon elimistön omia kudoksia. Immuunivasteen kehittymiseen vaikuttaa myös se, millä tavalla antigeeni joutuu elimistöön. Jos useita antigeenejä pääsee elimistöön samanaikaisesti, vasta-ainevaste saattaa olla heikentynyt. Immunitetin syntymiseen ei vaikuta, kuinka paljon antigeenejä joutuu elimistöön. (Soppi 1992, 5-1–5-7.)

Luonnolliseksi eli synnynnäiseksi immunitetiksi kutsutaan nopeaa ensivaiheen puolustusta. Siihen osallistuvat monosyytit, makrofagit, eosinofiilit sekä luonnolliset tappajasolut (NK-solut). Luonnollinen immunitetti käynnistyy välittömästi mikrobin tunkeuduttua elimistöön. Hankittu eli opittu immunitetti sen sijaan muodostuu vähitellen ja perustuu vasta-aineiden ja immunologisen muistin kehittymiseen. Siitä huolehtivat veressä ja imukudoksessa kiertävät B- ja T-lymfosyytit. (Laatikainen 2004, 395–396.)

## 2.6 Immunokemialliset menetelmät

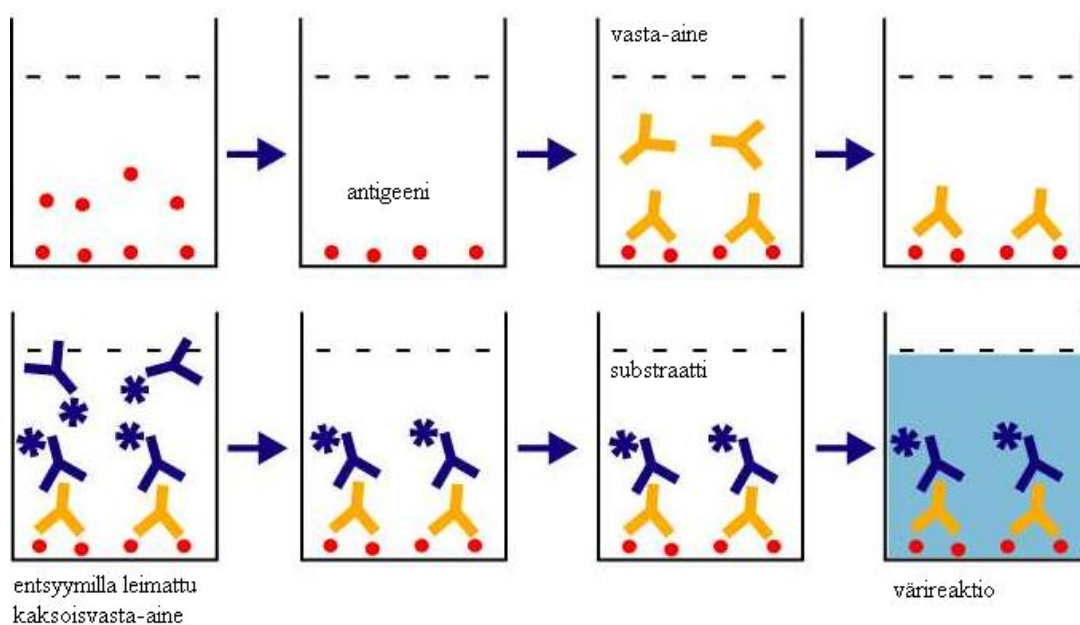
Immunokemiallisessa menetelmässä mitataan joko antigeenin tai vasta-aineen pitoisuutta. Antigeeni on yhdiste, joka sitoutuu vasta-aineeseen. Vasta-aine on immunoglobuliini, joka kykenee sitomaan luonnossa olevia synteettisiä yhdisteitä. Polyklonaaliseksi vasta-aineeksi kutsutaan vasta-aineseosta, jossa on monia spesifisiä antigeenin sitomispaikaltaan erilaisia vasta-aineita. Monoklonaalisessa vasta-aineessa on ainoastaan yksi spesifinen antigeenin sitomispaikka. (Halonen 2004, 90.) Immunokemialliset menetelmät on koottu liitteeseen 1.

Kilpailevaan sitoutumiseen perustuvassa määrittäksessä näyte ja reagenssit sekoitetaan keskenään joko samanaikaisesti tai portaittain. Kun määritettävä yhdiste ja leimattu vakiomääräinen yhdiste kilpailevat sitoutumisesta tiettyyn määrään vasta-ainetta samanaikaisesti, on olennaista, että vasta-aine sitoutuu sekä määritettävään että leimattuun yhdisteeseen yhtä herkästi. Toisessa kilpailevaan sitoutumiseen perustuvassa menetelmässä määritettävä yhdiste sekoitetaan ensin vasta-aineen kanssa. Leimattu vakiomääräinen yhdiste lisätään kun määritettävän yhdisteen ja vasta-aineen välinen reaktiotasapaino on saavutettu. Vapaa ja vasta-aineeseen sitoutunut antigeeni erotetaan toisistaan ja vasta-aineeseen sitoutunut leimattu antigeeni määritetään. (Halonen 2004, 90–91.)

Kaksoisvasta-ainetekniikassa määritettävä yhdiste (antigeeni) sitoutuu kiinteän faasin pintaan olevaan vasta-aineeseen, jonka jälkeen sitoutumattomat yhdisteet pestään pois ja leimattu vasta-aine lisätään. Leimattu vasta-aine sitoutuu määritettävään yhdisteeseen, jolloin muodostuu vasta-ainekompleksi. Sitoutumaton ylimääräinen leimattu vasta-aine pestään pois ja sitoutunut leimattu vasta-aine määritetään. Tämä on suoraan verrannollinen mitattavan yhdisteen pitoisuuteen. (Halonen 2004, 90–92.)

Heterogeenisessä immunokemiallisessa menetelmässä erotetaan ennen mittausta vapaana oleva ja sitoutunut leimattu antigeeni tai vasta-aine toisistaan (Halonen 2004, 93). Homogeenisessä immunokemiallisessa menetelmässä näitä ei eroteta, vaan koko tarvittava reaktio tapahtuu yhdellä reagenssien sekoituksella (Seppälä 1996a, 126). Homogeenisessä menetelmässä antigeeniin liitetyn leiman aktiivisuus muuttuu vasta-aineeseen sitoutuessa ja määritettävä yhdiste voidaan mitata suoraan reaktioseoksesta (Halonen 2004, 93).

Entsyymi-immunomääritysmenetelmässä (EIA-menetelmä) käytetään entsyymejä leimana. ELISA-menetelmä eli Enzymelinked immunosorbent assay on heterogeeninen entsyymi-immunomääritysmenetelmä. ELISA-menetelmä perustuu joko kilpailevaan sitoutumiseen tai kaksoisvasta-ainetekniikkaan. (Halonen 2004, 94–95.) ELISA-menetelmä perustuu kiinteällä alustalla tapahtuvaan immunologiseen kiinnittymiseen. Menetelmässä kiinteään faasiin kiinnitetyn antigeenin tai vasta-aineen avulla voidaan osoittaa siihen sitoutuneen vasta-aineen tai antigeenin pitoisuus. (Pätäri & Holthöfer 2003.) Kaksoisvasta-ainetekniikkaan perustuvassa menetelmässä yksi reaktioon osallistuvista komponenteista on kiinnitetty kiinteään faasin pintaan, esimerkiksi vasta-aine kuoppalevyn kuoppaan. Tutkittava näyte annostellaan kuoppalevyyn ja mitattava yhdiste sitoutuu kiinteään faasin pinnalla olevaan vasta-aineeseen. Kiinteä faasi pestään ja entsyymileimattu kaksoisvasta-aine lisätään (konjugaatti), jolloin syntyy kaksoisvasta-ainekompleksi. Ylimääräinen sitoutumaton vasta-aine pestään pois ja lisätään entsyymiin sitoutuva aine (substraatti). Entsyymi katalysoi (nopeuttaa) substraatin reaktiotuotteeksi, joka mitataan esimerkiksi spektrofotometrillä. Reaktiotuotteen määrä on suoraan verrannollinen näytteen vasta-ainepitoisuuteen. (Halonen 2004, 94.) Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipisteen käyttämä In-House ELISA-menetelmä perustuu kaksoisvasta-ainetekniikkaan.



Kuva 2. ELISA-menetelmän periaate. (Decker 2006.)

EMIT (enzyme-multiplied immunoassay technique) -menetelmä on homogeeninen entsyymi-immunomääritysmenetelmä. Menetelmässä kyvettiin lisätä samanaikaisesti näytettä, substraattia ja mitattavalle yhdisteelle spesifistä vasta-ainetta, joka sitoutuu inkuboinnin aikana mitattavaan yhdisteeseen. Tämän jälkeen lisätään entsyymileimattua mitattavaa yhdistettä sisältävää reagenssia, joka sitoutuu ylimäärin olevaan vasta-aineeseen muodostaen antigeeni-vasta-ainekompleksin. Tällöin entsyymi menettää katalyyttisen aktiivisuuden ja entsyymiaktiivisuuden muutos on verrannollinen mitattavan yhdisteen pitoisuuteen. (Halonen 2004, 96.)

CEDIA (cloned enzyme donor immunoassay) -menetelmässä käytetään geeniteknologisesti valmistettua beetagalaktosidaasientsyymiä, jonka inaktiiviset osat luovuttaja ja vastaanottaja liittyvät reaktiossa muodostaen aktiivisen entsyymin. Antigeeni on liitetty entsyymin luovuttajaosaan. Reaktiossa näytteessä oleva antigeeni ja luovuttajaosan antigeeni kilpailevat sitoutumisesta antigeenille spesifiseen vasta-aineeseen. Luovuttajaosan ollessa sitoutuneena vasta-aineeseen se ei enää voi sitoutua vastaanottajaosaan ja muodostaa entsyymiä. Näytteen pitoisuus on suoraan verrannollinen entsyymiaktiivisuuteen. (Halonen 2004, 96–97.)

Radioimmuunimääritysmenetelmässä (radio immuno assay) leimana käytetään radioaktiivista merkkiainetta. Menetelmä on tarkka ja herkkä. Lisäksi isotooppi on helppo liittää antigeeniin tai vasta-aineeseen. (Halonen 2004, 94.) RIA-määrityksessä radioaktiivisella merkkiaineella leimattu ja tutkittavassa näytteessä oleva leimaamaton antigeeni kilpailevat spesifisen vasta-aineen sitoutumiskohdista. (Turpeenoja 1995, 186.) Perinteinen radioimmuunimääritysmenetelmä on kilpailevaan sitoutumiseen perustuva heterogeeninen immunokemiallinen menetelmä. Vakiomäärä vasta-ainetta on sidottu kiinteään faasiin. Vapaa ja vasta-ainekompleksiin sitoutunut leima erotetaan toisistaan pesuvaiheiden avulla. Mitattu radioaktiivisuus on kääntäen verrannollinen mitattavan yhdisteen pitoisuuteen. Immunoradiometrinen menetelmä (IRMA) on kaksoisvasta-ainetekniikkaan perustuva heterogeeninen menetelmä. Siinä kiinteän faasin pinnassa oleva vasta-aine sitoo näytteessä olevan määritettävän yhdisteen. Sitoutumaton antigeeni pestään pois ja lisätään leimattu kaksoisvasta-aine. Sitoutumaton leimattu vasta-aine pestään ja jäljellejäänyt radioaktiivisuus mitataan. (Halonen 2004, 94.)

Fluoroimmunomääritysmenetyssä käytetään fluoresoivia molekyyliä merkkiaineena. Aikaerotteinen fluoroimmunomääritysmenety (TRFIA) on heterogeeninen menety, ja se voi olla joko kilpailevaan sitoutumiseen tai kaksoisvasta-ainetekniikkaan perustuva. Siinä merkkiaineena käytetään usein lantanidi-sarjan kelaatteja. Fluoresenssipolarisaatioimmunomääritys (FPIA) on homogeeninen kilpailevaan sitoutumiseen perustuva menety. Analysoitavat molekyyli kilpailevat leimatun yhdisteen kanssa sitoutumisesta vasta-aineeseen. Reaktioseosta säteilytetään polarisoidulla valolla, jolloin polarisoitua valoa säteilee vain vasta-aineeseen sitoutuneesta leimasta. Mitattu polarisaatio on kääntäen verrannollinen näytteen pitoisuuteen. (Halonen 2004, 97–98.)

## 2.7 Menetyän validointi

Kliinisen laboratorion mittausmenetyjen on tuotettava mahdollisimman luotettavaa ja tarkkaa tietoa mitattavasta parametrasta (Lehtonen & Sihvonen 2004, 94). Uuden laboratorioanalyysimenetyän soveltuvuus aiottuun käyttötarkoitukseen osoitetaan validoinnilla (Jaarinen & Niiranen 2005, 11). Validoinnin vaatimuksiin vaikuttaa se, onko menety kansainvälinen standardimenety, itse kehitetty menety, muualla tuotetun tieteellisen julkaisun perusteella pystytetty menety vai kaupallinen menety (Menetyt, menetyjen validointi ja mittauksen jäljitettävyys 2005). Validoinnin laajuuteen vaikuttavat usein asiakkaan erityistarpeet ja vaatimukset sekä näytematriisi. Validointiparametrien tulosten perusteella analyysimenetyä kehitetään siten, että halutut parametriarvot saavutetaan. Validointi on oleellinen osa uuden analyysimenetyän kehitystyötä. (Lehtonen & Sihvonen 2004, 94.)

Menetyän validointi sisältää koejärjestelyjen suunnittelun, mittauksen suorittamisen, tulosten arvioinnin ja tilastolliset laskut sekä menetyäohjeen ja menetyän liittyvän laadunvalvonnan laatimisen. Mitä useampia toistoja kussakin validoinnin vaiheessa tehdään, sitä luotettavampia ovat tulosten perusteella lasketut menetyän ja mittauksen luotettavuutta kuvaavat tunnusluvut. Validoinnin vaiheet mittauksineen ja johtopäätöksineen dokumentoidaan validointiraporttiin. (Jaarinen & Niiranen 2005, 30–31.)

Kvantitatiivisille immunokemiallisille menetelmille on omat validointikriteerit. Vasta-aine tai antigeeni eivät saa merkittävästi erota testissä ja standardissa. Näytematriisi ei saa vaikuttaa menetelmään, vaikka siinä olisi vaihtelevia komponentteja. Määritysrajan tulee olla hyväksyttävällä alueella suhteessa muihin tutkimuksiin. Menetelmän tarkkuuden on oltava muiden tutkimusten vaatimusten tasolla. Menetelmän suoritustapa ei saa nostaa systemaattisen virheen riskiä. (Immunochemical methods 2005, 188.)

Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipiste aloitti In-House ELISA-menetelmän validoinnin biopölyspesifisille IgM-vasta-aineille vuonna 2007. Validointi on sisältänyt useita määrityskertoja laimennossuhteeltaan erilaisilla standardipohjilla ja konjugaattiliuksilla. Myös oikean näytelaimennoksen löytäminen on vaatinut useita kokeiluja. Lisäksi on tutkittu 6- ja 7-paneelien antigeenipohjien laimennossuhteiden vaikutusta määrittäisiin.

## 2.8 Viitearvot ja niiden määrittäminen

Penttilän (2004, 18–20) mukaan viitearvot ovat välttämättömiä, jotta pystytään erottamaan sairaat henkilöt terveistä. Viitevälillä tarkoitetaan aluetta, jossa terveiden henkilöiden arvot yleensä ovat. Yleensä viitevälit lasketaan aineistosta siten, että ne sisältävät 95 % tuloksista. Biologisesta variaatiosta johtuen viitearvojen määrittämistä varten arvot on mitattava tarpeeksi suurelta joukolta. Viitearvon hieman ylittävä tai alittava arvo ei ole välttämättä merkki sairaudesta. Viiteväleihin vaikuttavat ikä ja sukupuoli, joten tämänkin takia tutkittavaksi tarvitaan suuri joukko henkilöitä.

Suomessa ei ole toistaiseksi olemassa koko maata koskevia yhtäpitäviä viitearvoja. Tähän on syynä se, että laboratoriomenetelmät eroavat käytännössä jonkin verran eri laboratorioissa. Jokainen laboratorio joutuu määrittämään omat viitearvonsa. Erot eri laboratorioiden välillä eivät kuitenkaan ole suuria. Viime vuosina pyrkimyksenä on ollut päästä käyttämään yksilökohtaisia viitearvoja, mutta tämän toteutumista hidastavat muun muassa kustannussyyt. (Mustajoki & Kaukua 2008.)

Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipiste määrittää viitearvot uudelle antigeenille siten, että kuoppalevy päällystetään titrauksen perusteella antigeenille saadulla käyttöalaimennoksella. Viitearvojen määrittämiseen tarvitaan 100 seeruminäytettä. Näytteet pipetoidaan levyille rinnakkaisina ja lisätään kontrollinäytteet jokaiselle levyille. Standardilaimennossarja pipetoidaan omalle levyille. Inkuboinnit, pesut ja reagenssien lisäykset tehdään ohjeiden mukaan. Absorbanssit mitataan Tecan Spectrofluor -spektrofluorometrillä. Tulokset siirretään excel-taulukkoon ja niiden perusteella määritetään antigeenin viitearvot. (Työterveyslaitos, Kuopion aluetoimipiste 2009.)

## 2.9 Tilastolliset tunnusluvut viitearvoja määriteltäessä

Kuvailevan eli deskriptiivisen tilastotieteen tarkoituksena on selvittää havaintoaineiston käyttökelpoisuutta jatkoanalyysiä varten. Lisäksi kuvailevassa tilastotieteessä selviää, millaisia jatkotoimenpiteitä aineistolle on mahdollista analyysin edetessä suorittaa. (Paunonen & Vehviläinen-Julkunen 1997, 76–77.) Kuvailevassa tilastotieteessä tutkimuksen kohteena olevasta ilmiöstä kerätyt tiedot esitetään taulukoina, graafisina kuvioina ja tilastollisina tunnuslukuina. Taulukoiden ja kuvioiden tarkoituksena on tiivistää tilastoaineiston tulokset ja osoittaa totuudenmukaisesti tilastotietojen sisältämä fakta. (Holopainen & Pulkkinen 2008, 46.)

Koska kuvion tulkinta on aina jossain määrin subjektiivista, johtopäätösten ja objektiivisen tulkinnan tueksi tarvitaan tunnuslukuja, jotka lasketaan jakaumasta. Tunnuslukuja on useita erilaisia ja niistä jokainen valottaa muuttujan jakaumaa eri näkökulmasta. Tunnuslukujen antamat tiedot yhdistämällä saadaan oleellista tietoa jakaumasta. Tunnuslukuja voidaan määrittää vaivattomasti erilaisilla tilasto- ja taulukkolaskentaohjelmilla. Myös tunnuslukujen tulkinta on keskeistä, muuten tunnusluku on vain numero tai joukko numeroita. Yksittäisen tunnusluvun perusteella ei voida tehdä luotettavia johtopäätöksiä vaan niitä on määritettävä useita ja tarkasteltava yhtä aikaa. (Holopainen & Pulkkinen 2008, 78.)

Sijaintiluvut kuvaavat, mihin suuruusluokkaan tai mittaustason kohtaan sijoittuu suurin osa muuttujan havainnoista. Keskiluku **moodi** eli tyyppiarvo on

havaintoaineiston yleisin muuttujan arvo tai luokka, jolla on suurin frekvenssi. (Vilka 2007, 121.) **Mediaani** on järjestetyn havaintoaineiston keskimäinen havainto. Mediaani jakaa aineiston kahteen osaan siten, että puolet arvoista on mediaania pienempiä ja puolet mediaania suurempia. **Keskiarvosta** puhuttaessa tarkoitetaan yleensä aritmeettista keskiarvoa. Keskiarvo saadaan, kun havaintojen mittaustulokset lasketaan yhteen ja jaetaan se havaintojen lukumäärällä. Keskiarvon käyttöä tunnuslukuna tulisi välttää, jos muutama arvo poikkeaa huomattavasti valtaosasta muita arvoja tai aineisto on vino. (Holopainen & Pulkkinen 2008, 79–85; Vilka 2007, 122.)

Hajontaluvuilla mitataan, kuinka laajalle tai suppealle välille havaintoarvot sijoittuvat. Usein niiden avulla tarkastellaan myös sitä, kuinka tiheästi havaintoarvot ovat sijoittuneet keskiluvun ympärille. Hajontalukuja tarvitaan tilastollisessa päätöksenteossa. Yleisin hajontaluku on **keskihajonta**, jota käytetään usein yhdessä aritmeettisen keskiarvon kanssa. (Holopainen & Pulkkinen 2008, 88–92.) Keskihajonta kertoo, kuinka kaukana yksittäisen muuttujan arvot ovat keskimääräisen muuttujan arvosta (Vilka 2007, 124).

**Vinous** ja **huipukkuus** ovat tilastollisen päätöksenteon yhteydessä käytettäviä suoran jakauman tunnuslukuja. Niiden avulla arvioidaan empiirisen jakauman normaalisuutta ja ne mittaavat kumpikin jakauman poikkeamaa normaalijakaumasta. Normaalijakaumaa noudattavan jakauman vinous on nolla. Jos vinous poikkeaa selvästi nollassa, muuttuja ei ole normaalisti jakautunut. (Holopainen & Pulkkinen 2008). Vinous kuvaa jakauman symmetrisyyttä eli tasaisuutta keskiarvoon nähden. Se kertoo, kuinka suuri osa havainnoista on keskimääräistä suurempia tai pienempiä. Huipukkuus kertoo jakauman muodosta ja ilmoittaa, kuinka korkea jakauman huippu on normaalijakaumaan verrattuna. (Vilka 2007, 125).

**Normaalijakauman** periaate on, että pienten ja suurten arvojen määrä ja todennäköisyys on pieni, mutta keskimääräisten havaintojen määrä ja ilmenemisen todennäköisyys on suuri (Metsämuuronen 2000, 23). Yleensä normaalijakaumaa noudattavat sellaiset satunnaismuuttujat, joiden arvoon vaikuttavat monet pienet toisistaan riippumattomat tekijät (Holopainen & Pulkkinen 2008, 144).

### 3 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipisteellä on käytössä In-House ELISA-menetelmä biopölyspesifisten IgG- ja IgE-vasta-aineiden määrittämisessä. Tämän tutkimuksen tarkoituksena on osallistua biopölyspesifisten IgM-vasta-aineiden määrittämisessä käytettävän In-House ELISA-menetelmän validointiin määrittämällä viitearvot biopölyspesifisille IgM-vasta-aineille.

### 4 TUTKIMUKSEN TOTEUTTAMINEN

#### 4.1 Tutkimusmenetelmä ja tutkimusaineisto

Tämä opinnäytetyö on luonteeltaan määrällinen tutkimus, koska käsittelemämme aineisto on numeerinen ja tilastollinen. Määritämme aineistosta tilastollisia tunnuslukuja ja laskemme viitearvot vasta-aineille. Määrällisen tutkimuksen avulla selvitetään lukumääriin liittyviä kysymyksiä. Määrällisen tutkimuksen aineisto on matemaattinen, tilastollinen ja se on pystyttävä koodaamaan numeeriseen muotoon. Olennaista on, pystytäänkö tutkittavan ilmiön erityispiirteitä mittaamaan systemaattisesti tai voidaan tutkittavasta ilmiöstä erottaa mitattavia osia. Tutkimuksessa voidaan kuvata tutkittavaa ilmiötä eli muuttujaa ja sitä, millaisista osista se koostuu. Lisäksi voidaan kuvata muuttujien välisiä riippuvuuksia tai muuttujien määrissä tapahtuvia muutoksia. Määrällinen tutkimus yhdistetään usein luonnontieteelliseen tutkimukseen. (Tuomi 2006, 95.)

Tämän tutkimuksen aineisto koostuu 200:sta seeruminäytteestä, jotka Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos (THL) on kerännyt Kuopion alueelta. Henkilöt, joilta näytteet ovat peräisin, ovat työikäistä väestöä iältään 25–64 vuotta. 100:sta näytteestä määritettiin IgM-vasta-ainepitoisuudet kahdeksalle määrän ympäristön mikrobille (6-paneeli) ja 100:sta näytteestä IgM-vasta-ainepitoisuudet kahdeksalle

kosteusvauriomikrobille (7-paneeli). Paneeleihin sisältyvät mikrobit on lueteltu taulukossa 1.

## 4.2 Kuvaus vasta-ainemäärityksiä edeltävistä työvaiheista

### 4.2.1 Puhdaskantojen viljely

Antigeenin valmistamiseen tarvitaan mikrobien puhdaskantoja. Puhdasviljelmä on elatusalustalla viljelty sieni- tai bakteerikanta. Kantoja eristetään tutkittavana olleista seka- ja puhdasviljelmistä. Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipisteen ympäristömikrobiologian laboratoriossa viljellään ja säilytetään mikrobien puhdaskantoja.

Viljely tehdään etanolilla puhdistetussa suojakaapissa. Puhdaskantaa kasvatetaan alustalla, jolla kyseinen mikrobi parhaiten kasvaa. Sienille käytetään M2-agaria ja bakteereille THG-agaria. Tarvittaessa käytetään myös muita agareita. Jokaiselle uudelle kannalle annetaan tunnus. Kannat viljellään agarille levitystekniikalla tai kolmen pisteen viljelmänä. Rihmasienet viljellään kolmipistetekniikalla, jolloin alkuperäisestä pesäkkeestä otetaan pala viljelysauvaan ja painetaan agarin pintaan kolmeen pisteeseen. Levitysviljelmässä alkuperäisestä pesäkkeestä otetaan pala viljelysauvaan ja viljellään koko agarpinnalle. Kannat viljellään myös koeputkiin valetuille agarpinnoille. Sienet viljellään M2-agar-vinopinnoille ja bakteerit THG-agar-vinopinnoille.

Mesofiilisia kantoja kasvatetaan seitsemän vuorokautta  $+25 \pm 5$  °C:ssa. Gramnegatiivisia bakteereita kasvatetaan  $+25 \pm 5$  °C:ssa tai  $+37 \pm 3$  °C:ssa kaksi vuorokautta. Termotolerantteja eli tavallista lämpimämpiä olosuhteita kestäviä sienikantoja kasvatetaan  $+40 \pm 3$  °C:ssa viisi vuorokautta ja termofiilisia eli kuumien lähteiden bakteerikantoja  $+55 \pm 3$  °C:ssa kolme vuorokautta. Kasvatuksen jälkeen kannan puhtaus tarkistetaan ja tarvittaessa tehdään uusi eristäminen. Kantoja säilytetään kylmiössä  $+7 \pm 3$  °C:ssa.

#### 4.2.2 Antigeenin valmistus

Puhdasviljelmälle pipetoidaan noin 5 ml Mycological- tai Bacto Pepton-lihalientä, joka levitetään steriilillä L-sauvalla samalla irrottaen kasvusto maljan pinnalta. Lihaliemi ja mikrobikasvusto siirretään steriilillä pipetillä soluviljelypulloon. Tämän jälkeen mikrobikasvustoa kasvatetaan kullekin mikrobille soveltuvassa lämpötilassa. Kasvatuksen jälkeen tehdään viljely maljalle puhtauden toteamiseksi.

Kun mikrobikasvuston puhtaus on todettu ja kasvustoa on tarpeeksi, se autoklavoidaan eli höyrysteriloidaan. Pullosta kasvusto siirretään dekantterilasiin tai erlenmayeriin ja peitetään foliolla ja autoklaaviteipillä, johon merkitään kyseessä olevan mikrobin tunnistustiedot. Astiat autoklavoidaan 120 °C:ssa 15 minuuttia. Tämän jälkeen pullossa kasvatettu mikrobimassa pestään suodattamalla Millipore Oy:n kolmipaikkaisella suodattimella kompressoria apuna käyttäen. Laitteisto pestään ennen suodattamista vedellä ja 70 % -alkoholilla. Käytettävien suodatinpapereiden tulee olla steriilejä suodatinpapereita. Suodattamisen jälkeen erotettu mikrobimassa huuhdotaan steriilillä PBS-puskurilla kolme kertaa. Jos pesuliukseen irtoaa mikrobimassaa, se erotetaan sentrifugoimalla. Tämän jälkeen mikrobimassa kerätään steriileihin sentrifugi- tai falcon-putkiin, joissa on steriiliä PBS-puskuria ja pakastetaan -20 °C:ssa. Maljalla kasvatettu mikrobimassa pestään steriilillä PBS-puskurilla steriilissä sentrifugiputkessa ja sentrifugoidaan kolme kertaa 3000 rpm 10 minuuttia ja pakastetaan -20 °C:ssa.

Mikrobimassan hajottaminen tehdään joko Ultra-Turax-sauvasekoittimella tai Soniprep 150-ultraäänihajottimella. Ultra-Turaxin kärki puretaan osiin ja pestään ennen käyttöä sekä käytön jälkeen ensin vedellä ja sitten 70 % -alkoholilla. Sulanut mikrobimassa hajotetaan Ultra-Turax-sekoittimella kolme kertaa minuutin jaksoissa siten, että kärki on ensin melkein pohjalla, sitten keskellä ja lopuksi melkein pinnassa. Jaksojen välillä putki laitetaan jäihin vähintään kahden minuutin ajaksi. Hajottamisen jälkeen mikrobimassa pakastetaan -20 °C:ssa. Vaihtoehtoisesti mikrobimassan hajottaminen voidaan tehdä Soniprep 150-ultraäänihajottimella.

Viimeinen vaihe antigeenin valmistuksessa on mikrobimassan sentrifugointi. Mikrobimassa sentrifugoidaan kylmäsentrifugilla (Joulan Mr22 i -sentrifugi) 15000 rpm/min +6 °C:ssa 30 minuutin ajan. Ensin tehdään esijäähdytys +6 °C:een, joka

kestää 15 minuuttia. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti otetaan talteen ja putken pohjalle jäänyt mikrobimassa heitetään pois. Tämän jälkeen supernatantti suodatetaan ja 1 ml liuosta otetaan erilliseen, korkilliseen koeputkeen titrausta varten. Jäljelle jäävää liuosta säilytetään -70 °C pakastimessa.

#### 4.2.3 Antigeenin titraus

Uudelle antigeenierälle määritetään laimennussuhde titraamalla rinnakkain uusi ja vanha antigeenierä. Titraus tarkoittaa menetelmää, jossa liuoksessa olevan aineen pitoisuus määritetään tunnetun titrausliuoksen avulla. Ensin tehdään levyn päällystäminen. Uutta antigeenierää otetaan 1–2 ml ja saman antigeenin edellistä erää otetaan yksi putki. Laimennokset tehdään PBS-puskuriin. Laimennokset tehdään siten, että uusi antigeenierä laimennetaan 1:100, josta edelleen 1:200 ja edelleen 1:400 jne. Vanhasta erästä tehdään laimennos siten, että käyttöläimennoksen molemmin puolin tulee yksi laimennos. Kuoppalevy päällystetään antigeenilaimennoksilla (LIITE 2). Levy inkuboidaan huoneenlämmössä  $22 \pm 2$  tuntia, jonka jälkeen levy pestään PBS-puskurilla ja kylmäkuivataan.

Titrauksessa A7-kontrolli ja kyseiselle antigeenille positiivinen tunnettu seerumi laimennetaan 1:100 PBS-puskuriin ja pipetoidaan kuoppalevyille rinnakkaisina (LIITE 2). Kuoppalevy inkuboidaan lämpökaapissa ja pestään kuoppalevypesurilla, huuhdellaan milli-Q-vedellä ja kuivataan hakkaamalla selluloosaan. Konjugaattiliuoksen ja substraattiliuoksen lisäys sekä inkuboinnit ja pesut tehdään ohjeiden mukaan. Lopuksi antigeenipitoisuudet mitataan Tecan Spectrofluor-spektrofluorometrillä.

Laimennussuhde tarkistetaan titraamalla A7-kontrollilla ja antigeenille positiivisella ja negatiivisella seerumilla. Uusi antigeenilevy päällystetään edellisen titrauksen perusteella määrätyillä uuden erän laimennoksilla (LIITE 3). Levyille tehdään inkubointi, pesu ja kylmäkuivaus. A7-kontrolli ja seerumit laimennetaan 1:100 PBS-puskuriin ja pipetoidaan rinnakkaisena levyille. Levy inkuboidaan lämpökaapissa, pestään kuoppalevypesurilla, huuhdellaan milli-Q-vedellä ja kuivataan hakkaamalla selluloosaan. Konjugaattiliuoksen ja substraattiliuoksen lisäys sekä inkuboinnit ja

pesut tehdään ohjeiden mukaan. Antigeenipitoisuudet mitataan Tecan Spectrofluor-spektrofluorometrilla.

Laimennussuhteen tarkistamisen toisessa vaiheessa antigeenilevy päällystetään määrätyillä laimennoksilla rinnakkaisina. Antigeenilaimennokset tehdään PBS-puskuriin alkaen 1:100 → 10 + 10 → 10 + 10 jne. Laimennokset pipetoidaan levyille, inkuboidaan, pestään ja kylmäkuivataan. A7-positiivinen kontrolli, 3-9 tunnettua positiivista ja yksi negatiivien seerumi laimennetaan 1:100 PBS-puskuriin ja pipetoidaan levyille (LIITE 4). Tämän jälkeen tehdään standardilaimennokset ja pipetoidaan levyille. Pesut, reagenssien lisäykset, inkuboinnit ja mittaukset tehdään ohjeiden mukaan.

#### 4.2.4 Antigeenin kiinnitys kuoppalevyille

Kussakin paneelissa on kahdeksan antigeeniä. Jokaiselle paneelille on valmis paneelintekokaavake, johon on merkitty antigeenien tunnuksot, eränumerot, laimennussuhteet ja laimennusohje. Antigeeniuutteet laimennetaan PBS-puskuriin. Kuoppalevyihin merkitään paneelin numero ja valmistuspäivä. Antigeeniliuos pipetoidaan levyille 200 µl/kuoppa. Tämän jälkeen levyt peitetään sealing-teipillä ja inkuboidaan huoneenlämmössä  $22 \pm 2$  tuntia.

Seuraavaksi 10 % -FBS laimennetaan 1:10 PBS-puskuriin, sekoitetaan ja pipetoidaan levyille monikanavapipetillä 300 µl/kuoppa. Levyjä inkuboidaan  $120 \pm 3$  minuuttia huoneenlämmössä, jonka jälkeen tehdään pesu PBS-puskurilla. Levyjä kylmäkuivataan vähintään kaksi tuntia. Levyt laitetaan pakastepusseihin ja säilytetään  $-20 \pm 2$  °C:ssa.

#### 4.2.5 Standardilevyn valmistaminen

Standardilevyn pohjalle on kiinnitetty antigeenejä, joihin vasta-aineet kiinnittyvät. Standardilevy valmistetaan laimentamalla 1:1500 Goat Antiserum to Human IgM. Levyt inkuboidaan huoneenlämmössä 22h + 2h, pestään, kiinnitetään, kylmäkuivataan ja pakastetaan kuten antigeenin kiinnitys kuoppalevyille -kohdassa.

### 4.3 IgM-vasta-ainemäärittysten suorittaminen

Tehtävämme oli määrittää IgM-vasta-ainepitoisuudet kahdelle eri paneelille 200 näytteestä. Määritykset oli jo aloitettu Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipisteessä, kun tulimme mukaan projektiin. 7-paneelin mikrobeille määritettiin pitoisuudet 100 näytteestä ja 6-paneelin mikrobeille 100 näytteestä. IgM-vasta-ainemäärityksissä käytimme In-House ELISA-menetelmää (Enzymelinked immunosorbent assay), jonka periaate on kuvattu aiemmin luvussa Immunokemialliset menetelmät. Työ tehtiin Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipisteen työohjeen mukaan.

#### 4.3.1 Standardilaimennossarjan tekeminen

Monissa analyttisen kemian määrityksissä kuten spektrometriassa käytetään laitteiston kalibroinnissa ja näytteen analysoinnissa standardiliuosta eli vertailuliuosta. Standardiliuos toimii vertailukohteena, eli näytteiden analysointi suoritetaan standardiliuosten avulla. (Lehtonen & Sihvonen 2004, 39.) Myös Tecan Spectrofluor -spektrofluorometrillä määritettävät pitoisuudet lasketaan standardisuoran avulla, joka saadaan standardilaimennossarjasta. Jokaisella määrityskerralla tehdään näytteiden lisäksi määritykset standardilevyille standardilaimennossarjaa käyttämällä.

Standardilaimennoksia tehdessä valmistetaan ensin väliliuos siten, että lähtöliuosta (WHO 7600 mg/l human serum) pipetoidaan 60 µl koeputkeen, johon lisätään 3 ml PBS-puskuria. Standardilaimennossarjan teossa edellisestä putkesta otetaan taulukon mukainen (LIITE 5) määrä liuosta seuraavaan putkeen ja lisätään ohjeen mukainen määrä PBS-puskuria, jolloin liuos laimenee edellisestä liuoksesta puoleen. Standardilaimennoksia pipetoidaan standardilevyille rinnakkaisina 100 µl/kuoppa siten, että ensimmäisessä kuopassa on nolla-näyte (PBS-puskuri). Pipetointijärjestys on laimeammasta liuoksesta väkevämpään.

### 4.3.2 Näytteiden pipetointi antigeenilevyille

Nolla-näyte, näytteet ja kontrollit pipetoidaan antigeenilevyille alla olevan taulukon 2 mukaan 100 µl/kuoppa. Käytössä oli kaksi eri kontrollia (K1 ja K2), jotka oli otettu Työterveyslaitoksen henkilökunnalta. Käytimme työskentelyssä 10–100 µl, 40–200 µl, 1 ml pipettejä sekä monikanavapipettejä.

Taulukko 2. Näytteiden pipetointi levyille

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	Kont.	kont.
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Pipetoinnin jälkeen näytelevyt ja standardilevyt peitettiin muovikalvolla ja inkuboitiin  $36 \pm 1$  °C:ssa  $120 \pm 3$  minuuttia. Inkuboinnin aikana näytteessä olevat vasta-aineet kiinnittyivät kuoppalevyn pohjalla oleviin antigeeneihin.

### 4.3.3 Konjugaatin lisäys

Konjugaatti valmistettiin 1:10000 pipetoimalla 10 µl konjugaatti Nordic Biosite -liuosta 100 ml:aan 10 % FBS-liuosta. Inkuboinnin jälkeen levyt pestiin mikrotiiterilevyjen Tecan M8/R2 Columbus Plus -kuoppalevypesurilla käyttämällä PBS + Tween 20 -puskuriliuosta (1l PBS-puskuria + 0,5 ml Tween 20 -puskuriliuosta) ja huuhdeltiin upottamalla levyt tislattuun veteen siten, että kuopat täyttyivät vedestä. Levyt nostettiin pöydälle kahden minuutin ajaksi, jonka jälkeen ne tyhjennettiin ja kuivattiin taputteleamalla napakasti selluloosaa vasten. Tämän jälkeen pipetoitiin konjugaattiliuosta 100 µl/kuoppa. Levyt peitettiin jälleen muovikalvolla ja inkuboitiin lämpökaapissa  $36 \pm 1$  °C:ssa  $120 \pm 3$  minuuttia. Konjugaatti eli

entsyymileimattu kaksoisvasta-aine sitoutuu inkuboinnin aikana näytteessä olevaan vasta-aineeseen.

#### 4.3.4 Substraatin lisäys

Substraattiliuokseen punnittiin p-Nitrophenyl phosphate -jauhetta 1,125 mg yhteen millilitraan Dietanolamiini-MgCl<sub>2</sub>-liuosta, joka on kaupallinen valmis liuos. Punnitus tehtiin vaakahuoneessa käsineet kädessä. Kahden tunnin jälkeen konjugaatin lisäyksestä, levyt pestiin pesulaitteella ja huuhdeltiin vedellä kuten ensimmäisen inkuboinnin jälkeen. Substraattiliuosta pipetoitiin 100 µl/kuoppa. Levyt peitettiin muovikalvolla ja inkuboitiin lämpökaapissa  $36 \pm 1$  °C:ssa  $30 \pm 1$  minuuttia. Substraatti sitoutuu inkuboinnin aikana entsyymiin, joka katalysoi eli nopeuttaa substraatin muuttumista reaktiotuotteeksi. Lopuksi kuoppiin pipetoitiin natriumhydroksidia (2-M NaOH) 50 µl/kuoppa reaktion pysäyttämiseksi.

#### 4.3.5 Pitoisuuden mittaus

Kun entsyymi katalysoi substraatin reaktiotuotteeksi, muodostuu värireaktio. Mitattu absorbanssi on suoraan verrannollinen näytteessä olevaan vasta-ainepitoisuuteen. Pitoisuuden mittaus tehtiin Tecan Spectrofluor -spektrofluorometrillä käyttäen aallonpituutta 405. Ohjelma määrittää näytteiden pitoisuudet standardisuoran avulla. Tulokset siirrettiin Tecan Magellan 3 -ohjelmasta Excel-ohjelmaan ja SPSS-tilasto-ohjelmaan. Excelillä tarkistimme aineiston ja poistimme kaksi maksimiarvon ylittävää näytettä.

#### 4.3.6 Viitearvojen määrittäminen

Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipiste määrittää IgM-vasta-aineiden viitearvot tutkittaville mikrobeille siten, että 90 % persentiilin raja-arvon alapuolelle jää 90 % terveistä henkilöistä. Määritimme arvot käyttämällä SPSS-tilasto-ohjelmaa. Viitearvot on esitetty taulukossa 3. Määritimme myös joitakin aineistoa kuvaavia tunnuslukuja, joita ovat keskiarvo, keskihajonta, mediaani, moodi, vinous ja

huipukkuus. Tunnuslukujen tarkoitus on antaa tarkempaa tietoa aineistosta ja havainnollistaa sitä.

## 5 TUTKIMUKSEN TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

Tutkimuksen tuloksena saadut IgM-vasta-aineiden viitearvot 16 mikrobille on esitetty taulukossa 3. Näytteiden IgM-vasta-aineiden viitearvoja verrattiin jo käytössä oleviin IgG- ja IgE-vasta-aineiden viitearvoihin (LIITE 7). Vertailun mukaan tutkittujen näytteiden IgM-vasta-ainepitoisuudet ovat matalampia kuin IgG-vasta-ainepitoisuudet sekä suurempia kuin IgE-vasta-ainepitoisuudet. IgE-pitoisuudet ovat yleensä matalia, sen sijaan IgG-pitoisuudet korkeampia. Laatikainen (2004, 389) toteaa, että IgG-vasta-aineet jäävät elimistöön primaari- ja sekundaari-infektioiden yhteydessä jopa koko eliniäksi. IgE-vasta-aineiden muodostuminen lisääntyy allergisissa tiloissa. IgM-vasta-aineita löytyy usein infektion alkuvaiheessa ja ne säilyvät elimistössä muutaman kuukauden ajan. Sekundaari-infektiossa IgM-vasta-aineiden muodostuminen on vähäisempää tai voi puuttua kokonaan. IgM-vasta-aineiden löytyminen seerumista kertoo lähikuukausien aikana sairastetusta infektiosta, ja tutkimuksia käytetään tuoreen infektion selvittämiseen.

Taulukko 3. IgM-vasta-aineiden viitearvot mikrobeille.

<b>Määrän ympäristön mikrobit (6-paneeli)</b>	<b>Viitearvot mg/l</b>	<b>Kosteusvauriomikrobit (7-paneeli)</b>	<b>Viitearvot mg/l</b>
<i>Acinetobacter sp.</i>	< 1,52	<i>Aspergillus versicolor</i>	< 1,43
<i>Acremonium atrogriseum</i>	< 1,96	<i>Chaetomium globosum</i>	< 2,23
<i>Acremonium kiliense</i>	< 3,00	<i>Fusarium merismoides</i>	< 3,19
<i>Bacillus cereus</i>	< 3,17	<i>Stachybotrys chartarum</i>	< 1,04
<i>Exophiala sp.</i>	< 2,91	<i>Streptomyces albus</i>	< 1,45
<i>Phialophora olivacea</i>	< 1,27	<i>Streptomyces halstedii</i>	< 1,99
<i>Rhodotorula glutinis</i>	< 8,76	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	< 1,37
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	< 5,79	<i>Tritirachium oryzae</i>	< 2,11

Tunnusluvut ovat luettavissa taulukossa 4. Tutkittavien näytteiden vasta-ainepitoisuudet vaihtelivat välillä 0,27 mg/l – 60,68 mg/l. Joidenkin homeiden kohdalla vasta-ainepitoisuus oli huomattavan korkea. Erityisen suuria vasta-ainepitoisuuksia oli *Rhodotorula glutinis* -homeelle, jolle suurin mitattu arvo oli 60,68 mg/l. *Rhodotorula glutinis* -homeelle pienin vasta-ainepitoisuus oli kuitenkin 1,20 mg/l, keskiarvo oli 5,34 mg/l ja keskihajonta 6,62. Tunnusluvut viittaavat siihen, että yksittäiset näytteet antavat suuria pitoisuuksia. Vasta-ainepitoisuuksien keskihajonta *Sporidiobolus johnsonii* -mikrobille oli 1,9, mutta muiden mikrobien kohdalla keskihajonta oli alle 1, joten näytteiden pitoisuudet olivat lähellä keskiarvopitoisuutta. Matalin keskiarvo, 0,70 mg/l, oli *Stachybotrus chartarum* -homeelle, joten tämän aineiston perusteella tälle homeelle altistus oli vähäisintä. Tulosten mukaan seerumin vasta-ainepitoisuudet tutkittaville mikrobeille olivat yleensä ottaen matalia ja vaihtelivat välillä 0,8 mg/l – 3,0 mg/l. Mediaanit olivat melko lähellä keskiarvoa, joten pitoisuudet olivat jakautuneet tasaisesti keskiarvon molemmin puolin.

Oletuksena tässä tutkimuksessa oli, että muuttujat ovat normaalisti jakautuneita, koska Holopaisen ja Pulkkisen (2008, 144) mukaan ihmisten fyysiset ja henkiset ominaisuudet noudattavat yleensä normaalijakaumaa. Vasta-ainepitoisuuksien normaalijakautuneisuutta tutkittiin SPSS-ohjelman One-Sample Kolmogorov-Smirnovin testillä. Muuttuja on normaalisti jakautunut, kun sig-arvo on yli 0,05. Suurin osa jakaumista on normaalisti jakautuneita. Vasta-ainepitoisuudet *Exophiala*, *Rhodotorula glutinis* ja *Sporidiobolus johnsonii* -homeelle eivät olleet normaalisti jakautuneita, koska sig-arvo oli alle 0,05. *Trititrachium oryzae* oli juuri ja juuri normaalisti jakautunut, koska sig-arvo oli 0,056.

Jokaisen vasta-ainepitoisuusjakauman vinous poikkesi hiukan nollasta. Poikkeama oli suurimmalla osalla niin pientä, että niitä voidaan kuitenkin pitää normaalisti jakautuneina. Kun vinous on suurempi kuin nolla, jakauma on oikealle (positiivisesti) vino. Tutkittavat jakaumat olivat kaikki hiukan oikealle vinoja. Huipukkuus oli vähäistä kaikilla vasta-ainepitoisuuksilla, lukuun ottamatta *Rhodotorula glutinis* -hometta, jolla huipukkuus oli 50,608. Vasta-ainepitoisuudet *Streptomyces albus* ja *Streptomyces halstedii* -mikrobeille olivat huipukkuudeltaan negatiivisia, joten jakaumat olivat huiputtomia.

Taulukko 4. Tunnusluvut.

MIKROBI	Keskiarvo	Mediaani	Moodi	Keskihajonta	Vinous	Huipukkuus	Min	Max	Sig-arvo
<i>Acinetobacter sp.</i>	1,001	0,909	0,715	0,449	1,735	3,719	0,356	2,694	0,018
<i>Acremonium atrogriseum</i>	1,401	1,350	0,931	0,424	0,946	1,026	0,749	2,799	0,275
<i>Acremonium kiliense</i>	1,792	1,768	1,439	0,843	1,354	3,343	0,509	5,538	0,297
<i>Aspergillus versicolor</i>	0,843	0,752	0,502	0,461	1,520	3,474	0,267	2,773	0,096
<i>Bacillus cereus</i>	2,035	1,885	0,723	0,754	1,104	1,586	0,723	4,699	0,179
<i>Chaetomium globosum</i>	1,421	1,362	1,120	0,576	0,991	1,698	0,521	3,744	0,220
<i>Exophiala sp.</i>	1,943	1,800	1,403	0,721	1,849	5,935	0,884	5,559	0,014
<i>Fusarium merismoides</i>	2,140	1,968	1,452	0,749	0,846	0,543	0,767	4,649	0,220
<i>Phialophora olivacea</i>	0,942	0,900	0,536	0,325	1,307	3,254	0,462	2,255	0,202
<i>Rhodotorula glutinis</i>	5,337	3,688	2,944	6,623	6,395	50,608	1,200	60,680	0,000
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	3,241	2,688	3,419	1,981	2,080	4,747	0,870	11,690	0,000
<i>Stachybotrus chartarum</i>	0,750	0,725	0,594	0,215	0,464	0,163	0,339	1,498	0,701
<i>Streptomyces albus</i>	1,077	1,057	0,725	0,276	0,437	-0,180	0,571	1,793	0,446
<i>Streptomyces halstedii</i>	1,401	1,373	1,199	0,413	0,415	-0,405	0,629	2,460	0,799
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0,976	0,956	0,576	0,297	0,247	0,243	0,392	1,712	0,918
<i>Tritirachium oryzae</i>	1,214	1,156	1,318	0,469	1,281	2,754	0,439	3,080	0,056

Sarjojen välistä toistettavuutta arvioitiin kontrollien perusteella. 6-paneelille tehtiin K1-kontrollilla 11 toistomittausta ja K2-kontrollilla 9 toistomittausta. 7-paneelille tehtiin K1-kontrollilla 9 toistomittausta ja K2-kontrollilla 11 toistomittausta. Kontrollien keskiarvo, keskihajonta, minimi ja maksimi on esitetty liitteessä 6. Kontrolleissa oli havaittavissa melko suurta hajontaa, mikä saattaa vaikuttaa tulosten luotettavuuteen.

## 6 TUTKIMUKSEN LUOTETTAVUUS

Kaikessa tutkimustoiminnassa pyritään välttämään virheitä. Tutkimuksen luotettavuuden arviointiin on monia erilaisia ja eri asioita painottavia käsityksiä. Määrällisessä tutkimuksessa mittauksen luotettavuutta kuvataan käsitteillä validiteetti ja reliabiliteetti, jotka yhdessä muodostavat mittarin kokonaisluotettavuuden. Lisäksi kokonaisluotettavuuteen vaikuttavia tekijöitä voivat olla tietojen syötössä tietokoneelle tapahtuvat virheet, niin sanotut käsittelyvirheet, mittausvälineiden

epätarkkuus, mittaukseen vaikuttavat häiriötekijät, peitto- ja katovirheet (esimerkiksi tutkittavasta joukosta ei ole ajan tasaista rekisteriä) sekä otantavirheet. (Tuomi 2006, 149–150.)

Validiteetti kuvaa sitä, mittaako mittari juuri sitä asiaa, mitä pitäisi. Mittaus on validia silloin, kun on onnistuttu mittaamaan juuri sitä, mitä on haluttu. Reliabiliteetti kuvaa mittauksen kykyä tuottaa pysyviä ja toistettavia tuloksia. (Tuomi 2006, 150.) Tutkimuksen reliabiliteettia arvioitiin kontrollien osalta. Mittauksissa käytettiin kahta kontrollia, joiden avulla voidaan arvioida menetelmän tarkkuutta ja toistettavuutta. Kontrollien keskihajonta joidenkin mikrobien kohdalla kertoo, että menetelmän toistotarkkuus ei ole määrityksissä ollut hyvä. Tässä tutkimuksessa reliabiliteettiin voi vaikuttaa esimerkiksi pipettien ja laitteiden tarkkuus sekä määritysten tekijöiden kädenjälki. Kontrollien keskihajonta voi vaikuttaa tulosten luotettavuuteen.

Tutkimuksen luotettavuutta olisi voinut lisätä tekemällä rinnakkaismääritykset näytteistä. Pienen näytemäärän vuoksi samaa seeruminäytettä ei voitu käyttää kuin yhdessä määrityksessä. Rinnakkaismääritysten pohjalta olisi voitu arvioida menetelmän toistettavuutta ja muita validoinnissa usein tarkasteltavia ominaisuuksia. Rinnakkaismääritysten avulla olisi voitu myös pohtia mahdollisten satunnaisvirheiden ilmenemistä. Ennen määrityksiä tutustuttiin huolellisesti työohjeisiin ja toiminnan vaiheet suunniteltiin etukäteen, mikä vähensi virheriskiä.

Tutkimuksen tarkoitus oli määrittää viitearvot 16 mikrobille. Tämä tarkoitus toteutui, joten tältä osin tutkimus on validi. Tutkimus tuotti viitearvojen osalta uutta tietoa ja se oli hyödyllinen Työterveyslaitokselle. Aineisto oli suhteellisen laaja, vaikka viitearvojen määrittämisessä käytetään usein laajempaa aineistoa. Työterveyslaitos on arvioinut 100 näytteen olevan riittävä määrä viitearvojen määrittämiseen. Asiakkaille kerrotaan, minkä kokoisesta otoksesta viitearvot on laskettu. Tutkimuksen tulosten luotettavuutta heikentää osaltaan se, että aineistosta saatu tieto jäi vähäiseksi.

Tilastollisen käsittelyn yhteydessä tarkistettiin, ettei tuloksissa tai niiden siirrossa ollut tapahtunut virheitä. IgM-vasta-ainemäärityksissä pyrittiin toimimaan tarkalleen ohjeiden mukaan. Aineistosta ei poistettu erityisen suuria ja pieniä arvoja. Tämä saattaa vääristää tulosten keskiarvoa joko suuremmaksi tai pienemmäksi. Esimerkiksi

*Rhodotorula glutunis* -mikrobin kohdalla yksittäisten näytteiden antamat pitoisuudet nostavat viitearvoa. Tämä on yksi syy, miksi tutkimuksen antamia viitearvoja on suositeltava käyttää viitteellisesti, ja luotettavampien viitearvojen saamiseksi vaadittaisiin laajempi otoskoko.

## 7 TUTKIMUKSEN EETTISYYS

Tutkimuksen tekemiseen liittyy monia eettisiä asioita, jotka tutkimuksessa tulee huomioida. Tutkimuksen teossa tulee noudattaa hyvää tieteellistä käytäntöä. Tähän kuuluu, että tutkijat noudattavat tiedeyhteisön toimintatapoja eli rehellisyyttä, huolellisuutta sekä tarkkuutta tutkimustyössä, tulosten tallentamisessa, arvioinnissa sekä esittämisessä. Tutkijat soveltavat tieteellisen tutkimuksen kriteerien mukaisia ja eettisesti kestäviä tiedonhankinta-, tutkimus- ja arviointimenetelmiä sekä noudattavat avoimuutta tutkimuksen tuloksia julkaistaessa. Tutkijan tulee ottaa muiden tutkijoiden saavutukset asianmukaisesti huomioon ja antaa niille kuuluva merkitys omassa tutkimuksessaan. Tutkimus tulee suunnitella, toteuttaa ja raportoida yksityiskohtaisesti ja asetettujen vaatimusten edellyttämällä tavalla. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2007, 23–27.) Tämän tutkimuksen suunnittelussa ja toteuttamisessa pyrittiin noudattamaan hyvää tieteellistä käytäntöä. Määritysten teossa pyrittiin olemaan huolellisia ja noudattamaan ohjeita tarkasti. Tutkimustulosten raportoinnissa haluttiin olla rehellisiä.

Hyvään tieteelliseen tapaan kuuluu myös ulkopuolisten lähteiden asiallinen käyttö (Vilka 2007, 165). Tässä tutkimuksessa pyrittiin mahdollisimman tarkkoihin ja selkeisiin lähdeviittauksiin. Ongelmana olivat puutteelliset lähdetiedot verkkoteksteissä. Tutkimuksessa arvioitiin jokaista lähteenä käytettyä tekstiä kriittisesti ja pohdittiin tiedon luotettavuutta sekä paikkansapitävyyttä. Tutkimuksessa pyrittiin välttämään vanhojen lähteiden käyttöä. Verkkolähteitä käytettäessä arvioitiin sivuston luotettavuutta ja kirjoittajan asiantuntemusta.

Lähtökohtana tutkimuksessa tulee olla, että tutkimus kunnioittaa ihmisarvoa. Ihmisten itsemääräämisoikeutta kunnioitetaan antamalla henkilölle mahdollisuus

päättää, osallistuuko hän tutkimukseen. Lisäksi tulee selvittää, miten henkilöiden suostumus hankitaan, millaista tietoa heille annetaan ja millaisia riskejä sisältyy heidän osallistumiseensa. Osallistumisen tulee olla vapaaehtoista. Epärehellisyyttä tulee huomioida seuraavissa asioissa: toisten tekstiä ei saa plagioida, tuloksia ei saa kaunistella, raportointi ei saa olla harhaanjohtavaa tai puutteellista eikä tutkimukseen myönnettyjä määrärahoja saa käyttää väärin. (Hirsjärvi ym. 2007, 23–27.) Tämän tutkimuksen aineistoa koskevat tiedot säilyvät salaisina. Aineistoa koskevat henkilökohtaiset tiedot eivät olleet tutkimuksen tekijöidenkään käytössä.

Tälle tutkimukselle tuli pyyntö Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipisteeltä, joka myös myönsi tutkimusluvan. Tutkijat saivat työskentelyoikeuden laboratorioon ja heidät perehdytettiin määrityksissä tarvittavien välineiden ja laitteiden käyttöön.

## 8 POHDINTA

Valitsimme opinnäytetyön aiheen oman mielenkiintomme mukaan. Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipisteellä oli tarjota meille mielenkiintoinen ja tarpeellinen aihe. Tutkimuksen tarkoituksena oli osallistua In-House ELISA-menetelmän validointiin määrittämällä viitearvot IgM-vasta-aineille. Tehtävä vaikutti sopivan haastavalta ja monipuoliselta ja siihen sisältyvät laboratoriomääritykset tuntuivat mielekkäiltä.

Teoreettisessa viitekehysessä käsitelimme kosteusvaurioita, kosteusvauriomikrobeja sekä niiden aiheuttamia terveyshaittoja. Halusimme sisällyttää työhömmä myös immunologian perusteet ja immunokemialliset menetelmät, koska ne ovat olennaisia aiheen ymmärtämisen kannalta. Sisällön looginen rakentaminen ja sen rajaus vaati syvällistä perehtymistä aihepiiriin ja yhteistyötä Työterveyslaitoksen kanssa.

Opinnäytetyössä syvennymme tarkemmin ELISA-menetelmän periaatteeseen ja erityisesti Työterveyslaitoksen, Kuopion aluetoimipisteen kehittämään In-House ELISA-menetelmään. Saimme osallistua IgM-vasta-ainemääritysten tekemiseen

Työterveyslaitoksella. Opimme, että uuden menetelmän kehittäminen ja validointi on työlästä ja vie aikaa. In-House ELISA-menetelmän toteuttamisessa haasteena on lisäksi se, että määrityksissä käytetään biologista materiaalia. Antigeeniliuoksista on vaikea saada homogeenisia. Määrityksissä tarvittavien antigeeni- ja standardilevyjen valmistus ja varsinainen määritysten tekeminen vievät aikaa useamman päivän ja vaativat monen ihmisen työpanoksen. Tämä tekee menetelmästä erityisen arvokkaan.

Kartutimme tietojamme immunologiasta, mikrobeista ja niiden kasvuvaatimuksista, kosteusvaurioista ja niiden aiheuttamista terveyshaitoista. Perehdyimme ELISA-menetelmän lisäksi myös muihin immunokemiallisiin määritysmenetelmiin ja vertailimme niitä. Opinnäytetyöprosessin aikana harjaannuimme monipuoliseen tiedonhakuun ja lähdemateriaalin käyttöön. Bioanalyytikon ammatillisen osaamisen kannalta saimme hyödyllistä kokemusta ELISA-määritysten tekemisestä. Yhteistyön Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipisteen kanssa koimme palkitsevaksi ja opettavaiseksi.

Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipiste on ainoa paikka Suomessa, jossa tehdään IgM-vasta-ainemäärityksiä biopölyspesifisille vasta-aineille. Yritimme hakea tietoa vastaavanlaisista IgM-vasta-ainemäärityksistä ja mikrobeille määritetyistä viitearvoista muualla maailmassa, mutta emme löytäneet. Tutkimuksen luotettavuuden kannalta olisi ollut erittäin hyvä verrata nyt määritettyjä viitearvoja muualla määritettyihin viitearvoihin.

Opinnäytetyön tekemistä vaikeuttivat ongelmat tiedonhankinnassa. Immunologian perusteista, kosteusvaurioista ja niiden aiheuttamista terveyshaitoista oli saatavilla runsaasti tietoa. Vaikeampi oli löytää tutkimuksen kannalta oleellista tietoa tutkittavista mikrobeista. Arvelimme tämän johtuvan siitä, että mikrobeista ei ole vielä olemassa tutkittua tietoa tai emme saaneet käsiimme uusimpia lähteitä. Immunokemiallisten menetelmien suhteen ongelmana oli menetelmien runsaus ja monimuotoisuus. Menetelmien etuja ja haittoja oli vaikea arvioida, koska yksityiskohtaista tietoa menetelmistä ei ollut saatavilla ja itsellämme ei ollut kokemusta niistä.

Koimme ongelmallisena teoreettisen viitekehyksen laajuuden. Asioihin syventyminen jää joiltakin osin pintapuoliseksi ja niukaksi ja sisältö on hajanainen.

Tutkimuksen tarkoitus muuttui työn aikana, mikä näkyy tuotoksessa. Alun perin tutkimuksen toisena tarkoituksena oli osallistua In-House ELISA-menetelmän validointiin, mutta tämä osio jäi melko suppeaksi työssämme. Syynä oli se, että validointi oli jo aloitettu kuukausia ennen kuin tulimme mukaan projektiin. Jo opinnäytetyön suunnitteluvaiheessa olisi pitänyt tarkemmin päättää, mitä validointi sisältää tässä tutkimuksessa. Myös oma perehtyminen menetelmän validointiin ennen työvaihetta olisi voinut olla syvällisempää, jotta olisimme osanneet huomioida joitakin asioita jo työvaiheen aikana. Lisäksi olisimme kaivanneet jonkinlaista mallia vastaavasta menetelmän validoinnista.

Vasta-ainemääritysten tekeminen onnistui hyvin. Tulosten käsittelyvaiheessa ilmeni, että sarjan rinnalla tehdyt standardisuorat olivat liian matalalla tasolla, joten pitoisuudeltaan korkeille näytteille ei pystytty laskemaan tuloksia. Lopullisen tulosten laskennassa käytimme Työterveyslaitoksen määrittämää keskiarvosuoraa. Määrittysarjojen kontrolleissa oli huomattavissa melko suurta hajontaa. Tähän vaikuttavia tekijöitä saattaisivat olla muun muassa tekijöiden kädenjälki, kontrollien näytteenottoajankohta, pipettien tarkkuus, pienet erot inkubointiajoissa ja -lämpötiloissa sekä menetelmän tarkkuus.

Jos aineistosta olisi ollut käytettävissä tietoa laajemmin (esimerkiksi ikä, sukupuoli ja oireet), olisimme voineet tarkastella vasta-ainepitoisuuksia niiden pohjalta. Olisi ollut mielenkiintoista verrata esimerkiksi henkilön oireita suhteessa vasta-ainetasoon.

Tässä tutkimuksessa määritettyjä viitearvoja biopölyspesifisille IgM-vasta-aineille Työterveyslaitoksen Kuopion aluetoimipiste voi käyttää vertailuarvoina tehdessään vasta-ainemäärityksiä asiakkaille. Työterveyslaitos aikoo lisätä IgM-vasta-ainemääritykset tutkimusvalikoimaansa vuonna 2010.

## LÄHTEET

**Bornehag, C.G., Sundell, J., Hagerhed-Engman, L., Sigsggard, T., Janson, S. & Aberg, N.** 2005. 'Dampness' at home and its association with airway, nose, and skin symptoms among 10,851 preschool children in Sweden: a cross-sectional study, 3–4. Viitattu 2.4.2009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

**Brostoff, J., Male, D. & Roitt, I.** 1996. Immunology. Barcelona: Times Mirror International Publishers Limited, 4-2-4-3.

**Decker, J. M.** 2006. The University of Arizona. Immunology. Päivitetty 1.2.2006. Viitattu 7.11.2009. <http://www.microvet.arizona.edu/courses/mic419/ToolBox/elisa.html>

**De Hoog, G.S., Guarro, J., Tan, C.S., Winternans, R.G.F. & Gene, J.** 1995. Teoksessa G. S. De Hoog & J. Guarro (toim.) Atlas of clinical fungi. Reus: Universitat Rovira i Virgili, 187, 214.

**Doctor fungus.** 2007. The fungi. Trichoderma spp. Päivitetty 1.7.2007. Viitattu 21.4.2009. <http://www.doctorfungus.org/Thefungi/Trichoderma.htm>

**EMLab.** 2008. Fungi. Tritirachium sp. Viitattu 21.4.2009. <http://www.emlab.com/app/fungi/Fungi.po?event=fungi&type=secondary&species=126&name=Tritirachium>

**Ericson, E. & Ericson, T.** 1992. Kliininen mikrobiologia ja infektioaudit. Helsinki: Otava.

**Ferrala, N.** 1999. Aspergillus versicolor. Päivitetty 29.5.1999. Viitattu 21.4.2009. <http://www.bio.net/bionet/mm/mycology/1999-May/007314.html>

**Haahtela, T. & Reijula, K.** 2009. Homesienten aiheuttamat hengityselinsairaudet. Päivitetty 19.1.2009. Viitattu 14.10.2009.

[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=seh00071](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=seh00071)

**Haahtela, T.** 2007. Sisäilman homesienet. Teoksessa T. Haahtela, M. Hannuksela, K. Karjalainen, M. Mäkelä, A. Sovijärvi & E. Terho (toim.) Allergia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 380.

**Haahtela, T., Nordman, H. & Talikka, M.** 1993. Sisäilma ja terveys. Allergialiitto.

**Halonen, T.** 2004. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa I. Penttilä (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Helsinki: WSOY, 90–100.

**Helsingin Hengitysyhdistys ry.** 2008. Paikallisyhdistykset. Tietoutta kosteusvaurioista ja niille altistuneiden elämästä. Helsingin hengitysyhdistys ry:n verkkosivut. Päivitetty 27.12.2008. Viitattu 2.3.2009.

<http://www.hengitysliitto.fi/helsinki/>

**Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P.** 2007. Tutki ja kirjoita. Helsinki: Tammi.

**Holopainen, M. & Pulkkinen, P.** 2008. Tilastolliset menetelmät. 5. uudistettu painos. Helsinki: WSOY.

**Husman, T. & Seuri, M.** 2002. Miten tutkin ja hoidan kosteusvauriorakennuksessa oireilevan potilaan? Itä-Suomen Työterveyslääkärit ry:n julkaisu. Hometta 2, 30–34.

**Husman, T.** 2002. Homealtistuksen aiheuttamat oireet ja sairaudet. Itä-Suomen Työterveyslääkärit ry:n julkaisu. Hometta 2, 10–12.

**Hägerhed-Engman, L., Sigsgaard, T., Samuelson, I., Sundell, J., Janson, S. & Bornehag, C.G.** 2009. Low home ventilation rate in combination with moldy odor from the building structure increase the risk for allergic symptoms in children. Päivitetty 9.3.2009. Viitattu 2.4.2009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

**Immonen, J.** 2002. Kosteus- ja homevaurioituneiden koulurakennusten vaikutus koululaisten vasta-aineisiin ja keuhkojen toimintaan. Suomen Lääkärilehti 57 (44), 4523.

**Immunochemical methods.** 2005. Biological assays. European pharmacopoeia 1, 187–188. Viitattu 20.9.2009.

[http://lib.njutc.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/02\\_methods\\_of\\_analysis/2.7.\\_\\_biological\\_assays/2.7.1.%20Immunochemical%20methods.pdf](http://lib.njutc.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/02_methods_of_analysis/2.7.__biological_assays/2.7.1.%20Immunochemical%20methods.pdf)

**Jaarinen, S. & Niiranen, J.** 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. painos. Helsinki: Edita Publishing Oy.

**Jääskeläinen, E.** 2008. Bacillus cereus ruokamyrkytyksen aiheuttajana. Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen julkaisut. Päivitetty 13.3.2008. Viitattu 14.4.2009.

[http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet\\_2008/nro\\_3\\_2008/bacillus\\_cereus\\_ruokamyrkytysten\\_aiheuttajana/](http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet_2008/nro_3_2008/bacillus_cereus_ruokamyrkytysten_aiheuttajana/)

**Kalso, S., Vahanen, R., Puhakka, E. & Viitanen, H.** 1996. Kosteusvauriot. Sisäilmätietokeskus. Teoksessa Terveellinen sisäilma (toim.) Helsinki: Suomen Sisäilmaston Mittauspalvelu Oy.

**Kalso, S. & Koukila-Kähkölä, P.** 1996. Sienisuvut. Sisäilmätietokeskus. Teoksessa Terveellinen sisäilma (toim.) Helsinki: Suomen Sisäilmaston Mittauspalvelu Oy.

**Koivisto, J., Haverinen, U., Meklin, T., Halla-aho, J. & Nevalainen, A.** 2002. Koulurakennusten kosteusvauriot. Sisäilmastoseminaari 2002. SIY Raportti 17, 173–177.

**Laatikainen, A.** 2004. Puolustusvaste. Vasta-ainevälitteinen immunitetti. Teoksessa I. Penttilä (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY, 395–401.

**Lehtonen, P.O. & Sihvonen, M.-L.** 2004. Laboratoriaoalan analyttinen kemia. Helsinki: Opetushallitus.

**Malmivaara, M.** 2002. Kosteusvauriot, mitä ne maksavat. Itä-Suomen Työterveyslääkärit ry:n julkaisu. Hometta 2, 43–47.

**Meklin, T., Putus, T., Hyvärinen, A., Haverinen-Shaughnessy, U., Lignell, U. & Nevalainen, A.** 2007. Koulurakennusten kosteus- ja homevauriot. Opas ongelmien selvittämiseen. Kansanterveyslaitoksen julkaisuja 9/2007. Kansanterveyslaitos. Viitattu 19.5.2009.  
[http://www.ktl.fi/attachments/suomi/julkaisut/julkaisusarja\\_c/2007/2007c09.pdf](http://www.ktl.fi/attachments/suomi/julkaisut/julkaisusarja_c/2007/2007c09.pdf)

**Menetelmät, menetelmien validointi ja mittausten jäljitettävyys.** 2005. Kansanterveyslaitoksen julkaisuja B. Hyvä tutkimustapa KTL:ssa. Eräiden tutkimustyyppien erityispiirteet. Kliinisten näytetutkimusten erityispiirteet. Päivitetty 19.5.2005. Viitattu 25.4.2009 <http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/julkaisusarjat/>

**Metsämuuronen, J.** 2000. Tilastollisen päättelyn perusteet. Viro: Jaabes OÜ.

**Mustajoki, P & Kaukua, J.** 2008. Mitä tarkoittaa viitearvo. Senkka ja 100 muuta tutkimusta. Kustannus Oy Duodecim. Päivitetty 9.7.2008. Viitattu 21.4.2009.  
[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=snk02060](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk02060)

**Mäkinen, O.** 2005. Tieteellisen kirjoittamisen ABC. Helsinki: Tammi.

**Nevalainen, A.** 2002. Missä mennään homekysymyksessä? Itä-Suomen Työterveyslääkärit ry:n julkaisu. Hometta 2, 2–4.

**Nevalainen, A., Husman, T. & Hirvonen, M-R.** 2004. Hankala, haitallinen home. Aikakauskirja Duodecim. 120 (13), 1681–7.  
[http://www.ktl.fi/portal/suomi/terveyden\\_ammattilaisille/ymparistoterveys/hometalot/tutkimustietoa](http://www.ktl.fi/portal/suomi/terveyden_ammattilaisille/ymparistoterveys/hometalot/tutkimustietoa)

**Nordman, H., Toskala-Hannikainen, E., Kari, O., Piipari, R. & Uitti, J.** 2007. Kosteusvauriomikrobien aiheuttamien sairauksien tutkiminen. Suomen Lääkärilehti 57(9), 911–917.

**Paunonen, M. & Vehviläinen-Julkunen, K.** 1997. Hoitotieteen tutkimusmetodiikka. Helsinki: WSOY.

**Penttilä, I.** 2004. Viitearvot ja niiden määrittäminen. Teoksessa I. Penttilä (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Helsinki: WSOY, 18–20.

**Pirkanmaan sairaanhoitopiiri.** 2007. Akinetobakteeri sulkee Taysin plastiikka- ja käsikirurgisen osaston uusilta potilailta. Päivitetty 24.10.2008. Viitattu 14.4.2009. <http://www.tays.fi/default.aspx?contentid=3436&nodeid=9469&contentlan=1>

**Puolijoki, H.** 2001. Kodin kosteusvaurio ja allergiaoireet. Suomen Lääkärilehti 56 (30–32), 3048.

**Putus, T.** 2006c. Home ja terveys -sivustot. Tärkeimmät mikrobisivut. Aktinobakteerit. Päivitetty 29.3.2008. Viitattu 14.4.2009. [http://www.homejaterveys.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=72&Itemid=71](http://www.homejaterveys.net/index.php?option=com_content&view=article&id=72&Itemid=71)

**Putus, T.** 2006b. Home ja terveys –sivustot. Tärkeimmät mikrobisivut. Hiivat. Päivitetty 29.3.2008. Viitattu 14.4.2009. [http://www.homejaterveys.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=71&Itemid=70](http://www.homejaterveys.net/index.php?option=com_content&view=article&id=71&Itemid=70)

**Putus, T.** 2006a. Home ja terveys –sivustot. Tärkeimmät mikrobisivut. Homeet. Päivitetty 29.3.2008. Viitattu 14.4.2009. [http://www.homejaterveys.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=70&Itemid=69](http://www.homejaterveys.net/index.php?option=com_content&view=article&id=70&Itemid=69), <http://www.heli.fi/Paikallisyhdistykset/HelsinginHengitysyhdistys/>

**Pätäri, A. & Holthöfer, H.** 2003. Laboratoriokäsikirja. Immunologian abc. Viitattu 3.3.2009. [http://www.yhtyneetlaboratoriot.fi/kasikirja/?file=content\\_exec&id=62&submenu=3](http://www.yhtyneetlaboratoriot.fi/kasikirja/?file=content_exec&id=62&submenu=3)

**Ranta, H.** 2004. Sienet ja terveys. Mikrosienten esiintyminen luonnossa ja ulkoilmassa. Lääketieteellisen mykologian seuran tiedotuslehti 7 (2). Viitattu 1.9.2009. <http://www.mykologia.net/sienetjaterveys2.pdf.pdf>

**Reijula, K.** 2001. Ihminen terveellisessä ympäristössä. Kirjasarja Suomen Lääkäriliitto. Helsinki: Suomen lääkäriliitto.

**Reijula, K.** 2009. Homealtistumisen selvittely kosteusvauriorakennuksissa. Lääkäriin käsikirja. Päivitetty 12.2.2009. Viitattu 4.9.2009.  
[http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/koti?p\\_haku=homealtistuminen](http://www.terveysportti.fi/dtk/ltk/koti?p_haku=homealtistuminen)

**Renkonen, O-V.** 1996. Pseudomonakset ja muut melko avirulentit aerobiset gramnegatiiviset sauvat. Teoksessa A. S. Tiilikainen, M. Vaara & A. Vaheri (toim.) Lääketieteellinen mikrobiologia. 7. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 398.

**Rintala, H.** 2004. Väitöskirja-artikkeli. Streptomykeettien toteaminen ja monimuotoisuus sisäympäristössä. Kansanterveyslehti 2. Päivitetty 27.2.2004. Viitattu 22.4.2009..  
[http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet\\_2004/2\\_2004](http://www.ktl.fi/portal/suomi/julkaisut/kansanterveyslehti/lehdet_2004/2_2004)

**Scott, F. G.** 1997. Developmental biology. Fifth edition. Sinauer Associates, Inc. Viitattu 4.9.2009. <http://8e.devbio.com/article.php?id=31>

**Seppälä, I. J. T.** 1996a. Immuunivasteen määritysmenetelmiä. Teoksessa A. S. Tiilikainen, M. Vaara & A. Vaheri (toim.) Lääketieteellinen mikrobiologia. 7. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 113, 126.

**Seppälä, I. J. T.** 1996b. Vasta-aineet eli immunoglobuliinit. Teoksessa A. S. Tiilikainen, M. Vaara & A. Vaheri (toim.) Lääketieteellinen mikrobiologia. 7. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 5–17.

**Seuri, M. & Reiman, M.** 1996. Rakennusten kosteusvauriot, home ja terveys. Helsinki: Rakennustieto Oy.

**Seuri, M., Nevalainen, A. & Sauni, R.** 2007. Kosteusvauriorakennusten mikrobikasvuun liittyvät hengitystieoireet ja -sairaudet. Suomen Lääkärilehti 62 (8), 783–787.

**Silvennoinen-Kassinen, S.** 1996. Sienet, mycota (fungi). Teoksessa A. S. Tiilikainen, M. Vaara, & A. Vaheri (toim.) Lääketieteellinen mikrobiologia. 7. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 440.

**Sisäilmayhdistys ry.** 2008. Terveelliset tilat. Katsaus mikrobeihin. Viitattu 14.4.2009.  
[http://www.sisailmayhdistys.fi/portal/terveelliset\\_tilat/kosteusvauriot/mikrobit/katsaus\\_mikrobeihin](http://www.sisailmayhdistys.fi/portal/terveelliset_tilat/kosteusvauriot/mikrobit/katsaus_mikrobeihin)

**Soppi, E.** 1992. Vasta-ainevälitteinen immunitetti. Kliininen immunologia. Tampere: Oy Medical Interscience Talents M.I.T. Consulting Ltd, 1–2, 5–6.

**Steinman, H.** 2006. ImmunoCAP. ImmunoCAP Allergens. Chaetomium globosum. Viitattu 20.4.2009.  
[http://www.immunocapinvitrosight.com/dia\\_templates/ImmunoCAP/Allergen\\_\\_\\_\\_28157.aspx](http://www.immunocapinvitrosight.com/dia_templates/ImmunoCAP/Allergen____28157.aspx)

**The Universite of Adelaide.** 2008. Mycology Online. Exophiala sp. Viitattu 20.4.2009.  
[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(dematiaceus\)/Exophiala/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(dematiaceus)/Exophiala/)

**Tirri, R., Lehtonen, J., Lemmetyinen, R., Pihakaski, S. & Portin, P.** 2001. Biologian sanakirja. Helsinki: Otava.

**Towner, K. J.** 1996. Biology of Acinetobacter spp. Teoksessa E. Bergogne-Berezin, M. L. Joly-Guillou & K. J. Towner (toim.) Acinetobacter: Microbiology, Epidemiology, Infektions, Management. Florida: CRC Press, Inc. Boca Raton, 3–4. Viitattu 20.4.2009. <http://books.google.fi/books?id=Eyc4sX6yWcoC>

**Tuomi, J.** 2007. Tutki ja lue. Johdatus tieteellisen tekstin ymmärtämiseen. Helsinki: Tammi.

**Turpeenoja, L.** 1995. Biokemiaa. 2. uudistettu painos. Helsinki: Opetushallitus.

**Työterveyskirjasto.** 2009. Lääketieteen termit. Acinetobacter. Viitattu 14.4.2009. Kustannus Oy Duodecim.  
[http://www.terveysportti.fi/tyoterveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=ltm22189](http://www.terveysportti.fi/tyoterveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltm22189)

**Työterveyslaitos, Kuopion aluetoimipiste.** 2009. Phialophora olivacea. Moniste kosteusvauriomikrobeista ja märän ympäristön mikrobeista.

**Vaara, M.** 1996. Kuinka infektio tauti saa alkunsa ja etenee? Teoksessa A. S. Tiilikainen, M. Vaara & A. Vaari (toim.) Lääketieteellinen mikrobiologia. 7. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 206.

**Vaara, M., Sarvas, M. & Mäkelä P.** 1996. Bakteerien rakenne. Teoksessa A. S. Tiilikainen, M. Vaara & A. Vaari (toim.) Lääketieteellinen mikrobiologia. 7. uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 233.

**Vilka, H.** 2007. Tutki ja mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Tammi.

## LIITE 1. Immunokemialliset menetelmät.

MENETELMÄ	PERIAATE	MERKKIAINE	KÄYTTÖ
Radioimmunomääritys- menetelmä (RIA) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Perinteinen RIA</li> <li>• Immunoradio- metrinen menetelmä (IRMA)</li> </ul>	Kilpailevaan sitoutumiseen perustuva heterogeeninen menetelmä Kaksoisvasta- ainetekniikkaan perustuva heterogeeninen menetelmä	Radioaktiivinen merkkiaine esim. <sup>125</sup> I	Herkkyyden ja spesifisyyden vuoksi soveltuu pienien pitoisuuksien mittaamiseen, epäherkkä häiritseville tekijöille, isotooppi on helppo liittää antigeeniin tai vasta- aineeseen  Herkempi kuin perinteinen RIA, laajempi mittausalue
Entsyymi- immunomääritys- menetelmä (EIA) <ul style="list-style-type: none"> <li>• ELISA- menetelmä (enzyme-linked immunosorbent assay)</li> <li>• EMIT- menetelmä (enzyme-multiplied immunoassay technique)</li> <li>• MEIA- menetelmä (micro particle enzyme immuno assay)</li> <li>• CEDIA –menetelmä (Cloned enzyme donor immuno assay)</li> </ul>	Kaksoisvasta- ainetekniikkaan perustuva heterogeeninen menetelmä Homogeeninen EIA- menetelmä  Heterogeeninen EIA- menetelmä  Homogeeninen EIA-menetelmä	Entsyymi esim. fosfataasi, piparjuuriperoksidaasi sekä glukoosi-6- fosfaattidehydrogenaasi   geeniteknologisesti valmistettu beetagalaktosidaasientsyymi	Käytetään kliinisessä kemiassa, seulonta-, vierianalytiikka- ja kotitestisovellutuksissa  Lääkeaine-, hormoni- ja metaboliittimäärityksissä, ei yhtä herkkä kuin ELISA- ja MEIA- menetelmä  Syrjäyttämässä EMIT - menetelmän; käytetään lääkeaine-, hormoni- ja metaboliittimäärityksissä
Fluoroimmunomääritys- menetelmä (FIA) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aikaerotteinen fluoroimmunomääritys- menetelmä (TRFIA)</li> <li>• Fluoresenssipolari- saatioimmunomääritys- menetelmä (FPIA)</li> <li>• FRET (Fluorescence resonance excitation transfer)</li> </ul>	Joko kilpailevaan sitoutumiseen tai kaksoisvasta- ainetekniikkaan perustuva heterogeeninen menetelmä Kilpailevaan sitoutumiseen perustuva homogeeninen menetelmä Homogeeninen kaksoisvasta- ainetekniikka	Fluoresoivia molekyylijä  europium, samarium tai terbium  fluoreskeiini-isotiosynaatti  europium (III) trisbipyridiinkryptaatti, allofykosyaniini	Menetelmät erittäin herkkiä, jopa 10 <sup>-15</sup> mol/l pitoisuuksia voidaan mitata Hormoni- ja immunoglobuliini- määrityksissä  Lääkeainepitoisuuksien mittauksessa, menetelmä erittäin herkkä  Herkkyys jopa 0,25 µg/l, hormoni-, kilpirauhas-, tuumorimarkkeri ja sydänmerkkiainediagnostiikassa
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kemiluminesenssi- immunomääritys CLIA</li> </ul>	Heterogeeninen immunomääritys- menetelmä	kemiluminisioivia molekyylijä ( esim. isoluminoli ja fenyylifosforyyli- adamantyyliidioksetaani)	RIA- menetelmään verrattuna herkempi ja lyhyempi mittausaika. Käytetään lääkeaine-, vitamiini- , hormoni- ja erilaisissa proteiinimäärityksissä

## LIITE 2. Antigeenilaimennokset ja pipetointikaavio.

Antigeeni: tunnus (uusi erä)				Antigeeni: tunnus ja erä (vanha erä)	
1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
1:800	1:800	1:51200	1:51200	1:2000	1:2000
1:100	1:100	1:6400	1:6400	1:1000	1:1000
1:200	1:200	1:12800	1:12800	1:2000	1:2000
1:400	1:400	1:25600	1:25600	1:4000	1:4000
1:800	1:800	1:51200	1:51200		
1:1600	1:1600	1:102400	1:102400		
1:3200	1:3200	1:204800	1:204800		
1:6400	1:6400	1:409600	1:409600		
A7 1:100	näyte 1:100	A7 1:100	näyte 1:100	A7 1:100	näyte 1:100

## LIITE 3. Uuden antigeenierän laimennokset

Antigeeni: tunnus

	1-3	4-6	7-9	10-12
A	1:1000	1:2000	1:3000	
B	1:1000	1:2000	1:3000	
C	1:1000	1:2000	1:3000	
D	1:1000	1:2000	1:3000	
E	1:1000	1:2000	1:3000	
F	1:1000	1:2000	1:3000	
G	1:1000	1:2000	1:3000	
H	1:1000	1:2000	1:3000	



## LIITE 5. Standardilaimennossarja.

Pitoisuudet mg/l	Edellisestä putkesta otettu	PBS-puskuria
100 mg/l	2,7 ml	1,3 ml
32 mg/l	1,6 ml	3,4 ml
16 mg/l	3 ml	3 ml
8 mg/l	3 ml	3 ml
4 mg/l	3 ml	3 ml
2 mg/l	3 ml	3 ml
1,5 mg/l	3,75 ml	1,25 ml
1 mg/l	4 ml	2 ml
0,75 mg/l	3 ml	1 ml
0,5 mg/l	2 ml	1 ml
0,25 mg/l	1,5 ml	1,5 ml
0,1 mg/l	2 ml	3 ml
0,05 mg/l	2 ml	2 ml
0,025 mg/l	2 ml	2 ml

## LIITE 6. Kontrollit.

Kontrolli 1				
	Keskiarvo	Keskihajonta	Min	Max
<i>Acinetobacter sp.</i>	0,376	0,124	0,159	0,547
<i>Acremonium atrogriseum</i>	0,729	0,216	0,475	1,108
<i>Acremonium kiliense</i>	0,799	0,205	0,502	1,084
<i>Aspergillus versicolor</i>	0,392	0,050	0,330	0,486
<i>Bacillus cereus</i>	1,031	0,256	0,759	1,473
<i>Chaetomium globosum</i>	0,504	0,148	0,280	0,772
<i>Exophiala sp.</i>	0,838	0,249	0,501	1,222
<i>Fusarium merismoides</i>	0,945	0,141	0,739	1,174
<i>Phialophora olivacea</i>	0,374	0,088	0,261	0,507
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0,760	0,198	0,537	1,198
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	0,853	0,181	0,622	1,131
<i>Stachybotrus chartarum</i>	0,346	0,046	0,287	0,416
<i>Streptomyces albus</i>	0,498	0,099	0,391	0,658
<i>Streptomyces halstedii</i>	0,620	0,073	0,496	0,712
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0,473	0,051	0,406	0,574
<i>Tritirachium oryzae</i>	0,498	0,074	0,412	0,667
Kontrolli 2				
	Keskiarvo	Keskihajonta	Min	Max
<i>Acinetobacter sp.</i>	0,513	0,267	0,285	1,021
<i>Acremonium atrogriseum</i>	0,464	0,302	0,205	1,068
<i>Acremonium kiliense</i>	0,627	0,457	0,215	1,403
<i>Bacillus cereus</i>	1,403	0,747	0,768	3,194
<i>Exophiala sp.</i>	1,189	0,538	0,627	2,258
<i>Phialophora olivacea</i>	0,496	0,260	0,230	1,027
<i>Rhodotorula glutinis</i>	5,621	5,211	2,125	18,700
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	2,004	0,679	1,166	3,086
<i>Aspergillus versicolor</i>	0,232	0,069	0,146	0,386
<i>Chaetomium globosum</i>	0,473	0,141	0,191	0,667
<i>Fusarium merismoides</i>	0,741	0,111	0,572	0,884
<i>Stachyrobotrys chartarum</i>	0,361	0,068	0,274	0,467
<i>Streptomyces albus</i>	0,476	0,101	0,237	0,612
<i>Streptomyces halstedii</i>	0,741	0,088	0,612	0,878
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0,457	0,091	0,288	0,628
<i>Tritirachium oryzae</i>	0,443	0,079	0,330	0,596

## LIITE 7. Viitearvojen vertailutaulukko.

	IgM mg/l	IgG mg/l	IgE kU/l *
<i>Acinetobacter sp.</i>	< 1,52	< 22	< 0,10
<i>Acremonium atrogriseum</i>	< 1,96	< 18	< 0,19
<i>Acremonium kiliense</i>	< 3,00	< 26	< 0,13
<i>Aspergillus versicolor</i>	< 1,43	< 34	< 0,10
<i>Bacillus cereus</i>	< 3,17	< 9	< 0,26
<i>Chaetomium globosum</i>	< 2,23	< 25	< 0,27
<i>Exophiala sp.</i>	< 2,91	< 18	< 0,16
<i>Fusarium merismoides</i>	< 3,19	< 25	< 0,27
<i>Phialophora olivacea</i>	< 1,27	< 6	< 0,35
<i>Rhodotorula glutinis</i>	< 8,76	< 110	< 0,40
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	< 5,79	< 23	< 0,23
<i>Stachybotrus chartarum</i>	< 1,04	< 14	< 0,10
<i>Streptomyces albus</i>	< 1,45	< 41	< 0,19
<i>Streptomyces halstedii</i>	< 1,99	< 36	< 0,10
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	< 1,37	< 38	< 0,13
<i>Tritirachium oryzae</i>	< 2,11	< 18	< 0,22

\*) pitoisuudet alle tämän ovat negatiivisia