

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2017

Heli Junes

# VERTAILUMATERIAALIN TUOTTAMINEN JA MYCOMETER<sup>®</sup>-MENETELMÄN VALIDOINTI



Heli Junes

## VERTAILUMATERIAALIN TUOTTAMINEN JA MYCOMETER -MENETELMÄN VALIDOINTI

Mikrobivaurion havaitseminen rakennusmateriaalista mikrobiologisin menetelmin elatusaineelle viljelemällä on tehokasta, mutta aikaa vievää. Mycometer analysaattori mittaa entsyymipitoisuutta, joka korreloi näytteessä olevan mikrobikasvuston kanssa. Analyysin etuna on nopeus, mittaolosuhteista riippuen tulos on saatavissa maksimissaan kahden tunnin kuluttua mittauksen aloittamisesta. Työ suoritettiin Turun Yliopistolla, Aerobiologian yksikössä ja työn tarkoituksena oli validoida Mycometer-menetelmä rakennusmateriaalissa olevan mikrobipitoisuuden määrittämiseen.

Validointi suoritettiin vertaamalla tuloksia referenssimenetelmällä saatuihin tuloksiin. Referenssimenetelmänä tässä validoinnissa käytettiin asumisterveysasetuksen mukaista laimennusviljelyä. Näytteet viljeltiin laimennusviljelynä ja analysoitiin Mycometerillä samassa pitoisuustasossa, jotta pystyttiin havaitsemaan menetelmien antamien tulosten erot.

Vertailumateriaali tuotettiin kammiokasvatuksena kontrolloidussa ilmankosteudessa ja lämpötilassa, jotta saatiin mahdollisimman yhteneviä tuloksia antavaa materiaalia. Näyttematriisina käytettiin steriloitua sahanpurua, johon oli ymppeämällä siirretty kasvamaan haluttu sienilaji. Tuotetun vertailumateriaalin lisäksi validointimateriaalina käytettiin Aerobiologian yksikköön vuoden 2015 aikana tuotuja rakennusmateriaalinäytteitä, jotka oli kerätty aidoista vauriokohteista.

Validoinnin perusteella voidaan todeta, että Mycometer antaa lähes täysin yhtenevän tai vähintään suuntaa antavan tuloksen referenssimenetelmään verraten. Tuloksia tulkittiin asumisterveysasetuksen ohjeiden sekä Mycometer A/S antamien ohjeiden mukaisesti. Onnistuneen validoinnin jälkeen menetelmä voitaisiin ottaa käyttöön muiden analyysimenetelmien rinnalle. Menetelmän heikkouksien vuoksi, kuten menetelmällä ei pystytä tunnistamaan eri mikrobilajeja, menetelmällä ei voida korvata nykyisin käytössä olevia menetelmiä.

### ASIASANAT:

Validointi, Mycometer, vertailumateriaali, sisäilmaongelma, homesienet,  $\beta$ -N-asetyyliheksaamidaasi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology/ Biotechnology

2017 | 60

Ilari Suominen, M.Sc, Turku University of Applied Sciences

Sirkku Häkkinen, MA, University of Turku

Heli Junes

## PREPARATION OF REFERENCE MATERIAL AND VALIDATION OF MYCOMETER® METHOD

Microbiological growth in a building material is effectively detected by microbial methods but such methods are time-consuming. In the Mycometer method, enzyme activity is measured by fluorometry. The advantage of the Mycometer method is speed: depending on the measuring conditions the result is available in less than two hours. This study was performed in the Aerobiology Unit at Turku University. The aim of the study was to validate the Mycometer method for detection of fungal content in the building material.

The validation was performed by comparing obtained results with the results obtained by the reference method. The reference method was dilution cultivation, which was executed in compliance with the Decree on Health-related Conditions of housing. All the samples were cultivated by dilution cultivation and analyzed with Mycometer at the same content level for detecting differences in results between these two methods.

The reference material was prepared by molding in a chamber where air humidity and temperature were controlled. The main aim when preparing the reference material was to get congruent results. In this validation, woodchips were used as a sample matrix, which were inoculated after sterilization with the desired fungi species. In addition to the produced reference material, samples from buildings with a genuine moisture problem which had been brought to the Aerobiology unit were also used in the validation.

On the basis of the validation results, it can be concluded that the Mycometer gives almost identical results or at least indicative results when compared with the reference method. The results were interpreted on the basis of instructions in the relevant decree and those provided by Mycometer A/S. After a successfully performed validation the method can be brought into use along with currently used methods. Due to the weaknesses of the method, such as those related to identification of species, it cannot replace current methods, however.

### KEYWORDS:

Validation, Mycometer, reference material, indoor air problem, mold,  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>2 MYCOMETER® -MENETELMÄ</b>	<b>3</b>
<b>3 VERTAILUMATERIAALIN TUOTTAMINEN HOMEHDUTTAMALLA</b>	<b>7</b>
<b>4 VALIDOINTI</b>	<b>8</b>
4.1 Oikeellisuus	11
4.2 Täsmällisyys	11
4.3 Spesifisyys ja selektiivisyys	12
4.4 Herkkyys	12
4.5 Lineaarisuus	13
4.6 Häiriöalttius	13
4.7 Mittausalue	13
4.7.1 Toteamisraja	14
4.7.2 Määrittäysraja	14
4.8 Menetelmien vertailu	15
<b>5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b>	<b>16</b>
5.1 Reagenssit ja laitteet	16
5.2 Kammiokasvatus	16
5.3 Suspension valmistus	18
5.3.1 Fuchs Rosenthal laskentakammio	19
5.4 Materiaalin käsittely ja ympäryys	20
5.5 Elatusaineet	21
5.6 Viljely	22
5.6.1 Laimennusviljely	22
5.6.2 Suoraviljely	23
5.6.3 Mycometer analyysi	23
<b>6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU</b>	<b>25</b>
6.1 Menetelmien vertailu	26
6.1.1 <i>Paecilomyces variotii</i>	27
6.1.2 <i>Aureobasidium pullulans</i>	31
6.1.3 <i>Chaetomium globosum</i>	35

6.1.4 <i>Aspergillus restrictus</i>	35
6.1.5 Asiakasnäytteet	36
6.2 Täsmällisyys	38
6.3 Herkkyys	39
6.4 Toteamisraja	40
6.5 Määritysraja	40
6.6 Spesifisyys ja selektiivisyys	40
6.7 Häiriöalttius	40
6.8 Ongelmankartoitus ja -ratkaisu	41
6.8.1 <i>C. globosum</i>	41
6.8.2 <i>A. restrictus</i>	42
<b>7 PÄÄTELMÄT</b>	<b>43</b>
<b>8 LÄHDELUETTELO</b>	<b>46</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Laskuesimerkki solulaskennasta
- Liite 2. Laskuesimerkki itiölaskennasta
- Liite 3. Kasvualustat ja liuokset

## KUVAT

Kuva 1. Mycometer mittaukseen tarvittava testivälineistö.	5
Kuva 2. Putket kasvatuskammiossa ennen (vas.) ja jälkeen (oik.) siirrosta.	18
Kuva 3. Havainnollistava kuva Fuchs-Rosenthal kammioista.	20
Kuva 4. Lämpötilan vaikutus reaktioaikaan.	24
Kuva 5. Referenssimenetelmän tulokset, <i>Paecilomyces variotii</i> .	27
Kuva 6. Validoitavan menetelmän tulokset, <i>Paecilomyces variotii</i> .	29
Kuva 7. Referenssimenetelmän tulokset, <i>Aureobasidium pullulans</i> .	31
Kuva 8. Validoitavan menetelmän tulokset, <i>Aureobasidium pullulans</i> .	33
Kuva 9. Asiakasnäytteiden itiöpitoisuus ja Mycometerarvo.	36

## TAULUKOT

Taulukko 1. Tulokategoriat.	5
Taulukko 2. Lajien inkubointiajat.	17
Taulukko 3. Laimennusviljelyn toimenpiderajat.	25
Taulukko 4. Aerobiologian suoraviljelyanalyysi.	26
Taulukko 5. Tulosten täsmällisyyden arviointia tilastotieteellisin määrein.	38

# 1 JOHDANTO

Työ suoritettiin Turun Yliopiston Aerobiologian yksikölle. Aerobiologian yksikön laboratoriolle on terveydensuojelun 49 a § mukainen EVIRAn hyväksyntä laboratoriksi, joka tekee viranomaisille tarkoitettuja asumisterveysstutkimuksia. (Turun Yliopisto, Aerobiologian yksikkö 2017) Analyseissä noudatetaan Sosiaali- ja terveysministeriön asetusta (Sosiaali- ja terveysministeriö 2015) sekä Valviran Asumisterveysasetuksen soveltamisohjetta, joka on tehty Asumisterveysasetuksen § 20 perusteella.

Mikrobikasvun havaitseminen on yksi tärkeä etappi analysoitaessa rakennusterveyttä ja etenkin sen heikkenemistä. Niin aktiivinen, kuin kuollutkin mikrobikasvu (tässä tapauksessa sieni-, tai bakteerikasvu) saattaa aiheuttaa terveyshaittaa ja on poistettava. Terveydensuojelulaissa terveyshaitalla tarkoitetaan sairautta tai sen oireita tai olosuhteita, joissa sairauden/oireiden syntyminen on mahdollista (Sisäilmäyhdistys ry 2017). Mikrobikasvun rakenteissa aiheuttaa kosteusvaurio, joka mahdollistaa kasvuvaatimuksiltaan vaativienkin homeelajien lisääntymisen.

Rakennusmikrobiologinen analyysi voidaan tehdä asiakkaan toiveesta erilaisilla viljelymenetelmillä, joita on laimennusviljely, suoraviljely (materiaali, pinta tai ilma) tai suoramikroskopiointi. Mikrobiologisten näytteiden viljelyyn, inkubointiin ja analysointiin menee kaiken kaikkiaan 14 vuorokautta (pl. suoramikroskopiointi). Näytteitä inkuboidaan 7+7 vrk (Valvira 2016), jotta itiöt ehtivät muodostaa pesäkkeinä havaittavaa rihmastoja. Tämä aika eliminoiduu lähes täysin uuden laitteen, Mycometerin, ansiosta. Se antaa tuloksen olosuhteista riippuen viimeistään kahden tunnin kuluessa. Mycometer soveltuu niin laboratorio- kuin kenttäkäyttöön, mutta tässä työssä laite validoidaan pelkästään laboratoriokäyttöön.

Työn tarkoituksena oli suorittaa validointi Mycometer-menetelmälle, jossa mittaus tehdään suoraan analysoitavasta materiaalista. Validointi suoritetaan referenssimenetelmään verraten, joka tässä validoinnissa on Valviran asumisterveysasetuksen mukainen laimennusviljelymenetelmä. Validoinnin suunnittelussa käytetään merkittävänä apuna VTT:n validoinnin suunnittelun opasta.

Menetelmän validoinnin lisäksi työhön kuului vertailumateriaalin valmistaminen homehuttamalla. Yhteneviä aliotoksia antavan vertailumateriaalin tuottaminen tapahtui kammiokasvatuksella 3-4 viikon pituisena kasvatuksena. Kammiosta poimittiin näytteitä

määräajoin, joka mahdollisti eri pitoisuustasoisten näytteiden saamisen. Vertailumateriaalin tuottaminen laboratoriossa onnistui kahdella lajilla odotetusti, ja kahdella lajilla kasvu epäonnistui. Vertailumateriaalin tuottamisesta erilaisin menetelmin pidin esitelmän Sisäilmastoyhdistyksen järjestämässä Sisäilmastoseminaarissa Helsingissä 15.3.2017.



## 2 MYCOMETER® -MENETELMÄ

Mycometer on tanskalainen, vuonna 1998, perustettu yritys. Nykyään alansa johtava yritys toi vuonna 1999 markkinoille nimeään kantavan testin, jolla mitataan sienien biomassaa. Ainoastaan sieniä mittaavan laitteen rinnalle yritys toi bakteereja vedestä mittaavan The Bactiquant – water testin ja myöhemmin bakteereja pinnoilta mittaavan testin. Yrityksellä on useita patenteja sekä toimintaa niin Yhdysvalloissa kuin Aasiassakin. Tässä opinnäytetyössä validoitiin ainoastaan materiaalinäytteille (rakennusmateriaali) soveltuva testi.

Mittaus perustuu fluorometriseen mittaukseen, jossa havaitaan entsyymipitoisuutta. Mitattava entsyymi on  $\beta$ -N-asetyyliheksaamidaasi, lyh. NAHA. (Mycometer A/S 2011) Kaikki homeet tuottavat NAHA entsyymiä ja sitä esiintyy niin sienien rihmastossa kuin itiöissäkin. Entsyymipitoisuus voi elävän kasvuston lisäksi kertoa myös kuolleesta tai kuivuneesta kasvustosta. (Rylander 2015) Kuolleen ja kuivuneen kasvuston havaitseminen menetelmällä on etu, sillä nykyisillä menetelmillä kuolleen rihmaston havaitseminen on mahdollista vain suoramikroskopiolla, jolla ei pystytä arvioimaan kasvun määrää. Kostuneen rakenteen kuivuminen väliaikaisesti ei tuhoa mikrobikasvustoa, vaan kasvusto menee lepotilaan. Itiöt pysyvät elinkykyisinä lepotilassa parhaimmillaan vuosia, ja voivat jatkaa kasvuaan olosuhteiden jälleen muuttuessa suotuisiksi. Homeet kestävät hyvin vaihtelevia olosuhteita sekä kuivuusjaksoja. (Ympäristöministeriö 2016) Tämän vuoksi kuivuneen kasvuston havaitseminen on yhtä lailla merkittävää kuin aktiivisen kasvuston havaitseminen, sillä niin kuollut kuin kuivunutkin kasvusto voi aiheuttaa terveyshaittoja.

Mycometer-menetelmä perustuu siihen, että NAHA entsyymillä läsnäolo hydrolysoi substraatin ja loisteaine vapautuu. Valmistajan mukaan laite on tarkka, sillä kaikki loisteaine vapautuu suoraan testiliuokseen. Loisteaine säteilee UV-valossa ja säteilyä mitataan fluorometrillä. Fluoresenssisignaali on suoraan verrannollinen biomassaan, eli sienipitoisuuteen näytteessä. (Mycometer 2016)

Yritys on tehnyt materiaalikohtaisia validointeja laitteelleen vain muutamia, joten näyttematriisiksi haluttiin valita materiaali, jota ei ole vielä validoitu. Näin ollen myös valmistajayritys hyötyy tästä opinnäytetyöstä. Yritys on testannut entsyymiaktiivisuutta erilaisilla sienilajeilla, kuten *Aspergillus* –suvun sekä *Penicillium* –suvun sienillä (Henkilö-

kohtainen tiedonanto: tohtori Morten Reeslev, Mycometer A/S 17.11.2015). Näytematriisin lisäksi lajisto on valittu niin, ettei lajien entsyymiaktiivisuutta ole aiemmin testattu.

NAHA entsyymiä esiintyy sienien lisäksi pieninä pitoisuuksina bakteereissa. Entsyymiä esiintyy bakteereissa kuitenkin vain kitiinin läsnä ollessa, joten Mycometer-menetelmää ei voida käyttää analyysimenetelmänä bakteereja käsiteltäessä. Entsyymien määrä on bakteereilla niin pieni, ettei Mycometer-tuloksista voida suoraan tehdä päätelmiä bakteerikasvuston olemassaolosta materiaalissa.

NAHA entsyymiä esiintyy pienempinä pitoisuuksina myös esimerkiksi jauhoissa tai vedessä. On siis mahdollista saada virheellinen tulos, jos analysaattoria käytetään ympäristössä, jossa valmistetaan elintarvikkeita. Myös näytteen suuri siitepölypitoisuus ja hyönteisten jäämät sisältävät NAHA entsyymiä pieninä pitoisuuksina, ja voivat läsnäolollaan näin ollen häiritä mittauksia. (Henkilökohtainen tiedonanto: Morten Reeslev, tohtori, 17.11.2015)

Koska Mycometer tunnistaa vain NAHA entsyymiä sisältäviä eliöitä, ei laitteella pysty mittaamaan bakteerikasvustoa (esim. kosteusvauriota indikoivat aktinomykeetit) eikä hiivoja. Laite ei myöskään tunnistakaan mitään lajeja näytteessä kasvaa. Toisaalta lajistolla ei ole merkitystä, jos mikrobiaktiivisuus on runsasta. Toisin sanoen mitään tahansa mikrobiikasvustoa rakenteissa pidetään terveystahattuna. Menetelmä ei myöskään tunnistakaan toksiineja tai toksista kasvustoa.

Näytteen Mycometer-analysointi aloitetaan mittaamalla käytettävät reagenssit analysaattorilla, sillä näiden aiheuttama taustafluoresenssi vähennetään tuloksista. Analyysissä käytettävät liuokset ovat kehitysliuos (developer), substraatti (substrate) ja testiliuos (test solution). Kuva 1. kuvaa testivälineistöä. Kirkaskorkki mustalla renkaalla on kehitysliuos, sinikorkkinen putki on testiliuos ja korkeampi putki kirkkaalla korkilla on substraatti. Musta kyvetti on kalibrointikyvetti ja punakorkillinen putki on standardi. Analysaattorin mukana tulee pipetti, sekuntikello ja lämpötilamittari. Kuvassa 1. oikealla nähdään itse analysaattori. Reagoivien aineiden taustafluoresenssin mittaamisen jälkeen reaktioliuos kaadetaan materiaalin joukkoon, ja reaktio alkaa. (Mycometer A/S 2011)



Kuva 1. Mycometer mittaukseen tarvittava testivälineistö.

Mittausten jälkeen tuloksista vähennetään taustan signaali, jotta saadaan pelkästään näytteestä aiheutuva fluoresenssisignaali, eli Mycometer-arvo. Tulokset jaetaan Mycometer-arvon perusteella kolmeen tulkintaluokkaan, jotka on määritetty empiirisellä tutkimuksella lukuisista kohteista (Mycometer A/S 2011). Tulokategoriat on esitetty Taulukko 1.

Taulukko 1. Tulokategoriat.

Kategoria	Mycometer-arvo	Tulkinta
A	$\leq 25$	Sienipitoisuus ei ole normaalitasoa korkeampi
B	$25 < \text{Mycometer-arvo} \leq 450$	Sienipitoisuus on normaalitasoa korkeampi
C	$> 450$	Sienipitoisuus on korkea, normaalitasoa korkeampi

Kategoria A on määritetty tutkimuksella, jossa näytteet otettiin puhtaalta pinnalta, jossa ei ollut havaittavissa näkyvää pölyä tai likaa. Näytteet analysoitiin Mycometerilla ja kaikki näytteet antoivat signaalin, joka oli alle 25 FU (fluorescence unit). Tämän vuoksi

25 valikoitui biomassan normaalitasoksi, ja kertoo rakennuksen normaalista itiöpitoisuudesta. (Mycometer A/S 2011)

Kategoria B on määritetty tutkimuksella, jossa näytteet otettiin pinnalta, jossa oli selkeitä pölykertymiä sekä likaa. Näytteet analysoitiin Mycometerilla ja 96 % näytteistä antoi signaalin, joka oli alle 450 FU. Kategoria B kertoo, että näytteessä voi mahdollisesti olla homekasvua, näytteenottopinnalle kerääntyneitä itiöitä tai näytteessä oleva kasvusto on kuollutta/kuivunutta. (Mycometer A/S 2011)

Kategoria C on määritetty tutkimuksella, jossa näytteet ovat selkeästi homehtuneita. Näytteet analysoitiin Mycometerilla ja kaikki näytteet antoivat signaalin, joka oli yli 450 FU. Kategoriaan C luokiteltava tulos kertoo sienien biomassan määrän olevan korkea ja kertoo selkeästi sienikasvustosta. (Mycometer A/S 2011)

### 3 VERTAILUMATERIAALIN TUOTTAMINEN HOMEHDUTTAMALLA

Mikrobiologisiin menetelmän validointeihin, menetelmävertailuihin tai menetelmän testauksiin soveltuvaa vertailumateriaalia on hankala tuottaa, etenkin jos vertailumateriaalia tarvitaan suuria määriä. Vertailumateriaalin on oltava riittävän tasalaatuista, jotta aliotokset ovat yhteneviä ja validointitulokset vertailukelpoisia.

Mikrobiologista validointia tehtäessä vertailumateriaalina olisi ideaalista käyttää aitoa materiaalia, tässä työssä niin sanotusti luonnollisesti homehtunutta materiaalia. Mikrobivaurioituneissa rakennuksissa mikrobikasvusto syntyy hallitsematta pitkän ajan kuluessa, vaihtelevissa kosteusoloissa, joten materiaali ei ole tasalaatuista ja materiaaliin kasvanut mikrobikasvusto voi vaihdella voimakkaasti näytteiden välillä. Tämän vuoksi todellisten näytteiden käyttäminen vertailumateriaalina sisältää näytteen sisäisen vaihtelun, jolloin menetelmissä havaitut erot voivat johtua näytteiden välisestä vaihtelusta enemmän kuin menetelmien välisestä.

Tässä työssä Aerobiologian yksikköön tuotuja asiakasnäytteitä käytettiin validointia tukevana lisämateriaalina. Aitoa materiaalia käytettäessä jokaiselle pitoisuustasolle ei välttämättä ole riittävää määrää näytteitä, jolloin toistojen määrä jää liian pieneksi. Tästä syystä päädyimme itse homehduttamaan materiaalin kammiokasvatuksena ja käyttämään asiakasnäytteitä lisämateriaalina validoinnissa. Kammiokasvatuksen etuna on myös selektiivisyys – materiaali steriloidaan ennen mikrobien siirrostusta, jolloin materiaalissa kasvaa vain haluttu laji.

Vertailumateriaalin valmistuksessa käytetyistä menetelmistä kerrotaan tarkemmin kappaleissa 5.4–5.6.

## 4 VALIDOINTI

Validoinnilla osoitetaan, että menetelmälle tai laitteelle määritellyt vaatimukset ovat käyttötarkoitukseen sopivia. Validointiin valitaan parametreja, joilla pystytään kuvaamaan menetelmän luotettavuutta ja joilla saadaan selville mittauksen epävarmuuteen vaikuttavia osatekijöitä. Parametrit, joille tuotetaan vertailuarvoja, valitaan jokaiseen validoitavaan menetelmään erikseen, eikä kaikkia validoinnin parametreja ole tarkoitus käyttää jokaisen menetelmän validoinnissa. (Elintarvikevirasto 1997)

Mikrobiologinen validointi voi olla hankalampaa kuin esimerkiksi kemiallinen validointi, sillä validoinnissa vertailumateriaalina käytetään eläviä mikrobeja. Lisäksi näytteitä laimennetaan, jotta pesäkeluku olisi laskettavampi, ja tämä saattaa aiheuttaa suuriakin eroja maljojen välille. Tuloksissa saattaa olla siis paljonkin vaihtelua, ilman että se olisi virhe. (Elintarvikevirasto 1997) Tässä työssä validoinnin suunnittelussa on käytetty merkittävänä apuna VTT:n Validoinnin suunnittelun opasta (2016), jonka on laatinut Metrologian neuvottelukunnan (MNK) validointityöryhmä.

Juuri tässä työssä esitettävässä validoinnissa on otettava huomioon, että validoitavan menetelmän mitattava määre on eri, kuin referenssimenetelmässä. Tällä hetkellä käytössä olevilla menetelmillä (m.l. referenssimenetelmä) analysoitava tulos on käytetyillä elatusalustoilla pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä näytteessä (pmy), kun taas validoitavassa menetelmässä tulos on fluoresenssisignaali (FU), joka kertoo NAHA entsyymien määrän näytteessä. NAHA entsyymien määrä on verrannollinen sienien biomassaan, joka kasvaa itiön itäessä ja rihmaston kasvaessa. (Mycometer A/S 2011, Mahcer, J. 1999 mukaan).

Mycometer tilattiin yksikön käyttöön 2015 loppuvuodesta. Laitetta ei ole käytetty ennen validointia, sen toimintaa on vain testattu muutaman kerran. Mycometer on tarkoitettu käytettäväksi niin laboratorioissa kuin kentälläkin, joten asiakkaalla olisi mahdollisuus tehdä pikatesti kohteessa, eikä odottaa kymmentä vuorokautta tuloksia. Tässä validoinnissa validoidaan pelkästään suoraan materiaalista mitattava menetelmä. Tämä validointi koskee pelkästään materiaalinäytteitä, muille Mycometer-analysointorilla tehtäville menetelmille, kuten pintasively ja ilmanäytteille, on tehtävä oma validointinsa.

Sahanpuru on rakentamisessa yleisesti käytetty eristemateriaali ja sen vuoksi yleinen näytemateriaali, jonka mikrobipitoisuutta Aerobiologian laboratorioissa määritetään.

Validoinnissa testataan homehdutetun materiaalin lisäksi aitoa, asiakkailta näytteenä saatua sahanpurua. Sahanpurulle Mycometer-laitteen valmistaja ei ole tehnyt validointia, ja sen vuoksi kyseinen materiaali valikoitui työn matriisiksi.

## Näytteet ja lajisto

Validoinnissa näytematriisina käytettiin homehduttamalla tuotettua vertailumateriaalia sekä asiakasnäytteitä, joita on otettu kohteista, joiden epäillään olevan kosteusvaurioituneita. Vertailumateriaali tuotettiin kontrolloiduissa olosuhteissa lyhyen ajan kuluessa kun taas asiakkailta kerätyissä näytteissä mikrobikasvusto on syntynyt hallitsematta pitkän ajan kuluessa, vaihtelevissa olosuhteissa. Asiakasnäytteissä oli taustamikrobisto mukana määrittäksessä, eli kaikki sieni- sekä bakteerilajit, joita näytteessä on. Vertailumateriaali tuotettiin suspensiolla, jossa oli vain yhtä lajia ja taustamikrobisto oli poistettu steriloimalla.

Lajistoksi valittiin neljä eri sienilajia, joista kolme on kosteusindikaattoreita. Kosteusindikaattori on mikrobi, jota ei yleensä havaita terveessä ja vaurioitumattomassa rakennuksessa tai merkittävinä pitoisuuksina sisä- tai ulkoilmassa. (Ympäristöministeriö 2016) Kosteusvauriota indikoivina pidetään myös tavanomaisia mikrobeja, jos niitä esiintyy näytteissä suurina pitoisuuksina. (Valvira 2016)

*Aspergillus restrictus* on kserofiilinen sieni, eli se kasvaa mieluummin kuivassa ympäristössä, kuin kosteassa. Laji on hidaskasvuinen, eikä tuota itiöitä ensimmäisen 7 vuorokauden aikana. (Samson, *et al.* 2010) *A. restrictus* tarvitsee kasvaakseen pitkäaikaisesti, lievästi kohenneen kosteuden. Tällaiset olosuhteet voivat toteutua kosteusvaurioituneessa kohteessa, minkä vuoksi lajin esiintyminen rakennusmateriaalissa tai rakennuksen sisäilmassa viittaa kosteusvaurioon. Tästä syystä lajia voidaan pitää kosteusindikaattorilajina. (Ympäristöministeriö 2016)

*A. restrictuksen* vähimmäiskosteusvaatimus homekasvun alulle on noin 70 %, mutta huoneenlämmössä vähimmäiskosteusvaatimus on 73 %. Laji on usein valtalajina, silloin, kun kosteus on kriittisen kosteuden tuntumassa, mutta korkeammassa kosteudessa muut lajit syrjäyttävät *A. restrictuksen* homeen ja kasvu lakkaa. Vaikka kammioiden kosteus olikin tässä validoinnissa korkea, *A. restrictus* sai kasvaa vapaasti, koska syrjäyttäviä lajeja ei ollut. Sieni on satunnainen patogeeni ja puurakenteissa yleinen laji. (Ympäristöministeriö 2016)

*Paecilomyces variotii* on yleinen ympäristössä (niin sisäilma kuin ulkoilma) havaittava homesieni. Se aiheuttaa infektioita ja sairauksia immuunivasteeltaan heikentyneissä ihmisissä. (Houbraken *et al.* 2010) Laji on nopeakasvuinen ja itiöi runsaasti jo seitsemän vuorokauden ikäisenä. Laji kasvaa mieluiten lämpimässä (jopa 50 °C), kuten esimerkiksi komposteissa. Laji kasvaa huomattavasti kosteammassa ympäristössä kuin esimerkiksi *A. restrictus*, ja sitä on eristetty myös urheilujuomista. (Samson, *et al.* 2010). Kosteusvaurion aikaansaamat olosuhteet ovat suotuisat lajin kasvun alkamiselle, ja sen vuoksi se on kosteusvauriota indikoiva laji. (Ympäristöministeriö 2016)

*Aureobasidium pullulans* on yleinen homelaji, ja sitä on eristetty kasvien lehdistä, ruoasta, ihmisestä ja lisäksi se on yleinen laji kosteusvaurioituneissa rakennuksissa. *A. pullulans* kasvaa mielellään kosteassa, kuten kylpyhuoneessa. Lajin kasvu on mahdollista hyvin matalissa lämpötiloissa (+4 °C), jonka vuoksi kasvua voi ilmentyä esimerkiksi ikkunalaudoilla. Lajin optimaalinen kasvulämpötila on +25 °C. (Samson, *et al.* 2010) Homekasvuun vaadittavat olosuhteet täyttyvät kosteusvaurioituneissa kohteissa, mutta lajia voi esiintyä myös kohteissa, joissa ei ole kosteusvauriota. Tästä syystä lajia ei ole luokiteltu kosteusindikaattorilajiksi.

*A. pullulans* tuottaa itiöitä jo seitsemän vuorokauden ikäisenä. Laji kasvaa hiivamaisesti, mikä tekee lajista mielenkiintoisen testattavan, sillä Mycometer ei tunnista hiivan entsyymejä lainkaan. *A. pullulansin* tiedetään aiheuttavan allergisia reaktioita (Putus, *et al.* 2009, 2,7).

*Chaetomium globosum* on sisätiloissa rakennusmateriaalilla tavattava homesieni. Laji esiintyy kosteusvaurioituneissa selluloosaa sisältävissä rakenteissa, kuten tapetissa tai kirjoissa. Lajin kasvu on mahdollista esimerkiksi pitkään jatkuneissa vuotokohdissa (Flannigan, *et al.* 2011). *C. globosum* on nopeakasvuinen homesieni, joka tuottaa seitsemän vuorokauden kuluessa isoja pesäkkeitä ja 7-14 vuorokauden kuluessa itiöitä. Optimaalinen lämpötila itiön tuotannolle on 18–20 °C. Itiöt eivät ole lämpöresistenttejä, mutta sietävät hyvin kuivuutta ja UV-säteilyä. (Samson, *et al.* 2010)

*C. globosum* on kosteusindikaattorilaji (Ympäristöministeriö 2016), se voi tuottaa toksineja ja se on allergisoiva. Lisäksi saattaa aiheuttaa autoimmuunitauteja, joten se on ihmiselle hyvin haitallinen home. (Laboratories 2016)



#### 4.1 Oikeellisuus

Oikeellisuudella tarkoitetaan saatavan tuloksen yhtäpitävyyttä oikeaan tulokseen. Tässä validoinnissa ”oikeana” tuloksena pidetään referenssimenetelmällä, joka on asumis-terveysoppaan mukainen laimennussarjaviljely, saatua tulosta. Tässä validoinnissa oikeellisuudella tarkoitetaan siis validoitavan menetelmän antamien tulosten vastaavuutta referenssimenetelmän antamiin tuloksiin, eli tässä työssä ei etsitä absoluuttista totuutta. Oikeellisuus voidaan määrittää esimerkiksi lukuisien näytteiden tulosten keskiarvon yhtäpitävyytenä vertailuarvoon, eli referenssimenetelmän antamaan tulokseen. (Metrologian neuvottelukunnan validointityöryhmä 2016)

Mikrobiologisessa menetelmän validoinnissa oikeellisuuden määrittäminen on hankalaa, sillä mikrobit ovat elävää materiaalia. Suspensiota tai valmistetta ei pystytä tekemään niin, että niiden tarkka pitoisuus olisi tiedossa ja pysyisi muuttumattomana. (Elintarvikevirasto 1997) Suhteellinen oikeellisuus kuvaa validoitavan menetelmän antaman tuloksen yhtäpitävyyttä referenssimenetelmän tulokseen.

Oikeellisuuteen vaikuttavat virheet jaetaan systemaattisiin virheisiin ja satunnaisvirheisiin. Satunnaisvirheiden määrään voidaan vaikuttaa riittävän monella toistolla, mutta systemaattisten virheiden osalta validoinnin tavoitteena on, ettei niitä esiintyisi lainkaan. (Metrologian neuvottelukunnan validointityöryhmä 2016)

#### 4.2 Täsmällisyys

Täsmällisyys kertoo, kuinka tasaisesti menetelmä antaa usealla toistolla yhtenevän tuloksen ja kuinka yhtäpitäviä rinnakkaiset tulokset ovat. (Metrologian neuvottelukunnan validointityöryhmä 2016) Täsmällisyys voidaan määrittää tilastotieteellisin määrein, kuten keskihajonnan avulla. Menetelmän uusittavuus ja toistettavuus on parempia, jos menetelmä on täsmällinen. Uusittavuus voidaan selvittää esimerkiksi eri työntekijöiden välisillä eroilla – kuinka samanlaiset tulokset eri työntekijät saavat samoista näytteistä. Toistettavuus voidaan selvittää viljelemällä sama näyte useaan kertaan saman henkilön toimesta. (Elintarvikevirasto 1997)

Täsmällisyys on merkittävä tieto tulosten luotettavuuden kannalta. Jos hajonta on suurta, ei yhdestä näytteestä saatavaan tulokseen voida luottaa, vaan näytteitä pitäisi olla useampi. Näin ollen useasta tuloksesta voidaan keskiarvon perusteella antaa luotetta-

vampi tulos. Tässä validoinnissa jokaisesta näytteestä tehdään kolme rinnakkaista määrittystä, jotta tulos olisi luotettava ja vertailukelpoinen

Täsmällisyyteen vaikuttaa näytteessä oleva mikrobipitoisuus, eli tässä työssä entsyymipitoisuus. Mitä matalampi entsyymipitoisuus on, sitä suurempaa hajonta on. (Elintarvikevirasto 1997) Menetelmän antamien tulosten täsmällisyyteen vaikuttaa olennaisesti myös reagensseista, eli taustasta, aiheutuva hajonta.

#### 4.3 Spesifisyys ja selektiivisyys

Spesifisyys tarkoittaa menetelmän kykyä löytää tutkittava mikrobi näytteen häiritsevistä taustoista huolimatta. (Metrologian neuvottelukunnan validointityöryhmä 2016) Näytematriisi steriloidaan ennen ymppäystä, joten laboratoriossa homehduttamalla valmistetuissa vertailumateriaalinäytteissä lajit eivät joudu kilpailemaan elintilasta. Homehdutettujen näytteiden lisäksi validoinnissa testataan asiakasnäytteitä, joissa kaikki lajit saavat kasvaa vapaasti.

Mycometer ei tunnista lajeja eikä myöskään toksiineja. Mikä tahansa mikrobi, joka kasvaa rakenteissa, voidaan pitää terveyshaittana ja merkinä rakennuksen kosteusvauriosta. (Mycometer A/S 2011)

Selektiivisyys tarkoittaa, että menetelmä keskittyy vain yhden asian määrittämiseen, vaikka häiritseviä mittausmääreitä olisi läsnä (Metrologian neuvottelukunnan validointityöryhmä 2016). Mycometer on selektiivinen menetelmä, sillä se perustuu NAHA entsyymien tunnistamiseen. Tämän menetelmän kohdalla selektiivisyys ei häiriinny muista tekijöistä, kuten esimerkiksi muista entsyymeistä.

#### 4.4 Herkkyys

Herkkyys tarkoittaa menetelmän kykyä havaita pienetkin vaihtelut määritettävien mikrobien pitoisuuksissa. Herkkyys määritetään tietyllä materiaalilla testausolosuhteissa sekä suorituksen samassa vaiheessa. Mittaustulosten häiriönkestävyyteen voi vaikuttaa esimerkiksi reagenssien lämpötila, huoneen lämpötila (otettu menetelmässä huomioon, joten tässä validoinnissa ei aiheuta häiriötä) sekä määrittäjän tekijähenkilö. (Metrologian neuvottelukunta 2005)

#### 4.5 Lineaarisuus

Lineaarisuus kuvaa menetelmän kykyä tuottaa signaalia, joka on suoraan verrannollinen analyytin (tässä validoinnissa mikrobi) pitoisuuteen näytteessä. (Metrologian neuvottelukunnan validointityöryhmä 2016)

Näytteen pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä grammassa materiaalia havaitaan referenssimenetelmällä, joka on tässä validoinnissa asumisterveysasetuksen mukainen laimennusviljely. Lisäksi näytteet viljellään suoraviljelynä rinnakkain Mycometer mittauksen kanssa (näytteet samasta näyteputkesta), jolloin saadaan vertailu myös suoraviljelyn ja laimennusviljelyn välille. Tulosten lineaarisuutta pohditaan kappaleessa 5.1 ja 5.2.

#### 4.6 Häiriöalttius

Häiriöalttiutta voi aiheuttaa esimerkiksi näytematriisin ominaisuudet ja taustamikrobisto, mutta myös esimerkiksi työntekijöiden työskentelyerot tai analysointitavat. Jälkimmäiset kuitenkin ovat systemaattisia virheitä, jotka yritetään eliminoida validoinnilla. Näytematriisin ominaisuudet vaikuttavat olennaisesti esimerkiksi näytteen homogeenisuuteen ja kosteuden leviämiseen näytteessä. Näyteputkesta samanlaisten alanäytteiden saaminen vaikuttaa tulokseen ja tulosten lineaarisuuteen sekä näin ollen koko validoinnin tulokseen. (Metrologian neuvottelukunnan validointityöryhmä 2016)

Taustamikrobisto ei aiheuta häiriöalttiutta tämän validoinnin aikana, sillä matriisi steriloidaan ennen ympäystä. Kontaminaatio voisi aiheuttaa häiriöalttiutta, jos bakteerit syrjäyttäisivät kohdesienet elinalueiltaan. Bakteerien ilmeneminen ja elintilan valtaaminen näkyisi Mycometerin tuloksissa analyysiarvon laskemisena, sillä Mycometer ei tunnista bakteereja.

#### 4.7 Mittausalue

Mittausalueella tarkoitetaan sitä pitoisuusaluetta tai vaihtelualuetta, jossa menetelmä antaa tarkan tuloksen. Mittausalueen alkupäässä on rajoittavana tekijänä menetelmän toteamis- tai määrittäysraja ja loppupäässä mittalaitteen kyky havainnoida pitoisuuden muutoksia. (Metrologian neuvottelukunnan validointityöryhmä 2016)

Mycometerin antamat tulokset jaotellaan kolmeen luokkaan saadun arvon mukaisesti (ks. Taulukko 1). Jos tulos kuitenkin on alle 10, ei tulos ole luotettava (merkitsevyytaso 99 %), vaan raportoidaan arvon olevan havaitsemisrajan alapuolella (Below Detection). Jos tulos on alle 16, ei tulos ole luotettava (merkitsevyytaso 99 %), vaan raportoidaan tuloksen olevan määrittämissärajien alapuolella (Below Method Quantification Limit). Signaalin ylittäessä korkeimman mahdollisen luettavan arvon, antaa analysaattori tuloksen ”over”. Tällöin tulos raportoidaan ”>6000–8000”. (Mycometer A/S 2011)

Mittausalueeksi voidaan määrittellä lineaarinen alue, mutta mittausalue voi olla myös laajempi, kuin lineaarinen alue. Lineaarinen alue määritetään tekemällä useita mittauksia standardille, eli tunnetulle pitoisuudelle. Lineaarista aluetta määritettäessä valitaan vähintään viisi eri pitoisuutta, joille tehdään kolme rinnakkaista toistoa. (Metrologian neuvottelukunnan validointityöryhmä 2016) Mikrobiologisessa validoinnissa lineaarisen mitta-alueen määrittäminen on käytännössä mahdotonta, sillä mikrobien kasvu ei ole lineaarista.

#### 4.7.1 Toteamisraja

Toteamisrajana (Limit of detection, LOD) pidetään pienintä mitattavaa arvoa, joka voidaan vielä luotettavasti havaita. Pienin mitattava arvo tulee erota selkeästi nollanäyttestä tai taustan signaalista. (Elintarvikevirasto 1997)

Toteamisrajan määrittämisessä käytetään taustan antamaa signaalia, joka mitataan lukuisia kertoja. Keskiarvon ja arvojen hajonnan perusteella määritetään arvo, joka eroaa tarpeeksi taustan signaalista.

Mycometer A/S on itse määrittänyt menetelmälle toteamisrajan tutkimuksella, jossa 88 steriiliä pumpulipuikkoa analysoitiin Mycometerilla. Tulosten perusteella voidaan todeta, että Mycometerin toteamisraja on 95 %:n varmuudella 7,9 FU ja 99 %:n varmuudella 10,4 FU. (Mycometer A/S 2011, 32)

#### 4.7.2 Määrittämissäraja

Määrittämissäraja (method quantification limit, MQL) määritetään toteamisrajan avulla. Määrittämissäraja on toteamisraja, johon on lisätty taustan keskihajonta kolminkertaisena. Taustan keskihajonta määritetään testisubstraattilla, jonka keskihajonta tutkimuksen mukaan

on 2,0. Määritysraja on 95 %:n varmuudella 13,9 FU ja 99 %:n varmuudella 16,4 FU. Kuten toteamisrajankin, myös määritysrajan on asettanut yritys, Mycometer A/S. (Mycometer A/S 2011, 32)

Tässä työssä toteamisrajalla ja määritysrajalla ei ole suurta merkitystä, sillä käytettävät tulokset eivät ole lähellä näitä rajoja. Tulokset ovat selkeästi korkeampia kuin taustasignaalit, joten työn suunnittelussa ei ollut ideaalista suunnitella omaa mittausta toteamisrajan tai määritysrajan määrittämiseen.

#### 4.8 Menetelmien vertailu

Validointi suoritetaan vertaamalla tuloksia referenssimenetelmän tuloksiin. Referenssimenetelmä on tässä validoinnissa Valviran asumisterveysasetuksen (Valvira 2016, 6) mukainen laimennussarjamenetelmä mikrobikasvun havaitsemiseen. Laimennussarjamenetelmän lisäksi näytteet viljellään suoraviljelymenetelmällä, joka on myös asumisterveysasetuksen (Valvira 2016, 6) mukainen näytteiden mikrobipitoisuuden määrittäminen. Suoraviljely tehdään vain vertailun vuoksi sekä ikään kuin kontrollina laimennussarjaviljelylle, mutta menetelmien vertailussa suoraviljelyn antamat tulokset eivät ole merkittävässä roolissa.

## 5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 5.1 Reagenssit ja laitteet

#### **Näytteiden valmistaminen ja tutkiminen**

Kaliumsulfaatti, VWR Chemicals, Product 26997.23, Batch 14L100014

Ammoniumsulfaatti, VWR Chemicals, Batch 21332.293, Lot 16C304113

Laimennusliuos, resepti liitteessä 3

#### **Mycometer**

Mycometer analysaattori, Mallinumero: 8000-005, sarjanumero: 804769, normalisoitu 17.09.2015 Mycometer A/S toimesta.

Mycometer surface kit:

Batch # 18 (materiaalimenetelmä, 75 näytteen varastosäiliöissä)

Batch # 276

Mikroskooppi, Olympus BX40F-3, Japan

### 5.2 Kammiokasvatus

Rakennusmateriaalin homehduksessa kasvatuskammioina käytettiin lasisia eksikaattoreita (Kuva 2). Kasvatuskammiot steriloitiin autoklavoimalla (121,5 °C, 20 min) autoklavointipussissa. Pussit avattiin laminaarivirtauskaapissa, jossa tapahtui kaikki eksikaattorin käsittely.

Kasvatuskammiossa vallitseva ilmankosteus saatiin aikaan kylläisellä suolaliuoksella. Lasisen eksikaattorin pohjalle kaadettiin silmämääräisesti noin 250 ml suolaliuosta luomaan haluttu ilmankosteus eli RH 97 - 99 % ja ylikylläisyyden varmistamiseksi lisättiin noin teelusikallinen liuottamatonta steriloitua kaliumsulfaattia. Suhteelliseen ilman-

kosteuteen pystytään vaikuttamaan merkittävästi suolan valinnalla. Tässä työssä haluttiin ilmankosteudeksi mahdollisimman korkea, 95–97 % RH. Korkea ilmankosteus jäljittelee kosteusvaurioitunutta tilaa, joka aidossa tilanteessa saisi rakennusmateriaalin homehtumaan. (Greenspan 1977) Eksikaattori tiivistettiin eksikaattorirasvan avulla, jota käytettiin myös tiivistämään hana. Putkiteline aseteltiin kammioon ja kammio suljettiin. Eksikaattori suljettiin hanalla, jolloin ilmaa ei päässyt sisään eikä ulos, näin olosuhteet säilyivät samana koko tutkimuksen ajan. Eksikaattori oli ilmatiivis kannen ja pohjan liitoskohdasta ja sen käsittely tapahtuu vain laminaarivirtauskaapissa. Kammion sisäosa oli siis tutkimuksen alussa täysin steriili, jonka vuoksi näyteputkia ei tarvinnut sulkea.

Lämpötilaa kontrolloitiin pitämällä kasvatuskammioita lämpösäädelyssä kaapissa tai kontrolloidulla korkeudella huoneenlämmössä. Lämpötilan kannalta olennaista oli, että kaikki kammiot olivat samassa lämpötilassa. Ei ollut siis ongelma, jos kammioiden ympäröivä lämpötilaa täytyi muuttaa esimerkiksi siirtämällä kammiot kasvatuskaapista huoneenlämpöön tilanpuutteen vuoksi, kunhan kaikkia kammioita kohdeltiin samalla tavoin. Näin vältettiin kammioiden keskinäinen hajonta.

Kasvatuskammiossa inkuboitujen materiaalien mikrobipitoisuus määritettiin validoinnin mukaisilla viljelyillä/analyseillä. Näytteitä otettiin kammioista määrääjoin, jotka määritettiin kullekin lajille optimaalisesti (Ks. Taulukko 2).

Taulukko 2. Lajien inkubointiajat.

Laji	Inkubointiaika (vrk)			
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	7	21	35
<i>Paecilomyces variotii</i>	0	7	14	21
<i>Chaetomium globosum</i>	0	13	40	47
<i>Aspergillus restrictus</i>	0	7	28	52

Lajin inkubointiajoissa huomiottiin kunkin lajin kasvunopeus. Esimerkiksi *Chaetomium globosum* ja *Aspergillus restrictus* ovat tunnetusti hidaskasvuisia (Samson, et al. 2010), ja sen vuoksi viljelyiden väliset inkubointiajat olivat pitkiä. Kaikki lajit viljeltiin ensimmäisen kerran ympärypäivänä (inkubointiaika 0 vrk).



Kuva 2. Putket kasvatuskammiossa ennen (vas.) ja jälkeen (oik.) siirrostuksen.

### 5.3 Suspension valmistus

Itiösuspensio valmistettiin homesienikannoista, jotka oli eristetty Aerobiologian Yksikön analysoitavaksi saapuneista rakennusmateriaalinäytteistä. Ympättävistä lajeista oli tehty puhdasviljelmät noin kaksi viikkoa ennen ympäystä. Itiösuspensio valmistettiin puhdasviljelmistä samana päivänä, kun siirrostus tapahtui.

Tavoitearvo suspension vahvuudelle oli 10 000 itiötä/ml. Suspensiota valmistaessa pyritään suspension itiöpitoisuudeksi saamaan 5000 itiötä/ympä. Ympin vahvuus on suuri, sillä osan itiöistä tiedetään olevan kuolleita. Lisäksi vaikka laskentakammioilla laskettaessa suspensio saataisiin pitoisuudeltaan oikeaksi, eivät kaikki suspensiossa olevat solut välttämättä ole lisääntymiskykyisiä. Ympin vahvuudella on suuri merkitys kasvun alkamiselle, sillä liian pieni ympä ei välttämättä lähde kasvamaan ollenkaan, kun taas liian suuri ympä saattaa kasvaa hallitsemattomasti. Suspension elävyys sekä vahvuus tarkistetaan viljelemällä suspensio laimennusviljelynä. Viljelyllä selviää, kuinka suuri osa suspension itiöistä kykenee lisääntymään, eli tuottamaan rihmastoja.



Itiösuspension valmistaminen tapahtui pipetoimalla 4-5 ml laimennusliuosta petrimaljal-  
la olevan puhtasviljelmän päälle. Itiöt irtosivat pesäkkeistä laimennusliuokseen, joka  
pipetoitiin maljalta muutaman minuutin jälkeen eppendorf-putkeen. Suspensio valmis-  
tettiin aluksi mahdollisimman väkeväksi, josta sitä olisi helppo laimentaa tarpeen mu-  
kaisesti. Ennen itiöiden laskemista itiöiden irrottaminen toisistaan ja erittely tapahtui  
ultraäänikäsitteilyllä (30 min) sekä tasokääntelijällä (60 min.)

Suspension valmistamisen ja laimentamisen jälkeen suspensiosta tehtiin kontrolliviljely  
laimennusviljelynä. Kontrolliviljelyn tuloksena saatiin elävien itiöiden eli pesäkkeitä  
muodostavien yksiköiden määrä suspensiossa, eli kuinka monta itiötä pystyy muodos-  
tamaan rihmasto/pesäkkeen. Suspension laimennusviljelyssä saatiin selville myös,  
ovatko jotkin pesäkkeet steriilejä, eli muodostivatko ne itiöitä vai eivät.

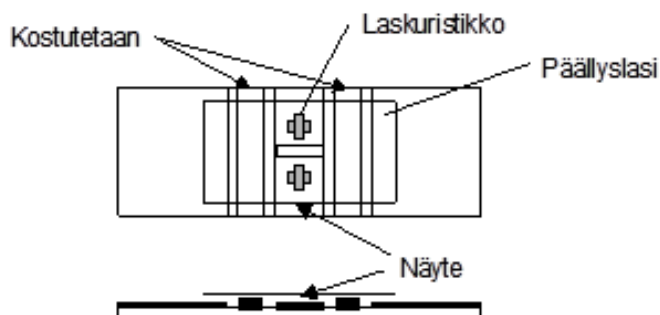
### 5.3.1 Fuchs Rosenthal laskentakammio

Suspension itiöpitoisuus haluttiin tietää tarkasti, jonka vuoksi solupitoisuus määritettiin  
mikroskooppisesti laskemalla Fuchs-Rosenthal laskukammion avulla. Kammioon pipe-  
toitiin näytettä sopivana pitoisuutena niin, että itiöiden lasku on mahdollisimman tark-  
kaa. Näytettä joudutaan usein laimentamaan, jotta laskettava solumäärä ruutua kohden  
olisi alle 10. Näyte pipetoitiin peitinlasin ja kammiolaskurin välissä olevaan välitilaan,  
josta kapillaarivoima imi näytteen peitinlasin ja kammiolaskurin väliin, jossa on lasken-  
taruudukko. Laskentaruudukko valittiin itiöiden koon ja suspension pitoisuuden perus-  
teella. (Electron Microscopy Sciences 2016) Kuva 3. havainnollistaa kammiolaskurin  
rakennetta.

Kammio kasattiin kostuttamalla koholla olevat osat ja asettamalla tarkoitukseen sopiva  
peitinlasi laskentaruudukoiden päälle. Käytäviin pipetoitiin varovasti laimentamatonta  
itiösuspensiota niin, että kummatkin laskentaruudukot peittyivät. Preparaatin annettiin  
asettua viisi minuuttia, jonka jälkeen itiöitä voi laskea.

A ruudukko on ruudukoista isoin, ja se oli paras vaihtoehto suurille itiöille. C ruutu on  
kapea ja pitkä, ja näin paras vaihtoehto vahvalle suspensiolle, jossa itiöpitoisuus oli  
suuri. *Aspergillus restrictus* sekä *Chaetomium globosum* laskettiin A ruudukosta, ja  
*Aureobasidium pullulans* sekä *Paecilomyces variotii* laskettiin C ruudukosta. Solumää-  
rän laskemisessa käytettiin kaavaa, joka on kuvattu sivulla 17. Kaavassa muuntoker-  
toimella kuvataan kuinka monta kertaa ruudun (A/C) tilavuus menee yhteen kuutiosent-

timetriin. Kaikkien ruutujen muuntokertoimet sekä esimerkkilasku ovat esitettynä liitteessä 1.



Kuva 3. Havainnollistava kuva Fuchs-Rosenthal kammioista.

Itiöt laskettiin 50 samankokoisen ruudun sisältä sekä lisäksi ruudun kahden viivan päältä (esim. yläviiva ja vasen viiva). Tuloksista laskettiin keskiarvo sekä keskihajonta ja lopullinen solumäärä millilitraa kohden voidaan teoreettisesti määrittää seuraavan kaavan mukaisesti.

$$B \times \left(\frac{1}{K}\right) \times N$$

Kaavassa

$B$  on ruudukon muuntokerroin, joka kertoo, kuinka monta kertaa ruutu  $A$ :n tilavuus menee yhteen kuutiosenttimetriin

$K$  on laimennuskerroin, ja

$N$  kertoo laskentaruudukossa olevien solujen keskiarvon.

Esimerkki solujen laskemisesta sekä laskuissa tarvittavat muuntokertoimet ovat esitettynä liitteessä 1.

#### 5.4 Materiaalin käsittely ja ympärys

Identifioidut näyteputket suljettiin alumiinifoliolla ja steriloidtiin pussitettuina autoklaavissa. Steriloidut näyteputket aseteltiin avonaisina kasvatuskammioihin putkitelineissä. Putkissa on näytemateriaalia, eli tässä validoinnissa sahanpurua. Sahanpuru (Capell, pesäpuru, kuusi- ja mäntypuu) ostettiin päivittäistavarakaupasta kilon paketeissa. Pu-

rua punnittiin  $1,5 \text{ g} \pm 2 \%$  putkeen, joka suljettiin sitten foliolla steriloinnin ajaksi. Valmistettu itiösuspensio ympättiin steriileihin sahanpuruihin pipetoimalla. Ymppäyksen jälkeen puru piti homogenisoida mahdollisimman tarkasti, jotta itiöt leviäisivät tasaisesti ympäri näytettä. Putket asetettiin eksikaattoriin avonaisina, jonka vuoksi eksikaattorissa oli samanaikaisesti vain yhtä lajia.

Ymppäyksen jälkeen tehtiin nollaviljely, jotta havaittiin ympin ja materiaalin nollataso. Nollaviljely viljeltiin laimennusviljelynä, mutta Mycometer mittaukset olivat tarpeettomat ennen inkubointia, sillä rihmasto ei ollut ehtinyt näyttemateriaaliin muodostua.

Valmistettua itiösuspensiota pipetoitiin 0,5 ml jokaiseen putkeen, ja putkea vortexoitiin voimakkaasti, jotta ymppi levisi tasaisesti. Ymppäyksen jälkeen putket laitettiin avonaisina kasvatuskammioon, josta niitä kerättiin kullekin lajille sopivin väliajoin (ks. Taulukko 2).

## 5.5 Elatusaineet

Elatusaineiden reseptit löytyvät liitteestä 3.

### **M2**

M2 kasvualustalla on mallasuutetta 2 %. Mesofiilille sienille tarkoitettu kasvualusta, jolla kasvaa hiiva- ja homesienet. Tässä työssä referenssimenetelmän laimennusviljelyssä mallasuuteagaria käytettiin kasvualustana *Paecilomyces variotiille*, *Chaetomium globosumille* ja *Aureobasidium pullulansille*.

### **DG-18**

Dikloraani-18 %-glyseroli-agar on optimaalinen kasvualusta kuivahkoissa olosuhteissa kasvaville sienille, eli kserofiilille sienille (Samson, *et al.* 2010, 7). Tässä työssä DG-18 – kasvualustaa käytettiin *Aspergillus restrictukselle*, joka ei kasva muilla maljoilla, tai sen havaitseminen on vaikeaa (Raper & Fennel 1965, 236).

## THG

Tryptoni-hiivauute-glukoosiagar on bakteerien kasvatukseen tarkoitettu kasvualusta. Tässä työssä kasvatettiin, analysoitiin ja mitattiin Mycometerilla ainoastaan sienikasvustoa, joten THG ei ole optimaalinen kasvualusta millekään lajille, vaan kasvualustalle viljeltiin ainoastaan kontrolliviljelyt, joilla seurattiin näytteiden kontaminoitumista.

## Hagem

Rose Bengal mallasuute kasvualusta on optimaalinen elatusaine nopeasti kasvaville sienille, joiden analysointi on sen vuoksi haasteellista. Kaikkien validoinnissa käytettyjen homelajien laimennusviljely tehtiin myös Hagem-kasvualustalle, sillä se todettiin analysointia helpottavaksi kasvualustaksi (ks. kappale 6.1).

### 5.6 Viljely

Uuden menetelmän validointi suoritettiin referenssimenetelmää vasten. Referenssimenetelmän tiedettiin antavan luotettavasti oikea tulos, jolloin tuloksia vertailemalla voitiin todeta, että analysaattorin tulostaso on vertailukelpoinen muilla menetelmillä saataviin tuloksiin.

Uusi menetelmä oli tässä validoinnissa materiaalinäytteistä entsyymipitoisuutta mittaava Mycometer testi. Referenssimenetelmänä tässä validoinnissa oli asumisterveysasetuksen mukainen laimennusviljely ja validoinnin tueksi tehtiin myös suoraviljely ikään kuin kontrolliviljelynä. Näytteitä viljellessä toimittiin aina aseptisesti, huolehtien, etteivät näytteet kontaminoituneet.

#### 5.6.1 Laimennusviljely

Putket poistettiin eksikaattoreista laminaarivirtauskaapissa, ja putkiin pipetoitiin 30 ml laimennusliuosta. Putkea sekoitettiin voimakkaasti, jotta neste levisi purujen sekaan tasaisesti. Putket aseteltiin ultraäänihauteeseen 30 minuutiksi, jotta itiöt irtosivat paremmin laimennusliuokseen. UÄ-käsittelyn jälkeen putket menivät ravisteluun tasokääntelijään vähintään 60 minuutiksi. Ravistelun jälkeen näytteistä tehtiin laimennus-

sarja ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ), joista viljeltiin lajikohtaisesti sopiville elatusalustoille 0,1 ml laimennosta.

Tässä validoinnissa *Aspergillus restrictus* viljeltiin DG-18 ja Hagem elatusalustoille, kaikki muut lajit viljeltiin M2 ja Hagem elatusalustoille. Viljellyt maljat inkuboituivat kasvatuskaapissa (+25 °C) 7 vuorokautta, jonka jälkeen pesäkkeet voitiin laskea.

### 5.6.2 Suoraviljely

Suoraviljely viljeltiin samasta näyteputkesta, josta tehtiin myös Mycometer analyysi. Näytettä lusikoitiin tasaisesti elatusaineen päälle silmämääräisesti noin 0,5 ml/malja. Materiaali pyrittiin saamaan maljalle mahdollisimman tasaisesti, jotta pesäkkeet eivät kaikki kasvaisi samaan kohtaan. Viljeltyjä maljoja inkuboitiin 7 vuorokautta, jonka jälkeen pesäkkeet laskettiin.

### 5.6.3 Mycometer analyysi

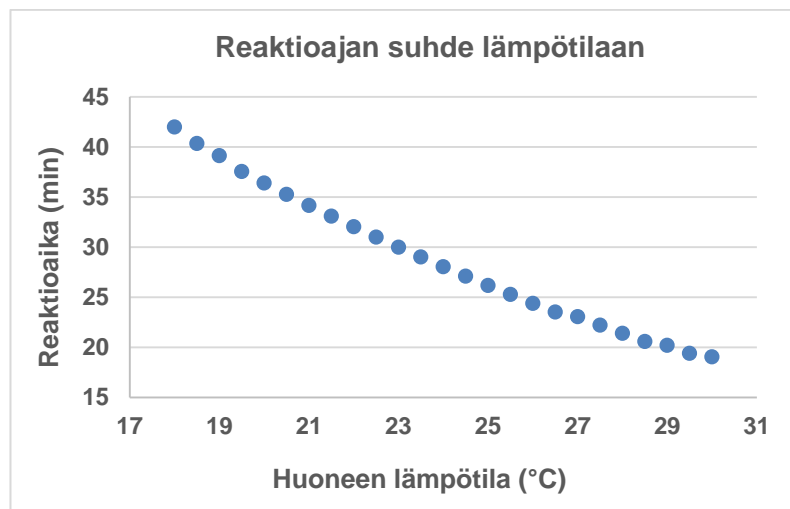
Haluttua materiaalia punnittiin mahdollisimman tarkasti 0,1 g. Valmistajan ohjeiden mukaisesti materiaali tulisi punnita punnitusalustalla, josta se siirretään reaktioputkeen. Tämä kuitenkin todettiin hankalaksi, joten sujuvuuden helpottamiseksi materiaali punnittiin 5 ml:n eppendorf-putkeen. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaista määrittystä.

Ennen mittauksia ja joka kerta kun mittari sammuu, täytyi se kalibroida. Kalibrointi suoritettiin kaksivaiheisena, ensin mitattiin "blank" eli nollataso ja tämän jälkeen standardiliuksella tarkistettiin, että laite antaa oikean tuloksen. Fluoresenssistandardille oli määritetty arvo, joka saa vaihdella 3 %. Viitearvo löytyy jokaisen Mycometer laitteen pohjasta, ja se oli tarkistettava aina kalibroitaessa. (Mycometer A/S 2011)

Mycometerillä tehtävät mittaukset aloitettiin määrittämällä tausta, jonka signaali johtui jostain muista tekijöistä, kuin sienestä. Taustasignaalia aiheuttivat esimerkiksi reagenssit. Taustan määrittäminen aloitettiin mittaamalla arvo kehitysliukselle, joka oli pipetoitu suoraan mittauskyvetiin. Mittauksen jälkeen testiliuos sekoitettiin substraattiin ja kun substraatti oli täysin liuennut testiliukseen, pipetoitiin liuosta 100 µl kehitysliuksen joukkoon. Kehitysliuos+substraatti arvo mitattiin Mycometerilla. Reagenssien

arvot, eli taustan osuus mitattavasta arvosta oli tiedettävä, jotta lopullinen analyysitulokset voitiin laskea.

Testiliuos, johon oli liuotettuna jauhemainen substraatti, sekoitettiin purujen joukkoon ja reaktioajan annettiin kulua. Reaktioaika oli suoraan verrannollinen huoneen lämpötilaan; kun lämpötila nousi, reaktioaika laski (ks. Kuva 4.). Kun reaktioaika oli kulunut, pipetoitiin reaktioputkesta 100 µl mitattavaan kyvetiin, jossa oli kehitysliuos valmiina. Kyvetti mitattiin, ja tulokset dokumentoitiin.



Kuva 4. Lämpötilan vaikutus reaktioaikaan.

## 6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

Tuloksia tarkasteltaessa validoitavan menetelmän tuloksia verrataan referenssimenetelmään. Laimennusviljelymenetelmän ja Mycometer – menetelmän tulokset ovat eri yksiköissä, joten vertailussa keskitytään toimenpiderajojen yhtäpitävyyteen ja näyttees-tä annettavaan lopulliseen lausuntoon koskien mikrobikasvua näytteessä.

Laimennusviljelyn lisäksi Mycometer-menetelmän tuloksia verrataan suoraviljelystä saataviin tuloksiin. Kaikki suoraviljelystä saadut tulokset ylittivät toimenpiderajan (+++ /++++). Suoraviljely on semikvantitatiivinen menetelmä, eli tulokset ilmoitetaan suuntaa antavasti. Suoraviljelyn tuloksia ei erikseen käsitellä tässä validoinnissa, sillä kaikki tulokset olivat validoinnin osalta keskenään samat.

Laimennusviljelyn tulos kertoo kokonaisitiöpitoisuuden näytteessä. Itiöpitoisuus laske-taan maljoilla kasvaneen pesäkeluvun ja laimennussuhteen perusteella. Esimerkki itiöpitoisuuden laskemisesta on esitetty liitteessä 2. Asumisterveysasetuksen mukai- sesti toimenpideraja on > 10000 itiötä, tämän rajan ylityttyä voidaan todeta, että raken- nusmateriaalissa esiintyy mikrobikasvustoa. (Valvira 2016)

Mycometer-menetelmässä tulos kategorioidaan arvon mukaisesti A-, B-, tai C- kategoriiaan (ks. Taulukko 1.). Tuloksia kirjatessa huomioidaan mittausalueen asetta- mat rajoitukset (ks. kappale 4, mittausalue). C-kategoria, eli Mycometer-arvo > 450, vastaa laimennusviljelyn toimenpiderajaa > 10000 itiötä.

Taulukko 3. Laimennusviljelyn toimenpiderajat.

Itiöpitoisuus	Lausunto
> 10000	Rakennusmateriaalissa esiintyy mikrobikasvustoa
5000–10000	Voidaan tulkita kosteusvauriona, jos lajit ovat kos- teusindikaattoreita ja sienisuvusto yksipuolinen

Taulukko 4. Aerobiologian suoraviljelyanalyysi.

Tulos	Vastaava pesäkemäärä	Luonnehdinta
+	0-10 (1-5) <sup>1</sup>	vähän
++	11–50 (6-25) <sup>1</sup>	kohtalaisesti
+++	>50 (>25) <sup>1</sup>	runsaasti
++++	ei laskettavissa	erittäin runsaasti

<sup>1</sup> Suuri-itiöiset taksonit, tässä validoinnissa *C.globosum*. Kyseiset lajit tuottavat suhteellisesti vähän itiöitä ja vain muutama pesäke voi peittää koko maljan. (Aerobiologian laatukäsikirja, 2016)

Taulukossa 3 on huomioitu vain tässä validoinnissa käytetty lajisto.

Suoraviljelyä ei ole validoitu Valviran ohjeistuksen mukaisesti, mutta se ei vaikuta validoinnin tuloksiin. Suoraviljely ei ole tämän validoinnin referenssimenetelmä, vaan sitä käsitellään pelkästään lisämateriaalina validoinnin tueksi.

Tulokset – kappaleessa esitetään tulokset vain kahden lajin osalta. *Paecilomyces variotii* ja *Aureobasidium pullulans* kasvoivat kammioissa odotetusti, joten niillä pystyttiin suorittamaan menetelmän validointi. Sen sijaan sahanpurun ympärys *Chaetomium globosum* ja *Aspergillus restrictus* –suspensioilla ei onnistunut odotetusti, eivätkä lajit lähteneet kasvamaan pitkänkään inkuboinnin jälkeen. Tästä johtuen kaikki tulokset, niin laimennusviljelyssä kuin Mycometer mittauksissa, olivat käyttökelvottomia. Validointi ei epäonnistuneiden lajien osalta onnistunut, joten ko. lajeille tehtiin ympärys, kammiokasvatus, ja viljely uudelleen. Tarkemmin korjaavat toimenpiteet on kerrottu kappaleessa 6.3

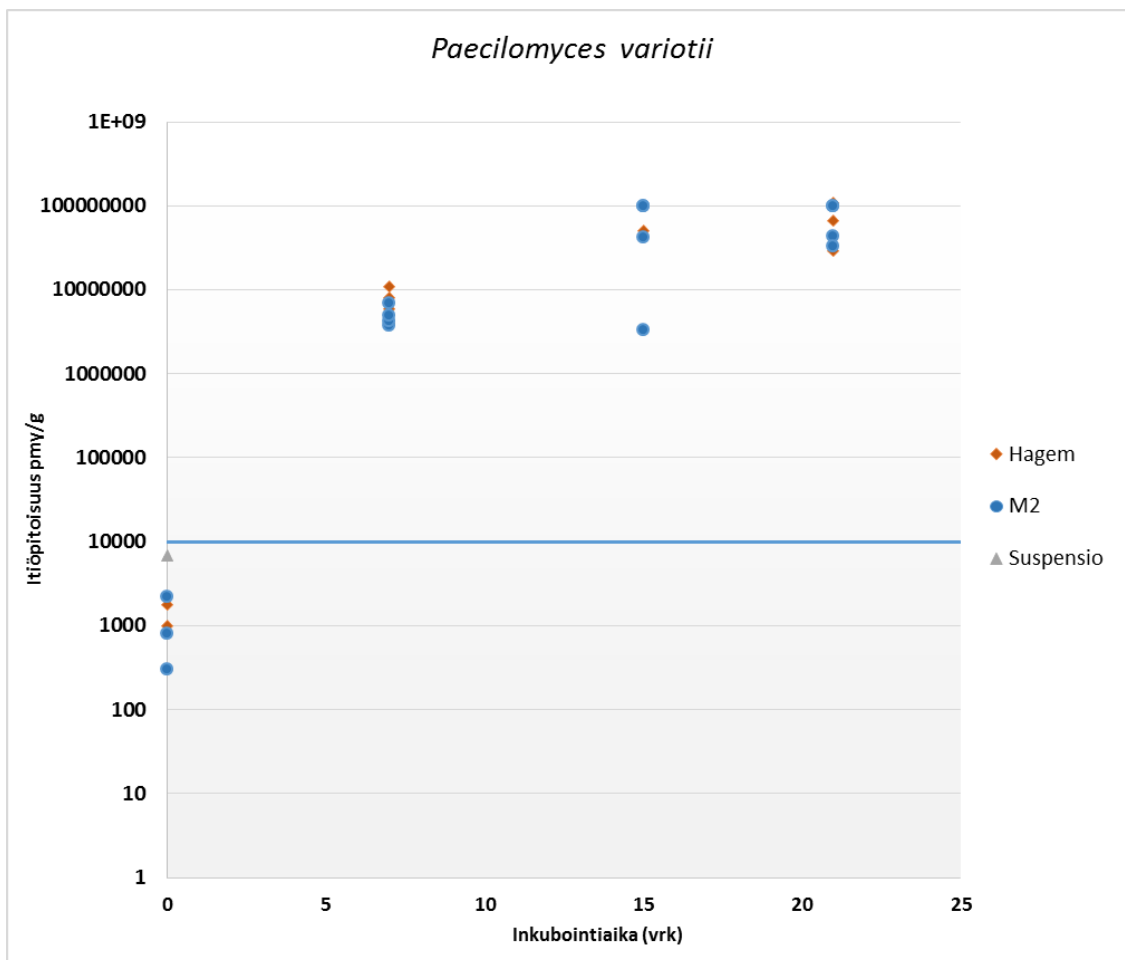
### 6.1 Menetelmien vertailu

Validoitavan menetelmän tuloksia verrataan referenssimenetelmän tuloksiin, jotta pystytään havaitsemaan antavatko menetelmät yhtenevät tulokset, tai keskenään edes suuntaa antavat tulokset. Tulosten käsittelyssä kiinnitetään erityisesti huomiota toimenpiderajoihin ja niiden ylittymiseen.



### 6.1.1 *Paecilomyces variotii*

Kuvassa 5. on esitetty referenssimenetelmällä saadut tulokset. Kuvaajaan on sinisellä viivalla merkitty toimenpideraja Taulukon 3 mukaisesti, eli sieni-itiöpitoisuus > 10 000. Toimenpiderajan ylittyminen tarkoittaa mikrobikasvustoa, joka voi aiheuttaa terveysoireita.



Kuva 5. Referenssimenetelmän tulokset, *Paecilomyces variotii*.

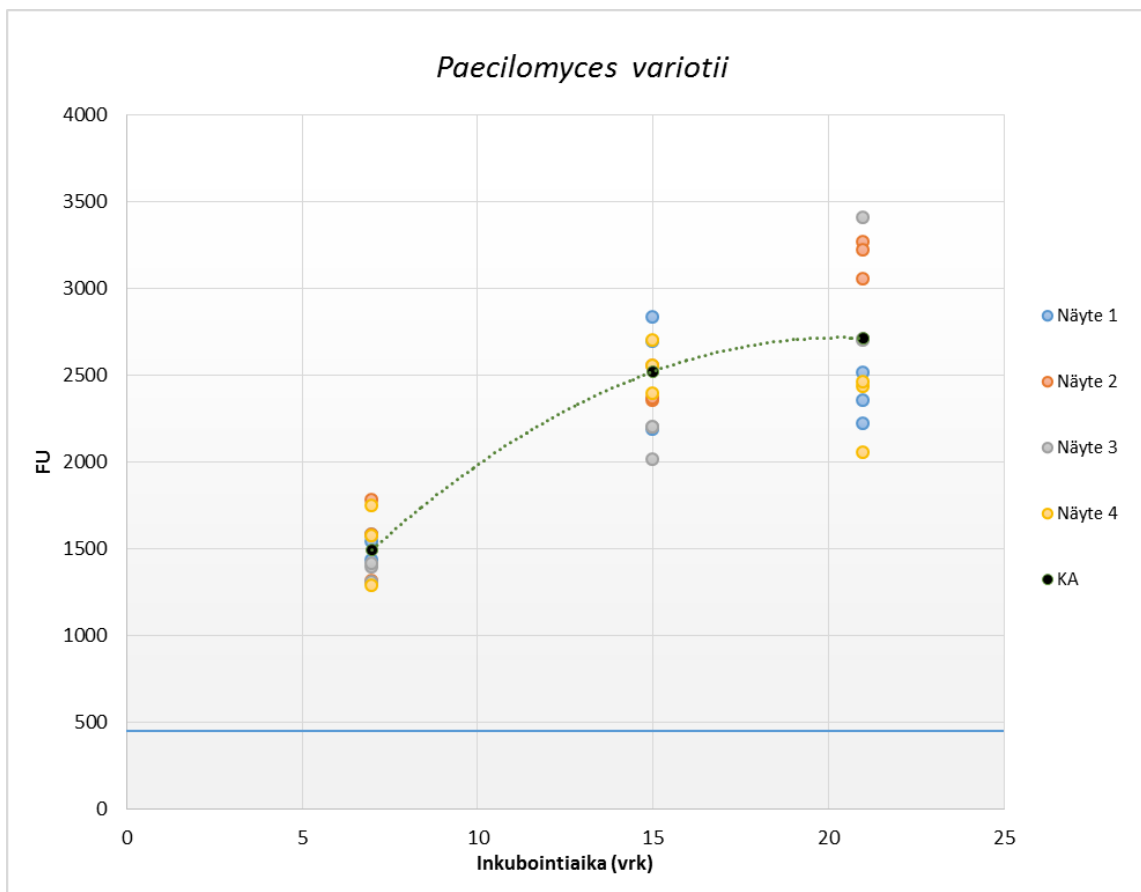
Sahanpurun ympärys *P.variotii* –suspensiolla onnistui hyvin, sillä laji lähti nopeasti eksponentiaaliseen kasvuun. Kuvasta 5 voidaan havaita, että *Paecilomyces variotii* on nopeakasvuinen ja tuottaa nopeasti paljon itiöitä. Jo seitsemän vuorokauden inkuboinnin jälkeen itiöpitoisuus on ylittänyt toimenpiderajan. Kuvaajasta voidaan havaita, että eksponentiaalinen kasvu tapahtuu 0-15 vuorokauden välillä. Eksponentiaalisen vaiheen jälkeen kasvu tasaantuu 15–21 vuorokauden välillä, mutta kuolinvaihe ei ehdi alkaa voimakkaasti, ennen kuin inkubointi lopetetaan. Mycometerin validointiin nähden

inkubointiaika ja viljelypisteet ovat hyvät, sillä tavoitteena oli saada mahdollisimman erilaiset pitoisuudet mikrobin kasvun eri vaiheista.

*Paecilomyces variotii* suspension itiöpitoisuus laimennusviljelyn perusteella on 6900 pmy/g. Tulos kertoo suspension olevan elinkykyinen ja tuottavan runsaasti itiöitä. Kuvasta huomataan, että suspension itiöpitoisuus on suurempi, kuin ympättyjen, mutta inkuboimattomien näytteiden itiöpitoisuus. Uuteen elinympäristöön siirtyminen voi aiheuttaa soluille sopeutumishankaluuksia, joten lisääntyminen ei ala välittömästi. Näin voi tapahtua etenkin silloin, jos ympä on liian vahva. Lisäksi osa itiöistä saattaa ympäyksen aikana takertua materiaaliin, eivätkä näin ollen siirry pipetoitaessa maljalle.

Kuvassa 5 on eriteltynä laimennusviljelyssä käytetyt sienikasvulle sopivien elatusaineiden (Hagem ja M2) tulokset. Mallasuute-agar (M2) on kokeissa päämaljana asumisterveysasetuksen mukaisesti, mutta Hagem-alusta otettiin vertailun vuoksi toiseksi alustaksi. Elatusaineiden välillä ei tuloksissa ole havaittavissa merkittävää eroa, mutta pesäkkeiden laskemisessa huomattiin, että Hagemille muodostuneet pesäkkeet ovat helpommin laskettavissa, sillä pesäkkeet ovat pienempiä ja sen vuoksi selkeämpiä erottaa ja laskea. Hagem-alustassa on Rose Bengalia, joka rajoittaa sienipesäkkeiden kasvua (ks. Liite 3).

Inkubointiajan pidentyessä ja sienipitoisuuden kasvaessa joudutaan viljeltäessä näyttettä laimentamaan enemmän, sillä liian pienestä laimennuksesta johtuen suurin osa maljoista on ylikasvanut, eikä niiltä voida sen vuoksi laskea itiöpitoisuutta.



Kuva 6. Validoitavan menetelmän tulokset, *Paecilomyces variotii*.

Kuvassa 6. on esitettyä Mycometerilla mitattaessa saadut fluoresenssisignaalit, jotka vastaavat sienien kokonaisbiomassaa näytteessä. Mycometerilla mitattaessa on kustakin pitoisuudesta tehty 12 toistoa: 4 eri kasvatuskammiota, jokaisesta näytteestä kolme rinnakkaista toistoa. Näytteiden alaotokset ovat kuvattuna samenvärisillä pisteillä, kun taas eri näytteet on kuvattu erivärisillä pisteillä. Mittaukset tehtiin samalla pitoisuustasolla, kuin kuvan 5. viljelyt. Fluorimetrin antamat tulokset jaotellaan kolmeen kategoriaan (ks. Taulukko 1), joista kuvaajassa on esitetty punaisella viivalla vain kategoria C:n alaraja 450 FU. Muita kategorioita ei ole kuvaajassa esitetty, sillä yksikään yksittäinen tulos ei esiinny näissä kategorioissa. Kuvaajasta voi selkeästi havaita, että kaikki tulokset ylittävät melko reilusti valmistajan asettaman toimenpiderajan, eli kategoria C:n alarajan. Myös kaikki laimennusviljelystä saatavat tulokset ylittävät toimenpiderajan (Kuva 5.).

Kuvissa 5. ja 6. inkubointiajat ovat samat, mutta laimennusviljelystä on lisäksi myös inkuboimaton, eli 0 vrk viljely. Tätä pitoisuutta ei ole mitattu Mycometerilla lainkaan.

Referenssimenetelmän ja validoitavan menetelmän antamien tulosten tulisi olla mahdollisimman identtiset keskenään. Tuloksia tulkitessa täytyy muistaa, että Mycometer on suuntaa antava menetelmä, kun taas laimennusviljely antaa kvantitatiivisesti tarkan tuloksen elinkykyisten mikrobien määrästä. Kuvaajista 5. ja 6. näkee, että menetelmien tulokset ovat samansuuntaisia, ja muutokset pitoisuustasojen välillä ovat suhteessa samanlaiset. Tulosten perusteella voidaan todeta, lajin ollessa *Paecilomyces variotii*, Mycometerin antamat tulokset ovat samansuuntaiset, kun mikä laimennusviljelyllä saadaan. Molemmilla menetelmillä analysoituna tulokset osoittavat selkeästi mikrobikasvua analysoidussa näytteissä.

Kuvan 6. keskiarvopisteistä on havaittavissa, että 21 vuorokauden tulospisteet eivät asetu lineaarisesti suoralle aiempien tulospisteiden kanssa. Muutos Mycometerillä saaduissa tuloksissa 15–21 vuorokauden välillä on pienempi kuin 7-15 vuorokauden välillä. Syy tähän selviää kuvasta 5., josta nähdään sienen kasvun kääntyvän kuolleisuuden puolelle. Itiöiden ja rihmaston kuollessa entsyymipitoisuuden tulisi tasaantua, mikä havaitaan myös kuvasta 6. Entsyymiaktiivisuus laskee pitkän ajan kuluessa, mutta validoinnin aikana tätä ei ole havaittavissa. Vaikka laji siis kuvan 5. mukaisesti on mennyt kuolinvaiheeseen, ei kuvan 6. pisteiden kuuluisi laskea, vaan tasaantua.

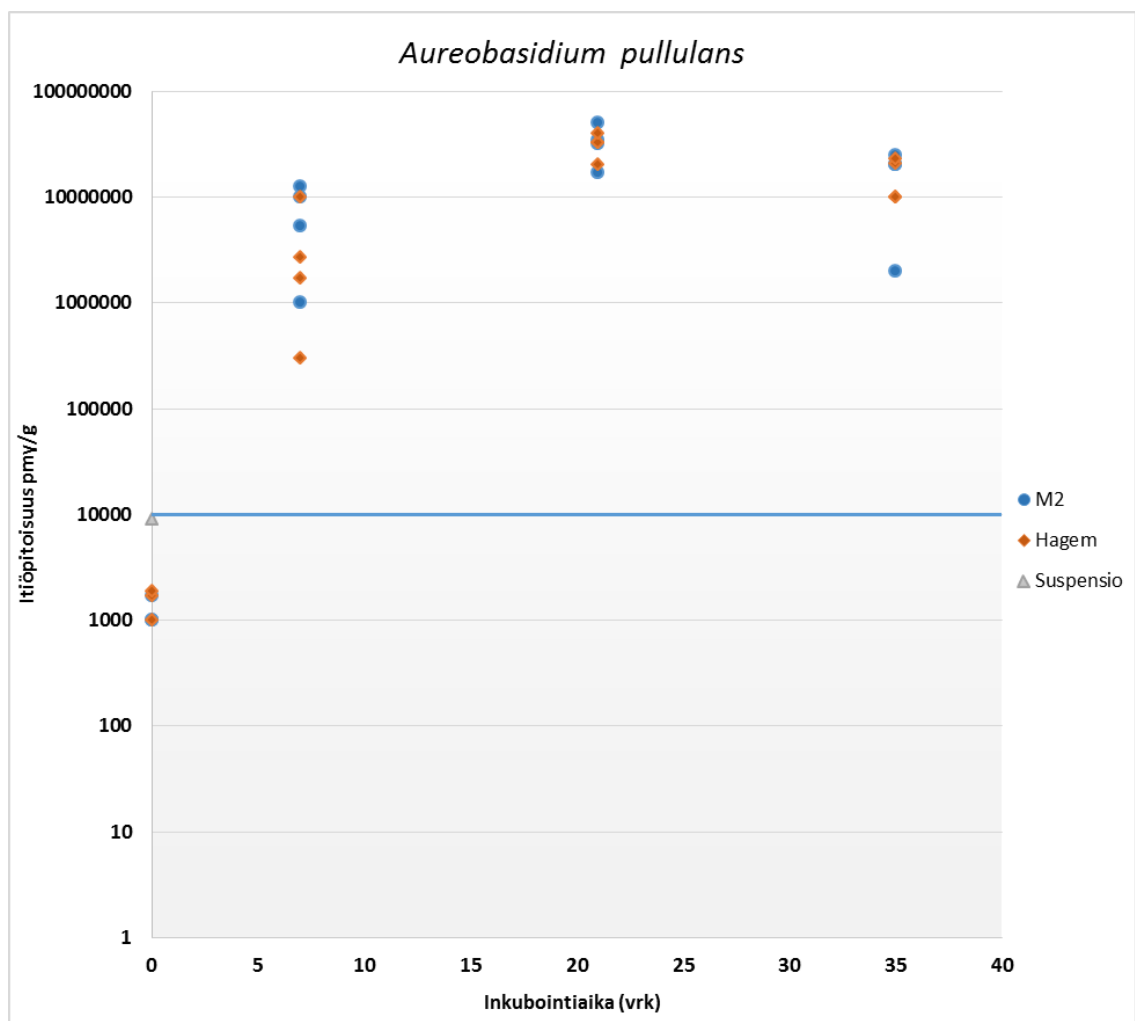
Tarkasteltaessa tulosten välistä hajontaa voidaan havaita, että näytteiden väliset erot saattavat vaihdella paljonkin, mutta saman näytteen eri aliotoksien välillä tapahtuva hajonta on pienempää. Hajonnan suuruuteen vaikuttaa olennaisesti vertailumateriaalin homogeenisyys. Sahanpuru on helpompi saada homogeeniseksi, kuin esimerkiksi mineraalivilla, mutta täsmälleen samanlaisten aliotosten saaminen näytteestä on mahdollista. Mycometer analyysiin käytetään vain pieniä määriä näytettä (0,1 g), josta johtuen vaihtelu on suurta. Hyvä vertailukohde on laimennusviljely (kuva 5.), jossa näytemäärä on moninkertainen (1,5 g). Pienen näytekoon vuoksi Mycometer analyysiin saattaa päätyä hyvin erilaisia osia matriisista; johonkin kyvetiin ei välttämättä päädy lainkaan rihmasto, kun taas toisessa kyvetissä on rihmasto sekä itiöitä. Laimennusviljelyssä koko ympätty näyte viljellään, ja sen vuoksi näytteiden välinen hajonta on paljon pienempää kuin Mycometerillä tehdyissä mittauksissa.

Kuvaajasta pystytään havaitsemaan, että tulosten hajonta kasvaa entsyymipitoisuuden kasvaessa ja vastaavasti inkubointiajan pidentyessä. Hajonnan kasvuun voi vaikuttaa materiaalin epähomogeenisyys ympäyksen jälkeen. Jos ympä jakautuu epätasaisesti materiaaliin, osa materiaalista homehtuu enemmän kuin osa, tämä näkyy selkeämmin, kun kasvu on reippaampaa ja optimaalisesti homehtuneen kasvuston antama fluore-

senssisignaali on korkea. Tästä johtuen tulosten hajonta on suurempaa inkubointiajan kasvaessa, sillä kasvatuksen alkuvaiheessa pitoisuudeltaan matalan sienikasvuston fluoresenssisignaali ei ole suuri.

### 6.1.2 *Aureobasidium pullulans*

Kuvassa 7. on esitetty referenssimenetelmällä saadut tulokset. Kuvaajaan on sinisellä viivalla merkitty toimenpideraja Taulukon 3. mukaisesti, eli sieni-itiöpitoisuus > 10 000 pmy/g.



Kuva 7. Referenssimenetelmän tulokset, *Aureobasidium pullulans*.

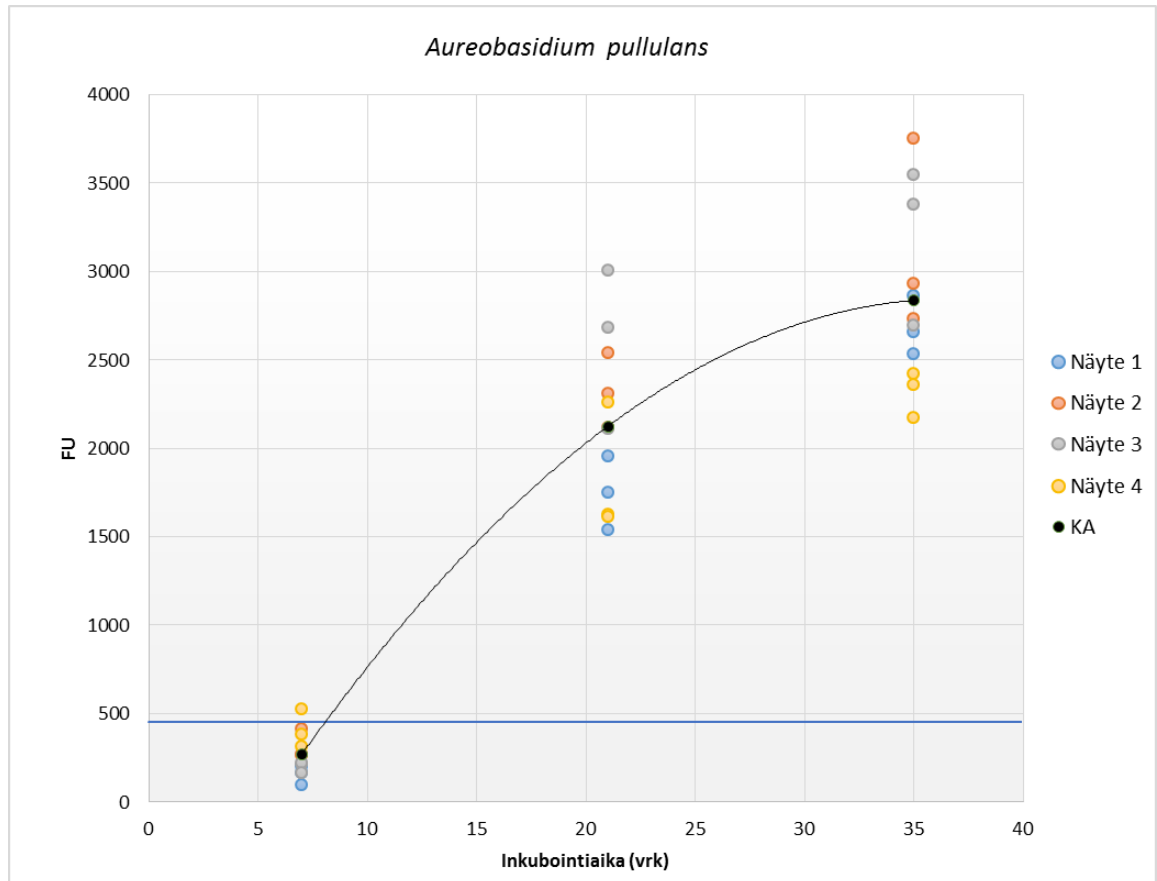
*A. pullulans* on hieman hidaskasvuisempi, kuin *P. variotii* ja sen vuoksi inkubointiaika on 7 vuorokautta pidempi. *A. pullulans* tuottaa paljon itiöitä, joten myös *A. pullulans* kasvaa

runsaasti yli toimenpiderajan *P.variottiin* tavoin. Kuvaajasta voidaan nähdä mikrobin elinkaari: eksponentiaalinen kasvu tapahtuu 0-7 vuorokauden aikana, 21 vuorokauden aikana kasvu on kuolleisuuden kanssa yhtä suurta, kun taas 35 vuorokauden aikana kuolleisuusnopeus on ylittänyt kasvunopeuden. Kuvaajasta nähdään, että pitoisuustaso 7 vuorokauden kohdalla on lähes sama, kuin 35 vuorokauden kohdalla. Tämä ei ole ideaalinen tilanne, sillä kaikki validoinnissa testattavat pitoisuustasot tulisivat olla selkeästi toisistaan eroavia.

Tulevaisuudessa vastaavaa vertailumateriaalia käytettäessä olisi hyödyllistä valita pitoisuustasot eritavalla. Kasvun alkuvaiheessa, esim. inkubointiajan ollessa 3 vrk, saataisiin tärkeää tietoa siitä, miten ympäristö käyttäytyy materiaalissa. Lisäksi kuolleisuuden ollessa voimakkaampaa kuin itiöiden lisääntyminen, ei vertailumateriaali ole enää ideaalinen käytettäväksi menetelmän testauksessa.

*Aureobasidium pullulans* -ympin suuruus laimennusviljelyn perusteella oli noin 9000 pmy/g, eli hyvin lähellä suunniteltua. Kuvasta 7. nähdään, että 0-näytteiden pitoisuus on pienempi, kuin pelkän suspension pitoisuus. Osa ympin itiöistä voi kuolla uuteen elinympäristöön siirryttäessä tai takertua näytemateriaaliin, mikä on huomioitu ympin vahvuudessa. Kun ympin on tarpeeksi vahva, ei lievä kuolleisuus haittaa vaan laji lähtee silti voimakkaaseen kasvuun.

Myös *A.pullulans* viljeltiin laimennusviljelyssä kahdelle eri elatusaineelle; Hagem ja M2 (Kuvassa 7. elatusaineet on merkitty eri värein). Elatusaineiden välillä ei ole havaittavissa merkittävää eroa.



Kuva 8. Validoitavan menetelmän tulokset, *Aureobasidium pullulans*.

Kuvassa 8. on esitettyä Mycometerilla, eli validoitavalla menetelmällä saadut fluoressissignaalit inkubointiajan funktiona. Kuvaajassa on sinisellä viivalla rajattu C-kategorian alaraja 450 FU (ks. Taulukko 1), joka vastaa laimennusviljelyn toimenpiderajaa >10 000 pmy/g. Kuten kuvassa 6., myös kuvassa 8. näytteiden alaotokset ovat kuvattuna samanvärisillä pisteillä, kun taas eri näytteet on kuvattu erivärisillä pisteillä. Kustakin pitoisuudesta on tehty 12 toistoa: 4 eri kasvatuskammiota, jokaisesta näytteestä kolme rinnakkaista toistoa.

Kuvaajasta nähdään, että ymppäys on onnistunut odotetulla tavalla, sillä entsyymipitoisuus kasvaa inkubointiajan funktiona. Pitoisuuspisteet on myös valittu validoinnin kannalta otollisesti, sillä näytteiden pitoisuudet eroavat selkeästi toisistaan.

Kun vertaillaan kuvia 7. ja 8., huomataan, etteivät tulokset ole yhteneviä. Entsyymipitoisuus ei korreloi itiöpitoisuuden kanssa, eikä mikrobivaurioon viittaava loppulausunto ole menetelmien kesken sama. Loppulausunto tehdään toimenpiderajan perusteella, mikä ei eri menetelmillä saaduilla tuloksilla ylitä samassa analyysipisteessä.

Kuvasta 8. nähdään, että entsyymipitoisuus kasvaa lähes lineaarisesti inkubointiajan kasvaessa. Kuvassa 7. nähdään selkeästi mikrobin elinkaari, kun taas Mycometerilla saaduista tuloksista (Kuva 8.) ei pysty havaitsemaan elinkaaren mitään vaiheita. Laimennusviljelyn tuloksissa kuolleisuus näkyy 35 vuorokauden kohdalla itiöpitoisuuden laskuna, kun taas Mycometerin tuloksissa 35 vuorokauden kohdalla entsyymipitoisuus nousee edelleen, vaikkakin pitoisuuden kasvu on jo tasoittumassa. Laimennusviljelyssä 7 vuorokauden ja 35 vuorokauden itiöpitoisuudet ovat hyvin lähellä toisiaan, kun taas Mycometerilla saaduilla tuloksilla näytteiden entsyymipitoisuudet ovat 35 vuorokauden kohdalla lähes kymmenkertaisia 7 vuorokauden kohdalla mitattuihin tuloksiin nähden.

Kuvasta 8. nähdään, että 7 vuorokauden inkuboinnin jälkeen mitatuissa näytteissä entsyymipitoisuus kuuluu kategoriaan B (ks. Taulukko 1.). Entsyymipitoisuuden perusteella näytteissä ei ole mikrobikasvustoa. 7 vuorokauden kohdalla viljeltyjen laimennusviljeltyjen tulokset ovat tuhatkertaisia toimenpiderajaan nähden. 7 vuorokauden viljelyn kohdalla validoitavan menetelmän tulos ei vastaa referoitavan menetelmän antamaa tulosta.

21 vuorokauden inkuboinnin jälkeen näytteen entsyymipitoisuus on selkeästi noussut, kuten sen laimennusviljelyn tulosten perusteella voidaan olettaa tekevänkin. Referenssimenetelmän kasvun huippu on 21 vuorokauden kohdalla. Mycometerin antamissa tuloksissa entsyymipitoisuus nousee edelleen vielä tämän jälkeenkin.

35 vuorokauden inkuboinnin jälkeen mitatuissa näytteissä entsyymipitoisuus on kasvanut edelleen, muttei kuitenkaan yhtä paljon, kuin 7-21 vuorokauden aikana. Referenssimenetelmän (kuva 7.) tulosten mukaisesti lajin olisi kuitenkin pitänyt jo kääntyä kuolleisuuteen, eli entsyymipitoisuuden olisi pitänyt tasoittua 21 vuorokauden mittausten jälkeen.

Mycometerilla saaduissa tuloksissa on havaittavissa hajonnan kasvaminen entsyymipitoisuuden kasvaessa, samalla tavalla kuin *P. variotiin* kohdalla (ks. kappale 6.1.). Myös *A. pullulans* on viljelty neljänä toistona ja jokaisesta toistosta kolmella aliotoksella. Saman näytteen aliotokset on kuvattu samalla värillä, mutta eri näytteet eri väreillä.

*A. pullulans* on kasvatavaltaan hiivamainen. Mycometer-menetelmä ei sovellu hiivasienille, joten alkuhypoteesina ko. lajin kohdalla oli, että Mycometer-menetelmä ei välttämättä toimi ollenkaan, tai menetelmän havaitsema entsyymipitoisuus on hyvin matala. Alkuoletusten vastaisesti menetelmä toimi, sillä analysaattori havaitsi entsyymiin suuntaa antavasti. Ainoa selkeästi poikkeava tulos referenssimenetelmään nähden on seit-



semän vuorokauden kohdalla, kun Mycometer antaa liian matalan tuloksen. Tämä voi selittyä myös lajin itiöntuotannolla. Ehkäpä itiöt/rihmasto eivät tuota entsyymiä tarpeeksi kasvun alkuvaiheissa, jotta Mycometerillä voisi sitä havaita.

### 6.1.3 *Chaetomium globosum*

*C. globosum* suspension elinkykyisten itiöiden pitoisuus oli laimennusviljelyn perusteella noin 2400 pmy/g, joka on noin neljäsosa suunnitellusta 10 000/ml. Suspensiosta itiöt laskettiin laskentakammion avulla, joten suspension kokonaisitiöpitoisuus saatiin selvitettyä tarkasti. Tarkasta laskennasta huolimatta suspension todellinen pitoisuus oli kaukana suunnitellusta, joten voidaan päätellä, että suspensiossa oli siis suurin osa itiöistä ollut kuolleita tai sellaisia, jotka eivät pystyneet kasvamaan käytetyllä kasvualustalla. Itiöpitoisuuden selvittyä näytematriisit oli ehditty jo ympätä, joten suspensiota ei tehty uudelleen.

Näytteitä viljeltiin ensimmäisen kerran 13 vuorokauden kuluttua ympäyksestä, sillä laji on hidaskasvuinen. Maljojen optimaalisen inkubointiajan jälkeen maljoilla ei ollut yhtään pesäkettä, eli näytematriisissa ei ollut lainkaan eläviä itiöitä. Laji on siis kuollut ympäämisen jälkeen, mikä voisi viitata siihen, että kaikki suspension laimennusviljelystä (ennen ympäystä viljelty) muodostuneet pesäkkeet olivat lisääntymiskyvyttömiä.

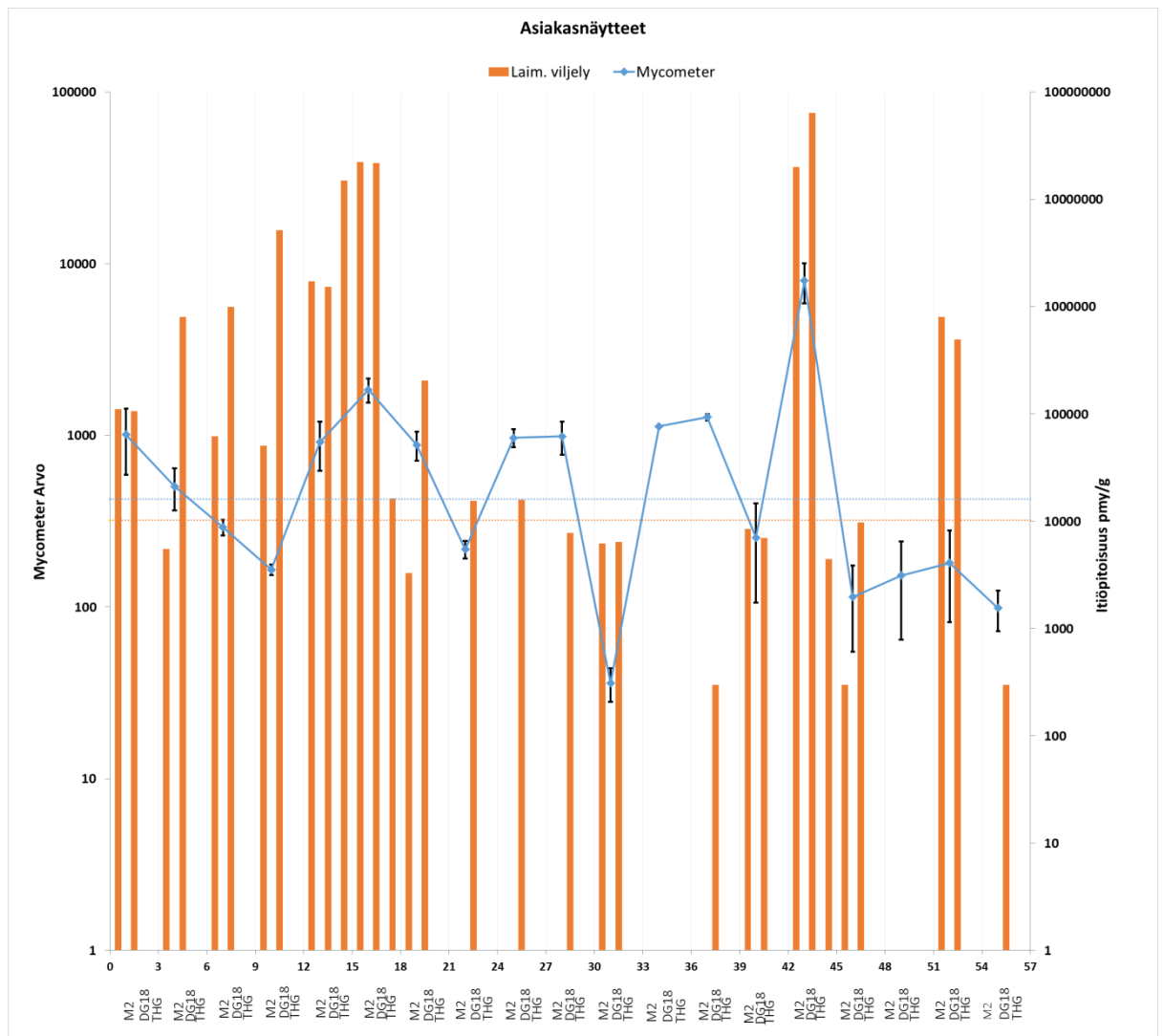
Näytteet mitattiin myös Mycometerilla, mutta entsyymiaktiivisuutta ei havaittu näytteistä lainkaan, vaan signaali oli steriilistä puupurusta saatavan signaalin kanssa samalla tasolla.

### 6.1.4 *Aspergillus restrictus*

*Aspergillus restrictuksen* suspension itiöpitoisuus laimennusviljelyn perusteella oli 970 pmy/g, eli alle 10 % suunnitellusta suspension vahvuudesta (10000 itiötä/ml). Kuten kaikkien lajien kohdalla, myös *A. restrictuksen* suspension itiöpitoisuus lasketaan laskentakammion avulla, joten itiöpitoisuus on tarkka. Kuten *C. globosumin*, myös *A. restrictuksen* kohdalla suurin osa itiöistä on ollut kuolleita jo ympätessä. Näytteiden inkubointia jatkettiin loppuun asti, vaikkakin jo ympäyspäivänä viljelyistä näytteistä (ns. nollanäyte) ei muodostunut yhtään pesäkettä maljoille.

Näytteet mitattiin myös Mycometerilla, mutta entsyymiaktiivisuutta ei havaittu lainkaan.

## 6.1.5 Asiakasnäytteet



Kuva 9. Asiakasnäytteiden itiöptoisuus ja Mycometerarvo.

Kuvaan on merkitty sinisellä pisteiviivalla Mycometer-analyysin toimenpideraja (>450) ja oranssilla pisteiviivalla laimennusviljelyn toimenpideraja (>10000 pmy/g). Laimennusviljelyn tuloksista on esitetty tulokset kaikilta maljoilta; M2, DG-18 ja THG (tässä järjestyksessä). Tässä kuvaajassa yksi näyte koostuu siis kolmesta laimennusviljely tuloksesta (oranssit pylväät) ja yhdestä sinisestä pisteestä. Jos laimennusviljelyn perusteella mikrobikasvua ei ole havaittavissa, ei pylväitä ole lainkaan. Mycometer-arvot on laskettu keskiarvona kolmesta rinnakkaisesta määrittäyksestä, joiden hajonnat on merkitty pitoisuusarvoihin.

Validoitavan menetelmän antamien tulosten yhtäpitävyyttä referenssimenetelmän tuloksiin määritettiin pääasiallisesti vertailumateriaalin avulla. Vertailumateriaalin lisäksi käytettiin rakennusmateriaalinäytteitä (sahanpuru), joita asiakkaat ovat tuoneet Aero-

biologian yksikköön analysoitavaksi vuoden 2016 aikana. Näytteistä tehdään asumis-terveysoppaan mukainen laimennusviljely ja Mycometer-analyysi, joka tehdään kustakin näytteestä kolmena rinnakkaisena määrittymenä.

Menetelmien tuloksia verrataan toisiinsa ja arvioidaan, saadaanko menetelmillä sama lopputulos eli voidaanko näytteestä antaa sama lausunto kummallakin menetelmällä. Sienipitoisuuden perusteella voidaan todeta, että suuressa osassa näytteistä lausunto on kummallakin menetelmällä yhtenevä. Kun katsotaan esimerkiksi kahta ensimmäistä palkkia Kuvassa 9., huomataan niiden itiöpitoisuuden olevan reilusti yli havaintorajan. Kun katsotaan vastaavaan kohdan Mycometer-arvoa, huomataan senkin olevan kaksinkertainen toimenpiderajaan nähden. Tässä tapauksessa kummallakin menetelmällä saadaan tulos, että näytteessä on mikrobivaurio.

Menetelmät eivät kuitenkaan ole yhteneviä kaikkien näytteiden kohdalla, vaan Mycometerin huomataan antavan esimerkiksi vääriä negatiivisia sekä vääriä positiivisia. Esimerkki väärästä negatiivisesta on Kuvassa 9., palkit 51-54. Laimennusviljelyllä saatujen tulosten perusteella näytteen itiöpitoisuus on kymmenkertaisesti korkeampi kuin toimenpideraja, mutta Mycometer-arvo selkeästi toimenpiderajan alapuolella. Tällaisessa tapauksessa menetelmät antavat ristiriitaisen tuloksen, jonka vuoksi Mycometeriin ei voida luottaa. Vastaavanlainen ristiriitaisuus on havaittavissa palkeissa 9-12. Väärä positiivinen sen sijaan havaitaan esimerkiksi palkkien 33-36 näytteessä, jossa ei laimennusviljelyn perusteella havaita lainkaan mikrobikasvustoa, mutta Mycometer havaitsee entsyymiä yli toimenpiderajojen.

Asiakasnäytteissä taustamikrobisto on mukana määrittymässä, joten Kuvassa 9. on esitettyä myös aktinomykeettien määrä. Mycometer A/S yrityksen mukaan analysoitavaa entsyymiä esiintyy pieninä määrinä myös bakteereissa, kun kitiiniä (sienissä soluseinäissä) on läsnä (Mycometer A/S 2011, 36). Kuvassa 9. bakteerikasvuna esitetään vain aktinomykeettien pitoisuudet, jotka näkyvät vain palkeissa, joiden alapuolella lukee ”THG”. Kuvassa 9. aktinomykeettikasvua on havaittavissa esimerkiksi palkeissa 12-15 ja 15-18. Kun vertaillaan näitä perättäisiä sarjoja, huomataan aktinomykeettien määrän olevan 12-15 palkissa moninkertainen 15-18 palkin aktinomykeettimäärään nähden. Mycometerillä mitattu arvo on kuitenkin korkeampi palkissa 15-18 kun palkissa 12-15. Kuvan 9. perusteella ei siis aktinomykeettien määrän voida todeta vaikuttavan Mycometer-arvoon.

Asiakasnäytteistä saatujen tulosten tuloksentulkinnassa on otettava huomioon, että laimennusviljelystä saadut tulokset ovat vain yksittäisiä tuloksia. Myös laimennusviljely on voinut epäonnistua eikä yhden näytteen perusteella voida todeta, että nimenomaan Mycometer-menetelmä antaisi virheellisen tuloksen. Realistisemman kuvan saamiseksi sama näyte tulisi analysoida useamman kerran, jotta rinnakkaisten määrityksien hajonta selviäisi.

## 6.2 Täsmällisyys

Täsmällisyys kertoo tulosten yhtäpitävyyden sekä reagenssien aiheuttaman virheen vaikutuksen tulokseen. Kaikista näytteistä, joita on neljä per pitoisuustaso, tehtiin kolme rinnakkaista analyysia validoitavalla menetelmällä, jotta saatiin selville hajonnan suuruus. Tulokset on esitetty taulukossa 5.

Taulukko 5. Tulosten täsmällisyyden arviointia tilastotieteellisin määrein.

		Inkubointiaika	Keskiarvo	Keskihajonta	CV%
	<i>P. variotii</i>	7	1497,1	165,6	11 %
		15	2521,9	367,4	15 %
		21	2714,3	469,0	17 %
	<i>A. pullulans</i>	7	268,9	121,3	45 %
		21	2124,5	460,5	22 %
		35	2836,6	489,2	17 %
<b>Tausta</b>	<i>P. variotii</i>	7	28,1	2,8	10 %
		15	31,5	3,0	10 %
		21	30,6	8,1	27 %
	<i>A. pullulans</i>	7	30,6	2,1	7 %
		21	31,5	7,2	23 %
		35	32,4	2,9	9 %

Taulukossa on tiedot kirjattuna laji kerrallaan ja täsmällisyys määritetään pitoisuuskoh-  
taisesti. Mycometer-arvojen keskiarvo kertoo arvojen suuruuden, mikä odotetusti nou-  
see inkubointiajan pidentyessä. Keskihajonta kertoo, kuinka paljon Mycometer-arvot

vaihtelevat keskiarvon ympärillä. CV % eli suhteellinen hajonta kertoo hajonnan suuruuden prosentteina.

Näytteen homogeenisyyden vaikutusta analyysituloksiin on pohdittu kappaleissa 6.1 ja 6.1.2. Mikrobiologisia näytteitä on mahdotonta saada täysin homogeenisiksi, sillä näytteet ovat elävää materiaalia. Taulukossa 3 näytteiden osalta vain *A. pullulansin* 7 vuorokauden viljelyssä on hälyttävän korkea hajonta. Tarkemmin tarkasteltuna tämä johtuu muutamasta näytteestä, joiden tulokset ovat huomattavasti alhaisempia tai korkeampia kuin valtaosa. Tällaisessa tapauksessa on mahdollista, että kyvetiin on esimerkiksi päätynyt voimakas kasvukeskittymä tai mittaus on jostain muusta tekijästä johtuen epäonnistunut.

Taulukossa 5. on kirjattuna myös taustan eli reagenssien hajonta. Reagenssien aiheuttama hajonta voi osaltaan selittää näytteiden hajontaa, sillä kun verrataan esimerkiksi viimeistä *P. variotiin* arvojoukkoa, voidaan havaita, että suhteellinen hajonta on suurempi kuin kahdessa aiemmassa näytejoukossa. Vastaava hajonnan nousu havaitaan kyseisten näytteiden taustan kohdalla, kun CV % on 27 %. Taustan suuri hajonta ei kuitenkaan aina selitä näytteiden hajontaa. Esimerkiksi *A. pullulans* ensimmäisen arvojoukon suhteellinen hajonta on suuri, 45 %. Vastaavan arvojoukon taustan suhteellinen hajonta on vain 7 %.

### 6.3 Herkkyys

Herkkyys yritettiin määrittää laimennussarjan avulla, jolloin havaittaisiin pienen pitoisuuden muutoksen vaikutus tulokseen. Laimennussarja tehtiin ympättävästä suspensiosta, joten suurin pitoisuus laskentakammion perusteella oli 10 000 pmy/g. Laimennussarja tehtiin laimennusliuoksen avulla ja näytteet viljeltiin laimennusviljelynä sekä analysoitiin Mycometerillä.

Laimennusviljelyn perusteella kaikki laimennukset kasvoivat erittäin voimakkaasti, joten niitä ei pystytty laskemaan. Mycometer ei havainnut näytteistä ollenkaan entsyymiä, ja fluoresenssisignaali oli verrattavissa taustan signaaliin. Herkkyuden määrittäminen ei siis onnistunut, todennäköisesti laimennusliuoksesta johtuen. Laimennusliuoksessa on suurin osa vettä ja lisäksi detergenttinä Tweeniä, jotka saattavat häiritä mittausta.

#### 6.4 Toteamisraja

Kuten aiemmin todettiin (ks. kappale 4.7.1), Mycometer A/S on määrittänyt laitteelle toteamisrajan, joiden perusteella voidaan todeta, että Mycometerin toteamisraja on 95 %:n varmuudella 7,9 FU ja 99 %:n varmuudella 10,4 FU.

#### 6.5 Määritysraja

Kuten toteamisrajankin, myös määritysrajan Mycometer A/S on asettanut (ks. kappale 4.7.2), mutta sen voi myös itse laskea. Määritysraja on toteamisraja, johon on lisätty taustasta aiheutuva keskihajonta kolminkertaisena. Yrityksen mukaan keskihajonta taustalle oli 2,0. Määritysraja on siis 95 %:n varmuudella 13,9 FU ja 99 %:n varmuudella 16,4 FU.

#### 6.6 Spesifisyys ja selektiivisyys

Ks. kappale 4.3

#### 6.7 Häiriöalttius

Häiriöalttiutta voi aiheuttaa esimerkiksi bakteerien läsnäolo tai matriisin kontaminoituminen. Tuotetulla vertailumateriaalilla bakteerien tai aktinomykeettien ilmaantuminen näytteeseen tarkoittaisi aina kontaminaatiota, sillä matriisit steriloidaan ennen kasvatuksen aloitusta. *A. pullulans* kasvatuksessa yksikään näyteputki ei kontaminoitunut, mikä pystyttiin havaitsemaan näytteiden viljelyllä THG-maljoille. *P. variotii* viljelyssä kontaminaatio havaittiin kahdessa näyteputkessa, jotka kummatkin inkuboituivat 21 vuorokautta. Toisessa näyteastiassa kontaminaatio oli pientä, THG-maljalle tuli vain muutama pesäke. Toisessa näyteputkessa bakteeripesäkkeitä oli kymmeniä, mutta kontaminaatio ei häirinnyt sienten kasvua, eikä aiheuttanut hajontaa tuloksissa. Kontaminaatio on haitallinen vain, jos kohdelajin kasvu häiriintyy.

## 6.8 Ongelmankartoitus ja -ratkaisu

Vertailumateriaali valmistettiin tässä työssä itse kammiokasvatuksen avulla. Haluttua sienilajia ympähti näytematriisiin, ja näytteiden annettiin inkuboitua suunnitellun ajan korkeassa ilmankosteudessa ja huoneenlämmössä. Ympin elinkykyisyys määritettiin laimennusviljelynä tuoreesta solususpensiosta, jotta havaittiin kuolleiden itiöiden osuus ympistä. Kuolleet itiöt eivät muodosta maljalle viljeltynä pesäkettä, osa itiöistä muodostaa maljalle pesäkkeen, joka ei kykene muodostamaan itiöitä. Tällaista pesäkettä sanotaan steriiliksi pesäkkeeksi.

### 6.8.1 *C. globosum*

*Chaetomium globosum* on kostean paikan home ja se kasvaa mieluummin märässä kuin hiukan kosteassa. Kammiokasvatuksessa luodaan haluttu ilmankosteus käyttämällä sopivaa suolaliuosta. Tavoitteena oli saada mahdollisimman korkea ilmankosteus, joten suolana käytettiin kaliumsulfaattia. Kaliumsulfaatilla ilmankosteudeksi saadaan 95–97 % RH, minkä oletetaan olevan *C. globosumille* optimi.

Ennen ympäystä näytematriisit olivat kasvatuskammioiden 15 vuorokautta, jotta niiden kosteus ehtisi tasaantua ennen siirrostusta. On mahdollista, että tämä aika ei kuitenkaan riittänyt *C. globosumille*, ja että näytteet eivät olleet tarpeeksi kosteita ympäysohjeilla. Laji joutuu ympäyksessä uuteen kasvu-ympäristöön, mikä saattaa olla shokki ja aiheuttaa lievää kuolemaa. Tämän lisäksi, jos kasvuolosuhteet eivät ole ideaaliset, ei laji välttämättä pääse shokistaan yli, eikä näin ollen ala lisääntyä.

Vertailumateriaalin valmistaminen ja Mycometerin validointi aloitettiin alusta, mutta olosuhteita muutettiin, jottei siirrostettu laji kuolisi uudelleen. Ilmankosteutta ei saatu nostettua korkeammaksi, sillä se oli ensimmäisellä kasvuyrityksellä jo korkea. Näytteiden kuivuuteen pyrittiin kuitenkin vaikuttamaan lisäämällä näytematriisiin 0,5 ml laimennusliuosta ennen ympäystä. Laimennusliuos lisättiin samalla, kun kasvatuskammiot kaesattiin, jotta kosteus ehti tasaantua tarpeeksi koko näytematriisiin ennen siirrostusta. Ympistä tehtiin vahvuudeltaan vastaava, kuin ensimmäisellä yritykselläkin, eli 10 000 itiötä/ml.

## Tulokset

Ympätyn suspension vahvuus laimennussarjaviljelyn perusteella oli 1237 pmy/g eli suunniteltua vahvuutta huomattavasti matalampi. 7 vuorokauden inkuboinnin jälkeen pesäkkeet olivat steriilejä, eli eivät tuottaneet itiöitä. Itiöntuotantoa haluttiin seurata, joten maljojen inkubointia jatkettiin muutaman viikon ajan. Pitkän inkuboinnin jälkeen pesäkkeissä havaittiin voimakasta itiöintiä, jonka jälkeen lajin uskottiin lähteneen kasvuun myös kammioissa. Analyysit kuitenkin osoittivat, ettei kasvua ollut edelleenkään havaittavissa. Heti ympäyksen jälkeen laimennusviljelyllä viljellyistä näytteistä (0-näyte) pystytään havaitsemaan ympin suhtautuminen materiaaliin heti ympäyksen jälkeen. 7 vuorokauden inkuboinnin jälkeen maljoilla kasvoi vain muutamia pesäkkeitä, mikä viittaa ympin kuolemiseen.

### 6.8.2 *A. restrictus*

*A. restrictus* on kserofiilinen sieni, eli kasvaa mieluummin kuivassa kasvuympäristössä kuin kosteassa. Kosteusvaatimus homekasvun alkamiselle on kuitenkin vähintään 70 % RH, joten 95–97 % RH ajateltiin olevan sopiva. Ympin kuitenkin kuoltua kammioon päädyttäessä, päätettiin kokeilla alemmaa ilmastusta. Ammouniumsulfaattia suolaliuoksena käytettäessä ilmastukseksi saadaan noin 80 % RH. Tämä on selkeästi alhaisempi kuin kaliumsulfaattia käytettäessä, mutta kuitenkin tarpeeksi korkea homekasvun alkamiselle. Kaikilta muilta osin vertailumateriaalin valmistaminen tapahtui samalla tavalla kuin aiemmassa kasvatuksessa. Kasvatusta ei ehditty aloittamaan, ennen kuin työ päättyi, joten tuloksia ei tähän tutkielmaan raportoida.



## 7 PÄÄTELMÄT

Työn tarkoituksena oli validoida mikrobikasvun havaitsemiseen huokoisesta materiaalista tarkoitettu Mycometer-menetelmä. Mycometer-mittaus perustuu näytteen entsyymipitoisuuden määrittämiseen fluoresenssin avulla. Validointi tehdään referenssimenetelmään verraten, joka tässä validoinnissa oli asumisterveysasetuksen (Valvira 2016) mukainen laimennusviljely.

Työn suunnittelun hetkellä asetetut tavoitteet täyttyivät osittain. Validointiin valittiin matriisiksi rakennusmateriaali ja testattavaksi lajistoksi valittiin neljä homesienilajia, jotka kasvavat valitulla rakennusmateriaalilla. Vertailumateriaalin tuottaminen ja Mycometer-menetelmän validointi liittyvät toisiinsa. Jos vertailumateriaalin tuottaminen ei onnistu, ei validointia voida suorittaa ja jos validointi epäonnistuu, voidaan vertailumateriaalin tuottamisen epäonnistumista pitää yhtenä syynä validoinnin epäonnistumiseen.

Vertailumateriaalin tuottaminen kasvatuskammiossa homehduttamalla onnistui kahdella lajilla odotetusti ja kahdella lajilla kasvatus epäonnistui. Steriloituun sahanpuruun pipetoitiin itiösuspensiota, jonka itiöpitoisuus määritettiin mikroskooppisesti laskemalla. Suspension vahvuus vaikuttaa merkittävästi sienikasvun alkuun, sillä epäonnistuneissa kasvatuksissa suspensio oli huomattavasti suunniteltua matalampi. Suspensioympäys todettiin toimivaksi ympäystekniikaksi, sillä kosteus tasaantuu sahanpurussa hyvin. Vertailumateriaaliin todettiin antavan tasaisia aliotoksia (havaittavissa Mycometerin antamissa tuloksissa) sekä näytteiden väliset erot ovat pieniä (havaittavissa laimennusviljelyn tuloksissa). Tulevaisuudessa vastaavanlaista koejärjestelyä vertailumateriaalin tuottamisessa käyttäessä tulee huomioida pitoisuustasot paremmin, jotta kriittisistä vaiheista, kuten eksponentiaalisesta kasvusta, saataisiin enemmän tietoa.

Validoinnin tarkoituksena oli verrata validoitavalla menetelmällä saatua tulosta referenssimenetelmän tulokseen. Toimenpiderajan ylittyminen viittaa siihen, että näytteessä on mikrobikasvua. Kun menetelmiä verrataan toimenpiderajan avulla, huomataan, että *P. variotiin* kohdalla menetelmät antavat yhtenevän tuloksen. Jokaisella pitoisuustasolla menetelmillä saatu tulos on yhtenevä eli mikrobipitoisuus on toimenpiderajaan nähden sama.

*A. pullulansin* kohdalla eri menetelmillä saadut tulokset eivät olleet yhteneviä, vaan tuloksissa oli eroja. Etenkin kasvun alkuvaiheessa, eli ensimmäisellä pitoisuustasolla,

sekä kasvun tasaantumisen kohdalla, eli viimeisen pitoisuustason kohdalla, menetelmien tuloksissa oli eroja. Erot tuloksissa voi selittyä esimerkiksi lajin entsyymituotannolla – entsyymiä ei välttämättä esiinny kasvun alkuvaiheessa, vaan vasta muutaman viikon ikäisenä. Mycometer-menetelmä antaa kuitenkin suuntaa antavasti oikean tuloksen todelliseen pitoisuuteen nähden, sillä entsyymipitoisuus on selkeästi kohonnut normaalista.

Herkkyden määrittäminen laimennussarjaviiljelyn avulla ei onnistunut lukuisista yrityksistä huolimatta. Herkkyyden määrittäminen olisi kuitenkin suotavaa, jotta nähdään miten pieneen pitoisuuteen analysaattori reagoi. Herkkyyttä voisi yrittää määrittää vielä jollain toisella keinolla, kuten analysoimalla näytteitä, joiden kasvatusaika eroaa vain vähän, esim. 12h.

Kasvatuksessa epäonnistuneiden lajien kohdalla validoitava menetelmä ja referenssimenetelmä antavat yhtenevän tuloksen – mikrobikasvua ei ole. Validointia ei kuitenkaan voida näiden lajien kohdalla suorittaa, joten menetelmä on validoitu neljän lajin sijasta vain kahdelle lajille. Menetelmän validointi jatkuu vielä tämän opinnäytetyön jälkeen, sillä kasvatuksen kannalta epäonnistuneiden lajien kohdalla validointi suoritetaan uudelleen. Lisäksi Mycometer analysaattorilla voi tehdä mittauksia eri menetelmillä. Tämä validointi keskittyy vain materiaalista mittaamiseen, mutta muita menetelmiä on esimerkiksi pintasivelymenetelmä ja ilmanäyttemenetelmä.

Mycometer-menetelmä ei voi korvata käytössä olevia menetelmiä, sillä menetelmän toimivuus on lajikohtaisesti vaihtelevaa. Menetelmän kyky havaita sienikasvusto perustuu spesifisen entsyymin havaitsemiseen, joten ongelmat lajin entsyymintuotannossa tai eri lajien väliset erot entsyymintuotannossa vaikuttavat menetelmän toimivuuteen. Tämä on havaittavissa esimerkiksi *A. pullulans* tuloksissa.

Menetelmän etuna on ajan säästävyden lisäksi kuolleen/kuivuneen kasvuston havaitseminen, mikä ei nykyisillä viljelyyn perustuvilla menetelmillä onnistu. Suoramikroskopoinnilla voidaan kuollutkin kasvusto havaita, mutta määrän arvioiminen on vaikeaa. Mycometer-menetelmä sopisikin käytettäväksi esimerkiksi suoramikroskopoinnin kanssa rinnakkain tai esimerkiksi laimennusviljelyn kanssa rinnakkain havaitsemaan kuolleen kasvuston osuus, etenkin jos viljelymenetelmällä ei kasvustoa havaita. Tällaisessa tapauksessa Mycometer-menetelmä toimisi ikään kuin varmistavana elementtinä, että rakennuksen sisäilmaongelmat eivät johdu elävästä tai kuolleesta mikrobikasvustosta.

Mycometer-mittauksia voitaisiin käyttää myös ennakoivana tutkimuksena esimerkiksi tapauksissa, kun mikrobikasvua on syytä epäillä, tai näytteenottokohde on kaukana laboratoriosta. Lopullinen näytemäärä on helppo arvioida, kun mikrobipitoisuuden suuruudesta on alustava arvio. Tällaisissa tapauksissa Mycometerillä voitaisiin tehdä mittauksia kohteessa, ja jos entsyymipitoisuutta on havaittavissa, otetaan kohteesta näytteitä, joiden mikrobipitoisuus todetaan Valviran ohjeistuksen mukaisilla menetelmillä tutkimusmenetelmillä.

## 8 LÄHDELUETTELO

- Elintarvikevirasto, 1997. Mikrobiologisten menetelmien validointiohje. Viitattu 1/2017: [https://www.evira.fi/globalassets/tietoa- evirasta/esittely/toiminta/vertailulaboratoritoiminta/ohjeet\\_vert\\_labr\\_toiminta/validointiohje\\_13\\_1997.pdf](https://www.evira.fi/globalassets/tietoa- evirasta/esittely/toiminta/vertailulaboratoritoiminta/ohjeet_vert_labr_toiminta/validointiohje_13_1997.pdf)
- E. M. S., 2016. Fuchs Resenthal Counting Chamber. Viitattu 25.11.2015 : <https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/63512-10.aspx>
- Flannigan, B., Samson, R. A. & Miller, D. J., 2011. Microorganisms in Home and Indoor Work Environments. Toinen painos. Boca Raton: CRC Press.
- Greenspan, L., 1977. Journal of research of the National Bureau of Standards-A. Physics and Chemistry. Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions, Osa/vuosikerta 81A, No. 1, 89-96.
- Houbraken, J.; Verweij, P.T; Rijs, A.J.M.M.; Borman, A.M.; Samson, R.A. 2010. Identification of *Paecilomyces variotii* in Clinical Samples and Settings. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8), 2754–2761.
- Laboratories, Mold & Bacteria consulting, 2016. Presence of *Chaetomium* in an Indoor Environment: What Are The Implications?. Viitattu 24.11.2016: <https://www.moldbacteria.com/mold/presence-of-chaetomium-in-an-indoor-environment-what-are-the-implications.html>
- Macher, J., 1999. Bioaerosols: Assessment and control. American conference of governmental industrial hygienists. 12:2.2.2.
- Mycometer A/S, 2011. Handbook of Mycometer 2011. Kuudes painos. Hoersholm.
- Metrologian neuvottelukunnan validointiryhmä, 2016. Validoinnin suunnittelun opas. Viitattu 1/2017: <http://www.vt.fi/inf/pdf/technology/2016/T276.pdf>
- Metrologian neuvottelukunta, 2005. Kemian metrologian opas. Kuudes painos. Helsinki: Tapio Ehder.
- Mycometer, 2016. Mycometer, rapid microbiology - on-site technology. Viitattu 22.11.2016: <http://www.mycometer.com/technology/>
- Putus, T., Bengt, L., Valo, J., Haikola, T., Salo, K., Turtiainen, T., Rouhiainen, M., Karttunen, M., Rämö, H., 2009. Sisäilma, kosteus, home, miten asut terveellisesti. Heinola: Asumisterveysliitto ry.
- Raper, K. B. & Fennel, D. I., 1965. The Genus *Aspergillus*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Reiman, M., Haatainen, S., Kallunki, H., Kujanpää, L., Laitinen, S., Rautiala, S., 1999. The characteristics of the dilution and direct plating methods for the determination of microbial flora and concentrations in building material. Edinburgh, Scotland: Proceedings of the 8th International Conference on Indoor Air Quality and Climate.
- Rylander, R., 2015.  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase (NAHA) as a Marker of Fungal Cell Biomass – Storage Stability and Relation to  $\beta$ -Glucan. *International Journal of Environmental Monitoring and Analysis* , Osa/vuosikerta 3, 205-209.

Samson, R.A.; Houbraken, J.; Thrane, U.; Frisvad, J.D.; Andersen, B., 2010. Food and Indoor Fungi. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

Sisäilmäyhdistys ry, 2017. Puolueetonta tietoa sisäilmästä  
Viitattu 6.2.2017: <http://www.sisailmayhdistys.fi/Terveelliset-tilat/Kosteusvauriot/Mikrobit/Katsaus-mikrobeihin>

Sosiaali- ja terveysministeriö, 2003. Asumisterveysohje, Asuntojen ja muiden oleskelutilojen fysikaaliset, kemialliset ja mikrobiologiset tekijät. 1 toim. Helsinki: Edita Prima Oy

Sosiaali- ja terveysministeriö, 2015. Sosiaali- ja terveysministeriön asetus asunnon ja muun oleskelutilan terveydellisistä olosuhteista sekä ulkopuolisten asiantuntijoiden pätevyysvaatimuksista. Helsinki

Turun Yliopisto, Aerobiologian yksikkö, 2017. Rakennusmikrobiologia.  
Viitattu 26.1.2017:  
<http://www.utu.fi/fi/yksikot/tyyk/aerobiologia/rakennusmikrobiologia/Sivut/home.aspx>

Valvira, 2016. Asumisterveysasetuksen soveltamisohje, Osa IV Mikrobiologiset olot.  
Viitattu 24.11.2017:  
<http://www.valvira.fi/documents/14444/261239/Asumisterveysasetuksen+soveltamisohje+osa+I+V.pdf/cdfaaa39-d2e5-4bd6-b9e9-6d9c0f60bff6>

Ympäristöministeriö, 2016. Ympäristöopas.  
Viitattu 20.2.2017: <https://julkaisut.valtioneuvosto.fi/handle/10024/75517>

## Fuchs rosenthal laskentakammio

Fuchs rosenthal kammiolaskurin muuntokertoimet:

Ruutu	Ruudun pinta-ala (mm <sup>2</sup> )	Ruudun pinta-ala (mm <sup>3</sup> )	Muuntokerroin
A	1/25	0,004	$2,5 \times 10^5$
B	1/100	0,001	$1,0 \times 10^6$
C	1/200	0,0005	$2,0 \times 10^6$
D	1/400	0,00025	$4,0 \times 10^6$
E	1/800	0,000125	$8,0 \times 10^6$
F	1/600	0,0000625	$1,6 \times 10^7$

Näytterroksen paksuus on 0,1 mm.

## Laskuesimerkki solulaskennasta

Taulukossa on listattuna solumäärät Fuchs Rosenthal laskukammion avulla laskettuna.

<b>1.</b>						<b>3.</b>					
8	2	2	3	3		1	0	4	0	0	
4	2	10	4	2		0	3	3	4	4	
2	4	1	2	2		2	3	2	1	3	
1	6	1	6	1		4	1	3	2	3	
5	4	4	1	3		3	1	7	3	1	
8	1	4	4	3		2	2	2	3	8	
4	4	3	5	3		4	1	1	2	3	
5	4	0	1	4		1	2	5	1	1	
9	1	1	3	3		5	1	6	1	5	
1	4	3	2	4		5	3	2	5	7	
<b>2.</b>						<b>4.</b>					
1	4	4	3	7		4	8	8	3	9	
2	7	8	1	5		3	7	4	6	3	
1	4	3	14	3		7	4	5	5	7	
0	4	3	4	3		7	7	5	7	9	
4	4	5	2	2		7	7	9	9	3	
4	1	4	4	0		5	6	9	6	8	
6	1	4	2	0		6	3	15	8	7	
2	7	7	6	3		8	3	4	7	7	
2	2	3	0	7		8	5	4	4	6	
4	2	2	2	5		3	6	8	5	7	

Solumäärä lasketaan sopivan kokoisesta ruudusta, 50 ruutua yhdestä ruudukosta, 50 ruutua 4 eri ruudukosta. Jokaisesta ruudukosta saatavista tuloksista lasketaan erikseen keskiarvo sekä keskihajonta. Keskiarvo jaetaan tämän jälkeen yksittäisen ruudun tilavuudella, josta saadaan tuloksena itiömäärä mikrolitraa kohden.

Ruudun 1. tulosten keskiarvo on 3,34 itiötä/ruutu.

$$\frac{3,34 \text{ itiötä}}{0,004 \text{ ml}} = 835 \text{ itiötä/ml}$$

Laskettava ruutu valitaan itiön koon sekä itiömäärän perusteella. Laskuesimerkissä ruuduksi on valittu ruutu A, joten ruudun pinta-alan tiedetään olevan 0,004 mm<sup>3</sup>.

Kaikkien ruudukoiden tulosten lasketuista keskiarvoista lasketaan edelleen keskiarvo, jonka perusteella tiedetään itiömäärä mikrolitrassa.

Kaikkien laskettujen ruudukoiden keskiarvot ja keskihajonnat ovat esitettynä seuraavassa taulukossa. Lopuksi on laskettu myös keskiarvojen keskiarvo ja keskihajonta.

Ruutu	Keskiarvo	Keskihajonta
1	835	76
2	890	90
3	680	68
4	1555	81
	<b>990</b>	<b>158</b>

Tämän jälkeen pystytään laskemaan, kuinka paljon laimentamatonta suspensiota täytyy lisätä, jotta haluttu määrä haluttua pitoisuutta saataisiin valmistettua. Työtä suunniteltaessa ympin vahvuudeksi päätettiin 5000 itiötä/ympä eli 10 000 itiötä/ml.

$$\frac{10000 \text{ ml} * 200\,000 \text{ ml}}{990 * 1\,000\,000 \text{ ml}} = 2,0202.. \text{ml}$$

Laimentamatonta itiösuspensiota lisätään laimennusliuokseen siis 2,02 ml, kun suspension lopulliseksi tilavuudeksi halutaan 200 ml.



## Laskuesimerkki itiöpitoisuuden laskemisesta

	0,1	0,1	0,01	0,01	0,001	0,001	0,0001	0,0001	0,00001	0,00001	0,000001	0,000001
	-1a	-1b	-2a	-2b	-3a	-3b	-4a	-4b	-5a	-5b	-6a	-6b
<b>M2</b>					n	n	39	24	7	2	3	2
<b>Hagem</b>					n	n	40	34	6	6	1	1

Taulukossa on eriteltynä erään 7 vuorokautta inkuboituneen näytteen tulokset pesäkemäärinä. Ensimmäisenä lasketaan pesäkkeiden summat yhteensä kummallekin maljatypille erikseen. Mallasuuteagarilla pesäkkeitä on yhteensä 77 ja Hagemilla 88. Tämän jälkeen lasketaan laimennussummat, jälleen kummallekin maljatypille erikseen. Mallasuuteagarille laimennussumma on

$$0,001 + 0,001 + 0,0001 + 0,0001 + 0,00001 + 0,00001 + 0,000001 + 0,000001 + 0,0000001 + 0,0000001 = 0,000222.$$

Näytteitä punnitessa kirjataan punnitustulokset ylös, sillä niiden avulla lasketaan viljelty osuus, huomioiden myös laimennusliuoksen (30 ml) määrä näytteessä.

$$\frac{0,000222}{30} * 1,555 \text{ g} = 0,000011507$$

Tämän tuloksen avulla voidaan laskea itiömäärä grammoissa.

$$\frac{77}{0,000011507} = 6691579,04$$

**Kasvualustat ja liuokset**

Kasvualustat valmistetaan sosiaali- ja terveysministeriön asumisterveysohjeen mukaisesti.

THG	
5,0 g	tryptonia
2,5 g	hiivauutetta
1,0 g	glukoosia
15,0 g	agaria
1000 ml	deionisoitua vettä
0,2 g	natamysiiniä

Vesi ja kuiva-aineet steriloidaan agarkeitimessä ja natamysiini lisätään seokseen vasta sen jäähtyttyä. Natamysiini liuotetaan etanoliin.

M2	
20 g	mallasuutetta
15,0 g	agaria
1000 ml	deionisoitua vettä
100 mg	kloramfenikolia

Vesi ja kuiva-aineet steriloidaan agarkeitimessä.

DG-18	
175 ml	Glyseroli
10 g	Glukoosi
5 g	Peptoni
1 g	Kaliumdivetyfosfaatti
0,5 g	Magnesiumsulfaatti
15 g	Agar
1 ml	10 % Kloramfenikolikäyttöliuos (lopullinen pitoisuus 0,1 g/l)
825 ml	deionisoitu vesi
1 ml	0,2 % Diklooraanikäyttöliuos (lopullinen pitoisuus 0,002 g/l)

Vesi, kuiva-aineet ja antibiootit steriloidaan agarkeitimessä.

(Sosiaali- ja terveysministeriö 2003)

Hagem on uusi lisäys Valviran asumisterveysasetuksen soveltamisohjeessa, ja sen vuoksi sen valmistusohjetta ei ole aiemmassa asumisterveysohjeessa.

Hagem:

Hagem	
1,0 g	Kaliumdivetyfosfaatti
0,5 g	Magnesiumsulfaatti
0,5 g	Ammoniumkloridi
5 g	glukoosi
5 g	mallasuute
15 g	Agar
35 mg	Streptomysiini
35 mg	Rose Bengal
1 ml	1 % FeCl <sub>3</sub> (lopullinen pitoisuus 10 mg/l)
1000 ml	deionisoitu vesi

Kuiva-aineet, vesi, glyseroli ja antibiootit steriloidaan agarkeitimessä. Streptomysiini lisätään liuoksen jäähtyttyä etanoliin liuotettuna. Rose bengal on erittäin valonherkkä,

ja muuttuu valossa sienten kasvua inhiboivaksi. Tämä on otettava huomioon niin maljojen valmistuksessa, kuin viljelyn aikana.

(Reiman, *et al.* 1999)

Laimennusliuos

0,0425 g	kaliumdivetyfosfaatti
0,25 g	magnesiumsulfaatti
0,008	natriumhydroksidi
1000 ml	deioinisoitu vesi
0,2 ml	Tween 20

Liuos steriloidaan autoklaavissa seuraavana päivänä valmistuksesta, jotta Tween 20 ehtii liueta kokonaan.

(Sosiaali- ja terveysministeriö 2003)