

QPCR - KVANTITATIIVINEN POLYMERAASIKETJUREAKTIO RAKENNUSTEN MIKROBIANALYYSISSÄ

Mihin qPCR-menetelmä perustuu?

qPCR, engl. quantitative PCR, jota myös nimellä real-time PCR eli reaaliaikainen PCR kutsutaan, on menetelmä, joka mittaa tietyn, ennalta määrätyn, DNA-jakson määrää näytteessä. Kaikilla eliöillä, niin mikrobeilla kuin meilläkin, on soluissa perintöainesta, DNA:ta. DNA on kuin helminauha, joka koostuu neljästä erilaisesta helmestä, jotka ovat määrättyssä järjestyksessä muodostaen DNA-jaksoja. DNA:ssa on kaikille eliöille yhteisiä, lähes samanlaisia jaksoja, ja toisaalta myös laji- ja jopa yksilökohtaisia eroja. Mitä läheisempää sukua eliöt ovat keskenään, sitä enemmän samanlaisia DNA-jaksoja niillä on. PCR-menetelmällä etsitään ja tunnistetaan juuri tietynlainen jakso pitkstä DNA-ketjusta. Riippuen siitä, kuinka pitkälle ”erikoistunut” kyseinen etsittävä jakso on, voidaan menetelmällä tunnistaa ja mitata joko laajempia eliöryhmiä, sukuja tai jopa yksittäisiä lajeja. Tunnistaminen perustuu siihen, että jokaista etsittävää ryhmää tai lajia varten luodaan yksilöllinen tunnistaja, aluke. Näytettä käsitellään siten, että DNA vapautuu solujen sisältä, ja siihen lisätään erilaisten reagenssien lisäksi halutut alukkeet. Mikäli näytteessä on etsittävää DNA-jaksoa, aluke tarttuu jaksoon. Aluke voi tarttua vain tietynlaiseen DNA-jaksoon; se on kuin lukko, johon käy vain juuri tietynlainen avain, tai kuin viehe, joka kelpaa vain ahvenille. Kun alukkeet ovat takertuneet paikalleen, aletaan näytteessä olevaa DNA:ta monistaa. Vain sellaiset DNA-jaksot, joihin aluke on takertunut, monistuvat, ja vain monistuneet DNA-jaksot voidaan havaita ja mitata.

qPCR-menetelmällä voidaan tunnistamisen lisäksi myös mitata, kuinka paljon etsittyä DNA:ta näytteessä on. DNA-jakso monistuu mitattavalle tasolle sitä nopeammin, mitä enemmän sitä alun perin näytteessä esiintyi. Monistumisen nopeutta ja siten DNA:n määrää seurataan merkkiaineiden avulla reaaliajassa (mistä johtuukin nimitys real-time PCR). Näytteen DNA-pitoisuus suhteutetaan standardisuoran avulla mikrobisolujen määrään ja tulokseksi saadaan soluekvivalenttia/g tai m^3 tai cm^2 , näytetyypistä riippuen.

Kuinka qPCR-menetelmä vertautuu viljelymenetelmiin mikrobien toteamisessa?

Viljelyllä määritetään näytteestä ne mikrobit, jotka ovat elinkykyisiä ja pystyvät kasvamaan käytetyissä olosuhteissa. Sen sijaan qPCR-menetelmä ei erottele, onko DNA peräisin elävistä vai kuolleista mikrobeista. Näytteestä mitattuun pitoisuuteen sisältyvät siis sekä elinkykyiset, että kuolleet mikrobit. Näin ollen on selvää, että viljelyllä ja qPCR:llä samoista näytteistä saadut tulokset eroavat useimmiten toisistaan ainakin jonkin verran. Mikrobionin kokemusten mukaan yli 80 %:ssa rakennusmateriaalinäytteitä qPCR:llä määritetty mikrobipitoisuus on suurempi kuin viljelyllä määritetty. Tämä asettaa haasteita menetelmien vertailulle.

Kun qPCR:llä määritetään laajempaa ryhmää, voi joidenkin mikrobisukujen tai lajien DNA monistua tehokkaammin kuin toisten. Näin käy esimerkiksi määritettäessä homeiden ja hiivojen pitoisuutta ns. yleisalukkeilla. Tällöin riippuen siitä, mitä homelajeja näytteessä on, sama kokonaismikrobipitoisuus voi antaa qPCR:llä hieman erilaisen tuloksen. Suku- tai lajikohtaiset qPCR-menetelmät määrittävät pitoisuuden tarkemmin. Niiden käyttö on kuitenkin hankalaa, koska homeiden lajikirjo on suuri. Jos jokainen suku tai laji määritetään erikseen, kasvavat kustannukset moninkertaisiksi, eikä kuitenkaan voitaisi olla varmoja, että kaikki näytteessä esiintyvät homesuvut on määritetty.

Minkälaiset näytemateriaalit käyvät qPCR-analyysiin?

qPCR voidaan tehdä käytännössä kaikista näytetyypeistä, joita käytetään sisäilmaongelmien ja kosteusvaurioiden selvitystyössä. Tulosten tulkinnassa on kuitenkin eroja. Tällä hetkellä Mikrobionissa pystytään antamaan tulkinta rakennusmateriaalinäytteiden tuloksista. Menetelmä on myös akkreditoitu. Ilma- ja pintanäytteet täytyy tulkita vertaamalla tuloksia esimerkiksi ennen ja jälkeen korjausten tai vaurio/vertailu-asetelmalla. Tulkintarajojen määrittäminen ilma- ja pintanäytteille on käynnissä.

- Rakennusmateriaaleille pätevät samat näytteenotto-ohjeet kuin viljelymenetelmällekin. Näytettä on hyvä olla kourallinen esimerkiksi muovipussiin pakattuna.
- Ilmanäytteet kerätään suodattimelle noin 4 l/min tilavuusvirtauksella käyttäen esimerkiksi Button-keräintä.
- Pintanäytteet kerätään kostutetulla pumpulipuikolla sivellen ja puikko katkaistaan nesteputkeen.

Näytteiden toimittamisessa laboratorioon pätevät myös samat säännöt kuin viljelyä varten otetuissa näytteissä; näytteet täytyy toimittaa mahdollisimman nopeasti laboratorioon.

Kuinka menetelmä validoidaan?

Validointi terminä tarkoittaa menetelmän kelpoisuuden toteamista. Validoinnin avulla selvitetään, että menetelmä on käyttötarkoitukseensa sopiva. Validoinnissa määritetään esimerkiksi menetelmän spesifisyys, määrittämissä ja mittausepävarmuus. Validointi sisältää myös vertailumittausten tekemistä ja menetelmästä riippuen muita asioita. Osana standardin mukaista laatujärjestelmää, kaikki käyttöön otettavat mittausmenetelmät validoidaan.

Validoitava menetelmä voi olla itse kehitetty tai tieteellisessä julkaisussa oleva tai parhaimmassa tapauksessa sille on olemassa standardi. Mikrobionissa käytetään qPCR-menetelmiä, jotka on julkaistu tieteellisissä lehdissä, mikä tarkoittaa sitä, että ne ovat käyneet läpi tieteellisen vertaisarvioinnin. Lisäksi ne on validoitu laboratoriossa.

Miten qPCR-tuloksia tulkitaan?

Jotta qPCR:llä saatuja analyysituloksia voidaan tulkita, täytyy tulkintarajat määrittää verraten qPCR-tuloksia käytössä olevaan viljelymenetelmään. Tällä hetkellä Mikrobionissa on määritetty tulkintarajat rakennusmateriaalinäytteille. Ilma- ja pintanäytteille työ on käynnissä.

Tulkinnallisten ohjeiden määrittämistä varten Mikrobionissa määritettiin homeiden ja bakteerien pitoisuudet Asumisterveysoppaan mukaisella laimennossarjaviljelyllä ja qPCR-menetelmällä 630 rakennusmateriaalinäytteestä. Tulokset analysoitiin tilasto-ohjelmalla. Tulkinnan ohjeet on merkitty tulosraportteihin. Tulos voi joko viitata mikrobikasvuun tai epäilyyn mikrobikasvusta tai ei viittaa mikrobikasvuun.

Tuloksia tulkittaessa on muistettava, että laboratorion määrittämät mikrobitulokset täytyy aina suhteuttaa muihin kohteesta oleviin tietoihin, ja johtopäätös kosteus- tai mikrobivauriosta voi olla myös erilainen kuin laboratoriotulos antaisi olettaa. Tulkinnassa on muistettava, että mikrobit eivät välttämättä kasva näytteissä, vaan voivat olla esimerkiksi maaperäkontaktista materiaaliin kertyneitä hiukkasia. Jos rakenne on kuiva, siihen kertyneet mikrobit muuttuvat yleensä ajan

kuluessa elinkyvyttömiksi, jolloin ne eivät näy viljelyssä. Nopeimmin elinkykynsä menettävät bakteerit ja korkean vesiaktiivisuuden lajit.

Toisaalta on myös hyvä, että qPCR tuo kuolleen mikrobiston esille, koska se voi olla terveydelle yhtä haitallista kuin eläväkin kasvusto ja toisaalta näin saadaan todennäköisesti vanhat kuivuneet vauriot paremmin esille. Materiaalinäytteiden qPCR on hyvä työkalu myös korjausrakentamisessa, kun tarvitaan esimerkiksi nopeasti tieto kuinka laajalle mikrobivaurio on levinnyt ja materiaalia täytyy poistaa.