

BAKTEERIALTISTUMINEN MAATILOILLA JA EI-MAATILOILLA ASUVILLA LAPSILLA - YHTEYS ATOPIAAN JA ASTMAAN

Maria Valkonen^{1,2}, Inge Wouters³, Martin Täubel¹, Helena Rintala^{1,*}, Ritva Vasara¹, Dick Heederik³, Jon Genuneit⁴, Erika von Mutius⁵, Charlotte Braun-Fahrländer⁶, Renaud Piarroux⁷ ja Anne Hyvärinen¹

¹ Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, Ympäristöterveyden osasto, Ympäristömikrobiologian yksikkö, Kuopio

² Itä-Suomen Yliopisto, Ympäristötieteen laitos, Kuopio

³ Utrecht University, Utrecht, Alankomaat

⁴ Institute of Epidemiology and Medical Biometry, Ulm University, Ulm, Saksa

⁵ Ludwig Maximilians University, München, Saksa

⁶ University of Basel, Basel, Sveitsi

⁷ UMR MD3 Aix-Marseille University, Marseilles, Ranska

* Nykyinen osoite: Mikrobioni Oy, Kuopio

TIIVISTELMÄ

Viime vuosikymmeninä lisääntyneet astma ja allergiset sairaudet ovat herättäneet kysymyksen, onko elinympäristömme mikrobeilla yhteyttä näiden sairauksien puhkeamiseen. Kaupunkimaisessa ympäristössä on havaittu olevan vähemmän mikrobeja kuin maatilaympäristöissä ja täten ihmisten altistuminen mikrobeille jää kaupunki-ympäristöissä vähäisemmäksi.

Tässä tutkimuksessa selvitimme bakteerialtistumisen yhteyttä astmaan ja atopiaan eri ympäristöissä (maatiloilla asuvat lapset, maatiloilla vierailevat lapset sekä lapset jotka eivät asu eivätkä vieraile maatiloilla). Lasten sängyistä kerätyistä pölynäytteistä analysoitiin bakteeristoa DGGE-menetelmällä (denaturoiva gradienttigeelielektroforeesi). Bakteerilajien yhteys terveysmuuttujiin analysoitiin tilastollisesti, sekä bakteeridiversiteettiä verrattiin astmaan ja atopiaan. DGGE-menetelmän perusteella valittiin bakteeriryhmiä, jotka analysoitiin kvantitatiivisesti qPCR:n (quantitative polymerase chain reaction, kvantitatiivinen polymeeraasiketjureaktio) avulla. Tässä raportissa esittelemme mykobakteeri-ryhmän yhteyden terveysmuuttujiin. Kvantitatiivinen PCR-analyysi vahvisti, että valituilla mikrobiryhmillä on yhteys vähentyneeseen atopiaan, kuten DGGE-menetelmä oli osoittanut. Määrällisesti mykobakteereja havaittiin eniten mautilojen lapsilta.

Tutkimus osoittaa, että DGGE:lla havaitut bakteeriryhmät olivat samalla tavalla yhteydessä terveysmuuttujiin myös kvantitatiivisessa qPCR analyysissä, joten menetelmä on käyttökelpoinen. Mykobakteeritasot olivat korkeimpia maatiloilla, mikä osoittaa niiden olevan yhteydessä mautila-altistumiseen. Tutkittujen bakteeriryhmien määrä oli verrannollinen vähentyneeseen atopiaan, mikä osoittaa altistumisen suojaavan näiltä sairauksilta.

JOHDANTO

Astman ja atooppisten sairauksien lisääntyminen viime vuosikymmeninä länsimaissa on ollut nopeaa. Yhtenä tekijänä näiden sairauksien lisääntymiseen pidetään ihmisten muuttunutta mikrobialtistumista. Maatiloilla oleskelevat ihmiset altistuvat enemmän mikrobeille, sillä maatilaympäristöissä on havaittu kaupunkiympäristöjä korkeampia mikrobipitoisuuksia /1-6/.

Immuunijärjestelmän luontaiseen kehittymiseen vaikuttaa useita tekijöitä. Useiden mikrobimarkkereiden kuten sienä kuvaavien glukaanin ja EPS:n (extracellular polysaccharide) sekä bakteereja kuvaavien endotoksiinin ja muramiinihapon on havaittu olevan yhteydessä vähentyneeseen astman ja atooppisten sairauksien puhkeamiseen /7-9/. Näiden tutkimusten perusteella on epäilty, että useat erilaiset mikrobiryhmät tai mikro-organismit vaikuttavat ihmisen immuunijärjestelmän kehittymiseen. Tutkimukset eivät kuitenkaan ole olleet yksiselitteisiä ja myös epäjohdonmukaisia yhteyksiä on havaittu mikrobien ja sairauksien puhkeamisen välillä /10-11/. Viimeaikaisissa tutkimuksissa on osoitettu myös mikrobidiversiteetillä olevan yhteys vähentyneeseen astman puhkeamiseen /2/.

MATERIAALIT JA MENETELMÄT

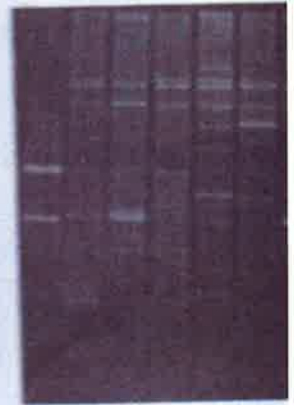
Tämä tutkimus on osa kansainvälistä Gabriel-projektia, joka on kuvattu tarkemmin Genuneitin ym. julkaisussa /12/. Tässä osassa projektia tutkittiin alppialueella asuvien lasten bakteerialtistumista. Lapsia oli kerätty tutkimukseen kolmesta eri altistumisryhmästä: 1) maatiloilla asuvat lapset, 2) lapset, jotka eivät asu maatiloilla, mutta vierailevat siellä säännöllisesti, sekä 3) lapset, jotka eivät asu eivätkä vieraile maatiloilla (kontrollit). Jokainen altistumisryhmä sisälsi atooppikkoja, astmaatikkoja sekä terveitä lapsia. Näyttematriisina käytettiin lapsen sängystä kerättyä pölynäytettä.

Lasten terveydentilasta oli tiedossa useita tekijöitä, kuten astma, siitepölyallergia tai ekseema. Atopia havainnoitiin lasten veren seerumista määritetyistä spesifisistä IgE-vastaneista. Lisäksi vanhemmat olivat raportoineet lasten muita terveystietoja sekä ympäristö-altistumista kyselyn avulla. Lasten vointia oli seurattu päivittäin ja mm. iho-oireet, yskät ja vinkuna oli kirjattu kyselyyn. Ympäristöaltistumisesta raportoitiin mm., jos lapsi oli kontaktissa eläimiin tai eläinten ruokiin. Samoin maatilalan aktiviteetteihin osallistuminen (esim. heinän puinti, lypsäminen tai kuivikkeiden vaihto) oli tiedossa.

DNA-eristys ja DGGE

Noin 20 mg osanäytteestä eristettiin DNA kaupallisella DNA-eristysmenetelmällä (GenElute Plant kit, Sigma-Aldrich). Näytteistä analysoitiin bakteeristoa DGGE-menetelmän (denaturoiva gradienttigeelielektroforeesi) avulla. Ensin DNA monistettiin PCR:n (polymeraasiketjureaktio) avulla, missä alukkeina käytettiin laajasti koko bakteeristoa monistavia alukkeita /13/. PCR-tuote ladattiin DGGE-geelille ja eroteltiin elektroforeesilla. DGGE-menetelmän erottelu perustuu sekvenssin eroihin, jolloin teoriassa jokainen näytteessä oleva bakteerilaji erottuu omana vyöhykkeenään geelillä. Erottelu tapahtuu polyakryyliamidigeelillä, missä denaturoivien aineiden gradientti oli tuotettu guanamiidin ja urean avulla. DGGE-ajoihin käytettiin Dcode Universal Mutation detection -laitteistoa (BioRad, USA).

Geelit värjättiin SYBR Green (Molecular biology grade, Sigma-Aldrich) avulla.



Kuva 1. DGGE-geeli, jota...

DGGE-datan tilastollis...

DGGE-data muunnettiin 0-1 yksinkertaisella ristineal ympäristömuuttujat) sekä ympäristömuuttujaa testi muuttuessa oleskele e luontekii eläinten rehuin ekseema, siitepölyallerg...

Tilastollisten testien jäl perustui vyöhykkeen ter...

Lisäksi DGGE-vyöhyk lukuäärä ja Shannon i...

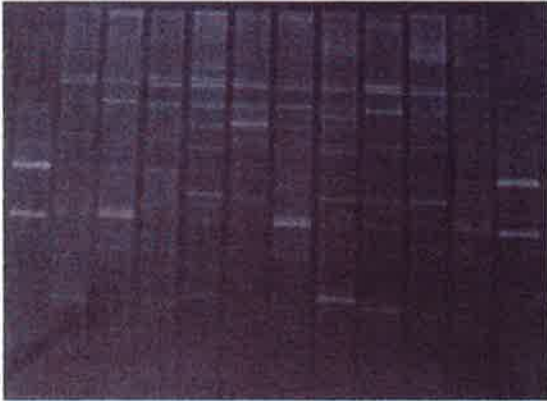
Kloonaus ja sekvensoi...

Valitut DGGE-vyöhyk kloonauksittain käsitteen sekvenssoitiin (ABI Pris tuonistamiseksi).

qPCR

Vyöhykkeiden sekvens kvantitatiivinen qPCR. Tässä esitetään vain m...

Geelit värjättiin SYBR Gold värjäysliuoksella ja valokuvattiin sinivalopöydän päällä (Claire chemical research). Valokuvadata analysoitiin Bionumerics- ohjelmiston (versio 4.61) avulla.



Kuva 1. DGGE-geeli, jossa reunoilla markkerit ja keskellä sänkyölynäytteet (10kpl).

DGGE-datan tilastolliset analyysit

DGGE-data muutettiin 0/1-dataksi (vyöhyke esiintyy/ei esiinny). Data analysoitiin yksinkertaisella ristiintaulukoinnilla (DGGE-vyöhyke vs. terveystuottajat/ ympäristömuuttajat) sekä Tobit regressioanalyysillä. Yhteensä 32 erilaista terveys- tai ympäristömuuttajaa testattiin DGGE-vyöhykkeitä vastaan. Ympäristömuuttajia olivat muun muassa oleskelu eläinsuojissa ruokinnan, siivouksen tai esim. lypsyn aikana, kontakti eläinten rehuihin, heiniin tai kuivikkeisiin. Terveystuottajia olivat mm. astma, ekseema, siitepölyallergia ja atopiat.

Tilastollisten testien jälkeen valittiin vyöhykkeet, jotka sekvensoitiin ja kloonattiin. Valinta perustui vyöhykkeen terveys- tai ympäristömuuttajiin olleisiin yhteyksiin.

Lisäksi DGGE-vyöhykkeistä laskettiin kaksi erilaista diversiteetti-indeksiä; vyöhykkeiden lukumäärä ja Shannon indeksi /14/.

Kloonaus ja sekvensointi

Valitut DGGE-vyöhykkeet leikattiin irti geelistä, puhdistettiin ja kloonattiin kaupallista kloonauskittiä käyttäen (pGEM-T vector system, Promega, USA). Lopuksi vyöhykkeet sekvensoitiin (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) bakteerilajien tunnistamiseksi.

qPCR

Vyöhykkeiden sekvensoinnin tulosten perusteella valittiin bakteeriryhmät, joille kehitettiin kvantitatiivinen qPCR-sovellus. Tällöin altistumista pystyttiin arvioimaan määrällisesti. Tässä esitetään vain mykobakteeri-ryhmän tulokset. Käytetyt qPCR sovellusten alukkeet ja

koettimet oli julkaistu aiemmin, joten ne optimoitiin sänkypölynäytteiden analysointikäyttöön sopiviksi.

Taulukko 1. Mykobakteeri-ryhmän qPCR sovellus

qPCR sovellus	Sekvenssi (5'-3')	Julkaistu
<i>Mycobacterium</i> spp.	F-alue: GAT GCA ACG CGA AGA ACC TT	Torvinen ym. 2010 /15/
	R-alue: TGC ACC ACC TGC ACA CAG G	
	koetin: FAM- CCT GGG TTT GAC ATG CAC AGG ACG -TAMRA	

TULOKSET

DGGE-menetelmällä havaittiin yhteensä 43 eri vyöhykettä geeleistä. Kaikilla näillä vyöhykkeillä oli yhteys johonkin testatuista muuttujista (ympäristö- ja terveystuuttajat). Terveystuuttajia vastaan bakteerivyöhykkeiden yhteyksistä suurin osa oli suojaavia, erityisesti atopiaan.

Kvantitatiivisella PCR:lla analysoidut bakteeriryhmät, kuten mykobakteeri-ryhmä, olivat tilastollisesti yhteydessä vähentyneeseen atopiaan, mikä vahvistaa DGGE-analyysin löydöksen. Astman kanssa ei havaittu selkeitä tilastollisesti merkitseviä yhteyksiä analysoitujen mykobakteerien kanssa.

Korkeimmat pitoisuudet mykobakteereja löytyi mautiloilla asuvien lasten sänkypölystä.

Molemmat diversiteetti-indeksit olivat suojaavasti yhteydessä atopiaa, mutta yhteyttä astman kanssa ei havaittu.

POHDINTA

Tässä tutkimuksessa analysoimme bakteeriston profiilia sänkypölynäytteistä. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää ja etsiä bakteerilajeja tai ryhmiä, joilla olisi yhteys allergisiin sairauksiin ja astmaan. DGGE:n avulla saimme useita bakteerivyöhykkeitä, joilla oli tilastollinen yhteys erityisesti atopiaan. Kvantitatiivinen PCR vahvisti DGGE:llä tehdyt löydökset, mikä osoittaa menetelmien käytettävyyden tällaisissa tutkimuksissa.

Tässä tutkimuksessa havaittiin, että mykobakteerien pitoisuudet olivat suurempia mautilakodeissa. Tämän vuoksi on syytä epäillä mykobakteerien kuvaavan mautila-altistumista ja että näillä bakteeriryhmillä voi olla yhteys 'farmiefektiin', eli mautilojen mikrobilastumisen suojaavalle vaikutukselle.

Molemmat analysoidut diversiteetti-indeksit olivat suojaavasti yhteydessä atopiaan, mutta eivät astmaan – samoin kuin yksittäiset bakteerivyöhykkeet DGGE-datassa. Mikrobi-diversiteetin vaikutus ihmisen terveyteen ja sairauksien kehittymiseen on ollut viime aikoina intensiivisen kansainvälisen tutkimuksen kohteena. Mikrobidiversiteetillä onkin havaittu olevan sekä positiivisia että negatiivisia vaikutuksia terveytemme. Diversiteetin on havaittu linkittyvän useisiin sairauksiin, sillä esimerkiksi runsaan sienilajiston tiedetään olevan yhteydessä kodin kosteusvaurioon. Samalla uskotaan muun muassa mautila-

JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksen johtopäätöksinä tutkimivuutensa ja qPCR:lla bakteeriryhmien ja terveyden suojaavasti yhteydessä atopiaan sairauksien puhkeamisen ja mautilaympäristö kohotti

LÄHDELUETTELO

1. Karkkainen PM. Value of bacterial load in the home. *Monit* 2010;12(3):75
2. Ege MJ, Mayer M. N. Exposure to environmental dust and its association with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;364(8):701-709
3. Normand AC. Sudre cultivable microflora. *Occup Environ Med*
4. Waser M, Schierl R. endotoxin levels in indoor areas. *Clin Exp Allergy*
5. Alenius H, Pakarinen immunological effects. *Allergy Immunol* 2002
6. van Strien RT. Exposure of rural school children to dust, and its association with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;113(5):860-867
7. Braun-Fahrlander C. Environmental exposure to dust. *N Engl J Med* 2002
8. Riedler J, Braun-Fahrlander C. Exposure to farm-related dust: a cross-sectional survey. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;113(1):66-71
9. Sordillo JE, Hoffmann microbial exposure. *Clinical & Experimental Immunology*
10. Chrischilles E. Allergy prevalence and risk factors. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 113(1):66-71
11. Ege MJ, Frei R. Farm environments and allergy. *Allergy Clin Immunol*

ympäristöjen runsaan diversiteetin suojaavan atooppisten sairauksien puhkeamiselta /2, 16/.

JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkimuksen johtopäätöksenä voidaan sanoa, että menetelmänä DGGE osoitti toimivuutensa ja qPCR:lla pystyttiin varmistamaan kvantitatiivisesti havaitut yhteydet bakteeriryhmien ja terveystuuttujen välillä. Analysoidut bakteeriryhmät olivat suojaavasti yhteydessä atopiaan, mikä osoittaa mikrobiryhmien yhteyden näiden sairauksien puhkeamisen kanssa. Mykobakteerien yhteys atopiaan oli selkeä ja maatilaympäristö kohotti mykobakteerien määrää lasten sänkyssä.

LÄHDELUETTELO

1. Karkkainen PM, Valkonen M, Hyvarinen A, Nevalainen A, Rintala H. Determination of bacterial load in house dust using qPCR, chemical markers and culture. *J Environ Monit* 2010;12(3):759-768
2. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WO, Braun-Fahrlander C, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med* 2011;364(8):701-709
3. Normand AC, Sudre B, Vacheyrou M, Depner M, Wouters IM, Noss I, et al. Airborne cultivable microflora and microbial transfer in farm buildings and rural dwellings. *Occup Environ Med* 2011;68(11):849-855
4. Waser M, Schierl R, von Mutius E, Maisch S, Carr D, Riedler J, et al. Determinants of endotoxin levels in living environments of farmers' children and their peers from rural areas. *Clin Exp Allergy* 2004;34(3):389-397
5. Alenius H, Pakarinen J, Saris O, Andersson MA, Leino M, Sirola K, et al. Contrasting immunological effects of two disparate dusts - preliminary observations. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149(1):81-90
6. van Strien RT, Engel R, Holst O, Bufe A, Eder W, Waser M, et al. Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(5):860-867
7. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med* 2002;347(12):869-877
8. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001 10/06;358(9288):1129
9. Sordillo JE, Hoffman EB, Celedón JC, Litonjua AA, Milton DK, Gold DR. Multiple microbial exposures in the home may protect against asthma or allergy in childhood. *Clinical & Experimental Allergy* 2010;40(6):902-910
10. Chrischilles E, Ahrens R, Kuehl A, Kelly K, Thorne P, Burmeister L, et al. Asthma prevalence and morbidity among rural Iowa schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(1):66-71
11. Ege MJ, Frei R, Bieli C, Schram-Bijkerk D, Waser M, Benz MR, et al. Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(5):1140-1147

12. Genuneit J, Buchele G, Waser M, Kovacs K, Debinska A, Boznanski A, et al. The GABRIEL Advanced Surveys: study design, participation and evaluation of bias. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2011;25(5):436-447
13. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 1993;59(3):695-700
14. Boon N, Windt W, Verstraete W, Top EM. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol Ecol* 2002;39(2):101-112
15. Torvinen E, Torkko P, Rintala AN. Real-time PCR detection of environmental mycobacteria in house dust. *J Microbiol Methods* 2010;82(1):78-84
16. Ege MJ, Mayer M, Schwaiger K, Mattes J, Pershagen G, van Hage M, et al. Environmental bacteria and childhood asthma. *Allergy* 2012

KANSAINVÄLINE SUORAUSTUTKIMUS

Heidi Kröger, Anne Mäkelä

Suomen Ympäristökeskus

TIIVISTELMÄ

Ympäristötekijöiden terveysvaaroista vaurioitain, joita tutkimus osoitti, ovat: pesemä ja ergonomiikka, sisäilman laatu, ja ergonomiikka.

Sisäilman laatu on merkittävä terveysvaara. Pöly, kosteus, lämpötila, valaistus, ääni, ja ilman laatu ovat useita tekijöitä, jotka vaikuttavat sisäilman laatuun. Nämä tekijät voivat aiheuttaa erilaisia oireita, kuten päänsärkyä, silmien ärsytystä, ja hengitysvaikeuksia.

MITÄ YMPÄRISTÖ

Laajasti ymmärretty ympäristötekijä on sisäilman laatu. Se on tärkeä tekijä, joka vaikuttaa ihmisten terveyteen ja hyvinvointiin. Ympäristötekijät, jotka vaikuttavat sisäilman laatuun, ovat esimerkiksi pöly, kosteus, lämpötila, valaistus, ja ilman laatu.

Suhteessa mielessä on yhteys ympäristötekijöiden ja sisäilman laatuun. Ympäristötekijät, jotka vaikuttavat sisäilman laatuun, ovat esimerkiksi pöly, kosteus, lämpötila, valaistus, ja ilman laatu. Nämä tekijät voivat aiheuttaa erilaisia oireita, kuten päänsärkyä, silmien ärsytystä, ja hengitysvaikeuksia.

Monissa tutkimuksissa on osoitettu, että sisäilman laatu on tärkeä tekijä, joka vaikuttaa ihmisten terveyteen ja hyvinvointiin. Noin 35 milj. ihmistä kärsii sisäilman laatuun liittyvistä ongelmista. Noin 10% näistä ihmisistä kärsii hengitystie- ja allergiatyypistä sairaudesta (SBS).