

# Loppuraportti

---

## Toksikologisen menetelmän kehittämissuunnitelma TOXTEST 2010-2012

**Terveyden ja Hyvinvoinnin laitos (THL), ympäristötoksikologian yksikkö:**

Maija-Riitta Hirvonen, Piia Markkanen, Kati Huttunen (THL/Itä-Suomen Yliopisto, ISY)

**Terveyden ja Hyvinvoinnin laitos (THL), ympäristömikrobiologian yksikkö:**

Anne Hyvärinen, Martin Täubel, Kati Järvi, Aino Nevalainen

**Helsingin yliopisto (HY):**

Mirja Salkinoja-Salonen, Maria Andersson, Raimo Mikkola

**Työterveyslaitos (TTL):**

Harri Alenius, Marina Leino, Maili Lehto, Sampsa Matikainen

**Turun yliopisto (TY):**

Esa-Matti Lilius, Janne Atosuo

## Tiivistelmä

TOXTEST-tutkimus on Itä-Suomen yliopiston, Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen, Työterveyslaitoksen, Helsingin yliopiston ja Turun yliopiston yhteinen hanke, jonka tavoitteena oli kehittää sisäilmanäytteille sopiva toksisuuden mittaamenetelmä. Tutkimuksessa kerättiin kolmessa eri kampanjassa pölynäytteitä kosteusvaurioituneista taloista ja vertailutaloista. Keräysmenetelminä käytettiin laskeutuneen huonepölyn keräämistä imuroimalla, pyyhkäisynäytteenä tai keräyslaatikkoon, sekä laskeumamaljoja, joihin kasvanut kasvusto kerättiin talteen. Kerätyt näytteet uutettiin, uutosten toksisuus mitattiin useilla toksikologisilla menetelmillä ja tuloksia verrattiin tietoihin kohteen kosteusvaurioitilanteesta ja asukkaiden oireilusta.

Hankkeen ensimmäisessä vaiheessa kehitimme toimivan näytteiden uuttoprotokollan, jonka avulla sisäympäristönäytteen liukoiset komponentit saatiin eristettyä toksisuustestejä varten. Toisessa vaiheessa pystyimme osoittamaan erilaisilla toksikologisilla menetelmillä saatujen tulosten korreloivan varsin hyvin toistensa kanssa, mutta käytettyjen näytetyyppien (yläpinnoilta imuroitu pöly ja laskeumamaljanäyte) tulosten perusteella vauriokohteita ei pystytty erottamaan vertailukohteista. Kolmannessa vaiheessa toksisuustestien erottelukykyä testattiin kahta eri lähestymistapaa käyttäen; 1) vertaamalla sisäilmaongelmakohteista eristettyjen mikrobien puhdasviljelmistä tehtyjä uutoksia vertailukannasta tehtyyn uutokseen sekä 2) vertaamalla kosteusvaurioituneista, oireilevista kohteista kahdella eri tavalla kerättyjen pölynäytteiden uutoksia oireettomista verrokkikohteista kerättyjen pölynäytteiden uutoksiin.

Mikrobien puhdasviljelmillä tehdyssä kokeessa havaittiin erityisesti nisäkässolutoksisuustestien korreloivan keskenään hyvin sekä erottavan sisäilmaongelmakohteista eristetyistä toksisista mikrobeista tehdyt uutokset ei toksisen vertailukannan uutoksesta. Pölynäytteillä (pyyhintänäyte yläpinnoilta ja laatikkoon laskeutunut pöly) tehdyn kokeen tulosten mukaan toksisuusmenetelmät eivät korreloineet positiivisesti kohteessa havaittujen kosteusvaurioiden ja asukkaiden kokemien terveyshaittojen kanssa kummallakaan testatulla näytteenkeräysmenetelmällä kerätyillä näytteillä. Vauriokohteissa oli vertailukohteita vähemmän pölyä, mikä vaikutti merkittävästi toksisuustestien tuloksiin. Eri nisäkässoluilla tehdyt toksisuustestit korreloivat edelleen verrattain hyvin keskenään. Rakennusten vertailu useamman näytteen tuloksen perusteella paransi jossain määrin, mutta ei ratkaisevasti mittaamenetelmien erottelukykyä.

Tulosten perusteella huonepölyuutoksen toksisuutta ei voida käyttää kosteusvauriokohteiden luokittelussa tai terveyshaitan arvioinnissa ainakaan tässä tutkimuksessa käytetyllä lähestymistavalla, eli testaamalla imuroimalla, laskeumamaljoille, pyyhkäisemällä tai laatikoihin kerätyn laskeutuneen huonepölyn uutosta sian siittiöiden, hiiren tai ihmisen immuunipuolustuksen solujen tai bakteerien vasteisiin perustuvilla toksikologisilla menetelmillä. Projektissa tuotettiin arvokasta tietoa, joka selkeästi osoitti, että pölyn määrä korreloi toksisuuden kanssa eli ominaistoksisuuden lisäksi on tärkeää huomioida myös massa suhteutettu kokonaisaltistumisen määrä. Lisäksi erityisesti ns. vanha pöly sisältää toksisuutta aiheuttavia tekijöitä useista tavanomaisista lähteistä, kuten pesuaineet, ulkoilma ja polttoperäiset hiukkaset. Saatua tulosta voidaan hyödyntää mahdollisissa jatkohankkeissa, joiden tavoitteena on kehittää yksi tai useampi kenttäkäyttöön soveltuva toksisuustesti, joissa edellä mainitut tekijät otetaan huomioon. On kuitenkin huomioitava, että huonepölyn toksisuus ei välttämättä ole selittävä tekijä kosteusvaurio-oireilussa.

## Hankkeen tausta ja lähtökohdat

Jopa yli puolet suomalaisista pientaloista on arvioitu olevan kosteusvauriokorjauksen tai tarkastamisen tarpeessa. Näistä noin 10 prosentissa kosteuden ja homekasvun arvioidaan uhkaavan käyttäjien terveyttä. Kosteudelle ja homeelle altistuu vuosittain satoja tuhansia suomalaisia, ja aiheutuvista terveyshaitoista arvioidaan aiheutuvan yhteiskunnalle yli puolen miljardin euron kustannukset.

Tällä hetkellä sekä julkisella että yksityisellä sektorilla on valtava paine korjata kosteusvaurioituneet rakennukset, mutta toistaiseksi ei ole voitu osoittaa työkaluja korjauskohteiden priorisointiin terveysperusteisesti; edes vauriokohteiden yksiselitteinen tunnistaminen ei ole mahdollista nykyisillä menetelmillä. Sisäilma-alan toimijoilla on selkeä tarve sisäilman tilanteen mittariin, jolla kosteusvaurioituneen rakennuksen tilannetta voitaisiin arvioida muun kuin pelkästään rakennuksen teknisen kunnan perusteella. Sisäilmaongelmien selvittämisessä olisi erityisen hyödyllistä käyttää menetelmää, joka ottaa huomioon eri altisteiden yhteisvaikutukset yksittäisen altisteen määrän mittaamisen sijasta.

TOXTEST-hankkeen tavoitteena oli kehittää kenttäkäyttöön soveltuva toksisuustesti, jota voitaisiin hyödyntää kosteus- ja homevaurion vakavuuden arvioinnissa. Hanke eteni kolmessa vaiheessa, joille oli asetettu omat yksityiskohtaisemmat tavoitteet:

1. Luoda sisäympäristönäytteille soveltuva näytteiden uuttomenetelmä sekä määrittää varsinaisiin kokeisiin soveltuvat annokset ja altistusajat.
2. Osoittaa ne toksikologiset tutkimusmenetelmät, jotka ovat käyttökelpoisimpia sisäympäristönäytteiden toksisuuden testaukseen, sekä osoittaa näiden menetelmien luotettavuus useilla rinnakkaisilla analyyseillä.
3. Testata käyttökelpoisimmilla toksisuustesteillä eri näytteenkeräysmenetelmiä käyttäen, voidaanko oireilevat vauriokohteet erottaa oireilemattomista kohteista.

## Hankeorganisaatio

### Terveyden ja Hyvinvoinnin laitos, Ympäristötoksikologian laboratorio

Professori Maija-Riitta Hirvonen

- Hankkeen organisointi
- Näytteiden käsittely
- Toksikologiset kokeet hiiren ja ihmisen solulinjoilla

### Terveyden ja Hyvinvoinnin laitos, Ympäristömikrobiologian laitos

Johtava tutkija Anne Hyvärinen

- Kenttätutkimus
- Terveyskyselyt, kuntokartoitukset
- Mikrobiologiset määritykset, toksiinimääritykset (Itävalta)

### Työterveyslaitos

Tutkimusprofessori Harri Alenius

- Toksikologiset kokeet ihmisen primäärisoluilla ja solulinjoilla

### Helsingin Yliopisto

Tutkimusjohtaja Mirja Salkinoja-Salonen

- Toksikologiset kokeet sian siittiöillä
- Toksiinien tunnistaminen

### Turun Yliopisto

Lehtori Esa-Matti Lilius

- Toksikologiset kokeet bakteeri *Escherichia coli*lla

## Projektin eteneminen

TOXTEST hanke käynnistyi kesällä 2010 ja sopimus allekirjoitettiin marraskuussa 2010. Hanke päättyi sopimuksen mukaisesti 31.12.2012. Hankeen alussa sopimusneuvottelujen venyminen viivästytti rahoituksen käyttöä suunnitelman mukaisesti, mutta työ pystyttiin käynnistämään tutkimukseen osallistuneiden laitosten omarahoitusosuuden turvin. Näytteiden kerääminen analyysyjä varten osoittautui suunniteltua työläemmäksi, koska vanhojen näytteiden hyödyntämisen sijasta vaiheissa 2-3 jouduttiin keräämään kokonaan uudet näytteet tutkimuksen tarpeisiin. Lisääntyneestä työmäärästä huolimatta vaiheet 1 -3 saatiin päätökseen pienin viivytyksin.

31.12.2012 mennessä on käytetty kaikki vuosille 2010-2012 myönnetystä määrästä ja omarahoitusosuudesta. Lisärahoituksen saaminen ei toteutunut alkuperäisen talousarvion mukaisesti, joten projektin omarahoitusosuutta on pienennetty vastaavasti. Projektin viimeistä vaihetta on lisäksi rahoittanut Sosiaali- ja Terveysministeriö erillisillä sopimuksilla.

## Toksisuus testit

Näytteen toksisuutta testattiin eri vaiheissa kaikkiaan kuudella eri solutyypillä ja noin kahdellakymmenellä menetelmällä. Käytettyjä solutyyppejä olivat ihmisen veren mononuklearisista soluista erilaistetut makrofagit (Kankkunen et al 2010) ja ihmisen makrofagisolulinja THP-1 (Niemi et al. 2011), joista mitattiin tulehdusvälittäjäaineiden tuotantoa [interleukiini (IL)-8, tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ] sekä solukalvon vahingoittumista (LDH -testi). Ihmisen keuhkoepiteelisolulinjasta A549 ja/tai hiiren makrofagisolulinjasta RAW264.7 mitattiin solun kuolleisuutta (solun koko/muoto, mitokondrion toiminta, solukalvon vahingoittuminen, apoptoosi), tulehdusvälittäjäaineiden tuotantoa [typpioksidi (NO), TNF $\alpha$ , macrophage inflammatory protein (MIP)-2] ja solunsisäistä peroksidituotantoa (Huttunen et al. 2003, Penttinen et al. 2005, Markkanen et al. 2009). Sian siittiö -testissä mitattiin siittiöiden ionoforisuutta ja liikkuvuutta (Andersson et al. 2010), munuaissoluista testattiin toksisuutta (Rasmus et al. 2012), sekä bakteerikanta *Escherichia coli*sta altisteen aiheuttamaa kuolleisuutta (Atosuo et al. 2012).

## Tulokset

### Vaihe 1

**Vaiheessa 1** eli esikoevaiheessa saimme paremman käsityksen tarvittavasta näytemäärästä ja muokkasimme näytteiden uuttoprotokollaa toimivammaksi siten, että liukoiset komponentit saatiin eristettyä toksikologisia kokeita varten. Sopivinta näytteenottomenetelmää selvitetessä todettiin, että ilmanäytteenotolla ei saada kerättyä riittävää massaa näytettä rinnakkaisiin analyyseihin, joten testattaviksi näytteenottomenetelmiksi valikoitui erilaisia tapoja kerätä pinnoille laskeutuvaa huonepölyä.

Vauriokohteiden näytteet hankittiin YMIK:ssa meneillään olevasta HOTES-tutkimuksesta, jossa selvitetään altistumista ja terveysvaikutuksia vakavasti kosteusvaurioituneissa asunnoissa. Tutkimuksen ensimmäisessä vaiheessa valittiin kaksi vauriokohdetta, jossa oli saatavilla runsaasti näyttemateriaalia, jota ensimmäisessä vaiheessa tarvittiin useisiin rinnakkaisiin analyyseihin. Lisäksi YMIK:n kaksi tutkijaa keräsi vaurioitumattomista kodeistaan vastaavat näytteet.

Kaikissa tutkimuksen vaiheissa toksikologisia analyysejä varten näytteet sokkoutettiin eli ne koodattiin siten, etteivät ko. analyysejä tekevät tutkimusryhmät voineet tunnistaa näytteiden alkuperää. Näytteet uutettiin etanoliin, uutos haihdutettiin kuiviin, punnittiin, liuotettiin metanoliin, jaettiin osiin ja toimitettiin eri ryhmille analysoitavaksi (Liite 1. Näytteenkäsittely vaihe 1). Näytteet analysoitiin sian siittiöttestillä (Helsingin yliopisto), altistamalla hiiren makrofageja (Itä-Suomen Yliopisto/Terveystieteiden ja Hyvinvoinnin laitos) ja ihmisen makrofageja (Työterveyslaitos).

Tulosten perusteella vertailukohteesta kerätyt näytteet aiheuttivat pääsääntöisesti enemmän toksikologisia vasteita kuin vertailukohteista kerätyt näytteet. Vauriokohteista kerättyjä näytteitä oli kuitenkin säilytetty jo pidemmän aikaa kun taas vertailukohteiden näytteet olivat tuoreita, mikä herätti epäilyn, että näytteiden ikä ja säilytys voivat vaikuttaa tuloksiin. Varsinaiset toksikologiset menetelmät näyttivät pääosin korreloivan keskenään. Tulosten perusteella pystyttiin myös arvioimaan jatkossa tarvittava näytemäärä ja optimoimaan näytteiden käsittelyä analyysejä varten. (Liite 2. Tulokset vaihe 1)

### Vaihe 2

Ensimmäisen vaiheen tutkimustulosten perusteella jatkotutkimuksiin tulevat näytteet päätettiin kerätä kaikki uusista kohteista samaan aikaan ja säilyttää lasiputkissa kaikissa vaiheissa. Kevään 2011 aikana YMIK:n HOTES-tutkimukseen tuli neljä uutta kohdetta, joille hankittiin verrokkikodit (samanikäisiä, samanlainen runkorakenne ja ilmanvaihto). Kaikissa kahdeksassa kodissa kerättiin yläpölynäytteet (yläpintojen imurointi), bakteeri- ja sienialustoille laskeumamaljanäytteet (1 h) sekä laskeutuneen pölyn näytteet keräyslaatikkoon (8 vkoa). Laskeumamaljanäytteitä kasvatettiin viisi viikkoa, minkä jälkeen kasvaneet pesäkkeet kerättiin etanoliin ja pakastettiin odottamaan jatkoanalyysejä. Kohteiden asukkaille toimitettiin terveystutkimus, heille tehtiin HOTES-tutkimuksen mukaiset terveystutkimukset sekä kohteissa tehtiin rakennustekninen tutkimus. Yläpölynäytteistä analysoitiin toksiinipitoisuudet Itävallassa sekä mikrobiologiset määritykset tehtiin YMIK:ssa. (Liite 3. Terveystutkimuksen tulokset vaihe 2)

Kaikki näytteet koodattiin, uutettiin etanoliin, uutos haihdutettiin kuiviin, punnittiin, liuotettiin metanoliin, jaettiin osiin ja toimitettiin eri ryhmille analysoitavaksi (Liite 4. Näytteenkäsittely vaihe

2). Toisen vaiheen näytteet analysoitiin laajalla menetelmävalikoimalla käyttäen sian siittiöiden, hiiren makrofagien, ihmisen keuhkoepiteelisolujen ja ihmisen makrofagien lisäksi myös bakteereita tutkimukseen mukaan tulleen Esa-Matti Liliuksen tutkimusryhmän (Turun Yliopisto) liittyttyä mukaan hankkeeseen.

Tulosten perusteella erilaisten toksisuutta ja tulehdusvasteen käynnistymistä mittaavat menetelmät korreloivat hyvin keskenään, mutta toksisuuden mittaaminen tutkituista näytetyypeistä (yläpöly, laskeumamaljat) ei kuvannut talon vaurio-tilannetta hyvin. Yläpölynäytteiden perusteella lupaavin käytetyistä analyysimenetelmistä oli bakteeritesti, mutta kaikki testit luokittelivat sekä vaurio- että vertailukohteita väärin. Laskeumamaljanäytteiden osalta rinnakkaisten maljojen vaihtelu oli niin suurta, ettei tulosten perusteella pystytty erottelemaan vaurio-kohteita vertailukohteista. (Liite 5. Tulokset vaihe 2)

### Vaihe 3

#### *Tutkimus 1*

Analyysimenetelmien vertailtavuutta ja erottelukykyä testattiin kuudella puhdasviljelmästä tehdyllä uutoksella, joista viisi oli peräisin sisäilmakohteesta eristetystä toksisesta mikrobikannasta ja yksi ei toksisesta vertailukannasta. Mykotoksiineja tuottavat kannat eristettiin viljelemällä laskeumamaljat tai laskeutunutta pölyä mallasuuteagarilla 4-5 viikkoa kiinniteipattuna ja ilman antibiootteja huoneenlämmössä. Maljoilla kasvavista erillispesäkkeistä seulottiin mykotoksiineja tuottavat pesäkkeet kuumentamalla kerättyä biomassaa etanolissa ja testaamalla suspension toksisuus siittiösoluja ja munuaissoluja kohdesoluina käyttäen. Toksisuustesteissä positiiviset kannat viljeltiin puhtaiksi ja tunnistettiin DNA –sekvenssin, morfologisten ja kasvuominaisuuksiensa perusteella. Mykotoksiinien tunnistamiseksi kantojen puhdasviljelmistä tehdyt uutteen fraktioitiin käyttämällä nestekromatografiaa. Toksiset fraktiot osoitettiin toksisuustestien avulla ja niiden mykotoksiinit tunnistettiin massaspektrometrillä. Lopuksi uutteen analysoitiin kaikilla TOXTEST projektissa käytetyillä toksisuustesteillä.

Tulosten perusteella useimmat käytetyistä toksisuutta mittaavista menetelmistä erottivat yhden ei toksisesta vertailukannasta tehdyn uutoksen viidestä sisäilmaongelmakohteesta eristetystä toksisesta mikrobikannasta tehdyistä uutoksista. Tulehdusvasteita aiheutti vain muutama tutkituista näytteistä. Vertailukannasta tehty uutoksesta oli vähiten toksinen lähes kaikilla menetelmillä mitattuna. (Liite 6. Tulokset vaihe 3 Tutkimus 1)

#### *Tutkimus 2*

Kolmannen vaiheen kohteiden valintaa varten tehtiin keväällä 2012 terveystutkimus 31 vaurio- ja 17 vertailukohteessa. Tutkimukseen esivalittiin kohteet terveystutkimuksen perusteella. Laajassa kyselyssä kysyttiin erilaisten oireiden ja sairauksien laatua ja esiintyvyyttä sekä kartoitettiin vastaajien käsitystä omasta yleisestä terveydentilastaan. Kullekin vastaajalle laskettiin useita erilaisia summamuuttujia ("score") oireiden ja sairauksien esiintyvyyden perusteella. Summamuuttujan arvo oli sitä suurempi, mitä enemmän vastaajalla oli erilaisia oireita ja mitä useammin niitä esiintyi. Tapauskohteiksi valittiin koteja, joissa oiresummamuuttujat saivat suurimmat arvot.

Vertailukohteiksi valittiin niitä, joissa arvot olivat mahdollisimman alhaiset. Kaikkiaan 12 tapausrakennusta ja 10 vertailurakennusta valittiin jatkotutkimuksiin.

Tapaus- ja vertailukohteiden valinnalla pyrittiin muodostamaan mahdollisimman selvästi toisistaan poikkeavat ryhmät, mikä onnistui hyvin, sillä tapauskohteiden asukkaat kärsivät tilastollisesti merkitsevästi huomattavasti enemmän kaikista kysytyistä oireista, mm. erilaisista hengitystieoireista, silmä- ja iho-ongelmista, sekä yleisoireista. Lisäksi tapauskohteiden asukkaat sairastivat keskimäärin selvästi enemmän kuin vertailukohteiden asukkaat. Tapauskohteissa asuvien oireiden koettiin liittyvän kodissa oleskeluun, kun taas vertailukohteiden asukkaat eivät yhdistäneet oireitaan kotiin lainkaan. Ainoastaan ”Muut oireet” -osan (esim. hiustenlähtö, kuukautishäiriöt, oppimisvaikeudet) oireiden esiintyvyydessä ei ollut merkitseviä eroja tapauskohteiden ja vertailukohteiden asukkaiden välillä. Erot tapauksien ja verrokkien välillä olivat lähes yhtä selvät riippumatta siitä, vertailtiin muuttujia tapauksien ja verrokkien saamien summamuuttujien keskiarvon vai perhekohtaisten maksimiarvojen perusteella (Liite 7. Terveyskyselyn tulokset vaihe 3 Tutkimus 2).

Yhdeksässä kahdestatoista tapauskohteesta ja kaikissa vertailukohteissa on lisäksi tehty kosteusvauriokuntoarvio. Kaikissa tapauskohteissa ei kosteusvauriokuntoarviota ehditty tehdä, koska kohteessa alkoi vaurioiden remontointi. Tutkimuskohteissa tehdyt kosteusvauriokuntoarviot vahvistivat asukkaiden raportoimat havainnot kosteusvaurioista, sillä lähes kaikissa tapausrakennuksissa oli selviä kosteusvaurioita ja homeen hajua, kun taas vertailurakennusten vauriot olivat korkeintaan lieviä.

Kohteista kerättiin pyyhintänäytteet (kolme näytettä/asunto) pyyhkimällä asuntojen yläpinnoilla olevaa ns. vanhaa pölyä lasisauvan ympärille kiinnitetyllä esipestyllä mikrokuituliinalla. Tämä näyte edustaa siis pölyä, joka on kertynyt pinnoille tuntemattoman ajan. Lisäksi kohteista kerättiin laskeutuneen pölyn näyte keräyslaatikkoon (kaksi näytettä/asunto). (Liite 8. Näytekoodit vaihe 3 Tutkimus 2). Laatikkopölyllä tarkoitetaan pölynäytteitä, joissa samankokoisiin ja samaa materiaalia oleviin laatikoihin annettiin laskeutua pölyä 8 viikon ajan. Näin ollen laatikkopölynäytteet olivat aina uutta, samanlaiselle alustalle tunnetun ajan kerättyä pölyä. Näyte kerättiin laatikosta imemällä pöly suodattimelle. Laatikon pintamateriaalin ja suodattimen toksisuus oli testattu altistamalla hiiren makrofageja materiaaleista tehdyille uutoksille erillisessä esikokeessa.

Pyyhintänäytteet ja suodattimelle imuroidut laatikkonäytteet uutettiin metanoliin, haihdutettiin kuiviin, liuotettiin määrättyyn pitoisuuteen (pyyhintänäytteet; näytteen ominaistoksisuuden mittaus) tai määrättyyn tilavuuteen (laatikkonäytteet; näytteen kokonaistoksisuuden mittaus), jaettiin osiin ja lähetettiin eri ryhmille analysoitavaksi. Kolmannessa vaiheessa toksikologisten menetelmien määrää karsittiin rajaamalla sekä eri toksisuustestien että erilaisten mitattavien vasteiden määrää. Kolmanteen vaiheeseen valituista kohteista analysoitiin kahdenlaisia näytteitä: kerätyt pyyhintänäytteet ns. vanhasta yläpölystä tutkittiin vain sian siittiöitä ja bakteereita altistamalla ja laatikkopölynäyte siittiö- ja bakteeritestin lisäksi hiiren ja ihmisen makrofageja altistamalla. (Liite 8 Näytteenkäsittely vaihe 3 Tutkimus 2)

Varsinaisista vaurio- ja vertailukohteista kerättyjä pölynäytteitä testatessa mikään toksisuustesti ei erottanut tapaus- ja vertailukohteita toisistaan kummallakaan käytetyllä näytteenottomenetelmällä (Taulukko 2). Laatikkopölynäytteet osoittivat, että tapauskohteissa oli merkittävästi vähemmän pölyä verrattuna vertailukohteisiin. Ryhmätasolla analysoituna tapauskohteista kerätyt

laatikkopölynäytteet aiheuttivat vähemmän toksisuutta ja tulehdusvälittäjäainetuotantoa, minkä selittänee vauriokohteiden pienempi pölyn määrä, sillä laatikkopölynäytteiden tulokset korreloivat sekä kerätyn pölymäärän että uutoksen määrän kanssa. Toksisuusanalyyseistä parhaiten korreloivat keskenään HY:n siittiötesti, ISY:n hiiren makrofageilla tehty MTT-testi ja TTL:n ihmisen monosyyteillä tehdyt analyysit (tulehdusvälittäjäaineet ja LDH). (Liite 10. Tulokset, vaihe 3 Tutkimus 2 TTL yhteenveto)

Tuloksia voidaan tarkastella myös rakennuskohtaisesti, laskemalla toksisten näytteiden määrän kustakin rakennuksesta; esimerkiksi yhdessä tapauskohteessa kaikki siittiötestillä analysoidut viisi näytettä olivat toksisia. Tälläkään lähestymistavalla spesifisyys ei kuitenkaan riittänyt luotettavasti erottelamaan ongelmarakennuksia vertailukohteista (Liitteet 11-12. Tulokset vaihe 3 Tutkimus 2 HY/TY).

Taulukko 2. Kolmannen vaiheen sokkoutettujen tulosten perusteella positiivisiin ja negatiivisiin näytteisiin jaettujen tulosten sensitiivisyys eli herkkyys (oikeiden positiivisten osuus analysoiduista tapauskohteista) ja spesifisyys eli kyky erottaa vertailukohteet (oikeiden negatiivisten osuus analysoiduista vertailukohteista). N = näytteiden määrä.

Menetelmä	Pyyhintänäytteet % (N)		Laatikkonäytteet % (N)	
	Sensitiivisyys	Spesifisyys	Sensitiivisyys	Spesifisyys
Sian siittiöt, liikkuvuus	78 (23)	27 (33)	23 (22)	55 (20)
<i>Escherichia coli</i> , kuolleisuus	28 (36)*	59 (37)*	24 (24)	62 (21)
Ihmisen makrofagit, solukalvon vaurio	-	-	29 (24)	24 (21)
Ihmisen makrofagit, tulehdus (IL-1 $\beta$ tuotanto)	-	-	17 (24)	71 (21)
Ihmisen makrofagit, tulehdus (TNF $\alpha$ tuotanto)	-	-	13 (24)	62 (21)
Ihmisen makrofagit, tulehdus (IL-8 tuotanto)	-	-	29 (24)	24 (21)
Hiiren makrofagit, mitokondrion toiminta	-	-	33 (24)	48 (21)
Hiiren makrofagit, solukalvon vaurio	-	-	20 (24)	85 (20)
Hiiren makrofagit, tulehdus (TNF $\alpha$ tuotanto)	-	-	11 (19)	29 (14)

*\*) usealla eri laimennoksella tehdyn bakteeritestin tulkinta on tehty liian suuresta näyteväkevyydestä*



## Pohdinta ja johtopäätökset

Tutkimus osoitti, että toksikologinen mittaus pölystä tai laskeumamaljojen pesäkkeiden yhteiskasvatuksesta tehdystä uutoksesta ei pysty erottelemaan oireilevia tapauskohteita lähes oireettomista vertailukohteista. Toksikologisilla analyysimenetelmillä saadut tulokset korreloivat hyvin keskenään ja toksisuustestit vaikuttavat toimivan sitä paremmin, mitä puhtaammista näytteistä on kysymys. Yksittäisten toksiinien testaaminen ei kuitenkaan ole riittävää haitallisuuden kriteeriksi, sillä huonepölyn alhaiset toksiinipitoisuudet viittaavat siihen, että kyseessä on useiden eri altisteiden yhteisvaikutus.

**Yläpölynäytteen** suurin ongelma oli se, että pöly oli kertynyt pinnoille määrittelemättömän ajan, toisissa kohteissa pöly voi olla hyvinkin vanhaa ja toisissa varsin tuoretta. Lisäksi erityisesti ns. vanha pöly sisältää toksisuutta aiheuttavia tekijöitä useista tavanomaisista lähteistä, kuten pesuaineet, ulkoilma ja polttoperäiset hiukkaset, joten asuntojen erilaiset pintamateriaalit sekä puhdistuksessa käytetyt kemialliset aineet voivat vaikuttaa pölyn toksisiin ominaisuuksiin. **Laskeumamaljanäytteet** eivät kuvanneet tilannetta kohteissa luotettavasti, sillä rinnakkaisten maljojen toksisuudessa oli merkittäviä eroja sekä valittu kasvualusta suosii tiettyjä mikrobeja. **Pyyhintänäytteiden** kerääminen olisi teknisesti toteutettavissa helposti ja nopeasti, mutta näytteen määrä jää pieneksi ja yläpölyn tapaan myös tämän näytetyypin ongelmaksi muodostuu vaihtelu pölyn iän ja keräysalustan suhteen. **Laatikkopölynäytteessä** tätä ongelmaa ei ole, mutta keräytyneen pölyn massan havaittiin vaikuttavan toksisuustestin lopputulokseen enemmän kuin pölyn laadun, jolloin näytteen käsittelyyn tulisi lisätä usea välivaihe massaperusteisen vertailun tekemiseksi. Näin ollen tulosten perusteella ominaistoksisuuden lisäksi on tärkeää huomioida myös massa suhteutettu kokonaisaltistumisen määrä.

Tulosten perusteella pölynäytteet soveltuvat huonosti toksikologisiin analyyseihin, joten näytteenottomenetelmiä tulisi kehittää nimenomaan toksikologisia testejä silmälläpitäen. Näytteen aktiivinen kerääminen esimerkiksi suoraan ilmasta voisi olla pölynäytettä suositeltavampi näytteenkeräystapa, jos kertyneiden hiukkasten määrä otetaan analyysissä huomioon. Sekä ilmanäytteen että laskeutuneen pölyn keräämisessä ongelmaksi voi muodostua riittävän, edustavan ja toistettavan näytteen kerääminen. On tärkeää ottaa huomioon, että ns. yleistä toksisuutta mittaavat menetelmät mittaavat aina kaikkien toksisuutta aiheuttavien tekijöiden yhteisvaikutusta, joten esimerkiksi pölyn sisältämät kemikaalit voivat vaikuttaa merkittävästi testin tulokseen.

Toksisuustesteistä edullisimmat ja nopeimmat ovat siittiötesti ja *E. coli* –testi, mikä puoltaisi näiden menetelmien sopivuutta kenttäkäyttöön. Saatujen tulosten perusteella kuitenkin mikään käytetyistä toksisuuden testausmenetelmistä ei sokkoutetuissa kokeissa pystynyt luotettavasti erottelemaan tapauskohteita vertailukohteista, eikä toksisuus korreloinut positiivisesti kohteessa havaittujen kosteusvaurioiden ja asukkaiden kokemien terveyshaittojen kanssa. Näin ollen niitä ei voida käyttää kosteusvauriokohteiden korjaustarpeiden priorisoinnin perusteena eikä terveyshaitan arvioinnissa ainakaan tässä tutkimuksessa käytetyillä lähestymistavoilla. Rakennusten vertailu useamman näytteen tuloksen perusteella paransi jossain määrin, mutta ei ratkaisevasti mittausmenetelmien erottelukykyä.

Projektissa tuotetun tiedon perusteella on kuitenkin voitu sulkea pois jo useita eri näytetyyppejä, sekä todeta toksisuusmenetelmien korreloivan keskenään verrattain hyvin, joten näitä tietoja voidaan hyödyntää mahdollisissa jatkohankkeissa, joiden tavoitteena on kehittää yksi tai useampi kenttäkäyttöön soveltuva toksisuustesti. On kuitenkin huomioitava, että huonepölyn toksisuus ei välttämättä ole selittävä tekijä kosteusvaurio-oireilussa.

Taulukko 3. Yhteenvedo keskeisistä tuloksista hankkeen eri vaiheissa.

Vaihe	Selvitetty asia	Keskeinen tulos
<b>1</b>	- Näytteiden säilytys - Näytteenkäsittely	➤ Pitkäaikainen säilytys voi vaikuttaa tuloksiin ➤ Toimiva uuttoprotokolla
<b>2</b>	- Toksisuus-menetelmät - Tulehdus-menetelmät - Toksisuus vs. tulehdus - Yläpölynäytteet  - Laskeumamaljanäytteet	➤ Hyvä korrelaatio THL, HY ja TY kesken ➤ Hyvä korrelaatio THL ja TTL kesken ➤ Toksisuus erottelee selvemmin kohteet ➤ Ei kuvaa kohteen tilannetta hyvin → pölyn historia, puhdistusaineet, pintamateriaalit ➤ Ei kuvaa kohteen tilannetta luotettavasti → vaihtelu suurta maljojen välillä samassa kohteessa, kasvatus suosii joitakin mikrobeja
<b>3</b>	- Toksisuusmenetelmät - Pyyhintänäytteet  - Laatikkonäytteet	➤ Hyvä korrelaatio THL, HY ja TTL kesken ➤ Ei erottele kohteita hyvin, pölyn määrä vähäinen erityisesti vauriokohteissa ➤ Ei erottele kohteita hyvin, tulos korreloi vahvasti pölyn määrän kanssa

## Kirjallisuusviitteet

Andersson, M.A., Mikkola, R., Rasimus, S., Hoornstra, D., Salin, P., Rahkila, R., Heikkinen, M., Mattila, S., Peltola, J., Kalso, S ja Salkinoja-Salonen, M. (2010) Boar spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosols. *Toxicology in Vitro*, 24, 2041-2052.

Atosuo, J. T., Lehtinen, J., Vojtek, L. ja Lilius, E. (2012) *Escherichia coli* K-12 (pEGFP<sub>lux</sub>ABCDEamp). A Tool for Analysis of Bacterial Killing by Antibacterial Agents and Human Complement Activities on a Real-Time Basis. *Luminescence*, doi: 10.1002/bio.2435.

Huttunen, K., Hyvärinen, A., Nevalainen, A., Komulainen, H. ja Hirvonen, M.-R. (2003) Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. *Environmental Health Perspectives* 111 (1): 85-92.

Markkanen (Penttinen), P., Pelkonen, J., Tapanainen, M., Mäki-Paakkanen, J., Jalava, P. I. ja Hirvonen, M.-R. (2009) Co-cultivated damp building related microbes *Streptomyces californicus* and *Stachybotrys chartarum* induce immunotoxic and genotoxic responses via oxidative stress. *Inhalation Toxicology*, 21(10): 857-867

Penttinen, P., Pelkonen, J., Huttunen, K., Toivola, M. ja Hirvonen, M.-R. (2005) Interactions between *Streptomyces californicus* and *Stachybotrys chartarum* can induce apoptosis and cell cycle arrest in mouse RAW264.7 macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*. 202(3):278-88.

Rasmus S., Mikkola R., Andersson M.A., Teplova, V.V., Venediktova, N., Ek-Kommonen, C. ja Salkinoja-Salonen, M. (2012) Psychotolerant *Paenibacillus tundra* from barley grains produces new cereulide-like depsipeptides, paenilide and homopaenilide, highly toxic to mammalian cells. Appl. Environ. Microbiol. 78: 3732-3743. doi: 10.1128/AEM.00049-12

## Liitteet

Liite 1 Näytteenkäsittely vaihe 1

Liite 2 Tulokset vaihe 1

Liite 3 Terveyskyselyn tulokset vaihe 2

Liite 4 Näytteenkäsittely vaihe 2

Liite 5 Tulokset vaihe 2

Liite 6 Tulokset vaihe 3 Tutkimus 1

Liite 7 Terveyskyselyn tulokset vaihe 3 Tutkimus 2

Liite 8 Näytekoodit vaihe 3

Liite 9 Näytteenkäsittely vaihe 3 Tutkimus 2

Liite 10 Tulokset vaihe 3 Tutkimus 2 TTL Yhteenveto

Liite 11 Tulokset vaihe 3 Tutkimus 2 HY

Liite 12 Tulokset vaihe 3 Tutkimus 2 TY

## YLÄPÖLYNÄYTTEET

### YLÄPÖLYNÄYTTEIDEN OTTO

1. Pölynäytteenottoa varten minigrip-pussissa on näytteenkeräys-sukka ja pussinsulkija sekä muovipussi pölypussille. Pidä pussit kiinni ennen keräystä ja koskettakaa näytesukkaa mahdollisimman vähän. Lisäksi mukana on kuvasarja näytteenotosta ja rekisteröintilomake pölynkeräystä varten.
2. Yläpölynäytettä on tarkoitus imuroida yhteensä n. 700 mg. Tämä tarkoittaa esimerkiksi kolme sukkaa noin puolillaan.
3. Laittakaa näytteenotto-sukka imurinne putken sisään ja teipatkaa se kiinni.
4. Näyte tulee imuroida kovilta vaakapinnoilta, joille pölyä on laskeutunut. Näytettä voidaan imuroida esimerkiksi ovien ja ikkunoiden listojen päältä, kirjahyllyn yms. hyllyjen/tasojen päältä, taulujen raameista jne- .
5. Eritelkää rekisteröintilomakkeeseen, mistä kaikkialta näyte on imuroitu, miten suurelta pinta-alalta näyte on otettu (neliömetreissä) ja kuinka kauan näytteitä on imuroitu.

### YLÄPÖLYNÄYTTEIDEN KÄSITTELY

1. Kaikki lasitavara, jota käytetään, tulee olla happopestyä (huuhdeltu MilliQ-vedellä) ja kuumennettu 350 °C:ssa yön yli tai 10–12 h. Lusikat ja sihti tulee olla autoklavoituja. Näytteen homogenisointi tehdään esikäsitteilylaboratorion (h.2119) vetokaapissa ja punnitus huoneen analyysiväällä (Metler Toledo).
2. Näytteitä käsiteltäessä käytetään suojavaatteita: takkia, hihansuojuksia, myssyä, hengityssuojainta ja käsineitä. Lisäksi noudatetaan hometutkimuslaboratoriossa tapahtuvaa toimintaa ja suojautumista koskevaa ohjetta (YMIK TO2).
3. Näytteen homogenisointi: Yläpölynäyte (YP) siirretään sukasta suppilon ja spaattelin tms. avulla ohueen koe-putkeen johon on kiinnitetty näytetunnuksella sekä homogenisointipäivämäärällä varustettu tarralappu. Mattonäyte (MPOH) homogenisoidaan sihtaamalla se steriloidun sihdin läpi merkattuun kimax-putkeen. Kimax-putkeen asetetaan suppilo, jonka päälle asetetaan edelleen sihti. Pöly siirretään lusikan avulla sukasta sihtiin, jossa sitä "pyörätellään" siten, että pölyn hienoaines sihtautuu putkeen. Suppilon jäävä pöly rapsutetaan putkeen silmukkasauvan tms. avulla. Näytetunnus, näytetyyppi, homogenisointipäivä sekä nimikirjaimet merkitään kyseisen tutkimuksen tiedostoon.
4. Välineet (atulat, lusikat, suppilo jne.) vaihdetaan puhtaisiin ja vetokaappi puhdistetaan huolellisesti 70 % (t/t) etanolilla eri pölytyyppien käsittelyn välissä. Esikäsitteilyssä käytetyt tarvikkeet huuhdellaan runsaalla vedellä ja viedään välinehuoltoon pesua varten.
5. Näytteen vakiointi: Homogenisoinnin jälkeen putket viedään vakioitumaan vähintään kahdeksi vuorokaudeksi kylmähuoneeseen 2126 eksikaattoriin (putket auki). Huolehdi että eksikaattorissa oleva silikageeli on toimivaa. Tarvittaessa silikageeli kuivatetaan lämpökaapissa käyttökuuntoiseksi.
6. Näytteen pakastus: Kaikki näytteet pakastetaan niille varattuun laatikkoon pakkahuoneeseen (-20 °C).

## YLÄPÖLYNÄYTTEIDEN UUTTO

*Käytetään vain puhtaita lasiastioita, ei muovia!*

1. Laskeutuneen pölyn näytteet säilytetään ennen näytteenkäsittelyä -20°C. Näytteet tulevat näytteenkäsittelyyn koodattuna, tutkimukset tehdään sokkona. Anne Hyvärinen vastaa näytteiden koodauksesta (TOXT juokseva numerointi)
2. Pölyä punnitaan korkillisiin 50 ml lasiputkiin 0,5 g pölyä /putki. Punnitus suoritetaan THL:ssä YMIK:n vaakaa käytäen, tämän jälkeen näytteet siirretään putkissa MRH:n labraan UEF:n tiloihin.
3. Lisätään 25 ml etanolia / putki
4. Putket lämmitetään +50 C 10 min.
5. Putket laitetaan sonikaattoriin +20 C 30 min.
6. Saman näytteen erät yhdistetään isoon dekkaan.
7. Haihdutetaan pieneen n. 10 ml tilavuuteen +50°C lämpölevyllä vetokaapissa.
8. Pölysuspendio siirretään 15 ml lasiputkeen ja sentrifugoidaan 2000 rpm 20 min ilman jarrua.
9. Neste siirretään taarattuun pieneen dekkaan. Sakka jätetään putken pohjalle, pakastus -20 C.
10. Haihdutetaan loppuun + 50 C lämpölevyllä vetokaapissa.
11. Punnitaan (UEF vaaka)
12. Lisätään metanolia niin että pitoisuus 10 mg/ml, jaetaan eriin (1-2 ml).
13. Säilytys pimeässä -20°C, lähetetään jäissä TTL ja HY.

## LASKEUMAMALJANÄYTTEET

### LASKEUMAMALJANÄYTTEIDEN KERÄYS

1. Ennen yläpölynäytteen ottamista asetetaan kuusi sienimaljaa ja kuusi bakteerimaljaa huoneeseen, jossa on selkein ja pahin vaurio.
2. Merkitse sieni- ja bakteerimaljat kummatkin tarroilla 1A, 1B, 2A, 2B, 3A ja 3B ja kohdetunnuksella.
3. Mikäli asunnossa ei ole selkeää vauriohuonetta, asettakaa maljat olohuoneeseen.
4. Maljat asetetaan huoneeseen kolmeen eri kohtaan niin, että vierekkäin on aina kaksi sienimaljaa ja kaksi bakteerimaljaa. Maljat asetetaan hyllyjen ja pöytien päälle. Mikäli huoneessa on selkeä vauriokohta, pyri asettamaan yksi maljaerä (2 sieni- ja 2 bakteerimaljaa) vaurion lähetyville.
5. Kannet avataan ja kansi laitetaan maljan viereen alassuin.
6. Maljoja pidetään auki tasan tunti, minkä jälkeen maljat suljetaan leveällä maalarinteipillä niin, että maljan kannen ja pohjan väliin ei jää mitään rakoa.
7. Rekisteröintilomakkeeseen merkitään näytteenottokohdat, -aika- ja päivämäärä ja mahdollisen vauriokohdan sijainti.

### LASKEUMAMALJANÄYTTEIDEN KÄSITTELY

1. Kerätyt maljat viedään laboratorioon, vetokaappiin/inkubaatiokaappiin (sienimaljat sienikaappiin ja bakteerimaljat bakteerikaappiin) , annetaan kasvaa 5 viikkoa. Maljoja voi tuona aikana tarkastella kannen läpi, mutta teippiä ei saa raottaa eikä kantta avata.
2. Viiden viikon inkubaation jälkeen tehdään biomassan keräys. Sieni- ja bakteerimaljat käsitellään aina ominaan ja niitä vastaavat suspensiot merkitään MA ja TSA. A-maljat kerätään myös erillisinä ja merkitään tunnuksilla A1, A2, A3. B-maljat (eli B1, B2 ja B3) yhdistetään yhdeksi suspensioksi ja merkitään B1-3. Kaikkiin suspensioihin merkitään luonnollisesti kohdetunnus.
3. Biomassan keräys tehdään vetokaapissa/laminaarivirtauskaapissa: yksi malja avataan ( aloitetaan maljasta A1) ja käsitellään ennen seuraavan avaamista. Malja peitetään ensin etanolilla (Etax A, Altia, Rajamäki) ja annetaan olla 5 min etanolin peitossa. Biomassa kaavitaan maljalta puhtaaseen pieneen lasiseen dekanterilasiin/korkilliseen lasipurkkiin, jossa on jo valmiiksi etanolia ja joka on merkitty näytettä vastaavilla koodeilla. Kaapimiseen voi käyttää objektilasia ja apuna lasisauvaa (1 tai kolmio) tai toista objektilasia. Jos kasvusto on tiukasti kiinni agarissa, mukaan voi kaapia myös agaria. Kaikki biomassa irrotetaan objektilasista nestepinnan alla, jotta oma altistuminen minimoituu. Tarvittaessa lisätään etanolia. Kaiken biomassan pitää olla upoksissa etanoliin. Merkitse etanolin määrä ylös, koska nollahaihdutus tulee tehdä samasta määrästä etanolista. Kaavittu malja laitetaan paperiseen autoklaavipussiin.
4. Työvaiheen päättyessä pestään kädet vedellä ja saippualla.
5. Toistetaan sama maljoille A2, A3 ja B1-B3
6. Jäännösmaljat (= joista biomassa on kaavittu pois) suljetaan Biohazard autoklaavipussiin (paperipussi), suljetaan pussi niittaamalla ja toimitetaan autoklavoitavaksi.
7. Myös nollamaljat (jotka olleet mittauskohteessa avaamattomina) tarkastetaan, ja jos niillä on merkittävää kasvustoa, vastaavat näytemaljat hylätään.

TOXTEST vaihe 1

Näytteenotto ja -käsittelymenetelmät

### **LASKEUMAMALJANÄYTTEIDEN UUTTO**

*Käytetään vain puhtaita lasiastioita, ei muovia!*

1. Laskeumamaljoilta kerätty biomassa-etanolisuspensio säilytetään tiiviisti suljetuissa lasiastioissa -20°C. Näytteet tulevat näytteenkäsittelyyn koodattuna, tutkimukset tehdään sokkona. Anne Hyvärinen/Martin Taubel THL/YMIK vastaa näytteiden koodauksesta (TOXT juokseva numerointi)
2. Biomassa-etanolisuspensiota lämmitetään korkillisissa lasiastioissa lämpöblokillä +50°C 2 h. Aika lasketaan siitä hetkestä, kun lämpötila on uudestaan saavutettu näyteastioiden laitton jälkeen.
3. Suspensio siirretään 15 ml lasiputkiin fuugauksen ajaksi, astian reunoja huuhdellaan sisällöllä, lopuksi vielä 1-2 ml etanolilla. Tarvittaessa jaetaan usean putkeen. Putket sentrifugoidaan 2000 rpm (~700×g) 20 min ilman jarrua.
4. Kirkas neste siirretään taarattuun pieneen lasidekkaan. Mahdolliset saman näytteen eri erät yhdistetään yhteen astiaan, haihdutetaan kuiviin lämpöblokillä +50°C vetokaapissa (yön yli jätettäessä lämpötila +30°C).
5. Biomassa jätetään putken pohjalle, pakastus -20°C.
6. Kun deka on kuiva, lisätään etanolia noin 2-3 ml niin että dekan pohja ja vähän reunoja peittyy. Kuumennetaan +50°C lämpölevyllä, pyöritetään liuotinta lasipipetillä dekan reunoja pitkin jotta sisäseinämät puhdistuvat.
7. Kun deka on vihdoin kuiva, punnitaan se.
8. Lisätään metanolia niin että liuenneen aineen pitoisuus 10 mg/ml, jaetaan eriin (300-500 µl/ lasiampulli varustettuna kierretulpalla (teflontiiviste), korkit + parafilmit).
9. Dekka punnitaan vielä tyhjänä, katsotaan paljon ainesta on jäänyt dekkaan ja korjataan ilmoitettu pitoisuus.
10. Säilytys pimeässä -20°C, lähetetään jäissä TTL, TY ja HY.

## Siittiötestit, Mirja Salkinoja-Salonen

- Siittiötesti on toistettu kolme kertaa, kolmen eri karjun siittiöillä
- Liikettä on arvioitu 1 ja 3 vrk altistuksen jälkeen. Lisäksi on määritetty mitokondrion depolarisaatio ja plasma membraanin vaurioituminen.
- Saadut tulokset erottelivat näytteet toisistaan, mutta suuria eroja ei löytynyt ts. kovin toksisia näytteet eivät olleet.
- Toksisuusjärjestys näiden kokeiden perusteella TOXT1>TOXT2>TOXT4>TOXT3

## RAW-soluilla tehdyt kokeet, Piia Markkanen

- RAW264.7 soluilla tehdyt kokeet on toistettu kolme kertaa dublikaatteina käyttäen kolmea annosta ja 24 h aikapistettä
- Solutoksisuutta on mitattu kuudella eri menetelmällä ja tulehdusvastetta on määritetty kolmea parametria mittaamalla.
- Saadut tulokset erottelivat näytteet toisistaan selvästi. Eri menetelmillä saadut tulokset korreloivat hyvin keskenään sekä myös Mirjan ryhmän tulosten kanssa.
- Toksisuusjärjestys näiden kokeiden perusteella oli sama kuin Mirjan ryhmälläkin eli TOXT1>TOXT2>TOXT4>TOXT3

## Näytteiden keräys ja kohdetiedot, Anne Hyvärinen

- Näytekoodi purettiin ja selvisi että vauriokohteita olivat TOXT3 sekä TOXT4 ja terveitä taloja ns. vertailukohteita olivat TOXT1 sekä TOXT2. Näin ollen terveistä kohteista otetut näytteet antoivat suuremman toksisen vasteen kuin mitä vauriokohteet.

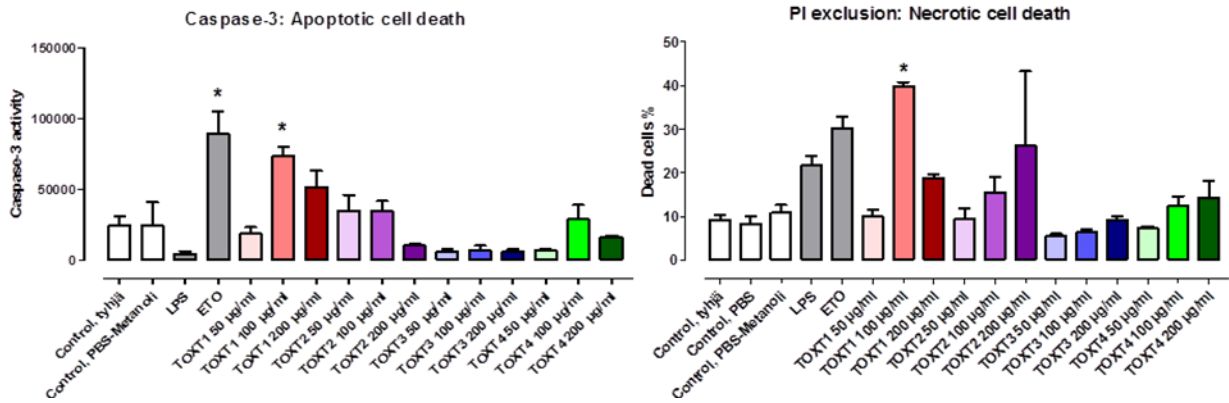
## ToxTest siittiöillä

Helsingin Yliopisto, Maria Andersson, Raimo Mikkola & Mirja Salkinoja-Salonen 20110201

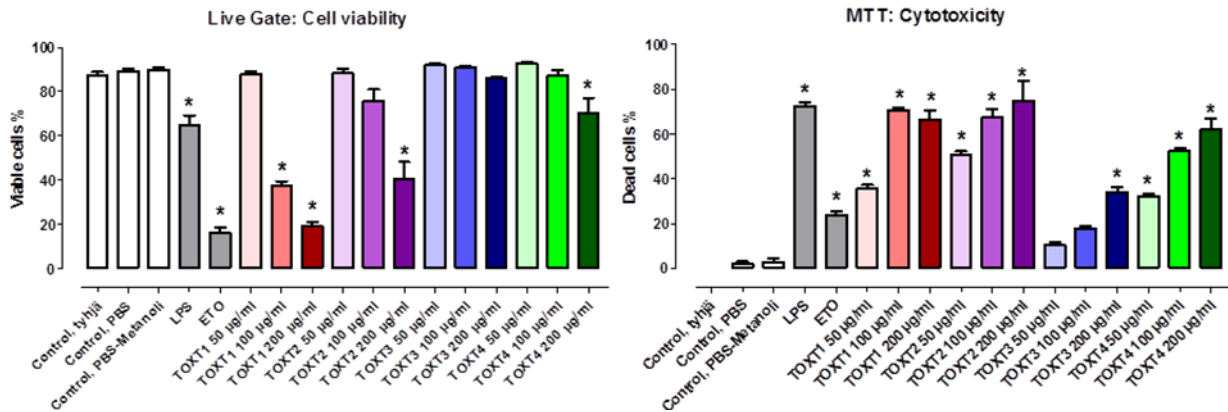
	EC50 ug/ml			
	Sperm motility inhibition		Depolarisation of mitokondria	Damage to plasma membrane
	1d	3 d		
Dust				
1	50	25	25	100-50
2	50	25	25	100
3	>100	100	>100	>100
4	100	100-50	100	>100
triclosan	2.5	1	1	5



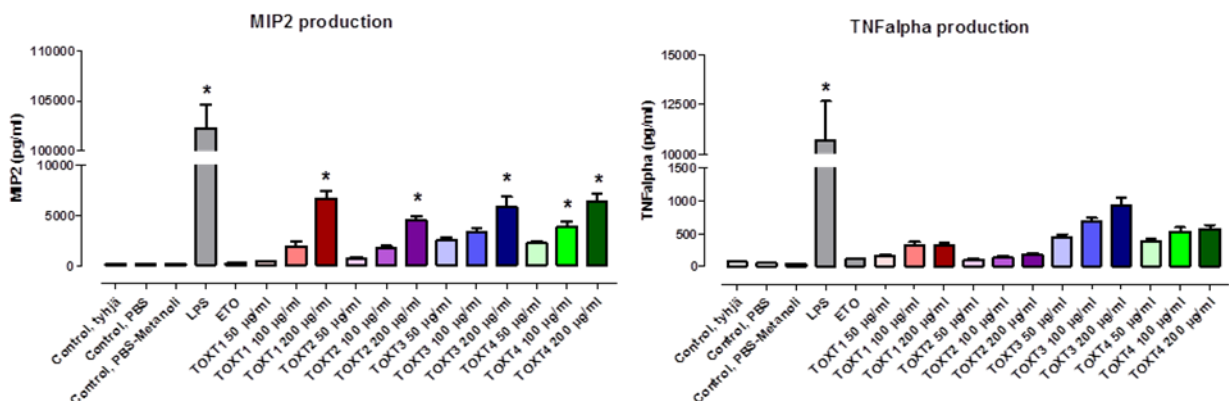
## Solutoksisuus: RAW264.7



## Solutoksisuus: RAW264.7



## Tulehdus: RAW264.7



Taulukko 1. Koetut oireet päivittäin, viikoittain ja harvemmin viimeisten 12 kuukauden aikana

Oire	Haitan tiheys	Vaurio, N=10 n (%)	Vertailu, N=12 n (%)	p-arvo
Nenän tukkoisuus	Päivittäin	4 (40,0)	0 (0,0)	0,08 <b>(0,05)</b>
	Viikoittain	1 (10,0)	3 (25,0)	
	Harvemmin	5 (50,0)	9 (75,0)	
Nuha	Päivittäin	3 (30,0)	0 (0,0)	0,27
	Viikoittain	1 (10,0)	2 (18,2)	
	Harvemmin	6 (60,0)	9 (81,8)	
Kuiva tai kipeä kurkku	Päivittäin	2 (22,2)	0 (0,0)	0,42
	Viikoittain	1 (11,1)	1 (9,1)	
	Harvemmin	6 (66,7)	10 (90,9)	
Äänen käheys	Päivittäin	2 (20,0)	0 (0,0)	0,48
	Viikoittain	1 (10,0)	2 (18,2)	
	Harvemmin	7 (70,0)	9 (81,8)	
Nenäverenvuoto	Päivittäin	0	0	0,48
	Viikoittain	1 (10,0)	0	
	Harvemmin	9 (90,0)	11 (100,0)	
Kuiva yskä	Päivittäin	2 (22,2)	1 (9,1)	0,28
	Viikoittain	3 (33,3)	1 (9,1)	
	Harvemmin	4 (44,4)	9 (81,8)	
Limainen yskä	Päivittäin	3 (30,0)	0	<b>0,035</b>
	Viikoittain	1 (10,0)	0	
	Harvemmin	6 (60,0)	11 (100,0)	
Vinkuva yskä	Päivittäin	1 (10,0)	0	0,09
	Viikoittain	2 (20,0)	0	
	Harvemmin	7 (70,0)	11 (100,0)	
Yöyskä	Päivittäin	2 (22,2)	1 (9,1)	0,28
	Viikoittain	3 (33,3)	1 (9,1)	
	Harvemmin	4 (44,4)	9 (81,8)	
Hengenahdistus	Päivittäin	2 (20,0)	0	<b>0,035</b>
	Viikoittain	2 (20,0)	0	
	Harvemmin	6 (60,0)	11 (100,0)	
Hengityksen vinkuna	Päivittäin	2 (20,0)	0	<b>0,035</b>
	Viikoittain	2 (20,0)	0	
	Harvemmin	6 (60,0)	11 (100,0)	
Silmäoireet	Päivittäin	2 (20,0)	0	0,21
	Viikoittain	0	0	
	Harvemmin	8 (80,0)	11 (100,0)	
Kuume yli 37,5	Päivittäin	0	0	
	Viikoittain	0	0	
	Harvemmin	9 (100,0)	11 (100,0)	

Fisher's Exact test (Pearson Chi-square)

Taulukko 1 jatkuu. Koetut oireet päivittäin, viikoittain ja harvemmin viimeisten 12 kuukauden aikana

Oire	Haitan tiheys	Vaurio, N=10 n (%)	Vertailu, N=12 n (%)	p-arvo
Virtsatievaivoja	<i>Päivittäin</i>	0	0	
	<i>Viikoittain</i>	0	0	
	<i>Harvemmin</i>	9 (100,0)	11 (100,0)	
Lihaskipu	<i>Päivittäin</i>	1 (11,1)	0	0,45
	<i>Viikoittain</i>	0	0	
	<i>Harvemmin</i>	8 (88,9)	11 (100,0)	
Nivelkipu / -turvotusta	<i>Päivittäin</i>	2 (20,0)	0	0,09
	<i>Viikoittain</i>	1 (10,0)	0	
	<i>Harvemmin</i>	7 (70,0)	11 (100,0)	
Selkäkipu	<i>Päivittäin</i>	0	0	1,00
	<i>Viikoittain</i>	2 (20,0)	2 (20,0)	
	<i>Harvemmin</i>	8 (80,0)	8 (80,0)	
Vatsaoireita	<i>Päivittäin</i>	0	0	0,21
	<i>Viikoittain</i>	2 (20,0)	0	
	<i>Harvemmin</i>	8 (80,0)	11 (100,0)	
Iho-oireita	<i>Päivittäin</i>	0	1 (10,0)	1,00
	<i>Viikoittain</i>	1 (10,0)	1 (10,0)	
	<i>Harvemmin</i>	9 (90,0)	8 (80,0)	
Väsymystä	<i>Päivittäin</i>	2 (20,0)	1 (9,1)	0,84
	<i>Viikoittain</i>	3 (30,0)	3 (27,3)	
	<i>Harvemmin</i>	5 (50,0)	7 (63,6)	
Päänsärkyä	<i>Päivittäin</i>	0	0	0,035
	<i>Viikoittain</i>	4 (40,0)	0	
	<i>Harvemmin</i>	6 (60,0)	11 (100,0)	
Keskittymisvai- keuksia	<i>Päivittäin</i>	0	0	1,00
	<i>Viikoittain</i>	2 (20,0)	2 (18,2)	
	<i>Harvemmin</i>	8 (80,0)	9 (81,8)	
Univaikeuksia	<i>Päivittäin</i>	1 (10,0)	0	0,035
	<i>Viikoittain</i>	3 (30,0)	0	
	<i>Harvemmin</i>	6 (60,0)	11 (100,0)	

Fisher's Exact test (Pearson Chi-Square)

<i>Taulukko 2. Koetut oireet päivittäin, viikoittain ja harvemmin viimeisten 3 kuukauden aikana</i>				
<b>Oire</b>	<b>Haitan tiheys</b>	<b>Vaurio, N=10 n (%)</b>	<b>Vertailu, N=12 n (%)</b>	<b>p-arvo</b>
Nenän tukkoisuus	<i>Päivittäin</i>	4 (40,0)	0	<b>0,044</b>
	<i>Viikoittain</i>	1 (10,0)	1 (9,1)	
	<i>Harvemmin</i>	5 (50,0)	10 (90,9)	
Nuha	<i>Päivittäin</i>	3 (30,0)	0	0,15
	<i>Viikoittain</i>	1 (10,0)	1 (9,1)	
	<i>Harvemmin</i>	6 (60,0)	10 (90,9)	
Kuiva tai kipeä kurkku	<i>Päivittäin</i>	1 (11,1)	0	0,36
	<i>Viikoittain</i>	2 (22,2)	1 (9,1)	
	<i>Harvemmin</i>	6 (66,7)	10 (90,9)	
Äänen käheys	<i>Päivittäin</i>	2 (20,0)	0	0,45
	<i>Viikoittain</i>	1 (10,0)	1 (9,1)	
	<i>Harvemmin</i>	7 (70,0)	10 (90,9)	
Nenäverenvuoto	<i>Päivittäin</i>	0	0	0,48
	<i>Viikoittain</i>	1 (10,0)	0	
	<i>Harvemmin</i>	9 (90,0)	11 (100,0)	
Kuiva yskä	<i>Päivittäin</i>	2 (20,0)	0	0,41
	<i>Viikoittain</i>	2 (20,0)	2 (18,2)	
	<i>Harvemmin</i>	6 (60,0)	9 (81,8)	
Limainen yskä	<i>Päivittäin</i>	1 (10,0)	0	<b>0,035</b>
	<i>Viikoittain</i>	3 (30,0)	0	
	<i>Harvemmin</i>	6 (60,0)	11 (100,0)	
Vinkuva yskä	<i>Päivittäin</i>	1 (11,1)	0	0,19
	<i>Viikoittain</i>	1 (11,1)	0	
	<i>Harvemmin</i>	7 (77,8)	11 (100,0)	
Yöyskä	<i>Päivittäin</i>	2 (22,2)	1 (9,1)	0,28
	<i>Viikoittain</i>	3 (33,3)	1 (9,1)	
	<i>Harvemmin</i>	4 (44,4)	9 (81,8)	
Hengenahdistus	<i>Päivittäin</i>	3 (30,0)	0	<b>0,035</b>
	<i>Viikoittain</i>	1 (10,0)	0	
	<i>Harvemmin</i>	6 (60,0)	11 (100,0)	
Hengityksen vinkuna	<i>Päivittäin</i>	1 (10,0)	0	<b>0,035</b>
	<i>Viikoittain</i>	3 (30,0)	0	
	<i>Harvemmin</i>	6 (60,0)	11 (100,0)	
Silmäoireet	<i>Päivittäin</i>	2 (20,0)	0	0,21
	<i>Viikoittain</i>	0	0	
	<i>Harvemmin</i>	8 (80,0)	11 (100,0)	
Kuume yli 37,5	<i>Päivittäin</i>	0	0	
	<i>Viikoittain</i>	0	0	
	<i>Harvemmin</i>	9 (100,0)	11 (100,0)	

*Fisher's Exact test (Pearson Chi-Square)*

Taulukko 2 jatkuu. Koetut oireet päivittäin, viikoittain ja harvemmin viimeisten 3 kuukauden aikana

Oire	Haitan tiheys	Vaurio, N=10 n (%)	Vertailu, N=12 n (%)	p-arvo
Virtsatievaivoja	Päivittäin	0	0	
	Viikoittain	0	0	
	Harvemmin	9 (100,0)	11 (100,0)	
Lihaskipu	Päivittäin	0	0	0,19
	Viikoittain	2 (22,2)	0	
	Harvemmin	7 (77,8)	11 (100,0)	
Nivelkipu / -turvotusta	Päivittäin	2 (20,0)	0	0,09
	Viikoittain	1 (10,0)	0	
	Harvemmin	7 (70,0)	11 (100,0)	
Selkäkipu	Päivittäin	0	0	1,00
	Viikoittain	2 (22,2)	2 (18,2)	
	Harvemmin	7 (77,8)	9 (81,8)	
Vatsaoireita	Päivittäin	1 (12,5)	0	0,16
	Viikoittain	1 (12,5)	0	
	Harvemmin	6 (75,0)	11 (100,0)	
Iho-oireita	Päivittäin	0	1 (9,1)	0,77
	Viikoittain	2 (22,2)	1 (9,1)	
	Harvemmin	7 (77,8)	9 (81,8)	
Väsymystä	Päivittäin	2 (20,0)	1 (9,1)	0,84
	Viikoittain	3 (30,0)	3 (27,3)	
	Harvemmin	5 (50,0)	7 (63,3)	
Päänsärkyä	Päivittäin	1 (10,0)	0	0,18
	Viikoittain	3 (30,0)	1 (9,1)	
	Harvemmin	6 (60,0)	10 (90,9)	
Keskittymisvai- keuksia	Päivittäin	0	0	1,00
	Viikoittain	2 (20,0)	2 (18,2)	
	Harvemmin	8 (80,0)	9 (81,8)	
Univaikeuksia	Päivittäin	0	0	0,07 <b>(0,038)</b>
	Viikoittain	3 (33,3)	0	
	Harvemmin	6 (66,7)	11 (100,0)	

Fisher's Exact test (Pearson Chi-Square)

Taulukko 5. Koettu terveydentila

Terveydentila	Vaurio, N=10 n (%)	Vertailu, N=12 n (%)	p-arvo
Erinomainen	0	6 (50,0)	<b>0,019</b>
Hyvä	6 (60,0)	5 (41,7)	
Tyydyttävä	2 (20,0)	1 (8,3)	
Huono	2 (20,0)	0	

Fisher's Exact test

## YLÄPÖLYNÄYTTEET

### YLÄPÖLYNÄYTTEIDEN OTTO

1. Pölynäytteenottoa varten minigrip-pussissa on näytteenkeräys-sukka ja pussinsulkija sekä muovipussi pölypussille. Pidä pussit kiinni ennen keräystä ja koskettakaa näytesukkia mahdollisimman vähän. Lisäksi mukana on kuvasarja näytteenotosta ja rekisteröintilomake pölynkeräystä varten.
2. Yläpölynäytettä on tarkoitus imuroida yhteensä n. 700 mg. Tämä tarkoittaa esimerkiksi kolme sukkaa noin puolillaan.
3. Laittakaa näytteenotto-sukka imurinne putken sisään ja teipatkaa se kiinni.
4. Näyte tulee imuroida kovilta vaakapinnoilta, joille pölyä on laskeutunut. Näytettä voidaan imuroida esimerkiksi ovien ja ikkunoiden listojen päältä, kirjahyllyn yms. hyllyjen/tasojen päältä, taulujen raameista jne- .
5. Eritelkää rekisteröintilomakkeeseen, mistä kaikkialta näyte on imuroitu, miten suurelta pinta-alalta näyte on otettu (neliömetreissä) ja kuinka kauan näytteitä on imuroitu.

### YLÄPÖLYNÄYTTEIDEN KÄSITTELY

1. Kaikki lasitavara, jota käytetään, tulee olla happopestyä (huuhdeltu MilliQ-vedellä) ja kuumennettu 350 °C:ssa yön yli tai 10–12 h. Lusikat ja sihti tulee olla autoklavoituja. Näytteen homogenisointi tehdään esikäsitteilylaboratorion (h.2119) vetokaapissa ja punnitus huoneen analyysiväällä (Metler Toledo).
2. Näytteitä käsiteltäessä käytetään suojavaatteita: takkia, hihansuojuksia, myssyä, hengitysuojainta ja käsineitä. Lisäksi noudatetaan hometutkimuslaboratoriossa tapahtuvaa toimintaa ja suojautumista koskevaa ohjetta (YMIK TO2).
3. Näytteen homogenisointi: Yläpölynäyte (YP) siirretään sukasta suppilon ja spaattelin tms. avulla ohueen koe-putkeen johon on kiinnitetty näytetunnuksella sekä homogenisointipäivämäärällä varustettu tarralappu. Mattonäyte (MPOH) homogenisoidaan sihtaamalla se steriloidun sihdin läpi merkattuun kimax-putkeen. Kimax-putkeen asetetaan suppilo, jonka päälle asetetaan edelleen sihti. Pöly siirretään lusikan avulla sukasta sihtiin, jossa sitä "pyöritellään" siten, että pölyn hienoaines sihtautuu putkeen. Suppilon jäävä pöly rapsutetaan putkeen silmukkasauvan tms. avulla. Näytetunnus, näytetyyppi, homogenisointipäivä sekä nimikirjaimet merkitään kyseisen tutkimuksen tiedostoon.
4. Välineet (atulat, lusikat, suppilo jne.) vaihdetaan puhtaisiin ja vetokaappi puhdistetaan huolellisesti 70 % (t/t) etanolilla eri pölytyyppien käsittelyn välissä. Esikäsitteilyssä käytetyt tarvikkeet huuhdellaan runsaalla vedellä ja viedään välinehuoltoon pesua varten.
5. Näytteen vakiointi: Homogenisoinnin jälkeen putket viedään vakioitumaan vähintään kahdeksi vuorokaudeksi kylmähuoneeseen 2126 eksikaattoriin (putket auki). Huolehdi että eksikaattorissa oleva silikageeli on toimivaa. Tarvittaessa silikageeli kuivatetaan lämpökaapissa käyttökuuntoiseksi.
6. Näytteen punnitus ja tuloksen tallentaminen: Vakioinnin jälkeen yläpölyt (YP) jaetaan osiin DNA-eristystä, ergosteroli-, MuAc-, tox- ja TOXICITY-määrityksiä varten. DNA-eristystä varten punnitaan n. 20 mg pölyä lasihelmiputkeen. Muac- ja ergo-määrityksiä varten punnitaan n. 7

## TOXTEST vaihe 2

### Näytteenotto ja -käsittelymenetelmät

mg kahteen kimax-putkeen ja toksiinianalyysia varten n. 25 mg erilliseen gerstel-putkeen. Loppupöly punnitaan kimax-putkeen toksisuusanalyysia varten.

7. Tarkat punnitustulokset merkitään lokiin "sample register", joka löytyy täältä: N:\YMIK\prjects\ TOXTEST\ loki. Putket merkitään näytetunnuksella (TOXTESTxxx), pölytyypillä (YP), osa-anayysilla (DNA, Muac, Ergo, Tox tai TOXICITY) sekä näytteenkäsittelyn päivämäärällä ja nimikirjaimilla.
8. Jos pölyä ei riitä kaikkiin analyysihin on ensisijalla toksiininäyte, joka punnitaan aluksi. Sen jälkeen punnitaan DNA-eristykseen menevä näyte ja loppupöly punnitaan toksisuusanalyysia varten.
9. Näytteen pakastus: Kaikki näytteet pakastetaan niille varattuun laatikkoon pakkahuoneeseen (-20 °C).

### YLÄPÖLYNÄYTTEIDEN UUTTO

*Käytetään vain puhtaita lasiastioita, ei muovia!*

1. Laskeutuneen pölyn näytteet säilytetään tiiviisti suljetuissa lasiastioissa ennen näytteenkäsittelyä -20°C. Näytteet tulevat näytteenkäsittelyyn koodattuna, tutkimukset tehdään sokkona. Anne Hyvärinen/Martin Taubel THL/YMIK vastaa näytteiden koodauksesta (TOXT juokseva numerointi)
2. Pölyä punnitaan korkillisiin lasiastioihin (n. 1 g /astia), tarkka määrä kirjataan ylös.
3. Pölyjen päälle annostellaan metanolia niin paljon että kaikki näyte peittyy, (noin kaksinkertainen volyyymi pölyn volyyymiin verrattuna, määrä kirjataan). Sekoitellaan heiluttamalla tai lasisauvalla.
4. Näytteet lämmitetään korkillisissa lasiastioissa lämpöbloilla +50°C 1 h. Aika lasketaan siitä hetkestä, kun lämpötila on uudestaan saavutettu näyteastioiden laiton jälkeen. Näytteet jätetään yön yli huoneenlämpöön vetokaappiin (korkit kiinni).
5. Etanoli-pöly suspensio siirretään 15 ml lasiputkiin fuugauksen ajaksi, astian reunoja huuhdellaan sisällöllä, lopuksi vielä 1-2 ml metanolilla. Tarvittaessa jaetaan usean putkeen. Putket sentrifugoidaan 2000 rpm (~700×g) 20 min ilman jarrua.
6. Kirkas neste siirretään taarattuun lasidekkaan. Mahdolliset saman näytteen eri erät yhdistetään yhteen astiaan, haihdutetaan kuiviin lämpöbloilla +50°C vetokaapissa.
7. Sakka jätetään lasiputken pohjalle, pakastus -20°C.
8. Kun deka on kuiva, lisätään metanolia noin 2-3 ml niin että dekan pohja ja vähän reunoja peittyy. Kuumennetaan +50°C lämpölevyllä, pyöritetään liuotinta lasipipetillä dekan reunoja pitkin jotta sisäseinämät puhdistuvat.
9. Kun deka on vihdoin kuiva, punnitaan se.
10. Lisätään metanolia niin että liuenneen aineen pitoisuus 10 mg/ml, jaetaan eriin (300 µl/ lasiampulli varustettuna kierretulpalla (teflonttiiviste), korkit + parafilmit).
11. Dekka punnitaan vielä tyhjänä, katsotaan paljon ainesta on jäänyt dekkaan ja korjataan ilmoitettu pitoisuus.
12. Säilytys pimeässä -20°C, lähetetään jäissä TTL, TY ja HY.

## LASKEUMAMALJANÄYTTEET

### LASKEUMAMALJANÄYTTEIDEN KERÄYS

1. Ennen yläpölynäytteen ottamista asetetaan kuusi sienimaljaa ja kuusi bakteerimaljaa huoneeseen, jossa on selkein ja pahin vaurio.
2. Merkitse sieni- ja bakteerimaljat kummatkin tarroilla 1A, 1B, 2A, 2B, 3A ja 3B ja kohdetunnuksella.
3. Mikäli asunnossa ei ole selkeää vauriohuonetta, asettakaa maljat olohuoneeseen.
4. Maljat asetetaan huoneeseen kolmeen eri kohtaan niin, että vierekkäin on aina kaksi sienimaljaa ja kaksi bakteerimaljaa. Maljat asetetaan hyllyjen ja pöytien päälle. Mikäli huoneessa on selkeä vauriokohta, pyri asettamaan yksi maljaerä (2 sieni- ja 2 bakteerimaljaa) vaurion lähetyville.
5. Kannet avataan ja kansi laitetaan maljan viereen alassuin.
6. Maljoja pidetään auki tasan tunti, minkä jälkeen maljat suljetaan leveällä maalarinteipillä niin, että maljan kannen ja pohjan väliin ei jää mitään rakoa.
7. Rekisteröintilomakkeeseen merkitään näytteenottokohdat, -aika- ja päivämäärä ja mahdollisen vauriokohdan sijainti.

### LASKEUMAMALJANÄYTTEIDEN KÄSITTELY

1. Kerätyt maljat viedään laboratorioon, vetokaappiin/inkubaatiokaappiin (sienimaljat sienikaappiin ja bakteerimaljat bakteerikaappiin) , annetaan kasvaa 5 viikkoa. Maljoja voi tuona aikana tarkastella kannen läpi, mutta teippiä ei saa raottaa eikä kantta avata.
2. Viiden viikon inkubaation jälkeen tehdään biomassan keräys. Sieni- ja bakteerimaljat käsitellään aina ominaan ja niitä vastaavat suspensiot merkitään MA ja TSA. A-maljat kerätään myös erillisinä ja merkitään tunnuksilla A1, A2, A3. B-maljat (eli B1, B2 ja B3) yhdistetään yhdeksi suspensioksi ja merkitään B1-3. Kaikkiin suspensioihin merkitään luonnollisesti kohdetunnus.
3. Biomassan keräys tehdään vetokaapissa/laminaarivirtauskaapissa: yksi malja avataan ( aloitetaan maljasta A1) ja käsitellään ennen seuraavan avaamista. Malja peitetään ensin etanolilla (Etax A, Altia, Rajamäki) ja annetaan olla 5 min etanolin peitossa. Biomassa kaavitaan maljalta puhtaaseen pieneen lasiseen dekanterilasiin/korkeisiin lasipurkkiin, jossa on jo valmiiksi etanolia ja joka on merkitty näytettä vastaavilla koodeilla. Kaapimiseen voi käyttää objektilasia ja apuna lasisauvaa (1 tai kolmio) tai toista objektilasia. Jos kasvusto on tiukasti kiinni agarissa, mukaan voi kaapia myös agaria. Kaikki biomassa irrotetaan objektilasista nestepinnan alla, jotta oma altistuminen minimoituu. Tarvittaessa lisätään etanolia. Kaiken biomassan pitää olla upoksissa etanoliin. Merkitse etanolin määrä ylös, koska nollahaihdutus tulee tehdä samasta määrästä etanolista. Kaavittu malja laitetaan paperiseen autoklaavipussiin.
4. Työvaiheen päättyessä pestään kädet vedellä ja saippualla.
5. Toistetaan sama maljoille A2, A3 ja B1-B3
6. Jäännösmaljat (= joista biomassa on kaavittu pois) suljetaan Biohazard autoklaavipussiin (paperipussi), suljetaan pussi niittaamalla ja toimitetaan autoklavoitavaksi.
7. Myös nollamaljat (jotka olleet mittauskohteessa avaamattomina) tarkastetaan, ja jos niillä on merkittävää kasvustoa, vastaavat näytemaljat hylätään.



### LASKEUMAMALJANÄYTTEIDEN UUTTO

*Käytetään vain puhtaita lasiastioita, ei muovia!*

1. Laskeumamaljoilta kerätty biomassa-etanolisuspensio säilytetään tiiviisti suljetuissa lasiastioissa -20°C. Näytteet tulevat näytteenkäsittelyyn koodattuna, tutkimukset tehdään sokkona. Anne Hyvärinen/Martin Taubel THL/YMIK vastaa näytteiden koodauksesta (TOXT juokseva numerointi)
2. Biomassa-etanolisuspensiota lämmitetään korkillisissa lasiastioissa lämpöblokillä +50°C 2 h. Aika lasketaan siitä hetkestä, kun lämpötila on uudestaan saavutettu näyteastioiden laitton jälkeen.
3. Suspensio siirretään 15 ml lasiputkiin fuugauksen ajaksi, astian reunoja huuhdellaan sisällöllä, lopuksi vielä 1-2 ml etanolilla. Tarvittaessa jaetaan usean putkeen. Putket sentrifugoidaan 2000 rpm (~700×g) 20 min ilman jarrua.
4. Kirkas neste siirretään taarattuun pieneen lasidekkaan. Mahdolliset saman näytteen eri erät yhdistetään yhteen astiaan, haihdutetaan kuiviin lämpöblokillä +50°C vetokaapissa (yön yli jätettäessä lämpötila +30°C).
5. Biomassa jätetään putken pohjalle, pakastus -20°C.
6. Kun deka on kuiva, lisätään etanolia noin 2-3 ml niin että dekan pohja ja vähän reunoja peittyy. Kuumennetaan +50°C lämpölevyllä, pyöritetään liuotinta lasipipetillä dekan reunoja pitkin jotta sisäseinämät puhdistuvat.
7. Kun deka on vihdoin kuiva, punnitaan se.
8. Lisätään metanolia niin että liuenneen aineen pitoisuus 10 mg/ml, jaetaan eriin (300-500 µl/ lasiampulli varustettuna kierretulpalla (teflontiiviste), korkit + parafilmit).
9. Dekka punnitaan vielä tyhjänä, katsotaan paljon ainesta on jäänyt dekkaan ja korjataan ilmoitettu pitoisuus.
10. Säilytys pimeässä -20°C, lähetetään jäissä TTL, TY ja HY.

# Vertailua: yläpöly vs. maljat

YLÄPÖLYNÄYTTEET		1v	1c	2v	2c	3v	3c	4v	4c
	Analysoidut näytteet	YP 6	YP 8	YP 13	YP 12	YP 11	YP 5	YP 7	YP 9
THL	8		X	X				X	X
Turku	7	X	-	x		X		X	X
HY	8		X			X		X	X
TTL	8					X	X	X	X

x = Toksinen vaste

v = Vauriokohteet  
punaisella pohjalla

c = Kontrollikohteet  
sinisellä pohjalla

LASKEUMAMALJAT		1v	1c	2v	2c	3v	3c	4v	4c
	Analysoidut näytteet	M 15	M 17	M 21	M 20	M 19	M 14	M 16	M 18
THL	47	X			X		X		X
Turku	58	X				X	X		X
HY	41	X			X	X	X		
TTL	14			X	X	X			X

# Yläpölynäytteet: toksikologia vs. mikrobiologia

YLÄPÖLYNÄYTTEET		1v	1c	2v	2c	3v	3c	4v	4c
	Analysoidut näytteet	YP 6	YP 8	YP 13	YP 12	YP 11	YP 5	YP 7	YP 9
THL	8		X	X				X	X
Turku	7	X	-	x		X		X	X
HY	8		X			X		X	X
TTL	8					X	X	X	X
Toxins, SUM		188	202	38	49	28	1	50	329
Toxins, NO		3	1	4	4	4	1	4	5
Microbes, SUM		1453	262	919	1625	8871	666	1967	2444
Microbes, indicators				X		X			X

v = Vaurikohteet punaisella pohjalla

c = Kontrollikohteet sinisellä pohjalla

# Yläpölynäytteiden mikrobiologia

	Toksiinit SUM	Toksiinit NO	Yleisimmät toksiinit	Mikrobit SUM	Yleisimmät mikrobit
<b>1v</b>	188	3	Chloramphenicol Beauvericin Enn B	1453	PenAsp Myko Eamst
<b>1c</b>	202	1	Chloramphenicol	262	Myko Strep PenAsp
<b>2v</b>	38	4	Emodin Enn B1 Alteranariolmethylether	919	Eamst PenAsp Tviri
<b>2c</b>	49	4	Chloramphenicol Mehtylsulochrin Alteranariolmethylether	1625	PenAsp Myko Strep
<b>3v</b>	28	4	Chloramphenicol Sterigmatocystine Enn B	8871	Tviri PenAsp Myko
<b>3c</b>	1	1	Enn B	666	Myko PenAsp Eamps
<b>4v</b>	50	4	Emodin Chloramphenicol Beauvericin	1967	PenAsp Myko Strep
<b>4c</b>	329	5	Andrastin A Chloramphenicol Enn B1	2444	PenAsp Eamst Myko

# Vertailua: tulosten korrelaatio

YP	Analysoidut näytteet (max. 8)	Toksisimmat	Vähemmän toksiset
THL	8	1c, <b>2v</b> , <b>4v</b> , 4c,	<b>1v</b> , 2c, <b>3v</b> , 3c
Turku	7	<b>1v</b> , <b>3v</b> , <b>4v</b> , 4c	<b>2v</b> , 2c, 3c
HY	8	1c, <b>3v</b> , <b>4v</b> , 4c,	<b>1v</b> , <b>2v</b> , 2c, 3c
TTL	8	<b>3v</b> , 3c, <b>4v</b> , 4c,	<b>1v</b> , 1c, <b>2v</b> , 2c

M	Analysoidut maljat (max. 58)	Toksisimmat	Vähemmän toksiset
THL	47	<b>1v</b> , 2c, 3c, 4c	1c, <b>2v</b> , <b>3v</b> , <b>4v</b>
Turku	58	<b>1v</b> , <b>3v</b> , 3c, 4c	1c, <b>2v</b> , 2c, <b>4v</b>
HY	41	<b>1v</b> , 2c, <b>3v</b> , 3c	1c, <b>2v</b> , <b>4v</b> , 4c
TTL	14	<b>2v</b> , 2c, <b>3v</b> , 4c	<b>1v</b> , 1c, 3v, <b>4v</b>

Vauriokohteet merkattu punaisella

# Vertailua: muut tiedot

	THL PI tuorevärjäys	THL Solusykli	HY Siittiötesti	HY Munuais- solutoksisuus	Turku <i>E. coli</i>	TTL IL-1 $\beta$ tulehdus
Hinta/näyte €	800	900	60	104 (6 näytteen erä)	100	265
Aika/näyte	4 pvä	5 pvä	1-2 pvä	5 pvä	1-2 pvä	5 pvä
Monta samanaikaisesti	14	14	4	6	90	16
Tarvittava näytemäärä ul	200	200	50	?	10-50	200

# TOXTEST – keskeiset tulokset

		Tulos
1	<ul style="list-style-type: none"><li>• Näytteiden säilytys</li><li>• Säilytysmateriaali</li><li>• Näytteenkäsittely</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Voi vaikuttaa tuloksiin</li><li>• Voi vaikuttaa tuloksiin</li><li>• Toimiva protokolla</li></ul>
2	<ul style="list-style-type: none"><li>• Toksisuus-metodit</li><li>• Tulehdus-metodit</li><li>• Toksisuus vs. Tulehdus</li><li>• Yläpölynäytteet</li> <li>• Laskeumamaljanäytteet</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hyvä korrelaation THL, HY ja Turku</li><li>• Hyvä korrelaation THL, TTL</li><li>• Toksisuus erottelee selvemmin kohteet</li><li>• Ei kuvaa kohteen tilannetta hyvin<ul style="list-style-type: none"><li>→ pölyn historia, puhdistusaineet, pintamateriaalit</li></ul></li><li>• Ei kuvaa kohteen tilannetta luotettavasti<ul style="list-style-type: none"><li>→ vaihtelu suurta maljojen välillä, kasvatus</li></ul></li></ul>
3	<ul style="list-style-type: none"><li>• Näytteenkeräysmenetelmä</li><li>• Toksikologiset metodit</li><li>• Kohteiden valinta</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mikä kuvaa hyvin kohteen tilannetta?</li><li>• 1-2 testiä, toteutettu kahdessa laboratoriossa?</li><li>• Koulut vs. kodit?</li></ul>

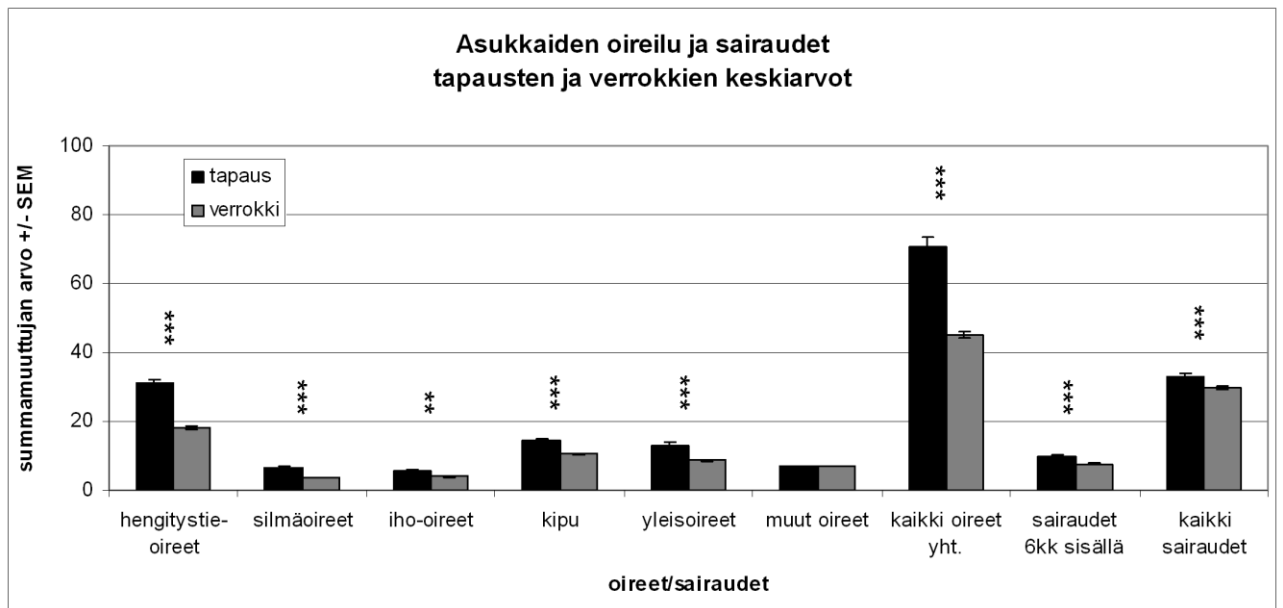
TOXTEST vaihe 3, tutkimus 1: Puhdasviljelmät  
Tulokset

Sisäilmaongelmakohteesta eristettyjen mikrobien (*Penicillium expansum*, *Paecilomyces variotii*, *Aspergillus versicolor*, *Trichoderma atroviride*, *Aspergillus westdijikiae*) puhdasviljelmistä tehtyjen uutosten sekä vertailukannasta (*Trichoderma longibrachiatum*) tehdyn uutoksen aiheuttamat vasteet eri toksisuusanalyysissä. Taulukossa on ilmoitettu joko EC<sub>50</sub> -arvo (sian siittiöt, munuaissolut, *E. coli*) tai alin selvästi kontrollitasosta poikkeavan vasteen aiheuttanut annos (hiiren makrofagit, ihmisen monosyytit). Toksiset uutokset on merkitty oranssilla ja selvästi toksiset punaisella värillä.

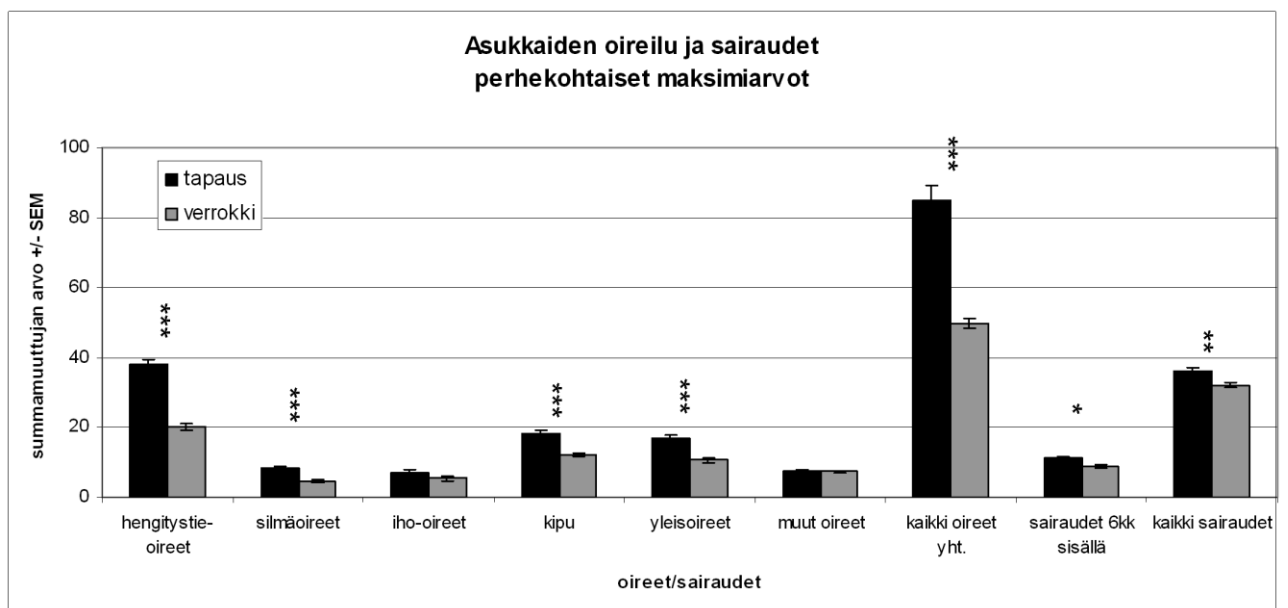
Hiiren makrofagit	Aika-piste	<i>Penicillium expansum</i> se 1	<i>Paecilomyces variotii</i> Paec 2	<i>Aspergillus versicolor</i> 3/sl	<i>Trichoderma atroviride</i> 1/226	<i>Aspergillus westdijikiae</i> pp2	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> DSM768
PI-värjäys	24 h	6	12	25	37	37	>100
MTT-testi	24 h	6	12	12	12	37	>100
Apoptoosi	24 h	>100	>100	>100	50	37	>100
NO	24 h	>100	>100	12	>100	>100	>100
TNFα	24 h	>100	1,6	1,6	37	>100	>100
Ihmisen monosyytit	Aika-piste	<i>Penicillium expansum</i> se 1	<i>Paecilomyces variotii</i> Paec 2	<i>Aspergillus versicolor</i> 3/sl	<i>Trichoderma atroviride</i> 1/226	<i>Aspergillus westdijikiae</i> pp2	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> DSM768
TNFα	6 h	>10	10	1	>10	>10	>10
IL1β	6 h	>10	10	<1	100	>10	>10
IL-8	6 h	>10	<1	<1	>10	>10	>10
LDH	6 h	>100	100	10	100	>100	>100
Sian siittiöt	Aika-piste	<i>Penicillium expansum</i> se 1	<i>Paecilomyces variotii</i> Paec 2	<i>Aspergillus versicolor</i> 3/sl	<i>Trichoderma atroviride</i> 1/226	<i>Aspergillus westdijikiae</i> pp2	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> DSM768
Toksisuus	½ h	12	10	250	12	10	250
	1 h	1	5	10	3	5	100
	24 h	1	2	5	1	5	50
Munuaissolut	Aika-piste	<i>Penicillium expansum</i> se 1	<i>Paecilomyces variotii</i> Paec 2	<i>Aspergillus versicolor</i> 3/sl	<i>Trichoderma atroviride</i> 1/226	<i>Aspergillus westdijikiae</i> pp2	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> DSM768
Toksisuus	2-4 d	0,5	500	1	30	15	500
<i>Escherichia coli</i>	Aika-piste	<i>Penicillium expansum</i> se 1	<i>Paecilomyces variotii</i> Paec 2	<i>Aspergillus versicolor</i> 3/sl	<i>Trichoderma atroviride</i> 1/226	<i>Aspergillus westdijikiae</i> pp2	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> DSM768
Toksisuus	3 h	3	100	40	22	40	150
	3 h*	2	150	6	2	4	40

\* *Altistus yhdessä polymyksiinin kanssa*

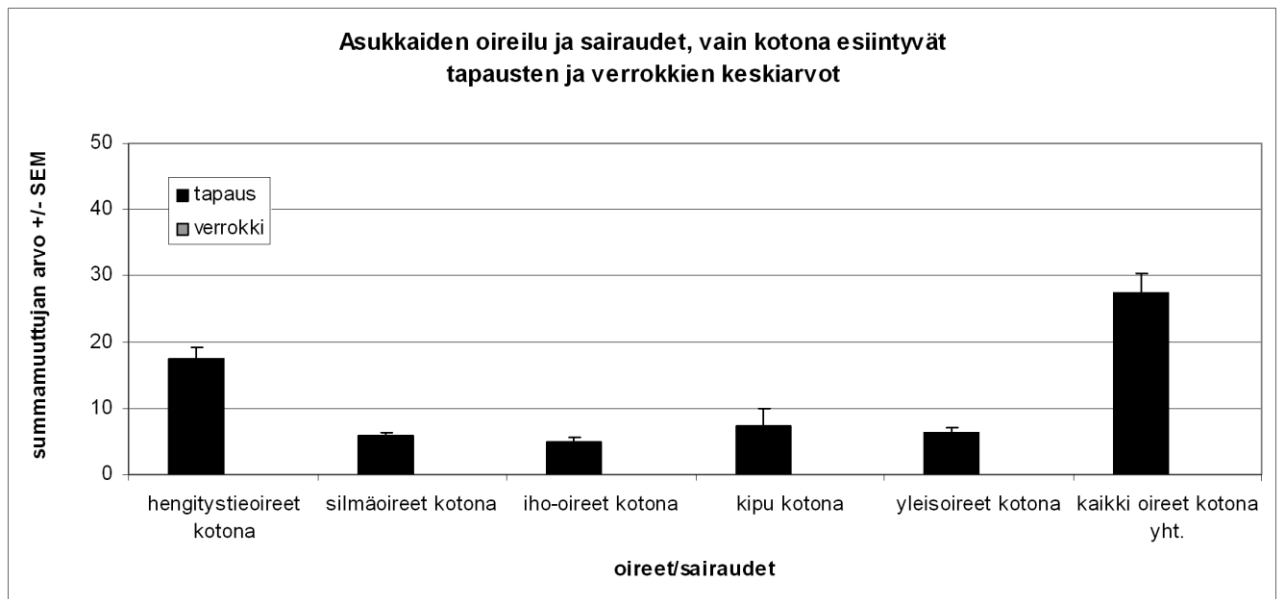




Oireiden esiintymistä kuvaavien summamuuttujien keskiarvot laskettuna erikseen tapauksille ja verrokeille. Tähdet kuvaavat tapausten ja verrokkien keskiarvojen eron tilastollista merkitsevyyttä (t-test,  $p < 0.001 = ***$ ,  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.05 = *$ ).



Oireiden esiintymistä kuvaavien summamuuttujien perhekohtaiset maksimi-arvot laskettuna erikseen tapauksille ja verrokeille. Tähdet kuvaavat tapausten ja verrokkien keskiarvojen eron tilastollista merkitsevyyttä (t-test,  $p < 0.001 = ***$ ,  $p < 0.01 = **$ ,  $p < 0.05 = *$ ).



Vain kotona esiintyvien oireiden yleisyyttä kuvaavien summamuuttujien keskiarvot. Verrokkien oireet eivät liittyneet kotona oleskeluun (kaikkien arvo = 0).

**LAATIKKOPÖLYNÄYTTEIDEN OTTO**

Laatikoista 4 kpl sijoitettiin olohuoneeseen ja 4 kpl huoneeseen, jota asukkaat / kenttähenkilökunta pitivät vaikeimpana ongelmatilana. Jokaiselle vauriokohteelle valittiin mahdollisimman samankaltainen vertailukohde, jossa laatikot sijoitettiin myös samoihin huoneisiin. Neljä laatikkoa imuroitiin yhdelle suodatimelle, eli kustakin kohteesta tuli kaksi näytettä.

Näytekoodi	Kohde	Tapauskohde 1 / vertailukohde 0	olohuone / vauriohuone	homeen hajua / koko asunto	havaintoja koko asunnosta
TOXT-637	5	0	VH	Ei	
TOXT-638	5	0	OH*	Ei	
TOXT-622	7	1	VH	Kyllä, lievä	
TOXT-623	7	1	OH	kyllä, lievä	
TOXT-645	9	0	VH	Ei	
TOXT-646	9	0	OH	Ei	
TOXT-618	14	1	OH	<b>Kyllä</b>	remontti alkanut
TOXT-619	14	1	VH	<b>Kyllä</b>	remontti alkanut
TOXT-615	15	1	OH	<b>kyllä</b>	remontti alkanut
TOXT-616	15	1	VH	<b>kyllä</b>	remontti alkanut
TOXT-639	17	0	VH	Ei	Lievä
TOXT-640	17	0	OH	Ei	lievä
TOXT-605+606	19	1	OH	<b>Kyllä</b>	
TOXT-607+608	19	1	VH	<b>kyllä</b>	
TOXT-647	21	0	VH		? Poikkeava haju
TOXT-648	21	0	OH		? Poikkeava haju
TOXT-641	22	1	VH	<b>kyllä</b>	
TOXT-642	22	1	OH	<b>kyllä</b>	
TOXT-610+611	25	0	OH	Ei	lievä
TOXT-612+613	25	0	VH	Ei	lievä
TOXT-620	27	1	OH	Ei	kosteus- ja mikrobivaurioita
TOXT-621	27	1	VH	Ei	kosteus- ja mikrobivaurioita
TOXT-653	28	0	VH	Ei	lievä
TOXT-654	28	0	OH	Ei	lievä
TOXT-635	32	1	VH	kyllä	
TOXT-636	32	1	OH	kyllä	
TOXT-649	34	0	VH	Ei	lievä
TOXT-650	34	0	OH	Ei	lievä
TOXT-651	35	0	VH	Ei	lievä
TOXT-652	35	0	OH	Ei	lievä
TOXT-600+601	37	1	OH	<b>Kyllä</b>	remontti alkanut
TOXT-602+603	37	1	VH	<b>Kyllä</b>	remontti alkanut
TOXT-604	37	kenttäblank	kenttäblank	Kyllä	remontti alkanut
TOXT-624	41	1	VH	<b>Kyllä</b>	
TOXT-625	41	1	OH	<b>kyllä</b>	
TOXT-626	42	0	VH	Ei	lievä
TOXT-627	42	0	OH	Ei	lievä
TOXT-628	43	1	VH	Kyllä	vähäinen
TOXT-629	43	1	OH	kyllä	vähäinen
TOXT-643	44	0	VH	Ei	lievä
TOXT-644	44	0	OH*	Ei	lievä
TOXT-630	46	1	VH	<b>Kyllä</b>	
TOXT-631	46	1	OH	<b>kyllä</b>	
TOXT-632	48	1	VH	<b>Kyllä</b>	
TOXT-633	48	1	OH	<b>kyllä</b>	

\* vain yksi suodatin (= 2 laatikkoa), muissa näytteissä 2 suodatinta (= neljä laatikkoa)

**PYYHINTÄPÖLYNÄYTTEIDEN OTTO**

Näytteitä otettiin 3 kpl / asunto, olohuoneesta aina yksi ja kaksi näytettä eri puolilta asukkaiden vaikeimmiksi ongelmataloiksi kokemista huoneista. Jos pahin huone oli olohuone, näytteitä otettiin kaksi olohuoneesta ja kolmas jostain muusta huoneesta.

Näytekoodi	Kohde ID	Tapaus 1 / vertailu 0	Vauriohuone kyllä 1 / ei 0	Huone	homeen hajua / asunto	havaintoja koko asunnosta
TOXT-960	5	0	0	OH	Ei	
TOXT-961	5	0	0	MH	Ei	
TOXT-962	5	0	0	AT	Ei	
TOXT-932	7	1	0	OH	Kyllä, lievä	
TOXT-933	7	1	1	MH1	kyllä, lievä	
TOXT-934	7	1	1	MH2	Kyllä, lievä	
TOXT-980	9	0	0	OH	Ei	
TOXT-981	9	0	0	MH	Ei	
TOXT-982	9	0	0	AT	Ei	
TOXT-908	14	1	0	OH	Kyllä	remontti alkanut
TOXT-909	14	1	1	MH	Kyllä	remontti alkanut
TOXT-910	14	1	1	MH	Kyllä	remontti alkanut
TOXT-916	15	1	0	OH	kyllä	remontti alkanut
TOXT-917	15	1	0	OH	kyllä	remontti alkanut
TOXT-918	15	1	1	KHH	kyllä	remontti alkanut
TOXT-976	17	0	0	OH	Ei	Lievä
TOXT-977	17	0	0	OH	Ei	lievä
TOXT-978	17	0	0	KHH	Ei	Lievä
TOXT-904	19	1	1	OH	Kyllä	
TOXT-905	19	1	1	OH	kyllä	
TOXT-906	19	1	0	MH	kyllä	
TOXT-907	19	kenttäblank	kenttäblank	kenttäblank	kyllä	
TOXT-972	21	0	0	OH		? Poikkeava haju
TOXT-973	21	0	0	OH		? Poikkeava haju
TOXT-974	21	0	0	AT		? Poikkeava haju
TOXT-968	22	1	0	OH	kyllä	
TOXT-969	22	1	0	OH	kyllä	
TOXT-970	22	1	1	KHH	kyllä	
TOXT-920	25	0	0	OH	Ei	lievä
TOXT-921	25	0	0	OH	Ei	lievä
TOXT-922	25	0	0	MH	Ei	lievä
TOXT-900	27	1	0	OH	Ei	kosteus- ja mikrobivaurioita
TOXT-901	27	1	1	MH	Ei	kosteus- ja mikrobivaurioita
TOXT-902	27	1	1	MH	Ei	kosteus- ja mikrobivaurioita
TOXT-956	28	0	0	OH	Ei	lievä
TOXT-957	28	0	0	takkahuone	Ei	lievä
TOXT-958	28	0	0	takkahuone	Ei	lievä
TOXT-964	29	0	0	OH	Ei	
TOXT-965	29	0	0	OH	Ei	

## TOXTEST näytekoodit

TOXT-966	29	0	0	MH	EI	
TOXT-944	32	1	0	OH	kyllä	
TOXT-945	32	1	1	MH	kyllä	
TOXT-946	32	1	1	MH	kyllä	
TOXT-984	34	0	0	OH	EI	Lievä
TOXT-985	34	0	0	takkahuone	EI	lievä
TOXT-986	34	0	0	MH	EI	lievä
TOXT-988	35	0	0	OH/ruokailutila	EI	lievä
TOXT-989	35	0	0	työhuone	EI	lievä
TOXT-990	35	0	0	AT	EI	Lievä
TOXT-912	37	1	0	OH	<b>Kyllä</b>	remontti alkanut
TOXT-913	37	<b>1</b>	0	OH	<b>Kyllä</b>	remontti alkanut
TOXT-914	37	<b>1</b>	1	MH	<b>Kyllä</b>	remontti alkanut
TOXT-928	41	<b>1</b>	0	OH	<b>Kyllä</b>	
TOXT-929	41	<b>1</b>	1	takkahuone	<b>kyllä</b>	
TOXT-930	41	<b>1</b>	1	takkahuone	<b>Kyllä</b>	
TOXT-948	42	0	0	OH	EI	lievä
TOXT-949	42	0	0	OH	EI	lievä
TOXT-950	42	0	0	takkahuone/KHH	EI	lievä
TOXT-940	43	1	0	OH	Kyllä	vähäinen
TOXT-941	43	1	1	KHH	kyllä	vähäinen
TOXT-942	43	1	1	KHH	Kyllä	vähäinen
TOXT-943	43	kenttäblank	kenttäblank	kenttäblank	kyllä	vähäinen
TOXT-952	44	0	0	OH	EI	lievä
TOXT-953	44	0	0	OH	EI	lievä
TOXT-954	44	0	0	AT	EI	lievä
TOXT-924	46	1	0	OH	<b>Kyllä</b>	
TOXT-925	46	1	1	MH	<b>kyllä</b>	
TOXT-926	46	1	1	MH	<b>kyllä</b>	
TOXT-936	48	<b>1</b>	0	OH	<b>Kyllä</b>	
TOXT-937	48	<b>1</b>	0	OH	<b>kyllä</b>	
TOXT-938	48	<b>1</b>	1	pukuhuone	<b>kyllä</b>	
TOXT-992		metodiblack	metodiblack			
TOXT-993		metodiblack	metodiblack			

## PYYHINTÄNÄYTTEET

### PYYHINTÄLIINOJEN PESU

*Työvaiheet suoritetaan vetokaapissa, käytetään metanolia kestäviä suojakäsineitä.*

1. Sini staattinen liina leikataan kokoon 5 cm x 20 cm, yhdestä paketista saa noin 200 kpl liinoja.
2. Puhdas iso lasiastia huuhdellaan metanolilla.
3. Liinat kastetaan metanolissa ja laitetaan lasiastiaan.
4. Lisätään metanolia riittävä määrä, että liinat peittyvät hyvin.
5. Lasiastia suljetaan ja pannaan vesihauteeseen + 50 °C, 1 h.
6. Kun lämpötila on saavutettu, sonikoidaan 30 min.
7. Metanoli kaadetaan jäteastiaan ja laitetaan uusi metanoli tilalle.
8. Lasiastia suljetaan ja pannaan vesihauteeseen + 50 °C, 1 h.
9. Kun lämpötila on saavutettu, sonikoidaan 30 min.
10. Viimeinen pesu-metanoli valutetaan puhtaaseen taarattuun 50 ml dekkaan, haihdutetaan kuiviin + 50 °C lämpöblokillä, dekka punnitaan ja liuotetaan haihtumisjäännös pitoisuuteen 10 mg/ml metanoliin, siirretään lasiampulliin, säilytys -20 °C, tutkitaan toksisuus.
11. Puristetaan ylimäärä metanoli liinoista pois metallipihdeillä ja liina kuivatetaan metallialustan päällä puhtaassa tarkoitukseen varatussa lämpökaapissa, + 50 °C poistoimu päällä.
12. Kuiva puhdas liina laitetaan metallipinseteillä puhtaaseen steriloituun lasipulloon, 1 liina/ pullo (100 ml Schott-pullo, teflontiivisteellä varustettu kierretulppa).
13. Liinat säilytetään yksitellen suljetuissa lasipulloissaan, kunnes käytetään kentällä.

### PYYHINTÄPÖLYNÄYTTEIDEN OTTO

*Kentällä liinojen käsittelyssä käytetään metallipinsettejä ja suojakäsineitä. Lasisauvat ja metalli-pinsetit puhdistetaan etanolilla jokaisen näytteenoton välillä. Kussakin kohteessa käytetään eri välineitä.*

1. Puhdas liina otetaan pullosta.
2. Liina kääritään lasisen viljelysauvan päälle ja kiinnitetään siihen metallipuristimella.
3. Pyyhitään ylätasolta (>1-1.5 m) pölyä, pyyhintäpinta-ala max. 0,25 m<sup>2</sup>/liina (50 cm x 50 cm).
4. Kirjataan pyyhitty pinta-ala ja pyyhityn tason materiaali. Näytteitä otetaan 3 kpl / asunto, olohuoneesta aina yksi ja kaksi näytettä asukkaiden vaikeimmiksi ongelmatiloina kokemista huoneista. Näytteenottolomakkeeseen kirjataan näytteenottohuone.
5. Näytteet koodataan TOXT XX\_PP1/PP2/PP3, josta PP1 on aina olohuone. (XX = kaksinumeroinen kohteen numero)
6. Irrotetaan pyyhe telineestä, pannaan samaan lasipulloon ja suljetaan pullo. Näytetunnus kirjataan sekä lasipulloon että korkkiin.
7. Säilytetään pullo suljettuna -20°C pimeässä, kunnes uutetaan. Uutto tehdään samassa pullossa.

### **PYYHINTÄLIINOJEN UUTTO**

1. Näytteet otetaan huoneenlämpöön, pulloon annostellaan metanolia niin paljon että liina peittyy (max. 50 ml). Sekoitellaan heiluttamalla tai lasisauvalla.
2. Näytteet laitetaan vesihauteeseen +50°C 2 h, tämän jälkeen vesihauteessa sonikointi 2×30 min. Näytteet jätetään yön yli huoneenlämpöön vetokaappiin (korkit kiinni).
3. Kaadetaan neste lasisuppilon avulla 50 ml sentrifuugiputkeen, metallipihdeillä rutistellaan rätistä metanolit talteen. Huuhdellaan säilöpulloa ja lasisuppiloa metanolilla (yht. n. 4× 1ml).
4. Putket sentrifugoidaan 2000 rpm (~700×g) 20 min ilman jarrua.
5. Taarataan dekat.
6. Kirkas neste siirretään pipetoimalla taarattuun pieneen lasidekkaan.
7. Haihdutetaan kuiviin lämpölokilla +50°C vetokaapissa.
8. Kun deka on kuiva, lisätään metanolia noin 2-3 ml niin että dekan pohja ja vähän reunoja peittyy. Kuumennetaan +50°C lämpölevyllä, pyöritetään liuotinta lasipipetillä dekan reunoja pitkin jotta sisäseinämät puhdistuvat.
9. Kun deka on kuiva, punnitaan se.
10. Lisätään metanolia niin että liuoksen aineen pitoisuus 10 mg/ml, jaetaan eriin (200 µl/ lasiampulli varustettuna kierretulpalla (teflontiiviste), korkit + parafilmit ympärille).
11. Dekka punnitaan vielä tyhjänä, katsotaan paljon ainesta on jäänyt dekkaan ja korjataan ilmoitettu pitoisuus.
12. Säilytys pimeässä -20°C.

## LAATIKKONÄYTTEET

### MILLIPORE-SUODATTIMIEN ESIKÄSITTELY

(Fluoropore Membrane, PTFE, hydrophobic, 0.45 µm, 37 mm, white).

*Työvaiheet suoritetaan vetokaapissa, käytetään metanolia kestäviä suojakäsineitä.*

1. Lämpökaappi +50°C, poistoilmakanava auki ja virtausnopeus täysillä.
2. Pyyhi pinsetit, spaattelit ja metallitarjottimet etanolilla, kuivaa hyvin.
3. Kaada puhdasta metanolia kahteen lasiastiaan n. 2 cm.
4. Poista suodattimien pakkauksesta siniset suojapaperit ja nosta pinseteillä suodatin pois pakkauksesta. Vältä koskemasta suodattimiin hanskoilla. Käännä suodatin niin että sileä puoli on ylöspäin.
5. Käytä suodatinta ensimmäisessä lasiastiassa ja sitten toisessa, niin että kastuvat kauttaaltaan (ei liotusta). Pidä lasiastioiden järjestys samana kaikille filttereille.
6. Nosta märkä suodatin tarjottimelle sileä puoli ylöspäin.
7. Aseta suodattimien reunoille spaatteleita painoiksi
8. Laita tarjottimet lämpökaappiin, kuivuu n. 2 h.
9. Kaada käytetty metanoli jäteastiaan.
10. Laita kuivat suodattimet sileä puoli ylöspäin niille tarkoitettuihin puhtaisiin PetriSlideihin (esim. Millipore Petri Slide without pad 100 kpl/pkt cat.num. PD1504700).

### LAATIKKOPÖLYNKERÄYS

1. Laatikot koodataan seuraavasti: TOXTXX-2012 LTK1-LTK4\_oloh./vaurioh. (vertailukohteissa oloh./vertailuh.). (XX = kaksinumeroinen kohdenumero)
2. 8 kpl laatikoita viedään jokaiseen vaurio- ja vertailukohteeseen. Laatikot ovat kartonkia, 20 cm x 45 cm x 5 cm kokoisia ja niissä on kiinteä kansi.
3. Laatikoista 4 kpl sijoitetaan olohuoneeseen ja 4 kpl huoneeseen, jota asukkaat/kenttähenkilökunta pitävät vaikeimpana ongelmatilana. Jokaiselle vauriokohteelle on valittu mahdollisimman samankaltainen vertailukohde, jossa laatikot sijoitetaan myös samoihin huoneisiin.
4. Pölynkeräys lopetetaan 8 viikon kuluttua. Asukkaat itse sulkevat laatikon varovasti hanskat kädessä, ja teippaavat sen ulkopuolelta kiinni maalarinteipillä annettujen ohjeiden mukaisesti. Laatikot noudetaan kohteesta 5 viikon kuluessa keräyksen päättymisestä. Laatikot säilytetään noutamiseen asti huoneenlämmössä kohteessa.
5. Laatikot tuodaan koodattuina Kuopioon THL/YMIK:iin, jossa niitä säilytetään huoneenlämmössä käsittelyyn asti.
6. Pöly imetään laatikosta Millipore-suodattimille (Millipore, FSLW03700 fluoropore Membrane, PTFE, hydrophobic, 0.45 µm, 37 mm, white), jotka on esipesty. Imuna käytetään Neuberger-pumppua. Neljän laatikon sarja imetään samalle suodattimelle tai jos usealle, suodattimet yhdistetään samaan lasiputkeen.
7. Suodattimet siirretään lasiputkiin, joissa niitä säilytetään jatkokäsittelyyn asti -20°C lämpötilassa.



### LAATIKONÄYTTEIDEN UUTTO

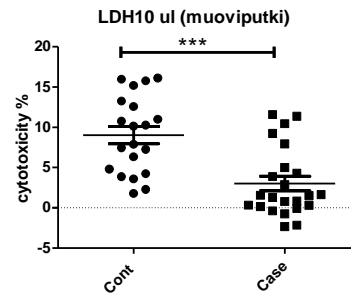
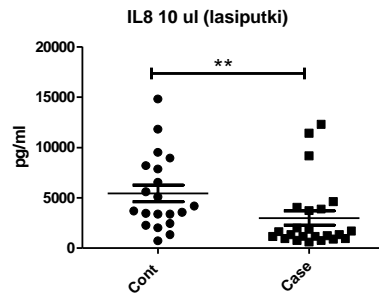
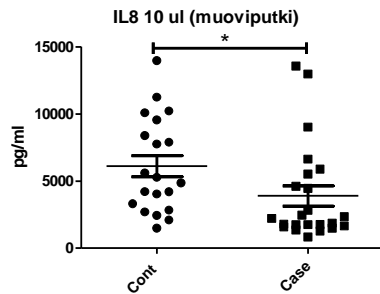
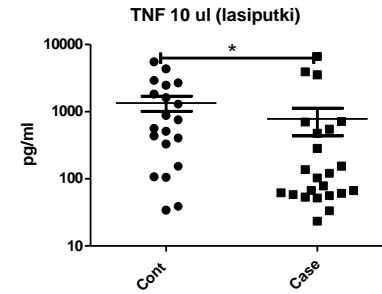
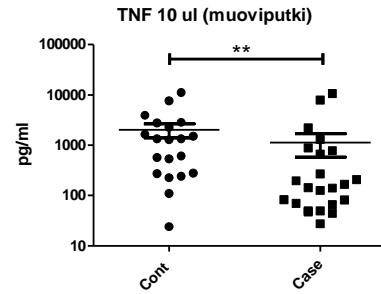
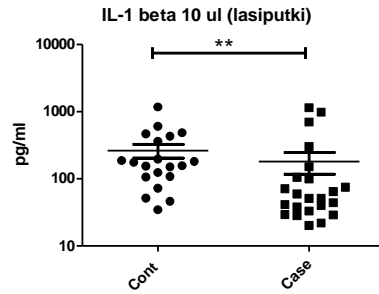
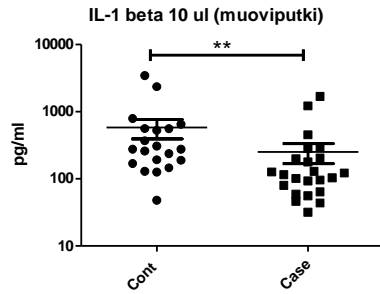
1. Jatkokäsittely tapahtuu THL/YTOK:ssa. Suodattimet peitetään lasiputkissaan metanolilla (20 ml?) ja sonikoidaan 30 min. Metanoli siirretään kaatamalla steriiliin lasipulloon, ja suodattimen päälle lisätään uusi metanoli. Sonikointi toistetaan ja metanoli siirretään samaan lasipulloon kuin ensimmäinen lisäys.
2. Metanoli-pöly-suspensiota lämmitetään tiiviillä korkilla suljetussa pullossa +50 °C 2 h ajan, jonka jälkeen suspensiota pidetään huoneen lämmössä yön yli.
3. Metanoli-pöly-suspensio siirretään sentrifuugiputkeen, huuhdellaan pulloa metanolilla (yht. n. 4 x 1 ml)
4. Putket sentrifugoidaan 2000 rpm (~700×g) 20 min ilman jarrua.
5. Taarataan dekat
6. Kirkas neste siirretään taarattuun pieneen lasidekkaan.
7. Haihdutetaan kuiviin lämpöblokillä +50°C vetokaapissa.
8. Kun deka on kuiva, lisätään metanolia noin 2-3 ml niin että dekan pohja ja vähän reunoja peittyy. Kuumennetaan +50°C lämpölevyllä, pyöritetään liuotinta lasipipetillä dekan reunoja pitkin jotta sisäseinämät puhdistuvat.
9. Kun deka on kuiva, punnitaan se.
10. Liuotetaan aines metanoliin aina 1 ml/4 laatikon sarja
11. Jaetaan eriin (200 µl/ lasiampulli varustettuna kierretulpalla (teflontiiviste), korkit + parafilmit ympärille). Säilytys pimeässä -20°C.
12. Dekka punnitaan vielä tyhjänä, katsotaan paljon ainesta on jäänyt dekkaan ja korjataan punnittu massa.

LIITE  
TOXTEST hankkeen toksisuusanalyysit  
Työterveyslaitos



# Analysointi jatkuvana muuttujana – laatikkopölyn toksisuus

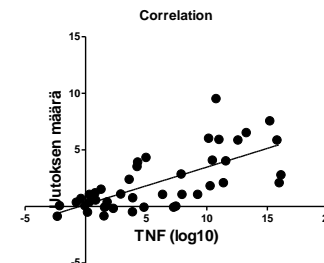
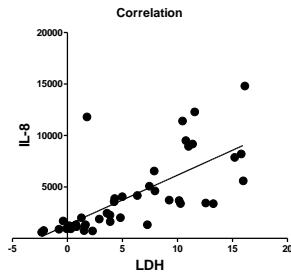
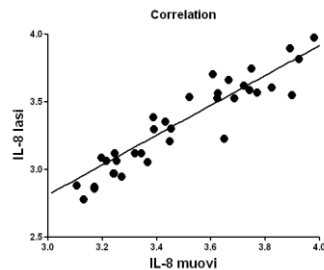
## Työterveyslaitos



Number of XY Pairs	43
Pearson r	0.9258
95% confidence interval	0.8663 to 0.9594
P value (two-tailed)	< 0.0001
P value summary	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.8571

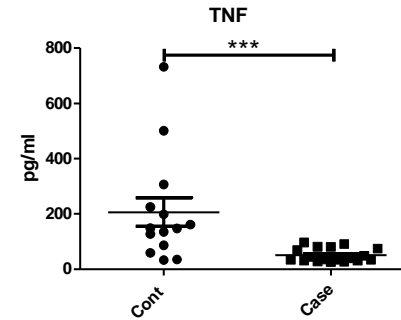
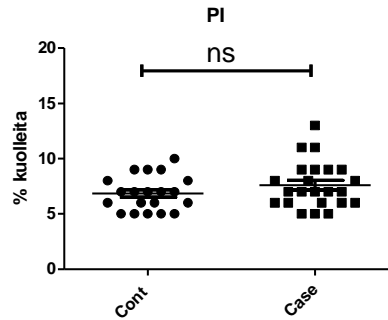
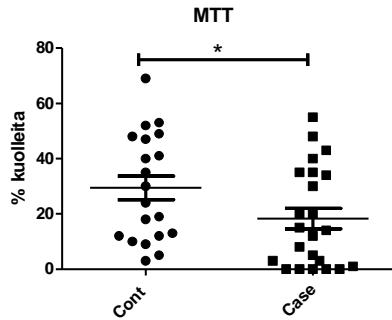
Number of XY Pairs	43
Pearson r	0.7005
95% confidence interval	0.5067 to 0.8269
P value (two-tailed)	< 0.0001
P value summary	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.4907

Number of XY Pairs	43
Pearson r	0.7025
95% confidence interval	0.5097 to 0.8281
P value (two-tailed)	< 0.0001
P value summary	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.4935



# Analysointi jatkuvana muuttujana – laatikkopölyn toksisuus

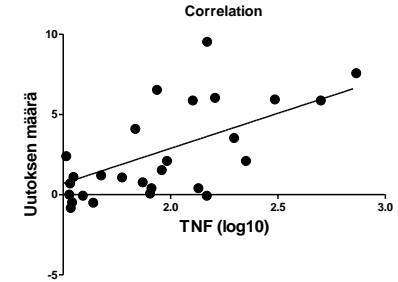
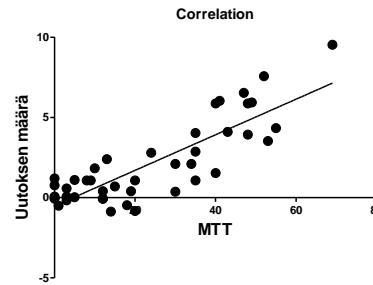
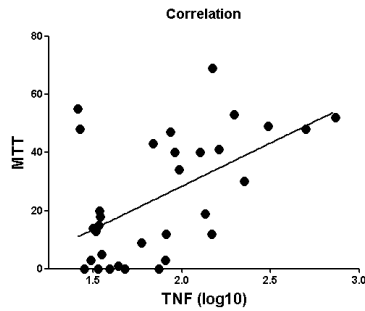
## Itäsuomen-yliopisto



Number of XY Pairs	32
Pearson r	0.5475
95% confidence interval	0.2457 to 0.7526
P value (two-tailed)	0.0012
P value summary	**
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.2998

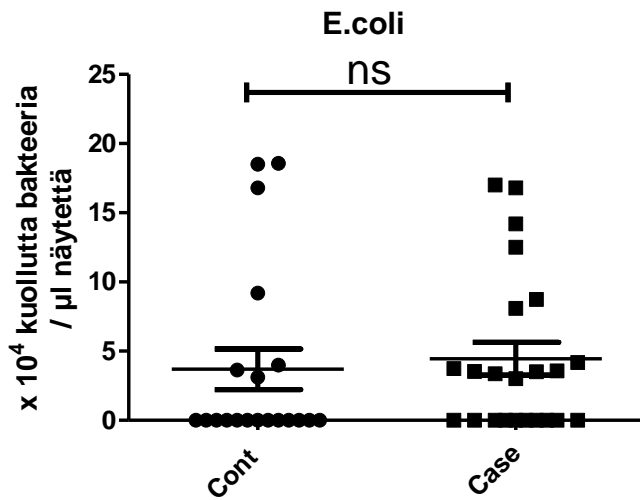
Number of XY Pairs	43
Pearson r	0.8408
95% confidence interval	0.7231 to 0.9111
P value (two-tailed)	< 0.0001
P value summary	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.7070

Number of XY Pairs	32
Pearson r	0.6034
95% confidence interval	0.3225 to 0.7866
P value (two-tailed)	0.0003
P value summary	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.3641

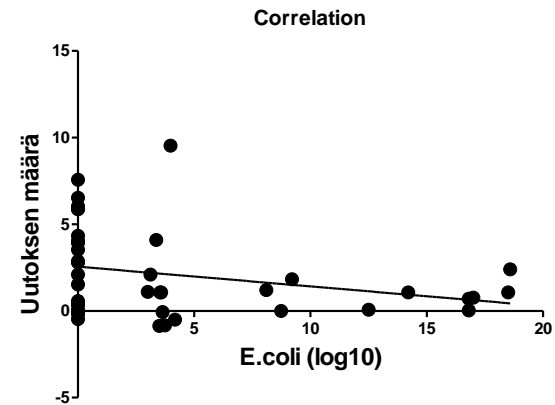


# Analysointi jatkuvana muuttujana – laatikkopölyn toksisuus

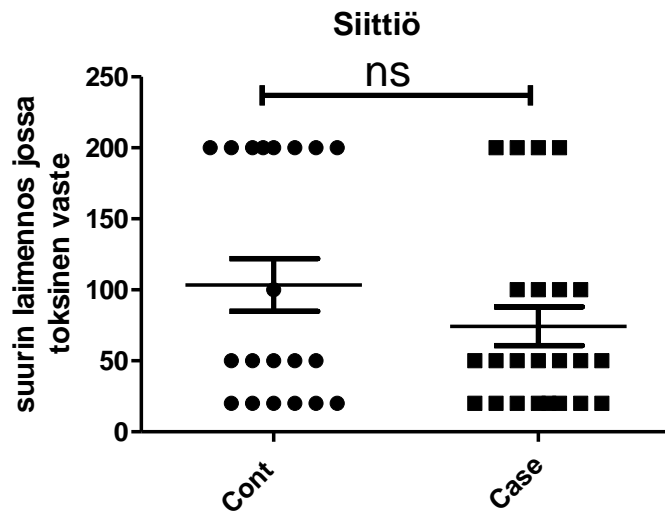
## Turun yliopisto



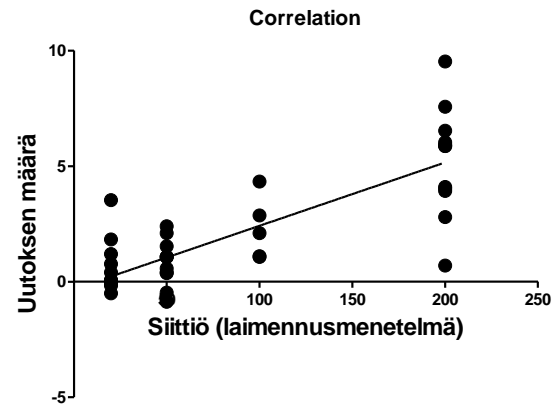
Number of XY Pairs	43
Pearson r	-0.2709
95% confidence interval	-0.5284 to 0.03208
P value (two-tailed)	0.0789
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0.07341



Analysointi "suurin laimennos jolla saatiin toksinen vaste" muuttujana  
 – laatikkopölyn toksisuus  
 Helsingin yliopisto

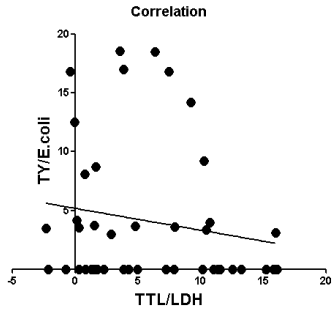


Number of XY Pairs	43
Pearson r	0.8042
95% confidence interval	0.6643 to 0.8897
P value (two-tailed)	< 0.0001
P value summary	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.6468

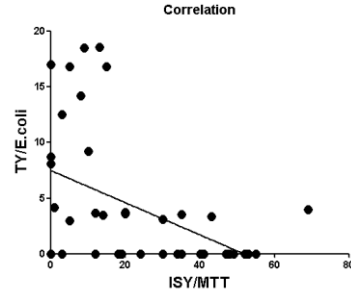


# Toksisuuden/tulehduksen korrelaatio eri tutkimusryhmillä

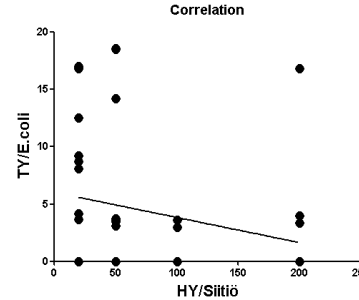
Number of XY Pairs	43
Pearson r	-0.1662
95% confidence interval	-0.4444 to 0.1413
P value (two-tailed)	0.2869
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0.02761



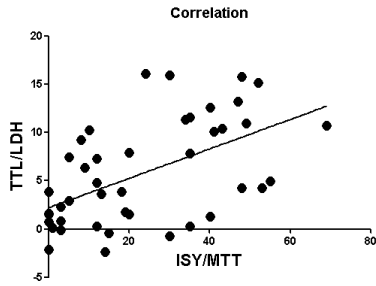
Number of XY Pairs	43
Pearson r	-0.4614
95% confidence interval	-0.6690 to -0.1868
P value (two-tailed)	0.0018
P value summary	**
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.2129



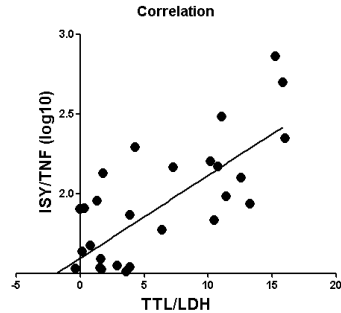
Number of XY Pairs	43
Pearson r	-0.2711
95% confidence interval	-0.5285 to 0.03186
P value (two-tailed)	0.0786
P value summary	ns
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No
R squared	0.07352



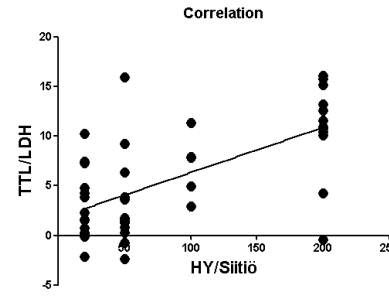
Number of XY Pairs	43
Pearson r	0.5448
95% confidence interval	0.2923 to 0.7264
P value (two-tailed)	0.0002
P value summary	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.2968



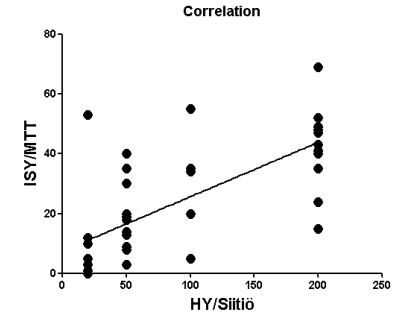
Number of XY Pairs	32
Pearson r	0.7439
95% confidence interval	0.5335 to 0.8676
P value (two-tailed)	< 0.0001
P value summary	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.5534



Number of XY Pairs	43
Pearson r	0.6298
95% confidence interval	0.4063 to 0.7822
P value (two-tailed)	< 0.0001
P value summary	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.3967



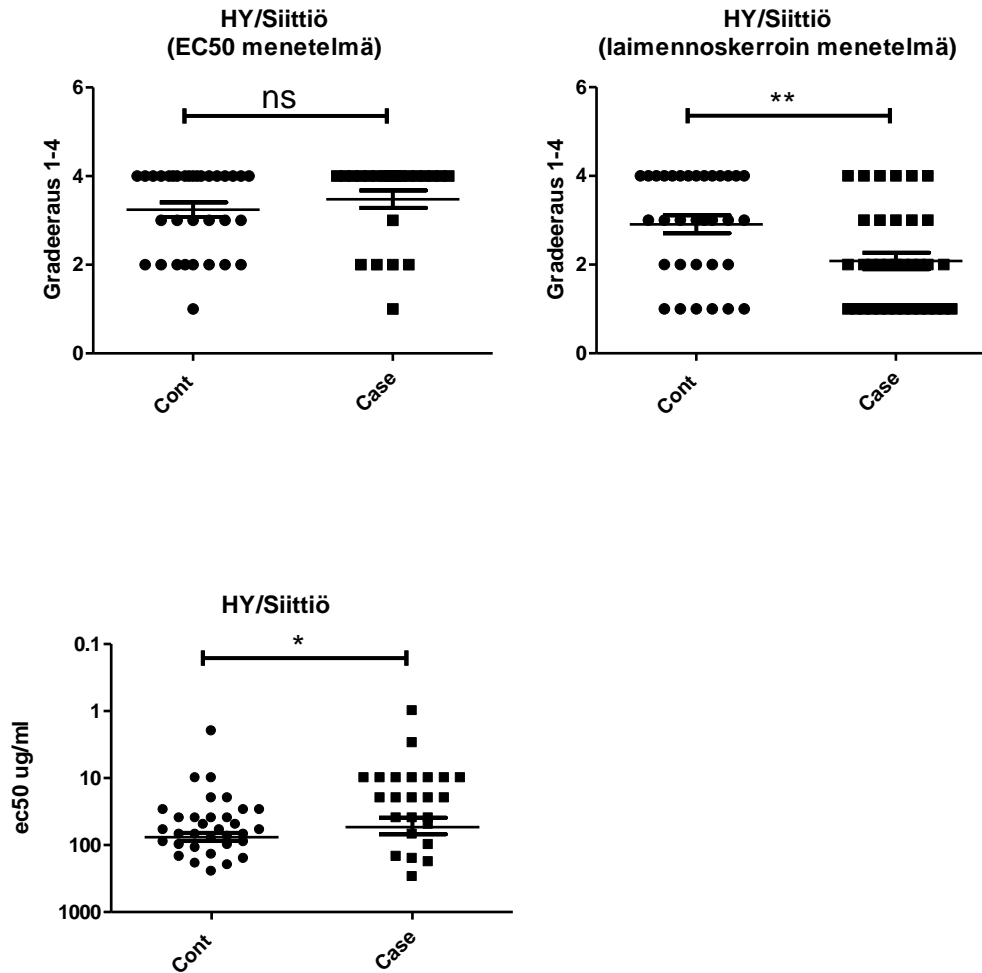
Number of XY Pairs	43
Pearson r	0.7051
95% confidence interval	0.5134 to 0.8297
P value (two-tailed)	< 0.0001
P value summary	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.4971



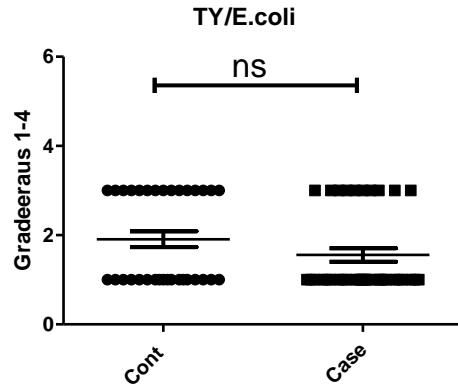




# Pyyhintänäytteiden toksisuuden jakautuminen Control vs Case HY



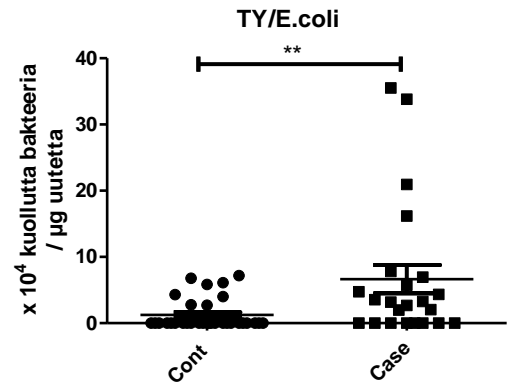
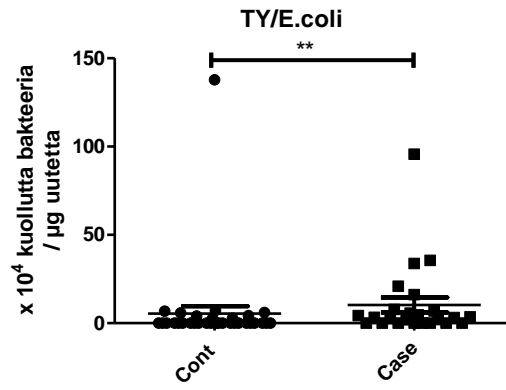
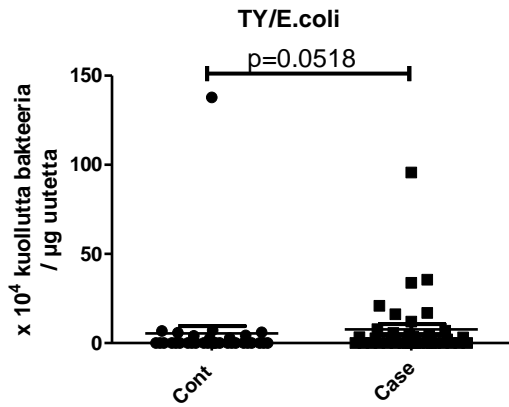
# Pyyhintänäytteiden toksisuuden jakautuminen Control vs Case TY



Kaikki data

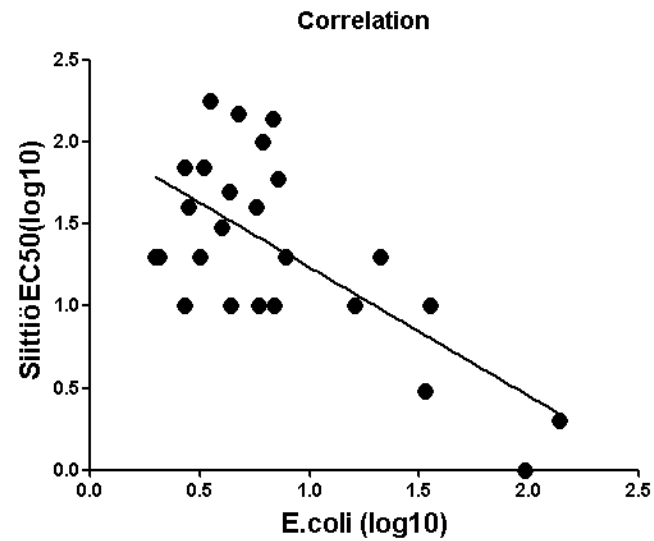
Poistettu 12 ET merkattua näytettä HY pyyhintänäytteiden mukaan (liian vähän uutetta analyysiin, olivat kaikki vauriokohteissa)

Poistettu 12 ET merkattua näytettä HY pyyhintänäytteiden mukaan + yksi korkea kontrolleista ja yksi korkea vauriokohteista



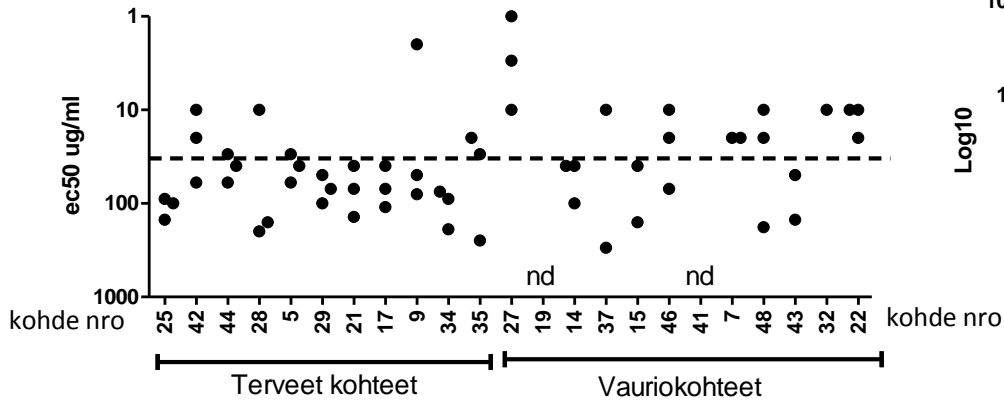
# Pyyhintänäytteiden toksisuuden korrelaatio eri menetelmien kesken

Number of XY Pairs	25
Pearson r	-0.6767
95% confidence interval	-0.8457 to -0.3843
P value (two-tailed)	0.0002
P value summary	***
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes
R squared	0.4579

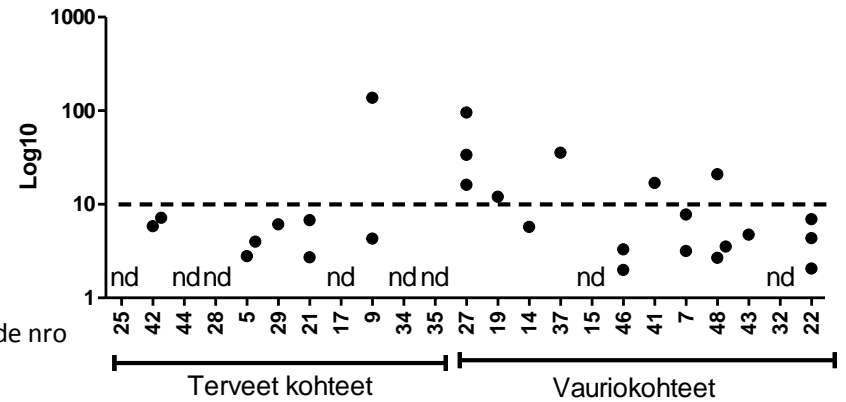


# Talokohtaiset pyyhintänäytteiden toksisuustulokset (siittiö ja Ecoli) sekä talokohtaiset laatikonäytteiden toksisuustulokset (LDH ja TNF)

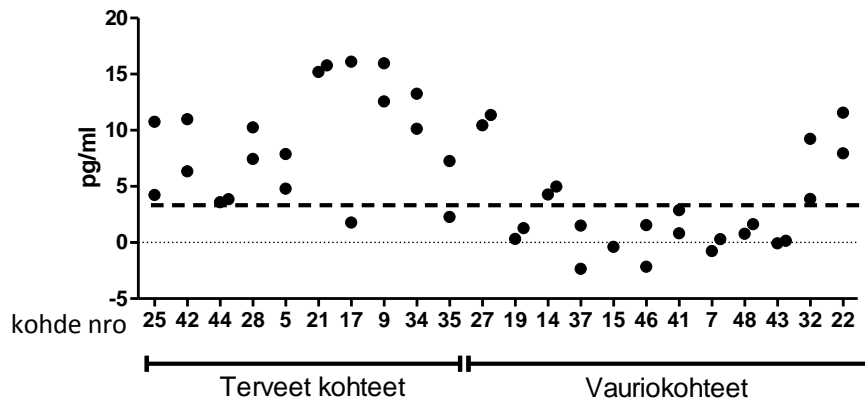
### Siittiö pyyhintänäytteet



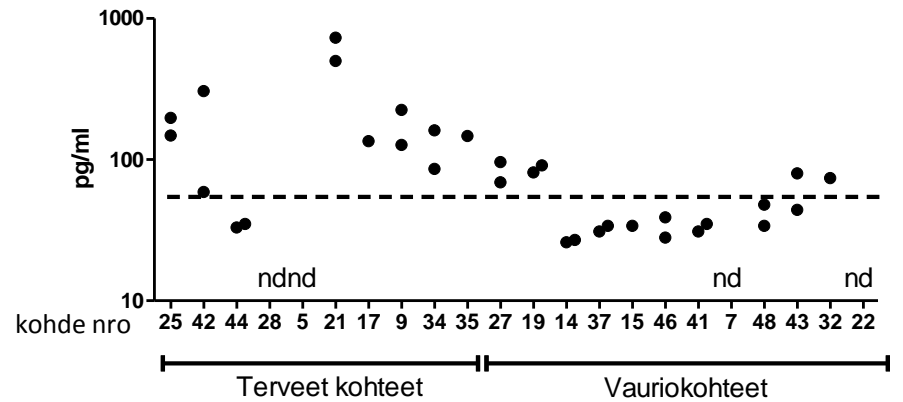
### Ecoli pyyhintänäytteet



### LDH (THP1) laatikko



### TNF (RAW) laatikko



näytekoodi  
1=vauriokohde  
0=verrokkikohde

Pyyhintänäytteet

Turun yliopisto, E. coli -testi

1=vauriokohde		Toksisuus asteikolla 1-4			
0=verrokki	Näytekoodi	1	2	3	4
1	TOXT-900	x			
1	TOXT-901	x			
1	TOXT-902	x			
1	TOXT-904	x			
1	TOXT-905	x			
1	TOXT-906	x			
FB	TOXT-907	x			
1	TOXT-908		x		
1	TOXT-909		x		
1	TOXT-910		x		
1	TOXT-912	x			
1	TOXT-913	x			
1	TOXT-914	x			
1	TOXT-916	x			
1	TOXT-917		x		
1	TOXT-918	x			
0	TOXT-920		x		
0	TOXT-921		x		
0	TOXT-922		x		
1	TOXT-924	x			
1	TOXT-925	x			
1	TOXT-926	x			
1	TOXT-928	x			
1	TOXT-929	x			
1	TOXT-930	x			
1	TOXT-932	x			
1	TOXT-933	x			
1	TOXT-934	x			
1	TOXT-936		x		
1	TOXT-937		x		
1	TOXT-938		x		
1	TOXT-940	x			
1	TOXT-941		x		
1	TOXT-942	x			
FB	TOXT-943	x			
1	TOXT-944	x			
1	TOXT-945	x			
1	TOXT-946	x			
0	TOXT-948		x		
0	TOXT-949		x		
0	TOXT-950	x			
0	TOXT-952		x		
0	TOXT-953		x		
0	TOXT-954	x			
0	TOXT-956	x			
0	TOXT-957	x			
0	TOXT-958	x			
0	TOXT-960		x		
0	TOXT-961		x		
0	TOXT-962	x			
0	TOXT-964	x			
0	TOXT-965	x			
0	TOXT-966	x			
1	TOXT-968		x		
1	TOXT-969		x		
1	TOXT-970	x			
0	TOXT-972	x			
0	TOXT-973	x			
0	TOXT-974	x			
0	TOXT-976	x			
0	TOXT-977	x			
0	TOXT-978	x			
0	TOXT-980		x		
0	TOXT-981		x		
0	TOXT-982		x		
0	TOXT-984	x			
0	TOXT-985		x		
0	TOXT-986		x		
0	TOXT-988		x		
0	TOXT-989	x			
0	TOXT-990	x			
MB	TOXT-992	x			
MB	TOXT-993	x			

Helsingin yliopisto, siittiötesti  
(EC50, menetelmä P)

Toksisuus asteikolla 1-4				
Näytekoodi	1	2	3	4
TOXT-900				X
TOXT-901				X
TOXT-902				X
TOXT-904				
TOXT-905				
TOXT-906				
TOXT-907				
TOXT-908		X		
TOXT-909				X
TOXT-910				X
TOXT-912				X
TOXT-913	X			
TOXT-914				
TOXT-916		X		
TOXT-917				X
TOXT-918				
TOXT-920				XX
TOXT-921		X		
TOXT-922		X		
TOXT-924			X	
TOXT-925				X
TOXT-926				X
TOXT-928				
TOXT-929				
TOXT-930				
TOXT-932				
TOXT-933				X
TOXT-934				
TOXT-936				X
TOXT-937		X		
TOXT-938				X
TOXT-940				X
TOXT-941		X		
TOXT-942				
TOXT-943				
TOXT-944				X
TOXT-945				
TOXT-946				
TOXT-948				X
TOXT-949			X	
TOXT-950				X
TOXT-952				X
TOXT-953			X	
TOXT-954				X
TOXT-956		X		
TOXT-957		X		
TOXT-958				X
TOXT-960				X
TOXT-961				X
TOXT-962			X	
TOXT-964			X	
TOXT-965			X	
TOXT-966		X		
TOXT-968				X
TOXT-969				X
TOXT-970				X
TOXT-972				X
TOXT-973		X		
TOXT-974				X
TOXT-976				X
TOXT-977	X			
TOXT-978		X		
TOXT-980				X
TOXT-981				X
TOXT-982				X
TOXT-984		X		
TOXT-985			X	
TOXT-986				X
TOXT-988				X
TOXT-989				X
TOXT-990				X
TOXT-992				X
TOXT-993				

Helsingin yliopisto, siittiötesti  
(laimennoskerroin, menetelmä P)

Toksisuus asteikolla 1-4				
Näytekoodi	1	2	3	4
TOXT-900				X
TOXT-901		X		
TOXT-902		X		
TOXT-904		X		
TOXT-905	X			
TOXT-906	X			
TOXT-907	X			
TOXT-908		X		
TOXT-909				X
TOXT-910		X		
TOXT-912	X			
TOXT-913	X			
TOXT-914		X		
TOXT-916		X		
TOXT-917				X
TOXT-918	X			
TOXT-920				XX
TOXT-921	X			
TOXT-922		X		
TOXT-924		X		
TOXT-925				X
TOXT-926				X
TOXT-928	X			
TOXT-929	X			
TOXT-930	X			
TOXT-932	X			
TOXT-933		X		
TOXT-934	X			
TOXT-936				X
TOXT-937				X
TOXT-938				X
TOXT-940		X		
TOXT-941	X			
TOXT-942	X			
TOXT-943	X			
TOXT-944				X
TOXT-945	X			
TOXT-946	X			
TOXT-948				X
TOXT-949			X	
TOXT-950		X		
TOXT-952				X
TOXT-953			X	
TOXT-954				X
TOXT-956	X			
TOXT-957	X			
TOXT-958		X		
TOXT-960				X
TOXT-961				X
TOXT-962				X
TOXT-964				X
TOXT-965				X
TOXT-966	X			
TOXT-968				X
TOXT-969				X
TOXT-970		X		
TOXT-972				X
TOXT-973	X			
TOXT-974				X
TOXT-976				X
TOXT-977	X			
TOXT-978				X
TOXT-980				X
TOXT-981		X		
TOXT-982				X
TOXT-984		X		
TOXT-985			X	
TOXT-986				X
TOXT-988				X
TOXT-989				X
TOXT-990				X
TOXT-992	X			
TOXT-993	X			

# näytekoodi

1 (tummennetut) =vauriokohde

0 (valkoiset) =verrokkikohde

# 1kk laatikkoon laskeutunut pöly

Itä-Suomen yliopisto, MTT-tes

Turun yliopisto, E. coli -testi

Helsingin yliopisto, siittiötesti (laimennoskerroin, menetelmä B)

Helsingin yliopisto, siittiötesti (laimennoskerroin, menetelmä A)

Työterveyslaitos, TNF-a

Työterveyslaitos, IL-8

Työterveyslaitos, LDH

	Näytekoodi	Toksisuus asteikolla 1-4			
		1	2	3	4
1	TOXT-600+601		x		
1	TOXT-602+603	x			
FB	TOXT-604	x			
1	TOXT-605+606			x	
1	TOXT-607+608		x		
0	TOXT-610+611				x
0	TOXT-612+613				x
1	TOXT-616		x		
1	TOXT-618			x	
1	TOXT-619				x
1	TOXT-620				x
1	TOXT-621			x	
1	TOXT-622		x		
1	TOXT-623			x	
1	TOXT-624	x			
1	TOXT-625	x			
0	TOXT-626	x			
0	TOXT-627				x
1	TOXT-628	x			
1	TOXT-629	x			
1	TOXT-630	x			
1	TOXT-631	x			
1	TOXT-632	x			
1	TOXT-633	x			
1	TOXT-635	x			
1	TOXT-636	x			
0	TOXT-637			x	
0	TOXT-638		x		
0	TOXT-639			x	
0	TOXT-640	x			
1	TOXT-641		x		
1	TOXT-642		x		
0	TOXT-643	x			
0	TOXT-644	x			
0	TOXT-645		x		
0	TOXT-646			x	
0	TOXT-647			x	
0	TOXT-648		x		
0	TOXT-649			x	
0	TOXT-650				x
0	TOXT-651		x		
0	TOXT-652	x			
0	TOXT-653	x			
0	TOXT-654	x			

	Näytekoodi	Toksisuus asteikolla 1-4			
		1	2	3	4
	TOXT-600+601	x			
	TOXT-602+603	x			
	TOXT-604			x	
	TOXT-605+606	x			
	TOXT-607+608	x			
	TOXT-610+611		x		
	TOXT-612+613	x			
	TOXT-616			x	
	TOXT-618	x			
	TOXT-619	x			
	TOXT-620	x			
	TOXT-621	x			
	TOXT-622	x			
	TOXT-623		x		
	TOXT-624	x			
	TOXT-625	x			
	TOXT-626			x	
	TOXT-627		x		
	TOXT-628	x			
	TOXT-629				x
	TOXT-630	x			
	TOXT-631		x		
	TOXT-632			x	
	TOXT-633			x	
	TOXT-635	x			
	TOXT-636			x	
	TOXT-637		x		
	TOXT-638	x			
	TOXT-639	x			
	TOXT-640			x	
	TOXT-641	x			
	TOXT-642	x			
	TOXT-643			x	
	TOXT-644			x	
	TOXT-645	x			
	TOXT-646	x			
	TOXT-647			x	
	TOXT-648		x		
	TOXT-649	x			
	TOXT-650	x			
	TOXT-651	x			
	TOXT-652	x			
	TOXT-653			x	
	TOXT-654				x

	Näytekoodi	Toksisuus asteikolla 1-4			
		1	2	3	4
	TOXT-600+601	x			
	TOXT-602+603	x			
	TOXT-604	x			
	TOXT-605+606	x			
	TOXT-607+608				
	TOXT-610+611				x
	TOXT-612+613	x			
	TOXT-616	x			
	TOXT-618	x			
	TOXT-619				x
	TOXT-620				x
	TOXT-621				x
	TOXT-622	x			
	TOXT-623	x			
	TOXT-624				
	TOXT-625				x
	TOXT-626	x			
	TOXT-627				x
	TOXT-628	x			
	TOXT-629	x			
	TOXT-630	x			
	TOXT-631				
	TOXT-632	x			
	TOXT-633				
	TOXT-635	x			
	TOXT-636				
	TOXT-637				x
	TOXT-638	x			
	TOXT-639				
	TOXT-640				
	TOXT-641				
	TOXT-642	x			
	TOXT-643				
	TOXT-644	x			
	TOXT-645				x
	TOXT-646				
	TOXT-647				x
	TOXT-648				x
	TOXT-649				x
	TOXT-650				x
	TOXT-651				
	TOXT-652	x			
	TOXT-653				
	TOXT-654				

	Näytekoodi	Toksisuus asteikolla 1-4			
		1	2	3	4
	TOXT-600+601	x			
	TOXT-602+603	x			
	TOXT-604	x			
	TOXT-605+606		x		
	TOXT-607+608	x			
	TOXT-610+611				x
	TOXT-612+613		x		
	TOXT-616	x			
	TOXT-618		x		
	TOXT-619			x	
	TOXT-620				x
	TOXT-621				x
	TOXT-622	x			
	TOXT-623	x			
	TOXT-624		x		
	TOXT-625				x
	TOXT-626		x		
	TOXT-627				x
	TOXT-628	x			
	TOXT-629	x			
	TOXT-630	x			
	TOXT-631	x			
	TOXT-632	x			
	TOXT-633	x			
	TOXT-635	x			
	TOXT-636				
	TOXT-637				x
	TOXT-638	x			
	TOXT-639			x	
	TOXT-640		x		
	TOXT-641				x
	TOXT-642	x			
	TOXT-643			x	
	TOXT-644		x		
	TOXT-645				x
	TOXT-646		x		
	TOXT-647				x
	TOXT-648				x
	TOXT-649				x
	TOXT-650				x
	TOXT-651		x		
	TOXT-652				
	TOXT-653	x			
	TOXT-654	x			

	Näytekoodi	Toksisuus asteikolla 1-4			
		1	2	3	4
	TOXT-600+601	x			
	TOXT-602+603	x			
	TOXT-604	x			
	TOXT-605+606		x		
	TOXT-607+608	x			
	TOXT-610+611				x
	TOXT-612+613		x		
	TOXT-616	x			
	TOXT-618		x		
	TOXT-619			x	
	TOXT-620				x
	TOXT-621				x
	TOXT-622	x			
	TOXT-623	x			
	TOXT-624	x			
	TOXT-625	x			
	TOXT-626		x		
	TOXT-627				x
	TOXT-628	x			
	TOXT-629	x			
	TOXT-630	x			
	TOXT-631	x			
	TOXT-632	x			
	TOXT-633	x			
	TOXT-635	x			
	TOXT-636		x		
	TOXT-637			x	
	TOXT-638	x			
	TOXT-639				x
	TOXT-640		x		
	TOXT-641				x
	TOXT-642		x		
	TOXT-643	x			
	TOXT-644	x			
	TOXT-645		x		
	TOXT-646			x	
	TOXT-647			x	
	TOXT-648				x
	TOXT-649		x		
	TOXT-650		x		
	TOXT-651	x			
	TOXT-652	x			
	TOXT-653		x		
	TOXT-654		x		

	Näytekoodi	Toksisuus asteikolla 1-4			
		1	2	3	4
	TOXT-600+601	x			
	TOXT-602+603	x			
	TOXT-604	x			
	TOXT-605+606		x		
	TOXT-607+608		x		
	TOXT-610+611				x
	TOXT-612+613		x		
	TOXT-616		x		
	TOXT-618			x	
	TOXT-619			x	
	TOXT-620				x
	TOXT-621				x
	TOXT-622		x		
	TOXT-623		x		
	TOXT-624		x		
	TOXT-625		x		
	TOXT-626			x	
	TOXT-627				x
	TOXT-628		x		
	TOXT-629		x		
	TOXT-630		x		
	TOXT-631			x	
	TOXT-632		x		
	TOXT-633		x		
	TOXT-635		x		
	TOXT-636			x	
	TOXT-637				x
	TOXT-638		x		
	TOXT-639				x
	TOXT-640				x
	TOXT-641				x
	TOXT-642				x
	TOXT-643		x		
	TOXT-644				x
	TOXT-645				x
	TOXT-646				x
	TOXT-647				x
	TOXT-648				x
	TOXT-649				x
	TOXT-650				x
	TOXT-651				x
	TOXT-652		x		
	TOXT-653				x
	TOXT-654				x

	Näytekoodi	Toksisuus asteikolla 1-4			
		1	2	3	4
	TOXT-600+601	x			
	TOXT-602+603	x			
	TOXT-604	x			
	TOXT-605+606	x			
	TOXT-607+608	x			
	TOXT-610+611				x
	TOXT-612+613		x		
	TOXT-616	x			
	TOXT-618			x	
	TOXT-619				x
	TOXT-620				x
	TOXT-621				x
	TOXT-622		x		
	TOXT-623		x		
	TOXT-624		x		
	TOXT-625		x		
	TOXT-626				x
	TOXT-627				x
	TOXT-628		x		
	TOXT-629		x		
	TOXT-630		x		
	TOXT-631				x
	TOXT-632		x		
	TOXT				

## TOXTEST hankkeen Helsingin Yliopiston osuus

Liite 11 TOXTEST loppuraporttiin:

Vaiheen 3 asuntonäytteiden tutkimus ja vertaaminen rakennusten i vaurio- ja asukkaiden terveyskyselytietoihin, sekä samoista näytteistä tehtyihin valobakteeritoksisuuden mittaustuloksiin.



## 11.1. Johdanto

### *Tutkimuksen toteuttaminen ja juoksutus*

Helsingin Yliopiston Elintarvike- ja ympäristötieteiden Its (mikrobiologia) vastasi siittiötestin soveltamisesta toksisuuden mittaamisessa asuntonäytteissä jen terveyshaittoihin liittyvien kosteus- ja homevaurioihin. Tutkimus- ja kehitystyön suunnittelivat ja toteuttivat FT Maria A Andersson, FT Raimo Mikkola ja tutkimusjohtaja Mirja Salkinoja-Salonen.

HY:n tutkijat analysoivat eri tavoin otettuja ja käsiteltyjä näytteitä lähes 600 kpl. HY:n tutkijat ovat koonneet TOXTEST hankkeen tähän loppuraportin Liitteeseen 11 tulokset TOXTEST Hankkeen III vaiheen tutkimusnäytteistä ja tuloksista. Tässä liiteraportissa esitellään tulokset , joilla selvitettiin eritavoin kerättyjen sisätilapölyjen soveltuvuus toksisuuden arviointiin siten, että terveyshaittoihin liittyvät sisätilaongelmat tunnistuvat mahdollisimman luotettavasti. Tästä syystä tämä Liite raportti 11 sisältää vertailuja pölyjen toksisuuden ja terveyshaitta kyselyn tulosten kesken. Työ tehtiin kaksoisokkotyönä niin, että HY:n tutkijat kehittivät ja toteuttivat useita erilaisia toksisuuden mittaamenetelmiä ja toksisuuden endpointteja.

Sisätilapölynäytteiden keruun ja käsittelyn toteutti THL (Terveiden ja Hyvinvoinnin laitos) , yhteistyössä UEF:n k (Itäsuomen Yliopisto, Kuopion yksikkö) . Näytteet (pyyhkäisynäytteet ja keräyslaatikonäytteet) uutettiin Kuopiossa ja toimitettiin lasiampulleissa kuriiripostilla Helsingin Yliopiston Elintarvike ja ympäristötieteiden laitoksen tutkijoille, jossa ne tutkittiin kahdella eri testillä: siittiöiden liikkuvuustesti ja siittiöiden sytotoksisuustesti.

Tiedot tutkimuksen kohteina olleiden asuntojen kokemista terveyshaitoista kokosi kyselytutkimuksen avulla THL. Asuinrakennusten kuntoteknisen tutkimuksen ja määrittämisen "vauriokohteeksi" tai "verrokkikohteeksi" teki THL (Kuopio).

Terveyshaittojen ja näytekohteina olleiden asuinrakennusten teknisten vaurioiden tutkimuksen toteutti THL/UEF. Niiden toteuttaminen ja tulokset on esitetty Liitteillä 7 ja 9.

Sekä rakennuksia että sen asukkaiden terveyshaittoja koskevat tiedot kerättiin sokkoutetusti, niin että näytteiden tutkijat (tässä: HY) eivät tienneet mistä rakennuksesta kukin näyte oli peräisin. Toteuttaj oli THL. Kummankin ryhmän mittaukset tehtiin kaksoisokkoutetusti.

Kun kaikki tulokset valmistuivat, koodit avattiin TOXTEST hankkeen kaikkien osapuolten läsnä ollessa 24.10.2013. Ne on esitelty Liitteellä 8. Rakennuksia koskevien kooditietojen yhdistäminen tutkimusnäytteiden (pölyt) koodeihin on esitetty Taulukossa 1/11. Terveyshaittaoiretiedot on koottuna Taulukkoon 2/11.

Koodien avaamisen jälkeen eri pölykeräysmenetelmiä (pyyhkäisynäytteet , keräyslaatikonäytteet) ja näytteistä mitattujen toksisuus-endpointtien (EC<sub>50</sub> määrittäminen siittiöiden liikkeen inhiboiminen; EC<sub>50</sub> määrittäminen sytotoksisuudelle) tuloksia (Taulukko 3/11) on verrattu rakennuksien asukkaiden oiretietoihin (Taulukko 4/11) , ja arvioitu, mikä sisätilapölyn toksisuuden mittaamenetelmistä parhaiten ilmentäisi sellaista sisätilatoksisuutta , joka näkyisi myös asukkaiden oireiluna. Nämä tulokset on esitelty Kuvissa 1 – 4/11.

Lopuksi vielä verrattiin siittiöillä mitattuja toksisuustuloksia Turun yliopistossa tehtyjen valobakteeritoksisuusmittauksien tuloksiin (Kuva 5/11).

## 11.2 Menetelmät

### 11.2.1. Siittiöiden liikkuvuustesti.

Siittiöiden liikkuvuustesti (L, motility) suoritettiin julkaistulla menetelmällä (Anderson ym. 2010). Tulostaulukossa ilmaistu  $EC_{50}$  tarkoittaa sitä tutkimusnäytteen (=pölyuute) pienintä pitoisuutta, jolle altistettuna yli puolet siittiöistä lakkaa uimasta.

### 11.2.2. Solukuoleman $EC_{50}$ arvon määrittäminen fluoresenssimenetelmällä (menetelmä P)

Tämä menettely sopii silloin kun tutkittavaa näytettä (mikrobeja, pölyä tai puhdistettua toksiinia) on käytettävissä niin niukasti, että motiliteetti mittaukseen tarvittavaa altisteen sarjalaimennosta ei voida tutkia.

Uudessa automaattisessa fluorometrisessä toksisuustestissä mitataan objektiivinen fluoresenssilukema solukuolemalle, joka mahdollistaa altisteen aiheuttaman sytotoksisuuden laskemisen altisteen  $EC_{50}$  arvona. Fluoresenssin intensiteetti mitataan siitä altisteen määrästä joka tappaa 50% altistetuista (elävistä) siittiöistä. Siittiöt altistetaan ravistelijassa, 37 °C lämpötilassa l. siittiöt altistetaan olosuhteissa joissa liikkuminen on indusoitu mutta siittiöiden liikkeen sammumisen säätelyn mekanismi on sivuutettu. Näissä stressaavissa olosuhteissa siittiöt kuolevat nopeasti, jos mitokondriot eivät toimi, solualvo on vaurioitunut tai solun joniliikenne on häiriintynyt.

Testin toteuttaminen. 96-kuoppaisen mikrotiiterilevyn kuoppiin pipetoidaan 0.1ml siittiöitä / kuoppa. Testiliuosta (testattava substanssi metanoli liuksena) lisätään 5, 2, 1 ja 0.5 ul. Levy peitetään kannella tiiviisti, laitetaan ravistelijaan 158 rpm 2h 37 °C. Tämän jälkeen jokaiseen kuoppaan lisätään 0.1ml propidium jodidi liuosta (20 mg/100ml siemen nesteen extenderia). Levy inkuboidaan fluoresenssivärin kanssa 10-20 min 37 °C pimeässä. Fluoresenssi mitataan fluorimetrillä (filtterit: 544/595).

Merkittävä toksisuus näkyy tällä menetelmällä  $EC_{50}$  arvona  $\leq 40 \mu\text{g/ml}$ .

### 11.2.3. Toksisuusvasteen laskeminen

Siittiöiden lukumäärä jokaisessa kuopassa on sama  $3 \times 10^5$  solua. 100% kuolleisuus mitataan nopeasti pakastetusta ja hitaasti sulatetusta näytteestä (sama siemenereä kuin testisiittiötkin). (Siittiöiden sakeuden pitää olla sama pakastetussa näytteessä ja kaikissa testikuopissa. Elävänä l. negatiivisena kontrollina käytetään metanolia 5, 2, 1, ja 0,5 ul. Taustan mittaamiseen käytettiin pelkkä siemen-extenderi ilman siittiöitä (0.1ml) ja propidium jodidi liuos (0.1ml).

### 11.2.4. Testin tekeminen ja kalibrointi

Kalibrintiaineena käytettiin triklosaania. ( $EC_{50}$  oli =  $1.75 \mu\text{g ml}^{-1}$   $SD \pm 0.5$  kolmella eri karjulla mitattuna).

#### 11.2.4. Toksisuustulosten tulkinta

Voidakseen elää terveenä, ihminen tarvitsee puhdasta ruokaa, juomaa ja hengitysilmaa. Koska sisätilapölyille ei toistaiseksi EU maissa ole toksineihin liittyviä virallisia raja-arvoja, olemme tässä tutkimuksessa noudattaneet sisätilapölyihin suhtautumisessa samoja linjoja kuin elintarvikkeiden mikrobiologisessa valvonnassa: jos elintarvike (tai juomavesi), josta otettu näyte sisältää mikrobibitoksiinia tai sen tuottajaa, se tulkitaan turvallisuusriskiksi ja kyseinen tuote määrätään poistettavaksi tarjolla pidosta (esim. työpaikkaruokalasta).

Toksiinia tai sen tuottajaa sisältävät elintarvike-erät määrätään yleensä käyttökieltoon ja poistettavaksi vaikka samassa tilassa olisi saatavissa myös ruokia, joista myrkyllisyyttä ei löydy. Puhtaiden ruokien läsnäolo ei vähennä tai neutraloi toksisten ruokien riskiä aiheuttaa terveysvaaraa. Saastuneet elintarvikkeet on poistettava tarjolla pidosta, koska niitä yksinkertaisesti ei saa olla ruokalutiloissa.

Elintarvikevalvonnan toimintamallin mukaisesti noudatamme tässä tutkimuksessa ajattelutapaa, jossa asunnosta löydettyjen toksisten pölynäytteiden lukumäärä ratkaisee toksisuuteen liittyvän terveysriskin, riippumatta siitä, onko tiloissa toksisten pölyjen ohella myös myrkyttämiä pölyjä.

### 11.3. Tulokset

#### 11.3.1 Pyyhkäisy-pölynäytteet

Tutkittiin toksisuus 72 asuinrakennuspyyhkäisy-pölynäytettä (Taulukko 11/1). Koska pölyjä oli kerätty enintään kolme per rakennus, katsomme, että myrkyllisimpiä sisätiloja indikoi se jos kaikki kolme pölyä ovat merkittävän toksisia (määritelmä, ks. 11.2.2., sivulla 2. Seuraavaksi haitallinen tilanne on se, jos yli puolet pölyistä on toksisia (jos on 3 pölyä, niin siis 2 toksista). Vähiten haitallisia olisivat näin ollen ne asunnot, joiden pölyistä vähemmän kuin puolet olivat merkittävän myrkyllisiä (tässä tapauksessa 0 – 1 toksista pölyä / asunto).

Yhteensä 14 rakennuksesta (Rakennukset # 5,9,14,17, 21, 25, 22, 27, 28, 34,42, 44, 46, 48) saatiin tarvittu 3 pölyä/asunto. Kahdessa rakennuksessa kaikki pölyt olivat merkittävän toksisia: #22, #27. Kuusi rakennusta oli sellaisia (#48, #46, #42, #5, #14, #44) joissa kaksi pölyä (kolmesta), siis yli puolet, oli toksisia. Näistä kolmen ensimmäisen näytteet olivat toksisuudeltaan samat (kullakin oli  $EC_{50}$  = 10 ja  $20 \mu\text{g/ml}$ ). Kolme, #9, #14, #44 hieman vähemmän myrkyllisiä pölyjä,  $EC_{50}$  arvot 30 – 40  $\mu\text{g/ml}$ . Kaikki THL:n vauriokohteiksi luokittelemat asunnot (# 22, 27, 48, 46, 14) olivat näitä asuntoja joissa yli puolet näytteistä oli merkittävän toksisia. Muut pölyä sisälsivät joukossa, oli luokiteltu (THL) vauriokohteiksi, loput 9 rakennusta olivat verrokkirakennuksia (Taulukko 1/11). Lisäksi yhdestä

rakennuksesta saatiin 2 pyyhkäisyypölyä. Näiden pyyhkäisyypölyjen sytotoksisuudet, siittiöillä mitattuna, on näytetty kuvassa 1-11.

**Taulukko 11-1.**

**Helsingin yliopisto, siittiöttesti (EC50)  
menetelmä P) µg/ml**

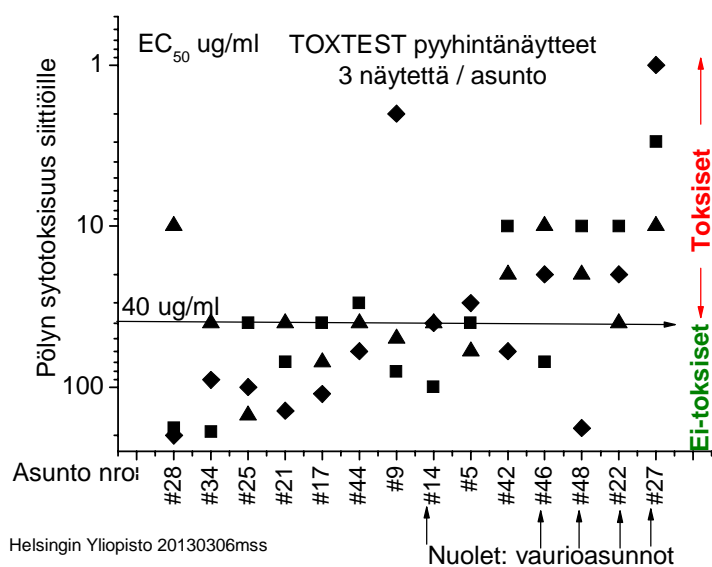
Näytekoodi	Pyyhintänäytteet EC <sub>50</sub> µg/ml				laimennus kerroin P
		rak. Num	EC <sub>50</sub> L=motility	EC <sub>50</sub> PI	
TOXT-900	0.25mg/ml	0/ 27	ET	3	100
TOXT-901	0.081	1/27	ET	1	50
TOXT-902	0.583	1/27	ET	10	50
TOXT-904	0	1/19	ET	ET*	200
TOXT-905	0	1/19	ET	ET	20
TOXT-906	0.25	1/19	ET	ET	20
TOXT-907	0	FieldBlank	ET	ET	20
TOXT-908	5,2	1/14	10	100	50
TOXT-909	4,3	1/14	10	40	200
TOXT-910	2,1	1/14	10	40	200
TOXT-912	0.3	1/37	ET	10	20
TOXT-913	6,3	1/37	60	300	20
TOXT-914	0	1/37	ET	ET*	200
TOXT-916	8,1	1/15	80	160	50
TOXT-917	6,9	1/15	20	40	200
TOXT-918	0	1 /15	ET	ET	20
TOXT-920	14	0/25	30	<90	200
TOXT-921	5	0/25	30	100	20
TOXT-922	5,2	0/25	30	150	50
TOXT-924	3,8	1/46	20	70	50
TOXT-925	1,5	1/46	20	20	100
TOXT-926	2,3	1/46	20	10	200
TOXT-928	0,17	1/41	ET	ET	20
TOXT-929	0	1/41	ET	ET	20
TOXT-930	0	1/41	ET	ET	20
TOXT-932	0,92	1/7	ET	20	20
TOXT-933	1,92	1/7	10	20	50
TOXT-934	0	1 /7	ET	ET	20
TOXT-936	5,6	1/48	10	10	200
TOXT-937	8,8	1/48	40	180	50
TOXT-938	8,3	1/48	10	20	>200
TOXT-940	2,5	1/43	6	50	20
TOXT-941	3	1/43	30	150	20

TOXT-942	0	1/43	ET	ET	20
TOXT-943	0	FB	ET	ET	20
TOXT-944	16	1/32	10	≤10	>200
TOXT-945	0	1/32	ET	ET	20
TOXT-946	0	1/32	ET	ET	20
TOXT-948	3,8	42	4	10	200
TOXT-949	6,3	42	30	60	100
TOXT-950	0,75	42	ET	20	50
TOXT-952	5,4	44	10	30	200
TOXT-953	6,3	44	30	60	100
TOXT-954	3,6	44	10	40	100
TOXT-956	3,2	28	30	160	20
TOXT-957	4	28	40	200	20
TOXT-958	0,58	28	ET	10	50

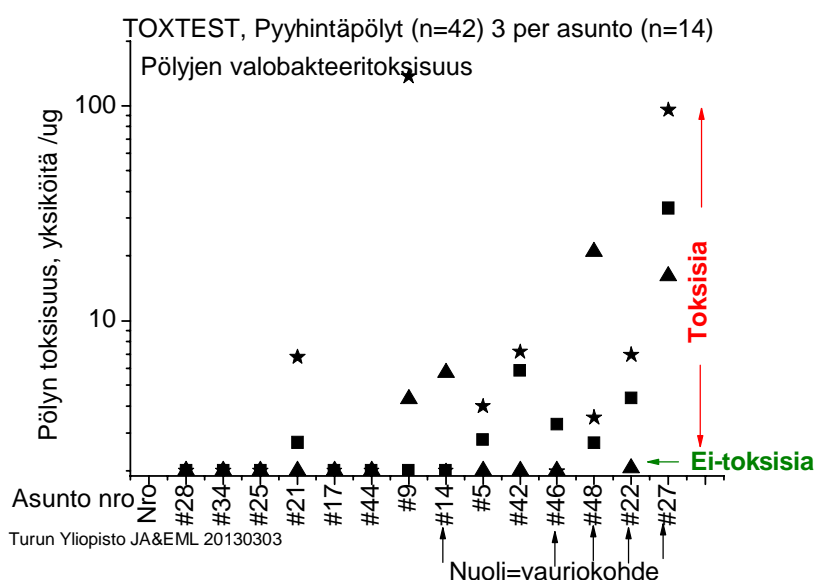
Kuvasta 1-11 ja taulukosta 1-11 näkee, että asuntokohteista saaduista kolmesta pyyhkäisyöpölyistä per rakennus, kaikki kolme olivat merkittävän toksisia ( $EC_{50} \leq 40 \mu\text{g/ml}$ , ks. 11.2.2., sivulla 3.) rakennuksissa #22, #27. Senlisäksi yli puolet pyyhkäisyäytteistä (siis 2 pölyä kolmesta) olivat poikkeavan toksisia rakennuksissa #48, #46, #42. Näiden joukossa oli kaksi vauriokohdetta (#46, #48). Viides vauriokohde oli #14, josta tuli kaksi toksista näytettä (kuvassa 1-11 on 2 täplää päällekkäin ( $EC_{50} = 40 \mu\text{g/ml}$ )).

Niiden rakennusten joukossa, joiden kolmesta näytteestä alle puolet (0 – 1kpl, oli myrkyllisiä, rakennukset #28, #34, #25, #21, #17, #9,) ei ollut yhtään THL:n vauriokohteeksi luokittelemaa asuntoa.

Tässä 3. vaiheen pyyhkäisyäytesarjassa otettiin vain kolme pyyhkäisyäytettä per asunto, minkä vaikeuttaa tilastollista tarkastelua. On mahdollista, että kohteiden väliset erot täsmentyvät, jos johdosta tilastollinen varmuus on vaatimatonta yksittäisen rakennuksen kohdalla. Jos tutkittavaksi saadaan 10-20 näytettä per asunto / koulu/päiväkoti niin kuin muissa tutkimuksissa on tehty (Salin ym, 2012), niin tilastollinen varmuus saattaa parantua.



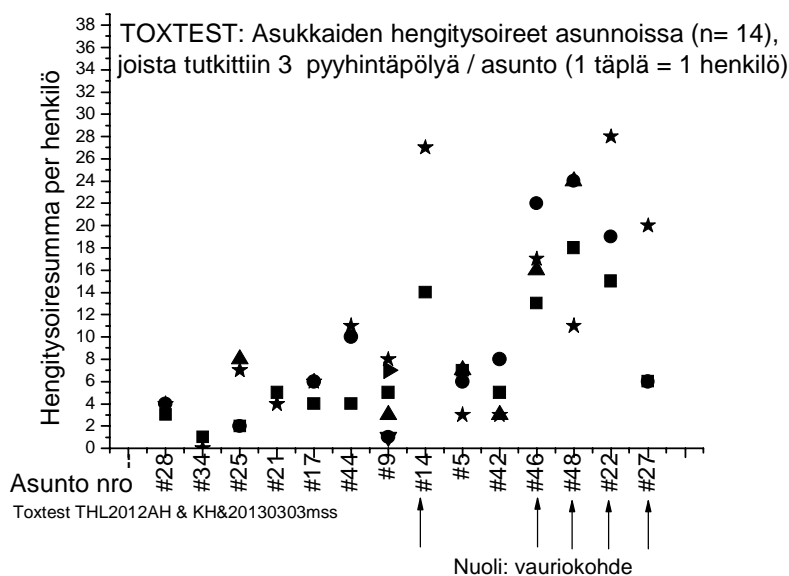
Kuva 1-11. Pyyhkäisynäytteiden toksisuusmittausten tulokset. Niiden 14 asunnon pyyhkäisypölyjen sytotoksisuus (siittiö) , joista saatiin 3 pyyhkäisynäytettä per asunto. Toksisuusmittaustiedot ovat taulukosta 1-11. Vauriokohteiksi luokiteltuja (THL) olivat asunnot #27, #22, #46, #48, #14. Tulosten tarkastelutapa: - Määritettiin viitearvo merkittävälle toksisuudelle. Siittiöiden sytotoksisuus- viitearvo tarkoittaa sitä että näytteet joiden EC<sub>50</sub> on PIENEMPI kuin 40 µg/ml , ovat tappavan myrkyllisiä soluille.



Kuva 2-11. Pyyhkäisypölynäytteiden toksisuusmittauste tulokset *E. coli* bakteerilla toteutettuna (alkuperäisdata, ks. liite 12, Turun Yliopiston tulokset.). Tuloksista näkee, että samat pölyuutteet, jotka olivat siittiötoksisia, olivat toksisia myös valobakteeritestissä (rakennukset #27, #22, #48, #46,#42, #5, # 14), lukuun ottamatta # 44..

Ne pyyhkäisy-pölyt, jotka olivat toksiset "kärjessä" siittiöiden sytotoksisuustestissä (#27, #22, #48, #46, , olivat ovat pyyhintä-pölyjä. Nämä kaikki oli THLÖ luokitellut vauriokohteiksi. Viides vauriokohdepöly, #14, näkyy kohonneena toksisuutena (kuva 2-11).

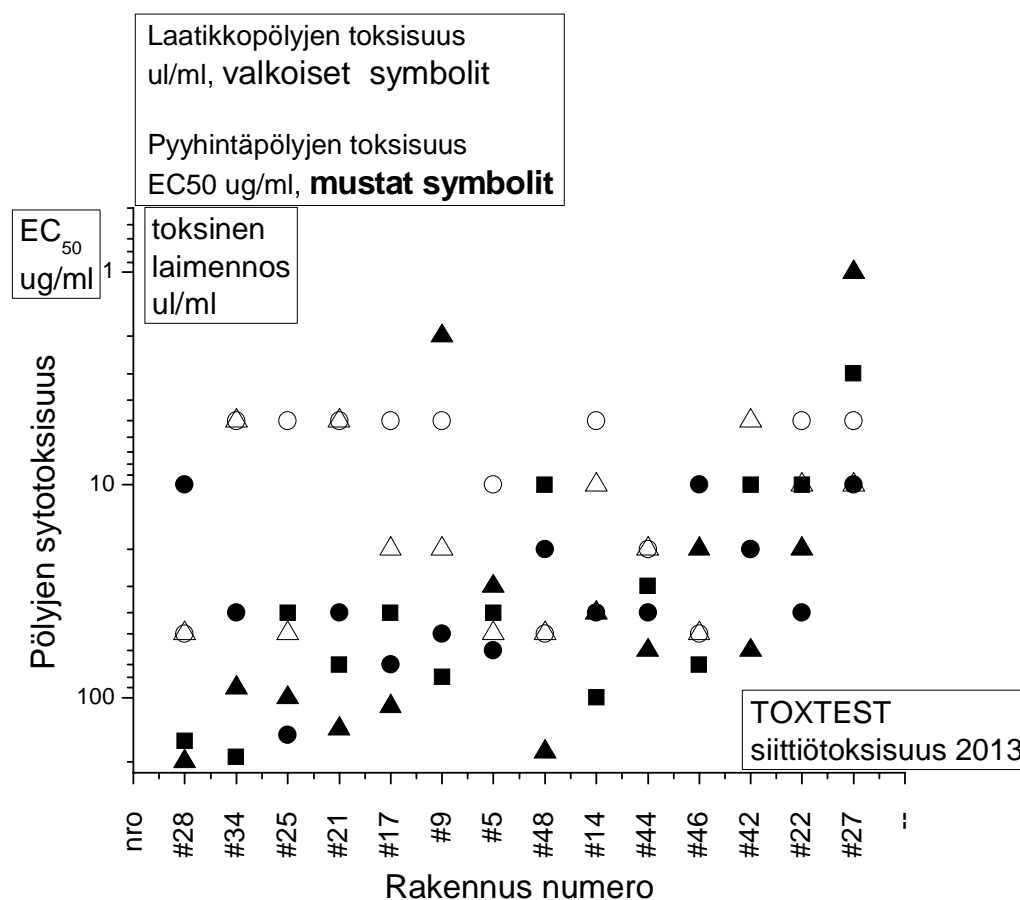
Kuva 3\_11 näyttää miten hengitysoireet esiintyvät näissä in vitro testeissä toksisiksi tunnistettujen pölyjen keräyspaikasta.



Kuva 3-11. Hengitysoireet TOXTEST hankkeen asukkailla . Data on THL:n keräämää (Ks. Liite 7). Kuvasta näkee, että samojen rakennusten pölyt, jotka olivat siittiöille sytotoksisia, valobakteereille tappavia, liittyvät myös ihmisten hengitystiesairasteluun.

Taulukko 2-11. Toksisen pölyn esiintyvyys vauriokohteissa verrattuna verrokkikohteisiin, sekä yhteydet oiretietoon. Toksiseksi luokiteltiin pöly jonka EC50 siittiön sytotoksisuustestissä on < 40 µg/ml. Oirekyselyt suunnitelti ja toteutti THL (ks. Liite 7) Pyyhkäisy-pölyn toksisuustieto (syttotoksisuus siittiöille) on Taulukosta 1-11, näkyy myös kuvassa 1-11.

	Vauriokohde		Verrokkikohde		Vaurio/verrokki
Sytotoksinen pöly	9/15	60%	5/27	19%	3,2
Valobakteerille toksinen pöly	10/15	66%	7/27	26%	2,5
<i>Oirekysely</i>	<i>Oiresumma</i>	<i>Summa/hlö</i>	<i>Oire-summa</i>	<i>Summa/hlö</i>	
Hengitysoireet	284	18	168	5.4	3,3
Silmäoireet	59	3,7	20	0,6	6,2
Kipuilu	82	5,1	51	1,6	3,2
Ihon oireet	42	2,6	35	1,6	1,2
Yleisoireet	104	6,5	1.6	2,8	2,3



Kuva 4-11. Keräyslaatikkopölyn toksisuuden mittaaminen asunnoista (TOXTEST). Kuvassa mustat symbolit ovat niiden 14:n asuinrakennuksen keräyslaatikkopölyjen uutteen, joiden pyyhkäisy-pölyjen toksisuudet on näytetty siittiöille kuvassa 1-11, ja valobakteerille kuvassa 2-12. Keräyslaatikkopölyille (valkoiset symbolit) ei voitu laskea EC50 arvoja (ominaismyrkyllisyyttä, vasemmanpuolinen Y-akseli) koska punnitustietoja ei ollut. Tulokset on kuvassa näytetty tilavuusmittana: kuinka monta mikrolitraa kyseistä pölyuutetta voi laittaa per ml siittiösuspensiota. (oikeanpuolinen Y-akseli).

Kuvasta 4-11 näkee että keräyslaatikkopölyt (n= 28) ovat lähes samalla tasolla pääosassa näytteitä. Mitään korrelaatiota viittaavaa pyyhkäläpölyjen toksisuuden ja keräyslaatikkopölyn kanssa toksisuuksien välillä ei näytä olevan, eikä siis myöskään valobakteeritoksisuudelle (kuva 2-11), eikä hengitysoireiden kanssa (kuva 3-11).



## 11.4 Johtopäätöksiä

TOXTEST hankkeessa tehtiin monipuolisesti mittauksia eri tekniikoilla. Tuloksista käy ilmi, että useat eri parametrit ryhmittävät samalla tavalla ne 14 rakennusta, joista saatiin kaikkia 3. vaiheessa mitattuja suureita täysi määrä (3 pyyhkäisynäytettä, 2 keräyslaatikonäytettä per rakennus, sekä terveyshaittatiedot (oireet) ja rakennusten tekninen kunto (Vauriokohde vs. verrokkikohde).

-Kaikki ne kohteet (n=2) joista löytyi 3/3 siittiöille tai E. colille (fotobakteeri) sytotoksisia pyyhintänäytteitä, olivat vauriokohteita.

-Kahdeksasta rakennuksesta löytyi fotobakteeritoksisia pyyhkäisypölyjä. Niihin sisältyi kaikki 5 vauriokohdetta.

-Hengitysoireet asukkailla keskittyivät niihin rakennuksiin, joiden pyyhkäisypölyistä vähintään 2/3 oli merkittävästi toksista ( $50 < 40 \text{ ug/ml}$ )

- Keräyslaatikkopölytjen toksisuus (tilavuuden pohjalta laskettuna, koska punnitustietoja ei ollut) ei näytä liittyvä mihinkään muuhun parametriin, paitsi mahdollisesti pölyn määrään (ks. Liite 10)

- Merkittävästi toksisten ( $< 40 \text{ ug/ml}$ ) pyyhkäisypölynäytteiden lukumäärät vaurioasunnoissa kaikkiaan (5 asuntoa) oli 60 -70 % kaikista näiden asuntojen pyyhkäisypölyistä, niin siittiöiden sytotoksisuudella kuin E. coli letaalitoksisuudellakin määritettynä. Sensijaan verokkiasunnoista nämä prosentit olivat 20-30%, eli < puolet.

-Asukkaat raportoivat hengitys, yleis- ja kipuoireita vauriokohdeasunnoista 2-3 kertaisesti enemmän kuin verrokkikohteista. Sama suhdeluku esiintyy näiden kohteiden pyyhkäisypölyjen letaalitoksisuudessa siittiöille (sytotoksisuus, kuolema) ja valobakteeri E. colille (bakterisidisyys).

- tutkimustulokset viittaavat siihen, että sisätilapölyjen toksisuutta nisäkässoluille, mutta myös E. colille, tutkimalla saadaan lukuarvoja, jotka (syistä joita tässä tutkimuksessa ehditty selvittää) heijastavat asukkaiden raportoimia terveyshaittaoireita. Asiaa voi yrittää hyödyntää vauriokohteiden etsinnässä etenkin silloin kun rakennuksessa ei ole helposti silmin tai teknisin mittarein havaittavia kosteusvaurioita.

-

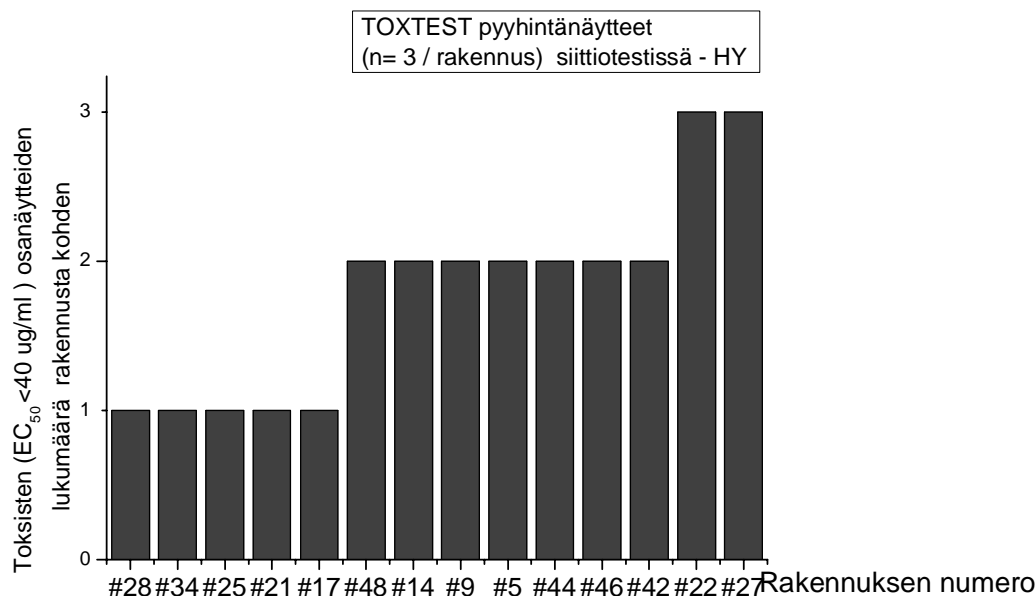
Taulukko 3-11. TOXTEST näytteiden sytotoksisuus  
siittiöllä mitattuna

20130208

Maria A. Andersson & Mirja Salkinoja-Salonen, Helsingin Yliopisto. Lukuarvot Harri Aleniuksen taulukosta 27.11.2012.

Rakennus Nro	TOXTEST nro	EC <sub>50</sub> µg/ml	TOXTEST nro	EC <sub>50</sub> µg/ml	TOXTEST nro	EC <sub>50</sub> µg/ml	kpl toksisia pyyhintä		Laatikkonäytteet suurin toksinen laimennos		suurin toksinen laimennos
							näytteitä	TOXTEST nro	µl/ml	TOXTEST nro	µl/ml
#28	TOXT-956	160	TOXT-957	200	TOXT-958	10	1	TOXT-653	50	TOXT-652	50
#34	TOXT-984	190	TOXT-985	90	TOXT-986	40	1	TOXT-649	5	TOXT-650	5
#25	TOXT-920	40	TOXT-921	100	TOXT-922	150	1	TOXT-610- 611	5	TOXT-612- 613	50
#21	TOXT-972	70	TOXT-973	140	TOXT-974	40	1	TOXT-647	5	TOXT-648	5
#17	TOXT-976	40	TOXT-977	110	TOXT-978	70	1	TOXT-639	5	TOXT-640	20
#48	TOXT-936	10	TOXT-937	180	TOXT-938	20	2	TOXT-632	50	TOXT-633	50
#14	TOXT-908	100	TOXT-909	40	TOXT-910	40	2	TOXT-618	5	TOXT-619	10
#9	TOXT-980	80	TOXT-981	2	TOXT-982	50	1	TOXT-645	5	TOXT-646	20
#5	TOXT-960	40	TOXT-961	30	TOXT-962	60	2	TOXT-637	10	TOXT-638	50
#44	TOXT-952	30	TOXT-953	60	TOXT-954	40	2	TOXT-643	20	TOXT-644	20
#46	TOXT-924	70	TOXT-925	20	TOXT-926	10	2	TOXT-630	50	TOXT-631	50
#42	TOXT-948	10	TOXT-949	60	TOXT-950	20	2	TOXT-626	20	TOXT-627	5
#35	TOXT-988	et	TOXT-989	30	TOXT-990	20		TOXT-651	50	TOXT-652	50
#22	TOXT-968	10	TOXT-969	20	TOXT-970	40	3	TOXT-641	5	TOXT-642	10
#27	TOXT-900	3	TOXT-901	1	TOXT-902	10	3	TOXT-620	5	TOXT-621	10

et = ei punnittavaa määrää saatavilla (ei voi laskea  
EC<sub>50</sub>)



Kuva 5-11. Kuva näyttää, miten monta rakennuksen sisätilapölyn pyyhintänäytettä oli yhtä toksisia tai toksisempia kuin pölyn sytotoksisuudelle siittiötestissä ehdotettu viitearvo (EC<sub>50</sub>, 40 ug/ml). Kun tutkittiin 14:n asuinrakennuksen pyyhintänäytteet, 3 näytettä per asunto (yht. 42 näytettä), löytyi kaksi rakennusta (#22, #27), joissa kaikki kolme pölyä olivat EC<sub>50</sub> ≤ 40 µg/ml, 7 rakennusta joiden kolmesta pyyhintänäytteestä kahden EC<sub>50</sub> oli ≤ 40 µg/ml, ja viisi rakennusta joista kustakin löytyi yksi näin sytotoksinen pyyhintäpöly. Rakennusta, jonka 3:sta pyyhintäpölystä yksikään olisi yletynyt tasolle EC<sub>50</sub> ≤ 40 µg/ml ei näiden 14 tutkitun joukosta löytynyt. Mukana ovat TOXTEST hankkeen kaikki ne rakennukset, joista saatiin kolme punnittua pyyhintäpölyä. THL:n mukaan rakennukset #14, 22, 27, 46, 48 olivat terveyshaittakohteita, # 27 oli kosteus- ja mikrobivaurioauriokohde. Homeen haju oli kirjattu kohteista #14, 22, 46, 48 (MAA & MSS, 20130210).

#### Lähdeviitteet.

Alm K., Taponen J., Dahlbom M., Tuunainen E., Koskinen E., Anderson M. 2001. A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. *Theriogenology* 56:677-674

Andersson, M.A. Mikkola, R., Rasimus, S., Hoornstra, D., Salin, P., Rahkila, R., Heikkinen, M., Mattila, S., Peltola, J., Kalso, S., Salkinoja-Salonen, M., 2010. Boar spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosols. *Toxicology in Vitro*, 24, 2041-2052

Salin, P.J., Salin, J.T., Andersson, M.A., Holma, T., Nelo, K., Salkinoja-Salonen, M.S. 2012. Sisätilänäytteiden toksisuus ja terveyshaitta-oireet kouluissa. SIY raportti 30, sivut 159 – 164. Sisäilmayhdistys, Espoo

# Liite Toxtest-loppuraporttiin

## *Escherichia coli-lux testin tulokset*

*Esa-Matti Lilius ja Janne Atosuo*

Biokemian laitos, Turun yliopisto

20014 Turun yliopisto

[esalil@utu.fi](mailto:esalil@utu.fi); [janato@utu.fi](mailto:janato@utu.fi)

TY:n *E.coli*-lux-testin tulkinta (taulukko 2 loppuraportti) tehtiin prospektiivisesti väärin pitoisuuksien perusteella johtuen lähetyksien väärästä tulkinnasta. Kun tulokset tulkittiin retrospektiivisesti uudestaan oikeiden pitoisuuksien perusteella, saatiin tämän liitteen taulukko 1:n ja taulukko 2:n esittämät tulokset. Kun näiden tulosten perusteella arvioitiin menetelmän suorituskykyä, saatiin seuraavat tulokset:

Vauriotalojen keskiarvo  $7,3 \pm 10,1 \times 10^4$  kuollutta bakteeria/ $\mu\text{g}$  uutetta (n=25). Vastaava kontrollitalojen keskiarvo on  $1,2 \pm 2,3 \times 10^4$  kuollutta bakteeria/ $\mu\text{g}$  uutetta (n=32). Ero on merkittävä arvolla 0,0018. Tämä tulos on saatu poistamalla Chauvenetin kriteerin mukaisesti molemmista populaatioista yksi täysin poikkeava arvo (95,65 vaurio ja 137,86 kontrolli). Jos näin ei tehdä, niin vauriotalojen ka. on  $10,7 \pm 20,0$  (n=26, 10 näytettä ei sisältänyt lainkaan pölynäytettä ja jätetty huomiotta) ja kontrollien  $5,4 \pm 23,9$  (n=33). Tällöin merkitsevyys on 0,37. Vauriotaloista otetuista näytteistä oikeita positiivisia on 18/26 eli 69%. Kontrollitaloista otetuista näytteistä oikeita negatiivisia on 24/33 eli 73%. Menetelmän sensitiivisyys ja spesifisyys on siis n. 70%. Jos lasketaan vauriotalot, joista olemme saaneet vähintään yhden näytteen positiiviseksi, on luku 10/12 eli 83%. Kontrollitaloja, joissa kaikki näytteet olivat negatiivisia, oli 6/11 eli 55%. Tällöin siis sensitiivisyys on n 80% ja spesifisyys n 60%. ROC-analyysin perusteella testi on toiminut kohtalaisen ja hyvän rajamailla. Rakennus 27 oli selvästi toksisin.

Laatikkonäytteissä vauriotalojen ka on  $4,8 \pm 5,9 \times 10^4$  kuollutta bakteeria/ $\mu\text{l}$  uutetta (n=24) ja kontrollitalojen ka on  $3,7 \pm 6,6$  (n=20). Eron merkitsevyys on tasolla 0,54. Positiivisia näytteitä vauriotaloissa oli 14/24 eli 58% ja negatiivisia näytteitä kontrollitaloissa oli 13/20 eli 65%. Näin ollen laatikkonäytteissä sensitiivisyys ja spesifisyys oli n 60%. Taloista vastaavasti oikeita positiivisia oli 9/12 eli 75% ja kontrolleista oikeita negatiivisia 4/10 eli 40%.

Näistä tuloksista voidaan päätellä, että meidän toksisuusmenetelmällämme pyyhkäisynäytteet toimivat vähän paremmin kuin laskeumanäytteet, joissa erityisesti kontrollitalojen näytteet olivat yllättävän toksisia. Osaltaan tulos voi johtua siitä, että pyyhintänäytteiden pölymäärä tunnettiin.

**Taulukko 1. pyyhkäisynäytteet**

	Näytekoodi	E.coli
0	TOXT-920	0
0	TOXT-921	0
0	TOXT-922	0
0	TOXT-948	5,85
0	TOXT-949	7,17
0	TOXT-950	0
0	TOXT-952	0
0	TOXT-953	0
0	TOXT-954	0
0	TOXT-956	0
0	TOXT-957	0
0	TOXT-958	0
0	TOXT-960	2,8
0	TOXT-961	4
0	TOXT-962	0
0	TOXT-964	0
0	TOXT-965	0
0	TOXT-966	6,12
0	TOXT-972	2,71
0	TOXT-973	6,77
0	TOXT-974	0
0	TOXT-976	0
0	TOXT-977	0
0	TOXT-978	0
0	TOXT-980	0
0	TOXT-981	137,86
0	TOXT-982	4,31
0	TOXT-984	0
0	TOXT-985	0
0	TOXT-986	0
0	TOXT-988	0
0	TOXT-989	0
0	TOXT-990	0
1	TOXT-900	33,83
1	TOXT-901	95,65
1	TOXT-902	16,17
1	TOXT-904	*0
1	TOXT-905	*0
1	TOXT-906	12,04

1	TOXT-908	0
1	TOXT-909	0
1	TOXT-910	5,74
1	TOXT-912	35,52
1	TOXT-913	0
1	TOXT-914	*0
1	TOXT-916	0
1	TOXT-917	0
1	TOXT-918	*0
1	TOXT-924	3,3
1	TOXT-925	1,99
1	TOXT-926	0
1	TOXT-928	16,9
1	TOXT-929	*0
1	TOXT-930	*0
1	TOXT-932	7,8
1	TOXT-933	3,18
1	TOXT-934	*0
1	TOXT-936	2,69
1	TOXT-937	3,54
1	TOXT-938	20,95
1	TOXT-940	0
1	TOXT-941	4,74
1	TOXT-942	*0
1	TOXT-944	0
1	TOXT-945	*0
1	TOXT-946	*0
1	TOXT-968	4,36
1	TOXT-969	6,94
1	TOXT-970	2,06
FB	TOXT-907	0
FB	TOXT-943	0
MB	TOXT-992	0
MB	TOXT-993	0

**HUOM: \* Tähdellä merkityissä näytteissä näytteenotto on epäonnistunut siten että ne eivät sisällä lainkaan pölyä! Niitä ei tietenkään ole otettu laskuissamme huomioon!**

**Taulukko 2. laskeumamaljanäytteet**

Näytekoodi	E.coli
TOXT-610+611	3,98
TOXT-612+613	0
TOXT-626	18,5
TOXT-627	0
TOXT-637	0
TOXT-638	3,64
TOXT-639	0
TOXT-640	0
TOXT-643	0
TOXT-644	18,58
TOXT-645	0
TOXT-646	3,12
TOXT-647	0
TOXT-648	0
TOXT-649	0
TOXT-650	0
TOXT-651	0
TOXT-652	0
TOXT-653	16,8
TOXT-654	9,2
TOXT-600+601	3,74
TOXT-602+603	3,5
TOXT-605+606	0
TOXT-615	13,8
TOXT-607+608	0
TOXT-616	16,8
TOXT-618	0
TOXT-619	0
TOXT-620	3,37
TOXT-621	0
TOXT-622	0
TOXT-623	3,54
TOXT-624	0
TOXT-625	3
TOXT-628	4,18
TOXT-629	12,5

TOXT-630	0
TOXT-631	0
TOXT-632	8,74
TOXT-633	8,1
TOXT-635	17
TOXT-636	14,2
TOXT-641	0
TOXT-642	3,58
TOXT-604	5,6