Työterveyslaitos | Arbetshälsoinstitutet
Finnish Institute of Occupational Health

TIETOA TYÖSTÄ

Torjuntaeliöiden allergeenit kasvihuonetyössä

Loppuraportti tutkimuksesta Torjuntaeliöiden allergeenit kasvihuonetyössä

HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI
LÄÄKETIETEELLINEN TIEDEKUNTA
MEDICINSKA FAKULTETEN
FACULTY OF MEDICINE

Työsuojelurahasto
Arbetarskyddsfonden
The Finnish Work Environment Fund

Piia Karisola
Hille Suojalehto
Terhi Vesa
Tapani Tuomi
Marc Baumann
Teija Inkinen
Irmeli Lindström
Katri Suuronen

Työterveyslaitos

PL 40

00032 TYÖTERVEYSLAITOS

ttl.fi

Toimitus: Piia Karisola, Hille Suojalehto

Valokuvat: Kari Salmi, Tapani Tuomi

Piirrokset: Piia Karisola, Terhi Vesa, Pyry Alenius

© 2026 Työterveyslaitos ja kirjoittajat

Hanke on toteutettu Työsuojelurahaston tuella.

Tämän teoksen osittainenkin kopiointi on tekijänoikeuslain (404/61, siihen myöhemmin tehtyine muutoksineen) mukaisesti kielletty ilman asianmukaista lupaa.

ISBN 978-952-391-278-6 (PDF)

Esipuhe

Kasvihuonetuotannossa hyödynnetään yhä enemmän biologista torjuntaa, jossa tuhohyönteisten torjunta perustuu petohyönteisten ja muiden eliöiden käyttöön kemiallisten kasvinsuojeluaineiden sijaan. Biologinen torjunta on tärkeä osa kestävää kasvintuotantoa, mutta sen lisääntyessä on tarpeen arvioida myös työntekijöiden terveyteen liittyviä mahdollisia riskejä. Kasvihuonetyöntekijät voivat altistua työssään biologisille torjunta-eliöille ja niiden proteiineille, joiden mahdollisia allergisoivia vaikutuksia tunnetaan edelleen verrattain huonosti.

Tutkimuksen lähtökohtana oli tarve lisätä tietoa biologiseen torjuntaan liittyvistä allergiariskeistä ja erityisesti siitä, voivatko kasvihuoneissa käytettävät eliöt aiheuttaa työntekijöille allergista herkistymistä. Tutkimuksessa keskityttiin erityisesti petolude Macrolophus pygmaeus -lajiin. Kehitimme menetelmiä petoluteen proteiinien eristämiseen ja tunnistamiseen sekä selvitimme niiden IgE-välitteistä reaktiivisuutta. Erityisenä kohteena oli tropomyosiini, joka tunnetaan useista selkärangattomista eliöistä löytyvänä allergeenisena proteiinina. Tutkimuksessa puhdistettua M. pygmaeus -tropomyosiinia verrattiin myös muiden lajien tropomyosiineihin ja sen IgE-reaktiivisuutta tutkittiin erilaisilla immunologisilla menetelmillä.

Hankkeen tavoitteena ei ole ollut asettaa biologista torjuntaa vastakkain työntekijöiden terveyden kanssa, vaan tuottaa tietoa, jonka avulla biologisen torjunnan mahdolliset terveysriskit voidaan tunnistaa ja ottaa paremmin huomioon. Tutkimustieto on tärkeää sekä työntekijöiden työturvallisuuden että biologisen torjunnan turvallisen ja kestävän käytön kehittämisen kannalta. Toivomme, että tämän hankkeen tulokset lisäävät ymmärrystä biologiseen torjuntaan liittyvistä allergiariskeistä ja auttavat jatkossa kehittämään herkistymisen tutkimista, allergiadiagnostiikkaa sekä altistumisen seurantaa ja käytännön toimintatapoja, joilla kasvihuonetyö voidaan tehdä turvallisesti myös biologisen torjunnan laajentuessa.

Tämän projektin ulkopuolisista henkilöistä haluamme lämpimästi kiittää FT Joseph Ndikaa ja Pyry Aleniusta, jonka pro gradu -työssä tehdyt alustavat tutkimukset toimivat ponnahduslautana tälle tutkimukselle. Kiitämme myös FT Lorenz Aglasia ja FM Andre Stapelfeldiä eliölysaattien IgE-sitoutuvuuden tutkimisesta, sekä FT Sami Tuomivaaraa allergeenien massa-analyyseista. Panoksenne oli arvokasta kokeellisen osion onnistumiselle.

Hankkeen päärahoittajia olivat Työsuojelurahasto sekä Helsingin yliopisto ja Työterveyslaitos, joita kiitämme tuesta. Projektilla oli aktiivinen ohjausryhmä, jonka jäsenten asiantuntemuksesta oli suurta hyötyä tutkimuksen toteuttamisessa, koulutusmateriaalin laatimisessa ja tulosten jakamisesta sidosryhmille. Ohjausryhmässä olivat edustettuina

Kauppapuutarhaliitto ry, Österbottens Svenska Producentförbund rf, Biotus Oy, Luonnonvarakeskus, LähiTapiola, Turun yliopisto ja päärahoittajat. Tutkimusryhmä kiittää lämpimästi ohjausryhmää rakentavista keskusteluista, tuesta ja kiinnostuksesta hanketta kohtaan.

Kasvihuoneen pölynäytteitä kerättiin tomaatti- ja kurkkukasvihuoneyrityksissä. Haluamme kiittää yrittäjiä ja työntekijöitä yhteistyöstä ja positiivisesta suhtautumisesta tutkimukseemme. Ilman työpaikkojen myötävaikutusta tällaista tutkimusta ei olisi voitu toteuttaa.

Helsingissä 28.8.2026
Tekijät

Tiivistelmä

Aiemmissa tutkimuksissamme havaitsimme, että noin puolet kasvihuonetyöntekijöistä on herkistynyt biologisille torjuntaeliöille ja että heillä esiintyy runsaasti työhön liittyviä hengitystie- ja iho-oireita. Työntekijöiden herkistymisen tunnistamiseen ei kuitenkaan ole ollut käytettävissä riittävän tarkkoja menetelmiä. Tämän tutkimushankkeen tavoitteena oli kehittää menetelmiä kasvihuoneiden biologisten allergeenien tunnistamiseen, selvittää biologisessa torjunnassa käytettävän petoluteen (Macrolophus pygmaeus) allergeeniprofiilia sekä arvioida uusien menetelmien soveltuvuutta työperäisen allergian diagnostiikkaan ja altistumisen arviointiin. Lisäksi tavoitteena oli kehittää kasvihuoneiden allergeenialtistumisen mittaamiseen soveltuvaa ympäristönäytteenottoa. Tutkimuksessa yhdistettiin ympäristönäytteenotto, immunologiset analyysimenetelmät (ELISA, immunoblot ja funktionaaliset solutestit) sekä massaspektrometrinen proteiinianalyysi.

Tutkimus osoitti, että kasvihuonepölyn kerääminen on teknisesti mahdollista, mutta pölyn proteiinipitoisuudet ja allergeenien säilyvyys vaihtelivat huomattavasti, minkä vuoksi ympäristöpöly ei soveltunut luotettavasti allergeenien pikatestaukseen. Sen sijaan biologisista näytteistä allergeenien tunnistaminen onnistui hyvin, ja tutkimuksessa tunnistettiin M. pygmaeuksesta uusi allergeeni, tropomyosiini. Koska tropomyosiinit ovat eri niveljalkaisissa laajasti esiintyviä ja voimakkaasti ristiinreagoivia allergeeneja, niiden tunnistaminen on tärkeää työperäisen ja muun allergisen herkistymisen erottamisessa. Hankkeen keskeinen anti oli uusien tutkimusmenetelmien kehittäminen ja biologisten torjuntaeliöiden allergeenien karakterisointi, mikä luo perustaa tarkemmalle työperäisten allergioiden diagnostiikalle ja biologisten altisteiden riskinarvioinnille. Tutkimuksen perusteella kasvihuonetyöntekijöiden altistumista voidaan vähentää käyttämällä suojakäsineitä sekä pitkähihaisia ja -lahkeisia työvaatteita, sekä hengityksensuojaimia pölyävissä työvaiheissa.

Biologisen torjunnan käyttö kasvihuoneviljelyssä lisääntyy jatkuvasti kestävän maatalouden yleistyessä, minkä seurauksena myös biologisille torjuntaeliöille altistuvien työntekijöiden määrä kasvaa. Tässä hankkeessa tuotettu tieto uusista allergeeneista, niiden ristiinreagoivuudesta ja biologisten altisteiden tutkimusmenetelmistä luo perustaa työterveyshuollon diagnostiikan ja työperäisten allergioiden riskinarvioinnin kehittämiselle. Pitkällä aikavälillä tutkimustuloksia voidaan hyödyntää altistumisen hallinnassa, työympäristöjen turvallisuuden parantamisessa sekä työntekijöiden työkyvyn tukemisessa. Jatkossa tarvitaan laajempia tutkimuksia uusien allergeenikomponenttien kliinisen merkityksen selvittämiseksi sekä työympäristöihin soveltuvien altistumisen arviointimenetelmien kehittämiseksi.

Abstract

In our previous studies, we found that approximately half of greenhouse workers were sensitized to biological pest control agents and experienced a high prevalence of work-related respiratory and skin symptoms. However, sufficiently accurate methods for identifying sensitized workers have not been available. The aim of this project was to develop methods for identifying biological allergens in greenhouses, characterize the allergen profile of the predatory bug Macrolophus pygmaeus, which is widely used in biological pest control, and evaluate the applicability of these novel methods for the diagnosis of occupational allergy and the assessment of allergen exposure. In addition, the project sought to develop environmental sampling methods suitable for measuring allergen exposure in greenhouse environments. The study combined environmental dust sampling with immunological methods (ELISA, immunoblotting, and functional cell-based assays) and mass spectrometry-based protein analysis.

The study demonstrated that although collecting greenhouse dust is technically feasible, protein concentrations and allergen stability in dust samples varied considerably, limiting the suitability of environmental dust for reliable rapid allergen testing. In contrast, allergen identification from biological samples proved successful, leading to the identification of tropomyosin as a novel allergen in M. pygmaeus. As tropomyosins are widely distributed and highly cross-reactive allergens among arthropods, their identification is important for distinguishing occupational sensitization from sensitization caused by other allergen sources. A major outcome of the project was the development of novel analytical methods and the characterization of allergens from biological control agents, providing a foundation for more accurate diagnosis of occupational allergies and improved risk assessment of biological exposures. Based on the findings, greenhouse workers' exposure can be reduced by using protective gloves, and long-sleeved clothing and respiratory protective equipment during dusty work tasks.

The use of biological pest control in greenhouse production continues to increase as sustainable agriculture becomes more widespread, resulting in a growing number of workers exposed to biological control agents. The knowledge generated in this project on novel allergens, their cross-reactivity, and methods for investigating biological exposures provides a basis for improving occupational health diagnostics and the risk assessment of occupational allergies. In the longer term, these findings can be applied to exposure management, the improvement of workplace safety, and the maintenance of workers' health and work ability. Further studies are warranted to determine the clinical significance of newly identified allergen components and to develop exposure assessment methods suitable for occupational environments.

Sisällys

Esipuhe 1

Tiivistelmä 3

Abstract 4

Sisällys 5

1 Johdanto 7

2 Tutkimuksen tavoitteet 8

3 Aineisto ja menetelmät 9

3.1 Pölynkeräyskohteet 9

3.2 Näytteenottomenetelmien pilotointi 10

3.3 Varsinaiset näytteenkeräysmenetelmät 11

3.3.1 Laskeutuneen pölyn näytteet 12

3.3.2 Yleisilman kokonaispölyn näytteet 12

3.4 Pölynäytteiden mittaukset ja analysointi 13

3.4.1 Suodattimien punnitukset 13

3.4.2 Olosuhde- ja pölypitoisuusmittaukset 13

3.4.3 Pölynäytteiden uuttaminen 14

3.5 Seerumit ja vasta-aineet 14

3.6 Torjuntaeliöt 15

3.6.1 Käytetyt torjuntaeliöt 16

3.6.2 Torjuntaeliölysaattien tekeminen 16

3.7 Proteiinien analysointimenetelmät 17

3.7.1 Proteiinikonsentraation mittaus: NanoDrop, Qubit ja BCA -menetelmillä 17

3.7.2 Polyakryyliamidigeeli (PAGE) -ajot 17

3.7.3 Hopeavärjäykset 18

3.7.4 Western blot 18

3.8 Proteiinien tunnistaminen massaspektrometrialla 19

3.8.1 Näytekäsittely 19

3.8.2 Massaspektrometria ja tulosten analysointi 19

3.9 Tropomyosiinin puhdistaminen M. pygmaeuksesta (pähkämölude) 19

3.9.1 Erbanin menetelmä 19

3.9.2 Jancon menetelmä 20

3.10 Immunologiset analyysit 21

3.10.1 Suora-IgE-ELISA 21

3.10.2 Inhibitio-IgE-ELISA 21

3.10.3 IgE:n toiminnallinen testi (FAB-määritys) 22

4 Tulokset 22
4.1 Kasvihuoneiden keräyspilotti 22
4.1.1 Keräävästi ja suoraan osoittavasti mitatut pölypitoisuudet 22
4.1.2 Olosuhteet kasvihuoneissa 25
4.1.3 Proteiinimäärät 25
4.1.4 Kasvihuoneallergeenien tunnistaminen 25
4.1.5 Kerätyt pölypitoisuudet 27
4.1.6 Pölyjen proteiinimäärät 28
4.1.7 Allergeenien tunnistaminen 29
4.2 Allergeenien tunnistaminen torjuntaeliölysaateista 29
4.2.1 Eliölysaattien tunnistaminen potilasseerumeilla 30
4.2.2 Eliölysaattien tunnistaminen FAB-menetelmällä 30
4.3 M. pygmaeuksen allergeenien puhdistaminen 31
4.3.1 Proteiinipuhdistuksen optimointi 32
4.3.2 Allergeenien tunnistaminen potilasseerumeilla 34
4.4 M. pygmaeuksen allergeenien karakterisointi massaspektrometrialla 35
4.5 M. pygmaeuksen tropomyosiinin ristiinreagoivuus 38
4.5.1 Ristiinreagoivien allergeenien tunnistaminen kasvihuoneiden potilasseerumeilla 38
4.5.2 Ristiinreagoivien allergeenien tunnistaminen tropomyosiiniallergisilla potilasseerumeilla 41
5 Tulosten pohdinta 42
6 Johtopäätökset 45
7 Suositukset 46
8 Hankkeen tuotoksia 47
9 Kirjallisuus 48

1 Johdanto

Tuholaisten torjuntaan käytetään vihannesviljelyssä pääosin biologista torjuntaa, mutta työhygieenisiä tutkimuksia on vähän. Pölyjä ja aerosoleja on mitattu kukka- (Thilsing et al. 2015) ja vihannestuotannossa (Madsen et al. 2014, Madsen et al. 2016, Suuronen et al. 2022), mutta allergiaa aiheuttavia altisteita ei juuri tunneta. Aiemmissa tutkimuksissa ei ole mitattu torjuntaeliöiden allergeeneja kasvihuoneissa. Ruotsalaisessa (Kronqvist et al. 2005) ja hollantilaisissa (Groenewoud et al. 2002, Thilsing et al. 2015) tutkimuksissa todettiin IgE-välitteinen allergia torjuntapunkeille noin 20 % työntekijöistä. Työterveyslaitoksella on todettu ammattiastmoja, -nuhia ja kosketusnokkosihottumia viljelykasvien lisäksi myös torjuntaeliöille, kuten petopunkille ja loispistiäiselle (Lindstrom et al. 2018). TSR:n rahoittamassa, jo päättyneessä ”Biologinen torjunta kasvihuoneissa – altistuminen, allergiat ja niiden ehkäisy” -projektissa (no. 118101) (Suojalehto et al. 2022) totesimme noin 50 % kasvihuonetyöntekijöistä herkistymistä tuholaisille ja tuholaistorjuntaorganismeille (Suojalehto et al. 2021, Suojalehto et al. 2022). Yksittäisistä lajeista Macrolophus pygmaeus -petoluteelle herkistyminen oli suurinta (46 %)(Lindstrom et al. 2022).

Allergeenit eli allergisia oireita aiheuttavat antigeenit (tavanomaisesti proteiineja) esiintyvät yleensä runsaina ympäristössä tai elintarvikkeessa, kestävät hyvin lämpöä ja ruoansulatusentsyymeitä, ja elimistössä ne aiheuttavat IgE-luokan vasta-aineiden tuotantoa sekä Th2-tyyppisiä soluvasteita (Pekar et al. 2018). Vaikka testiuutteilla on allergiadiagnostiikassa paikkansa, vain molekyylitasolla karakterisoitujen (tunnettujen) allergeenien avulla voidaan luotettavasti tunnistaa oireiden aiheuttaja, sekä tuottaa homogeenisia ja toistettavia testejä allergisten potilaiden ja allergeenimäärien mittaamiseksi. Allergeenien karakterisointiin kuuluu erilaisten analyysimenetelmien (esim. kromatografiat, massaspektrometria) käyttö, jotka mahdollistavat kohdeproteiinien tunnistamisen, eristämisen ja puhdistamisen sekä niiden rakenteen ja toiminnan karakterisoinnin.

Pölymittaukset tehdään työhygieenisissä mittauksissa yleisesti käytetyllä menetelmällä: ilmanäytteenottopumpulla imetään ilmaa keräimessä olevan suodattimen läpi, jolloin ilmassa oleva pöly jää suodattimelle. Menetelmä on vakiintunut, mutta edellyttää pitkää, todennäköisesti useamman päivän keräilyaikaa, jotta saamme riittävästi pölyä allergeenien analysoimiseen. Lisäksi voimme käyttää passiivista, laskeutuvan pölyn keräystä.

Alustavissa tutkimuksissamme olemme jo tunnistaneet M. pygmaeus -luteen IgE:tä sitovasta proteiinista tropomyosiinille tyypillisiä sekvenssialueita. Proteiini tunnistettiin myös torakan tropomyosiinin tunnistavalla vasta-aineella. Täten on hyvin todennäköistä, että kyse on laajasti eliökunnasta löytyvistä, sekvenssiltään, rakenteeltaan ja toiminnaltaan hyvin samankaltaisista (homologisista) tropomyosiini-proteiineista, jotka aiheuttavat herkistyneillä allergista ristiinreagoivuutta (Shafique et al. 2012).

2 Tutkimuksen tavoitteet

Tavoite 1: Tunnistaa ja karakterisoida torjuntaeliöiden allergeeneja. Allergisten kasvihuonetyöntekijöiden seerumien avulla tunnistamme IgE:hen sitoutuvia proteiineja, eristämme todennäköisimmät allergeenit ja tutkimme niiden ominaisuuksia, sekvenssiä ja homologeja (samankaltaisia proteiineja).

Tutkimuskysymykset: Millaisia proteiineja oireisten potilaiden seerumi tunnistaa, mutta oireettomien kontrollihenkilöiden seerumi ei? Mitä ominaisuuksia (koko, varaus, sekvenssi) kohdeproteiineilla on? Löytyykö niille sekvenssihomologeja jo tunnetuista proteiineista tai allergeeneista eri eliöistä?

Tavoite 2: Tutkia potilasseerumeiden IgE vasta-aineiden avulla ristiinreagoivuutta muihin tunnettuihin selkärangattomien eliöiden allergeeneihin (esimerkiksi torakan, katkaravun, tai pölypunkin proteiineihin).

Tutkimuskysymykset: Sitoutuuko torjuntaeliöille oireilevien kasvihuonetyöntekijöiden seerumiin myös eri eliöiden homologisia allergeeneja? Jos sitoutuu, mihin se on voimakkainta? Tunnistetaanko tällainen ristiinreagoiva potilas millään nykyisillä allergiatestillä (ImmunoCAP, siru) allergiseksi?

Tavoite 3: Kehittää menetelmät, joilla a) tunnistetaan herkistyneet kasvihuonetyöntekijät verinäytteen avulla, sekä b) määritetään allergeenipitoisuuksia työpaikan ilmasta.

Tutkimuskysymykset: Millaisia ELISA-pohjaisia mallitestejä voimme kehittää? Miten kerätä ja mitata luotettavasti kasvihuoneen ilmaa, jotta allergeenit voidaan mitata? Mikä on ilmanäytteiden tutkimiseen sopivin, riittävän herkkä ja luotettava menetelmä?

Tavoite 4: Ohjeistaa työpaikkoja ja työterveyshuoltoa kuvattujen haittojen tunnistamiseen ja torjuntaan.

Tutkimuskysymykset: Miten allergeenitietoisuutta ja täten työturvallisuutta voidaan lisätä kasvihuoneissa? Voidaanko työpaikoille ja työterveyshuollolle suunnattuja ohjeita parantaa/täydentää? Millaisilla kasvihuonetyöntekijöiden terveystarkastuksilla allergisoituneet työntekijät voidaan tunnistaa?

3 Aineisto ja menetelmät

3.1 Pölynkeräyskohteet

Tutkimusta suunniteltaessa etsittiin viisi kasvihuoneyrittäjää, joiden tomaattiviljelmissä käytetään ensisijaisena biologisena torjuntaeliönä mm. jauhiaisluteita vastaan M. pygmaeusta (pähkämöludetta) ja jotka olivat suostuvaisia osallistumaan tutkimukseen. Kaikissa kohteissa oli M. pygmaeuksen lisäksi käytetty Encarsia formosaa (jauhiaiskiilukaista) mm. ansarijauhiaisen torjuntaan ja yhdessä lisäksi Eretromocerus eremicusta (kaliforniankiilukaista) (Taulukko 1).

Taulukko 1. Kohdeyritykset ja niissä käytetyt torjuntaeliöt sekä näytteenottopäivämäärät.

Kohdeyritys	Torjuntaeliöt	Näytteenottopäivä
”A”	M. pygmaeus, E. formosa	9.12.2024
”B”	M. pygmaeus, E. Formosa	10.12.2024
”C”	M. pygmaeus, E. Formosa, E. eremicus	10.12.2025
”D”	M. pygmaeus, E. Formosa	11.2.2025
”E”	M. pygmaeus, E. Formosa	10.2.2025

Useimmissa kohdeyrityksissä kasvatettiin tomaatteja, mutta myös kurkkuja ja salaatteja. Kaikissa kohteissa käytettiin M. pygmaeusta ja useimmissa myös E. formosaa (Taulukko 2).

Taulukko 2. Kohdeyritysten tomaattitaimien istutusviikot (2024) ja torjuntaeliöiden lisäyskerrat.

Kohdeyritys	Istutus vko	Torjuntaeliölisäykset (vko)		
		M. pygmaeus[1]	E. formosa[2]	E. eremicus[3]
”A”, osasto 3	17	17, 20, 35, 38 ja 48	17–48	
”A”, osasto 2	32	32, 36, 39	32– 39	
”B”	33	33, 35–39, 41, 43–45 ja 47	33–34, 48 ja 49	
”C”	34	35–37	41–43	41–43
”D”	17	18, 21, 23, 42 ja 44	vkot 18–44	
”E”	27	27–30		

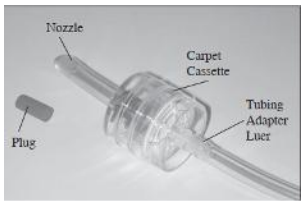
[1]n. 2 kpl per m^2 lisäyskerralla; [2-3]n.10 kpl per m^2 lisäyskerralla

3.2 Näytteenottomenetelmien pilotointi

Ennen varsinaisia näytteenottoja näytteenottomenetelmiä pilotoitiin. Yhdessä kasvihuoneessa (yritys ”A”) tehtiin viikon ajan pilottimittauksia eri pölynkeräysmenetelmillä 26.2. -1.3.2024 välisenä aikana (Taulukko 3). Kaikkia näytetyyppejä kerättiin rinnakkaisina näytteinä.

Taulukko 3. Pilotoidut näytteenottomenetelmät.

	Keräin ja pumppu ym.	Virtaus	Mittausaika / pinta-ala	Näytetyyppi
1	 Button, ATTP polykarbonaattisuodattimella (halkaisija 25 mm,  SKC:n Touch pocket -pumppu	4 l/min	5 työpäivää	Hengittyvän pölyn näyte työntekijän hengitysvyöhykkeeltä (EN-481).
2	 MP 37 mm, ATTP polykarbonaattisuodattimella (huokoskoko 0,8 µm). ATEX-suojattu kalvovakuumipumppu virtausmitta-	30 l/min	5 työpäivää	Yleisilmanäyte istutuskäytävien keskeltä. Kerätty hiukkasfraktio vastaa ns. kokonaispölyfraktiota (SFS 3860).
3	 MP 37 mm, ATTP polykarbonaattisuodattimella (huokoskoko 0,8 µm). ATEX-suojattu kalvovakuumipumppu virtausmittarilla.	30 l/min	½ h	Yleisilmanäyte rakennuspaperilla verhotusta kasvista (kts. kuva 1), jota tärytettiin ½ h ajan n. kerran viidessä minuutissa (SFS 3860).
4	 Suodatinkotelo, 70 mm, Whatman no. 3 suodatinpaperilla.	-	n. 0,1 m^2	Laskeutuneen pölyn näyte muovilla vuoratun kasvualustan päältä.
	Micro-Vac, esitäytetty 37 mm mp. kotelo, huokoskoko 0,4 µm polykarbonaatti-suodattimella, AirCon2			

5		n. 10 l/min	n. 0,4-1 dm^2	Kasvien pinnoilta ja kasvien alapuolella olevan kaasuputken päältä kerätty laskeutuneen pölyn näyte.
6	 Aukinainen alumiinifoliolla vuorattu pizza-kotelo istutusrivin päädyssä.	-	5 työpäivää	Laskeutuneen pölyn näyte.

Näiden pilottinäytteiden perusteella varsinaisiin näytteenottoihin valikoitiin (yllä mainitut), erityisesti M. pygmaeus allergeenien taltiointia ajatellen tehokkaimmiksi osoittautuneet menetelmät (Kappale 2.3)

3.3 Varsinaiset näytteenkeräysmenetelmät

Kohteista kerättiin rakennuspaperilla verhotusta kasvista pölytyksen edistämiseen käytetyn täryttämisen aikana n. 900 – 2 000 litran ns. yleisilman kokonaispölynäyte 25 mm polykarbonaattimembraanille (Kuva 2). Lisäksi kerättiin laskeutuneen pölyn näyte kasvialustaa peittävältä muovipeitteeltä (Kuva 1, Kuva 3).



Kuva 1. Laskeutuneen pölyn näytteen keräystä suodatinkotelomenetelmällä.



Kuva 2. Rakennuspaperilla verhottu kasvi.



Kuva 3. Suodatinkotelo ladattuna Whatman nr. 3 suodatinpaperilla sekä imurin imuputkeen kytketty suodatinkotelo.

3.3.1 Laskeutuneen pölyn näytteet

Imurimenetelmä. Laskeutunutta pölyä kerättiin suodatinkoteloon (Kuva 3, Tuomi ym. 2019), joka oli kytketty 800 W pölynimuriin, josta oli pölypussi ja ulosvirtaavan ilman suodattimet poistettu. Imuri yhdistettiin 3-D tulostettuun suodatinkotelon suuttimeen/pidikkeeseen, joka sisälsi halkaisijaltaan 70 mm Whatman no. 3 selluloosasuodattimen huokoskoolla 6 µm (1003-070, Merck KGaA, Darmstadt, Saksa). Näytettä kerättiin 10 m x 0,10 m (0,1 m^2) alueelta, muovilla vuoratun kasvialustan päältä. Lisäksi näytteeseen imuroitiin n. 15-20 lehden alapintaa. Laskeutuneen pölyn lisäksi suodattimelle kerääntyi lehtien ja kukintojen osia sekä yksittäisiä eläviä tai kuolleita hyönteisiä ja niiden osia. Kaikki näytteet kerättiin rinnakkaisina näytteinä, yleensä eri istutuskäytävältä tai saman käytävän toiselta puolelta.

3.3.2 Yleisilman kokonaispölyn näytteet

Polykarbonaattisuodatin- ja tärytysmenetelmän kuvaus. Kokonaispölyn (SFS, 1976) yleisilmanäytteitä kerättiin rakennuspaperilla vuoratun kasvin läheltä, paperivuorauksen sisältä siten, että kasvia tärytettiin pölytyksen edistämiseen käytetyllä sauvalla tai sähköisellä täryttimellä n. 5 min välein 1/2-1 tunnin ajan. Näytteenkeräykseen käytettiin kalvovakuumipumppuja virtauksella 30 l/min (Greiffenberger Antriebstechnik, TYP EKF36CX-4, ABM Greiffenberger, Marktredwitz, Saksa). Keräysalustana oli Millipore 37 mm, ATTP polykarbonaattisuodatin, huokoskoolla 0,8 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Saksa).

3.4 Pölynäytteiden mittaukset ja analysointi

3.4.1 Suodattimien punnitukset

Ennen näytteenottoa suodattimet esipunnittiin laboratoriossa vakioiduissa olosuhteissa (t= 20±2 °C, suhteellinen kosteus 50±5 %) noudattaen standardia ISO 15767 (Työterveyslaitoksen työohje AERO-TY-003). Whatman no. 3 suodattimilla ladatut suodatinkotelot punnittiin suodattimien kanssa, kun taas ilmanäytteissä käytetyt polykarbonaattimembraanisuodattimet punnittiin erikseen. Suodattimet sisältäneet kotelot suljettiin näytteenoton jälkeen mittauskohteessa ennen niiden toimittamista laboratorioon.

Laboratoriossa suodattimia/suodatinkoteloita pidettiin n. 3 h ajan vakioiduissa olosuhteissa, kuten yllä. Tasapainotetut näytteet punnittiin tarkkuusvaa'alla, jonka määritysraja oli polykarbonaattisuodattimia punnittaessa 0,06 mg/näyte (Työterveyslaitoksen työohje AERO-TY-003) ja Whatman no. 3 suodatinkoteloita punnittaessa vastaavasti n. 1 mg/näyte.

3.4.2 Olosuhde- ja pölypitoisuusmittaukset

Olosuhteiden ja pölypitoisuuden mittauksessa käytetyt mittalaitteet on esitetty Taulukko 4:ssä. Olosuhteet mitattiin jokaisesta tutkimuskohteesta näytteidenkeräyksen ollessa käynnissä. Pölypitoisuutta mitattiin suoraan osoittavasti vain pilottikohteessa.

Taulukko 4. Käytetyt mittalaitteet.

Mittalaite	Mittausperiaate
Ilmanlaatumittari (lämpötila, suhteellinen kosteus, hiilidioksidi ja hiilimonoksidi) Fluke 975 Air meter, Fluke Corporation, Everett, Washington, USA	Termistori, kapasitiivinen anturi, infrapuna, elektrokemiallinen kenno
Hiukkaslaskuri (Alveolijakeinen pöly ja hengittyvä pöly) Grimm 11-C, Grimm Technologies, Hampuri, Saksa	Optinen hiukkaslaskuri

3.4.3 Pölynäytteiden uuttaminen

Proteiinit eristettiin Whatman-suodattimelta tai polykarbonaattikalvolta (PC-kalvo) siten että Whatman 3 -suodattimen tai PC-kalvon pinnalle kerätty pöly siirrettiin kertakäyttöisillä pinseteillä 50 ml:n Nunc-putkeen. Putkeen lisättiin 30 % (v/v) asetonitriiliä siten, että pöly peittyi kokonaan nesteeseen. Tämän jälkeen suodatin leikattiin pieniksi paloiksi ja siirrettiin erilliseen 50 ml:n Nunc-putkeen, johon lisättiin vastaavasti 30 % asetonitriiliä pölyn peittämiseksi.

Näytteitä sonikoitiin 2 minuutin ajan huoneenlämmössä (Elma Sonic, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Saksa), minkä jälkeen ne sentrifugoitiin 2000 × g 8 minuutin ajan. Sonikoinnin jälkeen pölyä sisältävä suspensio siirrettiin Lysing Matrix D -putkiin (1,4 mm zirkonium silikaattikeraamiset helmet; MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Suodatin- tai kalvopalat kerättiin talteen 2 ml putkiin ja säilytettiin −20 °C:ssa jatkoanalyysejä varten.

Pölysuspensio homogenisoitiin FastPrep 24-laitteella (MP Biomedicals) käyttäen asetuksia 6,5 m/s ja 60 sekunnin käsittelyaika. Homogenoinnin jälkeen näytteet sentrifugoitiin 20 000 × g 2 minuutin ajan huoneenlämmössä. Saatu supernatantti siirrettiin uusiin putkiin ja säilytettiin −20 °C:ssa analysointiin saakka.

3.5 Seerumit ja vasta-aineet

HUS alueellinen lääketieteellinen tutkimuseettinen toimikunta antoi puoltavan lausunnon tutkimuksesta (HUS/3372/2017, lausunto 10/2024) ja Työterveyslaitos antoi hankkeelle tutkimusluvan. Kaikki tutkimukseen osallistuneet henkilöt saivat kirjallisen tiedotteen tutkimuksesta ja antoivat kirjallisen suostumuksen tutkimukseen osallistumisesta.

Tutkimukseen pyydettiin mukaan Työterveyslaitoksen ammattitautitutkimuksissa olevia potilaita, joilla todettiin ihopistokokeissa herkistyminen torjuntaeliöille. Tutkimukseen osallistuneilta henkilöiltä otettiin seeruminäyte. Tutkimukseen osallistui 7 henkilöä, joiden seeruminäyteet kerättiin 12/2024-10/2025 välisenä aikana.

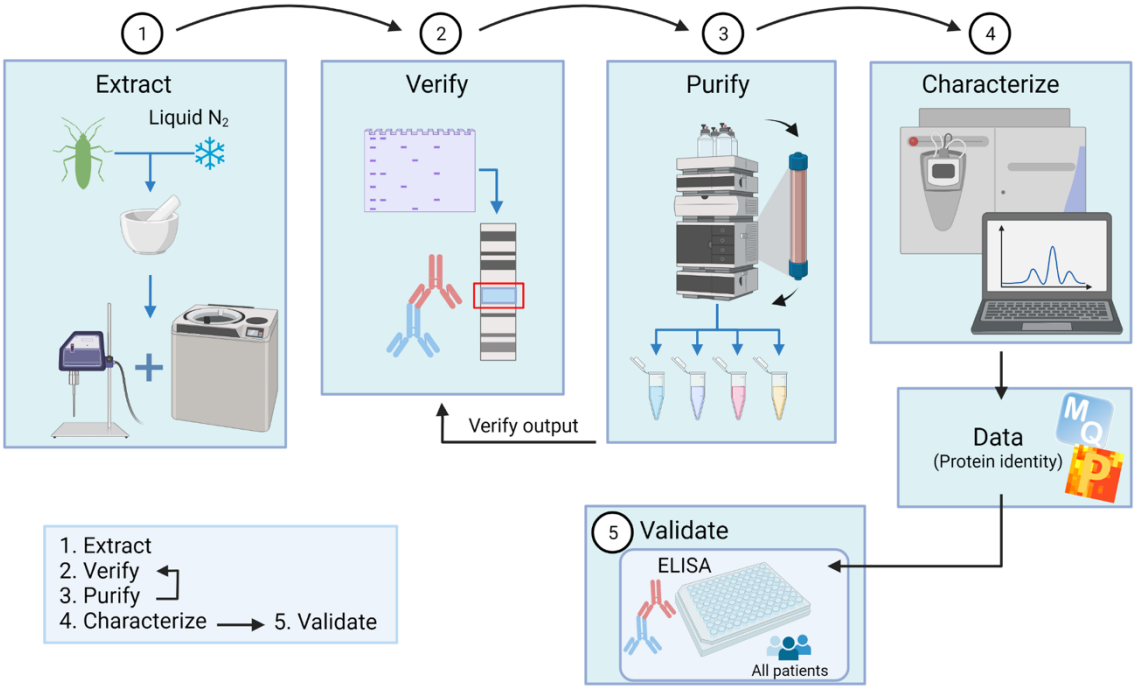
Potilasseerumipooli muodostettiin kuuden ”Biologinen torjunta kasvihuoneissa – altistuminen, allergiat ja niiden ehkäisy” -projektin (no. 118101) yhteydessä kerätyistä hengitystieoireisen kasvihuonetyöntekijän seerumeista, joissa oli todettu ImmunoCAP-menetelmällä IgE-vasta-aineiden sitoutuminen M. pygmaeus -lysaattiin välillä 4,7–79,6 kU/l. Kutakin seerumia lisättiin pooliin yhtä suuri tilavuus. Kontrolliseerumipooli muodostettiin vastaavasti kuuden oireettoman kasvihuonetyöntekijän seerumeista, joissa ei todettu IgE-vasta-aineiden sitoutumista M. pygmaeus -lysaattiin immunoCAP-menetelmällä. PlasmaLabilta (PlamaLab International, Everett, WA, USA) hankittiin yhteensä 27 kaupallista

allergisten seerumia, joista 9 oli pölypunkkiallergisilta, 9 katkarapuallergisilta ja 9 amerikantorakka-allergisilta henkilöiltä.

Tämän projektin töissä on käytetty seuraavia vasta-aineita: anti-Tropomyosiinin (1A6, MA-1A6, 37027, Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA, USA) kanssa käytettiin sekundaarisena vasta-aineena vuohessa tuotettua, biotinyloitua anti-hiiri IgG (H+L), (BA-9200, Vector Laboratories Inc, Newark, CA, USA). Potilasseerumeiden kanssa käytettiin sekundaarivasta-aineena vuohessa tuotettua anti-ihmisen Epsilon Chain Biotinylated, ref BA-3040, lot ZC2219, Vector Laboratories, Burlington, CA, USA. FAB-analyyseissä käytettiin 1:50 laimennoksena phytoerytrin-leimattua anti-ihmisen CD23 vasta-ainetta (ref 982904, BioLegend, San Diego, CA, USA) sekä fluorescein-leimattua, vuohessa tuotettua anti-ihmisen IgE:tä (KPL, cat no 5230-0287, SeraCare Life Sciences, Inc., Milford, MA, USA laimennoksena 1:100.

3.6 Torjuntaeliöt

Alla kaavio torjuntaeliöiden allergeenien eristämisestä, puhdistamisesta, tunnistamisesta ja tulosten varmistamisesta (Kuva 4).



Kuva 4. Tutkimuksen työnkulku. 1) Torjuntaeliöstä peräisin olevien proteiinien eristämisessä käytettiin useita menetelmiä, kuten jauhamista nestemäisessä typessä, ultraääntä ja ultrasentrifugointia. 2) Proteiinin eristämistä arvioitiin ja varmistetettiin SDS-PAGE:lla ja immunoblot-menetelmällä. 3) Kun allergeenin läsnäolo oli varmistettu, uute puhdistettiin ioninvaihtopylväillä ja proteiinia eroteltiin useiksi eluoiduiksi fraktioiksi. Näistä tunnistettiin ne fraktiot, joiden todettiin sisältävän allergeenia. 4) Puhdistetut näytteet

karakterisoitiin nestekromatografia-tandemmassaspektrometrialla (LC-MS/MS) ja analysointi tehtiin FlexAnalysis- ja Biotools-analyysiohjelmistoilla. Allergeenin identiteetin selvittämiseksi käytettiin Mascot-palvelimen Miriadae-sukutietokantaa. 5) Validointi tehtiin vertaamalla potilaiden IgE-sitoutumista karakterisoituun allergeeniin ja rekombinanttiallergeeniin Der p 10 ja anti-tropomyosiini 1A6 IgG -vasta-aineeseen. Kuva luotu BioRender.comilla.

3.6.1 Käytetyt torjuntaeliöt

Tutkimme erilaisia kasvihuoneissa torjuntaeliöinä käytettäviä

- punkkeja: Amblyseius swirskii, Suidasia medanensis (ravintopunkki; vanhempia kehitysasteita);
- pistiäisiä: Encarsia formosa (Trialeurodes vaporariorum jauhiaisen koteloiden sisällä), Eretmocerus eremicus (Trialeurodes vaporariorum jauhiaisen koteloiden sisällä); sekä
- luteita: Macrolophus pygmaeus (pähkömölude, Kuva 5), Trialeurodes vaporariorum -koteloita (ansarijauhiainen).



Kuva 5. Pähkämölude (M. pygmaeus) on pieni vihreä lude, jota käytetään kasvihuoneissa erityisesti tomaatinviljelyssä ansarijauhiaisen torjuntaan.

3.6.2 Torjuntaeliölysaattien tekeminen

Allergeeniuutteet valmistettiin kokonaisista pakastetuista (-20°C) hyönteisistä (0,06–1 g/laji). Uutteiden valmistusta varten hyönteiset siirrettiin kuivajäällä esijäähdytettyyn morttelіin ja jauhettiin nestemäisen typen avulla mahdollisimman hienoksi jauheeksi survimella. Proteiinien uuttamiseksi jauhettu hyönteismateriaali suspensoitiin RIPA-lyysipuskuriin (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), johon oli lisätty 1× Halt Protease Inhibitor Cocktail -seosta (Thermo Scientific). Lysaatti siirrettiin Eppendorf-putkiin ja liukenematon aines poistettiin kahdella peräkkäisellä sentrifugoinnilla (21 000 × g, +4 °C, 2 h ja 1

h). Lopullinen supernatantti kerättiin talteen jatkoanalyysejä varten, ja sen proteiinipitoisuus määritettiin BCA-menetelmällä.

3.7 Proteiinien analysointimenetelmät

3.7.1 Proteiinikonsentraation mittaus: NanoDrop, Qubit ja BCA -menetelmillä

NanoDrop. Pölynäytteiden proteiinipitoisuus (mg/ml) määritettiin NanoDrop One -spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific) käyttäen laitteen sisäistä albumiinistandardia (BSA, bovine serum albumin).

Qubit. Qubit™ Protein Assay Kit (0,25-5 µg, Invitrogen) -menetelmä tehtiin seuraavasti. Työliuos (working solution) valmistettiin sekoittamalla Qubit™ Protein Reagent ja Qubit™ Protein Buffer suhteessa 1:200. Proteiinistandardit valmistettiin lisäämällä 10 µl standardia (Standard 1, 2 ja 3) 190 µl työliuosta. Näytteet valmistettiin sekoittamalla 1 µl näytelaimennosta ja 199 µl työliuosta. Standardit mitattiin standardisuoran muodostamiseksi, minkä jälkeen näytteiden proteiinikonsentraatiot määritettiin Qubit 4 -fluorometrillä (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Tulokset ilmoitettiin yksikössä µg/µl.

BCA (Binchoninaattihappo). Eliölysaattien proteiinipitoisuus määritettiin BCA-menetelmällä (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Näytteet laimennettiin RIPA-puskuriin. Standardisuora valmistettiin laimentamalla BSA-standardi RIPA-puskuriin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Työreagenssi (working reagent, WR) valmistettiin sekoittamalla BCA-reagenssia A ja B suhteessa 50:1 (50 ml reagenssia A ja 1 ml reagenssia B). Standardit, blank ja näytteet pipetoitiin 96-kuoppalevylle 25 µl/kuoppa, minkä jälkeen kuhunkin kuoppaan lisättiin 200 µl työreagenssia ja inkuboitiin +37 °C:ssa 30 minuutin ajan. Inkubaation jälkeen levy tasapainotettiin huoneenlämpöiseksi, ja absorbanssi mitattiin aallonpituudella 570 nm (Labsystems Multiskan Transmit, Labsystems, Helsinki, Suomi).

3.7.2 Polyakryyliamidigeeli (PAGE) -ajot

Eristetyt proteiininäytteet eroteltiin natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (SDS-PAGE) menetelmällä niiden molekyylipainon perusteella ajamalla esivaletuilla, 4–20 % Mini-Protean TGX geeleillä (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) tai 4–12 % Bolt Bis-Tris Plus -geeleillä (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Näytteet valmistettiin lisäämällä kuhunkin näytteeseen SDS-näytepuskuria määrä, joka vastasi yhtä neljäsosaa näytteen kokonaistilavuudesta. SDS-näytepuskuri koostui 4× Laemmli-puskurin ja β-

merkaptoetanolin seoksesta suhteessa 9:1. Näytteet denaturoitiin +95 °C:ssa viiden minuutin ajan ja jäähdytettiin jäillä. Ajopuskurina käytettiin Tris/Glysine/SDS puskuria (Bio-Rad) TGX-geeleillä ja MES SDS Running Buffer (Invitrogen) BoltTM-geeleillä.

Natiivi geeliajo tehtiin kuten yllä, mutta näytteet ajettiin 4–20 %:ssa Mini-Protean TGX esivaletuissa geeleissä, näytepuskurina käytettiin Native sample -puskuria (Bio-Rad) 1:2. Ajopuskurina käytettiin Tris/Glysine puskuria (Bio-Rad).

Molekyylipainostandardina käytettiin 2 µl Precision Plus Protein™ Dual Color Standard -markkeria (Bio-Rad). Proteiinien elektroforeettinen erottelu geelissä tehtiin 100 V jännitteellä ensimmäiset 10 min ja tämän jälkeen 200 V jännitteellä 40 min (Mini-Protean TGX gels, 4–20 %) tai 165 V jännitteellä 35 min (Bolt 4–12 % Bis-Tris Plus Gel).

3.7.3 Hopeavärjäykset

Proteiinien kokojakauman visualisoimiseksi ja näytteiden välisten erojen arvioimiseksi geelit hopeavärjättiin Silver Stain Plus Kit:llä (Pierce™, Thermo Fisher Scientific). Elektroforeesin jälkeen geelit fiksoitiin 20 minuutin ajan, minkä jälkeen ne huuhdeltiin Milli-Q-vedellä kahdesti 10 minuutin ajan. Geelit värjättiin tämän jälkeen enintään 20 minuutin ajan, kunnes haluttu signaalin voimakkuus saavutettiin. Lopuksi värjäysreaktio pysäytettiin 5 % etikkahapolla.

3.7.4 Western blot

Proteiinien eristyksen onnistuminen ja spesifisen IgE-sitoutuminen varmistettiin immunoblot – analyysillä, joka tehtiin SDS-PAGE-ajon jälkeen geelille. Geelissä erotellut proteiinit siirrettiin sähkövirran avulla PVDF-kalvolle 25 mM Tris,192 mM glysiini, 20 % metanoli (w/v), pH 8,3 puskurissa 100 V jännitteellä 60 minuutin ajan. Kalvoja blokattiin 1 tunnin ajan huoneenlämpötilassa (tai yön yli + 4 °C:ssä) 1 % BSA:lla TBS-puskurissa epäspesifisten proteiinien sitoutumisen estämiseksi. Tämän jälkeen kalvoja inkuboitiin yön yli 4 °C:ssa kontrolli- tai potilasseerumeilla tai anti-tropomyosiini (MA-1A6, Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA, USA) vasta-aineella.

Kalvot pestiin 3 kertaa 5 minuuttia TBST-puskurilla ja inkuboitiin (1 h) huoneenlämpötilassa, ja signaalia vahvistettiin avidiini-biotiini alkalinen fosfataasi -kompleksilla (VECTASTAIN ABC-AP Kit) valmistajan ohjeiden mukaisesti, minkä jälkeen värireaktio kehitettiin BCIP/NBT-substraatilla (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ja pysäytettiin vedellä.

3.8 Proteiinien tunnistaminen massaspektrometrialla

3.8.1 Näytekäsittely

Hopeavärjäys poistettiin geelinpaloista kitillä (Pierce Silver Stain for Mass Spectrometry, Thermo Scientific) ja niiden sisältämät proteiinit redusoitiin, alkyloitiin ja digestoitiin (Shevchenko et al. 2006). Geelinpaloista kerätyt peptidit puhdistettiin (Pierce C18 Tips, Thermo Scientific) ja resuspendoitiin, joko 1) laimeaan 0.1 % TFA (trifluoroasetaatti) liuokseen joka sekoitettiin sitten Matrixin (alpha-syani-4-hydroksikanelihappo) kanssa MALDI (Matrix-assisted-Liquid-Desorption-Ionization mass spectrometry) massaspektrometri (Bruker Corp. UltraFlexTreme) analysointia varten (MALDI-MS), tai 2) 0.1% muurhaishappoon, jos näyte analysoitiin normaalilla nestekromatografia ionisaatiolla yhdistettynä LC-MS (liquid chromatograph mass spectrometry) massaspektromeriin.

3.8.2 Massaspektrometria ja tulosten analysointi

LC-MS analyysissä, digestoidut peptidit injektoitiin ja separoitiin C18 pylväässä asetonitriili-gradientilla (0-40% 30 minuutin aikana) UltiMate 3000 nestekromatografialaitteella ja niiden sekvenssit analysoitiin Q Exactive HF massaspektrometrilla (Thermo Scientific) DDA (data-dependent acquisition) moodilla. Massaspektrometridata analysoitiin, joko FlexAnalysis (v3.4 Bruker Daltonics) ja Biotools (v.3.2 Bruker Daltonics) ohjelmistoilla (MALDI-MS), tai Proteome Discoverer ohjelmalla (v2.5, Thermo Scientific) käyttämällä M. pygmaeuksen ja lisäksi taksonomisten lähisukulaisluteiden proteiinisekvenssejä ((UniProt 2025), koska M. pygmaeuksen oma sekvenssitietokanta ei ole kovin kattava.

3.9 Tropomyosiinin puhdistaminen M. pygmaeuksesta (pähkämölude)

M. pygmaeuksen tropomyosiinin eristystä optimoitiin testaamalla kahta eri menetelmää, jotka perustuivat Erbanin (Erban 2011) ja Jancon (Janco et al. 2016) julkaisuihin.

3.9.1 Erbanin menetelmä

Erbanin menetelmän esikäsittely. Tropomyosiini eristettiin aiemmin kuvatun menetelmän mukaisesti pienin muutoksin (Erban 2011). Noin 0,1 g Macrolophus pygmaeus -luteita (Biotus Oy, Forssa, Suomi) jauhettiin nestemäisessä typessä, ja suspendoitiin lyysipuskuriin (1× PBS, 1 % CHAPS), johon oli lisätty 1× proteaasi-inhibiittoriseos (Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Lysaattia inkuboitiin jäillä 10

minuutin ajan, minkä jälkeen liukenematon aines poistettiin kahdella peräkkäisellä sentrifugoinnilla (21 000 × g, 4 °C, 2 h ja 1 h). Lopullinen supernatantti suodatettiin 0,45 µm:n kalvon läpi.

Erbanin menetelmän jatkokäsittely. Affiniteettipuhdistuksessa käytettiin 1 ml:n p-aminobentsamidiinipylvästä (HiTrap Benzamidine FF, Cytiva, Marlborough, MA, USA). Pylväs pestiin viidellä pylvästilavuudella (column volume, CV) Milli-Q-vettä ja tasapainotettiin 12 CV:llä sitoutuspuskuria (1× PBS, 1 % CHAPS). Suodatettu lysaatti lisättiin tasapainotetun pylvään läpi hitaasti ruiskun avulla, minkä jälkeen pylvästä inkuboitiin 20 minuutin ajan 4 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen pylväs pestiin 20 CV:llä sitoutuspuskuria (1× PBS, 1 % CHAPS). Sitoutuneet proteiinit eluoitiin 12 CV:llä eluutiopuskuria (0,05 M glysiini, pH 3,0), ja eluatti kerättiin 1 ml:n fraktioina. Fraktiot neutraloitiin välittömästi lisäämällä kuhunkin 1 ml:n fraktioon 100 µl 1 M Tris-HCl-puskuria (pH 9,0). Tropomyosiini eluoitiin pylväästä 1 ml:n fraktioina 20 CV:llä 0,5 M $CaCl_2$, 0,02 M Tris-HCl (pH 7,4) -puskurilla.

3.9.2 Jancon menetelmä

Jancon menetelmän esikäsittely. Tropomyosiinin eristys tehtiin pienin muutoksin aiemmin kuvatulla tavalla (Janco et al. 2016). Noin 0,25 g M. pygmaeus -pähkämöluteita (Biotus Oy, Forssa, Suomi) jauhettiin hienoksi nestemäisessä typessä ja jauhe siirrettiin hajotuspuskuriin (20 mM natriumfosfaatti pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM NaN_3), johon oli lisätty 1× Halt proteaasi-inhibiittoriseosta (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Lysaatteja kuumennettiin +80 °C:ssa 8 minuuttia lämpöblokissa ja jäähdytettiin huoneenlämpötilaan, minkä jälkeen liukenematon aines poistettiin kahdella peräkkäisellä sentrifugoinnilla (21 000 × g, 4 °C; 2 h ja 1 h). Supernatantti saostettiin säätämällä sen pH arvoon 4,7 HCl:llä (hapansaostus), ja saostunut aine kerättiin sentrifugoimalla 3900 x g, +4 °C 12 minuutin ajan. Tropomyosiinia sisältävä pelletti suspensoitiin uudelleen 500 mM NaCl, 100 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT ja 1 mM NaN_3, pH 7,5 -puskuriin, ja suodatettiin sitten 1,0 ja 0,45 µm:n kalvojen läpi. Puskurinvaihto tehtiin Amicon Ultra 10K pylväillä (0,5 ml; Merck Millipore Ltd., Burlington, Massachusetts, USA) 20 mM Tris (pH 7,5), 500 mM NaCl, 0,5 mM DTT -liuokseen.

Jancon menetelmän jatkokäsittely. 1 ml:n QFF-anioninvaihtopylväs (HiTrap, Cytiva, Marlborough, MA, USA) tasapainotettiin 10 ml:lla 20 mM Tris (pH 7,5), 500 mM NaCl ja 0,5 mM DTT - puskuria. M. pygmaeus -näyte lisättiin pylvääseen ja läpivirtausfraktio (FT) kerättiin. DNA:n ja muiden kontaminanttien poistamiseksi QFF-hartsi pestiin 5 pylvään tilavuudella (CV) 1 M NaCl:ia ja sen jälkeen 5 CV:llä 1 M NaOH:ta. Pylväs tasapainotettiin uudelleen 20 mM Tris (pH 7,5), 0,5 mM DTT- puskurilla (10 CV). Tropomyosiinia sisältävä FT-fraktio (1,5 ml) laimennettiin viisinkertaisesti 20 mM Tris (pH 7,5), 0,5 mM DTT puskurilla ja ladattiin takaisin tasapainotettuun pylvääseen. Tropomyosiini eluoitiin keräämällä 1 ml:n

fraktioita 100–500 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,5), 0,5 mM DTT -puskurilla. Fraktioiden proteiinikonsentraatio määritettiin Qubitilla. Eniten proteiinia sisältävät fraktiot, 300, 400 ja 500 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,5), 0,5 mM DTT, yhdistettiin ja puskurinvaihdettiin dPBS:ään Amicon Ultra 10K pylväillä. Puhtaan M. pygmaeus tropomyosiinin konsentraatio mitattiin Qubitilla kuten edellä.

3.10 Immunologiset analyysit

3.10.1 Suora-IgE-ELISA

Puhdistettu M. pygmaeus -tropomyosiini sekä Der p 10-, Pen a 1- ja Per a 7 -rekombinanttitropomyosiinit (Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA, USA) laimennettiin 50 mmol/l karbonaattipuskuriin pitoisuuteen 1 µg/ml, minkä jälkeen ne lisättiin polystyreenisille mikrotiitterilevyille (100 µl/kuoppa; Nunc, Roskilde, Tanska). Levyjä inkuboitiin yön yli 4 °C:ssa.
Inkubaation jälkeen levyt pestiin kerran PBS-puskurilla, joka sisälsi 0,05 % Tween 20:tä (PBST), minkä jälkeen kuoppiin lisättiin 100 µl seeruminäytteitä allergisilta ja ei-allergisilta kasvihuonetyöntekijöiltä (n = 15 + 15 + 5) sekä HDM-, katkarapu- ja torakka-allergisilta potilailta (n = 9 + 9 + 9; PlasmaLab, Everett, WA, USA). Kasvihuonetyöntekijöiden seerumit laimennettiin 1:4 ja HDM-, katkarapu- ja torakka-allergisten potilaiden seerumit 1:5 PBS:llä, joka sisälsi 0,02 % Tween 20:tä ja 0,2 % ihmisen seerumialbumiinia (PBST-HSA). Levyjä inkuboitiin kahden tunnin ajan huoneenlämmössä.

Kolmen pesun jälkeen levyille lisättiin biotinyloitua vuohen anti-ihmis-IgE-vasta-ainetta (Vector Laboratories, Burlington, CA, USA), laimennettuna 1:1000 PBST-HSA:lla, ja levyjä inkuboitiin yhden tunnin ajan. Tämän jälkeen levyt pestiin uudelleen, minkä jälkeen niihin lisättiin avidiini-biotiini-alkalisen fosfataasin -kompleksi (VECTASTAIN ABC-AP Kit, Vector Laboratories, Newark, CA, USA) valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Pesujen jälkeen kuoppiin lisättiin dietanoliamiinisubstraattipuskuriin valmistettu p-nitrofenyylifosfaattisubstraatti (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Värireaktio mitattiin absorbanssina aallonpituudella 405 nm automaattisella ELISA-lukijalla (Multiskan Transmit MS, Labsystems, Helsinki, Suomi).

3.10.2 Inhibitio-IgE-ELISA

Inhibitio-ELISA tehtiin muutoin edellä kuvatun menetelmän mukaisesti, mutta siihen lisättiin kilpaileva inhibitiovaihe. Tätä varten 50 µl seerumia laimennettuna suhteessa 1:10 PBS-T-HSA:lla inkuboitiin yhden tunnin ajan huoneenlämmössä yhtä suuren inhibiittoriliuostilavuuden kanssa. Inhibiittoreina käytettiin puhdistettua M. pygmaeus -

tropomyosiinia tai rekombinanttiproteiineja Der p 10, Pen a 1 ja Per a 7 pitoisuuksina 0,05, 5, 50 ja 500 pmol PBS-T-HSA:ssa. Kontrollinäytteissä inhibiittoriliuos korvattiin yhtä suurella PBS-T-HSA tilavuudella.

Inkuboinnin jälkeen seerumin ja inhibiittorin sisältävä seos sekä kontrollit lisättiin ELISA-levyn kuoppiin ja inkuboitiin kahden tunnin ajan huoneenlämmössä. Allergeeniin sitoutuneen IgE:n immunologinen määritys tehtiin edellä kuvatun ELISA-menetelmän mukaisesti.

3.10.3 IgE:n toiminnallinen testi (FAB-määritys)

Potilaiden IgE-vasta-aineiden toiminnallisuuden arviointiin käytimme tehostettua antigeenin sitoutumismääritystä (engl. facilitated antigen binding (FAB) assay) (Shamji et al. 2006). Tässä FAB-määrityksessä potilaan IgE muodostaa IgE-allergeenikomplekseja, jotka sitten sitoutuvat B-solujen IgE:tä sitovaan reseptoriin (CD23, FcεRII). Tässä määrityksessä käytetään B-solulinjoja, ja IgE-allergeenikompleksien havaitseminen tehdään B-solujen pinnalta virtaussytometrialla käyttämällä vasta-aineita, jotka tunnistavat spesifisesti IgE-vasta-aineiden vakioalueen (IgE:n Fc-osan). Kontrolleina käytettiin EBV transformoituja B-soluja joko anti-CD23-PE vasta-aineella ilman antigeenia tai antigeenin ja allergisen potilasseerumin kanssa anti-IgE:tä tai anti-CD23:a.

4 Tulokset

4.1 Kasvihuoneiden keräyspilotti

4.1.1 Keräävästi ja suoraan osoittavasti mitatut pölypitoisuudet

Keräävästi ja suoraan osoittavasti mitatut pölypitoisuudet pilottikohteissa. Pölypitoisuuksien mittauksissa pilottikohteessa käytetyt keräävät menetelmät on esitetty taulukossa 3 ja tulokset taulukossa 5. Taulukosta 5 nähdään, että työntekijöiden altistuminen hengittyvälle pölylle on työviikon aikana keskimäärin 0,15–0,20 mg/m^3. Työhygieeninen enimmäispitoisuus, eli ns. haitalliseksi tunnettu pitoisuus (HTP-arvo) orgaaniselle pölylle on 5 mg/m^3 (STM 2025), joten työntekijöiden altistuminen tässä tapauksessa on keskimäärin viikon ajalta n. 10 % orgaanisen pölyn HTP-arvosta. Yleisilman pitoisuutta kuvaavat kokonaispölymittaukset (1–3, taulukko 5) ovat selvästi alhaisemmat kuin suoraan osoittavasti mitatut yleisilman keskimääräiset hengittyvän pölyn pitoisuudet ja PM10 tulokset (Taulukko 6, Kuva 6).

Taulukko 5. Pölypitoisuudet pilottikohteessa.

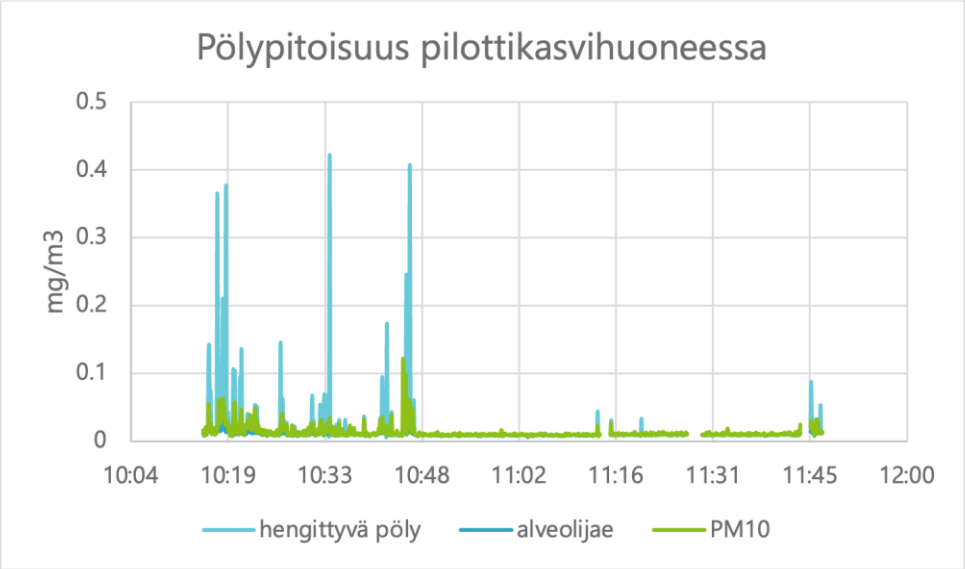
Kuvaus	Keräysaika	Pitoisuus (mg/m³)
[1]Hengittyvä pöly 1	Työviikko	0,15
[1]Hengittyvä pöly 2	Työviikko	0,20
Kokonaispöly 1 (yleisilma)	5 vrk	0,0041
Kokonaispöly 2 (yleisilma)	5 vrk	0,0028
Kokonaispöly 3 (yleisilma)	5 vrk	0,000032
Huputettu kasvi, kokonaispöly 4	½ h	0,69
Huputettu kasvi, kokonaispöly 5	½ h	0,23

[1]Mitattu työntekijän hengitysvyöhykkeeltä viikon ajan, työaikana.

Pilottikohteen yleisilmasta tehtyjen suoraan osoittavien pölymittausten tulokset ja massapitoisuudet ovat alla (Taulukko 6). Mittalaitteen suodatinta ei punnittu, joten pitoisuudet ovat suuntaa antavia ja niitä on verrattu vallinneeseen ulkoilman pitoisuuteen.

Taulukko 6. Suoraan osoittavasti mitatut pölyn massapitoisuudet pilottikasvihuoneen yleisilmassa ja pitoisuuksien suhde ulkoilman vastaaviin pitoisuuksiin (IO-suhde).

Pitoisuus [mg/m³]	Keskiarvo	Keskiarvo työskentelyä lähellä	I/O-suhde	I/O-suhde työskentelyä lähellä
Hengittyvä pöly	0,009	0,028	0,7	2,2
Alveolijae	0,009	0,012	0,7	1,0
PM10	0,012	0,017	1,0	1,3



Kuva 6. Pölypitoisuudet näytteenoton aikana ajan funktiona.

Pilottikasvihuoneen yleisilman suoraan osoittavasti mitatut pölypitoisuudet olivat keskimäärin kasvihuoneen ympäristön ulkoilman tasoa tai sitä matalammat (Taulukon 5 I/O-suhde < 1). Yleisilmassa näkyvät korkeammat piikit johtuvat työskentelystä kasvihuoneen päädyssä olleen mittauspisteen lähellä sekä mittauspisteen ohittavien työntekijöiden nostattamasta pölystä (Kuva 6). Liikkuminen ja työskentely kasvihuoneen päädyssä kohotti hengittyvän pölyn pitoisuutta kaksinkertaiseksi vallinneeseen ulkoilman pitoisuuteen nähden (Kuva 6). Hengittyvän ns. orgaanisen työhygieenisen pölyn HTP on 5 mg/m^3 ja alveolijakeisen pölyn Työterveyslaitoksen tavoitepitoisuus tuotannollisille työpaikoille on 0,5 mg/m^3 (TTL 2016). Mitatut pitoisuudet olivat siis pieniä verrattuna työhygieenisiin enimmäispitoisuuksiin ollen hengittyvän pölyn osalta < 0,3 % enimmäispitoisuudesta ja alveolijakeen osalta <3 % tavoitetasosta. Vastaavasti PM10 jae oli enimmillään 24 % ulkoilman vuorokausikeskiarvon enimmäispitoisuudesta (Valtioneuvosto 2017). Näiden yleisilmapitoisuuksien perusteella voidaan olettaa, että suurin osa työntekijöiden altistumisesta hengittyvälle pölylle ei johdu yleisilmasta vaan työskentelystä kasvien ja niiden osien kanssa. Esimerkkeinä tärytys, tomaattien poiminta ja kasvien leikkaus.

Lämpötila pilottikohteessa mittausviikon aikana oli 15 °C ja 25° C välillä, keskiarvon ollessa 21° C. Suhteellinen kosteus vaihteli välillä 52–87 %, keskiarvon ollessa 70 %. Hiilidioksidipitoisuuden vuorokauden keskipitoisuus oli välillä 580–620 ppm, keskimäärin viikon aikana 600 ppm.

4.1.2 Olosuhteet kasvihuoneissa

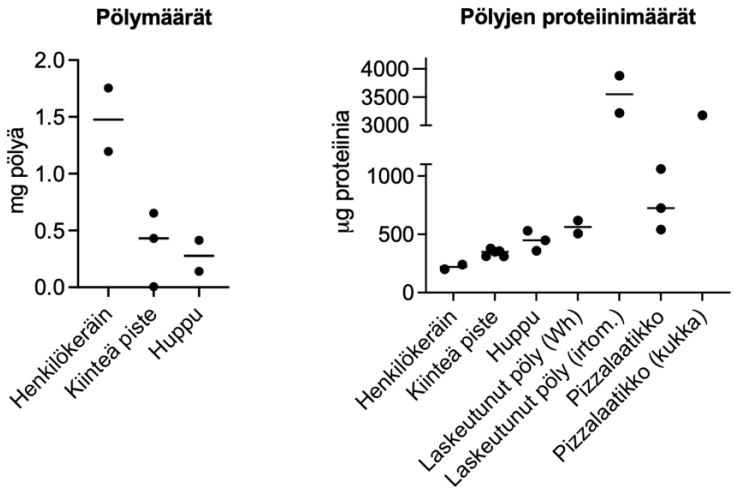
Vallinneet olosuhteet kasvihuoneissa on esitetty alla olevassa taulukossa (Taulukko 7).

Taulukko 7. Olosuhteet kasvihuoneissa.

Kohdeyritys	Lämpötila [°C]	Suhteellinen kosteus [%]	Hiilidioksidi, CO_2 (ppm)	Hiilimonoksidi, CO (ppm)
”A”, osasto 3	19	80	800	0
”A”, osasto 2	19	80	840	0
”B”	19	81	890	0
”C”	22	78	800	0
”D”	19	78	510	0
”E”	22	83	1050	0

4.1.3 Proteiinimäärät

Kun kerättyjen pölyjen määriä verrattiin saatuihin proteiinimääriin (Kuva 7), havaittiin, että vaikka henkilökeräin näytti tuottavan suurimman määrän pölyä, siitä löytyi kuitenkin vähinten proteiineja.

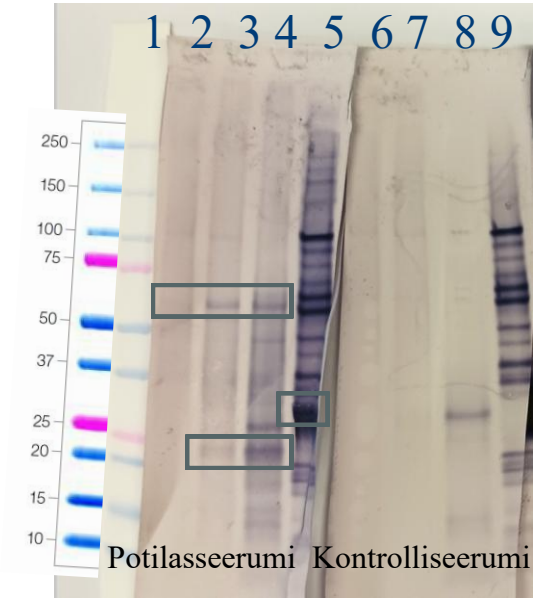


Kuva 7. Hengittyvässä ilmassa on paljon pölyä (massa), mutta vähän proteiineja. Irtomateriaaleissa taas oli paljon eliöitä ja proteiineja.

4.1.4 Kasvihuoneallergeenien tunnistaminen

Samat pölynäyteseokset eroteltiin molekyylipainon perusteella SDS-PAGE-elektroforeesilla ja siirrettiin PVDF membraanille. Potilasseerumipooli tunnisti useita proteiinivyöhykkeitä, joita kontrolliseerumipooli ei tunnistanut. Erityisesti noin 20–25 kDa:n ja 50–60

kDa:n molekyylipainoalueilla potilasseerumipoolin IgE-vasta-aineiden sitoutuminen erosi kontrolliseerumipoolin IgE-vasta-aineiden sitoutumisesta pölynäytteiden proteiineihin (Kuva 8).



Kuva 8. Pölyallergeenien tunnistaminen seeruminäytteillä. Huputettujen tomaattikasvien kokonais-pölynäytteet ovat kaivoissa 2 ja 6 (5 µg). Näytteet kaivoissa 3 ja 7 (10 µg) on kerätty imu-roimalla laskeutuneesta pölystä ja näyteet kaivoissa 4 ja 8 (10 µg) laskeutuneesta pölystä. M. pygmaeus -lysaattia (10 µg, kaivoissa 5 ja 9) käytettiin kontrollina. Näytteet ajettiin 4–20% TGX geelissä ja siirrettiin PVDF membraanille. Liuska inkuboitiin oireisten kasvihuone-työntekijöiden seerumipoolilla (vasemmalla: Potilasseerumi, 1:4), tai oireettomien kasvi-huonetyöntekijöiden seerumipoolilla (oikealla: Kontrolliseerumi, 1:4). Sekundaarivasta-aine oli biotinyloitu ihmisen anti-IgE vasta-aine (laimennos 1:750), jolla inkuboitiin kalvoja 3 h RT.

Pölypitoisuudet verhottujen kasvien läheisyydessä ja verhouksen sisällä olivat välillä 0,04–0,06 mg/m^3 niissä kohteissa, joissa kasveja tärytettiin sähköisellä täryttimellä. Muissa kohteissa tärytys tehtiin käsin sauvan avulla ja niissä näytteiden pölypitoisuus oli huomattavasti suurempi ollen välillä 0,21–2,76 mg/m^3 (Taulukko 8). Laskeutunutta pölyä kerättiin kohteista pienimmillään 12 mg/m^2 ja enimmillään 188 mg/m^2. Erot kasvualustan päälle kertyneissä pölymäärissä saattoivat silmämääräisten havaintojen perusteella liittyä mm. tomaattikasvien ikään ja kuntoon. Ilmanäytteiden kokonaispölypitoisuus oli keskimäärin 0,64 mg/m^3, eli 3,6 kertaa suurempi kuin pilottikohteesta työntekijöiden hengitysvyöhykkeeltä otettujen kahden hengittyvän pölyn näytteen keskiarvo (0,18 mg/m^3). Niissä kahdessa kohteessa, jossa käytössä oli sähköinen tärytin, kokonaispölypitoisuus täryttämisen aikana jäi kuitenkin alle puoleen pilottikohteen työntekijöiden hengittyvän pölyn

altistumisesta. On siis mahdollista, että käyttämällä sähköistä tärytintä sauvan sijaan, tärytyksestä johtuva työntekijöiden pölyaltistuminen olisi vähäisempää.

4.1.5 Kerätyt pölypitoisuudet

Eri kasvihuoneista saatiin talteen eri määriä pölyä (Taulukko 8), mutta kaikki arvot olivat hyvin matalia. Tämä selittynee ainakin osittain menetelmien eroista, minkä vuoksi ne ottivat talteen eri kokoista materiaalia ilmasta ja laskeutuneesta pölystä (Kuva 9).

Taulukko 8. Kerättyjen näytteiden pölypitoisuudet.

Kohdeyritys	Paperilla verhottu ja tärytetty kasvi (kokonaispöly)	Laskeutunut pöly (mg/m^2)
”A”, osasto 3	1,65 mg/1,59 m^3 = 1,04 mg/m^3	19
	4,31 mg/1,56 m^3 = 2,76 mg/m^3	24
”A”, osasto 2	0,64 mg/1,74 m^3 = 0,37 mg/m^3	22
	1,41 mg/1,74 m^3 = 0,81 mg/m^3	77
”B”	0,604 mg/0,900 m^3 = 0,67 mg/m^3	17
	0,752 mg/0,900 m^3 = 0,84 mg/m^3	17
”C”	0,189 mg/0,900 m^3 = 0,21 mg/m^3	163
	0,689 mg/0,900 m^3 = 0,77 mg/m^3	90
[1] ”D”	0,101 mg/1,65 m^3 = 0,061 mg/m^3	188
	<0,06 mg/1,65 m^3 = <0,036 mg/m^3	161
[1] ”E”	0,078 mg/1,92 m^3 = 0,041 mg/m^3	12
	0,077 mg/1,92 m^3 = 0,040 mg/m^3	67

[1]Näissä kasvihuoneissa oli käytössä sähköinen tärytin/pensseli toisin kuin kaikissa muissa kohteissa, joissa pölyttymistä edistettiin käsin, muovisella n. 50 cm pitkällä sauvalla.



Kuva 9. Esimerkkikuvat erilaisten keräysmenetelmien saannosta. Vasemmanpuoleinen on polykar-bonaattifiltteri kasvuston tärytyksestä ja muut ovat Whatmann-suodattimia imurointinäyt-teistä.

4.1.6 Pölyjen proteiinimäärät

Eri tavoin kerättyjen pölyjen proteiinipitoisuudet (Taulukko 9) mitattiin NanoDrop-menetelmällä. Eniten pölyä saatiin talteen laskeutuneesta pölystä ja vähiten suodattimiin keräämällä.

Taulukko 9. Kerättyjen pölyjen proteiinimäärät.

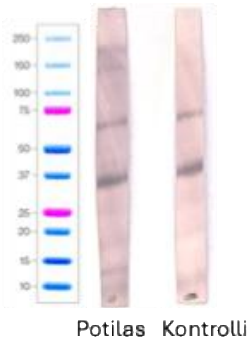
Puutarha	Pölytyyppi	Keräin	Kokonais proteiinimäärä (mg)	HY_ koodi	Näytenimi
"A"	Kokonaispöly	3	13.2	PC1	seos PC1-2*
"A"	Kokonaispöly	4	23.88	PC2	seos PC1-2
"F"	Kokonaispöly	5	12.78	PC3	seos PC3-4
"F"	Kokonaispöly	6	13.8	PC4	seos PC3-4
"A"	Kokonaispöly	1	-	PC5	
"A"	Kokonaispöly	2	80.4	PC7	PC7
"C"	Kokonaispöly	7	18.06	PC6	seos PC6+8
"C"	Kokonaispöly	8	14.76	PC8	
"A"	Laskeutunut	4	110.4	Wh1	Wh1*
"A"	Laskeutunut	4	250.5	Wh1b	Wh1b**
"F"	Laskeutunut	5	45.9	Wh2	seos Wh2+6
"F"	Laskeutunut	6	49.8	Wh6	seos Wh2+6
"A"	Laskeutunut	2	88.8	Wh3	seos Wh3-5
"A"	Laskeutunut	1	110.8	Wh4	seos Wh3-5
"A"	Laskeutunut	3	247.2	Wh5	seos Wh3-5
"C"	Laskeutunut	8	147.25	Wh7	seos Wh7-8
"C"	Laskeutunut	7	66.4	Wh8	seos Wh7-8
"C"	Laskeutunut	8	660	Wh7b	Wh7b-8b
"C"	Laskeutunut	7	424	Wh8b	Wh7b-8b
"E"	Kokonaispöly	1	13.2	PC-9	seos PC9-10
"E"	Kokonaispöly	2	16.8	PC-10	seos PC9-10
"D"	Kokonaispöly	3	20.64	PC-11	seos PC11-12
"D"	Kokonaispöly	4	16.14	PC-12	seos PC11-12
"E"	Laskeutunut	1	548	Wh9	seos Wh9-10
"E"	Laskeutunut	2	532	Wh10	seos Wh9-10
"E"	Laskeutunut	2	3750	Wh10b	Wh10b
"D"	Laskeutunut	3	982.8	Wh11	seos Wh11-12
"D"	Laskeutunut	4	1620	Wh12	seos Wh11-12
"D"	Laskeutunut	3	7140	Wh11b	seos Wh11b-12b
"D"	Laskeutunut	4	12080	Wh12b	seos Wh11b-12b

*PC, polykarbonaattikalvo; Wh, Whatman-suodatin

**b=irtomateriaali suodattimen päällä

4.1.7 Allergeenien tunnistaminen

Pölyn sisältämiä allergeeneja yritettiin tunnistaa potilasseerumipoolilla, sekä terveiden kontrollipoolilla. Ensimmäiseen testiin valittiin kaikki pölyt, ja tarkempi immunoblottaus tehtiin vain näytteellä Wh7–8. Molemmilla kalvoilla näkyi kuitenkin identtinen tunnistus potilaiden ja kontrollien välillä (Kuva 10).



Kuva 10. Tarkempi immunoblot-analyysi WH7–8 -pölypoolista. Yhteensä 25 µg WH7- ja 25 µg WH8-pölynäytteitä poolattiin (ja konsentroitiin SpeedVac-haihduttimella). Poolattu näyte eroteltiin 4–20 % Mini-PROTEAN® TGX™ -gradienttigeelissä käyttäen preparatiivista kaivoa. Elektroforeesin jälkeen proteiinit siirrettiin PVDF-kalvolle, joka leikattiin 13 liuskaan, joista kaksi käytettiin immunovärjäykseen. Vasen liuska inkuboitiin potilasseerumipoolilla ja oikea kontrolliseerumipoolilla (molemmat laimennettu 1:4). Sekundaarivasta-aineena käytettiin vuohen anti-humaani IgE -vasta-ainetta (1:750). IgE:n sitoutumista tehostettiin käyttäen VECTASTAINia, ja signaali kehitettiin BCIP/NBT-substraatilla.

4.2 Allergeenien tunnistaminen torjuntaeliölysaateista

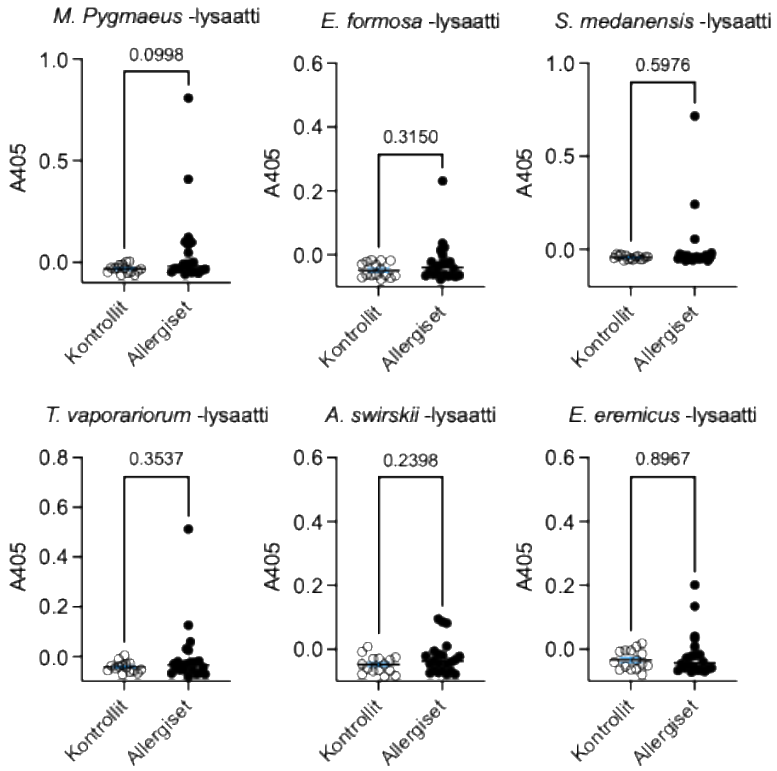
Edellä kuvatulla tavalla tehtyjen lysaattien pitoisuudet ovat alla oelvassa taulukossa (Taulukko 10):

Taulukko 10. Eliölysaattien konsentraatiot.

Laji	Proteiinipitoisuus (µg/µl)
Amblyseius swirskii	8,00
Encarsia formosa	3,15
Eretmocerus eremicus	6,42
Macrolophus pygmaeus	7,83
Suidasia medanensis	10,43
Trialeurodes vaporariorum	3,84

4.2.1 Eliölysaattien tunnistaminen potilasseerumeilla

Potilasseerumeiden IgE-vasta-aineiden sitoutumista tutkittiin näihin lysaatteihin suorassa ELISA:ssa (Kuva 11). Kaikkia valmistamiamme eliölysaatteja tunnisti muutama torjuntaeliöille allerginen potilas, mutta tilastollista merkitsevyyttä ei saavutettu kun spesifisen IgE:n sitoutumista verrattiin ei-allergisiin kontrollihenkilöihin.



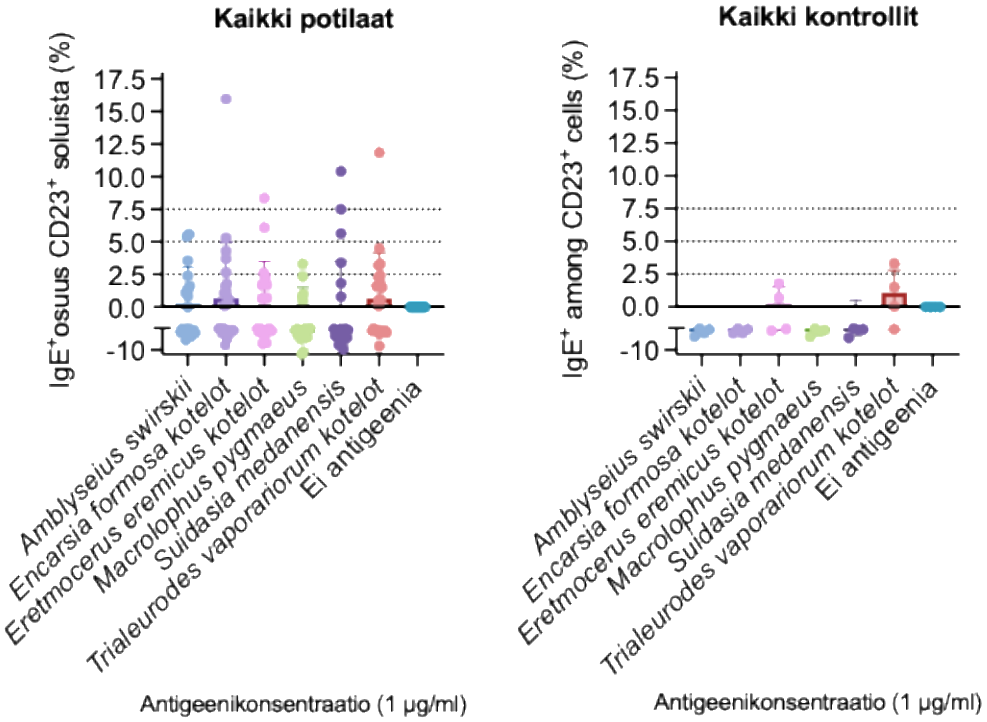
Kuva 11. Eliölysaattien suora-ELISA potilasseerumeilla (27 kpl) ja terveiden henkilöiden kontrolliseerumeilla (15 kpl).

4.2.2 Eliölysaattien tunnistaminen FAB-menetelmällä

Lääketieteessä useimmin käytetty toiminnallinen määritys allergisen reaktion todennäköisyyden tai vakavuuden arviointiin on basofiilien aktivaatiotesti (BAT) (Riggioni et al. 2024). BAT mittaa basofiilien pintamerkkiaineiden aktivoitumista potilaan basofiileissä allergeenin stimulaation yhteydessä, ja sitä käytetään erityisesti silloin, kun iho- tai IgE-verikokeet ovat epäselviä tai riskialttiita. Tämä testi kuitenkin tarvitsee tuoreverinäytteen, joita meillä ei ollut käytössämme. Tämän vuoksi analysoimme potilaiden IgE:iden

toiminnallista aktiivisuutta nk. FAB-määrityksellä, jossa allergeeni-IgE-kompleksit kilpailevat sitoutumisesta IgE-reseptoriin. Tiedetään, että tämä määritys korreloi hyvin potilaan oireiden kanssa (Shamji et al. 2019).

Kaikista potilasnäytteistä 10/22 tunnisti Amblyseius swirskiin, 13/22 Encarsia formosa -kotelot, 12/22 Eretmocerus eremicus -kotelot, 5/22 M. pygmaeuksen, 6/22 Suidasia medanensiksen ja 14/22 Trialeurodes vaporariorum -kotelot (
Kuva 12).



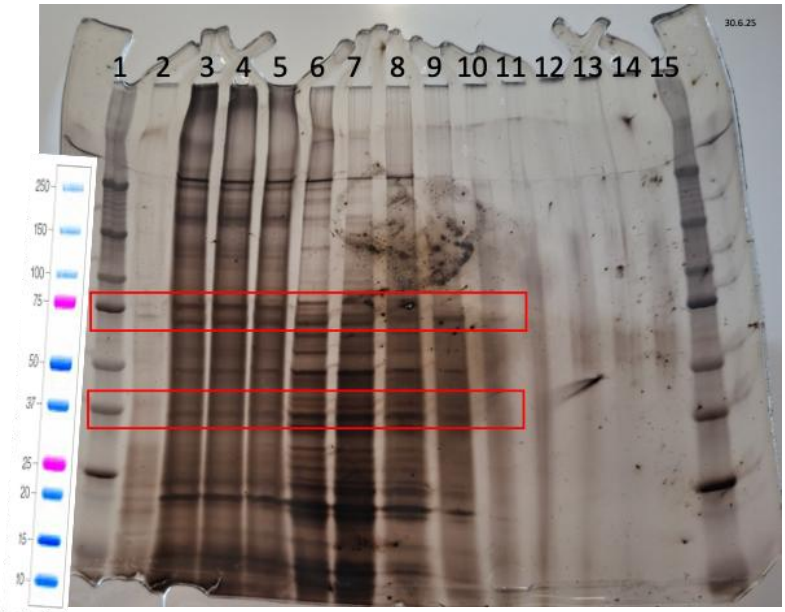
Kuva 12. Kaikkia 22 potilasseerumia sekä 4 kontrolliseerumia testattiin FAB-mittauksessa, jossa tutkittiin henkilön IgE:n sitoutumisaktiivisuutta eliölysaattien sisältämiin allergeeneihin.

4.3 M. pygmaeuksen allergeenien puhdistaminen

Aiemmissa tutkimuksissa oli havaittu, että potilaiden ImmunoCAP-mittauksessa jopa 50 % kasvihuoneessa allergisoituneista henkilöistä reagoi positiivisesti M. pygmaeukseen (Suojalehto et al. 2022). Siksi M. pygmaeuksen allergeeneja päätettiin tutkia tarkemmin.

4.3.1 Proteiinipuhdistuksen optimointi

M. Pygmaeuksen allergeenien puhdistamista optimoitiin kahdella eri tavalla: Erbanin menetelmällä sekä Jancon menetelmällä. Erbanin menetelmä oli suoraviivainen, mutta p-APA-pylvään läpi eluoitui vain hyvin pieniä määriä proteiinia (Kuva 13). Sen sijaan Jancon menetelmällä puhdistetusta M. pygmaeuksesta eluoitui oletetusti oikean kokoista proteiinia (Kuva 14).

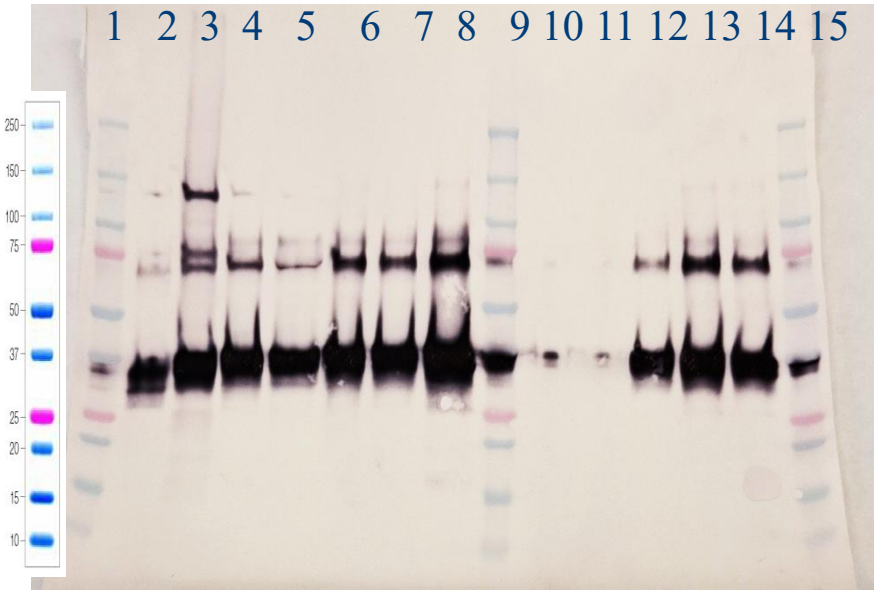


Kuva 13. Erbanin menetelmän puhdistustehokkuuden arviointi SDS-PAGE-geelillä (4–20 % TGX). M. pygmaeus -tropomyosiinin puhdistuksen eri vaiheet ja p-aminobentsamidiiniaffiniteettikromatografian (p-APA-pylvään) eluutiofraktiot hopeavärjäyksellä. Näytejärjestys geelissä: 1 ja 15: molekyylipainomarkkeri, 2: positiivinen kontrolli, M. pygmaeus -lysaatti, 3: jauhetut hyönteiset puskurissa (PBS sisältäen 1% CHAPS, 1x Halt proteaasi-inhibiittoriseos), 4: 2 h + 1 h sentrifugoitu supernatantti, 5: 0,45 μm läpi suodatettu supernatantti ennen affiniteettikromatografiaa, 6: p-ABA pylvään läpivirtausfraktio (FT), 7: pesufraktiot 1–2, 8: glysiinieluution ensimmäinen fraktio, 9–14: $CaCl_2$-eluutiofraktiot 1, 2, 3, 4, 5 ja 9. Eluutiofraktiot konsentroitiin kahdeksasosaan alkuperäisestä tilavuudesta ennen elektroforeesia. Punaiset laatikot kuvassa esittävät oletetun allergeenin ajautumiskohtaa geelillä.



Kuva 14. Jancon menetelmän puhdistustehokkuuden arviointi SDS-PAGE-geelillä (4–20% TGX). M. pygmaeus -tropomyosiinin puhdistuksen eri vaiheet ja HiTrap QFF -anioninvaihtokromatografian eluutiofraktiot hopeavärjäyksellä. Näytejärjestys geelissä: 1 ja 15: molekyylipainomarkkeri, 2: positiivinen kontrolli (M. pygmaeus -lysaatti), 3: jauhetut hyönteiset puskurissa (20 mM natriumfosfaatti pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM NaN_3, johon oli lisätty 1x Halt proteaasi-inhibiittoriseos), 4: 80 °C kuumennettu ja sentrifugoitu supernatantti, 5: happosaostuksen (pH 4,7) jälkeinen supernatantti, 6: happosaostuksen jälkeen uudelleensuspensoitu tropomyosiinifraktio, 7: suodatettu tropomyosiinifraktio, 8: puskurinvaihdettu tropomyosiinifraktio ennen anioninvaihtokromatografiaa, 9: toisen QFF-ajon läpivirtausfraktio (FT). Kaivot 10–14: toisen QFF-ajon eluutiofraktiot 100, 200, 300, 400 ja 500 mM NaCl -pitoisuuksilla. Eluutiofraktiot konsentroitiin kahdeksasosaan alkuperäisestä tilavuudesta ennen elektroforeesia. Punainen laatikko esittää oletetun allergeenin ajautumiskohtaa geelillä.

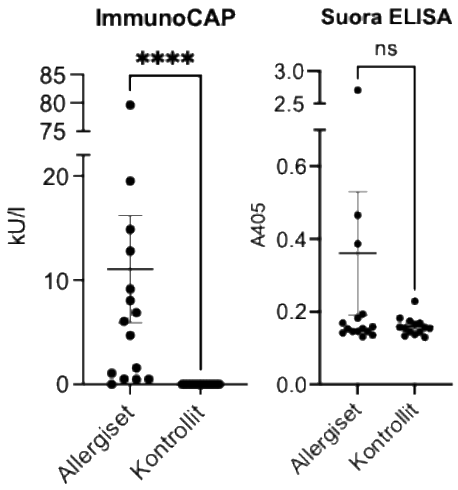
Sama geeli anti-tropoymyosiinilla värjätyssä immunoblotissa (Kuva 15).



Kuva 15. *M. pygmaeus* -tropomyosiinin puhdistuksen eri vaiheet Jancon menetelmän ja QFF-anioninvaihtopylvään eluutiofraktiot immunovärjäyksellä. Näytejärjestys blotilla: 1, 9 ja 15: molekyylipainomarkkeri, 2: positiivinen kontrolli, *M. pygmaeus* lysaatti, 3: jauhetut hyönteiset puskurissa 1 (20 mM natriumfosfaatti, pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM NaN_3, johon oli lisätty 1xHalt proteaasi-inhibiittoriseos), 4: 80 °C kuumennettu ja sentrifugoitu supernatantti, 5: hapansaostuksen (pH 4,7) jälkeinen supernatantti, 6: hapansaostuksen jälkeen uudelleensuspensoitu tropomyosiinifraktio, 7: suodatettu tropomyosiinifraktio, 8: puskurinvaihdettu tropomyosiinifraktio ennen anioninvaihtokromatografiaa, 10: kaivot 10–14: 5 ul QFF-pylvään 1 ml:n eluutiofraktioista 100, 200, 300, 400 ja 500 mM NaCl pitoisuuksilla. Eluutiofraktiot konsentroitiin kahdeksasosaan alkuperäisestä tilavuudesta ennen elektroforeesia. PVDF-kalvo on blokattu 3 %:lla BSA:lla, 1xTBS:ssä o/n + 4 C. Primaarivasta-aineena käytettiin anti-tropomyosiinia (1:1000, 1A6) 2h RT:ssä, ja sekundaarivasta-aineena käytettiin vuohessa tuotettua hiiren anti-IgG-vasta-ainetta (1:1000 Goat anti mouse IgG(H+L) biotinyloitu) 1 h RT, ja vyöhykkeet tunnistettiin BCIP/NBT-värireaktion avaulla, jonka annettiin jatkua 4 minuutin ajan.

4.3.2 Allergeenien tunnistaminen potilasseerumeilla

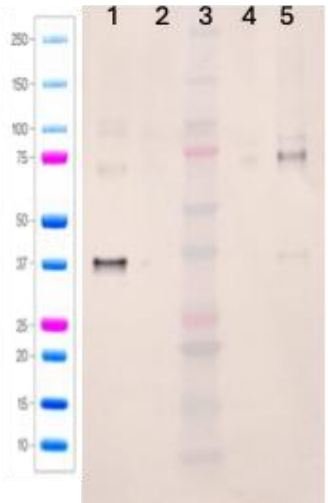
Puhdistetun M. pygmaeusesta eristetyn tropomyosiinin IgE:n sitoutumiskykyä testattiin sekä ImmunoCAP- että ELISA-menetelmillä (Kuva 16). Yksi kasvihuoneallerginen potilas tunnisti erittäin voimakkaasti molemmilla menetelmillä joko M. pygmaeus lysaatin tai puhdistetun allergeenin.



Kuva 16. Kasvihuoneiden torjuntaeliöille allergisten potilaiden seerumien IgE:n sitoutumiskykyä testattiin M. pygmaeuksen lysaatille ImmunoCAP:lla (vasen kuva) ja suorassa ELISA:ssa (oikeanpuoleinen kuva).

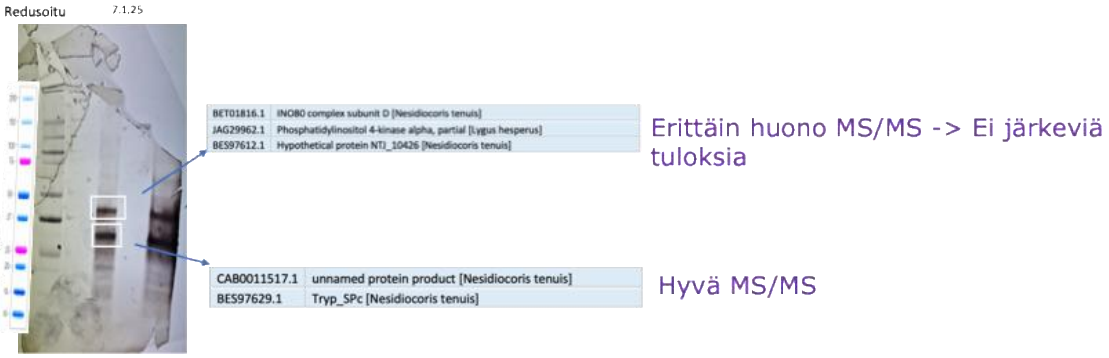
4.4 M. pygmaeuksen allergeenien karakterisointi massaspektrometrialla

Ajoimme puhdistettua M. pygmaeuksen oletettua tropomyosiinia sekä pelkistävissä että ei-pelkistävissä olosuhteissa (Kuva 17). Tämän perusteella näyttää, että proteiini esiintyy noin 37 kDa:n kokoisena monomeerina pelkistävissä olosuhteissa, kun taas natiivitilassaan se esiintyy ainakin dimeerina, joka on kooltaan noin 75 kDa.



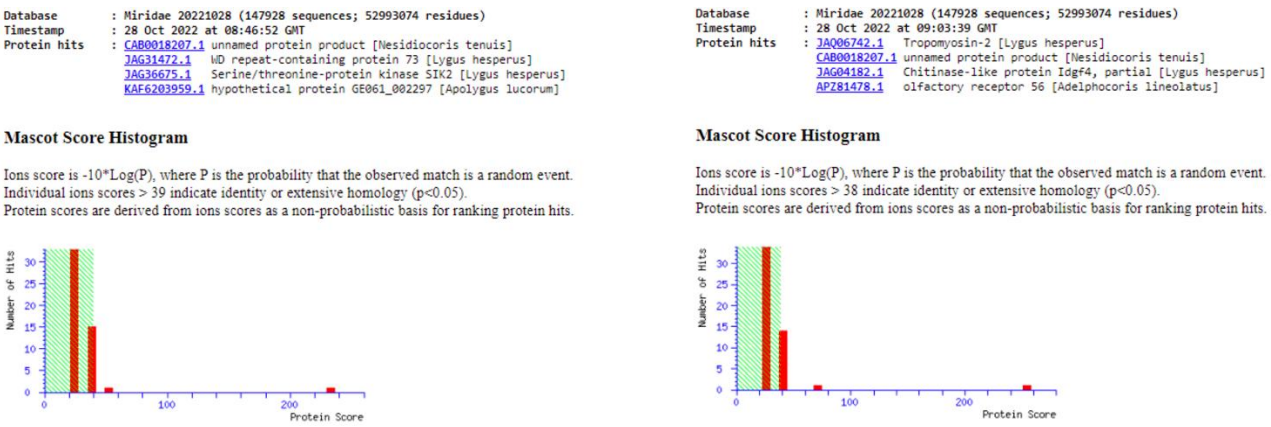
Kuva 17. M. pygmaeuksen oletettu tropomyosiini näyttää esiintyvän monomeerina (n. 37 kDa) pelkistävissä olosuhteissa (kaivo 1), kun taas ei-pelkistävissä olosuhteissa (kaivo 5) proteiini näyttää kulkeutuvan dimeerinä (n. 75 kDa). Kaivossa 3 on molekyylipainomarkkeri.

Tämän perusteella ajoimme kohdeproteiinia pelkistävissä olosuhteissa, tarkkaan erottelevassa Bis-Tris-SDS-PAGE-geelissä (Bolt, Kuva 18). Eristimme kaksi lähekkäin olevaan proteiinivyöhykettä erikseen ja määritimme niiden molekyylimassan LC-MS/MS-spektroskoopilla (Kuva 18).



Kuva 18. Proteiinivyöhykkeiden eristäminen 4–12 % Tris-Bis-geeliltä molekyylimassan määritystä varten.

Näytekäsittelyn ja proteiinien pilkkomisen jälkeen data käsiteltiin Marc Baumanin proteiinikemiallisessa laboratoriossa, Biomedicumissa, Helsingin yliopistossa. Saatuja molekyylipiikkejä verrattiin Miridae-datapankissa oleviin sekvensseihin. Alustavien tulosten perusteella ylempi vyöhyke ei tuottanut järkeviä tunnistuksia, mutta alemmasta vyöhykkeestä saatiin hyvät ja selvät massatulokset, joiden perusteella kohdeproteiinimme näytti olevan tropomyosiini (Kuva 19).



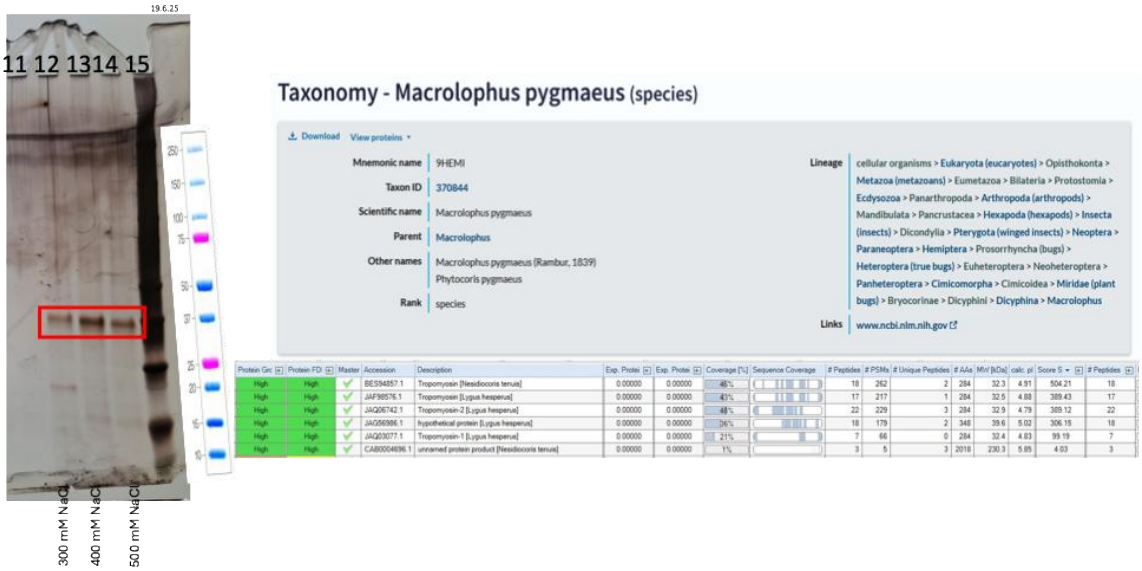
Kuva 19. Mascot-analyysin tulosten perusteella kohdeproteiinimme on tropomyosiini.

Myös sekvenssivertailun perusteella, kun vertasimme parhaan tunnistuksen sekvenssiä tietopankista tropomyosiinin sekvessiin, löytyi merkittäviä yhtäläisyyksiä (Kuva 20).

```
  1 MDAIKKKMQA MKMEKDTAMD KADTCEGQAK DANSRADKVL EDVRDLQKKL
 51 TQVEGDLVRT KKELETKTTE LEEKEKALTN AESEVASLNR KVQMVEEDLE
101 RSEERSGTAQ QKLAEASHAA DEASRMCKVL ENRSQQDEER MDQLTNQLKE
151 ARLLAEDADG KSDEVSRKLA FVEDELEVAE DRVKSGDSKI MELEEELKVV
201 GNSLKSLEVS EEKANQRVEE YKRQIKQLTV KLKEAEARAE FAEKTVKKLQ
251 KDVDRLEDDV RVEKEKSKVI IDDLDATFAE LSGF
```

Kuva 20. Yksityiskohtaisempi näkymä Mascot-tulosten proteiinisekvenssistä (CAB0018207.1), joka esittää Miridae-tietokannasta löytyneet täsmäävät peptidiosuudet (punaisella merkityt kohdat proteiinisekvenssissä; sekvenssin kattavuus 15 %). Sama proteiinihavaite esiintyi molemmissa LC-MS/MS-analyysissä ajetuissa näytteissä, ja tuloksena saatiin viisi täsmäävää peptidisekvenssiä, joista yhdessä oli yksi hapettumismuunnos. Tropomyosiineille tyypilliset peptidisekvenssit on korostettu keltaisella (Liu et al. 2013).

Kun LC-MS/MS-analyysi myöhemmin vielä toistettiin, kolme samankokoista proteiinivyöhykettä yhdistettiin eri kaivoista, jolloin näytettä saatiin enemmän. Tällöin tunnistus vielä varmistui (Kuva 21).

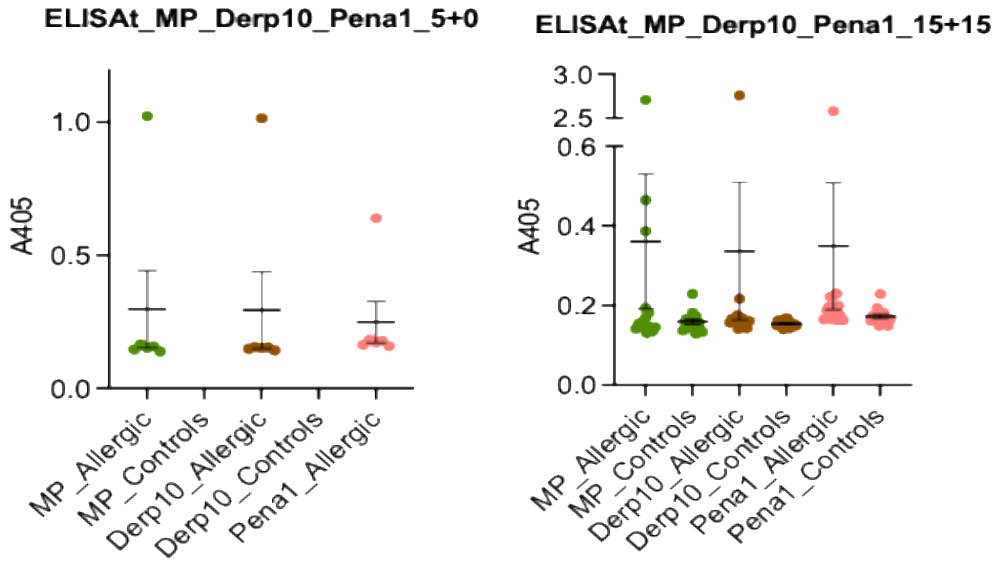


Kuva 21. Massa-analyysin uudelleenajo tehtiin suuremmalla määrällä kohdeproteiinia. Tässä ajossa tulokset olivat hyvin selvät ja proteiini varmistui M. pygmaeuksen tropomyosiiniksi.

4.5 M. pygmaeuksen tropomyosiinin ristiinreagoivuus

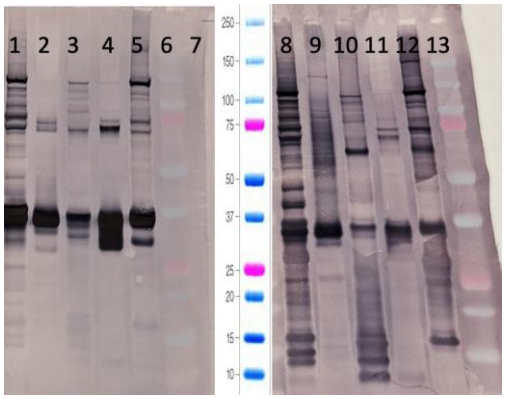
4.5.1 Ristiinreagoivien allergeenien tunnistaminen kasvihuoneiden potilasseerumeilla

Tropomyosiinin tiedetään olevan hyvin helposti ristiinreagoiva proteiini. Sen vuoksi testasimme kasvihuoneallergisten potilaiden IgE:n sitoutumista kaupallisesti saatavilla olleisiin pölypunkin (Der p 10), sekä katkaravun (Pen a 1) tropomyosiineihin (Kuva 22).



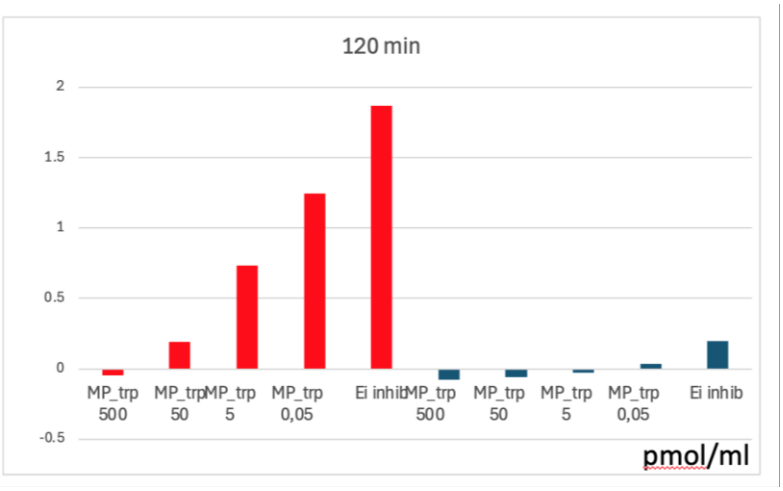
Kuva 22. Potilasseerumien IgE-vasta-aineiden sitoutuminen ristiinreagoiviin tropomyosiineihin suorassa ELISA:ssa. ELISA levyt päällystettiin 1 µg/ml *M. pygmaeus* - ja rekombinantti Der p 10 tropomyosiinia sekä 2 µg/ml rekombinantti Pen a 1 -tropomyosiinia. Potilas- ja kontrolliseerumit laimennettiin suhteessa 1:4. Sitoutunut IgE havaittiin biotinyloidulla vuohen anti-humaani-IgE-vasta-aineella (1:1000), signaalia vahvistettiin Vectastain-järjestelmällä ja värireaktio kehitettiin BCIP/NBT-substraatilla. Pisteet kuvaavat yksittäisiä seeruminäytteitä, vaakaviiva keskiarvoa ja virhepalkit keskihajontaa. Vasemmalla viiden uuden potilasseerumin, ja oikealla 15 potilas- ja 15 kontrolliseerumin IgE-vasta-aineiden sitoutuminen *M. pygmaeus* -luteen tropomyosiiniin (MP), pölypunkin tropomyosiiniin (Der p 10) ja katkaravun tropomyosiiniin (Pen a 1). Yhden potilasseerumin IgE-vasta-aineet sitoutuivat voimakkaasti kaikkiin kolmeen tropomyosiiniin, eli see-

Kun kaikkia tropomyosiineja testattiin anti-tropomyosiini-vasta-aineella, ne tunnistautuivat hyvin, samoin yhden potilaan seerumi tunnisti kaikki tropomyosiinit hyvin (Kuva 23).

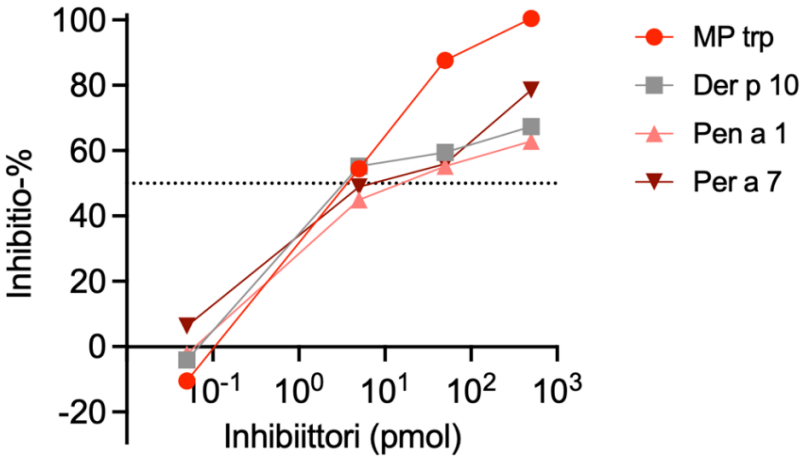


Kuva 23. Immunoblot-analyysi allergisen potilasseerumin IgE:n sitoutumisesta viiden kasvihuoneissa käytettävän torjuntaeliön kokonaisproteiineihin. Näytejärjestys kalvolla kaivot: 1 ja 8, M. pygmaeus; 2 ja 9, S. medanensis; 3 ja 10, E. formosa (kotelot); 4 ja 11, E. eremicus (kotelot); 5 ja 12, T. vaporariorum (kotelot); 6 ja 13, molekyylipainomarkkeri. RIPA-puskurissa valmistettuja kokonaisproteiinilysaatteja (10 µg/kaivo) eroteltiin 4–20 % Bis-Tris -polyakryyliamidigeelillä ja siirrettiin kalvolle immunoblot-analyysiä varten. Vasemmanpuoleinen kalvo inkuboitiin hiiren monoklonaalisella anti-tropomyosiinivasta-aineella (1A6, 1:1000), minkä jälkeen käytettiin biotinyloitua vuohen anti-hiiri-IgG-sekundaarivasta-ainetta (1:1000). Oikeanpuoleinen kalvo inkuboitiin allergisen potilaan seerumilla (1:4), minkä jälkeen käytettiin biotinyloitua vuohen anti-humaani-IgE-sekundaarivasta-ainetta (1:1000). Sekä kaupallinen anti-tropomyosiinivasta-aine, että allergisen potilaan seerumi tunnisti kaikissa viidessä lysaatissa tropomyosiinin molekyylipainoa vastaavan proteiinin.

Potilaiden IgE:n sitoutumisen voimakkuutta testattiin kahden eri tunnistajan seerumeilla (Kuva 24).



Kuva 24. Kahden tunnistajan inhibitio-ELISA puhtaalla tropomyosiinilla (TRP). Inhibitio ELISA potentiaalisille tropomyosiinia tunnistaville kasvihuoneessa allergisia oireita saavien potilaiden seerumeille (punaiset ja siniset pylväät). ELISA levy päällystettiin 100 pmol/ml (3.25 µg/ml) puhdistetulla M. pygmaeus tropomyosiinilla. Seerumit laimennettiin 1:5, ja niitä inkuboitiin yhtä suuren inhibiittoritilavuuden kanssa (lopullinen seerumilaimennos 1:10) 2 h. Inhibiittoreita käytettiin pitoisuuksina 0,05, 5, 50 ja 500 pmol. Sitoutunut IgE havaittiin biotinyloidulla vuohen anti-humaani-IgE-vasta-aineella (1:1000), signaalia vahvistettiin VECTASTAIN-järjestelmällä ja värireaktio kehitettiin BCIP/NBT-substraatilla. Punaisilla pylväillä kuvatun potilaalla inhibitio toimii erittäin hyvin, kun taas sinisillä pylväillä kuvatulla seerumilla tapahtuu hieman inhibitiota, mutta tällä seerumilla myös suora sitoutuminen on hyvin heikkoa.



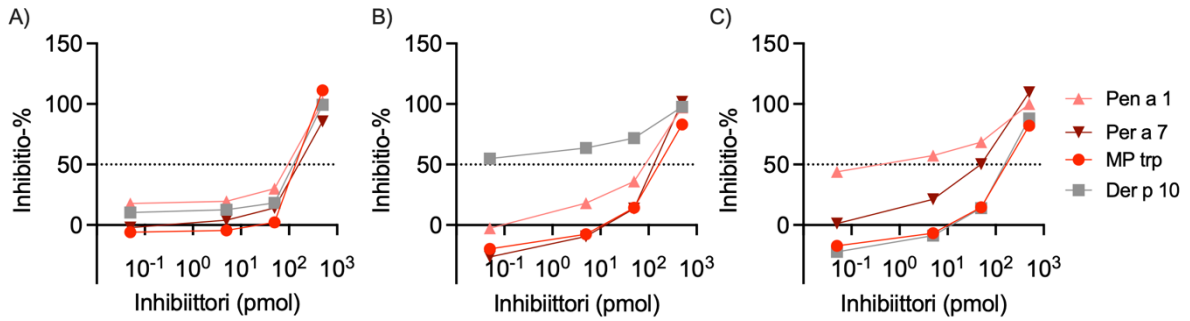
Kuva 25. Inhibitio-ELISA homologisilla tropomyosiineilla voimakkaasti tunnistavan potilaan seerumilla (edellisen kuvan punaiset pylväät). ELISA-levyt päällystettiin M. pygmaeuksen puhdistetulla tropomyosiinilla (100 pmol/ml; 3,25 µg/ml). Inhibiittoreina käytettiin M. pygmaeuksen, pölypunkin (Der p 10), katkaravun (Pen a 1) ja amerikantorakan (Per a 7) tropomyosiineja (0,05, 5, 50 ja 500 pmol). Potilasseerumi laimennettiin 1:10 ja inkuboitiin inhibiittoreiden kanssa 2 h. M. pygmaeus -tropomyosiini inhiboi IgE-sitoutumista voimakkaimmin. Per a 7 kilpaili IgE-sitoutumisesta seuraavaksi voimakkaimmin ja Pen a 1

vähiten. Kaikki tutkitut tropomyosiinit vähensivät IgE-sitoutumista annosriippuvaisesti. Tulokset osoittavat IgE:n merkittävää ristiinreagoivuutta M. pygmaeus -tropomyosiinin sekä amerikantorakan, pölypunkin ja katkaravun tropomyosiinien välillä tällä potilaalla.

4.5.2 Ristiinreagoivien allergeenien tunnistaminen tropomyosiiniallergisilla potilasseerumeilla

Seuraavaksi testattiin M. pygmaus -tropomyosiinin ristiinreagoivuutta tropomyosiiniallergisilla katkarapu-, pölypunkki- ja amerikantorakka-allergisten kaupallisilla seerumeilla (

Kuva 26).



Kuva 26. Inhibitio-ELISA kaupallisilla allergiaseerumeilla. ELISA-levyt päällystettiin M. pygmaeuksen, pölypunkin (Der p 10), katkaravun (Pen a 1) ja amerikantorakan (Per a 7) -tropomyosiineilla (30 pmol/ml). Inhibiittorina käytettiin puhdistettua M. pygmaeus -tropomyosiinia (0,05, 5, 50 ja 500 pmol). Kaupalliset seerumit pölypunkki-, katkarapu- ja amerikan torakka -allergisilta potilailta (n = 9 kussakin ryhmässä) laimennettiin suhteessa 1:10 ja inkuboitiin inhibiittoreiden kanssa 2 h. A) Katkarapuallergisella potilaalla M. pygmaeus -tropomyosiini inhiboi lähes täydellisesti IgE:n sitoutumisen kaikkiin neljään tropomyosiiniin, mikä viittaa voimakkaaseen ristiinreagoivuuteen eri lajien tropomyosiinien välillä. B) Amerikantorakka-allergisella potilaalla voimakkain inhibitio havaittiin Per a 7:ää vastaan. Merkittävää inhibitiota havaittiin myös Pen a 1:tä ja M. pygmaeuksen tropomyosiinia kohtaan, kun taas Der p 10:tä kohtaan inhibitio jäi vähäiseksi. C) Toisella amerikantorakka-allergisella potilaalla M. pygmaeus -tropomyosiini inhiboi tehokkaasti IgE:n sitoutumista M. pygmaeuksen tropomyosiiniin, sekä Der p 10:een ja Per a 7:ään, mutta Pen a 1:tä kohtaan inhibitiota ei käytännössä havaittu.

5 Tulosten pohdinta

Tulosten tarkastelun lähtökohdat

Kasvihuonetyö on biologisten altisteiden näkökulmasta monimuotoinen työympäristö, jossa työntekijät altistuvat samanaikaisesti kasvi-, mikrobi- sekä niveljalkaisperäisille proteiineille. Suomessa kasvihuoneissa työskentelee tuhansia työntekijöitä, joista merkittävä osa on kausityöntekijöitä. Aiemmassa tutkimuksessa on osoitettu, että jopa 63 % 117 kasvihuonetyöntekijästä oli herkistynyt vähintään yhdelle kasvihuoneissa esiintyvälle allergeenille tai kemikaalille (Suojalehto et al. 2022). Tämä korostaa kasvihuonetyön merkitystä allergisten sairauksien riskialttiina työympäristönä. Erityisen haastavaksi tilanteen tekee se, että osa herkistymisistä kohdistuu ristiinreagoiviin proteiineihin, kuten tropomyosiineihin. Tällöin työntekijällä voi esiintyä oireita myös muissa ympäristöissä, esimerkiksi altistuessaan pölypunkeille tai ruoka-aineallergeeneille. Oireet voivat jatkua myös työpaikan vaihdon jälkeen, mikä vaikeuttaa työperäisen altistumisen tunnistamista ja korostaa allergeenien tarkemman karakterisoinnin tarvetta. Tämän hankkeen tavoitteena oli syventää ymmärrystä kasvihuoneympäristön allergeenilähteistä sekä arvioida niiden tunnistamiseen soveltuvia menetelmiä työterveyden näkökulmasta, erityisesti M. pygmaeus -petoluteen osalta.

Pölypitoisuudet pilottikohteen ilmassa

Altistuminen orgaaniselle pölylle pilottikohteessa oli 0,15–0,20 mg/m^3, mikä vastaa 3–4 % orgaanisen pölyn ns. haitalliseksi tunnetusta pitoisuudesta (HTP-arvosta). Myös yleisilman hengittyvän pölyn pitoisuus kasvihuoneissa oli keräävillä ja suoraan osoittavilla menetelmillä mitattuna alhainen ja lähes ulkoilman tasoa vastaavana vuodenaikana. Työssä on kuitenkin vaiheita, joissa pölypitoisuus voi hetkellisesti nousta suuremmaksi. Tällaisia ovat esim. kasvien tärisyttäminen ja karsiminen sekä sadon korjuu. Viimeksi mainittua vaihetta mittauksiimme ei sisältynyt. Tärisyttämisen aikainen ns. kokonaispölypitoisuus oli huputetusta kasvista mitattuna korkeimmillaan n. 14 % orgaanisen pölyn HTP-arvosta. Vastaavanlaista työtä tekevillä kasvihuonetyöntekijöillä on todettu jonkin verran oireilua, joka on ollut yhdistettävissä käytettyjen torjuntaeliöiden tuottamille allergeeneille. Siksi pitäisi kasveista ja niiden kasvualustan peitteistä lähtöisin olevaa pölyä nostattavissa työvaiheissa käyttää kertakäyttöisiä FFP3 hengityksen suojaimia. Eritoten työntekijöiden, jotka kokevat hengitystieoireita, olisi niitä syytä käyttää pölyä nostattavissa tilanteissa, jossa työntekijä on lähellä pölyn lähdettä. Missään tutkimistamme kasvihuoneista hengityksensuojaimia ei käytetty. Yleisesti ottaen myös kasvihuoneiden siisteystasoon kannattaa edelleen panostaa niin, että pintojen ja yleisilman pölypitoisuus pysyy alhaisena ja vapaana kuihtuneista kasvinosista.

Kasvihuonepölyn näytteenotto ja altistumisen arvioinnin rajoitteet

Biologisten altisteiden mittaaminen kasvihuoneympäristöissä on edelleen metodologisesti haastavaa. Tulokset vahvistivat aiempia havaintoja siitä, että pölyn määrä ja proteiinikoostumus vaihtelevat voimakkaasti työtehtävien ja ympäristöolosuhteiden mukaan (Burdorf et al. 1994, Darbakk et al. 2025). Lisäksi havaittiin, että pölyn allergeenipitoisuus oli usein hyvin matala, mikä viittaa proteiinien hajoamiseen ympäristöolosuhteissa (Pomes et al. 2018, van Boven et al. 2020). Tämä tukee käsitystä, että ympäristöpöly ei sovellu luotettavaksi "pikadiagnostiikan" alustaksi työympäristön allergeeneille. Sen sijaan altistumisen arviointi tulisi perustaa yhdistettyihin menetelmiin, joissa hyödynnetään sekä ilmanäytteitä että komponenttipohjaista allergeenianalytiikkaa.

Biologisten uutteiden soveltuvuus allergeenien tunnistamiseen

Toisin kuin pölynäytteissä, kasvihuoneen torjuntaeliöistä tehdyistä lysaateista allergeenien tunnistaminen onnistui luotettavasti ELISA- ja FAB-soluaktivaatiomenetelmillä. Havainto viittaa siihen, että kontrolloiduissa biologisissa näytteissä allergeenien immunologinen aktiivisuus säilyy paremmin kuin ympäristöpölyssä, jossa proteiinien hajoaminen ja muut ympäristötekijät voivat heikentää allergeenien havaittavuutta. Funktionaaliset analyysit täydentävät spesifisen IgE:n määrityksiä arvioimalla allergeenien biologista aktiivisuutta ja efektorisolujen aktivaatiota (Jeebhay et al. 2019). Tämä on tärkeää työperäisen allergian diagnostiikassa, jossa pelkkä herkistymisen osoittaminen ei yksin riitä kliinisen merkityksen arviointiin.

Uuden M. pygmaeus -allergeenin tunnistaminen

Tutkimuksessa tunnistettiin uusi M. pygmaeus -allergeeni, joka massaspektrometrisesti identifioitiin tropomyosiiniksi. Tropomyosiinit ovat erittäin konservoituneita aktiinia sitovia rakenneproteiineja, jotka muodostavat merkittävän panallergeeniperheen niveljalkaisissa. Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että tropomyosiinit ovat keskeisiä ristireaktiivisia allergeeneja esimerkiksi pölypunkkien (Der p 10), torakoiden ja äyriäisten välillä (Ayuso et al. 2002, Wong et al. 2016). Näiden proteiinien laaja säilyvyys selittää IgE-välitteisen ristireaktiivisuuden, joka voi aiheuttaa oireita useissa eri ympäristöissä. Tässä kontekstissa M. pygmaeus -tropomyosiinin tunnistaminen tukee aiempia havaintoja siitä, että biologinen torjunta voi tuoda työympäristöihin uusia, kliinisesti merkittäviä allergeenilähteitä (Suojalehto et al. 2022). Tämä on erityisen tärkeää työterveyden kannalta, koska altisteet eivät rajoitu vain kasvihuoneympäristöön vaan voivat vaikuttaa oireiluun laajemmin työuran aikana.

Ristireaktiivisuus ja kliininen tulkinta

Koska tropomyosiinit ovat voimakkaasti ristiinreagoivia, tutkimuksessa arvioitiin M. pygmaeus -tropomyosiinin IgE-ristireaktiivisuutta eri allergeenilähteille herkistyneiden seerumeilla. Tämä on keskeistä, sillä aiemmissa tutkimuksissa on osoitettu, että merkittävä osa kasvihuonetyöntekijöiden IgE-positiivisuudesta voi selittyä ristireaktiivisuudella eikä primaarilla työperäisellä herkistymisellä (Wong et al. 2016, Moscato et al. 2020).

Tämä selittää osittain myös sen, miksi vain osa työntekijöistä reagoi spesifisesti M. pygmaeus -komponentteihin. Työterveyden näkökulmasta tämä korostaa komponenttidiagnostiikan merkitystä, jotta vältetään virheelliset tulkinnat työperäisestä allergiasta.

Tropomyosiinin puhdistusmenetelmät: metodologinen tarkastelu

Tutkimuksessa havaittiin merkittäviä eroja käytettyjen puhdistusmenetelmien välillä, mikä vaikutti tropomyosiinin eristämisen tehokkuuteen. Jancon menetelmä (Janco et al. 2016) osoittautui selvästi tehokkaammaksi kuin Erbanin menetelmä (Erban 2011).

Jancon menetelmän huomattavasti parempi puhdistusteho johtuu todennäköisesti valikoivien puhdistusvaiheiden yhdistelmästä. Menetelmä hyödyntää tropomyosiinin lämmönkestävyyttä (stabiiliutta) ja happosaostuvuutta, minkä ansiosta merkittävä osa epäpuhtausproteiineista voidaan poistaa jo ennen kromatografista erotusta. Tämän jälkeen näyte puhdistetaan HiTrap QFF -anioninvaihtopylväällä, joka erottaa proteiinit niiden varausominaisuuksien perusteella. HiTrap QFF on vahva anioninvaihtaja, jonka positiivisesti varautuneet ammoniumryhmät sitovat negatiivisesti varautuneita molekyylejä. Tropomyosiinin isoformien isoelektrinen piste (pI) on melko alhainen (noin 4,5–5,0), minkä vuoksi proteiini on pH 7,5:ssä voimakkaasti negatiivisesti varautunut ja sitoutuu tehokkaasti pylväsmateriaaliin. Ensimmäisen sidotusvaiheen korkea suolapitoisuus estää monien muiden proteiinien sitoutumisen pylvääseen, jolloin osa kontaminanteista poistuu. Toisessa sitouttamisvaiheessa näytteen alhaisempi suolapitoisuus mahdollistaa tropomyosiinin tehokkaan sitoutumisen hartsiin. Eluution aikana kasvava suolagradientti myös irrottaa proteiinit pylväästä niiden sitoutumisvoimakkuuden mukaan, mikä parantaa erotuskykyä.

Erbanin menetelmä puolestaan perustuu HiTrap Benzamidine FF-affiniteettipylvääseen. Koska menetelmästä puuttuvat selektiiviset esirikastusvaiheet, puhdistuksen tehokkuus riippuu pääasiassa p-aminobentsamidiiniligandin ja kohdeproteiinin välisestä affiniteetista. Bentsamidiini sitoo erityisesti seriiniproteaaseja ja trypsiinin kaltaisia entsyymejä, ja on mahdollista, ettei M. pygmaeus -tropomyosiinilla ole riittävää affiniteettia tähän hartsiin. Tämä selittää heikomman puhdistustehon ja korostaa esirikastusvaiheiden merkitystä allergeeniproteiinien eristämisessä.

Työterveyden ja altistumisen hallinnan näkökulma

Aiemmat epidemiologiset tutkimukset osoittavat, että biologista torjuntaa käyttävissä kasvihuoneissa allergisten oireiden esiintyvyys on kohonnut ja että herkistymiset voivat liittyä useisiin eri altisteisiin. Tämä tukee käsitystä, että kasvihuoneiden allergiariski ei ole yksittäisen allergeenin vaan laajemman biologisen altistumiskokonaisuuden seurausta. Työterveyden kannalta keskeinen johtopäätös on, että altistumisen hallinta edellyttää kokonaisvaltaista lähestymistapaa, jossa yhdistetään biologinen monitorointi, työprosessien tarkastelu ja kliininen diagnostiikka.

Kaiken kaikkiaan tämä tutkimus tuotti seuraavia uusia tutkimustuloksia: 1) Kasvihuoneallergeenien tunnistaminen ja karakterisointi antoi tietoa kasvihuoneissa esiintyvistä, herkistymistä ja allergiaa aiheuttavista proteiineista, mikä luo pohjan niiden mittaamiselle ja hyödyntämiselle. 2) Kasvihuoneallergeenien kanssa ristiinreagoivien proteiinien (allergeenien) tunnistamisen perusteella pystytään paremmin ymmärtämään allergiaoireiden aiheuttajia, sekä seulomaan herkistyneitä ja allergisoituneita työntekijöitä. 3) Torjuntaeliöiden herkistymisen tunnistavan menetelmän avulla pystytään terveystarkastuksissa tunnistamaan herkistyneet kasvihuonetyöntekijät. Oireilevien kasvihuonetyöntekijöiden herkistymisen tunnistaminen parantaa työhön liittyvien sairauksien diagnostiikkaa. 4) Ilmasta allergeenien määrän mittaava menetelmä auttaa tutkijoita arvioimaan jatkossa paremmin kasvihuoneiden ilmanlaatua allergeenien osalta, minkä seurauksena voidaan kehittää torjuntatoimia ja siten vähentää tai jopa estää allergisoitumista.

Yhteenveto ja tulevaisuuden näkymät

Hankkeen tulokset osoittavat, että kasvihuoneiden biologinen altistuminen on monitekijäinen ja metodologisesti haastava kokonaisuus. Vaikka ympäristöpöly ei sovellu allergeenien pikatestaukseen, tutkimus tuotti merkittävän uuden löydöksen M. pygmaeus -tropomyosiinista ja vahvisti käsitystä biologisten torjuntaeliöiden allergiavaikutuksista. Tulevaisuudessa tutkimuksen painopisteen tulisi siirtyä rekombinanttien allergeenikomponenttien kehittämiseen, laajempiin epidemiologisiin aineistoihin sekä ristireaktiivisuuden tarkempaan mekanistiseen ymmärtämiseen. Tämä mahdollistaisi tarkemman työperäisen allergian diagnostiikan ja paremman altistumisen hallinnan kasvihuonetyössä. Pitkällä aikavälillä nämä kehityssuunnat voivat merkittävästi parantaa kasvihuonetyöntekijöiden työterveyttä ja vähentää allergiasairauksien aiheuttamaa työkyvyn heikkenemistä.

6 Johtopäätökset

Tämän hankkeen keskeisenä tavoitteena oli lisätä tietoutta ja ymmärrystä kasvihuoneympäristön allergeeneista, niiden tunnistamisesta sekä ristiinreagoivien proteiinien

merkityksestä työperäisessä allergiassa. Tulokset osoittavat, että kasvihuonetyö aiheuttaa monimuotoista herkistymistä, missä työntekijät altistuvat sekä primaarisesti herkistäville että laajasti ristiinreagoiville allergeeneille.

- Ensimmäinen keskeinen johtopäätös on, että kasvihuoneiden biologiset allergeenit voidaan tunnistaa ja karakterisoida luotettavasti vain yhdistämällä immunologiset menetelmät ja proteomiikka. Tämä luo perustan allergeenien tarkemmalle mittaamiselle ja tulevaisuuden työperäisen allergian diagnostiikalle, mutta osoittaa samalla, että ympäristöpöly ei sellaisenaan sovellu riittävään allergeeniprofilointiin.
- Toinen keskeinen havainto on, että ristiinreagoivien proteiinien, erityisesti tropomyosiinien, merkitys kasvihuonetyön allergioissa on todennäköisesti aiemmin arvioitua suurempi. Tämä vaikeuttaa kliinistä diagnostiikkaa, koska IgE-positiivisuus voi heijastaa altistumista useista eri lähteistä eikä suoraan työperäistä herkistymistä. Komponenttipohjainen allergeenidiagnostiikka on siten välttämätön edellytys oikean etiologian selvittämiselle.
- Kolmanneksi tutkimus osoittaa, että biologiset torjuntaeliöt voivat toimia uusina työperäisinä allergeenilähteinä. M. pygmaeus -tropomyosiinin tunnistaminen vahvistaa, että myös hyötyeliöinä käytettävät lajit voivat sisältää kliinisesti merkittäviä allergeeneja, joiden merkitys kasvaa biologisen torjunnan yleistyessä.
- Neljänneksi voidaan todeta, että nykyiset ympäristöpohjaiset mittausmenetelmät eivät riitä työympäristön allergeenikuormituksen arviointiin. Tämä korostaa tarvetta kehittää uusia, standardoituja ja biologisesti relevantteja mittausmenetelmiä työterveyden tueksi.

7 Suositukset

Tutkimuksen perusteella voidaan esittää seuraavat työterveyteen ja työsuojeluun liittyvät suositukset:
Työhygienia: Kasvihuonetyön allergioita ja iho- ja hengitystieoireita voidaan torjua hyvällä yleisellä työhygienialla, kuten siisteillä työtavoilla ja prosesseilla, pölyävien työvaiheiden minimoimisella. Pölyämistä voi vähentää esimerkiksi välttämällä kasvijätteen käsittelyä lähellä hengitysvyöhykettä.
Henkilönsuojaimet biologisessa altistumisessa: Kasvihuonetyöntekijöiden tulisi käyttää hengityssuojaimia pölyä tai aerosoleja tuottavissa työvaiheissa. Tämä on erityisen tärkeää tilanteissa, joissa käsitellään kasvimateriaalia, tehdään siivousta tai työskennellään kuivissa olosuhteissa, joissa ilmassa oleva orgaaninen pöly voi lisääntyä.
Ihoaltistumisen vähentäminen: Pitkähihaisten ja -lahkeisten työvaatteiden sekä suojakäsineiden käyttöä tulisi suositella kaikissa työvaiheissa, joissa kosketus kasvimateriaaliin

tai torjuntaeliöihin on toistuvaa. Tämä voi vähentää sekä allergisoitumisriskiä että olemassa olevien herkistymisten pahenemista.
Työperäisen allergian varhainen tunnistaminen: Terveystarkastuksissa tulisi kiinnittää erityistä huomiota kasvihuonetyöntekijöiden hengitystie- ja iho-oireisiin ja ohjata herkästi jatkotutkimuksiin Työterveyslaitoksen yksiköihin herkistymisen kattavaksi selvittämiseksi. Tämä mahdollistaa työperäisten allergioiden varhaisemman tunnistamisen ja työkyvyn turvaamisen.
Altistumisen seurannan kehittäminen: Vaikka ympäristöpöly ei sovellu suoraan allergeenien mittaamiseen, biologisten altisteiden seurantaa tulisi kehittää yhdistämällä ilmanäytteenotto, kohdennetut allergeenimääritykset ja työprosessien arviointi. Tämä tukee tulevaisuudessa riskiperusteista työsuojelua.
Jatkotutkimus: Jatkossa tarvitaan laajempia epidemiologisia tutkimuksia, joissa selvitetään erityisesti M. pygmaeus -tropomyosiinin kliinistä merkitystä sekä ristiinreagoivuuden laajuutta eri potilasryhmissä. Lisäksi rekombinanttien allergeenikomponenttien kehittäminen mahdollistaisi tarkemman diagnostiikan ja altistumisen arvioinnin.

8 Hankkeen tuotoksia

Posteri: Allergenforskning i växthus, Närpes Trädgårds expo 16.-17.4.2026
Artikkeli: Piia Karisola, Hille Suojalehto, Katri Suuronen, Tapani Tuomi: Torjuntaeliöt turvaavat sadon, mutta voivat aiheuttaa allergioita työntekijöille; Puutarha & kauppa 10.7.2026.
Työterveyslaitoksen teemasivun ”Allergioiden ehkäiseminen kasvihuonetyössä” ja ohjeiden päivitys 8/2026.
Verkkouutinen: Tutkimus: Kasvihuonetyön uudet allergiariskit pitää huomioida ennaltaehkäisevin toimin, Työterveyslaitos 2.9.2026.
Seminaariesitys: Hille Suojalehto: Allergiat kasvihuonetyössä; Kasvinsuojelun opit kaudelta 2026: onnistumisia ja yllätyksiä - seminaari, Biotus, Lepaa-näyttely 13.8.2026
Tieteellinen artikkeli otsikolla ”Identification and Characterization of Allergens in Biopesticide Organisms among Greenhouse Workers” on valmisteilla.

9 Kirjallisuus

Ayuso, R., G. Reese, S. Leong-Kee, et al. (2002). "Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins." Int Arch Allergy Immunol 129(1): 38-48.

Burdorf, A., L. Lillienberg and J. Brisman (1994). "Characterization of exposure to inhalable flour dust in Swedish bakeries." Ann Occup Hyg 38(1): 67-78.

Darbakk, C., P. Graff and R. Olsen (2025). "An assessment of occupational exposure to inhalable aerosols and airborne proteins in food manufacturing plants." J Occup Environ Hyg 22(11): 903-914.

Erban, T. (2011). "Purification of tropomyosin, paramyosin, actin, tubulin, troponin and kinases for chemiproteomics and its application to different scientific fields." PLoS One 6(8): e22860.

Groenewoud, G. C., C. de Graaf in 't Veld, A. J. vVan Oorschot-van Nes, et al. (2002). "Prevalence of sensitization to the predatory mite Amblyseius cucumeris as a new occupational allergen in horticulture." Allergy 57(7): 614-619.

Janco, M., T. T. Bonello, A. Byun, et al. (2016). "The impact of tropomyosins on actin filament assembly is isoform specific." Bioarchitecture 6(4): 61-75.

Jeebhay, M. F., G. Moscato, B. E. Bang, et al. (2019). "Food processing and occupational respiratory allergy- An EAACI position paper." Allergy 74(10): 1852-1871.

Kronqvist, M., E. Johansson, B. Kolmodin-Hedman, et al. (2005). "IgE-sensitization to predatory mites and respiratory symptoms in Swedish greenhouse workers." Allergy 60(4): 521-526.

Lindstrom, I., P. Holtta, K. Suuronen, et al. (2022). "High prevalence of sensitization to bumblebee venom among greenhouse workers." J Allergy Clin Immunol Pract 10(2): 637-639.

Lindstrom, I., H. Karvonen, K. Suuronen, et al. (2018). "Occupational asthma from biological pest control in greenhouses." J Allergy Clin Immunol Pract 6(2): 692-694 e693.

Liu, R., A. L. Holck, E. Yang, et al. (2013). "Tropomyosin from tilapia (Oreochromis mossambicus) as an allergen." Clin Exp Allergy 43(3): 365-377.

Madsen, A. M., K. Tendal and M. W. Frederiksen (2014). "Attempts to reduce exposure to fungi, beta-glucan, bacteria, endotoxin and dust in vegetable greenhouses and a packaging unit." Sci Total Environ 468-469: 1112-1121.

Madsen, A. M., T. Thilsing, J. Baelum, et al. (2016). "Occupational exposure levels of bioaerosol components are associated with serum levels of the acute phase protein Serum Amyloid A in greenhouse workers." Environ Health 15: 9.

Moscato, G., C. Apfelbacher, K. Brockow, et al. (2020). "Gender and occupational allergy: Report from the task force of the EAACI Environmental and Occupational Allergy Interest Group." Allergy 75(11): 2753-2763.

Pekar, J., D. Ret and E. Untersmayr (2018). "Stability of allergens." Mol Immunol 100: 14-20.

Pomes, A., J. M. Davies, G. Gadermaier, et al. (2018). "WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language." Mol Immunol 100: 3-13.

Riggioni, C., C. Ricci, B. Moya, et al. (2024). "Systematic review and meta-analyses on the accuracy of diagnostic tests for IgE-mediated food allergy." Allergy 79(2): 324-352.

Shafique, R. H., M. Inam, M. Ismail, et al. (2012). "Group 10 allergens (tropomyosins) from house-dust mites may cause covariation of sensitization to allergens from other invertebrates." Allergy Rhinol (Providence) 3(2): e74-90.

Shamji, M. H. and J. N. Francis (2019). "Measurement of Allergen-Specific Inhibitory Antibody Activity." Methods Mol Biol 2020: 33-43.

Shamji, M. H., L. K. Wilcock, P. A. Wachholz, et al. (2006). "The IgE-facilitated allergen binding (FAB) assay: validation of a novel flow-cytometric based method for the detection of inhibitory antibody responses." J Immunol Methods 317(1-2): 71-79.

Shevchenko, A., H. Tomas, J. Havlis, et al. (2006). "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." Nat Protoc 1(6): 2856-2860.

STM (2025). HTP-arvot (Haitallisiksi tunnetut pitoisuudet) 2025. Helsinki, Sosiaali- ja Terveysministeriö. 2025:4: 108.

Suojalehto, H., P. Holtta, S. Suomela, et al. (2021). "High Prevalence of Sensitization to Mites and Insects in Greenhouses Using Biologic Pest Control." J Allergy Clin Immunol Pract 9(11): 4130-4137 e4131.

Suojalehto, H., I. Lindstrom, M. Koponen, et al. (2022). Allergiat ja niiden ehkäiseminen kasvihuonetyössä : loppuraportti tutkimuksesta biologinen torjunta kasvihuoneissa – altistuminen, allergiat ja niiden ehkäisy. Helsinki, Työterveyslaitos.

Suuronen, K., P. Holtta, M. Korva, et al. (2022). "Exposure to dust, endotoxins and microbes in Finnish vegetable greenhouses." Ann Agric Environ Med 29(1): 56-62.

Thilsing, T., A. M. Madsen, I. Basinas, et al. (2015). "Dust, endotoxin, fungi, and bacteria exposure as determined by work task, season, and type of plant in a flower greenhouse." Ann Occup Hyg 59(2): 142-157.

TTL (2016). "Hengittyvän ja alveolijakeisen pölyn tavoitetasoperustelumuistio." Retrieved 19.8.2026, 2026, from https://www.ttl.fi/sites/default/files/2021-11/hengittyva-ja-alveolijakeinen-poly-tavoitetaso.pdf.

UniProt, C. (2025). "UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025." Nucleic Acids Res 53(D1): D609-D617.

Valtioneuvosto (2017). Valtioneuvoston asetus ilmanlaadusta. 79/2017. Finlex.

van Boven, F. E., N. W. de Jong, M. Loomans, et al. (2020). "Describing fluctuating indoor aerosol dust measurements with application to house dust mite allergens." Sci Rep 10(1): 16897.

Wong, L., C. H. Huang and B. W. Lee (2016). "Shellfish and House Dust Mite Allergies: Is the Link Tropomyosin?" Allergy Asthma Immunol Res 8(2): 101-106.

HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI
LÄÄKETIETEELLINEN TIEDEKUNTA
MEDICINSKA FAKULTETEN
FACULTY OF MEDICINE

Työsuojelurahasto
Arbetarskyddsfonden
The Finnish Work Environment Fund

Biologinen torjunta on tärkeä osa kestävää kasvihuonetuotantoa, mutta torjuntaeliöt voivat aiheuttaa työntekijöille allergioita sekä hengitystie- ja iho-oireita. Tässä tutkimuksessa tunnistettiin ja karakterisoitiin kasvihuonetyöntekijöiden oireisiin liittyviä torjuntaeliöiden allergeeneja ja tutkittiin niiden ristiinreagoivuutta. Lisäksi selvitettiin mahdollisuuksia kehittää menetelmiä herkistymisen ja työympäristön allergeenialtistumisen arviointiin. Tulokset lisäävät tietoa torjuntaeliöihin liittyvistä terveysriskeistä ja tukevat työperäisten allergioiden ehkäisyn ja työhygienian kehittämistä.

Työterveyslaitos
PL

00032
ttl.fi
ISBN 978-952-391-278-6 (PDF)

Työterveyslaitos
Arbetshälsoinstitutet
Finnish Institute of Occupational Health