

What's in your dust?

ANALIZA ZBIÓRKI KURZU

PODMIOT: Quality Test

RAPORT SPORZĄDZONY: 05.11.2020

LABORATORIUM: 'ARCTEC'
LONDYŃSKA SZKOŁA HIGIENY I MEDYCYNY
TROPICALNEJ

NAZWISKO ANLITYKA:

Główny badacz: Prof. James Logan BSc, PhD, FRES, Director
Badacz Odpowiedzialny: Dr. James Hourst, Dr. Alexandra Hiscox
BA, MSc, PhD Dr. Sarah Dewhirst BSc, MSc, PhD
Asystent techniczny: David Hill BSc, MSc Freya Spencer BSc, MSc

Wprowadzenie i zastosowane metody

1. WPROWADZENIE

Kurz w naszych gospodarstwach domowych zawiera wiele różnych składników, w tym komórki skóry ludzkiej i zwierzęcej, włosy zwierząt domowych oraz szerokie spektrum mikroorganizmów łącznie z grzybami, pleśniami i bakteriami, a także materiał roślinny. Niektóre spośród mikrobów obecnych w kurzu z naszych gospodarstw domowych mogą wywierać negatywny wpływ na zdrowie człowieka wywołując alergie lub astmę o podłożu alergicznym. Roztocza kurzu domowego, takie jak *Dermatophagoides pteronyssinus* (europejskie roztocze kurzu domowego) również występują powszechnie w gospodarstwach domowych a jeden z alergenów kojarzonych z roztoczymi kurzu domowego (Der P 1) jest znajdowany w 68% domów w Europie. Skuteczne sprzątanie i usuwanie kurzu z gospodarstw domowych jest ważne dla zachowania zdrowia i zmniejszenia ekspozycji na potencjalne alergeny.

Celem tego studium było zbadanie zawartości próbek kurzu dostarczonych przez Dyson Technologies Ltd. na okoliczność występowania roztoczy kurzu i mikroorganizmów oraz zmierzenie koncentracji alergenu Der P 1. Próbki zostały pobrane ze zanonimizowanych gospodarstw domowych w całej Europie i w Ameryce Północnej za pomocą odkurzacza Dyson.

2. METODYKA

2.1. Wstępna obróbka kurzu

Próbki zostały dostarczone przez Dyson Technologies Ltd. w szalkach Petriego, które były umieszczone w szczelnych torebkach wraz z nawilżoną watą, mającą na celu utrzymanie wilgotności i zapobiegnięcie odwodnieniu roztoczy obecnych w próbkach. Po dotarciu do laboratorium próbki kurzu były zmagazynowane w temperaturze pokojowej do czasu rozpoczęcia ich obróbki. Próbki kurzu zostały zważone i następnie poddane przesiewaniu przez zgrubne sito przez 30 sekund. W ten sposób oddzielono drobny kurz od większych przedmiotów i włosów występujących w próbkach. Podjęto ocenę co do obecności i rodzaju włosów i innych obiektów w próbkach. W plikach przekazanych razem z tym raportem zamieszczono szereg zdjęć próbek wykonanych przed wstępną obróbką.

W wyniku dwukrotnego losowego wydzielenia podpróbki pobrano z niej 10 mg w celu wykonania posiewu na płytkach agarowych (vide sekcja 2.3 tego raportu) oraz 10 mg do przeprowadzenia testu ELISA (immunoenzymosorpcyjnego) na obecność Der P 1 (vide sekcja 2.4).

2.2. Ocena ilościowa roztoczy kurzu domowego

Drobny kurz pozostały po wydzieleniu podpróbek do wykonania posiewu na płytkach agarowych oraz testu ELISA na obecność Der P 1 (vide krok 2.1) został umieszczony w probówce wirówkowej o pojemności 50 ml, do której dodano 45 ml wody wodociągowej. Probówkę zamknięto szczelnie i 20-krotnie odwrócono do góry dnem w celu wymieszania kurzu z wodą. Następnie umieszczono probówkę w zamrażarce w temperaturze -20 stopni Celsjusza na okres 1 godziny i 15 minut.

W czasie zamrażania dochodzi do uformowania bloku lodowego z trzema wyraźnymi warstwami. Warstwa górna (cienka warstwa lodu) zawiera roztocza, które wypłynęły na powierzchnię. Środkowa warstwa pozostaje niezamrożona i zawiera wodę z pewną ilością drobin kurzu. W dolnej warstwie znajduje się kurz w lodzie.

Wierzchnia warstwa lodu została usunięta i rozmrożona na pokrywce szalki Petriego, a następnie poddana obserwacji za pomocą mikroskopu stereoskopowego w 40-krotnym powiększeniu. Roztocza kurzu i fragmenty owadów zostały policzone dla całej próbki, dając pogląd na to, ile roztoczy znajdowało się w całości drobnego kurzu w próbce (minus 20 mg użytych do innych prób).

Wprowadzenie i zastosowane metody

2.3. Ocena rozwoju mikroorganizmów na płytkach agarowych

10 mg drobnego kurzu wydzielonego jako losowa próbka (vide 2.1) umieszczono w 2-mililitrowej rurce mikrowirówki wraz z dodatkiem 1 ml zdemineralizowanej wody. Rurkę zamknięto szczelnie i poddano silnemu wstrząsaniu przez 10 sekund. Z zawiesiny kurzu pobrano następnie próbkę za pomocą sterylnej 5-mikrolitrowej pipety i naniesiono ją na płytkę Petriego z agarem ziemniaczano-glukozowym. Tak przygotowane próbki kurzu inkubowano przez dwa dni w temperaturze 28 stopni Celsjusza, po czym sfotografowano je. Agar ziemniaczano-glukozowy jest nieselektywną pożywką mikrobiologiczną nadającą się szczególnie do rozwoju pleśni i bakterii.

2.4. Oszacowanie ilościowe zawartości alergenu Der P 1 w próbkach

Próbki zostały przygotowane zgodnie z metodą ekstrakcji EARL et al., 20074, a test ELISA przeprowadzono z zastosowaniem zestawu Indoor Biotechnologies ELISA 2.0 służącego do pomiaru alergenu roztoczy Dermatophagoides pteronyssinus (Der P 1). Absorbancja została zmierzona na poziomie 450 nm przy użyciu fotometru mikroplótkowego Tecan Spark 10M. Granica wykrywalności dla tego sprzętu wynosiła 0,19 ng/ml, w związku z czym stężenia poniżej tej wartości nie mogły być wykryte.

2.5. Analiza włosów w próbkach kurzu

Grubszy kurz, który zatrzymał się na sicie na etapie wstępnej obróbki został posortowany ręcznie w celu wyodrębnienia włosów do dalszej analizy. Włosy w ilości do dziesięciu na próbkę zostały umieszczone na szkiełkach mikroskopowych i przytwierdzone środkiem do zamykania preparatów DPX w celu umożliwienia ich obserwacji w silnym powiększeniu pod mikroskopem optycznym. Identyfikacja jako włos (ludzki, koci, psi lub inny) opierała się na cechach morfologicznych widocznych przy dużym powiększeniu. Próbki włosów były analizowane za pomocą pionowego mikroskopu optycznego Nikon Ni-E w powiększeniu 200-krotnym.

2.6. Badanie roztoczy kurzu domowego mikroskopem elektronowym

Do zobrazowania roztoczy kurzu domowego (*Dermatophagoides farinae*) z kolonii LSHTM (London School of Hygiene & Tropical Medicine) zastosowano metodę skaningowej mikroskopii krioelektronowej (Cryo-SEM). Roztocza *D. farinae* były hodowane na płatkach karmy akwarystycznej TetraMin w inkubatorze, w temperaturze 21 stopni Celsjusza, w środowisku o wilgotności względnej 70-80%.

Roztocza były przenoszone pojedynczo na dwustronną węglową taśmę klejącą (Agar Scientific) przed umieszczeniem na uchwycie do skaningowego mikroskopu elektronowego. Preparację próbki do skaningowej mikroskopii krioelektronowej wykonano przy użyciu systemu Gatan Alto 2100. Uchwyt zamrożono przez zanurzenie w ciekłym azocie i przeniesiono go do nakolumnowej komory preparacyjnej za pomocą urządzenia transferowego wykorzystującego próżnię. Głęboko ochłodzone roztocza kurzu zostały następnie poddane napyłaniu złotem przez jedną minutę.

Zdjęcia mikrograficzne uzyskano z zastosowaniem skaningowego mikroskopu elektronowego JEOL 6360 LV. Parametry obejmowały napięcie przyspieszenia 10 kV, plamkę skaningową 30, dystans roboczy 14 mm, sygnał wykrywany za pomocą detektora elektronów wtórnych.

Waga próbek kurzu z gospodarstw domowych

Łączna waga twojej próbki kurzu (g)

6.2706

Udział kurzu drobnego (%)

38.74

Godna uwagi zawartość próbki

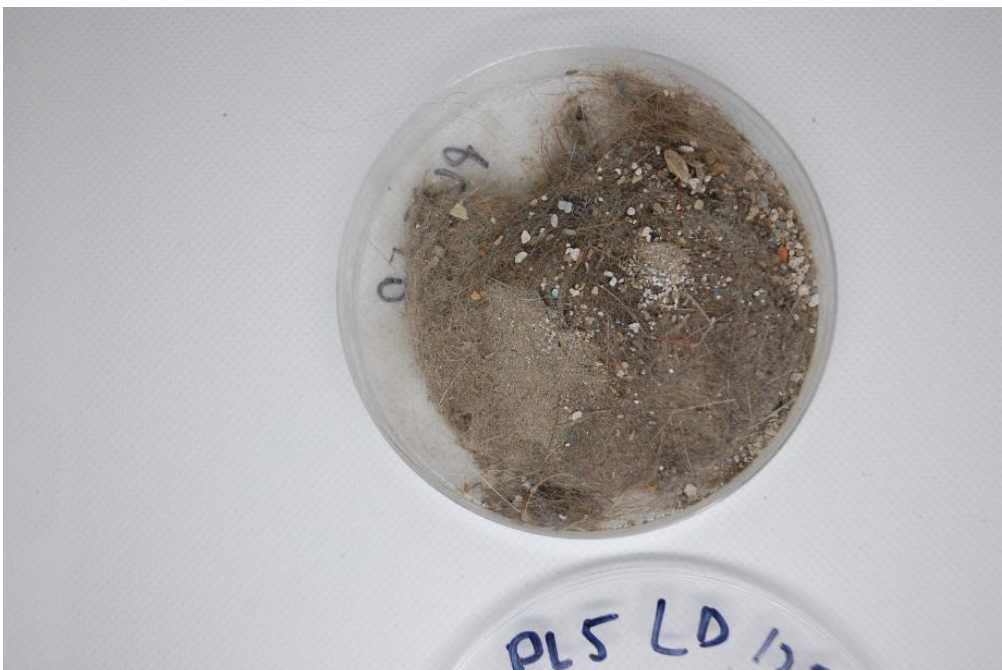
Gumowa uszczelka, kombinacja korpusów i kończyn owadów

Próbka kurzu wysłana do laboratorium

Metoda wstępnej obróbki kurzu

Próbki zostały dostarczone w szalkach Petriego, które były umieszczone w szczelnych torebkach wraz z nawilżoną watą, mającą na celu utrzymanie wilgotności i zapobieżenie odwodnieniu roztoczy obecnych w próbkach. Po dotarciu do laboratorium próbki kurzu były zmagazynowane w temperaturze pokojowej do czasu rozpoczęcia ich obróbki. Próbki kurzu zostały zważone i następnie poddane przesiewaniu przez zgrubne sito przez 30 sekund. W ten sposób oddzielono drobny kurz od większych przedmiotów i włosów występujących w próbkach. Podjęto ocenę co do obecności i rodzaju włosów i innych obiektów w próbkach. W plikach przekazanych razem z tym raportem zamieszczono szereg zdjęć próbek wykonanych przed wstępną obróbką.

W wyniku dwukrotnego losowego wydzielenia podpróbki pobrano z niej 10 mg w celu wykonania posiewu na płytkach agarowych (vide dalsze sekcje tego raportu) oraz 10 mg do przeprowadzenia testu ELISA (immunoenzymosorpcyjnego) na obecność Der P 1 (vide następne sekcje tego raportu). Cały pozostały drobny kurz zachowano w celu przeprowadzenia oceny ilościowej występowania roztoczy kurzu domowego (vide dalsze sekcje tego raportu). W sytuacji, gdy z próbki można było wyodrębnić bardzo małą ilość drobnego kurzu lub gdy nie występował on wcale, nie było do dyspozycji drobnego kurzu do potraktowania priorytetowego dla potrzeb wykonania posiewu oraz testu ELISA na obecność Der P 1.



Metoda oceny ilościowej roztoczy kurzu domowego

W twojej próbce kurzu znaleźliśmy:

0 całych roztoczy kurzu domowego

6 fragmentów owadów – kombinacja korpusów i kończyn

Znaleźliśmy w próbkach kurzu pochodzących z odkurzania w **Polsce** (9 innych próbek):

7 całych roztoczy kurzu (łącznie)
4 fragmenty owadów takich jak głowa mrówki lub para szczypiec owada.

Znaleźliśmy w próbkach kurzu pochodzących z odkurzania w **innych krajach** (61 innych próbek):

12 całych roztoczy kurzu (łącznie)

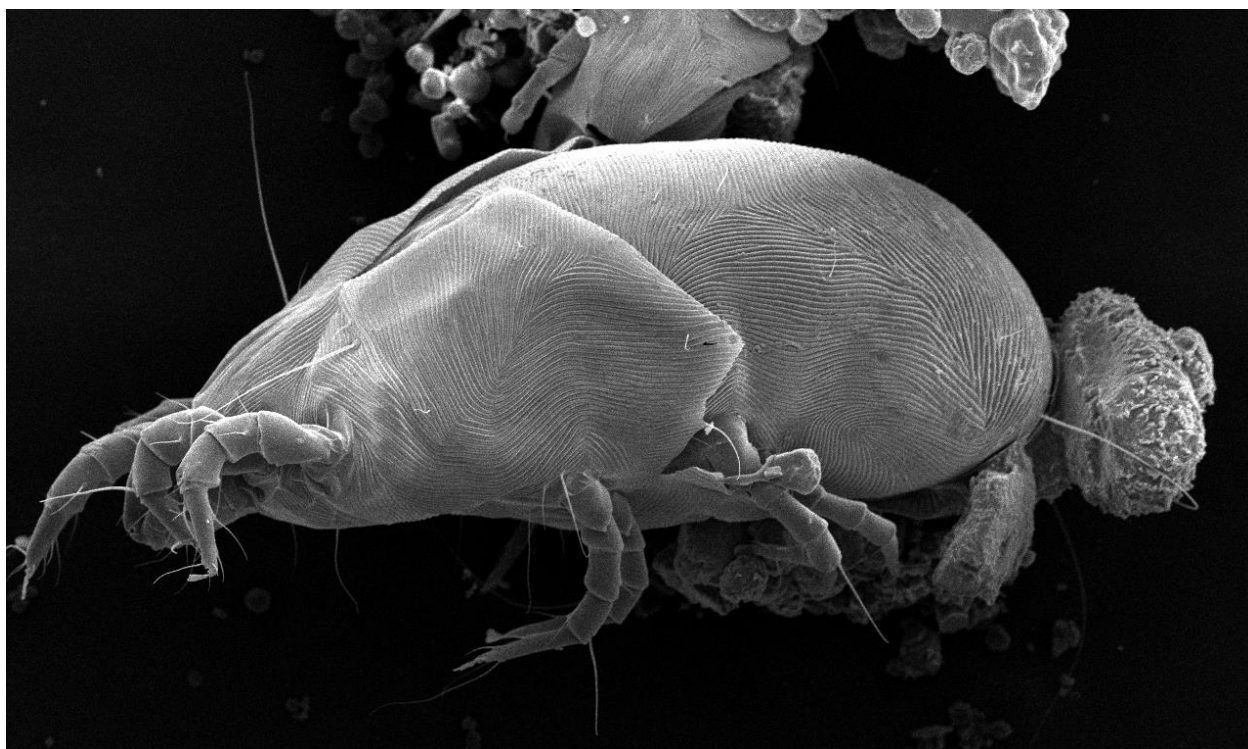
Metoda oceny ilościowej roztoczy kurzu domowego

Drobny kurz pozostały po wydzieleniu podpróbek do wykonania posiewu na płytkach agarowych oraz testu ELISA na obecność Der P 1 (vide krok 2.1) został umieszczony w probówce wirówkowej o pojemności 50 ml, do której dodano 45 ml wody wodociągowej. Probówkę zamknięto szczelnie i 20-krotnie odwrócono do góry dnem w celu wymieszania kurzu z wodą. Następnie umieszczono probówkę w zamrażarce w temperaturze -20 stopni Celsjusza na okres 1 godziny i 15 minut.

W czasie zamrażania dochodzi do uformowania bloku lodowego z trzema wyraźnymi warstwami. Warstwa górna (cienka warstwa lodu) zawiera roztocza, które wypłynęły na powierzchnię. Środkowa warstwa pozostaje niezamrożona i zawiera wodę z pewną ilością drobiny kurzu. W dolnej warstwie znajduje się kurz w lodzie.

Wierzchnia warstwa lodu została usunięta i rozmrożona na pokrywie szalki Petriego, a następnie poddana obserwacji za pomocą mikroskopu stereoskopowego w 40-krotnym powiększeniu. Roztocza kurzu i fragmenty owadów zostały policzone dla całej próbki, dając pogląd na to, ile roztoczy znajdowało się w całości drobnego kurzu w próbce (minus 20 mg użytych do innych prób).

Przykładowe zdjęcie roztocza kurzu wykonane w trakcie badań



Ocena rozwoju mikroorganizmów

Pleśnie i bakterie

Metoda oceny rozwoju mikroorganizmów na płytkach agarowych

10 mg drobnego kurzu wydzielonego jako losowa próbka umieszczono w 2-mililitrowej rurce mikrowirówki wraz z dodatkiem 1 ml zdemineralizowanej wody. Rurkę zamknięto szczelnie i poddano silnemu wstrząsaniu przez 10 sekund. Z zawiesiny kurzu pobrano następnie próbkę za pomocą sterylnej 5-mikrolitrowej pętli i naniesiono ją na płytkę Petriego z agarem ziemniaczano-glukozowym. Tak przygotowane próbki kurzu inkubowano przez dwa dni w temperaturze 28 stopni Celsjusza, po czym sfotografowano je. Agar ziemniaczano-glukozowy jest nieselektywną pożywką mikrobiologiczną nadającą się szczególnie do rozwoju pleśni i bakterii.

Wynik analizy dla Ciebie



Kwantyfikacja alergenu Der P 1 w próbkach

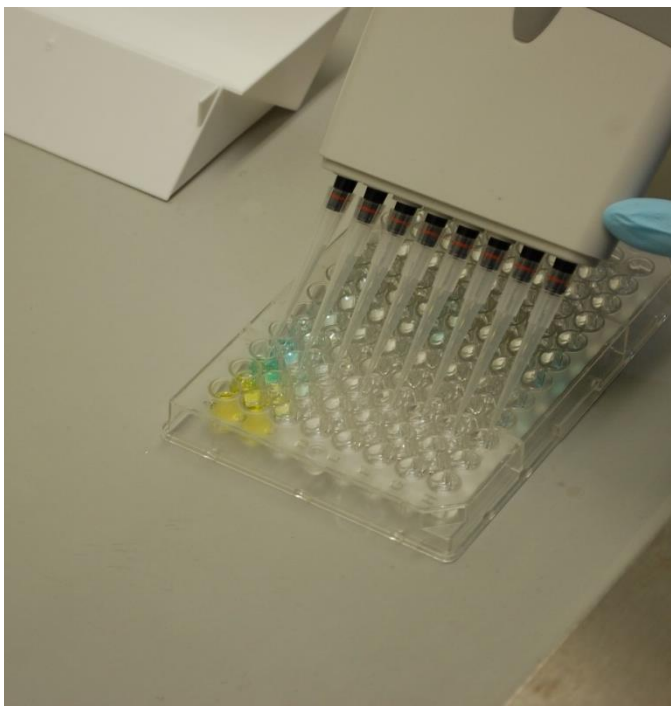
Po oszacowaniu wzrostu mikroorganizmów na płytkach agarowych znaleźliśmy w twojej próbce kurzu (opis zastosowanej metody - punkt 2.3. we wprowadzeniu i metodach):

Koncentracja alergenu Der P 1 (ng/ml): <0,19

W innych próbkach kurzu z Polski po oszacowaniu wzrostu mikroorganizmów na płytkach agarowych wykryliśmy:

Koncentrację alergenu Der P 1 (ng/ml): <0,19 w 8 próbkach i 0.92 w jednej.

Fotografia jednego z kluczowych etapów testu ELISA na obecność alergenu Der P 1. Na tym etapie dochodzi do zatrzymania reakcji między przeciwciałem Der P 1 i wyekstrahowanymi próbkami w wyniku dodania roztworu hamującego tuż przed analizą optyczną.



Metoda pomiaru zawartości alergenu Der P 1 w próbkach

Próbki zostały przygotowane zgodnie z metodą ekstrakcji EARL et al., 20074, a test ELISA przeprowadzono z zastosowaniem zestawu Indoor Biotechnologies ELISA 2.0 służącego do pomiaru alergenu roztoczy Dermatophagoides pteronyssinus (Der P 1). Absorbancja została zmierzona na poziomie 450 nm przy użyciu fotometru mikroplatkowego Tecan Spark 10M. Granica wykrywalności dla tego sprzętu wynosiła 0,19 ng/ml, w związku z czym stężenia poniżej tej wartości nie mogły być wykryte.

Test ELISA wykrył możliwą do zmierzenia koncentrację alergenu Der P 1 w 11 spośród 58 próbek.

Dodatkowe informacje:

Generalnie obecność alergenu Der P 1 była niska w całym przekroju przebadanych próbek. Wynikało to po części z ich z rodzaju i ze sposobu w jaki zostały pobrane. W bardziej sformalizowanym teście należałoby wystandardyzować metody zbierania kurzu, z którego wydziela się podpróbki drobnego kurzu do badania na 3 różne sposoby (test ELISA, badanie mikrobiologiczne i kwantyfikacja roztworu kurzu domowego za pomocą mikroskopu optycznego). Co więcej naukowcy zmuszeni byli używać dość małych podpróbek drobnego kurzu, gdyż w niektórych przypadkach było go bardzo niewiele.

Innym powodem, dla którego alergen Der P 1 nie był często znajdowany jest to, że próbki były pobierane z powierzchni niedawno odkurzanych, co może obniżyć koncentrację alergenów.

Warto wreszcie zaznaczyć, że analiza alergenu Der P1 stanowi najbardziej skomplikowaną część całego projektu zarówno w sensie jego przeprowadzenia jak i interpretacji jego rezultatów.

Nie ma jednego konkretnie określonego stężenia Der P 1, które można uznać za niebezpieczne dla zdrowia, ale jest to czynnik, który może prowadzić do odpowiedzi alergicznej, np. takiej jak skurcz oskrzeli u astmatyków lub reakcja zapalna w płucach. Gdy u kogoś raz rozwinie się reakcja alergiczna, to nawet mała koncentracja alergenu może pogorszyć samopoczucie.

Analiza włosów w próbkach kurzu

W twojej próbce kurzu znaleźliśmy:

4 ludzkie włosy

2 włosy kocie

Analiza włosów w próbkach kurzu

Grubszy kurz, który zatrzymał się na sicie na etapie wstępnej obróbki został posortowany ręcznie w celu wyodrębnienia włosów do dalszej analizy. Włosy w ilości do dziesięciu na próbkę zostały umieszczone na szkiełkach mikroskopowych i przytwierdzone środkiem do zamykania preparatów DPX w celu umożliwienia ich obserwacji w silnym powiększeniu pod mikroskopem optycznym. Identyfikacja jako włos (ludzki, koci, psi lub inny) opierała się na cechach morfologicznych widocznych przy dużym powiększeniu. Próbki włosów były analizowane za pomocą pionowego mikroskopu optycznego Nikon Ni-E w powiększeniu 200-krotnym.

Włos ludzki

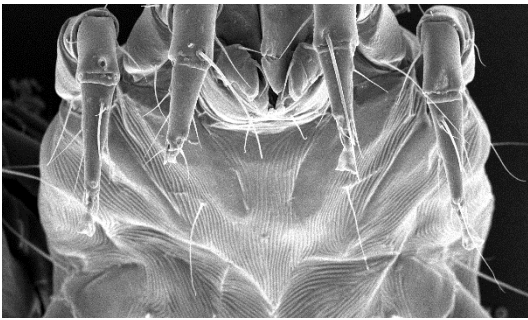


Włos kota

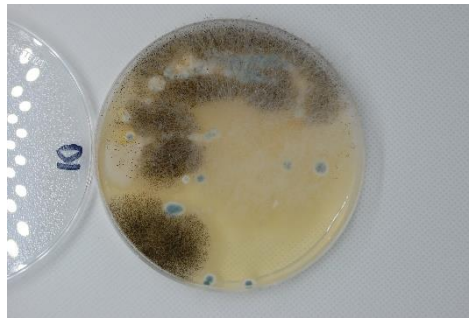


Przykłady innych cząstek, które znaleźliśmy w innych próbkach

Roztocza kurzu



Bakterie



Włosy ludzkie



Włosy jelenia



Włosy kota



Rośliny



Roztocza kurzu domowego



Owady



Wnioski

Próbki kurzu domowego pobrane dotąd na potrzeby tego studium zawierały bardzo szeroką gamę komponentów, począwszy od włosów wielu różnych rodzajów do tworzyw sztucznych, brokatu, owadów i materiału roślinnego. Istotne różnice występowały nie tylko w zakresie składników próbek, lecz również w ilości kurzu w poszczególnych próbkach. W związku z tym, że uczestnicy badania mogli odkurzać przez różny okres czasu doszło do dużego zróżnicowania wagi pobranego kurzu i odpadków w poszczególnych próbkach, wahającej się od około 4 g do mniej niż 0.3 g. Wiadomo powszechnie, że odkurzanie nie należy do ulubionych obowiązków domowych i częstotliwość odkurzania może różnić się znacznie pomiędzy gospodarstwami domowymi.

W wielu badanych próbkach kurzu wykryto roztocza kurzu domowego, co utwierdza w przekonaniu, że roztocza występują powszechnie w gospodarstwach domowych. Obecność fragmentów ciał owadów, nienależących do roztoczy uwydatnia fakt, że środowisko wewnątrz buduje cała wspólnota organizmów, a nie tylko my sami.

Umożliwienie mikrobom, pochodzącym z próbek kurzu, wzrostu na płytkach agarowych wykazało, że prawie żadne gospodarstwo domowe nie jest wolne od mikroorganizmów. Zarejestrowano dwa przypadki gospodarstw domowych ze znikomym lub żadnym rozrostem na płytkach agarowych, ale prawdopodobnie było to spowodowane tym, że występujące tam drobnoustroje charakteryzowały się słabym (niewidocznym dla ludzkiego oka) namnażaniem na zastosowanych pożywkach. Wachlarz kolorów i morfologii kolonii mikrobiologicznych pokazuje również, że w badanych gospodarstwach domowych występuje duża różnorodność mikrobów.

Kwantyfikacja alergenu Der P 1 w jedenastu próbkach wykazała, że alergeny były obecne w gospodarstwach domowych w wykrywalnych ilościach. Alergeny mogły występować również w innych próbkach, ale w koncentracji za małej, by można było je wykryć. Jest to szczególnie prawdopodobne dla próbek, w których zarejestrowano kompletne roztocza kurzu. Gdyby to badanie zostało powtórzone, to można by użyć większych ilości drobnego kurzu (o ile występowałyby w próbkach), po to by móc zwiększyć jego ilość na etapie wydobywania Der P 1 w teście ELISA. To mogłoby podnieść wskaźnik wykrywalności przy stosowaniu tej metody, ale wykluczyłoby z takiej analizy próbki o bardzo niskiej zawartości drobnego kurzu.

Istnieją mocne argumenty przemawiające za regularnym odkurzaniem, zwłaszcza, że wiadomo, iż codzienne odkurzanie, w szczególności mebli tapicerowanych, redukuje obecność alergenów w gospodarstwie domowym i wpływ tych alergenów na zdrowie.