

Hanna Liimatainen, Petri Auvinen ja Eeva Auvinen

Mikä mikrobi, mikä lääke?

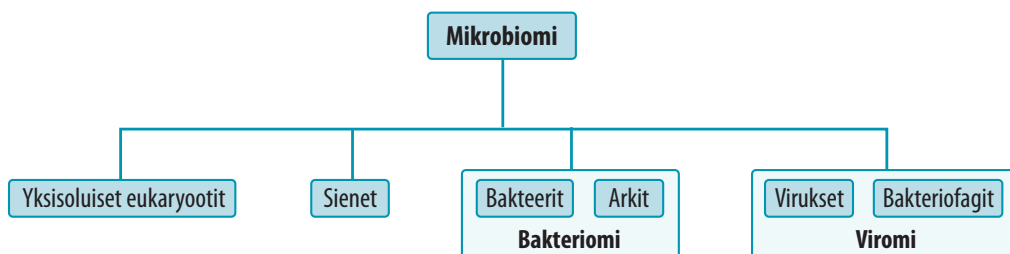
Onko uusista sekvensointimenetelmistä apua mikrobiologisissa laboratoriotutkimuksissa?

Monissa sairauksissa, kuten enkefaliitissa, taudinaiheuttaja jää usein selvittämättä, vaikka käytössämme on herkkiä ja tarkkoja laboratoriomenetelmiä tavallisimpien epäiltyjen taudinaiheuttajien osoittamiseen. Bakteritaudeissa taudinaiheuttajaa ei usein pystytä nimeämään bakteerilajin tasolla. Viljelyyn perustuvien herkkyysmääritysten tulosten saaminen kestää pitkään. Tällaisiin mikrobiologisiin kysymyksiin tuovat ratkaisuja uudet rinnakkaissekvensointimenetelmät. Laajaan ja tarkkaan mikrobien ja mikrobiopulaatioiden tutkimiseen kykenevillä sekvensointimenetelmillä on mahdollista kartoittaa elimistön mikrobiomia terveillä henkilöillä ja monissa sairauksissa.

Mikrobien uusia yhteyksiä terveysteemme ja sairauteemme löydetään koko ajan. Tiedon hankkimisen ja hyödyntämisen edellytyksenä ovat jatkuvasti kehittyvät laboratoriomenetelmät. Uusia sekvensointimenetelmiä voidaan hyödyntää paitsi mikrobidiagnostiikassa, myös resistenssimäärittelyksissä, epidemioiden seurannassa ja tartunnan jäljityksessä. Rinnakkaissekvensointi (next generation sequencing, NGS; myös massive parallel sequencing, MPS) on ainoa menetelmä, jolla voidaan kattavasti tutkia mikrobiomin merkitystä.

Mikrobien ja mikrobiomin merkitys

Mikrobiomilla tarkoitetaan jonkin anatomisen alueen, esimerkiksi suoliston, kaikkia mikrobeja (KUVA 1). Mikrobiomi käsittää akuutteja sairauksia aiheuttavia, persistoivia, latenteja ja oireettomia infektioita aiheuttavia taudinaiheuttajia. Myös ei-patogeeniset tai vain tietyissä tilanteissa patogeeniset mikrobit kuuluvat mikrobiomiin. Monien mikrobiomien koostumus vaihtelee eri elämänvaiheissa, niin terveenä kuin sairaanakin oltaessa, ja erilaisissa immunologisissa tai hormonaalisissa tilanteissa.



KUVA 1. Mikrobiomin koostumus.

Mikrobiomi vaikuttaa isännän solutoimintoihin ja muokkaa sekä luontaista että hankinnasta immuunivastetta. Hengitysteiden mikrobien keskinäiset vuorovaikutukset ovat akuuttien hengitystieinfektioiden kannalta merkittäviä (1). Omissa tutkimuksissamme olemme selvittäneet mikrobiomin yhteyttä allergiaan ja Parkinsonin tautiin (2,3). Terveen henkilön viromi ylläpitää immuunijärjestelmän stimulaatiota ja parantaa elimistön immunologista valmiutta, kun taas kroonisesti sairaiden viromi ylläpitää tulehdusta tai myötävaikuttaa esimerkiksi elinsiirtopotilaiden hyljintäreaktioihin.

Mitä rinnakkaissekvensointi tarkoittaa?

Rinnakkaissekvensointi tarkoittaa miljoonien, jopa miljardien sekvensointireaktioiden toteuttamista yhdestä näytteestä yhdellä kertaa. Rinnakkaissekvensointimenetelmiä voidaan käyttää hyvin laajaan sekvensointiin näytteen kaikkien mikrobien selvittämiseksi tai hyvin syvään sekvensointiin, esimerkiksi kaikkien taudinaiheuttajakantojen yksityiskohtaiseen analysointiin kaikista kliinisistä näyttemateriaaleista.

Rinnakkaissekvensoinnin työvaiheet esitetään pääpiirteissään **KUVASSA 2**. Vaativuudestaan huolimatta rinnakkaissekvensointi tarjoaa valtavat mahdollisuudet uuden tiedon hankkimiseen, kunhan tunnistetaan ne kysymykset, joihin se antaa parhaan tai ainoan vastauksen.

Rinnakkaissekvensoinnin lähestymistapoja

Kohdennettu sekvensointi perustuu tunnettujen taudinaiheuttajien sekvenssitiedon perusteella suunniteltuihin alukkeisiin ja kliinisissä näytteissä tavallisesti kohteen rikastamiseen polymeerasiketjureaktion (PCR) avulla ennen sekvensointia. Yhteistä geenialuetta voidaan hyödyntää muun muassa bakteerien tunnistamisessa ja lajinmäärityksessä. Tavallisin kohdealue on kaikille bakteereille yhteinen *16S rRNA*-geeni, sienillä *ITS1*- ja *ITS2*-geenit (internal transcribed spacer) ja muilla eukaryooteilla *18S*.

Kohdennettu sekvensointi voi olla myös hy-

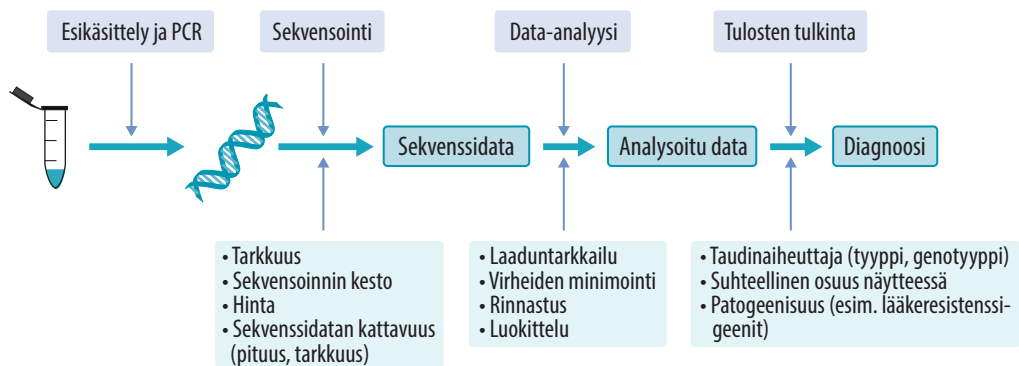
vin laajaa. Esimerkiksi VirCapSeq-VERT-menetelmässä peräti kahdella miljoonalla koettimella pyydystetään eristetyistä näytteistä kaikkien tunnettujen virusten nukleiinihapot, jotka sen jälkeen monistetaan ja sekvensoidaan (4). Kohdennetulla sekvensoinnilla voidaan saada erittäin paljon tietoa muun muassa sekvensoitavan alueen koon, sekvensoinnin syvyyden (kuinka monta kertaa haluttu alue sekvensoidaan) ja monistuksessa käytettävien alukkeiden määrän mukaan. Alukkeiden määrää voidaan lisätä sitä mukaa kuin uusia taudinaiheuttajia löydetään.

Kun kohdetta ei tiedetä eikä sekvenssitietoa ole käytettävissä tai kun ei haluta tehdä ennakko-oletusta näytteessä olevasta mikrobista, käytetään shotgun-sekvensointia (satunnaissekvensointi, haulikkosekvensointi) eli metagenomiikan lähestymistapaa. Metagenomiikalla löydetään myös odottamattomia ja kokonaan uusia, esimerkiksi zoonooseihin liittyviä taudinaiheuttajia. Metagenomiikkaa voidaan käyttää kompleksisten taudinaiheuttajapopulaatioiden karakterisoimiseen, esimerkiksi lasten hengitysteiden viromin tutkimiseen (5).

Rinnakkaissekvensointi mikrobi diagnostiikassa

Rinnakkaissekvensointi tuo mahdollisuuden tunnistaa sellaisia mikrobeja, joita on vaikeaa tai mahdotonta viljellä. Se mahdollistaa oireisiin perustuvan, laajan taudinaiheuttajakirjon diagnostiikan. Rinnakkaissekvensoinnin soveltamisesta mikrobiologisessa diagnostiikassa ei ole olemassa satunnaistettuja kontrolloituja tutkimuksia, ainoastaan tapausselostuksia. **TAULUKOSSA** on esitetty sellaisia kliinisen mikrobiologian rinnakkaissekvensoinnin sovelluksia, jotka ovat jo käytössä tai tulossa käyttöön eurooppalaisissa laboratorioissa.

Yksi ilmeisimmistä virologisista sovelluksista on enkefaliittien aiheuttajien tunnistaminen metagenomiikan avulla. Useimmiten enkefaliitin kohdalla epäillään virusetiologiaa, mutta jopa kahdessa kolmesta tapauksesta taudinaiheuttajaa ei tunnisteta. Hoidon kannalta on tärkeää erottaa toisistaan autoimmuunienkefaliitti ja infektiioon liittyvä enkefaliitti.



KUVA 2. Rinnakkaissekvensoinnin vaiheet pääpiirteissään. PCR = polymeerasiketjureaktio

Rinnakkaissekvensoinnilla on onnistuttu tunnistamaan enkefaliitin aiheuttaja kymmenissä tapauksissa, joissa taudinaiheuttajaa ei voitu osoittaa tavanomaisin menetelmin (6). Joukossa oli tavallisia taudinaiheuttajia, joiden osoittamiseksi on käytössä laboratoriotestejä, esimerkiksi herpes simplex -virus (HSV), coxsackie A9 -virus (CAV9), tuhkarokkivirus ja vesirokkovirus (VZV) sekä harvinaisia (*Brucella melitensis*, *Leptospira santarosai*) ja odottamattomia (astrovirus, sikotautiviruksen rokote-kanta) taudinaiheuttajia. Joissakin tapauksissa diagnostinen testi olisi ollut olemassa, mutta testejä ei todennäköisesti olisi käytetty enkefaliitin selvittelyssä ja taudinaiheuttajat olisivat siten jääneet tunnistamatta.

Enkefaliittipotilailta löytyi myös täysin uusia taudinaiheuttajia (oravan bornavirus, uusi astrovirus VA1/HMO-C), useimmat näistä immunosuppressiopotilailta tai henkilöiltä, joilla oli ollut poikkeuksellinen altistus (oravankasvatijat). Rinnakkaissekvensointia suositellaan ensi linjan diagnostiseksi testiksi paitsi immunosuppressiopotilaita tutkittaessa, myös kroonisten ja toistuvien enkefaliittien yhteydessä. Toisen linjan testiksi sitä suositellaan akuuttien enkefaliittien yhteydessä silloin, kun kohdennetuilla PCR-testeillä ei löydetä taudinaiheuttajaa (6).

Kohdennetulla rinnakkaissekvensoinnilla on joitakin ilmeisiä sovelluksia bakteriologiassa. Bakteridiagnostiikan etuna on kaikilta bakteereilta löytyvä *16S rRNA* -geeni, jota voidaan sekvensoida suoraan kliinisistä näytteistä ilman rikastusta viljelyllä. *16S*-sekvensoinnilla voidaan tunnistaa rajaton määrä erilaisia baktee-

reja eli näytteen koko bakteriomi. *16S*-geeni on hyvin samankaltainen eri bakteereilla eikä aina riitä kiistattomaan lajintunnistukseen. *23S rRNA* -geenin sekvensointi tuo lisävarmuutta lajin tai bakteerikannan tunnistukseen. Bakterin täsmällisellä tunnistamisella parannetaan hoitomahdollisuuksia ja täsmennetään mikrobilääkevalintaa.

Joitakin kaupallisia rinnakkaissekvensointiin perustuvia testejä mikrobiologiseen diagnostiikkaan on jo markkinoilla.

Resistenssi ja virulenssi

Viljelyyn perustuvat, fenotyyppiset bakteerien herkyydsmääritykset kestävät usein pitkään, esimerkiksi hitaasti kasvavan *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerin tunnistaminen ja herkyydsmääritykset kestävät noin kolme viikkoa. Rinnakkaissekvensoinnilla ja erityisesti bakteerien koko genomin sekvensoinnilla (whole genome sequencing, WGS) voidaan määrittää *Mycobacterium tuberculosis* -genomin kaikki lääkeaineresistenssiin vaikuttavat tekijät noin yhdeksässä päivässä jonkin verran pienemmällä kustannuksella, ja menetelmä onkin jo otettu käyttöön Englannissa (7).

Fenotyyppinen resistenssi on monimutkainen ilmiö, jonka takana voi olla genotyyppistä tai indusoituvaa resistenssiä. Virulenssitekijöiden osalta vastaavuus on parempi, vaikka niidenkään osalta genotyyppin ja fenotyyppin korrelaatio ei ole yksiselitteinen: esimerkiksi *Clostridium difficile* -bakteerin toksiiniuotannon indusoitumisen mekanismia ei ymmärretä

TAULUKKO. Rinnakkaissekvensointisovelluksia kliinisen mikrobiologian laboratorioissa Euroopassa.

Sovellus	Sekvensointikohde
Bakteerityypitys	16S rRNA -geeni
Bakteerien mikrobilääkeresistenssin tunnistaminen	Koko genomien sekvensointi
Uusien MRSA-kantojen tyyppitys	Koko genomien sekvensointi
Invasiivisten meningokokkien tyyppitys	Koko genomien sekvensointi
Gonokokkien tyyppitys	Koko genomien sekvensointi
Viljelynegatiivisten bakteerinäytteiden jatkotutkimus	16S- tai koko genomien sekvensointi
Harvinaisten bakteerilöydösten varmistus	16S- tai koko genomien sekvensointi
Hepatiitti B -viruksen genotyyppitys ja lääkeaineresistenssien määrittäminen	Polymeraasi, hepatiitti B:n pinta-antigeeni (HBsAg)
Hepatiitti C -viruksen genotyyppitys ja lääkeaineresistenssien määrittäminen	NS5B, 5'UTR, core; NS5A, NS5B, NS3
HIV-tyypitys ja lääkeaineresistenssien määrittäminen	Integraasi, RT (käänteiskopioijaentsyymi)
HSV-resistenssimääritykset	Tymidiinikinaasi UL23, DNA-polymeraasi UL30
Sytomegalovirus (CMV) -resistenssimääritykset	UL97, UL54
Influenssa A -virusresistenssimääritykset	Neuraminidaasi

täysin. EUCAST (The European Committee on Microbial Susceptibility Testing) suosittelee, että useimpien bakteerilajien osalta kliinistä päätöksentekoa ei toistaiseksi pitäisi tehdä koko genomien sekvensoinnin perusteella, mahdollisesti *Mycobacterium tuberculosis* -bakteeria lukuun ottamatta (8).

Rinnakkaissekvensointia käytetään jo lääkeaineresistenttien viruskantojen ja resistenssien varhaiseen toteamiseen ja seurantaan (**TAULUKKO**). Ensimmäisenä sovelluksena on HIV-tyypitys, mutta myös HSV-, sytomegalovirus (CMV)-, hepatiitti C -virus- ja influenssa A -virusresistenssimääritykset ovat lähellä kliinistä käyttöä. Menetelmä kykenee osoittamaan resistentin kannan noin kymmenen kertaa herkemmin kuin perinteinen Sanger-sekvensointi, jolla vähäiset variantit voivat jäädä löytymättä, mikäli potilaan virusmäärä on pieni.

Mikrobien syväanalyysi

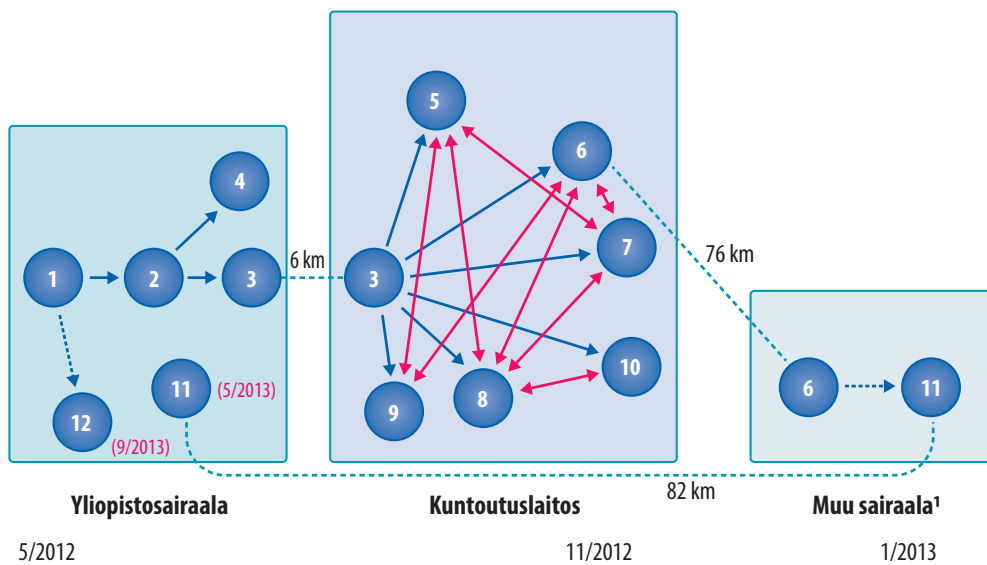
Elinsiirtopotilaiden CMV:n uudelleen aktivoituminen suosii potilaan eri viruskantojen rekombinaatiota, sillä potilaalla voi olla useita viruskantoja samassa infektoituneessa solussa. Rekombinaatiossa voi kehittyä lääkeaineresistenttejä tai isännän immuunihyökkäystä vastustavia kantoja, jotka voivat yleistyä selektion seurauksena. Rinnakkaissekvensoinnilla voidaan seurata erilaisten ”CMV-haplotyyppien”

tasapainoa sekä kantojen suhteellista lisääntymistä ja vähenemistä ajan funktiona. Tiedossa on pysähdyttäviä esimerkkejä siitä, että potilaan henkiinjääminen olisi ollut mahdollista, jos käytettävissä ollutta sekvenssitietoa CMV-kantojen dynamiikasta olisi osattu tulkita ajoissa (Judith Breuer, julkaisematon tieto).

Omissa tutkimuksissamme olemme selvittäneet syväsekvensoinnilla JC- ja BK-virusten muuntelua sekä muuntuneiden viruskantojen yhteyttä vakaviin sairauksiin (9–11). JC-viruksen muuntelu aivoissa on edellytys etenevän multifokaalisen leukoencefalopatian (PML) kehittymiselle, kun taas munuaisissa nefropatian kehittyminen ei näytä vaativan BK-viruksen – tai nefropatiassa harvinaisemman JC-viruksen – muuntelua. Osoitimme ensimmäistä kertaa, että PML:ään voi liittyä useita viruskantoja, joissa kussakin on erilaisia patogeneesiin liittyviä muutoksia (9).

Rinnakkaissekvensointi epidemioiden seurannassa ja jäljityksessä

Epidemiat ja tautiryöstymät muun muassa sairaaloissa ja hoitolaitoksissa ovat varsin tavallisia. Niiden leviämistä voidaan rajoittaa taudinaiheuttajan tai muuntuneen (resistentin) kannan nopealla tunnistamisella. Groningenin yliopistosairaalassa Alankomaissa koko genomien sekvensointia käytettiin uuden, CTX-



KUVA 3. Esimerkki hoitolaitosepidemioiden jäljityksestä rinnakkaissekvensoinnin avulla (12). Ympyrät kuvaavat yksittäisiä potilaita ja kiinteät siniset nuolet epidemiologisen ja geneettisen tiedon tukemaa, mahdollista suoraa tartuntaa potilaaseen. Siniset katkoviivanuolet kuvaavat epäsuoraa, epidemiologisen tiedon perusteella esimerkiksi ympäristön kautta tapahtunutta tartuntaa. Punaiset kaksisuuntaiset nuolet kuvaavat mahdollista tartuntaa jompaankumpaan suuntaan, jota ei voitu ratkaista tutkimustulosten perusteella. Katkoviiva hoitolaitosten välillä kuvaa potilaan siirtoa. Laitosten välinen maantieteellinen etäisyys on ilmoitettu kilometreinä.

¹Tautiryöstymä toisessa sairaalassa, josta ei kuitenkaan saatu isolaatteja tarkempiin tutkimuksiin.

M-15-beetalaktamaasia tuottavan ST15- *Klebsiella pneumoniae* -kannan karakterisointiin ja tartunnanjäljitykseen hoitolaitoksen sisällä ja myös hoitolaitosten välillä siirrettyjen potilaiden mukana (KUVA 3) (12). Tutkimuksessa hyödynnettiin epidemiaspesifistä markkeria, jolle kehitettiin oma spesifinen PCR-testi. Koko genomien sekvensointi on käyttökelpoinen menetelmä nopeaan tunnistamiseen, (moni)resistenttien kantojen kehittymisen seurantaan sekä mikrobievoluution ja -dynamiikan tutkimiseen (13).

Tarkalla sekvensoinnilla voidaan varmistaa tai sulkea pois yhteys epidemioiden välillä ja jäljittää kannat esimerkiksi kontaminaatiolähteisiin, kuten elintarvikkeisiin tai veteen. Koska tällaiset jäljitykset saattavat johtaa esimerkiksi tuote-erien markkinoilta vetämiseen ja taloudellisiin tai juridisiin seurauksiin, tulee laboratoriotulosten merkitystä punnita tarkasti. On tärkeää, että alkuperäinen sekvenssitieto tallennetaan, jotta tietokantoja voidaan hyödyntää epidemiajäljityksiin.

Rinnakkaissekvensointi tutkimuksessa

Metagenomiikalla voidaan selvittää elimistön bakteerikantojen kaikki resistenssigeenit ja virulenssitekijät (esimerkiksi MRSA). Suolen mikrobiomissa on aina mikrobilääkeresistenssigeenejä, ja horisontaalinen geenien siirtyminen sekä resistenttien bakteerikantojen valikoituminen mikrobilääkehoidon aikana on mahdollista.

Kun kuuden päivän ajan siprofloksasiinilla hoidettujen potilaiden suolen bakteerien resistenssigeenejä seurattiin, voitiin suoraan osoittaa mikrobilääkehoidon aiheuttama valintapaine (14). Samoin Shiga-toksiineja tuottavien *Escherichia coli* -kantojen sekvensoinnilla löydettiin bakteerikannoille spesifisiä markkereita, jotka paljastivat evolutiivisen valintapaineen ja selittivät adaptaation (15). Bakteeripatogeenisyyden ja virulenssitekijöiden tuntemus on myös rokotekehityksen avain.

Rinnakkaissekvensoinnin avulla on onnistuttu tunnistamaan odottamaton siperialainen

Ydinasiat

- ▶ Taudinaiheuttajamikrobi jää nykyisillä laboratoriomenetelmillä usein nimeämättä tai – kuten enkefaliitissa – jopa löytymättä.
- ▶ Normaalin mikrobiomin merkitystä sairauteen ja terveyteen ymmärretään vielä huonosti.
- ▶ Rinnakkaissekvensoinnin kyky laajaan ja yksityiskohtaiseen mikrobien tutkimiseen avaa mahdollisuuksia taudinaiheuttajien ja esimerkiksi lääkeaineresistenttien kantojen tunnistamiseen.
- ▶ Rinnakkaissekvensoinnin avulla on mahdollista nimetä ja jäljittää sairaalaepidemioiden aiheuttajia, löytää uusia taudinaiheuttajia ja tautiyhteyksiä sekä kartoittaa tarkasti resistenssi- ja virulenssitekijöitä.

puutiaisaivotulehdus (TBE) -viruskanta suomalaisen potilaan aivokudoksesta (16). Tämä on esimerkki siitä, että uusien patogeenien ja muuntuneiden patogeenikantojen lisäksi sekvensoinnilla voidaan tutkia taudinaiheuttajia levittävien isäntien, kuten TBE-virusta levittävien puutiaislajien levinneisyyden muutoksia. Rinnakkaissekvensoinnin avulla jopa tuhansia vuosia vanhoista näytteistä voidaan saada tietoa mikrobeista, niiden aiheuttamista epidemioista ja niiden evoluutiosta (17).

Laboratorion haasteet

Laboratoriossa rinnakkaissekvensointimenetelmien suurimpia ongelmia ovat kontaminoivan humaanisekvenssin poistaminen tai vähentäminen esimerkiksi rikastamalla mikrobikohdetta ennen sekvensointia sekä spesifistä sekvenssitietoa bioinformaattisin keinoin. Kliinisissä näytteissä on aina runsaasti ihmisperäistä materiaalia, joka heikentää rikastamisen tehoa ja sekvensoinnin herkkyyttä. Erityisesti metagenomiikassa sekvenssiedosta tyypillisesti yli 99 % edustaa humaanisekvenssejä. Mikrobidiagnostiikan kannalta sekvenssitietoa kontaminoi tietenkin myös normaalifloora. Rin-

nakkaissekvensointi voi olla erittäin herkkää ja erittäin tarkkaa menetelmien ja sekvensoinnin syvyyden mukaan.

Suosituksia rinnakkaissekvensoinnin kliinisestä soveltamisesta genetiikassa on julkaistu, ja ne antavat suuntaviivoja myös kliiniseen mikrobiologiaan (18). Rinnakkaissekvensointi eroaa useimmista muista menetelmistä siinä, että kaikkia mahdollisia löydöksiä ei voida ennakoida.

Bioinformatiikka

Rinnakkaissekvensoinnin myötä mikrobiologisissa laboratorioissa tarvitaan bioinformatiikan osaamista. Mikrobiologisten kysymystenasettelujen vaatimat bioinformatiikan taidot ovat hyvin erilaiset kuin genetiikassa, jossa rinnakkaissekvensointia on hyödynnetty jo pitkään. Monissa eurooppalaisissa mikrobiologian laboratorioissa on jo oma bioinformatiikan yksikkö. Joihinkin kysymyksenasetteluihin on saatavilla käyttäjäystävällisiä verkkopohjaisia analyysityökaluja, mutta monet rinnakkaissekvensoinnin sovellukset vaativat erityisosaamista ja räätälöityjä ratkaisuja.

Laadukkaat ja kattavat vertailutietokannat ovat keskeisiä sekvensointitulosten analysoinnissa. Niitä on jo olemassa bakteereille, mutta virussekvenssien analysointiin niitä on vasta vähän saatavilla. Tietokantojen ja analyysityökalujen parantuessa harvalukuisiakin mikrobeja voidaan luotettavasti tunnistaa.

Sekvensointitulosten analysoimisen ja tiedon säilyttämisen vaatimukset kasvavat, ja se vaatii suurta tietokonekapasiteettia. On tärkeää, että sekvenssitietoa säilytetään ja julkistetaan selkälaisessa muodossa, että sitä voidaan analysoida myös muissa laboratorioissa ja muilla analyysityökaluilla. Laboratorioiden suorituskykyä voidaan parantaa vain tuloksia jakamalla ja vertailemalla.

Laadunarviointi

Rinnakkaissekvensointiin perustuvien tutkimusten laadunarviointi on vaativaa, sillä menetelmän suuri suorituskyky tuo välttämättä mukanaan näytteestä tai näytekäsittelystä, kohteen

rikastuksesta, sekvensoinnista ja jatkuvasti kehittyvistä sekvensointialustoista sekä tulosten analysoinnista riippuvaisia eroja testikertojen ja laboratorioden välillä.

Suosituksien rinnakkaissekvensointia tekevä laboratorion pätevyysarviointiin ovat jo olemassa genetiikan osalta, ja suosituksia mikrobiologian osalta valmistellaan (18). Niitä sovelletaan ajan myötä myös mikrobiologiaan. Ulkoista laadunarviointia tullaan soveltamaan sekä koko sekvensointiprosessiin (KUVA 1) että erikseen sekvenssitiedon bioinformaattiseen analysointiin. Ulkoisen laadunarvioinnin ”näytteinä” käytetään tiettyjä indikaattorilajeja sisältäviä validointinäytteitä ja sekvenssitietoa, josta laboratorion on käyttämällänsä analyysityökaluilla kyettävä löytämään kliinisesti merkittävä tieto. Viimeistään vuonna 2022 laboratorioden tulee toteuttaa uutta eurooppalaista diagnostiikan testejä koskevaa asetusta, jonka vaatimukset erityisesti rinnakkaissekvensointimenetelmien osalta ovat haasteellisia.

Eettisiä kysymyksiä

Sekvensointiin perustuvilla menetelmillä saadaan halutun tiedon lisäksi aina sellaista tietoa, jota ei ole etsitty tai joka ei liity potilaan sairauteen (19). Esimerkiksi haettaessa ulosteesta taudinaiheuttajia saatetaan löytää HIV-sekvenssejä potilaalta, jota ei ole tiedetty HIV-positiiviseksi. Potilaan ja hoitavan lääkärin tulee olla tietoinen tällaisesta mahdollisuudesta. Bioinformatiikan keinoin epätoivottua sekvenssitietoa voidaan suodattaa pois, jolloin laboratorion antama vastaus olisi kliinisen päätöksen kannalta mahdollisimman yksiselitteinen. Jokaisen (satunnaisen) mikrobilöydöksen kliinistä merkitystä ei kuitenkaan ymmärretä.

Mikrobisekvenssitiedon tallentamista voidaan perustella sillä, että analyysihetkellä merkityksetön sekvenssitieto saattaa myö-

hemmin osoittautua tärkeäksi uusien tautiassosiaatioiden, lääkkeiden tai rokotteiden myötä. Erityisesti metagenomisissa lähestymistavoissa kertyy humaanisekvenssitietoa, jonka käsittely ja tallentaminen silloin, kun se ei ole ollut tutkimuksen kohteena, edellyttää terveydenalan toimijoiden ja etiikan asiantuntijoiden välistä keskustelua (18). Eurooppalaisissa kliinisen mikrobiologian laboratorioissa on sovitettu, että vain humaanisekvensseistä puhdistettua sekvenssitietoa voidaan jakaa.

Lopuksi

Erityisten mikrobiologisten kysymysten ratkaisemiseksi rinnakkaissekvensoinnin kustannusten tulee pienentyä ja tulosten saamisen nopeutua. Tarve tutkia näytesarjoja yksittäisten näytteiden sijaan pidentää tutkimukseen kuluva aikaa, mutta laitealustojen kehittyminen tuonee tulevaisuudessa ratkaisuja sekä tutkimusten kestoon että hintaan. Sekvensoinnin syvyys lisää kustannuksia. Yksinkertaisimpien rinnakkaissekvensointitutkimusten hinnat lähestyivät lähivuosina kvantitatiivisten PCR-tutkimusten hintoja. Taudinaiheuttajien tarkempi tunnistaminen ja oikeiden diagnoosien teko voi estää tautien pahenemista ja säästää kustannuksia.

Menetelmän suuria haasteita on sekvenssitiedon analysointi bioinformatiikan avulla – samoin kuin tulosten kliinisen merkityksen tulkinta, joka viime kädessä jää aina hoitavalle lääkärille. Olemme edellä kuvanneet joitakin rinnakkaissekvensoinnin realistisia sovelluksia, jotka ovat jo saaneet jalansijaa useissa mikrobiologisissa laboratorioissa Euroopassa. Rinnakkaissekvensoinnista ei koskaan tule pikadiagnostiikkaa, mutta huolella valituissa sovelluksissa se antaa mahdollisuuden laajaan, oireisiin perustuvaan ja yksilöllistettyyn mikrobiologiseen diagnostiikkaan. ■

HANNA LIIMATAINEN, FM, väitöskirjatutkija
HUSLAB, virologia ja immunologia
Helsingin yliopisto, virologian osasto

PETRI AUVINEN, virologian dosentti, tutkimusjohtaja
Helsingin yliopisto, biotekniikan instituutti

EEVA AUVINEN, virologian dosentti, laboraattori
HUSLAB, virologia ja immunologia
Helsingin yliopisto, virologian osasto

VASTUUTOIMITTAJA
Seppo Meri

KIRJALLISUUTTA

1. Pichon M, Lina B, Josset L. Impact of the respiratory microbiome on host responses to respiratory viral infection. *Vaccines* (Basel) 2017. DOI: 10.3390/vaccines5040040.
2. Hanski I, von Hertzen L, Fyhrquist N, ym. Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:8334–9.
3. Scheperjans F, Aho V, Pereira PA ym. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 2015;30:350–8.
4. Briese T, Kapoor A, Mishra N, ym. Virome capture sequencing enables sensitive viral diagnosis and comprehensive virome analysis. *MBio* 2015. DOI: 10.1128/mBio.01491-15.
5. Li Y, Fu X, Ma J, ym. Altered respiratory virome and serum cytokine profile associated with recurrent respiratory tract infections in children. *Nat Commun* 2019; 10:2288.
6. Brown JR, Bharucha T, Breuer J. Encephalitis diagnosis using metagenomics: application of next generation sequencing for undiagnosed cases. *J Infect* 2018;76: 225–40.
7. Satta G, Lipman M, Smith GP, ym. Mycobacterium tuberculosis and whole-genome sequencing: how close are we to unleashing its full potential? *Clin Microbiol Infect* 2018;24:604–9.
8. Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, ym. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST sub-committee. *Clin Microbiol Infect* 2017;23: 2–22.
9. Seppälä H, Virtanen E, Saarela M, ym. Single-molecule sequencing reveals the presence of distinct JC polyomavirus populations in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 2017;215:889–95.
10. Seppälä H, Helanterä I, Laine P, ym. Archetype JC polyomavirus prevails in a rare case of JC polyomavirus nephropathy and in stable renal transplant recipients with JC polyomavirus viraemia. *J Infect Dis* 2017;216:981–9.
11. Virtanen E, Seppälä H, Helanterä I, ym. BK polyomavirus microRNA expression and sequence variation in polyomavirus-associated nephropathy. *J Clin Virol* 2018; 102:70–6.
12. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowitz MA, ym. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol* 2017; 243:16–24.
13. Greninger AL, Zerr DM, Qin X, ym. Rapid metagenomic next-generation sequencing during an investigation of hospital acquired Human Parainfluenza Virus 3 infections. *J Clin Microbiol* 2017;55:177–82.
14. Willmann M, El-Hadidi M, Huson DH, ym. Antibiotic selection pressure determination through sequence-based metagenomics. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:7335–45.
15. Zhou K, Ferdous M, de Boer RF, ym. The mosaic genome structure and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 is driven by short-term adaptation. *Clin Microbiol Infect Clin Microbiol Infect* 2015;21. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.12.009.
16. Kuivanen S, Smura T, Rantanen K, ym. Fatal tick-borne encephalitis virus infections caused by Siberian and European subtypes, Finland, 2015. *Emerg Infect Dis* 2018;24:946–8.
17. Perdomo MF, Toppinen M, Hedman K, ym. Paleogenomiikka muinaisten ihmisten ja mikrobien jalanjäljillä. *Duodecim* 2018;134:1723–9.
18. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, ym. Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017;19:341–65.
19. Auvinen E, Auvinen P. Massiiviparalleelisekvensointi (NGS) mikrobiologian näkökulmasta – ja miten se liittyy Leo Tolstoiin. *Moodi* 2017;4:27–31.

SIDONNAISUDET

Hanna Liimatainen: Apuraha (Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin laboratoriapalvelut (HUSLAB))

Petri Auvinen: Ei ilmoitusta sidonnaisuuksista

Eeva Auvinen: Korvaukset koulutus- ja kongressikuluista (Roche Diagnostics, Qiagen, Hologic, Immuno Diagnostic Oy), luento-/asiiantuntijapalkkio (Labquality, Roche Diagnostics, Qiagen, Immuno Diagnostic Oy, FIMLAB)

SUMMARY

Which microbe, which drug? – Could novel sequencing technologies be helpful in microbiological laboratory diagnostics?

In many illnesses, such as encephalitis, we are often unable to identify the cause, although sensitive and specific laboratory methods are available to detect a range of the frequently suspected pathogens. In bacterial diseases we often fail to name the bacterium at species level. Culture-based sensitivity testing may take a long time. In such microbiological questions the new NGS sequencing methods (next generation sequencing; also MPS, massive parallel sequencing) may prove helpful. As NGS methods are capable of broad and precise investigation of microbes and microbial populations, they enable the study of the human microbiome and its impact in health and disease.