

Niina Ikonen, Saara Salmenlinna, Erika Lind, Anni Vainio ja Carita Savolainen-Kopra

Sekvensointi infektiöseurannan tukena

Sekvensoinnilla selvitetään genomien emäsjärjestystä. Sekvenssitietoa voidaan hyödyntää mikrobien leviämisen seurannassa ja epidemiaselvityksissä vertailemalla geneettisesti läheisiä mikrobeja toisiinsa. Sekvenssitiedosta voidaan tutkia mikrobien rakenneominaisuuksia, joista voidaan tulkita toiminnallisia asioita kuten taudinaiheuttamiskykyä sekä rokotteiden ja lääkkeiden tehoon vaikuttavia ominaisuuksia. Tulevaisuudessa sekvensointia hyödynnettäneen enenevästi seurannan lisäksi myös potilasdiagnostiikassa.

Sekvensoinnilla tarkoitetaan kohteen perintöaineen eli genomien emäsjärjestyksen määrittämistä. Sekvensointia on tehty jo vuosikymmenten ajan niin sanotulla Sanger-tekniikalla, jossa PCR-reaktion kaltaiseen DNA:n monistusreaktioon on lisätty dideoksinukleotideja, jotka pysäyttävät DNA-ketjun monistumisen. Näin syntyy joukko eripituisia DNA-ketjuja, joita voidaan mitata dideoksinukleotidiin lisättyjen fluoresoivien leimojen avulla. Laservalolla tapahtuvan detektion aikana voidaan emäs emäkseltä määrittää DNA-ketjun emäsjärjestys eli sekvenssi. Mikrobidiagnostiikassa ja -seurannassa käytetään edelleen Sanger-sekvensointia sen helppouden vuoksi tilanteissa, joissa lyhyt genomien osa riittää mikrobin tunnistukseen.

Tällä hetkellä pääosa sekvensoinnista tapahtuu niin sanotuilla uuden sukupolven sekvensointitekniikoilla (next generation sequencing, NGS). NGS sisältää eri sekvensointitekniikoita ja perustuu massiiviseen rinnakkaissekvensointiin. Koko genomien sekvensointi (whole genome sequencing, WGS) on noussut useiden mikrobien pääasialliseksi tyypitysmenetelmäksi. WGS:n avulla voidaan tunnistaa mikrobien sukulaisuussuhteita aiempaa tarkemmin, määrittää ja tutkia resistenssigeenejä sekä tutkia mikrobigenomeja tarkemmin fylogeneettisissa ja esimerkiksi rekombinaatioanaly-

seissa. Muista sekvensointitekniikoista yhden tai useamman geenin amplikonisekvensointia käytetään tutkittavan näytteen mikrobiyhteisöjen koostumuksen selvittämiseen. Metagenomisekvensointi sen sijaan käsittää tutkittavan näytteen kaikkien geenien emäsjärjestyksen selvittämisen.

Sekvensoinnin rooli epidemiaselvityksissä ja infektio-tautiseurannassa

Epidemiolla tarkoitetaan tiettyinä aikoina ja tietyllä alueella tapahtuneita sairastumisia, joilla on yhteinen lähde. Selvitystyöllä pyritään estämään epidemian leviäminen, ehkäisemään vastaavat epidemiat ja varmistamaan potilaiden asianmukainen hoito. Terveysturvallisuuden ammattilaiset ovat avainasemassa paikallisten epidemioiden havaitsemisessa ja torjunnassa. THL:n asiantuntijalaboratorio tyypittää valikoidusti bakteerikantoja ja virusnäytteitä. Näin voidaan tunnistaa myös laajalle levinneitä epidemioita. Vesivälitteisiksi epäiltyjen epidemioiden yhteydessä voidaan tutkia vesistä eristettyjä mikrobikantoja, genominäytteitä ja sekvenssejä. Sekvenssitietoa voidaan hyödyntää myös pidemmällä aikavälillä seurannassa osoittamaan mikrobikantojen muuntumista.

Sanger-sekvensointi

Sanger-sekvensointiin perustuvia menetelmiä on käytetty sekä patogeenien tunnistukseen että lajitasoa tarkempaan määrittämiseen. Jos bakteeri- tai alkueläinlajia ei saada selville tavanomaisilla tunnistusmenetelmillä (esimerkiksi PCR tai MALDI-TOF), voidaan sekvensoida mikrobin 16S- tai 18S-ribosomaalisen RNA:n geenit. Lajitasoa tarkemmassa tyyppityksessä kantojen tai näytteiden vertaamiseksi luetaan tyyppillisesti yksi tai muutama perimän alue (geeni, DNA- tai RNA-jakso). Näytteenä voi olla eristetty mikrobi tai suoraan potilasnäytteestä (esimerkiksi veri-, hengitystie-, uloste-) tai muusta näytteestä (vesi, ruoka, pinnat) eristetty DNA tai RNA.

Bakteeritaudeista Sanger-sekvensointia käytetään esimerkiksi metisilliinille resistenttien *Staphylococcus aureus*- (MRSA) ja invasiivisten *Streptococcus pyogenes* -bakteereiden seurantaan. Mikrobin seurannan tarkoituksena on saada yleiskuva trendeistä ja epidemiologisesta tilanteesta (TAULUKKO 1). Alueellisessa infektioautien seurannassa voidaan kiinnittää huomiota tietyn tyyppin yleistymiseen. Tällöin harkitaan, olisiko tyyppitystä syytä tarkentaa koko genomien sekvensoinnilla.

Alkueläintautien, kuten kryptosporidioosin, epidemiaselvityksissä voidaan käyttää myös Sanger-sekvensointia näytteiden tyyppittämiseen.

Virusten perimän sekvenssitietoja hyödynnetään paitsi epidemiaselvityksissä, myös viruslääkkeiden ja -rokotteiden valmistuksessa sekä viruslääkeresistenssiominaisuuksien määrittämisessä. Viruskantojen sekvenssitietoa voidaan hyödyntää myös rokotteiden tehon ja niiden aiheuttaman valintapaineen seurannassa. Esimerkiksi rotavirusrokotteiden tehoa seurataan tyyppittämällä väestössä kiertäviä kantoja. Sekvensoinnilla voidaan myös seurata rokotteina käytettyjen elävien heikennettyjen viruskantojen (esimerkiksi suun kautta otettava poliovirusrokote) mahdollista muuntumista ja näiden muuntuneiden rokotevirusten aiheuttamaa tautitaakkaa.

Toisena esimerkkinä sekvensoinnin käytöstä virusten seurannassa on enterovirusseu-

ranta. Enterovirukset aiheuttavat lauhkean vyöhykkeen maissa epidemioita loppukesästä ja syksyisin. Yleensä infektiot ovat vähäoireisia, mutta jotkut virustyyppit aiheuttavat myös vaikeita tautimuotoja, kuten halvauksia. Nykyään enterovirukset tyyppitetään viruksen genomien VP1- ja VP4/VP2-rakenneproteiineja koodaavan alueen osittaisella sekvensoinnilla. Suomessa Tyks Laboratoriot, HUSLAB ja THL tekevät enterovirusten tyyppitystä osana eurooppalaista enterovirusten epidemiaseurantaa (European non-polio enterovirus network, ENPEN).

Koko genomien sekvensointi

Viime vuosikymmenen aikana NGS-menetelmät ovat enenevästi korvanneet perinteisiä tunnistus- ja tyyppitysmenetelmiä. Sekvenssit voidaan jakaa myös kansainvälisesti julkisiin tai pääsytään rajoitettuihin sekvenssitietokantoihin. Raakasekvenssejä ja sekvensseistä tulkittua mikrobien ominaisuustietoa käytetään rajat ylittävien epidemioiden selvityksessä ja mikrobivarianttien seurannassa yhä yleisemmin (1). Sekvensoinnin vasteaika on tällä hetkellä parhaimmillaan näytteenotosta analysoituun vastaukseen noin kaksi viikkoa.

Mikrobisyhteisöjen amplikonisekvensointi tai ympäristönäytteen metagenomin syväsekvensointi voivat olla hyödyllisiä työkaluja myös osana vesiepidemioiden selvitystyötä erityisesti tapauksissa, joissa lievän taudinkuvan vuoksi potilasnäytteitä ei saada tutkittavaksi, mutta saastunutta talousvettä on saatu tallennettua jatkotutkimuksia varten (2).

THL on käyttänyt bakteerien WGS-menetelmää jo vuodesta 2015 lähtien, ja se on korvannut yksittäisiä PCR-menetelmiä, geenien sekvensointia Sangerilla, useita biokemiallisia menetelmiä sekä kokonaan niin sanotut sormenjälkitekniikat kuten pulssikenttägeeli-elektroforeesin (PFGE) ja variaabelialueiden restriktiopolymorfian (RFLP). WGS on ensisijainen menetelmä monien bakteereiden epidemiologisessa seurannassa, lajin varmistuksessa ja käytännössä lähes kaikissa epidemiaselvityksissä (TAULUKKO 2). WGS tarjoaa kantatyyppi-kohtaista seurantatietoa tautitaakka-arvioihin

TAULUKKO 1. Sanger-sekvensointi infektioautien valtakunnallisessa seurannassa.

Patogeeni tai seurannan kohde	Kohdegeeni	Seurannan laajuus
MRSA	<i>spa, mecA, mecC, PVL</i>	Kaikki uudet MRSA-tapaukset
<i>Streptococcus pyogenes</i>	emm	Invasiiviset kannat
<i>Mycobacterium</i>	<i>16S rRNA</i>	Lajitunnistus
<i>Cryptosporidium</i>	<i>Gp60, 18S rRNA</i>	Valikoiden, etenkin epidemiat
Norovirus	kapsidi (<i>ORF1, ORF2</i>)	Valikoiden, etenkin epidemiat
Rotavirus	<i>VP7, VP4</i>	Kaikki todetut
Poliovirus	<i>VP1</i>	Kaikki todetut, ml. jätevesi
Enterovirukset	<i>VP1, VP4/VP2</i>	Valikoiden, etenkin epidemiat
HIV	polymeraasi	Kaikki uudet todetut, primaariresistenssimääritys
E-hepatiitti (HEV)	<i>Orf2</i>	Valikoiden, etenkin epidemiat
Influenssa	<i>HA, NA</i>	Valikoiden, maantieteellinen ja ajallinen kattavuus

ja rokotteiden vaikutusten arvioinnin tueksi (3,4). WGS-seurannan avulla havaitaan epidemioita ja jäljitetään tartuntojen lähteitä, esimerkiksi mikrobilääkkeille resistenttien bakteereiden osastoepidemioita, ruokavälitteisiä ja harvinaisempia epidemioita sekä tuberkuloosin tartuntaketjuja (5–8).

Bakteereiden geneettistä samankaltaisuutta, klusteroitumista, voidaan tutkia ydingenomi-analyysillä (core genome MLST, cgMLST) tai yksittäisiin nukleotidieroihin perustuvalla SNP-analyysillä (single nucleotide polymorphisms). THL:ssa bakteerikantavertailuja tehdään etupäässä cgMLST:lla, jossa verrataan genomista niitä geenejä tai DNA-kohdealueita, jotka löytyvät kaikilta tutkittavilta kannoilta.

Kaikki kotimaisista tartunnoista eristetyt salmonella-, EHEC- ja listeriakannat sekvensoidaan. Suurin osa listerioosiepidemioista havaitaan referenssilaboratoriossa. Epidemiologisen tutkimuksen lisäksi elintarvike- ja potilaskantojen vertailu on tärkeä osa epidemiaselvitystä. Vuonna 2021 pakastettu tomaattivalmiste aiheutti *Salmonella enterica* -serotyyppi Typhimurium-epidemian ja vuonna 2012 pakastetut kanakuutiot *Salmonella Enteritidis* -epidemian Suomessa (6,9). Vuonna 2014 pastöroimaton maito aiheutti *Yersinia pseudotuberculosis* -epidemian ja vuonna 2012 lihahyytelö *Listeria monocytogenes* -epidemian (10,11). Kaikissa näis-

sä epidemioissa samanlaisen bakteerikannan toteaminen sekvensoimalla sekä potilas- että elintarvike- tai tuotantoympäristönäytteistä vahvisti tartuntalähteen ja sairastumisen välisen yhteyden tunnistamista.

Sekvenssitiedosta on tulkittavissa bakteerien virulenssi-, mikrobilääkeresistenssi- ja rakenneominaisuuksia. Tulosten tulkintaan tarvitaan erilaisia bioinformatiikan ohjelmistoja ja tietokantoja. Ohjelmistoja yhdistetään niin sanotun analyysityön vuoksi (pipeline). Työvuot rakennetaan mahdollisimman geneeriseksi, jotta samalla työvuolla voidaan analysoida usean bakteerin tulokset. Kehitystyötä tarvitaan myös tulosten tulkinnan automatisoimiseksi sekä raportoinnin parantamiseksi ja nopeuttamiseksi. Sekä sekvenssien laadun että tulosten oikeellisuuden varmistaminen on tärkeää. Sekvenssipohjaiset tulokset eivät aina ole välttämättä täysin identtisiä fenotyypillisillä menetelmillä saatujen tulosten kanssa. Tulokset voivat vaihdella myös analysoitaessa samaa ominaisuutta samasta genomista mutta eri ohjelmaa käyttäen, koska eri ohjelmat saattavat käyttää eri geenejä sisältävää tietokantaa. WGS:n käyttöä rajoittavia tekijöitä ovat edellytys puhdasviljelmästä näyttemateriaalina (bakteerit), sekvenssoinnin ja tulosten saamisen suhteellinen hitaus verrattuna esimerkiksi fenotyypiseen seroryhtymitykseen sekä vielä toistaiseksi myös hinta.

TAULUKKO 2. WGS-menetelmien käyttötarkoitus ja seurattavat ominaisuudet bakteereilla.

Bakteeri	WGS-käyttötarkoitus*	Sekvenssitiedosta tulkittavat mikrobiominaisuudet	Seurannassa käytössä oleva muu menetelmä kuin NGS
MRSA	Epidemiaselvitys, verikantojen seuranta	cgMLST, MLST**, spa, mecA, mecC, PVL	Sanger
Stafylokokit	Epidemiaselvitys		–
Pneumokokki	Seuranta, rokotteen vaikutavuus	Serotyypit	–
A-ryhmän streptokokki	Epidemiaselvitys	cgMLST	Sanger
B-, C-, G-ryhmän streptokokit	Epidemiaselvitys	cgMLST	–
Enterokokit, VRE	Seuranta	cgMLST, MLST, vanA, vanB	–
<i>Listeria monocytogenes</i>	Seuranta	cgMLST, MLST, seroryhmä	–
Tuberkuloosi	Seuranta	cgMLST, spoligotyyppi, AMR	AST
Meningokokki	Seuranta	cgMLST, MLST, seroryhmä, porA, fetA	Seroryhmitys
<i>Haemophilus influenzae</i>	Seuranta	cgMLST	Serotyypitys
CPE	Seuranta	cgMLST, MLST, resistenssi-geenit	–
EHEC	Seuranta, kotimaiset ja vakavat tapaukset	cgMLST, MLST, serotyypit, stx-alatyypit, eae-, hly-	PCR, serotyypitys (5 yleisintä)
Salmonella	Seuranta, kotimaiset ja vakavat tapaukset	cgMLST, MLST, serotyypit	Serotyypitys, AST
<i>Vibrio cholerae</i>	Seuranta	cgMLST, biotyypit, O1/O139-seroryhmä, ctxA	–
Shigella	Epidemiaselvitys	cgMLST, MLST, stx1	Seroryhmitys
Yersinia	Epidemiaselvitys	cgMLST, MLST, patogeenisuusryhmä	Pesäkemikroskopia
Kampylobakteerit	Epidemiaselvitys	cgMLST, MLST	–
Legionella	Seuranta	cgMLST, MLST	Seroryhmitys
<i>Clostridioides difficile</i>	Epidemiaselvitys	cgMLST, A- B-, binary toksinigeenit	–
<i>Clostridium perfringens</i>	Epidemiaselvitys	cgMLST, enterotoksiinigeeni, toksiiniluokittelu (alpha, beta, epsilon, iota)	–

* Seuranta = WGS tehdään rutiinisti, epidemiaselvitys sisältyy tarvittaessa. Seuranta tehdään kaikille uusille löydöksille, jolle muuta mainittu. Epidemiaselvitys = WGS tehdään vain, jos epäillään epidemiaa tai on muu erityinen syy.

**MLST=multilocus sequence typing, yleensä seitsemän geenin perusteella määritelty sekvenssityypit (ST)

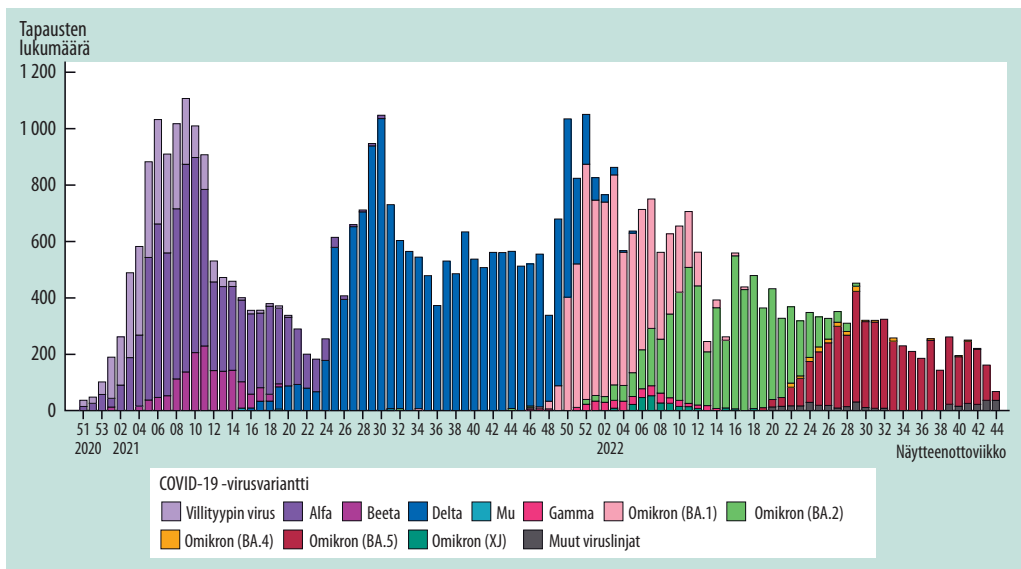
VRE = vankomysiiniresistentti enterokokki, CPE = karbapeneemi-resistentti enterokokki, EHEC = enterohemorraginen *Escherichia coli*

SARS-CoV-2:n geneettisen muuntelun seuranta

Viruksille, etenkin RNA-viruksille kuten SARS-CoV-2-virukselle, on tyypillistä, että ne muuntuvat kiertäessään väestössä. Perimään ilmaantuvat muutokset eli mutaatiot ovat osa viruksen luonnollista evoluutioprosessia, jota ohjaa muun muassa väestön joko luonnollisen taudin tai rokotusten kautta muodostunut im-

muniteetti. Yhdestä viruslinjasta kehittyä ajan myötä erillisiä uusia linjoja, jotka puolestaan polveutuvat alalinjoiksi.

Geneettisellä muuntumisella saattaa olla vaikutusta esimerkiksi viruksen antigeeniin ominaisuuksiin ja tarttuvuuteen, rokotteen ja viruslääkkeiden tehoon sekä infektiota aiheuttamaan taudinkuvaan. Viruskantoja sekvensoimalla voidaan varianttien ja mutaatioiden esiintyvyyttä seurata ajallisesti ja alueellisesti



KUVA 1. Tartuntatautirekisteriin kirjatut virusmuunnokset viikoittain, 51/2020–44/2022.

sekä havaita uusia poikkeavia virusvariantteja ja mutaatioita. Kaikista Suomen SARS-CoV-2-positiivisista näytteistä valitaan sekvensointiin viikoittain otos, jolla voidaan arvioida tilannetta eri puolilla Suomea (KUVA 1).

Loppuvuodesta 2020 Isossa-Britanniassa COVID-19 tautitapausmäärät lisääntyivät nopeasti. Tapausmäärien lisääntyminen liitettiin uuden SARS-CoV-2-virusvariantin (VUI202012/01, UK-variantti, alfavariantti) ilmaantumiseen. Alfavariantilla oli useita mutaatioita piikkiproteiinia koodaavassa geenissä, ja sen todettiin tarttuvan varhaisia SARS-CoV-2-kantoja herkemmin. Alfavariantin leviämisen ehkäisemiseksi ja hallitsemiseksi sekä uusien epidemiologisesti merkittävien virusvarianttien tunnistamiseksi Euroopan tautivirasto (ECDC) kehotti jäsenvaltioita lisäämään SARS-CoV-2-kantojen sekvensointia (12,13).

Pandemian alusta lähtien useat Euroopan maat olivat sekvensoineet SARS-CoV-2-kantoja ja jakaneet sekvenssitietoa julkiseen Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) -sekvenssitietokantaan. Myös Suomessa satunnaisia SARS-CoV-2-kantoja oli sekvensoitu Helsingin yliopiston (HY) Virologian osastolla viruksen evoluutiotutkimusta varten. Alfavariantin ilmaantuminen ja uusien varianttivirusien havaitseminen vaati sekven-

sointivalmiuden ja -kapasiteetin lisäämistä. Joulukuussa 2020 luotiin HY:n virologian osaston, Suomen molekyyli lääketieteen instituutin (FIMM) sekvensointiyksikön ja THL:n asiantuntijamikrobiologian yksikön välinen konsortio, joka jatkossa vastasi Suomessa satunnaisotannalla valittujen SARS-CoV-2-positiivisten näytteiden sekvensoinnista. FIMM:ssä oli valmiina WGS:sta laaja osaaminen ja tietämys sekä suuren sekvensointikapasiteetin laite (Illumina NovaSeq). Konsortiossa HY yhdessä HUSLAB:in kanssa vastasi HUS-alueen ja rajanäytteiden sekvensoinneista ja THL pääosin muun Suomen sekvensoinneista. FIMM avusti THL:ää sekvensointireaktioiden teossa sekä vastasi kaikkien sekvensointinäytteiden viikoittaisesta ajosta suuren kapasiteetin laitteella. Sekvensointimäärät olivat noin 800 sekvensointinäytettä viikoittain. Myös Tyks Laboratorioissa, Fimlab Laboratoriot Oy:n Tampereen keskuslaboratoriossa ja Vita Laboratorioissa tehtiin SARS-CoV-2-viruksen sekvensointia.

Syksyllä 2021 THL sai Euroopan unionin HERA-rahoitusinstrumentin kautta rahoituksen, joka mahdollisti kansallisen sekvensointikapasiteetin ja infrastruktuurin vahvistamisen. Keskisuuren sekvensointikapasiteetin laitteiston hankinta ja WGS-menetelmien pystyttäminen THL:ään on mahdollistanut Suomen

Ydinasiat

- ▶ Mikrobien seuranta ja epidemiaselvitystä tukemaan voidaan käyttää osittaista (Sanger-) sekvensointia tai koko genomin sekvensointia (WGS).
- ▶ Sekvenssitiedosta voidaan tulkita bakteerien virulenssi-, resistenssi- ja rakeneominaisuuksia sekä virusten antigeenisiä ja rokotteiden sekä viruslääkkeiden tehoon vaikuttavia ominaisuuksia.
- ▶ Tekniikoiden kehittyessä ja prosessien nopeutuessa sekvensointi tulee myös osaksi potilasdiagnoositiikkaa.

SARS-CoV-2-virusten sekvensoinnin keskittämisen THL:ään ja samalla vapauttanut HY:n ja FIMM:in sekvensointiin käytetyn kapasiteetin muihin tutkimustarpeisiin. Marraskuusta 2022 lähtien SARS-CoV-2-virusten sekvensointi siirtyi kokonaisuudessaan THL:ään. Tällä hetkellä SARS-CoV-2-viruksen otosperusteista sekvensointia jatketaan toistaiseksi, ja se käsittää noin 350 sekvensointinäytettä viikossa (14).

Suomessa on joulukuusta 2020 lähtien sekvensoitu yli 55 000 näytettä (tilanne 9.11.2022).

Lisäksi kaikki ne THL:n toteuttaman kansallisen koronaviruksen jätevesiseurannan näytteet, joissa havaitaan koronaviruksen RNA:ta, sekvensoidaan koronavirusemuunnosten varalta (15). Koronaviruksen RNA-lukumäärä tutkitaan tällä hetkellä viikoittain yhdeksällä paikkakunnalla: Espoon, Helsingin, Joensuun, Jyväskylän, Kuopion, Oulun, Tampereen, Turun ja Vaasan jätevedenpuhdistamoilla (16).

Sekvensoinnin tulevaisuuden näkymät

SARS-CoV-2-pandemian myötä sekvensointikapasiteetti ja -kyvykyys on lisääntynyt merkittävästi sekä Suomessa että maailmalla. Sekvenssidataa ja mikrobikohtaisesti räätälöityjä genomianalyysialustoja jaetaan avoimemmin kuin ennen, mikä mahdollistaa suurien, maantieteellisesti ja ajallisesti kattavien, näytemäärien yhtenäisen analysoinnin. Menetelmät, jot-

ka ovat jo vuosia olleet tutkimuskäytössä, ovat vakiintumassa myös epidemiologiseen ja kliiniseen käyttöön ja tuottavat huomattavan tarkkaa tietoa potilaan infektion laadusta, taudinpurkausten alkulähteistä ja väestössä kiertävistä patogeeneistä. Lähitulevaisuudessa sekvensoinnin hyödynnettävyyden tulee ratkaisemaan, miten hyvin onnistumme tuottamaan määrältään ja laadultaan tarkoituksenmukaista sekvenssitietoa sekä integroimaan sen osaksi niitä terveydenhuollon ja tartuntatautien seurannan ja torjunnan prosesseja, jotka niistä hyötyvät. Tarvittaviin sekvensointimääriin suhteessa saatuun hyötyyn vaikuttavat monet tekijät. Harvinaisen variantin havaitsemiseen tarvitaan merkittävästi laajempaa sekvensoinnin kattavuutta kuin vallitsevien linjojen suhteiden havaitsemiseen.

WHO julkaisi vuonna 2022 globaalin genomiseurannan strategian sellaisille taudinaiheuttajille, joilla on pandeemista ja epidemiologista potentiaalia (17). Strategian päämääränä on vahvistaa genomiseurannan toteutusta osana kansallisia ja globaaleja seurantajärjestelmiä siten, että genomitietoa voidaan yhä paremmin käyttää epidemioiden varhaisempaan tunnistamiseen sekä oikea-aikaisten ja tarkoituksenmukaisten kansanterveystoimien kohdistamiseen osana epidemioiden torjuntaa. Rajat ylittävä tiedonsiirto sekä sekvensoinnin yhä lyhyempi aikavaste edistävät tulevaisuudessa epidemioiden tunnistamista varhaisessa vaiheessa. Sekvenssianalyysit ovat vakiinnuttamassa asemansa epidemioiden torjunnassa tuottamalla informaatiota tartuntaketjuista sekä rajoitustoimien vaikuttavuudesta. Kuten SARS-CoV-2-pandemia on osoittanut, epidemioiden varhaisen vaiheen sekvenssit toimivat myös pohjana diagnostisten menetelmien pystyttämiseksi sekä ensimmäisille rokoteaihoille.

Kliinisessä diagnostiikassa sekvensointia on toistaiseksi hyödynnetty lähinnä resistenssimäärityksissä (esimerkiksi HIV, mykobakteerit, *Mycoplasma genitalium*) sekä steriilin alueen bakteeri-infektioiden diagnosointiin etenkin tilanteissa, joissa bakteeria ei ole saatu viljeltyä tai bakteerikantaa tunnistettua muilla menetelmillä. Sekvensointi on näissä menetelmissä yleensä kohdennettu tietyille geenialueelle, eikä koko genomin sekvensointia ole varsinaisessa

diagnostiikassa vielä juurikaan käytetty, vaikka esimerkiksi HIV:n resistenssimäärytyksiä NGS-menetelmillä tehdäänkin. Myös bakteereiden mikrobilääkeresistenssitieto (AMR prediction) on jatkossa mahdollista saada genomitiedosta.

Tulevaisuudessa NGS-menetelmät tulevat yhä enemmän käyttöön mikrobiologiseen laboratoriodiagnostiikkaan, ja SARS-CoV-2:n WGS-menetelmien pystytys pandemian aikana muutama kiiinnisen mikrobiologian laboratorioon on hyvä alkusysäys kehitykselle. Kliinisessä diagnostiikassa NGS-menetelmien toivotaan laajentavan mahdollisuuksia muun muassa moniresistenttien bakteerien resistenssitestijoiden tarkempaan selvitykseen (esimerkiksi karbapeneemeille resistentit gramnegatiiviset sauvat), etiologialtaan epäselviksi jääneiden mahdollisten infektioiden diagnostiikkaan (esimerkiksi etiologialtaan epäselvät enkefaliitit), antiviraaliherkkyyden arviointiin kroonisissa virusinfektioissa sekä mikrobistoanalyysiin.

NGS:n käyttöä kliinisessä diagnostiikassa hidastavat vielä tuloksen saannin suhteellinen hitaus ja kalleus sekä sekvensointidatan analysoinnin haastavuus. Huolimatta kaupallisestikin saatavilla olevista sekvenssidatan analyysiohjelmistoista, on luotettava datan laadun arviointi ja tulkinta hankalaa ilman bioinformatiikan asiantuntemusta. Bioinformatiikan osaamisen lisääntyminen kliinisissä mikrobiologian laboratorioissa sekä analyysiohjelmistojen ja sekvensointilaitteiden kehittyminen tulevaisuudessa mahdollistanevat NGS-menetelmien käyttöönoton rutiinidiagnostiikkaan.

Esimerkkinä kehityksestä on mahdollisuus tuottaa sekvenssitietoa paitsi tunnetuista myös tuntemattomista mikrobeista nanopore-tekniologialla puhelimen kokoisella MinION sekvensointilaitteella. Tekniologiaa käytettiin laajasti kenttäolosuhteissa vuoden 2014 ebolaepidemian aikana Länsi-Afrikassa (18). Suomessa sitä on käytetty muun muassa ensimmäisten

apinarokkotapausten varmentamiseen. Sen käyttö pyritään vakiinnuttamaan uusien, poikkeavien ja nopeaa tutkimusta vaativien näytteiden sekvensoinnissa osana Suomen valmiustointia. MinION-tekniikkaa voidaan hyödyntää myös plasmidivälitteisten AMR-epidemioiden tunnistamisessa.

Hengitystie- ja suolistovirusia on seurattu keräämällä seurantanäytteitä, jotka tutkitaan PCR- tai monianalyytti-PCR-menetelmillä yhden tai usean viruksen samanaikaista tunnistamista varten. Positiivisista näytteistä on tämän jälkeen tehty viruseristyksiä soluviljelmissä ja sekvensoitu yksittäisiä genejä linjamäärytyksiä, fylogeneettistä analysointia sekä antigenista karakterisointia varten. Seurantanäytteiden tutkiminen on yhä enenevässä määrin siirtymässä WGS-pohjaiseksi, jossa sekvensointituloksen perusteella valitaan sekä kiertäviä linjoja edustavia näytteitä että geneettisesti poikkeavia näytteitä viruseristykseen. Näköpiirissä on jo siirtyminen monianalyytti-NGS-strategioihin, joiden avulla voidaan kohdenetusti sekvensoida esimerkiksi seurantaan kerätystä hengitystienäytteistä kymmeniä viruksia. Tämä tulee yhtenäistämään virusten epidemiologista seuranta ja tuottamaan tasapuolisesti tietoa useista hengitystievirusista sekä niiden keskinäisestä dynamiikasta.

Lopuksi

NGS-menetelmien potentiaalin valjastamiseksi epidemiologisen ja kliinisen analytiikan hyväksi on ymmärrettävä sen rajoitukset. Todellinen kansanterveydellinen lisäarvo saavutetaan, kun genomidataa käytetään suunnitelmallisesti, aina näytteiden keräysstrategiasta tarkoitukseenmukaisiin laboratorio- ja tietojärjestelmiin, huomioiden paikallinen ja globaali konteksti sekä tulkinta kliiniseen ja epidemiologiseen taustatietoon tukeutuen. ■

NIINA IKONEN, johtava asiantuntija
SAARA SALMENLINNA, johtava asiantuntija
ERIKA LINDH, erikoistutkija
ANNI VAINIO, erikoistutkija
CARITA SAVOLAINEN-KOPRA, Johtava asiantuntija,
yksikön päällikkö
Terveysturvaajat-osasto, THL

Työryhmän jäsenet:
Jani Halkilahti, tutkija; Sari Hannula, Project manager;
Maija Lappalainen, ylilääkäri; Minna Paloniemi, erikoislääkäri; Tarja Pitkänen, johtava asiantuntija; Ruska Rimhanen-Finne, asiantuntijaeläinlääkäri; Kati Räisänen, erityisasiantuntija; Laura Lindholm, erikoistutkija; Teemu Smura, tutkijatohtori; Olli Vapalahti, kliinisen mikrobiologian erikoislääkäri; Tytti Vuorinen, emeritaylilääkäri

KIRJALLISUUTTA

1. Tagliani E, Anthony R, Kohl TA, ym. Use of a whole genome sequencing-based approach for Mycobacterium tuberculosis surveillance in Europe in 2017-2019: an ECDC pilot study. *Eur Respir J* 2021;57:2002272.
2. Jalava K, Rintala H, Ollgren J, ym. Novel microbiological and spatial statistical methods to improve strength of epidemiological evidence in a community-wide waterborne outbreak. *PLoS One* 2014;9:e104713.
3. Polkowska A, Rinta-Kokko H, Toropainen M, ym. Long-term population effects of infant 10-valent pneumococcal conjugate vaccination on pneumococcal meningitis in Finland. *Vaccine* 2021;39:3216–24.
4. Räisänen K, Lyytikäinen O, Kauranen J, ym. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacterales in Finland, 2012-2018. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020;39:1651–6.
5. van Beek J, Räisänen K, Broas M, ym. Tracing local and regional clusters of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae ST512 with whole genome sequencing, Finland, 2013 to 2018. *Euro Surveill* 2019;24:1800522.
6. Kääriäinen S, Obach D, Paspaliari DK, ym. Salmonella Typhimurium outbreak associated with frozen tomato cubes at a restaurant in western Finland, January to February 2021. *Euro Surveill* 2020;27:2200316.
7. Linkevicius M, Cristea V, Siira L, ym. Outbreak of invasive pneumococcal disease among shipyard workers, Turku, Finland, May to November 2019. *Euro Surveill* 2019;24:1900681.
8. Popovici O, Monk Ph, Chemtob D, ym. Cross-border outbreak of extensively drug-resistant tuberculosis linked to a university in Romania. *Epidemiology and Infection* 2018;146:824–31.
9. Huusko S, Pihlajasaari A, Salmenlinna S, ym. Outbreak of Salmonella enteritidis phage type 1B associated with frozen pre-cooked chicken cubes, Finland 2012. *Epidemiol Infect* 2017;145:2727–34.
10. Pärn T, Hallanvuori S, Salmenlinna S, ym. Outbreak of Yersinia pseudotuberculosis O:1 infection associated with raw milk consumption, Finland, spring 2014. *Euro Surveill*, julkaistu verkossa 8.10.2015. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.40.30033.
11. Jacks A, Pihlajasaari A, Vahe M, ym. Outbreak of hospital-acquired gastroenteritis and invasive infection caused by Listeria monocytogenes, Finland, 2012. *Epidemiol Infect.* 2016;144:2732–42.
12. Threat assessment brief: rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike protein mutations observed in the United Kingdom. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 20.12.2020. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-rapid-increase-sars-cov-2-variant>
13. Sequencing of SARS-CoV-2: first update. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 18.1.2021. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/sequencing-sars-cov-2>.
14. Ajankohtaista koronaviruksesta. Muuntuneet koronavirukset. Helsinki: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. <https://thl.fi/web/infektioaudit-ja-rokotukset/ajankohtaista/ajankohtaista-koronaviruksesta-covid-19/tarttuminen-ja-suojautuminen-koronavirus/muuntuneet-koronavirukset>.
15. Li L, Uppal T, Hartley PD, ym. Detecting SARS-CoV-2 variants in wastewater and their correlation with circulating variants in the communities. *Sci Rep* 2022; 12:16141.
16. Tutkimukset ja hankkeet. SARS-CoV-2 jätevedenpuhdistamoilla. Helsinki: Terveyden ja hyvinvoinnin laitos. <https://thl.fi/fi/tutkimus-ja-kehittaminen/tutkimukset-ja-hankkeet/sars-cov-2-jatevedenpuhdistamoilla/koronaviruksen-jatevesiseuranta>.
17. Carter LL, Yu MA, Sacks JA, ym. Global genomic surveillance strategy for pathogens with pandemic and epidemic potential 2022-2032. *Bull World Health Organ.* 2022;100:239.
18. Quick J, Loman N, Duraffour S, ym. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* 2016;530:228–32.

TEEMAN TOIMITTAJAT

Otto Helve ja Hannu Kiviranta

SIDONNAISUDET

Niina Ikonen: Konsultointi- ja asiantuntijatoiminta (Sanofi, kouluttajana, ei palkkiota, Suomen infektioidentifikaatioyhdistys ry), kongressi tai seminaari, luottamustoimet (ECDC, National Focal Point for Viral Respiratory Diseases, National Influenza Centre, NIC)

Saara Salmenlinna: kongressi tai seminaari (Aidian), luottamustoimet (ECDC, Microbiology focal point, ECDC, Food and waterborne infections network alternative focal point, Taruntautien neuvottelukunta, sihteeri) muut sidonnaisuudet (Hankerahoitus: MMM, Makera, EU HERA, EU Hadea, Osakeomistukset: Orion (rahastossa))

Erika Lindh: Ei sidonnaisuuksia

Anni Vainio: Ei sidonnaisuuksia

Carita Savolainen-Kopra: Konsultointi- ja asiantuntijatoiminta (Labquality Oy, Koulab Oy, HY, TaY), luottamustoimet (Eukomission koronaviruksen pikatestien asiantuntijaryhmä), terveydenhuollon ohjaukseen pyrkivät hankkeet (STM:n koronatestausvalmiuden kansallinen koordinaatioyhmä, STM:n kansallisen mikrobiologisen laboratoritoiminnan arvioinnin työryhmä)