

MALDI-TOF-MASSASPEKTROMETRIA MIKROBITUNNISTUKSESSA: OIKOTIE PAREMPAAN ASUMISTERVEYSDIAGNOSTIIKKAAN?

A-M. Pessi¹, S. Kankaanpää¹, I. Harju², E. Eerola², A. Saarto¹ ja A. Hakanen²

¹ Turun yliopiston biodiversiteettiyksikkö, Aerobiologian laboratorio

² Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiri, TYKS kliinisen mikrobiologian laboratorio

TIIVISTELMÄ

MALDI-TOF massaspektrometrialla voidaan luokitella ja tunnistaa mikro-organismeja niiden proteiiniprofiilin mukaan. Tämä kustannustehokas ja nopea menetelmä on otettu laajasti käyttöön mikrobiologisessa analytiikassa. Artikkelissa kuvataan aloitettua selvitystyötä menetelmän hyödynnettävyydestä asumisterveystutkimuksissa. Esikokeissa menetelmää testattiin 10 *Aspergillus*-kannalla sekä 50 asumisterveysnäytteistä eristetyllä aktinomykeetikannalla. *Aspergillus-lajien* tunnistus onnistui tyydyttävästi. Aktinomykeetit tunnistettiin käytetyn tietokannan suppeuden vuoksi pääosin vain sukutasolle. Menetelmän käyttöönotto edellyttäisi MALDI-TOF MS kirjastotietokantojen laajentamista DNA-sekvensoinnilla tunnistetuilla ympäristömikrobikannoilla

TAUSTAA

Kosteusvauriota indikoivat mikrobit ja viljelymenetelmän rajoitukset

Asumisterveysasetuksen soveltamisoppaassa /1/ ohjeistetut mikrobiologiset analyysit perustuvat viljelymenetelmiin, joissa määrän lisäksi arvioidaan havaittua lajistoa. Nk. kosteusvaurioindikoivien mikrobien poikkeavan esiintymisen perusteella voidaan materiaalin epäillä vaurioituneen tai osoittaa ilmanäyte tavanomaisesta poikkeavaksi, vaikka mikrobipitoisuus olisikin alittanut toimenpiderajat. Näillä menetelmillä ei homeita voida tunnistaa lajitasolle. Esim. *Aspergillus*-suvun tunnistus jää viljelyyn ja mikroskopiaan perustuen nykytietämyksen mukaan yleensä ryhmätasolle /2/.

Aktinomykeettien osalta edes sukutason tunnistus ei ole mahdollista pelkällä viljelyllä /3/. Asumisterveystutkimuksissa niiden tyyppitys perustuu rihmaston olemassaoloon sekä pidennetyn viljelyajan (THG, 25 °C) jälkeen havaittaviin ominaisuuksiin ('alustaan kiinnittynyt, jauhoinen, kuiva pesäke') /1/2/4/. Pelkästään kosteusvaurioindikoivuutta ajatellen menettely on toimiva: saksalaisen useita tunnistusmenetelmiä käyttäneen tutkimuksen mukaan rakennusten mikrobivaurioissa yleisimmin esiintyvät aktinomykeettisuvut ovat *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora* ja *Promicromonospora* /3/. Näistä ainoastaan viimeisin ei vastaa y.o. kuvausta.

Lajitasolle menevä tunnistaminen voisi auttaa rakenteista havaitun vaurion ja sisätiloista havaittujen mikrobien (ilma, pöly) välisen yhteyden selvittämisessä. Toisaalta mikrobien metaboliittituotto riippuu lajeista, niiden keskinäisistä yhdysvaikutuksista sekä

ympäristöoloista. Esimerkiksi *Chaetomium*-suvun eri lajien tuottamat sekundaari-metaboliitit vaihtelevat voimakkaasti /5/, jolloin potentiaalisen toksiinituotannon arvioiminen pelkän sukutason tunnistuksen perusteella johtaisi harhaan.

MALDI-TOF MS (matriisiavusteinen laser-desorptio-ionisaatio-lentoaika massaspektrometria) menetelmä

MALDI-TOF massaspektrometrialla voidaan mikro-organismeja luokitella taksonomisesti niiden proteiiniprofiilin mukaan. Tämä kustannustehokas, nopea ja helppokäyttöinen menetelmä on yleistynyt vaihtoehtoiseksi tunnistusmenetelmäksi mikrobiologisessa rutiinidiagnostiikassa, etenkin kliinisen mikrobiologian alalla mutta myös mm. ympäristövalvonnassa sekä elintarvikkeiden laadunvalvonnassa. /6/7/. Vaikka molekyylibiologiset menetelmät ovat mahdollistaneet lajitason tunnistamisen ja taksonomisen tutkimuksen, eivät ne kustannusten tai analyysien keston vuoksi monesti sovellu rutiinimenetelmiksi.

Menetelmä on sovellettavissa niin bakteerien kuin homeiden tunnistamiseen /8/9/. Etenkin monien bakteerin kohdalla luotettava lajintunnistus voidaan tehdä muutamissa minuuteissa /6/ ja menetelmää on sovellettu myös viljelymenetelmillä vaikeasti tunnistettavien *Streptomyceettien* osalta /10/. MALDI-TOF-laitteet ovat pitkälle automatisoituja ja siten helppokäyttöisiä. Verrattuna bioinformatiikan tietotaitoa vaativiin DNA-menetelmiin tai viljelymenetelmillä tehtävään lajitason tunnistamiseen biokemiallisine testeineen /11/ ovat menetelmän näytekohdaiset kustannukset pieniä.

MALDI-TOF MS menetelmässä lajinmääritys perustuu organismin molekyyylimassaspektriin, joka viitetietokannan avulla yhdistetään tiettyyn lajiin /12/. Näytteenä voidaan käyttää kokonaisia soluja tai niistä uutettua proteiinisuspensiota, jotka sekoitetaan matriisin kanssa näytelevyllä. Matriisilla kiteytettyä näytettä pommitetaan laserpulsseilla, jolloin erikokoiset molekyylit irtoavat (desorptio) näytelevyltä, kaasuuntuvat ja ionisoituvat. Sähkökentän avulla kiihdytetyt ionit lentävät laitteen sisällä tyhjiössä detektoriin hiukkasen massasta riippuvalla nopeudella. Lentoajan perusteella saadaan mitattua näytteen massaspektri. /11/

MALDI-TOF MS -tietokannat tunnistuksen tukena

Valmistajien ja laboratorioiden kokoamat spektritietokannat koostuvat pääosin kliinisesti tärkeistä mikrobeista. Brukerin (Bruker Daltonics, Saksa) valmistamaa laitteistoa tukevassa tietokannassa on jonkin verran ympäristömikrobeja, rakennusympäristön homeista useita tyypillisiä *Aspergillus*, *Penicillium* ja *Cladosporium* lajeja, sekä *Chaetomium globosum*, *Pseudogymnoascus (l. Geomyces) pannorum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Stachybotrys chartarum* ja *Trichoderma longibrachiatum*. Vaikka bakteerien osalta tietokanta on huomattavan laaja, on aktinomykeettien osuus pieni: *Streptomyces* -lajeja tietokannassa on vain 17 ja *Nocardiopsis*, *Pseudonocardia* ja *Saccharopolyspora* suvuista vain 1-2 lajia.

Brukerin lisäksi MALDI-TOF MS laitteistoja valmistaa VITEK MS (bioMeérieux, Marcy l'Etoile, Ranska), joka tietokannassa on ympäristömikrobeja ehkä hieman suppeammin kuin Brukerilla. Lisäksi Andromas SA (Pariisi, Ranska) on kehittänyt tietokantoja tällä hetkellä kliinisiin tarkoituksiin /13/. Kaupallisten tietokantojen lisäksi laboratoriot ovat kehittäneet tietokantoja sisäiseen käyttöönsä.

Asumisterveystutkimuksia ajatellen MALDI-TOF MS menetelmä edellyttäisi ympäristömikrobeja paremmin edustavaa tietokantaa, jossa olisi maantieteellisesti ja eri

rakennusmateriaaleilta eristettyjä, tunnistettuja ja DNA-menetelmin varmistettuja mikrobikantoja. Tunnistuksen onnistuminen ja sen tarkkuus riippuvat käytetyn tietokannan kattavuudesta. Bakteereilla tehdyn tutkimuksen /6/ mukaan tarvitaan vähintään 10 eri kannoista saatavaa spektriä, jotta vertailu olisi luotettava.

MENETELMÄT

Mikrobikannat

Nyt käsitellyissä kokeissa käytettiin pääasiassa Aerobiologian laboratorion maksullisen palvelutoiminnan yhteydessä (2011–2017) rakennusmateriaaleista tai ilmasta eristettyjä aktinomykeettikantoja. Testatut *Aspergillus*-kannat (Taulukko 1.) olivat sienipankeista hankittuja tai Aerobiologian laboratoriossa eristettyjä. Aktinomykeettikannat oli tyypitetty Asumisterveysoppaan /4/ kuvauksen mukaan. Kantoja oli ylläpidetty toistetuin jatkokasvatuksin agaralustalla (THG, M2) ja säilyttämällä kylmiössä tai pakastamalla. Lisäksi menetelmää testattiin 10 *Nocardia*-kannalla TYKS:n kantakokoelmasta.

Esikasvatus ja käsittely MALDI-TOF MS ajoa varten

MALDI-TOF MS mittausta varten tarvitaan tuoretta mikrobimassaa. Näytteinä käytettiin sieni- tai bakteerimassaa joko yli 7 vrk vanhalta kiinteän alustan viljelmältä tai 1-4 vrk kasvatuksesta ravintoliuoksessa.

Homeet siirrettiin M2 agarilta esikasvatukseen Sabouraud-dekstroosi rikasteliemessä (Lab M; 30 °C, pyöröravistelijä) ja uutettiin Schulthessin menetelmällä /13/.

Aktinomykeetit: Laitevalmistajan (Bruker Daltonics, Saksa) bakteereille suosittelema etanolikäsittely-muurahaishappouutto /6/ tuotti heikkolaatuisen massaspektrin agarilla kasvatetuista pesäkkeistä. Mykobakteereille kehitetty uuttomenetelmä, jossa solurakenteen hajotusta tehostetaan silikahelmillä /12/, toimi verrokkinäytteillä mykobakteereilla, mutta muilla aktinomykeeteillä spektrit jäivät heikkolaatuiseksi.

Käyttöön otettiin menetelmä, joka sovelsi Schulthessin homeilla käytettävää menetelmää: nesteviljelyä ja sitä seuraavaa ja etanoli-muurahaishappouuttoa /13/. Aktinomykeetit kasvatettiin THG rikasteliemessä (5 g tryptoni, 1 g glukoosi ja 2,5 g hiivauute, 1000 ml vettä) ravistelussa huoneenlämmössä. Solut kerättiin nesteviljelmästä sentrifugoimalla, pestiin ultrapuhtaalla vedellä ja etanoli-muurahaishappouuttoa jatkettiin Schulthessin /13/ menetelmän mukaisesti. Osa kannoista osoittautui THG-viljelyssä hyvin hidaskasvuiseksi eikä 4 vrk kasvatuksessa syntynyt rihmastomassa riittänyt luotettavaan analyysiin. Näitä kantoja esikasvatettiin käyttäen FAB-rikasteliemää (Fastidious anaerobe broth, Lab M), 30 °C.

MALDI-TOF MS –mittaus, lajintunnistus ja kirjastotietokannan luonti

Käytetyn laitteiston, ohjelmiston ja tietokannan valmistaja on Bruker Daltonics (Bremen, Saksa). Uutetut näytteet lisättiin teräksiselle näytelevylle 1 µl erissä triplikaattina ja päälle lisättiin 1 µl HCCA-matriisia. Näytespektrit mitattiin (MBT Smart –laite, MBT_AutoX-mittausohjelma) ja tunnistettiin vertaamalla spektrejä tietokannan referenssispektreihin (MBT Compass Biotyper Library, MALDI BioTyper Compass Explorer 4.1 ohjelma). Spektrien yhtenevyyttä verrataan käyttäen havaittujen piikkien tiheyden, sijainnin ja voimakkuuden perusteella luotavia pistearvoja (Taulukko 1.)

Taulukko 1. Brukerin esittämä luotettavuusasteikko ja sitä vastaava pistearvo:

Tunnistustaso	Symboli / pistearvo
Erittäin todennäköinen lajitason tunnistus	+++ / 2,30–3,00
Varma sukutason tunnistus, todennäköinen lajitason tunnistus	++ / 2,00–2,29
Todennäköinen sukutason tunnistus	+ / 1,70–1,99
Ei tunnistustulosta.	- / 0–1,69

Aktinomykeettikannoille, jotka eivät tunnistu käytetyllä tietokannalla, pyritään löytämään yhtenevyyksiä muiden tunnistumattomien kantojen välillä ja luomaan laboratorion sisäinen tietokanta. Tässä nyt aloitetussa tyytitystutkimuksessa samasta nesteviljelmästä tehdään 8–12 rinnakkaista näytettä näytelevylle, jotka mitataan kolmesti. Tietokantaan hyväksyttävään mittaukseen tarvitaan vähintään 20 spektriä, joiden laatu tarkistetaan FlexAnalysis 3.4 -ohjelmalla. Onnistuneesti luotua kirjastospektriä voidaan tämän jälkeen verrata muihin näytteisiin vertailuspektrinä.

TULOKSET JA POHDINTA

Aspergillus-homeiden tunnistettavuus

Pienen lajiotoksen perusteella *Aspergillus*-homeiden MALDI-TOF MS-tunnistaminen onnistui Brukerin tietokannan avulla tyydyttävästi (Taulukko 2.). Kliinisissä näytteissä yleiset *Aspergillus fumigatus* ja *A. niger* saivat erittäin todennäköisen lajitason tunnistustuloksen. *A. flavus* tunnistui hyvin *A. flavus-oryzae* -ryhmään (hyvä yhtenevyys sekä *A. flavus* että *A. oryzae* -lajien spektreihin). Laboratoriossamme mikroskooppisesti tunnistettu *A. ustii* –sektioon uuluva kanta tunnistui *A. ustus* lajiksi, kun taas saman sektorin *A. puniceus* –pankkikanta sai vain sukutason tunnistuksena pidettävän pistearvon. Ainoa tietokannassa ollut laji, jolle ei saatu tunnistustulosta, oli kserofiilinen *A. penicillioides*. Laji ei ehkä tuottanut normaalia rihmastoa nestekasvatuksessa. Muut testatut lajit puuttuivat tietokannasta (*A. restrictus*, *A. creber* ja *Eurotium repens*), joten lajitason tunnistamattomuus oli oletettua; näistä ei saatu kuitenkaan edes heikkoa sukutason tunnistusta.

Taulukko 2. Testattujen *Aspergillus*-kantojen tunnistettavuus Brukerin tietokannalla. DB = laji on Brukerin tietokannassa. Pistearvojen tulkinta, ks. Taulukko 1.

Testattu kanta			Tunnistustulos	Luotettavuus / pistearvo
<i>Aspergillus fumigatus</i>	¹	DB	<i>A. fumigatus</i>	+++ / 2,59
<i>A. flavus</i> IHEM 932	²	DB	<i>A. flavus</i> <i>A. oryzae</i>	+++ / 2,43 +++ / 2,50
<i>A. niger</i>	¹	DB	<i>A. niger</i>	+++ / 2,44
<i>A. ryhmä Usti</i>	¹	DB	<i>A. ustus</i>	+++ / 2,31
<i>A. puniceus</i> IHEM 1637	³	-	<i>A. ustus</i>	+ / 1,74
<i>A. terreus</i> MUCL 614		DB	<i>A. terreus</i>	+ / 1,85
<i>A. creber</i> IHEM 2646	³	-		- / < 1,7
<i>A. penicillioides</i> IHEM 2476		DB		- / < 1,7
<i>A. restrictus</i> IHEM 818		-		- / < 1,7
<i>Eurotium repens</i> MUCL 15977		-		- / < 1,7

¹ Testattava kanta on tunnistettu laboratorion sisällä mikroskooppisesti

² Laji tunnistuu *A. flavus-oryzae* -ryhmän lajiksi

³ Kannat *A. puniceus* IHEM 1637 on hankittu lajina *A. ustus*, ja *A. creber* IHEM 2646 lajina *A. versicolor*, uudelleen nimeäminen on tehty sienipankissa.

Aktinomykeettien tunnistettavuus

Aineistossa ei ollut ennalta tunnettuja aktinomykeettejä vaan se koostui rakennuksista eristetyistä kannoista. Tutkituista 50 kannasta lajilleen tunnistettiin vain neljä (*Streptomyces badius* ja *S. violaceoruber*). Näiden lisäksi 19 kantaa luokiteltiin *Streptomyces* –sukuun ja 1 *Kocuria* –sukuun (”todennäköinen sukutaso tunnistus”).

Taulukko 3. Rakennusympäristöstä eristettyjen aktinomykeettikantojen tunnistettavuus Brukerin tietokannalla. Pistearvojen tulkinta, ks. Taulukko 1.

Testattu kanta ja eristysmateriaali	Tunnistustulos	Luotettavuus / pistearvo
a/486; mineraalivilla	<i>Streptomyces badius</i>	++ / 2,03
a/560, finn foam	<i>S. violaceoruber</i>	++ / 2,01
a/582, mineraalivilla	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	++ / 2,06
a/434, polyuretaani	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	++ / 2,02
a/589, mineraalivilla	<i>Kocuria sp.</i> ¹	+ / 1,92
19 kpl kantoja	<i>Streptomyces sp.</i> ²	+ / 1,7–1,96
26 kpl kantoja	ei tunnistustulosta	- / < 1,7

¹ lähin tunnistus lajiin *Kocuria rhizophila*

² lähin tunnistus lajeihin *S. badius*, *S. griseus*, *S. scabiei* tai *S. violaceoruber*

Aloitettussa tyypitystutkimuksessa pyritään luomaan oma spektrikirjasto, johon liitetään suuntaa antavasti tunnistettujen sekä tunnistamatta jääneiden kantojen spektrejä. Jo alustavissa kokeissa on voitu havaita osan kannoista jakautuvan spektreiltään hyvin samankaltaisiin ryhmiin. Ryhmien sisältä valittiin kantoja, joille mitattiin laatutarkasteltu kirjastospektri. Näiden spektrien perusteella osa ryhmän muista kannoista tunnistuisi Brukerin pistearvoluokittelun perusteella ”samaksi lajiksi” eli spektrien välinen pistearvo on ylittänyt 2,3 (Taulukko 1). Näinkin pienen aineiston perusteella voi olettaa, että on löydettävissä rakennusmateriaaleille tyypillisiä aktinomykeettejä, ”tyyppilajeja”.

Aineistosta valittuja ”tyyppilajikantoja” pyrittiin tunnistamaan 16S-rRNA geenisekvensoinnilla siinä täysin onnistumatta. Tämä johtunee ainakin osin siitä, että näitä aktinomykeettejä ei ole löydettävissä myöskään tämän menetelmän referenssi-kokoelmista. Kantojen kuitenkin todettiin kuuluvan sukuihin *Streptomyces*, *Nocardia* ja *Pseudonocardia*. Rakennusperäisten aktinomykeettien MALDI-TOF kirjaston luomiseen tarvittaisiinkin paitsi kattavampi aineisto rakennusmateriaaleista eristettyjä, jo tunnistettuja ja sekvensoituja kantoja.

Osa kannoista kasvoi THG-liuoksessa hyvin heikosti. Vaihtoehtona kokeiltu FAB-liuos nopeutti selvästi kasvua ja FAB-kasvatetuista soluista saatu spektri oli selvä. Rikkaamman ravintoliuoksen mahdollista vaikutusta verrattuna THG-liuokseen ei vielä vertailtu.

YHTEENVETO

MALDI-TOF MS menetelmä on hyvin sovellettavissa asumisterveys tutkimuksiin ja jo nyt menetelmällä voidaan tunnistaa osa rakennusympäristön homeista ja aktinomykeeteistä. Esitutkimuksen perusteella suuri osa rakennusperäisistä aktinomykeeteistä on tunnistettavissa sukutasolle, mutta on huomattava, että aineisto oli eristetty tiettyjä sukuja suosivalla menetelmällä. Menetelmän soveltaminen rutiinianalytiikkaan edellyttää laajaa esityötä soveltuvien referenssietokantojen luomiseksi.

LÄHDELUETTELO

1. Asumisterveysasetuksen soveltamisohje. Valviran ohje 8/2016, osa IV.
2. Pessi, A-M. ja Jalkanen, K. (2018) Laboratorio-opas. Mikrobiologisten asumisterveys tutkimuksien näytteenotto ja analyysimenetelmät. Suomen Ympäristö- ja Terveysalan Kustannus Oy, Pori. 76 s.
3. Gabrio, U. ja muut (2009) Untersuchungen zum Vorkommen und zur gesundheitlichen Relevanz von Bakterien in Innenräumen. Dessau-Roßlau, Umweltbundesamt, 2009. 279 s.
4. Sosiaali- ja terveysministeriö (2009) Asumisterveysopas. Ympäristö ja Terveys -lehti, Pori. 3. korjattu painos. 200 s.
5. Došen, I. ja muut (2017) Potentially harmful secondary metabolites produced by indoor *Chaetomium* species on artificially and naturally contaminated building materials. *Indoor Air* 27:34–46. Doi:10.1111/ina.12290
6. Ballesté, R. (2018) Proteomics: Technology and Applications. Teoksessa: *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*. Elsevier Inc. 2018 Doi:10.1016/B978-0-12-814451-0.00001-0
7. Cassagne, C. ja muut. (2011) Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE* 6(12):e28425 Doi:10.1371/journal.pone.0028425
8. Schulthess B. ja muut (2014) Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for Identification of Gram-Positive Rods: Development of a Diagnostic Algorithm for the Clinical Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 52:1089–1097. Doi: 10.1128/JCM.02399-13
9. Seng, P. ja muut (2009) Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin.Infect.Dis.* 49:543-551 Doi:10.1086/600885
10. Loucif, L. ja muut (2014) Rapid identification of *Streptomyces* isolates by MALDI-TOF MS. *Microbiol.Res.* 169: 940–947. Doi:10.1016/j.micres. 2014.04.004
11. Singhal N. ja muut (2015) MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 6:791. Doi:10.3389/fmicb.2015.00791
12. Perutka, Z. ja Šebela, M. (2018) Basis of Mass Spectrometry: Technical Variants. Teoksessa: *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*. 2018 Elsevier Inc. Doi:10.1016/B978-0-12-814451-0.00002-2
13. Sampedro, A. ja muut. (2018) MALDI-TOF Commercial Platforms for Bacterial Identification. Teoksessa: *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*. 2018 Elsevier Inc. Doi:10.1016/B978-0-12-814451-0.00003-4
14. Standard Operating Procedure Mycobacteria Extraction (MycoEX) Method (2014). Bruker, Revision 3, 4 s.
15. Schulthess, B. ja muut. (2014 b). Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 52, 2797–2803. Doi:10.1128/JCM.00049-14