

Inimese mikrobiota biopank Tartu Ülikoolis

Reet Mändar¹, Hugo Mändar², Tiiu Rööp¹, Marika Mikelsaar¹

Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudi mikrobioloogia osakonnas asub inimese mikrobiota biopank (HUMB). Selle peamine ülesanne on toetada ja edendada inimese mikrobiota alast teadustegevust, eelkõige mikroobitüvede ja mikrobiota näidiste ning nende kohta käiva info kogumise, töötlemise, säilitamise ja kättesaadavaks tegemise kaudu.

AJALOOST

Kollektsioon sai alguse 1994. aastal, kui esimesed paarsada mikrobiotaproovi ja laktobatsillitüve koguti Eesti ja Rootsi laste allergia-uuringu käigus. See uuring ja jätku-uuringud on võimaldanud kindlaks teha mõned olulised trendid – kui 1990ndate algul oli Eesti lastel allergiat oluliselt vähem kui Rootsi lastel ning samal ajal oli nende soole mikrobiota koostis oluliselt rikkalikum, siis 1990ndate lõpuks olid need erinevused taandunud. Seda uuringut koordineeris Eesti poolt professor Marika Mikelsaar, kes pani aluse ka kultuurikollektsioonile.

Samal perioodil lisandusid kollektsiooni ka esimesed oportunistlikud bakteritüved, sh verekilvudest pärinevad *Staphylococcus aureus*, hingamisteedest pärinevad *Acinetobacter baumannii* tüved ning soolest pärinevad *Clostridium difficile* tüved (lisajad Epp Sepp, Siiri Kõljalg ja Paul Naaber oma doktoritööde tegemise käigus). Üle-eestilise ravimiresistentsuse uuringu käigus koguti arvukalt *Escherichia coli* tüvesid, mida oli huvitav võrrelda Nõukogude Liidu kitsa toimespektoriga antibiootikumide kasutamise tingimustes saadud tüvedega.

Samuti hangiti 1990. aastatel teistest kollektsioonidest (sh Saksamaalt, Rootsist, Moskvast, Hollandist) esimesed tüüpkultuurid. Koostöö Tampere ülikooli laboriga võimaldas võrdluskatsete jaoks kollektsiooni saada ka USAs arendatud probiootilise tüve *Lactobacillus rhamnosus* GG. Samal ajal on Tartus M. Mikelsaare kandidaaditöö käigus avastatud *Lactobacillus plantarum* 8-RA-3 leidnud tee Venemaale, kus seda müüakse nn kodumaise probiootikumina.

Järgnevatel aastatel on biopank arvukate Eesti-siseste ja rahvusvaheliste teadusprojektide käigus täienenud tuhandete mikrobiotaproovide ja mikroobitüvedega. Laktobatsillide alamkollektsioon kasvas oluliselt Euroopa Liidu 5., 6. ja 7. raamprogrammi projektide tulemusel, oportunistide alamkollektsioon suurenes aga eelkõige koostöös mitmete kliinikute ning tehnoloogia arenduskeskustega. Kollektsiooni hoogne kasv jätkub.

Esimest korda saadi M. Mikelsaare juhtimisel kollektsioonile riiklik rahastus Haridus- ja Teadusministeeriumi teaduskollektsioonide meetmest aastal 2004.

SÄILIKUD

Mikroobitüvede arv ulatub nüüdseks üle 15 000, need tüved kuuluvad 75 perekonda ja 203 liiki. Võrreldes maailma suurimate kollektsioonidega (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) sisaldab 24 000 tüve, American Type Culture Collection (ATCC) sisaldab 18 000 tüve) on see üsna märkimisväärne hulk.

Kollektsioonis on kaks osa: kasulikud piimhappebakterid (eelkõige laktobatsillid ja bifidobakterid) ning

oportunistlikud bakterid. HUMB kollektsiooni piimhappebakterite hulgast pärinevad mitmed patenteeritud mikroobitüved, sh *Lactobacillus fermentum* ME-3 (1), mis on kasutusel Helluse piimatoodete sarjas, aga ka apteegipreparaadina Reg'Active. Ka Tervisliku Piima Biotehnoloogiate Arenduskeskusele arenduseks üle antud bakteritüvedest on valminud mitmed patenteeritud probiootikumid, sh *Lactobacillus plantarum* Tensia, mille baasil on valminud probiootiline südamejuust Harmony.

Teise osa kollektsioonist moodustavad kliiniliste infektsioonidega seotud oportunistlikud bakterid, mis on kogutud koostöös TÜ Kliinikumi kliinikute ja ühendlaboriga ning mis pärinevad erinevate diagnoosidega patsientide verest, liikvorist ja roojast, samuti suust, tonsillidest, suguteedest jm. Näiteks on kollektsioonis tüvede komplektid, mis pärinevad allergiliste ja mitteallergiliste laste soolest, probiootikumide kliinilistes katsetes osalenute soolest, samuti enneaegsete, tervete ja infektsiooniga vastündinute soolest ja nahalt ning nende emade rinnapiimast. On ka tüved kliiniliste infektsioonidega (sepsis, meningiit, uroinfektsioon, haavainfektsioon, pneumoonia) patsientide erinevatest materjalidest, tervete ja periodontiidiga patsientide sülgest, igemetaskust ja hambajuurekanalist jpm.

Aastas lisandub ligikaudu 500–2000 säilikut, sh tervete ja patoloogiaga vastündinute, imikute, väikelaste, täiskasvanute ja vanurite mikroobikooslused ning mikroobitüved. Kollektsioonis säilitatakse ka ligi 100 referentstüve ehk tüüpkultuuri, mis on hangitud peamiselt DSMZ ja ATCC kollektsioonidest

¹ TÜ bio- ja siirdemeditsiini instituudi mikrobioloogia osakond, ² TÜ füüsika instituut

laborisisesse töö kvaliteedi kontrolliks.

KOLLEKTSIOONI KASUTAMINE

Biopangas käib pidev teadus- ja haldustöö – mikroobitüvede omaduste määramine, mikroobi-koosluste analüüs, andmebaasi täiendamine, säilikutel eluvõimelisuse kontroll ja uuendamine.

Probiootikumide arendus

Oluliseks biopanga tegevussuunaks on probiootikumide arendus. Maailmas on toimunud ulatuslik kasv funktsionaalsete toitude ning probiootiliste toodete arendamisel tervise tugevdamise ja teatud haiguste profülaktika eesmärgil. Sellised tooted vajavad Euroopa Liidu eeskirjadega reguleeritud laboratoorseid ja kliinilisi uuringuid, mis peavad kinnitama nii nende efektiivsust ja kasulikkust kui ka ohutust inimese tervisele (2). Käimas on mitmed arendusprojektid, mille käigus skriinitakse biotehnoloogilisteks rakendusteks laktobatsille ja sobivaid prebiootilisi lisandeid, mida rakendada krooniliste haiguste profülaktikaks. Järgnevalt mõned näited.

Hiljuti lõppes suuremahuline katse *L. fermentum* ME-3 sisaldava probiootilise keefiriga, mis kinnitas oksüdatiivse stressi olulist alane-mist 8nädalase tarvitamise järel. Uudse lähenemisena osalesid katses täiskasvanud, keda oleks võimalik südamehaiguste ennetamiseks ME-3 abil suunatult mõjutada. Samal ajal tehti *in vitro* katseid kompleksse sümbiootilise toote väljatöötamiseks, mille käigus leiti *L. acidophilus*'e liiki kuuluv suure potentsiaaliga probiootiline mikroobitüvi, mis talub hästi ka kooslust ME-3-ga. Testiti sobivaid prebiootikume (rafinoos, fruktoos, riboos, palatinoos, laktuloos) ning nn kandjaid (mandli-, soja-, riisi- ja kooskospium; šokolaad). ME-3 säilis hästi šokolaadis, kuid parimaks osutusid kombinatsioonid kookospiumast, palatinoosist või fruktoosist ning kahest bakterist. Neid tule-

musi saab kasutada uute funktsionaalsete toitude väljatöötamisel. Koostöös firmaga VF Bioscience on välja töötatud uudne tehnoloogia *L. fermentum* ME-3 toidulisandi valmistamiseks (Reg'Activ Essential ME-3®), preparaat jõuab lähiajal apteekidesse. See võimaldab arstidel soovitada kontrollitud toodet, millel on kindel kontsentratsioon.

Koostöös Tervisliku Piima Biotehnoloogiate Arenduskeskusega on leidnud kinnitust, et *L. plantarum* Tensial on jogurtis ja juustus tänu metaboliitidele (lämmastikmooksiid, putrestsiin) vererõhku langetav ja südamehaiguste riski vähendav toime (3). Samas koostöös valminud Tensia ja ksülitooli segu on aga suunatud antibiootikumide tarvitamisest tingitud kõhulahtisuse ärahoidmisele.

Jätkuvad katsed laktobatsillitüvede leidmiseks, mis sobivad kasutamiseks krooniliste nahapõletike korral. Suurem aktiivsus akne tekitaja suhtes on leitud *L. salivarius*'e, *L. ruminis*'e, *L. plantarum*'i, *L. rhamnosus*'e ja *L. paracasei* liiki kuuluvatel tüvedel ning on seotud mitmete bakteriotsiinide ja metaboliitidega.

Oportunistlikud bakterid

Teiseks oluliseks HUMB-l rajanevaks uurimissuunaks on inimesel pärinevate oportunistlike bakterite virulentsusfaktorite, ravimiresistentsuse jt omaduste uurimine, mis võimaldab paremini mõista infektsioonhaiguste patogeneesi, selgitada tekitajate levikut ning välja töötada ravijuhendeid. Järgnevalt taas mõned näited uurimisprojektidest.

Koostöös lähiriikidega on viimastel aastatel sõeluuritud tuhandete *Enterobacteriaceae* kliiniliste tüvede karbapeneemiresistentsust ning vastavaid geene: fenotüübiliselt resistentseteks osutus paar protsenti tüvedest, kuid vastavaid geene leiti kolmandikul (4). ESBL-geene sisaldasid rohkem Venemaa (9,4%) ja Läti (7,7%) *E. coli* tüved ning vähem Eesti, Leedu ja Norra tüved (1,8–2,0%). Ravimiresistent-

suse paremaks mõistmiseks tehti tuhande tüve täisgenoomi sekveneerimine ning koostöös Synlabi laboriga töötati välja molekulaarne multipleksne platvorm sagedasemate resistentusgeenide määramiseks.

Koostöös Tallinna Lastehaigla ja TÜ Kliinikumiga hiljuti tehtud uuringus selgus, et enneaegsete vastsündinute emade rinnapiima koloniseerivad *Staphylococcus epidermidis*'e tüved kannavad virulentsuse ja resistentusega seotud geene sagedamini kui ajaliste vastsündinute emade rinnapiima tüved. Nende geenide sage esinemine intensiivravi osakonnas olevate enneaegsete nahal ja puudumine mittehospitaalseeritud ajaliste vastsündinute nahal leiduvatel *S. epidermidis*'e tüvedel viitab, et virulentsete tüvede allikas on tõenäoliselt intensiivraviosakond (5).

Polüoolide *in vitro* uuringutest (koostöös stomatoloogia kliiniku ja firmaga Cargill) selgus, et nii erütritool kui ka ksülitool pidurdavad oluliselt kariogeensete bakterite kasvu ja biofilmi produktsiooni, mõnevõrra ka hingamisteede ja uroloogiliste infektsioonide tekitajate kasvu. *In vivo* oli suurim mõju sülje mikroobioomile ja kaariese pidurdamisele erütritoolil.

HUMB kollektsiooni kasutades ja/või täiendades on kaitstud üle 40 doktori- ja magistratöö ning valminud üle 300 teaduspublikatsiooni. Tänu biopangale on mikrobioloogia osakond saanud võimaluse osaleda mitmetes Euroopa Liidu projektides. Võrdlus- ja arenduskatseteks on tüvesid üle antud paljudele kodu- ja välismaistele koostööpartneritele.

Kollektsiooni kasutamine teadustegevuse eesmärgil on avalik ja tasuta. Kasutamine toimub Euroopa Kultuurikollektsioonide Organisatsiooni (ECCO), Maailma Kultuurikollektsioonide Föderatsiooni (WFCC), CABRI (Common Access to Biological Resources and Information Service) ja Nagoya protokolliga soovituste kohaselt, mille alusel on välja töötatud

oma eeskirjad, mis on avalikult leitavad kollektsooni kodulehel eesti ja inglise keeles (6). Kollektsooni tüved on kättesaadavad pärast seda, kui materjalide üleandmiseks on sõlmitud leping.

ELEKTROONILISED ANDMEBAASID

HUMB kollektsooni andmebaasi ajakohastamine algas aastal 2010, paralleelselt on arendatud nii sisekasutuses olevat andmebaasi kui ka veebiversiooni. Aasta hiljem valmis esimene veebileht (eesti ja inglise keeles) ning esimene sisuline andmebaas MySQL platvormil, kuhu kanti kõik senised andmestruktuurid.

Aastal 2012 astuti järgmine oluline samm – HUMB eestvõttel valmis Eesti elektrooniline mikroobide andmebaas (EEMB, *Estonian Electronic Microbial dataBase*), mis sisaldas infot nii HUMB kollektsooni kui ka CELMSi kollektsooni (TÜ molekulaar- ja rakubioloogia instituudis asuv *Collection of Environmental and Laboratory Microbial Strains*) kohta. Tervisetehnoloogiarenduskeskuse kollektsoon CREP (*Collection of Reproductive Tract Microorganisms*) liitus aasta hiljem.

EEMB ja sinna kuuluvate baaside kodulehe uus kujundus valmis aastal 2013, kodulehel on kasutatud infotehnoloogilist lahendust, mis

põhineb programmil PHPRunner. See võimaldab kasutada keerulisi otsingufiltreid väljavõtete tegemiseks andmebaasis olevatest andmetest, vormistada väljavõtteid sobivas vormingus ja sisestada senisest oluliselt mugavamalt uusi andmeid kataloogidesse. Baasi uus veebiaadress on <http://eemb.ut.ee>.

HUMB kataloog sisaldab mitmesugust infot säilikute kohta, sh nimi ja number, geograafiline päritolu, isoleerimise allikas ja aeg, fotod, säilituse andmed, päritolu (riik, materjal, doonori andmed), kindlakstegemise meetodid ja tulemused, määratud omadused (biokeemiline profiil, antagonistlikud omadused, bioaktiivsete ainete tootmise võime, kasvukõverad, virulentsusfaktorid, biokile tootmise võime, antibiootikumitundlikkus, tundlikkus keskkonnategurite suhtes, hemolüüsivõime, adhesioonivõime, kloonsus, eostumine jt), tehtud loom- ja kliinilised katsed, publikatsioonid.

Veebipõhiselt on võimalik teha kombineeritud päringuid info leidmiseks. Kollektsooni kataloogi külastati 2017. aastal elektrooniliselt üle 262 000 korra kokku 33 riigist.

OSALEMINE ANDMEVÖRGUSTIKES

HUMB kuulub aastast 2006 Eesti mikrobioloogia rahvuskollekt-

siooni (7). Alates 2010. aastast on ta registreeritud rahvusvahelise kultuurikollektsoonide võrgustiku WDCM (World Data Centre for Microorganisms) juures kui Maailma Kultuurikollektsoonide Föderatsiooni Eesti inimese mikrobiota biopank (WDCM 977) (8). Aastal 2012 liitus kollektsoon Euroopa Kultuurikollektsoonide Organisatsiooniga (9). Aastal 2016 ühines kollektsoon eElurikkusega (10). Samuti on HUMB kollektsooni leitav Eesti Teadusinfosüsteemis (11) ning Eesti elektroonilise mikroobide andmebaasi (EEMB) veebilehel (12).

KIRJANDUS

1. Mikelsaar M, Zilmer M. Lactobacillus fermentum ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb Ecol Health Dis* 2009;21:1–27.
2. Mikelsaar M. Uut probiootikumidest. *Perearst* 2018;2:25–30.
3. Hütt P, Songisepp E, Rätsep M, Mahlapuu R, Kilk K, Mikelsaar M. Impact of probiotic Lactobacillus plantarum TENSIA in different dairy products on anthropometric and blood biochemical indices of healthy adults. *Benef Microbes* 2015;6:233–43.
4. Pavelkovich A, Balode A, Edquist P, et al. Detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae in the Baltic countries and st. Petersburg area. *Bio-med Res Int* 2014. Doi.org/10.1155/2014/548960.
5. Soeorg H. Coagulase-negative staphylococci in gut of preterm neonates and in breast milk of their mothers. (*Dissertationes medicinae Universitatis Tartuensis*). Tartu: University of Tartu Press; 2017. http://eemb.ut.ee/humb_eesti_Guidelines_list.php.
7. <http://www.teaduskogud.org>.
8. <http://www.wfcc.info/ccinfo/>.
9. <https://www.eccosite.org/>.
10. <http://elurikkus.ut.ee/collections.php?lang=est>.
11. <https://www.etis.ee/Portal/Collections/Display/95dcea5b-afd4-4886-af42-43dfa7fcf801>.
12. <http://eemb.ut.ee>.