Videnskabeligt møde i DSKMs arbejdsgruppe for NGS:

**Status for NGS i dansk klinisk mikrobiologi**

Abstracts

**Christian Salgård Jensen, Statens Serum Institut / KMA, Region Sjælland*:******Hegenom-baseret beskrivelse af genera Actinobaculum og Actinotignum viser interessant interspecies beslægtethed***

**Formål**

At anvende Whole Genome Sequencing (WGS) til at karakterisere genera Actinotignum og Actinobaculum.

**Introduktion**

Den taksonomiske inddeling af de to genera Actinobaculum og Actinotignum har været under forandring de seneste tyve år. Inddelingen er for nuværende primært baseret på DNA-DNA hybridisering, 16s rRNA sekvenser samt fænotypiske reaktioner.

**Metode**

Vi brugte 16 bloddyrkningsisolater gemt som enten Actinobaculum eller Actinotignum. Alle Actinobaculum og Actinotignum typestammer blev bestilt hos CCUG. Samtlige stammer blev sekventeret på en MiSeq, evt. kombineret med Nanopore sekventering. Desuden fandt vi 11 WGS sekvenser på NCBI webserveren. I alt er medtaget 31 isolater/sekvenser. Fylogenetiske træer blev lavet med Coregenom analyse, CSI phylogeny og kSNP3. Average Nucleotide Identity (ANI) og GC% blev udregnet og 16s rRNA sekvenserne blev ekstraheret fra WGS sekvenserne og sammenlignet med sekvenser fra typestammerne.

**Resultater**

Coregenom analyse, CSI phylogeny og kSNP3 placerede alle stammer i fire clustre: ”*Actinobaculum massiliense* cluster”, ”*Actinobaculum suis*-cluster”, ”*Actinotignum urinale*-cluster” og ”*Actinotignum schaalii*/*sanguinis* cluster”. Indenfor ”*Actinotignum schaalii*/*sanguinis* cluster” findes flere subclustre. ANI viste at kun få af de medtagne stammer ligner typestammerne for *A. schaalii* og *A. sanguinis* og indenfor ”*Actinotignum schaalii*/*sanguinis* cluster” findes dårlig korrelation mellem 16s rRNA sekvenserne og resultaterne ved brug af de WGS baserede metoder. Ved alle de undersøgte metoder findes stor forskel på *A. urinale* og de resterende species i genus Actinotignum.

**Konklusionen**

* ”*Actinotignum schaalii*/*sanguinis* cluster” indeholder flere subclustre som kunne repræsentere species der endnu ikke er beskrevet. 16s rRNA sekventering er dårlig til at skelne mellem disse clustre.
* *A. urinale* har stor divergens med de andre species i genus Actinotignum og bør måske karakteriseres som et nyt genus.

**Søren Persson, Statens Serum Institut*: National overvågning af C. difficile på SSI – nu og i fremtiden***

*NGS anvendt på C. difficile er involveret i den rutinemæssige overvågning og et udviklingsprojekt baseret på targeted metagenomics.*

*Den rutinemæssig overvågning har siden 2018 været opbygget ved fulgenom-sekvensering (WGS) af renkulturer og har til d.d. produceret over 5000 fuldgenom-sekvenser. Metoden tillader identifikation af toksinprofiler, ST, wg/cgMLST, og resistensgener. WGS-data giver også mulighed for at identificere udbrudskloner, mulige transmissions-events og resistensgener.*

*Targeted metagenomics er under udvikling, da primær diagnostik i stigende grad udføres via PCR, som ikke producerer et isolat til WGS. Derfor vil det i fremtiden være nødvendigt at kunne udføre en form for typning på DNA oprenset direkte fra fæces. Til dette formål er der udviklet et Fluidigm/JUNO assay rettet mod C. difficile MLST- og toksin gener. Her PCR-amplificeres de pågældende loci i multiplex format direkte fra oprenset DNA og præpareres med nødvendige adapterer (barcodes+P5/P7) for efterfølgende Illumina-sekvensering. Metoden er afprøvet på spiket og klinisk fæces og har vist sig anvendelig til formålet, , dog med en detektionsgrænse omkring qPCR Ct-værdi på 30, svarende til at ca. 1/3 af kliniske prøver ikke detekteres. Yderligere tiltag er i gang for at hæve sensitiviteten og udvide antallet af target-gener.*

**Christian Højte Schouw, KMA, Region Sjælland*: Identifikation af bakterier i kliniske prøver med Nanopore sekventering af 16S rRNA PCR produkter*.**

Den fortsat stigende præcision i Nanopore sekventering åbner op for nye anvendelsesmuligheder, som kan være med til at udfase nogle af de mere besværlige og tidskrævende metoder.

Vi har testet anvendelsen af Nanopore’s platform til at sekventere og analysere dele af 16S-genet, i håb om at udvikle en hurtigere og mere sensitiv metode til identificering af bakterier.

Resultaterne er holdt op imod svarene fra afdelingens nuværende metode, som er baseret på Sanger sekventering. I >96% af prøverne finder Nanopore analysen de samme bakterier

som ved Sanger sekventering, og i ~16% af prøverne finder Nanopore analysen flere bakterier end ved Sanger sekventering.

**Henrik Hasman, Statens Serum Institut: *MinION sekventering 2021 (..og frem). Hvor står vi?***

*Teknologien til at foretage helgenomsekventering baseret på long-read teknologien fra Oxford Nanopore Technology (ONT) på bl.a. MinION sekvenatoren har efterhånden været tilgængelig i små 5 år. Fordelen med teknologien har været (og er stadig) at man kan samle genomer og mobile elementer som plasmider til lukkede (ofte cirkulære) molekyler. Udfordringen har især været, at fejlraten pr base har været en del højere end de eksisterende short-read teknologier som f.eks. Illumina sekventering. Over årene er fejlraten fra ONT sekventering stødt faldet, så de to teknologier tilnærmelsesvist nærmer sig hinanden mht præcision; men dette har dog givet udfordringer mht at holde sig opdateret i forhold til nye typer af flowceller og sekventeringskits til ONT systemet. Ydermere har mange laboratorier allerede investeret massivt i Illuminas teknologi (inklusiv robotter til prøveforberedelse og analysepipelines som Bifrost til at håndtere data automatiseret), hvorfor det kan være en udfordring at udvide sekventeringskapaciteten til også at omfatte ONTs teknologi.*

*SSI startede i 2016 med at evaluere ONTs udstyr og har løbende forsøgt at holde det opdateret med de nyeste ændringer både i reagenser, flowceller og efterfølgende analyser. Dette indbefatter at evaluere output i forhold til kvalitet samt at udvikle en ny type SNP-caller kaldet MinTyper til at håndtere både Illumina og ONT sekvenser samt et tilhørende automatiseret software (kaldet MOSS), der er i stand til at kalde relaterede WGS clustre (”udbrud”) i sekvensdata. Det er tanken, at SSI fra starten af 2022 vil begynde at køre udvalgte isolater (CPE) parallelt på både Illumina’s og ONT’s sekventeringssystemer for at evaluere muligheden for at implementere ONT teknologien til en opdateret Fast-Track sekventering af især CPO, men også andre kritiske patogener som VTEC og udvalgte fødevarebårne patogener.*

**Søren Overballe-Petersen, Statens Serum Institut*:* a) *Fuld-længde 16S amplikon ”mikrobiom” nanopore sekventering til klinisk diagnostik,* b) *Erfaringer med direkte klinisk diagnostik vha. nanopore sekvensering***

***a) Full-length 16S amplicon ‘microbiome’ nanopore sequencing for clinical diagnostics***

*We are validating and improving the ‘16S Barcoding Kit 1-24 (SQK-16S024)’ from Oxford Nanopore*

*Technologies. Our goal is within half a year to implement a ‘fast-track microbiome’ analysis for*

*patient samples with bacterial growth, where there should not be bacteria in a healthy person,*

*e.g. spinal or synovial fluid. Our initial long-read validation performed well, with higher resolution*

*than V3-V4 region short-read sequencing. However, we uncovered a serious and undescribed*

*problem with detecting a handful of gram-positives, including mycobacteria and several*

*opportunistic pathogens. They all belong to the actinobacteria, which are infamous for the very*

*high GC content in their genomes. We have tracked down the problem to strong secondary*

*structures in the full-length amplicons and we are testing a solution that should solve the issue.*

***b) Erfaringer med direkte klinisk diagnostik vha. nanopore sekvensering***

*Vi har kørt et nu afsluttet pilotprojekt med direkte klinisk diagnostik på spinalvæsker vha.*

*nanopore sekvensering med henblik på at diagnosticere og potentielt type meningitis infektioner.*

*Først testede vi dybdesekvensering af prøverne, hvor vi oprensede alt DNA og sekvenserede med*

*det samme. Det viste sig hurtigt at være urentabelt, da højst 1 ud af 10.000 reads var noget andet*

*end humant. Derfor tog vi kontakt til et engelsk laboratorie, som hjalp os med at indkøre en*

*protokol, hvor vi enzymatisk reducerer mængden af humant DNA, inden vi sekvenserer prøverne.*

*Denne metode virker efter hensigten i laboratoriet, men desværre kun når prøvematerialet er*

*udtaget fra patienten inden opstart af antibiotika-behandling. Netop ved mistanke om en*

*meningitis infektion, så begynder man antibiotika-behandling med det samme og tager prøver*

*bagefter... Metoden kan dog være interessant til andre typer prøver, for eksempel cystisk fibrose,*

*som englænderne arbejder med, eller tuberkulose.*

**Jannik Fonager, Anders Formsgaard og Morten Rasmussen*: Anvendelse af Sars-CoV-2 helgenomsekventering under pandemien***

***Virus Forskning og Udvikling (ViFU), Virus og Mikrobiologisk specialdiagnostik, Statens Serum Institut.***

***Introduktion:*** *Da Sars-CoV-2 pandemien opstod i 2020, blev der i mange lande hurtigt udviklet og implementeret diagnostiske metoder, og i flere lande blev dette også fulgt op af helgenomsekventering (WGS). Danmark var et af de lande, der hurtigst implementerede WGS på nanopore platformen i regi af Danish COVID-19 consortium, som også indbefattede opbygning af lokal kapacitet på flere af landets hospitaler til WGS. WGS har i løbet af pandemien vist sig at være et essentielt værktøj til bl.a. at overvåge varianter, afdække zoonotisk smitte mellem mink og mennesker, samt til at informere om genomiske ændringer, der kan påvirke effektiviteten af diagnostiske metoder. I denne præsentation vil udvalgte nedslagspunkter omkring anvendelsen af WGS blive gennemgået.*

***Resultater:***

1. ***En kort historisk oversigt over udviklingen og implementeringen af WGS på SSI/Aalborg Universitet.***
2. ***Udfordringer undervejs –mulige læringspunkter til fremtiden.***
3. ***Sars-CoV-2 genomet og de forskellige typningssystemer.***
4. ***WGS rolle i opdagelsen af minkvarianternes opståen og spredning.***
5. ***WGS rolle i overvågningen af bekymringsvarianter (alfa, delta etc.).***
6. ***Molekylærepidemiologisk anvendelse af WGS i samarbejde med SSI´s epidemiologer til f.eks. udbrudsundersøgelser.***
7. ***WGS bidrag til udvikling og vedligeholdelse af Sars-CoV-2 diagnostiske værktøjer.***

***Konklusion:*** *WGS har vist sig at være et yderst vigtigt værktøj under Sars-CoV-2 pandemien, og de erfaringer der er gjort bør indtænkes både i forhold til overvågningen af eksisterende vira og i planlægningen af det fremtidige beredskab lokalt og nationalt.*

***Acknowledgement***

*Mads Albertsen, Aalborg Universitet*

*Danish Covid-19 genome consortium*

**Lasse Dam Rasmussen:  *NGS (Nanopore) bestemmelse af Sars-CoV-2 varianter i spildevand*.** Abstract mangler

**Kristian Schønning og Helle Krogh Johansen, Rigshospitalet: Genomsekventering: fra forskning til klinik anvendelse**

*Afdeling for Klinisk Mikrobiologi, Henrik Harpestrengs Vej 4A, Rigshospitalet, København*

*På klinisk mikrobiologisk afdeling (KMA) på Rigshospitalet (RH) indførte vi fuld genomsekventering (WGS) i slutningen af 2016 i samarbejde med Genomisk Medicin og en dedikeret bioinformatiker med særlig mikrobiologisk interesse. Dette gjorde vi på baggrund af et forskningsprojekt1, hvor vi havde sekventeret ca. 475 kliniske Pseudomonas aeruginosa isolater indsamlet longitudinalt fra 40 cystisk fibrose (CF) patienter over en 10-årig periode. Forskningen viste at over halvdelen af alle CF-patienter er inficeret med den samme klontype i flere år til trods for adækvat og intensiv antibiotikabehandling. Desuden så vi, at hvis en klontype allerede har været i lungerne hos én CF-patient er den adapteret og har endnu større chancer for at overleve i lungerne hos andre CF-patienter ved en eventuel transmission. Med indførsel af WGS fik vi også mulighed for at afsløre transmission af særligt adapterede kloner mellem patienterne hvilket fik CF-afdelingen til at introducere enestue i forbindelse med hospitalsindlæggelse, ingen kontakt mellem indlagte CF-patienter, intensiv rengøring og mere fokuseret antibiotikaterapi.*

*WGS har kørt rutinemæssigt i 5 år på KMA på RH og anvendes i tiltagende omfang til at belyse den genetiske baggrund for usædvanlige fænotyper f.eks. bakterie isolater med uventet resistensmønsker. Desuden sekventeres alle Achromobacter isolater da MALDI-biblioteket ikke yder korrekt species identifikation.*

*CMV-infektioner kan hos transplanterede patienter være årsag til alvorlige infektioner. Derfor gives ofte antiviral profylakse. Gennembrud af CMV under profylakse eller manglende effekt af antiviral behandling af CMV opstået efter ophør af profylakse kan skyldes viral resistens. KMA RH er ved at udvikle et genotypisk resistensassay der bygger på den teknologi, der har vundet indpas til rutinemæssig sekventering af SARS-CoV-2. Dette muliggør i princippet samtidig sekventering af flere genetiske regioner, således at der i én analyse opnås information om resistens mod samtlige i klinikken anvendte CMV-aktive antivirale medikamina.*

*1 Marvig RL, Sommer LM, Molin S, Johansen HK. Convergent evolution and adaptation of Pseudomonas aeruginosa within patients with cystic fibrosis. Nat Genet. 2015 Jan;47(1):57-64. doi: 10.1038/ng.3148. Epub 2014 Nov 17. PMID: 25401299*

**Michael Kemp, KMA Region Sjælland / Syddansk Universitet: *Genomisk epidemiologi af bakterier, der giver samfunds- og hospitalserhvervede infektioner, analyseret med enkle værktøjer.***

*Forebyggelse og standsning af udbrud af bakterielle infektioner kræver effektiv karakterisering af de egens. På nuværende tidspunkt opnås den bedste karakterisering ved Whole Genome Sequencing (WGS) og efterfølgende typning, antibiotikaresistens- og virulensgenprofilering og plasmididentifikation. I en årrække har vi benttet WGS til overvågning og udbrudsdetektion på subnationalt niveau. På grund af manglen på bioinformatisk ekspertise blev brugervenlige løsninger brugt til at analysere genomdata. Her præsenterer vi opdagelser og udbrudshåndtering baseret på WGS. Vi præsenterer også brugen af ​​WGS til forbedrede metoder til infektionskontrol. Afslutningsvis diskuteres integrering af nye løsninger inden for overvågning, herunder invitationer til deltagelse i projektforslag*Afslutningsvis diskuteres integration nye løsninger inden for overvågning, herunder invitationer til deltagelse i projektforslag.

Finally, integration discusses new solutions within monitoring, including invitations to participate in project proposals.

Afslutningsvis drøftes integration nye løsninger inden for overvågning, herunder invitationer til deltagelse i projektforslag.

Finally, integration discusses new solutions within monitoring, including invitations to participate in project proposals.

Can't load full results

Try again

Retrying...

Retrying...