

SEKVENCIRANJE NASLEDNJE GENERACIJE (NGS): TESTIRANJE VZORCEV BLATA PRAŠIČEV Z DRISKO

Urška Kuhar*, Darja Kušar, Bojan Papić, Ivan Toplak

Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija

urska.kuhar@vf.uni-lj.si

Tehnologije sekvenciranja naslednje generacije (NGS) predstavljajo velik preboj v diagnostiki kužnih bolezni, saj omogočajo dokazovanje in tipizacijo znanih patogenih mikroorganizmov, dokaz novih patogenov, hkratni dokaz več patogenov v vzorcu, določanje celih genomov in metagenomske raziskave. Namen naše raziskave je bil ugotoviti vrednost NGS pri odkrivanju patogenov v kliničnih vzorcih, in sicer v vzorcih blata prašičev z drisko. Analizirali smo štiri vzorce blata obolelih prašičev s kliničnimi znaki hude driske. Iz suspenzij blata prašičev smo izolirali celokupne nukleinske kisline in jih uporabili za pripravo knjižnic NGS ter jih sekvencirali s tehnologijo Ion Torrent. Skupno smo 396.486 odčitkov, dolgih v povprečju 129 nukleotidov, umestili v 1.537 sošesk. 786 sošeskam smo pripisali njihovo taksonomijo na nivoju vrste ali rodu, medtem ko 751 sošeskam nismo uspeli pripisati taksonomije. V vseh štirih preiskovanih vzorcih smo potrdili prisotnost virusa prašičje epidemične diareje (PED). V dveh vzorcih smo ugotovili tudi prisotnost virusa iz rodu *Picobirnavirus* in prašičjega astrovirusa. V enem vzorcu je bil prisoten tudi virus iz rodu *Torovirus*. Poleg virusnih nukleotidnih zaporedij smo v vzorcih ugotovili tudi prisotnost bakterijskih zaporedij, zaporedij arhej, nematodov, protistov in ameb. Naši rezultati potrjujejo, da je NGS močno orodje za diagnostiko povzročiteljev kužnih bolezni, ki omogoča hkratno detekcijo več patogenov v kompleksnih vzorcih.

Ključne besede: sekvenciranje naslednje generacije (NGS); klinični vzorci; diagnostika; naključno sekvenciranje

Uvod

Trenutno sta molekularna testa, kot sta RT-PCR in RT-PCR v realnem času, najpogostejše uporabljena testa v diagnostiki virusnih okužb. Molekularni testi so hitri, relativno poceni, visoko specifični in bolj občutljivi kot klasična metoda izolacije virusa v celični kulturi. Nedavno razvite tehnologije sekvenciranja naslednje generacije (NGS) predstavljajo velik preboj v veterinarski in humani diagnostiki kužnih bolezni. NGS med drugim omogoča dokazovanje in tipizacijo znanih patogenov, hkratni dokaz več patogenov v vzorcu, določanje zaporedja nukleotidov celotnih genomov in metagenomske raziskave. Pri naključnem sekvenciranju (angl. *shotgun sequencing*) gre za sekvenciranje vseh prisotnih nukleinskih kislin v vzorcu. Omenjen pristop nam omogoča določitev zaporedja genoma oz. odsekov genoma mikroorganizmov v kliničnih vzorcih neodvisno od predhodnega poznavanja njihove identitete oz. sestave mikrobne združbe v vzorcu. Za razliko od obstoječih metod pri NGS nismo omejeni s številom tarčnih patogenov, ki jih lahko vključimo v test. Prav tako pri metodi NGS nismo omejeni s poznavanjem raznolikosti tarčnih zaporedij, zato je ta metoda zelo uspešna tudi pri dokazovanju novih patogenov (1, 2). Namen naše raziskave je

bil ugotoviti uporabno vrednost NGS pri odkrivanju patogenov v kliničnih vzorcih, in sicer v vzorcih blata prašičev z drisko.

Material in metode

Analizirali smo štiri vzorce blata obolelih prašičev s kliničnimi znaki hude driske, ki smo jih odvzeli iz rej pitancev, kjer je veterinar na podlagi klinične slike postavil sum na okužbo z virusom prašičje epidemične diareje (PED). Z metodo RT-PCR v realnem času (Virotype PEDV/TGEV, Qiagen, Nemčija) smo v teh vzorcih dokazali prisotnost nukleinske kisline virusa PED. Iz vzorcev blata smo pripravili suspenzijo v gojišču RPMI in izolirali nukleinske kisline s kompletom QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Nemčija). Knjižnice RNA smo pripravili s kompletom Ion Total RNA Sequencing Kit v2. Za emulzijski PCR in obogatitev knjižnic smo uporabili komplet Ion PGM™ Template OT2 200. Koncentracijo in kvaliteto knjižnic NGS smo določali s kapilarno elektroforezo LabChip GX (Perkin Elmer, ZDA). Tako pripravljene knjižnice smo sekvencirali s tehnologijo Ion Torrent na platformi Ion PGM (Thermo Fisher Scientific, ZDA). Odčitke smo sestavili v daljša zaporedja (soseske) s programom AssemblerSPAdes (3). S programom BLASTN smo nukleotidna zaporedja primerjali z zaporedji v podatkovni zbirki NCBI GenBank. S programom MEGAN5 (4) smo soseskam pripisali njihovo taksonomijo na podlagi taksonomske uvrstitve njim najbolj podobnim zaporedjem.

Rezultati

Skupno smo 396.486 odčitkov, dolgih v povprečju 129 nukleotidov, sestavili v 1.537 sosesk. S programom MEGAN5 smo 786 (51,1 %) soseskam pripisali njihovo taksonomijo na nivoju vrste ali rodu, medtem ko 751 (48,9 %) soseskam nismo uspeli pripisati taksonomije. Rezultati so prikazani v Preglednici 1. V vzorcu 1 smo ugotovili prisotnost virusa PED in virusa, ki spada v rod *Picobirnavirus*. Preostale soseske so se uvrščale v 24 bakterijskih rodov. Prisotnost virusa PED smo ugotovili tudi v vzorcu 2. Poleg virusa PED so bili v omenjenem vzorcu prisotni tudi prašičji astrovirusi ter virusi iz rodov *Torovirus* in *Picobirnavirus*. Soseske, ki so se grupirale z bakterijskimi zaporedji, so se uvrščale v 18 različnih bakterijskih rodov. Manjše število sosesk se je grupiralo z zaporedji gliv, arhej, protistov, ameb in nematodov. V vzorcu 3 smo prav tako ugotovili prisotnost virusa PED, prašičjega astrovirusa in virusa iz rodu *Picobirnavirus*. Soseske, ki so se grupirale z bakterijskimi zaporedji, so se uvrščale v 38 različnih bakterijskih rodov. Poleg tega se je manjše število sosesk grupiralo z zaporedji arhej, nematodov, protistov in ameb. V vzorcu 4 smo ugotovili prisotnost samo enega virusa, in sicer virusa PED. Zaporedja, ki so se grupirala z bakterijskimi zaporedji, so se uvrščala v 72 različnih bakterijskih rodov. Nekatere soseske so se grupirale tudi z zaporedji arhej, protozojev in nematodov.

Razprava

V vseh štirih preiskovanih vzorcih, v katerih smo predhodno potrdili prisotnost virusa PED z metodo RT-PCR v realnem času, smo prisotnost virusa PED ugotovili tudi z metodo NGS. Rezultati potrjujejo, da lahko z novo tehnologijo NGS ugotovimo prisotnost patogenih mikroorganizmov tudi v tako kompleksnih vzorcih, kot je blato. Veliko število komenzalnih oziroma netarčnih mikroorganizmov v blatu ni onemogočalo detekcije patogenih mikroorganizmov, in sicer virusa PED. Poleg virusa PED smo ugotovili tudi

Preglednica 1: Rezultati in analiza odčitkov iz štirih vzorcev blata prašičev, sekvenciranih z NGS

	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Skupaj
število odčitkov	108.188	66.194	83.567	138.537	396.486
povprečna dolžina odčitkov	120 bp	113 bp	124 bp	162 bp	129 bp
število sosesk	343	150	277	767	1.537
število sosesk s pripisano taksonomijo	219 (63,8 %)	67 (44,7 %)	140 (50,5 %)	360 (46,9 %)	786 (51,1 %)
število sosesk, ki jim nismo uspeli pripisati taksonomije	124 (36,2 %)	83 (55,3 %)	137 (49,5 %)	407 (53,1 %)	751 (48,9 %)

prisotnost virusov iz rodov *Torovirus* in *Picobirnavirus* ter prašičji astrovirus. Veliko število zaporedij nismo uspeli taksonomsko uvrstiti, kar kaže na veliko in še zelo slabo poznano raznolikost mikrobne združbe v blatu prašičev. Medtem ko smo pri molekularnih metodah, ki temeljijo na dokazovanju oziroma analizi zaporedij tarčnih odsekov genoma omejeni z raznolikostjo in nepoznavanjem tarčnega odseka, nam NGS omogoča tudi dokazovanje novih patogenov s še nepoznanim zaporedjem nukleotidov v genomu. Zaključimo lahko, da je NGS močno orodje, ki veliko obeta in bo v prihodnje pomembna tehnološka rešitev pri dokazu povzročiteljev kužnih bolezni in bo omogočila tudi hkratno dokazovanje večjega števila patogenov v kompleksnih vzorcih.

Reference

1. Thorburn F, Bennett S, Modha S, et al. The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of respiratory infections. *J Clin Virol* 2015; 69: 96-100.
2. Radford AD, Chapman D, Dixon L, et al. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol* 2012; 93(9): 1853-68.
3. Nurk S, Bankevich A, Antipov D, et al. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J Comput Biol* 2013; 20(10): 714-37.
4. Huson DH, Mitra S, Ruscheweyh HJ, et al. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Res* 2011; 21(9): 1552-60

Next generation sequencing (NGS): testing of feces samples from pigs with diarrhea

Next-generation sequencing (NGS) technologies are a major breakthrough in the field of infectious disease diagnostics as they allow novel pathogen detection without prior sequence knowledge and enable simultaneous detection of multiple pathogens, whole genome studies and metagenome studies. The aim of this study was to determine the value of NGS in the detection of pathogens in clinical samples, namely diarrheic pig fecal samples. Fecal samples from four pigs with severe diarrhea were analyzed. NGS libraries were prepared from sample suspensions and used for Ion Torrent sequencing. Altogether, 396.486 reads were assembled into 1.537 contigs. Taxonomy units were assigned to 786 contigs, while 751 contigs remained unassigned. All four samples were positive for porcine epidemic diarrhea virus

(PED). In two samples, viruses from the genus *Picobirnavirus* and porcine astrovirus were also detected, while one sample was positive for the virus from genus *Torovirus*. In addition to viral sequences, sequences from bacteria, archaea, nematodes, Protista and amoebae were also detected in investigated samples. Based on these results, we can conclude that the NGS technology is a powerful tool for infectious disease diagnostics which enables us simultaneous detection of multiple pathogens in complex samples.

Key words: next generation sequencing; NGS; clinical samples; diagnostics