

16S sekvensering med NGS

Lina Guerra¹, Martin Vondracek¹, Reza Advani², Erik Alm², Mattias Mild²

¹Klinisk Mikrobiologi, Karolinska Universitetssjukhuset, Stockholm. ²Avdelningen för Mikrobiologi, Folkhälsomyndigheten, Solna.

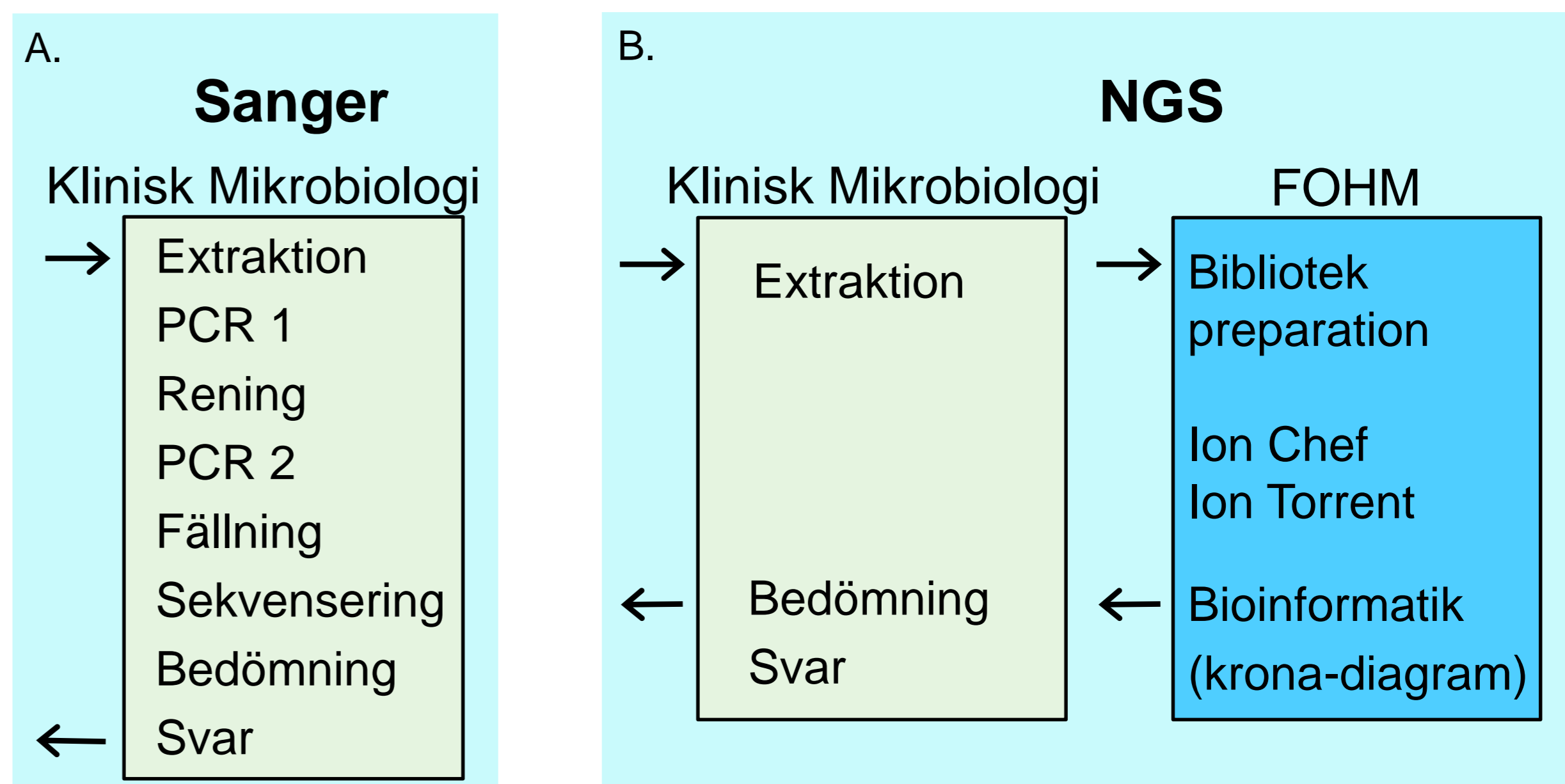
Introduktion

16S rDNA-sekvensering är en tids- och resurskrävande metod som utförs på Klinisk Mikrobiologi, Karolinska Universitetssjukhuset i Solna för att bestämma vilken eller vilka bakterier som finns i ett kliniskt prov eller isolat. Idag utförs 16S-analysen med Sangersekvensering vilket begränsar metoden till att hitta 1-3 dominerade patogener. Syftet med projektet var att jämföra Sangersekvensering med Next Generation Sequencing (NGS) -amplikonbaserad 16S-sekvensering som utförs på Folkhälsomyndigheten (FOHM).

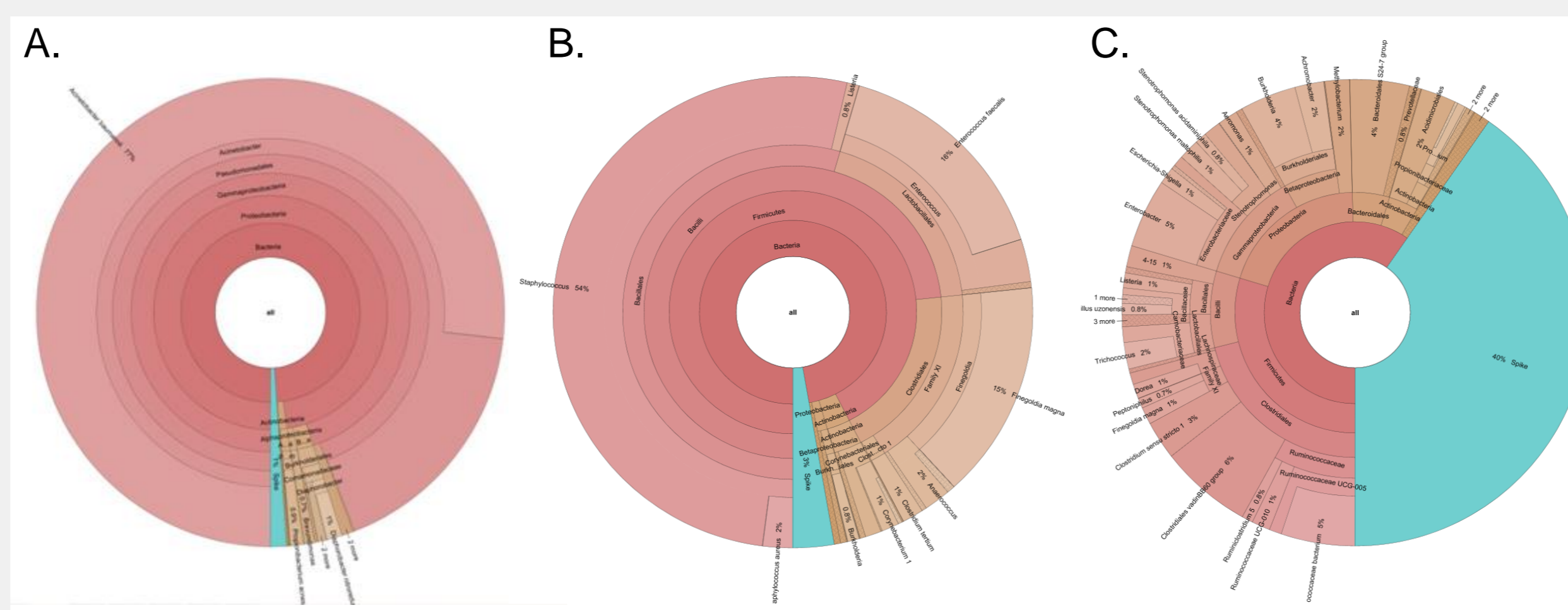
Utförande

I ett samarbetsprojekt mellan Klinisk Mikrobiologi och FOHM parallelltestades 202 kliniska prov eller isolat, med Sangerbaserad 16S-sekvensering och Ion Torrenbaserad NGS- amplikonbaserad 16S-sekvensering. Proverna inkom till Klinisk Mikrobiologi där DNA extraherats med MagNa Pure 96-systemet (Roche). Därefter delades proverna. En del skickades till FOHM för NGS-analys och den andra analyserades med Sangerbaserad rutindiagnostik.

Data från NGS-analysen genomgick bioinformatisk analys och presenterades i ett format kallat "krona"-diagram där varje prov representeras av en tårta och fynden delas in i tårtbitar. Varje tårtbit delas in systematisk efter stam, klass, ordning, familj ect. Resultaten skickades därefter tillbaka till Klinisk Mikrobiologi där fynden värderades och jämfördes med rutinanalysen.



Figur 1. A) Flödet över Sanger-16s-sekvensering på Mikrobiologen. B) Flödet över samarbetsprojektet mellan Mikrobiologen och FOHM. Flödena tar cirka 2.5 dagar.



Figur 2. Bioinformatisk analys av tre prover med kronadiagram. A) Krona över ett positivt klinisk prov för en patogen (*Acinetobacter baumannii*). B) Krona över ett positivt klinisk prov för tre olika patogener (*Staphylococcus sp.*, *Enterococcus faecalis* och *Finegoldia magna*). C) Krona över ett negativt klinisk prov.

Resultat

Resultaten visar övergripande god överensstämmelse mellan NGS-teknik och Sangersekvensering. I flera fall (7 prov) hittas flera fynd med NGS-teknik där Sangersekvensering endast hittar ett fynd. Därutöver hittas flera fynd från negativa Sangersekvenseringar med NGS-teknik (18 prov från 12 olika patienter).

Tabell 1. Jämförelse mellan NGS och Sanger-tekniken. Totalt 202 kliniska prover.

Ytterligare fynd utöver Sanger	NGS		Sanger	
	+	-	+	-
+	75 (7)	3		
-	18 (12)	107		

Antal patienter

Slutsats

Sammantaget visar resultaten att NGS-sekvensering ger en högre kapacitet, effektivare flöde och bättre kvalitet jämfört med rutinbaserad Sangersekvensering. Att byta Sangersekvensering till NGS-sekvensering skulle i det aktuella flödet generera dubbla kapaciteten, frigöra personal till övriga analyser och öka antalet positiva fynd.