

TIIVISTELMÄRAPORTTI

”VIROMIDIAGNOSTIIKKA KENTTÄOLOSUHTEISSA: UUDET JA UHKAAVAT MIKROBITARTUNNAT”

Olli Vapalahti (olli.vapalahti@helsinki.fi, tutkimuksen johtaja), Tarja Sironen, Eili Huhtamo, Hussein Alburkat, Hanna Vauhkonen, Teemu Smura

Zoonosivirologian tutkimusyksikkö

Helsinki One Health verkosto, Helsingin yliopisto
Lääketieteellinen ja Eläinlääketieteellinen tdk

Tiivistelmä

Tämän projektin tavoitteena oli tutkia, soveltuuko kannettava uuden sukupolven syväsekvensointitekniikan MinION-laite uhkaavien mikrobin detektioon kenttäolosuhteissa. Syväsekvensoinnilla on mahdollista tunnistaa kaikki infektoivien agenssien genomit yhtäaikaaisesti, mikä olisi nopeampi ja joustavampi vaihtoehto nykykäytännön monille yksittäisille testeille. Olemme laboratoriossamme aiemmin selvittäneet tällä tekniikalla eri organismien sisältämiä virusgenomeja (viromeja) Illuminan MiSeq-syväsekvensointilaitteella ja olemme löytäneet kehittämäämme bioinformatiikka-algoritmia käyttäen jopa aiemmin tuntemattomia viruksia. Tässä projektissa selvitimme MinION-laitteiston kykyä suorittaa vastaavanlainen hypoteesivapaa viromianalyysi. MinION-laitteiston sekvensointitekniikka perustuu DNA-juosteen kuljettamiseen nanoaukkojen läpi ja tämän aiheuttamien jännitemuutosten mittaamiseen. Tekniikka poikkeaa siten perinteisestä DNA juosteen synteesiin perustuvista sekvensointitekniikoista ja on huomattavasti DNA-synteesiin perustuvia tekniikoita nopeampi. Tämä mahdollistaa reaaliaikaisen tulosten analysoinnin ja mahdollisen uhkaavan agenssin tunnistamisen nopeasti. MinIONin etuina on myös laitteen pieni koko ja helppokäyttöisyys ja sitä on aikaisemmin käytetty muun muassa ebolavirusepidemian seurannassa. Analysoimme näytteitä sekä täysin hypoteesivapaasti, eli näytteen kaikki virukset (ns. viromin) tunnistuen, että osittaiseen ennakkoletukseen perustuen, eli määritimme lajispesifisellä polymeerasiketjureaktiolla (PCR) rikastetun viruslajin kannan ja sen koko genomien sekvenssin. Tutkimuksen tuloksena oli, että hypoteesivapaassa viromitunnistuksessa MinION ei tällä hetkellä yllä laadullisesti Illuminan MiSeq-syväsekvensointilaitteen tasolle vaan vaatii huomattavaa panostusta sekä laboratorio-, että bioinformatiikkamenetelmien kehittämiseksi. Näytteen laboratorioprosessi oli työläs ja monivaiheinen kenttälaboratoriota ajatellen. Nopeutensa ja reaaliaikaisuutensa ansiosta laitteisto kuitenkin sopii erinomaisesti ennakkoletuksen mukaan rikastetun virusvariantin määrittämiseen.

Postiosoite
Postadress
Postal Address
MATINE/Puolustusministeriö
PL 31
FI-00131 Helsinki
Finland

Käyntiosoite
Besöksadress
Office
Eteläinen Makasiinikatu 8 A
00130 Helsinki
Finland

Puhelin
Telefon
Telephone
Vaihe 295 160 01

s-posti, internet
e-post, internet
e-mail, internet
matine@defmin.fi
www.defmin.fi/matine

1. Johdanto

Viime vuosien aikana on ilmaantunut tihenevästi mm. ympäristömuutosten ja globalisaation seurauksena uusia infektiouhkia, jotka ovat alun perin zoonoottisia - eläimistä ihmisiin tarttuvia. Osa näistä uusista ja uhkaavista mikrobeista muodostaa myös tarpeen bioriskien hallintaan ja bioturvaamisen. Näihin agensseihin lukeutuu potentiaalisia bioaseita, ja toisaalta myös teknologiat taudinaiheuttajien edelleen muokkaamiseen ovat tulleet helpommin saavutettaviksi. Muuttuvassa toimintaympäristössä tarvitaan tehokkaita keinoja havaita ja kuvata nopeasti paitsi tunnettuja, myös aiemmin tunnistamattomia agensseja; näitä keinoja tarjoavat nyt uudet syväsekvensointimenetelmät (NGS, next generation sequencing) ja näihin liittyvät bioinformatiikkamenetelmät.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on kehittää edelleen nopeaa laboratoriodiagnostiikkaa maassamme "uusien" infektiouhkien ja mahdollisten bioaseina käytettävien virusten varalle. Virusten nukleiinihapon osoittamiseksi potilasnäytteistä ja mahdollisista muista näytteistä (ympäristönäytteet) on tähän mennessä käytetty pääasiassa spesifejä ja sensitiivisiä reaaliaikaiseen polymeerasiketjureaktioon (PCR) tai antigeenitunnistukseen perustuvia menetelmiä. Koska nämä testit perustuvat tunnetun nukleiinihapon tai antigeenin osoittamiseen, niitä voidaan käyttää vain tunnetuille viruksille. Lajin- ja kannanmäärittystä varten pitää jokaiselle lajille/kannalle olla oma spesifinen testinsä, joka ei ristireagoi muiden kanssa. Näiden menetelmien hyviä ominaisuuksia ovat tarkkuus, herkkyys ja osin edullinen hinta. Huonona ominaisuutena on se, että voidaan löytää vain sitä, mitä etsitään, tai mitä ylipäätään osataan epäillä. Nykyaikaiset mikrobiperimään keskittyneet NGS-menetelmät ovat lajintunnistuksessa osoittautuneet ylivoimaisiksi verrattuna aikaisemmin käytössä oleviin menetelmiin.

Tutkimusryhmämme käytössä on seitsemän vuoden ajan ollut NGS-teknologiaa hyödyntävä Illuminan MiSeq-laitteisto. Olemme onnistuneesti luoneet laboratoriosesseja, joiden avulla pystymme periaatteessa mistä tahansa näytteestä määrittämään kaikki näytteen sisältämät virukset (eli niin kutsutun viromin) hypoteesivapaasti eli ilman ennako-oletuksia. Olemme kehittäneet tehokkaan "Lazypipe" analyysialgoritmin tämän kaltaisen metagenomisekvenssidatan kokoamiseen, taksonomiseen luokitteluun ja kvantitaatioon sekä sekvenssitiedon lajitteluun. Lazypipe pystyy tunnistamaan myös aikaisemmin tuntemattomia viruksia – suuri osa maailman viruksista on edelleen tunnistamatta – joskin ihmisen perinteiset virukset pääosin luultavasti jo tunnetaan. Huomatakoon myös, että viromitutkimuksen lopputuloksena ei ole ainoastaan viruksen detektio, vaan myös tyyppillisesti sen koko genomien karakterisaatio, mikä mahdollistaa myös viruksen alkuperän tunnistamisen, mahdollisen muokkauksen ja in silico- sekä in vitro-analyysit sen patogeenisyydestä.

Tämän tyyppiselle viromianalyysille tulee olemaan kysyntää akateemisen tutkimuksen lisäksi myös kliinisessä diagnostiikassa ja ympäristölaboratorioissa laboratoriotekniikoiden ja algoritmien parantuessa sekä hinnan halventuessa. Toistaiseksi tällaista diagnostiikkapalvelua ei ole, sillä tämänhetkisten NGS-menetelmien herkkyys, nopeus ja hinta eivät yllä spesifien nukleiinihappotestien tasolle. Lisäksi koska virusgenomia (yksi- tai kaksijuosteinen RNA tai DNA) on näyttemateriaalin kaikista nukleiinihapoista vain murtoosa, yksi haasteistamme on kehittää kullekin näytetyypille sopiva virusgenomien rikastusmenetelmä. Sekvenssitiedon bioinformaattisen analyysien automatisointi, nopeutta-

minen ja kehittäminen helppokäyttöisemmäksi ovat myös diagnostiikan kannalta keskeisiä.

Viime vuosikymmenellä on markkinoille tullut uudenlaiseen sekvensointiteknologiaan perustuva Oxford Nanopore Technologies MinION-laite, joka on tällä hetkellä ainoa kaupallinen kannettava reaaliaikainen sekvensointilaitte. Laite painaa alle 100 grammaa. Sekvensoinnin lähtömateriaalina voidaan käyttää sekä RNA:ta, että DNA:ta ja laitevalmistajalla on myynnissä eri lähtömateriaaleihin ja tarkoituksiin soveltuvia sekvensointi-reagenssipakkauksia. MinION-teknologia eroaa tämänhetkisistä (joita edustaa esimerkiksi Illumina MiSeq) synteisiin perustuvista sekvensointimenetelmistä siten, että detektio perustuu nukleiinihappoketjun rakenteen aiheuttamaan sähkövirran muutokseen, eikä spesifin emäksen entsyymaattiseen liittämiseen synteisireaktiossa. Tämän takia sekvenssiä voidaan lukea samanaikaisesti kuin sähkövirran muutokset havaitaan, ja siten myös tulosten käsittely on mahdollista toteuttaa reaaliajassa. Pienin MinION-laite tarvitsee käyttöä varten tehokkaan kannettavan tietokoneen, joka verkkoon kytkettynä kykenee analysoimaan sekvenssiä sitä mukaan, kun sitä syntyy.

2. Tutkimuksen tavoite ja suunnitelma

Hankkeessa keskityttiin NGS-sekvensointiin perustuvaan metodiikan kehittämiseen tähtäimessä uusien ja uhkaavien mikrobien havaitseminen ja karakterisoiminen. Tavoitteena oli tutkia liikuteltavan sekvensointilaitteen (Oxford Nanopore Technologies MinION) ja virominäytteiden käsittelyyn liittyvien laboratorioprosessien soveltuvuutta kenttäolosuhteisiin.

Tavoitteena oli mahdollistaa NGS:aan perustuva, paikasta riippumaton uhkaavien mikrobien detektio menetelmä vaihtoehtona monille yksittäisille testeille. Projektin alkaessa (2020) hankittiin MinION laite, jonka käyttöä oli tarkoitus testata ensin Helsingin yliopistossa rinnakkain Illumina MiSeq-laitteiston kanssa kontrollinäytteiden avulla. Tavoitteena oli saada ensimmäisen vuoden jälkeen näytteenkäsittelylle toimivat protokollat ja verrattua MinION-laitteen tuottamia tuloksia Illumina MiSeq:iin. Toisen vuoden aikana oli tarkoitus järjestää valitulla protokollalla testaaminen kenttäolosuhteissa ensin Suomessa, sitten Keniassa.

Alkuperäinen projektin seurantaryhmän kanssa sovittu aikataulu oli seuraava: MinION-laitteen tilaaminen (05-07/20), aihepiiriin liittyvä kirjallisuuskatsaus (01/21), raportti menetelmän soveltuvuudesta (04/21), testaukset laboratorio- ja kenttäolosuhteissa (05-10/21) ja loppuraportti 12/21.

3. Aineisto ja menetelmät

Projektin aikana analysoimme MinION-laitteella näytteitä, joille oli aiemmin saatu MiSeq-laitteistolla ja Lazypipe-bioinformatiikka-analyysillä viromitulos. Tutkimme myös näytteen käsittelyn laboratorioprosessin soveltuvuutta kenttäolosuhteisiin. Analysoimme näytteitä 1. täysin hypoteesivapaasti, eli näytteen kaikki virukset (viromin) tunnistuen, 2. osittaisella ennako-oletuksella, eli tunnistimme rikastetun viruslajin kannan ja sen mahdolliset mutaatiot.

Viromidetektio vaiheet olivat sekä MiSeq- että MinION NGS-menetelmässä seuraavan-

laiset:

1. Näytteen laboriokäsittely (virusten rikastus suodatuksella ja nukleaasikäsittelyillä, virusten nukleiinihappoeristys, RNA- ja DNA-virusgenomien rikastus, sekvensointilaitteelle ladattavan näytteen eli NGS-kirjaston teko).
2. Syväsekvensointi (MiSeq / MinION)
3. Bioinformatiikka (Lazypipe / EPI2ME)

Näytteinä käytettiin laboratoriossa olevia materiaaleja, joista oli jo aiempi hypoteesivapaa Illumina MiSeq-viromitulos olemassa. Lisäksi näytteinä käytettiin kohdennetulla amplikonimenetelmällä (lajintunnistus ei-hypoteesivapaa, virusvariantin tunnistus hypoteesivapaa) aikaansaatuja SARS-CoV-2 näytteitä, joista ajettiin MiSeq-ajot samanaikaisesti.

Menetelmiä testattiin kolmelle eri tyyppin/protokollavaiheen näytteelle:

1. Linnun nielusta valmis hypoteesivapaasti rikastettu virusgenomi viromimääritystä varten. Samasta näytteestä oli aiemmin tehty MiSeq-laitteelle sopiva NGS-kirjasto ja sekvensointi.
2. Neljä kissan ulostenäytettä, joille tehtiin koko näytteenkäsittelyn koko protokolla raakamateriaalista lähtien. Näistä näytteistä oli tehty rinnakkain näytteenkäsittelyprotokolla ja MiSeq-analyysi.
3. 11 kpl esirikastettua koronavirukselle kohdennettua amplikoninäytettä virusvariantin määritystä varten. Samoista amplikoninäytteistä tehtiin rinnakkain MiSeq-analyysi.

Näytteen käsittely raakamateriaalista lähtien (nukleiinihappoeristys, virusgenomin rikastus) tehtiin hypoteesivapaalla Netovir/WTA2-menetelmällä, joka on laboratoriossa käytössä Illuminan MiSeq-laitteiston virominäytteiden käsittelyssä. Menetelmässä ensin rikastetaan näytteestä virusfraktio, eristetään nukleiinihapot (sekä RNA- että DNA-muotoiset) ja rikastetaan satunnaistetulla PCR-amplifikaatiolla sekä RNA- että DNA-juosteet. SARS-CoV-2-amplikoninäytteet olivat nenänielusta otettuja potilasnäytteitä, joista SARS-CoV-2-genomi oli rikastettu spesifisellä koko genomien kattavalla PCR-amplifikaatiolla. Tämä lähestymistapa sopi virusvariantin määrittämiseen tunnetusta lajista.

MinION NGS-kirjastojen teossa käytettiin ligaatiopohjaista menetelmää, jossa valmista tuotetta ei monistettu. Näin pyrittiin välttämään monistuksesta aiheutuvat tulosten vääristymät. MinION-sekvensointiajot suoritettiin laitevalmistajan ohjeistusten mukaisesti. Ajojen kesto määräytyi bioinformatiikka-analyysissä tarvittavien sekvenssipalojen (niin kutsuttujen readien) mukaisesti – kohdennetuissa amplikonianalyysissä ajon kesto oli lyhyempi, sillä näyte sisälsi lähes 100% haluttua virusgenomia. Havaitsimme, että 50 000 readia riitti kattamaan koronaviruksen koko sekvenssin riittäväällä syvyydellä, että virusvariantti voitiin määrittää. Nopein variantin määritykseen johtava ajo kesti 35 minuuttia. Viromiajon pituus riippui siitä, mikä oli oletetun virussekvenssin osuus koko näytteestä. Näissä erimittaisissa ajoissa kerättiin vähintään 1.5 miljoonaa readia yhden readin keskipituuden ollessa noin 400 emäsparia.

Bioinformatiikka suoritettiin valmistajan suosittelemalla reaaliaikaisella verkkopohjaisella EPI2ME-analyysiohjelmistolla, lisäksi kokeiltiin MiSeq-sekvensoinnissa käytetyn, laboratoriossa kehitetyn, Lazypipe-ohjelmiston toimivuutta MinIONilla tuotettuun dataan.

SARS-CoV-2 -virusvariantit tunnistettiin NextClade ja Pangolin -ohjelmistolla verkkopohjaisen EPI2ME-ohjelmiston lisäksi.

4. Tulokset ja pohdinta

Tutkimuksessa keskityttiin kannettavan MinION-sekvensointilaitteen kykyyn suorittaa viromianalyseja sekä laitteen ja sen käyttöön liittyvien laboratorioprosessien käytettävyyteen kenttäolosuhteita ajatellen. Pääasiallinen tutkimusaspekti oli viromidiagnostiikka eli kaikkien mahdollisten, myös aiemmin tuntemattomien virusten detektio näytteestä. Työvaiheet näytteestä patogeenin tunnistukseen käsittivät laboratorioprosessit (virusgenomien eristys, rikastus ja sekvensointikirjaston teko), itse MinION-laitteen käytön eli sekvensoinnin, ja bioinformatiikan eli sekvenssin tunnistamisen kaikkien saatujen sekvenssien joukosta.

Havaitsimme, että laitevalmistaja Nanoporen verkkosivut olivat epäselvät ja sieltä oli hankala löytää relevanttia informaatiota juuri viromidiagnostiikkaa silmälläpitäen. Laitteiston käyttökoulutus toteutettiin 2x2h verkkokoulutuksena, jossa käytiin läpi lähinnä reagenssipakettien sisältöjä ja pitkälle vietyjä bioninformatiikan ohjelmistoja. Laitteiston tuotetuki oli sähköpostitse tapahtuvaa ohjausta tai FAQ-tyyppistä edellisten ongelmien seulomista. Mistään ei suoranaisesti käynyt ilmi, minläläisille kysymyksenasetteluille mikään menetelmä sopii ja minkäläisille ei.

Testausta varten hankittiin kahden eri tyyppin MinION-laitteistot: pieni Mk1B-laite, joka vaatii kannettavan tietokoneen datan keruuseen ja analysointiin, sekä hieman isompi Mk1C-laite, jonka sisältämä GPU-prosessori mahdollisti reaaliaikaisen raakadatan prosessoimiseen (signaalin muuttamisen emäsjärjestykseksi, basecall). Mk1B-laitteeseen liitetyn kannettavan tietokoneen heikomman prosessorin takia kolmen tunnin ajo tarvitsi yli vuorokauden raakadatan prosessoimiseen sekvensseiksi. Toisaalta viromianalyysin verkkopohjainen ohjelmisto toimi kannettavalta tietokoneella, joten sitä mukaan, kun sekvenssiedostot valmistuivat, oli reaaliaikainen viromianalyysi mahdollista. Tehokkaampi Mk1C-laitteisto sisälsi pienen näytön, jonka kautta pystyi seuraamaan ajon edistymistä, mutta tiedostojen siirto toiselle koneelle reaaliaikaista analyysia varten olisi vaatinut yhteyden verkkoaasemaan, joka yliopiston palomuurien takia jäi toteutumatta. Tiedostoja kierrätettiin ajolaitteesta tietokoneelle muistitikuilla ja ulkoisilla kovalevyillä.

Ajo-ohjelmistojen päivittäminen kannettavalle tietokoneelle tapahtui palomuurien takia yliopiston tietotekniikkatuen kautta. Tämä koettiin hankalaksi aikataulutusten kannalta, varsinkin kun ohjelmistojen versiopäivitykset eivät aina toimineet toivotulla tavalla. Olettaen, että puolustusvoimien tarvitsema tietoturvaso on huomattavasti yliopistoa korkeampi, suosittelemme puolustusvoimien IT-asiantuntijoiden konsultaatiota ja arviointia ennen laitteen mahdollista käyttöönottoa.

Näytteille saadut tulokset:

1. Linnun nielusta valmis rikastettu hypoteesivapaa viromi (WTA2-materiaali). MinION-ajon tuloksena ei löytynyt viruksia. MiSeq-ajolle tehty Lazypipe-analyysi löysi 2.1% vi-

rusperäisiä readeja, näistä 0.9% oli peräisin erilaisista adenoviruksista. Todennäköisesti virusten määrä oli liian pieni MinION-analyysia varten. Molemmat NGS-analyysit löysivät näytteestä lintuperäisiä avibakteereita.

2. Neljä kissan ulostenäytettä. MinION-tulos: yhdestä näytteestä löytyi kissaruttoa aiheuttava protoparvovirus (yksijuosteinen DNA-virus), muista ei löytynyt viruksia. MiSeq-ajossa tämän osuus oli 11.8% kaikista readeista ja MinION-ajossa vastaavasti 4.7%. Kahdesta näytteestä löydettiin sekä MiSeq- että MinION-analyysilla samat bakteeriperäiset virukset, bakteriofaagit. Kissalla 22 parabacteroides-faagin readien osuus oli MinION:illa 16.3%, kun taas MiSeq:illä niitä oli 0.9%. Tämän näytteen MinION-ajossa oli faagiperäisiä 17% kokonaismäärästä (MiSeq-ajossa 0.9%). Kissalla 6 taas puolet kaikista MiSeq-readonlyista oli faagiperäisiä (47.2%) ja näsitiä suurin osa (36.2%) edusti podoviridae-faagiperhettä, jonka readeja ei löytynyt MinION-tuloksista ollenkaan. Kissan 6 MinION-readonlyista faagiperäisiä oli 0.4%, jotka lähes kaikki EPI2ME-analyysissä kohdentuivat ilveksestä kuvattuun faagiin (Lynx canadensis associated microvirus). Bakteriofaagien readien määrät poikkesivat toisistaan, mikä todennäköisimmin johtui satunnaisista eroavuuksista virusten rikastuksessa näytteen esikäsittelyn aikana.

3. Korona-amplikoninäytteet, 11 kpl. MinION-ajon tuloksena samat virusvariantit kuin MiSeq-analyysilla.

Hypoteesivapaasti, satunnaisella genomimonistuksella viromianalyysia varten tuotettu MinION-datan readit, eli raakadatan prosessoidut sekvenssinpätkät, olivat yksisuuntaista, liian hajanaista, liian lyhyttä ja liian paljon virheitä sisältävää, että sitä olisi voinut suoraan käyttää laboratoriossa kehitettyyn viromibioinformatiikkaan kohdentuvaan Lazypipe-ohjelmistoon. Viruksia olisi todennäköisesti pitänyt rikastaa paremmin alkuperäisestä näytteestä tai virusreadit olisi pitänyt saada pidemmiksi, että Lazypipe-ohjelmisto olisi tunnistanut mitään. Illuminan MiSeq tuottaa vähemmän virheitä, joten pienikin virusmäärä on detekoitavissa, MinION tarvitsee suuremman datamäärän päästäkseen samaan tulokseen (jos ylipäättään pääsee).

Yksi menetelmän haitoista oli se, että kirjaston laadun eli ligaatioreaktion onnistumisen tehokkuuden näki vasta ajotilanteessa. Kirjaston laatu, ajon kesto sekä aktiivisten sekvensointikanavien (pore) määrä ajokammiossa (flow cell) vaikuttivat ajossa tuotettavan datan määrään, ja tämän takia ajon edistymistä ja kokonaiskestoa oli vaikea ennalta määrittää. Ajon kesto riippuu halutusta sekvenssointisyvyydestä (miten tarkasti halutaan genomi määrittää) ja siitä, mikä on tutkittavan agenssin osuus koko kirjastosta. Esimerkiksi yhtenä päivänä 6.5h viromiajo tuotti 1.8 miljoonaa readia, kun taas toisena päivänä eri kirjastolla ja flow cellilla tehty 7h 17min ajo tuotti 5.1 miljoonaa readia.

Laitevalmistajan lupaama sekvenssointitarkkuus on noin 95% tarkoittaen sitä, että keskimäärin joka kahdeskymmenes sekvenssin emäs on väärä. Virheet ovat tyypillisimmin pieniä deleetioita tai insertioita. Suurempi tarkkuus on mahdollista saavuttaa raakadatan tehokkaammin prosessoivalla ohjelmalla, johon vaaditaan suorituskykyisempi tietokone. Tämä 95% tarkkuus tarkoittaa myös sitä, että luotettavan sekvenssin (joka on useamman heikkolaatuisen sekvenssin konsensus) saamiseksi tarvitaan enemmän readeja. Näin ollen, jos kahden miljoonan totaali-readien määrällä on MiSeq (jolla on yli 99.9% sekvenssointitarkkuus) kyennyt tunnistamaan viruksen, tarvitsee MinION samaan tunnistustarkkuuteen pääsemiseksi readeja vähintään satakertaisesti. Testissä käyttämämme linnun

nielunäytteessä olevia viruksia oli suhteessa kaikkeen sekvenssiin liian vähän, että MinION-menetelmä olisi kyennyt niitä tunnistamaan. Kissaruttoviruksen 1-2% osuus readien kokonaismäärästä oli sen sijaan riittävä tuottamaan tunnistuksen.

Suurempaan tarkkuuteen kykenevä MiSeq tuottaa jokaisesta kirjasto-DNA-palasta sekvenssit molempiin suuntiin, kun taas MinIONin tuottama sekvenssi on yksisuuntaista. Kaksisuuntainen sekvenssi on tarkempaa, sillä eri suunnan sekvenssit paikkaavat toistensa puutteita. Tämän takia virus on mahdollista tunnistaa pienemmällä readien määrällä. Tähän on MinION-laitevalmistaja vastannut tuomalla markkinoille menetelmän, joka tuottaa kaksisuuntaista sekvenssiä.

Amplikonien sekvensointiin sen sijaan menetelmä soveltui erinomaisesti, kyseessä siis halutun lajin kannantunnistuksen hypoteesivapaa lähestymistapa, kun kohteena oleva virusgenomi on rikastettu näytteestä PCR:n avulla. SARS-CoV-2 virukseen kohdennettu analyysi tuotti riittävästi readeja, jotta satunnaiset virheet pystyttiin ohittamaan taustakohinanä. Raakadatan ajonaikainen prosessointi sekvenssiksi mahdollisti reaaliaikaisen viromianalyysin ja ajo voitiin lopettaa heti, kun tulos oli selvillä. Tämä oli MinION-laitteen selvä etu MiSeq-laitteistoon nähden, jossa ajo on aina ennalta määrätyn pituinen ja vasta ajon päätyttyä on mahdollista aloittaa sekvenssien bioinformatiikka-analyysit. Tutkimuksen aikana, joulukuussa 2021, oli Suomeen tullut uusi SARS-CoV-2-variantti, Omikron. Suomen ensimmäinen omikrontapaus tunnistettiin juuri tämän tutkimuksen tuloksena.

Kenttäkokeiden sijaan (alkuperäisessä tutkimussuunnitelmassa suunniteltu tehtäväksi Suomessa ja Keniassa) sovittiin epävirallisessa tutkijatapaamisessa menetelmän siirto puolustusvoimien laboratorioon Biologisten Uhkien Osaamiskeskukseen ja loppuraportti toukokuulle 2022. Menetelmän siirto toteutettiin 9-11. toukokuuta THL:n tiloissa ja siinä suoritettiin kaksi MinION-ajoa ja tehtiin niihin liittyvät laboratorioprosessit. Näytteinä käytettiin SARS-CoV-2 amplikoninäytettä ja kissan ulosteesta eristettyä virusgenomia, josta molemmille on saatu MiSeq-sekvensoinnilla tulos. Näytteistä tehtiin MinION-kirjastot ja sekvensointiajot. Kissan ulostenäytteen aiemmin eristetty virusgenomi lisäksi rikastettiin PCR:lla ennen MinION-kirjaston tekoa. Tulokset analysoitiin verkkopohjaisella mikrobiomin tunnistukseen tarkoitettulla Fastq WIMP-ohjelmistolla (EPI2ME), joka tunnistaa bakteerit ja virukset; lisäksi SARS-CoV-2-amplikoni analysoitiin myös koronaviruskannan tunnistukseen suunnatulla Fastq ARTIC + NextClade -ohjelmistolla (EPI2ME). Menetelmän siirrossa saadut tulokset olivat yhteneviä aiempien tulosten kanssa.

MinION-laitteisto itsessään on halpa, mutta käyttökustannukset ovat korkeat. Vaikka yhtä flow celliä pystyisikin käyttämään moneen peräkkäiseen ajoon, jokainen ylimääräinen käsittely tuo riskin saada flow celliin ilmakuplia, jotka tuhoavat sensorialueen. Lisäksi käytetyn flow cellin uudelleenikäikä on rajallinen – tämä on tieto, joka ei selkeästi tullut laitevalmistajalta ilmi missään vaiheessa. Menetelmän siirrossa tehdyt kaksi kirjastoa ajettiin samalla flow cellilla. Amplikonijon jälkeen flow cell pestiin (eli käsiteltiin laitevalmistajan ohjeiden mukaisesti nukleaaaseilla), minkä tarkoituksena oli poistaa ajokammioista edellisessä ajossa käytetty kirjasto. Viromiajon readeista 0,05% kohdentui kuitenkin koronaviruskannan, ja nämä olivat todennäköisesti jäämiä edellisestä amplikonijosta. Tämän takia on huomioitava, että mikäli edellisessä ajossa on jokin genomi runsaasti edustettuna, on mahdollista, että sitä ei saada nukleasikäsittelyllä kokonaan eliminoitua seuraavasta ajosta. Vaikka MinIONia käyttäen on julkaistu paljon mikrobien

metagenomiikkaan kohdentuvia artikkeleita, on hypoteesivapaita viromianalyyseja raportoitu poikkeuksellisen vähän verrattuna bakteerimetagenomiikkaan. Tämä viromijulkaisujen vähyys todennäköisesti ei johdu yritysten vaan julkaisukelpoisten tulosten puutteesta. Bakteerien hypoteesivapaa analyysi on helpompaa toteuttaa, sillä bakteerin genomi on kaksijuosteista DNA:ta, suurempi kooltaan ja sekvensointikirjaston teko tapahtuu suoraviivaisemmalla, vähemmän välivaiheita tarvitsevalla tavalla. Virusten pienempi genomikoko, isäntäorganismien ja sen bakteerikontaminanttien läsnäolo, näytteen pakolliset käsittelyt ennen varsinaista kirjaston tekoa, genomien mahdollinen hajoaminen käsittelyiden yhteydessä, ja ylipäättään eri menetelmät NGS-kirjastojen tekemisessä (nämä genomien koon ja laadun erilaisuudesta johtuen) ovat todennäköisimpiä syitä, miksi tämänkaltaisia viromiartikkeleita on hyvin vähän.

Helsingin yliopiston laboratoriossa kevästä 2020 lähtien annettu koronapandemiasta johtuva sekvensoinnin virka-apu THL:lle vei tutkimusresursseja. Tämän takia alkuperäinen aikataulu viivästyi ja testaukset jäivät suunniteltua suppeammiksi. Päivitetyn aikataulun mukaiset välitavoitteet kuitenkin saavutettiin: kirjallisuuskatsaus (06/21), laboratoriotokolla (12/21), menetelmän siirto (05/22) ja loppuraportti (05/22).

Projektin viimeisen viikon lopulla varmistimme menetelmän avulla Suomen ensimmäisen apinorokkotapauksen ja sekvensoimme nopeasti viruksen koko genomien. Varmistus tapahtui sekvensoimalla orthopoxvirus-spesifiä amplikonin, jonka tiedettiin sisältävän apinorokolle tyypillisiä emäksiä. Tämä varmistusprosessi vei aikaa yhteensä noin seitsemän tuntia, alkaen DNA-näytteen saapumisesta laboratorioon ja loppuen MinION-ajon readeista saadun konsensussekvenssin vertailuun. Itse MinION-ajo kesti noin tunnin ja tässä ajassa amplikonista tuotettiin noin 600.000 readia, mikä riitti kattamaan kyseisen geenialueen tuhatkertaisesti ja siten kompensoimaan heikomman sekvenssin laadun. Bioinformatiikka tehtiin vertailemalla MinIONin tuottaman sekvenssin konsensusa apinorokkoviruksen referenssigenomiin. Koko genomien käsittävä sekvenssi saatiin sekvensoimalla PCR-satunnaisrikastettua DNA-näytettä - ensimmäisen version saaminen vei yhteensä vain noin 40 tuntia, joista MinION-ajon osuus oli noin 24 tuntia. Pelkkä MiSeq-ajo ilman laboratoriotyötä ja bioinformatiikkaosuutta olisi vienyt noin kaksi vuorokautta. Voimme todeta, että MinION on ylivoimainen menetelmä virusten nopeaan detektioon, kun ennako-oletuksia on saatavilla – kyseessä myös toteutunut reaalielämän testaus nopeasta tunnistuksesta ja koko genomien sekvensoinnista genomiltaan isolle (noin 200 000 emästä) virusryhmästä, jota pidetään yhtenä merkittävimmistä bioterrorismigenseista.

5. Loppupäätelmät

Projektin tarkoituksena oli hankkia MinION-laitteisto, kehittää laboratorioprosessia viromianalyysiin ja tulosten bioinformaattiseen käsittelyyn, sekä vertailla laitteistolla saatuja tuloksia MiSeq-laitteistolla saatuihin tuloksiin. Lisäksi tarkoituksena oli arvioida laitteiston ja viromianalyysin laboratorioprosessin käyttökelpoisuutta kenttäolosuhteita ajatellen.

Näytteen laboratoriokäsittely hypoteesivapaata viromidiagnostiikkaa varten on näkemyksemme mukaan liian haastavaa kenttäolosuhteissa toteutettavaksi. Lisäksi MinIONin tuottama sekvenssi oli liian heikkolaatuista, että siitä olisi ollut mahdollista tunnistaa pieniä virusmääriä viromianalyysia varten. Sitä vastoin amplikonipohjainen

jatkoanalyysi, kuten koronavirusvariantin tunnistaminen, oli huomattavasti yksinkertaisempi toteuttaa. Kokemus apinarokkoviruksen tunnistamisesta mukaan lukien koko virusperimän luku kahdessa vuorokaudessa näytteen saapumisesta osoitti, että sekvensointi sekä kohdennetusti että viromianalyysina voi tällaisille infektiopäilyille toimia erinomaisesti, mikäli patogeenista on olemassa ennekko-oletus.

Suurin osa MinIONilla tehdyistä tieteellisistä julkaistuista virustutkimuksista perustuukin kannan tai variantin tunnistavaan, ei-hypoteesivapaaseen amplikonianalyysiin, mihin käyttökokemuksemme mukaan laitteisto soveltuu erinomaisesti. Agenssien primaarinen tunnistus tulisi siis suorittaa ensin jollain toisella menetelmällä (antigeenintunnistus, qPCR) ja spesifin rikastuksen jälkeen tarkempi tunnistus ja analyysi on mahdollista suorittaa MinION-laitteella.

6. Tutkimuksen tuottamat tieteelliset julkaisut ja muut mahdolliset raportit

Käsikirjoitus valmisteilla (menetelmän käytöstä apinarokkoviromin sekvensoinnissa).