



Rijksinstituut voor Volksgezondheid  
en Milieu  
*Ministerie van Volksgezondheid,  
Welzijn en Sport*

## Detectie van verwisselingen en spillover in Whole Genome Sequencing met DNA spikes

Han de Neeling (ex-RIVM)

Met speciale dank aan  
Lucia Jonckers Nieboer  
(stagiaire)





(Potentiële) belangenverstrengeling

Geen

Voor bijeenkomst mogelijk relevante relaties

Geen



› J Microbiol Methods. 2022 Jun;197:106482. doi: 10.1016/j.mimet.2022.106482. Epub 2022 May 10.

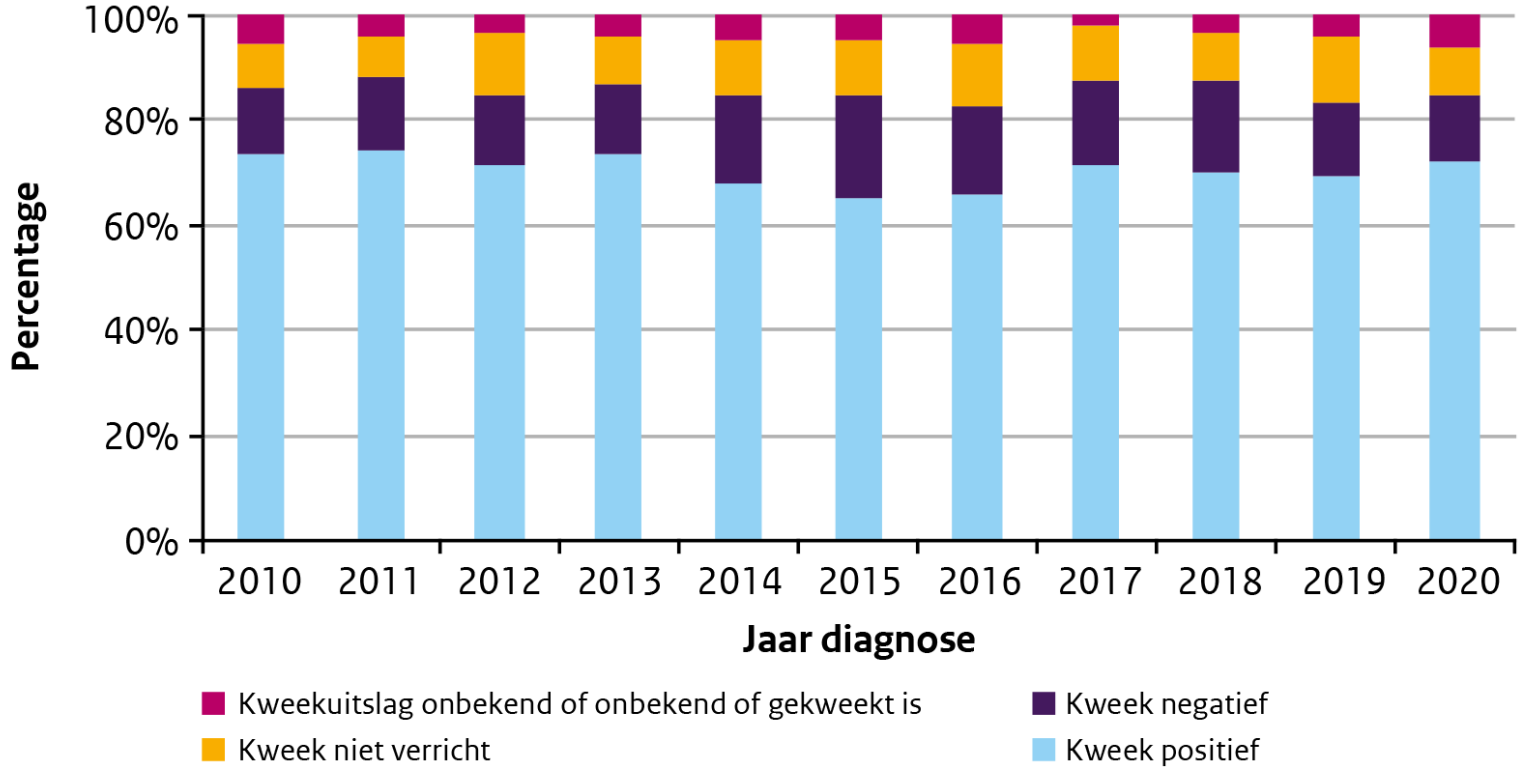
## Tracking *Mycobacterium tuberculosis* sequencing samples using unique spikes of random DNA

Albert J de Neeling<sup>1</sup>, Lucia F Jonckers Nieboer<sup>2</sup>, Arnout Mulder<sup>2</sup>, Rob Mariman<sup>2</sup>,  
Richard M Anthony<sup>2</sup>, Dick van Soolingen<sup>2</sup>



# Kweekbevestiging van tbc in Nederland; ongeveer 70%

Figuur 14 Percentage kweekbevestiging, 2010-2020





Alle (vermoedelijke) *Mycobacterium tuberculosis* isolaten worden naar het RIVM gestuurd (5-600 per jaar) voor;

- (sub) species identificatie
- resistentie onderzoek (moleculair and fenotypisch)
- epidemiologische typering



## In de lange keten van processen tbc diagnostiek kunnen fouten gemaakt worden met grote gevolgen voor de patient

- Verwisseling van monsters van patiënten
- Verkeerde labelling
- Kruiscontaminatie van positief naar negatief materiaal bij kweken
- Kruiscontaminatie van bacteriën/DNA tijdens laboratoriumtesten
- Fouten in verwerking van data

Op grond van stelselmatige DNA fingerprinting is van kweken ongeveer 1% van de positieve kweken in Nederland te herleiden naar kruiscontaminaties of andere fouten (bevestigd a.d.h.v. discutabele TBC diagnose)



## Ons idee (analoog aan klinisch genetisch onderzoek)



- Toevoegen van artificiële DNA fragmenten aan begin tbc diagnostiek als **interne controle** die in gehele procedure mee loopt
- Dus idealiter toevoegen aan sputumpotje en traceren bij DNA sequentie analyse van *M. tuberculosis*





## ‘Artificiële DNA fragmenten’ of **DNA spikes**: Hoe ze te maken?

- Fragmenten van kunstmatig DNA van 1000 baseparen lang
- Unieke samenstelling: random DNA sequentie
- GC-gehalte 65% (zoals bij *M. tuberculosis*)
- Dan blijkt dat er maximaal 19 bp overeenkomst is tussen de spikes onderling en tussen de spikes en het genomisch DNA
- Geen mogelijke vorming ongewenste DNA structuren
- Kosten ongeveer €150,- voor 1000 ng







## 'Artificiële DNA fragmenten' of **DNA spikes**: Hoeveel toevoegen?

- Moleculair gewicht van genomisch DNA is 4.4 miljoen
- Moleculair gewicht van een spike is duizend
- Concentratie genomisch DNA is 10 ng/ $\mu$ L
- Hoeveel moet je toevoegen om een gelijke dekking (depth) van reads te krijgen op het genoom en op de spike?



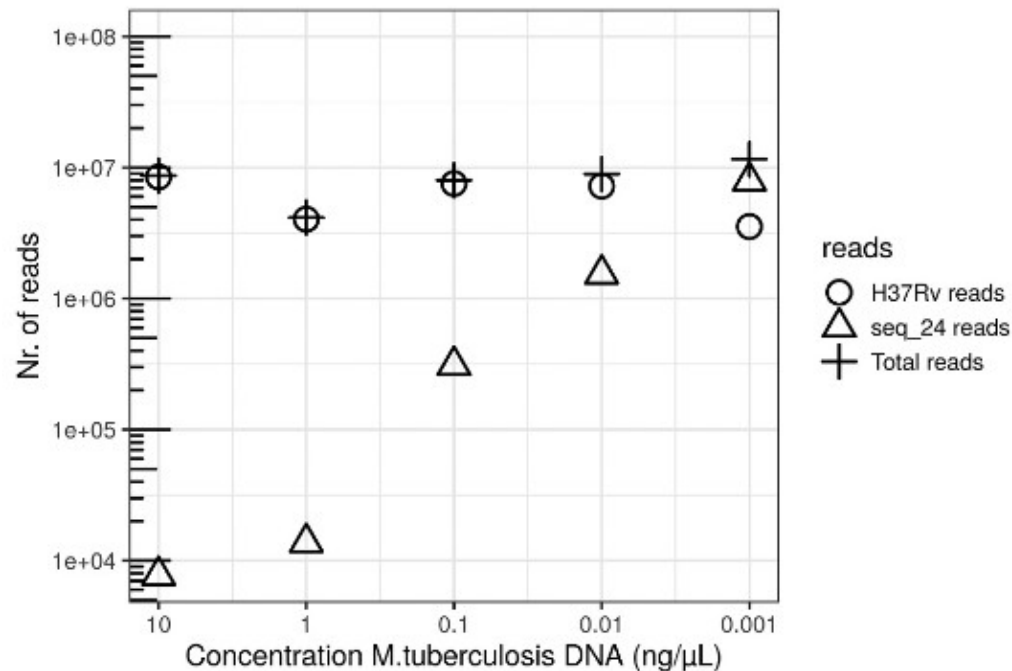


## Eerste twee testen om spikes aan een deel van de keten in de tbc diagnostiek toe te voegen

- Spikes toegevoegd aan DNA verdunningen van de mycobacteriële controle stam (die bij elke sequence run mee loopt). Wat is de invloed van spikes op het sequencen?
- Spikes toegevoegd aan bacteriën waaruit DNA wordt geïsoleerd - net voor het afdoden door verhitting. Kunnen ze deze procedure aan?



# Aantal reads (aflezingsen) bij verschillende verdunningen van DNA van de controle stam en 1 concentratie spike DNA (0,01 ng/ $\mu$ L)



Conclusie: één constante concentratie spike bleek geschikt om een brede range aan mycobacteriële DNA concentraties te spiken, zonder negatieve invloed op de sequentie analyse



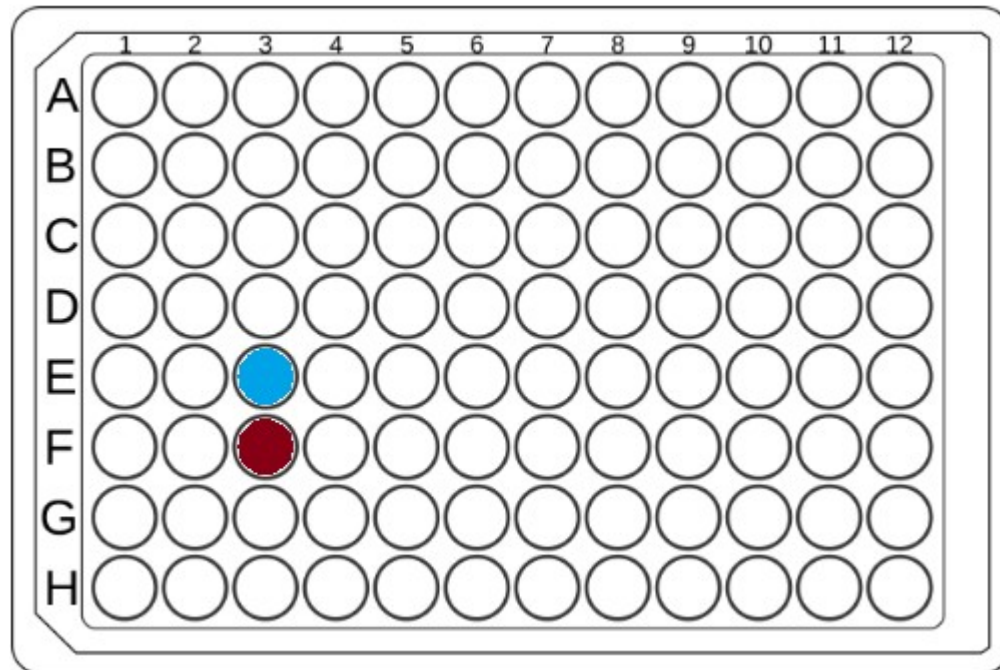
Resultaten detectie van spikes (0,003 ng/ $\mu$ L) die toegevoegd werden aan 4 mycobacteriële kweken voordat deze door verhitting werden geïnactiveerd waarna DNA werd geïsoleerd

Name of spiked sample	Name of spike	Name of isolate	dsDNA (ng/ $\mu$ L)	Number of reads		
				Mapped on H37Rv	Mapped on spike	Not mapped
74	seq_25	367	3.2	1,679,210	20,059	5.49e6
75	seq_41	384	1.0	5,200,583	5837	158,233
76	seq_42	395	4.2	9,116,662	8287	228,604
77	seq_43	397	3.1	9,421,448	10,626	226,979

Conclusie: Spike DNA kan verhitting en DNA isolatiemethode verdragen en de spikes kunnen in deze concentratie uiteindelijk getraceerd worden in de sequentie analyse



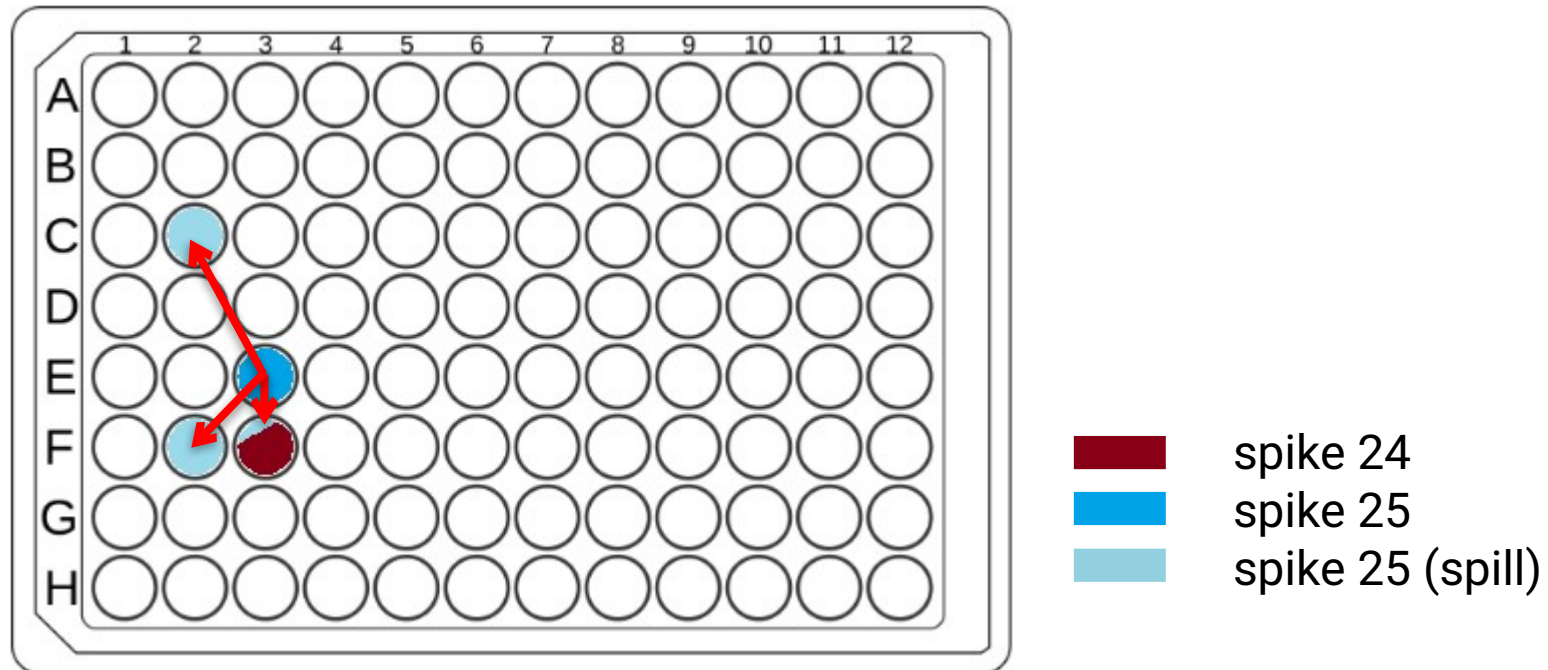
Kruiscontaminatie tijdens sequencen is helaas een reëel probleem...zoals bleek in ons eigen experiment



■ spike 24  
■ spike 25



Kruiscontaminatie tijdens sequenzen is helaas een reëel probleem...zoals bleek in ons eigen experiment



Conclusie; Spike DNA kan kruiscontaminatie op efficiënte wijze aantonen  
En; (veel belangrijker?) cross-over in 96-well platen treedt echt op...



## Conclusies

- Random DNA spikes als interne controle in de tbc diagnostiek zijn goedkoop en op efficiënte wijze te ontwerpen
- Hebben geen invloed op het sequencen van het genomisch DNA
- Kunnen aan mycobacteriële kweken worden toegevoegd direct voor inactivatie (verhitting) en DNA isolatie waarna ze nog herkend kunnen worden in de WGS analyse
- Kruiscontaminatie in een 96-well plaat kon met de spikes worden aangetoond
- Een lage concentratie DNA lijkt relatief gevoelig voor kruiscontaminatie
- Spikes toegevoegd voor het kweken werden niet teruggevonden: DNase werking?



## Vervolgstappen

- DNA spikes beschermen, zodat ze wel voor het kweken kunnen worden toegevoegd en op termijn aan het sputum potje
- Dit zou dan de standaardprocedure kunnen worden om fouten als verwisselingen en kruiscontaminaties efficiënt te kunnen opmerken
- Kweek achterwege laten





## RIVM TB reference laboratory



Richard Anthony



Dick van Soolingen



Joyce van  
den Dool



Miranda Kamst



Rina de Zwaan



Ella Ubbelohde  
PhD candidate



Tridia van der Laan



Arnout Mulder