



NIELS BROCK

UDDANNELSE SIDEN 1881

# Nanopore-sekventering af DNA fra saliva med henblik på identificering af antibiotika resistensgener

FORSKERSPIRE 2022  
MATHIAS WAHL – SUND

# Nanopore-sekventering af DNA fra saliva med henblik på identificering af antibiotika resistensgener

Mathias Wahl

*Niels Brock, Det Internationale Gymnasium, Forskerspire ved KU 2022.*

Validiteten i identifikation af resistensgener ved illumina-sekventering er bredt anerkendt; nanopore-sekventering, der er langt hurtigere og billigere end illumina-sekventering, har udvist potentiale for identifikation af resistensgener fra blodprøver, men resistensgener i saliva er endnu ikke undersøgt. I pilotprojektet blev indholdet af bakterier i saliva undersøgt med PCR samt elektroforese, og der forskes videre i, om der kan påvises resistensgener ved brug af nanopore-sekventering. Saliva er mere tilgængeligt og kan derved bruges i en række situationer, hvor blod ikke er egnet som fx til massetestning. Dertil vil det kombineret med nanopore-sekventering kunne bidrage til en langt mere effektiv resistensopsporing og kortlægning, som kan udføres på få timer i modsætning til dage for illumina-blodprøver.

*Søgeord: nanopore, antibiotikaresistens, resistens, ARG, sekventering, 16s rRNA*

## INDHOLDSFORTEGNELSE

<b>ORDSLISTE</b> .....	2
<b>INTRODUKTION</b> .....	2
<b>PROBLEMFOMULERING</b> .....	2
<b>Formålet</b> .....	2
Figur 1.....	3
<b>SPYTMIKROBIOM</b> .....	3
<b>AFGRÆNSNING</b> .....	3
<b>METODE</b> .....	4
<b>DNA-sekvensering ved PCR og agarosegel elektroforese under pilotforsøg</b> .....	4
Figur 2.....	4
Figur 3.....	4
<b>Nanopore-sekvensering under forskningsprojekt</b> .....	4
Figur 4.....	5
Figur 5.....	5
Figur 6.....	5
Figur 7.....	5
<b>PILOTPROJEKTET</b> .....	6
<b>FORSKNINGSPROJEKTET</b> .....	6
<b>RESULTATER</b> .....	6
<b>BUDGET</b> .....	7
<b>TIDSRAMME</b> .....	7
<b>KONKLUSION</b> .....	8
<b>TAK TIL</b> .....	8



<b>LITTERATURLISTE</b> .....	<b>9</b>
<b>BILAG</b> .....	<b>10</b>
Bilag 1.....	10
Bilag 2.....	10
Bilag 3.....	11
Bilag 4.....	11

## ORDSLISTE

ARG: Antibiotika Resistensgener, AMR: Antimikrobiel Resistens, HGT: Horisontal Genoverførsel, MGE: Mobile Genelementer, PCR: Polymerase Chain Reaction, Saliva: Spyt

## INTRODUKTION

I 2020 blev der udskrevet 350 recepter antibiotika pr 1.000 indbygger i Danmark. Derudover tilskriver man 5-10 år af den forventede levealder til præparatet<sup>1</sup> (bilag 1). Men resistens udgør en stigende risiko for, at antibiotika taber sin effekt på de mange bakterielle sygdomme, som vi i dag er blevet vant til at kunne behandle med en antibiotikakur. WHO anslår, at der på verdensplan dør ca. 700.000 mennesker om året grundet infektion med bakterier, der har udviklet resistens — det forventes at tallet i 2050 vil stige til 10.000.000, det er flere end der i dag dør af cancer. Ligeså er der indenfor svineproduktionen udbredte eksempler på, hvor de forebyggende penicillinkure tilført gennem drikkevandet har medført resistens. Her kan den resistente stafyloko bakterie, MRSA<sup>a</sup> bl.a. nævnes, som også evner at påføre smitte til mennesker<sup>2</sup>. At være i stand til at kortlægge og identificere bakterier hurtig kan være med til at minimere forbruget af antibiotika, og sikre at den givne bakterie ikke udviser resistens for et aktuelt præparat. I dette projekt søger jeg derfor at undersøge sekvenseringsværktøjet Nanopore MinIONs mulige anvendelse for hurtig resistensgenbestemmelse og dermed mindsning af resistensudbredelsen.

## PROBLEMFOMULERING

Mikrober i vores omgivelser kan nedbryde antibiotika med den konsekvens til følge, at

sygdomsbehandling med antibiotika ikke virker. Analyse af prøver for at bestemme modtageligheden overfor specifikke antibiotika er tidskrævende, da mikrober vokser langsomt (timer til måneder).

*Dette projekt har til formål at undersøge om det er muligt at anvende saliva fra patienter med henblik på at identificere mikrober ved sekventering af relevante dele af deres genom, fx 16S rRNA genet. Særligt er det formålet at kortlægge ARG for at kunne give patienten den optimale antibiotika ved en infektion.*

**Formålet** med projektet består i at undersøge anvendelsesmulighederne ved nanopore-sekventering og effektivisere processen hvormed resistens opspores og kortlægges. Dette gøres ved at udnytte den øgede hastighed, som sekvensering med nanoporer har, og sikre brug af korrekt antibiotika sådan at (a): bakterier der viser tegn på resistens behandles med en alternativ antibiotikatype (b): en generaliseret kortlægning af resistens, som fx kan bruges i tilfælde af udbrud af resistente bakterier. Dertil søger forskningsprojektet at undersøge, om saliva som prøvetype konsistent kan bruges til sekventeringsanalyse.

I 1928 opdagede Alexander Fleming penicillin, der skulle komme til at redde millioner af menneskeliv. Den selv samme Alexander Fleming udtrykte 36 år efter i 1964 en bekymring for resistens “ved ukorrekt brug”<sup>3</sup>. I dag ses et stigende antal resistente bakterie, og derfor har det aldrig været mere **relevant** at sikre fremtidens antibiotikas virkning. Her vil en hurtig og

<sup>a</sup> Methicillin-resistent Stafylokok aureus.

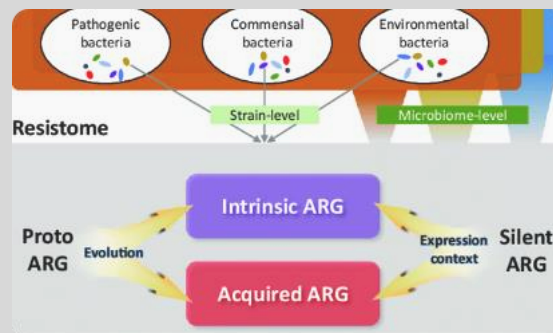
fremkommelig sekventering af en givent bakteries DNA kunne vise, om der skulle forekomme ARG og hvilket antibiotikum, som denne resistens enten koder og/eller ikke koder for.

Det er med en vis ærefrygt, at jeg er dybt fascineret af bakteriers evne til at adaptere på selv de mest trange habitater. Engang havde jeg altid associeret en slem blærebetændelse, halsbetændelse, lungebetændelse osv. med en syv dages penicillinkur, hvorefter man var tilbage. Men da min egen farmor gik bort, fordi hun i sin beskyttede bolig havde tilegnet sig en resistent bakterie, blev jeg mere bevidst om resistens — en langsom tsunami som Verdensbanken også har omtalt det<sup>4</sup>.

## RESISTENSGENER I MIKROBER FRA KROPPEN

Antimikrobiel resistens (AMR) er en alvorlig udfordring i mange dele af sundhedsvæsenet, og identifikation og overvågning er en af strategierne for at begrænse problemet<sup>5</sup>.

Tarmen, saliva og mundhule er steder i vores krop, som indeholder mikrober, der er bærere af resistensgener, samlet kaldet resistomet. Resistensgener har evnen til at nedbryde antibiotika. Nogle af de gavnlige mikrober huser naturligt antibiotika resistensgener, som gør dem i stand til at overleve, hvis de udsættes for antibiotika. Kroppen kan dog også blive invaderet af sygdomsfremkaldende mikrober kaldet patogener. Men patogenerne kan også erhverve sig resistensgener fra de gavnlige tarmmikrober, så de ikke kan bekæmpes med antibiotika. Overførslen af resistensgener sker ved såkaldt horisontal genoverførsel (HGT) hvor ARG på et plasmid overføres fra en bakterie til et andet via mobile genelementer (MGE). Det har vist sig, at patogene bakterier er særligt gode til at udveksle resistensgener<sup>6</sup>. Dette er et voksende problem, fordi resistensgenernes udbredelse vokser ved brug af antibiotika i landbruget og sundhedssektoren.



Figur 1: Den samlede pulje af resistensgener i en niche kommer fra forskellige typer af bakterier (øverst). Resistensgenerne er enten medfødte eller blevet overført fra andre bakterier (nederst). *Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission* Dae-Wi kim & Chang-jun Cha, *Nature* 2021.

## SPYTMIKROBIOM

Spytmikrobiom<sup>b</sup> har vist sig at være en proxy for andre nicher, fx tarmen og lungerne. Det er foreslået at spytmikrobiomet er en god surrogatindikator for at monitorere heldbredstilstanden og sygdomsdiagnose. En fordel her er, at det er meget nemt at udtage prøver til analyse.

## AFGRÆNSNING

Projektet vil fokusere på identifikation af bakterier i salivaprøver ved sekventeringsanalyse af 16S rRNA genet. De indledende pilotforsøg skal undersøge om bakterielt 16S rRNA gen kan isoleres fra saliva, som er spiket med E coli.

Projektet vil undersøge bakterietyper i saliva, som vurderes at være nemt tilgængeligt. Kroppen har også andre reservoirs af bakterier bl.a. i fæces og blod, som der ikke fokuseres på i dette projekt. Kendskab til bakterietypen giver ikke nødvendigvis indblik i samtlige resistensgener som bakterien indeholder, idet resistensgenerne ofte er placeret i mobile plasmider, der er i stand til at udveksle resistensgenerne mellem andre bakterier. En del af ARG er placeret i DNA strukturer kaldet transposomer, som kan hoppe rundt i kromosomet. Disse ARG er en del af

<sup>b</sup> Mikroorganismesammensætningen i saliva.



bakteriens medfødte forsvar mod antibiotika. Forekomst af resistensmekanismer og den deraf følgende grad af resistens varierer meget for forskellige bakteriearter, og på denne baggrund vil kendskab til bakteriearten være et pejlemærke for resistensgraden.

Den samlede pulje af resistens gener der er til stede i et reservoir<sup>c</sup> af naturligt forekommende bakterier, resistomet, kan overføres til sygdomsfremkaldende patogene bakterier og dermed gøre den antibiotika resistente. Identifikation af resistomet er derfor afgørende for valget af antibiotika til bekæmpelse af en bakteriel infektion<sup>7</sup>.

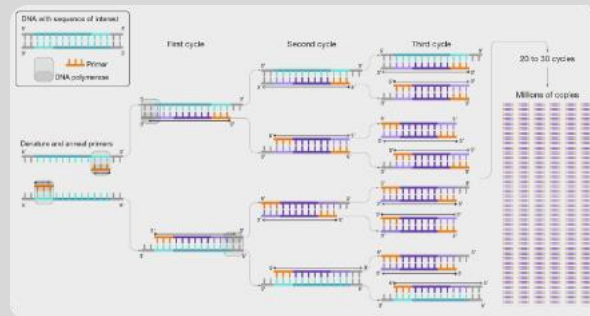
En hurtig resistom analyse kan føre til personlig antibiotika behandling og dermed give en optimal sygdomsbekæmpelse hos den enkelte patient. Analysemetoderne er baseret på en hurtig DNA-analyse metode, hvor en håndholdt enhed (MinION) registrerer de elektriske impulser nukleotiderne i DNA giver anledning til. Analysen af bakteriernes samlede DNA-reservoir kan færdiggøres på under en enkelt arbejdsdag<sup>8</sup>. Blandt andet på grund af udstyrets lave pris vil det være langt mere tilgængeligt.

## METODE

Projektet anvender en deduktiv tilgang idet hypotesen bygger på eksisterende teori. Forsøgene er designet ud fra dette, og på baggrund af den indsamlede empiri kan der konkluderes på hypotesen.

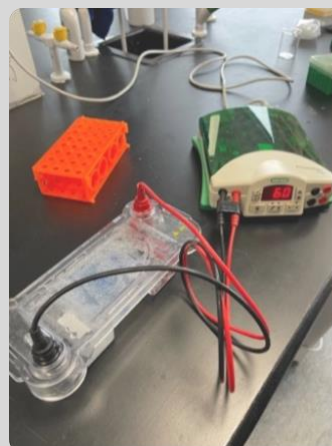
### DNA-sekvensering ved PCR og agarosegel elektroforese under pilotforsøg.

DNA-sekvenseringen starter med PCR. Her opvarmes DNA'et til mellem 94° og 98° grader celsius, således at det denaturerer. Herefter sænkes temperaturen til mellem 50° og 60° grader celsius, og primerne kan anneal til de komplementære sekvenser (16s). Temperaturen hæves til 72° grader celsius, så Taq polymerasen kan starte elongeringen<sup>d</sup>. Processen startes forfra, og ved hvert cyklus sker der en fordobling af DNA-strengene<sup>9</sup>.



Figur 2: Grafik over PCR-processen. *Polymerase chain reaction (PCR)*, National Human Genome Research Institute, M. Smith, 2022.

Ved elektroforese løber en elektrisk strøm igennem en agarosegel hvor DNA'et separeres på baggrund af størrelse da det negativt ladet DNA bevæger sig gennem gelens porer mod den positivt ladet del af gelen — her afgøre DNA-størrelsen, farten hvorpå at DNA'et vandrer gennem gelen. Derved kan der på baggrund af en kendt DNA stige og PCR-fragmentet ses, om der er udtrykt 16s rRNA<sup>10</sup>.



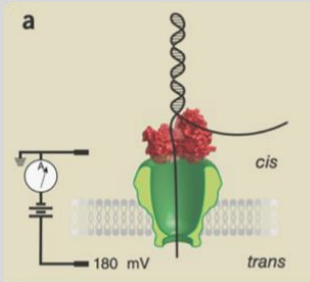
Figur 3: Opstilling ved elektroforese. M. Wahl

### Nanopore-sekvensering under forskningsprojekt.

En nanopore agerer biosensor ved, at en lipidmembran tilføres en spænding samt katode og anode på forward og reverse siden af membranen. Da DNA er et negativt ladet biomolekyler, vil det ved placering på forward siden ske translokation grundet elektroforetiske kræfter<sup>11</sup>.

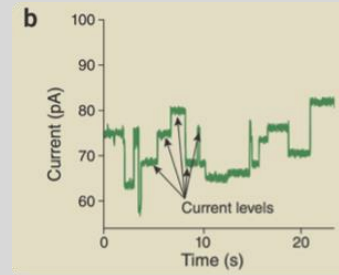
<sup>c</sup> Tarmen, salvia mv.

<sup>d</sup> Syntese af DNA-streng ud fra nukleotider.



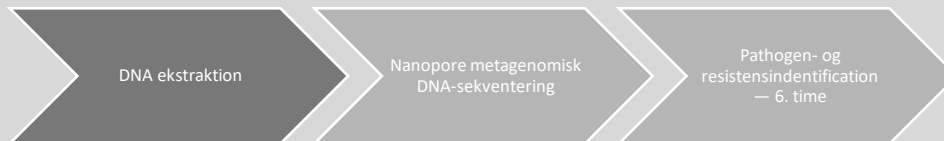
Figur 4: Illustration af nanopore-sekventering. *Three decades of nanopore sequencing, D. Deamer, M. Akesson & D. Branton, Nature 2016.*

Den ioniske ledningsevne er ekstremt følsom overfor nukleotidernes kemiske struktur og vil afhængig af den ændre strømmen (A)<sup>11</sup>.



Figur 5: Illustration af ændringer i modstand under nanopore-sekventering. *Three decades of nanopore sequencing, D. Deamer, M. Akesson & D. Branton, Nature 2016.*

Bestemmelse af resistens via nanopore-sekvenseringen kan udføres på under 6 timer. Sammenholdt mod bestemmelse af resistens via illumina-sekventering, som afhængig af mikrobiom, kan tage ca. 66 timer — et stort potentiale ift. anvendelsesmuligheder<sup>12</sup> (se figur 6 og 7).



Figur 6: Illustration af processen ved nanopore-sekvensering, *M. Wahl.*



Figur 7: Illustration af processen ved PCR og illumina-sekventering, *M. Wahl.*

## PILOTPROJEKTET

Pilotforsøget har til formål at undersøge, om der kan isoleres DNA fra bakterier 16S rRNA DNA fra saliva, der er tilsat E Coli. Efterfølgende laves PCR amplification. DNA oprensnes med QUIAGEN DNeasy Power Soil Kit fra 2 ml saliva tilsat E Coli. Ved brug af specifikke primere opformeres 16S rRNA genet ved PCR. Størrelsen på det PCR opformede fragment undersøges ved agarose gelelektroforese og brug af en DNA stige.

1. Oprensning af DNA fra saliva vha. QUIAGEN DNeasy Power Soil Kit.
2. Koncentrationen af DNA måles, så den rette mængde DNA kan afpipetteres til PCR.
3. Bakterierne i prøven identificeres ved at sammenligne DNA-sekvensen i et afsnit af deres gen for 16S rRNA (1500 bp). Der benyttes to specifikke primere, forward (F) og reverse (R) primer. Herefter PCR-opformering mhp. bakterie identifikation. Primeren er forsynet med en rapid attachment sequence<sup>e</sup>. Hertil kan der inden sekventeringen bindes Rapid Adapters (RAP, helicase), som før sekventeringen opdeler DNA strengen i enkeltstreng og trækker den ene enkeltstreng gennem nanoporen under sekventeringen.

## FORSKNINGSPROJEKTET

Forskningsprojektets formål er at identificere den samlede pool af antibiotika resistensgener (resistomet) i saliva fra forskellige individer. Dette vil danne baggrund for at kunne give den rigtige individuelle antibiotikabehandling.

1. Oprensning af DNA fra saliva vha. QUIAGEN DNeasy Power Soil Kit.

2. Koncentrationen af DNA måles, så den rette mængde DNA kan afpipetteres til Nanopore sekventering.
3. Sekventering i Nanopore MinION. DNA'et nedbrydes til 2 enkeltstreng vha. helicase og trækkes gennem nanoporemembrannen, og der måles ændringer i de elektriske impulser fra DNA molekylets forskellige nukleotider. De elektriske impulser sendes til en computer, hvor de oversættes til den genetiske kode.
4. Databehandling fra sekventeringen som skal kortlægge resistomet<sup>f</sup> ([bilag 2](#)).

## RESULTATER

Pilotforsøget viser, at DNA er blevet isoleret fra saliva tilsat en lille mængde E coli. Kvaliteten/renheden af prøven blev bestemt ved at måle OD260/280 rationen med Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Rationen blev bestemt til 1,73, hvilket er tæt på den forventede værdi på 1,80. Den lidt lavere værdi kan skyldes små forskelle i pH eller ionstyrke i bufferen, som DNA'et er opløst i.

DNA-prøven blev herefter anvendt til, at PCR opformere et 1,55 kb fragment fra 16S genet. Størrelsen på PCR-fragmentet blev bestemt til 1,5-1,7 kb vha. agarose gelelektroforese med en DNA-stige i samme elektroforese og efterfølgende farvning med Fast Blast DNA Stain fra Biorad ([Bilag 3](#), [4](#)).

Forskerprojektets resultater vil vise, hvilke antibiotika resistensgener salivaprøverne indeholder. Tidligere forsøg har konkluderet, at salivamikrobiomet indeholder resistensgener mod antimikrobielle stoffer som beta-lactamater, tetracycline, tigecycline, amoxicillin, gentamicin, erythromycin og cetylpyridinium chloride. Saliva og mundhulemikrobiomet er særdeles komplekst med over 700 bakterielle specier fra fakultativt aerobe til strengt anaerobe<sup>13</sup>.

<sup>e</sup> Koblingssekvens.

<sup>f</sup> Resistensgenerne i spytpøverne.

## BUDGET

Materialer	Pris	Pris i DKK	Reference	Note
MinION	€900,00	6.699,53 (kurs 744)	<a href="#">Nanoporetech</a>	Kan umildbart ikke lånes og skal derfor købes. Jeg har også kontakt til en skole, som jeg kan donere den til bagefter.
16S Barcoding Kit SQK-16S024	€813,00	6.048,72 (kurs 744)	<a href="#">Nanoporetech</a>	
QIAGEN Nuclease-fri vand	\$65,00	485,55 (kurs 747)	<a href="#">Qiagen</a>	
QIAGEN DNeasy kit	\$204,00	1.523,88 (kurs 747)	<a href="#">Quiagen</a>	
CleanNGS breads	\$125,00	933,75 (kurs 747)	<a href="#">Bulldog</a>	
Ethanol 100%		144,00	<a href="#">Scandidact</a>	
Indsamling af snytprøver		1.790,50 (35,81 · 50)**	<a href="#">Læger.dk \$51 2102</a>	Samarbejde med privat læge.*
Podenåle		51,00	<a href="#">Scandidact</a>	
Fluorometer kan lånes af kontakt		0,00		
<b>Total</b>		<b>17.676,93</b>		

\* [Ansøgning til lægemiddelstyrelsen.](#)

\*\*Antal prøver.

## TIDSRAMME

Procedure	Forventet tid
Ansøgningsproces samt aftale med privat læge. I samme periode bestilles udstyr	60 dage
Indsamling af prøver	5 dage
Gennemgang samt opsætning af udstyr	1 dag
Oprensning af DNA	0,5 dag
Sekvensering	2 dage
Databehandling	2 dage
<b>Total</b>	<b>70,5 dage</b>



## KONKLUSION

Resultatet fra dette studie adresserer problemformuleringen: (a) Det er muligt at oprense bakterielt DNA fra saliva og isolere 16S vha. PCR bekræftet ved at bestemme størrelsen af PCR-fragmentet ved gelelektroforese. Dette baner vejen for at identificere de forskellige bakteriespecier i salivaprøver fra patienter direkte ved nanopore-sekventering og dermed undgå at skulle dyrke bakterier, som er en tidskrævende proces, da nogle bakterier vokser meget langsomt – op til to måneder og andre kan slet ikke dyrkes. (b) Det oprensede bakterielle DNA fra saliva kan anvendes direkte til nanopore-sekventering, og den genetiske kode via databaser anvendes til at lave en profil af resistomet i saliva. Med denne viden kan antibiotika resistensgener bestemmes for den enkelte patient og ”individuel” antibiotika medicin fastlægges. Dette vil give hurtigere behandling og mindske spredning af antibiotikaresistens og dermed bedre behandling

for patienterne. Kroppen indeholder mange forskellige niches (tarm, saliva, fæces, blod, lunger), hvor forskellige resistometter opstår. Hvilket resistomet der skal anvendes for at bestemme den optimale antibiotika til sygdomsbehandling, vil fremtidige studier kaste lys over. Vi står i en rivende udvikling, da sekventeringsteknologien er blevet ekstremt hurtig og så billig, at den har potentiale til at nå ud i de fjerneste afkroge i verden.

## TAK TIL

Tak til Ph.d. Jesper Vind, som er biolog og forsker på Novozymes, for at hjælpe og guide mig i projektet.

Tak til KU og projekt Forskerspire for at give mig blod på tanden til at prøve kræfter med et naturfagligt projekt — selvom jeg er HHX'er.



## LITTERATURLISTE

- (1)Gottfried, J. *History Repeating? Avoiding a Return to the Pre-Antibiotic Age*.  
<https://dash.harvard.edu/bitstream/handle/1/8889467/Gottfried05.html>.
- (2)*Antibiotikaresistens*. <https://sum.dk/temaer/antibiotikaresistens> (accessed 2022-10-30).
- (3)*Alexander Fleming Discovery and Development of Penicillin - Landmark*. American Chemical Society.  
<https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html>.
- (4)World Bank, Drug Resistant Infections, marts 2017
- (5)*Særberetning: Bekæmpelse af antimikrobiel resistens*. <https://op.europa.eu/webpub/eca/special-reports/amr-18-2019/da/>.
- (6)Ellabaan, M. M. H.; Munck, C.; Porse, A.; Imamovic, L.; Sommer, M. O. A. Forecasting the Dissemination of Antibiotic Resistance Genes across Bacterial Genomes. *Nat. Commun.* 2021, 12 (1), 2435. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22757-1>.
- (7)*Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria | Elsevier Enhanced Reader*.  
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0032579119449961?token=920F5E20CA18F3142AE2D2828B2FB377D8B93DB4A56BDCA61350071A929F82E8A7CAA532DABD0829C9105C84BFBB41E0&originRegion=eu-west-1&originCreation=20221030224027>. <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.622>.
- (8)Wang, Y.; Zhao, Y.; Bollas, A.; Wang, Y.; Au, K. F. Nanopore Sequencing Technology, Bioinformatics and Applications. *Nat. Biotechnol.* 2021, 39 (11), 1348–1365. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>.
- (9)Garibyan, L.; Avashia, N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J. Invest. Dermatol.* 2013, 133 (3), e6. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.
- (10)*Gel elektroforese - Labster Theory*. [https://theory.labster.com/Gel\\_elektroforese/](https://theory.labster.com/Gel_elektroforese/) (accessed 2022-10-30).
- (11)Deamer, D.; Akeson, M.; Branton, D. Three Decades of Nanopore Sequencing. *Nat. Biotechnol.* 2016, 34 (5), 518–524. <https://doi.org/10.1038/nbt.3423>.
- (12)Avershina, E.; Frye, S. A.; Ali, J.; Taxt, A. M.; Ahmad, R. Ultrafast and Cost-Effective Pathogen Identification and Resistance Gene Detection in a Clinical Setting Using Nanopore Flongle Sequencing. *Front. Microbiol.* 2022, 13, 822402. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.822402>.
- (13)Takeshita, T. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study  
*Published: 24 February 2016*,. <https://doi.org/10.1038/srep22164>.



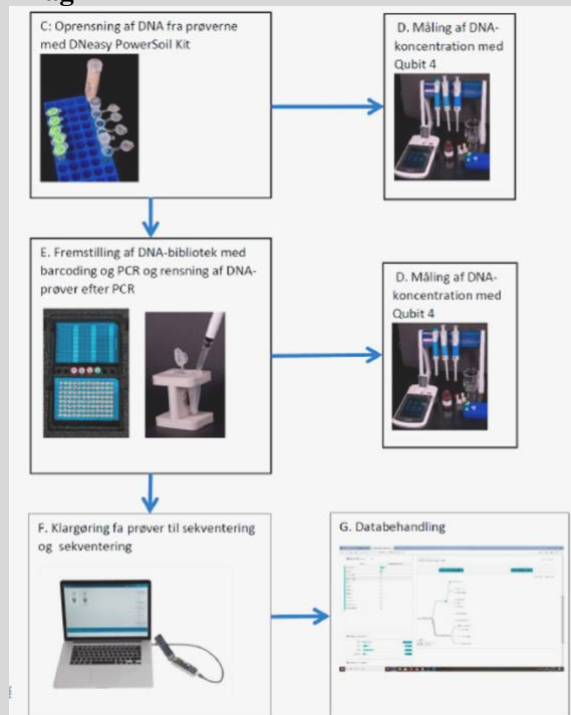
## BILAG

### Bilag 1

Year	Deaths due to Bacterial Illness	American Population	Death Rate due to Bacterial Illness (per 100,000 population)
1930	293,623	118,708,333	247.7
1936	277,541	129,083,333	216.3
1952	93,014	155,758,376	59.7
1960	90,345	179,321,462	50.4
2002	110,202	289,055,601	38.1

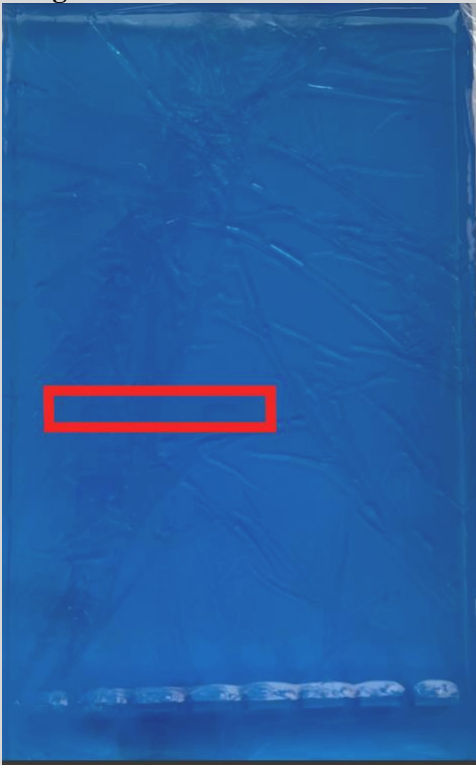
Dødsstatistik, *US National Vital Statistics Report*.

### Bilag 2



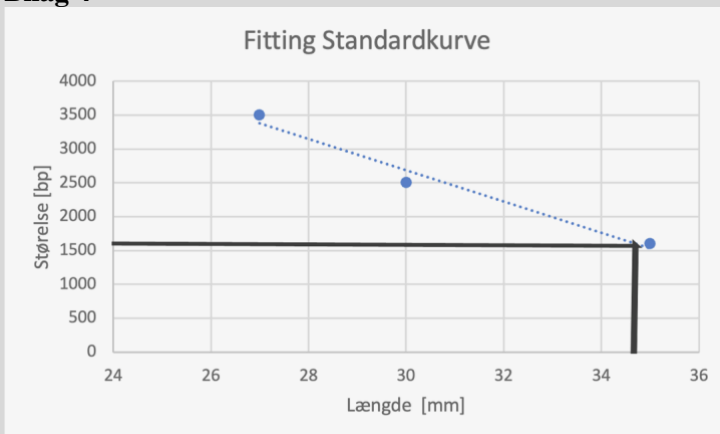
Nanopore-sekventering, *Oxford Nanopore Technologies*

**Bilag 3**



Billede af agarosegel, *M. Wahl*

**Bilag 4**



Størrelsesbestemmelse af DNA-fragment ud fra agarosegel, *M. Wahl*