

# Nanopore sequencen in de strijd tegen antimicrobiële resistentie

25-1-2021

*Snelle detectie van resistente bacteriën is van groot belang voor adequate behandeling van de patiënt. Ook voor het voorkomen van verdere verspreiding van resistente bacteriën tussen patiënten in het ziekenhuis en binnen de samenleving is snelle detectie belangrijk. Mechanismen die antimicrobiële resistentie veroorzaken liggen gecodeerd in het genoom (chromosoom en plasmiden) van de bacterie. Vooral de plasmiden bevatten vaak meerdere resistentiegenen en kunnen relatief gemakkelijk worden overgedragen naar andere bacteriën. Plasmiden zijn dus een belangrijke oorzaak van verspreiding van resistentie.*

Voor snelle bacteriële identificatie, inclusief detectie van resistentiegenen, is de Oxford Nanopore Technologie (<https://nanoporetech.com>, Fig.1) zeer geschikt.



*Figuur 1. Het laden van de nanopore flowcell voor een sequence run met de MinION sequencer.*

Met deze technologie kunnen lange DNA-fragmenten (> 100.000 bp) worden gesequenced en kunnen sequentiedata real-time en binnen een paar uur (na kweek) worden verkregen. Correcte identificatie van bacteriële species is al mogelijk na 10 minuten sequencen, en een resistentiepatroon kan worden verkregen binnen een uur (1). De Oxford Nanopore Technologie kan dus bijdragen aan een snelle diagnose en de juiste behandeling van de patiënt. Daarnaast maken de grote DNA-fragmenten de assemblage van het volledige genoom, en hiermee onderscheid tussen chromosomaal en plasmide DNA, mogelijk. Hierdoor kan worden bepaald of resistentie gecodeerd ligt op een plasmide, en er kan een inschatting gemaakt worden met betrekking tot de kans op verspreiding van resistentie, zodat er adequaat gehandeld kan worden om verspreiding van de resistente bacterie te voorkomen. Kennis over de locatie van een resistentiegen en de omliggende genetische elementen geeft tevens informatie over het mechanisme van mogelijke verspreiding. Zijn er bijvoorbeeld conjugatiegenen op het plasmide aanwezig die overdracht van het plasmide faciliteren, of ligt het resistentiegen in een transposon

waardoor het kan overspringen naar een ander plasmide. Verder kan informatie over de ligging van het resistentiegen, het aantal kopieën van het gen binnen een plasmide, en het aantal kopieën van het plasmide in de bacterie, informatief zijn voor de en mate van resistentie.

Een nadeel van de Oxford Nanopore Technologie is dat er nog relatief veel fouten (~8%) in de sequentiedata aanwezig zijn. Door deze fouten zijn commerciële softwareprogramma's, beschikbaar voor Illumina-data, niet altijd geschikt voor data gegenereerd met de Oxford Nanopore Technologie. In samenwerking met de unit Klinische Bio-informatica binnen het Erasmus MC hebben wij daarom meerdere bio-informatica tools in een Galaxy platform ondergebracht (2), en we hebben een data-analyse-pijplijn ontwikkeld. Galaxy is een open source platform voor computergestuurde data-analyse (<https://galaxyproject.org>). Ook zonder kennis van bio-informatica zijn bio-informatica-tools en -pijplijnen, die ondergebracht zijn in dit platform, toegankelijk voor onderzoekers, MMMers en artsen.

In het Galaxy platform kunnen de sequentiedata gemakkelijk worden ingeladen waarna een analyse met een paar overzichtelijke stappen kan worden gestart. Bij de door ons ontwikkelde pijplijn is het resultaat van de analyse een zogenaamde assemblage die één of meerdere contigs (consensus producten van overlappende DNA-sequenties) bevat. In een gegenereerde visualisatie van de contigs is te zien of de assemblage van het chromosoom en eventuele plasmiden volledig is (circulaire structuren) of niet (lineaire structuren, Fig. 2, rechts). De aanwezigheid van plasmidesequenties wordt tevens voorspeld op basis van het GC- percentage in de contigs. Verder wordt er een resistentieprofiel gegenereerd door de contigs te scannen tegen ResFinder, PlasmidFinder en PointFinder databases (Fig.2, midden).



*Figuur 2. Verschillende resultaten gegenereerd door onze Galaxy data-analyse pijplijn. Informatie van de ingevoerde nanopore sequentiedata (links), geïdentificeerde resistentiegenen en een visualisatie van de contigs inclusief een aanduiding van de locatie van de resistentiegenen (midden), (Bandage) visualisatie van de geassembleerde contigs waarbij een circulaire structuur de volledige assemblage van het chromosoom of een plasmide aangeeft (rechts).*

Op dit moment zijn we de pijplijn aan het valideren. Ook hebben we recent additionele functionaliteit toegevoegd zoals BLASTn, gen-annotatie en een e-report-functie. In het e-report staan alle resultaten, inclusief informatie over de kwaliteit, lengte en hoeveelheid van de ingevoerde ruwe sequenties, overzichtelijk weergegeven (Fig. 2, links). De pijplijn is op aanvraag beschikbaar voor onderzoekers, MMMers en artsen in Nederland.

*Onderzoekers/bio-informatici:*

- Astrid P. Heikema en dr. John. P. Hays, Medische Microbiologie en Infectieziekten, Erasmus MC, Rotterdam.
- Helena Rasche, Willem de Koning, Saskia D. Hiltemann en dr. Andrew P. Stubbs, Unit Klinische Bio-informatica, Pathologie, Erasmus MC, Rotterdam.

*Contactpersoon: dr. Astrid P. Heikema (a.heikema@erasmusmc.nl)*

Dit werk is mede mogelijk gemaakt door financiering uit het reservefonds van de Werkgroep Moleculaire Diagnostiek en Infectieziekten (WMDI) van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie.

Belangenconflict: geen gemeld; de onderzoekers hebben geen financieel belang bij Nanopore of Illumina.

*Referenties:*

1. Taxt AM, Avershina E, Frye SA, Naseer U, Ahmad R. Rapid identification of pathogens, antibiotic resistance genes and plasmids in blood cultures by nanopore sequencing. *Scientific reports*. 2020;10(1):7622.
2. de Koning W, Miladi M, Hiltemann S, Heikema A, Hays JP, Flemming S, et al. NanoGalaxy: Nanopore long-read sequencing data analysis in Galaxy. *Gigascience*. 2020;9(10).
3. Heikema A, de Koning W, Li Y, Stubbs A, Hays JP. Lessons learnt from the introduction of nanopore sequencing. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(10):1286-8.