



Target Enrichment voor moleculaire analysemethoden

Auteur(s): Frits van Charante en Leo Heijnen

Samenvatting

Om beter inzicht te krijgen in de drinkwaterkwaliteit en de potentiële bedreigingen is het noodzakelijk om zeer lage concentraties pathogenen te kunnen detecteren. Bij het gebruik van gebruik van moleculaire methoden loopt men met de huidige concentratie- en DNA-isolatie methoden tegen limieten aan. Met behulp van target enrichment kunnen specifieke organismen of de DNA-sequenties van deze organismen selectief worden verrijkt. Hierdoor kan men met de analyses inzoomen op de zeldzame, maar relevante, micro-organismen in een populatie. Dit geeft mogelijkheden voor detectie lage concentraties pathogenen en vereenvoudigd NGS data-analyse.

Consequenties voor u

	Laag	Middel	Hoog	Beknopte uitleg
Impact				Beter inzicht in waterkwaliteit door verbeterde laboratorium analyses.
Zekerheid				

Trendbeschrijving en achtergrond

Moleculaire microbiologische analysemethoden

Bij de toepassing van moleculaire microbiologische analysemethoden vindt de analyse plaats op basis van de samenstelling van het DNA (DNA-sequenties) of RNA van de organismen. Deze analysemethoden kunnen worden toegepast voor specifieke detectie van één organisme (qPCR) of, door gebruik te maken van Next Generation Sequencing (NGS) technologieën, om inzicht te krijgen in de DNA-sequenties van zeer veel micro-organismen in een populatie (Metagenomics). Deze analyses kunnen worden gebruikt om inzicht te krijgen in de eventuele aanwezigheid van pathogene of antibioticum resistente micro-organismen en de biochemische processen die onder invloed van de microbiologie plaats vinden.

Huidige limitatie

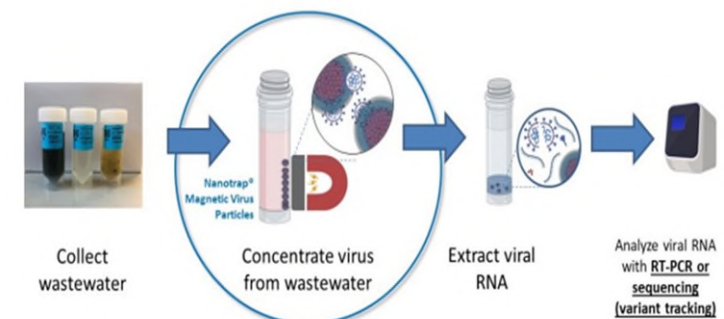
Bij het gebruik of de consumptie van drinkwater kunnen zeer lage concentraties pathogene organismen al zorgen voor onaanvaardbare gezondheidsrisico's. Het is daarom essentieel om het microbiologisch onderzoek ook te kunnen richten op de micro-organismen met zeer lage concentratie. Vanwege deze lage, maar relevante, concentraties worden de huidige analysetechnieken gekenmerkt door het gebruik van een combinatie van een krachtige concentreringsmethode met een zeer gevoelige en specifieke detectiemethode waardoor het

mogelijk wordt om de "speld in de grote hooiberg" aan te tonen. Echter, het gebruik van methoden waarmee concentratie plaatsvindt op basis van alleen de afmeting van deeltjes (filtratie) zorgt voor concentratie van zeer veel extra deeltjes (micro-organismen en stoffen zoals organisch- en anorganisch-materiaal) die de analyse kunnen verstoren. Dit maakt de analyse van grotere volumes problematisch. Methoden waarmee micro-organismen, specifiek kunnen worden verrijkt (target enrichment) en geconcentreerd vormen potentieel aantrekkelijke opties voor de analyse van zeldzame organismen in grotere volumes.

Verrijking van organismen

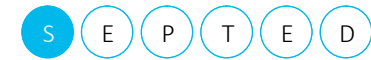
Een methode voor target enrichment maakt gebruik van kleine magnetische deeltjes (beads) die kunnen binden aan specifieke micro-organismen in een watermonster. Na binding kunnen deze beads gebruikt worden voor het scheiden van deze specifieke organismen van alle andere bestanddelen (organismen en stoffen). Zeer bekend, en alle lange tijd in gebruik, zijn IMS Dynabeads® voor de specifieke verrijking van protozoa zoals *Cryptosporidium* en *Giardia*. Recent zijn er ook magnetische beads beschikbaar gekomen waarmee het mogelijk is om een hele range aan bacteriën of virussen uit een geconcentreerd mengsel te isoleren (Nanotrap®

Microbiome Particles van Ceres Nanosciences). Met deze Nanotrap® beads worden de geselecteerde micro-organismen aan beads gebonden en gescheiden van de andere organismen en vervolgens kan het DNA of RNA van de geselecteerde organismen eenvoudig worden geïsoleerd (Figuur 1). Op het verrijkte monster kunnen verschillende organismen vervolgens specifiek worden gedetecteerd met qPCR (Liu et al., 2023) of er kunnen NGS analyse worden uitgevoerd waarmee de geselecteerde organismen aangetoond kunnen worden en de samenstelling van de complete genetische informatie (genoom) van deze organismen kan worden bepaald (Brighton et al., 2024).



Figuur 1: Schematisch overzicht van het gebruik van Nanotrap® in het virusonderzoek van rioolwater

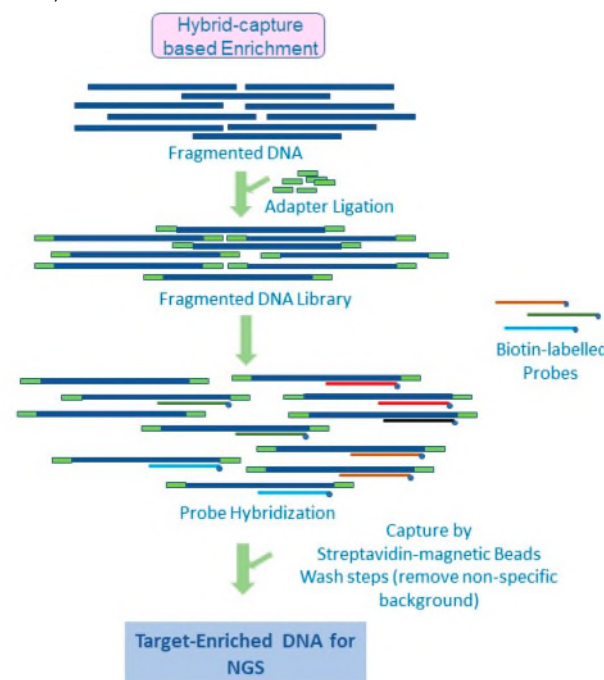
Verrijking van DNA-sequenties



De klassieke methode om specifieke targets te verrijken in een monster is door middel van PCR met primers voor een specifieke DNA-sequentie. Het voordeel van deze methode is dat er relatief weinig target aanwezig hoeft te zijn om de doelsequentie te verrijken. Echter, de sequentieinformatie per organisme is beperkt en het lastig om deze methode op te schalen naar vele targets in één monster aangezien er reacties tussen de verschillende primers kunnen plaatsvinden waarmee artefacten worden gecreëerd.

De toepassing van hybridisatietechnieken vormen een goede optie voor gelijktijdige verrijking van veel genetische targets. Hierbij wordt het, uit een watermonster geïsoleerd, genetisch materiaal (DNA en/of RNA) eerst in stukjes gebroken en aansluitend wordt een mengsel van veel verschillende synthetische DNA(of RNA)-moleculen (probes) toegevoegd waaraan een biotine marker is gekoppeld. De sequenties van deze probes is zodanig gekozen dat binding tussen de probes en het genetisch materiaal van geselecteerde organismen plaats vindt. Na binding van de probes aan het genetisch materiaal uit het monster worden er magnetische beads, waaraan streptavidine is gekoppeld, toegevoegd. De streptavidine bindt aan de biotine marker van de probes waarna de doelsequenties gescheiden kunnen worden van de andere sequenties in

het mengsel. De verrijkte sequenties kunnen vervolgens worden geamplificeerd en gesequenced met NGS (Figuur 2) (Kozarewa et al., 2015 Ballester et al., 2016; Singh, 2022).



Figuur 2. Schematisch overzicht van hybridisatie gebaseerde target enrichment (Singh, 2022)

Er zijn meerdere commerciële aanbieders van gevalideerde mengsels van grote hoeveelheden probes (panels) beschikbaar. Met de samenstelling van de panels is het mogelijk om te bepalen welke sequenties uit het mengsel worden geïsoleerd. Er bestaan panels waarmee het complete genetische materiaal van één virus (zoals SARS-CoV-2) kan worden geïsoleerd of panels waarmee het genetisch materiaal van een selectie van micro-organismen kan worden geïsoleerd.

Beschikbare hybridisatie panels

Er zijn verschillende panels van probes ontwikkeld voor target enrichment door meerdere commerciële partijen (o.a. Illumina, Twist Bioscience en Celeomics) die ook interessant kunnen zijn voor gebruik in drinkwater. Hieronder vallen panels om te screenen voor verschillende virussen en pathogenen. Ook bestaan er panels van probes gericht op functionele genen zoals antibioticaresistentie (AMR) genen (Guiton et al., 2019). Hiermee zou snel een sample gescreend kunnen worden op de aanwezigheid van een grote set AMR genen zonder al het erfelijk materiaal van de verschillende micro-organismen (volledige genomen) te moeten sequencen.



Relevantie

Toepassing: detectie van lage concentraties

Door verrijking toe te passen op de organismen of het DNA (of RNA) van deze organismen zijn er potentiële mogelijkheden om deze organismen met hogere gevoeligheid te detecteren en gericht de sequentie van deze geselecteerde organismen te kunnen bepalen. Het is te verwachten dat verrijking het ook mogelijk maakt om de organismen uit concentraat van grotere volumes te analyseren doordat de met de verrijking ook stoffen, die analyse kunnen verstoren, worden verwijderd. De eenvoud van de zuiveringsstap van organismen met Nanotrap® maakt het mogelijk om zeer snel en met weinig handelingen specifieke organismen uit een watermonster te concentreren en zuiveren. Door deze zuivering is te verwachten dat een eenvoudige isolatiestap voldoende zal zijn voor het isoleren van DNA (of RNA) van voldoende kwaliteit om hierop qPCR of sequencing te kunnen uitvoeren. Wellicht dat de toepassing van Nanotrap® ook de uitvoering van qPCR op locatie, voor gevoelige detectie van pathogenen of indicatororganismen, mogelijk maakt.

Toepassing: sequencing in detail

Met target enrichment kunnen niet alleen specifieke genen of delen van het erfelijk materiaal van micro-organismen verrijkt worden, maar de volledige

genomische informatie van één specifiek micro-organisme (Li et al., 2017) of een mengsel van verschillende organismen. Hiermee kan direct uit een monster de sequentie van het DNA (of RNA) van specifieke micro-organismen in detail niveau worden bepaald. Met deze kennis is het mogelijk om te bepalen welke sequentievarianten er circuleren (zoals SARS-CoV-2 riool surveillance, (Martínez-Puchol et al., 2020)) en geeft de mogelijkheid om bronnen van besmetting te achterhalen.

Toepassing: eenvoudigere analyses

De analyse van NGS-data is nog altijd complex en een lang proces. Er wordt zeer veel data gegenereerd die verwerkt moet worden alvorens gekeken kan worden naar de daadwerkelijke onderzoeksvraag. Door specifiek de gewenste groep micro-organismen of genen te amplificeren alvorens sequentieanalyse uit te voeren wordt er minder complexe data verkregen en wordt de bioinformatica analyse versimpeld.

Meer informatie

- Brighton, K., Fisch, S., Wu, H., Vigil, K. and Aw, T.G. 2024. Targeted community wastewater surveillance for SARS-CoV-2 and Mpox virus during a festival mass-gathering event. *Science of The Total Environment* 906, 167443.
- Guitor, A. K., Raphenya, A. R., Klunk, J., Kuch, M., Alcock, B., Surette, M. G., ... & Wright, G. D. (2019). Capturing the resistome: a targeted capture method to reveal antibiotic resistance determinants in metagenomes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(1), 10-1128.
- Kozarewa, I., Armisen, J., Gardner, A. F., Slatko, B. E., & Hendrickson, C. L. (2015). Overview of target enrichment strategies. *Current protocols in molecular biology*, 112(1), 7-21.
- Li, T., Unger, E. R., Batra, D., Sheth, M., Steinau, M., Jasinski, J., ... & Rajeevan, M. S. (2017). Universal human papillomavirus typing assay: whole-genome sequencing following target enrichment. *Journal of clinical microbiology*, 55(3), 811-823.
- Liu, P., Guo, L., Cavallo, M., Cantrell, C., Hilton, S. P., Nguyen, A., ... & Moe, C. (2023). Comparison of Nanotrap® Microbiome A Particles, membrane filtration, and skim milk workflows for SARS-CoV-2



concentration in wastewater. *Frontiers in Microbiology*, 14.

- Martínez-Puchol, S., Rusiñol, M., Fernández-Cassi, X., Timoneda, N., Itarte, M., Andrés, C., ... & Bofill-Mas, S. (2020). Characterisation of the sewage virome: comparison of NGS tools and occurrence of significant pathogens. *Science of the Total Environment*, 713, 136604.

Keywords

DNA, RNA, Moleculair, Detectie, Micro-organismen, bacteriën, virussen, hygiënisch betrouwbaar drinkwater

Auteur(s): Frits van Charante en Leo Heijnen

Thematisch Trendalert: Target enrichment voor moleculaire analysemethoden

Opdrachtnummer: 402045-042