



Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap, med professor Knut Rudi som veileder og Ph.D. student Anuradha Ravi som biveileder.

Jeg vil rette en takk til min veileder professor Knut Rudi for å vise engasjement, for å støtte meg i tunge stunder og for å motivere meg. Takk for din hjelp gjennom hele masteoppgaven og svarene for mine ofte ”dumme” spørsmålene. Jeg vil også takke Anuradha Ravi for hjelp med laboratoriearbeid og skrivingen. Takk for din analyse av 16S rRNA data. Jeg vil også takke alle i Microbial Diversity gruppen som gjorde at jeg følte meg velkommen og for å hjelpe med min laboratoriearbeid. Dere gjorde hver dag spennende.

Jeg vil takke Gro Aresvik, som hjalp meg med den språklige delen og retta oppgaven min. Jeg lærte mye av deg.

Til slutt vil jeg takke kjæresten min Maciej Tomasz Roszyk for å være der for meg uansett hva. Å skrive masteroppgave var en utfordring for meg, som krevd mye energi fra meg, derfor takk for din forståelse. Din støtte betyr verden for meg. Takk til mine foreldre for å ha alltid tro på meg og støtte meg i hele mitt liv.

Ås, Mars 2016.

Agnieszka Segin

Sammendrag

Morsmelk er den viktigste næring for spedbarn i de første månedene av livet. Tidligere var morsmelk ansett som steril, men mye forskning viste at den inneholder bakterier. Siden morsmelk er den første næring barn for, spiller den en viktig rolle i utvikling av tarmflora hos spedbarn. Riktig utvikling av tarmfloraen er avgjørende for barnas helse. På grunn av den viktige rolle, som tarmfloraen har på spedbarns helse var mye forskning utført innenfor dette området. Forskningene på avføring til spedbarn viste at bakteriene i tarmfloraen hos barn inneholder integroner. Integroner er genetiske elementer, som bærer antibiotikaresistente gener. I denne studien ble det undersøkt om morsmelken kan være en kilde til integroner i bakteriene hos barn. Det ble i tillegg undersøkt taksonomisk sammensetning av bakteriene i morsmelkprøver ved hjelp av 16S rRNA genet. Deteksjon av integroner i morsmelkprøver var utført ved hjelp av integrase genet (*int 1*) og HMR analysen. Resultatene for deteksjonen viste ingen prøver positive for *int 1* genet. Primere som var bruk i analysen var rettet mot integroner av gram-negative bakterier. Resultatene av taksonomisk analysen viste at prøvene var dominert med gram-positive bakterier, derfor var prøvene med stor innhold av gram-positive bakterier selektert, og analysert med gram-positive primere. Ved hjelp av Sanger sekvensering og BLAST søk ble det funnet to prøver positive for *int 1* genet. Disse resultatene tyder på at morsmelken er sannsynlig ikke en kilde til integroner i avføring hos spedbarn. Taksonomisk analyse av morsmelkprøvene viste at de mest dominerende familier i både 10/90 dager prøvene og placebo/probiotisk Biola prøvene er *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*. Innhold av *Moraxellaceae* familien varierer mellom prøvene isolert etter 10/90 dager og placebo/probiotisk Biola prøvene. 16S rRNA sekvensering hadde mange sekvenser med dårlig kvalitet. På grunn av dette burde sekvenseringen gjentas.

Abstract

Breast milk is the most important food for infants during the first months of life. Previously breastmilk has been considered sterile, but much research showed that it contains bacteria. Since breast milk is the first food that children are getting, it plays an important role in development of intestinal flora in infants. Proper development of the intestinal flora is essential for children's health. Because of the important role that gut flora have on infant health, much research was done within this area. Researches on stools samples of infants showed that bacteria in the gut flora of children contain integrons. Integrons are genetic elements that contain antibiotic resistance genes. In this study, we investigated whether human milk can be a source of integrons in bacteria in children. It was also examined taxonomic composition of the bacteria in milk samples using the 16S rRNA gene. Detection of integrons in breast milk samples was performed using the integrase gene (*int 1*) and HMR analysis. The results for detection showed no samples positive for *int 1* gene. The primers used in the analysis were targeting integrons of gram-negative bacteria. The results of taxonomic analysis showed that the samples were dominated by gram-positive bacteria, therefore the samples with high content of gram-positive bacteria were selected and analyzed using gram-positive primers. Using Sanger sequencing and BLAST search two samples were found to be positive for *int 1* gene. These results suggest that breast milk is likely not a source of integrons in stools samples of infants. Taxonomic analysis of breast milk samples showed that the most dominant families in both 10/90 days samples and placebo / probiotic Biola samples are Staphylococcaceae, Streptococcaceae. A content of Moraxellaceae family varies between samples isolated after 10/90 days and placebo / probiotic Biola samples. 16S rRNA sequencing had many sequences with poor quality. Because of that the sequencing should be repeated.

Forkortelser

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

Bp - base pair

ddNTP - dideoxynukleotidtrifosfat

DNA - deoksyribonukleinsyre

dNTP - deoxynukleotidtrifosfat

dsDNA - dobbelttråd DNA

HRM - High resolution melting

int1 - klasse 1 integron integrase gen

OUT - Operational taxonomic unit

PCoA - Principal coordinates analysis

PCR - Polymerasekjedereaksjon

QIIME - Quantitative Insights Into Microbial Ecology

qPCR - kvantitativ polymerasekjedereaksjon

RNA - Ribonukleotidsyre

rRNA - ribosomal ribonukleotidsyre

Innhold

1. Innledning	1
1.1 Breast milk.....	1
1.2 Spedbarn microbiota	2
1.3 Probiotika.....	2
1.4 Multidrugresistens.....	3
1.5 Mobile genetiske elementer	4
1.5.1 Konjugasjon.....	4
1.5.2 Transduksjon	4
1.5.3 Transformasjon.....	4
1.5.4 Integroner	5
1.6 16S rRNA som verktøy til å studere mikrobiell diversitet	6
1.7 Polymerase kjedereaksjon	6
1.8 Sekvensering	7
1.8.1 Sanger sekvensering	7
1.8.2 Illumina	7
1.8.3 Pyrosekvensering	8
1.9 Mål	9
2. Materialer og metoder	10
2.1 Oversikt over metoder.....	10
2.2 Informasjon om prøver	10
2.3 DNA ekstraksjon.....	11
2.4 Polymerase kjedereaksjon (PCR).....	11
2.4.1 Primers	11
2.4.2 Kvalitativ PCR.....	12
2.4.3 Gradient PCR.....	12
2.4.4 Kvantitativ PCR.....	12
2.5 DNA kvalifikasjon og kvantifikasjon	13
2.5.1 Gelelektroforese.....	13
2.5.2 Qubit	13
2.6 Sekvensering	13

2.6.1 Sekvensering PCR	13
2.6.2 16S rRNA metagenome sekvensering	14
2.7 Sanger sekvensering	15
2.8 Dataanalysen	15
2.8.1 Taksonomisk analyse	15
2.8.2 <i>int 1</i> analyse	15
3. Resultater	16
3.1 Integroner	16
3.1.1 Gram-negative integroner	16
3.1.2 Gram-positive integroner	19
3.2 16S rRNA metagenom analyse	22
3.2.1 α diversitet	22
3.2.2 β diversitet	24
3.2.3 Taksonomisk analyse	24
4. Diskusjon	28
4.1 Taksonomisk analyse	28
4.2 <i>Int 1</i> analyse	29
4.3 Teknisk vurdering	29
5. Referanser	30

1. Innledning

1.1 Breast milk

Morsmelk var tidligere ansett som steril, men mange studier viser at det er ikke tilfellet. Morsmelk inneholder bakterier og næringsstoffer som er betydelig for spedbarnas utvikling og helse. Studiene viser at amming kan forhindre forekomsten av gastrointestinale infeksjoner, luftveisinfeksjoner, allergiske sykdommer og diabetes. Det er isolert mange forskjellige bakteriearter fra morsmelk til i dag, men studiene viser at det finnes en kjernegruppe av bakterieslekter i nesten alle morsmelkprøver. *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacteria*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas* og *Bradyrhizobiaceae* er de ni slekter som ifølge Hunt og hans medarbeidere er kjerneslekter. Det finnes også *Bifidobacterium* arter i melk som er vesentlige for modningen og utvikling av immunsystem hos spedbarn. I tillegg anses *Bifidobacteria* som en av de artene som medfører helsesmessige fordeler for sin vert (Jeurink et al. 2013), (Hunt et al. 2011).

Utenom bakterier finnes det mange nyttige næringsstoffer i morsmelk som karbohydrater, nukleotider, fettsyrer, immunoglobuliner, cytokiner, lysosomer, eksosomer og andre immunmodulerende faktorer. Veldig lite er kjent om funksjonen til de næringsstoffene og mekanismene som spiller viktig rolle i utvikling av immunsystemet hos barn (Jeurink et al. 2013). Morsmelk inneholder også en kompleks gruppe av Human Milk Oligosaccharide (HMO). Omfattende forskning ble gjennomført for å forstå den viktige rolle av morsmelk-oligosakkarider. Forskningene har vist at HMO er ansvarlig for utvikling av immunsystem, forhindrer patogene infeksjoner og modulerer spedbarns tarmflora til bifidogenic mikrobiota (Jeong et al. 2012).

Morsmelken endrer seg stadig i løpet av ammingen avhengig av barnas behov. Tre hovedfaser har blitt definert: råmelk, overgangsmelk og vanlig melk. I den første fase er melken tykk og den produseres i små mengder. Råmelken inneholder en vesentlig mengde av antistoffer og vekstfaktorer og fungerer som første immunforsvar. I den andre fasen forandres sammensetningen av melken. Den inneholder mindre proteiner og immunoglobuliner og mer av sukker og fettstoffer. I den siste fasen er melken tynnere og inneholder alle de næringsstoffene som er nødvendige for barnas vekst og helse.

1.2 Spedbarn microbiota

Mesteparten av spedbarn microbiota finnes i tarmen. Etablering av tarmen hos mennesket er en spennende prosess hvor sammensetning av bakteriene i tarmen endres fra barn til voksen. Rett etter at barn er født begynner mesteparten av koloniseringen. Etter noen få dager er tarmfloraen kolonisert. Forskningene viser at det har stor betydning for utvikling av immunsystemet hos spedbarn.

Størsteparten av koloniseringen begynner rett etter fødsel. De første bakteriene som kommer inni tarmen er fakultativ anaerobe som *Escherichia coli* og *Streptococcus*. Disse bakteriene bryter ned alt oksygen og skaper enda mer anaerobt miljø i tarmen. Dette gjør at andre anaerobe bakterier som *Bifidobacteria*, *Bacteroides* og *Lactobacilli* kommer inni tarmen. De etterfølgende koloniserende bakterier er i stor grad bestemt av foringsprofilen av barnet (Palmer et al. 2007), (Wallace et al. 2011). Mye forskning viser at det tar omtrent 2 år før tarmfloraen hos nyfødte stabiliserer seg og begynner å ligne på den hos voksne. I løpet av den tiden er *Bifidobacteria* arter dominerende i spedbarnas tarm (Avershina et al. 2013).

Det er mange faktorer som kommer i tillegg til foring. Alder på individet og miljøet individet lever i, kan også påvirke diversiteten av tarmfloraen. Samtidig viser forskningen at nær relaterte individer som mor og barn, har mer lignende tarmprofil enn individer som er ubeslektet. Grunnen til det kan også være måten barnet er født på. Under vaginal fødsel er spedbarn utsatt for mors sin vaginale bakterieflora, mens under keisersnitt er barn i kontakt med hudbakterier og med bakterier som finnes i nærheten (Lozupone et al. 2012). I tillegg kan medisiner som antibiotika, påvirke bakteriene i tarmen.

1.3 Probiotika

Probiotika er levende mikroorganismer som kan gi helsemessige fordeler for sin vert. Bakteriene fra slektene *Lactobacillus* og *Bifidobacteria* er brukt mest i probiotika. Forskingen viser at bruk av probiotika kan redusere forekomsten av sykdommer som atopisk eksem, nekrotiserende enterokolitt, autisme, fedme, diabetes og allergi. Probiotika er også ofte brukt ved fordøyelsesproblemer. Hvordan de probiotiske bakteriene fungerer, er ikke helt forstått (Sanders et al. 2013). Probiotika balanserer bakterieprofilen inni tarmen og erstatter eventuelt bakterier som er mistet ved bruk av antibiotika. I disse studiene ble det brukt probiotisk Biola som inneholdt *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* La-5 og *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* Bb-12.

1.4 Multidrugresistens

Oppdagelse av antibiotika var viktig for vår verden. Den første antibiotika ble funnet av Alexander Flemming i 1928. Penicillin ble isolert fra en soppart *Penicillium notatum*, og ble videre utviklet til mange forskjellige typer (Fleming 2001). Antibiotika er medikamenter som brukes til å behandle infeksjoner forårsaket av bakterier. Antibiotika er produsert av mikroorganismer for å hemme vekst eller drepe andre bakterier. Antibiotika har ingen virkning på virus. Siden oppdagelsen av penicillin ble offentliggjort har andre, mer effektive antimikrobielle midler blitt oppdaget, utviklet og modifisert; blant annet streptomycin, tetracycline og kloramfenikol. Det finnes forskjellige mekanismer for hvordan antibiotika angriper bakterier. Antibiotika som hemmer vekst av bakterier kalles bakteriostatiske, mens de som dreper bakterier, kalles bakteriocider eller bakteriedrepende stoffer. De fleste aktuelle bakteriedrepende antibiotika hemmer syntese av DNA, RNA, cellevegg eller proteiner (Kohanski et al. 2010).

Oppdagelse av antibiotika var vesentlig for utvikling av medisin. Antibiotika har gjort bakterieinfeksjoner mye mindre farlig og forbedret folkehelsen. Uten antibiotika kunne det blitt vanskelig eller nesten umulig å gjennomføre operasjoner eller transplantasjoner. Utenom de fordeler som oppdagelse av antibiotika bidrar med i vårt daglige samfunn, finnes det også ulemper. Nesten ubegrenset og uaktsomt brukt av antibiotika gjennom mange år har ført til at bakteriene har utviklet mekanismer for å bli motstandsdyktige eller resistente mot forskjellige medisiner. I begynnelsen hadde bakterier utviklet resistens mot enkelte antibiotika, men med tiden har de utviklet multiresistens mot flere enn bare et antibiotikum såkalte "super bug". Dette problemet har blitt en økende trussel mot menneskets helse og er særlig farlig i sykehusene. Antibiotikaresistente gener spres seg ganske fort, siden bakterier har evne til å overføre sitt genetiske materiale mellom hverandre. Spredning av gener skjer ved horisontal genoverføring. Bakterier i tillegg til kromosomale gener har også gener utenfor kromosom på ett eller flere såkalte plasmider, som er sirkulære DNA-molekyler som replikeres uavhengig av kromosom. Dette gjør overføring av gener lettere. Overføring av gener mellom arter kalles horisontal genoverføring. Mekanismen spiller viktig rolle i spredning av antibiotikaresistens og var sannsynlig avgjørende i evolusjonen. Det finnes tre mekanismer for horisontal genoverføring: konjugasjon, transduksjon og transformasjon. Mekanismene blir nærmere beskrevet videre.

1.5 Mobile genetiske elementer

Mobile genetiske elementer er DNA-segmenter, som kan flytte seg til nye steder på kromosomet. Disse forekommer i alle prokaryoter. Det finnes forskjellige mobile genetiske elementer, men de mest vanlige er plasmider og transposoner. Transposon er et stykke DNA som kan flytte seg fra et sted til en annen i genomet. De kan flytte på seg på to måter: enten klippes de ut og limes et annet sted på genomet, eller replikeres og kopien settes inn et annet sted.

1.5.1 Konjugasjon

Konjugasjon er en mekanisme hvor bakteriene kommer i direkte kontakt med hverandre og det genetiske materiell er overført fra den ene bakterie til den andre. Overføring skjer gjennom porer eller såkalte pili, som er hårlignende strukturer som finnes på overflaten av mange bakterier. Denne prosessen krever et avansert maskineri som sikrer DNA mobilisering. Disse konjugative gener kan være kodet av et separat plasmid eller av integrerende konjugative elementer innsatt i kromosomet. Konjugasjon i gram-negative bakterier er formidlet av type IV seksjons-system, som er et stort makromolekylært kompleks involvert i substrat transport og pilus biogenese. Dette systemet er også involvert i utskillelse av virulensfaktorer til eukaryote celler (Cabezón et al. 2015).

1.5.2 Transduksjon

Transduksjon er en prosess hvor DNA er overført ved hjelp av bakteriofager som gjør at prosessen ikke krever direkte kontakt mellom bakterier. Bakteriofag er et virus som angriper bare bakterier. Denne prosessen er begrenset til nær beslektede arter på grunn av spesifisiteten hos virus.

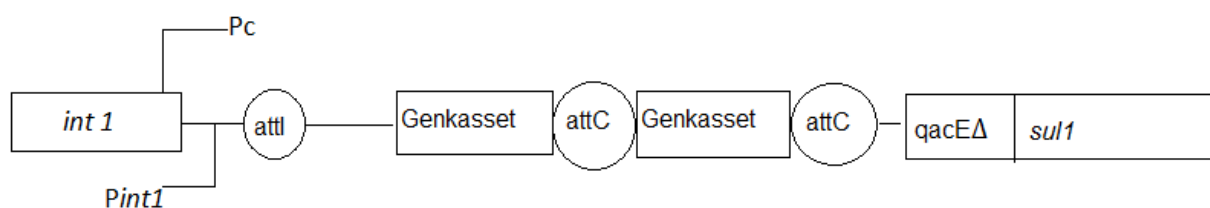
1.5.3 Transformasjon

Transformasjon er en prosess hvor bakteriene tar opp et fremmed DNA fra omgivelsen og inkorporerer det i sitt eget genom. For å ta opp DNA fra omgivelse, må bakteriene være kompetente. Bakteriene kan bli kompetente ved bruk av quorum sensing. Quorum sensing bakterier produserer og frigjør kjemiske signalmolekyler, som fungerer som kommunikasjon mellom bakteriene i et samfunn. Ved transformasjon kan bakteriene ta opp mye større DNA-fragmenter enn ved de to andre metodene. Metoden er også ganske risikabel for bakteriene, siden inkorporert DNA fra omgivelse kan være skadelig eller defekt. Mange forskjellige grunner til at transformasjon er viktig for bakteriene, har blitt foreslått. En av teoriene er at hensikten med transformasjon er å fange genetisk materiale fra andre celler for å reparere

skadede gener, generere genetisk mangfold og tilegne seg nye egenskaper. En annen teori sier at bakteriene blir kompetente for ernæringsmessige formål (Johnsborg et al. 2007).

1.5.4 Integroner

Integroner er viktige elementer i spredning av antibiotikaresistente gener mellom bakteriene, og har stor betydning for multidrugresistens i enkelte individer. Integroner er DNA-elementer som fungerer som rekombinasjonsplattformer, som gjenkjenner og inkorporerer genkassetter. Integroner inneholder gen som koder for integrase (*int*), genkassetter og et integrasjonssted for genkassetter (*att*) (*fluit*). Genkassettene inneholder antibiotikaresistente gener og et spesifikt rekombinasjonssete (*attC*) nedstrøms for genet. Kassettene er bevegelige, noe som gjør at de kan flytte seg fra et integron til et annet. Integroner kan også inneholde flere enn bare en genkasset, som betyr at de kan inneholde flere enn bare et antibiotikaresistent gen. Genkassetter inneholder ikke sine egne promotor områder, derfor er uttrykk av disse genene avhengig av en promotor lokalisert i integronet. Integrasjon av nye kassetter skjer nærmest promotor som gjør at ny antibiotikaresistent gen blir uttrykt først.



Figur 1. Figuren viser strukturen av klasse 1 integroner.

Integroner er delt inn i fem forskjellige klasser etter sekvensen av integrase de bærer. Klasse 1 integroner er forbundet med funksjonelt og ikke funksjonelt transposoner avledet fra transposon Tn402. Klasse 2 integroner er knyttet til Tn7 derivater. Klasse 3 integroner anses å være plassert på et ukarakterisert plasmid, mens klasse 4 og klasse 5 integroner ble identifisert i henhold til deres bidrag til utviklingen av trimetoprim resistens i *Vibrio* arter (Mazel 2006). Klasse 1 integroner er mest aktive i å akkumulere nye genkassetter og finnes nå i alle patogener. Det finnes også super-integroner som er lokalisert på kromosom hos bakteriene. Super-integroner er mye større enn vanlige integroner og inneholder større antall gen kassetter.

1.6 16S rRNA som verktøy til å studere mikrobiell diversitet

I de siste årene er forskerne blitt interessert i å studere forskjellige miljøer og deres sammensetning av mikroorganismer som helhet. Ikke alle bakterier kan dyrkes og analyseres. Det er vanskelig å studere mikroorganismer som er udyrkbare. For å studere mikrobielle samfunn som er udyrkbare ble mange metoder utviklet. Metoden som ble brukt i disse studiene for å studere morsmelk prøver var 16S ribosomal RNA-sekvensering. 16S rRNA er et høy konservert og funksjonelt konstant gen, som i de siste årene er mye brukt som en genetisk markør i DNA-sekvensering. Markøren blir ofte brukt til å karakterisere taksonomisk sammensetning av prøver, samt fylogenetisk mangfold (Woo et al. 2008), (Langille et al. 2013). 16S rRNA genet inneholder høy konservative domener av sekvenser med flere variable regioner. De konservative regioner gir informasjon som hjelper å klassifisere høyere taksa, mens de variable domener brukes for å skille mellom nær beslektede arter. Størrelse på en gjennomsnittlig 16S rRNA molekyl er på 1500 nukleotider. 16S rRNA ble for første gang brukt av Carl Woese og George E. Fox i en fylogenetisk analyse.

1.7 Polymerase kjedereaksjon

Polymerase chain reaction, altså polymerase kjedereaksjon (PCR), er en reaksjon der ønsket DNA-fragment er amplifisert eller kopiert opp til millioner kopier til at tilstrekkelig mengde DNA oppnås til videre analyse uten bruk av levende organismer. PCR var for første gang brukt i 1985 (Saiki et al. 1985). Med denne teknikken kan bare korte DNA-fragmenter amplifiseres, som for eksempel et gen, og sekvensen av fragmentet må være kjent.

I reaksjonen brukes varmen som denaturerer dobbeltråd DNA ved 95°C, og setter syntesen av nye fragmenter i gang. Før syntesen av fragmenter starter, senkes temperaturen og forward og reverse primere bindes til enkeltråder av DNA for å indikere starten og slutten av ønsket fragment. Deretter begynner varmestabil DNA polymerase kalt Taq polymerase å syntetisere fragmentet i 72°C. Dette gjentas opptil 40 sykluser for å oppnå ønsket mengde DNA.

Kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR) er den teknikk som er mest brukt i dag. Metoden er rask og nøyaktig for kultur-independent kvantifisering av mikroorganismer. Metoden baserer seg nesten på de samme prinsippene som vanlig PCR, men i tillegg brukes det fluoriserende reagens for å måle antall kopier generert for hver syklus. C_t verdi er et mål for det fluoriserende signalet qPCR maskinen detekterer. C_t verdien er en terskel som viser antall sykluser det tok til å oppdage et ekte signal fra prøvene. Hvis det er mye av den aktuelle

DNA i prøven, trengs det mindre syklere for å detektere signalet. Dette betyr at konsentrasjonen av DNA er stor i prøvene med lav C_t verdi.

1.8 Sekvensering

I løpet av de 10 siste årene har antall sekvensert genom økt enormt. Dette skyldes utvikling av neste generasjon sekvenseringsteknologi, som gjorde sekvenseringen både billigere og raskere. Før det var første generasjon sekvenseringsteknologi brukt.

1.8.1 Sanger sekvensering

Sanger sekvensering var en av de første teknologiene, som var brukt til sekvensering. Denne metoden ble utviklet av Fredrick Sanger i 1977. Sekvensering er basert på at DNA polymerase kopierer templat ved å inkorporere deoksyribonukleotid trifosfater (dNTP) til 3' enden av primere, som er hybridisert til templat DNA. Ekstensjon forekommer i 5' til 3' retning ved dannelse av en fosfordiester binding mellom 3' hydroksylgruppe (OH) og 5' fosfatgruppe. I tillegg til deoksyribonukleotider tilsettes det også dideoksyribonukleotider (ddNTP) som i stedet for hydroksylgruppe i 3' enden har bare ett hydrogenatom. Dette fører til at neste nukleotid blir ikke inkorporert og sekvenseringen stoppes. Fire reaksjoner trenges for å avlese sekvensen. I hver separat reaksjon tilsettes det bare en av de fire ddNTP, som er merket med forskjellige fargestoffer – en for hver ddNTP. Videre kan sekvensen bestemmes ved hjelp av gelelektroforese. Gelelektroforese er en metode brukt til å separere DNA/RNA-sekvenser, proteiner, aminosyrer eller andre. Ved å sette på strøm vandrer de negativt ladete DNA-fragmenter gjennom porete agarosegelen mot positiv pol. Fragmenter vandrer med ulik hastighet gjennom gelen avhengig av størrelsen. Resultatet er et mønster med forskjellig DNA-fragmenter i hvert bånd. Siden nukleotider er merket med fargestoffer, kan sekvensen avleses direkte av båndmønsteret (Metzker 2005).

1.8.2 Illumina

Dagens komplekse problemstillinger knyttet til forskning på bakteriell samfunn som helhet i deres naturlige miljø, førte til at det var viktig å utvikle bedre og raskere sekvenseringsteknologier. Disse teknologier kalles neste generasjon sekvensering, og en av dem er utviklet av Illumina bedriften. Illumina sekvenseringsteknologi muliggjør håndtering av de store problemstillinger. MiSeq system gir ut informasjon med opp til 25 millioner reads, som er 2x300 basepar (bp) lange. Teknologien er rask og billig, som gjør at det er en av mest brukte sekvenserings metoder i dag. Illumina er sekvensering ved syntese teknologi og prosessen deles inn i tre trin; prøvepreparering, kolonidannelse og sekvensering.

Før prøvepreparering er DNA rensset. Under prøvepreparering er DNA fragmentert og korte oligonukleotider bindes til hver ende av begge DNA-tråd. Disse korte sekvenser kalles adaptore. Videre er prøvene amplifisert i såkalt redusert syklus amplifikasjon, hvor sekvenser for primerbinding, indekser, og terminale sekvenser er bundet. Indeksene er unike, korte sekvenser, som er brukt i løpet av DNA-sekvensanalyse for å identifisere forskjellige prøver.

Neste trinn i Illumina sekvenseringsprosess er kolonidannelse. Prosessen er utført på såkalt flowcell, som er en glasscelle med linser. Hver linse inneholder to typer av oligonukleotider. Det finnes mange forskjellige oligonukleotider på en celle. Disse oligonukleotider binder komplementære oligonukleotider fra prøvene, og DNA polymerase hybridiserer ny tråd. Dobbeltråd DNA er da videre denaturert, og templattråd er vasket bort. Andre enden av den kopierte tråd bøyes og bindes til den andre oligonukleotidtypen, som danner en bro. DNA polymerase hybridiserer dobbeltrådig bro, som er videre denaturert, og resulterer i to enkeltrådig DNA bundet til cellen. Denne prosessen er repetert mange ganger for mange forskjellige oligonukleotider på cellen. Etter denne prosessen er reverstråder kuttet og vasket bort. Dette fører til dannelse av mange forskjellige kolonier, som videre bli sekvensert samtidig.

Sekvensering begynner med binding av primere for å hybridisere de første reads. I denne prosessen brukes nukleotider merket med fluorescens, hvor hver av basene er merket med sin egen farge. Mens DNA polymerase inkorporerer basene, frigjøres det det fluorescernde signalet til hver base. For hver koloni er alle de identiske tråder hybridisert samtidig, som emitterer et sterkt signal. Signalet er detektert av maskinen, og sekvensen er avlest. Deretter er andre reads sekvensert. Hele prosessen produserer millioner av sekvenser, som representerer alle bakteriene i prøvene.

1.8.3 Pyrosekvensering

Pyrosekvensering er en annen teknikk for sekvensering etter sekvensering av synteseprinsippet. Denne metoden er basert på PCR amplifikasjon på overflaten av små kuler. Kullene er i en emulsjon av olje og vann. En kule inneholder et templat DNA-molekyl og alle reagensene som er nødvendig til amplifikasjon. I løpet av emPCR, blir de enkelte bibliotekmolekyler forsterket til millioner av identiske kopier, som er bundet til kulene for optimal deteksjon av signalet. Sekvensering starter med binding av primere og nukleotider med pyrofosfat. Etter at nukleotid er inkorporert, kuttes pyrofosfat av. Dette danner et lyssignal, som er detektert av instrumentet, og sekvensen er bestemt.

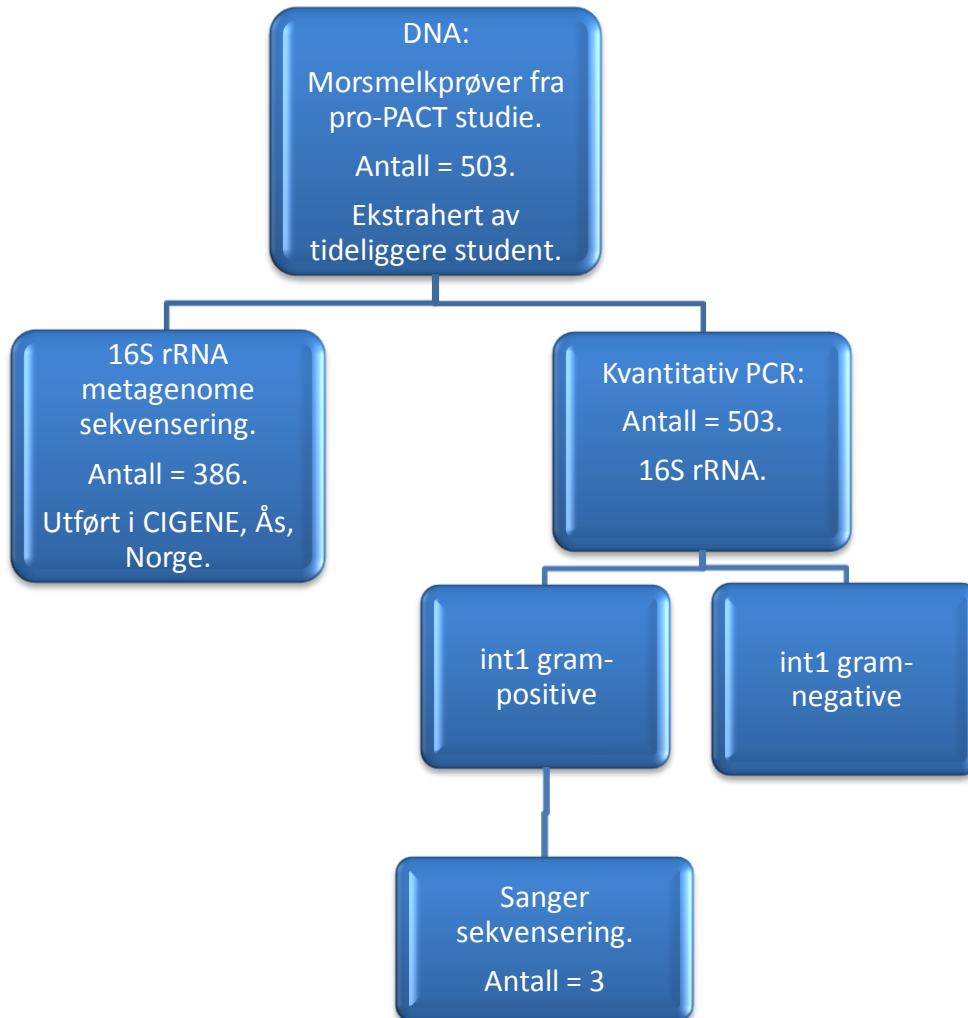
1.9 Mål

Oppdagelse av antibiotika var en revolusjon for medisinen. Allikevel har uaktsomt og nesten ubegrenset bruk av antibiotika på forskjellige infeksjoner ført til at bakteriene har utviklet resistens. Antibiotikaresistens hos bakteriene er en økende trussel for menneskets helse, siden de ikke lenger er resistente mot enkelte antibiotika, men mot flere samtidig. En av mekanismene, som er brukt av bakteriene for spredning av antibiotikaresistens, er integroner. Strategisk sted for spredning av antibiotikaresistens er tarmfloraen hos mennesket. Mange studier viser at det finnes integroner i tarmen allerede hos spedbarn. Morsmelk er en av de viktigste næringskilder for spedbarn, som gjør den en potensiell kilde for integroner i tarmen hos barn.

Målet med denne oppgaven er å undersøke om morsmelk er en av kilder til integroner i bakterier som finnes i tarmen hos spedbarn. I denne studien ble det også undersøkt sammensetningen av bakteriene i morsmelk, siden det har vesentlig påvirkning på barnas utvikling og helse.

2. Materialer og metoder

2.1 Oversikt over metoder



Figur 2. Oversikt over metoder brukt under studiet, samt antall prøver og eventuelle institusjoner analyser ble utført i.

2.2 Informasjon om prøver

Prøvene kommer fra tidligere Pro-PACT- studiet som igjen er understudiet av PACT-studiet (The Prevention of Allergy Among Children in Trondheim). Probiotika i PACT- studiet altså Pro-PACT-studiet er et studie hvor mødrene hadde tatt probiotisk og placebo Biola® (Tine BA, Oslo, Norge) under svangerskap og under amming. Målet med Pro-PACT- studiet var å undersøke om probiotisk Biola kan redusere forekomst av allergiske sykdommer hos barn gjennom de 2 første år etter fødsel. Probiotisk Biola inneholder *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* La-5 og *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* Bb-12. Kvinner

som var rekruttert i studien, skulle drikke Biola i 4 måneder, fra 36 uke av svangerskap til 3 måneder etter fødsel.

I denne studien var det til sammen 503 prøver hvor 129 kvinner hadde tatt probiotisk Biola mens 130 hadde tatt placebo Biola, altså uten de probiotiske bakterier i melken. Totalt 259 mødre var inkludert i studiene. Morsmelk var samlet fra mødre i to forskjellige tidspunkter etter fødsel, etter 10 dager og etter 90 dager.

2.3 DNA ekstraksjon

DNA ble isolert fra bakterier i morsmelk ved hjelp av MagMidi LGC ekstraksjonskit (LGC Genomic, UK). Instrumentet som ble brukt til å ekstrahere DNA, var KingFisher Flex robot. Prøvene ble først sentrifugert med hastighet på 15000 rpm (omreininger per minutt) gjennom 30 min, supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i 100 µl av S.T.A.R buffer. S.T.A.R buffer forhindrer nedbrytning av nukleinsyre og inaktiverer mulige patogene bakterier. 70 µl av resuspendert pellet ble overført til FastPrep rør som innehold syrevasket glasskuler (Sigma-Aldrich, <106 µm; 0,1 g). Prøvene ble deretter behandlet to ganger i MagNaLyser med hastighet på 2000 rpm i 40 sek med 40 sek mellomrom. Prøvene ble sentrifugert med hastighet på 3500 rpm i 5 min. 50 µl av supernatanten ble overført til KingFisher 96- brønners plate og det ble tilsatt 50 µl av lysis buffer og 5 µl av protease. Protease ble brukt for å bryte ned proteiner i prøvene. Platen ble da videre satt inni roboten og ”ProteinaseMagMiniLGC” prosedyren ble brukt for å inkubere prøvene i 10 min i temperaturen på 55°C. 6 MagMidi plater ble preparert og alle ble satt inni roboten og prosedyren ”MagMiniLGC” satt i gang. Da DNA var ferdig isolert, ble prøvene fryst og lagret i -20°C. Dette var utført av en tidligere student.

2.4 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

2.4.1 Primers

Tabell 1. Oversikt over primere brukt under studiene.

Primer	DNA sekvens (5'-3')	Annealing temp. (°C)	Rettet mot:
PRK341 F	CCTACGGGRBGCASCAG	61	V3-V4 region av 16S rRNA genet
PRK806 R	GGACTACYVGGGTATCTAAT	60	
16S rRNA F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	59	Konservert region av 16S rRNA genet
16S rRNA R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	58	

Int1 F	ACGAGCGCAAGGTTTCGGT	66	1. klasse integrerer av integrasegenet rettet mot gram- negative bakterier
Int1 R	GAAAGGTCTGGTCATACATG	53	
Int1 F	CCT CCC GCA CGA TGA TC	55	1 klasse integrerer av integrasegenet rettet mot gram- positive bakterier
Int1 R	TCC ACG CAT CGT CAG GC	55	

2.4.2 Kvalitativ PCR

Reaksjonsblanding for kvalitativ PCR per prøve på 25 µl inneholdt 1x HOT FIREPol® DNA polymerase med en konsentrasjon på 1,25 U, 1x HOT FIREPol® buffer B2, 2,5 mM MgCl₂, 200 µl dNTP, forward og revers primere med en konsentrasjon på 0,2 µM og nukleasefritt vann. Reaksjonsblandingen ble jevnt fordelt på 96-brønners PCR platen og DNA ble tilsatt. Reaksjonen ble utført på 2720 Thermal Cycler med standard program. Følgende innstillinger ble brukt: oppvarming i 15 min ved temperaturen på 95°C, denaturering ved 95°C i 30 sek, annealing og ekstensjon ved justert temperatur og avslutning ved 72°C i 7 min. Den standard prosedyren ble brukt til PRK, indeksing og int1 PCR og detaljer blir beskrevet.

2.4.3 Gradient PCR

Det var utført gradient PCR for å detektere den optimale temperaturen for annealing der primere binder best og amplifikasjon gir beste resultater. Gradient var satt på 2,5°C på område fra 58,2°C til 60,8°C. Fire prøver ble valgt, samt negativ og positiv kontroll. Det ble laget fire sett med reaksjoner i fire forskjellige temperaturer: i 58,2 °C, 58,9 °C, 60,1 °C og i 60,8 °C. Resultatene ble sjekket på gel og etter båndstyrke ble en bestemt temperatur valgt til å være den optimale temperaturen for annealing. Den optimale temperaturen ble deretter brukt i alle PCR reaksjoner for integrase gen (*int1*) i prøvene med høyt innhold av gram positive bakterier.

2.4.4 Kvantitativ PCR

Reaksjonsblanding for kvantitativ PCR per prøve med total volum på 20 µl inneholdt 1x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR mix, forward og revers primere og nukleasefritt vann. Blandingen ble fordelt på LightCycler® plate med 19 µl i hver brønne og 1 µl av DNA ble tilsatt. Prøvene ble først amplifisert med primere som var rettet mot V3-V4 hypervariabel region av 16S rRNA gen. Reaksjonen startet med oppvarming av DNA i 95°C gjennom 15 min, videre ble det denaturering i 97°C for 30 sek, annealing i 61°C i 30 sek og ekstensjon i 72°C i 30 sek. De tre siste stegene ble gjentatt gjennom 40 sykluser.

Deretter ble prøvene amplifisert med primere som var rettet mot integrase genen (*int1*). Reaksjonen startet igjen med oppvarming av DNA i 95°C gjennom 15 min, videre ble det denaturering i 97°C for 30 sek, annealing i 53°C i 30 sek og ekstensjon i 72°C i 30 sek gjennom 40 sykluser. Alle qPCR reaksjoner ble utført av LightCycler® 480. Fluoriserende signaler ble detektert på slutten av hver syklus og C_t-verdier ble registrert. Reaksjoner for *int1* genen inneholdt også High Resolution Melting (HRM) curve analysen som var videre analysert i Microsoft Excel. C_t-verdier var tatt direkte av qPCR maskinen.

2.5 DNA kvalifikasjon og kvantifikasjon

2.5.1 Gelelektroforese

PCR produkter ble sjekket på 1% agarosegel, hvor 1g av agarosepulver løses i hver 100 ml av 1x TAE buffer. Gelen legges i buffer og strøm settes på. Negativt ladete DNA fragmenter vandrer gjennom porete agarosegelen mot positiv pol. Fragmenter vandrer med ulik hastighet gjennom gelen avhengig av størrelsen. Resultatet er et mønster med forskjellig DNA fragmenter i hvert bånd. For å visualisere DNA fragmenter peqGREEN ble brukt. PeqGREEN er et fargestoff som er fluorescerende, og synliggjør DNA fragmenter under UV-lys. 100bp ladder ble brukt for å vise størrelse av fragmenter på gelen. Gelbilder ble tatt på Gel Doc™ XR+ System.

2.5.2 Qubit

For å kvantifisere hvor mye av genomisk DNA som var i prøvene ble det brukt Qubit fluorometer. Prinsippet bak metoden er å tilsette til prøve fluorescens fargestoff som når det er bundet til DNA er sterk fluorescerende. Instrumentet måler emittert lys og beregner konsentrasjon. Først ble det laget Quant arbeidsløsning som inneholdt Quant reagens og Quant HS buffer i forhold 1:200. Deretter ble 2 µl av prøve og 198 µl av arbeidsløsning blandet i hver rør. Det ble også laget to standarder for å kalibrere instrumentet. Målingene ble utført på Qubit® Fluorometer v 1.0.

2.6 Sekvensering

2.6.1 Sekvensering PCR

Først ble prøvene amplifisert med PRK primere som var rettet mot V3 – V4 regioner av 16S rRNA genen. Standard prosedyren ble brukt med annealing ved 50°C i 30 sek og ekstensjon ved 72°C i 45 sek gjennom 30 sykluser. Det ble brukt ulik mengde templat. I første omgang ble det brukt 2 µl av DNA siden mengden av DNA i morsmelkprøvene er lav. Deretter økes

mengden templat til 5 µl i andre omgang og i tredje omgang ble det brukt 1 µl DNA. Dette ble gjort for å amplifisere mest mulig av prøvene.

Etter PCR reaksjoner ble prøvene resent ved hjelp av AMPure XP kuler. Kulene er paramagnetiske og binder ønskede DNA fragmenter, mens uønskede nukleotider og primere blir fjernet. Dette ble utført på en Biomek 3000 robot med 1,0X mengden av kulene til mengden av PCR produktet.

Videre ble prøvene amplifisert med Illumina-indeksed PRK primere, hvor alle primere ble modifisert ved å tilsette til sekvensen en unik Illumina adapter. Det finnes 16 forward og 36 reverse primere som utgjør til sammen 576 ulike kombinasjoner. Hver prøve har fått bare en unik kombinasjon av primere. Standard prosedyre ble brukt med unntak av oppvarming som ble utført ved 95°C i 5 min og annealing ved 50°C i 1 min gjennom 10 sykluser. PCR produkt ble fortynnet 1:200 før videre behandling.

2.6.2 16S rRNA metagenome sekvensering

Prøvene ble normalisert ved hjelp av Taq-man probe. Metoden inkluderte standardkurve fra 10^{10} - 10^4 som ble videre brukt til å beregne konsentrasjon. Det ble brukt fortynnet indeksing PCR produkt. Reaksjonsblanding for kvantitativ PCR per prøve med total volum på 25 µl inneholdt 1x HOT FIREPol® probe qPCR mix, forward og revers primere og nukleasefritt vann. Blandingen ble fordelt på LightCycler® plate med 24 µl i hver brønne og 1 µl av DNA ble tilsatt. Reaksjonen startet med oppvarming av DNA i 95°C gjennom 15 min, videre ble det denaturering i 95°C for 30 sek, annealing/ekstensjon i 60°C i 1 min gjennom 40 sykluser. Mengden av prøvene ble beregnet ved hjelp av standardkurven. Prøvene ble videre normalisert og sammenslått på Biomek 300. Produkt ble rensert ved hjelp av AMPure XP med 0.8X konsentrasjon av kulene til 150 µl av sammenslått prøve og eluert i 30 µl av PCR vann. Konsentrasjon av prøven ble målt ved hjelp av PerfeCta® NGS Quantification Kit for Illumina (Quanta BioSciences) og videre ble prøven fortynnet i Tris pH 8,5 til konsentrasjon på 4nM. Prøven ble denatureert og spiked med 15% av PhiX kontroll. PhiX er nødvendig for prøver med lav diversitet, og gjør det lettere for programvaren å identifisere klasser. Provene ble satt på MiSeq med konsentrasjon på 8pM. Sekvensering ble utført i The Centre for Integrative Genetics (CIGENE), Ås, Norge. Til sammen 386 prøver av 503 ble sendt til sekvensering.

2.7 Sanger sekvensering

Det ble utført Sanger sekvensering for *int1* genet på prøver med høy mengde av gram-positive bakterier. 5 µl av PCR produkt og µl av forward int1 primere ble blandet i en eppendorfrør for hver prøve. Prøvene ble sendt til GATC biotech (Tyskland) for sekvensering.

2.8 Dataanalysen

2.8.1 Taksonomisk analyse

16S rRNA genet var analysert ved hjelp av QIIME pipeline av Anuradha Ravi. QIIME er en bioinformatisk verktøy for analyse av mikrobiell samfunn fra rå DNA-sekvensering. Sekvensene var kvalitetsfiltrert og gruppert. QIIME genererte såkalte operative taksonomiske enheter OTU, taksonomisk analyse, diversitetanalyse, konstruerer fylogenetiske trær og visualiserer data. Mangfold i prøvene var analysert ved hjelp av rarefraksjon kurver for α -diversitet, mens UniFrac Principal Coordinates Analyses (PCoA) var utført for β -diversitet.

2.8.2 *int 1* analyse

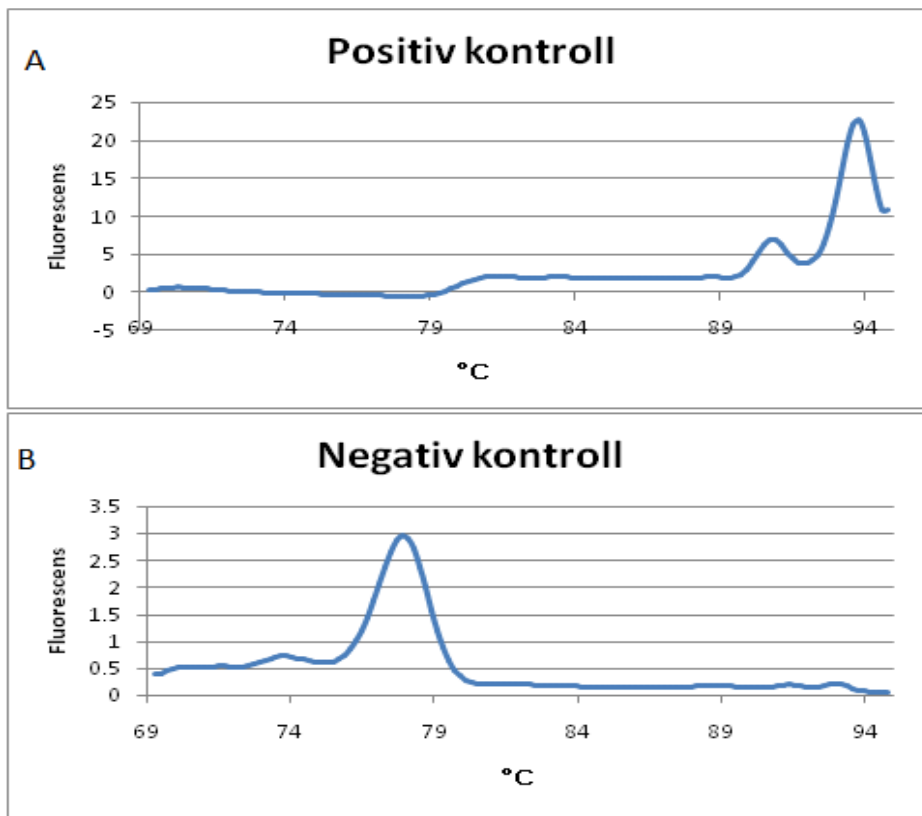
Int 1 genet data var analysert ved hjelp av Microsoft Excel og BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). BLAST er en verktøy for sammenligning av sekvenser. BLAST var brukt for å sjekke sekvensene fra Sanger sekvensering.

3. Resultater

3.1 Integroner

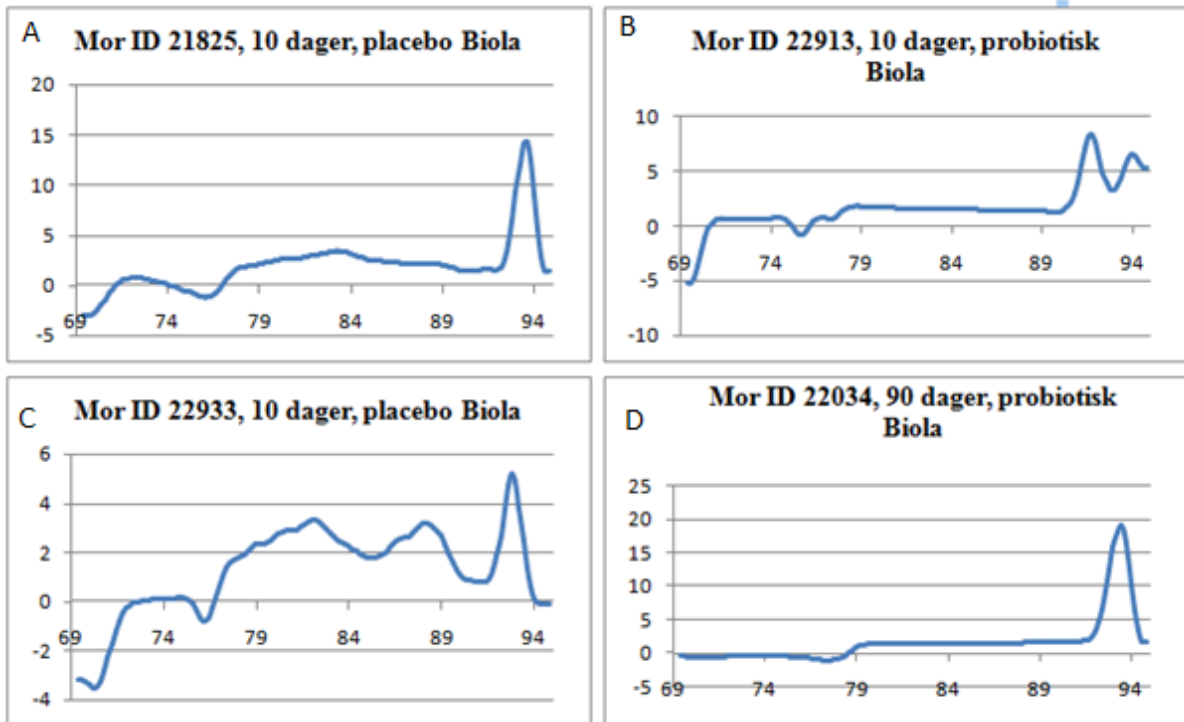
3.1.1 Gram-negative integroner

Alle 503 morsmelkprøvene var sjekket for innhold av gram-negative integroner ved hjelp av *Int 1* genet. Genet har en karakteristisk smeltekurve med fullstendig smeltepunkt på 94°C (figur 1). *Int1* har størrelse på ~530, som gjør at det er enkelt å påvise genet. qPCR og HRM (High Resolution Melt) analyse var utført på alle prøvene. HRM analysen er brukt til å identifisere variasjoner i DNA-sekvensen. Metoden er basert på deteksjon av små forskjeller i smeltekurver. I denne studien brukes HRM analysen for å identifisere prøvene positive for *int1* genet. Resultater av HRM analysen var plotet i Microsoft Excel og prøvene var sjekket for toppen som ligner på den fra positiv kontroll.



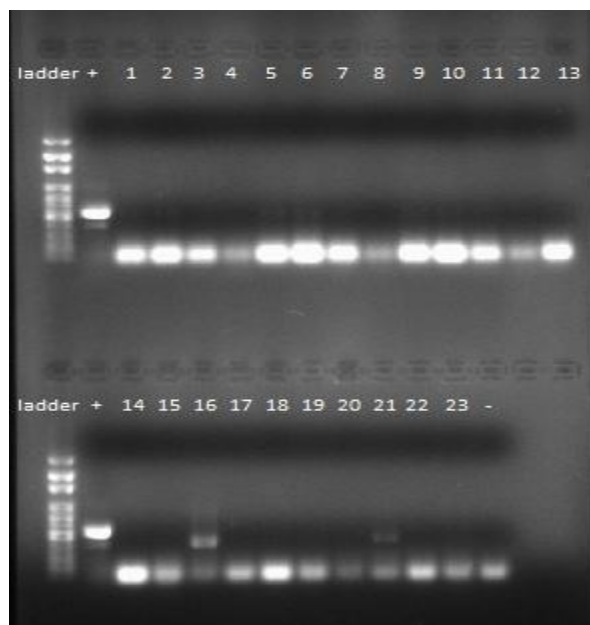
Figur 1. Figuren viser grafene fra HRM analysen. A: Kurven for positiv kontroll med smeltepunkt ved 94 °C, som er vist med topp på grafen. B: Kurven for negativ kontroll, som har smeltepunkt tidligere på grafen.

23 av alle prøvene hadde en lignende topp rundt 94 °C på grafen. Eksempler på prøvene som var selektert vises i figur 3. Noen prøver viser en tydelig topp på grafen ved 94 °C. Andre grafene til prøvene er utydelig, men ble selektert for å oppnå mest nøyaktige resultater.



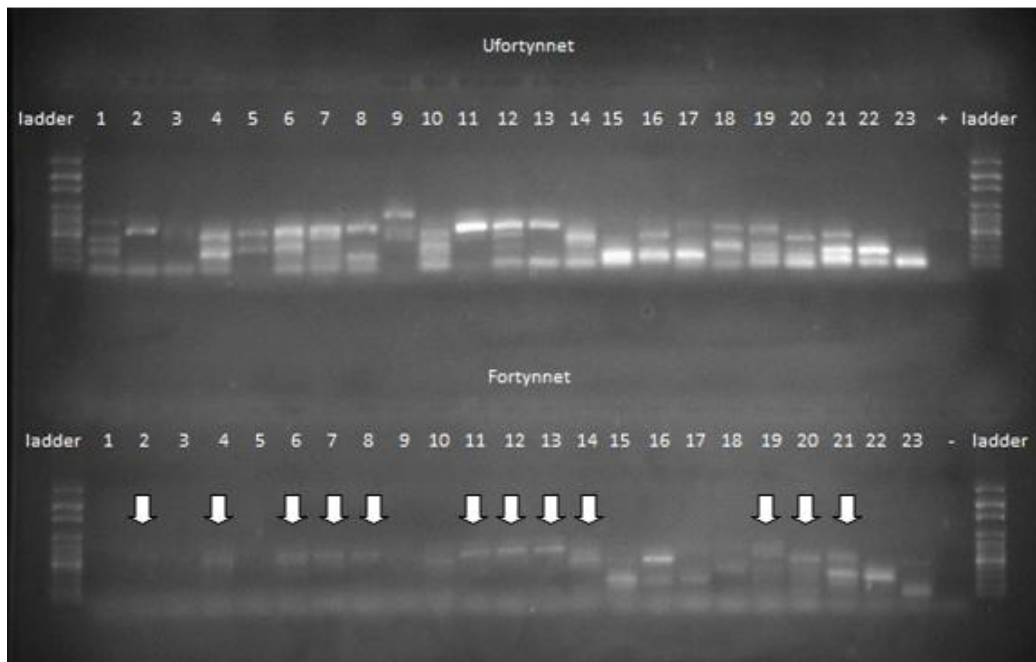
Figur 3. Grafene viser representative prøver som var utvalgt.

Utvalgte prøver var amplifisert med hensyn på *int1* genet og resultatene var sjekket på gel. Størrelse på PCR produkt er på 565bp.



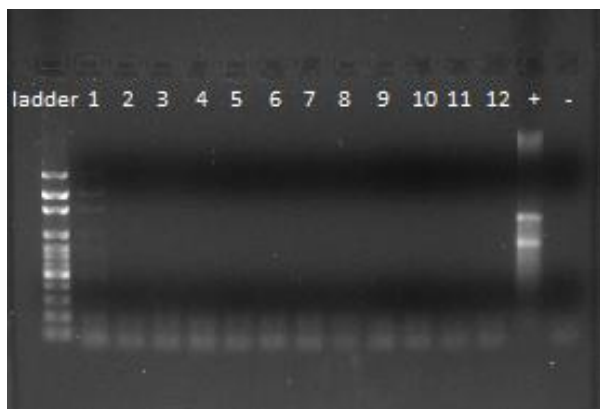
Figur 4. Gelbilde for selekterte prøver. Bilde viser PCR produktet for 23 prøver som var utvalgt, samt ladder, positiv (+) og negativ (-) kontroll.

Resultater fra PCR viste ingen amplifikasjon av *int1* genet for alle prøver. Siden qPCR produkt viste litt bedre resultater var selekterte prøvene rensset. Prøvene var rensset ved bruk av paramagnetiske kuler. Prøvene var fortynnet 1:200 og både de fortynnete og ufortynnet prøvene var amplifisert ved hjelp av kvalitativ PCR.



Figur 5. Gelbilde viser resultater av rensset PCR produktet for utvalgte prøver. Den øvre gelen viser ufortynnet prøver, mens gelen nederst viser fortynnet prøver. Pilene viser prøvene som var utvalgt for videre analyse. Positiv (+) og negativ (-) kontroll er merket.

Positiv kontroll ga veldig svakt bånd, samme som prøvene som var fortynnet. Ut ifra de fortynnete prøver var det utvalgt prøver, som ga bånd på samme størrelse som positiv kontroll. Totalt 12 prøver var selektert, som er vist med piler på bildet. Disse var sendt til Høgskolen i Hedmark for Sanger sekvensering. Sekvensering var mislykket og ga ingen resultater. Derfor var *int1* qPCR på selekterte prøvene gjentatt. Grafene av HRM analysen viste at ingen av prøvene hadde smeltepunkt (topp) ved 94°C. For å bekrefte at ingen av prøvene var positive for *int1* genet var de en gang til amplifisert ved hjelp av kvalitativ PCR. Dette ga heller ingen resultater.



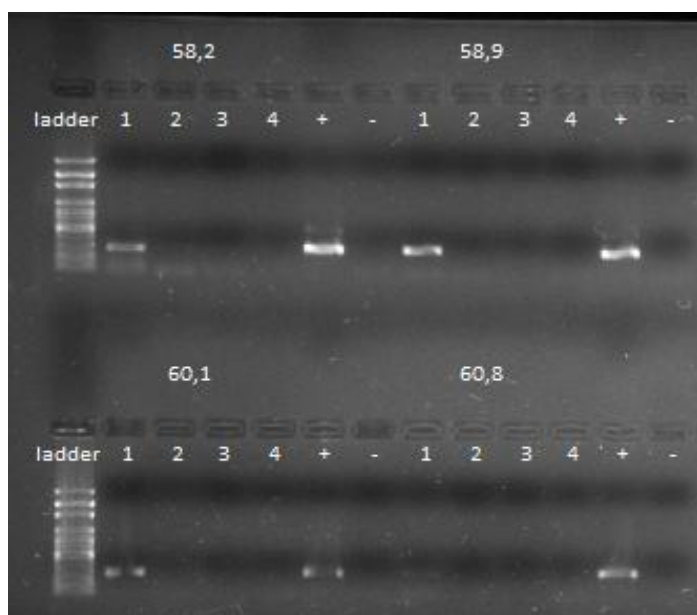
Figur 6. Gelbilde for gram-negative int 1 prøver. Positiv (+) og negativ (-) kontroll er merket.

Denne studien viser at mest sannsynlig gram-negative bakterier i morsmelken inneholder ikke *int1* genet, samt antibiotika resistens.

3.1.2 Gram-positive integroner

Prøvene som innehold 50% og mer av *Firmicutes* var selektert. *Firmicutes* er en gruppe med hovedsakelig gram-positive bakterier. Det var selektert totalt 71 morsmelkprøver. Deteksjon av *int1* i disse prøvene var utført på samme måte som på gram-negative.

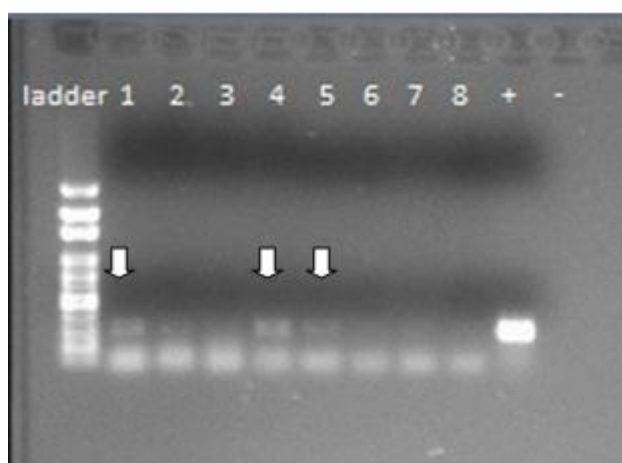
For å selektere den optimale temperaturen i hvilket *int1* primere for gram-positive bakterier gir best amplifikasjon, var gradient PCR utført. Prøvene som var brukt til dette var positive for *int1* genet og kom fra en annen studie. Det var laget fire sett med reaksjoner i fire forskjellige temperaturer: i 58,2°C, 58,9°C, 60,1°C og i 60,8°C. Gradient var satt på 2,5.



Figur 7. Gelbilde viser resultater av optimalisering av annealing temperatur for gram-positiv *int 1* primer. 4 prøver samt positiv (+) og negativ (-) kontroll var satt på gradient PCR med 4 forskjellige temperaturer. Temperaturer er merket på bilde.

Resultatene viste at den optimale temperaturen var 59°C, og den var brukt videre i analysen.

Etter som den optimale temperaturen for amplifikasjon var bestemt, var qPCR utført. Ut ifra HRM grafene var prøvene med topp rundt 94°C selektert. Totalt 8 morsmelkprøver var utvalgt. Disse var igjen amplifisert ved hjelp av kvalitativ PCR.



Figur 8. Gelbilde viser utvalgte gram-positiv *int1* prøver. Pilene viser prøvene som var tatt til videre analysen. Positiv (+) og negativ (-) kontroll er merket.

Ut ifra bildet var det selektert tre prøver som viste sterkeste bånd. De er vist med piler på bildet. Prøvene var videre rensset ved hjelp av paramagnetiske kuler og reamplifisert ved 15 sykluser ved PCR.



Figur 9. Gelbilde viser reamplifisert *int1* prøver. Positiv (+) samt negativ (-) kontroll er merket.

Gelbilde viser at reamplifikasjon var vellykket og *int1* genet kom opp med sterke bånd.

Positiv kontroll kom ikke opp, men prøvene ble allikevel tatt med til videre analysen. Prøvene var rensset igjen og mengde DNA var sjekket på Qubit. Konsentrasjon av dsDNA for prøve 1 var 21,50 ng/ml, for prøve 2 26,10 ng/ml og for prøve 3 9,90 ng/ml.

Morsmelkprøvene sammen med primere var videre sendt til GATC biotech (Tyskland) for Sanger sekvensering. Resultatene kom digitalt og sekvenser var sjekket ved hjelp av BLAST søk. Prøve nr. 1, altså mor ID 21039, 10 dager, Biola og prøve nr.2, mor ID 20787, 90 dager, Biola, ga etter BLAST søk. Prøve nr. 3 var en kort sekvens på 41 nukleotider og ga ingen resultater i BLAST.

Tabell 2. Resultater for BLAST søk for prøve med mor ID 21039, 10 dager, Biola.

Sequence ID	Organism	Max score	Total score	Query cover	E value	Identity
KM219981.1	<i>Escherichia coli</i>	394	394	98%	4e-106	98%
KT625469.1	Uncultured bacterium	390	390	97%	5e-105	98%
CP012137.1	<i>Shigella flexneri</i>	388	388	96%	2e-104	98%
KT326691.1	<i>Citrobacter freundii</i>	388	388	96%	2e-104	98%
KT897470.1	<i>Actinotignum schaalii</i>	388	388	96%	2e-104	98%

Tabell 1 viser resultatene av BLAST søk for prøve nr.1. Sekvensen var 228 bp lang. Treffene for søket viser *int 1* genet med 98% av identitet.

Tabell 3. Resultater for BLAST søk for prøve med mor ID 20787, 90 dager, Biola.

Sequence ID	Organism	Max score	Total score	Query cover	E value	Identity
KT326691.1	<i>Citrobacter freundii</i>	414	414	87%	4e-112	98%
KT897470.1	<i>Actinotignum schaalii</i>	414	414	87%	4e-112	98%
HG314954.2	<i>Salmonella enterica</i>	414	414	87%	4e-112	98%
KR338349.1	<i>Salmonella</i> sp. Nsa217	414	414	87%	4e-112	98%
KR338351.1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	414	414	87%	4e-112	98%

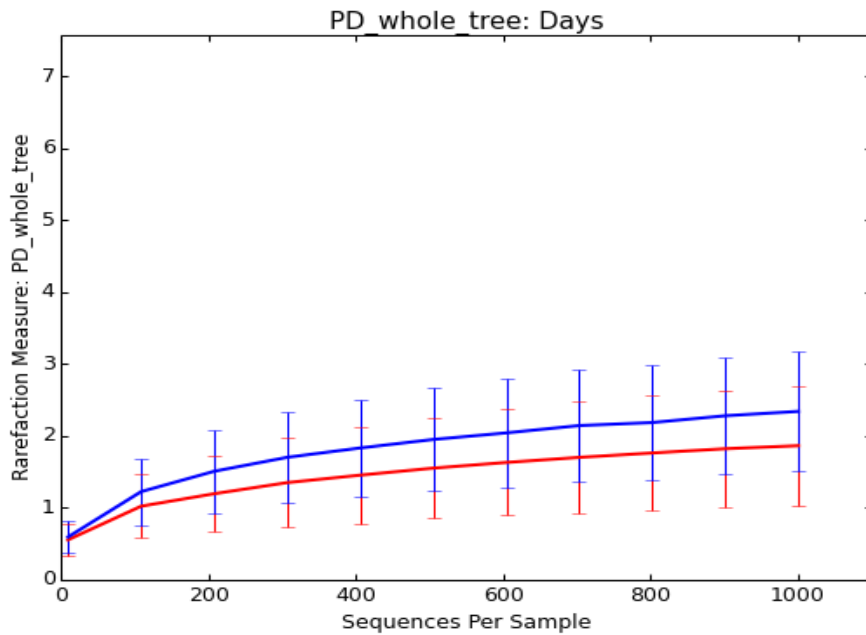
Tabell 2 viser resultater av BLAST søk for prøve nr.2. Sekvensen var 271 bp lang og treffene viser *int 1* genet med 98% av identitet.

3.2 16S rRNA metagenom analyse

Sammensetning av microbiota i morsmelk var analysert ved hjelp av 16S rRNA sekvensering. Sekvensene var videre analysert i QIIME av Anuradha Ravi. Totalt 386 prøver var sendt til sekvensering. Antall av prøver som var sekvensert var 384 med totalt antall av sekvenser på 2994728. Gjennomsnittlig antall sekvenser per prøver var 7798,771 med median på 1208,500. Prøvene som hadde mindre enn 1000 sekvenser ble forkastet, og 199 prøver var tatt videre til analysen.

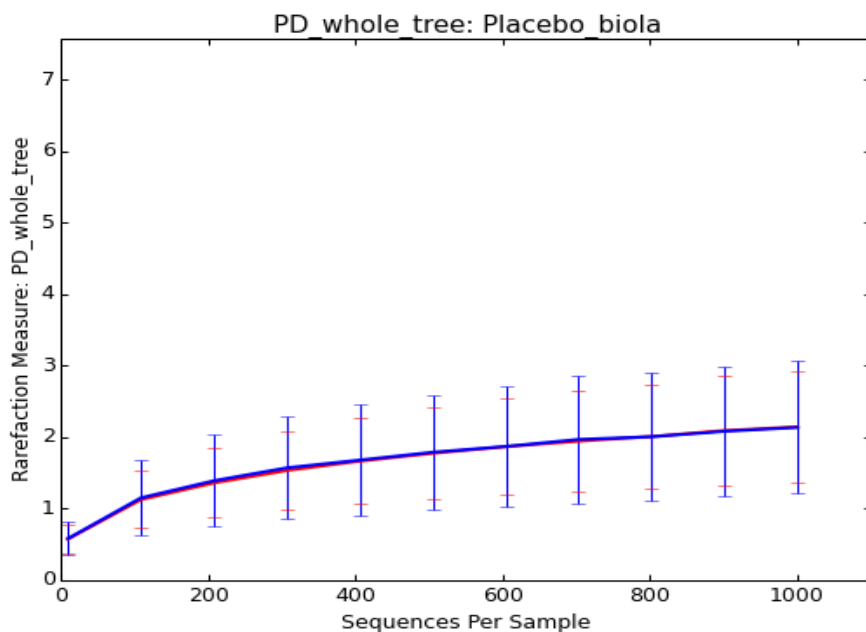
3.2.1 α diversitet

α diversitet analysen var utført for å undersøke artmangfoldet i prøvene. QIIME var brukt for å lage rarefraksjon grafene med gjennomsnittelig antall observerte arter til mengden av sekvenser per prøve. Grafene var lagt for å undersøke forskjeller mellom prøvene som var samlet etter 10 dager og 90 dager, men også for prøvene mellom placebo og probiotisk Biola.



Figur 10. Grafen viser rarefraksjon kurven for prøvene etter 10 dager (rød kurven) og etter 90 dager (blå kurven).

Resultater i figur 6. viser rarefraksjon kurvene for prøvene samlet etter 10 og 90 dager etter fødsel. Dette viser at det er forskjell i artsmangfoldet mellom prøvene etter 10 og 90 dager, som mange studier har bekreftet. (ref)

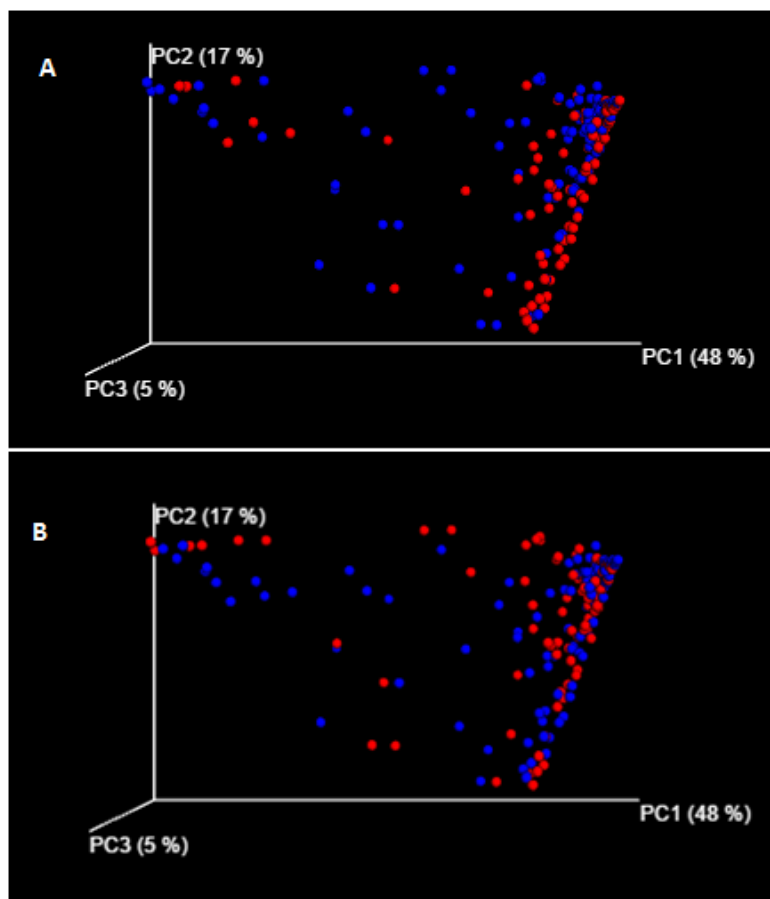


Figur 11. Grafen viser rarefraksjon kurven for prøvene med probiotisk Biola (rød kurven) og placebo Biola (blå kurven)

Rarefraksjon kurven for prøvene med placebo og probiotisk Biola viser at det er ingen forskjell i artsmangfoldet mellom dem.

3.2.2 β diversitet

β diversitet analysen var utført for å undersøke variasjoner mellom prøvene. Analysen var utført ved hjelp av UniFrac Principal Coordinate's Analysis (PCoA). Vektet PCoA plottene for biola/placebo og 10/90 dager prøvene viser ingen variasjon.



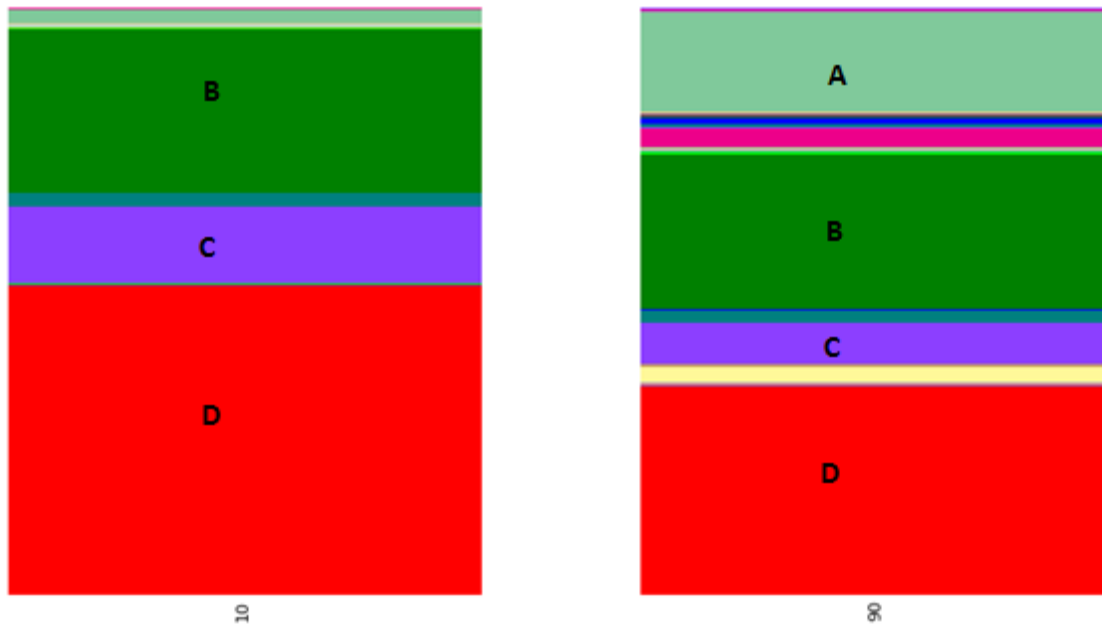
Figur 12. Figuren viser vektet PCoA plottene. A: PCoA plot for 10/90 dager prøvene (rød: 10 dager, blå: 90 dager). B: PCoA plot for biola/placebo prøvene (rød: biola, blå: placebo).

3.2.3 Taksonomisk analyse

Taksonomisk analyse var utført for å undersøke sammensetningen av bakterier i morsmelkprøver. Det finnes mange OTU som ikke er tildelt til noen av de taksonomiske grupper av bakterier på alle taksonomiske nivåer.

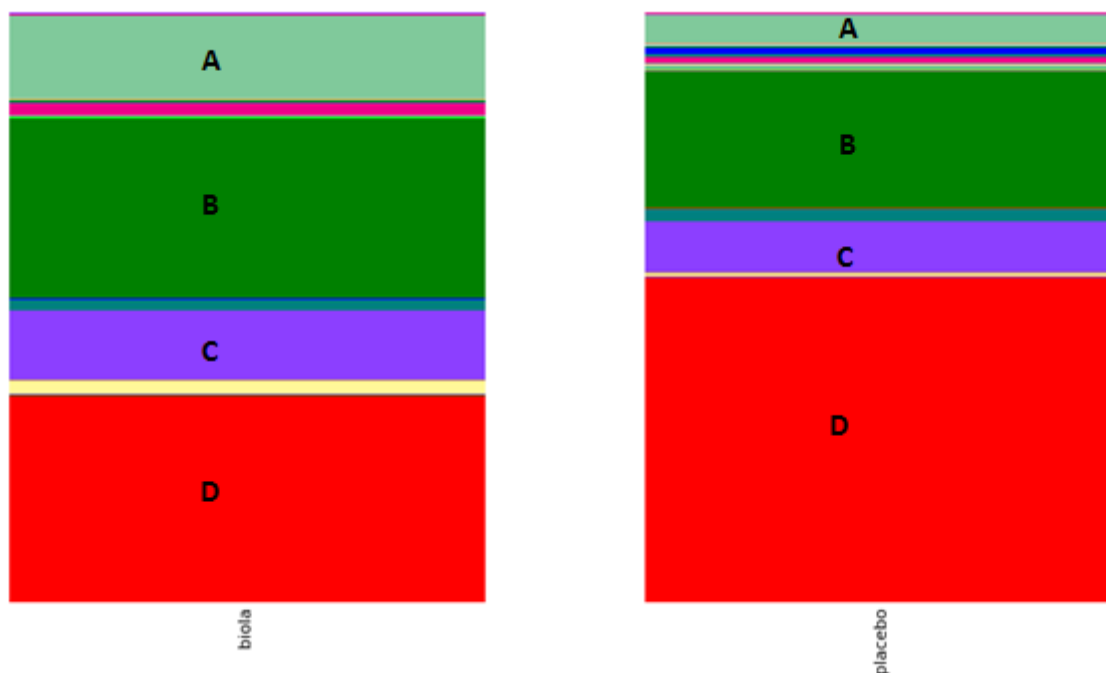
Bakterieinnhold i prøvene isolert etter 10 og 90 dager var sammenlignet på familie nivå. I prøvene isolert etter 10 dager dominerer *Staphylococcaceae* og *Streptococcaceae*. De to familier finnes også i prøvene isolert etter 90 dager. I tillegg *Moraxellaceae* familien er

dominerende i disse prøvene. Sammensetningen av prøvene etter 90 dager er mer kompleks enn prøvene etter 10 dager. Det finnes mange forskjellige familier i små prosentandel i disse prøvene som; *Sphingobacteriaceae* (gul), *Caulobacteraceae* (rosa) og *Sphingomonadaceae* (blå). Resultatene vises i figur 9.



Figur 13. Resultater av taksonomisk analyse for 10/90 dager prøvene på familie nivå. A: *Moraxellaceae*, B: *Streptococcaceae*, C: *Staphylococcaceae*, D: Unassigned.

Sammensetningen av bakterier var også analysert i prøvene med probiotisk og placebo Biola. Disse prøvene viser mindre variasjon. I prøvene fra mødrene som har drukket probiotisk Biola dominerer *Moraxellaceae*, *Streptococcaceae* og *Staphylococcaceae* familiene. I prøvene fra mødrene som har drukket placebo Biola finnes det mindre *Moraxellaceae* familien. *Streptococcaceae* og *Staphylococcaceae* familiene er også dominerende i disse prøvene. Det finnes veldig små variasjoner i sammensetning av bakteriene for disse prøvene. Resultatene vises i figur 10.



Figur 14. Resultater av taksonomisk analyse for biola/placebo prøvene på familie nivå. A: *Moraxellaceae*, B: *Streptococcaceae*, C: *Staphylococcaceae*, D: Unassigned.

Ut ifra taksomomisk analyse for både 10/90 dager og probiotisk og placebo Biola viste det seg at prøvene er dominert av gram-positive bakterier som *Streptococcaceae* og *Staphylococcaceae* familiene.

Det var utført Kruskal–Wallis test på alle prøvene. Dette var gjort for å undersøke signifikante forskjeller mellom OTU i prøvene. Kruskal-Wallis test er en statistikk test for variansanalyse kalt ANOVA (analysis of variance).

Tabell 4. Tabellen viser OTU's som viser signifikant forskjell mellom probiotisk og placebo Biola.

OTU	Test-Statistic	P	FDR_P	biola_mean	placebo_mean	taxonomy
OTU_465	6.95	0.01	0.64	0.33	0.01	f. <i>Moraxellaceae</i>
OTU_232	6.21	0.01	0.64	0	0.64	f. <i>Pseudomonadaceae</i>
OTU_28	5.93	0.01	0.64	5.24	0	f. <i>Moraxellaceae</i>
OTU_192	5.10	0.02	0.64	0.43	0.19	f. <i>Staphylococcaceae</i>
OTU_38	4.23	0.04	0.64	0.38	0.65	f. <i>Streptococcaceae</i>

Tabell 3 viser OTU's som var signifikant forskjellige mellom prøvene av probiotisk og placebo Biola, hvor p-verdi $< 0,05$. Det finnes bare 5 OTU's som viser signifikante forskjeller. Disse OTU's tilhører familiene som er dominerende i prøvene.

Tabell 5. Tabellen viser OTU's som viser signifikant forskjell mellom 10 og 90 dager.

OTU	Test-Statistic	P	FDR_P	10_mean	90_mean	taxonomy
OTU_55	24.98	5.79E-07	0.00	0.81	2.36	f. <i>Veillonellaceae</i>
OTU_4	22.98	1.64E-06	0.00	49.48	17.51	f. <i>Staphylococcaceae</i>
OTU_131	14.89	0.00	0.01	0.08	0.97	f. <i>Veillonellaceae</i>
OTU_210	12.69	0.00	0.03	0.89	1.46	f. <i>Micrococcaceae</i>
OTU_38	9.21	0.00	0.10	0.26	0.72	f. <i>Streptococcaceae</i>
OTU_96	8.16	0.00	0.15	0.12	0.41	f. <i>Prevotellaceae</i>
OTU_113	7.69	0.01	0.18	0.15	0.37	f. <i>Coriobacteriaceae</i>
OTU_32	7.56	0.01	0.19	0.99	0.80	f. <i>Micrococcaceae</i>
OTU_135	6.16	0.01	0.29	1.35	4.29	f. <i>Sphingomonadaceae</i>
OTU_8	5.56	0.02	0.33	19.80	18.79	f. <i>Streptococcaceae</i>
OTU_261	5.49	0.02	0.33	0.18	0.07	f. <i>Tissierellaceae</i>
OTU_148	5.05	0.02	0.38	12.29	36.75	f. <i>Streptococcaceae</i>
OTU_151	5.01	0.03	0.38	0.02	0.49	f. <i>Fusobacteriaceae</i>
OTU_62	4.97	0.03	0.38	0.50	0.63	f. <i>Carnobacteriaceae</i>
OTU_665	4.32	0.04	0.45	1.31	0.10	f. <i>Streptococcaceae</i>
OTU_101	4.30	0.04	0.45	0.08	0.01	f. <i>Staphylococcaceae</i>
OTU_374	4.15	0.04	0.45	0.04	0.00	f. <i>Pseudomonadaceae</i>
OTU_6	4.07	0.04	0.45	1.37	5.56	f. <i>Caulobacteraceae</i>
OTU_72	4.07	0.04	0.45	0.06	0.86	f. <i>Weeksellaceae</i>
OTU_288	4.06	0.04	0.45	0.05	0.24	f. <i>Nitriliruptoraceae</i>

Tabell 4 viser OTU's som var signifikant forskjellige (p-verdi $< 0,05$) mellom prøvene isolert etter 10 dager og 90 dager. I disse prøvene finnes det 20 OTU's som var signifikant forskjellige mellom prøvene, og disse tilhører mange forskjellige familier.

4. Diskusjon

4.1 Taksonomisk analyse

Resultatene for α -diversitet i morsmelkprøver viser at det er forskjell i artsmangfold i prøvene isolert etter 10 dager og i prøvene isolert etter 90 dager etter fødsel. Dette er et nytt funn, som viser endring av sammensetning av bakterier i melken over tid. Dette kan tyde på at morsmelksammensetning endres med barnas behov og kan ha påvirkning på barnas tarmflora. Mye forskning viser at tarmfloraen hos spedbarn endrer seg stadig, og stabiliserer seg omtrent etter 2 år. Næring er en av faktorer som påvirker endringen.

Resultater for prøvene hvor mødrene har drukket placebo og probiotisk Biola viser ingen forskjell. Grunnen til det kan være at analysen ikke tar hensyn til tidspunktet prøvene var isolert i. Hvis prøvene har vært delt til placebo/10 dager og placebo/90 dager, kunne det sannsynlig bli forskjell mellom disse. Samme mellom Biola/10 dager og Biola/90 dager.

Resultatene for β -diversitet viser ingen forskjell verken i prøvene 10/90 dager eller i prøvene placebo/probiotisk Biola. Dette betyr at det er veldig lite variasjon mellom prøvene, og artsmangfoldet er nesten lik i alle prøvene.

Taksonomisk analyse for prøvene isolert etter 10 og 90 dager viser at prøvene er dominert av *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae* og *Moraxellaceae* familier. Familien *Moraxellaceae* derimot varierer for prøvene isolert etter 10 og 90 dager. Resultatene viser at i prøvene som er isolert etter 90 dager, er *Moraxellaceae* familien mye mer dominerende enn i prøvene isolert etter 10 dager. Analysen for placebo og probiotisk Biola viser nesten samme resultater. I disse prøvene dominerer også *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae* og *Moraxellaceae* familiene. *Moraxellaceae* familien er mye mer dominerende i prøvene med probiotisk Biola. I begge analysene observeres det ellers lite variasjon mellom prøvene. De mest dominerende familier i både 10/90 dager prøvene og placebo/probiotisk Biola prøvene er *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*. Begge disse familiene er av gram-positive bakterier. Konklusjonen er at prøvene er dominert av gram-positive bakterier. Dette bekrefter andre studier. Hunt og hans medarbeidere presenterte i sin arbeid kjerneslektene blant annet *Streptococcus*, *Staphylococcus*. Disse to slektene er også nevnt i Cabrera-Rubio og Jeurink sine studier (Hunt et al. 2011), (Cabrera-Rubio et al. 2012), (Jeurink et al. 2013).

4.2 *Int 1* analyse

Resultatene for deteksjon av integroner i de 503 morsmelkprøvene ga ingen resultater. HRM analysen var brukt til å detektere prøvene positive for *int1* genet. Noen av prøvene viste i begynnelsen positive resultater, men til slutt var ingen av prøvene positive for *int1* genet. Primere som var brukt i analysen var rettet mot gram-negative bakterier. Siden taksonomisk analyse viste at prøvene er dominert av gram-positive bakterier, ble videre analyse rettet mot disse.

Prøvene med 50 % og mer av *Firmicutes*, som hovedsakelig inneholder gram-positive bakterier, var selektert. Prøvene var analysert på samme måten som før. Sanger sekvensering ga to sekvenser som i BLAST søk ga treff til *int1* genet.

Disse resultatene tyder på at morsmelk er sannsynlig ikke kilde til integroner i gram-negative bakterier, som var funnet i avføring hos spedbarn (Ravi). Det betyr at det finnes andre kilder til integroner hos bakteriene i spedbarns tarm. Mest sannsynlig kilde til integroner er omgivelsene. Sykehusene er et sted hvor det ofte finnes mye bakterier. Dette gjør det lettere for bakterien å spre antibiotikaresistens. Spedbarn er derfor utsatt for kontakt med en stor mengde bakterier med antibiotikaresistente gener, mens de er på sykehuset. En annen mulig kilde er vaginale bakterier, som barna er i kontakt med under fødsel.

Begrenset antibiotika bruk under svangerskap og amming kan være en forklaring for resultatene i denne studien. Noen antibiotika kan være farlig for ufødte barn eller for barn som ammes. Derfor er bruk av antibiotika begrenset for kvinner i denne perioden. Dette gjør at bakteriene ikke er tvunget til å utvikle eller skaffe resistens mot antibiotika.

4.3 Teknisk vurdering

Etter 16S rRNA sekvensering hadde mange av sekvensene dårlig kvalitet og ble ikke tatt med i analysen. I tillegg prøvene som hadde mindre enn 1000 sekvenser per prøve var forkastet. Til slutt ble bare 199 prøver av 386 som var sendt til sekvensering analysert. I tillegg minst 30% av OTU i taksonomisk analysen både for 10/90 dager prøver og placebo/probiotisk Biola prøver er unassigned. Dette betyr at disse OTU ble ikke tildelt noen av de taksonomiske gruppene av bakteriene på alle taksonomiske nivåer. På grunn av dette kunne en del av informasjonen være tapt. For å oppnå mest nøyaktige informasjon burde sekvenseringen gjentas.

5. Referanser

- Avershina, E., Storro, O., Oien, T., Johnsen, R., Wilson, R., Egeland, T. & Rudi, K. (2013). Bifidobacterial succession and correlation networks in a large unselected cohort of mothers and their children. *Appl Environ Microbiol*, 79 (2): 497-507.
- Cabezón, E., Ripoll-Rozada, J., Pena, A., de la Cruz, F. & Arechaga, I. (2015). Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol Rev*, 39 (1): 81-95.
- Cabrera-Rubio, R., Collado, M. C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. & Mira, A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr*, 96 (3): 544-51.
- Fleming, A. (2001). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bull World Health Organ*, 79 (8): 780-90.
- Hunt, K. M., Foster, J. A., Forney, L. J., Schutte, U. M., Beck, D. L., Abdo, Z., Fox, L. K., Williams, J. E., McGuire, M. K. & McGuire, M. A. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One*, 6 (6): e21313.
- Jeong, K., Nguyen, V. & Kim, J. (2012). Human milk oligosaccharides: the novel modulator of intestinal microbiota. *BMB Rep*, 45 (8): 433-41.
- Jeurink, P. V., van Bergenhenegouwen, J., Jimenez, E., Knippels, L. M., Fernandez, L., Garssen, J., Knol, J., Rodriguez, J. M. & Martin, R. (2013). Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes*, 4 (1): 17-30.
- Johnsborg, O., Eldholm, V. & Havarstein, L. S. (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol*, 158 (10): 767-78.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*, 8 (6): 423-35.
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., et al. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotech*, 31 (9): 814-821.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489 (7415): 220-230.
- Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol*, 4 (8): 608-20.
- Metzker, M. L. (2005). Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res*, 15 (12): 1767-76.
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 5 (7): e177.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 (4732): 1350-4.
- Sanders, M. E., Guarner, F., Guerrant, R., Holt, P. R., Quigley, E. M., Sartor, R. B., Sherman, P. M. & Mayer, E. A. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*, 62 (5): 787-96.
- Wallace, T. C., Guarner, F., Madsen, K., Cabana, M. D., Gibson, G., Hentges, E. & Sanders, M. E. (2011). Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutrition Reviews*, 69 (7): 392-403.

Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Tse, H. & Yuen, K. Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*, 14 (10): 908-34.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no