



Sekvenování v mikrobiologii a mikrobiom člověka

Jakub Hurych

Ústav lékařské mikrobiologie, 2. LF UK a FN Motol

9.10.2024



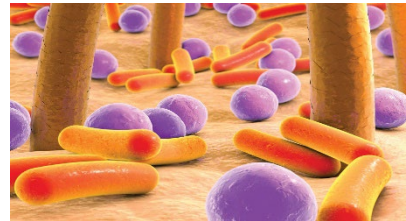
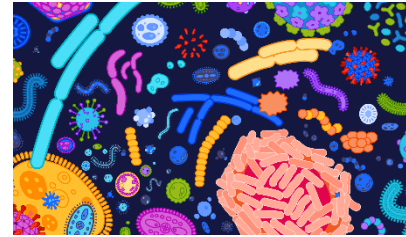
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA
UNIVERZITA KARLOVA



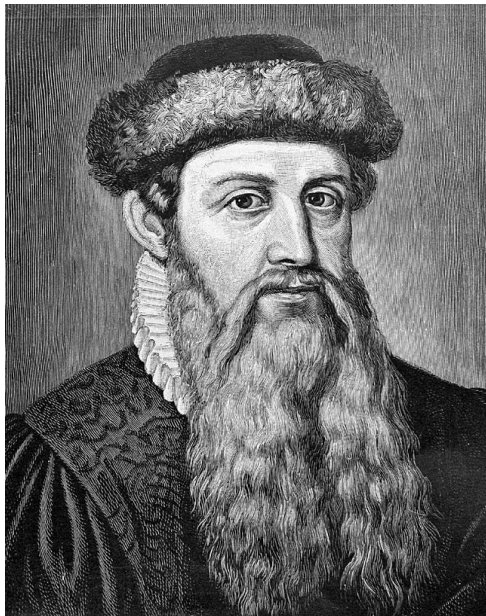
FN MOTOL

Obsah přednášky

- 1) Sekvenování v mikrobiologii
- 2) Lidský mikrobiom
- 3) Fyziologická mikrobiota



Historické paralely



Johannes Gutenberg (1450)
Vynález knihtisku



Zpřístupnění vědomostí
veřejnosti (=ztráta vlivu církve)

A jak to bylo mikrobiologii?



Osekvenování lidského genomu
(HGP oficiálně zahájen 1990 a dokončen 2003)

**Trvalo to 13 let k osekvenování prvního
lidského genomu**

A dnes: WGS – dny; NGS (konkrétní úseky)
- jen desítky hodin!



Sekvenování nové generace (2007)

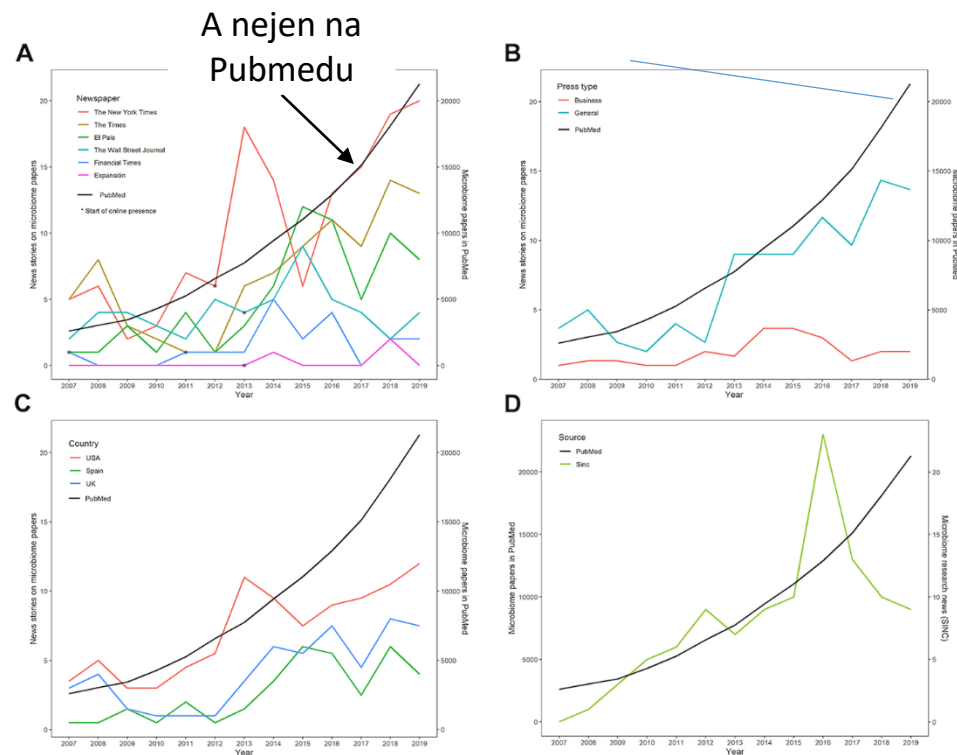
**Zpřístupnění dat veřejnosti:
Masivní rozvoj mikrobiomové vědy**

Něco co vědce zajímá a možná by mělo i vás

	Annual cites from 2007 to 2019	Cites in 2007	Cites in 2019	Average annual percentage change	Correlations with microbiome papers in PubMed* (p-value)	Correlations with microbiome news published by SINC ² (p-value)
Microbiome papers in PubMed	9297.0 (6063.3)	2600	21292	19.6%	-	0.62 (0.023)
Biomedicine papers in PubMed	1111673.6 (203280.1)	785933	1397557	4.9%	-	-
Microbiome/biomedicine in PubMed	0.8%	0.4%	1.4%	9.6%	-	-
Microbiome/biomedicine in SINC ²	-	-	-	-	-	-
Biomedicine in SINC ²	-	-	-	-	-	-
Microbiome in SINC ²	-	-	-	-	-	-
Microbiome/biomedicine in SINC ²	-	-	-	-	-	-
Total newspapers	4.6 (4.9)	2.3 (2.2)	7.8 (7.5)	15.9%	0.88 (<0.001)	0.66 (0.014)
Individual newspapers						
<i>The New York Times</i>	10.3 (6.4)	5	20	16.0%	0.83 (0.005)	0.48 (0.095)
<i>The Times</i>	6.8 (4.4)	5	13	14.3%	0.82 (0.005)	0.47 (0.102)
<i>El País</i>	5.1 (4.0)	1	8	22.7%	0.74 (0.004)	0.71 (0.006)
<i>The Wall Street Journal</i>	4.1 (1.8)	2	4	2.9%	0.14 (0.652)	0.35 (0.236)
<i>Financial Times</i>	1.5 (1.6)	1	2	11.8%	0.39 (0.177)	0.58 (0.038)
<i>Expansion</i>	0.2 (0.6)	0	0	4.3%	0.41 (0.166)	0.11 (0.713)
Country						
USA	7.2 (5.6)	3.5 (2.1)	12.0 (11.3)	12.0%	0.85 (0.002)	0.57 (0.039)
UK	4.1 (4.2)	3.0 (2.8)	7.5 (7.8)	14.5%	0.81 (0.001)	0.57 (0.042)
Spain	2.7 (3.7)	0.5 (0.7)	4.0 (5.7)	23.1%	0.75 (0.003)	0.68 (0.010)
Newspaper type						
General newspaper	7.4 (5.4)	3.7 (2.3)	13.7 (6.0)	15.7%	0.91 (<0.001)	0.61 (0.024)
Business newspaper	1.9 (2.1)	1.0 (1.0)	2.0 (2.0)	7.2%	0.39 (0.185)	0.56 (0.043)

Mean followed by the standard deviation in parentheses is indicated for microbiome/biomedicine papers in PubMed, microbiome/biomedicine news in SINC and stories on microbiome papers in newspapers.
*The numbers showed the Pearson correlation coefficient.
²News stories published by SINC were available from 2008 to 2018.
Significant p-values are highlighted in bold.

Za 12 let 10x více článků na Pubmedu





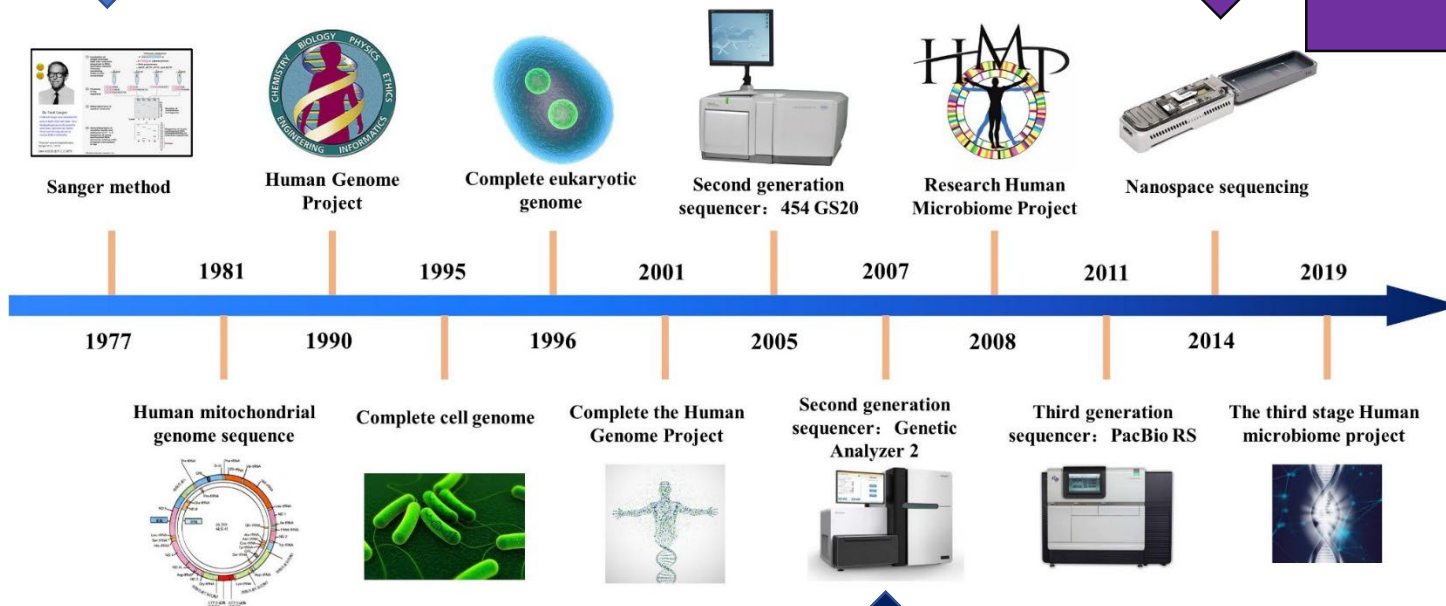
1) Sekvenování v mikrobiologii

Sekvenování první generace (Sangerovo sekvenování)

- Panbakteriální PCR
- Typizace některých bakterií (spa typy *S.aureus*)

Sekvenování třetí generace (PacBio, Nanopore)

- Sekvenování v reálném čase



Sekvenování druhé generace (next-generation sequencing)

= masivně paralelní sekvenování

- Celý genom (WGS) / exony (metagenom) / jen konkrétní úseky (profilování)
- Mikrobiomy, viromy, genomy bakterií (rezistomy, příbuznost pro epidemiologii)

S laskavým svolením
Dr. Marcely Krůtové

Kde se to dá využít?



Diagnostika infekcí z primárně sterilních materiálů

Analýzy genomu bakterií (software)

- Virulentní kmeny
- Geny rezistence (ResFinder)
- Klonální šíření (Galaxy)

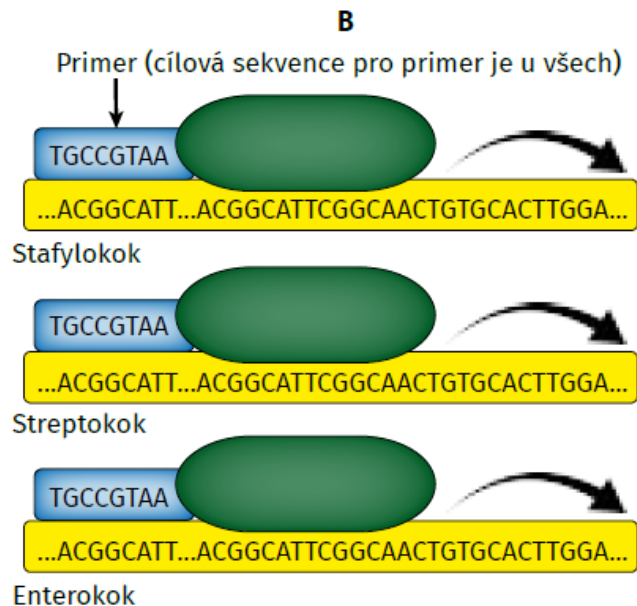
Fekální mikrobiální terapie

- testování dárců
- sledování udržení u příjemců

Studium lidského mikrobiomu

- asociace s neinfekčními nemocemi (IBD, IBS, T1D, obezita aj.)

Panbakteriální PCR



Materiály?
Primárně sterilní!

Srdeční chlopně

Punktáty

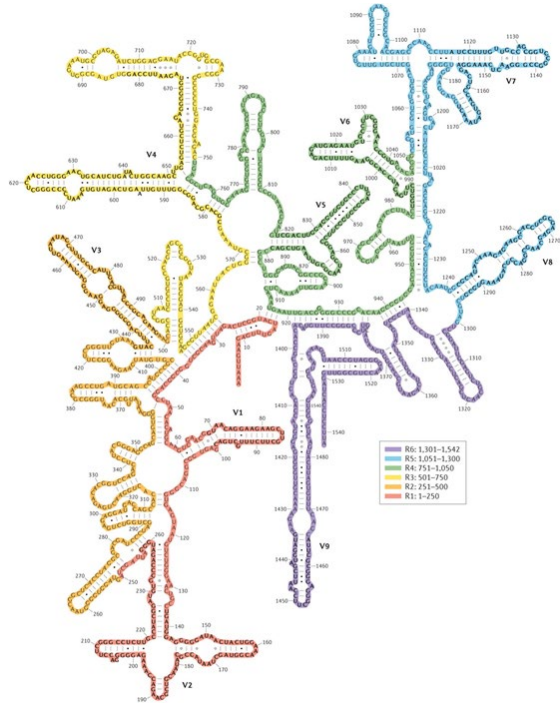
Likvor

Velmi vzácně i krev, BAL

Ještě vzácněji narostlé kultury

Jak se to dělá?

- Dvoukolový proces

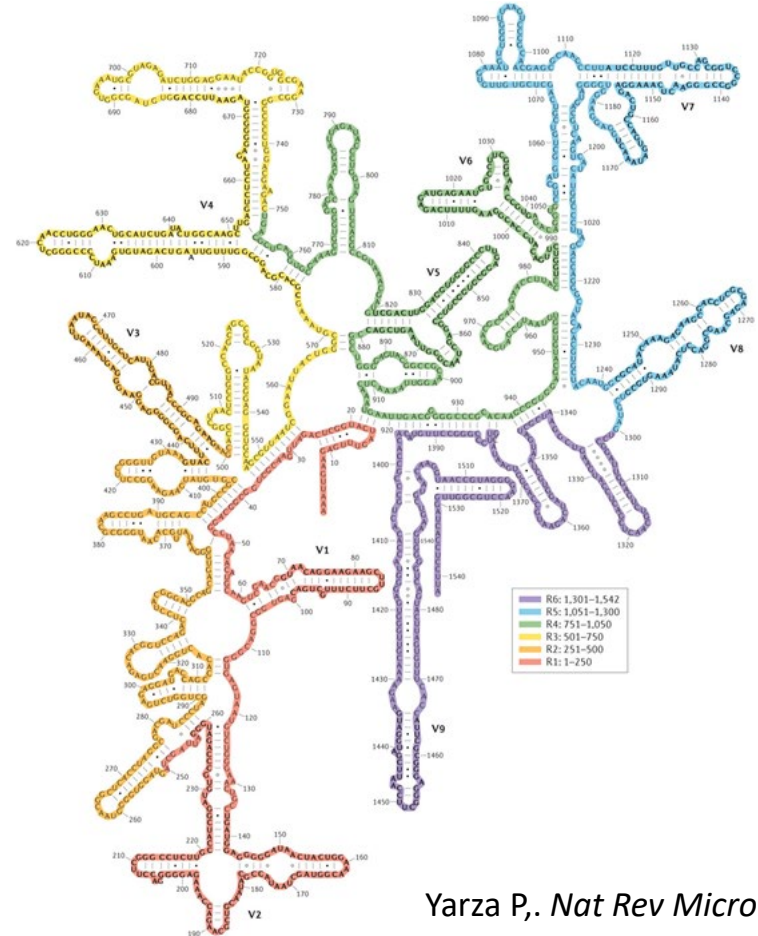


1. Amplifikace 16S rDNA

2. Sekvenování ampliconu
16S rDNA

Gen pro 16S rRNA

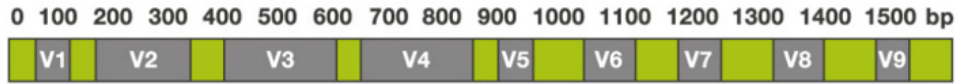
- Je část malé ribosomální podjednotky bakterií (30S, tvořena 21 proteiny a 16S rRNA)
- Velikost: 1542 bp
- Struktura genu:
 - konzervativní oblasti (tam nasedají primery) a 9 hypervariabilních oblastí V1-V9 (to se amplifikuje a pak sekvenuje).
 - Využívá se nejvíc oblast **V3-V4** (asi 440 bp)



Yarza P., *Nat Rev Microbiol*; 2014

Gen pro 16S rRNA

16S rDNA is a linear structure - > transcribes into a linear rRNA, and folds.



CONSERVED REGIONS: unspecific applications

VARIABLE REGIONS: group or species-specific applications

Figure 1: An example of a 16S rRNA gene. The regions in green are conserved in all microorganisms. These are the sites that are targeted by primers for PCR amplification so that all the 16S rRNA genes in a sample are amplified. The grey regions are the species-specific regions that-- when sequenced-- allow for scientists to see which species are present in a community. Image courtesy of: <http://www.alimetrics.net/en/index.php/dna-sequence-analysis>

Výhody a proč se využívá:

- Je to jak vysoce konzervovaná, tak ubikvitární sekvence
- Je to relativně jednoduché a levné sekvenovat
- Existuje dobrá referenční databáze (Silva, GreenGenes, RDP)

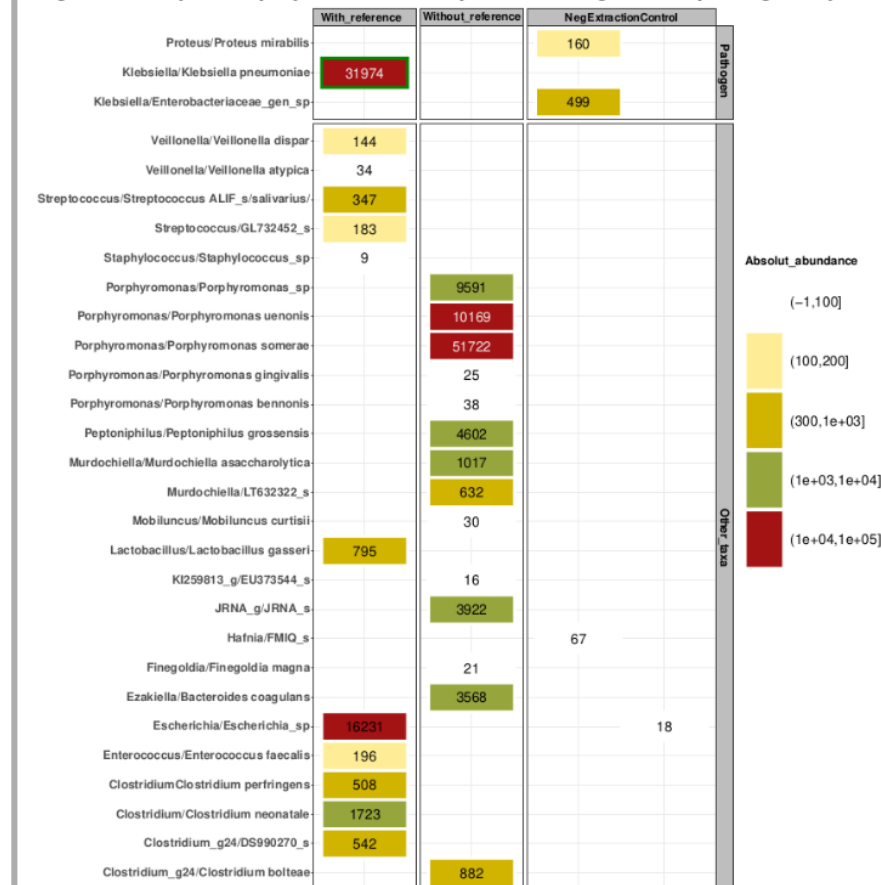
Další využití panbakteriálního PCR

- Zkouší se i z NESTERILNÍCH MATERIÁLŮ (tedy často polymikrobiálních)
- Obtížná interpretace

U zkoušky, ale platí, že indikace panbakteriálního PCR jsou primárně sterilní materiály!

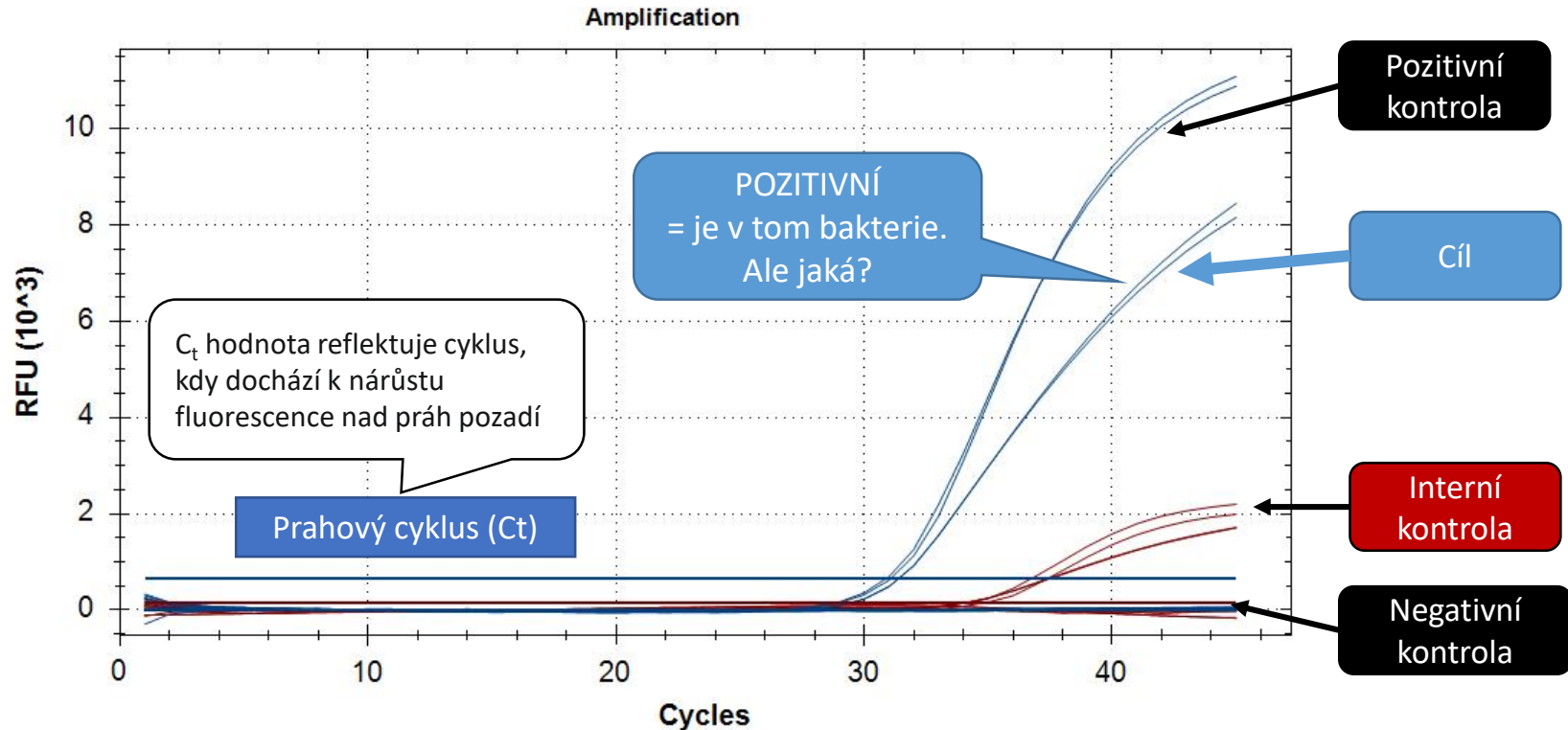
3.3. Suspected polymicrobial samples

Figure 7: Suspected polymicrobial samples with single or no pathogen reported by P



1. Hodnocení křivky PCR

Materiál: Kultivačně negativní kloubní punktát



2. Hodnocení sekvence

Sekvence míří do databáze [NCBI BLAST](#)

Hodnocení:

- Similarita sekvencí (98-100%)
- Počet shodných nálezů

Vzorek: BA-9454

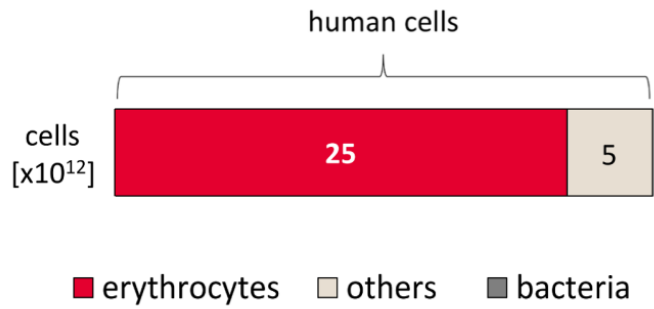
```
CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTG
TGCACATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCCGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACG
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAG
CGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAT
GTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCC
```





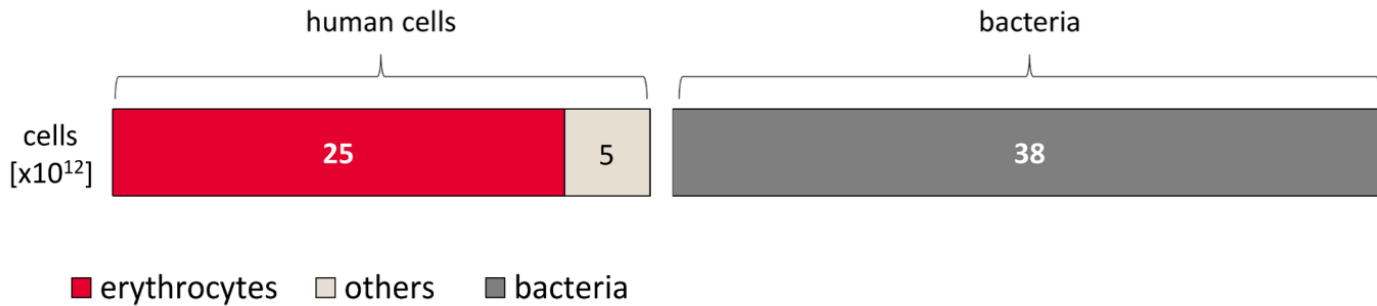
2) Lidský mikrobiom - Co to je?

Jsmé víc lidí nebo mikrobi (bakterie)?






Sender et al, PLOS, 2016

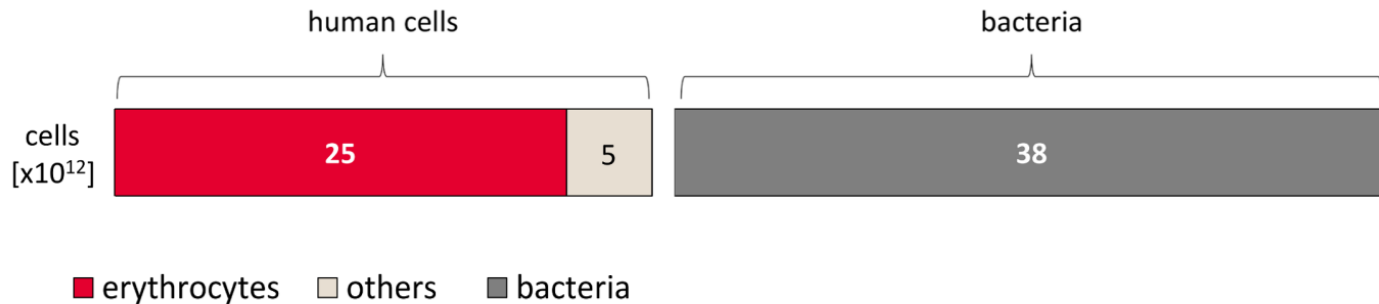
Jsme víc lidí nebo mikrobi (bakterie)?



Sender et al, PLOS, 2016

		Počet buněk
Člověk		30 bilionů (3.0 x 10 ¹³)
Bakterie		38 bilionů (3.8 x 10 ¹³)
		1.3x více bakteriální 

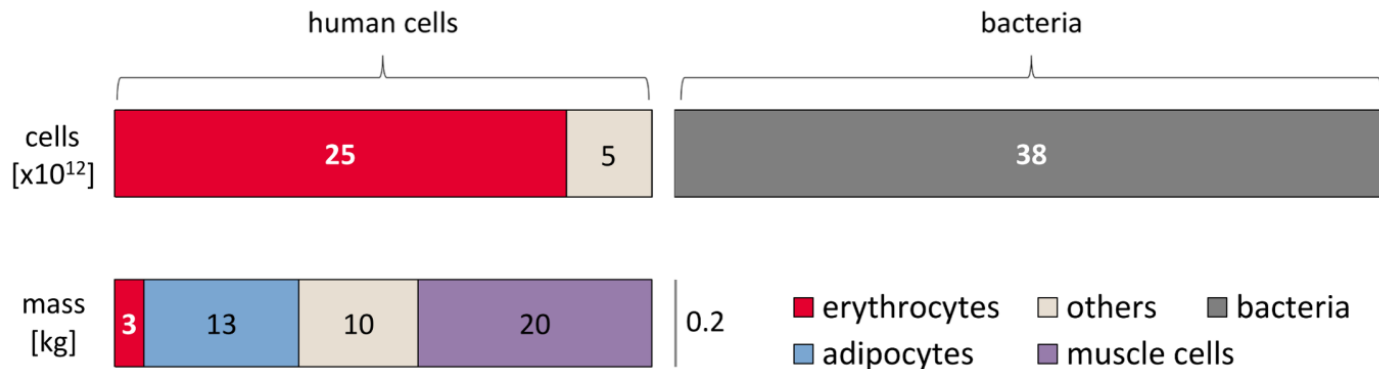
Jsme víc lidí nebo mikrobi (bakterie)?








Sender et al, PLOS, 2016

	Počet buněk	Počet genů
Člověk 	30 bilionů (3.0×10^{13})	20-25 tisíc (2.0×10^4)
Bakterie 	38 bilionů (3.8×10^{13})	2-20 milionů ($2.0 \times 10^6 - 2.0 \times 10^7$)
	1.3x více bakteriální 	100x více bakteriální 

Jsme víc lidí nebo mikrobi (bakterie)?



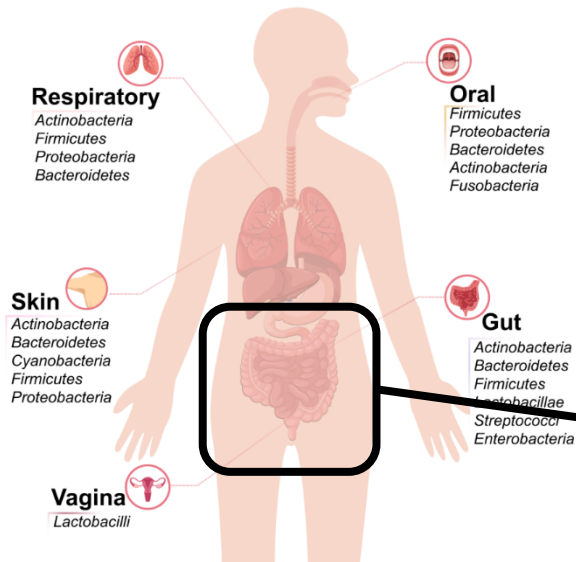
Sender et al, PLOS, 2016

	Počet buněk	Počet genů	Hmota
Člověk 	30 bilionů (3.0×10^{13})	20-25 tisíc (2.0×10^4)	70-100 kg
Mikrobi 	38 bilionů (3.8×10^{13})	2-20 milionů ($2.0 \times 10^6 - 2.0 \times 10^7$)	0.2 kg
	1.3x více bakteriální 	100x více bakteriální 	350-500x víc člověk 

Mikrobiom

Mikrobiom = charakteristická mikrobiální komunita, která obývá určitý racionálně vymezený habitat s typickými fyzikálními a chemickými podmínkami

Berg et al, *Microbiome*, 2020



Hou et al, *Sig Transduct Target The*, 2022

Microbiome

Microbiota

Bacteria

Archaea

Fungi

Protists

Algae

+ "Theatre of activity"

Microbial structural elements

Proteins/
peptides

Lipids

Poly-
saccharides

Nucleic acids

structural DNA/RNA

mobile genetic elements

incl. viruses/phages relic DNA

Internal/external structural elements

Environmental
conditions

Microbial metabolites

Signalling
molecules

Toxins

(An)organic
molecules

Berg et al, *Microbiome*, 2020

Střevní mikrobiom

Bakteriom

Archeom

Virom

Proteom

Mykobiom

Parazitom

Transkriptom

Metabolom

Metody studia střevního mikrobiomu

Sběr vzorků stolice

V domácnosti pacientů
Skladování:

- krátkodobě při -18°C
- dlouhodobě při -80°C



Extrakce DNA

Qiacube (Qiagen)



Profilování 16S/18S rDNA

PCR pro 16S/18S rDNA ➤ ————— ➤

Masivně paralelní
sekvenování
amplikonů

Porovnání ASV/OTU s referenční
databází

Hodnocení **taxonomie**

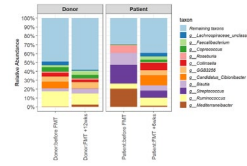
Metagenomické sekvenování

Náhodné
fragmenty,
VŠECHNA DNA

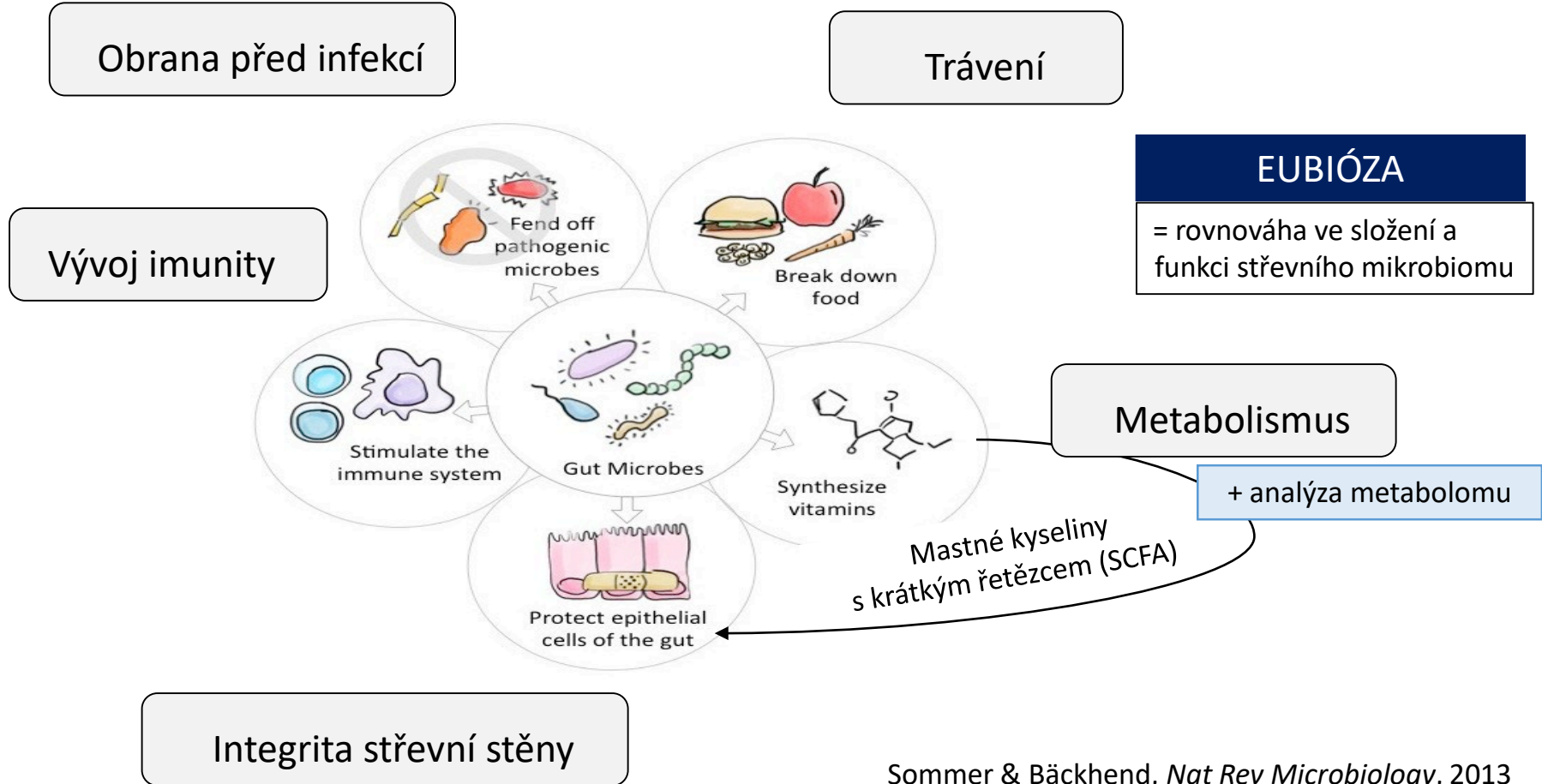
Sekvenování
Sestavení genomů

Hodnocení jak taxonomie (více do hloubky), tak i
predikce **funkčních schopností mikrobiomu**

Komplexní
bioinformatická
analýza
a hodnocení výstupů



Fyziologické funkce střevního mikrobiomu



Dysbióza střevního mikrobiomu

Vaginální porod

Kojení

Dieta bohatá na vlákninu

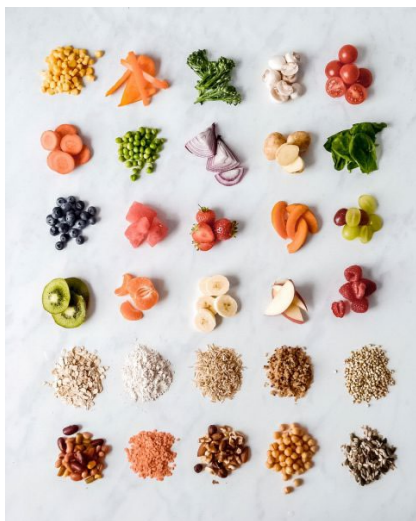
Fyzická aktivita

Genetika



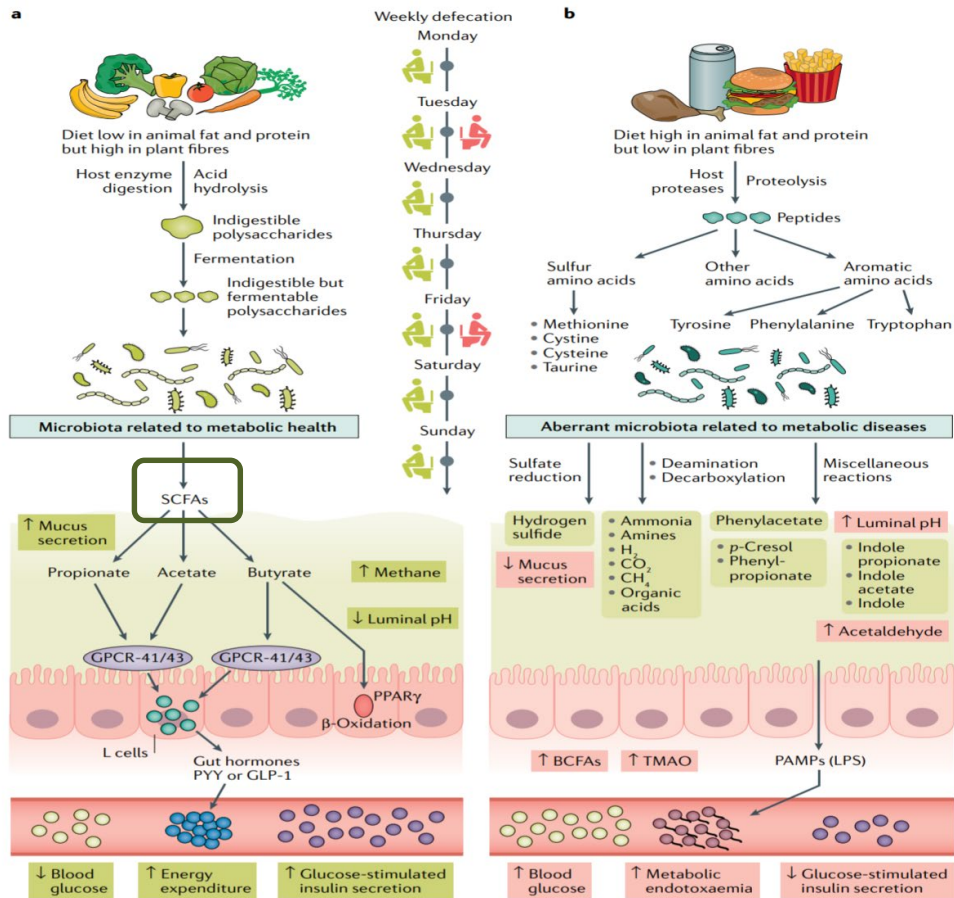
EUBIÓZA

Co je přesně strava bohatá na vlákninu?



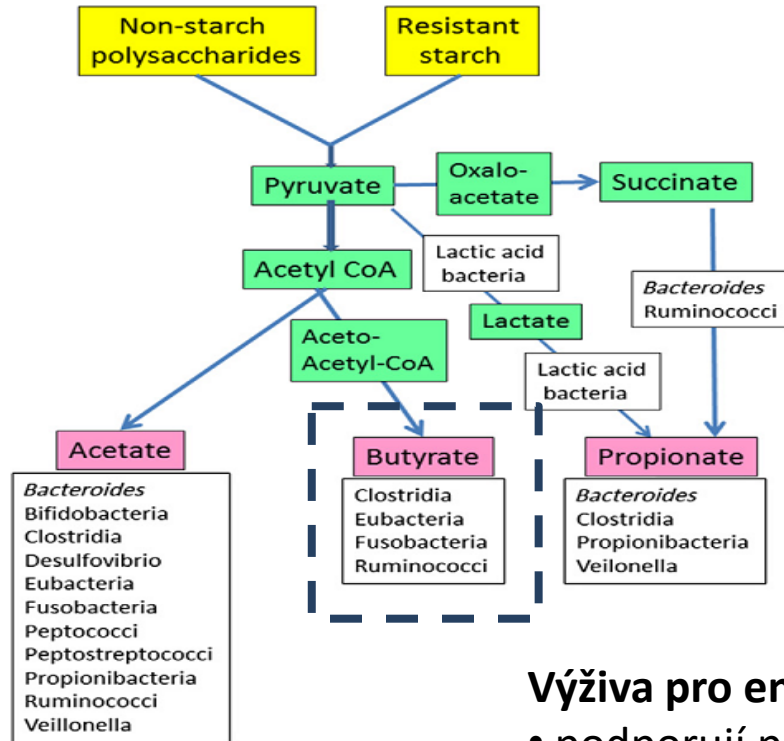
„Thirty different plants per week“

(Knight et al, American Gut Project, 2012)



Mastné kyseliny s krátkým řetězcem

(Short chain fatty acids, SCFA)



Výživa pro enterocyty:

- podporují proliferaci a opravy buněk
- podporují difernciaci
- upevňují spojení (tight junctions)

Dysbióza střevního mikrobiomu

Vaginální porod

Kojení

Dieta bohatá na vlákninu

Fyzická aktivita

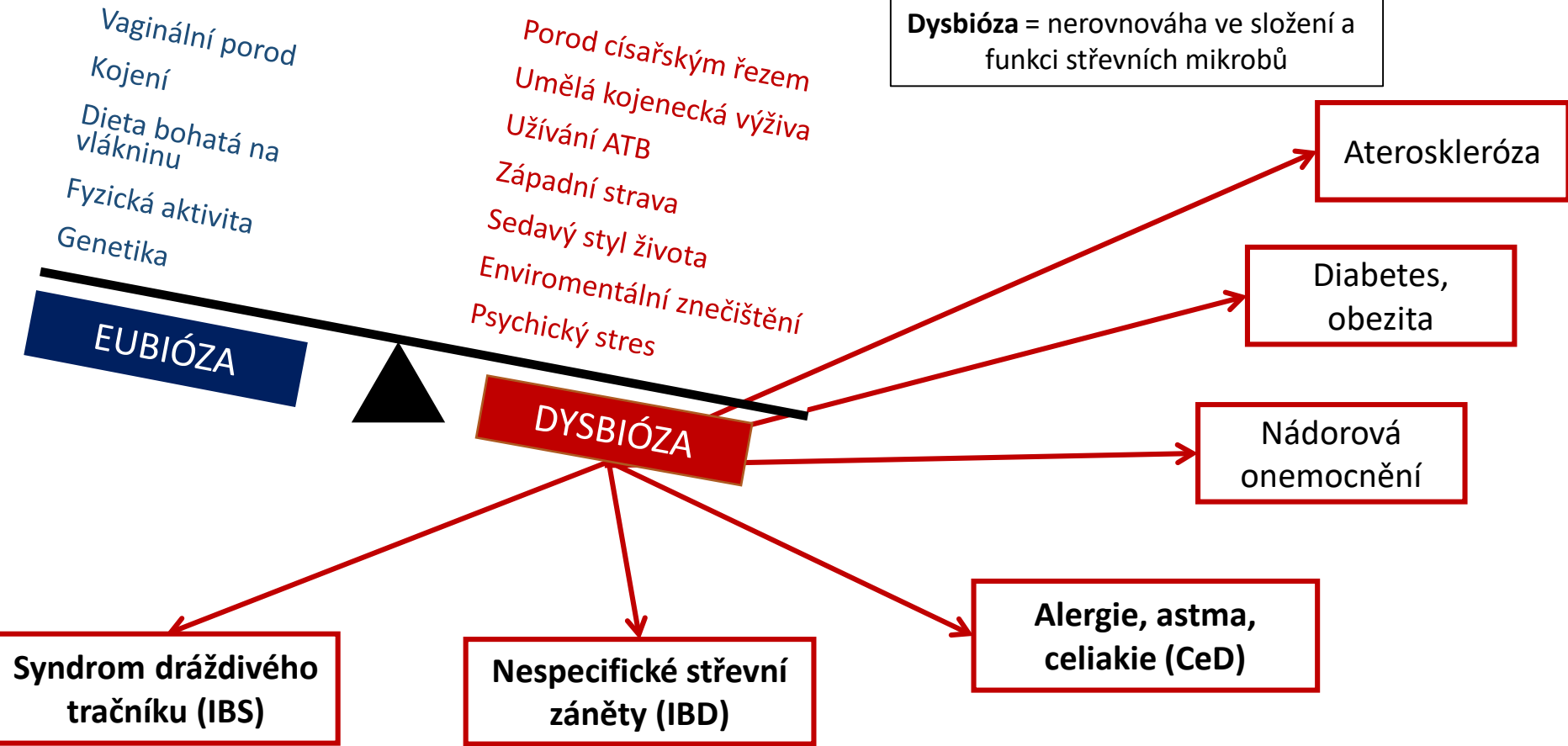
Genetika



EUBIÓZA

Dysbióza střevního mikrobiomu

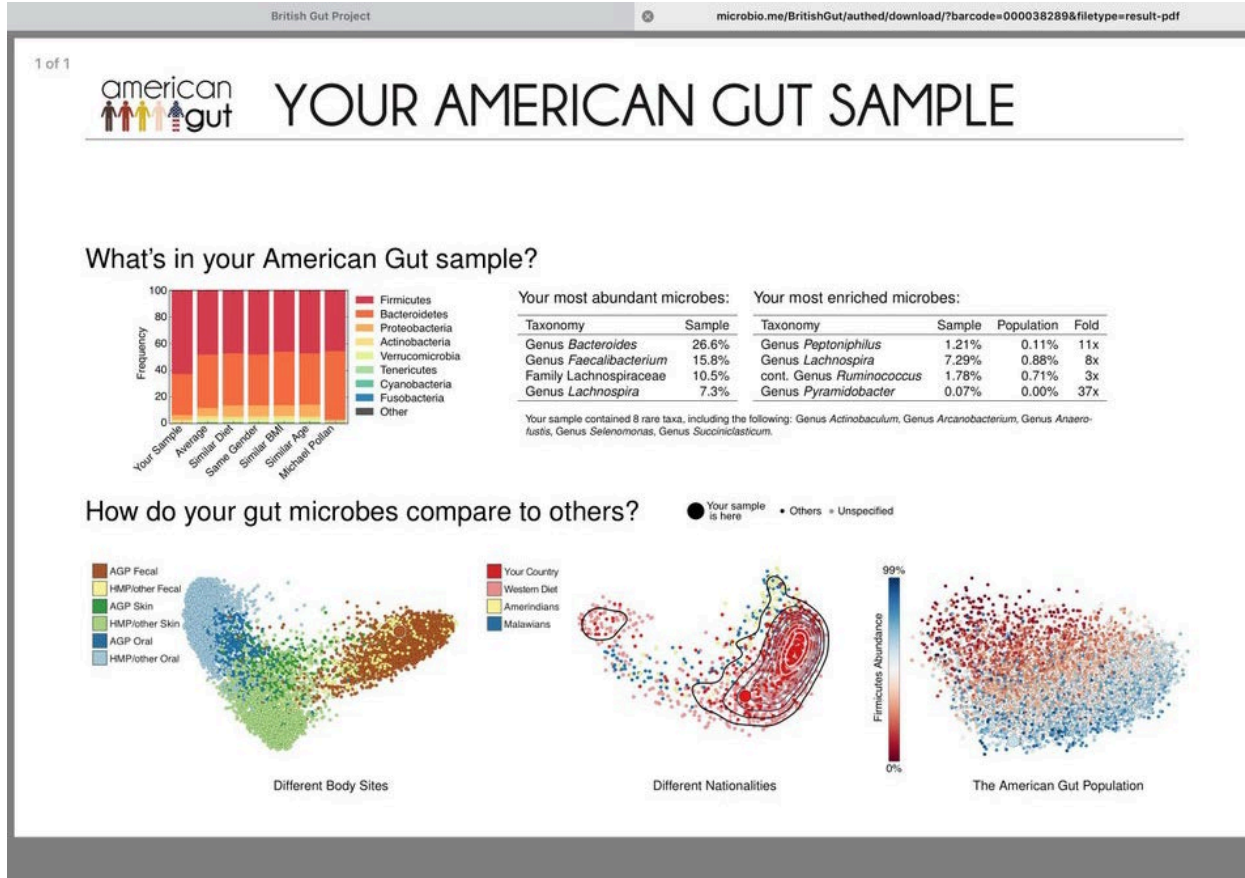
Dysbióza = nerovnováha ve složení a funkci střevních mikrobů





2) Lidský mikrobiom - Jak se to hodnotí?

Jak může vypadat výsledek



Kompozice - co tam bydlí?

Hlavní kmeny

Třídy

Příklady rodů

Actinobacteria

Actinobacteria

Actinomyces; Bifidobacterium

Bacteroidota

Bacteroidia

Bacteroides; Prevotella; Alistipes

Firmicutes

Bacilli

Bacillus; Staphylococcus

Enterococcus; Lactobacillus; Lactococcus; Streptococcus; Leuconostoc

Clostridia

Clostridium; Coprococcus; Roseburia; Faecalibacterium; Ruminococcus

Negativicutes

Veillonella

Proteobacteria

Epsilonproteobacteria

Helicobacter; Campylobacter

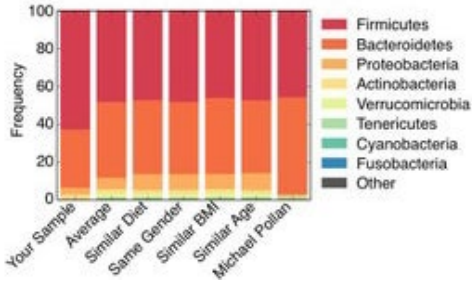
Gammaproteobacteria

Citrobacter; Escherichia; Shigella; Klebsiella; Providencia

Verrucomicrobia

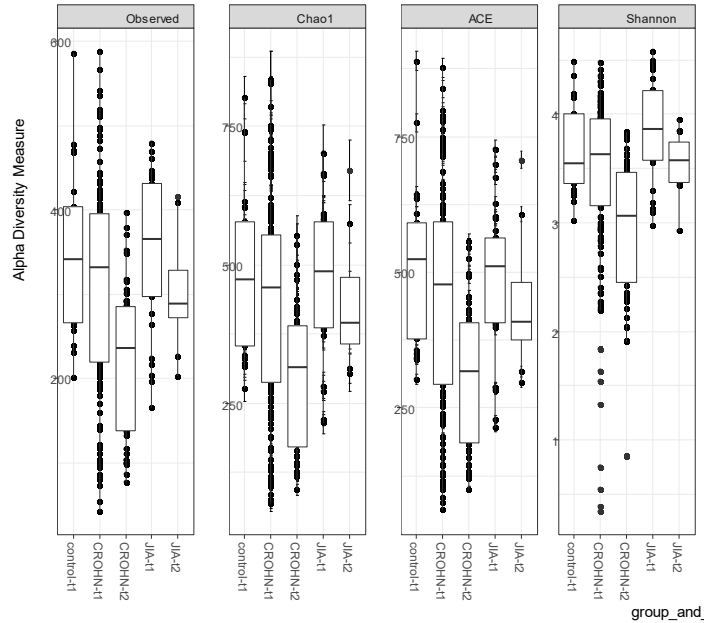
Verrucomicrobiae

Akkermansia

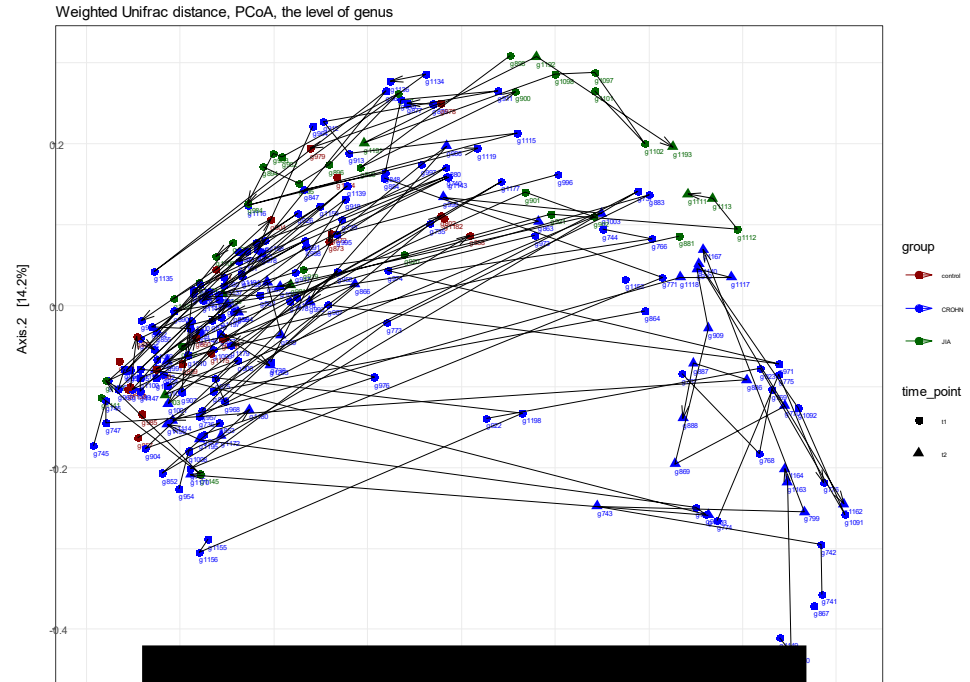


90%

Diverzita - alfa a beta



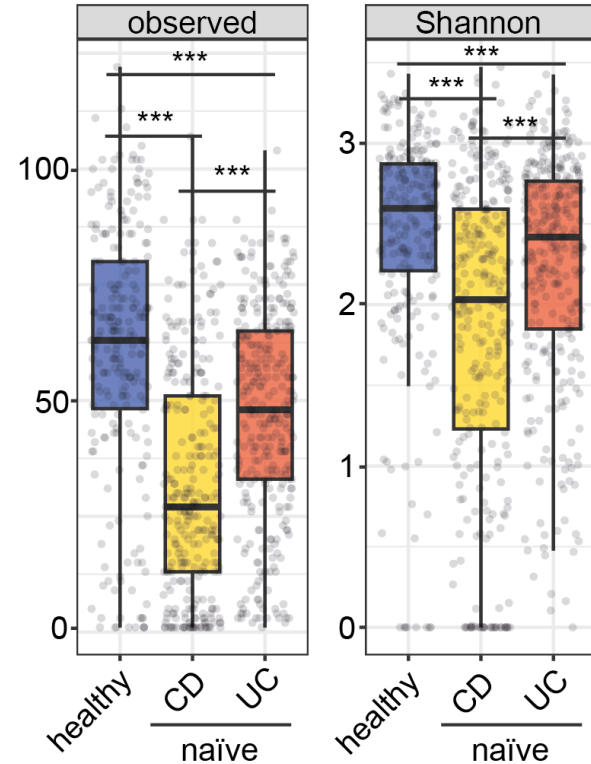
Alfa = v jednom vzorku



Beta = mezi vzorky

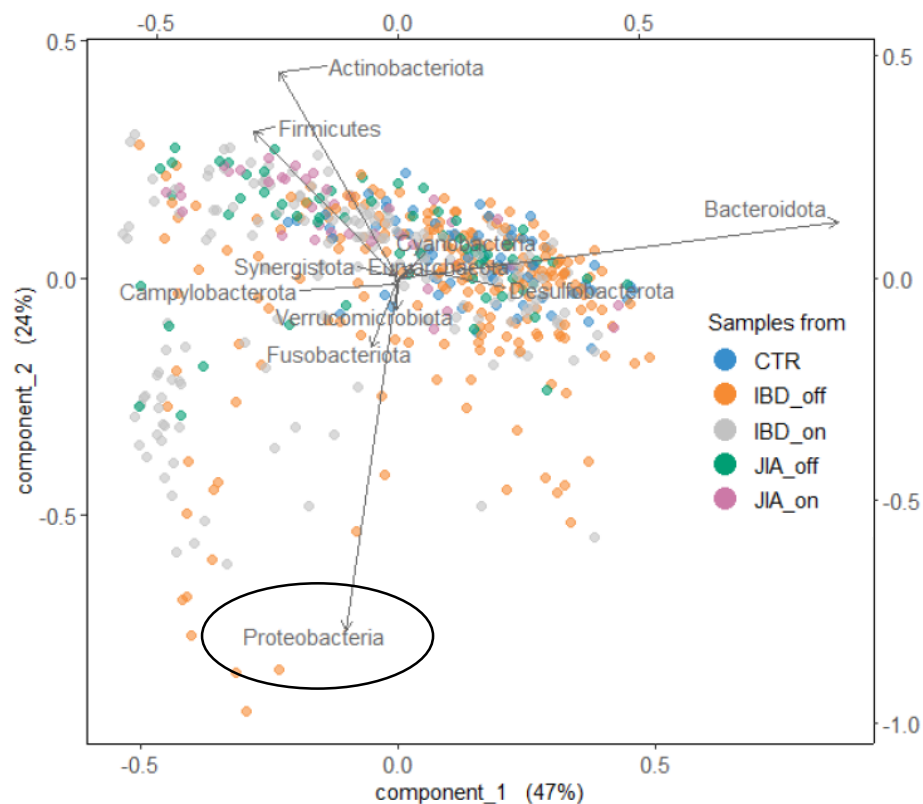
Alfa diverzita – příklad

- Alfa-diverzita je snížena mezi zdravými a skupinami s ulcerózní kolitidou (UC) a Crohnovou nemocí (CD) ($p < 0.001$)

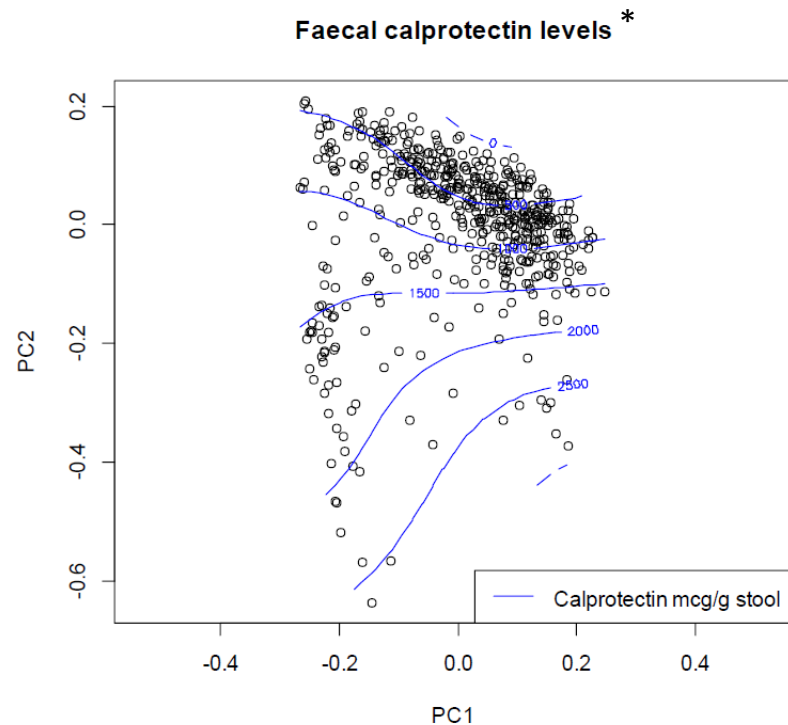


Příklad beta-diverzity (pomocí analýzy hlavních komponent (PCA))

Posun ve „zdravém směru“ je patrný i v longitudinálním sledování.



Hurych et al, *J Crohn Colitis*, 2024

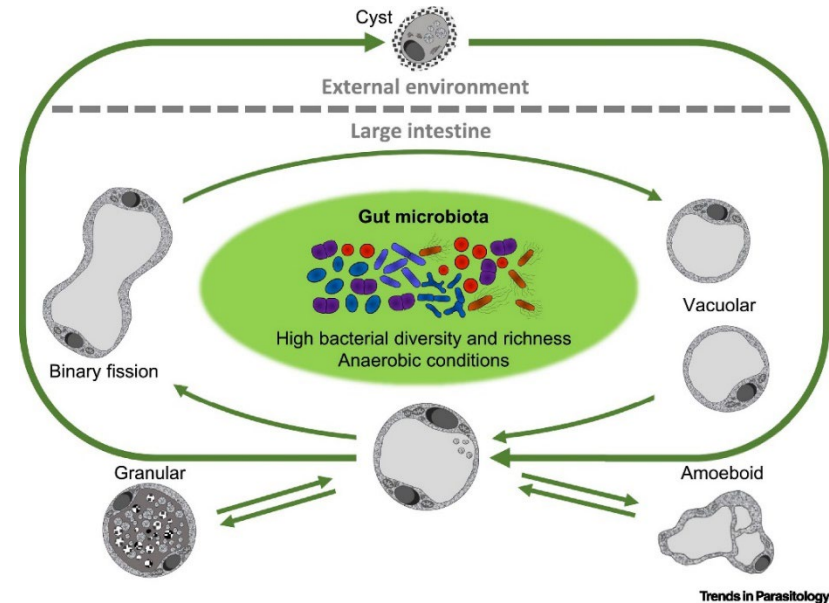


* >250 ug/g – střevní patologie

Hurych et al, *J Crohn Colitis*, 2024

Mimo bakterie: *Blastocystis*

- Nejvíce zastoupený eukaryont v lidském střevě ¹⁻³
- **Marker vysoké bakteriální diverzity** ^{4,5}
- Prevalence se liší
 - Vyšší v rozvojových zemích (40-100%) ⁶⁻⁸
 - Nižší v industrializovaných zemích (7-50%) a střevních onemocněních (do 5%) ⁹⁻¹²
- Klasifikuje se do subtypů (ST1-ST41) ¹³
 - Potvrzeno 37 STs
 - Z toho 15 u člověka (ST1-ST4 představují 90% všech)



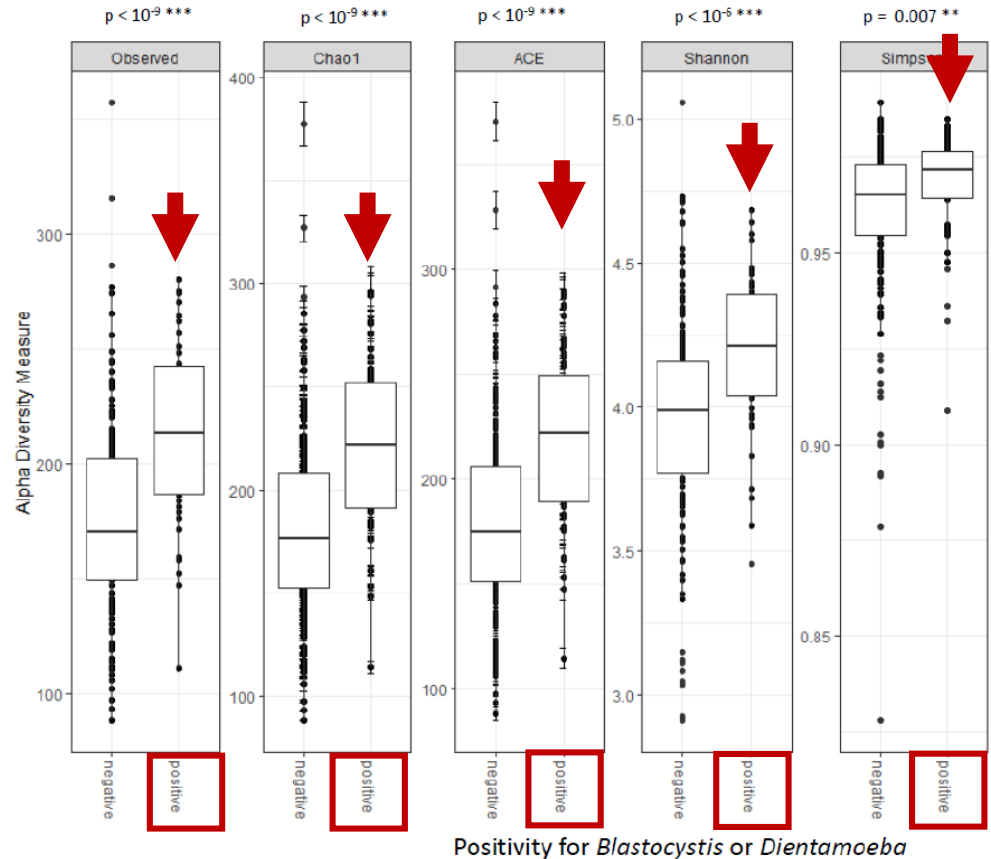
Stensvold, Trends in Parasitology, 2020

1) Tito. *Gut*. 2019; 2) Andersen. *FEMS Microbiol Ecol*. 2015; 3) Rostami. *Parasitol Res*. 2017; 4) Clark. *Adv Parasitol*. 2013; 5) Cinek. *Parasit Vectors*. 2021; 6) Poulsen. *Am J Trop Med Hyg*. 2016; 7) Mohammad. *Asian Pac J Trop Med*. 2017; 8) Oliveira-Arbex; *Infect Genet Evol*. 2018; 9) Wawrzyniak. *Ther Adv Infect Dis*. 2013; 10) Stensvold. *Parasitol Int*. 2016; 10) Bart. *BMC Infect Dis*. 2013; 11) El Safadi. *BMC Infect Dis*. 2016; 11) Scanlan. *Infect Genet Evol*. 2016. 11) Scanlan. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014. 12) Lhotska. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 13) Hernandez, *J Eukaryot Microbiol*, 2023)

Bacteriome alpha-diversity in the presence of *Blastocystis*

- All indices higher in the presence of the protists
- All $p < 10^{-4}$

The alpha-diversity of the bacteriome is increased in the presence of protists



Co je „dobrý a špatný“ výsledek?

DOBŘÍ

Vysoká alfa diverzita (300-1000 species)

Anaerobní prostředí (např. velmi málo *Proteobacteria*)

Více producentů SCFA

Blastocystis pozitivní

Zdravý mikrobiom?

ŠPATNÝ

Nízká alfa diverzita (méně než 100 species)

Mnoho fakultativních anaerobů (např. více *Proteobacteria*)

Málo producentů SCFA

Blastocystis negativní

Pojem zdravý mikrobiom **neexistuje**



ČMS ▾

Pro odborníky ▾

Pro pacienty a laiky ▾

Podcasty

Pro členy

English ▾

A jaké by tedy měl mít zdravý člověk složení mikrobiomu?

NEVÍME – a neví to zatím nikdo, ani komerční subjekty, které nabízejí, že Vám mikrobiom opraví!

Vědci mají jistě všeobecnou představu o složení mikrobiomu, ale pro konkrétního člověka v konkrétní životní situaci to definovat zatím nelze.

Vezmeme-li v potaz, že počet genů mikroorganismů ve střevním traktu je 100-150x větší, než počet genů v genomu člověka, a zároveň je genetická informace mikroorganismů vysoce individuální a variabilní, odpovídá to na otázku, proč je tak těžké mikrobiom studovat a proč nejsou výsledky více uplatňované v praxi. Zatím je prozkoumána pouze část mikroorganismů, u nichž víme, jaké živiny spotřebovávají a jaké látky produkují. Mnohé jsou prospěšné, některé mohou za určitých podmínek organismu škodit, o jiných zatím nevíme téměř nic.

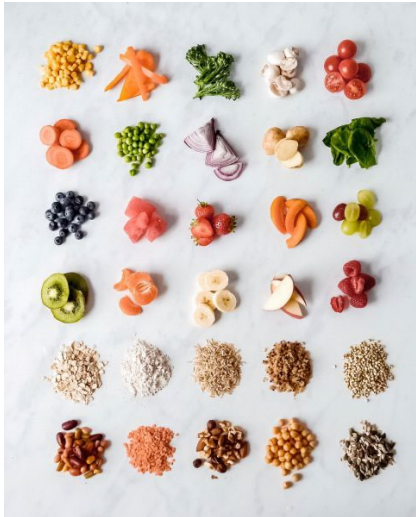
V některých případech lze skutečně říct, že konkrétní složení mikrobiomu je nezdravé (např. převaha patogenních kmenů bakterie *Clostridioides difficile* způsobujících úporné průjemy), ale nikdo dosud nedokázal přesně definovat „zdravé“ nebo „správné“ složení mikrobiomu.

www.mikrobiom-cms.cz

Když se rodiče /pacienti zeptají
na střevní microbiom

Řekněte jim at:

- Jedí široké spektrum rostlinných potravin
- Dobře spí, cvičí a jsou venku



Co můžete dělat jako lékaři:

- Říkejte jim to samé bez vyzvání
- Předepisujte ATB jen když je to třeba - **antibiotika nejsou lentilky!**
- Nelečte *Blastocystis* u asymptomatického pacienta



2) Lidský mikrobiom

- K čemu to je?

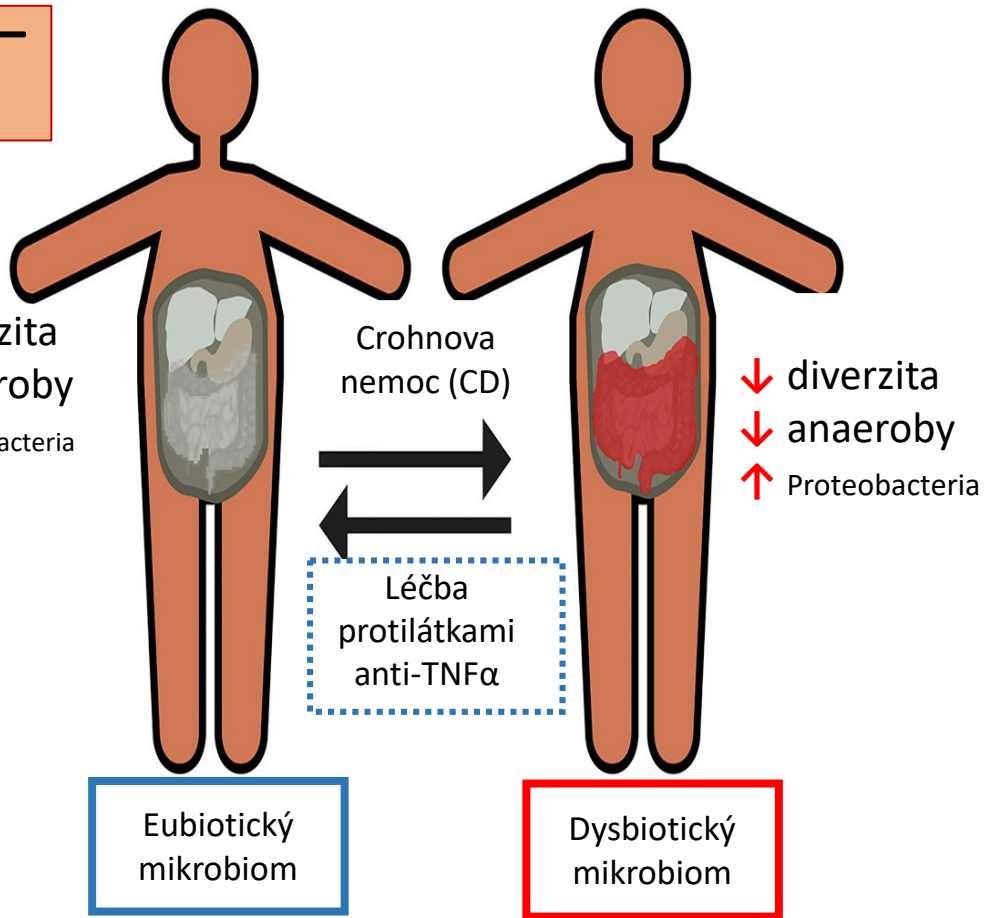
Patogeneze Crohnovy nemoci – vliv střevní dysbiózy

- 1) Nízká alfa diverzita ^{1,4}
- 2) Dysbióza u CD (s převahou Proteobacteria) ¹⁻¹¹
- 3) Léčba anti-TNF mění střevní mikrobiom ¹²⁻¹⁶

ALE!

- 1) Jak změny vypadají v dlouhodobém měřítku? A jak u dětí?
- 2) Je změna složení mikrobiomu odpověď bakterií na anti-TNF α nebo známka vyléčeného zánětu?

↑ diverzita
↑ anaeroby
↓ Proteobacteria



1. Lloyd-Price J, Nature 2019; 2. Joossens M, Gut 2011; 3. Clooney AG, Gut 2021; 4. Pascal V, Gut 2017; 5. Gevers D, Cell Host Microbe 2014; 6. Vich Vila A, Sci Transl Med 2018; 7. Sokol H, Gut 2017; 8. Ananthakrishnan AN, Cell Host Microbe 2017; 9. Metwaly A, Nat Commun 2020; 10. Zhou Y, Front Nutr 2021; 11. Vester-Andersen MK, Sci Rep 2019; 12. Wang Y, J Crohns Colitis 2018; 13. Wang Y, Gut Microbes 2021; 14. Ventin-Holmberg R, Sci Rep 2022; 15. Ventin-Holmberg R, J Crohns Colitis 2021; 16. Hoyhtya M, Inflamm Bowel Dis 2022.

Design studie – Crohnova nemoc vs. JIA

- Exploratorní analýza **longitudinálních** dat na bakteriom
- **Hledání bakteriálních taxonů** asociovaných s vyléčením zánětu ve střevě

Srovnat s jinou diagnózou na anti-TNF, ale bez postižení střeva



Juvenilní idiopatická artritida



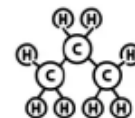
A multicentric prospective longitudinal observational study



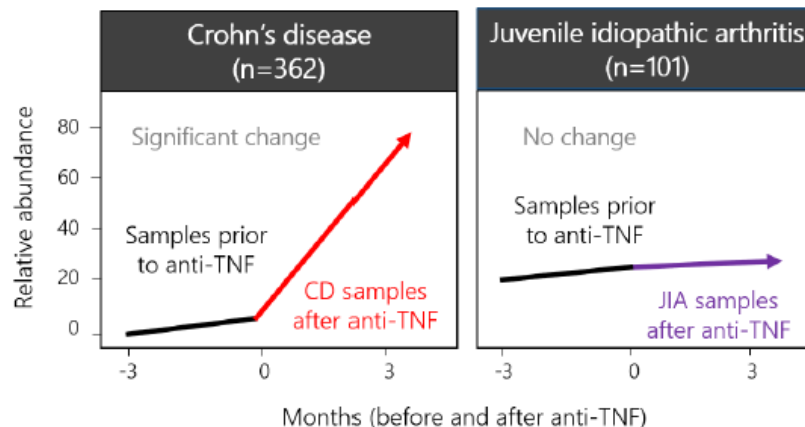
16S rDNA profiling (V4 region)



Stool samples n= 530 including 67 from healthy controls



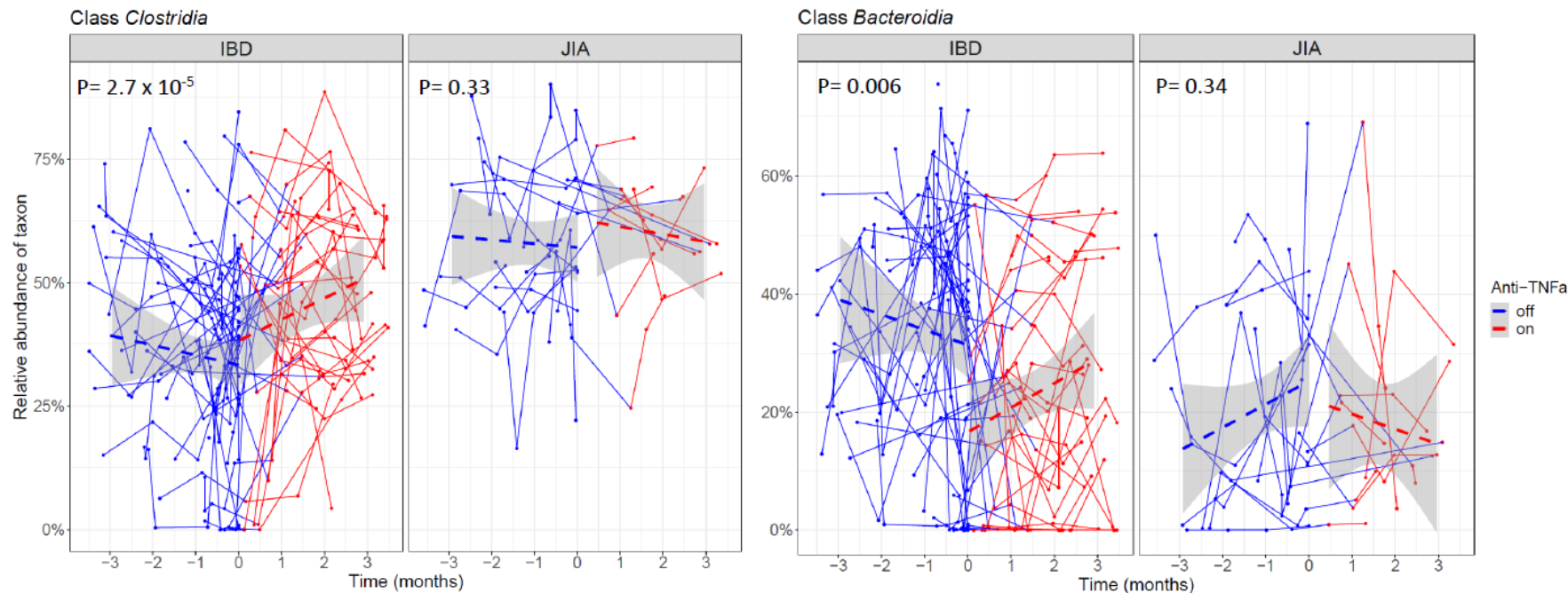
¹H nuclear magnetic resonance



Taxony, jejichž množství se významně změnilo při anti-TNF terapii u CD

Bakteriální taxon	Crohnova choroba (CD)	Změna při anti-TNF terapii u pacientů s CD		Juvenilní idiopatická artritida (JIA)	Změna při anti-TNF terapii u pacientů s JIA	
	Průměrný výskyt taxonu u pacientů s CD (% z celk. počtu čtení)	Průměrná změna při léčbě (procentní body)	P hodnota korigovaná na počet test. taxonů	Průměrný výskyt taxonu u pacientů s JIA (% z celk. počtu čtení)	Průměrná změna při léčbě (procentní body)	P-hodnota nekorigovaná
p. Bacteroidota						
└ c. Bacteroidia	29 %	-8.1	0.0061	22 %	+4.1	0.34, NS
└└ o. Bacteroidales						
└└└ f. Rikenellaceae	2.6 %	-1.9	9.2×10^{-4}	2.4 %	+0.68	0.38, NS
└└└ g. <i>Alistipes</i>	2.7 %	-2.0	0.0024	2.4 %	+0.71	0.37, NS
p. Firmicutes	54 %	+9.7	1.7×10^{-4}	64 %	-4.8	0.19, NS
└ c. Clostridia	43 %	+11	2.7×10^{-5}	58 %	-3.6	0.33, NS
└└ o. Peptostreptococcales	2.0 %	+1.4	0.0055	1.8 %	+0.29	0.53, NS
└└└ f. Peptostreptococcaceae	1.7 %	+1.1	0.017	1.7 %	+0.35	0.44, NS
└└└└ g. <i>Intestinibacter</i>	0.74 %	+0.75	0.0019	0.56 %	+0.13	0.47, NS
└└ o. Lachnospirales	26 %	+9.4	3.7×10^{-6}	30 %	-4.3	0.12, NS
└└└ f. Lachnospiraceae	26 %	+9.4	6.4×10^{-6}	31 %	-4.1	0.14, NS
└└└└ g. <i>Ruminococcus</i>	2.3 %	+2.7	0.015	0.2 %	0.0	0.94, NS
└└└└└ g. <i>Flavonifractor</i>	0.4%	+0.38	0.042	0.2%	-0.05	0.32, NS

Relativní četnost tříd Clostridia a Bacteroidia v čase



Hurych et al, *J Crohn Colitis*, 2023

IBD = Crohnova choroba, **JIA** = Juvenilní idiopatická artritida

Barvy odpovídají terapii anti-TNF

- **modrá** = vzorek stolice odebraný v době, kdy nebyl podáván Anti-TNF;
- **červená** = vzorek stolice odebraný při podávání anti-TNF.

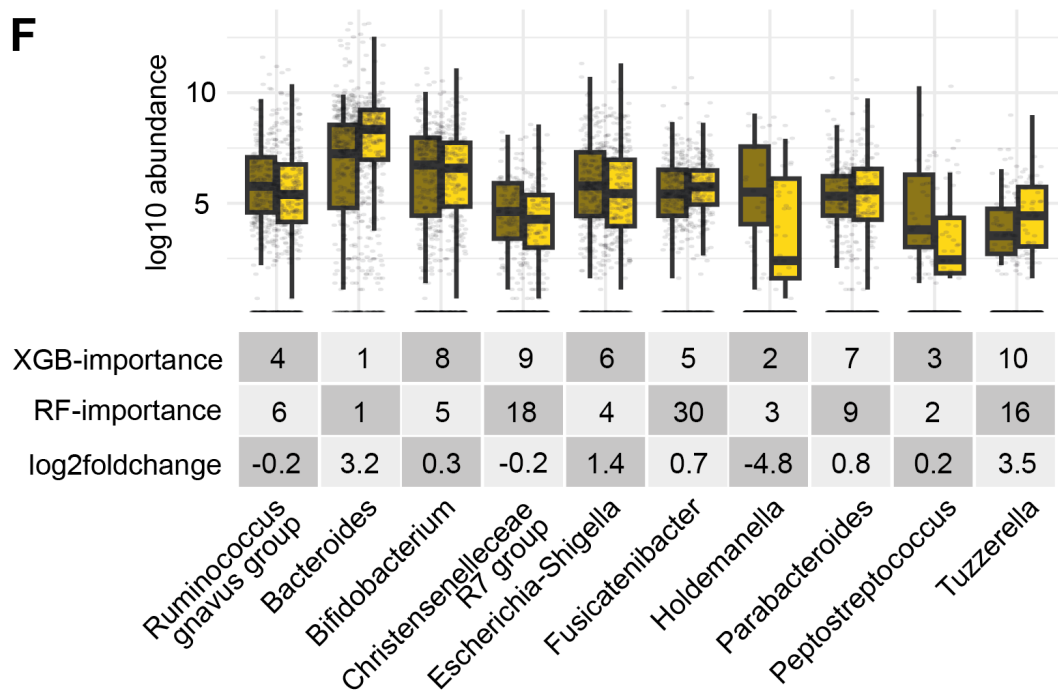
P-hodnota u Crohnovy choroby je korigována na počet testovaných taxonů

Našli jsme taxony asociované s vyléčením střevního zánětu

DIAGNOSTIKA CD PREDIKCE ODPOVĚĚ NA LÉČBU

- Opět rakouská metaanalýza (dětské kohorty)
- Rozdíly mezi respondery (R) a non-respondery (NR)
 - Alfa-diverzita: NS
 - Beta-diverzita: $p < 0,001$
- Co je tím rozdílem?
 - *Bacteroides*
 - *Holdemanella*
 - *Escherichia-Shigella*

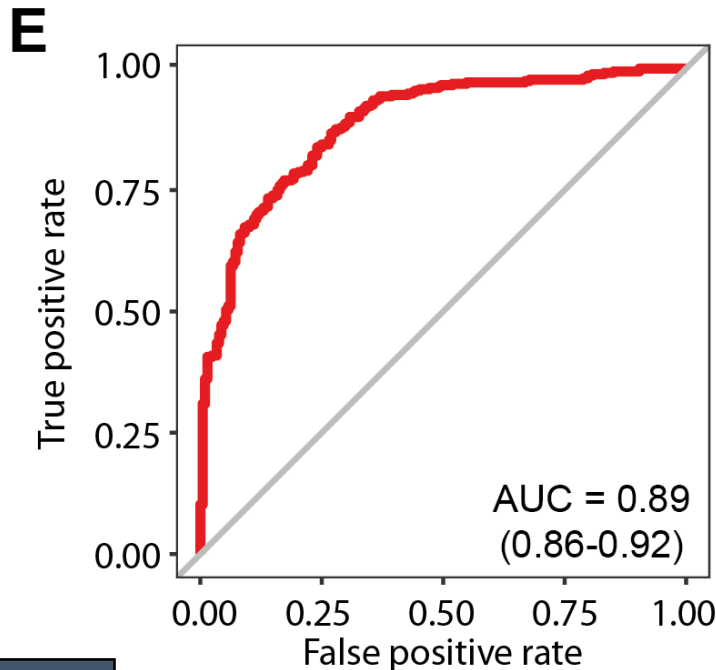
F



DIAGNOSTIKA CD PREDIKCE ODPOVĚĚ NA LÉČBU

- Opět rakouská metaanalýza (dětské kohorty)
- Rozdíly mezi respondery (R) a non-respondery (NR)
 - Alfa-diverzita: NS
 - Beta-diverzita: $p < 0,001$
- Co je tím rozdílem?
 - *Bacteroides*
 - *Holdemanella*

Profilování mikrobiomu umožňuje rozlišit odpověď na léčbu u dětské Crohnovy nemoci a ulcerózní kolitidy (AUC 0,89)



Vogel et al, *J Crohn Colitis* – v recenzním řízení, 2024

K čemu je celé studium lidského mikrobiomu?

- Zkoumá patogenезi nemocí spojených s dysbiózou
- Pomocný diagnostický nástroj

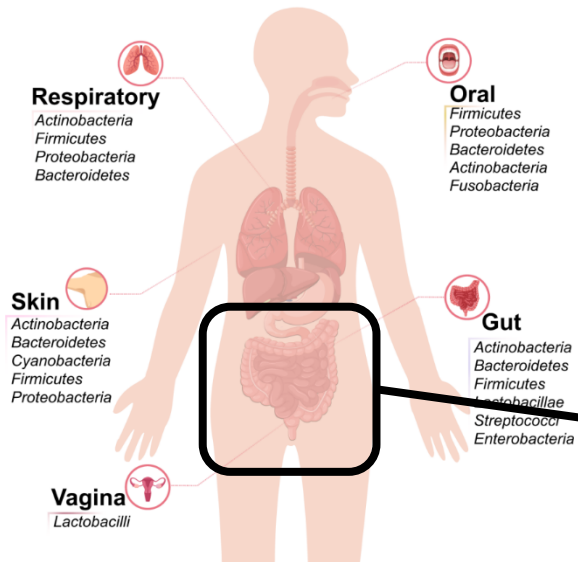
An illustration of a microbiome. It features several vertical, brown, textured cylindrical structures representing host cells or mucus. Scattered around and between these structures are various colorful microorganisms: purple spheres, orange and yellow rod-shaped bacteria, and some red-tipped rods. The background is a light, textured surface.

3) Fyziologická mikrobiota

Mikrobiom

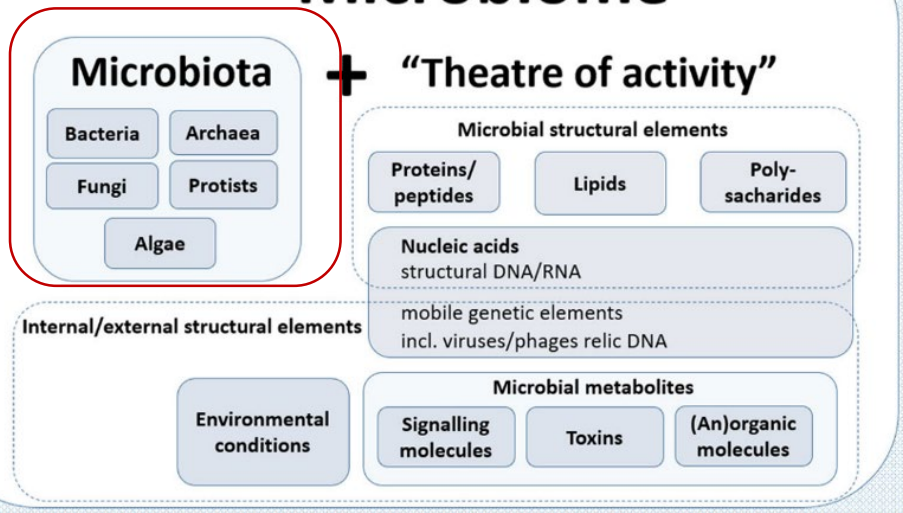
Mikrobiom = charakteristická mikrobiální komunita, která obývá určitý racionálně vymezený habitat s typickými fyzikálními a chemickými podmínkami

Berg et al, *Microbiome*, 2020



Hou et al, *Sig Transduct Target The*, 2022

Microbiome



Berg et al, *Microbiome*, 2020

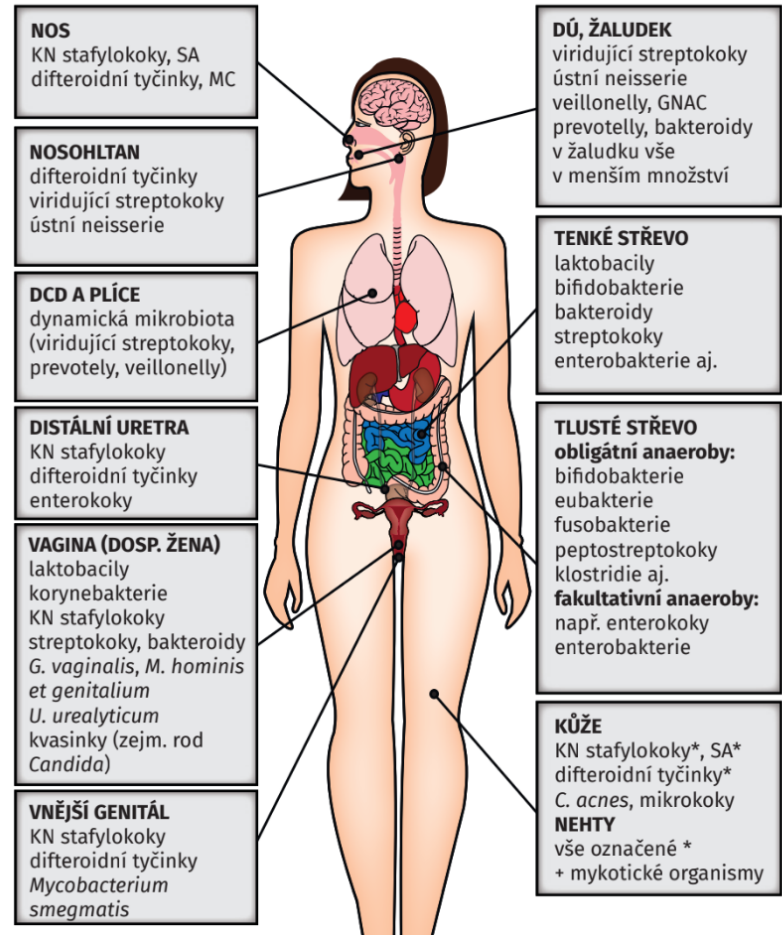


FYZIOLOGICKÁ MIKROBIOTA

Nejčastější materiály s fyz. mikrobiotou

- Stěr kůže
- Výtěry z nosu a nosohltanu
- Výtěr z krku
- Výtěr z vaginy
- Výtěr z rekta a stolice

(Sputum a aspiráty z DCD – to je ale kontaminace z HCD)



Materiál	Fyziologické nálezy
Stěr kůže	Koaguláza-negativní stafylokoky, difteroidy
Výtěry z nosu a nosohltanu	Koaguláza-negativní stafylokoky, difteroidy, nosičství <i>S. aureus</i>
Výtěr z krku	Viridující streptokoky a neiserie, anaeroby
Sputum a aspiráty z DCD	Téměř „sterilní“
Výtěr z vaginy	Laktobacily, koaguláza-negativní stafylokoky
Výtěr z rekta a stolice	Enterobakterie, enterokoky, koaguláza-negativní stafylokoky

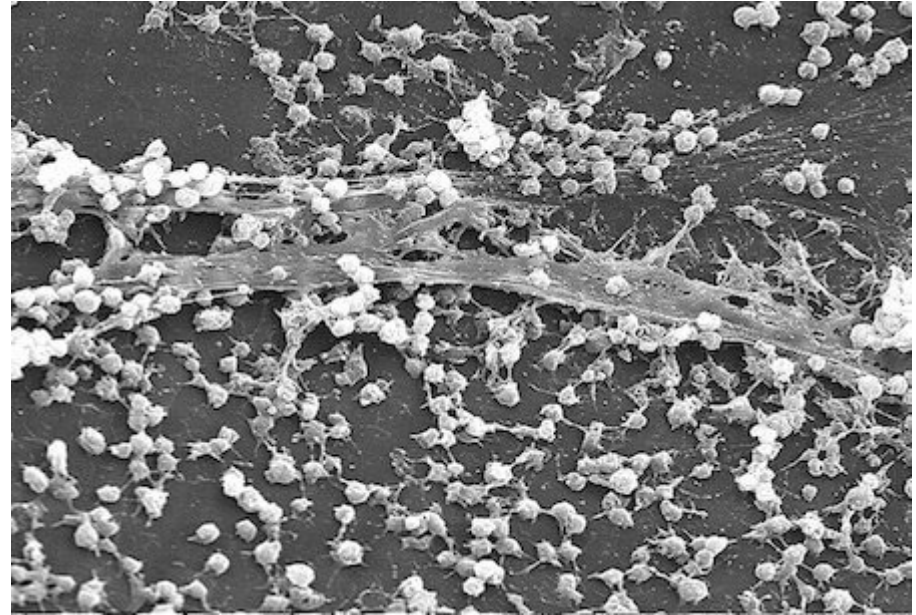
Materiál	Fyziologické nálezy
Stěr kůže	Koaguláza-negativní stafylokoky, difteroidy
Výtěry z nosu a nosohltanu	Koaguláza-negativní stafylokoky, difteroidy, nosičství <i>S. aureus</i>
Výtěr z krku	Viridující streptokoky a neiserie, anaeroby
Sputum a aspiráty z DCD	Téměř „sterilní“
Výtěr z vaginy	Laktobacily, koaguláza-negativní stafylokoky
Výtěr z rekta a stolice	Enterobakterie, enterokoky, koaguláza-negativní stafylokoky

Název	Hemolýza na KA	Patogenita	
<i>S. aureus</i>	Ano	+++	Fyziologicky v nose (asi 20%); Patogenní potenciál: - IKMT, ortopedické, pneumonie (! PVL+), IMC, IKŘ, - Enterotoxikóza, STSS, SSSS
CoNS nejsou jen <i>S. epidermidis</i> a <i>S. saprophyticus</i>			
<i>S. capitis</i>	Ano	+	Fyziologicky na kůži; Kolonizace katetrů, náhrad a chlopní
<i>S. epidermidis</i>	Ne	+	
<i>S. hominis</i>	Ne	+	
<i>S. haemolyticus</i>	Ano	+	
<i>S. lugdunensis</i>	Ano	++	Fyziologicky na kůži; IKMT, ortopedické, endokarditida, IKŘ
<i>S. saprophyticus</i>	Ne	++	Fyziologicky na kůži; IMC

* IKMT = infekce kůže a měkkých tkání; IKŘ = infekce krevního řečiště; IMC = infekce močových cest; STSS = stafyl. syndrom toxického šoku; SSSS = stafyl. syndrom opařené kůže; PVL = Panton-valentinův leukocidin)

Koaguláza-negativní stafylokoky

- Kde je má smysl řešit? U všech materiálů s rizikem tvorby **biofilmu**
 - Hemokultury*
 - Katetry se sign. kvantitou*
 - Ortopedické materiály (tkáně, stěry, punktáty)
 - Stěry ran u spondylochirurgických pacientů
 - Hluboké rány se známkami infekce



Biofilm *Staphylococcus aureus* odebraný z infikovaného zavedeného katétru (*The Role of Bacterial Biofilms in Antimicrobial Resistance*, ASM, 2023)

Pozitivní:
2/4 lahviček

číslo: [redacted] no: 16.12.2023-00:12
přijato: 16.12.2023-09:48
mater: **Hemokultivace**
upř+lok: aerobní periferie
odděl: INDM Interna - standard. 7. stanice
uzavřeno:

↑	↕	Výmaz	Kopie	F2-rámec	F5-oper	F6-vyš	P-Půda	I-izolace	L-Identif	M-Mikro	A-ATB	K-kvantita	D-Maldi	C-ceka	H-Dohřátí	O-opak	E-Klín	V-Iden.Koky	Z-Zamrazit	S-ser	X-mimo	F-DUPLIKÁT		
Kult	Dat	Operace	Výsledek	([F10] - vstup do editoru, [Ins] - tisk, [Ctrl/Ins] - kopie operace , [Alt/Ins] - kopie větve, [Shift/Ins] - vložit kopii)																			T	U
		MIKROSKOPICKY																						
	17.12-05:41	Preparát z klinického materiálu:	g+koky ve shlucích																					
		Kultivace																						
	16.12-09:48	krevní agar (Columbia) - hemokultiva	dřepa																					
	18.12-07:16	Maldi - koky	Staphylococcus epidermidis																					
	17.12-07:55	citlivé zóny Stafylokoky (3 řady)	OXA+ PEN? COT+ ERY+ KLI+ TET+ RIF+ OFL+ VAN- TEI- GEN+ LNZ+ TGC+ CPT+																					
	17.12-00:52	Doba do positivity	1d 0h 41m																					
	17.12-05:41	MacConkey půda HK																						
		Mikroaerofilní kultivace																						
	17.12-05:41	čokoládový agar																						

Materiál: **Hemokultivace aerobní periferie**
Vyšetření: hemokultivace, hemokultivace pozitivní, hemokultivace vyočkování

MIKROSKOPICKY

Preparát z klinického materiálu: g+koky ve shlucích

Kultivace

Nález 1: **Staphylococcus epidermidis**

ANTIPIOGRAM (disková difúzní metoda)

oxacilin.....	C	ofloxacin.....	C
kotrimoxazol.....	C	gentamicin.....	C
erythromycin.....	C	linezolid.....	C
klindamycin.....	C	tigecyklin.....	C
tetracyklin.....	C	ceftaroline.....	C
rifampicin.....	C		

Zkratky: C = citlivý, R = rezistentní, I = intermediální, * = výsledek k dispozici po konzultaci s ATB střediskem

Signifikantní
kvantita (>15 CFU)

Číslo: [redacted] no: 15.12.2023-12:01
materiál: Katetr cévní přijato: 15.12.2023-13:33
upř+lok: centrální žilní
odděl: CH34 3.chir.klinika-JIP asept. uzavřeno:

Kult	Dat	Operace	Výsledek ([F10] - vstup do editoru, [Ins] - tisk, [Ctrl/Ins] - kopie operace , [Alt/Ins] - kopie větve, [Shift/Ins] - vložit kopii)	T	U	O
		MAKI				
	15.12-13:33	Krevní agar (Columbia) MAKI				
	16.12-08:12	izolace na Krevní agar	átte			
	18.12-08:32	Maldi - koky	<i>Staphylococcus hominis</i>			
	18.12-10:23	citl zóny Stafylokoky	OXA PEN? COT ERY KLI TET RIF OPL VAN TEI GEN LNZ TGC CPT			
	16.12-08:12	kvantita	> 15 CFU			
2	16.12-08:12	duplikát operace				
	16.12-08:12	izolace na Krevní agar	átte			
	18.12-08:32	Maldi - koky	<i>Staphylococcus hominis</i>			
	16.12-08:12	kvantita	> 15 CFU			
		SONO				
	15.12-13:33	Krevní agar (Columbia) SONO	negativní			
	15.12-13:33	Trypton-sojový bujón				

Materiál: **Katetr cévní centrální žilní**

Vyšetření: cévní katetr - vyšetření

MAKI

Nález 1: **Staphylococcus hominis > 15 CFU**

SONO

Nález: **negativní**

číslo: [redacted] o: 12.12.2023-10:40
 mater: Tkáň přijato: 12.12.2023-13:54
 upř+lok: jiné (nutno uvést lokalizaci) TEP genus I. sin.
 odděl: OSPE 1 - odpoed kl. septicke odd. uzavřeno:

Výmaz Kopie F2-rámec F5-oper F6-vyř P-Půda Izolace L-Identif M-Mikro A-ATB K-kvantita D-Maldi C-ceka H-Dohřáti O-opak E-Klíň V-Iden.Koky Z-Zamrazit S-ser X-mimo F-DUPLIKÁT

Kult	Dat	Operace	Výsledek ([F10] - vstup do editoru, [Ins] - tisk, [Ctrl/Ins] - kopie operace , [Alt/Ins] - kopie větve, [Shift/Ins] - vložit kopii)	T	U	O
		MIKROSKOPICKY				
	12.12-13:54	Preparát z klinického materiálu:	buněčná drť, leukocyty masivně, bez mikrobu			
		PRIMOKULTIVACE				
	12.12-13:54	krevní agar se stafyl.čárou (Columbia)	negativní			
	13.12-06:50	dohřáti	dtto			
	12.12-13:54	MacConkey agar				
		POMNOŽENÍ				
	12.12-13:54	bujón thioglykolátový				
2	12.12-13:54	krevní agar (Columbia) - pomnožení	dtto			
	14.12-08:18	Maldi - koky	Staphylococcus epidermidis			
	14.12-08:18	citř zóny Stafylokoky (3 řady)	OXA- PEN? COT+ BRY- KLI- TET+ RIF+ OFL- VAN+ TEI+ GEN+ LNZ+ TGC+ CPT+			
	12.12-13:54	MacConkey agar - pomnožení				
	12.12-13:54	Schaedler - 1.čtení	negativní			
	12.12-13:54	Schaedler VL	Výsledek prodloužené kultivace sdělíme dodatečně.			
	12.12-13:54	Bujón pro anaerobní kultivaci - thioglykolátový				
	19.12-00:00	Schaedler - vyočkování po 5. dnech				
1	12.12-13:54	Schaedlerův agar - primokultivace	dtto			
	14.12-07:05	Maldi - anaerobi	Staphylococcus epidermidis			
	14.12-08:33	kvantita	zcela ojedinele			

Co tento náález?

Materiál: **Stěr z rány, defektu, píštěle, eflorescence...** hluboká operační 1.vzorek (Odběr)

Vyšetření: hluboká rána - kultivace vč. anaerobů

PRIMOKULTIVACE

Nález 1: **Staphylococcus pseudintermedius**

<u>ANTIBIOGRAM (disková difusní metoda)</u>			
oxacilin.....	C	vankomycin.....	C
kotrimoxazol.....	C	teikoplanin.....	C
erythromycin.....	C	gentamicin.....	C
klindamycin.....	C	linezolid.....	C
tetracyklin.....	C	tigecyklin.....	C
rifampicin.....	C	ceftaroline.....	C
ofloxacin.....	C		

Nález 2: **Corynebacterium sp**

<u>ANTIBIOGRAM (disková difusní metoda)</u>			
penicilin.....	R	cefotaxim.....	C
ampicilin.....	C	rifampicin.....	C
klindamycin.....	R	vankomycin.....	C
kotrimoxazol.....	C	linezolid.....	C
norfloxacin.....	C	tigecyklin.....	C

POMNOŽENÍ

Nález: **dtto**

Anaerobní kultivace

Nález: **negativní**

První záchyt *Staphylococcus pseudintermedius* z humánního klinického materiálu v České republice

*The first isolation of **Staphylococcus pseudintermedius**
from a human clinical specimen in the Czech Republic*

Petr Petráš, Pavel Švec, Ivana Machová

Souhrn • Summary

Staphylococcus pseudintermedius je jedním z nejnovejších stafylokokových druhů, popsáný v roce 2005 u nemocných zvířat. Je pravděpodobné, že i tento druh bude hrát roli v lidských infekcích obdobně jako fenotypově velice příbuzné kmeny *S. intermedius*. Tyto dva druhy je možné odlišit pouze s využitím molekulárně-biologických metod. Prezentovaný kmen byl izolován z výtěru krku při faryngitidě majitelky domácího psího mazlíčka 11 let před prvním popisem druhu v taxonomické literatuře.

*Staphylococcus pseudintermedius, one of the most recently described staphylococcal species, was isolated from diseased animals in 2005. Similarly to phenotypically highly related *S. intermedius*, it is also likely to play a role in human infections. These two species can only be distinguished from each other by molecular biological methods. The presented strain *Staphylococcus pseudintermedius* was isolated from a throat swab of a pet dog owner with pharyngitis 11 years before the first report of this species in the taxonomic literature.*

Zprávy EM (SZÚ, Praha) 2010; 19(3): 65–67.

a podle výsledku shlukové analýzy byl rovněž zařazen do druhu *S. pseudintermedius* (Obrázek 1).

Závěr

Je pravděpodobné, že kmeny *S. pseudintermedius* budou hrát svou roli i v lidských onemocněních, především tam, kde došlo ke kontaktu se zvířetem, např. po kousnutí psem. Spolehlivá identifikace a odlišení druhu *S. pseudintermedius* od *S. intermedius* jsou však možné pouze s využitím molekulárně-biologických metod.

V současnosti existuje v rodu *Staphylococcus* 52 validně popsaných taxonů. V posledním čísle taxonomického časopisu International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology byl zveřejněn popis druhu *S. massiliensis*. Jeden kmen tohoto koagulázanegativního stafylokoka izolovali francouzští bakteriologové z mozkového abscesu 52letého muže, který byl operován pro nádor na mozku. Fenotypově je kmen *S. massiliensis* 5402776^T nejbližší s druhem *S. pettenkoferi*. Název do-

12. Hooveis LA, vankeerberghen A, Boei A, et al. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. *J Clin Microbiol* 2006; 44(12): 4609–4612.
13. Chuang CY, Yang YL, Hsueh PR, Lee PI. Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. *J Clin Microbiol* 2010; 48(4): 1497–1498.
14. Petráš P, Ježek P. Smíšená infekce *Staphylococcus intermedius* a *Pasteurella multocida* subsp. *septica* po kousnutí psem. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 1998; 7(3): 116–117.
15. Masalma MA, Raoult D, Roux V. *Staphylococcus massiliensis* sp. nov., isolated from a human brain abscess sample. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010; 65(5): 1066–1072.

Podpořeno projekty MSM 0021622416
a GAČR 310/09/04569.

Petr Petráš, Ivana Machová
NRL pro stafylokoky, SZÚ, Praha

Pavel Švec
Česká sbírka mikroorganismů, PFF MU, Brno

Když není interpretace mikrobiologa – vždy mu raději volat

POZOR NA TYTO NÁLEZY s fyziologickou mikrobiotou

Všechno ve sterilním vzorku:

- Tkáně
- Srdeční chlopně
- Hemokultury (kromě jedné z vícero lahvíček, kde KN stafylokoky – susp. kontaminace)
- Kloubní aspirát
- Mozkomíšni mok

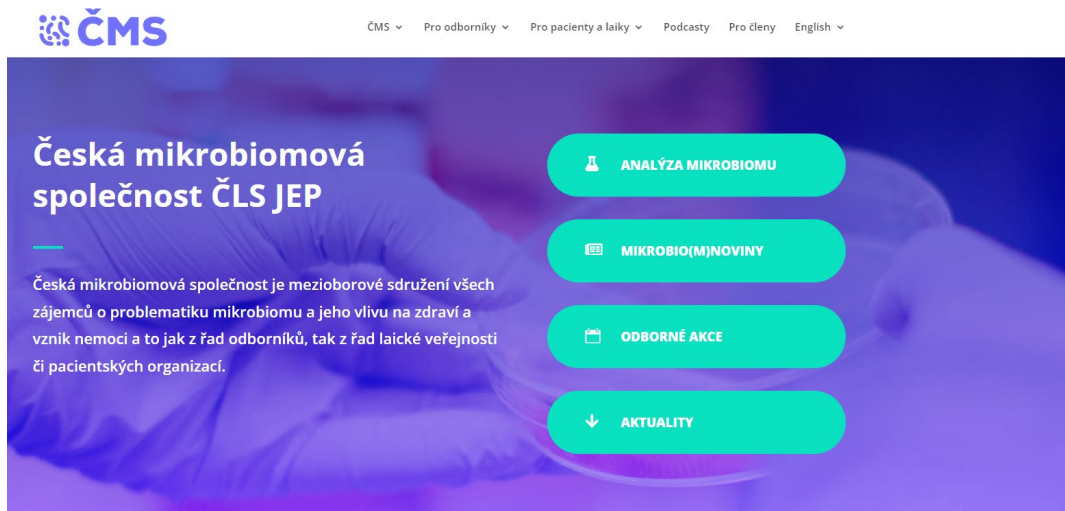
Mimo jiné:

- Více než 10^3 CFU ze suprapubické punkce
- STD patogeny u dětí
- E.coli* ze vzorku stolice u dětí do 2 let

Take-home message

- Sekvenování v mikrobiologii
 - V diagnostice se uplatňuje zejm. panbakteriální PCR
 - Materiál: primárně sterilní - tkáně, tekuté materiály
- Lidský střevní mikrobiom
 - Nevím, co je zdravý mikrobiom, ale víme jak pečovat o jeho zdraví
 - Jeho studium se zabývá mj. otázky patogeneze některých onemocnění a pomáhá využít jako diagnostický nástroj
- Fyziologická mikrobiota
 - Potřeba rozlišit, kdy „vadí“ a kdy nikoliv

Více informací o mikrobiomu a všem novém kolem něj nyní najdete snadno!




The screenshot shows the homepage of the website www.mikrobiom-cms.cz/. The header features the CMS logo and navigation links: ČMS, Pro odborníky, Pro pacienty a laiky, Podcasty, Pro členy, and English. The main content area has a blue background with a petri dish. On the left, the text reads: "Česká mikrobiomová společnost ČLS JEP" followed by a description: "Česká mikrobiomová společnost je mezioborové sdružení všech zájemců o problematiku mikrobiomu a jeho vlivu na zdraví a vznik nemocí a to jak z řad odborníků, tak z řad laické veřejnosti či pacientských organizací." On the right, there are four red buttons: "ANALÝZA MIKROBIOMU", "MIKROBIO(M)NOVINY", "ODBOBNÉ AKCE", and "AKTUALITY".

<https://www.mikrobiom-cms.cz/>



The screenshot shows the Facebook profile of the Česká mikrobiomová společnost ČLS JEP. The profile name is "Česká mikrobiomová společnost ČLS JEP" with 79 posts. The cover photo shows purple rod-shaped bacteria. The profile picture is the CMS logo. The bio reads: "Oficiální účet ČMS ČLS JEP. Pravidelné informace ze světa mikrobiomu pro odbornou i laickou veřejnost #mikrobiom #cms_clsjep". The footer shows "Zdravotnictví", the website link "mikrobiom-cms.cz", and a post from "Uživatel se připojil duben 2023".



PODCAST

Medici Boni Podcast

Medici Boni

FOLLOWING

Up next

#038 O pomoci Ukrajině a vnímání svých krajanů v ČR | Vyacheslav Grebenyuk

V dalším dílu našeho podcastu jsme přivítali MUDr. Vyacheslava Grebenyuka, lékaře Kliniky infekčních nemocí Fakultní nemocnice Bulovka a nově i FN Motol. Se Slávou jsme probírali jeho (nejen) první týžny po ruské invazi na Ukrajinu a roli v organizaci pomoci ukrajinským vědeckým uchylkům, ale také...

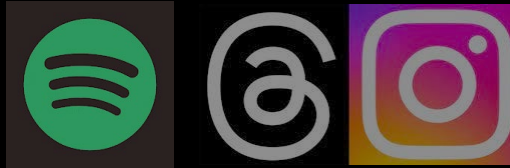
Oct 20 - 59 min 17 sec

All Episodes


#039 O překážkách na cestě vědou i medicinou | Zuzana Střížová

Tentokrát pozvání do našeho podcastu přijala MUDr. Zuzana Střížová, PhD., oceňovaná vědkyně a lékařka na Ústavu imunologie 2.LF UK a FN Motol. Úspěchy dr. Střížové na poli vědy prakticky nebylo možné nezaznamenat a i my se připojili se zvědavostí, jaký příběh...

Nov 7 - Played ✓



Kdo si chce něco opakovat při prokrastinaci na instagramu může na IG a FB účtu **@mediciboni**



mediciboni

Following Message +A ...

83 posts 726 followers 45 following

Medici Boni

mediciboni

Author

♥ Aby studium medicíny tolik nebolelo
 ↓ Výuka mikrobiologie zde a LM - Repetitorium
 ↓ Inspirativní příběhy v Medici Boni Podcast
 ↪ open.spotify.com/episode/0NSUnXuYyvcosEF0pUZD23?si=tibhkrOT62HrB4p4bxF-Q

Followed by barujirova, brajerovamarie, ko_lize + 51 more

Mikrokvíz III 0 Mikrokvíz II 1 Mikrokvíz 1 0 O nás 1 Podcast 3.vydání LM-R 2.vydání LM-R

POSTS TAGGED

 <p>PYELONEFRITIDA zánět ledviny a ledvinné pánvičky</p>	 <p>CYSTITIDY zánět močového měchýře</p>	 <p>PNEUMONIE aneb zápal plic</p>
 <p>CHŘIPKA respirační onemocnění chladných měsíců</p>	 <p>Co je zač "VIRÓZKA"? • rýma, kašel, bolest v krku • Pomůžou mi antibiotika?</p>	 <p>DAPTOMYCIN lipopeptidové antibiotikum s baktericidním účinkem</p>