



Sekvenování v mikrobiologii a mikrobiom člověka

Jakub Hurych

Ústav lékařské mikrobiologie, 2. LF UK a FN Motol

18.12.2023



2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA
UNIVERZITA KARLOVA



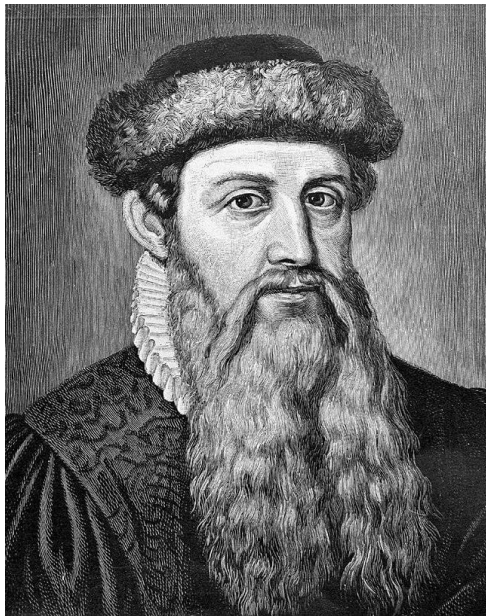
FN MOTOL

Obsah přednášky

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



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)

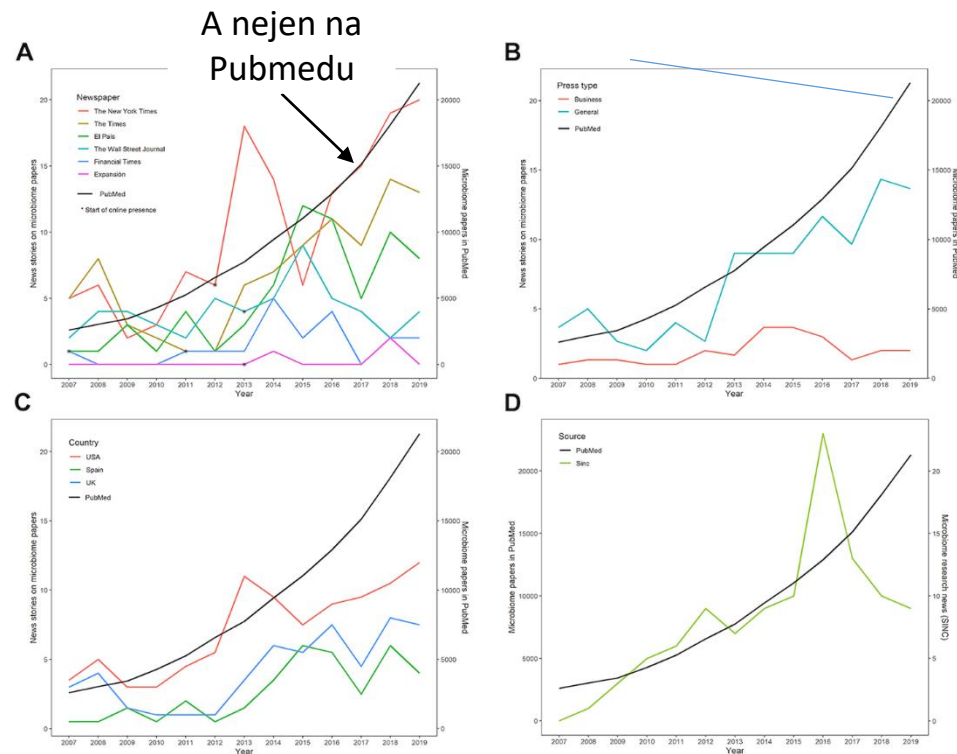
**Zpřístupnění dat veřejnosti:
Masivní rozvoj mikrobiomové vědy**

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 ¹ (p-value)	Correlations with microbiome news published by SINC ^{1,2} (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/biomedicine in SINC ²	-	-	-	-	-	-
Total newspapers	4.6 (4.9)	2.3 (2.2)	7.8 (7.5)	13.9%	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.
¹The 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





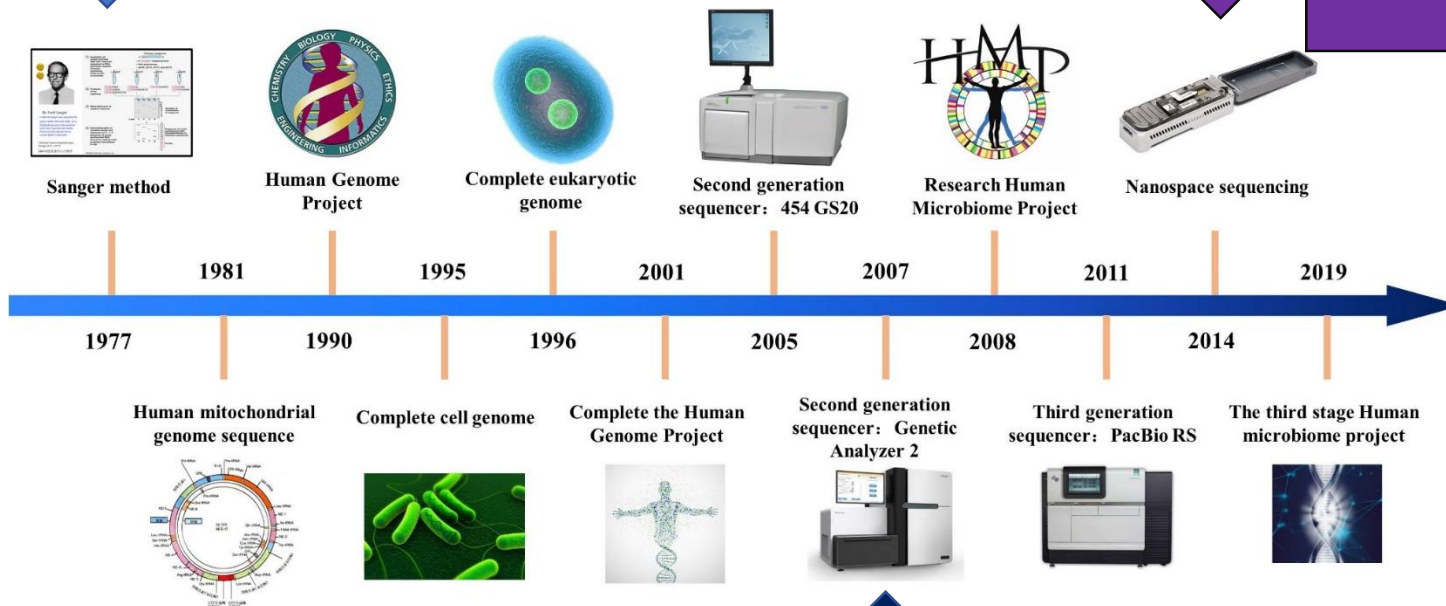
1) Sekvenování v mikrobiologii

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

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

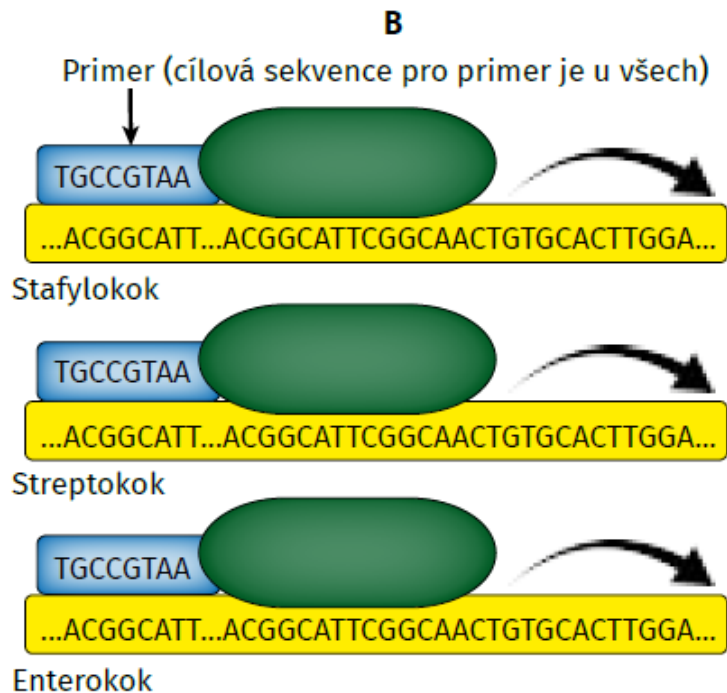
Fekální mikrobiální terapie

- 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

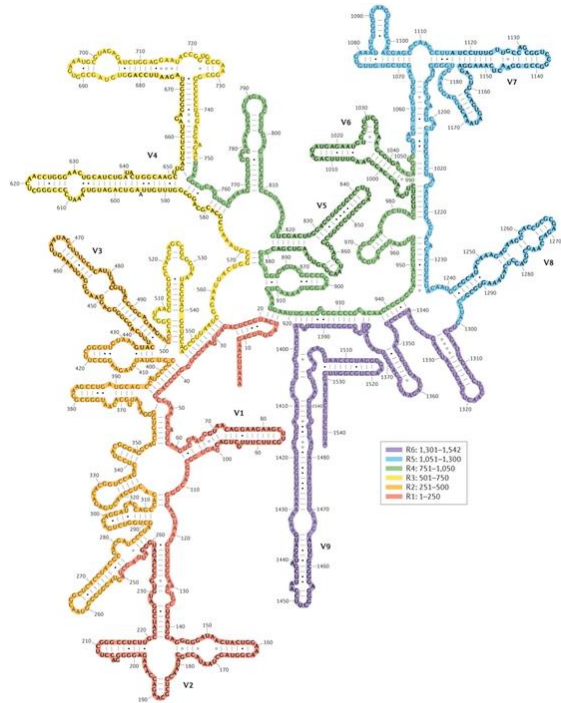
Likvor

Velmi vzácně i krev, BAL

Ještě vzácněji narostlé kultury

Jak se to dělá?

- Dvoukolový proces



1. Amplifikace 16S rDNA

2. Sekvenování ampliconu 16S rDNA

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>

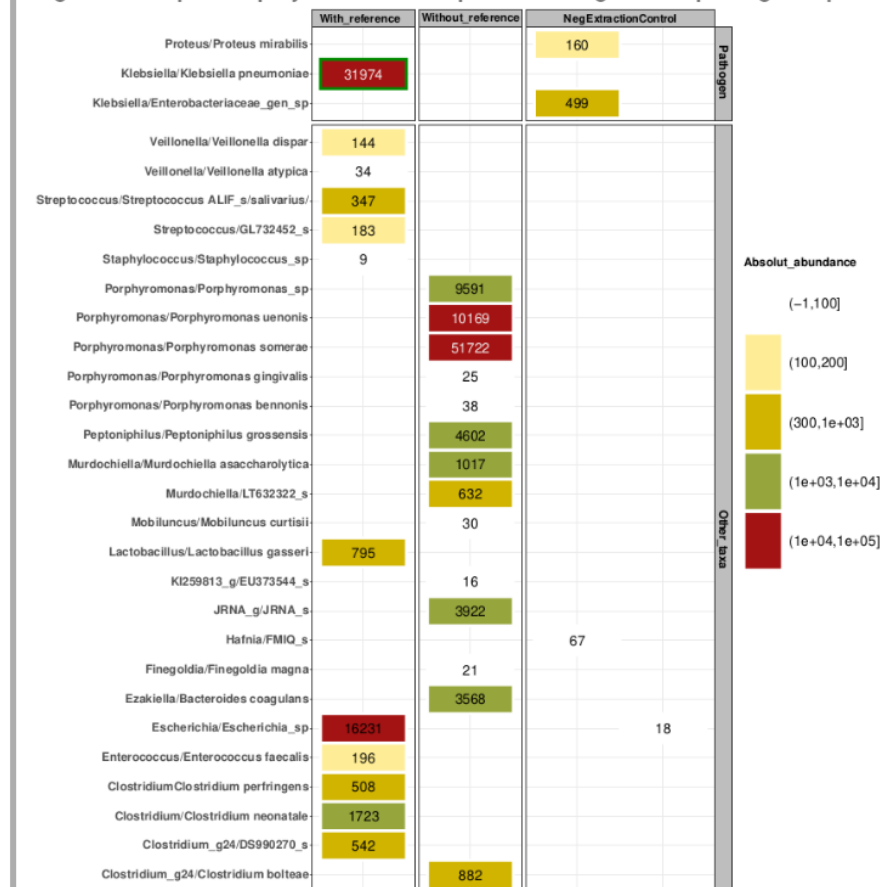
Další využití panbakteriálního PCR

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

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

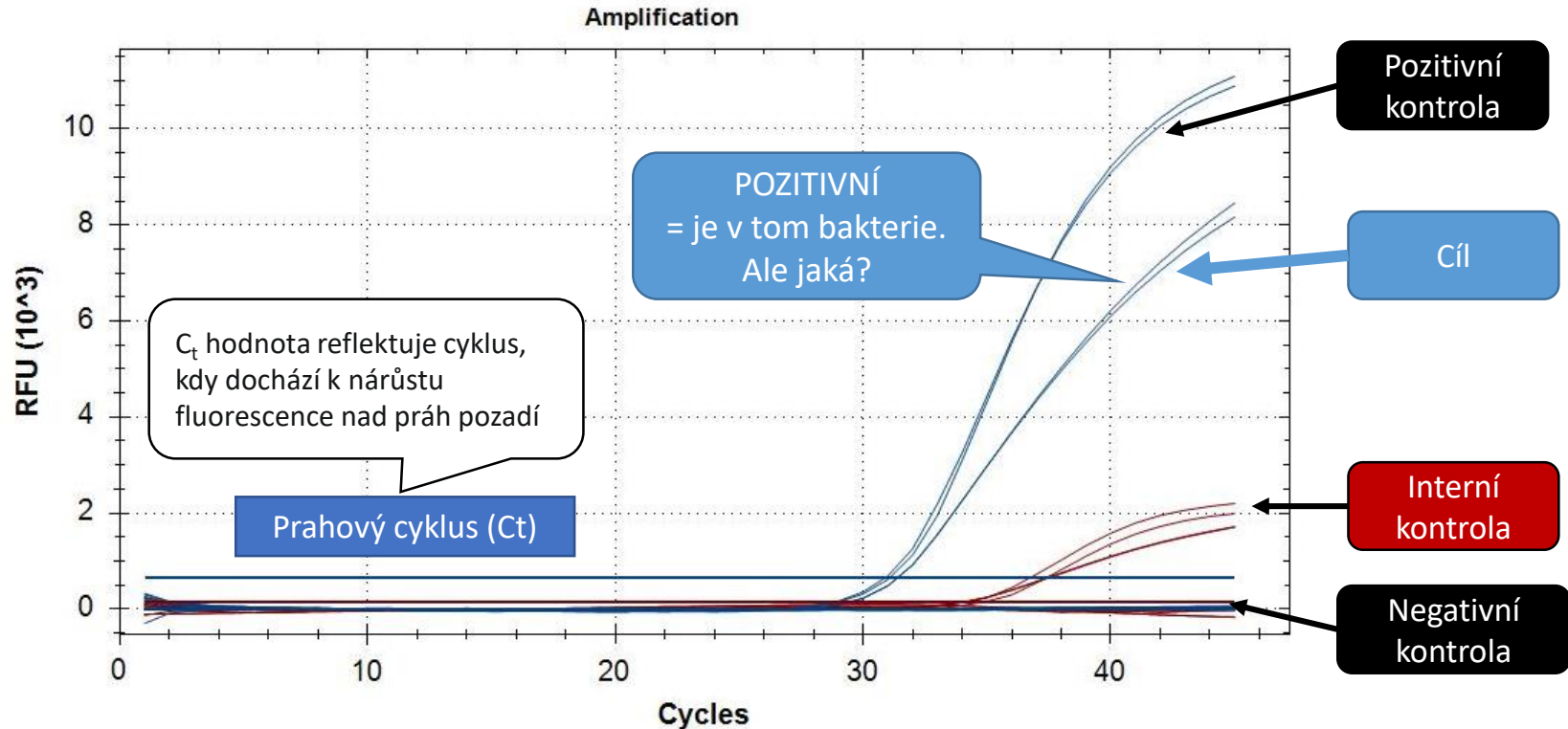
3.3. Suspected polymicrobial samples

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 mří do databáze [NCBI BLAST](#)

Hodnocení:

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

Vzorek: BA-9454

```
CGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACTG
TGCACATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACG
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAG
CGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCTGAT
GTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCC
```



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

2) Fyziologická mikrobiota

Trochu terminologie na začátek



Mikrobiom
= genom

Molekulární
metody



Mikrobiota / mikroflóra
= živé organismy

Kultivační
metody

3% !

FYZIOLOGICKÁ MIKROBIOTA

Koaguláza-negativní
stafylokoky, difteroidy

Viridující streptokoky, ústní
neiserie, difteroidy

Viridující streptokoky
(zpolykané)

KN stafylokoky, difteroidy,
enterokoky (10^3 a méně v
moči)

Laktobacily, difteroidy
KN stafylokoky,
viridující streptokoky

Viridující streptokoky, ústní
neiserie, difteroidy

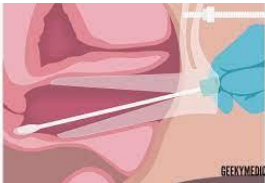
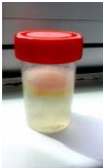
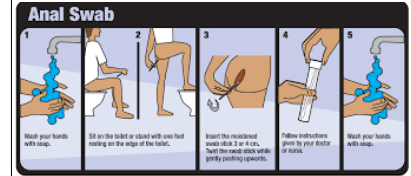
Téměř vše:

- kromě původců GI infekcí
(*Campylobacter*, *Salmonella*,
Yersinia)

- Toxigenní *C. difficile* and *H.
pylori* (ve stolici)

- Parazité (*Cryptosporidium*,
Entamoeba histolytica atd.) ale
nikoliv *Blastocystis* nejsou-li
příznaky

Koaguláza-negativní
stafylokoky, difteroidy,
mikrokoky (*Cutibacterium
acnes*)



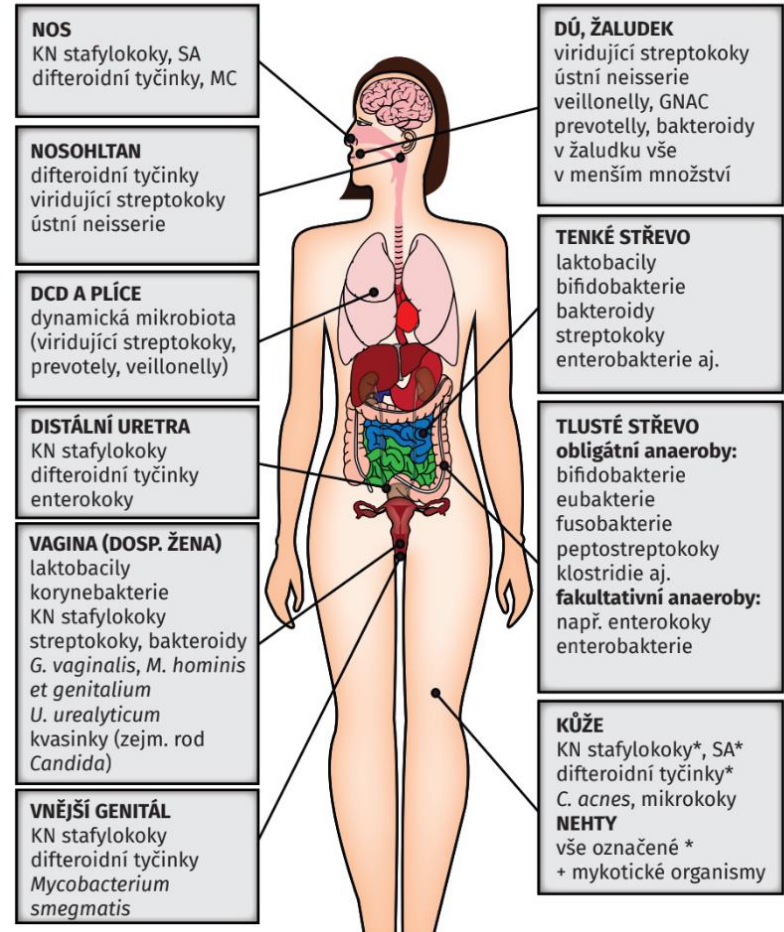
GEEKYMEDICS.COM

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

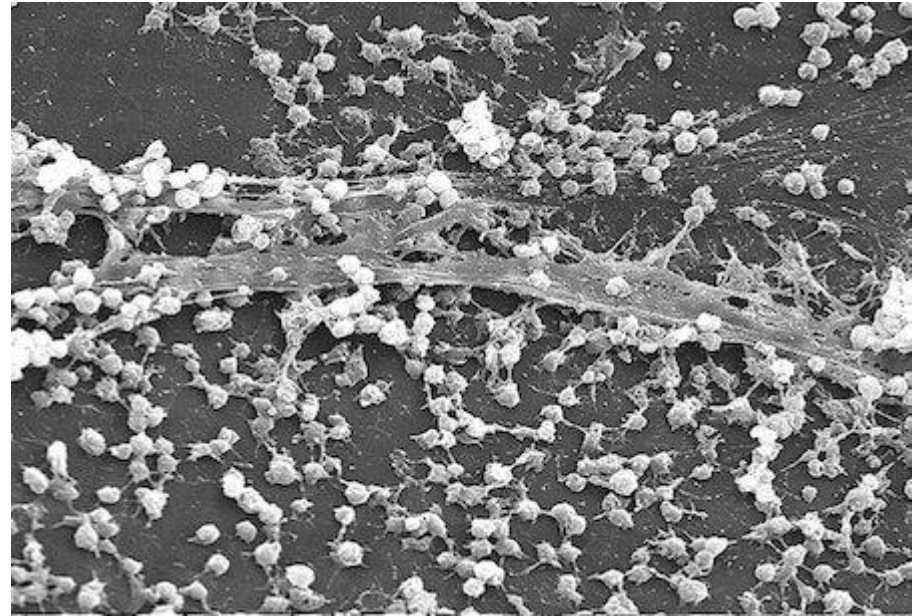
(Sputum a aspiráty z DCD – to je ale kontaminace z HCD)



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

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)

Název	Hemolýza na KA	Patogenita	
<i>S. aureus</i> (není KNS!)	Ano	+++	Fyziologicky v nose (asi 20%); Patogenní potenciál: - IKMT, ortopedické, pneumonie (! PVL+), IMC, IKŘ, - Enterotoxikóza, STSS, SSSS
KNS není 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)

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-Dohřáti	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	Staphylococcus hominis			
	18.12-10:23	citl zóny Stafylokoky	OXA PEN? COT ERY KLI TET RIP 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	Staphylococcus hominis			
	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: **Tkan** přijato: 12.12.2023-13:54
 upř+lok: jiné (nutno uvést lokalizaci) TEP genus I. sin.
 odděl: OSPE 1.ortoped.kl.-septicke odd. uzavřeno:

Výmaz Kopie F2-rámec F5-oper F6-vyř P-Půda I-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 mikrobrů			
		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			

Materiál: **Stěr z rány, defektu, pištěle, eflorescence...** hluboká operační 1.vzorek (Odběr)
Vyšetření: hluboká rána - kultivace vč. anaerobů

PRIMOKULTIVACE

Nález 1: **Staphylococcus pseudintermedius**

ANTIBIOGRAM (disková difuzní metoda)

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**

ANTIBIOGRAM (disková difuzní metoda)

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**

POZOR NA TYTO NÁLEZY s fyziologickou mikrobiotou

Všechno ve sterilním vzorku:

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

Mimo jiné:

- Více než 10^3 CFU ze suprapubické punkce
- STD patogeny u dětí
- E.coli* in ze vzorku stolice u kojenců a batolat



3) Lidský mikrobiom

Trochu terminologie na začátek



Mikrobiom
= genom

Molekulární
metody



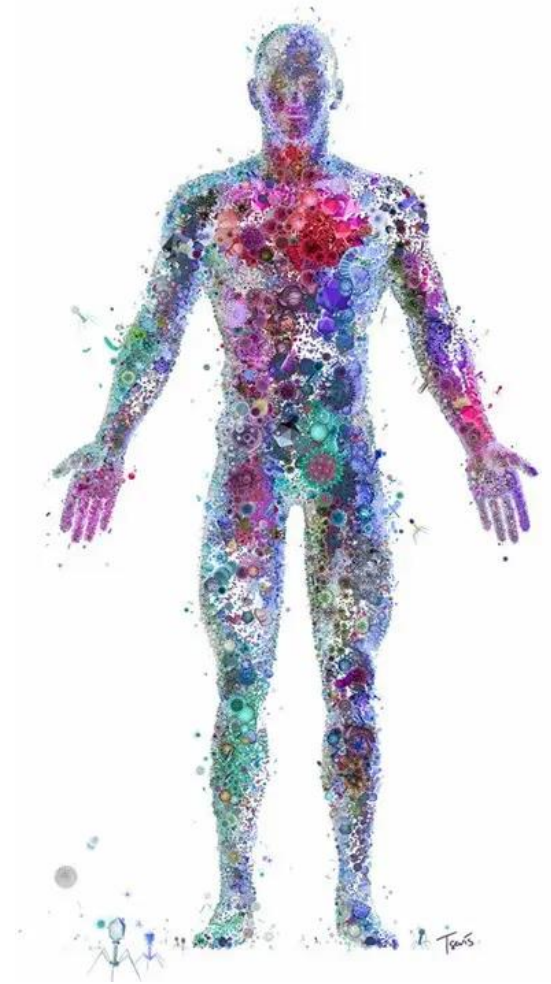
Mikrobiota / mikroflóra
= živé organismy

Kultivační
metody

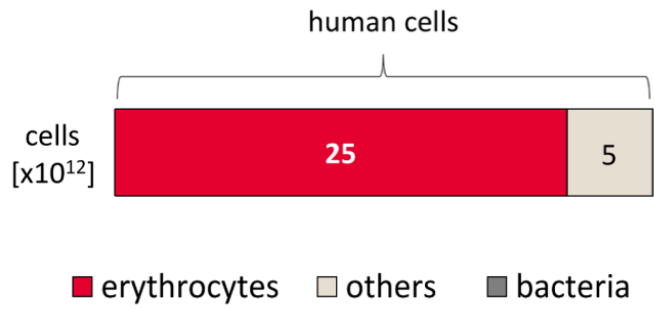
3%!

Lidský super-organismus

Žijí oni s námi nebo my s nimi?

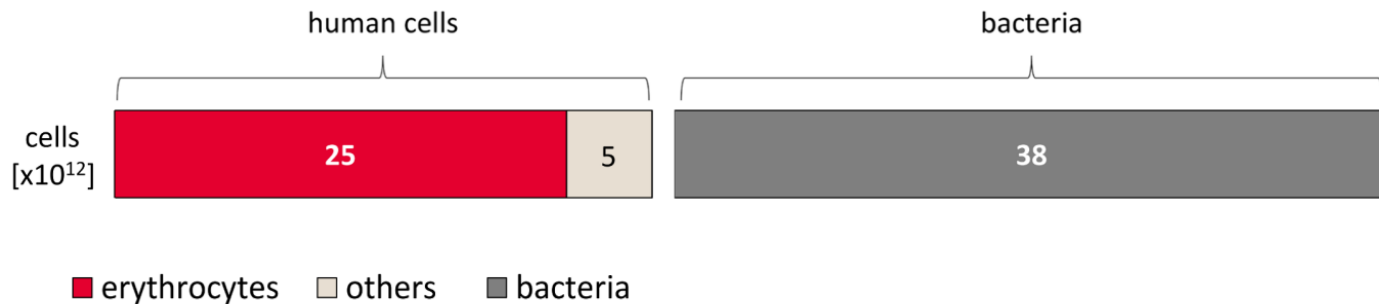


Jsmé víc lidí nebo mikrobi (bakterie)?






Sender et al, PLOS, 2016

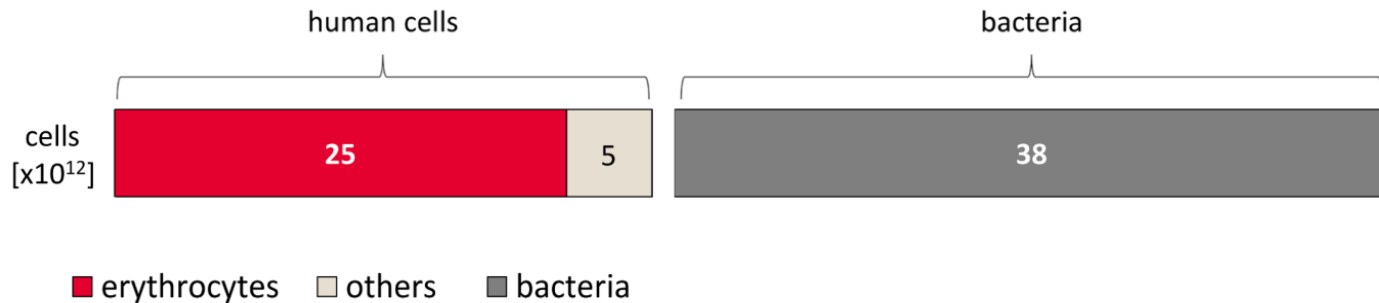
Jsme víc lidí nebo mikrobi (bakterie)?







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 

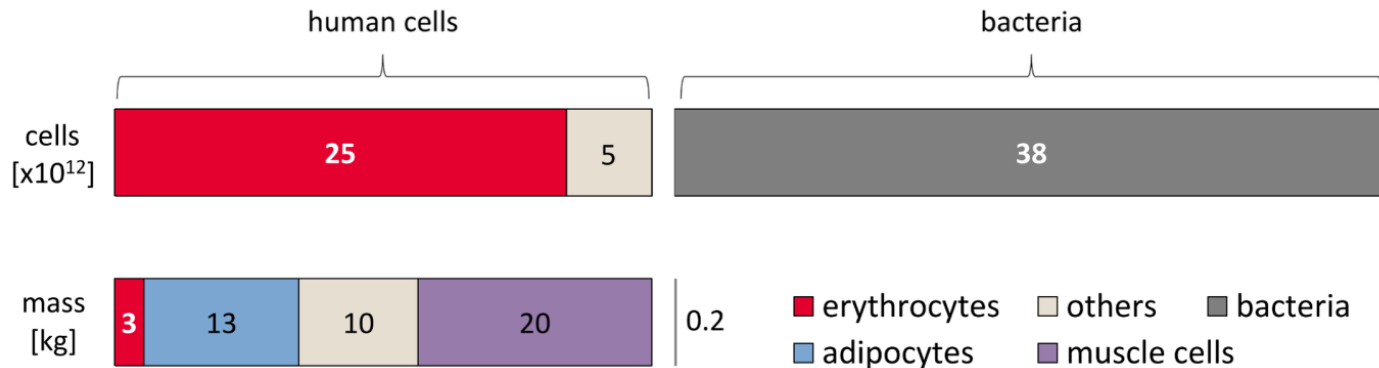
Jsme víc lidí nebo mikrobi (bakterie)?








Sender et al, PLOS, 2016

	Počet buněk	Počet genů
Člověk 	30 bilionů (3.0 x 10 ¹³)	20-25 tisíc (2.0 x 10 ⁴)
Bakterie 	38 bilionů (3.8 x 10 ¹³)	2-20 milionů (2.0 x 10 ⁶ – 2.0 x 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 

Microbiome

IN NUMBERS

38 billion

symbiotic microbes live in and on every person and make up the human microbiota

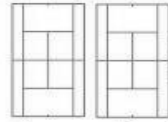
The human body has more microbes than there are stars in the milky way

95%

of our microbiota is located in the GI tract

150:1

The genes in your microbiome outnumber the genes in our genome by about 150 to one



The surface area of the GI tract is the same size as 2 tennis courts

You have **1.3X** more microbes than human cells

>10,000

Number of different microbial species that researchers have identified living in and on the human body

2kg

The gut microbiota can weigh up to 2Kg

ap
Microbiome
Ireland

Interfacing Food & Medicine

The microbiome is more medically accessible and manipulable than the human genome

90%

It is thought that of disease can be linked in some way back to the gut and health of the microbiome

5:1

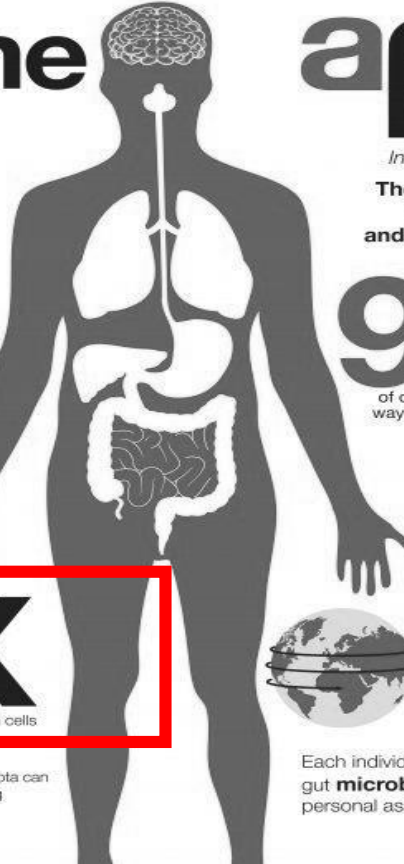
Viruses:Bacteria in the gut microbiota



2.5

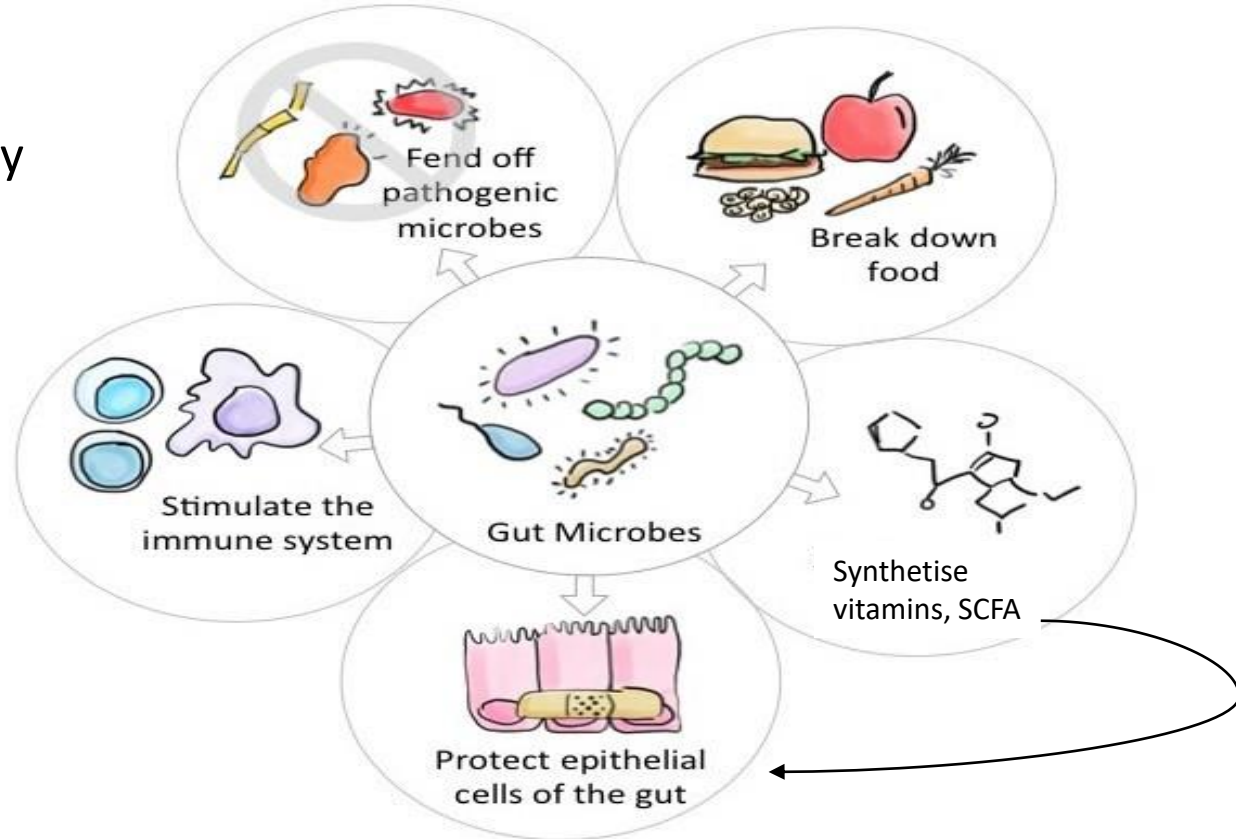
The number of times your body's microbes would circle the earth if positioned end to end

Each individual has a unique gut microbiota, as personal as a fingerprint



Fyziologická role mikrobiomu

- Trávení
- Metabolismus (vitaminy and mastné kyseliny s krátkým řetězcem)
- Regulace imunitního systému
- Obrana před infekcí
- Integrita střevní stěny



ČÍM JE NEJVÍCE OVLIVNĚN?

Exercise
Diet
Breastfeeding
Vaginal birth
Genetics

C-section
Formula feeding
Environmental pollutants
Circadian disruption
Stress
Sedentary lifestyle
Processed diet
Other medications
Antibiotics

EUBIÓZA

DYSBIOZA

Nespecifické střevní
záněty (IBD)

Crohnova
choroba (CD)

Syndrom dráždivého
tračníku (IBS)

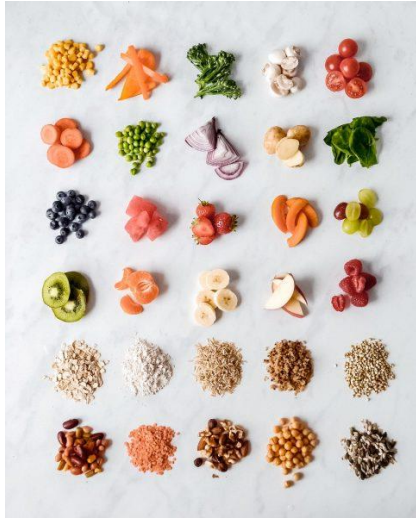
Alergie, astma,
celiakie

Obezita, T2D

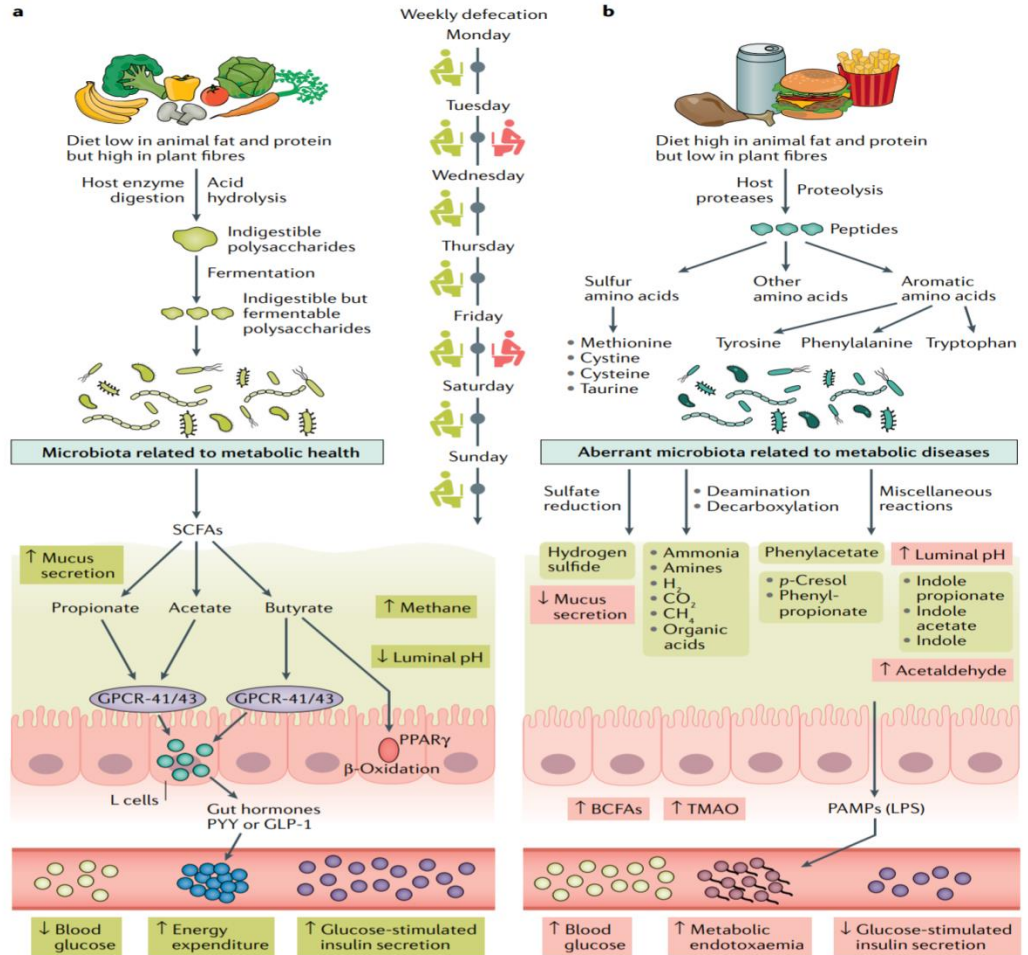
Ateroskleróza a
KVO

Co je tedy „dobrá“ strava?

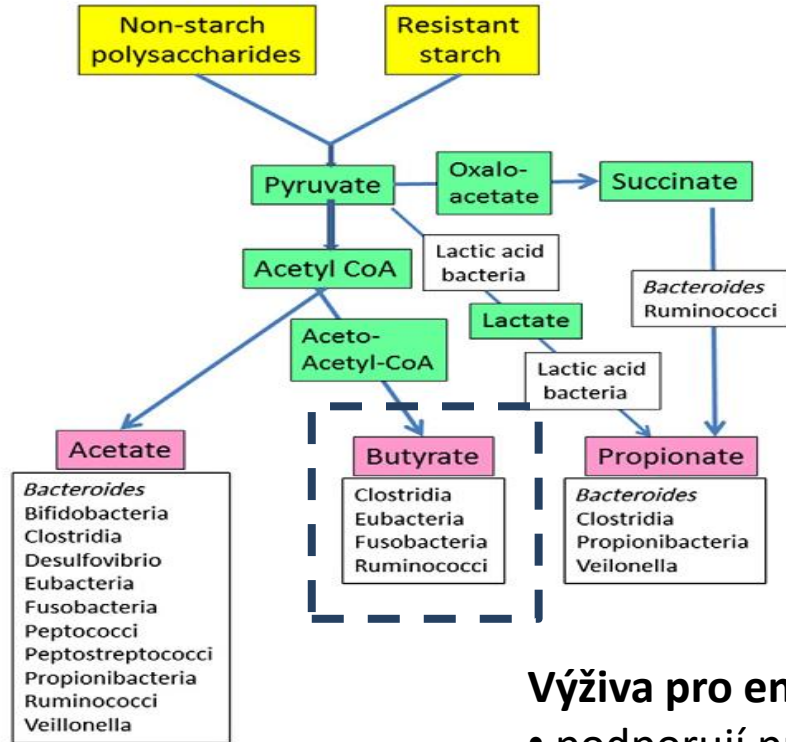
(microbiome-wise)



„Thirty different plants per week“
(Knight et al, American Gut Project, 2012)



Short chain fatty acids (SCFA)



Ramakrishna BS. J
Gastroenterol Hepatol 2013

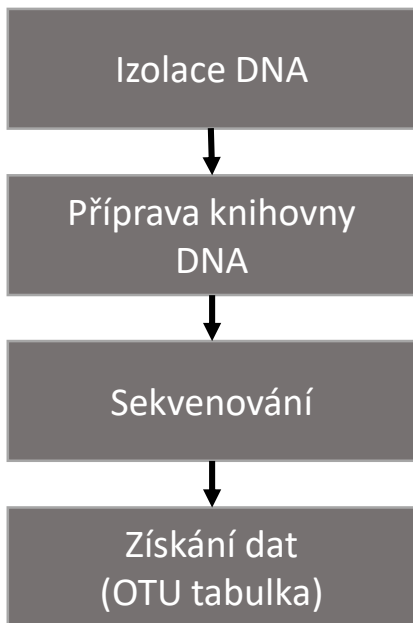
Výživa pro enterocyty:

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

Jak se to analyzuje?

Aneb krok za krokem - od vzorku k hezkým obrázkům

Laboratorní práce



1. **PCR #1:** amplifikace 16S rDNA (odstupňované „staggered“ primery) s kontrolou na ELFO
2. Přečištění #1
3. **PCR #2:** indexování
4. Přečištění #2
5. **Ekvalizace vzorků**
6. Poolování
7. Získání finálního **poolu knihoven DNA**

Stool collection

Stored at -80°C

DNA Extraction

DNA stored in -80°C

16S rDNA profiling

PCR for 16S rDNA

Mass sequencing of this gene

Group reads by similarity, count them

Classify taxonomy

```

>OTU1: AAGCATATGCTATGATCGATCATGACT
>OTU2: CATGATCTGACTATTATTCCGGATTG
>OTU3: GCGATATTGATCTATTTCGATGCGGAT
.....
>OTU1: Firmicutes; Clostridia; Clostridium piliforme
>OTU2: Firmicutes; Clostridia; Ruminococcus bromii
>OTU3: Firmicutes; Bacilli; Leuconostoc
  
```

Metagenomic sequencing

Randomly fragment total DNA

Sequence, assemble genes

Data analysis

Analyze composition

Compare cases with controls

Case	Actinobacteria	Proteobacteria	Firmicutes	Planctomycetes	Bacteroidetes	Gemmatimonadetes	NA
1	~2	~15	~10	~18	~5	~1	~1
2	~1	~12	~15	~10	~8	~1	~1
3	~1	~10	~18	~12	~5	~1	~1
4	~1	~8	~15	~10	~5	~1	~1
5	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1
6	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1
7	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1
8	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1
9	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1
10	~1	~1	~1	~1	~1	~1	~1

Classify genes by function

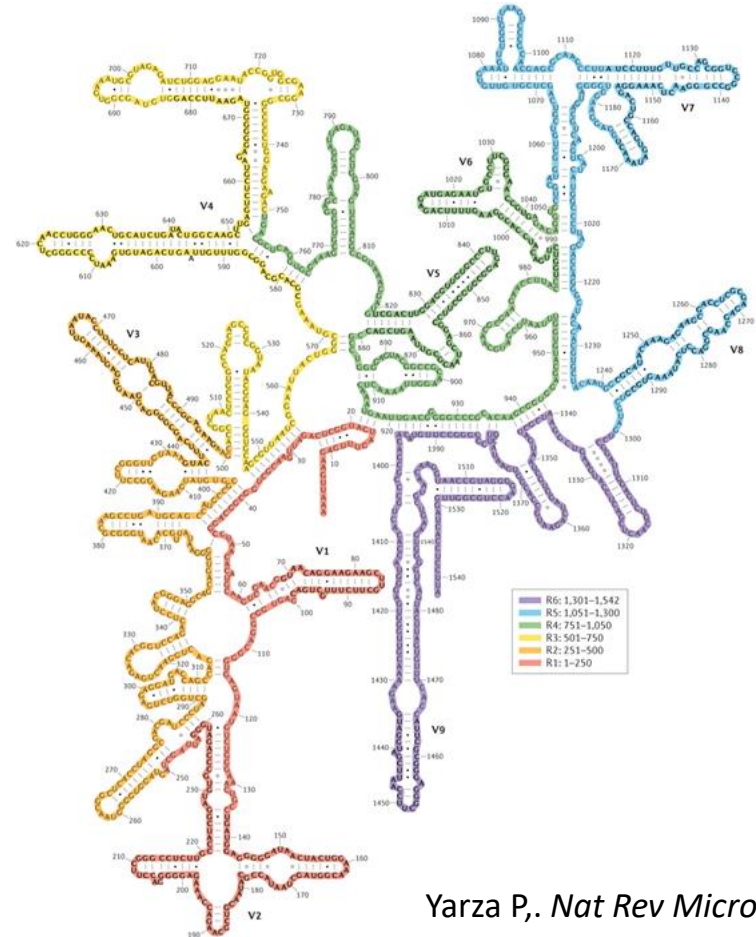
- > glucosidase
- > lambda phage capsid
- > lactase
- > cable pilus
-

Assess functional capabilities of the microbiome

Compare cases with controls

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

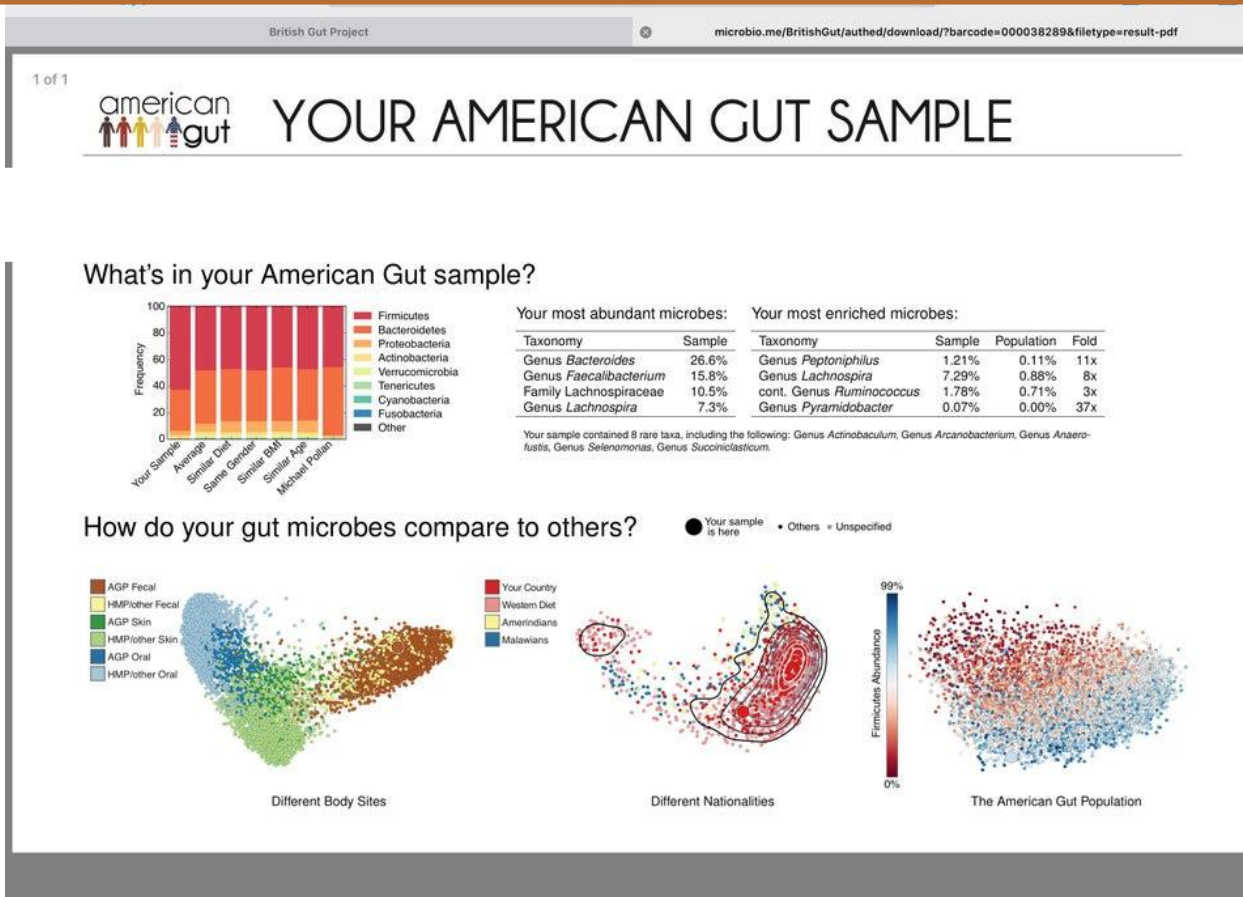
VARIABLE REGIONS: group or species-specific applications

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)

Jak může vypadat výsledek



Kompozice - co tam bydlí?

Hlavní kmeny

Třídy

Příklady rodů

Actinobacteria

Actinobacteria

Actinomyces; Bifidobacterium

Bacteroidetes

Bacteroidia

Bacteroides; Prevotella; Alistipes

Firmicutes

Bacilli

Bacillus; Staphylococcus

Enterococcus; Lactobacillus; Lactococcus; Streptococcus; Leuconostoc

90%

Clostridia

Clostridium; Coprococcus; Roseburia; Faecalibacterium; Ruminococcus

Negativicutes

Veillonella

Proteobacteria

Epsilonproteobacteria

Helicobacter; Campylobacter

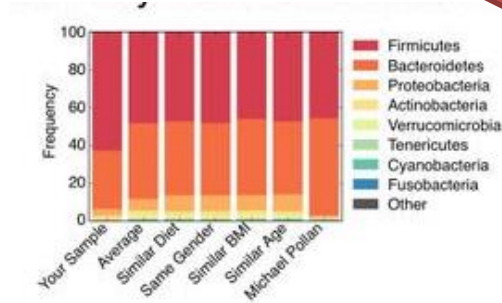
Gammaproteobacteria

Citrobacter; Escherichia; Shigella; Klebsiella; Providencia

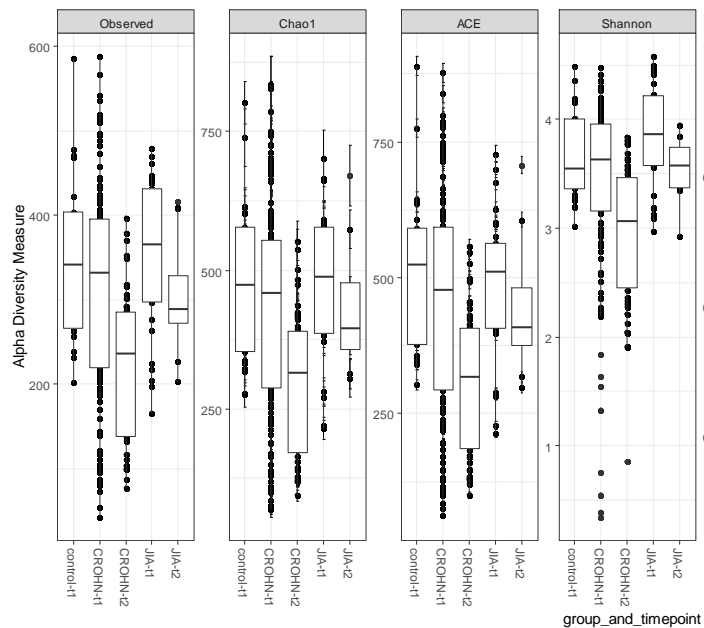
Verrucomicrobia

Verrucomicrobiae

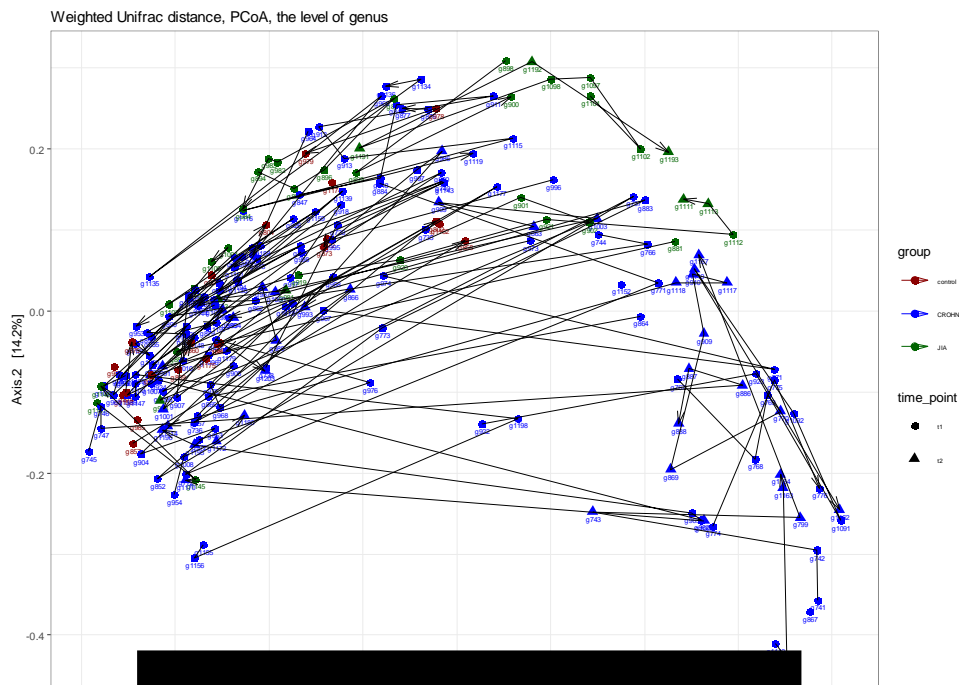
Akkermansia



Diverzita - alfa a beta



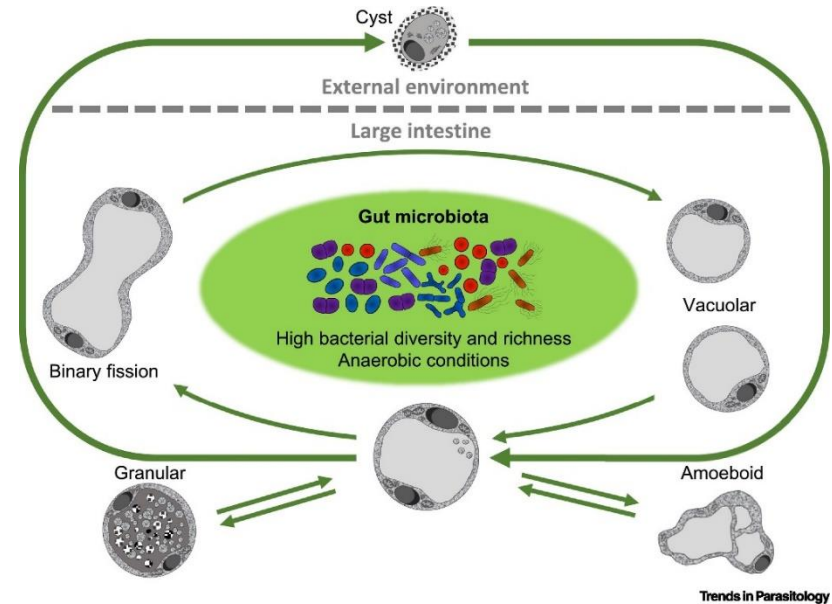
Alfa = v jednom vzorku



Beta = mezi vzorky

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. *The 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)

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

Když se rodiče /pacienti zeptají na střevní mikrobiom

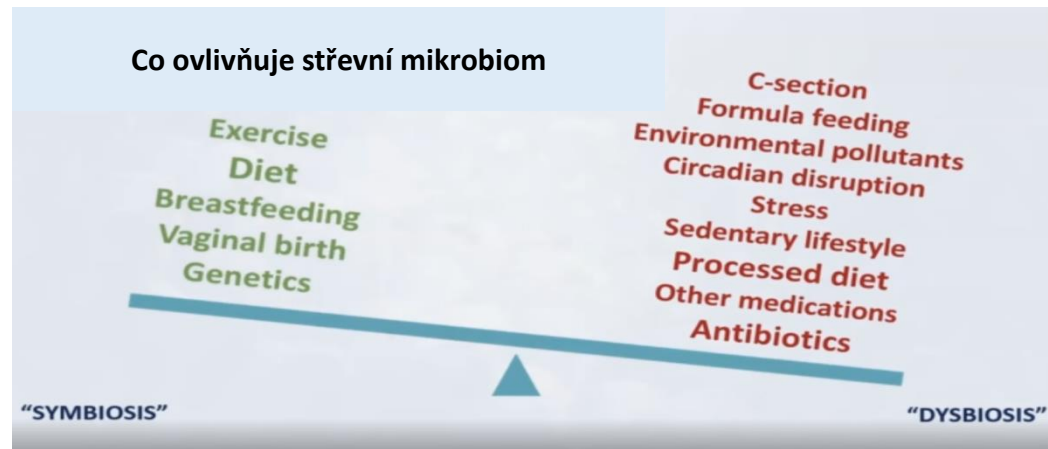
Řekněte jim ať:

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

Konzultace výsledků: mj.
diverzita a četnost anaerobů

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



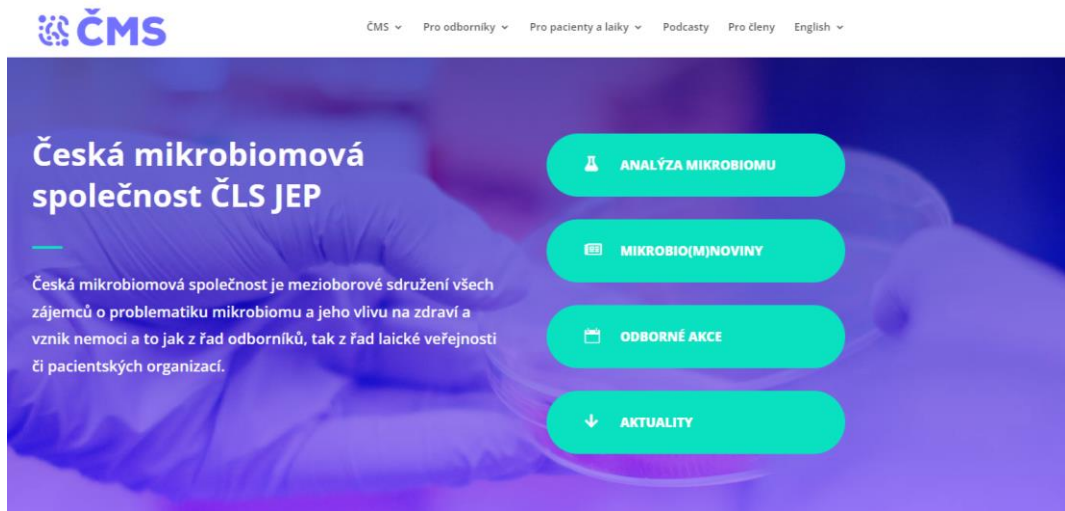
Buďte v klidu když uvidíte
fyziologickou mikrobiotu

- Ale klidně nám radši zavolejte

Take-home message

1. Jste **superorganismus** (buněčně: 1.3x více mikrobiální než lidský)
2. Potraviny bohaté na vlákninu jsou nejlepší potravou pro střevní mikrobi, kteří produkují SCFA a ty jsou potravou pro enterocyty a udržují mj. střevní integritu
3. Hlavní kmeny bakterií ve střevě jsou *Firmicutes* a *Bacteroides*
4. Říkejte pacientům ať jí diverzitu rostlinných potravin, cvičí a podporujte kojení. Předepisujte ATB jen když je to třeba.
5. Naučte se jak vypadá fyziologický nález z každého vzorku, ať jste pak v klidu když ho uvidíte

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



The screenshot shows the homepage of the website. At the top left is the logo for ČMS. To the right of the logo are navigation links: ČMS, Pro odborníky, Pro pacienty a laiky, Podcasty, Pro členy, and English. The main content area has a dark blue background with a close-up image of hands in white gloves. On the left, the text reads 'Česká mikrobiomová společnost ČLS JEP'. Below this is a short paragraph: '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 side, there are four red rounded rectangular buttons with white text and icons: 'ANALÝZA MIKROBIOMU' (with a microscope icon), 'MIKROBIO(M)NOVINY' (with a newspaper icon), 'ODBOBNÉ AKCE' (with a calendar icon), and 'AKTUALITY' (with a downward arrow icon).

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



The screenshot shows the Facebook profile page for 'Česká mikrobiomová společnost ČLS JEP'. The profile picture is a circular logo with the letters 'ČMS' in blue. The cover photo is a close-up of purple, rod-shaped bacteria. The page header shows the name 'Česká mikrobiomová společnost ČLS JEP' and '79 posty'. Below the profile picture are three icons: a menu, a share icon, and a 'Sleduji' (Follow) button. The bio text reads: 'Oficiální účet ČMS ČLS JEP. Pravidelné informace ze světa mikrobiomu pro odbornou i laickou veřejnost #mikrobiom #cms_clsjep'. At the bottom, there are three items: 'Zdravotnictví', a link to '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 další části našeho podcastu jsme přivítali MUDr. Vyacheslava Grebenyuka, lékaře Křivky infekčních nemocí Fakultní nemocnice Bulovka a nově i FN Motol. Se Slávou jsme probírali jeho (nejen) první roky po riské invazi na Ukrajinu a roli v organizaci pomoci ukrajinským válečným uprchlíkům, ale také...

Oct 20 - 59 min 17 sec

All Episodes



#039 O překážkách na cestě vědou i medicínou | 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 připojíme se zvědavostí, jaký příběh...

Nov 7 - Played ✓



About

Od medicíny přímo z praxe akademické zkušební komise... see more

Stories



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

↓ Inspirační příběhy v Medici Boni Podcast

open.spotify.com/episode/0NSUnXuYyvcosEF0pUZD23?si=tibhkrOT62HrB4p4bxF-Q

Followed by barujirova, brajerovamaria, ko_lize + 51 more



Mikrokvíz III 0



Mikrokvíz II 1



Mikrokvíz 1



O nás 0



Podcast



3.vydání LM-R



2.vydání LM-R

POSTS

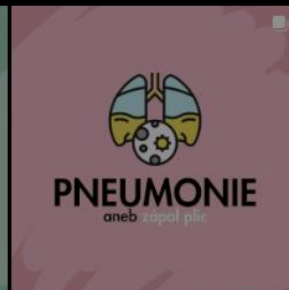
TAGGED



PYELONEFRITIDA
zánět ledviny a ledvinné pánvičky



CYSTITIDY
zánět močového měchýře



PNEUMONIE
nebo zápal plic



CHŘIPKA
respirační onemocnění chladných měsíců



Co je zač
"VIRÓZKA"?
• rýma, kašel, bolest v krku •
Pomůžou mi antibiotika?



DAPTOMYCIN
lipopeptidové antibiotikum s baktericidním účinkem

Kdo si chce něco opakovat při prokrastinaci na instagramu může na IG a FB účtu [@mediciboni](https://www.instagram.com/mediciboni)