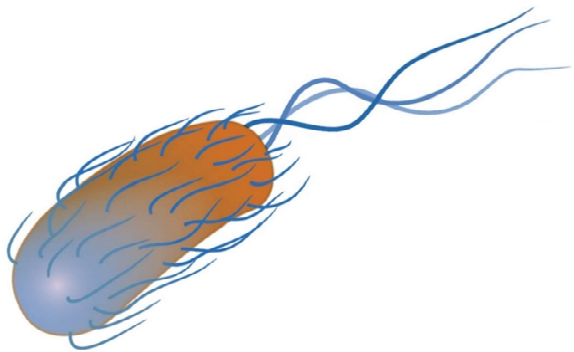




Molekulárně biologické metody v mikrobiologii



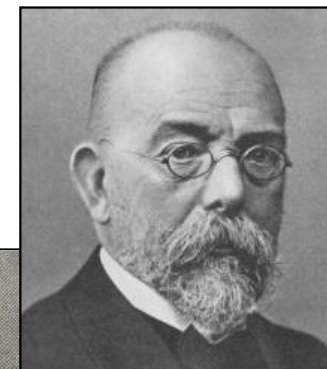
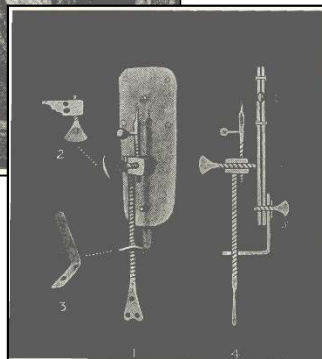
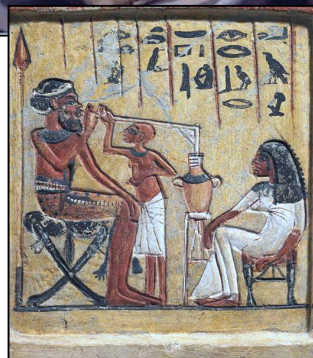
Monika Dolejská

Oddělení klinické mikrobiologie
Ústav laboratorní medicíny
Fakultní nemocnice Brno

Obsah prezentace

- Historie, vývoj a trendy klinické mikrobiologie
- Základní metody v molekulární mikrobiologii
- Nové technologie v mikrobiologické diagnostice
- Nové diagnostické přístupy

Historie klinické mikrobiologie



“Pravěk”

První pozorování mikrobů

Souvislost mikrobů a nemocí
- období “lovců mikrobů”

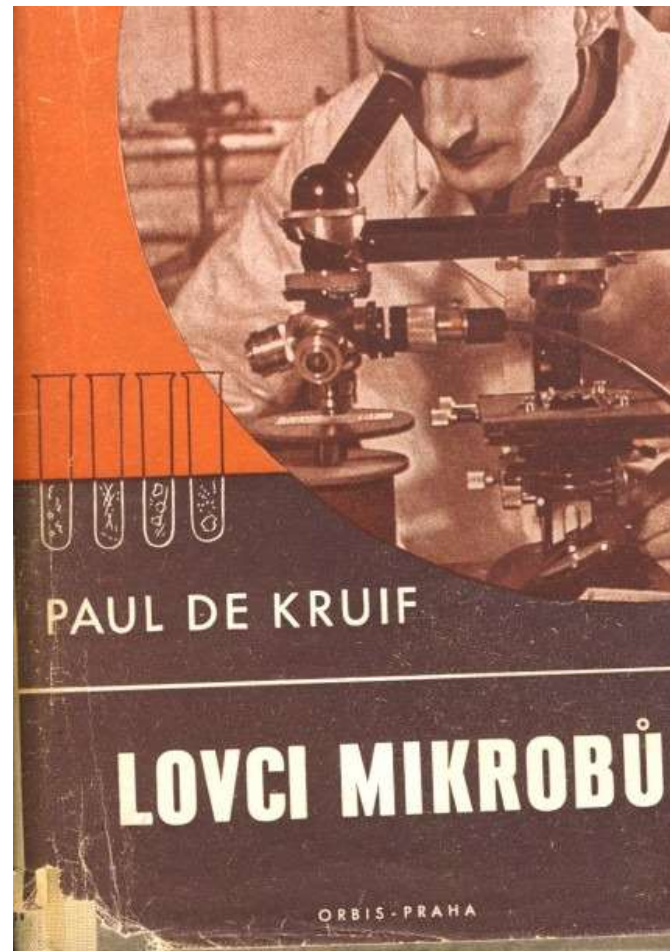
Antoni van Leeuwenhoek
(1632 - 1723)

Louis Pasteur (1822 - 1895)
Robert Koch (1843 - 1910)

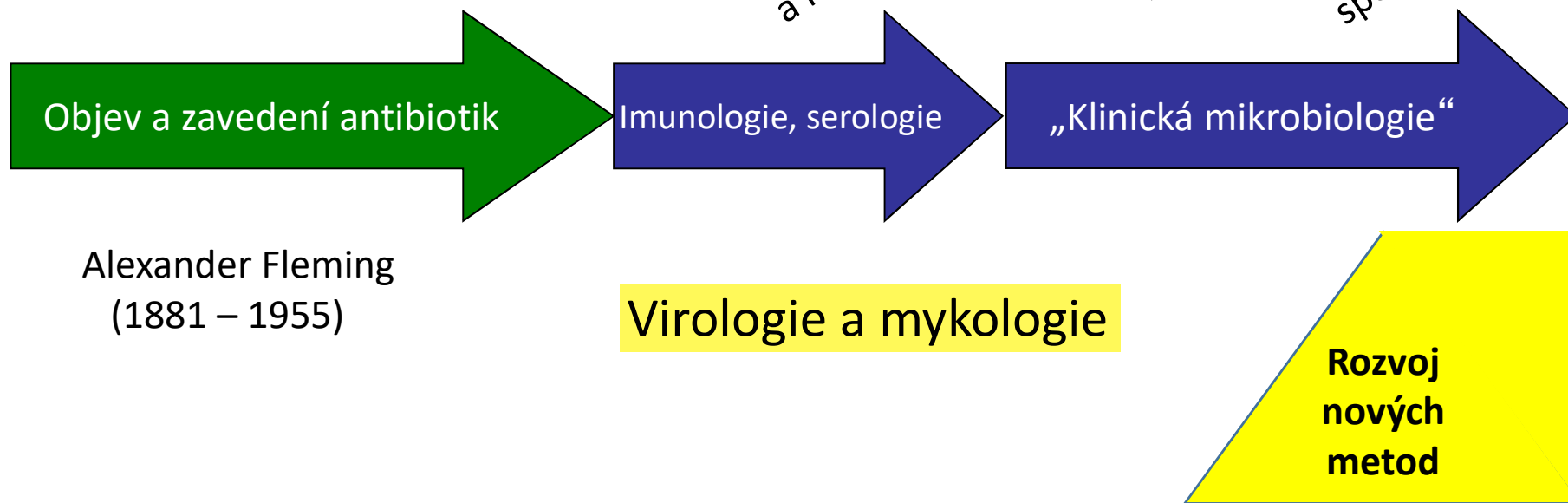
Joseph Lister (1827 - 1912)

Historie klinické mikrobiologie

- Období “lovců mikrobů”



Historie klinické mikrobiologie

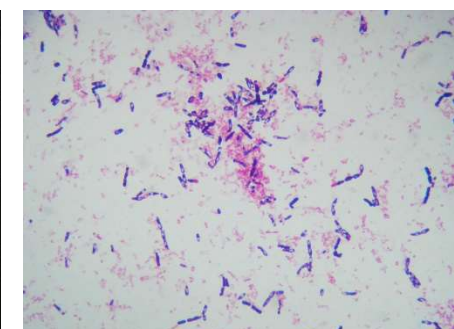
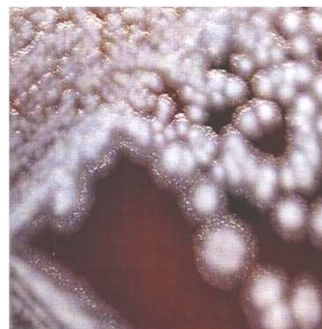
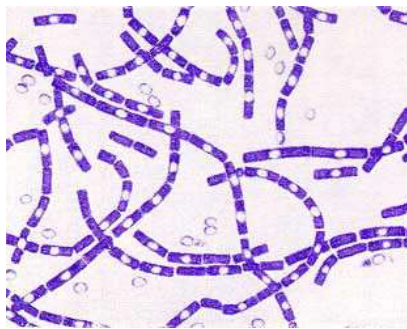


Kultivace mikrobů

- Omezený počet kultivovatelných mikrobů



- I v rámci jednoho druhu nebo úzce příbuzných taxonů dochází k významnému rozdílu ve virulenci
(např. *Escherichia coli* vs. *Shigella* spp., *Bacillus anthracis* vs. *Bacillus cereus*)



CDC, Atlanta

Mikrobiologická diagnostika

- **Virologie**

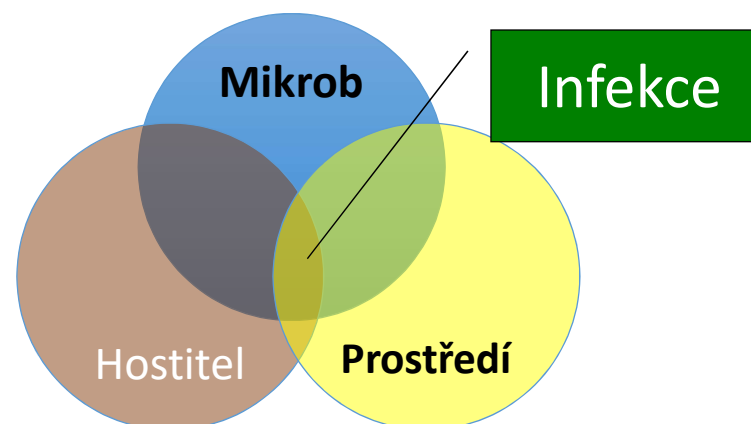
- Sérologie
- Molekulární genetik **←**
- Kultivace
- Elektronová mikroskopie

- **Parazitologie**

- Mikroskopie
- Sérologie
- Molekulární genetik **←**

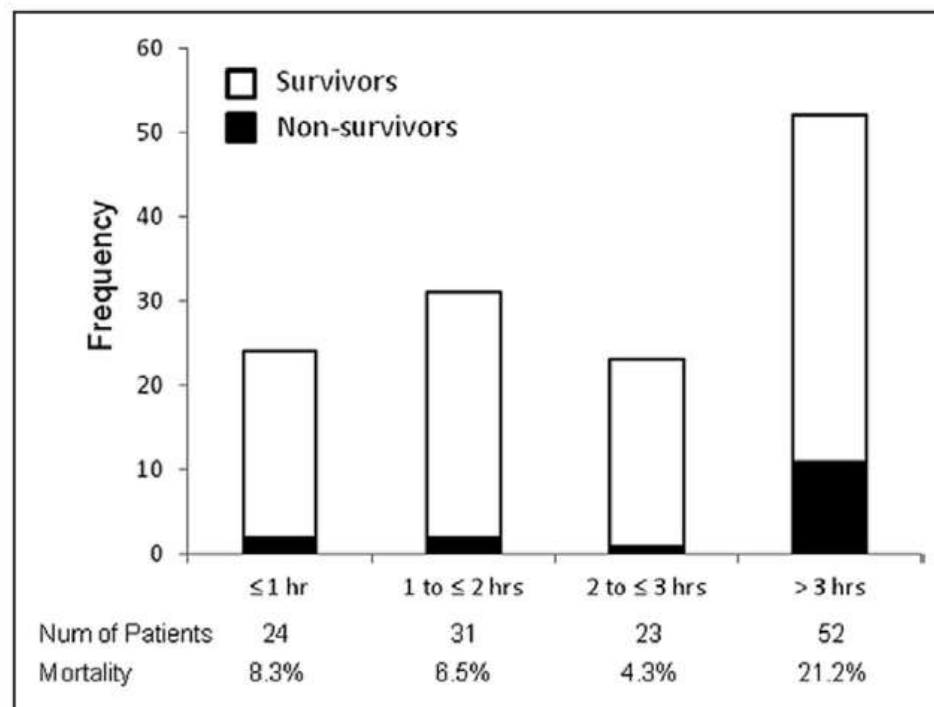
- **Bakteriologie a mykologie**

- Kultivace
- Mikroskopie
- Molekulární genetik **←**
- Sérologie



Současné potřeby mikrobiologické diagnostiky

- Rychlost
- Přesnost
- Klinická validita



Published in final edited form as:

Crit Care Med. 2014 November ; 42(11): 2409–2417. doi:10.1097/CCM.0000000000000509.

Delayed Antimicrobial Therapy Increases Mortality and Organ Dysfunction Duration in Pediatric Sepsis

Scott L. Weiss, MD¹, Julie C. Fitzgerald, MD, PhD¹, Fran Balamuth, MD, PhD², Elizabeth R. Alpern, MD, MSCE³, Jane Lavelle, MD², Marianne Chilutti, MS⁴, Robert Grundmeier, MD^{4,5}, Vinay M. Nadkarni, MD, MS¹, and Neal J. Thomas, MD, MSc⁶

Diagnostické metody v mikrobiologii

Kultivační metody

Automatické systémy

Analýza obrazu

Molekulárně – genetické metody

Amplifikační techniky

Mikročipy

Celogenomová sekvenace

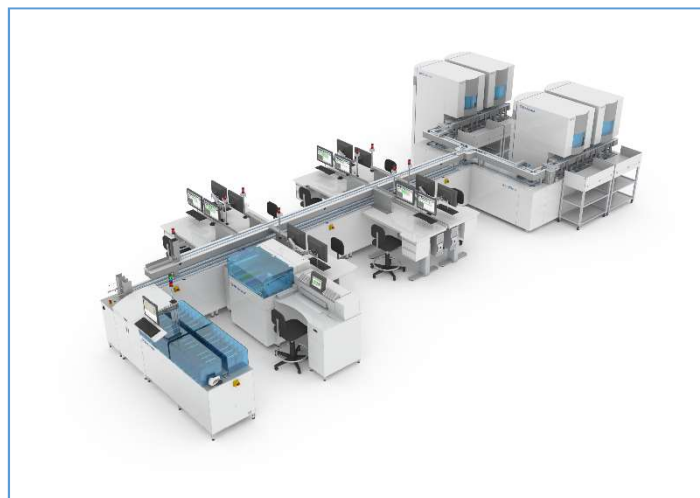
Funkční metody

Hmotnostní spektrometrie

Další spektroskopické metody

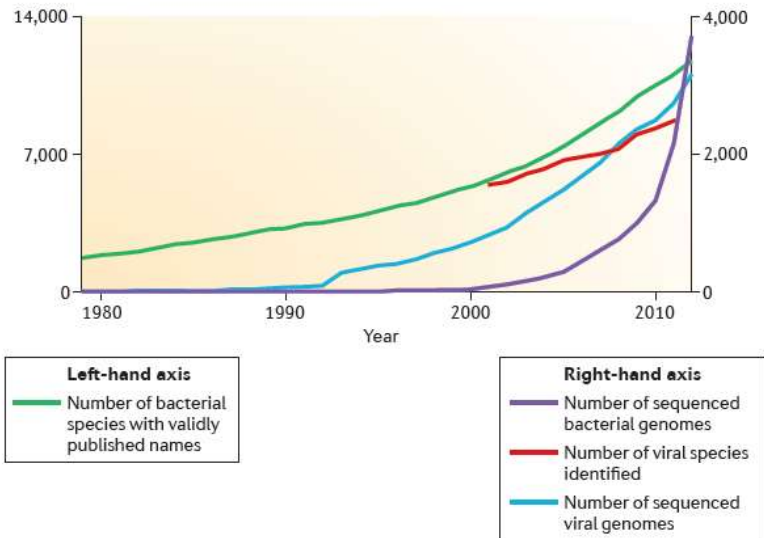
Speciální mikroskopické techniky

Průtoková cytometrie



Koncepce mikrobiologie - Marseilles

- Velká laboratoř - univerzitní nemocnice
- Důraz na konzultační službu
- Priority při zpracování vzorků



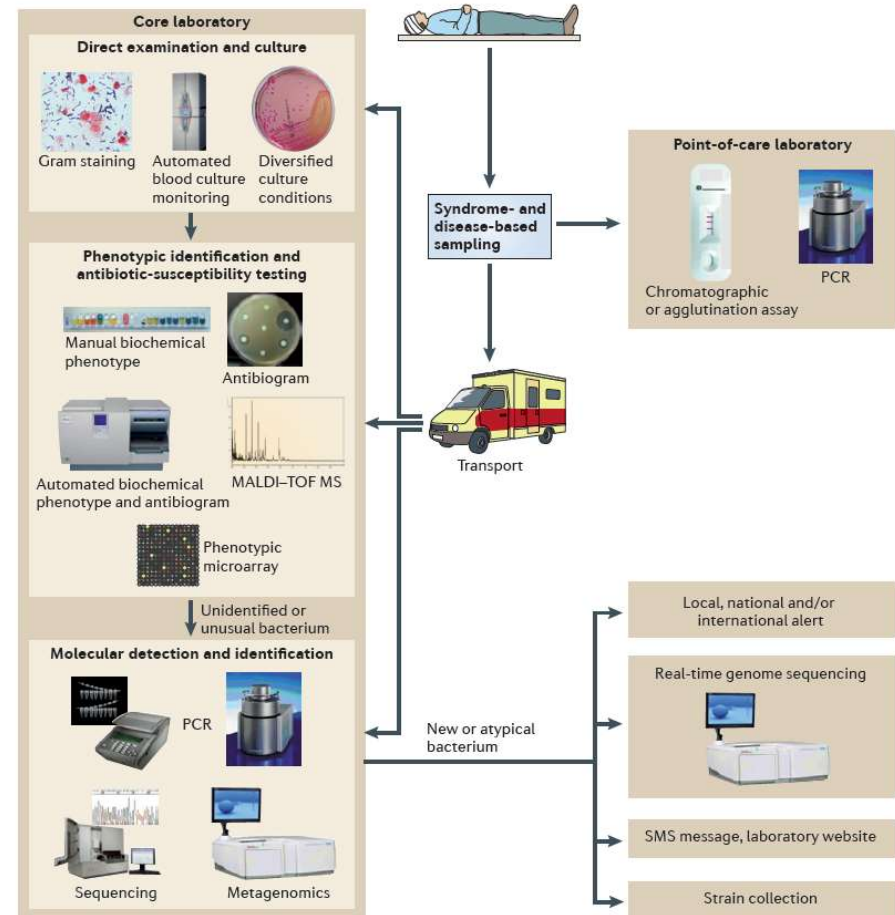
Modern clinical microbiology: new challenges and solutions

Pierre-Edouard Fournier, Michel Drancourt, Philippe Colson, Jean-Marc Rolain, Bernard La Scola and Didier Raoult

574 | AUGUST 2013 | VOLUME 11

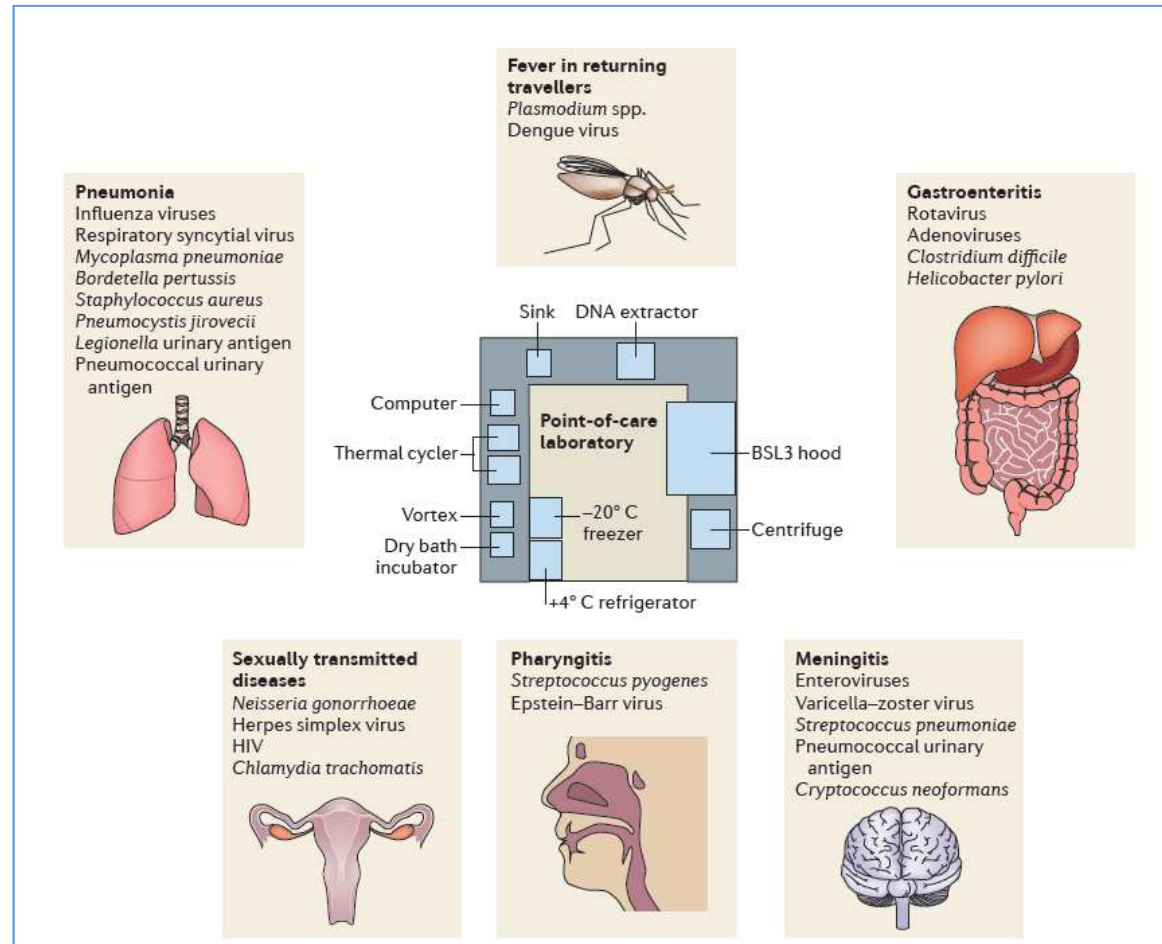
www.nature.com/reviews/micro

© 2013 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved



Koncepce mikrobiologie - Marseilles

- Satelitní POCT laboratoře



Molekulární metody v klinické mikrobiologii

Nevýhody tradičních metod

- Nedostatečná citlivost pro některé mikroby
- Limitace na patogeny se známými růstovými parametry
- Špatné odlišení mezi mikroby s běžnými vlastnostmi
- Neschopnost průkazu infekcí vyvolaných nekultivovatelnými (novými) mikroby

Nevýhody tradičních metod

Příklady:

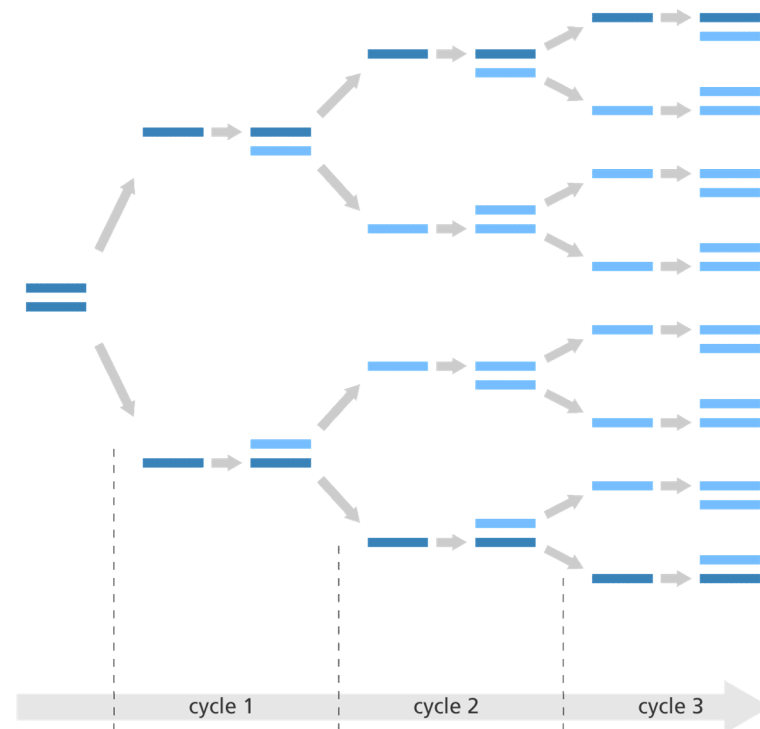
- Průkaz a identifikace pomalu rostoucích a obtížně kultivovatelných mikrobu – *M. tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi*
- Nekultivovatelné bacily vyvolávající Whippleovu chorobu
- Nemoci, o nichž se předpokládá, že jsou infekční, zůstávají špatně definovány bez detekovaného mikroorganismu – náhlá horečka po přisátí klíštěte
- viry: virové průjmy, virus vztekliny, viry chřipky, virus hepatitidy B a C, enteroviry, adenoviry, RS-virus, viry parainfluenzy, herpes simplex virus, virus průušnic

Molekulárně-biologické techniky

- Polymerázová řetězová reakce (PCR) – průkaz DNA
- PCR s reverzní transkripcí (RT-PCR) – průkaz RNA
- Real-time PCR (RT-PCR)
- Microarray
- Hybridizace
- DNA sekvenování

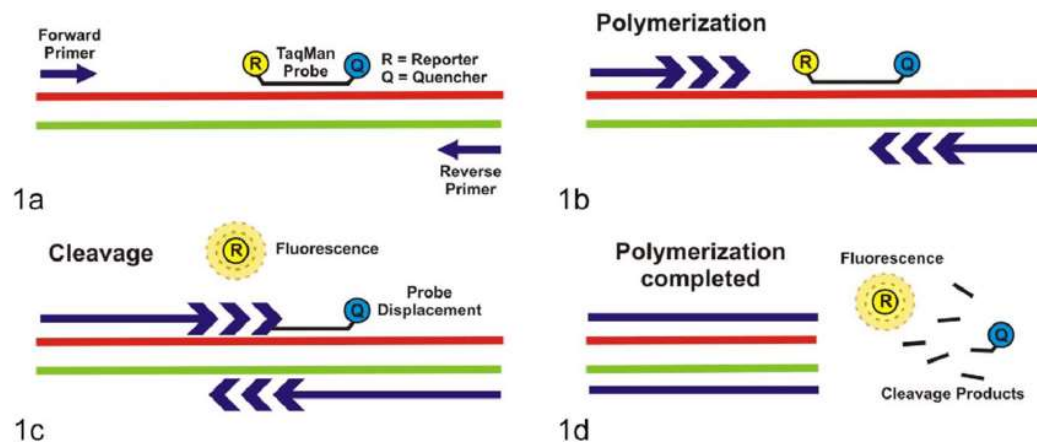
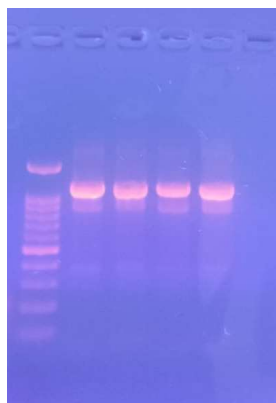
PCR

- 1983 Kary B. Mullis → Nobelova cena 1993
- Mnohonásobné zmnožení (**amplifikace**) specifického úseku DNA *in vitro* na principu replikace
- Široce používaná technika pro průkaz mikrobů ve vzorku
- Použití sekvenčně specifických primerů
- Vysoká citlivost (detekce i jedné buňky)
- Průkaz amplifikačního PCR produktu značí přítomnost mikroba

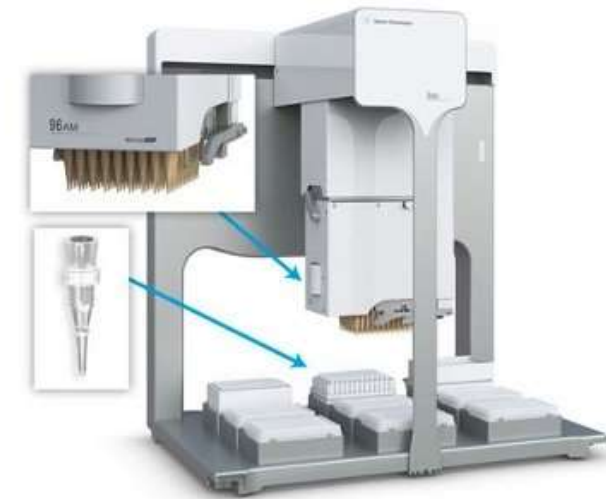
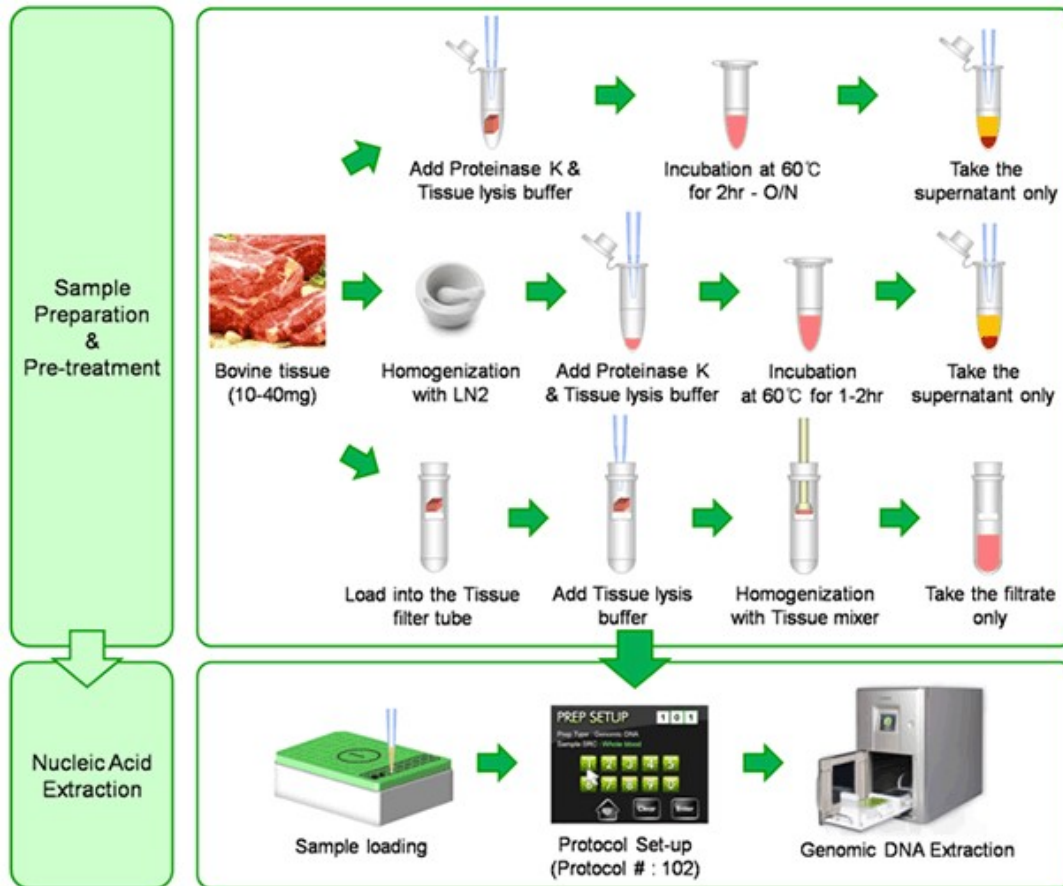


PCR – základní kroky

- **Izolace DNA** (fenol-chloroform, silikagely, magnetické částice)
- **Amplifikace** specifického úseku DNA
- **Detekce** produktu amplifikace
 - gelovou elektroforézou
 - použitím fluorescenční sondy



Automatizace izolace NK



„Otevřené“ a „uzavřené“ systémy



Složení PCR směsi

voda

nukleotidy (dNTP)

reakční pufr

primery

termostabilní DNA polymeráza

templátová nukleová kyselina (DNA)

případné látky (BSA, DMSO, Tween 20, glycerol,

spermidin, minerální olej)

Cyklus číslo	Počet nových dvouřetězcových molekul
1	1
2	3
3	7
4	15
5	31
6	63
7	127
8	255
9	511
10	1 023
11	2 047
12	4 095
13	8 191
14	16 383
15	32 767
16	65 535
17	131 071
18	262 143
19	524 287
20	1 048 575
21	2 097 151
22	4 194 303
23	8 388 607
24	16 777 215
25	33 554 431
26	67 108 863
27	134 217 727
28	268 435 455
29	536 870 911
30	1 073 741 823

Denaturace vzorku DNA
Pro oddělení řetězců dsDNA
(94 °C, 5 min)

Připojení primerů
na řetězce DNA
(30 - 65 °C, 1 min)

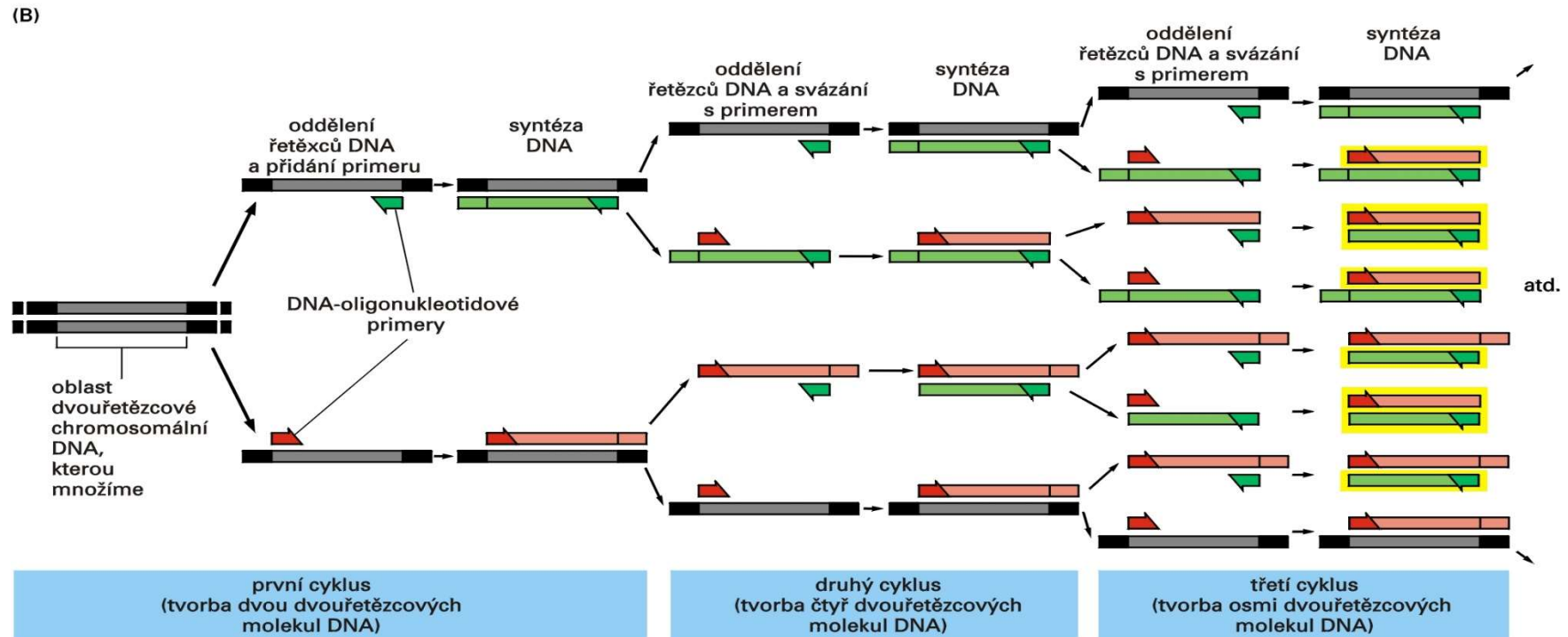
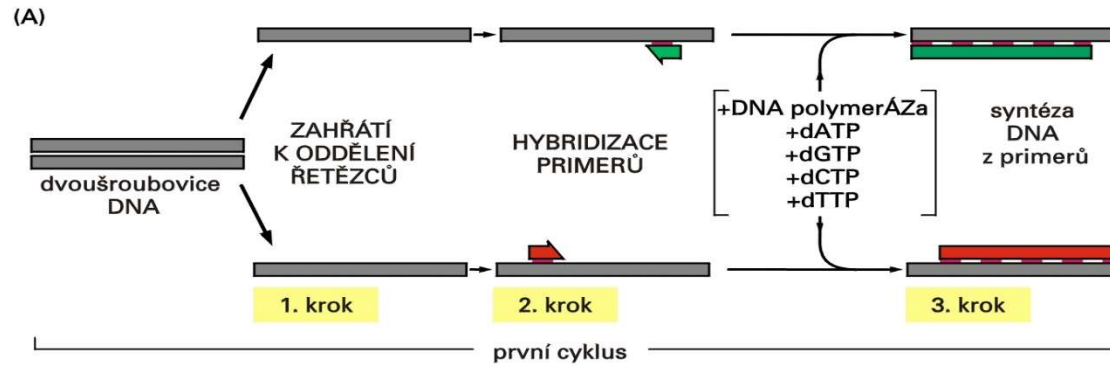
Denaturace pro separaci
řetězců DNA
(94 °C, 30 s)

25 – 35 ×

Syntéza nových řetězců
DNA polymerázou
(72 °C, 45s - 2 min)



Průběh PCR



Interní kontrola v PCR

- dochází k tzv. inhibici reakce (běžné)
- inhibice reakce je dána přítomností různých interferujících látek (např. z rukavic)
- pro detekci použita směs, obsahující kromě vzorku a jemu příslušných primerů ještě kontrolní DNA a druhou sadu primerů
- pozitivita IC - nedošlo k inhibici reakce
- IC může být negativní u vysoce pozitivních vzorků (reakce kompetují o nukleotidy)

Typy PCR

- „**klasická**“ PCR: end-point analýza (po proběhnutí všech cyklů analýza produktů gelovou elektroforézou)
- **real-time** PCR: sledování amplifikačních produktů po každém proběhlém cyklu („in real time“), nejčastěji používána kvantitativně (qPCR)
- **reverzně transkripční** PCR (RT-PCR): analýza RNA; samotné PCR předchází přepis RNA do cDNA reverzní transkriptázou
- **qRT-PCR** (RT-qPCR): kvantitativní (real-time) reverzně transkripční PCR

Typy PCR

- **specifická** PCR (specifický gen pro enzym, faktor patogenity apod.)
- **univerzální** PCR (cílové místo je gen, který mají všechny bakterie, nejčastěji gen pro 16S rRNA)
- **multiplex** PCR (několik specifických cílových míst v jedné reakci)
- **nested** PCR (dvě sady primerů použité ve dvou následujících PCR; omezuje vznik nespecifický produktů)

Multiplex PCR

- Reakční směs obsahuje ne jeden, ale **několik párů primerů** rozpoznávajících různé cílové sekvence
- Detekce několika genů/produktů současně v jediné reakční směsi
- **Výhoda** – simultánní detekce více agens, nižší náklady než při jednotlivých PCR dělaných zvlášť
- **Nevýhoda** – reakci je nutno velmi důkladně optimalizovat

vznikající produkty musí být různě dlouhé, aby je šlo současně detekovat při elektroforéze

nutno vyvažovat poměry koncentrací primerů (ve směsi se chovají jinak než jednotlivě); kompetice o „zdroje“ (zejm. polymerázu), nebezpečí preferenční amplifikace jednoho fragmentu na úkor ostatních

dále roste důležitost pozitivních a negativních kontrol

Real-time PCR

též **kvantitativní PCR** (qPCR)

umožňuje **detekci a kvantifikaci** produktu PCR **v průběhu reakce** (ne až po ní jako při konvenční PCR) – přidaná hodnota proti běžné PCR

extrémně vysoká **citlivost**

využití pro studium genové exprese, diagnostiku patogenů...

princip: **detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu produkovaného při syntéze PCR produktu** v tzv. light-cycleru – termocykler se zabudovaným fluorimetrem, tj. přístroj, který kromě cyklického střídání teplot umožňuje detekci fluorescence a monitorování průběhu PCR

kvantitativní vztah mezi množstvím PCR produktu a intenzitou fluorescence

Real-time PCR – detekce amplikonu

- Využívá tzv. **fluoroforů** – molekul, které po předchozí absorpci světla určité vlnové délky emitují světlo jiné vlnové délky (vždy vyšší, protože nižší energie)

nespecifická

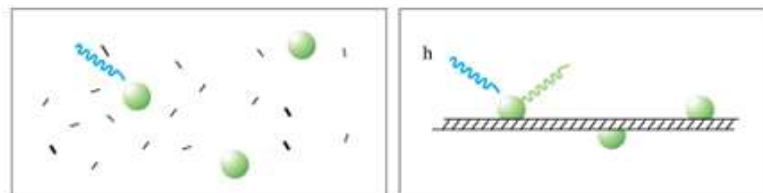
- interkalační barviva

specifická – oligonukleotidy s fluoroforem

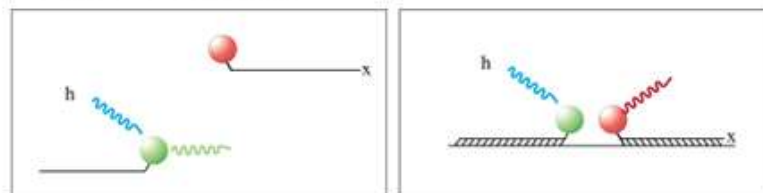
- TaqMan sondy
- FRET
- molekulární majáky
- citlivější a dražší

- tyto **sondy** (oligonukleotidy komplementární k PCR produktu) mimo fluoroforu často obsahují i **zhášec** – molekulu, která zachytává fluorescenci fluoroforu, brání detekci signálu před navázáním sondy (tj. před vznikem produktu)

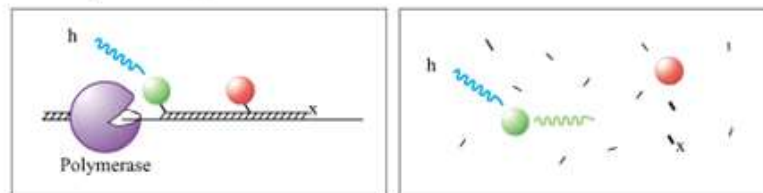
I. SYBR Green



II. Hybridization Probes

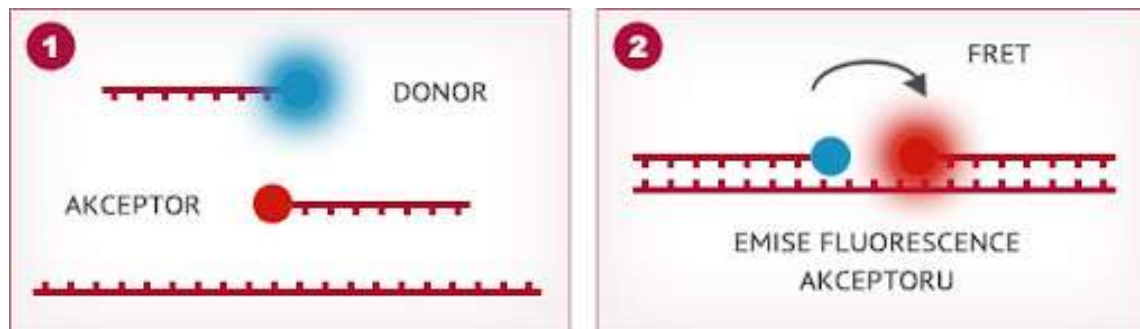


III. TaqMan Probes

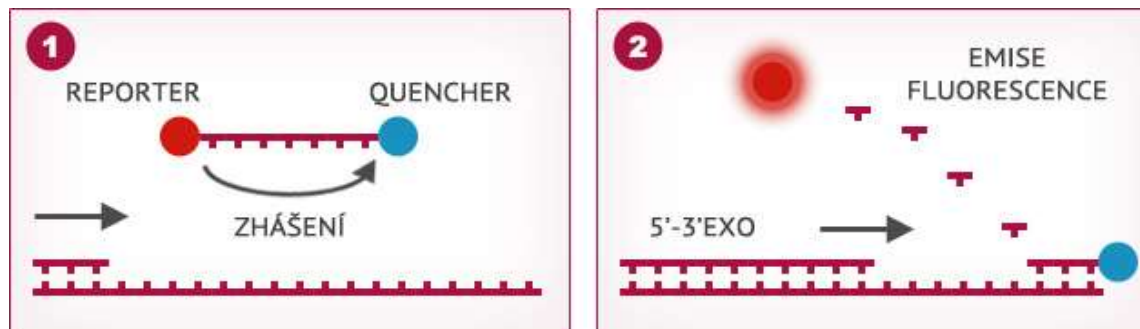


Real-time PCR – detekce amplikonu

hybridizační sondy (FRET) – Fluorescence Resonance Energy Transfer

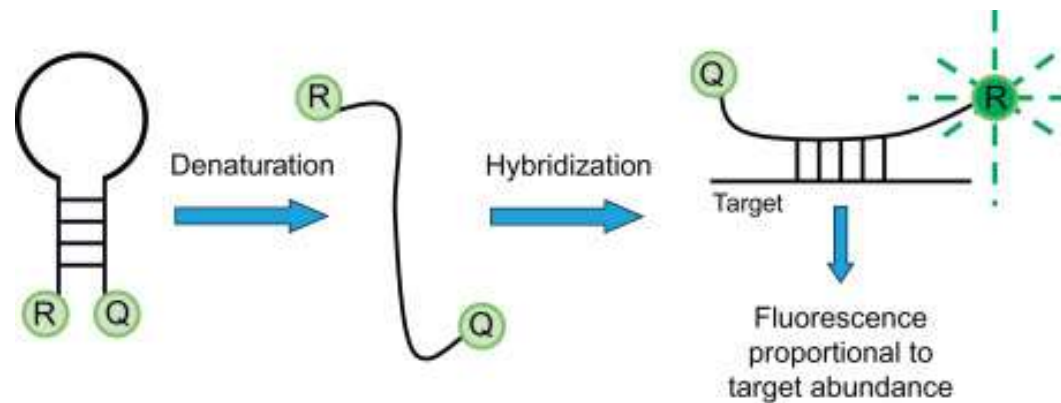


hydrolyzační sondy (TaqMan®)



Real-time PCR – detekce amplikonu

Molekulární majáky



sonda hybridizovaná s cílovou sekvencí → molekula reportéru je separovaná od quencheru → emise → fluorescence

Real-time PCR – princip kvantifikace

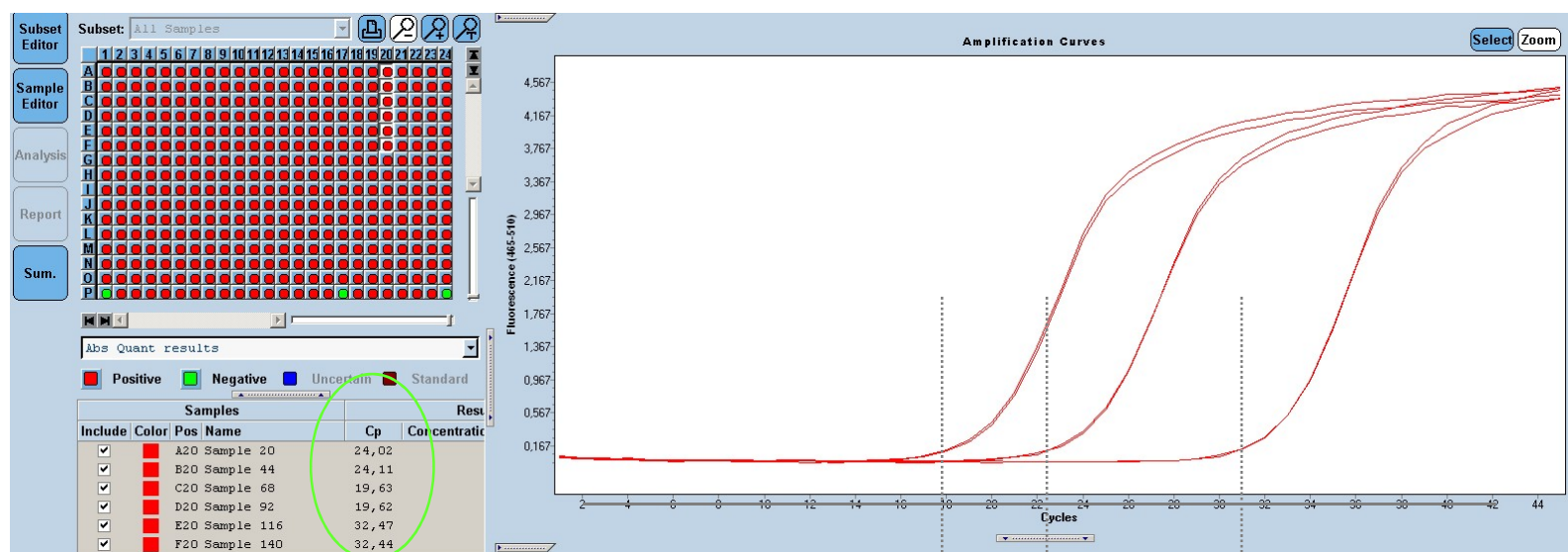
stanovení tzv. **amplifikačního prahu detekce**

amplifikační práh detekce – C_t (threshold cycle)

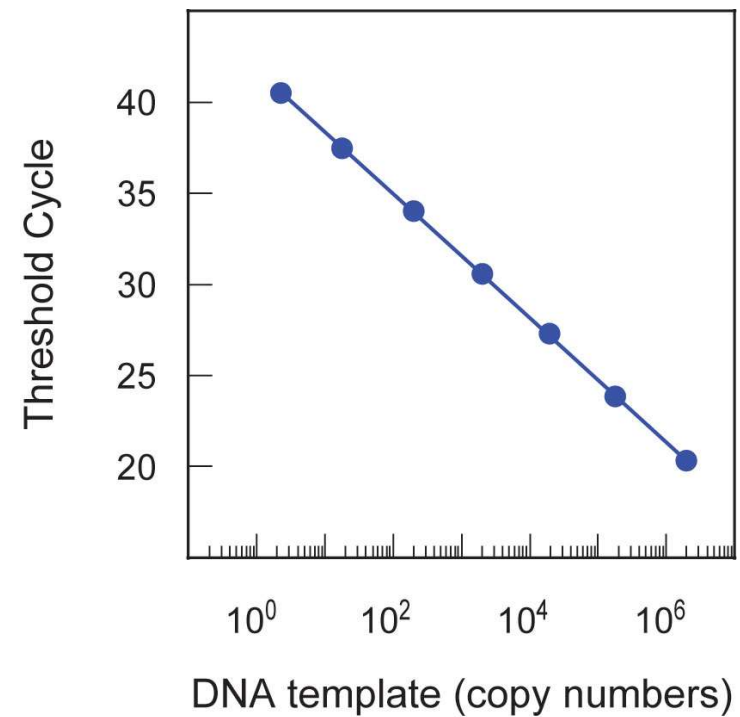
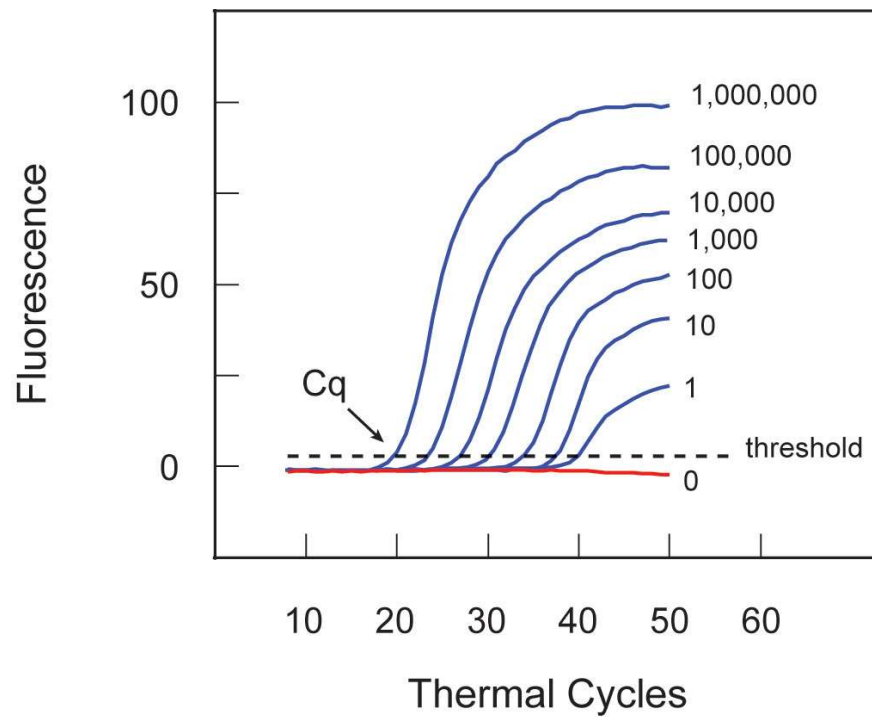
fáze celého procesu, kdy začíná exponenciální nárůst množství PCR produktu (vlastně číslo, udávající, ve kterém cyklu k nárůstu došlo)

určený na základě hodnoty fluorescence pozadí a vzorku v exponenciální fázi

čím menší C_t (čím dřív růst začne), tím větší počet kopií templátu vstoupil do reakce; rozdíl 1 C_t teoreticky odpovídá dvojnásobnému množství templátu



Real-time PCR – princip kvantifikace



Real-time PCR – kvantifikační strategie

Absolutní kvantifikace

pomocí externí kalibrační křivky

srovnání hodnot C_t jednotlivých vzorků s C_t externího standardu o známé koncentraci

Výstup – **absolutní hodnota** (koncentrace, množství DNA...)

Relativní kvantifikace – normalizace pomocí jednoho či více referenčních genů v tomtéž vzorku

nevyžaduje externí standard

výstup – **relativní hodnota** – kolikrát více/méně templátu ve srovnání s referenčním genem v tomtéž vzorku

význam – **např. analýza exprese genů** – srovnání, jak je exprese určitého genu intenzivní či jak se mění ve srovnání s referenčním genem se stálou expresí

nutná **normalizace výsledků** – koriguje variabilitu mezi jednotlivými vzorky způsobenou charakterem vzorků, pipetovacími chybami, kolísající efektivitou reverzní transkripce atd.

PCR diagnostické kity

- CE IVD
- Dle patogenu
- Soubor patogenu spojených s chorobou

Respiratory Infections

Gastrointestinal Tract Infections

Human Papillomavirus Infections

Sexually Transmitted Infections

Tuberculosis

Drug Resistance

Sepsis

Meningitis



Allplex™ Respiratory Panel 1

Analytes	<ul style="list-style-type: none"> • Influenza A virus (Flu A) • Influenza A-H1pdm09 (Flu A-H1pdm09) • Influenza B virus (Flu B) • Respiratory syncytial virus B (RSV B) 	<ul style="list-style-type: none"> • Influenza A-H1 (Flu A-H1) • Influenza A-H3 (Flu A-H3) • Respiratory syncytial virus A (RSV A) • Internal Control (IC) 	Specimens	<ul style="list-style-type: none"> • Nasopharyngeal swab • Bronchoalveolar lavage 	<ul style="list-style-type: none"> • Nasopharyngeal aspirate
			Cat No./Size	<ul style="list-style-type: none"> • RP10179Z / 25 rxns ^[1] • RP9801X / 100 rxns ^[1] 	<ul style="list-style-type: none"> • RP9801Y / 50 rxns

Allplex™ Respiratory Panel 2

Analytes	<ul style="list-style-type: none"> • Adenovirus (AdV) • Metapneumovirus (MPV) • Parainfluenza virus 2 (PIV 2) • Parainfluenza virus 4 (PIV 4) 	<ul style="list-style-type: none"> • Enterovirus (HEV) • Parainfluenza virus 1 (PIV 1) • Parainfluenza virus 3 (PIV 3) • Internal Control (IC) 	Specimens	<ul style="list-style-type: none"> • Nasopharyngeal swab • Bronchoalveolar lavage 	<ul style="list-style-type: none"> • Nasopharyngeal aspirate
			Cat No./Size	<ul style="list-style-type: none"> • RP10180Z / 25 rxns ^[1] • RP9802X / 100 rxns ^[1] 	<ul style="list-style-type: none"> • RP9802Y / 50 rxns

Allplex™ Respiratory Panel 3

Analytes	<ul style="list-style-type: none"> • Bocavirus 1/2/3/4 (HBoV) • Coronavirus NL63 (NL63) • Human rhinovirus (HRV) 	<ul style="list-style-type: none"> • Coronavirus 229E (229E) • Coronavirus OC43 (OC43) • Internal Control (IC) 	Specimens	<ul style="list-style-type: none"> • Nasopharyngeal swab • Bronchoalveolar lavage 	<ul style="list-style-type: none"> • Nasopharyngeal aspirate
			Cat No./Size	<ul style="list-style-type: none"> • RP10181Z / 25 rxns ^[1] • RP9601X / 100 rxns ^[1] 	<ul style="list-style-type: none"> • RP9601Y / 50 rxns

Allplex™ Respiratory Panel 4

Analytes	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bordetella parapertussis</i> (BPP) • <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> (CP) • <i>Legionella pneumophila</i> (LP) • <i>Streptococcus pneumoniae</i> (SP) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bordetella pertussis</i> (BP) • <i>Haemophilus influenzae</i> (HI) • <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (MP) • Internal Control (IC) 	Specimens	<ul style="list-style-type: none"> • Sputum • Nasopharyngeal aspirate 	<ul style="list-style-type: none"> • Nasopharyngeal swab • Bronchoalveolar lavage
			Cat No./Size	<ul style="list-style-type: none"> • RP10182Z / 25 rxns ^[1] • RP9803X / 100 rxns ^[1] 	<ul style="list-style-type: none"> • RP9803Y / 50 rxns

Allplex™ GI-EB Screening

Analytes <ul style="list-style-type: none"> • <i>Campylobacter</i> spp. (Cam) • <i>Escherichia coli</i> O157 (<i>E. coli</i> O157) • <i>Shigella</i> spp./EIEC^[5] (Sh/EI) • <i>Yersinia enterocolitica</i> (Yer) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Clostridium difficile</i> toxin A/B (CdA/B) • <i>Salmonella</i> spp. (Sal) • STEC^[4] (<i>stx1/2</i>) • Internal Control (IC) 	Specimen <ul style="list-style-type: none"> • Stool 	Cat No./Size <ul style="list-style-type: none"> • GI10196Z / 25 rxns ^[6] • GI10198X / 100 rxns ^[6] 	<ul style="list-style-type: none"> • GI10197Y / 50 rxns
--	---	---	---	--

Allplex™ GI-Helminth(I) Assay

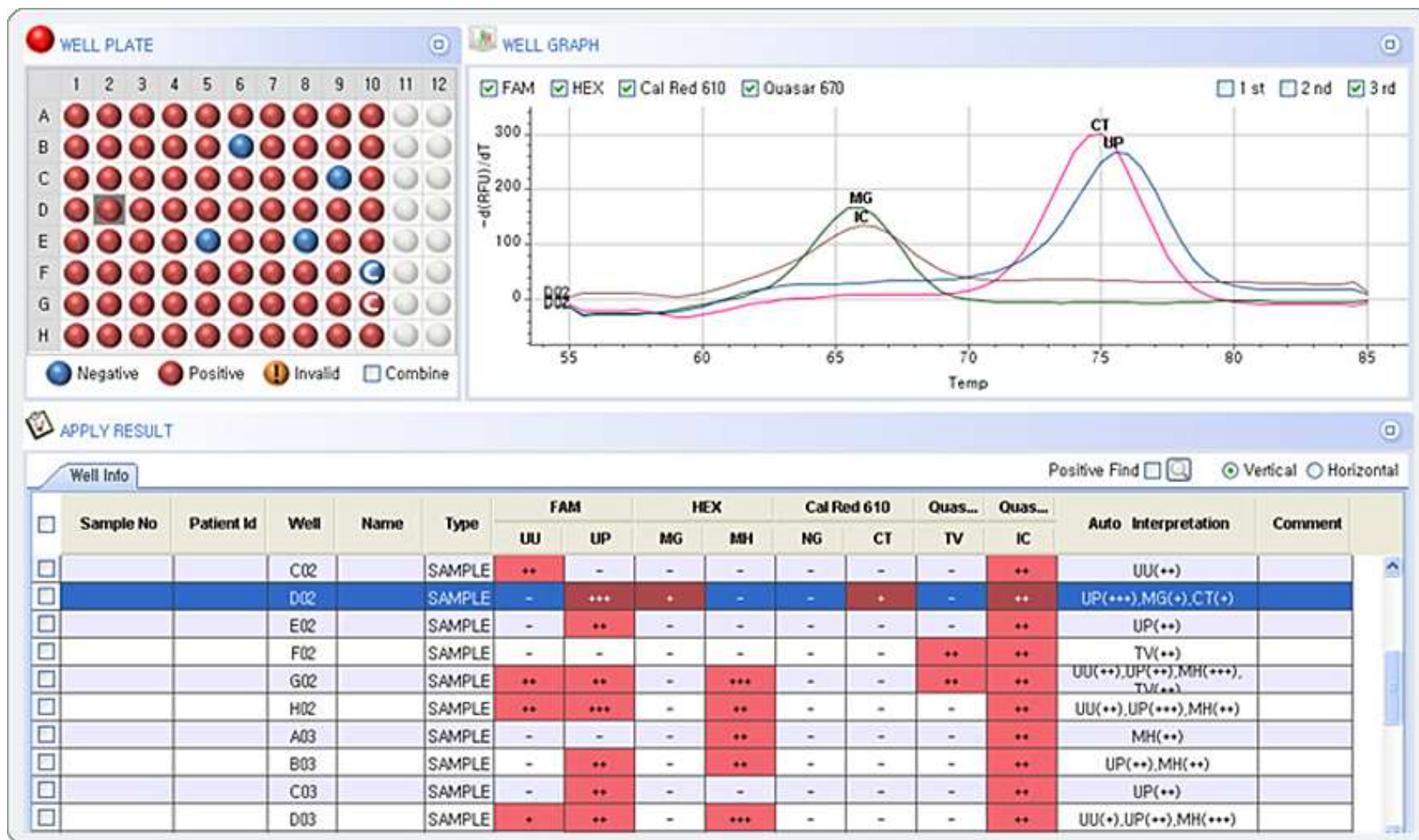
Analytes <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ancylostoma</i> spp.^[7] (AN) • <i>Enterobius vermicularis</i> (EV) • <i>Hymenolepis</i> spp.^[10] (HY) • <i>Strongyloides</i> spp.^[11] (ST) • <i>Trichuris trichiura</i> (TT) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Ascaris</i> spp.^[8] (AS) • <i>Enterocytozoon</i> spp. / <i>Encephalitozoon</i> spp.^[9] (EN) • <i>Necator americanus</i> (NA) • <i>Taenia</i> spp.^[12] (TA) • Internal Control (IC) 	Specimens <ul style="list-style-type: none"> • Stool 	Cat No./Size <ul style="list-style-type: none"> • GI10189Z / 25 rxns ^[6] • GI10191X / 100 rxns ^[6] 	<ul style="list-style-type: none"> • Fecal swab • GI10190Y / 50 rxns
--	--	--	---	--

Allplex™ GI-Parasite Assay

Analytes <ul style="list-style-type: none"> • <i>Blastocystis hominis</i> (BH) • <i>Cyclospora cayatanensis</i> (CC) • <i>Entamoeba histolytica</i> (EH) • Internal Control (IC) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Cryptosporidium</i> spp. (CR) • <i>Dientamoeba fragilis</i> (DF) • <i>Giardia lamblia</i> (GL) 	Specimen <ul style="list-style-type: none"> • Stool 	Cat No./Size <ul style="list-style-type: none"> • GI10202Z / 25 rxns ^[6] • GI9703X / 100 rxns ^[6] 	<ul style="list-style-type: none"> • GI9703Y / 50 rxns
---	---	---	--	---

Allplex™ GI-Virus Assay

Analytes <ul style="list-style-type: none"> • Adenovirus (AdV) • Norovirus GI (NoV-GI) • Rotavirus (RotV) • Internal Control (IC) 	<ul style="list-style-type: none"> • Astrovirus (AstV) • Norovirus GII (NoV-GII) • Sapovirus (SV) 	Specimen <ul style="list-style-type: none"> • Stool 	Cat No./Size <ul style="list-style-type: none"> • GI10184Z / 25 rxns ^[6] • GI9701X / 100 rxns ^[6] 	<ul style="list-style-type: none"> • GI9701Y / 50 rxns
--	--	---	--	---

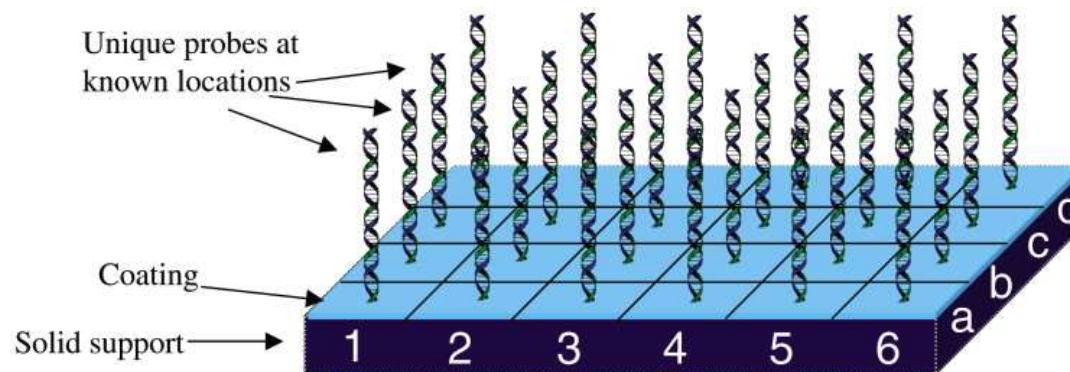


Chlamydia trachomatis (CT)
Mycoplasma genitalium (MG)
Mycoplasma hominis (Quantitative) (MH)
Neisseria gonorrhoeae (NG)

Trichomonas vaginalis (TV)
Ureaplasma parvum (UP)
Ureaplasma urealyticum (UU)
 Internal Control (IC)

DNA čipy

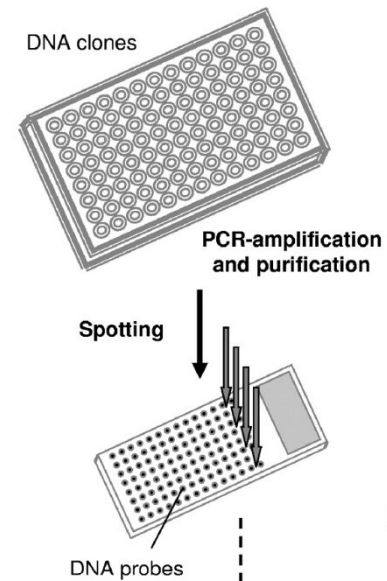
- soubor různých krátkých vláken DNA (oligonukleotidů) přichycených na podkladu ve známých konkrétních místech (spotech)
- v konkrétním místě je přichyceno více kopií stejného oligonukleotidu (sonda, próba, reportér)
- vzorek:
 - DNA (stanovování genového profilu různých organismů, často i blízce příbuzných)
 - RNA jako cDNA (předchází krok RT-PCR) pro analýzu exprese
 - cílové molekuly označeny fluoroforem



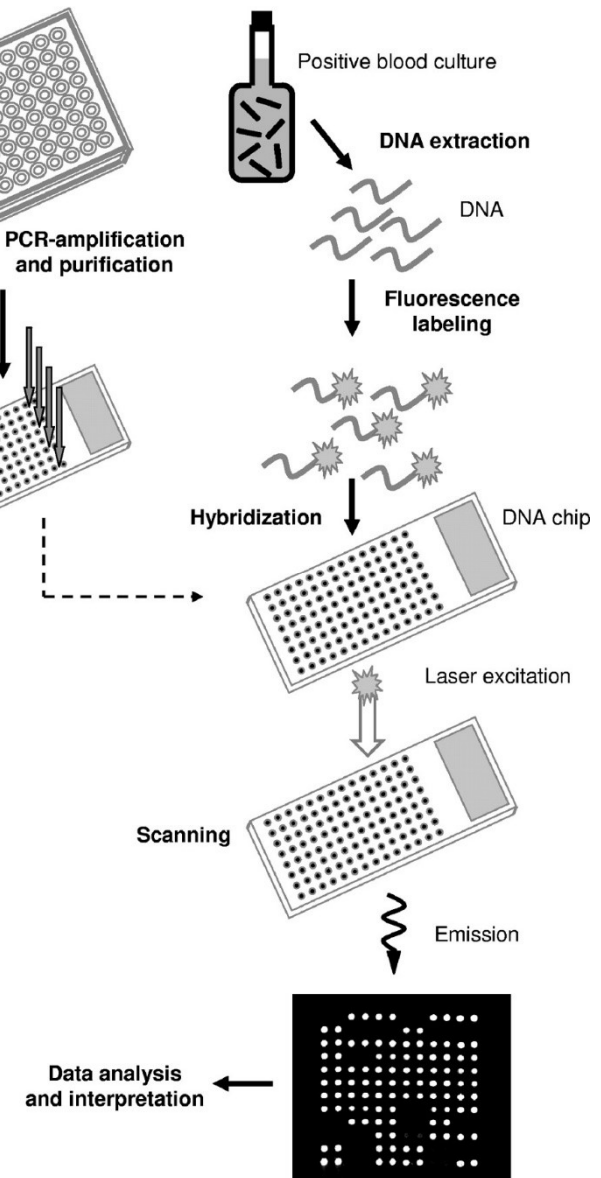
DNA čipy

- cílové molekuly hybridizují s komplementárními vlákny oligonukleotidů přichycenými k destičce
- promytí odplaví všechny neuchycené molekuly
- kvantifikace fluorescence v každém z míst (spotů)
- zpracování bioinformatickými postupy

A. DNA-chip construction



B. Diagnostic workflow



DNA čipy

Ma et al. *BMC Microbiology* (2020) 20:177
https://doi.org/10.1186/s12866-020-01842-3

BMC Microbiology

RESEARCH ARTICLE Open Access

Development of a DNA microarray assay for rapid detection of fifteen bacterial pathogens in pneumonia

Xiuqing Ma¹, Yanqin Li¹, Yuan Liang¹, Yang Liu¹, Ling Yu¹, Chunsun Li¹, Qiqi Liu^{2†} and Liangan Chen^{1*†}

Check for updates

To identify bacteria at the species level, we chose to use a 16S rDNA probe combined with a species-specific probe to detect each bacterium. The sequences of the species-specific probes corresponded to 15 species-specific genes.

MICROBIAL DRUG RESISTANCE
Volume 16, Number 1, 2010
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/mdr.2009.0082

Development of a DNA Microarray to Detect Antimicrobial Resistance Genes Identified in the National Center for Biotechnology Information Database

Jonathan G. Frye¹, Rebecca L. Lindsey¹, Gaelle Rondeau,² Steffen Porwollik,² Fred Long,² Michael McClelland,² Charlene R. Jackson¹, Mark D. Englen¹, Richard J. Meinersmann¹, Mark E. Berrang¹, Johnnie A. Davis¹, John B. Barrett¹, Jennifer B. Turpin¹, Sutawee N. Thitaram¹, and Paula J. Fedorka-Cray¹

AR genes in the National Center for Biotechnology Information GenBank database were identified by their annotations and compiled into a nonredundant list of 775 genes. A DNA microarray was constructed of 70mer oligonucleotide probes designed to detect these genes encoding resistances to various antibiotics.

Automatizované systémy v diagnostice



Auto-barcoding



Auto-sampling



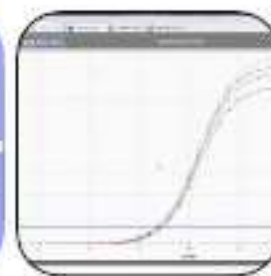
DNA/RNA
extraction



PCR Setup



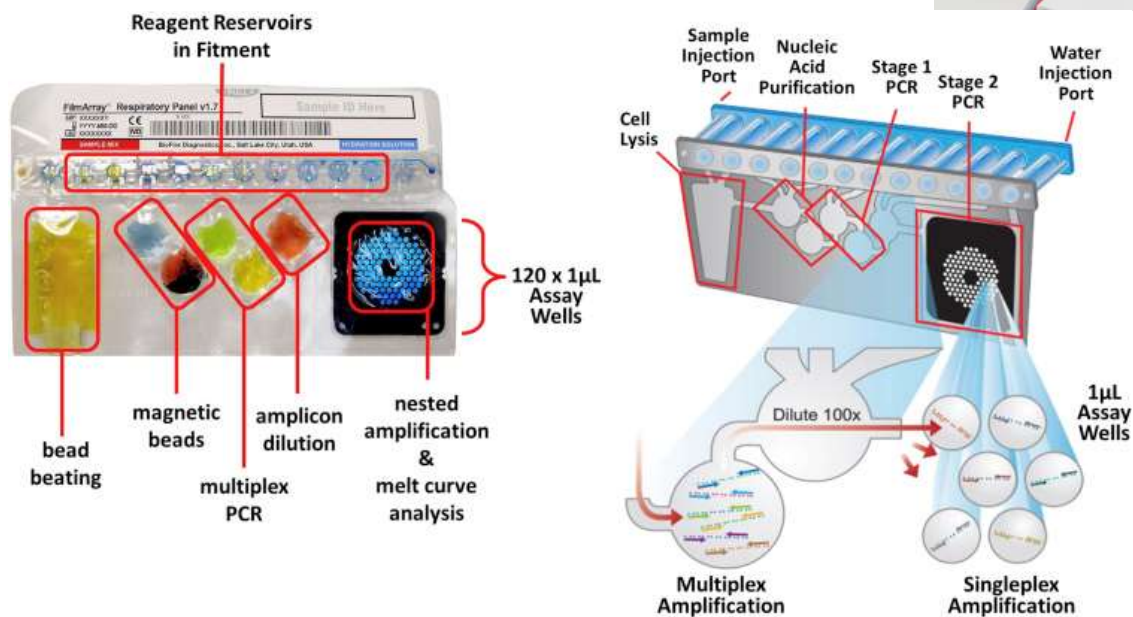
Real-time PCR



Result analysis



Automatizované systémy v diagnostice



Automatizované systémy v diagnostice

22 cílových patogenů najednou

NAHORU

Cílové mikroorganismy panelu FilmArray™ GI:

Bakterie	Diarrhogenni E. coli/Shigella
<ul style="list-style-type: none"> ▶ Campylobacter (jejuni, coli & upsaliensis) ▶ Clostridium difficile (Toxin A/B) ▶ Plesiomonas shigelloides ▶ Salmonella ▶ Yersinia enterocolitica ▶ Vibrio (parahaemolyticus, vulnificus, & cholerae) ▶ Vibrio cholerae 	<ul style="list-style-type: none"> • E. coli O157 • Enteroagregační E. coli (EAEC) • Enteroagregační E. coli (EPEC) • Enteroagregační E. coli (ETEC) lt/st • Shiga-like toxin produkující E. coli (STEC) stx1/stx2 E. coli O157 • Shigella/Enteroinvasive E. coli (EIEC)
Viry	Paraziti
<ul style="list-style-type: none"> ▶ Adenovirus F 40/41 ▶ Astrovirus ▶ Norovirus GI/GII ▶ Rotavirus A ▶ Sapovirus (I,II, IV, and V) 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Cryptosporidium ▶ Cyclospora cayetanensis ▶ Entamoeba histolytica ▶ Giardia lamblia

34 cílů

NAHORU

BIOFIRE® FILMARRAY® Pneumonia Panel *plus* je komplexním souběžným testováním pro 27 nejvíce známých patogenů způsobujících LRTI a 7 genů antibiotické rezistence.

Bakterie (semikvantitativní)	Geny antibiotické rezistence
<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> group <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	ESBL CTX-M Carbapenemases KPC NDM Oxa48-like VIM IMP Methicilin Resistance mecA/mecC and MREJ

Atypické Bakterie (Kvalitativní)	Viry
<i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i>	Influenza A Influenza B Adenovirus Coronavirus Parainfluenza virus Respiratory Syncytial virus Human Rhinovirus/Enterovirus Human Metapneumovirus Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)*
	* MERS-CoV will only be available on the Pneumonia Panel <i>plus</i>

Automatizované systémy v diagnostice - POCT



Influenza A/B+RSV
SARS-CoV-2+Influenza A/B
Streptococcus pyogenes skupiny A
Clostridium difficile

Metody sekvenování NK

- **stanovení pořadí nukleotidů** v molekule DNA (primární struktury)
- význam:
 - odvození informace o aminokyselinové sekvenci kódovaných proteinů, regulaci jejich tvorby
 - charakterizace mutací např. způsobujících genetické choroby
 - charakteristika příbuznosti organismů
 - a mnohé další

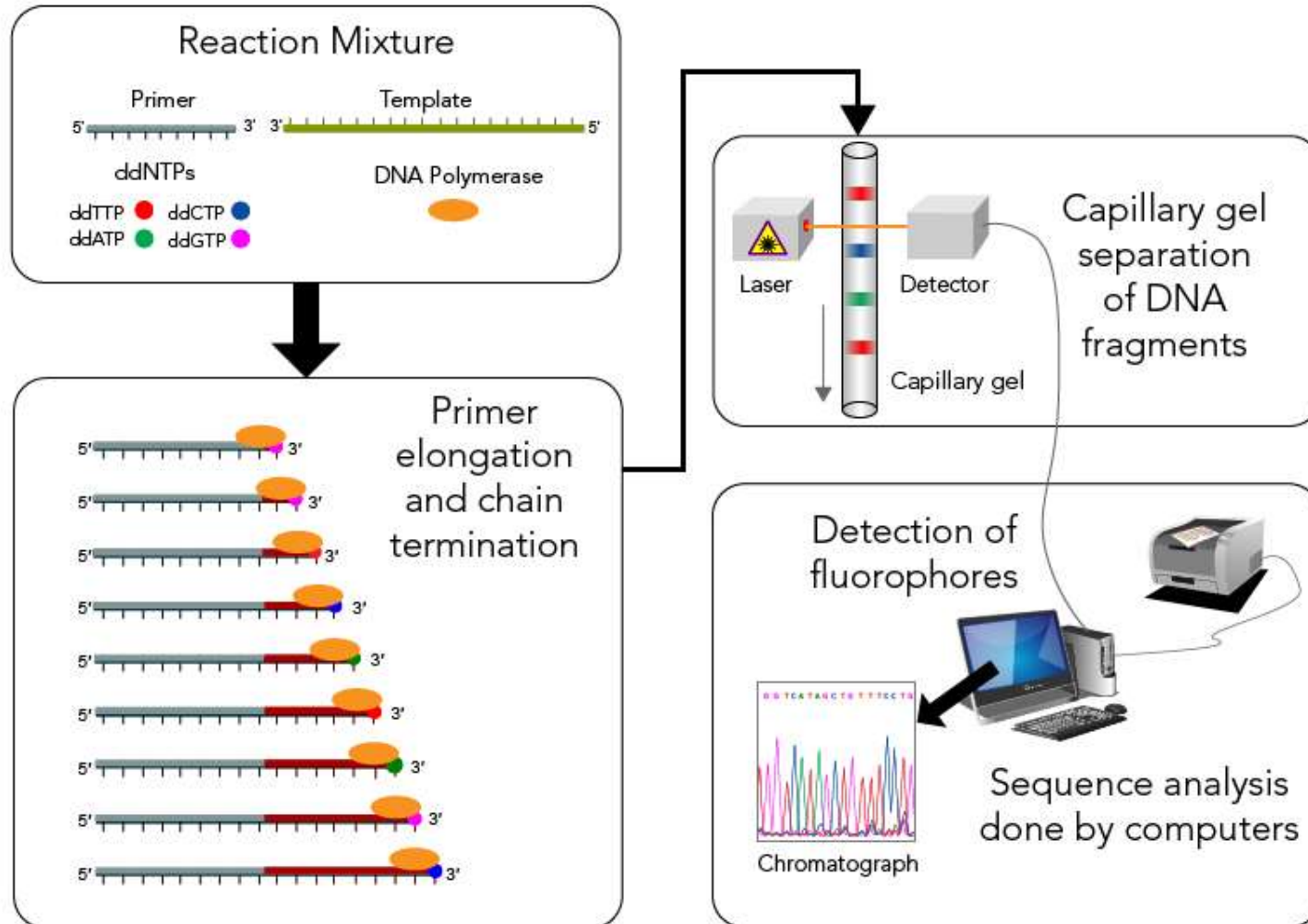
Metody sekvenování NK

- Chemická metoda (Maxamovo-Gilbertovo sekvenování)
- Enzymatická metoda (Sangerovo sekvenování)
- Pyrosekvenování
- Sekvenování nové generace (NGS)

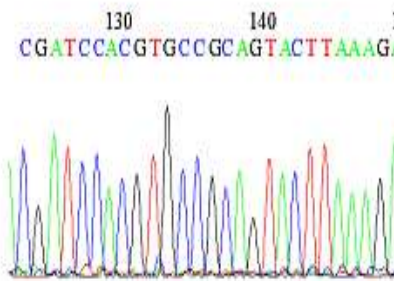
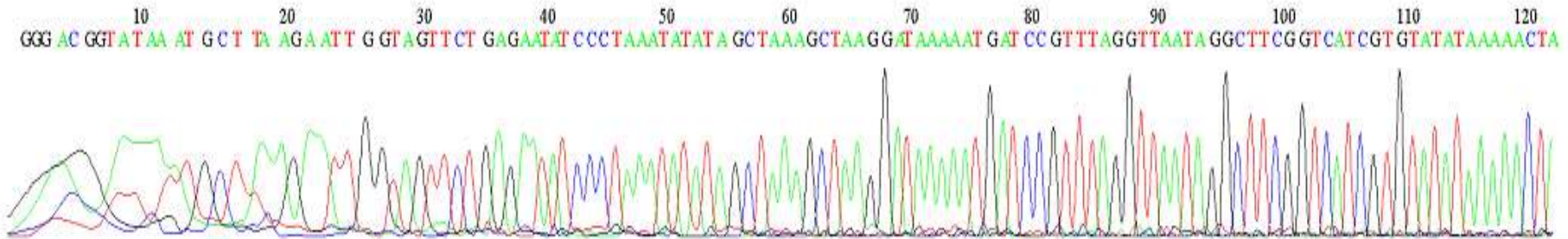
Enzymatická (Sangerova) metoda

- Založená na asymetrické PCR – do reakce vstupuje pouze jeden primer (sekvenujeme-li produkt PCR, používá se nejčastěji jeden z primerů použitých při PCR, případně oba ve dvou oddělených reakcích)
- Reakční směs oproti běžné PCR obsahuje navíc tzv. dideoxynukleotidy
- Frederick Sanger (1977)
- Komericializace Applied Biosystems
- Nejpoužívanější metoda po 40 let
- Dnes postupně nahrazována NGS

Enzymatická (Sangerova) metoda

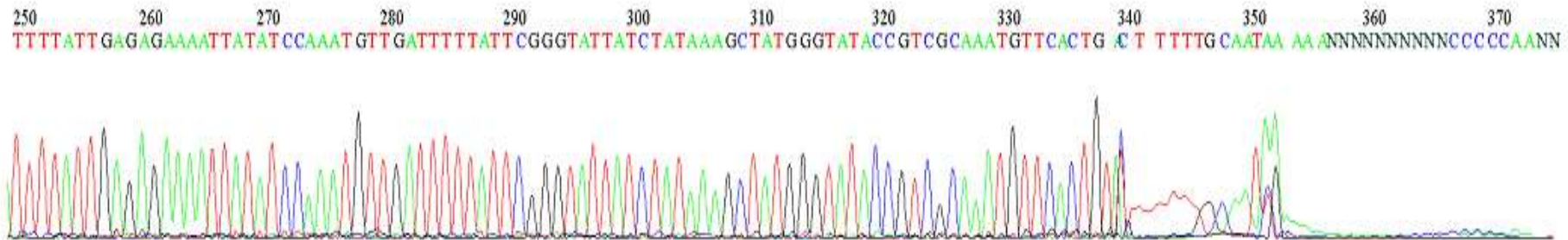
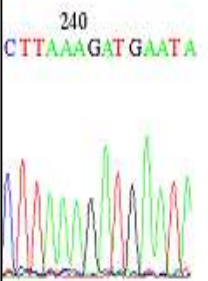


Hodnocení dat



Přiřazení sekvence známému organismu

- bioinformatické přístupy:
 - BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (NCBI)
 - další (specializované) databáze: 16SpathDB
- vyhledávání podobností v databázi



Sekvenování nové generace

- Poptávka po nízkonákladovém sekvenování vyvolala tlak na vývoj „high-throughput“ metod
- Princip – **paralelizace procesu sekvenování**
- Produkce **tisíců až milionů sekvencí současně**
- Výstupem **obrovský objem dat**, který je třeba zpracovat/roztřídit
- Poprvé v historii problém **ne** s tím jak data **získat**, ale smysluplně je **interpretovat, vytěžit**
- Využití obecně – získání velkého množství sekvenční informace (o celém genomu, nebo o mnoha kopiích určitého úseku DNA, nebo o mnoha genomech současně – metagenomika)

Sekvenování nové generace - platformy

- Různé technologie, přístupy, mají své výhody i nevýhody, vhodné pro různé aplikace
- Obecné schéma obvykle podobné:
 - (0. izolace celogenomové DNA - získáme mnoho kopií genomové DNA)
 - 1. Příprava tzv. **knihovny** - fragmentace genomové DNA na fragmenty o délce řádově stovky bp dlouhé (např. ultrazvukem, proudem dusíku aj.)
 - 2. Zatupení konců fragmentů a ligace tzv. **adaptérů** - krátkých oligonukleotidů, od kterých pak probíhá sekvenování jednotlivých fragmentů (vážou se k nim primery; všechny fragmenty se tedy sekvenují **stejným primerem**)
 - (3. Namnožení klonů jednotlivých fragmentů – např. emulzní PCR) – NGS metody 3. generace už nevyužívají
 - 4. Vlastní sekvenování - zpravidla na základě detekce toho, jaká báze se právě začlenila do vznikajícího řetězce

Sekvenování nové generace - platformy

454 (Roche)

Illumina

Ion Torrent (Life Technologies)

SOLiD (Life Technologies)

PACBIO (Pacific BioSciences)

Oxford Nanopore (MinION...)



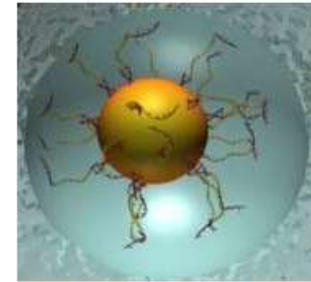
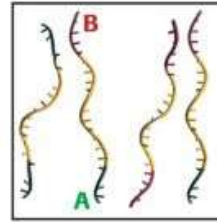
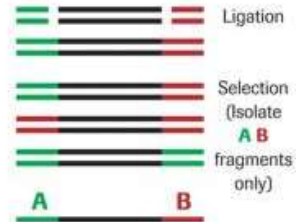
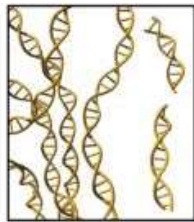
2. generace sekvenování

3. generace sekvenování

454 pyrosekvenování

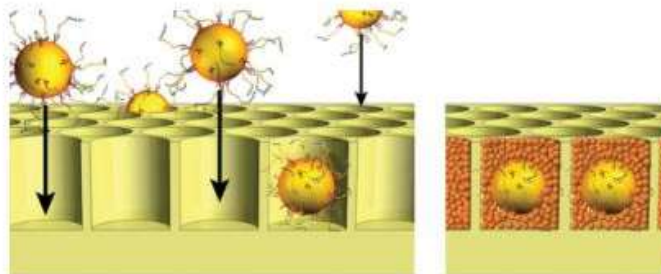
- firma Roche
- modely **454 GS Junior (35 MB)** x **454 GS FLX (700 MB)**
- příprava knihovny: nebulizace tekutým dusíkem
- příprava vlastního templátu pro sekvenování: **emulzní PCR** na kuličkách (*beads*); na každou kuličku se váže jeden fragment původní knihovny; kriticky důležitá koncentrace DNA v knihovně (aby na každou kuličku připadal jen jeden fragment)
- Po PCR na každé kuličce navázáno mnoho kopií příslušného fragmentu
- Sekvence syntézou v mikrojamkách (objem v pl, v každé jedna kulička), detekce chemiluminiscenční - **pyrosekvenování**

454 pyrosekvenování

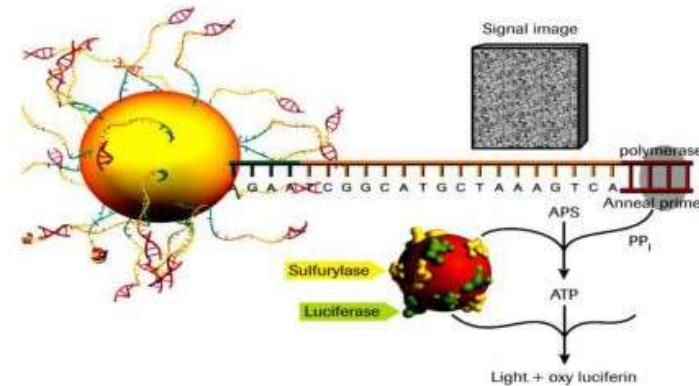


1) Prepare Adapter Ligated ssDNA Library (A-[insert]-B)

2) EmPCR: Clonal Amplification on 28 μ beads followed by enrichment



3) Load beads and enzymes in PicoTiter Plate™

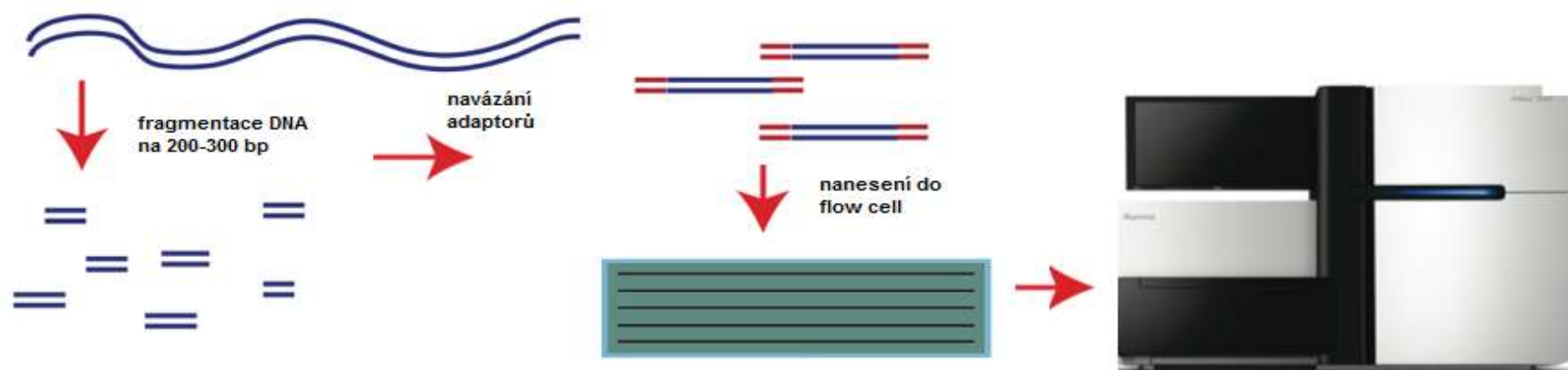


4) Perform sequencing-by-synthesis on the 454 Sequencer

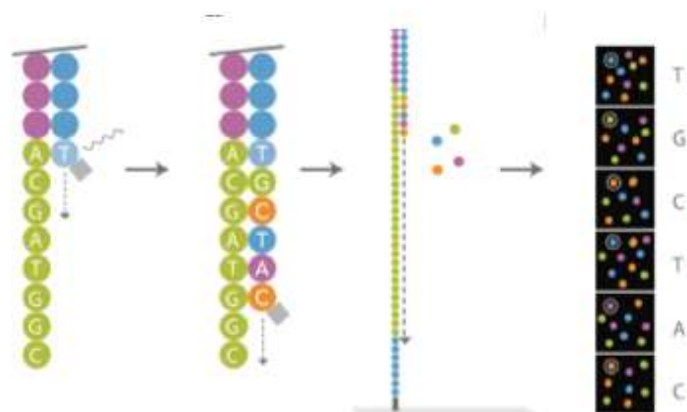
Illumina

- různé modely platformem
- příprava templátu: hybridizace na sklíčku, tvorba clusterů (shluků) na pevné destičce, tj. ne v kapce (emulzi); každý cluster opět obsahuje klony (kopie) téhož fragmentu
- sekvenace syntézou (SBS – sequencing by synthesis)
- detekce fluorescence odštěpené značky z reverzního terminátoru (nukleotidu) – pokud se začlení, vidíme (různo)barevnou fluorescenci
- opět paralelní analýza mnoha clusterů současně

Illumina

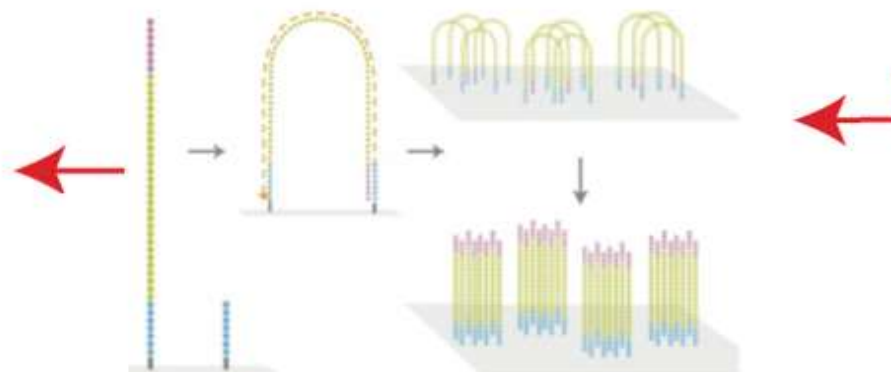


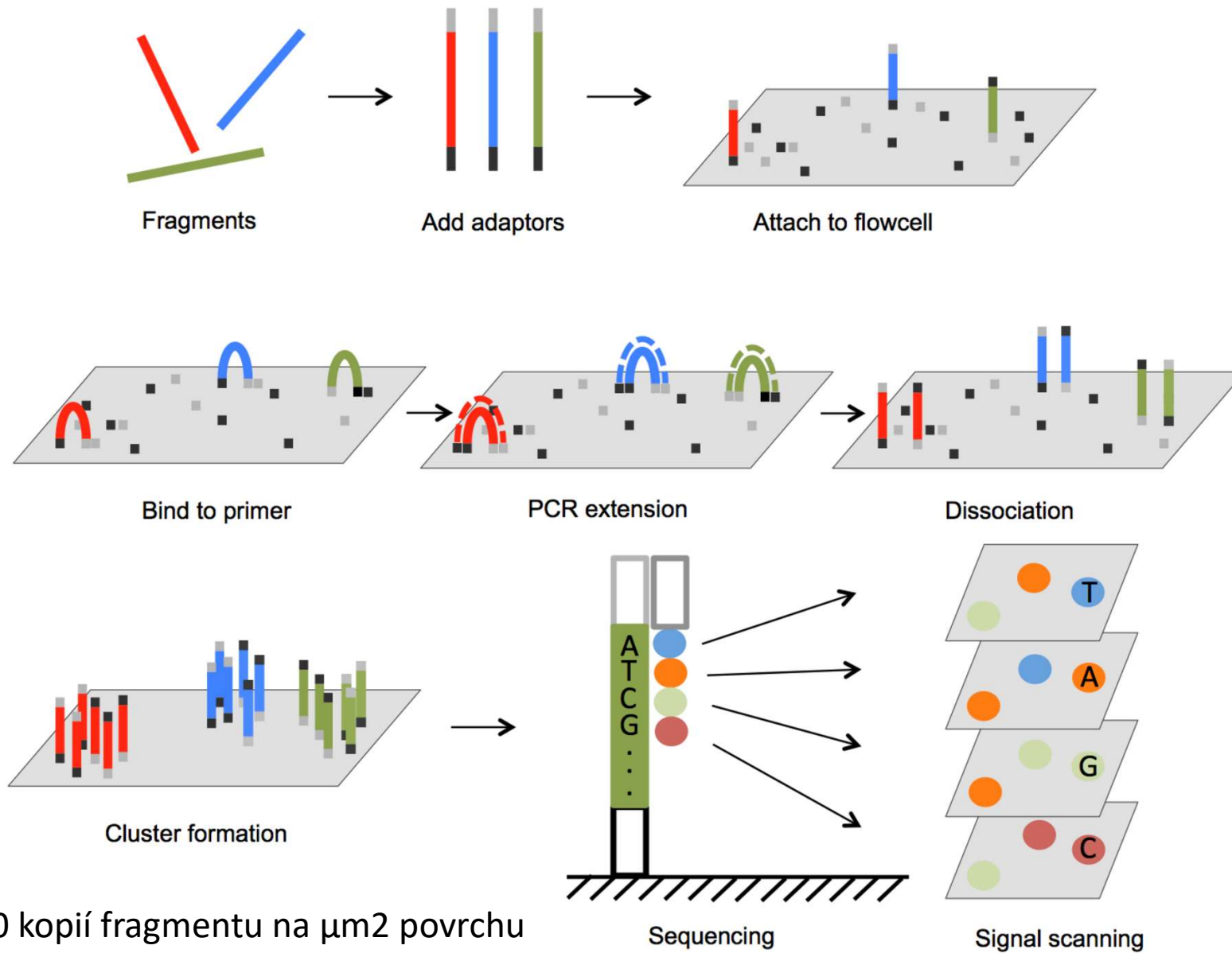
sekvenace pomocí SBS s reverzibilními fluorescenčními terminátory



analýza obrazu - určení sekvenace v jednotlivých klastrech

můstková amplifikace PCR na pevné fázi





- až 1000 kopií fragmentu na μm^2 povrchu
- na celém povrchu až 10 milionů shluků na cm^2

Illumina



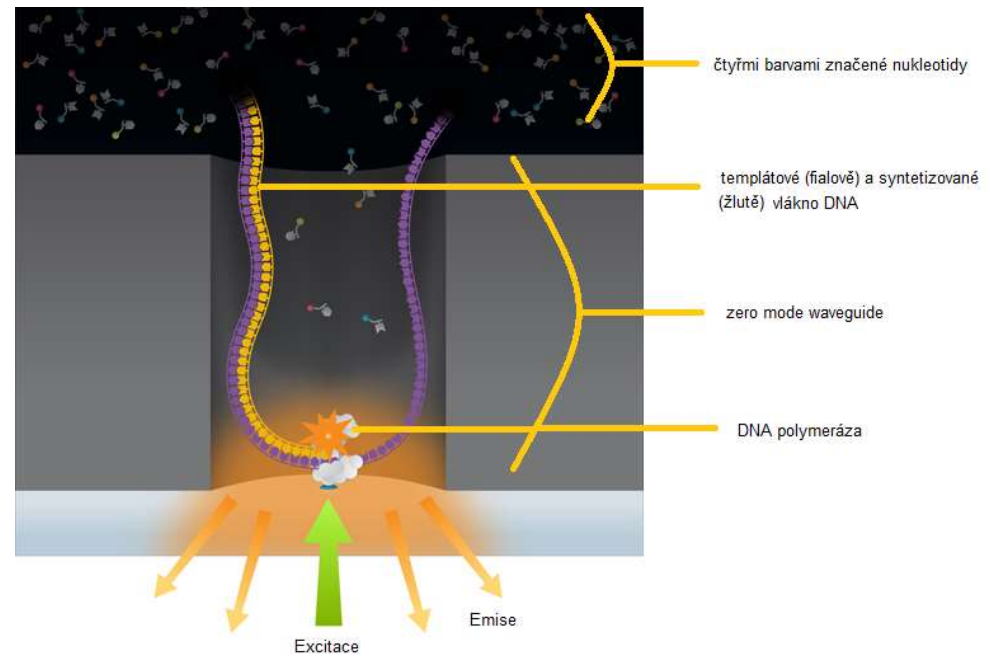
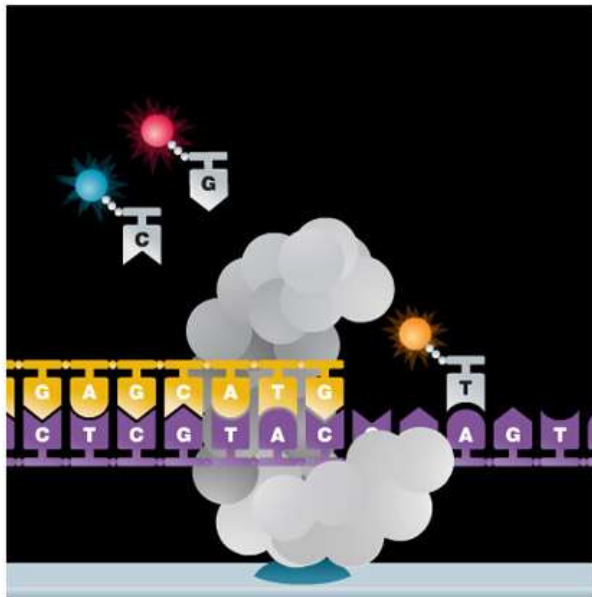
	MiniSeq	MiSeq	NextSeq 500	HiSeq 4000	NovaSeq
Run Time	24 hours	56 hours	29 hours	3.5 days	40 hours
Read length (pb)	2x 150	2x 300	2x 150	2x 150	2x 150
Read number	50 10 ⁶	50 10 ⁶	800 10 ⁶	5 10 ⁹	3.3 10 ⁹
Ouput	7.5 Gb	15 Gb	120 Gb	1,500 Gb	1,000 Gb
Throughput	7 Gb/day	7 Gb/day	100 Gb/day	430 Gb/day	500 Gb/day

Sekvenování třetí generace

- **nevyužívá pomnožení** templátu pro zvýšení signálu, sekvenace **v reálném čase** – analogie real-time PCR
- produkuje výrazně **delší čtení** (řádově tisíce až desetitisíce bp) – **snazší sestavování** (assembly)
- snazší sekvenování **GC bohatých oblastí** (druhá generace – problémy)

PacBIO

- PacBio RSII (500-1000 MB)
- Od 2011
- technologie SMRT (*single molecule real time sequencing*)
- detekce odštěpeného barviva z připojovaného nukleotidu v tzv. *zero mode waveguides* (malé „kontejnery“ na dně jamky)
- volné nukleotidy plavou v roztoku



PacBio



flowcell

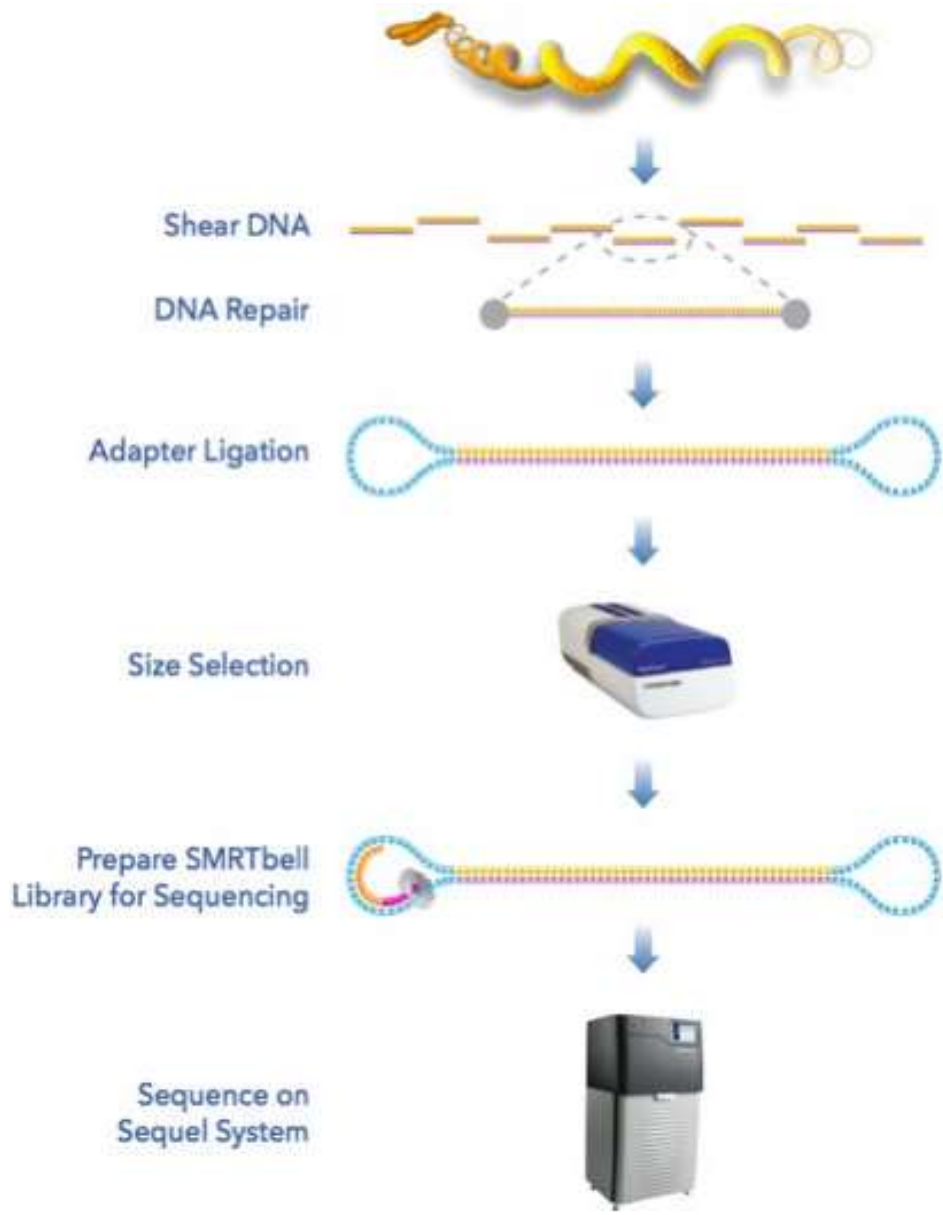


PacBio RSII

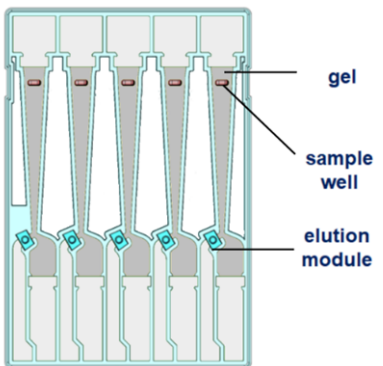
PacBio - workflow



Procedure & Checklist – Preparing Multiplexed Microbial SMRTbell® Libraries for the PacBio® Sequel® System



→ Pooling libraries - multiplexing



BluePippin gel cassette



BluePippin

PacBio – multiplexování knihoven

Shearing



Damage and end repair



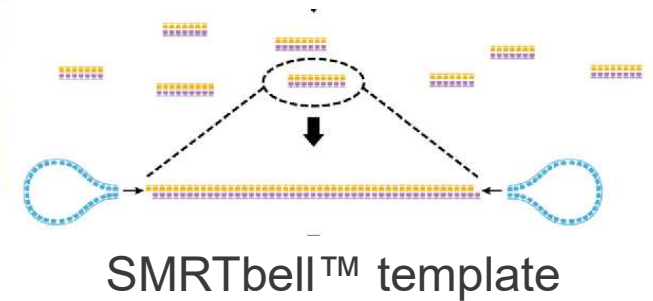
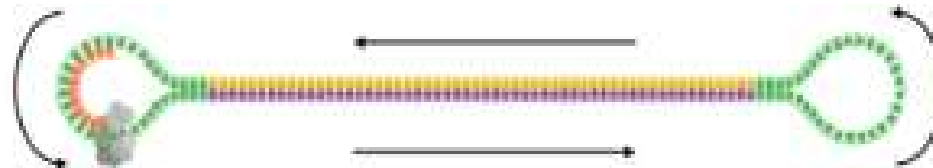
Barcoding



Pooling




(Size selection), QC, sequencing



PacBio – multiplexování knihoven

It helps to ensure equimolar pooling and sequencing representation across all pooled samples despite different genome size, shear size and sample concentration

**Express Microbial Multiplexing Calculator**

Sample Information Plex (Calculated): 10

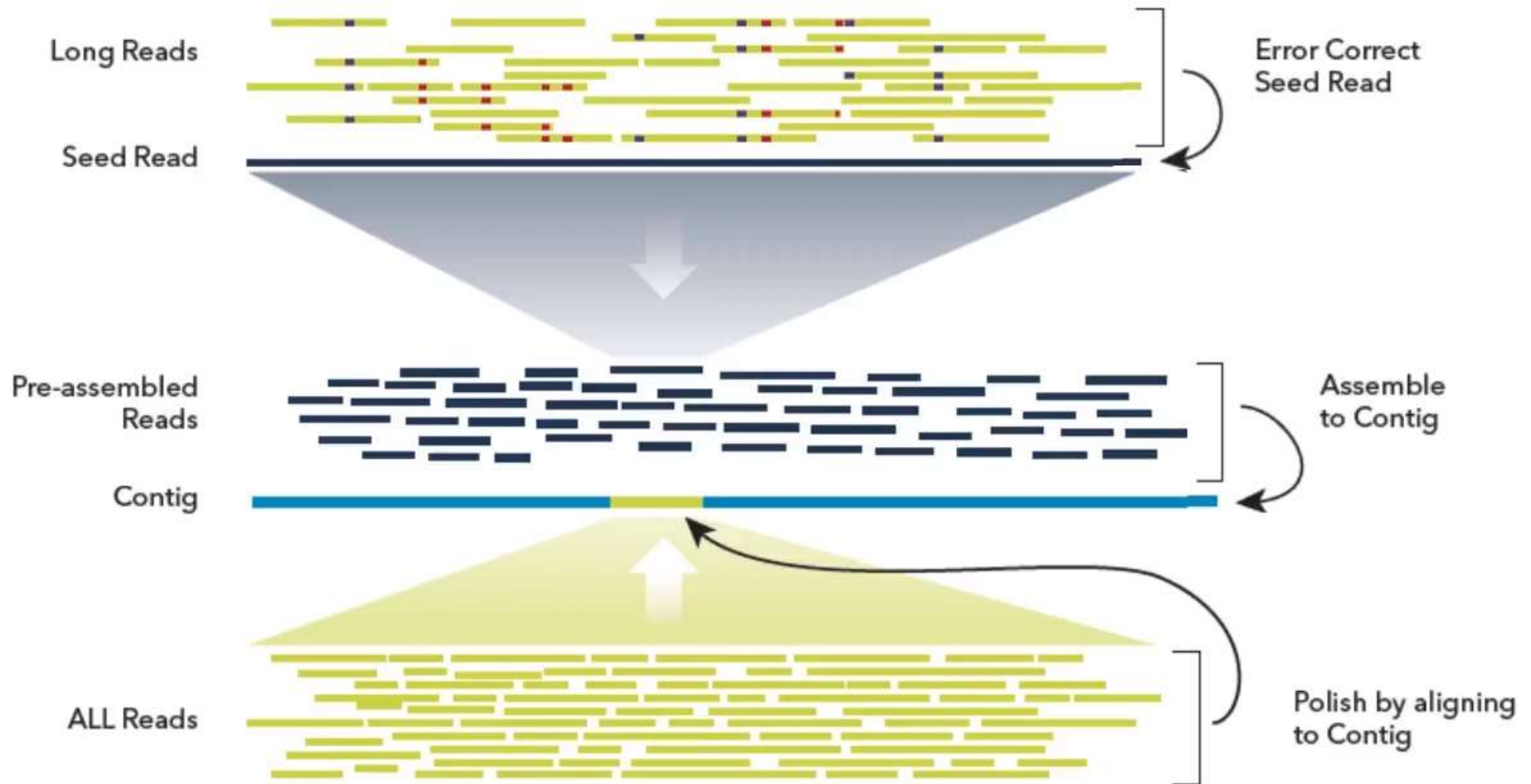
Total Sample Pool Volume Post Ligation (μl)

Sample Name	Barcode	Expected Genome Size (bases)	Avg Shear Size (bases)	Optional Sample Conc (ng/μl)	Calculated Volumes (μl)
Microbe Sample 1	BC1001	6 000 000	12 000	65,0	12,2
Microbe Sample 2	BC1002	6 000 000	12 500	60,0	13,8
Microbe Sample 3	BC1003	6 000 000	14 500	56,0	17,2
Microbe Sample 4	BC1008	6 000 000	13 670	78,0	11,6
Microbe Sample 5	BC1009	6 000 000	15 770	58,0	18,0
Microbe Sample 6	BC1010	6 000 000	16 800	78,0	14,3
Microbe Sample 7	BC1011	6 000 000	12 345	65,0	12,6
Microbe Sample 8	BC1012	500 000	11 560	59,0	1,1
Microbe Sample 9	BC1015	500 000	15 468	61,0	1,4
Microbe Sample 10	BC1016	500 000	14 560	89,0	0,9

PacBio – analýza dat

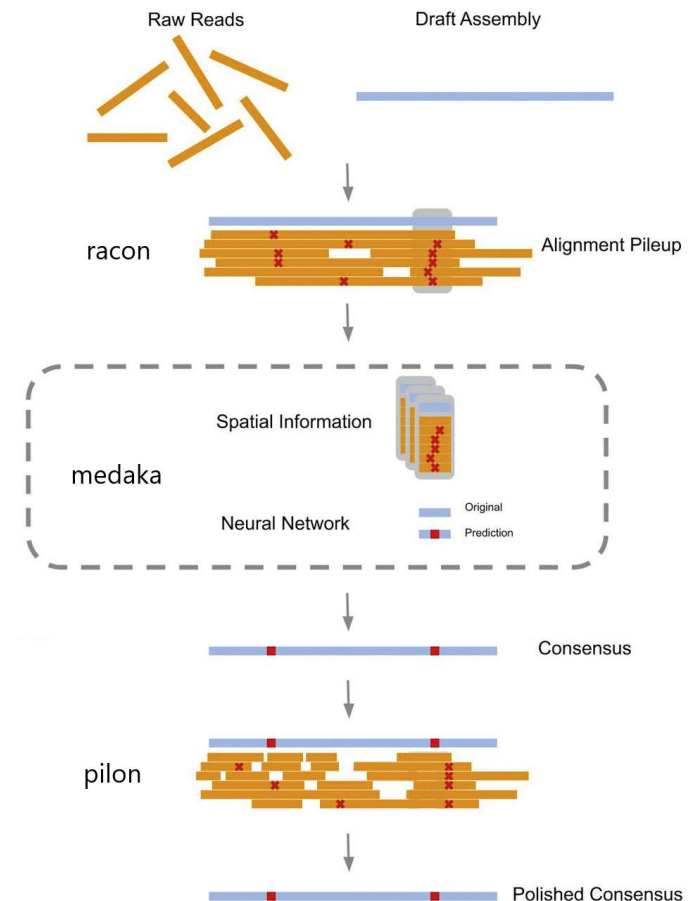
- Automatic demultiplexing once run is finished
- **HGAP**: Hierarchical Genome Assembly Process to generate high quality de novo assemblies of genomes
- **Microbial Assembly** released in September 2019

PacBio – (HGAP) a polishing



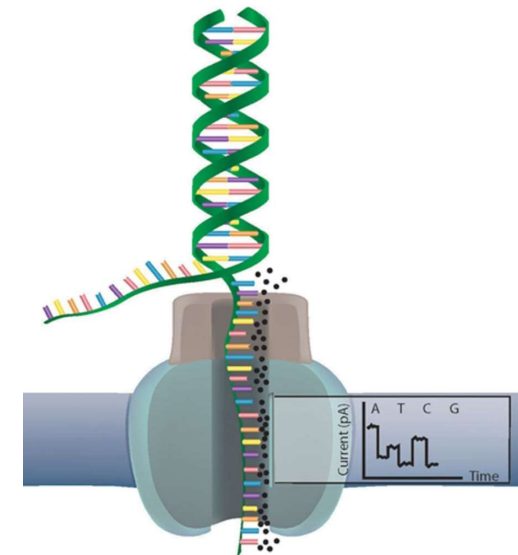
PacBio – (HGAP) a polishing

- Assembly (unicycler/flye)
- Polishing – racon (1), medaka (2), pilon (3)
 1. Initial correction of raw assembly (consensus tool) → alignment graph
 2. Recurrent neural network-based polishing
 3. Polishing with Illumina reads (SNPs, indels, repetitions)
- Manual check → mapping and checking (circularised plasmids, additional SNPs/indels, chimeras)

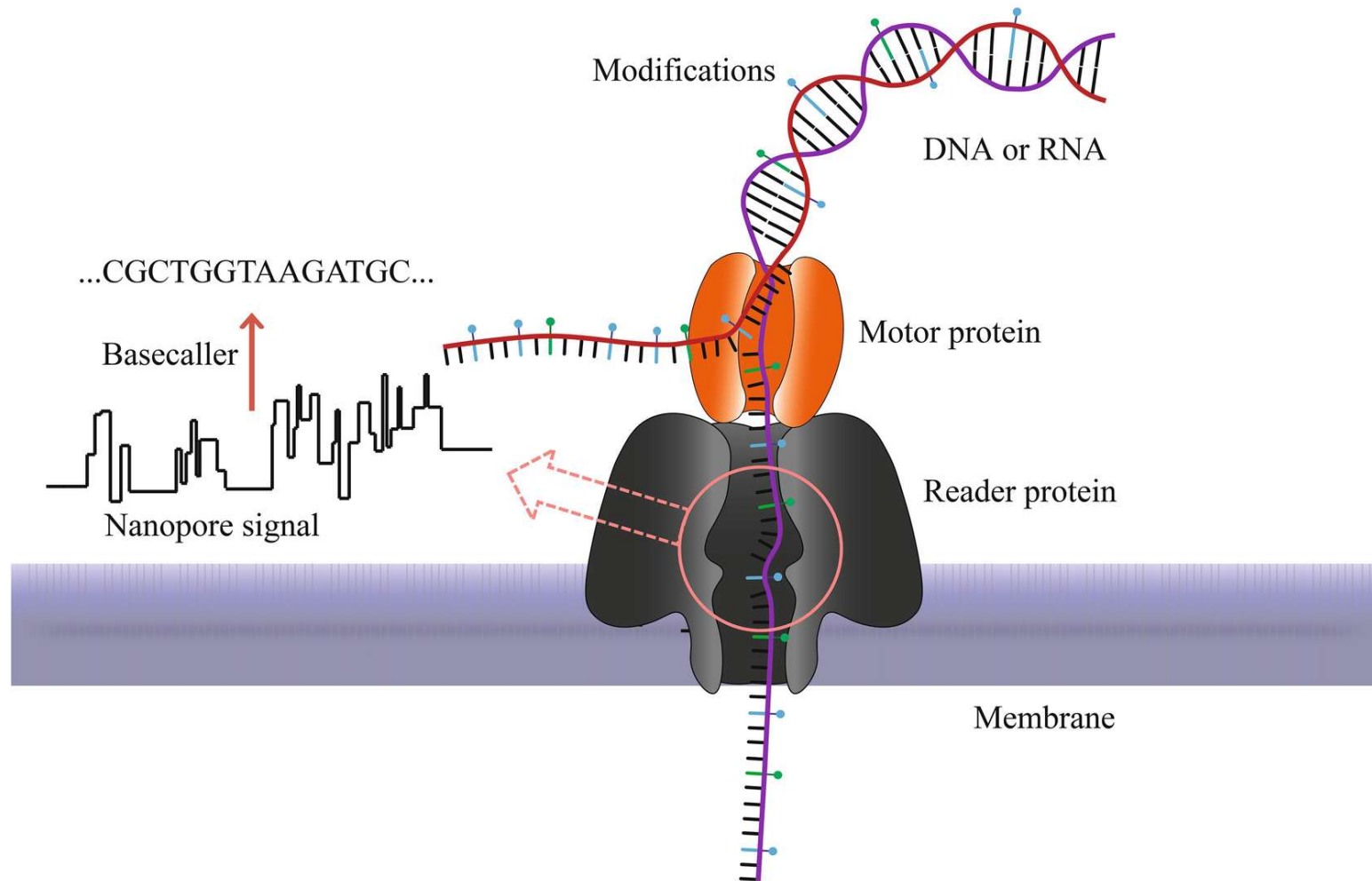


Oxford Nanopore

- Modely Flongle, MinION, GridION, PromethION (řádově jednotky až stovky GB!)
- Od 2014
- Délky readů až stovky kb
- MinION – přenosné zařízení! (< 100 g)
- Zatím také o něco **nižší přesnost čtení (kolem 95 procent)**
- Princip – průchod vlákna DNA miniaturním pórem, kterým prochází elektrický proud; při průchodu dochází ke kolísání proudu specifickým způsobem odpovídajícím procházejícímu nukleotidu

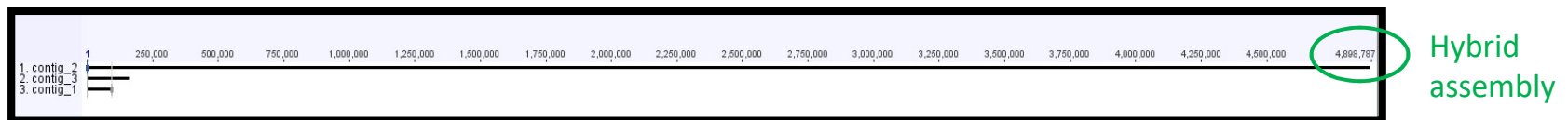
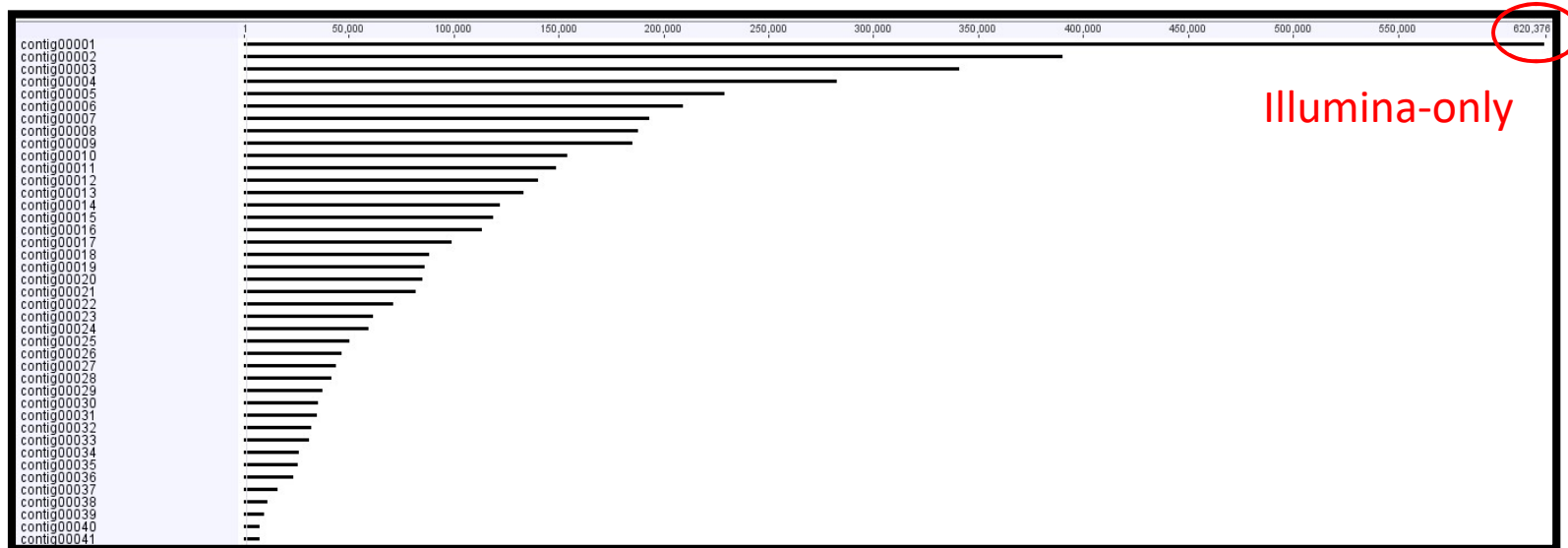


Oxford Nanopore



Why Oxford Nanopore?

- Long reads – ability to assemble whole plasmids and chromosomes



- Quality worse than PacBio but cheaper than PacBio

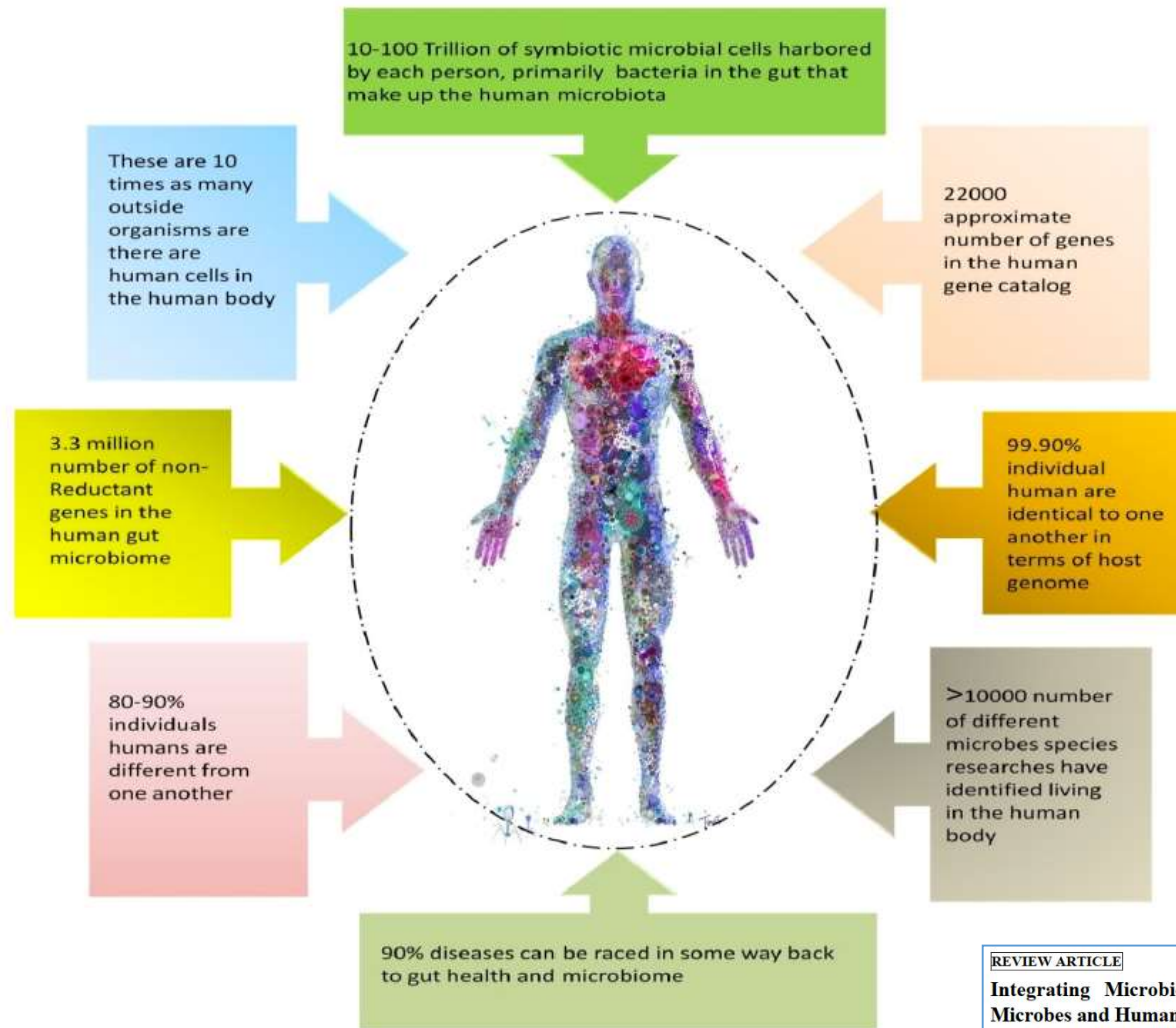
Nové diagnostické přístupy

Sekvenování nové generace

- Analýza mikrobiomu (bakteriom, virom,...)
 - Detekce nových infekčních agens
- Vyšetření citlivosti
- Virologická diagnostika

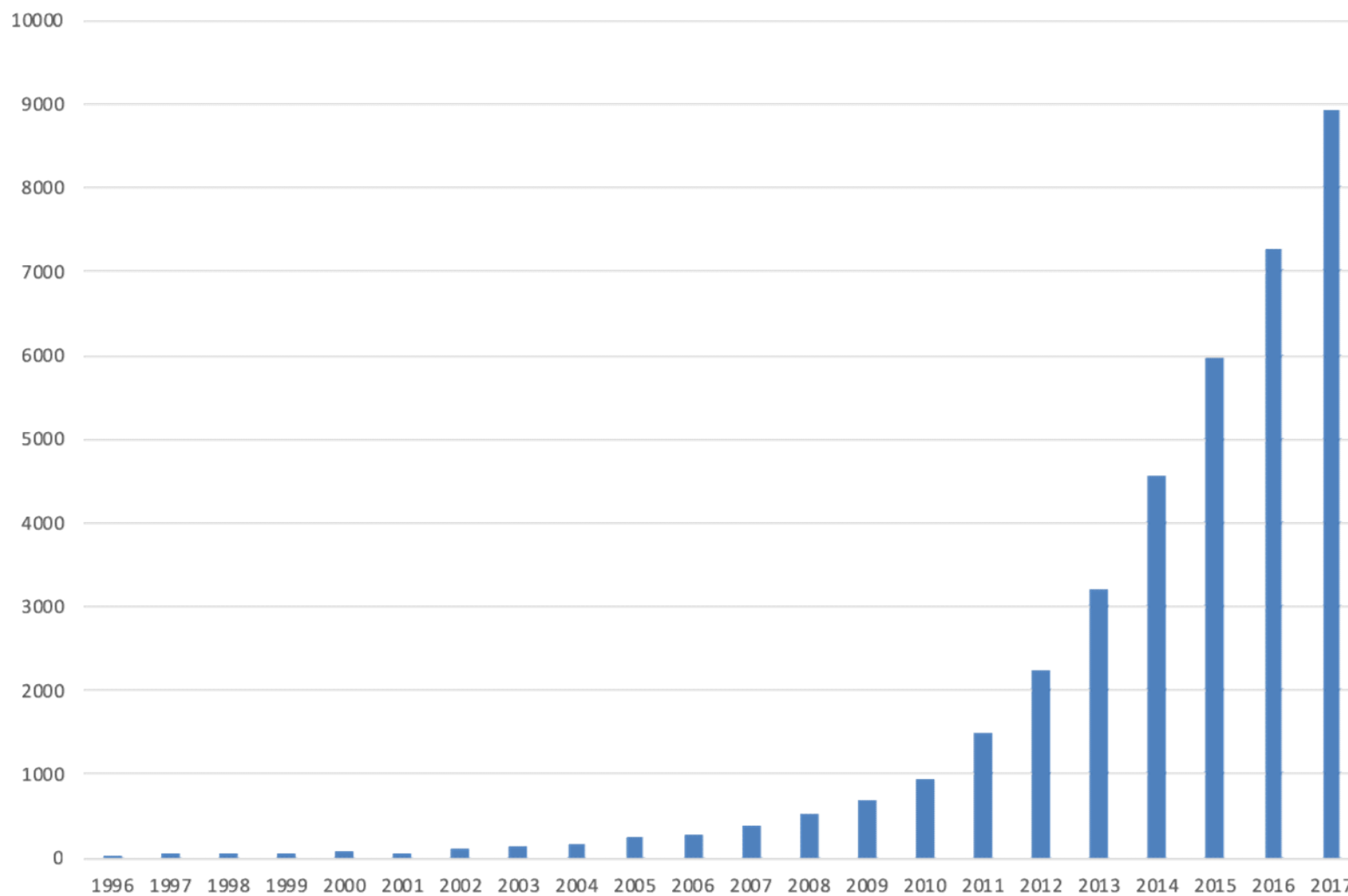


Mikrobiom člověka a jeho vliv



REVIEW ARTICLE
Integrating Microbiome Network: Establishing Linkages Between Plants, Microbes and Human Health
Suresh B. N. Krishna¹, Anamika Dubey², Muneer A. Malla¹, Richa Kothari⁴, Chandrama P. Upadhyay⁵, Jamila K. Adam¹ and Ashwani Kumar^{2,*}

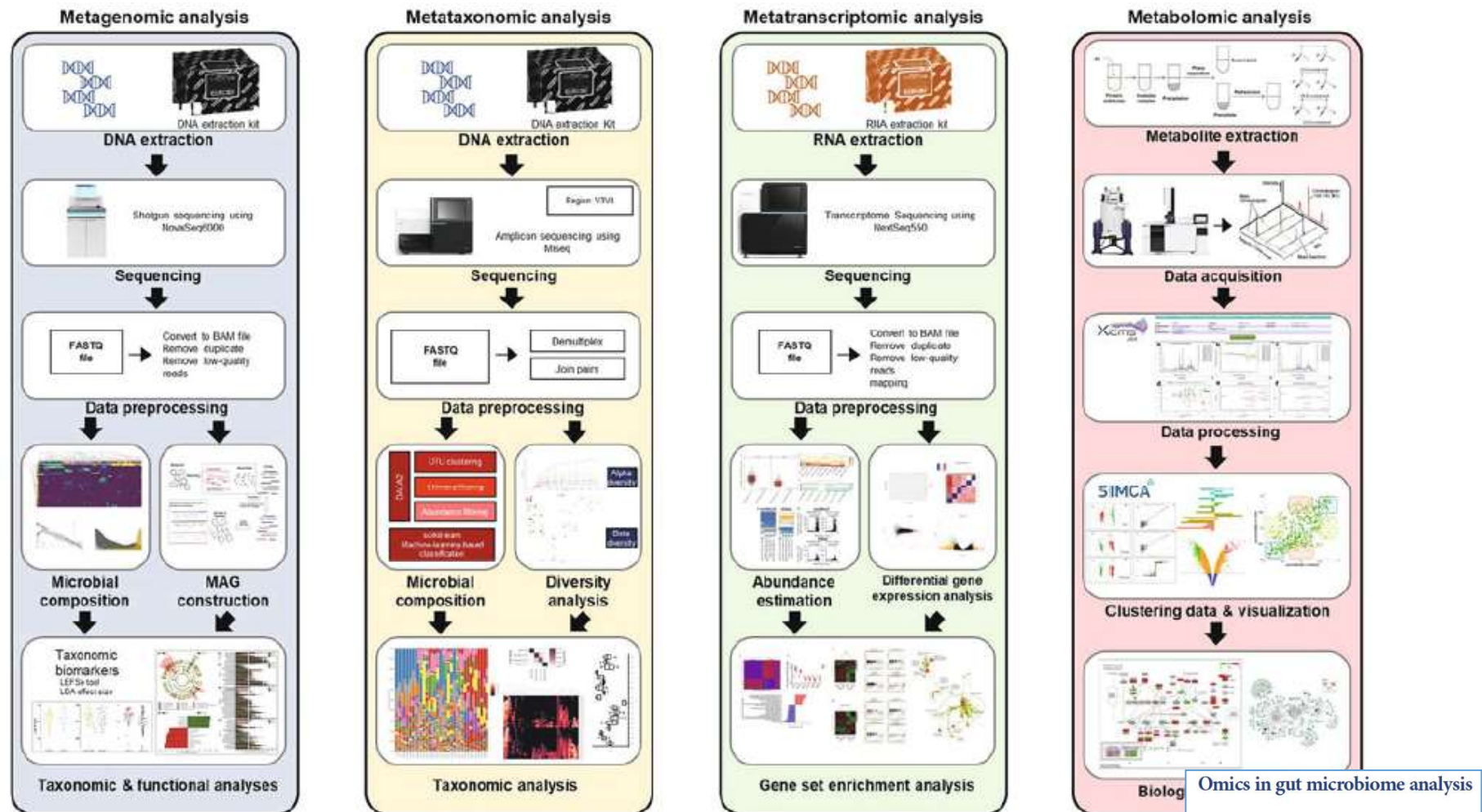
Studie zaměřené na mikrobiom



Analýza mikrobiálních populací

- **Metataxonomika** (16S rRNA profilování)
- **Metagenomika**
- **Metatranskriptomika** (analýza mRNA)
- **Metabolomika** (analýza metabolitů)

Využití různých metod pro studium mikrobiomu

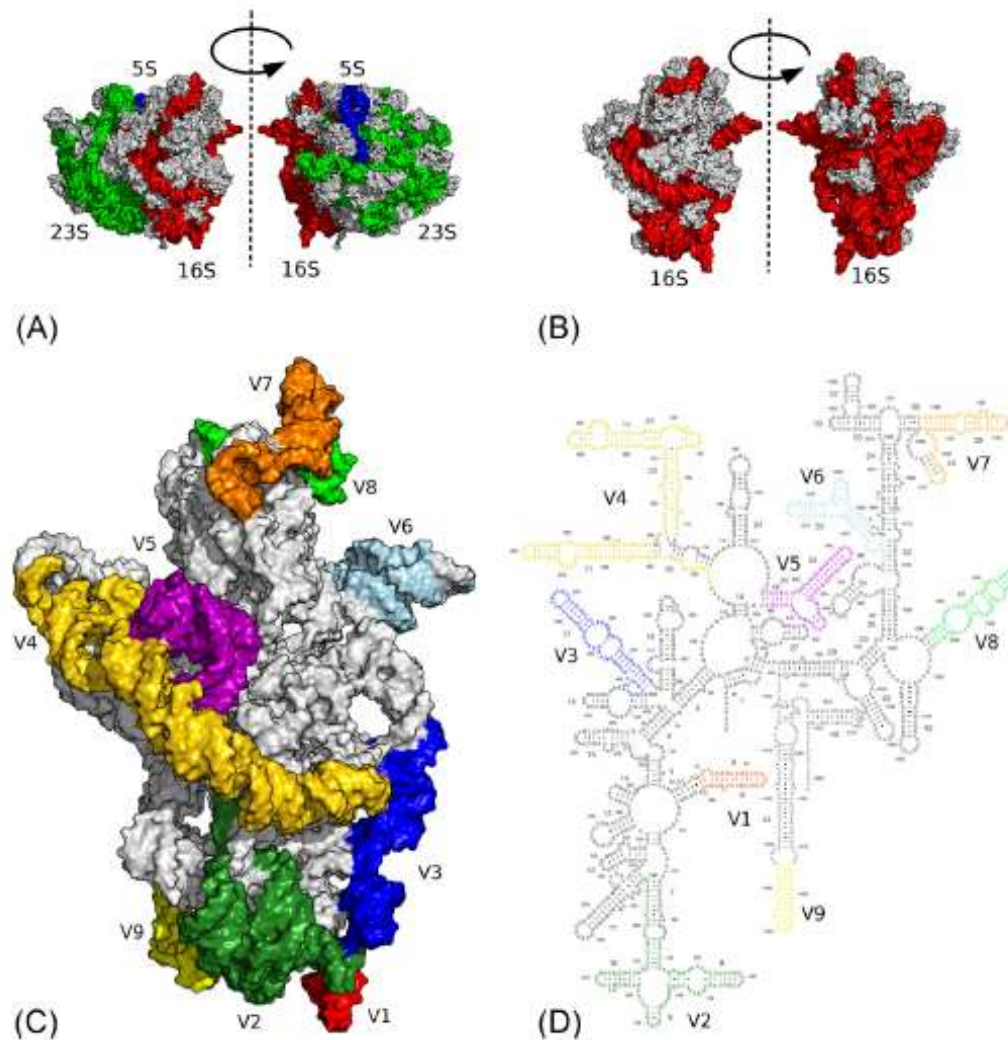


Tae Woong Whon^{1†}, Na-Ri Shin^{2†},
Joon Yong Kim³, and Seong Woon Roh^{1*}

Analýza mikrobiálních populací

- **Metataxonomika**
 - Běžně dostupná metoda
 - Využití 16S rRNA profilování (limity identifikace)
 - Neumožňuje identifikaci taxonů na detailní úrovni
 - Nepopisuje variabilitu na úrovni jednotlivého druhu (např. faktory virulence)

Ribozom v taxonomii bakterií



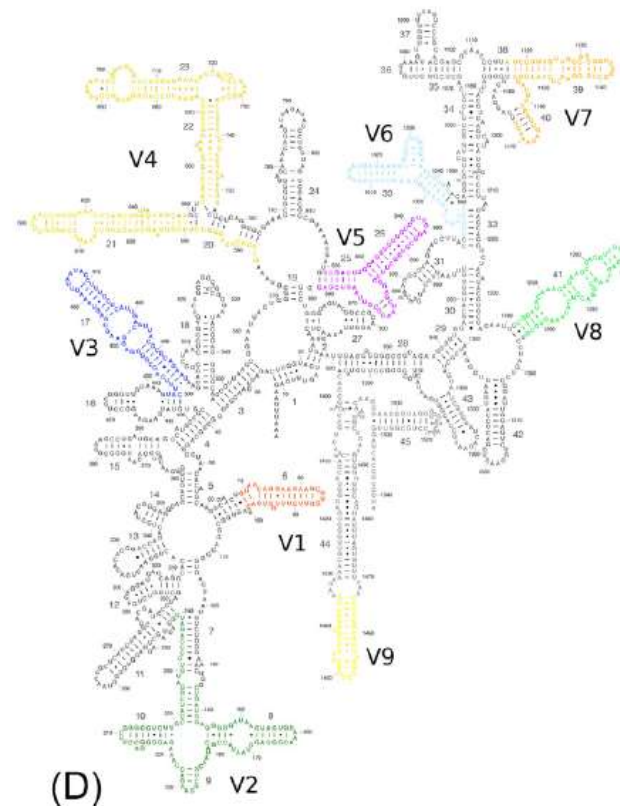
16S rRNA-Based Taxonomy Profiling in the Metagenomics Era

Matteo Ramazzotti*, Giovanni Bacci†

*Università degli Studi di Firenze - Dipartimento di Biologia, Firenze, Italy †Università degli Studi di Firenze - Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche "Mario Serio", Firenze, Italy

Ribozom v taxonomii bakterií

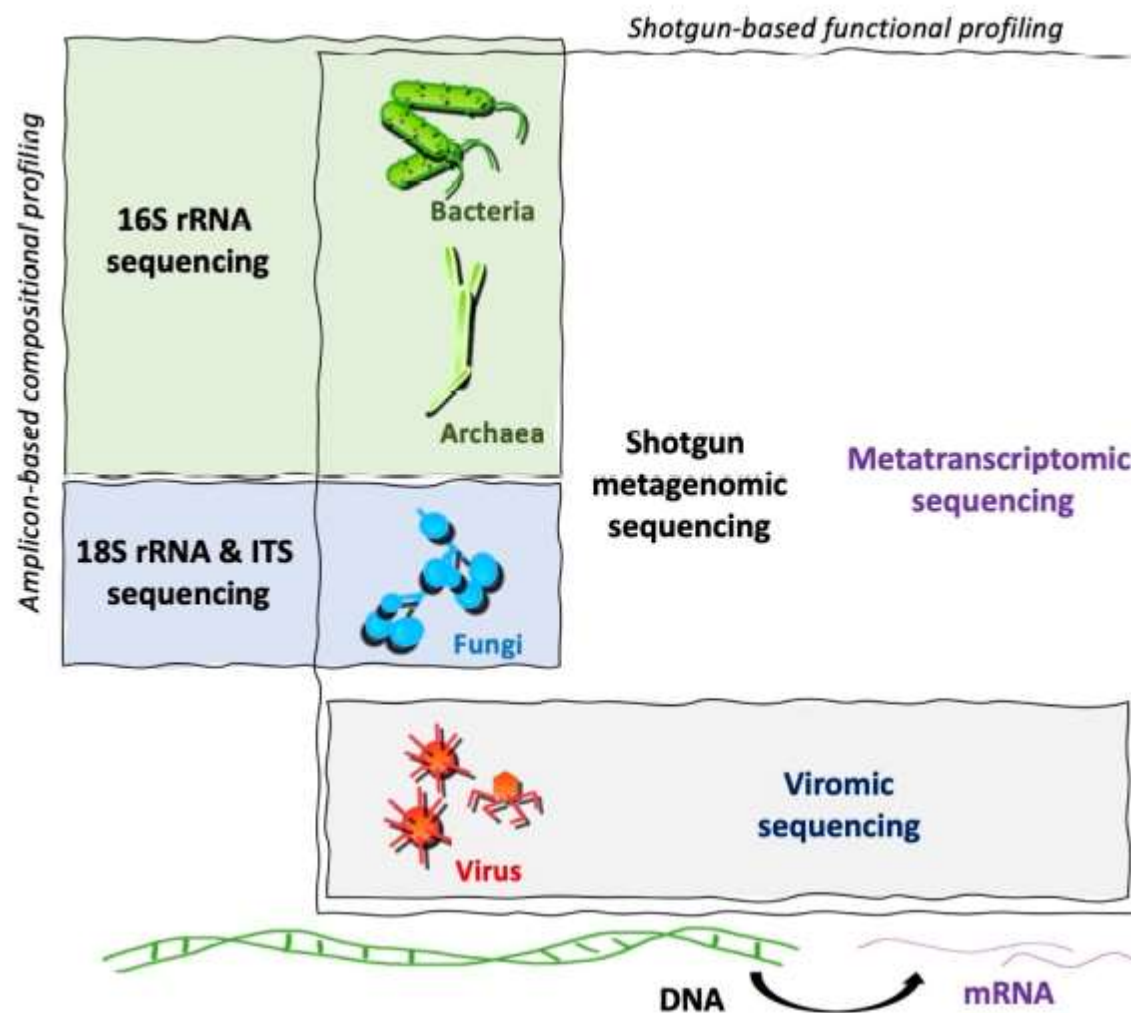
- **Konzervativní oblasti** (možnost návrhu „univerzálních“ primerů)
- **Variabilní oblasti** (databáze různých taxonů)



Analýza mikrobiálních populací

- **Metagenomika**
 - Detailní úroveň genetické informace
 - Náročné bioinformatické analýzy
 - Možné popsat i jiné mikroorganismy
 - viry
 - mikromycety
 - parazity
- **Metatranskriptomika (analýza mRNA)**
 - Poskytuje informace o jednotlivých exprimovaných genech
 - Náročná laboratorní část
 - Náročné zpracování vzorků

Analýza mikrobiálních populací




Analýza mikrobiálních populací

Metagenomika, metatranskriptomika, metabolomika mohou přinášet skvělé výsledky, avšak problémem je zpracování dat a klinická interpretace



Využití NGS – predikce ATB rezistence



nature
COMMUNICATIONS

ARTICLE

Received 17 Apr 2015 | Accepted 28 Oct 2015 | Published 21 Dec 2015

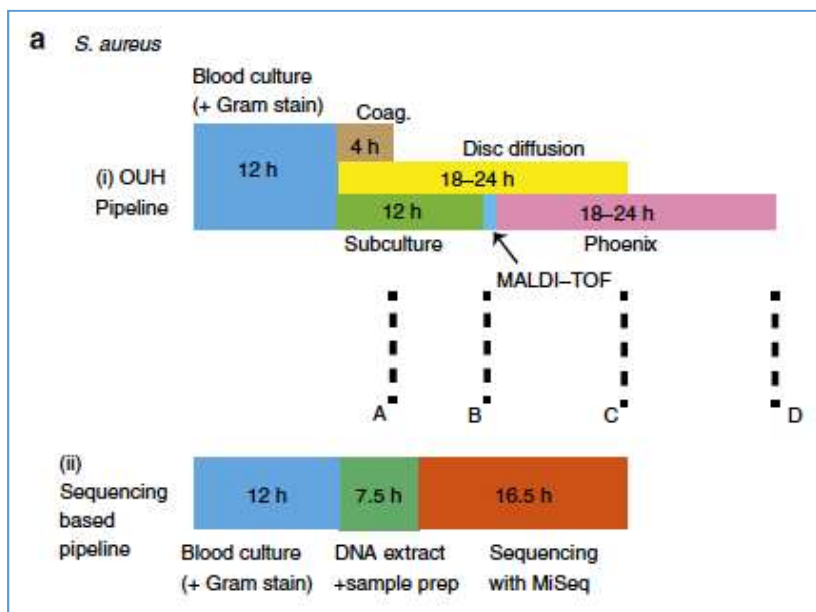
DOI: 10.1038/ncomms10063 OPEN

Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*

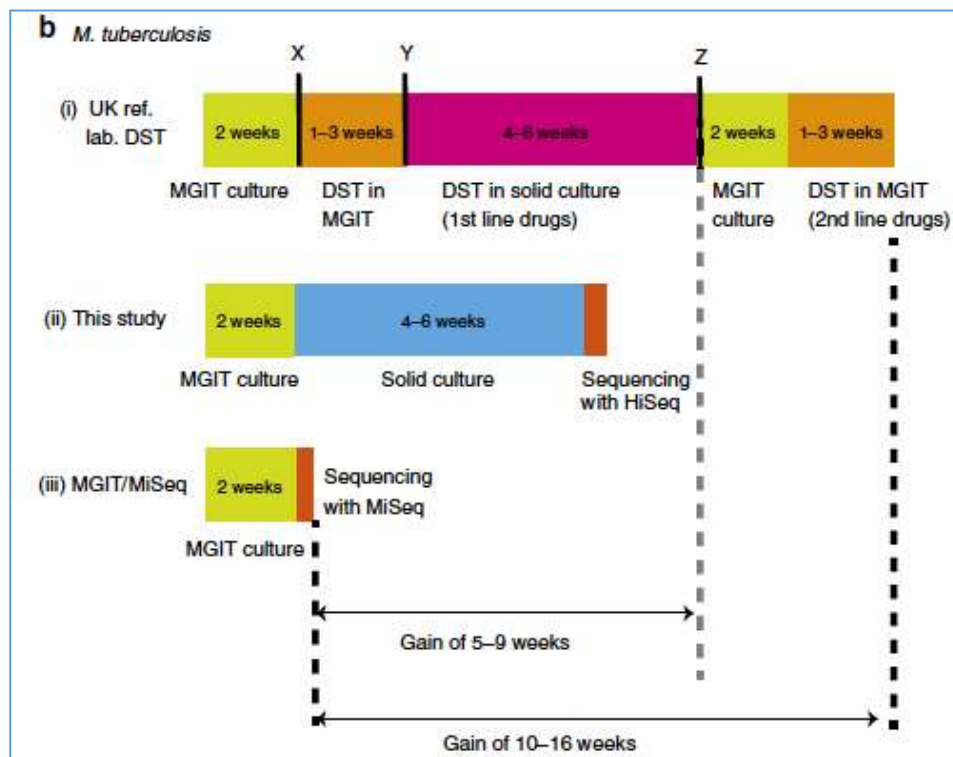
Phelim Bradley¹, N. Claire Gordon², Timothy M. Walker², Laura Dunn², Simon Heys¹, Bill Huang¹, Sarah Earle², Louise J. Pankhurst², Luke Anson², Mariateresa de Cesare¹, Paolo Piazza¹, Antonina A. Votintseva², Tanya Golubchik², Daniel J. Wilson^{1,2}, David H. Wyllie², Roland Diel³, Stefan Niemann^{4,5}, Silke Feuerriegel^{4,5}, Thomas A. Kohl⁴, Nazir Ismail^{6,7}, Shaheed V. Omar⁶, E. Grace Smith⁸, David Buck¹, Gil McVean¹, A. Sarah Walker^{2,9}, Tim E.A. Peto^{2,9}, Derrick W. Crook^{2,9,10} & Zamin Iqbal¹

Sekvenování nové generace a vyšetření citlivosti

Staphylococcus aureus



Mycobacterium tuberculosis



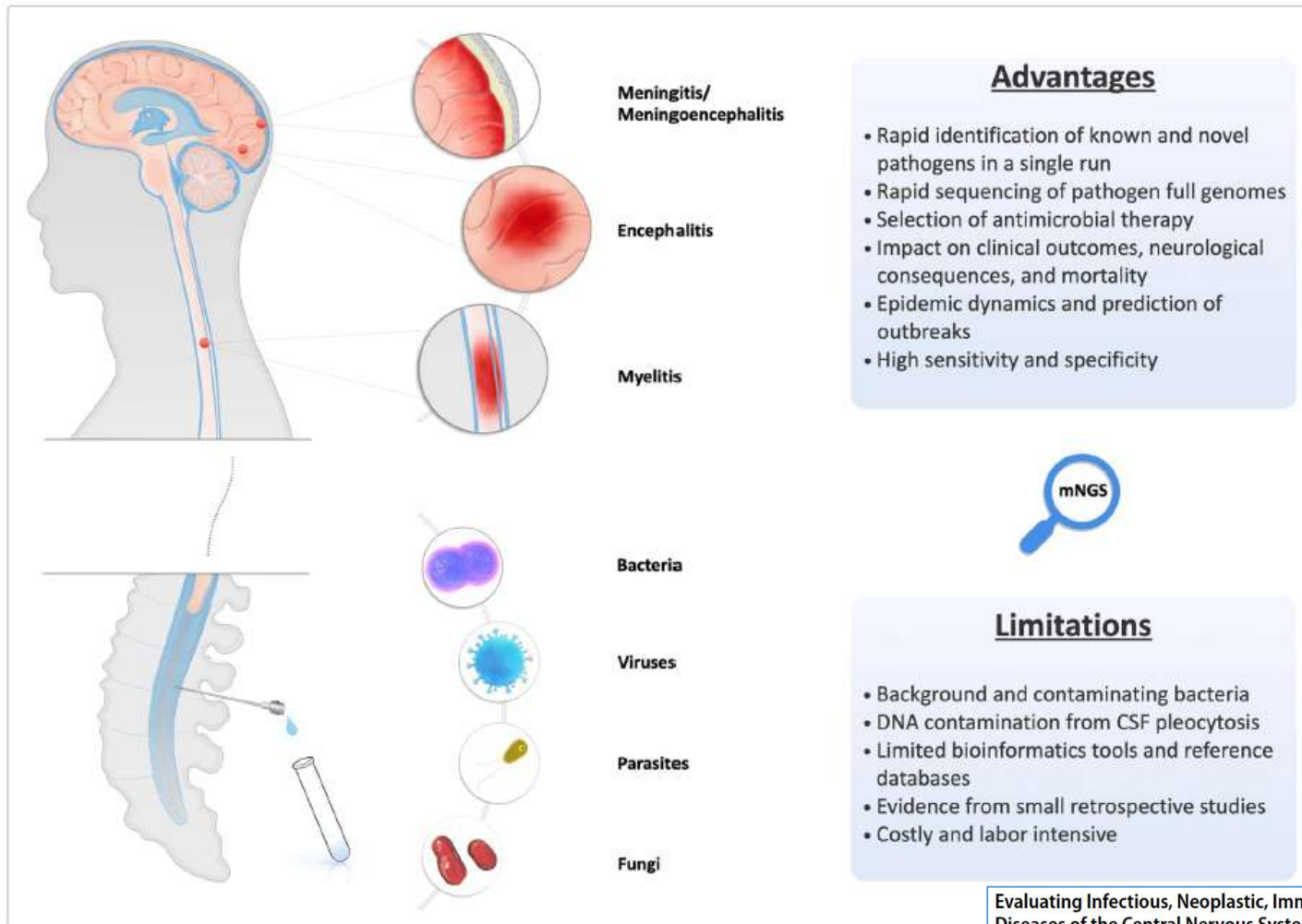
Sekvenování nové generace a vyšetření citlivosti

- Predikce pravděpodobnosti antibiotické rezistence

Detekce genů rezistence \Rightarrow predikce vysoké pravděpodobnosti rezistence

\nRightarrow predikce vysoké pravděpodobnosti citlivosti – NE - neplatí ekvivalence...

Využití pro vyšetření infekcí CNS



Evaluating Infectious, Neoplastic, Immunological, and Degenerative Diseases of the Central Nervous System with Cerebrospinal Fluid-Based Next-Generation Sequencing

Konstantinos I. Tsamis^{1,2} · Hercules Sakkas³ · Alexandros Giannakis¹ · Han Suk Ryu⁴ · Constantina Gartzonika³ · Ilias P. Nikas²

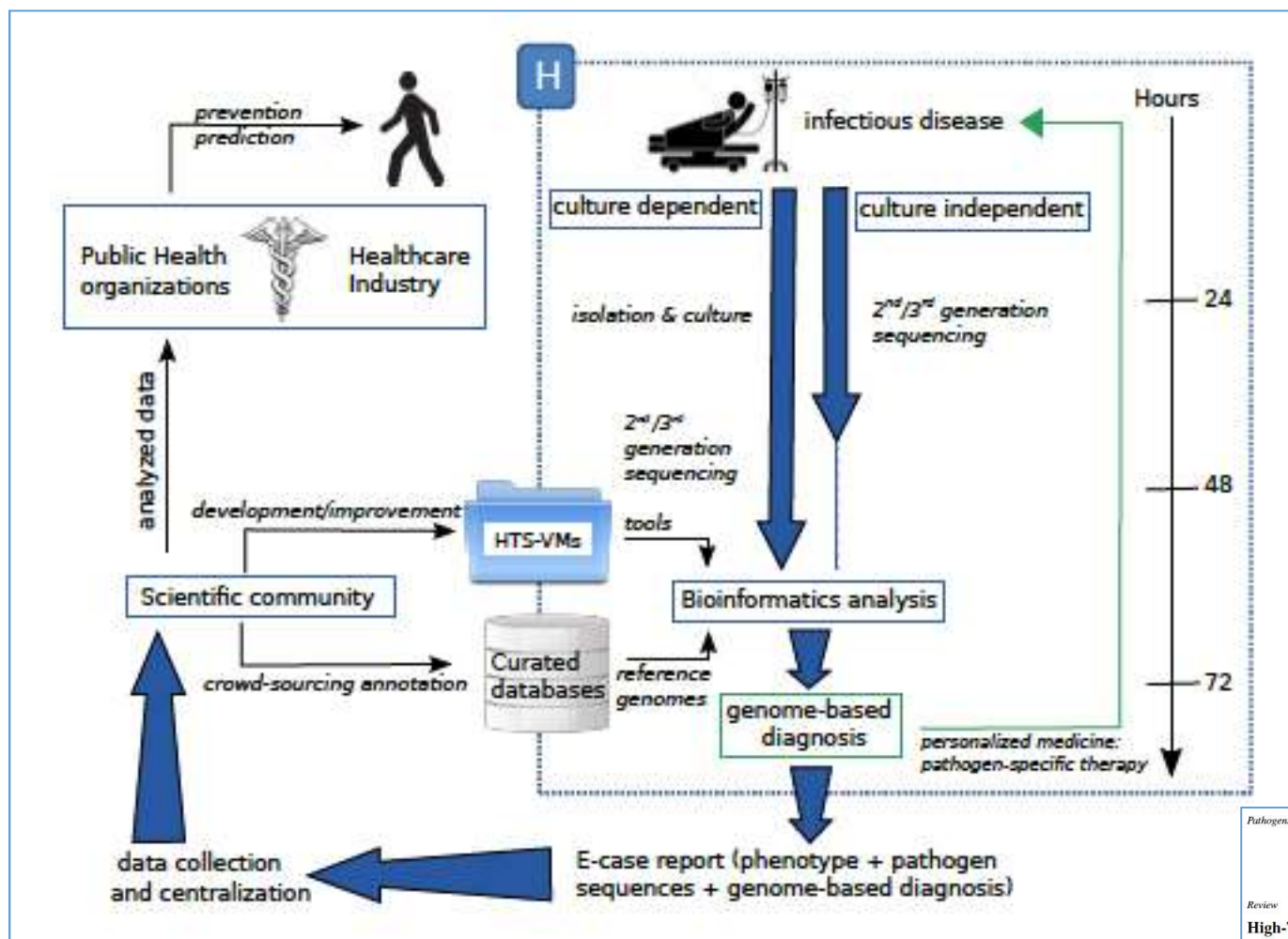
Sekvenování nové generace

- **Aplikace ve virologii**
- **Uplatnění v molekulární epidemiologii**
- Dosud poměrně drahé
- Pomalé (2-5 dní)
- **Naděje v případě sekvenace třetí generace (několik hodin)**
- Zásadní je interpretace dat – potřeba BIOINFORMATIKA, případně speciálních bioinformatických nástrojů



Závěr

Strategie v klinicko-mikrobiologické diagnostice



Pathogens 2014, 3, 258-279; doi:10.3390/pathogens3020258

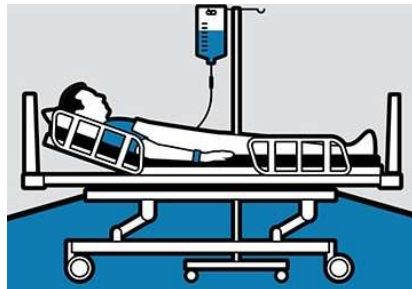
OPEN ACCESS
pathogens
 ISSN 2076-0817
 www.mdpi.com/journal/pathogens

Review

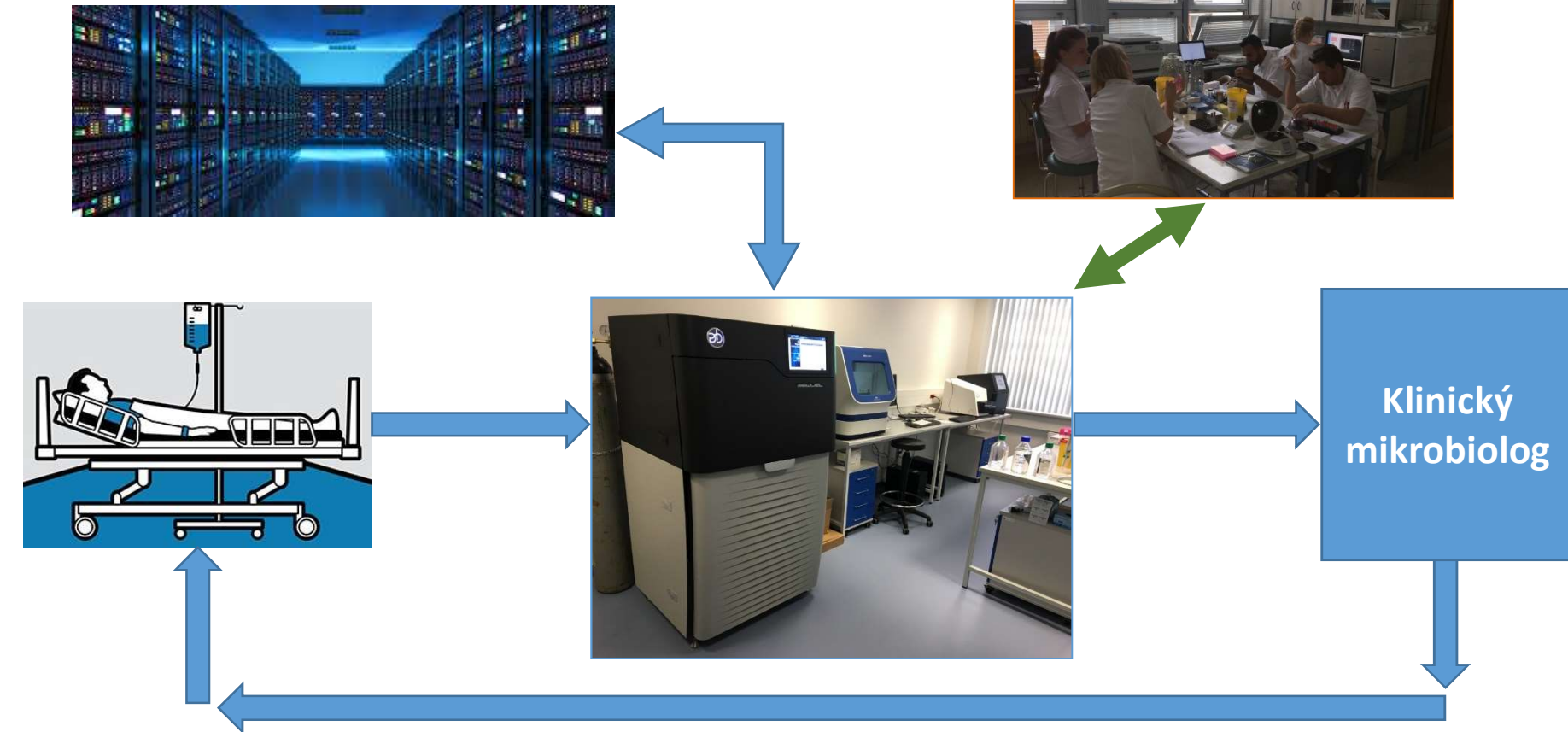
High-Throughput Sequencing, a Versatile Weapon to Support Genome-Based Diagnosis in Infectious Diseases: Applications to Clinical Bacteriology

Ségolène Caboche ^{1,4,*}, Christophe Audebert ^{2,4} and David Hot ^{1,3,4}

Výzkumná laboratoř

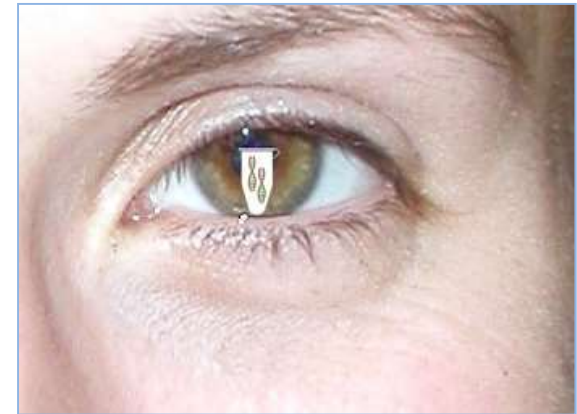
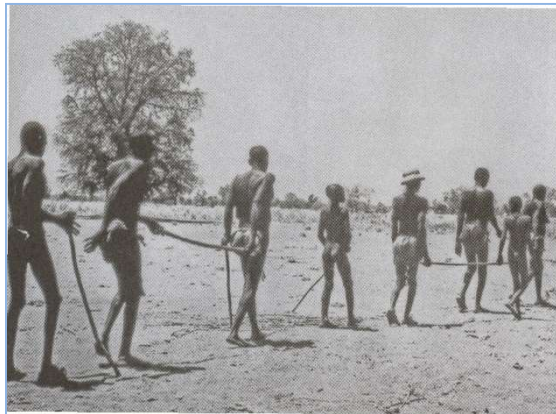


Klinický
mikrobiolog



Kam kráčí klinická mikrobiologie

- Mikrobiologická diagnostika zaznamenává bouřlivý rozvoj
- Vždy je však za vzorkem potřeba vidět pacienta
- Funkční metody mohou přispět k další personalizaci medicíny
- **Vývoj nových metod klinické virologie**



Sekvenování DNA

<https://www.youtube.com/watch?v=vK-HIMaitnE> – Sanger sequencing

<https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8> - Illumina

<https://www.youtube.com/watch?v=E9-Rm5AoZGw> – Nanopore

<https://www.youtube.com/watch?v=v8p4ph2MAvI> – Pacific Biosciences

