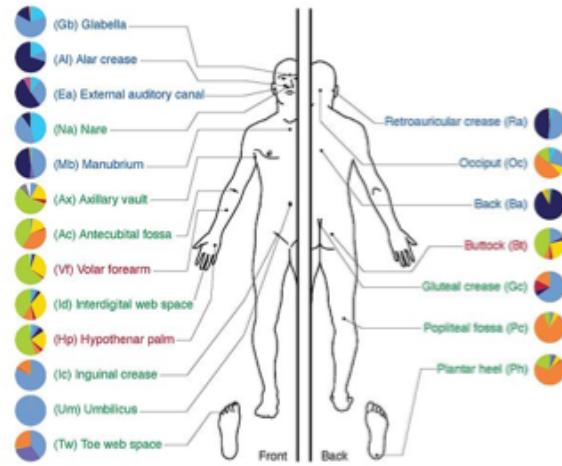




Microbiota analyse in de routine diagnostiek

Stefan Boers

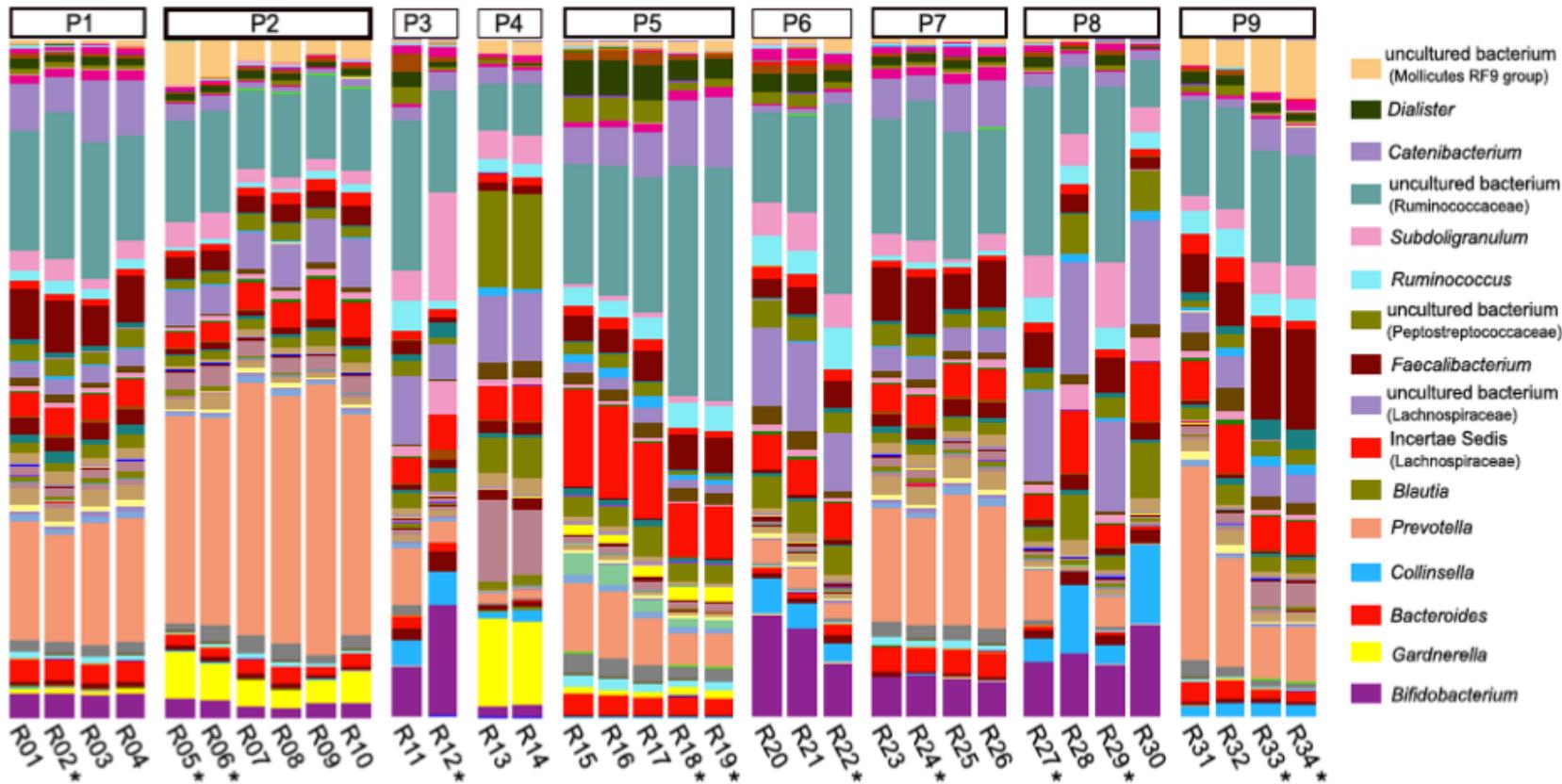
2018-01-09



Microbiota analyse

- Geeft veel inzicht in de microbiële diversiteit en taxonomie binnen ecosystemen
 - middels een 16S rRNA gen sequencing benadering
- Vele beweringen van associaties tussen de menselijke microbiota en ziekte
 - Bijvoorbeeld: obesitas, diabetes, en psychische aandoeningen
- Het **ontbreken van een gevalideerd protocol** belemmert de implementatie in klinische diagnostiek

Rondzending

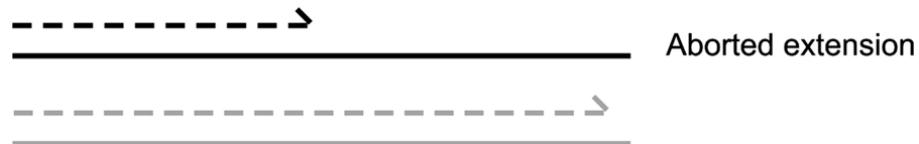


Microbiota analyse – de traditionele manier

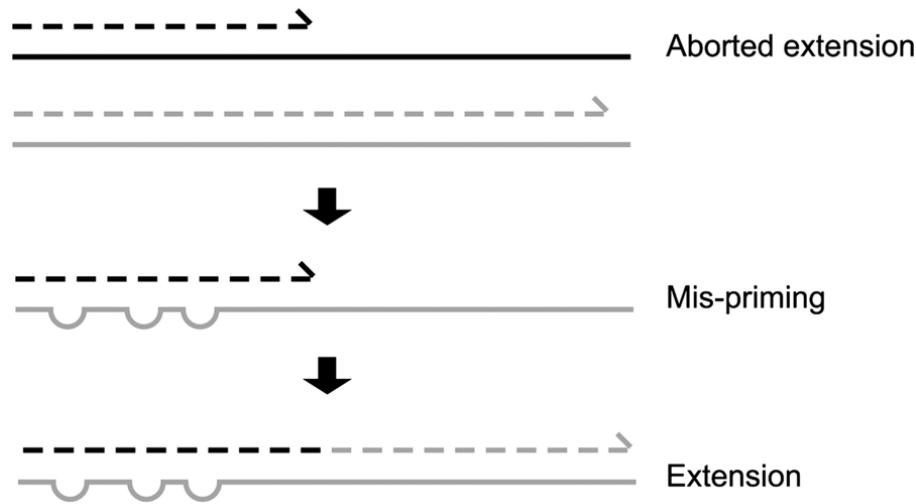


- PCR wordt uitgevoerd in een enkel reactievolume (1 compartiment)
 - Competitie als gevolg van ongelijke efficiëntie van 16S rRNA gen amplificaties
 - Gevoelig voor chimeervorming

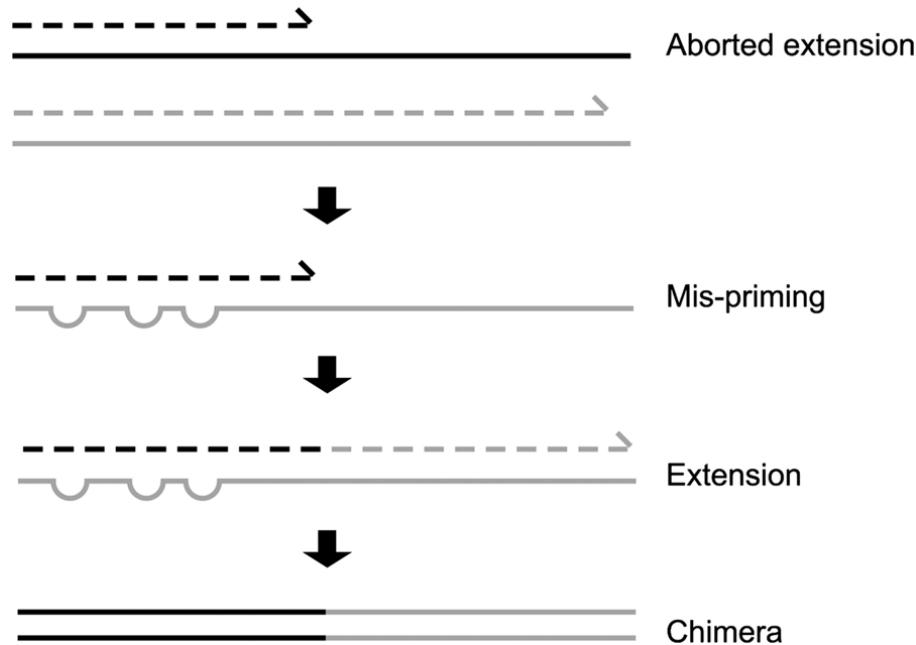
Het ontstaan van chimeren



Het ontstaan van chimeren

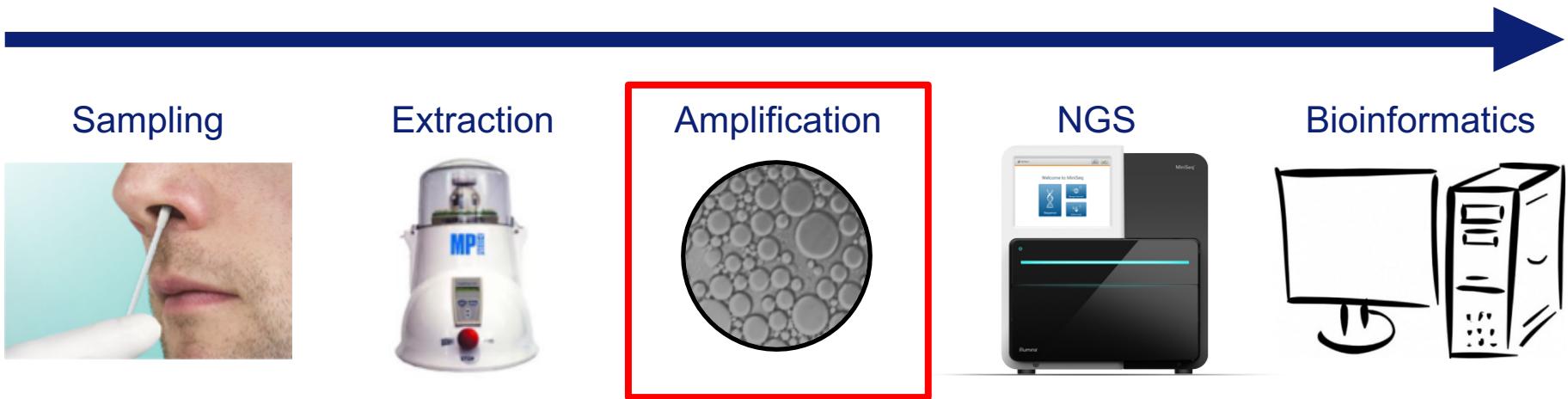


Het ontstaan van chimeren



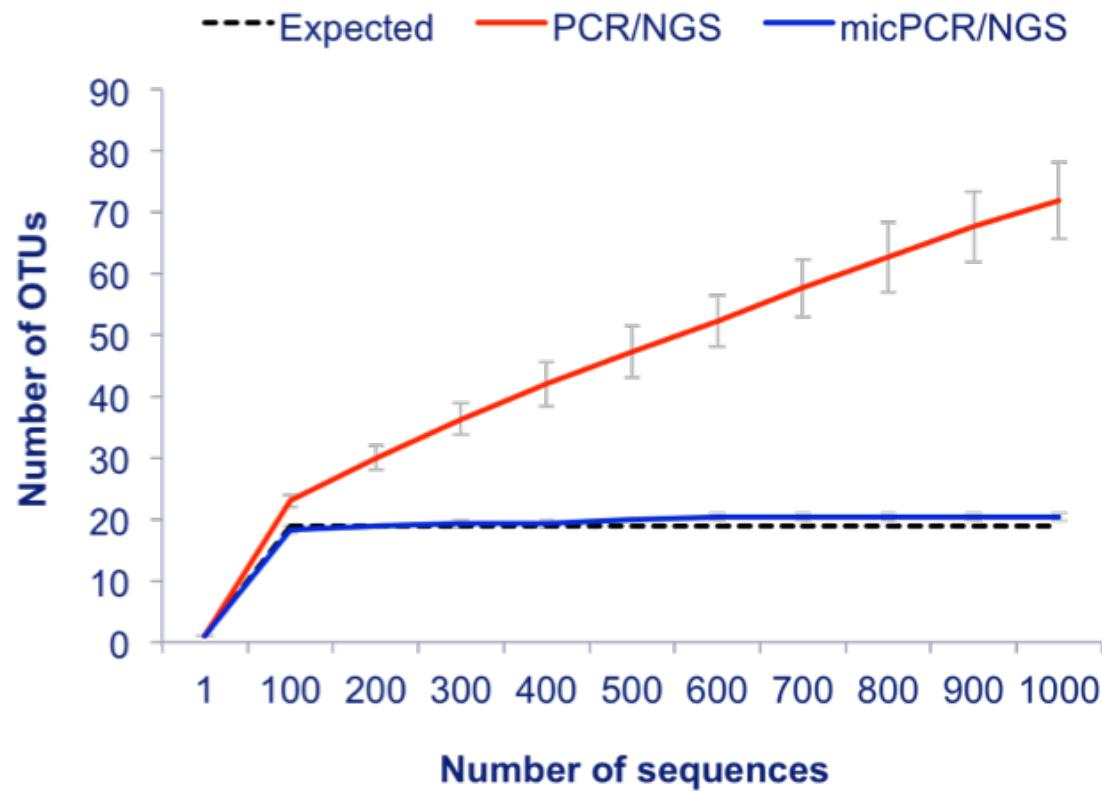
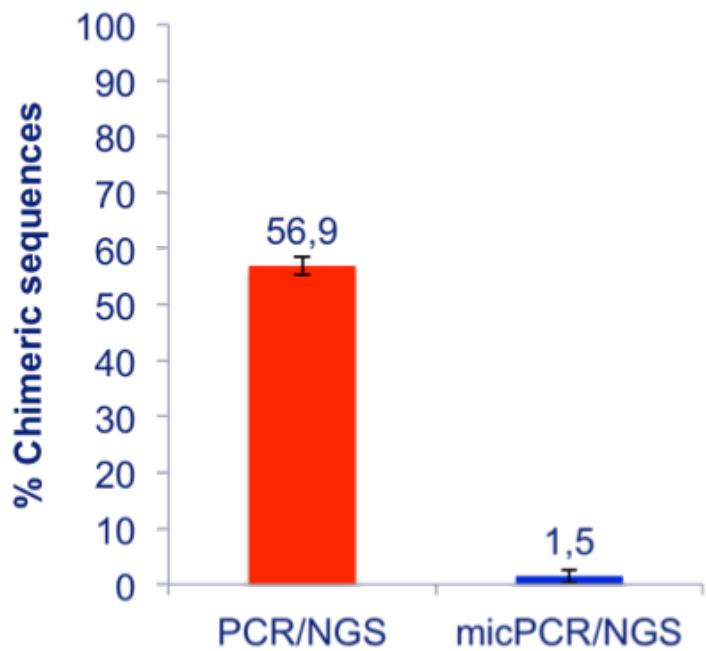
10 – 60% van de resultaten gebaseerd op foutieve taxonomische identificatie

Microbiota analyse – de micelle manier



- Elk DNA molecuul wordt **individueel** geamplificeerd ($\sim 10^{10}$ compartimenten)
 - Niet gevoelig voor chimeervorming en PCR competitie
 - Toevoeging van een **interne controle** om resultaten uit te drukken in 16S rRNA gen kopieën
 - Verbeterd de standaardisatie van microbiota analyses

Chimeren



PCR competitie

Bacterial Species	Expected	PCR/NGS	micPCR/NGS
<i>Clostridium beijerinckii</i>	0,00	1,31	0,67
<i>Bacteroides vulgatus</i>	0,00	1,10	0,04
<i>Neisseria meningitidis</i>	0,00	0,89	0,18
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,00	0,57	0,87
<i>Streptococcus mutans</i>	0,00	0,38	0,27
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0,00	0,31	0,00
<i>Deinococcus radiodurans</i>	0,00	0,13	-0,65
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,00	-0,02	0,38
<i>Staphylococcus aureus/epidermidis</i>	0,00	-0,16	0,40
<i>Propionibacterium acnes</i>	0,00	-0,19	0,11
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	0,00	-0,64	-1,26
<i>Bacillus cereus</i>	0,00	-0,84	0,56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,00	-0,87	-0,17
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,00	-1,05	-0,62
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,00	-1,33	-0,23
<i>Escherichia coli</i>	0,00	-1,41	-0,20
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,00	-2,30	-1,80
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0,00	-3,39	-1,88
<i>Helicobacter pylori</i>	0,00	-4,98	-1,24

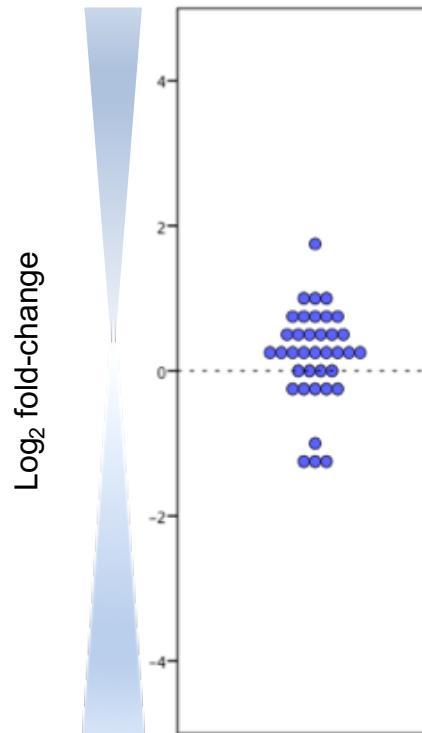
Interne controle

- Sample + 100 16S rRNA gen kopieen van *Synechococcus*

OTU	NGS reads
<i>Clostridium</i>	200
<i>Staphylococcus</i>	300
<i>Haemophilus</i>	100
<i>Moraxella</i>	400
<i>Synechococcus</i>	80

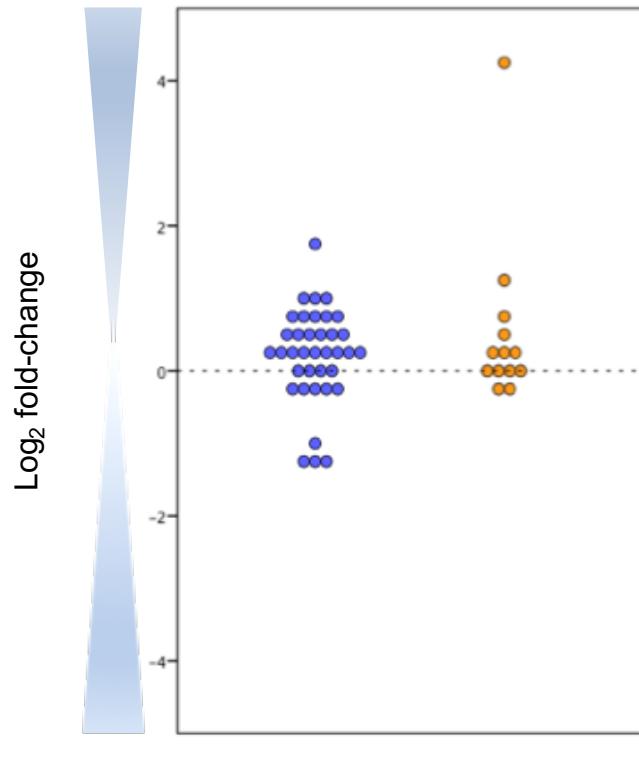
- Triplo experimenten om de nauwkeurigheid te verbeteren

Kwantificatie



- Totale biomassa kwantificatie (n=37)
 - Factor 1,16 verschil met 16S rRNA gen qPCR

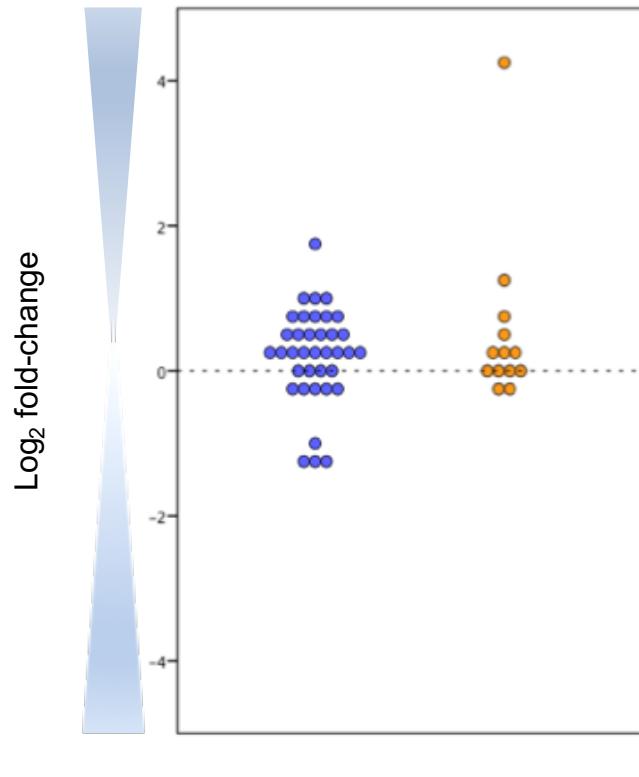
Kwantificatie



- Totale biomassa kwantificatie (n=37)
 - Factor 1,16 verschil met 16S rRNA gen qPCR

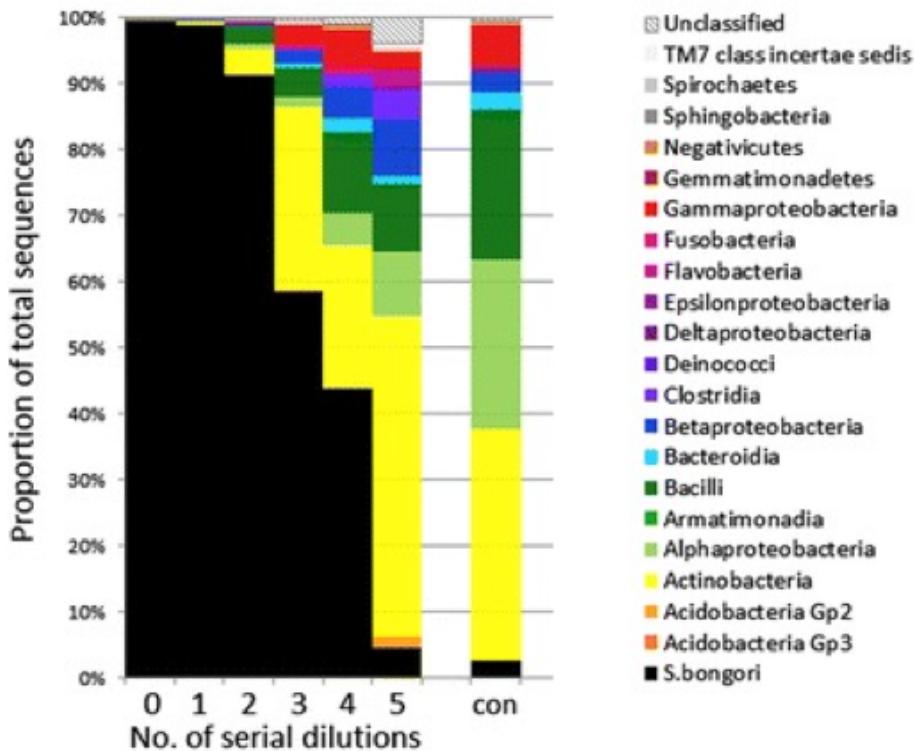
- Specifieke biomassa kwantificatie (n=13)
 - Factor 1,20 verschil met *S. aureus* qPCR
 - 1 uitbijter met een factor 20 verschil

Kwantificatie



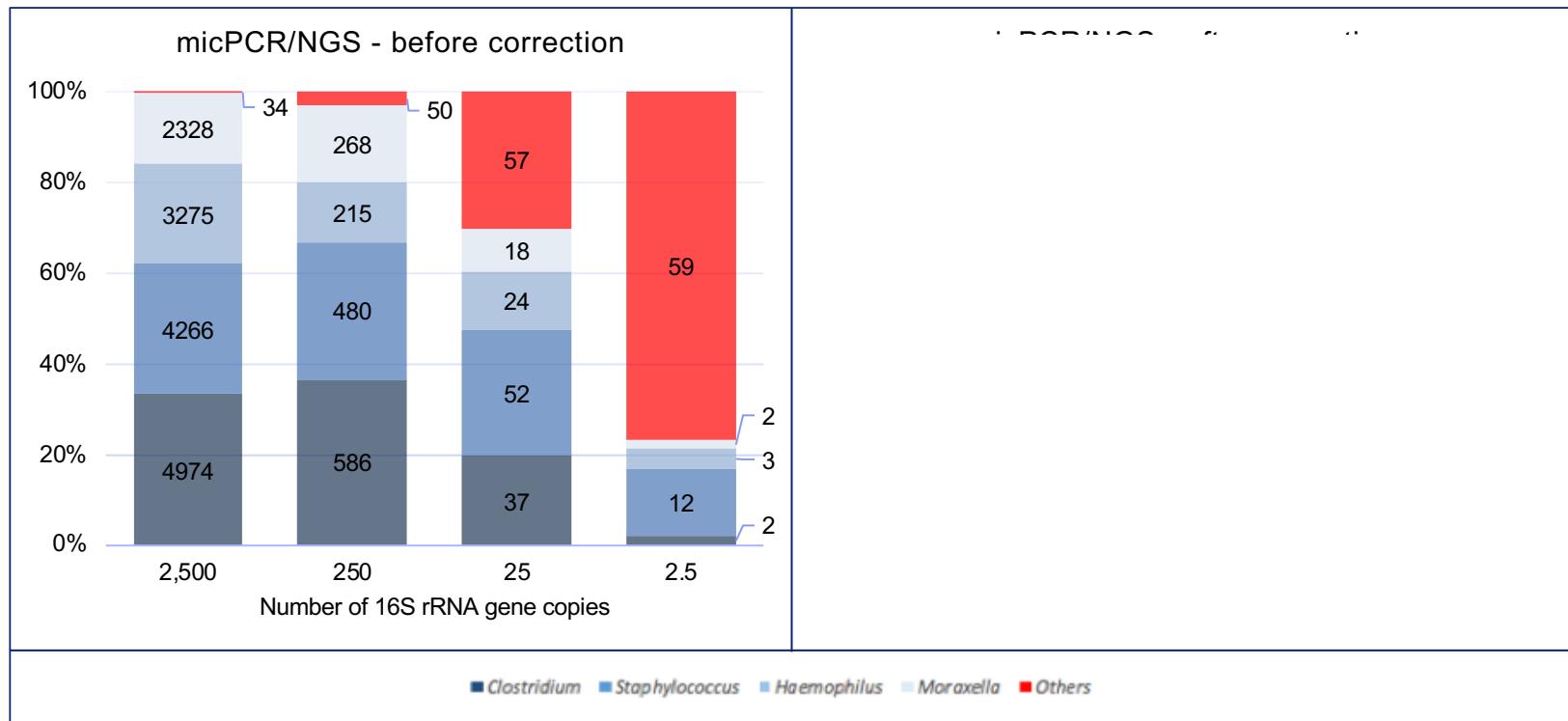
- Totale biomassa kwantificatie (n=37)
 - Factor 1,16 verschil met 16S rRNA gen qPCR
- Specifieke biomassa kwantificatie (n=13)
 - Factor 1,20 verschil met *S. aureus* qPCR
 - 1 uitbijter met een factor 20 verschil
- Combinatie van micPCR en qPCR data voor species-specifieke microbiota analyse

Achtergrond DNA



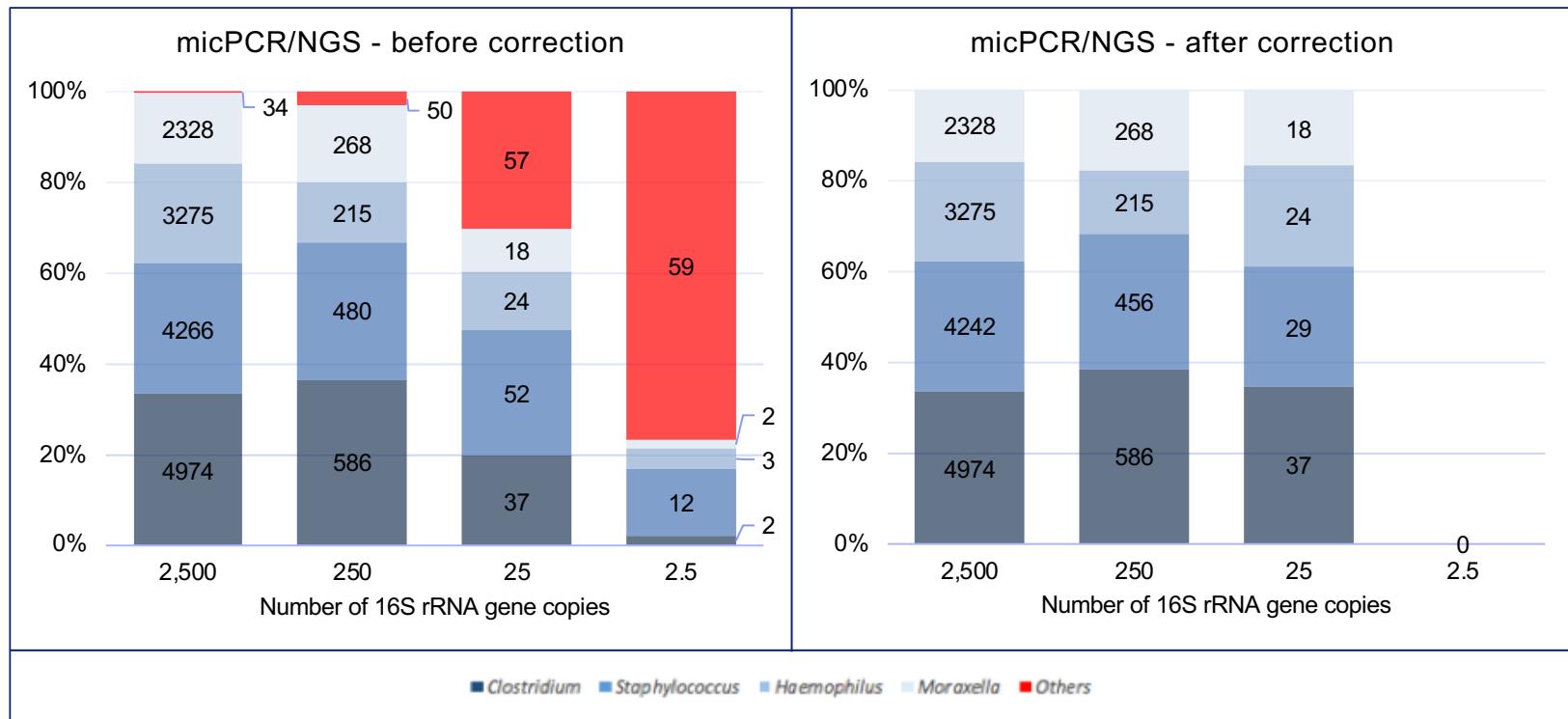
- Micelle PCR maakt achtergrond DNA subtractie mogelijk middels negatieve controles

Achtergrond DNA



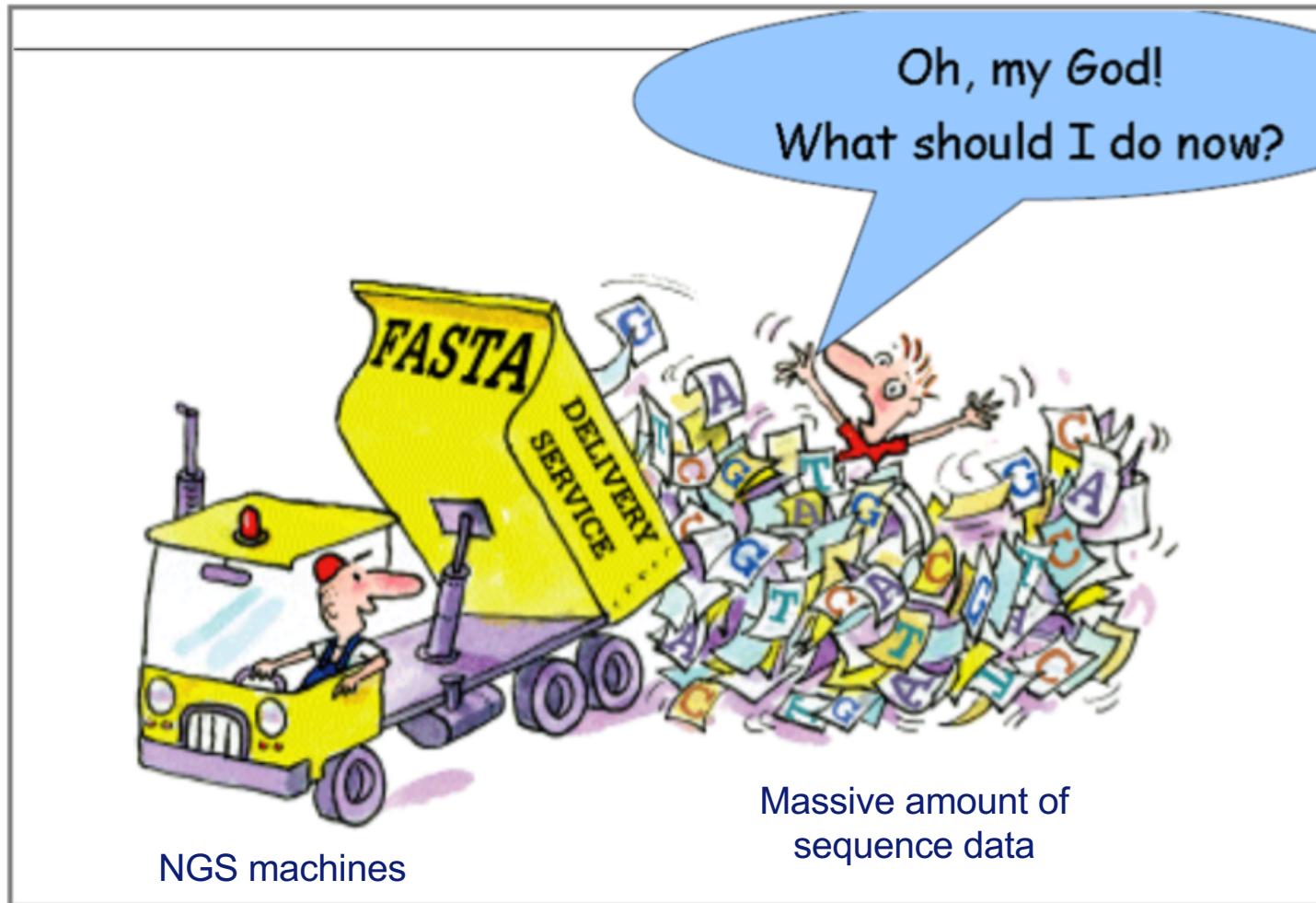
114 verschillende OTUs aangetoond

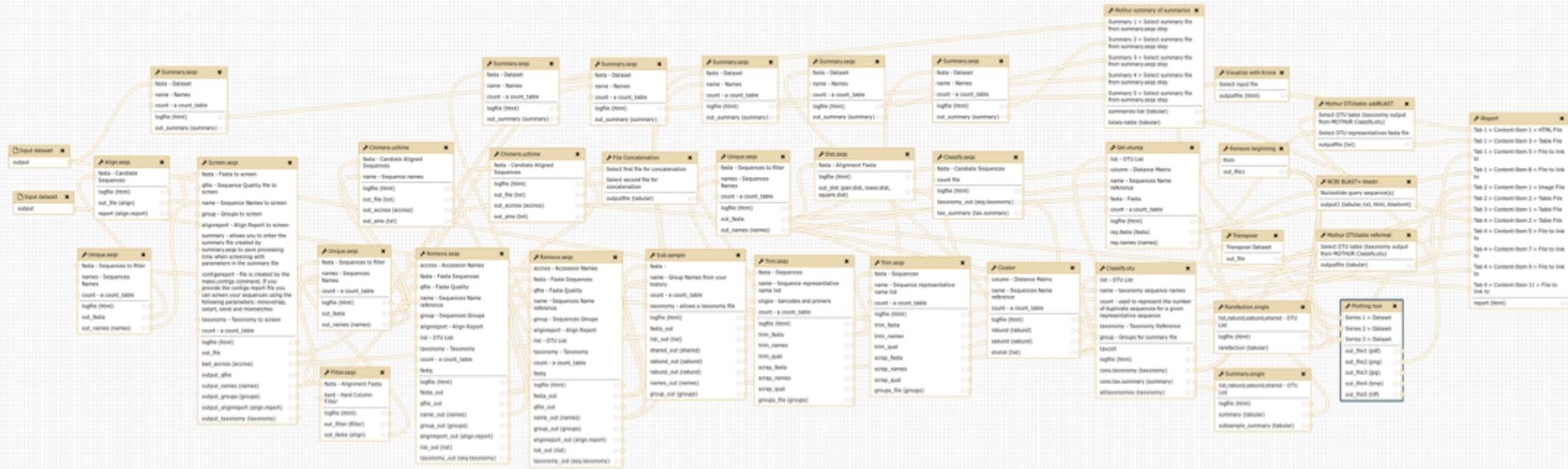
Achtergrond DNA



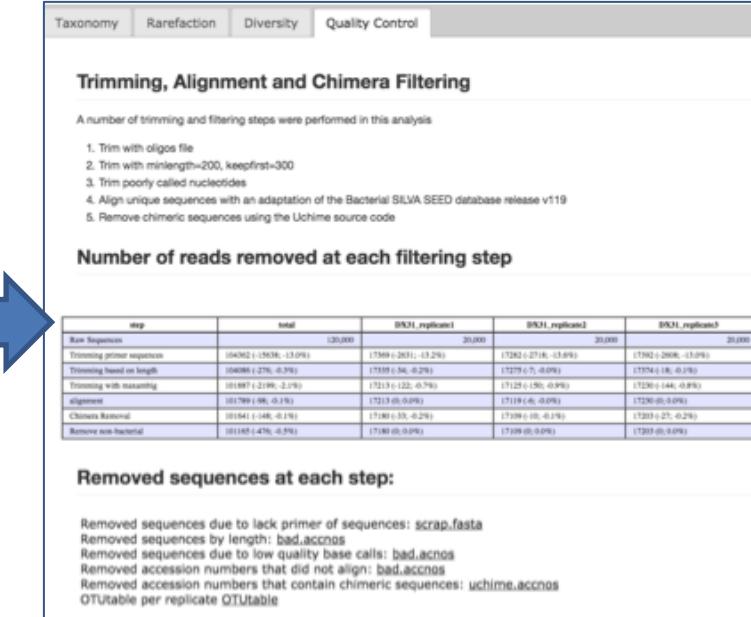
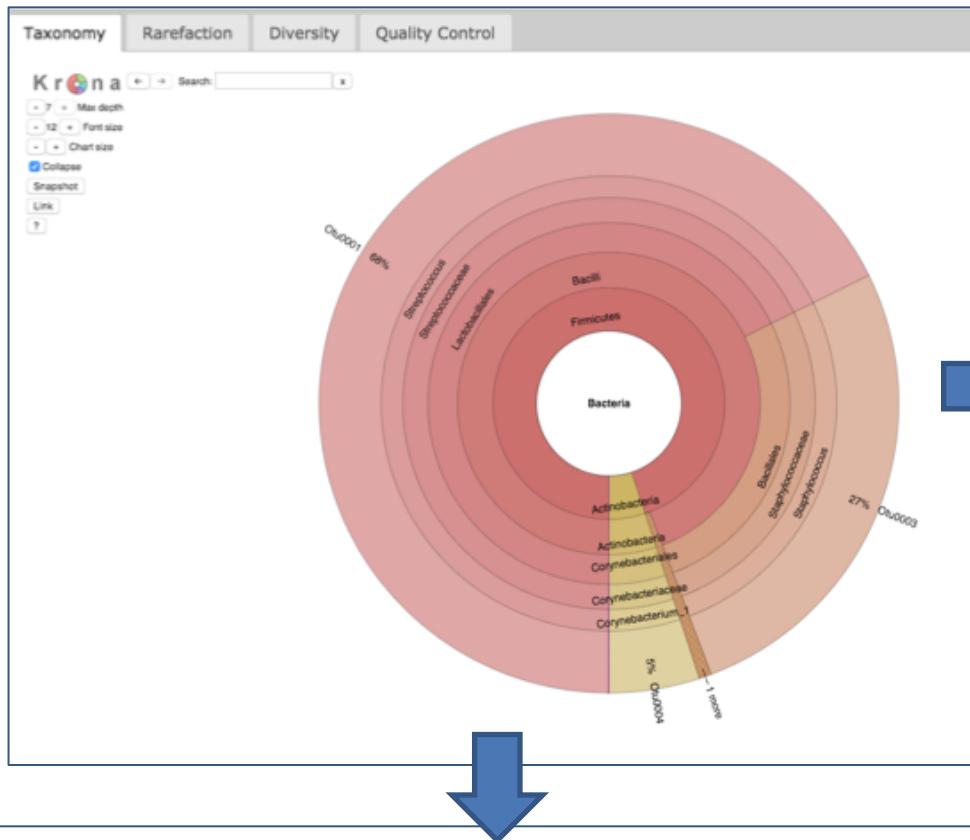
114 verschillende OTUs aangetoond

Data analyse





- Vertaling van een **gevalideerde** workflow in een gebruiksvriendelijke pipeline
- 'Plug and Play' – gebruiker selecteert input files en drukt op Execute!
- iReport rapportage



Show 10 entries

Search:

OTU	DX31	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	BLAST
Otu0001	8566	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	send to BLAST
Otu0003	3359	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	send to BLAST
Otu0004	639	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium_1	send to BLAST
Otu0025	16	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Family_XI	Finegoldia	send to BLAST
Otu0032	72	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Family_XI	Anaerococcus	send to BLAST

Showing 1 to 5 of 5 entries

Previous [Next](#)

... maakt de implementatie van microbiota diagnostiek mogelijk in de klinische laboratoria



- >100 klinische samples verwerkt en vergeleken met routine kweekresultaten

Voorbeeld: post-operatieve wond

					
Taxonomy	CFU	%	Taxonomy	16S copies	%
Huidflora	+	33%	Anaerobe bacteriën (12)	251.692	87%
			<i>Streptococcus</i>	30.408	10%
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	67%	<i>Staphylococcus aureus</i> *	8.960	3%

- Identificeer en kwantificeer anaerobe bacteriën net zo gemakkelijk als aerobe bacteriën

Voorbeeld: gewrichtsvochten

- Samples afkomstig van patiënten met vermoedelijke septische artritis (n=19)
- MYcrobiota **confirmde** 12/19 kweek-negatieve resultaten
- MYcrobiota detecteerde bacterieel DNA in 7/19 kweek-negatieve samples:
 - *Parvimonas*, *Prevotella*, *Ruminococcus*,
 - *Kingella* -> geconfermeerd met *Kingella kingae* specifieke PCR
 - *Ureaplasma*,
 - *Enterococcus*, *Turicella*.

Conclusies

- MYcrobiota biedt zeer nauwkeurige kwantitatieve microbiota analyses
- Verbetert de standaardisatie van microbiota analyse door de kwantitatieve benadering
- Zeer geschikt voor de verwerking van samples met een lage biomassa
- Microbiota analyse toegankelijk zonder bioinformatica expertise
- iReports zijn relatief kleine bestanden (download, delen, bewaren)

MYcrobiota maakt de implementatie van microbiota diagnostiek mogelijk

...Huh, ik?.... Vragen?...eh!...

