

22. TÜRK KLİNİK MİKROBİYOLOJİ VE
İNFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ

9-12 Mart 2022

Gloria Golf Resort Belek Antalya



Mikrobiyata Çalışmaları: Nasıl Planlayalım? Nasıl Yorumlayalım?

Dr. Mert Ahmet KUŞKUCU

İ.U-C, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi, KUISCID

Flora ; Mikrobiyota; Mikrobiyom

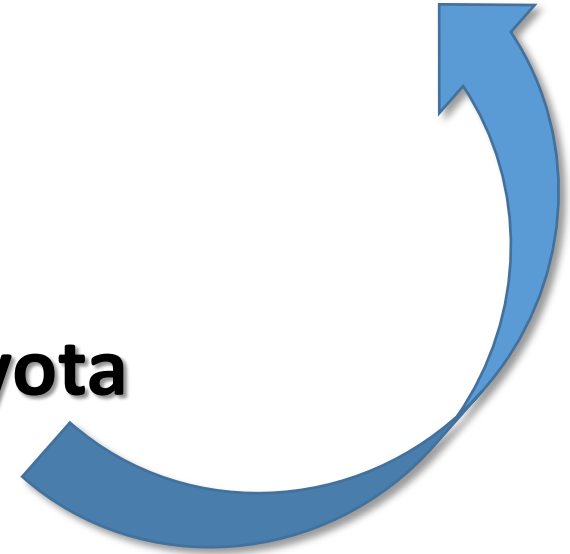
- Örnek insan barsağı;

- Bakteriler
- Archaealar
- Mantarlar
- Ekaryot mikroplar (Blastocystis gibi)
- Viruslar/fajlar

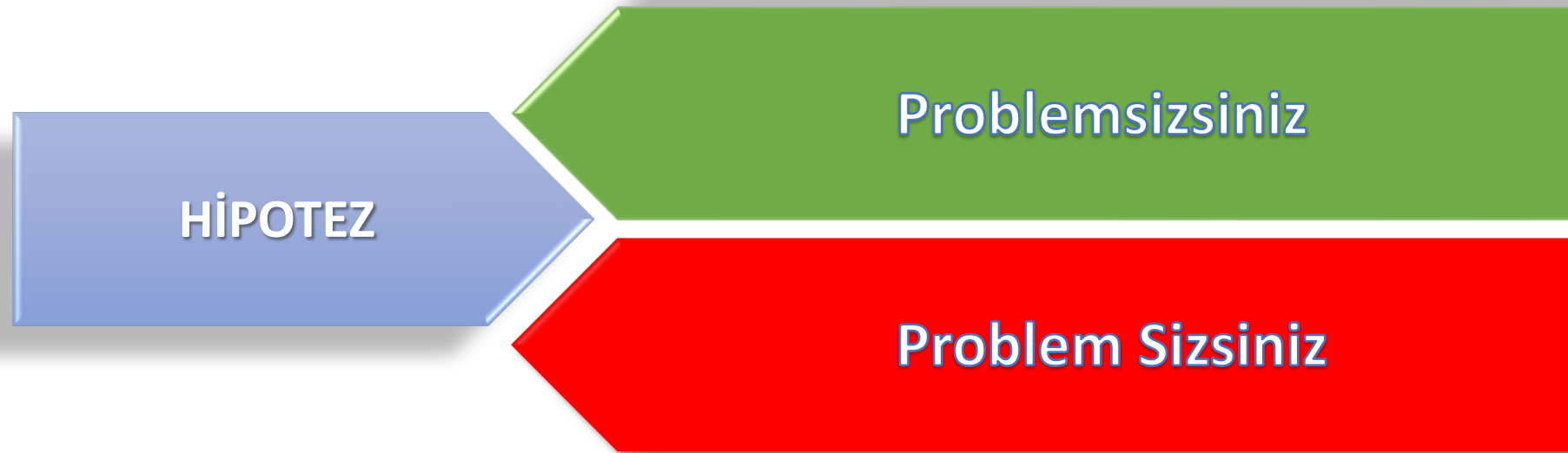


Mikrobiyota

Mikrobiyom



Mikrobiyata Çalışmaları: Nasıl Planlayalım?





**Örnek
Alma**



Depolama



Taşıma



**DNA/RNA
Eldesi**

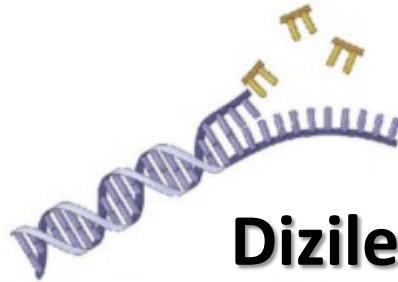
HİPOTEZ



Biyoinformatik

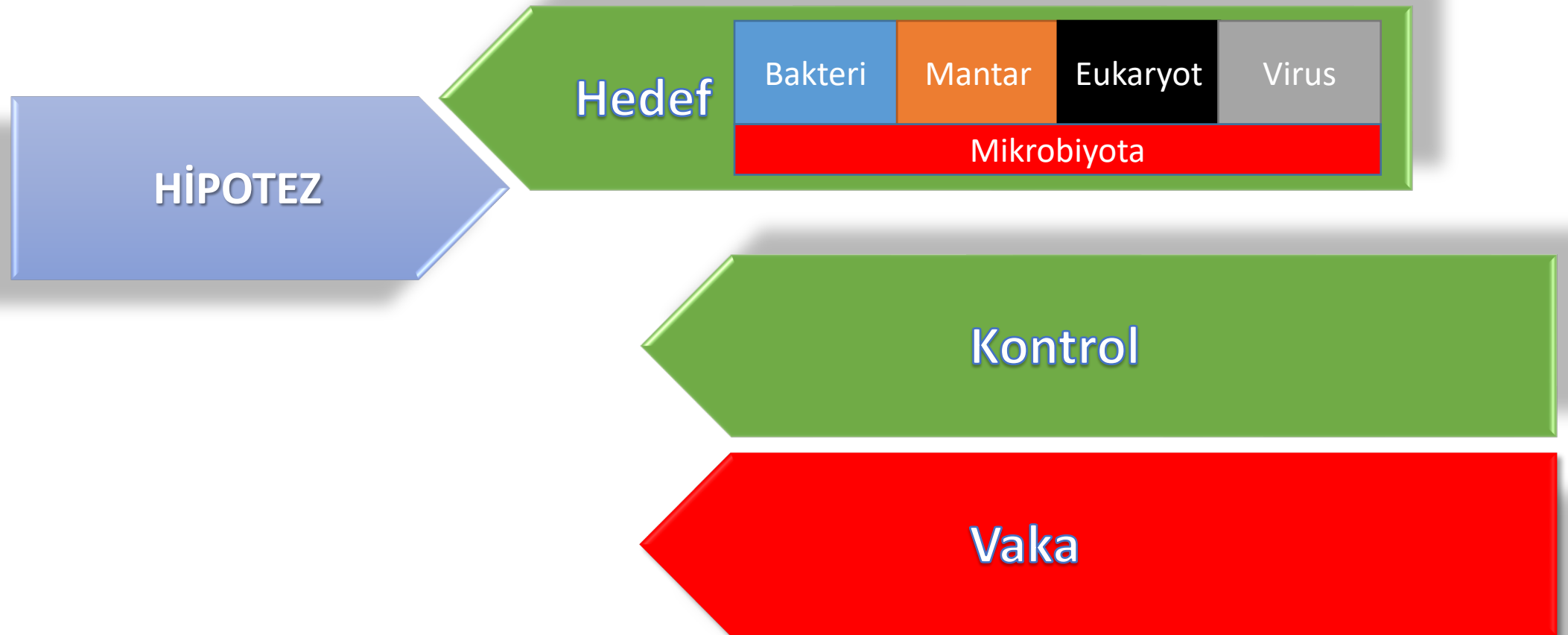


**Dizileme için
Kütüphane Oluşturma**



Dizileme

Mikrobiyata Çalışmaları: Nasıl Planlayalım?





**Örnek
Alma**



Depolama



Taşıma

- Antibiyotik kullanımı

- .
- .
- .
- .
- .
- .
- .





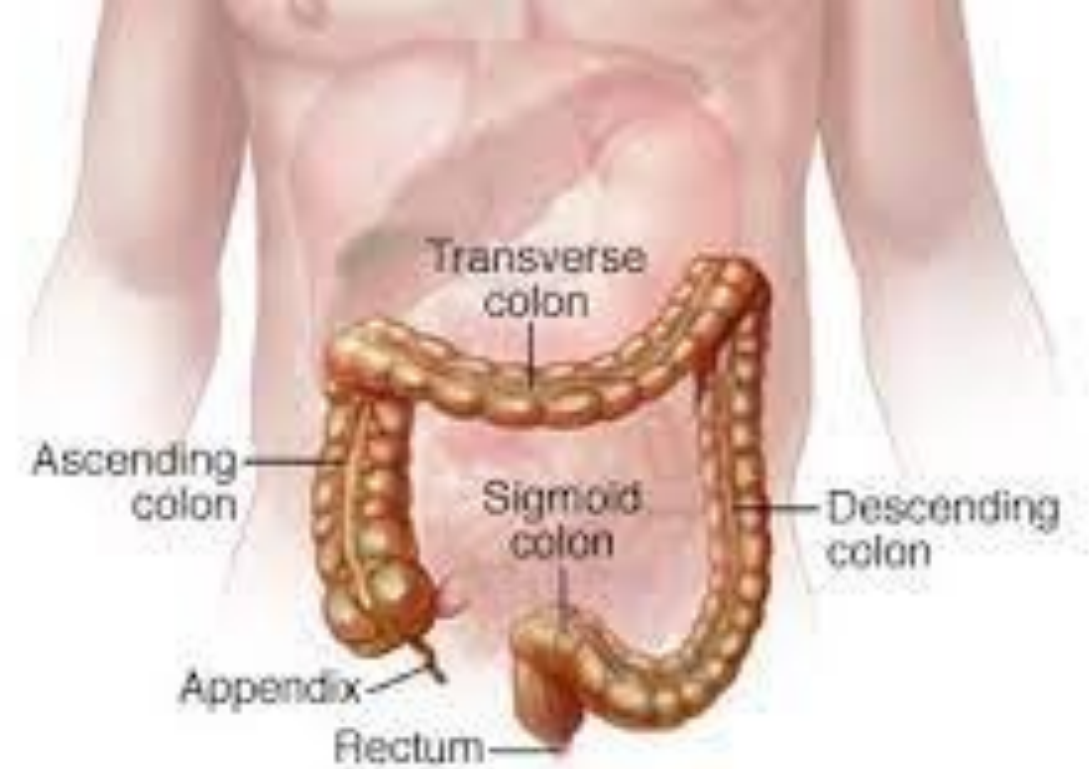
**Örnek
Alma**



Depolama



Taşıma





Örnek Alma



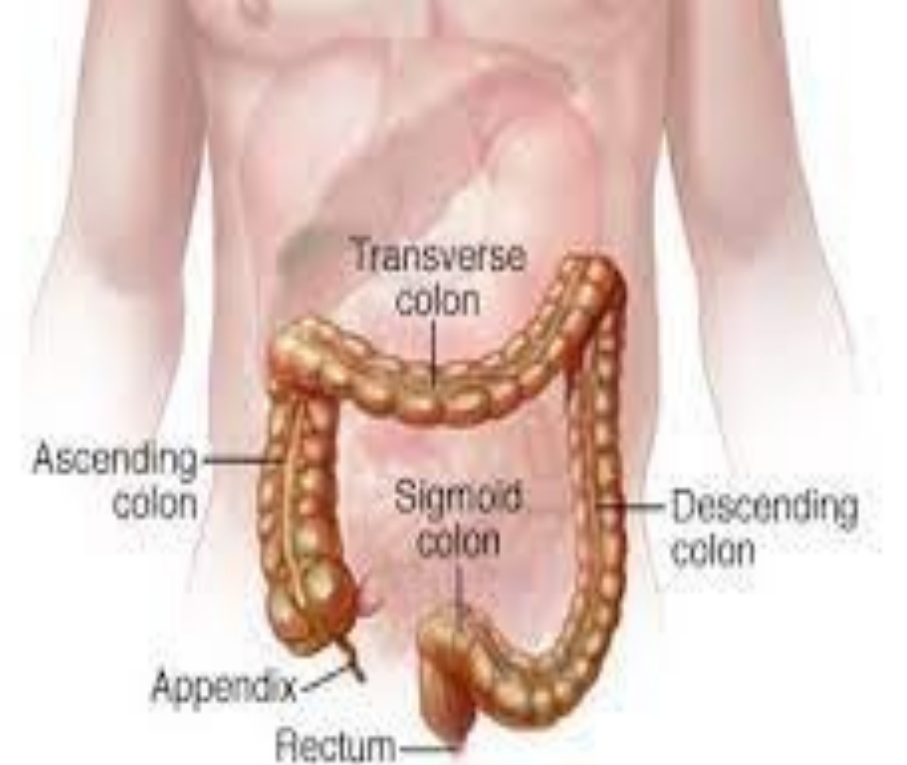
Depolama



Taşıma

Barsak mikrobiyota çalışmalarında

- bağırsakta belirli bir bölgede mukoza ve lümenin mikrobiyomları bakımından birbirinden farklı olduğu
- mikrobiyomun, esasen mide ve ince bağırsak olmak üzere, bağırsak uzunluğu boyunca önemli ölçüde değiştiği
- kalın bağırsakta tamamen farklı olduğu unutulmamalıdır.



[Contraception](#). Author manuscript; available in PMC 2018 Sep 1.

PMCID: PMC5701660

Published in final edited form as:

NIHMSID: NIHMS889217

[Contraception](#). 2017 Sep; 96(3): 189–195.

PMID: [28624570](#)

Published online 2017 Jun 15. doi: [10.1016/j.contraception.2017.05.017](#)

Effects of intrauterine contraception on the vaginal microbiota

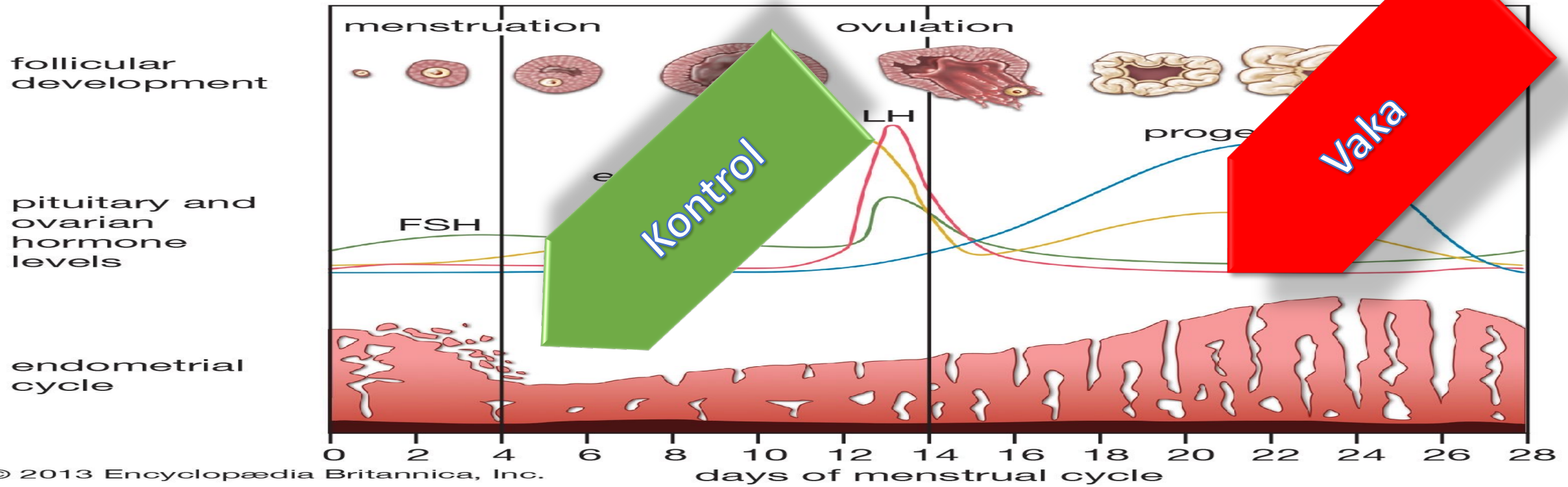
[Christine M. Bassis](#),^a [Jenifer E. Allsworth](#),^b [Heather N. Wahl](#),^c [Daniel E. Sack](#),^a [Vincent B. Young](#),^{a,d} and
[Jason D. Bell](#)^c

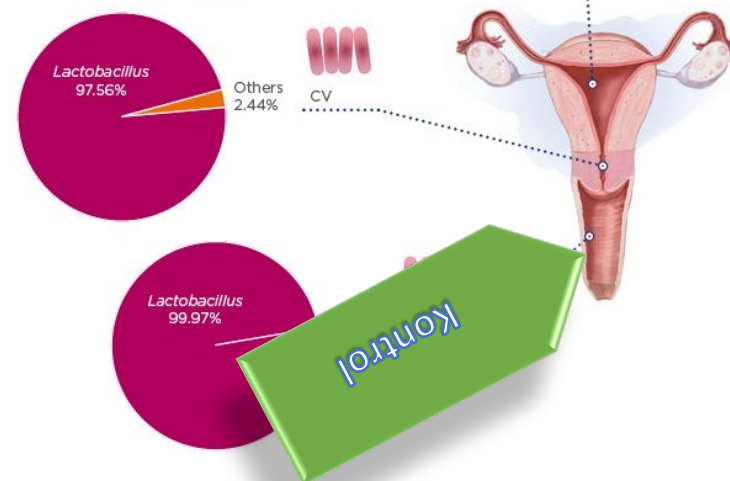
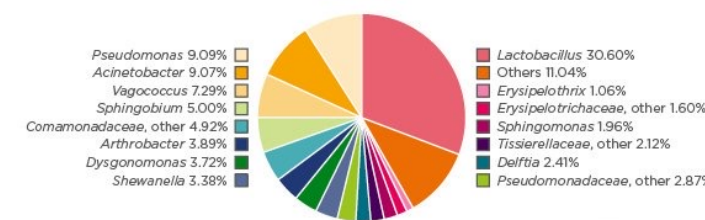
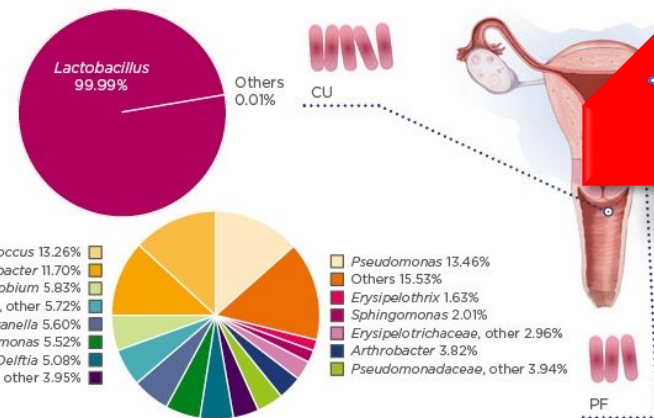
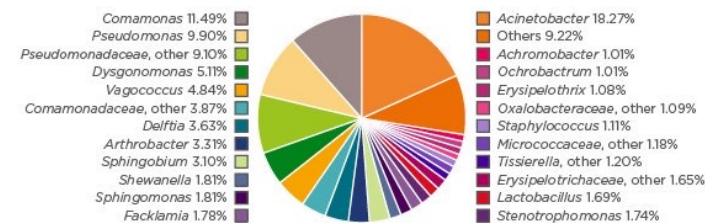
Vaka Kontrol Seçimi

The menstrual cycle

follicular phase

luteal phase

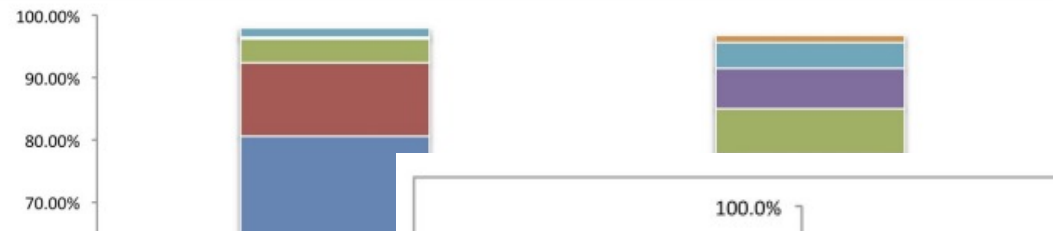




Örnek; Vaka – Kontrol Seçimi

- Kısacası, mükemmel bir yöntem yoktur çünkü seçim
 - fizibiliteye,
 - maliyete,
 - hastanın kabulüne
 - mikrobiyomu analiz için kullanılacak yöntemle
 - .
 - .
 - .





tion of the synovial

Limitations

Bacterial DNA was identified in 14/16 patients with RA, and in all disease free controls whereas fungal DNA was identified in 12 out of 16 RA samples, and 8 out of 9 healthy controls. These results are consistent with other published works that have previously reported the presence of bacterial DNA in the majority, but not necessarily all, samples investigated [80, 81]. A potential limitation of this study is that we did not elect to sequence of experimental controls, and relied on the absence of a detectable signal following agarose gel electrophoresis and

	RA	Controls
g_Cladosporium	5.1%	0.1%
c_Agaricomycetes_unidentified	3.2%	2.2%
c_Tremellomycetes_unidentified	3.0%	2.8%
g_AspERGillus	0.2%	6.2%
g_Pichia	8.9%	0.0%
g_Candida	11.9%	0.0%
g_Penicillium	0.7%	15.0%
o_Hypocreales_other_other	0.0%	26.4%
g_Malassezia	45.3%	40.9%

Metagenomics to Assist in the Diagnosis of Bloodstream Infection

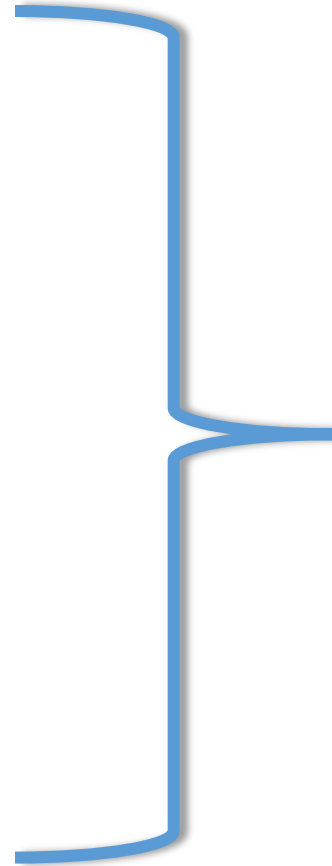
Alexander L. Greninger^{1*} and Samia N. Naccache²

Prealitik	• Normal cilt florası • Antibiyotik kullanımı • Geçici bakteriyemi • mNGS doğrulaması için kullanılan fazla numuneler, steril olmayan kimya veya teknikler
Analitik	• Reaktifler (örn. elüsyon tamponları, nükleik asit ekstraksiyon kitleri, enzimler) sırasında kontamine olmuştur. çevresel viral, bakteriyel veya fungal kirleticilerle üretim • Kullanıcının normal florası veya potansiyel patojenlerin yayılması (gizli solunum veya ishal virüsleri) • Ekstraksiyon, ters transkripsiyon, zenginleştirme, kütüphane hazırlığı sırasında çapraz kontaminasyon • Önceden oluşturulmuş kitaplıklarla çapraz kontaminasyon • Aynı barkod şemasını kullanarak önceki çalışmalardan sızma • Aynı çalıştırmada farklı barkodlardan indeks atlama
Postanalitik	• Bildirilen patojenin kontaminant mı, normal flora mı yoksa kandan gelen bir patojen mi olduğunun belirlenmesi



DNA/RNA Eldesi

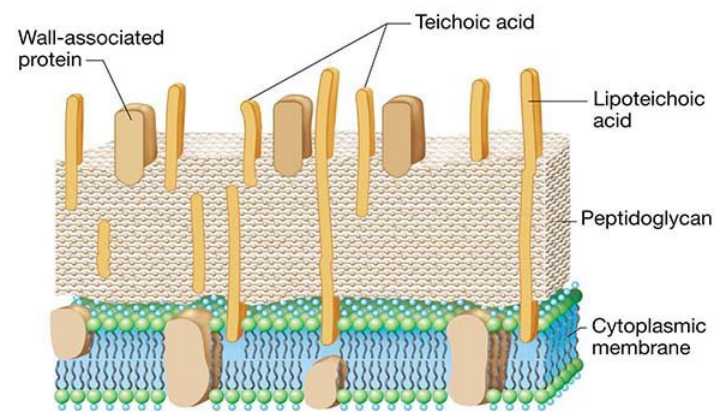
Dışkı
Balgam
İdrar
Vajinal sürüntü
Yara Sürüntüsü
Beyin omurilik sıvısı
ASCIT
Biyopsi



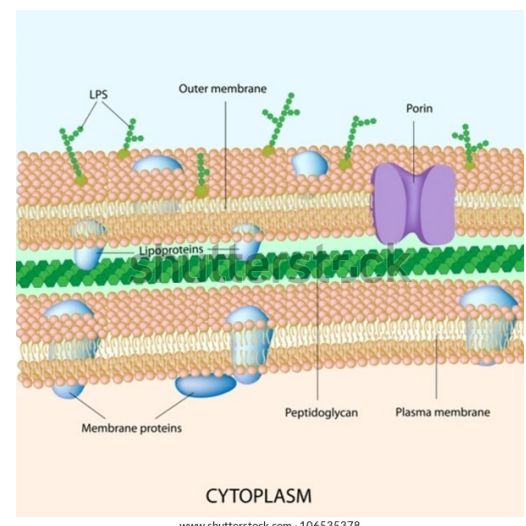
**Matrikse
uygun
yöntem**



DNA/RNA Eldesi

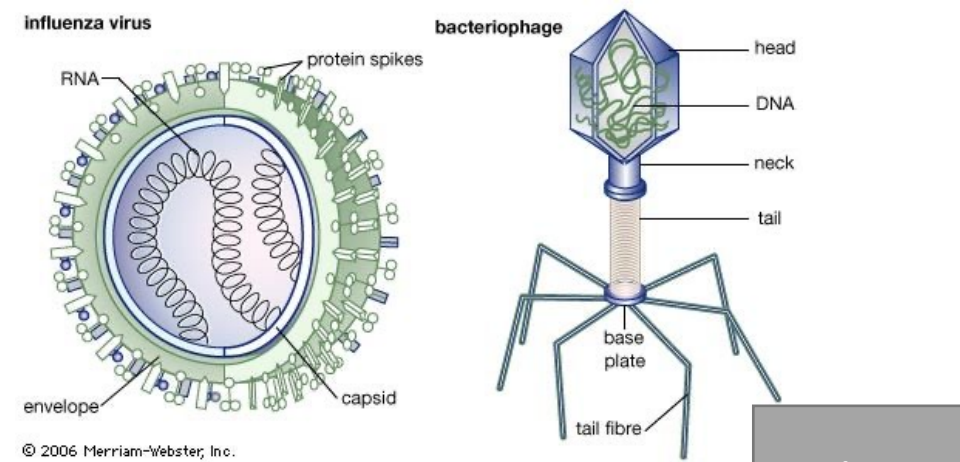
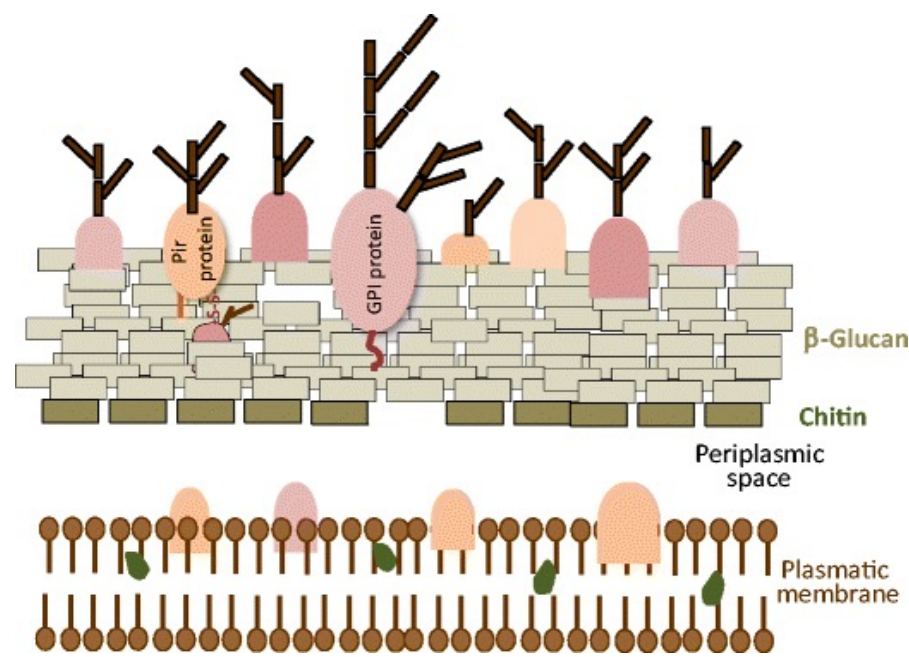


Bakteri



Mantar

Eukaryot

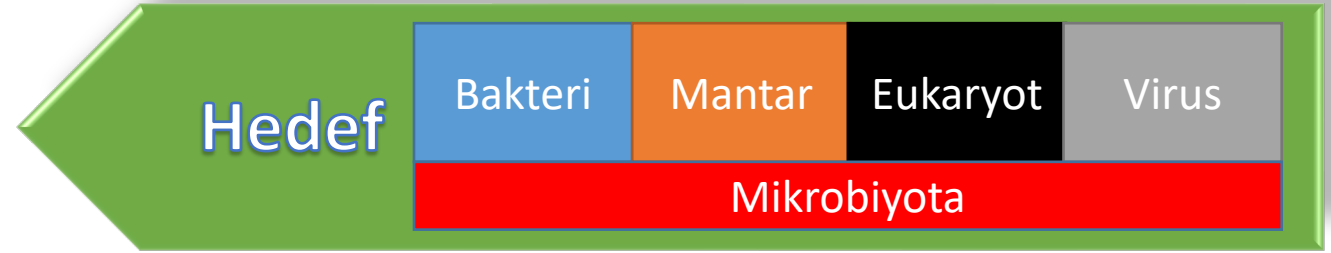


Virus



Dizileme için Kütüphane Oluşturma

HİPOTEZ



Hedefe Yönelik Dizileme; Yüksek derecede korunmuş genler

tüm bakteriler için kolay hedeflenebilir

Cinsler için ayırma olanak verir

Bakteri; 16 s 23s Dizileme

Mantar ITS 1-2 Dizileme

Tüm Nükleik Asit Verisini Dizileme; Shotgun Dizileme

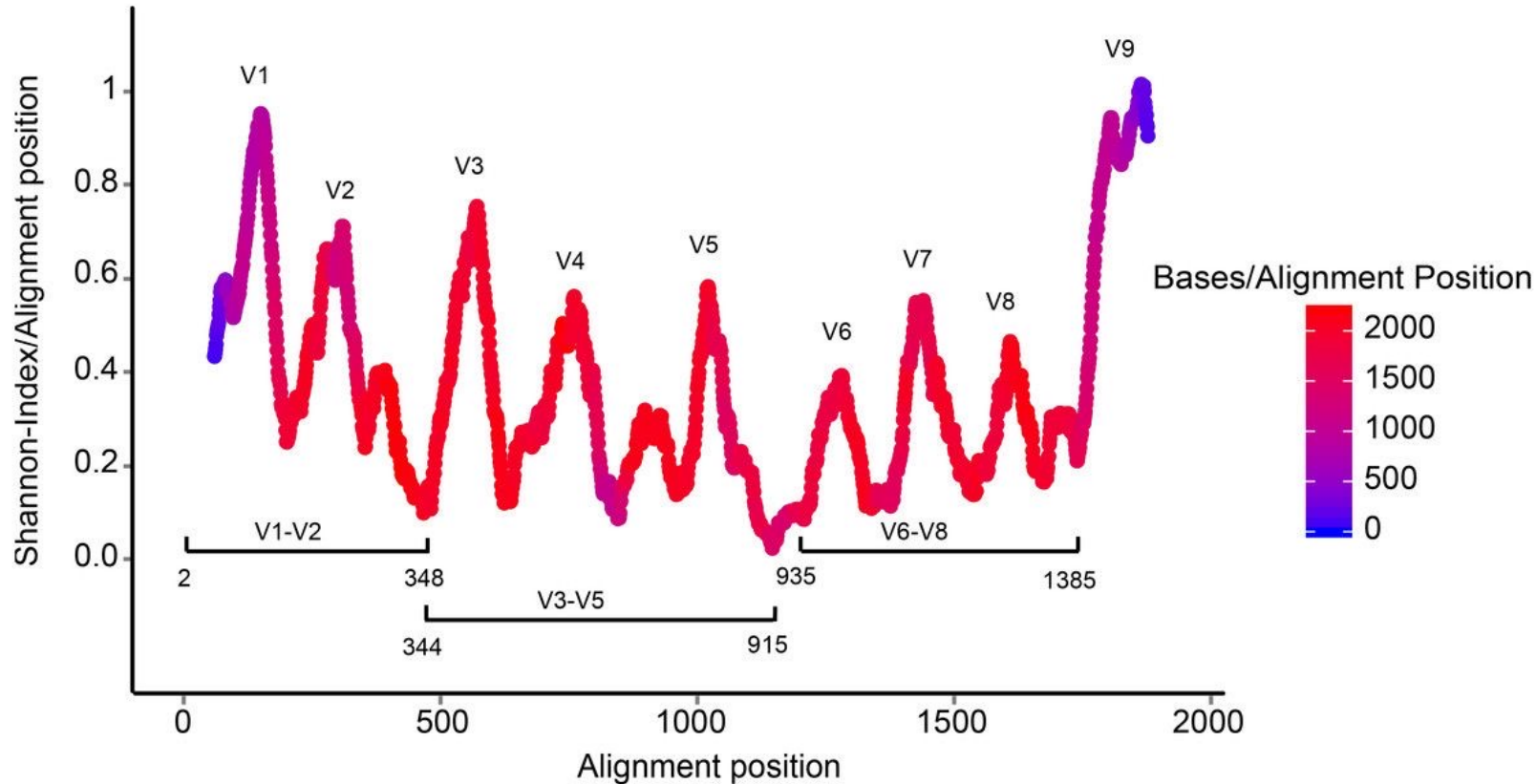


Dizileme için Kütüphane Oluşturma

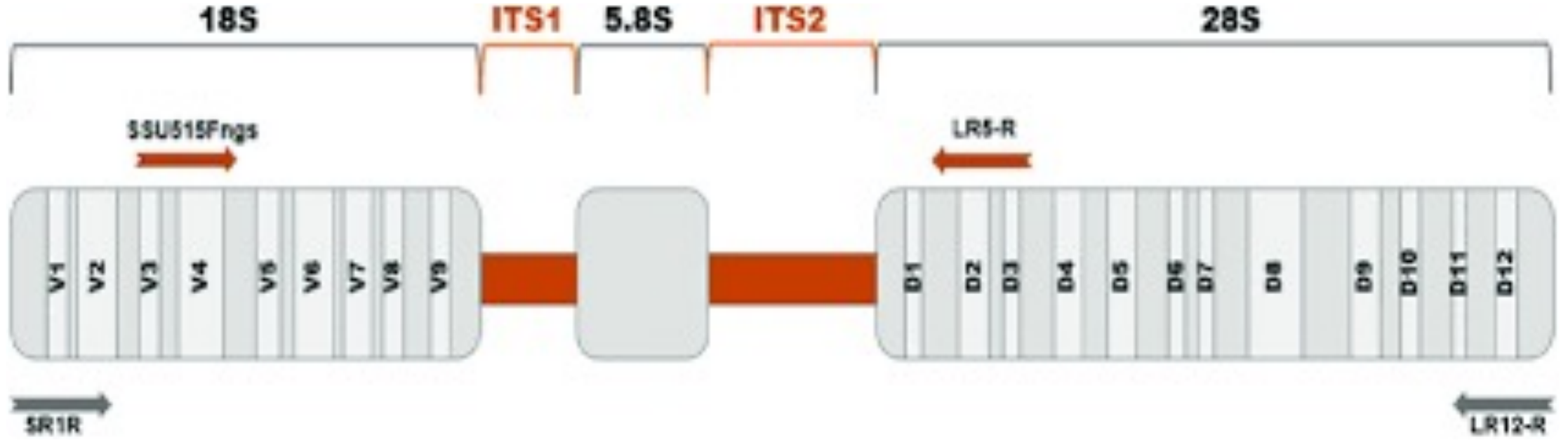
	Hedef Dizileme	"Shotgun" Dizileme
İyi Yönleri	İyi kurgulanmış genel protokoller Görece ucuz (\$50-\$100/örnek)	Hedef ampliconlar için kullanılan primer setleri olmadığı için bias yok Amplicon verisi ile sınırlı değil Fonksiyonel bilgi verebilir
Zayıf Yönleri	Değişken bölgelerin seçimi bias yapabilir. Çok korunmuş bölge seçildiği için ayırım zayıf kalabilir	Konak nükleik asitleri dahil çevresel kontaminasyon Daha pahalı (1000\$ üstü örnek başı) Veri analizi daha karmaşık Daha yüksek kapasiteli, yüksek RAMli bilgisayarlara ihtiyaç var



Dizileme için Kütüphane Oluşturma



- 16S rRNA gene 9 hipervariable bölge içerir;
- En iyi seçenek örnek çalışmlardaki bölgeleri kullanmak
- Genel bir yaklaşım için
 - V1-V3 ya da V3-V5 insan mikrobiyom projesinde
 - V4 Dünya Mikrobiyom projesinde



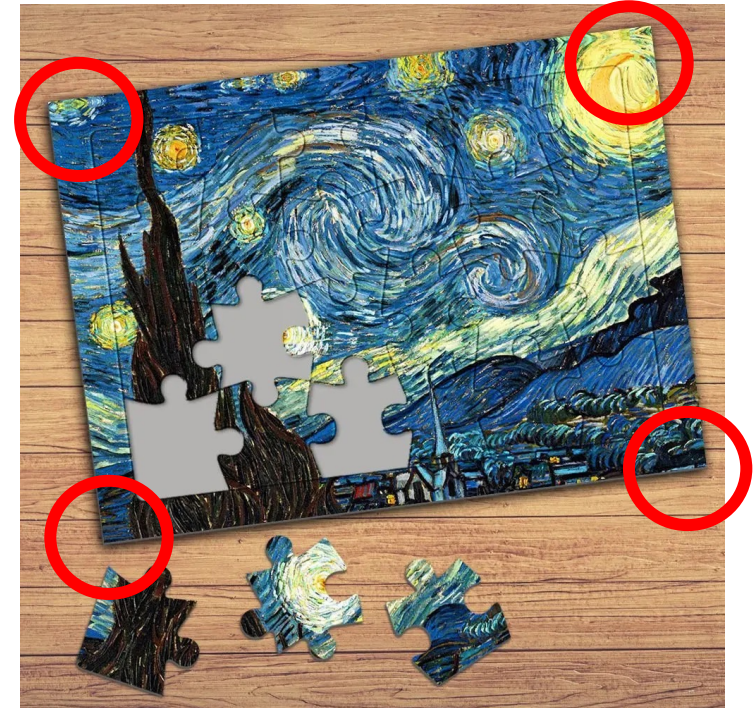
Mikrobiyom analizi- Hedef amplicon sekanslama

Mikrobiyom analizinde,
kullanılan yöntemler
bakteriyel mikrobiyom ve
taksonomik sınıflandırma
kadar gelişmiş değil

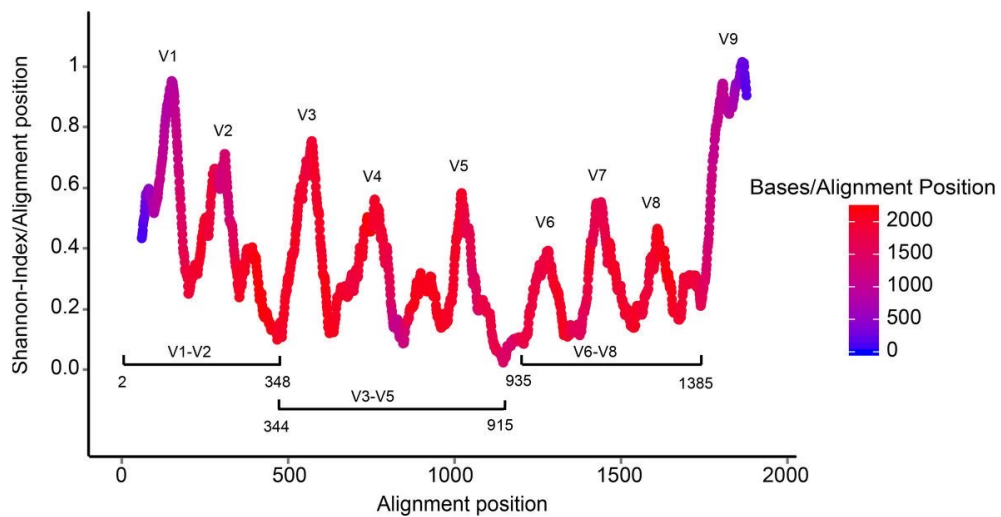
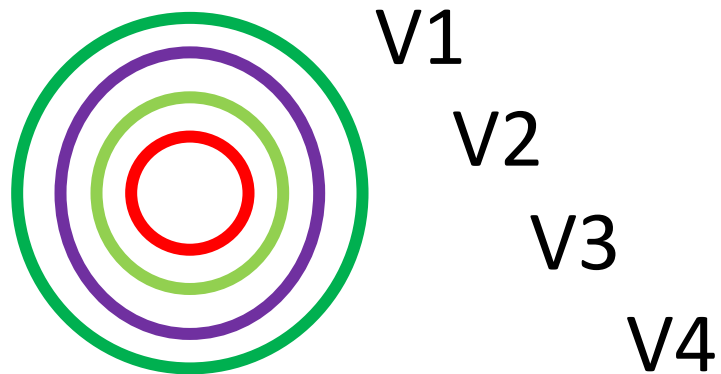
Primer seçimi yanlılığı
("bias") azaltmak için çok
önemli

En sık kullanılan bölge
ribozomal altüniteleri
bağlayan ITS 1 ve ITS
2(universal genetik fungal
barkod)

Hedefe Yönelik “Shotgun”



Hedefe Yönelik “Shootgun”



Dizileme için Kütüphane Oluşturma

Hedef

Bakteri

Mantar

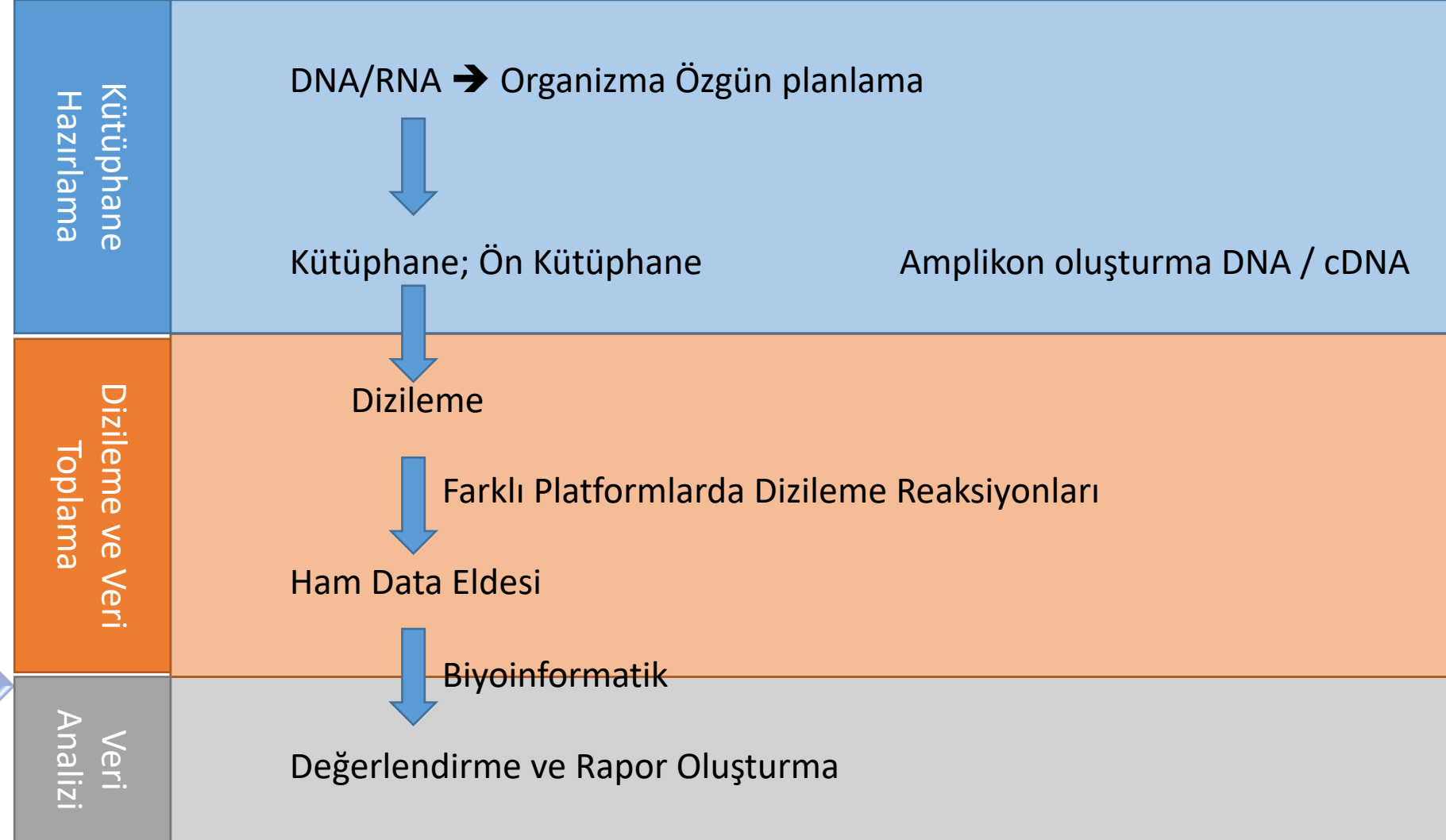
Eukaryot

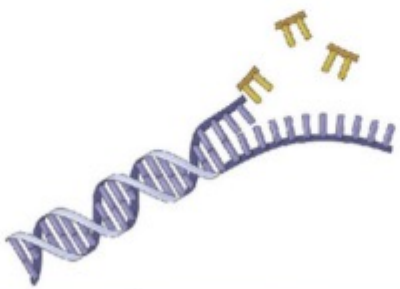
Virus

Mikrobiyota



HİPOTEZ





Dizileme

	Illumina					ThermoFisher		
								
	iSeq100	MiniSeq	MiSeq	NextSeq	NovaSeq6000	Ion PGM	Ion S5/S5XL	Ion Proton
Output Range	1.2 Gb	1.8-7.5 Gb	0.3-15 Gb	20-120 Gb	134-6000 Gb	20 Mb-2 Gb	1.2-8 Gb	10 Gb
Run Time	9-19 hr	24 hr	5-55 hr	11-29 hr	24-44 hr	2-7 hr	4-5 hr	2-4 hr
Reads per Run	4 million	8-25 million	1-25 million	130-400 million	Up to 20 billion	0.2- 6 million	3-80 million	60-80 million
Read Length	2 x 150 bp	2 x 150 bp	2 x 300 bp	2 x 150 bp	2 x 150 bp	200-400 bp	200-400 bp	200 bp
Instrument Cost	~\$19.9K	~\$50K	~\$100K	~\$250K	~\$985K	~\$50K	~\$65K/157K	~\$149K

Veri “DATA”

- 1 g dışkı; yaklaşık 1 çay kaşığı yaklaşık;
 - 100 milyar bakteri (10^{11}) içermekte
[<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>]
 - Her bir bakteri genomu yaklaşık 5 milyon (10^6) baz içermekte;
 - Dijital karşılığı (10^{11})x (10^7) = (10^{17}) 100,000 terabyte.
 - En yüksek kapasiteli en küçük disk 1 terebayt bilgi almakta, ve yaklaşık 12 g
 - $100\ 000 \times 12\text{g} = 1,200,000\text{ g} = 1,200\text{ kg}$ yaklaşık bir zürafa kadar



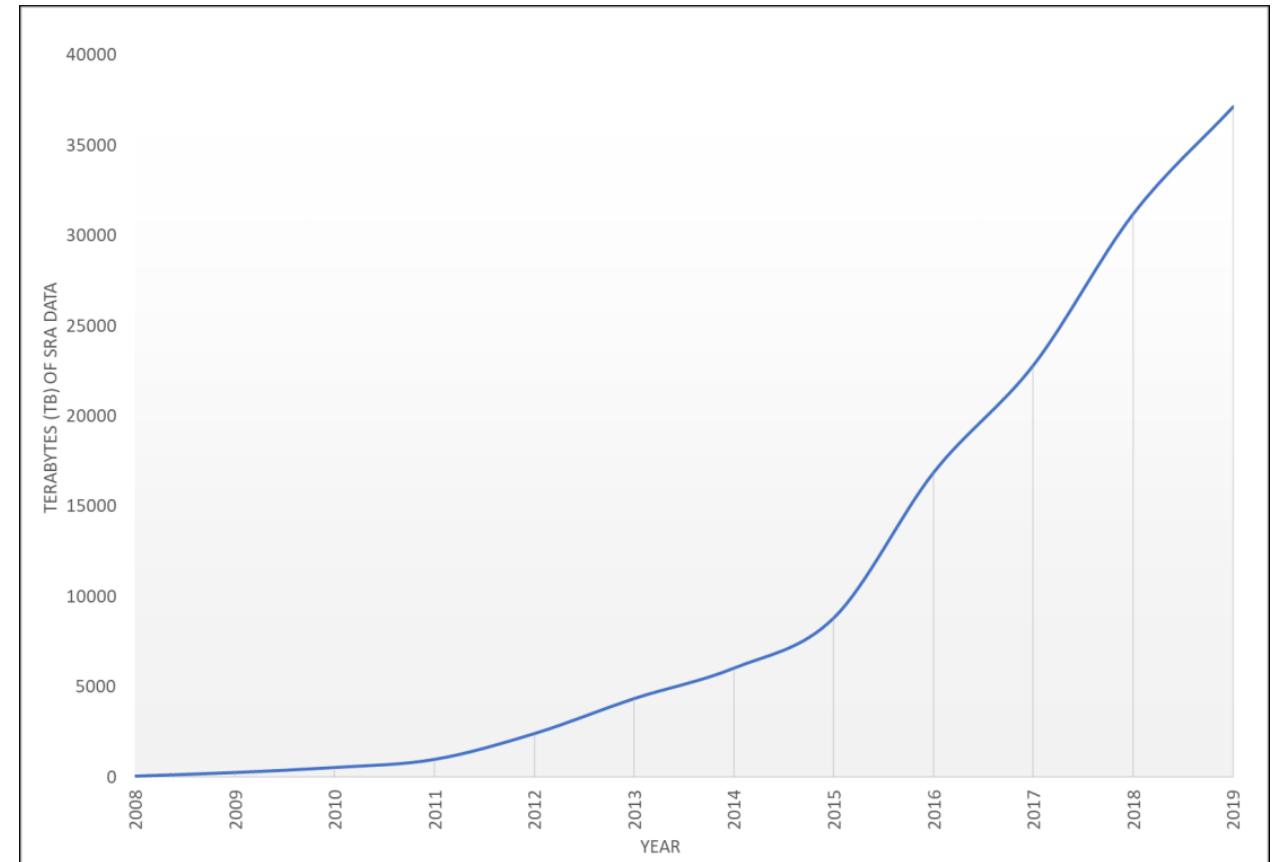
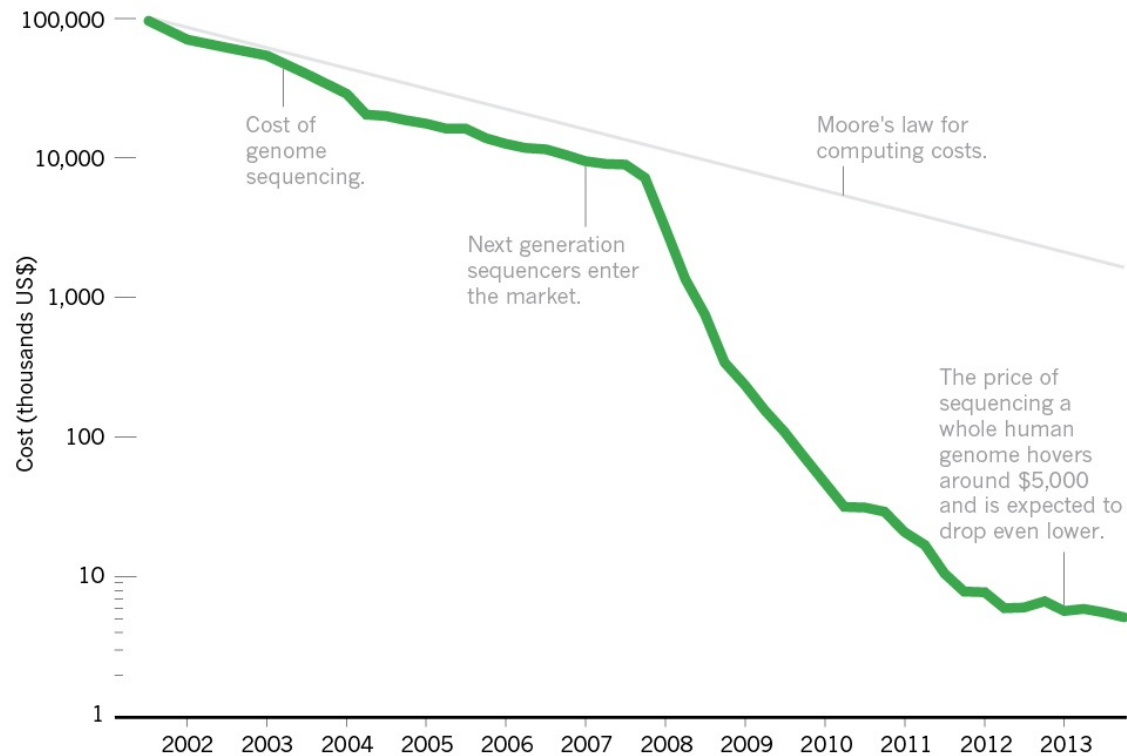
Maliyet !!!



Maliyet !!!

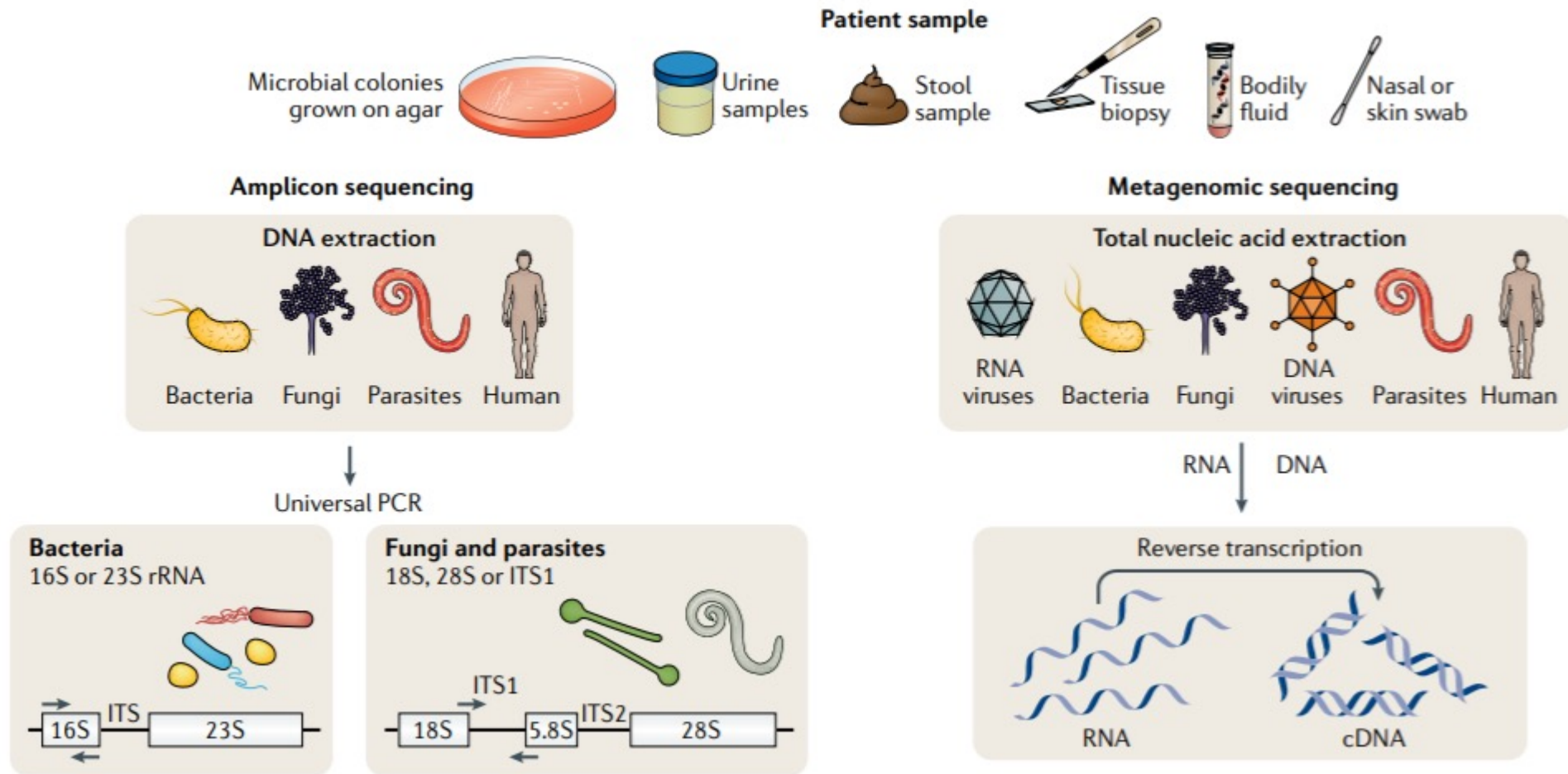
Falling fast

In the first few years after the end of the Human Genome Project, the cost of genome sequencing roughly followed Moore's law, which predicts exponential declines in computing costs. After 2007, sequencing costs dropped precipitously.





Biyoinformatik



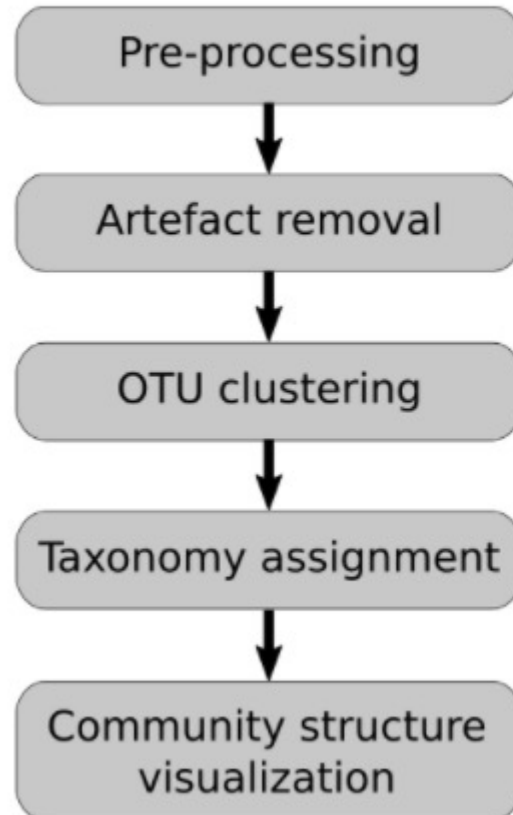


Biyoinformatik

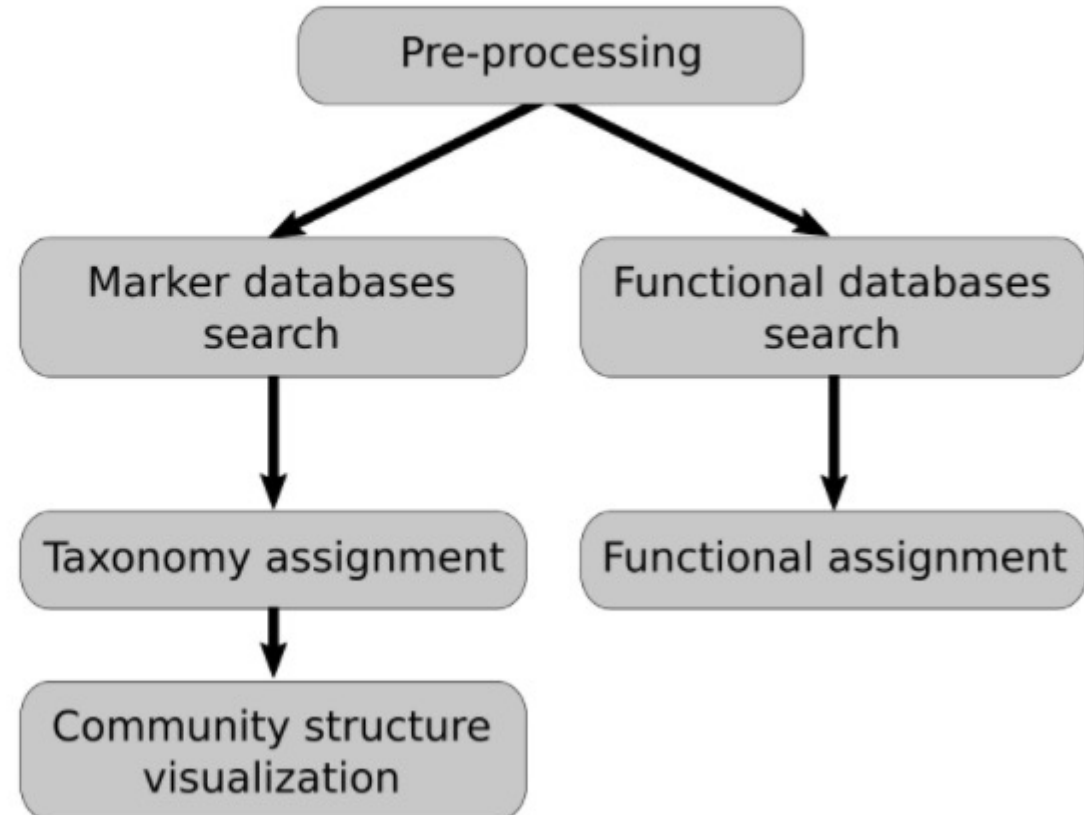


Biyoinformatik

Amplicon



Shotgun

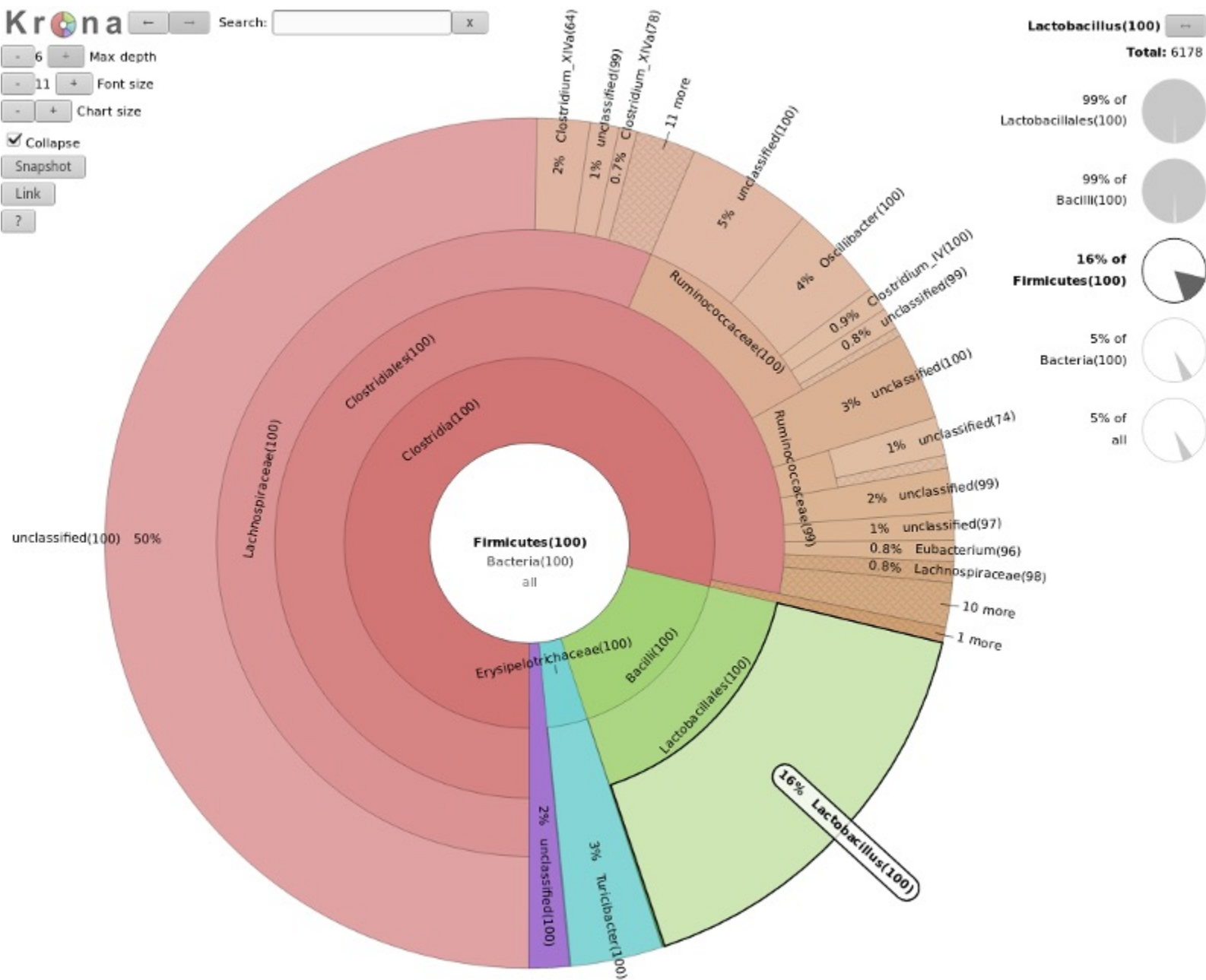




Krona

6 Max depth
 11 Font size
 Chart size

☒ Collapse





Biyoinformatik

- Klinisyenlerin genellikle kafalarındaki ana sorular;
- - “vakalarım ve kontrollerim nasıl farklı?”
 - “bu hastadan alınan bu örnek belirli bir hastalığın göstergesi mi?”
- Özellikle moleküler analizleri yürütmek için birçok seçenek göz önüne alındığında, bilimin mevcut durumuyla bu soruları yanıtlamak zor olabilir.



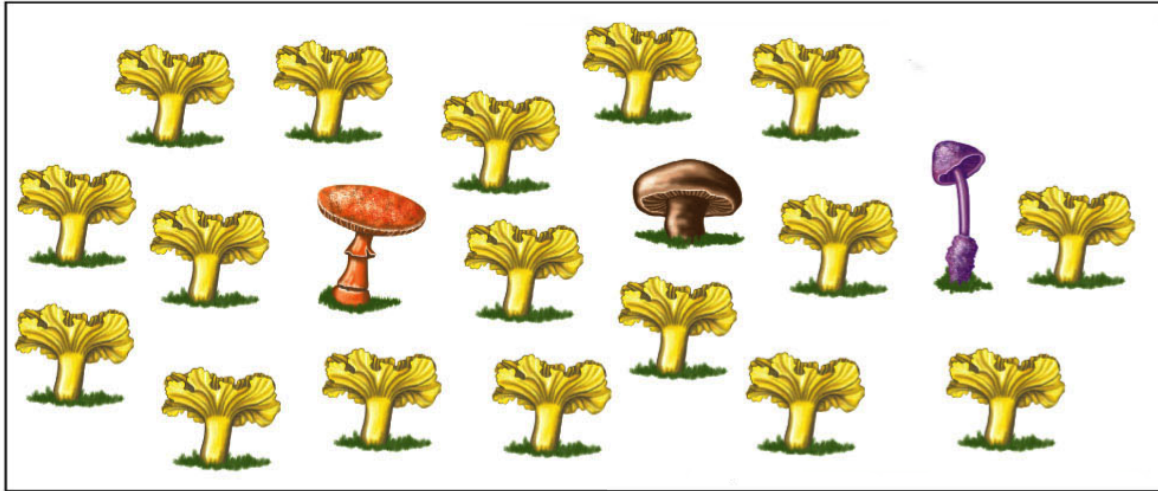
Biyoinformatik

- (1) Ham DNA dizi verilerimden her bir numunede her türden (veya metagenomik için gen/suşun) kaç tanesinin gözlemlendiğine ilişkin bir tabloya nasıl gidebilirim?
- (2) Bu tabloyu analiz için ilgili klinik değişkenlere nasıl bağlarım?
- (3) Tüm mikrobiyom düzeyinde (tipik olarak α çeşitliliği ve β çeşitlilik analizleri) veya bireysel taksonlar veya genler düzeyinde uygun analizleri nasıl yapabilirim?



Biyoinformatik

Community A

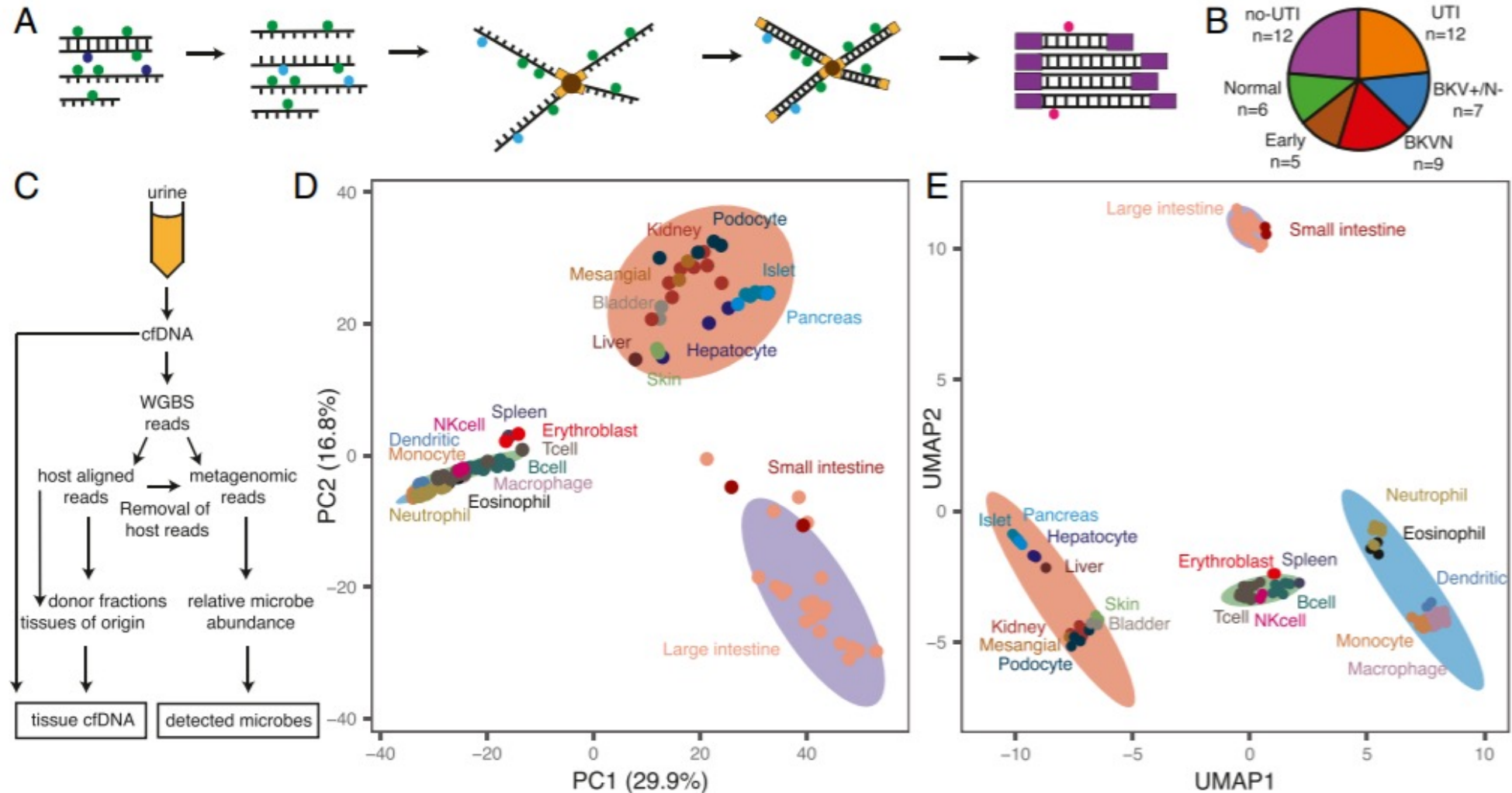


Community B



A cell-free DNA metagenomic sequencing assay that integrates the host injury response to infection

Alexandre Pellan Cheng^a, Philip Burnham^a, John Richard Lee^{b,c}, Matthew Pellan Cheng^{d,e}, Manikkam Suthanthiran^{b,c}, Darshana Dadhania^{b,c,1,2}, and Iwijn De Vlaminc^{a,1,2}





*"Beni Türk Hekimlerine
Emanet Ediniz"*

Gazi M. Kemal