

Mikrobiom: Stand des Wissens und Perspektiven



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Prof. Dr. Dr. André Gessner



26. Jahrestagung
Wien 2018



05.10.2018

Universität Regensburg



Wir sind nicht allein....



Antony van Leeuwenhoek 1632–1723

„....that the people living in our United Netherland are not as many as the living animals that I carry in my own mouth this very day.“

ERSTE MIKROBIOM-BESCHREIBUNG

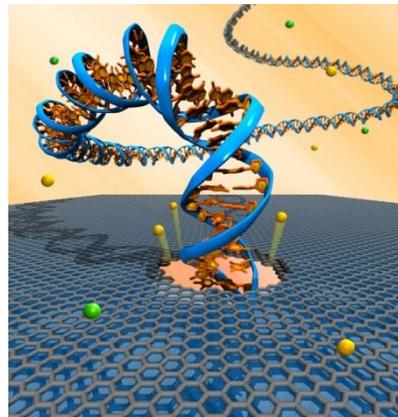
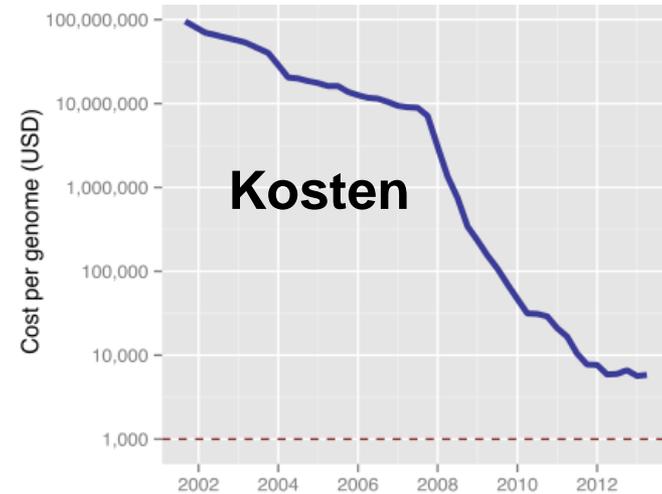
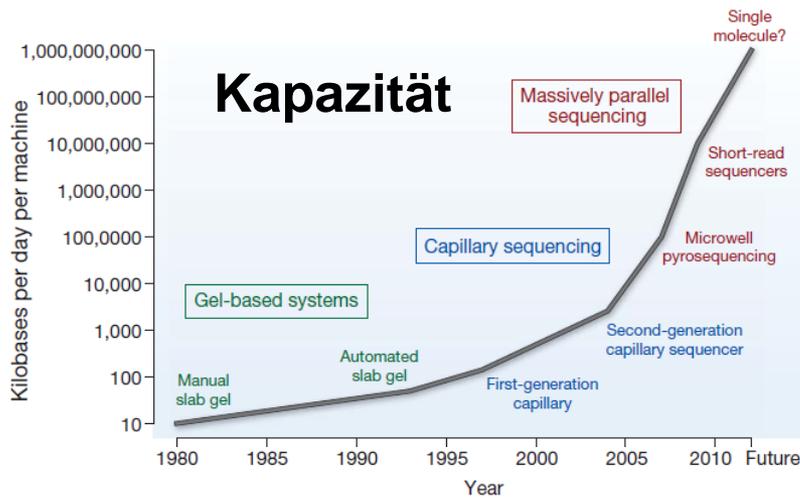
1677, Royal British Society

Human Microbiome Project (HMP)

140 Mio. 29 Mio. US\$

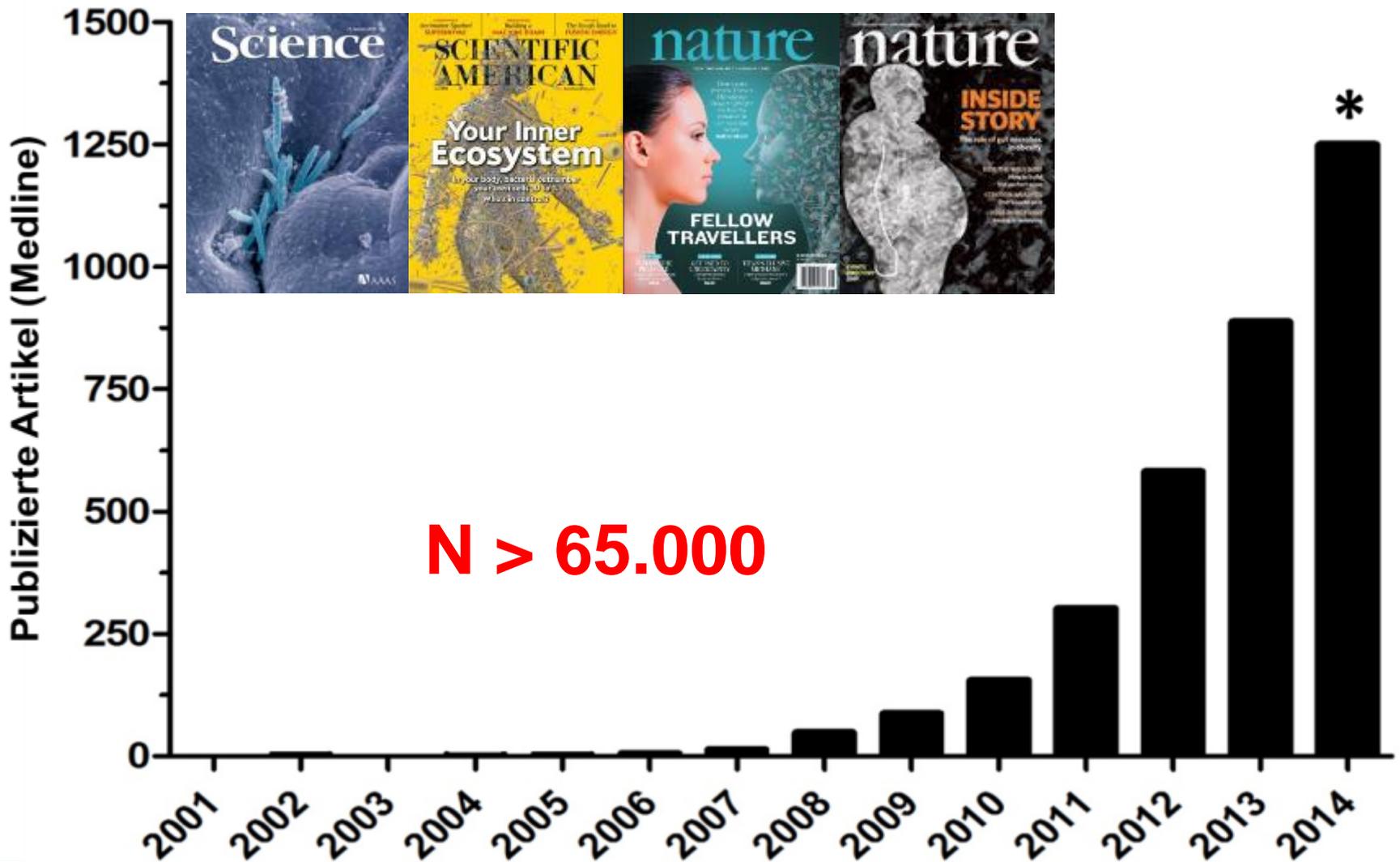
- **2007** initiiert durch das NIH, EU: MetaHit-Konsortium
- ca. **80 % der Bakterien** bis jetzt nicht angezüchtet
- **Hochdurchsatz-Sequenzierung der 16s-rRNA-Gene**
- **300 Probanden**, je 15-18 Körperstellen, 2-3 Visiten
- **> 1500 Bakterienspezies**, derzeit > 500 Genome komplett (GI) und >1400 Genome gesamt
- **2012-2014, 922 Mio US\$**: Mikrobiom bei Diabetes, Übergewicht, Herz-Kreislauf, Autismus, Asthma, Krebs.....
- **Beispiel 2018**: Fimrenpartnerschaft Roche/Genentech-Microbiotica, Biomarker u. Therapien IBD (**534 Mio US\$**)

Next Generation Sequencing (NGS)



„Third generation“
(Nanopore, Einzelmoleküle)

Publikationsflut „Microbiome“

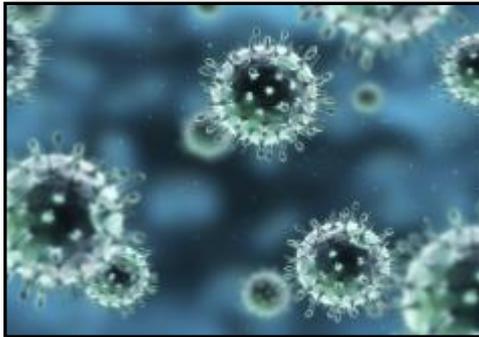


Das Mikrobiom: Mehr als nur Bakterien

Bakterien



Viren



Pilze



Mikrobiom

Einzeller/Archaeen



> 100-fach
mehr
genetische
Information

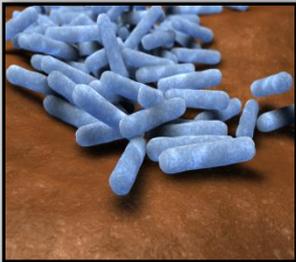
“Second genome”



10^{13} humane Zellen

Mikrobiom

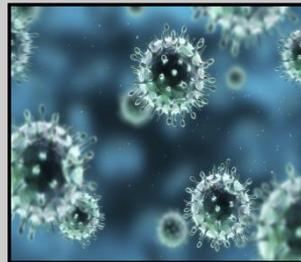
Bakterien



10^{13-14}

>100-fach
mehr
genetische
Information

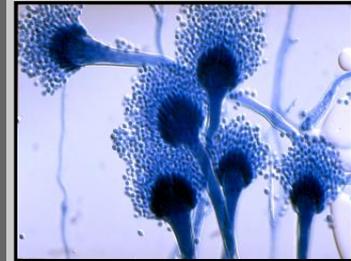
Viren



Virom:
 $\sim 10^{15}$

„Second genome“

Pilze

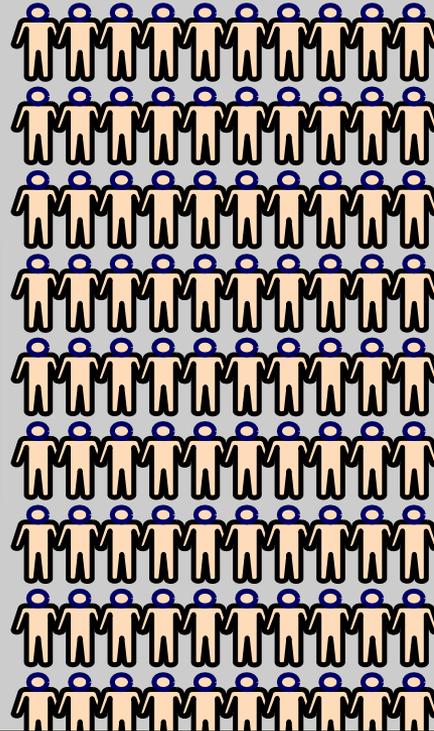


Mykobiom: 10^{12} ?

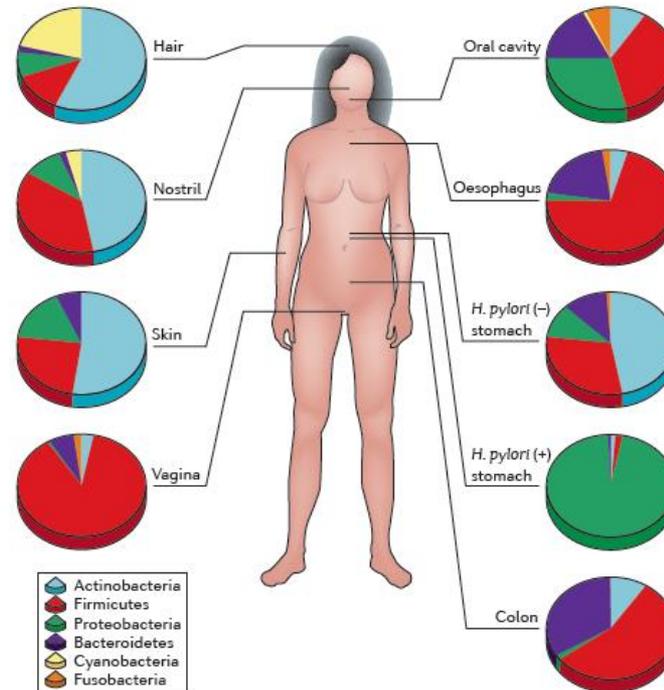
Protozoen



?



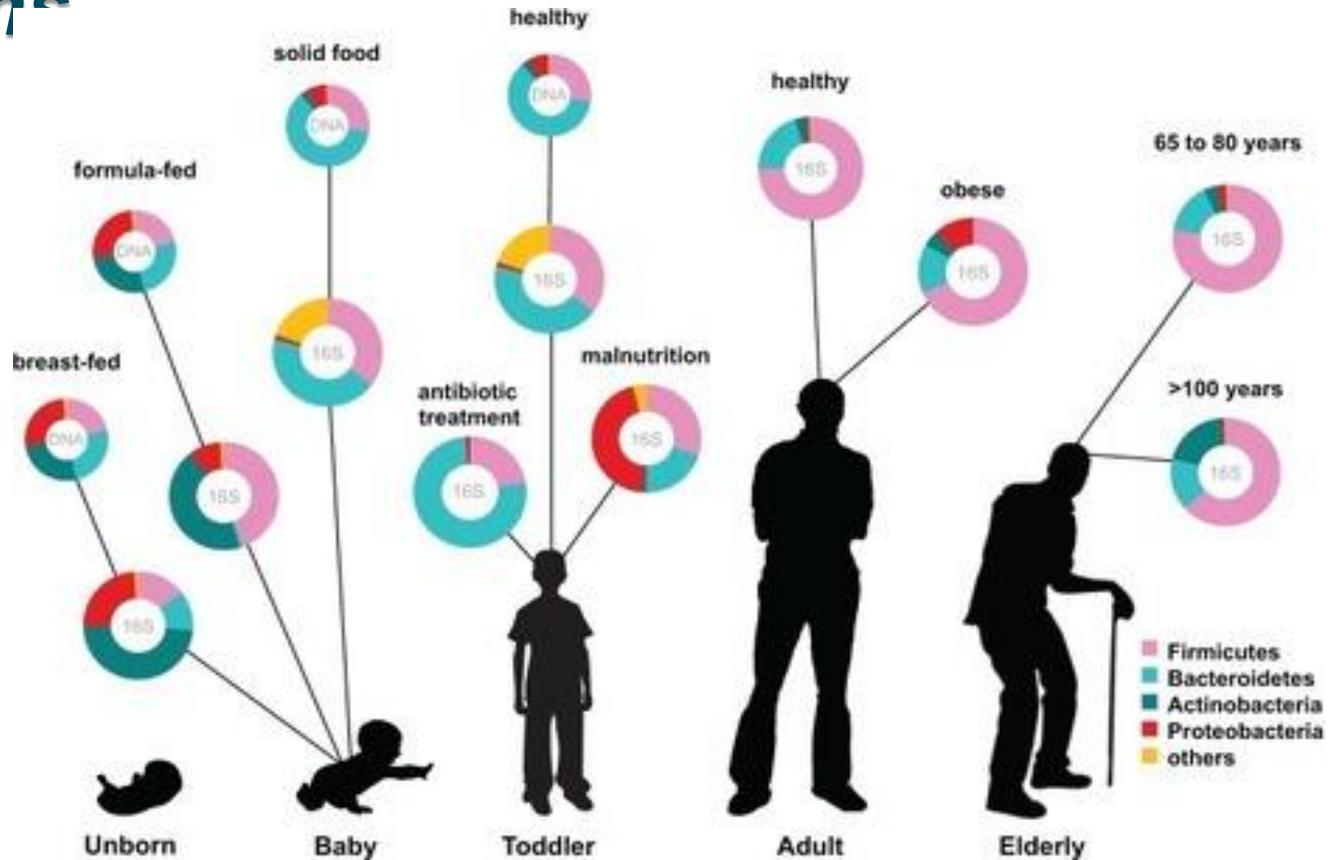
Human Microbiome Project (HMP)



Cho and Blaser,
Nature Reviews Genetics April 2012

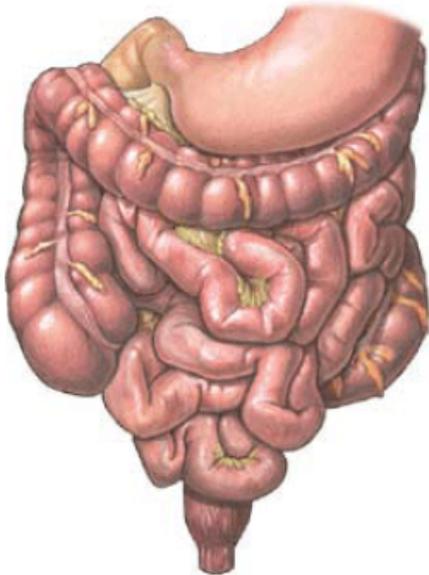
Wirt + Mikrobiom = „Superorganismus“

Das Mikrobiom ändert sich im Laufe des Lebens



Darmmikrobiom

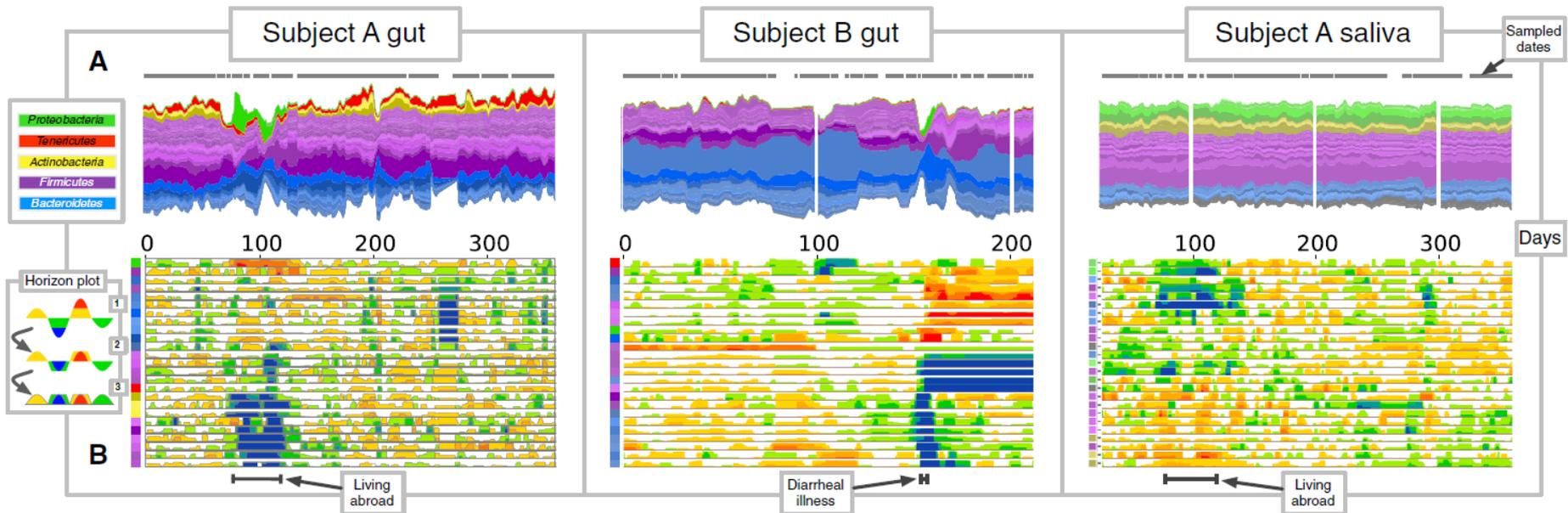
Unser „vergessenes Organ“



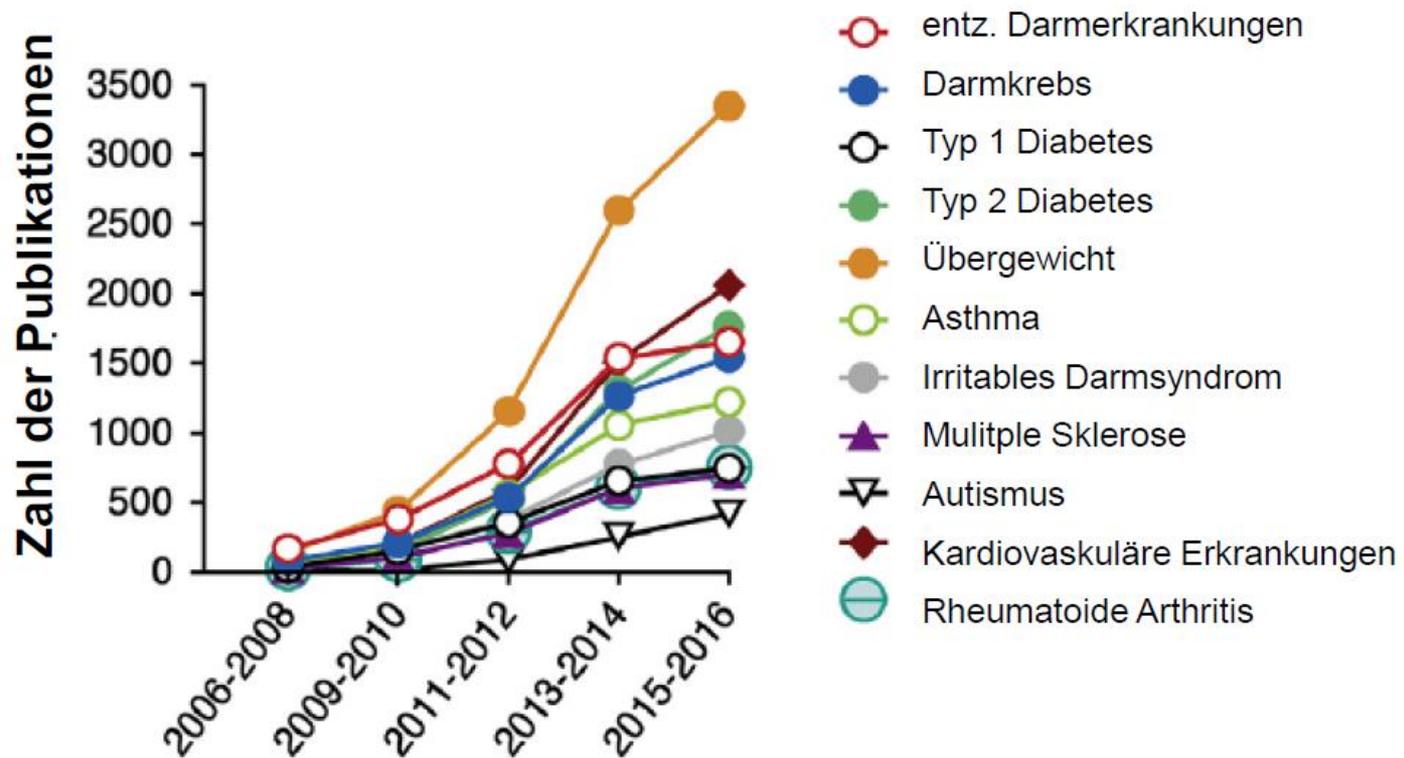
- Totale Masse ca. 1,5 kg
- Mikroben im Darm = > 10000 x Menschen auf der Erde
- 30 % des fäkalen Volumens
- Synthese von Vitaminen, Aminosäuren..
- **Die meisten Plasma-Metabolite sind bakteriell!**
- Schutz vor Krankheitserregern

Das **Darmmikrobiom** hat bei vielen Erkrankungen größeren Einfluß als das Patientengenom

Individuelle Mikrobiom-Stabilität



Publikationen zum Mikrobiom bei verschiedenen Erkrankungen



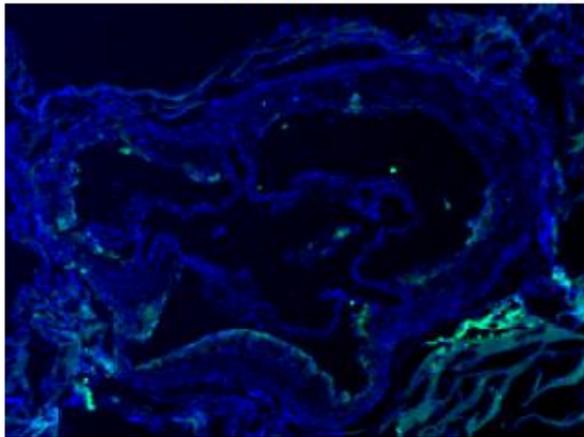
Mikrobiom und Kardiovaskuläre Erkrankungen

ARTICLE

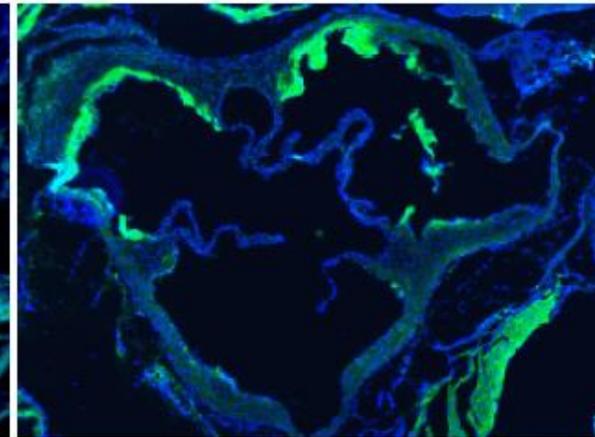
April 2011

doi:10.1038/nature09922

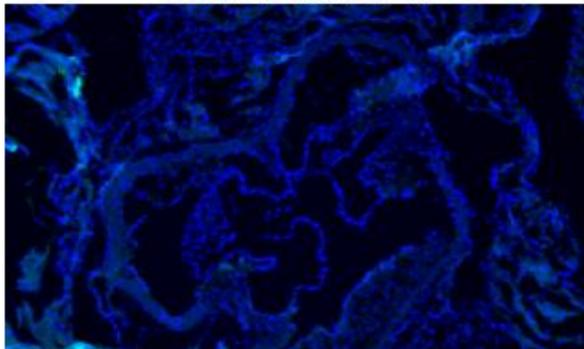
control diet



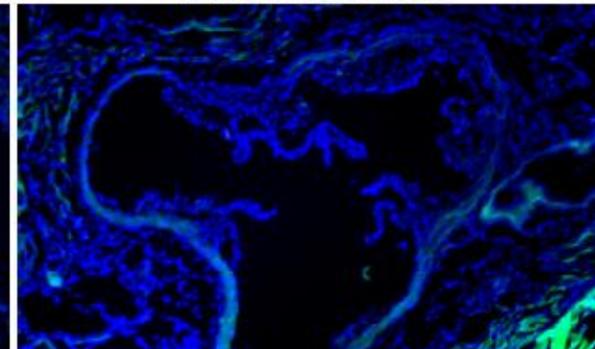
choline diet



control diet / Abx

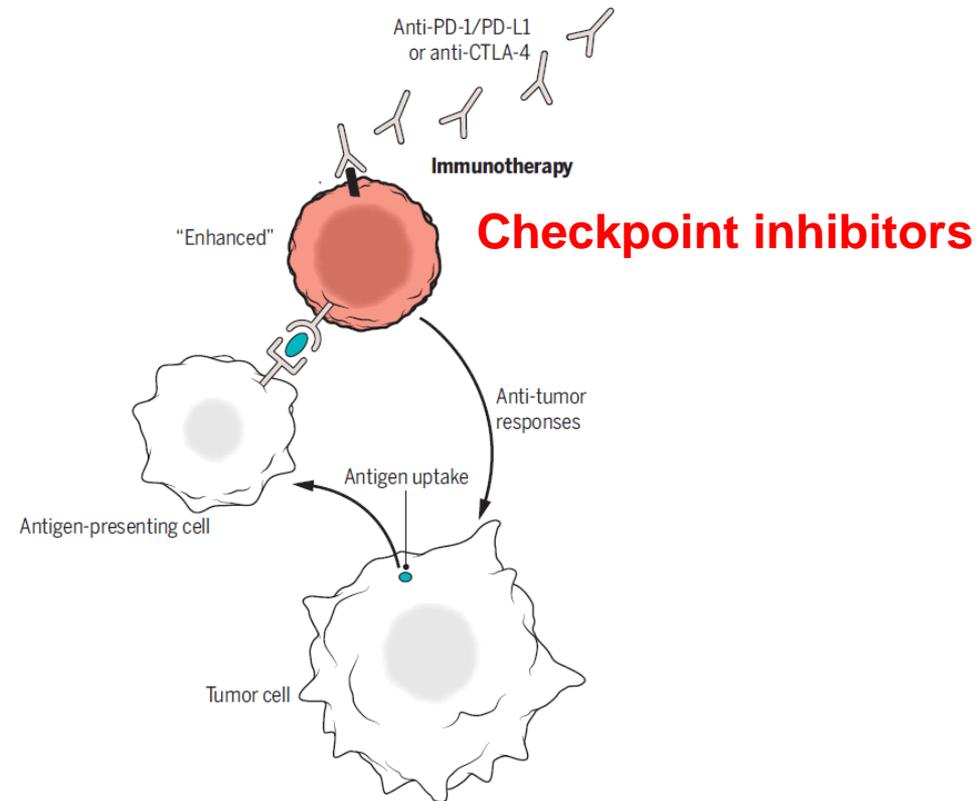
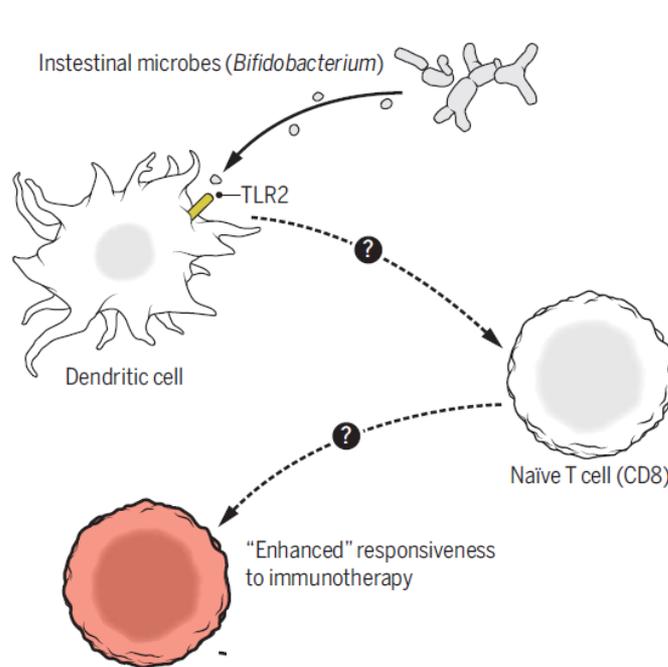


choline diet / Abx



Das **Darmmikrobiom** beeinflusst **kardiovaskuläre Erkrankungen**

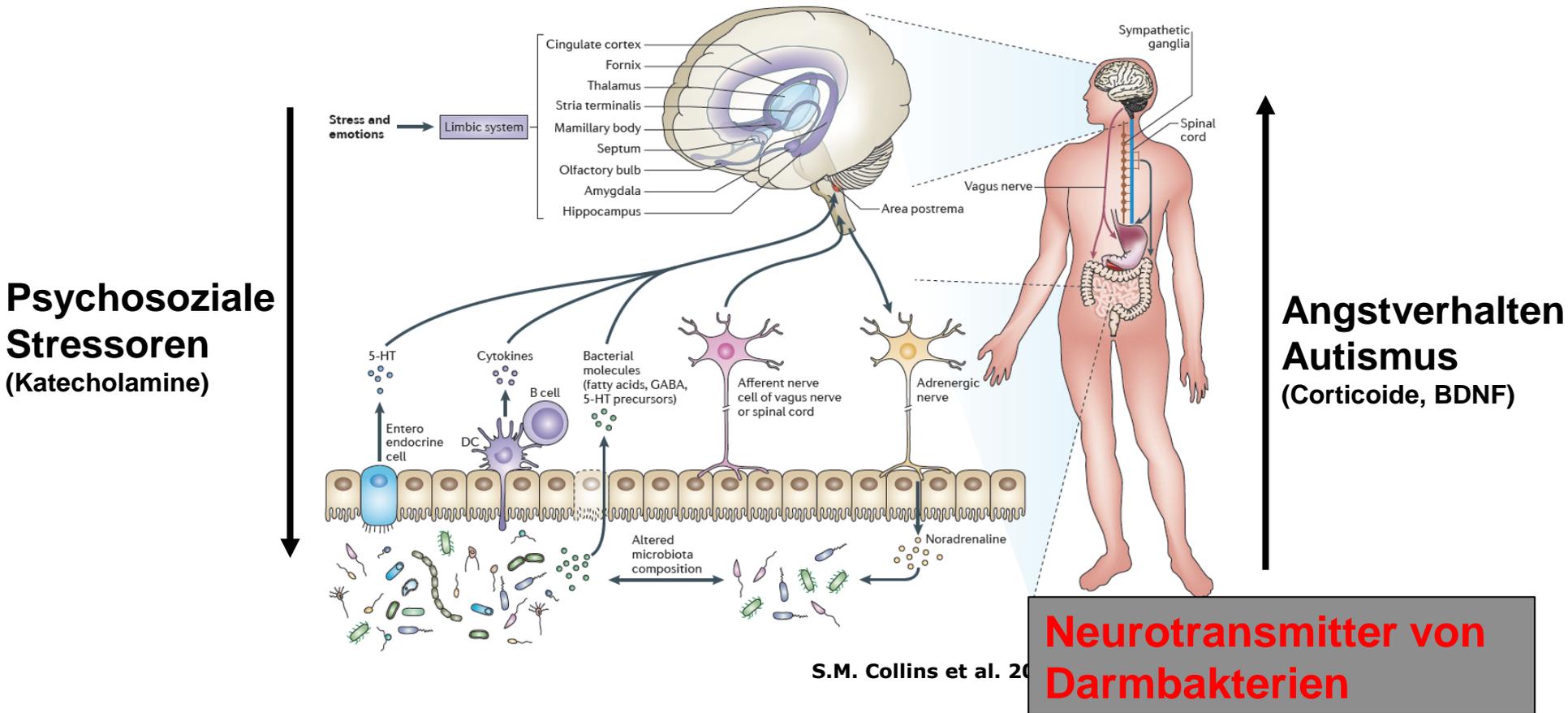
Mikrobiom und Krebs



Schwabe and Jobin, *Science*, Nov. 2015

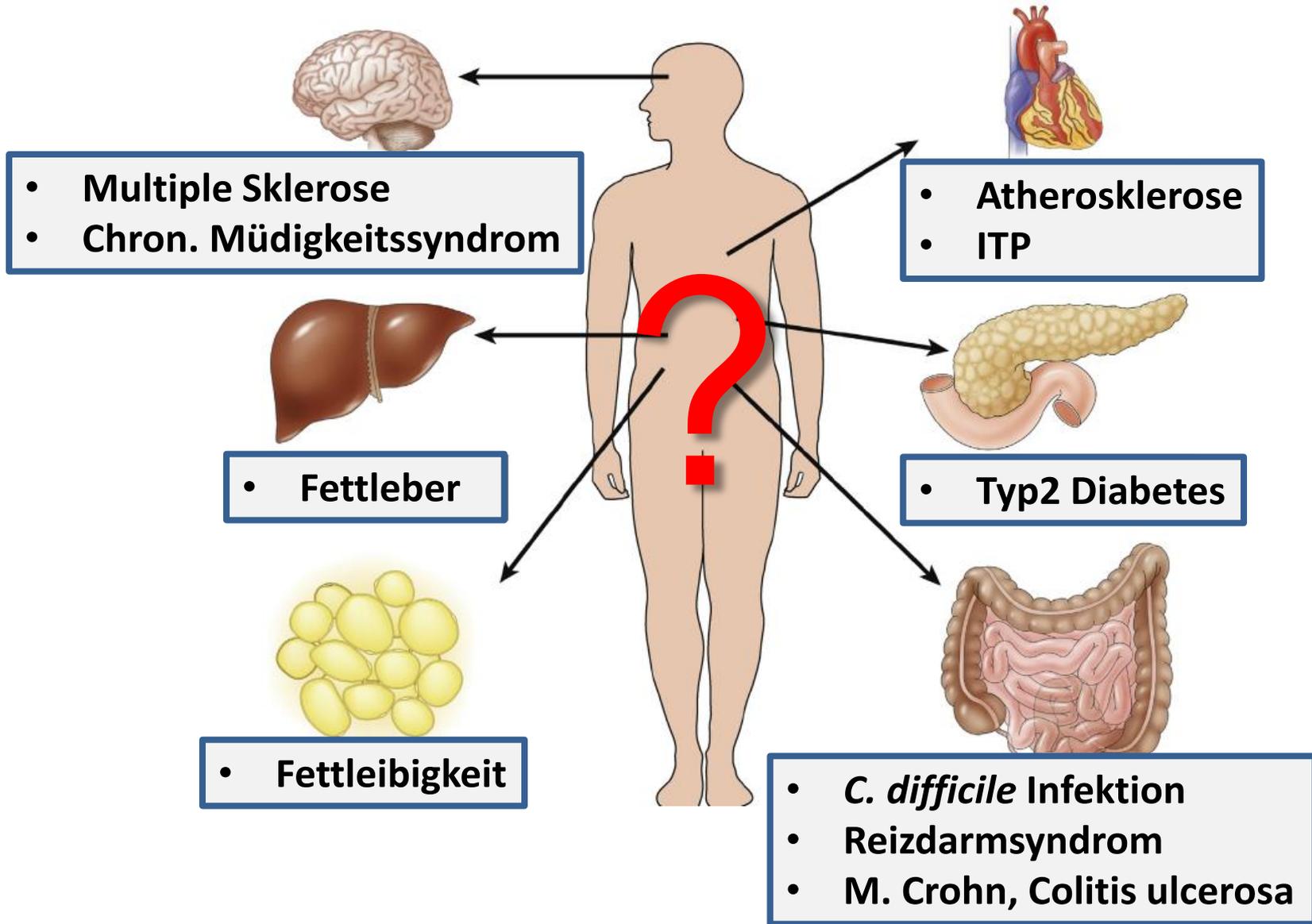
Das Mikrobiom beeinflusst entscheidend den Erfolg moderner
Krebstherapien

Bidirektionale Kommunikation Mikrobiom - Nervensystem

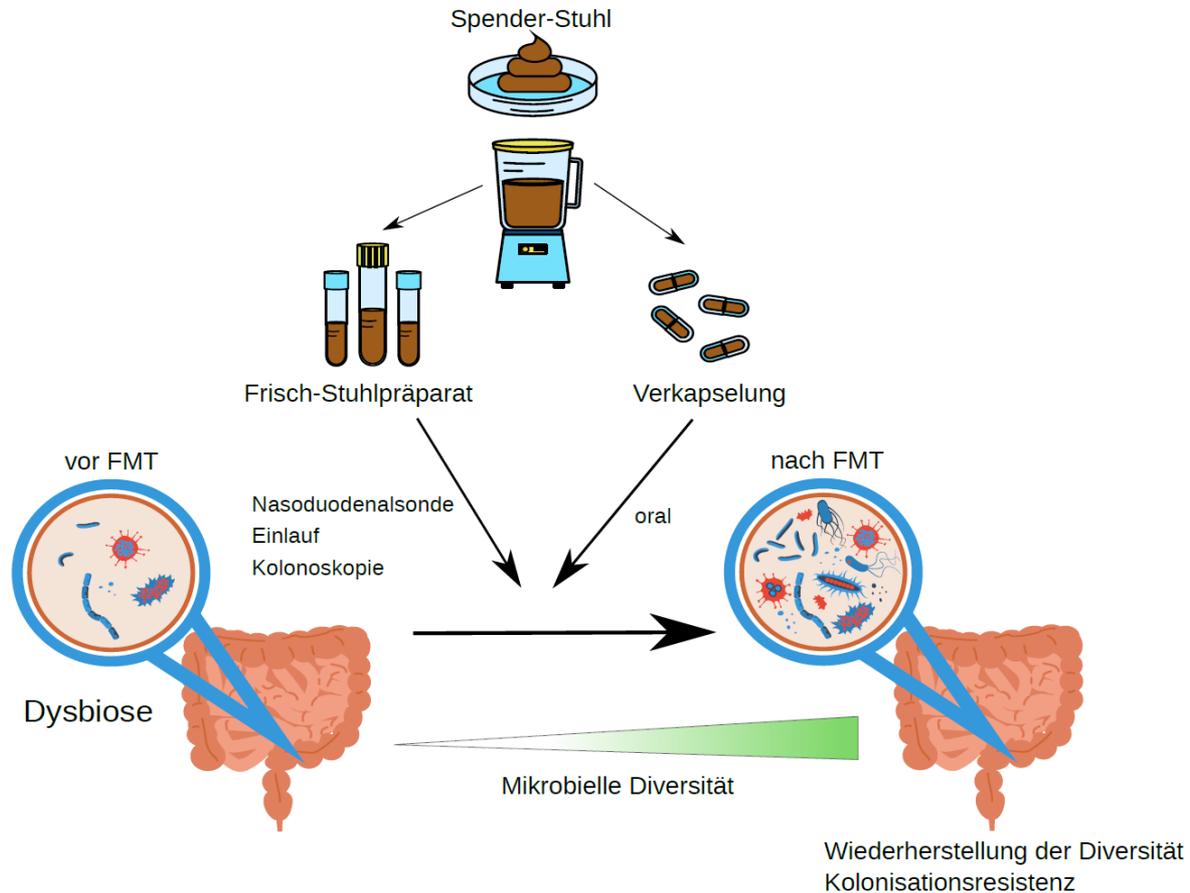


Das **Darmmikrobiom** beeinflusst unsere Psyche und umgekehrt

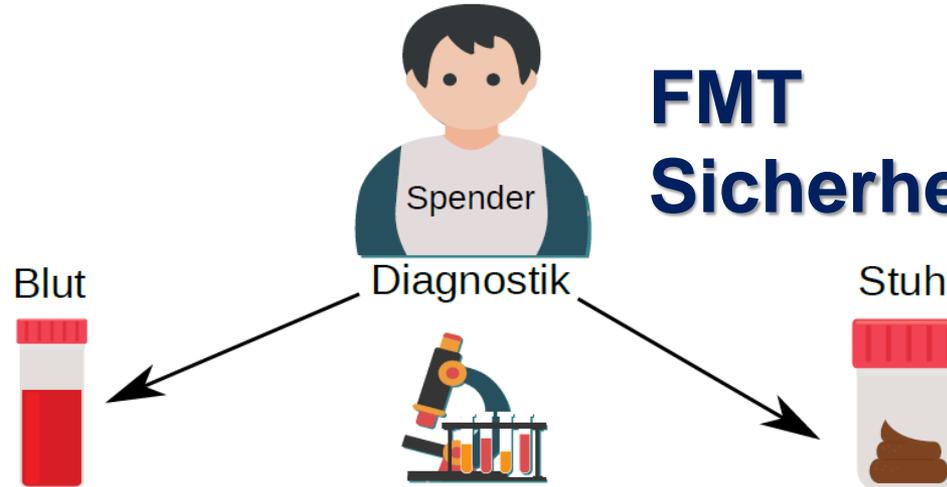
Mikrobiomtransplantation als Therapieoption



Fäkal-Mikrobiota-Transfer (FMT, „Stuhltransplantation“)



FMT Sicherheitsdiagnostik



+ MIKROBIOMKOMPOSITION

- Treponema pallidum*
- Mycobacterium tuberculosis*
- Escherichia histolytica*
- HIV, HSV
- HIV-1, HIV-2
- HBV, HCV, HAV, HEV
- HTLV *

- Blutbild
- Albumin
- Kreatinin und Elektrolyten
- Aminotransferasen
- Bilirubin
- GGT
- Alkalische Phosphatase

- Campylobacter*
- Clostridium difficile*
- Escherichia coli*
- ESBL
- Helicobacter pylori*
- Listeria monocytogenes**
- MRSA
- Salmonella*
- Vibrio cholerae* *
- VRE
- Yersinia*

- Cryptosporidium*
- Entamoeba histolytica*
- Giardia intestinalis*
- Plasmodium*
- Strongyloides stercoralis* *
- Helminthen, Wurmeier
- Iso spora* *
- Microsporidien*

- Norovirus
- Rotavirus *

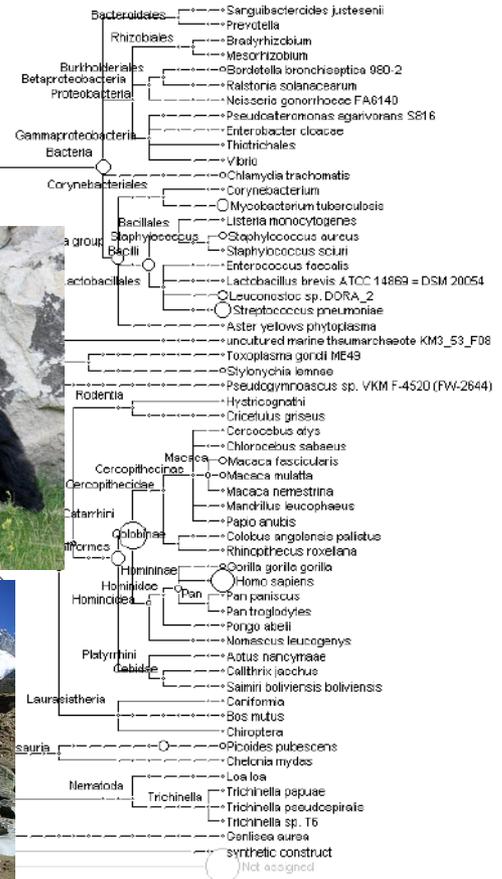
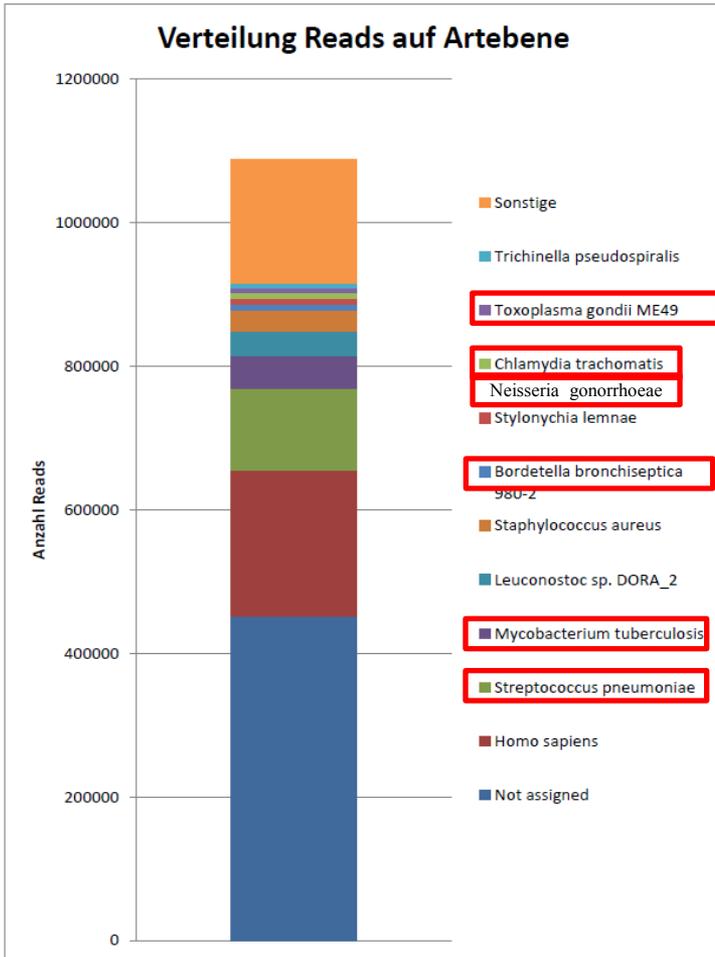
- Test auf okkultes Blut
- Calprotectin

- Bakterien
- Parasiten
- Viren
- Ergänzende Labordiagnostik

* Optional bei speziellen Bedingungen (Immunsuppression, Reiseanamnese, ...)

Urin-Mikrobiomanalyse

PHYLOGRAM DER ANNOTIERTEN SEQUENZEN



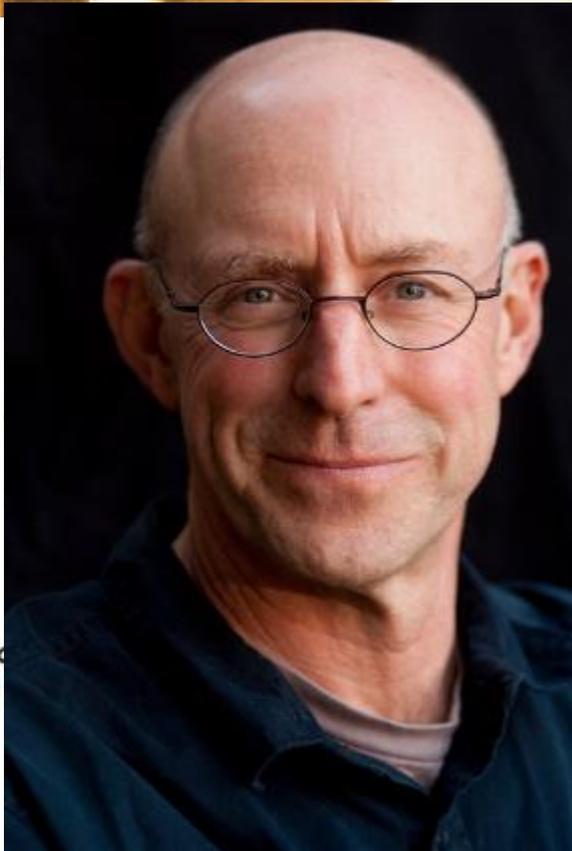
Mikrobiomanalysen als diagnostisches Tool



ORDER NOW

MAILING LIST

ACTIVATE KIT



Frequency

Your

s. other
s
cutes
eroidetes
obacteria
comicrobia
obacteria



Mikrobiom Sequenzierzentrum



INSTAND e.v.
Molekulargenetische Mikrobiom-Analyse
Gruppe 580
★★ Ringversuchsleitung ★★



Europäisches Ringversuchszentrum Mikrobiomanalysen



Dr. Gläsner



Dr. Hiergeist



C. Irtenkauf



H. Melzl



C. Deinzer



Prof. U. Reischl



F. Stämmli



Prof. R. Spang

Akkreditierung *Mikrobiomanalyse*

- **Projektstart 2014:** Entwicklung von Spike-in-Kontrollen, Stabilisierungspuffer, SOP-Finalisierung, Kontakt zum Sektorkomitee der DAkkS
- **2.11.15:** Vortrag in Frankfurt vor Sektorkomitee mit Diskussion
- **9.12.15:** Ganztägiges Audit in Regensburg (Prof. McKenzie)
- **Q I 2016:** Entwicklung Checkliste (8 Autoren, 72 Checkpunkte)
- **2/2016:** Stellungnahme Qualitätssicherungskommission der DGHM
- **10/2016:** Feststellung medizinischer Indikationen: *C. difficile*-Infektionen FMT, GvHD
- **10/2017: DAkkS-Urkunde** nach Instituts-Gesamt-Reakkreditierung

Akkreditierung der NGS basierten Mikrobiom-Analytik nach DIN EN ISO 15189 (med. Laboratorien)

 Universitätsklinikum Regensburg	Arbeitsanweisung zur Methodendurchführung	INSTITUT FÜR KLINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE UNIVERSITÄTSKLINIKUM REGENSBURG Prof. Dr. André Gessner
		Next-Generation Sequenzierung mit dem Roche GS Junior+ System Seite 1 von 15 Version A Datum: 03.09.2012

 Universitätsklinikum Regensburg	Arbeitsanweisung zur Methodendurchführung	INSTITUT FÜR KLINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE UNIVERSITÄTSKLINIKUM REGENSBURG Prof. Dr. André Gessner
		Arbeitsanweisung zur Methodendurchführung Seite 1 von 11 Version B Datum: 18.05.2015

Arbeitsanweisung: AM-BA-611/A
Next-Generation Sequenzierung mit dem GS Junior+ System

Arbeitsanweisung: AM-BA-600/B
Herstellung eines Internen Mikrobiom-Standards zur Mikrobiom-Analyse

 Universitätsklinikum Regensburg	Arbeitsanweisung zur Methodendurchführung	INSTITUT FÜR KLINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE UNIVERSITÄTSKLINIKUM REGENSBURG Prof. Dr. André Gessner
		DNA Isolierung für die Mikrobiom-Analyse mit dem MagNA Pure 96 System Seite 1 von 10 Version A Datum: 03.09.2012

- 16 Arbeitsanweisungen
- 9 Geräte-SOPs, Validierungs-Berichte
- > 400 DIN A4 Seiten
- Checkliste
- Indikationsliste
- Begutachtung: 16.12.2015

Arbeitsanweisung: AM-BA-601/A
DNA Isolierung für die Mikrobiom-Analyse mit dem MagNA Pure 96 System

Arbeitsanweisung: AM-BA-603/B
Real-time PCR Quantifizierung des Internen Mikrobiom Standards

 Universitätsklinikum Regensburg	Arbeitsanweisung zur Methodendurchführung	INSTITUT FÜR KLINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE UNIVERSITÄTSKLINIKUM REGENSBURG Prof. Dr. André Gessner
		Emulsions-PCR für die Sequenzierung mit dem Roche GS FLX+ System Seite 1 von 14 Version A Datum: 03.09.2012

 Universitätsklinikum Regensburg	Arbeitsanweisung zur Methodendurchführung
	

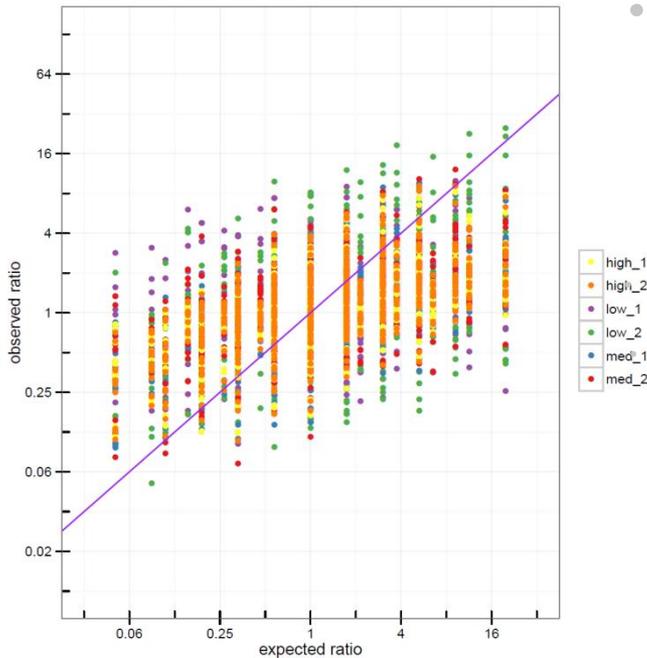
Arbeitsanweisung: AM-BA-612/A
Next-Generation Sequenzierung mit dem GS FLX+ System

Arbeitsanweisung: AM-BA-604/B
Nachweis von Bakterien 16S rDNA (speziesübergreifend) zur Mikrobiom-Analyse

Arbeitsanweisung: AM-E
Quantifizierung von 16S ribosomalen RNA Genkopien in DNA-Präparationen

16srDNA NGS: Process Control / Normalization / Quantification

internal

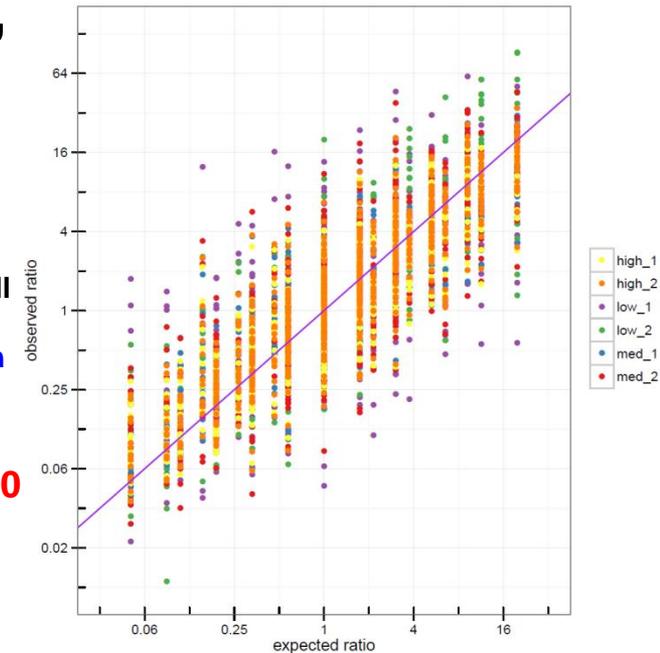


- 5 spike bacteria, **cultivable, countable**
- **absent** in animal or human gut microbiota
- **Representative** for taxa and cell wall compositions
- **Robust and selective quantification** by qPCRs in mixtures

Patented No. 2985350



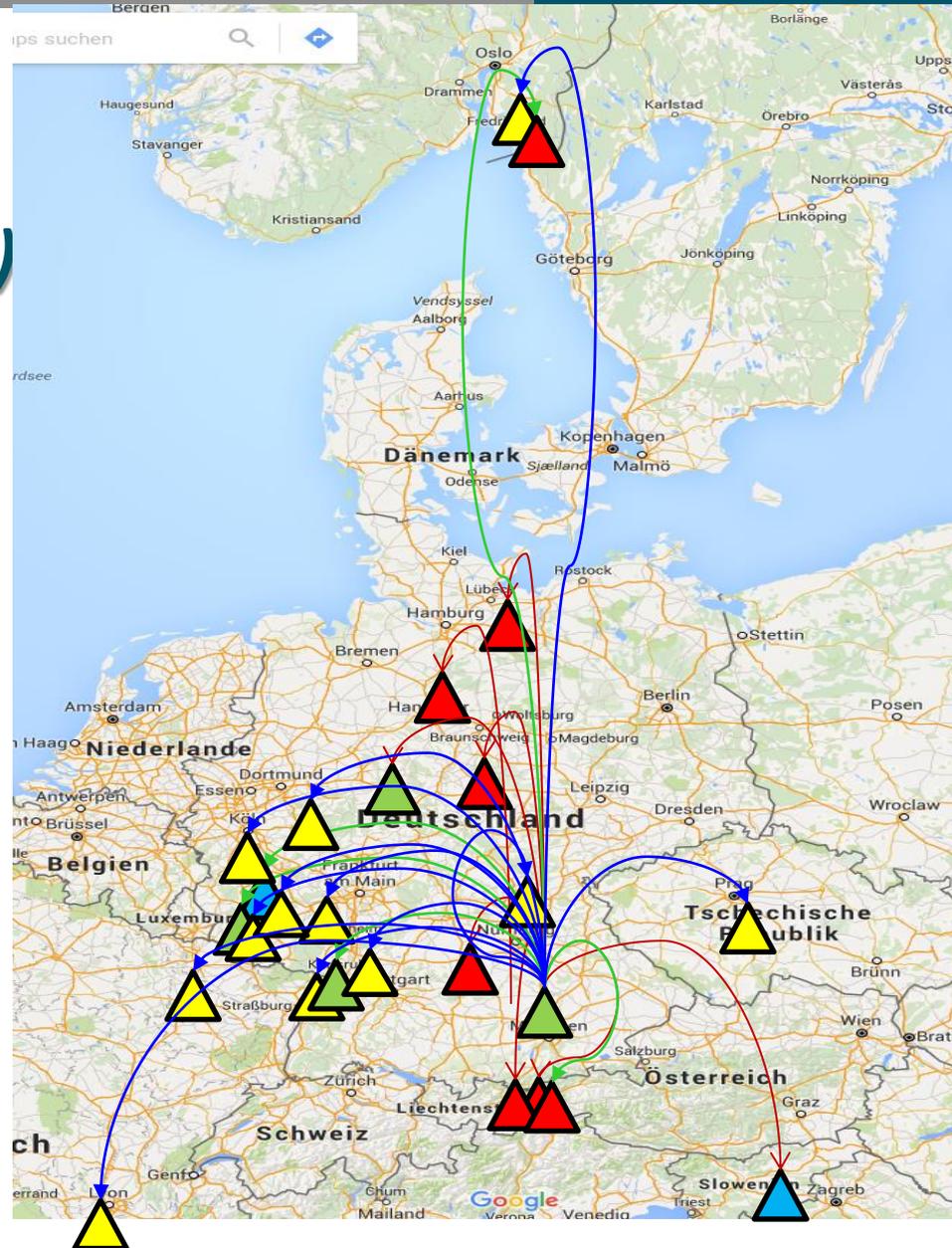
spiked



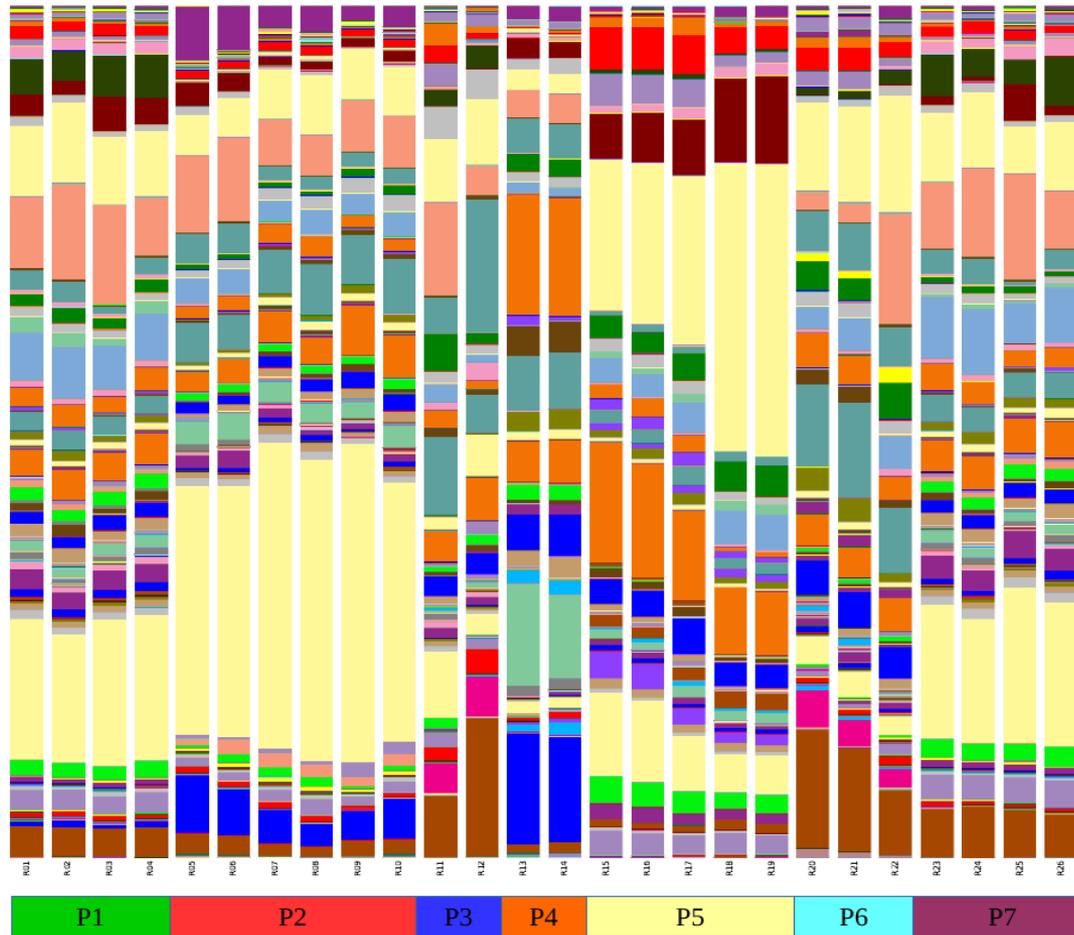
latin square tests: 1 sample, 6 dilutions x 6 spike combinations = 36-plicate NGS

Ringversuch (EQA)

2014
2015
2016
2017
2018



- ▲ Roche/454
- ▲ Illumina
- ▲ IonTorrent
- ▲ NA (2016)



Uniform Data Analysis Of Raw Sequencing Data - All Samples (Stool, DNA) -

- Raw Data QC for each Participant
- QIIME 1.9.1
- Reference based OTU picking (97 %, Uclust)
- Silva release 119 16S Database
- Merged OTU tables

Taxonomic Level: Genus

Participants

Roche/454
GS Junior+

IonTorrent
PGM

Illumina
MiSeq

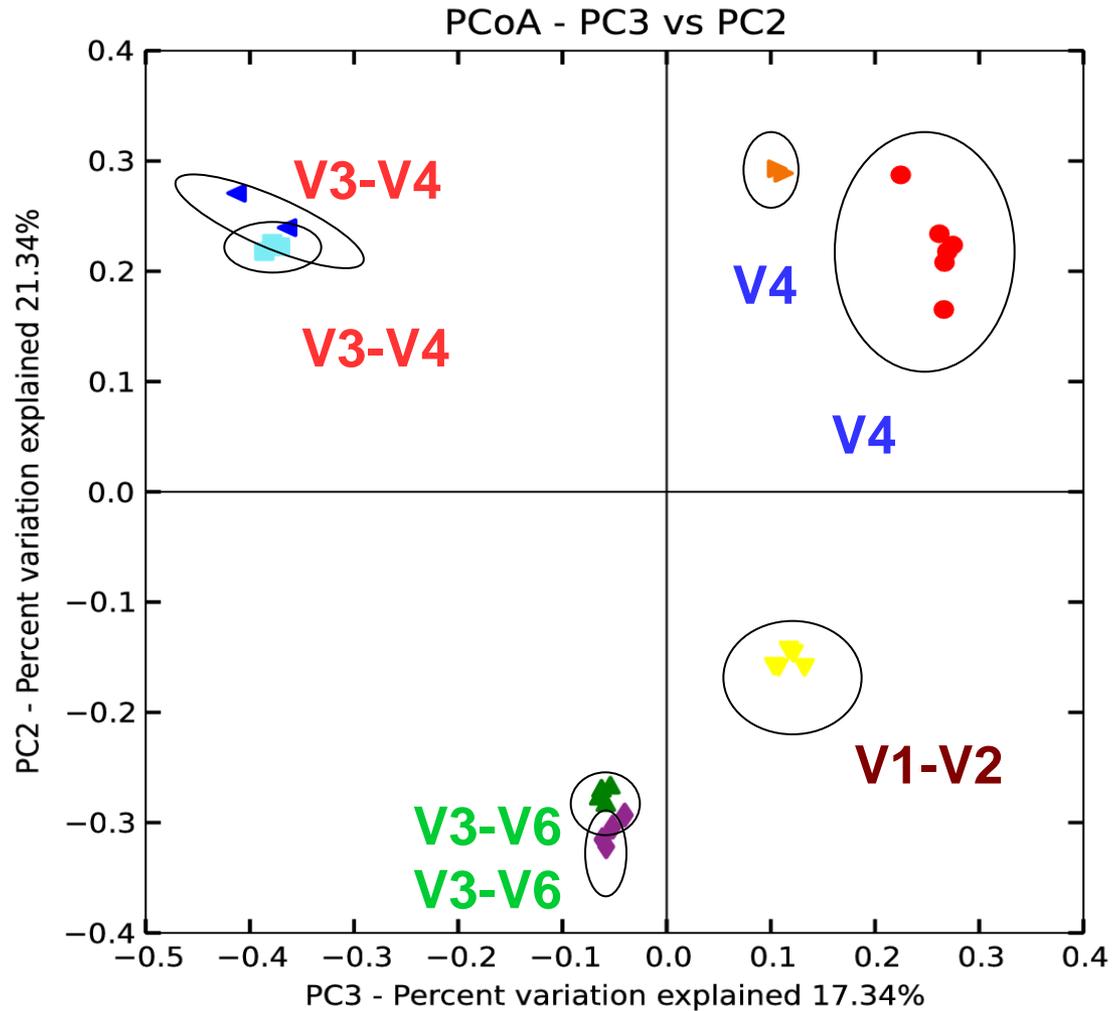
Illumina
MiSeq

Illumina
MiSeq

Illumina
MiSeq

Roche/454
GS FLX+

Beta Diversity - 16S V-Region



Principal Coordinate Analysis
Bray Curtis Distance

Zusammenfassung

Mikrobiom-Analysen in der Diagnostik

- **Mikrobiom: Individuell
veränderbar
größer als wir**
- **Krankheitsassoziationen: Allgemein- bis Zahnmedizin**
- **Anwendungsreife therapeutische Optionen
für Prophylaxe und Therapie**
 - **Molekulare Diagnostik durch NGS
(Standardisierung und Qualitätssicherung
dringend erforderlich!)**

Vielen Dank !

Sigrid Bülow

Joachim Gläsner

Andreas Hiergeist

Christine Irtenkauf

Holger Melzl

Udo Reischl

Rainer Spang

Frank Stämmler

Ernst Holler

Daniela Weber