



Gilbert Greub<sup>1</sup>, Marta Rosikiewicz<sup>1</sup> und Claire Bertelli<sup>1</sup>

# Mikrobiota-Analyse in einem diagnostischen Labor: Definitionen, Anwendungen und Qualitätsaspekte

Während der vergangenen zehn Jahre wurden in diagnostischen Labors zahlreiche neue Technologien eingeführt, mit deren Hilfe schneller mehr Informationen gewonnen werden können. Neben der Methode MALDI-TOF, die 2009 in die meisten Labors Einzug hielt, und der Automatisierung, die sich schrittweise von serologischen auf molekularbiologische und klassische mikrobiologische Labors (Mikroskopie und Kultur) ausweitete, hat die Ankunft der Hochdurchsatzsequenzierung ebenfalls dazu geführt, dass mehr Informationen aus der mikrobiologischen Zusammensetzung eines gegebenen Bereichs auf ausreichend schnelle und zuverlässige Weise gewonnen werden können, was sie zu einem leistungsfähigen Werkzeug der Diagnostik macht. Wir haben seit Beginn des Jahres 2012 in Lausanne die Bakteriengenomik sowie die Mikrobiota-Analyse entwickelt und konnten unser Labor für die Bakteriengenomik und Metagenomik dieses Jahr akkreditieren lassen. Die Bemühungen um die Akkreditierung haben es uns ermöglicht, die Anwendungen der Hochdurchsatzsequenzierung in der Diagnostik zu präzisieren und Protokolle äusserst genau zu definieren.

## Definitionen

Zur Hochdurchsatzsequenzierung der mikrobiellen Diversität stehen unterschiedliche Analysemethoden zur Verfügung. Einfacher ausgedrückt gibt es zwei Haupttypen der Hochdurchsatzsequenzierung für die Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung: mit und ohne Amplifikation durch PCR (Tabelle 1).

In diesem Artikel konzentrieren wir uns auf die Mikrobiota-Analyse auf Basis der Amplifikation durch PCR, die auch Post-PCR-Metagenomik oder einfach Mikrobiota-Analyse heisst. Der Begriff Metagenomik sollte der Amplifikation der gesamten in einer gegebenen Probe vorhandenen Genome vorbehalten sein, die auch direkte oder Shotgun-Metagenomik genannt wird.

## Hauptanwendungen von Analysen der mikrobiellen Diversität in der klinischen Mikrobiologie

In der Vergangenheit zielte die Mikrobiologie hauptsächlich darauf ab, das Vorhandensein pathogener Mikroben in einer klinischen Probe nachzuweisen, um so den auslösenden Erreger einer Infektion zu bestimmen. Dies ist eine der am häufigsten eingesetzten Anwendungen, da es möglich ist, anhand der Mikrobiota-Analyse auf

Grundlage von Amplikons, die durch auf die 16S ribosomale RNA abzielende PCR gewonnen wurden, das Prinzip der Eubakterien-PCR auch auf nicht physiologisch sterile Proben anzuwenden, was bislang ein komplexes Verfahren darstellte. In der Tat war bei einer Mischflora ein Schritt zur Amplikonklonierung erforderlich, um die Gesamtheit der mikrobiellen Diversität beobachten zu können. Dieser Klonierungsschritt war aber dem Einsatz in der wissenschaftlichen Forschung vorbehalten. Die Mikrobiota-Analyse unter Verwendung verschiedener, spezifischerer PCR, die auf konservierte, unterscheidende Gene (z.B. *rpoB*, *gltA*) abzielen, wird sich in diagnostischen

Labors weiterentwickeln und schrittweise die klassische Eubakterien-PCR ablösen, an die sich eine Sanger-Sequenzierung anschliesst.

Die übrigen Anwendungen der klinischen Metagenomik verändern die Wahrnehmung unserer Spezialisierung vollkommen, da es sich bei unseren Kunden nicht mehr nur um Ärzte handelt, die sich mit Infektionen befassen (Intensivmediziner, Notärzte, Kinderärzte, Infektiologen ...), sondern auch um Spezialisten, die in der Hauptsache mit nicht infektiösen Krankheiten konfrontiert sind (Endokrinologen, Diabetologen, Dermatologen ...). In der Tat könnte die Analyse der Mikrobiota im Verdauungsapparat beispielsweise

Tabelle 1: Analyse der mikrobiellen Diversität durch Hochdurchsatzsequenzierung (Metagenomik im weiteren Sinn).

Mit PCR-Amplifikation	Ohne PCR-Amplifikation
Profiling von Mikroben = Post-PCR-Metagenomik	Direkte Metagenomik Shotgun-Metagenomik Metagenomik (im engeren Sinn)
Ergebnisse beschränken sich auf die mikrobielle Zusammensetzung	Es sind Informationen zur mikrobiellen Vielfalt verfügbar, aber auch zu metabolischen Fähigkeiten, zum Resistom und zum Virulom der in der Probe vorhandenen Mikroben
Auf Bakterien begrenzt	Einschliesslich Informationen zum Vorkommen bzw. Fehlen von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten
Schnelle Ergebnisse, kostengünstige Analyse	Teuer, komplexe Analyse

<sup>1</sup> Institut de Microbiologie, CHUV, Lausanne

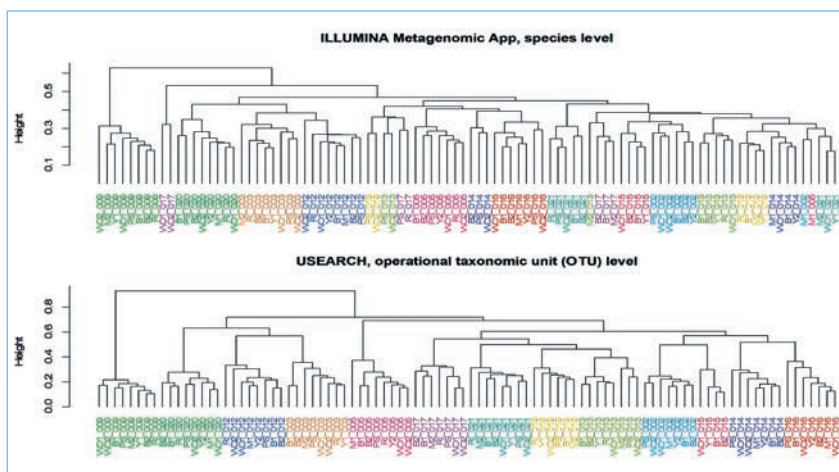


Abbildung 1: Bioinformatischer Pipelinetypeffekt angewendet auf das Clustering der Mikrobiota von Sequenzierungsproben aus Stuhlproben gesunder Personen. Jede Farbe steht für die Probe einer bestimmten Person. Zu beachten ist, dass die Mikrobiota einer Person relativ konstant ist (wenn weder eine Behandlung mit Antibiotika noch ein grösserer Eingriff vorliegt). Mit dem «Usearch»-Ansatz gruppieren sich die Proben einer Person gemäss den Erwartungen. Die Informatikpipeline, die standardmässig von Illumina vorgeschlagen wird, lässt eine Beobachtung dieser Gruppierung nicht zu.

bei der Behandlung von Patienten, die unter Obesitas und/oder Typ-2-Diabetes leiden, hilfreich sein (1). Die Analyse der Mikrobiota der Haut könnte Dermatologen bei der genaueren Bestimmung der Physiopathologie gewisser Krankheiten wie der atopischen Dermatitis oder Psoriasis unterstützen und bei neuen Therapieansätzen hilfreich sein. Ebenso könnte die Analyse der Mikrobiota der Haut nützlich sein, wenn es darum geht, bei Patienten mit umfangreichen Verbrennungen die die Haut besiedelnden Keime zu identifizieren, und eine Hilfe bei der Wahl der empirischen Therapie darstellen, wenn klinische und paraklinische Anzeichen nicht kontrollierter Infektionen auftreten. Ebenso könnte die Analyse der Plazenta und/oder eines vaginalen Abstrichs im Falle einer Fehlgeburt dem Geburtshelfer dabei helfen, den eventuellen ursächlichen Erreger der Fehlgeburt zu ermitteln und so erneute Fehlgeburten zu vermeiden. Auch könnte die Analyse der Mikrobiota des Verdauungstrakts Onkologen Hinweise darauf liefern, wie sich Chemotherapien und die neuen, heute eingesetzten Immuntherapien auf unsere Darmflora niederschlagen. Wie in einem Artikel dieser Ausgabe beschrieben (2), ist die Identifizierung einzelner Personen anhand ihrer Speichelzusammensetzung eine neuartige Anwendung in der Kriminologie, welche die Ent-

nahme von schlecht erhaltenen Proben am Tatort eines Verbrechens ermöglicht (angesichts der besseren Haltbarkeit der DNA von Bakterien im Vergleich zur menschlichen DNA, insbesondere von grampositiven Bakterien). Eine weitere Anwendung der Mikrobiota-Analyse in der Kriminologie ist die Feststellung, ob bei einem im Wasser gefundenen Leichnam Tod durch Ertrinken vorliegt oder ob die Leiche erst nach dem Tod im Wasser versenkt wurde (etwa zur Vertuschung eines Verbrechens). Wie die oben genannten Beispiele zeigen, ist das Anwendungsfeld der Mikrobiota-Analyse in der klinischen Mikrobiologie weit und wird sich in den kommenden Jahren noch weiter ausdehnen. Daher gilt es hier, die Analysemethoden zu definieren, die ausreichend zuverlässig und reproduzierbar sind und deren Interpretation einfach genug ist, sodass sie in der Routinediagnostik angeboten werden können. In diesem Zusammenhang ist es unerlässlich, dass diese verschiedenen künftigen Anwendungen den Bereich der wissenschaftlichen Forschung verlassen und Schritt für Schritt von klinischen Mikrobiologen umgesetzt werden, die sich bei ihrem Tätigkeitsansatz auch Gedanken zu qualitativen Aspekten vor, während und nach der Analyse machen.

## Analyse du microbiote dans un laboratoire diagnostic: définitions, applications et aspects qualité

Le séquençage à haut débit est une révolution récente dans la microbiologie diagnostique qui permet d'entrevoir de nombreuses nouvelles applications dont l'analyse du microbiote par séquençage de gènes conservés. Ces nouvelles technologies nous permettent d'avoir plus de données plus rapidement, mais représentent une révolution technologique qui nécessite l'adaptation des compétences de nos microbiologistes cliniques et de nos équipes. Afin d'avoir les bioinformaticiens nécessaires à l'analyse fine des données, nous avons initié il y a quelques années à Lausanne un cycle d'enseignement de l'analyse microbiologique des données issus du séquençage de nouvelles générations, et ce dans le cadre de travaux pratiques dispensés au niveau Master à l'école de biologie (4). Cet enseignement, d'ailleurs couronné du «Biology teaching award de la Faculté de Biologie et Médecine», a porté ses fruits et nous permet aujourd'hui d'avoir la masse critique de bioinformaticiens. Nous avons par ailleurs passablement travaillé sur les aspects formels en préparant des directives et procédures dans notre système de documents d'accréditation (système v-doc) et ce pour les différentes étapes clefs.

### Qualitative Aspekte

Im Rahmen einer kürzlich in Lausanne durchgeführten Studie wurden von 14 Teilnehmern jeweils neun Stuhlproben seriell untersucht. Die Teilnehmer hatten gewisse Ernährungsvorschriften zu beachten und erhielten mit Probiotika versetzte Joghurt- oder Sauermilchprodukte im Cross-over-Verfahren mit Wash-out-Phasen (3).

Tabelle 2: Wichtige Schritte bei Analysen der Mikrobiota

N°	Schritte
1	Testindikation
2	Probenahme (Probentyp, Entnahmemodalitäten, Lagerung, Fristen)
3	DNA-Extraktion
4	Amplifikation durch PCR (Zielgen...)
5	Sequenzierungstyp (Illumina, PacBio...)
6	Bioinformatikanalysen (Pipelintyp, Datenbank...)
7	Technische Validierung der erhaltenen Sequenzen
8	Biomedizinische Validierung und Interpretation der Ergebnisse



Die signifikante Anzahl an Proben, die von jeweils denselben Probanden stammten, machte es uns möglich, den Einfluss unterschiedlicher bioinformatischer Pipelines auf die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu untersuchen. Wie in Abbildung 1 dargestellt, ermöglichte uns eine der Pipelines das präzise Clustering der Proben nach Studienteilnehmern (jeder Teilnehmer wird durch eine andere Farbe dargestellt). Eine andere Pipeline jedoch, und zwar die von Illumina standardmässig vorgeschlagene, erlaubte nur eine weniger gute Unterscheidung der unterschiedlichen Proben nach Teilnehmern. Zwar ist es schwierig, ohne Richtwerte Schlussfolgerungen zu ziehen, jedoch zeigt diese einfache Analyse trotz allem den bedeutenden Einfluss des angewendeten bioinformatischen Werkzeugs. So müssen mikrobiologische Diagnostiklabors genaue Pipelinegrenzwerte erarbeiten und die Nachverfolgbarkeit der verwendeten Pipeline sicherstellen. Unter Verwendung der Stuhlproben von drei Probanden (005, 013 und 009) aus derselben Studie (3) konnten wir zudem den grossen Einfluss von Datenbanken zeigen (Abbildung 2), die für die Klassifizierung der erhaltenen 16S-Sequenzen eingesetzt wurden. Wie aber Abbildung 3 deutlich zeigt, beeinflusst nicht nur die bioinformatische Analyse die Ergebnisse massgeblich, dasselbe gilt beispielsweise auch für die DNA-Extraktion. Das Macherey-Nagel-Kit erweist sich für die Extraktion der DNA von Firmicutes und Actinobacteriae als wesentlich besser geeignet als das Qiagen-Kit.

**Schlussfolgerungen**

Die Hochdurchsatzsequenzierung stellt eine aktuelle Revolution in der diagnostischen Mikrobiologie dar, mit der sich zahlreiche neue Anwendungen auftun, darunter die Mikrobiota-Analyse durch Sequenzierung von konservierten Genen. Diese neuen Technologien ermöglichen uns eine schnellere und umfangreichere Datenerhebung, stellen aber auch eine technologische Revolution dar, die eine Anpassung der Kompetenzen unserer klinischen Mikrobiologen und unserer Teams erfordert. Um auf die für eine Feinanalyse unserer Daten notwendigen Bio-

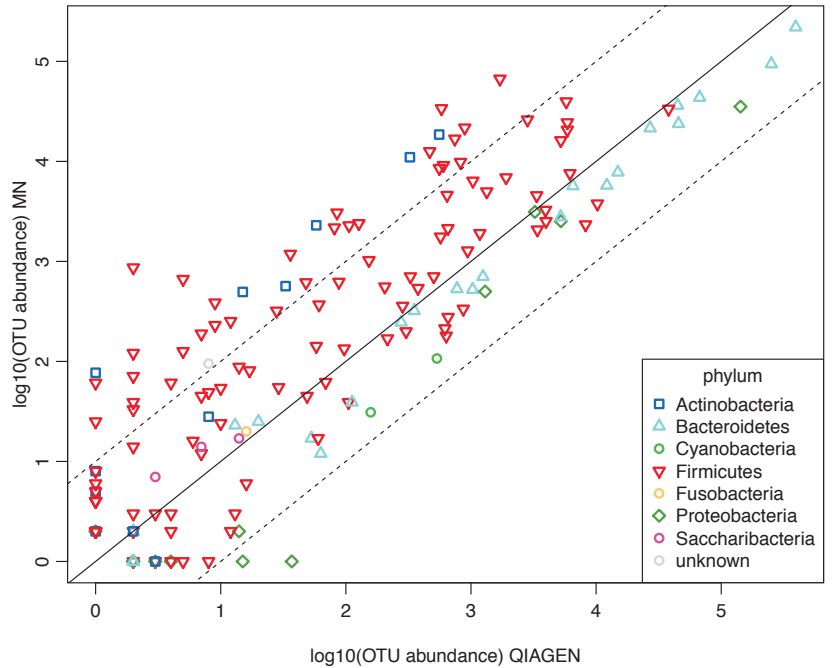


Abbildung 3: Vergleich der Menge an verschiedenen Mikroben nach zwei DNA-Extraktionstypen. Die Überlegenheit des Macherey-Nagel-Kits zur Extraktion der DNA von Firmicutes (rote Dreiecke) und Actinobacteriae (blaue Quadrate) im Vergleich zum Qiagen-Kit ist signifikant (mehr als ein Log Unterschied).

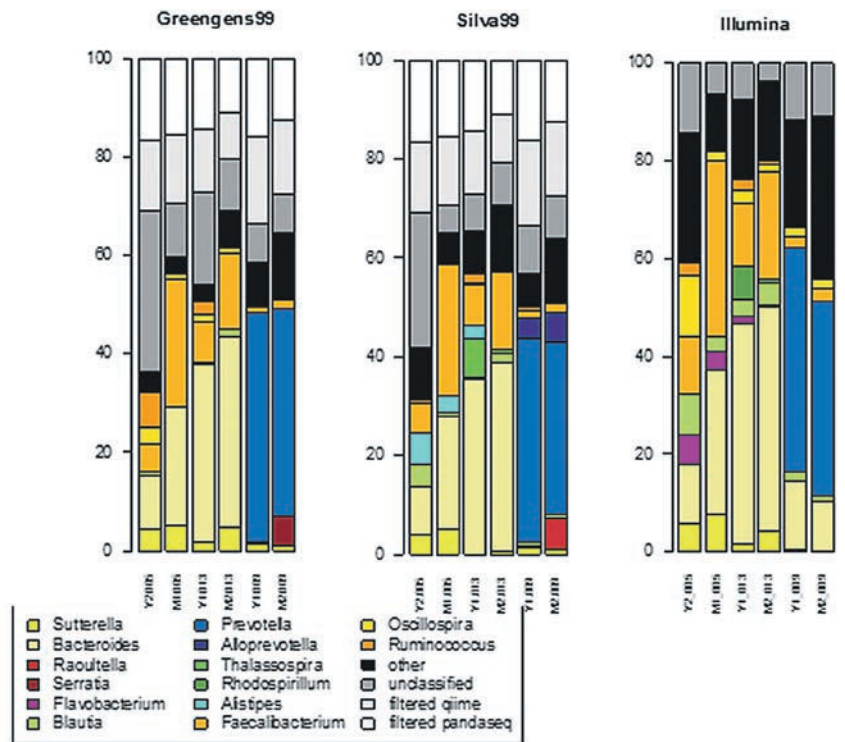


Abbildung 2: Die mikrobielle Diversität von drei Personen wurde mithilfe dreier verschiedener Datenbanken analysiert: Greengens99, Silva99 und Illumina. Die Ergebnisse weichen sehr stark voneinander ab und zeigen den enormen Einfluss der verwendeten Datenbank auf die Analyseergebnisse der mikrobiellen Diversität.





informatiker zurückgreifen zu können, haben wir vor einigen Jahren in Lausanne einen Unterrichtszyklus zum Thema mikrobiologische Analyse von Daten aus Sequenzierungen der neuen Generation eingeführt, der im Rahmen praktischer Arbeiten auf Masterniveau an der biologischen Fakultät vermittelt wird (4). Dieser Unterricht, an dessen Ende der Abschluss «Biology Teaching Award der Fakultät für Biologie und Medizin» steht, hat bereits Früchte getragen und dafür gesorgt, dass wir heute über die kritische Masse an Bioinformatikerinnen und Bioinformati-

kern verfügen. Wir haben uns zudem recht intensiv mit den formalen Aspekten beschäftigt und innerhalb unseres Systems der Akkreditierungsdokumente (V-doc-System) Richtlinien und Verfahren ausgearbeitet, und zwar für die verschiedenen Schritte, die in Tabelle 2 aufgelistet sind.

Korrespondenz  
Gilbert.Greub@chuv.ch

La version française de l'article se trouve en ligne sur [www.sulm.ch/pipette](http://www.sulm.ch/pipette)

#### Referenzen

- Somm E, Henry H, Bruce SJ, Aeby S, Rosikiewicz M, Sykiotis GP, Asrih M, Jornayvaz FR, Denechaud PD, Albrecht U, Mohammadi M, Dwyer A, Acierno JS Jr, Schoonjans K, Fajas L, Greub G, Pitteloud N.  $\beta$ -Klotho deficiency protects against obesity through a crosstalk between liver, microbiota, and brown adipose tissue. *JCI Insight*. 2017 Apr 20;2(8). pii: 91809.
- Scherz V, Bertelli C, Palmiere C, Taroni F, Greub G. Microbiote et médecine forensique: une nouvelle évidence? *Pipette* 2018, diese Ausgabe.
- Burton KJ, Rosikiewicz M, Pimentel G, Büti-kofer U, von Ah U, Voirol MJ, Croxatto A, Aeby S, Drai J, McTernan PG, Greub G, Pralong FP, Vergères G, Vionnet N. Probiotic yogurt and acidified milk similarly reduce postprandial inflammation and both alter the gut microbiota of healthy, young men. *Br J Nutr*. 2017 May;117(9):1312–1322.
- Bertelli C, Aeby S, Chassot B, Clulow J, Hilfiker O, Rappo S, Ritzmann S, Schumacher P, Terrettaz C, Benaglio P, Falquet L, Fari-nelli L, Gharib WH, Goesmann A, Harshman K, Linke B, Miyazaki R, Rivolta C, Robinson-Rechavi M, van der Meer JR, Greub G. Sequencing and characterizing the genome of *Estrella lausannensis* as an undergraduate project: training students and biological insights. *Front Microbiol*. 2015 Feb 19;6:101.
- Opota O, Greub G. Mentor-mentee relationship in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect*. 2017 Jul;23(7):448–453.

## Citizen Science mit der App «Zecke»

Die App «Zecke» zeigt, wie man eine Zecke entfernt und informiert über Zeckenkrankheiten. Das Zeckentagebuch erinnert 5, 10 und 28 Tagen nach dem Stich zur Symptomkontrolle. Zusätzlich zu den anonymen Daten senden App-User die entfernten Zecken per Post zu Forschungszwecken ans Referenzlabor NRZK. [www.zecke-tique-tick.ch](http://www.zecke-tique-tick.ch)



## ZENTRUM FÜR LABORMEDIZIN

Diagnostische und klinische  
Kompetenz aus einer Hand®

Das ZLM St. Gallen gehört zu den führenden medizinisch-diagnostischen Laboratorien der Schweiz. Unsere rund 180 Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter führen Routine- und Spezialanalysen in der Klinischen Chemie, Hämatologie, Hämostaseologie, Mikrobiologie, Immunologie, Molekularbiologie, Genetik und Veterinärmedizin durch. Zu unseren Auftraggebern zählen das Zentrumsspital Kantonsspital St. Gallen mit seinen 3 Standorten, die Spitäler aller Spitalregionen des Kantons St. Gallen, niedergelassene Ärztinnen und Ärzte sowie andere nationale und internationale Spitäler und Universitäten. Unsere Labordiagnostik ist hochgradig automatisiert und vernetzt.

**Wir suchen zum nächst möglichen Zeitpunkt bzw. nach Vereinbarung eine/n**

**Biomedizinische/r Analytiker/in BMA HF (oder vergleichbar) 100%**

**um unser Team in der humanmedizinischen Mikrobiologie zu ergänzen.**

**Besuchen Sie uns auf [www.zlmsg.ch/karriere/stellenangebote](http://www.zlmsg.ch/karriere/stellenangebote)**

Das Labor hat erfolgreich eines der modernsten WASPLabs in den Routinebetrieb integriert und setzt mit der Digitalisierung der Gram-Präparate europaweit Maßstäbe. Klassische interpretative Beurteilung der Kulturen sind eng vernetzt mit hochtechnologischer Unterstützung bei Anlage, Inkubation und Ablesung.

Ihre Hauptaufgaben umfassen die Durchführung eines vielfältigen Analysenspektrums nach akkreditierten Richtlinien, die Beteiligung an Weiterentwicklungen in der Automation, von Methoden und des Analysenspektrums sowie Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragestellungen. Im Turnus leisten Sie Wochenend-, Spät- und Pikettendienste.

Wir erwarten einen aufgeschlossenen, teamfähigen und modern denkenden Charakter, idealerweise mit Berufserfahrung im Bereich der Medizinischen Mikrobiologie. Es erwartet Sie eine spannende und anspruchsvolle Aufgabe an der derzeitigen technologischen Grenze in der Bakteriologie in einem modernen und expandierenden Unternehmen, Möglichkeiten der internen und externen Weiterbildung sowie zeitgemäße und attraktive Anstellungsbedingungen unter Einbeziehung der Vorsorgeleistungen des Kantons St. Gallen runden das Angebot ab.

**Weitere Auskünfte erteilt Ihnen gerne:**

Dr. Salome Seiffert, T +41 71 494 37 62

**Bitte richten Sie Ihre Bewerbung, vorzugsweise per Mail an:**

Frau Monika Staubli, HR Management  
Frohbergstrasse 3, 9001 St. Gallen, [hr@zlmsg.ch](mailto:hr@zlmsg.ch)