

Detekce mikrobiomu horních močových cest u pacientů s urolitiázou: studie proveditelnosti

Profiling upper urinary tract microbiota: a feasibility study in patients with urinary stone disease

Jan Hrbáček¹, Vítězslav Hanáček¹, Vojtěch Tláškal^{2,3}, Martina Saláková⁴, Pavel Čermák⁵, Ruth Tachezy⁴, Roman Zachoval¹

¹Urologická klinika 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní Thomayerovy nemocnice, Praha

²Ústav půdní biologie a biogeochemie, Biologické centrum AV ČR, České Budějovice

³Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha

⁴Katedra genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha

⁵Oddělení klinické mikrobiologie Fakultní Thomayerovy nemocnice, Praha

Došlo: 31. 10. 2022

Přijato: 25. 11. 2022

Korespondující autor:

MUDr. Jan Hrbáček, Ph.D.

Urologická klinika 3. LF UK

a Fakultní Thomayerovy nemocnice

Vídeňská 800

140 59 Praha

e-mail: jan.hrbacek@ftn.cz

Prohlášení o podpoře: Podpořeno MZ ČR – RVO („Thomayerova nemocnice – TN, 00064190“) Supported by Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization („Thomayer hospital – TN, 00064190“).

Hlavní stanovisko práce: Nejen dolní, ale i horní močové cesty jsou osídleny společenstvím mikroorganismů.

Major statement: Upper urinary tract seems to harbour microbial communities, similar to the lower urinary tract

SOUHRN

Hrbáček J, Hanáček V, Tláškal V, Saláková M, Čermák P, Tachezy R, Zachoval R. Detekce mikrobiomu horních močových cest u pacientů s urolitiázou: studie proveditelnosti.

Cíl: Zjistit, zda existuje mikrobiální osídlení horních močových cest (HMC) a pokud ano, tak liší-li se od mikrobiomu dolních močových cest (DMC).

Materiál a metoda: Soubor tvoří pacienti podstupující endoskopický operační zákrok v anestezii pro litiázu HMC. Moč z močového měchýře byla odebrána aseptickou katetrizací, z HMC cystoskopicky zavedeným ureterálním katétre. Po izolaci DNA byla bakteriální 16S rDNA sekvenována na platformě Illumina MiSeq a získaná data zpracována příslušnými bioinformatickými nástroji. Část izolované DNA byla využita k detekci virových nukleových kyselin pomocí kvantitativní polymerázové

řetězové reakce (qPCR). Párové vzorky vždy z HMC a DMC byly porovnány z hlediska struktury bakteriálního společenstva a přítomnosti vybraných DNA virů.

Výsledek: Zařazeno bylo devět pacientů (8 mužů a 1 žena) průměrného věku 49,7 let, z nichž u osmi byla provedena sekvenace bakteriálních nukleových kyselin a u sedmi qPCR na přítomnost sedmi běžných DNA virů. Bohatost a diverzita mikrobiomu (alfa diverzita) HMC a DMC nebyla statisticky významně odlišná. Struktura mikrobiálních komunit z HMC a DMC (beta diverzita) vykazala větší podobnost v rámci jednoho pacienta, než byla podobnost všech vzorků HMC, resp. všech vzorků DMC. Virová DNA byla detekována jak v HMC, tak v DMC.

Závěr: Výsledky naší pilotní studie poukazují na přítomnost bakteriálního a virového osídlení horních močových cest u pacientů s urolitiázou.

KLÍČOVÁ SLOVA

Lidský mikrobiom, horní močový trakt, virom, ledvina, močový měchýř.

ABSTRACT

Hrbáček J, Hanáček V, Tláskal V, Saláková M, Čermák P, Tachezy R, Zachoval R. Profiling upper urinary tract microbiota: a feasibility study in patients with urinary stone disease.

Aim: To investigate the putative existence of upper urinary tract microbiota and if present, to compare the microbial communities from the kidney with those in the urinary bladder.

Patients and Methods: Patients were undergoing endoscopic procedures under anesthesia for upper urinary tract stones. Bladder urine was obtained by aseptic catheterisation, renal urine samples were collected via ureteric catheter inserted into the renal pelvis under cystoscopic and radiographic guidance. Pairwise comparison of urine samples from the same individual were made with regard to their bacteriome and virome.

Results: A total of nine patients (8 males, 1 female) provided both samples for analysis. Next-generation sequencing of the V4 hypervariable region of the 16S rDNA using primers 515F and

806R was performed on eight of them and quantitative polymerase chain reaction for the presence of viral nucleic acids of seven common DNA viruses was performed on seven of them. There were no significant differences in alpha diversity measures (number of OTUs, iChao1, ACE, Shannon and Simpson indices) of samples from the kidney and bladder from the same individual. Likewise, microbial communities from the upper and lower urinary tract within the same individual were more similar to each other than samples within the respective group (e.g. all kidney samples). Viral nucleic acids were detected in the upper as well as lower urinary tract.

Conclusion: Upper urinary tracts seem to be inhabited by microbial communities whose composition resembles that of the lower urinary tract.

KEY WORDS

Human microbiome, upper urinary tract, virome, kidney, urinary bladder.

.....

ÚVOD

Výzkum lidského mikrobiomu – mikrobiálních populací žijících v různých anatomických lokalitách našeho těla, tzv. nikách – dosáhl v posledních dvou dekádách významného pokroku. Na rozdíl od mikrobiomu např. gastrointestinálního traktu, jehož znalost již významně pokročila, jsou ostatní niky probádané daleko méně. Že moč zdravých asymptomatických žen není sterilní, nýbrž obsahuje kultivovatelné mikroorganismy a k tomu DNA desítek či stovek dalších, jejichž kultivace je problematická až nemožná, víme od roku 2011 (1), respektive 2016 (2). Následující práce prokázaly odlišnosti ve složení mikrobiomu u různých klinických situací, např. u žen s urgentní inkontinencí ve srovnání se zdravými kontrolami (3) nebo u žen s intersticiální cystitidou ve srovnání se zdravou populací (4). Mužský močový mikrobiom začal být zkoumán s určitým zpožděním. Dosud byly popsány mj. odlišnosti ve složení mikrobiálních komunit u mužů

s různou závažností symptomů dolních močových cest (DMC) při benigní hyperplazii prostaty (5) nebo u pacientů s karcinomem močového měchýře a zdravými kontrolami (6).

Zatímco bakteriom močového traktu postupně odkrýváme, virom močových cest je takřka neznámý. Většina informací o močovém viromu je známa díky studiím na pacientech po transplantaci ledviny, u kterých BK polyomavirus (BKV) způsobuje nefropatii štěpu asociovanou s polyomavirovou infekcí (7). Většina virů obsažených v moči jsou bakteriofágy – viry infikující bakterie (8), avšak podařilo se detekovat i viry napadající eukaryotní buňky. Z klinického hlediska byla přítomnost polyomavirů spojena s rejekcí štěpu po transplantaci ledviny (9), v ojedinělých studiích také s intersticiální cystitidou (8) nebo hyperaktivním močovým měchýřem (10).

Cílem prezentované pilotní studie bylo zjistit, zda jsou mikrobiální společenství – bakteriom a virom – detekovatelná nejen v dolních, ale i v horních močových cestách (HMC) a pokud ano, tak zda se mikrobiomy horních a dolních močových cest liší.

SOUBOR PACIENTŮ A METODA

Prezentovaný soubor tvoří část pacientů zařazených do naší studie močového mikrobiomu, jejíž výsledky byly publikovány dříve (11–13). Pacienti podstupovali endoskopický operační zákrok na močových cestách, jehož standardní součástí byla katetrizace HMC. Studie byla schválena nemocniční etickou komisí a všichni pacienti podepsali před odběrem moči informovaný souhlas.

Předoperační kultivace moči byla (s jednou výjimkou pacienta č. 6) negativní. Antibiotická profylaxe byla (opět s jednou výjimkou pacienta č. 2) podávána až po odběru obou vzorků moči. Žádný ze subjektů studie neměl v močových cestách zavedeno cizí těleso, např. stent nebo močovou cévku.

Vzorek moči z močového měchýře, resp. dolních močových cest (DMC) byl odebrán po zarouškování, dezinfekci genitálu a zavedení cystoskopu s použitím lubrikačního gelu bez mikrobicidní

příměsí. Poté byl měchýř naplněn fyziologickým roztokem a do předpokládané oblasti renální pánvičky zavedena 7 F ureterální cévka; později jsme používali 70 cm mono-J stenty. Moč byla odebrána samospádem odkapáním do připravené sterilní zkumavky v množství 5–50 ml. Z provozních důvodů netrval žádný odběr déle než 10 minut. Oba vzorky byly uloženy při 4 °C a týž den zmrazeny a poté uchovány při -20 °C až do extrakce DNA.

K izolaci DNA byl použit Eligene Urine Isolation Kit (Elisabeth Pharmakon, Brno, ČR) dle instrukcí výrobce. Hypervariabilní region V4 genu pro bakteriální 16S rRNA byl amplifikován polymerázovou řetězovou reakcí s primery 515 F a 806R v krocích popsanych dříve (11). Po vytvoření sekvenčních knihoven pomocí nástroje TruSeq DNA PCR-Free LP Kit byla DNA sekvenována na platformě Illumina MiSeq 2x250 bazí (Illumina Inc., San Diego, USA).

Sekvenční data byla analyzována postupem popsaným dříve (12). Po vypuštění dat s nízkou kvalitou byly sekvence seskupeny do operačních taxonomických jednotek (OTU) na úrovni 97% podobnosti, což odpovídá bakteriálnímu druhu. Analýza alfa a beta diverzity byla provedena v prostředí R 4.2.0 (14) pomocí balíčku vegan 2.6-2 (15). Byl spočítán počet OTU reprezentujících 95 % celkové bakteriální komunity v každém vzorku, iChao1 (16), ACE (abundance-based coverage estimator) (17), Shannonův a Simpsonův index. Průměrná hodnota rozdílnosti pro jednotlivé skupiny byla spočítána na základě Bray-Curtis distanční matice. Statistické rozdíly byly považovány za signifikantní na úrovni $p < 0,05$.

Integrita izolované DNA a přítomnost inhibitorů byla ověřena amplifikací kontrolního genu pro lidský beta globin (18). Poté byla provedena detekce BKV, JC polyomaviru (JCV), torque-teno viru (TTV), viru Epstein-Barrové (EBV), lidského cytomegaloviru (HCMV) a adenovirů pomocí kvantitativní PCR (qPCR), HPV byly identifikovány pomocí PCR s následnou reverzní hybridizací na membráně. Pro jednotlivé qPCR byly použity již publikované primery a hydrolyzační próby značené fluorescenční barvou FAM na 5' konci a zhasěčem BHQ-1 na 3' konci. Seznam všech primerů a prób je k dispozici u korespondujícího autora na vyžádání. Reakce

o celkovém objemu 10 ml se skládala z 1× PCR pufru, 5mM MgCl₂, 200M dNTPs, 0,5 μM koncentrace každého přímého a zpětného primeru a 0,25 μM sondy, 0,25 U HotStart Taq Polymerase (Qiagen, Německo) a DNA templátu. Amplifikační reakce probíhala v cycleru Biorad CFX96 Real-Time PCR (Biorad Laboratories, Kalifornie, USA) za následujících podmínek: aktivace polymerázy 15 min. při 95 °C, následovaná 45 cykly po 15 s při 94 °C a 1 min. při 60 °C. qPCR byly validovány pomocí klinických vzorků a plazmidů s virovými cílovými sekvencemi. DNA lidského papillomaviru (HPV) byla detekována kombinací dvou PCR s primery specifickými pro oblast L1. Určení typu HPV bylo provedeno pomocí hybridizace amplikonů PCR se sondami specifickými pro 37 typů HPV na membráně (18).

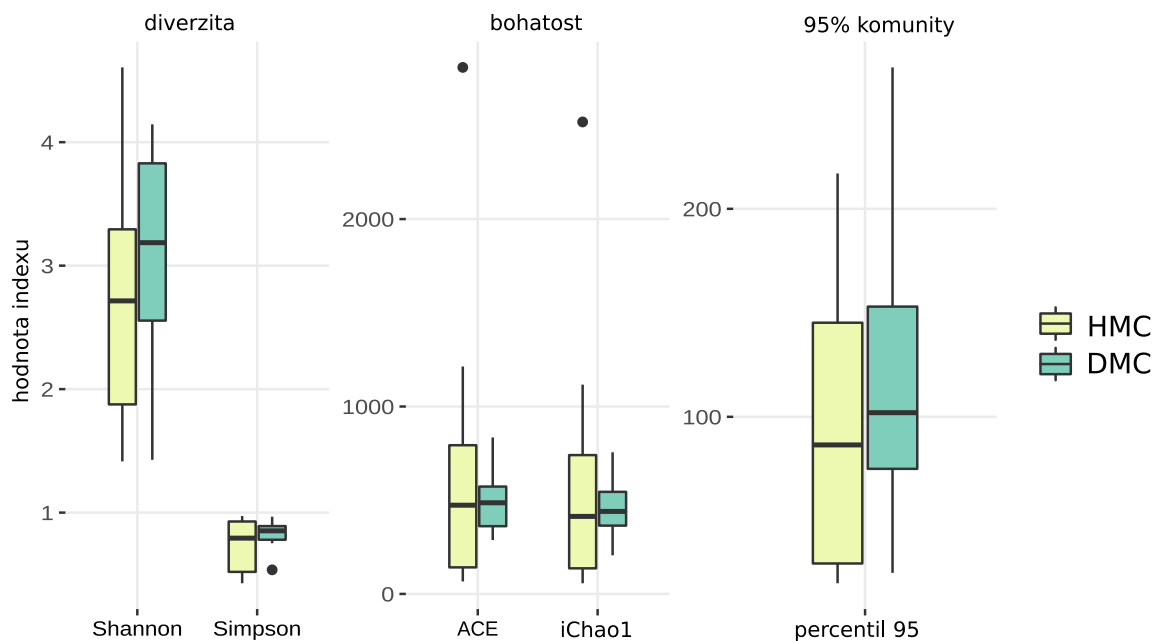
VÝSLEDKY

Prezentovaný soubor čítá 9 pacientů (8 mužů a 1 ženu) průměrného věku 49,7 let (mezikvartilové rozpětí 39–57) operovaných na našem pracovišti mezi říjnem 2019 a říjnem 2020 pro litiázu HMC.

Nefrolitiázu mělo pět pacientů, ureterolitiázu osm a u dvou byl výskyt konkrementů bilaterální. Z hlediska komorbidit trpěli tři pacienti hypertenzí, jeden diabetem, zatímco chronickou renální insuficiencí stupně 3 a více neměl nikdo. Průměrný body mass index byl 28,6 (± 8,3), čtyři pacienti se označili za kuřáky. Medián doby mezi předoperační kultivací moči a odběrem vzorku byl jeden den.

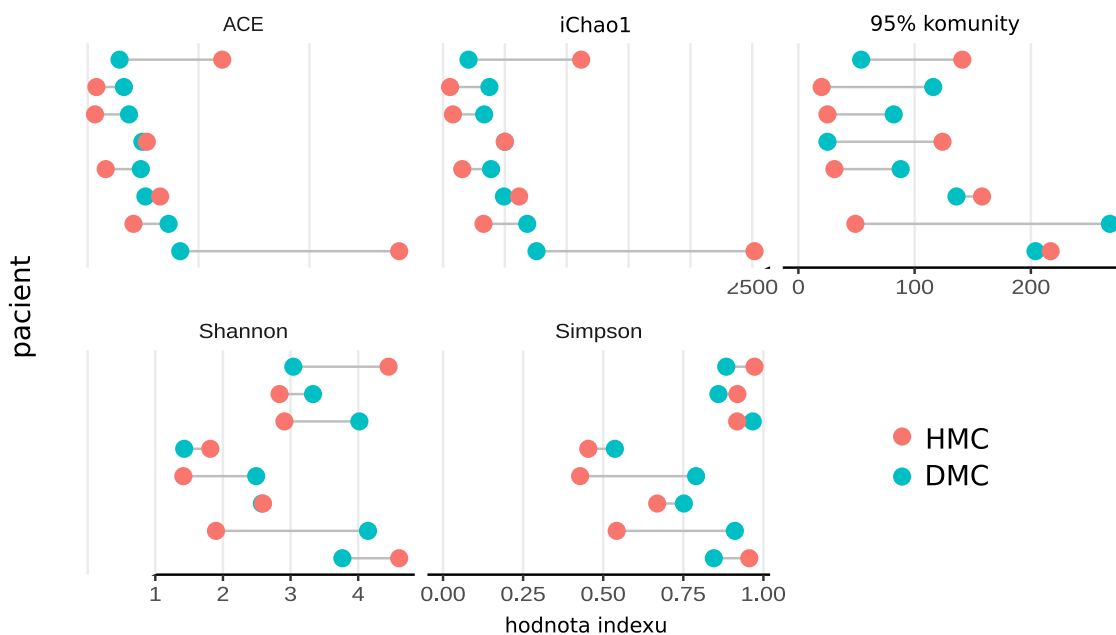
K dispozici jsme měli osm párových vzorků pro porovnání bakteriálního mikrobiomu dolních a horních močových cest. Počet individuálních taxonomických jednotek na úrovni druhů ve vzorcích z HMC a DMC a jejich relativní zastoupení (abundance) se statisticky významně nelišily v žádném z měřítek diversity (počet taxonů pokrývajících 95 % relativní abundance, indexy iChao1 a ACE, ani indexy Shannona a Simpsonův) (Obr. 1). Obrázek 2 ilustruje všech 8 pacientů a jejich indexy alfa diversity individuálně.

Párové vzorky z HMC a DMC z jednoho pacienta si byly podobnější než vzorky z HMC a DMC v rámci své skupiny navzájem. Rozdílnost vzorků od různých pacientů byla signifikantní ($p = 0,008$). Obrázek 3 dokládá podobnost moči z HMC a DMC formou úseček spojujících vždy dva párové vzorky od každého paci-

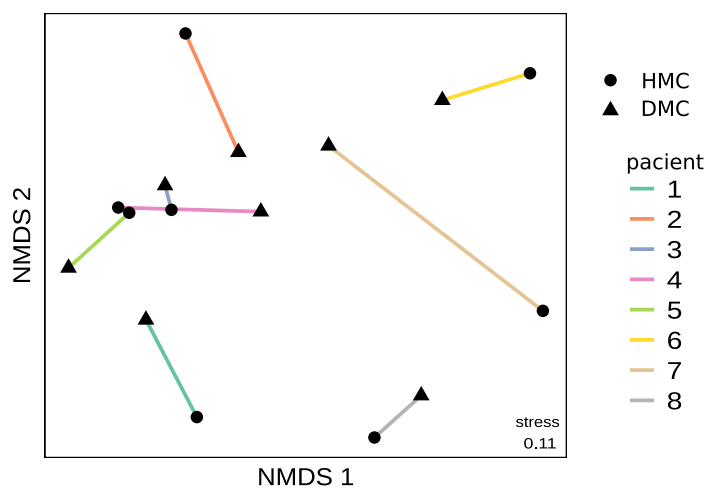


Obr. 1. Porovnání hodnot indexů alfa diversity pro vzorky moči z horních a dolních močových cest; v žádném z nich není rozdíl statisticky významný; bližší vysvětlení významu jednotlivých indexů v textu

Fig. 1. Alpha diversity indices of samples from the upper and lower urinary tract, respectively; no statistically significant differences were detected; see text for details



Obr. 2. Porovnání bohatosti (indexy ACE, iChao1 a počet taxonů reprezentujících 95 % komunity v každém vzorku) a diverzity (indexy Shannonův a Simpsonův) jednotlivých párů vzorků moči z horních a dolních močových cest
Fig. 2. Individual pairwise comparisons of alpha diversity indices (number of operational taxonomic units, iChao1, abundance-based coverage estimator, Shannon and Simpson indices) from kidney and bladder samples



Obr. 3. Graf NMDS – nemetrického vícerozměrného škálování znázorňuje dvojice vzorků moči z horních a dolních močových cest pro pacienty 1–8. Vzdálenosti mezi párovými vzorky (úsečky spojující trojúhelníky a kroužky) jsou v součtu kratší než vzdálenosti mezi kroužky nebo trojúhelníky navzájem. To dokládá vyšší míru podobnosti mezi páry močí z měchýře a ledviny než v rámci skupiny močí z měchýře resp. ledvin. Koncentrace trojúhelníků v centru grafu a rozptýlenost kroužků na okrajích naznačuje vyšší míru vzájemné podobnosti taxonomického složení vzorků z močového měchýře než z ledvin.

Fig. 3. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot – shows the (dis)similarity of samples from the bladder and the kidney, respectively, from the same individual (circle=kidney urine, triangle=bladder urine). The longer the connecting line between a circle and a triangle, the more the samples are dissimilar. The cumulative distance between circles and their corresponding triangles is shorter than the distance between all triangles or all circles which suggests the samples from the same individual are relatively similar.

Tab. 1. Detekce nukleových kyselin vybraných DNA virů ve vzorcích moči z horních a dolních močových cest. HMC horní močové cesty DMC dolní močové cesty, EBV virus Epstein a Barrové, HCMV lidský cytomegalovirus, BKV BK polyomavirus, JCV JC polyomavirus, TTV torque teno virus, HPV lidský papillomavirus, HAdVs adenovirus, NT netestováno.

Tab. 1. The detection of viral nucleic acids in the upper and lower urinary tract. EBV Epstein-Barr virus, HCMV human cytomegalovirus, BKV BK polyomavirus, JCV JC polyomavirus, TTV torque teno virus, HPV human papillomavirus, HAdVs human adenovirus, NT not tested.

Pacient		EBV	HCMV	BKV	JCV	TTV	HAdVs	HPV
1	HMC	—	—	—	—	+	—	—
	DMC	—	—	—	—	+	—	—
2	HMC	—	—	+	—	+	—	—
	DMC	—	—	—	—	—	—	—
3	HMC	—	—	—	—	—	—	—
	DMC	—	—	—	—	—	—	—
4	HMC	—	—	—	—	—	—	—
	DMC	—	—	—	—	—	—	—
5	HMC	NT	—	—	—	—	—	NT
	DMC	—	—	—	—	—	—	—
8	HMC	—	—	—	+	—	—	—
	DMC	—	—	—	+	—	—	—
9	HMC	—	—	—	+	—	—	—
	DMC	—	—	—	—	—	—	—

enta. Taxonomické složení vzorků z močového měchýře vykazovalo nižší rozdílnost (průměrná rozdílnost 0,775) než složení vzorků z ledvin (rozdílnost 0,849).

Detekci viromu zároveň dolních i horních močových cest jsme provedli u sedmi pacientů. U pěti z nich byl nález v HMC i DMC shodný, ve dvou případech byly v HMC nalezeny virové DNA, které se nepodařilo detekovat v DMC (Tab. 1).

DISKUZE

V době, kdy jsme vytvářeli design projektu detekce a popisu močového mikrobiomu nebylo jasné, zda vůbec u mužů existuje mikrobiální osídlení DMC, natož pak HMC. Předkládané výsledky jsou dílčí analýzou z rozsáhlého objemu dat, která se nám podařilo shromáždit. Z těchto dílčích výsledků vyplývá, že mikrobiální společenství jsou detekovatelná nejen v močovém měchýři, ale také v HMC. Kromě toho lze usuzovat, že bakteriální komunity žijící v HMC a DMC jsou si u daného jedince poměrně podobné.

Naše výsledky lze zasadit do kontextu jediné práce testující stejnou hypotézu. Dornbier et al. zkoumali přítomnost mikroorganismů v kalciové urolitiáze, přičemž od šesti pacientů získali vzorky moči jak z HMC, tak z DMC. Ani v jejich případě nebyly rozdíly ve složení mikrobiálních komunit HMC a DMC statisticky významné (19). Mikrobiomem kalciových konkrementů se zabývali také Xie et al. (20). Jejich statistické zpracování však nezahrnuje párové porovnání vzorků, nýbrž pouze srovnání na úrovni skupin, což je pro daný typ analýzy neadekvátní.

Některé viry se vyskytují i v moči zdravých jedinců. Příkladem jsou polyomaviry BKV a JCV, se kterými se většina lidí setká v dětském věku, a které dokáží dlouhodobě přežívat v ledvinách a epitelální výstelce HMC (21). Dalším v populaci rozšířeným virem prokazatelným v séru 90 % dospělých jedinců, jenž ale není spojován s žádným onemocněním, a který se podařilo detekovat z moči, je TTV. TTV se v hostiteli dlouhodobě replikuje; jeho aktuální virová nálož odpovídá poměru mezi rychlostí replikace a schopností hostitelského organismu se virionů zbavovat

(22) a je vyšší u imunokompromitovaných osob (23) a pacientů s nádorovými onemocněními (24).

V naší studii byly u dvou pacientů vzorky z HMC pozitivní na BKV a TTV (pac. č. 2), resp. JCV (pac. č. 9), zatímco moč z měchýře DNA těchto virů neobsahovala. K přítomnosti virů v jednotlivých oblastech močového traktu neexistují v literatuře prakticky žádné informace. Rozdílné výsledky jsou patrně způsobeny metodickým omezením při izolaci DNA z moči a qPCR. Zajímavé by do budoucna bylo využití ještě citlivějších metod, jako je masivní paralelní sekvenování nebo digitální PCR (ddPCR). Metoda ddPCR předčí svou citlivostí qPCR: téměř 7× snižuje detekční limit pro DNA JCV v mozkomíšním moku (25).

Za hlavní limitaci v metodice naší pilotní studie považujeme odběr moči z HMC ureterálním katétreem zavedeným cystoskopicky přes močový měchýř. Zde nelze vyloučit kontaminaci vzorku z HMC moči z měchýře, kterou může vysoce citlivá polymerázová řetězová reakce a následné sekvenování interpretovat jako přítomnost bakteriálního

osídlení i přes stopové množství kontaminující DNA. Kvantifikace přítomné DNA totiž sekvenováním není možná. Určit množství DNA ve vzorku umožňuje použití qPCR – v našem případě použitá k detekci močového viromu. Zde však byly koncentrace DNA ve vzorcích z HMC a z DMC podobné. Druhou limitací je fakt, že všichni pacienti měli litiázu močových cest, a proto výsledky nemusejí platit pro jedince bez močových kamenů. Pro vyloučení pochybností o existenci mikrobiomu HMC by bylo vhodné v budoucnu porovnat moč z DMC se vzorky odebranými z HMC perkutánně. Jak ovšem ze zkušenosti víme, legitimní klinická indikace tohoto typu je řídkým jevem.

ZÁVĚR

Výsledky naší pilotní studie poukazují na pravděpodobnou přítomnost mikrobiálního osídlení horních močových cest u pacientů s urolitiázou.

LITERATURA

1. Siddiqui H, Nederbragt AJ, Lagesen K, Jeansson SL, Jakobsen KS. Assessing diversity of the female urine microbiota by high throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. *BMC Microbiol.* 2011; (11): 1–12.
2. Price TK, Dune T, Hilt EE, et al. The Clinical Urine Culture: Enhanced Techniques Improve Detection of Clinically Relevant Microorganisms. *J Clin Microbiol.* 2016; 54(5): 1216–22.
3. Pearce MM, Hilt EE, Rosenfeld AB, et al. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence. *MBio.* 2014; 5(4).
4. Siddiqui H, Lagesen K, Nederbragt AJ, Jeansson SL, Jakobsen KS. Alterations of microbiota in urine from women with interstitial cystitis. *BMC Microbiol* [Internet]. 2012; 12: 205. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/205>.
5. Bajic P, Kuiken ME van, Burge BK, et al. Male Bladder Microbiome Relates to Lower Urinary Tract Symptoms. *Eur Urol Focus* [Internet]. 2020; 15(6): 376–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.euf.2018.08.001>.
6. Wu P, Zhang G, Zhao J, et al. Profiling the Urinary Microbiota in Male Patients With Bladder Cancer in China. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018; 8: 167.
7. Novotná E, Viklický O. BK virová infekce po transplantaci ledvin. *Vnitř Lék.* 2008; 54(9): 835–41.
8. Miller-Ensminger T, Garretto A, Brenner J, Thomas-white K, Zambom A, Wolfe AJ. Bacteriophages of the Urinary Microbiome. *J Bacteriol.* 2018; 200(7): e00738-17.
9. Sigdel TK, Mercer N, Nandoe S, Nicora CD. Urinary Virome Perturbations in Kidney Transplantation. *Front Med.* 2018; 5(April): 72.
10. Garretto A, Thomas-White K, Wolfe AJ, Putonti C. Detecting viral genomes in the female urinary microbiome. *J Gen Virol.* 2018; 99: 1141–6.

11. Hrbacek J, Morais D, Cermak P, Hanacek V, Zachoval R. Alpha-diversity and microbial community structure of the male urinary microbiota depend on urine sampling method. *Sci Rep* [Internet]. 2021; 11(1). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03292-x>.
12. Hrbacek J, Tlaskal V, Cermak P, Hanacek V, Zachoval R. Bladder Microbiota Are Associated with Clinical Conditions That Extend beyond the Urinary Tract. *Microorganisms*. 2022; 10(5): 1–14.
13. Hrbáček J, Tláškal V, Čermák P, Hanáček V, Zachoval R. Bladder cancer is associated with decreased urinary microbiota diversity and alterations in microbial community composition. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2022; přijato k publikaci.
14. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. [Internet]. 2022 [cited 2021 Sep 22]. Available from: <http://www.r-project.org/>.
15. Oksanen AJ, Blanchet FG, Friendly M, et al. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-2. Vol. 5, Community Ecology Package. 2022.
16. Chiu CH, Wang YT, Walther BA, Chao A. An improved nonparametric lower bound of species richness via a modified good-turing frequency formula. *Biometrics*. 2014; 70(3): 671–82.
17. O'Hara RB. Species richness estimators: How many species can dance on the head of a pin? *J Anim Ecol*. 2005; 74(2): 375–86.
18. Tachezy R, Smahelova J, Kaspírková J, Saláková M. Human papillomavirus type-specific prevalence in the cervical cancer screening population of Czech women. *PLoS One*. 2013; 8(11): 2–9.
19. Dornbier RA, Bajic P, Van Kuiken M, et al. The microbiome of calcium-based urinary stones. *Urolithiasis* [Internet]. 2020; 48(3): 191–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00240-019-01146-w>.
20. Xie J, Huang JS, Huang XJ, et al. Profiling the urinary microbiome in men with calcium-based kidney stones. *BMC Microbiol*. 2020; 20(1): 1–10.
21. Zhong S, Zheng HY, Suzuki M, et al. Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmuno-compromised individuals. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(1): 193–8.
22. Maggi F, Pistello M, Vatteroni M, et al. Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2001; 75(24): 11999–2004.
23. Frye BC, Bierbaum S, Falcone V, et al. Kinetics of Torque Teno Virus-DNA Plasma Load Predict Rejection in Lung Transplant Recipients. *Transplantation*. 2019; 103(4): 815–22.
24. Saláková M, Nemecek V, König J, Tachezy R. Age-specific prevalence, transmission and phylogeny of TT virus in the Czech Republic. *BMC Infect, Dis*. 2004; 4(1): 56.
25. Giovannelli I, Ciccone N, Vaggelli G, et al. Utility of droplet digital PCR for the quantitative detection of polyomavirus JC in clinical samples. *J Clin Virol*. 2016; 82: 70–5.