

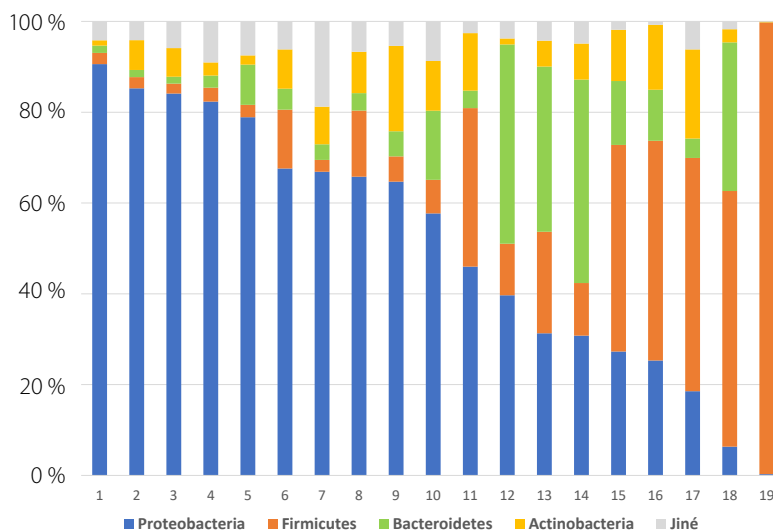
EQUC zůstává, že organismy vyžadující ke svému růstu jiné podmínky nebo speciální živiny se ani touto robustní metodou vykultivovat nepodaří.

Druhý způsob zkoumání MM využívá jednu z přelomových technologií molekulární biologie: sekvenování nukleových kyselin. Protože většina z nás nesekvuje nukleové kyseliny každý den, připomeneme si základní princip: DNA polymeráza syntetizuje nový řetězec komplementární DNA dle existujícího templátu a pořadí inkorporovaných deoxyribonukleotid-fosfátů dešifruje konkrétní DNA sekvenci (10). Namísto jednoho si nyní představte miliony různých fragmentů DNA sekvenované paralelně v jednom okamžiku na čipu velikosti dvou sim-karet v plně automatizovaném systému, který zkrátí dobu zpracování vzorku od odběru po kompletní přečtení genetické informace na řádově hodiny. V rámci jednoho pracovního cyklu (tzv. runu) přístroje Illumina MiSeq, který je v současnosti nejužívanější platformou NGS (11), lze takto zpracovat DNA z desítek vzorků různého původu a biologické povahy (12). Detekce bakterií technikou sekvenování je založena na existenci DNA, která se vyskytuje pouze u prokaryot a nemůže tedy být obsažena v žádné lidské buňce. Jde o vysoce konzervovaný gen pro 16S rRNA (r jako ribozomální), který však v sobě obsahuje hypervariabilní regiony V1 až V9. Unikátnost hypervariabilních regionů se využívá při NGS k taxonomickému zařazení mikroorganismů (13).

Nevýhodou NGS je, že metoda není kvantitativní (proto vždy hovoříme o „relativní abundanci“, tj. procentuálním zastoupení sekvencí náležejících určitému druhu, vztaženému k celkové kvantitě DNA ve vzorku – obr. 1) a krom toho nelze s jistotou říci, že detekované fragmenty DNA pocházejí z aktuálně živého mikroorganismu (14). NGS je dále zatížena řadou metodologických pastí a nejasností (11), jejichž rozbor leží mimo zaměření tohoto článku.

Zpracování těžko představitelného objemu generovaných dat je vyhrazeno softwarovým algoritmům (15), s jejichž pomocí se vzniklé sekvence filtrují dle délky, odstraňují artefakty a prokazatelně reálné úseky DNA se nakonec porovnávají (opět automaticky a online) s mezinárodními databázemi DNA všech dosud známých mikroorganismů. To umožňuje taxonomické zařazení do tzv. operačních taxonomických jednotek (OTU). Dle kontextu může OTU představovat druh, rod, čeleď – podle toho, jak podrobně byla DNA ze vzorků sekvenována a jak jsou získané fragmenty specifické (pro konkrétní druh, rod či jen řád atp.).

I tak zůstává enormní množství informací, k jejichž zpracování byla vyvinuta řada biostatistických metod využívaných původně v mikrobiologii a ekologii, které jsou založeny na modelování a konstrukci hypotéz spíše než na tradičním statistickém posuzování pravděpodobnosti neplatnosti nulové hypotézy. K popisu mikrobiomu potom používáme názvosloví opět převzaté z buněčné biologie a eko-



**Obr. 1.** Graf relativní abundance kmenů zastoupených v 19 vzorcích moči (vlastní data autorů)

**Fig. 1.** Relativa abundance graph of phyla represented in 19 urine samples (original data)