

Mikrobiálna biodiverzita z nazofaryngálnych výterov na podklade metatranskriptómovej analýzy: pilotná štúdia

Michaela Hýblová¹, Dominik Hadzega¹, Klaudia Babišová¹, Patrik Krumpolec¹, Andrej Gnip¹, Peter Sabaka², Gabriel Minárik¹

¹MEDIREX GROUP ACADEMY, Nitra, Slovakia

²Department of Infectology and Geographical Medicine, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Bratislava, Slovakia

Celosvetový výskyt pandémie SARS-CoV-2 urýchlil výskum vo viacerých oblastiach vedy, ktorého cenné výstupy a zistenia pomôžu v budúcnosti riešiť zdravotné výzvy v prípade výskytu nových vírusov. Spravili sme metatranskriptómovú analýzu z nazofaryngálnych výterov pacientov s rôznou závažnosťou ochorenia COVID-19 a negatívneho kontrolného súboru na porovnanie rozdielov v bakteriálnom spektre a prítomnosti vírusov sekvenovaním RNA nezávislého od kultivácie. Pozorovali sme výrazné zvýšenie diverzity mikrobiálnych druhov u pacientov s COVID-19 bez ohľadu na závažnosť ochorenia. Bakteriálny kmeň *Actinobacteria* je výrazne viac zastúpený u zdravých ľudí ako u infikovaných, zatiaľ čo kmeň *Bacteroides* je zastúpený výrazne menej. Infikovaní ľudia bez ohľadu na závažnosť a príznaky majú v rovnakom pomere zastúpené kmene *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* a *Fusobacteriales*. Okrem SARS-CoV-2 a početných skupín fágov sme v niekoľkých vzorkách identifikovali sekvencie klinicky významných vírusov, ako je *Human Herpes Virus 1*, *Human Mastadenovirus D*, *Molluscum Contagiosum Virus* a *Rhinovirus A*. Analýzy boli realizované retrospektívne, preto sú v prípade SARS-CoV-2 zastúpené rôzne varianty (WHO klasifikácia) ako je *alpha* (B.1.1.7), *delta* (B.1.617.2), *omicron* (B.1.1.529) a 20C.

Kľúčové slová: metatranskriptóm, mikrobióm, SARS-CoV-2, viróm

Microbial biodiversity from nasopharyngeal swabs based on metatranscriptome analysis: a pilot study

The global emergence of the SARS-CoV-2 pandemic has accelerated research in several areas of science, the valuable outputs and findings of which will help to address future health challenges in the case of emerging viruses. We performed metatranscriptome analysis of nasopharyngeal swabs from patients with varying severity of COVID-19 disease and a negative control cohort to compare differences in the bacterial spectrum and viral presence via culture-independent RNA sequencing. We observed a significant increase in microbial species diversity in COVID-19 patients regardless of disease severity. Some bacterial *phyla*, such as *Actinobacteria*, are significantly more abundant in healthy subjects than in infected subjects, whereas the *Bacteroides* *phyla* are less abundant. Infected people, regardless of severity and symptoms, have *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Fusobacteriales* represented in equal proportions. In addition to SARS-CoV-2 and numerous phage groups, we identified sequences of clinically significant viruses such as *Human Herpes Virus 1*, *Human Mastadenovirus D*, *Molluscum Contagiosum Virus*, and *Rhinovirus A* in several samples. The analyses were performed retrospectively; therefore, different variants (WHO classification) are represented in SARS-CoV-2, such as *Alpha* (B.1.1.7), *Delta* (B.1.617.2), *Omicron* (B.1.1.529) and 20C.

Keywords: metatranscriptome, microbiome, SARS-CoV-2, virome

NewsLab, 2023; roč. 14 (1): 10 – 16

Úvod

Denne do seba vdýchame asi milión mikrobiálnych častíc. Horné dýchacie cesty sú hlavnou vstupnou bránou pre veľké množstvo vírusov, a to nielen respiračných. Sliznica nosovej dutiny je zároveň kolonizovaná širokým spektrom mikroorganizmov, ktorých špecifický význam nie je dobre objasnený. Pod vplyvom nedávnej pandémie COVID-19 sa do popredia dostal záujem o to, ako vírusová infekcia ovplyvňuje celkový mikrobióm dýchacích ciest. V súčasnosti sa intenzívne študuje mikrobiálna diverzita v kontexte závaž-

nosti ochorenia COVID-19, žiaľ, často s kontroverznými výsledkami⁽¹⁻³⁾.

Spomedzi baktérií prevládajú vo väčšine skúmaných anatomických oblastí vrátane horných dýchacích ciest (HDC) kmene *Bacteroidetes* a *Firmicutes*, ktoré sú najviac skúmanými zložkami ľudského mikrobiómu⁽⁴⁾.

Mikrobióm nosovej dutiny zdravého človeka je zložený predovšetkým z kmeňov *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* a *Proteobacteria* s prevahou zástupcov rodov *Bifido-*

Tabuľka 1. A. študovaná kohorta, charakteristika vek a pohlavie; **B.** Ct (len ťažkí, mierni, asymptomatickí pacienti)

A	počet	M	Ž	vek (medián)	SD	M	SD	Ž	SD
negatívne kontroly	72	26	46	37 (25-75)	10,59	42 (25-58)	9,05	35 (25-75)	11,45
ťažkí	30	16	14	68 (32-90)	13	69.5 (32-90)	13,6	64 (41-77)	11,7
mierni	25	13	12	37 (17-57)	11,83	38 (17-57)	12,77	32.5 (19-57)	10,54
asymptomatickí	24	14	10	42 (20-49)	7,86	39 (21-49)	9,35	43 (36-48)	3,72
	151	69	82	39,5		40,5		39	
		45,70 %	54,30 %						

B	Ct hodnoty E gén (medián)	SD
ťažkí	28.06 (13.9-37.3)	7,34
mierni	24.89 (15-38.77)	5,32
asymptomatickí	28.56 (19.24-33.59)	4,72

M – muži, Ž – ženy, SD – štandardná odchýlka (standard deviation), Ct – threshold cyklus v RT-PCR

bacterium, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Dolosigranulum* a *Moraxella*^(5,6).

O niečo menej známym faktom je, že ľudia sú tiež kolonizovaní pozoruhodným množstvom DNA a RNA vírusov, ktoré možno označiť ako viróm. Mnohé z nich sú schopné spôsobovať akútnu, perzistentnú alebo latentnú infekciu hostiteľa. Ľudský viróm pozostáva hlavne z bakteriofágov (fágov), ktoré infikujú baktérie, archeálnych vírusov, eukaryotických vírusov, ktoré infikujú ľudské bunky, a vírusov prechodne sa vyskytujúcich v potravinách^(7,8). Spomedzi identifikovaných vírusových genómov sa v horných dýchacích cestách najviac vyskytujú pikornavírusy, anellovírusy a bakteriofágy z čeľade *Siphoviridae*⁽⁹⁾.

Vo všeobecnosti existujú na identifikáciu mikroorganizmov dva hlavné sekvenčné prístupy: amplikónové sekvenovanie 16S rRNA a metagenomické shotgun sekvenovanie. Prvé z nich je atraktívne nižšími nákladmi, uprednostňuje sa v prostredí s nižšou mikrobiálnou diverzitou, a identifikuje najmä dominantné mikroorganizmy⁽¹⁰⁾. Druhá metóda sa vyznačuje robustnejším rozlíšením a pokrýva metagenómovú komunitu vrátane ľudského genómu, vírusov a húb, ktorú nie je možné zachytiť amplikónovým sekvenovaním⁽¹¹⁾. V našej štúdiu sme nahradili analýzu metagenómu metatranskriptomom, aby sme pokryli RNA vírusy, medzi ktoré patrí aj SARS-CoV-2. Nesekvenovali sme celkovú RNA, ale v počiatočných krokoch prípravy knižnice sme odstránili dominantnú ľudskú 18S rRNA, aby sme zvýšili relatívne množstvo reziduálnej ľudskej a mikrobiálnej, resp. vírusovej RNA. Vo všeobecnosti sa odhaduje, že 18S rRNA tvorí približne 80 – 90 % celkovej RNA v typickej bunke cicavcov⁽¹²⁾.

Materiál a metódy

Pacienti a vzorky

Štúdia sa uskutočnila so súhlasom Etickej komisie Bratislavského samosprávneho kraja pod identifikačným číslom 03228/2021/HF zo dňa 12. januára 2021. Všetci pacienti podpísali informovaný súhlas a dostali dotazníky s relevantnými otázkami týkajúcimi sa ich anamnézy a zdravotného stavu vo vzťahu ku COVID-19. Všetkých 151 pacientov bolo zo Slovenska a boli rozdelení do štyroch skupín: asymptomatickí (n = 24), pacienti s miernym/so stredne ťažkým (n = 25), s ťažkým/so závažným COVID-19 (n = 30) a negatívna kontrolná skupina (n = 72). Skupina pacientov so závažnou formou COVID-19 pochádzala z dvoch univerzitných nemocníc v Bratislave: Ružinov a Kramáre (Slovensko). Charakteristika

kohorty ohľadom veku a pohlavia účastníkov štúdie je zhrnutá v **tabuľke 1A**. Výtery z nosohltana boli odoberané od marca 2021 do októbra 2022 do transportného média viRNAtrap (GeneSpector, Česká republika) a do spracovania boli uchovávané pri teplote 4 °C v chladničke.

Izolácia RNA, RT-PCR a príprava knižnice

RNA bola izolovaná retrospektívne zo zberného média (z nosohltanového výteru) pomocou súpravy Sera-Xtracta™ virus/Pathogen Kit (Cytiva, UK) na stolnom automatizovanom zariadení KingFisher Flex (ThermoFisher Scientific, UK). Množstvo RNA sa meralo fluorometricky pomocou Qubit™ RNA High sensitivity (Invitrogen, USA). Izoláty RNA sa až do spracovania skladovali pri teplote –80 °C. Genomické knižnice sa pripravili pomocou súpravy Kapa HyperPrep s RiboErase Kit (Roche, USA) s depléciou eukaryotickej RNA pre 18S rRNA podľa odporúčaní výrobcu. Súčasťou prípravy knižnice je reverzný prepis RNA do cDNA v dvoch krokoch: 1. syntéza prvého vlákna cDNA pomocou náhodných primerov, 2. syntéza komplementárneho vlákna na ds cDNA pomocou dUDP. Na indexovanie vzoriek sa použili duálne adaptéry TruSeq CD spoločnosti Illumina. Výsledné knižnice sa kvantifikovali fluorometrickou analýzou pomocou súpravy Qubit™ dsDNA HS Assay (Invitrogen, USA) a fragmentovou analýzou pomocou súpravy čidiel High Sensitivity DNA (Agilent Technologies, Litva).

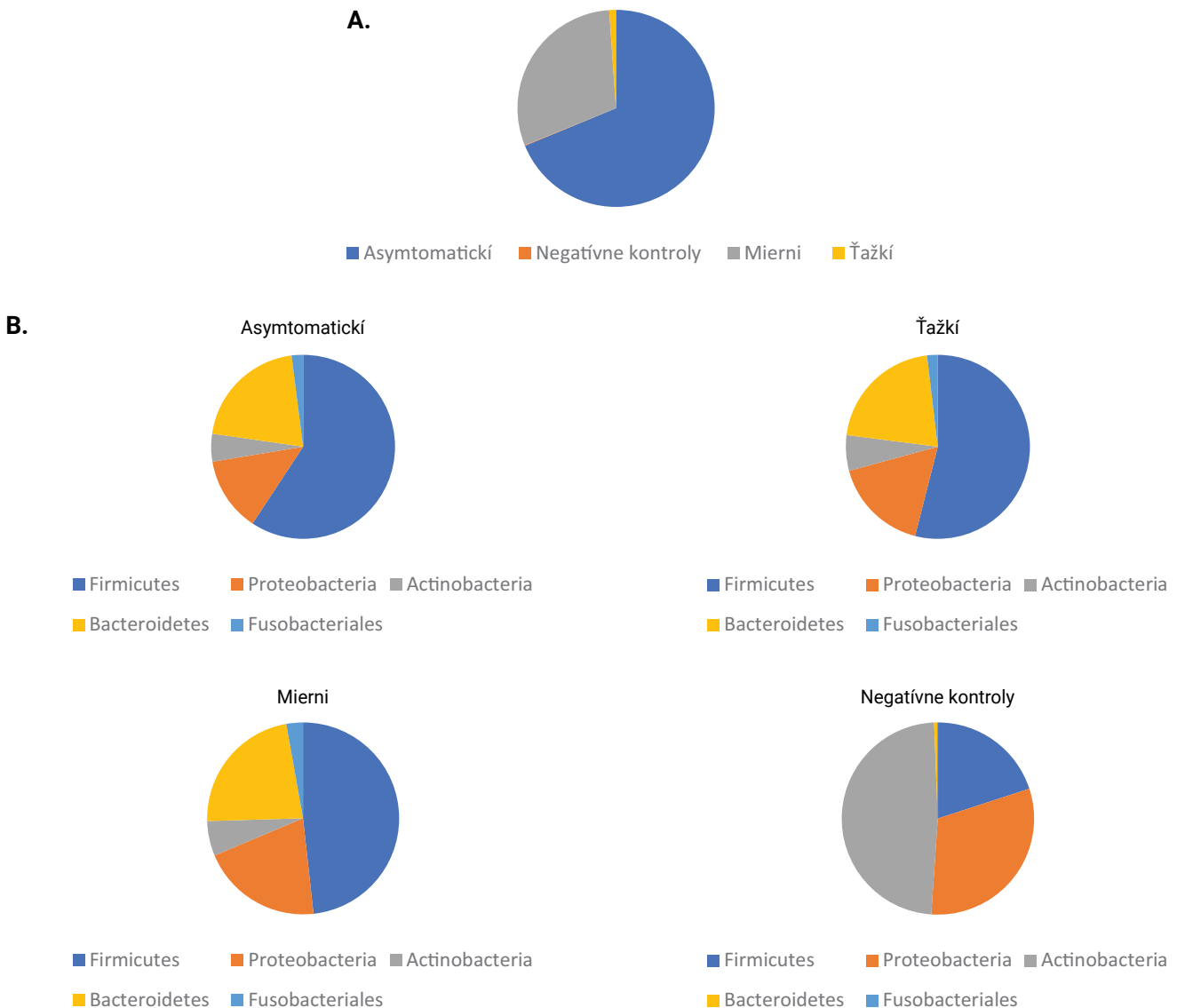
Všetky RNA sa podrobili RT-PCR na potvrdenie alebo vylúčenie pozitivity SARS-CoV-2 pomocou súpravy COVID-19 Real-Time Multiplex RT-PCR Kit (Labsystems Diagnostics, Fínsko) a platformy ABI QuantStudio 6 Real-Time PCR System RT-qPCR (ThermoFisher, USA) s použitím originálnych protokolov výrobcu. Na vyhodnotenie vzorky ako pozitívnej sa vyžadovala hodnota Ct < 40.

Sekvenovanie a bioinformatická analýza

Párové sekvenovanie – 2x 75 a 2x 100) sa realizovalo na platformách NextSeq500/550 a NextSeq2000 (Illumina, USA). Výsledné čítania sa mapovali na ľudskú referenciu hg38 (GRCh38) pomocou algoritmu BWA-MEM⁽¹³⁾. Nemapované čítania dlhšie ako 50 bp boli ďalej analyzované s cieľom identifikácie mikrobiómu. Na identifikáciu a kvantifikáciu bakteriálnych druhov sme použili Kraken 2 v2.1.2⁽¹⁴⁾.

Na skladanie vírusu SARS-CoV-2 sme použili nástroj *de novo assembly* coronaspades.py zo Spades v3.15.5⁽¹⁵⁾. Priraďovanie línií SARS-CoV-2 sa uskutočnilo podľa Maier a Batut, 2023⁽¹⁶⁾.

Obrázok 1. Koláčové grafy relatívnej početnosti baktérií vo všetkých 4 skupinách **A.** Zastúpenie hlavných bakteriálnych taxónov naprieč všetkými 4 skupinami **B.**



Štatistická analýza

Počty čítaní sa normalizovali delením celkovým počtom čítaní v danej analýze a následne sa vynásobili priemerným počtom čítaní. Rozdiel v počte zistených bakteriálnych transkriptov medzi skupinami sa štatisticky analyzoval pomocou nástroja LefSE (Galaxy verzia 1.0)⁽¹⁷⁾. Na porovnanie distribúcie bakteriálnych rodov a druhov medzi jednotlivými skupinami sme použili štatistický nástroj PERMANOVA. Mannov-Whitneyho U test (Wilcoxonov test) sa použil na porovnanie počtov čítaní zhodujúcich sa so sekvenciami z databázy Kraken2 medzi jednotlivými dvojicami skupín. Tento test sa použil aj na porovnanie hodnôt Ct medzi každou dvojicou pozitívnych skupín.

Výsledky

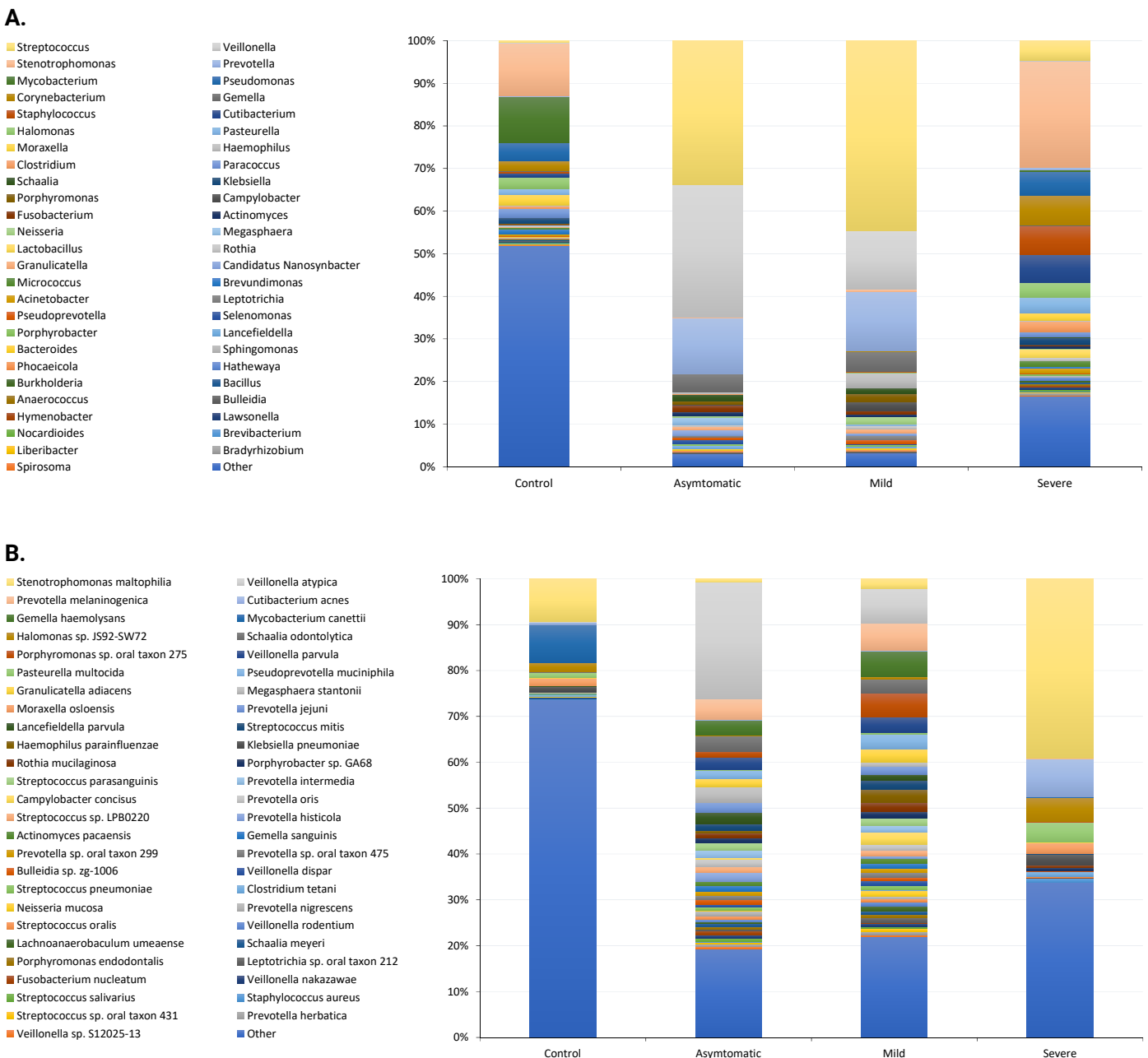
Prokaryotický mikrobióm

Metatranskriptómovým sekvenovaním sme analyzovali 151 vzoriek rozdelených do 4 hlavných skupín: asymptomatickí (24, A), mierni (25, M), ťažkí (30, Ť) a kontrolná skupina

(72, NK). Priemerný počet čítaní na vzorku bol 45,3 M (27,7 – 133 M). Podiel mikrobiómu, distribúcia a zastúpenie bakteriálnych taxónov boli vo všetkých 4 skupinách odlišné. Relatívna početnosť baktérií podľa mapovaných sekvenčných čítaní bola výrazne vyššia u asymptomatických a miernych pacientov, zatiaľ čo v ťažkých a negatívnych skupinách bola len 1,1 %, resp. 0,1 % (**obrázok 1A**). *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* a *Fusobacteriales* boli najpočetnejšie kmene medzi COVID pozitívnymi vzorkami. Naopak, v kontrolnej skupine boli najpočetnejšou skupinou *Actinobacteria*, *Proteobacteria* a *Firmicutes*, zatiaľ čo *Bacteroides* a *Fusobacteriales* mali len zanedbateľný podiel (**obrázok 1B**). V tejto súvislosti je dôležité spomenúť, že u značnej časti pacientov so závažným COVID-19 z nemocníc už bola podávaná antibiotická liečba (ATB), čo malo za následok zníženie celkového množstva baktérií, ale pomer jednotlivých bakteriálnych taxónov sa napriek tomu zachoval.

Identifikovali sme celkovo 944 druhov, 531 rodov, 218 čeľadí, 110 radov, 28 tried a 25 kmeňov. Najvyšší počet druhov bol v skupine s ťažkým (725), asymptomatickým (692)

Obrázok 2. Stĺpcové grafy znázorňujúce relatívnu početnosť vo všetkých 4 skupinách **A.** bakteriálnych rodov **B.** bakteriálnych druhov



a miernym (574) ochorením COVID-19 a viac ako desaťnásobne nižším počtom v skupine negatívnych kontrol (58). Ďalej sme profilovali mikrobiálne zloženie na úrovni rodov a druhov v zdravých kontrolách a rôznych skupinách COVID-19. Najpočetnejšími rodmi vo vzorkách nazofaryngálnych výterov v miernej a asymptomatickej skupine je *Streptococcus*, *Prevotella* a *Veillonella*, (**obrázok 2A**). V skupine s ťažkým COVID-19 (ŤP) dominujú rody *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus* a *Corynebacterium*. V COVID negatívnej skupine je opäť prekvapivo najpočetnejší rod *Stenotrophomonas*, ďalej *Mycobacterium* a *Pseudomonas*. Na úrovni druhov boli pri ťažkých najviac zastúpené druhy *Stenotrophomonas maltophilia*, *Cutibacterium acnes* a *Halomonas sp. JS92-SW72*. *Veillonella atypica* a *Prevotella melaninogenica* boli najviac zastúpené pri miernych a asymptomatických a celkové zastúpenie os-

tatných druhov rodu *Prevotella* (*P. jejuni*, *P. histicola*, *P. intermedia*, *P. oris*) a *Streptococcus* (*S. parasanguinis*, *S. mitis*, *S. sp. LPB0220*) bolo u oboch veľmi podobné (**obrázok 2B**). V kontrolnej skupine zdravých, ako aj v skupine s ťažkým priebehom boli najviac zastúpené *Stenotrophomonas maltophilia*, *Halomonas sp. JS92-SW72* a *Mycobacterium canettii*. Z klinicky relevantných oportúnnych bakteriálnych druhov boli vo všetkých štyroch skupinách prítomné napr. baktérie *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus parainfluenzae*, hoci v žiadnej zo skupín výrazne nedominovali a rozdiely medzi skupinami neboli štatisticky významné; ich výskyt bol skôr podobný v dvojiciach ťažká a negatívni verzus mierni a asymptomatickí. Mimoriadne zaujímavá bola prítomnosť bakteriálnych druhov vo všetkých skupinách, ktoré nie sú úplne typické pre mik-

robióm horných dýchacích ciest človeka. *Moraxella osloensis* sa z klinických vzoriek izolujú len veľmi zriedkavo a *Pasteurella multocida* je súčasťou normálnej flóry nosohltana mnohých divých a domácich zvierat vrátane mačiek a psov.

Analýza virómu

Zo 79 RT-PCR pozitívnych vzoriek bolo metatranskriptomovým sekvenovaním zostavených 41 kompletných a 19 čiastočne kompletných genómov SARS-CoV-2, čo predstavuje 62 % (51/79) zo všetkých. Okrem toho sme neidentifikovali sekvencie SARS-CoV-2 v žiadnej zo vzoriek kontrolnej skupiny (SARS-CoV-2 RT-PCR negatívny). V asymptomatickej, miernej a ťažkej skupine sme identifikovali varianty SARS-CoV-2: *alpha* (B.1.1.7) – 20I, *delta* (AY.4; AY.43; AY.43.9; AY.122; AY.9.2;) – 21I a 21J, *omicron* (BA.1.1; BA.2.9; BA.2; BA.2.67; BA.5) – 21L a 22B a v jednej vzorke variant 20C. Varianty *alpha* a *delta* prevládali v skupine s ťažkým ochorením, avšak v 30 % analýz sa nepodarilo zostaviť genóm z dôvodu nedostatočného počtu čítaní mapovaných na referenčný genóm SARS-CoV-2. V skupine s miernym priebehom dominoval variant *alpha*, zatiaľ čo v asymptomatickej skupine SARS-CoV varianty *omicron* a *delta*.

Okrem SARS-CoV-2 sme identifikovali sekvencie ďalších ľudských RNA vírusov, napr. z čeľade *Picornaviridae* (*Rhinovirus A*). Podľa očakávania to boli hlavne DNA fágy z čeľadi *Pedoviridae*, *Rountreeviridae* a *Siphoviridae*. V niekoľkých jednotlivých vzorkách sme identifikovali sekvencie ľudského herpesvírusu 1, *HSV-1* (*Alphaherpesviridae*), ľudského masta-denovírusu D (*Adenoviridae*) a vírusu *Molluscum Contagiosum* (*Poxviridae*).

Z hľadiska distribúcie veku boli rozdiely najmä medzi pacientmi s ťažkým COVID-19 z nemocnice (medián 68 rokov) a ostatnými skupinami (M-37, A-42, N-37) (**tabuľka 1**).

Diskusia

V našej štúdii sme porovnávali mikrobióm vrátane virómu nosohltana medzi štyrmi skupinami na základe závažnosti vírusového ochorenia dýchacích ciest a pozitivity na SARS-CoV-2: negatívna (bez príznakov ochorenia, RT-PCR negatívny), mierna (nevýrazné príznaky, nevyžadujúce hospitalizáciu), asymptomatická (bez príznakov ochorenia, RT-PCR pozitívny) a skupina ťažko chorých pacientov s COVID-19 (dýchacie ťažkosti, pneumónia, hospitalizovaní) pomocou metatranskriptomového sekvenovania. V texte na zjednodušenie používame početnosť baktérií alebo vírusov, hoci v skutočnosti stále hovoríme o transkriptochoch, ktoré však vyjadrujú zastúpenie aktívnej časti mikrobiómu. Relatívna početnosť baktérií je výrazne vyššia v miernej a asymptomatickej skupine, zatiaľ čo v ťažkej a negatívnej kontrole je prítomná len malá časť (**obrázok 1A**). Nízka početnosť baktérií u ťažkých pacientov je ľahko vysvetliteľná užívaním antibiotík. Používanie antibiotík bez jasnej indikácie bakteriálnej superinfekcie je kontroverzné, zdá sa však, že v niektorých zdravotníckych centrách bolo bežnou praxou bez ohľadu na riziká vzniku rezistencie. Podľa závažnosti ochorenia sú *Firmicutes* najčastejšie u asymptomatických, miernych a ťažkých pacientov, zatiaľ čo u zdravých kontrol sú výrazne menej početné a porovnané zastúpené. U ťažkých pacientov sme pozorovali výrazný pokles početnosti, nie však diverzity bakteriálnych taxónov a ich zastúpenia.

Rozdelenie na dve skupiny COVID pozitívnych miernych a asymptomatických bolo motivované cieľom zistiť, či existuje nejaký rozdiel medzi mikrobiómom ľudí s príznakmi respiračných ochorení, ako je nádcha, horúčka, kašeľ, a ľudí, ktorí sú síce infikovaní (RT-PCR pozitívni), ale nevykazujú žiadne príznaky. Naše výsledky naznačujú, že početnosť baktérií aj pomerné zastúpenie jednotlivých taxónov sú v oboch skupinách veľmi podobné. Hoci sa mediánové hodnoty Ct v miernej (24,89) a asymptomatickej skupine (28,56) zdali dosť odlišné, neboli štatisticky významné (Wilcoxonov test, $p = 0,017$) (**tabuľka 1B**). Veľkosť oboch skupín (25 vs 24) a vekové rozloženie (37 vs 42) boli inak podobné (**tabuľka 1A**). Na úrovni rodov a druhov sme nezaznamenali žiadne významné rozdiely, čo potvrdila aj štatistická analýza (PERMANOVA; $p = 0,053$ a $0,024$, vypočítaná hraničná hodnota p bola $0,0023$). Najviac zastúpenými rodmi v oboch skupinách boli *Streptococcus*, *Veillonella* (oba kmeň *Firmicutes*) a *Prevotella* (kmeň *Bacteroidetes*), pričom najpočetnejšími druhmi boli *Veillonella atypica* a *Prevotella melaninogenica* (**bakteriálne druhy a rody, obrázky 2A,B**). Toto pozorovanie je v súlade so zisteniami iných štúdií mikrobiómu horných dýchacích ciest^(18–20). *P. melaninogenica* je gramnegatívny obligátne anaeróbny kokobacil, ktorý môže pôsobiť ako oportúnny patogén, pričom existujú protichodné hypotézy o jeho vplyve na dýchacie cesty. Napríklad sa zistilo, že *P. melaninogenica* je „prospešným“ členom mikrobiómu dýchacích ciest, pretože zvyšuje ochranu pred bakteriálnou pneumóniou spôsobenou najmä *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*). Ďalej bola *P. melaninogenica* zaradená medzi najvýraznejšie odlišujúce bakteriálne druhy u pacientov s pneumóniou spôsobenou *S. pneumoniae* (s menším množstvom *P. melaninogenica*) a zdravými kontrolami (s väčším množstvom *P. melaninogenica*)⁽²¹⁾. Zaujímavé je, že závažná skupina so získanou pneumóniou neznámeho bakteriálneho pôvodu v našom súbore mala významne menej *P. melaninogenica* (**obrázok 2B**).

Analyzovali sme 72 negatívnych zdravých kontrol, všetky boli dodatočne overené/testované pomocou RT-PCR (gény E, ORF1ab, N) a vyhodnotené ako negatívne. Relatívna početnosť baktérií na základe počtu namapovaných čítaní a transkriptov predstavovala u nich najnižší podiel (0,1 %) zo všetkých skupín (asymptomatická 68,8 %; mierna 30 % a ťažká 1,1 %) (**obrázok 1A**). Nie je to až také prekvapujúce, keďže každá vírusová infekcia vrátane infekcie SARS-CoV-2 zvyšuje pravdepodobnosť sekundárnej bakteriálnej superinfekcie. U zdravých dospelých ľudí sú v nosovej dutine zvyčajne baktérie bežne prítomné na koži, prevažne zástupcovia rodu *Actinobacterium* (napr. *Corynebacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*), ďalej *Firmicutes* (napr. *Staphylococcus spp.*) a *Proteobacteria*⁽⁵⁾. V negatívnych kontrolách sme identifikovali 58 druhov z viac ako 900 druhov, čo zodpovedá na úrovni mikrobiálnej diverzity len približne 6 %.

Zastúpenie rôznych variantov SARS-CoV-2 z nazofaryngálnych výterov u asymptomatických, miernych a ťažkých pacientov korelovalo s obdobím výskytu jednotlivých kmeňov na Slovensku. Senzitivita detekcie SARS-CoV-2 prostredníctvom sekvenovania metatranskriptomu bola len približne 60 %, na druhej strane súbor SARS-CoV-2 pozitívnych vzoriek pozostával z rôznych hodnôt Ct zodpovedajúcich rôznym úrovniam vírusovej nálože. Na individuálnej úrovni sme

zo všetkých vzoriek, ktoré mali Ct 20 alebo menej, čo zodpovedá vyššej vírusovej náloži, dokázali zostaviť celý genóm vírusu SARS-CoV-2. Vzorky od ťažkých pacientov v nemocnici boli odobrané často 3 až 7 dní po zaradení do štúdie a títo pacienti boli liečení širokou škálou liekov (antibiotiká, kortikoterapia, imunomodulačná liečba, antivirotiká), ktoré mohli medzitým ovplyvniť vírusovú nálož. Jednoznačnou výhodou transkriptomového prístupu je jeho schopnosť zachytiť nielen RNA, ale aj DNA vírusy (ich transkripty). Okrem SARS-CoV-2 boli neprekvapivo najčastejšie identifikované sekvencie pochádzajúce z DNA vírusov baktérií, t. j. fágov z čeľadí *Pedoviridae*, *Rountreeviridae* a *Siphoviridae*.

Sekvencie mapované na ľudský transkriptom tvorili nezanedbateľnú časť analýzy, ale nie sú predmetom tohto článku a zasluhujú si osobitnú pozornosť.

Záver

Identifikovali sme rozdiely v mikrobióme medzi rôznymi skupinami COVID pozitívnych a negatívnou skupinou. Napriek rozdielom v početnosti bola relatívna početnosť jednotlivých taxónov v skupinách pozitívnych na COVID-19 podobná bez ohľadu na závažnosť a použitú liečbu. Skupinu zdravých negatívnych kontrol definoval najmenší počet mikroorganizmov. Sekvenovanie metatranskriptomu je nástroj

na širokospektrálne štúdium aktívnej časti prokaryotického mikrobiómu, virómu, ale aj ľudského transkriptomu z rôznych dostupných zdrojov. Hoci jeho diagnostický potenciál z hľadiska citlivosti nie je optimálny, môže doplniť skladačku mozaiky širokej druhovej rozmanitosti a pomôcť pri pochopení zložitých vzťahov medzi mikrobiómom a imunitou človeka v podmienkach konkrétneho ochorenia, jeho závažnosti a na rôznych miestach ľudského tela. V našej štúdii bolo modelové ochorenie COVID-19 s rôznou závažnosťou, od asymptomatických až po ťažké prejavy vyžadujúce hospitalizáciu a intenzívnu liečbu. Nosohltan je zasa miestom, ktoré je dobre prístupné na odber vzoriek, je kolonizované širokou škálou mikroorganizmov, ktoré ovplyvňujú lokálnu imunitnú odpoveď, a je tiež miestom vstupu a počiatočného množenia širokého spektra respiračných vírusov.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Závažné civilizačné ochorenia a COVID-19, kód ITMS: 313011AVH7, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. BAI, Xiangning, Aswathy NARAYANAN, Magdalena SKAGERBERG, Rafael CEÑA-DIEZ, Christian G. GISKE, Kristoffer STRÄLIN a Anders SÖNERBERG. Characterization of the Upper Respiratory Bacterial Microbiome in Critically Ill COVID-19 Patients. *Biomedicines* [online]. 2022, 10(5), 982. ISSN 2227-9059. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines10050982
2. CANDEL, Sergio, Sylwia D. TYRKALSKA, Carmen ÁLVAREZ-SANTACRUZ a Victoriano MULERO. The nasopharyngeal microbiome in COVID-19. *Emerging Microbes & Infections* [online]. 2023, 12(1). ISSN 2222-1751. Dostupné z: doi: 10.1080/22221751.2023.2165970
3. ZHU, Taiping, Jun JIN, Minhua CHEN a Yingjun CHEN. The impact of infection with COVID-19 on the respiratory microbiome: A narrative review. *Virulence* [online]. 2022, 13(1), 1076–1087. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi: 10.1080/21505594.2022.2090071
4. NEMERGUT, Diana R., Steven K. SCHMIDT, Tadashi FUKAMI, Sean P. O'NEILL, Teresa M. BILINSKI, Lee F. STANISH, Joseph E. KNELMAN, John L. DARCY, Ryan C. LYNCH, Phillip WICKEY a Scott FERRENBERG. Patterns and Processes of Microbial Community Assembly. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2013, 77(3), 342–356. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi: 10.1128/MMBR.00051-12
5. BASSIS, Christine M, Alice L TANG, Vincent B YOUNG a Melissa A PYNNONEN. The nasal cavity microbiota of healthy adults. *Microbiome* [online]. 2014, 2(1), 27. ISSN 2049-2618. Dostupné z: doi:10.1186/2049-2618-2-27
6. STEARNS, Jennifer C, Carla J DAVIDSON, Suzanne MCKEON, Fiona J WHELAN, Michelle E FONTES, Anthony B SCHRYVERS, Dawn M E BOWDISH, James D KELLNER a Michael G SURETTE. Culture and molecular-based profiles show shifts in bacterial communities of the upper respiratory tract that occur with age. *The ISME Journal* [online]. 2015, 9(5), 1246–1259. ISSN 1751-7362. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2014.250
7. MINOT, Samuel, Alexandra BRYSON, Christel CHEHOUD, Gary D. WU, James D. LEWIS a Frederic D. BUSHMAN. Rapid evolution of the human gut virome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2013, 110(30), 12450–12455. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1300833110
8. RAJAGOPALA, Seesandra V., Nicole G. BAKHOUM, Suman B. PAKALA, Meghan H. SHILTS, Christian ROSAS-SALAZAR, Annie MAI, Helen H. BOONE, Rendie MCHENRY, Shibu YOUSEPH, Natasha HALASA a Suman R. DAS. Metatranscriptomics to characterize respiratory virome, microbiome, and host response directly from clinical samples. *Cell Re-*

- ports *Methods* [online]. 2021, 1(6), 100091. ISSN 26672375. Dostupné z: doi:10.1016/j.crmeth.2021.100091
9. ROVIRA RUBIÓ, Judit, Spyridon MEGREMIS, Maria PASIOTI, John LAKOUMENTAS, Bede CONSTANTINIDES, Paraskevi XEPAPADAKI, Claus BACHERT, Susetta FINOTTO, Tuomas JARTTI, Evangelos ANDREAKOS, Barbara STANIC, Cezmi A. AKDIS, Mübecel AKDIS a Nikolaos G. PAPA-DOPOULOS. Respiratory virome profiles reflect antiviral immune responses. *Allergy* [online]. 2023. ISSN 0105-4538. Dostupné z: doi:10.1111/all.15634
10. TESSLER, Michael, Johannes S. NEUMANN, Ebrahim AFSHINNEKOO, Michael PINEDA, Rebecca HERSCH, Luiz Felipe M. VELHO, Bianca T. SEGOVIA, Fabio A. LANSAC-TOHA, Michael LEMKE, Rob DESALLE, Christopher E. MASON a Mercer R. BRUGLER. Large-scale differences in microbial biodiversity discovery between 16S amplicon and shotgun sequencing. *Scientific Reports* [online]. 2017, 7(1), 6589. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-06665-3
11. BRUMFIELD, Kyle D., Anwar HUQ, Rita R. COLWELL, James L. OLDS a Menu B. LEDDY. Microbial resolution of whole genome shotgun and 16S amplicon metagenomic sequencing using publicly available NEON data. *PLOS ONE* [online]. 2020, 15(2), e0228899. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0228899
12. MORTAZAVI, Ali, Brian A WILLIAMS, Kenneth MCCUE, Lorian SCHAEFFER a Barbara WOLD. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* [online]. 2008, 5(7), 621–628. ISSN 1548-7091. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.1226
13. HENG LI. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM [online]. nedatováno. Dostupné z: doi:10.48550/arXiv.1303.3997
14. WOOD, Derrick E a Steven L. SALZBERG. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology* [online]. 2014, 15(3), R46. ISSN 1474-760X. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2014-15-3-r46
15. MELESHKO, Dmitry, Iman HAJIRASOULIHAM a Anton KOROBEYNIKOV. coronaSPAdes: from biosynthetic gene clusters to RNA viral assemblies. *bioRxiv*. 2021.
16. MAIER, Wolfgang a Bérénice BATUT. Mutation calling, viral genome reconstruction and lineage/clade assignment from SARS-CoV-2 sequencing data. 2023.

17. SEGATA, Nicola, Jacques IZARD, Levi WALRON, Dirk GEVERS, Larisa MIROPOLSKY, Wendy GARRETT a Curtis HUTTENHOWER. *Metagenomic Biomarker Discovery and Explanation*. 24. červen 2011
18. LIU, Jing, Sheng LIU, Zhao ZHANG, Xuejun LEE, Wenxuan WU, Zhanlian HUANG, Ziyang LEI, Wenxiong XU, Dabiao CHEN, Xing WU, Yang GUO, Liang PENG, Bingliang LIN, Yutian CHONG, Xiangyu MOU, Mang SHI, Ping LAN, Tao CHEN, Wenjing ZHAO a Zhiliang GAO. Association between the nasopharyngeal microbiome and metabolome in patients with COVID-19. *Synthetic and Systems Biotechnology* [online]. 2021, 6(3), 135–143. ISSN 2405805X. Dostupné z: doi:10.1016/j.synbio.2021.06.002
19. RATTANABURI, Somruthai, Vorthon SAWASWONG, Suwalak CHITCHAROEN, Pavaret SIVAPORNNUKUL, Pattaraporn NIMSAMER, Nungruthai SUNTRONWONG, Jiratchaya PUENPA, Yong POOVORAWAN a Sunchai PAYUNGPORN. Bacterial microbiota in upper respiratory tract of COVID-19 and influenza patients. *Experimental Biology and Medicine* [online]. 2022, 247(5), 409–415. ISSN 1535-3702. Dostupné z: doi:10.1177/15353702211057473
20. VENTERO, Maria Paz, Rafael R. C. CUADRAT, Inmaculada VIDAL, Bruno G. N. ANDRADE, Carmen MOLINA-PARDINES, Jose M. HARO-MORENO, Felipe H. COUTINHO, Esperanza MERINO, Luciana C. A. REGITANO, Cynthia B. SILVEIRA, Haithem AFLI, Mario LÓPEZ-PÉREZ a Juan Carlos RODRÍGUEZ. Nasopharyngeal Microbial Communities of Patients Infected With SARS-CoV-2 That Developed COVID-19. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2021, 12. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.637430
21. HORN, Kadi J., Melissa A. SCHOPPER, Zoe G. DRIGOT a Sarah E. CLARK. Airway Prevotella promote TLR2-dependent neutrophil activation and rapid clearance of *Streptococcus pneumoniae* from the lung. *Nature Communications* [online]. 2022, 13(1), 3321. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-022-31074-0

RNDr. Michaela Hýblová, PhD.

MEDIREX GROUP ACADEMY, Bratislava
Galvaniho 17/C, 821 04 Ružinov
e-mail: michaela.hyblova@medirex.sk