

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Botanika

Studijní zaměření: Mykologie



**Vliv mikrobiomu na patogenezi střevních onemocnění**

The effect of microbiota on pathogenesis of gut diseases

Diplomová práce

Autor: Bc. Natalie Galanová

Školitel: Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 02.05.2017

.....

Natalie Galanová

### *Poděkování*

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli Miroslavu Kolaříkovi Ph.D. Velký vděk patří i mým konzultantům MUDr. Miloslavu Kverkovi Ph.D. a Kláře Klimešové Ph.D., kteří mi umožnili pracovat zcela svobodně a samostatně, věřili v mé schopnosti a investovali do mne mnoho své energie. Děkuji také celému kolektivu Laboratoří buněčné a molekulární imunologie a genetiky a metabolismu hub za příjemný pracovní kolektiv a přátelskou atmosféru. Největší vděk patří Mgr. Martinu Kostovčikovi, který se mi vždy ochotně věnoval i ve chvílích, kdy jsem už nevěřila v řešení, a Mgr. Zuzaně Stehlíkové, která mi byla po celou dobu magisterského studia rádcem, oporou i přítelkyní a dělila se se mnou o své znalosti i klidnou místnost k práci. Děkuji také Karlu Prášilovi a všem, kteří mi svým přístupem i znalostmi byly inspirací.

Má rodina a můj partner však nesou největší zásluhu na odevzdání této práce a absolvování toho studia.

Tato práce byla financována za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt GAUK 1366217).

## Abstrakt

Střevní mikrobiota je významným faktorem ve vývoji některých onemocnění, k nimž patří i idiopatické střevní záněty (IBD, n = 127), Ulcerózní kolitida, Crohnova choroba, a kolorektální karcinom (CRC, n = 64). Součástí této práce je připravit klinický materiál různého typu (stolice, biopsie) k sekvenaci na platformě Illumina Miseq. Tohoto je dosaženo přes izolaci DNA, amplifikaci 16S a vnitřního přepisovaného mezerníku (ITS), normalizaci a ligaci sekvenačních adaptorů. Cílem je pomocí sekvenačních dat popsat rozdíly v mikrobiomu zdravých a nemocných jedinců v případě IBD nebo zdravé a karcinomem zasažené tkáně u pacientů s CRC. Tuto práci tvoří i kultivační část, kdy jsou vzorky čerstvé stolice (n = 3) kultivovány při široké škále aplikovaných podmínek, jimiž je zjištěna ekofyziologická a druhová diverzita těchto vzorků klasickými a molekulárními metodami. Zároveň je spolehlivě taxonomicky určena diverzita kultivovatelných hub ve fekálních vzorcích amplifikací relevantních genů (ITS1,  $\beta$  tubulin, druhé největší podjednotky RNA polymerázy II., RPB2) a následnou oboustrannou sekvenací Sangerovou metodou. Vybrané druhy hub jsou zpracovány na lyzáty, kterými jsou stimulovány buněčné kultury myších makrofágů (RAW). Vliv hub na imunitní odpověď je tak studován *in vitro* a analyzován imunologickými metodami jako je průtoková cytometrie (FASC) a kolorimetrické analýzy, enzymatická imunoanalýza (ELISA) a Griessova reakce.

Práce se tak neomezuje na pouhý popis změn střevního mikrobiomu, ale variabilitou zapojených metod se snaží o komplexní uchopení tematiky střevního mikrobiomu a jeho souvislosti se střevním onemocněním.

**Klíčová slova:** mykobiom, mikrobiota, Illumina, ITS rDNA, diverzita, idiopatický střevní zánět, kolorektální karcinom, *in vitro* testy, imunoanalýzy

## **Abstract**

Gut microbiota is considered an important factor in the development of various diseases including inflammatory bowel disease (IBD, n = 127), Ulcerative colitis, Crohn's disease, and colorectal cancer (CRC, n = 64). A part of this thesis is to prepare clinical material of different sorts (stool, biopsy) for sequencing on Illumina Miseq platform. This is achieved through DNA isolation, amplification of 16S and internal transcribed spacer (ITS), normalization and ligation of sequencing adaptors. The aim of this project is to describe the differences between microbiota in healthy and diseased subjects in case of IBD or unimpaired and tumorous tissue for CRC patients. This research is also being based on cultivation, where a fresh stool samples (n = 3) are cultivated in a broad range of conditions, which enables us to obtain ecophysiological and species diversity of these samples by traditional and molecular methods. The cultivable fungi are also assigned reliable taxonomy by amplification of relevant genes (ITS1,  $\beta$  tubulin, second largest subunit of RNA polymerase II, RPB2) followed by both-sided Sanger sequencing. Selected species of fungi are processed into lysates, which are used for stimulation of mice macrophage cell line (RAW). Therefore the impact on immunity response is studied *in vitro* and analyzed by immunological methods such as fluorescence-activated cell sorting (FACS) and colorimetric assays, enzyme-linked immunosorbent assay and Griess reaction.

This thesis is not limited on a sole description of microbiome changes, but provides complex preview of the intestinal microbiome and its links to intestinal disease through variety of employed methods.

**Key words:** mycobiome, microbiota, Illumina, ITS rDNA, diversity, inflammatory bowel disease, colorectal cancer, *in vitro* tests, immunoassays

# OBSAH

## Seznam použitých zkratek

<b>1. Úvod a cíle .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Literární úvod .....</b>	<b>9</b>
2.1 Mikrobiom a jeho složení.....	9
2.2 Funkce mikrobiomu .....	10
2.3 Interakce .....	10
2.3.1 Vztahy uvnitř ekosystému.....	11
2.3.2 Vztahy s hostitelem.....	11
2.4 Idiopatické střevní záněty.....	13
2.5 Kolorektální karcinom .....	15
<b>3. Metodika.....</b>	<b>18</b>
3.1 Molekulární analýzy.....	18
3.1.1 Studované populace a extrakce DNA .....	18
3.1.2 Amplifikace ITS2.....	18
3.1.3 Test kitu na odstranění hostitelské DNA .....	19
3.1.4 Test primerů a finální amplifikace ITS1 .....	20
3.1.5 Amplifikace 16S .....	21
3.1.6 Příprava knihovny .....	22
3.2 Bioinformatické zpracování a statistické vyhodnocení dat .....	23
3.3 Kultivace .....	24
3.3.1 Studovaná populace .....	24
3.3.2 Přípravné experimenty .....	24
3.3.3 Finální schéma experimentu .....	25
3.3.4 Identifikace morfotypů.....	25
3.3.5 Extrakce DNA.....	26
3.3.6 Identifikace kultur .....	26
3.4 In vitro analýzy .....	27
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>31</b>
4.1 Diverzita hub biopsií pacientů s CRC .....	31
4.2 Využitelnost kitu na odstranění hostitelské DNA.....	32
4.1 Houbová diverzita stolic pacientů s IBD.....	33
4.2 Bakteriální diverzita biopsií pacientů s CRC .....	35
4.3 Kultivace dominantních hub a vliv kultivačních podmínek .....	36
4.3.1 Vliv způsobu uchování vzorku .....	42
4.4 Imunomodulační působení houbových lyzátů.....	45
<b>5. Diskuse.....</b>	<b>48</b>
5.1 Detekované rozdíly v mikrobiomu .....	48
5.2 Kultivační metody.....	52
5.3 Imunomodulace detekovaná in vitro .....	55
<b>6. Závěr.....</b>	<b>57</b>
<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>58</b>
<b>Přílohy .....</b>	<b>71</b>

## Seznam použitých zkratek

<b>ASCA</b>	Anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> antibodies	Protilátky proti <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>AIDS</b>	Acquired Immunodeficiency Syndrome	Syndrom získaného selhání imunity
<b>ALS</b>	Agglutinin-like sequence adhesins	Adheziny sekvenčně podobné aglutininu
<b>APC</b>	Antigen presenting cell	Antigen prezentující buňka
<b>BHI</b>	Brain-heart infusion agar	Agar s infuzí mozek-srdce
<b>CA</b>	Czapek agar	Czapkův agar
<b>CD</b>	Crohn's disease	Crohnova choroba
<b>CFU</b>	Colony forming units	Jednotky tvořící kolonie
<b>CLRs</b>	C-type lectin receptors	Lektinový receptor C-typu
<b>CYAS</b>	Czapek agar with 20 % NaCl	Czapkův agar s 20 % NaCl
<b>DRBC</b>	Dichloran rose-bengal chloramphenicol agar	Dichloranový agar s Bengálskou červení
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay	Enzymatická imunoanalýza
<b>FACS</b>	Fluorescence-Activated Cell Sorting	Průtoková cytometrie
<b>HC</b>	Healthy control	Zdravá kontrola
<b>HD</b>	Hirschsprung disease	Hirschsprungova choroba
<b>IBD</b>	Inflammatory Bowel Disease	Idiopatický střevní zánět
<b>IBS</b>	Irritable Bowel Syndrom	Syndrom dráždivého tračníku
<b>IL</b>	Interleukin	Interleukin
<b>ITS</b>	Internal Transcribed Spacer	Vnitřní přepisovaný mezerník
<b>MAMPs</b>	Microbe-associated molecular patterns	Molekulární vzory asociované s mikroby
<b>MK</b>	Fatty acids	Mastné kyseliny
<b>NFκB</b>	Nuclear factor κB	Nukleární faktor κB
<b>NK</b>	Natural killers	Přirození zabíječi
<b>NLR</b>	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors	Receptory podobné nukleotid vázající oligomerizační doméne
<b>OTU</b>	Operational Taxonomic Unit	Operačně taxonomická jednotka
<b>pANCA</b>	Perinuclear Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies	Protilátky proti perinukleární oblasti cytoplasmy neutrofilů
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline	Fosfátový pufr
<b>PCA</b>	Principal component analysis	Analýza hlavních komponent
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction	Polymerázová řetězová reakce
<b>PDA</b>	Potato dextrose agar	Bramborovo-dextrózový agar
<b>PRRs</b>	Pattern-recognition receptors	Receptory rozpoznávající molekulární vzory
<b>PSC</b>	Primary sclerosing cholangitis	Primární sklerotizující cholangitida
<b>rDNA</b>	Gene for rRNA	Gen pro rRNA
<b>RPB2</b>	Second largest subunit of RNA polymerase II	Druhá největší podjednotka RNA polymerázy II
<b>SAB</b>	Sabouraud agar	Sabouraudův agar
<b>TGF β</b>	Transforming growth factor β	Transformační růstový faktor β
<b>TLRs</b>	Toll like receptors	Receptory podobné Toll
<b>TNFα</b>	Tumor necrosis factor α	Tumor nekrotizující faktor α
<b>UC</b>	Ulcerative colitis	Ulcerózní kolitida
<b>qPCR</b>	Quantitative PCR	Kvantitativní PCR

# 1. Úvod a cíle

Diplomová práce vznikla v návaznosti na studium role bakteriálního mikrobiomu v rozvoji střevních onemocnění. Zatímco se většina prací omezuje na diverzitu bakterií, tato práce se soustředila především na houbové společenstvo střev, které bylo částečně doplněné o kontext bakteriální složky. Díky nadstandardní spolupráci Laboratoře buněčné a molekulární imunologie s klinickými pracovišti v České republice bylo získáno velké množství vzorků, což bylo nezbytnou podmínkou této práce z důvodu interindividuální variability ve složení mykobiomu (Monteiro-da-Silva, Araujo and Sampaio-Maia, 2014).

Asociace mikroskopických hub s onemocněními střev je diskutována od objevení protilátek proti *Saccharomyces cerevisiae* u pacientů s Crohnovou chorobou (CD). Tato běžná kvasinka indukuje tvorbu protizánětlivého cytokinu IL-10, a byla tak spojena s pozitivním působením na slizniční homeostázy střev (Sokol et al., 2016). Hojně zkoumaný je také oportunně patogenní druh *Candida albicans*. Mimo těchto dvou příkladů však nejsou příliš jasné životní strategie, fyziologie, metabolismus, imunomodulace ani celkový význam druhů detekovaných v lidském střevě. Mykobiom pacientů s kolorektálním karcinomem (CRC) do dnešního dne nebyl zatím ani popsán, a tak stejně jako charakteristika zdravého mykobiomu stále chybí.

Sekvenování nové generace (NGS) je v současnosti nejpoužívanějším nástrojem pro popis střevního mykobiomu. Ideálním případem by bylo jeho doplnění o kultivační část, která umožňuje další práci s izoláty a posouvá tak čistě popisnou vědu k uceleným znalostem. Klasická na kultivaci založená metoda izolace hub je příliš náročná ve smyslu, designu pokusu, uchovávání vstupního materiálu, investovaného času a nutných zkušeností. Zároveň má nejistý výsledek dokládáný pracemi, které označují většinu střevního mykobiomu za nekultivovatelnou. V klinické praxi jsou následně běžně aplikovány metody hmotnostní spektrometrie (Gouba and Drancourt, 2015), které výrazně usnadňují a urychlují identifikaci kultur, avšak přinášejí výrazné zkrácení vůči druhům často detekovaných lidských patogenů. Současně se tyto porovnávají oproti neuceleným databázím, a tak neumožňují důvěryhodnou identifikaci kultur. Vědecká praxe, která je provozována mimo zdravotnická centra, se při práci s klinickými vzorky pacientů potýká s mnohými problémy spojenými s logistikou a uchováním vzorků. V případě stolice odběr provádí sám pacient, který poté dopraví vzorek na klinické pracoviště, ze kterého se následně musí dostat do rukou vědeckého pracovníka, který jej zpracuje. Časová náročnost popsaného postupu vystavuje vzorek působení mnoha teplotních proměnných, jenž jsou v mnohých případech následně završeny dlouhodobým zamražením při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V případě bakteriálních komunit byla pomocí NGS prokázána signifikantní změna v ústředním poměru Firmicutes/Bacteroidetes (Bahl, Bergström and Licht, 2012), u houbových komunit nic podobného zatím nebylo testováno.



Hlavním cílem této práce je objasnit roli mykobiomu ve výskytu IBD a CRC. Konkrétně byla porovnána struktura mykobiomu zdravých a nemocných jedinců v případě IBD i zdravé a karcinomem zasažené tkáně u pacientů s CRC. Následně byla testována odpověď imunitních buněk na vybrané druhy hub, čímž byla nastíněna jejich role při indukci zánětu. Projekt má následující dílčí cíle.

- a) Optimalizovat metodiku přípravy vzorků k NGS (platforma Illumina Miseq) pro studium hub a bakterií v biopsiích a fekálních vzorcích.
- b) Optimalizovat metodiku ke kultivační izolaci hub z fekálních vzorků. Tato část zahrnuje testování vlivu uchovávání biologického vstupního materiálu, kultivační atmosféry, teplot a médií s cílem najít optimální postup vedoucí k izolaci nejvyšší kvantity a kvality hub.
- c) Validovat výsledky NGS a kultivací porovnáním jejich výstupů. Kultury hub byly použity na přesné druhové určení, což umožnilo lepší interpretaci NGS dat.
- d) Testovat vybrané druhy hub v *in vitro* pokusech na buněčných kulturách myších makrofágů k určení jejich prozánětlivého potenciálu.

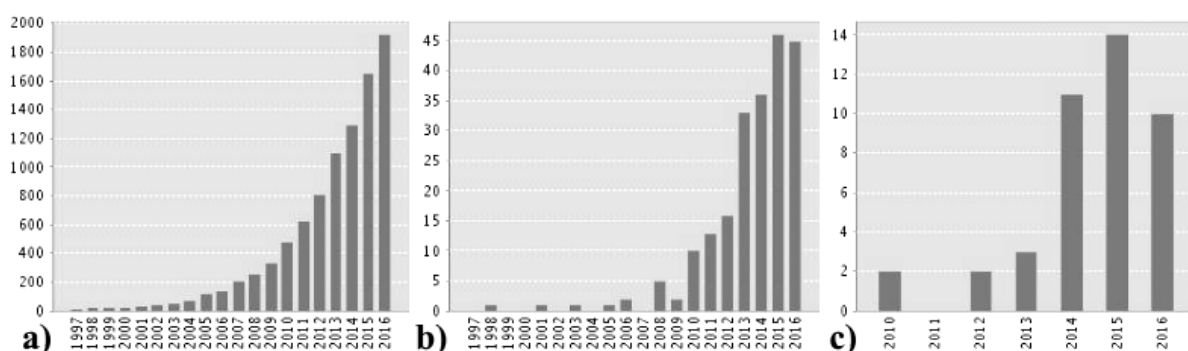
## 2. Literární úvod

### 2.1 Mikrobiom a jeho složení

Člověka odpradáva zájmalý drobné organismy, které osidlují lidské tělo. Hippocrates, také přezdívaný jako otec racionálního lékařství, psal již kolem roku 377 př. n. l. o orálních lézích, jež byly zřejmě způsobeny oportunně patogenním rodem *Candida*. V roce 1681 pak Antony van Leeuwenhoek popsal miniaturní rychle se pohybující živočichy v lidské stolici, které byly zpětně identifikovány jako *Giardia intestinalis* (Dobell, 1920). Jednou z oblastí zájmu kolem roku 1897 byly i kvasinkovité houby, tehdy souhrnně nazývané *Blastomyces*, jako hlavní zástupce rodu *Saccharomyces*, které byly spojovány s tumory a rakovinou (Defendorf, 1897). Až počátkem nového staletí však byly pozorovány, kultivovány i testovány kvasinky přítomné v lidské stolici (Anderson, 1917).

Dnes víme, že lidské tělo má stovky mikrohabitátů, které jsou osídleny specifickým mikrobiomem. Mikrobiom je pojmenování všech mikroskopických organismů tvořících unikátně funkční společenstvo. Zaměříme-li se na zdravé střevo, tak nejpočetnější složku tvoří bakterie (Whitman, Coleman and Wiebe, 1998). To je zřejmě hlavní důvod, proč je pojem mikrobiom často vztahován jen na prokaryota. Pro specifikaci houbové složky se užívá buď spojení houbový mikrobiom nebo jednoduše mykobiom (Ghannoum et al., 2010). Využití těchto pojmů v publikacích reprezentuje

Obrázek č.1.



Obrázek 1: počet prací publikovaných během let 1998–2016 v indexovaných databázích dle Web of Science; téma a) lidská mikrobiota, b) lidská houbová mikrobiota, c) lidský mykobiom.

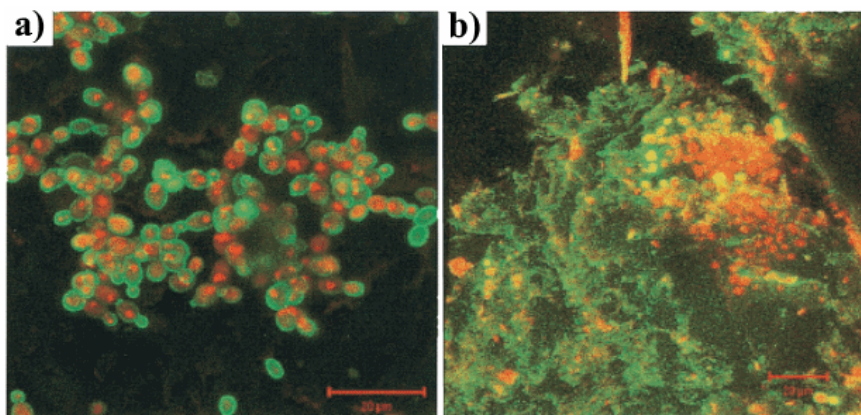
Mezi ostatní eukaryota lidského střeva řadíme helminty (Stoll, 1999) a mikroskopická protista. U těchto skupin se zájem koncentruje převážně na patologicky působící druhy (Stensvold, Lebbad and Verweij, 2011), ale existují i druhy protist s nejasným vlivem na hostitele (Tan et al., 2006). Funkčně významnou složkou jsou archea (Nottingham and Hungate, 1968, Hoffmann et al., 2013) a jako poslední je třeba zmínit viry (Kim et al., 2011), jejichž většinu tvoří bakteriofágy (Minot and Bryson, 2013).

## 2.2 Funkce mikrobiomu

Primární funkcí mikrobiomu je štěpení složek potravy. Složení mikrobiomu, takzvaný enterotyp, je silně asociován s dlouhodobou stravou. Potrava bohatá na proteiny, AK, nasycené MK je asociovaná s rody *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides* a odpovídá Západní stravě. Zatímco jídelníček bohatý na sacharidy, jednoduché cukry a nenasycené MK typické pro vegetariány nebo pro chudší stravu agrárních regionů je spojen s dominancí rodů *Prevotella*, *Paraprevotella*, *Catenibacterium*, *Candida*, *Methanobrevibacter* a *Nitrososphaera* (Wu et al., 2011, Hoffmann et al., 2013). V konečném důsledku mikrobiom mění energetickou rovnováhu jedince tím, že rozštěpí, a tak zprostředkuje dostupnost jinak nestavitelné energie i její uložení, což může vést až k nadváze či obezitě. Jeho složení koreluje s BMI, kdy se neobézní vyznačují vyšším podílem Bacteroidetes a Mucorales a obézní Firmicutes (Ley et al., 2005, Turnbaugh et al., 2006, Mar Rodríguez et al., 2015).

## 2.3 Interakce

Mikroby se v organismu vyskytují uspořádané do komplexních společenstev, takzvaných biofilmů, které jim umožňují vzájemné interakce. K jeho vzniku je nezbytná adherence (Klotz et al., 2007), následně buňky proliferují, tvoří mikrokolonie, agregují a tvoří výsledný vícevrstevný biofilm. Hlavní odlišností od volně žijících buněk je akumulace extracelulární matrice (Kumamoto and Vines, 2005) složené primárně z polysacharidů připomínajících buněčnou stěnu spolu s proteiny, fosforem, aminy, glukózou, galaktózou a manózou (Baillie and Douglas, 2000). Matrix vyplňuje prostor mezi buňkami a tvoří asi 450 µm širokou vrstvu nad nimi. Na schopnosti adherovat se podílí produkty mnoha genů, například INT1p, kódující povrchový protein podobný savcím integrinům (Gale et al., 1998). V případě dimorfních hub jako je *C. albicans* se kvasinková forma přichytává k povrchu, roste, dělí se, tvoří řetízky, takzvané pseudohyfy, a nakonec může klíčit hyfou. Tvorba biofilmu však není morfotypově specifická (Chandra et al., 2001), viz Obrázek 2.



Obrázek 2: konfokální laserová rastrovací mikroskopie zachycující *C. albicans* formující biofilm na akrylovém povrchu po a) osmi, b) po 48 hodinách; červené oblasti jsou metabolicky aktivní (FUN1 barvení), zeleně je barven polysaccharidový extracelulární materiál (ConA), žlutě se jeví duálně obarvené oblasti; úsečka 20 µm; převzato a upraveno z (Chandra et al., 2001)

### 2.3.1 Vztahy uvnitř ekosystému

V biofilmech složených z různých typů mikrobů lze na vzájemné interakce nahlížet z ekologické perspektivy a můžeme tedy mluvit o mutualismu, komenzálismu, kompetici a predaci. Mutualismus, kdy jsou si druhy vzájemně prospěšné je popsán například pro *Candida albicans* a *Staphylococcus epidermidis*, které se mohou pomocí produkce extracelulárních polymerů vzájemně chránit před působením antimykotik či antibiotik (Adam, 2002). Produkce matrice se sice podílí na resistenci k antimikrobním látkám (Hawser and Douglas, 1995), bylo však prokázáno, že rezistence nekoreluje s množstvím produkované matrice, tedy nezávisí pouze na fyzické bariéře, kterou farmaka špatně procházejí, ale jedná se zřejmě o povrchem indukovanou genovou expresí vysoké specifity (Baillie and Douglas, 2000). Jiné druhy rodu *Streptococcus* na svůj povrch vylučují proteiny bohaté na prolin, na které se *C. albicans* váže. To usnadňuje rychlé formování kombinovaného biofilmu (O'Sullivan, Jenkinson and Cannon, 2000). Synergie panuje taktéž pro usnadněnou kolonizaci hostitele rody *Bacteroidetes* a *Enterococcus*, pokud je již kolonizován *C. albicans* (Mason et al., 2012). Dalším vzájemně prospěšným vztahem je návaznost metabolismu *Methanobrevibacter smithii*, který produkuje methan, na produkty fermentačního metabolismu sacharolytických bakterií, především pak  $H_2$  (Samuel et al., 2007). Jeho odstraňováním dokonce zvyšují účinnost bakteriální fermentace. Kompetice o prostor je pak hlavním mechanismem zodpovědným za inverzní vztah diverzity a četnosti mezi houbovou a bakteriální složkou mikrobioty (Kühbacher et al., 2006). Dochází-li při léčbě antibiotiky k redukci bakterií, přirozeně nastává namnožení houbové složky (Noverr et al., 2004). Opačně pokud narušíme přirozené složení mykobiomu antimykotiky, může dojít k zaplnění uvolněných míst patogenními bakteriemi, které mohou v důsledku působit zánět střeva (Qiu et al., 2015). Probiotické působení rodu *Lactobacillus* je založeno na kompetici s *C. albicans*, kterou vytlačuje od přímého kontaktu s epitelem a omezuje její přítomnost na sliznici (Savage, 1969). Kompeticí by se dalo nazvat i působení *Pseudomonas aeruginosa*, která tvorbou pyocyaninu a phenazinů inhibuje morfogenezi, adheenci a respiraci *C. albicans* (Morales et al., 2013). Do určité míry by se dal použít i termín predace, kdy je pro candidu v hyfální formě letální kontakt s *Pseudomonas*, která je schopná eliminovat hyfy jejich porůstáním a tvorbou biofilmu. Kvasinková forma v tomto případě není postižena (Hogan and Kolter, 2002).

### 2.3.2 Vztahy s hostitelem

Podobné vztahy, jaké mají mikroby mezi sebou mohou mít i ve vztahu k hostiteli. Od silně pozitivního působení probiotik přes mutualisty a komenzály po čistě negativně působící parazity nebo patogeny. Mezi známá probiotika patří někteří zástupci rodů *Lactobacillus* (Isolauri et al., 1991) , *Bifidobacterium* (Yasui, Kiyoshima and Ushijima, 1995) a dále také druh *Escherichia coli* kmen Nissle 1917 (Boudeau et al., 2003). Jako probiotikum byl v minulosti využíván i kmen *Sacharomyces*

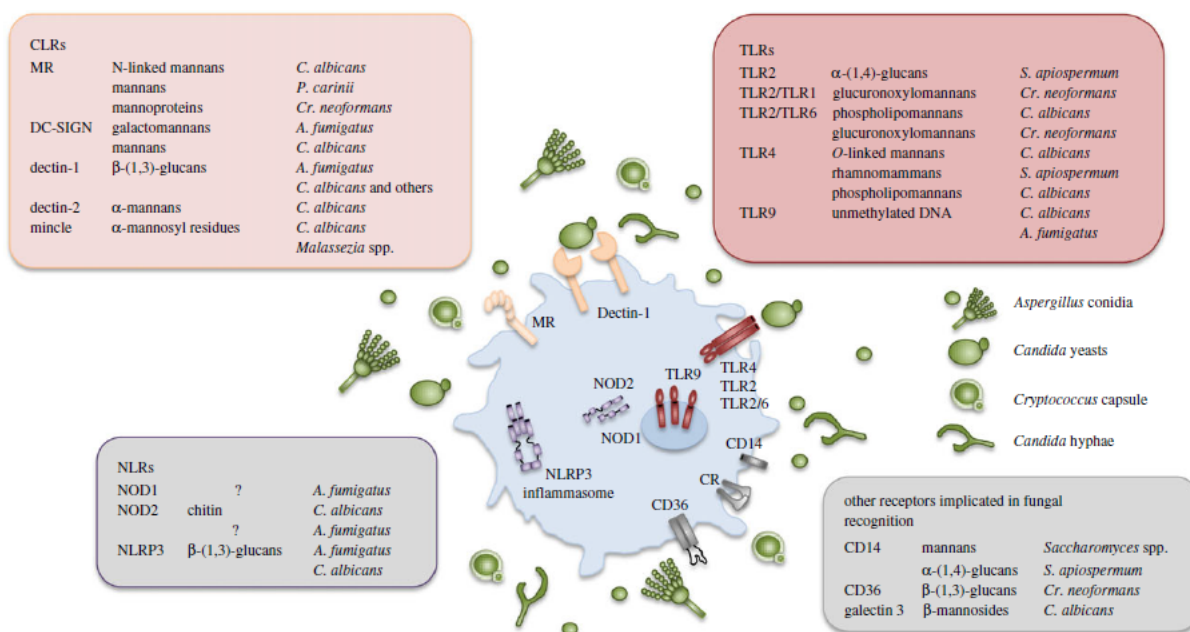
*boulardii*, který se využíval při každodenním perorálním podání k prevenci i terapii široké škály průjemových onemocnění včetně těch působených antibiotiky, AIDS nebo infekcí *Clostridium difficile* (McFarland and Bernasconi, 1993). Havním prospěchem zde může být zvýšení produkce střevní sacharázy, laktázy a maltázy, což může zlepšit absorpci těchto z složek potravy (Buts, De Keyser and De Raedemaeker, 1994). Ačkoliv je *S. boulardi* probiotický, i tento druh může u silně oslabených jedinců při kontaminaci intravenózního katetru působit závažné fungémie (Cassone et al., 2003). Příkladem komenzála, dobře adaptovaného na prostředí lidského střeva, je kvasinka *C. albicans*. Tato se v daném prostředí vyskytuje ve formě gastrointestinálně indukované přeměny, která se vyznačuje navýšenou schopností přijímat živiny specifické pro prostředí střeva, jako jsou mastné kyseliny, fosfát, a naopak nereaguje na své pohlavní feromony a prakticky se neúčastní pohlavního procesu (Pande, Chen and Noble, 2013). Adheruje pomocí povrchových proteinů Int1p (Gale et al., 1998) a Als (Klotz et al., 2007). Prostaglandiny, hlavní morfogenní faktory, indukují klíčení hyfou (Noverr and Huffnagle, 2004). Tyto látky tvoří jak *de novo* vlastní produkci, tak konverzí z exogenních zdrojů kyseliny arachidonové (Noverr et al., 2001). *Candida albicans* je zároveň známa jako oportunní patogen, kdy následkem změn prostředí může dojít k přepnutí buněčné identity do takzvaného béžového typu, který naopak sekretuje aspartyl proteinázy (Kretschmar et al., 1999), lipázy a další faktory virulence. Ty narušují přirozenou bariéru epitelu a umožňují prostoupení mikroba skrze přirozené bariéry. Béžový typ zároveň podstupuje pohlavní rozmnožování s partnerem opačného ladění (Pande et al., 2013). Tyto příklady ukazují, že s výjimkou striktně obligátních patogenů nejde ani tak o daný mikrobiální druh, jako spíše o jeho buněčnou identitu a vyhodnocení imunitním systémem.

Sliznice trávicí trubice tvoří fyzické rozhraní mezi vnitřním a vnějším prostředím. Se sliznicí je také asociována velká část lymfoidní tkáně lidského těla. Komenzální mikroby těchto povrchů modulují expresi genů zahrnujících absorpci živin, funkci bariéry, metabolismus xenobiotik, tvorbu krevních kapilár a postnatální vývoj střev (Hooper, 2001). Pod vrstvou hlenu je epitel, jehož buňky jsou prostoupeny kanály a pumpami, které umožňují transport látek skrze buňky, a těsné spoje pro transport mezi buňkami. Tyto tvoří několik proteinů, především pak occludin (Furuse et al., 1993), a adhezní molekuly tvořící těsné spoje (Martin-Padura et al., 1998).

Buňky hostitele exprimuje receptory rozeznávající molekulární vzory (PRRs), které detekují lipopolysacharidy, peptidoglykan, flagellin, chitin, manan,  $\beta$ -glukany, zymosany,  $\beta$ -oligomanosidy, vlákna RNA, metylovanou DNA a další, jenž můžeme souhrně označit jako s mikroby asociované molekulární vzory (MAMPs). Mezi nejdůležitější rodiny PRRs patří receptory podobné Toll (TLR), lektinové receptory C-typu (CLR), receptory podobné nukleotid vázající oligomerizační doméně (NLR) mezi které patří i receptory i NOD receptory (G. Y. Chen, 2014). Tyto po kontaktu s MAMP spouští přirozenou a adaptivní imunitu intracelulární signalizací, která ústí v aktivaci transkripčního jaderného faktoru  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) a indukci aktivační kaskády. Specifické CLRy rozpoznávající houbové struktury jsou Dectin 1, který rozpoznává  $\beta$ -glukany a Dectin 2 rozpoznávající na manózu bohaté

složky, především pak u hyfálních forem. NOD se vyskytují v cytosolu antigen prezentujících buněk (APC), dendritických buněk a makrofágů, kam se antigeny dostávají pomocí fagocytózy (Girardin et al., 2003). Detekci hub imunitním systémem zobrazuje Obrázek 3.

Se sliznicí asociovaná lymfoidní tkáň zahrnuje T a B lymfocyty, granulocyty, žírné buňky a přirozené zabíječe (NK). Tato je v kontaktu s lumen přes specializované enterocyty, takzvané M buňky, které umožňují transport antigenů z lumen střeva do lymfoidní tkáně bez porušení integrity sliznice. Lymfoidní tkáň se v tenkém střevě shukuje do Peyerových plaků a v případě tlustého střeva do uzlíkovitých shluků, kde se hromadí APC a okolo nich T a B buňky. Extuje i alternativní cesta, kdy dendritické buňky expresí proteinů těsných spojů dokáží tyto otevřít i zavřít. Mohou tak prostrkovat panožky mezi buňkami a fagocytovat v lumen bez poškození integrity epitelu (Rescigno et al., 2001). Dendritické buňky exprimují celé spektrum TLR a NOD, které indukují vznik regulačních T buněk na úkor efektorových, a tím přispívají k protizánětlivému prostředí střeva. Speciální epitheliální buňky tenkého střeva jsou pak Panethovy buňky, které se nachází na dně krypt. Ty fungují v regulaci mikrobiálních populací produkcí různých antimikrobních proteinů a peptidů, například defensinů, amfipatických molekul, které lyzují bakteriální membránu (Baumgart and Carding, 2007).



Obrázek 3: detekce hub imunitním systémem, PAMP – PPR interakce k rozpoznání houbových buněk, obrázek Dr. Jeanette Wagener (Gow & Netea, 2016).

## 2.4 Idiopatické střevní záněty

Idiopatické střevní záněty (IBD) patří k chronickým zánětlivým onemocněním trávicího traktu s recidivujícím charakterem. Dvě hlavní onemocnění jsou Crohnova choroba (CD) a Ulcerózní kolitida (UC), jejichž manifestace se částečně překrývá, ale každá má i svá specifika. CD je transmurální zánět, který může ovlivnit jakoukoliv část trávicí trubice, ale nešťastěji je postižena

terminální část tenkého střeva, tlusté střevo a konečník. Komplikacemi mohou být vznik píštělí a omezení průchodnosti střeva až jeho obstrukce. Pro UC je typický zánět tlustého střeva a konečníku spolu se zasažením omezeným na střevní sliznici (Baumgart and Sandborn, 2007). Jeho jasným symptomem je krvavá průjmovitá stolice. Mimo postižení střev jsou IBD často doprovázena i extraintestinální manifestací. Například anémií vzniklou v důsledku malnutrice, postižením kloubů, očí, sliznic úst, pokožky nebo žlučových cest (Bernstein et al., 2015). Asociace mezi UC a jaterními onemocněními byla zkoumána již v 60. letech (Parker and Kendall, 1954), ale dodnes není jasně definováno, zda je primární sklerotizující cholangitida (PSC) jedním z fenotypů IBD nebo pouhou mimostřevní manifestací IBD. PSC se sice ve většině případů vyskytuje společně s IBD, ale v některých případech nemusí být onemocnění střev detekovatelné. PSC je difúzní zánět a fibróza žlučových cest, které můohou vést ke stavům cirhózy, jaterního selhání nebo karcinomu (Chapman et al., 1980). Zatímco se incidence těchto onemocnění ve vyspělých zemích Severní Evropy a Ameriky stabilizovala na prevalenci 63-445 pacientů na 100 000 osob, tak v méně rozvinutých oblastech, kde byla dříve prevalence nízká, počty významně rostou. Jedná se o Jižní a Střední Evropu, Asii, Afriku a Latinskou Ameriku.

Mezi příčiny vzniku se řadí genetické predispozice s oblastmi na dvanácti chromozomech spolu s environmentálními proměnnými. Zajímavé je zjištění, že zánět slepého střeva a jeho chirurgické odstranění před dvacátým rokem života snižují riziko UC (Andersson et al., 2001). Skutečně kontroverzně pak vyznívá, že kuřáci mají výrazně nižší pravděpodobnost onemocnění UC nebo PSC. Naopak bývalí kuřáci byli ve významně vyšším riziku. Kouření obecně pak zdvojnásobuje riziko CD (Lindberg et al., 1988). Rizikovým faktorem CD by mohla být i infekce *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, jehož přítomnost byla v čerstvých střevních biopsiích signifikantně vyšší než u kontrol (Bull et al., 2003). Tato bakterie způsobuje paratuberkulózu skotu, která se projevuje průjmem, úbytkem na váze a tvorbou granulomů, které jsou typické pro CD (Chambers and Morson, 1979). *Mycobacterium* je následně přítomno nejen v jeho výkalech, ale i mléku, kde přežívá proces pasterizace a v závislosti na lokalitě bývá detekován i v komerčních produktech (Ellingson et al., 2005).

V souvislosti s mikroby jsou vždy uváděné také specifické protilátky detekované v krvi pacientů s IBD. Pro nemocné CD jsou markerem protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) (Main et al., 1988) zatímco pro UC proti perinukleární cytoplazmě neutrofilů (pANCA). pANCA byly dokonce detekovány u 25 % pacientů s UC již několik let před objevením příznaků a stanovením diagnózy (Israeli et al., 2005). Houbový mikrobiom pacientů s IBD je v porovnání s bakteriálním daleko méně prozkoumaný. Typicky je zvýšen poměr basidiomycetů vůči ascomycetům, sníženou proporcí *Saccharomyces cerevisiae* spolu s *Malassezia sympodialis* a naopak zvýšenou proporcí *Candida albicans*. Množství *S. cerevisiae* pozitivně koreluje s množstvím v případě rodů *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Roseburgia* a *Ruminococcus*. Tato kvasinka byla dokonce spojena s produkcí protizánětlivého

cytokinu IL-10. Mezi nejčastější rody patřily mimo *Saccharomyces* a *Candida* i *Debaryomyces*, *Penicillium* a *Kluyveromyces*. Nejenom, že dochází k nerovnováze ve složení střevní mikrobioty, takzvané dysbióze na úrovni jednotlivých říší a snížení jejich alfa diverzity. Navíc bylo prokázáno i narušení vzájemných vazeb bakteriální a houbové diverzity, především pak u pacientů s UC. U pacientů s CD bylo detekováno specifické prostředí střeva, které favorizuje houby na úkor bakterií (Sokol et al., 2016). Zajímavé je také zjištění, že transfer střevního mikrobiomu společně s pektinovým suplementem poskytují pacientům s UC dlouhodobou úlevu od průvodních symptomů nemoci díky mikrobiálnímu inokulu ze zdravého střeva spolu se substrátem pro jejich fermentační metabolismus (Wei et al., 2016).

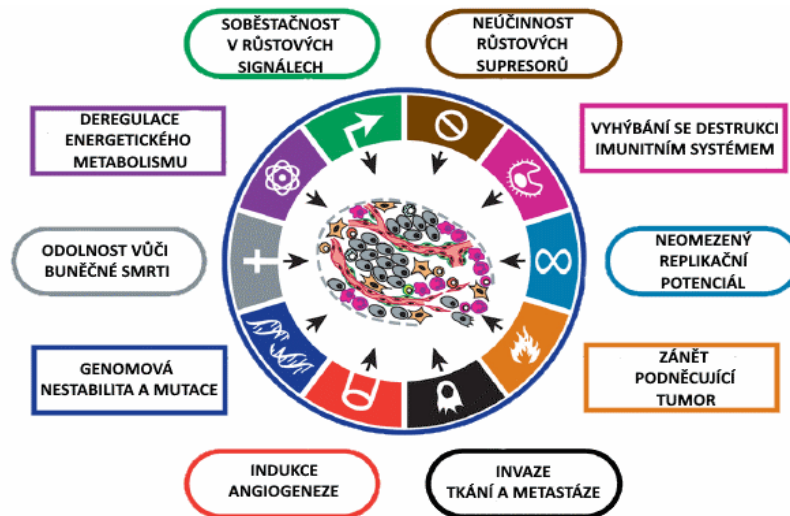
Mezi fyziologické specifity IBD patří nižší odolnost epitelu. Z tohoto důvodu stimulací některými složkami potravy dochází k rozšíření těsných spojení, dissociaci aktinových filament a ve finálním důsledku ke zvýšení propustnosti střeva (Söderholm et al., 2002). Porušení střevní bariéry pak vede k zaplavení imunitních buněk antigeny z lumen střeva, což vede k jejich trvalé aktivaci a vzniku zánětu. Současně je u pacientů s IBD narušená přirozená imunitní odpověď. Epiteliální buňky na svém povrchu namísto TLR3 exprimují ve vyšší míře TLR4 (Cario and Podolsky, 2000) a TLR9, díky němuž mohou přímo reagovat na bakteriální DNA produkcí IL-8, který funguje jako chemotaktický faktor pro granulocyty (Akhtar et al., 2003). IL-8 zároveň způsobuje uvolnění histaminu a indukuje respirační vzplanutí, což dále zvyšuje potenci zánětu. Dendritické buňky vyhodnocením komenzálních mikrobů za patogenní indukují diferenciaci naivních T buněk na buňky efektorové Th1, Th2, Th17, které následně produkují prozánětlivé cytokiny (Baumgart and Carding, 2007). Zároveň během zánětu dochází k indukci exprese NOD prozánětlivým cytokinem tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) i v buňkách epitelii (Rosenstiel et al., 2003). Aktivované T buňky jsou rezistentní vůči apoptóze (Ina et al., 1999), a tak dochází k jejich akumulaci ve sliznici. V součtu všechna tato působení indukují zánět, který je díky početným pozitivním zpětným vazbám udržován, ztrácí své přínosné působení a jeho chronickým působením dochází k trvalému poškození tkáně, která může v konečném důsledku vést až ke vzniku karcinomu (Deschner et al., 1983).

## 2.5 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom je běžnou neoplázií postihující tračník, esovitou kličku a konečník. Jedná se o maligní nádorové onemocnění, které se vyskytuje ve třech známých formách: sporadická, která tvoří 85 %, rodinná 10 % a děděná 5 % s čistě Mendelovským přenosem (Pardini et al., 2008). Z tohoto je jasné, že environmentální proměnné jsou klíčové k iniciaci a progresi CRC. Buňky karcinomu nabývají šesti biologických schopností, získaných během několikastupňového procesu vývoje tumoru, Obrázek 4. Mimo rakovinných buněk se tumor vyznačuje repertoárem na první pohled normálních buněk, které se podílejí na tvorbě specifického mikroprostředí tumoru (Hanahan and Weinberg, 2011). Jednotlivé stupně vývoje tumoru by se daly označit za změny v proliferaci a diferenciaci (Deschner et



al., 1983), vznik lézí abnormálních střevních krypt (Di Gregorio et al., 1997), adenomatózní polypy, které jsou většinou benigní a asymptomatické, ale z některých se mohou vyvinout malignance, jenž



Obrázek 4: specifické biologické schopnosti nádorových buněk; převzato a upraveno z (Hanahan and Weinberg, 2011)

je posuzována dle neoplastických buněk infiltrujících submukózu (Kyzer et al., 1992).

Kolorektální karcinom je v současné době třetí nejčastější typ maligního nádoru; v roce 2015 byl celosvětově zodpovědný za 774 000 úmrtí ([www.who.int](http://www.who.int)). Jedná se o kontinuální nárůst v celosvětovém výskytu, kdy například v roce 2012 se jednalo o 693 900 úmrtí. Nejvyšší incidence je dokumentována pro Austrálii a Oceánii spolu s Evropou a Severní Amerikou. Nízká ale rostoucí incidence je pak v Asii a nejnižší vůbec v Africe (Torre et al., 2015). Obecně incidence narůstá v ekonomicky se rozvíjejících zemích, kdy Česká republika byla v letech 1998-2002 na úplném vrcholu s nárůstem od roku 1983 u mužů o 45 % u žen o 25 % (Center, Jemal and Ward, 2009). Naopak v USA dochází od roku 1984 k poklesu počtu úmrtí, který je vysvětlen především lepším screeningem, časnějším záchytem a pokroky v léčebných metodách. Mezi rizikové faktory vzniku CRC řadíme kouření, obezitu a konzumaci červeného masa. Naopak faktory snižující riziko jsou fyzická aktivita, konzumace vlákniny (Martínez et al., 1997), užívání aspirinu a multivitaminů (Edwards et al., 2010). V České republice má občan nárok na preventivní test okultního krvácení ve stolici od 50 let věku a na kolonoskopické vyšetření od 55 let. Zatímco ke snížení incidence dochází ve věkové skupině nad 64 let, u skupiny pod 50 let probíhá signifikantní nárůst (Siegel, Miller and Jemal, 2017).

Mykobiom pacientů s CRC do dnešního dne nebyl kompletně popsán, ale jako vodítko může sloužit studie párových biopsií pacientů s adenomy. Ve všech vzorcích se vyskytovaly skupiny Ascomycota, Basidiomycota, Glomeromycota, rod *Phoma* a druh *Candida tropicalis*. Také byla detekována snížená diverzita v adenomu oproti nepostížené sliznici a v pokročilých adenomech byly signifikantně zvýšeny rody *Fusarium* a *Trichoderma*, které se díky svému infekčnímu potenciálu mohou podílet na progresi adenomu. Houby rodu *Phoma* negativně korelují s bakterií rodu *Tatumella*

(Costa, Mendes and Ribeiro, 2008), která je stejně jako *Phoma* oportunně patogenní. Synergie panuje mezi rody *Candida* a *Cladosporium*, a druhý zmíněný navíc inhibuje patogenní rody *Escherichia* a *Shigella* (Luan et al., 2015). Studie zaměřená pouze na bakteriální mikrobiom pacientů s CRC jsou hojné a byl detekován společný výskyt rodů *Fusobacterium*, *Leptotrichia* a *Campylobacter* v tumoru současně s asociací k nadměrné expresi prozánětlivého IL-8 (Warren et al., 2013). Množství *Fusobacterium nucleatum* je dokonce spojováno s kratším dožitím u pacientů s CRC (Mima et al., 2016).

Zajímavých výsledků bylo dosaženo pomocí fekálních transplantátů od pacientů s CRC a zdravých kontrol (HC) gnotobiotickým myším s následnou chemicky indukovanou tumorogenezí. Tyto experimenty prokázaly, že rozdíly v počtu tumorů se neodvíjely od rakovinného statutu dárce, ale od zásadních změn v mikrobiomu příjemce. Zvířata s více tumory vykazovala navýšení četnosti u rodů *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Alistipes* a *Akkemansia*, kteří se vyznačují degradací glykanů hostitele. Naopak negativní korelací se vyznačovali zástupci Clostridií, především pak skupina XIVa (Baxter et al., 2014), která je jednou z hlavních producentů butyrátu, který patří do skupiny krátkých mastných kyselin jako je acetát a propionát, produkovaných anaerobními bakteriemi fermentací vlákniny. Butyrát je preferovaným zdrojem energie střevního epitelu (Clausen and Mortensen, 1995) a ve střevě působí protizánětlivě díky inhibici NFκB (Segain et al., 2000), který hraje zásadní roli v regulaci transkripce prozánětlivých cytokinů. Navíc butyrát až čtyřnásobně zvyšuje spontánní apoptózu buněčných linií lidských CRC (Heerdt, Houston and Augenlicht, 1994) a inhibuje morfogenezi oportunně patogenní *C. albicans* (Noverr and Huffnagle, 2004).

## 3. Metodika

### 3.1 Molekulární analýzy

#### 3.1.1 Studované populace a extrakce DNA

Kohortu 1 tvořily párové bioptické vzorky zdravá tkáň/tumor od 32 pacientů s CRC získaných v součinnosti s Fakultní Nemocnicí Plzeň. Vzorky byly ihned po odběru zamrazeny na -80 °C. Kohorta 2 viz Tabulka 1. Jednalo se celkem o 127 vzorků stolice pacientů s IBD pod různými schémata léčby (aminosalicyláty, kortikoidy, azathioprin, probiotika, anti-TNF- $\alpha$ ) a zdravých kontrol. Byly získány v období 2015-2016 ve spolupráci s Institutem klinické a experimentální medicíny (Praha, CZ). Tyto vzorky byly pacienty dopraveny na klinické pracoviště, kde byly následně zamrazeny na -80 °C.

DIAGNÓZA	PSC	PSC IBD	UC	CD	HC
POČET	12	39	33	11	32
POHLAVÍ	♂ 10 ♀ 2	♂ 29 ♀ 10	♂ 18 ♀ 15	♂ 3 ♀ 8	♂ 13 ♀ 19
MEDIÁN VĚKU	35				35

Tabulka 1: Kohorta 2

Kohorta 3 byla tvořena dvěma pacienty a jedním zdravým jedincem, jejichž čerstvá stolice byla získána za účelem zjištění vlivu uchování vzorku na diverzitu houbového společenstva (viz kapitola 3.3).

Celková DNA byla u všech vzorků izolována pomocí komerčně dostupného izolačního kitu MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicenter, Illumina Inc., Madison, WI, USA) a lyzačních zkumavek s keramickými kuličkami Matrix Tubes Y (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Vzorek sliznice byl na suchém ledu oddělen skalpelem, stolice byla odrýpnuta, a zvážen. Za optimální navážku bylo považováno 40 -70mg. Izolace byla prováděna dle protokolu výrobce s následujícími úpravami. Rozbití keramickými kuličkami probíhalo třikrát v homogenizátoru FastPrep na nejvyšší výkon 60 s, shodně i inkubace na 65 °C byla provedena třikrát. Inkubace na 37 °C byla při třepání na 300 rpm, a před inkubací na ledu bylo přidáno 14  $\mu$ l TE Buffer a 50  $\mu$ l 2 $\times$  Tissue and Cell Lysis Solution do každého vzorku. Vzorek byl srážen ve 200  $\mu$ l isopropanolu a eluován v 50  $\mu$ l TE pufr. Získaná DNA byla měřena na spektrofotometru Nanodrop ND-1000, který poskytuje mimo jiné i informace o kvalitě izolované DNA. Samotná kvantita DNA byla po několika ověřeních na fluorometru Qubit dsDNA Broad Range vyhodnocena jako polovina hodnoty stanovené Nanodropem.

#### 3.1.2 Amplifikace ITS2

Pro identifikaci mykobioty ve vzorcích sliznice pacientů s CRC byla zvolena amplifikace ITS2 rDNA za využití degenerovaných primerů ITS2\_KYO uvedených v Tabulce 2 (Toju et al., 2012). Podmínky reakce viz Tabulka 3.

AMPLIFIKOVANÁ OBLAST	NÁZEV	SEKVENCE	ZDROJ
ITS2	ITS2_KYO_F	GATGAAGAACGYAGYRAA	Toju et al., 2012
	ITS2_KYO_R	CTBTTVCCCKCTTCACTCG	
16S	Bakt_341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	Alm et al. 1996
	806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	Caporaso et al. 2010b
ITS1	ITS1-18S_fw	GTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC	Findley et al., 2013
	ITS1-5.8Srv	GTTCAAAGAYTCGATGATTCAC	

Tabulka 2: souhrnná tabulka primerů využitých pro finální amplifikace rDNA u různých vzorků.

REAKČNÍ SMĚS	OBJEM (μl)	FÁZE	OPAKOVÁNÍ	TEPLOTA (°C)	ČAS
pufr B (5×)	5	1.	-	95	3 m
enhancer (5×)	5	2.	35	94	30 s
dNTP (10 mM)	0,5		35	55	60 s
Kapa HiFi DNA polymeráza	0,2		35	72	70 s
H <sub>2</sub> O	3,8	3.	-	72	10 m
forward primer (10 pmol)	2	Tabulka 3: složení reakční směsi pro ITS2 a podmínky PCR amplifikace; vše Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA.			
reverse primer (10 pmol)	2				
templát (50 ng/ul)	6,5				

PCR produkty byly vždy zobrazeny na elektroforetogramu (1,5 % agarózový gel (Amresco, Solon, OH, USA) obsahující odpovídající množství SYBR Safe 10.000x (Invitrogen, Burlington, Kanada) s využitím hmotnostního standardu O'GeneRuler Express DNA Ladder DNA a barvy Gel Loading Dye 6X (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Viz přílohy Obrázek č.1.

Z důvodu špatných výsledků sekvenace biopsií bylo přistoupeno k další optimalizaci.

### 3.1.3 Test kitu na odstranění hostitelské DNA

Většina genomické DNA izolované z biopsií je lidského původu, což vedlo k obtížím při amplifikaci mikrobiální DNA. Proto byl testován kit NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA), který vyvazuje lidskou DNA na základě přítomnosti metylace CpG míst. K jeho vyzkoušení bylo využito 1000 ng od každého ze tří vzorků různého původu: lidská biopsie CRC, lidská biopsie psoriatické kůže a uměle vytvořená pozitivní kontrola tvořená lidskou DNA z krevních buněk a MOCK společenstva popsaném výše. Kvalita vstupního materiálu byla ověřena pomocí elektroforézy popsané výše s modifikací 0,6 % gel se standardem Quick-Load 1 kb Extend DNA Ladder (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA). Kit využívá magnetické kuličky na které je kovalentně navázán MBD2-Fc protein, který se váže na metylovaná CpG místa, která jsou velmi častá v lidské i myši DNA, méně častá u hub a ojedinelá u bakterií. Výsledkem protokolu dle výrobce jsou dvě frakce: mikrobiální supernatant (zahrnující bakteriální a

část houbové DNA) a vyvázaná hostitelská DNA. Celkem bylo získáno osm frakcí ze čtyř původních vzorků, které byly použity, jako referenční originál. Na těchto 12 vzorcích byly ověřeny změny mezi originálním vzorkem vstupujícím do kitu, vyčištěnou mikrobiální DNA a zachycenou hostitelskou DNA pomocí klasické PCR i qPCR reakce se 4 sety primerů, které jsou uvedeny v Tabulce 4. Postup ověření byl dle instrukcí výrobce vyvazovacího kitu mimo vstupní koncentraci DNA templátu do ověřovací reakce, která byla v rozmezí 6 - 50 ng a vždy se shodovala pro dané tři frakce jednoho vzorku. Pro namíchání reakce byl použit SYBR Green Master mix 12,5 µl do finálního objemu 25 µl (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Měření probíhalo na přístroji CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, přílohy, Tabulka 7.

TAXONOMICKÁ SELEKTIVITA	NÁZEV	POUŽITÍ	SEKVENCE	CITACE
houby	ITS2_KYO_F9	PCR	AACAACCAGATGAAGAACGYAGYRAA	Toju et al., 2012
	ITS2_KYO_R2		AAACATCGCTBTTVCKCTTCACTCG	
houby	ITS1-18S_fw	PCR	GTA AAAAGTCGTAACAAGGTTTC	Findley et al., 2013
	ITS1-5.8Srv		GTTCAAAGAYTCGATGATTCAC	
člověk	RPL30_F	qPCR	GCCCGTTCAGTCTCTTCGATT	manuál kitu E2612S
	RPL30_R		CAAGGCAAAGCGAAATTGGT	
houby	FungiQuant_F	qPCR	GGRAAACTCACCAGGTCCAG	Liu et al., 2012
	FungiQuant_R		GSWCTATCCCCAKCACGA	
bakterie	16S_F	qPCR	CCATGAAGTCGGAATCGCTAG	manuál kitu E2612S
	16S_R		GCTTGACGGGCGGTGT	

Tabulka 4: kombinace PCR primerů použitých pro PCR amplifikaci a qPCR kvantifikaci houbové, bakteriální a živočišné DNA ze vzorků podrobených separaci DNA pomocí Microbiome DNA Enrichment Kitu.

### 3.1.4 Test primerů a finální amplifikace ITS1

Na čtyř fekálních vzorcích pacientů s IBD a uměle vytvořeném MOCK společenstvu byly provedeny testovací amplifikace pomocí šesti unikátních kombinací primerů, viz Tabulka 5. MOCK společenstvo bylo vytvořeno smícháním 15 ng genomické DNA z kultur NG2, NG3, NG5, NG6, NG10, NG1.

Všechny čtyři vzorky s primery cílicími na ITS1 amplifikovaly produkt ve shodné délce jako MOCK.

AMPLIFIKOVANÁ OBLAST	NÁZEV	SEKVENCE	ZDROJ
ITS2	ITS2_KYO_F	GATGAAGAACGYAGYRAA	Toju et al., 2012
	ITS2_KYO_R	CTBTTVCKCTTCACTCG	
ITS1	ITS1-18S_fw	GTA AAAAGTCGTAACAAGGTTTC	Findley et al., 2013
	ITS1-5.8Srv	GTTCAAAGAYTCGATGATTCAC	
ITS2	3271-ITS2F	CARCAAYGGATCTCTTGG	Delhaes et al., 2012
	3271-ITS2R	GATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	
celý ITS	ITS1F	CTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAA	Amend et al. 2010
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. 1990
ITS2	ITS2_KYO_F	GATGAAGAACGYAGYRAA	Toju et al., 2012
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. 1990
ITS2	ITS3_F	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White et al. 1990
	ITS2_KYO_R	CTBTTVCKCTTCACTCG	Toju et al., 2012
ITS2	ITS3_F	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White et al. 1990
	ITS4_R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Tabulka 5: veškeré testované kombinace primerů k amplifikaci vzorků pacientů s IBD.

Tato kombinace byla dle Findley et al., 2013 navržena tak, aby byla co nejméně kompatibilní s lidskou DNA. V testu oproti ostatním kombinacím amplifikovala nespecifity jen v malé míře, a tak byla zvolena pro finální experiment pro vzorky stolice pacientů s IBD a kontrol. (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Podmínky reakce viz Tabulka 6.

REAKČNÍ SMĚS	OBJEM (μl)
pufr B (5×)	5
enhancer (5×)	5
dNTP (10 mM)	0,5
Kapa HiFi DNA polymeráza	0,2
H <sub>2</sub> O	5,3
BSA	2,5
forward primer (10 pmol)	2
reverse primer (10 pmol)	2
templát (10 ng/ul)	2,5

FÁZE	OPAKOVÁNÍ	TEPLOTA (°C)	ČAS
1.	-	95	3 m
2.	35	95	30 s
	35	50	30 s
	35	72	60 s
3.	-	72	10 m

Tabulka 6: složení reakční směsi pro ITS1 a podmínky PCR amplifikace; vše Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA.

### 3.1.5 Amplifikace 16S

Pro identifikaci bakteriálního společenstva ve vzorcích sliznice byla zvolena amplifikace V3-V4 regionu 16S rDNA za využití primerů amplifikujících oblast 16S uvedených v Tabulce 2.

PCR byla optimalizována ředěním templátové DNA, tedy snahou vyředit inhibitory, změnou teploty nasedání i délky nasedací a prodlužovací fáze cyklu. Zároveň jsem testovala různé enhancery, například DMSO (5 %), formamid (5 %), MgCl<sub>2</sub> (1,5 – 6 mM). Optimalizace nevedla k významnému zvýšení specifity amplifikace 16S rDNA (produkt cca 500 bp), a proto byly nespecifické PCR produkty větší velikosti (přílohy, Obrázek č. 2) odstraněny ve fázi přípravy knihovny. Podmínky reakce viz Tabulka 7.

REAKČNÍ SMĚS	OBJEM (μl)	FÁZE	OPAKOVÁNÍ	TEPLOTA (°C)	ČAS
pufr B (5×)	5	1.	-	94	3 m
enhancer (5×)	5	2.	35	94	30 s
dNTP (10 mM)	0,5		35	54,2	45 s
Kapa HiFi DNA polymeráza	0,15		35	72	75 s
H <sub>2</sub> O	4,35	3.	-	72	10 m
MgCl <sub>2</sub> (3mM)	1,5				
forward primer (10 pmol)	1				
reverse primer (10 pmol)	1				
templát (50 ng/ul)	6,5				

Tabulka 7: složení reakční směsi pro 16S a podmínky PCR amplifikace; vše Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA.

Patnáct problematických vzorků, kde PCR neproběhla, nebo se amplifikoval pouze nespecifický produkt, bylo dále optimalizováno. Dvanáct bylo amplifikováno při reakci s menším množstvím templátu (2 μl), větším objemem DNA polymerázy (0,2 μl) a vody (8,8 μl), zároveň byl upraven cyklus, annealing snižen na 50,3 °C a počet cyklů zvýšen na 40. Tento postup vedl

k namnožení specifického PCR produktu. Takto upravený protokol byl testován na všech vzorcích, ale u většiny neposkytoval zvýšení specifity reakce. Tři DNA vzorky se nepodařilo amplifikovat a byly vyřazeny.

### 3.1.6 Příprava knihovny

Triplikáty všech reakcí, ITS i 16S, byly nakonec smíchány a jejich koncentrace byla náhodným výběrem ověřena na spektrofotometru Nanodrop ND-1000, opět v kombinaci s Qubit BR. Cílem bylo ověřit, že se vzorky mezi sebou řádově neliší, a tak lze dávat do normalizace jednotný objem pro všechny vzorky.

U části vzorků, kde byl amplifikován také nespecifický PCR produkt, byl cílový produkt vyříznut z gelu a přečištěn pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Nakonec byla kolonka ve dvou opakováních promyta 50  $\mu$ l EB pufru (10 mM Tris·Cl, pH 8.5). Výsledkem byl vzorek o velkém objemu a nízké koncentraci DNA, který byl následně pomocí octanu sodného a 100 % ethanolu vysrážen a znovu rozpuštěn v 10  $\mu$ l TE pufru.

Přečištění a normalizace ITS2 amplikonů z biopsií a ITS1 amplikonů ze stolic bylo provedeno pomocí SequalPrep Normalization Plate Kit 96-well (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) dle protokolu výrobce. Normalizované vzorky byly ekvimolárně spojeny do PCR knihovny. Přečištění 16S amplikonů biopsií bylo pro nespecifické nasedání primerů provedeno vyřezáním cílového produktu z gelu. Pro extrakci PCR produktů z gelu byly testovány dva druhy agaróz na přípravu elektroforetického gel (1,5 % Agarose I, Amresco a 0, 5% Agarose, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; oboje TAE pufr, 100 V, 35 min). a pět extrakčních kitů: QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen; Gel Extraction kit, Geneaid; Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System Quick Protocol (Promega, Madison, WI, USA); Column DNA Lego Kit (Top-Bio, Vestec, Česká Republika), za použití izolace přes kolonku anebo křemičitých kuliček) za použití 2 různých agaróz (Amresco a Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Z tohoto testu nejlépe vyšel a pro finální protokol byl využit Gel Extraction kit, Geneaid za použití Agarose I, Amresco. Knihovna byla následně vytvořena validací koncentrace spojených triplikátů na Qubit Broad Range, které byly ekvimolárně spojeny, lyofilizovány, a nakonec eluovány ve 100  $\mu$ l. Knihovna byla následně nanesena na gel připravený dle postupu výše a cílový fragment o délce 500 bp byl vyříznut a přečištěn. Celý proces extrakce z gelu byl opět opakován třikrát a triplikát byl smíchán, což poskytlo dostatečný výtěžek pro vstup do ligační fáze, kdy byly ke všem knihovnám ligovány sekvenační adaptory pomocí TruSeq DNA PCR-free LT Sample Preparation Kitu (Illumina Inc., Madison, WI, USA). Koncentrace naligovaných knihoven byla zjištěna pomocí qPCR prostřednictvím KAPA Library Quantification Kitu. Tyto výsledky spolu s počtem vzorků, jejich typem (pro bakteriální vzorky byl očekáván pětikrát vyšší počet sekvencí než u houbových) a délkou amplikonu poskytly informace ke konečnému smíchání jednotlivých knihoven v jednu finální. Knihovna biopsií byla sekvenovaná použitím optimalizovaných protokolů na

platformě Illumina, MiSeq v Centrální laboratoři pro genomiku v CEITEC (Brno, CZ). První sekvenační běh, byl důsledkem chybného nařazení knihovny suboptimální. Při následné resekvenaci nebyly houbové vzorky řezány z gelu a ligace adaptorů byla zajištěna Centrální laboratoři pomocí KAPA Library Preparation Kit Illumina s osmi cykly PCR amplifikace KAPA HiFi polymerázou. Knihovny stolice pacientů s IBD byly připraveny v Laboratoři buněčné a molekulární imunologie, což znamenalo kromě primární validační qPCR a smíchání, také opětovnou validaci finální knihovny a následné ověření koncentrace a délky ampikonových fragmentů na Agilent 2100 Bioanalyzeru (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA.). Finální knihovna sekvenována v Laboratoři environmentální mikrobiologie, MBÚ AV ČR.

### **3.2 Bioinformatické zpracování a statistické vyhodnocení dat**

Data získaná ze sekvenace byla procesována pomocí softwarového balíčku Qiime (Caporaso et al., 2010) při aplikaci standardních procedur zahrnujících kontrolu kvality, filtrování dat, klastrovací analýzu a taxonomickou identifikaci. Konkrétněji: hrubá sekvenční data byla filtrována dle požadavku na minimální kvalitu Q20 (Phred quality score  $\geq 20$ ), sekvence obsahující neidentifikované báze byly vyřazené a maximální počet přípustných chyb v části odpovídající molekulární značce, barcode, byl roven jeden a půl báze. Sekvence z forward a reverse readů byly následně spojeny dovolující maximálně 20 % rozdíl v oblasti překryvu. Chimerické sekvence byly identifikované pomocí algoritmu implementovaného v nástroji USEARCH (Edgar and Flyvbjerg, 2015) a odfiltrované z finálního datasetu, který byl rozdělen do skupin, klastrů, obsahujících sekvence o minimální podobnosti 97 % pomocí algoritmu UCLUST (Edgar, 2010). Reprezentativní sekvence z jednotlivých skupin byly podrobeny taxonomické identifikaci porovnáním pomocí BLAST (Altschul et al., 1990). V případě bakterií s databází Greengenes (verze 13\_8) (DeSantis et al., 2006) a hub s databází ntF-ITS1 (Motooka et al., 2017). Výsledkem těchto kroků byla matice vzorků a taxonů v nich nalezených společně s jejich četnostmi, která sloužila jako vstupní data k následným ekologicko-diverzitním a statistickým analýzám. Před samotnou analýzou alfa a beta diverzity byla vstupní data náhodným výběrem srovnána na stejný počet sekvencí na vzorek zohledněním nejmenšího počtu sekvencí získaných ve vzorku datasetu. V rámci výpočtu alfa diverzity bylo použito několik indexů s různou interpretační hodnotou zahrnující indexy Chao1, Simpson index, Shannon index a v případě bakteriálních komunit taktéž PD-whole-tree index zohledňující fylogenetickou příbuznost identifikovaných skupin. Pro výpočet beta diverzity byl u bakteriálních komunit použit index Unifrac (Lozupone and Knight, 2005) a to jednak ve variantě zohledňující četnosti jednotlivých skupin, weighted unifrac, tak kvalitativní, unweighted unifrac index, který tyto četnosti ignoruje. Jeho přínosem je, že při výpočtu beta diverzity zohledňuje fylogenetickou příbuznost taxonů přítomných ve srovnávané komunitě. V případě houbových společenstev, pro které nebylo možné vytvořit alignment reprezentativních sekvencí z důvodu použitého markeru byly jako ekvivalenty pro výpočet beta



diverzity použité indexy Bray-Curtis, kvantitativní, a Binary-Jaccard, kvalitativní index. Pro grafickou reprezentaci beta diverzity byly zkonstruované PCoA diagramy. Vliv proměnných na složení komunit byl testován pomocí nástroje Maaslin, který využívá generalizované lineární modely pro zjištění statistické signifikance. Pro vysvětlení odlišnosti jednotlivých skupin biologických vzorků byl použit nástroj Lefse (Segata et al., 2011), který kromě standardních statistických testů signifikance implementuje i testy biologické konzistence a významnosti daného efektu.

### 3.3 Kultivace

#### 3.3.1 Studovaná populace

Ke kultivaci byly využity vzorky čerstvé stolice ze dvou pacientů s diagnostikovaným onemocněním trávicího traktu a jedné kontroly, Tabulka 8. Pro naše potřeby to znamená, že byly zpracovány do tří hodin od odběru a v mezičase byly skladovány pouze při pokojové teplotě. Tito pacienti nebyli vystaveni používání antibiotik ani antimykotik minimálně tři měsíce před odběrem. Shodná čerstvá stolice byla ve stejném okamžiku, kdy byla použita pro kultivaci, také odizolována a zpracována shodně, jako vzorky IBD (kapitoly: 3.1.1, 3.1.3, 3.1.6, 3.2), pro sekvenaci houbového společenstva.

ČÍSLO	POHLAVÍ	BMI	ROK NAROZENÍ	DIAGNÓZA	MEDIKACE
Zdravá kontrola	žena	25,3	1957	X	X
Pacient 1	žena	17,4	1991	chronický zánět žaludku, intolerance laktózy po prodělaném zánětu střev	Lactanon
Pacient 2	žena	20,9	1990	CD v klidové fázi	Pentasa Sachet, Imuran

Tabulka 8: demografická a klinická data pacientů, jejichž čerstvá stolice byla využita k analýzám kultivačních podmínek.

#### 3.3.2 Přípravné experimenty

Během pilotních pokusů byly hledány optimální kultivační podmínky pro další testy. Probíhaly na precizně zhomogenizovaných čerstvých fekálních vzorcích jednoho zdravého dárce a bylo testováno 1) optimální ředění (5×, 10×, 100×, 1000×, 10 000×); 2) použité rozpouštědlo (fosfátový pufr, fyziologický roztok, intravenní voda); 3) druh kultivačního média (Sabouraudův agar, SAB; Bramborovo-dextrózový agar, PDA, HiMedia, Mumbai, India; Malt extrakt agar, MEA; Brain-heart infusion agar, BHI, Oxoid, Basingstoke, UK; Czapkův agar; CA, samotný nebo s přísadkou 20 % chloridu sodného, CYAS; a Dichloranový agar s bengálskou červení, DRBC), složení médií je uvedené v přílohách Tabulka č.1; 4) přídatné růstové látky, jako olivový olej, bengálská červeň a antibiotika: chloramphenicol, 40 mg/l mimo DRBC, kde 100 mg/l, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany; gentamicin, 50 mg/l, Sandoz, Praha, Česká republika; cykloheximid, 40 mg/l, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany. Všechny petriho misky (průměr 9 cm) pak byly inkubovány

za aerobních podmínek ve dvou různých teplotách: 24 °C, 37 °C. Nárůst hub byl vyhodnocen kvantitativně (počet CFU) a kvalitativně (spektrum zachycenů hub určených pomocí morfologie). S tímto vzorkem byl také testován finální experiment, dle schématu níže.

### 3.3.3 Finální schéma experimentu

Z přípravné fáze kultivace bylo nakonec pro detailnější analýzu vybráno ředění 5x, které poskytuje dostatek kolonií pro využití statistiky, ale zároveň počet dovolující odečet CFU, antibiotika zamezující nárůstu bakterií a olivový olej podporující růst lipolytických druhů. Vybrané kultivační podmínky byly tyto: ředění vzorku 5x, rozpouštědlo fyziologický roztok, objem inokula 100 µl, teploty 5 °C, 24 °C, 37 °C, 45 °C, inkubace aerobní (petriho misky s parafilmem) i anaerobní. Pro další práci byla vybrána média s rozdílným poměrem C:N, která se výrazně lišila ve spektru zachycených hub: BHI s gentamicinem a chloramphenicolem, SAB s olivovým olejem (aplikováno 200 µl v tenké vrstvě na ztuhlé médium), DRBC s bengálskou červení a chloramphenicolem, vše dělané v triplikátu. Vzorek byl analyzován na obsah vody zvážením hmotnostního úbytku po vysušení.

Tyto vybrané podmínky byly použity pro zjištění vlivu kultivačních podmínek (teplota, atmosféra, kultivační médium) a metody uchovávání vzorku na počet CFU a druhové spektrum hub. Pro studium vlivu uchovávání vzorku stolice byl zvolen následující postup: čerstvá stolice byla rozvážena do pěti různých zkumavek, které byly vystaveny následujícím podmínkám, které simulují nejčastěji používané metody skladování: 1) 5 °C, 2) - 25 °C a 3) - 80 °C. Vzorky byly analyzovány ve dvou časových bodech: po třech a čtrnácti dnech. Vzorek byl během 20 minut přiveden na pokojovou teplotu, jeho část byla použita ke stanovení váhy sušiny a zbylá část byla v odpovídajícím ředění inokulována na stejný set misek, jako je popsán výše. Kultivační probíhala pouze za teploty 24 °C v aerobních podmínkách. Založené experimenty byly sledovány po dobu minimálně čtvrt roku. K dosažení anaerobního prostředí bylo využito obdélníkové plastové dózy pro uchování potravin Freshbox 2,5 l (Tescoma) za použití sáčků s kyselinou askorbovou AnaeroGen 2.5L Sachet (Oxoid, Basingstoke, UK).

### 3.3.4 Identifikace morfotypů

Jednotlivé morfotypově odlišné kolonie byly izolovány do čistých kultur (4 % MEA s chloramphenicolem, 50 mg/l. Rozdělení vláknitých hub do morfotypů probíhalo na základě makromorfologie kolonie a mikroskopického pozorování. K hrubému roztřídění kolonií kvasinek byl použit CHROMagar Candida (CHROMagar, Paris, France), na něž byly jednotlivé kolonie inokulovány sterilními párátky. Naočkované chromogenní médium bylo inkubováno aerobně při 37 °C po dobu dvou dní a poté vyhodnoceno. Počet druhů byl na hraně rozlišovacích schopností média, proto byl pro další diferenciaci testován Pal's agar (Pal, 1997), který však neposkytl lepší výsledek.

### 3.3.5 Extrakce DNA

DNA byla z mladých čistých kultur extrahována pomocí ArchivePure DNA Purification kit (5Prime, Gaithersburg, MD, USA) dle protokolu výrobce pro izolaci kvasinek s drobnými úpravami: všechny časy centrifugace byly prodlouženy na 11 minut, při srážení proteinu je po vortexování dán vzorek do třepačky na 10 minut při 1500 rpm. Srážení DNA probíhá převrácením zkumavky 50× a následnou inkubací přes noc v – 80 °C. Celkem bylo od obou pacientů izolováno 54 kultur a od zdravého jedince, který byl využit na přípravné experimenty 3 kultury. Koncentrace všech byla ověřena na spektrofotometru Nanodrop ND-1000.

### 3.3.6 Identifikace kultur

Všechny vyizolované vzorky byly porovnány pomocí PCR fingerprintu, k ověření unikátnosti kultur. Pro dereplikaci byl použit primer Eric1R (Tabulka 11). Reakční podmínky viz Tabulka 9. Validace na agarózovém gelu poskytla fingerprint, díky němuž byly vyřazeny identické druhy.

REAKČNÍ SMĚS	OBJEM (μl)	FÁZE	OPAKOVÁNÍ	TEPLOTA (°C)	ČAS
pufi (10×)	2	1.	-	94	3 m
dNTP (10 mM)	0,8	2.	36	94	40 s
Perfect Taq DNA polymeráza	0,1		36	52	60 s
H <sub>2</sub> O	12,4		36	65	3 m
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,8	3.	-	65	10 m
primer (10 pmol)	2				
templát (4-25 ng/ul)	2				

Tabulka 9: složení reakční směsi pro Eric1R a podmínky PCR amplifikace; vše Bionline, London, UK.

Pro identifikaci pomocí sekvenování Sangerovou metodou (Macrogen) bylo použito 36 jedinečných izolátů. Reakční podmínky jsou uvedeny v Tabulce 10, seznam použitých primerů v Tabulce 11.

Izoláty rodů *Aspergillus* a *Penicillium* byly z důvodu větší variability úseku amplifikovány primery cílicími na geny pro β tubulin nebo RPB, zbylé izoláty primery cílicími na ITS. Produkty byly ověřeny na elektroforetogramu.

Přečištění PCR produktů bylo provedeno přesrážením produktů pomocí acetátu sodného (NaOAc) a etanolu dle následujícího postupu:

- k 20 μl produktu byly přidány 2 μl 3M NaOAc a 50 μl 96 % etanolu
- směs byla propipetována a inkubována 10-15 minut při pokojové teplotě
- centrifugace 30 minut, 13 200 rpm, 22 °C
- supernatant byl odstraněn a k peletě bylo přidáno 250 μl 70 % etanolu
- promícháno a centrifugováno při podmínkách výše
- supernatant byl odstraněn a peleta vysušena inkubací v termobloku na 65 °C, 5-10 minut

PCR fragmenty byly nakonec sekvenovány oběma koncovými primery použitými pro amplifikaci.

Získané párové sekvence byly následně spojeny a manuálně editovány v programu BioEdit.

Konsenzuální sekvence byla porovnána s GeneBank za využití BLAST.

REAKČNÍ SMĚS	OBJEM (μl)
pufr (10×)	2,5
dNTP (10 mM)	0,5
Perfect Taq DNA polymeráza	0,1
H <sub>2</sub> O	17,9
forward primer (10 pmol)	1
reverse primer (10 pmol)	1
templát (4-25 ng/ul)	2

Tabulka 10: složení reakční směsi k identifikaci kultur a podmínky PCR amplifikace; vše Bioline, London, UK.

RPB2			
FÁZE	OPAKOVÁNÍ	TEPLOTA (°C)	ČAS
1.	-	95	1 m
2.	35	95	1 m
	35	55	1 m
	35	72	75 s
3.	-	72	10 m

ITS STANDART			
FÁZE	OPAKOVÁNÍ	TEPLOTA (°C)	ČAS
1.	-	94	4 m
2.	35	94	60 s
	35	53	60 s
	35	72	60 s
3.	-	72	10 m

### 3.4 In vitro analýzy

Ke studiu základních imunitních a buněčných odpovědí vůči různým houbovým stimulantům bylo použito lyzátů šesti houbových kultur, které byly očkovány v suspenzi fyziologického roztoku na MEA a aerobně inkubovány sedm dní. Jednalo se o tři druhy, které se překrývaly mezi subjekty: 1. *Saccharomyces cerevisiae* – kultury NG3 (pacient 2) a NG50 (pacient 1), 2. *Candida parapsilosis* – kultury BL.KV (zdravá kontrola) a NG54 (pacient 1), 3. vnitrodruhově variabilní *Rhodotorula*

GEN	NÁZEV	SEKVENCE	ZDROJ	PROGRAM	IZOLÁTY
X	Eric1R	ATGTAAGCTCCTG GGGATTCAC	Versalovic et al. 1991	X	X
ITS	ITS1F	CTTGGTCATTTAG AGGAAGTAA	Amend et al. 2010	ITS STANDART	NG4, NG5, NG8, NG12, NG19, NG22, NG23, NG24, NG25, NG29, NG50, NG54, NG55, NG56, NG101, NG103, NG200, NG201, NG304, NG400
	ITS4	TCCTCCGCTTATT GATATGC	White et al. 1990	ITS STANDART	
β tubulin	T10	ACGATAGGTTTAC CTCCAGAC	White et al. 1990	ITS STANDART	NG6, NG9, NG14, NG27, NG30, NG31, NG36, NG104, NG202
	bt2b	ACCCTCAGTGTAG TGACCCTTGGC			
β tubulin	bt2a	GGTAACCAAATC GGTGCTGCTTTC	Glass et al. 1995	ITS STANDART	NG18
	bt2b	ACCCTCAGTGTAG TGACCCTTGGC			
ITS	ITS1F_KYO2	TAGAGGAAGTAA AAGTCGTAA	Toju et al. 2012	ITS STANDART	NG17, NG301
	ITS4	TCCTCCGCTTATT GATATGC	White et al. 1990		
RPB	fRPB2 - 5F	GAYGAYMGWGAT CAYTTYGG	Liu et al. 1999	RPB2	NG10, NG11, NG28, NG38
	fRPB2 - 7CR	CCCATRGCTTGYT TRCCCAT			

Tabulka 11: primery využité k identifikaci izolátů z kultur

*mucilaginoso* – kultury NG12 (pacient 1) a NG400 (pacient 2). K těmto byl přidán *Mucor plumbeus*, NG23 (pacient 1). Houbová biomasa byla sklizena do fyziologického roztoku a počet buněk byl vyhodnocen pomocí Bürkerovy komůrky po obarvení Trypanovou modří. Následně byla zkumavka stočena (14 000 g, 11 minut), dvakrát promyta destilovanou vodou, třikrát rozbita ve FastPrepu na nejvyšší výkon, 60s, pomocí kuliček Matrix Tubes Y (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) a nakonec byl supernatant alikvotován a lyofilizován. Lyzáty byly následně eluovány ve tkáňové vodě na koncentraci  $5.8 \cdot 10^8$  buněk/ml.

Pomocí lyzátů byly stimulovány imunitní buňky RAW 264,7. Jedná se o immortalizovanou buněčnou linii myších makrofágů, které byly získány z tumoru indukovaného Abelsonovým virem myši leukémie. Zamražená alikvota obsahující 5 milionů buněk (uchovávána v 5 % DMSO při  $-80^\circ\text{C}$ ) byla rozmrazena, suspendována v RAW médiu k promytí, složení viz Tabulka 12, stočena (1 200 rpm, 5 minut) a v 10 ml nového média inkubována v kultivační lahvi o objemu 160 ml (dno  $75\text{ cm}^2$ ) při  $37^\circ\text{C}$  a 5 %  $\text{CO}_2$ . Každé tři až čtyři dny je potřeba měnit médium případně i pasážovat buňky. Během pasážování je odstraněno staré médium, buňky jsou omyty fyziologickým roztokem a seškrábány ze dna lahve. Následně jsou dle požadovaného ředění v novém médiu vráceny do kultivačné lahve. Když buňky v přiměřeném množství adherovaly na dno lahve, mohly být sklizeny a nasazeny do 96 jamkové kultivační desky s rovným dnem. Postup byl zpočátku shodný s pasážováním, po seškrábání byly buňky spočítány (viz výše), naředěny na odpovídající koncentraci v RAW médiu a nasazeny  $8 \cdot 10^5$  buněk/jamka. Následovala 24 hodinová inkubace za shodných podmínek.

RAW médium		Antigen	Fluorochrom	Barvení
Látka (finální koncentrace)	Objem (ml)	detekce buněčné viability (FVD)	eFluor 780	povrchové
intravenózní voda	86	diferenční skupina (CD) 80	Allophycocyanin	povrchové
DMEM (1 ×)	86	CD86	Fluorescein isothiocyanate	povrchové
FBS (10 %)	20	CD40	Phycoeritrin	povrchové
ATB (1 %)	2	myší ekvivalent MHC II (I-A/I-E)	Alexa Fluor	povrchové
GLU (1 %)	2	inducibilní NO syntáza (iNOS)	Phycoeritrin a Cyanin	vnitrobuněčné
$\text{NaHCO}_3$ (0.15 %)	4	proliferční marker (Ki-67)	Brilliant violet	vnitrobuněčné

Tabulka 12: vlevo - složení RAW média; FBS = fetální bovinní sérum, ATB = antibiotika (10 000 jednotek penicilinu a 10 mg streptomycinu na ml), GLU = glutamin, všechny látky (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); Tabulka 13: vpravo - monoklonální protilátky konjugované s fluorochromy na FACS

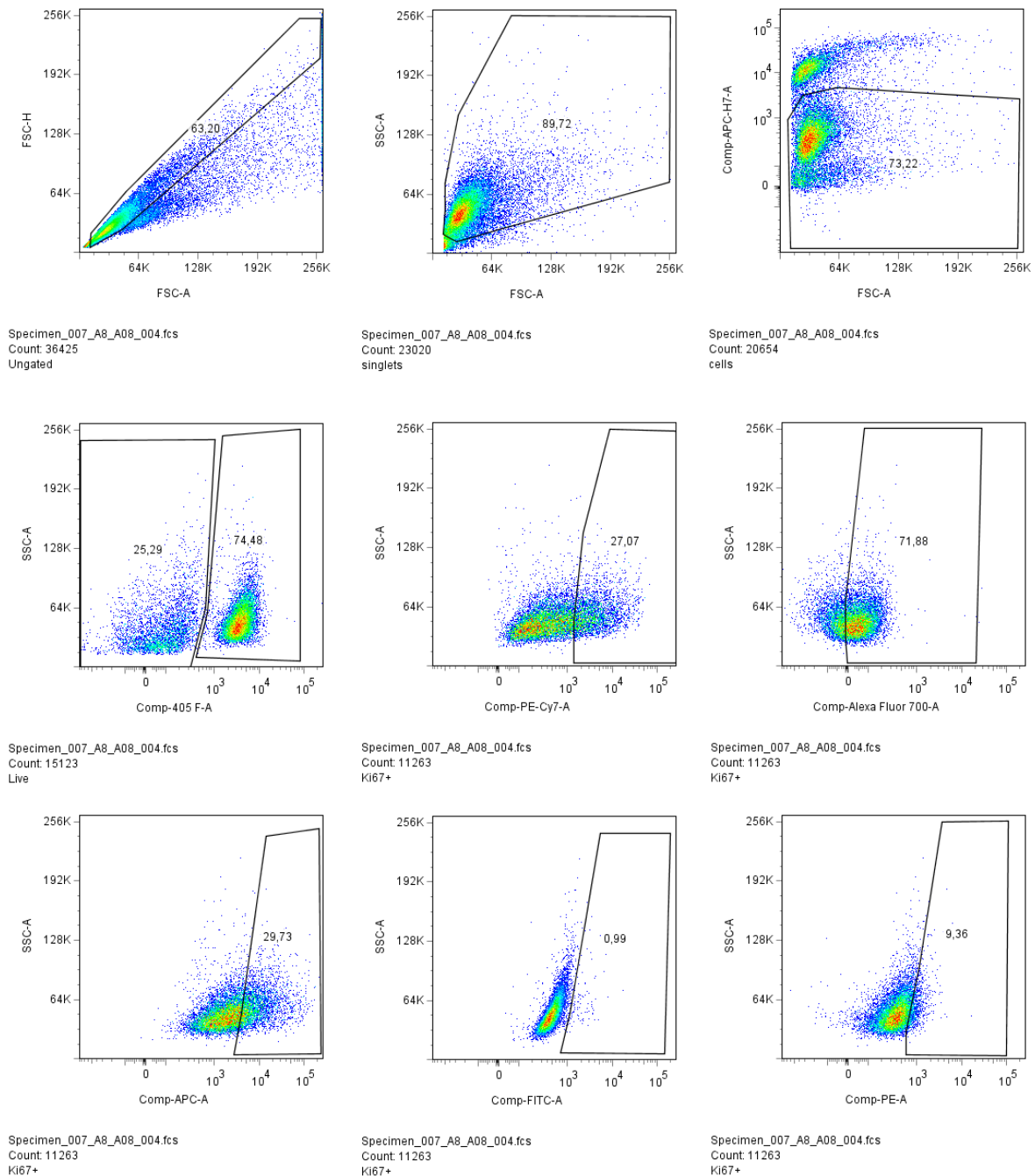
Stimulace buněk byla následně provedena odsátím veškerého média v jamkách, přidáním 50  $\mu\text{l}$  lyzátu ve čtyřech různých koncentracích (první ředění  $1000 \times$ , s následnými v desítkové ředící řadě) nebo kontrolních mikrobiálních antigenů. Zde lipopolysacharid (finální koncentrace 100 ng/ml), CpG oligodeoxynukleotidy (200  $\mu\text{g/ml}$ ), zymosan a mannan (oba 100  $\mu\text{g/ml}$ ) spolu s negativními kontrolami stávajícími se z čistého média. Všechny vzorky byly dělány v duplikátu, kdy do lichých

sloupců desky bylo přidáno 50  $\mu$ l polymixinu B (0,08 %), který funguje jako antibiotikum a detergent, čímž odstraňuje potenciálně stimulační kontaminující lipopolysacharid. Nakonec byl objem všech jamek dorovnán RAW médiem do finálního objemu 200  $\mu$ l. Takto byla deska opět inkubována 24 hodin.

Stimulační deska byla další den rozdělena na supernatant a buňky. Supernatant byl využit pro imunologické analýzy k detekci stimulačního efektu lyzátů na produkci prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$  pomocí enzymoimunoanalýzy (ELISA) DuoSet Development system (R&D systems, Biotechne brand, Avonmouth, VBr). A dále na kvantifikaci respiračního vzplanutí využitím kolorimetrické analýzy detekující hladinu NO<sub>2</sub>, Griessovy reakce (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), kde byl jako standard použit NaNO<sub>2</sub> ve dvojkové řadě od 12.5  $\mu$ M, standard 8 je vždy ponechán jako blank. Obě metody byly provedeny beze změn dle manuálu výrobce. Na každou z těchto analýz bylo použito 50  $\mu$ l supernatantu. V případě Griessovy reakce se jednalo o neředěný supernatant, na ELISA test byl ředěn 10  $\times$ . Stimulované buňky byly využity na Fluorescenční průtokovou cytometrii (FACS) za použití monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorochromy (eBioscience, San Diego, CA, USA; Biolegend, San Diego, CA, USA; BD BioSciences, San Jose, CA, USA), Tabulka 13. Dle protokolu:

- a) buňky byly po celou dobu manipulace uchovávány na ledu, ze stimulační desky byly seškrábány ve 150  $\mu$ l PBS/jamka a přeneseny na FACS desku s konvexním dnem
- b) tato byla stočena (300 g, 4  $^{\circ}$ C, 5 minut), supernatant byl odklepnut, opakováno dvakrát
- c) nespecifická vazba protilátek byla blokována 20  $\mu$ l/jamka 10 % normálním myším sérem v PBS po dobu 20 minut
- d) bylo přidáno 130  $\mu$ l PBS/jamka, deska stočena a odklepnuta
- e) buňky byly barveny na povrchové znaky mixem barevně značených protilátek ředěných v PBS (FVD 200  $\times$ , ostatní 100  $\times$ ) a smíchaných, 10  $\mu$ l/jamka, 30 minut
- f) bylo přidáno 140  $\mu$ l PBS/jamka, deska stočena a odklepnuta, opakováno dvakrát
- g) buňky byly fixovány ve fixačním a zároveň permeabilizačním roztoku (morfologie buňky je zafixována, ale stěna je zároveň účinně propustnější pro detekční látky) 140  $\mu$ l/jamka (eBioscience, San Diego, CA, USA), 45 minut ve tmě
- h) deska byla stočena (navýšení na 350 g, 4  $^{\circ}$ C, 5 minut), odklepnuta, promyta permeabilizačním roztokem 150  $\mu$ l/jamka, opakováno dvakrát
- i) buňky byly barveny na intracelulární znaky mixem barevně značených protilátek ředěných v permeabilizačním roztoku (100  $\times$ , eBioscience, San Diego, CA, USA) a smíchaných, 10  $\mu$ l/jamka, 30 minut
- j) bylo přidáno 140  $\mu$ l permeabilizačního roztoku/jamka, deska stočena a odklepnuta, opakováno dvakrát
- k) resuspendace ve 100  $\mu$ l PBS

Vzorky byly měřeny na přístroji BD LSR II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) pomocí programu Diva verze 6.1.1 (BD Biosciences). Pro nastavení přístroje byly použity buňky barvené jednou protilátkou. Do analýz byly zahrnuty pouze buňky spadající do ohraničené části grafu, viz strategie na Obrázku 5. Data byla vyhodnocena v programu FloJo verze 7.2.5 s použitím automatické kompenzace.



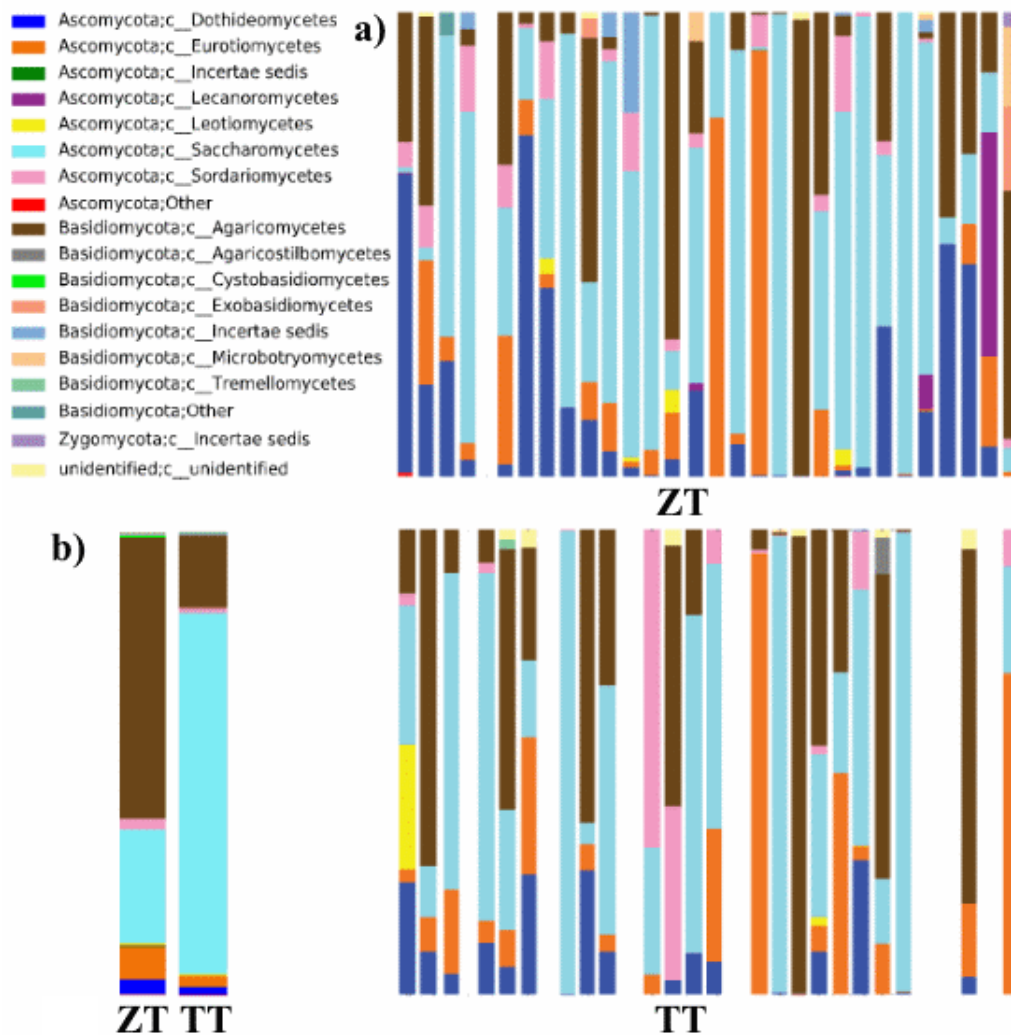
Obrázek 5: průtoková cytometrie, strategie ohraničování buněk zahrnutých do následných analýz.

## 4. Výsledky

### 4.1 Diverzita hub biopsií pacientů s CRC

Z výsledků na úrovni tříd je patrné, že v karcinomu dochází k významnému nárůstu pro Saccharomycetes na úkor významného úbytku v Agaricomycetes, méně taktéž u Eurotiomycetes, Dothideomycetes a Sordariomycetes, Obrázek 6.

Statisticky průkazné změny v abundanci taxonů pouze několik OTU. Na úrovni rodů se jedná se o *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Udeniomyces* a *Trichaptum*. V Tabulce 14 jsou kromě jednotlivých rodů také vidět data ze statistické analýzy, stejně jako pokles nebo nárůst abundance ve tkáni tumoru v porovnání s kontrolou. Mezi rody hojnější v karcinomu pak patří *Beauveria*, *Aspergillus* a *Trichaptum*, naopak je tomu u *Udeniomyces* a *Cladosporium*. Nejmarkantnější posun pak pozorujeme právě u *Beauveria*.



Obrázek 6: a) sloupcové grafy vyjadřující poměry tříd v jednotlivých vzorcích, b) sumární sloupcový graf porovnávající nepostižený biopsický vzorek (ZT) se vzorkem tkáně karcinomu (TT).



Z této sekvenace houbového společenstva degenerovanými ITS2 primery bylo získán očekávaný počet sekvencí. V kroku, kdy byly odfiltrovány sekvence, které nepatří houbám však bylo zjištěno, že až 99 % readů bylo lidských. Výsledkem tedy bylo preferenční nasedání degenerovaných primerů na hostitelskou DNA, která je v těchto vzorcích v nadbytku. Běžně nastavovaný práh počtu readů pro zahrnutí vzorku do analýzy dat byl pro tento případ snížen na 20. Takto nízký objem dat však neumožňuje dostat se v analýze hlouběji než na úroveň třídy. Dalším problémem byla taktéž preferenční amplifikace nehoubového organismu, tentokrát prvoka *Blastocystis hominis*. U několika málo vzorků bylo získáno dostatečné množství čistě houbových sekvencí, a tak mohly být analyzovány hlouběji. Z výše zmíněných důvodů bylo přistoupeno k další optimalizaci.

OTU - Řád	ZDRAVÁ TKÁŇ*	TUMOR*	ΔTUMOR	P
Cystofilobasidiales	0,0026	0,0000	↓	0,0370
<b>Čeleď</b>				
Hypocreaceae	0,0034	0,0337	↑	0,0334
Cystofilobasidiaceae	0,0026	0,0000	↓	0,0370
Hymenochaetales;f Incertae sedis	0,0001	0,0059	↑	0,0484
<b>Rod</b>				
<i>Beauveria</i>	0,0000	0,0217	↑	0,0056
<i>Cladosporium</i>	0,0222	0,0041	↓	0,0342
<i>Udeniomyces</i>	0,0026	0,0000	↓	0,0370
<i>Aspergillus</i>	0,0153	0,0404	↑	0,0440
<i>Trichaptum</i>	0,0001	0,0059	↑	0,04834

Tabulka 14: aplikací Kruskal - Wallisova testu získané signifikantně rozdílné taxony identifikované jako operační taxonomické jednotky (OTU) v biotických vzorcích pacientů s CRC, popisky: P = p-hodnota, hladina pravděpodobnosti platnosti nulové hypotézy, \* průměrná hodnota abundance taxonu, ΔTumor = ↑ nárůst, ↓ pokles abundance taxonu ve tkáni tumoru.

## 4.2 Využitelnost kitu na odstranění hostitelské DNA

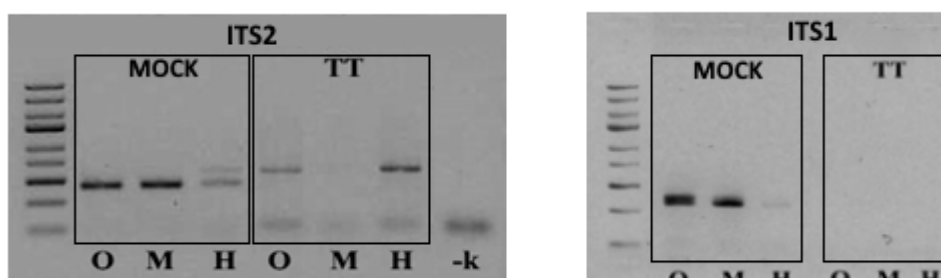
Všechny vzorky mimo pozitivní kontrolu byly významně fragmentované. Na kratším úseku DNA je menší množství metylovaných míst, což u daných vzorků mohlo snížit efektivitu vyvázání lidské DNA. Výsledky qPCR za použití primerů specifických pro člověka ukázaly pouze částečné vyvázání lidské DNA z mikrobiální frakce všech lidských vzorků, což bylo v rozporu s výsledky deklarovanými výrobcem (Tabulka č. 15). Lidská DNA byla v těchto frakcích stále přítomná a její koncentrace dokonce nebyla vždy nižší než v originálním vzorku. qPCR kvantifikace bakteriálními primery validuje přítomnost bakteriální DNA v hostitelské frakci, což naznačuje sice nízkou, ale podstatnou hladinu nežádoucího vyvázování bakteriální složky. Různě dlouhé produkty vznikly s primery specifickými pro houby. Z tohoto důvodu byly všechny produkty těchto primerů zobrazeny elektroforézou agarózového gelu, kde bylo jasně patrné, že pro lidský vzorek CRC se před využitím

kitu amplifikoval nespecifický produkt houbové DNA o vysoké intenzitě, ale nízké kvalitě („smear“), zatímco využitím kitu výsledná mikrobiální frakce tvořila jeden specifický houbový produkt a hostitelská pouze nevýrazný smear s amplifikací pouze nespecifických produktů.

PRIMERY		LIDSKÉ								
NÁZEV VZORKU	K4D			TT			MOCK			kontrola
TYP VZORKU (O, H, M)	O	M	H	O	M	H	O	M	H	
CYKLUS	22,5	23,3	23,1	25,3	25,9	24,4	29,6	28,9	26,3	negativní
KŘIVKA TÁNÍ	1 peak									
PRIMERY		HOUBOVÉ								
NÁZEV VZORKU	TT			MOCK						kontrola
TYP VZORKU (O, H, M)	O	M	H	O	H	H				
CYKLUS	26,2	32,1	31,2	21,4	21,2	28		28		negativní 33,5
KŘIVKA TÁNÍ	1 slabý produkt	1 produkt, jiné délky	nespecifické produkty	1 produkt		1 slabý produkt jiné délky		1 slabý produkt jiné délky		
PRIMERY		BAKTERIÁLNÍ								
NÁZEV VZORKU	K4D			TT						kontrola
TYP VZORKU (O, H, M)	O	M	H	O	M	H				
CYKLUS	31,3	30,4	33,1	23,3	22,5	28,3	negativní 31,6			
KŘIVKA TÁNÍ	1 produkt			1 produkt jiné délky						

Tabulka 15: výsledky qPCR na vzorcích Microbiome DNA enrichment kitu pomocí qPCR, popisky: K4D = lidská biopsie psoriatické kůže, TT = biopsie tumoru pacienta s CRC, MOCK = uměle vytvořená pozitivní kontrola tvořená lidskou DNA z krevních buněk a houbových kultur (popsáno viz 3.1.4), kontrola = negativní kontrola, O = originální vzorek vstupující do kitu, M = mikrobiální obohacená frakce, H = hostitelská vyvázaná DNA.

Klasická PCR provedená ITS1 a ITS2 primery na pozitivní kontrole a biopsii potvrdila, že se ITS2 primery váží na lidskou DNA, a to preferenčně v bioptických vzorcích oproti pozitivní kontrole z lidské krve. Zároveň bylo prokázáno, že kit vyvazuje i metylovanou DNA hub. Toto je zřetelné u pozitivní kontroly v hostitelské frakci, kdy kratší ze dvou produktů je houbový a delší je lidský ampikon, Obrázek 7. Pro takto masivní ověřování však nebyl výtěžek kitu dostatečný, tedy mikrobiální frakce do reakce s primery ITS1 byla pouze sterilní vodou vypláchnutá zkumavka od původního vzorku.

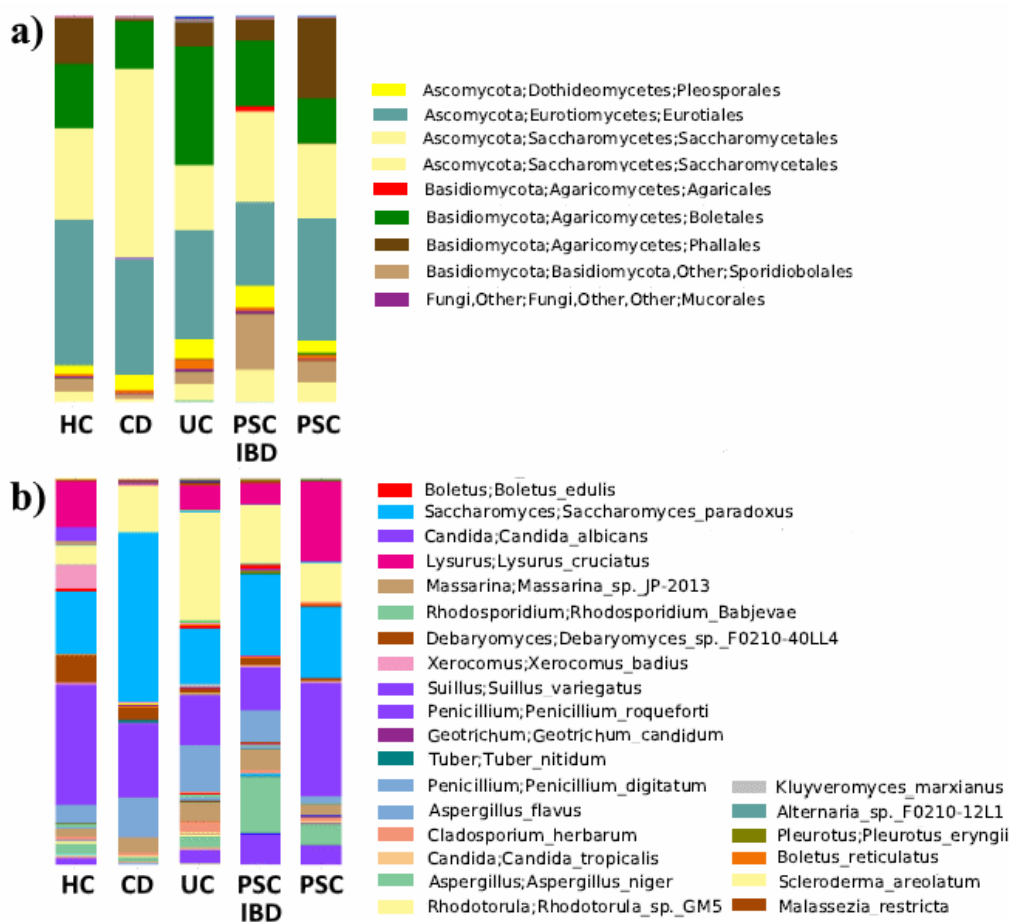


Obrázek 7: Elektroforetogram MOCK = uměle vytvořená pozitivní kontrola tvořená lidskou DNA z krevních buněk a houbových kultur (popsáno viz 3.1.4) a lidské biopsie CRC (TT) po PCR s 35 cykly za použití houbových primerů. Obrázek vlevo ITS2; obrázek vpravo ITS1.

#### 4.1 Houbová diverzita stolic pacientů s IBD

Sekvence mykobiomu pacientů s IBD a zdravých kontrol poskytla nad očekávání vysoký počet sekvencí. Tohoto bylo dosaženo přidáním 10 % BSA do finálního objemu PCR reakce a amplifikací

pomocí přímerů cílicích na ITS1.



Obrázek 8: sloupcové grafy vyjadřující poměry a) na úrovni řádů, b) na druhové úrovni v jednotlivých skupinách dle diagnózy.

Zastřešující úroveň řádů u zdravých jedinců ukazuje na nejvyšší zastoupení Eurotiales, následované Saccharomycetales, Boletales, Phallales. Tyto poměry se dále mění různým způsobem dle jednotlivých diagnóz, Obrázek 8. Na druhové úrovni zdravého jedince pak vidíme největší poměr *Penicillium roqueforti* následován *Saccharomyces paradoxus*, *Lysurus cruciatus*, *Debaryomyces sp.*, *Xerocomus badius*, *Scleroderma areolatum*, *Suillus variegatus*, *Penicillium digitatum*, *Rhodospodium babjevae*, *Massarina sp.* a *Candida albicans*.

Tato sekvenční data přišla krátce před datem odevzdání diplomové práce, proto nebyly provedeny statistické analýzy k určení signifikance výše zobrazených rozdílů, které je tedy potřeba brát pouze jako vizuálně detekovatelné rozdíly. Jsou zde uvedena především pro lepší představu výsledků optimalizace metodiky. Díky kvalitě sekvenčních dat a rozsahu klinických metadat mám výborný základ k jejich detailnímu vyhodnocení. Metadata zahrnují mimo informací shrnutých v Tabulce 1 například rozsah onemocnění, postižené části trávicí trubice, aktivitu zánětu dle stupnice i momentálního stavu (aktivní/remise), historii chirurgických zákroků, schéma léčby, detekované krevní protilátky spolu se všemi údaji krevního obrazu. Je tedy potřeba mnoha dlouhotrvajících analýz k odhalení vlivu všech těchto proměnných a zjištění s nimi striktně spojených změn v mykobiomu.

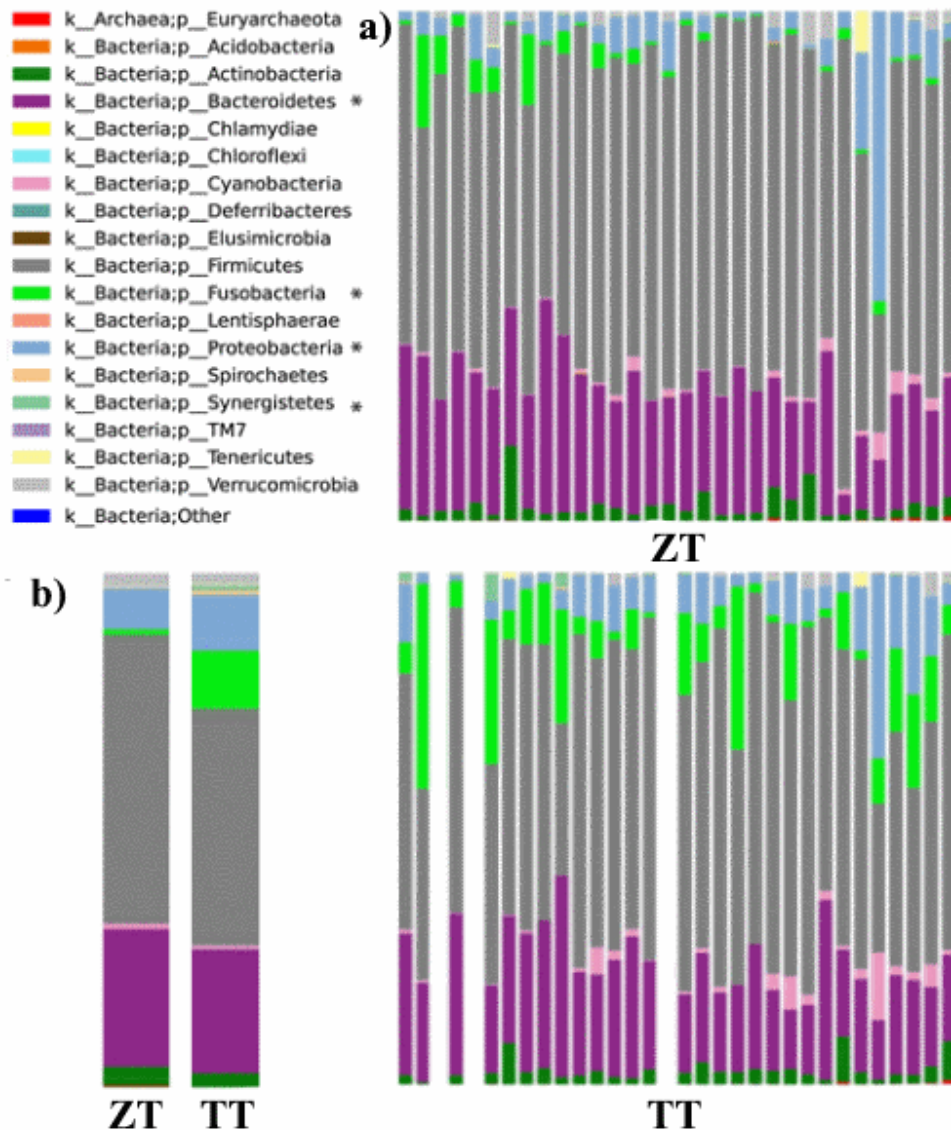
## 4.2 Bakteriální diverzita biopsií pacientů s CRC

Sekvenací bakteriálního mikrobiomu 16S primery bylo taktéž získáno očekávané množství dat.

V analýze tříd vidíme významný pokles u Firmicutes a v menší míře i Bacteroides na druhou stranu velký nárůst pro Fusobacteria a dále také Proteobacteria i Synergistetes, Obrázek 9 a Tabulka 16. Pro jednotlivé rody je jasný nejvýznamnější nárůst v postižené tkáni pro *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Eikenella* a *Campylobacter*. Naopak pokles byl zaznamenán u *Helcococcus* a *Blautia*. Zajímavé jsou změny poměrů pro rod *Clostridium*, kdy někteří jeho zástupci vykazují signifikantní pokles a jiní naopak nárůst ve tkáni tumoru pacientů CRC.

OTU - Řád	ZDRAVÁ TKÁŇ*	TUMOR*	ΔTUMOR	P
Fusobacteriales	0,0212	0,1061	↑	5*10 <sup>-6</sup>
Clostridiales	0,5145	0,4367	↓	0,0114
Lactobacillales	0,0186	0,0502	↑	0,0132
Bacteroidales	0,2684	0,2148	↓	0,0214
Campylobacterales	0,0014	0,0102	↑	0,0236
Synergistales	0,0007	0,0049	↑	0,0348
<b>Čeleď</b>				
Fusobacteriaceae	0,0204	0,0973	↑	1*10 <sup>-5</sup>
Leptotrichiaceae	0,0008	0,0088	↑	0,0043
Campylobacteraceae	0,0008	0,0097	↑	0,0098
Eubacteriaceae	0,0002	0,0001	↓	0,0218
[Odoribacteraceae]	0,0086	0,0044	↓	0,0285
Rikenellaceae	0,0148	0,0087	↓	0,0304
Ruminococcaceae	0,1341	0,1057	↓	0,0368
Lactobacillales;f_unidentified	3*10 <sup>-5</sup>	0,0000	↓	0,0442
Dermabacteraceae	2*10 <sup>-5</sup>	5*10 <sup>-7</sup>	↓	0,0499
<b>Rod</b>				
<i>Fusobacterium</i>	0,0191	0,0928	↑	7*10 <sup>-6</sup>
<i>Leptotrichia</i>	0,0008	0,0088	↑	0,0043
<i>Eikenella</i>	5*10 <sup>-5</sup>	0,0002	↑	0,0084
<i>Campylobacter</i>	0,0008	0,0097	↑	0,0098
<i>Clostridium</i>	0,0050	0,0071	↑	0,0172
<i>Helcococcus</i>	0,0003	8*10 <sup>-6</sup>	↓	0,0209
<i>Blautia</i>	0,0613	0,0429	↓	0,0261
Fusobacteriaceae;Other	0,0012	0,0041	↑	0,0302
<i>Clostridium</i>	0,0001	8*10 <sup>-5</sup>	↓	0,0305
<i>Filifactor</i>	2*10 <sup>-5</sup>	0,0002	↑	0,0367
<i>Sphingomonas</i>	6*10 <sup>-5</sup>	0,0003	↑	0,0423
Intrasporangiaceae;g_unidentified	3*10 <sup>-5</sup>	0,0000	↓	0,0442
<i>Ruminococcus</i>	6*10 <sup>-6</sup>	0,0000	↓	0,0442

Tabulka 16: aplikací Kruskal - Wallisova testu získané statisticky signifikantně rozdílné taxony identifikované jako OTU v bioptických vzorcích pacientů s CRC, popisky: P = p-hodnota, hladina pravděpodobnosti platnosti nulové hypotézy, \* průměrná hodnota abundance taxonu, ΔTumor = ↑ nárůst, ↓ pokles abundance taxonu ve tkáni tumoru.



Obrázek 9: a) sloupcový graf vyjadřující poměry tříd v jednotlivých vzorcích, b) sumární sloupcový graf porovnávající nepostižený biotický vzorek se vzorkem tkáň karcinomu; signifikantě odlišné třídy mezi ZT a TT značí \*, (Kruskal – Wallisův test,  $p < 0,05$ )

### 4.3 Kultivace dominantních hub a vliv kultivačních podmínek

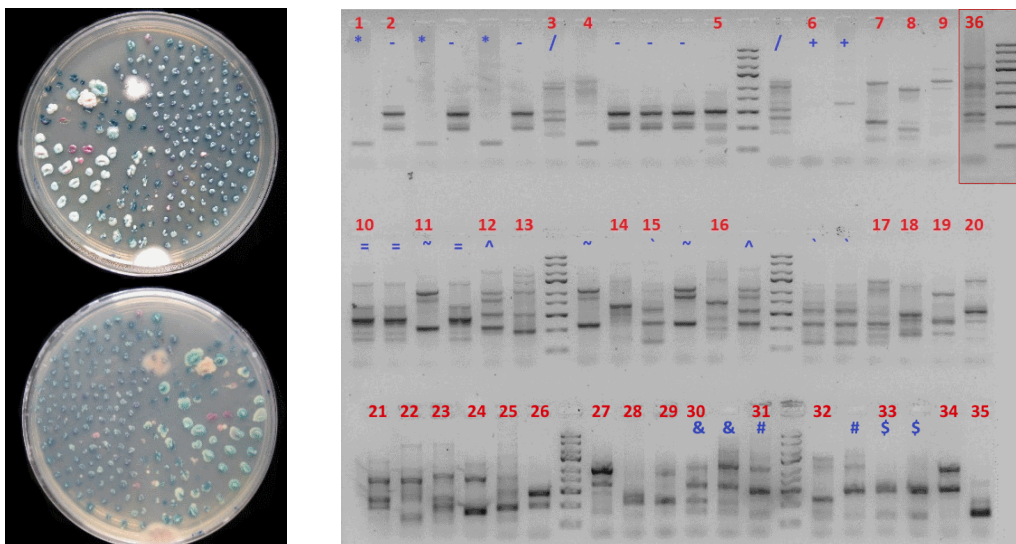
Veškeré kvasinkové kolonie vypadaly na všech úrovních morfologie velice podobně, za použití média CHROMagar Candida byly roztříděny na modře (NG56), fialově (NG50, NG55) a bíle (NG54) se pigmentující kolonie (Obrázek 10).

Izolací DNA a následnou dereplikací pomocí PCR fingerprintu zbylo z původních 54 morfortypů 36 předpokládaných unikátních druhů. Bylo zajímavé, že kultury s odlišnou morfologií v rámci jednoho pacienta se molekulárně shodovaly, zatímco kultury s velice podobnou morfologií od různých jedinců byly molekulárně různými druhy. Počáteční předpoklad druhového překryvu mezi pacienty tedy nebyl správný. Teto byl PCR fingerprintem identifikován na jediný, NG50 (pacient 1) a NG3 (pacient 2), Obrázek 11. Amplifikace relevantních genů daných kultur a jejich určení sekvencí Sangerovou metodou odhalila další hypoteticky sdílené druhy: NG27 (pacient 2) a NG28 (pacient 1), NG12 (99 % shoda s referenční sekvencí, pacient 1) a NG400 (100 % shoda s referenční sekvencí,

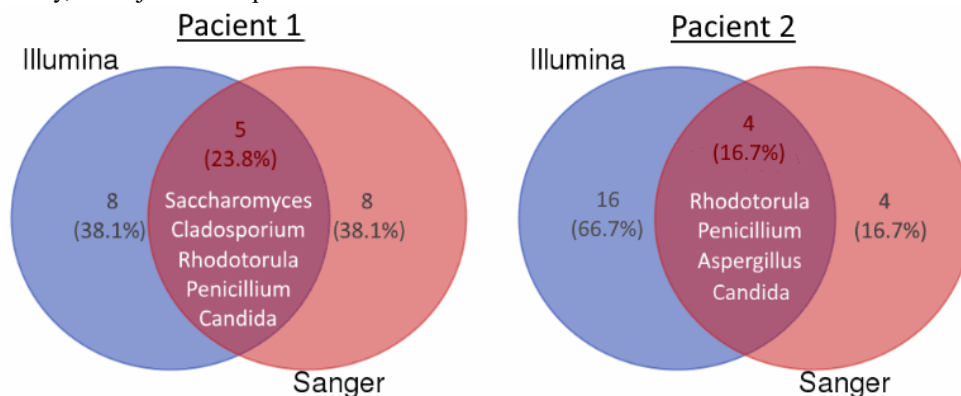


pacient 2), NG10 (pacient 1) a NG202 (pacient 2). Tyto výsledky jsou však diskutabilní, protože PCR fingerprinty daných dvojic se neshodují. Stejná situace panuje i u izolátů NG4 a NG5 (pacient 2). Naopak dvě jasné duplicity byly NG30 a NG27 (pacient 2, shoda ve fingerprintu) a NG56 a NG200 (pacient 1, shoda ve fingerprintu). Překryv NG18 a NG304 (pacient 2) není založen na shodné sekvenci, a to především z důvodu, že NG304 byla sekvenována na ITS, neboť se v kultuře jevila sterilní a fingerprint v tomto případě nemá dostatečnou výpovědní hodnotu, může se však jednat o duplicitu. Přehledné určení morfotypů do poskytuje Tabulka 17. Do druhu bylo určeno 32 vykultivovaných hub. Celková kultivovatelná diverzita byla druhově nejbohatší na rody *Penicillium* a *Aspergillus* s pěti zástupci, následovaly rody *Candida*, *Saccharomyces*, *Alternaria* a *Mucor* s dvěma druhy, ostatní byly po jednom zástupci.

Vyhodnocení překryvu sekvenace jednotlivých morfotypovaných kolonií amplifikovaných na relevantní geny Sangerovou metodou a celého objemu DNA ze vzorku čerstvé stolice amplifikovaného na ITS1 a sekvenovaného Illumina Miseq, přílohy Tabulka 6 a Obrázek 3, lze vidět na rodové úrovni znázorněný Vennovými diagramy na Obrázku 12. Druhový překryv se pak u obou pacientů sestává z druhů *Penicillium roqueforti* a *Candida albicans*.



Obrázek 10: vlevo – kulturační miska dokumentovaná z horní a spodní strany jako příklady barevných a morfologických typů kvasinkovitých kolonií odočkovaných na CHROMagar Candida; Obrázek 11: vpravo - PCR fingerprint izolovaných kultur, vzorek = kultura, modré symboly značí shodný vzor, červená čísla jsou unikátní kultury, které jsou dále zpracovávány.



Obrázek 12: Vennovy diagramy vyjadřující rodový překryv mezi kompletní DNA sekvenovanou na platformě Illumina a Sanger sekvenací markerových genů jednotlivých morfotypů; vytvořeno online pomocí UGent

Kmen	Druh	Gen	Genbank (překryv)	Genbank, nejlepší shoda *	Genbank reference
NG4	<i>Geotrichum candidum</i>	ITS	360/360 (100 %)	JQ668727, <i>Geotrichum candidum</i> , SLMA-1028	(Alper, Frenette and Labrie, 2013)
NG5	<i>Geotrichum candidum</i>	ITS	396/396 (100 %)	JN974290, <i>Galactomyces candidum</i> , S11176	(Groenewald et al., 2012)
NG6	<i>Aspergillus fumigatus</i>	$\beta$ tubulin	506/506 (100 %)	KT150514, <i>Aspergillus fumigatus</i> , SMYA3627	(Lee and Yamamoto, 2015)
NG8	<i>Alternaria infectoria</i>	ITS	580/582 (99 %)	KP131538, <i>Alternaria infectoria</i> , SCNRMA10.143	(Irinnyi et al., 2015)
NG9	<i>Aspergillus sydowii</i>	$\beta$ tubulin	358/358 (100 %)	EF428373, <i>Aspergillus sydowii</i> , S CBS593.65	(Zalar et al., 2008)
NG10	<i>Aspergillus tubingensis</i>	RPB	487/487 (100 %)	KM457221, <i>Aspergillus tubingensis</i> , SIC5312	(Olarie et al., 2015)
NG11	<i>Penicillium chrysogenum</i>	RPB	957/957 (100 %)	JN121487, <i>Penicillium chrysogenum</i> , SCBS 306.48	(Houbraken, Frisvad and Samson, 2011)
NG12	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	ITS	631/632 (99 %)	KP132584, <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , S PMM08-3684L	(Irinnyi et al., 2015)
NG14	<i>Aspergillus aureolus</i>	$\beta$ tubulin	507/509 (99 %)	EF669808, <i>Aspergillus aureolus</i> , isolate NRRL 2244	(Peterson, 2008)
NG17	<i>Geosmithia sp. 3</i>	ITS	526/526 (100 %)	AM181467, <i>Geosmithia pallida</i> , SCCF3481	(Kolařík et al., 2008)
NG18	<i>Penicillium camemberti</i>	$\beta$ tubulin	369/369 (100 %)	FJ930954, <i>Penicillium camemberti</i> , SCBS29948	(Giraud et al., 2010)
NG19	<i>Microascales sp.</i>	X	X	X	X
NG22	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	ITS	548/548 (100 %)	AY361968, <i>Cladosporium cladosporioides</i> , SATCCng2 64726	(Park et al., 2004)
NG23	<i>Mucor plumbeus</i>	ITS	581/581 (100 %)	HM999955, <i>Mucor plumbeus</i> , SCBS 634.74	(Vitale et al., 2012)
NG24	<i>Mucor mucedo</i>	ITS	636/636 (100 %)	JN206086, <i>Mucor mucedo</i> , SCBS 542.66	(Walther et al., 2013)
NG25	<i>Alternaria destruens</i>	ITS	552/552 (100 %)	NR_137143, <i>Alternaria destruens</i> , ATCC 204363	(Pryor and Bigelow, 2003)
NG27	<i>Penicillium roqueforti</i>	$\beta$ tubulin	408/408 (100 %)	KF225082, <i>Penicillium roqueforti</i> , SUBOCC-A-108110	(Lecellier et al., 2014)
NG28	<i>Penicillium roqueforti</i>	$\beta$ tubulin	344/362 (95 %)	KF225082, <i>Penicillium roqueforti</i> , SUBOCC-A-108110	(Lecellier et al., 2014)
NG29	<i>Alternaria infectoria</i>	ITS	599/599 (100 %)	KP131539, <i>Alternaria infectoria</i> , SCNRMA8.1405	(Irinnyi et al., 2015)
NG30	<i>Penicillium roqueforti</i>	$\beta$ tubulin	408/408 (100 %)	KF225082, <i>Penicillium roqueforti</i> , SUBOCC-A-108110	(Lecellier et al., 2014)
NG31	<i>Penicillium griseofulvum</i>	$\beta$ tubulin	405/408 (99 %)	JF909942, <i>Penicillium griseofulvum</i> , SCBS 185.27	(Houbraken and Samson, 2011)
NG36	<i>Penicillium crustosum</i>	$\beta$ tubulin	415/415 (100 %)	DQ486635, <i>Penicillium crustosum</i> , SEXF-1005	(Sonjak, Frisvad and Gunde-Cimerman, 2007)
NG38	<i>Aspergillus oryzae</i>	RPB	1059/1059 (100%)	AP007169, <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40, SC038	(Machida et al., 2005)
NG50	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ITS	711/711 (100 %)	NR_132207, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , S288c	(Johnston et al., 1997)
NG54	<i>Candida parapsilosis</i>	ITS	522/522 (100 %)	AY391843, <i>Candida parapsilosis</i> , SCBS 604	(Rycovska et al., 2004)
NG55	<i>Saccharomyces boulardii</i>	ITS	171/177 (97 %)	AY428861, <i>Saccharomyces boulardii</i>	(Fietto et al., 2004)

NG56	<i>Candida albicans</i>	ITS	551/551 (100 %)	KP131671, <i>Candida albicans</i> , SPM08-366L	(Irinnyi et al., 2015)
NG101	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	ITS	544/544 (100 %)	NR_073249, <i>Trichosporon coremiiforme</i> , CBS 2482	(Scorzetti and Fell, 2002)
NG103	<i>Onygenales</i> sp.	X	X	X	X
NG104	<i>Dothideomycetes</i> sp.	$\beta$ tubulin	229/268 (85 %)	FJ157871, <i>Aureobasidium pullulans</i> , SCBS 146.30	(Zalar et al., 2008)
NG200	<i>Candida albicans</i>	ITS	544/544 (100 %)	KP131671, <i>Candida albicans</i> , SPM08-366L	(Irinnyi et al., 2015)
NG201	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	ITS	573/573 (100 %)	JX270501, <i>Geomyces</i> sp. 16WV05	(Lorch et al., 2012)
NG202	<i>Aspergillus tubingensis</i>	$\beta$ tubulin	508/508 (100 %)	EF661086, <i>Aspergillus tubingensis</i> isolate NRRL 4875	(Peterson, 2008)
NG301	<i>Hormographiella aspergillata</i>	ITS	687/688 (99 %)	KP132299, <i>Hormographiella aspergillata</i> , SIHEM 14649	(Irinnyi et al., 2015)
NG304	<i>Penicillium camemberti</i>	ITS	597/597 (100 %)	NR_119396, <i>Penicillium camemberti</i> , CBS 299.48	(An et al., 2009)
NG400	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	ITS	623/623 (100 %)	KP132584, <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , S PMM08-3684L	(Irinnyi et al., 2015)

Tabulka 17: identifikace jednotlivých morfotypů kultur pomocí sekvenování Sangerovou metodou; \*obsahuje Genbank Přístupový kód, název organismu a číslo kmene

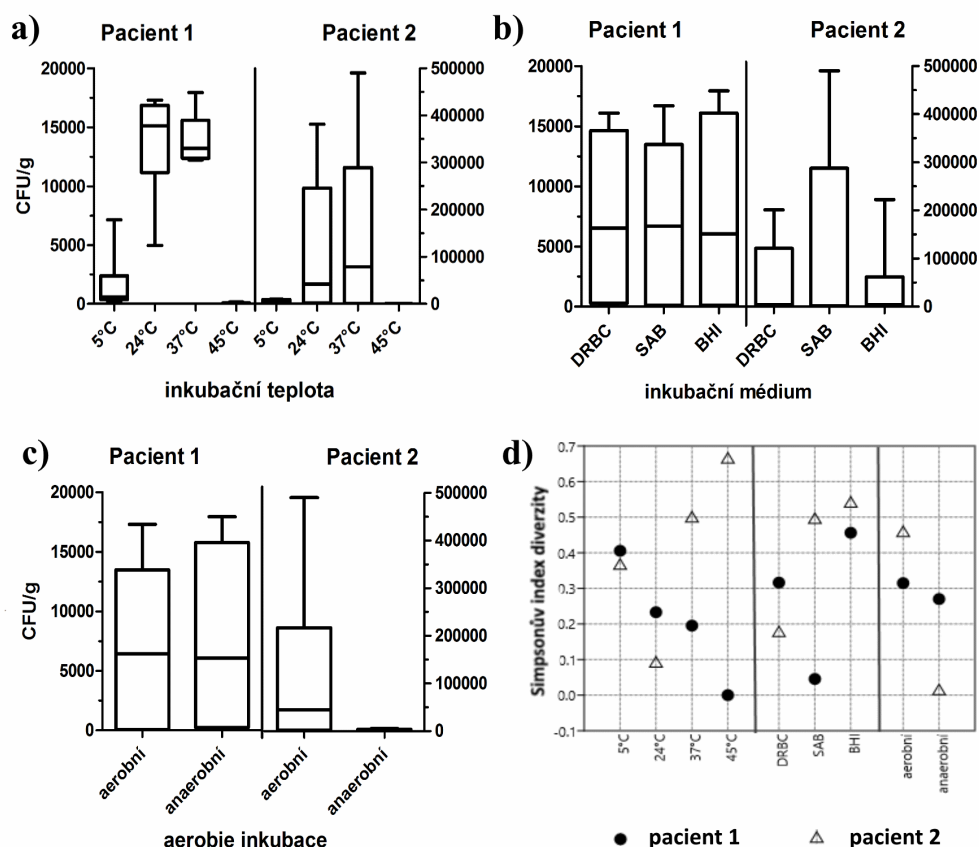
Kultivační data byla vyhodnocena z hlediska vlivu proměnných na kvantitu kolonií, Obrázek 13 a) – c). Jako první je zřejmé, že pacient 2 měl vždy minimálně o jeden řád více CFU. Nevíce kolonií poskytovaly teploty 24 °C a 37 °C, což jasně svědčí o převaze mezofilních termotolerantních druhů. Počty kolonií zachycených na jednotlivých médiích u pacienta 1 jsou vyrovnané, zatímco druhovému složení pacienta 2 spíše vyhovovalo neselektivní médium SAB. Dostupnost kyslíku pak hraje zásadní roli pro spektrum hub pacienta 2.

Dalším aspektem hodnoceným u kultivačních analýz byly změny diverzity působené kultivačními podmínkami, Obrázek 13, d). Pro tyto účely byl použit Simpsonův index diverzity. Je vidět, že i teploty poskytující nízký počet CFU (5 °C a 45 °C) dosahují vysoké diverzity kultivovaného společenstva. Naopak 24 °C, při kterých roste většina druhů má tento index poměrně nízký. U pacienta 1 pak můžeme pozorovat jasný klesající trend s přibývajícím teplotou, kdy 5 °C dosahuje nejvyšší hodnoty. Společenstvo pacienta 2 je diverzita bohatší s narůstající extrémností teploty, dosahující nejvyšší hodnoty ve 45 °C. Zajímavý je i pohled na vliv média, kdy univerzálnost SAB tlačí hodnotu diverzity u pacienta 1 k nulovým hodnotám, zatímco v případě pacienta 2 nejselektivněji působí DRBC. Diverzita kopíruje trendy počtu CFU v případě dostupnosti kyslíku.

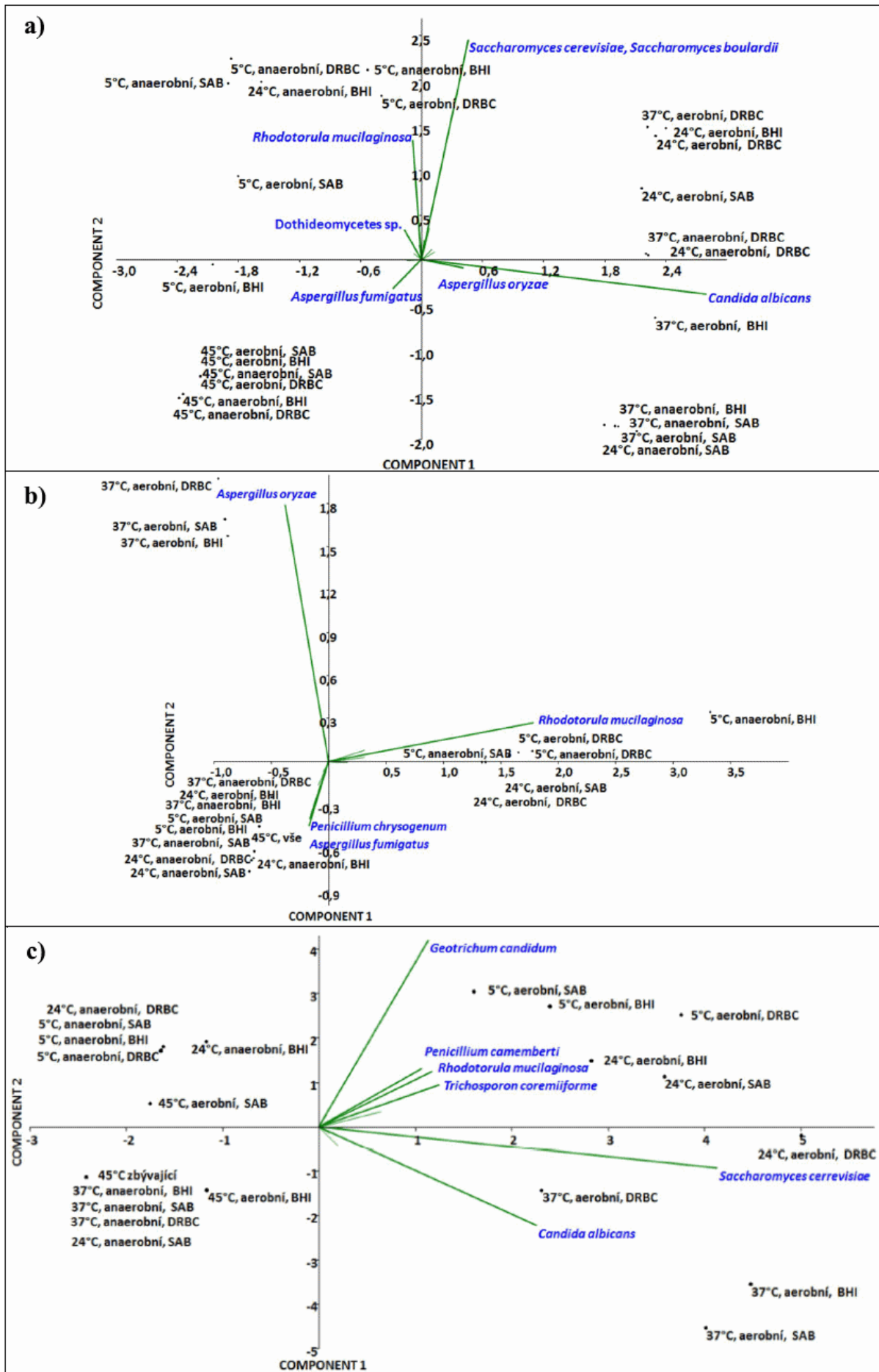
K získání komplexního náhledu na vlivy jednotlivých proměnných byly provedeny analýzy hlavních komponent (PCA), Obrázek 14 a 15. Na vzorky pacienta 1 působí jako hlavní proměnná teplota, která je provázána se záchytem hyperabundantních kvasinek *Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae*, které zároveň vysvětlují největší (97 % F1 a 85 % F2 respektive) variabilitu hlavních komponent, které dohromady dávají 68 % variance, Obr. 14 a). Kvasinka *C.*



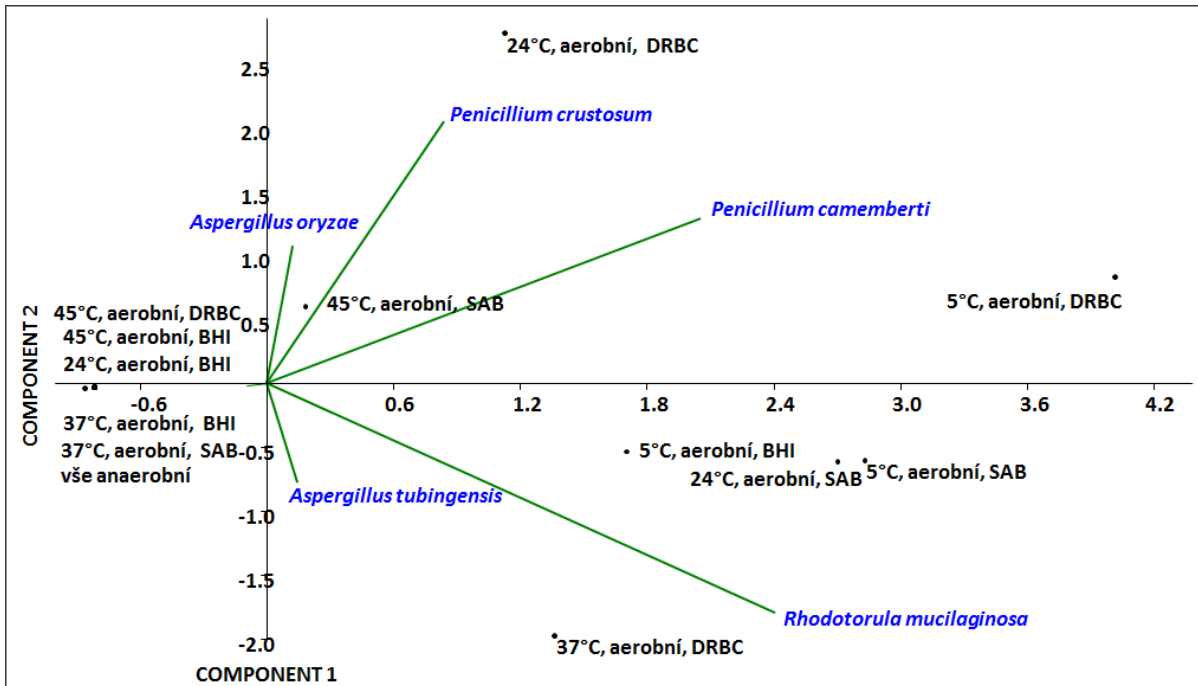
*albicans* totiž roste především při 24 °C a 37 °C, zatímco rod *Saccharomyces* při všech teplotách mimo 45 °C. Po jejich odstranění se zdůrazní role druhů profitujících z jiných kultivačních teplot, Obr. 14 b). Jedná se o *Rhodotrula mucilaginosa* preferujících média DRBC a SAB při 5 °C a 24 °C (93 % F1) a *Aspergillus oryzae*, který byl zachycen pouze ze 37 °C (93 % F2,  $\Sigma$  F1 a F2 vysvětluje 56 % variability). Druhy *Aspergillus fumigatus* a *Penicillium chrysogenum* vysvětlují největší variabilitu F3 (10 % variability), která je také provázaná s telotou, ale i s dostupností kyslíku při kultivaci, protože tyto druhy byly zachyceny při 45 °C a 24 °C respektive a to pouze za anaerobních podmínek. Pro vzorky pacienta 2 pak můžeme vidět jasné rozdělení dle dostupnosti kyslíku, což silně koreluje i trendem na grafech diverzitních indexů, Obrázek 14 c). Za anaerobních podmínek se vyskytují pouze druhy *Trichosporon coremiiforme* (24 % F1, 18 F2,  $\Sigma$  F1 a F2 vysvětluje 72 % variability) a *Geotrichum candidum*. Druhý zmíněný druh v případě pacienta 2 hraje ústřední roli (21 % F1, 79 % F2, 41 % F3, 15 % F4), kdy se za aerobních i anaerobních podmínek vyskytuje při teplotách 5 °C a 24 °C v podobných počtech CFU/g sušiny. Po jejich odstranění uvidíme shodný trend, který je popsán u pacienta 1 pro *C. albicans* a *S. cerevisiae*. Pokud odstraníme i tyto, pak se opět zvýrazní role *Rhodotrula mucilaginosa* (73 % F1 a 54 % F2) společně s *Penicillium camemberti* (62 % F1 a 39 % F2), *Penicillium crustosum* (25 % F1 a 62 % F2) a již zmíněným *Aspergillus oryzae* (33 % F2), Obrázek 15. F1 a F2 vysvětlují dohromady 85 % variability (67 % a 18 % respektive). Pro rhodotorulu platí podmínky již zmíněné, ale zde i výskyt ve 37 °C, penicillia rostou při 5 °C i 24 °C, ale *P. crustosum* pouze na DRBC. Primární data k Pca grafům viz přílohy, Tabulky 8 – 11.



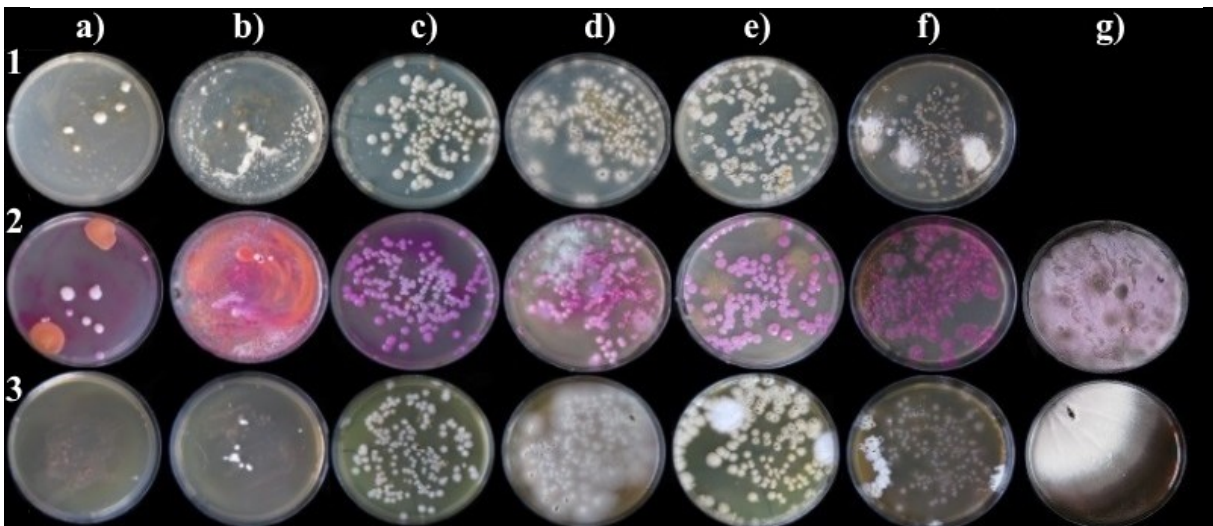
Obrázek 13: sloupcové grafy se standardní odchylkou vyjadřující počet CFU na gram sušiny vzorku dle 40 vlivu jednotlivých proměnných; a) inkubační teplota, b) kultivační médium, c) inkubační atmosféra, d) bodový graf zobrazující vliv jednotlivých proměnných na Simpsonův index diverzity; grafy byly vytvořeny v programech GraphPad Prism a Past 3.15



Obrázek 14: PCA aplikovaná na vzorky z experimentu k zachycení diverzity, a) pacient 1 veškerá diverzita, b) pacient 1 bez kvasinek rodů *Candida* a *Saccharomyces*, c) pacient 2 veškerá diverzita; grafy byly vytvořeny v programu Past 3.



Obrázek 15: PCA aplikovaná na vzorek pacienta 2 z experimentu k zachycení diverzity bez kvasinek rodů *Candida* a *Saccharomyces* a anaerobně rostoucích *T. coremiiforme* a *G. candidum*; Past 3.

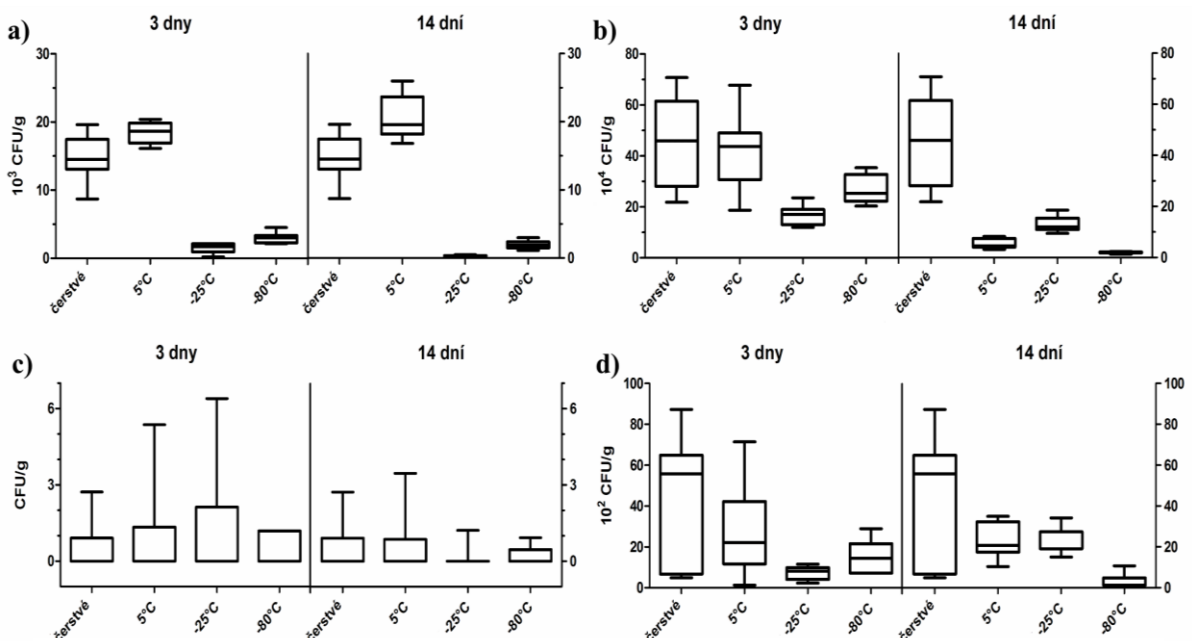


Obrázek 16: ukázka izolačních misek pacienta 1, popisky: 1 – 3 = typ média: 1. SAB, 2. DRBC, 3. BHI; a) 5 °C aerobní, b) 5 °C anaerobní, c) 24 °C aerobní, d) 24 °C anaerobní, e) 37 °C aerobní, f) 37 °C anaerobní, g) 45 °C anaerobní.

#### 4.3.1 Vliv způsobu uchování vzorku

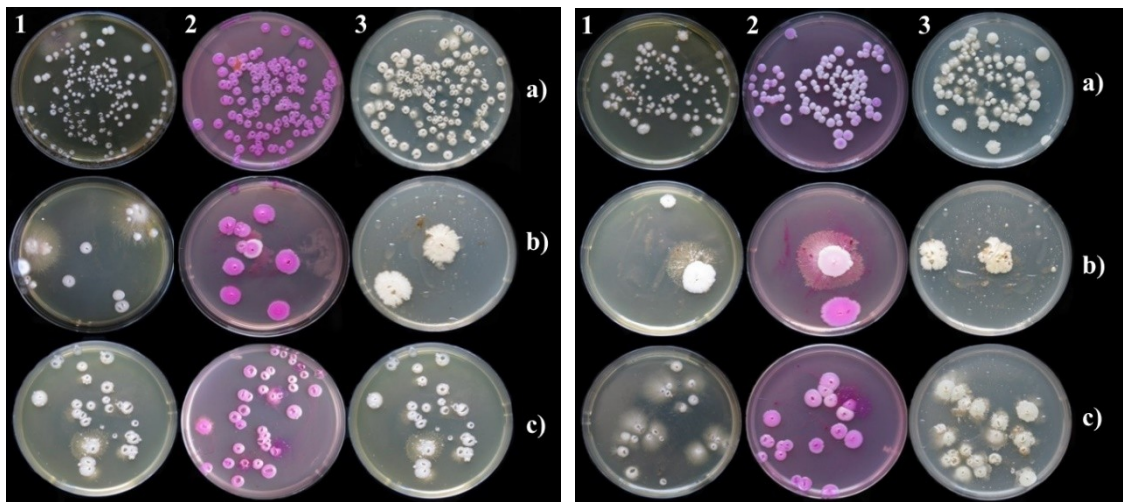
Graf na Obrázku 17 odráží vliv uchování čerstvého vzorku stolice na počty kolonií formujících jednotek (CFU) získaných následnou kultivací a přepočtených na gram sušiny vzorku (viz přílohy Tabulky 2-5 pro primární data). Kvasinky a vláknité houby byly vyhodnoceny zvlášť z jasného důvodu potenciálního ovlivnění morfologií daných druhů. Teplota, ve které byl uchováván vzorek čerstvé stolice neměla konstantní vliv na počet CFU kvasinek a vláknitých hub napříč dvěma pacienty. Uchování vzorku v lednici při 5 °C mělo narůstající vliv spolu s dobou, po kterou byl vzorek takto uchováván. U kvasinkových druhů pacienta 1 mělo toto za následek namnožení CFU, naopak tomu

bylo u pacienta 2, kde prostředí lednice způsobilo jejich pokles, který byl markantní především po uplynutí dvou týdnů, Obrázek 18. Stejný vzor se opakoval i u vláknitých druhů téhož pacienta. Počet nulových hodnot vláknitých druhů pacienta 1 znemožňuje objektivní vyhodnocení a je zde uveden především pro porovnání mezi jedinci. Zamražení mělo konstantní významně destruktivní vliv napříč pacienty a morfologií houby, kdy způsobilo pokles kultivovatelných CFU o několik řádů. Poměrně konstantní byl i vliv rozdílných teplot, kdy na příkladech kvasinkových druhů pacienta 1 v obou časových bodech a vláknitých pacienta 2 po třech dnech při teplotě  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vidíme pokles na vůbec nejnižší hodnoty zmíněných oddílů grafů. Toto naznačuje trend většího poškození pomalým zamražováním oproti rychlému hlubokému zamražení na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , které ve zmíněných oddílech nabývá vyšších hodnot přeživších CFU. Tomuto trendu se vymykají kvasinky i vláknité druhy pacienta 2 po dvoutýdenní inkubaci v teplotách pod bodem mrazu, kdy se náhle hodnoty CFU blíží nule. To může značit jakýsi zlomový bod v inkubaci těchto druhů při dané teplotě a době. Celkový počet CFU/g sušiny vzorku dle vlivu podmínek uchování a následné inkubace bez zohlednění morfologie viz Obrázek 19 a) – c). Je zde vidět i vliv média, který však může být vychýlen celkovým vlivem a délkou zamražení. Přes nezpochybnitelný vliv zamražení na kvantitu hub je nezbytné zahodnotit i kvalitativní hledisko vlivu uchování, Obrázek 19 d). Zajímavý trend shodný pro oba pacienty ukazuje vliv teploty na Simpsonův index diverzity. Střední hodnoty zachycené diverzity nabývají vzorky uchovávané v  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , následuje nejvyšší hodnota vůbec při uchování v  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  a nakonec nejnižší hodnoty při uchování v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . To umožňuje složit celkový obraz, kdy se hluboké zamražení na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  sice jeví šetrněji v celkovém počtu zachycených CFU, ale v kombinaci s diverzitním indexem vidíme, že je extrémně selektivní a tyto kolonie budou chudé na počet druhů, protože většina jich toto uchování nepřežije. Naopak  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  poskytuje ve většině případů nejnižší počet CFU, ale nejen že zachovává původní diverzitu vzorku, navíc ji ještě navyšuje.

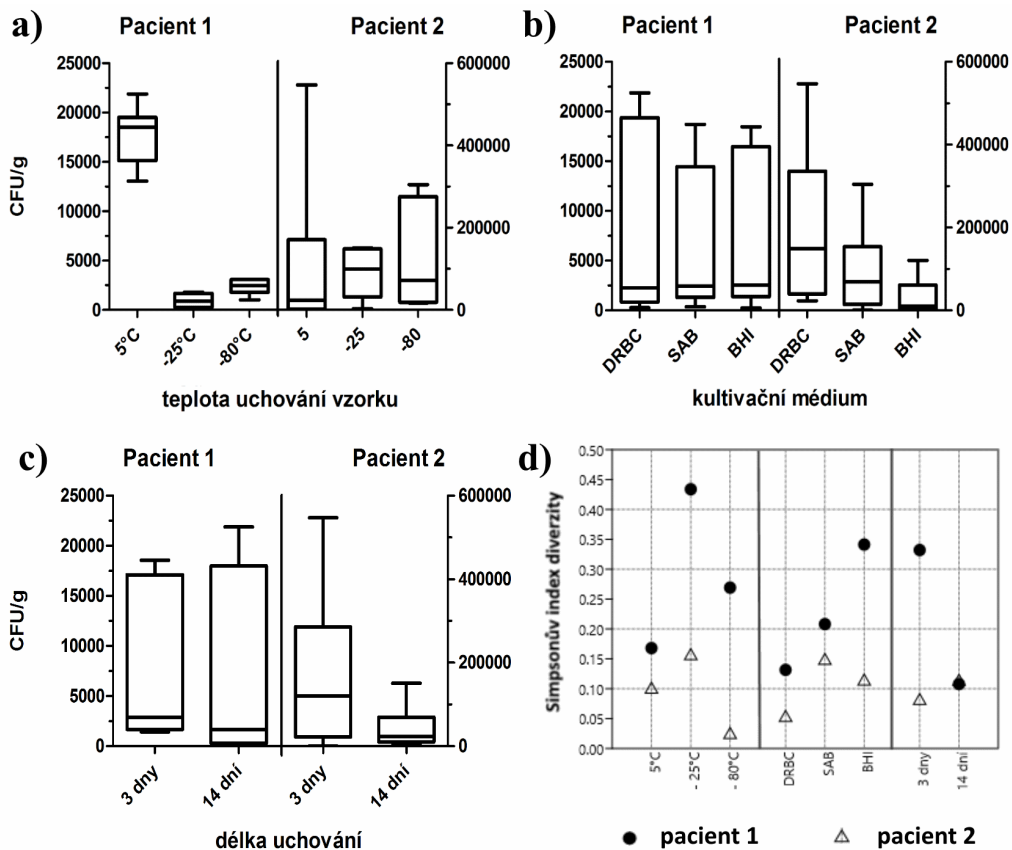


Obrázek 17: sumární krabicové grafy vlivu uchování vzorku (osa x) na počty CFU kultivovaných hub (osa y); a) kvasinkové druhy pacienta 1, b) kvasinkové druhy pacienta 2, c) vláknité druhy pacienta 1, d) vláknité druhy pacienta 2; průměrná hodnota je pro každý typ média v daném prostředí označena krátkou horizontální čarou; čerstvé = bod 0 neboli počáteční stav; GraphPad Prism.





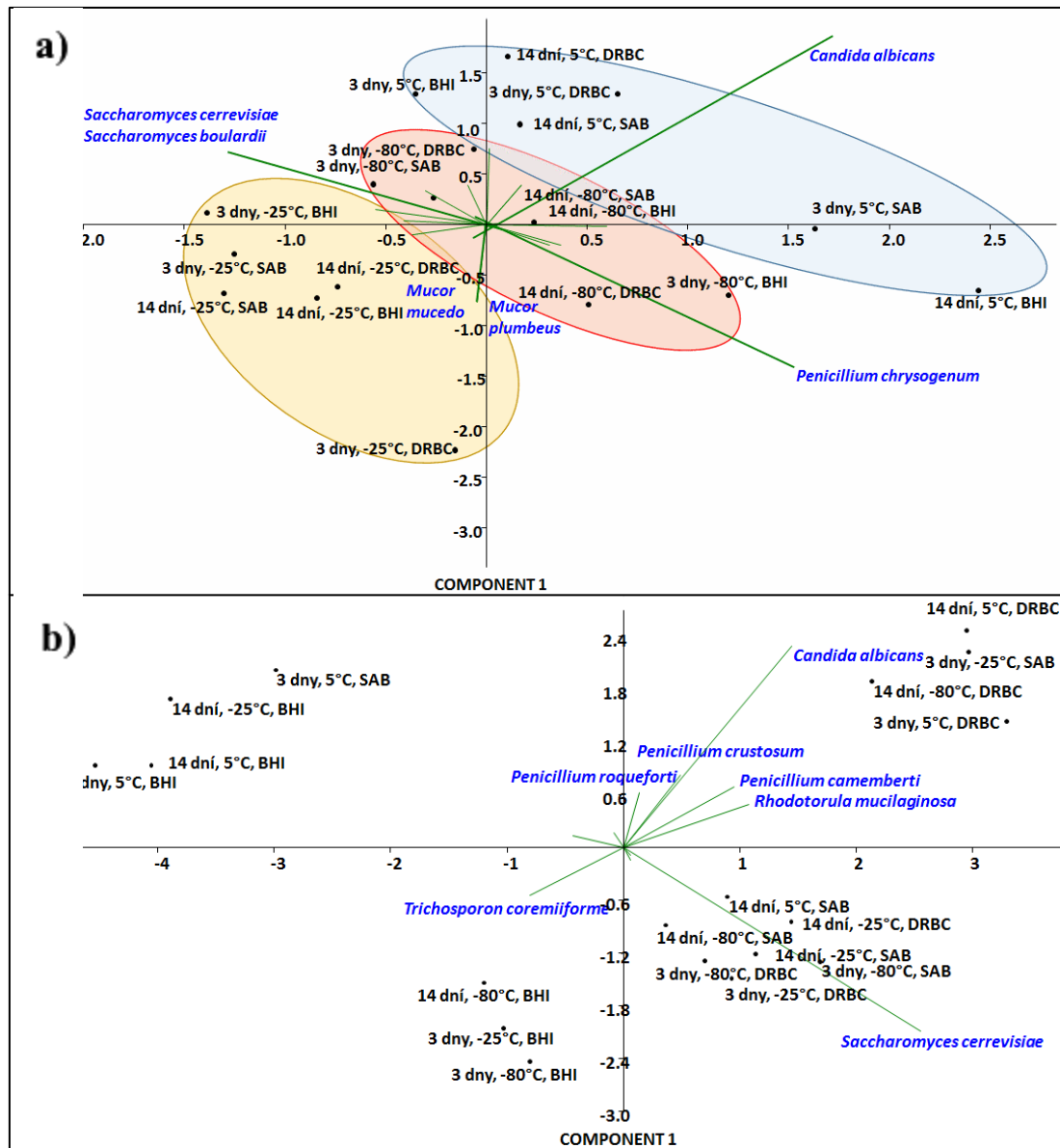
Obrázek 18: ukázka izolačních misek pro vliv uchování, pacient 1; obrázek vlevo – vzorek v chladu 3 dny; obrázek vpravo – vzorek v chladu 14 dní; popisky: 1 – 3 = typ média: 1. BHI, 2. DRBC, 3. SAB; a) lednice, b) mrazák - 25 °C, c) mrazák - 80 °C



Obrázek 19: sloupcové grafy se standardní odchylkou vyjadřující počet CFU na gram sušiny vzorku dle vlivu jednotlivých proměnných; a) teplota uchování vzorku, b) kultivační médium, délka uchování vzorku před odočkováním, d) bodový graf zobrazující vliv jednotlivých proměnných na Simpsonův index diverzity; grafy byly vytvořeny v programech GraphPad Prism a Past 3.15

Završení komplexního náhledu na vliv uchování vzorku poskytují opět PCA, Obrázek 20, kdy je u pacienta 1 vidět shlukování vzorků dle teploty uchování s dominantním vlivem hyperabundantních kvasinek *S. cerevisiae* a *C. albicans*, které byly detekovány na všech kultivačních miskách a měnil se

pouze počet jejich kolonií. Dalším dominantním druhem je *P. chrysogenum*, které se vyskytuje na 5/18 misek. Žádný trend pak není jasný z PCA na vliv uchování vzorku pro pacienta 2. Zřejmě protože vliv hyperabundantních kvasinek zde není tak velký, neboť na všech miskách se vyskytuje *G. candidum*, následováno *S. cerevisiae* s 14/18 misek, *R. mucilaginosa* 13/1, *P. camemberti* 10/18, *T. coremiiforme* 8/18, *P. roqueforti* 7/18 a *C. albicans* s pouze 4/18.

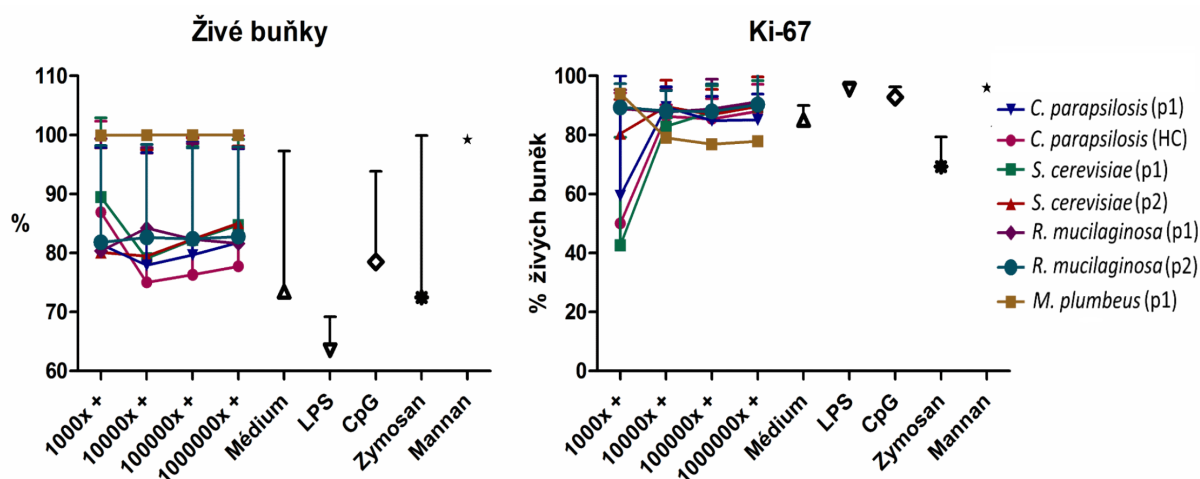


Obrázek 20: PCA aplikovaná na vzorky z experimentu na vliv uchování vzorku, a) pacient 1, b) pacient 2.

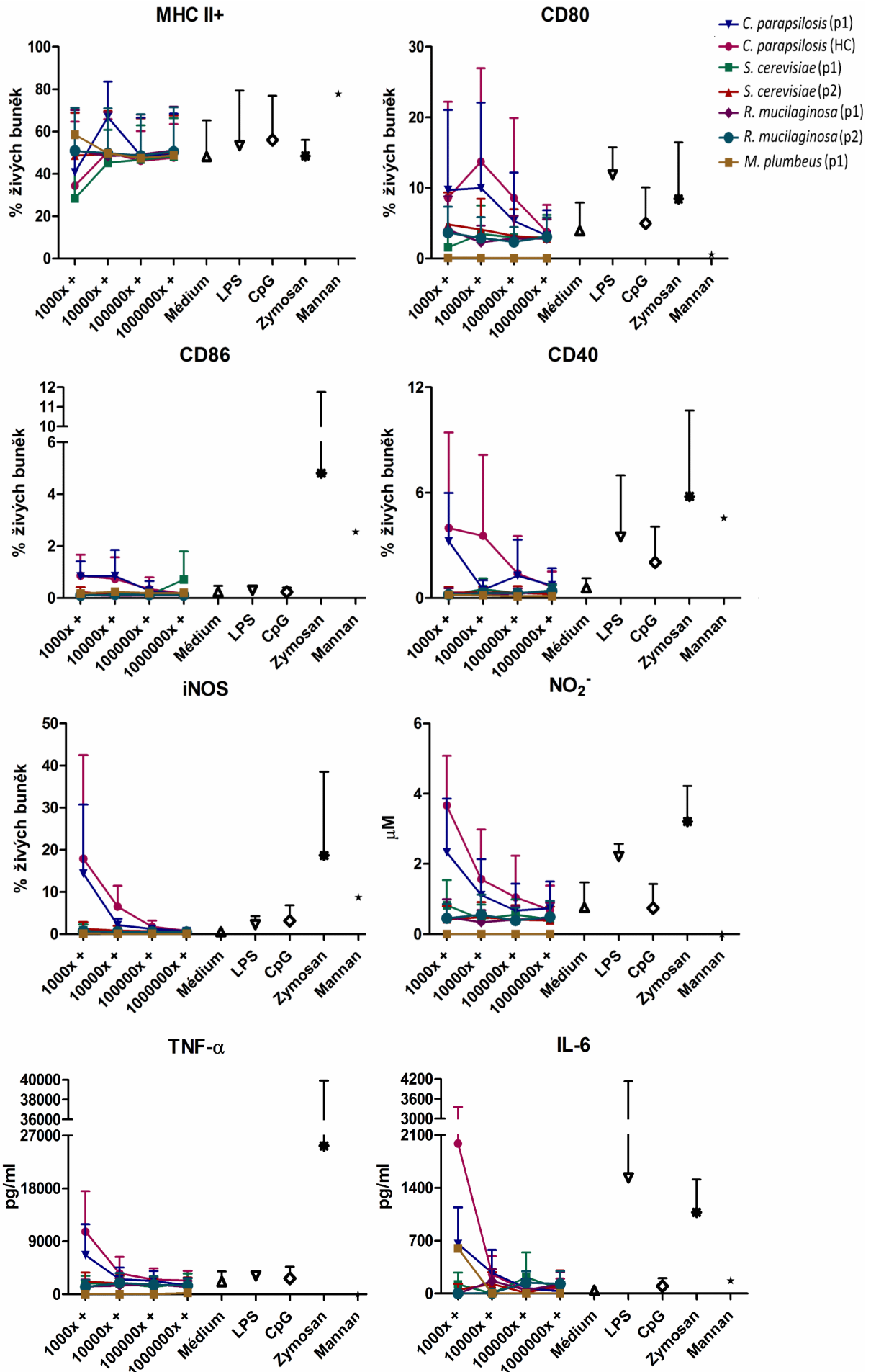
#### 4.4 Imunomodulační působení houbových lyzátů

Výsledky průtokové cytometrie myších makrofágů stimulovaných lyzáty vybraných druhů hub ukázaly dobrou životnost buněk, 75 – 100 % a zvyšující se proliferaci (Ki-67) s klesající koncentrací lyzátu Obrázek 21. Jedinou výjimkou byl *Mucor plumbeus*, který při stimulaci nejvyšší koncentrací

akleceleroval nejvyšší dělivost buněčné kultury, která spolu s nižší dávkou stimulans klesala. U tohoto druhu lze vidět stejný trend i pro prezentaci antigenu (MHC II+) zatímco většina kvasinek vykazuje opačný trend, kdy výrazně nejvyšší hodnoty dosahuje *Candida parapsilosis* (pacient 1) při koncentraci 10 000 ×, Obrázek 22. Kvasinka *C. parapsilosis* pak u zdravé kontroly (HC) i u pacienta 1 působí jako nejvýraznější stimulans všech kostimulačních proteinů nutných pro aktivaci antigen prezentujících buněk (CD80, CD86, CD40), což ve výsledku vede k indukci prozánětlivé odpovědi. Inducibilní NO syntáza (iNOS) ukazuje opět klesající trend spojený s koncentrací stimulans s nejvyššími hodnotami pro *C. parapsilosis*. Ji produkovaný NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, výsledek respiračního vzplanutí, byl detekován pomocí Griessovy reakce. Zde pozorovaný trend logicky kopíruje iNOS, jen s lépe pozorovatelnými rozdíly díky odlišné měřicí škále (μM). Výše zmíněná produkce prozánětlivých cytokinů byla testována enzymoimunoanalýzou na příkladu TNF-α a IL-6. Tato kolorimetrická metoda ukazuje veskrze shodný trend s nejvyššími hodnotami *C. parapsilosis* při nejvyšších stimulačních koncentracích. Pozoruhodná je extrémní indukce produkce IL-6 u daného izolátu ze zdravého jedince. Tato dokonce převyšuje indukci působenou pozitivními kontrolami. Zajímavé je, že právě tento konkrétní izolát ze zdravého jedince má plošně větší stimulační efekt v porovnání s izolátem od pacienta 1, jehož indukce IL-6 je srovnatelná s *Mucor plumbeus*. Co se týče kontrol tak univerzálně stimulační je působení zymosan, mírně stimulační působení vykazují CpG oligodeoxynukleotidy. Pro vytvoření všech zobrazených grafů bylo použito pouze stimulací za přítomnosti polymixinu B. Hodnoty bez polymixinu sledovaly stejný trend, ale byly navýšeny bakteriálním lipopolysacharidem (LPS). Tento je univerzálně vysoce stimulační a může být kontaminantem laboratorního prostředí včetně používaných plastů.



Obrázek 21: výsledky FACS v podobě bodových grafů se spojnicí trendu; v legendě je za názvem druhu uveden v závorce původ izolátu (pacient 1/2/zdravá kontrola = HC); grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism.



Obrázek 22: výsledky průtokové cytometrie (MHCII+ - iNOS), Griessovy reakce (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) a ELISA analýz (TNF- α a IL-6); grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism. 47



## 5. Diskuse

### 5.1 Detekované rozdíly v mikrobiomu

V době mého příchodu do kolektivu Laboratoře buněčné a molekulární imunologie probíhala houbová sekvenace NGS pomocí primerů IST3\_F a IT4\_R cílicích na ITS2. Tato praxe vyplynula jak z originální publikace těchto primerů (White et al., 1990), tak diplomové práce Mgr. Tomáše Zelenky. Během těchto pokusných běhů se však ukázalo, že tyto primery navrhnuté na několika málo rodech hub jsou sice vysoce specifické, což je pro vzorky z trávicího traktu, které obsahují DNA hostitele, pozůstatků jídla, bakterií, hub, virů, archeí i protist, vysoce žádoucí. Avšak zároveň se tyto primery vyznačují vyšší afinitou k oddělení Ascomycet, což je pro oblast střev, kde je vysoký a hlavně významný podíl Basidiomycet, nežádoucí. Proto bylo přirozené rozhodnutí vyměnit tyto za degenerované primery amplifikující ITS2 (Toju et al., 2012). Finální produkt jejich amplifikace měl velikost cca 500 pb. Délková variabilita ITS je obecně velmi dobře známá a bývá uváděn rozptyl 170 - 550 pb (Tang et al. 2015). Jelikož se získané produkty pohybovaly v této oblasti a panoval předpoklad, že nejpočetnější frakci budou tvořit kvasinky typu *Saccharomyces* nebo *Candida*, které mají obecně delší ITS region (Motooka et al., 2017), tak jsem nepojala žádné podezření a až finální data ukázala, že se degenerované primery preferenčně vázaly na lidského hostitele a amplifikovaly úsek o velikosti 500 pb lidské DNA. Tyto primery taktéž amplifikovaly prvoka *Blastocystis hominis*, čímž detekovaly jeho významný podíl v několika biotických vzorcích pacientů s CRC. Detekce jednobuněčných střevních parazitů, kteří jsou nedílnou součástí celkového diagnostického obrazu (Dollive et al., 2012), je samozřejmě významným přínosem pro komplexní studium mikrobiomu trávicího traktu. Z tohoto důvodu některé poměrně recentní studie nadále využívají kombinovaný přístup sekvenace ITS i 18S (Gouba, Raoult and Drancourt, 2013; Hamad et al., 2012).

Následná selekce primerů cílicích na ITS1 a jimi amplifikovaný sekvenační běh pacientů s IBD poskytly velmi dobré výsledky. Jednalo se však o vzorky stolice s menším poměrem hostitelské DNA. Biotické vzorky byly následně testovány s využitím kitu vyvazujícím hostitelskou DNA. Jeho použití pro vzorky lidských střevních biopsií pacientů s CRC, ze kterých se nedaří amplifikovat mikrobiální DNA z důvodu jejího minimálního obsahu v celkovém objemu izolované DNA, je sice účinné, ale kit jednoznačně vyvazuje i velké množství DNA hub. Zároveň je zřejmé, že se jedná o preferenční skupiny s vyšším výskytem metylací a využití tohoto kitu by tak mohlo zásadním způsobem zkreslit finální výsledky. Většina optimalizací využitých při přípravě různých typů vzorků pro sekvenování houbové a bakteriální složky na platformě Illumina Miseq byla přínosná a poskytla kýžený efekt. Do budoucna mám mimo jiné v plánu testovat Ultra-Deep Microbiome Prep izolační kit, amplifikaci Takara polymerázou a Ultra II ligační kit k dosažení ještě lepších výsledků ve všech krocích přípravy vzorků k sekvenaci.

Zde prezentované výsledky jednoznačně potvrzují signifikantní změny ve složení mikrobiomu v souvislosti se střevním onemocněním. Například detekovaný *Blastocystis* v biotických vzorcích pacientů s CRC je současně udáván jako dominantní ve fekálních vzorcích zdravých lidí (Scanlan and Marchesi, 2008). Část těchto jedinců jsou nositeli více subtypů, přičemž některé se vyskytují spíše ve smíšených a jiné zase v izolovaných infekcích. To může odrážet vzájemný kompetitivní nebo kooperativní vztah (Scanlan, Stensvold and Cotter, 2015). Recentně byla korelace *Blastocystis* se zdravým střevním mikrobiomem doložena na skupině lidí s různými zdravotními obtížemi. U nositelů *Blastocystis* pak byla prokázána vyšší bakteriální diverzita s významnými podíly prospěšných druhů než u HC (Audebert et al., 2016). Samotná patogenita je diskutována a zůstává i nadále kontroverzní. Zdá se, že lze izoláty *Blastocystis hominis* rozdělit pomocí PCR fingerprintingu do shluků, které jasně odrážejí zda pochází ze symptomatického nebo asymptomatického hostitele, což naznačuje, že by se mohlo jednat o dva odlišné druhy či kmeny (T. C. Tan et al., 2006). Obecně je onemocnění způsobené tímto parazitem demonstrováno bolestí břicha, zácpou, průjmem a jejich střídáním, zvracením a celkovou únavou (Qadri, al-Okaili and al-Dayel, 1989). Bylo navržen také jeho častější výskyt u pacientů s IBD (Tungtrongchitr et al., 2004, Jimenez-Gonzalez et al., 2012), naopak významný pokles jeho výskytu byl prokázán pro pacienty s aktivní UC (Rossen et al., 2015).

Na úrovni rodu dochází u pacientů s CRC mezi zdavou a zasaženou tkání k signifikantním změnám u *Cladosporium*, *Aspergillus* a *Beauveria* a *Udeniomyces*. V neposlední řadě sem však spadá i makromycet *Trichaptum*. Tento rod je v našem prostředí znám spíše jako Bránovitec, saprotrof s kloboukatými až rozlitými plodnicemi rostoucí na mrtvém dřevě. Zároveň byl prokázán jeho významný nárůst v dysbiotickém mikrobiomu z nosních dutin pacientů trpících astmatem (van Woerden et al., 2013) nebo jedince trpícího chronickým zánětem sliznice paranasálních dutin (Buzina et al., 2003). Tedy jeho asociace s mykobiomem nemocných jedinců je již prokázána, toto je však první popis ve vzorku trávicího traktu. Hlavním pojícím prvkem se zde zdá být hlen, který je hojný jak v respiračním tak v trávicím traktu.

V datech této práce bylo zjištěno, že *Beauveria* je signifikantně častější v tumoru než-li zdravé tkáni. Tato byla detekována v nasálním mikrobiomu (Buzina et al., 2003), což spolu s jejím využitím jako insekticidního agens nahrává jejímu původu z prostředí. Ve stolici byla dosud detekována pouze kultivačními metodami (Gouba et al., 2013; Gouba and Drancourt, 2015). Díky jejím účinným virulencím faktorům (Zhang et al., 2009) má rozhodně potenciál k invaznímu působení v lidském střevě.

Dále popisovaná redukce u Firmicutes i Bacteroidetes naznačuje odvrácení od mikrobiomu, který běžně zajišťuje štěpení a absorpci látek pocházejících z potravy. Poměr těchto dvou tříd je také dokládán v souvislosti s tělesným hmotnostním indexem pacienta, kdy převaha Firmicutes značí obezitu a hubnutí poměr znovu obrací ve prospěch Bacteroidetes (Turnbaugh et al., 2006). Ti jsou již několik desetiletí známi jako hlavní štěpitelé komplexních polysacharidů z potravy (Salyers et al.,

1977). Jako poslední z úrovně tříd bych chtěla zmínit ve tkáni CRC obohacené Synergistetes, kteří jsou známi z různých nik lidského těla stejně jako z různých fyziologických stavů, a to jak u zdravých, tak u nemocných jedinců. V souvislosti s touto prací je významná například jejich izolace z abscesu v tenkém střevě. Jejich role je však zatím nejasná (Marchandin et al., 2010).

U rodů *Clostridium*, *Blautia* a *Ruminococcus*, objevujících se ve zde prezentovaných datech, již nějakou dobu probíhá reklasifikace (Liu et al., 2008), a proto jejich separátní vyhodnocení může dle některých autorů pozbývat hlubšího smyslu (Goodrich et al., 2014), avšak jedná se o běžnou praxi. Studie pacientů s CRC založená taktéž na analýze párových biopsií dokládá významnou shodu s daty zde prezentovanými pro nárůst *Proteobacteria*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Campylobacter*, *Clostridium hylemonae* (zde pouze *Clostridium*) a pokles Firmicutes, *Eubacterium* (zde Eubacteriaceae), *Clostridium symbiosum* (opět *Clostridium*) a *Ruminococcus* (Zeller et al., 2014). A také čánek na fekální vzorky IBD souhlasí s mou prací v několika aspektech, jako je pokles čeledí Rikenellaceae a Ruminococcaceae, řádu Clostridiales a rodu *Blautia*. Zajímavé je, že *Blautia* a *Ruminococcus* údajně pozitivně korelují se *Saccharomyces* (Sokol et al., 2016).

Zároveň bylo literaturou prokázáno, že zástupci rodu *Clostridium* skupin IV a XIV, producenti butyrátu, jsou početnější pro skupinu kolonizovanou *Blastocystis* a opačně *Lactobacillales* pro těmito nekolonizované subjekty (Audebert et al., 2016). Tyto clostridie byly testovány na myším modelu, kde prokazatelně indukují produkci TGF- $\beta$  ve střevním epitelu, který je kritický pro regulaci vývoje regulačních T-lymfocytů, čímž přispívá k protizánětlivému prostředí střeva. Pokud je těmito skupinami clostridií stimulováno mládě, tak je v dospělosti chráněno před vznikem kolitidy, případně má mírnější symptomy (Atarashi et al., 2008). Tyto skupiny clostridií zároveň ve střevě působí protizánětlivě díky produkci butyrátu (Baxter et al., 2014), který inhibuje NF $\kappa$ B (Segain et al., 2000), ústřední regulátor transkripce prozánětlivých cytokinů, a až čtyřnásobně zvyšuje spontánní apoptózu buněčných linií lidských CRC, čímž blokuje karcinogenezi (Heerdt et al., 1994).

*Ruminococcus* představuje další bakteriální rod, který je signifikantně nižší ve tkáni tumoru pacientů s CRC je s. Konkrétně druh *R. bromii* byl dokonce označen za klíčový druh, protože nejen že je schopen sám fermentovat odolné škroby, ale svou přítomností dokáže stejnou schopnost stimulovat i u jiných druhů, čímž i v případě prostředí, které omezuje jeho vlastní růst, zajišťuje hostiteli energii z této významné složky stravy (Ze et al., 2012). Jeho redukce v nádoru pacientů, tak potvrzuje odklon mikrobiálního společenstva tumorózní tkáně CRC od funkční jednotky naplňující efektivní fermentaci zdrojů potravy.

V této práci vyšel jako nejvýznamnější rod *Fusobacterium*, který je ve vzorku tumoru významně obohacen. Jeho poddruhy *Fusobacterium nucleatum* ssp. *vincentii*, *F. nucleatum* ssp. *animalis* jsou spolu s *Porphyromonas asaccharolytica* a *Peptostreptococcus stomatis* označovány díky specifické asociaci s prostředím tumoru za vhodný nástroj pro brzkou detekci CRC. Zároveň jsou tyto markerové druhy validovány jako specifické pro detekci CRC porovnáním s daty IBD, které by

díky zánětu mohly mít shodný mikrobiální posun. Dokonce je postulováno, že pro CRC vzorky není zásadní rozdíl mezi fekálním a bioptickým vzorkem (Zeller et al., 2014). Důležitým faktorem je i metabolismus navrhovaných markerových druhů, který je asacharolytický, tedy nevyužívá glukózu, která je hlavním substrátem metabolismu tumoru (Vander Heiden, Cantley and Thompson, 2009). Nejprozkoumanější je vliv prvního zmíněného. Druh *Fusobacterium nucleatum* se přichytává k epitelu přes FadA adhesin, invaduje a indukuje onkogenní a zánětlivou odpověď čímž stimuluje selektivní růst CRC buněk, který ústí v narušení bariérové funkce epitelu. Úroveň exprese fadA genu ve tkáni pacientů s CRC jsou 10-100 × vyšší než u kontrol (Rubinstein et al., 2013). Zároveň produkty metabolismu aminokyselin *F. nucleatum* fungují jako atraktants pro tumor infilující myeloidní buňky, které mohou podporovat jeho progresi (Kostic et al., 2013) přes inhibici proliferace a indukci apoptózy efektorových T-lymfocytů (Gabrilovich, Ostrand and Bronte, 2012), což vede k lokální imunosupresi. Výrazná abundance *F. nucleatum* koreluje s metastázemi do lymfatických uzlin (Castellarin et al., 2012), kratším dožitím (Mima et al., 2016) a mikrosatelitovou nestabilitou. Význam výše zmíněného však musí být chápán v kontextu jeho prevalence mezi CRC pacienty, která je poměrně nízká 8,6 – 13 % (Nosho et al., 2016; Mima et al., 2016). Náš nálezn, že se rod *Fusobacterium* v tumoru CRC vyskytuje společně s rody *Leptotrichia* a *Campylobacter* potvrzuje i jiná studie (Warren et al., 2013). Zmíněné druhy spolu s rodem *Eikenella* byly známy ze sekvenování orálního mikrobiomu (Mager et al., 2005), ale od těchto jsou významně divergentní. V kulturách společně adherují k povrchu a vytváří biofilm s výrazným virulenčním potenciálem. Současně je tato polymikrobie asociována s nadměrnou expresí IL 8, který působí prozánětlivě (Warren et al., 2013).

Podobné změny na nejvyšších úrovních bakteriálního společenstva, jaké byly prokázány u bioptických vzorků pacientů s CRC dokládají i další studie. Například analýza stolice pacientů s Hirschprungovou chorobou (Frykman et al., 2015), ale i biopsie (Frank et al., 2007) a fekální vzorky (Sokol et al., 2016) pacientů s IBD. Zastřešující motiv dysbiózy tedy bude podobný.

Zde plynule naváží na sekvenaci mykobiomu pacientů s IBD, tedy nedokončené výsledky bez podpory statistické signifikance. Proporční rozložení hlavních oddělení u zdravých kontrol je Ascomycota 64 % a Basidiomycota 29 %. Pokud s tímto porovnáme poměry u UC, PSC-IBD a PSC, tak vidíme snížení na 52-56 % u oddělení Ascomycota, který je způsoben proporčním nárůstem u Basidiomycota. Toto zjištění odpovídá literatuře (Sokol et al., 2016). Zásadně se však vymyká skupina pacientů s CD, kde Ascomycota tvoří 84 %. Podobný poměr však dokládá i (Li et al., 2014). Tento nárůst ve zde prezentovaných datech odráží Saccharomycetales a druh *Saccharomyces paradoxus*. Tato kvasinka byla v literatuře popsána pouze ve stolici zdravých jedinců (Gouba and Drancourt, 2015) a pacientů s chronickou virovou hepatitidou B (Chen et al., 2011). U pacientů s UC, PSC-IBD a PSC je pak nárůst množství *S. paradoxus* doprovázen i nárůstem pro *Candida albicans*, jež je s IBD naopak spojována často, a to především v akutní fázi zánětu (Sokol et al., 2016; Li et al., 2014). Velmi zajímavé je významné množství *Penicillium roqueforti*, s nejvyšším množstvím u zdravých jedinců, což

není ojedinělé (Hallen-Adams et al., 2015). Jeho význam je ještě znásoben překryvem s kultivačními a sekvenačními daty diskutovanými později. Naopak poměrně netradiční je takto četná detekce makromycet jako je *Lysurus cruciatus*, *Xerocomus badius*, *Scleroderma areolatum*, *Suillus variegatus*, *Boletus edulis*, *B. reticulatus* a *Tuber nitidum*, které převažují především u zdavých jedinců a pacientů trpících pouze PSC.

## 5.2 Kultivační metody

V kultivační části této práce vyšly jako nejbohatší rody *Penicillium* a *Aspergillus* s pěti zástupci, což společně s rody *Candida* a *Mucor* potvrzuje, že kultivace nahrává rodům oportunně patogenním (Scanlan and Marchesi, 2008). Zároveň se ve všech případech mimo rod *Candida* jedná o dobře sporující rody, které jsou tak přirozeně častěji zachycovány v kulturách. Rody *Alternaria*, *Aureobasidium* a *Cladosporium* jsou dobře známy z orálního (Dupuy et al., 2014) a nasálního (Sellart-Altisent et al. 2007) mikrobiomu a mimo jejich běžný habitat, kterým je venkovní vzduch (Jacob et al., 2002) je znám i jejich hojný výskyt ve vnitřních prostorách budov (Amend et al., 2010). Mohou tak být kontaminanty prakticky čehokoliv včetně jídla. S potravou jsou pak spojovány především druhy *Saccharomyces cerevisiae*, známý jako pivovarská nebo pekařská kvasinka, *Penicillium camemberti*, *P. roqueforti* a *Geotrichum candidum*, které jsou využívány v produkci sýrů (Le Bars, 1979; Nelson, 1970; Boutrou, Kerriou and Gassi, 2006) spolu s rodem *Mucor*, který je po penicillíích druhým hlavním rodem sýrářství (Hermet et al., 2012). Druhy *Penicillium chrysogenum* a blíže neurčený *Cladosporium sp.* jsou známi ze sušených masných produktů (Sonjak et al., 2011), *P. chrysogenum* i *Cladosporium sp.* byly taktéž izolovány z hroznů vinné révy (Magnoli et al., 2003). Dobře zmapované je i využití druhu *Aspergillus oryzae* k produkci asijských specialit jako jsou sojová omáčka, miso pasta a další. Do tohoto odsavce spadá i *Geosmithia sp. 3*, která dle referenční publikace může naznačovat laboratorní kontaminaci, ale již mnoho let se s ní zde nepracuje. Je běžná především v půdě (Pitt, 1978), ale i v cereáliích (Pitt and Hocking, 1997), na nichž velké ekonomické ztráty působí *P. roqueforti* (Druvefors, Passoth and Schnürer, 2004). *Sacharomyces boulardii* jako probiotický druh nepotřebuje komentář. Všechny houby využívající se při produkci nebo detekované na potravinách jsou samozřejmě běžně získávány analýzou vzorků stolice, neboť DNA přežívá průchod trávicím traktem.

Z důvodu suplementace pacienta 1 biotechnologicky připraveným farmakem Lactanon, při jehož produkci se využívá *Aspergillus niger* (informace na obalu) a výskytu černých *Aspergillů* na kultivačních miskách, byl jeden prášek homogenizován, suspendován ve fyziologickém roztoku a aerobně kultivován na MEA. Výsledkem byla detekce druhu *Aspergillus fumigatus* a blíže neurčeného *Penicillium sp.* (data neuvěděna). *A. fumigatus* je v literatuře uváděn jako tolerující pH v rozsahu 6 - 7,3 (Hua, Yuan and Wilhelmus, 2010), měl by tedy být zničen v podstatně kyslejších prostředí žaludku. I toto zjištění podporuje narušenou tvorbu kyseliny a následně vyšší pH žaludku při

chronickém zánětu. Tento druh je tedy mimo exogenního zdroje v podobě farmaka detekován i na hroznovém víně (Magnoli et al., 2003) a může být i kontaminantem uskladněných obilnin, kde produkuje mykotoxiny. V lékařské mykologii je pak znám z nasálního hlenu zdravých jedinců (Sellart-Altisent et al., 2007) i hlenu samotné dýchací trubice pacientů s cystickou fibrózou (Delhaes et al., 2012), ale především jako jeden z hlavních původců invazních houbových infekcí, které jsou typické vysokou mortalitou (Rabkin et al., 2000). Jeho detekce ve střevním mykobiomu není známa. V souvislosti s farmakologií zmiňme i *Penicillium chrysogenum*, které bylo s jistými kontroverzemi označeno za druh na němž Alexander Fleming (1929) objevil produkci penicilinu (Clutterbuck, Lovell and Raistrick, 1932).

V rámci sekvenace izolátů Sangerovou metodou detekované překryvy druhů *P. roqueforti*, *R. mucilaginosa* a *A. tubingensis* mezi pacienty nepovažují za zcela důvěryhodné, protože jejich fingerprinty tomu neodpovídají. Fingerprintingu je přisuzována vyšší specifita rozlišení houbových izolátů oproti porovnávání sekvence s databázemi, které jsou v neustálém vývoji. Fingerprintem lze odlišit i různé populace v rámci jednoho druhu, což by mohl být případ *P. roqueforti*. Tuto úvahu podporuje detekce enormní genetické diverzity mezi jeho izoláty, která bývá často spojována s komplexy kryptických druhů. Izoláty shlukují do šesti vysoce rozlišených clustrů (Ropars et al., 2014). Podobná situace panuje i u *G. candidum*, které tvoří pět cladů (Jacques et al., 2016). Takto detailní analýza pro *R. mucilaginosa* do dnešního dne nebyla provedena, ačkoliv několik článků se touto myšlenkou za pomoci různých metod již zabývalo (Saracli et al., 2003; Libkind et al., 2008). Taxonomická situace u *A. tubingensis* je naopak předmětem detailních analýz, které řeší především jeho významnou podobnost a možnou záměnu s *A. niger* (Juhász et al., 2007; Geiser et al., 2007; Juhász et al., 2008). Není tak vyloučeno, že by i toto mohl být případ našeho datasetu. Překryv mezi kultivovanými morfotypy amplifikovanými na relevantní geny a určenými Sangerovou sekvenací s DNA z celkového čerstvého vzorku stolice amplifikovanou na ITS1 a sekvenovanou na platformě Illumina Miseq byl ve druhovém spektru omezen na dva druhy, *P. roqueforti* a *Candida albicans*. Je s podivem, že překryv je ve shodě mezi pacienty a zřejmě se nejedná o jiné vysvětlení než o obecně častou detekci těchto druhů sekvenačními i kultivačními metodami ve vzorcích stolice (Hallen-Adams et al., 2015; Scanlan and Marchesi, 2008). Důvody poměrně malého překryvu na všech úrovních jsou zřejmě již z deskriptivního popisu využitých metod, z čehož vyplývají jejich zásadní odlišnosti v podobě menších či větších slabín. Těchto lze nalézt více na straně sekvenace celého vzorku stolice, kdy je DNA amplifikována pouze na univerzální gen ITS1, který však pro detailnější rozlišení rodů *Penicillium* a *Aspergillus* není dostatečně variabilní. Illumina zároveň svou sekvenací pomocí syntézy tvoří mírný šum zvyhodňující krátké sekvence (Tang et al., 2015) v porovnání s párovou Sanger sekvencí, která tak delší sekvencí poskytuje větší prostor ke spolehlivému určení. Navíc NGS sekvence lze hromadně porovnávat pouze oproti jedné zvolené databázi na rozdíl od porovnání výstupů Sangerovy metody pomocí BLAST s celým Genebankem.

Literatura o vlivu kultivační teploty na růst hub potvrzuje asociaci růstu rodu *Aspergillus* s vyššími teplotami, zatímco rod *Penicillium* roste již od 4 °C do 25 °C (Pasanen et al., 1991). Díky tomu, že neroste při 37 °C (Pitt & Hocking, 2009), je *Penicillium* často označováno za transientní v lidském střevě (Suhr, Banjara and Hallen-Adams, 2016). A naopak *Aspergillus* při růstovém optimu 30 °C (Pasanen et al., 1991) je hlavním činitelem fungálních infekcí u imunosuprimovaných pacientů, které se vyznačují vysokou mortalitou (Lin, Schranz and Teutsch, 2001). *Rhodotorula mucilaginosa*, která v našich datech koreluje především s nízkými teplotami (5 °C), ale detekovaná byla i při 37 °C u pacienta 2, se také vyznačuje dříve netušenou patogenitou u náchylných osob. Tato basidiomycetová kvasinka typická produkcí karotenoidů se vyznačuje mortalitou kolem 20 % a rizikovými faktory jsou intravenózní katetr spolu s profylaxií triazolovými antimykotiky (Lunardi et al., 2006), vůči kterým je přirozeně rezistentní (Zaas et al., 2003). Tato vybijí přirozenou flóru a k infekci tak dochází snadněji. Mimo fagální infekce byla *R. mucilaginosa* detekována ve stolici pacientů s CD (Ott et al., 2008), ale také ve fekálních vzorcích zdravých jedinců (Dollive et al., 2012; Gouba, Raoult and Drancourt, 2014). Její výskyt a velká produkce biomasy zde uváděná při 5 °C není v konfrontaci s literaturou prvním pozorováním. Kmen této kvasinky izolovaný z antarktické maríní řasy produkoval nejvíce extracelulární proteázy při 10 °C a pH 4 (Chaud et al., 2016), které také znamená, že jí nebude činit problém ani prostředí žaludku. Psychrofilní organismy jsou přitom vyhledávané z hlediska bioprospectingu a extrémně variabilního průmyslového využití jejich enzymů. Houbové proteázy jsou často přirozeně acidické, a tak jsou využívány především v potravinářství a farmacii. Viz výše zmiňovaný *A. niger*, který mimo produkce laktázy zcela dominuje produkcí kyseliny citrónové, které se ročně vyrobí 600 tisíc metrických tun (Anastassiadis, Aivasidis and Wandrey, 2002). Dalším významným druhem našich kultivací byl *Geotrichum candidum*, který produkuje silnou peroxidázu, jenž si poradí i se syntetickými toxickými barvami (Kim and Shoda, 1999) a dále i proteázy, hydrolázy (Boutrou et al., 2006) a lipázy (Alford, Pierce and Suggs, 1964). Obecně enzymatická produkce současně tvoří vhodnou výbavu pro invazní působení v lidském hostiteli. Literatura potvrzuje, že jeho výskyt není vázán na dostupnost kyslíku, což dokládá jeho inenzivní mikroaerofilní až anaerobní růst (Tabak and Cooke, 1968). Tolerance mikroaerofilního prostředí je klíčová z důvodu propojení mezi adaptací k hypoxii a patogenézí eukaryotických aerobů (Chun, Liu and Madhani, 2007). Jeho výskyt z NGS dat je znám ze stolic jak zdravých jedinců (Nina Gouba et al., 2014; Gouba and Drancourt, 2015), tak pacientů postižených dermatologickým onemocněním (Buslau, Menzel and Holzmann, 1990). Na závěr výčtu významných druhů kultivačních dat zmíním *Trichosporon coremiiforme*. Tento druh byl detekován z podkožních abscesů, moči a dalších převážně povrchových lokalit těla, zatímco mu velice blízce příbuzný (99.7 % shoda v ITS) *T. asahii* (Chagas-Neto et al., 2009) působí převážnou většinu smrtelných krevních fungemií. Problematická je také rezistence většiny jejich kmenů k amfotericinu B (Rodriguez-Tudela et al., 2005). *T. asahii* je současně

znám ze stolice zdavých jedinců, což by hypoteticky mohla být cesta, jíž při oslabení hostitele dochází k invazi (Cho, Matsukura and Sugita, 2015).

Vliv uchování čerstvého vzorku měl jednoznačný výsledek redukce počtu kolonií a výrazného navýšení diverzity. Tato zjištění značí na vliv šoku během prvotního zamražení a zároveň zřejmě dochází díky omezení počtu CFU hyperabundantních druhů k uvolnění prostoru pro jiné druhy s následným nárůstem diverzity. Vliv uchování při teplotách pod bodem mrazu nebyl v minulosti příliš studován pro směsné vzorky klinického ani environmentálního charakteru. Tento byl adresován především u čistých kultur pro uchování v tekutém dusíku. U mnoha druhů vláknitých hub i *Saccharomyces* bylo doloženo, že většina tento způsob uchování přežívá (Hwang, 1966; Wellman and Stewart, 1973). Odpověď je však specifická pro růstovou fázi kvasinky, která je odolná během lag fáze a náchylná v log fázi růstu. Toleranci lze dokonce indukovat pomocí vystavení jinému stresoru: NaCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lehkému tepelnému šoku (Park et al., 1997). Co se týče vláknitých hub, tak jejich rozmnožovací útvary, konidie a spory, přežívají i zamražení s následným vysušením (Tan and Stalpers, 1991). Hyfální formy pak často tvořily intracelulární led, který u většiny případů pro houbu nebyl letální. Výjimkou byla *Oomycota* a někteří zástupci basidiomycet, které vyžadovaly kryoprotektant glycerol (Morris, Smith and Coulson, 1988). Dalším pozorovaným efektem vlivu uchování bylo patrné obohacení kvasinkového společenstva u pacienta 1 při uchování v 5 °C. To lze vysvětlit jako chladem stimulovaný růst v kombinaci s namnožením původního počtu CFU psychrotolerantních druhů. Chlad zde působí jako stresový faktor, který je pozitivním stimulem s následkem zmnožení kolonií. Možným úskalím pak je široký rozptyl v obsahu sušiny ve vzorku očkovaném na kultivační misky. Nehomogenost vzorků narůstá s vystavením různým teplotám uchování. Mimo manuálního promísení vzorku, které bylo vždy provedeno, je však prakticky nemožné tento homogenizovat nedestruktivně.

### 5.3 Imunomodulace detekovaná *in vitro*

Kvasinka *Candida parapsilosis* izolovaná ze zdravého jedince je silným stimulem pro buňky přirozené imunity. V mých experimentech indukovala v buňkách myši makrofágové linie expresi molekul nutných k prezentaci antigenu (MHC II+, CD80, CD86, CD40), produkci TNF- $\alpha$  a IL-6 I respirační vzplanutí (iNOS, NO<sub>2</sub>). Vliv *C. parapsilosis* na transkriptom myších makrofágů (J774.2) analyzovala recentní studie (Németh et al., 2014), která také narazila na zvýšenou produkci TNF- $\alpha$ . Většina upregulovaných genů souvisela s imunitní odpovědí, jako je zánět, transkripce, signalizace, apoptóza, buněčný cyklus, elektrovnový transport a také adheze buněk. Zajímavé je, že v průběhu interakce *C. parapsilosis* s makrofágy dochází ke zvýšené expresi receptoru TNFRSF9, který potencuje kontakt antigen prezentujících buněk s T lymfocyty a tím zvyšuje prozánětlivé působení této kvasinky. Tento efekt není typický pouze pro *C. parapsilosis*, ale u tohoto druhů bývá nejsilnější (Németh et al., 2014). Tato studie tedy potvrzuje naši hypotézu indukce produkce TNF- $\alpha$  a CD86 *C. parapsilosis*.



Z čistě klinického pohledu působí *C. parapsilosis* 25 % všech invazních fungálních infekcí, s vyšší mortalitou oproti kandidázám působeným *C. albicans*, především kvůli vyšší rezistenci k triazolům (Raghuram et al., 2012). Z hlediska NGS dat je častější u pacientů s chronickými průjmy (Banerjee, Kaur and Uppal, 2013) stejně jako těch s IBD (Ott et al., 2008; Chehoud et al., 2015). Tento druh je také znám z orálního mykobiomu (J. Wu et al., 2014), kde je díky produkci proteáz spojen s možnou progresí parodontózy (Wu and Samaranayake, 1999).

Dalším druhem u kterého se ukázal zajímavý biologický efekt byl *Mucor plumbeus* izolovaný z pacienta 1, který stimuloval dělení makrofágů (exprese Ki-67), expresi kostimulačních molekul, prezentaci antigenu a produkci IL-6. Jeho vliv na buňky přirozené imunity však není zatím popsán. Rod *Mucor* společně s dalšími zástupci Mucorales působí u imunosuprimovaných jedinců závažně mukormykózy (Lalwani et al., 2012) s významnou mortalitou podpořenou rezistencí k některým antimykotikům (Vitale et al., 2012). Mukormykózy však nejsou pouze doménou imunosuprimovaných jedinců, protože až 72 % pacientů s mukormykózou ledvin tvoří imunokompetentní jedinci (Gupta et al., 1999). Mimo invazní fungální infekce je tento rod znám ze stolice zdravých jedinců (Gouba and Drancourt, 2015) a s nízkou prevalencí i z nasálního mikrobiomu zdravých jedinců (Mianroodi et al., 2011). To může značit na původ tohoto převážně saprotrofního druhu z prostředí. Obecně je pak rod *Mucor* ve stolici, především jeho druhy *M. racemosus* a *M. fuscus*, spojován s nízkým tělesným hmotnostním indexem (Rodríguez et al., 2015). Polysacharidy jeho buněčné stěny jsou tvořeny chitinem a chitosanem. Chitosan má významné antimikrobiální účinky vůči patogenním houbám i bakteriím (Tajdini et al., 2010) společně s ochranným vlivem proti rozvoji obezity a schopnosti snižovat C-reaktivní protein v krvi, takzvané CRP, který je jedním z hlavních zánětlivých parametrů (Walsh et al., 2013).

Na závěr je třeba zdůraznit, že vyšší prozánětlivý potenciál nemusí být pro hostitele pouze nebezpečný, ale může také vést k indukci imunitní odpovědi, a tak jedince chránit před infekcí.

## 6. Závěr

- V rámci této práce jsem optimalizovala molekulárně mikrobiologickou analýzu hub ve vzorcích lidské střevní tkáně a stolice. Výsledek detekovaného mykobiomu byl nejlepší za použití 10 % koncentrace BSA v PRC reakci a ITS1 primerů. Další specifika přípravy závisí na typu vzorku, cílovém společenstvu a použitých primerech. Ve střevním tumoru byly signifikantně nejvíce navýšeny abundance rodů *Beauveria* a *Fusobacterium* a naopak sníženy abundance *Cladosporium* a *Helcococcus*. Zároveň byl v řadě případů detekován protozoální druh *Blastocystis hominis*. U pacientů s CD pak byl pozorován významný nárůst *Saccharomyces paradoxus*.
- Dále jsem optimalizovala předanalytickou fázi kultivačních analýz mykobiomu. Jako zcela zásadní se ukázal vliv uchování vzorku i podmínky vlastní kultivace (teplota, médium, aerobie) nejen na počet kolonií, ale především zachycení kultivovatelné diverzity. Proto je jednoznačně nejvhodnější zpracování fekálního vzorku v čerstvém stavu během prvních tří hodin. Pro testování kultivační diverzity byl zvolen malý počet vzorků, který byl kultivován za široké škály aplikovaných podmínek. Tímto extenzivním přístupem byla detekována jedinečná ekofyziologická a druhová diverzita. Tato by při odstranění jakékoliv z podmínek (extrémní teploty, anaerobní prostředí) nebyla tím, co se momentálně jeví jako ucelené a poskytující komplexní náhled. Navíc vzorky od různých pacientů se od sebe značně liší co do počtu CFU, což značně komplikuje jakýkoli kultivační přístup. Jednotná metodika, především pak ředění vzorku, mohou v konečném důsledku způsobit omezení detekovatelné diverzity.
- Dále jsem porovnála výsledky mezi NGS a kultivací, což se mi nejeví jako příliš vypovídající. Na druhové úrovni se shodovaly pouze dva druhy, *Penicillium roqueforti* a *Candida albicans*, zatímco na rodové byl překryv metod 17–24 %. Kultivační přístup společně s určením pomocí markerových genů, manuálním editováním sekvencí a porovnáním s Genebank jednoznačně poskytují vyšší spolehlivost, která je ještě upřesněna PCR fingerprintem. Detekováno bylo mnoho druhů, které mohou pocházet z okolního prostředí (vzduch, potraviny, farmaka). Z hlediska vztahu k hostiteli bylo určeno několik velmi významných oportunních patogenů, jako například *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *G. candidum*, *M. mucedo*, *M. plumbeus*, *R. mucilaginosa*, *T. coremiiforme*, ale i druhů s pozitivním působením, jako je *S. boulardii* a *S. cerevisiae*.
- Dále jsem kultivací vybraných houbových lyzátů s myší makrofágovou buněčnou linií odhalila silně prozánětlivé vlastnosti kvasinky *Candida parapsilosis* a vláknitého druhu *Mucor plumbeus*. *C. albicans* vyšla jako jednoznačně nejsilnější stimulans indukující prozánětlivou imunitní odpověď navýšením prezentace antigenu, produkcí kostimulačních proteinů, respiračním vzplanutím, produkcí NO<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  a IL-6. *M. plumbeus* výrazně indukoval dělivost buněk, prezentaci antigenu a produkci IL-6. Tyto vlastnosti nebyly u jiných izolátů (*Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*).

## Seznam použité literatury

- Adam, B. (2002). Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*, 51(4), 344–349. Retrieved from <http://jmm.sgmjournals.org/content/51/4/344.short>
- Akhtar, M., Watson, L. J., Nazli, A., & McKay, M. D. (2003). Bacterial DNA evokes Epithelial IL-8 production by an Erk MAPK-dependent, NF $\kappa$ B-independent pathway. *The FASEB Journal*, (August 2003).
- Alford, J. a, Pierce, D. a, & Suggs, F. G. (1964). Activity of microbial lipases on natural fats and synthetic triglycerides. *Journal of Lipid Research*, 5(6), 390–394.
- Alm, E. W., Oerther, D. B., Larsen, N., Stahl, D. A., & Raskin, L. (1996). The oligonucleotide probe database. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3557–3559.
- Alper, I., Frenette, M., & Labrie, S. (2013). Genetic diversity of dairy *Geotrichum candidum* strains revealed by multilocus sequence typing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(13), 5907–5920. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4776-2>
- Altschul, Stephen, F., Gish, W., Miller, W., Myers, Eugene, W., & Lipman, David, J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*.
- Amend, A. S., Seifert, K. a, Samson, R., & Bruns, T. D. (2010). Indoor fungal composition is geographically patterned and more diverse in temperate zones than in the tropics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31), 13748–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000454107>
- An, K. D., Kiyuna, T., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S., & Sugiyama, J. (2009). The identity of *Penicillium* sp. 1, a major contaminant of the stone chambers in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan, is *Penicillium paneum*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 96(4), 579–592. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9373-0>
- Anastassiadis, S., Aivasidis, A., & Wandrey, C. (2002). Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(1–2), 81–87. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1098-1>
- Anderson, H. W. (1917). Yeast-Like Fungi of the Human Intestinal Tract. *The Journal of Infectious Diseases*, 21(4), 341–386. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(71\)80055-0](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(71)80055-0)
- Andersson, R. E., Olaison, G., Tysk, C., & Ekblom, A. (2001). APPENDECTOMY AND PROTECTION AGAINST ULCERATIVE COLITIS. *The New England Journal of Medicine*, 344(11), 808–814.
- Audebert, C., Even, G., Cian, A., Safadi, D. El, Certad, G., Delhaes, L., ... Chabé, M. (2016). Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Scientific Reports*, 6(April), 25255. <https://doi.org/10.1038/srep25255>
- Bahl, M. I., Bergström, A., & Licht, T. R. (2012). Freezing fecal samples prior to DNA extraction affects the Firmicutes to Bacteroidetes ratio determined by downstream quantitative PCR analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 329(2), 193–197. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02523.x>
- Baillie, G. S., & Douglas, L. J. (2000). Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(3), 397–403. <https://doi.org/10.1093/jac/46.3.397>
- Banerjee, P., Kaur, R., & Uppal, B. (2013). Study of fungal isolates in patients with chronic diarrhea at a tertiary care hospital in north India. *Journal de Mycologie Medicale*, 23(1), 21–26. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L52416212%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2012.12.002%5Cnhttps://gsk.worldcat.org/openurlresolver?sid=EMBASE&isn=11565233&id=doi:10.1016%2Fj.mycmed.2012.12.002&atitle=Study+of+fun>
- Baumgart, D. C., & Carding, S. R. (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*, 369(9573), 1627–1640. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60750-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60750-8)
- Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*, 369(9573), 1641–1657. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60751-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60751-X)
- Baxter, N. T., Zackular, J. P., Chen, G. Y., & Schloss, P. D. (2014). Structure of the gut microbiome following colonization with human feces determines colonic tumor burden. *Microbiome*, 2, 20. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-20>

- Bernstein, C., Eliakim, A., Fedail, S., Fried, M., Gearry, R., Goh, K., ... Lemair, A. (2015). Inflammatory Bowel Disease. Retrieved from <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/inflammatory-bowel-disease-english-2015-update.pdf>
- Boudeau, J., Glasser, a-L., Julien, S., Colombel, J.-F., & Darfeuille-Michaud, a. (2003). Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *18*(1), 45–56. <https://doi.org/10.1046/j.0269-2813.2003.01638.x>
- Boutrou, R., Kerriou, L., & Gassi, J. Y. (2006). Contribution of *Geotrichum candidum* to the proteolysis of soft cheese. *International Dairy Journal*, *16*(7), 775–783. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.07.007>
- Bull, T. J., McMinn, E. J., Sidi-boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., ... Hermon-taylor, J. (2003). Detection and Verification of *Mycobacterium avium* subsp . paratuberculosis in Fresh Ileocolonic Mucosal Biopsy Specimens from Individuals with and without Crohn's Disease Detection and Verification of *Mycobacterium avium* subsp . paratuberculosis in Fres. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(7), 2915–2923. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.2915>
- Buslau, M., Menzel, I., & Holzmann, H. (1990). Fungal flora of human faeces in psoriasis and atopic dermatitis. *Mycoses*.
- Buts, J. P., De Keyser, N., & De Raedemaeker, L. (1994). *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatric Research*, *36*(4), 522–7. <https://doi.org/10.1203/00006450-199410000-00019>
- Buzina, W., Braun, H., Freudenschuss, K., Lackner, a, Habermann, W., & Stammberger, H. (2003). Fungal biodiversity--as found in nasal mucus. *Medical Mycology : Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, *41*(2), 149–161.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... Walters, W. a. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, *7*(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303.QIIME>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108* Suppl(Supplement\_1), 4516–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Cario, E., & Podolsky, D. K. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infection and Immunity*, *68*(12), 7010–7017. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.7010-7017.2000>
- Cassone, M., Serra, P., Mondello, F., Girolamo, A., Scafetti, S., Pistella, E., & Venditti, M. (2003). Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* Subtype *boulardii* Fungemia in Patients Neighboring Those Treated with a Probiotic Preparation of the Organism. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(11), 5340–5343. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5340>
- Castellarin, M., Warren, R. L., Freeman, J. D., Warren, L., Freeman, J. D., Dreolini, L., ... Holt, R. A. (2012). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research*, 299–306. <https://doi.org/10.1101/gr.126516.111>
- Center, M. M., Jemal, A., & Ward, E. (2009). International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *18*(6), 1688–1694. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0090>
- Chagas-Neto, T. C., Chaves, G. M., Melo, A. S. A., & Colombo, A. L. (2009). Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: Species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*(4), 1074–1081. <https://doi.org/10.1128/JCM.01614-08>
- Chambers, T. J., & Morson, C. (1979). The granuloma in Crohn's disease. *Gut*, *20*, 269–274.
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., Ghannoum, M. A., ... Mitchell, J. S. F. and A. P. (2001). Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *National Review of Microbiology*, *9*(18), 109–118. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5385>
- Chapman, W. G., Arborgh, B. A. M., Scheuer, P. J., & Sherlock, S. (1980). Primary sclerosing cholangitis: *Gut*,

- Chaud, L. C. S., Lario, L. D., Bonugli-Santos, R. C., Sette, L. D., Pessoa Junior, A., & Felipe, M. das G. de A. (2016). Improvement in extracellular protease production by the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *New Biotechnology*, *33*(6), 807–814. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.07.016>
- Chehoud, C., Albenberg, L. G., Judge, C., Hoffmann, C., Grunberg, S., Bittinger, K., ... Wu, G. D. (2015). Fungal Signature in the Gut Microbiota of Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, *21*(8), 1948–56. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000454>
- Chen, G. Y. (2014). Role of Nlrp6 and Nlrp12 in the maintenance of intestinal homeostasis. *European Journal of Immunology*, *44*(2), 321–327. <https://doi.org/10.1002/eji.201344135>
- Chen, Y., Chen, Z., Guo, R., Chen, N., Lu, H., Huang, S., ... Li, L. (2011). Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *70*(4), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.04.005>
- Cho, O., Matsukura, M., & Sugita, T. (2015). Molecular evidence that the opportunistic fungal pathogen *Trichosporon asahii* is part of the normal fungal microbiota of the human gut based on rRNA genotyping. *International Journal of Infectious Diseases*, *39*, 87–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.09.009>
- Chun, C. D., Liu, O. W., & Madhani, H. D. (2007). A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathogens*, *3*(2), 0225–0238. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030022>
- Clausen, M. R., & Mortensen, P. B. (1995). Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis. *Gut*, *37*(5), 684–9. <https://doi.org/10.1136/gut.37.5.684>
- Clutterbuck, P. W., Lovell, R., & Raistrick, H. (1932). The formation from glucose by members of the *Penicillium chrysogenum* series of a pigment, an alkali-soluble protein and Penicillin-the antibacterial substance of Fleming. *The Biochemical Journal*, *26*(6), 1907–1918.
- Costa, P. S., Mendes, J. M., & Ribeiro, G. M. (2008). *Tatumella tyseos* causing severe human infection: report of the first two Brazilian cases. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *12*(32), 442–443.
- Defendorf, A. R. (1897). Yeasts and Their Relation to Malignant Tumors. *Transactions of the American Microscopical Society*, *18*, 219–247.
- Delhaes, L., Monchy, S., Fréalle, E., Hubans, C., Salleron, J., Leroy, S., ... Viscogliosi, E. (2012). The airway microbiota in cystic fibrosis: A complex fungal and bacterial community-implications for therapeutic management. *PLoS ONE*, *7*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036313>
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E., L., Keller, K., ... Andersen, G., L. (2006). Greengenes: Chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible in ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*, 5069–5072.
- Deschner, E. E., Winawer, S. J., Katz, S., Katzka, I., & Kahn, E. (1983). Proliferative defects in ulcerative colitis patients. *Cancer Investigation*, *1*(1), 41–47. <https://doi.org/10.3109/07357908309040931>
- Di Gregorio, C., Losi, L., Fante, R., Modica, S., Ghidoni, M., Pedroni, M., ... Roncucci, L. (1997). Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology*, *30*(4), 328–334. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.1997.d01-626.x>
- Dobell, C. (1920). The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, *13*(Sect Hist Med), 1–15. <https://doi.org/10.1097/00007611-192204000-00022>
- Dollive, S., Peterfreund, G. L., Sherrill-Mix, S., Bittinger, K., Sinha, R., Hoffmann, C., ... Bushman, F. D. (2012). A tool kit for quantifying eukaryotic rRNA gene sequences from human microbiome samples. *Genome Biology*, *13*(7), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-7-r60>
- Druvefors, U. Ä., Passoth, V., & Schnürer, J. (2004). Nutrient effects on biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during airtight storage of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(4), 1865–1869. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1865-1869.2005>
- Dupuy, A. K., David, M. S., Li, L., Heider, T. N., Peterson, J. D., Montano, E. a, ... Strausbaugh, L. D. (2014). Redefining the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy: discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *PLoS One*, *9*(3), e90899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090899>

- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, *26*(19), 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Edgar, R. C., & Flyvbjerg, H. (2015). Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics*, *31*(21), 3476–3482. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv401>
- Edwards, B. K., Ward, E., Kohler, B. A., Ehemann, C., Zauber, A. G., Anderson, R. N., ... Ries, L. A. G. (2010). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*, *116*(3), 544–573. <https://doi.org/10.1002/cncr.24760>
- Ellingson, J. L. E., Anderson, J. L., Koziczowski, J. J., Radcliff, R. P., Sloan, S. J., Allen, S. E., & Sullivan, N. M. (2005). Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *Journal of Food Protection*, *68*(5), 966–972.
- Fietto, J. L. R., Araújo, R. S., Valadão, F. N., Fietto, L. G., Brandão, R. L., Neves, M. J., ... Castro, I. M. (2004). Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Canadian Journal of Microbiology*, *50*(8), 615–21. <https://doi.org/10.1139/w04-050>
- Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J. A., ... Segre, J. A. (2013). Human Skin Fungal Diversity. *Nature*, *498*(7454), 367–370. <https://doi.org/10.1038/nature11130>. Reduced
- Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. a, Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(34), 13780–13785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>
- Frykman, P. K., Nordenskjöld, A., Kawaguchi, A., Hui, T. T., Granström, A. L., Cheng, Z., ... Su, W. (2015). Characterization of bacterial and fungal microbiome in children with Hirschsprung disease with and without a history of enterocolitis: A multicenter study. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124172>
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1993). Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *Journal of Cell Biology*, *123*(6 II), 1777–1788. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.6.1777>
- Gabrilovich, D. I., Ostrand-R., S., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews. Immunology*, *12*(4), 253–68. <https://doi.org/10.1038/nri3175>
- Gale, C. a, Bendel, C. M., McClellan, M., Hauser, M., Becker, J. M., Berman, J., & Hostetter, M. K. (1998). Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science (New York, N.Y.)*, *279*(9), 1355–1358. <https://doi.org/10.1126/science.279.5355.1355>
- Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J., & Samson, R. A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, *59*, 1–10. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.01>
- Ghannoum, M. a, Jurevic, R. J., Mukherjee, P. K., Cui, F., Sikaroodi, M., Naqvi, A., & Gillevet, P. M. (2010). Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathogens*, *6*(1), e1000713. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000713>
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. a M., Antignac, A., Jéhanno, M., Viala, J., ... Philpott, D. J. (2003). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science (New York, N.Y.)*, *300*(5625), 1584–1587. <https://doi.org/10.1126/science.1084677>
- Giraud, F., Giraud, T., Aguilera, G., Fournier, E., Samson, R., Cruaud, C., ... Dupont, J. (2010). Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. *International Journal of Food Microbiology*, *137*(2–3), 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.014>
- Glass, N. L., & Donaldson, C. G. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(4), 1323–1330.
- Goodrich, J. K., Di Rienzi, S. C., Poole, A. C., Koren, O., Walters, W. A., Caporaso, J. G., ... Ley, R. E. (2014). Conducting a Microbiome Study. *Cell*, *158*(2), 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.037>
- Gouba, N., & Drancourt, M. (2015). Digestive tract mycobiota: A source of infection. *Medecine et Maladies*

- Infectieuses*, 45(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.01.007>
- Gouba, N., Raoult, D., & Drancourt, M. (2013). Plant and Fungal Diversity in Gut Microbiota as Revealed by Molecular and Culture Investigations. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059474>
- Gouba, N., Raoult, D., & Drancourt, M. (2014). Eukaryote culturomics of the gut reveals new species. *PloS One*, 9(9), e106994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106994>
- Gow, N. A. R., & Netea, M. G. (2016). Medical mycology and fungal immunology: new research perspectives addressing a major world health challenge. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0462>
- Groenewald, M., Coutinho, T., Smith, M. T., & van der Walt, J. P. (2012). Species reassignment of *Geotrichum bryndzae*, *Geotrichum phurueaensis*, *Geotrichum silvicola* and *Geotrichum vulgare* based on phylogenetic analyses and mating compatibility. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(12), 3072–3080. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.038984-0>
- Gupta, K. L., Kusum, J., Kamal, S., Kohli, H. S., Vivekanand, J., Radotra, B. D., & Vinay, S. (1999). Renal zygomycosis: an under-diagnosed cause of acute renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14, 2720–2725.
- Hallen-Adams, H. E., Kachman, S. D., Kim, J., Legge, R. M., & Martínez, I. (2015). Fungi inhabiting the healthy human gastrointestinal tract: A diverse and dynamic community. *Fungal Ecology*, 15, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.01.006>
- Hamad, I., Sokhna, C., Raoult, D., & Bittar, F. (2012). Molecular detection of eukaryotes in a single human stool sample from senegal. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040888>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hawser, S. P., & Douglas, L. J. (1995). Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(9), 2128–2131. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.9.2128>
- Heerd, B. G., Houston, M. A., & Augenlicht, L. H. (1994). Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Research*, 54(12), 3288–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8205551>
- Hermet, A., Méheust, D., Mounier, J., Barbier, G., & Jany, J. L. (2012). Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biology*, 116(6), 692–705. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.002>
- Hoffmann, C., Dollive, S., Grunberg, S., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., ... Bushman, F. D. (2013). Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PloS One*, 8(6), e66019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066019>
- Hogan, D., & Kolter, R. (2002). *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science*, 296(5576), 2229–2232. <https://doi.org/10.1126/science.1070784>
- Hooper, L. V. (2001). Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.881>
- Houbraken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus*, 2(1), 87–95. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2011.02.01.12>
- Houbraken, J., & Samson, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*, 70, 1–51. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.01>
- Hua, X., Yuan, X., & Wilhelmus, K. R. (2010). A fungal pH-responsive signaling pathway regulating *Aspergillus* adaptation and invasion into the cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(3), 1517–1523. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4348>
- Hwang, S. W. (1966). Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Applied Microbiology*, 14(5), 784–788.
- Ina, K., Itoh, J., Fukushima, K., Kusugami, K., Yamaguchi, T., Kyokane, K., ... Fiocchi, C. (1999). Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(April), 1081–1090. [https://doi.org/ji\\_v163n2p1081](https://doi.org/ji_v163n2p1081) [pii]

- Irinyi, L., Serena, C., Garcia-Hermoso, D., Arabatzis, M., Desnos-Ollivier, M., Vu, D., ... Meyer, W. (2015). International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database - The quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Medical Mycology*, 53(4), 313–337. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv008>
- Isolaauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanaukee, P., & Koivula, T. (1991). A Human Lactobacillus Strain (Lactobacillus casei sp strain GG) Promotes Recovery From Acute Diarrhea in Children. *Pediatrics*, 88(1), 90–97.
- Israeli, E., Grotto, I., Gilburd, B., Balicer, R. D., Goldin, E., Wiik, A., & Shoenfeld, Y. (2005). Anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic antibodies as predictors of inflammatory bowel disease. *Gut*, 54(9), 1232–1236. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.060228>
- Jacob, B., Ritz, B., Gehring, U., Koch, A., Bischof, W., Wichmann, H. E., & Heinrich, J. (2002). Indoor Exposure to Moulds and Allergic Sensitization. *Environmental Health Perspectives*, 110(7), 647–653. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110647>
- Jacques, N., Mallet, S., Laaghouti, F., Tinsley, C. R., & Casaregola, S. (2016). Specific populations of the yeast Geotrichum candidum revealed by molecular typing. *Yeast*, 34(4), 165–178. <https://doi.org/10.1002/yea.3223>
- Jimenez-Gonzalez, D. E., Martinez-Flores, W. A., Reyes-Gordillo, J., Ramirez-Miranda, M. E., Sara Arroyo-Escalante, Romero-Valdovinos, M., ... Maravilla, P. (2012). Blastocystis infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitology Research*, 110(3), 1269–1275. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2626-7>
- Johnston M, Hillier L, Riles L, Albermann K, Andre B, Ansorge W, Benes V, Bruckner M, Delius H, Dubois E, Dusterhoft A, Entian KD, Floeth M, Goffeau A, Hebling U, Heumann K, Heuss-Neitzel D, Hilbert H, Hilger F, Kleine K, Kotter P, Louis EJ, Messenguy F, et al. (1997). The nucleotide sequence of Saccharomyces cerevisiae chromosome XIII. *Nature*, 387(6632), 90–93.
- Juhász, Á., Engi, H., Pfeiffer, I., Kucsera, J., Vágvölgyi, C., & Hamari, Z. (2007). Interpretation of mtDNA RFLP variability among Aspergillus tubingensis isolates. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 91(3), 209–216. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9110-x>
- Juhász, A., Pfeiffer, I., Keszthelyi, A., Kucsera, J., Vágvölgyi, C., & Hamari, Z. (2008). Comparative analysis of the complete mitochondrial genomes of Aspergillus niger mtDNA type 1a and Aspergillus tubingensis mtDNA type 2b. *FEMS Microbiology Letters*, 281(1), 51–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01077.x>
- Kim, M.-S., Park, E.-J., Roh, S. W., & Bae, J.-W. (2011). Diversity and abundance of single-stranded DNA viruses in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 8062–70. <https://doi.org/10.1128/AEM.06331-11>
- Kim, S. J., & Shoda, M. (1999). Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from Geotrichum candidum Dec 1 Involved in Decolorization of Dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1029–1035.
- Klotz, S. a, Gaur, N. K., De Armond, R., Sheppard, D., Khardori, N., Edwards, J. E., ... El-Azizi, M. (2007). Candida albicans Als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. *Medical Mycology : Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 45(4), 363–370. <https://doi.org/10.1080/13693780701299333>
- Koji Atarashi, Takeshi Tanoue, Tatsuchiro Shima, Akemi Imaoka, Tomomi Kuwahara, Yoshika Momose, Genhong Cheng, Sho Yamasaki, Takashi Saito, Yusuke Ohba, Tadatsugu Taniguchi, Kiyoshi Takeda, Shohei Hori, Ivaylo I. Ivanov, Yoshinori Umesaki, Kikuji Itoh, and K. H. (2008). Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science*, 317(5), 724–732. <https://doi.org/10.1126/science.1158153>
- Kolařík, M., Kubátová, A., Hulcr, J., & Pažoutová, S. (2008). Geosmithia fungi are highly diverse and consistent bark beetle associates: Evidence from their community structure in temperate Europe. *Microbial Ecology*, 55(1), 65–80. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9251-0>
- Kostic, A. D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J. N., Gallini, C. A., Michaud, M., ... Garrett, W. S. (2013). Fusobacterium nucleatum Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host and Microbe*, 14(2), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.007>



- Kretschmar, M., Hube, B., Bertsch, T., Sanglard, D., Merker, R., Schröder, M., ... Nichterlein, T. (1999). Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. *Infection and Immunity*, 67(12), 6637–6642.
- Kühbacher, T., Ott, S. J., Helwig, U., Mimura, T., Rizzello, F., Kleessen, B., ... Schreiber, S. (2006). Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut*, 55(6), 833–841. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.078303>
- Kumamoto, C. A., & Vences, M. D. (2005). ALTERNATIVE *CANDIDA ALBICANS* LIFESTYLES: Growth on Surfaces. *Annual Review of Microbiology*, 59(1), 113–133. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121034>
- Kyzer, S., Begin, L. R., Gordon, P. H., & Mitmaker, B. (1992). The care of patients with colorectal polyps that contain invasive adenocarcinoma: Endoscopic polypectomy or colectomy? *Cancer*, 70(8), 2044–2050. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19921015\)70:8<2044::AID-CNCR2820700805>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19921015)70:8<2044::AID-CNCR2820700805>3.0.CO;2-X)
- Lalwani, S., Govindasamy, M., Gupta, M., Siraj, F., Varma, V., Mehta, N., ... Nundy, S. (2012). Gastrointestinal mucormycosis-four cases with different risk factors, involving different anatomical sites. *Indian Journal of Gastroenterology*, 31(3), 139–143. <https://doi.org/10.1007/s12664-012-0215-z>
- Le Bars, J. (1979). Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(6), 1052–1055.
- Lecellier, A., Mounier, J., Gaydou, V., Castrec, L., Barbier, G., Ablain, W., ... Sockalingum, G. D. (2014). Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *International Journal of Food Microbiology*, 168–169, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.011>
- Lee, S., & Yamamoto, N. (2015). Accuracy of the high-throughput amplicon sequencing to identify species within the genus *Aspergillus*. *Fungal Biology*, 119(12), 1311–1321. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.006>
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. a, Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11070–11075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>
- Li, Q., Wang, C., Tang, C., & He, Q. (2014). Dysbiosis of Gut Fungal Microbiota is Associated With Mucosal Inflammation in Crohn's Disease. *J Clin Gastroenterol [ ...]*, 48(6), 513–523. Retrieved from [http://pdfs.journals.lww.com/jcge/9000/00000/Dysbiosis\\_of\\_Gut\\_Fungal\\_Microbiota\\_is\\_Associated.98726.pdf](http://pdfs.journals.lww.com/jcge/9000/00000/Dysbiosis_of_Gut_Fungal_Microbiota_is_Associated.98726.pdf)
- Libkind, D., Gadanho, M., Van Broock, M., & Sampaio, J. P. (2008). Studies on the heterogeneity of the carotenogenic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* from Patagonia, Argentina. *Journal of Basic Microbiology*, 48(2), 93–98. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700257>
- Lin, S., Schranz, J., Teutsch, S. (2001). Aspergillosis case-fatality rate: systemic review of the literature. *Clin Infect Dis*, 32, 358–366. <https://doi.org/10.1086/318483>
- Lindberg, E., Tysk, C., Andersson, K., & Järnerot, G. (1988). Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut*, 29(3), 352–7. <https://doi.org/10.1136/gut.29.3.352>
- Liu, C., Finegold, S. M., Song, Y., & Lawson, P. A. (2008). Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydroge*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(8), 1896–1902. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65208-0>
- Liu, Y. J., Whelen, S., & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic Relationships Among Ascomycetes : Evidence from an RNA Polymerase II Subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 1799–1808.
- Lorch, J. M., Lindner, D. L., Gargas, A., Muller, L. K., Minnis, A. M., & Blehert, D. S. (2012). A culture-based survey of fungi in soil from bat hibernacula in the eastern United States and its implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. *Mycologia*, 105(May 2012), 237–52. <https://doi.org/10.3852/12-207>
- Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228>

- Luan, C., Xie, L., Yang, X., Miao, H., Lv, N., Zhang, R., ... Zhu, B. (2015). Dysbiosis of Fungal Microbiota in the Intestinal Mucosa of Patients with Colorectal Adenomas. *Scientific Reports*, 5(7980), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep07980>
- Lunardi, L. W., Aquino, V. R., Zimerman, R. a, & Goldani, L. Z. (2006). Epidemiology and outcome of *Rhodotorula fungemia* in a tertiary care hospital. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 43(6), e60–e63. <https://doi.org/10.1086/507036>
- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., ... Kikuchi, H. (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438(1476–4687 (Electronic)), 1157–1161. <https://doi.org/nature04300> [pii]r10.1038/nature04300
- Mager, D. L., Haffajee, A. D., Devlin, P. M., Norris, C. M., Posner, M. R., & Goodson, J. M. (2005). The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *Journal of Translational Medicine*, 3, 8. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-27>
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., & Dalcero, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37(2), 179–184. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01376.x>
- Main, J., Mckenzie, H., Yeaman, G. R., Kerr, M. a, Robson, D., & Pennington, C. R. (1988). Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* ( bakers '™ yeast ) in Crohn '™ s disease Rupture of tendon after cryotherapy for hand wart. *Genetics*, 297(October), 1105–1106.
- Mar Rodríguez, M., Pérez, D., Javier Chaves, F., Esteve, E., Marin-Garcia, P., Xifra, G., ... Fernández Real, J. M. (2015). Obesity changes the human gut mycobiome. *Scientific Reports*, 5, 14600. <https://doi.org/10.1038/srep14600>
- Marchandin, H., Damay, A., Roudière, L., Teyssier, C., Zornio, I., Dechaud, H., ... Jumas-Bilak, E. (2010). Phylogeny, diversity and host specialization in the phylum Synergistetes with emphasis on strains and clones of human origin. *Research in Microbiology*, 161(2), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.12.008>
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., ... Dejana, E. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *Journal of Cell Biology*, 142(1), 117–127. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.1.117>
- Martínez, M. E., Giovannucci, E., Spiegelman, D., Hunter, D. J., Willett, W. C., & Colditz, G. A. (1997). Leisure-Time Physical Activity, Body Size, and Colon Cancer in Women. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(13), 948–955.
- Mason, K. L., Downward, J. R. E., Mason, K. D., Falkowski, N. R., Eaton, K. a., Kao, J. Y., ... Huffnagle, G. B. (2012). *Candida albicans* and bacterial microbiota interactions in the cecum during recolonization following broad-spectrum antibiotic therapy. *Infection and Immunity*, 80(10), 3371–3380. <https://doi.org/10.1128/IAI.00449-12>
- McFarland, L. V., & Bernasconi, P. (1993). *Saccharomyces boulardii*. A Review of an Innovative Biotherapeutic Agent. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 6(208), 157–171. <https://doi.org/10.3109/08910609309141323>
- Mianroodi, A. A., Nasiri, D., Khanjani, N., Amin, S., & Mousavi, A. (2011). The Fungi Flora of Healthy Nasal Mucosa in Kerman , Iran. *Iranian Journal of Otorhinolaryngology*, 23(2), 21–28.
- Mima, K., Nishihara, R., Qian, Z. R., Cao, Y., Sukawa, Y., Nowak, J. A., ... Ogino, S. (2016). *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut*, (65), 1973–1980. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310101>
- Mima, K., Sukawa, Y., Nishihara, R., Qian, R., Yamauchi, M., Inamura, K., ... Medical, S. (2016). *Fusobacterium nucleatum* and T-cells in Colorectal Carcinoma. *JAMA Oncology*, 1(5), 653–661. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.1377.Fusobacterium>
- Minot, S., & Bryson, A. (2013). Rapid evolution of the human gut virome. *Proceedings of the ...*, 110(30), 12450–12455. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300833110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1300833110>
- Monteiro-da-Silva, F., Araujo, R., & Sampaio-Maia, B. (2014). Interindividual variability and intraindividual

- stability of oral fungal microbiota over time. *Medical Mycology*, 52(5), 498–505.  
<https://doi.org/10.1093/mmy/myu027>
- Morales, D. K., Grahl, N., Okegbe, C., Dietrich, L. E. P., Jacobs, N. J., & Hogan, D. a. (2013). Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *mBio*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00526-12>
- Morris, G. J., Smith, D., & Coulson, G. E. (1988). A Comparative Study of the Changes in the Morphology of Hyphae during Freezing and Viability upon Thawing for Twenty Species of Fungi. *Microbiology*, 134(11), 2897–2906. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-11-2897>
- Motooka, D., Fujimoto, K., Tanaka, R., & Yaguchi, T. (2017). Fungal ITS1 Deep-Sequencing Strategies to Reconstruct the Composition of a 26-Species Community and Evaluation of the Gut Mycobiota of Healthy Japanese Individuals, 8(February), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00238>
- Nelson, J. H. (1970). Production of blue cheese flavour via submerged fermentation by *Penicillium roqueforti*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(4), 567–69. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20033184449>
- Németh, T., Tóth, A., Hamari, Z., Falus, A., Éder, K., Vágvölgyi, C., ... Gácsér, A. (2014). Transcriptome profile of the murine macrophage cell response to *Candida parapsilosis*. *Fungal Genetics and Biology*, 65, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.01.006>
- Nosho, K., Sukawa, Y., Adachi, Y., Ito, M., Mitsunashi, K., Kurihara, H., & Kanno, S. (2016). Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(2), 557–566. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.557>
- Nottingham, P. M., & Hungate, R. E. (1968). Isolation of methanogenic bacteria from feces of man. *Journal of Bacteriology*, 96(6), 2178–2179.
- Noverr, M. C., & Huffnagle, G. B. (2004). Regulation of *Candida albicans* Morphogenesis by Fatty Acid Metabolites Regulation of *Candida albicans* Morphogenesis by Fatty Acid Metabolites. *Infection and Immunity*, 72(11), 6206–6210. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6206>
- Noverr, M. C., Noggle, R. M., Toews, G. B., & Huffnagle, G. B. (2004). Role of antibiotics and fungal microbiota in driving pulmonary allergic responses. *Infection and Immunity*, 72(9), 4996–5003. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.4996-5003.2004>
- Noverr, M. C., Phare, S. M., Toews, G. B., Coffey, M. J., & Huffnagle, G. B. (2001). Pathogenic Yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* Produce Immunomodulatory Prostaglandins. *Infection and Immunity*, 69(5), 2957–2963. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.2957>
- O’Sullivan, J., Jenkinson, H., & Cannon, R. (2000). Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. *Microbiology*, 146(1), 41–48. Retrieved from <http://mic.sgmjournals.org/content/146/1/41.short>
- Olarte, R. A., Horn, B. W., Singh, R., & Carbone, I. (2015). Sexual recombination in *Aspergillus tubingensis*. *Mycologia*, 107(2), 307–312. <https://doi.org/10.3852/14-233>
- Ott, S. J., Kühbacher, T., Musfeldt, M., Rosenstiel, P., Hellmig, S., Rehman, A., ... Schreiber, S. (2008). Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 43(7), 831–841. <https://doi.org/10.1080/00365520801935434>
- Pal, M. (1997). First report of isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from avian excreta in Kathmandu, Nepal. *Revista Iberoamericana de Micología*, 14(4), 181–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15538823>
- Pande, K., Chen, C., & Noble, S. (2013). Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nature Genetics*, 45(9), 1088–1038. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted>
- Pardini, B., Naccarati, a, Novotny, J., Smerhovský, Z., Vodickova, L., Polakova, V., ... Vodicka, P. (2008). DNA repair genetic polymorphisms and risk of colorectal cancer in the Czech Republic. *Mutation Research*, 638(1–2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.09.008>
- Park, H. G., Managbanag, J. R., Stamenova, E. K., & Jong, S. C. (2004). Comparative analysis of common indoor *Cladosporium* species based on molecular data and conidial characters. *Mycotaxon*. Retrieved from <http://ukpmc.ac.uk/abstract/AGR/IND43634446>

- Park, J. I., Grant, C. M., Attfield, P. V., & Dawes, I. W. (1997). The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(10), 3818–3824.
- Parker, R. G. F., & Kendall, E. J. C. (1954). The liver in Ulcerative colitis. *British Medical Journal*, 1953–1955.
- Pasanen, A.-L., Kalliokoski, P., Pasanen, P., Jantunen, M. J., & Nevalainen, A. (1991). Laboratory studies on the relationship between fungal growth and atmospheric temperature and humidity. *Environment International*, *17*(4), 225–228. [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(91\)90006-C](https://doi.org/10.1016/0160-4120(91)90006-C)
- Peterson, S. W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, *100*(2), 205–226. <https://doi.org/10.3852/mycologia.100.2.205>
- Pitt, J. I. (1978). *Geosmithia* gen. nov. for *Penicillium lavendulum* and related species. *Canadian Journal of Botany*, *57*(19), 2021–2030. <https://doi.org/10.1139/b79-252>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and food spoilage* (2nd editio). London: Blackie Academic and Professional. Retrieved from [https://scholar.google.cz/citations?view\\_op=view\\_citation&hl=cs&user=MrD03xAAAAAJ&citation\\_for\\_view=MrD03xAAAAAJ:u5HHmVD\\_uO8C](https://scholar.google.cz/citations?view_op=view_citation&hl=cs&user=MrD03xAAAAAJ&citation_for_view=MrD03xAAAAAJ:u5HHmVD_uO8C)
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food spoilage* (3 rd Editi). Springer. Retrieved from [https://scholar.google.nl/scholar?start=10&q=fmea+proces&hl=nl&as\\_sdt=0,5%5Cnhttps://scholar.google.nl/scholar?start=10&q=fmea+proces&hl=nl&as\\_sdt=0,5](https://scholar.google.nl/scholar?start=10&q=fmea+proces&hl=nl&as_sdt=0,5%5Cnhttps://scholar.google.nl/scholar?start=10&q=fmea+proces&hl=nl&as_sdt=0,5)
- Pryor, B. M., & Bigelow, D. M. (2003). Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium* and *Stemphylium*. *Mycologia*, *95*(6), 1141–1154. <https://doi.org/10.2307/3761916>
- Qadri, S. M., al-Okaili, G. A., & al-Dayel, F. (1989). Clinical significance of *Blastocystis hominis*. *J. Clin. Microbiol.*, *27*(11), 2407–2409. Retrieved from <http://jcm.asm.org/cgi/content/long/27/11/2407>
- Qiu, X., Zhang, F., Yang, X., Wu, N. N., Jiang, W., Li, X., ... Dieleman, L. A. (2015). Changes in the composition of intestinal fungi and their role in mice with dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scientific Reports*, *5*(April), 10416. <https://doi.org/10.1038/srep10416>
- Rabkin, J. M., Orolloff, S. L., Corless, C. L., Benner, K. G., Flora, K. D., Rosen, H. R., & Olyaei, a J. (2000). Association of fungal infection and increased mortality in liver transplant recipients. *American Journal of Surgery*, *179*(5), 426–430. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(00\)00366-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(00)00366-4)
- Raghuram, A., Restrepo, A., Safadjou, S., Cooley, J., Orloff, M., Hardy, D., ... Koval, C. (2012). Invasive Fungal Infections Following Liver Transplantation: Incidence, Risk Factors, Survival, and Impact of Fluconazole-Resistant *Candida parapsilosis* (2003-2007). *Liver Transplantation*, *18*(9), 1100–1109. <https://doi.org/10.1002/lt>.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., ... Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, *2*(4), 361–367. <https://doi.org/10.1038/86373>
- Rodriguez-Tudela, J. L., Diaz-guerra, T. M., Cano, V., Tapia, C., Perkins, A., Gomez-lopez, A., ... Cuenca-estrella, M. (2005). Susceptibility Patterns and Molecular Identification of *Trichosporon* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(10), 4026–4034. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4026>
- Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Snirc, A., Gillot, G., Coton, M., ... Giraud, T. (2014). Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Evolutionary Applications*, *7*(4), 433–441. <https://doi.org/10.1111/eva.12140>
- Rosenstiel, P., Fantini, M., Bräutigam, K., Kühbacher, T., Waetzig, G. H., Seeger, D., & Schreiber, S. (2003). TNF alfa and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, *124*(4), 1001–1009. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50157>
- Rossen, N. G., Bart, A., Verhaar, N., van Nood, E., Kootte, R., de Groot, P. F., ... van Gool, T. (2015). Low prevalence of *Blastocystis* sp. in active ulcerative colitis patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *34*(5), 1039–44. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2312-2>
- Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., & Han, Y. W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin / b -Catenin Signaling via its FadA Adhesin. *Cell*

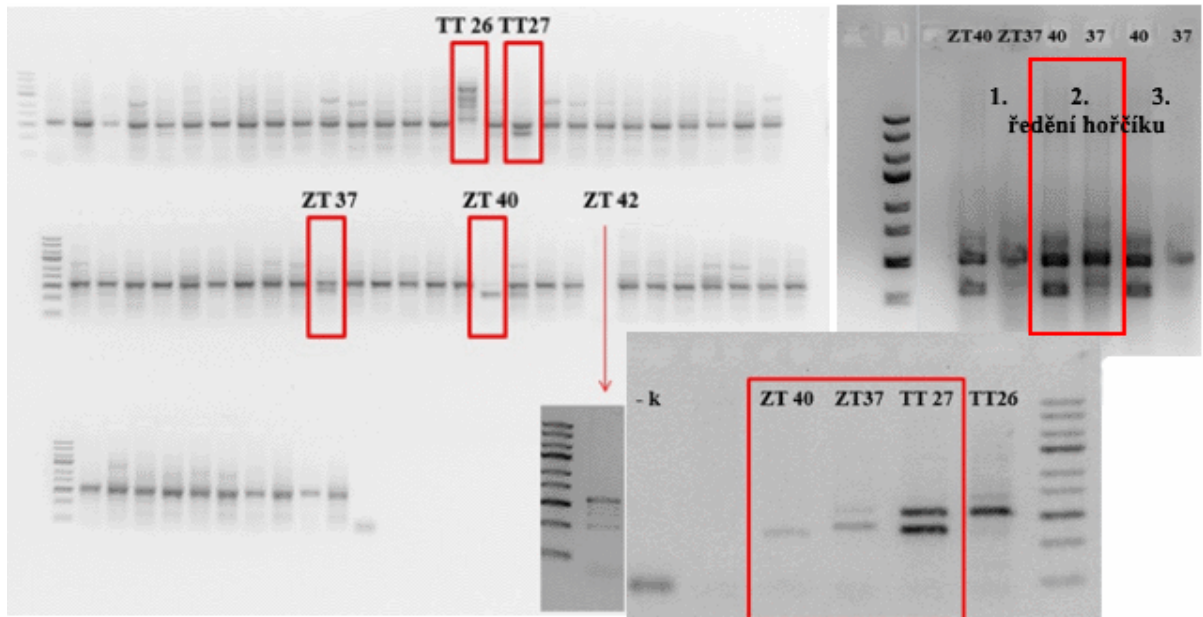
*Host and Microbe*, 14(2), 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.012>

- Rycovska, A., Valach, M., Tomaska, L., Bolotin-Fukuhara, M., & Nosek, J. (2004). Linear versus circular mitochondrial genomes: Intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 150(5), 1571–1580. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26988-0>
- Salyers, A. a, West, S. E., Vercellotti, J. R., & Wilkins, T. D. (1977). Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the Fermentation of Mucins and Plant Polysaccharides by Anaerobic Bacteria from the Human Colon. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34(5), 529–33.
- Samuel, B. S., Hansen, E. E., Manchester, J. K., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Fulton, R., ... Gordon, J. I. (2007). Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), 10643–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704189104>
- Saracli, M. A., Sener, K., Gonlum, A., Yildiran, S. T., & Wickes, B. L. (2003). Genotyping of clinical *Rhodotorula mucilaginosa* isolates by pulsed field gel electrophoresis Genotypisierung von klinischen *Rhodotorula mucilaginosa*-Isolaten durch Pulsfeld-Gelelektrophorese. *Mycoses*, 46, 487–491.
- Savage, D. C. (1969). Microbial interference between indigenous yeast and lactobacilli in the rodent stomach. *Journal of Bacteriology*, 98(3), 1278–1283.
- Scanlan, P. D., & Marchesi, J. R. (2008). Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *The ISME Journal*, 2(12), 1183–93. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.76>
- Scanlan, P. D., Stensvold, C. R., & Cotter, P. D. (2015). Development and application of *Blastocystis* subtype-specific PCR reveals that mixed subtype infections are common in a healthy human population. *Applied and Environmental Microbiology*, 353(April), AEM.00520-15. <https://doi.org/10.1128/AEM.00520-15>
- Scorzetti, G., & Fell, J. W. (2002). Systematics of basidiomycetous yeasts : a comparison of large subunit D1 / D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*, 1497(4), 495–517. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00117.x>
- Segain, J. P., Raingeard de la Blétière, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., ... Galmiche, J. P. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, 47(3), 397–403. <https://doi.org/10.1136/gut.47.3.397>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S. W., ... Hunter, J. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Sellart-Altisent, M., Torres-Rodríguez, J. M., Gómez de Ana, S., & Alvarado-Ramírez, E. (2007). Microbiota fúngica nasal en sujetos alérgicos y sanos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(2), 125–130. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70027-X](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70027-X)
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 0(0), 1–17. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>
- Söderholm, J. D., Olaison, G., Peterson, K. H., Franzén, L. E., Lindmark, T., Wirén, M., ... Sjö Dahl, R. (2002). Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*, 50(3), 307–13. <https://doi.org/10.1136/gut.50.3.307>
- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H., Jegou, S., Landman, C., ... Beaugerie, L. (2016). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*, 1–10. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310746>
- Sonjak, S., Frisvad, J. C., & Gunde-Cimerman, N. (2007). Genetic variation among *Penicillium crustosum* isolates from Arctic and other ecological niches. *Microbial Ecology*, 54(2), 298–305. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9202-1>
- Sonjak, S., Ličen, M., Frisvad, J. C., & Gunde-Cimerman, N. (2011). The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. *Food Microbiology*, 28(3), 373–376. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.09.007>
- Stensvold, C. R., Lebbad, M., & Verweij, J. J. (2011). The impact of genetic diversity in protozoa on molecular diagnostics. *Trends in Parasitology*, 27(2), 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.11.005>
- Stoll, N. R. (1999). This Wormy World Published by. *The Journal of Parasitology*, 85(3), 392–396.
- Suhr, M. J., Banjara, N., & Hallen-Adams, H. E. (2016). Sequence-based methods for detecting and evaluating

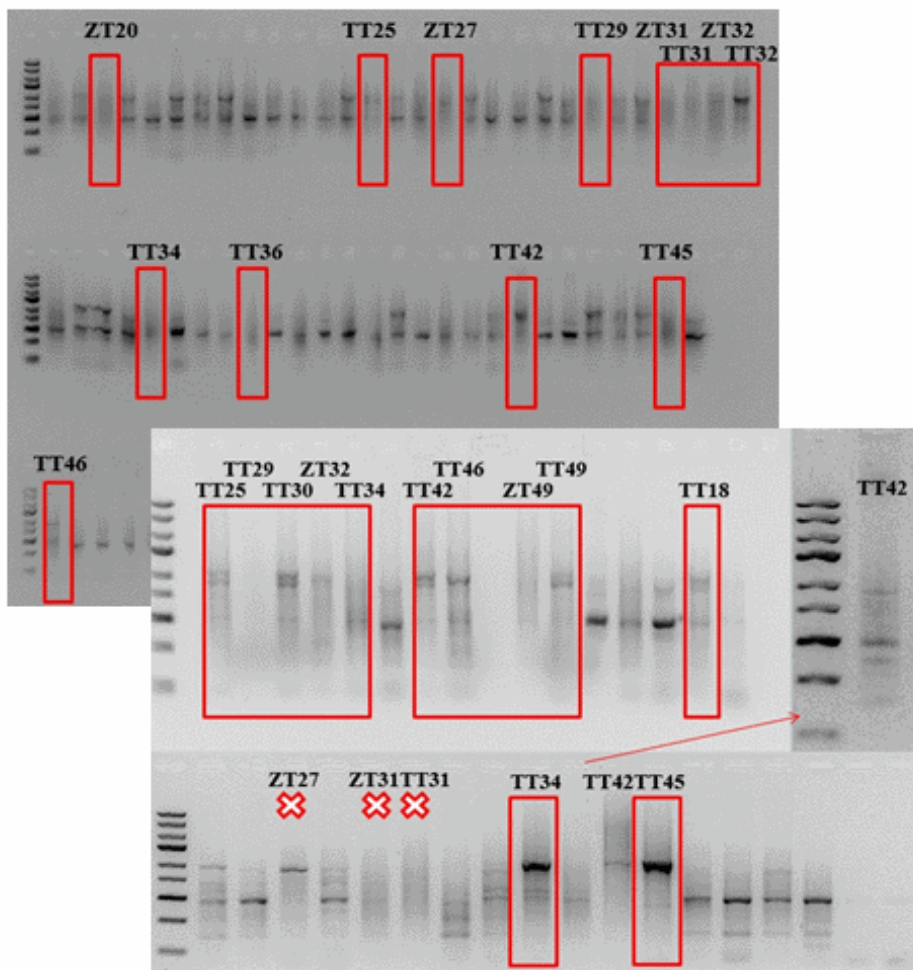
- the human gut mycobiome. *Letters in Applied Microbiology*, 62(3), 209–215.  
<https://doi.org/10.1111/lam.12539>
- Tabak, H. H., & Cooke, Wm., B. (1968). Growth and Metabolism of Fungi in an Atmosphere of Nitrogen  
 Author. *Mycologia*, 60(1), 115–140.
- Tajdini, F., Amini, M. A., Nafissi-Varcheh, N., & Faramarzi, M. A. (2010). Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from *Rhizomucor miehei* and *Mucor racemosus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(2), 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.05.002>
- Tan, C. S., & Stalpers, A. A. (1991). Freeze-Drying of fungal hyphae. *Mycologia*, 83(5), 103–113.  
<https://doi.org/10.1163/157338210X516242>
- Tan, T. C., Suresh, K. G., Thong, K. L., & Smith, H. V. (2006). PCR fingerprinting of *Blastocystis* isolated from symptomatic and asymptomatic human hosts. *Parasitology Research*, 99(4), 459–465.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-006-0177-0>
- Tang, J., Iliev, I. D., Brown, J., Underhill, D. M., & Funari, V. A. (2015). Mycobiome: Approaches to analysis of intestinal fungi. *Journal of Immunological Methods*, 421, 112–121.  
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.004>
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS ONE*, 7(7).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal of Clinicians.*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- Tungtrongchitr, A., Manatsathit, S., Kositchaiwat, C., Ongrotchanakun, J., Munkong, N., Chinabutr, P., ... Chaicumpa, W. (2004). *Blastocystis hominis* infection in Irritable bowel syndrome patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 35(3), 705–710.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. a, Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1031.  
<https://doi.org/10.1038/nature05414>
- van Woerden, H. C., Gregory, C., Brown, R., Marchesi, J. R., Hoogendoorn, B., & Matthews, I. P. (2013). Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma patients and non-atopic controls: a community based case control study. *BMC Infectious Diseases*, 13, 69. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-69>
- Vander Heiden, M., Cantley, L., & Thompson, C. (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic Requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033.  
<https://doi.org/10.1126/science.1160809.Understanding>
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823–6831.  
<https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
- Vitale, R. G., De Hoog, G. S., Schwarz, P., Dannaoui, E., Deng, S., Machouart, M., ... Walther, G. (2012). Antifungal susceptibility and phylogeny of opportunistic members of the order Mucorales. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(1), 66–75. <https://doi.org/10.1128/JCM.06133-11>
- Walsh, A. M., Sweeney, T., Bahar, B., & O'Doherty, J. V. (2013). Multi-Functional Roles of Chitosan as a Potential Protective Agent against Obesity. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053828>
- Walther, G., Pawłowska, J., Alastruey-Izquierdo, A., Wrzosek, M., Rodriguez-Tudela, J. L., Dolatabadi, S., ... de Hoog, G. S. (2013). DNA barcoding in *Mucorales*: an inventory of biodiversity. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 30(1), 11–47. <https://doi.org/10.3767/003158513X665070>
- Warren, R. L., Freeman, D. J., Pleasance, S., Watson, P., Moore, R. A., Cochrane, K., ... Holt, R. A. (2013). Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome*, 1(1), 16.  
<https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-16>
- Wei, Y., Gong, J., Zhu, W., Tian, H., Ding, C., Gu, L., ... Li, J. (2016). Pectin enhances the effect of fecal microbiota transplantation in ulcerative colitis by delaying the loss of diversity of gut flora. *BMC Microbiology*, 16(1), 255. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0869-2>

- Wellman, A. M., & Stewart, G. G. (1973). Storage of brewing yeasts by liquid nitrogen refrigeration. *Applied Microbiology*, 26(4), 577–83. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=379852&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–324). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578–6583. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y., Sue, A., ... Lewis, J. D. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*, 334(6052), 105–108. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>. Linking
- Wu, J., Guo, H., Yi, G., Zhou, L., He, X., Huang, X., ... Xu, J. (2014). Prevalent drug resistance among oral yeasts from asymptomatic patients in Hainan, China. *Mycopathologia*, 177(5–6), 299–307. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9747-3>
- Wu, T., & Samaranyake, L. P. (1999). The expression of secreted aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. *Journal of Medical Microbiology*, 48(8), 711–720. <https://doi.org/10.1099/00222615-48-8-711>
- Yasui, H., Kiyoshima, J., & Ushijima, H. (1995). Passive Protection against Rotavirus-Induced Diarrhea of Mouse Pups Born to and Nursed by Dams Fed *Bifidobacterium breve* YIT4064 Author ( s ): Hisako Yasui , Junko Kiyoshima and Hiroshi Ushijima Published by : Oxford University Press Stable URL : <http://w. The Journal of Infectious Diseases>, 172(2), 403–409.
- Zaas, A. K., Boyce, M., Schell, W., Lodge, B. A., Miller, J. L., & Perfect, J. R. (2003). Risk of Fungemia Due to *Rhodotorula* and Antifungal Susceptibility testing of *Rhodotorula* Isolates. *Microbiology*, 41(11), 5233–5235. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5233>
- Zalar, P., Frisvad, J. C., Gunde-Cimerman, N., Varga, J., & Samson, R. A. (2008). Four new species of *Emericella* from the Mediterranean region of Europe. *Mycologia*, 100(5), 779–795. <https://doi.org/10.3852/08-078>
- Zalar, P., Gostinčar, C., de Hoog, G. S., Uršič, V., Sudhaham, M., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*, 61, 21–38. <https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.02>
- Ze, X., Duncan, S. H., Louis, P., & Flint, H. J. (2012). *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *The ISME Journal*, 6(8), 1535–1543. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.4>
- Zeller, G., Tap, J., Voigt, A. Y., Sunagawa, S., Kultima, J. R., Paul, I., ... Zimmermann, J. (2014). Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Molecular Systems Biology*, 10(11), 1–18.
- Zhang, Y., Zhao, J., Fang, W., Zhang, J., Luo, Z., Zhang, M., ... Pei, Y. (2009). Mitogen-activated protein kinase *hog1* in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* regulates environmental stress responses and virulence to insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3787–3795. <https://doi.org/10.1128/AEM.01913-08>

## Přílohy



Obrázek 1: elektroforetogramy amplifikace úseku ITS2 u biotických vzorků pacientů s CRC, problematické vzorky jsou označeny a popsány.



Obrázek 2: elektroforetogramy amplifikace úseku 16S u biotických vzorků pacientů s CRC, problematické vzorky jsou označeny a popsány.



SAB	LÁTKY (g/l)	PDA	LÁTKY (g/l)	MEA	LÁTKY (g/l)	BHI	LÁTKY (g/l)	CA	LÁTKY (g/l)	CYAS	LÁTKY (g/l)	DRBC	LÁTKY (g/l)
ddH <sub>2</sub> O	1	ddH <sub>2</sub> O	1	ddH <sub>2</sub> O	1	ddH <sub>2</sub> O	1	ddH <sub>2</sub> O	1	ddH <sub>2</sub> O	1	ddH <sub>2</sub> O	1
glukóza	40	dextróza	20	glukóza	20	glukóza	2	sacharóza	30	sacharóza	30	glukóza	10
pepton	10	bramborová infuze	200	pepton	1	pepton	10	minerální roztok*	10 ml	NaNO <sub>3</sub>	2	pepton	5
agar	15	agar	15	agar	15	agar	10	agar	15	agar	15	agar	15
				malt extrakt	30	NaCl	5	Cu-Zn koncentrát^	1 ml	MgSO <sub>4</sub>	0.5	MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	0.5
				minerální roztok*	1 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
						infuze z mozků	12.5			KCl	0.5	dichloran	1 ml
						infuze ze hovězích srdcí	5			FeSO <sub>4</sub>	0.01	bengálská červeň	500 ul

Tabulka 1: Složení kultivačních médií; \* 0.005 % CuSO<sub>4</sub>, 0.01 % ZnSO<sub>4</sub>; ^ 0.3 % NaNO<sub>3</sub>, 0.05 % KCl, 0.05 % MgSO<sub>4</sub>, 0.001 % FeSO<sub>4</sub>

PACIENT 1 - KVASINKY		čerstvé	3 dny			14 dní		
médium	miska	RT	lednice	-25	-80	lednice	-25	-80
DRBC	1	16.427	19.860	1.493	2.857	20.622	0.243	1.304
DRBC	2	8.713	16.639	0.213	2.143	18.715	0.243	1.118
DRBC	3	17.154	19.055	2.133	4.523	25.994	0.365	1.863
SAB	1	13.251	19.860	2.133	3.333	19.582	0.486	2.980
SAB	2	13.069	16.102	0.427	2.143	17.676	0.365	1.676
SAB	3	13.069	18.652	2.133	2.381	18.889	0.365	2.328
BHI	1	14.521	17.176	1.493	2.976	16.809	0.243	1.676
BHI	2	19.604	20.396	1.707	3.333	25.994	0.243	2.421
BHI	3	17.789	17.713	1.707	3.095	21.315	0.243	2.235
sušina ze vzorku (%)		44.073	29.802	18.759	33.604	23.083	32.919	42.952

Tabulka 2: počty 10<sup>3</sup> kvasinkovitých kolonií formujících jednotek/gram (CFU/g) sušiny vzorku stolice pacienta 1 za daných proměných, popisky: RT = pokojová teplota.

PACIENT 2 - KVASINKY		čerstvé	3 dny			14 dní		
médium	miska	RT	lednice	-25	-80	lednice	-25	-80
DRBC	1	60.707	51.252	20.481	24.743	6.984	14.041	2.271
DRBC	2	62.258	67.799	23.582	32.750	8.264	18.571	2.378
DRBC	3	58.573	43.765	15.031	21.929	5.639	11.893	2.129
SAB	1	29.093	18.718	14.047	25.392	4.526	10.935	1.748
SAB	2	39.251	31.196	17.102	32.750	4.591	12.235	1.986
SAB	3	45.882	46.794	17.553	32.822	8.031	16.792	2.010
BHI	1	27.153	33.692	12.080	22.506	3.634	11.058	1.879
BHI	2	21.820	30.156	11.965	20.342	3.169	9.457	1.284
BHI	3	70.792	43.882	17.114	35.347	4.436	11.852	1.879
sušina ze vzorku (%)		32.998	30.773	34.569	5.545	30.929	29.234	33.642

Tabulka 3: počty 10<sup>4</sup> kvasinkovitých CFU/g sušiny vzorku stolice pacienta 2 za daných proměných, popisky: RT = pokojová teplota.

VZOREK 1 - VLÁKNITÉ		čerstvé	3 dny			14 dní		
médium	miska	RT	lednice	-25	-80	lednice	-25	-80
DRBC	1	0.908	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
DRBC	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
DRBC	3	0.908	1.342	6.399	1.190	3.466	0.000	0.931
SAB	1	0.000	1.342	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SAB	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SAB	3	2.723	5.367	2.133	1.190	0.000	1.215	0.000
BHI	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
BHI	2	0.000	0.000	2.133	1.190	0.000	0.000	0.000
BHI	3	0.000	1.342	2.133	1.190	1.733	0.000	0.931
sušina ze vzorku (%)		44.073	29.802	18.759	33.604	23.083	32.919	42.952

Tabulka 4: počty vláknitých CFU/g sušiny vzorku stolice pacienta 1 za daných proměných, popisky: RT = pokojová teplota.

VZOREK 2 - VLÁKNITÉ		čerstvé RT	3 dny			14 dní		
médium	miska		lednice	-25	-80	lednice	-25	-80
DRBC	1	58.185	41.595	8.100	14.427	20.692	19.160	1.189
DRBC	2	41.215	22.097	4.628	7.214	20.692	19.160	1.189
DRBC	3	69.095	71.491	8.100	21.641	32.332	30.108	10.703
SAB	1	4.849	1.300	2.314	7.214	10.346	15.054	0.000
SAB	2	7.273	22.097	4.628	21.641	20.692	19.160	4.757
SAB	3	6.061	5.199	3.471	21.641	20.692	19.160	4.757
BHI	1	55.761	18.198	9.257	7.214	14.226	20.528	3.568
BHI	2	87.278	42.895	11.571	28.854	34.919	34.214	4.757
BHI	3	60.610	24.697	10.414	14.427	32.332	24.634	4.757
sušina ze vzorku (%)		32.998	30.773	34.569	5.545	30.929	29.234	33.642

Tabulka 5: počty vláknitých  $10^2$  CFU/g sušiny vzorku stolice pacienta 2 za daných proměných, popisky: RT = pokojová teplota.

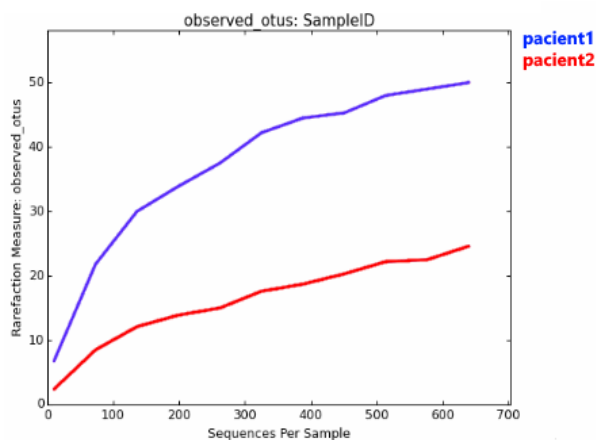
Pacient 2	
Sequencing	Počet sekvencí
<i>Penicillium roqueforti</i>	6360
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	831
<i>Rhodotorula sp. GM5</i>	302
<i>Penicillium digitatum</i>	236
<i>Candida albicans</i>	68
<i>Rhodospiridium Babjevae</i>	66
<i>Debaryomyces sp. F0210-40LL4</i>	34
<i>Aureobasidium sp. UY4</i>	25
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	15
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	12
<i>Aspergillus niger</i>	11
<i>Candida santamariae</i>	10
<i>Cryptococcus sp. BF108</i>	10
<i>Cryptococcus sp. FA-D1</i>	9
<i>Scleroderma areolatum</i>	13
<i>Cladosporium herbarum</i>	18
<i>Cryptococcus victoriae</i>	7
<i>Massarina sp. JP-2013</i>	11
<i>Cintractia sorghi</i>	4
<i>Xerocomus badius</i>	3
<i>Boletus edulis</i>	3
<i>Aschersonia tamurai</i>	3
<i>Verpa bohemica</i>	4
<i>Aspergillus flavus</i>	3
<i>Pseudozyma antarctica</i>	2

Pacient 1	
Sequencing	Počet sekvencí
<i>Rhodospiridium Babjevae</i>	86
<i>Penicillium roqueforti</i>	54
<i>Candida albicans</i>	35
<i>Massarina sp. JP-2013</i>	24
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	30
<i>Rhodotorula sp. GM5</i>	12
<i>Thecaphora amaranthi</i>	12
<i>Penicillium digitatum</i>	9
<i>Lentinula edodes</i>	5
<i>Cintractia sorghi</i>	4
<i>Cladosporium herbarum</i>	11
<i>Scleroderma areolatum</i>	8
<i>Lysurus cruciatus</i>	15
<i>Verpa bohemica</i>	1

Tabulka 6: detekované složení mykobiomu z čerstvých vzorků stolice amplifikovaných na ITS1 a sekvenovaných na platformě Illumina Miseq.

FÁZE	OPAKOVÁNÍ	TEPLOTA (°C)	ČAS
1.	-	95	3 m
2.	40	94	30 s
	40	59	40 s
	40	72	60 s
křivka tání	-	95	

Tabulka 7: q PCR cyklus využitý na validaci vyvazovacího kitu Microbial Enrichment.



Obrázek 3: refrakční křivka operačních taxonomických jednotek (OTU) z čerstvých vzorků stolice amplifikovaných na ITS1 a sekvenovaných na platformě Illumina Miseq.



Subjekt-pacient 1	Teplota (°C)			Médium			Délka uchování			Subjekt-pacient 1	Teplota (°C)			Médium			Délka uchování (dny)		
	5	-25	-80	DRBC	SAB	BHI	3	14	Druh		5	24	37	45	DRBC	SAB	BHI	3	14
<i>Aspergillus fumigatus</i>	45	0	0	0	0	45	45	0	<i>Geotrichum candidum</i>	30	0	0	0	0	30	0	30	0	
<i>Alternaria infectoria</i>	0	0	40	0	0	40	40	0	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0	0	212	151	0	61	0	212	
<i>Aspergillus sydowii</i>	0	71	0	0	0	71	71	0	<i>Aspergillus tubingensis</i>	0	30	0	0	30	0	0	30	0	
<i>Aspergillus tubingensis</i>	45	0	0	45	0	0	45	0	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0	182	0	0	61	0	121	0	182	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	102	71	71	102	45	97	156	89	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	7291	121	0	0	363	151	6898	272	7140	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	45	0	0	45	0	0	45	0	<i>Penicillium raqaeiforti</i>	0	91	0	0	0	91	0	91	0	
<i>Aspergillus aureus</i>	0	71	0	0	71	0	71	0	<i>Alternaria infectoria</i>	212	0	0	0	0	0	212	212	0	
<i>Geosmithia sp. 3</i>	0	71	40	0	40	71	111	0	<i>Penicillium crustosum</i>	30	0	0	0	30	0	0	30	0	
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	58	0	40	97	0	0	40	58	<i>Aspergillus oryzae</i>	0	454	0	0	242	121	91	454	0	
<i>Mucor plumbeus</i>	0	71	0	0	71	0	71	0	<i>Candida parapsilosis</i>	121	30	0	0	0	0	151	30	121	
<i>Mucor plumbeo</i>	0	71	0	71	0	0	71	0	<i>Candida albicans</i>	61	71428	74665	0	47588	55938	42627	68100	78053	
<i>Alternaria destruens</i>	58	41	0	58	41	0	58	98	<i>Orygenales sp.</i>	30	0	0	0	0	0	30	0	30	
<i>Penicillium raqaeiforti</i>	0	0	71	0	0	71	40	31	<i>Dothideomycetes sp.</i>	61	0	0	0	30	0	0	0	61	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9273	4163	1918	2752	4142	8461	12091	3263	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1966	10528	8683	0	10377	908	9893	14945	6232	
<i>Saccharomyces boulardii</i>	0	0	31	0	0	31	0	31	<i>Saccharomyces boulardii</i>	0	30	0	0	30	0	0	30	0	
<i>Candida parapsilosis</i>	96727	1096	11969	43039	34215	32538	50666	59127	<i>Hormographiella aspergillata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Candida albicans</i>	179	0	0	0	179	0	179	0											
<i>Trichosporon coremiforme</i>																			
Subjekt-pacient 2	Teplota (°C)			Médium			Délka uchování			Subjekt-pacient 2	Teplota (°C)			Médium			Délka uchování (dny)		
Druh	5	-25	-80	DRBC	SAB	BHI	3	14	Druh		5	24	37	45	DRBC	SAB	BHI	3	14
<i>Geotrichum candidum</i>	11847	7182	3319	8944	5558	7845	10923	11425	<i>Geotrichum candidum</i>	30626	18384	0	40	18990	10020	20040	29253	19798	
<i>Penicillium camemberti</i>	519	460	679	798	860	0	1102	556	<i>Penicillium camemberti</i>	1131	364	0	40	889	606	40	1535	0	
<i>Microascales sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	<i>Mucor mucedo</i>	40	0	0	0	0	40	0	40	0	
<i>Penicillium raqaeiforti</i>	86	404	320	323	82	405	279	530	<i>Penicillium crustosum</i>	283	202	0	0	485	0	0	485	0	
<i>Penicillium griseofulvum</i>	172	0	0	0	172	0	172	0	<i>Aspergillus oryzae</i>	0	40	0	0	40	0	0	40	0	
<i>Penicillium crustosum</i>	907	46	0	866	86	0	303	649	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2316	635879	400937	40	340660	514392	184121	1039173	0	
<i>Aspergillus oryzae</i>	43	91	240	240	0	135	284	91	<i>Candida albicans</i>	189	12202	465972	0	12391	356234	109737	478362	0	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	609512	494637	741675	1147258	522467	176100	1470096	375728	<i>Trichosporon coremiforme</i>	1737	646	2747	0	646	40	4444	4970	162	
<i>Candida albicans</i>	15720	36256	3171	18891	36256	0	49183	5965	<i>Pseudogymnoascus sp.</i>	0	0	40	0	0	40	0	40	0	
<i>Trichosporon coremiforme</i>	1642	431	1440	645	0	2868	2281	1232	<i>Aspergillus tubingensis</i>	0	0	40	0	40	0	0	40	0	
<i>Hormographiella aspergillata</i>	0	46	0	0	46	0	0	46	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2545	606	768	0	2747	1051	121	3919	0	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3021	979	679	2069	2521	89	1473	3205											

Tabulka 9: sumární počty detekovaných kolonií CFU/g sušiny daných druhů ve vzorcích stolice za daných proměných; použité k výpočtu Simpsonova indexu diverzity.

Teplota (°C) - pacient 1				Teplota (°C) - pacient 2				Médium - pacient 1			Médium - pacient 2			Aerobie - pacient 1		Aerobie - pacient 2	
5	24	37	45	5	24	37	45	DRBC	SAB	BHI	DRBC	SAB	BHI	aerobní	anaerobní	aerobní	anaerobní
666	14158	12222	0	9939	200848	157899	0	666	424	242	9939	6626	8970	666	817	9939	4040
424	13221	13553	0	6626	381333	490384	81	14158	13221	17305	200848	381333	79515	424	514	6626	4000
242	17305	12434	0	8970	79515	222222	40	12222	13553	12434	157899	490384	222222	242	7139	8970	5293
817	16095	14794	151	4040	4162	0	0	0	0	0	0	81	40	14158	16095	200848	4162
514	16700	12858	0	4000	0	0	0	817	514	7139	4040	4000	5293	13221	16700	381333	0
7139	4962	17940	61	5293	2465	0	0	16095	16700	4962	4162	0	2465	17305	4962	79515	2465
								14794	12858	17940	0	0	0	12222	14794	157899	0
								151	0	61	0	0	0	13553	12858	490384	0
														12434	17940	222222	0
														0	151	0	0
														0	0	81	0
														0	61	40	0

Teplota (°C) - pacient 1			Teplota (°C) - pacient 2			Médium - pacient 1			Médium - pacient 2			Délka		Délka	
5	-25	-80	5	-25	-80	DRBC	SAB	BHI	DRBC	SAB	BHI	3 dny	14 dní	3 dny	14 dní
18563	1422	3095	547230	147609	266182	18563	13061	18473	547230	953	2860	18563	21892	547230	45351
13061	1635	2658	953	104217	304896	1422	1635	1778	147609	104217	41309	13061	18715	953	44316
18473	1778	3055	2860	41309	120708	3095	2658	3055	266182	304896	120708	18473	15827	2860	2759
21892	284	1024	45351	150632	23031	21892	18715	15827	45351	44316	2759	1422	284	147609	150632
18715	365	2297	44316	94202	19463	284	365	243	150632	94202	2646	1635	365	104217	94202
15827	243	2049	2759	2646	17244	1024	2297	2049	23031	19463	17244	1778	243	41309	2646
												3095	1024	266182	23031
												2658	2297	304896	19463
												3055	2049	120708	17244

Tabulka 10: sumární počty celkových detekovaných kolonií CFU/g sušiny ve vzorcích stolice za daných proměných; použité ke grafům závislosti počtu CFU na podmínkách.

	Teplota				Médium			Aerobie	
	5°C	24°C	37°C	45°C	DRBC	SAB	BHI	aerobní	anaerobní
<b>pacient 1</b>	0.406	0.233	0.195	0.000	0.316	0.046	0.456	0.315	0.270
<b>pacient 2</b>	0.368	0.094	0.501	0.667	0.179	0.497	0.543	0.460	0.016

	Teplota			Médium			Délka uchování	
	5°C	-25°C	-80°C	DRBC	SAB	BHI	3 dny	14 dní
<b>pacient 1</b>	0.168	0.434	0.269	0.132	0.208	0.341	0.332	0.108
<b>pacient 2</b>	0.102	0.158	0.026	0.054	0.150	0.115	0.083	0.115

Tabulka 11: Simpsonův index diverzity v závislosti na podmínkách kultivace nebo uchování vzorku.