

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Molekulární diagnostika fungálních patogenů
z klinických vzorků**

Diplomová práce

Bc. Jana Cimická

Školitel: RNDr. Kateřina Černá, Ph.D.

České Budějovice 2020

Cimická, J. 2020: Molekulární diagnostika fungálních patogenů z klinických vzorků. [Molecular diagnostic of fungal pathogens from clinical samples. Mgr. Thesis, in Czech] – 57 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This study is focused on optimization and use of molecular methods in mycological diagnostics. The patient's life often depends on early diagnosis, which current culture methods cannot provide. The solution is based on pan-fungal primers of ITS region and next generation sequencing (NGS). These methods were used for fungal detection from FFPE tissue samples from patients with ulcerative colitis (UC), Crohn disease (CD) and 10 controls without chronic inflammatory changes in the intestine.

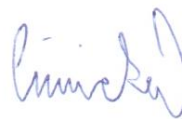
Results of this study have three levels. Firstly, the process of optimization highlights the importance of sterile DNA isolation in a laminar box which can prevent contamination by *Malassezia spp.* Secondly, raw data showed balanced rate of Ascomycota and Basidiomycota in CD samples similar to negative controls, while UC samples indicated higher representation of Ascomycota than other groups. Thirdly, detailed data showed fungal genera *Malassezia*, *Cladosporium* and *Toninia* in all groups, while genus *Candida* was found only in UC samples and genera *Engyodontium* and *Ramularia* were found in CD samples.

In conclusion, mycobiome plays a role in inflammatory bowel diseases; however, its compartments are still questionable. The optimization of pan-fungal nested PCR and NGS helped with introduction of mycological diagnostics from FFPE samples to *Bioptická laboratoř s.r.o.* and is used for differential diagnostics.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 18. 5. 2020



.....
Bc. Jana Cimická

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala školitelce své diplomové práce RNDr. Kateřině Černé, Ph.D. za ochotu, trpělivost, odborné rady a inspiraci. Také bych ráda poděkovala RNDr. Janě Němcové, Ph.D. za motivaci a odbornou konzultaci, a Ing. Miloslavě Kavkové, PhD. za možnost konzultovat získané výsledky na pracovišti VÚM v Táboře. Dále bych chtěla poděkovat celé společnosti Biopická laboratoř s.r.o. za financování výzkumu a vynikající pracovní prostředí. Poděkování také patří RNDr. Ivě Traxmandlové, Ph.D. za pomoc se statistickým zpracováním dat. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat mojí mamce, která mě neustále podporuje po celou dobu mého studia.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Fungi	2
1.1.1	Stavba fungální buňky.....	3
1.1.2	Fungální genetické markery	4
1.2	Střevní mykobiom.....	5
1.2.1	Zdravý střevní mykobiom	5
1.2.2	Střevní mykobiom u pacientů s IBD	5
1.2.3	Úloha fungálních druhů ve střevním mykobiomu.....	6
1.2.4	Vliv některých léků na střevní mykobiom	7
1.3	IBD.....	8
1.3.1	Obecná genetika	8
1.3.2	Environmentální vlivy.....	8
1.3.3	Bariéerní funkce střeva	9
1.3.4	Mechanismus a mutace NOD2 receptoru.....	9
1.3.5	Imunitní odpověď.....	10
1.3.6	Crohnova choroba	12
1.3.7	Ulcerózní kolitida.....	12
1.3.8	Epidemiologie Crohnovi choroby a ulcerózní kolitidy	13
2	Cíle práce	14
3	Materiál a metody	15
3.1	Výběr a odběr vzorků.....	15
3.2	Izolace DNA.....	15
3.3	PCR a její modifikace	16
3.3.1	Design primerů.....	16
3.3.2	PCR úseku ITS 2.....	16
3.3.3	Nested PCR úseku ITS 1 - ITS 2.....	17
3.3.4	Vizualizace produktů	17
3.3.5	Přečištění PCR reakce	18
3.4	Sekvenační reakce – Sangerovo sekvenování	18
3.4.1	Přečištění sekvenační reakce.....	18
3.5	Sekvenování nové generace (NGS).....	19
3.5.1	Vstupní úprava vzorků	19
3.5.2	Fragmentace	19

3.5.3	End Repair & A-Tailing.....	19
3.5.4	Adaptorová ligace	20
3.5.5	Postligační čištění.....	20
3.5.6	Amplifikace knihovny.....	20
3.5.7	Postamplifikační čištění	20
3.5.8	Finální úprava knihovny.....	20
3.5.9	Parametry sekvenování	21
3.5.10	Práce s datovými výstupy.....	21
3.6	Statistická analýza.....	21
4	Výsledky	22
4.1	Porovnání izolačních kitů.....	22
4.2	Analýza primerů.....	23
4.3	Vliv způsobu izolace na výsledek	24
4.4	Porovnání Sangerovi sekvenace s NGS	25
4.5	Fungální zastoupení v diagnózách	26
4.5.1	Hrubá analýza fungálních oddělení ve vztahu k diagnóze	26
4.5.2	Detailní statistická analýza fungálních oddělení ve vztahu k diagnóze	27
4.5.3	Přehled nejčastějších fungálních rodů ve vztahu k diagnóze	28
4.5.4	Fungální rody u pacientů s ulcerózní kolitidou.....	29
4.5.5	Fungální rody u pacientů s Crohnovou chorobou	30
4.5.6	Fungální rody v negativních kontrolách.....	31
5	Klinické zkušenosti z praxe	32
5.1	Kazuistika č. 1	32
5.2	Kazuistika č. 2.....	33
5.3	Kazuistika č. 3.....	34
6	Diskuze.....	35
6.1	Metodický rozbor	35
6.2	Klinický rozbor	37
7	Závěr	40
8	Seznam použitých zkratk.....	41
9	Seznam použité literatury.....	42
10	Přílohy	48

1 Úvod

Mykologické infekce jsou nejvíce zanedbávanou oblastí diagnostiky infekčních onemocnění pomocí molekulárně biologických metod, avšak v poslední době potřeba včasného a přesného určení kauzálního mykotického agens nabývá na vážnosti. Vzhledem k narůstajícímu počtu pacientů s oslabenou imunitou vzniká „úrodná půda“ pro mykologická onemocnění. Ohrožení jsou hlavně pacienti s AIDS, autoimunitním onemocněním, po orgánové transplantaci a pacienti v léčbě nádorového onemocnění.

Pacientův život mnohdy závisí na rychlé diagnostice, což nynější metody úplně neumožňují. Dostupné techniky průkazu mykologické infekce jsou pomalé, nedostatečně citlivé a málo specifické. Dále jsou také náročné pro personál a zatížené osobní interpretací.

Určování závažných mykologických druhů pomocí molekulárních metod založených na stabilních genotypových charakteristikách je nejrychlejší cesta ke specifickému výsledku (Shadrivova a kol. 2019). K rychlosti testu přispívá hlavně možnost analyzovat DNA přímo ze vzorku tkáně nebo tělních tekutin, namísto čekání na výsledky z kultivace, která může trvat až několik týdnů (Votava a kol. 2010). Zároveň mykologická kultivace nemůže zastihnout všechny fungální druhy najednou, jelikož každý druh má specifické kultivační podmínky a mnohé z nich jsou nekultivovatelné. Vznikají tak falešně negativní výsledky, které ohrožují pacientův život.

Mezi onemocnění, které nemají zcela objasněnou příčinu vzniku, můžeme najít i idiopatické střevní záněty (IBD). Crohnova choroba a ulcerózní kolitida jsou typičtí zástupci této skupiny. Etiologie těchto onemocnění je velmi bohatá a zaznamenává změny na genetické, imunologické i histologické úrovni. V posledních letech byl také intenzivně zkoumán střevní mikrobiom a jeho úloha v patogenezi IBD. Podle Ramos a Papadakis (2019) a dalších, mykobiom má svou úlohu v patogenezi IBD, avšak jeho složení a role určitých komponent je velmi diskutabilní.

V našem retrospektivním výzkumu se proto zaměřujeme na optimalizaci molekulárních metod pro průkaz klinicky závažných mykologických druhů způsobující komplikace pacientům s Crohnovou chorobou nebo ulcerózní kolitidou.

1.1 Fungi

Fungi neboli houby, jsou skupinou heterotrofních eukaryotních organismů. Mají dynamický metabolismus, vysokou schopnost adaptace a možnost pohlavního i nepohlavního rozmnožování. Díky těmto mechanismům rychle kolonizují prostředí. V případě vzniku nepříznivých podmínek mají možnost přežití v podobě velice odolných spor. Výjimečným obranným způsobem fungálních spor je obsah černého barviva melanoidní povahy ve stěně endospory. Toto barvivo chrání spory před účinky slunečního a UV záření. Klíčením spory vzniká hyfa (vlákno), která se může větvit v přibližně pravém úhlu. Hyfy rostou apikálně, proplétají se mezi sebou a vzniká tak mycelium. Mezi jednotlivými hyfami může zároveň vznikat propojení sloužící k výměně obsahu hyf. Při růstu dochází k selekci, kdy substrátové mycelium má za úkol příjem živin a exkreci metabolitů, zatímco vzdušné mycelium je hydrofobní a zajišťuje reprodukci. Na morfologii substrátového a vzdušného mycelia je založena mikroskopická diagnostika (Němec a Matoulková 2015).

V lidském mykobiomu se obvykle vyskytují kvasinky, vláknité houby (mikromycety) a dimorfické mikromycety. Pro lékařské účely se houby dále třídí na původce systémových onemocnění, onemocnění podkoží či povrchových onemocnění kůže (Schindler 2014). Nejvýznamnější mykobiální druhy patří do oddělení Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota a Mucoromycotina.

Fungální klasifikace se potýká se dvěma hlavními problémy. Za prvé, některé houby jsou dimorfní, neboli mající schopnost morfologické změny mezi hyfoidní a kvasinkovou formou. Tento přesmyk je závislý na podmínkách okolního prostředí. Za druhé, fungi ve svém životním cyklu procházejí určitými fázemi pohlavního a nepohlavního stádia, které mají odlišný vzhled. Tyto dva faktory v minulosti způsobily označení jednoho fungálního druhu za dva odlišné a kvůli přetrvávajícím misidentifikacím ve fungálních databázích ovlivňují fungální klasifikaci dodnes (Nash a kol. 2017).

V současnosti již existují online servery (např. <https://www.uniprot.org/>), které uspořádaly dostupná data a neustále sjednocují fungální názvy a klasifikaci.

1.1.1 Stavba fungální buňky

Fungální buňky se morfologicky nijak zásadně neodlišují od ostatních eukaryotických buněk. Mají však několik modifikací, které je činní značně odolnější.

Buněčná stěna je velmi pevná a tvořená vrstvami semikrystalických chitinových mikrofibril, které jsou zanořeny do amorfni matrix β -glukanu. Dále se zde vyskytují manany, polysacharidy složené z glukózaminu, látky podobné ligninu, celulóza, enzymaticky aktivní i strukturální bílkoviny a vosky, které zaručují hydrofobní vlastnosti hyf.

Cytoplazma odpovídá chemickým složením eukaryotním buňkám, avšak vyskytuje se v ní větší množství tukových kapének, které slouží jako hlavní zásobní látka. U mikromycet se v cytoplazmě mohou hromadit různé metabolity i antibiotické povahy, steroidy, alkaloidy nebo terpeny.

Vakuola je zásobní organela fungální buňky, která se zároveň významně podílí na udržování intracelulárního pH (6,2-6,4). Také se vyznačuje značnou hydrolytickou aktivitou a obsahuje proteázy, esterázy a endonukleázy, takže zároveň plní funkci lysozomu.

Ribozomy se nacházejí v cytozolu a skládají se ze dvou podjednotek a přídatných bílkovin. Malá podjednotka je tvořená z 18S rRNA a velká podjednotka je tvořená z 5S, 5,8S a 28S rRNA.

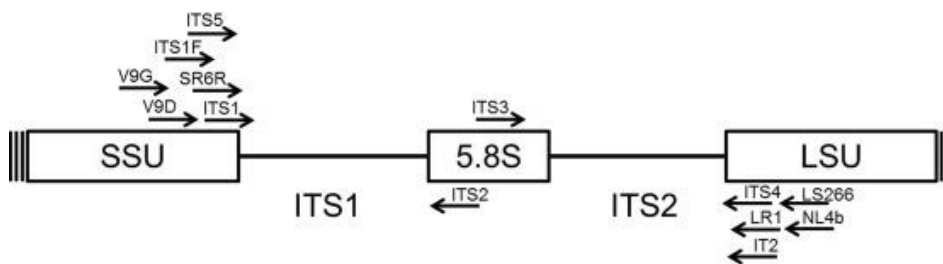
Jádro je většinou haploidní s rozmezím chromozomů od 3 do 20 ohraničené jadernou membránou s velkými jadernými póry. Buňky hyf většinou obsahují větší počet jader (jsou tzv. cenocytické), kdežto buňky konidií jsou jednojaderné.

(Němec a Matoulková 2015)

1.1.2 Fungální genetické markery

Pro efektivní klinickou diagnostiku je třeba najít dostatečně variabilní úsek DNA ukotvený konzervovanou oblastí, která zajistí, že se tento úsek časem neztratí. Variabilita úseku umožňuje rozlišovat mezi jednotlivými mykobiálními druhy. Pro tyto účely bylo vybráno několik možných DNA regionů.

Nejdůležitějším z těchto regionů je tzv. internal transcribed spacer (ITS) s lokalizací v oblasti DNA kódující ribozomální RNA. Eukaryotický rRNA cistron je přepisován RNA polymerázou I. a skládá se ze tří exonů: 18 S – malá ribozomální podjednotka (SSU), 5.8 S, 28 S – velká ribozomální podjednotka (LSU) a dvou intronů: ITS1 a ITS2, které jsou při posttranskripčních úpravách vystřiženy. V mykobiální fylogenetice se běžně používá gen pro malou ribozomální podjednotku (18 S), stejně jako se v bakteriální fylogenetice používá SSU (16 S). ITS je vždy přítomný a jeho délka je relativně limitována, proto je označován jako univerzální genetický marker (Schoch a kol. 2012).



Obr. 1. ITS regiony s možnostmi volby primeru. ITS1 region má okolo 300 bp a ITS2 region je o velikosti přibližně 300 bp (převzato z Irinyi a kol. 2016).

Dalším možným genetickým markerem může být mitochondriální gen pro podjednotku 1 cytochromoxidázy C (CO1). Jelikož CO1 je nepostradatelným enzymem oxidativní fosforylace, její DNA se skládá z konzervovaných genů. Nevýhodou tohoto úseku je, že obsahuje mnoho intronů, které nejsou konzistentně zachovány u všech druhů. Ve srovnání s ITS regionem, mitochondriální CO1 poskytuje horší taxonomické výsledky a nehodí se jako univerzální fungální marker (Gilmore a kol. 2009).

Protein kódující geny jsou většinou přímo specifické pro určitý rod, nikoliv však pro celou říši. Například β -tubulin je specificky používán pro rod *Penicillium* a translační elongační faktor 1- α je specifický pro rod *Fusarium* (Schoch a kol. 2012).

V klinické diagnostice se nejčastěji využívá ITS region jako univerzální marker, který může být následně doplněn o specifickou detekci primery cílenými na konkrétní fungální rod.

1.2 Střevní mykobiom

Střevní mykobiom je velice proměnlivý systém, méně stabilní než systém bakteriální. Je velmi závislý na okolním prostředí člověka a na způsobu stravování. Právě z těchto důvodů je mykobiom, v rámci jednoho pacienta, proměnný v čase. Jeho součásti se dají rozdělit na fungi rezidentní a nerezidentní. Fungi rezidentní musí být schopny růst při 37 °C i bez přístupu kyslíku a musí být schopné přežít výkyvy pH (kyselé v žaludku, alkalické v duodenu). Naopak fungi nerezidentní tyto schopnosti nemají, a tak gastrointestinálním traktem pouze procházejí (Hallen-Adams a Suhr, 2017).

1.2.1 Zdravý střevní mykobiom

Většina studií majících za cíl určit zdravý střevní mykobiom člověka je prováděna ze vzorků lidské stolice. Dominantní zastoupení v těchto vzorcích mají rody *Saccharomyces*, *Malassezia* a *Candida*. Méně často potom *Penicillium*, *Aspergillus*, *Galactomyces*, *Debaryomyces*, *Cladosporium*, *Trichosporon* a *Cryptococcus* (Nash a kol. 2017, Hoffmann a kol. 2013).

Za zvážení však stojí, zdali tyto rody jsou schopny růst při teplotě lidského těla. Rody *Malassezia* a *Cladosporium* mohou potenciálně kolonizovat gastrointestinální trakt (GIT), ale např. rody *Penicillium* a *Debaromyces* nemohou růst při lidské teplotě těla a nemohou tak ani kolonizovat GIT. Ostatní druhy jako *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Aspergillus sp.* se obvykle vyskytují v potravinách různého druhu nebo přímo v prostředí a nelze tak přesně určit jejich účel v GIT (Hallen-Adams a Suhr 2017).

1.2.2 Střevní mykobiom u pacientů s IBD

Fungální a bakteriální střevní mikrobiom jsou úzce propojeny. Zatímco bakteriální biodiverzita u pacientů s Crohnovou chorobou klesá, fungální biodiverzita významně narůstá. Složení bakteriálního mikrobiomu je modifikováno redukcí rodů *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, a nárůstem *Proteobakterií*, které jsou potenciálně zodpovědné za průjem (Mukhopadhy a kol. 2012). Zdánlivý nárůst fungální biodiverzity může být způsoben jevem, kde mykobiom nezápětlivé a zápětlivé tkáně se liší svým složením v jednom pacientovi. Například druhy *Saccharomyces cerevisiae* a *Filobasidium uniguttulatum* jsou asociovány s nezápětlivou tkání, zatímco řád *Xalariales* je asociován se zápětlivou tkání (Liguori a kol. 2016).

1.2.3 Úloha fungálních druhů ve střevním mykobiomu

Saccharomyces sp.

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*), neboli pekařská, pивní či vinná kvasinka využívaná ke kvasným procesům v potravinářství je zároveň nejčastěji detekovanou součástí střevního mykobiomu ze vzorků stolice. Hojně využívaný je také kmen *S. boulardii* tohoto druhu (*S. cerevisiae*). *S. boulardii* je využíván jako probiotikum hlavně k prevenci a léčbě průjemových onemocnění (Moré a Swidsinski 2015, Richard a kol. 2015). Pozitivně ovlivňuje střevní mikrobiom produkcí proteáz snižujících počet patologických bakterií (z čeledí: Enterobacteriaceae, Bifidobacteriaceae a Clostridiaceae) a naopak podporuje růst bakterií, které produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem (Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Bacteroidaceae a Prevotellaceae). Mastné kyseliny s krátkým řetězcem přirozeně stimulují imunitní systém a chrání sliznici proti průstupu patogenů modulací tvorby mucinu v enterocytech (Ríos-Covián a kol. 2016). Zároveň *S. boulardii* působí protizánětlivým efektem inhibicí signální cesty nukleárního faktoru κB (NF- κB) a to má za následek blokování sekrece prozánětlivých cytokinů, např. IL-8 (Pothoulakis 2009; Moré a Swidsinski 2015).

Malassezia sp.

Kvasinky rodu *Malassezia* nemají vlastní syntézu lipidů a jsou tak závislé na savcích. Běžně se vyskytují na kůži a jsou hlavní součástí kožního mykobiomu. Vzhledem k tomuto faktu není známo, zdali *Malassezia sp.* opravdu kolonizují lidské tělo i zevnitř, nebo zda se jedná o kontaminaci při procesu odebírání vzorku či při jeho zpracování. Genom *Malassezia sp.* však ukazuje přítomnost genů kódujících sekreční enzymy podobné enzymům známého lidského patogena *Candida albicans*. Konkrétním příkladem je *Malassezia sympodialis*, která je schopná secernovat potencionální alergen, který může zvyšovat lokální zánět v postižené části střeva u pacientů s IBD (Buentke a kol. 2002).

Candida sp.

Candida albicans je nejčastějším zástupcem ve střevním mykobiomu. Vyskytuje se jako komezál u zdravých jedinců, ale může se stát i oportunním patogenem u jedinců s oslabenou nebo poškozenou imunitou. *C. albicans* je dimorfní houba a patogenita je závislá na její formě. Hyfoidní forma *C. albicans* dokáže sekretovat amfipatický cytolytický peptid (candidalysin), který narušuje membrány epiteliálních buněk a způsobuje tak invazivní onemocnění (Moyes a kol. 2016).

Ostatní

Vliv následujících fungálních druhů v GIT ještě nebyl přesně studován, avšak jsou dostupné základní předpoklady. Zástupci rodů *Cladosporium*, *Aspergillus* a *Penicilium* jsou vláknité houby (plísně), na rozdíl od výše zmíněných kvasinek. Zároveň se ve větší míře vyskytují v okolním prostředí nežli v lidském zažívacím traktu, a z tohoto důvodu jim doposud nebyla přisuzována žádná větší úloha. Nejběžněji zachycované druhy ve střevním mykobiomu jsou *C. herbarum*, *C. cladosporioides*, *Wallemia sebi*, *W. muriae*, jedlé houby a rostlinné patogeny (Hallen-Adams a Suhr 2017).

1.2.4 Vliv některých léků na střevní mykobiom

Jakékoliv podání léčivých prostředků per os významně ovlivňuje složení střevního mikro i mykobiomu. Ve většině případů dochází k disbióze a expanzi některého fungálního rodu. Například užívání orálních antibiotik může způsobit expanzi populace candidy ve střevě. Užívání fluconazolu (orální antimykotikum) vede ke snížení prevalence některých fungálních rodů, ale naopak zvyšuje růst rodů, jako jsou *Aspergillus*, *Wallemia* a *Epicoccum*. Narušení fungální rovnováhy ve střevě se projeví systémově v imunitním systému produkcí protilátek třídy IgE, Th2 cytokinů a zvýšením hladiny eozinofilů (Wheeler a kol. 2016).

1.3 IBD

Zkratka pocházející z anglického „Inflammatory bowel disease“ znamená v překladu „zánětlivé střevní onemocnění“. IBD je typ chronického zánětu zažívacího traktu, který má relaptické tendence. Mechanismus vývoje tohoto onemocnění je komplexní záležitost ovlivňovaná mnoha faktory, jako jsou imunitní systém, genetika, mikrobiom a vnější vlivy. Nejčastějšími zástupci spadajícími do kategorie IBD jsou Crohnova choroba (CD) a ulcerózní kolitida (UK).

1.3.1 Obecná genetika

Genetika IBD onemocnění je charakterizována polymorfizmy na 201 lokusech. Přibližně 137 z nich je společných pro CD i UK, 41 lokusů je specifických pro CD a 30 pro UK (Franke a kol. 2010, Anderson a kol. 2011). Zároveň 70 % z těchto lokusů je společných pro mnohé autoimunitní a imunodeficientní poruchy. I přes výše zmíněné, pouze 25 % IBD dědičnosti bylo objasněno pomocí genetických výzkumů (McGovern a kol. 2015).

1.3.2 Environmentální vlivy

Mezi vlivy z prostředí řadíme: kouření, typ výživy, působení léčiv a mikrobiom. Nejvíce zkoumaným faktorem bylo kouření cigaret, u kterého byl prokázán poškozující účinek u pacientů s CD, avšak u pacientů s UK byl zaznamenán spíše protektivní účinek (Khor a kol. 2011). Dieta bohatá na nasycené mastné kyseliny a maso zvyšuje riziko vzniku IBD. Naopak dieta bohatá na vlákninu toto riziko snižuje o 40 %; pravděpodobně díky střevním bakteriím, které vlákninu rozkládají na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které mají protizánětlivý účinek (Ramos a Papadakis 2019).

Důležitým faktorem s výrazným vlivem na střevní stěnu je působení léčiv, obzvláště antibiotik. Působení antibiotik značně ovlivňuje přirozenou střevní flóru a stane-li se tak v dětském věku, je možné, že neproběhne správně adaptace imunitních buněk na tyto antigeny a později vzniká IBD. Zároveň u IBD pacientů byla prokázána nerovnováha bakterií střevního mikrobiomu. Bakterie vyvolávající zánětlivé projevy byly u pacientů s IBD zvýšeny na úkor bakterií se schopností syntetizovat mastné kyseliny s krátkým řetězcem (protizánětlivých bakterií) ve srovnání se zdravými jedinci (Frank a kol. 2007). Také byly prokázány konkrétní bakteriální druhy, které zvyšují riziko vzniku IBD. Například mukolytické bakterie nebo bakterie redukující sírany na hydrogensírany, které poškozují střevní stěnu a spouštějí tak zánětlivou reakci.

1.3.3 Bariérodní funkce střeva

Střevní bariéra je nepostradatelnou mechanickou, ale i funkční obranou. Obsahuje několik typů buněk s velmi specifickými funkcemi. Buňky zajišťující transport živin a vody (enterocyty), pohárkové buňky produkující ochranný hlen mucin (Gobletovi buňky), buňky sekretující antimikrobiální peptidy (Panethovi buňky), buňky prezentující antigeny ze střevního lumen (M buňky), enteroendokrinní buňky produkující hormony a prekurzory prostaglandinů. Důležitým pojídkem mezi těmito buňkami jsou E-kadheriny.

V jakémkoliv z těchto systémů může vzniknout mutace a pro IBD je jich popsáno hned několik. Mutace ovlivňující strukturu E-kadherinů způsobují špatné spojení buněk a vznik mezer, mezi kterými mohou snadno pronikat infekční agens do submukózy. Jejich prostup je zároveň usnadněn v případě mutace genu *muc2* v Gobletových buňkách, která způsobí inhibici syntézy mucinu a zeslabení ochranné vrstvy sliznice (Ramos a Papadakis 2019).

Genetické mutace v Gobletových buňkách jsou spojovány se vznikem UK, kdežto mutace vzniklé v Panthových buňkách jsou spojovány se vznikem CD. Tyto mutace nejčastěji postihují NOD2 receptor (z anglického nucleotide-binding oligomerization domaine - containing protein 2). Společně s mutací NOD2 receptoru se u Pantehových buněk vyskytuje i mutace způsobující defekty v autofagii, což vede k selhání anti-mikrobiální funkce (Ferrand a kol. 2019).

1.3.4 Mechanismus a mutace NOD2 receptoru

Mutace genu *NOD2* na chromosomu 16q12 je nejčastěji spojovaný polymorfismus s Crohnovou chorobou. Tento gen kóduje vznik stejnojmenného receptoru rozpoznávajícího N-glykolyl-MDP (muramyl dipeptid). Chen a kol. v roce 2015 prokázali, že právě glykol (substituent v molekule N-glykolyl-MDP) signifikantně zvyšuje NOD2 stimulační aktivitu. N-glykol-MDP se vyskytuje v buněčné stěně mykobakterií a aktinomycet. Běžná degradace buněčné stěny uvolní MDP, které jsou zachyceny NOD2 receptorem. Ten spustí obranu hostitele pomocí produkce cytokinů, chemokinů, antimikrobiálních peptidů, sekrecí mucinu a aktivací přirozené i adaptivní imunity (Ferrand a kol. 2019).

1.3.5 Imunitní odpověď

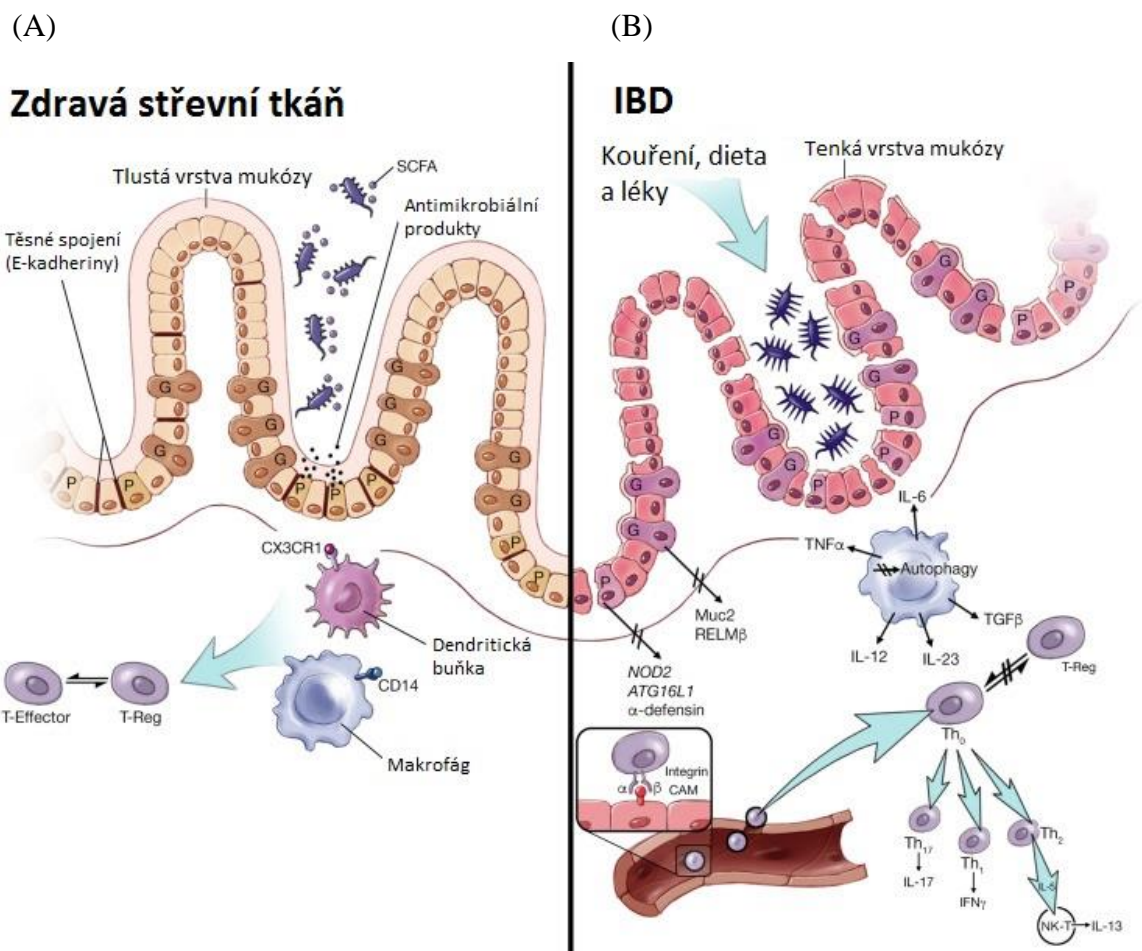
U pacientů s IBD je poškozený nespecifický imunitní systém. Pacienti mají celkově oslabenou aktivitu makrofágů a neutrofilů a normální funkce Panethových buněk je značně omezena nefunkčním NOD2 receptorem. Dále se ve střevní sliznici také vyskytují makrofágy CD14+, které zaujímají funkci dendritických buněk a prezentují antigeny. Zároveň tyto CD14+ makrofágy produkují velké množství prozánětlivých cytokinů, konkrétně TNF- α a IL-6. V mutovaných Panethových buňkách je tento nadbytek TNF- α využíván (namísto signální cesty od receptoru NOD2) k aktivaci kaskádové reakce NF- κ B, který vede k uvolnění α -defensinů do střevního lumen (Kamada a kol. 2008; Ferrand a kol. 2019).

Cytokinový obraz IBD se skládá z TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 a interferonu γ . Tyto cytokiny umocňují zánětlivou reakci a jsou produkovány antigen prezentujícími buňkami, makrofágy, endoteliálními buňkami a fibroblasty (Nanau a Neuman 2012, M. F. Neurath 2014).

Specifická imunitní odpověď je v obou případech (CD i UK) zprostředkovaná

T lymfocyty. Rozdíl je až v jednotlivých frakcích, kdy UK je spojovaná s aktivitou Th2, kdežto CD je spojována s Th1 (Bouma a Strober 2003). Regulaci imunitní reakce by měly zajišťovat T regulační lymfocyty, avšak v nich se může objevit mutace v transkripčním faktoru FOXP3. Zánětlivá reakce pak není regulovaná a dochází k imunopatologickým reakcím (Baumgart a Sandborn 2012).

Shrnutí problematiky IBD výstižně zobrazuje obr. 2, který porovnává zdravou a zánětlivou střevní tkáň i se základními imunitními mechanismy.



Obr. 2. **Porovnání zdravé střevní tkáň s IBD.** (A) Zdravá střevní tkáň je složena z úzce propojených buněk E-kadheriny, četnými Gobletovými buňkami produkujícími hlen chránící sliznici a Panethovými buňkami produkujícími antimikrobiální látky. V lumen střeva se vyskytuje dostatek mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA). Imunitní systém je v rovnováze. (B) Naopak integrace sliznice u IBD je narušena nefunkčními E-kadheriny, počet Gobletových buněk je nižší a produkce ochranného hlenu také. Panethovi buňky produkují antimikrobiální látky alternativní cestou stimulovanou nadbytkem TNF- α produkovaným makrofágy. Imunitní reakce je neregulovaná s nadbytečnou produkcí prozánětlivých faktorů (převzato a upraveno podle Ramos a Papadakis 2019).

1.3.6 Crohnova choroba

Crohnova choroba je nespecifický chronický zánět, který se může vyskytovat v celé délce trávicí trubice. Nejčastěji se objevuje v terminálním ileu a vzestupném tračníku. Typickým úkazem pro Crohnovu chorobu je segmentální uspořádání v průběhu celého zažívacího ústrojí, tj. střídání zdravé a poškozené tkáně (Baumgart a Sandborn 2012).

Subjektivně se tato nemoc projevuje bolestí v pravém hypogastriu (pravý dolní kvadrant břicha), hubnutím, recidivujícími horečkami a průjmem s přídavkem krve. U dětí se může objevit opoždění růstu. Jelikož je Crohnova choroba zároveň systémové onemocnění, příznaky se objeví také na kůži, očích, játrech, ledvinách, pankreatu a cévním systému (Klener 1997).

Principem rozsáhlého poškození celé střevní stěny je průnik mikrobů skrz epiteliální vrstvu do submukózy, kde se spustí neregulovaná imunitní reakce a vytvoří se granulom (nakupení polymorfonukleárních leukocytů). Produkce zánětlivých látek v granulomu a jeho okolí se stále stupňuje, až nakonec poškodí veškerou přilehlou tkáň a vytvoří se vřed, který prochází celou střevní sliznicí až do serózy. V některých případech může vzniknout absces nebo píštěl. Z takto masivního poškození sliznice vyplývá, že ve stolici pacienta nalezneme krev. Zároveň se ztrácí schopnost střeva vstřebávat vodu i živiny a to se projevuje řídkou stolicí a malnutricí (Baumgart a Sandborn 2012).

Léčba je možná antibiotiky, kortikosteroidy, protizánětlivými léky, enterální výživou (bohužel po ukončení terapie dochází k relapsu), chimérickou protilátkou proti TNF- α , nebo chirurgickým odstraněním poškozených úseků.

1.3.7 Ulcerózní kolitida

Ulcerózní kolitida je nejčastějším zástupcem zánětlivého onemocnění střeva. Vyskytuje se výhradně v konečniku a tlustém střevu. Příčinou tohoto onemocnění je autoimunitní hemoragicko-hnisavý až ulcerózní zánět tlustého střeva. Zánět či vřed vždy zasahuje jen sliznici a submukózu, nikoliv celou strukturu střevní stěny, jak tomu je u Crohnovy choroby. Vývoj nemoci postupuje kontinuálně od distální části tlustého střeva, tj. rekta (Klener 1997).

Molekulárním principem UK je reaktivita cytotoxických T lymfocytů a p-ANCA protilátek proti vlastním buňkám sliznice. V séru pacientů jsou prokazatelné protilátky p-ANCA, které jsou primárně zaměřené proti vnitřním antigenům kolem jádra neutrofilů. Předpokládá se, že tyto protilátky prvotně reagují se střevními mikroby, které obsahují podobné antigenní struktury jako naše buňky, a následně cross-reagují s vlastními buňkami. ANCA protilátky jsou prokazatelné obzvláště u těžkých forem UK. V těsné blízkosti vředu bylo také nalezeno neobvyklé množství cytotoxických T lymfocytů (Lee a kol. 2019).

Pacienti pocítují bolest v levém hypogastriu (levý dolní kvadrant břicha). Zároveň mívají bolestivé nutkání na stolici, které po vyprázdnění nepřestává. Stolice je řídká až vodnatá s přídatkem krve a hlenu. Z mimo střevních příznaků se objevují bolesti kloubů, kožní projevy převážně na dolních končetinách (erythema nodosum, pyoderma gangrenosum) a aftózní ulcerace dutiny ústní (Klener 1997).

Medikamentózní léčba se opírá o protizánětlivé léky, doplněné vhodnou dietou či chimérickou monoklonální protilátkou proti TNF- α . V nejzávažším případě se využívá chirurgická léčba, která při správném provedení odstraní UK z těla (Ross a kol. 2014).

1.3.8 Epidemiologie Crohnovi choroby a ulcerózní kolitidy

Prevalence těchto onemocnění je mnohem vyšší ve vyspělejších zemích (Severní Amerika a Evropa) než v rozvojových zemích (Jižní Amerika, Afrika). Například 1,6 miliónu obyvatel z USA se potýká s IBD, z toho 785 000 obyvatel má diagnostikovanou Crohnovu chorobu a 910 000 obyvatel ulcerózní kolitidu (Aniwan a kol. 2017).

Tento fakt potvrzuje celosvětová rešeršní studie prof. Ng a kol. z roku 2017. Přínosem této studie je zjištění: „*Od roku 1990 se výskyt zánětlivého onemocnění střev v západním světě stabilizoval, ale prevalence zůstává vysoká.*“ Nově industrializované země nyní čelí vzrůstající incidenci IBD stejně, jako tomu bylo ve 20. stol v západních zemích. Příloha č. 1 a č. 2 přehledně shrnuje tematiku prevalence a incidence CD a UK na světové mapě.

2 Cíle práce

Cíle této diplomové práce jsou:

1. Optimalizovat metodu NGS pro analýzu mykobiomu z FFPE vzorků.
 - Stanovit vhodný izolační kit a způsob izolace DNA.
 - Optimalizovat metodu PCR pro mykobiální DNA.
 - Nastavit vhodné podmínky pro přípravu vzorku pro NGS (vstupní a výstupní koncentrace vzorku/knihovny, délka DNA fragmentu, počet cyklů PCR k amplifikaci DNA ve vzorku).
 - Analýza dat ze sekvenátoru a interpretace výsledků.
2. Zmapovat spektrum fungálních patogenů u definovaných skupin pacientů s oslabenou imunitou na základě histologické a molekulárně-biologické analýzy klinických vzorků.
 - U pacientů s Ulcerózní kolitidou.
 - U pacientů s Crohnovou chorobou.
3. Vybudovat interaktivní databázi fungálních patogenů ve vztahu ke klinické diagnóze pacienta.

3 Materiál a metody

3.1 Výběr a odběr vzorků

Pro výzkum byly použity FFPE vzorky (formalin-fixed, parafin-embedded). Vzorky tkání z oblastí zažívacího traktu (konkrétně z tenkého střeva, tlustého střeva a rekta) byly odebrány z pacientů trpících Crohnovou chorobou, ulcerózní kolitidou i osob bez zjištěných patologických diagnóz. Vyjmutá tkáň byla ihned po odběru fixována v 10% formolu (= 4% formaldehyd) a následně přepravena do histologické laboratoře. Zde byla tkáň odvodněna, prosycena parafinem a zalita do parafinového bločku.

3.2 Izolace DNA

Parafinové bločky byly nakrájeny na rotačním mikrotomu (RM 2125 RT, Leica biosystems, USA). Mezi každým vzorkem se mikrotom dekontaminoval Termini-DNA-torem (Biotools B&M Labs S.A.) a z každého vzorku se nejprve odkrojil první řez, který byl zlikvidován. Následně bylo odkrojeno 5 řezů tloušťky 5 μm do jedné mikroskopické kumavky a poté byla ze vzorků izolována deoxyribonukleová kyselina (DNA) několika různými komerčními kity. Izolace probíhala v laminárním boxu (BIO 130A2, Alpina, Polsko). Pro získání mykobiální DNA z FFPE vzorků byly použity následné kity: BiOstic® FFPE Tissue DNA Isolation Kit (MO BIO laboratories, Inc., USA); QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN, Germany); EliGene® FFPE DNA Isolation Kit (Elisabeth pharmacon, Česká republika); GeneAll® Exgene FFPE Tissue DNA (GeneAll Biotechnology co., LTD, Korea). Izolace DNA probíhala přesně podle pokynů výrobce. Praktický princip izolace DNA je u všech kitů velice podobný, liší se hlavně ve způsobu odstranění parafinu ze vzorku. U izolačního kitu QIAamp® DNA mini kit bylo třeba použít deparafinizační roztok a ATL pufr (QIAGEN, Germany) pro odstranění parafinu ze vzorku. Celý proces izolace probíhal v laminárním boxu.

Koncentrace získané DNA byla měřena na spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Vzorky s koncentrací DNA $\geq 2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ a čistotou izolované DNA ($A_{260/280} \geq 1,8$) byly použity do dalších analýz, do té doby byly uskladněny při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3 PCR a její modifikace

3.3.1 Design primerů

V tabulce č. 1 jsou přehledně vypsány nejpoužívanější primery, konkrétní pořadí bází primerů, lokalizace v genomu a zdrojová publikace.

Tab. 1. Primerový přehled

Název primeru	Sekvence 5' - 3'	úsek	zdroj
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	1773-1791 (18S)	White a kol. 1990
ITS1-F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	1735-1756 (18S)	Gardes & Bruns 1993
ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	53-34	White a kol. 1990
ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	34-53	White a kol. 1990
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	57-38 (28S)	White a kol. 1990
ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	1749-1770 (18S)	White a kol. 1990

3.3.2 PCR úseku ITS 2

Prvotní pokusy proběhly s kombinacemi primerů z originální publikace podle protokolů White a kol. 1990. PCR reakce byla založena na amplifikaci úseku ITS2 mezi primery ITS3 a ITS4. PCR mix byl připraven podle tab. 2. Vlastní reakce probíhala v termocykleru SympliAmp™ (Thermofisher Scientific, USA).

Použité reagenty ve všech PCR reakcích:

- HotStarTaq Master Mix Kit (1000 U), Qiagen, Germany.
- Primery (Generi Biotech, Česká republika) následně ředěné na koncentraci 10 μ M.

Tab. 2. Příprava PCR mixu pro úsek ITS 2

Reagencie	[μ l]
MM Hot Star	12,5
Primer ITS 3	1,0
Primer ITS 4	1,0
H ₂ O	5,5
DNA	2,0

Celkem 25 μ l (23 μ l PCR Mixu + 2 μ l DNA)

Program: 95 °C/14min; 40x (94 °C/1min, 51 °C/1min, 72 °C/1min); 72 °C/10min; 4 °C/ ∞ .

3.3.3 Nested PCR úseku ITS 1 - ITS 2

Následné pokusy se zaměřily na specifitější a citlivější amplifikaci pomocí semi-nested PCR (nPCR). V první fázi se amplifikoval celý úsek DNA mezi oblastmi pro malou a velkou ribozomální podjednotku.

Tab. 3. PCR mix 1. kolo (primer ITS 1)

Reagencie	[μ l]
MM Hot Star	12,5
Primer ITS 1	1,0
Primer ITS 4	1,0
H ₂ O	8,5
DNA	2,0

Celkem 25 μ l (23 μ l PCR Mixu + 2 μ l DNA)

Tab. 4. PCR mix 1. kolo (primer ITS 5)

Reagencie	[μ l]
MM Hot Star	12,5
Primer ITS 5	1,0
Primer ITS 4	1,0
H ₂ O	8,5
DNA	2,0

Celkem 25 μ l (23 μ l PCR Mixu + 2 μ l DNA)

Program: 95 °C/14min; 40x (94 °C/30s, 50 °C/1min, 72 °C/1min); 72 °C/10min; 4 °C/ ∞ .

Následovala PCR s primery amplifikujícími v úseku ITS 2. PCR mix byl připraven v preamplifikační části laboratoře a DNA z prvního kola reakce byla přidána do těchto zkumavek v boxu (Aura PCR, Bioair S.p.A. Italy) v postamplifikační části laboratoře.

Tab. 5. PCR mix 2. kolo

Reagencie	[μ l]
MM Hot Star	12,5
Primer ITS 3	1,0
Primer ITS 4	1,0
H ₂ O	9,5
DNA	1,0

Celkem 25 μ l (24 μ l PCR Mixu + 1 μ l DNA)

Program: 95 °C/14min; 40x (94 °C/1min, 51 °C/1min, 72 °C/1min); 72 °C/10min; 4 °C/ ∞ .

3.3.4 Vizualizace produktů

PCR produkty byly vizualizovány v 2% agarózovém gelu připraveného z 3 g agarózy (Sigma-Aldrich, USA) rozpuštěné ve 150 ml TAE pufru (Sigma-Aldrich, USA; ředěno z koncentrátu 50x) s přidavkem 3,2 μ l Ethidium Bromidu (Top-Bio, Česká republika). Vzorky byly smíchány s 5 μ l nanášecího barviva pro gelovou elektroforézu (ThermoFisher Scientific, USA) a nanoseny do gelu. Ke každé řadě v gelu byl nanesen leader (molekulární marker), sloužící k určení délky PCR produktu. Elektroforéza probíhala při konstantním nastavení 400 mA a 150 V po dobu 20 minut.

3.3.5 Přečištění PCR reakce

25 µl PCR produktu bylo smícháno s 36 µl AMPure magnetic beads (Beckmancoulter, USA) a inkubováno při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Zkumavky byly přeneseny na magnetickou destičku, kde se magnetické kuličky s navázanou DNA přichytily ke stěně zkumavky, a čirý roztok byl odsát. Následně byly kuličky 2x promyty 200 µl 70% etanolu. Poté se nechal zbylý etanol odpařit 5 min při laboratorní teplotě a následně bylo přidáno mimo magnetickou destičku 40 µl elučního pufru (10mM) pro uvolnění DNA z vazby na magnetické kuličky, a směs se nechala 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Přečištěné PCR produkty byly použity do sekvenačních reakcí.

3.4 Sekvenační reakce – Sangerovo sekvenování

Do plata mikrozkuvek byla namíchána sekvenační reakce podle následující tabulky.

Tab. 6. Mix pro sekvenační reakci

Reagencie	10 [µl]
BigDie 1.1 Mix	1,0
SEQ pufr	1,5
H ₂ O	5,5
Primer ITS 3 (3,2 µM)	1,0
Přečištěný PCR produkt	1,0

Program: 96 °C/1min; 25x (96 °C/10s; 50 °C/5s; 60 °C/19s); 4 °C/∞

Sekvenační reakce probíhala ve forward směru od primeru ITS3 za použití BigDye reagensů (Applied Biosystems, USA). Spolu se vzorky byla připravena i pozitivní kontrola sekvenace (pUC).

3.4.1 Přečištění sekvenační reakce

Do každého vzorku bylo přidáno 10 µl magnetických kuliček CleanSEQ (Beckmancoulter, USA) a 42 µl 85% ethanolu, důkladně promícháno pipetováním. Vzorky byly přeneseny na magnetickou destičku a nechány 5 minut separovat. Následně byl odstraněný čirý roztok a vzorky byly 2x promyty 100 µl 85% etanolu. Zbytky etanolu byly vysušené na vzduchu po dobu 10 minut. Následně bylo přidáno 60 µl elučního pufru (0,1mM EDTA) mimo magnetickou destičku a inkubace probíhala 5 minut. Následně se od DNA vzorku oddělily magnetické kuličky na magnetické destičce (čas separace 5 minut) a do speciální sekvenační destičky bylo přepipetováno 20 µl vzorku.

Vlastní sekvenační reakce probíhala na sekvenátoru ABI 3130XL (16 kapilárový sekvenátor) v Bioptické laboratoři. Datové výstupy byly analyzovány programem Chromas a porovnány s databází NCBI.

3.5 Sekvenování nové generace (NGS)

3.5.1 Vstupní úprava vzorků

Příprava vzorků na sekvenování nové generace probíhala z tentýchž přečištěných PCR reakcí jako Sangerovo sekvenování, a to pomocí kitu KAPA Hyper Plus (KHP, Roche). Aby byla knihovna vzorků pro NGS vyvážená, bylo nutné mít vzorky s podobnými koncentracemi DNA. Proto je nutné před zahájením samotného KHP protokolu přesně změřit koncentrace všech vybraných PCR produktů přesným fluorometrickým měřením (Qubit® Ds DNA BR Assay kit, Thermofisher Scientific, USA). Na jeden vzorek je třeba si nejprve připravit barvicí roztok ze 199 μl BR pufru a 1 μl BR koncentrátu. Fluorescenční barvivo se na světle rozkládá, a tak je třeba držet tento roztok v temnu. Následuje příprava roztoku pro měření ze 198 μl předem připraveného barvicího roztoku a 2 μl vzorku. Pro toto měření je nutné používat speciální Qubit mikrozkušavky (Thermofisher Scientific, USA). Na přístroji Qubit® 2.0 (Thermofisher Scientific, USA) byla měřena dsDNA v jednotkách [$\text{ng}/\mu\text{l}$]. Pokud jsou rozdíly koncentrací souběžně připravovaných vzorků větší než 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$, je třeba je upravit ředěním.

3.5.2 Fragmentace

Od tohoto kroku probíhala další příprava na ledu. Prvním krokem pro KHP protokol byla fragmentace, na kterou bylo použito 35 μl přečištěného PCR produktu bez EDTA, 5 μl KAPA frag pufru (10x) a 10 μl KAPA frag enzymu. Tato směs byla následně inkubována v termocykleru SympliAmp™ (Thermofisher Scientific, USA) po dobu 15 minut při 37 °C pro dosažení optimální délky fragmentu 270 pb (Tang a kol. 2015).

3.5.3 End Repair & A-Tailing

Následovalo opravení konců vláken a navázání adeninové baze. Do zkumavky s fragmentovanou DNA (50 μl) bylo přidáno 7 μl End Repair & A-Tailing pufru a 3 μl End Repair & A-Tailing enzymu. Následovala inkubace v termocykleru při 65 °C po dobu 30 minut.

3.5.4 Adaptorová ligace

Vzorek (60 μ l) byl takto připraven k adaptorové ligaci, na kterou bylo použito 30 μ l ligačního pufru, 10 μ l enzymu DNA ligázy, 5 μ l vody a 5 μ l KAPA Dual-indexes Adapters. Směs byla inkubována 15 minut při 20 °C. Označení použitého adaptéru bylo zaznamenáno do protokolu k příslušnému vzorku.

3.5.5 Postligační čištění

K 110 μ l ligovaného produktu bylo přidáno 88 μ l AMPure magnetických kuliček, promícháno a inkubováno při laboratorní teplotě po dobu 10 minut k navázání DNA na magnetické kuličky. Zkumavky byly poté přemístěny na magnetickou destičku, ze které byl po vyčeření roztoku, čirý roztok odsát a vzorek byl 2x promyt 200 μ l 80% etanolu. Zbytky etanolu byly nechány odpařit při 5 minutové inkubaci v laboratorní teplotě. Mimo magnet bylo poté do vzorků přidáno 25 μ l elučního pufru (10 mM Tris-HCl, pH 8,0-8,5) a směs byla 2 minuty inkubována při laboratorní teplotě. Následně byly zkumavky opět přesunuty na magnet a do čisté zkumavky bylo přeneseno 20 μ l čirého roztoku.

3.5.6 Amplifikace knihovny

K 20 μ l vzorku s navázanými adaptory bylo přidáno 25 μ l KAPA HiFi HotStart ReadyMixu (2X) a 5 μ l Primer Mixu (10X). Amplifikace probíhala v termocykleru SympliAmpTM (Thermofisher Scientific, USA) při programu: 98 °C/45s; 6x (98 °C/15s, 60 °C/30s, 72 °C/30s); 72 °C/1min.

3.5.7 Postamplifikační čištění

Postup byl shodný s postligačním čištěním. Eluce proběhla přidáním 25 μ l 10 mM Tris-HCl (pH 8,0-8,5) a inkubací 2 minuty mimo magnet. Následně byly zkumavky opět přesunuty na magnet a do čisté zkumavky bylo přeneseno 20 μ l čirého roztoku.

3.5.8 Finální úprava knihovny

Před vlastním poolováním knihovny bylo třeba opět změřit koncentraci produktů na Qubitu (viz výše) a ředěním ji upravit do 16 nM (5 μ l vzorku + x μ l H₂O). Když jsou všechny vzorky ekvimolární, z každého se odpipetuje 30 μ l do společné zkumavky a takto připravená knihovna se může nechat zamrazit a uschovat pro pozdější sekvenaci.

3.5.9 Parametry sekvenování

K sekvenaci byla použita sekvenační chemie na 300 cyklů (Illumina, USA), 2 nM knihovna, 0,2 M roztok NaOH sloužící k denaturaci knihovny a 5% PhiX (Illumina, USA) jako vnitřní kontrola sekvenace. PhiX má známou sekvenci a na základě jeho souběžného sekvenování s ostatními vzorky se vypočítává tzv. Q skóre, které určuje kvalitu sekvenace. Výrobce doporučuje dosahovat hodnot Q skóre nad 85 %.

Vlastní NGS analýza probíhala na přístroji Next seq 550 (Illumina, USA) a všechny provedené sekvenace splnily podmínky validity výrobce.

3.5.10 Práce s datovými výstupy

Získaná data ze sekvenování ve formě FASTQ souborů byla nahrána na basespace serveru od Illuminy®, kde následně probíhala bioinformatická analýza pomocí aplikace Illumina® ITS Metagenomic.

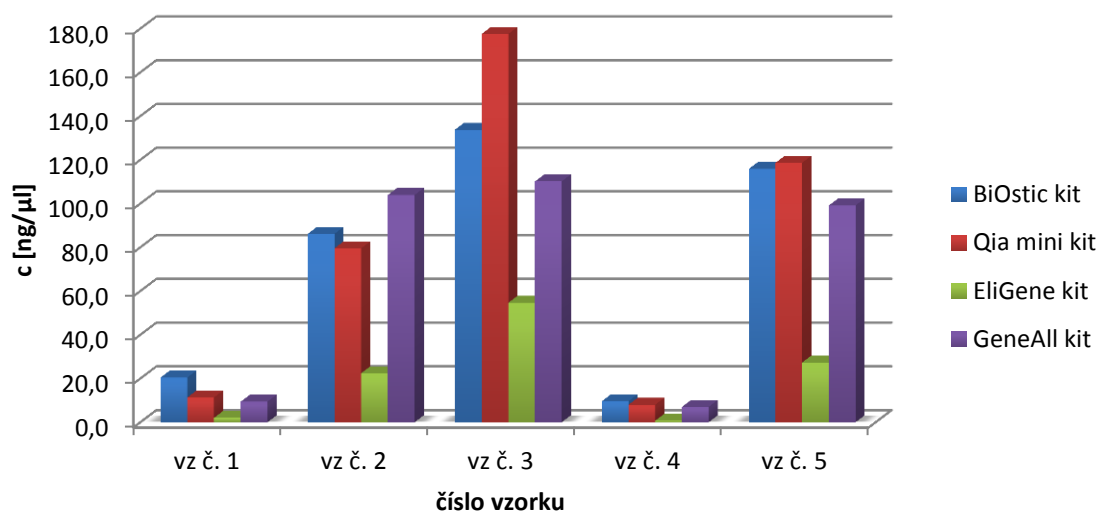
3.6 Statistická analýza

Všechna data byla zpracována v programu Microsoft Excel 2010. Obr. 8 byl zpracován v programu GraphPad Prism 8 a porovnání diagnóz v Obr. 9 bylo provedeno pomocí mnohonásobného Box-Whisker plot v programu STATISTICA (Anonymous 2012), kde byl použit F test a p (ANOVA) a také Kruskal-Wallis test, který testuje shodu distribučních funkcí. Jako závislé proměnné byly použity skupiny hub – Ascomycota, Basidiomycota a Neklasifikováno, jako nezávislé proměnné byly použity diagnózy (UK, CD, NK).

4 Výsledky

4.1 Porovnání izolačních kitů

Izolace fungální DNA je komplikovaná záležitost vzhledem k velice odolné buněčné stěně. Proto bylo nejprve nutné nalézt optimální izolační kit, který si dokáže poradit s FFPE tkání a zároveň dokáže prolomit odolnou fungální buněčnou stěnu. Na pěti vzorcích byly otestovány 4 možné izolační kity. Naměřené koncentrace extrahované DNA byly shrnuty do Obr. 3.



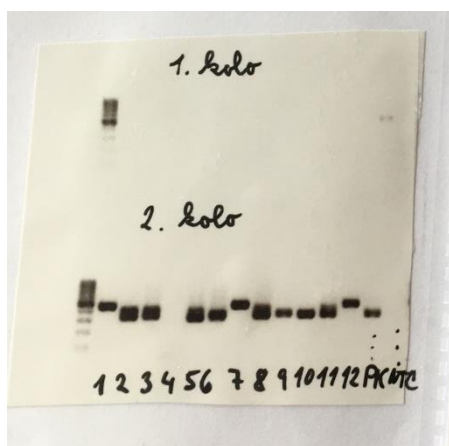
Obr. 3. **Porovnání výtěžnosti DNA izolačních kitů.** Rozdíly mezi koncentracemi extrahované DNA mezi vzorky jsou způsobeny velikostí tkáně zalité v parafrinovém bločku. Bloček vzorků č. 1 a 4 obsahoval malé částičky střeva získané z endoskopie, na rozdíl od vzorků č. 2, 3 a 5, které obsahovaly větší části střeva získané z resekátu.

Nejvhodnějším kitem pro izolaci fungální DNA je BiOstic® FFPE Tissue DNA Isolation Kit, který prokázal vysokou výtěžnost i specifitu izolované fungální DNA. Přijatelnou možností je také EliGene® FFPE DNA Isolation Kit, který má srovnatelnou specifitu izolované fungální DNA, avšak nízkou výtěžnost. QIAamp® DNA mini kit má sice vysokou výtěžnost izolované DNA, ale má nízkou fungální specifitu, která se projevuje hlavně při sekvenování. Vzorky izolované kitem od společnosti Qia převážně nešly analyzovat ani sangerovým sekvenováním, ani NGS. Posledním testovaným kitem byl GeneAll® Exgene FFPE Tissue DNA kit, který prokázal vhodnou výtěžnost DNA, ale následná sekvenace ukázala zaměření kitu spíše na buňky rostlinné nežli buňky fungální. Proto všechny další vzorky byly izolovány BiOstic® FFPE Tissue DNA Isolation Kitem.

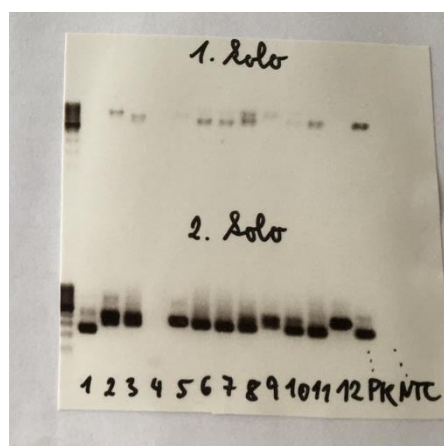
4.2 Analýza primerů

Cílem této analýzy bylo vybrat ideální primer pro první kolo nPCR. Na základě studie Flury a kol. (2014) byly testovány primery ITS1 a ITS5. Primery pro druhé kolo nPCR (ITS3 a ITS4) byly ověřeny mnohými studiemi (Gomez a kol. 2017, Irinyi a kol. 2016, Flury a kol. 2014, Schoch a kol. 2012) a označeny za vhodné i specifické.

Na Obr. 4 a 5 si lze povšimnout výrazného rozdílu mezi produkty 1. kol nPCR, kdy u primeru ITS1 nejsou viditelné produkty, avšak u primeru ITS5 jsou mnohé z produktů již viditelné.



Obr. 4. Produkty s primerem ITS1



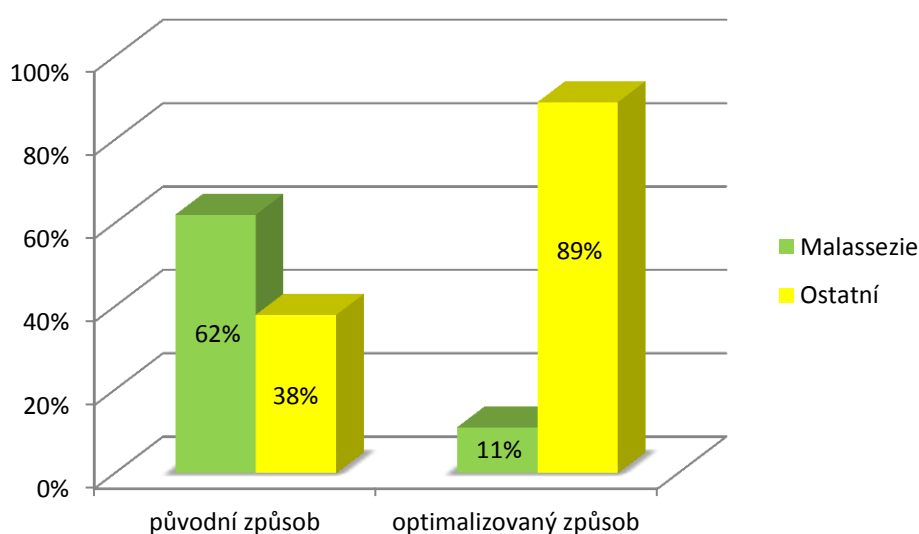
Obr. 5. Produkty s primerem ITS5

Po sekvenční analýze produktů se ukázala 50% discrepance fungálních druhů mezi jednotlivými primery (n=22 vzorků). Po vizuální stránce odečítání sekvencí, byly snáze odečitatelné výstupy produktů primeru ITS5. Všechny následné analýzy byly prováděny v kombinaci primerů ITS5 a 4, ITS 3 a 4.

4.3 Vliv způsobu izolace na výsledek

Izolace DNA zpočátku probíhala v místnosti určené k izolaci DNA za standardních podmínek genetické laboratoře. Tedy v ochranném oděvu a rukavicích, na plochách denně čištěných prostředkem likvidujícím nukleové kyseliny, v místnosti pravidelně dekontaminované UV světlem.

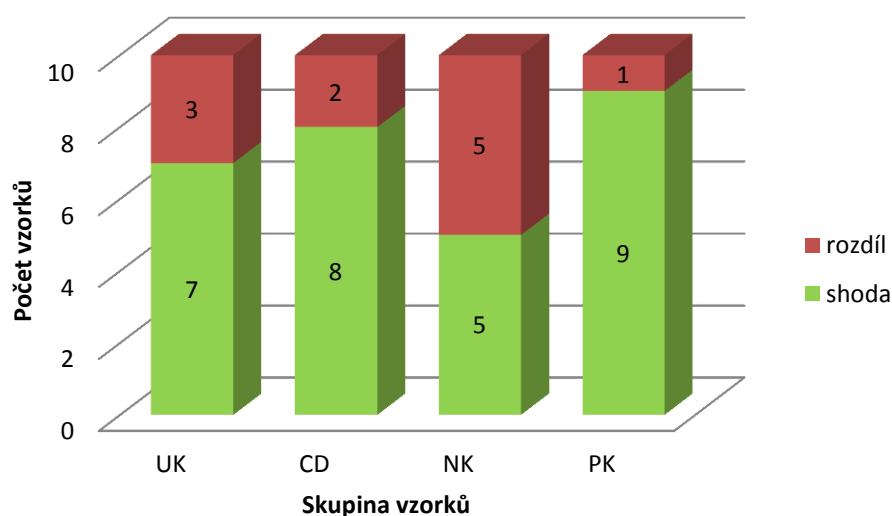
Po zhodnocení první části výsledků bylo vysloveno podezření na kontaminaci sporami rodu *Malassezia* z prostředí, proto další vzorky byly izolovány za zpřísněných podmínek v laminárním boxu.



Obr. 6. **Porovnání původního způsobu izolace a identifikace s optimalizovaným způsobem izolace a identifikace.** Do pokusu bylo započítáno 27 vzorků izolovaných fungálně specifickým kitem BiOstic® FFPE Tissue DNA. U původního způsobu izolace a identifikací PCR s primery ITS3 a 4 byla prokázána přítomnost kvasinek rodu *Malassezia* v 62 % vzorků. Izolací totožných vzorků stejným kitem v laminárním boxu a identifikací specifičtější nPCR s primery ITS5 a 4 a ITS3 a 4 se podařilo snížit záchyt rodu *Malassezia* na 11 % ze všech vzorků. Pojem „ostatní“ shrnuje zachycené fungální druhy: *Cladosporium* sp., *Engyodontium album*, *Wallemia* sp., *Aletrnaria* sp., *Sacharomyces* sp., *Intersonilia* sp., *Leptosphaerulina* sp., *Cryptococcus* sp., *Epicoccum nigrum*, *Lachnum* sp., *Penicilium* sp.

4.4 Porovnání Sangerovi sekvenace s NGS

40 vzorků bylo analyzováno nejprve Sangerovo sekvenací a následně pomocí NGS. Již v elektroforéze bylo viditelné, že všechny vzorky obsahují více než jeden fungální rod a NGS tento trend potvrdilo. Porovnání sekvenací ukázalo shodu v 72,5 % ze všech analyzovaných vzorků. Rozdílné výsledky ve 27,5 % vzorků mohou být způsobeny nedokonalostmi v Sangerovo sekvenování tzv. prioritním sekvenováním, překryvem bazí a zaměnění sekvence jednoho fungálního rodu za jiný.



Obr. 7. **Porovnání sekvenací ve specifických skupinách vzorků.** (UK = ulcerózní kolitida, CD = Crohnova choroba, NK = negativní kontrola, PK = pozitivní kontrola) Metody se shodují, jestliže identifikovaly stejný fungální rod.

Negativní kontroly většinou obsahovaly větší množství fungálních rodů na jeden vzorek než ostatní skupiny vzorků, a proto odečítání fungálních rodů ze Sangerovo sekvenování bylo zatíženo velkou chybou směšného vzorku a komplikovaného odečítání.

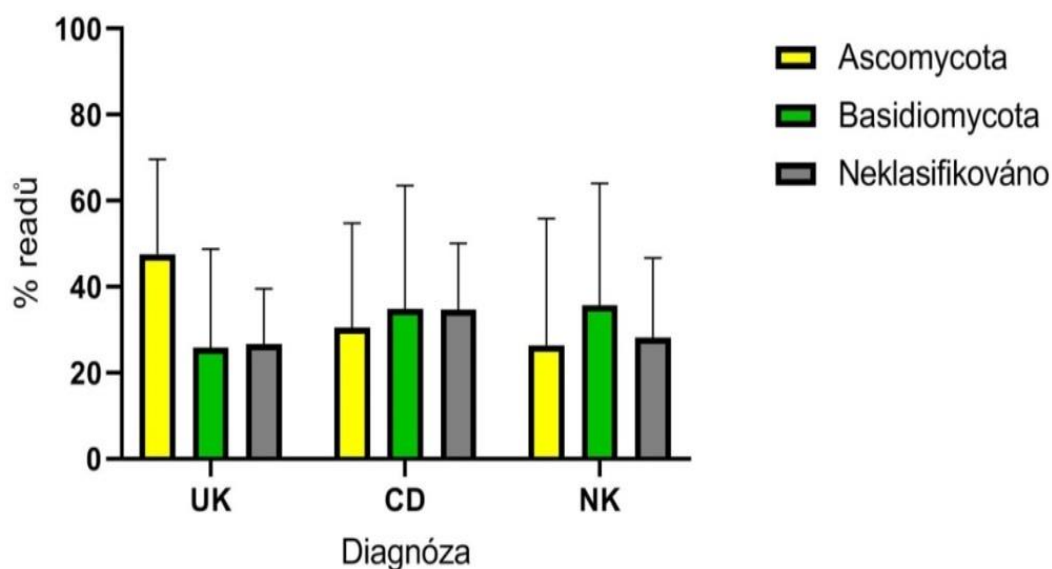
Proto byly na základě elektroforézy vybrány vzorky s jedním silným bendem jako pozitivní kontroly a byly osekvenovány oběma metodami. Avšak i zde jeden ze vzorků obsahoval podle NGS čtyři příbuzné fungální rody, které byly v Sangerovo sekvenaci zaměněny za jeden naprosto odlišný.

4.5 Fungální zastoupení v diagnózách

Na základě předchozích zjištění o vyšší četnosti fungálních rodů ve vzorku byla veškerá data v této sekci výsledků získána metodou NGS. Do výsledků byly zaznamenány pouze fungální rody s procentem readů vyšším než 2 % z celkového počtu readů ve vzorku.

4.5.1 Hrubá analýza fungálních oddělení ve vztahu k diagnóze

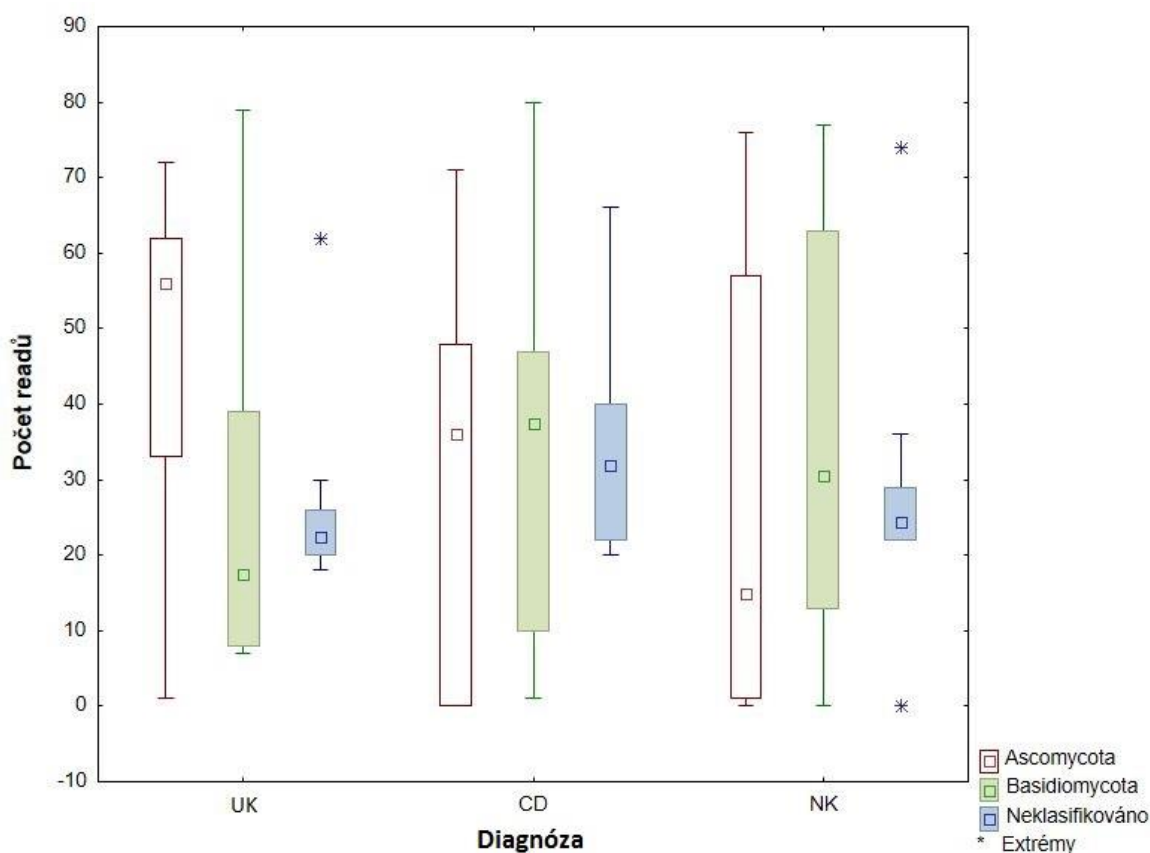
Pro prvotní orientaci se využívá rozdělení do fungálních oddělení k obecnému zjištění vyváženosti mykobiomu. Jestliže negativní kontroly ukazují rovnováhu fungálního mykobiomu v nezánettivé tkáni, pak na první pohled má Crohnova choroba velice podobnou fungální rovnováhu. Viditelný rozdíl je u mykobiomu pacientů s ulcerózní kolitidou, kde je fungální rovnováha narušena vyšším zastoupením Ascomycet a zároveň nižší četností Basidiomycet. I když jsou tato data (Obr. 8) statisticky neprůkazná, podobají se výsledkům studie Sokol. a kol (2017) přiložených v příloze č. 4.



Obr. 8. **Zastoupení fungálních oddělení v diagnózách.** Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou (UK = ulcerózní kolitida, CD = Crohnova choroba, NK = negativní kontrola, % readů = procento readů z všech readů ve vzorku).

4.5.2 Detailní statistická analýza fungálních oddělení ve vztahu k diagnóze

Mnohonásobný box-whisker plot (Obr. 9) zobrazuje detailní rozdíly mezi fungálními odděleními a danými diagnózami. Skupina vzorků od pacientů s UK se vyznačovala vyšším zastoupením Ascomycet a nižším zastoupením Basidiomycet v porovnání s negativními kontrolami. Vzorky od pacientů s CD ukazovaly velmi vyvážený poměr Asco- a Basidiomycet, ale zároveň i větší množství neklasifikovaného materiálu. Negativní kontroly projevovaly nižší procenta readů Ascomycet než Basidiomycet s celkovým dojmem vysoké variability obou oddělení.



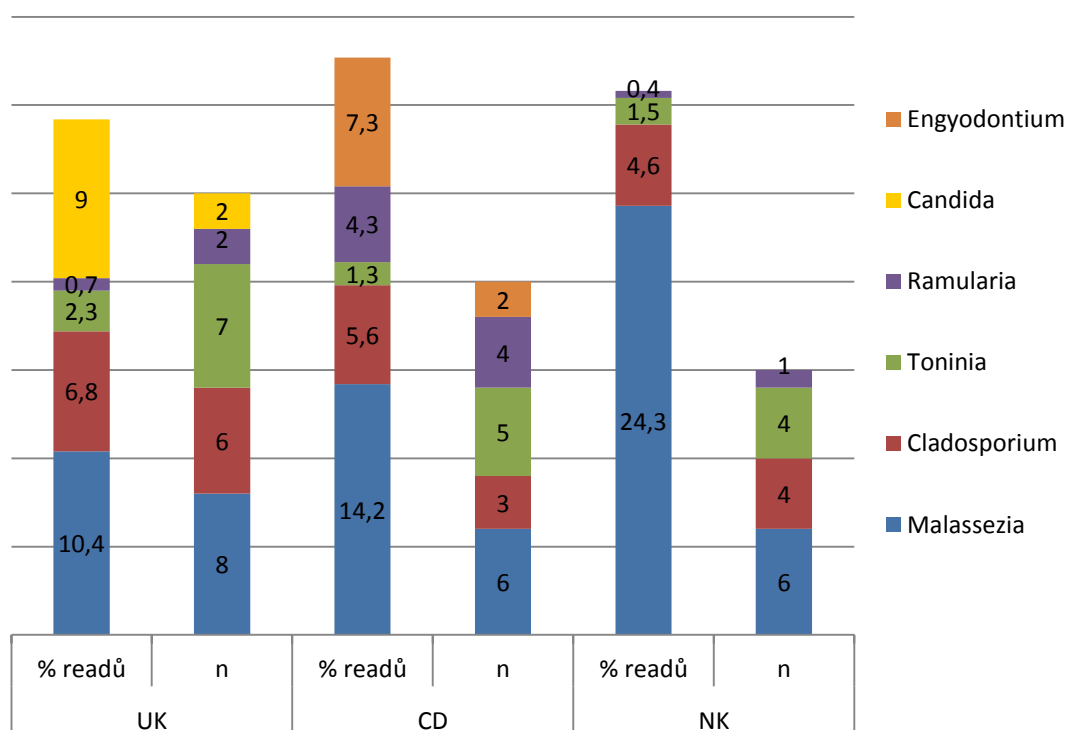
Obr. 9. Podrobnější zobrazení vztahů fungálních oddělení k diagnózám.

non-outlier min a max, 25-75% kvartil, median – čtvereček. Extrémní hodnoty jsou vyznačeny hvězdičkou pro nezkreslení dat celé skupiny. (UK = ulcerózní kolitida, CD = Crohnova choroba, NK = negativní kontrola).

Mezi jednotlivými diagnózami nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$).

4.5.3 Přehled nejčastějších fungálních rodů ve vztahu k diagnóze

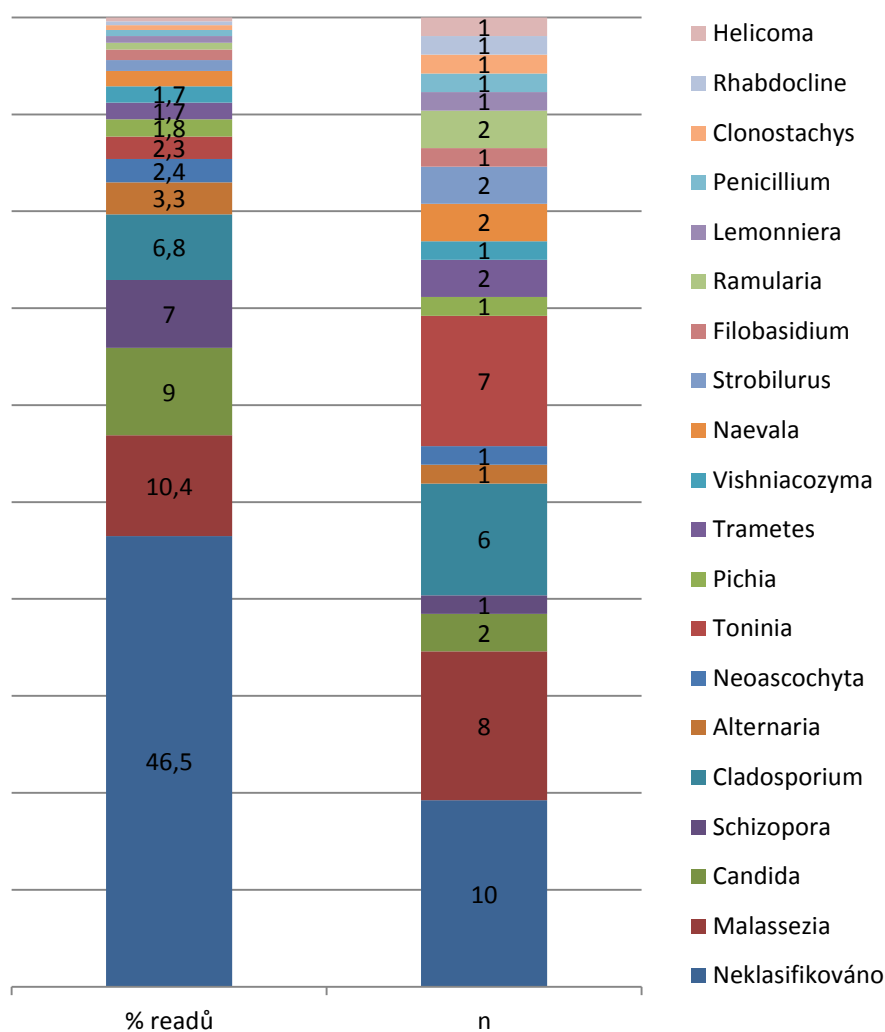
Detailnějším pohledem na fungální rody můžeme zjistit další odlišnosti mezi zdravými jedinci, pacienty s CD a pacienty s UK (Obr. 10). Nejčastěji se ve vzorcích napříč diagnózami vyskytovali kvasinky rodu *Malassezia* a houby rodu *Cladosporium* a *Toninia*. Rod *Ramularia* se v menší míře vyskytl u všech diagnóz, výrazněji u vzorků s CD. Rod *Candida* se podařilo prokázat jenom u vzorků s UK a rod *Engyodontium* byl prokázán jen u vzorků s CD. Obvykle se v jenom vzorku vyskytovalo průměrně 4-5 fungálních rodů, z nichž v 1/3 vzorků byl jeden majoritní fungální rod.



Obr. 10. **Rodové zastoupení v diagnózách.** Poměrové porovnání, kolikrát se určitý fungální rod vyskytl ve vzorcích s danou diagnózou (n) k jeho procentuálnímu výskytu u dané diagnózy (% readů). (UK = ulcerózní kolitida, CD = Crohnova choroba, NK = negativní kontrola).

4.5.4 Fungální rody u pacientů s ulcerózní kolitidou

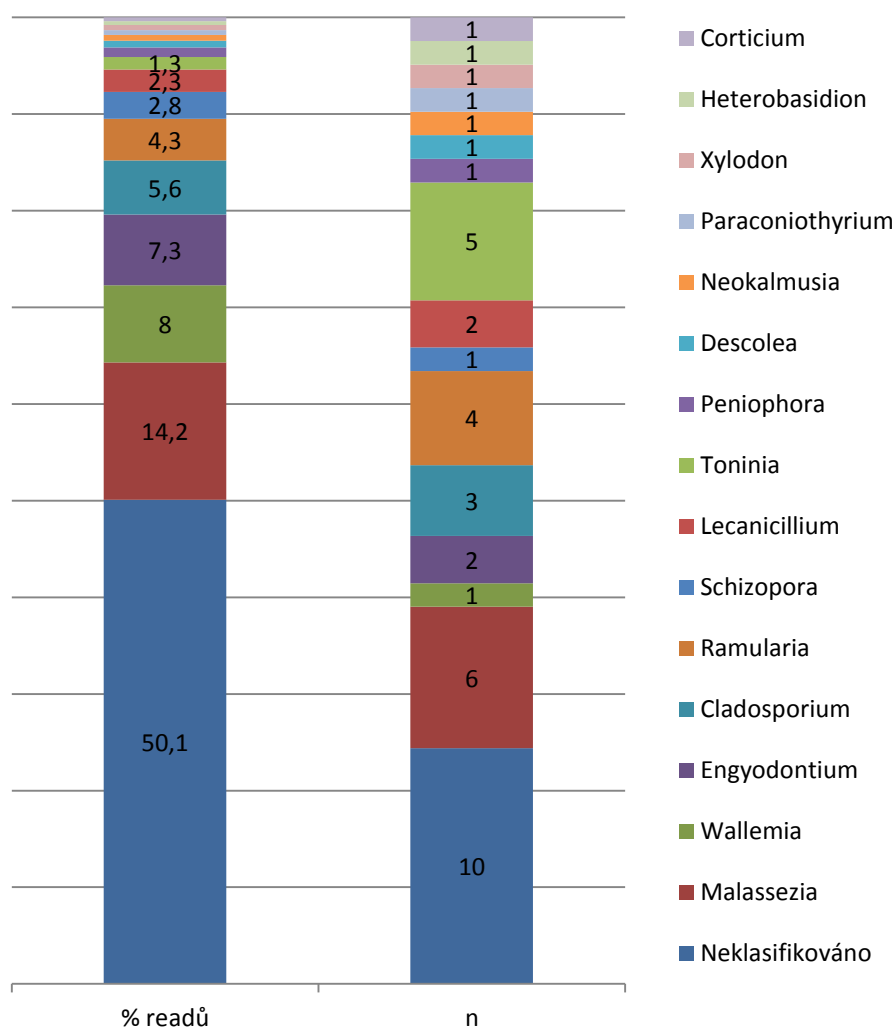
Podrobná data fungálních rodů z 10 vzorků od pacientů s diagnostikovanou ulcerózní kolitidou jsou zobrazena v obr. 11. Celkově bylo nalezeno u pacientů s UK 19 rodů, z nich nejčastější byly rody *Malassezia* (nalezena v 8 vzorcích z 10), *Toninia* (7/10) a *Cladosporium* (6/10). Ačkoliv se rod *Toninia* vyskytoval ve většině vzorků, jeho % readů byla vždycky jedna z nejnižších. Dále pak ve dvou vzorcích měl výraznou převahu rod *Candida* a u jednoho měl úplnou převahu rod *Schizopora*.



Obr. 11. **Fungální rody u pacientů s ulcerózní kolitidou.** Levý sloupec znázorňuje procentuální zastoupení fungálního rodu ve všech vzorcích, zatímco pravý sloupec doplňuje, v kolika vzorcích se daný rod vyskytoval.

4.5.5 Fungální rody u pacientů s Crohnovou chorobou

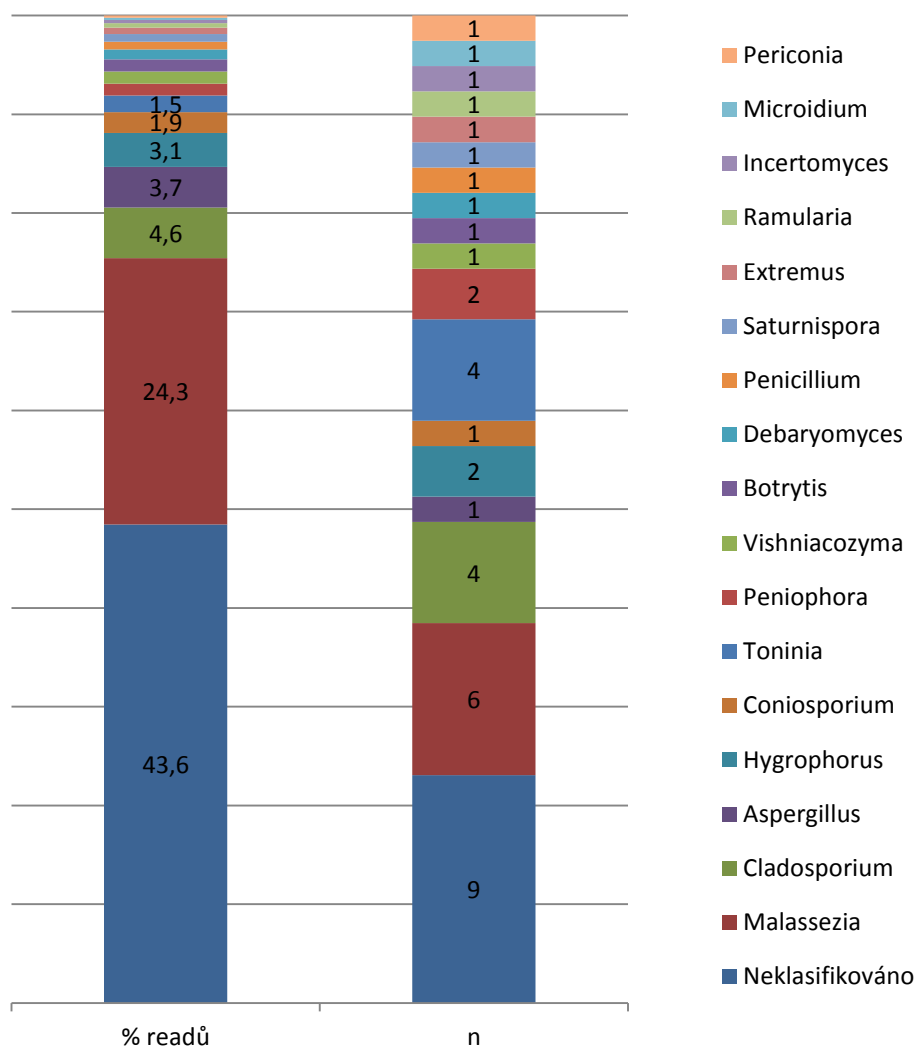
V 10 vzorcích pacientů s diagnostikovanou Crohnovou chorobou bylo nalezeno celkem 15 fungálních rodů (Obr. 12). Nejčastěji se mezi nimi objevovaly rody *Malassezia* (6/10), *Toninia* (5/10) a *Ramularia* (4/10). Rod *Toninia*, stejně jako u UK vzorků, byl vždy přičten v malém procentu readů. Dále nelze opomenout rod *Engyodontium*, který se ve dvou vzorcích vyskytoval s procentuální převahou a rod *Wallemia*, který měl v jednom vzorku převahu úplnou.



Obr. 12. **Fungální rody u pacientů s crohnovou chorobou.** Levý sloupec znázorňuje procentuální zastoupení fungálního rodu ve všech vzorcích, zatímco pravý sloupec doplňuje četnost rodu ve všech vzorcích.

4.5.6 Fungální rody v negativních kontrolách

Data byla získána z 9 vzorků od pacientů bez prokázaných zánětlivých změn a zobrazena v obr. 13. V jednom z deseti vzorků nebyly detekovány žádné fungální agens, i tak bylo u negativních kontrol prokázáno 17 fungálních rodů. Nejčastěji byly prokazovány rody *Malassezia* (6/10), *Cladosporium* (4/10) a *Toninia* (4/10). Rod *Toninia* zaujímal stejně nízká % readů jako u vzorků s UK i CD. Dále se u jednoho vzorku ve zvýšené míře objevil rod *Aspergillus*.



Obr. 13. **Fungální rody v negativních kontrolách.** Levý sloupec znázorňuje procentuální zastoupení fungálního rodu ve všech vzorcích, zatímco pravý sloupec doplňuje, v kolika vzorcích se daný rod vyskytoval.

5 Klinické zkušenosti z praxe

Moderní molekulární metody umožňují rychlou diagnostiku, která zachraňuje životy. Ne vždy však lékaři určující diagnózu vědí o těchto možnostech a na fungi jako původce pacientových komplikací se převážně nepomýšlí. Klinický obraz mykotické infekce se může projevit jako nespecifický granulomatózní zánět a fungální původce může být snadno zaměněn s původcem bakteriálním. V mnoha případech se mykotická infekce může klinikovi jevit jako zhoubný novotvar či neoplazie (viz níže). Léčba se však v obou případech zásadně liší od léčby antifungální. Nasazení antibiotik většinou způsobí přemnožení kvasinek a zhoršení pacientova stavu (Parker a kol. 1976). Léčba kancerogeneze útočí na rychle se dělící buňky a jako vedlejší efekt ničí pacientův imunitní systém, čímž otevře dveře nerozpoznané fungální infekci a pacientův život je tak opět v ohrožení (Donhuijsen a kol. 2008). Včasná fungální diagnostika mnohým pacientům zlepšuje kvalitu života a jiným může život zachránit. Níže jsou uvedeny příklady, kdy nově zavedená diagnostika fungálních agens pomocí molekulárně genetických metod pomohla s diferenciací diagnostikou bioptovaných vzorků.

5.1 Kazuistika č. 1

Čtrnáctiletý pacient se suspektní klinickou diagnózou: Onychomykóza s tvorbou pigmentu, k vyloučení pigmentové neoplazie.

Do laboratoře byly přijaty 2 kožní částky. První pocházející z nehtové ploténky 5. prstu pravé dolní končetiny o rozměrech 0,5x0,3x0,2 cm a druhá částka pocházející z části ploténky přivrácené k nehtovému lůžku o rozměrech 0,3x0,2x0,1 cm. Oba materiály byly zpracovány v celém rozsahu.

Mikroskopickým vyšetřením nebyl viditelný žádný pigment. Histologické barvení na železo neprokázalo depozita hemosiderinu, ani barvení Masson Fontana neprokázalo žádná depozita melaninu. Imunohistochemickým vyšetřením s melanocytárním markerem melanem A nebyla prokázána přítomnost pravé melanocytární afekce. Imunohistochemické vyšetření metodou PAS prokázalo četné mykotické struktury charakteru hyf a spor, které mají oproti běžným sporám větší rozměr. Molekulárně-biologickým vyšetřením pomocí regionu ITS 2 a NGS byla prokázána fungální DNA náležící druhu *Trychophyton rubrum*, formě produkující melanin.

Závěr: Onychomykóza s tvorbou pigmentu způsobená infekcí *Trychophytonem rubrum*, formou produkující melanin (melanonychia). Pigmentová neoplazie vyloučena.

5.2 Kazuistika č. 2

Patnáctiletý pacient s akutní lymfoblastickou leukémií (euploidní cALL s aberantní expresí CRLF2, CD66c, CNS1, negativní fúzní geny; chemoterapeuticky léčeno v posledních 7 měsících), obezitou, Pickwickovým syndromem, aterosklerózou II. stupně, septickým šokem, multiorgánovým selháním, sepsí způsobenou jinými gramnegativními organismy *Klebsiella pneumoniae*, akutním respiračním selháním typu I (hypoxické), akutním selháním ledvin, ascitem, toxickou nemocí jater s cholestázou, koagulopatií a neuropenií zemřel na celkovou sepsi. Pitva prokázala invazivní diseminovanou mykózu s postižením cév tenkého střeva a nadledvin, s ložiskovými ischemickými nekrózami střevní sliznice a nadledvin.

Histologické vyšetření prokázalo v tenkém střevě autolyzovanou sliznici s ložisky nekrotické sliznice kryté pseudomembránou. V četných cévách, ve svalovině a v submukóze i v subseróze byly nalezeny opticky duté hyfy vypadající na fungální rod *Aspergillus*. Další mykotické ložisko bylo nalezeno v nadledvině v rozsáhlé hemoragické nekróze i v tromboembolech v přilehlých cévách.

Genetická analýza i mikroskopický obraz potvrdily masivní výskyt fungální infekce a určily fungální druh *Rhizopus microsporus* (Zygomycotina, Mucorales, Mucoraceae).

Pacientův stav byl včetně výše zmíněného komplikovaný: hypertrofií levé srdeční komory, trombózami, embolizací větví a. pulmonalis, koagulopatií (intracerebrální hemoragie, fokálním prokrvácením orgánů dutiny břišní, ledvinné pánvičky, močovodů a plic), hydrothoraxem (vol. 100 ml), steatofibrózou jater těžkého stupně s ložiskovými nekrózami hepatocytů, intrahepatální cholestázou, ascitem (vol. 4000 ml), ikterem sklér, hemoragickou indurací sleziny a akutním selháním ledvin.

Závěr: Pacient zemřel na mykotickou sepsi druhem *Rhizopus microsporus*.

5.3 Kazuistika č. 3

Třiašedesátiletá pacientka s klinickou diagnózou chronické Lymphadenopatie colli a podezřením na lymfom či metastatické poškození uzliny u melanoblastomu.

Pacientce byla odebrána lymfatická uzlina (LU) z jugulodigastrické oblasti vpravo a zaslána na histologické vyšetření. Kompletně zpracovaná LU rozměrů 4x2x2 cm poskytla potvrzení diagnózy chronická nespecifická lymfadenitida a vyvrátila podezření na nádor i granulomatózní zánět.

Genetické vyšetření z tkáně LU vyvrátilo sexuálně přenosné infekce (*Chlamydia trachomatis* LGV, *Heamophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, CMV, lidský herpesvirus 1 a 2, virus Varicella-zoster) zoonózy (*Bartonella sp.*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella sp.*, *Francisella tularensis*, *Chlamydophila psittaci*) a *Toxoplasma gondii*.

Orientační genetická analýza ITS2 regionu mykotického agens poukázala na přítomnost houbového oportunního patogena *Alternaria infectoria*. Tento druh je saprofytem či příležitostným parazitem na rostlinách a skladovaném obilí. Stejný druh byl také identifikován s 99% pravděpodobností i ze zaklonovaných PCR produktů. Dále byla provedena orientační analýza aktinomycet, která potvrdila přítomnost bakteriálního agens *Actinomyces graevenitzii*.

Závěr: Chronická lymphadenopatie způsobená infekcí houbového oportunního patogena *Alternaria infectoria* a bakteriálním agens *Actinomyces graevenitzii*.

6 Diskuze

6.1 Metodický rozbor

Nejdůležitějším bodem ve správné mykologické diagnostice je izolace DNA. Jelikož se fungální spóry běžně vyskytují v jakémkoliv prostředí (de Hoog a kol. 2000), je třeba dbát na sterilní práci, aby se zamezilo kontaminaci vzorku z prostředí. Úkolem pro další studie by mohlo být zjištění, v jakých fázích se může vzorek kontaminovat: např. při odběru vzorku nebo při histologickém zpracování. Naše práce prověřila část řetězce zpracování vzorku v molekulárně genetické laboratoři, tzn. izolaci DNA a její analýzu. Jako kontaminující DNA byl opakovaně prokázán rod *Malassezia*, který je takto skloňován i ve studii Flury a kol. (2014). Důležitým zjištěním naší práce je, že i v germicidně čištěné místnosti se stále mohou vyskytovat fungální spóry a je nutné pracovat v laminárním boxu.

Důležitým krokem v izolaci fungální DNA je prolomení fungální buněčné stěny, která je běžně velmi pevná. Histologické zpracování zaručuje fixaci struktur, které zároveň částečně narušuje, jelikož i nízké koncentrace formaldehydu způsobují lyzi buněčné stěny (Denyer a Russel 2004). Komplikací použití formalínu (4% formaldehydu) je poškození DNA. Formalín může způsobovat cross-link cytozinu, který tak nemůže být rozpoznán DNA polymerázou a ta namísto guaninu vloží adenosin a vzniká tak umělá C>T nebo G>A mutace (Oh a kol. 2015). Jelikož ale tento fakt nevede při onkologické diagnostice, kde se prokazují bodové mutace, tak ve fungální diagnostice je tento fakt značně zanedbatelný.

Pomocí specializovaných kitů na izolaci fungální DNA z parafinových vzorků lze získat dostatečně kvalitní DNA pro PCR a sekvenční analýzy. Prvním důležitým faktorem je schopnost kitu izolovat DNA z parafinových vzorků. Druhým faktorem je schopnost kitu dokončit rozpad fungální buněčné stěny a vyizolovat fungální DNA ze směsného vzorku (Vesty a kol. 2017). Tyto schopnosti má izolační kit od firmy MoBio laboratories, BiOstic® FFPE Tissue DNA Isolation Kit, který vyšel z našich dat jako nejlepší varianta.

Dále je třeba odlišit oportunní fungální patogeny od běžných hub obsažených v potravě. Studie Hallen-Adams a Suhr (2017) rozděluje fungi na rezidentní a nerezidentní podle jejich schopností přežít podmínky panující v lidském zažívacím traktu. I když fungi nerezidentní nejsou schopny přežít tyto podmínky, jejich DNA se může ve vzorcích

vyskytovat, avšak v poškozeném stavu. Na této teorii je postaveno použití nPCR, která v prvním kole zachycuje úsek DNA o velikosti přibližně 600 bp, který by vcelku měla obsahovat jenom nepoškozená DNA hub rezidentních. Tento krok by měl eliminovat záchyt hub nerezidentních. Pro tyto účely byla na základě studie Irinyi a kol. (2016) vybrána a ověřena kombinace primerů v prvním kole ITS5 a ITS4, v druhém kole pak ITS3 a ITS4.

Kratší úsek fungální DNA o velikosti přibližně 300 bp vymezený primery ITS3 a ITS4 má optimální délku pro sekvenační analýzu. Výsledky získané ze Sangerevova sekvenování mohou sloužit jako orientační, ale za směrodatné by měly být spíše pokládány výsledky získané z NGS.

Vzorky z GIT standardně obsahují více než jeden fungální rod (Sokol a kol. 2017). Některé fungální rody mají velmi podobnou velikost produktů v elektroforéze a je tak obtížné je od sebe odlišit a správně manuálně oddělit. Tento fakt potom radikálně ovlivňuje výsledky ze Sangerova sekvenování, kdy dochází k typickému diagramu smíšeného vzorku a častému překryvu bazí. Takto může být snadno jeden fungální rod zaměněn za jiný a celkové povědomí o fungálním zastoupení ve vzorku je špatný. Lepší a přesnější variantou je NGS, protože zpracování vzorku obsahující mnoho fungálních rodů je manuálně jednodušší, jelikož není třeba ručně oddělovat jednotlivé produkty na základě jejich velikosti.

Menší nepříjemností přípravy setu vzorků na NGS je hlídání koncentrací a ředění vzorků do ekvimolární podoby. Bez rovnoměrného zastoupení molů vzorku ve finální knihovně není možné získat dostatek readů u všech vzorků a bylo by nutné analýzu méně koncentrovaných vzorků opakovat. Pro ušetření času a peněz je dobré vytvořit si v excelu jednoduchou tabulku na přepočítávání koncentrací vzorků na moly a tabulku ředění.

Zároveň u NGS lze mít výsledkové varianty semikvantitativní a kvantitativní. Rozdíl je v použití molekulárních barecodů. U semikvantitativní analýzy se používají pouze adaptory, které určují identitu vzorku. Zatímco kvantitativní analýza má navíc navázané molekulární barecody, které označí počáteční množství DNA a po sekvenaci o určitém počtu cyklů je vypočítáno přesné množství fungální DNA ve vzorku (Gohl a kol. 2019). Použití molekulárních barecodů ale analýzu výrazně prodražuje.

U většiny vzorků nemalou část celkového procenta readů tvořil neklasifikovaný materiál, což by mohlo být závislé právě na způsobu izolace, podstatě vzorku nebo nekompletní srovnávací databázi. Příloha č. 3 zobrazuje možnost vlivu izolačního kitu na výsledky NGS jednoho vzorku izolovaného odlišnými kity. Podobná anomálie se objevila i u několika dalších vzorků izolovaných QIAamp® DNA mini kitem. I když je tento kit považován za zlatý standard pro NGS onkologické diagnostiky (Kofanova a kol. 2020), pro fungální diagnostiku se dle našich zkušeností nehodí.

6.2 Klinický rozbor

Tenké i tlusté střevo je komplexní biosystém vzhledem k počtu mikroorganismů, které ho obývají. Pro objasnění záhad střevních chorob je nutné brát na vědomí nejenom střevní sliznici, bakterie, viry a imunitní systém, ale i mnohdy opomíjené houby a kvasinky. Sokol a kol. (2017) vytvořili síť vztahů bakteriální a fungální říše přiloženou v příloze č. 4. Z této sítě vyplývá odlišná úloha mykobiomu v patogenezi CD a UK. Zatímco bakteriální biodiverzita je u obou chorob snižena, u CD fungální biodiverzita zůstává, a tak nastává rozvrat mezi interakcemi bakteriálního a fungálního mikrobiomu. Naopak UK má fungální biodiverzitu zvýšenou a vznikají tak nové interakce mezi říšemi, které také mohou vést k zánětu.

Naše výsledky částečně potvrzují výstupy studie Sokol a kol. (2017), kdy Obr. 8 zobrazuje zvýšenou biodiverzitu u UK vzorků s převahou Askomycet, zatímco u CD vzorků je fungální biodiverzita zachována vyváženým poměrem Asko- a Basidiomycet, podobně jako u vzorků negativních kontrol. Použitím statistických metod F testu, Kruskal-Wallis testu a ANOVY nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$), avšak zjištění těchto trendů může být základem pro další studie.

Při prvním pohledu na rozdělení do oddělení se jeví fungální biodiverzita u skupiny UK jako zvýšená ve prospěch Askomycet. Při podrobnějším pohledu na biodiverzitu fungálních rodů, skupina UK obsahuje nejvíce prokázaných rodů (19) ze všech skupin. U skupiny NK jsme prokázali 17 rodů a u skupiny CD jsme prokázali 15 rodů.

Ve všech skupinách vzorků (CD, UK, NK) jsme nejčastěji našli kvasinku *Malassezia*, plíseň *Cladosporium* a lišejník *Toninia*. Kvasinky rodu *Malassezia* byly s nejvíce procenty readů prokazovány u vzorků bez zánětlivých změn (NK) a shodují se tak s literaturou,

kteřá řadí *Malassezie* do zdravého střevního mykobiomu. Literatura řadí do zdravého mykobiomu také *Candida sp.* a *Saccharomyces cerevisiae*, avšak ani jeden jsme u našich negativních kontrol neprokázali. Tento jev lze vysvětlit odlišným materiálem vzorků, kdy většina výzkumů je prováděna ze vzorků stolice, zatímco my jsme pracovali s bioptickými vzorky. Naše výsledky by tak potvrzovaly mnohokrát skloňovanou teorii, že vzorky stolice obsahují navíc i fungi z potravy (Hallen-Adams a Suhr 2017) a pro reálné zjištění střevního mykobiomu jsou lepší vzorky bioptické.

Dále se ve všech skupinách velmi často, i když v nízkých procentech readů, objevoval také druh *Toninia physaroides*, který se v přírodě normálně vyskytuje jako lišejník na povrchu půdy, písku, vzácně na skalních stěnách. Tento fungální rod normálně roste při pH 7,3±0,1 (Farkas a Veres 2009), ale není známo, jestli dokáže přežít aciditu žaludku a alkalitu duodena.

Rod *Ramularia* se také vyskytl ve všech skupinách vzorků v nízkém procentu readů, ale u skupiny CD vzorků se vyskytoval častěji a u jednoho z CD vzorků dokonce s nadměrnou převahou. *Ramularia* je patogen ječmene a cukrové řepy a do organismu se dostane pomocí potravin vyrobených z těchto zdrojů. Ne nadarmo se pacientům s CD doporučují speciální diety, které zahrnují i omezení lepku či jeho úplné vynechání. Jelikož CD pacienti mají oslabenou bariérní funkci střeva a defektní regulaci imunitní reakce, z hlediska prevence relapsu CD je rozumné snížit mikrobiální nálož ve střevě výběrem vhodné stravy. Nejlepší výsledky jsou zaznamenávány u pacientů s enterální výživou, která je syntetická a neobsahuje tak žádné patogeny rostlin či jiné fungální kontaminanty potravin (Goens a Micic 2020).

Skupina vzorků pacientů s Crohnovou chorobou se také výrazně odlišovala průkazem druhu *Engyodontium album* s významným procentem readů ve vzorcích. *Engyodontium album* je fungální druh, ze kterého pochází proteináza K, běžně využívaná k degradaci keratinu a naštěpení tkáně před izolací DNA. Některé studie (Delavenne a kol. 2011; Amrouche a kol. 2020) označují tento fungální druh jako kontaminant, který se do vzorku dostal s použitím proteinázy K. Jelikož jsme *Engyodontium album* prokázali jen u dvou vzorků, lze možnost kontaminace tímto fungálním druhem vyloučit a je možné, že hraje roli v patogenezi Crohnovi choroby.

Skupina vzorků od pacientů s ulcerózní kolitidou obsahovala *Malassezia sp.* ve většině vzorků, ale s nejmenší četností v jednotlivých vzorcích v porovnání s ostatními skupinami. Také obsahovala častěji než ostatní skupiny plíseň *Cladosporium* a lišejník *Toninia*. Významným rozdílem od ostatních skupin je průkaz kvasinek *Candida intermedia* a *Candida tropicalis*, vždy s nadměrnou převahou nad ostatními fungálními rody ve vzorku. Podle výzkumu Zwolinska-Wcislo a kol. (2009) se *Candidy* vyskytují u dlouhotrvající ulcerózní kolitidy a komplikují hojení vředů. Pro zlepšení stavu pacienta a léčbu kandidové kolonizace při UK se používá buď antifungální léčba fluconazolem, nebo podáním probiotika *Lactobacillus acidophilus*.

Podle klinických zkušeností viditelných ve třech uváděných případech kazuistiky je možné si povšimnout, že na mykotickou infekci se myslí až v nejzazším případě, kdy už není mnoho jiných možností. Mykotické infekce se mohou jevit jako neoplastické změny pocházející od neznámého druhu zhoubného novotvaru nebo jako nespecifický granulomatózní zánět. Vyloučení kancerogeneze je logickým prvním krokem, avšak v kroku druhém by s prověřováním typických bakteriálních infekcí mělo být i prověření infekcí mykotických.

7 Závěr

Cílem této práce bylo nejprve optimalizovat metodu NGS pro analýzu mykobiomu a následně zmapovat spektrum fungálních rodů u pacientů s ulcerózní kolitidou a Crohnovou chorobou.

Během optimalizačního procesu byl vybrán BiOstic® FFPE Tissue DNA Isolation Kit za nejvhodnější kit pro izolaci fungální DNA. Zároveň byl potvrzen rod *Malassezia* jako kontaminant z prostředí, jehož výskyt ve vzorku byl omezen izolací DNA v laminárním boxu. Pro odlišení hub, plísní či kvasinek obsažených v potravě od oportunních fungálních patogenů byla úspěšně zavedena nPCR s použitím primerů ITS 5 a 4 a ITS 3 a 4. Závěrem bylo NGS prokázáno jako specifitější volba pro sekvenaci pan-fungálních sekvencí než Sangerovo sekvenování.

V klinické části výzkumu byly pozorovány zajímavé trendy vyššího zastoupení Askomycet ve střevních vzorcích pacientů s ulcerózní kolitidou a vyvážený poměr Askomycet a Basidiomycet u vzorků pacientů s Crohnovou chorobou podobný poměru v negativních kontrolách. Tyto trendy by mohly ukazovat na roli Askomycet v patogenezi ulcerózní kolitidy.

Při vytváření podrobného přehledu fungálních rodů vyskytujících se u pacientů s IBD a ve vzorcích bez prokázaných zánětlivých změn jsme nejčastěji ve všech skupinách vzorků prokazovali kvasinky rodu *Malassezia*, plíseň rodu *Cladosporium* a lišejník rodu *Toninia*. Dále jsme pozorovali rod *Candida* výhradně u UK vzorků a rod *Engyodontium* a *Ramularia* u CD vzorků. Negativní kontroly se od ostatních skupin odlišovaly vyšším zastoupením rodu *Malassezia* v jednotlivých vzorcích. Z našich dat však nelze vyvodit žádný fungální rod se statistickou významností, který by byl typický pro dané onemocnění. A proto nebylo možné vybudovat interaktivní databázi, která by přiřazovala určité fungální rody ke klinické diagnóze.

Výstupy této diplomové práce byly použity pro zavedení mykobiální diagnostiky z FFPE vzorků metodou NGS v Bioptické laboratoři s.r.o. v Plzni, kde nyní pomáhá při diferenciální diagnostice bioptovaných vzorků.

8 Seznam použitých zkratek

BR	broad range; široká škála
bp	base pair; párů bází
cALL	childhood- akutní lymfoblastická leukémie
CD	Crohnova choroba
CMV	Cytomegalovirus
CO1	cytochromoxidáza C 1
ER	endoplazmatické retikulum
FFPE	formalin fixed, parafin embedded; formalínem fixováno, v parafínu zakotveno
GIT	gastrointestinální trakt
IBD	inflammatory bowel disease; zánětlivé střevní onemocnění
IL	interleukin
ITS	internal transcribed spacer; vnitřní transkribovaný prostor
KHP	KAPA Hyper Plus
lab.	laboratorní
LU	lymfatická uzlina
LSU	velká ribozomální podjednotka
mag.	magnetické
MDP	muramil dipeptid
MM	master mix
NF- κ B	nukleární faktor κ B
NGS	next generation sequencing; sekvenování nové generace
NOD2	Nukleotidy vázající oligomerizační doména - obsahující protein 2;
nPCR	nested polymerázová řetězová reakce
p-ANCA	perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies
PCR	polymerázová řetězová reakce
SSU	malá ribozomální podjednotka
TAE pufr	Tris-Acetát-EDTA pufr
TNF- α	tumor necrosis faktor α
UK	Ulcerózní kolitida

9 Seznam použité literatury

- Amrouche, T., Mounier, J., Pawtowski, A., Thomas, F., & Picot, A. (2020). Microbiota Associated with Dromedary Camel Milk from Algerian Sahara. *Current Microbiology*, 77(1), 24-31.
- Anderson, C. A., Boucher, G., Lees, C. W., Franke, A., D'Amato, M., Taylor, K. D., ... & Lagacé, C. (2011). Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature genetics*, 43(3), 246.
- Aniwan, S., Park, S. H., & Loftus, E. V. (2017). Epidemiology, natural history, and risk stratification of Crohn's disease. *Gastroenterology Clinics*, 46(3), 463-480.
- Anonymous (2012) STATISTICA, v. 12, StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA; Available from: <http://www.statsoft.com>.
- Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2012). Crohn's disease. *The Lancet*, 380(9853), 1590-1605.
- Bouma, G., & Strober, W. (2003). The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature reviews immunology*, 3(7), 521-533.
- Buentke, E., Heffler, L. C., Scheynius, A., Wilson, J. L., Wallin, R. P., Löfman, C., ... & Ljunggren, H. G. (2002). Natural killer and dendritic cell contact in lesional atopic dermatitis skin—Malassezia-influenced cell interaction. *Journal of investigative dermatology*, 119(4), 850-857.
- de Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J., & Figueras, M. J. (2000). *Atlas of clinical fungi* (No. Ed. 2). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J. L., Barbier, G., & Le Blay, G. (2011). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International journal of food microbiology*, 151(2), 247-251.
- Denyer, S., & Russell, A. D. (2004). Non-antibiotic antibacterial agents: mode of action and resistance. *Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology*, 306-322.
- Donhuijsen, K., Petersen, P., & Schmid, W. K. (2008). Trend reversal in the frequency of mycoses in hematological neoplasias: autopsy results from 1976 to 2005. *Deutsches Ärzteblatt International*, 105(28-29), 501.

- Farkas, E., & Veres, K. (2009). Habitat preferences on some soil-inhabiting *Toninia* species with special attention to some soil parameters. *Acta Botanica Hungarica*, *51*(3-4), 289-300.
- Ferrand, A., Al Nabhani, Z., Tapias, N. S., Mas, E., Hugot, J. P., & Barreau, F. (2019). NOD2 expression in intestinal epithelial cells protects toward the development of inflammation and associated carcinogenesis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, *7*(2), 357-369.
- Flury, B. B., Weisser, M., Prince, S. S., Bubendorf, L., Battegay, M., Frei, R., & Goldenberger, D. (2014). Performances of two different panfungal PCRs to detect mould DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissue: what are the limiting factors?. *BMC infectious diseases*, *14*(1), 692.
- Frank, D. N., Amand, A. L. S., 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*, *104*(34), 13780-13785.
- Franke, A., McGovern, D. P., Barrett, J. C., Wang, K., Radford-Smith, G. L., Ahmad, T., ... & Anderson, C. A. (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature genetics*, *42*(12), 1118.
- Gilmore, S. R., Graefenhan, T., Louis-Seize G. & Seifert, K. A. (2009). Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. *Molecular Ecology Resources*, *9*, 90-98.
- Goens, D., & Micic, D. (2020). Role of Diet in the Development and Management of Crohn's Disease. *Current Gastroenterology Reports*, *22*(4), 1-9.
- Gohl, D. M., Magli, A., Garbe, J., Becker, A., Johnson, D. M., Anderson, S., ... & Beckman, K. B. (2019). Measuring sequencer size bias using REcount: a novel method for highly accurate Illumina sequencing-based quantification. *Genome biology*, *20*(1), 1-17.
- Gomez, C. A., Budvytiene, I., Zemek, A. J., & Banaei, N. (2017). Performance of targeted fungal sequencing for culture-independent diagnosis of invasive fungal disease. *Clinical Infectious Diseases*, *65*(12), 2035-2041.

- Hallen-Adams, H. E., & Suhr, M. J. (2017). Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*, 8(3), 352-358.
- 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).
- Chen, K. T., Huang, D. Y., Chiu, C. H., Lin, W. W., Liang, P. H., & Cheng, W. C. (2015). Synthesis of Diverse N-Substituted Muramyl Dipeptide Derivatives and Their Use in a Study of Human NOD2 Stimulation Activity. *Chemistry—A European Journal*, 21(34), 11984-11988.
- Irinyi, L., Lackner, M., De Hoog, G. S., & Meyer, W. (2016). DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. *Fungal biology*, 120(2), 125-136.
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., ... & Akagawa, K. S. (2008). Unique CD14+ intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- γ axis. *The Journal of clinical investigation*, 118(6), 2269-2280.
- Khor, B., Gardet, A., & Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 307-317.
- Klener Pavel. *Vnitřní lékařství*. Praha: Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-367-9.
- Kofanova, O., Bellora, C., Frاسquilho, S. G., Antunes, L., Hamot, G., Mathay, C., ... & Betsou, F. (2020). Standardization of the preanalytical phase of DNA extraction from fixed tissue for next-generation sequencing analyses. *New biotechnology*, 54, 52-61.
- Lee, W. I., Subramaniam, K., Hawkins, C. A., & Randall, K. L. (2019). The significance of ANCA positivity in patients with inflammatory bowel disease. *Pathology*, 51(6), 634-639.
- Liguori, G., Lamas, B., Richard, M. L., Brandi, G., Da Costa, G., Hoffmann, T. W., ... & Campieri, M. (2016). Fungal dysbiosis in mucosa-associated microbiota of Crohn's disease patients. *Journal of Crohn's and Colitis*, 10(3), 296-305.
- McGovern, D. P., Kugathasan, S., & Cho, J. H. (2015). Genetics of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 149(5), 1163-1176.

- Moré, M. I., & Swidsinski, A. (2015). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis—a review. *Clinical and experimental gastroenterology*, 8, 237.
- Moyes, D. L., Wilson, D., Richardson, J. P., Mogavero, S., Tang, S. X., Wernecke, J., ... & Murciano, C. (2016). Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, 532(7597), 64-68.
- Mukhopadhyia, I., Hansen, R., El-Omar, E. M., & Hold, G. L. (2012). IBD—what role do Proteobacteria play?. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 9(4), 219.
- Nanau, R. M., & Neuman, M. G. (2012). Metabolome and inflammasome in inflammatory bowel disease. *Translational Research*, 160(1), 1-28.
- Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., ... & Ajami, N. J. (2017). The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome* 5: 153.
- Němec Miroslav a Dagmar Matoulková. *Základy obecné mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.
- Neurath, M. F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 329-342.
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., ... & Sung, J. J. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), 2769-2778.
- Oh, E., Choi, Y. L., Kwon, M. J., Kim, R. N., Kim, Y. J., Song, J. Y., ... & Shin, Y. K. (2015). Comparison of accuracy of whole-exome sequencing with formalin-fixed paraffin-embedded and fresh frozen tissue samples. *PloS one*, 10(12).
- Parker Jr, J. C., McCloskey, J. J., & Knauer, K. A. (1976). Pathobiologic features of human candidiasis: a common deep mycosis of the brain, heart and kidney in the altered host. *American journal of clinical pathology*, 65(6), 991-1000.
- Pothoulakis, C. (2009). anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 30(8), 826-833.

- Ramos, G. P., & Papadakis, K. A. (2019). Mechanisms of disease: inflammatory bowel diseases. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 94, No. 1, pp. 155-165). Elsevier.
- Richard, M. L., Lamas, B., Liguori, G., Hoffmann, T. W., & Sokol, H. (2015). Gut fungal microbiota: the Yin and Yang of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, *21*(3), 656-665.
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in microbiology*, *7*, 185.
- Ross, H., Steele, S. R., Varma, M., Dykes, S., Cima, R., Buie, W. D., & Rafferty, J. (2014). Practice parameters for the surgical treatment of ulcerative colitis. *Diseases of the colon & rectum*, *57*(1), 5-22.
- Shadrivova, O. V., Burygina, E. V., & Klimko, N. N. (2019). Molecular Diagnostics of Mucormycosis in Hematological Patients: A Literature Review. *Journal of Fungi*, *5*(4), 112.
- Schindler Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(16), 6241-6246.
- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H. P., Jegou, S., Landman, C., ... & Cosnes, J. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*, *66*(6), 1039-1048.
- 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.
- Vesty, A., Biswas, K., Taylor, M. W., Gear, K., & Douglas, R. G. (2017). Evaluating the impact of DNA extraction method on the representation of human oral bacterial and fungal communities. *PloS one*, *12*(1).

Votava, M., Růžička, F., Woznicová, V., Černohorská, L., Dvořáčková, M., Dvořáková Heroldová, M., ... & Zahradníček, O. (2010). *Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody*. Neptun.

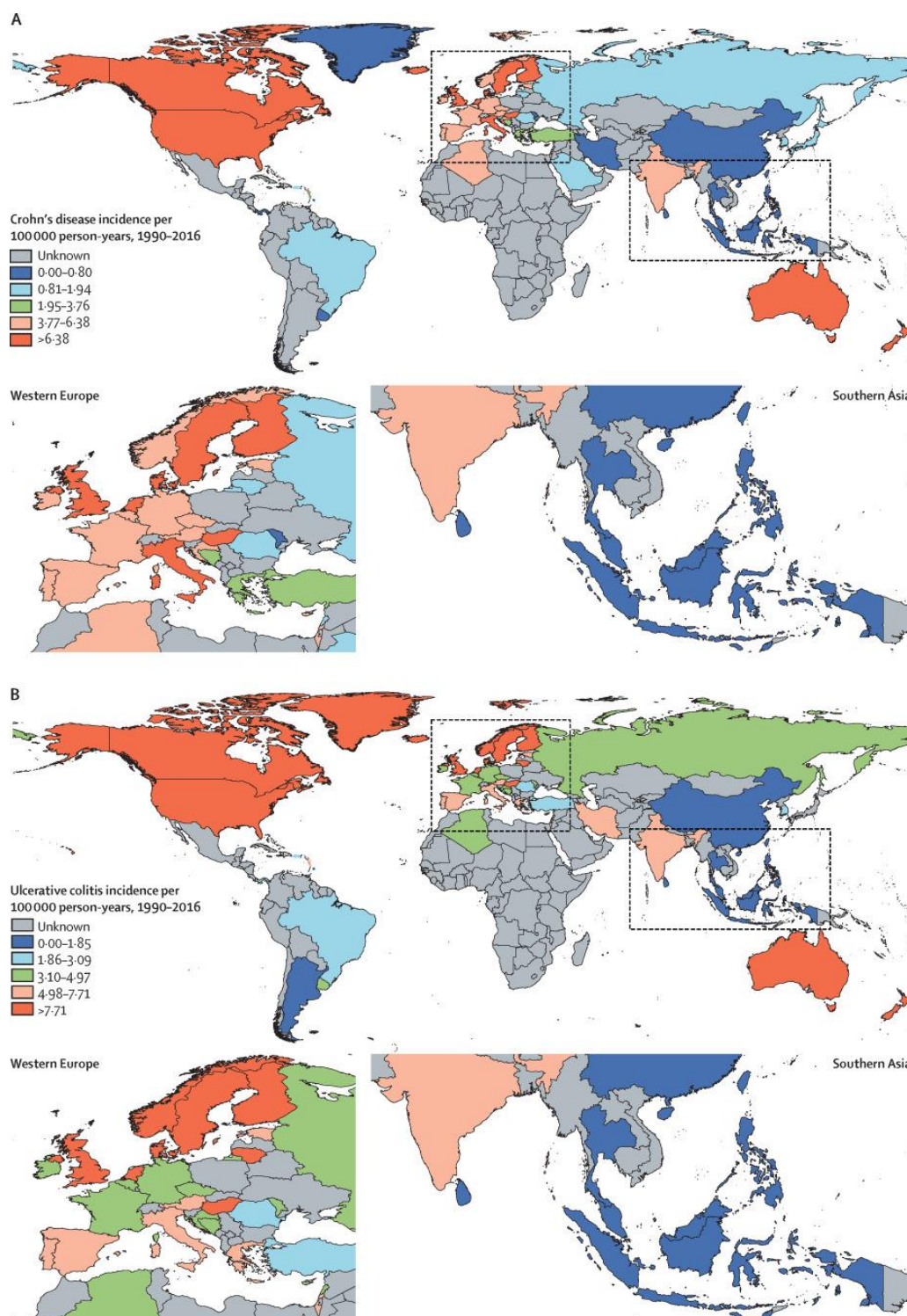
Wheeler, M. L., Limon, J. J., Bar, A. S., Leal, C. A., Gargus, M., Tang, J., ... & Arditi, M. (2016). Immunological consequences of intestinal fungal dysbiosis. *Cell host & microbe*, 19(6), 865-873.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

Zwolinska-Wcislo, M., Brzozowski, T., Budak, A., Kwiecien, S., Sliwowski, Z., Drozdowicz, D., ... & Pawlik, W. W. (2009). Effect of *Candida* colonization on human ulcerative colitis and the healing of inflammatory changes of the colon in the experimental model of colitis ulcerosa. *Acta physiologica Polonica*, 60(1), 107.

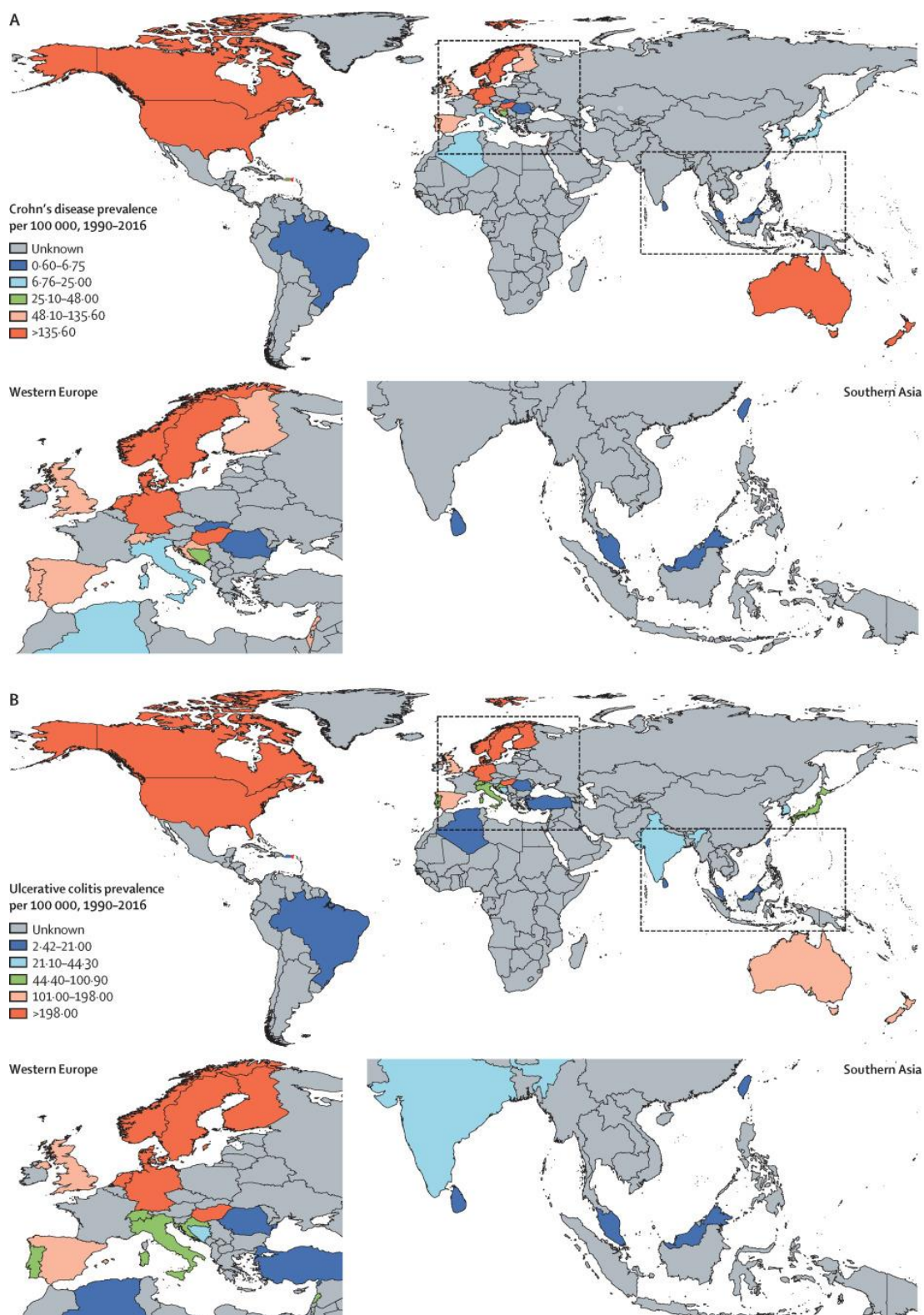
10 Přílohy

Příloha č. 1: Incidence CD (A) a UK (B) ve světě.



Zdroj: Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., ... & Sung, J. J. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), 2769-2778.

Příloha č. 2: Prevalence CD (A) a UK (B) ve světě.



Zdroj: Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., ... & Sung, J. J. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), 2769-2778.

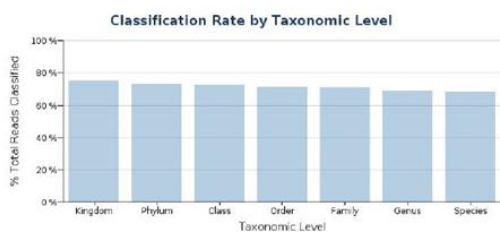
EliGene® FFPE DNA Isolation Kit

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
1,055,113	1,055,113	100.00 %

Classification Statistics

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	797,639	75.60 %
Phylum	771,655	73.13 %
Class	769,024	72.89 %
Order	753,742	71.44 %
Family	752,011	71.27 %
Genus	726,168	68.82 %
Species	724,236	68.64 %



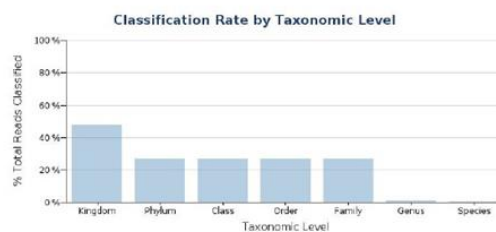
QIAamp® DNA mini kit

Sample Information

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
1,136,765	1,136,765	100.00 %

Classification Statistics

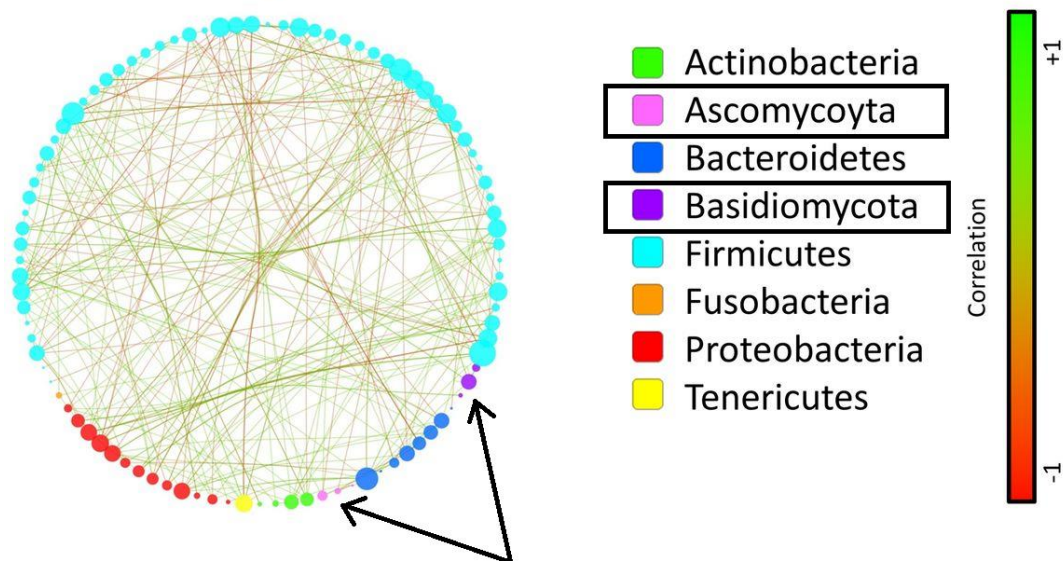
Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	543,926	47.85 %
Phylum	306,809	26.99 %
Class	305,522	26.88 %
Order	305,435	26.87 %
Family	305,290	26.86 %
Genus	10,768	0.95 %
Species	8,276	0.73 %



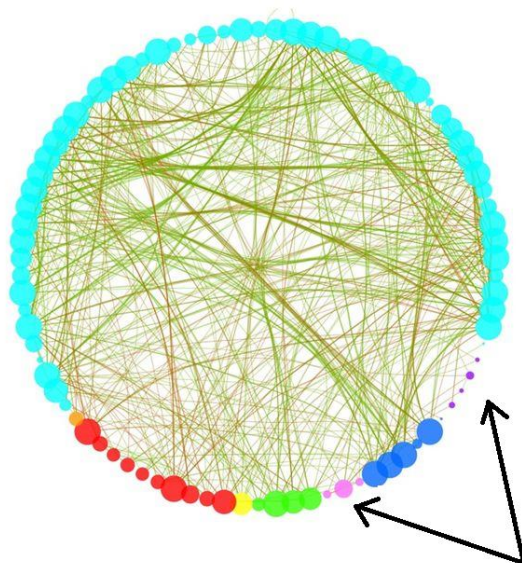
Zdroj: vlastní

Příloha č. 4: Síť vlivů mikrobiálních říší ve střevním biosystému

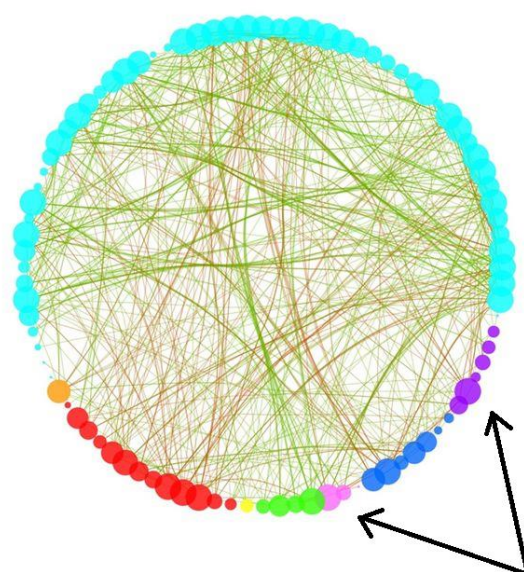
A Zdraví jedinci



B Crohnova choroba



C Ulcerózní kolitída



Barva kruhu představuje fungální nebo bakteriální oddělení. Každý kruh představuje mikrobiální rod a jeho velikost představuje počet přímých interakcí, které má. Barva linky interakce označuje důležitost korelace; zelená označuje pozitivní korelaci a červená označuje negativní korelaci (stanoveno pomocí testu Spearman). Statistická významnost byla stanovena pro všechna párová srovnání; jsou zobrazeny pouze významné korelace (hodnota $p < 0,05$).

Upraveno podle Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H. P., Jegou, S., Landman, C., ... & Cosnes, J. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*, 66(6), 1039-1048.