

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Mikrobiota pacientů s perkutánní endoskopickou
gastrostomií**

Bakalářská práce

Autor práce: Kateřina Kindlová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Nikol Modráčková

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Mikrobiota pacientů s perkutánní endoskopickou gastrostomií" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20.4.2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Doc. Ing. Věře Neužil-Bunešové, Ph.D. za odborné vedení mé práce, vstřícnost, trpělivost, laskavost a pomoc při práci v laboratoři i při zpracování práce.

Také bych ráda poděkovala všem dárcům a jejich zákonným zástupcům, kteří věnovali své vzorky stolice nejen pro účely této bakalářské práce ale i dalších prací.

Dále bych chtěla poděkovat Bc. Ladislavu Pospíchalovi, Barbaře Děkanovské, Martinu Tůmovi za pomoc s technickými problémy a spoustě dalších přátel za psychickou podporu.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, kteří mi umožňují studovat a jsou pro mě velkou oporou.

Mikrobiota pacientů s perkutánní endoskopickou gastrostomií

Souhrn

Perkutánní endoskopická gastrostomie (neboli PEG) je metoda, při které je do žaludku zavedena sonda přes stěnu břišní. Je určena pacientům odkázaným dlouhodobě na enterální výživu. Tato sonda slouží k zajištění optimální výživy, předchází vzniku malnutrice či jiným dopadům na lidské zdraví. Indikuje se na dobu delší než 6 týdnů.

Bakalářská práce se skládá ze dvou částí. První část je teoretická, kde je popsáno složení a funkce mikrobioty, její vývoj v průběhu života, poruchy rovnováhy – dysbiózy, nemoci související s dysbiózami, enterální výživa, perkutánní endoskopická gastrostomie (co to je za metodu, její techniky zavedení, komplikace samotného výkonu, kontraindikace) a mikrobiota těchto pacientů. V praktické části jsou popsány metody a analýza výsledků.

Hlavním cílem práce bylo porovnat mikrobiotu pacientů s PEG z dostupných studií s naší analyzovanou skupinou pacientů z FN v Motole. Těmto pacientům byla indikována enterální výživa. Pro analýzu jejich mikrobioty byly odebrány vzorky stolice, z nichž byla izolována DNA a ta následně analyzována pomocí metody sekvenování nové generace (NGS – next generation sequencing).

Provedenou studií jsme zjistili, že mikrobiota našich zkoumaných pacientů se mírně liší, avšak žádné značné výkyvy či výskyt potenciálně patogenních skupin bakterií, což je popisováno v literatuře jsme nezaznamenali. Dominantním kmenem mikrobioty pacientů s PEG byl kmen *Firmicutes*, dále pak *Bacteroides*, *Actinobacteria* a v menší míře *Proteobacteria*, což odpovídá běžnému kmenovému složení mikrobioty běžné populace. Nicméně, mezi testovanými pacienty byla značná individuální variabilita. U třech pacientů byl například detekován kmen *Tenericutes*, který je charakterizována nedostatkem bakteriální buněčné stěny, velmi malým genomem a obsahem široké škály rostlinných i živočišných patogenů a mohl by sloužit pro další výzkumné účely. Zaznamenali jsme také zvýšený počet bifidobakterií u pěti pacientů a u jednoho z pacientů byl detekováno vysoké zastoupení rodu *Faecalibacterium*. Příčina této nadlimitní koncentrace nám není známá a bylo by vhodné danou analýzu zopakovat u opakovaného odběru a zaměřit se na kultivaci uvedených rodů a

charakterizaci izolátů, jelikož jsou řazeny mezi příznivě působící bakterie ve střevní mikrobiotě.

Klíčová slova: mikrobiota, PEG, dieta, sekvenování.

The microbiota of patients with percutaneous endoscopic gastrostomy

Summary

Percutaneous endoscopic gastrostomy (or PEG) is the method by which the probe is introduced into the stomach through the abdominal wall. It is intended for patients reliant on long-term diet of enteral nutrition. This probe serves to ensure optimal nutrition, prevent malnutrition or other impacts on the human health. It is indicated for more than 6 weeks.

This bachelor thesis consists of two parts. The first part is theoretical, where the composition and function of microbiota is described, its evolution during life, balance disorders - dysbiosis, diseases related to dysbiosis, enteral nutrition, percutaneous endoscopic gastrostomy (what is the method, deployment techniques, complications during the intervention, contraindications) and the microbiota of these patients. In the practical part there is description of methods and analysis of the results.

The main subject of this work was to compare the microbiota of patients with PEG from available studies with our analyzed group of patients from the Faculty hospital in Motol. To these patients, enteral nutrition was indicated. For analysing their microbiota samples of bowel movement were collected, from which the DNA was isolated and subsequently analyzed by the next generation sequencing (NGS).

Our study found that microbiota of our examined patients is slightly different but we did not notice significant fluctuations or presence of potentially pathogenic groups of bacteria which is described in the literature. The dominant phylum of microbiota of PEG patients was phylum *Firmicutes*, subsequently *Bacteroides*, *Actinobacteria* and lower rate of *Proteobacteria* which corresponds to the normal composition of the common microbial population. However, there was considerable individual variability among tested patients. For example, by three patients the phylum *Tenericutes* was detected, which is characterized by bacterial cell wall deficiency, a very small genome and wide range of plant and animal pathogens, which could be helpful for future research purposes. We also registered increased number of bifidobacteria by five patients, and one of the patients was detected with high proportion of bacterial genus *Faecalibacterium*. The cause of this over-limit concentration is unknown to us, and it would be advisable to repeat this analysis for repeated samplings and

to focus on the cultivation of these genera and the characterization of the isolates because they are classified as beneficial bacteria in the intestinal microbiota.

Keywords: microbiota, PEG, diet, sequencing.

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce	2
3 Hypotéza	3
4 Literární rešerše	4
4.1 Střevní mikrobiota a její význam v lidském organismu.....	4
4.1.1 Hlavní význam mikrobioty	4
4.1.2 Složení mikrobioty	5
4.1.3 Vývoj mikrobioty	6
4.1.3.1 Porod a vývoj v dětském věku.....	6
4.1.3.2 Dospělost	8
4.1.3.3 Stáří.....	8
4.2 Dysbiózy	11
4.2.1 Crohnova choroba.....	12
4.2.2 Ulcerózní kolitida	12
4.3 Enterální výživa	13
4.4 Perkutánní endoskopická gastrostomie	14
4.4.1 Technika zavedení	14
4.4.1.1 Metoda Pull (dle Gauderera a Ponskyho)	14
4.4.1.2 Metoda Push over wire (dle Sackse a Wina).....	14
4.4.1.3 Metoda Push through (dle Russela)	15
4.4.2 Komplikace s PEG.....	15
4.4.3 Kontraindikace.....	15
4.5 Mikrobiota pacientů s PEG	16
5 Materiály a metody	18
5.1 Izolace bakteriální DNA ze vzorku stolice	19
5.2 Analýza mikrobioty metodou NGS.....	20
6 Výsledky	20
6.1 Vyhodnocení výsledků na úrovni kmenového zastoupení.....	20
6.2 Vyhodnocení výsledků na úrovni kmenového zastoupení u jednotlivých pacientů	21
6.3 Vyhodnocení zastoupení vybraných skupin bakterií s PEG	23
7 Diskuze	26
8 Závěr	29
9 Seznam použité literatury	30
10 Seznam tabulek	35

11 Seznam grafů	35
12 Seznam obrázků	35

1 Úvod

Střevní mikrobiota hraje poměrně zásadní roli v otázce zdraví a nemoci jedince. Její složení úzce souvisí a ovlivňuje fyziologické pochody organismu. Pochopením všech funkcí mikrobioty můžeme značně ovlivnit kvalitu života, hledat řešení různých zdravotních problémů a v neposlední řadě jim předcházet, ať už úpravou našich stravovacích zvyklostí či vývojem nových typů potravin. V důsledku její nerovnováhy může docházet k autoimunitním onemocněním jako Crohnova choroba či ulcerózní kolitida. Tyto nespecifické střevní záněty jsou doprovázeny průjmy, postižením jater, únavou, hubnutím, neprůchodností střev. Zmírněním příznaků těchto nemocí může být aplikace enterální výživy, která zajistí přísun dostatečného množství živin do trávicího traktu a předejde vzniku malnutrice. Mezi nejpreferovanější způsob nutriční podpory patří perkutánní endoskopická gastrostomie, kdy je do žaludku zavedena sonda přes břišní stěnu v průběhu gastroscopického vyšetření. Tato sonda se indikuje na dobu delší než 6 týdnů, zajišťuje dostatečnou nutriční podporu pro tyto pacienty a zlepšuje kvalitu jejich života.

2 Cíl práce

Perkutánní endoskopická gastrostomie (PEG) je metoda využívaná k léčbě pacientů s nespecifickými střevními záněty či jinými kontraindikacemi neumožňující normální příjem stravy. PEG je tenká sonda zavedená přes kůži stěny břišní do žaludku zajišťující přísun enterální výživy s předpokládanou dobou podávání déle než 6 týdnů. Hlavním cílem práce bylo porovnat mikrobiotu dětských pacientů s PEGem, kterým byla dlouhodobě indikována enterální výživa oproti pacientům stravujících se běžným způsobem. Mikrobiota byla zkoumána pomocí sekvenování nové generace.

3 Hypotéza

Vlivem diety podávané ve formě enterální výživy v dlouhodobém hledisku bude mít vliv jak na kvantitativní tak kvalitativní složení střevní mikrobioty pacientů s PEGem.

4 Literární rešerše

4.1 Střevní mikrobiota a její význam v lidském organismu

Pod pojmem střevní mikrobiota si můžeme představit různou intenzitu osídlení trávicí trubice mikroorganismy. Dřívější název střevní mikroflóra byl časem nahrazen kvůli zaměnitelnosti s rostlinou říší a setkáme se s ním ve starších publikacích. Obdobně může být použit také pojem mikrobiom, který označuje genom mikrobioty (Frič, 2010).

Tento mikrobiom zahrnuje tedy mikroorganismy, především bakterie obývající střevo. Tyto bakterie tvoří ekosystém a probíhají v něm interakce mezi jimi samotnými, mezi jimi a hostitelským organismem (tedy člověkem) a jeho imunitním systémem (Jirků-Pomajbíková et Lukeš, 2016).

Lidský mikrobiom je kromě bakterií složen z archeí, virů a eukaryotických mikrobů. Tyto mikroby mají obrovský potenciál ovlivňovat naše fyziologické pochody ve zdraví i v nemoci. Podílejí se na metabolických funkcích, chrání nás před patogeny, modulují imunitní systém a prostřednictvím těchto základních funkcí přímo nebo nepřímo ovlivňují většinu našich fyziologických funkcí (Shreiner et al., 2015).

Můžeme se dále setkat s termínem komenzální mikroflóra tedy mikrobiota, což označuje mikrobiální společenství trávicí trubice bez obsahu choroboplodných zárodků (Frič, 2010).

Střevní mikrobiota zásadním způsobem ovlivňuje normální strukturální a funkční vývoj imunitního systému sliznice. Imunitní reakce vyžaduje přesné řízení a schopnost rozpoznat komenzální bakterie od patogenních. Manipulace s bakteriálním obsahem střev tudíž představuje slibnou terapeutickou strategii pro budoucnost (O'Hara et Shanahan, 2006).

4.1.1 Hlavní význam mikrobioty

Mezi hlavní význam patří především:

1. Ochrana před patogeny.

Probíhá bakteriocidním působením mastných kyselin s krátkým řetězcem, produkcí peroxidu vodíku a sirovodíku. Pak také pomocí neimunologických obranných mechanismů (T a B lymfocyty, imunoglobulin A).

2. Štěpení komplexních sacharidů.
Tento proces probíhá v tenkém střevě pomocí enzymů (amyláza, maltáza, sacharáza, laktáza) – bez nich neschopnost trávení rostlinné stravy.
3. Tvorba mastných kyselin s krátkým řetězcem (acetát, propionát, butyrát).
Hlavní energetický substrát pro kolonocyty.
4. Modulace imunitního systému.
Ovlivnění schopnosti odpovědi imunitního systému na nežádoucí podněty.
5. Neutralizace toxických metabolitů.
Oxaláty, heterocyklické aminy, nitrosaminy, cholesterol a žlučové kyseliny.
6. Modulace nervového systému.
Porucha tvorby serotoninu při nevyvážené symbióze mikrobiomu.
7. Produkce vitamínů.
Tvorba vitamínů B a K především (Frühauf, 2017).

4.1.2 Složení mikrobioty

Osídlení střevní mikroflóry závisí na mnoha faktorech. Jedním z nich může být způsob porodu (císařským řezem nebo vaginálně), způsob krmení kojence, místem pobytu, stravovacími návyky, způsobem stravy, věkem, genetickými faktory (D'Argenio et Salvatore, 2015).

Naše mikrobiota obsahuje celkově 10^{14} bakterií. Krom toho také viry, plísně a parazity. Největší množství je obsaženo v tlustém střevě. Diverzita je tvořena z více než 1000 druhů bakterií a počet jejich genů převyšuje asi stonásobně počet genů v lidském genomu. Zhruba 70 % mikrobů není dosud kultivovatelných klasickými metodami (Špičák, 2017).

Mikrobiální společenství obsahuje zástupce převážně kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Kmen *Firmicutes* má dominantní postavení a je zastoupen zhruba 65 %. Tyto bakterie jsou převážně grampozitivní, tvarem koky, nebo tyčinky. Řadíme sem třídy Bacilli, Clostridia, Mollicutes. Kmen *Bacteroidetes* je gramnegativní a zastoupen z 23 %. Do tohoto rodu patří třídy Bacteroidetes, Flavobacteria, Sphingobacteria. Počet rodů bakterií obývajících gastrointestinální trakt se odhaduje na 1800 a počet druhů až na 15000-36000. Mezi nejzastoupenější patří rody *Bacteroidetes*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus* a *Bifidobacterium* (Frič, 2010).

Existují studie, které potvrzují, že obezita je velmi úzce spojena se střevní mikrobiotou a to kontrétně s poměrem mezi *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Při postupném zvyšování bakterií kmenu *Firmicutes* a snižování obsahu *Bacteroidetes* se zvyšuje index tělesné hmotnosti (BMI). Tato asociace byla i nadále významná při zahrnutí dalších ovlivňujících faktorů jako věk, pohlaví či fyzická aktivita (Koliada et al., 2017).

4.1.3 Vývoj mikrobioty

Mikrobiota se považuje za hybnou sílu, která ovlivňuje imunitní, nervový a metabolický systém. Její vliv je vyvíjen prostřednictvím produkovaných metabolitů, které mohou být důležité pro optimální vývoj jedince a jeho zdraví. Počáteční kolonizace v trávicím traktu je velmi důležitá, protože může ovlivnit dlouhodobé složení a mikrobiální aktivitu. Střevní mikrobiom může také hrát klíčovou roli v otázce zdraví a nemoci. Udržováním ochranných mikrobiálních látek by mohlo být rozhodující pro prevenci onemocnění souvisejících s dysbiózou, jako jsou například alergie, autoimunitní poruchy či metabolický syndrom (Castanys-Muñoz et al., 2016).

4.1.3.1 Porod a vývoj v dětském věku

Gastrointestinální trakt je do narození sterilní a kolonizace začíná bezprostředně po narození (Mitsou et al., 2008). Podle novější studie vyplývá, že plodová tekutina a placenta jsou možnými substráty pro kolonizaci střev ještě v těle matky a proto mohou být důležitým determinantem při interakci s potenciálním patogenem (Collado et al., 2016).

Další bakteriální kolonizace začíná v průběhu vaginálního porodu, kde dítě přichází do kontaktu s vaginálním sekretem matky. Získané mikroorganismy od matky mají zásadní vliv na vývoj mikrobioty a jsou základem jejich imunitního systému. V případě císařského řezu je osídlování střevního traktu značně opožděné. První bakterie obývající střevo zdravého jedince jsou fakultativní anaeroby. Ty dominují převážně první dva týdny života jedince. Patří sem rody *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* a *Streptococcus*. O něco méně pak bifidobakterie a *Clostridium perfringens*. *Clostridium perfringens* se považuje za prekurzor osídlení dalšími bakteriemi (*Bacteroides*, *Clostridium* sp.).

Klíčovou roli hraje také strava, kterou je dítě krmeno. U dětí krmených mateřským mlékem je podporován růst bifidobakterií, zejména *Bifidobacterium bifidum*. Je to způsobeno přítomností prebiotik v mateřském mléce. Oproti tomu u dětí krmených kojeneckou stravou

se setkáváme stále s dominantním výskytem *Clostridium perfringens*. Z tohoto důvodu je doporučováno přidávat jako náhradní prebiotikum inulin do umělé výživy, aby došlo k podobnému složení střevní mikroflóry jako u kojených dětí (Bezirtzoglou, 1997). Primární kolonizace je velmi důležitá, protože změna již jednou konstituované mikroflóry je velice obtížná. Bifidus faktor (označení oligosacharidů mateřského mléka) slouží jako substrát pro tyto probiotické bakterie. Probiotické bakterie mají antiadhezivní schopnost vůči střevním patogenům a díky tomu jsou schopné modulovat imunitní odpověď a snižovat riziko infekce (Frühauf, 2013).

Krom způsobu porodu může mít vliv v průběhu fáze laktace také BMI matky (Cabrera-Rubio et al., 2012). Jako novou hypotézu pro osídlení střevní mikrobioty můžeme považovat takzvanou „aktivní migraci“. Mechanismus této migrace zatím nebyl zcela objasněn, jelikož by bakterie museli projít přes střevní epitel, vyhnout se imunitnímu systému a dostat se do mléčné žlázy. Zdá se, že tento proces je značně selektivní. Imunitními buňkami jsou rozpoznány pouze některé kmeny a ty mohou být přeneseny do mléčné žlázy. Respektive můžeme předpokládat, že rozpoznány jsou všechny bakterie, ale pouze určité jsou imunitním systémem propuštěny (Musilová et al., 2016). Po přechodu na pevnou stravu dochází ke kolonizaci dalšími mikroorganismy, zejména rodu *Firmicutes*. Díky rychlému rozvoji imunitního systému se již od 2. roku života mikrobiota dítěte podobá mikrobiotě dospělého člověka (Bezirtzoglou, 1997).

Nejčastěji izolované bakterie z mateřského mléka:

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus aureus

Streptococcus mitis

Streptococcus salivarius

Lactobacillus salivarius

Lactobacillus fermentum

Lactobacillus gasserii

Lactobacillus rhamnosus

Bifidobacterium breve

Bifidobacterium bifidum

Streptococcus lactarius

(Martin et al., 2011)

4.1.3.2 Dospělost

Dominantní bakterie v těle zdravého dospělého jedince jsou kmeny *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Ty představují zhruba 80-90% celkového osídlení. Kromě toho v důsledku vysoké variability mezi jednotlivci můžeme lidi zařadit mezi tři enterotypy u nichž dominuje jiný bakteriální rod. U první skupiny převládá zastoupení mikrobů z rodu *Bacteroides*, u druhé rod *Prevotella*. Pro třetí rod je charakteristický vysoký počet bakterií rodu *Ruminococcus*. Tyto enterotypy se zdají být nezávislé na pohlaví, věku jedince, národnosti či jeho indexu tělesné hmotnosti. Avšak co se obecného ustanovení týče, konkrétní podoba se u každého jedince liší v důsledku ovlivnění velkého množství faktorů, jako je například stres, užívání antibiotik, následky různých diet a v neposlední řadě životní styl (Salazar et al., 2017).

Struktura mikrobioty dle jednotlivých enterotypů se zdá být závislá na hlavních složkách potravy. Při převládajícím obsahu bílkovin a živočišných tuků ve stravě převládá nárůst *Bacteroides*, kdežto dieta obsahující převážně polysacharidy upřednostňuje rod *Prevotella*. Je zajímavé, že změna obsahu diety nevede k žádným změnám složení mikrobioty, avšak enterotyp je značně stabilní a vědci se domnívají, že jeho změna je možná pouze v dlouhodobém trvání diety (Tláskalová-Hogenová et Městecký, 2012).

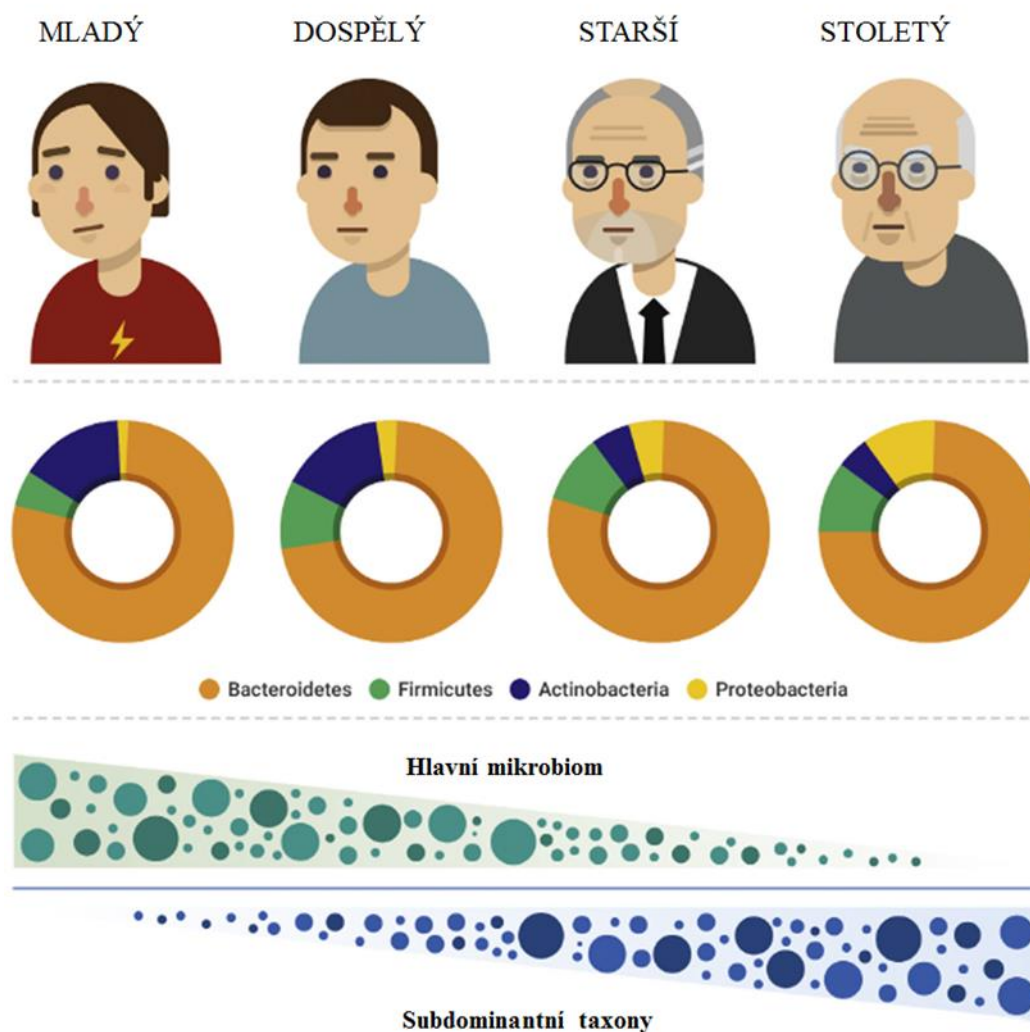
4.1.3.3 Stáří

V pozdním věku dochází ke změnám a to sice ke změnám bakteriálních druhů, snižování diverzity, poklesu prospěšných organismů, zvyšování počtu fakultativních anaerobních bakterií a snižování tvorby mastných kyselin s krátkým řetězcem. Při porovnání mikrobioty staršího a mladšího člověka dochází ke snižování hladiny bakterií rodu *Firmicutes* a naopak dochází ke zvyšování populací bakterií kmenu *Proteobacteria*. S rozdílnými výsledky studií se setkáváme u kmene *Bacteroidetes* a u laktobacilů (Salazar et al., 2017).

Celkový počet anaerobních bakterií zůstává stabilní u jedinců starších 65 let, avšak zmenšená mikrobiální kompozice se dává do souvislosti s výskytem obezity, diabetu, aterosklerózy, zánětlivých střevních onemocnění a nekrotizující enterokolitidy (Marques et al., 2014).

Studie prokázali, že zásahy do střevní mikrobioty příznivě ovlivňují zdraví a stárnutí jedince. Zásahy v potravě a množství probiotik v dietě zvyšuje antioxidační aktivitu, zlepšuje imunitní homeostázu, potlačuje chronické záněty, reguluje nadměrné tukové zásoby a slouží jako prevence vůči inzulinové rezistenci. Kromě toho také vysokou účinnost vykazuje

transplantace fekálních mikrobiálních buněk při prevenci nebo léčbě patologických stavů souvisejících s věkem (Vaiserman et al., 2017).



Obrázek 1 - změny mikrobioty v průběhu života (Vaiserman et al., 2017).

Na obrázku můžeme vidět, jak se zde rozcházejí studie Salazarové (2017) a Vaisermana (2017). Dle Salazarové dochází ke snižování bakterií rodu *Firmicutes*. Vaiserman toto dle obrázku vyvrací. Salazarová ve své práci připouští, že je potřeba více studií u starších populací, aby bylo lépe porozuměno jak je mikrobiota asociována s dietními změnami a komorbiditami. Pochopením těchto interakcí by mohlo dojít k vývoji specifických potravin pro seniorskou populaci.

4.2 Dysbiózy

S rostoucím zájmem o střevní mikrobiotu byly odhaleny určité souvislosti mezi změnami jejího složení u pacientů se střevními chorobami. Tyto změny jsou nazývány dysbiózy.

Dysbióza způsobuje poruchu rovnováhy v trávicím traktu a poruchy dílčích funkcí mikrobioty. Můžeme jí charakterizovat ztrátou diverzity, zvýšením počtu potenciálních patogenů a absencí prospěšných bakterií. Tato ztráta druhové diverzity koreluje v různých studiích s aktivitou onemocnění idiopatických střevních zánětů (IBD) (Špičák, 2017).

Navzdory pokrokům v posledních letech, patogeneze těchto zánětů nebyla zcela objasněna. Zdá se zřejmé, že Crohnova choroba a ulcerózní kolitida v geneticky predisponovaných subjektech je zapříčiněna nesprávnou aktivací slizniční bariéry, která je způsobena bakteriálním obsahem ve střevech (Seksik, 2010).

Změna mikrobiální kompozice a funkce při zánětlivých onemocnění střev má za následek zvýšenou imunitní stimulaci, epiteliální dysfunkci nebo zvýšenou permeabilitu sliznice (Sartor, 2008).

Mezi IBD řadíme Crohnovu chorobu a Ulcerózní kolitidu. Tato zánětlivá střevní onemocnění se mohou projevovat bolestmi břicha, krvavými průjmy a malnutricí. Jelikož přesné příčiny nejsou jasné, je identifikace zevních faktorů velmi důležitá a v současné době je předmětem intenzivních výzkumů (Nevoral, 2007).

K idiopatickým střevním zánětům můžeme také přiřadit neurčitou kolitidu, což je zánět tlustého střeva, u kterého se vykazují známky jak ulcerózní kolitidy, tak Crohnovy nemoci, či jiné atypické známky. Tato nemoc je velmi nespecifická a je téměř nemožné u ní stanovit přesnou a důvěryhodnou diagnózu (Lukáš, 1997).

V současné době jsou dysbiózy nacházeny nejen v trávicím traktu, ale také u mnoha dalších chorob (metabolických, psychiatrických, nádorových). Zůstává zde však nadále nezodpovězená otázka, jestli je dysbióza sama o sobě příčinou, asociací nebo jako důsledek patologického stavu (Špičák, 2017).

Přestože tradiční patogeny pravděpodobně nejsou zodpovědné za tyto poruchy, zvýšená virulence komenzálních bakteriálních druhů, zvláště *Escherichia coli*, zvyšuje jejich slizniční vazbu, invazi a intracelulární perzistenci. Tím je následně stimulována patogenní imunitní odpověď organismu (Sartor, 2008).

4.2.1 Crohnova choroba

Jedná se o zánět stěny trávicího traktu. Může jím být postihnuta jakákoliv část trávicí trubice. Nejčastěji bývá postižena v místě, kde se napojuje tenké střevo na tlusté (ileocekální 45-65%), dále tračník (25-45%), tenké střevo (5-15%) a výjimečně jiná atypická lokalizace (žaludek, jícen, nebo dutina ústní do 5%). Může docházet k tvorbě píštělí, abscesů a zužování střeva. Mezi první příznaky této nemoci patří průjmy, bolesti břicha, hubnutí a teploty (Ehrmann, 2011).

4.2.2 Ulcerózní kolitida

Na rozdíl od Crohnovy choroby se ulcerózní kolitida soustředí pouze na oblast sliznice tračníku. Tato nemoc začíná vždy postižením rekta. Dle rozsahu ho můžeme rozlišit na tři typy.

E1- postižení rekta a distální části tračníku

E2- postižení levého tračníku

E3- extenzivní postižení tlustého střeva- pankolitida

Typické je pro tuto nemoc střídání fází klidu a nemoci (remise a relapsy). Fáze relapsů je charakterizována průjmy s krví, anémií, křečemi v břiše. Fáze remise se projevuje bez jakýchkoliv obtíží a může být i dlouhodobá (Ehrmann, 2011).

Pacienti s touto nemocí mají podstatně snížené množství protizánětlivé bakterie *F. prausnitzii*. Tato bakterie je zodpovědná za produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) a dalších protizánětlivých faktorů (Špičák, 2017).

4.3 Enterální výživa

Enterální výživu můžeme definovat jako způsob dodávání živin do trávicího traktu pomocí pití bilancovaných roztoků nebo zavedením sondy. Tento způsob výživy je vhodný pro pacienty, kteří nejsou z jakýchkoliv důvodů schopni jíst a mají plně funkční trávicí trakt. Díky tomu můžeme předcházet vzniku malnutrice, snížení digesce a absorpce složek výživy či poruchám příjmu potravy, které mohou mít fatální dopady na lidské zdraví. Enterální výživa se považuje za nejlepší modalitu nutriční intervence, která zajišťuje dodávku živin do organismu (Dastyh, 2012).

Zejména u kriticky nemocných pacientů často dochází k malnutrici. Postihuje zhruba až 40 % případů. Je to způsobeno metabolickými změnami, ke kterým dochází v reakci na stres, zvyšují katabolismus bílkovin a dochází ke značným tělesným ztrátám. Cílem nutriční podpory tedy je zabránění komplikacím a modulace stresové reakce pacientů. Toho lze dosáhnout zajištěním odpovídajících dávek mikro a makroživin, omezením komplikací nutriční podpory, snížení deficitu dusíku a modulace zánětlivé odpovědi těla pomocí různých substrátů (Seron-Arbeloa, 2013).

Výživa pomocí sondy se do žaludku podává nasogastrickou sondou nebo gastrostomií. Gastrostomie je nejčastěji zaváděna endoskopicky (PEG, perkutánní endoskopická gastrostomie), méně často chirurgicky. Sondy zaváděné do tenkého střeva k aplikaci enterální výživy se zavádějí nasojejunální sondou nebo výživnou jejunostomií. Tyto zákroky se provádějí endoskopicky (PEJ, perkutánní endoskopická jejunostomie) nebo chirurgicky (nutritivní nebo výživná jejunostomie). Způsob podávání živin je tudíž velmi závislý na tom, do které části trávicího traktu je sonda zavedena (Grofová, 2009).

4.4 Perkutánní endoskopická gastrostomie

Perkutánní endoskopická gastrostomie je preferovaný způsob výživy a nutriční podpory u pacientů s indikací dlouhodobé enterální výživy (na delší dobu než 4-6 týdnů). Případně se indikuje u pacientů, kterým hrozí riziko malnutrice (Kohout et al., 2010-2016).

První PEG byl zaveden u dítěte a to v roce 1980. Ročně je zaveden přibližně u 220 000 pacientů a téměř nahradil chirurgickou gastrostomii (Dastych, 2012).

Tento typ metody provedli poprvé Gauderer a Ponsky ve Spojených státech u 4leté dívky, která trpěla poruchou polykání a mozkovou obrnou. V České republice byl PEG zaveden v roce 1992 ve Fakultní nemocnici Brno Kammlerem a Axmannem (Kohout et al., 2010-2016).

PEG se považuje za bezpečnou a jednoduchou metodu, s nízkým rizikem mortality a morbidit při zavádění. Míra komplikací při odstranění PEGu je taktéž minimální (Kohout et al., 2010-2016).

4.4.1 Technika zavedení

4.4.1.1 Metoda Pull (dle Gauderera a Ponskyho)

Tato metoda patří mezi nejčastěji využívané. Při této metodě je zaveden do žaludku gastroskop, kterým je vyšetřen jícen, žaludek, duodenum a zjišťuje se průchodnost trávicí trubice. Pak se hledá nejvhodnější místo pro zavedení PEGu. Přes prosvětlenou břišní stěnu je zavedené vlákno, které je uvnitř žaludku uchopeno gastroskopem. Gastroskop toto vlákno vytáhne vnitřkem před ústa a pak se na vlákno naváže gastrostomický katétr a je protažen zpětně žaludkem a břišní stěnou navenek. Fixace je zajištěna silikonovým terčíkem, který znemožňuje vytažení katétru (Urbánek et Urbánková, 2012).

4.4.1.2 Metoda Push over wire (dle Sackse a Wina)

Méně často využívaná metoda. Sonda zde není tažena za vodič ven, ale je na něm ponechána a tlačena přes břišní stěnu. Po proniknutí je tahem umístěna v konkrétní části žaludku (Kianička et al., 2012).

4.4.1.3 Metoda Push through (dle Russela)

PEG je zaveden přímo do žaludku po dilataci kanálu. Doporučuje se při tomto typu zavedení žaludek zafixovat k břišní stěně. Sonda se pak nejčastěji fixuje pomocí vodou naplněným balónkem (Kohout et al., 2010-2016).

4.4.2 Komplikace s PEG

Většina komplikací je drobná, život ohrožující komplikace se vyskytují velmi vzácně. Můžeme je rozdělit podle doby vzniku nebo podle druhu komplikace. Starší pacienti jsou vystaveni většímu riziku komplikací. Nejzávažnější komplikace související s výkonem jsou aspirační pneumonie, krvácení, poranění vnitřních orgánů, nekrotizující fasciitida, implantace tumoru do vývodu PEG. Mezi ty méně závažné patří infekce vývodu kanyly, obstrukce žaludku, poškození sondy nebo její přesun do tenkého střeva, případně její ucpání. Tyto méně závažné komplikace neovlivní morbiditu ani mortalitu pacientů (Hucl et Spicak, 2016).

4.4.3 Kontraindikace

Kontraindikace PEG můžeme rozdělit na kontraindikace gastroscopie, nebo kontraindikace vlastního provedení PEG. Mezi kontraindikace gastroscopie řadíme srdeční nestabilitu, nesouhlas pacienta s provedením výkonu či případ, kdy není možné pacientovi zavést endoskop do žaludku. Do kontraindikací vlastního provedení PEG patří nepřítomnost diafanoskopického vyšetření, zánět pobřišnice, ascites, karcinom žaludku, karcinomatóza peritonea, poruchy srážlivosti krve, obezita případně těžká malnutrice, peritoneální dialýza, žaludeční varixy, portální hypertenze případně různé pooperační stavy (Kianička et al., 2012).

4.5 Mikrobiota pacientů s PEG

U většiny pacientů bývá často izolována patogenní mikrobiota. Přesto však nebyl dosud nalezen vztah mezi typem mikroorganismu a klinickými příznaky. Zajímavé je, že v žádné studii dosud nebyla zjištěna přítomnost streptokoků skupiny A, která byla dávána do souvislosti s bolestmi břicha a nepohodlí při nošení PEG (De Vries et al., 2015).

Mezi nejčastěji izolované bakterie ze studie De Vriese (2015) patří: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* a *Enterococcus*. Uvedená studie byla provedena na sto pacientech pomocí kultivačně závislé metody. Bakterie byly kultivovány na agarových deskách.

Studie prováděna Rolstonem a kol. (2011) zkoumala mikrobiotu pacientů s PEG, kteří měli rakovinu. U 53 pacientů ze 78 byla zjištěna infekce (monomikrobiální i polymikrobiální). Většina izolovaných mikroorganismů byla náchylná na běžně používané antimikrobiální látky.

Monomikrobiální infekce	%
<i>Candida</i> spp.	26
<i>Staphylococcus aureus</i> MN	23
staphylococci (koagulázně-negativní)	19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
<i>Streptococcus species</i>	10
<i>Staphylococcus aureus</i> MR	3
<i>Serratia marcescens</i>	3

Tabulka 1 - procentuální výskyt bakterií monomikrobiální infekce u pacientů s PEGem (Rolston et al., 2011)

Polymikrobiální infekce	%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
<i>Staphylococcus aureus</i> MN	10
<i>Klebsiella species</i>	9
<i>Enterococcus species</i>	8
<i>Enterobacter cloacae</i>	8
<i>Candida species</i>	8
<i>Streptococcus species</i>	6
staphylococci (koagulázně-negativní)	6
<i>Escherichia coli</i>	6
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	4
Anaerobní bakterie	4
<i>Staphylococcus aureus</i> MR	3
<i>Achromobacter species</i>	3
<i>Acinetobacter species</i>	1
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
<i>Serratia species</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1

Tabulka 2 - procentuální výskyt polymikrobiální infekce u pacientů s PEGem (Rolston et al., 2011)

vysvětlivky: MN-meticilin nerezistentní MR-methicilin rezistentní

Z této studie vyplývá, že opět silně dominuje kmen *Firmicutes*. U mono mikrobiální infekce dominuje s 55 % (*Staphylococcus aureus* MN+MR, staphylococci, *Streptococcus* spp.). Následují *Ascomycota* (*Candida* spp.) a *Proteobacteria* (*Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*).

U polymikrobiální infekce opět dominuje *Proteobacteria* (34%), *Firmicutes* (33%), *Klebsiella* (9%). Dále *Enterobacter* (8%), *Ascomycota* (8%), *Actinobacteria* (4%).

Je zajímavé, že v obou studiích se stejně četně vyskytují jak *Candida albicans*, tak *Staphylococcus aureus* a ač se skupiny pacientů v obou studiích značně lišili, tak jejich mikrobiota je srovnatelná (De Vries et al., 2015).

5 Materiály a metody

Bakterie obsažené ve stolici jsou vzorkem osídlení trávicího traktu. Pro jejich identifikaci můžeme použít dva typy identifikačních metod, a to metody kultivačně závislé a kultivačně nezávislé. Cílem těchto procesů je zjištění přítomnosti nebo množství mikroorganismů ve vzorku.

Pro analýzu mikrobioty vzorků pacientů s PEG, jejichž fekální vzorky byly použity pro studii prováděnou ve spolupráci Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky ČZU v Praze a Dětským oddělením gastroenterologie FN Motol v Praze, byla použita metoda sekvenování nové generace (NGS – next generation sequencing). Vlastní analýza NGS byla provedena ve spolupráci s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky, Akademií věd České republiky.

Seznam pacientů obsahující informaci k pohlaví a věku je uveden v tabulce č. 3. Všichni z uvedených pacientů přijímali dlouhodobě a výhradně stravu prostřednictvím PEG. Bližší informace k pacientům a jejich diagnóze v práci uvedeny nejsou a nebudou ani nijak diskutovány. Zástupci pacientů udělili souhlas se zpracováním vzorků k výzkumným účelům a výsledky analýz budou použity pro budoucí publikaci.

Vzorek	Pohlaví	Rok narození	Rok prvního odběru	Věk k prvnímu odběru
PEG1	chlapec	2001	2017	16
PEG2	chlapec	2013	2017	4
PEG3	chlapec	2015	2017	2
PEG4	chlapec	2011	2017	6
PEG5	dívka	2011	2017	6
PEG6	chlapec	2007	2017	10
PEG7	dívka	2006	2017	11
PEG8	dívka	2006	2017	11
PEG9	chlapec	2004	2017	13
PEG10	chlapec	2006	2017	11
PEG11	dívka	2011	2017	6
PEG12	chlapec	2012	2017	5
PEG13	chlapec	2004	2017	13
PEG14	dívka	2012	2017	5

Tabulka 3 - Seznam pacientů s PEG

Mým úkolem byla izolace bakteriální DNA ze vzorků stolice pacientů a poté vyhodnocení dat, která mi byla poskytnuta.

5.1 Izolace bakteriální DNA ze vzorku stolice

Při detekci bakterií pomocí metody PCR je zapotřebí izolovat bakteriální DNA ze vzorku stolice. Pro postup izolace se používali kity Fast Prep (modifikace protokolu pro půdu).

Postup izolace byl následující:

Bylo naváženo 250 mg vzorku stolice do zkumavky Lysing Matrix E, přidáno 978 μ l fosfátu sodného (Sodium Phosphate Buffer) a 122 μ l MT Buffer. Následně byla směs zhomogenizována v přístroji FastPrep po dobu 40 sekund při rychlosti 5. Tento proces byl prováděn dvakrát. Poté směs byla centrifugována po dobu deseti minut při 14 000 otáčkách.

Následně byl přelit supernatant do 2 ml mikrocentrifugační zkumavky, přidáno 250 μ l PPS (Protein Precipitation Solution) a směs protřepána. Poté opět centrifugována 10 minut při 14 000 otáčkách. Po ukončení procesu byl přepipetován vzniklý supernatant do 15 ml zkumavek. Zbylá peleta po centrifugaci obsahovala směs nežádoucích proteinů.

Do 15 ml zkumavek se supernatantem byl přidán 1 ml Binding Matrixu. Po dobu dvou minut obsah zkumavky byl ručně promícháván překlápěním. Následně byl nechán obsah sedimentovat po dobu 10 minut a odstraněno 800 μ l z vrchní části supernatantu. Ve zbylé směsi byla rozmíchána peleta a přepipetováno 650 μ l do zkumavek s filtrem (SPIN).

Po dobu jedné minuty směs centrifugovala při 14 000 otáčkách. Supernatant vzniklý pod filtrem byl vylit. Následně bylo přidáno 500 μ l roztoku SEWS-M, stočeno po dobu jedné minuty při 14 000 otáčkách a odstraněny zbytky. Následně opět byla směs centrifugována po dobu dvou minut při stejných otáčkách. Směs byla přelita do nové zkumavky a nechána 5 minut odstát na vzduchu, aby došlo k odpaření ethanolu. Poté rozmělněna ve 100 μ l apyrogenní vody a stočena po dobu jedné minuty při 14 000 otáčkách.

Po odstranění SPIN filtru byla ve zkumavce vyizolovaná DNA. Tato DNA byla posléze měřena na přístroji Spektrometr (ND-1000, NanoDrop) a naředěna na koncentraci 25 ng/ μ l.

5.2 Analýza mikrobioty metodou NGS

Cílem metody NGS byl odhad mikrobiální diverzity v gastrointestinálním traktu (GIT) dětských pacientů s PEG. Z několika existujících platform NGS, byla vybrána platforma Ion Torrent™ neboli polovodičové sekvenování. Platforma Ion Torrent™ sestává ze šesti základních kroků, a to; izolace DNA, přípravy amplikonů PCR, přípravy knihovny, přípravy templátu, sekvenování a analýzy dat.

Jak je již uvedeno výše mým úkolem byla izolace DNA pod vedením vedoucí mé práce. Další kroky analýzy byly provedeny Ing. Nikol Modráčkovou, doc. Věrou Neužil Bunešovou, Ph.D. a Ing. Jakubem Mrázkem, Ph.D.

6 Výsledky

Celkem bylo k analýze použito 14 vzorků DNA. Nicméně, pouze u 13 vzorků byla analýza NGS úspěšná. U pacienta číslo 8 se analýza nepodařila. Tudíž je dále hodnoceno pouze 13 pacientů.

6.1 Vyhodnocení výsledků na úrovni kmenového zastoupení

Při zprůměrování výsledků kmenového zastoupení v mikrobiotě všech 13 pacientů je zřejmé,

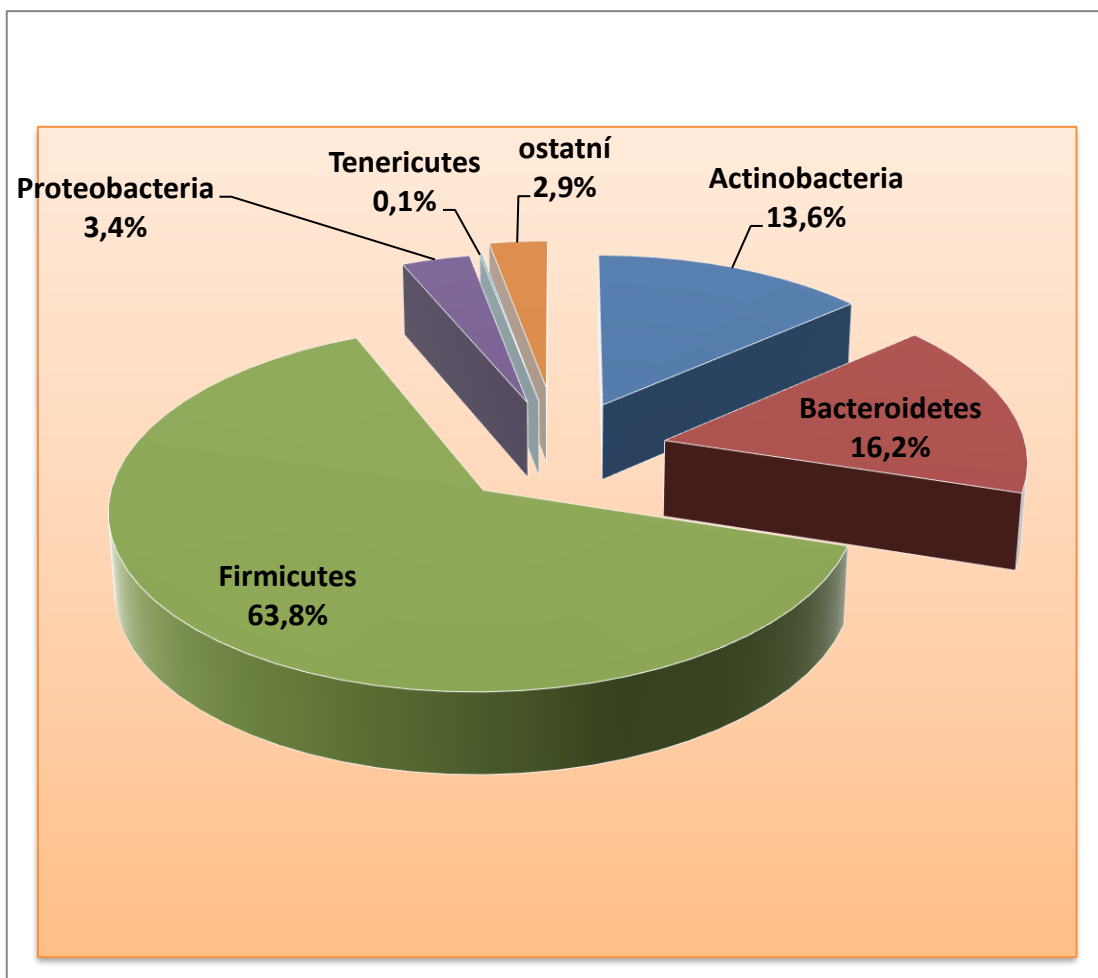
Kmen	[%]
<i>Actinobacteria</i>	13,6
<i>Bacteroidetes</i>	16,2
<i>Cyanobacteria</i>	0,0
<i>Firmicutes</i>	63,7
<i>Fusobacteria</i>	0,0
<i>Lentisphaerae</i>	0,0
<i>Planctomycetes</i>	0,0
<i>Proteobacteria</i>	3,4
TM7	0,0
<i>Tenericutes</i>	0,1
<i>Verrucomicrobia</i>	0,0
ostatní	2,9

Tabulka 4 - Průměrná mikrobiota analyzovaných pacientů s PEGem

že kmen Firmicutes má dominantní postavení. Bakterie z tohoto kmene mají větší jak poloviční zastoupení (63,7%). Druhým dominantním kmenem je kmen Bacteroidetes, který už však oproti Firmicutes má pouze 16,2% z celkového počtu. Posledním dominujícím kmenem jsou Actinobacteria s 13,6%.

Zbylé kmeny se vyskytují v minoritním zastoupení, nebo vůbec.

Z minoritních kmenů byl detekován kmen Proteobacteria – 3,4% a Tenericutes – 0,1%. Kmeny *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Planctomycetes*, TM7- *Saccharibacteria* a *Verrucomicrobia* nebyly ve vzorcích vůbec detekovány.



Graf 1 – Průměrné zastoupení bakteriálních kmenů analyzovaných pacientů s PEGem

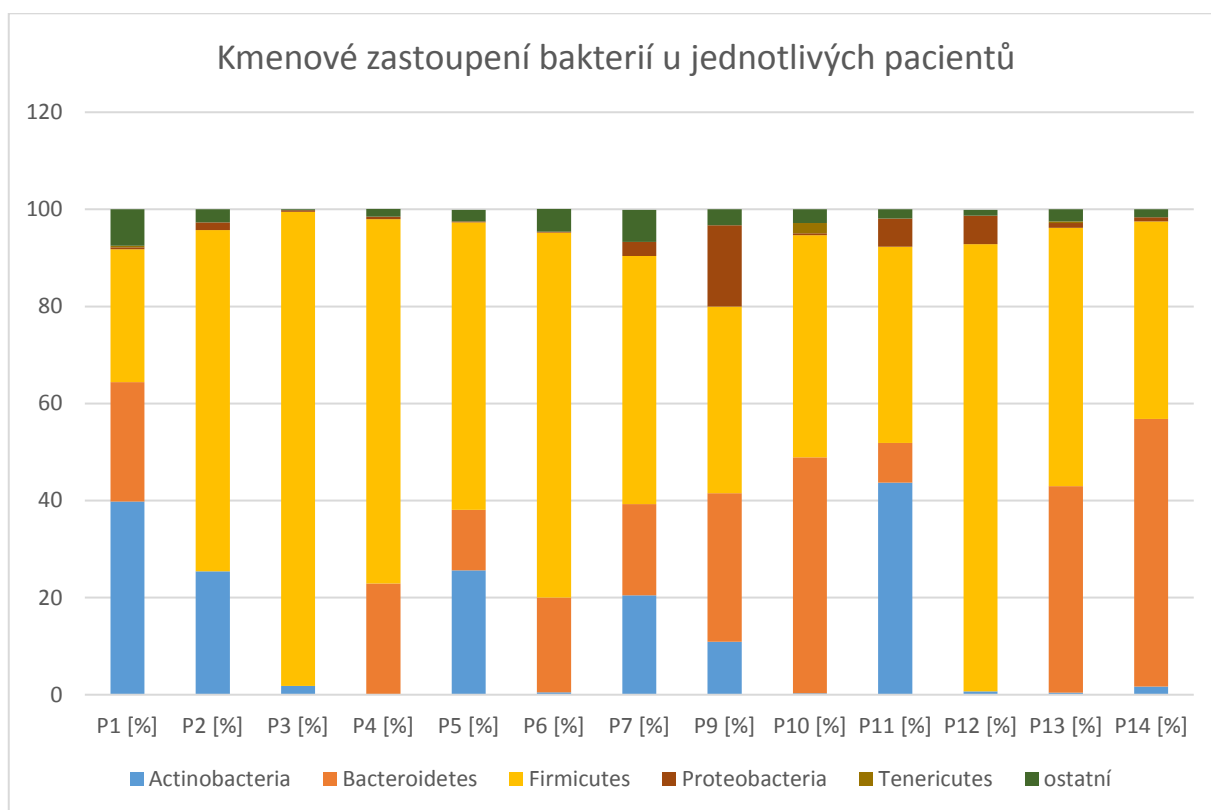
6.2 Vyhodnocení výsledků na úrovni kmenového zastoupení u jednotlivých pacientů

Pokud se podíváme na kmenové složení mikrobioty jednotlivých sledovaných jedinců, zjistíme, že se mezi nimi nachází značná mikrobiální variabilita. U většiny pacientů převládá kmen *Firmicutes*, ale můžeme najít i výjimky (pacient č. 1 a 14). Oproti tomu u pacientů č. 3 a 12 jsou *Firmicutes* v dominantním postavení, kdy jejich mikrobiota obsahuje nad 90 % bakterií tohoto kmenu. Podrobné informace jsou uvedeny v tabulce č. 5 a grafu č. 2. Pacienti č. 1, 2, 5, 7, 9, 11 měli velké množství aktinobakterií, ostatní pacienti je měli také, ale ve velmi nepatrném množství. Oproti tomu kmen *Bacteroidetes* u pacientů č. 2 a 12 nebyl

vůbec zjištěn. Kmeny *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* nebyly vůbec detekovány.

Jednotliví pacienti													
Kmen	P1 [%]	P2 [%]	P3 [%]	P4 [%]	P5 [%]	P6 [%]	P7 [%]	P9 [%]	P10 [%]	P11 [%]	P12 [%]	P13 [%]	P14 [%]
Actinobacteria	39,8	25,4	1,8	0,1	25,6	0,5	20,5	10,9	0,3	43,7	0,7	0,4	1,7
Bacteroidetes	24,6	0,0	0,0	22,8	12,5	19,5	18,8	30,6	48,6	8,2	0,0	42,6	55,1
Cyanobacteria	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Firmicutes	27,4	70,3	97,7	75,1	59,2	75,2	51,1	38,5	45,8	40,4	92,1	53,2	40,7
Fusobacteria	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lentisphaerae	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Planctomycetes	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Proteobacteria	0,4	1,6	0,3	0,5	0,2	0,2	2,9	16,7	0,4	5,8	5,9	1,0	0,9
TM7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tenericutes	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0	0,0	0,3	0,0
Verrucomicrobia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ostatní	7,5	2,7	0,2	1,6	2,4	4,7	6,6	3,3	2,8	1,9	1,2	2,5	1,6

Tabulka 5- Kmenové zastoupení v mikrobiotě jednotlivých analyzovaných pacientů s PEGem



Graf 2 - Jednotliví pacienti

Pokud budeme rozebírat jednotlivé pacienty, tak je kmenové zastoupení variabilní. Podle poměru a zastoupení jednotlivých kmenů měli nejrozmanitější mikrobiotu pacienti č. 1, 7, 9 a 11, u kterých se vyskytuje nejvíce jednotlivých bakteriálních kmenů. Naopak pacienti č. 3 a 12 mají převládající množství kmenu *Firmicutes* a můžeme říci, že jejich mikrobiota

na úrovni zastoupení kmenů je značně jednotná. Pacienti č. 1, 10 a 13 jsou jediní, kde byl detekován kmen *Tenericutes*.

Co se týče pohlaví, tak u všech pacientů byly detekován bakteriální kmen *Firmicutes*, pouze s jiným procentem zastoupení. Zastoupení ostatních kmenů se lišilo. Nutno ale poznamenat, že množství pacientů mužského pohlaví téměř jednou tolik převyšuje. Celkově bylo analyzováno více vzorků chlapců, jednalo se o 9 vzorků oproti 4 vzorkům dívek. Tudíž nelze variabilitu vztahovat k pohlaví pacienta.

V neposlední řadě je třeba brát v potaz věkové rozložení pacientů, které má také značný vliv na mikrobiotu, jak již bylo popsáno výše. Průměrný věk skupiny byl 8,5 roku. Nejstarším pacientem je pacient č. 1, který byl ve věku 16 let a má mikrobiotu nejrozmanitější a má z celé skupiny nejmenší zastoupení kmenu *Firmicutes* a převládají u něj kmeny *Actinobacteria* a *Bacteroidetes*. Naopak nejmladší pacient č.3 ve věku 2 let je přesným opakem. Kmen *Firmicutes* je u něj zastoupen téměř z 98% a ostatní kmeny byly detekovány ve velmi malém množství nebo vůbec. Zajímavým úkazem je pacientka č. 11, kde bylo detekováno zdaleka největší množství aktinobakterií, a pacientka č. 14, kde více jak polovina bakteriálního obsahu patřila do kmenu *Bacteroidetes*. Věk obou pacientek je velmi nízký. U pacienta č. 10 bylo detekováno největší množství kmenu *Tenericutes*, který byl detekován pouze u dvou dalších pacientů a ve velmi malém množství.

6.3 Vyhodnocení zastoupení vybraných skupin bakterií s PEG

Na základě výše uvedených informací o bakteriích detekovaných u pacientů s PEG jsem z NGS dat získala zastoupení vybraných skupin bakterií. Jednalo se rody bakterií, nejčastěji izolované u pacientů s PEG a bakteriální rody, které mohou působit infekce. Bylo tedy analyzováno zastoupení rodu *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiela* a *Escherichia*. Na druhou stranu bylo zhodnoceno zastoupení prospěšných bakterií, jako jsou rody *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium* a *Faecalibacterium*. Zastoupení analyzovaných bakterií je uvedeno v tabulce č. 6.

Zastoupení rodu	∅	PEG1	PEG2	PEG3	PEG4	PEG5	PEG6	PEG7	PEG9	PEG10	PEG11	PEG12	PEG13	PEG14
<i>Streptococcus</i>	0,3%	0.0%	0.0%	0.9%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	1.9%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.2%
<i>Staphylococcus</i>	0,0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Enterococcus</i>	0,5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	19.8%	0.0%	0.2%	0.1%	1.6%	1.4%	0.0%	0.0%
<i>Pseudomonas</i>	0,0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Klebsiella</i>	0,0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%
<i>Escherichia</i>	0,0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Bifidobacterium</i>	12,0%	39.2%	25.0%	1.2%	0.1%	0.2%	0.0%	18.5%	10.2%	0.0%	43.4%	0.0%	0.1%	0.2%
<i>Lactobacillus</i>	0,3%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.2%	0.6%	0.1%	0.3%	0.3%	3.2%	0.4%	0.1%	0.0%
<i>Eubacterium</i>	0,2%	2.0%	0.0%	0.4%	0.0%	0.6%	0.2%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
<i>Faecalibacterium</i>	2,8%	0.2%	0.1%	18.6%	0.0%	0.3%	0.3%	0.2%	0.3%	1.1%	0.0%	0.0%	1.9%	0.6%

Tabulka 6 - Zastoupení vybraných bakteriálních kmenů u jednotlivých pacientů

Rody jako je *Staphylococcus*, *Pseudomonas* a *Escherichia* se v pomoci analýzy NGS nepodařilo detekovat. Nicméně zde může být vliv metody získávání vzorků, použité technologie NGS a typu analýzy dat. Výskyt rodu *Klebsiella* byl též skoro nulový, jen u pacientů č. 9 a 12 bylo detekováno 0,1 %. V případě rodu *Enterococcus* byl průměrný výskyt 0,5 %, což bylo způsobeno zvýšeným výskytem u pacienta č. 6, jinak byl výskyt nízký nebo nulový. Rod *Streptococcus* se vyskytl celkem u pěti pacientů, takže u méně než poloviny.

Poměrně zajímavý byl však výskyt prospěšných bakterií, jako jsou rody *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium* a *Faecalibacterium*. Bakterie rodu *Bifidobacterium* byly detekovány ve vysokých hodnotách u pěti pacientů (1, 2, 7, 9 a 11). Nejvíce u pacienta č. 11 v hodnotě zastoupení detekovaného rodu 43,4 %. Také rod *Faecalibacterium* byl u jednoho pacienta detekován v hodnotě 18,6 % a nicméně druhá nejvyšší hodnota byla 1,9 %. Ostatní hodnoty byly velmi nízké a u některých pacientů nulové. V případě rodu *Eubacterium* se hodnoty u některých pacientů pohybovaly v desetinách procent, podobně to bylo s rodem

Lactobacillus, jen u pacienta č. 11 byla detekovaná hodnota nejvyšší 3,2 %. Podrobné informace jsou v tabulce č. 6.

7 Diskuze

Střevní mikrobiota je často poslední dobou zmiňována jako „zapomenutý orgán“ a její funkci v lidském organismu se přikládá čím dál větší význam. Na jejím složení mají význam jak vnější, tak vnitřní faktory, mění se a moduluje v průběhu života. Při nevyváženém poměru bakteriálního obsahu mohou vznikat různé dysbiózy, jejichž příčina vzniku není zcela obeznámena (Špičák, 2017). Dysbiózy způsobují různé dysfunkce organismu, nejčastěji střev. Mezi tyto dysfunkce řadíme například Crohnovu chorobu nebo ulcerózní kolitidu. Při těchto onemocněních pacienti často nejsou schopni jíst a hrozí jim různé kontraindikace, proto je vhodné dodávat živiny do organismu pomocí pití bilancovaných roztoků případně zavedení sondy. Při dlouhodobé indikaci enterální výživy, kdy je vhodné pacienta vyživovat pomocí sondy se využívá lékařská metoda zvané perkutánní endoskopická gastrostomie. Při této metodě je zavedena sonda do žaludku přes břišní stěnu a zajišťuje dostatečný příjem živin (Kohout et al., 2010-2016). Ač je tato metoda málo invazivní a její výsledky se setkávají s úspěchem, přesto někteří pacienti často mají převážně patogenní mikrobiotu (De Vries et al., 2015). Proto tématem mé bakalářské práce byla mikrobiota pacientů s PEG, kde jsme pomocí dostupných publikací porovnávali výslednou mikrobiotu s naší analyzovanou skupinou pacientů z FN Motol. Pacientům v Motole byla dlouhodobě indikována enterální výživa a předpokládali jsme, že bude mít vliv na jejich bakteriální složení.

Výsledky některých studií dokazují, že mikrobiota pacientů s PEGem na kmenové úrovni je podobná jako u zdravého jedince. Převážně dominují zástupci kmene *Firmicutes*, avšak s rozdílnými výsledky se setkáváme u bakterií kmene *Proteobacteria*, který je u pacientů s PEG obsažen ve větším množství. Dále také pacienti s PEGem mají výraznější podíl kmene *Ascomycota* (Rolston et al., 2011; De Vries et al., 2015). Tento kmen nebyl v naší studii detekován pravděpodobně typem použitého kitu na izolaci DNA. Avšak o tom, jak přesnou podobu má mikrobiota pacientů s PEG můžeme pouze odhadovat, protože existuje velmi málo studií, které se touto problematikou zabývají. Co se týče již zmíněných studií, byly použity kultivačně závislé metody oproti našemu sekvenování nové generace, které je kultivačně nezávislé.

Pokud budeme porovnávat průměrnou námi detekovanou mikrobiotu, dominuje kmen *Firmicutes* (63,8 %) a poté kmen *Bacteroidetes* (16,2 %), což odpovídá běžnému zastoupení bez PEG (Frič, 2011). Také kmeny *Proteobacteria* a *Actinobacteria* se vyskytovaly

v podobném množství jako u zdravých jedinců. Avšak co se jednotlivců týče, zastoupení těchto tří kmenů, tak se na úrovni jedince velmi lišilo.

Kromě toho byl detekován zajímavý kmen *Tenericutes*, pod který spadá třídu Mollicutes. Tato třída je charakterizována nedostatkem bakteriální buněčné stěny, velmi malým genomem a obsahem široké škály rostlinných i živočišných patogenů. Proto by mohla být ideálním genetickým modelovým organismem, který by sloužil pro porozumění určitých genových funkcí (Browning et Citti, 2014). Pokud se ponoříme hlouběji a zaměříme se na rodové zastoupení bakterií, zjistíme, že u našich pacientů bylo detekováno poměrně velké množství řady prospěšných bakterií, zejména bifidobakterií. Bifidobakterie patří mezi první mikroorganismy, které kolonizují gastrointestinální trakt a přiřazuje se jim pozitivní vliv na zdraví člověka (O'Callaghan et Van Sinderen, 2016). Tento rod spadá pod kmen *Actinobacteria*, jsou součástí komenzální mikrobioty, chrání proti patogenům, zlepšují střevní bariéru, modulují imunitní odpověď organismu, podporují protizánětlivé prostředí organismu, syntetizují vitamíny rozpustné v tucích, tráví rostlinné oligosacharidy a polysacharidy a v neposlední řadě potlačují produkci potenciálně toxických a karcinogenních metabolitů (Floch et al., 2017). Otázkou zůstává, zda-li se vyskytují přirozeně, nebo došlo k intervenci probiotik. Avšak v našich výsledcích bifidobakterie několika násobně převyšují nad rodem *Lactobacillus*. Rod *Lactobacillus* je rozmanitá skupina bakterií, která zahrnuje mnoho druhů využívaných při výrobě a uchování potravin. V důsledku jejich fermentativní činnosti dochází ke zvýšení konzistence, okyselení, zlepšení chuti, struktury a výživy dané potraviny. Některé z nich se považují za probiotické, a tudíž v průměrném množství mají pozitivní vliv na zdraví svého hostitele (Claesson et al., 2007). Většina probiotických preparátů obsahuje právě kombinaci bifidobakterií a laktobacilů. Takže pokud pacienti skutečně dostávali probiotika, tak bifidobakterie mohly lépe přežít a kolonizovat trávicí trakt daných pacientů. Rody *Eubacterium* a *Faecalibacterium* se sice vyskytují, ale v mnohem menším množství. Rod *Eubacterium* zahrnuje široké spektrum fenotypů. Všechny druhy spadají do kmene *Firmicutes*. Eubakterie jsou striktně anaerobní a jejich kultivace je velmi obtížná, některé kmeny mohou růst pouze ve speciálním médiu (Zhou et Li, 2015). Velmi zajímavý byl výskyt druhu *Faecalibacterium* u pacienta č. 3 v hodnotě 18,6 %. Jediný známý druh tohoto rodu je *Faecalibacterium prausnitzii*. Tato komenzální bakterie vysoce funkčně důležitá a její přítomnost v trávicím traktu naznačuje přítomnost zdravé mikrobioty. Ukázalo se, že změny v množství obsahu této bakterie ve střevech jsou spojeny s dysbiózami u některých lidských poruch (Miquel et al., 2013).

Rody jako je *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsilla* a *Escherichia*, které se u pacientů s PEG řadí mezi nejčastěji izolované (De Vries et al., 2015) byly detekovány ve velmi malých množstvích nebo použitou metodikou detekovány nebyly.

8 Závěr

Hlavním cílem této práce bylo porovnat mikrobiotu dětských pacientů s perkutánní endoskopickou gastrostomií, kterým byla indikována enterální výživa oproti pacientům stravujících se běžným způsobem. Předpokládali jsme, že enterální výživa bude mít vliv na kvalitativní i kvantitativní složení mikrobioty jedince. Zjistili jsme, že mikrobiota těchto pacientů po indikaci je podobná mikrobiotě zdravého jedince, co se týče základního kmenového složení. Bylo detekováno značné množství zajímavých výsledků na úrovni jednotlivců. Jako například kmen *Tenericutes*, který má potenciál pro genetické využití, nebo rod *Faecalibacterium*, který je znakem komenzální mikrobioty. Do budoucna by bylo velmi přínosné tyto bakterie stanovit kultivačně. Zajímavá byla také detekce bifidobakterií, které pacienti měli ve velkém množství, otázkou však zůstává, zda-li to nebylo díky probiotické intervenci. Pro budoucí studii by bylo velmi přínosné mít větší počet pacientů a také větší množství vzorků od každého pacienta.

9 Seznam použité literatury

- Bezirtzoglou, E. 1997. The Intestinal Microflora During the First Weeks of Life. *Anaerobe* [online]. 3 (2-3). 173-177. [cit. 2018-02-07]. DOI: 10.1006/anae.1997.0102. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996497901025>>
- Browning, G., Citti, C. 2014. *Mollicutes: molecular biology and pathogenesis*. Caister Academic Press. Norfolk, U.K. ISBN: 978-1-908230-30-0.
- Cabrera-Rubio, R., Collado, M., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., Mira, A. 2012. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 96 (3). 544-551. [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.3945/ajcn.112.037382. ISSN: 0002-9165. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/ajcn/article/96/3/544/4576808>>
- Castanys-Muñoz, E., Martin, M., Vazquez, E. 2016. Building a Beneficial Microbiome from Birth. *Advances in Nutrition* [online]. 7 (2). 323-330. [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.3945/an.115.010694. ISSN: 2156-5376. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/advances/article/7/2/323/4558089>>
- Claesson, M., van Sinderen, D., O'Toole, P. 2007. The genus *Lactobacillus* – a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 269 (1). 22-28. [cit. 2018-04-13]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00596.x. ISSN: 03781097. Dostupné z: <<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2006.00596.x>>
- Collado, M., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E., Salminen, S. 2016. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports* [online]. 6 (1). -. [cit. 2018-02-28]. DOI: 10.1038/srep23129. ISSN: 2045-2322. Dostupné z: <<http://www.nature.com/articles/srep23129>>
- D'Argenio, V., Salvatore, F. 2015. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta*. 451 (451). 97-102. DOI: 10.1016/j.cca.2015.01.003. ISSN: 00098981. Dostupné také z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898115000170>>
- Dastych, M. 2012. Enterální výživa v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi* [online]. 14 (4). 152-156. [cit. 2018-03-04]. Dostupné z: <<https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/04/04.pdf>>

- de Vries, T., de Ruiter, A., Westendorp, A., van Zeijl, J. 2015. Microorganisms and complaints in outpatients with a percutaneous endoscopic gastrostomy catheter. *American Journal of Infection Control* [online]. 43 (8). 802-804. [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1016/j.ajic.2015.04.002. ISSN: 01966553. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196655315002278>>
- Ehrmann, J. 2011. Diagnostika a léčba idiopatických střevních zánětů. *Medicína pro praxi* [online]. 8 (10). 435-437. [cit. 2018-02-22]. Dostupné z: <<https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/10/09.pdf>>
- Floch, M., Ringel, Y., Walker, W. 2017. The microbiota in gastrointestinal pathophysiology: implications for human health, prebiotics, probiotics, and dysbiosis. Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier. Boston. ISBN: 978-0-12-804024-9.
- Frič, P. 2010. Střevní mikroflóra, gastrointestinální ekosystém a probiotika. *Medicína pro praxi* [online]. 7 (11). 408-414. [cit. 2018-02-07]. Dostupné z: <<https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2010/11/03.pdf>>
- Frühauf, P. 2013. Mateřské mléko a jeho biologické aktivity. *Pediatric pro praxi* [online]. 14 (1). 63-64. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: <<https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2013/01/18.pdf>>
- Frühauf, P. 2017. Střevní mikrobiota a možnosti ovlivnění. *Pediatric pro praxi* [online]. 18 (4). 239-242. [cit. 2018-02-26]. Dostupné z: <<https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2017/04/08.pdf>>
- Grofová, Z. 2009. Přehled přípravků enterální výživy pro domácí použití. *Medicína pro praxi* [online]. 3 (6). 169-171. [cit. 2018-03-08]. Dostupné z: <<https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2009/03/12.pdf>>
- Hucl, T., Spicak, J. 2016. Complications of percutaneous endoscopic gastrostomy [online]. 30 (5). 769-781. [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1016/j.bpg.2016.10.002. ISSN: 15216918. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521691816300804>>
- Jirků-Pomajbíková, K., Lukeš, J. 2016. Ovlivňují střevní organismy naše zdraví?. *Akademie věd České republiky* [online]. 2016. [cit. 2018-02-07]. Dostupné z: <<http://www.avcr.cz/cs/pro-media/aktuality/Ovlivnuji-strevni-organismy-nase-zdravi/>>
- Kianička, B., Žák, J., Bareš, M. 2012. Využití perkutánní endoskopické gastrostomie – přehled indikací, popis techniky a současné trendy v neurologii. *Česká a Slovenská*

- neurologie a neurochirurgie [online]. . 165-169. [cit. 2018-03-08]. Dostupné z:
<http://www.csnn.eu/ceska-slovenska-neurologie-clanek/vyuziti-perkutanni-endoskopicke-gastrostomie-prehled-indikaci-popis-techniky-a-soucasne-trendy-v-neurologii-37557?confirm_rules=1>
- Kohout, P., Rušavý, Z., Šerclová, Z. 2010-2016. Vybrané kapitoly z klinické výživy. 1. vydání. Forsapi. Praha. Informační servis pro lékaře. ISBN: 978-80-87250-32-7.
- Koliada, A., Syzenko, G., Moseiko, V., Budovska, L., Puchkov, K., Perederiy, V., Gavalko, Y., Dorofeyev, A., Romanenko, M., Tkach, S., Sineok, L., Lushchak, O., Vaiserman, A. 2017. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. BMC Microbiology [online]. 17 (1). -. [cit. 2018-02-28]. DOI: 10.1186/s12866-017-1027-1. ISSN: 1471-2180. Dostupné z:
<<http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-1027-1>>
- Lukáš, K. 1997. Idiopatické střevní záněty: diagnostika a léčba pro praxi. Vyd. 1. Triton. Praha. ISBN: 80-858-7531-4.
- Marques, T., Cryan, J., Shanahan, F., Fitzgerald, G., Ross, R., Dinan, T., Stanton, C. 2014. Gut microbiota modulation and implications for host health: Dietary strategies to influence the gut–brain axis [online]. 22. 239-247. [cit. 2018-02-28]. DOI: 10.1016/j.ifset.2013.10.016. ISSN: 14668564. Dostupné z:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856413001690>>
- Martin, V., Manes-Lazaro, R., Rodriguez, J., Maldonado-Barragan, A. 2011. Streptococcus lactarius sp. nov., isolated from breast milk of healthy women. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY [online]. 61 (5). 1048-1052. [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1099/ijms.0.021642-0. ISSN: 1466-5026. Dostupné z:
<<http://ijms.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.021642-0>>
- Miquel, S., Martín, R., Rossi, O., Bermúdez-Humarán, L., Chatel, J., Sokol, H., Thomas, M., Wells, J., Langella, P. 2013. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. Current Opinion in Microbiology [online]. 16 (3). 255-261. [cit. 2018-04-13]. DOI: 10.1016/j.mib.2013.06.003. ISSN: 13695274. Dostupné z:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527413000775>>
- Mitsou, E., Kirtzalidou, E., Oikonomou, I., Liosis, G., Kyriacou, A. 2008. Fecal microflora of Greek healthy neonates. Anaerobe [online]. 14 (2). 94-101. [cit. 2018-02-07]. DOI:

- 10.1016/j.anaerobe.2007.11.002. ISSN: 10759964. Dostupné z:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996407000996>>
- Morinaga, S., Sakamoto, K., Konishi, K. 1988. Antitumor Activity and Its Properties of *Eubacterium lentum*. Japanese Journal of Cancer Research [online]. 79 (1). 117-124. [cit. 2018-04-13]. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1988.tb00018.x. ISSN: 09105050. Dostupné z:
<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.1988.tb00018.x>>
- Musilová, Š., Bunešová, V., Rada, V. 2016. Je mateřské mléko pro novorozence zdrojem prebiotik a probiotik?. *Pediatric pro praxi* [online]. 17 (1). 27-31. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z:
<<https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2016/01/06.pdf>>
- Nevoral, J. 2007. Současná terapie idiopatických střevních zánětů u dětí. *Pediatric pro praxi* [online]. 6 (8). 369-373. [cit. 2018-02-21]. Dostupné z:
<<https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2007/06/09.pdf>>
- O'Callaghan, A., van Sinderen, D. 2016. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology* [online]. 7. -. [cit. 2018-04-11]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00925. ISSN: 1664-302X. Dostupné z:
<<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00925/abstract>>
- O'Hara, A., Shanahan, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* [online]. 7 (7). 688-693. [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1038/sj.embor.7400731. ISSN: 1469-221X. Dostupné z: <<http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.embor.7400731>>
- Rolston, K., Mihu, C., Tarrand, J. 2011. Current microbiology of percutaneous endoscopic gastrostomy tube (PEG tube) insertion site infections in patients with cancer. *Supportive Care in Cancer* [online]. 19 (8). 1267-1271. [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1007/s00520-011-1177-x. ISSN: 0941-4355. Dostupné z: <<http://link.springer.com/10.1007/s00520-011-1177-x>>
- Salazar, N., Valdés-Varela, L., González, S., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. 2017. Nutrition and the gut microbiome in the elderly. *Gut Microbes* [online]. 8 (2). 82-97. [cit. 2018-02-07]. DOI: 10.1080/19490976.2016.1256525. ISSN: 1949-0976. Dostupné z:
<<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19490976.2016.1256525>>
- Sartor, R. 2008. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* [online]. 134 (2). 577-594. [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.11.059. ISSN: 00165085. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508507021579>>

- Seksik, P. 2010. Gut microbiota and IBD. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* [online]. 34. 44-51. [cit. 2018-02-22]. DOI: 10.1016/S0399-8320(10)70020-8. ISSN: 03998320. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0399832010700208>>
- Seron-Arbeloa, . 2013. Enteral Nutrition in Critical Care. *Journal of Clinical Medicine Research* [online]. . -. [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.4021/jocmr1210w. ISSN: 19183003. Dostupné z: <<http://www.jocmr.org/index.php/JOCMR/article/view/1210>>
- Shreiner, A., Kao, J., Young, V. 2015. The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology* [online]. 31 (1). 69-75. [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1097/MOG.000000000000139. ISSN: 0267-1379. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4290017/>>
- Špičák, J. 2017. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii II*. 1. vydání. Grada Publishing. Praha. ISBN: 978-80-271-0318-8.
- Tláskalová-Hogenová, H., Městecký, J. 2012. Účast slizničního imunitního systému a komensálních bakterií v alergii. *Alergie* [online]. (2). 124-133. [cit. 2018-03-04]. Dostupné z: <http://www.tigis.cz/images/stories/Alergie/2012/2_2012/07_tlaskalova_alergie_2-12.pdf>
- Urbánek, L., Urbánková, P. 2012. Perkutánní endoskopická gastrostomie v algoritmu terapie pokročilých nádorů hlavy a krku. *Časopis endoskopie* [online]. 1 (21). 32-34. [cit. 2018-03-08]. Dostupné z: <<https://www.casopisendoskopie.cz/pdfs/end/2012/01/08.pdf>>
- Vaiserman, A., Koliada, A., Marotta, F. 2017. Gut microbiota: A player in aging and a target for anti-aging intervention. *Ageing Research Reviews* [online]. 35. 36-45. [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1016/j.arr.2017.01.001. ISSN: 15681637. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568163716302653>>
- Zhou, X., Li, Y. 2015. *Atlas of oral microbiology: from healthy microflora to disease*. Zhejiang University Press. Hangzhou, China. ISBN: 978-0-12-802234-4.

10 Seznam tabulek

Tabulka 1 - procentuální výskyt bakterií monomikrobiální infekce u pacientů s PEGem (Rolston et al., 2011).....	16
Tabulka 2 - procentuální výskyt polymikrobiální infekce u pacientů s PEGem (Rolston et al., 2011)	16
Tabulka 3 - Seznam pacientů s PEG.....	18
Tabulka 4 - Průměrná mikrobiota analyzovaných pacientů s PEGem	20
Tabulka 5- Kmenové zastoupení v mikrobiotě jednotlivých analyzovaných pacientů s PEGem	22
Tabulka 6 - Zastoupení vybraných bakteriálních kmenů u jednotlivých pacientů	24

11 Seznam grafů

Graf 1 – Průměrné zastoupení bakteriálních kmenů analyzovaných pacientů s PEGem	21
Graf 2 - Jednotliví pacienti	22

12 Seznam obrázků

Obrázek 1 - změny mikrobioty v průběhu života (Vaiserman et al., 2017).	10
---	----