

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Beata Szymczysková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Kultivační vyšetření dýchacích cest

Bakalářská práce

Beata Szymczysková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: doc. MUDr. Vladislav Raclavský, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Beata SZYMCZYSKOVÁ**
Osobní číslo: **R18658**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Kultivační vyšetření dýchacích cest**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Zpracovat literární přehled mikrobioty dýchacích cest a diskutovat otázku fyziologické kolonizace dolních cest dýchacích (DCD)
2. Srovnat výsledky kultivace tekutiny z BAL s mikrobiotou dutiny ústní (DÚ) a střev, identifikovat mikrobiální druhy dolních dýchacích cest, které mohou pocházet z dutiny ústní, příp. z trávicího traktu, a pokusit se zhodnotit případný kolonizační potenciál jednotlivých druhů ve vztahu k DCD
3. Posoudit, zda jsou některé druhy v mikrobiotě DÚ, příp. DCD, typicky detekovány společně a zda lze u těchto skupin příp. dovodit vztah k hygieně DÚ, kouření, příp. věku a pohlaví
4. Korelovat kultivační detekci kvasinky *C. albicans* v DÚ a v DCD s hladinou sérových protilátek

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Tortora GJ, Funke BR, Case CL: Microbiology - an introduction. Pearson, San Francisco, 2007. (vybrané kapitoly ke kultivaci mikroorganismů)
2. Wilson M.: Microbial Inhabitants of Humans. Cambridge University Press, Cambridge, 2005. (vybrané kapitoly k fyziologické mikroflóře)
3. Faner R, Sibila O, Agustí A, Bernasconi E, Chalmers JD, Huffnagle GB, Manichanh C, Molyneaux PL, Paredes R, Pérez Brocal V, Ponomarenko J, Sethi S, Dorca J, Monsó E. The microbiome in respiratory medicine: current challenges and future perspectives. Eur Respir J. 2017 Apr 12;49(4).
4. Montelongo-Jauregui D, Lopez-Ribot JL. Candida Interactions with the Oral Bacterial Microbiota. J Fungi (Basel). 2018 Nov 3;4(4). pii: E122.
5. <http://www.homd.org/>

Vedoucí bakalářské práce: **doc. MUDr. Vladislav Raclavský, Ph.D.**
Ústav mikrobiologie

Datum zadání bakalářské práce: **26. dubna 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. července 2021**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Štechtělu 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 634 901

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Beata Szymczysková
Název práce	Kultivační vyšetření dýchacích cest
Typ práce	Bakalářská práce
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	doc. MUDr. Vladislav Raclavský, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Klíčová slova	MALDI-TOF MS, kultivace, <i>C. albicans</i> , mikrobiota
Počet stran	57
Počet příloh	13
Jazyk	Český

ABSTRAKT

Respirační trakt představuje složitý orgánový systém, který je zodpovědný především za výměnu kyslíku a oxidu uhličitého s okolním prostředím. Je obýván řadou specifických společenství bakterií, které mohou být zapojeny v udržování homeostázy fyziologie dýchání a imunity. Dokonce plíce, které dříve byly považovány za zcela sterilní, jsou neustále vystavovány různým mikroorganismům z orofaryngu a jiných oblastí respiračního traktu, a jsou tedy rovněž mikroby kolonizovány. Hustota plicní mikrobioty je však menší oproti např. střevní mikroflóře, protože malý počet bakterií zdá se být rozhodujícím faktorem v udržování dobrého zdraví jedince. Současně je vývoj mikrobiálních komunit horních a dolních cest dýchacích podrobně studován, s cílem zjistit, jak tahle mikrobiota ovlivňuje zdraví dýchacích cest a působením kterých faktorů dochází k jejím změnám, které pak v krajním případě mohou vyústit v infekci. Tato bakalářská práce popisuje hlavní charakteristiky mikrobioty dýchacích cest a její funkční dopad na fyziologii a zdraví respiračního traktu. Dále srovnává výsledky kultivace a identifikované mikrobiální druhy z dutiny ústní, střev a dolních cest dýchacích.

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Beata Szymczysková
Title	Culture examination of respiratory airways
Type of thesis	Bachelor thesis
Departement	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc
Supervisor	doc. MUDr. Vladislav Raclavský, Ph.D.
The year of presentation	2021
Keywords	MALDI-TOF MS, cultivation, <i>C. albicans</i> , microbiota
Number of pages	57
Number of appendices	13
Language	Czech

SUMMARY

The respiratory tract is a complex organ system that is primarily responsible for the exchange of oxygen and carbon dioxide with the environment. It is inhabited by a number of specific communities of bacteria that may be involved in maintaining the homeostasis of respiratory physiology and immunity. Even the lungs, which were previously considered to be completely sterile, are constantly exposed to various microorganisms from the oropharynx and other areas of the respiratory tract and are therefore also colonized by microbes. However, the density of the lung microbiota is lower compared to, for example, the intestinal microflora, because a small number of bacteria seems to be a decisive factor in maintaining the good health of an individual. At the same time the development of microbial communities of the upper and lower respiratory tract is studied in detail in order to find out how this microbiota affects the health of the respiratory tract and by which factors its changes occur, which in extreme cases can result in infection. This bachelor thesis describes the main characteristics of airway microbiota and its functional impact on the physiology and health of the respiratory tract. It also compares the results of cultivation and the identified microbial species from the oral cavity, intestines and lower respiratory tract.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. MUDr. Vladislava Raclavského, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

.....

Beata Szyczková

Děkuji mému vedoucímu doc. MUDr. Vladislavovi Raclavskému, PhD. za věnovaný čas, vstřícnost při konzultacích a odborné vedení této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Radko Novotnému a celému personálu Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za poskytování rad a příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě také děkuji své rodině a blízkým za podporu při psaní této práce i během celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	HORNÍ A DOLNÍ CESTY DÝCHACÍ.....	3
3.2	OBRANNÉ MECHANISMY DÝCHACÍHO SYSTÉMU.....	3
3.3	MIKROBIOTA DÝCHACÍCH CEST	4
3.3.1	Rod <i>Neisseria</i>	4
3.3.2	Rod <i>Streptococcus</i>	5
3.3.4	<i>Moraxella catarrhalis</i>	8
3.3.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	9
3.3.6	<i>Actinomyces spp.</i>	11
3.3.7	<i>Veillonella spp.</i>	11
3.4	INTERAKCE MEZI ČLENY MIKROBIOTY RESPIRAČNÍHO TRAKTU.....	11
3.5.1	Mikrobiota horních dýchacích cest mění se s věkem a životním stylem.....	13
3.6.1	Odběr mikrobiálních vzorků z dolních cest dýchacích.....	14
4	MATERIÁL A METODY	15
4.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	15
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY	15
4.3	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ	16
4.4	POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ POSTUPY	16
4.4.1	Princip MALDI-TOF MS	16
4.4.2	Příprava vzorků pro MALDI-TOF MS.....	17
4.4.3	Identifikace subkultivovaných izolátů technikou MALDI-TOF MS.....	18
4.4.4	Čištění MALDI desek za použití TFA.....	19
4.4.5	Zpracování dat v tabulkovém procesoru Microsoft Excel.....	20
5	VÝSLEDKY	22
5.1	ODKUD PŘECHÁZEJÍ DRUHY DO DOLNÍCH CEST DÝCHACÍCH A JAK TAM PROSPERUJÍ... 22	
5.2	POSOUZENÍ NÁHODNOSTI SPOLEČNÉHO VÝSKYTU DRUHŮ	40
5.3	KORELACE KULTIVAČNÍ DETEKCE KVASINKY <i>CANDIDA ALBICANS</i> V DU A DCD S HLADINOU SÉROVÝCH PROTILÁTEK.....	43
6	DISKUSE	46

7	ZÁVĚR.....	51
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	52
9	PŘÍLOHY	57

POUŽITÉ SYMBOLY A ZKRATKY

MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of Flight Mass Spectrometry)
HCD	horní cesty dýchací
DCD	dolní cesty dýchací
CoNS	koaguláza negativní stafylokoky (Coagulase-Negative Staphylococci)
TFA	kyselina trifluoroctová (Trifluoroacetic Acid)
m/z	poměr hmotnosti k náboji (bezrozměrná fyzikální veličina často používaná v elektrodynamice nabitých částic)
NS	vzorky v rámci projektu zaměřeného na nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC, Non-Small Cell Lung Cancer)
CRC	vzorky v rámci projektu zaměřeného na kolorektální karcinom (CRC, Colorectal Cancer)
DU	výplach z dutiny ústní
R	výtěr z konečníku (z rekta)
ST	vzorek stolice odebraný mimo tělo
BAL	bronchoalveolární laváž (výplach bronchů při bronchoskopii)
BAT	bronchalveolární tekutina
KA	krvní agar
COKO	čokoládový agar s bacitracinem
NAS	agar s kyselinou nalidixovou
F	anaerobní krevní agar
N	anaerobní agar s neomycinem
S	Schaedlerův anaerobní agar
DX	deoxycholát-citrátový agar
NGS	sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing)

16S rRNA	ribosomální RNA (ribonukleová kyselina), která je součástí malé podjednotky prokaryotického ribozomu
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)

SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Graf 1: Celkový počet pozitivních a negativních pacientů na CAAL s ohledem na kouření.

Graf 2: Hladiny protilátek třídy IgA, IgG a IgM s ohledem na kouření.

Graf 3: Hladiny protilátek třídy IgA, IgG a IgM v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti *C. albicans* ve vzorcích z dutiny ústní (bez ohledu na kouření).

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Hodnocení spolehlivosti identifikace (MALDI Biotyper 3.0 User Manual Revision 2, Bruker Daltonics GmbH, 2018).

Tabulka 2: Identifikované mikrobiální druhy z bronchoalveolární tekutiny pomocí MALDI-TOF MS a softwaru MALDI Biotyper, s relativním zastoupením každého druhu a bez párování podle skutečných pacientů (zobrazeny jsou jen výsledky pro druhy s relativní četností vyšší jak 20 %).

Tabulka 3: Identifikované mikrobiální druhy z dutiny ústní pomocí MALDI-TOF MS a softwaru MALDI Biotyper, s relativním zastoupením každého druhu (zobrazeny jsou jen výsledky pro druhy s relativní četností vyšší jak 20 %).

Tabulka 4: Identifikované mikrobiální druhy z rektálního výtěru a vzorků stolice pomocí MALDI-TOF MS a softwaru MALDI Biotyper, s relativním zastoupením každého druhu (zobrazeny jsou jen výsledky pro druhy s relativní četností vyšší jak 20 %).

Tabulka 5: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 130 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 6: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 170 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU).

Tabulka 7: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 178 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 8: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 179 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 9: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 182 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 10: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 184 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 11: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 188 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU).

Tabulka 12: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 189 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 13: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 190 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 14: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 199 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 15: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 208 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 16: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 210 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 17: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 216 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU).

Tabulka 18: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 222 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 19: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 226 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 20: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 232 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 21: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 234 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 22: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 235 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU).

Tabulka 23: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 238 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU).

Tabulka 24: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 240 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 25: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 241 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Tabulka 26: Mikroorganismy detekované společně v BAT a DU s absolutní četností vyšší jak 50.

Tabulka 27: Dvojice mikroorganismů, jejichž skóre odchylky od náhody je $\geq 1,2\times$ než náhodný výskyt (seřazeno od nejvyšší odchylky po nejnižší).

Tabulka 28: Dvojice mikroorganismů, jejichž skóre odchylky od náhody je $\leq 0,8\times$ než náhodný výskyt.

Tabulka 29: Hladiny protilátek jednotlivých tříd (IgA, IgG, IgM) u kuřáků, nekuřáků a exkuřáků (bez ohledu na přítomnost CAAL v DU).

Tabulka 30: Hladiny protilátek jednotlivých tříd (IgA, IgG, IgM) u pacientů pozitivních a negativních na *C. albicans* (bez ohledu na kouření).

1 ÚVOD

Horní a dolní cesty dýchací jsou kolonizovány řadou mikroorganismů, složení mikroflóry se vyvíjí ve vztahu k nejrůznějším faktorům, jako jsou dostupnost živin, hormonální působení, antibiotika či teplota a pH prostředí. Mikrobiom respiračního traktu zahrnuje i organismy, kteří jsou potenciálními patogeny a původci infekcí dýchacích cest. Rizika vzniku akutních a chronických infekcí dýchacích cest jsou nejčastějšími důvody zavádění antimikrobiální léčby v primární péči v nemocnicích a jiných zdravotnických zařízeních z důvodu snadného přenosu mikrobů vzduchem. Mnohdy léčbu bakteriálních infekcí komplikuje rezistence bakterií vůči antibiotikům jako reakce na silný selektivní tlak, který vzniká v důsledku nadměrného používání těchto látek, ne jenom jako léčiv, ale také například v krmivech pro hospodářská zvířata. Pro klinickou diagnostiku je zjišťování přítomnosti patogenních mikroorganismů v dýchacích cestách velmi důležité. Kvantitativní analýzy pro identifikaci bakterií byly často nákladné a časově náročné, navíc vždy nepřinášely přesné výsledky. S rozvojem nových technologií se v současnosti pro stanovení mikroorganismů na základě molekulových hmotností využívá hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS. Jedná se o vysoce přesnou metodu, aplikovatelnou pro široké spektrum mikroorganismů a mnohem rychlejší ve srovnání s klasickými metodami. MALDI-TOF MS nám umožňuje rozlišit nejen bakterie či jiné organismy jako jsou kvasinky a vláknité mikromycety na kmenové, rodové i druhové úrovni, ale také přímo detekovat některé mechanismy antibiotické rezistence bakterií. Kolonizace dýchacích cest hraje klíčovou roli při vzniku plicních infekcí zejména u pacientů s rakovinou plic, ovlivňuje terapeutické postupy a pravděpodobně i vývoj nemoci. Proto jsou studie, s cílem této mikrobiotě a její epidemiologii lépe porozumět, nezbytné pro zavedení efektivní individuální léčby.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je zpracování literárního přehledu mikrobioty dýchacích cest a diskuse na otázku fyziologické kolonizace dolních cest dýchacích.

V praktické části je cílem srovnání výsledků kultivace tekutiny z BAL s mikrobiotou dutiny ústní a střev, identifikace mikrobiálních druhů dolních dýchacích cest, které mohou pocházet z dutiny ústní, případně z trávicího traktu a pokusit se zhodnotit případný kolonizační potenciál jednotlivých druhů ve vztahu k DCD. Posoudit, zda jsou některé druhy v mikrobiotě dutiny ústní nebo DCD typicky detekovány společně. Nakonec korelovat kultivační detekci kvasinky *Candida albicans* v dutině ústní a v DCD s hladinou sérových protilátek.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Horní a dolní cesty dýchací

Respirační systém se skládá ze dvou částí, kterými jsou horní a dolní cesty dýchací. Horní cesty dýchací zahrnují nos (*nasus*), dutinu ústní (*cavum oris*) a hltan (*pharynx*) včetně středního ucha (*auris media*) a Eustachovy (sluchové) trubice (*tuba pharyngotympanica*), která spojuje nosohltan (*nasopharynx*) se středním uchem, jehož je také součástí a umožňuje vyrovnávat tlak na obou stranách bubínku. V rámci tohoto systému jsou důležité přítomné kanály, které vybíhají z dutin a slzných aparátů (*apparatus lacrimalis*) a odvádějí slzy do dutiny nosní, podobně jako sluchová trubice, která ale odvádí hlen ze středního ucha do horní části hrdla. Zásadní roli zde hraje chrupavčitá příklopka hrtanová (*epiglottis*), která při spolknutí potravy nebo tekutiny se uzavře, díky čemuž potrava putuje do jícnu a nedochází k jejímu vdechnutí. Dolní cesty dýchací zahrnují hrtan (*larynx*), průdušnice (*trachea*), průdušky (*bronchus*) a plicní sklípky (*alveolus*). Plicní sklípky jsou vzdušné váčky, které tvoří plicní tkáň; představují základní funkční jednotku plic (*pulmo*), v nichž kyslík (O₂) a oxid uhličitý (CO₂) je vyměňován mezi plicemi a krví, čímž dochází k vlastnímu procesu dýchání (Tortora *et al.*, 2007).

3.2 Obranné mechanismy dýchacího systému

Existuje řada obranných mechanismů, kterými se snaží organismus bránit před patogeny. Epitel sliznice dýchacích cest je řasinkový a zachycuje prachové částice a mikroorganismy z ovzduší ve vrstvě hlenu, který je pomocí řasinek a jejich koordinovaným kmitavým pohybem posouván směrem k ústní části hltanu (orofaryngu), kde je následně vykašláván nebo polykán. Tento proces se označuje jako mukociliární transport hlenu. Řasinkový epitel tvoří až 2/3 povrchu respiračního traktu, najdeme ho v dutině nosní, nosohltanu, hrtanu ale i v průdušinkách. Řasinkové buňky jsou v těchto regionech nejpočetnější, každá nese na svém apikálním povrchu velký počet pohyblivých cilií. Nedílnou součástí epitelu dýchacích cest jsou pohárkové buňky, které produkují a uvolňují na svůj povrch mucin a podílejí se tak na tvorbě hlenu. Jestliže se mikroorganismy a jiné složky ze vzduchu dostanou do plic, přítomné fagocytující alveolární makrofágy (též prашné buňky nebo méně obvyklé označení koniofágy), které se mohou vyskytovat jak mezi pneumocyty (plicními buňkami), tak i volně uvnitř alveol, zajišťují pohlcení vdechnutých částic či jiných drobných nečistot. V některých sekretech, jako jsou sliny nebo hlen, který mechanicky

zabraňuje přístup bakteriím ke sliznicím, jsou přítomné i protilátky třídy IgA (též označovány jako slizniční protilátky, protože jsou produkovány B-lymfocyty nacházejícími se ve slizničních vrstvách), které pomáhají chránit slizniční povrchy respiračního systému před mnoha patogeny (Lüllmann-Rauch, 2012; Tortora *et al.*, 2007; Wilson, 2005). Ačkoliv organismus disponuje těmito několika mechanismy na obranu vůči mikroorganismům, kteří způsobují infekce dýchacích cest, ne vždy se podaří tomuto zabránit.

3.3 Mikrobiota dýchacích cest

Horní cesty dýchací jsou kolonizovány řadou mikrobů, kteří dutinou nosní nebo ústní přímo vstupují ze vzduchu do respiračního traktu. Dokonce v plicích, které ještě nedávno byly považovány za zcela sterilní, koexistuje řada mikroorganismů. Složení mikroflóry je velmi variabilní, sliznice dýchacího traktu jsou osídleny bakteriemi především z ovzduší a závisí také na dostupnosti živin v sekretech. Makromolekuly jako jsou proteiny, glykoproteiny, lipidy či nukleové kyseliny přítomné v sekretech mohou být činností některých mikroorganismů převedeny pomocí jejich různých enzymů (např. proteázami, glykosidázami, lipázami apod.) na sacharidy, aminokyseliny a mastné kyseliny, které pak využívají jako zdroje energie. Jednotlivé regiony respiračního traktu jsou osídleny širokou škálou mikrobů. (Wilson, 2005). Následující text pojednává jen o některých rodech a zástupcích mikrobioty dýchacích cest.

3.3.1 Rod *Neisseria*

Jedná se o aerobní, nepohyblivé, Gram-negativní diplokoky, které nevytvářejí spory. Mohou růst v rozmezí teplot od 22-40 °C, ideální teploty jsou kolem 35-38 °C. Kromě druhů *Neisseria meningitidis* a *Neisseria gonorrhoea*, které jsou patogenní, jsou zbylí členové rodu nenároční na výživu. Oba patogenní druhy jsou kultivačně náročné, vyžadují komplexní kultivační půdy s obsahem nativních bílkovin, vlhké prostředí a zvýšenou koncentrací CO₂. Všechny druhy rodu *Neisseria* jsou pozitivní jak na katalázu, tak i na oxidázu, oxidují karbohydráty na kyseliny. Jednotlivé druhy lze identifikovat podle cukrů, které jsou schopné převést na kyseliny; nepatogenní neisserie obvykle štěpí víc různých sacharidů, patogenní *Neisseria meningitidis* štěpí glukózu a maltózu, zatímco *Neisseria gonorrhoea* tvoří kyselinu jen z glukózy (Tang *et al.*, 2015; Votava, 2003; Wilson, 2005).

Neisseria meningitidis, také známá jako meningokok, se může vyskytovat na sliznicích nosohltanu i u zdravých jedinců. Existuje třináct séro skupin (označovaných A, B, C, D, atd.), které jsou rozeznávány na základě antigenity polysacharidových kapsulí těchto bakterií. Řada virulentních faktorů, kterými bakterie disponuje, umožňuje rozvrátit obranné systémy hostitele a způsobit jeho poškození. Mezi hlavní onemocnění vyvolané meningokokem patří meningitida a septikémie, dále může být zodpovědný za septickou artritidu, zápal plic, perikarditidu, zánět spojivek či zánět vedlejších nosních dutin. Přenáší se vzdušnou kapénkovou cestou. Počet úmrtí na celém světě zapříčiněný meningitidou, vyvolanou bakterií *Neisseria meningitidis*, se pohybuje v rozmezí 10-20 %. Vysoký podíl přeživších trpí určitým trvalým postižením, jako je hluchota nebo mentální retardace. Penicilin je efektivní pro léčbu tohoto onemocnění, ale stále častěji jsou izolovány kmeny vykazující rezistenci vůči antibiotikům. V prevenci onemocnění je však vakcinace stále důležitá (Rouphael *et al.*, 2012; Wilson, 2005).

3.3.2 Rod *Streptococcus*

Streptokoky jsou nepohyblivé, Gram-pozitivní, sférické nebo oválné koky, které se obvykle vyskytují v párech nebo řetězcích o různé délce. Většinou jsou to fakultativní anaerobové, nicméně jsou známy i druhy striktně aerobní. Streptokokům chybí enzym kataláza, proto vykazují negativní reakci na katalázový test. Všechny druhy jsou výživově náročné, fermentují sacharidy přeměnou hlavně na laktát. Některé druhy vyžadují pro svůj růst i vysoké hladiny CO₂ (5%). Optimální teplota pro jejich růst je přibližně 37 °C, jsou ale schopni růst i v teplotním rozmezí 20-42 °C. Existují i druhy, které snesou kyselé podmínky prostředí a jsou schopné přežít i v tak nízkém pH jako 4,1. Podle staršího klasifikačního systému se streptokoky na základě hemolytických reakcí na krevním agaru dělí na α -, β -, a γ -hemolytické streptokoky. Alfa-hemolytické neboli viridující streptokoky mění hemoglobin na zelený derivát verdoglobin, beta-hemolytické streptokoky způsobují poškození membrán erytrocytů, což se projevuje projasněním agaru kolem rostoucích kolonií a gama-hemolytické streptokoky hemolýzu nevyvolávají. Používání hemolytických reakcí pro klasifikaci streptokoků není zcela uspokojivé, protože samotná hemolýza je ovlivněna řadou faktorů, jako druhem a stářím červených krvinek. Jiným způsobem dělení streptokoků, tzv. rozdělení podle Lancefieldové, je na základě přítomnosti povrchových antigenů (M-proteinu a polysacharidu C) v buněčných stěnách většiny bakterií. Taxonomie a genetické vztahy těchto organismů jsou nadále zkoumány (Baron, 1996; Wilson, 2005).

Streptococcus pyogenes patří do skupiny beta-hemolytických streptokoků a A skupiny podle Lancefieldové. Dokáže se vázat na mucin, který je jednou z hlavních komponent plicního surfaktantu a to pomocí dvou proteinových adhezínů, z nichž jeden je protein M. Povrchový antigen, M-protein, je hlavním faktorem virulence tohoto streptokoka a kromě toho, že umožňuje jeho adhezi na epiteliální buňky prostřednictvím kyseliny sialové, je zodpovědný i za jeho odolnost vůči fagocytóze. Mezi další adheziny, které se mohou podílet na adhezi streptokoků k epiteliálním buňkám, patří např. kyselina lipoteichoová, protein F2, SpeB nebo kyselina hyaluronová. *Streptococcus pyogenes* je zodpovědný za širokou škálu infekcí, zejména způsobuje hnisavé infekce hltanu a kůže (*pyogenes* v doslovném překladu z řečtiny znamená „tvořící hnis“), a kromě adhezínů má působivou řadu virulentních faktorů. Například hyaluronidáza štěpí kyselinu hyaluronovou v pojivových tkáních na kyselinu glukuronovou a N-acetylglukosamin, které mohou bakterie použít jako zdroje energie, což jim napomáhá šířit se tkáněmi. Enzym streptokináza zase převádí plasminogen na plasmin, který štěpí fibrin, čímž dochází k fibrinolýze a umožňuje tak průnik bakterií do tkání. Nebo již zmíněný SpeB (streptokokový pyrogenní exotoxin B) štěpí hostitelské proteiny včetně protilátek a řadí se mezi tzv. superantigeny, když indukuje uvolňování pro-zánětlivých cytokinů a zprostředkovává vazbu na laminin a integriny (Baron, 1996; Wilson, 2005).

Existuje řada infekcí, které způsobuje bakterie *Streptococcus pyogenes*. Faryngitida neboli zánět hltanu, je nejčastější infekcí vyvolanou tímto streptokokem. Pokud kmeny produkují jeden nebo více pyrogenních exotoxinů (SpeA, SpeB, SpeC), infekce může být doprovázena kožní vyrážkou a deskvamací kožních buněk – stav, který je známý pod pojmem spála. Infekce postihuje především děti ve věku 2-12 let, napadá především nosohltan a způsobuje často zánět mandlí, ale může se rozšířit do středního ucha až k mozkovým plénám (Sykes *et al.*, 2020; Wilson, 2005).

Akutní revmatická horečka je život ohrožující zánětlivé onemocnění postihující srdce a klouby. Je hlavní příčinou srdečních onemocnění u dětí, následuje přibližně tři týdny po infekci horních cest dýchacích určitými kmeny *Streptococcus pyogenes*. Nemoc vzniká v důsledku abnormální imunitní reakce. Podobnost některých povrchových molekul bakterií s proteiny přítomnými v srdeční a nervové tkáni nebo synoviální tekutině kloubů má za následek křížové reakce protilátek s proteiny hostitele, což vede k zánětu (Binotto, 2002; Wilson, 2005).

Streptokokový syndrom toxického šoku (STSS – Streptococcal toxic shock syndrome) je vyvolán systémovou imunitní odpovědí na superantigeny (pyrogenní exotoxiny A a C

produkované některými kmeny *Streptococcus pyogenes*), které aktivují imunitní systém přímou vazbou na receptory T-lymfocytů bez účasti antigen prezentujících buněk. Postižené osoby trpí vazodilatací, intravaskulární koagulací, selháním ledvin až multiorgánovým postižením, způsobenými uvolněním nadměrného množství prozánětlivých cytokinů z aktivovaných lymfocytů. Úmrtnost na STSS je vysoká a pohybuje se v rozmezí 30-80 % u dospělých, u dětí je nižší (Drápalová *et al.*, 2017).

Streptococcus pneumoniae je alfa-hemolytický streptokok, který se od ostatních členů této skupiny liší svou citlivostí k ethylhydrokupreinu, neboli optochinu, a také tím, že v jeho buněčné stěně není přítomen polysacharid C. Koky obvykle tvořící páry, jsou uzavřeny v polysacharidové kapsuli, na základě jejichž antigenicity rozlišujeme 90 sérotypů *Streptococcus pneumoniae*. Streptokok je díky polysacharidovému pouzdru chráněn před fagocytózou. Důležitým adhezinem streptokoka, který mu napomáhá přilnout k epiteliálním buňkám v nosohltanu, je cholin vázající protein A. Mezi faktory virulence, kromě již zmíněného polysacharidového pouzdra a proteinu A patří také např. pneumolysin, který je toxický pro řasinkové buňky bronchiálního epitelu, způsobuje uvolňování pro-zánětlivých cytokinů, inhibuje proliferaci lymfocytů a tvorbu protilátek a indukuje apoptózu neutrofilů, makrofágů či nervových buněk. Nebo sialidázy (neuroaminidázy), které štěpí zbytky kyseliny sialové z mucinu a umožňují bakteriím připojit se na sliznici dýchacích cest, čímž přispívají k degradaci těchto komplexních molekul a uvolňování sacharidů a aminokyselin, které jsou bakteriemi využívány jako zdroje energie. Důležitá je také IgA proteáza štěpící molekuly IgA protilátek za uvolňování jejich fragmentů, které jsou dále degradovány (Dion *et al.*, 2020; Wilson, 2005).

Streptococcus pneumoniae je lidský patogen zodpovědný za celou řadu onemocnění, včetně pneumonie (zápalu plic), meningitidy, zánětu středního ucha nebo vedlejších nosních dutin (Wilson, 2005).

Oba patogenní streptokoky lze od ostatních odlišit pomocí bacitracinového či optochinového testu. *Streptococcus pyogenes*, který je citlivý na bacitracin, vytváří kolem disku s bacitracinem kruhovou zónu inhibice, obdobně *Streptococcus pneumoniae*, kultivován na krevním agaru, neroste v okolí disku s optochinem.

3.3.3 Rod *Haemophilus*

Haemophilus je rod nepohyblivých, aerobních, Gram-negativních bakterií, které nevytvářejí spory. V závislosti na podmínkách prostředí se vyskytují v podobě kokobacilů nebo vláknitých tyček. Jejich růst je obecně podporován zvýšenými hladinami oxidu uhličitého (5-10%) s optimálním pH 7,6 a teplotou v rozmezí 35-37 °C, přičemž dokážou růst i v teplotním rozsahu od 20 do 40 °C. Tyto bakterie jsou výživově náročné a pro jejich kultivaci *in vitro* je nutná přítomnost růstových faktorů – heminu (růstový faktor X), nikotinamidadenin dinukleotidu (NAD, růstový faktor V) nebo obou látek. Fermentují sacharidy na kyselinu jantarovou, mléčnou nebo octovou (Baron, 1996; Wilson, 2005).

Haemophilus influenzae je patogen respiračního systému. Rozlišujeme sedm základních skupin, šest z nich tvoří pouzdro a jsou dále rozdělovány na sérotypy a až f na základě struktury a antigenicity jejich kapsulárních polysacharidů. Nejznámější z nich je *Haemophilus influenzae* typu b (Hib), jehož pouzdro obsahuje polysacharid polyribosylribitolfosfát a který je zodpovědný za řadu těžkých, invazivních onemocnění. V konečném důsledku může vést k meningitidě, pneumonii, epiglotitidě, artritidě, zánětu středního ucha, vedlejších nosních dutin, průdušek nebo spojivek. Sedmou skupinu tvoří ty, které kapsuli nemají, a proto jsou označovány jako netypické nebo neopouzdržené (non-typeable *H. influenzae*, NTHi). Mezi faktory virulence patří např. LOS (lipooligosacharidy) nebo transferin vázající proteiny. Lipooligosacharidy jsou cytotoxické pro řasinkové epitelální buňky a indukují uvolňování prozánětlivých cytokinů. Strukturou připomínají lidské glykosfingolipidy, proto je hostitelský obranný systém nerozeznává. Transferin vázající proteiny pomáhají bakteriím napadnout epitelální buňky a procházet těsnými mezibuněčnými spojeními (tight junctions). Adheze k mucinu je dána přítomností P2 a P5 vnějších membránových proteinů, zatímco k epitelálním buňkám fimbriemi (Baron, 1996; Wilson, 2005).

3.3.4 *Moraxella catarrhalis*

Jedná se o aerobní, nepohyblivé, Gram-negativní koky často se vyskytující v párech (diplokoky) a každý s průměrem 0,5-1,5 μm. Optimální teplota pro kultivaci na čokoládovém nebo krevním agaru je opět 37 °C, jsou však schopné růst i v teplotním rozmezí 20-42 °C. Vykazují pozitivní katalázový i oxidázový test, nicméně nejsou schopny štěpit glukózu nebo jiné karbohydráty na kyseliny. Produkují DNAsy, fosfolipázy a esterázy, z enzymů dále β-

laktamázu, která snižuje účinnost některých antibiotik, jako jsou penicilin nebo cefamycin a je tedy zodpovědná za rezistenci bakterií vůči těmto antibiotikům. Ačkoliv je *Moraxella catarrhalis* součástí flóry horních cest dýchacích, za určitých podmínek se stává častým původcem zánětu vedlejších nosních dutin nebo zánětu středního ucha u dětí, u dospělých lidí pak způsobuje infekce dolních dýchacích cest, které mohou vyústit v chronickou obstrukční plicní nemoc. Vzhledem k její podobnosti s druhy rodu *Neisseria*, bývá často ve vzorcích přehlížena (Goldstein *et al.*, 2009; Wilson, 2005).

3.3.5 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (také nazýván jako „zlatý stafylokok“ podle žlutého pigmentu, který tvoří) se vyznačuje od ostatních členů rodu *Staphylococcus* schopností produkovat enzym koagulázu. Je součástí přirozené lidské mikroflóry na kůži a sliznicích, zejména v nosohltanu a orofaryngu. *Staphylococcus aureus* má řadu různých adhezínů, které jsou důležité pro připevnění organismu k povrchu v dutině nosní nebo na kůži, zejména když se podílí na kožních infekcích. *In vitro* studie na mutantech, kteří nedostatečně exprimovali jeden z hlavních adhezínů (protein A, fibronektin vázající protein A, koagulázu), ukázaly významně sníženou vazbu organismů na lidské keratinocyty. Adheze rodičovských kmenů na pokožkové buňky je výrazně ovlivněna pH – pokud pH se pohybuje v rozmezí 3-6, počet přilnutých bakterií je menší než v rozmezí pH 7-10. To má souvislost s atopickou dermatitidou, při které pH pokožky stoupá na alkalické úrovně – adheze mikroorganismů k pokožce při těchto hodnotách pH je zvýšena, čímž se zvyšuje i riziko infekce u těchto pacientů. U více než 90 % pacientů s atopickou dermatitidou se tvoří kožní léze a jsou kolonizováni právě druhem *Staphylococcus aureus* (Hülpüsch *et al.*, 2020; Wilson, 2005).

Mezi hlavní faktory virulence těchto nepohyblivých, Gram-negativních koků patří protein A, který inhibuje fagocytózu (váže se na Fc region IgG protilátek, čímž zabraňuje jejich interakci s receptory na fagocytech), koaguláza, která převádí fibrinogen na fibrin a chrání bakterie před hostitelským obranným systémem nebo α -, β -, γ - či δ -hemolysiny, které jsou cytotoxické, neurotoxické, dermonekrotické a způsobují hemolýzu. Z cytotoxinů a enzymů pak leukocidin zabíjející leukocyty, proteázy poškozující hostitelskou tkáň, stafylokinázy hydrolyzující fibrin a podílející se na šíření stafylokoků po hostitelském organismu nebo indukující masivní uvolňování cytokinů enterotoxiny. *Staphylococcus aureus* produkuje nespočet bakteriocinů se širokým spektrem aktivity, včetně staphylococcinu BacR1, který působí proti některým kmenům *Staphylococcus aureus*, CoNS, viridujícím

streptokokům, *Corynebacterium spp.*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella spp.*, *Neisseria spp.*, *Bacillus spp.* a Bac1829, který je aktivní proti *Streptococcus suis*, *Corynebacterium spp.*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella spp.*, *Moraxella bovis* a *Pasteurella multocida* (Bien *et al.*, 2011; Liu, 2009; Wilson, 2005).

Staphylococcus aureus patří mezi nejčastější původce nozokomiálních infekcí, včetně infekcí kůže, kostí, kloubů, měkkých tkání nebo endovaskulárních onemocnění. Počet infekcí, na kterých se *S. aureus* podílí, neúprosně roste hlavně kvůli meticilin-rezistentním (MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) a multi-rezistentním kmenům. Stafylokok se snadno přenáší vzduchem a stanoví velké riziko vzniku infekcí zejména u pacientů podstupujících operaci nebo s hemodialýzou. Snaha snížit nebo přímo eliminovat přenos organismu vzdušnou cestou se obecně zaměřuje na aplikaci dezinfekce a antibiotik, z nichž jako nejúčinnější se prokázal mupirocin, produkovaný bakterií *Pseudomonas fluorescens*. Jiný možný postup zahrnuje využití tzv. bakteriální interference, která je založena na inhibičním účinku ostatních členů nosní mikroflóry na *Staphylococcus aureus* – např. negativní korelace je pozorována mezi stafylokokem přítomným v nosní dutině a bakteriemi *Staphylococcus epidermidis* nebo *Corynebacterium spp.*, která je s největší pravděpodobností dána produkcí některých inhibičních složek (bakteriocinů, toxických produktů metabolismu) nebo soutěžením o místo na nosním epitelu. Stafylokokový syndrom toxického šoku (STSS, Staphylococcal toxic shock syndrome) je onemocnění, které následuje po neinvazivní infekci způsobené patogenem *S. aureus*. Je charakterizován vasodilatací, syndromem akutní dechové tísně (ARDS, acute respiratory distress syndrome, adult respiratory distress syndrome), selháním ledvin až multiorgánovou dysfunkcí. Vznik symptomů a následné masivní uvolnění prozánětlivých cytokinů jsou důsledkem produkce exotoxinů TSST-1 (toxic shock syndrome toxin-1), SEB (staphylococcal exotoxin B) a SEC (staphylococcal exotoxin C). Jedná se o superantigeny, které i v pikomolárních koncentracích dokážou stimulovat proliferaci T-lymfocytů. Úmrtnost na TSST se pohybuje v rozmezí 3-5 %. Důvodem smrti dětí mezi 2 až 3 měsíci je syndrom náhlého úmrtí kojenců (SIDS, sudden infant death syndrome). Studie mikrobioty nosofaryngu dětí, které zemřely na SIDS, odhalily, že stafylokok se u nich vyskytuje výrazně častěji než u kontrolní skupiny dětí. Izolované kmeny byly navíc toxigenní (Silversides *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2015; Turner *et al.*, 2019; Wilson, 2005).

3.3.6 *Actinomyces spp.*

Rod *Actinomyces* se skládá z nepohyblivých, Gram-pozitivních bakterií v podobě tyček (krátkých či vláknitých), které netvoří spory. Většina druhů, které jsou běžně přítomné v dutině ústní (*A. israelii*, *A. gerencseriae*, *A. georgiae*, *A. meyeri*, *A. odontolyticus*), zahrnuje fakultativní anaeroby, jejichž růst je stimulován vysokými koncentracemi oxidu uhličitého, nebo obligátní aeroby. Fermentují sacharidy na kyselinu jantarovou, mravenčí nebo octovou jako koncové produkty metabolismu. Produkují sialidázy a glykosidázy, čímž přispívají k degradaci mucinu. Aktinomycety jsou schopny přilnout jak k zubnímu tak slizničnímu povrchu hlavně pomocí fimbrií. Rozlišujeme dva typy fimbrií. První zprostředkovává vazbu na proteiny bohaté na prolin, které jsou přítomné ve sklovině a zapojuje bakterie do tvorby zubního plaku, protože řada aktinomycet produkuje polysacharidy, které k jeho tvorbě přispívají. Druhý typ se váže na glykoproteiny přítomné na epitelálních buňkách a umožňuje bakteriím přilnout na sliznici v dutině ústní. Rozeznávají sacharidové receptory na povrchu mnoha viridujících streptokoků a jiných orálních bakterií a jsou zodpovědné za koagregaci s některými druhy. Aktinomycety jsou obecně spojeny s tvorbou zubního kazu, zánětem dásní či paradontózou (Valour *et al.*, 2014; Wilson, 2005).

3.3.7 *Veillonella spp.*

Tyto nepohyblivé, anaerobní, Gram-negativní koky se vyskytují v řetězcích nebo hroznovitých útvarech. Rod zahrnuje sedm druhů, z nichž tři obývají dutinu ústní (*V. parvula*, *V. atypica*, *V. dispar*). Jsou schopny růst v rozmezí teplot 24-40 °C, optimální teplota je však 30-37 °C. Nedokážou využívat sacharidy jako zdroje energie, pro tento účel jim slouží laktát, pyruvát, fumarát, malát nebo některé puriny a ty pak přeměňují na propionát, acetát či vodík jako konečné produkty metabolismu. Preferují kyselé prostředí s pH nižším jak 4,5. Koagregují s řadou bakterií patřících do rodu *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Neisseria* nebo *Rothia* a podílejí se na tvorbě plaku a kolonizaci slizničních povrchů v dutině ústní. Jsou zřídka zodpovědné za infekce (Wilson, 2005).

3.4 Interakce mezi členy mikrobioty respiračního traktu

Pozitivní interakce mezi mikroby osídlující respirační systém jsou postaveny na vzájemném poskytování živin. Nejdostupnějším zdrojem živin se stávají muciny, jejichž

degradace vyžaduje přítomnost mikrobů exprimujících enzymy jako jsou sialidázy, glykozidázy a proteázy. Sacharidy, aminokyseliny a mastné kyseliny jsou zase uvolňovány působením hyaluronidázy, chondroitin sulfatázy nebo lipázy některých bakteriálních druhů. Konečné produkty metabolismu jako je laktát tvořený streptokoky, stafylokoky a *Haemophilus spp.* mohou být použity jako energetické zdroje pro *Neisseria spp.* a *Veillonella spp.* Spotřeba kyslíku druhu rodu *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.* a *Moraxella catarrhalis* přispívá k tvorbě mikrohabitatů s nízkými koncentracemi kyslíku, ve kterých mají možnost růst mikroaerofilní a anaerobní bakterie (Wilson, 2005).

Mikrobi respiračního traktu mají schopnost skutečně inhibovat nebo přímo zabít ostatní členy produkcí bakteriocinů, mastných kyselin či peroxidu vodíku. Navíc prostředí s nízkými hodnotami pH a nízkým obsahem kyslíku mohou vznikat v důsledku tvorby kyselin a využíváním kyslíku některými mikroorganismy, čímž se omezí nebo zabrání růst některých jiných druhů. To neplatí pro všechny, protože společný výskyt *Corynebacterium spp.* a *Dolosigranulum spp.* v nosohltanu může mít za následek okyselení prostředí bakteriemi *Dolosigranulum spp.*, což usnadňuje expanzi korynebakteriím. Viridující streptokoky zase naopak inhibují růst patogenů respiračního systému, jako jsou *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Staphylococcus aureus*. Nebo *Corynebacterium accolens* převádí hostitelské triacylglyceroly na volné mastné kyseliny, které zase omezují růst pneumokoků. (Bomar *et al.*, 2016; Wilson, 2005)

Bakteriální asociace závisí také na hybných silách nebo hostitelském prostředí, nikoli jen na přímých nebo nepřímých mikrobiálních interakcích jako takových (Man *et al.*, 2017).

3.5 Fyziologická kolonizace horních cest dýchacích

Horní cesty dýchací poskytují mnoho fyziologických funkcí, jako jsou filtrování, ohřívání a zvlhčování inhalovaného vzduchu. Nosní dutina je v neustálém kontaktu s vnějším prostředím a tvoří fyzické rozhraní mezi vnějším prostředím a dolními dýchacími cestami včetně gastrointestinálního traktu. Nejběžnějšími místy pro odběr vzorků k analýze nazálních mikrobiomů jsou nosní dírky a nosohltan (Kumpitsch *et al.*, 2019; Sahin-Yilmaz *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2014).

Maxilární, frontální, ethmoidní a sfenoidální dutiny jsou vzduchem naplněné dutiny v obličejové kostře, které jsou právě důležité pro zvlhčování a ohřívání vdechovaného vzduchu. Jsou pokryté řasinkovým dlaždicovým epitelem produkujícím hlen, ve kterém jsou

různě velké částice a mikroorganismy zachyceny. V těchto oblastech nosní dutiny se vytvářejí výklenky se specifickými mikrobiálními populacemi. Dalším zajímavým místem pro studium mikrobiomů je čichový epitel umístěný na stropě nosní dutiny, a to z důvodu korelace čichové funkce s taxonomickým složením nosního mikrobiomu (Azevedo *et al.*, 2019; Kumpitsch *et al.*, 2019; Sahin-Yilmaz *et al.*, 2011).

3.5.1 Mikrobiota horních dýchacích cest mění se s věkem a životním stylem

Horní cesty dýchací poskytují mikrobiálním společenstvím řadu míst pro osídlení. Zatímco povrchy přední části nosní dutiny, které jsou nejvíce vystaveny okolnímu prostředí, jsou obývány komenzály a patogeny, jako *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Dolosigranulum pigrum*, *Corynebacterium* spp., *Moraxella* spp. nebo *Anaerococcus* spp., jiné oblasti nosní dutiny a nosohltanu jsou osídleny zcela odlišně, zejména pak u dospělých lidí. I když je mikrobiota horních cest dýchacích do značné míry individuální, lze pozorovat změny v obsazení bakteriemi i během různých ročních období a věku (Kumpitsch *et al.*, 2019; Wos-Oxley *et al.*, 2010).

Moraxella, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Dolosigranulum* a *Corynebacterium* je šest nejčastěji izolovaných rodů u kojenců. Hned po narození se nasofaryngeální mikrobiom dítěte podobá vaginálnímu a kožnímu mikrobiomu matky. Mikrobiální složení se postupně mění i v závislosti na tom, zda kojenec je krmen mateřským mlékem či umělou výživou (Biesbroek *et al.*, 2014; de Steenhuijsen Piters *et al.*, 2015).

Mikrobiota horních dýchacích cest u kojenců je hustší, ale méně rozmanitá než u dospělých. Vzorky dospělých obsahují velký podíl *Firmicutes* jako jsou *Lachnospiraceae*, *Staphylococcus* a *Streptococcus*, *Bacteroidetes* jako *Sphingobacterium* a *Prevotella*, a aktinobakterie (jiné než *Corynebacterium*) jako *Bifidibacteria*, *Rothia* a *Propionibacterium*. V případě kuřáků nastávají další změny, neboť cigaretový kouř zvyšuje adhezi bakterií k epiteliálním buňkám dýchacích cest, protože indukuje produkci proteinu FimA, který podporuje tvorbu biofilmů. Cigaretový kouř je v bezprostředním kontaktu s respiračními povrchy a toxické látky v něm přítomné narušují účinný mukociliární transport hlenu jak v horních tak v dolních cestách dýchacích a imunitní odpověď vůči patogenům. Expozice cigaretovým kouřem, ať už pasivní nebo aktivní, je tedy spojena se zvýšeným rizikem nejen rakoviny, paradontózy a kardiovaskulárních onemocnění, ale také s chronickými respiračními

onemocněními a akutními respiračními infekcemi (Kumpitsch *et al.*, 2019; Stearns *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2017).

3.6 Fyziologická kolonizace dolních cest dýchacích

Hrtan, průdušnice, průdušky, průdušinky a plicní sklípky obvykle nejsou kolonizovány takovým množstvím mikrobů, jako v případě horních dýchacích cest. Molekulární diagnostické techniky, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR, polymerase chain reaction), umožňují detekovat mikroorganismy i v mnohem nižších koncentracích než nám dovolují klasické kultivační techniky. Díky nim se ukázalo, že k asymptomatické kolonizaci dochází i v dolních dýchacích cestách a malé množství bakterií může být izolováno i z těchto regionů, zejména z hrtanu a průdušnice. Bakterie jsou v těchto místech přítomny v důsledku aspirace sekretů s navázanými mikroorganismy z horních cest dýchacích (Reller *et al.*, 2003; Robinson, 2004; Wilson, 2005).

3.6.1 Odběr mikrobiálních vzorků z dolních cest dýchacích

Bronchoalveolární laváž (BAL) je metoda, která umožňuje získat buněčné a nebuněčné složky z dolních cest dýchacích včetně plicních sklípků. Samotný proces zahrnuje zavedení flexibilního fibrobronchoskopu do segmentálního nebo subsegmentálního bronchu a instilaci sterilního fyziologického roztoku do plic, následovanou odsátím a odběrem bronchalveolární tekutiny (BAT) pro analýzu, díky které je možné stanovit etiologii celé řady onemocnění. Jedná se o nenáročnou, šetrnou a opakovatelnou metodu prováděnou při podezření na infekční či neinfekční plicní postižení, u kterého má vyšetření BAT (v případě infekčního postižení izolace původce z BAT) jednoznačný diagnostický význam nebo může být přínosem pro stanovení diagnózy a zahájení léčby (Patel *et al.*, 2021).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Výchozím biologickým materiálem pro klasifikaci mikroorganismů pomocí MALDI-TOF hmotnostního spektrometru Microflex LT/SH od společnosti Bruker byly jednotlivé kolonie mikroorganismů kultivované v Petriho miskách na agarové půdě.

4.2 Použité chemikálie a roztoky

Agarové půdy byly získávány komerčně v podobě ploten s půdou, připravenou pro kultivaci. Jednotliví dodavatelé jsou uvedeni u stručného popisu jednotlivých agarů.

- **Columbia krevní agar** – médium k primokultivaci nebo subkultivaci, pro všechny typy vzorků, přítomnost krve umožňuje prokázat hemolytické reakce určitých kmenů bakterií; dodavatel Trios s.r.o., ČR
- **Čokoládový agar s bacitracinem** – selektivní půda určena k izolaci *Haemophilus spp.* z klinických vzorků se smíšenou flórou, zejména z respiračního traktu; dodavatel Trios s.r.o., ČR
- **Agar s kyselinou nalidixovou a sulfamethazinem** – semi-selektivní půda pro izolaci streptokoků skupiny anginosus (Waite *et al.*, 2012); připravovaný na zakázku Oxoid s.r.o., ČR
- **Anaerobní krevní agar s BHI** (Brain-Heart Infusion) – neselektivní agar obohacený o beraní erytrocyty; dodavatel Trios s.r.o., ČR
- **Schaedlerův anaerobní agar** – selektivní obohacený agar s beranými erytrocyty a kanamycinem; dodavatel Trios s.r.o., ČR
- **FAA** (Fastidious Anaerobic Agar) **s neomycinem** – selektivní obohacený agar s neomycinem pro kultivaci růstově náročných anaerobních bakterií; dodavatel Oxoid s.r.o., ČR
- **Deoxycholát-citrátový agar** – selektivní médium pro rody *Salmonella* a *Shigella*, z klinických i neklinických vzorků; dodavatel Trios s.r.o., ČR

Kyselina mravenčí pro hrubou extraci proteinů byla připravena naředěním destilovanou vodou na 70% koncentraci (v/v).

Roztok matrice byl připraven v souladu s doporučením výrobce rozpuštěním 10 mg α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny (HCCA, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) v 1 ml rozpouštědla, které bylo tvořeno směsí 50% acetonitrilu, 47,5% destilované vody a 2,5% kyseliny trifluorooctové; HCCA substance byla od firmy Bruker, ostatní chemikálie byly od Sigma Aldrich (Merck Group).

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- MALDI-TOF hmotnostní spektrometr Microflex LT/SH (Bruker, Německo)
- MALDI Biotyper software 3.0 (Bruker, Německo)
- MALDI desky MSP 96 target polished steel BC (Bruker, Německo)
- Tabulkový procesor Microsoft Excel

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Princip MALDI-TOF MS

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of Flight Mass Spectrometry) patří v současnosti k nejpoužívanějším nástrojům moderní analýzy. Umožňuje identifikovat celou řadu látek, jako jsou biopolymery, syntetické polymery, farmaceutika a další nízkomolekulární, ať už organické nebo anorganické látky. MALDI-TOF MS se používá ke stanovení molekulové hmotnosti látek a peptidového mapování. Princip metody spočívá v aplikaci laserového záření na krystaly matrice s analyzovaným vzorkem, což způsobí desorpci molekul matrice spolu s molekulami vzorku (odpařují se částice matrice, které s sebou strhávají molekuly analytu a převádějí je do plynného skupenství) a zároveň dojde k ionizaci molekul vzorku. Vzniklé ionty jsou urychleny silným elektrickým polem a proletí trubici detektoru určitou rychlostí, která je úměrná jejich hmotnosti a náboji. Zaznamenává se celková doba letu částic. Je aplikováno extrakční napětí mezi MALDI destičku a vstupní štěrbinu průletového analyzátozu, díky čemuž dochází k extrakci nabitých molekul podle zvolené polarizace napětí a k jejich analýze v

průletovém hmotnostním analyzátoru (Hou *et al.*, 2019; Huong *et al.*, 2014; Singhal *et al.* 2015).

Identifikace mikroorganismů metodou MALDI-TOF MS se skládá z následujících kroků: (i) kultivace mikroorganismů, (ii) příprava vzorku a jeho přímé nanesení na spoty MALDI desky, (iii) překrytí vzorku nejdřív kyselinou mravenčí a potom matricí, (iv) získání hmotnostních spekter v MALDI-TOF MS a (v) srovnání průměrného proteinového spektra s databází proteinových spekter vybraných referenčních kmenů mikroorganismů (Purkrťová *et al.*, 2018).

4.4.2 Příprava vzorků pro MALDI-TOF MS

Vzorky určené pro identifikaci pomocí MALDI-TOF MS byly připraveny na desce typu MSP (MSP 96 target polished steel BC). Desky bývají vyrobeny z nerezové oceli či hliníku, obecně se musí jednat o materiál inertní vůči matrici, která se přidává k analyzovaným vzorkům a rozpouštědlům používaných k přípravě vzorků nebo čištění desky (v případě, že se nejedná o desku na jedno použití). Pro snadnější orientaci jsou pozice na desce (kruhové terče, spoty) označeny, řádky jsou značené písmeny od A do H, zatímco sloupce jsou značené čísly od 1 do 12. Nejdříve byly jednotlivé mikrobiální kultury pomocí bakteriologické kličky nanášeny na terče MALDI desky. V případě podezření na výskyt rozdílných bakteriálních kolonií v jednom vzorku ze vzhledu na jejich odlišnou morfologii či barvu, bylo nutné nanést i tyto kolonie na samostatné spoty. Před každým nanesením nové kultury na kruhový spot MALDI desky byla bakteriologická klička vyžihána nad kahanem, aby se předešlo kontaminaci vzorků. Pro vlastní přehled byly vzorky zapisovány do předtištěné tabulky. Abychom mohli kultury spektrofotometricky identifikovat, je potřeba provést lýzi buněčných stěn mikroorganismů, čímž dojde k uvolnění jejich intracelulárních proteinů. Proto na každou nanesenou kulturu bylo napipetováno 0,75 μ l 70% kyseliny mravenčí a po uběhnutí cca 5 min, když kyselina mravenčí uschnula, ještě 0,75 μ l matrice, která s každým vzorkem zkrystalizovala, čímž se zabránilo rozpadu analyzované látky.

Ionizace laserem umožňuje měřit molekulové hmotnosti látek v téže vzorku. K dostatečné lýzi buněčné stěny mikroorganismů může dojít působením silně kyselé matrice či případně i během ionizace laserem, pokud je však buněčná stěna i vůči takovému působení odolná (což platí pro některé grampozitivní bakterie, případně některé druhy kvasinek nebo plísní), je nutno nejdříve aplikovat např. 70% kyselinu mravenčí, jako v našem případě. Po

uschnutí matrice na vzduchu byla MALDI deska použita k vlastnímu spektrofotometrickému měření.

4.4.3 Identifikace subkultivovaných izolátů technikou MALDI-TOF MS

Pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF analyzujeme druhově specifická hmotnostní spektra proteinů a glykoproteinů. Srovnáním získaného hmotnostního spektra s referenční databází spekter je možné stanovit kmeny mikroorganismů.

Připravená MALDI deska byla vložena do hmotnostního spektrometru. Po spuštění programu byl vytvořen nový projekt, zadáním údajů o vzorcích (číslo vzorku, druh kultivační půdy) a výběru projektové metody bylo zkontrolováno nastavení projektu a spuštěna identifikace. Samotná doba trvání identifikace je různá v závislosti na počtu a charakteru (čistotě) vzorků. Výsledkem měření je proteinový profil, zobrazován jako hmotnostní spektrum, které je druhově specifické pro jednotlivé mikroorganismy. Hmotnostní spektrum představuje graf závislosti intenzity iontů na jejich m/z , kdy na ose x pozorujeme molekulovou hmotnost proteinů bakteriální buňky, zatímco na ose y intenzitu jejich signálu. Podobnost naměřeného hmotnostního spektra a výsledný profil píků jsou porovnávány s profily uloženými v referenční databázi. Správná interpretace získaných dat může být někdy obtížná z důvodu výskytu nepatrných rozdílů ve spektrech příbuzných kmenů. Signál je dále posuzován na základě přesnosti stanovení molekulové hmotnosti. MALDI-TOF MS není kvantitativní metodou, protože intenzita signálu je závislá na relativní koncentraci proteinu v místě ionizace a stupni ionizace molekuly během spektrofotometrického měření (Hou *et al.*, 2019).

Pokud je druh identifikován s vysokou pravděpodobností, nebo rod je identifikován s jistotou a druh jen pravděpodobně, znamená to, že automatickým sběrem dat pomocí softwaru byly získány vhodné spektra a vzorek byl dobře homogenizován, protože správný signál poskytla většina naměřených míst na kruhovém spotu. Pokud vzorek byl vyhodnocen jako nespolehlivá identifikace, pak bylo nutné ručně dohledávat místa pro aplikaci laseru, které po ionizaci poskytují kvalitnější výsledné hmotnostní spektrum (viz Tabulka č. 1). Děje se tak v případě, že dojde ke krystalizaci vzorku po obvodu, mimo kruhový terč nebo ve shlucích. Zpráva o výsledcích klasifikace byla vytištěna do přehledné tabulky výsledků.

Tabulka 1: Hodnocení spolehlivosti identifikace (MALDI Biotyper 3.0 User Manual Revision 2, Bruker Daltonics GmbH, 2018).

Rozsah	Význam hodnot skóre	Označení
2,300-3,000	Druh identifikován s vysokou pravděpodobností	(+++)
2,000-2,999	Rod identifikován s jistotou, druh jen pravděpodobně	(++)
1,700-1,999	Pravděpodobná identifikace rodu	(+)
0,000-1,699	Nespolehlivá identifikace	(-)

Srovnávací algoritmus používaný ke srovnání molekulárního identifikátoru vzorku využívá výpočet skóre vzorku ze tří hodnot: (i) z počtu signálů v referenčním spektru, (ii) z počtu signálů neznámého spektra a (iii) ze symetrie signálů neznámých a referenčních spekter. Uvedené hodnoty jsou vynásobeny a jejich součin je vyjádřen záporným dekadickým logaritmem. Čím je hodnota skóre vyšší, tím pravděpodobnější je správná klasifikace analyzovaného druhu. Maximálně dosažitelná hodnota skóre je 3, minimálně 0. Tato hodnota udává míru pravděpodobnosti správné identifikace, tj. vyjádření shody mezi měřeným a referenčním kmenem. Je tedy důležité si uvědomit, že hodnota skóre vygenerovaného přístrojem MALDI Biotyper, znamená jen pravděpodobnost toho, že neznámý mikroorganismus bude jedním z druhů, jež jsou v databázi zachyceny (MALDI Biotyper 3.0 User Manual Revision 2, Bruker Daltonics GmbH, 2018).

4.4.4 Čištění MALDI desek za použití TFA

Čištění pomocí kyseliny trifluoroctové (TFA) je vhodné pro čištění povrchů MALDI desek typu MSP a MTP (např. polished steel, ground steel, BigAnchor 24, BigAnchor 96, BigAnchor 384 desek). Použitá deska byla položena do Petriho misky a její povrch byl překryt 70% ethanolem. Po 5 minutách byla z Petriho misky s ethanolem vyjmuta a intenzivně oplachována pod tekoucí horkou vodou z kohoutku. Následně byla deska několikrát otřena ubrouskem namočeným do 70% roztoku ethanolu. Opět byla deska oplachována horkou vodou z kohoutku a navíc otírána ubrouskem. Čištění je založeno na vystavení povrchu desky 80% kyselině trifluoroctové. Proto v digestoři byla destička překryta vrstvou 80% TFA, všechny pozice na desce pak byly intenzivně otřeny ubrouskem. Následně byla deska opláchnuta destilovanou vodou, vysušena ubrouskem a ponechána kompletně uschnout minimálně 15 minut při laboratorní teplotě. Po zkontrolování (zda na ní nezůstaly

nějaké nečistoty např. chlupy z ubrousku) byla deska vložena do obalu a připravena k dalšímu použití. Tento postup zabraňuje paměťovým efektům na povrchu MALDI desky.

4.4.5 Zpracování dat v tabulkovém procesoru Microsoft Excel

Data byla nejdříve zpracována bez ohledu na pacienta, kdy do prvního souboru Microsoft Excel byly vloženy všechny vzorky z dutiny ústní nehledě na to, zda vzorky pocházely od pacientů s NSCLC nebo CRC, do druhého všechny vzorky z bronchoalveolární laváže a do třetího všechny vzorky výtěru z rekta a ze stolice. V každém souboru byly vyloučeny opakované detekce stejného druhu bakterie u stejného pacienta ve stejném typu vzorku, bez ohledu na kultivační půdu. Byly sečteny absolutní četnosti bakterií a spočítány jejich relativní zastoupení v daném typu vzorku (tj. podle toho, zda vzorek pocházel z DU, BAL nebo R a ST). Bakterie v souboru s daty z BAL byly seřazeny podle relativních četností od nejvyšší k nejnižší. Ke každé bakterii z BAT byly doplněny relativní četnosti z DU a společné relativní četnosti z R a ST. Pokud se určitý bakteriální druh, přítomný v BAT, nevyskytoval ve vzorcích z DU nebo R a ST, pak u těchto bakterií v příslušném řádku byla uvedena hodnota 0. Pro snadnější orientaci v tabulkách byly používány filtry a zavedena funkce SUBTOTAL.

Další zpracování výsledků bylo na základě párování podle skutečných pacientů. Byly k tomu použity výše připravené soubory, zvláště pro vzorky z BAL, DU, rekta a stolice očištěné o duplicitu. Všechny byly seřazeny podle čísla pacienta tak, že do nového souboru byly zkopírovány výsledky pro vzorky z BAL a k nim přiřazeny výsledky u stejného pacienta pro vzorky z DU, v dalším listu téhož souboru pak ke konkrétním vzorkům z BAL byly přiřazeny výsledky od stejného pacienta pro vzorky z R a ST. V třetím listu byly bakterie sumarizovány do samostatné tabulky a pro každý druh byly stanoveny tyto hodnoty: (i) kolikrát se vyskytuje konkrétní bakterie výhradně v BAT, (ii) kolikrát současně v BAT a DU a (iii) kolikrát současně v BAT a R+ST.

Jednotlivé bakteriální druhy byly posuzovány a počítány vždy nejdřív zvláště, ale některé druhy bylo poté nutné shrnout do jedné položky z toho důvodu, že jsou od sebe pomocí MALDI TOF MS obtížně odlišitelné. K těmto druhům patří *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Streptococcus pseudopneumoniae* (souhrnně označeny zkratkou SMOPP), *Enterobacter* (všechny druhy shrnuty jako *Enterobacter sp.*) a *Veilonella atypica*, *Veilonella parvula* (shrnuty jako *Veilonella sp.*).

Pro posouzení náhodnosti společného výskytu druhů bylo potřeba vytvořit nové soubory v Microsoft Excel, nejdřív zvlášť pro NS a CRC. V každém souboru bylo nutné odstranit jiné vzorky než ty z BAL a DU a vícečetné detekce stejného druhu ze stejného typu vzorku. Pak všechna tato data sloučit do jedné tabulky. Následující výpočty byly provedeny jen pro druhy od určité četnosti výše (>50):

- výpočet absolutního výskytu druhu A celkově a z něho vypočítaná četnost
- výpočet absolutního výskytu druhu B celkově, z něho vypočítaná četnost
- kolikrát by se měly tyto bakteriální druhy vyskytnout společně náhodně:
četnost A \times četnost B
- skutečný absolutní výskyt A společně s B, z něho vypočítaná skutečná četnost
- skutečná četnost děleno četnost dle náhody; je-li výsledek >1 , vyskytují se společně častěji než by odpovídalo náhodě a naopak, je-li výsledek <1 , vyskytují se společně méně často než by odpovídalo náhodě
- protože vzhledem k relativně malému souboru vzorku nebylo možné dosáhnout při statistickém hodnocení hranice signifikance rozdílů ve výskytech alespoň na 5% hladině ($p=0,05$), byly jako potenciálně zajímavé vyhodnoceny alespoň extrémní. Hranice extrémů byla na obou stranách stanovena arbitrárně tak, že byl jako potenciálně zajímavý společný výskyt dvou druhů hodnocen takový výskyt, kdy odchylka od náhody byla $\geq 1,2\times$, a naopak jako potenciálně zajímavý vylučující se výskyt byly hodnoceny dvojice s odchylkou $\leq 0,8\times$

5 VÝSLEDKY

Všechna potřebná data pro konečné vyhodnocení výsledků kultivace poskytl Ústav mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Data jsou z období 2019-2020. Vzorky byly získány od pacientů a kontrol v rámci dvou výzkumných projektů, jeden byl zaměřen na nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) a druhý na kolorektální karcinom (CRC). Celkově byly použity vzorky z dutiny ústní od 116 pacientů, z dolních cest dýchacích od 23 pacientů a ze střev od 129 pacientů. Z dutiny ústní byly vzorky získány výplachem úst, který provedl sám pacient, z dolních cest dýchacích odběrem bronchoalveolární tekutiny pomocí bronchoalveolární laváže (BAL) a ze střev provedením rektálního výtěru a pokud to bylo možné i samoodběru vzorku stolice. Od pacientů s NSCLC byly získány také vzorky krve pro vyšetření hladiny protilátek IgA, IgG a IgM proti *Candida albicans*.

5.1 Odkud přecházejí druhy do dolních cest dýchacích a jak tam prosperují

Z celkového počtu identifikovaných druhů z BAL (309 druhů z 23 vzorků) byly nejčastěji detekovanými bakteriálními druhy streptokoky (*S. parasanguinis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. oralis*, *S. pneumoniae* a další), dále rod *Veillonella* (*V. atypica*), aktinomycety (*A. odontolyticus*, *A. oris*) nebo *Prevotella* (*P. salivae*, *P. melaninogenica*). Poměrně časté byly také rody *Haemophilus* (*H. parainfluenzae*), *Rothia* (*R. dentocariosa*), *Neisseria* (*N. subflava*) nebo *Lactobacillus* (viz Tabulka č. 2). Všechny identifikované streptokoky tvořily 36 % z celkového počtu druhů, rod *Prevotella* 10 %, *Veillonella* 7 % a aktinomycety 8 %. Zbylé druhy se vyskytovaly v menším počtu nebo jen ojediněle (*Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacillus thuringiensis* a další).

Tabulka 2: Identifikované mikrobiální druhy z bronchoalveolární tekutiny pomocí MALDI-TOF MS a softwaru MALDI Biotyper, s relativním zastoupením každého druhu a bez párování podle skutečných pacientů (zobrazeny jsou jen výsledky pro druhy s relativní četností vyšší jak 20 %).

Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	Absolutní četnost	Relativní zastoupení
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	17	0,7391
<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>	16	0,6957

Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	Absolutní četnost	Relativní zastoupení
<i>Veillonella</i>	<i>atypica</i>	16	0,6957
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	13	0,5652
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	13	0,5652
<i>Prevotella</i>	<i>salivae</i>	11	0,4783
<i>Streptococcus</i>	<i>oralis</i>	11	0,4783
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	11	0,4783
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	9	0,3913
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	9	0,3913
<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>	7	0,3043
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	7	0,3043
<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	6	0,2609
<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	6	0,2609
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	6	0,2609
<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	6	0,2609
<i>Granulicatella</i>	<i>adiacens</i>	5	0,2174
<i>Leptotrichia</i>	<i>sp.</i>	5	0,2174
<i>Prevotella</i>	<i>jejuni</i>	5	0,2174
<i>Rothia</i>	<i>mucilaginoso</i>	5	0,2174
<i>Solobacterium</i>	<i>moorei</i>	5	0,2174
<i>Streptococcus</i>	<i>peroris</i>	5	0,2174

* Kdybychom streptokoky skupiny *mitis* (*Streptococcus mitis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae* a *S. pseudodopneumoniae*) shrnuli pod akronym SMOPP a kdybychom druhy *Veillonella atypica* a *Veillonella parvula* souhrnně označili jako *Veillonella sp.* (tyto druhy jsou pomocí MALDI TOF MS obtížně odlišitelné, takže jsou často identifikovány nepřesně), pak by hodnota relativního zastoupení pro SMOPP byla 0,8696 (87 %), pro *Veillonella* 0,6957 (70 %).

Z celkového počtu identifikovaných druhů z DU (2073 druhů ze 116 vzorků) byly nejčastěji detekovanými mikrobiálními druhy opět streptokoky (*S. mitis*, *S. parasanguinis*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. anginosus* a další), dále aktinomycety (*A. oris*, *A. odontolyticus*), rod *Rothia* (*R. mucilaginoso*, *R. dentocariosa*), *Neisseria* (*N. subflava*), kvasinka *Candida* (*C. albicans*) nebo *Haemophilus* (*H. parainfluenzae*). Poměrně časté byly také rody *Gemella* (*G. haemolysans*, *G. sanguinis*), *Lactobacillus* (*L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*) nebo *Granulicatella* (*G. adiacens*), (viz Tabulka č. 3). Všechny identifikované streptokoky tvořily

35 % z celkového počtu vzorků, aktinomycety 9 %, rod *Rothia* 6 % a *Neisseria* 7 %. Zbylé druhy se vyskytovaly v menším počtu (např. *Escherichia coli*, rod *Prevotella*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Klebsiella*) nebo jen ojediněle (*Cardiobacterium hominis*, *Megasphaera micronuciformis* a další).

Tabulka 3: Identifikované mikrobiální druhy z dutiny ústní pomocí MALDI-TOF MS a softwaru MALDI Biotyper, s relativním zastoupením každého druhu (zobrazeny jsou jen výsledky pro druhy s relativní četností vyšší jak 20 %).

Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	Absolutní četnost	Relativní zastoupení
<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>	105	0,9052
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	96	0,8276
<i>Streptococcus</i>	<i>oralis</i>	91	0,7845
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	86	0,7414
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	84	0,7241
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	69	0,5948
<i>Rothia</i>	<i>mucilaginosa</i>	65	0,5603
<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	61	0,5259
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	60	0,5172
<i>Veillonella</i>	<i>atypica</i>	56	0,4828
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	55	0,4741
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	54	0,4655
<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	49	0,4224
<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	49	0,4224
<i>Veillonella</i>	<i>dispar</i>	43	0,3707
<i>Veillonella</i>	<i>parvula</i>	43	0,3707
<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	41	0,3534
<i>Streptococcus</i>	<i>sanguinis</i>	37	0,3190
<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>	34	0,2931
<i>Gemella</i>	<i>haemolysans</i>	32	0,2759
<i>Actinomyces</i>	<i>graevenitzii</i>	31	0,2672
<i>Neisseria</i>	<i>macacae</i>	31	0,2672
<i>Streptococcus</i>	<i>cristatus</i>	25	0,2155
<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	24	0,2069
<i>Streptococcus</i>	<i>mutans</i>	24	0,2069

* Při použití souhrnného označení SMOPP a *Veillonella sp.* by byla hodnota relativního zastoupení pro SMOPP 0,9483 (95 %), pro *Veillonella* 0,6810 (68 %).

Z celkového počtu 136 vzorků z rektálního výtěru a 61 vzorků stolice od 129 pacientů bylo izolováno a úspěšně identifikováno 2090 izolátů mikroorganismů (bakterií a kvasinek). Nejčastěji detekovaným bakteriálním druhem byla *Escherichia coli*, dále rod *Bacteroides* (*B. uniformis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*), *Clostridium* (*C. innocuum*, *C. perfringens*), *Streptococcus* (*S. anginosus*) nebo *Enterococcus* (*E. faecalis*). Poměrně častá byla také přítomnost rodů jako *Lactobacillus*, *Finigoldia*, *Candida*, *Corynebacterium*, *Bifidobacterium* nebo *Staphylococcus* (viz Tabulka č. 4).

Tabulka 4: Identifikované mikrobiální druhy z rektálního výtěru a vzorků stolice pomocí MALDI-TOF MS a softwaru MALDI Biotyper, s relativním zastoupením každého druhu (zobrazeny jsou jen výsledky pro druhy s relativní četností vyšší jak 20 %).

Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	Absolutní četnost	Relativní zastoupení
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	111	0,8605
<i>Bacteroides</i>	<i>vulgatus</i>	74	0,5736
<i>Clostridium</i>	<i>innocuum</i>	70	0,5426
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	57	0,4419
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	56	0,4341
<i>Bacteroides</i>	<i>uniformis</i>	53	0,4109
<i>Bacteroides</i>	<i>ovatus</i>	52	0,4031
<i>Finigoldia</i>	<i>magna</i>	45	0,3488
<i>Clostridium</i>	<i>perfringens</i>	40	0,3101
<i>Corynebacterium</i>	<i>amycolatum</i>	40	0,3101
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	38	0,2946
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	38	0,2946
<i>Collinsella</i>	<i>aerofaciens</i>	37	0,2868
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	34	0,2636
<i>Corynebacterium</i>	<i>aurimucosum</i>	32	0,2481
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	29	0,2248
<i>Parabacteroides</i>	<i>distasonis</i>	26	0,2016

* Kdybychom streptokoky skupiny *mitis* shrnuli do jednoho druhu SMOPP a druhy *Veillonella atypica* a *Veillonella parvula* shrnuli jako *Veillonella sp.*, hodnota relativního zastoupení pro SMOPP by byla 0,1938 (19 %), pro *Veillonella* 0,0620 (6 %).

Střevní mikroflóra oproti mikrobiotě v dutině ústní nebo dolních cestách dýchacích je mnohem více rozmanitá a také specifitější, v závislosti na životním stylu a typu stravy hostitele, což dokazuje skutečnost, že řada identifikovaných druhů se vyskytovala jen ojediněle u některých pacientů. Ze střev bylo celkově identifikováno nejvíce mikrobiálních druhů; 314 z rekta a vzorků stolice. V porovnání s tím, z dutiny ústní bylo celkově identifikováno 186 různých mikrobiálních druhů a z bronchoalveolární tekutiny 89.

Data ze spektrofotometrické analýzy byla zpracována na základě párování podle skutečných pacientů a použita ke srovnání výsledků kultivace tekutiny z BAL s výsledky kultivace z dutiny ústní a střev. Zohledňujeme tedy výsledky z BAT od 23 pacientů s NSCLC.

Pro představu o reálných poměrech rekapitulujeme nejprve výsledky u jednotlivých pacientů a potom uvádíme souhrnné vyhodnocení.

V tabulkách jsou vždy uvedeny vlevo bakterie, které se vyskytovaly v BAT a ve sloupcích vpravo je graficky (✓) znázorněno, zda se některá z těchto bakterií vyskytovala také v některém z dalších typů vzorků (DU nebo R/ST). Konkrétně např. u pacienta č. 130 se tři druhy – *Streptococcus salivarius*, *Veillonella sp.* a SMOPP – vyskytovaly ve všech typech vzorků, tj. v tekutině z BAL, ve výplachu z dutiny ústní i ve výtěru z rekta. Další bakterie, tj. *Haemophilus haemolyticus*, *H. parainfluenzae*, *Actinomyces oris* a *S. parasanguinis*, se vyskytovaly souběžně jenom v tekutině z BAL a ve výplachu z dutiny ústní. Pouze v tekutině z BAL byly pak detekovány *Solobacterium moorei*, *Atopobium parvulum* a *Alloscardovia omnicolens* (viz Tabulka č. 5).

Tabulka 5: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 130 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 130, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	✓	✓
<i>Veillonella</i>	<i>atypica</i>	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	✓	
<i>Haemophilus</i>	<i>haemolyticus</i>	✓	
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	✓	

Pacient 130, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	✓	
<i>Solobacterium</i>	<i>moorei</i>		
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>		
<i>Alloscardovia</i>	<i>omnicolens</i>		
<i>Atopobium</i>	<i>parvulum</i>		

V následujících Tabulkách č. 6-25 jsou obdobně znázorněny všechny mikroorganismy, které se vyskytovaly v BAT pacientů a zda někteří z těchto mikrobů se vyskytovali také v některém z dalších typů vzorků, tj. v DU nebo R/ST.

Tabulka 6: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 170 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU).

Pacient 170, BAL		
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	✓
<i>Prevotella</i>	<i>jejuni</i>	✓
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	
<i>Prevotella</i>	<i>salivae</i>	
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	
<i>Alloscardovia</i>	<i>omnicolens</i>	
<i>Veillonella</i>	<i>atypica</i>	
<i>Capnocytophaga</i>	<i>sp.</i>	

Tabulka 7: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 178 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 178, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓	
<i>Prevotella</i>	<i>histicola</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	✓	
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	✓	
<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i>	✓	
<i>Veillonella</i>	<i>sp.</i>	✓	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>		✓
<i>Granulicatella</i>	<i>adiacens</i>		
<i>Actinomyces</i>	<i>graevenitzii</i>		
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>		
<i>Rothia</i>	<i>mucilaginososa</i>		
<i>Alloscardovia</i>	<i>omnicolens</i>		
<i>Solobacterium</i>	<i>moorei</i>		
<i>Gardnerella</i>	<i>vaginalis</i>		
<i>Porphyromonas</i>	<i>gingivalis</i>		
<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		
<i>Lactobacillus</i>	<i>crispatus</i>		
<i>Prevotella</i>	<i>jejuni</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>mutans</i>		
<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>		

Tabulka 8: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 179 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 179, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	✓	✓
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	✓	

Pacient 179, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	✓	
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	✓	
<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓	
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	✓	
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>		
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>		
<i>Prevotella</i>	<i>jejuni</i>		
<i>Veillonella</i>	<i>dispar</i>		

Tabulka 9: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 182 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 182, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Streptococcus</i>	<i>sanguinis</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	✓	✓
<i>Veillonella</i>	<i>atypica</i>		
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>		
<i>Streptococcus</i>	SMOPP		
<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>		
<i>Granulicatella</i>	<i>adiacens</i>		

Tabulka 10: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 184 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 184, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	✓	✓
<i>Veillonella</i>	<i>atypica</i>	✓	
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	✓	
<i>Parvimonas</i>	<i>micra</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>		
<i>Granulicatella</i>	<i>adiacens</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>		

Tabulka 11: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 188 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU).

Pacient 188, BAL		
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	✓
<i>Veillonella</i>	<i>sp.</i>	✓
<i>Granulicatella</i>	<i>adiacens</i>	✓
<i>Neisseria</i>	<i>flavescens</i>	✓
<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>SMOPP</i>	✓
<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	
<i>Bacillus</i>	<i>thuringiensis</i>	
<i>Prevotella</i>	<i>oulorum</i>	
<i>Prevotella</i>	<i>denticola</i>	
<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	
<i>Parvimonas</i>	<i>micra</i>	
<i>Campylobacter</i>	<i>concisus</i>	
<i>Leptotrichia</i>	<i>sp.</i>	
<i>Prevotella</i>	<i>salivae</i>	
<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>	

Pacient 188, BAL		
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	
<i>Capnocytophaga</i>	<i>gingivalis</i>	
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	
<i>Eikenella</i>	<i>corrodens</i>	

Tabulka 12: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 189 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 189, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Actinomyces</i>	<i>graevenitzii</i>	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	✓	
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	✓	
<i>Veillonella</i>	<i>atypica</i>	✓	
<i>Prevotella</i>	<i>salivae</i>		
<i>Veillonella</i>	<i>dispar</i>		
<i>Haemophilus</i>	<i>haemolyticus</i>		
<i>Atopobium</i>	<i>parvulum</i>		
<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>		
<i>Klebsiella</i>	<i>variicola</i>		
<i>Prevotella</i>	<i>jejuni</i>		
<i>Lactobacillus</i>	<i>oris</i>		
<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>		

Tabulka 13: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 190 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 190, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	✓	✓
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	✓	
<i>Rodentibacter</i>	<i>pneumotropicus</i>	✓	
<i>Prevotella</i>	<i>histicola</i>	✓	
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	✓	
<i>Neisseria</i>	<i>mucosa</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓	
<i>Prevotella</i>	<i>salivae</i>	✓	
<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>	✓	
<i>Slackia</i>	<i>exigua</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>peroris</i>		
<i>Selenomonas</i>	<i>artemidis</i>		
<i>Solobacterium</i>	<i>moorei</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>		
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>		
<i>Veillonella</i>	<i>atypica</i>		
<i>Atopobium</i>	<i>parvulum</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>		

Tabulka 14: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 199 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 199, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	✓	✓
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	✓	✓
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓	

Pacient 199, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	✓	✓
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	✓	✓
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓	
<i>Gemella</i>	<i>sanguinis</i>	✓	
<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	✓	
<i>Neisseria</i>	<i>macacae</i>	✓	
<i>Prevotella</i>	<i>histicola</i>	✓	
<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i>		✓
<i>Prevotella</i>	<i>oralis</i>		

Tabulka 15: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 208 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 208, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	✓	✓
<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>	✓	
<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	✓	
<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>	✓	
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	✓	
<i>Gemella</i>	<i>sanguinis</i>		
<i>Rothia</i>	<i>aeria</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>		
<i>Rothia</i>	<i>mucilaginoso</i>		
<i>Leptotrichia</i>	<i>sp.</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>peroris</i>		
<i>Solobacterium</i>	<i>moorei</i>		
<i>Prevotella</i>	<i>salivae</i>		
<i>Prevotella</i>	<i>pallens</i>		

Pacient 208, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Selenomonas</i>	<i>flueggei</i>		
<i>Veillonella</i>	<i>atypica</i>		
<i>Rodentibacter</i>	<i>pneumotropicus</i>		
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>intermedius</i>		

Tabulka 16: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 210 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 210, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	✓	✓
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	✓	
<i>Veillonella</i>	<i>sp.</i>	✓	
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>mitis</i>	✓	
<i>Fusobacterium</i>	<i>periodonticum</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>peroris</i>		
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>		
<i>Prevotella</i>	<i>salivae</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>infantis</i>		
<i>Slackia</i>	<i>exigua</i>		
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>		

Tabulka 17: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 216 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU).

Pacient 216, BAL		
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>sanguinis</i>	✓
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	✓
<i>Rothia</i>	<i>mucilaginosa</i>	
<i>Streptococcus</i>	<i>peroris</i>	
<i>Actinomyces</i>	<i>graevenitzii</i>	
<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	
<i>Bacteroides</i>	<i>thetaiotaomicron</i>	
<i>Bacteroides</i>	<i>ovatus</i>	

Tabulka 18: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 222 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 222, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	✓	✓
<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	✓	
<i>Rothia</i>	<i>mucilaginosa</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>	✓	
<i>Rothia</i>	<i>aeria</i>	✓	
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>		✓
<i>Actinomyces</i>	<i>naeslundii</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>		

Tabulka 19: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 226 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 226, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Streptococcus</i>	<i>sanguinis</i>	✓	✓
<i>Enterobacter</i>	<i>sp.</i>	✓	✓
<i>Veillonella</i>	<i>atypica</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓	
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>		✓
<i>Prevotella</i>	<i>salivae</i>		

Tabulka 20: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 232 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 232, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓	
<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	✓	
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>		✓

Tabulka 21: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 234 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 234, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	✓	✓
<i>Veillonella</i>	<i>sp.</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓	

Tabulka 22: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 235 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU).

Pacient 235, BAL		
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	✓
<i>Capnocytophaga</i>	<i>gingivalis</i>	

Tabulka 23: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 238 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU).

Pacient 238, BAL		
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU
<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	✓
<i>Prevotella</i>	<i>salivae</i>	
<i>Alloscardovia</i>	<i>omnicolens</i>	
<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>	

Tabulka 24: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 240 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 240, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>SMOPP</i>	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	✓	
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>stomatis</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	✓	
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	✓	
<i>Neisseria</i>	<i>perflava</i>	✓	
<i>Veillonella</i>	<i>atypica</i>	✓	
<i>Veillonella</i>	<i>rogosae</i>	✓	
<i>Prevotella</i>	<i>melaninogenica</i>	✓	

Pacient 240, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>		✓
<i>Campylobacter</i>	<i>concisus</i>		
<i>Parvimonas</i>	<i>micra</i>		
<i>Fusobacterium</i>	<i>periodonticum</i>		
<i>Leptotrichia</i>	<i>sp.</i>		
<i>Gemella</i>	<i>sanguinis</i>		
<i>Selenomonas</i>	<i>flueggei</i>		
<i>Prevotella</i>	<i>salivae</i>		
<i>Prevotella</i>	<i>oralis</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>australis</i>		
<i>Prevotella</i>	<i>nanceiensis</i>		

Tabulka 25: Mikroorganismy z dolních dýchacích cest pacienta č. 241 s vyznačením druhů, které byly u téhož pacienta detekovány také ve výplachu z dutiny ústní (DU) nebo ve výtěru z rekta, příp. ve stolici (R/ST).

Pacient 241, BAL			
Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	DU	R/ST
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	✓	✓
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	✓	✓
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	✓	
<i>Leptotrichia</i>	<i>sp.</i>	✓	
<i>Granulicatella</i>	<i>adiacens</i>	✓	
<i>Prevotella</i>	<i>salivae</i>	✓	
<i>Streptococcus</i>	<i>peroris</i>	✓	
<i>Veillonella</i>	<i>atypica</i>	✓	
<i>Gemella</i>	<i>sanguinis</i>	✓	
<i>Capnocytophaga</i>	<i>gingivalis</i>	✓	
<i>Haemophilus</i>	<i>pittmaniae</i>		
<i>Solobacterium</i>	<i>moorei</i>		
<i>Streptococcus</i>	<i>constellatus</i>		

Výsledky kultivace tekutiny z BAL od pacientů č. 223 a 227 nemohly být srovnány s výsledky kultivace z dutiny ústní a střev, protože žádné společné mikrobiální druhy nebyly v ani jednom vzorku u těchto pacientů nalezeny.

5.2 Posouzení náhodnosti společného výskytu druhů

Práce, které využívají pro studium mikrobioty techniky NGS, uvádějí v závislosti na různých faktorech – např. hygieně dutiny ústní, kouření, věku a pohlaví – různá charakteristická složení mikrobiomu. Vzhledem k zatím ne vždy dostatečné hloubce sekvenování, případně při použití méně nákladné analýzy jen 16S rRNA genů, tyto techniky většinou neposkytují podrobný přehled konkrétních bakteriálních druhů, ale pouze vyšších taxonomických skupin. Využili jsme proto naše výsledky k posouzení náhodnosti společného výskytu určitých druhů, resp. pro odhalení výrazných odchylek od předpokládaného náhodného společného výskytu. Pro posouzení byly použity jenom vzorky z BAL a DU, z toho pak detekované mikroorganismy, jejichž absolutní četnost byla vyšší jak 50 (viz Tabulka č. 26).

Tabulka 26: Mikroorganismy detekované společně v BAT a DU s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod	Mikrobiální druh	Absolutní četnost	Relativní zastoupení
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	136	0,9784
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	113	0,8129
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	99	0,7122
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	97	0,6978
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	87	0,6259
<i>Rothia</i>	<i>mucilaginosa</i>	70	0,5036
<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	67	0,4820
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	61	0,4388
<i>Veillonella</i>	VAP	98	0,7050
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	64	0,4604
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	61	0,4388
<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	55	0,3957
<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	55	0,3957

*SMOPP = *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudodpneumoniae*

*VAP = *Veillonella atypica*, *Veillonella parvula*

Předpokládali jsme, že pokud se dva mikroorganismy vyskytují ve vzorcích společně na základě náhody, pak musí být pravděpodobnost jejich společného výskytu násobkem pravděpodobností výskytu jednotlivých druhů. Pokud by se např. druh A vyskytoval v 50% vzorků (četnost 0,5) a druh B také v 50 % vzorků, pak četnost náhodného společného výskytu bude $0,5 \times 0,5 = 0,25$ (25% vzorků). Námí skutečně pozorovaný společný výskyt dvou bakterií jsme proto srovnali s předpokládaným náhodným společným výskytem takto: (i) pro každou dvojici srovnávaných mikroorganismů jsme spočítali předpokládanou náhodnou četnost (četnost druhu A \times četnost druhu B) a (ii) srovnali ji se skutečně pozorovanou četností společného výskytu této dvojice formou podílu: skutečná četnost / četnost dle náhody. Pokud je tento podíl >1 , vyskytují se oba mikroorganismy společně častěji a naopak (pokud výsledek byl <1).

Menší odchylky od ideální hodnoty 1, která odpovídá náhodnému výskytu, jsou samozřejmě projevem přirozené variability a významnost každé pozorované odchylky od náhody by bylo žádoucí posoudit odpovídajícím statistickým testem. Náš relativně malý soubor pacientů ale ve statistickém hodnocení nemohl přinést potvrzení signifikance pozorovaných rozdílů. Proto jsme pro orientační posouzení možných souvislostí ve výskytu druhů použili arbitrárně stanovenou hranici – za potenciálně zajímavé odchylky od náhody jsme považovali výskyt dvojice druhů $\geq 1,2\times$ než náhodný výskyt, nebo $\leq 0,8\times$ než náhodný. Tyto výsledky sumarizují následující Tabulky č. 27 a 28.

V přílohách jsou uvedeny tabulky s hodnotami odchylek od náhody pro všechny mikroorganismy uvedené v Tabulce č. 26.

Tabulka 27: Dvojice mikroorganismů, jejichž skóre odchylky od náhody je $\geq 1,2\times$ než náhodný výskyt (seřazeno od nejvyšší odchylky po nejnižší).

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	0,1822	32	0,2302	1,2636
<i>Rothia</i>	<i>mucilaginosa</i>	<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	0,2427	42	0,3022	1,2448
<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,1907	33	0,2374	1,2448
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,1822	31	0,2230	1,2241
<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,2219	37	0,2662	1,1994
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,2747	45	0,3237	1,1786
<i>Rothia</i>	<i>mucilaginosa</i>	<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,2210	36	0,2590	1,1719
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,1926	31	0,2230	1,1580
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	<i>Rothia</i>	<i>dentacariosa</i>	0,3126	50	0,3597	1,1509

Tabulka 28: Dvojice mikroorganismů, jejichž skóre odchylky od náhody je $\leq 0,8\times$ než náhodný výskyt.

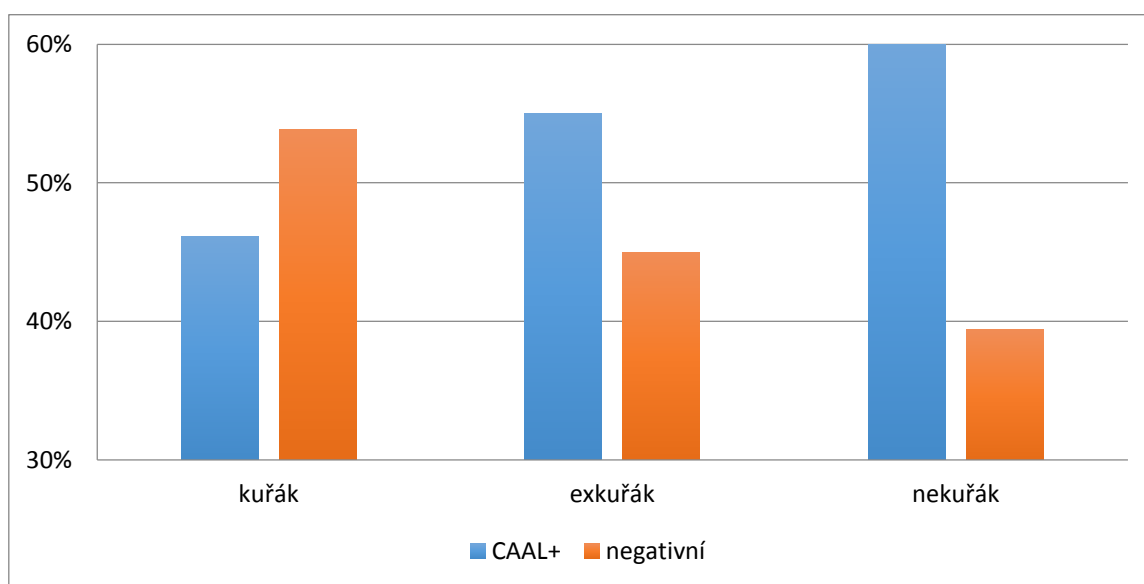
Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	<i>Veillonella</i>	VAP	0,4413	49	0,3525	0,7989
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,2882	32	0,2302	0,7989

5.3 Korelace kulturační detekce kvasinky *Candida albicans* v DU a DCD s hladinou sérových protilátek

Protože k výše zpracovaným vzorkům z DU a DCD nebyla doposud laboratorně stanovena hladina protilátek a nebyla také doplněna klinická data o kouření, vycházejí následující analýzy ze souboru dříve vyšetřených pacientů. Jedná se o vzorky z předchozího období, u kterých jsou již k dispozici výsledky kultivace *Candida albicans* (CAAL) z DU (nikoli z BAL), u kterých byla stanovena hladina protilátek ze séra a klinickými lékaři byla do databáze doplněna anamnéza kuřáctví.

Pro korelaci kulturační detekce kvasinky *Candida albicans* v DU s hladinou sérových protilátek zohledňujeme celkově 66 pacientů, z nichž 37 bylo pozitivních a 29 negativních na CAAL. Ze všech pacientů pozitivních na CAAL bylo 6 kuřáků, 11 nekuřáků a zbylých 20 tvořili exkuřáci. Ze všech pacientů negativních na CAAL bylo 7 kuřáků, 9 nekuřáků a 13 exkuřáků (viz Graf č. 1).

Graf 1: Celkový počet pozitivních a negativních pacientů na CAAL s ohledem na kouření.



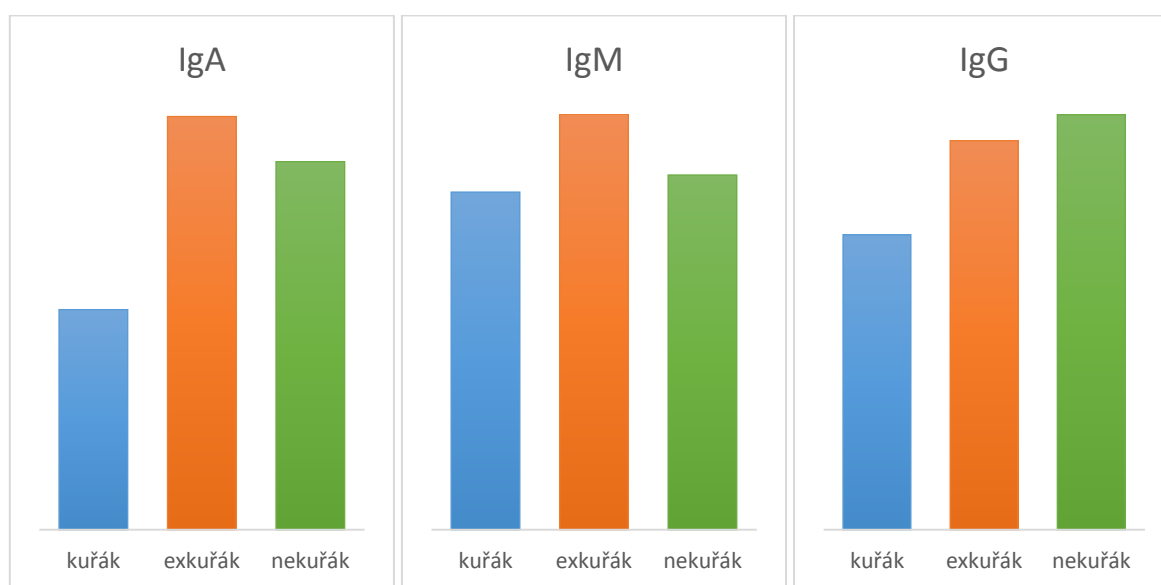
Nejnižší relativní kolonizace *C. albicans* byla pozorována u kuřáků (46 % pacientů), zvyšovala se u exkuřáků a nejvyšší byla u nekuřáků (61 %), a naopak. Tomu odpovídala i průměrná hladina protilátek proti *C. albicans*, které byly ve všech třídách (IgA, IgM i IgG) u kuřáků vždy nejnižší. Nejvyšší ale nebyla vždy u nekuřáků – ve třídách IgA (odpovídají za slizniční imunitu) byla nejvyšší u exkuřáků, stejně jako u IgM (jsou markerem akutní reakce).

U nekuřáků byla průměrná hladina protilátek nejvyšší jen u IgG, které představují dlouhodobě přetrvávající protilátky, takže pravděpodobně vypovídají sumárně o celé předchozí historii stimulace imunitního systému pacienta přítomností *C. albicans* (viz Graf č. 2). Srovnáním hladiny protilátek u pacientů pozitivních na *C. albicans* s negativními se potvrdila korelace průměrných hladin ve všech třídách se zjištěnou přítomností *C. albicans* ve výplachu z dutiny ústní. Nejvýraznější rozdíl byl však pozorován u IgA, což dobře odpovídá obecné roli těchto protilátek ve slizniční imunitě – znamená to, že u *C. albicans* nejvíce bezprostředně vypovídají o aktuálním stavu kolonizace sliznice dutiny ústní touto kvasinkou (viz Graf č. 3). Tato třída vykazovala také největší rozdíl průměrných hladin mezi kuřáky a exkuřáky. Obecně ale velké směrodatné odchylky vypovídají o tom, že existují buď velké rozdíly v interindividuální reaktivitě imunitního systému na přítomnost *C. albicans*, nebo jsou velké rozdíly v imunogenitě jednotlivých kmenů *C. albicans*, příp. jde o kombinaci obojího.

Tabulka 29: Hladiny protilátek jednotlivých tříd (IgA, IgG, IgM) u kuřáků, nekuřáků a exkuřáků (bez ohledu na přítomnost CAAL v DU).

Typ pacienta	IgA	SD IgA	IgG	SD IgG	IgM	SD IgM
kuřák	3,02	1,234	60,21	48,545	3,56	1,538
nekuřák	5,67	4,618	79,42	46,929	4,38	1,937
exkuřák	5,05	4,104	84,71	35,471	3,74	1,797

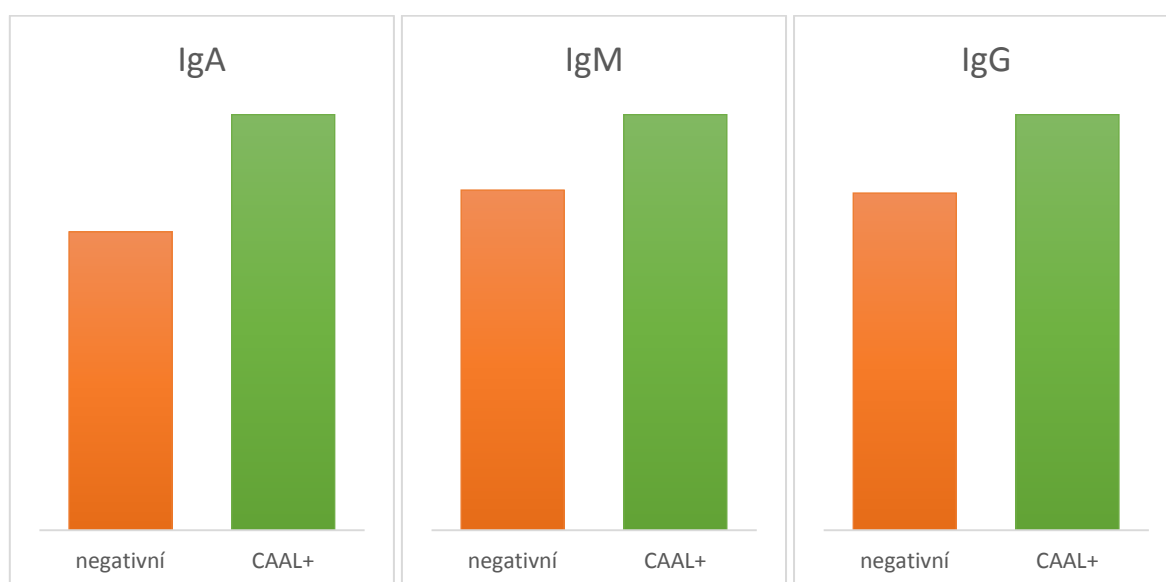
Graf 2: Hladiny protilátek třídy IgA, IgG a IgM s ohledem na kouření.



Tabulka 30: Hladiny protilátek jednotlivých tříd (IgA, IgG, IgM) u pacientů pozitivních a negativních na *C. albicans* (bez ohledu na kouření).

		Hladiny protilátek					
		IgA	SD IgA	IgG	SD IgG	IgM	SD IgM
Počet pacientů pozitivních na CAAL	37	5,81	4,711	86,11	40,607	4,24	1,908
Počet pacientů negativní na CAAL	29	4,17	3,137	69,85	41,747	3,47	1,526

Graf 3: Hladiny protilátek třídy IgA, IgG a IgM v závislosti na přítomnosti nebo nepřítomnosti *C. albicans* ve vzorcích z dutiny ústní (bez ohledu na kouření).



6 DISKUSE

Kolonizace horních a dolních cest dýchacích hraje klíčovou roli při vzniku infekcí respiračního traktu, které mohou představovat riziko pro pacienty zejména s oslabenou imunitou. Včasná diagnóza daného onemocnění a rychlá identifikace patogenních mikroorganismů, ať už přímo se podílejících na vzniku nemoci nebo ohrožujících život pacienta s oslabenou imunitou v důsledku jiného chorobného stavu, jsou nezbytné pro zavedení cílené terapie a následné léčby. Velice efektivní metodou rychlého určení mikroorganismů kultivovaných na agarových půdách je hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Hodnota skóre vzorku vygenerována přístrojem MALDI-TOF MS představuje pravděpodobnost toho, že identifikovaný mikroorganismus je jedním z druhů, které se nacházejí v databázi. Problémy nastávají během analýzy blízkých příbuzných druhů, které občas na základě získaného hmotnostního spektra nemusí být správně diferencovány. Proto některé druhy bylo nutné shrnout do jedné položky a to z toho důvodu, že jsou od sebe pomocí MALDI Biotyper obtížně odlišitelné. K těmto druhům patří streptokoky skupiny *mitis*, tj. *Streptococcus mitis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae* a *S. pseudodopneumoniae* (SMOPP), dále *Veillonella atypica* a *V. parvula*, které shrnujeme jako *Veillonella sp.* (VAP) a také druhy rodu *Enterobacter*. V rámci vlastního zpracovávání vzorků byla tato skutečnost zohledněna.

Mikrobiální kolonie vypěstované na různých kultivačních půdách (KA, COKO, NAS, F, S, N, DX) byly identifikovány pomocí MALDI-TOF MS s využitím softwaru MALDI Biotyper. Experimentální část bakalářské práce byla zaměřena na identifikaci mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS, srovnání výsledků analýzy mezi jednotlivými pacienty a posouzení, zda některé druhy v DU nebo DCD byly často detekovány společně. Vzorky pocházely od pacientů s nemalobuněčným karcinmem plic a kolorektálním karcinmem.

Výsledky kultivace tekutiny z BAL byly srovnány s výsledky kultivace mikrobioty dutiny ústní a střev, zda identifikované mikrobiální druhy dolních cest dýchacích mohou pocházet z dutiny ústní, případně z trávicího traktu. Z BAL 23 pacientů nejčastěji detekovanými mikrobiálními druhy byly streptokoky, rody *Veillonella*, *Prevotella* nebo aktinomycey. Ve vzorcích z DU od 116 pacientů byly nejčastěji detekovány opět viridující streptokoky, dále aktinomycey, rody *Rothia*, *Neisseria*, *Veillonella* nebo *Haemophilus*. Horní cesty dýchací jsou kolonizovány řadou rozmanitých mikroorganismů, což potvrzuje skutečnost, že ze 116 vzorků pocházejících z DU pacientů bylo celkově izolováno 2073 kultur,

mezi kterými bylo identifikováno až 186 různých mikrobiálních druhů. Ačkoliv byly zkoumány vzorky pacientů s diagnózami rakovinového bujení (NSCLC a CRC), výše zmíněné bakteriální rody jsou součástí normální respirační mikroflóry zdravých jedinců, jejichž dýchací cesty mohou být také osídleny potenciálními patogeny jako druhy *Staphylococcus aureus*, jehož přítomnost v rámci zkoumaných vzorků z BAL a DU byla potvrzena pouze u třech pacientů, nebo *Haemophilus influenzae*, který se vyskytl jenom u pěti pacientů. Je patrné, že mikrobiota dolních cest dýchacích pochází z dutiny ústní, v menší míře také ze střev. Řada identifikovaných mikrobiálních druhů v DCD se totiž shodovala s druhy v DU a R nebo ST zkoumaných pacientů.

Střevní bakterie se do plic dostávají prostřednictvím refluxu, který nejdříve umožňuje transport mikroorganismů z trávicího traktu do horních cest dýchacích a poté mikroaspirací následuje jejich translokace do dolních cest dýchacích. Bakterie ze zažívacího traktu nebo z dutiny ústní nemusí být vždy schopné plíce trvale kolonizovat, např. z důvodu pro ně nevhodných podmínek prostředí. Proto počet vzorků z BAL, společně s celkovým počtem mikrobiálních druhů identifikovaných v BAT pacientů byl menší, protože mikroorganismy jsou v DCD oproti dutině ústní nebo střevům přítomny v menším množství. Kromě toho bakterie mohou být transportovány do DCD a jiných tkání a orgánů krví a lymfou (Elliot *et al.*, 2018; Wilson, 2005).

U některých mikroorganismů jsme ale pozorovali častější výskyt v tekutině z BAL, tj. v DCD, než ve výplachu z dutiny ústní. Tento výsledek lze vysvětlit dvěma způsoby – některé druhy se nemusí dařit z výplachu z dutiny ústní kultivovat tak často, jako z tekutiny z BAL ne proto, že v ní nejsou přítomny, ale proto, že v konkurenci většího množství bakterií v HCD nejsou po inokulaci na agar schopny konkurence a nejsou proto detekovány. Druhým vysvětlením může být, že sice se v HCD vyskytují a přecházejí odtud do DCD, ale v DCD mají vzhledem k menší konkurenci jiných mikrobů a některým dalším specifickým odlišnostem lepší podmínky, dosahují zde vyšší hustoty kolonizace a jsou proto častěji úspěšně kultivovány. V naší práci nedokážeme odlišit, který z těchto dvou mechanismů vedl k častější kultivaci určitého druhu z DCD, příp. u kterého konkrétního druhu se mohou oba tyto mechanismy v různé míře kombinovat. V každém případě jsou druhy, zachycované častěji z DCD, kandidáty na další studium jako možní představitelé mikrobioty specifické pro DCD.

Našimi kultivačními technikami jsme zaznamenali častější výskyt v DCD ve srovnání s HCD u těchto druhů (uvedeny jsou jen druhy, které se vyskytly alespoň v 5 vzorcích BAT): *Veillonella atypica* (pozitivních 70 % vzorků z BAL versus 48 % z DU), *Streptococcus*

pneumoniae (48 % versus 35 %), *Prevotella melaninogenica* (30 % versus 17 %), *Streptococcus constellatus* (26 % versus 19 %), *Leptotrichia sp.* (22 % versus 6 %), *Prevotella jejuni* (22 % versus 6 %), *Solobacterium moorei* (22 % versus 4 %) a *Streptococcus peroris* (22 % versus 12 %).

Některé druhy mikrobioty horních nebo dolních cest dýchacích byly typicky detekovány společně. Pro posouzení náhodnosti společného výskytu druhů byly použity jenom vzorky z BAL a DU. Muselo se jednat o druhy detekované z těchto oblastí, jejichž absolutní četnost byla vyšší jak 50, protože pro vzácné druhy by stanovení náhodnosti společného výskytu bylo velmi nespolehlivé. Konkrétně se jednalo o následující organismy: *Streptococcus parasanguinis*, *S. salivarius*, *S. anginosus*, *S. vestibularis*, SMOPP, *Actinomyces odontolyticus*, *A. oris*, *Rothia mucilaginosa*, *R. dentocariosa*, *Neisseria subflava*, *Candida albicans*, *Haemophilus parainfluenzae* a VAP. Pokud podíl hodnot skutečné absolutní četnosti a náhodného společného výskytu dvou mikrobů byl větší jak jedna, vyskytovaly se oba mikroorganismy společně častěji a naopak. Například SMOPP neměly zvýšenou (více než 1,2×) ani sníženou (méně než 0,8×) vazbu na žádný z druhů uvedených v Tabulce č. 26 a to z toho důvodu, že tyto streptokoky se vyskytovaly téměř u všech pacientů (98 %), a proto jejich zvýšený výskyt neměl k ostatním druhům žádný vztah. Obdobná situace platila pro *Streptococcus parasanguinis* nebo *S. salivarius*. Mikroorganismy, jejichž skóre bylo 1,2× a vyšší, se spolu vyskytovaly častěji, než by odpovídalo náhodě. Konkrétně se jednalo o druhy (i) *Haemophilus parainfluenzae* s *Actinomyces oris* a *Streptococcus vestibularis*, (ii) *Neisseria subflava* s *Rothia mucilaginosa*, *H. parainfluenzae* a *S. vestibularis*, (iii) *Rothia dentocariosa* se *Streptococcus anginosus*, *R. mucilaginosa*, *Candida albicans* a *Actinomyces odontolyticus*. Skóre zřetelně nižší než 0,8× vykazovala při kombinaci s druhy *Haemophilus parainfluenzae* a *Veillonella sp.*, bakterie *Streptococcus anginosus*. Konkrétně *S. anginosus* ovlivňoval pravděpodobně i řadu ostatních druhů, jako jediný totiž ve více případech vykazoval odchylku od náhody <0,8×, přičemž jediná bakterie, která jeho přítomnost evidentně dobře snášela, byla *R. dentocariosa* s hodnotou skóre 1,18×. S řadou ostatních druhů má skóre nižší jak 0,9×. Dokonce SMOPP, které se vyskytovaly prakticky u každého pacienta, se vyskytovaly pouze u 85 % pozitivních na *S. anginosus*, oproti očekávané 100% pozitivitě na základě náhody. To všechno napovídá tomu, že *S. anginosus* má určité specifické postavení, protože se jeho přítomnost častěji s jinými mikroorganismy vylučuje. Důvodem může být uvolňování toxinu, který potlačuje růst ostatních bakterií. Tahle hypotéza

by mohla být dále laboratorně testována, např. společnou kultivací *S. anginosus* s ostatními bakteriemi a posouzením, zda snižuje jejich životaschopnost nebo schopnost se množit.

Primární kolonizátoři jsou schopní vázat se pomocí vlastních adhezínů na respirační povrchy prostřednictvím receptorů. Mezi tyto průkopnické mikroorganismy, které svou vazbou na receptory řasinkového epitelu dýchacích cest nebo enamelu, dásní apod. dokážou růst a reprodukovat se přímo na místě, v aerobních podmínkách prostředí s neutrálním pH, patří právě často detekované viridující streptokoky (hlavně *Streptococcus mitis*, *S. oralis*), rody *Neisseria*, *Haemophilus* (*H. parainfluenzae*) a aktinomycey (*A. odontolyticus*). Postupný vývoj a růst těchto mikrobiálních společenství mění prostředí mnoha způsoby, v důsledku spotřeby kyslíku, vylučování produktů metabolismu či degradací hostitelských makromolekul. Ve výsledku pak vznikají oblasti dýchacích cest, které jsou méně aerobní, jsou zdrojem nových živin a poskytují další substráty, které umožňují adhezi dalších mikrobiálních druhů. Takové organismy, které nejsou schopné se udržet a přežít na povrchu bez přítomnosti a činnosti jiných organismů, se označují jako sekundární kolonizátoři. To vede ke vzniku rozmanitějších mikrobiálních společenství, ve kterých mikrobi vzájemně mezi sebou interagují, ať už v pozitivním nebo negativním slova smyslu. Proto např. obligátní anaerobové, jako VAP, byli často detekováni společně s aerobními nebo fakultativně aerobními druhy, jako jsou streptokoky a *Neisseria subflava*, protože dokážou v respiračním traktu přežít pouze v jejich přítomnosti. *Veillonella sp.* zase podporuje růst bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, která je nebezpečným respiračním patogenem zejména pro pacienty s cystickou fibrózou (Banerjee *et al.*, 2000; Wilson, 2005). Častější společné výskyty jednotlivých druhů mohou být tedy dány buď charakteristickou mikrobiotou některých jedinců, nebo jak již bylo řečeno, se některé bakterie mohou vzájemně symbioticky podporovat. Anebo naopak, jako v případě bakterie *Streptococcus anginosus*, se může jednat o situaci, kdy bakterie potlačuje růst těch druhů, se kterými se vyskytuje méně často.

Kouření má vliv na složení mikroflóry, cigaretový kouř zvyšuje adhezi bakterií k epitelálními buňkám dýchacích cest. Podle řady předchozích studií je kouření také spojeno se zvýšenou kolonizací sliznic dýchacích cest kvasinkou *Candida albicans*. V našem souboru dat jsme překvapivě pozorovali pravý opak, jak ve výskytu *C. albicans* ve vzorcích, tak v průměrné hladině protilátek, zejména IgA. Možné vysvětlení je dvojí – soubor pacientů s dosud vyšetřenou hladinou protilátek je příliš malý, takže jsou výsledky zkresleny náhodou, nebo je složení našich pacientů natolik specifické, že se příliš vymyká obecné populaci. Vysvětlení tohoto pozorování bude možné pravděpodobně až po shromáždění výsledků od

většího souboru pacientů, kteří budou také podrobněji stratifikováni s ohledem na jejich základní onemocnění.

Naše výsledky alespoň potvrdily, že existuje korelace mezi průměrnou hladinou protilátek a kolonizací sliznic pacienta *C. albicans*, přičemž nejsilnější korelaci jsme pozorovali ve vazbě na slizniční protilátky třídy IgA. Podrobnější korelace hladin se základním onemocněním a jeho průběhem může v budoucnu ukázat, zda existují vazby mezi vývojem a agresivitou rakoviny plic a interakcí organismu s *C. albicans*. I když se na základě velkého rozptylu hladin protilátek může jevit jejich stanovení jako málo spolehlivé, může se ukázat pravý opak, pokud např. protilátky IgG budou vypovídat o celkové historii „potýkání se“ pacienta s *C. albicans*, což může být pro ovlivnění kancerogeneze významnější než momentální akutní stav v době odběru vzorku na kultivaci.

7 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla objasněna fyziologická kolonizace dýchacích cest, společně s uvedením několik významných mikrobiálních rodů a druhů. V praktické části byly pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF identifikovány druhy z horních a dolních cest dýchacích, a střev vybraných pacientů s NSCLC nebo CRC. Byla potvrzena přítomnost běžných kolonizátorů respiračního traktu rodu *Streptococcus*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Rothia* či *Haemophilus*. Výsledky kultivace z bronchoalveolární tekutiny byly srovnány s mikrobiotou z dutiny ústní a střev. Řada mikroorganismů z BAT byla detekována v DU, což potvrzuje skutečnost, že mikrobiota dolních cest dýchacích pochází z dutiny ústní, v menší míře také ze střev. Pomocí výpočtu podílu hodnot skutečné absolutní četnosti a náhodného společného výskytu dvou mikrobů bylo zjištěno, které z těchto druhů byly typicky detekovány společně. Konkrétně se jednalo o druhy *Haemophilus parainfluenzae*, *Actinomyces oris*, *Actinomyces odontolyticus*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus anginosus*, *Neisseria subflava*, *Rothia mucilaginosa*, *Rothia dentocariosa* a *Candida albicans*. Kultivační detekce kvasinky *Candida albicans* v dutině ústní korelovala s průměrnou hladinou sérových protilátek, nejvýraznější korelace byla pozorována u slizničních protilátek třídy IgA.

8 POUŽITÁ LITERATURA

Azevedo R. S. S., de Sousa J. R., Araujo M. T. F. *et al.* (2018): *In situ* immune response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17765-5>

Bachman M. A., Oyler J. E., Burns S. H. *et al.* (2011): *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. *Infection and immunity*, 79(8):3309–3316. <https://doi.org/10.1128/IAI.05114-11>

Banerjee D., Stableforth D. (2000): The treatment of respiratory pseudomonas infection in cystic fibrosis: what drug and which way? *Drugs*. 60(5):1053-64. doi: 10.2165/00003495-200060050-00006. PMID: 11129122

Baron S. (1996): *Medical Microbiology* (4th edition). University of Texas: Medical Branch at Galveston. ISBN 0963117211

Bien J., Sokolova O., Bozko P. (2011): Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of pathogens*. <https://doi.org/10.4061/2011/601905>

Biesbroek G, Bosch A. A. T. M., Wang X., *et al.* (2014): The impact of breastfeeding on nasopharyngeal microbial communities in infants. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190:298–308.

Binotto M., Guilherme L., Tanaka A. (2002): Rheumatic Fever. *Images in paediatric cardiology*, 4(2):12–31.

Bomar L., Brugger S. D., Yost B. H. *et al.* (2016): *Corynebacterium accolens* Releases Antipneumococcal Free Fatty Acids from Human Nostril and Skin Surface Triacylglycerols. *mBio*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.01725-15>

Crisafulli E., Bernardinello N., Alfieri V. *et al.* (2019): A pulmonary infection by *Actinomyces odontolyticus* and *Veillonella atypica* in an immunocompetent patient with dental caries. *Respirology case reports*. 7(9), e00493. <https://doi.org/10.1002/rcr2.493>

- de Steenhuijsen Piters W. A. A., Sanders E. A. M., Bogaert D. (2015): The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370:20140294. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0294>
- Dion C. F., Ashurst J. V. (2020): *Streptococcus Pneumoniae*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470537/>
- Faner R., Sibila O., Agustí A. *et al.* (2017): The microbiome in respiratory medicine: current challenges and future perspectives. *European Respiratory Journal*, 49(4).
- Fangous M. S., Lazzouni I., Alexandre Y. *et al.* (2018): Prevalence and dynamics of *Lactobacillus* sp. in the lower respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *Research in Microbiology*. 169:222-226. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.03.005>
- Goldstein E. J. C., Murphy T. F., Iyer Parameswaran G. (2009): *Moraxella catarrhalis*, a Human Respiratory Tract Pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, 49:124-131. <https://doi.org/10.1086/599375>
- Hou T. Y., Chiang-Ni C., Teng S. H. (2019): Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(2):404-414. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>
- Hülpüsch C., Tremmel K., Hammel G. *et al.* (2020): Skin pH-dependent *Staphylococcus aureus* abundance as predictor for increasing atopic dermatitis severity. *Allergy*, 75(11):2888-2898. doi: 10.1111/all.14461
- Huong T. T., Komínková M., Gurán R. *et al.* (2014): Identification of microorganisms using MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, 1:64-66.
- Jayananda S., Gollol-Raju N. S., Fadul N. (2017): *Gemella* Species Bacteremia and Stroke in an Elderly Patient with Respiratory Tract Infection. *Case reports in medicine*, 1098527. <https://doi.org/10.1155/2017/1098527>
- Kumpitsch C., Koskinen K., Schöpf V. *et al.* (2019): The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biology*, 17(87). <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0703-z>
- Larsen J. M. (2017): The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology*, 151(4):363–374. <https://doi.org/10.1111/imm.12760>

Liu G. (2009): Molecular Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Infection. *Pediatric Research*, 65:71–77. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819dc44d>

Lo T. S. (2012): A cavitary pneumonia caused by leptotrichia species in an immunocompetent patient. *Infectious disease reports*, 4(1), e24. <https://doi.org/10.4081/idr.2012.e24>

Lüllmann-Rauch R. (2012): *Histologie* (3. vydání). Praha: Grada. 287-301. ISBN 9788024737294

Man W. H., de Steenhuijsen P. A., Bogaert D. (2017): The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nature reviews, Microbiology*, 15(5):259–270. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.14>

Mathieu E., Escribano-Vazquez U., Descamps D. (2018): Paradigms of Lung Microbiota Functions in Health and Disease, Particularly, in Asthma. *Frontiers in Physiology*. 9:1168. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01168>

Montelongo-Jauregui D., Lopez-Ribot J. L. (2018): Candida Interactions with the Oral Bacterial Microbiota. *Journal of Fungi*, 4(4).

Patel P. H., Antoine M., Ullah S. (2021): *Bronchoalveolar Lavage*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430762/>

Popova M., Molimard P., Courau S. *et al.* (2012): Beneficial effects of probiotics in upper respiratory tract infections and their mechanical actions to antagonize pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 113(6):1305-1318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05394.x>

Purkrťová S., Zdeňková L., Fanta P. *et al.* (2018): Využití MALDI-ToF MS pro identifikaci bakterií způsobujících kažení mlékařských výrobků. *Mlékařské listy* 171, 29(6):25-31. http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2018/170-171/veda_171_s.25-31.pdf

Rouphael N. G., Stephens D. S. (2012): *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. *Methods in molecular biology*, 799:1–20. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-346-2_1

- Reller L. B., Weinstein M. P., Murdoch D. R. (2003): Nucleic Acid Amplification Tests for the Diagnosis of Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 36(9):1162–1170. <https://doi.org/10.1086/374559>
- Robinson J. (2004): Colonization and infection of the respiratory tract: What do we know?. *Paediatrics & child health*, 9(1):21–24. <https://doi.org/10.1093/pch/9.1.21>
- Sahin-Yilmaz A., Naclerio R. M. (2011): Anatomy and physiology of the upper airway. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 8:31–9. <https://doi.org/10.1513/pats.201007-050RN>
- Silversides J. A., Lappin E., Ferguson A. J. (2010): Staphylococcal toxic shock syndrome: mechanisms and management. *Current Infectious Disease Reports*, 12(5):392-400. doi: 10.1007/s11908-010-0119-y
- Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K. *et al.* (2015): MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6:791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Stearns J. C., Davidson C. J., Mckee S. *et al.* (2015): Culture and molecular-based profiles show shifts in bacterial communities of the upper respiratory tract that occur with age. *ISME Journal*, 9:1246–59. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.250>
- Sykes E. A., Wu V., Beyea M. M. *et al.* (2020): Pharyngitis: Approach to diagnosis and treatment. *Canadian family physician, Medecin de famille canadien*, 66(4): 251–257.
- Tang Y. W., Sussman M., Liu D. *et al.* (2015): *Molekular Medical Microbiology* (2nd edition). *Neisseria gonorrhoeae*. Toronto, ON, Canada: University of Toronto. 1471-1485. ISBN: 978-0-12-397169-2
- Tong S. Y., Davis J. S., Eichenberger E. *et al.* (2015): Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28(3):603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. (2007): *Microbiology - an introduction*. San Francisco: Pearson. 713-730. ISBN 9780135789346

Turner N. A., Sharma-Kuinkel B. K., Maskarinec S. A. *et al.* (2019): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*, 17:203–218. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>

Valour F., Sénéchal A., Dupieux C. *et al.* (2014). Actinomycosis: etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infection and drug resistance*, 7:183–197. <https://doi.org/10.2147/IDR.S39601>

Votava M. (2003): *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 8090289665

Waite R. D., Wareham D. W., Gardiner S. *et al.* (2012): A simple, semiselective medium for anaerobic isolation of anginosus group streptococci from patients with chronic lung disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4):1430-2. doi: 10.1128/JCM.06184-11.

Wilson M. (2005): *Microbial Inhabitants of Humans*. Cambridge: Cambridge University Press, 128-178, 318-372. ISBN 9780521841580

Wos-Oxley M., Plumeier I., von Eiff C. *et al.* (2010): A poke into the diversity and associations within human anterior nare microbial communities. *ISME Journal*, 4:839–851. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.15>

Yu G., Phillips S., Gail M. H. *et al.* (2017): The effect of cigarette smoking on the oral and nasal microbiota. *Microbiome*, 5:1–6. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0226-6>

Zhou Y., Mihindukulasuriya K. A., Gao H. *et al.* (2014): Exploration of bacterial community classes in major human habitats. *Genome Biology*, 15, R66. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-5-r66>

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterií SMOPP s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Příloha 2: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Streptococcus parasanguinis* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Příloha 3: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Actinomyces odontolyticus* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Příloha 4: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Streptococcus salivarius* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Příloha 5: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Streptococcus anginosus* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Příloha 6: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Rothia mucilaginosa* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Příloha 7: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Neisseria subflava* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Příloha 8: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu kvasinky *Candida albicans* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Příloha 9: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterií *Veillonella sp.* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Příloha 10: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Haemophilus parainfluenzae* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Příloha 11: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Rothia dentocariosa* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Příloha 12: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Actinomyces oris* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Příloha 13: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Streptococcus vestibularis* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Příloha 1: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterií SMOPP s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Streptococcus</i>	SMOPP	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	0,6828	96	0,6906	1,0115
		<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,4505	63	0,4532	1,0061
		<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	0,3871	54	0,3885	1,0035
		<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	0,6969	97	0,6978	1,0014
		<i>Veillonella</i>	VAP	0,6898	95	0,6835	0,9908
		<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	0,4716	64	0,4604	0,9763
		<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	0,4294	58	0,4173	0,9718
		<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,4294	58	0,4173	0,9718
		<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	0,7954	107	0,7698	0,9678
		<i>Rothia</i>	<i>mucilaginosa</i>	0,4927	66	0,4748	0,9637
		<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,3871	50	0,3597	0,9291
		<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	0,6124	72	0,5180	0,8458

Příloha 2: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Streptococcus parasanguinis* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	0,5673	84	0,6043	1,0652
		<i>Veillonella</i>	VAP	0,5732	81	0,5827	1,0167
		<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,3743	52	0,3741	0,9994
		<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	0,3919	54	0,3885	0,9914
		<i>Rothia</i>	<i>mucilaginosa</i>	0,4094	56	0,4029	0,9841
		<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	0,5790	79	0,5683	0,9816
		<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,3568	48	0,3453	0,9679
		<i>Streptococcus</i>	SMOPP	0,7954	107	0,7698	0,9678
		<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	0,3568	47	0,3381	0,9478
		<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	0,3217	42	0,3022	0,9393
		<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,3217	42	0,3022	0,9393
		<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	0,5088	58	0,4173	0,8201

Příloha 3: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Actinomyces odontolyticus* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,3126	50	0,3597	1,1509
		<i>Rothia</i>	<i>mucilaginoso</i>	0,3587	56	0,4029	1,1232
		<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	0,2818	43	0,3094	1,0977
		<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	0,4970	74	0,5324	1,0711
		<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,3279	48	0,3453	1,0530
		<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	0,3433	50	0,3597	1,0478
		<i>Streptococcus</i>	SMOPP	0,6969	97	0,6978	1,0014
		<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	0,3126	43	0,3094	0,9897
		<i>Veillonella</i>	VAP	0,5021	69	0,4964	0,9886
		<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	0,5790	79	0,5683	0,9816
		<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,2818	38	0,2734	0,9701
		<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	0,4458	56	0,4029	0,9038

Příloha 4: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Streptococcus salivarius* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	0,2761	42	0,3022	1,0943
		<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	0,3364	51	0,3669	1,0908
		<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,3213	48	0,3453	1,0747
		<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	0,4970	74	0,5324	1,0711
		<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	0,5673	84	0,6043	1,0652
		<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,3062	45	0,3237	1,0571
		<i>Rothia</i>	<i>mucilaginoso</i>	0,3514	51	0,3669	1,0440
		<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,2761	40	0,2878	1,0422
		<i>Veillonella</i>	VAP	0,4920	70	0,5036	1,0236
		<i>Streptococcus</i>	SMOPP	0,6828	96	0,6906	1,0115
		<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	0,3062	40	0,2878	0,9397
		<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	0,4368	50	0,3597	0,8236

Příloha 5: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Streptococcus anginosus* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,2747	45	0,3237	1,1786
		<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	0,2747	38	0,2734	0,9953
		<i>Rothia</i>	<i>mucilaginoso</i>	0,3152	42	0,3022	0,9586
		<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	0,2477	33	0,2374	0,9586
		<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	0,4458	56	0,4029	0,9038
		<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,2477	31	0,2230	0,9005
		<i>Streptococcus</i>	SMOPP	0,6124	72	0,5180	0,8458
		<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	0,3017	35	0,2518	0,8346
		<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	0,4368	50	0,3597	0,8236
		<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	0,5088	58	0,417	0,8201
		<i>Veillonella</i>	VAP	0,4413	49	0,3525	0,7989
		<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,2882	32	0,2302	0,7989

Příloha 6: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Rothia mucilaginosa* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Rothia</i>	<i>mucilaginosa</i>	<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	0,2427	42	0,3022	1,2448
		<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,2210	36	0,2590	1,1719
		<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	0,3587	56	0,4029	1,1232
		<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,1993	30	0,2158	1,0831
		<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	0,3514	51	0,3669	1,0440
		<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	0,2210	31	0,2230	1,0091
		<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	0,4094	56	0,4029	0,9841
		<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	0,1993	27	0,1942	0,9748
		<i>Streptococcus</i>	SMOPP	0,4927	66	0,4748	0,9637
		<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	0,3152	42	0,3022	0,9586
		<i>Veillonella</i>	VAP	0,3551	47	0,3381	0,9523
		<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,2319	28	0,2014	0,8688

Příloha 7: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Neisseria subflava* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	<i>Rothia</i>	<i>mucilaginosa</i>	0,2427	42	0,3022	1,2448
		<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,1907	33	0,2374	1,2448
		<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,2219	37	0,2662	1,1994
		<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	0,1907	29	0,2086	1,0939
		<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	0,3364	51	0,3669	1,0908
		<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,2115	31	0,2230	1,0543
		<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	0,3433	50	0,3597	1,0478
		<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	0,3919	54	0,3885	0,9914
		<i>Streptococcus</i>	SMOPP	0,4716	64	0,4604	0,9763
		<i>Veillonella</i>	VAP	0,3398	44	0,3165	0,9315
		<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	0,2115	25	0,1799	0,8503
		<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	0,3017	35	0,2518	0,8346

Příloha 8: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu kvasinky *Candida albicans* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,1926	31	0,2230	1,1580
		<i>Rothia</i>	<i>mucilaginosa</i>	0,2210	31	0,2230	1,0091
		<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	0,2747	38	0,2734	0,9953
		<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	0,1736	24	0,1727	0,9943
		<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,1736	24	0,1727	0,9943
		<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	0,3126	43	0,3094	0,9897
		<i>Streptococcus</i>	SMOPP	0,4294	58	0,4173	0,9718
		<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	0,3568	47	0,3381	0,9478
		<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	0,3062	40	0,2878	0,9397
		<i>Veillonella</i>	VAP	0,3094	38	0,2734	0,8836
		<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,2021	24	0,1727	0,8545
		<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	0,2115	25	0,1799	0,8503

Příloha 9: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterií *Veillonella sp.* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Veillonella</i>	VAP	<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	0,4920	70	0,5036	1,0236
		<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,3246	46	0,3309	1,0195
		<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	0,5732	81	0,5827	1,0167
		<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	0,2790	39	0,2806	1,0058
		<i>Streptococcus</i>	SMOPP	0,6898	95	0,6835	0,9908
		<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	0,5021	69	0,4964	0,9886
		<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,3094	42	0,3022	0,9766
		<i>Rothia</i>	<i>mucilaginoso</i>	0,3551	47	0,3381	0,9523
		<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	0,3398	44	0,3166	0,9315
		<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,2790	36	0,2590	0,9284
		<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	0,3094	38	0,2734	0,8836
		<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	0,4413	49	0,3525	0,7989

Příloha 10: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Haemophilus parainfluenzae* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	0,1822	32	0,2302	1,2636
		<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,1822	31	0,2230	1,2241
		<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	0,2219	37	0,2662	1,1994
		<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,2021	32	0,2302	1,1393
		<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	0,3213	48	0,3453	1,0747
		<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	0,3279	48	0,3453	1,0530
		<i>Veillonella</i>	VAP	0,3246	46	0,3309	1,0195
		<i>Streptococcus</i>	SMOPP	0,4505	63	0,4532	1,0061
		<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	0,3743	52	0,3741	0,9994
		<i>Rothia</i>	<i>mucilaginoso</i>	0,2319	28	0,2014	0,8688
		<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	0,2021	24	0,1727	0,8545
		<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	0,2882	32	0,2302	0,7989

Příloha 11: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Rothia dentocariosa* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	0,2747	45	0,3237	1,1786
		<i>Rothia</i>	<i>mucilaginosa</i>	0,2210	36	0,2590	1,17190
		<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	0,1926	31	0,2230	1,1580
		<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	0,3126	50	0,3597	1,1509
		<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,2021	32	0,2302	1,1393
		<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	0,1736	27	0,1942	1,1186
		<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,1736	27	0,1942	1,1186
		<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	0,3062	45	0,3237	1,0571
		<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	0,2115	31	0,2230	1,0543
		<i>Veillonella</i>	VAP	0,3094	42	0,3022	0,9766
		<i>Streptococcus</i>	SMOPP	0,4294	58	0,4173	0,9718
<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	0,3568	48	0,3453	0,9679		

Příloha 12: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Actinomyces oris* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,1822	32	0,2302	1,2636
		<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,1736	27	0,1942	1,1186
		<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	0,1566	24	0,1727	1,1028
		<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	0,2818	43	0,3094	1,0977
		<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	0,2761	42	0,3022	1,0943
		<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	0,1907	29	0,2086	1,0939
		<i>Veillonella</i>	VAP	0,2790	39	0,2806	1,0058
		<i>Streptococcus</i>	SMOPP	0,3871	54	0,3885	1,0035
		<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	0,1736	24	0,1727	0,9943
		<i>Rothia</i>	<i>mucilaginosa</i>	0,1993	27	0,1942	0,9748
		<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	0,2477	33	0,2374	0,9586
		<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	0,3217	42	0,3022	0,9393

Příloha 13: Tabulka posouzení náhodnosti společného výskytu bakterie *Streptococcus vestibularis* s ostatními druhy z BAT a DU, s absolutní četností vyšší jak 50.

Mikrobiální rod A	Mikrobiální druh A	Mikrobiální rod B	Mikrobiální druh B	Náhodný společný výskyt	Skutečný absolutní výskyt A s B	Skutečná četnost výskytu A s B	Skutečná četnost/četnost dle náhody
<i>Streptococcus</i>	<i>vestibularis</i>	<i>Neisseria</i>	<i>subflava</i>	0,1907	33	0,2374	1,2448
		<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	0,1822	31	0,2230	1,2241
		<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	0,1736	27	0,1942	1,1186
		<i>Actinomyces</i>	<i>oris</i>	0,1566	24	0,1727	1,1028
		<i>Rothia</i>	<i>mucilaginoso</i>	0,1993	30	0,2158	1,0831
		<i>Streptococcus</i>	<i>salivarius</i>	0,2761	40	0,2878	1,0422
		<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	0,1736	24	0,1727	0,9943
		<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus</i>	0,2818	38	0,2734	0,9701
		<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	0,3217	42	0,3022	0,9393
		<i>Streptococcus</i>	SMOPP	0,3871	50	0,3597	0,9291
		<i>Veillonella</i>	VAP	0,2790	36	0,2590	0,9284
<i>Streptococcus</i>	<i>anginosus</i>	0,2477	31	0,2230	0,9005		