

LUDZKI MYKOBIOM W STANACH NORMOBIOZY I DYSBIOZY – CHARAKTERYSTYKA I METODY ANALIZY

Sebastian Gnat^{1*}, Dominik Łagowski¹, Mariusz Dyląg², Aneta Nowakiewicz¹

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej

² Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Zakład Mykologii i Genetyki

Wpłynęło we wrześniu, zaakceptowane w grudniu 2020 r.

Streszczenie: Choroby grzybicze dotyczą rocznie ponad 300 milionów ludzi na całym świecie, powodując ponad 1,6 miliona zgonów. Nawet przy tak wysokim współczynniku chorobowości infekcji grzybiczych, stosunkowo niewiele gatunków grzybów jest patogenami, a inwazyjne infekcje grzybicze u zdrowych osób są rzadkością. Analizy porównawcze mykobiomów ujawniają, że ludzki organizm kolonizowany jest przez odpowiednie grzyby wkrótce po urodzeniu, a ilościowy i jakościowy skład tej mykobioty zmienia się w trakcie życia. W ostatnich latach prowadzone są analizy korelacji między strukturą mykobiomu i stanem zdrowia, jak również w kontekście stanów chorobowych, na poziomie interakcji grzyb-mykobiom-gospodarz. Zależność pomiędzy zasiedlanym przez grzyby obszarem ludzkiego ciała tzw. lokalizacją anatomiczną, a swoistymi dla tego obszaru gatunkami grzybów, pozwala wnioskować o istnieniu silnej presji selekcyjnej wybiórczo promującej rozwój gatunków swoistych dla danej niszy ekologicznej w obrębie organizmu. Inną kwestię stanowi walidacja i standaryzacja metod analizy mykobiomów. W tym aspekcie szczególnym zainteresowaniem cieszą się obecnie metody sekwencjonowania metagenomicznego. W tej pracy została zaprezentowana aktualna wiedza na temat mykobiomu w stanach fizjologicznych i chorobowych mających źródło w dysbiozie ukształtowanego już mikrobiomu. Omówione zostały również metody i wyzwania diagnostyczne w ilościowej i jakościowej analizie mykobiomów.

1. Wprowadzenie. 2. Mykobiom w zdrowiu i chorobie. 2.1. Mykobiom płuc. 2.2. Mykobiom jelit. 2.3. Mykobiom skóry. 2.4. Mykobiom a zaburzenia neurologiczne. 2.5. Mykobiom środowiskowy. 3. Badania nad mykobiomem w praktyce klinicznej. 4. Analiza mykobiomów: metodologie i wyzwania. 4.1. Przetwarzanie próbki. 4.2. Sekwencjonowanie amplikonów. 4.3. Sekwencjonowanie metagenomiczne. 4.4. Wyzwania bioinformatyczne. 5. Podsumowanie

HUMAN MYCOBIOME IN NORMOBIOSIS AND DYSBIOSIS STATES CHARACTERISTICS AND ANALYSIS METHODS

Abstract: Fungal diseases affect over 300 million people worldwide each year and cause over 1.6 million deaths. Even with such a high prevalence of fungal infections, relatively few fungal species are pathogens, and invasive fungal infections are rarely diagnosed in healthy subjects. Comparative analyses of mycobiomes reveal that the human organism is colonized by specific fungi soon after birth, and the quantitative and qualitative composition of the mycobiota changes throughout life. In recent years, correlations between the mycobiome structure and health status, also in disease conditions, have been analyzed at the level of fungus-mycobiome-host interactions. The relationship between the colonized area of the human body defined as anatomical location, and fungal species specific for this area, indicates a strong selective pressure that promotes the growth of species specific for a given ecological niche within the organism. Another issue is the validation and standardization of mycobiome analysis methods. In this respect, metagenomic sequencing methods are currently arousing considerable interest. The review presents the current knowledge about the mycobiome in physiological and disease states induced by the dysbiosis of the existing microbiome. The methods and diagnostic challenges in the quantitative and qualitative analysis of mycobiomes are discussed as well.

1. Introduction. 2. Mycobiome in health and disease states. 2.1. Pulmonary mycobiome. 2.2. Intestinal mycobiome. 2.3. Skin mycobiome. 2.4. Mycobiome and neurological disorders. 2.5. Environmental mycobiome. 3. Mycobiome studies in clinical practice. 4. Analysis of mycobiomes: methodologies and challenges. 4.1. Sample processing. 4.2. Amplicon sequencing. 4.3. Metagenomic sequencing. 4.4. Bioinformatics challenges. 5. Summary

Słowa kluczowe: mykobiom, mikrobiom, dysbioza, grzyby, analizy metagenomiczne

Keywords: mycobiome, microbiome, dysbiosis, fungi, metagenomic analyses

1. Wprowadzenie

Każdego roku choroby grzybicze występują u ponad 300 milionów ludzi na całym świecie, powodując ponad 1,6 miliona zgonów [17, 38]. Pomimo tak wysokiej

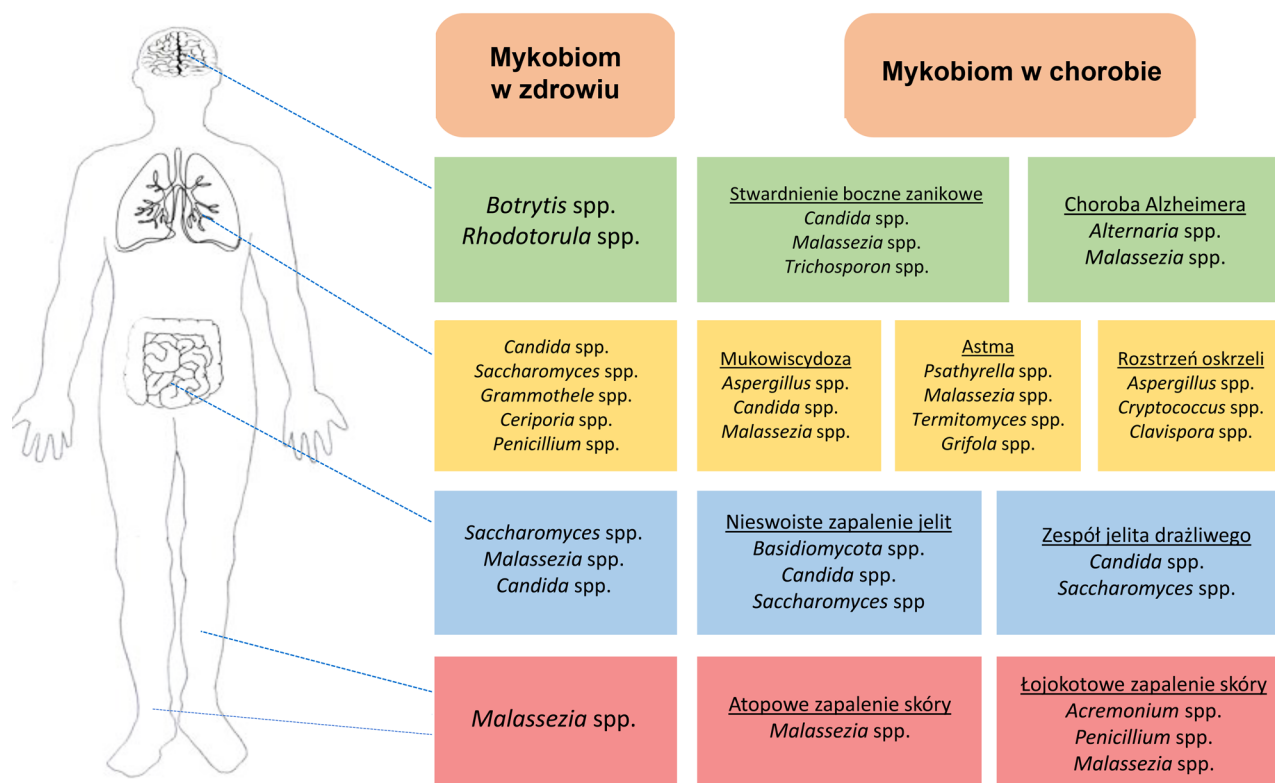
w skali roku zapadalności na grzybicę, niewiele gatunków grzybów jest patogenami, a inwazyjne infekcje grzybicze (IFIs, Invasive Fungal Infections) u osób immunokompetentnych są rzadkością [103]. IFIs stanowią jednak problem dla pacjentów z obniżoną

* Autor korespondencyjny: Sebastian Gnat, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; tel. 81 445 60 93; e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl

odpornością, u których wiążą się z wysoką zachorowalnością i śmiertelnością. Przypadki IFIs wpisują się też w globalny trend wzrostu liczby zakażeń grzybiczych wśród podatnych populacji [17, 41, 42, 69, 71]. W grupie szczególnego ryzyka wymieniane są osoby zakażone ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV), pacjenci z nowotworami oraz po transplantacjach, poddawani terapii immunosupresyjnej lub immunomodulującej [45]. Pośredni wpływ na wzrost liczby przypadków grzybic w skali roku ma globalne ocieplenie i zmiany klimatu, których skutkami są wyższa przeżywalność grzybów w środowisku [21, 37]. Ponadto, obserwowana jest aklimatyzacja grzybów do coraz wyższych temperatur, co zwiększa ich zdolność do replikacji w organizmie gospodarza, nawet przy podwyższonej temperaturze ciała [37, 46]. Przeżywalność komórek niektórych szczepów grzybów w wyższych niż typowe dla gatunku temperatury maksymalne, jest przejawem poszerzenia się spektrum czynników promujących rozwój w ustroju człowieka, przez co w konsekwencji czynnikami sprawczymi grzybic stają się gatunki dotychczas uważane za niepatogenne [103]. Proces aklimatyzacji wpływa również na rozmieszczenie grzybów w środowisku i umożliwia ich wzrost w cieplejszych niszach ekologicznych, co ułatwia interakcję komórek patogenów z organizmem człowieka i transmisję choroby na drodze zakażenia przez skórę, jamę ustną lub przez jamę nosową [36]. Wymienione czynniki przyczyniają się do zwiększenia różnorodności mykobioty organizmu człowieka i otaczającego go środowiska, a pośrednio do wzrostu zagrożenia związanego z infekcjami o charakterze endogennym [72].

Termin mykobiom jest używany do opisu składnika mikrobiomu. Nie jest jeszcze wiadome, czy istnieje u ludzi mykobiom rdzenny, jak w przypadku bakteriomu. W porównaniu z bakteriomem (>99% całkowitej mikrobioty), ludzki mykobiom jest mniej zróżnicowany, zwykle nie przekraczający 20. taksonomicznych jednostek operacyjnych na próbkę (OTU, Operational Taxonomic Unit) i występuje w mniejszej ilości ($\leq 0,1\%$ całkowitej masy mikrobioty) [77, 86]. Wieloletnie badania nad składem ludzkiego mikrobiomu przewodu pokarmowego również ujawniają, że udział komponentu grzybowego plasuje się w zakresie od 0,001 do 0,1% populacji mikroorganizmów izolowanych z dróg pokarmowych [12]. Badania oparte o sekwencjonowanie genomów ujawniają obecność w drogach pokarmowych niemowląt grzybów z rodzaju *Candida*, *Saccharomyces*, *Cladosporium*, *Cryptococcus* i *Malassezia* [74]. O ile w przypadku wymienionych dwóch pierwszych rodzajów wiąże się to z kolonizacją odpowiednich odcinków układu pokarmowego, występowanie grzybów z trzech pozostałych rodzajów związane jest raczej z ich przejściową obecnością i nie mogą być one postrzegane jako typowe komponenty

tej ontocenozy [110]. Natomiast mykobiomy zdrowych osób dorosłych wykazują przewagę grzybów z rodzaju *Saccharomyces*, *Candida*, *Trichosporon* i *Galactomyces*, co sugeruje, że są one kluczowymi składnikami zdrowego mykobiomu obecnego przez całe życie [24, 77]. Niemniej jednak, w przeciwieństwie do badań ludzkich bakteriomów, odnotowana jest niewielka korelacja pomiędzy profilem gatunkowym mykobiomu i stanem zdrowia, a dane na temat interakcji grzyb-mykobiom-gospodarz ograniczone są do przypadków kolonizacji przez grzyby różnych lokalizacji anatomicznych w stanach chorobowych (Ryc. 1) [25]. Dostępne wyniki badań naukowych wskazują, że skomplikowane systemy immunologiczne są zaangażowane w utrzymywanie względnie stałej równowagi w jakościowym i ilościowym składzie mykobiomów. Zaburzenie tej swoistej równowagi zwykle prowadzi do rozwoju infekcji grzybiczej bądź bakteryjnej lub w sposób pośredni wpływa na rozwój takich jednostek chorobowych jak atopowe zapalenie skóry (AZS), czy łojotokowe zapalenie skóry [89]. Odpowiedź immunologiczna na obecność komórek grzybów w ustroju, w pierwszym etapie opiera się na właściwym rozpoznaniu komórek patogenu. Za ten proces odpowiadają receptory rozpoznające wzorce (PRR, Pattern Recognition Receptors), które są obecne na powierzchni lub w cytoplazmie komórek układu odpornościowego. Receptory te, rozpoznają wzorce molekularne związane z patogenami, swoiste dla patogennych grzybów, co indukuje uwalnianie określonych interleukin. Obecne w błonach komórkowych makrofagów receptory PRR rozpoznają mannany i adhezyny obecne w ścianach komórkowych wielu grzybów, wyzwalając aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, produkcję interleukin: IL-1 β i IL-6 oraz fagocytozę. Niektóre rodzaje grzybów, jak *Candida* dzięki stosowaniu tzw. mimikry molekularnej są w stanie uniknąć rozpoznania obecnych na powierzchni ich komórek reszt mannozy przez komórki układu odpornościowego gospodarza, co skutkuje brakiem właściwej odpowiedzi immunologicznej, nasilając infekcję lub prowadząc do infekcji przewlekłej [106]. Ograniczona liczba gatunków grzybów, które faktycznie zasiedlają różne obszary anatomiczne ludzkiego ciała, może wskazywać na zachowawczość ewolucyjną w odniesieniu do składników ludzkiego mykobiomu [49], przejawiającą się też w wyjątkowo wąskiej specjalizacji pewnych gatunków do określonych nisz ekologicznych [25]. Klasyfikacyjnym przykładem dla poparcia tego stwierdzenia są grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Malassezia*. W kontekście ludzkiego mykobiomu, królestwo grzybów wykazuje mniejszą różnorodność niż bakterii, co najlepiej widać w odniesieniu do mykobiomu skóry, gdzie wyraźnie dominują gatunki z rodzaju *Malassezia* [54, 83]. Obserwowane są również zależności między lokalizacją anatomiczną, a swoistymi dla niej gatunkami



Ryc. 1. Skład gatunkowy mykobiomu różnych narządów w stanie zdrowia i w wybranych jednostkach chorobowych

grzybów. Może to wskazywać na istnienie silnej presji selekcyjnej w kontekście możliwości adaptacji poszczególnych gatunków do specyficznych nisz ekologicznych organizmu człowieka [83, 89]. W kontekście tego typu rozważań należy jednak zawsze mieć na uwadze, czy stwierdzenie występowania danego gatunku grzyba w obrębie badanej lokalizacji anatomicznej, nie jest związane wyłącznie z przejściową obecnością drobnoustroju wprowadzonego chociażby z pokarmem.

Obecnie w badaniach mykobiomów największym zainteresowaniem cieszą się techniki metagenomiczne. Techniki te umożliwiają pozyskiwanie DNA genomowego drobnoustrojów bezpośrednio z próbek środowiskowych, niezależnie od rodzaju próbki i liczby różnych gatunków drobnoustrojów. Niewątpliwie zaletą tej metody jest to, że daje możliwość zbadania całej puli genetycznej zbiorowisk drobnoustrojów poprzez sekwencjonowanie i późniejszą analizę uzyskanych sekwencji nukleotydowych. Wewnętrzny transkrybowany przerywnik (ITS Internal Transcribed Spacer) obejmujący dwa zmienne podregiony ITS1 i ITS2 jest zlokalizowany w rejonie genów rybosomalnego RNA i wykorzystywany jest jako uniwersalny i rekomendowany marker DNA w identyfikacji gatunków grzybów, w próbkach metagenomicznych.

Celem niniejszej pracy było dokonanie przeglądu piśmiennictwa traktującego o aktualnych danych związanych z różnorodnością mykobiomu ludzkiego. Ponadto, omówione zostały kluczowe prace badaw-

cze, w których technologia sekwencjonowania, w tym sekwencjonowania metagenomicznego znalazła zastosowanie diagnostyczne w ocenie ludzkiego mykobiomu.

2. Mykobiom w zdrowiu i chorobie

2.1. Mykobiom płuc

Grzybicze choroby płuc są obecnie szeroko rozpowszechnione i stanowią coraz większy problem zdrowia publicznego na całym świecie. Brak jest jednak specjalistycznych badań nad mykobiomami płuc, których celem byłoby przeprowadzenie analiz porównawczych między mykobiomami płuc osób zdrowych i tych z przewlekłymi chorobami płuc. Utrudnia to zdefiniowanie i ocenę różnorodności mykobiomu w tym narządzie. Wcześniejsze założenia sterylności zdrowego płuca zatrzymały badania mikrobiomu tego narządu na wiele lat. W efekcie, zrozumienie mikrobiomu oddechowego jest znacznie opóźnione w porównaniu z innymi organami [65]. Pojawienie się technologii sekwencjonowania, jako metody niezależnej od uzyskania kultury grzyba, ujawniło różnorodność mikroorganizmów występujących w płucach, w tym obecnych w płucach osób zdrowych [9]. Dzięki obserwowanej w ostatnich latach znacznej redukcji kosztów sekwencjonowania o wysokiej przepustowości możliwe jest wyodrębnianie prawie kompletnych genomów

bezpośrednio z metagenomicznych zestawów danych. Z kolei, badania oparte o sekwencjonowanie regionu ITS ujawniły, że w skład mykobiomu płuc mogą wchodzić grzyby klasyfikowane jako *Ceriporia lacerata*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Penicillium brevicompactum*, przy czym za najważniejszy czynnik etiologiczny aspergilozy i główny patogen w warunkach dysbiozy jest postrzegany niezmiennie *Aspergillus fumigatus* [27]. Konidia tego gatunku, z uwagi na najdrobniejsze wśród rodzaju *Aspergillus* rozmiary, mogą wnikać do przestrzeni pęcherzyków płucnych. Mikrobiota stwierdzana w zdrowych płucach obejmuje oprócz grzybów także bakterie i wirusy, które razem na poziomie różnych taksonów tworzą międzygatunkową sieć ekologiczną [74, 105]. Wspomniane czynniki biologiczne najczęściej dostają się do dróg oddechowych na drodze inhalacji, wchodząc w bezpośredni kontakt z warstwą śluzu pokrywającą powierzchnie poszczególnych odcinków dróg oddechowych. W tym kontekście, analizując wyniki badań nad mikrobiomem płuc należy mieć na uwadze, że stwierdzane tam mikroorganizmy i wirusy mogą stanowić jedynie przejściową mikrobiotę płuc, która zwykle jest aktywnie usuwana. Ponadto wykazano, że możliwe są również interakcje między mikrobiomem płucnym i jelitowym, które zachodzą poprzez osłoneczkę płucno-jelitową i mają istotne konsekwencje zdrowotne. Udowodniono, że zmiany w mykobiomie jelitowym mogą wpływać na powstawanie alergicznych chorób dróg oddechowych [14,92]. Na modelu mysim wykazano między innymi, że nadmierna proliferacja *Candida albicans* w jelitach wyraźnie nasila przebieg alergicznej choroby dróg oddechowych [92]. Podobnie, sztucznie indukowana u myszy kolonizacja jelit przez grzyba *Wallemia mellicola* prowadziła do zwiększonego nasilenia alergicznej choroby dróg oddechowych [92].

Mykobiom zdrowych płuc różni się od obserwowanego u pacjentów z przewlekłymi chorobami układu oddechowego, takimi jak astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc, mukowiscydoza i rozstrzenie oskrzeli [78]. Wszystkie płuca badanych osób cierpiących z powodu astmy, obturacyjnej choroby płuc i mukowiscydozy wykazywały mniejszą różnorodność mykobiomów [104]. W grupie pacjentów z astmą stwierdzano w płucach zdecydowanie większy udział różnych gatunków grzybów, w tym najczęściej *Psathyrella candolleana*, *Malassezia pachydermatis*, *Termitomyces clypeatus* i *Grifola sordulenta* [77,103]. Ponadto, zwraca uwagę fakt większej różnorodności gatunkowej grzybów w porównaniu z pulą gatunków izolowanych z dróg oddechowych zdrowych osób, u których do tej pory nie stwierdzano w płucach niektórych z wymienionych gatunków, jak chociażby tych z rodzaju *Malassezia* [77]. U dzieci z ciężką astmą stwierdzono większą liczebność grzybów z taksonów *Pneumocystis*, *Leucosporidium* i *Rhodotorula* w porównaniu z grupą dzieci

zdrowych [47]. Z kolei rozstrzenie oskrzeli, czyli trwałe i nieodwracalne poszerzenie światła dróg oddechowych, naraża pacjentów na większe ryzyko wystąpienia infekcji grzybiczej dolnych dróg oddechowych [22]. Znajduje to odzwierciedlenie w mykobiomach dróg oddechowych tej grupy pacjentów. Przeprowadzone analizy w tej grupie chorych pozwoliły wykazać wyższą liczebność potencjalnie patogennych grzybów, w tym z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* i *Cryptococcus*, jak również wykazać u tych pacjentów częstsze występowanie reakcji alergicznych i silnej odpowiedzi immunologicznej związanej z pleśniami z rodzaju *Aspergillus*. Ze względu na zaburzone oczyszczanie śluzowo-rzęskowe, które jest nieodłącznie związane z rozstrzeniami oskrzeli, drogi oddechowe są podatne na grzyby obecne w bioaerozolu i proces kolonizacji [9]. W przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, pleśnie *Aspergillus* spp. były stwierdzane w oparciu o analizy metagenomiczne u 17% pacjentów, a określone gatunki grzybów, takie jak *Pneumocystis jirovecii*, wykryto również w przebiegu tej choroby u pacjentów zakażonych wirusem HIV, co wskazuje na udział predyspozycji immunologicznych w zróżnicowaniu mykobiomów tego narządu [62]. Obecność *Pneumocystis* spp. w płucach pacjentów z infekcją HIV często jest wyznacznikiem tej upośledzającej układ odpornościowy infekcji. Dodatkowo koreluje ona z wyraźnie mniejszym zróżnicowaniem mykobiomu płuc i wpływa negatywnie na utrzymanie homeostazy tego narządu [27]. Znaczna różnorodność gatunkowa w mykobiomie płuc obserwowana jest u pacjentów z mukowiscydozą, chorobą genetyczną określaną jako tzw. zwłóknienie torbielowate płuc. W tej grupie pacjentów, *A. fumigatus* był stwierdzany w płucach u 6 do 60% badanych [67]. Badania nad mykobiomem płuc u pacjentów z mukowiscydozą znajdują się w początkowej fazie i często nie jest jasne czy izolowane grzyby stanowią stabilny element mykobiomu, czy występują w płucach przejściowo [19]. Badania pacjentów z mukowiscydozą oparte o sekwencjonowanie metagenomiczne pozwalają wykryć znacznie szersze spektrum gatunków grzybów niż badania oparte o konwencjonalną hodowlę mykologiczną [19]. Stwierdzano też większą liczebność gatunków z rodzaju *Aspergillus* (zwłaszcza *A. fumigatus*) i grzybów drożdżopodobnych z takich gatunków jak *C. albicans*, *Candida parapsilosis* i *Malassezia* spp. [78]. Zarówno u pacjentów z astmą, jak i mukowiscydozą, ewentualna odpowiedź alergiczna może być wywołana obecnością *Aspergillus* spp., a w pewnych przypadkach u tych pacjentów może też prowadzić do alergicznej aspergilozy oskrzelowo-płucnej [88]. Niezależnie od rodzaju schorzenia, mykobiomy płuc poszczególnych pacjentów mogą różnić się diametralnie. Jak wykazano, korelują one ze składem gatunkowym grzybów obecnych w powietrzu zewnętrznym i wewnętrznym pomiesz-

czeń mieszkalnych, w których taka osoba przebywa [88]. Zastosowanie metod sekwencjonowania całych mykobiomów płuc zyskało w ostatnich latach znaczną popularność i zainteresowanie badaczy. Coraz częściej też, sekwencjonowanie metagenomiczne staje się nieodzowną techniką wykorzystywaną w szczegółowych analizach mykobiomów płuc pacjentów z chorobami układu oddechowego [9].

2.2. Mykobiom jelit

Wyniki badań mykobiomu jelit osób zdrowych są bardzo ograniczone. Nash i wsp. [77] zaobserwowali, że ludzki mykobiom jelitowy u osób zdrowych jest zdominowany przez grzyby drożdżopodobne, takie jak *Saccharomyces* spp., *Malassezia* spp. i *Candida* spp., aczkolwiek ze znaczną zmiennością między- i wewnątrz-osobniczą. Sugeruje to, obserwowaną w czasie, dynamikę zmian w ilościowym i jakościowym składzie mykobiomu jelitowego, na którą dodatkowo ma wpływ odporność gospodarza [74, 77].

Wysiłki mające na celu zbadanie mykobiomów jelitowych koncentrowały się w dużej mierze na pacjentach z chorobami przewodu pokarmowego, a kluczowe odkrycia odzwierciedlają trendy zmian w liczebności i zróżnicowaniu gatunkowym mykobiomów w stanach chorobowych. Dla przykładu, w grupie nieswoistych zapaleń jelit badania oparte na analizie sekwencji 18S rRNA wykazały zwiększoną różnorodność gatunkową mykobiomu jelit u osób z chorobą Leśniowskiego-Crohna i stosunkowo stały skład mykobiomu u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, w porównaniu z osobami zdrowymi [63]. Ponadto, określone zostały różnice między mykobiomem jelit w stanie zapalnym i bez reakcji zapalnej [63]. Zwrócono uwagę na fakt, że przeprowadzenie sekwencjonowania fragmentu ITS2 ujawniło wyraźną dysbiozę w składzie mykobiomu na tle całej populacji drobnoustrojów, w nieswoistych zapaleniach jelit, ze zwiększonym udziałem przedstawicieli *Basidiomycota* kosztem grzybów z gromady *Ascomycota*, w szczególności *C. albicans* i *S. cerevisiae* [94]. W przypadku pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, sekwencjonowanie fragmentów ITS2 potwierdziło również wzrost liczebności komponentu grzybowego podczas zaostrzeń choroby oraz wyższą częstość występowania grzybów z rodziny *Cystofilobasidiaceae* i gatunku *C. glabrata*. Natomiast przeprowadzenie sekwencjonowania fragmentów ITS1 ujawniło zwiększoną liczebność grzybów drożdżopodobnych *Candida tropicalis* w mykobiomie jelit osób z chorobą Leśniowskiego-Crohna, w porównaniu ze zdrowymi osobami o wysokim stopniu pokrewieństwa [54]. Chociaż powszechnie wiadomo, że grzyby, w tym drożdżopodobne nie są czynnikami etiologicznymi tego schorzenia, gatunki takie jak

S. cerevisiae i *Filobasidium uniguttulatum* były niejednokrotnie stwierdzone w jelitach bez towarzyszącego stanu zapalnego [64]. Nie można jednak wykluczyć, że ich obecność była przejściowa i mogła być wynikiem stosowania probiotyków zawierających w składzie mikroorganizmy, w przypadku których wykazano już pozytywny wpływ na przebieg choroby Leśniowskiego-Crohna. W podgrupie pacjentów z polimorfizmami CARD9 (Caspase Recruitment Domain-containing protein 9), przejawiających wrodzoną skłonność do kandydozy, wykazano, że obecność *Malassezia restricta* może nasilać objawy choroby Leśniowskiego-Crohna. Może to sugerować, że ukierunkowanie leczenia na hamowanie wzrostu określonych gatunków grzybów może mieć znaczenie w kontekście lepszych efektów terapeutycznych u niektórych pacjentów [66]. Potwierdzają to badania Wheeler i wsp. [111], którzy udowodnili, na podstawie analiz sekwencji fragmentów ITS1, że u zwierząt doświadczalnych, którym podawano antymykotyki, występowało zaburzenie w składzie mykobiomu jelit, charakteryzujące się zmniejszeniem liczebności grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* z równoczesnym wzrostem liczebności pleśni *Aspergillus* spp., *Wallemia* spp. i *Epicoccum* spp. Powszechnie też wiadomo, że stosowanie antybiotyków wpływa na nasilenie stanów zapalnych jelit poprzez modyfikację bakteriomu jelitowego, co w konsekwencji prowadzi do preferencyjnej kolonizacji przez grzyby [95]. W tym przypadku znaczące ograniczenie populacji bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* sprzyja kolonizacji przez grzyby i w konsekwencji prowadzi do nasilenia objawów zapalenia okrężnicy [95]. Należy przy tym zaznaczyć, że te ostatnie doniesienia dotyczą doświadczeń przeprowadzonych na myszach i nie mogą być reprezentatywne dla ludzkiego mykobiomu jelita.

U pacjentów cierpiących na zespół jelita drażliwego lub przewlekłą chorobę czynnościową układu pokarmowego, analiza próbek kału, oparta na sekwencjonowaniu regionu ITS1, ujawniła dysbiozę mykobiomów jelit ze znaczną utratą różnorodności gatunkowej. Grzyby *Saccharomyces* spp. i *Candida* spp. były dominujące w mykobiomie pacjentów z zespołem jelita drażliwego i grupie kontrolnej obejmującej osoby zdrowe, z tą różnicą, że zdecydowanie wyższy odsetek grzybów z wymienionych rodzajów został odnotowany u osób chorych [49]. Przeprowadzone na modelu zwierzęcym badania nadwrażliwości trzewnej, schorzenia powiązanego z zespołem jelita drażliwego, dają podstawy, żeby sądzić, że ukierunkowana manipulacja mykobiomem jelitowym może zapewnić podstawę skutecznej interwencji terapeutycznej [18]. Do wyjaśnienia mechanistycznych podstaw tych wczesnych obserwacji potrzebne są jednak dodatkowe dowody i walidacja biologiczna [49]. Można znaleźć też doniesienia na temat istotnego zahamowania progresji guzów

nowotworowych, szczególnie w wolno postępujących gruczolakorakach przewodowych trzustki, w efekcie włączenia terapii przeciwgrzybiczej. Co ciekawe, do ponownego uaktywnienia się choroby nowotworowej doszło po zakończeniu leczenia i związanym z tym odtworzeniem populacji grzybów, głównie z rodzaju *Malassezia* [13]. Autorzy cytowanej pracy wykazali, że w wielu przypadkach progresja guza w pewnym stopniu wiąże się z aktywnością lektyny wiążącej mannozę i aktywacją kaskady dopełniacza [16]. Ponadto, zwiększona liczebność grzybów drożdżopodobnych *Malassezia* spp., z mniejszym udziałem innych grzybów takich jak *Moniliophthora* spp., *Rhodotorula* spp., *Acremonium* spp., *Thielaviopsis* spp. i *Pisolithus* spp., była opisywana u pacjentów z rakiem jelita grubego, podczas gdy większa liczebność grzybów z gromady *Basidiomycota* wiąże się z późnymi stadiami tej choroby [26].

Ze względu na potencjalne skutki zmian w mykobiomie jelit związane z wiekiem, ocenie poddano również biotę jelit dzieci cierpiących na nieswoiste zapalenia jelit. Uzyskane na podstawie analiz sekwencji 18S rDNA wyniki wykazały dominację grzybów z gromady *Basidiomycota* [76]. Z kolei sekwencjonowanie regionu ITS1 ujawniło w tej grupie wysoką liczebność grzybów z rodzaju *Candida*, a dodatkowo mniejszą różnorodność gatunkową mykobiomu jelit w porównaniu z dziećmi zdrowymi [23].

Mykobiom jelitowy może dodatkowo wpływać pośrednio na inne układy narządów, takie jak płuca i ośrodkowy układ nerwowy, ale dokładne mechanizmy tych zjawisk są słabo poznane. W szczególności istotna jest tu oś łącząca płuca i jelita. Dotychczasowe badania wskazują, że skład gatunkowy mikrobiomu jelitowego może być skorelowany z zapadalnością na przewlekłe zapalne choroby płuc [20]. Dla przykładu, obecność grzybów drożdżopodobnych *C. albicans* w mykobiomie jelit wpływa na szlaki odpornościowe związane z limfocytami Th17, co w konsekwencji sprzyja kolonizacji dróg oddechowych patogennymi grzybami pleśniowymi z rodzaju *Aspergillus* spp. Niewątpliwie jest to przykład wpływ składu mykobiomu jelitowego na podatność i przebieg infekcji grzybiczych układu oddechowego [14].

Dysbioza mykobiomów jelitowych była również opisywana w grupie pacjentów z zaburzeniami neurologicznymi. Podobnie do powyższego, również w mykobiomach jelit pacjentów ze schizofrenią, autyzmem lub zespołem Retta stwierdzano większą liczebność grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* [97]. Wyniki te skłoniły do przeprowadzenia analiz porównawczych mykobiomów jelitowych z uwzględnieniem osi mikrobiom-jelito-mózg. Należy wspomnieć, że koncepcja wpływu mikrobiomu bakteryjnego jelita poprzez odpowiednie osie jest już mocno ugruntowana [30]. Niemniej jednak, nawet dla specjalistów, związek mykobiomu jelitowego z objawami neurologicznymi, takimi

jak lęk czy depresja u osób cierpiących na zespół jelita drażliwego, jest intrygujący [101]. Chociaż odkrycia te pozostają obecnie spekulatywne i wymagają dalszych badań w celu wyjaśnienia mechanizmu biologicznego, niewątpliwie podkreślają one znaczenie i rolę grzybów zasiedlających jelita w osi mikrobiom-jelito-mózg.

2.3. Mykobiom skóry

Skóra jest kluczowym organem organizmu ludzkiego, zapewniając barierę mechaniczną, a tym samym pierwszą linię obrony przed patogenami. Jednocześnie, powszechnie wiadomo, że skóra jest główną niszą ekologiczną kolonizowaną przez grzyby [39, 44, 72–74, 82]. Skład gatunkowy mykobiomu skóry różnych osób może być bardzo różny, a istotny wpływ na jego strukturę ma wiek i płeć. Powszechnie wiadomo, że dzieci cechuje większa liczebność i różnorodność grzybów obecnych na skórze, w porównaniu do osób dorosłych, u których dominują lipofilne grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Malassezia*, co wiąże się ze zwiększoną aktywnością gruczolów łojowych nasilającą się z wiekiem dojrzewania [65]. Taki stan rzeczy u dzieci wynika więc z różnic w składzie sebum oraz niskiej aktywności gruczolów łojowych w tym wieku [60]. Niemniej jednak mykobiom skóry jest strukturą dynamiczną, a poszczególne grzyby tworzące tę populację oddziałują ze sobą i tworzą ekologiczną strukturę sieci [105].

Podobnie jak w przypadku innych układów narządów i ich mikrobiomów, dysbioza mykobiomów skóry najczęściej wiąże się z chorobami skórными. Powszechnie znanym faktem jest też pośredni wpływ grzybów z rodzaju *Malassezia* na indukcję i nasilenie takich jednostek chorobowych jak łojotokowe zapalenie skóry, czy AZS [65]. Odwrotnie w łuszczycy, chorobie, która związana jest z nadmiernym rogowaceniem naskórka, stwierdzano znacznie niższą liczebność grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Malassezia* w porównaniu ze znacznie bogatszymi mykobiomami w przypadku osób zdrowych. Pomijając liczebność i zróżnicowanie gatunkowe mykobiomów skóry pacjentów z obu grup należy zauważyć, że grzyby z rodzaju *Malassezia* zawsze stanowiły dominujący komponent [113]. Wykazano również związek między mykobiomem skóry a chorobami ogólnoustrojowymi, które często manifestują się pewnymi zmianami skórными. W twardzinie układowej, mykobiom skóry pacjentów z tej grupy był zdominowany przez *Rhodotorula glutinis*, przy czym należy zaznaczyć, że, aczkolwiek spójne, wyniki badań zostały uzyskane z analiz mykobiomów zaledwie czterech pacjentów chorych i czterech z grupy kontrolnej [11]. W łupieżu pstrym czynnikami etiologicznymi są niezaprzeczalnie grzyby z rodzaju *Malassezia*. Objawy chorobowe towarzyszące tej infekcji są między innymi konsekwencją apoptozy zachodzącej w melanocytach

pod wpływem działania malasezyny, przy jednoczesnej ekspozycji na promieniowanie UV [65]. W patomechanizmie tej jednostki chorobowej istotna jest też rola receptorów węglowodorów aromatycznych AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor), które są w stanie modulować przebieg melanogenezy poprzez regulację ekspresji genów związanych z tym procesem [68]. Mykobiomy skóry pacjentów cierpiących na tę chorobę wykazują istotnie większą liczebność *Malassezia globosa*, *Malassezia sympodialis* i *Malassezia furfur*, obecnych tu głównie w formie strzępkowej w przeciwieństwie do blastokonidiów tych grzybów, powszechnie obserwowanych na zdrowej skórze [57]. W mykobiomach skóry osób zdrowych, w odróżnieniu od pacjentów z łupieżem pstym, dominują w zależności od regionu geograficznego *Malassezia restricta*, *M. globosa* i *M. sympodialis* [51], przy czym wyraźną dominację ostatniego z wymienionych gatunków obserwowano w Polsce [56]. Ostatnio zwraca się też uwagę na znaczenie dysbiozy mykobiomu skóry, jak również odpowiedniej miejscowej terapii przeciwgrzybiczej gwarantującej przywrócenie naturalnego stanu tej swoistej niszy ekologicznej [32].

Rola mykobiomu została też opisana w kontekście łojotokowego zapalenia skóry. Grzyby *M. restricta* i *M. globosa* są identyfikowane szczególnie często u pacjentów z łojotokowym zapaleniem skóry, a zwiększenie liczebności tych gatunków w mykobiomie, w porównaniu ze skórą głowy osób zdrowych, wskazuje na początek choroby [112]. Grzyby z rodzaju *Malassezia* mogą ponadto nasilać powstawanie łupieżu skóry głowy [57]. Grzyby klasyfikowane w gromadach *Ascomycota* i *Basidiomycota* są powszechne zarówno w mykobiomie skóry zdrowej, jak i dotkniętej łupieżem. W tej ostatniej, stwierdzano jednak większą liczebność grzybów z rodzaju *Acremonium*, *Penicillium* i *Malassezia* [57]. Atopowe zapalenie skóry może być kolejnym przykładem choroby skóry pozostającej w wyraźnym związku z mykobiomem skóry. U pacjentów z AZS obserwuje się znaczną zmienność wewnątrz- i międzypersonalną w składzie i liczebności mykobiomów. Jednak, podobnie jak w przypadku innych chorób skóry, *M. sympodialis*, *Malassezia sloofiae* i *Malassezia dermatitis* wydają się pośrednio wpływać na przebieg tej choroby, a czasami nawet ją nasilają. U pacjentów z AZS notowane są też krążące we krwi przeciwciała IgE jako odpowiedź na antygeny grzybów drożdżopodobnych *Malassezia* spp. [51, 57, 58, 65]. Grzyby *Malassezia* spp. wchodzące w skład mykobiomu skóry mogą też wywoływać stany zapalne skóry poprzez nasilenie odpowiedzi immunologicznej związanej z limfocytami Th-17 [96]. Autorzy jednej z prac, sugerują nawet związek *Malassezia* spp. z występowaniem choroby Alzheimera. Stwierdzane u tych pacjentów stany zapalne o różnej lokalizacji w obrębie ośrodkowego układu nerwowego oraz wysokie stężenia chitynaz, wskazywały na występowanie

nie grzybów z rodzaju *Malassezia*, których obecność w tych tkankach jednoznacznie potwierdzano w oparciu o metody molekularne [74].

W badaniach mykobiomów skóry stosowano różne metody biologii molekularnej. U pacjentów z AZS zastosowano sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, Next Generation Sequencing), jak również ukierunkowane na sekwencjonowanie różnych regionów genomu grzybów, obejmujących, m.in. sekwencje rybosomalnego RNA 28S i 18S odpowiednio z dużej i małej podjednostki, jak też sekwencje ITS1 i ITS2 [11, 51, 57, 110, 112].

2.4. Mykobiom a zaburzenia neurologiczne

Coraz więcej dowodów wskazuje na znaczenie mikrobiomu w chorobach neurologicznych. Wykazano między innymi, że zmiany w liczebności i różnorodności bakterii jelitowych są powiązane ze stwardnieniem rozsianym [6,34]. Ponadto, u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym odnotowano na podstawie analiz sekwencji nukleotydowych regionów ITS1 większą liczebność grzybów *Candida* spp., *Malassezia* spp. i *Trichosporon* spp., w porównaniu z osobami zdrowymi z grupy kontrolnej [6]. Podobnie, analizy metagenomiczne płynu mózgowo-rdzeniowego pacjentów ze stwardnieniem rozsianym ujawniły obecność grzybów z gromady *Ascomycota* oraz rodzajów *Malassezia* spp., *Funneliformis* spp., *Glomus* spp., *Cladosporium* spp., *Candida* spp. i *Alternaria* spp. [84]. Tego typu wyniki budzą kontrowersje, a Perlejewski i wsp. [84] sugerują, że tak duże zróżnicowanie gatunkowe prawdopodobnie odzwierciedla zanieczyszczenia środowiskowe, a nie właściwy skład mykobiomu płynu mózgowo-rdzeniowego. Z kolei, Jovel i wsp. [59] w płynie mózgowo-rdzeniowym pobranym od pacjentów ze stwardnieniem rozsianym nie odnotowali żadnych grzybów.

W chorobie Alzheimera komórki grzybów są wykrywane w neuronach za pomocą immunohistochemii i mikroskopii konfokalnej. Dotychczas tymi metodami zidentyfikowano grzyby z rodzajów *Candida*, *Cladosporium*, *Malassezia*, *Neosartorya*, *Phoma* i *Saccharomyces* [85]. Podaje się ponadto, że grzyby *Alternaria* spp. i *Malassezia* spp. są reprezentowane w znacznie większej liczebności u pacjentów z chorobą Alzheimera w porównaniu z grupą kontrolną, bez jakichkolwiek dysfunkcji tkanki mózgowej [7]. W innych pracach, w tkance mózgowej osób ze stwardnieniem zanikowym bocznym wykazano zwiększoną liczebność grzybów z rodzajów *Candida*, *Malassezia*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Trichoderma* i *Cryptococcus* [34]. Wykazany silny związek pomiędzy występowaniem łojotokowego zapalenia skóry, a chorobą Parkinsona również nasuwa podejrzenie specyficznego wkładu grzybów drożdżopodobnych *Malassezia* spp. w oba stany chorobowe. Co ważne,

udowodniono, że polimorfizmy genetyczne związane z chorobą Parkinsona i stosowanie w leczeniu lewodopy promują wzrost i inwazyjność grzybów *Malassezia* spp. Możliwy związek między składem mykobiomu skóry osób z łojotokowym zapaleniem skóry, a jednoczesnym występowaniem choroby Parkinsona może mieć znaczenie kliniczne [61]. Podsumowując, obecnie prowadzone badania wskazują, że grzyby mają pewne pośrednie znaczenie w patogenezie kilku chorób neurologicznych. Wyniki wielu badań wskazują, że obserwowane interakcje pomiędzy żywicielem a mikroorganizmem mają wpływ na stan ludzkiego zdrowia oraz na sieć komunikacyjnych osi między narządowych, co sprzyja rozwojowi pewnych chorób.

2.5. Mykobiom środowiskowy

Grzyby są wszechobecne i występują zarówno w środowisku naturalnym, jak i wewnątrz pomieszczeń mieszkalnych i gospodarczych. Badania naukowe wskazują, że skład gatunkowy mykobiomu środowiskowego wewnątrz budynków i w środowisku naturalnym jest zbliżony w odniesieniu do grzybów mikroskopijnych tzw. mikromycetes, aczkolwiek zwykle różny w kontekście ilościowym. Diaspory grzybowe w pomieszczeniach zamkniętych są rozmieszczone przypadkowo i zdominowane przez zarodniki, fragmenty strzępek oraz inne elementy wegetatywnych i generatywnych struktur grzybni [91]. Na skład gatunkowy mykobiomu środowiskowego wpływa lokalizacja geograficzna i związana z nią temperatura i wilgotność powietrza [50]. Mykobiom zamkniętych pomieszczeń pochodzi najczęściej z powietrza zewnętrznego, grzyby dostają się do wnętrza w wyniku wentylacji pomieszczeń. Na jego skład największy wpływ ma pula gatunków grzybów obecnych w danej lokalizacji. Inne źródła grzybów w pomieszczeniach obejmują przebywających w nich ludzi, zwierzęta domowe, rośliny, obecność instalacji wodno-kanalizacyjnych, systemów ogrzewania, wentylacji i klimatyzacji, a także resuspcję cząstek kurzu [2].

Z obecnością grzybów w pomieszczeniach zamkniętych zawsze wiążą się pewne negatywne aspekty, które jak powszechnie wiadomo są znacznie poważniejsze w skutkach, w sytuacji gdy organizmy te, znane z biodeterioracji i biodegradacji materiałów, kolonizują ściany i inne elementy budowlane w budynku. Uwalniane do atmosfery zarodniki i inne elementy grzybni, w tym alergeny i mykotoksyny, czy też lotne związki organiczne pochodzenia mikrobiologicznego (MVOC, Microbial Volatile Organic Compounds) w konsekwencji mogą nasilać objawy pewnych chorób jak astma, reumatyzm, czy też skutkować wystąpieniem syndromu chorego budynku (SBS, Sick Building Syndrome) o etiologii grzybiczej [1]. Mykobiom wewnątrz

budynków, zwłaszcza mieszkalnych, jest zatem przedmiotem zainteresowania mikrobiologów, ekologów i klinicystów [1, 81]. Bazując na metodach molekularnych i sekwencjonowaniu fragmentu ITS2 wykazywano od 450 do 4400 OTU na próbę [4, 9, 81]. Wyniki tych badań wskazują, że z pomieszczeniami zamkniętymi związane są ilościowo i jakościowo bogate mykobiomy. Opisany szeroko w literaturze SBS związany jest ze złą jakością powietrza w pomieszczeniach i ekspozycją na grzyby. Występujące u mieszkańców budynku objawy najczęściej obejmują ból głowy, zawroty głowy, nudności, podrażnienie oczu, nosa lub gardła [98]. W ramach wysiłków na rzecz ograniczenia szkodliwego narażenia na mykobiom występujący w pomieszczeniach, niezbędne jest śledzenie zarodników unoszących się w powietrzu i wyeliminowanie zanieczyszczeń, które mogą stanowić ich potencjalne rezerwuary. Stanowi to istotne wyzwanie nawet w pomieszczeniach zamkniętych biorąc pod uwagę ruch aerozoli, który tu nie jest wzbudzany prądami powietrza jak to zwykle ma miejsce w środowisku zewnętrznym. Co więcej, grzyby znajdujące się na różnych powierzchniach w budynkach mogą być niewidoczne gołym okiem, a wykonywanie prób mykologicznych ze wszystkich powierzchni jest nieuzasadnione. Z tego też względu przyszłe badania zamiast koncentrować się na metodach konwencjonalnych, mogłyby uwzględniać próby śledzenia źródła poprzez zastosowanie matematycznych modeli probabilistycznych, w oparciu o dotychczasowy stan wiedzy o niszach ekologicznych grzybów [106]. Takie postępowanie mieści się jedynie w kategoriach czysto teoretycznych i nie mogłoby znaleźć zastosowania w codziennej praktyce restauratorów zabytków, czy mykologów budowlanych przeprowadzających ekspertyzy mykologiczne oraz zabiegi konserwacyjne.

Wyniki badań opartych o konwencjonalne metody hodowli ujawniają, że grzyby z rodzajów *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhodotorula* i *Wallemia* stanowią znaczny odsetek mykobiomu pomieszczeń cechujących się podwyższoną wilgotnością względną, takich jak toalety, gdzie szczególnie dominującym gatunkiem jest *Rhodotorula mucilaginosa*. Z kolei *A. fumigatus* na ogół dominuje jako składnik mykobiomu pomieszczeń o niższej wilgotności względnej powietrza, takich jak pokoje dzienne, podczas gdy *Cladosporium* spp. stwierdzone były w prawie każdej przestrzeni życiowej [4, 106]. Oprócz określania różnorodności mykobiomów pomieszczeń, kolejnym obszarem aktywnych badań są prace nad materiałami budowlanymi i powłokami, które minimalizują lub zapobiegają kolonizacji przez grzyby [109]. Rozwiązania te są jednak aktualnie drogie, a dodatkowo utrzymanie sterylności w środowisku wewnętrznym pomieszczenia jest bardzo trudne lub prawie niemożliwe, stąd uzasadnione jest wyłącznie względami medycznymi,

na przykład na oddziałach intensywnej opieki medycznej, czy też w przypadku pacjentów w stanie głębokiej immunosupresji [3]. Alternatywnie, budynki powinny być konstruowane według projektów architektonicznych, które uwzględniają standardy minimalizujące liczebność mykobiomu w systemach ogrzewania, wentylacji, klimatyzacji i instalacjach hydraulicznych [98].

3. Badania nad mykobiomem w praktyce klinicznej

Liczba publikacji dotyczących mikrobiomu wzrasta wykładniczo w ostatnich latach [31, 34]. Równoległe, lepsze zrozumienie roli drobnoustrojów w zdrowiu i chorobach wzmocniło zainteresowanie badaniami mykobiomu i jego udziałem w chorobach [9, 14]. Powszechnie wiadome jest, że mikroorganizmy prokariotyczne i eukariotyczne współistnieją w tym samym środowisku i że interakcja między mikrobiomami bakteryjnymi, grzybowymi i wirusowymi prowadzi do homeostazy u zdrowych osób, podczas gdy dysbioza prowadzi do rozwoju choroby. Coraz częściej badania mykobiomu przeprowadza się u pacjentów z różnymi schorzeniami, u których możliwe jest istnienie dysbiozy w odniesieniu do danego narządu, lokalizacji anatomicznej itp. Rola mykobiomu w kontekście klinicznym cieszy się rosnącym zainteresowaniem. Pozostaje kilka wyzwań, w tym walidacja i standaryzacja metod pobierania próbek i zastosowania metod analitycznych na większą skalę [28, 81]. Obecnie nie ma znormalizowanych metod analizy mykobiomów, w tym przede wszystkim w zakresie badań genetycznych, w obszarze metod ekstrakcji DNA, doboru starterów, technik sekwencjonowania i stosowanych referencyjnych baz danych. Metodologia badań nad mykobiomami ewoluje, co z pewnością pozwoli w przyszłości korzystać z wystandaryzowanych procedur, odpowiednio walidowanych, które dadzą gwarancję uzyskania pełnego obrazu mykobiomu pokrywającego się z rzeczywistością [13].

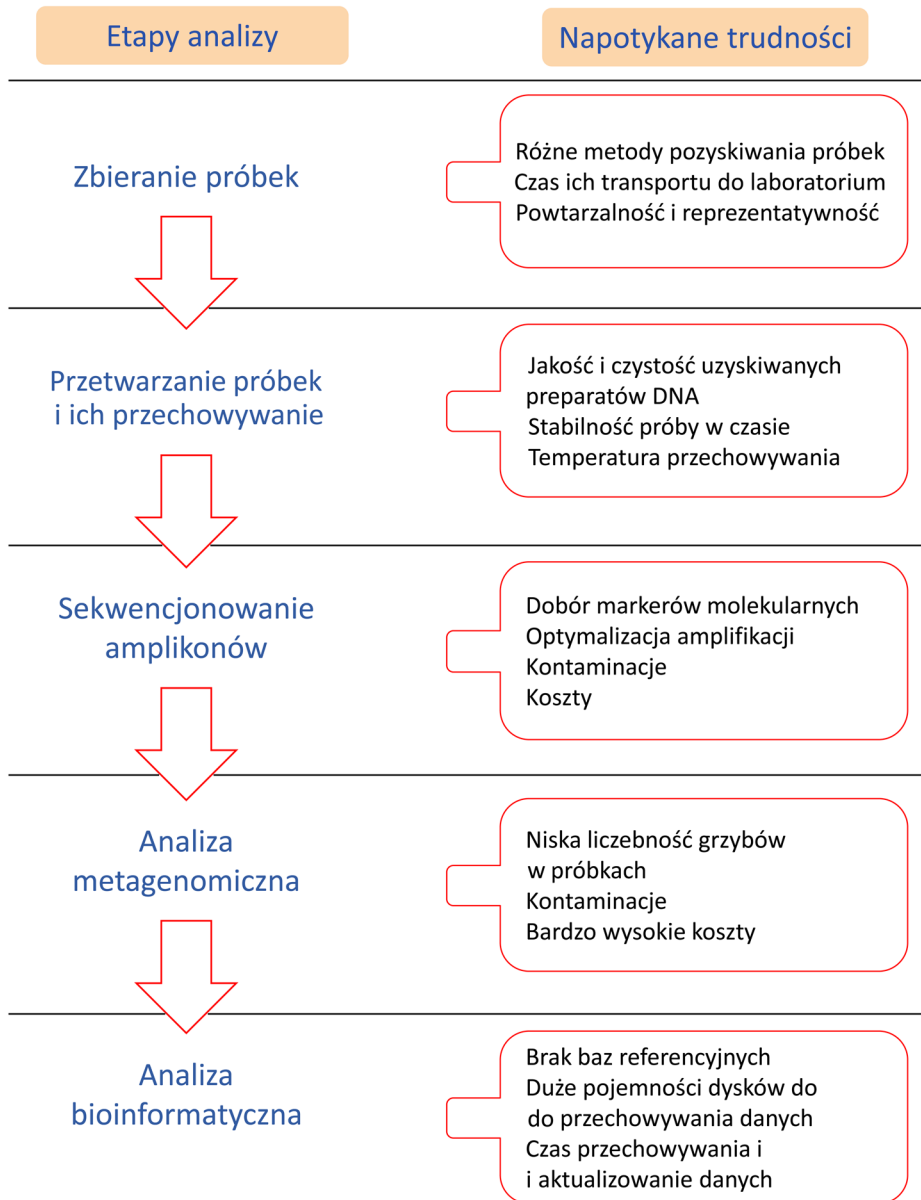
Dzięki lepszemu poznaniu specyfiki mykobiomów oraz ich interakcji z systemem odpornościowym gospodarza, a także umiejętności skorelowania tych danych z chorobą na różnych jej etapach, możliwe będzie przyspieszenie samej diagnozy i podjęcie bardziej ukierunkowanych terapii. Nowatorskie podejście i nowsze metody leczenia mogą wynikać z lepszego doboru grupy pacjentów w oparciu o profile mykobiomów, podczas gdy manipulowanie lub przywracanie „zdrowego” mykobiomu również stanowi potencjalnie i realne postępowanie medyczne [32]. Obecny postęp technologiczny w połączeniu z rosnącą ilością danych z sekwencjonowania mykobiomów, mogą w przyszłości przyczynić się do rozwoju diagnostyki „punktowej” w zakresie chorób grzybiczych [103].

4. Analiza mykobiomów: metodologia i wyzwania

Od czasu, gdy do badań nad mikrobiomami wprowadzono metagenomikę stało się możliwe uzyskiwanie pełnych obrazów populacji mikroorganizmów wchodzących w skład rozpatrywanej niszy ekologicznej, także tych niehodowlanych [102]. Detekcja tych ostatnich dotychczas nie była możliwa w oparciu o metody konwencjonalnej diagnostyki mikrobiologicznej. Metagenomika jest nową techniką polegającą na klonowaniu DNA pozyskiwanego bezpośrednio z naturalnych środowisk, w tym różnych lokalizacji anatomicznych w obrębie ludzkiego ciała i następnie sekwencjonowaniu ogromnych bibliotek genomowych. Metagenomika jest więc metodą analizy nie jednego genomu, ale puli genomów mikroorganizmów, stanowiących określony mikrobiom. Analizując poszczególne sekwencje z takiego „zbiorkowego” sekwencjonowania, można ocenić genetyczną różnorodność mikroorganizmów tworzących mikrobiom danej niszy ekologicznej. Technika ta obejmuje klonowanie, sekwencjonowanie i funkcjonalną analizę genetycznego materiału, izolowanego z różnych lokalizacji anatomicznych czy innych środowisk naturalnych. Zastosowana tu technika NGS jest doskonalsza od ograniczonego, tradycyjnego sekwencjonowania [102]. Dokładne poznanie składu mikrobiomu danej niszy ekologicznej wymaga zastosowania specyficznego podejścia analitycznego do wyekstrahowanego metagenomowego DNA. W tym celu najczęściej wykorzystuje się filogenetyczny marker w postaci genu rybosomalnego RNA małej podjednostki (16S i 18S SSU rRNA, odpowiednio dla organizmów prokariotycznych i eukariotycznych), który po amplifikacji w reakcji PCR podlega klonowaniu. Pozwala to otrzymać bibliotekę reprezentującą wszystkie mikroorganizmy obecne w analizowanej niszy ekologicznej. Ostatecznie, poszczególne sklonowane fragmenty DNA są sekwencjonowane i analizowane w oparciu o narzędzia bioinformatyczne. Bardziej szczegółowe opisy postępowania w ramach poszczególnych etapów analizy metagenomicznej zostały przedstawione w dalszej części tej pracy.

4.1. Przetwarzanie próbki

Sposoby i techniki przetwarzania próbek mykologicznych, w tym technika pobrania materiału biologicznego, warunki jego przechowywania i różne protokoły ekstrakcji DNA, mogą wpłynąć na wyniki eksperymentów (Ryc. 2). Badania porównawcze różnych technik przetwarzania próbek wskazują na różną ich skuteczność, co ma implikacje dla porównań krzyżowych opublikowanych dotychczas badań nad mykobiomami. Zalecane jest zamrażanie próbek w ciągu 12 godzin od pobrania, aby zapobiec przerostowi przez szybko



Ryc 2. Metodyka analizy mykobiomów i napotymane trudności na każdym z etapów

rosnące grzyby. Istotne jest również unikanie wielu cykli zamrażania i rozmrażania próbek, aczkolwiek pojedynczy cykl zamrożenia i rozmrożenia na ogół nie obniża różnorodności taksonomicznej mykobiomu [28,81]. Obecność w ekstrahowanym metagenomowym DNA zanieczyszczeń RNA pochodzących z obecnych w próbce innych mikroorganizmów, zmniejsza udział procentowy sekwencji grzybów z niektórych taksonów, szczególnie w próbkach kału, czego efektem mogą być błędy w ocenie liczebności mykobiomów [8]. Z kolei, w takich przypadkach ocena różnorodności taksonomicznej mykobiomu (jakościowa) jest na ogół możliwa do oszacowania [77].

Podczas ekstrakcji DNA grzybowego z próbek przeznaczonych do sekwencjonowania mykobiomów, gruba i oporna na działanie licznych czynników fizyko-chemicznych ściana komórkowa grzyba, bogata w glukany, chitynę, mannany i glikoproteiny, wymaga dodatkowych procedur wstępnej degradacji, które obejmują rozbijanie mechaniczne lub lizę enzymatyczną [8, 53, 55]. Warto zauważyć, że w wielu doniesieniach naukowych liza enzymatyczna stanowi alternatywną opcję zwiększenia wydajności ekstrakcji DNA [48,107]. Uważa się ponadto, że bardziej drastyczne metody mechanicznej dezintegracji komórek mają niższą skuteczność, prawdopodobnie z powodu częściowej degradacji materiału genetycznego [90]. Różne metody ekstrakcji DNA również znacząco wpływają na wydajność i jakość uzyskiwanego DNA genomowego grzybów, a wydajność izolacji mieszanin zawierających fenol i chloroform często przewyższa wydajność uzyskiwaną z wykorzystaniem dostępnych komercyjnie zestawów [40, 43, 71, 90]. Wspomniane straty

Warto zauważyć, że w wielu doniesieniach naukowych liza enzymatyczna stanowi alternatywną opcję zwiększenia wydajności ekstrakcji DNA [48,107]. Uważa się ponadto, że bardziej drastyczne metody mechanicznej dezintegracji komórek mają niższą skuteczność, prawdopodobnie z powodu częściowej degradacji materiału genetycznego [90]. Różne metody ekstrakcji DNA również znacząco wpływają na wydajność i jakość uzyskiwanego DNA genomowego grzybów, a wydajność izolacji mieszanin zawierających fenol i chloroform często przewyższa wydajność uzyskiwaną z wykorzystaniem dostępnych komercyjnie zestawów [40, 43, 71, 90]. Wspomniane straty

w stężeniu DNA obserwowane przy użyciu zestawów handlowych są prawdopodobnie związane z zastosowaniem oczyszczania na kolumnie krzemionkowej [90]. Dodatkowo, producenci zestawów do ekstrakcji DNA podają niespójne wyniki, co jest spowodowane tym, że testy wykonywane są z zastosowaniem różnych typów próbek [40, 107]. Chociaż metody ekstrakcji wpływają na ilość i jakość DNA, ostatecznie ich wpływ na skład i różnorodność mykobiomów wydaje się niewielki [55, 90]. Niemniej jednak ostatnie analizy laboratoryjne ekstrakcji DNA grzybowego z płwociny wykonane przez nasz zespół, wykazały bardziej wydajną amplifikację regionu ITS z próbek poddanych rozerwaniu mechanicznemu w porównaniu z lizą enzymatyczną. Zmienna wydajność amplifikacji została zaobserwowana pomimo efektywniejszej wydajności izolacji DNA w metodzie z zastosowaniem lizy enzymatycznej, co może sugerować lepsze uwalnianie materiału genetycznego z komórek grzyba w trakcie mechanicznej dezintegracji komórek (dane nieopublikowane). Metody ekstrakcji DNA w analizie mykobiomów są punktem krytycznym i muszą być opracowane rygorystyczne procedury, które będą następnie konsekwentnie i ostrożnie stosowane. Protokoły ekstrakcji DNA genomowego w analizie mykobiomów powinny być ponadto specyficzne dla rodzaju próbki. Istnieje zatem potrzeba standaryzowania metod w odniesieniu do konkretnego typu próbki [35, 40].

4.2. Sekwencjonowanie amplikonów

Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, technika sekwencjonowania wysokoprzepustowego (HTS, High-Throughput Sequencing) stosowana w badaniach mikrobiomu bakteryjnego nie może być bezkrytycznie przyjmowana w analizach mykobiomów [55, 80]. Autorzy cytowanych prac zwracają uwagę na istnienie szeregu pułapek i potencjalnych błędów wynikających ze stosowania techniki HTS i interpretacji uzyskanych wyników. Brak doświadczenia w praktycznym zastosowaniu tej techniki często prowadzi do zupełnie nowej interpretacji filogenetycznych zależności [79]. Z kolei wiadome jest, że sekwencjonowanie amplikonów jest ściśle uzależnione od dopasowania starterów do amplifikacji, istotne znaczenie ma więc staranne ich zaprojektowanie [16]. Kluczowe wytyczne doboru markerów do analizy mykobiomów obejmują ich rozdzielczość taksonomiczną, siłę dyskryminacyjną, wydajność amplifikacji i wielkość uzyskiwanego amplikonu [16]. Region ITS zlokalizowany pomiędzy genami kodującymi rybosomalny RNA został zaproponowany jako uniwersalny genetyczny „kod kreskowy grzybów”. Z uwagi na fakt, że zawiera on zmienne sekwencje o wysokim tempie ewolucji, które otoczone są przez wysoce konserwatywne regiony obejmujące geny rRNA, służące jako odpowiednie miejsca docelowe dla uniwersalnych star-

terów, region ten jest jednym z kluczowych w identyfikacji gatunkowej grzybów [39, 41, 43, 42, 46, 70, 80]. Region ITS zazwyczaj posiada długość 500–700 par zasad i składa się z dwóch podregionów, ITS1 i ITS2, które są oddzielone genem o wysoce zakonserwowanej sekwencji, kodującym 5,8S rRNA [72, 71, 99]. Chociaż startery ukierunkowane na ITS były używane od dziesięcioleci w kilku projektach analizy mykobiomów na dużą skalę, do tej pory nie zostało rozstrzygnięte, który fragment ITS1 czy ITS2 jest bardziej optymalny do tego typu analiz. Ostatnie odkrycia ukazały, że fragmenty ITS nie mają wystarczającej siły dyskryminacyjnej, aby precyzyjnie identyfikować gatunki za pomocą sekwencjonowania uzyskanych z ich wykorzystaniem amplikonów [5, 33, 100]. W oparciu o te obserwacje, Nilsson i wsp. [80] przedstawili listę starterów zalecanych do amplifikacji regionu ITS i specyficznych dla różnych taksonów grzybów, które mogą być użyteczne w technice HTS i w analizach mykobiomów. Badacze Ci zalecają amplifikowanie sekwencji podregionu ITS2 za pomocą zdegenerowanych starterów gITS7ngs i gITS4ngs, ze względu na ich wysoką siłę dyskryminacyjną w identyfikacji gatunkowej grzybów. Zalety identyfikacji opartej o podregion ITS2 obejmują przede wszystkim bardziej uniwersalne miejsca przyłączenia starterów i mniejszą zmienność długości amplikonu między gatunkami grzybów, co prowadzi do mniejszej liczby błędnych rozpoznań w porównaniu z identyfikacją opartą o sekwencje podregionu ITS1 [52, 80]. Co istotne, pomimo że wspomniany zestaw starterów (gITS7ngs i gITS4ngs) ma lepszą siłę dyskryminacyjną w identyfikacji gatunkowej grzybów, rozdzielczość taksonomiczna podregionu ITS2 nie została jeszcze precyzyjnie oceniona eksperymentalnie [100]. Przed powszechnym ich wykorzystaniem konieczne są dalsze badania potwierdzające skuteczność. Ostateczny konsensus co do metodologii analiz mykobiomów, tak jak ma to miejsce w przypadku sekwencjonowania 16S rRNA mikrobiomów bakteryjnych, nie został jak dotąd osiągnięty.

Istotnym elementem jest również uzyskanie w procesie amplifikacji produktu o pełnej zakładanej długości i sekwencji pozbawionej błędów odczytu. Etap ten obejmuje staranne rozważenie liczby cykli PCR i możliwe rozcieńczenie próbek DNA do określonego wystandaryzowanego stężenia [15, 29]. Genetycy wskazują również na konieczność zredukowania liczby powstających chimer i przypadkowych błędów w powielanych sekwencjach, które kumulują się w późniejszych cyklach amplifikacji [29]. Niezbędnym wydaje się włączenie do analizy odpowiednich kontroli negatywnych i tzw. pozorowanych społeczności, czyli kultur mieszanych. Pierwsza z wymienionych wskazuje na źródła potencjalnego zanieczyszczenia, druga pozwala na ocenę powstawania chimer i poprawności wnioskowania o operacyjnych jednostkach taksonomicznych [15, 79].

4.3. Sekwencjonowanie metagenomiczne

Alternatywnym podejściem do ukierunkowanego sekwencjonowania określonych amplikonów w badaniach mykobiomów jest zastosowanie sekwencjonowania metagenomicznego (Ryc. 2). Pociąga to za sobą sekwencjonowanie całego wyekstrahowanego DNA w danej próbce bez stosowania ukierunkowanej amplifikacji regionu ITS lub innych specyficznych sekwencji docelowych. W takim podejściu, analizie podlega całkowite DNA metagenomowe wyizolowane z komórek drobnoustrojów, jak też z komórek gospodarza obecnych w próbce pobranej z analizowanej niszy ekologicznej. Odczyty sekwencji są następnie przetwarzane i klasyfikowane względem referencyjnej bazy danych [87]. Analiza zwykle obejmuje również etap usuwania sekwencji DNA gospodarza, co jest elementem krytycznym ze względu na możliwość utraty znacznej części danych, jeżeli nie podjęto próby usunięcia komórek gospodarza przed ekstrakcją DNA [75]. Sekwencjonowanie metagenomiczne powinno zapewnić lepszą, obiektywną ocenę mykobiomu. Niemniej jednak dotychczasowe badania z wykorzystaniem tej metody ujawniają niską liczebność grzybów w porównaniu z badaniami mikrobiomów bakteryjnych pochodzących z różnych typów próbek [86]. Dodatkowo tego typu analizy są kosztowne, przede wszystkim z powodu konieczności przeprowadzania bardzo precyzyjnej analizy celem wykrycia grzybów w próbkach, w których zwykle dominują bakterie [87]. Obecnie wydaje się, że właśnie niska liczebność grzybów w próbkach do analiz mykobiomów utrudnia powszechne stosowanie metagenomiki w tego typu badaniach [77].

4.4. Wyzwania bioinformatyczne

Rozwój narzędzi do analizy sekwencji fragmentu ITS jest wciąż zgłębianym obszarem badań, aczkolwiek dostępnych jest wiele opcji umożliwiających identyfikację grzybów z wykorzystaniem sekwencji tego regionu [36]. W tej dziedzinie wciąż jednak brak zgodności co do przyjętych standardów, jak też nie wypracowano zasad dobrej praktyki laboratoryjnej, stąd dalsze badania normalizacyjne są zdecydowanie potrzebne (Ryc. 2). Ponadto, prawdopodobne jest, że wyniki identyfikacji uzyskiwane z analizy sekwencji fragmentu ITS w dużej mierze zależą od typu badanych próbek [93]. Na podobny problem zwraca się uwagę w przypadku analizy mikrobiomu bakteryjnego metodami ukierunkowanymi na analizę sekwencji genu 16S rRNA. W przypadku analizy mykobiomu, wysoka zmienność sekwencji regionu ITS, jeszcze bardziej komplikuje ten problem. Kolejną trudność w metagenomicznych analizach mykobiomów stanowią słabo rozwinięte bazy danych, na których opiera się identyfikacja grzybów.

Prowadzi to do uzyskiwania dużej liczby niezidentyfikowanych operacyjnych jednostek taksonomicznych [10,77]. Obecnie stosowane referencyjne bazy danych sekwencji ITS obejmują INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration), UNITE (<https://unite.ut.ee/>) i Warcup ITS [80].

W niektórych przypadkach dokładna identyfikacja na poziomie gatunku nie jest możliwa wyłącznie w oparciu o sekwencjonowanie regionów ITS [38, 39, 46]. Obecnie jednak nie są znane alternatywne markery molekularne, dla których uzyskuje się porównywalną zdolność rozdzielczą. Uważa się, że sekwencje ITS umożliwiają dokonanie identyfikacji grzybów do poziomu rodzaju, rodziny, rzędu i klasy, na podstawie stopnia podobieństwa sekwencji wynoszącego odpowiednio przynajmniej 94,3%, 88,5%, 81,2% i 80,9% [108]. Obecnie coraz większa dostępność sekwencjonowania trzeciej generacji stanowi obiecujące narzędzie analizy mykobiomów, ponieważ w genomach grzybów znajdują się długie odcinki powtarzalnego i niekodującego DNA, a także geny zawierające introny [77, 80]. W literaturze naukowej brakuje szerszych opracowań poświęconych metagenomice grzybów. Dwa kluczowe badania przeprowadzone przez Nash i wsp. [77] oraz Donovan i wsp. [31] stanowią jak dotąd najbardziej dogłębną ocenę metagenomicznej identyfikacji grzybów w próbkach ludzkich. Nash i wsp. [77] przeprowadzili obszerną ocenę wyników uzyskanych z analiz metagenomicznych, jak również uzyskanych z sekwencjonowania regionów ITS dla próbek pobranych z jelit w ramach projektu analizy ludzkiego mykobiomu. Co ważne, wykazano, że metody ekstrakcji DNA nie miały znaczącego wpływu na liczbę wykrywanych gatunków, potwierdzając małą liczebność grzybów w tych próbkach. Po drugie, wspomniani badacze wykazali, że startery swoiste dla podregionu ITS2 przejawiały większą zdolność rozdzielczą, umożliwiając identyfikację taksonów grzybów o małej liczebności w badanej próbce [77]. Z kolei Donovan i wsp. [31] przedstawili podstawy bioinformatycznej analizy metagenomów grzybów. W swojej pracy zaproponowali nowe rozwiązanie w postaci aplikacji „FindFungi”, która umożliwia wykrywanie fałszywie dodatnich wyników. Dodatkowym wyzwaniem operacyjnym i logistycznym, które pozostaje jednak nierozwiązane, jest implementacja tego narzędzia bioinformatycznego do analizy mykobiomów. Korzystanie z oprogramowania „FindFungi” wymaga bowiem komputerów o wysokiej wydajności obliczeniowej ze względu na konieczność przechowywania dużych genomowych baz danych w pamięci i ich szybkiego przeszukiwania. Alternatywnym rozwiązaniem tego problemu natury czysto technicznej byłoby zastosowanie sieci komputerów, która zapewniłaby szybki przekaz informacji między tak zwanymi punktami sieci.

5. Podsumowanie

Liczba prac naukowych poświęconych mikrobiomowi i skoncentrowanych na bakteriach znacznie przewyższa liczbę publikacji na temat mykobiomów. W dużej mierze przypisuje się to pionierskim wysiłkom zmierzającym do standaryzacji metodologii sekwencjonowania i analizy bakteryjnego genu 16S rRNA. Wystandaryzowana i niezawodna metoda sekwencjonowania fragmentu ITS w analizach mykobiomów w połączeniu z bardziej kompleksową bazą danych będącymi kluczowe znaczenie dla osiągnięcia podobnego poziomu wiarygodnych analiz, jak w badaniach mikrobiomów bakteryjnych. Ponadto, pomimo znanych interakcji między różnymi grupami drobnoustrojów, badania integrujące bakteriomy, mykobiomy, wiriomy i parazytomy wciąż są ograniczone. Interakcje między drobnoustrojami z różnych grup mogą skutkować zmianą funkcji i struktury mikrobiomu jako całości, co z kolei może odgrywać istotną rolę w patogenezie danej jednostki chorobowej. Wiele gatunków drobnoustrojów wchodzi również w interakcje z elementami układu odpornościowego gospodarza, prowadząc do ogólnoustrojowych objawów choroby, wykraczających poza początkowe miejsce dysbiozy.

Dla lepszego zrozumienia roli mykobiomu i jego znaczenia w patogenezie choroby, przyszłe badania powinny zostać ukierunkowane na ocenę interakcji między przedstawicielami różnych królestw drobnoustrojów, jak również ich oddziaływań z układem immunologicznym gospodarza. Jedno jest pewne, w złożonych i wzajemnie powiązanych systemach mikrobiologicznych mykobiom jest wyraźnie rozpoznawalnym komponentem, którego dysbioza może warunkować rozwój szeregu chorób. Niemniej jednak, jeśli wiedza na jego temat zostanie odpowiednio wykorzystana, kształtowanie jego struktury, czy też dbałość o utrzymanie jego pierwotnego fizjologicznego stanu może istotnie zmienić oblicze przyszłej medycyny.

Piśmiennictwo

1. Abarenkov K., Nilsson R.H. i wsp.: Annotating public fungal ITS sequences from the built environment according to the MIxS-Built Environment standard – A report from a May 23–24, 2016 workshop (Gothenburg, Sweden). *MycKeys* **16**, 1–15 (2016)
2. Acerbi E., Chénard C., Miller D., Gaultier N.E., Heinle C.E., Chang V.W.C., Uchida A., Drautz-Moses D.I., Schuster S.C., Lauro F.M.: Ecological succession of the microbial communities of an air-conditioning cooling coil in the tropics. *Indoor Air* **27**, 345–353 (2017)
3. Adams R.I., Bibby K. i wsp.: Ten questions concerning the microbiomes of buildings. *Build. Environ.* **109**, 224–234 (2016)
4. Adams R.I., Miletto M., Taylor J.W., Bruns T.D.: The diversity and distribution of fungi on residential surfaces. *PLoS One* **8**, e78866 (2013)
5. Ali N.A.B.M., Aogáin M. Mac, Morales R.F., Tiew P.Y., Chotirmall S.H.: Optimisation and benchmarking of targeted amplicon sequencing for mycobiome analysis of respiratory specimens. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019)
6. Alonso R., Fernández-Fernández A.M., Pisa D., Carrasco L.: Multiple sclerosis and mixed microbial infections. Direct identification of fungi and bacteria in nervous tissue. *Neurobiol. Dis.* **117**, 42–61 (2018)
7. Alonso R., Pisa D., Fernández-Fernández A.M., Carrasco L.: Infection of fungi and bacteria in brain tissue from elderly persons and patients with Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* **10**, 159 (2018)
8. Angebault C., Ghozlane A., Volant S., Botterel F., D'Enfert C., Bougnoux M.E.: Combined bacterial and fungal intestinal microbiota analyses: Impact of storage conditions and DNA extraction protocols. *PLoS One* **13**, e0201174 (2018)
9. Aogáin M. Mac, Chotirmall S.H. i wsp.: Immunological corollary of the pulmonary mycobiome in bronchiectasis: The CAMEB study. *Eur. Respir. J.* **52**, (2018)
10. Mac Aogáin M., Chaturvedi V., Chotirmall S.H.: GENOMES: the new 'home' for the publication of fungal genomes. *Mycopathologia* **184**, 551–554 (2019)
11. Arron S.T., Dimon M.T., Li Z., Johnson M.E., A. Wood T., Feeney L., G. Angeles J., Lafyatis R., Whitfield M.L.: High rhodotorula sequences in skin transcriptome of patients with diffuse systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2138–2145 (2014)
12. Auchtung T.A., Fofanova T.Y., Stewart C.J., Nash A.K., Wong M.C., Gesell J.R., Auchtung J.M., Ajami N.J., Petrosino J.F.: Investigating colonization of the healthy adult gastrointestinal tract by fungi. *mSphere* **3**, (2018)
13. Aykut B., Miller G. i wsp.: The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. *Nature* **574**, 264–267 (2019)
14. Bacher P., Scheffold A. i wsp.: Human anti-fungal Th17 immunity and pathology rely on cross-reactivity against *Candida albicans*. *Cell* **176**, 1340–1355.e15 (2019)
15. Bakker M.G.: A fungal mock community control for amplicon sequencing experiments. *Mol. Ecol. Resour.* **18**, 541–556 (2018)
16. Bokulich N.A., Mills D.A.: Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 2519–2526 (2013)
17. Bongomin F., Gago S., Oladele R.O., Denning D.W.: Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J. Fungi* **3**, (2017)
18. Botschuijver S., van den Wijngaard R.M. i wsp.: Intestinal fungal dysbiosis is associated with visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome and rats. *Gastroenterology* **153**, 1026–1039 (2017)
19. Botterel F., Angebault C., Cabaret O., Stressmann F.A., Costa J.M., Wallet F., Wallaert B., Bruce K., Delhaes L.: Fungal and bacterial diversity of airway microbiota in adults with cystic fibrosis: concordance between conventional methods and ultra-deep sequencing, and their practical use in the clinical laboratory. *Mycopathologia* **183**, 171–183 (2018)
20. Budden K.F., Hansbro P.M. i wsp.: Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease. *Lancet Respir. Med.* **7**, 907–920 (2019)
21. Casadevall A., Kontoyiannis D.P., Robert V.: On the emergence of candida auris: climate change, azoles, swamps, and birds. *MBio* **10**, e01397–19 (2019)
22. Chandrasekaran R., Mac Aogáin M., Chalmers J.D., Elborn S.J., Chotirmall S.H.: Geographic variation in the aetiology, epidemiology and microbiology of bronchiectasis. *BMC Pulm. Med.* **18**, 83 (2018)

23. Chehoud C., Albenberg L.G., Judge C., Hoffmann C., Grunberg S., Bittinger K., Baldassano R.N., Lewis J.D., Bushman F.D., Wu G.D.: Fungal signature in the gut microbiota of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 1948–1956 (2015)
24. Chin V.K., Yong V.C., Chong P.P., Amin Nordin S., Basir R., Abdullah M.: Mycobiome in the gut: a multiperspective review. *Mediators Inflamm.* **2020**, 9560684 (2020)
25. Cho I., Blaser M.J.: The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 260–270 (2012)
26. Coker O.O., Nakatsu G., Dai R.Z., Wu W.K.K., Wong S.H., Ng S.C., Chan F.K.L., Sung J.J.Y., Yu J.: Enteric fungal microbiota dysbiosis and ecological alterations in colorectal cancer. *Gut* **68**, 654–662 (2019)
27. Cui L., Ghedin E. i wsp.: Topographic diversity of the respiratory tract mycobiome and alteration in HIV and lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **191**, 932–942 (2015)
28. Cuthbertson L., Rogers G.B., Walker A.W., Oliver A., Hoffman L.R., Carroll M.P., Parkhill J., Bruce K.D., van der Gast C.J.: Implications of multiple freeze-thawing on respiratory samples for culture-independent analyses. *J. Cyst. Fibros.* **14**, 464–467 (2015)
29. D'Amore R., Ijaz U.Z., Schirmer M., Kenny J.G., Gregory R., Darby A.C., Shakya M., Podar M., Quince C., Hall N.: A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics* **17**, 55 (2016)
30. Dinan T.G., Cryan J.F.: The microbiome-gut-brain axis in health and disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **46**, 77–89 (2017)
31. Donovan P.D., Gonzalez G., Higgins D.G., Butler G., Ito K.: Identification of fungi in shotgun metagenomics datasets. *PLoS One* **13**, e0192898 (2018)
32. Dyląg M., Leniak E., Gnat S., Szepietowski J., Kozubowski L.: A case of anti-pityriasis vesicular therapy that preserves healthy mycobiome. *BMC Dermatol.* in press (2020)
33. De Filippis F., Laiola M., Blaiotta G., Ercolini D.: Different amplicon targets for sequencing-based studies of fungal diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e00905–17 (2017)
34. Forbes J.D., Bernstein C.N., Tremlett H., Van Domselaar G., Knox N.C.: A fungal world: Could the gut mycobiome be involved in neurological disease? *Front. Microbiol.* **10**, 3249 (2019)
35. Fredricks D.N., Smith C., Meier A.: Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5122–5128 (2005)
36. Gabaldón T., Vatanshenassan M. i wsp.: Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: From PCR to NGS. *FEMS Microbiol. Rev.* **43**, 517–547 (2019)
37. Garcia-Solache M.A., Casadevall A.: Global warming will bring new fungal diseases for mammals. *MBio* **1**, e00061–10 (2010)
38. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A.: Major challenges and perspectives in the diagnostics and treatment of dermatophyte infections. *J. Appl. Microbiol.* **129**, 212–232 (2020)
39. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyląg M., Osińska M., Sawicki M.: Detection and identification of dermatophytes based on currently available methods – a comparative study. *J. Appl. Microbiol.* **130**, 278–291 (2020)
40. Gnat S., Nowakiewicz A., Ziółkowska G., Trościańczyk A., Majer-Dziedzic B., Zięba P.: Evaluation of growth conditions and DNA extraction techniques used in the molecular analysis of dermatophytes. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 1368–1379 (2017)
41. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyląg M.: Unusual dermatomycoses caused by *Nannizzia nana*: the geophilic origin of human infections. *Infection* **48**, 429–434 (2020)
42. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyląg M.: Tinea corporis caused by *Trichophyton equinum* transmitted from asymptomatic dogs to two siblings. *Brazilian J. Microbiol.* **51**, 1433–1438 (2020)
43. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyląg M.: Molecular methods for diagnostics of dermatomycoses – review of available techniques and evaluation of their advantages and disadvantages in implementation for in routine use. *Postępy Mikrobiol. – Adv. Microbiol.* **58**, 483–494 (2019)
44. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Osińska M., Kopiński Ł.: Population differentiation, antifungal susceptibility, and host range of *Trichophyton mentagrophytes* isolates causing recalcitrant infections in humans and animals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **39**, 2099–2113 (2020)
45. Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Zięba P.: Host- and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. *J. Med. Microbiol.* **68**, 823–836 (2019)
46. Gnat S., Nowakiewicz A., Zięba P.: Taxonomy of dermatophytes – the classification systems may change but the identification problems remain the same. *Postępy Mikrobiol. – Adv. Microbiol.* **58**, 49–58 (2019)
47. Goldman D.L., Chen Z., Shankar V., Tyberg M., Vicencio A., Burk R.: Lower airway microbiota and mycobiota in children with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 808–811.e7 (2018)
48. Goldschmidt P., Degorge S., Merabet L., Chaumeil C.: Enzymatic treatment of specimens before DNA extraction directly influences molecular detection of infectious agents. *PLoS One* **9**, e94886 (2014)
49. Gu Y., Zhou G., Qin X., Huang S., Wang B., Cao H.: The potential role of gut mycobiome in irritable bowel syndrome. *Front. Microbiol.* **10**, 1894 (2019)
50. Gusareva E.S., Schuster S.C. i wsp.: Microbial communities in the tropical air ecosystem follow a precise diel cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 23299–23308 (2019)
51. Han S.H., Cheon H.I., Hur M.S., Kim M.J., Jung W.H., Lee Y.W., Choe Y.B., Ahn K.J.: Analysis of the skin mycobiome in adult patients with atopic dermatitis. *Exp. Dermatol.* **27**, 366–373 (2018)
52. Heisel T., Podgorski H., Staley C.M., Knights D., Sadowsky M.J., Gale C.A.: Complementary amplicon-based genomic approaches for the study of fungal communities in humans. *PLoS One* **10**, e0116705 (2015)
53. Henderson G., Cox F., Kittelmann S., Miri V.H., Zethof M., Noel S.J., Waghorn G.C., Janssen P.H.: Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PLoS One* **8**, e74787 (2013)
54. Hoarau G., Ghannoum M.A. i wsp.: Bacteriome and mycobiome interactions underscore microbial dysbiosis in familial Crohn's disease. *MBio* **7**, e01250–16 (2016)
55. Huseyin C.E., Rubio R.C., O'Sullivan O., Cotter P.D., Scallan P.D.: The fungal frontier: A comparative analysis of methods used in the study of the human gut mycobiome. *Front. Microbiol.* **8**, 1432 (2017)
56. Jagielski T., Rup E., Ziółkowska A., Roeske K., Macura A.B., Bielecki J.: Distribution of *Malassezia* species on the skin of patients with atopic dermatitis, psoriasis, and healthy volunteers assessed by conventional and molecular identification methods. *BMC Dermatol.* **14**, 3 (2014)
57. Jo J.H., Kennedy E.A., Kong H.H.: Topographical and physiological differences of the skin mycobiome in health and disease. *Virulence* **8**, 324–333 (2017)
58. Johansson H.J., Vallhov H., Holm T., Gehrman U., Andersson A., Johansson C., Blom H., Carroni M., Lehtiö J., Scheynius A.: Extracellular nanovesicles released from the commensal yeast *Malassezia sympodialis* are enriched in allergens and interact with cells in human skin. *Sci. Rep.* **8**, 9182 (2018)
59. Jovel J., O'keefe S., Patterson J., Bording-Jorgensen M., Wang W., Mason A.L., Warren K.G., Wong G.K.S.: Cerebrospinal fluid in

- a small cohort of patients with multiple sclerosis was generally free of microbial DNA. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**, 198 (2017)
60. Kalan L., Loesche M., Hodkinson B.P., Heilmann K., Ruthel G., Gardner S.E., Grice E.A.: Redefining the chronic-wound microbiome: Fungal communities are prevalent, dynamic, and associated with delayed healing. *MBio* **7**, e01058–16 (2016)
 61. Laurence M., Benito-León J., Calon F.: *Malassezia* and Parkinson's disease. *Front. Neurol.* **10**, 758 (2019)
 62. Lawani M.B., Morris A.: The respiratory microbiome of HIV-infected individuals. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **14**, 719–729 (2016)
 63. Li Q., Wang C., Tang C., He Q., Li N., Li J.: Dysbiosis of gut fungal microbiota is associated with mucosal inflammation in crohn's disease. *J. Clin. Gastroenterol.* **48**, 513–523 (2014)
 64. Liguori G., Sokol H. i wsp.: Fungal dysbiosis in mucosa-associated microbiota of Crohn's disease patients. *J. Crohn's Colitis* **10**, 296–305 (2016)
 65. Limon J.J., Skalski J.H., Underhill D.M.: Commensal fungi in health and disease. *Cell Host Microbe* **22**, 156–165 (2017)
 66. Limon J.J., Underhill D.M. i wsp.: *Malassezia* is associated with Crohn's disease and exacerbates colitis in mouse models. *Cell Host Microbe* **25**, 377–388.e6 (2019)
 67. LiPuma J.J.: The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 299–323 (2010)
 68. Luecke S., Backlund M., Jux B., Esser C., Krutmann J., Rannug A.: The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 828–833 (2010)
 69. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A.: Mechanisms of dermatophyte resistance to antifungal substances. *Postępy Mikrobiol. – Adv. Microbiol.* **59**, 153–165 (2020)
 70. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M.: Comparison of *in vitro* activities of 11 antifungal agents against *Trichophyton verrucosum* isolates associated with a variety of hosts and geographical origin. *Mycoses* **63**, 294–301 (2020)
 71. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Trościańczyk A., Zięba P.: In search of the source of dermatophytosis: Epidemiological analysis of *Trichophyton verrucosum* infection in llamas and the breeder (case report). *Zoonoses Public Health* **66**, 982–989 (2019)
 72. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Trościańczyk A., Zięba P.: Dermatophytosis with concurrent *Trichophyton verrucosum* and *T. benhamiae* in calves after long-term transport. *Vet. Dermatol.* **31**, 414–e111 (2020)
 73. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Zięba P.: The prevalence of symptomatic dermatophytoses in dogs and cats and the pathomechanism of dermatophyte infections. *Postępy Mikrobiol. – Adv. Microbiol.* **58**, 165–176 (2019)
 74. Malinowska M., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: The human microbiome. *Postępy Mikrobiol.* **56**, 33–42 (2017)
 75. Marotz C.A., Sanders J.G., Zuniga C., Zaramela L.S., Knight R., Zengler K.: Improving saliva shotgun metagenomics by chemical host DNA depletion. *Microbiome* **6**, 42 (2018)
 76. Mukhopadhyay I., Hansen R., Meharg C., Thomson J.M., Russell R.K., Berry S.H., El-Omar E.M., Hold G.L.: The fungal microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease. *Microbes Infect.* **17**, 304–310 (2015)
 77. Nash A.K., Petrosino J.F. i wsp.: The gut mycobiome of the human microbiome project healthy cohort. *Microbiome* **5**, 153 (2017)
 78. Nguyen L.D.N., Viscogliosi E., Delhaes L.: The lung mycobiome: An emerging field of the human respiratory microbiome. *Front. Microbiol.* **6**, 89 (2015)
 79. Nguyen N.H., Song Z., Bates S.T., Branco S., Tedersoo L., Menke J., Schilling J.S., Kennedy P.G.: FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecol.* **20**, 241–248 (2016)
 80. Nilsson R.H., Anslan S., Bahram M., Wurzbacher C., Baldrian P., Tedersoo L.: Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 95–109 (2019)
 81. Nilsson R.H., Abarenkov K. i wsp.: Taxonomic annotation of public fungal ITS sequences from the built environment – A report from an April 10–11, 2017 workshop (Aberdeen, UK). *MycKeys* **28**, 65–82 (2018)
 82. Park C.O., Kupper T.S. i wsp.: Staged development of long-lived T-cell receptor $\alpha\beta$ TH17 resident memory T-cell population to *Candida albicans* after skin infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* **142**, 647–662 (2018)
 83. Peay K.G., Kennedy P.G., Talbot J.M.: Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 434–447 (2016)
 84. Perlejewski K., Radkowski M. i wsp.: Metagenomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **935**, 89–98 (2016)
 85. Pisa D., Alonso R., Rábano A., Rodal I., Carrasco L.: Different brain regions are infected with fungi in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **5**, 15015 (2015)
 86. Qin J., Wang J. i wsp.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010)
 87. Quince C., Walker A.W., Simpson J.T., Loman N.J., Segata N.: Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat. Biotechnol.* **35**, 833–844 (2017)
 88. Richardson M., Bowyer P., Sabino R.: The human lung and *Aspergillus*: You are what you breathe in? *Med. Mycol.* **57**, S145–S154 (2019)
 89. Romani L.: Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 275–288 (2011)
 90. Rosenbaum J., Usyk M., Chen Z., Zolnik C.P., Jones H.E., Waldron L., Dowd J.B., Thorpe L.E., Burk R.D.: Evaluation of oral cavity DNA extraction methods on bacterial and fungal microbiota. *Sci. Rep.* **9**, 1531 (2019)
 91. Seo S.C., Ji Y.G., Yoo Y., Kwon M.H., Choung J.T.: Submicron fungal fragments as another indoor biocontaminant in elementary schools. *Environ. Sci. Process. Impacts* **17**, 1164–1172 (2015)
 92. Skalski J.H., Limon J.J., Sharma P., Gargus M.D., Nguyen C., Tang J., Coelho A.L., Hogaboam C.M., Crother T.R., Underhill D.M.: Expansion of commensal fungus *Walleimia melleicola* in the gastrointestinal mycobiota enhances the severity of allergic airway disease in mice. *PLoS Pathog.* **14**, e1007260 (2018)
 93. Soergel D.A.W., Dey N., Knight R., Brenner S.E.: Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. *ISME J.* **6**, 1440–1444 (2012)
 94. Sokol H., Beaugerie L. i wsp.: Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* **66**, 1039–1048 (2017)
 95. Sovran B., Sokol H. i wsp.: *Enterobacteriaceae* are essential for the modulation of colitis severity by fungi. *Microbiome* **6**, 152 (2018)
 96. Sparber F., LeibundGut-Landmann S. i wsp.: The skin commensal yeast *Malassezia* triggers a type 17 response that coordinates anti-fungal immunity and exacerbates skin inflammation. *Cell Host Microbe* **25**, 389–403.e6 (2019)
 97. Strati F., De Filippo C. i wsp.: New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome* **5**, 24 (2017)
 98. Straus D.C., Cooley J.D., Wong W.C., Jumper C.A.: Studies on the role of fungi in Sick Building Syndrome. *Arch. Environ. Health* **58**, 475–478 (2003)

99. Tedersoo L., Anslan S., Bahram M., Pölme S., Riit T., Liiv I., Kõljalg U., Kisand V., Nilsson R.H., Hildebrand F., Bork P., Abarenkov K.: Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in meta-barcoding analyses of fungi. *MycKeys* **10**, 1–43 (2015)
100. Tedersoo L., Lindahl B.: Fungal identification biases in microbiome projects. *Environ. Microbiol. Rep.* **8**, 774–779 (2016)
101. Thijsen A.Y., Jonkers D.M., Leue C., van der Veek P.P.J., Vidakovic-Vukic M., van Rood Y.R., Clemens C.H.M., Masclee A.A.M.: Dysfunctional cognitions, anxiety and depression in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Gastroenterol.* **44**, e236–e241 (2010)
102. Thomas T., Gilbert J., Meyer F.: Metagenomics – a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* **2**, 3 (2012)
103. Tiew P.Y., Mac Aogain M., Ali N.A.B.M., Thng K.X., Goh K., Lau K.J.X., Chotirmall S.H.: The Mycobiome in health and disease: emerging concepts, methodologies and challenges. *Mycopathologia* **185**, 207–231 (2020)
104. Tipton L., Ghedin E., Morris A.: The lung mycobiome in the next-generation sequencing era. *Virulence* **8**, 334–341 (2017)
105. Tipton L., Müller C.L., Kurtz Z.D., Huang L., Kleerup E., Morris A., Bonneau R., Ghedin E.: Fungi stabilize connectivity in the lung and skin microbial ecosystems. *Microbiome* **6**, 12 (2018)
106. Tong X., Leung M.H.Y., Wilkins D., Lee P.K.H.: City-scale distribution and dispersal routes of mycobiome in residences. *Microbiome* **5**, 131 (2017)
107. Vesty A., Biswas K., Taylor M.W., Gear K., Douglas R.G.: Evaluating the impact of DNA extraction method on the representation of human oral bacterial and fungal communities. *PLoS One* **12**, e0169877 (2017)
108. Vu D., Groenewald M., Verkley G.J.M. i wsp.: Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Stud. Mycol.* **92**, 135–154 (2019)
109. Vučetić S.B., Rudić O.L., Markov S.L., Bera O.J., Vidaković A.M., Skapin A.S.S., Ranogajec J.G.: Antifungal efficiency assessment of the TiO₂ coating on façade paints. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 11228–11237 (2014)
110. Ward T.L., Dominguez-Bello M.G., Heisel T., Al-Ghalith G., Knights D., Gale C.A.: Development of the human mycobiome over the first month of life and across body sites. *mSystems* **3**, (2018)
111. Wheeler M.L., Iliiev I.D. i wsp.: Immunological consequences of intestinal fungal dysbiosis. *Cell Host Microbe* **19**, 865–873 (2016)
112. Wheeler M.L., Limon J.J., Underhill D.M.: Immunity to commensal fungi: detente and disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **12**, 359–385 (2017)
113. Yan D., Issa N., Afifi L., Jeon C., Chang H.W., Liao W.: The role of the skin and gut microbiome in psoriatic disease. *Curr. Dermatol. Rep.* **6**, 94–103 (2017)