

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Studijní program: Mikrobiologie



MUDr. Jakub Hurych

Střevní mikrobiom a jeho změny ve vztahu k léčbě chronických onemocnění

Gut microbiome and its changes related to therapy of chronic diseases

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Ondřej Cinek, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20.2.2024

Jakub Hurych

Poděkování

Ně největší poděkování ze všech patří mému školiteli, prof. Ondřeji Cinkovi, za pečlivé vedení mého postgraduálního studia, obětavý přístup při řešení všemožných problémů spojených s výzkumnou činností, ceně rady všeho druhu a v neposlední řadě za důvěru při plnohodnotném zapojení do celé řady rozsáhlých výzkumných projektů, včetně četných mezinárodních spoluprací.

Obrovský dík patří také kolektivu Laboratoře molekulární genetiky Ústavu lékařské mikrobiologie 2.LF UK a FN Motol, jmenovitě pak zejména Mgr. Lucii Hlinákové, Mgr. Kláře Hubáčkové a Mgr. Kateřině Poláčkové za pomoc s laboratorními pracemi.

Dále bych rád poděkoval prof. Danielovi Agardhovi z Centra klinických studií Lundské univerzity ve Švédsku za zajištění zahraniční výzkumné stáže, která obohatila moje postgraduální studium.

Na závěr bych rád poděkoval své manželce Elišce za obětavou podporu během celé doby studia a pochopení.

Dizertační práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (č. grantu 16619), Agentury pro zdravotnický výzkum MZ ČR (č. grantu 19-01-00127), Národního ústavu virologie a bakteriologie – Program EXCELES (č. projektu LX22NPO5103; financováno Evropskou unií - Next Generation EU), akce COST CA21105, podporovaná organizací COST (Evropská spolupráce ve vědě) a projektu HEDIMED, *European Union's Horizon 2020 research and innovation programme* (č. grantové smlouvy 874864).

Abstrakt

Práce se zabývá reakcí střevního mikrobiomu na terapeutické intervence ve třech longitudinálních studiích u chronických onemocnění gastrointestinálního traktu: Crohnovy choroby, celiakální autoimunity a syndromu dráždivého tračníku. K tomu byly využity četné metody mikrobiomové analýzy stolice (zejména masivně paralelní sekvenování 16S rDNA či 18S rDNA a metagenomické sekvenování) s následnou bionformatickou a statistickou analýzou. U Crohnovy choroby jsme detekovali dosud nepopsanou sekundární povahu změn střevního bakteriomu po léčbě anti-TNF. U celiakální autoimunity, kde byl v předchozích pracích popsán efekt intervence probiotik na serologické markery nemoci, střevní bakteriom i metabolom, jsme popsali absenci významných změn na prospěšné střevní prvky. U syndromu dráždivého tračníku jsme po podání čtyř dávek transplantace směsné mikrobioty pozorovali významnou reakci bakteriomu, avšak bez odpovědi na redukci klinických obtíží. Výsledky studií by mohly přispět k lepšímu poznání role střevního mikrobiomu v patogenezi těchto závažných onemocnění.

Klíčová slova: mikrobiom, Crohnova choroba, celiakie, syndrom dráždivého tračníku

Abstract

This work examines the response of the gut microbiome to therapeutic interventions in three longitudinal studies of chronic gastrointestinal diseases: Crohn's disease, celiac autoimmunity and irritable bowel syndrome. Multiple methods of stool microbiome analysis (especially massively parallel 16S rDNA or 18S rDNA sequencing and metagenomic sequencing) followed by bioinformatic and statistical analysis were used. In Crohn's disease, we detected a previously undescribed secondary nature of changes in the gut bacteriome after anti-TNF treatment. In celiac disease autoimmunity, where previous works described an effect of probiotic intervention on serological markers of the disease, the gut bacteriome and metabolome, we described the absence of significant changes in beneficial gut protozoa. In irritable bowel syndrome, we observed a significant response of the bacteriome after administering four doses of mixed microbiota transplantation but no response in the reduction of clinical symptoms. The results of these studies could contribute to a better understanding of the gut microbiome's role in the pathogenesis of these serious diseases.

Keywords: microbiome, Crohn's disease, celiac disease, irritable bowel syndrome

Seznam zkratek

IBD	Nespecifické střevní záněty (z ang. <i>Inflammatory Bowel Diseases</i>)
CD	Crohnova nemoc (z ang. <i>Crohn's Disease</i>)
SCFA	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (z ang. <i>short-chain fatty acids</i>)
IL	Interleukin
Anti-TNF	Protilátky proti cytokinu TNF α
IBS	Syndrom dráždivého tračníku (z ang. <i>Irritable Bowel Syndrome</i>)
FMT	Fekální mikrobiální transplantace
CeD	Celiakie (z ang. <i>Celiac Disease</i>)
CDA	Celiakální autoimunita (z ang. <i>Celiac Disease Autoimmunity</i>)

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Literární přehled	8
2.1 Úvod do problematiky mikrobiomu	8
2.2 Střevní mikrobiom a jeho změny ve vztahu k léčbě dětí s CD.....	26
2.3 Střevní mikrobiom ve vztahu k léčbě u dětí s CDA.....	33
2.4 Střevní mikrobiom ve vztahu k léčbě IBS.....	39
3. Úvod k publikacím, které jsou součástí práce	48
4. Diskuze.....	54
4.1 Střevní mikrobiom a jeho změny při léčbě anti-TNF u CD	54
4.2 Střevní mikrobiom ve vztahu k intervenčnímu podávání probiotik u dětí s CDA	59
4.3 Střevní mikrobiom ve vztahu k léčbě IBS pomocí FMT.....	63
5. Závěr	69
6. Použitá literatura.....	70
7. Přílohy.....	94

1. Úvod

Jednou z nejvíce zkoumaných oblastí současné mikrobiologie je studium lidského mikrobiomu. Ten je tvořen mj. asi 40 biliony bakterií, přičemž nejvíce osídleným orgánem je tlusté střevo, a tak není divu, že právě střevní mikrobiom je nejvíce zkoumanou složkou mikrobiomu člověka. Avšak kultivační metody, tvořící jinak základ klinicko-mikrobiologické diagnostiky, selhávají v poročení a kvantitativní charakteristice mikrobů ve stolici, jelikož většina střevních bakterií je obtížně kultivovatelná nebo nekultivovatelná. Nicméně díky metodám sekvenování nové generace jsme dnes schopni vyšetřovat bakteriální složku mikrobiomu velmi efektivními metodikami profilování 16S rDNA nebo metagenomického sekvenování. Takto byly v poslední dekádě získány nové a mnohdy překvapující znalosti spojující střevní mikrobiom s četnými primárně neinfekčními onemocněními, čímž se lékařská mikrobiologie začala pomalu dostávat do nové dimenze své působnosti.

Stále však v této problematice zůstává mnoho nejasných aspektů. Ač existuje mnoho průřezových studií popisující rozdíly mezi případy a kontrolami u jednotlivých nemocí, stále málo studií se zaměřuje na longitudinální sledování změn mikrobiomu po terapeutické intervenci. Ty mohou mnohem lépe posloužit k lepšímu pochopení patogeneze nemocí a ev. modulaci samotné terapie. Cílem této práce proto bylo zaměřit se na reakce střevního mikrobiomu na terapii pomocí longitudinálního sledování u celkem tří chronických střevních onemocnění: Crohnovy choroby (CD), celiakie (CeD) a syndromu dráždivého tračníku (IBS).

- 1) U dětí s CD byly studovány změny bakteriomu asociované s biologickou léčbou inhibitory TNF α v multicentrické prospektivní observační studii na pěti dětských gastroenterologických oddělení (FN Motol, Fakultní Thomayerova nemocnice, FN Plzeň, FN Olomouc, KN Zlín).
- 2) U dětí s celiakální autoimunitou byl vyšetřován jednobuněčný střevní parazitom v kontextu celého mikrobiomu. Dělo se tak u pacientů zařazených do randomizované dvojité zaslepené klinické studie s intervencí probiotik organizované Centrem klinických studií Lundské univerzity ve Švédsku.
- 3) U nemocných s IBS jsme podobným způsobem sledovali fekální mikrobiom před a po fekální mikrobiální terapii (FMT), která byla testována jako léčebná strategie v randomizované dvojité zaslepené intervenční klinické studii řešené ve spolupráci s Interním oddělením a Centrem výživy Fakultní Thomayerovy nemocnice.

2. Literární přehled

2.1 Úvod do problematiky mikrobiomu

2.1.1 Mikrobiom a holobiont

Na spojení mikroorganismů a člověka bylo ještě donedávna nahlíženo čistě z pohledu patogenů způsobujících infekční nemoci. Díky vyšší dostupnosti metod nezávislých na kultivaci, zejména sekvenování nové generace, jsme začali být schopni objevovat novou dimenzi vztahu člověka a mikroorganismů, a objevovat nejen původce infekcí, ale i mikroby obývající lidský habitat, které tvoří **lidský mikrobiom**. Společně s lidskými buňkami, tkáněmi a orgány pak mikrobiom každého člověka vytváří lidský holobiont, nebo také superorganismus, kde se všechny složky vzájemně ovlivňují.

Nejvíce osídleným mikrobiomem lidského holobiontu je v tlustém střevě. Jeho dysbióza, tedy nerovnováha ve složení a funkci střevních mikrobů, je spojována s celou řadou onemocnění od gastroenterologických až po neurologická, respirační, metabolická, jaterní a kardiovaskulární. V současné době se velké úsilí soustřeďuje na zkoumání potenciální příčinné souvislosti onemocnění se změnami mikrobiomu za realizace nových terapeutických a preventivních strategií. To bylo i předmětem této dizertační práce, která, jak zmíněno v úvodu, se zaměřila na změny střevního mikrobiomu při terapeutických intervencích u třech chronických, primárně neinfekčních onemocnění gastrointestinálního traktu.

2.1.2 Definice a terminologie

Mikrobiom je dnes chápán zejména ve svém holistickém, tedy ekologickém i genomickém významu, jako charakteristická mikrobiální komunita, která obývá určitý racionálně vymezený habitat s typickými fyzikálními a chemickými podmínkami (Berg et al., 2020); představuje dynamický a interaktivní mikro-ekosystém podléhající změnám v čase, je propojen s makro-ekosystémy včetně eukaryotických hostitelů, pro jejichž tělesné funkce a zdraví je potřebný nebo dokonce nezbytný. Vůbec první definici slova mikrobiom použili již v roce 1988 Whipps a kol., kteří se zabývali ekologií rhizosférických mikroorganismů. Mikrobiom popsali jako kombinaci slov "mikro" a "biom" a označili ho jako "charakteristické mikrobiální společenství v přiměřeně dobře definovaném prostředí, které má definované fyzikálně-chemické vlastnosti a své pole působnosti (Whipps, 1988)." To zahrnuje celé spektrum molekul produkovaných mikroorganismy, včetně jejich strukturních prvků (nukleové kyseliny, proteiny, lipidy, polysacharidy), metabolitů (signální molekuly, toxiny,

organické a anorganické molekuly) a molekul produkovaných koexistujícími hostiteli a strukturované okolními podmínkami prostředí. Proto by měly všechny mobilní genetické elementy, jako jsou fágy, viry, "reliktní" a extracelulární DNA, být zahrnuty do pojmu mikrobiom zároveň však nejsou součástí mikrobioty. Definice základních termínů jsou shrnuty v **Tabulce 1**.

Tabulka 1. Základní terminologie mikrobiomové vědy (Berg et al., 2020)

Mikrobiom (holistická definice)	Charakteristická mikrobiální komunita, která obývá určitý racionálně vymezený habitat s typickými fyzikálními a chemickými podmínkami; představuje dynamický a interaktivní ekosystém podléhající změnám v čase, je propojen s makro-ekosystémy včetně eukaryotických hostitelů, pro jejichž tělesné funkce a zdraví je potřebný nebo dokonce nezbytný.
Mikrobiota	Soubor jednotlivých živých mikroorganismů tvořících mikrobiom.
Metagenom	Kolektivní genom, tj. soubor mikrobiálních genomů daného mikrobiomu.
Metatranskriptom	Souhrn všech v určitém okamžiku přítomných RNA vzniklých transkripcí z funkčních, aktuálně transkribovaných genů mikrobioty daného mikrobiomu.
Metaproteom	Soubor proteinů, přítomných v rámci daného mikrobiomu.
Mikrobiální metabolom	Soubor metabolitů, nacházejících se v daném mikrobiomu.

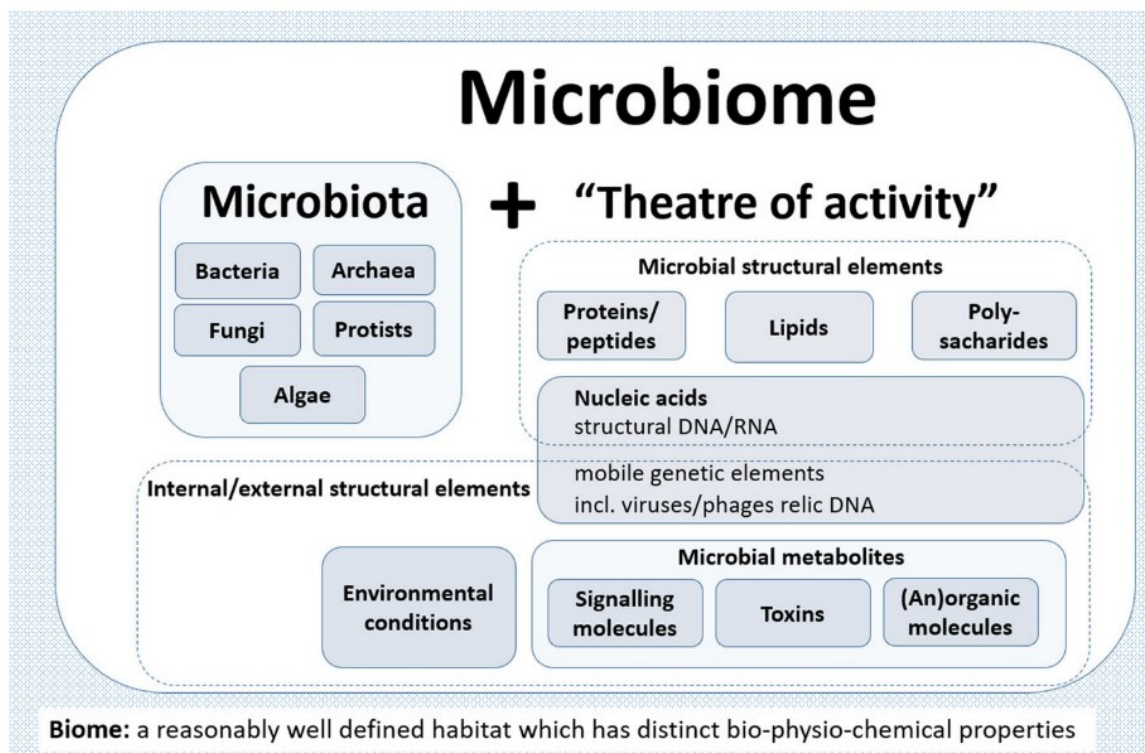
Ještě nedávno se však mikrobiom definoval, a často se stále definuje, dvojitým způsobem: ekologicky a geneticky. Ekologická definice ho chápala jako společenství komenzálních, symbiotických a patologických mikroorganismů a jejich působků v rámci lidského těla nebo jiného ekosystému (Lederberg, 2001); podobně genetická definice ho chápala jako kolektivní genom všech mikroorganismů v daném prostředí, tedy lidského těla nebo jiného ekosystému. Dnes se však kolektivní genom mikrobiomu označuje termínem **metagenom** (Marchesi & Ravel, 2015).

Soubor jednotlivých živých mikroorganismů (bakterií, archea, hub a jednobuněčných prvoků) obývajících určité prostředí, tedy například lidský mikrobiom, se označuje jako **mikrobiota** (Marchesi & Ravel, 2015). Tento termín slouží jako obecné označení pro celkový součet jednotlivých mikroorganismů v mikrobiomu, bez ohledu na jejich vzájemné vztahy a vlivy

prostředí. Pojem mikrobiota explicitně nahrazuje zastaralý, avšak stále běžně užívaný výraz „mikroflóra.“ Ten vznikl historicky jako opozice k pojmu „makrofauna“ v době, kdy bylo potřeba symbolicky oddělit živočichy, včetně člověka, od mikrobů, kteří kolem něj žijí. S ohledem na rostoucí důležitost ekologicky orientovaného výzkumu v oblasti mikrobiomů se považují konotace spojené s termínem „flóra“, který má botanický původ, za nevhodné a neodborné (Marchesi & Ravel, 2015). Protože fágy, viry, plazmidy, priony, viroidy a volná DNA obvykle nejsou považovány za živé mikroorganismy, nepatří tedy do mikrobioty, avšak spoluvytváří mikrobiom.

Budeme-li se držet centrálního dogmatu molekulární biologie (DNA → RNA → proteiny) po metagenomu následuje **metatranskriptom**, který představuje "souhrn všech v určitém okamžiku přítomných RNA vzniklých transkripcí z funkčních, aktuálně transkribovaných genů mikrobioty. Jeho výsledkem je pak **metaproteom**, tedy soubor proteinů přítomných v rámci daného mikrobiomu. Na závěr této sekvence je **metabolom**, který zkoumá mikrobiální metabolity. Nevýhodou studia metabolitů je, že v prostředí sdíleném různými mikroorganismy a ovlivněném metabolickou činností makroorganismu nelze, na rozdíl od analýzy proteinů a nukleových kyselin, účinně nebo dokonce vůbec stanovit konkrétního producenta metabolitů s nízkou molekulovou hmotností.

Termín mikrobiom tedy dnes chápeme jako termín nadřazený, který zahrnuje nejen v něm zapojené mikroorganismy, ale také jejich pole působnosti, ve kterém se formují specifické ekologické niky (Berg et al., 2020). Tyto niky pak představují mikrobiomy jednotlivých orgánových systémů – tedy mikrobiom střevní, kožní, vaginální či plicní. Vzhledem k tématu dizertační práce se další text zabývá pouze mikrobiomem střevním.



Obr. 1 Shrnutí termínů tvořící mikrobiom podle holistické definice, s laskavým svolením autorky (Berg et al., 2020)

2.1.3. Metody studia mikrobiomu

Mikrobiom lze popsat v jeho celkovém holistickém přístupu. Metody, které tak činí odpovídají na tři základní otázky: 1) „Kdo je v daném mikrobiomu přítomen?“ (mikrobiota, analyzovaná buď konvenčně kultivačními metodami, profilováním 16S rDNA i metagenomicky); 2) „Co umí dělat?“ (metagenomika) a 3) „Co dělá právě teď?“ (metatranskriptom, metaproteom a mikrobiální metabolom).

Kultivační techniky

V běžné praxi klinicko-mikrobiologické laboratoře spoléhá analýza vzorků stolice na kultivační techniky. Ty mají zásadní omezení, jelikož až 80 % bakteriálních druhů nalezených molekulárními metodami v lidském střevě nebylo kultivováno nebo dokonce ani nelze kultivovat (Turnbaugh et al., 2007). Dnes se však objevují metody spojující obohacenou kultivaci doplněnou profilováním 16S rDNA, které umožňují významně zvýšit podíl zachycených agens s přesnou identifikací (Lau et al., 2016).

Soubor mikrobů, které lze prokázat kultivačními technikami, pak označujeme jako **kulturom**. Normální kulturom stolice pak, v běžné praxi stále označován jako “běžná střevní flóra“, může zahrnovat při standardní kultivaci při 37°C v aerobních podmínkách nálezy enterobakterií (zejm. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) či enterokoků (*Enterococcus faecalis* či *E. avium* a další). Vyšetření v anaerobních podmínkách nabízí již větší paletu detekovatelných agens zahrnující grampozitivní koky (*Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Finegoldia magna*), grampozitivní tyčinky (*Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*), gramnegativní koky (*Veilonella*) a zejména gramnegativní tyčinky (*Bacteroides*, *Prevotella*).

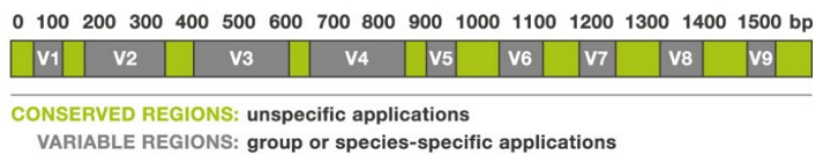
Sekvenační metody

Obecným problémem výše zmíněných kultivačních technik je nižší senzitivita oproti metodám sekvenace DNA. Ta vzniká v rámci preanalytické fáze (zejm. přerůstání aerobními bakteriemi po odběru), i analytické fáze (detekční možnosti omezené na kultivovatelné agens). Tím jsou možnosti detekce všech mikrobů ze stolice z pochopitelných důvodů omezené, avšak pro potřeby diagnostiky původců střevních infekcí dostačující.

Oproti tomu u metod využívající sekvenování DNA jsou odběr vzorku, jeho transport i samotná analýza navrženy tak, aby se docílilo detekce ideálně všech mikrobů ve vzorku. Nejvíce využívanými přístupy jsou profilování 16S rDNA a metagenomika. Masivně paralelní sekvenování ampliconů 16S rDNA poskytuje informace o taxonomickém složení rychle a za relativně nízkou cenu, – mnohdy však s omezenou přesností a hloubkou identifikace. Oproti tomu metagenomické sekvenování nás informuje nejen o přítomnosti jednotlivých taxonů, ale také o metabolickém potenciálu mikrobiomu. Nevýhodou jsou vyšší náklady a požadavky na pokročilé výpočetní analýzy (Wensel et al., 2022).

Profilování 16S rDNA. Tento přístup používá primery zacílené na specifickou oblast genu pro bakteriální 16S rRNA. Tento gen je dlouhý okolo 1550 bází a střídají se v něm jak konzervativní úseky, tak devět hypervariabilních úseků (V1-V9). Pro profilování bakteriomu z lidských stolic se nejvíce využívají úseky V3, V4 či celý úsek oblastí V3-V4. Konzervativní úseky slouží jako vazebná místa pro primery, kdežto unikátní sekvence hypervariabilních úseků umožňují identifikaci bakterie. Jedná se o dnes osvědčenou, rychlou a nákladově efektivní metodu pro získání pohledu na mikrobiom. Tento přístup se dobře osvědčil u vzorků

kontaminovaných lidskou DNA, jako jsou např. vzorky tkání, a vzorky s nízkým obsahem mikrobů. Mezi možné zdroje zkreslení při sekvenování 16S rDNA patří výběr variabilních oblastí, velikost ampliconů (Walker et al., 2015) a počet cyklů PCR (Bonnet et al., 2002). Vzorky s nízkým obsahem mikrobů jsou obzvláště náchylné ke zkreslení způsobenému nadměrnou amplifikací – s rostoucím počtem cyklů PCR dochází ke stále většímu nadměrnému zastoupení kontaminujících mikroorganismů (Walters et al., 2011). Optimalizace primerů může pomoci zmírnit zkreslení, ale to vyžaduje znalost složení mikrobiomu již předem, aby bylo možné posoudit taxonomické rozlišení a pokrytí cílového studovaného mikrobiomu (Walters et al., 2011). Nicméně i s dobře optimalizovanými primery je taxonomické rozlišení často omezeno na úroveň rodu (Knight et al., 2018).



Obr. 2 Gen pro 16S rRNA (Yarza et al., 2014)

Metagenomika je metoda sekvenování všech genomů ve vzorku a poskytuje podrobnější genomické informace a taxonomické rozlišení než samotné sekvenování PCR ampliconu 16S rDNA. Příprava a analýza vzorků je však nákladnější a technicky náročnější. Tato metoda zachycuje veškerou DNA přítomnou ve vzorku, včetně virové a eukaryotické DNA. Při odpovídající hloubce sekvenování (počet sekvenačních čtení na vzorek) lze dosáhnout taxonomického rozlišení na úrovni druhů nebo až kmenů bakterií (Scholz et al., 2016) a sestavení celých mikrobiálních genomů z krátkých čtení sekvencí DNA (Mukherjee et al., 2017), avšak anotace funkčních genů de novo není v těchto podmínkách možná. Metagenomické sekvenování profiluje funkční kapacitu celého mikrobiomu na úrovni genů (Abubucker et al., 2012). Zkreslení, která jsou vnášena konstrukcí knihovny, sestavováním a referenčními databázemi pro anotaci, jsou však méně pochopena než zkreslení, která existují v dobře charakterizovaných přístupech k profilování 16S rDNA (Knight et al., 2018).

Metatranskriptomika využívá sekvenování RNA k profilování transkriptomu v mikrobiomech a poskytuje informace o genové expresi a aktivním funkčním výstupu mikrobiomu. Sekvenování RNA identifikuje pouze geny, které jsou v době odběru vzorku aktivně transkribovány, tj. informuje o jejich funkčním profilu (Wensel et al., 2022).

Důležitým aspektem této metody je možná kontaminace hostitelskou RNA, zejména vysoce hojnou rRNA, navíc RNA je náchylnější k degradaci, což vyžaduje speciální zacházení preanalyticky i při zpracování vzorku. Navzdory technickým obtížím mohou metatranskriptomická data nabídnout jedinečné poznatky; transkriptomy se na úrovni jedince liší více než metagenomy (Franzosa et al., 2014) a metatranskriptomika může odhalit reakci mikrobiomu na externí faktory jako třeba expozici xenobiotikům (Maurice et al., 2013).

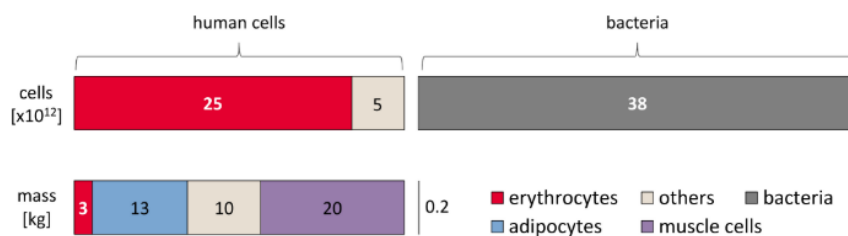
Metabolomika

Metabolom stolice podává specifické informace o metabolické souhře mezi člověkem, jeho stravou a střevní mikrobiotou (Marcobal et al., 2013) a doplňuje přístupy založené na sekvenování tím, že poskytuje funkční údaje o mikrobiomu – tedy nejen informace o složení, funkční kapacitě, ale i skutečných produktech studovaného ekosystému.

V oblasti studia střevního metabolomu se využívá nukleární magnetická rezonance (MRI) či plynové chromatografie spojené s hmotností spektrometrií. Metody se liší zpracování vzorku (MRI nevyžaduje derivatizaci, tedy umožňuje analýzu molekul bez předchozích úprav), a schopnosti pracovat s nekonvenčními vzorky dané svým složením, jako je právě stolice.

2.1.4 Střevní mikrobiom se zaměřením na bakteriom

Jak již bylo zmíněno, většina mikroorganismů lidského holobiontu se nachází ve střevech a vytváří tak střevní mikrobiom (Lynch & Pedersen, 2016). Jeho zdaleka nejprobádanější složkou je bakteriální kompartment nazývaný jako **bakteriom**. Tvoří ho asi 38 bilionů bakterií, jejichž společná genetická výbava čítá 2 miliony genů, tedy 1,3 více buněk a až 100x více genů než představuje samotný lidský organismus (Sender et al., 2016). Nutno dodat, že ohromující čísla nevyovídají o všem: 1) 83% lidských buněk jsou bezjaderné erytrocyty specializované jen na transport kyslíku a 2) geny bakterií jsou sice velmi odlišné a kumulativně tak násobně převyšují počet těch lidských, avšak funkčně jsou produkty jejich exprese varianty s velmi podobnou funkcí.



Obr. 3 Kvantitativní rozdíly mezi lidskými a bakteriálními buňkami (Sender et al., 2016)

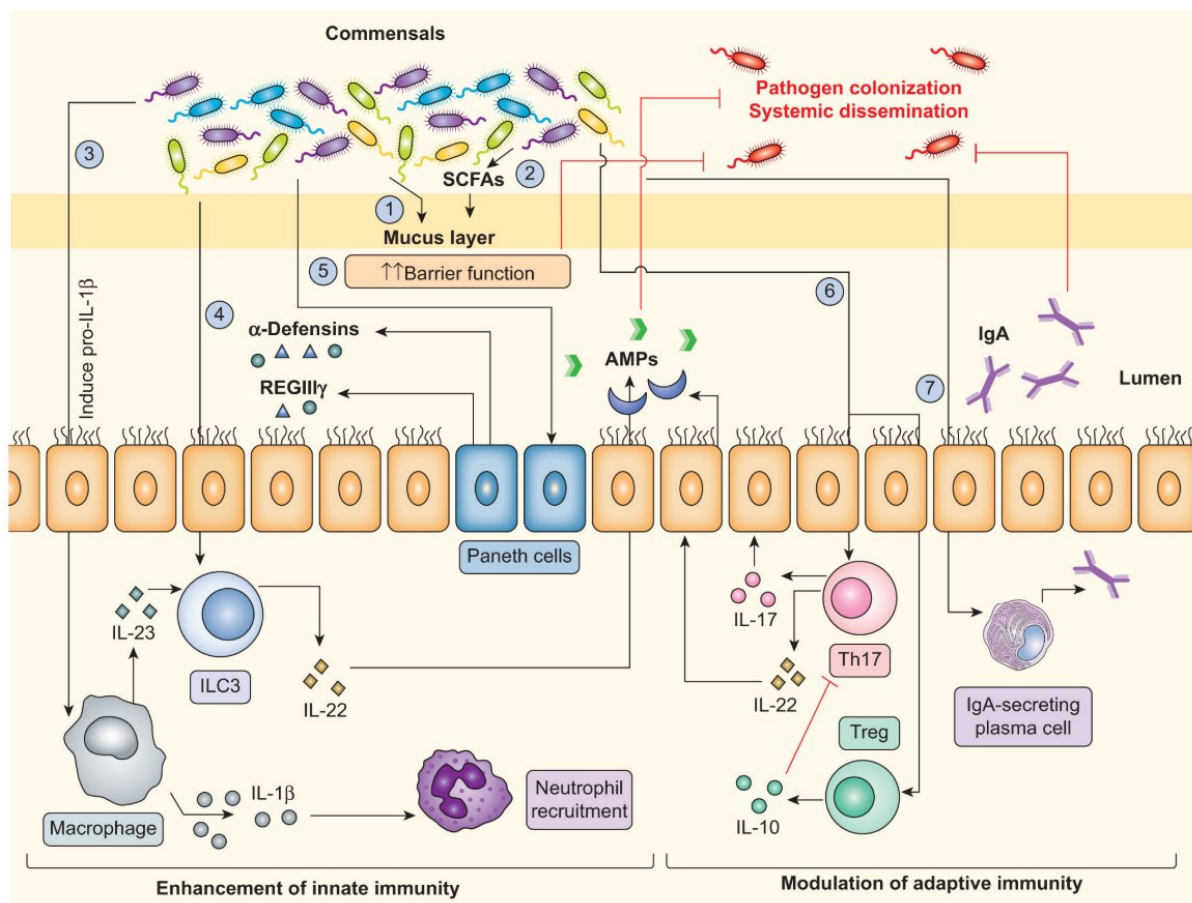
Klíčové funkce střevního mikrobiomu

Funkcí mikrobiomu je mnoho, vzhledem k tématu dizertační práce je prostor věnován zejména metabolickým funkcím a poté přímé a nepřímé obraně před střevními patogeny. Jednou z nejvýznamnějších funkcí je bohatá metabolická výbava, která je srovnatelná s játry a střevní sliznicí. Významně se tak podílí na trávení živin (Nicholson et al., 2012), a to díky enzymům, které nejsou kódovány lidským genomem, jako jsou ty sloužící k rozkladu polysacharidů, polyfenolů a syntéze vitaminů (K, B1, B5, B6 a B9). Střevní mikrobi také fermentují vlákninu za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem (ang. short-chain fatty acids, SCFA), zahrnující acetát, propionát a zejména pak butyrát. SCFA hrají klíčovou roli v udržování střevního zdraví tím, že vyživují enterocyty, přes tight-junctions udržují integritu střevní stěny a vykazují protizánětlivé účinky (Ramakrishna, 2013). Význam hraje střevní mikrobiota i v metabolismu xenobiotik (Buffie & Pamer, 2013).

Dále se střevní mikrobiota podílí na přímé ochraně před střevními patogeny pomocí několika mechanismů, které shrnují ve svém nyní již devět let starém přehledu Sassone-Corsi a

Raffatellu (Sassone-Corsi & Raffatellu, 2015). Jsou sníženy možnosti adheze patogenů, omezení zdrojů uhlíku a železa před patogeny, sekrece antimikrobiálních látek (bakteriociny a mikrocinny) a přímý přenos toxinů přes sekreční systémy typu 6 (T6SS).

Další funkcí mikrobioty je i nepřímý podíl na obraně proti patogenům (Sassone-Corsi & Raffatellu, 2015). (1) Prvním z nich je bariérová funkce daná čistou přítomností bakterií. (2) Významná je i produkce SCFA střevními anaeroby, která pomáhá udržet integritu střevní stěny a tím sekundárně brání před exogenními mikroby. (3) Komenzální bakterie stimulují zpracování a sekreci IL-1 β , což vede k atrahování neutrofilů do místa infekce. (4) Některé komezály (např. *Lactobacillus reuteri*) indukují sekreci IL-22 vrozenými lymfoidními buňkami (ILC), které mohou následně chránit před některými patogeny prostřednictvím indukce uvolňování antimikrobiálních látek epiteliálními buňkami. (5) Sekrece antimikrobiálních proteinů (AMP), včetně α -defensinů a REG3 γ , je klíčovou součástí kontroly růstu patogenů a je částečně zprostředkována mechanismy závislými na komezálech. (6) Komezály mohou podporovat adaptivní imunitu indukci diferenciací T buněk, například stimulací diferenciací a aktivací Th17 a Treg buněk. (7) Komezály mohou usnadnit správné fungování slizniční bariéry tím, že indukují B buňky a regulují sekreci IgA. Viz **Obr. 4**.



Obr. 4 Nepřímé mechanismy obrany proti patogenům (Sassone-Corsi & Raffatellu, 2015)

Komplexní funkce mikrobioty zahrnují i ovlivňování vzdálených orgánů, mimo střevní trakt; chová se totiž jako endokrinní orgán, ovlivňuje regulaci sytosti, náladu člověka a jeho chování - vzájemná interakce mezi střevním mikrobiomem a mozkem se pak nazývá "osa střev-mozek" (Lynch & Pedersen, 2016).

Ontogenetický vývoj střevního mikrobiomu

Zda jsou lidský plod a prostředí *in utero* ve zdravém těhotenství sterilní či osídlené mikroby, zůstává stále předmětem diskusí. Existují studie, které popisují přítomné bakterie v placentách zdravých matek (Aagaard et al., 2014), plodové vodě předčasně narozených dětí (DiGiulio et al., 2010), i ve smolce (Gosalbes et al., 2013). Nicméně, zjištěné nálezy jsou velmi pravděpodobně důsledkem kontaminace během odběru vzorků plodu nebo během extrakce DNA a sekvenování DNA, jelikož se v těchto studiích pracovalo se vzorky s velmi nízkou mikrobiální náloží (Kennedy et al., 2023). Kromě toho existence živých a replikujících se mikrobiálních populací ve zdravých tkáních plodu není slučitelná se základními koncepty

imunologie a klinické mikrobiologie. To vede vědeckou komunitu k závěru, že normální lidský plod by se stále měl považovat za sterilní.

Způsob porodu významně ovlivňuje časnou postnatální mikrobiální expozici a tím i první kolonizaci střeva (Backhed et al., 2015; Dominguez-Bello et al., 2010). Novorozenci rození *per vias naturales* tak mají střevní mikrobiom podobný tomu vaginálnímu, tedy tvořený převážně laktobacily, ti rození cestou *sectio caesarea* mají střevní mikrobiom podobný tomu kožnímu (Backhed et al., 2015). V kojeneckém věku se pak složení střevní mikrobiomu mění, začíná se podobat dospělému, a to v souvislosti s ukončením kojení a nikoli se zavedením tuhé stravy, jak by se nabízelo (Backhed et al., 2015). Během prvních postnatálních let se zvyšuje bakteriální diverzita a funkční kapacita mikrobiomu (Martens et al., 2008).

Rychlé tempo zvyšování bakteriální diverzity, které je pozorováno v kojeneckém věku, se v raném dětství zpomaluje (Cheng et al., 2016) a diverzita zůstává u dětí nižší než u dospělých (Cheng et al., 2016). V dětství se složení střevního bakteriomu stává stabilnějším, přičemž se v něm prosazuje více zástupců kmene Bacteroidetes, včetně těch produkující butyrát (Cheng et al., 2016). Dětský mikrobiom postupně dozrává do struktury podobné dospělému do věku 3 let (Yatsunencko et al., 2012), nicméně teprve v mladším školním věku (7 až 12 let) je počet bakteriálních taxonů a funkčních genů podobný jako v dospělosti (Hollister et al., 2015), ač věkově diferencované mikrobiomy jsou taxonomicky a funkčně odlišné. U starších školních dětí a dorostu (13-18 let) je střevní mikrobiom oproti dospělému ještě obohacen o *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* a Lachnospiraceae a o dráhy podílející se na tvorbě vitamínu B12 a biosyntéze folátu (Hollister et al., 2015).

U zdravého dospělého člověka se pak střevní bakteriom skládá z pěti převažujících kmenů (phyl) bakterií: (1) Firmicutes (60 až 80 % celkové složení), zahrnující třídy jako Clostridia, Bacilli a Negativicutes, (2) Bacteroidetes (20 až 40 %) zahrnující Flavobacteria, Bacteroidia, Sphingobacteria a Cytophagia, (3) Verrucomicrobia zahrnující zejména rod *Akkermansia*, (4) Actinobacteria zahrnující zejm. rod *Bifidobacterium* a (5) v menší míře Proteobacteria zahrnující čeleď Enterobacteriaceae (Donaldson et al., 2016). Z dalších organismů pak nacházíme metanogenní archea (především *Methanobrevibacter smithii*), z eukaryot převážně kvasinky a střevní prvoky (viz 2.1.5). Na taxonomické úrovni kmene je střevní mikrobiom u

dospělých stabilní (pokud se nepodávají antibiotika), ale konkrétní mikrobiální druhy a jejich zastoupení se u jednotlivých zdravých osob velmi liší, čímž se vytváří jedinečné složení střevního mikrobiomu každého člověka (Yatsunenka et al., 2012). Navzdory této taxonomické inter-individuální variabilitě je funkční kapacita střevního mikrobiomu dospělého člověka u zdravých osob relativně konzistentní (Human Microbiome Project, 2012; Qin et al., 2010).

Fylogenetický vývoj střevního mikrobiomu

Ve složení střevního mikrobiomu je dlouhodobě pozorován úbytek diverzity i zastoupení předků dnešních mikrobů (tzv. ancestrálních mikrobů), a to u velké části světové populace (Finlay et al., 2021). Důvody globálního snížení mikrobiální diverzity popisují komplexnější a explicitnější hypotézy (Scudellari, 2017; Stiemsma et al., 2015) navazující na původní hygienickou hypotézu D. P. Strachana (Strachan, 1989), které jako důvody uvádí zvýšenou urbanizaci, nadměrné užívání antibiotik a dalších léků, postupy a trendy v porodnictví a péči o kojence (vyšší podíl císařských řezů, vyšší užívání umělé kojenecké výživy), zintenzivnění hygienických návyků, globálně sníženou pestrost stravy (zejména klesající příjem vlákniny a zvýšené konzumace zpracovaných potravin) a rozšířené užívání tabáku, alkoholu a dalších drog (Bokulich et al., 2016; Le Bastard et al., 2018; Sessitsch et al., 2023; Sonnenburg & Sonnenburg, 2019).

V průběhu generací se snižuje přenos mikrobů z prostředí na člověka, a naopak se zvyšují ztráty mikrobů v lidském mikrobiomu. To může vést až k vymírání ancestrálních mikrobů a jejich trvalé ztrátě z mikrobiomového fondu. Tento dlouhodobý úbytek, o kterém poprvé referovali Blaser a Falkow (Blaser & Falkow, 2009) a nezávisle na nich i Rook (Rook et al., 2017), je znám jako **hypotéza mizející mikrobioty**. Snížená mikrobiální expozice a s ní spojený nárůst chronického zánětu jsou spojovány s rostoucím výskytem chronických onemocnění, včetně obezity, diabetu, astmatu a četných autoimunitních a imunitně podmíněných onemocnění (Buford, 2017). Podobně negativní efekt má konzumace antibiotik v raném dětství (Stiemsma et al., 2015), pravděpodobně ovlivněním rovnováhy získávání a ztráty mikrobů. Naopak, expozice venkovskému prostředí a hospodářským zvířatům byla popsána jako protektivní před rozvojem alergie (Illi et al., 2012).

Ovlivnění střevního mikrobiomu

Střevní mikrobiom ovlivňují mnohé faktory, jak endogenní tak exogenní (Falony et al., 2016; Zhernakova et al., 2016). Vzhledem k záměru dizertační práce však budou shrnuty jen základní informace, konkrétní vliv jednotlivých faktorů na složení střevního mikrobiomu u nemocí, které jsou tématem dizertační práce je pak detailně rozebrán v příslušných podkapitolách (2.2.-2.4.).

Mezi hlavní faktory ovlivňující složení střevního mikrobiomu člověka patří způsob porodu (Backhed et al., 2015), ač postupně vyprchává se zráním mikrobioty (Roswall et al., 2021), dále pak genetické predispozice (Goodrich et al., 2014), vlastnosti imunitního systému jedince (Wang et al., 2015), způsob stravování (včetně doplňků stravy, kojení a užívání umělé kojenecké výživy) (David et al., 2014), užívání antibiotik a dalších léků (Cho et al., 2012; Maurice et al., 2013), prodělané infekce (Hsiao et al., 2014), cirkadiální rytmus (Thaiss et al., 2014) a expozice environmentálním mikrobům (Fujimura et al., 2014), z nichž některé jsou prokázány jako rizikové faktory pro dětské nemoci, jako jsou autoimunitní onemocnění (Belkaid & Hand, 2014), alergie (Johnson et al., 2005) či obezita (Yallapragada et al., 2015). Relativní vliv těchto faktorů na složení a funkci lidského střevního mikrobiomu a přetrvávání těchto účinků se však značně liší.

Dysbióza střevního mikrobiomu

Základní, avšak stále nezodpovězenou otázkou v mikrobiomové vědě zůstává, jaké složení střevního mikrobiomu lze považovat za zdravé či alespoň normální. Zdá se, že odpověď na otázku „co je to zdravý mikrobiom“ je stále prostá: nevíme. Aktuální konsenzus mikrobiomové vědy proto zavádí termín **eubióza**, který se nejvíce blíže pojmu "zdravého mikrobiomu". Eubiózu lze považovat za rovnovážné složení střevního mikrobiomu mající příznivé účinky pro celý lidský holobiont. Celkově lze předpokládat, že eubiotický mikrobiom se vyznačuje vysokou diverzitou bakteriálních taxonů, vysokým genovým bohatstvím mikrobů a stabilním funkčním jádrem mikrobiomu.

Velké posuny v poměru mezi pěti převládajícími kmeny bakterií střevní mikrobioty nebo vzestup určitých bakteriálních skupin znamenají nerovnováhu spojenou s onemocněním, označovanou jako **dysbióza**. Hlavními znaky dysbiózy jsou snížení mikrobiální diverzity a nárůst gramnegativních proteobakterií (Weiss & Hennet, 2017). Dále je obvykle dysbióza charakterizována zvýšenou střevní permeabilitou (Weiss & Hennet, 2017). Za fyziologických

podmínek jsou produkty patogenních bakterií odstraněny působením lymfocytů Th1 a Th17, avšak velké množství invadujících bakterií působí nadměrnou aktivaci Toll-like receptorů (TLR), což vede k nadměrné expresi prozánětlivých cytokinů s následným poškozením epitelu a chronickému zánětu (jako třeba u Crohnovy choroby, viz 2.2.1.) (Karczewski et al., 2014).

Zatímco dysbiotický střevní mikrobiom může být charakteristickým znakem několika zánětlivých onemocnění, dysbióza sama o sobě může být spouštěčem narušení rovnováhy střevní homeostázy a rozvoje zánětu (Karczewski et al., 2014), jako třeba u novorozenecké nekrotizující enterokolitidy, nebo infekčního průjmu vyvolaného *Clostridioides difficile* (Weiss & Hennet, 2017). Je tedy otázkou, zda i u dalších onemocnění spojených s dysbiózou, jako jsou zánětlivá střevní onemocnění, autoimunitní onemocnění (celiakie, diabetes mellitus 1. typu), alergie, obezita, metabolická onemocnění či neurologické poruchy je dysbióza pouhým příznakem nebo naopak aktivním spouštěčem onemocnění.

2.1.5 Další složky střevního mikrobiomu mimo bakteriom

Nejen bakterie tvoří lidský mikrobiom, další složkou tohoto pestrého ekosystému jsou i viry, archea a eukaryota, jako jsou houby a prvoci.

Lidský virom tvoří 10^{13} - 10^{14} tzv. *virus-like particles* (VLP) (Liang & Bushman, 2021; Shkoporov & Hill, 2019), přičemž nejvíce se jich nachází v trávicím traktu a většina z nich jsou bakteriofágy (Shkoporov & Hill, 2019). Většina známých střevních fágů v lidském střevě jsou DNA viry, avšak pouze 56% střevního viromu bylo možné anotovat na úrovni čeledí a nižších taxonomických úrovní (Nayfach et al., 2021; Shkoporov & Hill, 2019), zbytek se označuje jako tzv. „temná hmota.“ Právě studiem této temné hmoty byl objeven i vůbec nejvíce zastoupený virus v lidském mikrobiomu, kterým je skupina dsDNA virů známá jako crAssphage (z ang. Cross-Assembly odkazující na způsob jeho objevu (Yutin et al., 2021)). CrAssphage je zastoupen přibližně v polovině lidských střevních metagenomů a v některých z nich tvoří až 90 % sekvenčních čtení (Yutin et al., 2021). Sekvence genomu crAssphage byly zjištěny v lidských střevních metagenomech z různých geografických lokalit, což ukazuje, že crAssphage je nejen nejhojnějším virem v lidských střevních mikrobiomech, ale je také široce rozšířen napříč lidskou populací (Dutilh et al., 2014; Edwards et al., 2019; Shkoporov & Hill, 2019). Podobně jako u bakteriomu, jsou i změny střevního viromu asociovány s průběhem

řady onemocnění, včetně IBD, infekce *Clostridioides difficile* (CDI), obezity, diabetu 1. typu, infekce SARS-CoV-2, jaterních onemocnění, kolorektálního karcinomu, a také podvýživy (Cao et al., 2022). Navíc terapeutická úprava střevního viromu ukázala velký potenciál v podobě transplantace fekálního viromu (FVT) a fágové terapie (Duan et al., 2019; Ott et al., 2017; Zuo et al., 2018), které se ukázaly jako vysoce účinné při léčbě střevní dysbiózy vyvolané antibiotiky (Draper et al., 2020), rekurentní klostridiové kolitidy (rCDI) (Ott et al., 2017), obezity (Rasmussen et al., 2020) a bakteriálních infekčních onemocnění (Cepko et al., 2020; Galtier et al., 2017).

Ačkoli většina archaeí je považována za extrémofily žijící v drsném prostředí, byly identifikovány i u lidí na kůži, v ústní dutině a ve střevě a tvoří tak **lidský archeom**. Jejich zastoupení se individuálně významně liší – tzv. nosiči mohou mít až 2% mikrobiomu tvořeného archaeí, nenosiči pak jen 0,02% (Moissl-Eichinger et al., 2018). Ve střevě se jedná především o metanogenní archaea, ze kterých nejvíce zastoupeným druhem je *Methanobrevibacter smithii* z řádu Methanobacteriales, tvořící až 96% střevního archeomu (Dridi et al., 2009). Ve srovnání se zdravými jedinci se metanogenní archea jeví jako nadměrně zastoupená u pacientů s IBD (Blais Lecours et al., 2014), fenotypu IBS s převažující zácpou (tzv. IBS-C) (Ghoshal et al., 2016), parodontálním onemocněním (Lepp et al., 2004), obezitou, nádorovými onemocněními (Cai et al., 2022) a divertikulózou (Guindo et al., 2020). Naopak jiné studie naznačují, že metanogenní archea mohou mít i prospěšnou roli tím, že snižují produkci pro lidský organismus nebezpečných kyslíkových radikálů a trimethylaminoxidu (Brugere et al., 2014).

Lidský mykobiom představuje další menší složku mikrobioty, a opět jeho největší část se nachází ve střevě, kde tvoří asi 1 % složení střevní mikrobioty (Nash et al., 2017). I dysbióza v jeho složení byla asociována s celou řadou nemocí, jak autoimunitních, metabolických, neurologických či nádorových (Zhang et al., 2022). Zejména kandidy sofistikovaně ovlivňují složení a funkci střevního bakteriomu, a to prostřednictvím buněčného kontaktu, kompeticí o dostupné živiny, produkcí sekundárních metabolitů a antimikrobiálních peptidů v rámci střevního mikrobiomu (Peleg et al., 2010). Ve zdravém střevě je složení mykobiomu představováno zejména rody *Candida*, *Saccharomyces* a *Cladosporium* (Nash et al., 2017). Zvýšené zastoupení rodu *Candida* je inverzně korelováno s vysokou bakteriální diverzitou a

je opakovaně pozorováno u obezity či IBD (Garcia-Gamboa et al., 2021; Sokol et al., 2017; Ventin-Holmberg et al., 2021).

Z eukaryotických organismů pak nelze opomenout komenzální střevní prvky tvořící **střevní parazitom**. Tím nejvýznamnějším je *Blastocystis*, anaerobní jednobuněčný a vysoce polymorfní organismus s mnoha formami, který je nejvíce zastoupeným jednobuněčným eukaryotickým organismem ve střevech dospělých (Clark et al., 2013) i u dětí (Cinek et al., 2021). Víceru autorů navrhuje *Blastocystis* jako marker eubiotického střevního mikrobiomu (Andersen et al., 2015; Rostami et al., 2017; Tito et al., 2019). *Blastocystis* se přenáší především fekálně-orální cestou, a i proto se více vyskytuje v rozvojových zemích s nižšími hygienickými standardy, kde se prevalence pohybuje mezi 40 % a 84 % (Mohammad et al., 2017; Oliveira-Arbex et al., 2018; Poulsen et al., 2016), ve srovnání s vysokopříjmovými zeměmi Evropy a USA, kde se pohybuje mezi 7 % a 56 % (Bart et al., 2013; El Safadi et al., 2016; Lhotska et al., 2020; Scanlan et al., 2016; Scanlan et al., 2014; Stensvold & Clark, 2016; Tito et al., 2019; Wawrzyniak et al., 2013). V kontinentální Evropě se pohybuje kolem 20-30 % (Francie 18 %, Nizozemsko 24 %, Česko 24 %, Belgie 30 %) (Bart et al., 2013; El Safadi et al., 2016; Lhotska et al., 2020; Tito et al., 2019) a překvapivě vyšší prevalence 56 % byla zaznamenána v Irsku (Scanlan et al., 2014). Na druhé straně dvě studie z venkovské populace Nigérie (Poulsen et al., 2016) a Senegalu (El Safadi et al., 2014) uvádějí velmi vysokou prevalenci 84 %, resp. 100 %. Podobně byla v neprivilegovaných oblastech Malajsie a Brazílie hlášena také vyšší prevalence, a to 41 %, resp. 47 % (Mohammad et al., 2017; Oliveira-Arbex et al., 2018). Nutno dodat, že publikované práce o prevalenci *Blastocystis* dokumentující velké rozdíly v prevalenci se liší v metodologii detekce prvoka; víc viz literární přehled na toto téma v **Tabulce 2**.

Mezi zástupci rodu *Blastocystis* bylo identifikováno 26 genetických subtypů (ST) (Maloney et al., 2020), které se liší svými biologickými vlastnostmi. Z těchto podtypů jsou ST 1-17 všeobecně uznávány jako platné, zatímco ostatní mohou zahrnovat artefakty molekulární detekce (Stensvold & Clark, 2020) a nebyly proto uznány. Z deseti podtypů vyskytujících se u lidí jsou nejrozšířenější ST1 až ST4 (Alfellani et al., 2013; Cinek et al., 2021), z nichž ST3 je celosvětově nejrozšířenější, (Stensvold & Clark, 2016) a ST4 se vyskytuje pouze v Evropě. Vzhledem k navrženému spojení *Blastocystis* se zdravým střevním ekosystémem tak není překvapivé, že roste počet vědeckých článků na téma prevalence, distribuce subtypů a

souvislosti se složením bakteriomu u gastrointestinálních onemocnění. Nejčastějšími onemocněním trávicího traktu, se kterými je *Blastocystis* spojována, jsou dvě chronická neinfekční onemocnění: IBD (Andersen et al., 2015; Tito et al., 2019) (viz 2.2) a IBS (Rostami et al., 2017). Výsledky studií se však liší v závislosti na studované populaci, strategii odběru vzorků, metodách detekce a subtypizaci, a co je také důležité, zaměřují se pouze na dospělou populaci.

Dalším častým prvokem lidského střeva je *Dientamoeba fragilis*, bičíkatá trichomonáda, kterou obklopují spory o tom, zda je spíše patogenem, nebo benigním střevním mikroorganismem (Jirku et al., 2022; Jokelainen et al., 2017; Stark et al., 2016). Její prevalence se pohybuje mezi 0,4 % a 71 % v závislosti na studované kohortě a použitých metodách (Barratt et al., 2011; Jirku et al., 2022; Stensvold, Arendrup, Molbak, et al., 2007; Windsor & Johnson, 1999). Je zajímavé, že na rozdíl od *Blastocystis* je její prevalence nižší v zemích s nízkými příjmy (Ogren et al., 2016; Oliveira-Arbex et al., 2021) a vyšší v zemích s vysokými příjmy, (Barry et al., 2013; Stensvold, Arendrup, Molbak, et al., 2007).

Tabulka 2. Literární přehled o prevalenci *Blastocystis* dokumentující velké pozorovatelné rozdíly.

Autor, rok	Místo	Populace *	Vzorky	Metody detekce	Hlavní zjištění
Bart, 2013	Nizozemsko	Dospělí	Stolice (n=442)	Mikroskopie a qPCR zaměřená na gen 18S rRNA	Prevalence 24,2 %.
El Safadi, 2016	Francie	Děti a dospělí	Stolice (n=788)	qPCR zaměřená na gen 18S rRNA	Prevalence 18,1 % Výrazně vyšší v létě (23,2 %) než v zimě (13,7 %).
Tito, 2019	Belgie	Dospělí **	Stolice (n=616)	Sekvenování genu 18S SSU rRNA	Prevalence 30 % Analyzovali také pacienty s IBD - prevalence byla pouze 4 %. Tato subanalýza není zahrnuta do této tabulky.
Scanlan, 2016	USA (Colorado)	Dospělí a děti	Stolice (n=139)	Sekvenování genu 18S SSU rRNA	Prevalence pouze 7 %.
Scanlan, 2014	Irsko	Dospělí	Stolice (n=105)	qPCR zaměřená na gen 18S rRNA	Prevalence 56 %
Lhotská, 2020	Česko	Dospělí	Stolice (n=288)	qPCR zaměřená na gen 18S rRNA	Prevalence 24 %
El Safadi, 2014	Senegal	Děti	Stolice (n=93)	qPCR zaměřená na gen 18S rRNA	Prevalence 100 %
Poulsen, 2016	Nigérie	Děti	Stolice (n=199)	qPCR zaměřená na gen 18S rRNA	Prevalence 84 %, s věkem se zvyšuje
Mohammad, 2017	Malajsie	Děti a dospělí	Stolice (n=253)	Kultivace v Jonesově médiu	Prevalence 40,7 %
Oliveira-Arbex, 2017	Brazílie	Děti a dospělí	Stolice (n=161) ***	qPCR zaměřená na gen 18S rRNA	Prevalence 47,2 % (děti: 40,7 %, pracovníci: 28,6 %, členové domácnosti: 50 %).

* Zdravá populace bez diagnózy onemocnění trávicího traktu. ** Flemish Gut Flora Project (FGFP), kohorta západní populace (pouze dospělí)

*** Z 161 celkem: 123 dětí ve školkách; 14 pracovníků ve školkách, 44 členové domácnosti

2.2 Střevní mikrobiom a jeho změny ve vztahu k léčbě dětí s CD

2.2.1 Úvod

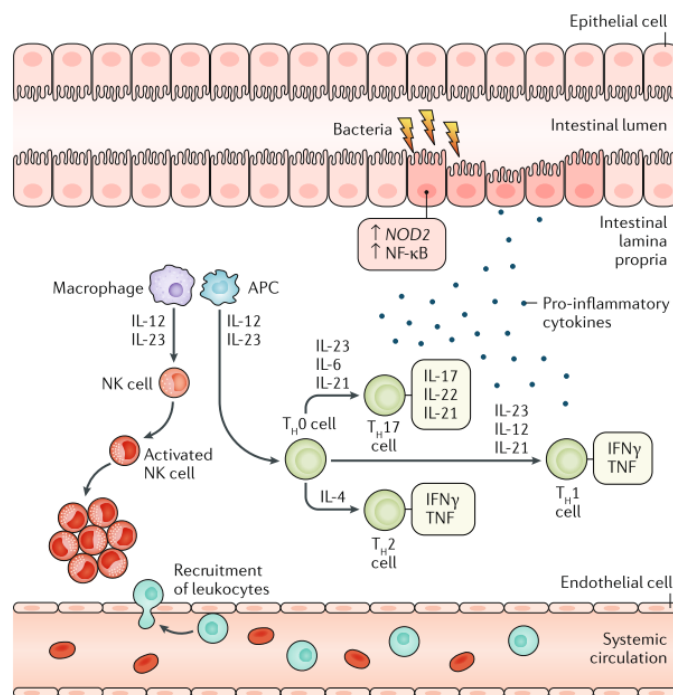
Crohnova choroba (CD) je chronické zánětlivé neinfekční onemocnění postihující primárně gastrointestinální trakt. Je charakterizováno přítomností segmentálního granulomatózního transmurálního zánětu střevní stěny v jakémkoliv úseku trávicí trubice, nejčastěji však oblasti terminálního ilea. Dle novějšího pohledu se jedná o jeden pól IBD (Torres et al., 2017), kde pólem druhým je ulcerózní kolitida, charakteristická kontinuálním zánětlivým postižením omezeným pouze na sliznici tlustého střeva, kdy je postiženo rektum a různě dlouhý úsek směrem orálně. CD postihuje jak děti, zpravidla v pubertálním věku, tak mladé dospělé mezi 20. a 30. rokem života. Hlavním projevem jsou recidivující průjmy, často s příměsí krve či hlenu, s kolikovitými bolestmi břicha, hubnutí a u dětí pak neprospívání a růstová retardace. Střídají se periody remisí a relapsů zánětu, onemocnění je velice bolestivé a vysilující a negativně ovlivňuje správný růst a vývoj dítěte.

Prevalence IBD se od roku 2000 alarmujícím způsobem zvyšuje, a to zejména v Evropě a Severní Americe, kde se nyní pohybuje kolem 320 případů na 100 000 obyvatel; významně stoupá i mezi dětskou populací (Ng et al., 2017; Roda et al., 2020). Česko se dle údajů z roku 2015 drží na 206 případech na 100 000 obyvatel (Zboril, 2018). Incidence IBD se celosvětově liší, pohybuje se mezi 0,1 a 58 novými případy na 100 000 obyvatel ročně, přičemž nejvyšší je opět v západních zemích (Evropa, Severní Amerika a Austrálie). V Česku se dle údajů z roku 2015 pohybuje na 23 nových případech na 100 000 obyvatel a rok (Zboril, 2018).

Etiopatogeneze CD je stále nejasná. Zánět trávicího traktu u CD zahrnuje poruchu funkce střevní bariéry, dysregulaci vrozené a adaptivní imunity a také dysbiózu střevního mikrobiomu, která je považována za jeden z nejvýznamnějších patogenetických faktorů CD, jelikož narušuje střevní homeostázu (Joossens et al., 2011; Wright et al., 2015). Ta je běžně udržována rovnováhou mezi lumenálním obsahem (stravou a střevními mikroby) a slizničním imunitním systémem v *lamina propria mucosae*. Střevní epitel tuto rovnováhu organizuje díky své mechanické funkci (jako fyzická bariéra), ale také díky své roli v imunitních reakcích. Důležitou roli ve střevní imunitě hrají specializované střevní epitelové buňky (IEC). Například Panethovy buňky jsou IEC přítomné u baze Lieberkühnových krypt a konstitutivně produkují antimikrobiální peptidy, zatímco M-buňky jsou IEC přítomné ve střevní lymfatické

tkáni, které sbírají lumenální antigeny a předkládají je buňkám adaptivního imunitního systému.

Střevní bakterie z čeledi Enterobacteriaceae tvoří obvykle marginální část zdravé mikrobioty střeva, avšak u CD přerůstají ostatní střevní mikrobiotu. To působí nadměrnou aktivaci Toll-like receptorů (TLR), což vede k nadměrné expresi zánětlivých cytokinů s následným narušení integrity střevní stěny a chronickému zánětu (Vich Vila et al., 2018). K tomu přispívají i další faktory, jako například polymorfismy v genu *NOD2*, čímž se narušuje tvorba antimikrobiálních peptidů. Důsledkem je průnik lumenálního obsahu do lamina propria, což vede k tomu, že dendritické buňky aktivují zánětlivé typy T buněk, jako jsou Th17 a Th2, které produkují prozánětlivé cytokiny, jako je interferon- γ a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-alfa). Kromě toho makrofágy v reakci na lumenální obsah, složky stravy nebo střevní mikrobiotu, produkují prozánětlivé cytokiny IL-12 a IL-23, které aktivují NK buňky, což vede k přetrvávání střevního zánětu s produkcí prozánětlivých cytokinů. IL-4, IL-6, IL-21 a IL-22 jsou rovněž produkovány TH0 v reakci na aktivaci dendritickými buňkami.



Obr. 5 Patogeneze CD (Roda et al., 2020)

K zachycení zánětlivého procesu ve střevě se využívá stanovení hladiny fekálního kalprotektinu, který je považován za velmi senzitivní, avšak méně specifický marker IBD (Carroccio et al., 2003). Díky své vysoké senzitivě se pak využívá ke sledování dynamiky

střevního zánětu u již diagnostikovaných pacientů (Vermeire et al., 2006). Definitivní diagnóza onemocnění se opírá o histologický průkaz výše zmíněného specifického zánětlivého procesu z bioptického vzorku tkáně trávicího traktu odebraného během endoskopického vyšetření.

Onemocnění je stále považováno za nevléčitelné, nicméně v dnešní době je k dispozici řada léčebných strategií. V Evropě se preferuje tzv. „step-up“ strategie, která v indukční léčbě lehké a středně těžké CD dětského věku preferuje jako první volbu imunomodulátory (thiopuriny, resp. metotrexát) v kombinaci s dietní léčbou (exkluzivní enterální výživou nebo tzv. CDED dietou, z ang. Crohn's disease exclusion diet). Navazující udržovací léčba se pak opírá o léčbu samotnými imunomodulátory (van Rheenen et al., 2020). V případě selhání indukční či udržovací léčby se pak přistupuje k biologické léčbě, tedy terapii monoklonálními protilátkami cílící na konkrétní molekulu, což dnes představuje paletu možností různých preparátů. Celosvětově nejrozšířenější a nejdostupnější jsou blokátory TNF alfa (anti-TNF) infliximab a adalimumab (Singh et al., 2021). Protikladem tohoto přístupu je tzv. „top-down“ strategie, uplatňovaná především v Severní Americe, která jako první volbu preferuje tato biologika na úkor imunomodulátorů.

Vzhledem ke stále plně neobjasněné etiopatogenezi onemocnění se studium střevního mikrobiomu u Crohnovy choroby, zejména ve vztahu k její léčbě, stalo předmětem zkoumání výzkumnými skupinami napříč světadíly.

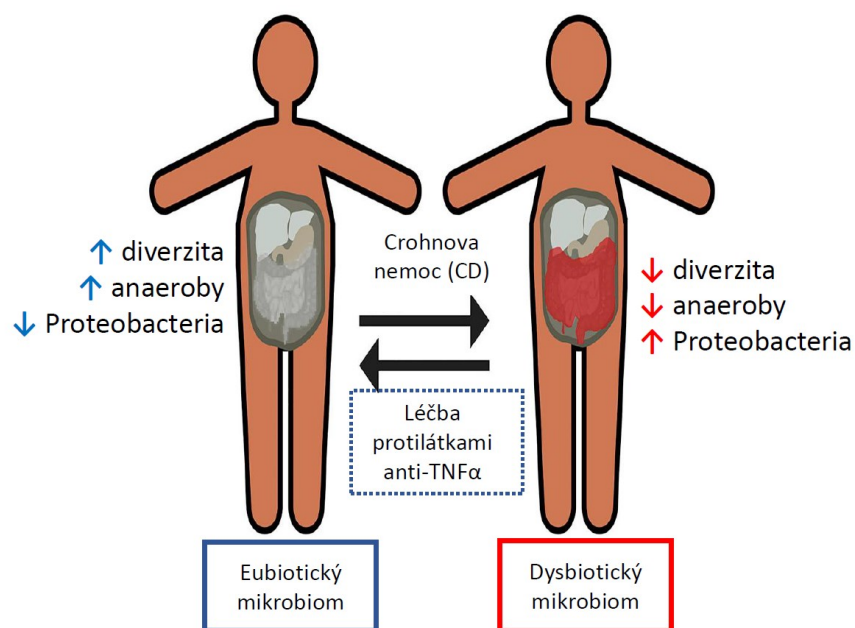
2.2.2 Změny bakteriomu při CD

Dysbióza střevního mikrobiomu (viz 2.1.4), je běžným rysem bakteriomu pacientů s CD (Ananthakrishnan et al., 2017; Clooney et al., 2021; Gevers et al., 2014; Joossens et al., 2011; Lloyd-Price et al., 2019; Metwaly et al., 2020; Pascal et al., 2017; Sokol et al., 2017; Vester-Andersen et al., 2019; Vich Vila et al., 2018; Zhou et al., 2021). Jejimi hlavními znaky jsou celkové snížení bakteriální diverzity a odlišné složení ve srovnání se zdravými jedinci: pokles obligátních anaerobů nebo bifidobakterií a nárůst fakultativních anaerobů (jako Enterobacteriaceae z Proteobacteria) nebo některých gramnegativních anaerobů, jako jsou Bacteroidota (Ananthakrishnan et al., 2017; Clooney et al., 2021; Gevers et al., 2014; Joossens et al., 2011; Lewis et al., 2015; Lloyd-Price et al., 2019; Metwaly et al., 2020; Pascal et al., 2017; Sokol et al., 2017; Tamboli et al., 2004; Vester-Andersen et al., 2019; Vich Vila

et al., 2018; Wright et al., 2015; Zhou et al., 2021). V porovnání s druhým pólem IBD, ulcerózní kolitidou, je mikrobiom CD více dysbiotický, má nižší mikrobiální diverzitu, složení více odlišné od zdravých kontrol a méně stabilní mikrobiální ekosystém (Pascal et al., 2017).

Jak bylo zmíněno výše, Enterobacteriaceae jsou ve vyšší četnosti u CD, jejich nárůst je spojen s intenzivní zánětlivou reakcí ve střevě a je zapojen do narušení integrity střevní stěny (Vich Vila et al., 2018). Z jednotlivých enterobakterií byla *Escherichia coli*, konkrétně její adherentně-invazivní patotyp (AIEC) (Barnich & Darfeuille-Michaud, 2007; Palmela et al., 2018), asociována s podporou zánětlivého procesu skrze nadměrnou kolonizaci buněk střevního epitelu. Z dalších skupin bakterií spojených se střevním zánětem stojí jistě za zmínku zástupci kmene Bacteroidota. Obecně jsou jeho zástupci asociováni se střevním zánětem a jejich zastoupení je zvýšené u pacientů s aktivním onemocněním (Gevers et al., 2014; Vich Vila et al., 2018; Zhou et al., 2021).

Na druhé straně stojí prospěšné bakterie. Z nich jsou to zejména producenti SCFA, kteří se rekrutují převážně z kmene Firmicutes. Jejich zastoupení u CD je snižené, což nepřímo narušuje integritu střevní bariéry, zvyšuje zánět a přispívá k progresi onemocnění. Vyšší zastoupení hojně studované bakterie *Faecalibacterium prausnitzii* z čeledi Ruminococcaceae a kmene Firmicutes bylo spojeno s ochranou před CD (Sokol et al., 2008). Podobně *Ruminococcus* z čeledi Lachnospiraceae je více zastoupený u zdravých než u IBD a zvýšení jeho četnosti bylo spojeno s odpovědí na léčbu anti-TNF u CD (Gevers et al., 2014; Sokol et al., 2017; Wang et al., 2021). Obecně jsou tak bakterie produkující SCFA považovány za střevu prospěšné.



Obr. 6 Schéma vztahu CD a mikrobiomu, volně upraveno (Lewis et al., 2015)

2.2.3 Změny viromu, mykobiomu a parazitomu při CD

Několik studií prokázalo roli střevního viromu a mykobiomu v patogenezi IBD (Norman et al., 2015). Zajímavé je, že ve střevních výplacích a biopsiích střeva dětských pacientů s CD byly zjištěny sekvence bakteriofágů z rodu Caudovirales, které by mohly být potenciálním biomarkerem časného nástupu CD (Norman et al., 2015). Metaanalýza ukázala nižší diverzitu viromu u pacientů s CD ve srovnání se zdravými jedinci, přičemž ve vzorcích s CD bylo pozorováno vyšší zastoupení fága *Synechococcus* S CBS1 a neznámého řádu čeledi Retroviridae (Perez-Brocal et al., 2013). Kromě toho v japonské kohortě se zdálo, že celková struktura mykobiomu u pacientů s CD se zcela liší od struktury zdravých jedinců, přičemž u pacientů s CD byla hojnější *Candida* (Imai et al., 2019), jejíž zvýšená četnost byla navíc i asociována s vyšším rizikem selhání léčby infliximabem (jeden z anti-TNF preparátů, t.č. nejvyužívanější typ biologické léčby CD) u dětských pacientů s IBD; naopak respondeři na infliximab měli vyšší zastoupení *Sacharomyces* (Ventin-Holmberg et al., 2022).

Střevní parazitom je u IBD méně prozkoumanou oblastí. Většina výzkumu se zaměřuje na *Blastocystis*, již zmiňovaného jednobuněčného prvoka spojovaného se střevní eubiózou (viz [2.3.](#)) (Andersen & Stensvold, 2016; Audebert et al., 2016). Nicméně, důkazy o bližších souvislostech *Blastocystis* a IBD zkoumané pomocí molekulárních metod, které jsou považované za citlivější metodu detekce (Roberts et al., 2011; Stensvold, Arendrup,

Jespersgaard, et al., 2007), nejsou dostatečné. Studie 71 dospělých pacientů s IBD z Íránu, z nichž pouze dva měli CD, ukázala trend k nižší prevalenci *Blastocystis* u pacientů s IBD než u zdravých kontrol (12,7 % oproti 21,1 % u zdravých kontrol) (Mirjalali et al., 2017). Podobné výsledky byly popsány v jiné studii se 100 dospělými pacienty s IBD z Dánska, z nichž 42 mělo CD, která prokázala pozitivitu u 5,0 % (5/100) pacientů s IBD ve srovnání s 19 % (18/96) u zdravých kontrol. Stratifikace studovaných skupin ukázala, že 4/5 pozitivních pacientů s IBD mělo UC, zatímco pouze 1/5 CD (Petersen et al., 2013). Žádná studie se dosud nezabývala prevalencí *Blastocystis* u dětských pacientů s CD; proto jsem se na toto téma zaměřili i v zatím nepublikované studii (viz. Diskuze, 4.1.2).

2.2.4 Vliv léčby anti-TNF na střevní bakteriom u CD

Jak bylo zmíněno výše, střevní bakteriom u CD byl charakterizován jako dysbiotický, avšak zdá se, že léčba preparáty anti-TNF, jedna z vůbec neúčinnějších léčebných modalit CD, je schopná změnit složení střevního bakteriomu směrem k eubióze. To se však děje jen částečně (Wang et al., 2018).

Tyto poznatky o vlivu anti-TNF na fekální mikrobiom a metabolom jsou nicméně stále omezené. Byla to právě jedna z vůbec prvních studií Wanga a kol. na populaci 11 dětí s CD, která uvedla, že anti-TNF blokáda u CD je spojena se zvýšenou diverzitou a posunem směrem ke složení, které je pozorováno u zdravých kontrol. Po léčbě anti-TNF pozorovali sice snížení prozánětlivých Enterobacteriaceae, ale bez významného zvýšení zdraví prospěšných rodů, jako jsou producenti SCFA (Wang et al., 2018). Následná práce stejného týmu studovala populaci 29 dětí s CD, z nichž 18 dostávalo anti-TNF a 11 z nich reagovalo změnou ve složení bakteriomu. Autoři popsali obohacení o několik producentů SCFA po léčbě anti-TNF a popsali, že ti, kdo odpovídali na infliximab se vyznačovali vyšším počtem některých rodů neprodukcujících SCFA na počátku léčby (*Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* a *Streptococcus*). Kromě toho zaznamenali posun v množství několika aminokyselin jako potenciálního markeru odpovědi na anti-TNF (Wang et al., 2021).

Několik nedávných studií se zaměřilo na predikci odpovědi na anti-TNF (konkrétně infliximab) u IBD pomocí složení mikrobiomu. Ventin-Holmberg *et al.* uvádějí nižší množství producentů SCFA na počátku léčby jako marker nedostatečné odpovědi na anti-TNF u dospělých (Ventin-Holmberg et al., 2021). V následné práci u dětské populace byla

odpověď na anti-TNF spojena s několika významnými rozdíly v četnosti bakterií na počátku léčby (konkrétně třídy Clostridia a Bacilli vs. třída Gammaproteobacteria) a Ruminococcus, jakožto známý producent SCFA, v kombinaci s výchozími hladinami kalprotektinu byl poměrně dobrým prediktorem odpovědi (Ventin-Holmberg et al., 2022). Höyhty et al. studovali základní složení bakteriomu u dětí a mladých dospělých – to bylo provedeno v absolutním a relativním množství. Zjistili mírné rozdíly v absolutních četnostech (více Bifidobacteriales a méně Actinomycetales ve skupině pacientů s remisí); změny v relativní četnosti na úrovni řádů však byly zaznamenány pouze u Bifidobacteriales (Hoyhtya et al., 2022). Výše uvedená studie Wanga et al. také uvádí několik hraničně významných asociací výchozí bakteriální četnosti s odpovědí na anti-TNF (Wang et al., 2018; Wang et al., 2021).

Existují tedy přesvědčivé důkazy o tom, že střevní mikrobiom pacientů s CD se při léčbě anti-TNF mění; nebylo však zjištěno, zda jsou tyto posuny mikrobiomu způsobeny snížením zánětlivé aktivity sliznice, nebo zda anti-TNF může mít další účinky nezávislé na zánětlivé aktivitě a hojení sliznice. Mikrob specificky se mění při podávání anti-TNF u CD, ale nereagující na anti-TNF u mimostřevní diagnózy by mohl naznačovat snižující se zánětlivou aktivitu sliznice. Právě takový design použila naše práce, která zapojila i dětské pacienty s juvenilní idiopatickou artritidou (JIA) jako extraintestinální pediatrickou diagnózu, která je také léčena anti-TNF (viz 3.1 a 4.1).

2.3 Střevní mikrobiom ve vztahu k léčbě u dětí s CDA

2.3.1 Úvod

Celiakie (CeD) je chronická enteropatie způsobená imunitně zprostředkovanou reakcí na lepek z pšenice, žita a ječmene, vznikající u malé části těch jedinců nesoucích lidské leukocytární antigeny (HLA) haplotypu DQ2 a/nebo DQ8. (Sollid et al., 1989) Subklinickou formou nemoci je **celiakální autoimunita (CDA)** definovaná přítomností protilátek proti tkáňové transglutamináze 2 (TGA) po dobu alespoň tří měsíců nebo do rozvinutí klinické celiakie.

CeD se může rozvinout v jakémkoli věku, včetně geriatrické populace (Lebwohl & Rubio-Tapia, 2021), což nemusí nutně znamenat pozdní odhalení dlouhodobé celiakie – může se jednat o *de novo* ztrátu tolerance lepku. Nicméně nedávné prospektivní kohortové studie zjistily, že u většiny pacientů se celiakie vyvine před dosažením věku 10 let (Andren Aronsson et al., 2019; Liu et al., 2017).

U kojenců a batolat jsou příznaky často mitigované až latentní, jsou-li přítomny, tak se nejčastěji projevují jako průjem, vzednuté břicho, zvracení, růstová retardace, apatie a hypotonie svalů. U starších dětí a dospělých je to pak často průjem s obsahem mastné stolice (*steatorea*), objevují se i flatulence, hubnutí a více se vyjadřují sekundární následky nemoci jako osteoporóza, růstová retardace, *dermatitis herpetiformis*, afty, mikrocytární anémie, opožděná puberta, vzácněji i cerebrální ataxie či deprese.

Screeningové studie naznačují, že celiakie je v současnosti závažným problémem veřejného zdravotnictví, dle globální séroprevalence z roku 2018 může dosahovat až 1,4 % (Singh et al., 2018). Vůbec nejvyšší je v Alžírsku, České republice, Indii, Izraeli, Mexiku, Malajsii, Saúdské Arábii, Švédsku, Portugalsku a Turecku (Singh et al., 2018); v Česku se udává prevalence 250 případů na 100 000 obyvatel (Stastna et al., 2023).

Z laboratorních ukazatelů mohou na celiakii ukázat sérologické markery, na prvním místě již zmiňované protilátky proti tkáňové transglutamináze 2 (TGA). Pomocnými ukazateli v diagnostice jsou pak i protilátky proti gliadinu a endomysiu. Diagnózu lze stanovit i bez biopsie sliznice, pokud je hladina IgA proti TGA rovna nebo vyšší než 10násobek horní hranice normy, za předpokladu, že endomyziální protilátky (EMA-IgA) budou pozitivní v druhém vzorku krve (Husby et al., 2020). U dětí s pozitivními IgA proti TGA menší než

10násobek horní hranice normy by měly být odebrány alespoň čtyři biopsie z distálního duodena a alespoň jedna z bulbu duodena. Při prokázání celiakie pak histologické vyšetření prokazuje atrofii klků, hyperplázii krypt a přítomnost intraepiteliálních lymfocytů. Léčba celiakie spočívá ve striktní bezlepkové dietě, tedy eliminaci pšenice, ječmene a žita.

2.3.2 Viry ve vztahu k CeD

Přestože je pro rozvoj celiakie nezbytná genetická predispozice a expozice lepku, je rozvoj nemoci rovněž asociován s faktory prostředí, jako jsou epizody infekčních gastroenteritid vyvolané různými mikroorganismy – nejvíce se zdůrazňuje možný vliv rotavirových infekcí a vakcinace jako možná metoda snížení rizika rozvoje celiakie (Kemppainen et al., 2017; Sanchez et al., 2013). Na druhou stranu se uvádí, že prevalence celiakie je výrazně nižší u obyvatel ruské Karélie s nižšími hygienickými a socioekonomickými standardy s vysokou expozicí mikrobům ve srovnání s populací žijící ve Finsku, a to i přesto, že populace z obou geograficky sousedících regionů sdílejí stejné genetické riziko (Kondrashova et al., 2008). Na rozdíl od výše uvedené studie ukázaly nedávné prospektivní kohortové studie dětí sledovaných od narození, že děti, u kterých se celiakie rozvine, mají častěji enterovirové (Kahrs et al., 2019; Oikarinen et al., 2020) a parechovirové (Tapia et al., 2021) infekce před sérokonverzí autoprotilátek proti tkáňové transglutamináze (Oikarinen et al., 2020).

2.3.3 Bakterie ve vztahu k CeD

Mikrobiologické souvislosti celiakie se však netýkají jen virů, ale i bakterií. Jako jiná chronická střevní onemocnění, je i celiakie podle většiny t.č. dostupných studií asociována s dysbiotickým složením střevního bakteriomu. Co víc, dle recentní studie Di Biase a kol. může dysbióza přímo napomáhat vzniku celiakie u predisponovaných osob a je spojena s nástupem příznaků nemoci (Di Biase et al., 2021). Hlavními charakteristikami dysbiózy u celiakie jsou zvýšená proporce prozánětlivých Enterobacteriaceae (Di Biase et al., 2021), *Bacteroides* (Collado et al., 2009), *Fusobacterium* (Di Biase et al., 2021) a naopak pokles v zastoupení prospěšných rodů *Akkermansia* (Di Biase et al., 2021) a *Bifidobacterium* (Collado et al., 2009). Tyto změny jsou pozorovány převážně v době stanovení diagnózy a po letech na bezlepkové dietě se vrací k normálu jen částečně (Collado et al., 2009). I další, velmi recentní studie s nízkým počtem pacientů, ale s inovativním designem (srovnávací skupinou byli nepostížení rodinní příslušníci aby se omezily zavádějící faktory včetně genetického původu, hygieny, stravovacích návyků a životního prostředí) popsala, že eliminace lepku sice

ovlivňuje mikrobiotu, ale pouze minimálně a to krátkodobým nárůstem zastoupením *Akkermansia muciniphila*. Ta samá studie také poskytla důkaz, že celiakie nemusí být nutně spojena s dysbiotickým mikrobiomem, jelikož mikrobiomy dětí s celiakií se oproti rodinným příslušníkům lišily minimálně (Turjeman et al., 2023).

Kromě charakteristik dysbiózy, a tedy pouhému popisu složení mikrobiomu, byly navrženy potenciální mikrobiální prediktory rozvoje celiakie. Jsou jimi zvýšené zastoupení *Porphyromonas*, *Dialister* a *Parabacteroides* spolu se sníženým zastoupením protizánětlivých druhů *Streptococcus thermophilus*, *Faecalibacterium prausnitzii* a *Clostridium clostridioforme* (Leonard et al., 2021) a nižší využití metabolických drah degradace lepku (Bodkhe et al., 2019). Existují i náznaky, že nositelé HLA-DQ2 mají odlišný bakteriom ve srovnání s jedinci, kteří nejsou nositeli tohoto rizikového haplotypu pro celiakii (Olivares et al., 2015; Russell et al., 2019).

Velmi často skloňovaným rodem ve vztahu k celiakii je *Akkermansia muciniphila*, která kolonizuje střevo již v raném věku, a u zdravých dospělých osob tvoří přibližně 3 % celkové střevní mikrobioty (Derrien et al., 2004). Tento zástupce kmene Verrucomicrobiota je schopný rozkládat hlenovú vrstvu a tím prospívat obnově střevního epitelu (Rodrigues et al., 2022). Při rozkladu mucinu produkuje SCFA (acetát a propionát) (Derrien et al., 2004), kterým jsou připisovány anorexické a protizánětlivé účinky, a proto je pak bakterie spojována s prospěšnou regulací nárůstu tělesné hmotnosti (Frost et al., 2014; Russell et al., 2013). I proto je pravděpodobně *A. muciniphila* méně zastoupena ve střevech lidí a myši s autoimunitními a metabolickými onemocněními (Everard et al., 2013; Pittayanon et al., 2020; Zheng et al., 2018), včetně celiakie (Di Biase et al., 2021; Turjeman et al., 2023). Zdá se, že navýšení jejího zastoupení ve střevě dětí se subklinickou formou celiakie může být spojeno s podáváním probiotik, jak ukázala i randomizovaná klinická studie (Oscarsson et al., 2021). Kromě akkermansie je však zmiňovaná studie významná tím, že jako první využila intervenci probiotik u dětí s celiakální autoimunitou diagnostikovanou na základě serologického screeningu; podávání dvou různých kmenů laktobacilů (*Lactiplantibacillus plantarum* HEAL9 a *Lacticaseibacillus paracasei* 8700:2) vedlo ke snížení hladin tkáňové transglutaminázy (Hakansson et al., 2019) a pozitivním změnám ve složení bakteriomu i metabolomu (Jenickova et al., 2023; Oscarsson et al., 2021). Literární přehled studií zabývajících se bakteriomem u celiakie nabízí **Tabulka 3**.

Tabulka 3. Literární přehled týkající se bakteriomu u CeD a CDA, a to jak ve vztahu k infekcím střevními parazity, tak samostatně.

Autor, rok	Cílová skupina CeD/CDA	Vzorky	Metodika analýzy mikrobiomu	Srovnávací skupina	Hlavní zjištění	Poznámky
Di Biase, 2021	Děti s CeD (n=26)	Stolice a biopsie duodena	Sekvenování 16S rDNA *	HC (n=16)	Mikrobiom CeD je spojen s prozánětlivou mikrobiotou (↑ Enterobacteriaceae, ↑ <i>Fusobacterium</i>) a prospěšnou <i>Akkermansia</i> ↓.	
Bodkhe, 2019	CeD (děti i dospělí; n=62)*	Stolice a biopsie duodena	Sekvenování 16S rDNA (oblast V4)**	HC (n=24) a FDR (n=15)	1) Snížení schopnosti mikrobiomu degradovat lepek u CeD ve srovnání s FDR (**); 2) Fekální mikrobiom CeD má ↓ <i>Akkermansia</i> a <i>Dorea</i> ; 3) Diverzita se neliší mezi CeD a HC.	Počet dětí NA Pouze metagenomická předpověď
Quagliariello, 2016	Děti s CeD (n=40)	Stolice	Sekvenování 16S rDNA (oblast V3-4)	HC (n=16)	1) mikrobiom CeD je narušen ve srovnání s HC (poměr ↓Firmicutes/Bacteroidota a Actinobacteriota); 2) Suplementace (3 měsíce) probiotiky posouvá mikrobiotu CeD směrem ke zdravější (↑ Firmicutes/Bacteroidota a Actinobacteriota).	
Collado, 2009	Děti s CeD (n=48)	Stolice a biopsie duodena	Real-time PCR pro specifické bakteriální taxony	HC (n=30)	U CeD ve srovnání s HC: ↑ <i>Bacteroides</i> , vzhledem k tomu, že <i>Lactobacillus</i> a <i>Bifidobacterium</i> ↓	Není sekvenováno, pouze PCR
Oscarsson, 2021	Děti CDA (n=78)	Stolice	Sekvenování 16S rDNA (oblast V3-4)	Skupina s placebem (n=38/78)	Suplementace (6 měsíců) probiotiky ovlivňuje mikrobiom CDA směrem ke zdraví (např. ↑ <i>Akkermansia</i>). Žádný vliv na diverzitu alfa.	Žádné kontroly
Turjeman, 2023	Děti s CeD (n=9)	Stolice	Sekvenování 16S rDNA (oblast V4)	Sourozenci (n=14) a rodiče (n=18)	Přestože se jedná o velmi malou studii, má inovativní design a poskytuje důkaz, že CeD není trvale spojena s dysbiózou mikrobioty.	
Soleimani Jevinani, 2023	CeD děti a dospělí (n=92)***	Stolice	Detekce pomocí qPCR; určení podtypu pomocí sekvenování genu pro SSU rRNA	HC (n=146)	Míra pozitivita blastocyst u CeD 16,3 % ve srovnání s 24,0 % u HC (P=0,87). Žádná korelace mezi CeD a <i>Blastocystis</i> sp. nebo jejími specifickými podtypy.	*** Včetně 50 dětí

Leonard, 2021	Děti s CeD *** (n=10)	Stolice	Metagenomické sekvenování a profilování metabolomu	HC (n=10)	Nástupu CeD předchází: 1) zvýšený výskyt prozánětlivých druhů a 2) snížený výskyt protizánětlivých druhů.	
Zafeiropoulou, 2020	Děti s CeD (n=65) ****	Stolice	Sekvenování 16S rDNA (oblast V3-4)	HC (n=57)	Ačkoli se zdá, že některé změny ve střevní mikrobiotě dětí s prokázanou CeD jsou důsledkem bezlepkové diety, existují specifické bakterie, které jsou výraznými biomarkery CeD.	

HC = zdravá kontrola, FDR = příbuzný prvního stupně; * *high taxonomic fingerprint microbiota array*; ** s kvantifikací několika taxonů pomocí PCR v reálném čase (*Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., skupina *B. fragilis*, enterobakterie (nespecifikované), *Clostridium cluster I*)

*** u kterých se 18 měsíců po zahájení studie objevila CeD

**** 20 nově vzniklých, 45 léčených bezlepkovou dietou

2.3.4 Jednobuněční střevní prvoci ve vztahu k CeD

Před zahájením této dizertační práce existovala pouze jedna studie zaměřená na děti s CDA a případnou souvislost s *Blastocystis* (Calderon de la Barca et al., 2020); měla však zásadní omezení: sledovaný soubor tvořilo 37 dětí s různými druhy autoimunity, z nichž pouze u dvou byla diagnostikována CDA. Z této jinak velmi zajímavé práce proto nebylo možné vyvodit žádné relevantní závěry.

I proto jsme se v návaznosti na práce skupiny z Lundské univerzity zabývali efektem probiotické intervence na prospěšné jednobuněčné prvoky ve střevě dětí s celiakální autoimunitou a jejich vzájemnému vztahu s bakteriomem. Hlavním bodem našeho zájmu byla *Blastocystis*. Naším cílem bylo opět přispět do poznání, jaký efekt má terapeutická intervence na další složky mikrobiomu, tentokrát se zaměřením na jednobuněčné parazity.

2.4 Střevní mikrobiom ve vztahu k léčbě IBS

2.4.1 Úvod

Syndrom dráždivého tračníku (IBS) je funkční gastrointestinální porucha, která má značný dopad na kvalitu života a fungování ve společnosti (Buono et al., 2017; Frandemark et al., 2018). Je charakterizován jako opakující se bolesti břicha v průměru alespoň jeden den v týdnu v posledních třech měsících, spojené se dvěma nebo více z následujících kritérií: 1) související s vyprazdňováním; 2) spojená se změnou frekvence stolice; 3) spojená se změnou formy (vzhledu) stolice (Lacy et al., 2016). Podle převažujících příznaků se rozděluje do čtyř subtypů: IBS-D (s převahou průjmovitých stolic), IBS-C (s převahou zácpy), IBS-M (smíšený typ) a IBS-U (nedeterminovaný typ).

V dospělé populaci je to velmi častá porucha, s výskytem kolem 5-10 %, přičemž globálně existuje velká geografická a zřejmě i etnická variabilita (Sperber et al., 2017). Vůbec nejvyšší je výskyt v Latinské Americe (17,5%), nejnižší na středním východě a v Africe (5,8%); v europoidní populaci (Severní Amerika/Evropa/Austrálie a Nový Zéland) se pohybuje kolem 7%. (Ford et al., 2020)

Jasná etiologie nemoci není dosud známa. Mezi její příčiny může mimo jiné patřit genetika, dieta, post-infekční stavy, psychologické mechanismy a zejména pak dysbióza střevního mikrobiomu.

Diagnostika onemocnění je *per exclusionem*, tedy po vyloučení organických příčin nemoci. Ke sledování průběhu nemoci se nejčastěji využívá symptomatického skóre IBS-SSS (*Irritable Bowel Syndrome - Severity Symptom Score*), které se skládá z hodnocení bolesti břicha, počtu dní s bolestí břicha, nadýmání/distenze břicha, spokojenosti s defekačními návyky a kvality života související s IBS. Každý ukazatel je hodnocen od 0 do 100, přičemž celkové skóre se pohybuje od 0 do 500 (Francis et al., 1997).

Terapie je obtížná, jejím cílem je zlepšit bolesti břicha a problémy s vyprazdňováním, ale často je zaměřena na nejproblematictější příznak. První linie léčby zahrnují změnu stravy, často doporučovaná je dieta s nízkým obsahem FODMAP (fermentovatelné oligosacharidy, disacharidy, monosacharidy a polysacharidy). Tyto sacharidy s malým řetězcem (FODMAPs) se v tenkém střevě špatně vstřebávají, zvyšují střevní osmolalitu, což vede ke zvýšenému

vstřebávání vody a produkci plynu fermentací v tlustém střevě (Barrett et al., 2010; Ong et al., 2010). Bylo prokázáno, že jejich vyloučení ze stravy vede ke snížení příznaků IBS (Marsh et al., 2016). Další terapeutické postupy zahrnují přidávání rozpustné vlákniny či spasmolytika. U pacientů se závažnými příznaky zahrnuje léčba centrální neuromodulátory, včetně nízkých dávek tricyklických antidepresiv, střevní sekretagoga, léky působící na opioidní nebo 5HT receptory, antibiotika a psychoterapii (Ford et al., 2018). Roční přímé a nepřímé náklady spojené s IBS se v Evropě odhadují až na 8 miliard eur (Flacco et al., 2019). I proto se jako slibná možnost léčby jeví podstatně levnější varianta v podobě transplantace střevní mikrobioty (FMT), která je v centru zájmu několika výzkumných skupin po světě.

2.4.2 Role střevního mikrobiomu při IBS

Zdaleka nejlepší přehled o problematice střevního mikrobiomu u IBS podává obsáhlé systematické review (Pittayanon et al., 2019), které zahrnuje 24 studií, a poskytuje tak nejlepší dostupné důkazy prokazující vztah mezi jednotlivými skupinami bakterií a příznaky IBS. Autoři v něm mj. zmiňují velkou heterogenitu zahrnutých studií a tedy současně i potíže v tom, docílit souhrnných závěrů ohledně jasného mikrobiálního vzoru u IBS. To zmiňuje i v současnosti nejaktuálnější systematické review o samotném IBS (Ford et al., 2020).

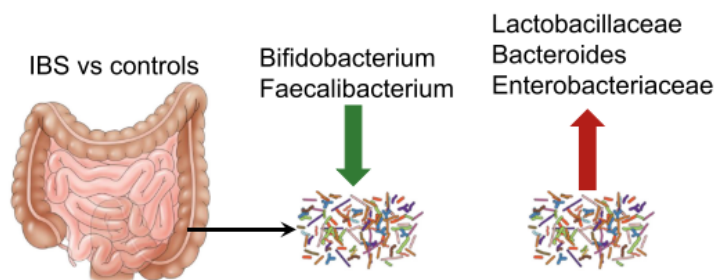
Nicméně, lze konstatovat, že existuje několik hlavních charakteristik mikrobiomu u IBS ve srovnání se zdravými kontrolami: nižší nebo stejná mikrobiální diverzita a dysbiotické složení zahrnující vyšší zastoupení některých prozánětlivých rodů a naopak nízké zastoupení těch prospěšných.

Mikrobiální diverzita je u pacientů s IBS častěji popisována jako nižší než u zdravých kontrol (Carroll et al., 2012; Liu et al., 2016; Pozuelo et al., 2015; Rangel et al., 2015), avšak několik studií naznačuje, že je se zdravými jedinci srovnatelná (Durban et al., 2012; Kerckhoffs et al., 2011; Rigsbee et al., 2012; Tap et al., 2017). Někteří autoři tak spekulují, že právě nízká diverzita je jedna ze známek probíhajícího zánětu u IBS a tím je nemoc ve své patofyziologii podobná IBD (Pittayanon et al., 2019), kde se nižší diverzita popisuje již od počátku studia mikrobiomu u této nemoci (Manichanh et al., 2006; Ott et al., 2004).

Většina studií analyzujících mikrobiom u IBS hodnotila dospělé s různými podtypy IBS, které dávají informaci o odlišném, tedy dysbiotickém, složení IBS ve srovnání se zdravými kontrolami, což shrnuje i systematické review (Ford et al., 2020). Jedním z hlavních rysů je

vyšší zastoupení čeledí Enterobacteriaceae (Carroll et al., 2012; Chassard et al., 2012; Maccaferri et al., 2012), Lactobacillaceae (Carroll et al., 2012; Maccaferri et al., 2012; Ringel-Kulka et al., 2016) a rodu *Bacteroides* (Liu et al., 2016; Shukla et al., 2015; Tap et al., 2017; Zhong et al., 2019). Vyšší zastoupení enterobakterií pravděpodobně souvisí se snížením anaerobiózy střevního ekosystému u pacientů s IBS, která tak umožňuje růst fakultativních anaerobů z Enterobacteriaceae, jež jsou spojovány s prozánětlivým působením; to opět přispívá k výše zmíněným teoriím o zánětlivém prostředí u IBS podobném tomu u IBD (Pittayanon et al., 2019). Mezi zástupci Enterobacteriaceae je množství původců infekčních gastroenteritid (*Escherichia*, *Shigella* či *Salmonella*), a není náhodou, že největším rizikovým faktorem rozvoje IBS je právě epizoda střevní infekce (udává se až u 10% všech pacientů s IBS) (Donnachie et al., 2018). Z čeledi Lactobacillaceae je *Lactobacillus* známý produkcí kyseliny mléčné a/nebo kyseliny octové a je spojen s bolestmi břicha a nadýmáním u pacientů s IBS (Tana et al., 2010). Zvýšení *Bacteroides* bylo pozorováno zejména u pacientů s IBS-D, což může být způsobeno zánětem nízkého stupně, protože některé kmeny *Bacteroides fragilis* mohou produkovat toxiny (Merino et al., 2011).

Naopak nižší zastoupení ve srovnání se zdravými kontrolami byla pozorována u rodu *Bifidobacterium* (Duboc et al., 2012; Liu et al., 2016; Rajilic-Stojanovic et al., 2011; Shukla et al., 2015; Zhong et al., 2019) a *Faecalibacterium* (Carroll et al., 2012; Li et al., 2018; Liu et al., 2016). Za pozornost stojí zejména nižší zastoupení rodu *Bifidobacterium*, který, zdá se, je slibným kandidátem pro probiotické podávání za účelem zmírnění příznaků IBS. Toto tvrzení totiž podporuje placebem kontrolovaná studie léčby *Bifidobacterium longum* u pacientů s IBS, která dospěla k závěru, že tato bakterie může snížit skóre deprese a zlepšit kvalitu života u nemocných pacientů snížením hladiny 4-kresol sulfátu (Pinto-Sanchez et al., 2017). Ten vzniká při interakci hostitele a bakterie (Selmer & Andrei, 2001) a ovlivňuje dopaminovou/noradrenalinovou dráhu u depresivních pacientů (Kapoor et al., 2011). *Faecalibacterium*, zejména *F. prausnitzii*, je spojován s udržováním zdravé střevní sliznice, zejména díky tomu, že je hlavním producentem butyrátu (Lopez-Siles et al., 2017). Tím působí protizánětlivě a udržuje integritu střevní stěny (Riviere et al., 2016).



Obr. 7 Typické rysy bakteriomu u IBS (Pittayanon et al., 2019)

Ač většina prací udává dysbiotické složení bakteriomu u IBS, recentní švédská práce s průřezovou studií zahrnující 119 pacientů s IBS konstatuje, že **IBS nemá specifické složení bakteriomu ani ve stolici ani ve sliznici střeva**, a že míra heterogenity pozorovaná mezi pacienty s IBS je vyšší než mezi zdravými jedinci (Hugerth et al., 2020). Zároveň autoři pozorovali významnou korelaci vlastního hodnocení zdraví se složením mikrobiomu, a to jak ze vzorků stolice, tak z biopsie střeva (Hugerth et al., 2020).

2.4.3 Fekální mikrobiální terapie (FMT) jako léčebná modalita IBS

Fekální mikrobiální terapie (FMT) je přenos stolice od zdravého dárce k pacientovi. Tato metoda byla popsána již ve čtvrtém století v Číně (Zhang et al., 2012) a v současnosti si získala popularitu díky svému pozoruhodnému účinku u recidivujících infekcí vyvolaných *Clostridioides difficile*, kde se nyní stala uznávanou život zachraňující terapií (Kelly, 2013). Kromě toho se FMT zkoumá jako možnost léčby řady dalších onemocnění, např. metabolického syndromu, IBD, jaterní encefalopatie a roztroušené sklerózy (Wortelboer et al., 2019), přičemž nejslibnější výsledky má FMT v těchto indikacích právě u léčbě IBD, konkrétně ulcerózní kolitidy (Costello et al., 2017; Sokol et al., 2020; Stojek et al., 2021).

Dárci FMT mohou být zdraví příbuzní nebo anonymní dárce. Výhodou druhého způsobu je možnost výběru dárců s vysokou diverzitou mikrobiomu a možnost skladovat stolici vyšetřených dárců v hlubokomrazicích boxech a využít ji pro vícero pacientů (Camarota et al., 2019). Poslední evropský konsenzus pro FMT doporučuje, aby byli dárce vybíráni na základě podrobných informací o onemocněních s předpokládanou souvislostí se střevní dysbiózou a bylo prováděno důsledné testování vzorků stolice a krve z důvodu zabránění přenosu infekcí (Keller et al., 2021).

FMT může být provedena několika způsoby (Konig et al., 2017):

- Podání do horní části GIT – podání do proximálního gastrointestinálního traktu nasogastrickou nebo nasoduodenální sondou nebo endoskopicky;
- Dolní endoskopie – aplikace do proximálního tračníku kolonoskopem
- Klyzma – rektální podání do tlustého střeva pomocí klyzmatu.
- Kapsle – perorální aplikace kapslových přípravků

Při léčbě recidivující CDI (rCDI) byla nejvyšší míra vyléčení zaznamenána při opakovaném podávání prostřednictvím dolní endoskopie (Baunwall et al., 2020). Úspěch v léčbě rCDI zaznamenalo i podání kapslí (Lee et al., 2016; Youngster et al., 2014).

První publikovaná randomizovaná, dvojitě zaslepená studie využívající FMT u IBS byla z roku 2018 (Johnsen et al., 2018). Používala stolici od alogenního dárce nebo autologní stolici coby kontrolu. Intervence byla zaměřena na přesně definovanou skupinu IBS převážně průjemové formy. Stolica byla přenesena pomocí kolonoskopie do céka. Primárním sledovaným cílem bylo zlepšení IBS-SSS. Léčba pomocí FMT byla spojena s významným účinkem po třech měsících (pokles IBS-SSS o 175 bodů), ale nikoliv po dvanácti měsících po intervenci (Johnsen et al., 2018). Tato studie využívala jednotlivé dárce, avšak nehodnotila nijak efekt na střevní mikrobiom, to se provedlo až v navazující práci, která popsala posun složení mikrobiomu po FMT směrem ke zdravým dárčům (Goll et al., 2020).

Od té doby bylo provedeno osm dalších intervenčních studií zaměřených na FMT u IBS (Aroniadis et al., 2019; El-Salhy et al., 2020; Guo et al., 2021; Halkjaer et al., 2018; Holster et al., 2019; Holvoet et al., 2021; Lahtinen et al., 2020; Singh et al., 2022), které se v různých parametrech lišily svým designem i efektem, jak klinickým, tak na mikrobiom příjemců (viz **Tabulka 4**). Osm z devíti článků z dosud provedených klinických studií popisuje změny složení střevního mikrobiomu. Pouze jedna práce (Holster et al., 2019) uvádí, že diverzita mikrobioty nebyla významně ovlivněna ani FMT, ani placebem (použili autologní FMT).

Hlavní závěry z osmi z devíti výše uvedených článků pak shrnuje nedávná metaanalýza randomizovaných kontrolních studií týkajících se právě FMT u IBS a poukazuje na nedostatečnou kvalitu důkazů, která by podporovala nebo vyvracela doporučení FMT v léčbě IBS (Halkjaer et al., 2023). Naše práce se snažila přispět do poznání o možné aplikaci FMT u

léčby IBS unikátním designem studie, který zahrnoval využití směsné mikrobioty osmi předem vybraných dárců stolice.

Tabulka 4. Přehled randomizovaných klinických studií využívající FMT v léčbě IBS

Autor, rok vydání	Design studie	Místo studie	Sample size	IBS subtypy	Typ FMT	Placebo	Dárci (mix)*	Klinický efekt	Efekt na mikrobiom
Johnsen, 2018	RCT, 3 paral.sk.	Norsko (Harstad)	83 (26 čerstvá FMT / 29 zmražená FMT / 28 placebo)	Pouze IBS-D a IBS-M	Stolice (zamražená nebo čerstvá), kolonoskopicky 50-80 g; jednorázové podání do céka	Vlastní stolice pacienta	2 (NE)	FMT na redukcii IBS-SSS fungovalo po 3 m, ale nikoliv po 12 m.	Mikrobiom analyzován až v navazující práci (Goll et al., 2020) – změny u aktivní substance směrem ke složení donorů.
Halkjaer, 2018	RCT, 2 paral.sk.	Dánsko	51 (25 FMT / 26 placebo)	Všechny	Kapsle, p.o.; 12 dávek á 25 kapslí	Prázdné kapsle s hnědou substancí	4 (ANO)	FMT na redukcii IBS-SSS po 3 m nefungovalo, ale placebo ano.	Příjemci FMT měli vyšší diverzitu (podobnou jako dárci), zatímco u placeba nikoli.
Aroniadis, 2019	RCT, crossover	USA	48 (25 FMT / 23 placebo)	Pouze IBS-D	Kapsle, p.o.; 3 dávky á 25 kapslí	Prázdné kapsle s hnědou substancí	4 (NE)	Jak FMT tak placebo fungovali na redukcii IBS-SSS po 3 m; nebyl mezi tím ale signifikantní rozdíl.	Složení příjemců FMT se podobalo dárcům; α -diverzita a podobnost dárcům se však mezi respondéry a non-respondéry FMT nelišila.
Holster, 2019	RCT, 2 paral.sk.	Švédsko	16 (8 FMT / 8 placebo)	Všechny	Stolice (zmražená), kolonoskopicky 30 g; jednorázové podání do céka	Vlastní stolice pacienta	2 (NE)	FMT fungovalo na redukcii GSRS-IBS skóre po 3 m. Rozdíl skóre mez FMT a placebem však nebyl signifikantní.	Diverzita se nezměnila ani u FMT ani u placeba (baseline ale byla podobná donorům); Složení příjemců FMT se podobalo dárcům.

El-Salhy, 2020	RCT, 3 paral.sk.	Norsko (Bergen)	164 (54 FMT s 30g, 55 FMT s 60g / 55 placebo)	Všechny	Stolice (zmražená), gastrokopicky 30 nebo 60 g; jednorázové podání do distálního duodena	Vlastní stolice pacienta	1 (NE)	FMT fungovalo na redukcii IBS-SSS po 3 m, placebo nikoliv. Dávka s 60 g stolice fungovala lépe.	Diverzitu nesrovnávali. Složení příjemců FMT se blížilo dárce. Pozorovány specifické taxa, jejichž zastoupení se změnilo u responderů (vyšší Eubacterium, Lactobacillus, Alistipes a nižší Bacteroides).
Holvoet, 2020	RCT, 2 paral.sk.	Belgie	62 (43 FMT / 19 placebo)	Pouze IBS-D a IBS-M	Stolice (čerstvá), nasojejunálně; neznámý objem; jednorázové podání do jejunu	Vlastní stolice pacienta	2 (NE)	FMT fungovalo na redukcii symptomů a zlepšení kvality života (QoL) po 3 m. Signifikantně větší odpověď pozorována u žen (69% vs 29%).	Responderi na FMT měli už na začátku vyšší diverzitu a odlišné složení než non-responderi. Nenalezen žádný taxon spojený s odpovědí na FMT.
Lahtinen, 2020	RCT, 2 paral.sk.	Finsko	51 (25 FMT / 26 placebo)	IBS-D, IBS-M a IBS-U	Stolice (zmražená), kolonoskopicky 30 g; jednorázové podání do céka	Vlastní stolice pacienta	1 (NE)	FMT nefungovalo na redukcii IBS-SSS u dost. množství pacientů po 3 m, až celkový pokles skóre byl signifikantní. Nebylo dosaženo dlouhodobé odpovědi po 12 m.	Složení příjemců FMT se blížilo dárce.

Singh, 2022	RCT, 4 paral.sk	USA	23 (11 FMT / 12 placebo)	IBS-D	Kapsle, p.o.; 1 dávka á 19 kapslí	Prázdné kapsle s hnědou substancí	6 (NE)	FMT vedlo k redukcii IBS-SSS, avšak nikoliv signifikantní. Hlavně, předléčení ATB významně snížilo entgraftment FMT.	Předléčení ATB signifikantně změnilo složení bakteriomu, které po 10, resp. 24 týdnech již nebylo tak zřejmé.
Guo, 2023	RCT, 2 paral.sk.	Čína	18 (9 FMT / 9 placebo)	IBS-D s klinickou úzkostí	Kapsle p.o.; 3 dávky á 30 kapslí	Prázdné kapsle s hnědou substancí	0 jen def. kapsle **	FMT snížilo signifikantně IBS-SSS a skóre úzkosti po 3 m	FMT zvýšilo diverzitu a změnilo složení bakteriomu (zvýšilo množství v obou hlavních kmenech Bacteroidota a Firmicutes)

RCT = randomizovaná kontrolovaná studie; m = měsíc

** s vágně definovaným mikrobiálním složením – udávají jen „Enterobacter FMT“

3. Úvod k publikacím, které jsou součástí práce

3.1 Faecal bacteriome and metabolome profiles associated with decreased mucosal inflammatory activity upon anti-TNF therapy in paediatric Crohn's disease

Je známo, že léčba anti-TNF protilátkami mění dysbiotický bakteriom stolice u Crohnovy choroby. Avšak dosud nebylo známo, zda jsou tyto změny způsobeny snížením zánětlivé aktivity sliznice, nebo zda se jedná o průvodní efekt anti-TNF, což by znamenalo, že podobná reakce bakteriomu by mohla být pozorována u jedinců se zdravým střevem. Proto jsme zkoumali změny ve fekálním bakteriomu a metabolomu při podávání anti-TNF u dětí s CD a porovnávali je se změnami u dětí s juvenilní idiopatickou artritidou (JIA) léčených také anti-TNF preparáty. Vzorky stolice se odebíraly longitudinálně před a během anti-TNF terapie (maximálně tři měsíce po zahájení) a byly analyzovány na složení bakteriomu pomocí masivně paralelního sekvenování 16S rDNA (oblast V4) a na složení metabolomu pomocí ¹H nukleární magnetické rezonance. Testovali jsme také několik reprezentativních kmenů střevních bakterií na inhibici růstu in vitro pomocí infliximabu, t.č. nejvíce využívanou anti-TNF protilátkou.

Takto jsme analyzovali 530 vzorků stolice od 121 dětí (CD 54, JIA 18, zdravé kontroly 49). Detekovali jsme reakci bakteriomu stolice na léčbu anti-TNF u CD: při léčbě se zvýšilo zastoupení tří rodů třídy Clostridia (*Intestinibacter*, *Ruminococcus*, *Flavonifractor*), zatímco se snížilo zastoupení rodu *Alistipes* z třídy Bacteroidia. Z fekálních metabolitů se při léčbě anti-TNF protilátkami zvýšilo množství glukózy a glycerolu, zatímco isoleucin a uracil se snížily. U JIA nebyly po podání anti-TNF zaznamenány žádné významné změny bakteriomu ani metabolomu. Růst bakterií v diskovém difuzním testu nebyl infliximabem vůbec ovlivněn. Naše zjištění tedy naznačují, že za změny bakteriomu a metabolomu pozorované u CD je odpovědné spíše hojení střevní sliznice než účinek samotného anti-TNF.

Výsledky byly publikovány v časopise Journal of Crohn's and Colitis (IF: 8,0; Q1 v Gastroenterology & Hepatology), považovaném dlouhodobě za vynikající v oboru Gastroenterologie a vůbec nejlepší časopis zaměřený na IBD.

3.2 Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lacticaseibacillus paracasei* supplementation on the single-cell fecal parasitome in children with celiac disease autoimmunity: a randomized, double-blind placebo-controlled clinical trial

Stejně jako u ostatních autoimunitních onemocnění, i prevalence celiakie v rozvojových zemích alarmujícím způsobem roste. Díky sérologickým markerům však dokážeme poznat, že dané dítě má vyšší riziko rozvoje tohoto onemocnění, které pak, rozvine-li se klinicky, významně negativně ovlivňuje růst a vývoj dítěte. Není tedy divu, že se výzkumné týmy snaží najít možnosti jak terapeuticky zasáhnout před plným projevem nemoci. Jako jedna z možností se nabízejí probiotika, které mají prospěšný účinek na střevní mikrobiotu, a navíc i protizánětlivé a imunomodulační účinky.

To iniciovalo vznik randomizované dvojité zaslepené a placebem kontrolované intervenční studie na půdě Lundské univerzity, kde se celkem 78 dětem s celiakální autoimunitou podávaly buď dva kmeny laktobacilů (*Lactiplantibacillus plantarum* HEAL9 a *Lacticaseibacillus paracasei* 8700:2; n=40) nebo placebo (n=38). Děti v ní byli sledováni po dobu šesti měsíců a v bodech 0-3-6 měsíců se sbíraly vzorky krve a stolice. Publikované výsledky popsaly pozitivní efekt na snížení sérologických markerů celiakie, v navazujících publikacích byly popsány pozitivní účinky na střevní bakteriom a metabolom. Naše studie si kladla za cíl zjistit, zda může probiotická kúra pozitivně ovlivnit i jednobuněčný střevní parazitom.

Proto jsme retrospektivně vyšetřili všech 227 vzorků stolice na přítomnost *Blastocystis* pomocí kvantitativního real-time PCR a subtypizovali pomocí masivně paralelního amplikonového sekvenování úseku 18S rDNA. Ostatní jednobuněční parazité byli detekováni necíleným sekvenováním 18S rDNA a poté ověřeni pomocí real-time PCR. Vztah mezi parazity a bakteriomem byl charakterizován pomocí profilování 16S rDNA oblasti V3-V4.

V naší práci jsme zjistili, že prevalence jednobuněčných prvoků je u dětí s CDA nízká. Kolonizace prvoky byla v čase stabilní, a co je důležité, bez ohledu na intervenci probiotiky. Jejich přítomnost souvisela se zvýšenou diverzitou fekálního bakteriomu, jak píše i většina studií, ale, velmi překvapivě, souvisela přítomnost prvoků nepřímo s některými prospěšnými bakteriemi, jako *Akkermansia muciniphila*. Výsledky byly publikovány v časopise *Parasites & Vectors* (IF 3,02; Q1 v Parasitology).

3.3 Protocol for faecal microbiota transplantation in irritable bowel syndrome – the MISCEAT study: a randomised, double-blind cross-over study utilising mixed microbiota from healthy donors

Navzdory vysoké prevalenci v dospělé populaci v Evropě zůstává etiologie IBS nevyjasněná. Může zahrnovat mj. dysbiózu střevního mikrobiomu, na což poukazuje mnoho studií (viz 2.4.2). Převážně jsou však průřezového charakteru, což omezuje schopnost zachytit dynamiku vývoje změn mikrobiomu v rámci jedince. Typická jsou totiž střídání epizod průjmu či zácpy s normálním složením mikrobiomu.

Jako potenciální terapeutická možnost pro IBS se objevila fekální transplantace mikrobioty, známá svým úspěchem při recidivujících infekcích *Clostridioides difficile*. První randomizovaná, dvojité zaslepená studie provedená v roce 2018 se zaměřila na převážně průjmový typ IBS a prokázala významný účinek po třech měsících, avšak ne po uplynutí 12 měsíců od intervence. Následné randomizované studie FMT u IBS se lišily ve svém designu, zejména ve výběru dárců a přípravě aktivní substance pro FMT (viz 2.4.3). Nedávná metaanalýza zmiňovaných randomizovaných kontrolních studií FMT u IBS, poukázala na nedostatečnou kvalitu důkazů, což brání doporučit FMT jako léčbu IBS.

Náš studijní protokol se snaží řešit některé z nedostatků již publikovaných randomizovaných studií a má za cíl posoudit účinnost FMT s využitím smíšené mikrobioty od pečlivě vybraných dárců na zmírnění příznaků IBS. Kvantifikace klinického efektu pomocí symptomatického skóre (IBS-SSS) proběhne čtyři týdny po intervenci v porovnání s autoklávovaným placebem. Sekundárními cíli jsou hodnocení akutních a dlouhodobých účinků na zmírnění symptomů, posouzení bolesti břicha, nadýmání, BMI, obsahu tuku, obvodu pasu, tloušťky kožních řas, psychologických aspektů a složení střevního mikrobiomu. Tímto komplexním přístupem se snažíme přispět k poznatkům o potenciální terapeutické roli FMT při zvládnutí symptomů IBS.

Studijní protokol byl publikován v časopisu BMJ Open (IF 2,9; Q2 v Medicine, General & Internal).

3.4 Freezing of faeces dramatically decreases the viability of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis*

Studie zkoumala vliv hlubokého zmrazení (-80°C) na životaschopnost prvků *Blastocystis* a *Dientamoeba fragilis* v kontextu transplantace fekální mikrobioty. Reaguje na studii (Terveer et al., 2020), kde byla popsána absence nežádoucích účinků při přenosu *Blastocystis* cestou FMT u pacientů s infekcí *Clostridioides difficile*. Dále pak bylo navrženo (Stensvold & van der Giezen, 2018), že *Blastocystis* by moha být pro dárce FMT spíše přínosem než rizikem vzhledem ke známým asociacím s vysokou diverzitou střevního bakteriomu člověka. To však kontrastovalo s guidelines pro FMT z roku 2019 (platná v době publikace), které vylučují z dárcovství stolice osoby pozitivní na *Blastocystis*.

Hlavním prvkem studie byl experiment, kde byla stolice dárce pozitivního na *Blastocystis* a *D. fragilis* podrobena jednomu cyklu hlubokého zmrazení přes noc a následnému rozmrazení - to simulovalo běžnou praxi při FMT. Testování viability se dělo cestou kultivace a mikroskopie, a také pomocí kvantitativního real-time PCR.

Výsledky naznačují plnou ztrátu životaschopnosti *D. fragilis* a významné omezení životaschopnosti *Blastocystis* po tomto procesu. Proto jsme na základě našich výsledků doporučili otevřenou diskusi a přehodnocení praxe vylučování dárců pozitivních na *Blastocystis* sp. a/nebo *D. fragilis* pro účely FMT nejen kvůli jejich možným benefitům na bakteriom, ale i vzhledem využívání stolice ve zmrazeném stavu, kdy nejsou, resp. jsou velmi omezeně, viabilní.

Článek byl publikován v časopise European Journal of Gastroenterology and Hepatology (IF 2,1, Q4 v Gastroenterology & Hepatology).

3.5 Stool metabolome-microbiota evaluation among children and adolescents with obesity, overweight, and normal-weight using ¹H NMR and 16S rRNA gene profiling

Výzkum zaměřený na charakterizaci metabolitů a složení mikrobioty v lidské stolici poskytuje hlubší vhled do molekulárních fenotypových rozdílů mezi jednotlivci s normální hmotností a těmi trpícími nadváhou či obezitou. Cílem této průřezové studie bylo identifikovat potenciální metabolické a mikrobiální markery ve stolici, které by mohly rozlišit stav nadváhy nebo obezity u dětí a dospívajících.

Pro dosažení tohoto cíle byl proveden výzkum, při němž byly pomocí ¹H NMR spektrální analýzy a profilování genů 16S rRNA (úsek V4) zhodnoceny metabolické profily stolice a střevního mikrobiomu u 52 dětí ve věku 7 až 16 let. Tito účastníci byli rozděleni do tří skupin na základě jejich BMI, konkrétně 16 s normální hmotností, 17 s nadváhou a 19 s obezitou.

Výsledky metabolické analýzy identifikovaly čtyři metabolity (arabinózu, butyrát, galaktózu a trimethylamin), jejichž koncentrace byla vyšší u obézních dětí než u dětí s normální hmotností ($p < 0,05$), mezi dalšími sledovanými skupinami signifikantní rozdíl pozorován nebyl. Zároveň byly identifikovány bakteriální taxony na úrovni rodu *Escherichia* a *Tyzzarella* 3, jejichž zastoupení se významně odlišovalo ($p < 0,01$) mezi všemi třemi studijními skupinami. Nebyl zjištěn žádný významný rozdíl v diverzitě mezi třemi studovanými skupinami a nebyly zjištěny žádné významné korelace mezi bakteriálními taxony a metabolity.

Tato průřezová studie podporuje dřívější zjištění (Murugesan et al., 2018) vysokého obsahu SCFA ve stolici obézních dětí. Přináší navíc i zjištění dalších možných metabolitů či bakteriálních taxonů, jejich četnost byla vyšší u skupiny obézních dětí oproti dětem s nadváhou či normální hmotností.

Článek byl publikován v časopise PLOS One (IF 3,7, Q2 v Multidisciplinary).

3.6 Publikované články mimo téma dizertační práce - přehled

Drevinec, P., **Hurych, J.**, Antuskova, M., Tkadlec, J., Berousek, J., Prikrylova, Z., Bures, J., Vajter, J., Soucek, M., Masopust, J., Martinkova, V., Adamkova, J., Hysperska, V., & Bebrova, E. (2021). Direct detection of ESKAPEc pathogens from whole blood using the T2Bacteria Panel allows early antimicrobial stewardship intervention in patients with sepsis. *MicrobiologyOpen* (IF 3,14; Microbiology – Q2).

Drevinec, P., **Hurych, J.**, Kepka, Z., Briksi, A., Kulich, M., Zajac, M., Hubacek, P. The sensitivity of SARS-CoV-2 antigen tests in the view of large-scale testing. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie* (IF 0,51; Microbiology – Q4).

Cuénod, A., Aerni, M., Bagutti, C., Bayraktar, B., Boz, E. S., Carneiro, C. B., Casanova, C., Coste, A. T., Damborg, P., van Dam, D., Demirci, M., Drevinec, P., Dubuis, O., Fernandez, J., Greub, G., Hrabak, J., Yiğitler, G. H., **Hurych, J.**, Jensen, T. G., Jost, G., ... Egli, A. (2022). Quality of MALDI-TOF Mass Spectra in Routine Diagnostics: Results from an International External Quality Assessment including 36 Laboratories from 12 countries using 47 challenging bacterial strains. *Clinical microbiology and infection*. (IF 8,067; Microbiology – Q1).

4. Diskuze

Dizertační práce se cestou tří projektů s terapeutickou intervencí snažila přispět k poznání o vztahu střevního mikrobiomu při léčbě tří chronických gastroenterologických onemocnění. Níže následuje diskuze jednotlivě ke každému z projektů.

4.1 Střevní mikrobiom a jeho změny při léčbě anti-TNF u CD

V rámci projektu zaměřeném na střevní mikrobiom a jeho změny ve vztahu k léčbě dětí s Crohnovou chorobou jsme publikovali jednu studii. Ta se snažila primárně odpovědět na otázku, zda jsou známé změny ve složení bakteriomu po léčbě anti-TNF preparáty primárního nebo sekundárního původu. Dále nás zajímalo, zda jsou popisované znaky dysbiotického mikrobiomu u dětí s CD pozorované i v longitudinálním měřítku, jelikož většina studií je průřezového charakteru. Další studie je zaměřená na prevalenci jednobuněčných prvků, data zatím nebyla publikována.

4.1.1 Změny fekálního bakteriomu při podávání anti-TNF

Jak již bylo popsáno výše (viz 2.2.2), běžným rysem střevního bakteriomu u pacientů s CD před léčbou anti-TNF je dysbióza (Lewis et al., 2015; Tamboli et al., 2004), popsaná v četných studiích různorodého designu a metodologie (Ananthakrishnan et al., 2017; Clooney et al., 2021; Gevers et al., 2014; Joossens et al., 2011; Lloyd-Price et al., 2019; Metwaly et al., 2020; Pascal et al., 2017; Sokol et al., 2017; Vester-Andersen et al., 2019; Vich Vila et al., 2018; Zhou et al., 2021). Tu jsme pozorovali i v naší studii. Patrné byly významné rozdíly mezi CD a srovnávacími skupinami bez nemocí střeva (JIA a zdravé kontroly), a to jak v diverzitě, tak ve složení bakteriomu.

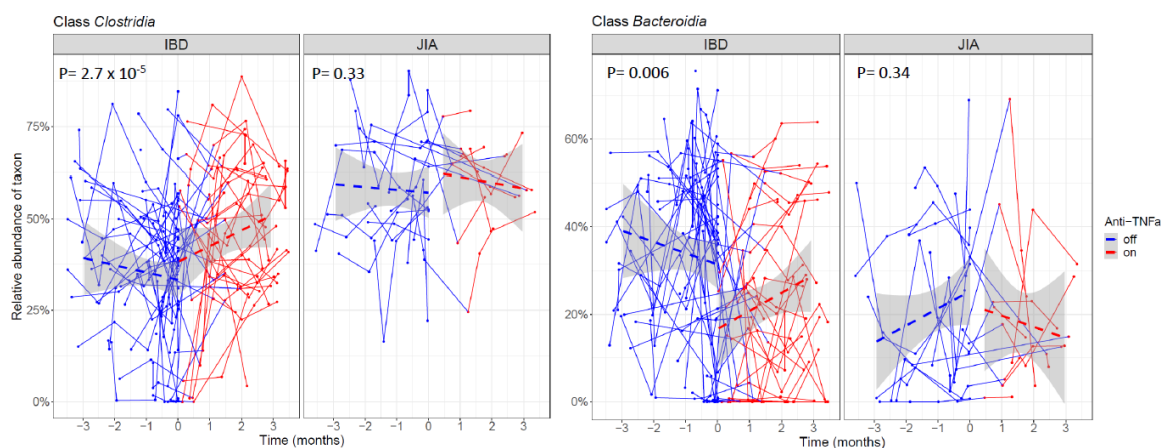
Diverzita bakteriomu u CD byla snížena až pozoruhodně a s časem od vstupu do studie se postupně zlepšovala. Zajímavé je, že čas byl jediným silným prediktorem zvýšení diverzity, avšak nikoliv léčba protilátkami anti-TNF. To naznačuje, že zvýšení diverzity v čase by mohlo být způsobeno jakýmkoliv typem terapie, nikoli pouze anti-TNF. Složení bakteriomů u dětí s CD mělo nápadně velký rozptyl, přičemž některé vzorky byly velmi vzdálené od složení pozorovaného u dětí s JIA nebo u zdravých kontrol. Zejména vzorky pacientů s CD ještě před léčbou anti-TNF preparáty měly vyšší zastoupení taxonů z kmene Proteobacteria a Fusobacteriota, což je známý znak střevní dysbiózy u CD, který byl popsán v mnoha průřezových studiích (Gevers et al., 2014; Lewis et al., 2015; Metwaly et al., 2020; Morgan et

al., 2012; Pascal et al., 2017; Zhou et al., 2021). **Celkově tak naše výsledky potvrzují vzorec dysbiotického složení bakteriomu u CD i z longitudinálního pohledu.**

Na změny po anti-TNF terapii u IBD se dosud zaměřilo jen několik studií, které uvádějí posun složení směrem k eubióze, konkrétně pokles Proteobacteria a/nebo zvýšení zastoupení producentů SCFA (Kolho et al., 2015; Wang et al., 2018; Wang et al., 2021). V naší studii se složení bakteriomu po podání anti-TNF u CD posunulo směrem od převažujícího zastoupení kmenů Proteobacteria a Bacteroidota směrem vyššímu zastoupení Firmicutes, což by mohlo být považováno za změnu směrem ke zdravějšímu střevnímu bakteriomu, protože u pacientů s IBD neléčených anti-TNF se v mnoha studiích uvádí vyšší zastoupení jak Proteobacteria, tak Bacteroidota (Gevers et al., 2014; Vich Vila et al., 2018; Wright et al., 2015; Zhou et al., 2021), zatímco rody z Firmicutes jsou spojovány se zdravějším střevem (Ananthakrishnan et al., 2017; Metwaly et al., 2020; Morgan et al., 2012; Pascal et al., 2017; Sokol et al., 2017; Wright et al., 2015; Zhou et al., 2021). **Co se tedy týče složení bakteriomu v reakci na anti-TNF, naše výsledky potvrzují závěry předchozích prací na dětské populaci i v rámci longitudinálně odebíraných vzorků.**

Testování jednotlivých taxonů na změnu jejich zastoupení po podávání anti-TNF neodhalilo žádné posuny u JIA, ale identifikovalo několik taxonů měnících se u CD. Rod *Alistipes* (třída Bacteroidia) měl nižší zastoupení po léčbě anti-TNF, zatímco zastoupení rodů *Intestinibacter*, *Flavonifractor* a *Ruminococcus* (všechny třída Clostridia) se zvýšilo. Za pozornost stojí rod *Ruminococcus* z čeledi Lachnospiraceae a rod *Flavonifractor* z čeledi Oscillospiraceae. Oba tyto bakteriální rody jsou známými producenty SCFA, a tedy pro střevo prospěšné (Domingo et al., 2008; Liu et al., 2015). *Ruminococcus* je více zastoupen v bakteriomech zdravých lidí než u pacientů s IBD (Gevers et al., 2014; Sokol et al., 2017), a zvýšení jeho zastoupení bylo spojeno s odpovědí na anti-TNF terapii u CD (Wang et al., 2018; Wang et al., 2021). Na druhou stranu některé rody ruminokoků mohou produkovat prozánětlivé molekuly v in vitro podmínkách (Hall et al., 2017) a jsou spojovány s IBD (Henke et al., 2019). *Flavonifractor* je rod fylogeneticky různorodý, dříve klasifikován jako *Eubacterium* (Carlier et al., 2010); jeho hlavní zástupce *F. plautii*, který se spolu s ostatními eubakteriemi, jinak dobře známými producenty SCFA, se běžně vyskytuje u lidí se zdravým střevem (Mukherjee et al., 2020). Za zmínku jistě stojí, že fylogeneticky příbuzný druh *E. rectale* byl již asociován s odpovědí na anti-TNF léčbu u dětí s CD (Kolho et al., 2015). Souvislost s CD již byla zaznamenána u rodu

Intestinibacter (Forbes et al., 2018) z čeledi Peptostreptococcaceae; nebyla však zohledněna aktivita onemocnění (remise vs. aktivní onemocnění) ani stav střevního zánětu. Ještě zajímavější je, že u dětí s IBD byl zaznamenán nárůst neznámého rodu z čeledi Peptostreptococcaceae, který je známkou odpovědi na anti-TNF léčbu (Ventin-Holmberg et al., 2021). Úloha rodu *Alistipes*, patřícího do řádu Bacteroidales, třída Bacteroidia, zůstává nejasná (Parker et al., 2020). Jeho souvislost se střevním zánětem při IBD se však na základě nejnovějších prací jeví jako pravděpodobná (Dziarski et al., 2016; Rodriguez-Palacios & Erkkila, 2019), a proto by jeho snížení po léčbě dávalo smysl. Celkově se v kontextu současné literatury domníváme, že změny bakteriomu naznačují významnou souvislost mezi souvisejícími taxony a zdravějším složením střevního bakteriomu. Navíc, absence takových pozorování u JIA se zdravým střevem naznačuje, že **změny bakteriomu po anti-TNF u dětí s CD jsou pravděpodobně sekundárního původu, tedy zprostředkovány zlepšením zdraví střeva a nikoliv samotným účinkem anti-TNF.**



Obr. 8 Relativní početnost tříd Clostridia a Bacteroidia v čase

Diagnóza: IBD = Crohnova choroba, JIA = juvenilní idiopatická artritida. Barvy podle terapie anti-TNF α : červená = vzorek stolice odebraný při podávání anti-TNF; modrá = vzorek stolice odebraný, když nebylo podáváno žádné anti-TNF. P-hodnota je korigována na počet testovaných taxonů pomocí víceúrovňového modelování.

4.1.2 Další nálezy v projektu

Kromě bakteriomu jsme se zaměřili i na fekální metabolom, kde jsme pozorovali zvýšení glukózy a glycerolu, zatímco isoleucin a uracil se snížily po léčbě u anti-TNF jen u CD a nikoliv u JIA. Obecně lze říci, že všechny změny mezi významnými metabolity podporují celkový obraz přechodu od proteolytické k sacharolytické fermentaci (Diether & Willing, 2019; Windey et al., 2012), která je považována za zdravější (Canfora et al., 2019). Zajímavé je, že u SCFA,

kteře jsou obecně považovány za protizánětlivé a jsou obohacené u zdravých lidí ve srovnání s pacienty s IBD (Bjerrum et al., 2015; Marchesi et al., 2007), jsme nepozorovali žádnou jejich souvislost s anti-TNF léčbou.

Dále jsme se sekundárně zaměřili i na možný přímý účinek anti-TNF na bakterie, který je nepravděpodobný, avšak nelze vyloučit, že se monoklonální protilátka váže nespecificky na strukturu bakteriální buňky. Proto jsme provedli diskový difuzní test s disky napuštěnými infliximabem (nejvyužívanější z přípravků anti-TNF) na kultivačních plotnách s šesti různými anaeroby, který neprokázal znatelnou inhibici růstu nebo jeho zesílení, čímž jsme dospěli k závěru, že přímý účinek anti-TNF na bakterie je velmi nepravděpodobný.

Žádná studie se dosud nezabývala prevalencí *Blastocystis* u dětských pacientů s CD. Dosud nepublikované výsledky naší výzkumné skupiny s longitudinálními odběry vzorků u dětských pacientů s CD z pěti nemocnic v ČR naznačují velmi nízkou prevalenci *Blastocystis* – pouhých 7,5% dětí s CD (3/40 subjektů), tedy významně méně než u zdravých kontrol (29%; 14/49 subjektů) i jiných mimostřevních onemocněním jako diabetes 1. typu (37%; 21/57 subjektů) či juvenilní idiopatická artritida (20%; 2/10).

4.1.3 Silné stránky a limitace studie

Silnou stránkou studie mohl být její jedinečný design díky paralelnímu sledování pacientů s JIA na anti-TNF terapii - to nám umožnilo odfiltrovat potenciální přímý obecný účinek anti-TNF na jakýkoli střevní mikrobiom, včetně mikrobiomu osob se zdravými střevy. V souladu s nejnovějšími trendy jsme použili longitudinální pozorování, abychom snížili vliv krátkodobých výkyvů v početnosti jednotlivých mikrobiálních taxonů (Knight et al., 2018). Navíc náš multicentrický nábor pacientů mohl zvýšit zobecnění výsledků. Kromě toho jsme pečlivě dbali na integritu vzorků v celém chladicím řetězci: byla kontrolována teplota v domácích mrazničkách subjektů studie a přepravní kontejnery byly zmrazeny chladicími obaly s fázovým rozhraním (s otvory pro sběrné zkumavky) v polystyrénovém boxu. Nakonec jsme ze všech vzorků stolice získali hladiny kalprotektinu, což nám umožnilo upravit modely pro aktivitu slizničního zánětu a potvrdit absenci slizničního zánětu u JIA, ačkoli to bylo při absenci gastrointestinálních symptomů *a priori* velmi nepravděpodobné (Arvonen et al., 2012; Pichler et al., 2016).

Hlavním omezením byl nižší počet pacientů s JIA zařazených do studie. Samotná diagnóza je vzácná a u dětí chyběla ochota odebrat vzorky stolice. Získaná data však nenaznačují žádné hraniční účinky anti-TNF na metabolom nebo bakteriom stolice u JIA: rozdíl v účinku v kontrastu s CD je tak zřejmý.

4.1.4 Závěry studie a využití do budoucích výzkumných projektů

V rámci tohoto podprojektu jsme popsali posun bakteriomu a metabolomu stolice směrem ke zdravějšímu složení po anti-TNF terapii u CD, který byl podpořen komplexním longitudinálním sběrem vzorků stolice. Nejdůležitější je, že v modelu adjustovaném na hladiny fekálního kalprotektinu jsme identifikovali čtyři bakteriální taxony (zejména producenty SCFA *Flavonifractor* a *Ruminococcus*) a čtyři fekální metabolity (zejména isoleucin), jejichž množství se významně změnilo po anti-TNF terapii pouze u CD, ale nikoli u JIA se zdravým střevem. Nepozorovali jsme žádný výrazný vliv infliximabu *in vitro* na růst reprezentativních anaerobních bakterií, což spolu s výše uvedeným naznačuje, že změny ve fekálním bakteriomu a metabolomu jsou sekundárního původu a že pravděpodobně odrážejí snížení slizničního zánětu než celkový účinek anti-TNF. Identifikované bakteriální taxony a fekální metabolity by tedy mohly být považovány za známky obnoveného střevního ekosystému, což by mohlo pomoci pochopit povahu změn střevního mikrobiomu při terapii CD.

Vysoké nároky na pravidelné odběry pacientů a sběr klinických dat pro hladký průběh takové studie nás přiměly vytvořit dobře fungující logistiku zaslání vzorků, jejich skladování a data management pro další výzkumné projekty. I proto bylo vytvořeno vícero dalších výzkumných projektů zaměřených na Crohnovu chorobu u dětí (studie metabolomu stolice při léčbě enterální výživou, studie bakteriomu stolice při léčbě eliminační dietou v indukční fázi, tzv. CDED).

Naše výsledky vzbudily zájem dalších výzkumných skupin a budujeme tak mezinárodní spolupráci. Nyní spolupracujeme na metaanalýze u dětských IBD, vedenou týmem z rakouského Grazu , za účasti dat z 25 studií z celého světa. Jejím cílem je systematicky analyzovat změny složení střevního mikrobiomu a jeho použitelnost jako biomarkeru vývoje onemocnění a odpovědi na léčbu. Dále jsme byli osloveni se spoluprací na výzkumném projektu vedeného týmem z korejského Soulu, jehož cílem je ověřit, zda model hlubokého učení dokáže předpovědět prognózu dosažení remise dětských pacientů s IBD na základě složení jejich mikrobioty.

4.2 Střevní mikrobiom ve vztahu k intervenčnímu podávání probiotik u dětí s CDA

V rámci projektu zaměřeném na střevní mikrobiom ve vztahu k léčbě u dětí s CDA jsme publikovali jednu práci, která popisuje změny jednobuněčného parazitomu, který byl analyzován v rámci randomizované klinické studie s intervencí probiotických kmenů u CDA. Intervence dvěma kmeny laktobacilů způsobila v předchozích podprojektech stejné klinické studie mírné změny v bakteriomu (Oscarsson et al., 2021) a metabolomu (Jenickova et al., 2023), avšak u parazitomu jsme žádný efekt nepozorovali. Spíše naopak, pozitivita výskytu prvoků byla po dobu sledování stabilní a sice souvisela se zvýšenou diverzitou bakteriomu, ale naopak nesouvisela s přítomností některých prospěšných bakterií.

4.2.1 Prevalence prvoků ve studii

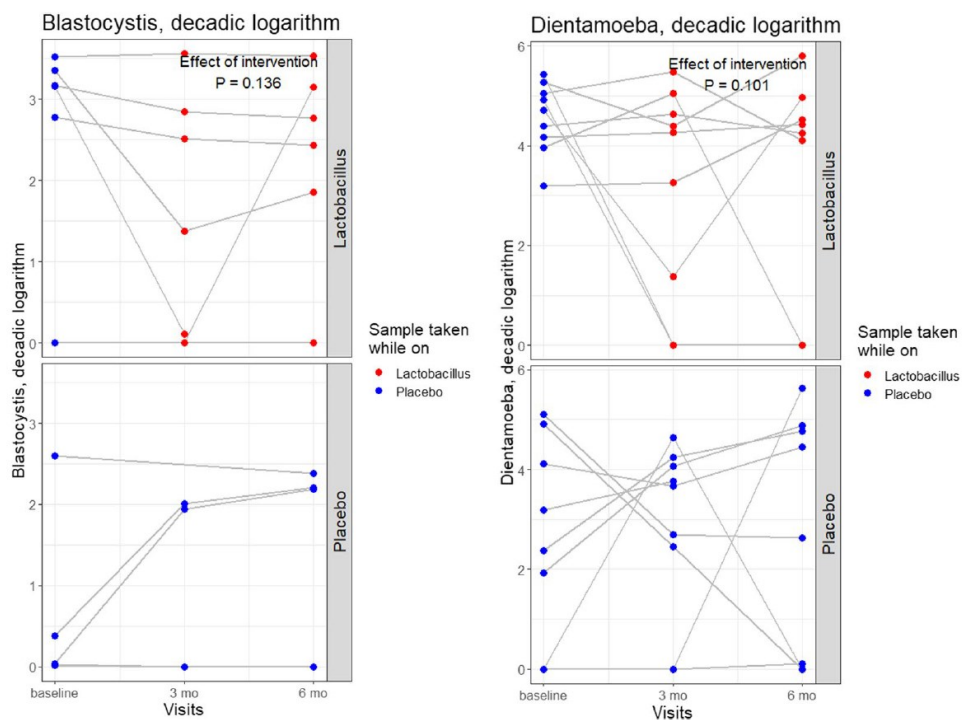
Cíleným molekulárním testováním pomocí kvantitativního PCR v reálném čase jsme nejprve zjišťovali prevalenci *Blastocystis* jako hlavního zástupce fekálního parazitomu (Cinek et al., 2021; Clark et al., 2013). Poté jsme prozkoumali celý parazitom pomocí profilování 18S rDNA a kvantifikovali pozitivní nálezy pomocí specifických PCR v reálném čase pro každého z prvoků. **Prevalence *Blastocystis* u dětí s CDA byla nízká (15,4 %)**, tedy v souladu s hygienickou hypotézou (Bach, 2001), recentní studií u pacientů s celiakií (Soleimani Jevinani et al., 2023) i geografickým gradientem výskytu *Blastocystis* u zdravých dospělých a dětí (Bart et al., 2013; El Safadi et al., 2016; El Safadi et al., 2014; Lhotska et al., 2020; Mohammad et al., 2017; Oliveira-Arbex et al., 2018; Poulsen et al., 2016; Scanlan et al., 2014; Tito et al., 2019).

Ačkoli je *Blastocystis* často uváděna jako nejčastější střevní eukaryont (Clark et al., 2013), v naší práci převažovala *D. fragilis* (celková prevalence 23,1 %). To může být způsobeno jejím vyšším výskytem v rozvinutých, urbanizovaných zemích (Barry et al., 2013; Stensvold, Arendrup, Molbak, et al., 2007), ale možná hrála významnější roli lokalita na jihu Švédska, což podporují i práce o vysokém výskytu ve Skánii, švédském Jönköpingu a v dánské Kodani (Jokelainen et al., 2017) (Ogren et al., 2015; Roser et al., 2013; Stensvold, Arendrup, Molbak, et al., 2007). Vyšší výskyt *D. fragilis* než *Blastocystis* v naší studii se tedy zdá být smysluplný s ohledem na geografickou blízkost zmiňovaných lokalit. Přesto vysoký výskyt *D. fragilis* v regionu vyvolává otázku jeho původu. Může se jednat o endemickou záležitost, ale může jít také o prosté reportovací zkreslení způsobené existencí několika dobře etablovaných skupin pro výzkum parazitů v Dánsku a Švédsku. Podobné ojedinělé případy překvapivě vysokého

výskytu *Dientamoeba* byly totiž nedávno hlášeny např. v Nizozemsku (Bruijnesteijn van Copenraet et al., 2015; de Wit et al., 2001) a v Česku (Jirku et al., 2022), rovněž při využití molekulární detekce.

4.2.2 Efekt probiotické intervence na parazity

Kolonizace prvoky byla v průběhu času stabilní a **nebyla ovlivněna intervencí laktobacily**. Časová stabilita u dětí byla dobře popsána u *D. fragilis* (Jokelainen et al., 2017); pro *Blastocystis* však existuje pouze jedna studie u dospělých s malým počtem subjektů (n=10) (Scanlan et al., 2014), takže naše studie je první, která tuto stabilitu parazitů u dětí uvádí. Ač bylo v dřívějších substudiích této klinické studie popsáno, že směs dvou kmenů laktobacilů moduluje imunitní odpověď, (Hakansson et al., 2019) mění fekální bakteriom (Oscarsson et al., 2021) a metabolom (Jenickova et al., 2023) směrem ke zdravějšímu složení, tak naše zjištění neprokázaly žádný účinek při modulaci fekálního parazitů u dětí s CDA.



Obr. 9 Množství *Blastocystis* a *Dientamoeba fragilis* u dětí s CDA dostávajících probiotickou intervenci laktobacilů (skupina Lactobacillus) nebo placebo po dobu 6 měsíců intervence

4.2.3 Prvoci a bakteriom

Diverzita bakteriomu nebyla ovlivněna probiotiky, ale pozorovali jsme, že je vyšší v přítomnosti prvoků, podobně jak to bylo dříve popsáno u jiných studií u dospělých, např. (Andersen et al., 2015) a u dětí (Cinek et al., 2021). Jak jsme spekulovali v předchozí práci našeho týmu, souvislost mezi pozitivitou prvoků a bohatým ekosystémem bakteriomu by mohla spočívat v prosperitě *Blastocystis* v diverzifikovaných ekosystémech (Cinek et al., 2021) nebo samotný prvok může modifikovat střevní ekosystém (Nieves-Ramirez et al., 2018). Navíc na základě našich současných zjištění je s diverzitou fekálního bakteriomu spojena i *D. fragilis* a nikoliv pouze *Blastocystis*.

Pozitivita *Blastocystis* a/nebo *D. fragilis* byla spojena s rozdílem ve složení bakteriomu.

Z jednotlivých taxonů asociovaných s *Blastocystis* vyniká negativní asociace s rodem *Akkermansia* a jejími vzestupnými taxonomickými kategoriemi. *Akkermansia* je známým degradátorem mucinu a producentem SCFA, (Derrien et al., 2004) a je tedy obecně považována za velmi prospěšnou pro střevní mikrobiom (Rodrigues et al., 2022). Navíc bylo popsáno, že její četnost je snížena u celiakie (Di Biase et al., 2021) a naopak se zvyšuje po podání probiotik (Oscarsson et al., 2021). Spekulujeme tedy, že se bakterii nedaří v ekosystému vytvořeném *Blastocystis*. Jiná prospěšná bakterie, *Faecalibacterium*, známý producent SCFA (Barcenilla et al., 2000), která má protizánětlivé vlastnosti (Sokol et al., 2008), byla rovněž negativně asociována s pozitivitou *Blastocystis*. Přítomnost *D. fragilis* byla mimo jiné inverzně spojena s *Enterobacteriaceae*, bakteriemi podporujícími zánět, o nichž je známo, že jsou obohaceny v bakteriomech pacientů s celiakií (Di Biase et al., 2021). Na druhou stranu byla její přítomnost, stejně jako *Blastocystis*, inverzně asociována s mnoha prospěšnými bakteriemi produkujícími SCFA (včetně *Flavonifractor*, *Faecalibacterium* nebo čeledi Lachnospiraceae), čímž se interpretace těchto asociací poněkud komplikuje.

4.2.4 Silné stránky a limitace studie

Naše práce přináší jedinečný pohled na nové téma ve výzkumu celiakie, protože žádná studie dosud nezkoumala střevní parazitom pomocí molekulárních metod. Vzorky byly odebírány longitudinálně, což pomáhá snížit vliv krátkodobých výkyvů v početnosti jednotlivých mikrobiálních taxonů (Knight et al., 2018). Analýza byla provedena několika doplňkovými metodami (kvantitativní PCR v reálném čase, ampliconové sekvenování různých úseků 18S

rDNA pro subtypizaci *Blastocystis* a testování parazitu). To spolu se zahrnutím více negativních kontrol chránilo před falešnou pozitivitou.

Hlavním nedostatkem byla nedostupnost čerstvého vzorku stolice potřebného pro přímé morfologické hodnocení pod mikroskopem, protože pro extrakci DNA byly použity pouze zmrazené vzorky. Nevíme tedy, jaká stádia prvoků byla přítomna a zda morfologie souvisí se subtypy *Blastocystis*. Dalším omezením je, že pro srovnání prevalence prvoků nebyla zkoumána žádná kontrolní skupina bez CDA, protože samotná klinická studie byla navržena mnohem dříve tato parazitologická podstudie.

4.2.5 Závěry studie a využití do budoucích výzkumných projektů

Prevalence *Blastocystis* u dětí s CDA je poměrně nízká, překvapivě *D. fragilis* je z obou prvoků častější. Pozitivita ani množství prvoků se po probiotické intervenci výrazně nezměnily. Přítomnost *Blastocystis* a *D. fragilis* byla spojena se zvýšenou diverzitou bakteriomu; nepřímo však souvisela s množstvím některých prospěšných bakterií, jako např. s *Akkermansia muciniphila*. Přestože probiotika mohou dětem s CDA pomoci modulovat imunitní odpověď a pozitivně ovlivnit fekální bakteriom, jednobuněčný parazitom zůstává neovlivněn.

Význam této práce souvisí zejména s dalším úspěšným využitím naší pipeline na analýzu jednobuněčného parazitu se zaměřením na *Blastocystis*, jakožto ukazatele bakteriomu stolice s vysokou diverzitou. Toho jsme využili i při zapojení do evropského projektu COST o *Blastocystis* v kontextu přístupu jednoho zdraví („One Health approach“), kde v současné době pracujeme na několika projektech zaměřených na detekci *Blastocystis* u různých populací, mj. právě u dětské Crohnovy choroby.

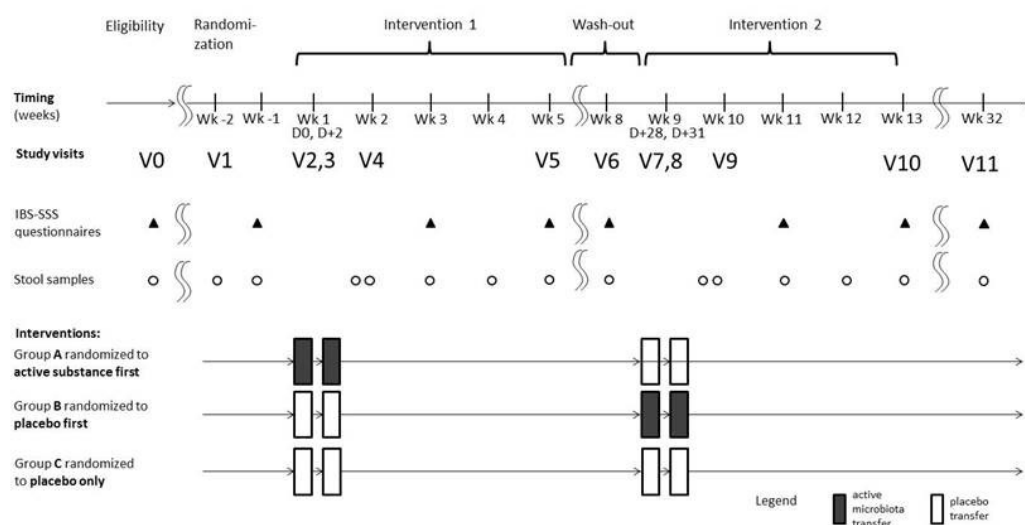
4.3 Střevní mikrobiom ve vztahu k léčbě IBS pomocí FMT

V rámci projektu zaměřeném na střevní mikrobiom a jeho změny ve vztahu k léčbě syndromu dráždivého tračnicku jsme publikovali dvě práce. První z nich je publikace protokolu této randomizované klinické intervenční studie, druhý je pak krátký formát typu „*letter to the Editor*“, který popisuje experiment, kterým jsme chtěli přispět do debaty o tom, co vše má být předmětem testování dárců stolice. Nábor pacientů je ukončen, studii t.č. dokončilo 55/60 subjektů, u zbylých probíhají finální klinické návštěvy a odběry vzorků. Vzhledem k tomu, že data o účinku na mikrobiom jsou nyní stále předmětem závěrečných analýz, nejsou publikována a nemohou tak být součástí dizertační práce. Níže tedy následuje diskuze nad designem studie v kontextu publikovaných prací na dané téma, a předběžných výsledcích studie.

4.3.1 Design studie

Naše studie je koncipována jako dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná, randomizovaná, překřížená studie se třemi skupinami dospělých pacientů s diagnózou IBS (průjemná nebo smíšená forma) podle Římských kritérií (IV. vydání). Každý účastník studie podstupuje dva páry FMT (celkem čtyři klyzmata pro každého pacienta), přičemž dvojice převodů jsou od sebe vzdáleny osm týdnů. Aktivní substancí je smíšená mikrobiota stolice získaná od osmi zdravých jedinců, kteří byli předem vybráni pro vysokou diverzitu svého mikrobiomu a svým složením jsou vzdáleni od mikrobioty pacientů IBS. Placebo je stejná mikrobiální směs, ale inaktivovaná autoklávováním.

Účastníci studie jsou náhodně zařazeni do jedné ze tří skupin: 1) klyzma nejprve s aktivní substancí a poté s placebem nebo 2) klyzma nejprve s placebem a poté s aktivní substancí nebo C) klyzma pouze s placebem (podrobné schéma na **Obr. 10**); poté jsou sledováni po celkovou dobu 32 týdnů od první intervence za účelem hodnocení závažnosti symptomů IBS (IBS-SSS), pravidelného sledování jejich střevního mikrobiomu (profilování 16S rDNA) a dalších parametrů, jako je počet řídkých stolic, Bristolská škála stolice, bolesti břicha a nadýmání, body mass index, obsah tuku, obvod pasu, tloušťka kožních řas a psychologická evaluace. Skupina s placebem je plánována z důvodu neznámého nástupu a trvání účinku intervence: pokud by se nástup účinku opozdil nebo pokud by přetrvával delší dobu, jednoduchý překřížený design by neměl dostatečnou sílu kvůli přenosovému efektu. V případě, že by FMT byla spojena s významným, ale ne trvalým zlepšením stavu, kontrolní skupina by ještě zvýšila statistickou sílu.



Obr.10 Schéma studie

4.3.2 Naše studie v kontextu literatury

Vzhledem k tomu, že 1) účinná terapie IBS není v současné době k dispozici a 2) roli v patogenezi onemocnění hraje velmi pravděpodobně střevní dysbióza, stala se FMT zajímavou možností jak pomoci pacientům s tímto tak velmi omezujícím onemocněním. V současnosti bylo publikováno devět randomizovaných klinických studií heterogenního designu (viz **Tabulka 4**).

Podskupiny IBS. Studie je navržena u průjmovitého subtypu IBS (IBS-D) a smíšeného subtypu (IBS-M) s převažujícím průjmem. Důvodů pro intervenci v této specifické podskupině je několik. Za prvé, přenos mikrobioty bude na rozdíl od formy se zácpou jednodušší. Za druhé, klinický účinek lze dobře posoudit, pokud dojde k významné změně konzistence a frekvence stolice. A konečně, cílová skupina pacientů bude srovnatelná s jinými studiemi v této oblasti, které také většinou využívají IBS-D nebo IBS-M (Halkjaer et al., 2023).

Cesta podání FMT. Při léčbě recidivující infekce *Clostridioides difficile* se jako nejefektivnější prokázalo opakovaná aplikace FMT cestou kolonoskopie, nicméně vysokou účinnost prokázalo i podávání kapslí (Baunwall et al., 2020; Cold et al., 2021). Naproti tomu u IBS vedla ke zlepšení klinického skóre IBS-SSS spíše FMT podávaná prostřednictvím horní endoskopie nebo kolonoskopie, ačkoliv se mnoho výzkumů zaměřilo na podávání FMT kapslemi (Franc et al., 2022). Žádná ze studií však nezvážila možnost aplikace klyzmatu, pro

kteří jsme se rozhodli v naší studii. Hlavními důvody jsou: 1) oproti endoskopii vyšší bezpečnost a 2) vyšší adherence v námi zvoleném zkříženém designu (očekáváme ji spíše u aplikace klyzmatu než při endoskopické podání). Podávání klyzmatu je levné a méně invazivní než endoskopická aplikace do tlustého střeva, ale může být méně účinné, protože se nerozšíří za oblast slezinného ohbí (*flexura lienalis*), tedy nejdále se dostane do sestupného tračníku tračníku (Konig et al., 2017), proto je v naší studii aplikace klyzmatu párová - během dvou dnů se opakuje (viz **Obr. 10**).

Dárci FMT – skrínink. Dárci pro FMT jsou jednotlivými biobankami vybíráni na základě splnění kritérií daných současnými doporučeními. V době přípravy studie jsme se řídili konsenzem pro biobanky stolice (Cammarota et al., 2019) Jedinou odlišností v našem přístupu bylo nevyřazení dárců pozitivních na jednobuněčné střevní prvoky *Blastocystis* a *Dientamoeba*, jelikož jsou tyto prvoci asociovaní s vysokou bakteriální diverzitou (Andersen et al., 2015; Hurych et al., 2022; Rostami et al., 2017; Tito et al., 2019) a jsou tedy spíše ukazatelem vhodného dárce. Navíc, jak jsme prokázali vlastním experimentem, oba prvoci nepřežívají zmrazení na -80°C využívané pro skladování stolic v rámci biobanky. Tedy, na základě naší krátké práce není bezpečnostních důvodů k vyloučení dárců pozitivních na *Blastocystis* a/nebo *Dientamoeba*.

Dárci FMT – strategie využití FMT. Zpravidla každá banka stolice má nízké jednotky předem selektovaných donorů stolice nebo dokonce jednoho super-donora, pro jejichž převážné využívání argumentuje např. (El-Salhy et al., 2021). Důvodem je fakt, že účinnost FMT se zdá být závislá právě na dárci. Avšak ztráta jednoho takové super-donora významně negativně ovlivňuje průběh studie, navíc se zde uplatňuje faktor temporální variability složení – v důsledku tak může celá studie předčasně skončit nebo se v každém z časových bodů aplikuje jiná mikrobiota. Ideálním řešením by tak mohlo být dárcovské stolice smíchat a zamrazit před intervenční fází studie. Tím se zajistí dostatečné množství stejného složení pro všechny aplikace ve studii. I proto jsme se v naší studii rozhodli pro výběr několika dárců ($n=8$), jejichž stolice jsme smíchali, poté alikvotovali do jednotlivých dávek a zamrazili ještě před intervenční fází studie. Tak jsme zajistili stejné složení pro všechny příjemce a díky smíchání stolic i vyšší diverzitu FMT, která zvyšuje šanci nastolení eubiózy ve střevním mikrobiomu příjemců.

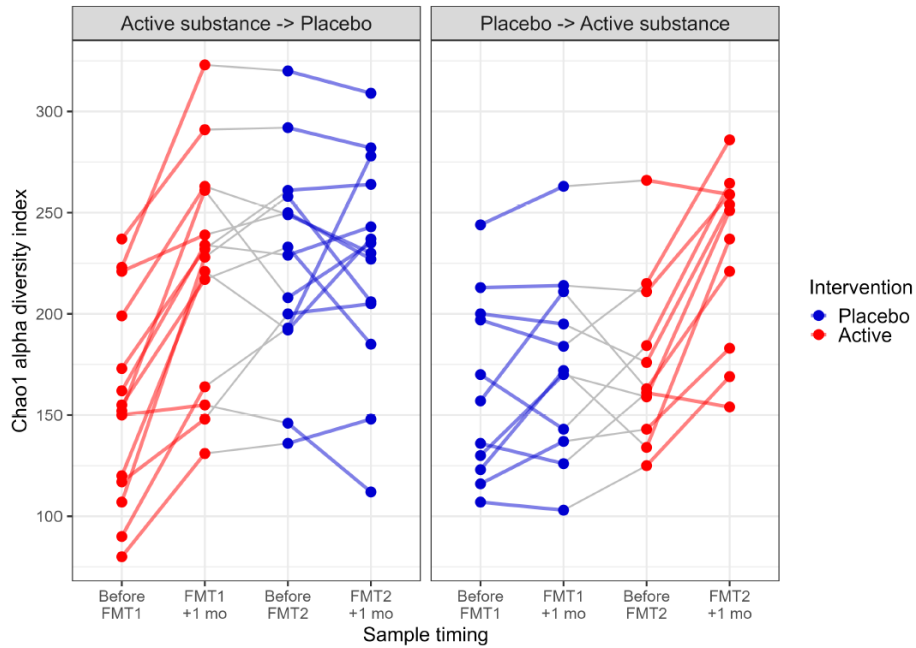
Placebo. U pacientů s IBS je míra odpovědi na placebo vysoká, odhady klinické odpovědi na placebo se v metaanalýzách pohybují od 16 % do 72 % (Ford & Moayyedi, 2010; Patel et al., 2005). Nejčastěji se jedná o vlastní stolici pacienta, ev. prázdné kapsle u kapslového podání (viz **Tabulka 4**). Využití vlastní stolice jako placebo má však celou řadu nevýhod – jedná se zejména o nekonzistentnost vzhledem k temporální variabilitě složení mikrobiomu, a navíc každý účastník studie pak dostává jiné placebo. V naší studii jsme se proto rozhodli využít autoklávovanou aktivní substanci pro FMT. Složení tak bylo stejné pro všechny účastníky studie a nebude obsahovat živé mikroorganismy, tedy efekt mikrobioty byl prakticky eliminován.

4.3.3. Efekt směsné mikrobioty na střevní mikrobiom u IBS – předběžné výsledky

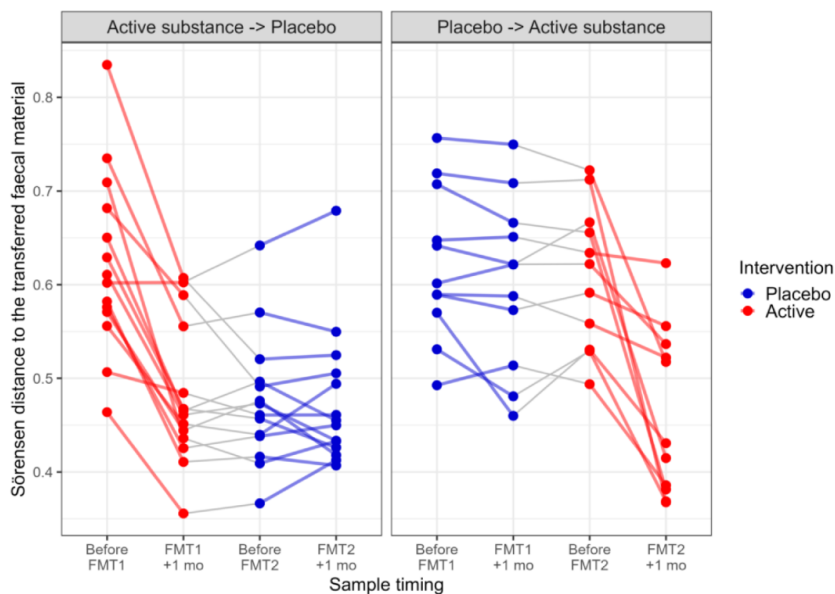
T.č. je hotova průběžná analýza u 25 subjektů, které dokončili pozorování, za využití metagenomické sekvenování vzorků stolice ve čtyřech časových bodech: týden před a jeden měsíc po každé ze dvou intervencí FMT. Data byla analyzována z hlediska taxonomického složení (MetaPhlAn), funkční kapacity (HUMAnN) a nosičství genů antibiotické rezistence. Byly použity lineární modely se smíšenými efekty ke zkoumání vlivu intervencí na kvantitativní charakteristiky mikrobiomu s náhodnou intercepcí pro každou intervenci (aktivní vs. placebo).

Podání živé FMT bylo silně spojeno se zvýšením diverzity fekálního mikrobiomu měsíc po její aplikaci, jak změřeno pomocí indexu Chaové ($p = 4 \times 10^{-7}$) a Shannonova indexu diverzity ($p = 4,5 \times 10^{-4}$), ale méně v Simpsonově indexu ($p = 0,024$). Podle metrik beta diverzity, tedy vzájemné odlišnosti bakteriomů, se fekální mikrobiota pacientů po FMT více podobala složení aktivní substance než podání autoklávovaného placebo, zatímco podání placebo nebo wash-out období vedlo ke kratším a náhodným trajektoriím ($p = 3,8 \times 10^{-9}$ pro rozdíl mezi vzdáleností po aplikaci živé mikrobioty a placebo).

Z výsledků lze konstatovat, že bakteriomy pacientů s IBS reagovaly na aktivní FMT, ale nikoliv na autoklávované placebo. Zvýšením své diverzity a svého složení se přiblížily dárčovské substanci směsné stolice. Tyto změny trvaly v průběhu sledování.



Obr. 11. Diverzita se po transplantaci aktivní FMT zvyšuje a přetrvává



Obr.12 Vzdálenost k dárcovské substanci se snižuje po aktivní FMT, ale nikoliv po placebo.

4.3.4. Efekt směsné mikrobioty na klinické příznaky IBS – předběžné výsledky

Primární sledovaný výsledek byla změna ve skóre IBS-SSS před FMT a 4 týdny po aplikaci FMT. Z předběžných analýz vyplývá, že podání FMT vedlo ke zlepšení skóre, avšak rozdíl mezi podáním aktivní mikrobioty a placebem nebyl klinicky významný ($p=0,893$; změny IBS-SSS u jednotlivých skupin viz **Tabulka 5.**)

Tabulka 5. Efekt FMT na změny IBS-SSS po prvním (týden 5) a druhém (týden 13) páru FMT u jednotlivých studijních skupin

Skupina / rozdíl v IBS-SSS*	Týden 5	Týden 13
1 (A – P)	-27,5	-14,7
2 (P – A)	-50,0	-39,1
3 (P – P)	-50,3	-5,3

* Jako klinicky účinný byl považován pokles v IBS-SSS oproti vstupní hodnotě o méně než 62,5 bodu;
A = aktivní substance; P = placebo

4.3.5 Využití do budoucích výzkumných projektů

Hlavním výstupem projektu budou další poznatky o změnách mikrobiomu a o klinickém efektu FMT u pacientů s IBS. Neméně důležitým vedlejším produktem je vytvoření funkční biobanky stolic pro účely FMT u rekurentních infekcí *C. difficile*, která se zřídila na půdě Fakultní nemocnice v Motole na konci roku 2021 na bázi naší výzkumné banky. Do dnešního dne bylo nemocným aplikováno přes stovku FMT.

5. Závěr

Cílem této práce bylo zkoumat reakce střevního mikrobiomu po terapeutické intervenci pomocí longitudinálního sledování u tří chronických střevních onemocnění: Crohnovy choroby, celiakie a syndromu dráždivého tračníku.

U Crohnovy choroby bylo známo, že anti-TNF léčba mění střevní bakteriom, avšak vzhledem neoptimálnímu designu dosud publikovaných studií nebylo známo, zda jsou tyto změny primárně efektem anti-TNF nebo sekundární reakce hojícího se střevního zánětu. Z našich výsledků modelování, které reflektuje nejen změny složení bakteriomu, ale i stav střevního zánětu, vyplývá, že změny bakteriomu u CD po léčbě anti-TNF jsou sekundární, tedy dané vyléčením střevní sliznice, a nikoliv primárně působením preparátů anti-TNF.

V případě celiakie jsme se zaměřili na její subklinickou formu, celiakální autoimunitu, kde jsme v rámci intervenční studie s probiotiky sledovali efekt na změny jednobuněčného střevního parazitomu a ovlivnění bakteriomu právě přítomností těchto jednobuněčných eukaryontů. Ač bylo v této klinické studii již dříve popsán efekt na snížení serologických markerů CeD a také pozitivní efekty na střevní bakteriom a metabolom, jednobuněčný střevní parazitom zůstal dle naší substudie neovlivněn. Přítomnost pro střevo prospěšných střevních prvků však významně ovlivňovala složení bakteriomu, ač překvapivě, byla jejich přítomnost asociována negativně s přítomností prospěšných střevních bakterií.

U syndromu dráždivého tračníku jsme pacientům v rámci randomizované klinické studie podávali FMT ve formě klyzmatu, a to celkem čtyři dávky směsné mikrobioty ze stolic osmi různých, předem vybraných dárců. Studie s inovativním designem je ukončena, k dispozici jsou zatím předběžné výsledky. Ty naznačují, že léčba směsnou mikrobiotou u pacientů s IBS nevedla ke zmírnění obtíží, avšak došlo k prospěšným změnám ve střevní mikrobiotě.

V rámci longitudinálních studií jsme tak popsali reakci střevního mikrobiomu na terapeutickou intervenci tří různých gastroenterologických onemocnění. Díky svému designu by výsledky studií mohly přispět k lepšímu poznání role střevního mikrobiomu v patogenezi těchto závažných onemocnění a ev. k úpravám jejich léčebných modalit.

6. Použitá literatura

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*, 6(237), 237ra265. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Abubucker, S., Segata, N., Goll, J., Schubert, A. M., Izard, J., Cantarel, B. L., Rodriguez-Mueller, B., Zucker, J., Thiagarajan, M., Henrissat, B., White, O., Kelley, S. T., Methe, B., Schloss, P. D., Gevers, D., Mitreva, M., & Huttenhower, C. (2012). Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome. *PLoS Comput Biol*, 8(6), e1002358. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002358>
- Alfellani, M. A., Stensvold, C. R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E. S., Fagbenro-Beyioku, A. F., & Clark, C. G. (2013). Variable geographic distribution of Blastocystis subtypes and its potential implications. *Acta Trop*, 126(1), 11-18. [https://doi.org/S0001-706X\(12\)00399-3](https://doi.org/S0001-706X(12)00399-3) [pii] 10.1016/j.actatropica.2012.12.011
- Ananthakrishnan, A. N., Luo, C., Yajnik, V., Khalili, H., Garber, J. J., Stevens, B. W., Cleland, T., & Xavier, R. J. (2017). Gut Microbiome Function Predicts Response to Anti-integrin Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host Microbe*, 21(5), 603-610 e603. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.010>
- Andersen, L. O., Bonde, I., Nielsen, H. B., & Stensvold, C. R. (2015). A retrospective metagenomics approach to studying Blastocystis. *FEMS Microbiol Ecol*, 91(7). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv072>
- Andersen, L. O., & Stensvold, C. R. (2016). Blastocystis in Health and Disease: Are We Moving from a Clinical to a Public Health Perspective? *J Clin Microbiol*, 54(3), 524-528. <https://doi.org/10.1128/JCM.02520-15>
- Andren Aronsson, C., Lee, H. S., Hard Af Segerstad, E. M., Uusitalo, U., Yang, J., Koletzko, S., Liu, E., Kurppa, K., Bingley, P. J., Toppari, J., Ziegler, A. G., She, J. X., Hagopian, W. A., Rewers, M., Akolkar, B., Krischer, J. P., Virtanen, S. M., Norris, J. M., Agardh, D., & Group, T. S. (2019). Association of Gluten Intake During the First 5 Years of Life With Incidence of Celiac Disease Autoimmunity and Celiac Disease Among Children at Increased Risk. *JAMA*, 322(6), 514-523. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.10329>
- Aroniadis, O. C., Brandt, L. J., Oneto, C., Feuerstadt, P., Sherman, A., Wolkoff, A. W., Kassam, Z., Sadovsky, R. G., Elliott, R. J., Budree, S., Kim, M., & Keller, M. J. (2019). Faecal microbiota transplantation for diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 4(9), 675-685. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30198-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30198-0)
- Arvonen, M., Vahasalo, P., Turunen, S., Salo, H. M., Maki, M., Laurila, K., Vaarala, O., & Karttunen, T. J. (2012). Altered expression of intestinal human leucocyte antigen D-related and immune signalling molecules in juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Immunol*, 170(3), 266-273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04663.x>
- Audebert, C., Even, G., Cian, A., Blastocystis Investigation, G., Loywick, A., Merlin, S., Viscogliosi, E., & Chabe, M. (2016). Colonization with the enteric protozoa Blastocystis is associated with increased diversity of human gut bacterial microbiota. *Sci Rep*, 6, 25255. <https://doi.org/10.1038/srep25255>
- Backhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M. T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowska, D., Colding, C., . . . Wang, J. (2015). Dynamics and

- Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*, 17(5), 690-703. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- Bach, J. F. (2001). Protective role of infections and vaccinations on autoimmune diseases. *J Autoimmun*, 16(3), 347-353. <https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0478>
- Barcenilla, A., Pryde, S. E., Martin, J. C., Duncan, S. H., Stewart, C. S., Henderson, C., & Flint, H. J. (2000). Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol*, 66(4), 1654-1661. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1654-1661.2000>
- Barnich, N., & Darfeuille-Michaud, A. (2007). Adherent-invasive Escherichia coli and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 23(1), 16-20. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3280105a38>
- Barratt, J. L., Harkness, J., Marriott, D., Ellis, J. T., & Stark, D. (2011). A review of Dientamoeba fragilis carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. *Gut Microbes*, 2(1), 3-12. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.1.14755>
- Barrett, J. S., Gearry, R. B., Muir, J. G., Irving, P. M., Rose, R., Rosella, O., Haines, M. L., Shepherd, S. J., & Gibson, P. R. (2010). Dietary poorly absorbed, short-chain carbohydrates increase delivery of water and fermentable substrates to the proximal colon. *Aliment Pharmacol Ther*, 31(8), 874-882. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04237.x>
- Barry, M. A., Weatherhead, J. E., Hotez, P. J., & Woc-Colburn, L. (2013). Childhood parasitic infections endemic to the United States. *Pediatr Clin North Am*, 60(2), 471-485. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.12.011>
- Bart, A., Wentink-Bonnema, E. M., Gilis, H., Verhaar, N., Wassenaar, C. J., van Vugt, M., Goorhuis, A., & van Gool, T. (2013). Diagnosis and subtype analysis of Blastocystis sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infect Dis*, 13, 389. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-389>
- Baunwall, S. M. D., Lee, M. M., Eriksen, M. K., Mullish, B. H., Marchesi, J. R., Dahlerup, J. F., & Hvas, C. L. (2020). Faecal microbiota transplantation for recurrent Clostridioides difficile infection: An updated systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*, 29-30, 100642. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100642>
- Belkaid, Y., & Hand, T. W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, 157(1), 121-141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Verges, M. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., . . . Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Bjerrum, J. T., Wang, Y., Hao, F., Coskun, M., Ludwig, C., Gunther, U., & Nielsen, O. H. (2015). Metabonomics of human fecal extracts characterize ulcerative colitis, Crohn's disease and healthy individuals. *Metabolomics*, 11, 122-133. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0677-3>
- Blais Lecours, P., Marsolais, D., Cormier, Y., Berberi, M., Hache, C., Bourdages, R., & Duchaine, C. (2014). Increased prevalence of Methanospaera stadtmanae in inflammatory bowel diseases. *PLoS One*, 9(2), e87734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087734>
- Blaser, M. J., & Falkow, S. (2009). What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat Rev Microbiol*, 7(12), 887-894. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2245>
- Bodkhe, R., Shetty, S. A., Dhotre, D. P., Verma, A. K., Bhatia, K., Mishra, A., Kaur, G., Pande, P., Bangarusamy, D. K., Santosh, B. P., Perumal, R. C., Ahuja, V., Shouche,

- Y. S., & Makharia, G. K. (2019). Comparison of Small Gut and Whole Gut Microbiota of First-Degree Relatives With Adult Celiac Disease Patients and Controls. *Front Microbiol*, *10*, 164. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00164>
- Bokulich, N. A., Chung, J., Battaglia, T., Henderson, N., Jay, M., Li, H., A, D. L., Wu, F., Perez-Perez, G. I., Chen, Y., Schweizer, W., Zheng, X., Contreras, M., Dominguez-Bello, M. G., & Blaser, M. J. (2016). Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med*, *8*(343), 343ra382. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad7121>
- Bonnet, R., Suau, A., Dore, J., Gibson, G. R., & Collins, M. D. (2002). Differences in rDNA libraries of faecal bacteria derived from 10- and 25-cycle PCRs. *Int J Syst Evol Microbiol*, *52*(Pt 3), 757-763. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-3-757>
- Brugere, J. F., Borrel, G., Gaci, N., Tottey, W., O'Toole, P. W., & Malpuech-Brugere, C. (2014). Archaeobiotics: proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease. *Gut Microbes*, *5*(1), 5-10. <https://doi.org/10.4161/gmic.26749>
- Bruijnesteijn van Coppenraet, L. E., Dullaert-de Boer, M., Ruijs, G. J., van der Reijden, W. A., van der Zanden, A. G., Weel, J. F., & Schuurs, T. A. (2015). Case-control comparison of bacterial and protozoan microorganisms associated with gastroenteritis: application of molecular detection. *Clin Microbiol Infect*, *21*(6), 592 e599-519. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.007>
- Buffie, C. G., & Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol*, *13*(11), 790-801. <https://doi.org/10.1038/nri3535>
- Buford, T. W. (2017). (Dis)Trust your gut: the gut microbiome in age-related inflammation, health, and disease. *Microbiome*, *5*(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0296-0>
- Buono, J. L., Carson, R. T., & Flores, N. M. (2017). Health-related quality of life, work productivity, and indirect costs among patients with irritable bowel syndrome with diarrhea. *Health Qual Life Outcomes*, *15*(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12955-017-0611-2>
- Cai, M., Kandalai, S., Tang, X., & Zheng, Q. (2022). Contributions of Human-Associated Archaeal Metabolites to Tumor Microenvironment and Carcinogenesis. *Microbiol Spectr*, *10*(2), e0236721. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02367-21>
- Calderon de la Barca, A. M., Castillo-Fimbres, R. S., Mejia-Leon, M. E., Quihui-Cota, L., Ochoa-Leyva, A., & Aguayo-Patron, S. V. (2020). Enteric parasitic infection disturbs bacterial structure in Mexican children with autoantibodies for type 1 diabetes and/or celiac disease. *Gut Pathog*, *12*, 37. <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00376-3>
- Camarota, G., Ianiro, G., Kelly, C. R., Mullish, B. H., Allegretti, J. R., Kassam, Z., Putignani, L., Fischer, M., Keller, J. J., Costello, S. P., Sokol, H., Kump, P., Satokari, R., Kahn, S. A., Kao, D., Arkkila, P., Kuijper, E. J., Vehreschild, M. J. G., Pintus, C., . . . Gasbarrini, A. (2019). International consensus conference on stool banking for faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*, *68*(12), 2111-2121. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319548>
- Canfora, E. E., Meex, R. C. R., Venema, K., & Blaak, E. E. (2019). Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat Rev Endocrinol*, *15*(5), 261-273. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0156-z>
- Cao, Z., Sugimura, N., Burgermeister, E., Ebert, M. P., Zuo, T., & Lan, P. (2022). The gut virome: A new microbiome component in health and disease. *EBioMedicine*, *81*, 104113. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104113>
- Carlier, J. P., Bedora-Faure, M., K'Ouas, G., Alauzet, C., & Mory, F. (2010). Proposal to unify *Clostridium orbiscindens* Winter et al. 1991 and *Eubacterium plautii* (Seguin

- 1928) Hofstad and Aasjord 1982, with description of *Flavonifractor plautii* gen. nov., comb. nov., and reassignment of *Bacteroides capillosus* to *Pseudoflavonifractor capillosus* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60(Pt 3), 585-590. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016725-0>
- Carroccio, A., Iacono, G., Cottone, M., Di Prima, L., Cartabellotta, F., Cavataio, F., Scalici, C., Montalto, G., Di Fede, G., Rini, G., Notarbartolo, A., & Averna, M. R. (2003). Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from irritable bowel syndrome: a prospective study in adults and children. *Clin Chem*, 49(6 Pt 1), 861-867. <https://doi.org/10.1373/49.6.861>
- Carroll, I. M., Ringel-Kulka, T., Siddle, J. P., & Ringel, Y. (2012). Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*, 24(6), 521-530, e248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01891.x>
- Cepko, L. C. S., Garling, E. E., Dinsdale, M. J., Scott, W. P., Bandy, L., Nice, T., Faber-Hammond, J., & Mellies, J. L. (2020). Myoviridae phage PDX kills enteroaggregative *Escherichia coli* without human microbiome dysbiosis. *J Med Microbiol*, 69(2), 309-323. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001162>
- Cinek, O., Polackova, K., Odeh, R., Allassaf, A., Kramna, L., Ibekwe, M. U., Majaliwa, E. S., Ahmadov, G., Elmahi, B. M. E., Mekki, H., Oikarinen, S., Lebl, J., & Abdullah, M. A. (2021). Blastocystis in the faeces of children from six distant countries: prevalence, quantity, subtypes and the relation to the gut bacteriome. *Parasit Vectors*, 14(1), 399. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04859-3>
- Clark, C. G., van der Giezen, M., Alfellani, M. A., & Stensvold, C. R. (2013). Recent developments in Blastocystis research. *Adv Parasitol*, 82, 1-32. <https://doi.org/B978-0-12-407706-5.00001-0> [pii] 10.1016/B978-0-12-407706-5.00001-0
- Clooney, A. G., Eckenberger, J., Laserna-Mendieta, E., Sexton, K. A., Bernstein, M. T., Vagianos, K., Sargent, M., Ryan, F. J., Moran, C., Sheehan, D., Sleator, R. D., Targownik, L. E., Bernstein, C. N., Shanahan, F., & Claesson, M. J. (2021). Ranking microbiome variance in inflammatory bowel disease: a large longitudinal intercontinental study. *Gut*, 70(3), 499-510. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321106>
- Cold, F., Baunwall, S. M. D., Dahlerup, J. F., Petersen, A. M., Hvas, C. L., & Hansen, L. H. (2021). Systematic review with meta-analysis: encapsulated faecal microbiota transplantation - evidence for clinical efficacy. *Therap Adv Gastroenterol*, 14, 17562848211041004. <https://doi.org/10.1177/17562848211041004>
- Collado, M. C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., & Sanz, Y. (2009). Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol*, 62(3), 264-269. <https://doi.org/10.1136/jcp.2008.061366>
- Costello, S. P., Soo, W., Bryant, R. V., Jairath, V., Hart, A. L., & Andrews, J. M. (2017). Systematic review with meta-analysis: faecal microbiota transplantation for the induction of remission for active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*, 46(3), 213-224. <https://doi.org/10.1111/apt.14173>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559-563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- de Wit, M. A., Koopmans, M. P., Kortbeek, L. M., van Leeuwen, N. J., Vinje, J., & van Duynhoven, Y. T. (2001). Etiology of gastroenteritis in sentinel general practices in the netherlands. *Clin Infect Dis*, 33(3), 280-288. <https://doi.org/10.1086/321875>

- Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., & de Vos, W. M. (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, *54*(Pt 5), 1469-1476. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02873-0>
- Di Biase, A. R., Marasco, G., Ravaioli, F., Dajti, E., Colecchia, L., Righi, B., D'Amico, V., Festi, D., Iughetti, L., & Colecchia, A. (2021). Gut microbiota signatures and clinical manifestations in celiac disease children at onset: a pilot study. *J Gastroenterol Hepatol*, *36*(2), 446-454. <https://doi.org/10.1111/jgh.15183>
- Diether, N. E., & Willing, B. P. (2019). Microbial Fermentation of Dietary Protein: An Important Factor in Diet(-)Microbe(-)Host Interaction. *Microorganisms*, *7*(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010019>
- DiGiulio, D. B., Romero, R., Kusanovic, J. P., Gomez, R., Kim, C. J., Seok, K. S., Gotsch, F., Mazaki-Tovi, S., Vaisbuch, E., Sanders, K., Bik, E. M., Chaiworapongsa, T., Oyarzun, E., & Relman, D. A. (2010). Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol*, *64*(1), 38-57. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00830.x>
- Domingo, M. C., Huletsky, A., Boissinot, M., Bernard, K. A., Picard, F. J., & Bergeron, M. G. (2008). *Ruminococcus gauvreauii* sp. nov., a glycopeptide-resistant species isolated from a human faecal specimen. *Int J Syst Evol Microbiol*, *58*(Pt 6), 1393-1397. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65259-0>
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(26), 11971-11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*, *14*(1), 20-32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- Donnachie, E., Schneider, A., Mehring, M., & Enck, P. (2018). Incidence of irritable bowel syndrome and chronic fatigue following GI infection: a population-level study using routinely collected claims data. *Gut*, *67*(6), 1078-1086. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313713>
- Draper, L. A., Ryan, F. J., Dalmasso, M., Casey, P. G., McCann, A., Velayudhan, V., Ross, R. P., & Hill, C. (2020). Autochthonous faecal viral transfer (FVT) impacts the murine microbiome after antibiotic perturbation. *BMC Biol*, *18*(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00906-0>
- Dridi, B., Henry, M., El Khechine, A., Raoult, D., & Drancourt, M. (2009). High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol. *PLoS One*, *4*(9), e7063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007063>
- Duan, Y., Llorente, C., Lang, S., Brandl, K., Chu, H., Jiang, L., White, R. C., Clarke, T. H., Nguyen, K., Torralba, M., Shao, Y., Liu, J., Hernandez-Morales, A., Lessor, L., Rahman, I. R., Miyamoto, Y., Ly, M., Gao, B., Sun, W., . . . Schnabl, B. (2019). Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease. *Nature*, *575*(7783), 505-511. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1742-x>
- Duboc, H., Rainteau, D., Rajca, S., Humbert, L., Farabos, D., Maubert, M., Grondin, V., Jouet, P., Bouhassira, D., Seksik, P., Sokol, H., Coffin, B., & Sabate, J. M. (2012). Increase in fecal primary bile acids and dysbiosis in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*, *24*(6), 513-520, e246-517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01893.x>
- Durban, A., Abellan, J. J., Jimenez-Hernandez, N., Salgado, P., Ponce, M., Ponce, J., Garrigues, V., Latorre, A., & Moya, A. (2012). Structural alterations of faecal and

- mucosa-associated bacterial communities in irritable bowel syndrome. *Environ Microbiol Rep*, 4(2), 242-247. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00327.x>
- Dutilh, B. E., Cassman, N., McNair, K., Sanchez, S. E., Silva, G. G., Boling, L., Barr, J. J., Speth, D. R., Seguritan, V., Aziz, R. K., Felts, B., Dinsdale, E. A., Mokili, J. L., & Edwards, R. A. (2014). A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat Commun*, 5, 4498. <https://doi.org/10.1038/ncomms5498>
- Dziarski, R., Park, S. Y., Kashyap, D. R., Dowd, S. E., & Gupta, D. (2016). Pglyrp-Regulated Gut Microflora *Prevotella falsenii*, *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides eggerthii* Enhance and *Alistipes finegoldii* Attenuates Colitis in Mice. *PLoS One*, 11(1), e0146162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146162>
- Edwards, R. A., Vega, A. A., Norman, H. M., Ohaeri, M., Levi, K., Dinsdale, E. A., Cinek, O., Aziz, R. K., McNair, K., Barr, J. J., Bibby, K., Brouns, S. J. J., Cazares, A., de Jonge, P. A., Desnues, C., Diaz Munoz, S. L., Fineran, P. C., Kurilshikov, A., Lavigne, R., . . . Dutilh, B. E. (2019). Global phylogeography and ancient evolution of the widespread human gut virus crAssphage. *Nat Microbiol*, 4(10), 1727-1736. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0494-6>
- El-Salhy, M., Hatlebakk, J. G., Gilja, O. H., Brathen Kristoffersen, A., & Hausken, T. (2020). Efficacy of faecal microbiota transplantation for patients with irritable bowel syndrome in a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Gut*, 69(5), 859-867. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319630>
- El-Salhy, M., Hausken, T., & Hatlebakk, J. G. (2021). Current status of fecal microbiota transplantation for irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*, 33(11), e14157. <https://doi.org/10.1111/nmo.14157>
- El Safadi, D., Cian, A., Nourrisson, C., Pereira, B., Morelle, C., Bastien, P., Bellanger, A. P., Botterel, F., Candolfi, E., Desoubieux, G., Lachaud, L., Morio, F., Pomares, C., Rabodonirina, M., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Gantois, N., Certad, G., Delhaes, L., . . . Viscogliosi, E. (2016). Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infect Dis*, 16(1), 451. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1776-8>
- El Safadi, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Dabboussi, F., Delhaes, L., Seck, M., Hamze, M., Riveau, G., & Viscogliosi, E. (2014). Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis*, 14, 164. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-164>
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(22), 9066-9071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110>
- Falony, G., Joossens, M., Vieira-Silva, S., Wang, J., Darzi, Y., Faust, K., Kurilshikov, A., Bonder, M. J., Valles-Colomer, M., Vandeputte, D., Tito, R. Y., Chaffron, S., Rymenans, L., Verspecht, C., De Sutter, L., Lima-Mendez, G., D'Hoe, K., Jonckheere, K., Homola, D., . . . Raes, J. (2016). Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*, 352(6285), 560-564. <https://doi.org/10.1126/science.aad3503>
- Finlay, B. B., Amato, K. R., Azad, M., Blaser, M. J., Bosch, T. C. G., Chu, H., Dominguez-Bello, M. G., Ehrlich, S. D., Elinav, E., Geva-Zatorsky, N., Gros, P., Guillemin, K., Keck, F., Korem, T., McFall-Ngai, M. J., Melby, M. K., Nichter, M., Pettersson, S., Poinar, H., . . . Giles-Vernick, T. (2021). The hygiene hypothesis, the COVID

- pandemic, and consequences for the human microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *118*(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.2010217118>
- Flacco, M. E., Manzoli, L., De Giorgio, R., Gasbarrini, A., Cicchetti, A., Bravi, F., Altini, M., Caio, G. P., & Ursini, F. (2019). Costs of irritable bowel syndrome in European countries with universal healthcare coverage: a meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *23*(7), 2986-3000. https://doi.org/10.26355/eurrev_201904_17580
- Forbes, J. D., Chen, C. Y., Knox, N. C., Marrie, R. A., El-Gabalawy, H., de Kievit, T., Alfa, M., Bernstein, C. N., & Van Domselaar, G. (2018). A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases-does a common dysbiosis exist? *Microbiome*, *6*(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0603-4>
- Ford, A. C., & Moayyedi, P. (2010). Meta-analysis: factors affecting placebo response rate in the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, *32*(2), 144-158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04328.x>
- Ford, A. C., Moayyedi, P., Chey, W. D., Harris, L. A., Lacy, B. E., Saito, Y. A., Quigley, E. M. M., & Syndrome, A. C. G. T. F. o. M. o. I. B. (2018). American College of Gastroenterology Monograph on Management of Irritable Bowel Syndrome. *Am J Gastroenterol*, *113*(Suppl 2), 1-18. <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0084-x>
- Ford, A. C., Sperber, A. D., Corsetti, M., & Camilleri, M. (2020). Irritable bowel syndrome. *Lancet*, *396*(10263), 1675-1688. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31548-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31548-8)
- Franc, A., Vetchy, D., & Fulopova, N. (2022). Commercially Available Enteric Empty Hard Capsules, Production Technology and Application. *Pharmaceuticals (Basel)*, *15*(11). <https://doi.org/10.3390/ph15111398>
- Francis, C. Y., Morris, J., & Whorwell, P. J. (1997). The irritable bowel severity scoring system: a simple method of monitoring irritable bowel syndrome and its progress. *Aliment Pharmacol Ther*, *11*(2), 395-402. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1997.142318000.x>
- Frandemark, A., Tornblom, H., Jakobsson, S., & Simren, M. (2018). Work Productivity and Activity Impairment in Irritable Bowel Syndrome (IBS): A Multifaceted Problem. *Am J Gastroenterol*, *113*(10), 1540-1549. <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0262-x>
- Franzosa, E. A., Morgan, X. C., Segata, N., Waldron, L., Reyes, J., Earl, A. M., Giannoukos, G., Boylan, M. R., Ciulla, D., Gevers, D., Izard, J., Garrett, W. S., Chan, A. T., & Huttenhower, C. (2014). Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(22), E2329-2338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319284111>
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., Carling, D., Swann, J. R., Gibson, G., Viardot, A., Morrison, D., Louise Thomas, E., & Bell, J. D. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun*, *5*, 3611. <https://doi.org/10.1038/ncomms4611>
- Fujimura, K. E., Demoor, T., Rauch, M., Faruqi, A. A., Jang, S., Johnson, C. C., Boushey, H. A., Zoratti, E., Ownby, D., Lukacs, N. W., & Lynch, S. V. (2014). House dust exposure mediates gut microbiome Lactobacillus enrichment and airway immune defense against allergens and virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(2), 805-810. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310750111>
- Galtier, M., De Sordi, L., Sivignon, A., de Vallee, A., Maura, D., Neut, C., Rahmouni, O., Wannerberger, K., Darfeuille-Michaud, A., Desreumaux, P., Barnich, N., & Debarbieux, L. (2017). Bacteriophages Targeting Adherent Invasive Escherichia coli Strains as a Promising New Treatment for Crohn's Disease. *J Crohns Colitis*, *11*(7), 840-847. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw224>

- Garcia-Gamboa, R., Kirchmayr, M. R., Gradilla-Hernandez, M. S., Perez-Brocal, V., Moya, A., & Gonzalez-Avila, M. (2021). The intestinal mycobiota and its relationship with overweight, obesity and nutritional aspects. *J Hum Nutr Diet*, *34*(4), 645-655. <https://doi.org/10.1111/jhn.12864>
- Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vazquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., Schwager, E., Knights, D., Song, S. J., Yassour, M., Morgan, X. C., Kostic, A. D., Luo, C., Gonzalez, A., McDonald, D., Haberman, Y., Walters, T., Baker, S., Rosh, J., . . . Xavier, R. J. (2014). The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*, *15*(3), 382-392. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.005>
- Ghoshal, U., Shukla, R., Srivastava, D., & Ghoshal, U. C. (2016). Irritable Bowel Syndrome, Particularly the Constipation-Predominant Form, Involves an Increase in *Methanobrevibacter smithii*, Which Is Associated with Higher Methane Production. *Gut Liver*, *10*(6), 932-938. <https://doi.org/10.5009/gnl15588>
- Goll, R., Johnsen, P. H., Hjerde, E., Diab, J., Valle, P. C., Hilpusch, F., & Cavanagh, J. P. (2020). Effects of fecal microbiota transplantation in subjects with irritable bowel syndrome are mirrored by changes in gut microbiome. *Gut Microbes*, *12*(1), 1794263. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1794263>
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., & Ley, R. E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, *159*(4), 789-799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>
- Gosalbes, M. J., Llop, S., Valles, Y., Moya, A., Ballester, F., & Francino, M. P. (2013). Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy*, *43*(2), 198-211. <https://doi.org/10.1111/cea.12063>
- Guindo, C. O., Drancourt, M., & Grine, G. (2020). Digestive tract methanodrome: Physiological roles of human microbiota-associated methanogens. *Microb Pathog*, *149*, 104425. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104425>
- Guo, Q., Lin, H., Chen, P., Tan, S., Wen, Z., Lin, L., He, J., Wen, J., & Lu, S. (2021). Dynamic changes of intestinal flora in patients with irritable bowel syndrome combined with anxiety and depression after oral administration of enterobacteria capsules. *Bioengineered*, *12*(2), 11885-11897. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1999374>
- Hakansson, A., Andren Aronsson, C., Brundin, C., Oscarsson, E., Molin, G., & Agardh, D. (2019). Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* on the Peripheral Immune Response in Children with Celiac Disease Autoimmunity: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Nutrients*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/nu11081925>
- Halkjaer, S. I., Christensen, A. H., Lo, B. Z. S., Browne, P. D., Gunther, S., Hansen, L. H., & Petersen, A. M. (2018). Faecal microbiota transplantation alters gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: results from a randomised, double-blind placebo-controlled study. *Gut*, *67*(12), 2107-2115. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316434>
- Halkjaer, S. I., Lo, B., Cold, F., Hojer Christensen, A., Holster, S., Konig, J., Brummer, R. J., Aroniadis, O. C., Lahtinen, P., Holvoet, T., Gluud, L. L., & Petersen, A. M. (2023). Fecal microbiota transplantation for the treatment of irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol*, *29*(20), 3185-3202. <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i20.3185>
- Hall, A. B., Yassour, M., Sauk, J., Garner, A., Jiang, X., Arthur, T., Lagoudas, G. K., Vatanen, T., Fornelos, N., Wilson, R., Bertha, M., Cohen, M., Garber, J., Khalili, H.,

- Gevers, D., Ananthakrishnan, A. N., Kugathasan, S., Lander, E. S., Blainey, P., . . . Huttenhower, C. (2017). A novel *Ruminococcus gnavus* clade enriched in inflammatory bowel disease patients. *Genome Med*, *9*(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0490-5>
- Henke, M. T., Kenny, D. J., Cassilly, C. D., Vlamakis, H., Xavier, R. J., & Clardy, J. (2019). *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(26), 12672-12677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904099116>
- Hollister, E. B., Riehle, K., Luna, R. A., Weidler, E. M., Rubio-Gonzales, M., Mistretta, T. A., Raza, S., Doddapaneni, H. V., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Petrosino, J. F., Shulman, R. J., & Versalovic, J. (2015). Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome*, *3*, 36. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0101-x>
- Holster, S., Lindqvist, C. M., Repsilber, D., Salonen, A., de Vos, W. M., Konig, J., & Brummer, R. J. (2019). The Effect of Allogenic Versus Autologous Fecal Microbiota Transfer on Symptoms, Visceral Perception and Fecal and Mucosal Microbiota in Irritable Bowel Syndrome: A Randomized Controlled Study. *Clin Transl Gastroenterol*, *10*(4), e00034. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000034>
- Holvoet, T., Joossens, M., Vazquez-Castellanos, J. F., Christiaens, E., Heyerick, L., Boelens, J., Verhasselt, B., van Vlierberghe, H., De Vos, M., Raes, J., & De Looze, D. (2021). Fecal Microbiota Transplantation Reduces Symptoms in Some Patients With Irritable Bowel Syndrome With Predominant Abdominal Bloating: Short- and Long-term Results From a Placebo-Controlled Randomized Trial. *Gastroenterology*, *160*(1), 145-157 e148. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.07.013>
- Hoyhtya, M., Korpela, K., Saqib, S., Junkkari, S., Nissila, E., Nikkonen, A., Dikareva, E., Salonen, A., de Vos, W. M., & Kolho, K. L. (2022). Quantitative Fecal Microbiota Profiles Relate to Therapy Response During Induction With Tumor Necrosis Factor alpha Antagonist Infliximab in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. <https://doi.org/10.1093/ibd/izac182>
- Hsiao, A., Ahmed, A. M., Subramanian, S., Griffin, N. W., Drewry, L. L., Petri, W. A., Jr., Haque, R., Ahmed, T., & Gordon, J. I. (2014). Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection. *Nature*, *515*(7527), 423-426. <https://doi.org/10.1038/nature13738>
- Hugerth, L. W., Andreasson, A., Talley, N. J., Forsberg, A. M., Kjellstrom, L., Schmidt, P. T., Agreus, L., & Engstrand, L. (2020). No distinct microbiome signature of irritable bowel syndrome found in a Swedish random population. *Gut*, *69*(6), 1076-1084. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318717>
- Human Microbiome Project, C. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, *486*(7402), 207-214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Hurych, J., Vodolanova, L., Vejmelka, J., Drevinek, P., Kohout, P., Cinek, O., & Nohynkova, E. (2022). Freezing of faeces dramatically decreases the viability of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, *34*(2), 242-243. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000002327>
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I., Kurppa, K., Mearin, M. L., Ribes-Koninckx, C., Shamir, R., Troncone, R., Auricchio, R., Castillejo, G., Christensen, R., Dolinsek, J., Gillett, P., Hrobjartsson, A., Koltai, T., Maki, M., Nielsen, S. M., Popp, A., Stordal, K., . . . Wessels, M. (2020). European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, *70*(1), 141-156. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002497>

- Chassard, C., Dapoigny, M., Scott, K. P., Crouzet, L., Del'homme, C., Marquet, P., Martin, J. C., Pickering, G., Ardid, D., Eschalier, A., Dubray, C., Flint, H. J., & Bernalier-Donadille, A. (2012). Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, *35*(7), 828-838. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2012.05007.x>
- Cheng, J., Ringel-Kulka, T., Heikamp-de Jong, I., Ringel, Y., Carroll, I., de Vos, W. M., Salojarvi, J., & Satokari, R. (2016). Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. *ISME J*, *10*(4), 1002-1014. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.177>
- Cho, I., Yamanishi, S., Cox, L., Methe, B. A., Zavadil, J., Li, K., Gao, Z., Mahana, D., Raju, K., Teitler, I., Li, H., Alekseyenko, A. V., & Blaser, M. J. (2012). Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*, *488*(7413), 621-626. <https://doi.org/10.1038/nature11400>
- Illi, S., Depner, M., Genuneit, J., Horak, E., Loss, G., Strunz-Lehner, C., Buchele, G., Boznanski, A., Danielewicz, H., Cullinan, P., Heederik, D., Braun-Fahrlander, C., von Mutius, E., & Group, G. S. (2012). Protection from childhood asthma and allergy in Alpine farm environments-the GABRIEL Advanced Studies. *J Allergy Clin Immunol*, *129*(6), 1470-1477 e1476. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.013>
- Imai, T., Inoue, R., Kawada, Y., Morita, Y., Inatomi, O., Nishida, A., Bamba, S., Kawahara, M., & Andoh, A. (2019). Characterization of fungal dysbiosis in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*, *54*(2), 149-159. <https://doi.org/10.1007/s00535-018-1530-7>
- Jenickova, E., Andren Aronsson, C., Mascellani Bergo, A., Cinek, O., Havlik, J., & Agardh, D. (2023). Effects of Lactiplantibacillus plantarum and Lacticaseibacillus paracasei supplementation on the faecal metabolome in children with coeliac disease autoimmunity: a randomised, double-blinded placebo-controlled clinical trial. *Front Nutr*, *10*, 1183963. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1183963>
- Jirku, M., Kasparova, A., Lhotska, Z., Obornik, M., Brozova, K., Petrzekova, K. J., Samas, P., Kadlecova, O., Stensvold, C. R., & Jirku, K. (2022). A Cross-Sectional Study on the Occurrence of the Intestinal Protist, Dientamoeba fragilis, in the Gut-Healthy Volunteers and Their Animals. *Int J Mol Sci*, *23*(23). <https://doi.org/10.3390/ijms232315407>
- Johnsen, P. H., Hilpusch, F., Cavanagh, J. P., Leikanger, I. S., Kolstad, C., Valle, P. C., & Goll, R. (2018). Faecal microbiota transplantation versus placebo for moderate-to-severe irritable bowel syndrome: a double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, single-centre trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, *3*(1), 17-24. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30338-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30338-2)
- Johnson, C. C., Ownby, D. R., Alford, S. H., Havstad, S. L., Williams, L. K., Zoratti, E. M., Peterson, E. L., & Joseph, C. L. (2005). Antibiotic exposure in early infancy and risk for childhood atopy. *J Allergy Clin Immunol*, *115*(6), 1218-1224. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.04.020>
- Jokelainen, P., Heibelstrup Jensen, B., Andreassen, B. U., Petersen, A. M., Roser, D., Krogfelt, K. A., Nielsen, H. V., & Stensvold, C. R. (2017). Dientamoeba fragilis, a Commensal in Children in Danish Day Care Centers. *J Clin Microbiol*, *55*(6), 1707-1713. <https://doi.org/10.1128/JCM.00037-17>
- Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P., & Vermeire, S. (2011). Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, *60*(5), 631-637. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.223263>

- Kahrs, C. R., Chuda, K., Tapia, G., Stene, L. C., Marild, K., Rasmussen, T., Ronningen, K. S., Lundin, K. E. A., Kramna, L., Cinek, O., & Stordal, K. (2019). Enterovirus as trigger of coeliac disease: nested case-control study within prospective birth cohort. *BMJ*, *364*, 1231. <https://doi.org/10.1136/bmj.1231>
- Kapoor, A., Shandilya, M., & Kundu, S. (2011). Structural insight of dopamine beta-hydroxylase, a drug target for complex traits, and functional significance of exonic single nucleotide polymorphisms. *PLoS One*, *6*(10), e26509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026509>
- Karczewski, J., Poniedzialek, B., Adamski, Z., & Rzymiski, P. (2014). The effects of the microbiota on the host immune system. *Autoimmunity*, *47*(8), 494-504. <https://doi.org/10.3109/08916934.2014.938322>
- Keller, J. J., Ooijevaar, R. E., Hvas, C. L., Terveer, E. M., Lieberknecht, S. C., Hogenauer, C., Arkkila, P., Sokol, H., Gridnyev, O., Megraud, F., Kump, P. K., Nakov, R., Goldenberg, S. D., Satokari, R., Tkatch, S., Sanguinetti, M., Cammarota, G., Dorofeev, A., Gubska, O., . . . Vehreschild, M. (2021). A standardised model for stool banking for faecal microbiota transplantation: a consensus report from a multidisciplinary UEG working group. *United European Gastroenterol J*, *9*(2), 229-247. <https://doi.org/10.1177/2050640620967898>
- Kelly, C. P. (2013). Fecal microbiota transplantation--an old therapy comes of age. *N Engl J Med*, *368*(5), 474-475. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1214816>
- Kemppainen, K. M., Lynch, K. F., Liu, E., Lonrot, M., Simell, V., Briese, T., Koletzko, S., Hagopian, W., Rewers, M., She, J. X., Simell, O., Toppari, J., Ziegler, A. G., Akolkar, B., Krischer, J. P., Lernmark, A., Hyoty, H., Triplett, E. W., Agardh, D., & Group, T. S. (2017). Factors That Increase Risk of Celiac Disease Autoimmunity After a Gastrointestinal Infection in Early Life. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *15*(5), 694-702 e695. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.10.033>
- Kennedy, K. M., de Goffau, M. C., Perez-Munoz, M. E., Arrieta, M. C., Backhed, F., Bork, P., Braun, T., Bushman, F. D., Dore, J., de Vos, W. M., Earl, A. M., Eisen, J. A., Elovitz, M. A., Ganal-Vonarburg, S. C., Ganzle, M. G., Garrett, W. S., Hall, L. J., Hornef, M. W., Huttenhower, C., . . . Walter, J. (2023). Questioning the fetal microbiome illustrates pitfalls of low-biomass microbial studies. *Nature*, *613*(7945), 639-649. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05546-8>
- Kerckhoffs, A. P. M., Ben-Amor, K., Samsom, M., van der Rest, M. E., de Vogel, J., Knol, J., & Akkermans, L. M. A. (2011). Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome. *J Med Microbiol*, *60*(Pt 2), 236-245. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.022848-0>
- Knight, R., Vrbanc, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolk, T., McCall, L. I., McDonald, D., Melnik, A. V., Morton, J. T., Navas, J., Quinn, R. A., Sanders, J. G., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Tripathi, A., Xu, Z. Z., . . . Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol*, *16*(7), 410-422. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0029-9>
- Kolho, K. L., Korpela, K., Jaakkola, T., Pichai, M. V., Zoetendal, E. G., Salonen, A., & de Vos, W. M. (2015). Fecal Microbiota in Pediatric Inflammatory Bowel Disease and Its Relation to Inflammation. *Am J Gastroenterol*, *110*(6), 921-930. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.149>
- Kondrashova, A., Mustalahti, K., Kaukinen, K., Viskari, H., Volodicheva, V., Haapala, A. M., Ilonen, J., Knip, M., Maki, M., Hyoty, H., & Epivir Study, G. (2008). Lower economic status and inferior hygienic environment may protect against celiac disease. *Ann Med*, *40*(3), 223-231. <https://doi.org/10.1080/07853890701678689>

- Konig, J., Siebenhaar, A., Hogenauer, C., Arkkila, P., Nieuwdorp, M., Noren, T., Ponsoen, C. Y., Rosien, U., Rossen, N. G., Satokari, R., Stallmach, A., de Vos, W., Keller, J., & Brummer, R. J. (2017). Consensus report: faecal microbiota transfer - clinical applications and procedures. *Aliment Pharmacol Ther*, *45*(2), 222-239. <https://doi.org/10.1111/apt.13868>
- Lacy, B. E., Mearin, F., Chang, L., Chey, W. D., Lembo, A. J., Simren, M., & Spiller, R. (2016). Bowel Disorders. *Gastroenterology*. [https://doi.org/S0016-5085\(16\)00222-5](https://doi.org/S0016-5085(16)00222-5) [pii] 10.1053/j.gastro.2016.02.031
- Lahtinen, P., Jalanka, J., Hartikainen, A., Mattila, E., Hillila, M., Punkkinen, J., Koskenpato, J., Anttila, V. J., Tillonen, J., Satokari, R., & Arkkila, P. (2020). Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation versus autologous placebo administered via colonoscopy in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, *51*(12), 1321-1331. <https://doi.org/10.1111/apt.15740>
- Lau, J. T., Whelan, F. J., Herath, I., Lee, C. H., Collins, S. M., Bercik, P., & Surette, M. G. (2016). Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. *Genome Med*, *8*(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0327-7>
- Le Bastard, Q., Al-Ghalith, G. A., Gregoire, M., Chapelet, G., Javaudin, F., Dailly, E., Batard, E., Knights, D., & Montassier, E. (2018). Systematic review: human gut dysbiosis induced by non-antibiotic prescription medications. *Aliment Pharmacol Ther*, *47*(3), 332-345. <https://doi.org/10.1111/apt.14451>
- Lebwohl, B., & Rubio-Tapia, A. (2021). Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease. *Gastroenterology*, *160*(1), 63-75. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.098>
- Lederberg, J. M., A.T. . (2001). 'Ome Sweet 'Omics--A Genealogical Treasury of Words [Commentary]. *The Scientist*, *15*(7). <https://www.the-scientist.com/commentary/ome-sweet-omics---a-genealogical-treasury-of-words-54889>
- Lee, C. H., Steiner, T., Petrof, E. O., Smieja, M., Roscoe, D., Nematallah, A., Weese, J. S., Collins, S., Moayyedi, P., Crowther, M., Ropeleski, M. J., Jayaratne, P., Higgins, D., Li, Y., Rau, N. V., & Kim, P. T. (2016). Frozen vs Fresh Fecal Microbiota Transplantation and Clinical Resolution of Diarrhea in Patients With Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, *315*(2), 142-149. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.18098>
- Leonard, M. M., Valitutti, F., Karathia, H., Pujolassos, M., Kenyon, V., Fanelli, B., Troisi, J., Subramanian, P., Camhi, S., Colucci, A., Serena, G., Cucchiara, S., Trovato, C. M., Malamisura, B., Francavilla, R., Elli, L., Hasan, N. A., Zomorodi, A. R., Colwell, R., . . . Team, C.-G. (2021). Microbiome signatures of progression toward celiac disease onset in at-risk children in a longitudinal prospective cohort study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *118*(29). <https://doi.org/10.1073/pnas.2020322118>
- Lepp, P. W., Brinig, M. M., Ouverney, C. C., Palm, K., Armitage, G. C., & Relman, D. A. (2004). Methanogenic Archaea and human periodontal disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(16), 6176-6181. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308766101>
- Lewis, J. D., Chen, E. Z., Baldassano, R. N., Otley, A. R., Griffiths, A. M., Lee, D., Bittinger, K., Bailey, A., Friedman, E. S., Hoffmann, C., Albenberg, L., Sinha, R., Compher, C., Gilroy, E., Nessel, L., Grant, A., Chehoud, C., Li, H., Wu, G. D., & Bushman, F. D. (2015). Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn's Disease. *Cell Host Microbe*, *18*(4), 489-500. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.09.008>

- Lhotska, Z., Jirku, M., Hlozkova, O., Brozova, K., Jirsova, D., Stensvold, C. R., Kolisko, M., & Jirku Pomajbikova, K. (2020). A Study on the Prevalence and Subtype Diversity of the Intestinal Protist Blastocystis sp. in a Gut-Healthy Human Population in the Czech Republic. *Front Cell Infect Microbiol*, *10*, 544335. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.544335>
- Li, G., Yang, M., Jin, Y., Li, Y., Qian, W., Xiong, H., Song, J., & Hou, X. (2018). Involvement of shared mucosal-associated microbiota in the duodenum and rectum in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*, *33*(6), 1220-1226. <https://doi.org/10.1111/jgh.14059>
- Liang, G., & Bushman, F. D. (2021). The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nat Rev Microbiol*, *19*(8), 514-527. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00536-5>
- Liu, C., Li, J., Zhang, Y., Philip, A., Shi, E., Chi, X., & Meng, J. (2015). Influence of glucose fermentation on CO₂ assimilation to acetate in homoacetogen *Blautia coccoides* GA-1. *J Ind Microbiol Biotechnol*, *42*(9), 1217-1224. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1646-1>
- Liu, E., Dong, F., Baron, A. E., Taki, I., Norris, J. M., Frohnert, B. I., Hoffenberg, E. J., & Rewers, M. (2017). High Incidence of Celiac Disease in a Long-term Study of Adolescents With Susceptibility Genotypes. *Gastroenterology*, *152*(6), 1329-1336 e1321. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.02.002>
- Liu, Y., Zhang, L., Wang, X., Wang, Z., Zhang, J., Jiang, R., Wang, X., Wang, K., Liu, Z., Xia, Z., Xu, Z., Nie, Y., Lv, X., Wu, X., Zhu, H., & Duan, L. (2016). Similar Fecal Microbiota Signatures in Patients With Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome and Patients With Depression. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *14*(11), 1602-1611 e1605. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.05.033>
- Lloyd-Price, J., Arze, C., Ananthakrishnan, A. N., Schirmer, M., Avila-Pacheco, J., Poon, T. W., Andrews, E., Ajami, N. J., Bonham, K. S., Brislawn, C. J., Casero, D., Courtney, H., Gonzalez, A., Graeber, T. G., Hall, A. B., Lake, K., Landers, C. J., Mallick, H., Plichta, D. R., . . . Huttenhower, C. (2019). Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature*, *569*(7758), 655-662. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1237-9>
- Lopez-Siles, M., Duncan, S. H., Garcia-Gil, L. J., & Martinez-Medina, M. (2017). Faecalibacterium prausnitzii: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J*, *11*(4), 841-852. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.176>
- Lynch, S. V., & Pedersen, O. (2016). The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*, *375*(24), 2369-2379. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1600266>
- Maccaferri, S., Candela, M., Turroni, S., Centanni, M., Severgnini, M., Consolandi, C., Cavina, P., & Brigidi, P. (2012). IBS-associated phylogenetic unbalances of the intestinal microbiota are not reverted by probiotic supplementation. *Gut Microbes*, *3*(5), 406-413. <https://doi.org/10.4161/gmic.21009>
- Maloney, J. G., Molokin, A., da Cunha, M. J. R., Cury, M. C., & Santin, M. (2020). Blastocystis subtype distribution in domestic and captive wild bird species from Brazil using next generation amplicon sequencing. *Parasite Epidemiol Control*, *9*, e00138. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00138>
- S2405-6731(20)30007-6 [pii]
e00138 [pii]
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J., & Dore, J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, *55*(2), 205-211. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073817>

- Marcobal, A., Kashyap, P. C., Nelson, T. A., Aronov, P. A., Donia, M. S., Spormann, A., Fischbach, M. A., & Sonnenburg, J. L. (2013). A metabolomic view of how the human gut microbiota impacts the host metabolome using humanized and gnotobiotic mice. *ISME J*, 7(10), 1933-1943. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.89>
- Marchesi, J. R., Holmes, E., Khan, F., Kochhar, S., Scanlan, P., Shanahan, F., Wilson, I. D., & Wang, Y. (2007). Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res*, 6(2), 546-551. <https://doi.org/10.1021/pr060470d>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3, 31. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Marsh, A., Eslick, E. M., & Eslick, G. D. (2016). Does a diet low in FODMAPs reduce symptoms associated with functional gastrointestinal disorders? A comprehensive systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr*, 55(3), 897-906. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0922-1>
- Martens, E. C., Chiang, H. C., & Gordon, J. I. (2008). Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe*, 4(5), 447-457. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.007>
- Maurice, C. F., Haiser, H. J., & Turnbaugh, P. J. (2013). Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell*, 152(1-2), 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.052>
- Merino, V. R., Nakano, V., Liu, C., Song, Y., Finegold, S. M., & Avila-Campos, M. J. (2011). Quantitative detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* subtypes isolated from children with and without diarrhea. *J Clin Microbiol*, 49(1), 416-418. <https://doi.org/10.1128/JCM.01556-10>
- Metwaly, A., Dunkel, A., Waldschmitt, N., Raj, A. C. D., Lagkouvardos, I., Corraliza, A. M., Mayorgas, A., Martinez-Medina, M., Reiter, S., Schlöter, M., Hofmann, T., Allez, M., Panes, J., Salas, A., & Haller, D. (2020). Integrated microbiota and metabolite profiles link Crohn's disease to sulfur metabolism. *Nat Commun*, 11(1), 4322. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17956-1>
- Mirjalali, H., Abbasi, M. R., Naderi, N., Hasani, Z., Mirsamadi, E. S., Stensvold, C. R., Balaii, H., Asadzadeh Aghdaei, H., & Zali, M. R. (2017). Distribution and phylogenetic analysis of *Blastocystis* sp. subtypes isolated from IBD patients and healthy individuals in Iran. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 36(12), 2335-2342. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3065-x>
- Mohammad, N. A., Al-Mekhlafi, H. M., Moktar, N., & Anuar, T. S. (2017). Prevalence and risk factors of *Blastocystis* infection among underprivileged communities in rural Malaysia. *Asian Pac J Trop Med*, 10(5), 491-497. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.05.001>
- Moissl-Eichinger, C., Pausan, M., Taffner, J., Berg, G., Bang, C., & Schmitz, R. A. (2018). Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes. *Trends Microbiol*, 26(1), 70-85. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.004>
- Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., Ward, D. V., Reyes, J. A., Shah, S. A., LeLeiko, N., Snapper, S. B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B. E., Xavier, R. J., & Huttenhower, C. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*, 13(9), R79. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r79>
- Mukherjee, A., Lordan, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2020). Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health. *Gut Microbes*, 12(1), 1802866. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1802866>

- Mukherjee, S., Seshadri, R., Varghese, N. J., Eloie-Fadrosch, E. A., Meier-Kolthoff, J. P., Goker, M., Coates, R. C., Hadjithomas, M., Pavlopoulos, G. A., Paez-Espino, D., Yoshikuni, Y., Visel, A., Whitman, W. B., Garrity, G. M., Eisen, J. A., Hugenholtz, P., Pati, A., Ivanova, N. N., Woyke, T., . . . Kyrpides, N. C. (2017). 1,003 reference genomes of bacterial and archaeal isolates expand coverage of the tree of life. *Nat Biotechnol*, *35*(7), 676-683. <https://doi.org/10.1038/nbt.3886>
- Murugesan, S., Nirmalkar, K., Hoyo-Vadillo, C., Garcia-Espitia, M., Ramirez-Sanchez, D., & Garcia-Mena, J. (2018). Gut microbiome production of short-chain fatty acids and obesity in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *37*(4), 621-625. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3143-0>
- Nash, A. K., Auchtung, T. A., Wong, M. C., Smith, D. P., Gesell, J. R., Ross, M. C., Stewart, C. J., Metcalf, G. A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Ajami, N. J., & Petrosino, J. F. (2017). The gut mycobion of the Human Microbiome Project healthy cohort. *Microbiome*, *5*(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4>
- Nayfach, S., Paez-Espino, D., Call, L., Low, S. J., Sberro, H., Ivanova, N. N., Proal, A. D., Fischbach, M. A., Bhatt, A. S., Hugenholtz, P., & Kyrpides, N. C. (2021). Metagenomic compendium of 189,680 DNA viruses from the human gut microbiome. *Nat Microbiol*, *6*(7), 960-970. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00928-6>
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*, *390*(10114), 2769-2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)
- Nieves-Ramirez, M. E., Partida-Rodriguez, O., Laforest-Lapointe, I., Reynolds, L. A., Brown, E. M., Valdez-Salazar, A., Moran-Silva, P., Rojas-Velazquez, L., Morien, E., Parfrey, L. W., Jin, M., Walter, J., Torres, J., Arrieta, M. C., Ximenez-Garcia, C., & Finlay, B. B. (2018). Asymptomatic Intestinal Colonization with Protist Blastocystis Is Strongly Associated with Distinct Microbiome Ecological Patterns. *mSystems*, *3*(3). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00007-18>
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, *336*(6086), 1262-1267. <https://doi.org/10.1126/science.1223813>
- Norman, J. M., Handley, S. A., Baldrige, M. T., Droit, L., Liu, C. Y., Keller, B. C., Kambal, A., Monaco, C. L., Zhao, G., Fleshner, P., Stappenbeck, T. S., McGovern, D. P., Keshavarzian, A., Mutlu, E. A., Sauk, J., Gevers, D., Xavier, R. J., Wang, D., Parkes, M., & Virgin, H. W. (2015). Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*, *160*(3), 447-460. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>
- Ogren, J., Dienus, O., Lofgren, S., Einemo, I. M., Iveroth, P., & Matussek, A. (2015). Dientamoeba fragilis prevalence coincides with gastrointestinal symptoms in children less than 11 years old in Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *34*(10), 1995-1998. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2442-6>
- Ogren, J., Van Nguyen, S., Nguyen, M. K., Dimberg, J., & Matussek, A. (2016). Prevalence of Dientamoeba fragilis, Giardia duodenalis, Entamoeba histolytica/dispar, and Cryptosporidium spp in Da Nang, Vietnam, detected by a multiplex real-time PCR. *APMIS*, *124*(6), 529-533. <https://doi.org/10.1111/apm.12535>
- Oikarinen, M., Puustinen, L., Lehtonen, J., Hakola, L., Simell, S., Toppari, J., Ilonen, J., Veijola, R., Virtanen, S. M., Knip, M., & Hyoty, H. (2020). Enterovirus Infections Are Associated With the Development of Celiac Disease in a Birth Cohort Study. *Front Immunol*, *11*, 604529. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604529>

- Olivares, M., Neef, A., Castillejo, G., Palma, G. D., Varea, V., Capilla, A., Palau, F., Nova, E., Marcos, A., Polanco, I., Ribes-Koninckx, C., Ortigosa, L., Izquierdo, L., & Sanz, Y. (2015). The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. *Gut*, *64*(3), 406-417. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306931>
- Oliveira-Arbex, A. P., David, E. B., Caccio, S. M., Fonseca, C., Martin, J. G., Kurokawa, C. S., Tosini, F., Souza Neto, J. A., & Guimaraes, S. (2021). Prevalence and genetic characterization of *Dientamoeba fragilis* in asymptomatic children attending daycare centers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, *63*, e39. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202163039>
- Oliveira-Arbex, A. P., David, E. B., & Guimaraes, S. (2018). Blastocystis genetic diversity among children of low-income daycare center in Southeastern Brazil. *Infect Genet Evol*, *57*, 59-63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.005>
- Ong, D. K., Mitchell, S. B., Barrett, J. S., Shepherd, S. J., Irving, P. M., Biesiekierski, J. R., Smith, S., Gibson, P. R., & Muir, J. G. (2010). Manipulation of dietary short chain carbohydrates alters the pattern of gas production and genesis of symptoms in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*, *25*(8), 1366-1373. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06370.x>
- Oscarsson, E., Hakansson, A., Andren Aronsson, C., Molin, G., & Agardh, D. (2021). Effects of Probiotic Bacteria Lactobacillaceae on the Gut Microbiota in Children With Celiac Disease Autoimmunity: A Placebo-Controlled and Randomized Clinical Trial. *Front Nutr*, *8*, 680771. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.680771>
- Ott, S. J., Musfeldt, M., Wenderoth, D. F., Hampe, J., Brant, O., Folsch, U. R., Timmis, K. N., & Schreiber, S. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, *53*(5), 685-693. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.025403>
- Ott, S. J., Waetzig, G. H., Rehman, A., Moltzau-Anderson, J., Bharti, R., Grasis, J. A., Cassidy, L., Tholey, A., Fickenscher, H., Seegert, D., Rosenstiel, P., & Schreiber, S. (2017). Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology*, *152*(4), 799-811 e797. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.010>
- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S. C., & Colombel, J. F. (2018). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*, *67*(3), 574-587. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314903>
- Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A. C. M., & Rodriguez-Palacios, A. (2020). The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Front Immunol*, *11*, 906. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00906>
- Pascal, V., Pozuelo, M., Borruel, N., Casellas, F., Campos, D., Santiago, A., Martinez, X., Varela, E., Sarrabayrouse, G., Machiels, K., Vermeire, S., Sokol, H., Guarner, F., & Manichanh, C. (2017). A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*, *66*(5), 813-822. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313235>
- Patel, S. M., Stason, W. B., Legedza, A., Ock, S. M., Kaptchuk, T. J., Conboy, L., Canenguez, K., Park, J. K., Kelly, E., Jacobson, E., Kerr, C. E., & Lembo, A. J. (2005). The placebo effect in irritable bowel syndrome trials: a meta-analysis. *Neurogastroenterol Motil*, *17*(3), 332-340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2005.00650.x>
- Peleg, A. Y., Hogan, D. A., & Mylonakis, E. (2010). Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol*, *8*(5), 340-349. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2313>
- Perez-Brocad, V., Garcia-Lopez, R., Vazquez-Castellanos, J. F., Nos, P., Beltran, B., Latorre, A., & Moya, A. (2013). Study of the viral and microbial communities associated with

- Crohn's disease: a metagenomic approach. *Clin Transl Gastroenterol*, 4(6), e36.
<https://doi.org/10.1038/ctg.2013.9>
- Petersen, A. M., Stensvold, C. R., Mirsepasi, H., Engberg, J., Friis-Moller, A., Porsbo, L. J., Hammerum, A. M., Nordgaard-Lassen, I., Nielsen, H. V., & Krogfelt, K. A. (2013). Active ulcerative colitis associated with low prevalence of Blastocystis and Dientamoeba fragilis infection. *Scand J Gastroenterol*, 48(5), 638-639.
<https://doi.org/10.3109/00365521.2013.780094>
- Pichler, J., Ong, C., Shah, N., Sebire, N., Kiparrissi, F., Borrelli, O., Pilkington, C., & Elawad, M. (2016). Histopathological features of gastrointestinal mucosal biopsies in children with juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Res*, 79(6), 895-901.
<https://doi.org/10.1038/pr.2016.27>
- Pinto-Sanchez, M. I., Hall, G. B., Ghajar, K., Nardelli, A., Bolino, C., Lau, J. T., Martin, F. P., Cominetti, O., Welsh, C., Rieder, A., Traynor, J., Gregory, C., De Palma, G., Pigrau, M., Ford, A. C., Macri, J., Berger, B., Bergonzelli, G., Surette, M. G., . . . Bercik, P. (2017). Probiotic Bifidobacterium longum NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 153(2), 448-459 e448.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.003>
- Pittayanon, R., Lau, J. T., Leontiadis, G. I., Tse, F., Yuan, Y., Surette, M., & Moayyedi, P. (2020). Differences in Gut Microbiota in Patients With vs Without Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review. *Gastroenterology*, 158(4), 930-946 e931.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.294>
- Pittayanon, R., Lau, J. T., Yuan, Y., Leontiadis, G. I., Tse, F., Surette, M., & Moayyedi, P. (2019). Gut Microbiota in Patients With Irritable Bowel Syndrome-A Systematic Review. *Gastroenterology*, 157(1), 97-108.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.03.049>
- Poulsen, C. S., Efunshile, A. M., Nelson, J. A., & Stensvold, C. R. (2016). Epidemiological Aspects of Blastocystis Colonization in Children in Ilero, Nigeria. *Am J Trop Med Hyg*, 95(1), 175-179. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0074>
- Pozuelo, M., Panda, S., Santiago, A., Mendez, S., Accarino, A., Santos, J., Guarner, F., Azpiroz, F., & Manichanh, C. (2015). Reduction of butyrate- and methane-producing microorganisms in patients with Irritable Bowel Syndrome. *Sci Rep*, 5, 12693.
<https://doi.org/10.1038/srep12693>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., . . . Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65.
<https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Rajilic-Stojanovic, M., Biagi, E., Heilig, H. G., Kajander, K., Kekkonen, R. A., Tims, S., & de Vos, W. M. (2011). Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 141(5), 1792-1801. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.043>
- Ramakrishna, B. S. (2013). Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *J Gastroenterol Hepatol*, 28 Suppl 4, 9-17. <https://doi.org/10.1111/jgh.12294>
- Rangel, I., Sundin, J., Fuentes, S., Reipsilber, D., de Vos, W. M., & Brummer, R. J. (2015). The relationship between faecal-associated and mucosal-associated microbiota in irritable bowel syndrome patients and healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther*, 42(10), 1211-1221. <https://doi.org/10.1111/apt.13399>
- Rasmussen, T. S., Mentzel, C. M. J., Kot, W., Castro-Mejia, J. L., Zuffa, S., Swann, J. R., Hansen, L. H., Vogensen, F. K., Hansen, A. K., & Nielsen, D. S. (2020). Faecal

- virome transplantation decreases symptoms of type 2 diabetes and obesity in a murine model. *Gut*, 69(12), 2122-2130. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320005>
- Rigsbee, L., Agans, R., Shankar, V., Kenche, H., Khamis, H. J., Michail, S., & Paliy, O. (2012). Quantitative profiling of gut microbiota of children with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*, 107(11), 1740-1751. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.287>
- Ringel-Kulka, T., Benson, A. K., Carroll, I. M., Kim, J., Legge, R. M., & Ringel, Y. (2016). Molecular characterization of the intestinal microbiota in patients with and without abdominal bloating. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 310(6), G417-426. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00044.2015>
- Riviere, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Front Microbiol*, 7, 979. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>
- Roberts, T., Barratt, J., Harkness, J., Ellis, J., & Stark, D. (2011). Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of blastocystis sp. in clinical stool samples. *Am J Trop Med Hyg*, 84(2), 308-312. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0447>
- Roda, G., Chien Ng, S., Kotze, P. G., Argollo, M., Panaccione, R., Spinelli, A., Kaser, A., Peyrin-Biroulet, L., & Danese, S. (2020). Crohn's disease. *Nat Rev Dis Primers*, 6(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0156-2>
- Rodrigues, V. F., Elias-Oliveira, J., Pereira, I. S., Pereira, J. A., Barbosa, S. C., Machado, M. S. G., & Carlos, D. (2022). Akkermansia muciniphila and Gut Immune System: A Good Friendship That Attenuates Inflammatory Bowel Disease, Obesity, and Diabetes. *Front Immunol*, 13, 934695. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.934695>
- Rodriguez-Palacios, A., Conger, M., Hopperton A., Ezeji Jessica C., & Erkkila, H. L., Fiocchi C., Cominelli, F. (2019). Identification of pathogenic bacteria in severe Crohn's disease. *Gastroenterology*, 156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.238>
- Rook, G., Backhed, F., Levin, B. R., McFall-Ngai, M. J., & McLean, A. R. (2017). Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity. *Lancet*, 390(10093), 521-530. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30566-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30566-4)
- Roser, D., Simonsen, J., Nielsen, H. V., Stensvold, C. R., & Molbak, K. (2013). Dientamoeba fragilis in Denmark: epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32(10), 1303-1310. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1880-2>
- Rostami, A., Riahi, S. M., Haghighi, A., Saber, V., Armon, B., & Seyyedtabaei, S. J. (2017). The role of Blastocystis sp. and Dientamoeba fragilis in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Res*, 116(9), 2361-2371. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5535-6>
- 10.1007/s00436-017-5535-6 [pii]
- Roswall, J., Olsson, L. M., Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, S., Tremaroli, V., Simon, M. C., Kiilerich, P., Akrami, R., Kramer, M., Uhlen, M., Gummesson, A., Kristiansen, K., Dahlgren, J., & Backhed, F. (2021). Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life. *Cell Host Microbe*, 29(5), 765-776 e763. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.02.021>
- Russell, J. T., Roesch, L. F. W., Ordberg, M., Ilonen, J., Atkinson, M. A., Schatz, D. A., Triplett, E. W., & Ludvigsson, J. (2019). Genetic risk for autoimmunity is associated with distinct changes in the human gut microbiome. *Nat Commun*, 10(1), 3621. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11460-x>

- Russell, W. R., Hoyles, L., Flint, H. J., & Dumas, M. E. (2013). Colonic bacterial metabolites and human health. *Curr Opin Microbiol*, *16*(3), 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.002>
- Sanchez, E., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Fernandez-Murga, M. L., & Sanz, Y. (2013). Duodenal-mucosal bacteria associated with celiac disease in children. *Appl Environ Microbiol*, *79*(18), 5472-5479. <https://doi.org/10.1128/AEM.00869-13>
- Sassone-Corsi, M., & Raffatellu, M. (2015). No vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. *J Immunol*, *194*(9), 4081-4087. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403169>
- Scanlan, P. D., Knight, R., Song, S. J., Ackermann, G., & Cotter, P. D. (2016). Prevalence and genetic diversity of Blastocystis in family units living in the United States. *Infect Genet Evol*, *45*, 95-97. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.018>
- Scanlan, P. D., Stensvold, C. R., Rajilic-Stojanovic, M., Heilig, H. G., De Vos, W. M., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2014). The microbial eukaryote Blastocystis is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol*, *90*(1), 326-330. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12396>
- Scudellari, M. (2017). News Feature: Cleaning up the hygiene hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(7), 1433-1436. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700688114>
- Selmer, T., & Andrei, P. I. (2001). p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. A novel glycyl radical enzyme catalysing the formation of p-cresol. *Eur J Biochem*, *268*(5), 1363-1372. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02001.x>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*, *14*(8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Sessitsch, A., Wakelin, S., Schloter, M., Maguin, E., Cernava, T., Champomier-Verges, M. C., Charles, T. C., Cotter, P. D., Ferrocino, I., Kriaa, A., Lebre, P., Cowan, D., Lange, L., Kiran, S., Markiewicz, L., Meisner, A., Olivares, M., Sarand, I., Schelkle, B., . . . Kostic, T. (2023). Microbiome Interconnectedness throughout Environments with Major Consequences for Healthy People and a Healthy Planet. *Microbiol Mol Biol Rev*, *87*(3), e0021222. <https://doi.org/10.1128/membr.00212-22>
- Shkoporov, A. N., & Hill, C. (2019). Bacteriophages of the Human Gut: The "Known Unknown" of the Microbiome. *Cell Host Microbe*, *25*(2), 195-209. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.017>
- Shukla, R., Ghoshal, U., Dhole, T. N., & Ghoshal, U. C. (2015). Fecal Microbiota in Patients with Irritable Bowel Syndrome Compared with Healthy Controls Using Real-Time Polymerase Chain Reaction: An Evidence of Dysbiosis. *Dig Dis Sci*, *60*(10), 2953-2962. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3607-y>
- Scholz, M., Ward, D. V., Pasolli, E., Tolio, T., Zolfo, M., Asnicar, F., Truong, D. T., Tett, A., Morrow, A. L., & Segata, N. (2016). Strain-level microbial epidemiology and population genomics from shotgun metagenomics. *Nat Methods*, *13*(5), 435-438. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3802>
- Singh, P., Alm, E. J., Kelley, J. M., Cheng, V., Smith, M., Kassam, Z., Nee, J., Iturrino, J., & Lembo, A. (2022). Effect of antibiotic pretreatment on bacterial engraftment after Fecal Microbiota Transplant (FMT) in IBS-D. *Gut Microbes*, *14*(1), 2020067. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2020067>
- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., Kelly, C. P., Ahuja, V., & Makharia, G. K. (2018). Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *16*(6), 823-836 e822. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.06.037>

- Singh, S., Murad, M. H., Fumery, M., Sedano, R., Jairath, V., Panaccione, R., Sandborn, W. J., & Ma, C. (2021). Comparative efficacy and safety of biologic therapies for moderate-to-severe Crohn's disease: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 6(12), 1002-1014. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(21\)00312-5](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(21)00312-5)
- Sokol, H., Landman, C., Seksik, P., Berard, L., Montil, M., Nion-Larmurier, I., Bourrier, A., Le Gall, G., Lalande, V., De Rougemont, A., Kirchgessner, J., Dagueneil, A., Cachanado, M., Rousseau, A., Drouet, E., Rosenzweig, M., Hagege, H., Dray, X., Klatzman, D., . . . Simon, T. (2020). Fecal microbiota transplantation to maintain remission in Crohn's disease: a pilot randomized controlled study. *Microbiome*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-0792-5>
- Sokol, H., Leducq, V., Aschard, H., Pham, H. P., Jegou, S., Landman, C., Cohen, D., Liguori, G., Bourrier, A., Nion-Larmurier, I., Cosnes, J., Seksik, P., Langella, P., Skurnik, D., Richard, M. L., & Beaugerie, L. (2017). Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*, 66(6), 1039-1048. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310746>
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L. G., Gratadoux, J. J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J. P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottiere, H. M., Dore, J., Marteau, P., Seksik, P., & Langella, P. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(43), 16731-16736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
- Soleimani Jevinani, S., Mohammad Rahimi, H., Asri, N., Rostami-Nejad, M., Ahmadipour, S., & Mirjalali, H. (2023). Molecular epidemiology and subtyping of Blastocystis sp. and its subtypes in celiac patients; a case control study. *Microb Pathog*, 179, 106086. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106086>
- Sollid, L. M., Markussen, G., Ek, J., Gjerde, H., Vartdal, F., & Thorsby, E. (1989). Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med*, 169(1), 345-350. <https://doi.org/10.1084/jem.169.1.345>
- Sonnenburg, J. L., & Sonnenburg, E. D. (2019). Vulnerability of the industrialized microbiota. *Science*, 366(6464). <https://doi.org/10.1126/science.aaw9255>
- Sperber, A. D., Dumitrascu, D., Fukudo, S., Gerson, C., Ghoshal, U. C., Gwee, K. A., Hungin, A. P. S., Kang, J. Y., Minhu, C., Schmulson, M., Bolotin, A., Friger, M., Freud, T., & Whitehead, W. (2017). The global prevalence of IBS in adults remains elusive due to the heterogeneity of studies: a Rome Foundation working team literature review. *Gut*, 66(6), 1075-1082. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-311240>
- Stark, D., Barratt, J., Chan, D., & Ellis, J. T. (2016). Dientamoeba fragilis, the Neglected Trichomonad of the Human Bowel. *Clin Microbiol Rev*, 29(3), 553-580. <https://doi.org/10.1128/CMR.00076-15>
- Stastna, M., Norek, A., Radkova, J., Slukova, M., Hrunka, M., Jabandzjev, P., & Janda, L. (2023). Increasing prevalence of celiac disease - where to look for answers? *Epidemiol Mikrobiol Immunol*, 72(3), 172-183. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37871991> (Narust prevalence celiakie - kde hledat odpovedi?)
- Stensvold, C. R., Arendrup, M. C., Jespersgaard, C., Molbak, K., & Nielsen, H. V. (2007). Detecting Blastocystis using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 59(3), 303-307. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.003>
- Stensvold, C. R., Arendrup, M. C., Molbak, K., & Nielsen, H. V. (2007). The prevalence of Dientamoeba fragilis in patients with suspected enteroparasitic disease in a

- metropolitan area in Denmark. *Clin Microbiol Infect*, 13(8), 839-842.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01760.x>
- Stensvold, C. R., & Clark, C. G. (2016). Current status of Blastocystis: A personal view. *Parasitol Int*, 65(6 Pt B), 763-771. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>
- Stensvold, C. R., & Clark, C. G. (2020). Pre-empting Pandora's Box: Blastocystis Subtypes Revisited. *Trends Parasitol*, 36(3), 229-232. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.009>
- Stensvold, C. R., & van der Giezen, M. (2018). Associations between Gut Microbiota and Common Luminal Intestinal Parasites. *Trends Parasitol*, 34(5), 369-377.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.02.004>
- Stiemsma, L. T., Reynolds, L. A., Turvey, S. E., & Finlay, B. B. (2015). The hygiene hypothesis: current perspectives and future therapies. *Immunotargets Ther*, 4, 143-157.
<https://doi.org/10.2147/ITT.S61528>
- Stojek, M., Jablonska, A., & Adrych, K. (2021). The Role of Fecal Microbiota Transplantation in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Med*, 10(18).
<https://doi.org/10.3390/jcm10184055>
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, 299(6710), 1259-1260.
<https://doi.org/10.1136/bmj.299.6710.1259>
- Tamboli, C. P., Neut, C., Desreumaux, P., & Colombel, J. F. (2004). Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*, 53(1), 1-4. <https://doi.org/10.1136/gut.53.1.1>
- Tana, C., Umesaki, Y., Imaoka, A., Handa, T., Kanazawa, M., & Fukudo, S. (2010). Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*, 22(5), 512-519, e114-515.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01427.x>
- Tap, J., Derrien, M., Tornblom, H., Brazeilles, R., Cools-Portier, S., Dore, J., Storsrud, S., Le Neve, B., Ohman, L., & Simren, M. (2017). Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, 152(1), 111-123 e118. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.049>
- Tapia, G., Chuda, K., Kahrs, C. R., Stene, L. C., Kramna, L., Marild, K., Rasmussen, T., Ronningen, K. S., Cinek, O., & Stordal, K. (2021). Parechovirus Infection in Early Childhood and Association With Subsequent Celiac Disease. *Am J Gastroenterol*, 116(4), 788-795. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001003>
- Terveer, E. M., van Gool, T., Ooijevaar, R. E., Sanders, I., Boeije-Koppenol, E., Keller, J. J., Bart, A., Kuijper, E. J., & Netherlands Donor Feces Bank Study, G. (2020). Human Transmission of Blastocystis by Fecal Microbiota Transplantation Without Development of Gastrointestinal Symptoms in Recipients. *Clin Infect Dis*, 71(10), 2630-2636. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1122>
- Thaiss, C. A., Zeevi, D., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Tengeler, A. C., Abramson, L., Katz, M. N., Korem, T., Zmora, N., Kuperman, Y., Biton, I., Gilad, S., Harmelin, A., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E., & Elinav, E. (2014). Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell*, 159(3), 514-529. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.048>
- Tito, R. Y., Chaffron, S., Caenepeel, C., Lima-Mendez, G., Wang, J., Vieira-Silva, S., Falony, G., Hildebrand, F., Darzi, Y., Rymenans, L., Verspecht, C., Bork, P., Vermeire, S., Joossens, M., & Raes, J. (2019). Population-level analysis of Blastocystis subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut*, 68(7), 1180-1189.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316106>
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J. F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *Lancet*, 389(10080), 1741-1755. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1)
- Turjeman, S., Sharon, E., Levin, R., Oralewska, B., Szaflarska-Poplawska, A., Bierla, J. B., Cukrowska, B., & Koren, O. (2023). Celiac-the lone horse? An autoimmune condition

- without signals of microbiota dysbiosis. *Microbiol Spectr*, e0146323.
<https://doi.org/10.1128/spectrum.01463-23>
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, *449*(7164), 804-810.
<https://doi.org/10.1038/nature06244>
- van Rheenen, P. F., Aloï, M., Assa, A., Bronsky, J., Escher, J. C., Fagerberg, U. L., Gasparetto, M., Gerasimidis, K., Griffiths, A., Henderson, P., Koletzko, S., Kolho, K. L., Levine, A., van Limbergen, J., Martin de Carpi, F. J., Navas-Lopez, V. M., Oliva, S., de Ridder, L., Russell, R. K., . . . Ruummele, F. M. (2020). The Medical Management of Paediatric Crohn's Disease: an ECCO-ESPGHAN Guideline Update. *J Crohns Colitis*. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjaa161>
- Ventin-Holmberg, R., Eberl, A., Saqib, S., Korpela, K., Virtanen, S., Sipponen, T., Salonen, A., Saavalainen, P., & Nissila, E. (2021). Bacterial and Fungal Profiles as Markers of Infliximab Drug Response in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*, *15*(6), 1019-1031. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjaa252>
- Ventin-Holmberg, R., Hoyhtya, M., Saqib, S., Korpela, K., Nikkonen, A., Salonen, A., de Vos, W. M., & Kolho, K. L. (2022). The gut fungal and bacterial microbiota in pediatric patients with inflammatory bowel disease introduced to treatment with anti-tumor necrosis factor-alpha. *Sci Rep*, *12*(1), 6654. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10548-7>
- Vermeire, S., Van Assche, G., & Rutgeerts, P. (2006). Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*, *55*(3), 426-431.
<https://doi.org/10.1136/gut.2005.069476>
- Vester-Andersen, M. K., Mirsepasi-Lauridsen, H. C., Prosberg, M. V., Mortensen, C. O., Trager, C., Skovsen, K., Thorkilgaard, T., Nojgaard, C., Vind, I., Krogfelt, K. A., Sorensen, N., Bendtsen, F., & Petersen, A. M. (2019). Increased abundance of proteobacteria in aggressive Crohn's disease seven years after diagnosis. *Sci Rep*, *9*(1), 13473. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49833-3>
- Vich Vila, A., Imhann, F., Collij, V., Jankipersadsing, S. A., Gurry, T., Mujagic, Z., Kurilshikov, A., Bonder, M. J., Jiang, X., Tigchelaar, E. F., Dekens, J., Peters, V., Voskuil, M. D., Visschedijk, M. C., van Dullemen, H. M., Keszthelyi, D., Swertz, M. A., Franke, L., Alberts, R., . . . Weersma, R. K. (2018). Gut microbiota composition and functional changes in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Sci Transl Med*, *10*(472). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aap8914>
- Walker, A. W., Martin, J. C., Scott, P., Parkhill, J., Flint, H. J., & Scott, K. P. (2015). 16S rRNA gene-based profiling of the human infant gut microbiota is strongly influenced by sample processing and PCR primer choice. *Microbiome*, *3*, 26.
<https://doi.org/10.1186/s40168-015-0087-4>
- Walters, W. A., Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Berg-Lyons, D., Fierer, N., & Knight, R. (2011). PrimerProspector: de novo design and taxonomic analysis of barcoded polymerase chain reaction primers. *Bioinformatics*, *27*(8), 1159-1161.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr087>
- Wang, S., Charbonnier, L. M., Noval Rivas, M., Georgiev, P., Li, N., Gerber, G., Bry, L., & Chatila, T. A. (2015). MyD88 Adaptor-Dependent Microbial Sensing by Regulatory T Cells Promotes Mucosal Tolerance and Enforces Commensalism. *Immunity*, *43*(2), 289-303. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.014>
- Wang, Y., Gao, X., Ghazlane, A., Hu, H., Li, X., Xiao, Y., Li, D., Yu, G., & Zhang, T. (2018). Characteristics of Faecal Microbiota in Paediatric Crohn's Disease and Their Dynamic Changes During Infliximab Therapy. *J Crohns Colitis*, *12*(3), 337-346.
<https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx153>

- Wang, Y., Gao, X., Zhang, X., Xiao, F., Hu, H., Li, X., Dong, F., Sun, M., Xiao, Y., Ge, T., Li, D., Yu, G., Liu, Z., & Zhang, T. (2021). Microbial and metabolic features associated with outcome of infliximab therapy in pediatric Crohn's disease. *Gut Microbes*, *13*(1), 1-18. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1865708>
- Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Dionigia, M., Texier, C., Delbac, F., & Alaoui, H. E. (2013). Blastocystis, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis*, *1*(5), 167-178. <https://doi.org/10.1177/2049936113504754>
- Weiss, G. A., & Hennet, T. (2017). Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci*, *74*(16), 2959-2977. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>
- Wensel, C. R., Pluznick, J. L., Salzberg, S. L., & Sears, C. L. (2022). Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. *J Clin Invest*, *132*(7). <https://doi.org/10.1172/JCI154944>
- Whipps, J. L., K.; Cooke, R;. (1988). *Mycoparasitism and plant disease control*. Manchester University Press.
- Windey, K., De Preter, V., & Verbeke, K. (2012). Relevance of protein fermentation to gut health. *Mol Nutr Food Res*, *56*(1), 184-196. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100542>
- Windsor, J. J., & Johnson, E. H. (1999). Dientamoeba fragilis: the unflagellated human flagellate. *Br J Biomed Sci*, *56*(4), 293-306. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10795375>
- Wortelboer, K., Nieuwdorp, M., & Herrema, H. (2019). Fecal microbiota transplantation beyond Clostridioides difficile infections. *EBioMedicine*, *44*, 716-729. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.066>
- Wright, E. K., Kamm, M. A., Teo, S. M., Inouye, M., Wagner, J., & Kirkwood, C. D. (2015). Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis*, *21*(6), 1219-1228. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000382>
- Yallapragada, S. G., Nash, C. B., & Robinson, D. T. (2015). Early-Life Exposure to Antibiotics, Alterations in the Intestinal Microbiome, and Risk of Metabolic Disease in Children and Adults. *Pediatr Ann*, *44*(11), e265-269. <https://doi.org/10.3928/00904481-20151112-09>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glockner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rossello-Mora, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol*, *12*(9), 635-645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Yatsunenkov, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., . . . Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, *486*(7402), 222-227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Youngster, I., Russell, G. H., Pindar, C., Ziv-Baran, T., Sauk, J., & Hohmann, E. L. (2014). Oral, capsulized, frozen fecal microbiota transplantation for relapsing Clostridium difficile infection. *JAMA*, *312*(17), 1772-1778. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.13875>
- Yutin, N., Benler, S., Shmakov, S. A., Wolf, Y. I., Tolstoy, I., Rayko, M., Antipov, D., Pevzner, P. A., & Koonin, E. V. (2021). Analysis of metagenome-assembled viral genomes from the human gut reveals diverse putative CrAss-like phages with unique genomic features. *Nat Commun*, *12*(1), 1044. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21350-w>

- Zboril, V. (2018). *Idiopatické střevní záněty*. Mlada Fronta
- Zhang, F., Aschenbrenner, D., Yoo, J. Y., & Zuo, T. (2022). The gut mycobioeme in health, disease, and clinical applications in association with the gut bacterial microbiome assembly. *Lancet Microbe*, 3(12), e969-e983. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00203-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00203-8)
- Zhang, F., Luo, W., Shi, Y., Fan, Z., & Ji, G. (2012). Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *Am J Gastroenterol*, 107(11), 1755; author reply p 1755-1756. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.251>
- Zheng, P., Li, Z., & Zhou, Z. (2018). Gut microbiome in type 1 diabetes: A comprehensive review. *Diabetes Metab Res Rev*, 34(7), e3043. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3043>
- Zhernakova, A., Kurilshikov, A., Bonder, M. J., Tigchelaar, E. F., Schirmer, M., Vatanen, T., Mujagic, Z., Vila, A. V., Falony, G., Vieira-Silva, S., Wang, J., Imhann, F., Brandsma, E., Jankipersadsing, S. A., Joossens, M., Cenit, M. C., Deelen, P., Swertz, M. A., LifeLines cohort, s., . . . Fu, J. (2016). Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science*, 352(6285), 565-569. <https://doi.org/10.1126/science.aad3369>
- Zhong, W., Lu, X., Shi, H., Zhao, G., Song, Y., Wang, Y., Zhang, J., Jin, Y., & Wang, S. (2019). Distinct Microbial Populations Exist in the Mucosa-associated Microbiota of Diarrhea Predominant Irritable Bowel Syndrome and Ulcerative Colitis. *J Clin Gastroenterol*, 53(9), 660-672. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000961>
- Zhou, Y., He, Y., Liu, L., Zhou, W., Wang, P., Hu, H., Nie, Y., & Chen, Y. (2021). Alterations in Gut Microbial Communities Across Anatomical Locations in Inflammatory Bowel Diseases. *Front Nutr*, 8, 615064. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.615064>
- Zuo, T., Wong, S. H., Lam, K., Lui, R., Cheung, K., Tang, W., Ching, J. Y. L., Chan, P. K. S., Chan, M. C. W., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Yu, J., Sung, J. J. Y., & Ng, S. C. (2018). Bacteriophage transfer during faecal microbiota transplantation in *Clostridium difficile* infection is associated with treatment outcome. *Gut*, 67(4), 634-643. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313952>

7. Přílohy