

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Testování antibiotické rezistence multihostitelských druhů  
bifidobakterií**

**Diplomová práce**

**Bc. Kateřina Hepnarová**

**Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů**

**doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.**

© 2022 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Testování antibiotické rezistence multihospitelských druhů bifidobakterií" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.3.2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Věře Neužil Bunešové Ph.D. za vedení, ochotu, cenné rady a odbornou pomoc při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Nikol Modráčkové Ph.D. za velmi milý přístup a ochotu kdykoliv pomoci. V neposlední řadě chci poděkovat také Bc. Jolaně Richterové za rady a morální podporu.

# Testování antibiotické rezistence multihostitelských druhů bifidobakterií

## Souhrn

Antibiotická rezistence a její možný přenos z komenzálních bakterií na patogenní je velkým problémem dnešní doby. Tato práce se zabývala výskytem antibiotické rezistence u multihostitelských druhů bifidobakterií, přítomných ve střevní mikrobiotě člověka a různých zvířat. Konkrétně se jednalo o druhy *B. animalis*, *B. adolescentis*, *B. dentium*, *B. globosum*, *B. lactis* a *B. pseudolongum*. Cílem práce bylo zjistit inhibiční schopnost komerčně používaných antibiotik v humánní i veterinární medicíně vůči bifidobakteriím a přinést nové poznatky k této problematice. V naší stanovené hypotéze jsme předpokládali, že vzorky bifidobakterií pocházející od hostitelů s častějším vystavením antibiotické terapii budou vykazovat větší výskyt rezistence na testovaná antibiotika. Teoretická část této práce se zaměřila na popis rodu *Bifidobacterium* a vybraných skupin antibiotik, rezistenci, její přenos a problémy s ní spojené. V praktické části bylo celkem otestováno 73 antibiotik v komerčně dostupných koncentracích pro testování diskovou metodou na 40 vzorcích bifidobakterií pocházejících od zdravých i nemocných lidí, zvířat z pokusného chovu i od zvířat ze ZOO. Vzhledem k velkému množství testovaných antibiotik bylo testování pojato jako screening pomocí diskové difúzní metody. Zkoumáno bylo také, jak bude inhibiční aktivita ovlivňovat schopnost agregace, zda bude mít vliv původ bifidobakteriálního kmene či zda existuje spojitost mezi antibiotickou terapií hostitele a rezistencí izolovaných bifidobakterií.

Z naší získaných výsledků vyplývá, že citlivost na antibiotika je značně druhově, ale i kmenově specifická. Bylo zjištěno, že agregační schopnost vzorku má vliv na inhibiční aktivitu, naopak se neprokázal vliv původu vzorku. Výsledky naznačují, že vystavení hostitele časté antibiotické terapii by mohlo mít vliv na výskyt rezistentních kmenů, pro prokázání hypotézy by však bylo zapotřebí dalšího zkoumání. Navíc některé kmeny bifidobakterií vytvářely během testování spontánně rezistentní mutanty.

Bifidobakterie jsou známými producenty folátu, který je důležitý při metabolických pochodech všech živých organismů. Některá antibiotika (sulfonamidy) mají svůj mechanismus účinku založený na inhibici metabolické dráhy folátu, zaměřili jsme se tak na možnou interakci kyseliny listové a antibiotik. Ze skupiny původně otestovaných vzorků a antibiotik bylo vybráno 23 vzorků bifidobakterií a 18 antibiotik. Tyto vzorky byly otestovány opět diskovou difúzní metodou, ovšem do pěstebního agaru byla přidána kyselina listová v koncentraci 1 g/l. Výsledkem byla větší citlivost bifidobakterií vůči všem testovaným antibiotikům. Inhibiční aktivitu vykazovala i antibiotika, na které jsou bifidobakterie přirozeně rezistentní. Jedná se o velmi zajímavé zjištění, kdy je potřeba dalšího výzkumu jak na úrovni *in vitro*, tak ověření *in vivo*.

**Klíčová slova:** Bifidobakterie; kultivace; antibiotikum; rezistence; mutace; rezistom

# Antibiotic resistance testing of bifidobacterial multi-host species

## Summary

Antibiotic resistance and its possible transfer from commensal to pathogenic bacteria is a major problem today. This thesis was focused on prevalence of antibiotic resistance in multi-host species of bifidobacteria, present in the intestinal microbiota of humans and various animals. Specifically, these were *B. animalis*, *B. adolescentis*, *B. dentium*, *B. globosum*, *B. lactis* and *B. pseudolongum* species. The aim of this thesis was to determine the ability of commonly used antibiotics in human and animal medicine to inhibit bifidobacteria and to bring new knowledge to this issue. Our hypothesis, assumed that bifidobacteria samples from hosts with more frequent exposure to antibiotic therapy would show a higher incidence of resistance to the tested antibiotics. The theoretical part of this work focused on the description of the genus *Bifidobacterium* and selected groups of antibiotics, resistance, its transmission and problems associated with it. In the practical part, a total of 73 types of antibiotics were applied in commercially available concentrations to 40 samples of bifidobacteria that were acquired from humans (ill and healthy), laboratory animals and animals from a ZOO. Due to the large number of tested antibiotics, testing was conceived as screening using the disk diffusion method. It was also investigated how the inhibitory activity will affect the ability to aggregate, whether it will be affected by the bacterial strain or the origin or whether there is an association between host antibiotic therapy and the resistance of isolated bifidobacteria.

Our results visibly show that antibiotic resistance is strongly species and strains specific. It was proven that the ability of samples to aggregate has an effect on the inhibition, on the other hand the origin of the sample does not. The results suggest that exposure of the host to frequent antibiotic therapy could affect the incidence of resistant strains, but further investigation would be needed to demonstrate the hypothesis. In addition, some bifidobacterial strains produced spontaneously resistant mutants during testing.

Bifidobacteria are known producers of folate, which is important in the metabolic processes of all living organisms. Some antibiotics (sulfonamides) have a mechanism of action based on the inhibition of the folate metabolic pathway, so we focused on the possible interaction of folic acid and antibiotics. From the originally tested samples and antibiotics, 23 samples of bifidobacteria and 18 antibiotics were selected. These samples were tested again by the disk diffusion method, but folic acid was added to the growing agar at a concentration of 1 g/L. The result was a greater susceptibility of bifidobacteria to all antibiotics tested. Antibiotics to which bifidobacteria are naturally resistant also showed inhibitory activity. This is a very interesting finding when further research is needed both at the *in vitro* level and *in vivo* verification.

**Keywords:** Bifidobacteria; cultivation; antibiotic; resistance; mutation; resistome

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>9</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	<b>10</b>
<b>3 Literární rešerše</b>	<b>11</b>
<b>Rod <i>Bifidobacterium</i></b>	<b>11</b>
3.1.1 Historie	11
3.1.2 Taxonomie	11
3.1.3 Morfologie	12
3.1.4 Fyziologie	13
3.1.5 Metabolismus	13
3.1.5.1 Cross feeding	14
3.1.5.2 Kyselina gama-aminomáselná	15
<b>Bifidobakterie a folát</b>	<b>15</b>
3.1.6 Folát	15
3.1.7 Testování	16
3.1.8 Bifidobakterie jako producenti	16
3.1.9 Výsledky jiných studií	17
<b>Význam a využití bifidobakterií v doplňcích stravy</b>	<b>17</b>
3.1.10 Probiotika	18
3.1.10.1 Bifidobakterie jako probiotika	19
3.1.11 Prebiotika	19
3.1.12 Synbiotika	20
3.1.13 Postbiontika	21
3.1.14 Psychobiotika	21
<b>Výskyt bifidobakterií</b>	<b>21</b>
<b>Vybrání zástupci multihostitelských druhů bifidobakterií</b>	<b>22</b>
3.1.15 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	22
3.1.16 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	22
3.1.17 <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	23
3.1.18 <i>Bifidobacterium dentium</i>	23
3.1.19 <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	24
3.1.20 <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	24
<b>Antibiotika</b>	<b>24</b>
3.1.21 Historie	25
<b>Vybrané skupiny antibiotik</b>	<b>25</b>
3.1.22 Aminoglykosidy	25
3.1.23 $\beta$ -laktamy	26
3.1.23.1 Peniciliny	26

3.1.24	Tetracykliny .....	27
3.1.25	Makrolidy.....	27
3.1.26	Chinolová antibiotika.....	27
3.1.27	Polypeptidová antibiotika .....	28
3.1.28	Nitroimidazoly .....	28
<b>Mechanismy účinku antibiotik.....</b>		<b>29</b>
3.1.28.1	Inhibice buněčné stěny.....	29
3.1.28.2	Ovlivnění mechanismu syntézy proteinů .....	29
3.1.28.3	Narušení mechanismu nukleových kyselin .....	30
3.1.28.4	Narušení metabolických drah.....	30
3.1.28.5	Narušení struktury bakteriálních obalů .....	30
3.1.29	Kombinace antibiotik.....	30
3.1.30	Komplexní mechanismy účinku .....	31
3.1.31	Minimální inhibiční koncentrace .....	31
3.1.31.1	Diluční metody.....	31
3.1.31.2	Difúzní metody.....	32
<b>Bifidobakterie a antibiotika .....</b>		<b>32</b>
<b>Rezistence.....</b>		<b>35</b>
3.1.32	Šíření antibiotické rezistence .....	36
3.1.32.1	Horizontální přenos genů .....	36
3.1.32.2	Transformace.....	37
3.1.32.3	Transdukce .....	37
3.1.32.4	Konjugace .....	37
3.1.33	Rezistom .....	38
3.1.34	Bifidobakterie jako zdroj rezistence .....	39
3.1.35	Bifidobakterie jako patogenní organismy.....	39
3.1.36	Riziko rezistence v životním prostředí .....	39
<b>4</b>	<b>Metodika.....</b>	<b>40</b>
<b>Screening antibiotické rezistence.....</b>		<b>40</b>
<b>Materiál.....</b>		<b>40</b>
4.1.1	Bifidobakterie .....	40
4.1.1.1	Kultivace vzorků .....	41
4.1.1.2	Kultivační médium.....	42
4.1.2	LSM agar pro testování antibiotické citlivosti.....	42
4.1.3	Antibiotika .....	43
<b>Metody.....</b>		<b>45</b>
4.1.4	Kontrola narostlých kultur .....	45
4.1.5	Identifikace pomocí MALDI-TOF MS.....	45

4.1.6	Příprava vzorků na testování .....	46
4.1.7	Vyhodnocení vzorků.....	47
<b>Testování inhibiční aktivity antibiotik ve spojení s kyselinou listovou .....</b>		<b>47</b>
<b>Materiál.....</b>		<b>47</b>
4.1.8	Bifidobakterie a antibiotika .....	47
4.1.9	LSM médium obohacené o kyselinu listovou .....	48
<b>Metody.....</b>		<b>49</b>
4.1.10	Kontrola narostlých kultur .....	49
4.1.11	Testování vzorků .....	49
4.1.12	Vyhodnocení vzorků.....	49
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Screening antibiotické rezistence.....</b>	<b>50</b>
5.1.1	Celkové zhodnocení.....	50
5.1.2	Kmenově specifická zjištění .....	53
5.1.3	Další sledované parametry .....	55
5.1.4	Mutagenita .....	55
<b>5.2</b>	<b>Testování inhibiční aktivity antibiotik ve spojení s kyselinou listovou .....</b>	<b>56</b>
5.2.1	Celkové zhodnocení.....	56
5.2.1.1	Porovnání.....	57
5.2.2	Zajímavosti .....	57
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>76</b>
<b>10</b>	<b>Samostatné přílohy.....</b>	<b>I</b>
	<b>Příloha č. 1 Souhrnné výsledky ze screeningové části .....</b>	<b>I</b>
	<b>Příloha č. 2 Souhrnné výsledky z testování s kyselinou listovou .....</b>	<b>X</b>



# 1 Úvod

Rezistence bakterií na antibiotika je v dnešní době čím dál tím větším problémem. Rezistence je v přírodě naprosto přirozeným jevem, jedná se o součást evoluce, pomáhá bakteriím v adaptaci na nové prostředí. Problém nastává ve chvíli, kdy se rezistence šíří mezi patogenními bakteriemi rychleji, než je věda schopna přijít s jiným řešením, novým antibiotikem. Rychlejšímu šíření velmi pomáhá lidská činnost – špatné užívání antibiotik, nadměrné užívání antibiotik, či například znečištění ekosystému.

Vědci se v současné době zabývají i otázkou možného přenosu rezistence z komenzálních bakterií, například i probiotických, na ty patogenní. Rezistence je běžná i u probiotických bakterií, což může být limitující při selekci probiotických kmenů. Navíc jsou minimální inhibiční koncentrace pro bifidobakterie dostupné jen u některých antibiotik. I z tohoto důvodu je následně těžké určit, zda bifidobakterie jsou na dané antibiotikum citlivé nebo rezistentní. Kromě toho používání antibiotické terapie u lidí i zvířat může vést k jevu, kdy si komenzální bakterie vytvoří rezistenci, kterou následně mohou přenést i na patogenní bakterie.

Vhodnými a hojně rozšířenými metodami používanými na testování citlivosti bakterií na antibiotika jsou diluční a difúzní metody. Agarová difúzní metoda využívá agarových ploten s vykultivovanými bakteriemi a následně antibiotikum ve formě roztoku, proužku s koncentračním gradientem či disku o určité koncentraci. Daná forma antibiotika, například disk, se umístí na agarovou plotnu a dá se kultivovat – v případě bifidobakterií na 24 hodin při 37 °C. Výsledkem jsou inhibiční zóny, které nám říkají, jak hodně je dané antibiotikum vůči bakteriím účinné. Metoda je pro svou rychlost a celkovou nenáročnost vhodná pro zpracování velkého počtu vzorků při screeningovém testování, které může odhalit druhové či kmenové odlišnosti, které mohou být podmětem k dalšímu výzkumu, což bylo náplní této práce.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Náplní této práce je antibiotický screening multihostitelských druhů bifidobakterií pocházející z hostitelů s různou mírou užití antibiotik, s cílem otestovat antibiotika nejčastěji používaná v lidské a veterinární medicíně a získat tak rezistentní kmeny pro další charakterizaci a zároveň přinést nové poznatky k dané problematice.

**Hypotéza:** Předpokládáme, že bifidobakteriální kmeny izolované od lidských a zvířecích jedinců vystavených časté antibiotické terapii budou vykazovat větší výskyt rezistence k testovaným antibiotikům.

## 3 Literární rešerše

### Rod *Bifidobacterium*

Zástupci rodu *Bifidobacterium* jsou grampozitivní, sacharolytické, obligátně anaerobní (se schopností tolerovat kyslík u *Bifidobacterium indicum* či *Bifidobacterium asteroides*), mezofilní, nepohyblivé, nesporotvorné, katalázově a oxidázově negativní, pleomorfní tyčinky (Killer et al. 2018). Představují jednu z dominantních mikrobiálních skupin obývajících gastrointestinální trakt (GIT) lidí a zvířat, včetně savců, ptáků a sociálního hmyzu. Členové rodu *Bifidobacterium* jsou považováni za klíčové pro vývoj zdravé střevní mikrobioty v raném věku, kolonizující GIT v prvních dnech po narození (Mancino et al. 2019).

#### 3.1.1 Historie

Bifidobakterie byly poprvé izolovány ze stolice kojenců roku 1899. Objevitel Henry Tissier z Pasteurova institutu jim dal název *Bacillus bifidus*. Z důvodu podobnosti morfologických a fyziologických vlastností s laktobacily, byly na začátku 20. století mylně zařazovány do rodu *Lactobacillus* (Turroni et al. 2011). Až roku 1924 Orla-Jensen rozpoznal, že se jedná o samostatný rod *Bifidobacterium* (Lugli et al. 2017). Zásluhy na rapidním nárůstu studií bifidobakterií v 60. letech dvacátého století mají Reuter v Německu, Mitsuoka v Japonsku a Scardovi v Itálii. Reuter (1963) nejprve uspořádal již dříve popsáné „biotopy“ či „skupiny“ do druhů, z nichž popsal 8 vyskytujících se v lidských výkalech (Biavati et al. 2018). Dle publikace Bunešová et al. (2014) rod *Bifidobacterium* v danou dobu zahrnoval 48 druhů a poddruhů, z nichž 32 bylo původně izolováno z výkalů nebo gastrointestinálního traktu živočichů. V současné době rod dle bacterio.net zahrnuje více než 100 druhů.

#### 3.1.2 Taxonomie

Tabulka 1 Taxonomické zařazení

Taxonomické zařazení	
Doména	<i>Bacteria</i>
Kmen	<i>Actinobacteria</i>
Třída	<i>Actinobacteria</i>
Řád	<i>Bifidobacteriales</i>
Čeleď	<i>Bifidobacteriaceae</i>
Rod	<i>Bifidobacterium</i>

Základními fenotypovými znaky, které jsou využívány při identifikaci a taxonomickém rozčlenění bakterií jsou morfologie buněk, fermentace sacharidů či elektroforetická mobilita enzymů. Nicméně využití těchto metod někdy vedlo k nejednoznačným výsledkům. Dříve se druhy rodu *Bifidobacterium* identifikovaly na základě lokace nebo dle hostitele, ze kterého byly izolovány (např. *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium dentium*), dále za pomoci morfologie buněk, analýzy produktů fermentace a související enzymatické aktivity a schopnosti využívat různé sacharidové substráty (Ventura et al. 2004).

Enzym fruktosa-6-fosfát fosfoketoláza je taxonomickým markerem čeledi *Bifidobacteriaceae* využívaným k její identifikaci (Russell et al. 2011). Další metody identifikace byly dříve dle typu peptidoglykanu nebo obsahu DNA G + C (Killer et al. 2018b).

Bakteriální taxonomie je určována také pomocí hybridizace DNA-DNA, kdy se měří stupně genetické podobnosti mezi dvěma mikrobiálními genomy (Lugli et al. 2018). Další uznávanou metodou, která byla a je stále široce používána v bakteriální taxonomii, je srovnávací analýza sekvencí založených na genu 16S rRNA (Killer et al. 2018b). Bohužel metoda hybridizace DNA-DNA má problémy s reprodukovatelností a neposkytuje přesné měření skutečné sekvenční identity mezi genomy (Rosselló-Mora & Amann 2001). Podobná omezení má i metoda genu 16S rRNA, kdy odlišné druhy, které prošly intenzivními evolučními tlaky, mohou mít velmi podobné sekvence tohoto genu (Lugli et al. 2018).

Další metodou, která postrádá nedostatky předchozích, je celogenomové sekvenování následované komparativní genomikou. Srovnávací genomika se ukázala být přesná při rozlišování kmenů a je široce používána pro fylogenetickou charakterizaci nových bakteriálních druhů, zejména těch, které sídlí v komplexních komunitách, např. členové střevní mikrobioty (Milani et al. 2014; Vernikos et al. 2015).

Pro taxonomické určení bifidobakterií lze použít multigenového přístupu založeného na alternativních molekulárních markerech, jako jsou *clpC*, *dnaB*, *dnaG*, *dnaJ1*, *purF*, *rpoC* a/nebo *xfp* (Milani et al. 2016). Pan-genomová analýza čeledi *Bifidobacteriaceae* provedená v roce 2017 umožnila identifikaci 353 shluků ortologních genů (COG) sdílených 67 (sub) druhy, což představuje jádro genomu v dané době sekvenovaných zástupců *Bifidobacteriaceae* (jádro Bae-COG). Zkoumání ukazuje, že nejkonzervovanější jádrové geny specifikují funkce, jako je replikace, transkripce a translace, nebo funkce související s adaptací, jako je metabolismus sacharidů, nukleotidů a aminokyselin (Lugli et al. 2017). Matematická extrapolace dat ukazuje, že genomový rezervoár dostupný pro bifidobakteriální pan-genom se kládá z více než 5000 genů, které jsou pravděpodobně důležité pro zajištění adaptačních schopností souvisejících s lidským GIT (Bottacini et al. 2010). Pan-genomová analýza také umožnila identifikaci skutečně jedinečných genů (TUG) čeledi *Bifidobacteriaceae*, tj. těch genů, které jsou přítomny v jednom konkrétním kmeni, ale chybí v kterémkoli z dalších zkoumaných představitelů čeledi *Bifidobacteriaceae* (Lugli et al. 2017).

### 3.1.3 Morfologie

Bifidobakterie jsou grampozitivní pleomorfní tyčinky. Tvarově se vyskytují od stejnoměrných (uniformních) až po typické rozvětvené tyčinky ve tvaru Y nebo V. Jsou povětšinou anaerobní, nemotylní a nesporelující. Větvící povaha není závislá pouze na druhu, ale také na kultivačním médiu (Tannock 1999; Mattarelli & Biavati 2018).

Buněčná stěna bifidobakterií má typickou grampozitivní strukturu tvořenou silným peptidoglykanovým obalem obsahujícím polysacharidy, proteiny a kyselinu teichoovou. Zastoupení aminokyselin v tetrapeptidu se liší mezi druhy, což umožňuje jejich lepší identifikaci. Obvykle tetrapeptidy obsahují L-alanin, kyselinu D-glutamovou, L-ornitin a D-alanin, ale v některých kmenech může být ornithin nahrazen lysinem. Základní polysacharidy obsažené v buněčné stěně bifidobakterií jsou glukóza, galaktóza či rhamnóza. Teichoové kyseliny ve spojení s polysacharidovým řetězcem zodpovídají za přilnutí bakterií

k povrchu střeva. Lipoteichoové kyseliny následně zajišťují hydrofobní charakter bakterií (Biavati et al. 2000; Bottacini et al. 2014).

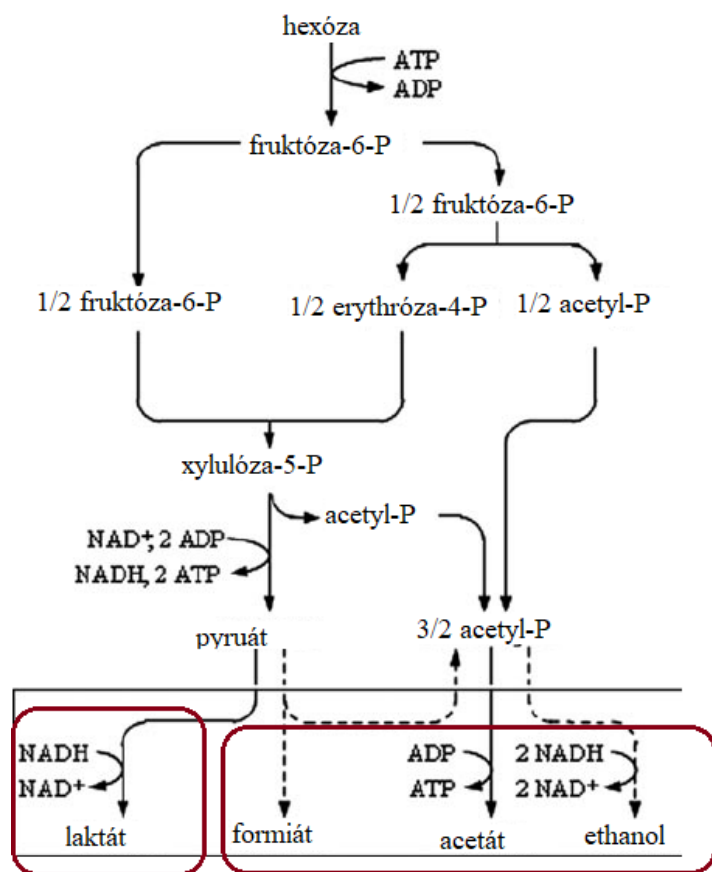
### 3.1.4 Fyziologie

Jak bylo již zmíněno výše, zástupci rodu *Bifidobacterium* jsou anaerobními organizmy. Některé druhy však v přítomnosti oxidu uhličitého dokážou kyslík do jisté míry tolerovat. Teplotní minimum pro jejich růst je v rozmezí 25-28 °C. Teplotní maximum se pro bakterie pohybuje v rozmezí 43-45 °C. Bifidobakterie se ovšem dokázaly částečně teplotně přizpůsobit na prostředí, ve kterém se vyskytují, proto druhy žijící v lidském organismu mají teplotní optimum mezi 36 až 38 °C, zatímco pro druhy žijící v trávicím traktu zvířat je optimální teplota pro růst vyšší, kolem 41 až 43 °C (Mattarelli & Biavati 2018). Jsou zde i výjimky, například *Bifidobacterium thermacidophilum*, jehož růstové optimum může být až 49,5 °C a po omezený čas dokáže přežít i teplotu 60 °C (Biavati et al. 2018). Další výjimkou je pak *Bifidobacterium psychraerophilum*, u kterého je prokázán jeho růst i při teplotách nižších, než jsou 4 °C (Leahy et al. 2005). Optimální pH pro růst se pohybuje v rozmezí 6,5 až 7,0. Hraníčními hodnotami pH, při kterých růst ustává je 4,5 a nižší, poté pak 8,0 a vyšší (Biavati et al. 2000).

### 3.1.5 Metabolismus

Bifidobakterie jsou sacharolytické bakterie a většinu energie získávají z nestravitelných sacharidů, jako jsou oligosacharidy živočišného i rostlinného původu. Jejich metabolismus obsahuje unikátní dráhu pro štěpení hexóz za vzniku ATP známou jako „bifid shunt“ (Obrázek č. 1). Všechny hexózy uvolněné hydrolýzou z komplexu sacharidů podléhají tomuto typu metabolismu (Pokusaeva, Fitzgerald, & Van Sinderen 2011). Hlavním enzymem metabolické dráhy je fruktosa-6-fosfát fosfoketoláza (F6PPK) (Biavati et al. 2018), která je klíčovým enzymem pro teoretický výtěžek 1,5 molu acetátu, 1 mol laktátu a 2,5 ATP z 1 mol glukózy. Poměry vytvořeného laktátu a acetátu se mohou lišit v závislosti na zdroji a druhu sacharidů a v závislosti na tom, zda se meziprodukt pyruvát štěpí na acetylfosfát a formuje se nebo se redukuje na laktát (Palframan et al. 2003). *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* a *Bifidobacterium breve* mohou metabolizovat L-fukózu na acetát, formiát, laktát a 1,2-propandiol (1,2-PD) s využitím cesty s nefosforylovanými meziprodukty, čímž se získá 1 mol L-fukózy a 1 mol 1,2-PD. 1,2-PD je prekurzorem pro tvorbu bakteriálních propionátů (Bunešová et al. 2017). Bifidobakterie mají také extracelulární enzymy, které katalyzují hydrolýzu polysacharidů, jako je amylopektin, amylóza a xylan (Ventura et al. 2004).

Acetát řadíme mezi mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFAs = short chain fatty acids), které mají výhody především pro hostitelské organismy (Musilová et al. 2015). SCFAs, které mají vysoký kalorický obsah, jsou vstřebány enterocyty v tlustém střevě, kde jsou metabolizovány a použity jako zdroj energie. Kromě toho SCFAs stimulují absorpci sodíku a vody v tlustém střevě a jsou známy svou schopností indukovat enzymy, které podporují obnovu sliznic (D'Argenio & Mazzacca 2000; Pokusaeva et al. 2011).



D-laktát  
produkcijící dráha

## Bifid Shunt

Obrázek 1 Schéma štěpení sacharidů pomocí „bifid shunt“ (Pokusaeva 2011).

### 3.1.5.1 Cross feeding

Cross feeding je důležitou součástí dynamického a funkčního komplexu mikrobiálního ekosystému v lidském tlustém střevě. Tlusté střevo je kolonizováno především kmeny Bacteroidetes, Firmicutes a Actinobacteria. Hlavní funkcí těchto převážně anaerobních bakterií je fermentace zbytků stravy, které neprošly trávením hostitelskými enzymy. Jedná se především o rezistentní škroby, neškrobové polysacharidy a oligosacharidy včetně fruktooligosacharidů. Produkty a meziproducty rozkladu sacharidů slouží jako zdroj uhlíku a energie pro křížové interakce (cross feeding) bakterií (Rios-Covian, Gueimonde & Flint 2015).

Zvýšený růst bifidobakterií na fruktanech inulinového typu způsobuje zvýšenou produkci butyrátu a bifidogenní účinek je tak doprovázen i butyrogenním účinkem. Kromě toho je to důkaz o přímé degradaci fruktanů inulinového typu bakteriemi tlustého střeva produkujícími butyrát. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je proto výskyt křížové interakce, tj. poskytování produktů rozkladu polysacharidů jako sekundárních substrátů po částečné hydrolyze primárními rozkladači. Produkty rozkladu sacharidů mohou skutečně sloužit jako meziproducty v metabolických křížových interakcích mezi bakteriemi tlustého střeva, a tím se metabolizovat na SCFAs (De Vuyst & Leroy 2011).

Dalším specifickým substrátem pro růst mikroorganismů je mucin. Mucin je produkován mukózními a pohárkovými buňkami gastrointestinálního traktu. Produkce je zahájena před porodem a kompletní hlenová vrstva je vyvinuta již několik dní po narození.

Lidské muciny jsou glykoproteiny složené z polypeptidové kostry bohaté na tandemové repetice prolinových, serinových, threoninových a O-glykosylovaných postranních řetězců. Muciny jsou neustále vylučovány z epitelu tlustého střeva, a proto jsou potenciálním zdrojem glykanů pro střevní mikrobiotu. Degradace mucinu však vyžaduje několik degradačních enzymů specifických pro jeho vazby; proto se jen malé množství mikroorganismů specializuje na degradaci mucinových glykanů. Zástupcem z rodu *Bifidobacterium*, který může mucin degradovat a zároveň v jeho přítomnosti růst je *Bifidobacterium bifidum*. *B. bifidum* degraduje mucin extracelulárně prostřednictvím aktivity membránově vázaných enzymů umožňujících křížové zpřístupňování živin jiným druhům. Již dříve bylo prokázáno, že *B. breve* roste za použití mono- a oligosacharidů uvolňovaných *B. bifidum* z mucinových glykanů (Bunešová et al. 2017).

### 3.1.5.2 Kyselina gama-aminomáselná

Kyselina gama-aminomáselná (gamma aminobutyric acid = GABA) je neproteinová aminokyselina, která je široce obsažena v rostlinách, zvířatech a mikroorganismech. GABA má několik známých fyziologických a psychologických funkcí. Různé studie zdůraznily, že je převážně přítomna v mozku, kde působí jako hlavní inhibiční neurotransmiter v savčím centrálním nervovém systému (CNS) (Dhakal et al. 2012). Dysfunkce v metabolismu GABA se konkrétně podílí na úzkosti a depresi (Barrett et al. 2012). Dále se podílí na regulaci krevního tlaku a srdeční frekvence, hraje také roli ve vnímání bolesti a úzkosti. Další potenciální přínosy GABA pro lidské zdraví jsou kontrola sekrece růstového hormonu a antiproliferační aktivita (Duranti et al. 2020).

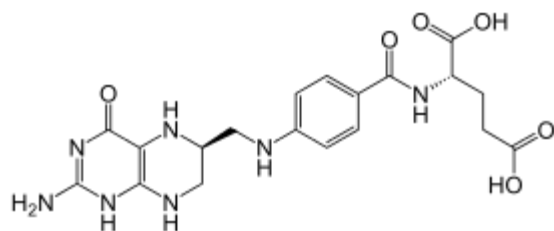
Opakující se bolest břicha je celkem běžný zdravotní problém, který je částečně přičítán viscerální přecitlivělosti. Stále více důkazů naznačuje, že střevní bakterie přispívají k vnímání bolesti břicha modulací osy mikrobiom-střevo-mozek. Specifické mikrobiální signály však zůstávají špatně definovány. Kyselina gama-aminomáselná je hlavním inhibičním neurotransmiterem a klíčovým regulátorem vnímání bolesti břicha a centrálního nervu z periferních aferentních neuronů. Ačkoli se uvádí, že střevní bakterie produkují GABA, není známo, zda mikrobiální neurotransmiter moduluje bolest břicha (Pokusaeva et al. 2017).

## Bifidobakterie a folát

### 3.1.6 Folát

Folát neboli vitamin B9 je označení široké kategorie biomolekul, které mají podobnou chemickou strukturu jako kyselina listová (Obrázek č. 2), která je součástí skupiny sloučenin zvaných pteridiny. Chemická struktura folátu se skládá ze tří složek: pterinu, kyseliny para-aminobenzoové a glutamátových podjednotek (Andlid et al. 2018; Engevik et al. 2019b). V přírodě jsou foláty přítomny hlavně ve svých redukováných, jedním uhlíkem substituovaných (nebo nesubstituovaných) formách pteroylglutamátů. Aby byla molekula folátu biologicky aktivní, musí být právě v redukované formě, zároveň je tato forma ale chemicky nestabilní (Forssén et al. 2013), zvláště je pak náchylná k oxidativnímu štěpení. Ke štěpení dochází na vazbě C9–N10, a často tak vznikají neaktivní molekuly pteridinu a p-aminobenzoylglutamátu (Lucock 2000). Stabilita folátů závisí na pH prostředí, teplotě

a na přítomnosti kovových iontů, jako je měď a železo, které stabilitu snižují (Gregory et al. 1996; Gregory 1989).



Obrázek 2 Kyselina listová

Folát jsou schopny produkovat rostliny, kvasinky a bakterie - z nich například bakterie mléčného kvašení či bifidobakterie. Savčí buňky nejsou schopny produkovat folát, jsou závislé pouze na externích zdrojích. Přírodní formy folátu, většinou přítomné ve formě derivátů polyglutamátu, se běžně vyskytují v zelené listové zelenině, ovoci, játrech, chlebu, bramborách a mléčných výrobcích (Konings et al. 2001; Kok et al. 2020). Syntetická kyselina listová (kyselina pteroylmonoglutamová) se běžně používá v doplňcích stravy nebo obohacených potravinářských produktech, z důvodu jejího plně oxidovaného a stabilního složení (Kok et al. 2020).

Foláty se podílejí na některých z nejzákladnějších metabolických reakcí probíhajících ve všech buňkách, mezi které řadíme například syntézu DNA nebo syntézu a metylaci proteinů (Andlid et al. 2018). Nedostatečný obsah nebo příjem folátu se podílí na vzniku vrozených vad, neurodegenerativních stavů, kardiovaskulárních onemocnění a některých rakovin (Smith & Refsum 2016; Porter et al. 2016).

### 3.1.7 Testování

Měření bakteriální produkce folátu lze provádět buď mikrobiologickými testy (Masuda et al. 2012; Sugahara et al. 2015) nebo technikami vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Andlid et al. 2018). Obě metody jsou široce používány pro analýzu folátu a mají své výhody i nevýhody. Mikrobiologické testy jsou levné a celkem jednoduché na provedení. Těmito testy je však možné zjistit pouze celkový obsah folátu ve vzorku, což může být v určitých studiích nevýhodou. Použití metody HPLC přináší podrobnější výsledky, kdy je možné určit i koncentrace zastoupených derivátů folátu ve vzorku. Problémem však zde je nutnost drahého vybavení a také odborné znalosti s používáním a interpretací dat.

Důležitou fází testování je i stabilizace folátů. Některé studie zabývající se měřením bakteriální produkce folátu pomocí mikrobiologických testů uvádí, že v nich nebyly použity žádné antioxidanty pro stabilizaci folátu (Masuda et al. 2012), zatímco jiné práce uvádějí použití kyseliny askorbové (Sugahara et al. 2015), 2-merkapt ethanolu (Hugenschmidt et al. 2010) nebo kombinaci kyseliny askorbové s 2-merkapt ethanolem (Sybesma et al. 2003).

### 3.1.8 Bifidobakterie jako producenti

Bylo prokázáno, že rod *Bifidobacterium* zahrnuje několik druhů se schopností *de novo* biosyntézy folátu (Rossi et al. 2016; D'Aimmo et al. 2012). Známí producenti folátu jsou



kmeny *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum* a *B. catenulatum* (Sugahara et al. 2015). Zdá se však, že mnoho kmenů a možná i celých druhů tuto schopnost syntézy ztratilo. Druhy, u kterých biosyntéza folátu nebyla nalezena nebo se vyskytuje pouze vzácně, jsou *B. animalis*, *B. longum* subsp. *infantis* a *B. breve*. Nejnižší úroveň na jednotku biomasy byla zjištěna u *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527. Vliv zde zřejmě měla adaptace na biotopy, které často obsahují externí folát, zejména pak prostředí střevního traktu zvířat. Tyto podmínky pravděpodobně vedly ke snížení selekčního tlaku pro *de novo* biosyntézu folátu. Kmeny stejného druhu se tak mohou lišit tím, že jsou samozásobující se folátem, nebo jsou závislé na příjmu z prostředí. I přes tento fakt si všechny bifidobakterie uchovaly řadu buněčných funkcí závislých na folátech. Praktickým důsledkem toho je, že některé bifidobakterie nebudou růst v syntetickém médiu bez suplementace kyseliny listové, zatímco jiné ano. Dalším důsledkem je, že fermentace potravin může vést ke snížení nebo zvýšení obsahu folátu v konečném produktu, jak bylo prokázáno u různých bakterií mléčného kvašení (Laiño et al. 2013).

### 3.1.9 Výsledky jiných studií

Data studie provedené D'Aimmo et al. (2012) (2012) pomocí HPLC ukazují, že obsah folátu u bifidobakterií je vysoce závislý na kmeni a značně se mezi nimi liší. *B. adolescentis* ATCC 15703 a *B. longum* ssp. *longum* B1990 obsahovali nejvyšší množství celkového folátu 6415 a 6015 µg/100 g sušiny. Nejnižší hladiny folátu byly zjištěny u kmenů izolovaných ze zvířat a z fermentovaného mléka - *B. animalis* ssp. *lactis* DSMZ 10140 obsahovalo 385 µg/100 g sušiny a *B. animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527 obsahovalo 220 µg/100 g sušiny celkového množství folátu.

D'Aimmo et al. (2014) zkoumali obsah a složení folátu u bifidobakterií izolovaných z masožravců (pes a gepard), všežravých primátů (šimpanz a orangutan) a nektarivorního hmyzu (včela medonosná). Výsledky ukazují, že důkaz biosyntézy folátu byl nalezen u vzorků izolovaných z primátů, ale nebyl nalezen u bifidobakterií masožravců a včel. Izoláty z orangutanů a šimpanzů měly vysoký celkový obsah folátu, průměrné hodnoty byly 7792 µg/100 g sušiny u šimpanze a 8368 µg/100 g sušiny u orangutana. Nejnižší obsah folátů byl u *B. dentium* CHZ9 (3749 µg/100 g sušiny), přičemž nejvyšší obsah byl nalezen u *B. adolescentis* ORG10 (8210 µg/100 g sušiny).

Sugahara et al. (2015) ve své studii testovali *in vitro* produkci folátu u 44 bifidobakteriálních kmenů patřících k 9 taxonům druhů lidských rezidenčních bifidobakterií (HRB) a 7 taxonům druhů nehumánních rezidenčních bifidobakterií (non-HRB) v médiu obsahujícím esenciální hladiny folátu. Testování ukázalo, že všechny testované kmeny HBR byly schopny produkovat folát, zatímco většina non-HBR kmenů nikoli. Výjimkou byli pouze *B. thermophilum* a *B. longum* ssp. *suis*. Rozdíly v produkci folátu *in vivo* pomocí HRB a non-HRB byly potvrzeny použitím monoasociovaných myší.

## Význam a využití bifidobakterií v doplňcích stravy

Bifidobakterie jsou probiotické mikroorganismy, které se v potravinářském průmyslu běžně používají. Probiotické mikroorganismy jsou obvykle dostupné jako kultivační koncentráty v sušené nebo zmrazené formě, které se přidávají do potravin pro průmyslové nebo

domácí použití (Tripathi & Giri 2014). Kromě potravinových probiotik jsou na trhu různé zdravotní výrobky a farmaceutické přípravky obsahující probiotika (Saad et al. 2013). Nejčastěji používaným druhem probiotických bakterií v lyofilizované formě a mléčných výrobcích jsou *B. adolescentis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *longum* a *B. longum* subsp. *infantis* (Cao et al. 2020). Množství probiotických bakterií potřebných pro terapeutický účinek se považuje za rozmezí  $10^9$  buněk živých mikroorganismů za den. Aby se dosáhlo příznivého účinku, musí bakterie zůstat v produktu životaschopné až do doby spotřeby. Komerčně dostupná probiotika jsou obvykle ve formě zmrazených, práškových bakterií nebo ve formě kapslí, což může ovlivnit jejich perzistenci a životaschopnost (Bunešová et al. 2015). Z hlediska dlouhodobého zdraví člověka má však používání probiotik několik bezpečnostních problémů, včetně přenosu lékové rezistence na oportunní střevní patogeny (Imperial & Ibana 2016). Jedním ze základních kritérií pro probiotika je tedy nepřítomnost přenosné antibiotické rezistence (Cao et al. 2020).

Tradičně se bifidobakterií používá ve fermentovaných mléčných výrobcích. Bezpečné používání bifidobakterií je podporováno dlouhou historickou spotřebou fermentovaných mléčných výrobků a rostoucími poznatky o taxonomii a fyziologii bifidobakterií. Bakterie produkující kyselinu mléčnou se v potravinách považují za komenzální mikroorganismy s malým nebo žádným patogenním potenciálem (Picard et al. 2005).

### 3.1.10 Probiotika

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které v adekvátním množství mají zdravotní přínos pro hostitele (Reid et al. 2019). Stanovení antimikrobiální citlivosti bakteriálního kmene je důležitým předpokladem pro jeho schválení jako probiotika (Moubareck et al. 2005). K nejpoužívanějším druhům pro výrobu probiotik patří rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Ve studiích na zvířatech a na lidech byly široce testovány na jejich prospěšné účinky při prevenci širokého spektra gastrointestinálních poruch (Picard et al. 2005; Hill et al. 2014).

Význam slova probiotikum má původ z řeckého výrazu „pro život“ a v průběhu let měl několik různých výkladů. Slovo probiotikum poprvé použili Lilley a Stillwell roku 1965 pro pojmenování substance vylučované jedním organismem, jež stimulovala růst jiného mikroorganismu. Až roku 1989 Fuller představil přesnější definici (Fuller 1992). Definice dle Hill et al. (2014) zní: Probiotika jsou mono- nebo směsné kultury živých mikroorganismů, které po aplikaci prospěšně ovlivňují hostitele zlepšením vlastností jeho vlastní mikroflóry.

Hlavní probiotické účinky:

1. Prevence a/nebo snížení doby trvání průjmu, způsobeného rotaviry nebo spojeného s užíváním antibiotik, jakož i zmírnění potíží vyvolaných v důsledku nesnášenlivosti laktózy.
2. Snížení koncentrace enzymů stimulujících rozvoj nádorových onemocnění a/nebo vznik hnilobných (bakteriálních) metabolitů ve střevě.
3. Prevence a zmírnění nespecifických a nepravidelně se vyskytujících onemocnění gastrointestinálního traktu u zdravých lidí.

4. Příznivé účinky na mikrobiální odchylky, záněty a další potíže v souvislosti se zánětlivými onemocněními trávicího traktu, infekce způsobené *Helicobacter pylori* nebo bakteriální přerůstání.
5. Normalizace procházející stolice a její konzistence u osob trpících zácpou nebo dráždivostí tračníku.
6. Prevence nebo zmírnění alergií a atopických chorob u kojenců.
7. Prevence infekcí dýchacích cest (rýma, chřipka) a jiných infekčních onemocnění a pomoc při podpoře léčby infekcí urogenitálních cest (de Vrese & Schrezenmeir 2008).

V případě současného podávání probiotik s antibiotiky k prevenci a léčbě střevních poruch by probiotika měla být rezistentní na některá antibiotika, aby přežila v gastrointestinálním traktu (Rosaria et al. 2006). Avšak probiotika mající vlastnosti rezistence mohou mít negativní důsledky pro lidské zdraví. Existuje totiž riziko související s potenciálním přenosem antibiotické rezistence z probiotických kmenů na střevní patogeny (Moubareck et al. 2005).

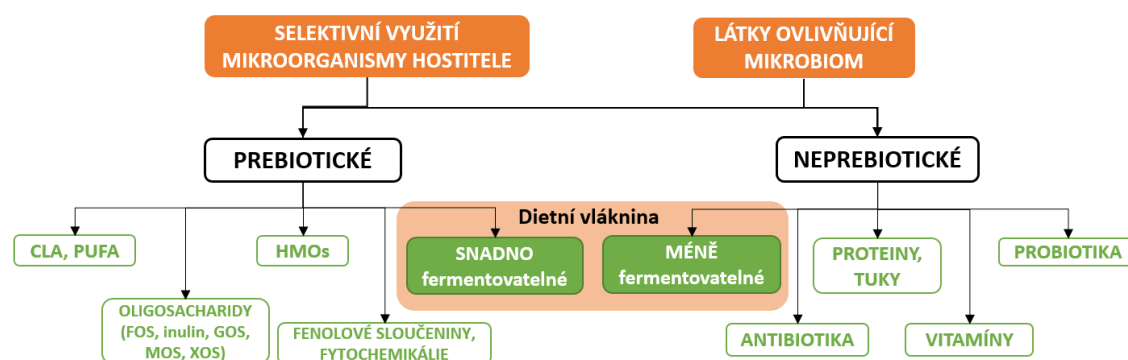
#### 3.1.10.1 Bifidobakterie jako probiotika

Funkční vlastnosti bifidobakterií přispívají přímo nebo nepřímo k několika zdravotním přínosům, včetně ochrany proti patogenním mikroorganismům, hypertenzi, zánětu, diabetu či oxidativnímu stresu. Podílejí se také na modulaci mikrobiomu, imunitní modulaci a anticholesterolemické aktivitě (Novik & Savich 2020). Bifidobakterie mohou syntetizovat a produkovat vitamíny jako riboflavin, thiamin, vitamín B6 a vitamín K a související bioaktivní molekuly, jako je kyselina listová a niacin. Ve srovnání s bakteriemi mléčného kvašení bifidobakterie přednostně produkují kyselinu L-mléčnou, která je snadněji metabolizována lidmi a může být důležitá v případě kojenců nebo lidí s metabolickou acidózou. Potravinové produkty obsahující bifidobakterie mohou také zlepšit biologickou dostupnost minerálů usnadněním jejich ionizace (Sharma et al. 2021). Probiotické přípravky obsahující bifidobakterie zahrnují jednotlivé bakteriální kmeny v kombinaci s jinými probiotickými mikroorganismy, zapouzdřené bakteriální buňky a společně zapouzdřené buňky s prebiotiky. Zjistilo se, že nejběžnějšími druhy rodu *Bifidobacterium* kolonizující lidské střevo a používající se v probiotických přípravcích jsou *B. animalis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* a *B. longum* (O'Callaghan & van Sinderen 2016).

#### 3.1.11 Prebiotika

Slovo prebiotikum představili Gibson a Robertfroid a definovali jej jako „nestravitelnou složku potravin, která příznivě ovlivňuje hostitele tím, že selektivně stimuluje růst a/nebo aktivitu jedné bakterie nebo omezeného počtu bakterií v tlustém střevě“ (Manning & Gibson 2004). Definice z roku 2017 definuje prebiotikum jako substrát, který je selektivně využíván hostitelskými mikroorganismy, které poskytují zdravotní přínos (Obrázek č. 3) (Gibson et al. 2017). Optimální střevní mikrobiota může zvýšit odolnost vůči patogenním bakteriím, snížit amoniak v krvi, zvýšit stimulaci imunitní odpovědi a snížit riziko rakoviny (Manning & Gibson 2004). Aby se daná látka mohla řadit mezi prebiotika, musí splňovat 2 základní požadavky –

průchod horní částí trávicího traktu příjemce v nezměněné formě a musí sloužit selektivně jako substrát pro fermentaci určitými bakteriemi tlustého střeva, které mají příznivý efekt na zdravotní stav hostitele (Gibson & Roberfroid 1995). Nejčastěji používanými prebiotickými sloučeninami jsou inulin a oligofruktóza (fruktooligosacharidy), galaktooligosacharidy a laktulóza (Jirillo, Jirillo & Magrone 2013). Definice prebiotik se více či méně překrývá s definicí vlákniny, s výjimkou selektivity prebiotik pro určité druhy. Tato selektivita byla objevena i pro bifidobakterie, které mohou být podporovány požitím látek, jako jsou fruktooligosacharidy a inulin (Mao et al. 2018), transgalaktosylované oligosacharidy a sójové oligosacharidy (de Vrese & Schrezenmeier 2008). Prebiotika se přirozeně vyskytují v semenech a kořenech některých rostlin jako je čekanka, cibule, česnek, artyčoky, chřest, ječmen, žito, sójové boby, cizrna a lupina. Mohou být také extrahována vařením, enzymatickým působením nebo alkoholem. Existují také syntetické oligosacharidy získané přímou polymerizací disacharidů či fermentací a probiotické jsou i některé polysacharidy z buněčné stěny kvasinek (Flesch, Poziomyck & Damin 2014).



Obrázek 3 Schéma prebioticky účinných substrátů dle Gibson et al. 2017

CLA (Conjugated Linolic Acid) – Konjugovaná kyselina linolová

PUFA (Poly Unsaturated Fatty Acids) - Polynenasycené mastné kyseliny

HMOs (Human Milk Oligosaccharides) – Oligosacharidy mateřského mléka

### 3.1.12 Synbiotika

Mezinárodní vědecká asociace pro probiotika a prebiotika (ISAPP) definovala synbiotikum jako „směs obsahující živé mikroorganismy a substrát(y) selektivně využívané hostitelskými mikroorganismy, které hostiteli propůjčují zdravotní přínos“ (Swanson et al. 2020). Bylo prokázáno, že pravidelný dlouhodobý příjem synbiotik zlepšuje zdraví dospělých snížením výskytu a závažnosti onemocnění dýchacích cest v období podzimu a zimy. Synbiotika také mění složení mikrobioty tlustého střeva, snižují zánětlivé procesy ve střevní sliznici a mají potenciál vyvolat remisi při zánětlivém onemocnění střev (Jirillo, Jirillo & Magrone 2013). Mohou vést ke snížení hladiny cholesterolu v krvi a snížení krevního tlaku (Safavi et al. 2013), pomáhají také snížit výskyt ekzému u kojenců do 2 let (Dang et al. 2013).

Příkladem synbiotik může být směs rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* spolu s fruktooligosacharidy, inulínem či psylliem (Markowiak & Ślizewska 2017).

### 3.1.13 Postbiotika

Optimální vývoj gastrointestinálního traktu a imunitního systému je mimo jiné spojen se správným vývojem a složením střevní mikrobioty. Kromě prebiotik, probiotik a synbiotik mohou takzvaná postbiotika přispívat k modulaci mikrobiálního složení a tím k rozvoji jak gastrointestinálního traktu, tak imunitního systému (Jabandžiev et al. 2019). Postbiotika jsou funkční bioaktivní sloučeniny generované v matrix během fermentace (Wegh et al. 2019) produkované probiotickými mikroby, které ovlivňují různé biologické funkce hostitele na místní i systémové úrovni (Jabandžiev et al. 2019) a podporují tak zdraví a integritu střevní bariéry, aniž by představovaly významná rizika (Mantziari et al. 2020).

Postbiotika mohou zahrnovat mnoho různých složek, včetně metabolitů, SCFAs, mikrobiálních buněčných frakcí, funkčních proteinů, extracelulárních polysacharidů, buněčných lyzátů, kyseliny teichoové, muropeptidů odvozených od peptidoglykanu a struktur typu pili (Wegh et al. 2019).

Postbiotika mohou představovat bezpečnou alternativu schopnou modulovat buněčnou odpověď a stimulovat humorální reakci hostitele (Mantziari et al. 2020).

### 3.1.14 Psychobiotika

Psychobiotika jsou skupinou probiotik, které ovlivňují funkce a chování související s centrálním nervovým systémem (CNS), zprostředkované osou mikrobiota-střevo-mozek prostřednictvím imunitních, humorálních, nervových a metabolických cest za účelem zlepšení nejen gastrointestinální funkce, ale také antidepresivní a anxiolytickou kapacitu (Cheng et al. 2019). Psychobiotika jsou považována za potenciální modulátory obousměrné komunikace mezi gastrointestinálním traktem a centrálním nervovým systémem. Přestože příčinná souvislost dosud nebyla prokázána, střevní dysbióza se objevila jako charakteristický znak několika nemocí, včetně neuropsychiatrických poruch (Tremblay et al. 2021). V posledních letech bylo u některých kmenů psychobiotik zjištěno, že mohou fungovat jako inhibitory zánětu a snižovat hladinu kortizolu, což vede ke zlepšení symptomů úzkosti a deprese. Psychobiotika účinně zlepšují neurodegenerativní a neurovývojové poruchy, včetně poruchy autistického spektra, Parkinsonovy choroby a Alzheimerovy choroby (Cheng et al. 2019).

## Výskyt bifidobakterií

Bifidobakterie se přirozeně vyskytují v řadě ekologických nik, které jsou buď přímo nebo nepřímo spojeny s gastrointestinálním traktem zvířat (teplokrevných savců a sociálního hmyzu) a lidí, kde tvoří dominantní mikrobiální skupinu (O'Callaghan & van Sinderen 2016; Ruiz et al. 2016). Běžnými zástupci ve střevech savců jsou *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* a *B. pseudolongum* (Lugli et al. 2019). V minoritním zastoupení pak můžeme bifidobakterie nalézt v dutině ústní, odpadních vodách či potravinách (Mattarelli & Biavati 2018).

V současné době se výzkum zaměřuje na identifikaci nových druhů bifidobakterií převážně u opic a primátů. Modráčková et al. (2021) v nedávno publikované studii zkoumali celkem 326 izolátů od opic, z nichž bylo 210 F6PPK-pozitivních bifidobakterií. Nejčastěji identifikovanými druhy u opic z nového světa (obývající jihoamerické tropické a subtropické oblasti) byli *B. parmae*, *B. imperatoris/saguini* a *B. ramosum*. U opic starého světa (obývající

tropické a subtropické oblasti Asie a Afriky) byly nejčastěji zastoupeny druhy *B. dentium* a *B. catenulatum/pseudocatenulatum*.

Další často zkoumanou skupinou živočichů na přítomnost bifidobakterií je hmyz se společenským způsobem života. Kopečný et al. (2010) zjistili, že bifidobakterie byly přítomny ve střevech většiny společenského hmyzu – včely medonosné, vosy, švábi a čmeláci, kromě mravenců. U včel medonosných bylo častým zástupcem *B. indicum*. Zheng et al. (2019) prostřednictvím analýzy genomů bakteriálních izolátů a metagenomu střevní mikroflóry včely medonosné zjistili, že rody *Bifidobacterium* a *Gilliamella* jsou hlavními degradátory hemicelulózy a pektinu.

## Vybrání zástupci multihostitelských druhů bifidobakterií

V této kapitole jsou blíže popsány multihostitelské druhy/poddruhy bifidobakterií, které byly testovány v praktické části diplomové práce. Tyto multihostitelské druhy/podruhy se vyskytují u více různých živočichů a často také u člověka.

### 3.1.15 *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*

První izolaci ze zvířecího trusu provedl Tomotari Mitsuoka roku 1969. Chybně ho však označil jako *Bifidobacterium longum* subsp. *animalis*. Pomocí DNA-DNA hybridizace byli Scardovi & Trovatelli (1974) schopni identifikovat, že zde není podobnost s *B. longum* a nově objevený druh nazvali *Bifidobacterium animalis*.

Druh *B. animalis* se skládá ze dvou poddruhů, *B. animalis* subsp. *lactis* a *B. animalis* subsp. *animalis* (Ruiz-Moyano et al. 2012). I přesto si zástupci obou taxonů jsou fenotypicky podobní a sdílí více než 70% příbuznost DNA-DNA (Masco et al. 2004).

V experimentech *in vitro* bylo ukázáno, že testované zvířecí probiotické kmeny *B. animalis* subsp. *animalis* při zánětlivých podmínkách aktivovali antiapoptotické dráhy fosfatidylinositol 3-kinázy a cesty závislé na proteinové kináze C, což vedlo k regulaci aktinového cytoskeletu. Tyto cesty přispívají k regeneraci střevního epitelu a modulaci slizničního imunitního systému, které spolu s inhibicí signalizace toll-like receptoru (TLR) podporují obecnou imunitní toleranci (Paveljšek et al. 2021).

### 3.1.16 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* je jedním z nejběžnějších druhů rodu *Bifidobacterium* používaných jako probiotikum v komerčních produktech v Severní Americe a Evropě. *B. lactis* se používá pro výrobu fermentovaných potravin po celá desetiletí a vědecky ho prvně klasifikoval Meile et al. (1997), poté byl překlasifikován na *B. animalis* subsp. *lactis* v roce 2004 (Masco et al. 2004).

Při pravidelné konzumaci tohoto probiotického druhu byly prokázány zdravotní benefity, například kontrolu přírůstku tělesného tuku v intervenční studii u lidí. Předklinické údaje dále naznačují zlepšení slizniční integrity a kontrolu hladiny glykemie v krvi, jakož i zlepšení odolnosti hostitele vůči patogenům (Uusitupa et al. 2020).

Li et al. (2019) ve své studii zkoumali protizánětlivé účinky a mechanismy jednotlivých a kombinovaných probiotik, která by byla schopna snížit zánětlivé reakce v buňkách střevního

epitelu při zánětlivém onemocnění střev. Výsledky ukazují, že *B. animalis* subsp. *lactis* opravdu snižuje zánětlivé reakce. Zároveň bylo zjištěno, že kombinace *Lactobacillus acidophilus* a *B. animalis* subsp. *lactis* může mít silnější protizánětlivý účinek než každý z mikroorganismů sám o sobě.

### 3.1.17 *Bifidobacterium adolescentis*

V roce 1963 Reuter izoloval kmeny *Bifidobacterium adolescentis* z výkalů dospělých a seskupil je do čtyř biovarů na základě sérologických reakcí a rozdílů ve fermentaci mannitolu a sorbitolu. Buněčná morfologie je společná jako u mnoha dalších druhů *Bifidobacterium* (Reuter 1963). Obtíže při odlišení *B. adolescentis* na základě fenotypových charakteristik od jiných bifidobakterií izolovaných z výkalů dospělých lidí uvádí Yaeshima et al. (1992), který použil složení bází DNA a homologie DNA–DNA ke správnému přiřazení izolátů k *B. adolescentis*.

*B. adolescentis* vykazuje výrazné antiflogistické, anxiolytické a antidepressivní účinky, které souvisejí se snížením zánětlivých cytokinů a obnovení rovnováhy střevní mikrobioty (Guo et al. 2019). Při laboratorních pokusech na myších Fang et al. zjistili, že *B. adolescentis* podporuje diferenciaci regulačních T-lymfocytů, potlačuje reakce Th2 lymfocytů a zvyšuje výskyt baterií rodu *Lactobacillus* ve střevech, který pozitivně koreluje se zvýšením produkce kyseliny propionové, a má tedy potenciál pro zlepšení atopické dermatitidy (Fang et al. 2020).

Stres může narušit rovnováhu střevní mikroflóry, stimulovat mechanismy zánětu mozku a vést k aktivaci mikroglíí u depresivních poruch (Maes 2008). Nukleární faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) je jedním z hlavních transkripčních faktorů, které zprostředkovávají zánětlivé reakce, a aktivaci NF- $\kappa$ B v buňkách lze inhibovat preinkubací s *B. adolescentis* (Riedel et al. 2006). *B. adolescentis* může také regulovat poměr *Proteobacteria* k *Bacteroidetes* ve střevní mikrobiotě a inhibovat aktivaci NF- $\kappa$ B v tlustém střevě (Guo et al. 2019).

### 3.1.18 *Bifidobacterium dentium*

První popis *Bifidobacterium dentium* pochází od Scardovi & Crociani (1974). Izolován byl z dutiny ústní a vzhledem k tomu, že jeho přítomnost souvisí se zubním kazem, je považován za potenciální kariogenní mikroorganismus. Studie ukázaly, že jeho počet je pod detekčním limitem nebo velmi nízký na povrchu zubů bez kazu, ale vysoký v hlubokých lézích (Mantzourani et al. 2010; Henne et al. 2015). *B. dentium* nekolonizuje neporušené zubní tvrdé povrchy, ale místo toho kolonizuje až léze vzniklé po iniciaci jinými druhy - například *Streptococcus mutan*. Přítomnost *B. dentium* je tedy spíše důsledkem než příčinou počátečních zubních kazů (Kaur et al. 2013).

Bylo zjištěno, že *B. dentium* adheruje k lidskému hleny MUC2+ a obsahuje proteiny vázající mucin. V nepřítomnosti glukózy může *B. dentium* metabolizovat různé zdroje živin převážně rostlinného původu. Na rozdíl od jiných bifidobakterií nebyl *B. dentium* do značné míry schopen růst na sloučeninách nacházejících se v lidském střevním hleny (Engevik et al. 2021). Údaje z testů *in silico* odhalily, že *B. dentium* postrádá enzymy nezbytné k rozsáhlé degradaci mucinových glykanů obsažených v lidském střevním hleny. Toto zjištění bylo potvrzeno prokázáním, že *B. dentium* nemohlo *in vitro* používat nativní mucinové glykany jako primární zdroje uhlíku (Engevik et al. 2019).

*B. dentium* je schopno produkovat kyselinu gama-aminomáselnou prostřednictvím enzymatické dekarboxylace glutamátu (Pokusaeva et al. 2017).

### 3.1.19 *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum*

V roce 1969 Scardovi et al. izoloval a popsal dva nové bifidobakteriální druhy, *B. globosum* a *B. ruminale*, z bacheru. V letech 1970 a 1971 oznámili, že mezi *B. globosum* a *B. pseudolongum* byly zjištěny vysoké úrovně genetické příbuznosti (Scardovi et al. 1971).

Fylogenomická analýza genomových sekvencí následně potvrdila, že *B. pseudolongum* subsp. *globosum* a *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* opravdu představuje dva odlišné bifidobakteriální druhy. Analýza zjistila i metabolické rozdíly. Srovnávací analýzy genetických strategií k prevenci invaze cizí DNA odhalily, že *B. pseudolongum* subsp. *globosum* vykazuje větší plasticitu genomu. Získaná zjištění naznačují, že *B. pseudolongum* subsp. *globosum* je přizpůsobivější různým ekologickým nikám, jako jsou střevo savců a ptáků, oproti *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* (Lugli et al. 2019).

### 3.1.20 *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *pseudolongum*

První popis tohoto druhu pochází od Mitsuoky z roku 1969, kdy izoloval vzorky z prasete, kuřete, psa, býka, telete, křavy a morčete. *Bifidobacterium pseudolongum* má asi 70% homologii DNA-DNA s *B. globosum* a vykazuje podobné fenotypové rysy a identickou peptidoglykanovou strukturu (Mitsuoka 1969).

*B. pseudolongum* se spolu s dalšími bifidobakteriálními druhy hojně vyskytuje v zažívacím traktu savců (Lugli et al. 2019). Bo et al. (2020) provedli studii na obézních myších, která zkoumala potenciální přínost *B. pseudolongum* na léčbu obezity, na střevní mikrobiotu a její fyziologický mechanismus. Model obézních myší byl vytvořen dietou s vysokým obsahem tuků. Zkoumaly se změny obsahu tuku, plazmatických metabolitů a střevní mikrobioty u obézních myší a obézních myší léčených *B. pseudolongum*. Studie ukázala, že léčba *B. pseudolongum* významně snížila tělesnou hmotnost (o 12 %), plazmatické triglyceridy (o 12,4 %) a viscerální tuk (o 26,5 %) u obézních myší. *B. pseudolongum* může mít terapeutický potenciál pro léčbu obezity vyvolanou stravovacími návyky. Léčba *B. pseudolongum* by mohla změnit střevní mikroflóru hostitele a poskytnout mu tak výhodu při trávení, a tím zmírnit pravděpodobnost rozvoje metabolických onemocnění (Bo et al. 2020).

## Antibiotika

Antibiotikum je lék, který má bakteriostatické nebo bakteriocidní účinky. Jejich objev představuje jednu z nejdůležitějších událostí v historii medicíny a znamenal revoluci v moderní chemoterapii, protože tyto sloučeniny přispěly k drastickému snížení úmrtnosti na bakteriální onemocnění lidí a zvířat. Antibiotika se běžně dělí podle chemické struktury nebo mechanismu účinku do různých rodin: betalaktamová antibiotika, makrolidy, chinolony, tetracykliny, aminoglykosidy atd (Martín et al. 2015).

Roku 1947 definoval Selman A. Waksman termín „antibiotikum“: „Antibiotikum je chemická látka produkovaná mikroorganismy, která má schopnost inhibovat růst a dokonce ničit bakterie a jiné mikroorganismy“ (Waksman 2018). Jak z definice vyplývá, antibiotika jsou



primárně produkty půdních živých organismů. Aktinobakterie a houby jsou zdrojem přibližně dvou třetin antimikrobiálních látek, které se v současné době používají v humánní medicíně. (Durand, Raoult, & Dubourg 2019).

### 3.1.21 Historie

V září roku 1928 objevil Sir Alexander Fleming antimikrobiální aktivitu generovanou houbou kontaminující kulturu Petriho misky *Staphylococcus* sp. Fleming, který pracoval v londýnské nemocnici St. Mary's, zaznamenal svá pozorování v článku v *The British Journal of Experimental Pathology* v roce 1929 (Fleming 1929), kde ukázal, že penicilin je schopen inhibovat růst bakterií *in vitro*. Fleming se domníval, že penicilin by mohl být užitečný jako lokální antiseptikum, ale nepodařilo se mu vyčistit penicilin ani charakterizovat jeho aktivitu (Aminov 2010).

V roce 1932 byl Flemingův izolát identifikován jako *Penicillium notatum* (Obrázek č. 5) a aktivní sloučenina inhibující růst bakterií byla nazvána penicilinem (Martín et al. 2015). Flemingův článek o penicilinu posloužil vědcům v Oxfordu jako základ k zahájení výzkumu nových antimikrobiálních látek v roce 1939. Článek zaujal hlavně Howarda Floreyho spolu s Ernstem Chainem. Chain a Florey se rozhodli navrhnout metodu kultivace plísně a zaměřili se na její produkci v dostatečném množství, aby bylo možné dále testovat její antimikrobiální roli. Norman Heatley, mladý chemik ve Floreyho laboratoři, sehrál klíčovou roli v procesu čištění penicilinu. Heatley a Chain navrhli rané metody pro extrakci penicilinu, který byl potřebný k získání dostatečného množství materiálu k provedení prvních zkoušek. V polovině 40. let 20. století bylo na Patologické škole sira Williama Dunna v Oxfordu k dispozici dostatek penicilinu, aby bylo možné testovat jeho účinnost na myších.

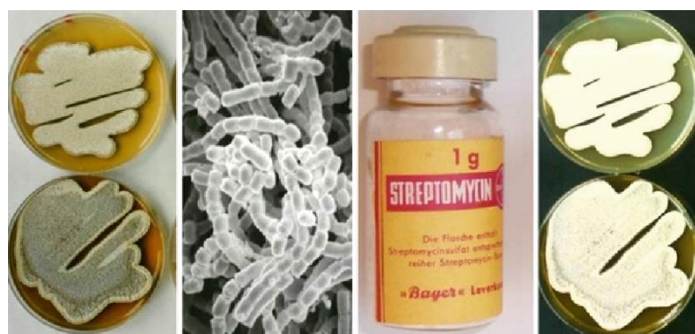
Právě tento experiment, který provedli Heatley a kolegové, poskytl data k prokázání účinku penicilinu *in vivo* (Heatley 2004). Osmi myším byla injekčně podána smrtelná dávka streptokoka. Po jedné hodině byla dvěma myším podána jedna dávka penicilinu (10 mg) a dvěma myším bylo podáno 5 mg penicilinu plus další dávky (5 mg) 3, 5, 7 a 11 hodin po infekci. Čtyři myši sloužily jako kontrolní skupina a nedostaly žádný penicilin. Sedmnáct hodin po počáteční infekci všechny myši v kontrolní skupině zemřely, zatímco všechny myši, které dostaly dávku penicilinu, přežily. Toto pozorování poskytlo důkaz, že penicilin má potenciál zachraňovat životy (Lobanovska & Pilla 2017).

## Vybrané skupiny antibiotik

### 3.1.22 Aminoglykosidy

První popsané antibiotikum třídy aminoglykosidů bylo streptomycin (Obrázek č. 4). Tato sloučenina byla izolována Schatzem et al. roku 1944 ze *Streptomyces anulatus* subsp. *griseus* (Schatz & Waksman 2016). Streptomycin a mnoho dalších aminoglykosidů jsou vysoce účinná širokospektrá antibiotika a působí primárně narušením syntézy bakteriálních proteinů vazbou na 30S ribozomální podjednotku. Tato třída antibiotik je stále v klinickém použití, i když většinou v kombinované terapii. Streptomycin byl také prvním anti-tuberculozicem použitým v terapii, a navíc vykazoval aktivitu proti několika dalším chorobám, které nebylo

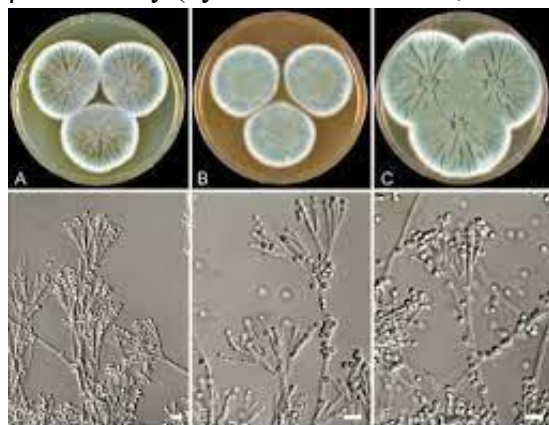
možné vyléčit penicilinem. Dalšími zástupci jsou kanamycin, gentamicin a tobramycin, které se uplatňují v léčbě gramnegativních bacilárních infekcí (Mohr 2016).



Obrázek 4 *Streptomyces anulatus*, Streptomycin (Mohr 2016)

### 3.1.23 $\beta$ -laktamy

Penicilin a příbuzné  $\beta$ -laktamy představují jednu z našich nejstarších a nejrozšířenějších antibiotických skupin (Cho et al. 2014). Objev a vývoj  $\beta$ -laktamů penicilinového a cefalosporinového typu a jejich syntetických verzí byly nepostradatelné při vzniku moderního farmaceutického průmyslu (Karwehl & Stadler 2016). Charakteristický pro tuto skupinu je  $\beta$ -laktamový kruh v molekulární struktuře. Většina  $\beta$ -laktamových antibiotik je účinnými inhibitory biosyntézy buněčné stěny. První  $\beta$ -laktamové antibiotikum, penicilin G, bylo účinné zejména proti grampozitivním bakteriím, protože buněčná stěna většiny gramnegativních je pro toto činidlo nepropustná. Následně vyvinuté polosyntetické peniciliny (methicilin, oxacilin, ampicilin, karbenicilin) vykazují širokospektrální aktivitu a také inhibují několik gramnegativních patogenů. Mnoho bakterií, jako například stafylokoky nebo *E. coli*, je schopno produkovat  $\beta$ -laktamázy; enzymy, které ničí  $\beta$ -laktamový kruh, a proto činí antibiotikum neúčinným. Dnes se často podávají  $\beta$ -laktamová antibiotika v kombinaci s inhibitory  $\beta$ -laktamázy (kyselina klavulanová, sulbaktam) (Mohr 2016).



Obrázek 5 *Penicillium notatum*

#### 3.1.23.1 Peniciliny

Peniciliny mají jako centrální jádro 6-aminopenicilanovou kyselinu, které je tvořeno  $\beta$ -laktamovým kruhem spojeným s pětičlenným thiazolidinovým kruhem. Boční řetězec pak propůjčuje hydrofobní nebo hydrofilní vlastnosti. Některé peniciliny jsou proto hydrofobní,

jako je penicilin G nebo benzylpenicilin a penicilin V nebo fenoxymethylpenicilin, zatímco jiné peniciliny mají hydrofilní postranní řetězec, jako v případě isopenicilinu N.

Hydrofobní peniciliny jsou syntetizovány výhradně vláknitými houbami (*Penicillium allii-sativi*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium dipodomyis*, *Penicillium flavigenum*) Hydrofilní peniciliny produkují vláknité houby (*P. chrysogenum*, *Acremonium chrysogenum*), několik aktinomycetů (*Streptomyces* sp.) a některé gramnegativní bakterie (Martín et al. 2015).

### 3.1.24 Tetracykliny

Tetracykliny jsou důležitou třídou antibiotik získávanou od bakterií rodu *Streptomyces*. První tetracykliny – aureomycin, objevený Duggarem roku 1948 a terramycin popsáný Finlay et al. roku 1950 byly izolovány z fermentačních bujónů *Streptomyces aureofaciens*. Molekuly tetracyklinu působí bakteriostaticky inhibicí biosyntézy proteinů a obsahují lineární fúzované tetracyklické jádro, ke kterému jsou připojeny různé funkční skupiny (Mohr 2016). Molekuly tetracyklinu se vážou na 30S ribozomální podjednotku a blokují vstup amino-acyl tRNA do A místa ribozomu. Proto jsou širokospektrálními antibiotiky a vykazují aktivitu proti široké škále grampozitivních a gramnegativních mikroorganismů včetně patogenů, jako jsou chlamydie, mykoplazmy či protozoální paraziti. První bakterie rezistentní na tetracyklin, *Shigella dysenteriae*, byla izolována v roce 1953 (Chopra & Roberts 2001). Rezistence na tetracyklin se nyní vyskytuje u rostoucího počtu patogenních, oportunních a komenzálních bakterií. Přítomnost patogenů rezistentních na tetracyklin omezuje použití těchto činidel při léčbě onemocnění (Marosevic et al. 2017).

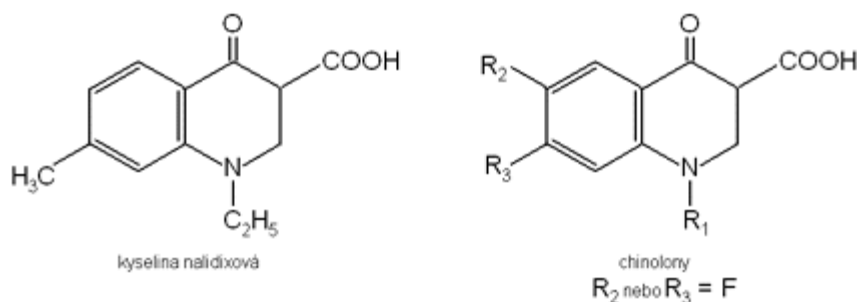
### 3.1.25 Makrolidy

Makrolidy objevil James M. McGuire, který izoloval a popsal první sloučeninu erythromycin z bakterie *Streptomyces erythreus*. Kmen byl izolován ze vzorku půdy odebraného na filipínském ostrově v roce 1952 (McGuire et al. 1952). Makrolidy jsou makrocyclické polyketidy, které se obvykle skládají z 12–16 řetězcového makrocyclického laktonového kruhu s glykosidicky vázaným aminosacharidem. Makrolidová antibiotika se vážou na podjednotku 50S bakteriálního ribozomu a inhibují translokasu, a tím inhibují syntézu proteinů (Vázquez-Laslop & Mankin 2018). Působí primárně bakteriostaticky, hlavně proti metabolicky aktivním bakteriím. Patogenní spektrum makrolidů zahrnuje grampozitivní koky (stafylokoky, streptokoky) a tyčinky, gramnegativní patogeny jako *Legionella pneumophila*, chlamydia, *Bordetella pertussis*, spirochaetes, *Haemophilus influenza* a buněčnou stěnu postrádající mykoplazmata (Mohr 2016). Bylo objeveno, že makrolidy pomáhají ke zlepšení výsledků u pacientů s virovou pneumonií související s chřipkou a jinými viry, pravděpodobně kvůli jejich imunomodulačním účinkům (Arabi et al. 2019).

### 3.1.26 Chinolová antibiotika

Syntetická chinolonová antibiotika jsou pravděpodobně jednou z nejdůležitějších tříd protiinfekčních léků. Jejich způsob působení byl v době jejich objevu nový. Působí baktericidně tím, že inhibují bakteriální enzym DNA gyrázu (topoizomerázu II), která katalyzuje změny v topologii DNA. Tyto enzymy jsou proto nezbytné pro přežití všech bakterií (Collin et al.

2011). První klinický chinolon, kyselina nalidixová (Obrázek č. 6), byl objeven náhodně jako vedlejší produkt syntézy důležitého antimalarického léčiva chlorochinu. Kyselina nalidixová byla patentována společností Sterling Drug Company v roce 1963 (Bisacchi 2015). Kyselina nalidixová a další chinolony první generace (kyselina oxolinová) se dnes používají zřídka kvůli své toxicitě. Častější využití tak mají chinolonová antibiotika generace druhé (ciprofloxacin), třetí (levofloxacin) a čtvrté (gemifloxacin) (Kohanski et al. 2010).



Obrázek 6 Kyselina nalidixová

### 3.1.27 Polypeptidová antibiotika

Polypeptidová antibiotika jsou skupinou antimikrobiálních látek s různými účinky proti mnoha gramnegativním a grampozitivním bakteriím. Členy polypeptidů jsou bacitracin, colistin A, colistin B, polymyxin B1 a polymyxin B2. Tyto sloučeniny s velkou molekulovou hmotností mají společnou strukturu heptapeptidového kruhu s polypeptidovým postranním řetězcem. Bacitracin je produkován *Bacillus licheniformis* a *Bacillus subtilis* a je směsí několika blízkých příbuzných polypeptidů (Bladek et al. 2020). Vzhledem k jejich vysoké toxicitě je použití polypeptidů v humánní medicíně omezeno, ale výše zmíněná antibiotika jsou široce používána jako veterinární léčiva v chovu zvířat (Cattray et al. 2015). V roce 2016 byly polymyxiny (primárně colistin) pátou nejprodávanější skupinou antimikrobiálních látek pro zvířata určená k produkci potravin ve 30 evropských zemích (Bladek et al. 2020).

### 3.1.28 Nitroimidazoly

Nitroimidazoly jsou třídou antimikrobiálních léků, které mají široké spektrum účinnosti proti anaerobním grampozitivním a gramnegativním bakteriím, stejně jako parazitům a mykobakteriím. Do této skupiny řadíme metronidazol, pretomanid a delamanid, které jsou i součástí léčby *Helicobacter pylori* či *Mycobacterium tuberculosis*. Jedná se o proléčiva, která vyžadují redukci nitroskupiny, než projeví jakékoli antimikrobiální účinky (Thomas & Gwenin 2021). Toho je normálně dosaženo pomocí flavinmononukleotidu (FMN) nebo flavinadeninukleotidu (FAD) jako protetických skupin a buď NADH nebo NADPH jako redukčních činidel (Ang et al. 2017). Mechanismus má následující kroky: molekuly vstupují do buněk pasivní difúzí, nitroskupina je redukována na reaktivní radikálové druhy a radikály reagují s DNA nebo proteinem v buňce. Redukce produktů v buňce závisí na redox potenciálu sloučeniny a počtu přenášených elektronů (Patterson & Wyllie 2014). Systém funguje efektivněji za anaerobních podmínek, což znamená, že baktericidní účinky jsou zvýšené ve srovnání s přítomností kyslíku (Thomas & Gwenin 2021).

## Mechanismy účinku antibiotik

Antibiotika mohou být klasifikována na základě buněčné složky nebo systému, který ovlivňují. Dalším možným kritériem je rozdělení na antibiotika, která indukují buněčnou smrt (baktericidní léky) nebo pouze inhibují buněčný růst (bakteriostatické léky). Dále můžeme antibiotika rozdělit dle spektra účinnosti na antibiotika s úzkým spektrem, středním spektrem a širokým spektrem účinku (Kohanski et al. 2010).

Antibiotika jsou specifická svým účinkem vůči různým bakteriálním druhům. Jejich účinek může cílit na:

- ovlivnění syntézy buněčné stěny ( $\beta$ -laktamy)
- ovlivnění mechanismu syntézy proteinů prostřednictvím interakce s ribozomálními podjednotkami (tetracyklin, chloramfenikol, aminoglykosidy)
- narušení mechanismu nukleových kyselin (Rifampicin, Fluorochinolony)
- narušení metabolických drah (analogy kyseliny listové, sulfonamidy)
- narušení struktury bakteriálních obalů (Colistin) (Walsh 2010; Sultan et al. 2018)

### 3.1.28.1 Inhibice buněčné stěny

Bakteriální buňka je obalena vrstvami peptidoglykanu, kovalentně zesíťovanou polymerní maticí složenou z peptidově vázaného  $\beta$ -(1–4)-N-acetylhexosaminu (Bugg & Walsh 1992). Mechanická pevnost poskytovaná touto vrstvou buňky je rozhodující pro schopnost bakterie přežít podmínky prostředí, které mohou změnit převládající osmotické tlaky. Udržování peptidoglykanové vrstvy je dosaženo aktivitou enzymů transglykosylázy a transpeptidázy (Park & Uehara 2008).

$\beta$ -laktamy a glykopeptidy patří mezi třídy antibiotik, které interferují se specifickými kroky v biosyntéze homeostatické buněčné stěny. Úspěšná léčba inhibitory syntézy buněčné stěny může vést ke změnám tvaru a velikosti buněk, vyvolat reakce buněčného stresu a vyvrcholit lýzou buněk. Například  $\beta$ -laktamy (včetně penicilinů, karbapenemů a cefalosporinů) blokuji zesíťování jednotek peptidoglykanů inhibicí reakce tvorby peptidové vazby katalyzované transpeptidázami, které jsou také známé jako proteiny vázající penicilin (Kohanski et al. 2010; Baquero & Levin 2021).

### 3.1.28.2 Ovlivnění mechanismu syntézy proteinů

Léky inhibující syntézu proteinů, patří mezi nejširší třídy antibiotik a lze je rozdělit do dvou podtříd: inhibitory 50S a inhibitory 30S. Mezi inhibitory ribozomu 50S patří makrolidy (erythromycin), linkosamidy (klindamycin), streptograminy, amfenikoly (chloramfenikol) a oxazolidinony (linezolid) (Katz & Ashley 2005). Inhibitory ribozomu 50S fungují tak, že fyzicky blokuji buď iniciaci proteinové translace nebo translokaci peptidyl tRNA, což slouží k inhibici reakce peptidyltransferázy, která prodlužuje vznikající peptidový řetězec.

Inhibitory ribozomu 30S zahrnují tetracykliny a aminocyklitoly. Tetracykliny fungují tak, že blokuji přístup aminoacyl tRNA k ribozomu (Chopra & Roberts 2001). Třída aminocyklitolů zahrnuje spektinomycin a aminoglykosidy (například streptomycin, kanamycin a gentamicin), které vážou složku 16S rRNA podjednotky ribozomu 30S. Spektinomycin interferuje se stabilitou vazby peptidyl tRNA na ribozom inhibicí translokace katalyzované

elongačním faktorem, ale nezpůsobuje chybnou translaci proteinu. Naproti tomu interakce mezi aminoglykosidy a 16S rRNA může vyvolat změnu v konformaci komplexu vytvořeného mezi kodonem mRNA a jeho příbuznou nabitou aminoacyl tRNA na ribozomu. To podporuje nesprávné párování tRNA, což může mít za následek chybnou translaci proteinu (Pape et al. 2000; Kohanski et al. 2010).

#### 3.1.28.3 Narušení mechanismu nukleových kyselin

Inhibice syntézy RNA polosyntetickými baktericidními antibiotiky třídy rifamycinu, podobně jako inhibice replikace DNA chinolony, má účinek na metabolismus prokaryotických nukleových kyselin a je účinným prostředkem pro indukci smrti bakteriálních buněk. Rifamycinové léky inhibují DNA-dependentní transkripci stabilní vazbou s vysokou afinitou k podjednotce enzymu RNA polymerázy (Kohanski et al. 2010).

#### 3.1.28.4 Narušení metabolických drah

Sulfonamidy a trimethoprim inhibují dva po sobě jdoucí kroky syntézy tetrahydrofolátu potřebného pro syntézu nukleotidů. Tetrahydrofolát je také základní kofaktor biosyntézy thyminu (Minato et al. 2018). Konečným mechanismem zabíjení je tak nedostatek thyminu, který s největší pravděpodobností podporuje poškození DNA zprostředkované reaktivními formami kyslíku (Baquero & Levin 2021).

#### 3.1.28.5 Narušení struktury bakteriálních obalů

Chemické disruptory buněčných obalů zahrnují detergenty, biocidy, halogeny a toxické plyny. Terapeutickým antimikrobiálním látkám jsou podobnější enzymy ničící buněčnou stěnu, bakteriociny a antimikrobiální peptidy, včetně peptidů obrany hostitele hmyzu, plazů nebo vyšších živočichů (cekropiny, magaininy a defensiny). Tato činidla rychle zabíjejí bakterie vytvářením děr v jejich obalech, zejména v buněčné membráně. Řada antibiotik, která se klinicky používá, jako jsou cyklické peptidy (polymyxin B a colistin) a lipopeptidy (telavancin a daptomycin), zabíjejí narušením buněčných membrán. Podobně jako u detergentů lze zabíjející účinek těchto látek lépe popsat jako „fyzický“ spíše než biologický. Při nízkých koncentracích těchto látek mohou bakterie kompenzovat nebo opravovat výsledné poškození a mohou se replikovat rychlostí, která převyšuje míru zabíjení (Baquero & Levin 2021).

### 3.1.29 Kombinace antibiotik

Antibiotika používaná v kombinaci jsou účinnou strategií pro boj s četnými infekčními nemocemi v klinických a veterinárních podmínkách, zejména jako terapie poslední volby u obtížně léčitelných případů (Gray & Wenzel 2020). Kombinovaná terapie může zvýšit rychlost usmrcování bakterií, rozšířit spektrum antibiotik, snížit dávkování a snížit tak nežádoucí vedlejší účinky, dokonce může i kontrolovat vznik rezistence. Podávání antibiotik v kombinaci se již více než 70 let účinně používá proti bakteriálním infekcím. První kombinace byly vyzkoušeny k léčbě tuberkulózy (Sullivan et al. 2020).

Sulfonamidy se zaměřují na enzym podílející se na syntéze folátu a rifampicin na RNA polymerázu. Jsou známé rychlým rozvojem rezistence, a proto se aplikují v kombinaci s jinými léky. Při hledání trvanlivějších řešení se vývoj antibiotik postupně přesunul na kandidáty antibiotik s cíli kódovanými více geny, se strukturálními nebo vícenásobnými cíli (Wenzel 2020).

### 3.1.30 Komplexní mechanismy účinku

Některé mechanismy účinku působí na více cílů nebo mají vícenásobné účinky. Například bacitracin se váže na bactoprenol fosfát a ovlivňuje jak syntézu peptidoglykanu buněčné stěny, tak teichoových kyselin buněčné stěny, protože obě dráhy sdílejí bactoprenol fosfát jako transmembránovou nosnou molekulu pro jejich příslušné prekurzory. Membránově aktivní antibiotika, ačkoli se mohou vázat pouze na jeden cíl, standardně inhibují více buněčných procesů (Wenzel 2020). Jejich interference s funkcí membrány primárně zhoršuje syntézu buněčné stěny a buněčné dýchání, ale také řadu dalších procesů vázaných na membránu, jako je buněčné dělení, sekrece proteinů, sporulace nebo syntéza nového membránového materiálu (Gray & Wenzel 2020). Některá antibiotika se vážou na dva nebo více samostatných molekulárních cílů. Například polymyxiny inhibují jak vnější, tak vnitřní membránu gramnegativních bakterií (Deris et al. 2014) a lantibiotický nisin inhibuje biosyntézu buněčné stěny vazbou na lipid II a následně využívá prekurzor buněčné stěny spojený s undekaprenylem jako molekulu k vytvoření transmembránových pórů (T Hart et al. 2016).

### 3.1.31 Minimální inhibiční koncentrace

Minimální inhibiční koncentrace (MIC, minimal inhibition concentration) definuje *in vitro* úroveň citlivosti nebo rezistence specifických bakteriálních kmenů k aplikovanému antibiotiku. Spolehlivé stanovení MIC má významný vliv na volbu terapeutické strategie, která ovlivňuje účinnost infekční terapie. Stanovená hodnota MIC se následně musí porovnat s klinickými hraničními hodnotami MIC, aby bylo možné posoudit, zda je kmen citlivý nebo rezistentní na antibiotikum. Hodnocení antibiotické rezistence na základě hodnoty MIC neznamená identifikaci mechanismu rezistence. Z epidemiologických důvodů však kvalifikace takového kmene do kategorie rezistence podle hodnoty MIC může být podnětem k provedení dalšího výzkumu detekce mechanismu rezistence (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher 2021).

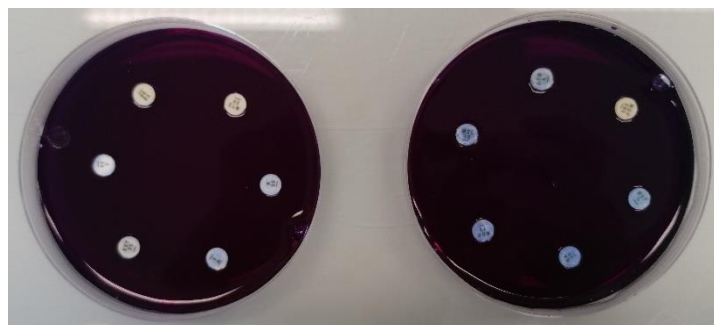
#### 3.1.31.1 Diluční metody

Cílem dilučních metod v bujónu a agaru je stanovit nejnižší koncentraci testovaného antimikrobiálního činidla (MIC), která za definovaných testovacích podmínek inhibuje viditelný růst zkoumané bakterie. Hodnoty MIC se používají ke stanovení citlivosti bakterií na léky a také k hodnocení aktivity nových antimikrobiálních látek. Ředění agarů zahrnuje začlenění různých koncentrací antimikrobiální látky do živného agarového média s následnou aplikací standardizovaného počtu buněk na povrch agarové plotny. Pro ředění živné půdy, často stanovené ve formátu 96-jamkové mikrotitrační destičky, se bakterie naočkují do kapalného růstového média v přítomnosti různých koncentrací antimikrobiálního činidla. Růst se hodnotí po inkubaci po definovanou dobu a odečte se hodnota MIC (Wiegand et al. 2008).

### 3.1.31.2 Difúzní metody

Agarové difúzní testy je jednou z metod pro kvantifikaci schopnosti antibiotik inhibovat růst bakterií (Bonev et al. 2008). Možné je i použití E-testovacích proužků impregnovaných předem definovaným gradientem koncentrací antibiotik. Tyto metody jsou jednoduché, rychlé a použitelné v rutinní mikrobiologické diagnostice (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher 2021).

Technika agarové difúze (Obrázek č. 7) se běžně používá pro stanovení MIC v pevných médiích. Zahrnuje aplikaci antibiotických roztoků různých koncentrací do kelímků, jamek nebo papírových disků, umístěných na povrchu nebo vpichovaných do agarových ploten, na kterých jsou testované bakteriální kmeny. Difúze antibiotik z těchto zdrojů do agarového média vede k inhibici růstu bakterií v blízkosti zdroje a k tvorbě čistých „zón“ bez bakteriální kultury. Průměr těchto zón se zvyšuje s koncentrací antibiotika (Bonev et al. 2008).



Obrázek 7 Disková difúzní metoda

## Bifidobakterie a antibiotika

U bifidobakterií se většinou uvádí, že jsou citlivé na beta-laktamy, glykopeptidy, chloramfenikol a rifampicin, ale jsou rezistentní na aminoglykosidy, polypeptidy, chinolony a mupirocin. Citlivost bifidobakterií na erythromycin je různá, stejně jako citlivost na sulfanilamid a trimethoprim, tetracykliny, kyselinu fusidovou, metronidazol a clindamycin (Cao et al. 2020). V některých člancích byla zaznamenána proměnlivá citlivost k beta-laktamům, jako je ampicilin a oxacilin, kde bylo zjištěno, že malé procento bifidobakteriálních kmenů je rezistentních (Kheadr et al. 2007; Kiwaki & Sato 2009). Podobně byl v některých studiích popsán citlivý fenotyp na aminoglykosidy, jako je gentamicin, kanamycin a streptomycin (D'Aimmo et al. 2007; Xiao et al. 2010). Citlivý fenotyp na streptomycin byl nalezen častěji, zatímco na tobramycin a apramycin nebyly hlášeny žádné citlivé fenotypy. Pokud jde o chinolony, byly popsány pouze rezistentní fenotypy k norfoxacinu a kyselině nalidixové, byla však popsána senzitivita a proměnná citlivost na ciprofoxacin (Cao et al. 2020).

Pan et al. (2020) se pokusili stanovit minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro 15 antibiotik na 20 izolátech rodu *Bifidobacterium* a otestovat možnost přenosu genů rezistence na antibiotika. Vzorky byly testovány metodou za použití kultivace v bujónu. K detekci genů rezistence byly použity specifické primery a polymerázová řetězová reakce (PCR). Hodnoty MIC se významně lišily mezi izoláty bifidobakterií, včetně izolátů stejného druhu. Všechny izoláty byly citlivé na ampicilin, gentamicin, streptomycin a linezolid a byly přirozeně odolné



vůči kanamycinu; naproti tomu citlivost na chloramfenikol, ciprofloxacín, clindamycin, erythromycin, neomycin, tetracyklin, trimethoprim a vankomycin se mezi izoláty lišila. Experimenty s párováním filtrů však neukázaly žádný přenos genů rezistence na antibiotika. Bifidobakterie by se tak neměly podílet na dalším vzniku bakterií rezistentních na antibiotika.

Tabulka 2 Reakce bifidobakterií na antibiotika dle Cao et al. 2020

	Antibiotikum	Senzitivní	Rezistentní	Nejednoznačná reakce
Beta-laktamy	Ampicilin	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. animalis</i>		<i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. pseudolongum</i>
	Oxacilin	<i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i>		<i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. pseudolongum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i>
	Penicilin	<i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. pseudolongum</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. adolescentis</i>		
Aminoglykosidy	Aztreonam		<i>B. animalis</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i>	
	Cefoperazone	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. catenulatum</i>		<i>B. animalis</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i>
	Cefazolin	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. catenulatum</i>		<i>B. animalis</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i>
	Cefoxitin	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. catenulatum</i>	<i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i>	
	Cefalotin	<i>B. animalis</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i>		<i>B. bifidum</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i>
	Mupirocin		<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i>	
	Gentamicin	<i>B. breve</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> <i>B. pseudocatenulatum</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. dentium</i>	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. lactis</i>
	Kanamycin		<i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. pseudolongum</i>	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. catenulatum</i>
Rifampicin	<i>B. animalis</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i>		<i>B. bifidum</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i> , <i>B. infantis</i>	

Chinoliny	Streptomycin	<i>B. bifidum, B. longum</i>	<i>B. animalis, B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, B. longum, B. infantis</i>	<i>B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. longum, B. pseudolongum, B. catenulatum, B. globosum, B. adolescentis, B. lactis, B. dentium</i>
	Neomycin		<i>B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. longum, B. lactis, B. pseudolongum</i>	
	Amikacin		<i>B. animalis, B. breve, B. adolescentis, B. bifidum, B. longum, B. infantis</i>	<i>B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, B. infantis, B. catenulatum</i>
	Tobramycin		<i>B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, B. infantis, B. catenulatum</i>	
	Spectinomycin	<i>B. lactis, B. longum, B. bifidum</i>	<i>B. lactis</i>	
	Norfloxacin		<i>B. animalis, B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, B. longum, B. infantis</i>	
	Ciprofloxacin		<i>B. lactis, B. bifidum, B. breve, B. longum, B. infantis</i>	<i>B. animalis, B. breve, B. longum, B. infantis, B. lactis, B. dentium, B. catenulatum, B. bifidum, B. adolescentis</i>
Nalidixic acid		<i>B. bifidum, B. animalis, B. lactis, B. breve, B. longum, B. catenulatum, B. infantis, B. adolescentis</i>		
Sulfonamidy	Sulfamethoxazol	<i>B. bifidum, B. longum</i>	<i>B. animalis, B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, B. longum, B. infantis</i>	
	Trimethoprim	<i>B. longum</i>	<i>B. animalis, B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, B. longum, B. infantis</i>	<i>B. lactis, B. bifidum, B. breve, B. longum, B. infantis, B. animalis, B. adolescentis, B. catenulatum, B. dentium, B. pseudolongum</i>
Polypeptidy	Polymyxin B		<i>B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, B. infantis, B. catenulatum, B. dentium, B. animalis, B. lactis, B. longum</i>	
	Colistin		<i>B. animalis, B. breve, B. adolescentis, B. bifidum, B. longum, B. infantis</i>	
	Bacitracin	<i>B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, B. infantis, B. lactis, B. catenulatum, B. longum</i>	<i>B. longum</i>	
Glykope	Teikoplanin	<i>B. bifidum, B. animalis, B. lactis, B. breve, B. longum, B. pseudocatenulatum</i>		

	Vancomycin	<i>B. bifidum, B. animalis, B. lactis, B. breve, B. longum, B. infantis, B. catenulatum, B. adolescentis, B. dentium, B. pseudolongum</i>	<i>B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. longum, B. adolescentis, B. pseudolongum</i>	
Makrolidy	Clindamincin	<i>B. animalis, B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, B. longum, B. infantis, B. lactis</i>		<i>B. breve, B. bifidum, B. lactis, B. longum, B. infantis, B. adolescentis, B. animalis, B. dentium, B. pseudolongum, B. globosum</i>
	Erythromycin	<i>B. bifidum, B. animalis, B. lactis, B. breve, B. longum, B. catenulatum, B. dentium, B. adolescentis, B. infantis</i>		<i>B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. longum, B. lactis, B. pseudolongum, B. adolescentis, B. globosum, B. catenulatum, B. dentium</i>
Tetracykliny	Tetracyklin	<i>B. animalis, B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, B. longum, B. infantis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. lactis, B. longum, B. pseudolongum, B. catenulatum, B. dentium, B. adolescentis, B. globosum</i>
Nitroimidazoly	Nitrofurantoin	<i>B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, B. infantis, B. catenulatum</i>		
	Metronidazol	<i>B. lactis</i>	<i>B. animalis, B. bifidum, B. adolescentis, B. breve, B. longum, B. infantis, B. dentium</i>	<i>B. bifidum, B. animalis, B. lactis, B. breve, B. longum, B. infantis</i>
Oxazolidony	Chloramfenikol	<i>B. bifidum, B. animalis, B. lactis, B. breve, B. longum, B. infantis, B. catenulatum, B. adolescentis, B. dentium, B. pseudolongum, B. globosum</i>		<i>B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. longum, B. pseudolongum</i>
	Kyselina fusidová	<i>B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, B. infantis, B. catenulatum</i>	<i>B. animalis, B. infantis, B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, B. longum</i>	<i>B. bifidum, B. animalis, B. lactis, B. breve, B. longum</i>

## Rezistence

Antimikrobiální rezistence (AR) je přirozeným jevem v životním prostředí, který předchází modernímu selektivnímu tlaku klinického používání antibiotik (Dcosta et al. 2011). Klinická definice AR je založena především na bakteriální odpovědi na léčbu. Jeden mikroorganismus je považován za rezistentní, pokud existuje vysoká pravděpodobnost terapeutického selhání při léčbě antibiotiky. V důsledku toho byla rezistence definována na základě mezních hodnot MIC (Olivares et al. 2013).

Lidská střevní mikrobiota může být pravidelně vystavována řadě antimikrobiálních látek, jako jsou antibiotika, která se používají při léčbě a prevenci bakteriální infekce v humánní a veterinární medicíně (Duranti et al. 2017). Rozsáhlé používání antimikrobiálních látek však urychlilo šíření antimikrobiální rezistence, vedlo k rychlejšímu přenosu genů antimikrobiální rezistence (Sabri et al. 2020) a tím k rychlejšímu vzniku rezistentních patogenních bakterií, které mohou ohrozit účinnost antimikrobiální terapie (Rozman et al. 2020). Rezistence i na více

léčiv u grampozitivních a negativních bakterií se obtížně léčí a mohou být dokonce neléčitelné konvenčními antibiotiky (Frieri et al. 2017). Vzhledem k rychlému vzniku AR spolu s nedostatkem nových antimikrobiálních látek je AR uznána jako hlavní globální zdravotní problém (Rozman et al. 2020). Geny antimikrobiální rezistence (AGR) obsažené v bakteriích mohou odstranit nebo inaktivovat konkrétní antibiotika nebo změnit jejich cíl či vazebná místa, na která působí. AGR přítomné v genomu jsou stabilní a jsou považovány za vnitřní a nepřenositelné. Tyto geny ovšem mohou být přítomny na extrachromozomálních replikonech, jako jsou plazmidy, transpozony a fágy, které jsou přenosné i na jiné členy střevní mikrobioty prostřednictvím horizontálních přenosů genů (Sultan et al. 2018). Kromě toho může být antibiotická rezistence zajištěna také mutací v genu kódujícím antibiotický cíl, přičemž v tomto případě není získaná rezistence považována za horizontálně přenosnou (Duranti et al. 2017).

### 3.1.32 Šíření antibiotické rezistence

Vznik a šíření rezistence vůči antibiotikům mezi patogenními bakteriemi je v posledních desetiletích stále větším problémem veřejného zdraví (Duranti et al. 2017; Frieri et al. 2017). Relevantní pro přenos jsou nejen geny rezistence vůči antibiotikům, s nimiž se setkáváme u klinických patogenů, ale všechny patogenní, komenzální i environmentální bakterie, mobilní genetické prvky a bakteriofágy tvoří rezervoár ARG (rezistom) z nichž mohou patogenní bakterie získat rezistenci prostřednictvím horizontálního přenosu genů (Von Wintersdorff et al. 2016). Horizontální přenos genů způsobil šíření rezistence vůči antibiotikům z komenzálních a environmentálních druhů na patogenní, jak bylo prokázáno u některých klinicky významných ARG. Zatímco transformace a transdukce byly považovány za méně důležité, nedávné objevy naznačují, že jejich role může být větší, než se dříve myslelo (Frieri et al. 2017).

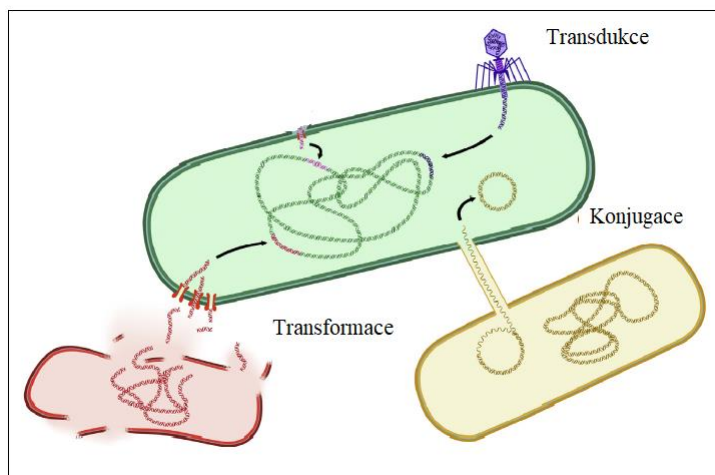
#### 3.1.32.1 Horizontální přenos genů

Bakterie ovlivňují eukaryotické buňky jako paraziti, komenzálové nebo prospěšní symbionti. Kromě těchto interakcí s organismy byly bakterie také důležitými zdroji nových genetických sekvencí prostřednictvím horizontálního přenosu genů (HGT) pro eukaryota (Husnik & McCutcheon 2018).

Adaptace bakterií na prostředí a nepříznivé podmínky se urychluje nejen mutacemi a rychlým množením, ale i získáním nových vlastností prostřednictvím HGT (Oliveira et al. 2017). Horizontální přenos genů označuje získání cizích genů organismy. Význam HGT mezi bakteriemi byl poprvé rozpoznán, když byla pozorována „infekční dědičnost“ mnohočetné antibiotické rezistence vůči patogenům (Heuer & Smalla 2007). HGT mezi bakteriemi je řízen třemi hlavními procesy (obrázek č. 8): transformací (příjem volné DNA), transdukcí (přenos genů zprostředkovaný bakteriofágy) a konjugací (přenos genů pomocí plazmidů nebo integrativních konjugativních prvků). Mobilní genetické elementy, jako jsou plazmidy, bakteriofágy, integrační konjugativní elementy, transpozony, inzerční sekvence, integrony, genové kazety a genomové ostrůvky, jsou důležitými prostředníky při transdukcii a konjugaci (Fernández & Hancock 2012; Husnik & McCutcheon 2018).

Plazmidy, bakteriofágy a extracelulární DNA jsou třemi primárními hnacími silami HGT. Přenos genů každým ze tří mechanismů je upřednostňován mezi blízkými příbuznými

organismy, ale může k němu dojít i mezi fylogeneticky vzdálenými organismy (Johnston et al. 2014).



Obrázek 8 3 typy horizontálního přenosu genů dle McInnes et al. 2020

### 3.1.32.2 Transformace

Transformace nastává, když bakterie přijmou extracelulární DNA a importovaný gen je rekombinován do hostitelského genomu. Transformace je stabilní příjem, integrace a funkční exprese extracelulární DNA (Johnston et al. 2014), ke které může docházet za podmínek přirozeného růstu bakterií. Je mechanismem, který může potenciálně vysvětlit, jak bakterie získávají DNA z cizích druhů mimo hostitelský rozsah mobilních genetických prvků nebo bakteriofágů. Aby došlo k přirozené transformaci, musí si bakteriální buňky nejprve vyvinout regulovaný fyziologický stav kompetence, o kterém bylo zjištěno, že zahrnuje přibližně 20 až 50 proteinů. Většina přirozeně transformovatelných bakterií si vyvine časově omezenou schopnost v reakci na specifické podmínky prostředí, jako jsou změněné podmínky růstu, přístup k živinám, hustota buněk nebo hladovění. Podíl bakterií, které si vyvinou tyto schopnosti se v bakteriální populaci může pohybovat od nuly do téměř 100 % (Thomas & Nielsen 2005; Lerminiaux & Cameron 2019). Experimentálně bylo prokázáno, že tuto přirozenou kompetenci má více než 80 bakteriálních druhů (McInnes et al. 2020).

### 3.1.32.3 Transdukcce

Transdukcce je uznávána jako potenciální přispěvatel k šíření ARG, zejména mezi členy stejného druhu. K transdukcí dochází, když virové částice přenášejí bakteriální geny. Po infekci bakteriofágem je bakteriální DNA někdy náhodně zabalena do kapsidy bakteriofága. Kapsida obsahující bakteriální DNA je plně schopná vázat se na buňku příjemce a injektovat cizí DNA. Pokud je přenesená bakteriální DNA rekombinována do genomu buňky příjemce, došlo k transdukcí. (Gillings 2017; Watson et al. 2018).

### 3.1.32.4 Konjugace

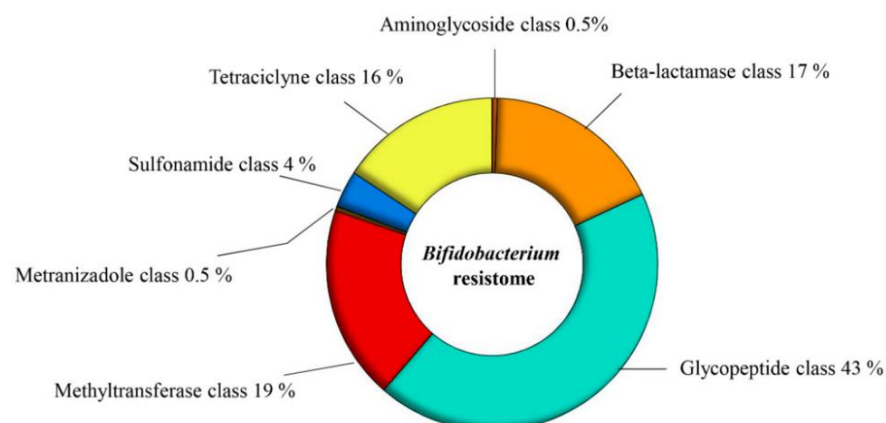
Zatímco plazmidy mohou být odebrány přirozenou transformací, proces spojený se získáním plazmidu je konjugativní přenos. Konjugativní přenos je zprostředkován mezibuněčnými spoji a pórem, kterým může DNA projít (Lerminiaux & Cameron 2019).

Konjugativní přenosové systémy jsou často spojeny s plazmidy, pravděpodobně proto, že k vývoji by normálně potřebovaly, aby genetický prvek, jehož jsou součástí, byl kompletně přenesen k příjemci. Proto jedním z nejrozšířenějších přenosových systémů jsou relativně malé genetické prvky – plazmidy, které lze rychle přenést (Thomas & Nielsen 2005).

### 3.1.33 Rezistom

Rezistom byl definován jako soubor všech ARG a jejich prekurzorů v patogenních a nepatogenních bakteriích (Wright 2007). Jeho složky byly přesně popsány jako všechny ARG, včetně těch, které cirkulují v patogenních bakteriích, producentech antibiotik a benigních nepatogenních bakteriích. S ohledem na původ ARG se předpokládá, že rezistom zahrnuje geny protorezistence jako rezervoár prekurzorů ARG, stejně jako geny klinické, environmentální a vnitřní rezistence (Wright 2010). Definice byla dále upřesněna označením typů rezistence, jako je získaná rezistence (vertikálně nebo horizontálně přenesená, taxonově nespecifická), vnitřní rezistence (pouze vertikálně přenášená, specifická pro taxony), tichá rezistence (fenotypicky citlivá, funkční, ale nevyjádřená) a protorezistence (fenotypicky citlivá, malá/žádná aktivita, dokud nezmutuje) (Perry et al. 2014). Antibiotický rezistom tedy zahrnuje všechny typy ARG (získané geny a geny vnitřní rezistence), jejich prekurzory a některé potenciální mechanismy rezistence v mikrobiálních komunitách, které vyžadují evoluci nebo změny v kontextu exprese, aby se získala odolnost (Kim & Cha 2021).

Vnitřní rezistence je způsobena důsledkem nepropustnosti buněčných stěn, aktivitou efluxních pump (substrátově specifické transportní mechanismy, které vznikají zvýšenou expresí proteinů zevní membrány) či nedostatkem vhodných cílů pro danou skupinu léčiv (Fernández & Hancock 2012). Zjistilo se však, že charakteristický fenotyp citlivosti daného bakteriálního druhu na antibiotika závisí na společné aktivitě několika prvků, což bylo pojmenováno jako vnitřní rezistom. Tyto determinanty nezahrnují pouze klasické geny rezistence. Další prvky, z nichž několik se podílí na základních bakteriálních metabolických procesech, jsou důležité pro vnitřní rezistenci bakteriálních patogenů. Vnitřní rezistom je tedy definován jako soubor prvků, které přímo nebo nepřímo přispívají k rezistenci vůči antibiotikům a jejichž přítomnost je nezávislá na předchozí expozici antibiotikům a není způsobena horizontálním přenosem genů (Olivares et al. 2013).



Graf 1 Předpokládaný rezistom rodu *Bifidobacterium* dle Marcino et al. 2019

### 3.1.34 Bifidobakterie jako zdroj rezistence

Zástupci rodu *Bifidobacterium* patří mezi první kolonizátory střev savců, kde působí jako důležití střevní komenzálové, kteří ovlivňují zdraví hostitele. Jako součást střevní mikrobioty mohou být bifidobakterie vystaveny působení antibiotik (Mancino et al. 2019). Během prvních měsíců po porodu představují bifidobakterie jednu z nejdominantnějších složek lidské střevní mikrobioty. Porovnání datových souborů bifidobakteriálního rezistomu a střevního metagenomu od dospělých a kojenců navíc ukázalo, že střevní mikrobiota v raném věku je náchylnější k poruchám způsobeným antibiotickou léčbou ve srovnání se střevní mikrobiotou vyvinutou v pozdějším stádiu života (Duranti et al. 2017).

Používání stejných antibiotik v humánní i veterinární medicíně, vedlo k rychlému výskytu antibiotické rezistence u bakterií z potravinového řetězce (Rozman et al. 2020). Bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie mohou působit jako rezervoár genů rezistentních na antibiotika (Duranti et al. 2017), které by mohly být dále šířeny prostřednictvím potravinového řetězce, zejména ve střevním mikrobiomu, který je považován za rizikové místo pro horizontální přenos genů (Liu et al. 2012). Byl prokázán přenos genů rezistentních na antibiotika z bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení na jiné komenzály nebo potenciálně patogenní bakterie v *in vitro* a *in vivo* podmínkách (Rozman et al. 2020).

### 3.1.35 Bifidobakterie jako patogenní organismy

Některé bifidobakteriální kmeny mohou být i patogenní a způsobovat gastrointestinální a extraintestinální infekce, přestože tyto infekce jsou zřídka popsány ve srovnání s těmi, které jsou spojeny s jinými probiotickými druhy. Patogenní bifidobakteriální kmeny byly izolovány z infekcí vyskytujících se v ústech, břišní dutině, v abscesech, v porodních cestách a na hrudi. *B. dentium* a *B. adolescentis* byly zodpovědné za polovinu těchto infekcí (Moubareck et al. 2005; Kaur et al. 2013).

### 3.1.36 Riziko rezistence v životním prostředí

Obavy ze zdravotního rizika reziduí antibiotik v životním prostředí představují zejména:

- potenciální nebezpečí požitých reziduí antibiotik v životním prostředí, které mění lidský mikrobiom a podporuje vznik a selekci rezistence bakterií v lidském těle
- potenciální nebezpečí vytvoření selekčního tlaku na mikrobiom životního prostředí a vedoucí k rezervoárům rezistence vůči antibiotikům v životním prostředí.

Čtyři základní prvky rezistence vůči antibiotikům spojených se zbytky antibiotik v životním prostředí jsou identifikace nebezpečnosti, posouzení expozice, posouzení odezvy na dávku a charakterizace rizika (Ben et al. 2019).

Biofilmy se podílejí na rezistenci vůči více léčivům a mohou představovat velký problém pro kontrolu šíření infekce (Frieri et al. 2017). Také kořeny rostlin jsou kolonizovány půdními bakteriemi, o kterých je známo, že jsou rezervoárem genů antibiotické rezistence. Rezistomy se mohou těmito mikroorganismy přenášet i na patogeny (Wang et al. 2021).

Čistírny odpadních vod mohou fungovat jako rezervoáry a environmentální dodavatelé antibiotické rezistence. Byly také označeny jako hotspots pro horizontální přenos genů, což umožňuje šíření genů rezistence vůči antibiotikům mezi různými bakteriálními druhy. (Karkman et al. 2018).

## 4 Metodika

Cílem praktické části bylo udělat screening antibiotické citlivosti a rezistence multihostitelských druhů bifidobakterií vůči nejčastěji komerčně používaným antibiotikům v humánní i veterinární medicíně. Celkem bylo testováno 73 antibiotik dostupných ve formě antibiotických disků na celkem 40 vzorcích bifidobakterií. Jako zástupci multihostitelských druhů byli zkoumáni *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. adolescentis*, *B. dentium*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum* a *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*. Pro testování byla využita disková difúzní metoda na Petriho miskách. Jelikož pro většinu testovaných antibiotik nejsou pro bifidobakterie stanoveny minimální inhibiční koncentrace, byly u uvedených antibiotik v rámci screeningu testovány koncentrace komerčně dostupné. Kultivace testovaných kmenů bifidobakterií probíhala v tekutém pěstebním médiu – modifikovaný Wilkins-Chalgren bujón. Na testování na Petriho miskách byl využit LSM agar, jehož složení a postup přípravy odpovídá ISO normě 10932:2010 zabývající se stanovením minimální inhibiční koncentrace antibiotik pro bifidobakterie a bakterie mléčného kvašení.

### Screening antibiotické rezistence

#### Materiál

##### 4.1.1 Bifidobakterie

K testování antimikrobiální rezistence byly použity čerstvě vykultivované vzorky multihostitelských druhů bifidobakterií ze zmražených kultur sbírky Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky. V celkových 40 testovaných vzorcích bylo zastoupeno 15 vzorků *B. animalis* subsp. *lactis*, 2 vzorky *B. animalis* subsp. *animalis*, 8 vzorků *B. adolescentis*, 5 vzorků *B. dentium*, 3 vzorky *B. globosum* a 6 vzorků *B. pseudolongum*. Od každého druhu byl vždy alespoň jeden vzorek typový kmen pro kontrolu. Kompletní zastoupení vzorků i s původem jejich izolace je uvedeno v Tabulce č. 3.

Tabulka 3 Seznam testovaných kmenů bifidobakterií

Muf 1 6	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Muflon	Přírodní rezervace
Pes N.O.	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Německý ovčák (štěně)	Chovná stanice x
P2N1	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Německý ovčák (štěně)	Chovná stanice x
ZDK 8	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Okapi	ZOO
ZDK 7	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Okapi	ZOO
ZDK 5 10	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Paovce hřívnatá	ZOO
ZDK 1 8	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Ovce kamerunská	ZOO
ZDM 8 12	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Původ neznámý	ZOO
N73	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Lemur kata	ZOO*
N45	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kočkodan Cambellův	ZOO*
N30	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kočkodan bělonosý	ZOO*
D16	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Člověk (dospělá mikrobiota)	Zdravý jedinec
D41	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Člověk (dospělá mikrobiota)	Zdravý jedinec



Danone 3	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Jogurt Activia	Mléčný výrobek (komerční probiotický kmen)
Nestlé	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kojenecká výživa Nestlé	Dětská výživa (komerční probiotický kmen)
<b>DSM 10140</b>	<b><i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i></b>	FMV (jogurt)	<b>Typový kmen</b>
DSM 26074	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Krysa	Oficiální sbírkový kmen
<b>DSM 20104</b>	<b><i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i></b>	Krysa	<b>Typový kmen</b>
N63	<i>B. adolescentis</i>	Lvíček zlatý	ZOO
N101	<i>B. adolescentis</i>	Lvíček zlatý	ZOO
DSM 20087	<i>B. adolescentis</i>	Bachor krávy	Oficiální sbírkový kmen
D12	<i>B. adolescentis</i>	Člověk (dospělá mikrobiota)	Zdravý jedinec
D19	<i>B. adolescentis</i>	Člověk (dospělá mikrobiota)	Zdravý jedinec
M43	<i>B. adolescentis</i>	Člověk (dospělá mikrobiota)	Jedinec s CD**
M11	<i>B. adolescentis</i>	Člověk (dospělá mikrobiota)	Jedinec s CD**
<b>DSM 20083</b>	<b><i>B. adolescentis</i></b>	Člověk (dospělá mikrobiota)	<b>Typový kmen</b>
N21	<i>B. dentium</i>	Šimpanz	ZOO*
N5	<i>B. dentium</i>	Šimpanz	ZOO*
N12	<i>B. dentium</i>	Makak lví	ZOO*
M2A	<i>B. dentium</i>	Člověk (dospělá mikrobiota)	Jedinec s CD**
M4E	<i>B. dentium</i>	Člověk (dospělá mikrobiota)	Jedinec s CD**
T46	<i>B. globosum</i>	Tele	Zemědělský podnik
T19	<i>B. globosum</i>	Tele	Zemědělský podnik
<b>DSM 20092</b>	<b><i>B. globosum</i></b>	Bachor krávy	<b>Typový kmen</b>
W1	<i>B. pseudolongum</i>	Německý ovčák (dospělec)	Venkovní odchov
4/3b	<i>B. pseudolongum</i>	Spalax	Jihočeská univerzita (výzkumná skupina zvířat)* x
3/3c	<i>B. pseudolongum</i>	Spalax	Jihočeská univerzita (výzkumná skupina zvířat)* x
4/3c	<i>B. pseudolongum</i>	Spalax	Jihočeská univerzita (výzkumná skupina zvířat)*
P9	<i>B. pseudolongum</i>	Prase	Školní demonstrační stáj
<b>DSM 20099</b>	<b><i>B. pseudolongum</i></b>	Prase	<b>Typový kmen</b>
		VYSVĚTLIVKY	** jedinec často vystavený antibiotické terapii
		x agregující vzorek	* jedinec vystavený antibiotické terapii

#### 4.1.1.1 Kultivace vzorků

Vzorky jsou uchovávány v penicilinových lahvičkách při teplotě -20 °C. Vzorky jsou uchovávány v poměru 60 % narostlé kultury a 40 % Bifipufu s glycerolem (složení je uvedeno v příloze č. X). Před kultivací byly vzorky rozmrazeny při pokojové teplotě a následně byly 0,5 ml kultury přeočkovány do zkumavek s WSP médiem (9 ml, Wilkins-Chalgren broth s přísadkou sojového peptonu, cysteinu a tweenu, přesné složení je uvedeno v Tabulce č. 4). Přeočkované vzorky byly kultivovány v termoboxu při 37 °C po dobu 24 hodin.

#### 4.1.1.2 Kultivační médium

Pro kultivaci bifidobakterií byl využit modifikovaný Wilkins-Chalgren broth – tekuté pěstební médium pro anaerobní bakterie. V níže uvedené Tabulce č. 4 jsou uvedeny všechny složky potřebné na přípravu 1 litru média.

Tabulka 4 Složení pěstebního WPS média

Složky média
1 l demineralizované vody
33 g Wilkins-Chalgren bujón (broth; Oxoid)
5 g GMO sojového peptonu (Oxoid)
0,5 g L-cysteinu (Sigma-Aldrich)
1 ml tween (Sigma-Aldrich)

Jednotlivé složky byly naváženy a přidány do 1 litru destilované vody do kónické Erlenmeyerovy baňky. Po řádném promíchání a pro rozpuštění všech složek byl výsledný roztok dán na 10 minut vařit do vodní lázně. Po převaření bylo médium dávkováno po 9 ml do zkumavek/penicilinek (Obrázek č. 9), které byly probublány oxidem uhličitým a uzavřeny zátkami pro dosažení anaerobního prostředí. Zkumavky/penicilinky byly následně dány do autoklávu na sterilaci (program tekutiny).



Obrázek 9 Přeočkování zamražených kultur

#### 4.1.2 LSM agar pro testování antibiotické citlivosti

Pro přípravu LSM agaru je potřeba ISO-Sensitest agar (Oxoid, UK) a MRS agar (Sigma-Aldrich, Germany) v poměru 9:1. Na 1 litr destilované vody bylo zapotřebí 28,26 g ISO-Sensitest agaru a 6,2 g MRS agaru. Přesně navážené množství se převedlo do destilované vody do Erlenmeyerovy baňky se zábrusem. Řádně rozmíchané agary byly dány na 1 hodinu do autoklávu na uvaření a sterilaci. Po vyndání z autoklávu byl agar v baňce dán do vodní lázně při 52 °C pro vychladnutí bez rizika ztuhnutí. Po vytemperování bylo možné agar použít pro testování.

### 4.1.3 Antibiotika

Celkem byla v praktické části testována inhibiční aktivita 73 antibiotik (Tabulka č. 5). Všechna testovaná antibiotika v podobě papírových disků byla pro účely našeho testování nově zakoupena od společnosti Oxoid.

Výběr testovaných antibiotik byl zaměřen na antibiotika běžně používaná v humánní a veterinární medicíně, zároveň byla vybrána i ta, u kterých EFSA (European Food Safety Authority) požaduje testování antibiotické rezistence pro probiotické kmeny bifidobakterií. Jedná se o ampicilin (10 µg), vankomycin (2 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), streptomycin (10 µg), erytromycin (15 µg), clindamycin (2 µg), tetracyklin (16 µg) a chloramfenikol (30 µg) (EFSA 2012). Uvedená antibiotika jsou v tabulce označena hvězdičkou.

Tabulka 5 Seznam použitých antibiotik

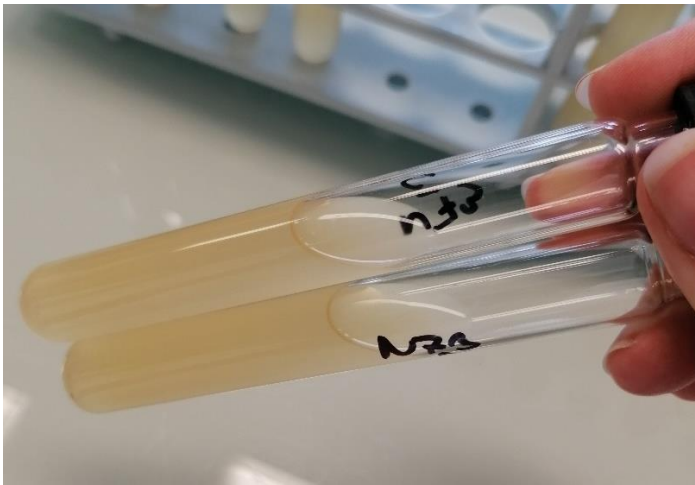
Antibiotikum	Koncentrace	Skupina
Amikacin AK	30 µg	Aminoglykosidy
Amoxycilin + Clavulanic acid AMC	30 µg	Beta-laktamy
Amoxycilin AML	25 µg	Peniciliny
Ampicilin AMP	2 µg	Peniciliny
<b>Ampicilin AMP*</b>	10 µg	Peniciliny
Ampicilin + Sulbactam SAM	20 µg	Beta-laktamy
Azitromycin AZM	15 µg	Makrolidy
Aztreonam ATM	30 µg	Beta-laktamy
Bacitracin B	10 IU	Polypeptidy
Cefaclor CEC	30 µg	Cefalosporiny
Cefadroxil CFR	30 µg	Cefalosporiny
Cefepime FEP	30 µg	Cefalosporiny
<b>Cefixime CFM</b>	5 µg	Cefalosporiny
Cefoperazone CFP	75 µg	Cefalosporiny
Cefovecin CVN	30 µg	Cefalosporiny
Cefoxitin FOX	30 µg	Cefalosporiny
Cefpodoxim CPD	10 µg	Cefalosporiny
Ceftarolin CPT	5 µg	Cefalosporiny
Ceftazidim CAZ	10 µg	Cefalosporiny
Ceftibuten CFT	30 µg	Cefalosporiny
Ceftriaxon CRO	30 µg	Cefalosporiny
Cefuroxime CXM	30 µg	Cefalosporiny
Cefalexin CL	30 µg	Cefalosporiny
Cefazolin KZ	30 µg	Cefalosporiny
Ciprofloxacin CIP	5 µg	Chinoliny
<b>Clindamycin DA*</b>	2 µg	Makrolidy
Colistin CT	10 µg	Polypeptidy
Doripenem DOR	10 µg	Karbapenemy
Doxycyklin DO	30 µg	Tetracykliny
Enrofloxacin ENR	5 µg	Chinoliny
Ertapenem ETP	10 µg	Karbapenemy

<b>Erythromycin E*</b>	15 µg	Makrolidy
Flukonazol FCA	25 µg	Aminoglykosidy
Flumequin UB	30 µg	Chinoliny
Fosfomycin FOS	50 µg	Fosfonová antibiotika
Framycetin FY	100 µg	Aminoglykosidy
<b>Gentamicin CN*</b>	30 µg	Aminoglykosidy
<b>Chloramfenikol C*</b>	30 µg	Oxazolidony
Kanamycin K	5 µg	Aminoglykosidy
<b>Kanamycin K*</b>	30 µg	Aminoglykosidy
Levofloxacin LEV	5 µg	Chinoliny
Lincomycin MY	10 µg	Makrolidy
Linezolid LZD	10 µg	Oxazolidony
<b>Mecillinam MEL</b>	10 µg	Peniciliny
Meropenem MEM	10 µg	Karbapenemy
Metronidazol MTZ	5 µg	Nitroimidazoly
<b>Metronidazol MTZ</b>	50 µg	Nitroimidazoly
Minocyclin MH	30 µg	Tetracykliny
<b>Moxifloxacin MXF</b>	5 µg	Chinoliny
<b>Mupirocin MUP</b>	200 µg	Aminoglykosidy
Nafcilin NF	1 µg	Peniciliny
<b>Nalidic acid NA</b>	30 µg	Chinoliny
Neomycin N	10 µg	Aminoglykosidy
Netilmicin NET	10 µg	Aminoglykosidy
Nitrofurantoin F	100 µg	Nitroimidazoly
<b>Norfloxacin NOR</b>	10 µg	Chinoliny
Ofloxacin OFX	5 µg	Chinoliny
Oleandomycin OL	15 µg	Makrolidy
Oxacilin OX	1 µg	Beta-laktamy
Oxolinic acid OA	2 µg	Chinoliny
Oxytetracyklin OT	30 µg	Tetracykliny
Penicilin G, P	10 IU	Peniciliny
Piperallicin PRL	30 µg	Peniciliny
Piperallicin/Tazobactam TZP	36 µg	Peniciliny
Polymyxin B, PB	300 IU	Polypeptidy
Rifampicin RD	5 µg	Aminoglykosidy
Spectinomycin SH	25 µg	Cefalosporiny
Spiramycin SP	100 µg	Makrolidy
<b>Streptomycin S*</b>	10 µg	Aminoglykosidy
Streptomycin S	300 µg	Aminoglykosidy
Sulphamethoxazol + Trimethoprim SXT	25 µg	Sulfonamidy
<b>Tetracyklin TE*</b>	30 µg	Tetracykliny
Ticarcillin TIC	75 µg	Peniciliny
Tobramycin TOB	10 µg	Aminoglykosidy
<b>Trimethoprim W</b>	5 µg	Sulfonamidy
<b>Trimethoprim/Sulphamethoxazol STX</b>	25 µg	Sulfonamidy
<b>Vancomycin VA*</b>	5 µg	Glykopeptidy

## Metody

### 4.1.4 Kontrola narostlých kultur

Vykultivované vzorky bifidobakteriálních kmenů (Obrázek č. 10) byly kontrolovány, aby došlo k vyloučení možné kontaminace narostlé kultury. Pro kontrolu byl využit světelný mikroskop s fázovým kontrastem (Eclipse E200, Nikon). Malé množství narostlé kultury bylo pomocí injekční stříkačky dáno na podložní sklíčko a co nejrychleji bylo překryto krycím sklíčkem. Takto připravený vzorek byl zkontrolován pod mikroskopem. Další kontrola identity vzorků probíhala pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Výhodou této metody bylo, že jsme byli schopni ověřit druh bifidobakterií ve vzorku.



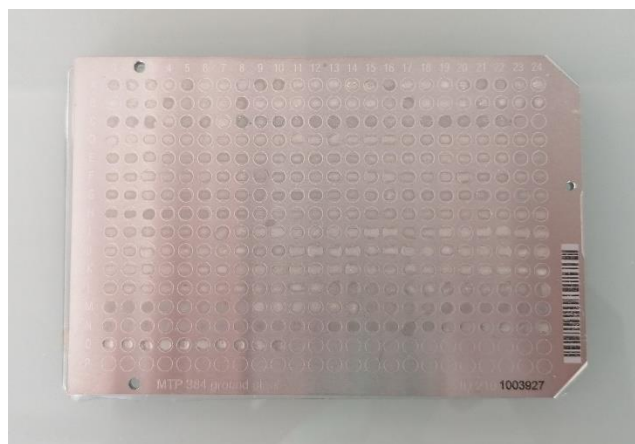
Obrázek 10 Narostlé kultury

### 4.1.5 Identifikace pomocí MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS funguje na principu identifikace ribozomálních spekter a jejich určování dle identifikačního skóre. Pro identifikaci byla použita metoda extrakce pomocí mravenčí kyseliny a acetonitrilu. Vlastní extrakci ribosomálních proteinů předcházela fixace vzorku pomocí etanolu. Přesný postup je uveden níže.

1. Do označených Eppendorf zkumavek o objemu 1,5 ml byl převeden 1 ml mikroskopicky zkontrolované čerstvě narostlé kultury.
2. Zkumavky byly dány na 3 minuty do centrifugy na 14 500 otáček za minutu. Tím bylo dosaženo usazení sedimentu na dně zkumavek. Zbýlý supernatan byl odstraněn.
3. K sedimentu bylo napipetováno 0,5 ml 70% ethanolu pro fixaci vzorku. Sediment byl v ethanolu důkladně promíchán a následně zvortexován. Vzniklý roztok byl znovu dán na 2 minuty do centrifugy.
4. Od znovu vzniklého sedimentu byl odlit a odpipetován ethanol a vzorek se nechal 10 minut sušit na vzduchu, aby došlo k odstranění zbývajících ethanolu.
5. Pro extrakci proteinů bylo k sedimentu přidáno 20  $\mu$ l 70% mravenčí kyseliny, důkladně promícháno a zvortexováno.

6. K roztoku mravenčí kyseliny bylo přidáno 20  $\mu$ l acetonitrilu, následně byl vzorek zvortexán a dán na 2 minuty do centrifugy.
7. Z výsledného roztoku bylo odebráno 2x 1  $\mu$ l tekuté složky, který byl převeden na speciální destičku (Bruker) ve dvou kopiích.
8. Po zaschnutí byl na každý vzorek pipetován 1  $\mu$ l matrice (Bruker). Vzorky byly analyzovány.



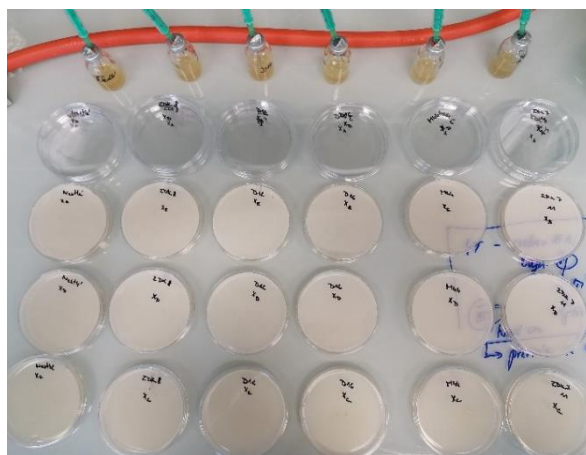
Obrázek 11 MALDI-TOF destička (Bruker)

#### 4.1.6 Příprava vzorků na testování

Jelikož jsou bifidobakterie anaerobní bakterie, bylo zapotřebí vzorky zpracovat za co nejkratší možnou dobu, aby nedošlo k jejich poškození. Do předem označených velkých Petriho misek byl injekční stříkačkou převeden 1 ml narostlé a zkontrolované kultury. Bezprostředně na to bylo do misky přidáno 20 ml připraveného agaru a vše bylo řádně promícháno pro zajištění rovnoměrného růstu bifidobakterií po celé misce. Pro přesné dávkování byl využit špaček normovaný na 20 ml. Takto připravené Petriho misky se vzorky (Obrázek č. 12) se nechaly zatuhnout a následně na ně byly aplikovány disková antibiotika – 6 disků různých antibiotik pomocí aplikátoru (Oxoid) (Obrázek č. 13) na 1 Petriho misku. Ihned po aplikaci antibiotik byly vzorky dány do nádob zajišťujících anaerobní prostředí společně s vyvíječi anaerobního prostředí (AnaeroGen, Thermo Scientific) a uloženy do termoboxu při 37 °C na 24 hodin na kultivaci.



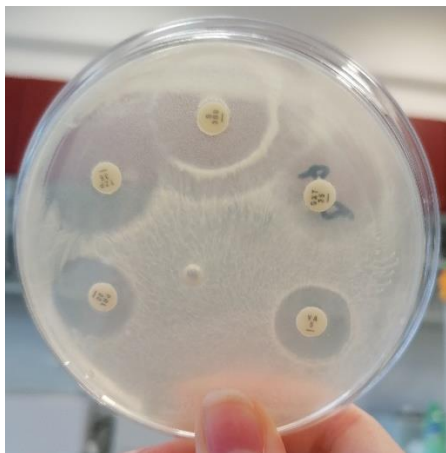
Obrázek 13 Dispenzor antibiotických disků (Oxoid)



Obrázek 12 Petriho misky na testování

#### 4.1.7 Vyhodnocení vzorků

Vzorky byly po 24 hodinách zkontrolovány, zda došlo k nárůstu kultury v médiu a vzniku inhibičních zón, které jsou důkazem citlivosti testované kultury k danému antibiotiku. Antibiotika, vůči kterým byly bifidobakterie citlivé (v dané koncentraci), měla kolem disků zónu bez nárůstu. Tyto zóny byly odečítány pomocí pravítka v jejich průměru včetně velikosti disku (6 mm). Pokud je bakteriální kultura k testované koncentraci antibiotika rezistentní, tak nedojde k vytvoření inhibiční zóny a nárůst je viditelný i kolem antibiotického disku (Obrázek č. 14).



Obrázek 14 Odečítání výsledků

#### Testování inhibiční aktivity antibiotik ve spojení s kyselinou listovou

Z původních 40 vzorků bifidobakterií a 73 antibiotik použitých při screeningu jsme vybrali skupinu 16 vzorků bifidobakterií a 18 antibiotik, se kterými jsme provedli testování v médiu obohaceném o kyselinu listovou. Kyselina listová je produkována některými zástupci rodu *Bifidobacterium*, kdy dosavadní výsledky naznačují velkou druhovou a kmenovou variabilitu v rámci produkce. Navíc naše screeningové testování poukázalo na velkou variabilitu při testování sulfonamidů, které kompetitivně inhibují syntézu kyseliny listové, která je růstovým faktorem bakterií. Cílem bylo zjistit, jaký bude mít na růst bifidobakterií vliv přítomnost kyseliny listové v médiu/ agaru použitým pro diskovou metodu.

#### Materiál

##### 4.1.8 Bifidobakterie a antibiotika

Testovaných 16 vzorků bifidobakterií mělo druhové zastoupení: *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. adolescentis*, *B. dentium*, *B. globosum* a *B. pseudolongum*. V tabulce s testovanými kmeny jsou označeny hvězdičkou (Tabulka č. 3). Antibiotika (v Tabulce č. 4 označena tučně) byla vybrána na základě výsledků screeningového testování, jejich selektivity pro bifidobakterie (s detekovanou citlivostí vs rezistencí) i s ohledem na dříve provedené studie (Masco et al. 2006; Sugahara et al. 2015) a další.

#### 4.1.9 LSM médium obohacené o kyselinu listovou

K testování byl použit LSM agar složený z ISO-Sensitest agar (Oxoid, UK) a MRS agar (Sigma-Aldrich, Germany) v poměru 9:1 viz předchozí screeningové testování, který byl obohacený o kyselinu listovou (97%, Sigma) v koncentraci 1 g/l. Kyselina listová (Obrázek č. 15) byla přidána až po tepelné úpravě z důvodu snížení ztrát její aktivity. LSM agar bez kyseliny listové byl použit jako kontrola, nicméně byl v této fázi experimentu doplněný o bromkrezolovou fialovou sloužící jako barevný indikátor pro lepší odečet inhibičních zón (Obrázek č. 16).



Obrázek 15 Kyselina listová



Obrázek 16 Připravená LSM média. Vlevo s indikátorem, vpravo s kyselinou listovou.



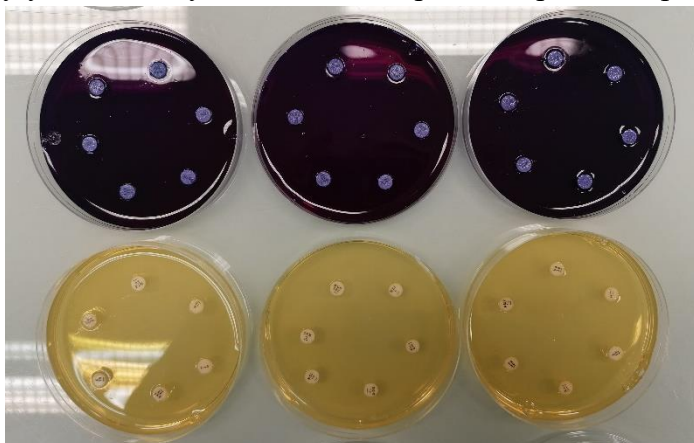
## Metody

### 4.1.10 Kontrola narostlých kultur

Všechny vzorky byly před testováním zkontrolovány pomocí světelného mikroskopu s fázovým kontrastem (Eclipse E200, Nikon). Následně byly vzorky zkontrolovány MALDI-TOF MS pro identifikaci bifidobakterií na druhové úrovni.

### 4.1.11 Testování vzorků

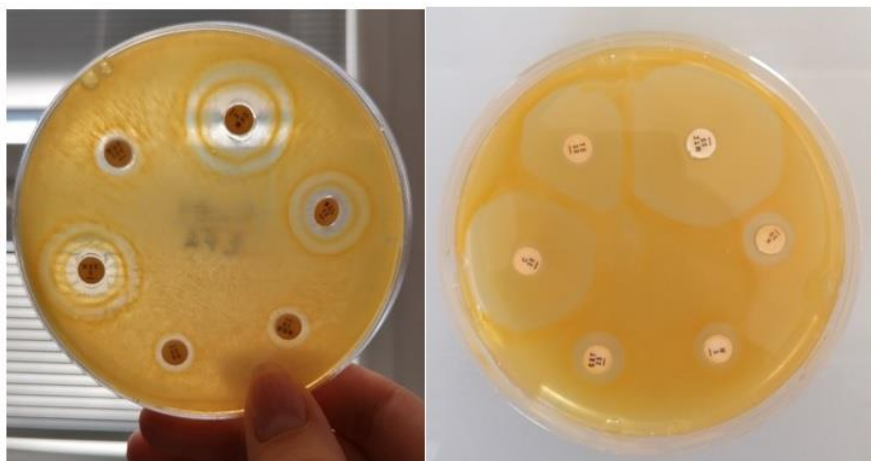
Testování vzorků probíhalo stejným způsobem jako u screeningu. Pro kontrolu bylo stejné měření provedeno i v LSM agaru bez kyseliny listové pouze s přidavkem indikátoru bromkrezolovou fialovou pro snazší odečítání zón. Pro vyloučení interakce média s kyselinou listovou a antibiotik byly připraveny kontrolní Petriho misky pouze s agarem bez bifidobakterií a byly na ně nanесeny antibiotické disky (Obrázek č. 17). Všechny testované Petriho misky byly kultivovány za anaerobního prostředí při 37 °C po dobu 24 hodin.



Obrázek 17 Kontrolní misky. Nahoře agar s indikátorem, dole agar s kyselinou listovou.

### 4.1.12 Vyhodnocení vzorků

Po 24 hodinách byly testované vzorky zkontrolovány a byly odečteny inhibiční zóny okolo antibiotických disků. Výsledné inhibiční zóny lze vidět na Obrázku č. 18.



Obrázek 18 Inhibiční zóny LSM agar s kyselinou listovou

## 5 Výsledky

V praktické části byl proveden screening antibiotické rezistence/citlivosti celkem 40 vzorků multihostitelských druhů bifidobakterií náležících do skupin *B. animalis/lactis*, *B. adolescentis*, *B. dentium*, a *B. pseudolongum/globosum* na 73 komerčně používaných antibiotik. Vzhledem k velkému množství použitých antibiotik jsou výsledky prezentovány podle typu použitého antibiotika. Všechna testovaná antibiotika i s výsledky jsou uvedena v Tabulce č. 6 a jsou barevně rozlišena dle antibiotických/testovaných skupin – Aminoglykosidy (oranžová), Beta laktamy (žlutá), Cefalosporiny (tmavě zelená), Fosfonová a Glykopeptidová antibiotika (šedá), Chinolová (tmavě modrá), Karbapenemy (tyrkysová), Makrolidy (světle zelená), Nitroimidazoly (červená), Oxazolidony (růžová), Polypeptidová (světle modrá), Sulfonamidy (hnědá) a Tetracykliny (fialová). Aby bylo možné tak velké množství antibiotik otestovat, byla zvolena disková difúzní metoda s postupem odpovídajícím ISO normě 10932:2010 zabývající se stanovením minimální inhibiční koncentrace antibiotik pro bifidobakterie a bakterie mléčného kvašení. Jak bylo zmíněno v metodické části práce, pro bifidobakterie nejsou stanoveny minimální inhibiční koncentrace pro antibiotika, z toho důvodu byly použity antibiotika v běžně dostupných koncentracích.

### 5.1 Screening antibiotické rezistence

Cílem uvedeného screeningu bylo zhodnotit vliv účinku antibiotik na úrovni rodu, druhu/poddruhu a najít možnou kmenovou variabilitu v závislosti na hostiteli.

#### 5.1.1 Celkové zhodnocení

Pro lepší orientaci jsou výsledky přepočteny do souhrnné tabulky (č. 6). Tabulka je rozdělena na testované skupiny antibiotik, sloupce odpovídají testovaným druhům, ke každému druhu je připsán počet testovaných kmenů. Ke každému druhu jsou pak výsledky rozděleny do 3 skupin v závislosti na inhibiční schopnosti antibiotika na nízkou citlivost (NC) 6-12 mm inhibiční zóny, střední citlivost (SC) 13-25 mm a vysokou citlivost (VC) 26 a více mm. Veškeré naměřené hodnoty pro jednotlivé zástupce k danému antibiotiku byly přepočteny na procentické zastoupení. Z hodnot je tak lépe patrné, jakou citlivost antibiotikum/skupina antibiotik vůči danému druhu vykazovaly.

Z tabulky je patrné, že druhy *B. adolescentis* a *B. dentium* mají celkově vyšší citlivost (větší inhibiční zóny), primárně pak na betalaktamy, cefalosporiny, makrolidy a tetracykliny. Naopak druhy *B. animalis* a *B. pseudolongum* vykazují vyšší míru rezistence, jsou však více citlivá na chinoliny. Nejvíce rezistentní skupinou antibiotik se ukázaly být aminoglykosidy, nejnižší zastoupení rezistentních vzorků pak mají tetracykliny.

Pro testování byla vybrána i antibiotika, na která bifidobakterie vykazují specifickou rezistenci pro kontrolu správnosti testování. Jednalo se například o mupirocin a kyselina nalidixová, která společně s antibiotiky kanamycin (v obou koncentracích), netylmicin, kyselina oxolinová, kolistin a polymyxin B neinhibovaly žádný testovaný vzorek. U streptomycinu lze vidět závislost koncentrace na účinku, v koncentraci 10 µg nevykazoval inhibiční účinek, avšak ve vyšší koncentraci (300 µg) již inhiboval růst u všech vzorků. Oproti tomu zde byla antibiotika, která inhibovala růst všech testovaných kmenů. Jednalo se

o amoxicilin, cefuroxim, ceftriaxon, linezolid, piperacilin, bacitracin a minocyklin. Bifidobakterie vykazují vůči aztreonamu rezistenci/nízkou citlivost, důvodem zde může být primární účinek antibiotika na gramnegativní bakterie. Všechny vzorky napříč druhy byly rezistentní na metronidazol v nižší koncentraci, ve vyšší koncentraci se již inhibice vyskytovala.

Tabulka 6 Souhrnná tabulka výsledků ze screeningu, data uvedena v procentech.

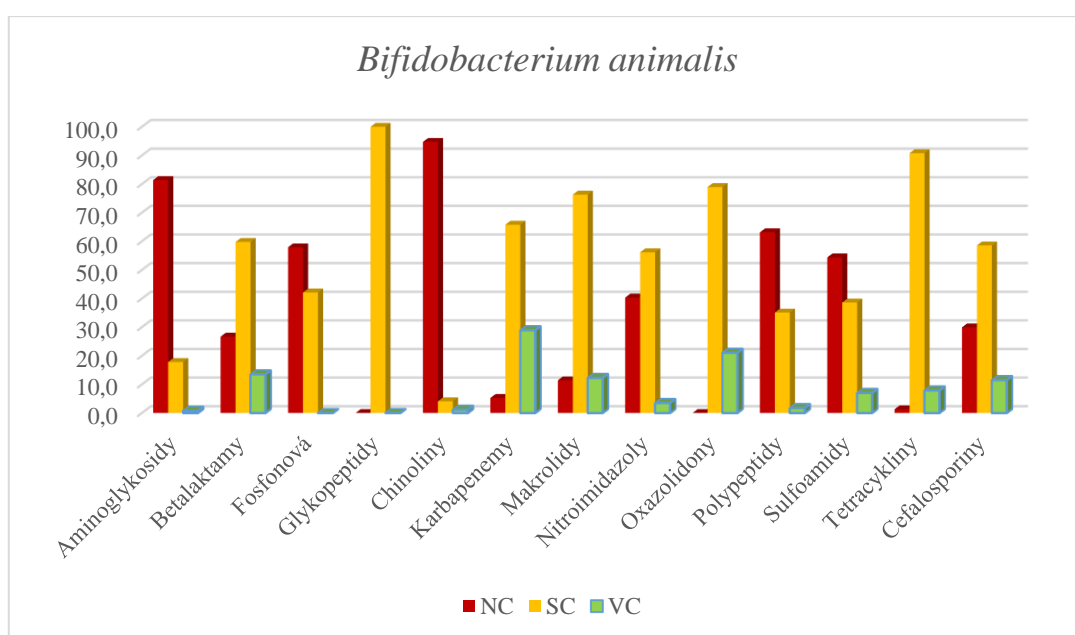
Název antibiotika	<i>B. animalis</i> N=19			<i>B. adolescentis</i> N=8			<i>B. dentium</i> N=5			<i>B. pseudolongum</i> N=9		
	NC	SC	VC	NC	SC	VC	NC	SC	VC	NC	SC	VC
Amikacin (30 µg)	94,7	5,3	0	75	25	0	60	40	0	55,5	44,4	0
Framycetin (100 µg)	57,9	42,1	0	0	100	0	0	80	20	0	100	0
Gentamicin (30 µg)	100	0	0	50	50	0	60	40	0	44,4	55,5	0
Kanamycin (5 µg)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Kanamycin (30 µg)	100	0	0	100	0	0	80	20	0	100	0	0
Mupirocin (200 µg)	94,7	5,3	0	87,5	0	12,5	100	0	0	100	0	0
Neomycin (10 µg)	100	0	0	100	0	0	80	20	0	66,6	33,3	0
Netilmicin (10 µg)	94,7	5,3	0	87,5	12,5	0	80	20	0	100	0	0
Rifampicin (5 µg)	15,8	78,9	5,3	0	37,5	62,5	0	60	60	0	66,6	33,3
Streptomycin (10 µg)	100	0	0	100	0	0	80	20	0	77,7	22,2	0
Streptomycin(300 µg)	0	94,7	5,3	0	87,5	12,5	0	80	20	0	100	0
Tobramycin (10 µg)	100	0	0	100	0	0	80	20	0	77,7	22,2	0
Flukonazol (25 µg)	100	0	0	100	0	0	80	20	0	100	0	0
Amoxycilin (25 µg)	0	63,2	36,8	0	37,5	62,5	0	20	80	0	100	0
Amoxycilin + Clavulanic acid (30 µg)	5,3	73,7	21	0	37,5	62,5	0	0	100	0	100	0
Ampicilin (2 µg)	5,3	84,2	10,5	12,5	50	37,5	40	20	40	33,3	66,6	0
Ampicilin (10 µg)	10,5	78,9	10,5	0	37,5	62,5	0	20	80	0	100	0
Ampicilin + Sulbactam (20 µg)	5,3	84,2	10,5	0	50	50	0	20	80	0	100	0
Aztreonam (30 µg)	16	10,5	5,3	75	25	0	100	0	0	100	0	0
Doripenem (10 µg)	5,3	78,9	15,8	0	37,5	62,5	0	0	100	0	77,7	22,2
Mecillinam (10 µg)	100	0	0	12,5	87,5	0	60	40	0	100	0	0
Nafcilin (1µg)	47,4	52,6	0	0	100	0	0	60	40	88,8	11,1	0
Oxacilin (1µg)	73,7	21	5,3	37,5	62,5	0	20	60	20	100	0	0
Penicilin G (10 IU)	5,3	78,9	15,8	0	25	75	0	40	60	0	100	0
Piperacilin (30 µg)	15,8	73,7	10,5	0	37,5	62,5	0	20	80	0	100	0
Piperacilin/ Tazobactam (36 µg)	5,3	73,7	21	0	50	50	0	0	100	0	100	0
Ticarcillin (75 µg)	10,5	63,2	26,3	0	12,5	87,5	0	0	100	0	100	0
Cefaclor (30 µg)	21	47,4	31,6	0	75	25	0	20	80	22,2	77,7	0
Cefadroxil (30 µg)	36,8	63,2	0	0	25	75	0	40	60	44,4	55,5	0
Cefepim (30 µg)	5,3	68,4	26,3	0	37,5	62,5	0	0	100	0	88,8	11,1
Cefixim (5 µg)	94,7	5,3	0	12,5	37,5	50	0	40	60	100	0	0
Cefoperazon (75 µg)	15,8	78,9	5,3	0	12,5	87,5	0	0	100	0	88,8	11,1
Cefovecin (30 µg)	0	94,7	5,3	0	25	75	0	40	60	0	100	0

Cefoxitin (30 µg)	42,1	42,1	15,8	0	75	25	0	0	100	0	100	0
Cefpodoxim (10 µg)	5,3	89,4	5,3	0	25	75	0	0	100	11,1	88,8	0
Ceftarolin (5 µg)	0	63,2	36,8	0	25	75	0	40	60	11,1	77,7	11,1
Ceftazidim (10 µg)	5,3	89,4	5,3	0	87,5	12,5	0	40	60	33,3	66,6	0
Ceftibuten (30 µg)	100	0	0	37,5	50	12,5	80	20	0	100	0	0
Ceftriaxon (30 µg)	0	73,7	26,3	0	75	25	0	0	100	22,2	66,6	11,1
Cefuroxim (30 µg)	0	89,4	10,5	0	12,5	87,5	0	0	100	0	100	0
Cefalexin (30 µg)	26,3	73,7	0	0	62,5	37,5	0	40	60	11,1	88,8	0
Cefazolin (30 µg)	31,6	57,9	10,5	12,5	62,5	25	0	40	60	11,1	88,8	0
Spectinomycin(25µg)	94,7	5,3	0	12,5	87,5	0	20	80	0	100	0	0
Fosfomycin (50 µg)	57,9	42,1	0	25	75	0	40	60	0	77,7	22,2	0
Vankomycin (5 µg)	0	100	0	0	100	0	0	100	0	11,1	88,8	0
Ciprofloxacin (5 µg)	89,4	10,5	0	12,5	87,5	0	0	80	20	55,5	44,4	0
Enrofloxacin (5 µg)	94,7	5,3	0	12,5	87,5	0	0	60	40	88,8	11,1	0
Flumequin (30 µg)	100	0	0	87,5	12,5	0	100	0	0	88,8	11,1	0
Levofloxacin (5 µg)	84,2	10,5	5,3	25	62,5	12,5	0	60	40	33,3	66,6	0
Moxifloxacin (5 µg)	84,2	10,5	5,3	25	62,5	12,5	0	60	40	55,5	44,4	0
Kyselina nalidixová (30 µg)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Norfloxacin (10 µg)	100	0	0	75	25	0	20	80	0	100	0	0
Ofloxacin (5 µg)	100	0	0	37,5	62,5	0	0	100	0	100	0	0
Ks. Oxolinová (2 µg)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Ertapenem (10 µg)	5,3	73,7	21	0	37,5	62,5	0	0	100	0	100	0
Meropenem (10 µg)	5,3	57,9	36,8	0	25	75	0	0	100	0	77,7	22,2
Azitromycin (15 µg)	10,5	89,4	0	0	50	50	0	40	60	0	100	0
Clindamycin (2 µg)	21	52,6	26,3	0	25	75	0	60	40	66,6	22,2	11,1
Erythromycin (15 µg)	10,5	68,4	21	0	12,5	87,5	0	0	100	0	66,6	33,3
Lincomycin (10 µg)	10,5	78,9	10,5	0	25	75	0	60	40	11,1	88,8	0
Oleandomycin(15 µg)	5,3	84,2	10,5	0	50	50	0	0	100	0	100	0
Spiramycin (100 µg)	5,3	84,2	5,3	0	25	75	0	40	60	0	100	0
Metronidazol (5 µg)	100	0	0	87,5	12,5	0	60	40	0	100	0	0
Metronidazol (50 µg)	10,5	84,2	5,3	37,5	62,5	0	40	20	40	8	11,1	0
Nitrofuratoin(100 µg)	10,5	84,2	5,3	0	62,5	37,5	0	20	80	11,1	88,8	0
Chloramfenikol (30 µg)	0	68,4	31,6	0	12,5	87,5	0	0	100	0	55,5	44,4
Linezolid (10 µg)	0	89,4	10,5	0	12,5	87,5	0	0	100	0	8	11,1
Bacitracin (10 IU)	0	94,7	5,3	0	87,5	12,5	0	80	20	0	100	0
Colistin (10 µg)	100	0	0	100	0	0	100	0	0	88,8	11,1	0
Polymyxin B (300 IE)	100	0	0	75	25	0	80	20	0	100	0	0
Sulphamethoxazol + Trimethoprim (25 µg)	42,1	52,6	5,3	12,5	87,5	0	20	20	60	22,2	77,7	0
Trimethoprim (5 µg)	57,9	31,6	10,5	75	25	0	0	60	40	44,4	55,5	0
Doxycyclin (30 µg)	0	94,7	5,3	0	37,5	62,5	0	20	80	22,2	44,4	33,3
Minocyclin (30 µg)	5,3	84,2	10,5	0	25	75	0	0	100	0	88,8	11,1
Oxytetracyclin(30 µg)	0	89,4	10,5	0	37,5	62,5	0	0	100	33,3	55,5	11,1
Tetracyclin (30 µg)	0	94,7	5,3	0	25	75	0	0	100	33,3	66,6	0

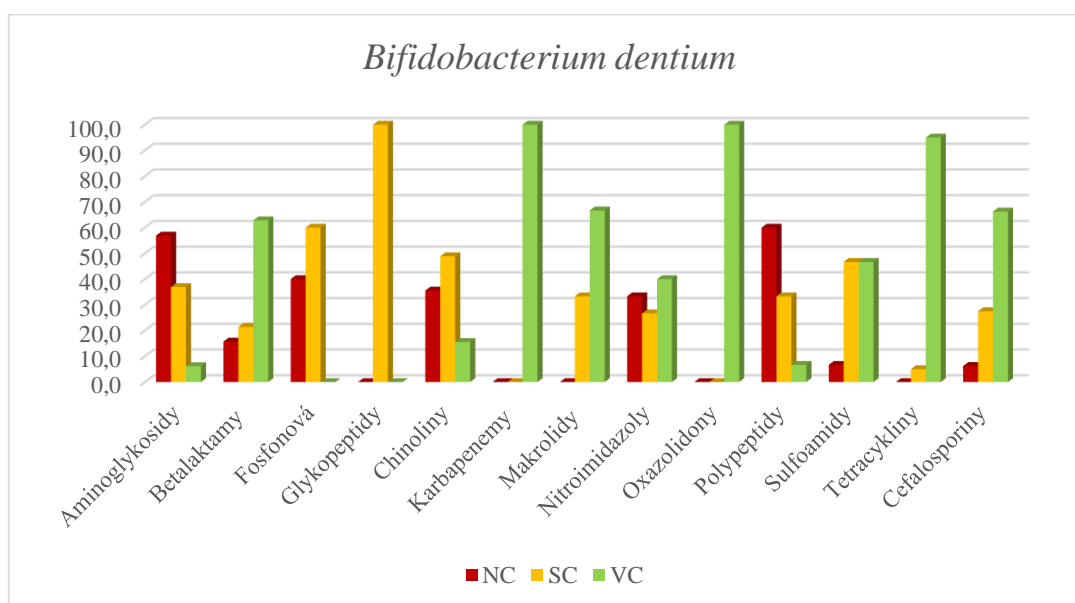
### 5.1.2 Kmenově specifická zjištění

Z výsledků lze usoudit, že citlivost na antibiotika je velmi druhově specifická, v některých případech je specifčnost i na úrovni kmene. U každého bifidobakteriálního druhu byl alespoň jeden vzorek typový kmen – výsledky těchto kmenů korespondují s výsledky většiny ostatních vzorků ve skupině.

Ze souhrnné tabulky je také patrné, že podobné reakce vůči antibiotikům vykazovali druhy *B. animalis* a *B. pseudolongum*, a poté *B. adolescentis* a *B. dentium*. Skupina *B. adolescentis/B. dentium* je inhibována antibiotiky met icilinam, fosfomycin a spectinomycin, zatímco skupina *B. animalis/B. pseudolongum* je vůči těmto antibiotikům rezistentní/nízce citlivá. Rozdíly mezi jednotlivými druhy demonstrují grafy č. 2 a č. 3, na kterých je dobře patrné, jak se účinnost antibiotik u jednotlivých druhů liší.

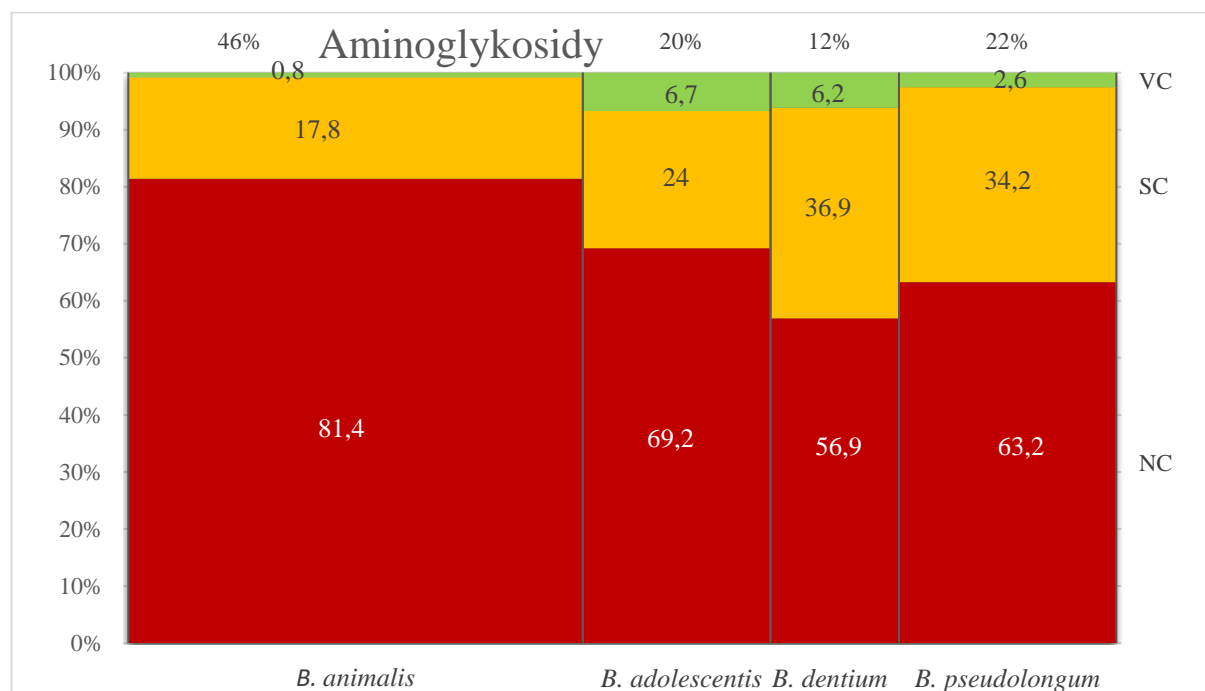


Graf 2 Účinnost antibiotik na *B. animalis*, data uvedena v procentech.

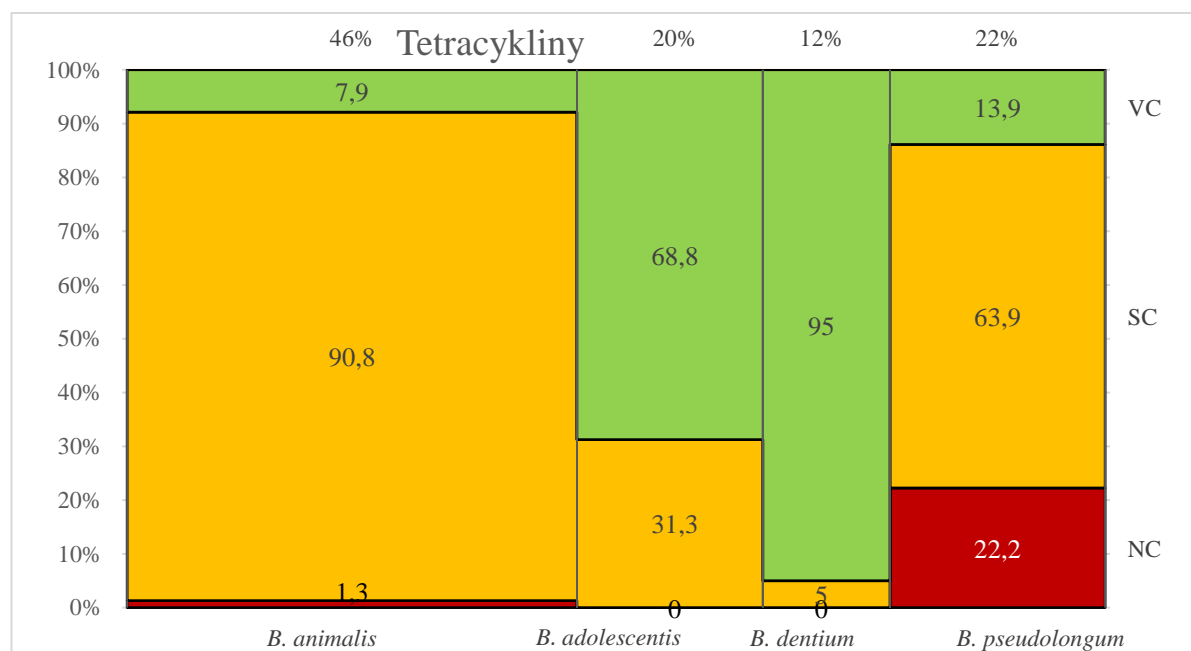


Graf 3 Účinnost antibiotik na *B. dentium*, data uvedena v procentech.

Odlišnosti v účinnosti antibiotik na testované druhy jsou patrné také z grafů č. 4, č. 5 a č. 6. Grafy ukazují, jak jednotlivé druhy bifidobakterií reagovaly vůči jedné skupině antibiotik. Graf v procentech ukazuje, kolik bylo testovaných kmenů v rámci jednoho druhu a zároveň ukazuje jejich citlivost na antibiotika. Zatímco u aminoglykosidů (Graf č. 3) je patrná nízká citlivost v rámci všech testovaných druhů, u tetracyklinů (Graf č. 4) je tomu přesně naopak.



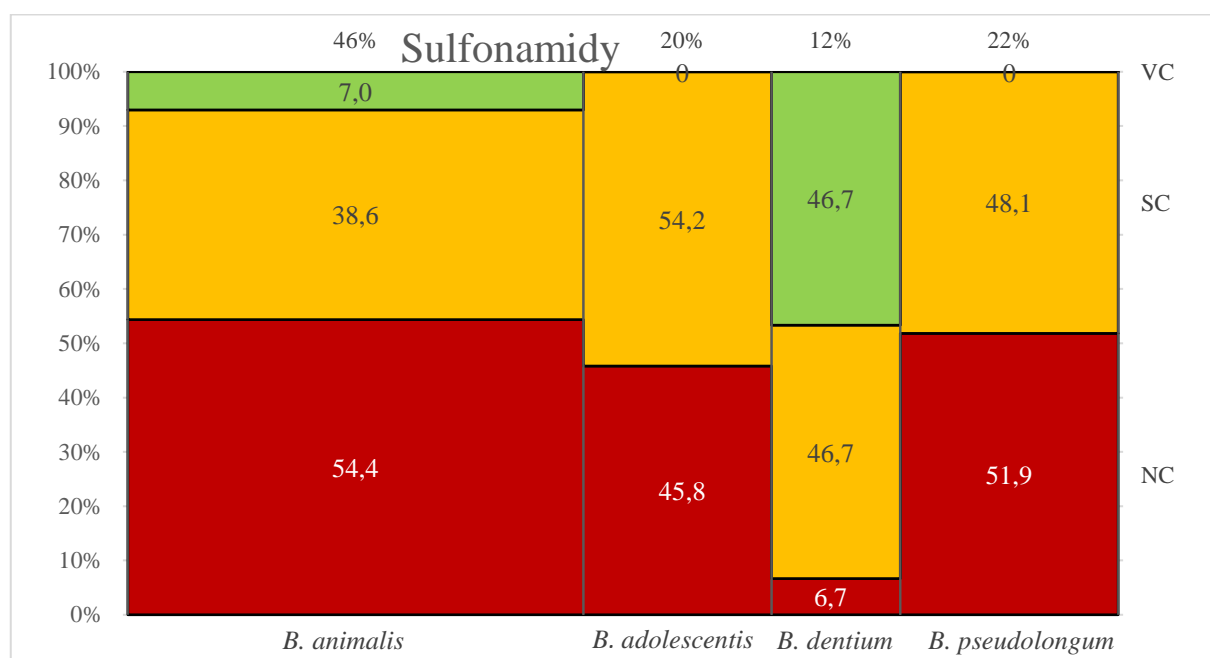
Graf 4 Účinnost aminoglykosidů na všechny testované druhy, data uvedena v procentech.



Graf 5 Účinnost tetracyklinů na všechny testované druhy, data uvedena v procentech.

U sulfonamidů (Graf č. 6) můžeme pozorovat nejen druhovou, ale i významnou kmenovou variabilitu. Sulfonamidy měly největší účinek na *B. dentium*, kde značně inhibovaly

růst u 93,3 % testovaných kmenů. Ostatní testované druhy měly zastoupení rezistentních a citlivých kmenů zhruba půl na půl. Tento výsledek je jedním z důvodů, proč jsme se rozhodli u této skupiny antibiotik otestovat jejich inhibiční aktivitu ve spojení s kyselinou listovou.



Graf 6 Účinnost sulfonamidů na všechny testované druhy, data uvedena v procentech.

### 5.1.3 Další sledované parametry

Dalšími parametry, které mohly mít na účinnost antibiotik vliv, a které jsme u vzorků sledovali, byly schopnost agregace a zatížení hostitele antibiotickou léčbou. Mezi testovanými izoláty byly zahrnuty celkem 4 agregující kmeny (v Tabulce č. 3 označeny písmenem x). Dva z nich byly od Německého ovčáka, další dva pak od Slepce (*Spalax*), z výzkumné skupiny Jihočeské univerzity. Všechny agregující vzorky vykazovaly lehce odlišnou citlivost (vyšší i nižší) na antibiotika oproti ostatním vzorkům včetně typových kmenů. Pro lepší posouzení vlivu této vlastnosti by bylo třeba zahrnout více kmenů s agregační aktivitou.

Sledovali jsme také, kteří hostitelé byli často vystaveni antibiotické léčbě. Zde se jednalo o izoláty od lidí trpících Crohnovou chorobou (CD) a poté o zvířata chovaná v ZOO (v Tabulce č. 3 vyznačeno hvězdičkou). U izolátů od zvířat chovaných v ZOO nebyly patrné odchylky v reakci na antibiotika oproti ostatním vzorkům. U vzorků od lidí s CD, jednalo se o druh *B. dentium*, byla zjištěna nižší citlivost na metronidazol i ve vyšší koncentraci 50 µg, což u zbylých vzorků tohoto druhu nebylo pozorováno. Jelikož se metronidazol používá v léčbě zánětlivých onemocnění střev, tento pozorovaný výsledek s tím může mít zřejmě souvislost.

### 5.1.4 Mutagenita

Testováním se nám také podařilo zjistit, že některé kmeny vykazovaly mutagenní schopnost. Během působení antibiotik se u nich v inhibičních zónách vyskytovaly ojedinělé rezistentní kolonie (viz Obrázek č. 19). Tento jev se vyskytoval pouze u vzorků získaných od lidí, jednalo se o druhy *B. adolescentis*, celkem u čtyř kmenů a také u jednoho vzorku

*B. dentium*. U vzorku M11 (*B. adolescentis*) od člověka trpícím CD se tento mutagenní jev vyskytoval nejvíce, celkem na 6 různých antibiotik (ampicilin, mecilinam, oxacilin, lincomycin, cefaclor a ceftriaxon).



Obrázek 19 Mutagenita - rezistentní kolonie u AMP a MEL

## 5.2 Testování inhibiční aktivity antibiotik ve spojení s kyselinou listovou

Cílem tohoto testování bylo zjistit, zda a jak ovlivní přidavek kyseliny listové (v koncentraci 1 g/l) inhibiční schopnost vybraných antibiotik. Byla zde zahrnuta antibiotika, vůči kterým jsou bifidobakterie rezistentní (mupirocin, norfloxacin, kyselina nalidixová), dále u kterých EFSA vyžaduje testování na rezistenci a poté druhově a kmenově specifická antibiotika.

### 5.2.1 Celkové zhodnocení

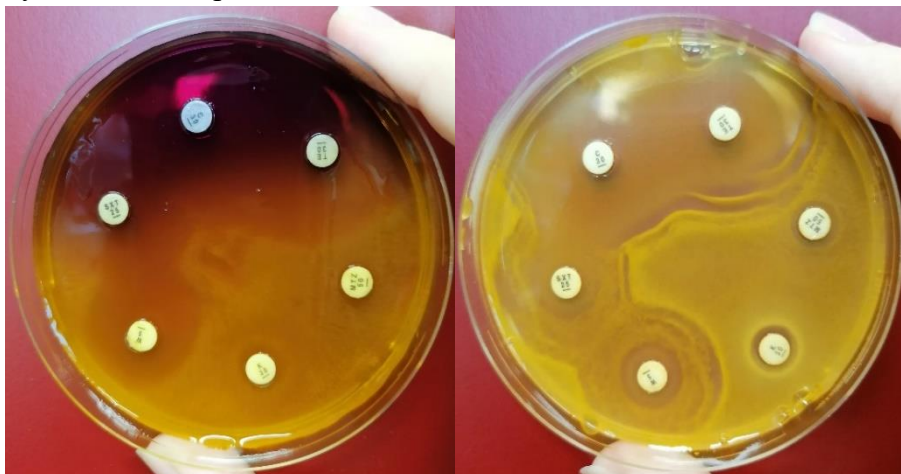
V tabulce (Příloha č. 2) jsou ke každému vzorku uvedeny 3 sloupce hodnot, první jsou výsledky ze screeningu, druhý pochází z kontrolních Petriho misek s přidavkem bromkrezolové fialové pro lepší odečet a ve třetím sloupci jsou uvedeny velikosti inhibičních zón po přidavku kyseliny listové. Z těchto hodnot je patrné zvětšení inhibičních zón po přidavku folátu. U všech 16 testovaných vzorků bifidobakterií se nám podařilo zjistit, že přidavek kyseliny listové do agarů zvyšuje inhibiční schopnost všech otestovaných antibiotik.

Výskyt rezistentních výsledků u kyseliny listové klesl oproti screeningu o 100 %, nevyskytoval se zde totiž ani jediný. Inhibiční schopnost, byť nižší (do 15 mm), začala vykazovat i antibiotika, vůči kterým jsou bifidobakterie rezistentní. Do testování jsme zahrnuli i sulfonamidy, které ve screeningu vykazovaly velmi rozdílné výsledky na druhové i kmenové úrovni. Zde i tato antibiotika vykazovala ve všech případech inhibiční aktivitu.



### 5.2.1.1 Porovnání

Na Obrázku č. 20 lze vidět rozdíl mezi vzorky bez použití a s použitím kyseliny listové. Na prvním obrázku je LSM agar s indikátorem, vínová barva značí místa, kde bifidobakterie nerostly. Také je zde vidět, že okolo disku s metronidazolem (MTZ) a kanamycinem (K) není patrná žádná zóna. Bifidobakterie tedy byly na tato antibiotika v dané koncentraci rezistentní. Oproti tomu na druhém obrázku je agar obohacený o kyselinu listovou. Je zde patrné sytě žluté zabarvení v místě růstu bifidobakterií. Také je zde vidět tvorba nejednoznačných (nejasně ohraničených) zón. V oblasti disků metronidazolu a kanamycinu jsou patrné inhibiční zóny – kyselina listová pomohla v účinnosti antibiotik.

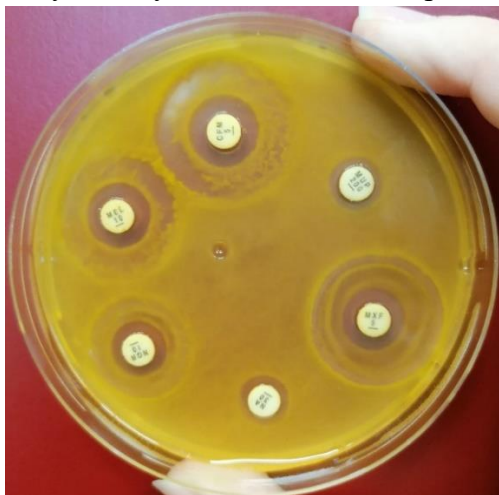


Obrázek 20 *B. dentium*. Vlevo LSM agar, vpravo LSM agar s kyselinou listovou.

### 5.2.2 Zajímavosti

Bylo častým jevem, že inhibiční zóna byla rozdělena do „prstenců“ (Obrázek č. 21) – bifidobakterie byly zřejmě schopné v určité vzdálenosti od antibiotického disku přežít a shlukovaly se v dané oblasti. Výsledkem byly zóny o dvou až čtyřech vzdálenostech (v Příloze č. 2 označeno více čísly v jedné buňce).

Bifidobakterie v přítomnosti kyseliny listové také začaly produkovat sytě žlutý pigment, který byl patrný ve všech vzorcích. Jedinými místy, kde se pigment nevyskytoval byly inhibiční zóny, kde byl růst bifidobakterií potlačen.



Obrázek 21 Inhibiční zóny LSM agar s kyselinou listovou - "prstence" a žlutý pigment.

## 6 Diskuze

Cílem naší práce bylo zjistit výskyt antibiotické rezistence mezi multihostitelkými bifidobakteriálními druhy. Rezistence probiotických organismů na antibiotika a s tím spojené riziko přenosu genů rezistence na patogení mikroorganismy je v současné době stále více diskutované téma. I tak jsou k dispozici pouze omezené informace o rezistenci vůči antibiotikům mezi lidskými střevními komenzály (Duranti et al. 2017). Tato rezistence by mohla mít pozitivní důsledky na průběh antibiotické léčby, kdy užívání probiotik snižuje počet nežádoucích účinků. Tuto skutečnost potvrzuje i studie provedená Ouwehand et al. (2016). Studie provedené (Ouwehand et al. 2016; Morovic et al. 2017) také zmiňují, že probiotika jsou specificky vybírána tak, aby nepřispívala k šíření antibiotické rezistence a nenesla přenosnou antibiotickou rezistenci.

Naše výsledky odhalily, že skupinou antibiotik s nejvyšším zastoupením rezistence byly aminoglykosidy. Tuto skutečnost potvrzují i další studie (Yazid et al. 2000; Moubareck et al. 2005; Kunová et al. 2012).

Masco et al. (2006) zkoumali antibiotickou citlivost pomocí diskové diluční metody u 11 antibiotik, která byla použita i v naší práci. Jednalo se o amoxicilin, gentamycin, erytromycin, tetracyklin, clindamycin, ciprofloxacín, sulphamethoxazol, trimethoprim, chloramfenikol, rifampicin a polymyxin B. Jejich výsledky pro *B. adolescentis* v rámci míry citlivosti korespondují s našimi výsledky pro všechna testovaná antibiotika. Podobnost vykazovaly také vzorky *B. dentium*, kdy pro ciprofloxacín (5 µg) či erytromycin (15 µg) bylo rozpětí hodnot téměř totožné. Pro *B. animalis* se ovšem naše výsledky již mírně rozcházejí. Všechny námi testované kmeny vykazovaly nižší citlivost, než tomu bylo ve studii Masco et al. (2006). Pro představu, rozpětí hodnot inhibičních zón pro tetracyklin (30 µg) u Masco et al. bylo 28-36. Naše výsledky měly rozpětí hodnot pouze 16-26 při stejné koncentraci antibiotika. Totéž platilo i pro trimethoprim (5 µg), kdy ve studii uvádí rozpětí 21-46, zatímco naše vzorky vykazovaly v převážné většině rezistenci, či jen nízkou citlivost. Uvedené rozdíly mohou být způsobeny metodickými rozdíly jako je například zvolené médium pro testování, kdy my jsme používali LSM agar podle ISO normy 10932:2010 a Masco et al. 2006 používal LSM agar obohacený o cystein. Naše kmeny pocházely převážně od zvířecích nebo lidských hostitelů, zatímco Masco et al. 2006 používali vzorky vyizolované z probiotických přípravků.

Bifidobakteriální citlivostí na antibiotika se zabývali také Moubareck et al. (2005), kteří testovali celkem 30 antibiotik. Ve své studii zjistili, že vysoká míra rezistence byla pozorována u metronidazolu a aminoglykosidů, kdy kanamycin (30 µg) a gentamicin (15 µg) nebyly vůbec aktivní – 100 % kmenů vykazovalo rezistenci. Tato zjištění potvrzují i naše výsledky. Kanamycin v obou testovaných koncentracích (5 a 30 µg) nevykazoval žádnou inhibiční aktivitu, stejně tak metronidazol v nižší koncentraci (5 µg). Ve vyšší koncentraci (50 µg) však u druhu *B. animalis* a *B. adolescentis* byla zjištěna střední citlivost. Stejně jako my, si Moubareck et al. ve studii zvolili antibiotikum, které bylo kontrolní a bifidobakterie by na něj měly mít přirozenou rezistenci. V případě této studie se jednalo o kyselinu nalidixovou, kterou jsme ve své práci použili také. Yazid et al. (2000) ve své studii uvádí, že polymyxin B (300 IE) a kolistin (10 µg) nebyly proti testovaným bifidobakteriím účinné. Tuto skutečnost potvrzují Masco et al. (2006) i naše výsledky, všechny testované kmeny byly vůči těmto antibiotikům

rezistentní. Dva makrolidy, erythromycin (15 µg) a oleandomycin (15 µg), inhibovaly růst všech testovaných organismů. I zde se naše výsledky shodují se studii od (Yazid et al. 2000; Masco et al. 2006).

Antibiotika, u kterých ESFA požaduje testování antibiotické rezistence se rozhodli prověřit i Kunová et al. (2012). Jednalo se o ampicilin, vankomycin, erytromycin, clindamycin, tetracyklin a chloramfenikol. Všechny testované bifidobakteriální kmeny byly citlivé na všechny výše zmíněná terapeuticky používaná antibiotika. Vysoký stupeň rezistence mezi bifidobakteriemi pozorovali u streptomycinu, gentamicinu a kanamycinu. Tyto závěry potvrzují i naše výsledky, rozdíl jsme pozorovali pouze u kanamycinu, který v našem testování vykazoval převážně rezistenci či nízkou citlivost v obou testovaných koncentracích. Kunová et al. 2012 také tvrdí, že pro bifidobakterie je na skupinu aminoglykosidů rezistence typická.

Jak může být z tabulek v Přílohách č. 1 a 2 patrné, ne vždy se nám podařilo získat konzistentní výsledek. Vyskytují se zde odchylky, kdy jeden kmen vykazuje diametrálně odlišný výsledek oproti ostatním testovaným vzorkům ze stejného druhu. Důvodem může být různá růstová fáze jednotlivých vzorků, rychlost zatuhnutí agaru a s tím související vystavení bifidobakterií kyslíku, ale i lidská chyba. Velké rozpětí ve velikosti inhibičních zón uvádějí i další studie (Moubareck et al. 2005; Masco et al. 2006), je tedy možné, že tato nesourodost výsledků je určitým specifickým znakem bifidobakterií a bylo by zajímavé tuto skutečnost dále prozkoumat. Výsledky by mohly být ovlivněné také skutečností, že většina bifidobakterií se řadí ke striktním anaerobům, tudíž jsou při testování na Petriho miskách vystaveni stresu z okolního kyslíku. Bylo by tak vhodné při dalším testování a hledání MIC koncentrace vyzkoušet testování v tekutém médiu na mikrotitračních destičkách za anaerobních podmínek. Výsledky by se následně mohly porovnat s E-testem provedeným na Petriho misce a zjistit, pokud a jak stres výsledky ovlivňuje. Touto problematikou se již u jiných bakterií zabývali Cherkaoui et al. (2018).

Antibiotický screening také ukázal, že citlivost na antibiotikum se liší na druhové i kmenové úrovni. Zde se může promítnout vliv hostitele, ze kterého byl daný vzorek vyizolován, ale vliv může mít i částečné odlišení jednotlivých druhů na genetické úrovni. Bottacini et al. (2010) ve své studii zkoumali, jak blízko k sobě geneticky jednotlivé druhy ve fylogenetických taxonech mají. Zjistili, že druhy patřící do skupiny *B. adolescentis*, jako je *B. adolescentis* a *B. dentium* k sobě mají velmi blízko – jsou si tedy velmi podobné. Tuto skutečnost by podporovaly i naše výsledky, kdy druhy *B. adolescentis* a *B. dentium* se v citlivosti na antibiotika lišily od ostatních testovaných druhů, avšak vzájemně měly velmi podobné výsledky.

Mezi námi otestovanými vzorky bifidobakterií byly i vzorky se schopností agregace. Jednalo se o bifidobakterie izolované od Německého ovčáka. Agregáčnı schopnost přispívá k lepší adhezi. Adheznı schopnost probiotik ke střevnímu hlenu a enterocytům je důležitým předpokladem pro kolonizaci střevního traktu hostitele, brání jejich okamžitě eliminaci peristaltikou a poskytuje konkurenční výhodu v tomto ekosystému (Vlková et al. 2008; González-Rodríguez et al. 2012). Přílnavost k hlenu a/nebo lidským epiteliálním buňkám, doporučuje Organizace pro výživu a zemědělství Organizace spojených národů – Světová zdravotnická organizace (FAO/WHO) jako testy *in vitro* ke screeningu potenciálních probiotik (González-Rodríguez et al. 2012). Agregující vzorky v našem testování také vykazovaly odlišné výsledky oproti neagregujícím vzorkům. Zde může být důvodem, že shluk, který

bifidobakterie vytvořily má menší povrch, se kterým může antibiotikum reagovat. Pro průkaznější výsledky by bylo nutné dalšího zkoumání.

Výsledky odhalily, že některé vzorky vykazovaly schopnost spontánní mutace. Krasovec (2021) ve své studii uvádí, že rychlost spontánních mutací je velmi proměnlivá vlastnost, která podléhá posunu, selekci a je vysoce specifická. V důsledku toho mohou být rozdíly mezi blízkými druhy nebo dokonce mezi populacemi stejného druhu velmi velké. Námi testované vzorky vykazující spontánní mutaci náležely ke druhům *B. adolescentis* a *B. dentium* a všechny pocházely od lidských hostitelů. Vzniklé spontánní mutace vykazovaly rezistenci pouze vůči některým z testovaných antibiotik. Tyto mutace by se daly označit za nahodilé, nebyla souvislost mezi antibiotiky, u kterých se vyskytovaly. Jediným společným znakem byl původ vzorků. Výsledek tak koresponduje s výše zmíněnou informací od Krasovec (2021), že v případě mutace se jedná o velmi specifickou vlastnost s nahodilým výskytem. Spontánní mutace nejsou u bifidobakterií vzácností. Dokazuje to i studie provedená Vitali et al. (2007), která se zabývala výskytem spontánní mutace u *B. breve*, *B. infantis* a *B. adolescentis* na antibiotikum rifaximin. Rezistentní kolonie vyizolovali a následně u nich zkoumali stabilitu rezistence v nepřítomnosti selektivního tlaku. Vzhledem k tomu, že rezistentní fenotyp přetrvával po více než 400 bakteriálních generací, dospěli k závěru, že nedošlo k žádnému zvratu antibiotické rezistence.

Pro testování byla využita i antibiotika, na která jsou bifidobakterie přirozeně rezistentní. Jednalo se o mupirocin, norfloxacin a kyselinu nalidixovou. Důvodem zde byla kontrola čistoty kultur či správnosti přípravy vzorků na testování. Dle Ammor et al. (2008) o přirozené rezistenci mluvíme v případě, kdy rezistence vůči danému antimikrobiálnímu agens je typická pro všechny kmeny daného druhu. Naopak, když kmen typicky vnímavého druhu, je odolný vůči danému antibiotiku, je to považováno za získanou rezistenci. K získávání rezistence dochází prostřednictvím mutací původních genů nebo horizontálním přenosem. Mutace můžeme dle způsobu vzniku dělit na spontánní a indukované. Horizontální přenos genů je dle Heuer & Smalla (2007) definován jako mechanismus získání cizích genů organismy za účelem získání nové vlastnosti – například získání rezistence na antibiotika. Některé probiotické kmeny s vnitřní antibiotickou rezistencí mohly být užitečné pro obnovu střevní mikroflóry po léčbě antibiotiky. U typických probiotických rodů jsou však často detekovány specifické determinanty antibiotické rezistence nesené na mobilních genetických prvcích, jako jsou geny rezistence na tetracyklin, a představují rezervoár rezistence pro potenciální potravinové nebo střevní patogeny, což představuje vážný bezpečnostní problém (Gueimonde et al. 2013). Zde je zajímavé, že v našem testování se rezistence na tetracyklin neobjevila, naopak tetracyklin a obecně celá skupina tetracyklinových antibiotik v našem případě vykazovala jedny z nejvyšších citlivostí a velmi vysoký inhibiční účinek.

Mechanismy účinku antibiotik můžeme rozdělit dle místa, na který v bakteriích cílí. Jedná se o ovlivnění syntézy buněčné stěny ( $\beta$ -laktamy, cefalosporiny), ovlivnění syntézy proteinů (tetracykliny, chloramfenikol, aminoglykosidy), narušení mechanismu nukleových kyselin (rifampicin) či narušení metabolických drah (sulfonamidy, analogy kyseliny listové) (Walsh 2010; Sultan et al. 2018). Mechanismy účinků jsou velmi složité a má zde vliv více faktorů. Například aminoglykosidy mají stejný mechanismus účinku jako tetracykliny, avšak na rozdíl od tetracyklinů nevykazují u bifidobakterií téměř žádný vliv. Důvodem je přirozená rezistence anaerobních bakterií (mezi které bifidobakterie řadíme) na aminoglykosidy (Lincová &

Farghali 2007). Existují také antibiotika, která mají mechanismů účinku více, nebo jejich mechanismus není dosud plně objasněn. Řadí se sem například metronidazol, jehož mechanismus hlavního cytotoxického účinku zatím není přesně znám. Ví se, že redukcí jeho nitroskupiny se stane alternativním akceptorem elektronů, čímž je účinný primárně proti anaerobním mikroorganismům. Dále jeho mechanismus zahrnuje potlačení replikace DNA, poškození molekuly DNA pomocí oxidace, díky čemuž vznikají jednořetězcové a dvouřetězcové trhliny, které následně vedou k degradaci DNA a smrti organismu (Diniz et al., 2000). Metronidazol se řadí mezi hlavní antibiotika využívaná k léčbě chronických střevních onemocnění (Lukáš & Chalupná 2005).

V našem testování jsme zkoumali i vzorky bifidobakterií pocházející od lidí trpících Crohnovou chorobou. Jednalo se o druhy *B. adolescentis* a *B. dentium*. Crohnova choroba je chronické střevní onemocnění, při jehož léčbě se často využívá probiotik. Guglielmetti et al. (2013) ve své studii prokázali, že bifidobakterie mají imunomodulační schopnosti a zmírňují tak symptomy a podporují regresi několika gastrointestinálních poruch. K léčbě se také využívají antibiotika metronidazol a ciprofloxacin v délce užívání až 3 týdny (Lukáš & Chalupná 2005). Z našich výsledků je patrné, že na tato antibiotika vykazuje převážná většina vzorků rezistenci nebo pouze mírnou citlivost. U ciprofloxacinu vykazovaly citlivost pouze vzorky náležející ke druhům *B. adolescentis* a *B. dentium*. U metronidazolu jsme testovali 2 různé koncentrace. Nižší (5 µg) vykazovala rezistenci ve všech případech testování. Na vyšší koncentraci (50 µg) vykazovaly rezistenci už pouze vzorky pocházející od lidí s Crohnovou chorobou. Tato skutečnost může mít souvislost právě s častějším využíváním tohoto antibiotika v jejich léčbě. Pro potvrzení této domněnky by bylo zapotřebí otestovat více vzorků pocházejících od nemocných jedinců a využití například E-testů.

Bifidobakterie jsou známým producentem kyseliny listové. Schopnost bifidobakterií produkovat folát je vysoce závislá na kmeni i druhu. Produkce folátu také souvisí s původem hostitele (Sugahara et al. 2015). Folát je důležitou součástí metabolismu každého organismu, který potřebuje pro svůj život. Bakteriální a další mikrobiální infekce sdílejí zrychlený metabolismus. Aby se zajistilo správné fungování replikace buněk a procesů syntézy proteinů a nukleových kyselin, je v těchto případech také zvýšena rychlost metabolismu folátu. Z tohoto důvodu se antagonisté kyseliny listové od svého objevu používají k léčbě různých druhů mikrobiálních infekcí, přičemž využívají tohoto metabolického rozdílu ve srovnání s lidskými buňkami. (Fernández-Villa et al. 2019). Důležitost folátu pro organismy byla jedním z důvodů, proč jsme se rozhodli otestovat účinnost antibiotik proti bifidobakteriím ve spojení s agarem obohaceným o kyselinu listovou. D'Aimmo et al. (2012) ve své studii uvedli, že schopnost každého bifidobakteriálního kmene produkovat folát byla odlišná, když byl kultivován v syntetickém médiu bez folátu nebo v médiu obsahujícím komplexní folát. Abychom předešli zkreslení výsledků, které D'Aimmo et al. (2012) popsali, všechny testované vzorky a antibiotika jsme otestovali i na agaru bez přídavku folátu. Použitá antibiotika byla vybrána tak, aby byly zastoupeny přirozeně rezistentní, kmenově a druhově specifická antibiotika a poté sulfonamidy, která mají spojitost s kyselinou listovou. Jednalo se o trimethoprim a sulfamethoxazol, která jsou dobře známá svojí inhibicí syntézy kyseliny listové. Sulfamethoxazol je sulfonamid, strukturní analog kyseliny paraaminobenzoové, který kompetitivně inhibuje dihydropteroátsyntázu, enzym, který katalyzuje tvorbu dihydrofolátu z kyseliny para-aminobenzoové a pteridinu. Trimethoprim je diaminopyrimidinové

antibiotikum, strukturální analog pteridinové složky dihydrofolátu, chová se jako kompetitivní inhibitor dihydrofolát reduktázy, čímž blokuje redukci kyseliny dihydrofolové na kyselinu tetrahydrofolátovou. Kyselina tetrahydrofolátová je fyziologicky aktivní forma kyseliny listové, která je nezbytným kofaktorem pro syntézu thymidinu, purinů a methioninu (López et al. 2021). Výsledkem našeho testování bylo, že všechna otestovaná antibiotika měla vyšší inhibiční účinnost oproti jejich testování na agaru bez kyseliny listové.

Pro zjištění průkaznosti našich výsledků, by bylo zapotřebí dalších testování, ale také pokračování ve zkoumání bifidobakteriálního rezistomu a genů přenášejících antibiotickou rezistenci.

Rezistom je definován jako soubor všech genů rezistence k antibiotikům. Mancino et al. (2019) se ve své studii zabývali identifikací bifidobakteriálního rezistomu. Zjistili, že celkový počet předpokládaných genů rezistence na antibiotika identifikovaných mezi 625 genomy byl 13 870, což představuje méně než 1 % z celkového počtu analyzovaných genů rodu *Bifidobacterium*. Třída genů antibiotické rezistence s nejvyšším počtem zástupců byla třída propůjčující glykopeptidovou rezistenci, působícím proti glykopeptidovým antibiotikům, jako je vankomycin, teikoplanin a telavancin. Zejména *B. bifidum* kmen 791, *B. longum* subsp. *infantis* 1888B a *B. bifidum* AM42-15AC byly kmeny obsahující nejvyšší počet těchto genů. Většina studií se v současné době zaměřuje převážně na molekulárně-genetické analýzy, bylo by však vhodné zaměřit se jak na sledování rezistomu, ale také na následné porovnání výsledků *in vitro* a *in vivo*.

## 7 Závěr

- Pomocí antibiotického screeningu se nám podařilo zjistit, že míra citlivosti na antibiotikum nezávisí pouze na typu antibiotika a jeho mechanismu účinku, ale hraje zde důležitou roli i druhová a kmenová specifita. Nepodařilo se nám prokázat spojitost mezi hostitelem a jeho vystavením antibiotické terapii a zvýšenou rezistencí bifidobakterií na antibiotika. U druhu *B. dentium* výsledky jistý vliv naznačují, pro jeho prokázání by však bylo nutné zkoumání většího počtu vzorků a více koncentrací antibiotik.
- Během testování se nám podařilo zjistit, že některé kmeny vykazují spontánní mutace vedoucí k rezistenci. Tato schopnost se objevila pouze u vzorků pocházejících od lidí, primárně se jednalo o druh *B. adolescentis*. Jeden z kmenů izolovaný od člověka s Crohnovou chorobou vykazoval spontánní mutaci/rezistenci na celkem 6 různých antibiotik.
- Dalším parametrem, který ovlivňoval výslednou antibiotickou citlivost, byla schopnost vzorků agregovat. V práci byly zahrnuty celkem 4 agregující kmeny, všechny pocházející od zvířat. Všechny agregující vzorky vykazovaly odlišnou citlivost na antibiotika oproti ostatním vzorkům, včetně typových kmenů.
- Podařilo se nám zjistit, že přídavek kyseliny listové pomáhá účinku testovaných antibiotik, a to i těch, na které jsou bifidobakterie přirozeně rezistentní, jedná se například o mupirocin. Vyšší inhibiční schopnost po přidavku folátu do média se prokázala u všech otestovaných antibiotik napříč všemi vzorky. Tento jev by mohl souviset se schopností bifidobakterií produkovat folát. Pro prokázání této spojitosti by bylo potřeba dalších testování.
- Výsledky ukazují vysokou míru rezistence na aminoglykosidová antibiotika. Potvrzuje se tak informace, že anaerobní bakterie (řadíme sem i bifidobakterie) jsou na tuto skupinu antibiotik přirozeně rezistentní. Některé studie uvádí zvýšenou rezistenci na tetracykliny – tato skutečnost se v našem testování nepotvrdila.
- Disková metoda se ukázala jako vhodná pro screeningové testování, navíc přídavek pH indikátoru umožňuje lepší odečet inhibičních zón.
- Hypotézu, že bifidobakteriální kmeny izolované od lidských a zvířecích jedinců vystavených časté antibiotické terapii budou vykazovat větší výskyt rezistence k testovaným antibiotikům, se nám nepodařilo potvrdit. Zde by bylo třeba testovat více izolátů od konkrétního hostitele, nejlépe po známé antibiotické terapii a takové izoláty jsme k dispozici neměli.

## 8 Literatura

- T Hart P, Oppedijk SF, Breukink E, Martin NI. 2016. New Insights into Nisin's Antibacterial Mechanism Revealed by Binding Studies with Synthetic Lipid II Analogues. *Biochemistry* **55**:232–237. *Biochemistry*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26653142/> (accessed December 31, 2021).
- Aminov RI. 2010. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology* **1**.
- Ammor MS, Flórez AB, Van Hoek AHAM, De Los Reyes-Gavilán CG, Aarts HJM, Margolles A, Mayo B. 2008. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **14**:6–15. *J Mol Microbiol Biotechnol*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17957105/> (accessed March 31, 2022).
- Andlid TA, D'Aimmo MR, Jastrebova J. 2018. Folate and Bifidobacteria. *The Bifidobacteria and Related Organisms*:195–212. Academic Press.
- Ang CW, Jarrad AM, Cooper MA, Blaskovich MAT. 2017. Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases. *Journal of medicinal chemistry* **60**:7636–7657. *J Med Chem*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28463485/> (accessed December 31, 2021).
- Arabi YM et al. 2019. Macrolides in critically ill patients with Middle East Respiratory Syndrome. *International Journal of Infectious Diseases* **81**:184–190. Elsevier.
- Baquero F, Levin BR. 2021, February 1. Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics. *Nature Research*.
- Barrett E, Ross RP, O'Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. 2012.  $\gamma$ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of Applied Microbiology* **113**:411–417. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x> (accessed September 12, 2021).
- Ben Y, Fu C, Hu M, Liu L, Wong MH, Zheng C. 2019, February 1. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. Academic Press Inc.
- BIAVATI B, HOLZAPFEL WH, A BJBW, MATTARELLI P. 2018. The bifidobacteria and related organisms: biology, taxonomy, applications. Page *The bifidobacteria and related organisms*.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: History, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology* **50**:117–131.
- Bladek T, Szymanek-Bany I, Posyniak A. 2020. Determination of polypeptide antibiotic residues in food of animal origin by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Molecules* **25**. MDPI AG.
- Bo T bei, Wen J, Zhao Y chun, Tian S jie, Zhang X ying, Wang D hua. 2020. Bifidobacterium pseudolongum reduces triglycerides by modulating gut microbiota in mice fed high-fat food. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **198**. Elsevier Ltd.
- Bonev B, Hooper J, Parisot J. 2008. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**:1295–1301.
- Bottacini F, Medini D, Pavesi A, Turrone F, Foroni E, Riley D, Giubellini V, Tettelin H, Van Sinderen D, Ventura M. 2010. Comparative genomics of the genus Bifidobacterium. *Microbiology* **156**:3243–3254.
- Bottacini F, Ventura M, Sinderen D van, Motherway MOC. 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories* **13**:1–15.
- Bugg TDH, Walsh CT. 1992. Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan



- biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance. *Natural product reports* **9**:199–215. *Nat Prod Rep*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1436736/> (accessed December 31, 2021).
- Bunešová V, Joch M, Musilová S, Rada V. 2017. Bifidobacteria, Lactobacilli, and Short Chain Fatty Acids of Vegetarians and Omnivores. *Scientia Agriculturae Bohemica* **48**:47–54.
- Bunesova V, Musilova S, Geigerova M, Pechar R, Rada V. 2015. Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements. *Journal of Microbiological Methods* **109**:106–109. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.016>.
- Bunešová V, Vlková E, Rada V, Hovorková P, Musilová Š, Kmet V. 2014. Direct identification of bifidobacteria from probiotic supplements. *Czech Journal of Food Sciences* **32**:132–136.
- Cao L, Chen H, Wang Q, Li B, Hu Y, Zhao C, Hu Y, Yin Y. 2020. Literature-Based Phenotype Survey and In Silico Genotype Investigation of Antibiotic Resistance in the Genus *Bifidobacterium*. *Current Microbiology* **77**:4104–4113. Springer.
- Catry B et al. 2015. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International journal of antimicrobial agents* **46**:297–306. *Int J Antimicrob Agents*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26215780/> (accessed December 31, 2021).
- CG R et al. 2006. Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* **441**:53–61. *Nature*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16541024/> (accessed September 25, 2021).
- Cheng LH, Liu YW, Wu CC, Wang S, Tsai YC. 2019, July 1. Psychobiotics in mental health, neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. Elsevier Taiwan LLC.
- Cherkaoui A, Fischer A, Azam N, Riat A, Schrenzel J. 2018. A comparison of Sensititre™ Anaerobe MIC plate with ATB ANA® test for the routine susceptibility testing of common anaerobe pathogens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **37**:2279–2284. Springer Verlag.
- Cho H, Uehara T, Bernhardt TG. 2014. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell* **159**:1300–1311. Cell Press.
- Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**:232. American Society for Microbiology (ASM). Available from </pmc/articles/PMC99026/> (accessed October 2, 2021).
- D’Aimmo MR, Mattarelli P, Biavati B, Carlsson NG, Andlid T. 2012. The potential of bifidobacteria as a source of natural folate. *Journal of Applied Microbiology* **112**:975–984. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2012.05261.x> (accessed February 5, 2022).
- D’Aimmo MR, Modesto M, Biavati B. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International journal of food microbiology* **115**:35–42. *Int J Food Microbiol*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17198739/> (accessed December 23, 2021).
- D’Aimmo MR, Modesto M, Mattarelli P, Biavati B, Andlid T. 2014. Biosynthesis and cellular content of folate in bifidobacteria across host species with different diets. *Anaerobe* **30**:169–177. Academic Press.
- D’Argenio G, Mazzacca G. 2000. Short-chain fatty acid in the human colon: Relation to inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Page Advances in Experimental Medicine and Biology*.

- D M, M K, Z J. 2017. Resistance to the tetracyclines and macrolide-lincosamide-streptogramin group of antibiotics and its genetic linkage - a review. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM* **24**:338–344. *Ann Agric Environ Med*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28664720/> (accessed October 2, 2021).
- Dang D, Zhou W, Lun ZJ, Mu X, Wang DX, Wu H. 2013. Meta-analysis of probiotics and/or prebiotics for the prevention of eczema. *The Journal of international medical research* **41**:1426–1436. *J Int Med Res*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23908398/> (accessed December 1, 2021).
- Dcosta VM et al. 2011, September 22. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21881561/> (accessed September 11, 2021).
- de Vrese M, Schrezenmeir J. 2008. Probiotics, prebiotics and synbiotics. *Adv Biochem Engin*:1–66.
- De Vuyst L, Leroy F. 2011. Cross-feeding between bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria explains bifidobacterial competitiveness, butyrate production, and gas production. *International Journal of Food Microbiology* **149**:73–80. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.003>.
- Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, Li J, Velkov T. 2014. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *The Journal of antibiotics* **67**:147–151. *J Antibiot (Tokyo)*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24169795/> (accessed December 31, 2021).
- Dhawal R, Bajpai VK, Baek K-H. 2012. Production of gaba ( $\gamma$  - aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Brazilian Journal of Microbiology* **43**:1230–1241. Sociedade Brasileira de Microbiologia. Available from <http://www.scielo.br/j/bjm/a/GppQ3My7zBYYbtkLtk8tjLG/?lang=en> (accessed September 12, 2021).
- Durand GA, Raoult D, Dubourg G. 2019, April 1. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. Elsevier B.V.
- Duranti S et al. 2017. Prevalence of antibiotic resistance genes among human gut-derived bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **83**.
- Duranti S et al. 2020. Bifidobacterium adolescentis as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. *Scientific Reports* 2020 10:1 **10**:1–13. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/s41598-020-70986-z>.
- EFSA. 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal* **10**. Wiley-Blackwell Publishing Ltd.
- Engvik MA et al. 2019a. Bifidobacterium dentium fortifies the intestinal mucus layer via autophagy and calcium signaling pathways. *mBio* **10**. American Society for Microbiology.
- Engvik MA et al. 2021. The metabolic profile of Bifidobacterium dentium reflects its status as a human gut commensal. *BMC Microbiology* **21**. BioMed Central Ltd.
- Engvik MA, Morra CN, Röth D, Engvik K, Spinler JK, Devaraj S, Crawford SE, Estes MK, Kalkum M, Versalovic J. 2019b. Microbial Metabolic Capacity for Intestinal Folate Production and Modulation of Host Folate Receptors. *Frontiers in Microbiology* **10**. Frontiers Media S.A.
- F C, S K, A M. 2011. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* **92**:479–497. *Appl Microbiol Biotechnol*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21904817/>.
- Fang Z, Li L, Zhao J, Zhang H, Lee YK, Lu W, Chen W. 2020. Bifidobacteria adolescentis regulated immune responses and gut microbial composition to alleviate DNFB-induced atopic dermatitis in mice. *European Journal of Nutrition* **59**:3069–3081. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.

- Fernández-Villa D, Aguilar MR, Rojo L. 2019, October 2. Folic acid antagonists: Antimicrobial and immunomodulating mechanisms and applications. MDPI AG.
- Fernández L, Hancock REW. 2012. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **25**:661–681. American Society for Microbiology 1752 N St., N.W., Washington, DC. Available from <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/CMR.00043-12>.
- Fleming A. 1929. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae. *British journal of experimental pathology* **10**:226. Wiley-Blackwell. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/>.
- Flesch AG, Amaral T, Poziomyck AK, Irineu, Damini DC, Arvalh. 2014. The therapeutic use of symbiotics. *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva: ABCD = Brazilian archives of digestive surgery* **27**:206–209.
- Forssén KM, Jägerstad MI, Witthöft CM, Wigertz K. 2013. Foliates and Dairy Products: A Critical Update. <https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718071> **19**:100S-110S. Routledge. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07315724.2000.10718071>.
- Frieri M, Kumar K, Boutin A. 2017, July 1. Antibiotic resistance. Elsevier Ltd.
- Gibson GR et al. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics.
- Gillings MR. 2017. Lateral gene transfer, bacterial genome evolution, and the Anthropocene. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1389**:20–36. *Ann N Y Acad Sci*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27706829/>.
- González-Rodríguez I, Sánchez B, Ruiz L, Turroni F, Ventura M, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A. 2012. Role of extracellular transaldolase from bifidobacterium bifidum in mucin adhesion and aggregation. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:3992–3998.
- GR G, MB R. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition* **125**:1401–1412. *J Nutr*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7782892/>.
- Gray DA, Wenzel M. 2020. Multitarget Approaches against Multiresistant Superbugs. *ACS Infectious Diseases* **6**:1346–1365. American Chemical Society. Available from <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsinfecdis.0c00001>.
- Gregory JF. 1989. Chemical and Nutritional Aspects of Folate Research: Analytical Procedures, Methods of Folate Synthesis, Stability, and Bioavailability of Dietary Foliates. *Advances in Food and Nutrition Research* **33**:1–101. Academic Press.
- GREGORY T, Care MG-P, 1998 undefined. (n.d.). Vitamins and the skin. [go.gale.com](https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA53457696&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=0031305X&p=AONE&sw=w). Available from <https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA53457696&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=0031305X&p=AONE&sw=w>.
- GS B. 2015. Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded “Discovery Story.” *Journal of medicinal chemistry* **58**:4874–4882. *J Med Chem*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25738967/>.
- Gueimonde M, Sánchez B, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A. 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology* **4**. Frontiers Media SA. Available from </pmc/articles/PMC3714544/>.
- Guglielmetti S, Fracassetti D, Taverniti V, Del Bo’ C, Vendrame S, Klimis-Zacas D, Arioli S, Riso P, Porrini M. 2013. Differential modulation of human intestinal bifidobacterium populations after consumption of a wild blueberry (*vaccinium angustifolium*) drink.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**:8134–8140.
- Guo Y et al. 2019. Prophylactic effects of *Bifidobacterium adolescentis* on anxiety and depression-like phenotypes after chronic stress: A role of the gut microbiota-inflammation axis. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **13**. Frontiers Media S.A.
- Heatley NG. 2004. Penicillin and luck: good fortune in the development of the “miracle drug”:11. RCJT Books.
- Henne K, Rheinberg A, Melzer-Krick B, Conrads G. 2015. Aciduric microbial taxa including *Scardovia wiggisiae* and *Bifidobacterium* spp. in caries and caries free subjects. *Anaerobe* **35**:60–65. *Anaerobe*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25933689/>.
- Heuer H, Smalla K. 2007, January. Horizontal gene transfer between bacteria.
- Hill C et al. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2014 11:8 **11**:506–514. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>.
- Hugenschmidt S, Schwenninger SM, Gnehm N, Lacroix C. 2010. Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. *International Dairy Journal* **20**:852–857. Elsevier.
- Husnik F, McCutcheon JP. 2018. Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. Nature Publishing Group.
- Imperial ICVJ, Ibane JA. 2016. Addressing the Antibiotic Resistance Problem with Probiotics: Reducing the Risk of Its Double-Edged Sword Effect. *Frontiers in microbiology* **7**. *Front Microbiol*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28018315/>.
- Jabandžiev P, Papež J, Pinkasová T, Pecl J, Veverková M, Kunovský L. 2019. Postbiotics and their using in pediatric. *Pediatric pro Praxi* **20**:142–147. SOLEN s.r.o.
- Jirillo E, Jirillo F, Magrone T. 2013. Healthy Effects Exerted by Prebiotics, Probiotics, and Symbiotics with Special Reference to their Impact on the Immune System. <http://dx.doi.org/10.1024/0300-9831/a000112>. Verlag Hans Huber .
- JM M, RL B, RC A, HE B, EH F, HM P, JW S. 1952. Ilotycin, a new antibiotic. *Antibiotics & Chemotherapy (Northfield, Ill.)* **2**:281–283. Available from <http://europepmc.org/article/MED/24541924>.
- Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP. 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature reviews. Microbiology* **12**:181–196. *Nat Rev Microbiol*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24509783/>.
- Karkman A, Do TT, Walsh F, Virta MPJ. 2018, March 1. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. Elsevier Ltd.
- Karwehl S, Stadler M. 2016. Exploitation of Fungal Biodiversity for Discovery of Novel Antibiotics. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **398**:303–338. Springer, Cham. Available from [https://link.springer.com/chapter/10.1007/82\\_2016\\_496](https://link.springer.com/chapter/10.1007/82_2016_496).
- Katz L, Ashley GW. 2005. Translation and protein synthesis: macrolides. *Chemical reviews* **105**:499–527. *Chem Rev*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15700954/>.
- Kaur R, Gilbert SC, Sheehy EC, Beighton D. 2013. Salivary levels of *Bifidobacteria* in caries-free and caries-active children. *International journal of paediatric dentistry* **23**:32–38. *Int J Paediatr Dent*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22309226/>.
- Kheadr E, Dabour N, Le Lay C, Lacroix C, Fliss I. 2007. Antibiotic susceptibility profile of bifidobacteria as affected by oxgall, acid, and hydrogen peroxide stress. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**:169–174. *Antimicrob Agents Chemother*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17060530/>.
- Killer J, Mekadim C, Pechar R, Bunešová V, Mrázek J, Vlková E. 2018a. Gene encoding the CTP synthetase as an appropriate molecular tool for identification and phylogenetic study

- of the family Bifidobacteriaceae. *MicrobiologyOpen* **7**:1–11.
- Killer J, Mekadim C, Pechar R, Bunešová V, Vlková E. 2018b. The threonine-tRNA ligase gene region is applicable in classification, typing, and phylogenetic analysis of bifidobacteria. *Journal of Microbiology* **56**:713–721.
- Kim DW, Cha CJ. 2021, March 1. Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. Springer Nature.
- Kiwaki M, Sato T. 2009. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium breve* strains and genetic analysis of streptomycin resistance of probiotic *B. breve* strain Yakult. *International journal of food microbiology* **134**:211–215. *Int J Food Microbiol*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19616336/>.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. 2010, June. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks.
- Kok DE, Steegenga WT, Smid EJ, Zoetendal EG, Ulrich CM, Kampman E. 2020, January 19. Bacterial folate biosynthesis and colorectal cancer risk: more than just a gut feeling. Taylor and Francis Inc.
- Konings EJM, Roomans HHS, Dorant E, Goldbohm RA, Saris WHM, Van den Brandt PA. 2001. Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. *American Journal of Clinical Nutrition* **73**:765–776. American Society for Nutrition. Available from <https://eurekamag.com/research/003/449/003449158.php>.
- Kopečný J, Mrázek J, Killer J. 2010. The presence of bifidobacteria in social insects, fish and reptiles. *Folia Microbiologica* **55**:336–339.
- Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. 2021, February 1. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. MDPI AG.
- Krasovec M. 2021. The spontaneous mutation rate of *Drosophila pseudoobscura*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **11**. Genetics Society of America.
- Kunová G, Adrien Vidailac, Ročková Š, Rada V, Lisová I. 2012. TESTOVÁNÍ BIFIDOBACTERIÍ NA CITLIVOST VŮČI ANTIMIKROBIÁLNÍM LÁTKÁM.
- Laiño JE, Juarez del Valle M, Savoy de Giori G, LeBlanc JGJ. 2013. Development of a high folate concentration yogurt naturally bio-enriched using selected lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology* **54**:1–5. Academic Press.
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **98**:1303–1315.
- Lerminiaux NA, Cameron ADS. 2019. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology* **65**:34–44. Canadian Science Publishing.
- Li SC, Hsu WF, Chang JS, Shih CK. 2019. Combination of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* shows a stronger anti-inflammatory effect than individual strains in HT-29 cells. *Nutrients* **11**. MDPI AG.
- Lincová D, Farghali H. 2007. Základní a aplikovaná farmakologie. Galén, 2. vydání.
- Liu L, Chen X, Skogerbø G, Zhang P, Chen R, He S, Huang DW. 2012. The human microbiome: A hot spot of microbial horizontal gene transfer. *Genomics* **100**:265–270. Academic Press.
- Lobanovska M, Pilla G. 2017. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? *Yale Journal of Biology and Medicine* **90**:135–145. Yale Journal of Biology and Medicine Inc.
- López I, Otero F, Guillén R, Fernández MDC, Bou G, Gosálvez J, Fernández JL. 2021. Rapid and accurate detection of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains susceptible/resistant to cotrimoxazole through evaluation of cell elongation. *Antibiotics* **10**. MDPI AG.

- Lucock M. 2000. Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. *Molecular Genetics and Metabolism* **71**:121–138. Academic Press.
- Lugli GA et al. 2017. Comparative genomic and phylogenomic analyses of the Bifidobacteriaceae family. *BMC Genomics* **18**:1–15.
- Lugli GA et al. 2019. Unveiling genomic diversity among members of the species *Bifidobacterium pseudolongum*, a widely distributed gut commensal of the animal kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* **85**. American Society for Microbiology.
- Lugli GA, Milani C, Duranti S, Mancabelli L, Mangifesta M, Turrone F, Viappiani A, van Sinderen D, Ventura M. 2018. Tracking the taxonomy of the genus *Bifidobacterium* based on a phylogenomic approach. *Applied and Environmental Microbiology* **84**. American Society for Microbiology.
- Lukáš M, Chalupná P. 2005. Antibiotika v terapii idiopatických střevních zánětů. *Ces.Slov.Gastroent.Hepatol.* **53**:122–126. Available from <https://www.csgh.info/cs/clanek/antibiotika-v-terapii-idiopatickych-strevnich-zanetu-32>.
- Maes M. 2008. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. undefined.
- Mancino W, Lugli GA, van Sinderen D, Ventura M, Turrone F. 2019. Mobilome and resistome reconstruction from genomes belonging to members of the *Bifidobacterium* genus. *Microorganisms* **7**.
- Manning TS, Gibson GR. 2004. *Prebiotics* **18**:287–298.
- Mantziari A, Salminen S, Szajewska H, Malagón-Rojas JN. 2020, October 1. Postbiotics against pathogens commonly involved in pediatric infectious diseases. MDPI AG.
- Mantzourani M, Gilbert SC, Fenlon M, Beighton D. 2010. Non-oral bifidobacteria and the aciduric microbiota of the denture plaque biofilm. *Molecular oral microbiology* **25**:190–199. *Mol Oral Microbiol*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20536746/>.
- Mao B, Gu J, Li D, Cui S, Zhao J, Zhang H, Chen W. 2018. Effects of different doses of fructooligosaccharides (FOS) on the composition of mice fecal microbiota, especially the bifidobacterium composition. *Nutrients* **10**. MDPI AG.
- Markowiak P, Ślizewska K. 2017, September 15. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. MDPI AG.
- Martín Juan-Francisco, García-Estrada Carlos ZS. 2015. Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Volume 2. Page Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites. Available from <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2531-5>.
- Masco L, Van Hoorde K, De Brandt E, Swings J, Huys G. 2006. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans, animals and probiotic products. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**:85–94.
- Masco L, Ventura M, Zink R, Huys G, Swings J. 2004. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: Reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:1137–1143.
- Masuda M, Ide M, Utsumi H, Niuro T, Shimamura Y, Murata M. 2012. Production Potency of Folate, Vitamin B12, and Thiamine by Lactic Acid Bacteria Isolated from Japanese Pickles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **76**:2061–2067. Oxford Academic. Available from <https://academic.oup.com/bbb/article/76/11/2061/5954602>.
- Mattarelli P, Biavati B. 2018a. Species in the Genus *Bifidobacterium*. Page *The Bifidobacteria*

- and Related Organisms.
- Mattarelli P, Biavati B. 2018b. Species in the Genus.
- McInnes RS, McCallum GE, Lamberte LE, van Schaik W. 2020, February 1. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. Elsevier Ltd.
- Meile L, Ludwig W, Rueger U, Gut C, Kaufmann P, Dasen G, Wenger S, Teuber M. 1997. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a Moderately Oxygen Tolerant Species Isolated from Fermented Milk. *Systematic and Applied Microbiology* **20**:57–64. Urban & Fischer.
- Milani C et al. 2014. Genomic encyclopedia of type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:6290–6302.
- Milani C, Turroni F, Duranti S, Lugli GA, Mancabelli L, Ferrario C, Van Sinderen D, Ventura M. 2016. Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. *Applied and Environmental Microbiology* **82**:980–991. American Society for Microbiology.
- Minato Y, Dawadi S, Kordus SL, Sivanandam A, Aldrich CC, Baughn AD. 2018. Mutual potentiation drives synergy between trimethoprim and sulfamethoxazole. *Nature Communications* 2018 9:1 **9**:1–7. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/s41467-018-03447-x>.
- Mitsuoka T. 1969. Mitsuoka, T., 1969. Comparative studies on bifidobacteria isolated from the alimentary tract of man and animals (including descriptions of *Bifidobacterium thermophilum* nov. spec., and *Bifidobacterium pseudolongum* nov. spec). *Zentralbl. Bakteriolog. Orig.* 21. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig.* 210.:52–64. Available from [https://www.google.com/search?q=Mitsuoka%2C+T.%2C+1969.+Comparative+studies+on+bifidobacteria+isolated+from+the+alimentary+tract+of+man+and+animals+\(including+descriptions+of+Bifidobacterium+thermophilum+nov.+spec.%2C+and+Bifidobacterium+pseudolongum+nov.\)](https://www.google.com/search?q=Mitsuoka%2C+T.%2C+1969.+Comparative+studies+on+bifidobacteria+isolated+from+the+alimentary+tract+of+man+and+animals+(including+descriptions+of+Bifidobacterium+thermophilum+nov.+spec.%2C+and+Bifidobacterium+pseudolongum+nov.))
- Modrackova N, Stovicek A, Burtscher J, Bolechova P, Killer J, Domig KJ, Neuzil-Bunesova V. 2021. The bifidobacterial distribution in the microbiome of captive primates reflects parvorder and feed specialization of the host. *Scientific Reports* 2021 11:1 **11**:1–13. Nature Publishing Group. Available from <https://www.nature.com/articles/s41598-021-94824-y>.
- Mohr KI. 2016. History of antibiotics research. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **398**:237–272. Springer Verlag.
- Morovic W, Roper JM, Smith AB, Mukerji P, Stahl B, Rae JC, Ouwehand AC. 2017. Safety evaluation of HOWARU® Restore (*Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus paracasei* Lpc-37, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04 and *B. lactis* Bi-07) for antibiotic resistance, genomic risk factors, and acute toxicity. *Food and Chemical Toxicology* **110**:316–324. Pergamon.
- Moubareck C, Gavini F, Vaugien L, Butel MJ, Doucet-Populaire F. 2005a. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**:38–44.
- Moubareck C, Gavini F, Vaugien L, Butel MJ, Doucet-Populaire F. 2005b. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**:38–44.
- Novik G, Savich V. 2020. Beneficial microbiota. Probiotics and pharmaceutical products in functional nutrition and medicine. *Microbes and infection* **22**:8–18. *Microbes Infect.* Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31233819/>.
- O’Callaghan A, van Sinderen D. 2016. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Frontiers in Microbiology* **7**:925. Frontiers Media S.A.
- Olivares J, Bernardini A, Garcia-Leon G, Corona F, Sanchez MB, Martinez JL. 2013. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. Frontiers Research Foundation.
- Oliveira PH, Touchon M, Cury J, Rocha EPC. 2017. The chromosomal organization of horizontal gene transfer in bacteria. *Nature Communications* **8**. Nature Publishing Group.
- Ouwehand AC, Forssten S, Hibberd AA, Lyra A, Stahl B. 2016. Probiotic approach to prevent

- antibiotic resistance. <https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1161232> **48**:246–255. Taylor & Francis. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07853890.2016.1161232>.
- Palframan RJ, Gibson GR, Rastall RA. 2003. Carbohydrate preferences of Bifidobacterium species isolated from the human gut. *Current Issues in Intestinal Microbiology*.
- Pan L, Guo H, Li L, Zhang W, Chen Y, Menghe B. 2020. Antibiotic Resistance in Bifidobacterium Isolates. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology* **20**:218–227. Chinese Institute of Food Science and Technology.
- Pape T, Wintermeyer W, Rodnina M V. 2000. Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nature structural biology* **7**:104–107. *Nat Struct Biol*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10655610/>.
- Park JT, Uehara T. 2008. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* **72**:211–227. *Microbiol Mol Biol Rev*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18535144/>.
- Patterson S, Wyllie S. 2014. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends in parasitology* **30**:289–298. *Trends Parasitol*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24776300/>.
- Paveljšek D, Ivičak-Kocjan K, Treven P, Benčina M, Jerala R, Rogelj I. 2021. Distinctive probiotic features share common TLR2-dependent signalling in intestinal epithelial cells. *Cellular Microbiology* **23**. Blackwell Publishing Ltd.
- Perry JA, Westman EL, Wright GD. 2014. The antibiotic resistome: what's new? *Current opinion in microbiology* **21**:45–50. *Curr Opin Microbiol*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25280222/>.
- Picard C, Fioramonti J, Francois A, Obinson TR, Eant FN, Tucha CMA, Vitapole D, Recherche C De, Carasso D. 2005. Review article : bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits:495–512.
- Pokusaeva K et al. 2017. GABA-producing Bifidobacterium dentium modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterology and Motility* **29**. Blackwell Publishing Ltd.
- Pokusaeva K, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes and Nutrition* **6**:285–306.
- Porter K, Hoey L, Hughes CF, Ward M, McNulty H. 2016. Causes, Consequences and Public Health Implications of Low B-Vitamin Status in Ageing. *Nutrients* **8**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). Available from </pmc/articles/PMC5133110/> (accessed February 5, 2022).
- Reid G, Gadir AA, Dhir R. 2019. Probiotics: Reiterating what they are and what they are not. *Frontiers Media S.A.*
- REUTER G. 1963. VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN UEBER DIE BIFIDUS-FLORA IM SAEUGLINGS- UND ERWACHSENENSTUHL. ZUGLEICH EIN BEITRAG ZUR SYSTEMATISIERUNG UND NOMENKLATUR DER BIFIDUS-KEIME. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*. 1. Abt. Medizinisch-hygienische Bakteriologie, Virusforschung und Parasitologie. Originale.
- Rios-Covian D, Gueimonde M, Flint HJ. 2015. Enhanced butyrate formation by cross-feeding between. *FEMS Microbiology Letters Advance*.
- Rosaria MD, Modesto M, Biavati B. 2006. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. Available from [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro) (accessed December 27, 2021).
- Rosselló-Mora R, Amann R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology*



- reviews **25**:39–67. FEMS Microbiol Rev. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11152940/>.
- Rossi M, Raimondi S, ... LC-I biotechnology, 2016 undefined. (n.d.). Folate: Relevance of chemical and microbial production. [books.google.com](https://books.google.com/books?hl=cs&lr=&id=FUq7CwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA103&ots=C0oG889Sdx&sig=pU_s6dLWWa_yhD1F3OQB1ODEOM). Available from [https://books.google.com/books?hl=cs&lr=&id=FUq7CwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA103&ots=C0oG889Sdx&sig=pU\\_s6dLWWa\\_yhD1F3OQB1ODEOM](https://books.google.com/books?hl=cs&lr=&id=FUq7CwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA103&ots=C0oG889Sdx&sig=pU_s6dLWWa_yhD1F3OQB1ODEOM).
- Rozman V, Mohar Lorbeg P, Accetto T, Bogovič Matijašić B. 2020. Characterization of antimicrobial resistance in lactobacilli and bifidobacteria used as probiotics or starter cultures based on integration of phenotypic and in silico data. *International Journal of Food Microbiology* **314**:108388. Elsevier B.V. Available from <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108388>.
- Ruiz-Moyano S, Tao N, Underwood MA, Mills DA. 2012. Rapid discrimination of *Bifidobacterium animalis* subspecies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Food Microbiology* **30**:432–437.
- Ruiz L, Delgado S, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Sánchez B. 2016. Proteinaceous molecules mediating *Bifidobacterium*-host interactions. *Frontiers in Microbiology* **7**:1193. Frontiers Media S.A.
- Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* **149**:88–105.
- Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM, Bressollier P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field.
- Sabri NA, Schmitt H, Van Der Zaan B, Gerritsen HW, Zuidema T, Rijnaarts HHM, Langenhoff AAM. 2020. Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **8**:102245. Elsevier.
- Safavi M, Farajian S, Kelishadi R, Mirlohi M, Hashemipour M. 2013. The effects of synbiotic supplementation on some cardio-metabolic risk factors in overweight and obese children: A randomized triple-masked controlled trial. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **64**:687–693.
- Scardovi V, Crociani F. 1974. *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *International Journal of Systematic Bacteriology* **24**:6–20.
- Scardovi V, Trovattelli LD. 1974. *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka) comb. nov. and the “minimum” and “subtile” groups of new bifidobacteria found in sewage. *International Journal of Systematic Bacteriology* **24**:21–28. Microbiology Society. Available from <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-24-1-21>.
- SCARDOVI V, TROVATELLI LD, ZANI G, CROCIANI F, MATTEUZZI D. 1971. Deoxyribonucleic Acid Homology Relationships Among Species of the Genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **21**:276–294. Microbiology Society. Available from <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-21-4-276>.
- Schatz A, Waksman SA. 2016. Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and Related Organisms. \*, †: <https://doi.org/10.3181/00379727-57-14769> **57**:244–248. SAGE Publications Sage UK: London, England. Available from <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-57-14769>.
- Sharma M, Wasan A, Sharma RK. 2021, June 1. Recent developments in probiotics: An emphasis on *Bifidobacterium*. Elsevier Ltd.

- Smith AD, Refsum H. 2016. Homocysteine, B Vitamins, and Cognitive Impairment. Annual review of nutrition **36**:211–239. Annu Rev Nutr. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27431367/>.
- Sugahara H, Odamaki T, Hashikura N, Abe F, Xiao JZ. 2015. Differences in folate production by bifidobacteria of different origins. Bioscience of Microbiota, Food and Health **34**:87. IPEC, Inc. Available from [/pmc/articles/PMC4654071/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27431367/).
- Sullivan GJ, Delgado NN, Maharjan R, Cain AK. 2020, October 1. How antibiotics work together: molecular mechanisms behind combination therapy. Elsevier Ltd.
- Sultan I, Rahman S, Jan AT, Siddiqui MT, Mondal AH, Haq QMR. 2018. Antibiotics, resistance and resistance mechanisms: A bacterial perspective. Frontiers in Microbiology **9**:2066. Frontiers Media S.A.
- Swanson KS et al. 2020, November 1. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. Nature Research.
- Sybesma W, Starrenburg M, Kleerebezem M, Mierau I, De Vos WM, Hugenholtz J. 2003. Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. Applied and environmental microbiology **69**:3069–3076. Appl Environ Microbiol. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12788700/>.
- Tannock GW. 1999. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. Current issues in molecular biology **1**:53–64.
- Thomas C, Gwenin CD. 2021, May 1. The role of nitroreductases in resistance to nitroimidazoles. MDPI AG.
- Thomas CM, Nielsen KM. 2005, September. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria.
- Tremblay A, Lingrand L, Maillard M, Feuz B, Tompkins TA. 2021, March 8. The effects of psychobiotics on the microbiota-gut-brain axis in early-life stress and neuropsychiatric disorders. Elsevier Inc.
- Tripathi MK, Giri SK. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage.
- Turroni F et al. 2009. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. Applied and Environmental Microbiology **75**:1534–1545.
- Turroni F, van Sinderen D, Ventura M. 2011. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. International Journal of Food Microbiology **149**:37–44.
- Uusitupa HM, Rasinkangas P, Lehtinen MJ, Mäkelä SM, Airaksinen K, Anglenius H, Ouwehand AC, Maukonen J. 2020. *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* 420 for metabolic health: Review of the research. Nutrients **12**. MDPI AG.
- Vázquez-Laslop N, Mankin AS. 2018, September 1. How Macrolide Antibiotics Work. Elsevier Ltd.
- Ventura M, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology **86**:205–223.
- Vernikos G, Medini D, Riley DR, Tettelin H. 2015. Ten years of pan-genome analyses. Current Opinion in Microbiology **23**:148–154. Elsevier Current Trends.
- Vitali B, Turroni S, Dal Piaz F, Candela M, Wasinger V, Brigidi P. 2007. Genetic and proteomic characterization of rifaximin resistance in *Bifidobacterium infantis* BI07. Research in Microbiology **158**:355–362. Elsevier Masson.
- Vlková E, Rada V, Šmehilová M, Killer J. 2008. Auto-aggregation and Co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. Folia Microbiologica **53**:263–269.
- Von Wintersdorff CJH, Penders J, Van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, Van Alphen LB, Savelkoul PHM, Wolfs PFG. 2016. Dissemination of antimicrobial resistance in

- microbial ecosystems through horizontal gene transfer.
- Waksman SA. 2018. What is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? <https://doi.org/10.1080/00275514.1947.12017635> **39**:565–569. Taylor & Francis. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00275514.1947.12017635>.
- Walsh TR. 2010. Emerging carbapenemases: a global perspective. *International journal of antimicrobial agents* **36 Suppl 3**:S8. *Int J Antimicrob Agents*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21129630/>.
- Wang C, Hu R, Strong PJ, Zhuang W, Huang W, Luo Z, Yan Q, He Z, Shu L. 2021. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens along the soil–mangrove root continuum. *Journal of Hazardous Materials* **408**.
- Watson BNJ, Staals RHJ, Fineran PC. 2018. CRISPR-cas-mediated phage resistance enhances horizontal gene transfer by transduction. *mBio* **9**. American Society for Microbiology.
- Wegh CAM, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. 2019, October 1. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. MDPI AG.
- Wenzel M. 2020, September 1. Do we really understand how antibiotics work? Future Medicine Ltd.
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* **3**:163–175.
- Wright GD. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature reviews. Microbiology* **5**:175–186. *Nat Rev Microbiol*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17277795/>.
- Wright GD. 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current opinion in microbiology* **13**:589–594. *Curr Opin Microbiol*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20850375/>.
- Xiao JZ, Takahashi S, Odamaki T, Yaeshima T, Iwatsuki K. 2010. Antibiotic susceptibility of bifidobacterial strains distributed in the Japanese market. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **74**:336–342. *Biosci Biotechnol Biochem*. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20139616/>.
- Yaeshima T, Fujisawa T, Mitsuoka T. 1992. *Bifidobacterium globosum*, Subjective Synonym of *Bifidobacterium pseudolongum*, and Description of *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *pseudolongum* comb. nov. and *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* comb. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **15**:380–385.
- Yazid AM, Ali AM, Shuhaimi M, Kalaivaani V, Rokiah MY, Reezal A. 2000. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Letters in Applied Microbiology* **31**:57–62. Blackwell Publishing Ltd.
- Zheng H, Perreau J, Elijah Powell J, Han B, Zhang Z, Kwong WK, Tringe SG, Moran NA. 2019. Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**:25909–25916. National Academy of Sciences.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

GIT – Gastrointestinální trakt

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

G + C – Guanin + Cytosin

rRNA – Ribosomální ribonukleová kyselina

tRNA – Transferová ribonukleová kyselina

mRNA – Mediátorová ribonukleová kyselina

COG – Shluky ortologních genů

ATP – Adenosin trifosfát

F6PPK – Fruktosa-6-fosfát fostoketoláza

SCFAs – Short chain fatty acids

GABA (Gama-aminobutyric acid) – Kyselina gama-aminomáselná

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HBR – Lidské rezidenční bifidobakterie

Non-HBR – Nehumánní rezidenční bifidobakterie

CLA (Conjugated Linolic Acid) – Konjugovaná kyselina linolová

PUFA (Poly Unsaturated Fatty Acids) - Polynenasycené mastné kyseliny

HMOs (Human Milk Oligosaccharides) – Oligosacharidy mateřského mléka

CNS – Centrální nervová soustava

FMN – Flavinmononukleotid

FAD – Flavinadenindinukleotid

NADH – Nikotinamidadenindinukleotid

MIC – Minimální inhibiční koncentrace

PCR – Polymerázová řetězová reakce

AR – Antimikrobiální rezistence

AGR – Geny antimikrobiální rezistence

HGT – Horizontální přenos genů

EFSA – European Food Safety Authority

ATB – Antibiotika

MALDI-TOF MS – Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem

## 10 Samostatné přílohy

### Příloha č. 1 Souhrnné výsledky ze screeningové části

Název ATB	Muf 1 6	Pes N.O.	P2N1	ZDK 8	ZDK 7	ZDK 5 10	ZDK 1 8	ZDM8 12	N73	N45	N30
	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>
Amikacin AK (30 µg)	12	12	R	10	R	R	R	R	10	9P	R
Framycetin FY (100 µg)	12	15	13	13	12	15	10	12	12P	12	12
Gentamicin CN (30 µg)	10	12	R	9	10	R	R	8	R	10	R
Gentamicin CN (30 µg)	27	14	10	11	12	10	10	12	10	10	12
Kanamycin K (5 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Kanamycin K (30 µg)	R	10	R	R	10	7	R	R	11P	R	11P
Mupirocin MUP (200 µg)	22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Neomycin N (10 µg)	10P	8	R	10	R	7	R	R	R	9	10
Netilmicin NET (10 µg)	24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rifampicin RD (5 µg)	21	30	25	20	20	20	12	18	17	20	20
Streptomycin S (10 µg)	8	10	R	9	R	R	R	8	R	9	11
Streptomycin S (300 µg)	28	21P	15	16	19	19	20	13	16	16	16
Tobramycin TOB (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Fluconazol FCA (25 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Amoxycilin AML (25 µg)	22	24	15	27	19	29	22	14	15	27	16
Amoxycilin + Clavulanic acid AMC (30 µg)	28	25	15	29	28	24	20	14	19	18	20
Ampicilin AMP (2 µg)	21	13P	14	20	22	11P	21	15P	18	14	16
Ampicilin AMP (10 µg)	23	26	20	25	21	21	22	12	R	26	15
Ampicilin + Sulbactam SAM (20µg)	21	26	12	16P	20P	17	20	14	15P	20P	16
Aztreonam ATM (30 µg)	26	R	R	R	R	21	R	R	R	R	R
Doripenem DOR (10 µg)	32	26	20	23	22	25	25	23	20	22	12
Mecillinam MEL (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Nafcilin NF (1 µg)	15	12	13	11	10	12	12	19	10	20	15

Oxacilin OX (1 µg)	11	15	12	12	R	R	R	8	15	10	14
Penicilin G - P (10 IU)	21	23	22	20	21	19	20	20	39	26	19
Piperacilin PRL (30 µg)	21	R	18	21	22	27	R	13	20	20	14
Piperacilin/Tazobactam (36µg) TZP	26	21P	15	22	25	25	26	24	20	22	16
Ticarcillin TIC (75 µg)	26	24	20	22	25	25	20	16	10	25	15
Cefaclor CEC (30 µg)	28	24	20	37	20P	21	9	24P	12	12	10
Cefadroxil CFR (30 µg)	19	23	R	18	R	15	20	12	R	25	14P
Cefepim FEP (30 µg)	26	29	30	28	28	11P	25	25	24	24	24
Cefixim CFM (5 µg)	12	8	8	10	R	R	R	8	10	14	10
Cefoperazon CFP (75 µg)	23	25P	10	21	20	20	22	14	20	22	16
Cefovecin CVN (30 µg)	25	25	20	23	23	24	22	20	20	25	18
Cefoxitin FOX (30 µg)	26	27	30	25P	24	R	R	24	10	12	12
Cefpodoxim CPD (10 µg)	22	17P	16	18	22	20	R	25	18	16	14
Ceftarolin CPT (5 µg)	34	33	20	23	28	26	24	24	22	22	20
Ceftazidim CAZ (10 µg)	19	21	12	20	20	23	24	26	20	16	20
Ceftibuten CFT (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftriaxon CRO (30 µg)	30	28	30	25	21	20	20	18	20	24	22
Cefuroxim CXM (30 µg)	20	28	25	24	20	20	20	24	19	24	22
Cefalexin CL (30 µg)	25P	11P	R	21P	17P	21	17P	15P	R	R	18
Cefazolin KZ (30 µg)	30	12P	14	20P	19P	17P	22P	17P	R	12	12
Spectinomycin SH (25 µg)	R	11	10	8	10	R	R	R	R	9	R
Fosfomycin FOS (50 µg)	18	14	10	10	11	12	14	12	10	13	9
Vancomycin VA (5 µg)	16	17	20P	16	17	15	17	18	16	16	16
Ciprofloxacin CIP (5 µg)	10	11	R	9	12	10	R	R	R	13	13
Enrofloxacin ENR (5 µg)	12	11	R	11	10	R	R	8	10P	10	15
Flumequin UB (30 µg)	9	R	R	12	7	R	R	R	R	9	R
Levofloxacin LEV (5 µg)	30	11	14	R	R	11	R	12	R	10	10
Moxifloxacin MXF (5 µg)	31	12	R	13	12	10	10P	R	10	10	R
Nalidixic acid NA (30 µg)	10	R	R	R	9	R	R	R	R	9	10P

Norfloxacin NOR (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	11P	R	11P
Ofloxacin OFX (5 µg)	8	9	R	10	8	R	R	R	10P	10	10
Oxolinic acid OA (2 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ertapenem ETP (10 µg)	31	21	15	14	21	23	28	21P	12	16	18
Meropenem MEM (10 µg)	33	22	18P	12	20P	29	25	28	15	14	16
Azitromycin AZM (15 µg)	20	R	R	20	16	19	20	18	19	22	16
Clindamycin DA (2 µg)	24	R	R	28	20	26	24	20	20	26	25
Clindamycin DA (2 µg)	23	R	R	22	21P	20P	24	21P	R	20	22
Erythromycin E (15 µg)	25	10	R	24	21	16P	24	26	25	24	19
Lincomycin MY (10 µg)	22	R	R	24	20	21	22	20	22	25	20
Oleandomycin OL (15 µg)	22	15	R	23	20	15P	20	23	26	22	20
Spiramycin SP (100 µg)	21	9	8	21	20	20	22	20	23	21	22
Metronidazol MTZ (5 µg)	9	10	8	7P	10	8	10	R	10	10	10
Metronidazol MTZ (50 µg)	21P	28	15	20	14	25	20	22	R	25	15P
Nitrofuratoin F (100 µg)	24	18	R	20	24	17	21	21	14	18	18
Chloramfenikol C (30 µg)	27	27	18	26	22	25	24	22	21	23	20
Linezolid LZD (10 µg)	15P	25	20	16P	18	21	18	20	20	17P	20
Bacitracin B (10 IU)	21	22	18	18	18	20	18	18	20	30	20
Colistin CT (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	10
Polymyxin B, PB (300 IE)	R	R	R	R	10	R	R	R	14	9	13P
Sulphamethoxazol + Trimethoprim SXT (25 µg)	15P	30	15	16P	R	R	R	R	25	20	18P
Trimethoprim W (5 µg)	20P	29	12P	27	R	R	R	R	12P	22P	19P
Doxycyclin DO (30 µg)	19	27	15P	23	21	20	20	16	15	18	15
Minocyclin MH (30 µg)	35	25	15P	24	20	21	20	21	20	20	20
Oxytetracyclin OT (30 µg)	20	26	15	19	20	17	20	20	19	23	20
Tetracyclin TE (30 µg)	22	26	20	21	19	17	18	18	17	20	16

Název ATB	D16	D41	Danone	Nestlé	M44	10 140	DSM 26074	DSM 20104	N63	N101	20 087
	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. adoles.</i>	<i>B. adoles.</i>	<i>B. adoles.</i>
Amikacin AK (30 µg)	R	R	9	R	8	14	10	R	13	10	12
Framycetin FY (100 µg)	10	20	14	10	12	14	15	R	18	19	13
Gentamicin CN (30 µg)	R	R	10	8	10	R	R	R	14	12	14
Gentamicin CN (30 µg)	10	9	R	15	15	13	14	15	14	16	15
Kanamycin K (5 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	10	R
Kanamycin K (30 µg)	R	R	11	R	12	12	R	R	12	8	R
Mupirocin MUP (200 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Neomycin N (10 µg)	R	R	8	R	12	10	R	R	11	11	R
Netilmicin NET (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	10	10	R
Rifampicin RD (5 µg)	12	20	18	20	18	20	R	16	26	30	25
Streptomycin S (10 µg)	R	R	9	8	10	11	R	R	12	10	10
Streptomycin S (300 µg)	17	17	16	15	19	18	16	15	20	20	17
Tobramycin TOB (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	10	R	R	R
Fluconazol FCA (25 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Amoxycilin AML (25 µg)	22	26	27	20	26	29	16	22	28	34	25
Amoxycilin + Clavulanic acid AMC (30 µg)	20	19	21	22	22	26	10	20	30	34	23
Ampicilin AMP (2 µg)	25	22	20P	30	28	17	17	15	26	30	20
Ampicilin AMP (10 µg)	20	20	24	14	24	25	15	20	30	30	24
Ampicilin + Sulbactam SAM (20µg)	18	16P	21	18	20	27	20	19	29	31	18
Aztreonam ATM (30 µg)	R	R	11P	15	R	R	R	R	10	12	R
Doripenem DOR (10 µg)	30	20	21	26	22	22	20	24	30	28	24
Mecillinam MEL (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	20	20	15
Nafcilin NF (1 µg)	14	11	16	16	16	15	10	10	24	17	17
Oxacilin OX (1 µg)	12	R	17	10	12	10	R	R	20	19	R
Penicilin G, P (10 IU)	20	20	25	8	20	24	25	26	32	29	28
Piperacilin PRL (30 µg)	25	23	R	20	24	30	25	23	34	32	26



Piperacilin + Tazobactam (36µg) TZP	24	26	R	21	25	25	27	24	30	34	24
Ticarcillin TIC (75 µg)	20	25	30	12	30	27	25	27	32	29	30
Cefaclor CEC (30 µg)	23	26	20P	26	25P	30	15	26	24	30	22
Cefadroxil CFR (30 µg)	22	15	23P	R	12	25P	R	13	29	27	15
Cefepim CEP (30 µg)	23	17	25	25	20P	25	20	15	30	44	28
Cefixim CFM (5 µg)	R	R	9	8	8	R	R	R	28	24	21
Cefoperazon CFP (75 µg)	22	20	23P	12	12	29	15	24	35	33	27
Cefovecin CVN (30 µg)	24	20	25	18	26	23	20	20	32	29	30
Cefoxitin FOX (30 µg)	R	R	16P	14	R	23	20	20	26	18	24
Cefpodoxim CDP (10 µg)	21	24	20	17	29	20	25	15	26	30	30
Ceftarolin CPT (5 µg)	21	26	22	22	22P	26	30	16	30	30	30
Ceftazidim CAZ (10 µg)	21	25	22	27	21	18	20	15	24	28	20
Ceftibuten CFT (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	14	14	9
Ceftriaxon CRO (30 µg)	24	29	26	18	24	21	20	18	29	37	20
Cefuroxim CXM (30 µg)	20	21	29	20	24	24	19	19	34	31	30
Cefalexin CL (30 µg)	19	10P	19P	25	22	25	17	13	28	28	19
Cefazolin KZ (30 µg)	20	R	18	22	17P	19	30	11	24	24	26
Spectinomycin SH (25 µg)	R	9	R	R	10	14	10	11	15	16	14
Fosfomycin FOS (50 µg)	14	14	18	12	20	12	10	10	15	16	13
Vancomycin VA (5 µg)	16	11	16	19	18	16	20	15	16	20	17
Ciprofloxacin CIP (5 µg)	R	12	10P	10	10	11	R	10	22	18	10
Enrofloxacin ENR (5 µg)	R	10	9	12	10	11	10	R	24	20	17
Flumequin UB (30 µg)	R	R	9	R	R	R	R	R	18	R	R
Levofloxacin LEV (5 µg)	R	R	11P	12	R	10	14	10	14	20	15
Moxifloxacin MXF (5 µg)	10	R	10P	11	12	10	15	R	18	20	14
Nalidixic acid NA (30 µg)	R	10	10P	R	R	R	R	R	R	R	R
Norfloxacilin NOR (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	16	15	R
Ofloxacin OFX (5 µg)	R	R	R	8	8	R	10	R	16	17	R

Oxolinic acid OA (2 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	8	11	R
Ertapenem ETP (10 µg)	21	24	16	28	28	25	20	21	30	30	20
Meropenem MEM (10 µg)	28	28	22	27	21	26	25	24	30	30	26
Azitromycin AZM (15 µg)	16	20	21	18	20	24	19	19	29	24	21
Clindamycin DA (2 µg)	20	24	26	22	24	27	R	10	32	30	14
Clindamycin DA (2 µg)	20P	25	20P	30	28P	25	17	10	26	28	16
Erythromycin E (15 µg)	20	20	25	20	26	29	28	20	34	34	27
Lincomycin MY (10 µg)	20	20	24	20	28	27	16	16	30	30	20
Oleandomycin OL (15 µg)	18	19	24	20	25	29	20	20	29	32	22
Spiramycin SP (100 µg)	18	20	23	20	24	28	21	21	30	30	24
Metronidazol MTZ (5 µg)	R	12	10	R	8	10	10	R	R	R	R
Metronidazol MTZ (50 µg)	20	25	20	18	18	20	20	R	20	18	R
Nitrofuratoin F (100 µg)	21	10	19P	30	25	22	22	22	26	24	25
Chloramfenikol C (30 µg)	24	23	26	24	28	26	25	21	35	30	24
Linezolid LZD (10 µg)	24	21	28	22	22	26	25	15	29	30	22
Bacitracin B (10 IU)	16	19	18	18	16	20	19	20	25	30	20
Colistin CT (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	9	R	R
Polymyxin B, PB (300 IE)	R	R	R	R	R	R	R	12	12	10	R
Sulphamethoxazol + Trimethoprim SXT (25 µg)	R	20P	25P	R	R	15	20	10	R	13P	22
Trimethoprim W (5 µg)	R	18P	19	8	R	13	R	R	R	R	10
Trimethoprim + Sulphamethoxazol (25 µg) STX	R	R	R	20	R	R	15	R	R	R	R
Doxycyclin DO (30 µg)	18	20	22	20	20	24	20	23	30	35	21
Minocyklin MH (30 µg)	24	21	12	23	25	22	29	25	32	34	16
Oxytetracyclin OT (30 µg)	20	20	24	22	22	26	21	21	32	35	20
Tetracyclin TE (30 µg)	16	16	19	18	18	20	24	20	30	36	19

Název ATB	T19	GLO	W1	4/3b	3/3c	4/3c	P9	20 099
	<i>B. globos.</i>	<i>B. globos.</i>	<i>B. pseudol.</i>	<i>B. pseudol.</i>	<i>B. pseudol.</i>	<i>B. pseudol.</i>	<i>B. pseudol.</i>	<i>B. pseudol.</i>
Amikacin AK (30 µg)	10	R	10	10	13	15	13	R
Framycetin FY (100 µg)	13	14	14	14	18	14	15	15
Gentamicin CN (30 µg)	10	11	R	15	13	20	15	R
Gentamicin CN (30 µg)	18	10P	10	15	15	25	16	11
Kanamycin K (5 µg)	R	10	R	R	R	R	R	R
Kanamycin K (30 µg)	R	R	10	10	12	9	R	R
Mupirocin MUP (200 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Neomycin N (10 µg)	10	R	14	14	13	12	12	R
Netilmicin NET (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Rifampicin RD (5 µg)	28	25	30	25	25	24	27	24
Streptomycin S (10 µg)	10	R	R	19	10	14	9	R
Streptomycin S (300 µg)	15	16	16	19	16	20	18	14
Tobramycin TOB (10 µg)	R	R	R	16	R	15	R	R
Fluconazol FCA (25 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Amoxycilin AML (25 µg)	19	22	20	15	19	19	25	15
Amoxycilin + Clavulanic acid AMC (30 µg)	14	25	20	15	15	15	20	20
Ampicilin AMP (2 µg)	15	16	12	14	13	16	16	10
Ampicilin AMP (10 µg)	16	20	19	15	13	19	20	16
Ampicilin + Sulbactam SAM (20 µg)	16	25	16	18	14	20	15	15
Aztreonam ATM (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Doripenem DOR (10 µg)	22	20	15	15	25	20	26	26
Mecillinam MEL (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Nafcilin NF (1 µg)	9	R	R	R	9	10	11	14
Oxacilin OX (1 µg)	R	R	R	R	R	R	10	R
Penicilin G, P (10 IU)	20	21	19	17	18	20	21	20
Piperacilin PRL (30 µg)	24	22	19	19	20	20	22	20

Piperacilin + Tazobactam TZP (36 µg)	15	24	20	20	17	20	24	24
Ticarcillin TIC (75 µg)	23	23	25	17	20	20	25	17
Cefaclor CEC (30 µg)	13	16	15	10	10	19	23	21
Cefadroxil CFR (30 µg)	R	17	R	R	R	15	18	19
Cefepim FEP (30 µg)	25	15	18	20	20	15	29	23
Cefixim CFM (5 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefoperazon CFP (75 µg)	20	25	15	15	26	15	21	14
Cefovecin CVN (30 µg)	20	20	14	19	25	15	22	25
Cefoxitin FOX (30 µg)	23	19	20	20	18	15	22	20
Cefpodoxim CPD (10 µg)	19	11	15	18	20	21	20	18
Ceftarolin CPT (5 µg)	19	20	16	R	14	20	30	25
Ceftazidim CAZ (10 µg)	14	10	12	10	15	20	20	15
Ceftibuten CFT (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftriaxon CRO (30 µg)	30	14	R	R	15	16	20	25
Cefuroxim CXM (30 µg)	21	15	14	18	24	20	21	22
Cefalexin CL (30 µg)	19	10P	15	20	20	23	20	20
Cefazolin KZ (30 µg)	15	R	15	14	20	20	16	14P
Spectinomycin SH (25 µg)	8	10	8	7	R	10	7	R
Fosfomycin FOS (50 µg)	10	10	12	10	10	20	10	14
Vancomycin VA (5 µg)	14	15	19	15	13	16	9	14
Ciprofloxacin CIP (5 µg)	10	15	10	15	10	20	14	12
Enrofloxacin ENR (5 µg)	10	12	12	12	R	16	12	R
Flumequin UB (30 µg)	R	R	R	R	R	19	10	R
Levofloxacin LEV (5 µg)	17	12	14	15	18	19	12	R
Moxifloxacin MXF (5 µg)	15	10	12	15	25	15	11	10
Nalidixic acid NA (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Norfloxacin NOR (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Ofloxacin OFX (5 µg)	12	R	8	12	12	10	R	R
Oxolinic acid OA (2 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R

Ertapenem ETP (10 µg)	16	17	15	15	22	25	20	25
Meropenem MEM (10 µg)	22	20	20	21	25	28	26	25
Azitromycin AZM (15 µg)	21	25	19	20	20	24	22	18
Clindamycin DA (2 µg)	10	13	R	11	10	16	R	26
Clindamycin DA (2 µg)	15	12	10	15	14	20	R	20P
Erythromycin E (15 µg)	20	25	25	20	20	29	26	28
Lincomycin MY (10 µg)	15	19	15	10	14	16	14	23
Oleandomycin OL (15 µg)	24	22	20	19	18	21	19	22
Spiramycin SP (100 µg)	24	24	20	22	19	25	23	20
Metronidazol MTZ (5 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Metronidazol MTZ (50 µg)	R	16	R	R	R	R	R	R
Nitrofuratoin F (100 µg)	25	25	20	19	25	20	19	R
Chloramfenikol C (30 µg)	20	29	26	24	20	30	25	30
Linezolid LZD (10 µg)	20	25	25	19	20	29	24	25
Bacitracin B (10 IU)	16	25	25	20	20	20	24	20
Colistin CT (10 µg)	R	15	R	R	R	R	R	R
Polymyxin B, PB (300 IE)	R	R	R	R	R	R	10	R
Sulphamethoxazol + Trimethoprim SXT (25 µg)	16	20	19	15	15	15	R	R
Trimethoprim W (5 µg)	14	R	15	15	12	14	R	R
Trimethoprim + Sulphamethoxazol SXT (25 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Doxycyklin DO (30 µg)	11	20	12	25	14	26	27	28
Minocyklin MH (30 µg)	16	20	15	20	18	14	28	25
Oxytetracyklin OT (30 µg)	12	20	10	25	14	25	25	26
Tetracyklin TE (30 µg)	11	19	10	21	13	25	25	25

Zelená – rezistence, žlutá – pseudozóna, modrá – mutace

## Příloha č. 2 Souhrnné výsledky z testování s kyslinou listovou

Název antibiotika	Nestlé <i>B. lactis</i>			ZDK 7 <i>B. lactis</i>			D16 <i>B. lactis</i>			N30 <i>B. lactis</i>		
	původní	nově	FA	původní	nově	FA	původní	nově	FA	původní	nově	FA
Tetracyklin (30 µg)	18	11	24	19	15	28	16	15	25	16	15	23
Chloramfenikol (30 µg)	24	22	32	22	22	30	24	22	29	20	23	31
Ampicilin (2 µg)	14 a 30	20	17	21	10	18,25	20 a 25	22	22	15 a 16	15	17,30
Vankomycin (5 µg)	19	16	25	17	19	29	16	17	26	16	16	30
Erytromycin (15 µg)	20	25	16,27	21	21	34	20	21	26	19	22	30
Clindamycin (2 µg)	22 a 30	21	22	20 a 21	18	28	20	20	27	25	22	27
Gentamicin (30 µg)	8 a 15	12	19	10	R	9,17	R	R	9,13	R	R	9,20
Streptomycin (10 µg)	8	8	16	R	R	17	R	R	12	11	R	15
Kanamycin (30 µg)	R	R	11	10	R	14	R	R	11	11	R	11
Mupirocin (200 µg)	R	R	11	R	R	11	R	R	12	R	R	12
Norfloxacin (10 µg)	R	R	13	R	R	9	R	R	13	11	R	15
Nalidic acid (30 µg)	R	R	15	9	R	9	R	R	13	10	R	14
Moxifloxacin (5 µg)	11	8	12	12	8	11,16	10	R	11	R	10	12
Cefixime (5 µg)	8	8	14	R	9	13	R	R	15	10	R	16
Mecillinam (10 µg)	R	10	13	R	R	16	R	R	17	R	7	16
Sulphamethoxazol + Trimethoprim (25 µg)	R	R	13	R	R	12	R	R	14	18 a R	R	14
Trimethoprim (5 µg)	8	R	11	R	R	11	R	R	12	19	R	12
Metronidazol (50 µg)	18	15	31	14	10	35	20	18	25,33	15	13	33

Název antibiotika	20104 <i>B. animalis</i>			10140 <i>B. lactis</i>			N63 <i>B. adolescentis</i>			20087 <i>B. adolescentis</i>		
	původní	nově	FA	původní	nově	FA	původní	nově	FA	původní	nově	FA
Tetracyklin (30 µg)	20	23	19,29	20	25	17,31	30	28	19,31	19	14	15,25
Chloramfenikol (30 µg)	21	22	25,28	26	30	21,33	35	27	20,30,34	24	30	30,39
Ampicilin (2 µg)	20 a 15	20	10	25 a 17	19	15	30 a 26	26	17,35	24 a 20	26	15,33
Vankomycin (5 µg)	15	16	25	16	25	27	16	20	12,14,18	17	23	17,26
Erytromycin (15 µg)	20	23	18,30	29	30	19,33	34	31	11,26,34	27	30	14,23,34
Clindamycin (2 µg)	10	14	27	27 a 25	22	27	32 a 26	27	19,25	14 a 16	19	15,25
Gentamicin (30 µg)	R	R	10,23	R	13	11	14	14	10	14	12	13
Streptomycin (10 µg)	R	R	15	11	11	16	12	11	10	10	10	11
Kanamycin (30 µg)	R	R	11	12	13	12	12	12	9	R	13	9
Mupirocin (200 µg)	R	R	14	R	7	13	R	8	10	R	10	10
Norfloxacin (10 µg)	R	R	12	R	R	10	16	8	9	R	13	9
Nalidic acid (30 µg)	R	R	14	R	R	11	R	9	8	R	R	8
Moxifloxacin (5 µg)	R	10	13	10	9	16	18	19	10,16,21	14	20,29	11,16,23
Cefixime (5 µg)	R	11	11	R	8	15	28	25	20,31	21	34	15,24
Mecillinam (10 µg)	R	R	12	R	R	11	20	22	14,20,30	15	15,25	12,17
Sulphamethoxazol + Trimethoprim (25 µg)	10 a R	R	13	15 a R	12	11	R	20	12	22 a R	15	13,26
Trimethoprim (5 µg)	R	R	14	13	R	10	R	15	11	10	10	12
Metronidazol (50 µg)	R	19	25,31	20	29	16,30	20	24	12,22	R	24	19

<b>Název antibiotika</b>	původní	nově	FA	původní	nově	FA	původní	nově	FA	původní	nově	FA
Tetracyklin (30 µg)	30	<b>29</b>	<b>12,18,24</b>	16	<b>18</b>	<b>13,18,25</b>	30	<b>35</b>	<b>33,36</b>	30	<b>34</b>	<b>25,34</b>
Chloramfenikol (30 µg)	30	<b>28</b>	<b>30,33,36</b>	34	<b>29</b>	<b>30,32,36</b>	29	<b>36</b>	<b>29,35</b>	30	<b>35</b>	<b>24,30,34</b>
Ampicilin (2 µg)	30 a 22	<b>28</b>	<b>14,33</b>	36 a 24	<b>33</b>	<b>29,32</b>	27 a 30	<b>31</b>	<b>26,30,33</b>	20 a 24	<b>30</b>	<b>33,37</b>
Vankomycin (5 µg)	16	<b>22</b>	<b>11,18,25</b>	17	<b>24</b>	<b>22,25,29</b>	24	<b>26</b>	<b>13,24,29</b>	20	<b>25</b>	<b>14,21,28</b>
Erytromycin (15 µg)	28	<b>27</b>	<b>15,26,33</b>	32	<b>28</b>	<b>13,22,29,33</b>	30	<b>36</b>	<b>22,29,33,39</b>	30	<b>37</b>	<b>20,30,36</b>
Clindamycin (2 µg)	27 a 25	<b>22</b>	<b>20,24</b>	32 a 30	<b>28</b>	<b>22,26</b>	19 a 22	<b>22</b>	<b>21,28</b>	20 a 22	<b>24</b>	<b>23,29</b>
Gentamicin (30 µg)	13	<b>11</b>	<b>8</b>	16	<b>12</b>	<b>9</b>	10 a 18	<b>15</b>	<b>9</b>	10 a 16	<b>14</b>	<b>8</b>
Streptomycin (10 µg)	10	<b>10</b>	<b>10</b>	12	<b>10</b>	<b>10</b>	9	<b>11</b>	<b>10</b>	8	<b>14</b>	<b>10</b>
Kanamycin (30 µg)	11	<b>10</b>	<b>9</b>	11	<b>11</b>	<b>9</b>	8	<b>10</b>	<b>10</b>	R	<b>9</b>	<b>10</b>
Mupirocin (200 µg)	R	<b>9</b>	<b>9</b>	R	<b>7</b>	<b>10</b>	R	<b>R</b>	<b>10</b>	R	<b>R</b>	<b>10</b>
Norfloxacin (10 µg)	11	<b>9</b>	<b>9</b>	R	<b>R</b>	<b>9</b>	15	<b>16</b>	<b>11,19</b>	14	<b>18</b>	<b>12,20</b>
Nalidic acid (30 µg)	R	<b>R</b>	<b>9</b>	R	<b>R</b>	<b>9</b>	R	<b>R</b>	<b>9</b>	R	<b>R</b>	<b>9</b>
Moxifloxacin (5 µg)	20	<b>18</b>	<b>14,23</b>	33	<b>16</b>	<b>11,18</b>	24	<b>25</b>	<b>11,19,27</b>	22	<b>22</b>	<b>12,20,27</b>
Cefixime (5 µg)	25	<b>27</b>	<b>14,32</b>	30	<b>30</b>	<b>15,30,34</b>	17	<b>18</b>	<b>15,28</b>	20	<b>20</b>	<b>17,26</b>
Mecillinam (10 µg)	19	<b>23</b>	<b>14,29</b>	20	<b>20</b>	<b>13,18</b>	11	<b>15</b>	<b>11,23</b>	10	<b>20</b>	<b>11,22</b>
Sulphamethoxazol + Trimethoprim (25 µg)	15 a 20	<b>13</b>	<b>15,22,27</b>	22 a 30	<b>R</b>	<b>14,20,26</b>	27 a 28	<b>28</b>	<b>14,28</b>	R a 22	<b>28</b>	<b>26,29</b>
Trimethoprim (5 µg)	R	<b>10</b>	<b>10</b>	10	<b>R</b>	<b>10</b>	24	<b>30</b>	<b>14,18,31</b>	22	<b>25</b>	<b>22,26,29,31</b>
Metronidazol (50 µg)	15	<b>13</b>	<b>11,19</b>	15	<b>15</b>	<b>13,19</b>	30	<b>30</b>	<b>32,36,40</b>	30	<b>29</b>	<b>31,35,38</b>



Název antibiotika	M2A <i>B. dentium</i>			M4E <i>B. dentium</i>			20092 <i>B. globosum</i>		20099 <i>B. pseudolongum</i>		
	původní	nově	FA	původní	nově	FA	nově	FA	původní	nově	FA
Tetracyklin (30 µg)	30	35	26,31,39	33	35	25,30,39	20	15,27	25	27	16,27,35
Chloramfenikol (30 µg)	35	40	35	31	33	34,38	29	30,35	30	24	15,25,34
Ampicilin (2 µg)	31 a R	32	34	34 a R	32	36	22	18,30	16 a 10	22	15,21
Vankomycin (5 µg)	18	25	19,26	18	28	25,30	20	15,29	14	18	14,25
Erytromycin (15 µg)	34	22	25,32,38	35	32	26,33,40	29	22,35	28	26	20,31
Clindamycin (2 µg)	30 a 28	27	19,27	35 a 32	29	25	22	15,27	26 a 20	21	13,24
Gentamicin (30 µg)	15 a 16	15,23	9	20	20	8	R	9	R a 11	14	11
Streptomycin (10 µg)	10	14	12	22	19	10	R	13	R	R	11
Kanamycin (30 µg)	9	19	11	21	23	10	R	10	R	R	9
Mupirocin (200 µg)	R	23	9	R	R	10	R	11	R	R	11
Norfloxacin (10 µg)	20	19	11,15,21	21	21	15,23	R	11	R	R	9
Nalidic acid (30 µg)	R	R	9	R	R	10	R	10	R	R	9
Moxifloxacin (5 µg)	26	27	12,21,27	24	27	13,24,27	15	15	10	9	14
Cefixime (5 µg)	28	23	14,26	27	25	35	R	12	R	R	14,20
Mecillinam (10 µg)	17	17	13,26	22	20	16,26	R	13	R	12	11
Sulphamethoxazol + Trimethoprim (25 µg)	30 a 24	38	27,31	29 a 24	26	25,28	R	10	R	R	14
Trimethoprim (5 µg)	31	29	15,25,29	29	25	14,21,28	R	10	R	R	10
Metronidazol (50 µg)	R	11	9	R	10	10	16	12,29	R	R	8

Modrá – EFSA testování

Žlutá – specificky rezistentní

Zelená – druhová specifita

Oranžová – kmenová specifita