

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Antimikrobiální aktivita bifidobakterií proti *Clostridium perfringens* a *Clostridium difficile***

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Vendula Bartošáková  
Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: Ing. Věra Bunešová, PhD.**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Antimikrobiální aktivita bifidobakterií proti *Clostridium perfringens* a *Clostridium difficile* " 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 12.4.2017

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Věře Bunešové, PhD. za cenné rady, předané vědomosti, odbornou literaturu, připomínky k diplomové práci a především za čas, který mi věnovala.

# **Antimikrobiální aktivita bifidobakterií proti *Clostridium perfringens* a *Clostridium difficile***

## **Souhrn**

Diplomová práce je zaměřena na identifikaci konkrétních druhů bifidobakterií, produkujících antimikrobiální látky, jež potlačují růst nežádoucích střevních patogenů. V teoretické části je podrobněji popsána střevní mikrobiota člověka a s ní spojené infekce trávicího ústrojí, kdy původci onemocnění jsou patogeny z rodu *Clostridium*. Dále je zde popsána problematika bifidobakterií, které by bylo možné navrhnout jako probiotické bakterie v možnostech prevence a podpory léčby proti gastrointestinálním onemocněním.

Hlavním cílem této práce bylo nalezením vhodných kmenů z rodu *Bifidobacterium*, které by mohly vykazovat antimikrobiální aktivitu proti *Clostridium perfringens* a *Clostridium difficile*.

Praktická část je složena ze tří experimentů. V první části byla pomocí diskové difúzní metody sledována antimikrobiální aktivita kmenů bifidobakterií k jednotlivým kmenům klostridií, které se chovají jako patogeny v trávicím traktu. Celkem bylo otestováno 12 kmenů (4 druhy) z rodu *Bifidobacterium*. Pouze u čtyř kmenů *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* a *Bifidobacterium choerinum* byla potvrzena antimikrobiální aktivita vytvořením jasných inhibičních zón. Součástí byla i detekce času, v němž dochází k produkci antimikrobiální látky. Dva kmeny vykazující antimikrobiální aktivitu byly přeočkovány a kultivovány. Během kultivace byly odebírány vzorky každé 2 hodiny a opět testovány deskovou difúzní metodou. Bylo zjištěno, že testované kmeny bifidobakterií vykazují stále stejnou antimikrobiální aktivitu. Tato aktivita byla detekována ve stejné míře ihned po přeočkování a i po 36 hodinách kultivace. Z toho vyplývá, že proti klostridiím pravděpodobně funguje látka obsažená v zamraženém médiu. Při použití supernatantů se zamražených vzorků byla navíc antimikrobiální aktivita nejvyšší.

Druhá část je věnována testování supernatantů s upravenými vlastnostmi. Je tvořena třemi dílčími pokusy. V prvním případě byla otestována tepelná stabilita pozitivních supernatantů při teplotě 100 °C po dobu 30 minut. V druhém případě byl ověřen vliv změny při hodnotách pH 2, 7, 9. V posledním případě byl otestován přídavek proteinázy K v koncentraci 0,1 mg /1 ml. Bylo zjištěno, že změna teploty a přídavek proteinázy K nemají žádný vliv na antimikrobiální aktivitu bifidobakterií. Pouze při okyselení supernatantu na hodnotu pH 2 došlo k vytvoření znatelně větší inhibiční zóny.

Třetí část je také tvořena dvěma dílčími pokusy. Nejprve byly testovány dva vzorky bifidobakterií s pozitivním účinkem pomocí speciálního filtru, aby došlo k separaci případně přítomných proteinů, čímž bylo zjištěno, že se pravděpodobně jedná o látku proteinové povahy. Při druhém pokusu došlo k přidavku tweenu v koncentraci 1 % do modifikovaného Wilkins-Chalgren anaerobic média za účelem podpoření antimikrobiální aktivity a vytvoření většího množství testovaného produktu. Přídavek však neměl žádný vliv na antimikrobiální aktivitu.

Z výsledků tohoto testování vyplývá, že některé testované supernatanty druhů *B. animalis* subsp. *animalis* a *B. choerinum* vykazují antimikrobiální aktivitu proti *C. perfringens* a *C. difficile*. Nicméně se může také jednat o produkt glycerolu, který je součástí zamrazovacího média, kde může být přítomen akrolein, u něhož je znám antimikrobiální efekt.

**Klíčová slova:** Klostridie, bifidobakterie, inhibice, antimikrobiální aktivita, bakteriociny

# **Antimicrobial activity of bifidobacteria against *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile***

## **Summary**

Master's thesis is focused on the identification of specific species of *Bifidobacterium*, that produce antimicrobial substances and those suppress the growth of undesirable intestinal pathogens. Theoretical part describes human intestinal microbiota and its associated infections of the digestive tract, where the origins of the disease are pathogens of the genus *Clostridium*. Further, there is a description of the issue of bifidobacteria, which could be suggested as a probiotic bacteria for the prevention and promotion of treatment of gastrointestinal disease.

The main objective of this thesis was to find suitable strains of the genus *Bifidobacterium*, which might evince antimicrobial activity against *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*.

The practical part consists of three experiments. In the first part, an antimicrobial activity of strains of *Bifidobacterium* to individual strains of clostridia was monitored by disc diffusion method, that behaves like pathogens in the gastrointestinal tract. Totally, there were 12 strains (4 kinds) of the genus *Bifidobacterium* tested. Only 4 strains of genus *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* and *Bifidobacterium choerinum* showed the antimicrobial activity confirmed by formation of clear inhibition zones. Tests also included a time detection, which leads to the production of antimicrobial substances. Two strains exhibiting antimicrobial activity were inoculated and cultivated. During the cultivation samples were taken every 2 hours and again tested by disc diffusion method. It was found that the tested strains of bifidobacteria show always the same antimicrobial activity. This activity was detected in equal measure immediately after the inoculation, and even after 36 hours of cultivation. This testing show that against to clostridia probably functions substance contained in frozen medium. Moreover a supernatants from frozen samples were able to produce also the highest antimicrobial activity.

The second part is dedicated to testing supernatants with modified properties. It consists of three part tests. In the first case the thermal stability of positive supernatants at 100 °C for 30 min was tested. In the second case, the effect of changes at pH 2, 7, 9 was verified. In the last case, the addition of proteinase K to 0,1 mg / 1 ml was tested. It was found, that the change in temperature and addition of proteinase K had no effect on the

antimicrobial activity of *Bifidobacterium*, only the acidification of the supernatant to value pH 2, made considerably larger inhibition zones.

The third part also consists of two part tests. First, two samples of *Bifidobacterium* with positive effects were tested using a special filter in order to separate present proteins, whereby it was found that the material had a protein nature probably. In the second experiment a tween in a concentration of 1% was added to the modified Wilkins-Chalgren anaerobic medium to enhance the antimicrobial activity. However, the addition had no effect on antimicrobial activity and making more test product.

The results of this testing showed, that some from tested supernatants of *B. animalis* subsp. *animalis* and *B. choerinum* exhibit antimicrobial activity against *C. perfringens* and *C. difficile*. However, it may be a product of glycerol, which is part of the frozen media, there can be present an acrolein, which is known for antimicrobial effect

**Keywords:** Clostridia, bifidobacteria, inhibition, antimicrobial activity, bacteriocins

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Vědecká hypotéza .....</b>	<b>2</b>
<b>3 Cíl práce .....</b>	<b>3</b>
3.1 Cíl teoretické části.....	3
3.2 Cíl praktické části.....	3
<b>4 Literární rešerše.....</b>	<b>4</b>
4.1 Trávicí trakt.....	4
4.1.1 Funkce a význam .....	4
4.1.1.1 Dutina ústní.....	6
4.1.1.2 Žaludek.....	6
4.1.1.3 Tenké střevo .....	6
4.1.1.4 Tlusté střevo .....	7
4.1.1.5 Slinivka břišní.....	7
4.1.1.6 Játra .....	7
4.1.2 Mikrobiota .....	7
4.1.2.1 Osídlení střevní mikrobioty v trávicím ústrojí.....	8
4.1.2.2 Faktory ovlivňující složení střevní mikrobioty.....	10
4.1.2.3 Vývoj fyziologické mikrobioty v průběhu života.....	11
4.2 Infekce trávicího traktu.....	12
4.2.1 Akutní.....	12
4.2.1.1 Gastroenteritida.....	13
4.2.2 Chronická.....	14
4.3 Rod <i>Clostridium</i> .....	15
4.3.1 <i>Clostridium difficile</i> .....	16
4.3.1.1 Pseudomembranózní enterokolitida .....	17
4.3.2 <i>Clostridium perfringens</i> .....	18
4.3.2.1 Nekrotická enteritida .....	22
4.4 Možnosti léčby.....	23
4.5 Probiotika.....	25
4.5.1 Pozitivní působení probiotik .....	26
4.5.2 Jednotlivý zástupci.....	27
4.5.3 Probiotika v terapii gastrointestinálních onemocnění .....	27
4.5.4 Bifidobakterie .....	29
4.5.5 Bakteriociny.....	30



4.6	Antimikrobiální aktivita bifidobakterií .....	32
<b>5</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>34</b>
5.1	Charakteristika použitých kmenů.....	34
5.2	Disková difúzní metoda.....	36
5.2.1	Použité zařízení a pomůcky .....	37
5.2.2	Kultivační médium.....	37
5.2.3	Vlastní provedení diskové difúzní metody .....	38
5.2.4	Příprava supernatantu pro testování .....	38
5.3	Detekce času produkce antimikrobiální látky.....	39
5.3.1	Postup práce.....	39
5.4	Testování supernatantů s upravenými vlastnostmi .....	40
5.4.1	Postup práce.....	40
5.5	Separace případně přítomných proteinů.....	40
5.5.1	Postup práce.....	41
5.6	Testování vlivu tweenu na antimikrobiální aktivitu.....	41
5.6.1	Postup práce.....	41
<b>6</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>42</b>
6.1	Výsledky testování citlivosti klostridií k antimikrobiální látce .....	42
6.2	Výsledky testování supernatantů s upravenými vlastnostmi.....	45
6.3	Nalezení optimálních podmínek produkce antimikrobiálních látek .....	46
<b>7</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>Seznam literatury.....</b>	<b>52</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>60</b>
<b>11</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>61</b>

# 1 Úvod

Mikrobiota je komplexní ekosystém složen z bakterií jak aerobních, tak anaerobních, virů, hub a dalších mikroorganismů. Z klinického hlediska je normální fyziologická mikrobiota definovatelná jako soubor mikroorganismů, které mohou být přítomny v trávicím traktu zdravého člověka. Avšak vhodné je věnovat pozornost i patogenní mikrobiotě. Infekční záněty mohou být způsobeny patogeny, oportunními mikroorganismy a dysmikrobií neboli porušením homeostázy mikrobiálního systému trávicího traktu. Tyto záněty mohou být akutní i chronické, kdy vyvolavateli jsou většinou patogeny, mezi které patří *Clostridium perfringens* a *Clostridium difficile*.

Probiotika příznivě ovlivňují zdravotní stav a udržují střevní mikrobiotu v rovnováze. Mají největší potenciál jako přídatná léčba k antibakteriální terapii, avšak mohou sloužit jako prostředek k zabránění klostridiových infekcí. Z toho vyplývá, že jednou z možností léčby infekčních gastrointestinálních poruch mohou být i probiotika. Do skupiny probiotik patří především rody *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*. Jedny z nejvíce využívaných probiotických bakterií jsou bifidobakterie. Jako dominantní mikrobiota jsou přirozeně přítomny u novorozenců a kojených dětí, avšak s rostoucím věkem se stávají až třetí nejhojnější skupinou střevních mikroorganismů. Bifidobakterie mají schopnost vyvíjet antagonistickou aktivitu proti patogenům. Produkují bakteriociny, což jsou peptidy s antimikrobiální aktivitou, které jsou účinné proti jiným bakteriím.

Antimikrobiální aktivita je důležitou vlastností bifidobakterií, která může být účinně využívána k potlačení nežádoucích klostridií.

## 2 Vědecká hypotéza

Vyvolavateli akutních infekcí zažívacího traktu jsou většinou patogeny, které působí primárně v gastrointestinálním traktu. Nejčastějšími vyvolávajícími agens v ČR jsou kampylobaktery a salmonely, z virů rotaviry, noroviry a stoupá i význam *C. difficile* vzhledem k nárůstu jejich počtu i závažnosti především po antibiotické léčbě. Velké zdravotní problémy jsou často způsobené i druhem *C. perfringens* způsobující enteritidy až nekrotické záněty střev.

Mezi nejvýznamnější výhody bifidobakterií patří modulace obranné odpovědi hostitele a ochrana proti infekčním chorobám. Předpokládáme, že bifidobakterie by mohly vykazovat antimikrobiální aktivitu proti *C. perfringens* a *C. difficile* a produkovat například bakteriociny.

Budeme se snažit nalézt konkrétní druhy bifidobakterií produkující látky, které budou potlačovat růst nežádoucích střevních patogenů. Takové mikroorganismy bude možné navrhnout jako probiotické bakterie, které jsou jednou z možností prevence a podpoření léčby.

## **3 Cíl práce**

### **3.1 Cíl teoretické části**

Cílem teoretické části je popis antimikrobiální aktivity bifidobakterií a ucelený přehled o infekcích zažívacího traktu způsobených bakteriemi *C. perfringens* a *C. difficile* a možnostech léčby.

### **3.2 Cíl praktické části**

Cílem praktické části bylo nalezení vhodných kmenů bifidobakterií vykazující antimikrobiální aktivitu proti klostridiím. Vybrané kmeny bifidobakterií s potenciálním probiotickým účinkem byly testovány pomocí deskové difúzní metody s patogenními, potenciálně patogenními a dalšími kmeny *C. perfringens* a *C. difficile*.

## 4 Literární rešerše

### 4.1 Trávicí trakt

Trávicí neboli gastrointestinální trakt (GIT) zajišťuje, aby přijaté živiny a ostatní součásti naší stravy tj. minerály, stopové prvky, vitamíny a bioaktivní molekuly byly adekvátně zpracovány a to jak mechanicky, tak chemicky a následně efektivně vstřebány bez zbytečných ztrát. Tyto dvě základní funkce GIT, tj. trávení a vstřebávání, můžeme doplnit o další funkce, které rovněž mají svůj význam. Je to např. ukládání některých látek do zásob (železo, vitamíny skupiny B, tuk, apod.) nebo zajištění dostatečné ochrany organismu před škodlivými látkami či bakteriemi v potravě. GIT má nezastupitelnou úlohu při procesu hemokoagulace. Významným způsobem se podílí na stavu a vývoji účinného imunitního systému, protože přijímané potraviny nejsou sterilní (Mourek, 2012; Mourek a kol., 2013).

#### 4.1.1 Funkce a význam

Pro udržení životních funkcí je nezbytný příjem potravy ze zevního prostředí, který slouží jako zdroj vody, minerálních látek, živin a vitamínů. Avšak trávicí systém, který zajišťuje příjem potravy, je také místem, kde jsou některé produkty metabolismu odstraňovány. Potrava musí projít jednotlivými prostory GIT, které jsou členěny do tří úseků. Horní úsek je tvořen ústy, jícnem a žaludkem, kde se potrava mechanicky rozmělnuje a některé části potravy jsou zde tráveny účinkem enzymů trávicích šťáv. Sousto (bolus) je postupně změněno na tráveninu neboli chymus, který se dostává do tenkého střeva a reprezentuje tedy střední úsek. Většina látek potřebných pro organismus se resorbuje právě v tenkém střevě a zbývající chymus přestupuje do tlustého střeva představující dolní úsek. Obsah se zde zahušťuje a je vystaven působení bakterií. Trávenina se proměňuje ve stolicí (Kittnar, 2011).

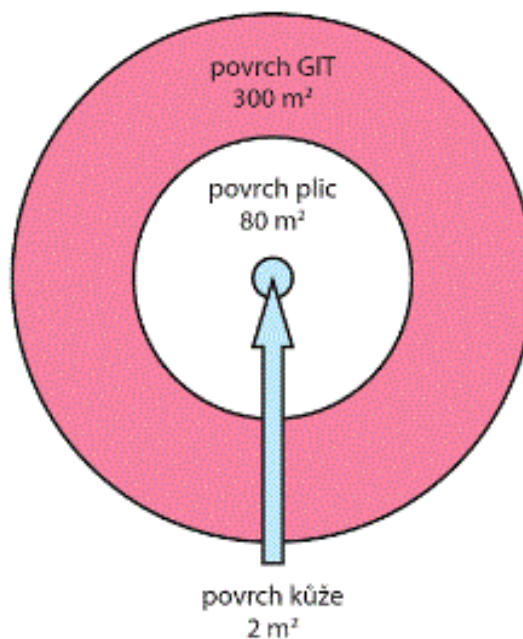
Funkce gastrointestinálního traktu lze zjednodušit do čtyř základních dějů. Motilita (posun a mísení tráveniny s trávicími šťávami), sekrece, trávení a vstřebávání. Vstřebávání je proces, který je téměř nevyčerpatelný (Kittnar a Mlček, 2009). Činnost GIT je řízena nervově (vlastní nervový systém trávicího traktu a autonomní nervový systém-sympatikus, parasympatikus), humorálně (hormony produkované převážně trávicím traktem) a přímým mechanickým a chemickým působením obsahu (Kittnar, 2011). Energetické nároky jsou hrazeny třemi základními živinami a to jsou bílkoviny (proteiny), tuky a sacharidy. Minimální potřeba bílkovin, která je nutná pro udržení životně nezbytné vyrovnané dusíkové bilance je cca 0,5 g/kg tělesné hmotnosti na den tzv. bilanční minimum. Přičemž, aby byl zajištěn

dostatečný přívod esenciálních aminokyselin, musí být přibližně polovina v podobě živočišných bílkovin. Zbylou a převážnou část energetické spotřeby hradí cukry (škroby, disacharidy, glykogen) a tuky (živočišné a rostlinné tuky, oleje). Tyto živiny mohou do značné míry zastoupit podíl cukrů, aniž by vznikly poruchy metabolismu. Tuk je postradatelný a musí být zajištěn dostatečný přívod vitamínů rozpustných v tucích a esenciálních mastných kyselin (kyselina linolová aj.). Aby byl pokryt celkový potřebný přívod látek a energie, musí být potrava:

- a) polknuta,
- b) mechanicky zpracována a chemicky rozštěpena (trávení),
- c) vstřebána ze střeva (resorbce; Silbernagl a Despopoulos, 2014).

Svalovina trávicího ústrojí je trojvrstevná a slouží k promíchávání a posunu obsahu. Doba pasáže trávicí trubici tj. žaludkem a jednotlivými oddíly střeva, je závislá především na složení potravy. Pro zabezpečení normální doby pasáže a to především tlustým střevem, musí potrava obsahovat tzv. balastní látky, tj. nestravitelné součásti rostlin (celulóza, lignin aj.) (Silbernagl a Despopoulos, 2014). Přestup živin a dalších látek do vnitřního prostředí je zajišťován sliznicí střev. Je především závislý na tom, jak jsou součásti potravy tráveny a následně jsou přeměněny na vstřebatelné látky. Transport látek můžeme rozdělit na aktivní a pasivní. Vnitřní povrch trávicího ústrojí je velký okolo 300 m<sup>2</sup> (obrázek 1) a umožňuje účinný přestup látek (Rokyta, 2015).

**Obrázek 1** Porovnání povrchů ploch kůže, plic a gastrointestinálního traktu; upraveno podle (Rokyta, 2015)



GIT zároveň potřebuje účinnou imunitní ochranu. Sliny obsahují účinné látky jako mucin, imunoglobulin A (IgA) a lysozym. Tyto látky tlumí pronikání mikroorganismů. Také žaludeční šťáva působí baktericidně. Konečně i fyziologické osídlení tlustého střeva střevní flórou brání rozšíření patogenních mikroorganismů. U novorozenců je sliznice trávicího ústrojí chráněna především IgA z mateřského mléka (Silbernagl a Despopoulos, 2014).

#### 4.1.1.1 Dutina ústní

Mechanické zpracování potravy, kterému říkáme žvýkání, se děje pomocí žvýkacích svalů. Dolní čelist (mandibula), která je pohyblivá, ovládáme pomocí hlavního žvýkacího svalu, který díky své složitější struktuře zajišťuje ukusování sousta a žvýkací pohyby. Žvýkáním je potrava mechanicky drcena a postupně smíchávána se slinami. Sliny se tvoří permanentně asi 1,5- 2litry/ 24h. Sliny obsahují především vodu (cca 95 %), anorganické komponenty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$  atd.) a důležité organické komponenty alfa-amylázu, imunoglobuliny lysozym a hlen (mucin). Mucin umožňuje hladkou pasáž sousta jícnem do žaludku při polykání. Alfa-amyláza je enzym, který začíná trávení škrobů (Mourek, 2012; Mourek a kol., 2013).

#### 4.1.1.2 Žaludek

V žaludku je potrava skladována, poté zpracována a to jak mechanicky, tak i chemicky působením žaludečních šťáv. Stěna žaludku je kromě sliznice vybavena mohutnou hladkou svalovinou. V žaludku se tvoří v průběhu 24 h/ 2 litry žaludeční šťávy, která je důležitá při zpracování přijaté potravy. Dochází k naředění a promíchání žaludečního obsahu a vytvoření chymu (natráveniny). Kyselost žaludeční šťávy (pH okolo 2-3) je způsobena kyselinou chlorovodíkovou. Žaludeční sliznice produkuje také hlen (mucin), který má vysokou schopnost odolávat kyselému prostředí žaludku i působení pepsinu a tak chrání žaludeční sliznici před poškozením (Mourek, 2012; Mourek a kol., 2013).

#### 4.1.1.3 Tenké střevo

Hlavní funkcí tenkého střeva je dokončení trávení potravy a také resorpce produktů štěpení spolu s vodou, elektrolyty a vitamíny. Chymus je zde promícháván s trávicími šťávami a žlučí. Následně je pak zpracován (Mourek, 2012; Silbernagl a Despopoulos, 2014).

#### 4.1.1.4 Tlusté střevo

Je poslední stanicí pro resorpci vody a iontů. Je osídleno bakteriemi a v céku a rektu představuje prostor pro hromadění stolice, takže i při hojném příjmu potravy probíhá defekace relativně méně často. Další významnou funkcí tlustého střeva je schopnost regulovat objem výraznou vstřebávací kapacitou pro vodu. Sliznice tlustého střeva nemá klky (Mourek, 2012; Silbernagl a Despopoulos, 2014).

#### 4.1.1.5 Slinivka břišní

Exokrinní část slinivky břišní produkuje denně 1-2 l pankreatické šťávy, která odtéká do duodena. Obsahuje především hydrogenuhličitanové ionty, které jsou důležité pro neutralizaci (pH 7-8) chymu ze žaludku bohatého na HCl. Také většinou obsahuje inaktivní prekurzory trávicích enzymů, které v tenkém střevě štěpí bílkoviny, tuky, sacharidy a další látky. Tvorba pankreatické šťávy je velmi podobná tvorbě slin, jelikož probíhá ve dvou stupních (Silbernagl a Despopoulos, 2014).

#### 4.1.1.6 Játra

Hlavní funkcí jater je detoxikace a vylučování četných, většinou lipofilních látek, které pocházejí buď z látkové přeměny (např. bilirubin nebo steroidní hormony), nebo ze střeva. Je to exokrinní žláza, která produkuje žluč (0,7 l/d) a následně je odváděna do žlučníku. Hlavní součásti žluči jsou žlučové kyseliny, které jsou syntetizovány v játrech z cholesterolu nebo se vracejí zpět do jater portálním oběhem. Další složkou žluče jsou žlučová barviva (bilirubin; Mourek, 2012; Silbernagl a Despopoulos, 2014).

### 4.1.2 Mikrobiota

Fyziologická mikrobiota trávicího ústrojí je komplexní ekosystém složen z bakterií jak aerobních, tak anaerobních, virů, hub a dalších mikroorganismů. Metody sekvenční analýzy ribozomální DNA a RNA ukazují, že počet mikrobiálních kmenů obsažených ve střevní mikrobiotě může dosahovat celkového počtu až 40 000 (Mai and Draganov, 2009).

Z klinického hlediska je normální fyziologická mikrobiota definovatelná jako soubor mikroorganismů, které mohou být přítomny v trávicím traktu zdravého člověka. Také je vhodné rozlišit patogenní mikrobiotu. Jedná se mikroorganismy, které v tomto prostředí nesmí být za fyziologických okolností přítomny. Normální fyziologická mikrobiota je za fyziologických okolností v určité kvantitativní rovnováze. Může dojít k porušení této rovnováhy v důsledku selhání kontrolních mechanismů. Příčinou může být tzv. dysmikrobie,



kdy kvalitativní struktura mikrobiálního ekosystému je zachována, ale kvantitativní poměry se zásadně mění. Dochází k nárůstu mikroorganismů, které jsou v trávicím traktu dlouhodobě zastoupeny v menšině (např. kandidy, pseudomonády, klostridia, stafylokoky aj.) Přerůstání této menšinové složky mikrobiálního systému může vést k tzv. oportunní infekci. Takový mikroorganismus se pak může stát zdrojem superinfekce (Zbořil, 2005).

#### 4.1.2.1 Osídlení střevní mikrobioty v trávicím ústrojí

Kvantitativní rozložení bakteriální mikrobioty trávicího traktu je charakterizováno aborálním růstem mikroorganismů:

- žaludek a duodenum  $10^1$ - $10^3$ /ml mikroorganismů;
- jejunum a ileum  $10^4$ - $10^8$ /ml mikroorganismů;
- kolon  $10^{10}$ - $10^{12}$ /ml mikroorganismů (Zbořil, 2005).

Kvalitativní zastoupení v jednotlivých oddílech:

- žaludek a duodenum - laktobacily, streptokoky, kvasinky;
- jejunum a ileum - laktobacily, koliformní bakterie, streptokoky, bakteroidy, bifidobakterie, fusobakterie;
- kolon - bakteroidy, bifidobakterie, streptokoky, eubakterie, fusobakterie, koliformní bakterie, klostridia, veillonely, laktobacily, proteus, stafylokoky, pseudomonády, kvasinky (Zbořil, 2005).

Složení mikrobioty střevního traktu je rozdílné podle lokalizace (tabulka 1). Mikrobiální flóra orální části tenkého střeva, jejichž součástí je jejunum (lačník) a ileum (kyčelník) má podobné složení jako žaludek a je také do jisté míry ovlivňována patologickými stavy žaludku. (Mourek, 2012; Mourek a kol., 2013; Nord and Kager, 1984). Kolon je hlavní část tlustého střeva. Mikrobiota tlustého střeva je velmi rozdílná v různých geografických oblastech a evidentně ovlivňována stravovacími zvyklostmi. (Nord and Kager, 1984; Verhoef-Verhage and Schaafsma, 1996).

**Tabulka 1** Složení mikrobioty lidského GIT (Nord and Kager, 1984)

Mikroorganismy	Počty mikroorganismů (CFU/g)			
	žaludek	jejunum	ileum	kolon
Celkové množství bakterií	0-10 <sup>3</sup>	0-10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup>
<b>Aeroby nebo fakultativní anaeroby</b>				
Čeď <i>Enterobacteriaceae</i>	0-10 <sup>2</sup>	0-10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>10</sup>
Streptokoky aerobní	0-10 <sup>3</sup>	0-10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>10</sup>
Stafylokoky	0-10 <sup>2</sup>	0-10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>9</sup>
Laktobacily	0-10 <sup>3</sup>	0-10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>10</sup>
Kvasinky	0-10 <sup>3</sup>	0-10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>
<b>Anaeroby</b>				
Bakteroidy	vzácné	0-10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup>
Bifidobakterie	vzácné	0-10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup> -10 <sup>11</sup>
Streptokoky anaerobní	vzácné	0-10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup>
Klostridie	vzácné	vzácné	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>11</sup>
Eubakterie	vzácné	vzácné	vzácné	10 <sup>9</sup> -10 <sup>12</sup>

V následujícím přehledu (tabulka 2) jsou vidět poměry a postupná proměna mikrobiálního ekosystému od převahy aerobů orálně k převaze anaerobů v aborálních oddílech (Nord and Kager, 1984).

**Tabulka 2** Poměr anaerobů k aerobům v trávicím traktu (Nord and Kager, 1984)

Oddíl GIT	Anaeroby: aeroby
Tenké střevo	1:1
Orální kolon	100:1
Aborální kolon	1000:1

Povrch lumina trávicího traktu je osídlen 10<sup>12-14</sup> mikrobiálních zárodků, které patří k fyziologické homeostáze tohoto prostředí. Metabolická kapacita bakteriální masy, dokonce převyšuje jaterní parenchym člověka. Je velmi těžké stanovit tzv. normální fyziologickou mikrobiotu trávicího traktu. Má velmi širokou kvantitativní, ale i kvalitativní variabilitu. Liší

se v jednotlivých geografických oblastech, je ovlivněná stravovacími návyky, vyvíjí se během lidského života (Zbořil, 2005).

Střevní mikrobiota musí být schopna zajistit mnoho funkcí:

- udržovat mikrobiální bariéru proti patogenům a potenciálním patogenům;
- ovlivňovat motilitu a prokrvení střevní stěny;
- stimulovat imunitní střevní systém a tím i tzv. společný slizniční imunitní systém;
- redukovat bakteriální translokaci;
- produkovat vitamíny (Van der Waaij et al., 1972).

Mikrobiální bariéra prospěšných komenzálních bakterií ve střevě, zabraňuje přerůstání patogenů a potenciálních patogenů, bývá označována jako kolonizační rezistence gastrointestinálního traktu vůči patogenům (salmonely, shigely, yersinie, kampylobakterie, vibria, atd.) a potenciálním patogenům (klostridia, kandidy, atd.) (Van der Waaij et al., 1972).

#### 4.1.2.2 Faktory ovlivňující složení střevní mikrobioty

Složení střevní mikrobioty je regulováno již slinami (lysozomy), následně žaludeční kyselinou (pH), poté žlučí (laktoferin, nekonjugované žlučové kyseliny), pankreatickou šťávou (lipáza) a také střevní motilitou. Jednu z důležitých rolí také hraje regenerace buněk střevní sliznice. Střevní mikrobiota má vlastní regulační schopnosti (tzv. kolonizační rezistence). To znamená, že brání průniku nežádoucích mikroorganismů a látek, zároveň inhibuje patogenní mikrobiotu baktericidním působením mastných kyselin s krátkým řetězcem a produkcí peroxidu vodíku a sirovodíku. Kromě těchto neimunologických obranných mechanismů existuje i buněčný (GALT – the gut associated lymphoid tissue, T a B lymfocyty) a humorální (sekreční imunoglobulin A) imunitní obranný mechanismus. Také stárnutí hraje roli ve střevním osídlení, jelikož věkem dochází k poklesu sekrece slin, k méně častému polykání a je snížena obnova slizničních buněk. Tak dochází snadněji ke kolonizaci gram-negativními bakteriemi, jako jsou enterobakterie a pseudomonády. S věkem také klesá počet střevních bifidobakterií a predominantními se tak stávají koliformní bakterie, klostridie a kandidy. Tyto změny však mohou být sekundární při zhoršené motilitě a při častější atrofické gastritidě ve stáří, stejně tak jako snížená imunologická tolerance a zpomalená buněčná regenerace (Verhoef-Verhage and Schaafsma, 1996).

Zevní faktory, které ovlivňují složení střevní flóry, zahrnují výživu, léčbu, zevní prostředí a stres. Dále jsou to změny ve stravování a léky, jako např. laxativa nebo antibiotika,

kteře přímo ovlivňují střevní mikrobiotu. Antibiotika mohou způsobit pseudomembranózní kolitidu nebo kolitidu vyvolanou toxinem *Clostridium difficile* (Van der Waaij et al., 1972).

#### 4.1.2.3 Vývoj fyziologické mikrobioty v průběhu života

Dlouho bylo myšleno, že novorozenec vystupuje ze sterilního prostředí. Avšak v současné době bylo toto tvrzení změněno. Bylo zjištěno, že plod je osídlován mikroorganismy již z placenty tzn., že mikrobiální profil se vyvíjí již v průběhu těhotenství (Neu, 2016).

Krátce po narození dítěte dochází ke kolonizaci střeva řadou bakterií, které patří do tříd fakultativních anaerobních bakterií a striktně anaerobních bakterií. Novorozenec nejprve přijde do styku s bakteriemi z porodního kanálu a jeho okolí. Jejich rozvoj probíhá postupně. Proces osídlování střeva je ovlivňován především těmito faktory:

- a) vlivy zevního prostředí - mikrobiální flóra ženského pohlavního ústrojí, hygienické podmínky, způsob porodu tzn. vaginální porod nebo císařský řez;
- b) typ krmení - kojení mateřským mlékem nebo krmení umělou výživou;
- c) genetickými faktory (Mai and Draganov, 2009; Mountzouris, et al., 2002; Neu, 2016).

Osídlování mikroorganismy probíhá v prvních dnech po narození zejména orální cestou. Přes dutinu ústní je osídlován žaludek, po té střevní část trávicího traktu. Hlavním zdrojem kontaktu je matka tzn. její kožní, ústní a nosní mikrobiota. Prvními zjistitelnými mikroorganismy jsou: *E. coli*, enterokoky, lactobacily a stafylokokové kmeny. V kojeneckém období se rozsah mikrobioty rozvíjí velice rychle a to hlavně kontaminací z mateřského mléka nebo jeho náhražek. Následuje fáze tračnicková s prudkým nárůstem anaerobů s 90 % predominancí bifidobakterií a fáze lačnicková s růstem gram-negativních anaerobů, znovu stoupají počty koliformních bakterií, enterokoků a klostridií, zatímco bifidobakterie stagnují. Významné rozdíly lze pozorovat mezi kojenci a příjemci náhražek mateřského mléka. U nekojených dětí se v relativně krátkém čase prvních měsíců po narození vytváří komplex takřka úplného spektra mikrobioty, kdy dominantní jsou bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, z anaerobů jsou to bakteroidy. Naopak u kojených dominují ve stolici uniformně anaeroby s 90 % převahou bifidobakterií (Zbořil, 2005).

Několik studií zkoumalo bakteriální flóru kojených dětí a dětí na umělé výživě. Tyto studie ukázaly, že v tlustém střevě u kojených dětí obecně dominují bifidobakterie a bakterie mléčného kvašení. Avšak u dětí, které jsou na umělé výživě je mikrobiota mnohem rozmanitější, méně stabilní a často obsahuje více rody *Bacteroides*, *Clostridium* a čeleď

*Enterobacteriaceae*. Mateřské mléko obsahuje velké množství komplexních oligosacharidů (10-12 g/l), které slouží jako přírodní prebiotikum a podporuje růst bifidobakterií (Knol et al., 2005). Bioaktivní a imunomodulační vlastnosti mateřského mléka nelze replikovat z důvodu složitých rozdílů kvantitativních a kvalitativních komponent. To může být jedním z důvodů, proč epidemiologický výzkum prokázal, že kojené děti jsou lépe chráněny proti infekcím střeva, respiračním chorobám a onemocněním močového ústrojí (Mountzouris et al., 2002).

Kojení pozitivně působí na strukturu a funkci střevní mikrobioty, což zřejmě souvisí s obsahem dalších substancí v mateřském mléce, jako jsou laktoferin, imunoglobuliny a další. První měsíce a roky dětství jsou i nadále ovlivněny tím, jak dlouho trvalo období kojení. Bylo prokázáno, že u časně odstavených dětí v pozdějších letech je daleko častější výskyt průjmů. Mezi 3-5. rokem života má mikrobiota dětí strukturu téměř totožnou s dospělým organismem. Odlišnosti mikrobioty v dospělosti jsou především závislé etnicky, geograficky a podle stravovacích návyků (Zbořil, 2005).

Ve stáří se mění kvantitativní poměry v mikrobiotě s charakteristickým poklesem bifidobakterií a růstem gram-pozitivních anaerobů, sulfobakterií, bakteroidů a metanogenů. Struktura fyziologické mikrobioty se během lidského života mění. Postupně dochází k modulaci definitivního mikrobiálního osídlení trávicího traktu stejně jako k dalším věkovým změnám (Zbořil, 2005).

Střevní bakterie tvoří bariéru proti bakteriím, způsobující onemocnění, zabraňují jejich osídlení na sliznici střeva a jejich pomnožování. Dále podporují látkovou výměnu ve střevní stěně a podporují pohyb střev, stimulují imunitní systém střevní stěny a produkují některé vitamíny skupiny B (Morrow, 2009).

## 4.2 Infekce trávicího traktu

### 4.2.1 Akutní

Akutní infekce jsou fyziologického rázu a vyvolávají účelový zánět. Tyto záněty představují akutní reakci na antigenní a mitogenní podněty:

- záněty infekční,
- zánětlivé reakce na antigenní složky potravy,
- záněty postradiační,
- záněty chemické (Dítě, 2001).

Infekční záněty mohou být způsobeny patogeny, oportunními mikroorganismy a dysmikrobií neboli porušením homeostázy mikrobiálního systému trávicího traktu.

Oportunní infekce je infekce za fyziologických podmínek kontrolovaná skupinou bakterií v rámci mikroekosystému trávicího traktu (Mountzouris et al., 2002).

Tyto infekce postihují různé části trávicího traktu – jícen, žaludek i tenké a tlusté střevo. Vyvolavateli akutních infekcí zažívacího traktu jsou většinou patogeny, které působí primárně v gastrointestinálním traktu. Tyto infekce mnohdy začínají průjmem (Alleberger and Wagner, 2010).

#### 4.2.1.1 Gastroenteritida

Gastroenteritida je obvykle charakterizována bolestí břicha, následným průjmem bez příměsí a zvracením. Afebrilní průběh gastroenteritidy je typický pro alimentární intoxikace vyvolané bakteriálním toxinem, jako je např. *Clostridium perfringens* typu A. S nejzávažnějšími průběhy střevních infekcí se setkáváme u invazivních patogenů, které působí invazí do stěny tlustého střeva, na sliznici se mohou objevit vředy, možný je vznik toxického megakolon s následnou perforací střeva a zánětem pobřišnice neboli peritonitidou. Tyto patogeny jsou schopné vyvolávat i extraintestinální (mimostřevní) infekce, a to hlavně u imunokompromitovaných pacientů (Garg et al., 2003).

*C. difficile* působí svými dvěma toxiny enterotoxinem a cytotoxinem. Klinický obraz se může pohybovat od asymptomatického nosičství přes netypické průjmové onemocnění a klasickou hemoragickou kolitidu s krví a cáry sliznice ve stolici až po toxické megakolon s perforací střeva, peritonitidou a mnohdy fatálním zakončením. Přenos klostridií je snadný, infekční dávka je nízká, časté jsou nozokomiální infekce (Leclair et al., 2010).

Normalizace bakteriální střevní mikrobioty může příznivě ovlivnit infekční průjmovitá onemocnění a to především u dětí. Byla publikována řada studií i několik metaanalýz, díky kterým bylo prokázáno, že léčba probiotiky snižuje dobu trvání průjmů o 1–2 dny. V těchto studiích byly podávány jako probiotika především lactobacily, ale také bifidobakterie, sacharomycety, streptokoky, eventuálně enterokoky. Také se zdá, že toto osídlení ihned po narození snižuje frekvenci nozokomiálních infekcí i alergií v dlouhodobé perspektivě až 20 let. Jednoznačný klinický význam ani ekonomický dopad této léčby však není doposud zcela jasný a je vyžadováno více studií, především, které kmeny a v jakém dávkování budou optimální v léčbě průjmů u dětí, eventuálně u dospělých jako prevence nozokomiálních infekcí (Allen et al., 2003).

Ačkoli infekce vyvolané *C. difficile* zatím nejsou v ČR povinně hlášeny, jejich počet výrazně stoupá a v roce 2010 jich hlásící systém Epidat, který slouží k evidenci a analýze infekčních onemocnění v České republice evidoval již 761. Touto infekcí jsou výrazněji

postižení starší pacienti. Klostridiová kolitida může vzniknout i po léčbě banální infekce a je třeba na ni myslet vždy při průjmovém onemocnění s anamnestickými údaji o antibiotické léčbě během posledního měsíce před jeho vznikem (inkubační doba 3–30dnů; Patel et al., 2011).

#### 4.2.2 Chronická

Chronické záněty jsou zánětlivé reakce, které mohou proběhnout buď jako účelový zánět nebo patologický. V druhém případě se jedná o poškozující zánět, což odpovídá dvojí zánětlivé odpovědi ve sliznici a stěně střevní. Do této skupiny nemocí patří rozsáhlá skupina nemocí. Příkladem může být divertikulitida, která začíná jako akutní zánětlivá odezva fyziologického typu, posléze však opakovanými dysmikrobiemi a vznikem anatomických změn stěny postiženého úseku trávicí trubice přechází v chronický zánět. Další onemocnění:

- ischemické kolitidy a enteritidy,
- enteritidy a kolitidy při autoimunních chorobách,
- hluboká cystická kolitida (colitis cystica profunda),
- diverzní kolitida aj. (Mountzouris et al., 2002).

Infekce vyvolané *C. difficile* (CDI) jsou hlavní příčinou postantibiotických průjmů, které jsou spojeny se značnou morbiditou a mortalitou. Zánětlivé střevní onemocnění (IBD), které zahrnují Crohnovu chorobu (CD) a ulcerózní kolitidu (UC). Jedná se o chronické recidivující zánětlivé stavy, které ve většině případů vyžadují dlouhodobé léčebné terapie, periodické hospitalizace, a dokonce i chirurgický zákrok. Bylo prokázáno, že chronické užívání antibiotik, kortikosteroidů, imunomodulátorů zvyšuje riziko zánětlivých střevních onemocnění, které způsobují *C. difficile*. Riziko IBD způsobené CDI přetrvává i po úplném chirurgickém odstranění tlustého střeva s vyústěním tenkého střeva do konečníku (kolektomie). CDI byla hlášena i u pacientů, kteří trpí UC a byla u nich provedena proktokolektomie s konstrukcí ileo-pouch-anální anastomózy (IPAA), což je chirurgický zákrok, při kterém je pacientovi odstraněno tlusté střevo a konečník, konec tenkého střeva se následně přemění v rezervoár a připojí k řitnímu kanálu. Tyto zákroky jsou prováděny proto, aby zlepšily kvalitu života pacientů. Přibližně 5 % - 19 % pacientů přijatých z důvodů relaps IBD byli pozitivně testováni na toxin produkovaný *C. difficile*. Byly provedeny studie s cílem určit rizikové faktory CDI u pacientů s IBD. U pacientů s UC je vyšší riziko pro CDI než u pacientů trpící CD. Zároveň u pacientů s UC, kteří trpí CDI, je vyšší riziko kolektomie a také je u nich vyšší mortalita. Další studie ukázaly významný inverzní vztah mezi přítomností toxinů produkovaných *C. difficile* a potřebou kolektomie během hospitalizace.

S ohledem na rostoucí úmrtnost u pacientů s UC trpících CDI bylo zajímavé, že CDI nebyla přímým přispívajícím faktorem pro potřebu kolektomie. Pozitivní diagnóza na přítomnost *C. difficile* byla definována pomocí pozitivní enzymové imunoanalýzy (EIA), což je test na přítomnost A nebo B toxinů ve stolici, která byla považována za infikovanou, protože vykazovala znaky kolitidy (tj. průjem, zvýšená frekvence stolice, krvácení z konečníku, křeče; Kariv et al., 2011).

Byla provedena studie u celkem 78 lidí. U 39 pacientů trpících ulcerózní kolitidou a Crohnovou chorobou a u 39 lidí jako kontrolní skupiny bez předchozí historie týkající se CDI způsobující UC. Průměrný věk byl 39 let. Základní demografické a klinické údaje jsou shrnuty v tabulce 3. Studie ukázaly, že CDI byla zjištěna u 47,2 % případů u 50 % pacientů došlo k selhání při první antibiotické léčbě, a 21,2 % mělo opakovaně CDI (Kariv et al., 2011).

**Tabulka 3** *C. difficile* infekce (CDI) způsobující ulcerózní kolitidu; upraveno podle (Kariv et al., 2011)

Faktory	Počet	Statistika
Akvizice ambulantní <i>C. difficile</i> infekce	20	47,2 %
Selhání první antibiotické léčby	13	50,0 %
Počet dnů léčby <i>C. difficile</i> infekce	16	14,0 %
Předchozí historie <i>C. difficile</i> infekce	7	21,2 %
Těžký průjem	11	28,2 %
Přetrvávající krvácení z konečníku	23	59,0 %
Bolest břicha / křeče	19	48,7 %

#### 4.3 Rod *Clostridium*

Jednotlivé druhy rodu *Clostridium* jsou klasifikovány na základě tvaru vegetativních buněk, struktury buněčné stěny, tvorby endospor, biochemických vlastností, 16S rRNA sekvenční homologie, obsahu G+C v DNA (mol %), PCR amplifikace specifických úseků 16S a 23S rRNA genů a sekvence genomu. Pozornost je věnována zejména druhům *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. tetani* a *C. botulinum* (typ A a B neproteolytický; Bhunia, 2008).

Klostridie fermentují širokou škálu organických sloučenin. Během fermentace produkují kyselinu máselnou a octovou, butanol, aceton, oxid uhličitý a vodík. Tento rod taktéž produkuje řadu extracelulárních enzymů, které degradují organické makromolekuly



(např. proteiny, lipidy, kolagen, celulózu aj.) a z toho důvodu hrají důležitou roli v biodegradačních procesech. Některé druhy klostridií jsou nežádoucí pro potravinářství a to především v sýrařství. Při zrání sýrů se může projevit pozdní duření, které je způsobeno vývojem a růstem klostridiálních spor a později především aktivitou vegetativních buněk bakterií rodu *Clostridium* (Rittich a kol., 2011).

Většina klostridií je považována za neškodné saprofyty. Avšak některé z nich jsou patogenní pro člověka, které jsou zapojeny v celé řadě lidských infekcí nebo onemocnění. Těmito patogeny jsou především druhy *C. perfringens* a *C. difficile* (Rittich a kol., 2011).

#### 4.3.1 *Clostridium difficile*

*C. difficile* je gram-pozitivní, obligátně anaerobní bakterie, která vytváří spory a jsou patogenní. Tento druh nemá proteázy, fosfolipázy C, nebo lipázy, ale je jednou z mála druhů bakterií, která je schopna zkvašovat tyrosin na p-kresol, což je fenolová sloučenina a tím inhibuje růst jiných anaerobních bakterií (Dawson et al., 2008; Hafiz and Oakley, 1976; Theriot and Young, 2015). Jedná se o buňky, které jsou pohyblivé, 0,5-1,9  $\mu\text{m}$  široké 3,0-1,9  $\mu\text{m}$  dlouhé, rozsah růstu je 25-45  $^{\circ}\text{C}$  avšak optimum je 30-37  $^{\circ}\text{C}$ , pH 5,0-5,5. Produkuje kyselinu octovou, isomáselnou, máselnou, isovalerovou, valerovou, isopropanovou, mravenčí a mléčnou (Hafiz and Oakley, 1976). Vytvářejí charakteristický zápach, který je popsán jako pach kravského hnoje (Engelkirk and Duben Engelkirk, 2008). Je schopna produkovat dva hlavní toxiny, toxin A a toxin B, které patří do velké rodiny klostridiových cytotoxinů, a také toxin CDT. Toxiny A a B sdílí řadu podobných strukturálních vlastností a jsou z téměř 50 % identické, co se týče aminokyselinového složení. Enzymologicky se jedná o UDP-glukóza-hydrolázy a glukosyltransferázy (Pothoulakis, 1996; Theriot and Young, 2015; Usacheva et al., 2016).

**Obrázek 2** *Clostridium difficile*



[<http://www.npr.org/tags/148073337/clostridium-difficile>]

Kmeny, které produkují alespoň jeden z těchto toxinů, způsobují onemocnění. Toxin A je považován za enterotoxin, protože způsobuje hromadění tekutiny ve střevě. Toxin B tohle nahromadění tekutiny nezpůsobuje, ale je pro buňky extrémně cytopatický (Rolfe and Finegonl, 1998).

Nachází se v životním prostředí a má schopnost přetrvávat na neživém povrchu několik měsíců (Kramer et al., 2006). Toxin B má silnější cytotoxickou aktivitu. Zatímco některé studie obnovily důležitost synergetického efektu mezi toxinem A a B, nedávné studie ukázaly, že toxin B byl hlavním faktorem virulence *C. difficile* a nevyžadoval přítomnost toxinu A (Usacheva et al., 2016).

Klostridiové infekce (CDI) jsou výsledkem infekce střeva bakterií *C. difficile*. Komplikace CDI patří mezi závažné infekce zahrnující, hypotenzi, šok, sepsi, střevní neprůchodnost (ileus), rozšíření tlustého střeva (megakolon) a perforaci, nebo až smrt. Mezi rizikové faktory pro CDI patří věková skupina > 65 let, změna normální střevní mikrobioty, osídlení tlustého střeva po antibiotické léčbě což snižuje úroveň ochrany a proto se stává hlavním rizikovým faktorem. Nicméně, pouze 25 % ze všech případů, které jsou spojeny s CDI, trpí postantibiotickými průjmy (Songer and Anderson, 2006; Usacheva et al., 2016). Typický, nástup onemocnění se vyskytuje 4-9 dnů po začátku antibiotické léčby. Mezi antibiotika, které mají nejvyšší riziko CDI, patří klindamycin, cefalosporiny, peniciliny, a další. Jejich časté používání může způsobit změnu domorodé střevní mikrobiální flóry a možnost kolonizace *C. difficile* což způsobuje následné onemocnění. Nicméně, bylo potvrzeno, že ke klíčení spor *C. difficile* dochází v tenkém střevě. Slepé střevo bylo stanoveno jako místo pro optimální růst a produkci toxinů *C. difficile* po antibiotické léčbě (Usacheva et al., 2016).

#### 4.3.1.1 Pseudomembranózní enterokolitida

*C. difficile* je původcem vzniku závažného až smrtelného onemocnění pseudomembranózní enterokolitidy (obrázek 3; Rees et al., 1995).

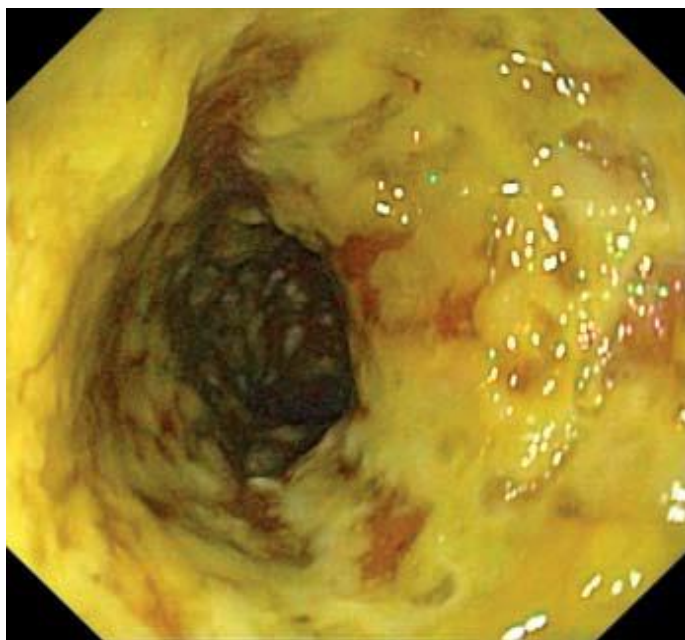
Před tímto onemocněním je důležité vědět cestovní anamnézu zejména do tropů a subtropů včetně údajů o způsobu ubytování a stravování a také údaj o používání antibiotik v posledním měsíci před onemocněním. Nejrizikovějšími antibiotiky jsou clindamycin, cefalosporiny, aminopeniciliny a fluorochinolony (Rees et al., 1995).

Základem diagnostiky bakteriálních průjmových onemocnění je kultivace ze stolice na běžných půdách. Při podezření na pseudomembranózní kolitidu vyvolanou *C. difficile* je prováděn výtěr z konečníku. Nutný je odběr vzorku stolice velikosti lískového oříšku.

Kultivaci je někdy třeba odebrat opakovaně, protože původce nemusí být zachycen v každé stolici. Vyšetření klostridiového toxinu je zcela běžné, rutinní a pro diagnostiku poměrně časté klostridiové kolitidy zásadní (Dupont et al., 2009).

Antibiotická léčba závisí na věku, kdy u dospělých pacientů je častější než u dětí vzhledem k jejich polymorbiditě a častějšímu imunodeficitu. Avšak nutná je jen málokdy cca u 10 % pacientů. Tato léčba má význam pouze u bakteriálních průjmů, a to zejména u invazivních patogenů. Je indikovaná u pseudomembranózní enkerokolitidy vyvolané *C. difficile*. Terapii je třeba zvážit i u imunodeficientních pacientů. Délka je obvykle krátká postačuje 3–5 dní, ale může být i delší v závislosti na úpravě klinického stavu a zánětlivých parametrů (Morrow, 2009).

**Obrázek 3** Kontinuální postižení sliznice u těžké formy pseudomembranózní kolitidy



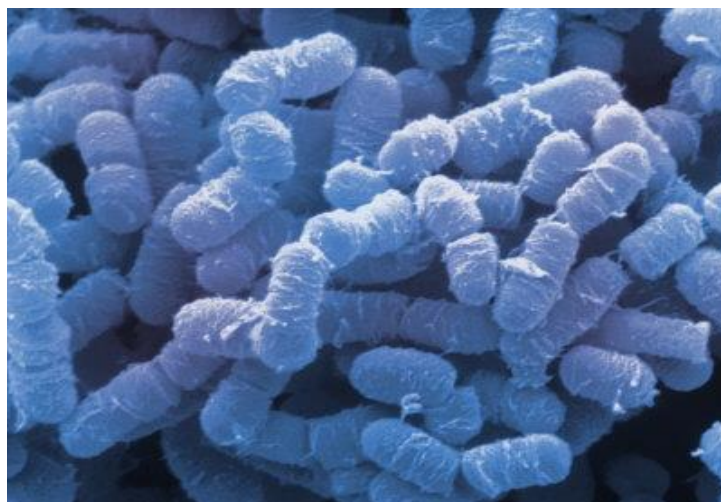
[<http://medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2012/10/06.pdf>]

#### 4.3.2 *Clostridium perfringens*

*C. perfringens* je synonymem s bakterií *Clostridium welchii*. Avšak přednost byla dána označení *C. perfringens*, protože toto druhové jméno bylo použito dříve (Simjee, 2007). Jedná se o sporulující, gram-pozitivní, anaerobní, tyčinkovitou bakterii, která tvoří velké, pravidelné, kulaté, mírně neprůhledné a lesklé kolonie na povrchu agarových ploten. Kolonie obvykle vykazují dvojitou zónu hemolýzy na krevním agaru s jasnou vnitřní beta-toxinovou zónou a vnější mlhavou zónou způsobenou tvorbou alfa-toxinu. Tyto bakterie jsou schopny

růstu mezi 15 a 50 °C, optimálně 45 °C. Doba generace (Gt), je obvykle pro většinu kmenů při teplotách mezi 33 a 49 °C méně než 20 minut (Lund and Hunter, 2008).

**Obrázek 4** *Clostridium perfringens*



[[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Gas\\_gangrene](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Gas_gangrene)]

*C. perfringens* se dělí na 5 různých typů, které mohou produkovat více než 13 různých toxinů. Jejich činnost je uvedena v tabulce 4 (Lund and Hunter, 2008). Nicméně, termín "toxin" se běžně používá k popisu antigenů, které se podílejí na vzniku lézí nebo přispívají k patogenezi u zvířat nebo člověka (Mcdonel, 1980).

**Tabulka 4** Toxiny produkované pěti různými druhy *C. perfringens* (Mcdonel, 1980; Petit et al., 1999)

Toxin	A	B	C	D	E
Alfa	+	+	+	+	+
Beta	-	+	+	-	-
Epsilon	-	(+)	-	(+)	-
Iota	-	-	-	-	(+)
Delta	-	+	+	-	-
Theta	+	+	+	+	+
Kappa	+	+	+	+	+
Lambda	-	+	-	+	+
Mu	+	+	+	+	-
Nu	+	+	+	+	+
Eta	+o	-	-	-	-
Gamma	-	+o	+o	-	-
Enterotoxin	+	o	+	+	o
Neuraminidase	+	+	+	+	+

#### Vysvětlivky k tabulce 4

+ = Produkované, některými uvedenými kmeny. Množství toxinu produkované různými kmeny se může lišit.

- = Není známo, může být produkován jakýmkoliv uvedeným kmenem.

(+) = Prototoxin, aktivace vyžaduje enzymy.

○ = Existence je nejistá.

+○ = Nebyly prostudovány.

Aktivita různých toxinů a jejich genetické uložení je uvedeno v tabulce 5. Alespoň u osmi z uvedených toxinů se předpokládá, že mohou být smrtelné. Role toxinů eta, gama, kappa, lambda, mu i nu je v patogenezi nejistá. Avšak není potvrzena existence eta a gama toxinů. Čtyři z těchto smrtících toxinů, alfa, beta, epsilon, a iota, jsou považovány za "hlavní" toxiny a jsou produkovány především těmito pěti toxikogenními typy A, B, C, D a E (Mcdonel, 1980).

**Tabulka 5** Aktivita a genetické uložení toxinů produkovaných *C. perfringens* (Mcdonel, 1980)

Toxin	Aktivita	Uložení
Alfa	smrtící; nekrotizující; hemolytický	chromozon
Beta	smrtící; nekrotizující	plazmidy
Epsilon	smrtící; nekrotizující	plazmidy
Iota	smrtící; nekrotizující	plazmidy
Delta	smrtící; hemolytický	neuveдено
Theta	smrtící; hemolytický	chromozom
Kappa	smrtící; nekrotizující; enzym želatináza	chromozom
Lambda	rozklad azocollu a kožního prášku, enzym želatináza	plazmidy
Mu	uvolňuje glukosamin z kyseliny hyaluronové	chromozom
Nu	leukocytóza u onemocnění plynaté sněti a poporodní infekci	neuveдено
Eta	pochybná existence; může být smrtelný	neuveдено
Gamma	pochybná existence; může být smrtelný	neuveдено
Enterotoxin	cytotoxické, způsobuje poškození v nadbytku; smrtící	Chromozom/ plazmidy
Neuraminidase	inhibuje funkci receptoru buněk	chromozom

Zatímco kmeny všech pěti typů *C. perfringens* vyrábí alfa toxin, avšak obvykle v největším množství jej produkuje kmen A. Podle studie Mcdonel (1980) je alfa toxin produkován kmenem typu A je izolovaný u jedinců trpících onemocněním plynaté sněti a břišních ran. Výtěžky toxinu byly nerozeznatelné od těch, které byly izolovány ze vzorků stolice od zdravých osob (Mcdonel, 1980).

Kmeny typu A jsou také spojeny s otravami jídlem u lidí. *C. perfringens* syntetizuje enterotoxin (CPE), který je odpovědný za gastrointestinální potíže. Na rozdíl od jiných toxinů, CPE je vyráběn pouze během sporulace. Nedávno byl identifikován nový toxin ( $\beta_2$ ) z kmene izolovaného ze selete, které zemřelo na nekrotickou enteritidu. Tento kmen byl původně klasifikován jako typ C, ale  $\beta_2$ -toxin je také produkován i jinými kmeny, jak bylo stanoveno v testech prováděných na myších.  $\beta_2$ -toxin je nekrotizující a má 15 % sekvenční identitu a nízkou úroveň imunologické zkřížené reakce se známým  $\beta$ -toxinem (nazývaný  $\beta_1$ ) Petit et al., 1999).

*C. perfringens* je původcem dvou odlišných alimentárních nemocí. Představuje typ A, který je mírný a patří k častěji se vyskytujícímu druhu. Vzácným typem je C, který je velmi závažný a je původcem lidské nekrotické enteritidy (Stránský a Ryšavá, 2014).  $\beta$ -toxin je produkován kmeny *C. perfringens* typu B a C avšak primárním nositelem letálního faktoru je typ C. Tento typ bakterie je také příčinou mnoha chorob u zvířat, jako jsou enterotoxemia a nekrotické enteritidy u ptáků (tabulka 6). Převážně postihuje většinu novorozených druhů hospodářských zvířat. Selata jsou obzvláště náchylná k infekcím typu C. Tyto bakterie obvykle produkují jeden nebo více toxinů (Songer, 1996; Nagahama et al., 2015).

**Tabulka 6** Onemocnění způsobené různými druhy *C. perfringens* (Mcdonel, 1980)

Druh	Onemocnění
A	plynatá snět u člověka a zvířat; otrava jídlem; nemoc z trávy u koní (EGS); nekrotizující kolitida a enterotoxemia koní
B	jehněčí úplavice; enterotoxemia hříbat, ovcí, koz
C	enterotoxemia ovcí, telata, jehňat, selat, nekrotická enteritida u člověka, slepic
D	enterotoxemia ovcí, jehňat, koz, skotu, případně i u člověka
E	patogenita nejasná; našel se u ovcí, skotu; mohou být odpovědné za kolitidy u králíků

*C. perfringens* je bakterie, tvořící spory přirozeně se vyskytující v střevním traktu mnoha teplokrevných zvířat i lidí. *C. perfringens* je bakterie, kterou je možno nalézt prakticky ve všech prostředích včetně půdy, vody, mléka, prachu, odpadů a trávicího traktu lidí a zvířat (Hatheway, 1990). *C. difficile* patří k běžným komenzalům vyskytujícím se přibližně u 5 % zdravé populace, u hospitalizovaných pacientů je však nalézán až ve 20 %. Obvykle jde o endogenní infekci, ale snadno se přenáší i velmi odolnými sporama, které nakažený vylučuje ve stolici (Polívková a Machala, 2014).

Přítomnost spor v půdě a výkalech ukazuje, že *C. perfringens* je vhodným ukazatelem fekálního znečištění (Fujioka and Shizumura, 1985), ukazatelem pro inaktivaci a odstranění virů a prvků v pitné vodě (Payment and Franco, 1993). Na základě těchto charakteristik, se *C. perfringens* používá jako indikátor povrchových zdrojů vody v Evropě (směrnice Rady 98/83 / EU). Mnohými průzkumy bylo prokázáno, že *C. perfringens* se nachází v syrových a zpracovaných potravinách avšak nejvíce v syrových masných výrobcích a koření (Lund and Hunter, 2008).

#### 4.3.2.1 Nekrotická enteritida

*C. perfringens* je hlavním původcem nekrotické enteritidy kuřat (NE), která byla poprvé popsána v roce 1961. Od té doby bylo toto onemocnění zjištěno ve všech zemích produkujících drůbež. Projevuje se jako akutní nebo chronická enterotoxemia. Akutní onemocnění způsobuje významnou mortalitu, zatímco chronické vede ke ztrátě produktivity. Již více než 30 let je enzym fosfolipáza C zvaný alfa-toxin považován za hlavní faktor virulence nekrotické enteritidy způsobené bakterií *C. perfringens*. Nicméně, s použitím genové mutace bylo v poslední době prokázáno, že alfa-toxin, není nezbytný pro vznik tohoto onemocnění. Nyní byl zjištěn, klíčový determinant virulence. Nový toxin (NetB) byl identifikován pouze u kmene *C. perfringens* typu A který byl izolován z kuřete trpícího nekrotickou enteritidou (NE). *C. perfringens* se šíří ve velkém množství v tenkém střevě a produkuje extracelulární toxiny, které poškozují střevní trakt a tak dochází ke vzniku NE. Studie spojené s identifikací nového toxinu ukazují, že je v omezené míře podobný beta-toxinu, který také produkuje *C. perfringens*. Toxin NetB byl zkoumán a bylo zjištěno, že je avirulentní v modelu zvířat, avšak proces byl obrácen, kdy byla tato mutace doplněna NetB genem divokého typu. Proto výsledky ukazují, že NetB je kritickým faktorem virulence v patogenezi kuřat. Kromě toho je NetB mutant první oslabený kmen, získaný z izolátu *C. perfringens* a má značný potenciál jako vakcína (Keyburn et al., 2008).

#### 4.4 Možnosti léčby

Při léčbě klostridiové enterokolitidy je základním opatřením ukončení původní antibiotické terapie, jelikož bylo prokázáno, že z 15-25 % indukuje nozokomiální průjmová onemocnění. Důležitou součástí terapie v nemocničním prostředí je také snaha o zamezení dalšího šíření infekce izolací pacienta. V případě lehké formy onemocnění můžeme volit symptomatickou a podpůrnou terapii. Avšak v klinické praxi je obvykle přistupováno ke kauzální terapii, což je léčba zaměřená na příčinu nemoci. Základem této léčby je použití metronidazolu a vankomycinu. Účinky těchto dvou preparátů jsou srovnatelné, jelikož u mírné až středně závažné formy onemocnění působí (90 vs. 98 %) a výskytu relapsu (20–30 %), u těžší formy se jeví účinnější vankomycin (76 % vs. 97 %; Zar et al., 2007).

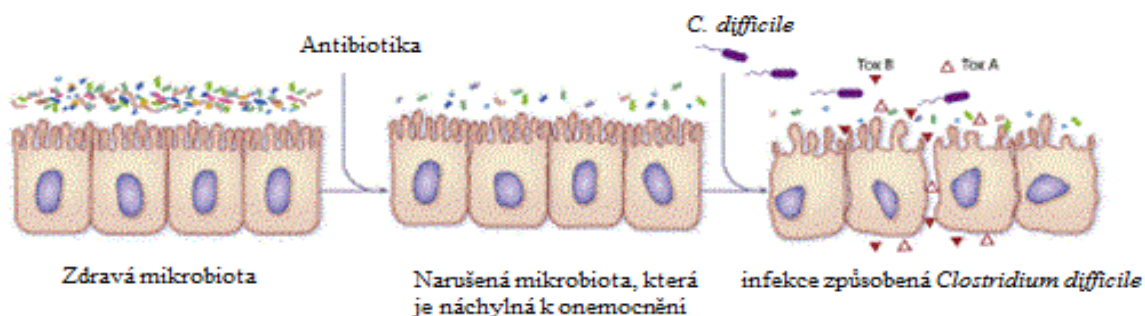
Jednou z nevýhod metronidazolu je nízká absorpce do tlustého střeva. Kromě toho se u něj projevují i vedlejší účinky jako je nevolnost, bolesti hlavy, kovová chuť a periferní neuropatie. Dále několik studií ukázalo, že léčba metronidazolem ve srovnání s vankomycinem je spojena s vyšší mírou recidivy a to zejména u těžce nemocných pacientů. Jedním z nejproblematictějších aspektů klostridiové infekce vyvolané *C. difficile* je vysoká míra recidivy. Po úspěšné léčbě metronidazolem nebo vankomycinem u 20 až 30% pacientů dojde k opětovnému propuknutí nemoci do 60 dnů. Obvykle k prvním projevům dochází již během prvních dvou týdnů. Kromě výše zmíněných preparátů v léčbě klostridiových infekcí se perspektivně jeví fidaxomicin. Jedná se o makrolidové antibiotikum, které má úzké antimikrobiální spektrum k selektivní eradikaci *C. difficile*. Ze studií bylo prokázáno, že hlavními výhodami fidaxomicinu ve srovnání vankomycinem je snížení recidivy o 45 %, jeho prodloužený postantibiotický účinek proti *C. difficile* a rychlejší vliv na celkové vyléčení pacienta. Dalším rozdílem mezi těmito dvěma preparáty je jejich účinnost. Fidaxomicin je baktericidní, jelikož rychle zabijí *C. difficile*, avšak vankomycin je pouze bakteriostatický, protože inhibuje jejich růst. Celkově lze říci, že fidaxomicin a vankomycin mají podobnou účinnost s ohledem na klinické řešení akutních průjmových onemocnění avšak menší poškození sliznice a trvalejší řešení těchto klostridiových infekcí je dosaženo díky preparátu fidaxomicinu (Louie et al., 2011).

Významným rizikovým faktorem antibiotické léčby je následná infekce *Clostridium difficile* (CDI). Ve většině případů dochází k narušení zdravé gastrointestinální mikrobioty po užívání antibiotik, což zvyšuje citlivost CDI. Podpůrná probiotická terapie poskytuje ochranu proti CDI, stabilizuje GI mikrobiotu a chrání hostitele různými mechanismy proti *C. difficile* (obrázek 5; Spinler et al., 2016; Tojo et al., 2014).

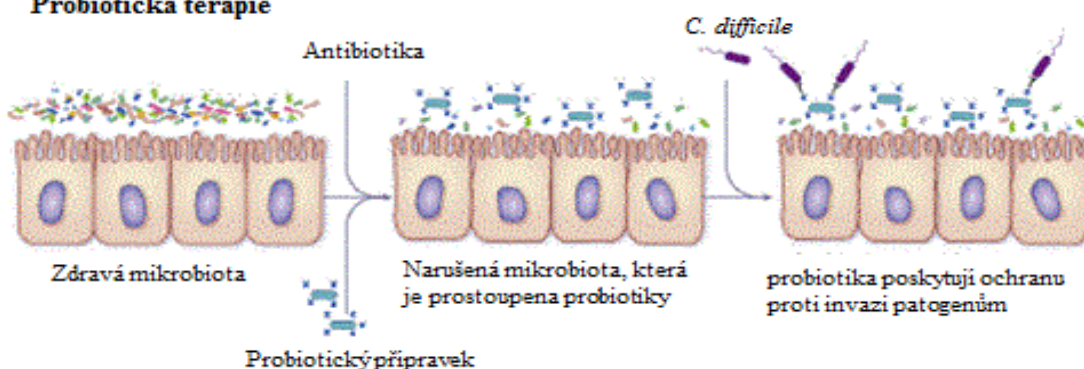


**Obrázek 5** Onemocnění GI mikrobioty *C. difficile* a následná prevence probiotiky; upraveno podle (Spinler et al., 2016)

**Vývoj onemocnění způsobené *Clostridium difficile***



**Probiotická terapie**



Současný standard péče CDI zahrnuje dodatečnou antibiotickou léčbu nemoci, která je již způsobená předchozím podáním antibiotik. Existují určité obavy o rezistenci *C.difficile* vůči antibiotikům. Ještě více znepokojivé je profylaktické použití vankomycinu nebo metronidazolu, aby se zabránilo CDI. Orální podávání těchto antibiotik je spojeno s poklesem kolonizace střevní mikrobioty, které udává vyšší riziko vzniku CDI. Stabilní růst CDI je doprovázeno zvýšeným výskytem recidivy onemocnění. Aktuální možnosti léčby pro CDI jsou omezeny na delší antibiotické režimy nebo fekální transplantace mikrobioty (FMT; Spinler et al., 2016). Navzdory různých zpráv, že probiotika jsou bezpečné a účinné pro prevenci CDI, kliničtí lékaři pracují na základě zastaralých směrnic Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA)/ the Infectious Diseases Society of America (IDSA) z roku 2010 (Cohen at al., 2010), které neposkytují zrovna nejpříznivější výsledky v léčbě recidivující CDI a mohou tak odradit využití probiotik v prevenci těchto onemocnění. Několik nedávných přezkumů a metaanalýz podporuje probiotika jako alternativní způsob léčby CDI. Doporučení, která hodnotí v odborné literatuře účinnosti probiotik a zároveň panel probiotických odborníků důsledně uvádí, že literatura dokládá použití probiotik v případě postantibiotických průjmů (Floch et al., 2015), i když zdůrazňují, že jsou zapotřebí další data pro zřejmé doporučení týkající se konkrétních dávek a kmenů (Spinler et al., 2016).

Probiotika mají největší potenciál jako přídatná léčba k antibakteriální terapii. Mohou sloužit jako prostředek k zabránění primární a recidivující CDI (Spinler et al., 2016). Z toho vyplývá, že jednou z možností léčby infekčních gastrointestinálních poruch mohou být i probiotika (Szilagyi, 2002).

#### 4.5 Probiotika

Světová zdravotnická organizace (WHO) definuje probiotika jako živé mikroorganismy, které, pokud jsou podány v adekvátním množství, mají příznivý vliv na zdraví hostitele (FAO/WHO. 2001; Kruis et al., 2004; Wood and Holzapfel, 1995).

Některým kmenům z rodu *Bifidobacterium* jsou připisovány probiotické vlastnosti jako:

- a) indukční tvorby imunoglobulinů,
- b) zlepšení nutriční hodnoty potravin asimilací substrátů, pokud není metabolizován v hostiteli,
- c) antikarcinogenní aktivita,
- d) syntéza kyseliny listové (Martinez et al., 2013).

Jedná se tedy často o bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie, které se dostávají do střeva potravou (Wood and Holzapfel, 1995). Používají se při narušení přirozené střevní mikrobioty, tedy jako léčba a prevence průjemových onemocnění, funkční zácpy, hnilobných a kvasných procesů v tlustém střevě, infekčních, cestovatelských průjmů, syndromu dráždivého tračnicku. Většina mikroorganismů z potravy je inaktivována žaludeční šťávou nebo enzymy tenkého střeva. Avšak mikroorganismy, které přežijí, se mohou usídlit v tlustém střevě a podílet se na štěpení nestrávených zbytků potravy (Morrow, 2009).

Zároveň příznivě ovlivňují mikrobiální rovnováhu v trávicím traktu a působí ve prospěch hostitele. Označení probiotický je opakem antibiotický, jelikož antibiotika zničí jak nebezpečné, tak příznivě působící mikroorganismy. Probiotika zvyšují imunitní schopnost organismu. Z toho vyplývá, že člověk pak lépe odolává běžným infekcím a zároveň má lepší obranyschopnost proti působení potenciálně karcinogenním látkám. Probiotika se používají v moderním potravinářství jako funkční přísada, která zlepšuje výživovou hodnotu výrobku a mění jej v některých případech z pouhé potraviny na funkční potravinu. Kultury musí splňovat přísná kritéria. V 1 ml výrobku musí být minimálně 10 milionů bakterií, které musí přežít kyselé žaludeční prostředí a působení žluči. Jednou z funkcí probiotik je, že kontrolují růst nežádoucích (patogenních) střevních mikroorganismů. Dochází k tomu tak, že probiotika tvoří organické kyseliny, tím dochází k poklesu pH což zastavuje jejich růst (Kunová, 2011).

Požadavky pro léčebné využití probiotik jsou velmi přísné:

- zárodky musí být jasné definovány;
- je zaručena jejich čistota;
- jsou vyloučeny faktory patogenity, především tvorba enterotoxinů a cytotoxinů, enteroinvazivita, hemolýza a sérorezistence (Zbořil, 2005).

V současné době můžeme definovat skupiny a jednotlivé mikrobiální organismy, které jsou využívány k přípravě probiotik:

- skupina nepatogenních *E. coli*;
- skupina lactobacilů a bifidobakterií;
- jiné (*Streptococcus salivarius*, *Saccharomyces boulardi*, laktokoky, enterokoky; Zbořil, 2005; Saavedra, 2007).

#### 4.5.1 Pozitivní působení probiotik

Do skupiny probiotik patří především *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*.

Připisuje se jim řada pozitivních účinků:

- podpora autochtonní střevní flóry;
- zmírnění symptomatiky u laktózové intolerance;
- prevence nebo zkrácení průběhu některých průjmových onemocnění;
- posílení efektu antibiotik při léčbě onemocnění způsobené *Helicobacter pylori*;
- zkrácení tranzitu střevního obsahu;
- zvýšení buněčné imunity;
- zmírnění symptomatiky u atopického ekzému a alergií na potraviny (Stránský a Ryšavá, 2014; Saavedra, 2007).

Mechanismus účinku probiotik spočívá:

- snížení pH ve střevech;
- snížení adheze patogenních bakterií na střevní stěně;
- stimulací aktivity fagocytů;
- zvýšení tvorby protilátek IgA;
- zábraně pomnožení patogenních mikroorganismů;
- snížení propustnosti epitelu střev pro bakterie a toxiny;
- reparaci nitrobuněčných vazeb porušených patogenními mikroorganismy;
- snížení protizánětlivých cytokinů;
- stimulací protizánětlivých cytokinů (Stránský a Ryšavá, 2014).

#### 4.5.2 Jednotlivý zástupci

**Tabulka 7** Řada probiotických kultur v důsledku jejich pozitivních účinků na průběh chorob (Stránský a Ryšavá, 2014)

<b>Průjem</b>		<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>B. bifidum</i>
	Akutní	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i>
	Prevence	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>B. bifidum</i>
	Po ATB	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. longum</i>
<b>Colitis Ulcerosa</b>		<i>B. bifidum</i>
<b>Crohnova choroba</b>		<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i>
<b>Jiné indikace</b>		<i>L. casei</i> : <i>Helicobacter pylori</i>
		<i>L. plantarum</i> : dráždivý tračník, stavy po břišních operacích, transplantaci jater, pankreatitida
		<i>L. johnsonii</i> : <i>Helicobacter pylori</i>
		<i>L. acidophilus</i> : dráždivý tračník, <i>Helicobacter pylori</i>
		<i>L. acidophilus</i> : dráždivý tračník, <i>Helicobacter pylori</i>
		<i>B. infantis</i> : dráždivý tračník

ATB - antibiotika

#### 4.5.3 Probiotika v terapii gastrointestinálních onemocnění

Kolonizace potenciálně patogenních mikroorganismů a přerůstání již přítomných oportunních kmenů nebo terapeutické podání antimikrobiálních látek způsobuje poruchy v rovnováze mezi hostitelem a normální mikrobiotou. Probiotičtí mikrobi, především laktobacily a bifidobakterie, mohou zmírnit nebo zabránit vzniku střevních poruch a tak významně redukovat riziko některých střevních onemocnění (Szilagyi, 2002; Tojo et al., 2014; von Wright and Salminen, 1999). Např. konzumace kysaného mléka obsahujícího *Lactobacillus acidophilus* prokazatelně snižuje počty hnilobných bakterií ve stolici (např. koliformních) a zvyšuje hladiny laktobacilů ve střevě (Hirayama and Rafter, 2000). *Saccharomyces boulardii* a *Enterococcus faecium* SF 68 byly testovány a následně doporučeny k prevenci nebo zkrácení doby léčby průjmu spojeného s užitím antibiotik. Použití *S. boulardii* bylo doporučeno k prevenci pozdější rekurence průjmu vyvolaného *C. difficile*. Také konzumace fermentovaných mlék obsahujících *Lactobacillus rhamnosus* GG byla doporučena ke zlepšení stavu u rotavirového průjmu a enteritidy u dětí (Marteau et al., 2001). S pomocí probiotik je možné snížit výskyt kolorektálního karcinomu (KRK). Je předpokládáno, že střevní mikrobiota může mít vliv na vznik KRK a to především na bakteriální druhy jako jsou hnilobné bakterie. Ty produkují škodlivé substance hrající roli v etiologii vzniku KRK (Cuevas-Ramos et al., 2010).

Některé probiotické druhy mohou zamezit růstu těchto škodlivých bakterií. Dokonce některé druhy mají antikancerogenní účinky. Prospěšné mohou být také interakce s buňkami kolonu či stimulace imunního systému. Na zvířecím modelu byl opakovaně prokázán příznivý účinek probiotik na inhibici genotoxicity karcinogenů a inhibici raného vývoje adenomu kolonu a redukci následných polypů a tumorů. Větší klinické či epidemiologické studie však zatím tento velmi nadějný efekt probiotik nepotvrdily (Fotiadis et al., 2008).

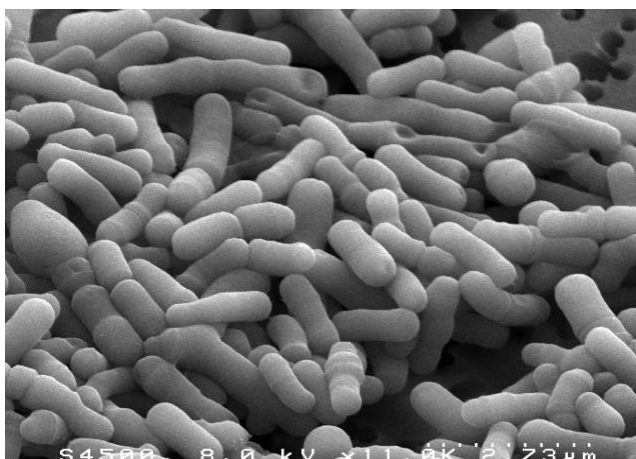
V etiopatogenezi idiopatických zánětů střevních (IZS) hraje důležitou roli rovnováha mezi prozánětlivými (např. bakterie v lumen střeva, bakteriální i potravinové antigeny) a protizánětlivými (např. slizniční bariéra, hlen) faktory, které jsou modifikovány genetickými vlivy a faktory podmíněnými prostředím. Důležitou roli hraje slizniční kompartment mikrobiální flóry. Některé tyto kmeny jsou považovány za agresivní (např. *Bacteroides* sp., *Enterococcus faecalis*, enteroinvazivní *Escherichia coli*). Naopak jiné mohou mít protektivní účinek (*Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp.). Vzhledem k tomu, že probiotika mohou řadu těchto faktorů ovlivnit, proto se jejich podání v této indikaci jeví teoreticky prospěšným. Již z první poloviny minulého století pochází první popis efektivity *Escherichia coli* Nissle. Pozitivní výsledky byly prokázány především u ulcerózní kolitidy, avšak u Crohnovy choroby není efekt jednoznačný. V oblasti léčby ulcerózní kolitidy byly publikovány studie především s kmenem *Escherichia coli* Nissle. Opakovaně byla prokázána stejná účinnost této léčby v udržení remise v porovnání se zlatým standardem léčby antibiotikem mesalazinem. Ulcerózní kolitida (UC) je chronické recidivující onemocnění. Cílem léčby je navození remise a prevence recidivy. Existují již dvě kontrolované studie, které se zabývají probiotickým bakteriálním kmenem *Escherichia coli* Nissle 1917 (ECN) v UC. Tyto studie neukázaly žádný rozdíl mezi účinkem ECN, který by zabránil opětovnému onemocnění a standardním mesalazinem. Tato studie potvrzuje, že účinky probiotické terapie s ECN a standardní podání mesalazinu proti recidivě jsou rovnocenné (Kruis et al., 2004).

Podobný efekt mělo i podání VSL3, který obsahuje tři druhy *Lactobacillus* sp., tři druhy *Bifidobacterium* sp. a *Streptococcus thermophilus*. Pilotní studie ukazují, že v této indikaci je velká pravděpodobnost, že by mohla být úspěšná i *S. boulardii*. Překvapivě se zdá, že v praxi užívá probiotika poměrně velké procento nemocných s IZS. Avšak mnohdy bez konzultací s lékařem a s výběrem kmenů, u kterých nebyl v této indikaci prokázán efekt (Hedin et al., 2010).

#### 4.5.4 Bifidobakterie

Bifidobakterie byly poprvé izolovány a popsány v roce 1899-1900 podle Tissier. Obecně je lze charakterizovat jako gram-pozitivní, anaerobní tyčinky, netvořící spory, kataláza negativní patřící do skupiny *Actinobacteria* (Bottacini et al., 2014; Ishibashi et al., 1997; Wood and Holzapfel, 1995). Původně byly klasifikovány jako *Bacillus bifidus communis*. Následně byly přejmenovány na *Lactobacillus bifidu* (Martinez et al., 2013).

**Obrázek 6** *Bifidobacterium animalis*



[<http://www.mysticalbiotech.com/product/probiotics/2960-2/>]

De Vries a Stouthamer (1967) navrhl, že by měly být překlasifikovány jako zřetelný rod *Bifidobacterium* z důvodu přítomnosti enzymu fruktóza-6-fosfátu phosphoketolase (F6PPK) a současné nepřítomnosti glukózy-6-fosfatázy (Martinez et al., 2013). Jedná se o heterofermentativní mikroorganismy (Krzewinski et al., 1996), proto jsou schopni zkvašovat glukózu na kyselinu mléčnou a octovou (v poměru 2:3) pomocí metabolické dráhy, která je charakterizována přítomností F6PPK (Salminen et al., 2004). Mají různé tvary, krátké až zakřivené tyčinky, či rozštěpené do tvaru ypsilon (Ishibashi et al., 1997). Bifidobakterie mají vysoký obsah guaninu a cytosinu (G + C), který se mění v závislosti na druhu od 54 do 67 mol % (Krzewinski et al., 1996).

Jsou přítomné v lidské střevní mikrobiotě, kdy přesný poměr je určen hlavně podle věku a stravy. Ve skutečnosti jsou bifidobakterie převládajícími střevními mikroorganismy u novorozenců a kojených dětí kdy tvoří až 91 % celkové mikrobioty. U dospělých jedinců se nacházejí v tlustém střevě, kde tvoří převažující část anaerobní mikrobioty, což představuje zhruba 3-7 % celkové mikrobioty (Bottacini et al., 2014; Hentges, 1983; Martinez et al., 2013; Wood and Holzapfel, 1995).

Počet bifidobakterií klesá s rostoucím věkem jedince a nakonec se stane třetím nejhojnějším rodem po rodu *Bacteroides* a *Eubacterium* (Hentges, 1983). Hlavní úloha bifidobakterií v hostitelských buňkách je odolnost vůči infekci. *In vitro* a laboratorní studie na zvířatech ukázaly, že bifidobakterie mají schopnost vyvíjet antagonistickou aktivitu proti patogenům. Kromě toho by antimikrobiální vlastnosti bifidobakterií mohly přispět k ochraně u kojených dětí proti infekci střeva (Lievin et al., 2000).

#### 4.5.5 Bakteriociny

Bakteriociny jsou peptidy s antimikrobiální aktivitou, které jsou produkovány bakteriemi, které jsou účinné proti jiným bakteriím. Jsou to primární nebo modifikované produkty ribozomální syntézy peptidů bakterií a mohou mít omezené nebo široké spektrum baktericidní aktivity. Mikroorganismy, které produkují vlastní bakteriocin, jsou proti němu imunní, což je vlastnost, která je zprostředkována specifickou imunitou proteinu. Produkce bakteriocinu probíhá většinou během pozdní exponenciální nebo během časně stacionární fáze (Martinez et al., 2013).

Působí aktivně hlavně proti gram-pozitivním buňkám, protože vnější membrána gram-negativních bakterií je před účinky bakteriocinů chráněna. Propustnost gram-negativních bakterií může být zvýšena subletálním poškozením vnější membrány. Bakteriociny jsou především aktivní při nízkém pH. Proto mikroorganismy, které je produkují, mohou být izolovány z čerstvých a fermentovaných potravin. Tyto bakterie mohou přirozeně produkovat i více než jeden bakteriocin. Výhoda bakteriocinů oproti klasickým antibiotikům, spočívá v jejich sugestivním enzymatickém zničení. Mikroorganismy, které produkují bakteriociny mohou být součástí nebo jako přídatek startovacích kultur fermentace potravin. Slouží za účelem zvýšení bezpečnosti a kvality potravin. Bakteriociny bakterií mléčného kvašení jsou rozděleny do čtyř hlavních tříd:

##### **Třída I-** nízkomolekulární lantibiotika

- tepelně stabilní, obsahují zbytky netypických aminokyselin
- obsahují posttranslačně modifikované aminokyseliny
- například nisin

##### **Třída II-** nízkomolekulární peptidické bakteriociny

- malé molekuly (30-100 aminokyselin), tepelně stabilní, nelantibiotika
  - IIa- pediocinové bakteriociny se silným antilisteriovým účinkem, Pediocin PA-1 produkovány *Pediococcus* spp.

- IIb- dvoupeptidové bakteriociny
- IIc- sekundárně druhotné sekrety bakteriocinů

**Třída III-** vysokomolekulární proteinové bakteriociny

- velké, termolabilní bakteriociny (> 30 kDa)

**Třída IV-** Komplexní bakteriociny

- složené z části proteinové a jedné nebo více komponent neproteinových (lipidických a sacharidických; Caplice and Fitzgerald, 1999).

**Tabulka 8** Bakteriociny produkované *Bifidobacterium* spp. a jejich hlavní charakteristiky (Martinez et al., 2013)

Bakteriocin	Kmen	Mol (kDa)	Teplotní stabilita	pH	Fáze produkce	Optimum produkce
Bifidin	<i>B. bifidum</i> NCDC 1452	(-)	(100 °C-30 min)	4,8-5,5	Po 48 h	pH 4,8
Bifidocin B	<i>B. bifidum</i> NCFB 1454	3,3	(121 °C-15 min)	2-12	(12–18 h)	37 °C, pH 5,0–6,0
Bifilong	<i>B. longum</i>	120	(100 °C-30 min)	2,5-5	(-)	(-)
Bifilact Bb-46	<i>B. longum</i> Bb-46	25-127	(121 °C-15 min)	4-7	(-)	(-)
Bifilact Bb-12	<i>B. lactis</i> Bb-12	25-89	Nestabilní za vysokých teplot	4-7	(-)	(-)
Thermophilicin B67	<i>B. thermophilum</i> RBL67	5-6	(100 °C-5 min)	2-10	24 h	40 °C pH 6
Bifidin I	<i>B. infantis</i> BCRC 14602	3	(121 °C-15 min)	4-10	18 h	(-)
Lantibiotic (Bisin)	<i>B. longum</i> DJO10A	(-)	(-)	(-)	1-8 h	Auto indukce surovým lantibiotikem



#### 4.6 Antimikrobiální aktivita bifidobakterií

Bifidobakterie mají schopnost syntetizovat organické kyseliny a další antimikrobiální sloučeniny, jako bakteriociny. V některých případech je antimikrobiální aktivita spojena s výrobou peptidů, ale přesná povaha účinné látky nebyla stanovena (Martinez et al., 2013).

První objevený bakteriocin nazvaný bifidin, byl produkován rodem *B. bifidum* NCDC 1452. Bylo zjištěno, že antimikrobiální aktivita tohoto kmene je největší, když roste v odstředěném mléce. Z tohoto média se extrahuje směsí metanol-aceton a částečně je přečištěn pomocí Sephadexu G-15 na gelové chromatografii. Vyčištěný produkt lze skladovat v chladničce po dobu 3 měsíců nebo i déle, aniž by vykazoval jakékoli ztráty aktivity. Analýza aminokyselin tohoto peptidu odhalila vysoký obsah fenylalaninu a kyseliny glutamové, v menší míře, threoninu, kyseliny asparagové, serinu, glycinu, prolinu, isoleucinu a leucinu. Avšak od poloviny roku 1980 v této studii nebyl zaznamenán žádný pokrok (Martinez et al., 2013).

Byly zjištěny i další antimikrobiální látky u šesti sledovaných kmenů rodu *Bifidobacterium*, které vykazovaly široké inhibiční spektrum proti gram-negativním a gram-pozitivním bakteriím, zejména proti *C. difficile*. *B. longum* DJO10A produkuje bakteriocin (Bisin), který je považován za autoinduktivní lantibiotikum a je účinný také proti *C. perfringens*. Bifidocin B je produkován *B. bifidum* NCFB 1454 a vykazuje aktivitu proti bakteriím rodů *Listeria*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus*, *Clostridium*, *Leuconostoc* a *Bacillus*. Jeho baktericidní aktivita způsobila pokles 99 % v CFU/ ml všech kmenů již po 30 minutách. Bifidocin B udržuje svou biologickou aktivitu mezi pH 2 a 12 a je více stabilní za kyselých než alkalických podmínek. Bylo také zjištěno, že je inaktivován proteázami, jako je trypsin, a-chymotrypsin, papain nebo pepsin, avšak na lysozym, ribonukleázy A, glukózo oxidázy, lipázy, amylázy a katalázy nemá žádný vliv. Kmen *B. longum* produkuje bakteriocin bifilong, který inhibuje některé gram-negativní a gram-pozitivní bakterie a je stabilní v rozmezí pH 2,5 až 5,0. Bakteriocin bifilact označený jako Bb-12 produkován *B. lactis* a bifilact Bb-46 produkován *B. longum*. U těchto dvou bakteriocinů bylo prokázáno, že vykazují silnou aktivitu proti *Staphylococcus aureus*, *S. typhimurium*, *Bacillus cereus*. Optimálně působí při hodnotách pH 4 a 7, jsou odolné vůči působení alfa-amylázy nebo lipázy. Avšak jsou citlivé na pepsin a trypsin. Bakteriocin thermophilicin B67 produkován *B. thermophilum* vykazuje činnost v širokém rozmezí pH 4-8 a při teplotě 25-47 °C (Martinez et al., 2013). Bifidin I byl purifikován z *B. infantis* BCRC 14602 postupně ve třech krocích. Jeho inhibiční spektrum zahrnuje gram-pozitivní a gram-negativních bakterie, což je důležitá vlastnost bakteriocinů pro jejich uplatnění v

konzervaci potravin. Použitý kmen *B. infantis* BCRC 14602 produkující bakteriocin je velmi užitečný jako startovací nebo ochranná kultura v mlékárenském průmyslu (Cheikhyoussef et al., 2010).

Antimikrobiální aktivita bifidobakterií byla zkoumána pomocí dvou infikovaných myších modelů. V prvním modelu mikrobiota chybí a epitel není plně diferencovaný. Druhý model je u běžných myší, které mají jak mikrobiotu tak plně diferencovaný epitel. Nicméně antagonistická aktivita bifidobakterií proti některým bakteriím a virům, které se podílejí na průjmu u lidí, nemůže být zkoumána za použití myších modelů, protože tyto patogeny jsou vysoce specifické pro lidské tkáně, a to především v důsledku strukturálních rozdílů mezi člověkem a myší. Na základě důkazů z *in vitro* a *in vivo* studií se zdá, že antimikrobiální aktivita bifidobakterií je kmenově specifickou vlastností a nemůže být extrapolována na jiné kmeny (Servin, 2004).

## 5 Materiál a metody

Hlavním úkolem diplomové práce bylo testování antimikrobiální aktivity a nalezení vhodných probiotických kmenů bifidobakterií proti potenciálním patogenům *C. perfringens* a *C. difficile*, které způsobují časté infekční onemocnění trávicího traktu. Praktická část je složena ze tří experimentů. V první části byla využita difúzní disková metoda k testování antimikrobiální aktivity bifidobakterií proti klostridiím. Pokud určitý kmen z rodu bifidobakterií tvořil některé antimikrobiálně působící látky, došlo k vytvoření inhibiční zóny v okolí jamky s příslušným supernatantem. Po té byl změřen průměr vybudovaných inhibičních zón. Součástí této části bylo i určení času, ve kterém dochází k produkci antimikrobiální látky. Druhá část byla zaměřena na testování supernatantů s upravenými vlastnostmi. Tato část experimentu byla tvořena třemi dílčími pokusy. Jednalo se o testování tepelné stability supernatantů, druhým dílčím pokusem byla změna pH příslušného supernatantu a posledním pokusem byl přídavek proteinázy K. Třetí část byla složena ze dvou pokusů. Nejprve došlo k otestování filtrátu pomocí speciálního filtru umožňující oddělení případně přítomných peptidů a poté došlo k přidavku tweenu do kultivačního média, abychom zjistili, zda dojde ke zvýšení antimikrobiální aktivity.

Dále jsme se zaměřili na to, zjistit za jakých podmínek dochází k produkci antimikrobiální látky a vyrobit ji ve větším množství pro další testování.

### 5.1 Charakteristika použitých kmenů

Pro testování antimikrobiální aktivity bifidobakterií proti klostridiím, bylo použito 12 kmenů rodu *Clostridium* a 12 kmenů rodu *Bifidobacterium*.

Z rodu *Clostridium* byly k testování použity 3 kmeny *C. perfringens* ČZU KMVD CL1, *C. perfringens* ČZU KMVD CL4, *C. perfringens* ČZU KMVD CL5, které pocházely ze sbírky mikroorganismů Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze. Tyto kmeny byly izolovány ze stolice telat. Dalších 7 kmenů *C. perfringens* DSM 11778, *C. difficile* DSM 12056, *C. difficile* DSM 27147, *C. acetobutyricum* DSM 792, *C. butyricum* DSM 10702, *C. clostridioforme* DSM 933, *C. tertium* DSM 2485, bylo použito ze sbírky DSMZ = Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Zbýlé 2 kmeny *C. perfringens* CCM 4435, *C. difficile* CCM 3593 byly použity z CCM = České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms). Seznam a taxonomické zařazení klostridií jsou uvedeny v tabulce 9.

Z rodu *Bifidobacterium* byly použity potenciálně probiotické kmeny, které byly výhradně izolovány ze stolice telat. Těmito kmeny jsou *B. animalis* subsp. *animalis* kmen BIF 1, *B. animalis* subsp. *animalis* BIF 2, *B. animalis* subsp. *animalis* BIF 3, *B. thermophilum* BIF 4, *B. choerinum* BIF 5, *B. thermophilum* BIF 6, *B. animalis* subsp. *animalis* BIF 7, *B. thermophilum* BIF 8, *B. longum* subsp. *suis* BIF 9, *B. thermophilum* BIF 10, *B. animalis* subsp. *animalis* BIF 11, *B. longum* subsp. *suis* BIF 12. Seznam a taxonomické zařazení bifidobakterií jsou uvedeny v tabulce 10. Kmeny bifidobakterií byly vybrány na základě předchozích testů prováděných na KMVD, které indikovaly možnou antimikrobiální aktivitu kmenů tohoto původu.

**Tabulka 9** Testované kmeny rodu *Clostridium*

<b>Taxonomické zařazení</b>	<b>Původ</b>
<i>C. perfringens</i> CCM 4435 (DSM 756)	hovězí maso
<i>C. perfringens</i> DSM 11778	hamburger
<i>C. perfringens</i> ČZU KMVD CL1	stolice telete
<i>C. perfringens</i> ČZU KMVD CL4	stolice telete
<i>C. perfringens</i> ČZU KMVD CL5	stolice telete
<i>C. difficile</i> DSM 12056	bachor čerstvě narozeného jehněte
<i>C. difficile</i> DSM 27147	stolice pacienta se symptomatickými příznaky
<i>C. difficile</i> CCM 3593 (DSM 1296)	stolice při průjmovém onemocnění
<i>C. acetobutyricum</i> DSM 792	rostliny, potraviny, kukuřičná mouka
<i>C. butyricum</i> DSM 10702	střeva prasete
<i>C. clostridioforme</i> DSM 933	bachor telete
<i>C. tertium</i> DSM 2485	neuvedeno

DSMZ= Německá sbírka pro mikroorganismy a buněčné kultury

(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen);

CCM =České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms)

Kmen *C. perfringens* CCM 4435 byl izolován z hovězího masa. Jedná se o typ A, který produkuje alfa toxin (lecithináza), fosfolipázu C, hemolizin a smrtící toxiny. Tento typ kmene je doporučený jako kontrolní kmen pro antimikrobiální testování citlivosti anaerobních bakterií. Jedná se o kontrolní kmen kvality podle European Pharmacopoeia, což je hlavní

regionální lékopis, který poskytuje společné normy kvality ve farmaceutickém průmyslu v Evropě s cílem kontrolovat kvalitu léčiv a látek používaných k jejich výrobě.

Kmen *C. difficile* CCM 3593 byl izolován ze stolice při průjmovém onemocnění. Produkuje cytotoxin. Je zodpovědný za metabolismus aminokyselin. Pozitivní PCR pro toxiny A a B (*tcdA* a *tcdB*) a negativní PCR pro binární toxiny (*ctdA* a *ctdB*).

*C. perfringens* DSM 11778 byl izolován z hamburgeru, jedná se o typ A, který je beta hemolytický. *C. difficile* DSM 12056 byl izolován z bacheru čerstvě narozeného jehněte. PCR je pozitivní pro toxiny A a B (*tcdA*, *tcdB*) a negativní PCR pro binární toxiny (*ctdA*, *ctdB*). *C. difficile* DSM 27147 byl izolován ze stolice pacienta, který měl symptomatické příznaky. Obsahuje ribotyp 027 s delecí 18BP v *tcdC* genu. Genom byl sekvenován. Pozitivní PCR pro toxiny A a B (*tcdA* a *tcdB*) a binární toxin (*ctdA* a *ctdB*). *C. acetobutyricum* DSM 792 byl izolován z rostlin, potravin či kukuřičné mouky. Produkuje aceton, n-butanol, acidolysin, auto bakteriocin a degraduje xylan. *C. butyricum* DSM 10702 byl izolován ze střev prasete a produkuje bakteriocin, který se nazývá butyricin. *C. clostridioforme* DSM 933 byl izolován z bacheru telete.

**Tabulka 10** Testované kmeny rodu *Bifidobacterium*

Taxonomické zařazení	Označení kmene	Původ
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Kmen BIF 1	stolice telete
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Kmen BIF 2	stolice telete
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Kmen BIF 3	stolice telete
<i>B. thermophilum</i>	Kmen BIF 4	stolice telete
<i>B. choerinum</i>	Kmen BIF 5	stolice telete
<i>B. thermophilum</i>	Kmen BIF 6	stolice telete
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Kmen BIF 7	stolice telete
<i>B. thermophilum</i>	Kmen BIF 8	stolice telete
<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>	Kmen BIF 9	stolice telete
<i>B. thermophilum</i>	Kmen BIF 10	stolice telete
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Kmen BIF 11	stolice telete
<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>	Kmen BIF 12	stolice telete

## 5.2 Disková difúzní metoda

Disková difúzní metoda byla použita ke sledování antimikrobiální aktivity potencionálně probiotických kmenů bifidobakterií k jednotlivým kmenům klostridií, které se mohou chovat, jako patogeny v trávicím traktu. Dále pak proti dalším kontrolním kmenům

klostridií. Do agaru byly vytvořeny jamky, do kterých byl aplikován supernatant z příslušných probiotických kmenů.

Jestliže probiotický kmen produkoval antimikrobiálně působící látky, vytvořila se inhibiční zóna kolem jamek s příslušným supernatantem. Inhibiční zóna byla kulatého tvaru a její velikost byla závislá na stupni citlivosti testovaného kmene ke koncentraci antimikrobiální látky v daném supernatantu. Velikost inhibiční zóny se udává v mm a je znázorněna na obrázku č. 8.

### 5.2.1 Použité zařízení a pomůcky

- Automatické pipety s nastavitelným objemem Eppendorf
- Centrifuga Eppendorf
- Eppendorfkové mikrozkušavky
- Chladnička
- Injekční stříkačky
- Korkovrt
- Laboratorní předvážky
- Laboratorní sklo (Petriho misky, sklopná pipeta, kádinky)
- Sterilní jehly
- Termostat (teplota 37 °C)
- Tlakový hrnec
- Vyvíječ anaerobní atmosféry

### 5.2.2 Kultivační médium

#### Wilkins-Chalgren anaerobic agar

Složení (množství jednotlivých složek uvedeno na 1 litr půdy):

- Agar 43 g
- Sójový pepton (Oxoid) 5 g
- Tween 80 (Sigma) 1 ml
- L-cystein (Sigma) 5 g

#### Bujón

- Agar 33 g
- Sójový pepton (Oxoid) 5 g
- Tween 80 (Sigma) 1 ml
- L-cystein (Sigma) 5 g

### 5.2.3 Vlastní provedení diskové difúzní metody

Nejprve bylo připraveno kultivační médium smícháním agaru, sójového peptonu, tweenu a L-cysteinu. Následně byl Wilkins-Chalgren anaerobic agar 60 min sterilován v tlakovém hrnci. Poté byl přenesen do vodní lázně, kde byl vytemperován na 48 °C. Dále byl naočkován 1 ml narostlé kultury klostridií do předem připravených Petriho misek a zalit 20 ml agaru pomocí sklopné pipety. Agar se zaočkovanou kulturou byl opatrně promíchán třemi krouživými pohyby na obě strany, aby byl nárůst rovnoměrný. Potom byl vložen na několik minut do lednice, aby zatuhl. Jakmile agar vytvořil tuhou strukturu, bylo pomocí vyžíhaného korkovrtu (obrázek 7) vytvořeno 6 jamek na předem označené místa lihovým fixem. Z jamek byl přebytečný agar odstraněn sterilní jehlou. Následně bylo do jamek dávkováno 40 µl supernatantu pomocí automatické pipety.

### 5.2.4 Příprava supernatantu pro testování

Jednalo se o supernatant čerstvě narostlé bakteriální kultury v modifikovaném Wilkins-Chalgren bujónu popsaném výše. Do označených penicilinek s 9 ml bujónu byl předchozí den zaočkován v množství 0,3 ml testovaný kmen ze zásobního zmraženého vzorku a byl kultivován při 37 °C 24 h. Taktéž klostridie bylo třeba před vlastním testováním nechat čerstvě narůst.

Supernatant byl připraven tak, že do sterilní ependorflky bylo naočkováno 1 ml narostlé bakteriální suspenze potenciálně probiotického kmene, který byl následně odstředěn v centrifuze po dobu 3 minut při 16000 otáčkách/min. Na jedné Petriho misce byla testována antimikrobiální aktivita 6 probiotických kmenů. Poté byly misky vloženy do plastové dózy s vyvíječem anaerobní atmosféry a kultivovány po dobu 24 hodin v termostatu při teplotě 37 °C. Po uplynulé době kultivace byly změřeny v mm vzniklé inhibiční zóny (obrázek 8) kolem jamek.

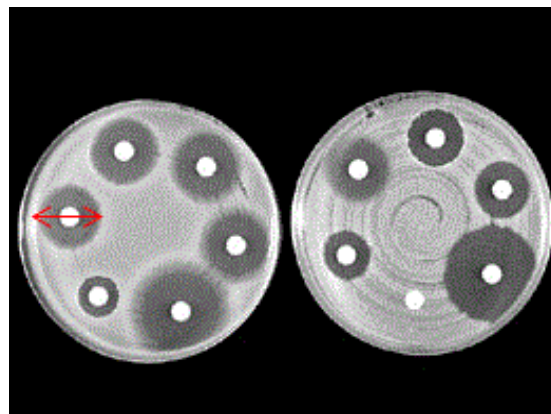
Uvedené testování bylo provedeno ve dvou kopiích pro každý kmen a celkově bylo zopakováno dvakrát pro kontrolu výsledků.

**Obrázek 7** Korkovrt



[<http://analytika.sk/VIZLAB/foto/pk13.jpg>]

**Obrázek 8** Inhibiční zóny



[<http://casopis.vesmir.cz>]

### 5.3 Detekce času produkce antimikrobiální látky

V této části byly testovány pozitivní kmeny bifidobakterií, které vykazovaly antimikrobiální aktivitu. Cílem bylo vyrobit větší množství látky, která podporuje antimikrobiální aktivitu a zjistit, ve kterém čase se začne produkovat. Obecně je známo, že tyto antimikrobiální substancce jsou produkovány až v sekundární fázi křivky.

#### 5.3.1 Postup práce

Byl vybrán jeden reprezentativní vzorek z rodu *B. animalis* subsp. *animalis* a *B. choerinum*. Tyto kultury byly ze zásobního zmrazeného vzorku zaočkovány do 45 ml Wilkins-Chalgren anaerobic bujónu v množství 1,5 ml a následně byly kultivovány v termostatu při 37 °C. V průběhu kultivace byly vzorky postupně odebírány po 1 ml v časovém intervalu po 2 hodinách. U vzorku bylo vždy změřeno pH a posouzena optická denzita. Jestliže došlo k poklesu pH, byl potvrzen růst vzorku. Další faktor, který potvrzoval růst vzorku, je jeho zakalení, což se projevilo změnou optické denzity. Supernatant byl připraven naočkováním 1 ml narostlé bakteriální suspenze do sterilní ependorfy a následně odstředěn v centrifuze po dobu 3 minut při 16000 otáčkách/min. U této sérii supernatantů byl zopakován test na antimikrobiální aktivitu. Tento test byl proveden pouze u dvou reprezentativních vzorků *B. animalis* subsp. *animalis* a *B. choerinum*, které fungovaly již v předchozím testování. Bylo zjištěno, že nezáleží na tom, z jaké časové fáze supernatant pochází, protože velikost inhibiční zóny byla shodná. Poslední vzorek, který byl odebrán po 36 hodinách, byl znovu zaočkován a následně byl proveden stejný test vzorkování v časovém intervalu po 2 hodinách. Bylo zjištěno, že zaočovaný vzorek opět vytvořil inhibiční zónu. Dále bylo provedeno testování u ostatních vzorků, které byly odebírány v průběhu růstu, a u nich nedošlo k vytvoření inhibiční zóny. Bylo usouzeno, že vzorky byly již hodně naředěny a



z toho důvodu již neúčinkovaly. Proto byla původní kopie vzorku (zamražený zásobní roztok testované kultury) opět odstředěna v centrifuze po dobu 3 minut při 16000 otáčkách/min a se vzniklým supernatantem byla provedena disková difúzní metoda. Byla zjištěna mnohem větší inhibiční zóna. Z toho vyplývá, že proti klostridiím pravděpodobně funguje látka obsažená v zamraženém médiu.

Podrobnou tabulku s testovanými kmeny je možné najít v přílohách této diplomové práce.

#### **5.4 Testování supernatantů s upravenými vlastnostmi**

K následujícímu testování byly vybrány dva reprezentativní vzorky, kdy první z nich byl *C. difficile* 3593 CCM a druhý *C. perfringens* 11778 DSM. Toto testování bylo provedeno pouze u dvou vzorků bifidobakterií, jelikož jsme disponovali velmi malým množstvím supernatantů. U těchto vzorků došlo v předchozím testování k vytvoření příslušných inhibičních zón, což bylo zaznamenáno jako pozitivní výsledek. Chtěli jsme více zjistit o neznámém produktu, proto jsme u těchto pozitivních supernatantů otestovali, jak jsou tepelně stabilní, jaký má na jejich účinek vliv změna pH a jak reagují na přidavek proteinázy K. Takto ošetřené supernatanty, byly otestovány již výše uvedenou metodou (difúzní disková metoda).

##### **5.4.1 Postup práce**

Nejprve došlo k ověření tepelné stability supernatantů po dobu 30 minut při teplotě 100 °C. Také byla provedena změna pH u právě rozmraženého vzorku, která byla na začátku okolo hodnoty 5. Tato úprava proběhla pomocí roztoků HCl a NaOH na pH hodnoty 2, 7, 9. Poslední částí tohoto pokusu bylo použití proteinázy K. Tímto testováním bylo ověřeno, jestli změna teploty, pH a přidavek proteinázy K v koncentraci 0,1 mg /1 ml působí na tvorbu inhibičních zón.

#### **5.5 Separace případně přítomných proteinů**

V této části testování byly použity dva vzorky bifidobakterií s pozitivním účinkem. Byl použit speciální filtr (Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Devices; Merck), který zachytí protein, jestliže bude přítomen v pozitivním supernatantu. Tudíž lze získat část vzorku s případným obsahem proteinů (velikosti větší než 3 kDa) a filtrát bez proteinů (detekční limit 3 kDa).

### 5.5.1 Postup práce

Nejdřív bylo naočkováno 2 ml z každého vzorku do ependorfy a následně odstředěno na centrifuze po dobu 3 minut při 16000 otáčkách/min. Po té bylo 1000 µl filtrátu pipetováno do speciálního filtru a následně odstředěno na odstředivce po dobu 20 min při 7500 otáčkách /min. Jelikož vzniklo malé množství filtrátu, odstředění bylo provedeno ještě jednou za stejných podmínek.

## 5.6 Testování vlivu tweenu na antimikrobiální aktivitu

Tímto přídavkem jsme chtěli zjistit, jestli zvýšené množství tweenu v kultivačním médiu ovlivní antimikrobiální aktivitu bifidobakterií, jelikož působí jako detergent a někteří autoři uvádějí jeho vliv na podporu antimikrobiální aktivity.

### 5.6.1 Postup práce

Testované kultury bifidobakterií byly tentokrát zaočkovány do modifikovaného Wilkins-Chalgren média, které obsahovalo 1 % tweenu oproti běžně používanému přídavku v koncentraci 0,1 %. Kultivace probíhala za podmínek, které byly používány v předchozích testech a totéž následné testování pomocí deskové difúzní metody.

## 6 Výsledky

### 6.1 Výsledky testování citlivosti klostridií k antimikrobiální látce

Celkem byly otestovány 4 druhy (12 kmenů) bifidobakterií, kdy se jednalo o izoláty zvířecího původu. K testování byly použity kmeny *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. thermophilum*, *B. choerinum*, *B. longum* subsp. *suis*, které byly izolovány ze stolice telete. Toto testování bylo především zaměřeno na *C. perfringens* a *C. difficile*.

Celkem 4 kmeny vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti výše zmíněným druhům klostridií. Z toho 3 kmeny byly z poddruhu *B. animalis* subsp. *animalis* a 1 kmen z druhu *B. choerinum*. Z poddruhu *B. animalis* subsp. *animalis* bylo celkem zastoupeno 5 kmenů, kdy 3 z nich vykazovaly jasnou antimikrobiální aktivitu a 2 nikoliv. Ostatní použité kmeny druhu *B. thermophilum* a poddruhu *B. longum* subsp. *suis* nevykazovaly žádnou antimikrobiální aktivitu.

Z těchto výsledků vyplývá, že pouze některé kmeny náležící k *B. animalis* subsp. *animalis* a *B. choerinum* vykazovaly jasnou antimikrobiální aktivitu proti *C. perfringens* a *C. difficile* a uvedená antimikrobiální aktivita byla shledána jako kmenově specifická.

**Tabulka 11** Antimikrobiální aktivita jednotlivých kmenů bifidobakterií proti *C. perfringens* a *C. difficile*

Taxonomické zařazení	Označení kmene	Antimikrobiální aktivita
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Kmen BIF 1	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Kmen BIF 2	+
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Kmen BIF 3	+
<i>B. thermophilum</i>	Kmen BIF 4	-
<i>B. choerinum</i>	Kmen BIF 5	+
<i>B. thermophilum</i>	Kmen BIF 6	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Kmen BIF 7	-
<i>B. thermophilum</i>	Kmen BIF 8	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>	Kmen BIF 9	-
<i>B. thermophilum</i>	Kmen BIF 10	-
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Kmen BIF 11	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>	Kmen BIF 12	-

(+) Vykazuje antimikrobiální aktivitu

(-) Nevykazuje antimikrobiální aktivitu

Celkem bylo otestováno 6 druhů (11 kmenů) klostridií, které jsou uvedeny v tabulce 11. Nejprve byly otestovány kmeny *C. difficile* CCM 3593 a *C. perfringens* DSM 11778 u kterých došlo k vytvoření inhibičních zón. V prvním případě u *C. difficile* CCM 3593 se vytvořila zóna o průměru 13 a 12 mm a v druhém případě u *C. perfringens* DSM 11778 se vytvořila zóna o něco menší a to 8 mm. Následně se pokračovalo s kmeny *C. difficile* DSM 12056, která vytvořila největší inhibiční zónu (průměr 14 a 15 mm) a s *C. difficile* DSM 27147. Po té byly otestovány kmeny *C. perfringens* ČZU KMVD CL4 a CL5, které pocházely ze stolice dvou různých telat. To se projevilo i v různé velikosti inhibičních zón, kdy *C. perfringens* ČZU KMVD CL4 vytvořila zónu o průměru 10 mm a *C. perfringens* ČZU KMVD CL5 zónu o průměru 8 mm. *C. perfringens* CCM 4435 je kravského původu a u ní se nevytvořila žádná inhibiční zóna, tudíž je výsledek negativní. Kromě *C. perfringens* a *C. difficile* u kterých se projevilo pozitivním působení bifidobakterií, byly přidány i další druhy jako jsou *C. acetobutyricum* DSM 792, *C. butyricum* DSM 10702, *C. clostridioforme* DSM 933 a *C. terium* DSM 2485. Bylo zjištěno, že bifidobakterie vykazují antimikrobiální aktivitu i proti těmto druhům klostridií, což se projevilo vytvořením inhibičních zón o velikosti 8- 10 mm.

**Tabulka 12** Výsledky antimikrobiální aktivity pozitivních supernatantů

		<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Clostridium acetobutyricum</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium clostridioforme</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium tertium</i>
Vzorek	pH	20087	792	10702	933	3593	12056	27147	4435	11778	CL4	CL5	2485
BIF1	5,1	-	10	9	10	13	14	9	-	8	10	8	8
BIF5	6,1	-	13	9	12	12	15	10	-	8	10	8	8

BIF 1= *B. animalis* subsp. *animalis*

BIF 5= *B. choerinum*

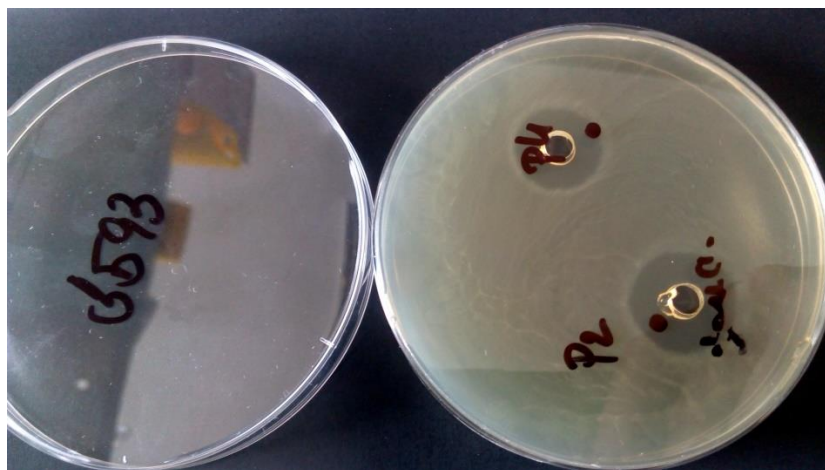
Hodnoty v tabulce 12 jsou průměry inhibičních zón ze dvou opakování testu uvedené v mm.

Také byl použit kontrolní vzorek kmen *Bifidobacterium adolescentis*, což je typická bifidobakterie, která se nachází v trávicím traktu dospělých osob a také i zvířat. U tohoto kmene nevznikla žádná inhibiční zóna, což potvrdilo, že bifidobakterie nepůsobí proti sobě.

V druhé části testování byl sledován čas, ve kterém je produkována antimikrobiální látka. Jednotlivé kmeny, které fungovaly v první kopii, byly postupně přeočkovávány v časových intervalech po 2 hodinách. Bylo zjištěno, že bifidobakterie vykazují antimikrobiální aktivitu pouze v první kopii (obrázek 9 a 10), což je neupravená forma izolátu. Nezáleží jak dlouho budeme původní izolát kultivovat, jelikož výsledek je pořád stejný a nezávisí na tom, z jaké časové fáze supernatant pochází, protože velikost inhibiční zóny byla shodná. Dalším testováním bylo zjištěno, že v druhé kopii izoláty již nefungují, což je pravděpodobně způsobeno jejich vysokým naředěním.

V této části testování bylo zjištěno, že u původní kopie vzorku došlo k vytvoření mnohem větší inhibiční zóny. Z toho vyplývá, že proti klostridiím pravděpodobně funguje látka obsažená v zamraženém médiu.

**Obrázek 9** Inhibiční zóny vytvořené původní kopií vzorku proti *C. difficile* CCM 3593



**Obrázek 10** Inhibiční zóny vytvořené původní kopií vzorku proti *C. perfringens* DSM 11778



## 6.2 Výsledky testování supernatantů s upravenými vlastnostmi

Jako první část tohoto testování byla provedena úprava supernatantů, abychom zjistili jestli pH, teplota a přídavek proteinázy K ovlivní antimikrobiální aktivitu. Nejprve bylo upraveno pH supernatantů a to pomocí NaOH a HCl, čímž bylo dosaženo hodnot pH 2, 5, 7, 9. U takto upraveného supernatantu byla prokázána antimikrobiální aktivita, detekována i u neupraveného vzorku. Tímto testováním bylo prokázáno, že úprava pH neměla výrazný vliv na dříve detekovanou antimikrobiální aktivitu. Nicméně v případě okyselení na pH 2 došlo k vytvoření znatelně větší inhibiční zóny, což je vidět v tabulce 13. Z toho vyplývá, že v tomto případě nepůsobila pouze antimikrobiální látka, ale i změna pH.

Druhým krokem bylo zahřátí na teplotu 100 °C po dobu 30 minut. Avšak nejpodstatnější bylo zjistit tepelnou stabilitu antimikrobiální látky. Bylo prokázáno, že ani zahřátí nemělo vliv na daný supernatant, jelikož vykazoval jasné inhibiční zóny o velikosti mezi 10 - 12 mm. Poslední částí bylo ošetření proteinázou K v běžně používané koncentraci. V tomto případě taktéž nedošlo k omezení ani výraznému vzrůstu antimikrobiální aktivity.

**Tabulka 13** Výsledky antimikrobiální aktivity s upravenými vlastnostmi

	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
Vzorek	3593	11778
BIF1- pH 2	25	16
BIF1- pH 5	14	9
BIF1- pH 7	12	9
BIF1- pH 9	12	9
BIF1- 30 min 100 °C	12	10
BIF1- 30 min 50 °C + proteináza K	12	10
BIF5- pH 2	24	15
BIF5- pH 5	13	9
BIF5- pH 7	11	9
BIF5- pH 9	11	9
BIF5- 30 min 100 °C	11	10
BIF5- 30 min 50 °C + proteináza K	11	10

BIF 1= *B. animalis* subsp. *animalis*

BIF 5= *B. choerinum*

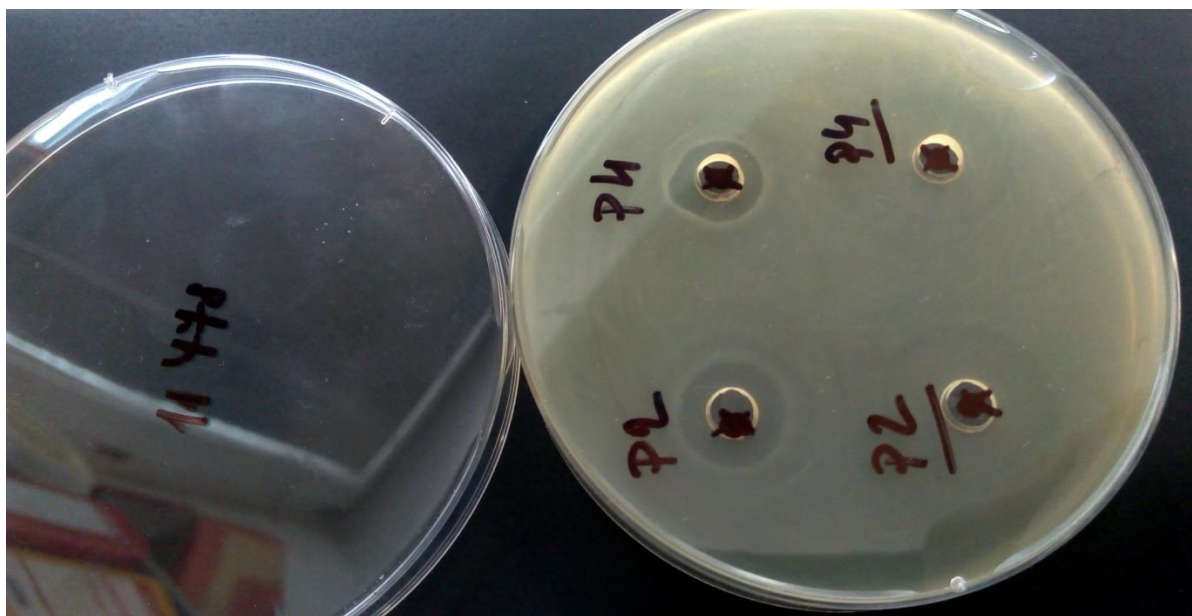
Hodnoty v tabulce 13 jsou průměry inhibičních zón ze dvou opakování testu uvedené v mm.

### 6.3 Nalezení optimálních podmínek produkce antimikrobiálních látek

V této části byl otestován filtrát pomocí speciálního filtru a to z důvodu, abychom o něm zjistili více informací. Byla zde hypotéza, že se jedná o produkt bifidobakterií, který vykazuje tuto antimikrobiální aktivitu, avšak ta se nepotvrdila. Proto se domníváme, že se jedná o přídatnou látku pravděpodobně bílkovinné povahy. Pomocí tohoto filtru jsme získali supernatant bez proteinů větších jak 3 kD a tento supernatant jsme zanalyzovali. Získaný supernatant byl následně testován diskovou difúzní metodou, abychom zjistili, jestli u něj došlo ke zvýšení antimikrobiální aktivity. Na obrázku 11 jsou znázorněny inhibiční zóny vzorku před filtrací (P2, P4) a po filtraci (P2, P4). Filtrace ukázala, že se pravděpodobně jedná o peptid, jelikož dříve získaný antimikrobiální supernatant dále netvořil inhibiční zóny. Tudíž je důležité, aby tento případný peptid byl podrobněji zkoumán. Jedinou nevýhodou je fakt, že této látky máme omezené množství.

Byl také otestován přídavek tweenu v koncentraci 1 % na antimikrobiální aktivitu, který byl přidán do modifikovaného Wilkins-Chalgren média. Je jedno jaké procentuální zastoupení tweenu je přidáno do média, jelikož nebyly zaznamenány žádné změny ve velikosti vytvořených inhibičních zón, což znamená, že antimikrobiální aktivita bifidobakterií byla pořád stejná.

**Obrázek 11** Vzorek supernatantu před a po filtraci



## 7 Diskuze

Obecně je známo, že bifidobakterie produkují antimikrobiální látky. Bakteriociny jsou antimikrobiální proteinové sloučeniny, které jsou letální pro příbuzné bakterie a potravinové patogeny (Yildirim et al., 1998). Bifidobakterie jsou jednou z nejhojnějších skupin mikroorganismů v lidském tlustém střevě. Důležitý aspektem je inhibiční účinek bifidobakterií na jiné mikrobiální populace, proti kterým mají specifický imunitní mechanismus (Biavati et al., 2000). U vyšších organismů, antimikrobiální peptidy přispívají k udržení přirozené imunity a jsou součástí základní obranné linie proti škodlivým mikroorganismům. Díky těmto látkám bakterie mezi sebou soutěží (Hassan et al., 2012). Podle Meghrous et al. (1990) bakterie, které produkují bakteriociny, mohou získat konkurenční výhodu nad sousedními citlivými kmeny. Dle studie Varela et al. (2016) byl zjištěn potenciál vybraných kmenů rodu *Bifidobacterium* pro inhibici růstu *C. difficile* díky působení antimikrobiálních látek. Meghrous et al. (1990) poprvé poskytl důkaz o tom, že bifidobakterie jsou schopny produkovat antimikrobiální látky, které mají vlastnosti bakteriocinů. Odhaduje se, že drtivá většina všech bakterií a archebakterií produkují alespoň jeden bakteriocin (Dobson et al., 2011). Podle studie Dobson et al. (2011) byla provedena analýza izolátu *B. longum* subsp. *longum* DJO10A, která prokázala, že produkce bakteriocinu touto bifidobakterií může mít důležitý vliv na její adaptaci a přežití v gastrointestinálním traktu. Dále bylo zjištěno, že *B. longum* DJO10A byla podstatně více konkurenceschopná proti střevnímu izolátu *C. difficile* DJOcd1, než tomu bylo v případě izogenní varianty *B. longum* DJO10-JH1. Tyto výsledky poskytují další důkaz o tom, že produkce bakteriocinu, je důležitá vlastnost, co se týče mikrobiální soutěže v lidském střevě a je kmenově specifická.

Tato diplomová práce byla zaměřena na nalezení vhodných kmenů bifidobakterií vykazující antimikrobiální aktivitu proti *C. perfringens* a *C. difficile*. Celkem byly otestovány 4 druhy (12 kmenů) bifidobakterií, kdy pouze 4 kmeny vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti *C. perfringens* a *C. difficile*. Z toho 3 kmeny byly z *B. animalis* subsp. *animalis* a 1 kmen z druhu *B. choerinum*. To znamená, že k pozitivnímu výsledku došlo v případě pouze 2 druhů. Jednalo se *B. animalis* subsp. *animalis* a *B. choerinum*, kdy oba byly telecího původu. Ostatní použité kmeny, které náležely k druhu *B. thermophilum* a *B. longum* subsp. *suis* nevykazovaly žádnou antimikrobiální aktivitu. Z toho vyplývá, že tato vlastnost není druhově, ale kmenově specifická. Podobných výsledků dosáhli i Vlková et al. (2008), jelikož taktéž provedli testování antimikrobiální aktivity proti potenciálnímu patogenu *C. difficile*. kdy



antimikrobiální aktivita byla stanovena u 10 kmenů bifidobakterií pomocí diskové difúzní metody a autoagregace. Použité kmeny bifidobakterií byly také izolovány ze stolice telat.

Dle doporučení ze studie podle Collado et al. (2005), bylo v této práci provedeno testování supernatantů s upravenými vlastnostmi, kdy byla otestována tepelná stabilita supernatantu, vliv působení pH a přídavek proteinázy K. Tímto testováním jsme chtěli zjistit mechanismus antimikrobiální aktivity, jelikož jsou zde domněnky, že by mohla být způsobena v důsledku působení peroxidu vodíku, kyseliny nebo bakteriocinu. Dle Biavati et al. (2000) bylo navrženo, že mechanismus inhibice rodem *Bifidobacterium* by se mohl vázat k fermentační produkci kyselin jako je acetát a laktát. Avšak na základě experimentu, kdy *Bifidobacterium infantis* byla inkubována s *E. coli* a *C. perfringens* v různých fermentačních systémech, bylo prokázáno, že *B. infantis* vykazovala inhibiční účinek, který není nutně spojený s výrobou kyseliny. Tyto výsledky ukazují, že bifidobakterie jsou schopny uplatnit více než jeden mechanismus inhibice, který může mít určitý význam, pokud jde o ochranu proti gastroenteritidě (Gibson a Wang, 1994).

V našem případě byly supernatanty tepelně ošetřeny na teplotu 100 °C po dobu 30 minut. Zároveň u nich byly upraveny hodnoty pH (2, 7, 9) a v posledním testu došlo k přidavku proteinázy K. Bylo zjištěno, že tyto úpravy supernatantu jako jsou změna teploty a přídavek proteinázy K nemají žádný vliv na antimikrobiální aktivitu bifidobakterií. Pouze při okyselení supernatantu na hodnotu pH 2 došlo k vytvoření znatelně větší inhibiční zóny v porovnání s vytvořenými inhibičními zónami při jiném pH, což je ve shodě s výsledky podle Collado et al. (2005), protože antimikrobiální aktivita byla taktéž zvýšena při kyselém pH 2. V této studii bylo také prokázáno, že antimikrobiální sloučeniny jsou tepelně stabilní a zároveň, že jejich inhibiční aktivita je v širokém rozsahu pH od 3 do 10 (Collado et al., 2005), kdy stejných výsledků bylo dosaženo i při našem testování. Také Meghrou et al. (1990) prokázal, že kmen z rodu *Bifidobacterium* produkoval tepelně stabilní molekulu proteinové povahy, která byla účinná při pH v rozmezí 2-10 vůči gram-pozitivním bakteriím, ale ne proti gram-negativním bakteriím. Dle studie podle Gibson a Wang (1994) byl taktéž testován vliv různých hodnot pH (2, 4, 7, 10), kdy inhibiční aktivita nebyla změněna, což potvrdilo fakt, že inhibice nebyla způsobena kyselinou mléčnou. Také peroxid vodíku, nebyl prokázán jako inhibiční faktor, jelikož použitím katalázy nebyl účinek zničen. Ani tepelným ošetřením při teplotě 100° C po dobu 15-30 min a při 121° C po dobu 15 min, nebyl účinek zničen. Vzorky supernatantu byly uchovávány při teplotě -20° C a ztratily aktivitu po 2 týdnech při pH 4, 7 a 10. Zcela neaktivní byl supernatant po 1 týdnu při teplotě 4 °C. Yildirim a Johnson (1998) popsali bakteriocin, nazývaný bifidocin B produkovaný *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454,

který je odolný vůči působení tepla, což je ve shodě s mými dosaženými výsledky a maximální produkce bakteriocinu je při pH 5-7, což v mém testování nebylo prokázáno. Také podle Cheikhyoussef et al. (2009) nový bakteriocin bifidin I, produkováný *B. infantis* BCRC 14602 ukázal široké spektrum aktivity, jelikož je schopen inhibovat růst gram-negativních a gram-pozitivních bakterií, z nichž mnohé mohou způsobovat kažení potravin. Z toho vyplývá, že aplikace bifidinu I je potenciálně užitečná v oblasti bezpečnosti potravin.

Další částí experimentu bylo otestování filtrátu pomocí speciálního filtru, protože zde byla hypotéza, že se jedná o bakteriocin, což je produkt bifidobakterií, který by vykazoval tuto antimikrobiální aktivitu. Filtrace ukázala, že se pravděpodobně jedná o peptid, proto je důležité, aby byly vlastnosti této látky dále zkoumány. Avšak handicapem této látky je, že jí máme velmi malé množství. Dle studie podle (Collado et al., 2005) vybrané kmeny z rodu *Bifidobacterium* byly ošetřeny různými enzymy pro určení povahy sloučenin zodpovědných za antimikrobiální aktivitu. Vzhledem k tomu, že všechny testované proteázy zmenšily antimikrobiální aktivitu, tak amylázy a lipázy neměli žádný účinek, což ukazuje, že inhibiční sloučeniny mají proteinový charakter.

Collado et al. (2005) udává, že bifidobakterie měly maximální antimikrobiální aktivitu v pozdní exponenciální fázi růstu (přibližně po 16 hodinách inkubace). V našem případě jsme však antimikrobiální aktivitu detekovaly už po 4 hodinách kultivace. Poté u každého dalšího vzorku, které byly získávány v 2 hodinových intervalech. Nestandardním výsledkem byl fakt, že velikost inhibiční zóny byla stále stejná i po 36 hodinách kultivace. Při přeočkování této kultury byl efekt ztracen. Což nás vrátilo zpět k výchozí kopii vzorků, která ukázala nejvyšší antimikrobiální efekt, který snižujeme přeočkováním.

Disponujeme tedy vzorky, které jsou schopny produkovat antimikrobiální látku, avšak během testování bylo zjištěno, že nejsme schopni tuto látku opakovaně vyrobit, proto náš další postup byl neplánovaný a zaměřily jsme se na optimalizaci podmínek v médiu. S tím, že Collado et al. (2005) doporučují přidávat 1 % tweenu 80 do média pro zvýšení antimikrobiální aktivity, což jsme provedli podle jejich doporučení, avšak v našem případě nebyly zaznamenány žádné změny. Více jak druhá kopie pozitivních kmenů, tedy těch co původně vykazovaly antimikrobiální aktivitu, ani s 1% přídavkem tweenu nevytvářeli inhibiční zóny. Podle dřívějších studií je antimikrobiální aktivita u bifidobakterií udržována v přítomnosti 1 % uhličitanu vápenatého, který eliminuje inhibiční účinky v důsledku výroby organických kyselin. Použití různých koncentrací glukózy v kultivačním médiu nemělo žádný

vliv na antimikrobiální aktivitu. Avšak přídavek tweenu 80 mírně zvýšil vylučování antagonistických sloučenin (Gagnon et al., 2004; Gibson a Wang, 1994; Lee et al., 2003).

Z důvodu neúčinnosti přídavku tweenu jsme se vrátili zpět k původnímu vzorku, kde jsme začali uvažovat nad tím, co může podmiňovat antimikrobiální aktivitu. Přemýšleli jsme nad přídavkem glycerolu, ten je součástí zamrazovacího média v našich původních kopiích s nejvyšší antimikrobiální aktivitou. Podle Axelsson et al. (1989) se glycerol využívá k produkci reuterinu za použití *Lactobacillus reuteri*, který je schopen inhibovat růst bakteriálních rodů *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* a *Staphylococcus* (Engels et al., 2016). Tohle je jedna z možností, která by měla být zvážena, jestli tam není vliv. Dále také během zpracování glycerolu mohou vznikat další produkty glycerolu a jedním z nich je akrolein, který vzniká za anaerobních podmínek při zahřívání. Podle Engels et al. (2016) bylo zjištěno, že právě akrolein je účinná látka, která je zodpovědná za antimikrobiální aktivitu, která je původně připisovaná reuterinu.

I přes tyto pozitivní výsledky, kdy 4 kmeny bifidobakterií jsou schopné produkovat antimikrobiální látku proti klostridiím, jsme tento produkt, který je zodpovědný za tuto antimikrobiální aktivitu nedokázali opakovaně vyrobit. Proto by bylo dobré se dále zamyslet nad případným použitím akroleinu v mechanismu působení antimikrobiální aktivity.

## 8 Závěr

Celkem byly otestovány 4 druhy (12 kmenů) bifidobakterií. Cílem bylo najít supernatanty bifidobakterií, které vykazují antimikrobiální aktivitu proti *C. perfringens* a *C. difficile*. Celkem 4 kmeny vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti výše zmíněným druhům klostridií. Z toho 3 kmeny byly z druhu *B. animalis* subsp. *animalis* a 1 kmen z druhu *B. choerinum*. Tato aktivita byla shledána u více kmenů těchto testovaných klostridií. Jednalo se celkem o 3 kmeny *C. perfringens* a 3 kmeny *C. difficile*. Pouze jeden kmen *C. perfringens* CCM 4435 byl detekován jako odolný a antimikrobiální působení bifidobakterií na něj nemělo vliv.

Bifidobakteriální supernatant byl shledán jako tepelně stabilní, také změna pH a působení proteinázy K neměli vliv na detekovanou antimikrobiální aktivitu. Na základě separace proteinů, bylo zjištěno, že antimikrobiálně působí složka s obsahem případných proteinů.

Na základě získaných poznatků, byla zde snaha vyprodukovat více pozitivního supernatantu, ale během testování bylo zjištěno, že to co působí pozitivně proti klostridiím, je pouze zásobní roztok. Z toho roztoku byly dále vytvářeny kopie, avšak bylo zjištěno, že tyto kopie ztrácí účinnost. To se projevilo ztrátou produkce antimikrobiální látky. Proto jsme se následně zaměřily na samotné médium, co za komponent by mohlo vytvářet antimikrobiální aktivitu. Vliv na antimikrobiální aktivitu by mohl mít přídavek glycerolu. Přidaný glycerol je sterilovaný za nepřítomnosti vzduchu, kdy může dojít k produkci akroleinu, u něhož již byl prokázán vliv na antimikrobiální aktivitu. Na druhou stranu musíme brát v potaz, že akrolein je životu nebezpečný. Proto by bylo vhodné se zamyslet, jestli by bylo možné odhalit princip působení akroleinu a ten využít v potlačení růstu klostridií.

## 9 Seznam literatury

- Alleberger, F., Wagner, M.** 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*. 16. 16–23.
- Allen, S. J., Okoko, B., Martinez, E., Gregorio, G., Dans, L. F.** 2003. Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons. 32.
- Axelsson, L. T., Chung, T. C., W. J. Dobrogosz, W. J., Lindgren, S. E.** 1989. Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology In Health And Disease*. 2. 131-136.
- Bhunja, A. K.** 2008. *Foodborne Microbial Pathogens*. Springer. New York. p. 269. ISBN: 978-0-387-74536-7.
- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V.** 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*. 50. 117-131.
- Bottacini, F., Ventura, M., Sinderen, D. v., Motherway, M. O. C.** 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial cell factories* 13. 1024-1024.
- Caplice, E., Fitzgerald, G. F.** 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50. 131-149.
- Cohen, S. H., Gerding, D. N., Johnson, S., Kelly, C. P., Loo, V. G., McDonald L. C., Pepin, J., Wilcox, M. H.** 2010. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 31 (5). 431-455.
- Collado, M. C., Hernández, M., Sanz, Y.** 2005. Production of Bacteriocin-Like Inhibitory Compounds by Human Fecal Bifidobacterium Strains. *Journal of Food Protection*. 68 (5). 1034–1040.
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C., R, Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., Nougayréde, J. P.** 2010. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Boston MA. 107 (25). 11537–11542.

- Dawson, L. F., Stabler, R. A., Wren, B. W.** 2008. Assessing the role of p-cresol tolerance in *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*. 57. 745-749.
- Dítě, P.** 2001. Nejčastější zánětlivá střevní onemocnění. *Interní medicína pro praxi*.(3)10. 451-454.
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C.** 2012. Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *American Society for Microbiology*, 1-6.
- Dupont, C., Foo J. L. K., Garnier, P., Moore, N., Mathiex-Fortunet, H., Salazar-Lindo, E.** 2009. Oral Diosmectite Reduces Stool Output and Diarrhoea Duration in Children With Acute Watery Diarrhoea. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 7 (4).456–462.
- Engelkirk, P. G., Duben- Engelkirk, J.** 2008. Laboratory diagnosis of Infectious diseases. Lippincott Williams & Wilkins. p. 423. ISBN: 978-0-7817-9701-6
- FAO/WHO.** 2001. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Dostupné z WWW. <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>
- Floch, M. H., Walker, W. A., Sanders M. E.** Nieuwdorp, M., Kim A. S., Brenner, D. A., Qamar, A. A., Miloh, T. A, Guarino, A., Guslandi, M., Dieleman, L. A., Ringel, Y., Quigley, E. M., Brandt, L. J. 2015. Recommendations for probiotic use- 2015 update: proceedings and consensus opinion. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 49 (1). 69-73.
- Fotiadis, C. I., Stoidis C. N., Spyropoulos B. G, Zografos, D. E.** 2008. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 14 (42). 6453–6457.
- Fujioka, R. S., Shizumura, L. K.** 1985. *Clostridium perfringens*, a reliable indicator of stream water quality. *Journal Water Pollution Control Federation*. 57. 982– 986.
- Gagnon, M., Kheadr, E. E., Le Blay, G., Fliss.I.** 2004. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *International Journal of Food Microbiology*. 92. 69–78.
- Garg, A. X., Szuri, R. S., Barrowman, N., Rehman, F., Matsell, D., Rosas-Arellano, M. P., Salvadori, M., Haynes, R. B., Clark, W. F.** 2003. Long – term renal prognosis of diarrhea – associated hemolytic uremic syndrome. *American Medical Association*. 290. 1360–1370.

- Gibson, G. R., Wang, X.** 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 77. 412-420.
- Hafiz, S., Oakley, C. L.** 1976. *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. *Journal Medical Microbiology*. 9. 129-136.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., Lotfipour, F.** 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 4. 723-736.
- Hatheway, C. L.** 1990. Toxigenic Clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*. 3. 68–98.
- Hedin, C. R., Mullard, M., Sharratt, E., Jansen, C., Sanderson, J. D., Shirlaw, P., Howe, L. C., Djemal, S., Stagg, A. J., Lindsay, J. O., Whelan, K.** 2010. Probiotic and prebiotic use in patients with inflammatory bowel disease: A case- control study. *Inflammatory Bowel Diseases*. 16 (12). 2099–2108.
- Hentges, D. J.** 1983. *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. Academic Press, New York. 3-31.
- Hirayama, K., Rafter, J.** 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection*. 2. 681–686.
- Cheikhoussef, A., Cheikhoussef, N., Haiqin Ch., Jianxin Z., Jian T., Hao Z., Wei, Ch.** 2010. Bifidin I – A new bacteriocin produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602: Purification and partial amino acid sequence. *Food Control*. 746–753.
- Christina Engels, Ch., Schwab, C., Zhang, J., Stevens, M. J. A., Bieri, C., Ebert, M. O., McNeill, K., Sturl, S. J., Lacroix, Ch.** 2016. Acrolein contributes strongly to antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin. *Scientific Reports*. 6 (1). 1-13.
- Ishibashi, N., Yaeshima, T., Hayasawa, H.** 1997. Bifidobacteria: their significance in human intestinal health. *Malaysian Journal of Nutrition*. 3. 149–59.
- Kariv, R., Navaneethan, U., Venkatesh, P. G. K., Lopez, R., Shen, B.** 2011. Impact of *Clostridium difficile* infection in patients with ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*. 5 (1), 34-40.

- Keyburn, A. L., Boyce, J. D., Vaz, P., Bannam, T. L., Ford, M. E., Parker, D., Rubbo, A. D., Rood, J. I., Moore, R. J.** 2008. NetB, a New Toxin That Is Associated with Avian Necrotic Enteritis Caused by *Clostridium perfringens*. *PLOS Pathogens*. 4 (2). 1-10.
- Kittnar, O., Mlček, M.** 2009. Atlas fyziologických regulací. 1. vyd. Grada. Praha. 320 s. ISBN: 978-80-247-2722-6.
- Kittnar, O.** 2011. Lékařská fyziologie. 1. vyd. Grada. Praha. 800 s. ISBN: 978-80-247-3068-4.
- Knol, J., Scholtens, P., Kafka, C., Steenbakkers, J., Groß, S., Helm, K., Klarczyk, M., Schöpfer, H., Böckler, H. M. Wells, J.** 2005. Colon Microflora in Infants Fed Formula with Galacto- and Fructo-Oligosaccharides: More Like Breast-Fed Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. Philadelphia. 36-42.
- Kramer, A., Schwebke, I., Kampf, G.** 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infection Diseases*. 6. 130.
- Kruis, W., Frič, P., Pokrotnieks, J., Lukáš, M., Fixa, B., Kaščák, M., Kamm, M. A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C., Schulze, J.** 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut Journal*. 53.1617–1623.
- Krzewinski, F., Brassart, C., Gavini, F., Bouquelet, S.** 1996. Characterization of the Lactose Transport System in the Strain *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082. *Current Microbiology*. 32 (6). 301-307.
- Kunová, V.** 2011. Zdravá výživa. 2., přeprac. vyd. Grada. Praha. 144 s. ISBN: 978-80-247-3433-0.
- Leclair, M. A., Allard, C., Lesur O., Pépin, J.** 2010. *Clostridium difficile* Infection in the Intensive Care Unit. *Journal of Intensive Care Medicine* . 25 (1). 23–30.
- Lee, Y. J., Yu, W. K., Heo, T. R.** 2003. Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 21. 340–346.
- Lievin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J. R., Servin, A. L.** 2000. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut Journal*. 47 (5). 646-652.



- Louie, T. J., Miller, M. A., Mullane, K. M., Weiss, K., Lentnek, A., Golan, Y., Gorbach, S., Sears, P., Shue, Y. K.** 2011. Fidaxomicin versus vankomycin for *Clostridium difficile* infection. The new England Journal of Medicine. 364. 422–431.
- Lund, B. M., Hunter, P. R.** 2008. The Microbiological Safety of Food in Healthcare Settings. Blackwell Publishing. p. 381. ISBN: 978-1-4051-2220-7.
- Mai, V., Draganov, P. V.** 2009. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. World Journal of Gastroenterology. 15 (1). 81-85.
- Marteau P. R., de Vrese, M., Cellier, C. J., Schrezenmeir, J.** 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. The American Journal of Clinical Nutrition. 73. 430–436.
- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Converti, A., Cotter, P. D.** 2013. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. Biotechnology Advances . 31. 482-488.
- Mcdonel, J. L.** 1980. *Clostridium Perfringens* Toxins (Type A, B, C, D, E). Pharmacology & Therapeutics - Journal. 10. 617- 655.
- Meghrous, J., Euloge, P., Junelles, A. M., Ballongue, J., Petitemange, H.** 1990. Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. Biotechnology Letters.12. 575-580.
- Morrow, L. E.** 2009. Probiotics in the intensive care unit. Current Opinion in Critical Care. 15 (2). 144–148.
- Mountzouris, K. C., McCartney, A. L., Gibson, G. R.** 2002. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. British Journal of Nutrition. 87. 405–420.
- Mourek, J.** 2012. Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů. 2., dopl. vyd. Grada. Praha. 222 s. ISBN: 978-80-247-3918-2.
- Mourek, J., Velemínský, M., Zeman, M.** 2013. Fyziologie, biochemie a metabolismus pro nutriční terapeutu. 1. vyd. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 99 s. ISBN: 978-80-7394-438-4.
- Nagahama, M., Oda, M., Tsuge, H., Kobayashi, K.** 2015. Enteric Toxins of *Clostridium perfringens*: Beta Toxin, TpeL, Epsilon Toxin and Iota Toxin. Elsevier. 997-1013.

- Neu, J.** 2016. The microbiome during pregnancy and early postnatal life. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 21 (6). 373-379.
- Nord, C. E., Kager, J.** 1984, The normal flora of the gastrointestinal tract. *The Netherlands Journal of Medicine*. 19 (27). 249–252.
- Patel, M. M., Steele, D., Gentsch, J. R., Wecker, J., Glass, R. I., Parashar, U. D.** 2011. Real – world Impact of Rotavirus Vaccination. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 30 (1). S1- S5.
- Payment, P., Franco, E.** 1993. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (8). 2418–2424.
- Petit, L., Gibert, M., Popoff, M. R.** 1999. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Elsevier Science. 7 (3). 104-110.
- Polívková, S., Machala, L.** 2014. Transplatace stolice a infekce *Clostridium difficile*. *Vesmír* 93. 622-625.
- Pothoulakis, C.** 1996. Pathogenesis of *Clostridium difficile* – associated diarrhoea. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 8 (11). 1041–1047.
- Rees, J. H., Soudain, S. E., Gregson, N. A., Hughes, R. A.** 1995. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barre syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 333. 1374–1379.
- Rittich, B., Chroboková, M., Gregušová, B., Španová, A.** 2011. Identifikace kmenů bakterií rodu *clostridium* izolovaných ze sýrů. *Mlékářské Listy* č. 129. 6-10.
- Rokyta, R.** 2015. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Grada Publishing. Praha. 712 s. ISBN: 978-80-247-4867-2.
- Rolfe, R. D., Finegonl, S. M.** 1998. *Clostridium difficile* Its Role in Intestinal Disease. Academic press, Inc. 1-12.
- Saavedra, J. M.** 2007. Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutrition in Clinical Practice*. 22 (3). 351–365.
- Salminen, S., Wright, A., Ouwehand, A.** 2004 *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects*, Third Edition. Marcel Dekker Inc. New York. p. 633. ISBN: 0-8247-5332-1.

- Servin, A. L.** 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* . 28 (4). 405-440.
- Silbernagl, S., Despopoulos, A.** 2014. Atlas fyziologie člověka. 6. vyd. Grada. Praha. 448 s. ISBN: 80-247-0630-X.
- Simjee, S.** 2007. Foodborne Diseases .Humana Press. New Yersey. p. 555. ISBN: 978-1-58829-518-7.
- Songer, J. G.** 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*. 216-234.
- Songer, J. G., Anderson, M. A.** 2006. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe* 12. 1-4.
- Spinler, J. K., Caná L. R., Savidge, T. C.** 2016. Probiotics as adjunctive therapy for preventing *Clostridium difficile* infection – What are we waiting? *Anaerobe - Journal - Elsevier*. 41. 51-57.
- Stránský, M., Ryšavá, L.** 2014. Fyziologie a patofyziologie výživy. 2., dopl. vyd. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta. 273 s. ISBN: 978-80-7394-478-0.
- Szilagyi, A.** 2002. Review article: lactose-a potential prebiotic. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 16. 1591–1602.
- Theriot, C. M., Young, V. B.** 2015. Interactions between the Gastrointestinal Microbiome and *Clostridium difficile*. In *Annual Review of Microbiology*. 445-461.
- Tojo, R., Suarez, A., Clemente, M. G., de los Reyes-Gavilan, C. G., Margolles, A., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P.** 2014. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World Journal of Gastroenterology* 20. 15163-15176.
- Usacheva, E. A., Jin, J. P, Peterson, L. R.** 2016. Host response to *Clostridium difficile* infection: Diagnostics and detection. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 7. 93–101.
- Van der Waaij, D., Berguist-de Vries, J. M., Lekkerkerk J. E. C.** 1972. Colonization resistance of the digestive tract and the spread of bacteria to the lymphatic organs in mice. *Journal of Hygiene. Cambridge University Press*. 70 (20). 335–342.
- Verhoef-Verhage, EA., Schaafsma, G.** 1996. A guide to the intestinal microflora. Inside story. *Yakult Nederland B. V.* 11–46.

- Vlková, E., Grmanová, M., Killer, J., Mrázek, J., Kopečný, J., Bunešová, V., Rada, V.** 2010. Survival of Bifidobacteria Administered to Calves . *Folia Microbiologica*. 55 (4). 390–392.
- von Wright, A., Salminen, S.** 1999. Probiotics: established effects and open questions. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 11. 1195–1198.
- Wood, B. J. B., Holzappel, W. H.** 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria volume 2*. Springer Science+Business Media Dordrecht. Glasgow. p. 392. ISBN: 978-1-4615-5817-0.
- Yildirim, Z., Johnson, M. G.** 1998. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Journal of Food Protection*. 61. 47-51.
- Zar, F. A., Bakkanagari, S. R., Moorthi, K. M. L. S. T., Davis, M. B.** 2007. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile* -associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clinical Infectious Diseases*. 45. 302–307.
- Zbořil, V.** 2005. *Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti*. vyd. 1. Grada. Praha. 153 s. ISBN: 80-247-0584-2.

## 10 Seznam použitých zkratek

DSMZ	Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
CCM	České sbírky mikroorganismů Czech Collection of Microorganisms
WHO	Světová zdravotnická organizace World Health Organization
KMVD	Sbírka mikroorganismů Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze
GIT	gastrointestinální trakt
ATB	antibiotika
CDI	infekce vyvolané <i>Clostridium difficile</i>
IBD	zánětlivé střevní onemocnění

## 11 Přílohy

### Seznam příloh:

**Příloha 1** Výsledky testování antimikrobiální aktivity bifidobakterií v časovém intervalu po 2 hodinách.

**Příloha 2** Výsledky testování kmenů, které fungovaly v první kopii a byly postupně přeočkovávány v časových intervalech po 2 hodinách.

## Příloha 1

		<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Clostridium acetobutyricum</i>	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium clostridioforme</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium tertium</i>
Vzorek (čas)	pH	20087	792	10702	933	3593	12056	27147	4435	11778	CL4	CL5	2485
a/4	6,1	-	10	9	10	13	14	8	-	7	9	8	8
a/6	5,5	-	10	9	10	13	12	7	-	7	10	8	8
a/8	5,3	-	10	9	10	13	14	7	-	8	10	8	8
a/10	5	-	10	9	10	13	14	10	-	7	10	8	8
a/12	5	-	10	9	10	13	14	10	-	8	10	8	8
a/14	5	-	10	9	10	13	14	10	-	7	10	8	8
a/16	5	-	10	9	10	13	13	10	-	8	12	8	8
a/18	5	-	10	9	10	13	14	10	-	8	10	8	8
a/20	5	-	10	9	10	13	14	10	-	8	10	8	8
a/22	5	-	10	9	10	13	14	10	-	8	10	8	8
a/24	5	-	10	9	10	13	14	10	-	9	10	8	8
a/36	5	-	10	9	10	13	13	10	-	9	10	8	8
b/4	6,1	-	12	9	12	12	14	10	-	8	10	7	8
b/6	6,1	-	12	9	12	12	14	10	-	8	10	8	8
b/8	6,1	-	12	9	12	12	14	10	-	8	10	8	8
b/10	6,1	-	13	9	12	12	14	10	-	8	10	8	8
b/12	6,1	-	13	9	12	12	16	10	-	8	10	8	8
b/14	6,1	-	13	9	12	12	16	10	-	8	10	8	8
b/16	6,1	-	13	9	12	12	14	10	-	8	10	8	8
b/18	6,1	-	13	9	12	12	14	10	-	8	10	8	8
b/20*	6,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
b/22*	6,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
b/24*	6,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
b/36	5	-	12	9	12	12	15	10	-	7	12	8	8

