

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Růst vybraných bakterií čeledi *Clostridiaceae* v mateřském mléce

Diplomová práce

**Bc. Anna Černá
Výživa a potraviny**

Ing. Nikol Modráčková, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Růst vybraných bakterií čeledi *Clostridiaceae* v mateřském mléce" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí 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 19. 4. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Nikol Modráčkové, Ph.D. za věnovaný čas, odbornou pomoc, cenné rady, ochotu a trpělivost při vedení mé diplomové práce. Ráda bych také poděkovala Ing. Štěpánce Dvořákové, Ing. Michaelle Čenkové a ostatním pracovníkům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za trpělivost a odbornou pomoc při práci v laboratoři.

Růst vybraných bakterií čeledi *Clostridiaceae* v mateřském mléce

Souhrn

Střevo kojence je obecně považováno za sterilní až do porodu. Od narození začíná u kojence proces mikrobiální kolonizace, který pokračuje ve vývoji a modulaci druhového zastoupení přibližně do tří let. Bakterie, které kolonizují kojence, pocházejí od matky, z mateřského mléka a okolního prostředí. Gastrointestinální trakt kojence je nejprve kolonizován fakultativně anaerobními bakteriemi jako jsou zástupci čeledí *Enterobacteriaceae* a *Lactobacillaceae*, které vytvářejí ve střevním lumen anaerobní prostředí a umožňují růst obligátně a striktně anaerobních bakterií jako jsou *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. a *Bacteroides* spp., které během následujících měsíců v neonatálním střevě dominují. Bifidobakterií začíná ve střevním lumen přibývat zejména díky jednoduchým cukrům a oligosacharidům mateřského mléka. Právě kojení je tedy spojováno s jejich dominancí. Oproti tomu kojenci krmení výlučně náhradní mléčnou výživou mají mikrobiotu rozmanitější s typicky nižším zastoupením bifidobakterií a často významným zastoupením klostridií.

Cílem praktické části této diplomové práce bylo *in vitro* testování schopnosti růstu vybraných klostridiálních druhů v mateřském mléce. Bylo testováno celkem sedm klostridiálních druhů. Přestože většina testovaných druhů klostridií (*Cl. difficile*, *C. tertium*, *C. butyricum*, *Paeniclostridium sordellii*) mateřské mléko využívat nedokázala (naznačení rodové vlastnosti), druh *C. perfringens* byl výjimkou. *Paraclostridium bifermentans* se poté ukázal jako odolný druh, který v mateřském mléce přežíval, ale nemnožil se. Schopnost růstu těchto klostridiálních druhů byla testována i na náhradních mléčných výživách, které lze hodnotit jako dostupnější růstové médium pro klostridie. Konkrétně druhy *C. perfringens*, *P. bifermentans* a *C. tertium* byly schopny využívat náhradní mléčné výživy nebo v nich přežívat. Druh *C. paraputrificum* se ukázal jako nevhodný pro tuto formu testování, jelikož nebyl schopen růstu na nutričně bohaté pozitivní kontrole.

Klíčová slova: kojenecká mikrobiota; klostridie; oligosacharidy mateřského mléka; antimikrobiální potenciál

Growth of selected bacteria of the *Clostridiaceae* family in human milk

Summary

The infant's intestine is generally considered sterile until birth. From birth, the infant begins a process of microbial colonization that continues to develop and modulate bacterial species representation until approximately three years of age. The bacteria that colonize the infant usually originate from the mother, breast milk, and the environment. The gastrointestinal tract of the infant is initially colonized by facultatively anaerobic bacteria such as members of the *Enterobacteriaceae* and *Lactobacillaceae* families, which create an anaerobic environment in the intestinal lumen and allow the growth of obligately and strictly anaerobic bacteria such as *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. and *Bacteroides* spp. that dominate the neonatal gut during the following months. Bifidobacteria begin to increase in the intestinal lumen, mainly due to the simple sugars and human milk oligosaccharides. Breastfeeding is therefore associated with their dominance. In contrast, infants fed exclusively on formula have a more diverse microbiota with typically lower levels of bifidobacteria and often a significant presence of clostridia.

The aim of the practical part of this diploma thesis was to test the growth ability of selected clostridial species in breast milk *in vitro*. A total of seven clostridial species were tested. Although most of the tested clostridial species (*Cl. difficile*, *C. tertium*, *C. butyricum*, *Paeniclostridium sordellii*) were unable to utilize breast milk (indication of genus characteristics), the species *C. perfringens* was an exception. *Paraclostridium bifermentans* then proved to be a resistant species that survived in breast milk but did not reproduce. The growth ability of these clostridial species was also tested on formula milks, which can be evaluated as a more accessible growth medium for clostridia. Specifically, species of *C. perfringens*, *P. bifermentans* and *C. tertium* were able to utilize or survive on formula milks. The species *C. paraputrificum* was not suitable for this form of testing as it was unable to grow on a positive control containing all the necessary substrates for growth.

Keywords: infant microbiota; clostridia; breast milk oligosaccharides; antimicrobial potential

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Kojenecká střevní mikrobiota	10
3.1.1 Kolonizace novorozence	10
3.1.1.1 Teorie kolonizace	10
3.1.1.2 Průběh kolonizace	12
3.1.2 Faktory ovlivňující osídlení kojence	14
3.1.2.1 Prenatální faktory	15
3.1.2.2 Neonatální faktory	17
3.1.2.3 Postnatální faktory	18
3.2 Rod <i>Clostridium</i>	20
3.2.1 Systematika klostridií	20
3.2.2 Obecné informace	23
3.2.2.1 Produkce kyselin, alkoholů a plynů	24
3.2.2.2 Produkce průmyslově důležitých enzymů	25
3.2.2.3 Kažení potravin	25
3.2.2.4 Komenzální klostridie	26
3.2.2.5 Patogenní klostridie	27
3.2.3 Kojenecké druhy klostridií	28
3.2.3.1 <i>Clostridioides difficile</i> (čeleď: <i>Peptostreptococcaceae</i>)	28
3.2.3.2 <i>Paeniclostridium sordellii</i> (čeleď: <i>Peptostreptococcaceae</i>)	29
3.2.3.3 <i>Clostridium butyricum</i> (čeleď: <i>Clostridiaceae</i>)	29
3.2.3.4 <i>Clostridium paraputrificum</i> (čeleď: <i>Clostridiaceae</i>)	31
3.2.3.5 <i>Clostridium perfringens</i> (čeleď: <i>Clostridiaceae</i>)	31
3.2.3.6 <i>Clostridium tertium</i> (čeleď: <i>Clostridiaceae</i>)	32
3.2.3.7 <i>Paraclostridium bifermentans</i> (čeleď: <i>Clostridiaceae</i>)	32
3.3 Mateřské mléko	33
3.3.1 Mateřské mléko a jeho význam	33
3.3.2 Složení mateřského mléka	34
3.3.2.1 Makronutrienty	34
3.3.2.2 Mikronutrienty	36
3.3.2.3 Další významné složky mateřského mléka	38
3.3.3 Mikrobiota mateřského mléka a její složení	43
3.3.3.1 Zdroj mikrobioty mateřského mléka	45

3.3.3.2	Faktory ovlivňující mikrobiotu mateřského mléka	46
3.4	Schopnost <i>Clostridiaceae</i> využít mateřské mléko	47
4	Metodika	49
4.1	Příprava kultur pro testování	49
4.2	Testované mateřské mléko a mléčné kojenecké výživy	49
4.2.1	Mateřské mléko.....	49
4.2.2	Mléčné kojenecké výživy	50
4.3	Příprava kultivačních a ředících médií	50
4.4	<i>In vitro</i> testování schopnosti využití mateřského mléka	51
4.4.1	Rozbor 0 hodin, rozbor z kultur; založení destičky pro rozbor 24 hodin .	51
4.4.2	Rozbor 24 hodin.....	52
4.4.3	Vyhodnocení rozboru 0 a 24 hodin.....	53
5	Výsledky.....	54
5.1	Kmeny <i>Clostridium perfringens</i>.....	54
5.2	Kmeny <i>Clostridioides difficile</i>	55
5.3	Kmeny <i>Clostridium tertium</i>	56
5.4	Kmeny <i>Clostridium butyricum</i>	56
5.5	Ostatní kmeny klostridií	57
5.6	Kontrolní kmeny	58
6	Diskuze.....	60
7	Závěr	64
8	Literatura.....	65
9	Samostatné přílohy	I
9.1	Příloha 1: Mléčná kojenecká výživa Beba Comfort 1 HM-O (Nestlé) (1vz)I	
9.2	Příloha 2: Mléčná kojenecká výživa Hipp Bio Combiotik Anfangsmilch (2vz) I	
9.3	Příloha 3: Mléčná kojenecká výživa Babybio (3vz)	II

1 Úvod

V lidském gastrointestinálním traktu se nachází rozmanité a složité mikrobiální společenství, které obsahuje nejen asi 1000 bakteriálních druhů, ale také mikroskopické houby, viry, fágy a archaea (Guinane & Cotter 2013; Hou et al. 2022). Toto mikrobiální společenství hraje důležitou roli při trávení, účastní se rozkladu komplexních sacharidů nestravitelných člověkem, brání kolonizaci střev potenciálně patogenními mikroorganismy a zachovává zdraví hostitele prostřednictvím interakcí s vyvíjejícím se imunitním systémem (Fallani et al. 2010; Kaplan et al. 2011; Turroni et al. 2020). Toto společenství, když je v rovnováze, přináší hostiteli řadu benefitů, nicméně pokud dojde k narušení jeho rovnováhy, může být spjato s onemocněním (Guinane & Cotter 2013; Hou et al. 2022).

Plod v děloze je za normálních podmínek považován za sterilní a kolonizace jeho střeva začíná, když zahájí průchod porodními cestami prostřednictvím vaginální, fekální a kožní mikrobioty matky (Fontaine et al. 2023; Jiménez et al. 2008) a také prostřednictvím prostředí (Perez-Muñoz et al. 2017; Suárez-Martínez et al. 2023).

Prostředí střeva novorozence se liší od prostředí dospělého, přičemž ve střevě novorozence je při narození pozitivní redoxní potenciál, zatímco střevo dospělého je téměř hypoxické. Gastrointestinální trakt kojence je tedy nejprve kolonizován fakultativně anaerobními bakteriemi, které snižují redoxní potenciál, vytvářejí ve střevním lumen anaerobní prostředí a umožňují tak růst obligátně a striktně anaerobních bakterií, včetně *Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp. a *Bacteroides* spp. (Bezirtzoglou 1997; Sanidad & Zeng 2020; Suárez-Martínez et al. 2023). Proces kolonizace představuje sestavení komplexního mikrobiálního společenství, který je ovlivněn řadou faktorů, ke kterým patří například způsob porodu, gestační věk a strava kojence (Guaraldi & Salvatori 2012; Laursen 2021; O'Neill et al. 2020; Suárez-Martínez et al. 2023).

Mateřské mléko je optimální výživou pro kojence, které kromě základních živin, jako jsou bílkoviny, tuky, sacharidy, vitamíny a minerální látky, obsahuje širokou škálu imunitních buněk a bioaktivních složek, jako jsou antimikrobiální peptidy, imunoglobuliny, růstové faktory, cytokiny a oligosacharidy mateřského mléka. Mateřské mléko obsahuje také pestrou škálu mikrobů, které jsou důležité pro udržení zdraví mléčné žlázy a kojenců (Zimmemann & Curtis 2020).

Kojení díky přísunu oligosacharidů mateřského mléka do střeva podporuje růst specifických druhů rodu *Bifidobacterium* využívajících oligosacharidy mateřského mléka, které v mikrobiálním společenství ve střevě kojence dominují, dokud je kojenec primárně kojen. Tyto druhy provádějí ve střevě sacharolytickou fermentaci (Laursen 2021). Oligosacharidy mateřského mléka totiž nejsou kojencem přímo katabolizovány, ale procházejí nestrávené horní částí trávicího traktu až do tlustého střeva, kde fungují jako prebiotika pro distální střevní mikrobiotu (Davis et al. 2016). Krmení náhradní mléčnou výživou, vzhledem k nedostatku oligosacharidů mateřského mléka a vyššímu obsahu bílkovin, dává vzniknout rozmanitější střevní mikrobiotě s větší prevalencí oportunních patogenních bakterií a vede k proteolytictějšímu metabolismu ve střevě (Laursen 2021).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Čeď *Clostridiaceae* obsahuje značně variabilní rody a druhy bakterií, od zdraví prospěšných butyrát produkujících bakterií s probiotickým potenciálem až po bakterie vysoce patogenní. Ve střevní mikrobiotě kojenců je jejich přítomnost a aktivita ovlivněna celou řadou faktorů. Nicméně informace o vlivu mateřského mléka a jeho oligosacharidů na růst a metabolickou aktivitu těchto bakterií jsou velmi omezené.

Hypotéza: Předpokládáme, že bakterie čeledi *Clostridiaceae* budou utilizovat mateřské mléko. Zároveň předpokládáme, že tato schopnost bude rodově specifická.

Cíle práce: Cílem práce bylo vytvoření přehledné literární rešerše na základě aktuálních vědeckých poznatků o zástupcích čeledi *Clostridiaceae* vyskytujících se v trávicím traktu kojenců. Dalším cílem práce bylo *in vitro* testování schopnosti růstu vybraných zástupců čeledi *Clostridiaceae* v mateřském mléce a náhradních mléčných kojeneckých výživách.

3 Literární rešerše

3.1 Kojenecká střevní mikrobiota

V lidském gastrointestinálním traktu se nachází rozmanité a složité mikrobiální společenství, které hraje zásadní roli pro lidské zdraví. V lidském střevě žije až 1000 bakteriálních druhů. Obecně se střevní mikrobiota skládá ze 6 významně zastoupených kmenů, mezi něž patří kmen Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria a Verucomicrobia. Nejvíce studovanými zástupci střevní mykobioty jsou potě rody *Candida*, *Saccharomyces*, *Malassezia* a *Cladosporium*. Kromě bakterií a hub obsahuje lidská střevní mikrobiota také viry, fágy a archaea (Guinane & Cotter 2013; Hou et al. 2022).

Střevní mikrobiota člověka hraje důležitou roli při trávení, brání kolonizaci střev potenciálními patogenními mikroorganismy a zachovává zdraví hostitele prostřednictvím interakcí s vyvíjejícím se imunitním systémem (Fallani et al. 2010; Kaplan et al. 2011). Účastní se rozkladu komplexních sacharidů nestravitelných enzymy člověka a sacharidů produkovaných člověkem (mucin, oligosacharidy mateřského mléka). Její další metabolické funkce zahrnují biotransformaci žlučových kyselin, tvorbu některých vitamínů, syntézu mastných kyselin s krátkým řetězcem (například butyrát, propionát a acetát) a dalších mikrobiálních produktů. Butyrát je vhodným zdrojem energie pro enterocyty. Také se předpokládá, že střevní mikrobiota je nezbytná pro správný vývoj imunitního systému hostitele (Turroni et al. 2020). Rovnováha střevní mikrobioty je úzce spjata s lidským zdravím a nemocemi, přičemž její narušení může být spojeno například se zánětlivým onemocněním střev či obezitou (Guinane & Cotter 2013; Hou et al. 2022).

Ve srovnání se střevní mikrobiotou dospělých a starších dětí, vykazuje mikrobiota kojenců nízkou diverzitu a není stabilní (Milani et al. 2017).

3.1.1 Kolonizace novorozence

3.1.1.1 Teorie kolonizace

Střevo kojence je již po dlouhou dobu považováno za sterilní až do porodu, po kterém následuje rychlá kolonizace. Podle tradiční teorie začátku mikrobiální kolonizace novorozence je plod v děloze za normálních podmínek sterilní a mikrobiální kolonizace střeva novorozence začíná až v okamžiku, kdy plod zahájí průchod porodními cestami. Ke kolonizaci dochází prostřednictvím vaginální a fekální mikrobioty matky (Jiménez et al. 2008) a prostřednictvím prostředí (Perez-Muñoz et al. 2017; Suárez-Martínez et al. 2023). Tato teorie je všeobecně přijímána, avšak zároveň zpochybňována návrhy, že vzorky mekonium a pupečnickové krve obsahují bakterie (Jiménez et al. 2005; Jiménez et al. 2008; Hansen et al. 2015), a že ani placenta a amniová tekutina (plodová voda) nejsou sterilní. Objevují se tedy návrhy a spekulace, že kolonizace lidského gastrointestinálního traktu začíná již před porodem (Perez-Muñoz et al. 2017).

Výsledky Jiménez et al. (2008) naznačují, že mekonium není sterilním prostředím, a proto může střevní kolonizace začínat ještě před porodem, a že bakteriální složení střeva matky by mohlo ovlivnit bakteriální obsah mekonium kojence. Hansen et al. (2015) zkoumali vzorky mekonium (získaného do 24 hodin po porodu) u 15 novorozenců narozených vaginálně

mezi 37. a 40. týdnem, s průměrnou hmotností 3,4 kg a průměrným věkem matky 32 let. U 10 z nich (66 %) byla na základě analýzy fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) prokázána přítomnost bakterií. V mekoniu jednoho novorozence byly nejvíce zastoupeny enterobakterie (*Enterobacteriaceae*), ostatní vzorky obsahovaly 2 až 5 dalších bakteriálních skupin, z nichž *Bifidobacterium* spp., *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* a *Bacteroides-Prevotella* spp. byly nejrozšířenější. Dle Hansen et al. (2015) je tedy ve vzorcích mekonia (od zdravých, vaginálně porozených, donošených a kojených kojenců) přítomen nízký počet bakterií.

Jiménez et al. (2005) zkoumali přítomnost bakterií v pupečnickové krvi zdravých novorozenců, narozených elektivním císařským řezem. U 9 vzorků ze 20 (45 %) byly také nalezeny bakterie. Identifikované izoláty patřily do rodu *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* nebo *Propionibacterium*. Také Satokari et al. (2009) našli DNA střevních bakterií ve většině vzorků placenty (DNA *Bifidobacterium* spp. byla detekována u 33 vzorků a DNA *Lactobacillus rhamnosus* ve 31 vzorcích ze 34 vzorků placenty). Na základě tohoto zjištění Satokari et al. (2009) navrhuji možnost horizontálního přenosu bakteriální DNA z matky na plod přes placentu. Nicméně žádné bifidobakterie ani laktobacily nebyly nalezeny kultivací. Rovněž Collado et al. (2016) objevili v placentě a amniové tekutině (plodové vodě) jedinečné mikrobiální společenství. Všichni novorozenci, kteří se studie zúčastnili, byli porozeni elektivním císařským řezem, v termínu, bez známek nitroděložní infekce. Mikrobiální populace v plodové vodě a placentě byly podobné a velmi konzistentní u všech jedinců s nízkou četností, nízkou bohatostí a nízkou diverzitou. Proteobacteria byly nejčastěji zastoupeným kmenem ve vzorcích placenty a amniové tekutiny, s vysokým zastoupením bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Ve vzorcích placenty a amniové tekutiny byli nalezeni zástupci rodů *Enterobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Lactobacillus*. Údaje Collado et al. (2016) naznačují, že lidská amniová tekutina a placenta obsahují jedinečná mikrobiální společenstva, která mohou poskytovat počáteční inokulum pro střevní kolonizaci. De Goffau et al. (2019) se snažili zjistit, zda preeklampsie, spontánní předčasný porod či porod dětí malých na gestační věk, byly spojeny s přítomností bakteriální DNA v lidské placentě. U většiny vzorků placenty, jak z komplikovaných, tak nekomplikovaných těhotenství, nebyl detekován žádný důkaz přítomnosti bakterií. Téměř všechny signály souvisely buď se získáním bakterií během porodu nebo s kontaminací laboratorních činidel s bakteriální DNA. Výjimkou byl *Streptococcus agalactiae*, u kterého byly nekontaminující signály detekovány přibližně u 5 % vzorků odebraných před nástupem porodu. De Goffau et al. (2019) tedy došli k závěru, že bakteriální infekce placenty není častou příčinou nepříznivého výsledku těhotenství a že lidská placenta nemá mikrobiom, ale představuje potenciální místo perinatálního zisku *S. agalactiae*, který bývá hlavní příčinou novorozenecké sepsy.

Dle Perez-Muñoz et al. (2017) je předpoklad, že při narození je střevní trakt sterilní a první známky kontaminace jsou rozpoznatelné několik hodin po porodu, stále platný a existuje jen málo důkazů, které by úspěšně zpochybnily paradigma sterilní dělohy. Nicméně první mikroorganismy vyskytující se ve střevě jsou podobné těm, které se běžně vyskytují v kojeneckém prostředí. Dle Perez-Muñoz et al. (2017) jsou důkazy na podporu kolonizační hypotézy *in utero* extrémně slabé, protože jsou založeny téměř výhradně na studiích, které používaly molekulární přístupy s nedostatečným detekčním limitem ke studiu mikrobiálních

populací s nízkou biomasou, postrádaly vhodné kontroly kontaminace a neposkytly důkazy o životaschopnosti bakterií.

3.1.1.2 Průběh kolonizace

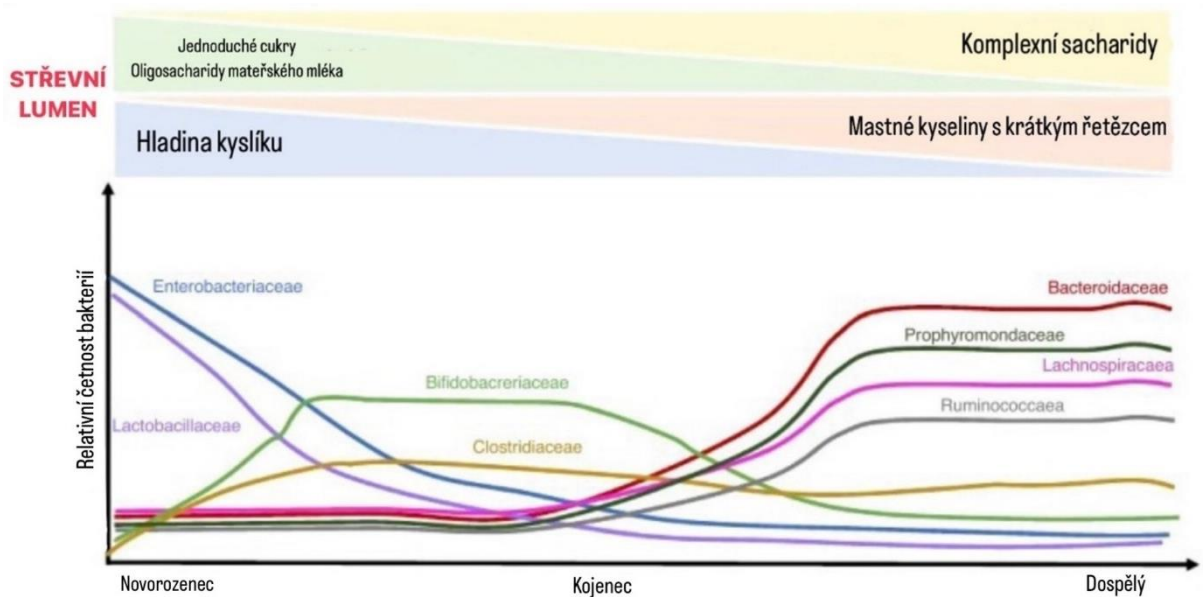
V děloze zůstávají vyvíjející se kojenci do značné míry izolováni od expozice mikroorganismů v prostředí. Během porodu a krátce po něm je kojeneček rychle vystaven mikrobům, které ho mohou kolonizovat přechodně nebo zde mohou zůstat dlouhodobě (Dalby & Hall 2020). Od narození začíná u člověka ve větší míře proces mikrobiální kolonizace, který pokračuje ve vývoji a modulaci druhového zastoupení po dobu přibližně 3 let, dokud se mikrobiota nepřiblíží té dospělého člověka (Suárez-Martínez et al. 2023). Mikroby jsou během a po porodu přenášeny jak vertikálně (z matky), tak horizontálně, kdy k přenosu dochází prostřednictvím ostatních lidí nebo z prostředí (Perez-Muñoz et al. 2017).

Prvotním a pravděpodobně nejdůležitějším příspěvkem k vytvoření kojenecké mikrobioty jsou mikroby od matky novorozence získané vertikálním přenosem a způsob porodu hraje velmi významnou roli při určování této počáteční inokulace (Dalby & Hall 2020). Vaginální, střevní a kožní mikrobiota matky tvoří důležitá bakteriální inokula (Fontaine et al. 2023).

Během prvního týdne života novorozence dochází k rychlému a pravidelnému nárůstu počtu bakterií v jeho střevě. Hodnoty 10^9 KTJ/g stolice je dosaženo po 1 týdnu. První bakterie kolonizující střevo u novorozenců narozených vaginálně jsou mateřského původu a převážně jde o fakultativně anaerobní a anaerobní bakterie. U kojenců porozených císařským řezem se z počátku jejich mikrobiota většinou vyznačuje nedostatkem anaerobních bakterií, které nepřežijí v kontaktu se vzduchem. Střevo novorozence porozeného císařským řezem obecně kolonizují nejprve pouze mikroaerofilní mikroorganismy, fakultativně anaerobní bakterie a sporulující formy bakterií jako je *Clostridium* spp. Obecně se bakterie začnou objevovat ve stolici novorozence během několika hodin po narození (Bezirtzoglou 1997).

Střevní prostředí novorozence se značně liší od střevního prostředí dospělého člověka. Prostředí ve střevě novorozence má při narození pozitivní redoxní potenciál (lze v něm hned po narození detekovat stopy kyslíku), zatímco střevo dospělého člověka je téměř zcela hypoxické. Gastrointestinální trakt je nejprve kolonizován fakultativně anaerobními bakteriemi (jako jsou zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* a *Lactobacillaceae*), které snižují redoxní potenciál, vytvářejí ve střevním lumen anaerobní prostředí a umožňují tak růst obligátně a striktně anaerobních bakterií (včetně *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. a *Bacteroides* spp.) (Bezirtzoglou 1997; Sanidad & Zeng 2020; Suárez-Martínez et al. 2023). Snižování obsahu kyslíku v neonatálním střevě umožňuje přechod dominance od prvních kolonizátorů, fakultativních anaerobů, k obligátním anaerobům během několika následujících měsíců (Sanidad & Zeng 2020). Bifidobakterií začíná ve střevním lumen přibývat díky jednoduchým cukrům a oligosacharidům mateřského mléka zejména z konzumace mateřského mléka. Současně se začíná zvyšovat také četnost *Clostridiaceae*, což vede k produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem, jako je butyrát. Toto hypoxické střevní prostředí, spolu s ukončením kojení a přechodem na pevnou stravu, sestávající z komplexních sacharidů, umožňuje následnou kolonizaci obligátních anaerobů *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae*, které se v dospělosti stávají

nejhojnějšími bakteriálními čeledmi v lidském střevě (Sanidad & Zeng 2020). Na obrázku 1 jsou znázorněni nejčastější zástupci vyskytující se v lidském střevě od narození do dospělosti.



Obrázek 1: Mění se prostředí střevního lumen od raného věku do dospělosti ovlivňuje relativní četnost bakterií (Sanidad & Zeng 2020)

Střevo je považováno za zralé a „dospělé“, pokud se zvýší diverzita a hojnost střevních bakteriálních společenstev a také dojde k posunu od dominance fakultativních anaerobů k dominanci obligátních anaerobů (Sanidad & Zeng 2020). Proces stárnutí ovlivňuje stabilitu mikrobioty, včetně přítomnosti *Clostridium* spp. U osob starších 65 let dochází k poklesu počtu striktních anaerobů a k nárůstu počtu fakultativních anaerobů (streptokoků, stafylokoků, enterokoků a enterobakterií) (Lopetuso et al. 2013).

Hlavní přítomné, izolované a dobře zcharakterizované kmeny ze střeva novorozence jsou: ***Staphylococcus* spp.** (*S. aureus*, *S. epidermidis*), ***Streptococcus* spp.** (*S. fecalis*, *S. faecium*, nehemolytický streptokok) a ***Enterobacteriaceae*** (*Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia* spp. a *Pseudomonas aeruginosa*). Za fakultativně anaerobními bakteriemi následuje anaerobní ***Bifidobacterium* spp.** (*B. bifidum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. adolescentis* a *B. breve*). Do 2 dnů se objevuje také ***Clostridium perfringens***, jehož výskyt je zvýšený u novorozenců narozených císařským řezem. Jiné klostridiové druhy, které jsou izolovány, přestože méně často, jsou například *C. paraputrificum*, *C. tertium*, *C. cochlearum*, *C. acetobutylicum*, *C. butyricum* a *Clostridioides difficile*. Dále se vyskytují druhy z ***Bacteroides* spp.** (*B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *B. distasonis*). Mezi další převládající anaerobní bakterie patří druhy z ***Eubacterium* spp.** (*E. lentum*, *E. aerofaciens*, *E. limosum*, *E. rectale*, *E. contortum*), ***Propionibacterium* spp.** (*P. acnes*), ***Lactobacillus* spp.** (*L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. fermentum*), ***Peptostreptococcus* spp.** (*P. intermedius*, *P. productus*), ***Peptococcus* spp.** (*P. asaccharolyticus*), ***Veillonella* spp.** (*V. parvula*, *V. alcalescens*) a ***Fusobacterium* spp.** (*F. novum*, *F. varium*, *F. prausnitzii*, *F. mortiferum*) (Bezirtzoglou 1997).

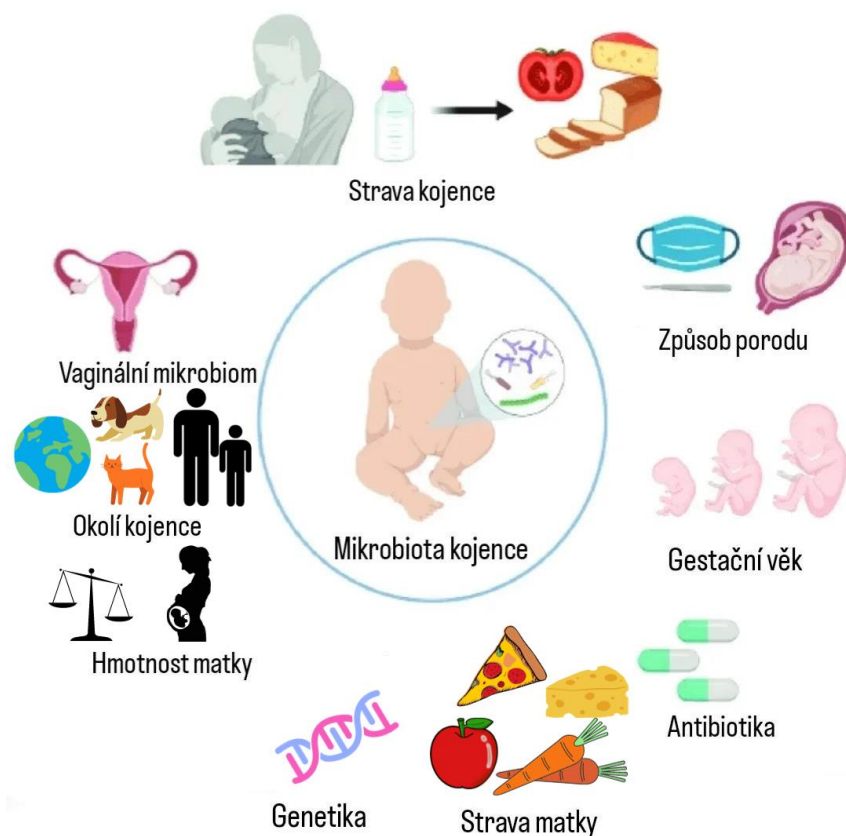
Výskytem sporotvorných bakterií ve střevě dítěte od narození po dobu dvou let se detailněji zabývali Ingridelli et al. (2023). Druhy *C. ramosum*, *C. tertium* a *C. paraputrificum* byly častěji detekovány během prvního roku života kojence, zatímco *C. butyricum* se vyskytovalo převážně během prvních 6 měsíců. Je zajímavé, že izoláty *C. perfringens* byly spolehlivě získány v průběhu celých dvou let života, zatímco *Clostridioides difficile* bylo přítomno sporadicky pouze během prvních několika měsíců. *C. baratii*, *C. jeddahense*, *Enterocloster bolteae*, *Paraclostridium bifermens* a *C. disporicum* byly během dvouletého období odběru vzorků detekovány pouze jednou nebo dvakrát, zatímco *C. symbiosum* opakovaně mezi 15. a 24. měsícem.

3.1.2 Faktory ovlivňující osídlení kojence

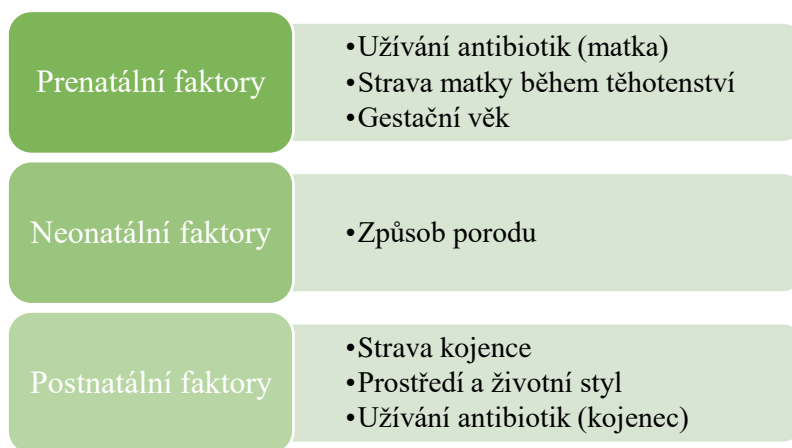
Bakterie, které kolonizují kojence, pocházejí od matky (především z vaginální a střevní mikrobioty), mateřského mléka (u kojených dětí) a okolního prostředí, které zahrnuje vybavení, vzduch či ošetřující personál. Vzorec a úroveň expozice během novorozeneckého období pravděpodobně ovlivňuje mikrobiální sukcesi a kolonizaci v trávicím traktu (Guaraldi & Salvatori 2012).

Mikrobiální kolonizace novorozence tedy představuje de novo sestavení komplexního mikrobiálního společenství a tento proces je ovlivněn řadou různých faktorů, které lze rozdělit do dvou hlavních kategorií – vnějších a vnitřních faktorů. Mezi vnější lze zařadit způsob porodu, stravovací návyky, farmakoterapie, bakterie matky a okolního prostředí, geografická oblast či hygienická úroveň. K vnitřním faktorům lze zařadit genetiku novorozence, střevní pH a sekreci, peristaltiku, imunitní odpověď a bakteriální slizniční receptory a interakce (Guaraldi & Salvatori 2012; Suárez-Martínez et al. 2023).

Složení mikrobioty kojence je tedy dynamické a závisí na mnoha faktorech (složení mikrobioty matky, způsob porodu, výživa kojence a způsob krmení, užívání antibiotik, různé faktory prostředí – přítomnost domácích zvířat a sourozenců). Faktory ovlivňující složení střevní mikrobioty jsou znázorněny na obrázku 2. Ačkoli všechny tyto faktory mají individuální vliv, strava kojence byla identifikována jako hlavní faktor, který ovlivňuje vývoj střevní mikrobioty v raném věku. Faktory lze také rozdělit dle období působení, na prenatální, neonatální a postnatální. Rozdělení faktorů je znázorněno na obrázku 3. Narušení složení střevní mikrobioty v kojeneckém věku je také spojováno s atopickým onemocněním, astmatem a obezitou v pozdějším věku (Laursen 2021; O'Neill et al. 2020; Suárez-Martínez et al. 2023).



Obrázek 2: Faktory ovlivňující kolonizaci novorozence a složení jeho střevní mikrobioty v brzkém věku (Laursen 2021; O'Neill et al. 2020)



Obrázek 3: Rozdělení faktorů ovlivňujících střevní mikrobiotu kojence (Suárez-Martínez et al. 2023)

3.1.2.1 Prenatální faktory

Prenatální faktory během těhotenství mohou ovlivnit střevní mikrobiotu matky, která následně může modifikovat střevní kolonizaci kojence a jeho budoucí vývoj. Mezi prenatální faktory lze zařadit léčbu antibiotiky během těhotenství, stravu matky během těhotenství a gestační věk (Suárez-Martínez et al. 2023).

3.1.2.1.1 Užívání antibiotik během těhotenství

Antibiotika užívaná matkou během těhotenství mohou ovlivňovat střevní mikrobiotu kojence. Antibiotika, která jsou řazena mezi nejčastěji užívané léky v těhotenství, mohou vyvolat změny v komenzální mikrobiotě porodních cest u těhotných žen. Komenzální mikrobiota chrání před množением patogenních bakterií. Její složení však není konstantní a řada faktorů, ke kterým patří například právě užívání antibiotik, může přispívat ke změnám ve složení vaginální mikrobioty matky (Stokholm et al. 2014).

Peripartální mateřský mikrobiom je jedním z klíčových faktorů, které se podílejí na utváření střevního mikrobiomu u dětí. Antibiotika, která jsou široce používána u žen v peripartálním období, zejména ve vyspělých zemích, mohou vyvolat změny jejich vaginálního a střevního mikrobiomu, a tak ovlivnit vývoj střevního mikrobiomu dítěte. Infekce streptokokem skupiny B je jednou z hlavních příčin novorozeneckých infekcí. Intrapartální kolonizace matky streptokokem skupiny B je primárním rizikovým faktorem pro novorozenecké onemocnění tímto streptokokem s časným nástupem, které se objevuje během prvního týdne po porodu. Intrapartální antibiotická profylaxe u žen kolonizovaných tímto streptokokem snižuje riziko přenosu tohoto streptokoka na novorozence a novorozeneckých streptokokových infekcí (Miyoshi & Hisamatsu 2022).

Vzhledem k tomu, že antibiotika mohou ovlivňovat a měnit střevní mikrobiom, dysbióza v raném věku může mít vliv na vývoj onemocnění v pozdějším věku. Toto antibiotiky způsobené narušení střevního mikrobiomu u dítěte může mít v budoucnu nepříznivé účinky na zdraví (Miyoshi & Hisamatsu 2022). Řada studií navrhuje možnou souvislost mezi užíváním antibiotik v raném věku a zvýšeným rizikem různých onemocnění jako je obezita (Trasande et al. 2013), astma (Zou et al. 2020), zánětlivé onemocnění střev (Örtqvist et al. 2019; Ungaro et al. 2014), atopická dermatitida, potravinové alergie (Metzler et al. 2019) či celiakie (Mårild et al. 2013). Předepisování antibiotik během těhotenství tak představuje výzvu, protože je třeba léčit infekce probíhající v organismu, ale zároveň je potřeba chránit plod před možnými nežádoucími účinky těchto léků (Stokholm et al. 2014).

3.1.2.1.2 Gestační věk

Dalším důležitým faktorem při utváření střevní mikrobioty kojenců je gestační věk (Milani et al. 2017). Předčasný porod je nefyziologický stav, který je vystaven mnoha klinickým faktorům v raném věku, které mění normální proces kolonizace (Tirone et al. 2019). Světová zdravotnická organizace (WHO) definovala předčasný porod jako porod před dokončeným 37. týdnem těhotenství (WHO 2023a). Předčasně narození novorozenci mají obvykle velmi nízkou porodní hmotnost (Suárez-Martínez et al. 2023). V závislosti na stupni nedonošenosti, mohou zpočátku překonávat závažné zdravotní problémy. Často mají nezralé střevo a vyskytující se u nich imunitní, respirační a neurologické problémy (Milani et al. 2017).

Navíc jsou velmi předčasně vystaveni rozsáhlému užívání antibiotik a jiných léků a často jsou také dlouhodobě hospitalizováni, vyžadují mechanickou ventilaci a obvykle dostávají parenterální výživu. Každý z těchto faktorů může způsobit nevratné změny v přirozených procesech jejich mikrobiální kolonizace, což vede k odlišnému složení střevní mikrobioty (Milani et al. 2017).

Předčasně narození novorozenci vykazují opožděnou kolonizaci střeva komenzálními anaerobními mikroby, jako jsou *Bifidobacterium* spp. či *Bacteroides* spp., přičemž jejich stolice naopak obsahuje výrazně vyšší množství *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp. a dalších oportunních patogenních mikroorganismů než stolice donošených novorozenců. Grampozitivní bakterie, jako jsou stafylokoky, enterokoky a klostridie, dominují ve střevní mikrobiotě velmi nedonošených novorozenců během prvního měsíce života (Milani et al. 2017).

3.1.2.1.3 Okolí kojence

Členové rodiny a blízcí příbuzní také ovlivňují kolonizaci kojence, přičemž sourozenci mají vyšší podíl *Bifidobacterium* spp. než kojenci, kteří nemají sourozence (Rodríguez et al. 2015). Grzeskowiak et al. (2012) porovnávali střevní mikrobiotu šestiměsíčních kojenců žijících na venkově v Malawi s kojenci žijícími ve městě ve Finsku, přičemž obě skupiny kojenců byly kojeny a měli stravu odpovídající věku typickou pro danou oblast. Bifidobakterie byly dominantní u všech šestiměsíčních kojenců, i když ve větším zastoupení u kojenců z Malawi než u těch z Finska. Dále byly u kojenců z Malawi ve větším zastoupení než u kojenců z Finska *Bacteroides-Prevotella* a *Clostridium histolyticum*. U kojenců z Finska se vyskytovaly druhy *B. adolescentis*, *C. perfringens* a *Staphylococcus aureus*, nicméně u kojenců z Malawi se tyto druhy nevyskytovaly. Střevní mikrobiota kojenců z nízkopříjmové země se významně liší od mikrobioty kojenců ze země s vysokými příjmy. De Filippo et al. (2010) porovnávali fekální mikrobiotu dětí z Evropy (z městské oblasti Florencie v Itálii) a u dětí z venkovské africké vesnice Burkina Faso, kde je typická strava s vysokým obsahem vlákniny a našli významné rozdíly v mikrobiotě těchto dvou skupin. Děti z africké vesnice vykazovali vyšší počty Bacteroidetes a nižší počty Firmicutes, s jedinečným množstvím bakterií z rodů *Prevotella* a *Xylanibacter*. Dále enterobakterie (rody *Shigella* a *Escherichia*) byly u dětí z africké vesnice zastoupeny významně méně než u dětí z Itálie.

3.1.2.1.4 Psychický stav

Zijlmans et al. (2015) zkoumali vývoj střevní mikrobioty a vliv prenatálního stresu. Jejich výsledky ukázaly, že prenatální stres matky byl silně a dlouhodobě spojen se složením mikrobioty kojenců. Kojenci matek s vysokým kumulativním stresem během těhotenství měli významně vyšší relativní zastoupení proteobakteriálních skupin, které obsahují potenciální patogeny (jako jsou rody *Escherichia*, *Enterobacter* a *Serratia*) a nižší relativní zastoupení bakterií mléčného kvašení (tedy bakterií *Lactobacillus* spp. a *Lactococcus* spp.) a bifidobakterií.

3.1.2.2 Neonatální faktory

K neonatálním faktorům, které ovlivňují kolonizaci střeva kojence, lze zařadit způsob porodu (Suárez-Martínez et al. 2023), přičemž porodní proces má velký vliv na složení mikrobioty novorozence (Madhogaria et al. 2022).

3.1.2.2.1 Způsob porodu

Bakterie, které osidlují střeva kojenců během prvních dnů života, pocházejí především od matky a z okolního prostředí. V raném věku je jedním z prvních významných faktorů ovlivňující střevní mikrobiotu způsob porodu. Vaginálně narození novorozenci jsou zpočátku kolonizováni fekálními a vaginálními bakteriemi matky, zatímco novorozenci narození císařským řezem jsou zpočátku vystaveni bakteriím pocházejícím z nemocničního prostředí a od zdravotnického personálu (Penders et al. 2006).

Vaginálně porozené novorozenci jsou vystaveni vaginální mikrobiotě své matky, a proto se u nich zpočátku vyskytují mikrobiální společenstva podobná mateřské vaginální mikrobiotě, jako jsou zástupci rodů *Escherichia*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Shigella* a *Prevotella*. Během prvních dnů života je v novorozeneckém střevě relativně vysoké množství laktobacilů, které pravděpodobně odráží vaginální mikrobiotu. Dále se během porodu či těsně po něm přenáší i *Bacteroides fragilis*. Anatomie člověka také podporuje fakt, že expozice fekální mikrobiotě matky je důležitou cestou přenosu během porodu. Fakultativně anaerobní *Enterobacteriaceae* představují jednu ze skupin bakterií s nejpravděpodobnějším přímým přenosem z matky na dítě prostřednictvím stolice (Rodríguez et al. 2015; Skillington et al. 2021).

Naopak novorozenci porození císařským řezem nepřicházejí do přímého kontaktu s porodními cestami své matky, ale získávají mikrobiální společenství z alternativních míst jako je kožní mikrobiota matky a nemocniční prostředí. V důsledku toho se u novorozenců narozených císařským řezem vyskytují střevní bakterie patřící do rodů *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* a *Klebsiella*. Kmeny Actinobacteria (*Bifidobacterium* spp.) a Bacteroidetes (*Bacteroides* spp.) se u nich vyskytují v nižší počtu než u vaginálně narozených novorozenců. Novorozenci porození císařským řezem jsou spojováni s vyšším výskytem oportunních patogenů, jako jsou *Cl. difficile*, což se shoduje s nízkou hladinou mastných kyselin s krátkým řetězcem ve střevě a vyšším pH v důsledku nižšího výskytu Actinobacteria a Bacteroidetes. Zástupci mikrobiální populace gastrointestinálního traktu kojenců porozených vaginálně, jako jsou *B. fragilis* a *Bifidobacterium* spp., totiž produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které udržují nižší střevní pH, které brání růstu patogenů, jako je například i druh *C. perfringens* (Skillington et al. 2021). Dle Penders et al. (2006), počty zástupců bifidobakterií a *Bacteroides* spp. ve střevní mikrobiotě kojenců porozených císařským řezem byly nižší a zároveň byli častěji kolonizováni *Cl. difficile* než u kojenců porozených vaginálně.

Dále se také uvádí, že novorozenci porození vaginálně vykazují vyšší taxonomickou rozmanitost než novorozenci narození císařským řezem, a že porod císařským řezem je spojen s rozvojem neinfekčních onemocnění, jako je astma, adipozita a diabetes v pozdějším věku (Skillington et al. 2021).

3.1.2.3 Postnatální faktory

Mezi postnatální faktory ovlivňující kolonizaci střeva kojence, lze zařadit stravu kojence, konzumaci probiotik a prebiotik, životní prostředí a životní styl, či léčbu antibiotiky (Suárez-Martínez et al. 2023).

3.1.2.3.1 Strava kojence

Mateřské mléko má komplexní a dynamické složení, které je ovlivněno gestačním věkem při porodu, obdobím kojení a stravou ženy. Liší se od náhradních mléčných kojeneckých výživ, pokud jde o koncentraci živin a složení, a také exkluzivní přítomností růstových faktorů, cytokinů, imunoglobulinů a trávicích enzymů (Guaraldi & Salvatori 2012).

Způsob krmení během brzkého kojeneckého věku, tedy to, zda je novorozenec kojen nebo krmen kojeneckými náhradními mléčnými výživami, silně ovlivňuje složení střevní mikrobioty a její metabolismus (Laursen 2021). Typ krmení ovlivňuje složení střevní mikrobioty tím, že poskytuje substráty pro bakteriální proliferaci, ale také zdroje pro bakteriální kontaminace, které pocházejí z bradavek a okolní kůže, mlékovodů mateřského mléka, ze sušeného prášku či z vybavení a vody používané na přípravu umělé výživy (Guaraldi & Salvatori 2012).

Mateřské mléko je doporučenou první výživou pro kojence, která poskytuje všechny potřebné živiny pro podporu růstu a vývoje, také poskytuje pasivní imunitu k ochraně před infekčními nemocemi během kojeneckého období (Laursen 2021; WHO 2023b) a jeho úloha při vývoji gastrointestinálního mikrobiomu se zdá být pro vývoj kojence klíčová. Oligosacharidy mateřského mléka nejsou kojencem přímo katabolizovány, ale procházejí nestrávené horní částí trávicího traktu až do tlustého střeva, kde fungují jako prebiotika pro distální střevní mikrobiotu. Komenzální bakterie, jako jsou zástupci rodů *Bifidobacterium* a *Bacteroides*, jsou vybaveny sadou enzymů schopných rozkládat oligosacharidy mateřského mléka (Davis et al. 2016). Zástupci z rodu *Bifidobacterium*, kteří jsou schopni rozkládat oligosacharidy mateřského mléka, jsou zejména *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (Ioannou et al. 2021). Z rodu *Bacteroides* jde například o *Bacteroides fragilis* a *Bacteroides vulgatus*. Také u některých druhů *Staphylococcus*, u *Lactobacillus casei* či u *Akkermansia muciniphilia* bylo prokázáno, že v různé míře využívají oligosacharidy mateřského mléka k růstu (Zhang et al. 2022; Kiely et al. 2023).

Mléčné náhradní výživy jsou navrženy tak, aby byly velmi podobné mateřskému mléku a poskytovaly kojenci všechny potřebné živiny a představují ideální volbu pro kojence, pro jejichž matky není kojení možné nebo pro kojence, kteří nejsou kojeni dostatečně. Řada mléčných náhradních výživ obsahuje prebiotika, jako jsou galaktooligosacharidy (GOS), fruktooligosacharidy (FOS) či biosyntetické oligosacharidy mateřského mléka, aby poskytly bioaktivní sloučeniny a živiny pro mikrobiotu. Navzdory těmto podobnostem se však mateřské mléko a náhradní mléčné výživy liší (O'Neill et al. 2020).

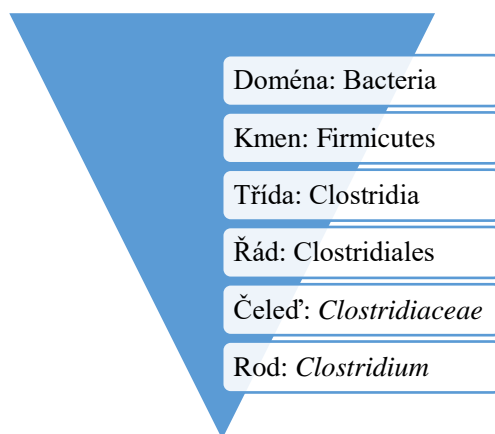
Kojenci kojení mateřským mlékem mají ve stolici obecně vyšší relativní množství rodů *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Prevotella*. Naopak kojenci, kteří jsou krmení buď výhradně náhradní mléčnou výživou nebo v kombinaci s mateřským mlékem, mají vyšší relativní zastoupení Firmicutes, Bacteroidetes a Proteobacteria, jako je *Cl. difficile*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Lachnospiraceae* či *Bacteroides* spp. Některé z těchto druhů s vyšším výskytem u kojenců krmených náhradními mléčnými výživami představují oportunní patogeny, jako například *Cl. difficile* a *Klebsiella* spp. (O'Neill et al. 2020).

Kojení tedy díky přísunu oligosacharidů mateřského mléka do střeva podporuje růst specifických druhů rodu *Bifidobacterium* využívajících oligosacharidy mateřského mléka, které v mikrobiálním společenství ve střevě kojence dominují, dokud je kojeneček primárně kojen. Tyto druhy provádějí ve střevě sacharolytickou fermentaci a produkují metabolity s fyziologickými účinky, které mohou přispívat k ochraně před infekčními a imunitně podmíněnými onemocněními. Kojenci krmení výlučně náhradní mléčnou výživou mají rozmanitější mikrobiotu s nižším zastoupením bifidobakterií využívajících oligosacharidy mateřského mléka a často se zvýšeným zastoupením druhů *Clostridium* (*Cl. difficile* a *C. perfringens*) a zástupců *Enterobacteriaceae* (např. *E. coli*). Krmení náhradní mléčnou výživou, vzhledem k nedostatku oligosacharidů mateřského mléka a vyššímu obsahu bílkovin, dává vzniknout rozmanitější střevní mikrobiotě s větší prevalencí oportunních patogenních bakterií a vede k proteolytičtějším metabolismu ve střevě (Laursen 2021).

3.2 Rod *Clostridium*

3.2.1 Systematika klostridií

Zástupci rodu *Clostridium* byli před 16S rRNA sekvenací definováni jako sulfát neredukující sporotvorné bakterie, s anaerobním energetickým metabolismem a s Gram-pozitivním typem buněčné stěny. Následně se pohled na klasifikaci bakterií změnil a celková taxonomická struktura prokaryot byla definována na základě příbuzenských vztahů, které odhalilo porovnání sekvencí genu 16S rRNA. To vedlo k přesunutí spousty klostridiálních druhů do nových rodů a k přesnější definici rodu *Clostridium* (Wiegel et al. 2006). Systematické členění klostridií je znázorněno na obrázku 4.



Obrázek 4: Systematické členění klostridií (Taxonomic Outline of the Archaea and Bacteria 2015)

Řád Clostridiales, patřící do třídy Clostridia, obsahuje 8 čeledí, kterými jsou čeleď *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Eubacteriaceae*, *Peptococcaceae*, *Heliobacteriaceae*, *Acidaminococcaceae* a *Syntrophomonadaceae* (Taxonomic Outline of the Archaea and Bacteria 2015). Konkrétně čeleď *Clostridiaceae* je dále členěna do 19 rodů, které jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Rody řazené k čeledi *Clostridiaceae* (Taxonomic Outline of Archaea and Bacteria 2015)

Čeďed': <i>Clostridiaceae</i>	
<i>Acetivibrio</i>	<i>Faecalibacterium</i>
<i>Acidaminobacter</i>	<i>Natronincola</i>
<i>Alkaliphilus</i>	<i>Oxobacter</i>
<i>Anaerobacter</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Caloramator</i>	<i>Sporobacter</i>
<i>Caloranaerobacter</i>	<i>Tepidibacter</i>
<i>Caminicella</i>	<i>Thermobrachium</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Thermohalobacter</i>
<i>Coprobacillus</i>	<i>Tindallia</i>
<i>Dorea</i>	

Clostridium difficile, které bylo dříve řazeno k rodu *Clostridium*, bylo v roce 2016 přejmenováno na *Clostridioides difficile* a přerazeno k rodu *Clostridioides*, který patří k čeledi *Peptostreptococcaceae* (Lawson et al. 2016; List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature 2024).

Je pár problémů, které ovlivňují taxonomii rodu *Clostridium* a příbuzných druhů a jejich zařazení do rodu nebo čeledi v rámci fylogenetické struktury založené na 16S rRNA bakterií. Rod *Clostridium* obsahuje spoustu platně popsáných druhů, avšak na základě analýz sekvencí genu 16S rRNA pouze 73 z nich spadá k typovému druhu rodu *Clostridium*, *C. butyricum*, a do klastru I (též označovaný jako rod *Clostridium sensu stricto*). Zbývající druhy spadají do různých fylogenetických klastrů v rámci celého grampozitivního kmene s nízkým obsahem G+C bází. Další problém souvisí se skutečností, že rod *Clostridium* (sensu stricto/klastr I) obsahuje příslušníky jiných druhů platných rodů (Wiegel et al. 2006). Tabulka 2 shrnuje zástupce řazené do klastru I, Tabulka 3 shrnuje zástupce řazené do ostatních klastrů (klastry III, IV, XIa, XIb, XII, XIVa, XIVb, XVI, XVIII a XIX).

Tabulka 2. *Clostridium sensu stricto* (klastr I) (Wiegel et al. 2006)

<i>Clostridium sensu stricto</i> (klastr I)			
<i>C. absonum</i>	<i>C. cochlearium</i>	<i>C. lentoputrescens</i>	<i>C. quinii</i>
<i>C. acetireducens</i>	<i>C. colicanis</i>	<i>C. limosum</i>	<i>C. roseum</i>
<i>C. acetobutylicum</i>	<i>C. collagenovorans</i>	<i>C. ljungdahlii</i>	<i>C. saccharobutylicum</i>
<i>C. acidisoli</i>	<i>C. cylindrosporum</i>	<i>C. magnum</i>	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>C. akagii</i>	<i>C. disporicum</i>	<i>C. malenominatum</i>	<i>C. sardiniense</i>
<i>C. algidicarnis</i>	<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i>	<i>C. novyi</i>	<i>C. sartagoforme</i>
<i>C. argentinense</i>	<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i>	<i>C. oceanicum</i>	<i>C. scatologenes</i>
<i>C. aurantibutyricum</i>	<i>C. fallax</i>	<i>C. paraperfringens</i>	<i>C. septicum</i>
<i>C. baratii</i>	<i>C. frigidicarnis</i>	<i>C. paraputrificum</i>	<i>C. sporogenes</i>
<i>C. beijerinckii</i>	<i>C. frigoris</i>	<i>C. pascui</i>	<i>C. subterminale</i>
<i>C. botulinum</i>	<i>C. gasigenes</i>	<i>C. pasteurianum</i>	<i>C. tertium</i>
<i>C. bowmanii</i>	<i>C. grantii</i>	<i>C. peptidivorans</i>	<i>C. tetani</i>
<i>C. butyricum</i>	<i>C. haemolyticum</i>	<i>C. perenne</i>	<i>C. tetanomorphum</i>
<i>C. cadaveris</i>	<i>C. histolyticum</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. thermobutyricum</i>
<i>C. carnis</i>	<i>C. homopropionicum</i>	<i>C. pfennigii</i>	<i>C. thermopalmarium</i>

<i>C. celatum</i>	<i>C. intestinale</i>	<i>C. proteolyticum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
<i>C. cellulovorans</i>	<i>C. isatidis</i>	<i>C. puniceum</i>	<i>C. vincentii</i>
<i>C. chartatabidum</i>	<i>C. kluyveri</i>	<i>C. putrefaciens</i>	
<i>C. chauvoei</i>	<i>C. lacusfryxellense</i>	<i>C. putrificum</i>	

Druhy rodu *Clostridium*, které patří do dalších klastrů

Tabulka 3: Druhy rodu *Clostridium*, které patří do další klastrů: klastry III, IV, XIa, XIb, XII, XIVa, XIVb, XVI, XVIII a XIX (Wiegel et al. 2006)

Klastr III	
<i>C. aldrichii</i>	<i>C. stercorarium</i>
<i>C. cellobioparum</i>	<i>C. termitidis</i>
<i>C. cellulolyticum</i>	<i>C. thermocellum</i>
<i>C. hungatei</i>	<i>C. thermolacticum</i>
<i>C. josui</i>	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>
<i>C. papyrosolvens</i>	<i>Bacteroides cellulosolvens</i>

Klastr IV (je v rámci navrhované čeledi <i>Lachnospiraceae</i>)	
<i>C. cellulose</i>	<i>C. sporosphaeroides</i>
<i>C. leptum</i>	<i>C. viride</i>
<i>C. orbiscindens</i>	<i>Ruminococcus bromii</i>

Klastr XIa (je v rámci navrhované čeledi <i>Peptostreptococcaceae</i>)	
<i>C. bifermentans</i>	<i>C. mangenotii</i>
<i>C. difficile</i>	<i>C. mayombei</i>
<i>C. ghonii</i>	<i>C. paradoxum</i>
<i>C. glycolicum</i>	<i>C. sordellii</i>
<i>C. hiranonis</i>	<i>C. sticklandii</i>
<i>C. irregulare</i>	<i>C. thermoalcaliphilum</i>
<i>C. litorale</i>	<i>Eubacterium acidaminophilum</i>
<i>C. lituseburensense</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>

Klastr XIb (je v rámci navrhované čeledi <i>Peptostreptococcaceae</i>)	
<i>C. felsineum</i>	<i>C. halophilum</i>
<i>C. formicaceticum</i>	<i>Filifactor villosus</i>

Klastr XII (je v rámci navrhované čeledi <i>Peptostreptococcaceae</i>)	
<i>C. acidurici</i>	<i>Eubacterium angustum</i>
<i>C. hastiforme</i>	<i>Eubacterium thermomarinus</i>
<i>C. purinilyticum</i>	<i>Tissierella</i> druhy
<i>C. ultunense</i>	

Klastr XIVa (je v rámci navrhované čeledi <i>Lachnospiraceae</i>)	
<i>C. aerotolerans</i>	<i>C. methoxybenzovorans</i>
<i>C. algidixylanolyticum</i>	<i>C. methylpentosum</i>
<i>C. aminophilum</i>	<i>C. nexile</i>
<i>C. aminovalericum</i>	<i>C. oroticum</i>

<i>C. celerecrescens</i>	<i>C. phytofermentans</i>
<i>C. clostridioforme</i>	<i>C. polysaccharolyticum</i>
<i>C. coccoides</i>	<i>C. populeti</i>
<i>C. fimetarium</i>	<i>C. proteoclasticum</i>
<i>C. hathewayi</i>	<i>C. saccharolyticum</i>
<i>C. herbivorans</i>	<i>C. scindens</i>
<i>C. hylemonae</i>	<i>C. sphenoides</i>
<i>C. indolis</i>	<i>C. sporosphaeroides</i>
<i>C. leptum</i>	<i>C. symbiosum</i>
<i>C. litorale</i>	<i>C. xylanolyticum</i>
<i>C. lituseburense</i>	<i>C. xylanovorans</i>

Klastr XIVb (je v rámci navrhované čeledi <i>Lachnospiraceae</i>)	
<i>C. colinum</i>	<i>C. piliforme</i>
<i>C. lactatifermentans</i>	<i>C. propionicum</i>
<i>C. lentocellum</i>	<i>Eubacterium yurii</i>
<i>C. neopropionicum</i>	„ <i>Epulopiscium</i> “ druhy

Klastr XVI	
<i>C. innocuum</i>	<i>Eubacterium dolichum</i>
<i>Eubacterium bifforme</i>	<i>Eubacterium tortuosum</i>
<i>Eubacterium cylindroids</i>	<i>Eubacterium pleomorphus</i>

Klastr XVIII	
<i>C. cocleatum</i>	<i>C. spiroforme</i>
<i>C. ramosum</i>	

Klastr XIX (je v rámci navrhované čeledi <i>Fusobacteriaceae</i>)	
<i>C. rectum</i>	<i>Leptotrichia buccalis</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Propionigenium modestum</i>

3.2.2 Obecné informace

První izolace *Clostridium* spp. byla popsána v 19. století Louisem Pasteurem, který v roce 1861 popsal mikroba schopného růstu bez kyslíku. Byl tak první, kdo rozpoznal, že bakterie mohou existovat a růst bez kyslíku. Pasteur takový mikroorganismus pojmenoval *Vibrion butyrique* kvůli hlavnímu produktu jeho fermentační dráhy – butyrátu. Také zavedl termín anaerobní pro označení života bez volného kyslíku a ukázal, že butanol vzniká během fermentace, což představuje první popis biologické syntézy tohoto rozpouštědla. Ačkoli Pasteur pravděpodobně nepracoval s čistou kulturou, jeho zprávy naznačují, že dominantním druhem bylo máselné *Clostridium*, jako je *C. acetobutylicum* či *C. butyricum*. O dvacet let později Adam Prazmowski navrhl, že Pasteurův *Vibrion butyrique*, van Tieghemův *Bacillus amylobacter* a třetí organismus – *Amylobacter*, jsou všechny totožné a měly by se jmenovat *Clostridium butyricum*. *V. butyrique* tak byl přejmenován na *Clostridium butyricum* (Dürre 2001).

Bakterie rodu *Clostridium* jsou anaerobní, endospory tvořící tyčinkovité bakterie (Samul et al. 2013), které mají grampozitivní typ buněčné stěny. V důsledku této jednoduché definice se rod *Clostridium* stal jedním z největších rodů bakterií (Collins et al. 1994). Tento rod obsahuje fyziologicky i geneticky různé druhy. Vysoký stupeň fylogenetické heterogenity v rámci tohoto rodu dokazuje široký rozsah hodnot obsahu guanino – cytosinového komplementárního páru (mol% G+C) spolu s variabilní 16S rRNA (Blaschek 2014).

Klostridie jsou velmi citlivé na kyslík a rostou pouze za anaerobních podmínek. Některé druhy, například *C. novyi*, tolerují nízké koncentrace kyslíku, zatímco pro ostatní druhy klostridií je kyslík vysoce toxický. Zástupci rodu *Clostridium* mohou růst ve velkém rozpětí hodnot pH i teplot. Většina druhů preferuje rozmezí hodnot pH mezi 6 a 7, ale některé druhy rostou i při pH pod 4 či nad 8. Většina klostridií preferuje teploty v rozmezí 25 až 37 °C, ale některé psychrofilní druhy rostou při teplotách pod 10 °C, zatímco jiné termofilní druhy rostou i při teplotách nad 60 °C (Johnson 2009). Například *C. perfringens* má velmi rychlý růst, kdy je generační doba pouhých 10 minut, při teplotách 40–45 °C. Existují také druhy termofilních klostridií, které jsou schopny růst při maximálních teplotách 80 °C. Mezi zástupce termofilních klostridií, jejichž optimální teplota růstu se pohybuje mezi 60 a 70 °C, patří *Clostridium thermoaceticum*, *C. thermosulfurogenes*, *C. thermocellum*, *C. fervidus*, *C. thermosuccinogenes*, *C. thermobutyricum* a *C. stercorarium* (Blaschek 2014).

Zástupci rodu *Clostridium* jsou všudypřítomné bakterie, které se běžně vyskytují v prostředí. Jsou například v půdě, prachu, ve vodě, v mořských sedimentech, v rostlinných a živočišných produktech a trávicím traktu lidí i zvířat (Samul et al. 2013; Blaschek 2014).

Druhy klostridií se též liší tím, jaký typ substrátu fermentují. Některé druhy intenzivně anaerobně fermentují cukry na etanol, organické kyseliny a další látky včetně plynů. Jiné druhy degradují proteiny za tvorby zapáchajících dusíkatých produktů charakteristických pro kazící se potraviny (Johnson 2009). Existují tedy sacharolytické a proteolytické druhy klostridií (Blaschek 2014). Druhy *C. bifermentans* a *C. sporogenes* jsou silně proteolytické (Willis & Gibson 1999). Sacharolytické klostridie jsou schopny fermentovat širokou škálu sacharidů (hexózy, pentózy a disacharidy) za vzniku organických kyselin a rozpouštědel. Druh *C. acetobutylicum* se vyznačuje tím, že byl v minulosti průmyslově využíván k výrobě acetonu a butanolu ze škrobu a melasy (Mitchell 1992). *C. perfringens* může rozkládat sacharidy na jednodušší cukry pomocí sacharolytických enzymů a výsledný cukr je účinně importován do buněk, kde je definitivně fermentován cestou anaerobní glykolýzy k tvorbě energie (Shimizu et al. 2002).

K rodu *Clostridium* jsou řazeny druhy jak prospěšné nepatogenní, které jsou důležité v tvorbě organických kyselin a dalších látek během anaerobní fermentace, tak patogenní, které způsobují lidská a zvířecí onemocnění a kažení potravin. Psychrofilní druhy klostridií se uplatňují při kažení potravin, zatímco spousta termofilních klostridií je cenným zdrojem odolných enzymů pro průmyslové procesy (Johnson 2009).

3.2.2.1 Produkce kyselin, alkoholů a plynů

K druhům klostridií uplatňujících se v produkci kyselin, alkoholů a plynů patří zejména *C. acetobutylicum*, *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. propionicum*, *C. beijerinckii* či *C. sporogenes*. Jejich produkty jsou kyselina máselná, kyselina mléčná, kyselina propionová,

kyselina octová, butanol, etanol, aceton, 2-propanol, 1,2-propandiol a 1,3-propandiol (Johnson 2009).

3.2.2.2 Produkce průmyslově důležitých enzymů

Některé termofilní klostridie produkují pozoruhodně stabilní a vysoce účinné enzymy rozkládající polymery, jako jsou celulózy, amylázy, proteinázy, pektinázy či kolagenázy, které jsou důležité z průmyslového hlediska. Mnohé z těchto enzymů mají vysokou tepelnou stabilitu. Mezi důležité druhy klostridií využívaných jako zdroje enzymů patří *C. thermosaccharolyticum*, *C. thermosulfurogenes*, *C. thermohydrosulfuricum* a *C. thermocellum*. Tyto enzymy jsou vyvíjeny pro průmyslové využití při zpracování a výrobě potravin, v detergencích a pro další aplikace. Některé klostridie také mají enzymové systémy pro anaerobní rozklad znečišťujících látek a xenobiotik, včetně aromatických sloučenin a halogenovaných chemických látek, jako jsou herbicidy. Zdá se tedy, že klostridie mohou mít důležitou roli v bioremediaci životního prostředí (Johnson 2009).

3.2.2.3 Kažení potravin

Ke klostridiím podílejících se na kažení potravin se řadí například *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. nigrificans*, *C. pasteurianum* či *C. thermosaccharolyticum*. Mezi klostridie způsobující otravy jídlem patří druhy *C. botulinum* a *C. perfringens* (Johnson 2009). Klostridie se obvykle podílejí na kažení potravin jako jsou konzervy nebo vakuově balené potraviny. Hlavním mechanismem kažení je hydrolyza bílkovin a anaerobní proteolýza způsobená bakteriemi rodu *Clostridium* spp., která může vést ke škodlivému hnití potravin. Některé druhy klostridií produkují enzymy, které hydrolyzují sacharidy a bílkoviny při zpracování potravin. Hlavními druhy klostridií, které způsobují kažení potravin jsou *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *C. pasteurianum*, *C. sporogenes*, *C. thermosaccharolyticum* a *C. putrefaciens*. Druhy *C. butyricum*, *C. beijerinckii* a *C. pasteurianum* způsobují kažení potravin s nízkým obsahem kyselin, jsou spojovány s kažením výrobků s hodnotami pH mezi 3,9 a 4,5 a způsobují nafukování konzerv a máselný zápach. *C. butyricum* a *C. tyrobutyricum* také mohou způsobovat kažení a tvorbu plynu v tvrdých sýrech. *C. sporogenes*, který je úzce příbuzný proteolytickým kmenům *C. botulinum*, působí kažení potravin projevující se nafouklými nebo prasklými obaly a silným hnilobným zápachem. *C. thermosaccharolyticum* má termorezistentní spory, které přežívají tepelné zpracování a klíčí a rostou, když je produkt skladován při zvýšených teplotách v rozmezí 30–60°C. Konzervované potraviny zkažené tímto mikroorganismem jsou bobtnavého nebo plyného typu a mají snížené pH a sýrový zápach. Jelikož se hojně vyskytuje v půdě, vyskytuje se na potravinách jako jsou houby a cibule. *C. putrefaciens* působí kažení potravin v uzenářství, přičemž je pro něj charakteristické změknutí masa bez zjevného snížení objemu (Lorenzo et al. 2018). *C. botulinum* roste nejlépe v podmínkách s nízkým obsahem kyslíku a produkuje spory a toxiny, které se nejčastěji tvoří při nesprávném domácím konzervování potravin. Jelikož *C. botulinum* nemůže růst při pH pod 4,6, kyselé potraviny, jako je většina ovoce, rajčat a nakládané okurky, lze bezpečně konzervovat ve vodní lázni. Nicméně potraviny s vyšším pH (většina zeleniny a maso) se musí zpracovávat pod tlakem a je třeba použít tlakový hrnec, který dosáhne dostatečně vysokých teplot potřebných pro zničení spor *C. botulinum* (USDA 2013).

3.2.2.4 Komenzální klostridie

Komenzální klostridie tvoří podstatnou část všech bakterií střevní mikrobioty. Začínají kolonizovat střevo kojených dětí během prvního měsíce života a osidlují specifickou oblast ve střevní sliznici v úzkém vztahu se střevními buňkami. Toto postavení jim umožňuje se podílet jako rozhodující faktory na modulaci fyziologických, metabolických a imunitních procesů ve střevě během celého života, a to interakcí s ostatními rezidentními populacemi mikrobů, ale také zajišťováním specifických a nezbytných funkcí (Lopetuso et al. 2013).

Epiteliální povrch střeva je v těsném kontaktu s komenzální střevní mikrobiotou, která hraje zásadní roli v anatomickém, fyziologickém a imunologickém vývoji hostitele. Tento epiteliální povrch gastrointestinálního traktu je také konfrontován s řadou různých mikroorganismů z vnějšího prostředí, avšak je chráněn fyziologickými a imunitními bariérami. Pro udržení homeostázy ve sliznicích se účastní stálého a efektivního dohledu. Jedním z těchto mechanismů je sekreční imunitní systém prostřednictvím IgA protilátek. Ochranná mikrobiota zabraňuje invazi a kolonizaci patogenními mikroorganismy a soutěží o receptory a/nebo metabolické substráty. Je známo, že střevní mikrobiota stimuluje proliferaci epiteliálních buněk a že kolonizace střeva s komenzální mikrobiotou ovlivňuje vývoj imunitního systému. Epiteliální buňky jsou důležité jako první linie obrany, protože mohou rozlišovat mezi patogenními a nepatogenními bakteriemi, pravděpodobně prostřednictvím rozpoznání složek konzervovaných struktur v bakteriích. Tato skutečnost je důležitá pro toleranci epitelu k normální mikrobiotě. Nepatogenní probiotické bakterie přítomné v potravinách také mohou ovlivňovat chování imunitního systému střevní sliznice. Mezi základní funkce slizničního imunitního systému patří ochrana proti patogenům, prevence průniku cizích antigenů, navození orální tolerance a udržení slizniční homeostázy (Galdeano & Perdigón 2006).

Gastrointestinální trakt je komplexní systém, vytvořený aliancí gastrointestinálního epitelu, imunitních buněk a rezidentní mikrobioty. Tyto tři složky gastrointestinálního ekosystému se společně vyvinuly tak, že každý závisí na přítomnosti dalších dvou složek k dosažení jeho normální funkce a aktivity (McCracken & Lorenz 2001). Gastrointestinální trakt je biologicky rozmanitý a komplikovaný systém, který plní základní fyziologické funkce, které podporují lidské zdraví a zároveň se udržuje jako izolované prostředí, aby se zabránilo infekci a systémovým onemocněním. Pro udržení homeostázy ve střevě musí dojít ke komunikaci mezi hostitelem a sídlícími mikrobiálními komunitami, aby mohlo dojít k identifikaci a eliminaci potenciálních patogenů, které by mohly kolonizovat a způsobit poškození prostřednictvím agresivních prozánětlivých reakcí slizničního imunitního systému (Allen & Torres 2008).

Klostridiální klastr XIVa (též znám jako skupina *C. coccoides*) a klostridiální klastr IV (znám také jako skupina *C. leptum*) tvoří podstatnou část (10–40 %) celkového počtu bakterií ve střevní mikrobiotě. Je tedy pravděpodobné, že klostridie hrají klíčovou roli ve střevní homeostáze tím, že interagují s ostatními populacemi rezidentních mikrobů, ale také tím, že zajišťují specifické a nezbytné funkce (Lopetuso et al. 2013). Kromě 2 zmíněných klostridiálních klastrů jsou některé kmeny *C. butyricum* považovány za prospěšné pro lidské zdraví. Tato bakterie (*C. butyricum*) je navíc v Asii (zejména Japonsku, Koreji a Číně) hojně

využívána jako probiotikum. Zmíněné komenzální klostridie se podílejí na regulaci a udržování všech střevních funkcí (Grenda et al. 2022).

3.2.2.5 Patogenní klostridie

Cl. difficile se vyskytuje v lidském střevě a za normálních podmínek není patogenní. Pokud však dojde ke změně podmínek, může způsobovat gastrointestinální onemocnění (Blaschek 2014; Berman 2019). Infekce vyvolané *Cl. difficile* se často objevují po léčbě antibiotiky. Antibiotika mohou zlikvidovat část komenzálních bakterií ve střevě a oportunní *Cl. difficile* se pak nekontrolovaně množí v důsledku nerovnováhy mezi mikrobiotou a střevním imunitním systémem. Poškozuje trávicí trakt, zejména tlusté střevo, svými toxiny. Produkuje 2 druhy toxinů (A a B), které mají oba charakter enterotoxinu. Způsobuje tedy zánět tlustého střeva s průjmem (Guo et al. 2020).

Mnohé klostridie způsobují devastující onemocnění lidí a zvířat. Známá onemocnění vyvolaná klostridiami jsou botulismus, tetanus, plynová gangréna (klostridiová myonekróza), průjmy spojené s antibiotiky a pseudomembranózní kolitida, průjmy, nekrotická enteritida lidí a domácích zvířat, černá noha a maligní edém u skotu a ovcí (Johnson 2009).

Mezi klostridie způsobující onemocnění patří neurotoxigenní druhy klostridií, ke kterým se řadí *C. botulinum* a *C. tetani*, dále klostridie, které se podílejí na vzniku plynové gangrény a nekrotizující infekce (*C. perfringens*, *C. sordelli* a *C. septicum*) a enteropatogenní *C. difficile*. *C. chauvoei*, které má silný fylogenetický vztah s *C. septicum*, lidským patogenem, má dlouhou historii veterinárního významu. Po dlouhou dobu byl tento druh považován za výhradně veterinární patogen, který je spojen pouze s onemocněním černé nohy u skotu, nicméně nedávné ohlášení výskytu této choroby u lidí vedlo k tomu, že byl tento patogen zařazen na seznam významných smrtelných onemocnění (Num & Useh 2014). *C. botulinum* produkuje neurotoxiny, které ovlivňují centrální nervový systém. Ze sedmi různých typů neurotoxinů (označených písmeny A až G), způsobují onemocnění u lidí pouze typy A, B, E a F (USDA 2013). Příklady patogenních druhů klostridií a nemoci, které způsobují, jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Druhy klostridií způsobující onemocnění (Blaschek 2014; Berman 2019)

Druh	Onemocnění
<i>Clostridium perfringens</i>	Otravy jídlem, plynová gangréna, nekrotická enteritida, infekce ran
<i>Clostridium tetani</i>	Tetanus
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismus – otravy jídlem
<i>Clostridium difficile</i>	Pseudomembranózní enterokolitida
<i>Clostridium novyi</i>	Plynová gangréna
<i>Clostridium histolyticum</i>	Plynová gangréna
<i>Clostridium septicum</i>	Plynová gangréna

Také půda je rezervoárem různých klostridiových patogenů, přičemž zemědělská půda představuje hlavní zdroj kontaminace pro plodiny a pasoucí se hospodářská zvířata. Mezi klostridiální druhy často uváděné jako hlavní půdní patogeny, které jsou zodpovědné

za oslabující a často smrtelné choroby, patří *C. botulinum*, *C. perfringens* a *C. tetani* (Palmer et al. 2019).

3.2.3 Kojenecké druhy klostridií

Vzhledem k praktické části této diplomové práce budou dále detailněji popsány tyto klostridiální druhy: *Cl. difficile*, *C. butyricum*, *C. paraputrificum*, *C. perfringens*, *C. tertium*, *Paeniclostridium sordelli* a *Paraclostridium bifermentans*.

3.2.3.1 *Clostridioides difficile* (čeleď: *Peptostreptococcaceae*)

C. difficile je grampozitivní anaerobní tyčinkovitá bakterie, tvořící spory a produkující toxiny, která byla v roce 2016 oficiálně přejmenována na *Clostridioides difficile* (Czepiel et al. 2019). *Cl. difficile* je řazeno k rodu *Clostridioides*, který patří do čeledi *Peptostreptococcaceae* (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature 2024). Spory této bakterie jsou přenášeny fekálně-orální cestou. *Cl. difficile* je široce rozšířeno ve střevním traktu lidí a zvířat a v životním prostředí. Mezi potencionální rezervoáry patří asymptomatictí nosiči, infikovaní pacienti, kontaminované prostředí a střevní trakt zvířat (psů, koček, prasat, ptáků) (Czepiel et al. 2019).

Cl. difficile bylo v roce 1935 objeveno jako komenzál zdravých novorozenců. Teprve koncem 70. let 20. století byla tato bakterie rozpoznána jako závažný patogen, který je zodpovědný za pseudomembranózní kolitidu související s antibiotiky (Neumann-Schaal et al. 2019). *Cl. difficile* je hlavním původcem patogenních infekcí spojených se zdravotní péčí a od počátku 21. století je infekce *Cl. difficile* považována za významný globální problém. Patogenita je zprostředkována proteinovými toxiny A a B, které způsobují klinické příznaky od samovolného průjmu až po život ohrožující pseudomembranózní kolitidu, toxický megakolon a dokonce mohou způsobit i smrt (Li et al. 2023).

Předpokládá se, že infekce *Cl. difficile* se vyvíjí kvůli nerovnováze ve střevní mikrobiotě hostitele, což může být způsobeno různými faktory (Li et al. 2023). Hlavními rizikovými faktory jsou antibiotická terapie, věk a imunosuprese (Neumann-Schaal et al. 2019). Širokospektrální antimikrobiální látky jsou považovány za nejvýznamnější rizikový faktor infekcí *Cl. difficile* u dospělých a dětí, kdy dochází k poškození hostitelské střevní mikrobioty a snížení odolnosti vůči kolonizaci *Cl. difficile* a dalších střevních patogenů. Dřívější studie prokázaly výrazné snížení diverzity bakterií mezi jedinci s infekcí *Cl. difficile*. Pacienti s infekcí *Cl. difficile* měli ve střevní mikrobiotě zvýšené počty zástupců rodu *Enterococcus*, čeledi *Enterobacteriaceae*, čeledi *Erysipelotrichaceae* a třídy *Gammaproteobacteria*, ale snížený počet zástupců z čeledí *Ruminococcaceae* a *Lachnospiraceae*, kmene *Bacteroidetes* a klostridiových shluků IV a XIVa. Epidemiologie *Cl. difficile* u dětí je charakterizována asymptomatickou kolonizací u mnoha kojenců, přičemž nejvyšší míra kolonizace je zejména u kojenců mladších 12 měsíců. Proto konsenzuální doporučení doporučují testování na *Cl. difficile* pouze v případě, že se u kojenců (<12 měsíců věku) vyskytne pseudomembranózní kolitida nebo toxické megakolon nebo pokud mají příznaky klinicky významného průjmu, u kterého byly vyloučeny jiné příčiny průjmu (Li et al. 2023).

Přibližně 60 až 70 % zdravých novorozenců a kojenců je kolonizováno střevním patogenem *Cl. difficile*. Z dosud nejasných důvodů se u těchto kolonizovaných kojenců neprojevují žádné škodlivé účinky silných exotoxinů uvolňovaných tímto anaerobem, na rozdíl od starších dětí a dospělých, kteří jsou náchylní k těžkým průjmům a kolitidám. Tato bakterie se získává v kojeneckém věku, stejně jako u dospělých, kontaminací prostředí (jesle, domácí prostředí). Mezi 12. a 24. měsícem je *Cl. difficile* vytěsněno jako komenzál, pravděpodobně postupným vývojem mikrobioty tlustého střeva dospělého člověka. Stav nosičství je kojenci dobře tolerován a zdá se, že imunoglobulin G antitoxinová reakce, která se vyvíjí během přenašečství, poskytuje trvalou ochranu před následným onemocněním způsobeným *Cl. difficile* (Jangi & Lamont 2010).

3.2.3.2 *Paeniclostridium sordellii* (čeleď: *Peptostreptococcaceae*)

P. sordellii (dříve *C. sordelli*, reklasifikováno v roce 2016) je grampozitivní anaerobní patogen, který se běžně vyskytuje v půdě a trávicím traktu zvířat. *P. sordellii* bylo také identifikováno v gastrointestinálním traktu přibližně 0,5 % dospělých lidí a ve vaginální mikrobiotě u 0,5–10 % žen. *P. sordellii* způsobuje závažné a smrtelné infekce u široké škály zvířat, včetně skotu, ovcí a hříbat. Ačkoliv jsou infekce vyvolané *P. sordellii* u člověka vzácné, jsou velmi závažné (Vidor et al. 2015; Zerrouki et al. 2022).

P. sordellii poprvé izoloval v roce 1922 argentinský mikrobiolog Alfredo Sordelli. Tuto bakterii izoloval z akutních edematózních infekcí lidských ran a pojmenoval ji *Bacillus oedematis sporogenes*. Název bakterie byl odvozen na základě společných znaků s bakterií *Bacillus oedematiens* (v současné době známé jako *C. novyi*), která způsobuje edém (zadržování tekutin a otok) a *B. sporogenes*, který má podobnou tyčinkovitou morfologii. Aby nedošlo k záměně s *B. oedematiens* a *B. sporogenes*, byla bakterie v roce 1927 přejmenována na *Bacillus sordellii*. O dva roky později se ukázalo, že je *B. sordellii* totožný s *C. oedematoides* a byl přijat název *C. sordellii*. Podrobnosti v morfologii a biochemickém profilu naznačovaly, že *C. sordellii* je pouze virulentní kmen *C. bifermentans*, nicméně produkce ureázy u *C. sordellii* oba druhy jasně odlišovala. Nedávno byla tato bakterie reklasifikována jako druh rodu *Paeniclostridium*, což je nový blízce příbuzný rod rodu *Clostridium* (Aldape et al. 2006; Orrell & Melnyk 2021).

P. sordellii je, stejně jako *C. perfringens*, nejčastěji spojováno se syndromem toxického šoku, sepsí a myonekrózou (plynovou gangrénou) u žen po porodu a po potratu, po operacích či při injekčním užívání drog. *P. sordellii* způsobuje infekce u lidí sporadicky, vyskytuje se méně často než infekce vyvolané *C. perfringens*, ale jejich letalita je relativně vyšší, blíží se 70 % (Zerrouki et al. 2022).

Patogenní kmeny *P. sordellii* produkují až 7 identifikovaných exotoxinů. Z nichž jsou za hlavní faktory virulence považovány letální toxin (LT) a hemoragický toxin (HT) (Aldape et al. 2006).

3.2.3.3 *Clostridium butyricum* (čeleď: *Clostridiaceae*)

C. butyricum je striktně anaerobní, grampozitivní, tyčinkovitá bakterie, která tvoří spory (Tran et al. 2020). Tato bakterie byla poprvé izolována Prazmowskim v roce 1880 ze střev

prasiat a byla pojmenována podle své schopnosti produkovat velké množství kyseliny máselné (Cassir et al. 2016).

C. butyricum je sacharolytická bakterie a produkuje velké množství plynu v médiích obsahujících zkvasitelné sacharidy. Hlavními produkty fermentace sacharidů jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (včetně kyseliny máselné, propionové a octové). Dále fermentuje cukr a glycerol na sloučeniny biopaliv a prekurzory biomateriálů, jako je H₂, butanol, 1,3-propandiol a kyselina máselná (Tran et al. 2020).

Kmeny *C. butyricum* se vyskytují v široké škále prostředí, včetně půdy, v zelenině a ve fermentovaných mléčných výrobcích. Vyskytují se také ve střevě lidí i zvířat. *C. butyricum* je detekováno u 10–20 % dospělé lidské populace a často je jedním z prvních kolonizátorů u kojenců, kdy je střevo po narození postupně kolonizováno fakultativními a striktně anaerobními bakteriemi, včetně *C. butyricum*. Bylo prokázáno, že *C. butyricum* je schopno přežít vysokou kyselost gastrointestinálního prostředí. V lidském střevě je považováno za symbionta (žije společně s hostitelem) a je schopné produkovat mastné kyseliny s krátkým řetězcem (zejména butyrát a acetát) fermentací nestrávené vlákniny. Butyrát je jedním z dominantních konečných produktů fermentace produkovaných *C. butyricum* v butyrátkinázové dráze. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem produkované mikroorganismy v tlustém střevě mají nesčetné a důležité účinky na hostitele, včetně modulace střevní imunitní homeostázy, zlepšují funkci gastrointestinální bariéry a zmírňují zánět (Cassir et al. 2016; Stoeva et al. 2021; Grenda et al. 2022).

C. butyricum je druh, který zahrnuje různé kmeny, z nichž některé mají geny umožňující produkci toxinů. Genomické analýzy však potvrzují, že jiné kmeny *C. butyricum* tyto geny ani jiné znaky patogeneze nemají, a že tyto nepatogenní kmeny mají vynikající potenciál prospívat zdraví hostitele. Některé kmeny *C. butyricum* se již desítky let používají jako probiotika. Kmen MIYAIRI 588 (MIYARI 588, CBM 588), který poprvé izoloval Dr. Chikaji Miyairi, nejprve v roce 1933 ze stolice člověka a později, v roce 1963, z půdy. Jedná se o komerčně dostupné, volně prodejné probiotikum, které je široce používáno v Japonsku, Koreji a Číně k léčbě (antimikrobiálně asociovaných) průjmů (Stoeva et al. 2021). Jiné kmeny *C. butyricum* zjištěné ve vzorcích stolice se však podílejí i na patologických stavech, jako je botulismus kojenců nebo nekrotizující enterokolitida u předčasně narozených novorozenců (Cassir et al. 2016). Botulismus u lidí je závažné paralytické onemocnění, které se vyskytuje ve 3 formách, jako kojenecký botulismus, botulismus v ranách a botulismus přenášený potravinami. Toto onemocnění je způsobené neurotoxiny typu A, B a E, které jsou obvykle produkovány druhem *C. botulinum*. Nicméně vzácně toto onemocnění způsobují i další klostridiální druhy, jako je *C. butyricum* produkující neurotoxin podobný botulotoxinu typu E a *C. baratii* produkující neurotoxin podobný botulotoxinu typu F. *C. butyricum* produkující botulotoxin typu E byl izolován u kojenců s kojeneckým botulismem (Meng et al. 1997; Fenicia et al. 1999). Nekrotizující enterokolitida je nejčastějším a nejzávažnějším gastrointestinálním onemocněním u předčasně narozených novorozenců a toto onemocnění je spojováno s kmeny *C. butyricum* (Cassir et al. 2016).

3.2.3.4 *Clostridium paraputrificum* (čeleď: *Clostridiaceae*)

Klostridie izolované ze stolice zdravých kojenců identifikovali Stark & Lee (1982), přičemž nejčastěji identifikovanými druhy bylo *C. butyricum*, *C. paraputrificum* a *C. difficile*. *C. paraputrificum* tedy bylo izolováno ze stolice kojence (Stark & Lee 1982) a tento patogen je spojován s dětskou infekcí (sepsí), nekrotizující enterokolitidou dospělých, bakteriemií a nekrotizující enterokolitidou u předčasně narozených novorozenců (Kiu et al. 2017). Nicméně, *C. paraputrificum* je zřídka identifikováno jako příčina lidských infekcí (Ciuro et al. 2021). Z druhů klostridií je nejčastějšími původci bakteriémie *C. perfringens* (42 %), *C. septicum* (14 %), *C. ramosum* (9 %), *C. clostridioforme* (6 %) a *C. difficile* (5 %). Naproti tomu *C. paraputrificum* bylo identifikováno pouze v 1 % případů (Fukui et al. 2017).

3.2.3.5 *Clostridium perfringens* (čeleď: *Clostridiaceae*)

C. perfringens je grampozitivní, sporotvorná, anaerobní bakterie. Ve srovnání s většinou ostatních anaerobních bakterií je však *C. perfringens* relativně odolné vůči usmrcení kyslíkem. Tato bakterie má extrémně rychlou dobu zdvojení, jeho krátká generační doba, která je kratší než 10 minut, přispívá k virulenci tím, že umožňuje této bakterii rychle dosáhnout patogenní zátěže v potravinách, ve střevě či v ranách. *C. perfringens* postrádá bičíky, ale pohybuje se pomocí pilusů IV typu, které přispívají i k dalším funkcím potenciálně souvisejícím s virulencí, jako je tvorba biofilmu a adherence (Mehdizadeh Gohari et al. 2021).

C. perfringens bylo poprvé izolováno koncem 19. století dvěma nezávislými výzkumnými skupinami. W. H. Welch izoloval *C. perfringens* z krve a orgánů muže, který zemřel na aneurysma aorty. Současně M. P. Achalme izoloval *C. perfringens* u pacienta s akutním kloubním revmatismem. Welch a jeho kolegové pojmenovali bakterii *Bacillus aerogenes capsulatus*, zatímco Achalme pojmenoval bakterii *Bacillus phlegmonis emphysematosae*. Od té doby byla tato bakterie ještě několikrát přejmenována, než byl v roce 1930 formálně přijat název *C. perfringens* (Orrell & Melnyk 2021).

C. perfringens je všudypřítomný v prostředí, v půdě, v rozkládající se vegetaci, ve stolici a v normální mikrobiotě gastrointestinálního traktu lidí i zvířat. Také je významným a mimořádně všestranným patogenem lidí a hospodářských zvířat. Je původcem mnoha histotoxických a enterotoxických onemocnění u lidí i zvířat (Rood et al. 2018; Mehdizadeh Gohari et al. 2021). Infekce vyvolané *C. perfringens* mají široké spektrum klinických projevů, včetně střevních infekcí vyvolaných specifickými toxinotypy, asymptomatické bakteriémie, gangrény, masivní intravaskulární hemolýzy a multiorgánového selhání v důsledku septického šoku. Septikémie s následnou hemolýzou je známa rychlým zhoršením klinického stavu a úmrtím (80 % úmrtnost). *C. perfringens* může produkovat širokou škálu více než dvaceti toxinů. Kombinace šesti z těchto toxinů (toxin α , toxin β , toxin ϵ , toxin ι , enterotoxin *C. perfringens* (CPE) a NetB toxin (necrotic enteritis B-like toxin)) se používá k určení toxinotypu A-G (Woittiez et al. 2022).

C. perfringens způsobuje infekce ran, jako je plynová gangréna (klostridiová myonekróza), enteritida/enterokolitida (včetně jednoho z nejčastějších onemocnění lidí způsobených potravinami) a enterotoxémie (kdy se toxiny produkované ve střevě vstřebávají a poškozují vzdálené orgány, např. mozek). Virulenci této bakterie lze z velké části přičíst jejímu arzenálu přibližně 20 účinných toxinů. Produkce toxinů u různých kmenů se však

značně liší. Tyto silné proteinové toxiny, z nichž většina je extracelulární, se obvykle podílejí na specifických syndromech onemocnění. Například α -toxin je nezbytný pro lidskou klostridiovou myonekrózu (plynovou gangrénu), enterotoxin *C. perfringens* (CPE) je nezbytný pro otravu potravinami u lidí, β -toxin pro specifické střevní infekce *C. perfringens*, ϵ -toxin je klíčovým toxinem u mnoha enterotoxemických infekcí vyvolaných *C. perfringens* u ovcí a koz a NetB toxin je esenciální pro nekrotickou enteritidu u kuřat (Rood et al. 2018; Mehdizadeh Gohari et al. 2021).

3.2.3.6 *Clostridium tertium* (čeleď: *Clostridiaceae*)

C. tertium je anaerobní, ale aerotolerantní grampozitivní tyčinka tvořící spory. Tato bakterie se vyskytuje v půdě, v gastrointestinálním traktu lidí i zvířat a v komenzální mikrobiotě dutiny ústní. Bylo také identifikováno v chirurgických a traumatických ranách. V ranách je obvykle považováno za kontaminant, avšak byl popsán i případ nekrotizující fascitidy a gangrény (Vanderhofstadt et al. 2010).

C. tertium poprvé popsal v roce 1917 Henry, který ho izoloval z ran vojáků z první světové války. Během první světové války bylo *C. tertium* třetí nejčastěji izolovanou bakterií z válečných zranění, po *C. perfringens* a *C. sporogenes*. Tento organismus byl oficiálně uznán jako patogen v roce 1963, kdy byl hlášen první případ septikémie spojené s *C. tertium* (Vanderhofstadt et al. 2010; Kiu et al. 2017).

C. tertium nejlépe roste za anaerobních podmínek a spory tvoří pouze za anaerobních podmínek. Na rozdíl od jiných klostridií netvoří toxiny (Vanderhofstadt et al. 2010).

Infekce vyvolané *C. tertium* jsou vzácné a jejich etiologie je různá. Bylo zjištěno u předčasně narozených kojenců a malých dětí s enterokolitidou a u dětí a dospělých se septikemií, pneumonií s empyémem, spontánní peritonitidou, kolitidou, s mozkovými, abdominálními a kožními abscesy, meningitidou, plynovou gangrénou a septickou artritidou. Je také spojováno s enteritidou skotu, nekrotizující enterokolitidou u předčasně narozených novorozenců a enterokolitidou dospělých (Vanderhofstadt et al. 2010; Kiu et al. 2017).

C. tertium je považováno za slabý patogen a jeho patogenita je nejasná, nicméně bylo zjištěno, že se podílelo na závažných infekcích se specifickými vlastnostmi. Izoláty *C. tertium* se obvykle vyskytují s jinými patogenními bakteriemi (Vanderhofstadt et al. 2010).

3.2.3.7 *Paraclostridium bifermentans* (čeleď: *Clostridiaceae*)

P. bifermentans, dříve *C. bifermentans*, je grampozitivní tyčinkovitá anaerobní pohyblivá bakterie, která produkuje plyn, redukuje siřičitany a tvoří endospory (Sankar et al. 2018; Moran et al. 2023). *P. bifermentans* se vyskytuje jako součást střevní mikrobioty v malém poměru. Případy zahrnující *P. bifermentans* jsou od konce 80. let minulého století hlášeny příležitostně. Taxonomie a nomenklatura *P. bifermentans* prošla zásadními revizemi v průběhu času a od roku 2016 jí byl přidělen nový název *Paraclostridium bifermentans* (Sankar et al. 2018).

P. bifermentans bylo poprvé izolováno v roce 1902 v hnijícím řeznickém mase. Vyskytuje se v odpadních vodách, půdě a příležitostně ve střevní mikrobiotě člověka. Nicméně četnost infekcí u člověka způsobených *P. bifermentans* je poměrně vzácná (Hale et al. 2016).

Paraclostridium spp. patří do třídy Clostridia. *P. bifermentans* je jedním ze dvou platně publikovaných druhů rodu *Paraclostridium*, všudypřítomného v různých mezofilních podmínkách, včetně půdy, mořského prostředí, znečištěných vod i lidských těl. Patogen *P. sordellii* je fylogenomicky blíže k *P. bifermentans* než ostatní patogenní členové v rámci klastru XI. *P. bifermentans* je tradičně považován za lidského komenzála, protože je obvykle nepatogenní, pokud nekoexistuje s *C. perfringens*. V klinických podmínkách je však hlášeno stále více případů, které prokazují jeho schopnost způsobovat různé lidské infekce, jako je mozkový absces, lymfadenitida, nekrotizující endometritida, kloubní infekce, empyém a endokarditida, zejména s rozvojem pokročilých diagnostických metod. *P. bifermentans* se tedy za specifických podmínek objevuje jako patogen u lidí, a i když současná pozorování naznačují, že infekce způsobené *P. bifermentans* nejsou smrtelné, nicméně nelze při tak omezeném počtu hlášených případů vyloučit možnost výskytu vysoce toxických kmenů. Schopnost *P. bifermentans* kódovat faktory virulence zůstává doposud z velké části neprozkoumaná, a proto jsou znalosti o patogenezí a potenciálu způsobovat smrtelné infekce omezené (Zhao et al. 2022; Cai et al. 2023).

3.3 Mateřské mléko

3.3.1 Mateřské mléko a jeho význam

Mateřské mléko je pro kojence dokonalou výživou, která je výsledkem evoluce, jež ho přesně přizpůsobila jeho potřebám (Andreas et al. 2015). Mateřské mléko je dokonale přizpůsobeno výživovým požadavkům novorozenců a podporuje jejich růst a vývoj. Kojení je také klíčovým postnatálním spojovacím článkem mezi matkami a novorozenci, podporuje mikrobiální kolonizaci, zrání imunitního systému a metabolické aktivity, čímž hraje klíčovou roli v programování zdraví kojenců (Selma-Royo et al. 2021).

Světová zdravotnická organizace (World Health Organization, WHO) a Dětský fond Organizace spojených národů (United Nations Children's Fund, UNICEF) doporučují včasné zahájení kojení do jedné hodiny od porodu a výlučné kojení po dobu prvních 6 měsíců života. Od 6 měsíců věku kojence doporučují zavedení nutričně adekvátních a bezpečných příkrmů spolu s pokračujícím kojením do 2 let věku nebo déle (WHO 2023b).

Kojení kromě živin poskytuje ochranu před gastrointestinálními a respiračními infekcemi a snižuje výskyt různých onemocnění, jako je obezita, diabetes, atopie a astma. Navíc je prospěšné jak pro kojence, tak pro jejich matky (Zhang et al. 2021), které chrání před rakovinou prsu a také se zdá, že je může chránit před rakovinou vaječníků a diabetem 2. typu (Victoria et al. 2016). Vyvíjející se imunitní systém kojence po narození má omezenou antioxidační a protizánětlivou aktivitu v dýchacích cestách a gastrointestinálním traktu, nedostatečně vyvinuté fyzikální bariéry, omezenou kyselost gastrointestinálního traktu či sníženou sekreci imunoglobulinů (sekrečního imunoglobulinu A). Raný život člověka (od fetálního stádia až po první měsíce života) je spojen s vývojovými milníky a lidské mléko poskytuje prostředí pro navození tolerance vůči antigenům i pro rozvoj silné imunitní obrany proti škodlivým patogenům. Mateřské mléko poskytuje zdravé podněty pro sliznici gastrointestinálního traktu, ovlivňuje složení střevní mikrobioty a podporuje vyvíjející se

imunitní systém kojence pravděpodobně prostřednictvím bioaktivních látek mateřského mléka (Carr et al. 2021).

3.3.2 Složení mateřského mléka

Mateřské mléko obsahuje 87 až 88 % vody a 124 g/l pevných složek jako jsou makroživiny, včetně sacharidů, bílkovin a tuku. Také obsahuje vitamíny, minerální látky (Kim & Yi 2020) i množství biologicky aktivních látek, které mají různorodé úlohy, jak při řízení vývoje imunitního systému kojenců, tak střevní mikrobioty (Andreas et al. 2015).

Na rozdíl od náhradní mléčné kojenecké výživy, jejíž složení je standardizováno ve velmi úzkém rozmezí, složení mateřského mléka je dynamické a mění se v rámci krmení, denně, během laktace i mezi matkami a populacemi (Ballard & Morrow 2013). Na složení mají také vliv genetické, fyziologické a nutriční faktory a uplatňují se i podmínky prostředí (Pietrzak-Fiećko & Kamelska-Sadowska 2020).

Mateřské mléko je děleno dle fáze laktace na mlezivo, přechodné mléko a mléko zralé. Mlezivo (kolostrum) je první tekutinou, kterou matky produkují po porodu a liší se v objemu, vzhledu a složení. Tvoří se do 5 dnů po porodu v malém množství a je bohaté na imunitní látky (imunoglobulin A, laktoferin, leukocyty a vývojové faktory), má nižší obsah tuku a vyšší obsah bílkovin než mléko zralé a zároveň obsahuje relativně nízké koncentrace laktózy, což naznačuje, že jeho primární funkce jsou spíše imunologické a trofické než nutriční (Ballard & Morrow 2013; Kim & Yi 2020; Damaceno et al. 2023). Přechodné mléko sdílí některé vlastnosti mleziva, ale představuje období „zvýšené“ produkce mléka pro podporu výživových a vývojových potřeb rychle rostoucího dítěte. Obvykle se objevuje mezi 5. a 14. dnem po porodu, poté je považováno za převážně zralé. Po 4 až 6 týdnech po porodu je mateřské mléko považováno za plně zralé (Ballard & Morrow 2013).

3.3.2.1 Makronutrienty

Průměrné složení makroživin zralého mateřského mléka se odhaduje na přibližně 0,9–1,2 g/dl bílkovin, 3,2–3,6 g/dl tuku a 6,7–7,8 g/dl laktózy. Odhady energetické hodnoty se pohybují v rozmezí 65–70 kcal/dl a jsou vysoce korelované s obsahem tuku v lidském mléce. Složení mléka se u předčasně narozených dětí a dětí narozených v termínu liší, přičemž u předčasně narozených má vyšší obsah bílkovin a tuku (Ballard & Morrow 2013). V tabulce 5 jsou uvedeny přibližné hodnoty makronutrientů obsažených v mlezivu a zralém mateřském mléce.

Tabulka 5: Makronutrienty mleziva a zralého mateřského mléka (Kim & Yi 2020)

	Mlezivo (1–5 dní)	Zralé mateřské mléko (>14 dní)
Energetická hodnota	50–60 kcal/100 ml	65–70 kcal/100 ml
Sacharidy	50–62 g/l	60–70 g/l
Laktóza	20–30 g/l	67–70 g/l
Oligosacharidy	20–24 g/l	12–14 g/l
Bílkoviny celkem	14–16 g/l	8–10 g/l
Tuk celkem	15–20 g/l	35–40 g/l

Mateřské mléko obsahuje více než 400 různých bílkovin, které plní řadu funkcí – poskytují výživu, mají antimikrobiální a imunomodulační účinky a také stimulují vstřebávání živin. Bílkoviny obsažené v mléce lze rozdělit do tří skupin, na kaseiny, syrovátkové a mucinové bílkoviny. Muciny (MUC1, MUC4 a případně další) jsou přítomny v membránách mléčných tukových kuliček a chrání kojence před infekcí (Ballard & Morrow 2013; Andreas et al. 2015). Poměr syrovátkové a kaseinové frakce se mění v souvislosti s nástupem laktace. V mlezivu je poměr syrovátky a kaseinu téměř 90:10, ale postupně se mění na 60:40 ve zralém mléce. Kasein je dělen na alfa, beta, gama a kappa kasein. Alfa-kasein, který je hojně zastoupen v kravském mléce, je v mateřském mléce přítomen jen zřídka (Kim & Yi 2020). Syrovátkové bílkoviny přítomné ve významném množství jsou alfa-laktalbumin, laktoferin, imunoglobulin IgA, sérový albumin a lysozym (Andreas et al. 2015). Alfa-laktalbumin tvoří až 40 % syrovátkových bílkovin mateřského mléka, avšak beta-laktoglobulin, který je reprezentativní bílkovinou kravského mléka, v mateřském mléce chybí (Kim & Yi 2020). Obsah bílkovin v mléce matek, které porodily předčasně, je výrazně vyšší než u matek, které porodily v termínu. Hladiny bílkovin v mateřském mléce klesají v průběhu prvních 4 až 6 týdnů života nebo déle bez ohledu na načasování porodu. Koncentrace bílkovin není ovlivněna stravou matky, ale zvyšuje se s tělesnou hmotností matky a klesá u matek, které produkují větší množství mléka (Ballard & Morrow 2013).

K nebílkovinným sloučeninám obsahující dusík je řazena močovina, kyselina močová, kreatinin, kreatin, aminokyseliny a nukleotidy. Nebílkovinné složky tvoří přibližně 25 % dusíku mateřského mléka (Ballard & Morrow 2013; Andreas et al. 2015).

Mateřské mléko obsahuje v průměru 4,0 % tuku (Cimmino et al. 2023), avšak tuk je nejvariabilnějším makronutrientem mateřského mléka. Zadní mléko, tedy mléko získávané ke konci krmení, může obsahovat dvojnásobnou až trojnásobnou koncentraci mléčného tuku než mléko přední, což je mléko, které je získáváno na počátku krmení (Ballard & Morrow 2013). Lipidy jsou přítomny ve formě emulze (Andreas et al. 2015) a zajišťují hlavní část celkového příjmu energie (lipidy tvoří 40-55 % celkové energie mateřského mléka) a základních mikroživin pro kojence, jako jsou vitamíny rozpustné v tucích, polynenasycené mastné kyseliny a bioaktivní složky. Tukovou frakci mateřského mléka tvoří přibližně z 95 až 98 % triacylglyceridy, zbytek tvoří převážně diacylglyceridy, monoacylglyceridy, volné mastné kyseliny, fosfolipidy a cholesterol. Tyto složky tvoří tukové kuličky, přičemž fosfolipidy tvoří membránu tukových kuliček a triacylglyceroly jsou v jádře tukových kuliček (Andreas et al. 2015; Perrella et al. 2021).

Mateřské mléko obsahuje více než 200 mastných kyselin, některé převažují, mnohé z nich jsou však přítomny ve velmi nízkých koncentracích (Andreas et al. 2015). Celkový obsah mastných kyselin je z 42,4 % tvořen mononenasycenými mastnými kyselinami, z 39,8 % nasycenými mastnými kyselinami a z 17,6 % polynenasycenými mastnými kyselinami, přičemž 14,7 % tvoří omga-6 mastné kyseliny a 2,91 % omega-3 mastné kyseliny (Kiełbasa et al. 2024). Tuk mateřského mléka se vyznačuje vysokým obsahem kyseliny palmitové (C16:0) a olejové (C18:1, n-9), přičemž palmitová kyselina je koncentrována převážně v 2. poloze triglyceridů a kyselina olejová v 1. a 3. poloze (Cimmino et al. 2023) a kyselina olejová tvoří přibližně 30–40 g/100 g tuku v mateřském mléce (Andreas et al. 2015). V mateřském mléce jsou nejvíce obsaženy mastné kyseliny s 10 až 18 uhlíky. Vyskytují se také 2 esenciální mastné kyseliny, kyselina linolová (C18:2, omega-6) a α -

linolenová (C18:3, omega-3), které nejsou syntetizovány člověkem (Cimmino et al. 2023). Vyšší koncentrace omega-3 polynenasycených mastných kyselin v mateřském mléce v prvních měsících laktace je spojena s lepším psychomotorickým vývojem (Perrella et al. 2021).

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem obsažené v mateřském mléce jsou také důležitým zdrojem energie a jsou nezbytné pro normální zrání gastrointestinálního traktu (Andreas et al. 2015). Vývoj mozku a neurokognitivní výsledky jsou také závislé na komplexních polárních lipidech, které jsou součástí zbývající 2% frakce tuku. Tyto lipidy se nacházejí v membráně tukových kuliček a zahrnují fosfolipidy, gangliosidy, sfingomyeliny a cholesterol (Perrella et al. 2021). Sfingomyeliny jsou zvláště důležité pro myelinizaci centrálního nervového systému a zlepšují neurobehaviorální vývoj kojenců s nízkou porodní hmotností (Andreas et al. 2015).

Profil mastných kyselin mateřského mléka se liší v závislosti na stravě matky, a to zejména v případě polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem (Cimmino et al. 2023). Zatímco podíly nasycených a mononenasycených mastných kyselin jsou během zavedené laktace stabilní, profil polynenasycených mastných kyselin mateřského mléka se mění v závislosti na lipidové výživě matky, adipozitě, gestačním přírůstkem hmotnosti a případně příjmu bílkovin matky (Perrella et al. 2021).

Sacharidy hrají významnou roli ve výživě kojenců a ve vývoji a udržování složení střevní mikrobioty. Laktóza, což je disacharid tvořený glukózou kovalentně vázanou na galaktózu, je hlavní sacharidovou složkou mateřského mléka (Andreas et al. 2015; Cimmino et al. 2023). Dalšími významnými sacharidy obsaženými v mateřském mléce jsou oligosacharidy mateřského mléka, které jsou hojně zastoupeny, ačkoliv jejich hodnoty se mění v závislosti na fázi laktace a genetických faktorech matky. Oligosacharidy patří mezi nevyživné bioaktivní faktory (Ballard & Morrow 2013).

3.3.2.2 Mikronutrienty

Vitamíny, minerální látky a stopové prvky jsou nezbytné pro procesy související s růstem a vývojem kojenců, včetně imunitního systému, syntézy hormonů a antioxidantních kofaktorů. Složení mikroživin mateřského mléka je ovlivněno nesčetnými faktory, mezi něž patří například strava matky a stádium laktace. Stav mikronutrientů u plně kojeného kojence závisí jak na příjmu z mléka, tak na zásobách nahromaděných v děloze (Perrella et al. 2021). Průměrné hodnoty mikronutrientů obsažených v mateřském mléce jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Průměrné hodnoty mikronutrientů v mateřském mléce (Darragh & Lönnerdal 2011)

Mikronutrient	Zralé mateřské mléko
Vitamíny rozpustné ve vodě	
Kyselina askorbová (vitamín C)	50–100 mg/l
Biotin (vitamín B7)	6 µg/l
Kyselina listová (vitamín B9)	80–133 µg/l
Niacin (vitamín B3)	1,6–6,0 mg/l
Kyselina pantothenová (vitamín B5)	2,0–2,5 mg/l
Riboflavin (vitamín B2)	400–600 µg/l
Thiamin (vitamín B1)	200 µg/l
Pyridoxin (vitamín B6)	0,1–0,3 mg/l

Kobalamin (vitamín B12)	1,0 µg/l
Vitamíny rozpustné v tucích	
Karotenoidy	0,2–0,6 mg/l
Retinol (vitamín A)	0,3–0,7 mg/l
Vitamín D	0,4 µg/l
Vitamín E	3–8 mg/l
Vitamín K	3–15 µg/l
Minerální látky	
Vápník	278 mg/l
Chlorid	426 mg/l
Hořčík	35 mg/l
Fosfor	140 mg/l
Draslík	530 mg/l
Sodík	180 mg/l
Síra	142 mg/l
Stopové minerální látky	
Chrom	200–400 ng/l
Kobalt	100–200 ng/l
Měď	0,2–0,4 mg/l
Fluorid	4–15 µg/l
Jód	146 µg/l
Železo	0,72 mg
Mangan	3–6 µg/l
Molybden	1–2 mg/l
Níkl	0,5–2 mg/l
Selen	10–20 µg/l
Zinek	1–3 mg/l

Mléčná žláza je jedinečný orgán, který je určen k podpoře přežití kojence a je schopen poskytnout kojenci dostatečný objem mléka i za nepříznivých výživových podmínek matky. Nicméně, zvláštní pozornost je třeba věnovat zdrojům potravy matky, které obsahují vitamíny A, B1, B2, B3, B6, B12, C a D, mastné kyseliny a jód, protože koncentrace těchto živin v mateřském mléce je alespoň částečně závislá na stravě a tělesných zásobách matky. Naopak kalorie, bílkoviny, foláty, minerální látky a stopové prvky v mateřském mléce nejsou závislé na stravě matky, nicméně, aby se zabránilo vyčerpání mateřských zásob těchto živin, je doporučený příjem těchto látek u kojících žen vyšší než u průměrného dospělého člověka (Valentine & Wagner 2013).

Všechny vitamíny rozpustné ve vodě a v tucích se nacházejí v mateřském mléce (Guo & Hendricks 2008). Koncentrace většiny vitamínů obsažených v mateřském mléce se zvyšuje s vyžíváním mateřského mléka od kolostra v mléko zralé, s výjimkou karotenoidů (α - a β -karoten, lutein, kryptoxantin a lykopen), retinolu a vitamínu E, jejichž koncentrace se snižuje. Avšak snížení koncentrace některých vitamínů nemusí změnit celkové množství dostupné pro kojence, jelikož snížení koncentrace může být kompenzováno zvýšením množství přijatého mateřského mléka kojencem (Darragh & Lönnerdal 2011). Mléko zdravých a dobře vyživovaných žen obvykle obsahuje dostatečné množství většiny vitamínů potřebných pro

kojence. Avšak vitamín D a K jsou výjimkou, jejich množství v mateřském mléce nemusí být dostatečné a doporučuje se jejich suplementace (Guo & Hendricks 2008; Darragh & Lönnerdal 2011; Valentine & Wagner 2013).

Minerální látky se v těle vyskytují v několika chemických formách, včetně anorganických iontů a solí nebo jako složky jiných organických molekul, jako jsou bílkoviny, tuky a nukleové kyseliny. Podílejí se na různých fyziologických funkcích, jsou součástí strukturálních složek tělesných tkání a tvoří nezbytné součásti mnoha enzymů a biologicky důležitých molekul. Sodík, draslík, chloridy, vápník, fosfor a sírany tvoří makrominerální látky obsažené v mateřském mléce (Guo & Hendricks 2008). Obecně platí, že obsah makrominerálních látek v mateřském mléce zůstává během období laktace stabilní po počátečním snížení koncentrací chloridů, draslíku, sodíku a síry (Darragh & Lönnerdal 2011). Nicméně obsah minerálních látek je stále ovlivněn výživovým stavem matky, životním prostředím a dalšími faktory (Guo & Hendricks 2008).

3.3.2.3 Další významné složky mateřského mléka

Mateřské mléko dále obsahuje imunomodulační složky, které jsou pro novorozence prospěšné během zrání jeho imunitního systému. Imunoglobuliny, růstové faktory, antimikrobiální peptidy, oligosacharidy mateřského mléka a cytokiny v mateřském mléce zastávají roli při posilování funkce střevní bariéry a snižují výskyt nekrotizující enterokolitidy (Nolan et al. 2020). Antimikrobiální faktory, jako je laktoferrin, laktadherin a lysozym, přímo likvidují patogeny (Thai & Gregory 2020).

Laktoferrin je bílkovinou vyskytující se v syrovátkové frakci. Tento glykoprotein patří do skupiny transferinů a má vysokou afinitu k vazbě železa, což mu propůjčuje antioxidační a bakteriostatické vlastnosti. Hladiny laktoferrinu se mění v průběhu zrání mléka. Průměrná koncentrace laktoferrinu v lidském kolostru se pohybuje mezi 5 a 6 mg/ml. Se zvyšující se produkcí mateřského mléka jeho koncentrace klesá na 1 mg/ml ve 2 až 3 měsících laktace. Průměrný příjem laktoferrinu v mléce u zdravých kojených kojenců narozených v termínu je přibližně 1200 mg za den v 1 měsíci věku a 700 mg za den ve 4 měsících (Goldman et al. 2017; Thai & Gregory 2020; Carr et al. 2021; Reniker et al. 2023). Laktoferrin váže volné železo, které je nezbytnou živinou pro růst bakterií a zabraňuje tak růstu různých patogenů, které jsou na železe závislé pro své další množení, což vede k bakteriostatickému účinku. Tato aktivita následně poskytuje konkurenční výhodu potenciálně prospěšným bakteriím, které mají nízkou potřebu železa, jako jsou *Lactobacillus* spp. a *Bifidobacterium* spp. Také inhibuje adhezi mikrobů k hostitelským buňkám a má přímý cytotoxický účinek proti bakteriím, virům a plísním, konkrétně tím, že vytváří laktofericin, peptid s baktericidní aktivitou vznikající při trávení laktoferrinu. Laktofericin má silnou antibakteriální i určitou antivirovou aktivitu s imunomodulačními schopnostmi (Goldman et al. 2017; Nolan et al. 2020; Thai & Gregory 2020; Carr et al. 2021; Reniker et al. 2023).

Lysozym je důležitý antimikrobiální protein, který se nachází v mléce a kolostru savců, v slzách, slinách, mateřském mléce, hlenu či vaječném bílku. Tento enzym (EC 3.2.1.17) hydrolyzuje beta-1,4 glykosidické vazby mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetylglukosaminem v buněčné stěně, což vede k lýze bakteriální buněčné stěny. Grampozitivní bakterie jsou k lysozymu citlivější než gramnegativní bakterie. Mateřské

mléko obsahuje přibližně 400 mg/ml lysozymu, což je přibližně 3000× více než v mléce kravském (Montagne et al. 2001; Clare et al. 2003; Rada et al. 2010). Lysozym má především antibakteriální účinky, ale má i určitou antivirovou aktivitu (Thai & Gregory 2020). Synergicky interaguje s dalšími imunoprotektivními látkami, jako jsou IgA, laktoferrin či složky komplementu (Rockova et al. 2011b). Lysozym mateřského mléka může dle Rockova et al. (2011b) působit jako selekční faktor pro specifické bakteriální kmeny ve střevech kojenců. Druhy rezistentní vůči lysozymu, *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum*, vykazovaly vynikající růst v mateřském mléce. Naproti tomu většina nepůvodních druhů, jako je *C. butyricum*, v mateřském mléce nerostla (Rockova et al. 2011b).

Laktadherin je glykoprotein obsažený v mateřském mléce, který přispívá k fagocytóze apoptotických buněk a zabraňuje tím tak zánětu. Nedostatek laktadherinu je spojen se zánětlivými a autoimunitními onemocněními (Nolan et al. 2020; Thai & Gregory 2020).

Imunoglobuliny jsou glykoproteinové molekuly produkované plazmatickými buňkami, které poskytují pasivní imunitu kojencům prostřednictvím přenosu nejprve přes placentu, poté během kojení. Existuje 5 typů imunoglobulinů, IgA, IgG, IgM, IgE a IgD, ačkoliv pouze IgG prochází přes placentu, přičemž většina je přenášena ve 3. trimestru. V mateřském mléce se vyskytují všechny typy imunoglobulinů (Carr et al. 2021). Imunoglobuliny v mateřském mléce posilují imunitu novorozence a podporují její vývoj. Imunoglobuliny v kombinaci s dalšími složkami mateřského mléka hrají roli při snižování patogenních infekcí, alergií a pravděpodobně i při zrání střev (Carr et al. 2021; Reniker et al. 2023). Nejvíce zastoupeným imunoglobulinem v mateřském mléce je IgA (90–95 %), následovaný IgM (2–5 %) a IgG (<1 %). Hladiny imunoglobulinů se v průběhu laktace mění, nicméně IgA zůstává převládajícím imunoglobulinem bez ohledu na fázi laktace. IgA v mateřském mléce podléhá proteolytickému štěpení za uvolnění sekrečního IgA. Kolostrum obsahuje vysoké koncentrace těchto sekrečních imunoglobulinů. Sekreční IgA vykazuje přímé antimikrobiální účinky ve střevě tím, že se váže na mikrobiální toxiny, bakterie a viry, zabraňuje jejich vazbě na hostitele nebo je přímo neutralizuje a slouží jako první linie obrany ve střevech (Carr et al. 2021; Reniker et al. 2023).

Mateřské mléko obsahuje také řadu cytokinů a růstových faktorů. Jde o mocné proteiny, které hrají ústřední roli při regulaci řady biologických procesů, včetně zánětu, růstu a vývoje (Reniker et al. 2023). Cytokiny jsou multifunkční peptidy, které působí autokrinně/parakrinně a mají imunomodulační funkci, zajišťují pasivní ochranu, mnohé z nich jsou protizánětlivé a pravděpodobně snižují závažnost infekce u kojených dětí. Mezi cytokiny patří zejména interleukiny (IL) IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, interferon gama (IFN γ) a tumor nekrotizující faktor α (TNF- α) a transformující růstový faktor β (TGF- β) (Ballard & Morrow 2013; Geddes & Kakulas 2018; Nolan et al. 2020).

Růstové faktory mají rozsáhlé účinky na střevní trakt, cévní, nervový a endokrinní systém (Ballard & Morrow 2013). Stimulují buněčný růst, plní ochrannou funkci, podílejí na stimulaci a regulaci růstu střev kojenců a napomáhají dozrávání střevní slizniční bariéry. Mezi růstové faktory přítomné v mateřském mléce patří epidermální růstový faktor (EGF), růstový faktor vázaný na heparin (HP-EGF), neuronální růstové faktory (BDNF – brain-derived neurotrophic factor; GDNF – glial cell-line derived neurotrophic factor; a ciliární neurotrofický faktor CNTF (ciliary neurotrophic factor)), skupina růstových faktorů

podobných inzulínu (IGF) a cévní endoteliální růstový faktor (VEGF) (Ballard & Morrow 2013; Geddes & Kakulas 2018; Nolan et al. 2020).

Dále mateřské mléko obsahuje peptidové i nepeptidové hormony včetně gonadotropinů (například progesteron, estrogeny, gonadotropin uvolňující hormon), hormonů regulujících metabolismus a tělesné složení (například inzulín, leptin, rezistin, adiponektin, gherlin), hormonů, které regulují růst (somatostatin, kalcitonin) a hormonů souvisejících s neuroendokrinními systémy (glukokortikoidy, melatonin, oxytocin). Mateřské mléko také obsahuje významné množství erythropoetinu, což je hlavní hormon zodpovědný za zvyšování počtu červených krvinek (Ballard & Morrow 2013; De Weerth et al. 2023).

Mateřské mléko obsahuje i řadu buněk, včetně makrofágů, T-buněk, kmenových buněk a lymfocytů (Ballard & Morrow 2013).

3.3.2.3.1 Oligosacharidy mateřského mléka

Oligosacharidy mateřského mléka (OMM) jsou důležitou složkou mateřského mléka, které jsou po laktóze a lipidech třetí nejrozšířenější pevnou složkou mateřského mléka. Jsou strukturně rozmanitou skupinou komplexních nestravitelných sacharidů (Wiciński et al. 2020), které byly původně objeveny jako „bifidus faktor“, který slouží jako metabolický substrát pro žádoucí bakterie a utváří složení střevní mikrobioty se zdravotními přínosy pro kojené novorozence. Nicméně nyní už je známo, že OMM mají mnohem více prospěšných funkcí pro zdraví kojence a nejsou jen „potravou pro bakterie“ (Bode 2012).

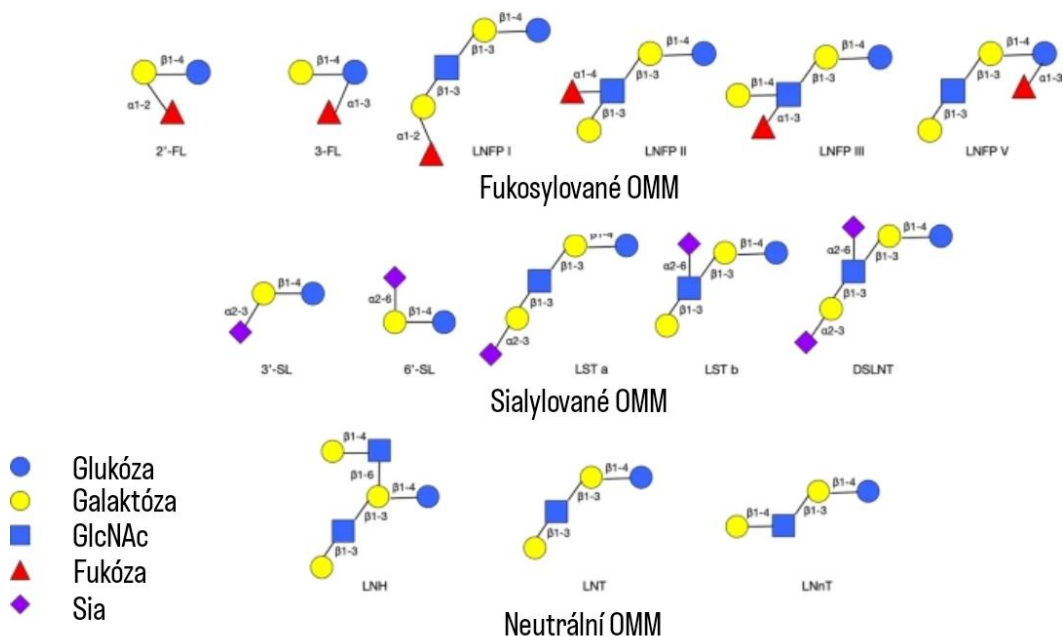
Množství a složení OMM se u jednotlivých žen v průběhu laktace liší (Bode 2012). Nejvyšší koncentrace OMM se vyskytují v kolostru a dosahují 20–23 g/l, poté se s dozráváním mléka jejich koncentrace snižuje na hodnoty 12–14 g/l (Wiciński et al. 2020).

Ve srovnání s mateřským mlékem jsou koncentrace oligosacharidů mléka většiny domácích zvířat jako jsou krávy, kozy, ovce, osli či prasata, spíše stokrát až tisíckrát nižší nebo je jejich struktura méně komplexní a diverzifikovaná (Li et al. 2021). Množství oligosacharidů obsažených v mateřském mléce je ve srovnání s množstvím oligosacharidů v mléce kravském pozoruhodně vysoké, přičemž v nejčasnějším kravském mléce dosahují koncentrace až 1 g/l, poté množství klesá na hodnoty 0,05–0,1 g/l ve zralém mléce. Mateřské mléko tak obsahuje více než dvacetinásobně vyšší množství oligosacharidů s vyšší rozmanitostí, což naznačuje, že složení a struktura OMM může být mnohem složitější, než je tomu v případě oligosacharidů kravského mléka (Zhang et al. 2021).

Bylo objeveno více než 200 strukturně odlišných OMM, ačkoliv 20–25 z nich je zastoupeno ve znatelném množství a dohromady tvoří více než 95 % všech OMM (Masi & Stewart 2022). OMM jsou syntetizovány v mléčné žláze působením specifických glykosyltransferáz, a to postupným přidáváním galaktózy, fukózy, N-acetylglukosaminu (GlcNAc) a kyseliny sialové (Sia) k molekule laktózy, přičemž kyselina N-acetylneuraminová (Neu5Ac) je převládající, ne-li jedinou formou kyseliny sialové (Gabrielli et al. 2011; Bode 2012).

OMM lze rozdělit do 3 skupin. Fukosylované oligosacharidy jsou neutrální, obsahují fukózu v koncové pozici a tvoří 35–50 % celkových OMM. K fukosylovaným oligosacharidům patří 2'-fukosyllaktóza (2'-FL), 3-fukosyllaktóza (3-FL) a lakto-N-fukopentaóza (LNFP). Neutrální oligosacharidy (neutrální obsahující N; nefukosylované) obsahují N-acetylglukosamin v koncové pozici a tvoří 42–55 % celkových oligosacharidů.

Řadí se k nim lakto-N-hexóza (LNH), lakto-N-tetraóza (LNT) a lakto-N-neotetraóza (LNnT). Neutrální oligosacharidy tedy dohromady tvoří více než 75 % celkových oligosacharidů. Třetí skupinu tvoří sialylované oligosacharidy, které jsou kyselé, obsahují kyselinu sialovou v koncové pozici a tvoří 12-14 % celkových oligosacharidů. Patří k nim 3'-sialyllaktóza (3'-SL), 6'-sialyllaktóza (6'-SL), sialyllakto-N-tetraóza (LST) a disialyllacto-N-tetraóza (DSLNT) (Plaza-Díaz et al. 2018; Zhang et al. 2021). Na obrázku 5 jsou znázorněny struktury oligosacharidů mateřského mléka (OMM) jednotlivých skupin.



Obrázek 5: Fukosylované, sialylované a neutrální oligosacharidy mateřského mléka (Zhang et al. 2021)

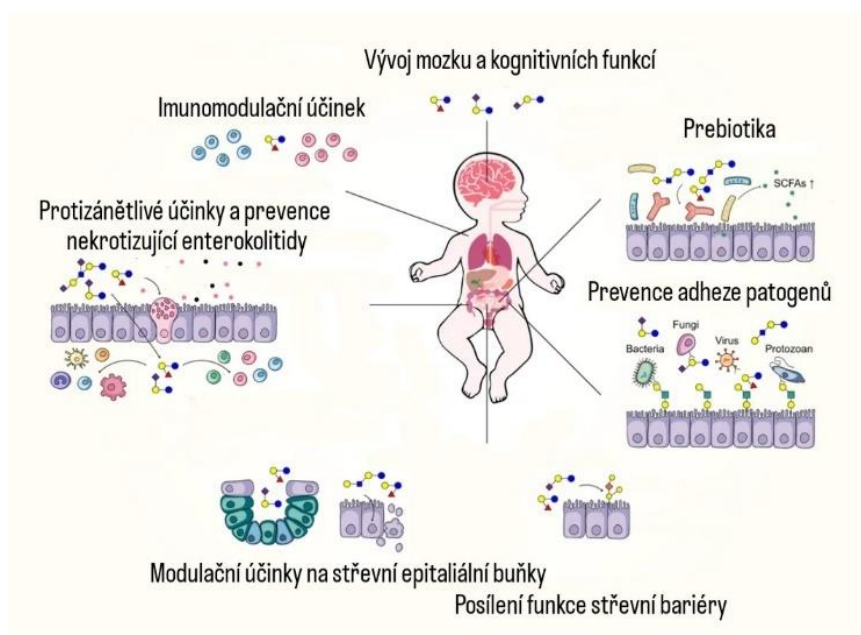
Množství a složení oligosacharidů se u jednotlivých žen liší. I když jsou hojnější OMM u jednotlivých matek zastoupeny ve srovnatelném množství, každá žena produkuje pouze část možných struktur a každá matka má specifické složení OMM. Ačkoliv syntéza OMM závisí na mnoha glykosyltransferázách specifických pro různé monomery, složení OMM také závisí na genetickém profilu matky a odráží charakteristiky krevních skupin, které závisí na expresi určitých glykosyltransferáz. V biosyntéze fukosylovaných oligosacharidů hrají důležitou roli 2 geny, gen *Secretor (Se)* a gen *Lewis (Le)*, které kódují různé fukosyltransferasy určující kvantitativní a kvalitativní složení OMM. α 1-2-fukosyltransferasa (FUT2) je kódována *Se* genem, zatímco α 1-3/4-fukosyltransferasa (FUT3) je kódována *Le* genem. Aktivace *Se* genu vede k expresi enzymu FUT2, který je zodpovědný za prodloužení koncového galaktózového řetězce typu 1 o fukózu prostřednictvím vazby α 1-2. Aktivace genu *Le* umožňuje expresi FUT3, která přidává fukózu s vazbou α 1-3/4 na subterminální N-acetylglukosamin řetězce typu 1. Mléko žen s aktivním *Se* lokusem, je bohaté na 2'-fukosyllaktózu (2'FL), lakto-N-fukopentaózu I (LNFP I) a další α 1-2-fukosylované oligosacharidy mateřského mléka. Naproti tomu mléko žen, které nemají aktivní *Se* lokus a nemají funkční enzym FUT2, neobsahuje α 1-2-fukosylované OMM. Na základě systému skupin, který je určen aktivitou těchto dvou genových lokusů kódujících fukosyltransferasy (FUT2 a FUT3), lze vytvořit

4 skupiny OMM ($Le^+ Se^+$; $Le^+ Se^-$; $Le^- Se^+$; $Le^- Se^-$) (Bode 2012; Plaza-Díaz et al. 2018; Zhang et al. 2021; Masi & Stewart 2022).

Nicméně dokonce i mléko Se -negativních a Le -negativních žen ($Se^- Le^-$), obsahuje fukosylované OMM (3FL nebo LNFP III), což naznačuje že se mohou podílet i jiné FUT, na Se a Le nezávislé (Bode 2012; Plaza-Díaz et al. 2018).

Na procesu biosyntézy sialylovaných OMM se podílejí dva geny, gen Le a gen ABH . Nízké hladiny sialylovaných oligosacharidů se vyskytují u mléka matek s genotypem $ABH^- Le^-$, zatímco matky s genotypem $ABH^+ Le^+$ mohou exprimovat vysoké hladiny těchto sacharidů (Zhang et al. 2021).

OMM mají řadu biologických funkcí, které vykazují prospěšné účinky pro novorozence, které jsou znázorněny na obrázku 6 (Cheng et al. 2021; Li et al. 2021).



Obrázek 6: Příznivé účinky oligosacharidů mateřského mléka (Cheng et al. 2021; Li et al. 2021)

OMM po požití kojencem odolávají nízkému pH v žaludku i degradaci enzymy. Přibližně 1 % požitých OMM se vstřebá, dostává se do systémového oběhu kojence a je vyloučeno neporušené močí. Většina OMM je však buď metabolizována střevními mikroby kojence nebo je vylučována v nezměněné formě ve stolici (Bode 2015). Jejich vstřebávání a metabolismus tedy probíhá především v tlustém střevě, kde slouží jako substrát pro specifické mikroby. OMM jsou považovány za prebiotika, protože podporují růst prospěšných bakterií ve střevě kojence. Dominantní zástupci střevní mikrobioty, *Bifidobacterium* spp. a *Bacteroidetes* spp., mají schopnost trávit a využívat OMM prostřednictvím specifických glykosidáz (Li et al. 2021). V důsledku toho mají tyto bakterie růstovou výhodu a daří se jim. Ostatní bakterie, které OMM nedokážou využít, jsou v nevýhodě a nerostou tak dobře nebo vůbec (Bode 2015).

Mnoho virových, bakteriálních či protozoárních parazitů se potřebuje přichytit na povrch epitelálních buněk, aby se mohli množit, napadnout hostitele a způsobovat onemocnění. Často dochází k počátečnímu navázání na sacharidy (glykany) na povrchu

epitelových buněk, známé také jako glykokalyx. Zatímco tyto glykany jsou konjugovány s bílkovinami nebo lipidy, OMM se podobají některým glykanovým strukturám a slouží jako lákající receptory, které blokují vazbu patogenů na epitelální buňky. Nevázané patogeny se již nemohou navázat na povrch buněk a jsou vyplavovány, aniž by způsobily onemocnění (Bode 2015). OMM mají nejen silný vliv na mikroby, ale také mohou přímo ovlivňovat střevní epitelální buňky (Cheng et al. 2021). Studie *in vitro*, kterou provedl Kuntz et al. (2008), ukázala, že kyselé i neutrální oligosacharidy izolované z mateřského mléka mají za homeostatických podmínek inhibiční účinky na proliferaci střevních buněk.

Ačkoli OMM mohou nepřímo ovlivňovat imunitní systém kojence změnou složení střevní mikrobioty, mohou také přímo modulovat imunitní reakce ovlivněním různých buněčných populací nebo regulací exprese zánětlivých genů (Li et al. 2021). Nekrotizující enterokolitida (NEC) je jedním z nejčastějších onemocnění u předčasně narozených novorozenců a její incidence se u kojenců s velmi nízkou porodní hmotností (méně než 1500 g) pohybuje mezi 5 a 10 %, přičemž úmrtnost se pohybuje mezi 20 a 30 %. Kojenci, kteří toto onemocnění přežijí se často potýkají s dlouhodobými neurologickými potížemi. Dle Bode (2018) mají předčasně narození kojenci krmení mateřským mlékem místo náhradní mléčné výživy, 6 až 10krát nižší pravděpodobnost, že se u nich rozvine toto onemocnění. Ačkoliv je patogeneze NEC nedostatečně prozkoumána, souvisí s nezralým střevem předčasně narozených novorozenců, krmením náhradními mléčnými výživami, abnormální kolonizací střevní mikrobioty, hypoxicko-ischemickým poškozením střevního epitelu a s ním souvisejícím poškozením střevních buněk (Li et al. 2021). Dle Bode (2018) kombinované údaje z modelů tkáňových kultur *in vitro*, preklinických studií *in vivo* na zvířecích modelech a také kohortové studie matek a kojenců, podporují hypotézu, že OMM přispívají k příznivým účinkům mateřského mléka proti NEC.

Primární funkcí gastrointestinálního traktu je trávení a vstřebávání živin, ale zároveň musí plnit funkci bariéry a chránit před toxickými látkami a potenciálními patogeny. Střevní trakt novorozenců je však při narození nezralý, nicméně OMM podporují funkci střevní bariéry, jak nepřímo ovlivňováním složení mikrobioty, tak přímo modulací střevních buněk (Cheng et al. 2021).

Také se zdá, že existuje souvislost mezi kojením a vývojem mozku a kognitivních funkcí kojence (Li et al. 2021). Dle Hobbs et al. (2021) jsou sialylované OMM jednou ze základních bioaktivních složek pro vývoj mozku a kognitivních funkcí novorozenců.

3.3.3 Mikrobiota mateřského mléka a její složení

Mateřské mléko bylo původně považováno za sterilní tekutinu (Selma-Royo et al. 2021) a bakterie obsažené v mateřském mléce byly považovány za kontaminanty či patogeny, které byly příčinou mastitid (Kim & Yi 2020). Nicméně v posledních letech se objevují zprávy o přítomnosti životaschopných bakterií v mateřském mléce zdravých žen (Mantziari & Rautava 2021).

Přítomnost bakterií v mateřském mléce byla zkoumána v řadě studií s využitím kultivačně závislých i kultivačně nezávislých technik. Kultivačně závislé metody sice umožňují identifikaci životaschopných a kultivovatelných bakterií v mateřském mléce, ale zároveň vedou k podhodnocení celkového počtu bakterií, protože nekultivovatelné mikroby

zůstávají nezjištěny. K překonání tohoto omezení jsou používány kultivačně nezávislé metody, jako jsou kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) a sekvenování nové generace (NGS). S rozvojem a používáním těchto technik byla potvrzena přítomnost mikrobiální DNA a existence bohaté a rozmanité mikrobiální komunity mateřského mléka (Gomez-Gallego et al. 2016; Mantziari & Rautava 2021).

Martín et al. (2003) zkoumali přítomnost bakterií mléčného kvašení v mateřském mléce zdravých žen a uvedli, že kojení může být významným zdrojem těchto bakterií pro střevo kojence. Jost et al. (2013) zkoumali bakteriální diverzitu v mateřském mléce odebraném od sedmi matek ve 3 časových úsecích laktace, tedy mezi 3. a 6. dnem, mezi 9. a 14. dnem a mezi 25. a 30. dnem po porodu. Tyto vzorky byly analyzovány kombinovanými metodami, tedy kultivačně závislými a nejmodernějšími kultivačně nezávislými metodami. Kromě převažujících fakultativních anaerobů, jako jsou *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Propionibacterium*, byly pomocí sekvenování detekovány populace obligátních anaerobů, včetně rodů *Bifidobacterium* a *Veillonella*, které byly potvrzeny izolací životaschopných kmenů. Sekvenování také odhalilo přítomnost DNA několika hlavních obligátních anaerobů spojených se střevem, jako jsou *Bacteroides* a také několik členů klostridií, včetně producentů butyrátu jako jsou rody *Faecalibacterium* a *Roseburia*, které jsou důležité pro zdraví tlustého střeva. Dle Jost et al. (2013) tedy může být mateřské mléko významným zdrojem bakteriální diverzity pro střevo novorozence, včetně obligátních anaerobů asociovaných se střevem, a může tak významně ovlivňovat kolonizaci střeva a zrání imunitního systému. Collado et al. (2009) analyzovali 50 vzorků mateřského mléka pomocí qPCR za účelem posouzení přítomnosti různých bakteriálních rodů a klastrů, včetně *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a klostridiálních klastrů IV, XIVA a XIVb. *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* byly ve vzorcích mateřského mléka převládajícími rody a byly zjištěny ve všech vzorcích (50/50), ve většině vzorcích byly zjištěny i klostridiální klastry XIVA-XIVb (48/50) a *Enterococcus* (38/50), zatímco v menších počtech vzorků byly zjištěny rod *Bacteroides* (20/50) a klostridiální klastr IV (2/50). Dle Collado et al. (2009) kvantitativní real-time PCR umožnila ve vzorcích mateřského mléka detekovat bakteriální DNA streptokoků, stafylokoků, bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií, což potvrzuje, že mateřské mléko může být významným zdrojem bakterií a bakteriální DNA pro střevo kojence.

Bylo tedy prokázáno, že mateřské mléko je trvalým zdrojem komenzálních, mutualistických a/nebo probiotických bakterií pro střevo kojence, včetně stafylokoků, streptokoků, bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení (Collado et al. 2009). Tyto bakterie také mohou hrát důležitou roli při snižování výskytu a závažnosti infekcí u kojeného kojence. Některé kmeny bakterií mléčného kvašení izolované z mateřského mléka mají totiž schopnost inhibovat růst širokého spektra patogenních bakterií kompetitivním vyloučením a/nebo produkcí antimikrobiálních sloučenin, jako jsou bakteriociny, organické kyseliny či peroxid vodíku (Collado et al. 2009).

V současné době tedy mateřské mléko představuje jeden z hlavních a nejvýznamnějších zdrojů bakterií pro střevo kojeného kojence a hraje důležitou roli v kolonizaci kojence během prvních měsíců jeho života (Khodayar-Pardo et al. 2014). Kojenec zkonzumuje přibližně 800 ml mateřského mléka denně, přičemž zároveň přijme přibližně 1×10^5 až 1×10^7 bakterií

za den. Při tomto množství je tak kojeneček vystaven obrovské denní koncentraci a kojenci získávají 27,7 % jejich bakterií z mateřského mléka (Selma-Royo et al. 2021).

Mateřské mléko je tedy v současné době považováno za trvalý zdroj mikroobů, přičemž bylo identifikováno více než 820 různých bakteriálních druhů a většina z nich patří ke kmenům Proteobacteria a Firmicutes (Selma-Royo et al. 2021). Příslušníci rodů *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Propionibacterium* jsou opakovaně identifikováni jako hlavní zástupci mikrobiomu mateřského mléka jak pomocí kultivačně závislých metod, tak metod kultivačně nezávislých. Zástupci rodů *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Veillonella* a *Rothia* jsou v mateřském mléce také široce zastoupeni, avšak v nižším množství. Mezi další běžně identifikované rody patří *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia/Shigella*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Acinetobacter*, *Acidovorax* a *Gemella* (Stinson et al. 2021). I když je o jejich přítomnosti v mateřském mléce a jejich potenciálních biologických účincích známo jen málo, byly v mateřském mléce nalezeny i další organismy, tedy mikroskopické houby a kvasinky, viry, fágy i Archaea (Selma-Royo et al. 2021).

Ve viromu kojence v raném věku dominují zejména bakteriofágy (až 95 % všech virů). Mezi nejhojnější patří zástupci z čeledí *Myoviridae*, *Siphoviridae* a *Podoviridae* z řádu Caudovirales, které mají převážně lytický způsob života (Mohandas & Pannaraj 2020). Z eukaryotických virů identifikovaných v mateřském mléce byly nejčastěji zastoupené viry z čeledí *Herpesviridae*, *Poxviridae*, *Mimiviridae* a *Iridoviridae*. Dle Boix-Amorós et al. (2017) se v mateřském mléce vyskytuje řada rodů hub, přičemž nejhojnější zastoupenými jsou rody *Malassezia*, *Candida* a *Saccharomyces*. Jiménez et al. (2015) identifikovali u 8 z 10 vzorků mléka od zdravých matek archeální DNA halofilních archea *Haloarcula marismortui*, *Halorhabdus utahensis* a *Halomicrobium mukohataei*, avšak tato archea nebyla identifikována u žádného ze vzorků mateřského mléka od matky s mastitidou. Nicméně halofilní archea vyžadují ke svému přežití vysoké koncentrace soli, takže jejich přítomnost v mateřském mléce je sporná. Avšak jejich nepřítomnost u vzorků od žen s mastitidou může naznačovat ochrannou roli těchto mikroorganismů (Stinson et al. 2021).

3.3.3.1 Zdroj mikrobioty mateřského mléka

Ačkoli přesný mechanismus vzniku mikrobioty není doposud znám, jsou dvě hlavní hypotézy, tedy entero-mamární cesta a retrográdní tok (Notarbartolo et al. 2022). Retrográdní tok je přenos z kojence na matku, při kterém se mikroby přenášejí kůží a slinami z dutiny ústní kojence do mlékovodu během sání. To by mohlo vysvětlit, jak se bakterie běžně se vyskytující v dutině ústní kojenců (například bakterie rodů *Veillonella*, *Leptotrichia* a *Prevotella*) nebo bakterie běžně se vyskytující v pochvě (například *Lactobacillus*) někdy nacházejí v mateřském mléce. Vaginální bakterie mohly být kojencem získány při vaginálním porodu a následně být přeneseny do mateřského mléka zpětným tokem (Lopez Leyva et al. 2021).

Jako další možná cesta, kterou se střevní mikrobiota matky může dostat do mateřského mléka a obohatit ho, se nabízí entero-mamární cesta. Tato cesta předpokládá, že mateřské střevní bakterie jsou přenášeny přes střevní epiteliální bariéru prostřednictvím dendritických buněk, které překračují paracelulární prostor střevního epitelu a odebírají bakterie ze střevního lumen. Cirkulace lymfy ve slizniční přidržené lymfatické tkáni by pak mohla

umožnit, aby se mikrobiota z gastrointestinálního traktu matky dostala do vzdálených míst, jako je například mléčná žláza (Lopez Leyva et al. 2021).

3.3.3.2 Faktory ovlivňující mikrobiotu mateřského mléka

Je známo, že řada faktorů jako je výživa matky, denní doba a stádium laktace, genetické faktory, způsob porodu a zeměpisná oblast ovlivňují složení mateřského mléka a byly zaznamenány i značné interindividuální rozdíly. Stejně tak všechny faktory, které by mohly ovlivňovat jak mikrobiotu matky (tedy kožní mikrobiotu, mikrobiotu dutiny ústní, vaginální mikrobiotu i střevní mikrobiotu), tak mikrobiotu kojence, jsou potenciálně schopny modulovat mikrobiotu mateřského mléka. Proto tedy stádium laktace, způsob porodu, gestační věk, strava a životní styl matky, zeměpisná poloha či užívání antibiotik a jiných léků mohou mít vliv na složení mateřského mléka (Gomez-Gallego et al. 2016).

Dle Cabrera-Rubio et al. (2012) se mikrobiota mateřského mléka v průběhu laktace mění. Mikrobiota kolostra se vyznačuje zvýšenou bakteriální diverzitou a převládajícími bakteriemi jsou bakterie patřící do rodů *Weisella* a *Leuconostoc* (obě jsou bakterie mléčného kvašení z řádu *Lactobacillales*), následované rody *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Lactococcus*. Přestože rody bakterií mléčného kvašení stále patřily k hojně se vyskytujícím i ve vzorcích mléka starého 1 a 6 měsíců, počet typických zástupců dutiny ústní (zástupci z rodů *Veillonella*, *Leptotrichia* a *Prevotella*) v těchto vzorcích výrazně vzrostl (Cabrera-Rubio et al. 2012). Dle Khodayar-Pardo et al. (2014) s postupem laktace roste celková koncentrace bakterií, zatímco bakteriální diverzita klesá, a zároveň roste počet zástupců rodu *Bifidobacterium* a *Enterococcus*. Dle Khodayar-Pardo et al. (2014) byl počet *Bifidobacterium* spp. v mateřském mléce matek, které porodily v termínu vyšší ve všech fázích laktace, oproti těm, které porodily předčasně. Nicméně, Urbaniak et al. (2016) nepozorovali vliv gestačního věku na složení mikrobioty mateřského mléka. Khodayar-Pardo et al. (2014) také zjistili vyšší celkové koncentrace bakterií jak v kolostru, tak přechodném mléce u žen, které rodily císařským řezem ve srovnání s těmi, které rodily vaginálně, avšak ve zralém mléce byly koncentrace podobné u obou způsobů porodu.

Dle Cabrera-Rubio et al. (2012) BMI matky ovlivnilo složení mikrobiomu mateřského mléka, přičemž vzorky obézních žen měly homogennější bakteriální složení ve srovnání se vzorky mléka od žen s normální hmotností, které byly více různorodé, což naznačuje, že bakteriální složení mohlo být ovlivněno tělesnou hmotností. Vyšší BMI u matky souviselo s vyšším počtem *Lactobacillus* spp. v kolostru a s vyššími počty *Staphylococcus* spp. a nižšími počty *Bifidobacterium* spp. v mateřském mléce získaném 6 měsíců po porodu. Cabrera-Rubio et al. (2012) detekovali vyšší počty bakterií, vyšší počty rodů *Staphylococcus* a *Lactobacillus* a nižší počty *Bifidobacterium* spp. ve vzorcích od obézních žen, získaných během prvních 6 měsíců kojení. Příjem vlákniny a rostlinných i živočišných proteinů se dle Cortes-Macías et al. (2021) podílí na ovlivňování mikrobioty mateřského mléka. Stravu matek Cortes-Macías et al. (2021) rozdělili do dvou skupin, na stravu bohatou na rostlinné bílkoviny, vlákninu a sacharidy a stravu bohatou na živočišné bílkoviny a lipidy. Rody *Staphylococcus* a *Bifidobacterium* byly spojeny s příjmem sacharidů, zatímco *Streptococcus* byl spojen s příjmem omega-3 polynenasycených mastných kyselin

(eikosapentaenové a dokosapentaenové kyseliny). Nižší zastoupení rodů *Lactobacillus* a *Bacteroides* bylo pozorováno u skupiny se stravou bohatou na živočišné bílkoviny a lipidy.

Lackey et al. (2019) zkoumali mikrobiotu mateřského mléka od žen žijících v různých mezinárodních lokalitách a porovnávali je s fekálními mikrobiomy jejich kojenců. Jejich výsledky poskytují důkazy o rozdílech v rámci populace a mezi populacemi v rozmanitosti bakteriálních společenstev a podporují vztah mezi bakteriálními společenstvy v mléce a ve stolici kojence. Vzorky mateřského mléka od matek z venkovských lokalit nebo rozvojových zemí měly vyšší diverzitu bakterií než vzorky od matek z měst či rozvinutých lokalit. Soto et al. (2014) zkoumali vliv terapie antibiotiky na populaci laktobacilů a bifidobakterií v mateřském mléce a jejich výsledky naznačují, že přítomnost laktobacilů a/nebo bifidobakterií může představovat dobré markery mikrobioty mateřského mléka, která nebyla ovlivněna používáním antibiotik.

3.4 Schopnost *Clostridiaceae* využít mateřské mléko

Mateřské mléko je bohatým zdrojem živin (Zimmermann & Curtis 2020). Řada z nich, které se v proximálním trávicím traktu člověka nevstřebá, prochází nestrávená do distálních částí, kde může být využita střevní mikrobiotou (Morowitz et al. 2011). Kromě základních živin obsahuje mateřské mléko také bioaktivní látky a antimikrobiální faktory (např. lysozym), které potlačují patogeny (Thai & Gregory 2020; Zimmermann & Curtis 2020).

Ve střevě kojence se vyskytuje řada bakteriálních druhů (Bezirtzoglou 1997), přičemž bifidobakterie a klostridie patří mezi ty hojně se vyskytující. U vaginálně porozených dětí jsou bifidobakterie nejhojnějšími střevními bakteriemi, zatímco u dětí porozených císařským řezem jsou dominantní skupinou klostridie (Musilova et al. 2017).

Většina kojeneckých bifidobakteriálních druhů, jako je *B. bifidum*, *B. breve* a *B. longum* subsp. *infantis*, jsou schopné využít mateřského mléka a některé z nich dokonce i jeho komponent jako jsou OMM (Ioannou et al. 2021). Rockova et al. (2011b) zjišťovali, zda jsou bifidobakterie (*B. bifidum* a *B. longum*) a klostridie (*C. butyricum*) schopny růst na OMM a dalších zdrojích uhlíku – laktóze (která je univerzálním zdrojem uhlíku jak pro bifidobakterie, tak i klostridie), kravském mléce a lidském mléce. Jak bifidobakterie, tak klostridie rostly na laktóze a produkovaly kyseliny. Oba tyto bakteriální druhy rostly také v kravském mléce.

Zdá se, že lysozym, který je obsažen v mateřském mléce, potlačuje patogeny (Thai & Gregory 2020) a může dle Rada et al. (2010) a Rockova et al. (2011a) také ovlivnit kolonizaci střevního traktu novorozence specifickými kmeny bifidobakterií. Kmeny bifidobakterií, které byly rezistentní k lysozymu (*B. bifidum*, *B. longum*), totiž hojně rostly v mateřském mléce. Nicméně kmeny *B. animalis*, které byly citlivé k lysozymu, byly po inkubaci v mateřském mléce inhibovány a vykazovaly nižší počty životaschopných jedinců než před inkubací. Rezistence vůči lysozymu a schopnost využívat OMM byly identifikovány jako nejdůležitější faktory ovlivňující růst bifidobakterií v mateřském mléce. Většina kmenů lidského původu bylo rezistentní vůči lysozymu a využívalo OMM (Rada et al. 2010; Rockova et al. 2011a).

Mateřské mléko dle Rockova et al. (2011b) podobně podporovalo růst bifidobakterií, ale ne klostridií. Zatímco oba kmeny bifidobakterií byly rezistentní vůči lysozymu, který je obsažen v mateřském mléce, 4 z 5 kmenů klostridií byly na lysozym citlivé. Bifidobakterie

rostly v mateřském mléce i na OMM, ale 3 z 5 kmenů klostridií nebyly schopny růstu v mateřském mléce a žádný kmen klostridií nebyl schopen využít OMM. Zdá se tedy, že OMM spolu s lysozymem mohou působit jako prebioticko-bifidogenní sloučeniny inhibující střevní klostridie (Rockova et al. 2011b).

Prebiotika selektivně stimulují růst a/nebo aktivitu probiotických střevních bakterií, přičemž cílovou skupinou jsou zejména bifidobakterie. FOS a GOS jsou nejčastěji používanými prebiotiky v kojenecké výživě (Rockova et al. 2011b). Dle Rada et al. (2008) komerčně dostupná prebiotika však nejsou zcela selektivní, jelikož FOS, GOS, rafinóza, stachyóza a inulin byly využívány také klostridiami izolovanými ze stolice kojence.

4 Metodika

V rámci této diplomové práce byla testována schopnost utilizace mateřského mléka a náhradních mléčných kojeneckých výživ variabilními kmeny klostridií kojeneckého původu.

4.1 Příprava kultur pro testování

Kultury vybrané pro testování (Tabulka 7) byly asepticky zaočkovány po 0,3 ml do anaerobních zkumavek s 9 ml WSP bujónu. Zkumavky se zaočkovanými kulturami byly kultivovány anaerobně, při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byla před samotným testováním vždy zkontrolována čistota kultur v mikroskopu s fázovým kontrastem (Eclipse E200, Nikon, Japonsko) a změřena optická denzita pomocí densilometru (McFarland Densitometer DEN-1, Biosan, Litva). Dále bylo u kultur změřeno pH pomocí reflektokvantu (RQflex 10, Merck Millipore, USA), pH Checkeru (Hanna Instruments, Česká republika) a pH papírků (Macherey-Nagel, Německo).

Tabulka 7: Seznam testovaných kmenů bakterií

č.	Kód	ID	Bakteriální druh/ MALDI-TOF MS	Původ
1	D10	CMM 3593	<i>Cl. difficile</i>	stolice kojence
2	EBR344	A28	<i>Cl. difficile</i>	stolice kojence
3	A6	LA4	<i>C. butyricum</i>	stolice kojence
4	A24	C12	<i>C. butyricum</i>	stolice kojence
5	EBR416	EBR416	<i>C. paraputrificum</i>	stolice kojence
6	A130	FW2	<i>C. perfringens</i>	stolice kojence
7	A141	T2	<i>C. perfringens</i>	stolice kojence
8	EBR323	EBR323	<i>C. perfringens</i>	stolice kojence
9	A19	DSMZ 2485	<i>C. tertium</i>	stolice kojence
10	EBR315	C71	<i>C. tertium</i>	stolice kojence
11	EBR325	SA62	<i>Paeniclostridium sordellii</i>	stolice kojence
12	EBR339	EBR339	<i>Paraclostridium bifermentans</i>	stolice kojence
K1	DSM 20088 (T)	DSM 20088	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	stolice kojence
K2	BRS 8-2	BRS 8-2	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	stolice kojence
K4	Nestlé(48)	Nestlé(48)	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	kojenecká výživa
K6	DSM 20016	DSM 20016	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	střevo dospělého člověka

4.2 Testované mateřské mléko a mléčné kojenecké výživy

4.2.1 Mateřské mléko

Pro testování schopnosti růstu klostridií v mateřském mléce byl vytvořen jeho směsný vzorek od dárkyně (mateřské mléko bylo vzorkováno v době stáří kojence 4–5 měsíců, věk matky 37 let, první těhotenství, porod vaginálně, kojené od narození). Dle Damaceno et al. (2023) a rozdělení laktace, lze testované mléko označit jako zralé.

Z pěti sterilních sáčků mateřského mléka ze dnů od 9. do 16.3.2023 byl připraven směsný vzorek, který byl rozdělen do sterilních zkumavek. Zkumavky s mateřským mlékem byly pasterovány při teplotě 62,5 °C po dobu 30 minut. Poté byly zkumavky zchlazeny, označeny a uloženy do mrazáku. Tyto podmínky jsou doporučovány pro tepelné ošetření mateřského mléka s jeho následným zchlazením na 10 °C, nejlépe však až na 4 °C, před přenesením do mrazáku (Weaver et al. 2019). Pro každé testování byla vždy použita nová zkumavka se vzorkem mateřského mléka pro zachování stejných podmínek testovaného vzorku.

4.2.2 Mléčné kojenecké výživy

Pro testování schopnosti růstu klostridií v náhradních mléčných výživách byly vybrány 3 výrobky – Beba Comfort 1 HM-O (Příloha 1), Hipp Bio Combiotik Anfangsmilch (Příloha 2) a Babybio (Příloha 3). Jednotlivé výživy byly rozděleny po 4 ml do sterilních Eppendorf zkumavek (Eppendorf, Německo), označeny názvem výživy a byly uloženy do mrazáku. Pro každé testování byly vždy použity nové zkumavky se vzorky mléčných výživ, aby byly zachované stejné podmínky testovaných vzorků.

4.3 Příprava kultivačních a ředících médií

Pro kultivaci bakteriálních kultur byly použity zkumavky s 9 ml Wilkins bujónu se sójovým peptonem (Tabulka 8), pro mikrobiologický rozbor v 0 hodin a sériové ředění penicilinky s 9 ml fyziologického roztoku (Tabulka 9) a pro rozbor 24 hodin zkumavky s 9,9 ml fyziologického roztoku (Tabulka 9) a penicilinky s 9 ml ředícího roztoku (Tabulka 10). Všechna tekutá média byla ošetřena metodou roll-tube technique (Hungate 1969) pro zajištění anaerobních podmínek.

Navážené látky jednotlivých médií byly rozpuštěny v odměřeném množství destilované vody. Vzniklé roztoky byly pipetovány do zkumavek a penicilinek. Naplněné zkumavky a penicilinky byly vloženy do vodní lázně vytemperované na 99 °C po dobu 10–15 minut. Po vyjmutí zkumavek a penicilinek z vodní lázně byly probublávány CO₂ procházejícím kolonou se zredukovanou mědí, čímž bylo ve zkumavkách a penicilinkách vytvořeno anaerobní prostředí. Zkumavky byly následně zavíčkované, vloženy do autoklávu (2840EL, Tuttnauer, Izrael) a vysterilovány na program Liquid a teplotu 121 °C.

Tabulka 8: Složení Wilkins bujónu se sójovým peptonem (WSP bujón)

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Wilkins Broth (Oxoid, UK)	33 g
L-Cysteine hydrochloride monohydrate (Sigma-Aldrich, USA)	0,5 g
Tween – Polysorbate 80 (Sigma-Aldrich)	1 ml
Sójový pepton (Veggie-tones GMO-free Soya Peptone; Oxoid)	5 g

Tabulka 9: Složení fyziologického roztoku

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Chlorid sodný (NaCl)	8,5 g

Tabulka 10: Složení ředících roztoků (roztoků ředících řad)

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Trypton (Oxoid, UK)	5 g
Nutrient Broth No. 2 (Oxoid)	5 g
Yeast Extract (Oxoid)	2,5 g
L-Cysteine hydrochloride monohydrate (Sigma-Aldrich, USA)	0,25 g
Tween (Sigma-Aldrich)	0,5 ml

Pro stanovení celkového počtu bakterií deskovou metodou bylo poté připraveno kultivační médium Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem (WSP agar) (Tabulka 11). V Erlenmayerových baňkách s odměřeným množstvím destilované vody byly rozpuštěny jednotlivé odvážené složky WSP agaru. Poté byly Erlenmayerovy baňky překryty alobalem, nadepsány, vloženy do hrnce a sterilovány po dobu 60 minut. Po proběhlé sterilaci poté byly vloženy do vodní lázně vytemperované na 50 °C a byly připraveny k použití.

Tabulka 11: Složení Wilkins-Chalgren agaru se sójovým peptonem

Látka	Množství
Destilovaná voda	1000 ml
Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar (Oxoid)	43 g
Sójový pepton (Oxoid)	5 g
L-cystein (Sigma-Aldrich)	0,5 g
Tween (Sigma-Aldrich)	1 ml

4.4 *In vitro* testování schopnosti utilizace mateřského mléka

4.4.1 Rozbor 0 hodin, rozbor z kultur; založení destičky pro rozbor 24 hodin

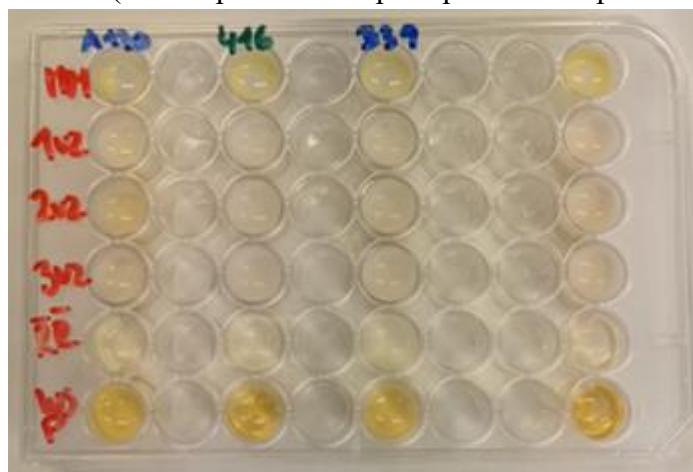
Ze zkumavky s čerstvě narostlou kulturou (Tabulka 7) byl sterilní stříkačkou přenesen 1 ml inokula do penicilinky (1. ředění) s 9 ml fyziologického roztoku. Penicilinka byla promíchána a byl z ní asepticky odebrán 1 ml a přenesen do další penicilinky (2. ředění) s fyziologickým roztokem. Penicilinka (2. ředění) byla promíchána a byl z ní asepticky odebrán 1 ml a přenesen do další penicilinky (3. ředění). Takto byla vytvořena ředící řada až pro osmé ředění pro jednu kulturu.

Z penicilinky pro 8. ředění bylo odebráno 0,5 ml inokula a nanášeno na malou Petriho misku o průměru 60 mm (VWR, USA). Z penicilinky pro 7. ředění bylo odebráno 0,5 ml inokula a nanášeno na malou Petriho misku. Obdobně u 6., 5., 4. a 3. ředění. Zaočkované Petriho misky byly zality WSP agarem a krouživým pohybem zamíchány. Agarem zalité

Petriho misky byly naskládány do anaerostatu (Oxoid, UK) s vysušeným katalyzátorem a pomocí Gassing systému (Whitley Jar Gassing System, Don Whitley Scientific, UK) byly vytvořeny anaerobní podmínky. Kultivace poté vždy probíhala při 37 °C po dobu 72 hodin.

Bezprostředně po rozboru z kultury byla založena mikrotitrační destička pro testování schopnosti klostridiálních kmenů utilizace mateřského mléka a umělých kojeneckých výživ. Na kultivační destičku (Thermo Fisher Scientific, USA) bylo asepticky nanášeno do jamek po 900 µl média (mateřské mléko (MM); mléčné kojenecké výživy: Beba Comfort (1vz), Hipp Bio Combiotik (2vz), Babybio (3vz); roztoky ředící řady (ŘŘ) a WSP bujón (WSP)). Poté bylo do jamek s médiem napipetováno 100 µl kultury z penicilinky pro 5. ředění. Pro ověření vlivu vyšší inokulační dávky toto poté bylo analogicky provedeno u vybraných kmenů také ze 3. ředění. Destička byla kultivována anaerobně v sáčku s katalyzátorem Genbag Anaer (BioMérieux, Francie) pro vytvoření anaerobních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Obrázek 7 znázorňuje mikrotitrační destičku s napipetovanými médii (MM, 1vz, 2vz, 3vz, ŘŘ, WSP) a kulturami (foceno po kultivaci při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin).



Obrázek 7: Mikrotitrační destička s napipetovanými médii a kulturami (A. Černá)

4.4.2 Rozbor 24 hodin

Po 24 hodinách kultivace zaočkovaných kmenů klostridií v mateřském mléce a náhradních mléčných výživách byla jamka s MM a kulturou v mikrotitrační destičce (0. ředění) pipetou důkladně promíchána a bylo odebráno 100 µl, které byly asepticky inokulovány do zkumavky s 9,9 ml fyziologického roztoku (označené MM, typem kultury, 2. ředění). Zkumavka byla promíchána na vortexu. Ze zkumavky byl asepticky odebrán 1 ml a přenesen do penicilinky s ředícím roztokem (3. ředění). Penicilinka byla promíchána a byl z ní asepticky odebrán 1 ml a přenesen do další penicilinky (4. ředění) s ředícím roztokem. Takto byla vytvořena ředící řada pro médium MM a kulturu až po 7. ředění. Stejný postup byl proveden i pro ostatní testované varianty (1vz, 2vz, 3vz, ŘŘ, WSP) u téže kultury.

Z penicilinky pro 7. ředění (MM, typ kultury) bylo odebráno 0,5 ml inokula a nanášeno na malou Petriho misku označenou typem média, typem kultury a číslem ředění (MM, typ kultury, 7. ředění). Z penicilinky pro 6. ředění (MM, typ kultury) bylo odebráno 0,5 ml inokula a nanášeno na malou Petriho misku (MM, typ kultury, 6. ředění). Obdobně u 5., 4. a 3. ředění. Ze zkumavky pro 2. ředění (MM, typ kultury) bylo odebráno 0,5 ml inokula

a nanese na malou Petriho misku (MM, typ kultury, 2. ředění). Zaočkované Petriho misky byly zality WSP agarem a krouživým pohybem zamíchány. Agarem zalité Petriho misky byly naskládány do anaerostatu s vysušeným katalyzátorem a pomocí Gassing systému byly vytvořeny anaerobní podmínky. Kultivace poté probíhala při 37 °C po dobu 48 hodin. Stejný postup byl proveden i s ostatními testovanými variantami (1vz, 2vz, 3vz, ŘŘ, WSP) u téže kultury. Pro všechny analyzované kultury (Tabulka 7) byl dodržen stejný postup.

Ve všech jamkách mikrotitrační destičky s napipetovanými médii a kulturami bylo poté změřeno pH třemi různými metodami – pomocí reflektokvantu, pH Checkeru a pH papírků.

4.4.3 Vyhodnocení rozboru 0 a 24 hodin

Po proběhlé době kultivace byly Petriho misky vyjmuty z anaerostatů, seřazeny a rozděleny podle druhu vzorků. Byly spočítány narostlé kolonie. Výsledný počet byl vynásoben dvěma, protože na malé Petriho misky bylo očkováno 0,5 ml, ale jednotka (KTJ/ml) je na 1 ml. Počet bakterií v KTJ/ml byl spočten dle vzorce: $P = [(P1+P2)/11] \times F$, případně $P = [(P1+P2+P3)/111] \times F$, kde P1, P2 a P3 je počet kolonií na dvou/třech po sobě jdoucích počitatelných miskách a F je převrácená hodnota vyššího ředění. Dále byl vypočítán dekadický logaritmus (log KTJ/ml) a byla stanovena inokulační dávka klostridiální kultury zaočkované do mikrotitrační destičky. Inokulační dávka byla spočtena z dekadického logaritmu počtu KTJ/ml. Např. pokud byla koncentrace v 0 hodin 7,37 log KTJ/ml v případě pipetování 100 µl do destičky s 900 µl média z penicilinky 3. ředění, inokulační dávka byla 3,37 log KTJ/ml. Analogicky pokud bylo do 900 µl média pipetováno 100 µl kultury z penicilinky 5. ředění: pokud koncentrace v 0 hodin byla 9,22 log KTJ/ml, inokulační dávka je 3,22 KTJ/ml. U naměřených hodnot pH byly spočteny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky. Dále byl spočten rozdíl nárůstu v log KTJ/ml a inokulační dávky (ID) v log KTJ/ml. Dle získané hodnoty v log KTJ/ml bylo určeno, zda kmen nepřežívá (<0); přežívá, ale neroste (0–0,5); mírně roste (0,5–1); roste (1–3) či extra roste (<3).

5 Výsledky

V rámci této diplomové práce byla testována schopnost 7 druhů klostridií využívat mateřské mléko a tři náhradní mléčné výživy. Celkem bylo otestováno 12 různých klostridiálních kmenů, které originálně pocházely ze stolice kojenců. Získané výsledky naznačují, že schopnost utilizace mateřského mléka a různých variant mléčných výživ je druhově specifická. Dále byly detekovány také kmenově specifické vlastnosti. Vzhledem ke striktně anaerobnímu metabolismu bylo zjištěno, že pro tuto forma testování není vhodná pro druh *C. paraputrificum*, který nebyl schopen nárůstu na pozitivní kontrole (tedy na WSP bujónu) obsahující všechny potřebné substráty k růstu. U zbylých 11 kmenů byla začleněním tohoto média, tedy pozitivní kontroly, potvrzena vhodnost této *in vitro* metody pro dané testování. Výsledky pro jednotlivé druhy klostridií jsou detailněji rozebrány v následujících podkapitolách.

5.1 Kmeny *Clostridium perfringens*

Tabulka 12: *Clostridium perfringens* – kmeny A141, A130 a EBR323

Kmen A141 – T2		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	$3,12 \times 10^8$	8,49	$6,64 \pm 0,13$	*ID=2,49	Interpretace	OD=9,71MFC
24 hodin	MM	$2,40 \times 10^5$	5,38	$6,59 \pm 0,02$	2,89	++	
	1 vz	$8,00 \times 10^3$	3,90	$6,71 \pm 0,28$	1,41	+	
	2 vz	$8,14 \times 10^7$	7,91	$5,41 \pm 0,01$	5,42	+++	
	3 vz	$4,40 \times 10^8$	8,64	$5,04 \pm 0,17$	6,15	+++	
	ŘŘ	$4,00 \times 10^6$	6,60	$6,48 \pm 0,11$	4,11	+++	
	WSP	$2,00 \times 10^6$	6,30	$6,80 \pm 0,10$	3,81	+++	

Kmen A130 – FW2		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	$2,87 \times 10^7$	7,46	$6,39 \pm 0,30$	*ID=3,46	Interpretace	OD=8,13MFC
24 hodin	MM	$1,20 \times 10^7$	7,08	$6,10 \pm 0,28$	3,62	+++	
	1 vz	$3,45 \times 10^4$	4,54	$6,20 \pm 0,57$	1,08	+	
	2 vz	$1,39 \times 10^8$	8,14	$4,45 \pm 0,07$	4,68	+++	
	3 vz	$6,86 \times 10^7$	7,84	$4,79 \pm 0,25$	4,38	+++	
	ŘŘ	$1,16 \times 10^7$	7,06	$6,57 \pm 0,05$	3,60	+++	
	WSP	$2,05 \times 10^8$	8,31	$6,82 \pm 0,11$	4,85	+++	

Kmen EBR323		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	$2,33 \times 10^7$	7,37	$6,43 \pm 0,15$	*ID=3,37	Interpretace	OD=6,72MFC
24 hodin	MM	$2,10 \times 10^5$	5,32	$5,22 \pm 0,20$	1,95	++	
	1 vz	$1,44 \times 10^6$	6,16	$5,94 \pm 0,13$	2,79	++	
	2 vz	$1,67 \times 10^8$	8,22	$4,40 \pm 0,00$	4,85	+++	
	3 vz	$3,92 \times 10^7$	7,59	$6,36 \pm 0,10$	4,22	+++	
	ŘŘ	$1,42 \times 10^7$	7,15	$6,74 \pm 0,15$	3,78	+++	
	WSP	$1,33 \times 10^7$	7,12	$6,86 \pm 0,05$	3,75	+++	

Pozn.: Přežití a růst kmene bylo hodnoceno jako rozdíl nárůstu (log KTJ/ml) a inokulační dávky (log KTJ/ml) následujícím způsobem: -, kmen nepřežívá (<0); 0, kmen přežívá, ale neroste (0–0,5); +, kmen mírně roste (0,5–1); ++, kmen roste (1–3); +++, kmen extra roste

(>3); MM = mateřské mléko; 1 vz = Beba Comfort; 2 vz = Hipp Bio Combiotik; 3 vz = Babybio; ŘŘ = ředící řada; WSP = WSP bujón.

Všechny testované kmeny *C. perfringens* vykazovaly nárůst v mateřském mléce, u kmene A130-FW2 byl dokonce pozorován extra nárůst skoro o tři řády. V mléčné výživě Beba Comfort kmen EBR323 vykazoval nárůst, zatímco kmeny A130-FW2 a A141-T2 rostly v této výživě méně. V mléčných výživách Hipp Bio Combiotik a Babybio vykazovaly všechny 3 kmeny extra nárůst. Extra nárůst všech třech kmenů byl pozorován také v negativní (nutričně chudé ředící médium) a pozitivní (WSP bujón) kontrole.

5.2 Kmeny *Clostridioides difficile*

Tabulka 13: *Clostridioides difficile* – kmeny EBR344 a D10

Kmen EBR344		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	1,71×10 ⁶	6,23	5,64±0,08	*ID=2,23	Interpretace	OD=8,32MFC
24 hodin	MM	<10 ¹	<1,00	5,90±0,14	-1,23	-	
	1 vz	<10 ¹	<1,00	6,21±0,27	-1,23	-	
	2 vz	<10 ¹	<1,00	6,58±0,04	-1,23	-	
	3 vz	<10 ¹	<1,00	6,71±0,15	-1,23	-	
	ŘŘ	<10 ¹	<1,00	6,67±0,09	-1,23	-	
	WSP	1,62×10 ⁶	6,21	6,30±0,00	3,98	+++	

Kmen D10		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	2,16×10 ⁵	5,33	5,87±0,25	*ID=1,33	Interpretace	OD=8,46MFC
24 hodin	MM	<10 ¹	<1,00	6,22±0,23	-0,33	-	
	1 vz	<10 ¹	<1,00	5,75±0,21	-0,33	-	
	2 vz	<10 ¹	<1,00	6,13±0,22	-0,33	-	
	3 vz	<10 ¹	<1,00	6,63±0,20	-0,33	-	
	ŘŘ	<10 ¹	<1,00	6,20±0,28	-0,33	-	
	WSP	4,84×10 ⁴	4,68	6,26±0,15	3,35	+++	

Pozn.: Přežití a růst kmene bylo hodnoceno jako rozdíl nárůstu (log KTJ/ml) a inokulační dávky (log KTJ/ml) následujícím způsobem: -, kmen nepřežívá (<0); 0, kmen přežívá, ale neroste (0–0,5); +, kmen mírně roste (0,5–1); ++, kmen roste (1–3); +++, kmen extra roste (>3); MM = mateřské mléko; 1 vz = Beba Comfort; 2 vz = Hipp Bio Combiotik; 3 vz = Babybio; ŘŘ = ředící řada; WSP = WSP bujón.

Ani jeden z kmenů *Cl. difficile* nerostl ani nepřežíval v mateřském mléce. Tyto kmeny nerostly ani nepřežívaly v žádné náhradní mléčné výživě, ani v ředícím nutričně chudém médiu. Poskytnuté substráty obsažené v mateřském mléce a náhradních mléčných výživách tedy nebyly tímto druhem využity. Nicméně jejich extra nárůst byl pozorován ve WSP bujónu, který obsahoval všechny potřebné substráty k jejich růstu. V negativní (nutričně chudé ředící médium) kontrole tyto kmeny nepřežívaly.

5.3 Kmeny *Clostridium tertium*

Tabulka 14: *Clostridium tertium* – kmeny A19 a EBR315

Kmen A19		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	3,37×10 ⁵	5,53	5,19±0,12	*ID=1,53	Interpretace	OD=8,66MFC
24 hodin	MM	<10 ¹	<1,00	6,17±0,16	-0,53	-	
	1 vz	1,15×10 ⁶	6,06	5,65±0,07	4,53	+++	
	2 vz	1,19×10 ⁸	8,08	4,60±0,14	6,55	+++	
	3 vz	8,16×10 ⁴	4,91	6,08±0,14	3,38	+++	
	ŘŘ	5,96×10 ⁶	6,78	6,10±0,14	5,25	+++	
	WSP	8,04×10 ⁶	6,91	5,37±0,21	5,38	+++	

Kmen EBR315		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	7,60×10 ⁵	5,88	5,59±0,02	*ID=1,88	Interpretace	OD=6,20MFC
24 hodin	MM	<10 ¹	<1,00	6,10±0,14	-0,88	-	
	1 vz	1,29×10 ⁵	5,11	6,44±0,20	3,23	+++	
	2 vz	1,15×10 ⁶	6,06	6,33±0,04	4,18	+++	
	3 vz	1,92×10 ⁶	6,28	6,69±0,13	4,40	+++	
	ŘŘ	1,20×10 ⁷	7,08	6,24±0,34	5,20	+++	
	WSP	1,33×10 ⁸	8,12	5,05±0,07	6,24	+++	

Pozn.: Přežití a růst kmene bylo hodnoceno jako rozdíl nárůstu (log KTJ/ml) a inokulační dávky (log KTJ/ml) následujícím způsobem: -, kmen nepřežívá (<0); 0, kmen přežívá, ale neroste (0–0,5); +, kmen mírně roste (0,5–1); ++, kmen roste (1–3); +++, kmen extra roste (>3); MM = mateřské mléko; 1 vz = Beba Comfort; 2 vz = Hipp Bio Combiotik; 3 vz = Babybio; ŘŘ = ředící řada; WSP = WSP bujón.

Ani jeden z kmenů *C. tertium* nerostl ani nepřežíval v mateřském mléce. Avšak ve všech třech testovaných mléčných výživách byl pozorován extra nárůst obou kmenů, stejně jako v pozitivní a negativní (nutričně chudé) kontrole.

5.4 Kmeny *Clostridium butyricum*

Tabulka 15: *Clostridium butyricum* – kmeny A24 a A6

Kmen A24		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	1,78×10 ⁵	5,25	5,27±0,05	*ID=1,25	Interpretace	OD=10,6MFC
24 hodin	MM	<10 ¹	<1,00	6,15±0,21	-0,25	-	
	1 vz	<10 ¹	<1,00	6,09±0,34	-0,25	-	
	2 vz	<10 ¹	<1,00	6,67±0,09	-0,25	-	
	3 vz	<10 ¹	<1,00	6,86±0,06	-0,25	-	
	ŘŘ	<10 ¹	<1,00	6,73±0,18	-0,25	-	
	WSP	7,84×10 ⁴	4,89	6,62±0,03	3,64	+++	

Kmen A6		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	5,17×10 ⁵	5,71	5,15±0,15	*ID=1,71	Interpretace	OD=11,4MFC
24 hodin	MM	<10 ¹	<1,00	6,22±0,21	-0,71	-	
	1 vz	<10 ¹	<1,00	6,29±0,26	-0,71	-	
	2 vz	<10 ¹	<1,00	6,00±0,00	-0,71	-	

	3 vz	<10 ¹	<1,00	6,40±0,00	-0,71	-
	ŘŘ	<10 ¹	<1,00	6,40±0,00	-0,71	-
	WSP	9,09×10 ⁴	4,96	6,50±0,10	3,25	+++

Pozn.: Přežití a růst kmene bylo hodnoceno jako rozdíl nárůstu (log KTJ/ml) a inokulační dávky (log KTJ/ml) následujícím způsobem: -, kmen nepřežívá (<0); 0, kmen přežívá, ale neroste (0–0,5); +, kmen mírně roste (0,5–1); ++, kmen roste (1–3); +++, kmen extra roste (>3); MM = mateřské mléko; 1 vz = Beba Comfort; 2 vz = Hipp Bio Combiotik; 3 vz = Babybio; ŘŘ = ředící řada; WSP = WSP bujón.

Ani jeden z kmenů *C. butyricum* nerostl ani nepřežíval v mateřském mléce a kmeny nerostly ani nepřežívaly v žádné z testovaných náhradních mléčných výživ, ani v negativní nutričně chudé kontrole. Nicméně v pozitivní kontrole byl pozorován jejich extra nárůst.

5.5 Ostatní kmeny klostridií

Tabulka 16: Kmeny *C. paraputrificum* EBR416, *Paraclostridium bif fermentans* EBR339 a *Paeniclostridium sordellii* EBR325

Clostridium paraputrificum

Kmen EBR416		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	9,94×10 ⁵	6,00	5,44±0,07	*ID=2,00	Interpretace	OD=4,40MFC
24 hodin	MM	<10 ¹	<1,00	6,29±0,01	-1,00	-	
	1 vz	<10 ¹	<1,00	6,61±0,01	-1,00	-	
	2 vz	<10 ¹	<1,00	6,64±0,06	-1,00	-	
	3 vz	<10 ¹	<1,00	6,89±0,02	-1,00	-	
	ŘŘ	<10 ¹	<1,00	6,83±0,11	-1,00	-	
	WSP	<10 ¹	<1,00	6,69±0,10	-1,00	-	

Paraclostridium bif fermentans

Kmen EBR339		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	1,64×10 ⁷	7,21	6,56±0,06	*ID=3,21	Interpretace	OD=7,04MFC
24 hodin	MM	1,45×10 ³	3,16	6,61±0,01	-0,05	0	
	1 vz	3,45×10 ³	3,54	6,54±0,09	0,33	0	
	2 vz	1,69×10 ⁵	5,23	6,68±0,11	2,02	++	
	3 vz	1,21×10 ⁶	6,08	6,59±0,18	2,87	++	
	ŘŘ	6,54×10 ⁶	6,82	7,11±0,18	3,61	+++	
	WSP	4,02×10 ⁸	8,60	6,95±0,05	5,39	+++	

Paeniclostridium sordellii

Kmen EBR325		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	1,98×10 ⁶	6,30	6,63±0,04	*ID=2,30	Interpretace	OD=6,55MFC
24 hodin	MM	<10 ¹	<1,00	5,95±0,07	-1,30	-	
	1 vz	<10 ¹	<1,00	6,78±0,25	-1,30	-	
	2 vz	<10 ¹	<1,00	6,66±0,08	-1,30	-	
	3 vz	<10 ¹	<1,00	6,54±0,13	-1,30	-	
	ŘŘ	1,79×10 ⁷	7,25	6,83±0,11	4,95	+++	
	WSP	1,18×10 ⁷	7,07	5,80±0,28	4,77	+++	

Pozn.: Přežití a růst kmene bylo hodnoceno jako rozdíl nárůstu (log KTJ/ml) a inokulační dávky (log KTJ/ml) následujícím způsobem: -, kmen nepřežívá (<0); 0, kmen přežívá, ale neroste (0–0,5); +, kmen mírně roste (0,5–1); ++, kmen roste (1–3); +++, kmen extra roste (>3); MM = mateřské mléko; 1 vz = Beba Comfort; 2 vz = Hipp Bio Combiotik; 3 vz = Babybio; ŘŘ = ředící řada; WSP = WSP bujón.

Kmen *C. paraputrificum* EBR416 nerostl, ani nepřežíval v mateřském mléce, ani v žádné z testovaných náhradních mléčných výživ. Nerostl ani nepřežíval v negativní kontrole. Stejný trend vykazoval také ve WSP bujónu, který byl použit jako pozitivní kontrola obsahující všechny substráty potřebné k růstu. Bylo tedy zjištěno, že tento typ *in vitro* testování není vhodný pro druh *C. paraputrificum*.

Kmen *P. bifermens* EBR339 v mateřském mléce a v mléčné náhradní výživě Beba Comfort přežíval, ale nerostl (tzn., že počty KTJ/ml byly takřka stejné jako samotná inokulační dávka). Naopak v mléčných výživách Hipp Bio Combiotik a Babybio kmen vykazoval nárůst. Kmen extra rostl jak na negativní, tak na pozitivní kontrole.

Kmen *P. sordellii* EBR325 nerostl, ani nepřežíval v mateřském mléce a stejně tak ani v žádné z testovaných náhradních mléčných výživ. Tento kmen extra rostl jak na negativní, tak na pozitivní kontrole.

5.6 Kontrolní kmeny

Pro hodnocení schopnosti divokých kmenů klostridií růst a přežívat v mateřském mléce a náhradních mléčných kojeneckých výživách byly do testování zařazeny také pozitivní kontroly kmenů bifidobakterií a laktobacila, u kterých byly již dříve popsány jejich schopnosti v utilizaci těchto substrátů.

Tabulka 17: Kmeny *B. longum* subsp. *infantis* DSM 20088 a BRS8-2, *B. animalis* subsp. *lactis* Nestlé(48) a *L. reuteri* DSM 20016

Bifidobacterium longum subsp. *infantis*

Kmen DSM 20088		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	1,66×10 ⁹	9,22	4,62±0,14	*ID=3,22	Interpretace	OD=9,22MFC
24 hodin	MM	2,56×10 ⁵	5,41	6,00±0,14	2,19	++	
	1 vz	2,36×10 ⁴	4,37	5,95±0,21	1,15	++	
	2 vz	3,00×10 ⁴	4,48	5,80±0,28	1,26	++	
	3 vz	1,09×10 ⁵	5,04	6,62±0,17	1,82	++	
	ŘŘ	<10 ¹	<1,00	6,20±0,14	-2,22	-	
	WSP	1,91×10 ⁵	5,28	6,46±0,05	2,06	++	

Bifidobacterium longum subsp. *infantis*

Kmen BRS8-2		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	2,14×10 ⁶	6,33	5,79±0,26	*ID=2,33	Interpretace	OD=10,7MFC
24 hodin	MM	1,27×10 ³	3,10	6,10±0,28	0,77	+	
	1 vz	7,27×10 ²	2,86	6,00±0,42	0,53	+	
	2 vz	2,23×10 ⁴	4,35	6,05±0,35	2,02	++	
	3 vz	5,12×10 ⁴	4,71	6,30±0,42	2,38	++	
	ŘŘ	2,35×10 ⁶	6,37	6,59±0,02	4,04	+++	
	WSP	2,99×10 ⁷	7,48	4,65±0,07	5,15	+++	

Bifidobacterium animalis subsp. lactis

Kmen Nestlé(48)		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	7,75×10 ⁸	8,89	4,63±0,06	*ID=4,89	Interpretace	OD=10,5MFC
24 hodin	MM	<10 ¹	<1,00	6,00±0,14	-3,89	-	
	1 vz	1,01×10 ⁵	5,00	6,08±0,18	0,11	0	
	2 vz	1,40×10 ⁸	8,15	3,85±0,25	3,26	+++	
	3 vz	8,00×10 ⁴	4,90	6,30±0,28	0,01	0	
	ŘŘ	8,27×10 ⁵	5,15	6,05±0,07	0,26	0	
	WSP	2,95×10 ⁷	7,47	4,47±0,12	2,58	++	

Limosilactobacillus reuteri

Kmen DSM 20016		KTJ/ml	log KTJ/ml	pH	Nárůst – ID		Poznámky
	0 hodin	1,54×10 ⁸	8,19	6,08±0,11	*ID=4,19	Interpretace	OD=9,63MFC
24 hodin	MM	1,64×10 ⁶	6,21	6,05±0,07	2,02	++	
	1 vz	6,19×10 ⁶	6,79	5,70±0,14	2,60	++	
	2 vz	9,86×10 ⁶	6,99	5,65±0,07	2,80	++	
	3 vz	1,51×10 ⁶	6,18	6,20±0,14	1,99	++	
	ŘŘ	8,80×10 ⁶	6,94	6,52±0,37	2,75	++	
	WSP	1,13×10 ⁸	8,05	6,49±0,09	3,86	+++	

Pozn.: Přežití a růst kmene bylo hodnoceno jako rozdíl nárůstu (log KTJ/ml) a inokulační dávky (log KTJ/ml) následujícím způsobem: -, kmen nepřežívá (<0); 0, kmen přežívá, ale neroste (0–0,5); +, kmen mírně roste (0,5–1); ++, kmen roste (1–3); +++, kmen extra roste (>3); MM = mateřské mléko; 1 vz = Beba Comfort; 2 vz = Hipp Bio Combiotik; 3 vz = Babybio; ŘŘ = ředící řada; WSP = WSP bujón.

Oba kontrolní kmeny *B. longum* subsp. *infantis* vykazovaly nárůst v mateřském mléce, konkrétně kmen DSM 20088 vykazoval nárůst, zatímco kmen BRS8-2 pouze mírný nárůst. Kmen DSM 20088 vykazoval také nárůst v mléčné výživě Beba Comfort, zatímco kmen BRS8-2 v této výživě vykazoval pouze mírný nárůst. Oba kmeny rostly také v mléčných výživách Hipp Bio Combiotik a Babybio. V negativní kontrole kmen DSM 20088 nerostl, ani nepřežíval, zatímco kmen BRS8-2 extra rostl. V pozitivní kontrole rostly oba kmeny, kmen DSM 20088 vykazoval nárůst, kmen BRS8-2 extra nárůst.

Kmen *B. animalis* subsp. *lactis* Nestlé(48) v mateřském mléce nerostl, ani nepřežíval, zatímco v mléčné výživě Hipp Bio Combiotik vykazoval extra nárůst a v mléčných výživách Beba Comfort a Babybio přežíval, ale nerostl. V negativní kontrole kmen přežíval, ale nerostl a v pozitivní kontrole kmen rostl.

Kmen *L. reuteri* DSM 20016 vykazoval nárůst jak v mateřském mléce, tak ve všech náhradních mléčných výživách. V negativní kontrole vykazoval nárůst, v pozitivní kontrole extra nárůst.

6 Diskuze

Získání střevní mikrobioty kojence je klíčové pro vytvoření symbiózy mezi hostitelem a mikrobiotou. Tato symbióza je mutualistická, tedy hostitel poskytuje živiny a niku pro mikrobiální společenstvo, zatímco mikrobiální společenstvo přispívá k trávení živin a získávání energie, podporuje rozvoj imunitního systému a poskytuje obranu proti střevním infekcím. Tato vzájemná interakce je klíčová během prvního roku života, kdy se rychle vyvíjí imunitní systém a střevní mikrobiota (Appert et al. 2020). Právě kojení, tedy konzumace mateřského mléka, podporuje kolonizaci bakteriemi z čeledi *Bifidobacteriaceae*. Počáteční kolonizace a spotřeba kyslíku v trávicím traktu poté umožňuje růst dalších striktně anaerobních bakterií, například čeledí *Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae* a *Lachnospiraceae* (Appert et al. 2020).

Bifidobakterie ve střevě kojenců během prvních 12 měsíců dominují (Rivière et al. 2016), nicméně klostridie jsou také velmi významnou skupinou bakterií. Časně kolonizují střevo a mohou být detekovány ve stolici již během prvního týdne po narození. Nejčastěji se jedná o *C. butyricum*, *C. paraputrificum* a *Cl. difficile* (Guo et al. 2020). Některé klostridiální druhy mají dokonce mnoho blahodárných účinků na střevní homeostázu a jsou známy jako její nepostradatelné regulátory (Guo et al. 2020). Některé kmeny *C. butyricum* jsou dokonce v Asii využívány jako probiotikum (Grenda et al. 2022). Druhy rodu *Clostridium* mohou využívat velké množství živin, které hostitel nemůže strávit, přičemž ve střevě člověka využívají především nestravitelné polysacharidy a většina metabolitů, které produkují, přináší mnoho výhod pro zdraví střev. Produkují mastné kyseliny s krátkým řetězcem (např. butyrát), které hrají významnou roli ve střevní homeostáze, slouží jako zdroj energie pro epitelové buňky tlustého střeva a mají protizánětlivé účinky či brání invazi patogenů (Guo et al. 2020).

Ačkoli komenzální klostridie se podílejí na regulaci a udržování všech střevních funkcí, některé klostridie jsou spojovány také s patogenními procesy. Je zajímavé, že některé kmeny *C. butyricum* zjištěné ve vzorcích stolice byly spojeny se závažnými onemocněními jako je kojenecký botulismus a nekrotizující enterokolitida u předčasně narozených kojenců (Grenda et al. 2022). Dále řada anaerobních infekcí byla vyvolána druhy klostridií, jako je *C. perfringens*, *Cl. difficile*, *C. botulinum* či *C. tetani*. Nicméně je důležité si uvědomit, že většina klostridií má komenzální vztah s hostitelem (Lopetuso et al. 2013; Guo et al. 2020).

Mateřské mléko je komplexní biologická tekutina, která poskytuje výživné, ochranné a vývojové funkce a je přizpůsobená potřebám vyvíjejícího se novorozence. Díky tomu je mateřské mléko jednoznačně zlatým standardem pro ranou výživu, s nímž dosud nemůže soupeřit žádná náhradní mléčná výživa. Je také považováno za významný zdroj životaschopných komenzálních mateřských bakterií schopných kolonizovat novorozenecké střevo, včetně obligátních anaerobů jako je *Bifidobacterium* spp. a také obsahuje strukturně rozmanité nestravitelné OMM, které mohou zvýšit růst specifických střevních bakteriálních populací, zejména *Bifidobacterium* spp. a *Bacteroides* spp. (Jost et al. 2015).

V rámci této diplomové práce byla testována schopnost využívat mateřské mléko a vybrané náhradní mléčné výživy divokými kmeny klostridií, které byly originálně izolovány z fekálních vzorků kojenců bez zdravotních obtíží. Bylo zjištěno, že druh *C. perfringens* dokáže mateřské mléko využívat a že druh *P. bifermentans* v něm dokáže přežít, ale neroste. Schopnost růstu *C. perfringens* v mateřském mléce naznačují také výsledky Shaw et

al. (2020), kteří zkoumali růst izolátu *C. perfringens* získaného od kojence s NEC. Izolát byl kultivován buď v médiu bohatém na živiny nebo v mateřském mléce, a to buď jako monokultura nebo v kokultuře s bakterií *B. longum* subsp. *infantis*, která byla vybrána jako typický konkurenční střevní druh, který roste na OMM. Oba druhy rostly v obou substrátech a za obou kultivačních podmínek, přičemž každý z nich rostl významně lépe v médiu bohatém na živiny a v monokultuře než v mateřském mléce. Oba druhy v nutričně bohatém médiu nevykazovaly významné rozdíly v růstu, nicméně v mateřském mléce rostlo *C. perfringens* významně nižší rychlostí než *B. longum* subsp. *infantis* v monokultuře i kokultuře (Shaw et al. 2020). Přestože se předpokládá, že bioaktivní složky mateřského mléka (imunoglobuliny, lysozym, laktoferrin, OMM) působí inhibičně proti řadě patogenů, včetně klostridií (Goldman 1993; Liu & Newburg 2013), v rámci této diplomové práce byl zjištěn opak a růst druhu *C. perfringens* jimi nebyl ovlivněn. V jiných studiích jsou případy inhibice například spojovány se sekrečním IgA obsaženým v mateřském mléce, kde potlačuje běžné mikrobiální patogeny (Matsumura et al. 2007, Rolfe & Song 1995), stejně tak s OMM (Lin et al. 2017) či laktoferinem (Bullen et al. 1972). Naše výsledky naznačují, že mateřským mlékem nedochází k potlačení růstu ani u druhu *P. bifementans*, který byl v podmínkách testování schopen přežít v nezměněných kultivačních počtech. Schopnost využívat mateřské mléko se tedy navíc jeví jako druhové specifická. Konkrétně pro druh *C. perfringens*, jelikož ostatní testované klostridiální druhy mateřské mléko nevyužívaly.

B. longum subsp. *infantis* je speciálně uzpůsobeno na efektivní metabolismus OMM a následnou produkci kyselin (Sela et al. 2008). Výsledky Shaw et al. (2020) ukázaly, že *B. longum* subsp. *infantis* významně překonává *C. perfringens*, pokud je kultivována v monokultuře a kokultuře v mateřském mléce. Když byly oba druhy kultivovány společně, nebyl pozorován žádný důkaz přímého inhibičního účinku. Toto srovnání však mohlo být dle Shaw et al. (2020) ovlivněno řadou faktorů jako je potenciální konkurence organismů s nízkým výskytem pocházejících z mateřského mléka, vliv toxinů *C. perfringens* na růst bifidobakterií a účinek potenciální expozice kyslíku, která by ovlivnila *C. perfringens*. Ačkoliv řada střevních komenzálních bakterií, včetně klostridií, nemůže metabolizovat OMM (Yu et al. 2013), zdá se, že druh *C. perfringens* by mohl být schopný mírné utilizace OMM. Marcobal et al. (2010) testovali růst bakteriálních druhů, včetně *C. perfringens* a *Cl. difficile* na OMM. *C. perfringens* vykazovalo slabý, ale znatelný růst, zatímco druh *Cl. difficile* v tomto substrátu nerostl vůbec. Také Salli et al. (2021) testovali účinky 3 OMM (2'-fukosyllaktózy, 3-fukosyllaktózy a difukosyllaktózy) na růst různých bakteriálních druhů, včetně běžných kojeneckých patogenů jako jsou *C. perfringens*. Kromě OMM byly jako zdroje uhlíku pro testované bakteriální kmeny hodnoceny i probiotické GOS, laktóza, fukóza a glukóza. Kmen *C. perfringens* utilizoval fukózu a dobře rostl na GOS, laktóze a glukóze. OMM 2'-fukosyllaktóza a difukosyllaktóza nepodporovaly růst žádné z testovaných potenciálně patogenních bakterií, avšak byl pozorován slabý růst *C. perfringens* na 3-fukosyllaktóze. Nicméně růst byl pozorován na začátku experimentu a postupně klesal, přičemž po 24 hodinách nevykazoval téměř žádný rozdíl ve srovnání s kontrolním médiem, což dle Salli et al. (2021) mohlo být ovlivněno malým množstvím zbytkové laktózy a galaktózy v použitém produktu 3-fukosyllaktózy. Ačkoliv Marcobal et al. (2010) a Salli et al. (2021) pozorovali slabý nárůst *C. perfringens* na OMM, tento nárůst byl mnohem slabší než u bifidobakterií využívajících OMM. Schopnost *C. perfringens* využívat OMM musí být

však dále testována, jelikož je pouze málo studií zabývajících se růstem tohoto druhu na OMM a na základě našich výsledků je zde patrný jeho potenciál. Také přežívání a růst druhů *C. perfringens* a *P. bifementans* v mateřském mléce nebylo dalšími studiemi potvrzeno ani vyvráceno. Pro potvrzení nebo vyvrácení této schopnosti u těchto klostridiálních druhů je tedy třeba dalšího testování.

Dále byly testovány také druhy *Cl. difficile*, *C. tertium*, *C. butyricum*, *C. paraputrificum* a *P. sordellii*, které ale v mateřském mléce nerostly, ani nepřežívaly. Schopnost růstu klostridií v mateřském mléce zkoumali také Rockova et al. (2011b), a to konkrétně u druhu *C. butyricum*. Tři z pěti kmenů nebyly schopny růstu na mateřském mléce, což bylo v souladu s našimi výsledky, kdy *C. butyricum* v mateřském mléce nerostlo. Dle Rockova et al. (2011b) bylo také 4 z 5 testovaných kmenů citlivé na lysozym, což je enzym s antibakteriálními účinky (Thai & Gregory 2020). Je tedy možné, že lysozym obsažený v mateřském mléce by mohl potlačovat růst *C. butyricum*. Pro potvrzení či vyvrácení neschopnosti růstu těchto klostridiálních druhů (*Cl. difficile*, *C. tertium*, *C. butyricum*, *C. paraputrificum*, *P. sordellii*) však není dostatek studií a je třeba dalšího testování.

V rámci našich výsledků bylo dále zjištěno, že pro druh *C. paraputrificum* tato forma *in vitro* testování není vhodná, jelikož nebyl schopen nárůstu na pozitivní kontrole obsahující všechny potřebné substráty k růstu, tedy WSP bujónu. Obecně jsou klostridie velmi citlivé na kyslík a rostou pouze za anaerobních podmínek. Nicméně některé druhy tolerují nízké koncentrace kyslíku, zatímco pro ostatní druhy klostridií je kyslík vysoce toxický (Johnson 2009). *C. paraputrificum* je striktně anaerobní bakterie (Evvyernie et al. 2000). Je tedy možné, že druh *C. paraputrificum* byl na možné vystavení kyslíku mnohem citlivější než ostatní testované druhy a nepřežíval, jelikož u ostatních testovaných anaerobních druhů byla potvrzena vhodnost této formy testování.

Zjištěná schopnost některých klostridií využívat mateřské mléko a náhradní kojenecké výživy by mohla být spojena také s obsahem prebiotických složek. Prebiotika selektivně stimulují růst a aktivitu prospěšných střevních bakterií, přičemž jejich cílovou skupinou jsou zejména bifidobakterie. Nejčastěji používanými prebiotiky v kojeneckých náhradních mléčných výživách jsou FOS a GOS (Rockova et al. 2011b). Dle Rada et al. (2008) komerčně dostupná prebiotika však nejsou zcela selektivní, jelikož FOS, GOS, rafinóza, stachyóza a inulin byly využívány také klostridiemi izolovanými ze stolice kojence. Je tedy pravděpodobné, že i z tohoto důvodu klostridie na umělých výživách hojně rostou. OMM jsou považovány také za prebiotika, protože podporují růst prospěšných bakterií ve střevě kojence. Dominantní zástupci střevní mikrobioty, *Bifidobacterium* spp. a *Bacteroidetes* spp., mají schopnost trávit a využívat OMM prostřednictvím specifických glykosidáz (Li et al. 2021). Ačkoliv jsou OMM 2'-fukosyllaktóza a lakto-N-neotetraóza přidávány do náhradních mléčných výživ (Li et al. 2021), existuje více než 200 strukturně odlišných OMM vyskytujících se v mateřském mléce (Masi & Stewart 2022). Kolostrum obsahuje přibližně 20–23 g/l, poté se jejich koncentrace s dozráváním mléka snižuje (Wiciński et al. 2020). Každá žena produkuje pouze část možných struktur OMM a má tak specifické složení OMM (Zhang et al. 2021). Lze tedy konstatovat, že koncentrace OMM v mateřském mléce se mění v rámci laktace a jsou strukturně bohatší než OMM přidávané do náhradních mléčných výživ. Na náhradní mléčné výživě Beba Comfort, která obsahuje OMM 2'-fukosyllaktosu, alespoň mírně rostly druhy *C. perfringens* a *C. tertium*. Druh *P. bifementans* přežíval, ale nerostl.

Na náhradní mléčné výživě Hipp Bio Combiotik, která obsahovala GOS, alespoň mírně rostly druhy *C. perfringens*, *C. tertium* a *P. bifementans*. Na náhradní mléčné výživě Babybio, která neobsahovala ani OMM, ani GOS, rostly druhy *C. perfringens*, *C. tertium* a *P. bifementans*. Ani na jedné z testovaných náhradních výživ nerostly druhy *Cl. difficile*, *C. butyricum* a *P. sordellii*. Lze tedy konstatovat, že *C. perfringens* rostlo jak na mateřském mléce, tak na všech testovaných výživách. Jeho kojenecké kmeny jsou tedy pravděpodobně metabolicky specializovány na tento typ substrátů. Jako méně k utilizaci kompetentní, ale velmi odolný druh, byl poté identifikován druh *P. bifementans*, který v mateřském mléce přežíval, a dokonce rostl v náhradních mléčných výživách. Na mléčných výživách byl schopný značného nárůstu i druh *C. tertium*, který však nebyl schopen růst na mateřském mléce.

Pro potvrzení či vyvrácení přežívání a růstu některých klostridiálních druhů v mateřském mléce i na jeho oligosacharidech je však třeba dalšího testování s větším počtem kmenů v rámci každého druhu. Studií, které se této problematice věnovaly není dostatek a pro většinu testovaných druhů, respektive kmenů kojeneckého původu, tedy informace o jejich schopnosti růstu v mateřském mléce a náhradních mléčných výživách chybí.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vytvoření literární rešerše na základě aktuálních vědeckých poznatků o zástupcích čeledi *Clostridiaceae* vyskytujících se v trávicím traktu kojenců. Dalším cílem bylo *in vitro* testování schopnosti růstu vybraných zástupců čeledi *Clostridiaceae* v mateřském mléce a náhradních mléčných výživách. Všechny cíle této diplomové práce byly splněny.

Hypotézou této práce byl předpoklad, že bakterie čeledi *Costridiaceae* budou utilizovat mateřské mléko a že tato schopnost bude rodově specifická. Byla otestována schopnost celkem 12 klostridiálních kmenů patřících do 7 druhů klostridií z čeledi *Clostridiaceae* a *Peptostreptococcaceae* utilizovat mateřské mléko a náhradní mléčné výživy. Obě tyto čeledi patří k řádu Clostridiales. Z čeledi *Clostridiaceae* bylo testováno 5 klostridiálních druhů (*C. butyricum*, *C. paraputificum*, *C. perfringens*, *C. tertium*, *P. bifermentans*) a z čeledi *Peptostreptococcaceae* 2 klostridiální druhy (*Cl. difficile*, *P. sordellii*). Bylo zjištěno, že druh *C. perfringens* dokáže využívat mateřské mléko a že druh *P. bifermentans* v něm dokáže přežít, ale nedokáže v něm růst. Ostatní testované druhy (*Cl. difficile*, *C. tertium*, *C. butyricum* a *Paeniclostridium sordellii*) v mateřském mléce nerostly, ani nepřeživaly. Dále bylo zjištěno, že druh *C. paraputificum* nebyl vhodný pro tuto formu *in vitro* testování, jelikož nebyl schopen růstu na pozitivní kontrole. Hypotéza tedy byla potvrzena pouze částečně. Přestože skoro všechny testované druhy klostridií mateřské mléko využívat nedokázaly, což naznačuje rodovou vlastnost klostridií, tato schopnost utilizace byla detekována pro druh *C. perfringens*. Pro ověření, zda se jedná o druhově specifickou schopnost, je nicméně nezbytné ji ověřit na větším počtu kmenů v rámci tohoto druhu. *P. bifermentans* se poté projevil jako odolný druh, který dokázal v mateřském mléce přežít, nicméně nedošlo k jeho pomnožení. Při hodnocení schopnosti utilizace náhradních mléčných výživ bylo zjištěno, že klostridiální druhy *C. perfringens* a *C. tertium* jsou schopny je využívat, vzhledem k poskytnutým substrátům. Také *P. bifermentans* byl schopen dvě ze tří výživ využít a v jedné z nich pouze přežíval. Žádný z dalších testovaných druhů nebyl schopen růstu v těchto náhradních výživách.

8 Literatura

- Aldape MJ, Bryant AE, Stevens DL. 2006. *Clostridium sordellii* Infection: Epidemiology, Clinical Findings, and Current Perspectives on Diagnosis and Treatment. *Clinical Infectious Diseases* **43**:1436-1446. DOI: <https://doi.org/10.1086/508866>.
- Allen CA, Torres AG. 2008. Host-Microbe Communication within the GI Tract. *GI Microbiota and Regulation of the Immune System*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 93-101. DOI: https://doi.org/10.1007/978-0-387-09550-9_8.
- Andreas NJ; Kampmann B, a Mehring Le-Doare K. 2015. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development* **91**:629-635. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>.
- Appert O, Garcia AR, Frei R, Roduit C, Constancias F et al. 2020. Initial butyrate producers during infant gut microbiota development are endospore formers. *Environmental Microbiology* **22**:3909-3921. DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15167>.
- Ballard O, Morrow AL. 2013. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America* **60**:49-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>.
- Berman JJ. 2019. Bacteria. Pages 39–119 In *Taxonomic Guide to Infectious Diseases*. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817576-7.00003-1>
- Bezirtzoglou E. 1997. The Intestinal Microflora During the First Weeks of Life. *Anaerobe*. **3**:173-177. DOI: <https://doi.org/10.1006/anae.1997.0102>.
- Blaschek HP, 2014. Clostridium Introduction. Pages 444-448 in Batt CA, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00067-7>.
- Bode L. 2012. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* **22**:1147-1162. DOI: <https://doi.org/10.1093/glycob/cws074>.
- Bode L. 2015. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development* **91**:619-622. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001>.
- Bode L. 2018. Human Milk Oligosaccharides in the Prevention of Necrotizing Enterocolitis: A Journey From in vitro and in vivo Models to Mother-Infant Cohort Studies. *Frontiers in Pediatrics* **6**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00385>.
- Boix-Amorós A, Martínez-Costa C, Querol A, Collado MC, Mira A. 2017. Multiple Approaches Detect the Presence of Fungi in Human Breastmilk Samples from Healthy Mothers. *Scientific Reports* **7**. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13270-x>.
- Bullen JJ, Rogers HJ, Leigh L. 1972. Iron-binding Proteins in Milk and Resistance to *Escherichia coli* Infection in Infants. *BMJ* **1**:69-75. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5792.69>.
- Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E et al. 2012. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of

- delivery. *The American Journal of Clinical Nutrition* **96**:544-551. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.037382>.
- Cai X, Peng Y, Yang G, Feng L, Tian X et al. 2023. Populational genomic insights of *Paraclostridium bifermentans* as an emerging human pathogen. *Frontiers in Microbiology* **14**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1293206>.
- Carr LE, Virmani MD, Rosa F, Munblit D, Matazel KS et al. 2021. Role of Human Milk Bioactives on Infants' Gut and Immune Health. *Frontiers in Immunology* **12**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.604080>.
- Cassir N, Benamar S, La Scola B. 2016. *Clostridium butyricum*: from beneficial to a new emerging pathogen. *Clinical Microbiology and Infection* **22**:37-45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.014>.
- Cheng L, Akkerman R, Kong C, Walvoort MTC, De Vos P. 2021. More than sugar in the milk: human milk oligosaccharides as essential bioactive molecules in breast milk and current insight in beneficial effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **61**:1184-1200. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1754756>.
- Cimmino F, Catapano A, Villano I, Di Maio G; Petrella L et al. 2023. Invited review: Human, cow, and donkey milk comparison: Focus on metabolic effects. *Journal of Dairy Science* **106**:3072-3085. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22465>.
- Ciuro J, Little T, Hiner E, Vakhariya C. 2021. *Clostridium paraputrificum*: An atypical and rare case of septic arthritis mimicking an acute sickle cell crisis. *IDCases* **23**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e01031>.
- Clare D, Catignani G, Swaisgood H. 2003. Biodefense Properties of Milk: The Role of Antimicrobial Proteins and Peptides. *Current Pharmaceutical Design* **9**:1239-1255. DOI: <https://doi.org/10.2174/1381612033454874>.
- Collado MC, Delgado S, Maldonado A, Rodríguez JM. 2009. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology* **48**:523-528. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02567.x>.
- Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. 2016. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports* **6**. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep23129>.
- Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J et al. 1994. The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**:812-826. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-812>.
- Cortes-Macías E, Selma-Royo M, García-Mantrana I, Calatayud M, González S et al. 2021. Maternal Diet Shapes the Breast Milk Microbiota Composition and Diversity: Impact of Mode of Delivery and Antibiotic Exposure. *The Journal of Nutrition* **151**:330-340. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa310>.

- Czepiel J, Drózd M, Pituch H, Kuijper EJ, Perucki W et al. 2019. *Clostridium difficile* infection: review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **38**:1211-1221. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03539-6>.
- Dalby MJ, Hall LJ. 2020. Recent advances in understanding the neonatal microbiome. *F1000Research* **9**. DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.22355.1>.
- Damaceno QS, Gallotti B, Reis IMM, Totte YCP, Assis GB et al. 2023. Isolation and Identification of Potential Probiotic Bacteria from Human Milk. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **15**:491-501. DOI z: <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09866-5>.
- Darragh A, Lönnerdal B. 2011. Milk, Human Milk. Pages 581-590 in Fuquay JW editor. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00315-0>
- Davis JCC, Totten SM, Huang JO, Nagshbandi S, Kirmiz N et al. 2016. Identification of Oligosaccharides in Feces of Breast-fed Infants and Their Correlation with the Gut Microbial Community **15**:2987-3002. DOI: <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.060665>.
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB et al. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**:14691-14696. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>.
- De Goffau MC, Lager S, Sovio U, Gaccioli F, Cook E et al. 2019. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature* **572**:329-334. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1451-5>.
- De Weerth C, Aatsinki AK, Azad MB, Bartol FF, Bode L et al. 2023. Human milk: From complex tailored nutrition to bioactive impact on child cognition and behavior. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **63**:7945-7982. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2053058>.
- Dürre P. 2001. From Pandora's Box to Cornucopia: Clostridia – A Historical Perspective. Pages 1-17 in Bahl H, Dürre P, editors. *Clostridia: Biotechnology and Medical Applications*. Wiley-VCH.
- Evyernie D, Yamazaki S, Morimoto K, Karita S, Kimura T et al. 2000. Identification and characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21, a chitinolytic, mesophilic and hydrogen-producing bacterium. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **89**:596-601. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80063-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80063-8).
- Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S et al. 2010. Intestinal Microbiota of 6-week-old Infants Across Europe: Geographic Influence Beyond Delivery Mode, Breast-feeding, and Antibiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **51**:77-84. DOI: <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181d1b11e>.
- Fenicia L, Franciosa G, Pourshaban M, Aureli P. 1999. Intestinal Toxemia Botulism in Two Young People, Caused by *Clostridium butyricum* Type E. *Clinical Infectious Diseases* **29**:1381-1387. DOI: <https://doi.org/10.1086/313497>.

- Fontaine F, Turjeman S, Callens K, Koren O. 2023. The intersection of undernutrition, microbiome, and child development in the first years of life. *Nature Communications* **14**. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39285-9>.
- Fukui M, Iwai S, Sakamoto R, Takahashi H, Hayashi T et al. 2017. *Clostridium paraputrificum* Bacteremia in an Older Patient with No Predisposing Medical Condition. *Internal Medicine* **56**:3395-3397. DOI: <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.8164-16>.
- Gabrielli O, Zampini L, Galeazzi T, Padella L, Santoro L et al. 2011. Preterm Milk Oligosaccharides During the First Month of Lactation. *Pediatrics* **128**:e1520-e1531. DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.2011-1206>.
- Galdeano CM, Perdigon G. 2006. The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* Induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity. *Clinical and Vaccine Immunology* **13**:219-226. DOI: <https://doi.org/10.1128/CVI.13.2.219-226.2006>.
- Geddes DT a Kakulas F. 2018. 7 Human Milk: Bioactive Components and Their Effects on the Infant and Beyond. In Family Larson- Rosenquist Foundation, Georg Thieme Verlag KG, editors. *Breastfeeding and Breast Milk – from Biochemistry to Impact*. The Global Health Network. DOI: <https://doi.org/10.21428/3d48c34a.de115c2a>
- Goldman AS. 1993. The immune system of human milk. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **12**:664-672. DOI: <https://doi.org/10.1097/00006454-199308000-00008>.
- Goldman AS, Chheda S, Keeney SE, Schmalstieg FC. 2017. Immunology of Human Milk. Fetal and Neonatal Physiology. S1254-1262.e5. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35214-7.00129-3>.
- Gomez-Gallego C, Garcia-Mantrana I, Salminen S, Collado MC. 2016. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* **21**:400-405. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.siny.2016.05.003>.
- Grenda T, Grenda A, Domaradzki P, Krawczyk P, Kwiatek K. 2022. Probiotic Potential of *Clostridium* spp.—Advantages and Doubts. *Current Issues in Molecular Biology* **44**:3118-3130. DOI: <https://doi.org/10.3390/cimb44070215>.
- Grześkowiak Ł, Collado MC, Mangani C, Maleta K, Laitinen K et al. 2012. Distinct Gut Microbiota in Southeastern African and Northern European Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **54**:812-816. DOI: <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318249039c>.
- Guaraldi F, Salvatori G. 2012. Effect of Breast and Formula Feeding on Gut Microbiota Shaping in Newborns. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00094>.
- Guinane CM, Cotter PD. 2013. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* **6**:295-308. DOI: <https://doi.org/10.1177/1756283X13482996>.

- Guo M, Hendricks G. 2008. Chemistry and Biological Properties of Human Milk. Pages 305-320 in Show PL, editor. *Current Nutrition & Food Science* **4**. DOI: <https://doi.org/10.2174/157340108786263667>.
- Guo P, Zhang K, Ma X, He P. 2020. *Clostridium* species as probiotics: potentials and challenges. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **11**. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0402-1>.
- Hale A, Kirby JE, Albrecht M. 2016. Fatal Spontaneous *Clostridium bifermentans* Necrotizing Endometritis: A Case Report and Literature Review of the Pathogen. *Open Forum Infectious Diseases* **3**. DOI: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw095>.
- Hansen R, Scott KP, Khan S, Martin JC, Berry SH et al. 2015. First-Pass Meconium Samples from Healthy Term Vaginally-Delivered Neonates: An Analysis of the Microbiota. *PLOS ONE* **10**. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133320>.
- Hobbs M, Jahan M, Ghorashi SA, Wang B. 2021. Current Perspective of Sialylated Milk Oligosaccharides in Mammalian Milk: Implications for Brain and Gut Health of Newborns. *Foods* **10**. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10020473>.
- Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D et al. 2022. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **7**. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>.
- Hungate RE. 1969. Chapter IV A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. *Methods in Microbiology*. 117-132. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70503-8](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70503-8).
- Ingribelli E, Modrackova N, Tejnecky V, Killer J, Schwab C et al. 2023. Culture-dependent screening of endospore-forming clostridia in infant feces. *BMC Microbiology* **23** DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03104-4>.
- Ioannou A, Knol J, Belzer C. 2021. Microbial Glycoside Hydrolases in the First Year of Life: An Analysis Review on Their Presence and Importance in Infant Gut. *Frontiers in Microbiology* **12**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.631282>.
- Jangi S, Lamont TJ. 2010. Asymptomatic Colonization by *Clostridium difficile* in Infants: Implications for Disease in Later Life. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **51**:2-7. DOI: <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181d29767>.
- Jiménez E, De Andrés J, Manrique M, Pareja-Tobes P, Tobes R et al. 2015. Metagenomic Analysis of Milk of Healthy and Mastitis-Suffering Women. *Journal of Human Lactation* **31**:406-415. DOI: <https://doi.org/10.1177/0890334415585078>.
- Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM et al. 2005. Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section. *Current Microbiology* **51**:270-274. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0020-3>.

- Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M et al. 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology* **159**:187-193. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.007>.
- Johnson EA. 2009. Clostridia. Pages 87-93 in Schaechter M, editor. *Encyclopedia of Microbiology Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123739445001395>.
- Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. 2013. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *British Journal of Nutrition* **110**:1253-1262. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114513000597>.
- Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. 2015. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutrition Reviews* **73**:426-437. DOI: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu016>.
- Kaplan JL, Shi HN, Walker WA. 2011. The Role of Microbes in Developmental Immunologic Programming. *Pediatric Research* **69**:465-472. DOI: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318217638a>.
- Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado MC, Martínez-Costa C. 2014. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *Journal of Perinatology* **34**: 599-605. DOI: <https://doi.org/10.1038/jp.2014.47>.
- Kiełbasa A, Monedeiro F, Bernatowicz-Łojko U, Sinkiewicz-Darol E, Buszewski B et al. 2024. The content of selected omega-3 free fatty acids in breast milk samples and their interactions with macronutrients as well as personal characteristics of mothers. *International Dairy Journal* **148**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105803>.
- Kiely LJ, Busca K, Lane JA, Van Sinderen D, Hickey RM. 2023. Molecular strategies for the utilisation of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **47**. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad056>.
- Kim SY, Yi DY. 2020. Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clinical and Experimental Pediatrics* **63**:301-309. DOI: <https://doi.org/10.3345/cep.2020.00059>.
- Kiu R, Caim S, Alcon-Giner C, Belteki G, Clarke P et al. 2017. Preterm Infant-Associated *Clostridium tertium*, *Clostridium cadaveris*, and *Clostridium paraputrificum* Strains: Genomic and Evolutionary Insights. *Genome Biology and Evolution* **9**:2707-2714. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evx210>.
- Kuntz S, Rudloff S, Kunz C. 2008. Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells. *British Journal of Nutrition* **99**:462-471. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114507824068>.
- Lackey KA, Williams JE, Meehan CL, Zachek JA, Benda ED et al. 2019. What's Normal? Microbiomes in Human Milk and Infant Feces Are Related to Each Other but Vary Geographically: The INSPIRE Study. *Frontiers in Nutrition* **6**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00045>.

- Laursen MF. 2021. Gut Microbiota Development: Influence of Diet from Infancy to Toddlerhood. *Annals of Nutrition and Metabolism* **77**:21-34. DOI: <https://doi.org/10.1159/000517912>.
- Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM. 2016. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* **40**:95-99. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>.
- Li W, Wang J, Lin Y, Li Y, Ren F et al. 2021. How far is it from infant formula to human milk? A look at the human milk oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* **118**:374-387. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.021>.
- Li Z, Dong N, Hao J, Ouyang Z, Qiang C et al. 2023. *Clostridioides difficile* infection in infants: a case report and literature review. *Gut Pathogens* **15**. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13099-023-00552-1>.
- Lin AE, Autran CA, Szyszka A, Escajadillo T, Huang M et al. 2017. Human milk oligosaccharides inhibit growth of group B *Streptococcus*. *Journal of Biological Chemistry* **292**:11243-11249. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.789974>.
- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. 2024. Species *Clostridioides difficile*. Available from: <https://lpsn.dsmz.de/species/clostridioides-difficile> (accessed April 2024)
- Liu B, Newburg DS. 2013. Human Milk Glycoproteins Protect Infants Against Human Pathogens. *Breastfeeding Medicine* **8**:354-362. DOI: <https://doi.org/10.1089/bfm.2013.0016>.
- Lopetuso LR, Scaldaferrri F, Petito V, Gasbarrini A. 2013. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathogens* **5**. DOI: <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-23>.
- Lopez Leyva L, Brereton NJB, Koski KG. 2021. Emerging frontiers in human milk microbiome research and suggested primers for 16S rRNA gene analysis. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **19**:121-133. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.057>.
- Lorenzo JM, Munekata PE, Dominguez R, Pateiro M, Saraiva JA et al. 2018. Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability: General Aspects and Overall Description. *Innovative Technologies for Food Preservation*. 53-107. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0>.
- Madhogaria B, Bhowmik P, Kundu A. 2022. Correlation between human gut microbiome and diseases. *Infectious Medicine* **1**:180-191. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imj.2022.08.004>.
- Mantziari A, Rautava S. 2021. Factors influencing the microbial composition of human milk. *Seminars in Perinatology* **45**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semperi.2021.151507>.
- Marcobal A, Barboza M, Froehlich JW, Block DE, German JB et al. 2010. Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Gut-Related Microbes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**:5334-5340. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf9044205>.

- Mårild K, Ye W, Lebwohl B, Green PHR, Blaser MJ et al. 2013. Antibiotic exposure and the development of coeliac disease: a nationwide case–control study. *BMC Gastroenterology* **13**. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-230X-13-109>.
- Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML et al. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics* **143**: 754-758. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.09.028>.
- Masi AC, Stewart CJ. 2022. Untangling human milk oligosaccharides and infant gut microbiome. *IScience* **25**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103542>.
- Matsumura T, Fujinaga Y, Jin Y, Kabumoto Y, Oguma K. 2007. Human milk SIgA binds to botulinum type B 16S toxin and limits toxin adherence on T84 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **352**:867-872. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.095>.
- McCracken VJ, Lorenz RG. 2001. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. Microreview. *Cellular Microbiology* **3**:1-11. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00090.x>.
- Mehdizadeh Gohari I, Navarro MA, Li J, Shrestha A, Uzal F et al. 2021. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence* **12**:723-753. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1886777>.
- Meng X, Karasawa T, Zou K, Kuang X, Wang X et al. 1997. Characterization of a neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism. *Journal of Clinical Microbiology* **35**:2160-2162. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.35.8.2160-2162.1997>.
- Metzler S, Frei R, Schmausser-Hechfellner E, Von Mutius E, Pekkanen J et al. 2019. Association between antibiotic treatment during pregnancy and infancy and the development of allergic diseases. *Pediatric Allergy and Immunology* **30**:423-433. DOI: <https://doi.org/10.1111/pai.13039>.
- Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F et al. 2017. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **81**:e00036-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>.
- Mitchell WJ. 1992. Carbohydrate assimilation by saccharolytic clostridia. *Research in Microbiology* **143**:245-250. DOI: [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(92\)90016-H](https://doi.org/10.1016/0923-2508(92)90016-H).
- Miyoshi J, Hisamatsu T. 2022. The impact of maternal exposure to antibiotics on the development of child gut microbiome. *Immunological Medicine* **45**:63-68. DOI: <https://doi.org/10.1080/25785826.2021.1963189>.
- Mohandas S, Pannaraj PS. 2020. Beyond the Bacterial Microbiome: Virome of Human Milk and Effects on the Developing Infant. Pages 86 – 93 in Ogra PL, Lönnerdal B, Walker WA, editors. Nestlé Nutrition Institute Workshop Series. Karger. <https://karger.com/books/book/348/chapter-abstract/5559594/Beyond-the-Bacterial-Microbiome-Virome-of-Human?redirectedFrom=fulltext>.

- Montagne P, Cuillière ML, Molé C, Béné MC, Faure G. 2001. Changes in Lactoferrin and Lysozyme Levels in Human Milk During the First Twelve Weeks of Lactation. *Bioactive Components of Human Milk. Advances in Experimental Medicine and Biology.* 241-247. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1371-1_30.
- Moran M, Patel SH, Kahlon G. 2023. *Clostridium Bifermentans* Infection of a Prosthetic Knee Joint in a Patient With Human Immunodeficiency Virus: A Case Report. *Cureus.* DOI: <https://doi.org/10.7759/cureus.47370>.
- Morowitz MJ, Carlisle EM, Alverdy JC. 2011. Contributions of Intestinal Bacteria to Nutrition and Metabolism in the Critically Ill. *Surgical Clinics of North America* **91**:771-785. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.suc.2011.05.001>.
- Musilova S, Modrackova N, Duskocil I, Svejstil R, Rada V. 2017. Influence of human milk oligosaccharides on adherence of bifidobacteria and clostridia to cell lines. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **64**:415-422. DOI: <https://doi.org/10.1556/030.64.2017.029>.
- Neumann-Schaal M, Jahn D, Schmidt-Hohagen K. 2019. Metabolism the Difficile Way: The Key to the Success of the Pathogen *Clostridioides difficile*. *Frontiers in Microbiology* **10**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00219>.
- Nolan LS, Parks OB, Good M. 2020. A Review of the Immunomodulating Components of Maternal Breast Milk and Protection Against Necrotizing Enterocolitis. *Nutrients* **12**. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12010014>.
- Notarbartolo V, Giuffrè M, Montante C, Corsello G, Carta M. 2022. Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children's Health. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition* **25**. DOI: <https://doi.org/10.5223/pghn.2022.25.3.194>.
- Num SM, Useh NM. 2014. *Clostridium*: Pathogenic Roles, Industrial Uses and Medicinal Prospects of Natural Products as Ameliorative Agents against Pathogenic Species. *Jordan Journal of Biological Sciences* **7**:81-94. DOI: <https://doi.org/10.12816/0008220>.
- O'Neill IJ, Sanchez Gallardo R, Saldova R, Murphy EF, Cotter PD et al. 2020. Maternal and infant factors that shape neonatal gut colonization by bacteria. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* **14**:651-664. DOI: <https://doi.org/10.1080/17474124.2020.1784725>.
- Orrell KE, Melnyk RA. 2021. Large Clostridial Toxins: Mechanisms and Roles in Disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **85**:e00064-21. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00064-21>.
- Örtqvist AK, Lundholm C, Halfvarson J, Ludvigsson JF, Almqvist C. 2019. Fetal and early life antibiotics exposure and very early onset inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gut* **68**:218-225. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314352>.
- Palmer JS, Hough RL, West HM, Avery LM. 2019. A review of the abundance, behaviour and detection of clostridial pathogens in agricultural soils. *European Journal of Soil Science* **70**:911-929. DOI: <https://doi.org/10.1111/ejss.12847>.

- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B et al. 2006. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Pediatrics* **118**:511-521. DOI: <https://doi.org/10.1542/peds.2005-2824>.
- Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. 2017. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* **5**. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0268-4>.
- Perrella S, Gridneva Z, Lai CT, Stinson L, George A et al. 2021. Human milk composition promotes optimal infant growth, development and health. *Seminars in Perinatology* **45**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semperi.2020.151380>.
- Pietrzak-Fiećko R, Kamelska-Sadowska AM. 2020. The Comparison of Nutritional Value of Human Milk with Other Mammals’ Milk. *Nutrients* **12**. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12051404>.
- Plaza-Díaz J, Fontana L, Gil A. 2018. Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. *Nutrients* **10**. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10081038>.
- Rada V, Nevoral J, Trojanová I, Tománková E, Šmehilová M et al. 2008. Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in in vitro conditions. *Anaerobe* **14**:205-208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.05.003>.
- Rada V, Splichal I, Rockova S, Grmanova M, Vlkova E. 2010. Susceptibility of bifidobacteria to lysozyme as a possible selection criterion for probiotic bifidobacterial strains. *Biotechnology Letters* **32**:451-455. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0170-7>.
- Reniker LN, Frazer LC, Good M. 2023. Key biologically active components of breast milk and their beneficial effects. *Seminars in Pediatric Surgery* **32**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sempedsurg.2023.151306>.
- Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. 2016. Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Frontiers in Microbiology* **7**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>.
- Rockova S, Nevoral J, Rada V, Marsik P, Sklenar J et al. 2011a. Factors affecting the growth of bifidobacteria in human milk. *International Dairy Journal* **21**:504-508. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.02.005>.
- Rockova S, Rada V, Marsik P, Vlkova E, Bunesova, V et al. 2011b. Growth of bifidobacteria and clostridia on human and cow milk saccharides. *Anaerobe* **17**:223-225. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.07.009>.
- Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI et al. 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health and Disease* **26**. DOI: <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>.

- Rolfe RD, Song W. 1995. Immunoglobulin and non-immunoglobulin components of human milk inhibit *Clostridium difficile* toxin A-receptor binding. *Journal of Medical Microbiology* **42**:10-19. DOI: <https://doi.org/10.1099/00222615-42-1-10>.
- Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA et al. 2018. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe* **53**:5-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>.
- Salli K, Hirvonen J, Siitonen J, Ahonen I, Anglenius H et al. 2021. Selective Utilization of the Human Milk Oligosaccharides 2'-Fucosyllactose, 3-Fucosyllactose, and Difucosyllactose by Various Probiotic and Pathogenic Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **69**:170-182. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06041>.
- Samul D, Worsztynowicz P, Leja K, Grajek W. 2013. Beneficial and harmful roles of bacteria from the *Clostridium* genus. *Acta Biochimica Polonica* **60**:515-521. DOI: <https://doi.org/10.18388/abp.2013.2015>.
- Sanidad KZ, Zeng MY. 2020. Neonatal gut microbiome and immunity. *Current Opinion in Microbiology* **56**:30-37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.05.011>.
- Sankar RU, Biswas R, Raja S, Sistla S, Gopalakrishnan MS et al. 2018. Brain abscess and cervical lymphadenitis due to *Paraclostridium bifermentans*: A report of two cases. *Anaerobe* **51**:8-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.006>.
- Satokari R, Grönroos T, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. 2009. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. *Letters in Applied Microbiology* **48**:8-12. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02475.x>.
- Sela DA, Chapman J, Adeuya A, Kim JH, Chen F et al. 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:18964-18969. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0809584105>.
- Selma-Royo M, Calvo Lerma J, Cortés-Macías E, Collado MC. 2021. Human milk microbiome: From actual knowledge to future perspective. *Seminars in Perinatology* **45**, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semperi.2021.151450>.
- Shaw AG, Cornwell E, Sim K, Thrower H, Scott H et al. 2020. Dynamics of toxigenic *Clostridium perfringens* colonisation in a cohort of prematurely born neonatal infants. *BMC Pediatrics* **20**. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12887-020-1976-7>.
- Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A et al. 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**:996-1001. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.022493799>.
- Skillington O, Mills S, Gupta A, Mayer EA, Gill CIR et al. 2021. The contrasting human gut microbiota in early and late life and implications for host health and disease. *Nutrition and Healthy Aging* **6**:157-178. DOI: <https://doi.org/10.3233/NHA-210129>.

- Soto A, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM et al. 2014. Lactobacilli and Bifidobacteria in Human Breast Milk: Influence of Antibiotherapy and Other Host and Clinical Factors. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **59**:78-88. DOI: <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000347>.
- Stark PL, Lee A. 1982. Clostridia isolated from the feces of infants during the first year of life. *The Journal of Pediatrics* **100**:362-365. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(82\)80430-7](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(82)80430-7).
- Stinson LF, Sindi ASM, Cheema AS, Lai CT, Mühlhäusler BS et al. 2021. The human milk microbiome: who, what, when, where, why, and how? *Nutrition Reviews* **79**:529-543. DOI: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa029>.
- Stoeva MK, Garcia-So J, Justice N, Myers J, Tyagi S et al. 2021. Butyrate-producing human gut symbiont, *Clostridium butyricum*, and its role in health and disease. *Gut Microbes* **13**. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1907272>.
- Stokholm J, Schjørring S, Eskildsen CE, Pedersen L, Bischoff AL et al. 2014. Antibiotic use during pregnancy alters the commensal vaginal microbiota. *Clinical Microbiology and Infection* **20**:629-635. DOI: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12411>.
- Suárez-Martínez C, Santaella-Pascual M, Yagüe-Guirao G, Martínez-Graciá C. 2023. Infant gut microbiota colonization: influence of prenatal and postnatal factors, focusing on diet. *Frontiers in Microbiology* **14**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236254>.
- Taxonomic Outline of the Archaea and Bacteria, 2015. Pages 1-17 in Trujillo ME, Dedysh S, Devos P, Hedlund B, Kämpfer P et al., editors. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118960608.bm00024>.
- Thai JD, Gregory KE. 2020. Bioactive Factors in Human Breast Milk Attenuate Intestinal Inflammation during Early Life. *Nutrients* **12**. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12020581>.
- Tirone C, Pezza L, Paladini A, Tana M, Aurilia C et al. 2019. Gut and Lung Microbiota in Preterm Infants: Immunological Modulation and Implication in Neonatal Outcomes. *Frontiers in Immunology* **10**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02910>.
- Tran NT, Li Z, Ma H, Zhang Y, Zheng H et al. 2020. *Clostridium butyricum*: a promising probiotic confers positive health benefits in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture* **12**:2573-2589. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12459>.
- Trasande L, Blustein J, Liu M, Corwin E, Cox LM et al. 2013. Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *International Journal of Obesity* **37**:16-23. DOI: <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.132>.
- Turroni F, Milani C, Duranti S, Lugli GA, Bernasconi S et al. 2020. The infant gut microbiome as a microbial organ influencing host well-being. *Italian Journal of Pediatrics* **46**. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13052-020-0781-0>.
- Ungaro R, Bernstein CN, Geary R, Hviid A, Kolho KL et al. 2014. Antibiotics Associated With Increased Risk of New-Onset Crohn's Disease But Not Ulcerative Colitis: A Meta-

- Analysis. American Journal of Gastroenterology **109**:1728-1738. DOI: <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.246>.
- Urbaniak C, Angelini M, Gloor GB, Reid G. 2016. Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. Microbiome **4**. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0145-y>.
- USDA. 2013. *Clostridium botulinum* & Botulism. Available from: <https://www.fsis.usda.gov/food-safety/foodborne-illness-and-disease/pathogens/clostridium-botulinum> (accessed March 2024).
- Valentine CJ, Wagner CL. 2013. Nutritional Management of the Breastfeeding Dyad. Pediatric Clinics of North America **60**:261-274. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.008>.
- Vanderhofstadt M, André M, Lonchay C, Levecque P, Holemans X et al. 2010. *Clostridium tertium* bacteremia: contamination or true pathogen? A report of two cases and a review of the literature. International Journal of Infectious Diseases **14**:e335-e337. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.03.004>.
- Victoria CG, Bahl R, Barros AJD, França GVA, Horton S et al. 2016. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. The Lancet **387**:475-490. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7).
- Vidor C, Awad M, Lyras D. 2015. Antibiotic resistance, virulence factors and genetics of *Clostridium sordellii*. Research in Microbiology **166**:368-374. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.09.003>.
- Weaver G, Bertino E, Gebauer C, Grovslien A, Mileusnic-Milenovic R et al. 2019. Recommendations for the Establishment and Operation of Human Milk Banks in Europe: A Consensus Statement From the European Milk Bank Association (EMBA). Frontiers in Pediatrics **7**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00053>.
- WHO. 2023a. Preterm birth. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth> (accessed January 2024).
- WHO. 2023b. Infant and young child feeding. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infant-and-young-child-feeding> (accessed January 2024).
- Wiciński M, Sawicka E, Gębalski J, Kubiak K, Malinowski B. 2020. Human Milk Oligosaccharides: Health Benefits, Potential Applications in Infant Formulas, and Pharmacology. Nutrients **12**. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12010266>.
- Wiegel J, Tanner R, Rainey FA. 2006. An Introduction to the Family Clostridiaceae. The Prokaryotes 654-678. DOI: https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_20.
- Willis CL a Gibson GR. 1999. Microflora of the intestine, The Natural Microflora of Humans. Encyclopedia of Food Microbiology 1351-1355. DOI: <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.1030>.
- Woittiez NJC, Van Prehn J, Van Immerseel F, Goossens E, Bauer MP et al. 2022. Toxinotype A *Clostridium perfringens* causing septicæmia with intravascular haemolysis: two cases

- and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases* **115**:224-228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.12.331>.
- Yu ZT, Chen C, Kling DE, Liu B, McCoy JM et al. 2013. The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology* **23**:169-177. DOI: <https://doi.org/10.1093/glycob/cws138>.
- Zerrouki H, Rebiahi SA, Elhabiri Y, Fatmi A, Baron SA et al. 2022. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Paenibacillus sordellii* in Hospital Settings. *Antibiotics* **11**. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010038>.
- Zhang B, Li LQ, Liu F, Wu JY. 2022. Human milk oligosaccharides and infant gut microbiota: Molecular structures, utilization strategies and immune function. *Carbohydrate Polymers* **276**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118738>.
- Zhang S, Li T, Xie J, Zhang D, Pi C et al. 2021. Gold standard for nutrition: a review of human milk oligosaccharide and its effects on infant gut microbiota. *Microbial Cell Factories* **20**. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01599-y>.
- Zhao H, Wang J, Peng Y, Cai X, Liu Y et al. 2022. Genomic insights from *Parabacillus bifementans* HD0315_2: General features and pathogenic potential. *Frontiers in Microbiology* **13**. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.928153>.
- Zijlmans MAC, Korpela K, Riksen-Walraven JM, De Vos WM, De Weerth C. 2015. Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota. *Psychoneuroendocrinology* **53**:233-245. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.01.006>.
- Zimmermann P, Curtis N. 2020. Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *Journal of Infection* **81**:17-47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.01.023>.
- Zou Z, Liu W, Huang C, Sun C, Zhang J. 2020. First-Year Antibiotics Exposure in Relation to Childhood Asthma, Allergies, and Airway Illnesses. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph17165700>.

9 Samostatné přílohy

9.1 Příloha 1: Mléčná kojenecká výživa Beba Comfort 1 HM-O (Nestlé) (1vz)

Složení: Pitná voda, odtučněné mléko 15 %, laktóza, rostlinné oleje (slunečnicový s vysokým obsahem kyseliny olejové, řepkový nízkoeurukový, slunečnicový), sušená syrovátka, minerální látky (vápenaté soli kyseliny citronové, citronan draselný, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, chlorid sodný, vápenaté soli kyseliny fosforečné, síran železnatý, síran zinečnatý, síran měďnatý, síran manganatý, jodid draselný, selenan sodný), 2'-fukosyllaktosa, emulgátor (sójový lecitin), rybí olej, olej z *Mortierella alpina*, cholin bitartát, L-fenylalanin, vitamíny (L-askorbát sodný, DL-alfa-tokoferyl-acetát, nikotinamid, D-pantothenát vápenatý, retinyl-acetát, thiamin-mononitrát, pyridoxin-hydrochlorid, riboflavin, kyselina listová, fyllochinon, cholekalcierol, D-biotin, kyanokobalamin), taurin, inositol, L-histidin, nukleotidy (kyselina cytidin-5'-fosforečná (CMP), sodné soli kyseliny uridin-5'-fosforečné (UMP), kyselina adenosin-5'-fosforečná (AMP), sodné soli kyseliny guanosin-5'-fosforečné (GMP), L-karnitin.

Výživové údaje na 100 ml výživy: energie 280 kJ/67 kcal; tuky 3,6 g, z toho: nasycené mastné kyseliny 0,3 g, mononenasycené mastné kyseliny 2,2 g, polynenasycené mastné kyseliny 0,7 g, kyselina linolová 556 mg, kyselina α -linolenová 46 mg, kyselina arachidonová 17 mg, kyselina dokosaheptaenová 17 mg; sacharidy 7,5 g, z toho: cukry 7,3 g, z toho: laktóza 7,3 g; vláknina 0,1 g; bílkoviny 1,2 g; sůl 0,05 g; minerální látky: sodík 21 mg, draslík 77,1 mg, vápník 42,6 mg, fosfor 23,6 mg, hořčík 5,68 mg, mangan 0,02 mg, selen 3,6 μ g, železo 0,31 mg, jód 14,9 μ g, měď 0,05 mg, zinek 0,48 mg, chloridy 50,4 mg, fluoridy < 0,01 mg; vitamíny: vitamín A 60,1 μ g, vitamín D 1,5 μ g, vitamín E 1,5 mg, vitamín K 4,2 μ g, vitamín C 10 mg, thiamin/vitamín B1 0,06 mg, riboflavin/vitamín B2 0,20 mg, niacin 0,51 mg, vitamín B6 0,04 mg, kyselina listová 13,3 μ g, kyselina pantothenová 0,52 mg, vitamín B12 0,20 μ g; ostatní látky: biotin 1,4 μ g, cholin 22 mg, inositol 9,0 mg, taurin 4,0 mg, karnitin 1,1 mg, nukleotidy 2,1 mg, 2'-fukosyllaktosa 0,1 g

9.2 Příloha 2: Mléčná kojenecká výživa Hipp Bio Combiotik Anfangsmilch (2vz)

Složení: mléčná syrovátka, odtučněné mléko, smetana, laktóza (z mléka), rostlinné oleje (slunečnicový, řepkový), galaktooligosacharidy z laktózy (z mléka), emulgátor lecitin, rybí olej, olej z *Mortierella alpina*, vápenaté soli kyseliny citronové, cholin, draselné soli kyseliny citronové, chlorid vápenatý, vápenaté soli kyseliny ortofosforečné, L-fenylalanin, chlorid draselný, L-askorbát sodný + askorbyl-L-palmitan (vitamín C), chlorid sodný, hydroxid draselný, citronan sodný, L-tryptofan, L-histidin, síran zinečnatý, síran železnatý, hydroxid hořečnatý, nikotinamid, DL-alfa-tokoferyl acetát (vitamín E), síran měďnatý, D-pantothenát vápenatý, thiamin hydrochlorid (vitamín B1), retinyl acetát (vitamin A), hydrochlorid pyridoxinu (vitamin B6), jodičnan draselný, Metafolin® (L-methylfolát vápenatý),

seleničitan sodný, fytomenadion (vitamín K), síran manganatý, cholekalciferol (vitamín D), D-biotin, kyanokobalamin (vitamín B12)

Výživové údaje/100 ml: energetická hodnota 278 kJ/67 kcal; tuky 3,6 g, z toho nasycené mastné kyseliny 1,6 g, mononenasycené mastné kyseliny 1,5 g, polynenasycené mastné kyseliny 0,5 g (z toho AA kyselina arachidonová 13,4 mg, DHA kyselina dokosaheptaenová 13,4 mg); sacharidy 7,1 g, z toho cukry 7,1 g (laktóza 7,1 g, inositol 5,8 mg); vláknina 0,3 g, z toho GOS galaktooligosacharidy 0,3 g; bílkoviny 1,3 g, z toho L-karnitin 1,2 mg; minerální látky: sodík 20 mg, draslík 67 mg, chlorid 52 mg, vápník 52 mg, fosfor 30 mg, hořčík 4,5 mg, železo 0,60 mg, zinek 0,50 mg, měď 0,054 mg, mangan 0,0050 mg, fluoridy < 0,0050 mg, selen 3,9 µg, jód 15 µg; vitamíny: vitamín A 55 µg, vitamín D 1,5 µg, vitamín E 0,70 mg, vitamín K 5,2 µg, vitamín C 8,9 mg, vitamín B1 0,050 mg, vitamín B2 0,20 mg, niacin 0,34 mg, vitamín B6 0,029 mg, kyselina listová (folát)* 10 µg (16,6 µg), vitamín B12 0,10 µg, biotin 1,5 µg, kyselina pantothenová 0,34 mg, cholin 26 mg. Hodnoty podléhají výkyvům typické pro přírodní suroviny. *Metafolin® je registrovaná ochranná známka společnosti Merck KGaA, Darmstadt, SRN.

9.3 Příloha 3: Mléčná kojenecká výživa Babybio (3vz)

Složení: částečně odstředěné mléko, voda, kukuřičné maltodextriny, laktóza, řepkový a slunečnicový olej, minerální látky (citrát sodný, citrát hořečnatý, chlorid draselný, bikarbonát sodný, síran železnatý, hydroxid draselný, sírany zinku, mědi a manganu, jodid draselný, seleničitan sodný), emulgátor slunečnicový lecitin, olej z *Cryptocodinium cohnii*, vitamíny (C, E, B3, B5, B1, B6, B2, A, B9, K, B8, D, B12), antioxidant: extrakt bohatý na tokoferoly

Výživové údaje na 100 ml: energetická hodnota 281 kJ/67 kcal; tuky 3 g, z toho: nasycené mastné kyseliny 0,9 g, kyselina linolová 407 mg, kyselina alfa-linolenová 57 mg, kyselina dokosaheptaenová DHA 17 mg; sacharidy 8,4 g, z toho cukry 5 g (z toho laktóza 5 g); bílkoviny 1,6 g; vitamíny: A 60 µg, D 1,6 µg, E 1 mg α-tokoferol, K 4,2 µg, C 7,5 mg, thiamin 90 µg, riboflavin 120 µg, niacin 0,7 mg, B6 66 µg, kyselina listová 17 µg-EFA, B12 0,2 µg, biotin 1,9 µg, kyselina pantothenová 0,3 mg; minerální soli: sodík 29 mg, draslík 82 mg, chlorid 54 mg, vápník 55 mg, fosfor 44 mg, hořčík 6 mg, železo 1,2 mg, zinek 0,5 mg, měď 50 µg, jód 15 µg, selen 3 µg, mangan 3 µg, fluor <15 µg.