

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Vliv mateřského mléka před a po pasterizaci na střevní
mikrobiotu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Iva Mrvíková

Obor studia: Výživa a potravinářství

Vedoucí práce: Ing. Šárka Musilová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Roman Švejtil

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv mateřského mléka před a po pasterizaci na střevní mikrobiotu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Šárce Musilové, Ph.D. za její vstřícnost a odborné vedení při zpracování diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Ing. Romanu Švejstilovi a Bc. Nikol Modráčkové za pomoc a rady v laboratoři.

V neposlední řadě bych také ráda poděkovala všem ochotným maminkám a jejich dětem, bez kterých by tato práce nevznikla. A samozřejmě své rodině a přátelům za materiální i psychickou podporu po celou dobu mého studia.

Vliv mateřského mléka před a po pasterizaci na střevní mikrobiotu

Souhrn

Mateřské mléko je nejvhodnější stravou pro kojence, dodává mu vyvážený poměr živin a je lehce stravitelné. Je zdrojem mnoha významných látek, které vedou ke správnému růstu a vývoji dítěte. Tyto látky napomáhají mimo jiné rozvoji střevní mikrobioty a podporují jeho imunitní systém.

Cílem této práce bylo otestovat vliv nepasterizovaného a pasterizovaného mateřského mléka na střevní mikrobiotu kojence u dětí porozených přirozeně a císařským řezem. A dále pak zjištění bakteriálního složení pasterizovaných a nepasterizovaných mlék. V práci je také popsáno složení střevní mikrobioty kojence a její postupný vývoj.

Mateřské mléko bylo rozděleno na dvě části. Jedna byla ponechána nepasterizovaná a druhá byla pasterizována při teplotě 62,5 °C po dobu 30 min. Na mikrotitrační destičku se nanoslo pasterizované i nepasterizované mateřské mléko a byl přidán inokulát kojenecké stolice. Následovala anaerobní kultivace při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po kultivaci se stanovovaly tyto bakterie: celkové počty, bakterie rodu *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *E. coli*, *Enterococcus* a Gram (-) bakterie. Složení střevní mikrobioty kultivované v nepasterizovaném i v pasterizovaném mateřském mléce se statisticky významně nelišilo ($P < 0,05$).

Dále pak bylo zjišťováno bakteriální složení mateřských mlék, u nichž se stanovovaly celkové počty bakterií, bakterie rodu *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a aerobní bakterie. Ty byly následně izolovány a identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Zde byly identifikovány zejména bakterie druhu *Propionibacterium acnes*, které se běžně vyskytují na kůži člověka, ale i bakterie rodu *Lactobacillus* a to konkrétně *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus plantarum*.

Klíčová slova: mateřské mléko, pasterizace, mikrobiota mléka, střevní mikrobiota

Influence of human milk on the intestinal microbiota before and after pasteurization

Summary

Human milk is the best food for infants, it is a source of important components for the infant growth and a development as well. Human milk is also a good source of energy and nutrients for the bacteria in the intestinal tract of the infant.

The aim of this thesis was to test the impact of unpasteurized and pasteurized human milk to the intestinal tract of the infants. And then to determine the bacterial composition of pasteurized and unpasteurized human milk. The thesis is also focused on the composition of the intestinal tract of the infant and its development.

Human milk was divided into two portions. The first was unpasteurized and second was pasteurization for 62,5 °C/30 minutes. Both milks were inoculated in to the microtitre plate with the baby stool and incubated in 37 °C for 24 hours. After the cultivation, it was determined the total count of bacteria, bifidobacteria, lactobacilli, *E. coli*, enterococci and gram-negative bacteria. There were no significant differences ($P < 0,05$) between pasteurized and unpasteurized human milk.

We also determined the bacterial composition of human milk. Total counts of bacteria, bifidobacteria, lactobacilli and aerobic bacteria were analysed was and subsequently isolated and identified by MALDI-TOF mass spectrometry. Most frequently identified bacterial strain was *Propionibacterium acnes*, which is found on human skin, but we found also bacteria of the genus *Lactobacillus*, namely *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum*.

Keywords: human milk, pasteurization, microbiota of milk, gut microbiota

Obsah

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Úvod | 1 |
| 2 | Cíl práce..... | 2 |
| 2.1 | Hypotéza..... | 2 |
| 3 | Přehled literatury | 3 |
| 3.1 | Mateřské mléko | 3 |
| 3.1.1 | Složení mateřského mléka | 3 |
| 3.1.1.1 | Kolostrum..... | 6 |
| 3.1.1.2 | Zralé mateřské mléko | 7 |
| 3.1.2 | Vliv mateřského mléka na zdraví kojence | 7 |
| 3.1.3 | Náhražky mateřského mléka..... | 8 |
| 3.1.3.1 | Mateřské mléko z mléčných bank..... | 10 |
| 3.1.3.2 | Porovnání mateřského mléka s mléky ostatních savců | 14 |
| 3.2 | Střevní mikrobiota | 15 |
| 3.2.1 | Složení střevní mikrobioty | 16 |
| 3.2.1.1 | Složení střevní mikrobioty kojence..... | 17 |
| 3.2.2 | Funkce střevní mikrobioty | 19 |
| 3.2.3 | Vliv mateřského mléka a jeho náhražek na mikrobiotu kojence | 22 |
| 4 | Materiál a metody | 23 |
| 4.1 | Kultivace střevní mikrobioty kojence v mateřském mléce | 23 |
| 4.1.1 | Příprava vzorků mateřského mléka..... | 23 |
| 4.1.2 | Odběr a příprava vzorků kojenecké stolice..... | 23 |
| 4.1.3 | Rozbor střevní mikrobioty kojence bez kultivace (0 hodin)..... | 23 |
| 4.1.4 | Rozbor střevní mikrobioty kojence po kultivaci v mateřském mléku | 24 |
| 4.2 | Rozbor mateřského mléka..... | 25 |
| 4.2.1 | Příprava vzorků mateřského mléka..... | 25 |
| 4.2.2 | Rozbor vzorků mateřského mléka | 25 |
| 4.2.3 | Identifikace bakterií mateřského mléka pomocí MALDI..... | 27 |
| 4.3 | Vyhodnocení výsledků | 27 |
| 5 | Výsledky..... | 28 |
| 5.1 | Rozbor střevní mikrobioty kojence | 28 |
| 5.2 | Rozbor střevní mikrobioty kojence po kultivaci v mateřském mléku | 29 |
| 5.3 | Rozbor mateřského mléka..... | 30 |
| 5.4 | Identifikace bakterií mateřského mléka pomocí MALDI | 32 |
| 6 | Diskuse | 34 |
| 6.1 | Střevní mikrobiota u kojenců porozených přirozeně a císařským řezem | 34 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 6.2 | Rozdíl mezi pasterizovaným a nepasterizovaným mateřským mlékem na mikrobiotu kojence | 35 |
| 6.3 | Bakterie v mateřském mléku | 35 |
| 7 | Závěr | 37 |
| 8 | Přílohy | 38 |
| 9 | Seznam literatury | 42 |

1 Úvod

Mateřské mléko je přirozenou a vyváženou stravou pro kojence. Obsahuje správný poměr živin v průběhu celé laktace a je pro kojence lehce stravitelné. Je zdrojem mnoha významných látek, které přispívají ke zdravému růstu a vývoji dítěte. Mezi tyto látky patří například oligosacharidy, vitamíny, minerály a dále také bioaktivní komponenty mateřského mléka. Všechny tyto látky napomáhají rozvoji střevní mikrobioty a tím podporují rozvoj imunitního systému dítěte nebo jeho mentální vývoj.

Ovšem ne všechny matky mohou plně kojit, a proto existuje několik alternativ. Jednou z nich je mléko z mléčných bank. V České Republice se nachází celkem pět bank mateřského mléka, a to v Praze, České Lípě, Českých Budějovicích, Hradci Králové a Mostě. I když se může zdát, že bank je dostatek ani zdaleka nepokrývají poptávku.

Před darováním mateřského mléka musí dárkyně projít nezbytným vyšetřením. Musí mít potvrzení od obvodního či závodního lékaře, být vyšetřena na HIV, hepatitidu B a další přenositelné onemocnění. I přes všechna tato opatření se mléko po odběru pasterizuje, a to při teplotě 62,5 °C po dobu 30 min. Při tomto postupu se inaktivují možné viry, ale také se ovlivňují nutriční a imunologické vlastnosti mléka. Proto lze předpokládat, že takto pasterizované mléko bude mít určitý vliv na střevní mikrobiotu kojence.

Tato práce se zabývá možným vlivem nepasterizovaného a pasterizovaného mateřského mléka na střevní mikrobiotu kojence u dětí porozených přirozeně a císařským řezem a dále pak samotným bakteriálním složením těchto mlék.

Dále je zde popsáno složení střevní mikrobioty kojence a její vývoj v průběhu prvních let života dítěte.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo otestovat vliv nepasterizovaného a pasterizovaného mateřského mléka na střevní mikrobiotu kojence u dětí porozených přirozeně a císařským řezem. A dále pak zjištění bakteriálního složení pasterizovaných a nepasterizovaných mlék.

2.1 Hypotéza

Pasterizací budou inaktivovány některé antimikrobiální látky mateřského mléka, a proto po inokulaci kojenecké stolice na něm poroste větší množství bakterií než v mléce nepasterizovaném.

3 Přehled literatury

3.1 Mateřské mléko

Mateřské mléko je často nazýváno „zlatým standardem“ pro výživu kojence v prvních měsících jeho života (Bode, 2009). Je zdrojem bioaktivních látek pro zdravý růst a vývoj kojence (Jeong et al., 2012), zároveň je také nejpřirozenějším a nejbezpečnějším druhem jeho výživy. Dodává mu správný poměr živin a je lehce stravitelné (Bode, 2009).

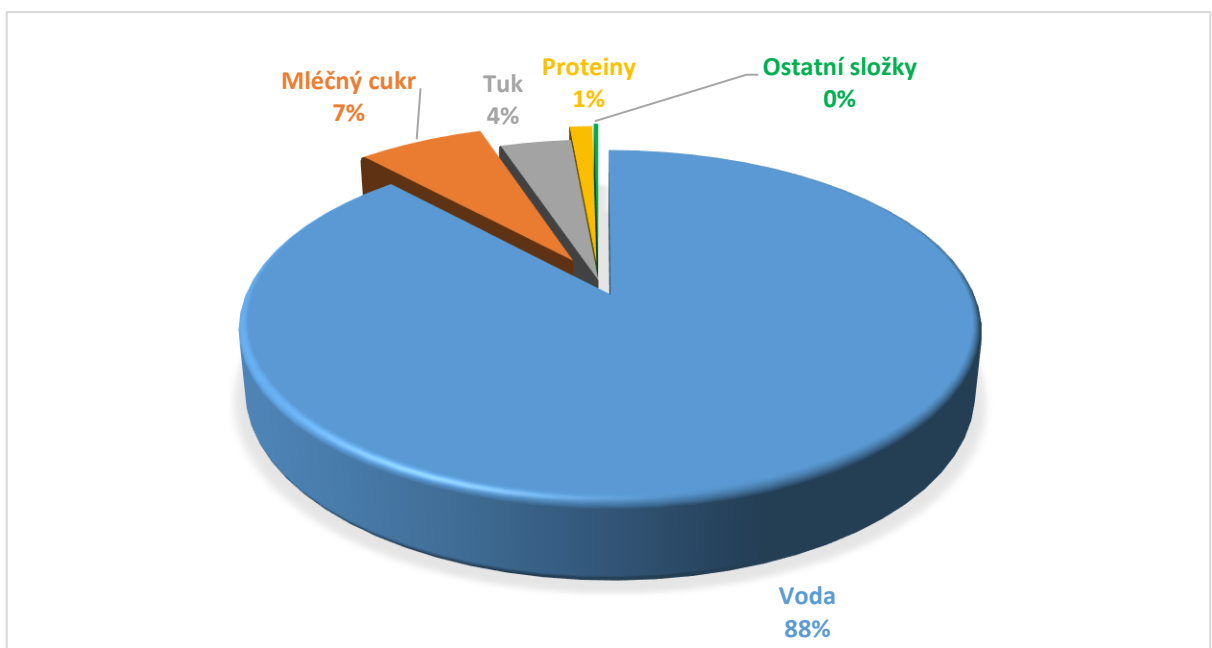
Mléko je složeno z různorodých látek, jako jsou sacharidy (zejména oligosacharidy), aminokyseliny, vitamíny a minerály, které podporují rozvoj střevní mikrobioty během raného dětství (McVea et al., 2000; Kramer et al., 2008; Reilly et al., 2005). Podle období laktace můžeme mateřské mléko rozdělit na kolostrum, které je produkováno první dny po porodu a na mléko zralé (Kulski and Hartmann, 1981).

3.1.1 Složení mateřského mléka

Mateřské mléko je odlišné od mlék jiných savců. Jeho složení je přizpůsobené pro správný růst a vývoj kojence. Složení je jedinečné v závislosti na matce, její stravě a období laktace (WHO, 1979).

Hlavní složky mateřského mléka jsou: voda, proteiny, tuk, sacharidy (zejména laktosa a oligosacharidy), minerály a vitamíny (WHO, 1979).

(Obr. 1) Složení mateřského mléka



Dané schéma (Obr. 1) nám ukazuje, že ve složení mateřského mléka převládá voda (88,17 %), dále pak mléčný cukr (6,7 %), tuk (3,7 %), proteiny (1,2 %). Ostatní složky mateřského mléka jsou pouze v zastoupení 0,23 % a však i tyto složky jsou nepostradatelné pro správný vývoj kojence (WHO, 1979; Havlík and Marounek, 2013).

Mateřské mléko můžeme rozdělit podle období laktace na kolostrum neboli mlezivo a zralé mateřské mléko. Jejich složení se mění v průběhu laktace v závislosti na potřebách kojence (Tab. 1.).

(Tab. 1) Srovnání složení zralého mateřského mléka a kolostra

| Obsah g/l | Zralé mateřské mléko | Kolostrum |
|----------------|----------------------|-----------|
| Proteiny | 12 | 20 |
| Tuk | 40 | 20 |
| Laktosa | 68 | 55 |
| Oligosacharidy | 15 | 24 |

(Havlík and Marounek, 2013; modifikováno)

Makronutrienty

Mateřské mléko je složeno ze 4 hlavních složek: proteinů, tuků, laktosy a oligosacharidů. Jejich zastoupení je patrné v Obr. 1. Složení makronutrientů se liší v závislosti na období laktace. Je výrazný rozdíl v obsahu živin u kolostra a zralého mléka. Od čtvrtého měsíce po porodu je složení mateřského mléka ještě více závislé na matce, a to zejména na její tělesné hmotnosti, příjmu bílkovin, návratu menstruace a frekvenci kojení. Ve studii bylo také prokázáno, že u matek, které produkují více mléka, je koncentrace tuků a bílkovin nižší a koncentrace laktosy vyšší (Nommsen et al., 1991).

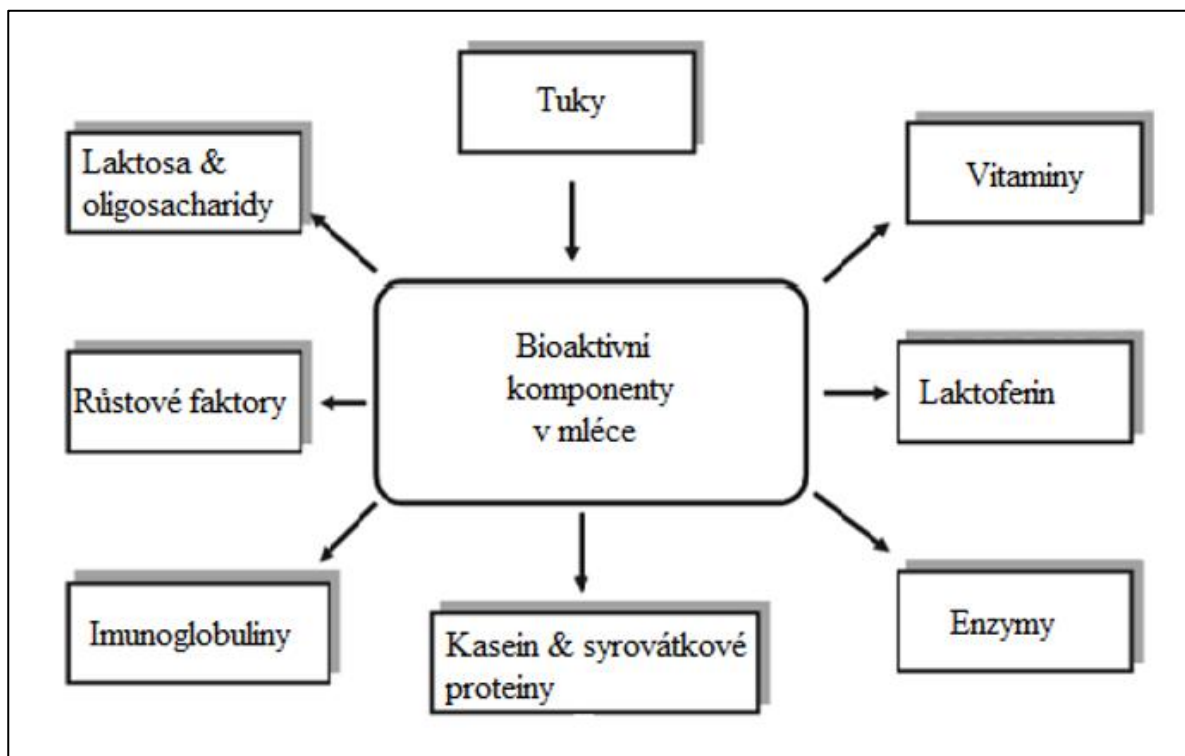
Mikronutrienty

Většina stopových prvků mateřského mléka je závislá na stravě matky a její tělesné konstituci. V mateřském mléce je obecně však velmi nízká koncentrace vitamínu D a K, u nichž je doporučeno, aby se přidávaly do matčiny stravy (Greer, 2001; Allen, 2012). Další možností, jak dětem doplnit vitamín D, je formou perorálních kapek. Jednou z variant může být přípravek Vigantol. Ten je předepisován českými pediatry jako prevence a léčba chorobných stavů způsobeným nedostatkem vitamínu D. Přípravek Vigantol obsahuje cholekalciferol (vitamín D₃), který se v těle mění na aktivní látku dihydrocholecalciferol, jež ovlivňuje metabolismus

vápníku v organismu. Tento přípravek je možné podávat kojenců od druhého týdne života a doporučená doba léčby je jeden rok (SÚKL, 2015).

Bioaktivní komponenty

(Obr. 2) Schéma ukazující hlavní bioaktivní komponenty v mateřské mléce (Park, 2009)



„Bioaktivní komponenty mateřského mléka představují spojení nutričních a imunologických vlastností, které se uplatňují paralelně. To znamená, že kromě energetického zisku jsou významné svou ochrannou funkcí“ (Frühauf, 2009). Novorozenec se rodí s téměř nevyvinutým imunitním systémem, a reflexy poznávat své okolí pomocí ohmatávání a vkládání cizích předmětů do úst. Tento fakt má za následek, že mateřské mléko je bohatým zdrojem bioaktivních a imunologických sloučenin s výraznými antimikrobiálními účinky. Bioaktivita mateřského mléka může ovlivnit zdraví kojence mnoha různými způsoby, včetně přímé inhibice patogenů, nebo jejich navázání, neutralizací mikrobiálních toxinů nebo modifikací střevní mikrobioty (Newburg and Walker 2007).

Bioaktivní komponenty v mateřském mléce pocházejí z různých zdrojů. Některé jsou produkovány a vylučovány z prsního epitelu, jiné zase z mateřského séra (Garofalo, 2010). Příkladem bioaktivních komponentů může být imunoglobulin A (IgA) nebo vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF-A a VEGF-B) (Van de Perre, 2003). Další bioaktivní složky mateřského mléka jsou uvedeny v Tab. 2.

Bakterie v mateřském mléce

Dříve bylo mateřské mléko považováno za zcela sterilní tekutinu, ovšem v dnešní době se objevují názory a studie, že bakterie obsahuje (Gueimonde et al., 2007). Některé studie prokázaly, že mateřské mléko zdravých žen obsahuje až 10^5 KTJ/ml bakterií (Martín et al., 2003). Na bakteriálním složení mateřského mléka se podílí mnoho faktorů. Může to být například BMI matky, způsob porodu nebo fáze laktace (Cabrera-Rubio et al., 2012; Khodayar-Pardo et al., 2014). Způsob, jakým se dostávají bakterie do mléka se nazývá aktivní migrace a však přesný mechanismus nebyl zatím objasněn. Předpokládá se ale, že důležitou roli zde hrají dendritické buňky a makrofágy (Rescigno et al., 2001).

V mateřském mléce jsou nejčastěji stanoveny a izolovány bakterie těchto rodů: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Otázkou však zůstává, jedná-li se pouze o primární mikrobiotu, protože není úplně jasné, zda lze mateřské mléko odebrat zcela asepticky. Mateřské mléko však díky tomu lze pokládat i za probiotickou stravu novorozenců v prvních týdnech jejich života (Gueimonde et al., 2007).

3.1.1.1 Kolostrum

Kolostrum neboli mlezivo (také někdy nazýváno jako první mléko) je hustá smetanovo-žlutá tekutina, která je produkována v prvních dnech po porodu.

Je bohaté na imunologické komponenty, jako jsou imunoglobulin A (IgA), laktoferin, leukocyty a také na růstové faktory jako je například epidermální růstový faktor (Castellote et al., 2011; Pang and Hartmann, 2007; Kulski and Hartmann, 1981). Kolostrum se od zralého mléka liší zejména v množství bílkovin a sacharidů. Obsah bílkovin je výrazně vyšší a obsah sacharidů je výrazně nižší (Jenness, 1979). Rozdíly jsou patrné i v odlišném obsahu minerálních látek. Hladiny chloridu sodného a hořčíku jsou vyšší a hladiny draslíku a vápníku nižší než ve zralém mléku (Pang and Hartmann, 2007; Kulski and Hartmann, 1981). Ve chvíli, kdy se začne měnit poměr draslíku a vápníku, tedy dochází k poklesu koncentrace draslíku a zvýšení koncentrace vápníku, dochází k aktivaci a sekreci přechodného mléka. K tomu obvykle dochází během několika prvních dnů. Opožděný nástup přechodného mléka je brán po 72 hodinách po porodu a častěji se vyskytuje u obézních matek nebo u předčasných porodů (Henderson et al., 2008; Nommsen-Rivers et al., 2012).

3.1.1.2 Zralé mateřské mléko

Od 5. dne do 2 týdnů po porodu je již mateřské mléko z velké části zralé a v období 4 až 6 týdnů po porodu je již zcela zralé. Tyto rychlé změny ve složení mléka jsou důležité a kopírují potřeby rychle rostoucího kojence (Kulski and Hartmann, 1981). Zralé mateřské mléko obsahuje 3 – 5 % tuku, 0,8 – 0,9 % bílkovin, 6,9 – 7,2 % sacharidů a 0,2 % minerálních látek. Energetická hodnota mateřského mléka je 65 – 75 kcal na 100 ml (Jenness, 1979).

V průběhu laktace se obsah tuku nijak výrazně nemění, ale změny v jeho obsahu kolísají během dne (Jenness, 1979).

3.1.2 **Vliv mateřského mléka na zdraví kojence**

Existuje vazba mezi mateřským mlékem a vývojem, růstem a zdravím kojence. Mateřské mléko prošlo 200 miliony let vývoje až do současné podoby. Jeho složení není důležité pouze pro výživu kojence, poskytuje také nesčetné bioaktivní sloučeniny, které ovlivňují růst, stimulaci a modulaci imunitního systému, kognitivní vývoj, ochranu před toxiny a patogenním onemocněním (Daniels and Adair, 2005; German et al., 2002; Harmsen et al., 2000).

Mateřské mléko obsahuje také různé druhy látek, mezi jejichž funkce patří chránit prsní žlázy matky před záněty a poskytovat ochranu kojenci v době, kdy jeho imunitní systém je stále ještě nevyvinutý (Brandtzaeg, 2003; Hanson et al., 2003; Lönnerdal, 2003). Tabulka 2 uvádí bioaktivní složky mléka, které mají vliv na zdraví kojence.

Bylo prokázáno, že mateřské mléko snižuje úmrtnost předčasně narozených dětí s velmi nízkou a extrémně nízkou porodní hmotností (Lucas and Cole, 1990; Schanler et al. 2005) a dále jim poskytuje výhody v podobě zlepšení obranyschopnosti imunitního systému, lepšího vývoje nervové soustavy a gastrointestinálního traktu (Morales and Schanler, 2007).

(Tab. 2) Bioaktivní složky mléka

| | |
|-------------------------|------------------|
| Adiponektin | κ -Kasein |
| Antisekreční lektiny | Lactadherin |
| Askorbát | Laktoferin |
| α -Laktoglobulin | Laktoperoxidáza |
| α -Tokoferol | Leptin |
| B-buňky | Leukocyty |
| Bifidogenní peptidy | Lysozym |

| | |
|---|---|
| Bifidogenní faktor | Makrofágy |
| β -Defenzin-1 | Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem |
| β -Karoteny | Mastné kyseliny se středním řetězcem |
| Bombesin | Muciny |
| Cystein | <i>N</i> -Acetyl-glukosamin |
| Epidermální růstové faktory (EGF, HB-EGF) | Nervové růstové faktory |
| Erytropoetin | Neurotensin |
| Estrogen, progesteron | Neurotrotsin |
| Faktor nádorové nekrózy (TNF- α) | Nukleotidy |
| Fibroblastový růstový faktor | Oligosacharidy |
| Gangliosidy | Osteoprotegerin (OPG) |
| Gastrin | Peptidy YY |
| Ghrelin | Prebiotika |
| Glutathionperoxidáza | Prolaktin |
| Gonádotropin | Protilátky nukleotidové hydrolýzy |
| Haptokorin | RANTES |
| Hormony hypotalamu | Růstové faktory granulocytů |
| Hormony štítné žlázy | Růstové faktory hepatocytů |
| Choriogonádotropin | Somatostatin |
| Inhibitor proteázy | T-buňky |
| Inzulinu podobné růstové faktory (IGF-I, II) | TLRs (Toll-like receptory) |
| Interlektiny | Transformující růstový faktory (TGF- α , β) |
| Inzulin | Vasoaktivní intestinální peptid |
| Kataláza | Volný sekreční protein |
| Kortisol | Žaludeční inhibiční polypeptid (GIP) |
| Krevní destičky aktivující faktor acetylhydrolázy | |

(Ewaschuk et al., 2011)

3.1.3 Náhražky mateřského mléka

Náhražky mateřského mléka jsou produkty na bázi kravského mléka nebo mlék jiných savců, které se ukázaly být vhodné pro výživu kojenců. Kojenecká výživa musí podporovat normální růst a vývoj dětí a její energetická hodnota by měla být v rozmezí 60 – 75 kcal na 100 ml (Life Sciences Research Office 1988; Scientific Committee on Food, 2003).

Předlohou pro výrobu náhražek mateřského mléka je zralé mateřské mléko. Přestože umělá kojenecká výživa se podobá vlastnímu mateřské mléku, stále existuje mnoho rozdílů v obsahu živin, a to zejména v oblasti energetické hodnoty, množství proteinů, lipidů a železa (Wells, 1996).

Některé látky se však synteticky vyrobit nemohou. Jsou to zejména bioaktivní komponenty a mateřské protilátky, které chrání kojence před onemocněním a infekcemi (Cleary, 2004). Umělá kojenecká výživa může mít odlišný účinek na kognitivní vývoj dítěte. Faktory (cholesterol, dlouhé řetězce polynenasycených mastných kyselin, růstové faktory, hormony, vitamíny, minerální látky), které podporují rozvoj centrálního nervového systému, buď chybí, nebo se v těchto náhražkách vyskytují ve výrazně nižším množství než u mateřského mléka (Banapurmath et al., 1996).

Rozdíl mezi mléčnou náhražkou a kojením není pouze ve složení, ale také například v ceně. Pokud se matka rozhodne pro umělou kojeneckou výživu, může ji to měsíčně stát až o více jak 2000 Kč. V ceně není pouze samotná mléčná náhražka, ale také vše potřebné pro její přípravu a uchování (Labusová, 2008).

(Tab. 3) Rozdíl mezi vlastnostmi mateřského mléka a jeho náhražkami

| Mateřské mléko | Náhražka mateřského mléka |
|--|---|
| Nesterilní, proměnné v obsahu a chuti | Sterilní, neproměnné v obsahu a chuti |
| Obsahuje neesenciální mastné kyseliny: kyselinu arachidonovou, kyselinu dekosahexaenovou | Až do nedávné doby obsahovala pouze esenciální mastné kyseliny |
| Vysoký obsah cholesterolu (110 – 140 mg/l) | Nízký obsah cholesterolu (až 3x méně) |
| Faktory podporující rozvoj nervového systému (hormony štítné žlázy, oligosacharidy, stimulující hormony, růstové faktory, ...) | Žádné hormony nebo růstové faktory |
| Živé buňky a proteiny s imunoprotektivní funkcí: protilátky, imunoglobuliny, lysozym, laktoferin, peroxidasy | Nevrozené imunoprotektivní vlastnosti |
| Obsahuje vitamíny a minerály | Obsahuje stejné vitamíny a minerály, často i ve vyšších koncentracích |
| Obsahuje nečistoty z potravy od matky | Žádné nečistoty, neměnné složení |

(Baker et al., 1998; Scariati et al., 1997)

V současné době mezi alternativy mateřského mléka nepatří pouze kojenecká výživa ve formě náhražek mateřského mléka, ale také mateřské mléko z mléčných bank. Tyto alternativy jsou vhodné pro matky, které nechtějí nebo nemohou kojit.

3.1.3.1 Mateřské mléko z mléčných bank

Jak již bylo řečeno, mateřské mléko je jedinou fyziologickou potravou pro novorozence a kojence a je doporučeno jako výživa pro všechny děti včetně těch předčasně narozených (Mydlilová, 2006). Nicméně matky předčasně narozených dětí nejsou často schopny poskytovat dostatečné množství mléka. Ve studii Schanler et al., 2005 uvádí, že pouze 27 % matek je schopných poskytnout dostatečné množství mléka předčasně narozeným dětem.

Problémy s kojením však nemají pouze matky předčasně narozených dětí, ale i ostatní. Důvodů, které zabraňují kojení je celá řada. Mezi nejčastější problémy patří různé druhy infekcí a zánětů mléčných žláz, ucpaný mlékovod, slabý vypuzovací reflex, nedostatek mléka, bolestivé nalití prsů, nebo i lenost kojence (Mydlilová, 2006).

Jestliže dítě nemůže být z jakýchkoli důvodů kojeno, měla by mu být poskytnuta plnohodnotná náhrada. Z tohoto důvodu začaly po celém světě vznikat banky mateřského mléka (Mydlilová, 2006).

První mléčná banka byla založena ve Vídni již roku 1907 (Mydlilová, 2006). Od té doby se jejich počet rozrostl a tím se zvýšila i možnost nákupu mateřského mléka. Například ve Velké Británii je 17 bank, které dodávají mateřské mléko (Wight, 2001). V České republice se nachází celkem pět bank mateřského mléka, a to v Praze, České Lípě, Českých Budějovicích, Hradci Králové a Mostě. Nejstarší bankou v ČR je banka v Hradci Králové, která byla založena roku 1958 (Mydlilová, 2006).

Dárcovské mateřské mléko je alternativní forma mléka, pokud matka nemá svoje mléko k dispozici nebo ho má nedostatek (Wight, 2001). Názory na výživu dárcovským mateřským mlékem se liší po celém světě. Z řady světových publikací a zkušeností světových bank mateřského mléka (Kanada, USA, Anglie, Francie, Austrálie) vyplývá, že používání mléka z bank hraje důležitou roli v redukci mortality a morbidit u kriticky nemocných a nedonošených dětí (Mydlilová, 2006).

Provoz bank je finančně velmi náročný, a to hlavně díky náročnému ošetření mléka a také nezbytnému vyšetření dárcovských matek. Dárkyně musí být zdravá (potvrzení od obvodního či závodního lékaře) a vyšetřena na HIV, HBsAg (proteinový antigen značící probíhající hepatitidu B), BWR (sérologická reakce používaná ke screeningu syfilis), AST, ALT

(specifické testy pro stanovení poškození jaterních buněk), výtěry – krk, stolice, vyšetření moče (Rothová, 2012; Mydlilová, 2006).

Výkupní cena mléka je 200 Kč/l a prodejní až 900 Kč/l (Rothová, 2012). Zatímco například ve Francii je činnost mléčné banky dotována státem, VZP produkty mléčných bank ze seznamu hrazeného biologického materiálu v roce 2007 vypustila. Mateřské mléko z banky sice může dítěti předepsat jeho obvodní lékař, ale protože by ho musel hradit ze svého paušálu, tak k tomu v praxi nedochází (Vokurková, 2013).

Prioritu v odběru mléka mají novorozenecká oddělení, ale v případě, že je mléka dostatek je možné prodávat mléko matkám domů (Rothová, 2012). Bohužel poptávka po mateřském mléku značně převyšuje nabídku, a proto se často mléko z banky dostane jen dětem v nemocnici. Pořadník dětí je následující: přednost mají děti nedonošené a nemocné na jednotce resuscitační péče, pak děti na jednotce intenzivní péče, odrůstající nedonošené děti, děti na oddělení fyziologických novorozenců a teprve poté je mléko k dispozici k prodeji matkám. Zájem o koupi mateřského mléka je veliký, dětí je hodně a mléčných bank je pouze pět (Vokurková, 2013).

V důsledku velké poptávky vznikl dokonce i černý trh s mateřským mlékem, v takovémto případě, ženy nabízejí přes internet vlastní mléko, které ale nemusí být ošetřeno a může být zdrojem i potenciálně patogenních bakterií a virů. Neošetřené dárcovské mléko může pro kojence představovat i fatální zdravotní komplikace (Conley, 2010).

Od roku 1987 je v ČR zakázáno dle doporučení WHO (Světová zdravotnická organizace) kojit dítě cizí matkou či krmit dítě cizím neošetřeným mateřským mlékem a prodej mateřského mléka na černém trhu se tak v České Republice stává nelegální (Mydlilová, 2006). Situace s prodejem, popřípadě darováním mateřského mléka ve světě je velmi různá. Například v jiných případech velmi striktní a přísné Spojené státy americké prodej, darování, popřípadě nakupování mateřského mléka nijak neregulují. Mateřské mléko se zde nepovažuje za „tělní tekutinu“ (jako u nás), ale za „potravu“, a proto pro něj platí jiná pravidla než pro krev nebo lidské orgány (Měchurová, 2015). V USA je sdílení mateřského mléka běžnou a dobře zavedenou praxí. V roce 2010 byla v USA založena webová stránka Eats on Feets sloužící právě ke sdílení mateřského mléka mezi matkami (Conley, 2010). V roce 2012 existovalo na sociální síti Facebook více než 170 skupin v 50 státech zabývajících se právě nabídkou a poptávkou po mateřském mléce (Gribble, 2014).

Problematika manipulace s kojeneckou výživou a odstříkaným mateřským mlékem je v České Republice právně ukotvena vyhláškou Ministerstva zdravotnictví ČR č. 137/2004 Sb.:

Vyhláška o hygienických požadavcích na stravovací služby a o zásadách osobní a provozní hygieny při činnostech epidemiologicky závažných, § 46 a 47.

3.1.3.1.1 Důvody pasterizace mateřského mléka

Všechny banky mateřského mléka jsou povinny darované mateřské mléko pasterizovat. Pasterizační teplota byla stanovena na prvním celosvětovém kongresu s názvem „Human Milk Banking“ v Hradci králové v roce 1981 na 62,5 °C po dobu 30 min (Mydlilová, 2006; Orloff et al., 1993; McDougal et al., 1985). Tato teplota bezpečně inaktivuje HIV, CMV. Virus HIV je termolabilní s inaktivací 56 °C za 10 min (Eglin and Wilkinson, 1987). To však platí pro virus, který je volně přítomný v extracelulární fázi mléka. Pro virus zabudovaný intracelulárně se doporučuje časový interval prodloužit na 30 min a použít teplotu 62,5 °C (Silvestre, et al., 2008). Kromě toho tato teplota ničí i jiné termolabilní viry. Po pasterizaci se mléko zchladí na teplotu 4 °C nebo se zmrazí na teplotu – 18 °C. Pokud je mléko pouze zchlazeno, použitelnost je 24 hodin, při zmrazení se prodlužuje na 3 měsíce. Tento postup inaktivuje možné viry, ale také ovlivňuje nutriční a imunologické vlastnosti mateřského mléka. Například se odhaduje, že se při tomto procesu zničí 34 % imunoglobulinu G (IgG). Nelze předpokládat, že darované mateřské mléko, které je takto upravené, bude mít stejné vlastnosti, a hlavně účinek jako vlastní mateřské mléko (Wight, 2001).

3.1.3.1.2 Vliv pasterizace na mateřské mléko

Pasterizace mateřského mléka není bez vedlejších účinků. Je všeobecně známo, že způsobuje kvalitativní i kvantitativní změny ve složení mléka, a to zejména v jeho obsahu bílkovin (Peila et al., 2016).

Vliv pasterizace na nebioaktivní složky mléka

Množství makronutrientů v pasterizovaném mléce se výrazně nemění (Braga and Palhares, 2007; Góes et al., 2002), dokonce bylo zjištěno, že obsah volných mastných kyselin se v pasterizovaném mléku zdvojnásobil v porovnání s mlékem nepasterizovaným (Lepri et al., 1997).

Minerály a vitamíny obecně přežívají pasterizační teploty bez změny, s výjimkou vitamínu B₁₂, jehož obsah se snižuje až o 48 % a vitamínu D, jehož ztráty jsou po pasterizaci 10 až 20 %. Zinek, železo a měď zůstávají po pasterizaci v podobném množství jako před pasterizací (Silvestre et al., 2008a, Gomes et al., 2016).

Vliv pasterizace na bioaktivní složky mléka

Zatímco u neimunitních složek mateřského mléka nejsou prokázány výrazné změny způsobené pasterizační teplotou, u imunitních složek je tomu naopak. Oficiální pasterizační teplota (62,5 °C, 30 min) plně deaktivuje všechny buněčné složky mléka, včetně T-buněk, B-buněk, makrofágů a neutrofilů (Björkstén et al., 1980; Lawrence, 1999; Liebhaber et al., 1977). K výraznému snížení došlo i u imunoglobulinů IgA a IgG, laktoferinu, lysozymu a erythropoietinu (Czank et al., 2009; Koenig et al., 2005, Untalan et al., 2009).

Pasterizace však neovlivňuje množství oligosacharidů mateřského mléka. Ty jsou zodpovědné za bifidogenní účinky mléka (Bertino et al., 2008).

I přes snížení nebo úplné zničení některých bioaktivních komponentů mléka má pasterizované mléko výrazné účinky. Udržuje si schopnost indukovat proliferaci T-buněk a poskytovat inhibici růstu bakterií *E. coli* (Silvestre et al., 2008b; Untalan et al., 2009).

(Tab. 4) Efekt pasterizace na složky mateřského mléka

| Složky mateřského mléka | Následek pasterizace |
|---|-------------------------|
| Amyláza | Snížení aktivity o 15 % |
| B-buňky, T-buňky | Zničení |
| Sůl žlučové kyseliny závislá na lipáze | Zničení |
| Tuk | Žádný efekt |
| Vápník | Žádný efekt |
| Měď | Snížení o 8 % |
| Inhibitor <i>E. coli</i> | Snížení o 26 % |
| Epidermální růstový faktor | Žádný efekt |
| Erythropoetin | Výrazné snížení |
| Volné mastné kyseliny | 80 % nárůst |
| Imunoglobuliny: | |
| IgA, sIgA | Snížení o 0 – 48 % |
| IgG | Snížení o 34 % |
| IgM | Zničení |
| Inzulinu podobné růstové faktory (IGF- I, II) | Snížení o 7 – 39 % |
| Interleukin (IL-10) | Výrazné snížení |
| Železo | Snížení o 15 % |
| Laktát | Snížení o 7 % |

| Složky mateřského mléka | Následek pasterizace |
|---|----------------------|
| Laktosa | Žádný efekt |
| Lipoprotein lipasa | Zničení |
| Lysin | Výrazné snížení |
| Lysozym | Snížení o 24 – 60 % |
| Lymfocyty | Zničení |
| Hořčík | Žádný efekt |
| Oligosacharidy | Žádný efekt |
| Fosfor | Žádný efekt |
| Draslík | Žádný efekt |
| Proteiny | Žádný efekt |
| Sodík | Žádný efekt |
| Transformující růstové f. (TGF- α , TGF- β) | Žádný efekt |
| Vitamín A | Žádný efekt |
| Zinek | Snížení o 3 % |

(Ewaschuk et al., 2011)

3.1.3.2 Porovnání mateřského mléka s mléky ostatních savců

Mateřské mléko obsahuje jedinečnou kombinaci látek, která se liší od mlék jiných savců (Tab. 5). Společně s mléky ostatních primátů má nízkou energetickou a výživou hodnotu v porovnání s jinými mléky (Gallagher, 1992).

Mateřské mléko je na rozdíl od mlék ostatních savců bohatým zdrojem bioaktivních látek včetně oligosacharidů (Hickey, 2012).

(Tab. 5) Srovnání mléka mateřského s kravským

| | Mateřské mléko | Kravské mléko |
|---------------------|----------------|---------------|
| Složení | | |
| Sušina (%) | 12,3 | 13,0 |
| Proteiny (%) | 1,2 | 3,5 |
| Tuk (%) | 3,7 | 4,0 |
| Sacharidy (%) | 6,7 | 4,7 |
| Minerální látky (%) | 0,23 | 0,77 |
| Ca (g/l) | 0,34 | 1,3 |

| | Mateřské mléko | Kravné mléko |
|-----------------------|--|--|
| Fe (g/l) | 1,2 | 6,2 |
| Porovnání | | |
| Proteiny | Kaseiny:laktalbumin = 0,6:1 | Kaseiny:syrovátka = 4:1 |
| Tuk | Většina VMK nenasycených 3 – 4 % esenciální VMK | Většina VKM nenasycených 1 % esenciálních VKM |
| Sacharidy | 67 – 72 g/l | 45 – 50 g/l |
| Z toho oligosacharidy | 15 – 20 g/l | 0,03 – 0,06 g/l |
| Vitamíny | Více vitamínů A, C, E | Více vitamínů B, D |
| Bifidogenní faktor | Přítomen | Nepřítomen |

(Havlík and Marounek, 2013; modifikováno)

3.1.3.2.1 Vliv pasterizace na mléko ostatních savců

Jak už jsem zmiňovala, bylo prokázáno, že bílkoviny obsažené v mléce jsou velmi citlivé na zpracování. Proto byla provedena studie, která si kladla za cíl zkoumat změny stavů bílkovin v mléce skotu, velbloudů a koz po zmrazení, sušení a pasterizaci (62 °C, 30 min).

Obsah proteinů se v séru významně snížil u vše třech zpracování. Některé proteiny byly extrémně citlivé na teplo např. laktoferin nebo lactadherin. Jejich ztráta byla po pasterizaci 25 až 85 %. Změna obsahu mléčných bílkovin byla jednak v jejich koncentraci po zpracování, tak i mezi různými druhy (Zhang et al., 2016).

3.2 Střevní mikrobiota

Střevní mikrobiota je složitý komplexní ekosystém sčítající několik stovek různých bakteriálních druhů. Tato mikrobiota hraje důležitou roli v lidském zdraví a výživě (Guarner and Malagelada, 2003; Kirjavainen et al., 2002). Mezi hlavní funkce střevní mikrobioty patří metabolické aktivity, které pomáhají s trávením některých složek potravin a napomáhají lepšímu vstřebávání živin. Má důležité účinky na imunitu člověka a střevní epitel. Zabraňuje kolonizaci nežádoucími bakteriemi a nárůstu počtu již přítomných patogenů (Guarner and Malagelada, 2003). Dále se také předpokládá, že mikrobiota gastrointestinálního traktu je spojena s četnými nemocemi dospělých i dětí včetně rakoviny žaludku, zánětlivého onemocnění střev nebo nekrotizující enterokolitidou (Parsonnet et al., 1991; Lecuit et al., 2004; Ott et al., 2004; Seksik et al., 2003; Fell, 2005).

3.2.1 Složení střevní mikrobioty

Střevní mikrobiota člověka obsahuje více než 500 bakteriálních druhů. Má více než 10^{14} bakteriálních buněk (Obr. 3), toto číslo je až 10x větší, než je počet somatických buněk a její hmotnost činí cca 1,5 – 2 kg (Konturek et al., 2015).

(Obr. 3) Střevní mikrobiota (Konturek et al., 2015)

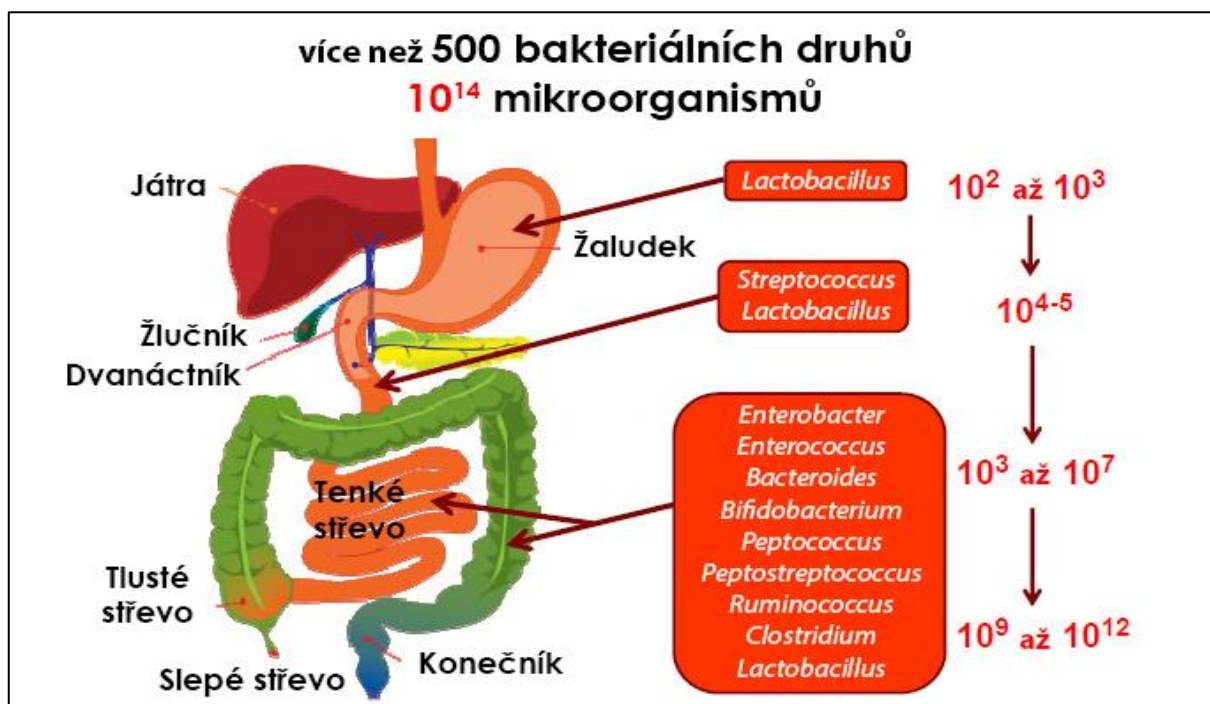


Schéma (Obr. 3) nám ukazuje rozložení střevní mikrobioty v celé délce trávicího traktu včetně počtu mikroorganismů.

Lidská střevní mikrobiota je pozoruhodně různorodá. Kolonizace střeva mikroorganismy začíná už při porodu a prostředí, ve kterém žije dítě v raném stádiu života, hraje klíčovou roli v rozvoji zdravé mikrobioty. Jakmile je plně vyvinutá poskytuje mnoho důležitých funkcí. V současné době rozeznáváme 4 různé fylogenetické skupiny (*Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* a *Proteobacteria*) (Obr. 4). Tyto skupiny se skládají převážně z anaerobních druhů. Počet genů mikrobioty převyšuje až 100x lidské geny (Power et al., 2014).

Z klinického hlediska nejvíce mikrobiálních druhů může být identifikováno nezávislými metodami, jako je 16S ribozomální RNA sekvenční metoda. Důležité přitom je, že každý jedinec má jedinečnou skladbu střevní mikrobioty, což znamená, že může fungovat jako „otisk prstu“. Složení zůstává relativně stabilní od pozdního dětství až do stáří, kdy dojde ke změnám v důsledku stárnutí (Petschow et al., 2013; Sun and Chang, 2014). Stárnutí je spojeno se změnami v rozmanitost druhů. Převažuje rod *Bacteroides*, mění se množství bakterií rodu

Clostridium, zvyšuje se enterobakteriální populace a snižuje se počet bakterií rodu *Bifidobacterium* (Arumugam et al., 2011; Claesson et al., 2011).

Složení střevní mikrobioty ovlivňuje strava, životní styl, lékařské zákroky včetně farmakologické léčby, užívání antibiotik. Porucha homeostázy může mít za následek poruchu obranyschopnosti proti patogenům a metabolitům (Goulet, 2015). Mikrobiální rozmanitost je charakteristická zvýšením metabolismu, odolností vůči infekcím a zánětům, odolností proti rakovině střeva. Střevní mikrobiota ovlivňuje i funkce střevní bariéry, zejména její propustnosti, jakož i buněčné proliferace a produkce imunoglobulinu IgA a defensinů (Bercik et al., 2012).

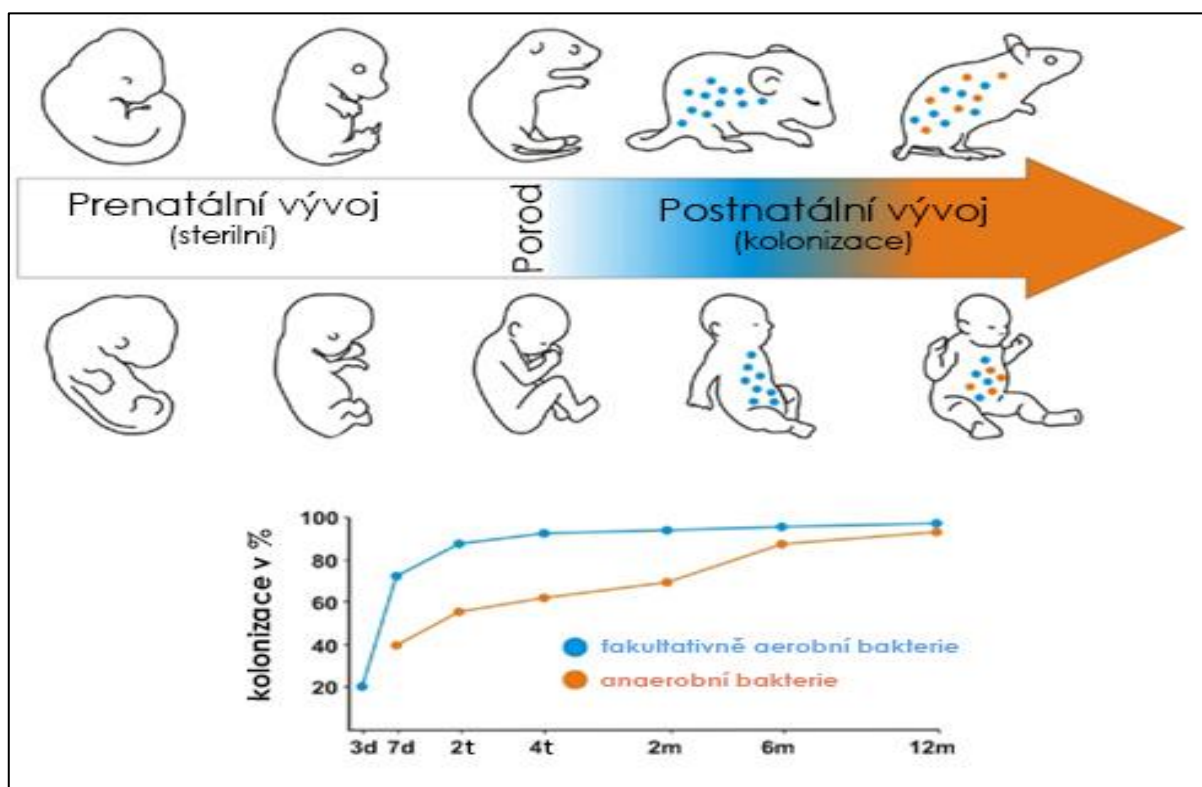
3.2.1.1 Složení střevní mikrobioty kojence

V děloze je trávicí trakt kojence sterilní, ovšem okamžitě během porodu je kolonizován nesčítelným množstvím vaginálních, fekálních a dalších bakterií vyskytujících se v okolním prostředí kojence. Prvních pár týdnů po porodu jsou střeva kolonizována. Bakteriální kolonizace gastrointestinálního traktu je ovlivněna řadou faktorů jako například stravou (u kojenců zejména mateřským mlékem), životním prostředím, antibiotickou léčbou, zráním a stářím sliznice střeva (Hooper et al., 2004).

Vzhledem k množství kyslíku nacházejícímu se v kojenecké stravě představují první kolonizátoři trávicího traktu hlavně fakultativně aerobní bakterie (Obr. 4). Zejména se tedy jedná o *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* a *Streptococcus*. Nejvíce jsou zastoupeny *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*, dále pak *Klebsiella* a *Enterobacter*. Velmi vzácně jsou v trávicím traktu novorozence zastoupeny bakterie rodů *Aeromonas*, *Pseudomonas* a *Acinetobacter*. Jejich expanze vede ke spotřebě kyslíku a tím se podporuje množení obligátně anaerobních bakterií s dominancí rodů *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Veillonella*, *Eubacterium* a *Ruminococcus* (Penders et al., 2006; Adlerberth a Wold, 2009; Vael a Desager, 2009).

Střevní mikrobiota kojence je složena z bakterií, které jsou ze tří hlavních zdrojů: od matky, především vaginální a střevní mikrobiota, z mateřského mléka (u kojených dětí) a z okolního prostředí, ve kterém se dítě nachází. Faktory ovlivňující mikrobiální kolonizaci lze rozdělit do dvou hlavních kategorií. První je vnější, které zahrnují geografickou oblast, bakterie z okolního prostředí, způsob porodu, hygienické a stravovací návyky. A druhé je vnitřní, mezi něž patří genetika novorozence, střevní pH a sekrety, peristaltika a imunitní reakce (Mackie et al., 1999; Penders et al., 2006; Adlerberth a Wold, 2009; Fallani et al., 2010).

(Obr. 4) Vývoj střevní mikrobioty u kojenče



(Grenham et al., 2011)

Kolonizace trávicího traktu začíná během porodu, a to převážně fakultativně aerobními bakteriemi (modrá), až později probíhá kolonizace anaerobními bakteriemi (oranžová). Přibližně od prvního roku života je složení mikrobioty stabilní a podobné jako v dospělosti (Grenham et al., 2011).

Ovlivnění střevní mikrobioty kojenče císařským řezem

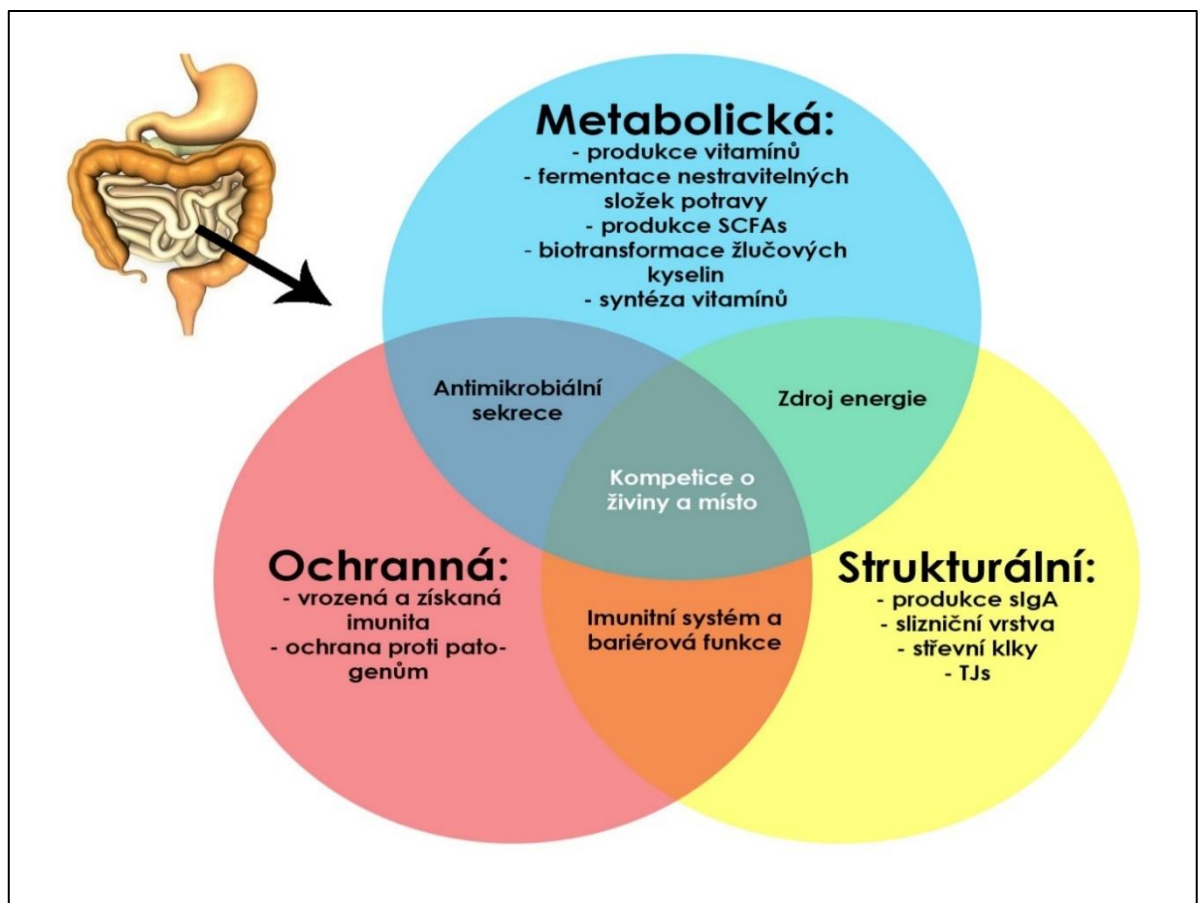
Císařský řez byl znám už ve středověku. Zmínky o něm jsou zaznamenány v textech z Mezopotámie i Egypta. V novověku jsou zmínky o císařském řezu od 16. století. Nejčastějším důvodem pro provedení zákroku byla zúžená pánev, kdy nebylo možné plod vytáhnout. Výsledky tohoto zákroku však byly velmi špatné, umíralo 60 – 90 % matek. Objev antibiotik po druhé světové válce omezil řadu infekčních onemocnění spojených s tímto zákrokem, a proto došlo k výraznému nárůstu porodů touto cestou. V současnosti je frekvence císařských řezů v USA nad 30 % a u nás to bylo v roce 2011 téměř 25 %. Častější porody císařským řezem jsou spjaty s vyšším věkem rodiček a s rozvinutou neonatologickou péčí, která umožňuje přežití i velmi nedonošených dětí (Gregora, 2013; Roztočil, 2008).

Probíhá mnoho studií, které se zabývají vlivem císařského řezu na kojence ať už z pohledu jeho zdravotního stavu, obezity nebo rozvoje střevní mikrobioty. Ve studii, která porovnávala obsah bifidobakterií a laktobacilů ve stolici kojenečích dětí narozených přirozeně a císařským řezem byly v prvních dnech po porodu zjištěny vyšší hladiny bifidobakterií u dětí porozených přirozenou cestou než ve skupině dětí narozených císařským řezem. Zatímco růst bifidobakterií byl porodem císařským řezem ovlivněn negativně, rozvoj laktobacilů byl zřejmě vlivem kojení na stejné úrovni jako u dětí porozených přirozeně (Chen et al., 2007; Gregora, 2013; Musilova et al., 2015).

3.2.2 Funkce střevní mikrobioty

Střevní mikrobiota je nezbytně důležitá pro správný vývoj střeva, homeostázi a ochranu proti patogenům, a proto je někdy právem označována za další orgán lidského těla (Konturek et al., 2015).

(Obr. 5) Funkce střevní mikrobioty



(Grenham et al., 2011)

(SCFA = „short chain fatty acids“ - mastné kyseliny s krátkým řetězcem, TJs = „tight junctions“ – těsné spoje epitelu střeva tvořené specifickými proteiny)

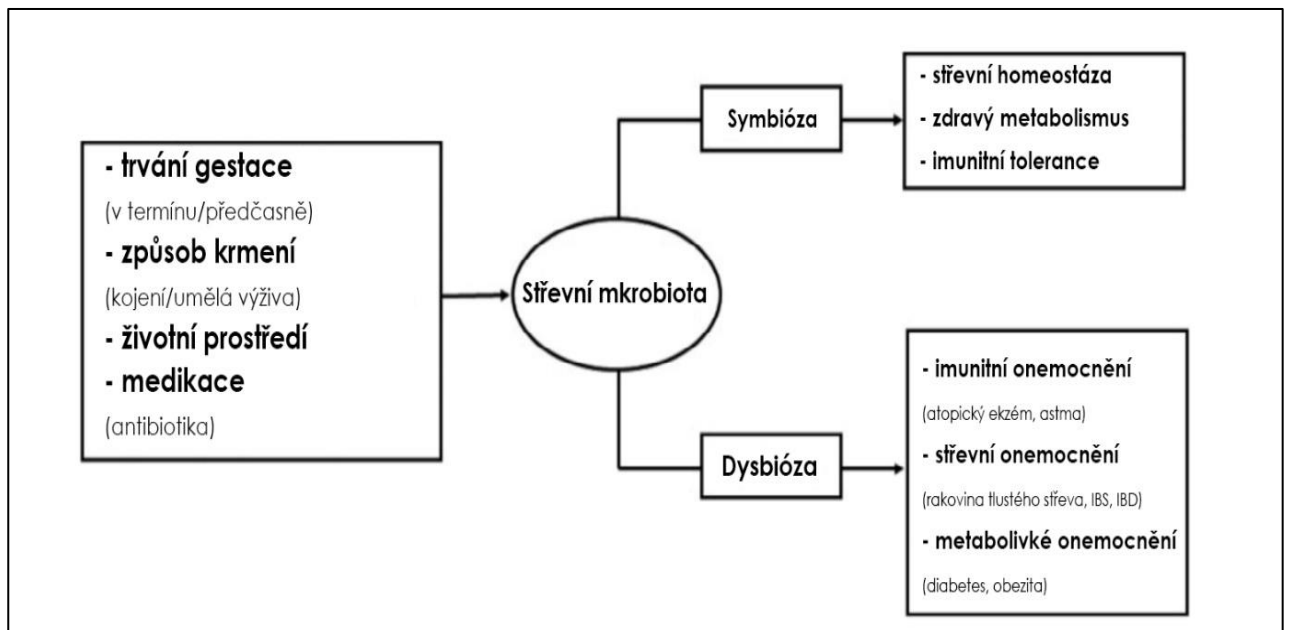
Metabolická funkce

Bakterie trávicího traktu hrají velmi významnou roli v metabolismu některých složek potravin zejména vlákniny, biotransformace žlučových kyselin, degradace oxalátových komplexů a syntéza vitamínů B₁₂ a K. Dále také regulují metabolismus cholesterolu, detoxikují jedy a pomáhají udržovat normální hodnotu pH žaludku (Cebra, 1999; Nicholson et al., 2005).

Role mikrobioty na zdraví člověka

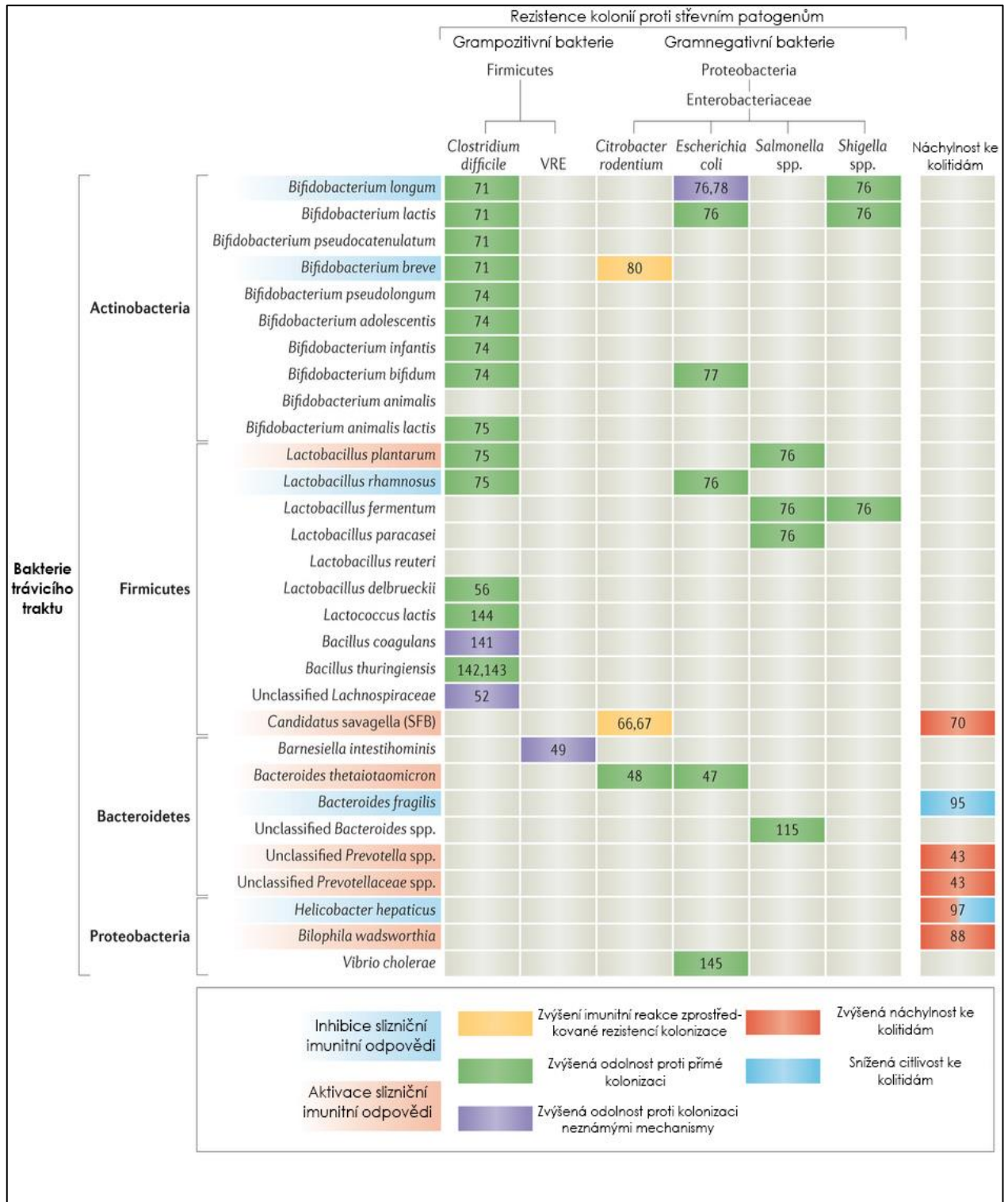
Z imunologického hlediska jsou mikroorganismy považovány za patogeny a imunitní systém člověka je rozpoznává a eliminuje. Nicméně většina střevních bakterií je nepatogenních a žijí společně s enterocyty v symbióze. Mikroorganismy pomáhají v metabolismu léčiv, zabráňují kolonizaci patogenními mikroorganismy a hrají důležitou roli ve funkci střevní bariéry (Konturek et al., 2015). Narušení stability mikrobioty může být spojováno s několika klinickými stavy (Obr. 6), jako jsou nozokomiální infekce, nekrotizující enterokolitida u předčasně narozených dětí, zánětlivé onemocnění střev, autoimunitní choroby nebo alergie (Goulet, 2015).

(Obr. 6) Ilustrace možného ovlivnění střevní mikrobioty a její následný dopad na zdraví člověka



(Goulet, 2005)

(Obr. 7) Fylogenetické skupiny střevních bakterií, které ovlivňují imunitu člověka a jejich odolnost střevním patogenům



(Buffie and Pamer, 2013)

Jednotlivé druhy bakterií, které ovlivňují imunitní reakci člověka, byly rozděleny mezi čtyři hlavní fylogenetické skupiny, které tvoří většinu střevní mikrobioty. Fylogeneticky různorodá skupina komensálních bakterií může potlačit imunitní odpovědi (modré), což často usnadňuje

kolonizaci střevních klků a někdy i zmírňuje zánětlivé infekce, jako je kolitida (modré buňky). Výrazně působí na aktivaci slizniční imunitní odpovědi i fylogeneticky příbuzné skupiny symbiotických bakterií (červené). Podskupina těchto prozánětlivých bakterií je spojována s rozvojem kolitidy (červené buňky), v kombinaci s některými bakteriemi však posilují imunitu vůči střevním patogenům (žluté buňky). Ostatní komensální bakterie vylučují antimikrobiální faktory, nebo jinak narušují růst a rozvoj střevních patogenů (*in vitro*), což naznačuje, že tyto komensální bakterie přímo antagonizují patogeny (zelené buňky). Další komensální bakterie inhibují infekce s patogeny (*in vivo*), ale závislost této inhibice na imunitě nebo jiných faktorech je nejasný (fialové buňky). Referenční čísla jsou uvedena v buňkách tabulky (Buffie and Pamer, 2013).

3.2.3 Vliv mateřského mléka a jeho náhražek na mikrobiotu kojence

Mikrobiota trávicího traktu kojence je velmi proměnná oproti mikrobiotě dospělého člověka. Mění se její složení mikroorganismů i stabilita v závislosti na čase. V prvním roce života je trávicí trakt dítěte postupně osidlován od téměř úplné sterility až po extrémně husté osídlení, které je v podstatě velmi podobné tomu, které nalézáme u dospělých jedinců (Stark and Lee, 1982).

Jedním velmi důležitým faktorem ovlivňujícím střevní mikrobiotu kojence je strava. Mateřské mléko představuje komplexní potravu pro dítě. Mléko ovlivňuje mikrobiotu přímo tím, že poskytuje substráty pro bakteriální profílaci a funkce a také je zdrojem kontaminace. Nepřímo tím, že moduluje morfolgie buněk, složení a fyziologii sliznice střev a ovlivňuje pankreatické funkce (Mackie et al., 1999; Le Huërou-Luron et al., 2010).

V posledních dvou desetiletích byly provedeny studie u novorozenců ve věku čtyř týdnů a starších s použitím kultivačních i molekulárních metod. Ve většině případů nebyly zjištěny žádné významné rozdíly ve složení mikrobioty dětí kojených mateřským mlékem a u dětí krmených umělou výživou. Naopak bylo pozorováno až zdvojnásobení počtu bakteriálních buněk u kojených dětí ve srovnání s dětmi na umělé výživě (Mackie et al., 1999; Penders et al., 2006).

4 Materiál a metody

4.1 Kultivace střevní mikrobioty kojence v mateřském mléce

4.1.1 Příprava vzorků mateřského mléka

K mé diplomové práci bylo použito 9 vzorků mateřského mléka, které byly odebrány v množství přibližně 10 ml do sterilních zkumavek. Následně jsem každý vzorek rozdělila na dvě části. Jedna část byla ponechána v nepasterizovaném stavu a druhá byla pasterizována ve vodní lázni (Medingen WBT 6, LaboMS spol. s r. o.) při teplotě 62,5 °C po dobu 30 min.

4.1.2 Odběr a příprava vzorků kojenecké stolice

Vzorky kojenecké stolice byly odebírány od dětí ve věku 4 týdny až 6 měsíců, které byly plně kojeny bez příkrmů, probiotik a bez antibiotické léčby. Vzorek byl odebírán sterilní lžičkou do zkumavky s bujónem (Wilkins-Chalgren anaerobe broth + Soya Peptone + Glycerol), obsah zkumavky byl probublán CO₂, aby bylo vytvořeno vhodné prostředí pro anaerobní bakterie. Postup odběru vzorku viz Příloha 1. Zkumavka s bujónem byla zvážena před odebráním a po odebrání vzorku, aby bylo zjištěno přesně množství kojenecké stolice. Vzorek byl před dalšími postupy homogenizován pomocí vortexu (Yellowline TTS 2, IKA).

Přesné množství vzorku, které se použilo do prvního ředění se spočítalo podle vzorce:

$$\text{Hmotnost zkumavky se vzorkem} - \text{hmotnost zkumavky bez vzorku} = X$$

$$1/X = \text{množství v ml, které se dá do 2. ředění}$$

Následně se odebíralo z každého ředění po 1 ml a to až do 9. ředění.

4.1.3 Rozbor střevní mikrobioty kojence bez kultivace (0 hodin)

V samotném vzorku kojenecké stolice byly stanoveny: Celkové počty, *E. coli*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a Gram (-) bakterie.

Do malých označených Petriho misek bylo vždy odebíráno 0,5 ml vzorku z příslušného ředění. A dále byl vzorek zalit správným kultivačním médiem. Bakterie rodu *Lactobacillus* byly po zatuhnutí kultivačního média zality znovu pro zajištění nižší koncentrace kyslíku.

V případě bakterií rodu *Enterococcus* a *E. coli* bylo odebíráno 0,1 ml vzorku z příslušného ředění a následně byl rozetřen kličkou již na zatuhlém kultivačním médiu ve velkých Petriho miskách.

(Tab. 6) Druhy použitých kultivačních médií pro střevní mikrobiotu kojenice

| Bakterie | Kultivační média |
|--|--|
| Celkové počty | Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem |
| <i>E. coli</i> | TBX agar (Tryptone bile X-glucuronide medium, Oxoid) |
| <i>Enterococcus</i> | Slanetz-Bartley medium (Oxoid) |
| <i>Bifidobacterium</i> , <i>Clostridium</i> | Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, mupirocinem a kyselinou octovou |
| <i>Bifidobacterium</i> | Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, mupirocinem a norfloxacinem |
| <i>Lactobacillus</i> | Rogosa agar (Oxoid) |
| Gram (-) bakterie | Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, krví a G-suplementem |

Popis přípravy jednotlivých kultivačních médií je uveden v příloze.

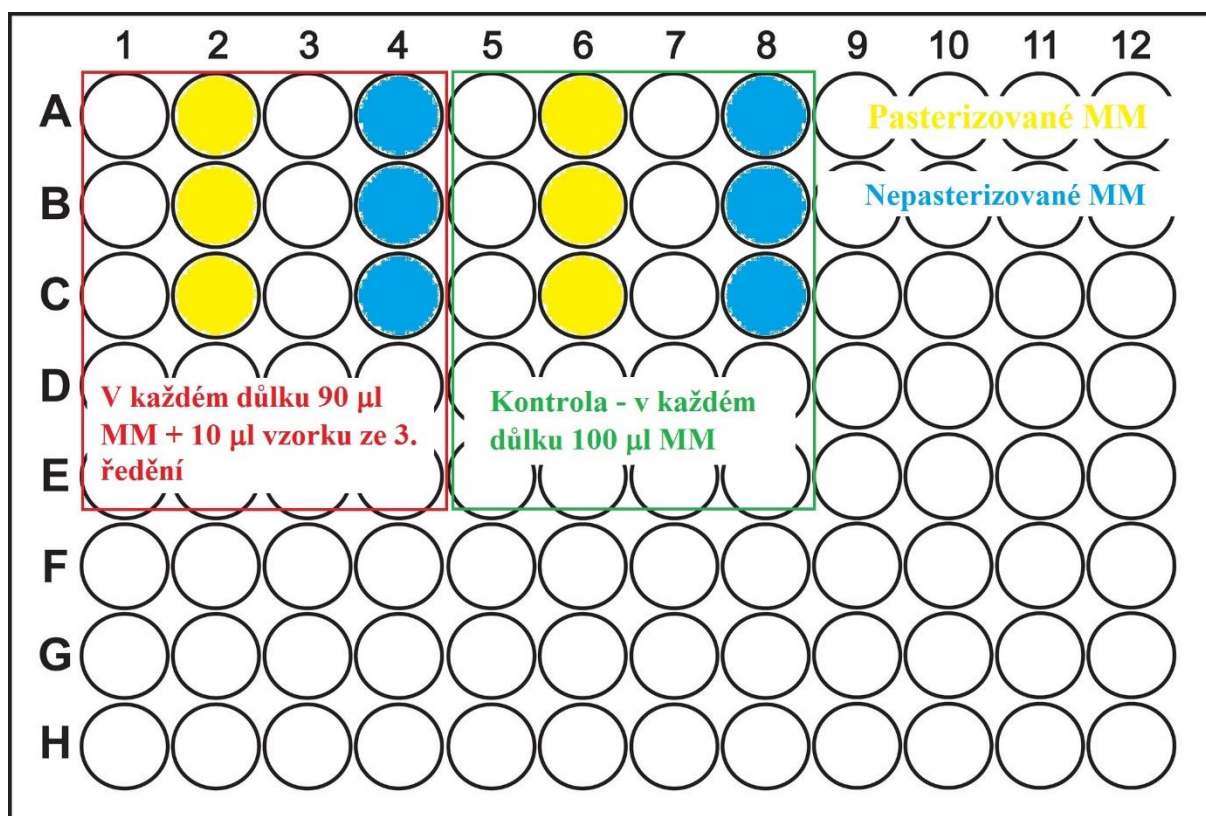
Kultivace bakterií rodu *Enterococcus*, *E. coli* a *Lactobacillus* probíhala za aerobních podmínek v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Celkové počty, *Bifidobacterium* a Gram (-) bakterie byly kultivovány za anaerobních podmínek v anaerostatu s vyvíječem anaerobní atmosféry (AnaeroGen™3,5L, Thermo Scientific) a to po dobu 48 hodin a teplotě 37 °C v termostatu.

Po kultivaci byly spočítány počty bakterií a zkontrolovány pod mikroskopem (Eclipse E200, Nikon).

4.1.4 Rozbor střevní mikrobioty kojenice po kultivaci v mateřském mléku

Mikrobiota kojenice byla kultivována na mikrotitrační destičce za anaerobních podmínek v pasterizovaném a nepasterizovaném mateřském mléce v termostatu po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C (Obr. 8). Z každého důlku mikrotitrační destičky (pasterizované MM + vzorek, nepasterizované MM + vzorek, pasterizované MM, nepasterizované MM) bylo odebráno 10 µl do 3. ředění. Další ředění probíhalo standardně po 1 ml. Dále již probíhal rozbor obdobně jako v 0 hodin. Byly stanoveny stejné rody bakterií za použití stejných kultivačních médií.

(Obr. 8) Kultivace střevní mikrobioty kojenče na mikrotitrační destičce



4.2 Rozbor mateřského mléka

Bylo testováno 9 vzorků mateřských mlék, které byly použity pro kultivaci střevní mikrobioty kojenče. Jednotlivé vzorky byly rozděleny do tří skupin: pasterizované MM, nepasterizované MM, nepasterizované MM s mupirocinem.

4.2.1 Příprava vzorků mateřského mléka

Jeden ml mateřského mléka byl zaočkován do 9 ml bujónu (Wilkins-Chalgren anaerobe broth + Soya Peptone) a ponechán 24 hodin při teplotě 37 °C. V případě třetí skupiny (nepasterizované MM s mupirocinem), k 9 ml bujónu byl přidán mupirocin o koncentraci 100 mg/l (Příloha 2).

4.2.2 Rozbor vzorků mateřského mléka

Ve všech třech skupinách byly stanoveny tyto bakterie: Celkové počty, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a aerobní bakterie stanovitelné na CHROMagarTMOrientation.

Do malých označených Petriho misek bylo vždy odebráno 0,5 ml vzorku z příslušného ředění. A dále byl vzorek zalit správným kultivačním médiem. Bakterie rodu *Lactobacillus* byly po zatuhnutí kultivačního média zality znovu pro zajištění nižší koncentrace kyslíku.

(Tab. 8) Druhy použitých kultivačních médií pro bakterie přítomné v mateřském mléce

| Bakterie | Kultivační média |
|------------------------|--|
| Celkové počty | Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem |
| <i>Bifidobacterium</i> | Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, mupirocinem a kyselinou octovou |
| <i>Lactobacillus</i> | Rogosa agar (Oxoid) |
| Aerobní bakterie | CHROMagar™Orientation se suplementem |

Popis přípravy jednotlivých kultivačních médií je uveden v příloze.

Kultivace celkových počtů a bakterií rodu *Bifidobacterium* probíhala za anaerobních podmínek v anaerostatu s vyvíječem anaerobní atmosféry (AnaeroGen™3,5L, Thermo Scientific) a to po dobu 48 hodin a teplotě 37 °C v termostatu. Bakterie rodu *Lactobacillus* a aerobní bakterie byly kultivovány 24 hodin při teplotě 37 °C v termostatu za aerobních podmínek.

Po kultivaci byly spočítány počty bakterií a zkontrolovány pod mikroskopem (Eclipse E200, Nikon). Bakterie dále byly izolovány k další identifikaci.

(Tab. 9) Interpretace barev CHROMagar™Orientation

| Mikroorganismus | Typický vzhled kolonií |
|--|--|
| Gram (-) | |
| <i>Escherichia coli</i> | tmavě růžové až načervenalé |
| <i>Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia</i> | metalicky modré (+/- načervenalé halo) |
| <i>Proteus, Morganella, Providencia</i> | hnědé halo |
| <i>Proteus vulgaris</i> | modré s hnědým halo |
| <i>Pseudomonas</i> | průsvitné (+/- přírodní pigmentace krémově zelené) |
| <i>Acinetobacter</i> | krémové |
| <i>Stenotrophomonas</i> | bezbarvé |

| Mikroorganismus | Typický vzhled kolonií |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Gram (+) | |
| <i>Enterococcus</i> | tyrkysově modré |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | zlaté, neprůhledné, malé |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | smetanové, bodové kolonie |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | růžové, neprůhledné malé |
| <i>StrepB</i> | světle modré |
| Kvasinky | |
| <i>Candida albicans</i> | krémové, neprůhledné kolonie |

4.2.3 Identifikace bakterií mateřského mléka pomocí MALDI

Identifikace bakterií byla rovněž provedena pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie na přístroji Autoflex speed (Bruker daltonik GmbH) v lineárním pozitivním módu. Bakteriální suspenze byla nejprve přečištěna 70 % ethanolem od pěstebního média a pelet byl suspendován v 70 % kyselině mravenčí a acetonitrilu (1:1). Pro analýzu byl použit supernatant, který byl nanesen na MALDI destičku a po zaschnutí překryt MALDI matricí = HCCA (kyselina α -kyano-4-hydroxykořicová) v podobě kyseliny skořicové. Při ozáření laserem v přístroji je vzorek ionizován a na základě doby letu ionizovaných proteinů jsou pak bakteriální kmeny identifikovány pomocí databáze mikroorganismů. K hodnocení přesnosti identifikace slouží tzv. skóre od 0 do 3: 0,000 - 1, 699 je nespolehlivá identifikace; 1,7000 - 1,999 je pravděpodobná identifikace na úroveň rodu; 2,000 - 2,299 je jistá identifikace na úroveň rodu a pravděpodobná identifikace na úroveň druhu a 2,300 - 3,000 značí velice pravděpodobnou identifikaci na úroveň druhu.

4.3 Vyhodnocení výsledků

Výsledky byly vyhodnoceny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ pomocí T-testu v Microsoft Excel a také v programu Statgraphics Centurion XV.II (Manugistics, Rockville, MD, USA) pomocí ANOVY.

5 Výsledky

5.1 Rozbor střevní mikrobioty kojence

Rozbor vzorků kojenecké stolice probíhal do 2 dnů od jejich odebrání a stanovovaly se u nich tyto bakterie: celkové počty, *Bifidobacteriu*, *Lactobacillus*, Gram (-) bakterie, *E. coli* a *Enterococcus*. V tabulce (Tab. 10) jsou uvedeny počty stanovených skupin bakterií pomocí selektivních médií ve stolicích kojenců. Hodnoty jsou uvedeny v logaritmech KTJ (kolonie tvořící jednotky) v 1 g stolice. Dle těchto výsledků u celkových počtů, bakterií rodu *Bifidobacterium*, *E. coli*, *Enterococcus*, Gram (-) bakterií a koliformních bakterií nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Pouze počty rodu *Lactobacillus* se statisticky významně lišily ve stolici dětí porozených císařským řezem od stolic dětí porozených přirozeně.

Statistické vyhodnocení se provádělo pomocí T-testu, kde byly porovnány dvě skupiny a to „Přirozený porod“ a „Císařský řez“.

(Tab. 10) Vyhodnocení rozborů střevní mikrobioty devíti kojenců v log KTJ/g \pm SD

| Bakterie | Přirozený porod | | | | | |
|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|
| | B | C | D | E | CH | Průměr + SD |
| CP | 9,20 \pm 0,18 | 10,18 \pm 0,16 | 10,46 \pm 0,01 | 10,51 \pm 0,02 | 10,31 \pm 0,01 | 10,13 + 0,54 ^a |
| Bif/Cl | 8,74 \pm 0,02 | 10,04 \pm 0,02 | 10,25 \pm 0,04 | 10,24 \pm 0,26 | 10,10 \pm 0,03 | 9,87 + 0,64 ^a |
| Bif | 8,76 \pm 0,07 | 8,19 \pm 0,03 | 10,08 \pm 0,10 | 10,21 \pm 0,27 | 9,94 \pm 0,04 | 9,44 + 0,91 ^a |
| Lb | 3,85 \pm 0,05 | 3,90 \pm 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,55 + 2,12 ^a |
| G- | 5,27 \pm 0,03 | 5,78 \pm 0,00 | 8,02 \pm 0,14 | 8,02 \pm 0,52 | 9,69 \pm 0,03 | 7,36 + 1,81 ^a |
| ENT | 5,81 \pm 0,17 | 7,59 \pm 0,25 | 6,97 \pm 0,02 | 6,77 \pm 0,06 | 7,77 \pm 0,00 | 6,98 + 0,78 ^a |
| <i>E. coli</i> | 5,94 \pm 0,46 | 9,20 \pm 0,09 | 8,28 \pm 0,17 | 0,00 | 7,40 \pm 0,69 | 6,16 + 3,65 ^a |
| Kol | 6,09 \pm 0,33 | 7,38 \pm 0,33 | 0,00 | 8,58 \pm 0,37 | 8,47 \pm 0,14 | 6,10 + 3,56 ^a |
| Bakterie | Císařský řez | | | | | Všechny vzorky |
| | A | F | G | H | Průměr + SD | Průměr + SD |
| CP | 10,27 \pm 0,01 | 10,37 \pm 0,05 | 9,61 \pm 0,01 | 10,36 \pm 0,02 | 10,15 + 0,36 ^a | 10,14 + 0,44 |
| Bif/Cl | 9,82 \pm 0,23 | 9,98 \pm 0,04 | 8,19 \pm 0,04 | 9,92 \pm 0,14 | 9,48 + 0,86 ^a | 9,70 + 0,73 |
| Bif | 10,01 \pm 0,09 | 10,04 \pm 0,03 | 0,00 | 9,91 \pm 0,13 | 7,49 + 4,99 ^a | 8,57 + 3,29 |
| Lb | 7,39 \pm 0,29 | 2,90 \pm 0,00 | 4,59 \pm 0,01 | 7,62 \pm 0,37 | 5,63 + 2,28 ^b | 3,36 + 2,97 |
| G- | 9,98 \pm 0,08 | 0,00 | 5,51 \pm 0,11 | 10,21 \pm 0,00 | 6,43 + 4,80 ^a | 6,94 + 3,24 |
| ENT | 9,82 \pm 0,08 | 0,00 | 8,94 \pm 0,01 | 9,35 \pm 0,30 | 7,03 + 4,70 ^a | 7,00 + 2,93 |
| <i>E. coli</i> | 0,00 | 7,27 \pm 0,32 | 9,27 \pm 0,20 | 0,00 | 4,14 + 4,84 ^a | 5,26 + 4,07 |
| Kol | 7,33 \pm 0,04 | 6,16 \pm 0,12 | 0,00 | 5,30 \pm 0,00 | 4,70 + 3,24 ^a | 5,38 + 3,29 |

(CP = celkové počty, Bif = *Bifidobacterium*, Cl = *Clostridium*, Lb = *Lactobacillus*, G- = Gram (-) bakterie, ENT = *Enterococcus*, Kol. = Koliformní bakterie)

5.2 Rozbor střevní mikrobioty kojence po kultivaci v mateřském mléku

Stolice kojenců byly kultivovány v mateřském mléce na mikrotitračních destičkách po dobu 24 h/37 °C. Následně byly stanoveny stejné skupiny bakterií jako u rozboru stolic 5.1. Testování probíhalo ve čtyřech skupinách (Pasterizované MM + stolice kojence, Nepasterizované MM + stolice kojence, Pasterizované MM – kontrola a Nepasterizované MM – kontrola).

V prvních dvou skupinách, tedy mateřské mléko se stolicí kojence, rostly bakterie ve vysokých počtech. Ve třetí skupině nebyl žádný nárůst bakterií, zejména z důvodu nízkého detekčního limitu 10^3 bakterií v 1 ml (g) vzorku. Ve čtvrté skupině byl nárůst bakterií výrazně nižší než u prvních dvou skupin.

Po kultivaci nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ mezi vzorky stolic kultivovanými v pasterizovaném a nepasterizovaném mléce.

Statistické vyhodnocení se provádělo pomocí ANOVY, kde byl stanoven statisticky významný rozdíl mezi mateřským mlékem se stolicí kojence a kontrolou (nepasterizovaným mateřským mlékem) a následně T-testem, kde byly porovnány dvě skupiny, které můžeme vidět v tabulce (Tab. 11).

(Tab. 11) Vyhodnocení rozboru střevní mikrobioty kojence po kultivaci v mateřském mléce v log KTJ/ml \pm SD

| Bakterie | Pasterizované MM + stolice kojence | Nepasterizované MM + stolice kojence |
|------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| | Průměr + SD | Průměr + SD |
| Přirozený porod | | |
| CP | 8,85 + 0,11 | 8,70 + 0,41 |
| Bif/Cl | 7,50 + 1,42 | 7,97 + 1,11 |
| Bif | 6,56 + 2,31 | 6,07 + 3,52 |
| Lb | 0,66 + 1,48 | 0,66 + 1,48 |
| G- | 5,45 + 3,39 | 6,71 + 1,49 |
| ENT | 6,17 + 3,51 | 6,24 + 3,55 |
| <i>E. coli</i> | 6,70 + 3,80 | 6,48 + 3,65 |
| Kol | 5,17 + 4,72 | 5,02 + 4,59 |
| Císařský řez | | |
| CP | 9,05 + 0,39 ^a | 8,96 + 0,44 |
| Bif/Cl | 8,61 + 0,89 ^a | 7,98 + 1,82 |
| Bif | 6,45 + 4,41 ^a | 6,35 + 4,33 |
| Lb | 3,56 + 3,61 ^a | 3,61 + 4,16 |
| G- | 5,37 + 3,98 ^a | 5,53 + 3,98 |
| ENT | 6,18 + 0,77 ^a | 6,60 + 0,80 |
| <i>E. coli</i> | 3,41 + 4,16 ^a | 3,78 + 4,42 |
| Kol | 5,81 + 3,97 ^a | 5,50 + 3,98 |

5.3 Rozbor mateřského mléka

Bylo testováno 9 vzorků mateřských mlék, které byly použity pro kultivaci střevní mikrobioty kojence. Jednotlivé vzorky byly rozděleny do tří skupin: pasterizované MM, nepasterizované MM, nepasterizované MM s mupirocinem. Do třetí skupiny byl ke vzorku mléka přidán mupirocin o koncentraci 100 mg/l, aby došlo k selektivnímu stanovení bakterií rodu *Bifidobacterium* ve vzorcích. U těchto tří skupin byly zjišťovány bakterie rostoucí na čtyřech typech kultivačních medií (Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, mupirocinem a kyselinou octovou, Rogosa agar, CHROMagarTMOrientation se suplementem).

Výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 12), počty bakterií jsou vyjádřeny v logaritmech KTJ (kolonie tvořící jednotky) v 1 ml mléka se směrodatnou odchylkou. Statisticky významné rozdíly můžeme vidět v prvních dvou sloupečcích, tedy u media Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem (CP) a u media Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, mupirocinem a kyselinou octovou (Bif). Bakterie rodu *Lactobacillus*, rostoucí na Rogosa agaru, se vyskytly pouze u jednoho z devíti vzorků mateřského mléka.

U bakterií rostoucích na Wilkins-Chalgren agaru se sójovým peptonem vidíme, že se na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky významně liší 2. skupina (nepasterizované MM) od 1. a 3. skupiny (pasterizované MM a nepasterizované MM s mupirocinem). 1. a 3. skupina se na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky významně neliší.

U bakterií rostoucích na Wilkins-Chalgren agaru se sójovým peptonem, mupirocinem a kyselinou octovou byly zjištěny statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ u všech tří skupin.

U bakterií rostoucích na Rogosa agaru a bakterií rostoucích na chromogenním médiu nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ($\alpha = 0,05$) až na CH (B, kde se statisticky významně lišila 3. skupina od 1. a 2. skupiny. Důležité je i to, že u všech těchto bakterií v mnoha případech nedošlo k žádnému nárůstu a byly detekovány pouze v některých mlékách.

(Tab. 12) Vyhodnocení rozboru mateřského mléka, hodnoty uvedeny v log KTJ/ml ± SD

| | W | W + mup | Rogosa | CH (T) | CH (B) | CH (R) | CH (F) | CH (M) |
|--|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Pasterizované MM | 1 | 0,00 | 1,46 ± 0,15 | 0,00 | 1,30 ± 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 2 | 6,62 ± 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 3 | 2,82 ± 0,47 | 1,58 ± 0,02 | 0,00 | 1,30 ± 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 4 | 2,21 ± 0,05 | 1,96 ± 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,30 ± 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 6 | 2,25 ± 0,14 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 7 | 2,60 ± 0,00 | 1,88 ± 0,66 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 8 | 2,30 ± 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 9 | - | 1,46 ± 0,15 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Průměr + SD | 2,35 ± 2,06 ^a | 0,93 ± 0,89 ^a | 0,00 ^a | 0,29 ± 0,57 ^a | 0,00 ^a | 0,14 ± 0,43 ^a | 0,00 ^a | 0,00 ^a |
| Nepasterizované MM | 1 | 4,98 ± 0,75 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 2 | 7,67 ± 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 5,23 ± 0,02 | 0,00 | 0,00 |
| | 3 | 4,59 ± 0,33 | 3,91 ± 0,05 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 4 | 4,78 ± 1,07 | 4,06 ± 0,44 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 5 | 5,26 ± 0,03 | 4,55 ± 0,87 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 5,23 ± 0,02 | 0,00 |
| | 6 | 8,67 ± 0,01 | 6,30 ± 0,06 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 7 | 8,21 ± 0,04 | 5,46 ± 0,15 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,01 ± 0,51 |
| | 8 | 6,62 ± 0,09 | 3,56 ± 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 7,05 ± 0,11 |
| | 9 | 8,90 ± 0,02 | 0,00 | 3,96 +/- 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Průměr + SD | 6,63 ± 1,77 ^b | 3,09 ± 2,46 ^b | 0,44 ± 1,32 ^a | 0,00 ^a | 0,00 ^a | 1,16 ± 2,31 ^a | 0,33 ± 1,00 ^a | 0,78 ± 2,35 ^a |
| Nepasterizované MM s mupirocinem | 1 | 4,22 ± 0,17 | 3,34 ± 1,10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 2 | 3,46 ± 0,52 | 2,83 ± 0,39 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 3 | 0,00 | 3,30 ± 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 4 | 3,99 ± 0,27 | 2,30 ± 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 6 | 5,93 ± 0,03 | 5,60 ± 0,01 | 0,00 | 0,00 | 5,28 ± 0,30 | 0,00 | 0,00 |
| | 7 | 2,78 ± 0,00 | 2,30 ± 0,00 | 0,00 | 3,35 ± 0,37 | 2,39 ± 0,08 | 0,00 | 0,00 |
| | 8 | 2,30 ± 0,00 | 2,30 ± 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 9 | 3,44 ± 0,13 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 5,66 ± 0,81 | 0,00 | 0,00 |
| Průměr + SD | 2,90 ± 1,93 ^a | 2,44 ± 1,72 ^{ab} | 0,00 ^a | 0,37 ± 1,12 ^a | 1,48 ± 2,39 ^b | 0,00 ^a | 0,00 ^a | 0,00 ^a |

(W = Wilkins-Chalgren agaru se sójovým peptonem, W + mup = Wilkins-Chalgren agaru se sójovým peptonem, mupirocinem a kyselinou octovou, CH = CHROMagarTMOrientation se supplementem)

5.4 Identifikace bakterií mateřského mléka pomocí MALDI

Bakterie, které byly stanoveny v mateřských mlékách, byly izolovány a následně identifikovány na MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii.

V tabulce (Tab. 14) můžeme vidět jednotlivé identifikované druhy bakterií, jedná se zejména o *Propionibacterium acnes*, které se vyskytují běžně na kůži člověka. Dále byly identifikovány i dva druhy bakterií rodu *Lactobacillus*, a to *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus plantarum*, bakterie rodu *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Staphylococcus*.

(Tab. 13) Barevné rozlišení chromogenního média

| CHROMagar™Orientation (barevné rozlišení) | | |
|---|-----------|-------------------------------------|
| CHROMagar™Orientation | Barva | |
| T | tyrkysová | <i>Enterococcus</i> |
| B | běžová | <i>Pseudomonas</i> |
| R | růžová | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> |
| F | fialová | <i>E. coli</i> |
| M | modrá | <i>Enterobacter</i> |

Toto médium bylo použito k izolaci kolonií, které byly následně identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

(Tab. 14) Identifikované bakterie v mateřském mléce pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

| MM | Identifikované bakterie | MM | Identifikované bakterie |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------|---|
| 1/A | <i>Propionibacterium acnes</i> | 6/C | NEIDENTIFIKOVÁNO |
| 1/A | <i>Streptococcus cristatus</i> | 6B | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 1/A | NEIDENTIFIKOVÁNO | 6C | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 1/C | <i>Propionibacterium acnes</i> | 6C | NEIDENTIFIKOVÁNO |
| 1/C | <i>Propionibacterium acnes</i> | 7/A | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| 2/A | <i>Propionibacterium acnes</i> | 7/A | NEIDENTIFIKOVÁNO |
| 2/A | NEIDENTIFIKOVÁNO | 7/B | NEIDENTIFIKOVÁNO |
| 2/B | <i>Propionibacterium acnes</i> | 7/B | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 2/B | NEIDENTIFIKOVÁNO | 7/B | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 2/B | NEIDENTIFIKOVÁNO | 7/B | NEIDENTIFIKOVÁNO |
| 2/C | <i>Propionibacterium acnes</i> | 7/C | NEIDENTIFIKOVÁNO |
| 2/C | <i>Propionibacterium acnes</i> | 7/C | <i>Pediococcus acidilactici</i> |
| 2/C | NEIDENTIFIKOVÁNO | 7/C | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> |
| 3/A | NEIDENTIFIKOVÁNO | 7/C | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> |
| 3/A | <i>Propionibacterium acnes</i> | 7/C | <i>Staphylococcus warneri</i> |
| 3/B | <i>Propionibacterium granulosum</i> | 8/B | NEIDENTIFIKOVÁNO |
| 3/B | <i>Propionibacterium acnes</i> | 8/B | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| 3/B | <i>Propionibacterium acnes</i> | 8/B | NEIDENTIFIKOVÁNO |
| 3/B | NEIDENTIFIKOVÁNO | 8/B | NEIDENTIFIKOVÁNO |
| 3/C | NEIDENTIFIKOVÁNO | 8/B | NEIDENTIFIKOVÁNO |
| 4/A | <i>Propionibacterium acnes</i> | 8/B | NEIDENTIFIKOVÁNO |
| 4/A | NEIDENTIFIKOVÁNO | 8/C | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 4/A | NEIDENTIFIKOVÁNO | 8/C | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| 4/B | NEIDENTIFIKOVÁNO | 9A | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 4/B | <i>Staphylococcus warneri</i> | 9A | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 4/C | <i>Propionibacterium acnes</i> | 9B LB malé | <i>Lactobacillus paracasei</i> |
| 5/B | NEIDENTIFIKOVÁNO | 9B LB velké | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| 5/B | <i>Propionibacterium acnes</i> | 9B LB velké | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| 5/B | NEIDENTIFIKOVÁNO | 9C | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 6/A | NEIDENTIFIKOVÁNO | 9C | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 6/A | NEIDENTIFIKOVÁNO | 9C | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| Legenda | | | |
| Označení MM | | Barva izolované kolonie | |
| Číslo (1 - 9) | Číslo vzorku | modrá | Wilkins-Chalgen agar se sójovým peptonem, mupirocinem a kyselinou |
| A | Pasterizované MM | černá | CHROMagar™ Orientation (M) |
| B | Nepasterizované MM | červená | CHROMagar™ Orientation (R) |
| | | zelená | CHROMagar™ Orientation (T) |
| C | Nepasterizované MM + mupirocin | šedá | CHROMagar™ Orientation (F) |
| | | zlatá | CHROMagar™ Orientation (B) |

6 Diskuse

6.1 Střevní mikrobiota u kojenců porozených přirozeně a císařským řezem

Mikroorganismy začínají kolonizovat trávicí trakt dítěte již v prvních hodinách po porodu. V životě člověka zastávají hned několik funkcí, například představují přirozenou bariéru, která zabraňuje kolonizaci střeva patogeny a cizími mikroby. Mezi prospěšné bakterie v zažívacím traktu patří rod *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* (Salminen et al., 2004).

Podle studie Grönlund et al., 1999 se počty bakterií rodu *Bifidobacterium* výrazně lišily mezi dětmi porozenými přirozeně a dětmi porozenými císařským řezem. Pokud však mají jedinci porození císařským řezem bakterie rodu *Bifidobacterium*, množství střevních bakterií je obvykle stejné jako u jedinců porozených přirozeně (Musilova et al., 2015). Dále také Musilova et al., 2015 uvádí, že bakterie rodu *Clostridium* byly častěji objeveny u dětí s absencí bakterií rodu *Bifidobacterium*.

Mikrobiota kojenců je, jak už bylo řečeno, výrazně ovlivněna způsobem, jakým jsou děti porozeny. Rozdíl je patrný zejména v prvních dnech života. Rozdílné složení mikrobioty se však postupně s věkem vyrovnává a je i významně ovlivněno kojením (Palmer et al., 2007).

V každém z devíti vzorků kojenecké stolice jsem stanovila stejné bakteriální druhy. Celkem jsem zjistila bakteriální složení u pěti vzorků od dětí porozených přirozeně a u čtyřech vzorků od dětí porozených císařským řezem. Dle hypotézy měly být počty bakterií, zejména tedy počty bakterií rodu *Bifidobacterium*, odlišné. Po statistickém zhodnocení však nebyl shledán statisticky významný rozdíl mezi těmito dvěma skupinami vzorků. Tyto výsledky mohly být zapříčiněny stářím kojenců, jelikož jak uvádí Palmer et al., rozdíly ve složení střevní mikrobioty se postupně s věkem ztrácí.

Jediný statisticky významný rozdíl byl shledán u bakterií rodu *Lactobacillus*. Počty těchto bakterií byly vyšší u skupiny vzorků „císařský řez“. Tento fakt mohl být opět zapříčiněn věkem kojenců. Jakobsson et al., 2014 ve svém článku uvádí, že průměrná procentuální hodnota počtu bakterií rodu *Lactobacillus* u dětí porozených císařským řezem je ve věku 3 – 12 měsíců vyšší než u dětí porozených přirozeně.

Dalším důvodem, proč se výsledky liší od výsledků lékařských studií je i to, že v našem případě se jednalo o malou skupinu vzorků. Lékařské studie jsou prováděny s vyšším počtem vzorků a tím pádem je mezi nimi větší variabilita a jsou statisticky lépe průkazné.

6.2 Rozdíl mezi pasterizovaným a nepasterizovaným mateřským mlékem na mikrobiotu kojence

Mateřské mléko představuje zcela vyváženou stravu pro kojence a přispívá k jeho celkovému správnému vývoji (Bode, 2009). Pokud však nemůže matka plně kojit, existuje několik možných alternativ, jak dítěti stravu vynahradit. Jednou z možností je mléko z mléčných bank. Toto mléko však musí být pasterizováno, což může mít za následek možné změny v jeho složení. Pasterizace mateřského mléka se provádí při teplotě 62,5 °C po dobu 30 min, při takto vysoké teplotě může dojít k řadě změn, a to zejména ve snížení různých bioaktivních látek (Ewaschuk et al., 2011).

Hypotézou této práce bylo, že díky pasterizaci se v mateřském mléku zničí některé antimikrobiální látky, tím pádem po inokulaci kojenecké stolice poroste na pasterizovaném mléku větší množství bakterií než na mléku nepasterizovaném. Tato hypotéza však nebyla potvrzena, protože ani u jednoho druhu bakterií nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi oběma mléky.

Antimikrobiální aktivita mateřského mléka by měla být významná hlavně z hlediska potlačení růstu patogenních mikroorganismů jako jsou například bakterie rodu *Clostridium*, které se vyskytují častěji u dětí porozených císařským řezem a u dětí s absencí bakterií rodu *Bifidobacterium* (Musilova et al., 2015). Z tohoto hlediska by právě proto měly být počty bakterií rostoucích na pasterizovaném mateřském mléku vyšší.

V našem případě ovšem nebylo mateřské mléko před použitím zcela čerstvé, což mohlo ovlivnit jeho antimikrobiální aktivitu. Čerstvé mateřské mléko je chráněno tzv. baktericidní fází, která chrání mléko před rozvojem bakterií, a dokonce snižuje i jejich prvotní množství. Silvestre et al. 2006 provedli studii, ve které zjišťovali baktericidní aktivitu mateřského mléka a její vývoj v čase. Po vyhodnocení výsledků zjistili, že při zchlazení mléka na teplotu 4 – 6 °C přetrvala baktericidní aktivita po dobu 48 hodin a při zmražení na teplotu -20 °C 10 dní. Zchlazené mléko po 72 hodinách vykazovalo významný pokles baktericidní aktivity. A právě to je možnou příčinou nesrovnalostí našich výsledků.

6.3 Bakterie v mateřském mléku

Dříve bylo mateřské mléko považováno za zcela sterilní tekutinu, v dnešní době však přichází na řadu mnoho spekulací, které se tuto myšlenku snaží změnit. Například Gueimonde et al., 2007 uvádí, že jsou v mateřské mléce často stanoveny bakterie rodů *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Bifidobacterium*. Ale není si zcela jist, zda se jedná o primární či

sekundární mikrobiotu, jelikož je velkou otázkou, zda může být mateřské mléko odebráno asepticky.

V mé práci jsem analyzovala pomocí deskové plotnové metody mikrobiotu pasterizovaného a nepasterizovaného mateřského mléka. Přičemž pasterizované mateřské mléko bylo zahřáto na teplotu 62,5 °C po dobu 30 min, toto tepelné ošetření by mělo zničit téměř všechny vegetativní formy mikroorganismů (Silvestre et al., 2008).

Byly vytvořeny tři skupiny, ve kterých se stanovovaly bakterie a to: pasterizované mléko, nepasterizované mléko a nepasterizované mléko s mupirocinem. Ve všech třech skupinách byla detekována přítomnost bakterií. K analýze vzorků byla použita čtyři kultivační média: Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, mupirocinem a kyselinou octovou, Rogosa agar, CHROMagarTMOrientation se suplementem. Po kultivaci vzorků byly vyizolovány narostlé kolonie, které byly mikroskopicky vyšetřeny a následně identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Po identifikaci bylo zjištěno, že se jedná zejména o bakterie druhu *Propionibacterium acnes*, které se běžně vyskytují na lidské kůži. Dále pak byly identifikovány bakterie rodu *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Lactobacillus*, což odpovídá již zmíněné studii od Gueimonde et al. 2007.

V pasterovaném mateřském mléku byly identifikovány bakterie rodu *Propionibacterium* a *Streptococcus*. To neodpovídá studii od Silvestre et al., 2008, proto je vysoce pravděpodobné, že se nejedná o původní mléčnou mikrobiotu, ale že byl vzorek kontaminován až při manipulaci po pasterizaci.

7 Závěr

Rozdíly mezi zkoumanou mikrobiotou dětí porozených císařským řezem a dětí porozených přirozenou cestou nebyl prokázán, tato skutečnost se ověřovala statisticky pomocí T-testu na hladině významnosti 0,05.

Bakterie, které jsme identifikovali v mateřském mléku pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie se ve velké míře přirozeně vyskytují na povrchu lidské kůže, čímž můžeme říci, že se jedná s největší pravděpodobností zejména o sekundární kontaminaci mléka. To odpovídá i výsledkům odborných studií zmíněných v práci.

Ukázalo se, že testované pasterizované ani nepasterizované mateřské mléko významně neovlivňuje růst střevních bakterií v *in vitro* testu, což vyvrátilo hypotézu formulovanou na začátku této práce.

Výsledky této práce mohou snížit obavy matek, které nemohou samy kojit a odebírají pro své děti mléko z mléčných bank. Pasterizační teplota 62,5 °C po dobu 30 minut významně neovlivňuje kvalitu mateřského mléka z hlediska růstu mikrobioty.

8 Přílohy

(Příloha 1)

Odběr vzorků kojenecké stolice

Do skleněné zkumavky s bujónem a červeným víčkem odebrat malé množství (asi 1 g, velikost lískového oříšku) čerstvé stolice.

Zkumavku uzavřít.

Opatrně promíchat stolicí, tak aby byl celý vzorek ponořen do tekutiny.

Nemíchat příliš intenzivně, vzorek by se promíchal se vzduchem, což nemají anaerobní bakterie trávicího traktu rády.

Bujón se nesmí vylít ani ulít!

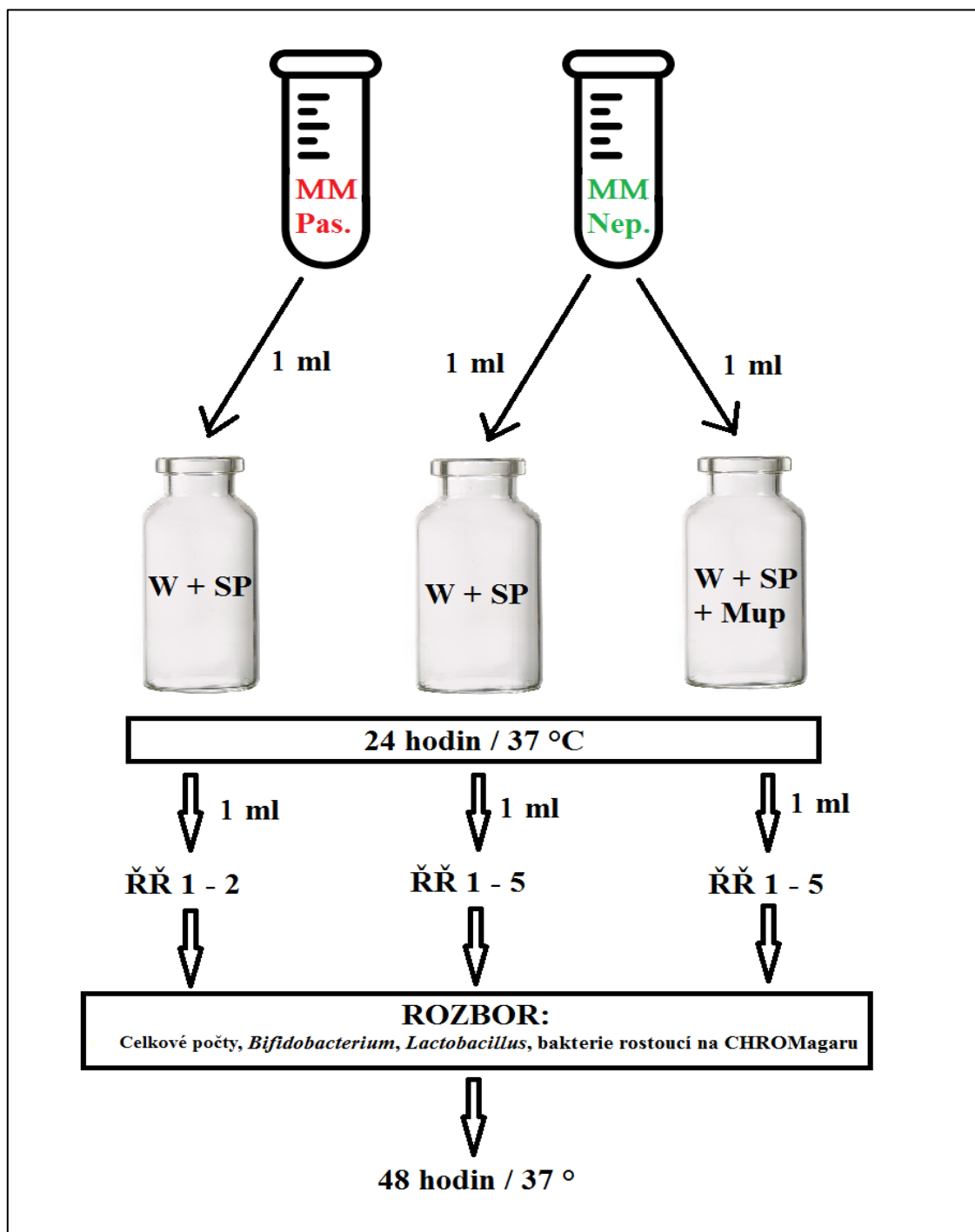
Nesmí se smazat číselný údaj na zkumavce!

Pokud zkumavku odevzdáte v den odběru nebo 2. den, uchovávat v lednici.

Pokud máte zkumavky dvě, jedna slouží jako náhradní, pro případ vylití bujónu a podobně.

Děkujeme Vám za spolupráci!

(Příloha 2) Příprava vzorků mateřského mléka



(Příloha 3) Popis přípravy kultivačních médií

Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem

1000 ml destilovaná voda

43 g Wilkins-Chalgren agar

5 g Soya Peptone

0,5 g Cystein

1 ml Tween (Polysorbate 80)

V destilované vodě se rozmíchají příslušné přísady, přivedeme k varu a necháme úplně rozpustit. Sterilujeme v autoklávu 15 min při 121°C. Po sterilaci se nechá médium vytemperovat na 50 °C ve vodní lázni.

TBX agar (Tryptone bile X-glucuronide medium, Oxoid)

1000 ml destilované vody

36,6 g T.B.X. Medium

V destilované vodě se rozmíchá T.B.X. agar, přivedeme k varu a necháme úplně rozpustit. Sterilujeme v autoklávu 15 min při 121°C. Po vytemperování na 50 °C ve vodní lázni se médium nalije do sterilních Petriho misek a nechá utuhnout.

Slanetz-Bartley medium (Oxoid)

1000 ml destilované vody

42 g Slanetz & Bartley medium

V destilované vodě se rozmíchá Slanetz & Bartley medium a nechá se povařit ve vodní lázni, dokud se rozpustí všechny složky média. Po rozvaření dostane médium zlatavou barvu. Po vytemperování na 50 °C ve vodní lázni se médium nalije do sterilních Petriho misek a nechá se utuhnout.

Rogosa agar

1000 ml destilované vody

60 g Rogosa agar

V destilované vodě se rozmíchá Rogosa agar a nechá se povařit ve vodní lázni, dokud se nerozpustí všechny složky agaru. 2 minuty před vyndáním se přidá 1,32 ml kyseliny octové na 1 l agaru. Před použitím se agar nechá vytemperovat na 50 °C ve vodní lázni.

Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, mupirocinem a kyselinou octovou

K základnímu médiu (Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem) se po vytemperování na 50 °C přidá 100 mg/l mupirocinu a 1ml/l kyseliny octové.

Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, mupirocinem a norfloxacinem

K základnímu médiu (Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem) se po vytemperování na 50 °C přidá 200 mg/l norfloxacinu, 100 mg/l mupirocinu a 1ml/l kyseliny octové.

Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, krví a G- suplementem

V základním médiu (Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem) vynecháme přísadek Tweenu a dále pokračujeme s obvyklou přípravou. Po vytemperování na 50 °C přidáme 5 ml krve (Laked horse blood, Thermo Fisher Scientific) na 100 ml média a 2ml G- suplementu (G-N Anaerobe Selective Supplement, Thermo Fisher Scientific) na 100 ml média. Agar nelze uchovávat, rychle se kazí.

CHROMagar™Orientation

1000 ml destilované vody

33 g CHROMagar™Orientation

1 g CHROMagar White Opaque supplement

V destilované vodě se rozmíchá CHROMagar™Orientation a CHROMagar White Opaque supplement, přivedeme k varu a necháme úplně rozpustit. Sterilujeme v autoklávu 15 min při 121°C. Poté se nechá vytemperovat na 50°C. Před použitím je nutné agar řádně promíchat.

(Příloha 4) Popis přípravy ředící řady

Ředící řada (1000 ml)

1000 ml destilované vody

5 g Tryptone

5 g Nutrient Broth No. 2

2,5 g Yeast extract

0,5 ml Tween (Polysorbate 80)

0,25 g Cystein

Úprava na pH 7 pomocí 1 M NaOH.

Všechny přísady se rozmíchají v destilované vodě a nechají rozpustit. Následně se plní do lahviček po 9 ml. Pro anaerobní bakterie je nutné roztok probublat CO₂ a snížit tak koncentraci O₂. Na závěr jsou lahvičky sterilovány v autoklávu.

9 Seznam literatury

Adlerberth, I., & Wold, A. E. (2009). Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta paediatrica*, 98(2), 229-238.

Allen, L. H. (2012). B vitamins in breast milk: relative importance of maternal status and intake, and effects on infant status and function. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3(3), 362-369.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Cicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Doré, J., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., & Bork P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *nature*, 473(7346), 174-180.

Baker, D., Taylor, H., & Henderson, J. (1998). Inequality in infant morbidity: causes and consequences in England in the 1990s. ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 52(7), 451-458.

Banapurmath, C. R., Banapurmath, S., & Kesaree, N. (1996). Developing brain and breastfeeding. *Indian pediatrics*, 33, 35-38.

Bercik, P., Collins, S. M., & Verdu, E. F. (2012). Microbes and the gut-brain axis. *Neurogastroenterology & Motility*, 24(5), 405-413.

Bertino, E., Coppa, G. V., Giuliani, F., Coscia, A., Gabrielli, O., Sabatino, G., Sgarella, M., Testa, T., Zampini, L., & Fabris, C. (2008). Effects of Holder pasteurization on human milk oligosaccharides. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 21(2), 381-385.

Björkstén, B. B. L. G., Burman, L. G., De Chateau, P., Fredrikzon, B. O., Gotheffors, L., & Hernell, O. (1980). Collecting and banking human milk: to heat or not to heat?. *Br Med J*, 281(6243), 765-769.

Bode, L. (2009). Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutrition reviews*, 67(suppl 2), S183-S191.

Braga, L. P., & Palhares, D. B. (2007). Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk. *Jornal de pediatria*, 83(1), 59-63.

Brandtzaeg, P. (2003). Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine*, 21(24), 3382-3388.

Buffie, C. G., & Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 13(11), 790-801.

Cabrera-Rubio, R., Collado, M. C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E., & Mira, A. (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(3), 544-551.

- Castellote, C.**, Casillas, R., Ramírez-Santana, C., Pérez-Cano, F. J., Castell, M., Moretones, M. G., López-Sabater, M. C., & Franch, À. (2011). Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *The Journal of nutrition*, 141(6), 1181-1187.
- Cebra, J. J.** (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *The American journal of clinical nutrition*, 69(5), 1046s-1051s.
- Chen, J.**, Cai, W., & Feng, Y. (2007). Development of intestinal bifidobacteria and lactobacilli in breast-fed neonates. *Clinical Nutrition*, 26(5), 559-566.
- Claesson, M. J.**, Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J. R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., Stanton, C., van Sinderen, D., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., Henry, C., O'Mahony, D., Fitzgerald, A. P., Shanahan, F., Twomey, C., Hill, C., Ross, R. P., & O'Toole, P.W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4586-4591.
- Cleary, T. G.** (2004). Human milk protective mechanisms. In *Protecting Infants through Human Milk* (pp. 145-154). Springer US.
- Conley, M.** (2010). Fda weighs in on breast milk sharing.
- Czank, C.**, Prime, D. K., Hartmann, B., Simmer, K., & Hartmann, P. E. (2009). Retention of the immunological proteins of pasteurized human milk in relation to pasteurizer design and practice. *Pediatric research*, 66(4), 374-379.
- Česko. Vyhláška č. 137 ze dne 17. 3. 2004 o hygienických požadavcích na stravovací služby a o zásadách osobní a provozní hygieny při činnostech epidemiologicky závažných. In: *Sbírka zákonů České Republiky*. 2004. částka 45. s. 1914. Dostupné z: <http://www.tzbinfo.cz/pravni-predpisy/vyhlaska-c-137-2004-sb-o-hygienickych-pozadavcich-na-stravovacisluzby-a-o-zasadach-osobni-a-provozni-hygieny-pri-cinnostech-epidemiologicky-zavaznych>.
- Daniels, M. C.**, & Adair, L. S. (2005). Breast-feeding influences cognitive development in Filipino children. *The Journal of Nutrition*, 135(11), 2589-2595.
- Eckburg, P. B.**, Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, 308(5728), 1635-1638.
- Eglin, R. P.**, & Wilkinson, A. R. (1987). HIV infection and pasteurisation of breast milk. *The Lancet*, 329(8541), 1093.
- Ewaschuk, J. B.**, Unger, S., Harvey, S., O'Connor, D. L., & Field, C. J. (2011). Effect of pasteurization on immune components of milk: implications for feeding preterm infants. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 36(2), 175-182.
- Fallani, M.**, Young, D., Scott, J., Norin, E., Amarri, S., Adam, R., Agilera, M., Khanna, S., Gil, A., Edwards, C. A., & Doré, J. (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(1), 77-84.

- Fell, J. M. E.** (2005). Neonatal inflammatory intestinal diseases: necrotising enterocolitis and allergic colitis. *Early human development*, 81(1), 117-122.
- Frühauf, P.** (2009). Poučení z mateřského mléka. Online 31. 1. 2015. Dostupné z: http://www.internimedicina.cz/incpdfs/act-000059-0001_10_2.pdf.
- Gallagher, W.** (1992). Motherless child. *SCIENCES-NEW YORK*, 32(4), 12-15.
- Garofalo, R.** (2010). Cytokines in human milk. *The Journal of pediatrics*, 156(2), S36-S40.
- German, J. B.,** Dillard, C. J., & Ward, R. E. (2002). Bioactive components in milk. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 5(6), 653-658.
- Gomes, F. P.,** Shaw, P. N., Whitfield, K., Koorts, P., McConachy, H., & Hewavitharana, A. K. (2016). Effect of pasteurisation on the concentrations of vitamin D compounds in donor breastmilk. *International journal of food sciences and nutrition*, 67(1), 16-19.
- Góes, H. C.,** Torres, A. G., Donangelo, C. M., & Trugo, N. M. (2002). Nutrient composition of banked human milk in Brazil and influence of processing on zinc distribution in milk fractions. *Nutrition*, 18(7), 590-594.
- Goulet, O.** (2015). Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. *Nutrition reviews*, 73(suppl 1), 32-40.
- Greer, F. R.** (2001). Do breastfed infants need supplemental vitamins?. *Pediatric Clinics*, 48(2), 415-423.
- Gregora, M.** (2013). Porod císařským řezem a jeho možná negativa pro novorozence, *Pediatr pro praxi*, 14(6), 404-406.
- Grenham, S.,** Clarke, G., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2011). Brain–gut–microbe communication in health and disease. *Frontiers in physiology*, 2, 94.
- Gribble, K. D.** (2014). Perception and management of risk in Internet-based peer-to-peer milk-sharing. *Early Child Development and Care*, 184(1), 84-98.
- Grönlund, M. M.,** Lehtonen, O. P., Eerola, E., & Kero, P. (1999). Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 28(1), 19-25.
- Guarner, F.,** & Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 361(9356), 512-519.
- Gueimonde, M.,** Laitinen, K., Salminen, S., & Isolauri, E. (2007). Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation?. *Neonatology*, 92(1), 64-66.
- Hanson, L. Å.,** Korotkova, M., Lundin, S., Håversen, L., SILFVERDAL, S. A., MATTSBY-BALTZER, I. N. G. E. R., ... & Telemo, E. (2003). The transfer of immunity from mother to child. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 987(1), 199-206.
- Harmsen, H. J.,** Wildeboer–Veloo, A. C., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijn, N., Bindels, J. G., & Welling, G. W. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and

formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 30(1), 61-67.

Havlík, J., & Maronek, M. (2013). *Živiny a živinové potřeby člověka: učebnice pro studenty ČZU v Praze*. 2. vyd. V Praze: Česká zemědělská univerzita. ISBN 978-80-213-2374-2.

Henderson, J. J., Hartmann, P. E., Newnham, J. P., & Simmer, K. (2008). Effect of preterm birth and antenatal corticosteroid treatment on lactogenesis II in women. *Pediatrics*, 121(1), e92-e100.

Hickey, R. M. (2012). The role of oligosaccharides from human milk and other sources in prevention of pathogen adhesion. *International Dairy Journal*, 22(2), 141-146.

Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual review of nutrition*, 22(1), 283-307.

Jakobsson, H. E., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C., Björkstén, B., Engstrand, L., & Andersson, A. F. (2014). Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*, 63(4), 559-566.

Jenness, R. (1979). The composition of human milk. In *Seminars in perinatology* (Vol. 3, No. 3, pp. 225-239).

Jeong, K. H., Nguyen, V., & Kim, J. H. (2012). Human milk oligosaccharides: the novel modulator of intestinal microbiota. *BMB reports*, 45(8), 433-441.

Khodayar-Pardo, P., Mira-Pascual, L., Collado, M. C., & Martinez-Costa, C. (2014). Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *Journal of Perinatology*, 34(8), 599-605.

Kirjavainen, P. V., Arvola, T., Salminen, S. J., & Isolauri, E. (2002). Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning?. *Gut*, 51(1), 51-55.

Koenig, Á., de Albuquerque Diniz, E. M., Barbosa, S. F. C., & Vaz, F. A. C. (2005). Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization. *Journal of Human Lactation*, 21(4), 439-443.

Konturek, P. C., Haziri, D., Brzozowski, T., Hess, T., Heyman, S., Kwiecien, S., Konturek, S. J., & Koziel, J. (2015). Emerging role of fecal microbiota therapy in the treatment of gastrointestinal and extra-gastrointestinal diseases. *J Physiol Pharmacol*, 66(4), 483-491.

Kramer, M. S., Aboud, F., Mironova, E., Vanilovich, I., Platt, R. W., Matush, L., Igumnov, S., Fombonne, E., Bogdanovich, N., Ducruet, T., Collet, J. P., Chalmers, B., Hodnett, E., Davidovsky, S., Skugarevsky, O., Trofimovich, O., Kozlova, L., & Shapiro, S. (2008). Breastfeeding and child cognitive development: new evidence from a large randomized trial. *Archives of general psychiatry*, 65(5), 578-584.

Kulski, J. K., & Hartmann, P. E. (1981). Changes in human milk composition during the initiation of lactation. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 59(1), 101-114.

Labusová, E. (2008). Rozdíly mezi kojením a umělou výživou. Online 31. 1. 2015. Dostupné z: http://www.evalabusova.cz/clanky/rozdily_mezi.php.

Lawrence, R. A. (1999). Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. *Acta Paediatrica*, 88(s430), 14-18.

Lecuit, M., Abachin, E., Martin, A., Poyart, C., Pochart, P., Suarez, F., Bengoufa, D., Feuillard, J., Lavergne, A., Gordon, J. I., Berche, P., Guillevin, L., & Lortholary, O. (2004). Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *New England Journal of Medicine*, 350(3), 239-248.

Le Huërou-Luron, I., Blat, S., & Boudry, G. (2010). Breast-v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutrition research reviews*, 23(01), 23-36.

Lepri, L., Del Bubba, M., Maggini, R., Donzelli, G. P., & Galvan, P. (1997). Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 704(1), 1-10.

Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022-1023.

Liebhaber, M., Asquith, M. T., Olds-Arroyo, L., & Sunshine, P. (1977). Alterations of lymphocytes and of antibody content of human milk after processing. *The Journal of pediatrics*, 91(6), 897-900.

Life Sciences Research Office (LSRO) American Societies for Nutritional Sciences. Assessment of Nutrient Requirements for Infant formulas. 1998. *The Journal Nutrition*, 128(11): 2059–2294.

Lönnerdal, B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American journal of clinical nutrition*, 77(6), 1537S-1543S.

Lucas, A., & Cole, T. J. (1990). Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *The Lancet*, 336(8730), 1519-1523.

Mackie, R. I., Sghir, A., & Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American journal of clinical nutrition*, 69(5), 1035s-1045s.

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Xaus, J., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of pediatrics*, 143(6), 754-758.

McDougal, J. S., Martin, L. S., Cort, S. P., Mozen, M., Heldebrant, C. M., & Evatt, B. L. (1985). Thermal inactivation of the acquired immunodeficiency syndrome virus, human T lymphotropic virus-III/lymphadenopathy-associated virus, with special reference to antihemophilic factor. *Journal of Clinical Investigation*, 76(2), 875.

McVea, K. L., Turner, P. D., & Pepler, D. K. (2000). The role of breastfeeding in sudden infant death syndrome. *Journal of Human Lactation*, 16(1), 13-20.

- Měchurová, A.** (2015). Prodám mléko: Zn. mateřské. Online 29. 11. 2016. Dostupné z: <http://www.babyweb.cz/prodam-mleko-zn-materske>.
- Morales, Y., & Schanler, R. J.** (2007). Human milk and clinical outcomes in VLBW infants: how compelling is the evidence of benefit?. In *Seminars in perinatology* (Vol. 31, No. 2, pp. 83-88). WB Saunders.
- Musilova, S., Rada, V., Vlkova, E., Bunesova, V., & Nevorál, J.** (2015). Colonisation of the gut by bifidobacteria is much more common in vaginal deliveries than Caesarean sections. *Acta Paediatrica*, 104(4), e184-e186.
- Mydlilová, A.** (2006). Banky mateřského mléka v ČR. *Pediatric pro praxi*, 1, 56-57.
- Newburg, D. S., & Walker, W. A.** (2007). Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatric research*, 61(1), 2-8.
- Nicholson, J. K., Holmes, E., & Wilson, I. D. (2005). Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology*, 3(5), 431-438.
- Nommsen, L. A., Lovelady, C. A., Heinig, M. J., Lönnerdal, B., & Dewey, K. G.** (1991). Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. *The American journal of clinical nutrition*, 53(2), 457-465.
- Nommsen-Rivers, L. A., Dolan, L. M., & Huang, B.** (2012). Timing of stage II lactogenesis is predicted by antenatal metabolic health in a cohort of primiparas. *Breastfeeding Medicine*, 7(1), 43-49.
- Orloff, S. L., Wallingford, J. C., & McDougal, J. S.** (1993). Inactivation of human immunodeficiency virus type I in human milk: effects of intrinsic factors in human milk and of pasteurization. *Journal of Human Lactation*, 9(1), 13-17.
- Ott, S. J., Musfeldt, M., Wenderoth, D. F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U. R., Timmis, K. N., & Schreiber, S.** (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 53(5), 685-693.
- Pang, W. W., & Hartmann, P. E.** (2007). Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 12(4), 211-221.
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O.** (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biol*, 5(7), e177.
- Park, Y. W.** (2009). Overview of bioactive components in milk and dairy products. *Bioactive components in milk and dairy products*, 3-5.
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N., & Sibley, R. K.** (1991). *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 325(16), 1127-1131.
- Peila, C., Coscia, A., Bertino, E., Li Volti, G., Galvano, F., Barbagallo, I., Visser, G. H. A., & Gazzolo, D.** (2016). The Effect of Holder Pasteurization on Activin A Levels in Human Milk. *Breastfeeding Medicine*, 11(9), 469-473.

Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P., & Stobberingh, E. E. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2), 511-521.

Petschow, B., Doré, J., Hibberd, P., Dinan, T., Reid, G., Blaser, M., Cani, P. D., Degnan, F. H., Foster, J., Gibson, G., Hutton, J., Klaenhammer, T. R., Ley, R., Nieuwdorp, M., Pot, B., Relman, D., Serazin, A., & Sanders, M., E. (2013). Probiotics, prebiotics, and the host microbiome: the science of translation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1306(1), 1-17.

Power, S. E., O'Toole, P. W., Stanton, C., Ross, R. P., & Fitzgerald, G. F. (2014). Intestinal microbiota, diet and health. *British Journal of Nutrition*, 111(03), 387-402.

Reilly, J. J., Armstrong, J., Dorosty, A. R., Emmett, P. M., Ness, A., Rogers, I., Steer, C., & Sherriff, A. (2005). Early life risk factors for obesity in childhood: cohort study. *Bmj*, 330(7504), 1357.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology*, 2(4), 361-367.

Rothová, R. (2012). Prodám mateřské mléko, zn.: Ihned! Online 31. 1. 2015. Dostupné z: <http://www.maminka.cz/clanek/prodam-materske-mleko-zn-ihned>.

Roztočil, A. (2008). *Moderní porodnictví*. 1. vyd. Praha: Grada, 2008, 405 s. ISBN 978-802-4719-412.

Salminen, S., Gibson, G. R., McCartney, A. L., & Isolauri, E. (2004). Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut*, 53(9), 1388-1389.

Scariati, P. D., Grummer-Strawn, L. M., Fein, S. B., & Yip, R. (1997). Risk of diarrhea related to iron content of infant formula: lack of evidence to support the use of low-iron formula as a supplement for breastfed infants. *Pediatrics*, 99(3), e2-e2.

Schanler, R. J., Lau, C., Hurst, N. M., & Smith, E. O. B. (2005). Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants. *Pediatrics*, 116(2), 400-406.

Scientific Committee on Food. 2003. Report of the Scientific Committee on Food on the Revision of Essential Requirements of Infant Formula and Follow-on Formula. Brussels, Belgium. European Commission. SCF/CS/NUT/IF/65 Final 2003.

Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., & Dore, J. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, 52(2), 237-242.

Silvestre, D., López, M. C., March, L., Plaza, A., & Martinez-Costa, C. (2006). Bactericidal activity of human milk: stability during storage. *British journal of biomedical science*, 63(2), 59-62.

- Silvestre, D.**, Miranda, M., Muriach, M., Almansa, I., Jareno, E., & Romero, F. J. (2008). Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatrica*, 97(8), 1070-1074.
- Silvestre, D.**, Ruiz, P., Martinez-Costa, C., Plaza, A., & Lopez, M. C. (2008). Effect of pasteurization on the bactericidal capacity of human milk. *Journal of Human Lactation*, 24(4), 371-376.
- Stark, P. L.**, & Lee, A. (1982). The microbial ecology of the large bowel of breastfed and formula-fed infants during the first year of life. *Journal of medical microbiology*, 15(2), 189-203.
- Sun, J.**, & Chang, E. B. (2014). Exploring gut microbes in human health and disease: Pushing the envelope. *Genes & Diseases*, 1(2), 132-139.
- SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv). (2015). Příbalová informace: informace pro pacienta. Online 16. 3. 2017. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0012023&tab=texts>.
- Untalan, P. B.**, Keeney, S. E., Palkowetz, K. H., Rivera, A., & Goldman, A. S. (2009). Heat susceptibility of interleukin-10 and other cytokines in donor human milk. *Breastfeeding Medicine*, 4(3), 137-144.
- Van de Perre, P.** (2003). Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine*, 21(24), 3374-3376.
- Vael, C.**, & Desager, K. (2009). The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Current opinion in pediatrics*, 21(6), 794-800.
- Vokurková, I.** (2013). Mateřské mléko nad zlato. Litr se prodává i za 1200 korun. Online 4. 3. 2015. Dostupné z: http://www.tyden.cz/rubriky/zdravi/zdravi/materske-mleko-nad-zlato-litrse-prodava-i-za-1200-korun_259055.html#.VPd2AfmG8o4.
- Wells, J. C. K.** (1996). Nutritional considerations in infant formula design. In *Seminars in Neonatology* (Vol. 1, No. 1, pp. 19-26). WB Saunders.
- Wight, N. E.** (2001). Donor human milk for preterm infants. *Journal of Perinatology*, 21(4).
- World Health Organization (WHO). (1979). *Breastfeeding*.
- Zhang, L.**, Boeren, S., Smits, M., van Hooijdonk, T., Vervoort, J., & Hettinga, K. (2016). Proteomic study on the stability of proteins in bovine, camel, and caprine milk sera after processing. *Food Research International*, 82, 104-111.
- Zoetendal, E. G.**, Akkermans, A. D., & De Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), 3854-3859.