

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Stanovení inhibičních účinků mastných kyselin se střední
délkou řezězce na vybrané bakterie**

Bakalářská práce

Jolana Richterová

Výživa a potraviny

prof. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Stanovení inhibičních účinků mastných kyselin se střední délkou řezězce na vybrané bakterie" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17.7.2020 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní prof. MVDr. Evě Skřivanové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné rady při zpracování této bakalářské práce. Děkuji také Ing. Kláře Laloučkové za trpělivost a ochotu, kterou mi věnovala při zpracovávání praktické části. A v neposlední řadě bych také ráda poděkovala panu Willemu Ederveenovi zastupujícímu firmu Daa Vision za poskytnutí vzorků.

Stanovení inhibičních účinků mastných kyselin se střední délkou řetězce na vybrané bakterie

Souhrn

Cílem práce bylo stanovit inhibiční aktivitu mastných kyselin se střední délkou řetězce (MCFAs) vůči *Salmonella enteritidis* 147/7F4, *S. typhimurium* K3, *Enterococcus cecorum* CCM 4385, *E. faecium* CCM 6226, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300.

Za minimální inhibiční koncentraci (MIC) bylo považováno množství aditiva, které způsobilo 80% úbytek růstu bakterií v porovnání s kontrolou. Inhibiční aktivita byla posuzována po 24 - hodinové inkubaci a následném změření zákalu ve všech 96 jamkách mikrotitrační destičky. Pro kultivaci bylo využito Müller-Hinton bujónu. Testováno bylo celkem 17 aditiv.

Nejméně účinná byla aditiva v inhibici gramnegativních bakterií rodu *Salmonella*. Nejnižší stanovená MIC činila 2048 µg/ml Cit₁₂/CitA (50/50), CinA/C₁₂ (50/50), GML/CinA (50/50) vůči *S. enteritidis* 147/7F4. Ostatní aditiva růst neinhibovala. V případě *S. typhimurium* K3 ani jedno aditivum nezpůsobilo MIC nižší než 4096 µg/ml.

Bakterie rodu *Staphylococcus* byly citlivé na přítomnost všech aditiv. Nejnižší stanovená MIC pro *S. aureus* ATCC 29213 byla 56 µg/ml při využití C₁₂/C₁₄ (70/30). Zbylá aditiva inhibovala růst v koncentracích 128-2048 µg/ml. Pro *S. aureus* ATCC 43300 byla nejnižší MIC 64 µg/ml naměřena za přidání aditiva C₁₂/C₁₄+GML+CinA (24,5/10,5/35/30). Ostatní aditiva inhibovala růst v koncentracích 64-2048 µg/ml.

Grampozitivní bakterie rodu *Enterococcus* reagovaly na aditiva obecně dobře. Vůbec nejnižší zaznamenaná hodnota MIC z celého měření byla 32 µg/ml C₁₄ vůči *E. cecorum* CCM 4385. MIC aditiv inhibujících *E. cecorum* CCM 4385 nabývala hodnot 64 až >4096 µg/ml. Aditiva s GML obecně špatně inhibovala růst *E. cecorum* CCM 4385. Nejnižší stanovená MIC pro *E. faecium* CCM 6226, 64 µg/ml, byla naměřena pro čtyři aditiva – C₁₂/C₁₄+GML (35/15/50), C₁₂/C₁₄+GML, GML (90), C₁₂/C₁₄ (70/30). MIC aditiv inhibujících *E. faecium* CCM 6226 činily 128-1024 µg/ml.

Z výsledků je patrné, že aditiva s obsahem MCFAs, a to jak samotných, tak i v kombinaci s dalšími antibakteriálními činidly, působí inhibičně především na grampozitivní bakterie.

Klíčová slova: mastné kyseliny, bakterie, minimální inhibiční koncentrace, antibakteriální

Determination of inhibitory activity of medium-chain fatty acids towards selected bacteria

Summary

The main focus of this bachelor thesis is on determination of the minimal inhibitory concentrations of medium chain fatty acids against selected bacteria, namely *Salmonella enteritidis* 147/7F4, *S. typhimurium* K3, *Enterococcus cecorum* CCM 4385, *E. faecium* CCM 6226, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300.

The minimal inhibitory concentration was determined by microdilution method, by comparing the growth of bacteria in wells with and without antibacterial agents. Antibacterial activity was analyzed after one day long incubation in Müller-Hinton broth by performing microdilution test in 96-well microtitration plates. In total 17 additives were tested.

Based on our results the additives in inhibition of gram-negative strains of *Salmonella* were the least effective. The lowest MIC (2048 µg/ml) that inhibited *S. enteritidis* 147/7F4 showed Cit₁₂/CitA (50/50), CinA/C₁₂ (50/50), GML/CinA (50/50). Other additives did not have the ability to inhibit the growth of bacteria. In case of *S. typhimurium* K3 the MIC of all additives did not get lower than 4096 µg/ml.

Bacterial strains of *Staphylococcus* were sensitive to all additives. The lowest MIC (56 µg/ml) caused by C₁₂/C₁₄ (70/30) inhibited the growth of *S. aureus* ATCC 29213. Other additives showed MIC in range from 128 to 2048 µg/ml. C₁₂/C₁₄+GML+CinA (24,5/10,5/35/30) proved to be the best in inhibition of *S. aureus* ATCC 43300, effectiveness starting at MIC 64 µg/ml. Other additives showed MIC in range from 64 to 2048 µg/ml.

Gram-positive strains of *Enterococcus* were generally sensitive to tested additives. The strongest antibacterial activity was observed in C₁₄, that inhibited *E. cecorum* CCM 4385 by MIC 32 µg/ml. Other additives showed MIC in range from 64 to more than 4096 µg/ml. In most cases GML based additives did not inhibit the growth of *E. cecorum* CCM 4385.

The strongest antimicrobial activity against *E. faecium* CCM 6226 was observed in relation to four additives: C₁₂/C₁₄+GML (35/15/50), C₁₂/C₁₄+GML, GML (90), C₁₂/C₁₄ (70/30). MIC equals to 64 µg/ml in all four cases. Other additives showed MIC in range from 128 to 1024 µg/ml.

In conclusion, antimicrobial effect of MCFAs, GML, citric and cinnamon acid was observed mostly in gram-positive bacteria.

Keywords: fatty acids, bacterium, minimum inhibitory concentrations, antibacterial

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Cíl práce.....	10
3 Literární rešerše.....	11
3.1 Mastné kyseliny	11
3.1.1 Antimikrobiální účinky mastných kyselin.....	12
3.1.2 Působení volných mastných kyselin na metabolismus bakterií.....	12
3.1.3 Lýza buněk	12
3.1.4 Bakteriální rezistence	12
3.2 Mastné kyseliny o střední délce řetězce	13
3.2.1 Kapronová kyselina	13
3.2.2 Kaprylová kyselina	14
3.2.3 Kaprinová kyselina	14
3.2.4 Laurová kyselina	15
3.3 Mastné kyseliny o střední délce řetězce v potravinách	15
3.3.1 Mastné kyseliny v mléce hospodářských zvířat	15
3.4 Metabolismus mastných kyselin.....	16
3.4.1 Transport z krevního řečiště do jater.....	17
3.4.2 Trávení a absorpce.....	17
3.4.3 Vliv konzumace MCFAs a MCT na obezitu	17
3.4.4 Využití MCFAs při léčebných dietách.....	18
3.4.5 MCFAs a ketolátky	18
3.5 Ostatní aktivní složky testovaných přípravků.....	18
3.5.1 Myristová kyselina (LCFAs)	18
3.5.2 Citronová kyselina	19
3.5.3 Skořicová kyselina.....	19
3.5.4 Monolaurin	20
3.5.5 Synergismus antibakteriálních činidel	21
3.6 Bakterie rodu Salmonella	21
3.6.1 Charakteristika	21
3.6.2 Zástupci rodu <i>Salmonella</i>	21
3.6.2.1 <i>Salmonella enteritidis</i>	22
3.6.2.2 <i>Salmonella typhimurium</i>	23
3.6.3 Případy nákazy člověka salmonelou v České republice	23
3.6.4 Rezistence rodu <i>Salmonella</i> k antibiotikům	24
3.6.5 Prevence nákazy	24

3.7	Bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	25
3.7.1	Charakteristika	25
3.7.2	Zástupci rodu <i>Staphylococcus</i>	25
3.7.2.1	Koaguláza negativní stafylokoky	25
3.7.2.2	Koaguláza pozitivní stafylokoky	26
3.7.2.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.8	Bakterie rodu <i>Enterococcus</i>	28
3.8.1	Charakteristika	28
3.8.2	Zástupci rodu <i>Enterococcus</i>	28
3.8.2.1	Výskyt enterokoků v prostředí	29
3.8.2.2	<i>Enterococcus cecorum</i>	29
3.8.2.3	Patogenní <i>Enterococcus cecorum</i>	29
3.8.2.4	<i>Enterococcus faecium</i>	30
4	Metodika	32
4.1	Materiál a metody	32
4.1.1	Materiál využitý v praktické části bakalářské práce	32
4.1.1.1	Bakteriální kmeny	32
4.1.1.2	Aditiva	32
4.1.1.3	Použité chemikálie	33
4.1.1.4	Přístroje a pomůcky	33
4.1.2	Metody	34
4.1.2.1	Testování antibakteriální aktivity komerčních přípravků na bázi mastných kyselin, kyseliny skořicové a kyseliny citronové	34
4.1.2.2	Stanovení minimální inhibiční koncentrace	36
5	Výsledky	37
5.1	Minimální inhibiční koncentrace	37
5.1.1	MIC-bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	37
5.1.2	MIC-bakterie rodu <i>Salmonella</i>	39
5.1.3	MIC-bakterie rodu <i>Enterococcus</i>	40
5.1.4	Porovnání účinků aditiv	40
6	Diskuze	44
7	Závěr	47
8	Literatura	48
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	56

1 Úvod

Nadměrné využívání antibakteriálních přípravků v medicíně, zemědělství a veterinární praxi zapříčinilo celosvětový nárůst antibakteriálních rezistencí. Infekce způsobené rezistentními bakteriemi si žádají komplikovanější i finančně náročnější léčbu. I přes vynaložené úsilí vedou tyto infekce procentuálně častěji k úmrtí člověka a zvířat (Tang et al., 2017).

Ve velké míře přispěla k rozšíření rezistencí plošná aplikace antibiotik jako růstových stimulátorů u zvířat. Toto využití bylo roku 2006 v EU zakázáno, avšak v jiných zemích je stále běžnou praxí (Evropská unie 2019). Rezistentní bakterie se mohou přenášet ze zvířat na člověka a to buď přímým kontaktem nebo prostřednictvím vody a jídla (Marshall & Levy 2011). Možný je též přenos bakterií vzduchem na vzdálenost stovek metrů (Andreoletti et al. 2007).

Dlouhodobým problémem je nedostatek nových antibiotik na trhu. Farmaceutické firmy nedokáží držet krok s přirozenou evolucí mikroorganismů. Mnohé farmaceutické firmy proto upouštějí od drahého vývoje přípravků a soustředí se na výrobu jiných léčiv (Bartlett, Gilbert, & Spellberg 2013). Hledají se tak nové prostředky v boji s bakteriemi (Tang et al. 2017).

Možné řešení představují mastné kyseliny a jejich deriváty, jejichž antimikrobiální účinky vůči bakteriím, virům, protozoa a houbám jsou známé již mnoho let (McGaw, Jäger, & Van Staden 2002). Mastné kyseliny dokáží pronikat přes buněčné stěny bakterií, ovlivňovat metabolismus buněk či destabilizovat buněčnou membránu a způsobit zánik buňky (Desbois & Smith 2010). Jejich účinek byl prokázán jak na grampozitivní, tak na gramnegativní bakterie (McGaw et al. 2002).

Zdrojem mastných kyselin o různých délkách řetězce jsou rostlinné oleje získávané převážně z tropických rostlin. Živočišným zdrojem mastných kyselin jsou mateřská mléka včetně lidského (Lemarié, Beauchamp, Drouin et al. 2018).

2 Cíl práce

Cílem práce bude stanovit inhibiční aktivitu mastných kyselin se střední délkou řetězce (MCFA) na vybrané druhy bakterií rodů *Salmonella*, *Enterococcus* a *Staphylococcus* mikrodiluční metodou. Výsledky vyhodnotit a diskutovat s dostupnou literaturou.

3 Literární rešerše

3.1 Mastné kyseliny

Jedná se o karboxylové kyseliny, tvořeny jsou 4-26 uhlíky uspořádanými do alifatického řetězce. Dle přítomnosti dvojně vazby dělíme mastné kyseliny (MK) na nasycené a nenasycené. Existují v podobě volných mastných kyselin (VMK) či jako součást lipidů, tj. esterů vyšších mastných kyselin s glycerolem (Moss, Smith, & Tavernier 1995).

Nasycené MK (saturated fatty acids-SAFA) obsahují ve svém řetězci pouze jednoduché vazby. Naopak nenasycené mají ve svém řetězci přítomnu buď jednu dvojnou vazbu (monounsaturated fatty acids-MUFA) či více dvojných vazeb (polyunsaturated fatty acids-PUFA) (Engelking 2015).

Dle délky řetězce dělíme MK do čtyř skupin – s krátkým řetězcem (short chain fatty acids - SCFAs - C₁-C₅), se středně dlouhým řetězcem (medium chain fatty acids - MCFAs - C₆-C₁₂), s dlouhým řetězcem (long chain fatty acids - LCFAs - C₁₃-C₂₁) a s velmi dlouhým řetězcem (very long chain fatty acids - VLCFAs - C₂₂+) (Moss et al. 1995). V tabulce č.1 pod textem je vypsán přehled nasycené mastných kyselin s barevně vyznačenými MCFAs.

MK jsou biologicky aktivní, ovlivňují buněčný a tkáňový metabolismus, funkci a odpověď na hormonální a jiné signály. Mají vliv na transkripční faktor (Calder 2015). Což je protein, který určuje míru transkripce genetické informace z DNA do messengerové RNA (Huber et al. 2017). MCFAs regulují metabolismus enterocytů a hepatocytů, stimulují lipogenezi a glukoneogenezi, naopak inhibují glykolýzu. Zasahují do anabolismu a katabolismu buněk (Papamandjaris, Macdougall, & Jones 1998). Těmito vlastnostmi MK do jisté míry ovlivňují zdraví člověka a zvířat (Calder 2015).

Tabulka 1 Přehled nasycených mastných kyselin

Počet uhlíků	Triviální název	Systematický název	Funkční vzorec
C4	Máselná	Butanová	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH
C6	Kapronová	Hexanová	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH
C8	Kaprylová	Oktanová	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH
C10	Kaprinová	Dekanová	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH
C12	Laurová	Dodekanová	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH
C14	Myristová	Tetradekanová	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH
C16	Palmitová	Hexadekanová	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
C18	Stearová	Oktadekanová	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
C20	Arachová	Eikosanová	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH
C22	Behenová	Dokosanová	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH
C24	Lignocerová	Tetrakosanová	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH
C26	Cerotová	Hexakosanová	CH ₃ (CH ₂) ₂₄ COOH

3.1.1 Antimikrobiální účinky mastných kyselin

Antimikrobiální účinky MK a jejich derivátů jsou známy již po mnoho let. MK dokáží inhibovat růst rozličných druhů bakterií, virů, protozoí a hub. Především působí na gram-positivní bakterie s výjimkou malého množství gramnegativních. Délka řetězce MK rozhoduje o specifitě účinku na daný patogen. Gram-positivní bakterie reagují nejvíce na MK s delšími řetězci, a to i za přítomnosti v nižších koncentracích. Naopak gramnegativní bakterie inhibují lépe SCFAs, avšak přítomny musí být ve vyšších koncentracích. Stereochemie MK též ovlivňuje antimikrobiální působení. Cis-izomery nenasycených MK jsou antimikrobiálně účinnější nežli trans-izomery (McGaw et al. 2002).

3.1.2 Působení volných mastných kyselin na metabolismus bakterií

MCFAs i LCFAs v nasycené i nenasycené podobě, které proniknou přes vnitřní membránu bakterií, se mohou potencionálně navázat na přenašeče elektron-transportního řetězce. Navázáním na přenašeče dochází k jejich rozpohybování či úplnému přemístění mimo membránu buňky. Elektron-transportní řetězec je dále narušován snižováním fluidity membrány a zabraňováním interakcí mezi jednotlivými přenašeči. Těmito kroky dojde k narušení schopnosti elektron-transportního řetězce přenášet elektrony, což vede k poškození protonového gradientu a snížení membránového potenciálu a s tím spojené zpomalení produkce ATP. Potenciální energie, která je vytvořena elektron-transportním řetězcem, se uvolňuje ve formě tepla a není využita na tvorbu ATP, díky čemuž bakterie postrádá energii pro svůj metabolismus (Desbois, Smith 2010).

3.1.3 Lýza buněk

Pokud dojde k proniknutí volných nenasycených MK do vnitřní membrány bakteriální buňky stává se membrána více fluidní a propustnější. Vnitřní obsah buňky tak může pronikat do mimobuněčného prostoru a zamezit růstu buňky. Dochází-li k nadměrně rychlému zvyšování fluidity, membrána se stává nestabilní, což vede k lýze buňky (Desbois, Smith 2010).

3.1.4 Bakteriální rezistence

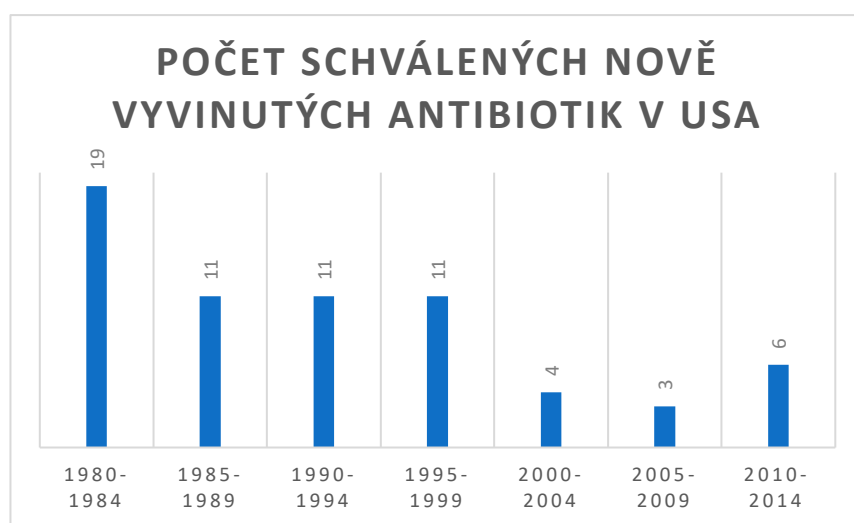
Objev antibiotik pomohl k záchraně milionů životů na celém světě. Od začátku využívání antibiotik uplynuly již desítky let. Za tuto dobu si mnohé bakterie dokázaly vytvořit bakteriální rezistenci (Golkar, Bagasra, Gene 2014). Ke vzniku rezistence dochází díky mutaci bakteriálních genů či získání exogenních genů rezistence, které v sobě nesou R-plasmidy (Livermore, Macgowan, Wale 2018). Rezistence se rozmáhá z důvodu předepisování nevhodných antibiotik nebo jejich nadměrnému užívání (Golkar et al. 2014). Antibiotika se hojně využívají k urychlení růstu hospodářských zvířat. 80 % veškerých antibiotik ve Spojených státech amerických (USA) bylo předepsáno právě zvířatům (Jackson et al. 2015). V USA žije 4,6 %

celosvětové populace, avšak podílejí se ze 46 % na celosvětovém trhu s antibiotiky. Pacient americké nemocnice má přibližně o 49 % vyšší šanci k nakažení methicilin-rezistentním *Staphylococcus aureus* (MRSA), než pacient z Nizozemska (Bartlett et al. 2013).

Množství nově vyvinutých a schválených antibiotických přípravků se obecně s přibývajícimi roky snižuje (Mella 2005). Graf č. 1 zobrazuje počet nově vyvinutých a schválených antibiotických přípravků na území USA. Z grafu je patrný klesající trend s výjimkou v roce 2014, kdy byly schváleny čtyři nové přípravky (Ventola 2015).

Evropská unie (EU) má oproti USA přísnější pravidla pro nakládání s antibiotiky (Bartlett et al. 2013). Antibiotika jako růstové stimulanty jsou v EU zakázána od roku 2006. Ale i přes to se EU potýká s obdobnými problémy jako Amerika. Přes 2/3 antibiotik je aplikováno zvířatům ve výkrmu. Antibiotika touto cestou pronikají do životního prostředí (Evropská unie 2019).

(Tang et al. 2017) prokázali, že snížením dávky antibiotik u hospodářských zvířat dojde též ke snížení množství mikroorganismů, které jsou rezistentní k antibiotikům. Veterinární podávání antibiotik úzce souvisí se vznikem bakteriálních rezistencí u člověka (Evropská unie 2019). Využití antimikrobiálních vlastností MK při prevenci a léčbě onemocnění je do budoucna možnou variantou (McGaw et al. 2002).



Graf 1 Množství nově vyvinutých a schválených antibiotických přípravků v USA (Ventola, 2015).

3.2 Mastné kyseliny o střední délce řetězce

3.2.1 Kapronová kyselina

Kapronová kyselina je sama o sobě bezbarvou olejovitou tekutinou vonící po sýru. Bezpečná je konzumace do 1 g kys. kapronové na 1 kg tělesné hmotnosti (Traul et al. 2000). Přirozeně se nachází v kozím a kravském mléku (Haenlein, 2004). Kokosový olej obsahuje 0,2 – 0,5 % kapronové kyseliny, ze všech MK přítomných v kokosovém oleji je to procentuálně nejméně viz tabulka č. 2 (Cabellero et al. 2003). Působí antimikrobiálně na *Streptococcus mutans*, bakterii, která se obvykle nachází v dutině ústní (Huang et al. 2011).

Tabulka 2 Složení kokosového oleje dle (Cabellero et al. 2003)

Název mastné kyseliny	% zastoupení
Kapronová kyselina	0,2-0,5
Kaprylová kyselina	5,4-9,5
Kaprinová kyselina	4,5-9,7
Laurová kyselina	44,1-51
Myristová kyselina	13,1-18,5
Palmitová kyselina	7,5-10,5
Stearová kyselina	1,0-3,2
Arachidonová kyselina	0,2-1,5
Olejová kyselina	5,0-8,2
Linolová kyselina	1-2,6

3.2.2 Kaprylová kyselina

Přirozeným zdrojem kaprylové kyseliny jsou kokosový olej (6-10 % z přítomných MK) a palmojádrový olej (2-5 % z přítomných MK). V prodeji jsou potravinové doplňky s kaprylovou kyselinou, které slibují zlepšení trávení. Potencionální výhody suplementace jsou předmětem studií (Lemarié et al. 2018).

Mléko je jediným živočišným zdrojem kaprylové kyseliny, obsah se liší u jednotlivých živočichů. Lidské mléko obsahuje 0,5 % kaprylové kyseliny (z přítomných MK), kravské 1-2 %, kozí 3 % a králíčí dokonce až 18 % kaprylové kyseliny ze všech přítomných MK (Lemarié et al. 2018).

Nově byla prokázána spojitost kaprylové kyseliny a ghrelinu. Kaprylová kyselina se kovalentně váže na peptid ghrelinu a dokáže ovlivnit jeho fyziologickou činnost (Lemarié et al. 2018). Ghrelin je peptidový hormon produkovaný periferními orgány, ovlivňuje také činnost mozku. Považuje se za hlavní regulátor glukózového metabolismu. Jeho působení je ovlivňováno enzymem ghrelin-O-acyltransferáza (GOAT), který dokáže vytvořit aktivní formu tohoto metabolického hormonu. GOAT acylací progherlin dá vzniknout acyl ghrelinu. Pochopení podstaty fungování GOAT je důležité k rozklíčování metabolismu ghrelinu a s ním související regulace apetitu a rozvoj obezity či rezistence k inzulinu (Khatib et al. 2015).

Kaprylová kyselina v množství 2 g na 1 kg krmné dávky způsobuje rychlejší růst, nižší mortalitu a zlepšení trávení u selat. Byla zaznamenána efektivnější konverze krmiva (1,3 kg krmiva/1 kg přírůstkem) v porovnání s kontrolní skupinou selat (Hanczakowska, Szewczyk, Okoň 2011)

3.2.3 Kaprinová kyselina

Kyselina kaprinová je složkou palmojádrového a kokosového oleje přibližně z 6 % (Beare-Rogers, Dieffenbacher, Holm 2007). Po přidání do krmné dávky selat v množství 2 g na 1 kg směsi byl zaznamenán vyšší denní přírůstek, nižší mortalita a také lepší stravitelnost proteinů

ve stravě, v menší míře zlepšení trávení vlákniny. Nejsilnější účinek měla kyselina kaprinová na rozměry střevních klků. U selat, kterým byla zkrmována strava s kyselinou kaprinovou, dosahovaly klky délky 306 μm , u kontrolní skupiny pak délky 233 μm . Tento nárůst zapříčiňují výše zmíněná pozitiva (Hanczakowska et al. 2011).

3.2.4 Laurová kyselina

Hlavním zdrojem laurové kyseliny je kokosový a palmový olej. Přídavkem kyseliny laurové do potravy dochází k celkovému zvýšení hladiny cholesterolu v krvi. Avšak zvyšuje především hodnoty HDL cholesterolu (Mensink, Zock, Kester, Katan 2003). Kokosový olej obsahuje nejvíce právě laurové kyseliny, a to až z 51 % (Cabellero et al. 2003). Dále ji nacházíme v oleji z jader datlí, ve složení je hned na druhém místě za kyselinou olejovou, procentuálně zastupuje 17,8 % z celku (Besbes et al. 2004).

Lidské mateřské mléko obsahuje 6,2 % laurové kyseliny z celkového tuku. Jedná se o hlavní antibakteriální a antivirovou složku mateřského mléka (Lieberman, Enig, & Preuss 2006). U kravského mléka je obsah poněkud menší, pouze 2,9 % laurové kyseliny z celkového tuku. Kozí mléko obsahuje 3,1 % laurové kyseliny z celkového tuku (Beare-Rogers et al. 2007).

Z organických kyselin má nejvyšší *in vitro* aktivitu proti *Campylobacter jejuni* právě laurová kyselina. Bakterie rodu *Campylobacter* jsou častými původci průjemových onemocnění člověka. Zdrojem nákazy je drůbež (Hankel et al. 2018).

Laurová kyselina může být využita jako alternativa k léčbě *Acne vulgaris* namísto antibiotik. Působí antimikrobiálně na *Propionibacterium acnes*, které rozvíjí zánětlivé procesy v kůži (Nakatsuji et al. 2009).

3.3 Mastné kyseliny o střední délce řetězce v potravinách

MCFAs nejsou v lidském jídelníčku tak hojně zastoupeny jako LCFAs. Výjimku tvoří převážně asijské státy, které ve velkém množství konzumují kokosový olej (Labarthe, Gélinas, Des Rosiers 2008). V případě západní stravy poskytují MCFAs méně než 2 % z celkové přijaté energie. V našich podmínkách je přirozeným zdrojem MCFAs především mléko hospodářských zvířat (Lemarié et al. 2018).

3.3.1 Mastné kyseliny v mléce hospodářských zvířat

Jednotlivé druhy mléka se mimo jiné liší zastoupením MK. Kozí mléko je oproti kravskému bohatší o máselnou, kapronovou, kaprylovou, kaprinovou, laurovou, myristovou, palmitovou a linolovou kyselinu. Naopak obsahuje méně stearové a olejové kyseliny. Díky převažujícímu výskytu kapronové, kaprylové a kaprinové kyseliny v kozím mléce byly názvy těchto kyselin odvozeny od latinského pojmenování pro kozu - *Capra aegagrus hircus* (Haenlein 2004).

Mléčný tuk je z hlediska zastoupení lipidů jedním z nejkompexnějších přírodních tuků. Triacylglyceridy kravského mléka jsou syntetizovány z více než 400 různých MK. Rozdíly v obsahu jednotlivých kyselin jsou dány druhem zvířete, šlechtěním, fází laktace, bachorovou

fermentací, složením krmné dávky a také sezónními rozdíly. V létě, kdy chodí krávy na pastvu, obsahuje jejich mléko nižší podíl nasycených MK a vyšší podíl nenasycených MK. V zimě je tomu přesně naopak (Lindmark Månsson 2008).

Kozy, kterým byla zkrmována ve větší míře zelená píče, poskytovaly mléko s vyšším obsahem máselné, kapronové, stearové, olejové, α -linolenové a eikosanové kyseliny, oproti kozám, které měly zelené píče méně. Ty ale produkovaly více kaprinové, laurové, myristové, palmitové a linolové kyseliny. Krmivo s vyšším obsahem vojtěšky způsobilo vytvoření méně nežádoucích trans- $C_{18:1}$ MK, tj. elaidové kyseliny (Haenlein 2004).

Tabulka č.3 porovnává obsah průměrného zastoupení MK (g/100 g mléka) u kozího a kravského mléka (Haenlein 2004).

Tabulka 3 Obsah MK v kravském a kozím mléce v gramech na 100 g mléka dle (Haenlein 2004)

	Kozí mléko (g)	Kravské mléko (g)
$C_{6:0}$ – kapronová kys.	0,13	0,11
$C_{8:0}$ – kaprylová kys.	0,09	0,06
$C_{10:0}$ – kaprinová kys.	0,1	0,04
$C_{12:0}$ – laurová kys.	0,26	0,08
$C_{14:0}$ – myristová kys.	0,12	0,09
$C_{16:0}$ – palmitová kys.	0,32	0,34
$C_{18:0}$ – stearová kys.	0,91	0,88
C_{6-14}	0,44	0,4
C_{6-14} celkové MCT	0,89	0,61
C_{4-18} celkové SAFA	2,67	2,08
$C_{16:1}$ palmitolejová kys.	0,08	0,08
$C_{18:1}$ – olejová kys.	0,98	0,84
$C_{16:1-22:1}$ MUFA	1,11	0,96
$C_{18:2}$ linolová kys.	0,11	0,08
$C_{18:3}$ linolenová kys.	0,04	0,05
$C_{18:2-18:3}$ celkové PUFA	0,15	0,12

3.4 Metabolismus mastných kyselin

MK a to jak volné, tak i navázené v komplexních lipidech hrají důležitou roli v metabolismu. Nalezneme je ve všech buněčných membránách. Jsou hlavním zdrojem zásobní energie. MK, které jsou součástí komplexních lipidů představují zdroj tepelné, elektrické a mechanické izolace. Součástí lidského jídelníčku bývají z 30-35 %. Jeden gram tuku dodá tělu 38 kJ. Dospělý člověk za den zkonsumuje přibližně 85 g tuku, většinou ve formě triacylglyceridů. V průběhu trávení vznikají volné mastné kyseliny (VMK) a monoacylglyceroly. Transport z krevního řečiště, absorpce a samotné trávení se odlišuje u mastných kyselin dle délky řetězce (Rustan, Drevon 2005).

3.4.1 Transport z krevního řečiště do jater

Transport MCFAs i SCFAs je v porovnání s LCFAs mnohonásobně rychlejší. MCFAs jsou přemístovány ze střev přímo do jater prostřednictvím portální žíly. V krevním řečišti se VMK napojují na plazmatické přenašeče – albuminy (Schönfeld, Wojtczak 2016). Pro porovnání LCFAs musí nejprve proniknout do lymfy, která se nachází v okolí střev. Následně putují mizovody v podobě chylomikronů do hrudního mizovodu, místa, kde se slévá lymfa z většiny tělních orgánů a ústí zde do krevního řečiště. Až v tento moment mohou LCFAs zahájit transport krví do jater, kde dochází k jejich metabolismu (Aoyama, Nosaka, Kasai 2007).

3.4.2 Trávení a absorpce

Po úspěšném transportu do jater podléhají MCFAs katabolickým přeměnám. Nejčastěji dochází k β –oxidaci (Schönfeld, Wojtczak 2016). β –oxidace je katabolický proces, který probíhá u eukaryotních buněk v matrix mitochondrií. Dochází ke vzniku acetyl-CoA, který vstupuje do Krebsova cyklu a redukovaných koenzymů, které postupují do dýchacího řetězce (Houten, Wanders 2010).

Může proběhnout i Ω -oxidace. K ní dochází v endoplazmatickém retikulu či cytoplazmě buněk při narušení β –oxidace a to u MK s 10-12 C. Vznikají dikarboxlové kyseliny (Lemarié et al. 2016).

Do buněčných mitochondrií pronikají SCFAs a MCFAs nezávisle na přítomnosti enzymu karnitinu. Karnitin je nepostradatelný při přenosu LCFAs (Papamandjaris et al. 1998). SCFAs a MCFAs ovlivňují vznik energie v mitochondriích dvěma způsoby. Dodávají redukční koenzymy do dýchacího řetězce a částečně snižují oxidační syntézu ATP (Schönfeld, Wojtczak 2016).

Absorbované MCFAs jsou rychleji hydrolyzovány a komplexněji metabolizovány nežli je tomu u LCFAs (Aoyama et al. 2007). Rychlejší vstřebávání je zajištěno menší molekulovou hmotností MCFAs, díky níž může pankreatická lipáza efektivněji účinkovat (Papamandjaris et al. 1998).

LCFAs se po proniknutí do vnitřního prostoru buňky aktivují na odpovídající Acyl-Co deriváty. Ty jsou buď zakomponovány do mezibuněčné tukové tkáně anebo vstupují do mitochondrií, kde proběhne jejich β -oxidace (Labarthe et al. 2008). MCFAs nejsou zabudovávány do tukové tkáně (Schönfeld, Wojtczak 2016).

3.4.3 Vliv konzumace MCFAs a MCT na obezitu

U pacientů s nadváhou, kterým byla podávána strava bohatá na MCFAs došlo k redukcí hmotnosti a zvýšenému výdeji energie oproti pacientům, kteří přijímali stejné množství kalorií avšak z diet bohatých na LCFAs (Lemarié et al. 2018).

U obézních i u zdravých myší konzumace triglyceridů o střední délce řetězce (MCT)

optimalizuje tělesnou hmotnost a zvyšuje citlivost k inzulinu. MCT snižují u myší zásoby jaterních tukových kapiček a bílé tukové tkáně. Stimulují termogenezi hnědé tukové tkáně. Strava bohatá na MCT tak představuje jednu z možností prevence obezity, steatózy jater a

diabetu 2. typu. Tato onemocnění jsou z části přičítána stravě bohaté na triglyceridy s dlouhým řetězcem (Rial et al. 2020).

3.4.4 Využití MCFAs při léčebných dietách

Díky rychlé absorpci, která nevyžaduje dodání energie, jsou MCFAs využívány při léčbě malnutrice či malabsorpce. Zvýšený příjem MCFAs je vhodný při určitých typech kardiomyopatie, kdy právě MCFAs dodávají potřebnou energii myokardu (Schönfeld, Wojtczak 2016).

Navýšený příjem MCFAs je také nutný při vrozené poruše β – oxidace LCFAs (Schönfeld, Wojtczak 2016). Poprvé byly použity v praxi v 50. letech 20. století k léčbě špatného vstřebávání tuků (Labarthe et al. 2008).

Studie na krysách a lidech prokázala, že strava bohatá na MCFAs vede k menšímu riziku vzniku rezistence k inzulinu, než je tomu u stravy, ve které převládají LCFAs (McCarty, DiNicolantonio 2016).

3.4.5 MCFAs a ketolátky

Po vstupu do jaterních mitochondrií, dojde k β -oxidaci MCFAs. Nadbytečný Acetyl-coA, který se nemůže uplatnit v jiných metabolických drahách, vstupuje do ketogeneze, pohání tvorbu ketolátek. Ketolátky představují alternativní zdroj energie pro tělo. Strava bohatá na MCFAs zvyšuje koncentraci ketolátek v krevní plazmě, a to bez dlouhodobého odepírání sacharidů. Navýšení ovšem není tak drastické jako při dlouhotrvajícím hladovění či jídelníčku ochuzeném o sacharidy (McCarty, DiNicolantonio 2016).

Pacienti při této dietě pokrývají svoji denní spotřebu energie z 40-60 % triglyceridy o střední délce řetězce. Ketogenní dieta má slibný potenciál při léčbě neurologických onemocnění jako je Alzheimerova choroba, epilepsie či autismus (Lemarié et al. 2018).

Avšak dodržování ketogenní diety pouze za účelem redukce hmotnosti není optimální. Jedná se o striktní dietu, kterou většina jedinců nedokáže dlouhodobě dodržovat, dostavit se může i jojo efekt (Campos 2017).

3.5 Ostatní aktivní složky testovaných přípravků

3.5.1 Myristová kyselina (LCFAs)

Tato 14-ti uhlíková nenasycená kyselina je součástí lidských buněčných membrán, avšak v nižších koncentracích než kyselina palmitová či stearová (Stillwell 2016). Z hlediska počtu uhlíků ji zařazujeme do kategorie kyselin s dlouhým řetězcem.

Své jméno získala podle latinského označení pro muškátový oříšek, *Myristica fragrans*, ze kterého byla poprvé izolována. Krom muškátového oříšku ji nalezneme v palmojádrovém oleji, kokosovém oleji, mléčném tuku a v mateřském mléce (Beare-Rogers et al. 2007). Kravské

mléko obsahuje 8-14 % kyseliny myristové, lidské mléko v průměru 8,6%. Kyselina myristová přispívá ke zvyšování hladiny cholesterolu v krvi (German, Dillard 2010).

Chen et al. (2019) zkoumali antibakteriální účinky myristové kyseliny vůči *Listeria monocytogenes*, bakterii, která způsobuje infekce trávicího ústrojí. Myristová kyselina má na *L. monocytogenes* inhibiční vliv, zapříčiňuje smrt buněk. Přítomnost myristové kyseliny vede ke změně permeability a integrity buněčné stěny bakterií. Dalším možným mechanismem zničení buněk se ukázala být schopnost myristové kyseliny navázat se na buněčnou DNA a změnit její strukturu. Z výsledků studie vyplývá možnost využití přirozených antibakteriálních účinků myristové kyseliny v potravinářském průmyslu při konzervaci potravin.

Suplementací myristovou kyselinou bylo dosaženo snížené produkce metanu u dojnic. Po suplementaci nedošlo ke změně procentuálního obsahu konjugované linolové kyseliny ani trans-mastné elaidové kyseliny (Odongo et al. 2007)

3.5.2 Citronová kyselina

Citronová kyselina ($C_6H_8O_7$) je klíčovým meziproduktem citátového cyklu. Ročně se jí na světě vyrobí přibližně 1,5 milionů tun. V současnosti se průmyslově získává především fermentací za pomoci kultry *Aspergillus niger* (Kirimura, Honda, Hattori 2011). Hojně se využívá v potravinářském průmyslu, kde plní funkci konzervantu. Snižuje pH potravin a nápojů, čímž usmrcuje přítomné mikroorganismy či zamezuje jejich množení (Nielsen, Arneborg 2007).

Citronová kyselina zpomaluje množení *Saccharomyces cerevisiae* a *Zygosaccharomyces bailii*. Přítomnost citronové kyseliny ovlivňuje metabolismus těchto kvasinek. Dochází ke snížené produkci ethanolu a navýšené syntéze glycerolu, což vede ke snížené produkci ATP (Nielsen, Arneborg 2007).

Kirimura et al. (2011) zkoumali reakci čtyř různých druhů bakterií z rodu *Shigella*: *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. dysenteriae* při vystavení citronové kyselině. Nejvyšší antimikrobiální aktivitu prokázala citronová kyselina vůči *S. boydii*. Při koncentraci nižší než 3 % nebyl pozorován žádný inhibiční účinek u *S. sonnei*.

Roztok citronové kyseliny o koncentraci 0,75 % snižuje kontaminaci povrchu vajec bakteriemi *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* (Oulkheir et. al. 2015).

3.5.3 Skořicová kyselina

Skořicová kyselina ($C_9H_8O_2$) je organickou kyselinou přirozeně se vyskytující v rostlinách. Má široké spektrum biologických účinků a proto i potenciál stát se součástí nově vznikajících léčiv (Sova 2012). Získává se ze skořicovníků, především ze skořicovníku čínského (*Cinnamomum cassia*), pocházejícího z jižní Číny a skořice cejlonské (*Cinnamomum verum*).

Sušená kůra se přidává díky svému aroma do parfémů a pokrmů. Důležitou roli hraje i v tradiční medicíně. Přidáním skořice do jídla zlepšujeme zdraví našich střev, potažmo snižujeme pravděpodobnost rozvinutí rakoviny tlustého střeva (Brodowska et al. 2016).

(Leach, Kumar 2012) prokázali, že kůra skořicovníku čínského působí pozitivně při léčbě diabetu. Ammar et al. (2016) pozorovali antibakteriální aktivitu esenciálních olejů získaných z *Cinnamomum aromaticum* vůči *E. coli*, *Kluyvera spp.* a *Klebsiella spp.* Giordani et al. (2006) zjistili při in vitro pokusech antifungální účinky *Cinnamomum cassia*, kterých by se mohlo využít při léčbě kandidózy. Za zmínku stojí také schopnost esenciálního oleje, získaného z *Cinnamomum cassia*, potlačovat růst mnohých plísní z rodu *Aspergillus*. Guzman (2014) připisuje kyselině skořicové antibakteriální účinek na tuberkulózu způsobující *Mycobacterium tuberculosis*.

3.5.4 Monolaurin

Monoester laurové kyseliny, monolaurin (GML – glycelor monolaurate), prokazuje vysoké antibakteriální a antivirové účinky. Často má vyšší biologickou aktivitu nežli samotná laurová kyselina. Monolaurin se v lidském těle vytváří z laurové kyseliny přítomné ve stravě. Avšak není zjištěno, jaké přesné množství monolaurinu tělo skutečně z daného množství např. kokosového oleje vytvoří (Lieberman, Enig, & Preuss 2006).

GML je látkou se silnými antibakteriálními účinky proti grampozitivním bakteriím, např. *Bacillus anthrax* (Schlievert, Peterson 2012). Dále na přítomnost monolaurinu reaguje *S. aureus* a *Mycobacterium terrae*. Naopak *E. coli* a *Klebsiella pneumoniae* se ukázaly být účinkům monolaurinu odolné (Preusset et al. 2005). Monolaurin působí virucidně na obalené viry. Zabraňuje fúzi obalených virů s buňkami savců. Má schopnost zabraňovat zánětům sliznice. Zánět sliznice je pro některé druhy virů klíčový pro proniknutí přes slizniční bariéru (Schlievert, Peterson 2012). Známé jsou antibakteriální účinky monolaurinu vůči *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactie* či *Listeria monocytogenes*. Do určité míry je účinný i proti viru HIV, spalniček, chřipky, zarděnek nebo také viru Epstein-Barr (Lieberman, Enig, & Preuss 2006)

Po přidání monolaurinu do krmné dávky brojlerů Fortuoso et al. (2019) pozorovali vyšší nárůst prsní svaloviny a snížení hodnoty *Eimeria spp.* a obecně nižší počet bakterií ve stolici v porovnání s kontrolní skupinou. Nepozorovali žádné negativní účinky na organismus brojlerů. Na základě těchto výsledků se monolaurin zdá být vhodnou náhradou či doplňkem klasické antibiotické léčby.

Mimo jiné je tato povrchově aktivní látka běžně využívaná v kosmetice a potravinářském průmyslu (Witcher, Novick, Schlievert 1996). Prodlužuje trvanlivost výrobků, napomáhá při výrobě emulzí (Ruzin, Novick 2000). Obecně je považován za bezpečné a zdravé neškodlivé aditivum (Schlievert, Peterson 2012).

Suplementace monolaurinem posiluje imunitní systém člověka. Doporučená denní dávka pro dospělého člověka činí 1-3 g. Užívat jej mohou i děti ve věku od 3-10 let, a to v množství do 30 mg (Lieberman, Enig, & Preuss 2006).

3.5.5 Synergismus antibakteriálních činidel

Kombinace MCFAs a organických kyselin může vést k zesílení antibakteriálních účinků, tedy synergismu (Kim & Rhee 2013). Ve svých pokusech s *E. Coli* O157:H7 Kim & Rhee (2013) pozorovali navýšení antibakteriálních účinků za použití kombinace citronové a kaprylové kyseliny, které samostatně vykazovaly zanedbatelné antibakteriální účinky. Za použití průtokové cytometrie a mikroskopické analýzy odhalili rozdíly v narušení membrán bakterií, které měly souvislost právě se synergickým efektem aditiv. Aplikace pouze MCFAs či organických kyselin způsobila disrupci membrány, avšak i nadále docházelo k růstu kolonií a poškození membrány bylo vratné. Naopak buňky vystavené působení kombinace aditiv vykazovaly jasnou desintegraci membrány, či vedly přímo k zániku buňky. Batovska et al. (2009) zaznamenali zesílení antibakteriálních účinků při zkombinování monolaurinu s laurovou kyselinou a také monolaurinu a monokaprinu.

3.6 Bakterie rodu *Salmonella*

3.6.1 Charakteristika

Bakterie rodu *Salmonella* byla poprvé indentifikována roku 1855 izolací z trávicího traktu prasete domácího (*Sus scrofa domestica*) kontaminovaného prasečím morem. Název získala po americkém patologovi Dr. Salmonovi, který se na objevení podílel. Salmonely jsou jedním z nejvíce se vyskytujících patogenů v potravě člověka. Odhaduje se, že celosvětově mají na svědomí 93,8 milionů případů nákazy z jídla, z toho 155 tisíc vede každoročně k úmrtí. Téměř všechny kmeny salmonel vykazují patogenitu, protože dokážou efektivně napadnout buňku, zreplikovat se a přežít v těle hostitele (Eng et al. 2015).

Rod *Salmonella* patří do čeledi *Enterobacteriace*, jedná se o gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinky, které nevytvářejí spory. Optimální růstová teplota se pohybuje okolo 37°C. Většina zástupců je motilních (Sánchez-Vargas, Abu-El-Haija, Gómez-Duarte 2011). Bakterie se pohybují pomocí dlouhých, heliakálních flagel, tj. bičíků lokalizovaných na povrchu buňky. Bičíky jsou tvořené několika proteiny, rozdílné kombinace proteinů jsou charakteristické pro dané druhy bakterií. Díky bičíkům se dokáží bakterie přemístit na místa vhodná ke kolonizaci (Spöring et al. 2018). Bičíky usnadňují bakteriální adhezi a tvorbu biofilmu (Abramo et al. 2012), avšak jsou i hlavním cílem pro imunitní obranný systém. Pomocí signálů z buněčného obalu bakterie může dojít k zastavení syntézy flagel a tím i zhoršení podmínek pro imunitní reakci. Patogen dokáže rozpoznat v jaké fázi kolonizace se nachází a přizpůsobit tomu i flagelární biosyntézu (Spöring et al. 2018).

3.6.2 Zástupci rodu *Salmonella*

Nejčastěji způsobuje onemocnění zvířat i člověka *Salmonella enteritidis* a *Salmonella typhimurium*. *S. Enteritidis* bývá spojována s konzumací kontaminovaných vajec a drůbežího masa, zatímco *S. Typhimurium* s konzumací vepřového, hovězího a masa kuřecího (Thung et al. 2016).

Nový taxonomický systém (viz tabulka č. 4) považuje *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhimurium* a *Salmonella typhi* za heterotypní synonyma pro *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (*bacterio.net*). V tabulce č. 5 je pro porovnání rozepsán zastaralý taxonomický systém, který ale může být využíván i dnes.

Tabulka 4 Dle *bacterio.net* k datu 21.10.19

Nový taxonomický systém
<i>Salmonella bongori</i>
<i>Salmonella enterica</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>indica</i>
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i>
<i>Salmonella subterranea</i>

Tabulka 5 Dle *bacterio.net* k datu 21.10.19

Zastaralý taxonomický systém
<i>Salmonella bongori</i>
<i>Salmonella choleraesuis</i>
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>arizonae</i>
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>choleraesuis</i>
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>diarizonae</i>
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>houtenae</i>
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>indica</i>
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp. <i>salamae</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Salmonella paratyphi</i>
<i>Salmonella subterranea</i>
<i>Salmonella typhi</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>

3.6.2.1 *Salmonella enteritidis*

S. enteritidis se vymyká svou schopností přežít ve vaječném bílku, který pro mnohé mikroorganismy představuje nepříznivé prostředí. Antimikrobiální podmínky ve vejcích jsou vytvářeny přítomností lysozymu, enzymu se schopností narušovat bakteriální stěnu a také ovotransferinu, který má baktericidní účinek (Baron et al. 2016).

V období mezi lety 2004-2016 bylo v Evropské unii zaznamenáno celkem 983 případů vajec infikovaných *S. enteritidis*. Nejčastější infikovanou komoditou bylo maso brojlerů, celkem 3317 evidovaných případů v daném období (viz tabulka č. 6) (EFSA & ECDC 2017).

Tabulka 6 Zaznamenané případy infekce jídla *Salmonellou enteritidis* v zemích EU dle (EFSA & ECDC 2017).

Zdroj nákazy / rok	2004-2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2004-2016
Vejce	765	25	102	22	23	22	24	983
Výrobky obsahující vejce	94	7	7	4	3	1	3	119
Maso brojlerů	1451	107	298	499	551	136	275	3317
Vepřové maso	196	21	22	17	11	10	31	308
Hovězí maso	125	2	4	18	13	2	9	173

3.6.2.2 *Salmonella typhimurium*

Jedná se o patogenní bakterii u člověka způsobující gastroenteritidu. Toxickou ji činí především její vnější membrána tvořená z větší části lipopolysacharidy, které ji ochraňují před vnějším prostředím. U myši způsobuje infekci celého organismu s projevy podobnými břišnímu tyfu u člověka, který způsobuje *S. enterica serovar Typhi*. *S. typhimurium* napadá i centrální nervový systém myši, což může vést k úmrtí či doživotním následkům. Pokusy na myších bylo zjištěno, že *S. typhimurium* dokáže proniknout přes hematoencefalická bariéru a dostat se do kontaktu s mozkovou tkání, kterou prokazatelně poškozuje (Chaudhuri et al. 2018).

3.6.3 Případy nákazy člověka salmonelou v České republice

Za rok 2017 bylo v Evropské unii evidováno celkem 93 583 případů nákazy salmonelou. To představuje 19,7 nemocných na 100 000 lidí. Nejvyšší počet nakažených byl zaznamenán v České republice (108,5 nemocných na 100 000 lidí). Přehled všech zaznamenaných případů salmonelózy na území ČR je vypsán v tabulce č. 4. Na druhém místě v počtu nálezů se umístilo Slovensko se 106,5 případy nákazy na 100 000 obyvatel. Naopak nejmenší počet nakažených byl na Kypru, dále v Řecku, Itálii, Portugalsku a Rumunsku. V České republice se naprostá většina nemocných nakazila salmonelou na našem území. Naopak ve Finsku se 76,3 % nemocných nakazilo při pobytu v zahraničí (Food & Authority 2018).

Tabulka 7 Případy zaznamenané salmonelózy na území ČR v letech 2014 -2017 dle (Food & Authority 2018)

2017		2016	
Celkem nemocných	Přepočet na 100 000 lidí	Celkem nemocných	Přepočet na 100 000 lidí
11 473	108,5	11 610	110
2015		2014	
Celkem nemocných	Přepočet na 100 000 lidí	Celkem nemocných	Přepočet na 100 000 lidí
12 408	117,7	13 255	126,1

3.6.4 Rezistence rodu *Salmonella* k antibiotikům

Rezistence bakterií rodu *Salmonella* k antibiotikům je závažným problémem, na který bylo poprvé upozorněno v 60. letech 20. století, kdy přestalo být účinné antibiotikum chloramphenicol a postupem času i antibiotika další (Trust, Bartlett 1979). Sérotypy salmonel vykazující MDR (multidrug-resistant) fenotyp mají schopnost vytvářet hybridní plazmidy, které nesou informace o antimikrobiální rezistenci sérotypů proti tradičním antibiotikům, jako jsou chloramphenicol, tetracyklin, ampicilin a streptomycin (Thung et al. 2016).

Rozšíření rezistence je následkem častého přidávání antibiotik do potravy zvířat za účelem zrychlení růstu a využívání antibiotik v léčbě bakteriálních infekcí. Zvyšuje se tak riziko přenosu kmenů MDR salmonel ze zvířete na člověka prostřednictvím konzumace nakaženého masa, či vodou nebo potravou kontaminovanou zvířecími výkaly. Určité kmeny MDR salmonel byly také nalezeny v tělech exotických zvířat, konkrétně želv. MDR kmeny salmonel se vyskytovaly i ve vodním prostředí, kde tito živočichové žijí (Eng et al. 2015).

3.6.5 Prevence nákazy

Nejlepší prevencí proti nákaze salmonelou je správné zacházení s jídlem, dostatečná tepelná úprava pokrmů a dodržování základních hygienických návyků. V rozvojových zemích je klíčový přístup k pitné vodě a rozšiřování povědomí o nákaze. Výsledky studií také ukazují, že částečně účinná je i vakcinace proti salmonel (Sánchez-Vargas et al. 2011).

Očkování zvířat se nabízí jako vhodný prostředek prevence či snížení přenosu mikroorganismů ze zvířat na člověka. V praxi se využívají 3 typy vakcín – živé bakterie rodu *Salmonella*, usmrcené bakterie rodu *Salmonella*, či kombinace obou zmíněných (Sánchez-Vargas et al. 2011).

Vakcíny *Salmonella* byly testovány na různých živočišných druzích. Na prasatech realizovali experimenty Sánchez-Vargas et al. (2011), kteří vakcíny úspěšně podali březím prasnicím za účelem omezení nákazy selat. Dórea et al. (2010) pak zkoumali účinky vakcinace na kuřata masného typu. Při vpravení vakcíny do těla bylo porovnáním očkovaných a neočkovaných zvířat zjištěno, že očkovaní jedinci mají nižší prevalenci salmonel v tenkém střevě. Pouze 38,3 % očkovaných brojlerů bylo infikovaných oproti 64,2 % nenačkovaných.

Reprodukční orgány byly u očkovaných brojlerů zasaženy ze 14,22 % versus 51,7 % u nenačkovaných.

3.7 Bakterie rodu *Staphylococcus*

3.7.1 Charakteristika

Pod mikroskopem byly bakterie poprvé spatřeny v preparátu infikované tkáně ledvin. Objevil je německý vědec Von Recklinghausen v roce 1871. O devět let později, roku 1880, Louis Pasteur a Sir Alexander Ogston prokázali, že tyto koky-formující bakterie jsou patogenní. Pojmenování pro rod *Staphylococcus* vymyslel Sir Alexander Ogston (Bhunia 2008). Grampozitivní bakterie rodu *Staphylococcus* zařazujeme do čeledi *Staphylococcaceae*. Bakterie jsou nepohyblivé, nesporulující a fakultativně anaerobní. Mohou se vyskytovat, a to jak samostatně, tak ve dvojicích, párech, tetradách a řetězcích (o 2-3 buňkách). Buněčná stěna obsahuje peptidoglykan a kyselinu teichoovou (Schleifer, Bell 2015).

3.7.2 Zástupci rodu *Staphylococcus*

Zástupce rodu *Staphylococcus* najdeme především na kůži, sliznicích a v kožních žlázách člověka, dále u savců a ptáků. U zdravých jedinců se stafylokoky běžně vyskytují. Vytváří kolonie uvnitř a vně těla, avšak při vytvoření vhodných podmínek mohou představovat potencionální patogeny. Stafylokoky rozdělujeme do dvou skupin: koaguláza pozitivní a koaguláza negativní (Marsilio, Di Francesco, Di Martino 2018).

3.7.2.1 Koaguláza negativní stafylokoky

Ze skupiny koaguláza negativních stafylokoků je za nejnebezpečnější považován *Staphylococcus epidermidis*. Způsobuje infekce močových cest a představuje problém při podstupování ambulantní dialýzy, dále může způsobit infekci při zavedení protetických kloubních náhrad a permanentních kardiostimulátorů. V 80. letech 20. století se objevil MRSE (methicillin rezistentní *S. epidermidis*), který byl často smrtelný pro pacienty po transplantaci srdce. *S. epidermidis* je spojován se vznikem mastitidy u krav. Zánět mléčné žlázy krav způsobuje také *S. warneri* a *S. haemolyticus* (Schleifer, Bell 2015). Vybrané kmeny koaguláza negativních stafylokoků se nacházejí v tabulce č. 8.

Tabulka 8 Přehled vybraných kmenů koaguláza negativních stafylokoků dle (Mack et al. 2005)

Koaguláza negativní		
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. carnosus subsp. carnosus</i>	<i>S. warneri</i>
<i>S. capitis</i>	<i>S. feli</i>	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. hominis</i>	<i>S. caprae</i>	<i>S. gallinarium</i>
<i>S. pettenkoferi</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. muscae</i>

3.7.2.2 Koaguláza pozitivní stafylokoky

Koaguláza pozitivní stafylokoky jsou běžné komenzální mikroorganismy a příležitostné patogeny lidí i zvířat. V tabulce č. 9 je vypsán přehled typických hostitelů pro jednotlivé MO. Zejména nebezpečným je methicillin-rezistentní *S. aureus* (MRSA).

Tabulka 9 Přehled vybraných koaguláza pozitivních stafylokoků dle (Hennekinne et al. 2010)

Koaguláza pozitivní	Hostitel
<i>S. aureus subsp. aureus</i>	člověk, zvířata
<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>	ovce
<i>S. intermedius</i>	pes, kůň, holub
<i>S. hyicus</i>	prase, kuře
<i>S. delphini</i>	delfín
<i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>	pes, kočka
<i>S. lutrae</i>	vydra

3.7.2.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus se vyskytuje na povrchu kůže a sliznic u 20-30 % zdravých jedinců (Andreoletti et al., 2007). Z toho přibližně 3 % připadají na methicillin-rezistentní *S. aureus* (Hanselman et al. 2009). Většinou nepředstavuje pro člověka žádné zdravotní riziko, ale při oslabení imunity může vyvolat infekci pokožky, pronikat do otevřených ran a v horším případě infikovat i vnitřní tělní tkáň (Andreoletti et al., 2007). Některé kmeny vytváří enterotoxiny, které jsou odolné vůči proteolytickým enzymům (Marsilio et al. 2018).

S. aureus je častým spouštěčem mastitidy u krav. Prevalence stafylokokové infekce se liší mezi jednotlivými státy, pohybuje se mezi 5-30 %. Riziko přenosu mikroorganismů hrozí především při dojení (Marsilio et al. 2018).

3.7.2.3.1 Rezistence *S. aureus* k antibiotikům

Mezi lety 1950-1960 zapříčinil *S. aureus* úmrtí mnoha nemocničních pacientů na nozokomiální nákazu. Od roku 1959 byl klíčbě stafylokokové infekce nově využíván methicillin, protože některé kmeny *S. aureus* se staly rezistentním na do té doby předepisovaný penicilin (Enright et al. 2002). V 80. letech 20. století se poprvé objevili methicillin-rezistentní *S. aureus* (MRSA) kmeny. *S. aureus* se vyvinul ve velmi účinný patogen, s vysokým stupněm virulence, který je rezistentní na mnohá antibiotika, což značně ztěžuje léčbu pacientů (Soni, Chakrapani, Chopra 2015).

3.7.2.3.2 Methicilin sensitivní *S. aureus*

Kromě obligátně známých MRSA kmenů existují i méně diskutované methicillin-senzitivní kmeny *S. aureus* tzv. MSSA kmeny. Hlavní rozdíl spočívá v jejich reakci na

antibiotikum methicillin. MRSA obsahuje gen kódující rezistenci k methicilinu a dalším β -laktamům. U MSSA se mohou β -laktamová antibiotika navázat na receptory v buněčné membráně, narušit syntézu peptidoglykanu a způsobit zánik buňky (Deurenberg, Stobberingh 2008). Projevy onemocnění jsou u obou typů obdobné. MRSA i MSSA jsou závažnými patogeny, které mohou ohrozit lidský život (Hallin et al. 2007). Data z tabulky č. 10 charakterizují pacienty s nosokomiální MRSA a MSSA infekcí. Úmrtí je vyšší v případě infekcí způsobené MRSA kmeny. MRSA i MSSA jsou častější u mužů než u žen. Jak ukazují hodnoty z tabulky č. 11 nejčastěji dochází k nakažení MRSA infekcí u pacientů na oddělení intenzivní péče, naopak MSSA mají ve svém organismu často pacienti docházející pravidelně na hemodialýzu. Data byla shromažďována po dobu 5 let v britské nemocnici Guy's and St. Thomas. Celkem bylo diagnostikováno 433 pacientů s MSSA infekcí a 382 pacientů s MRSA infekcí (Melzer et al. 2003).

Tabulka 10 Charakteristika pacientů s nosokomiální MRSA a MSSA bakteriemi dle (Melzer et al. 2003)

	MRSA-infikovaní pacienti (%)	MSSA-infikovaní pacienti(%)
Pacienti, kteří se zotavili	70,4	86,4
Úmrtí z důsledku infekce	11,8	5,1
Ženy	42,7	29,8
Muži	57,3	70,2

Tabulka 11 Místa, kde došlo k nakažení MRSA či MSSA infekcí dle (Melzer et al. 2003)

	MRSA-infikovaní pacienti (%)	MSSA-infikovaní pacienti(%)
Hemodialýza	16,5	33,7
Onkologie	4,5	9,5
Po operaci srdce	10,7	9,9
Oddělení intenzivní péče	27,5	5,3

3.7.2.3.3 Výskyt *S. aureus* v potravinách

S. aureus se často nachází v malých koncentracích v syrovém masu (vepřové, kuřecí, hovězí, krutí, skopové, králíčí) a také v mléčných výrobcích (mléko, sýry). V průměru testované maso obsahuje 0-1,2 % MRSA izolátů (maso testováno v Maďarsku, Francii, Itálii, Japonsku a Koreji) (Bortolaia, Espinosa-Gongora, Guardabassi 2016). Vyšší koncentrace byla naměřena v Pákistánu, kde syrové mléko obsahovalo 10,4 % MRSA izolátů. Dále mohou být stafylokoky kontaminované pudinky, salátové dresinky, lahůdky a mořské plody (Andreoletti et al. 2007).

3.7.2.3.4 Výskyt *S. aureus* v prostředí

Živočišná produkce je zdrojem vzdušných polutantů, které jsou nebezpečné pro životní prostředí. Vzduch na farmách obsahuje plyny, prachové částice a mikroorganismy. Nejvyšší koncentrace bakterií byla detekována na slepičích farmách, kde 80 % vzdušných mikroorganismů pochází z rodu *Staphylococcus*. Bakterie z farem mohou vzduchem putovat na vzdálenosti 150 až 250 metrů. Pracovníci na farmách bez pochyb vdechují MRSA přítomný

ve vzduchu, avšak namnožení bakterií hrozí spíše u pracovníků, kteří přichází se zvířaty do přímého kontaktu (29 % pracovníků je MRSA pozitivních), nežli pouze inhalací (Andreoletti et al. 2007).

3.8 Bakterie rodu *Enterococcus*

3.8.1 Charakteristika

Vývoj označení pro rod *Enterococcus* započal roku 1899, kdy vědec Thiercelin představil veřejnosti nové pojmenování pro jím objevenou střevní grampozitivní bakterii. Thiercelin se také pokusil o založení rodu *Enterococcus*, avšak nedočkal se podpory u svých kolegů. Roku 1906 se enterokoky staly podskupinou rodu *Streptococcus*. Až roku 1984 díky práci vědců Schleifer a Kilpper-Bälz vznikl nový, samostatný rod *Enterococcus*, který je zařazován do kmene *Firmicutes* (Švec, Franz 2014).

Enterokoky jsou grampozitivní, kataláza negativní, fakultativně anaerobní bakterie, které nevytváří spory. Mají schopnost přežít v nepříznivém prostředí, odolávají širokému spektru teplot (5-65 °C), rozmezí hodnot pH (4,5 – 10) a také vysokým koncentracím NaCl. Díky tomu mají předpoklad k rychlé adaptaci a kolonizaci prostředí (Fisher, Phillips 2009). Optimální růstová teplota je 37 °C. Buňky často tvoří kratší řetízky. Pohyblivost byla prokázána pouze u *E. Gallinarum* a *E. Casseliflavus*, ostatní zástupci nejsou motilní (Švec, Franz 2014). Enterokoky zařazujeme mezi bakterie mléčného kvašení (Fisher, Phillips 2009). Jsou přítomny v syrovém mléce a chovají se jako přírodní startery mléčného kvašení, dokáží přežít při ochlazení mléka a také jeho pasteraci (Hanchi et al. 2018).

3.8.2 Zástupci rodu *Enterococcus*

Po mnoho let byl rod *Enterococcus* považován za zdraví neškodný. Bakterie rodu *Enterococcus* jsou součástí přirozené střevní mikroflóry člověka i zvířat, avšak může být nebezpečným nosokomiálním patogenem, který je schopný vyústit až v bakteriémii či endokarditidu u člověka (Švec, Franz 2014). Svému onemocnění podlehnou 61 % pacientů trpících enterokokovou nosokomiální nákazou (Fisher, Phillips 2009).

Využití enterokoky nacházely a stále nachází ve zdravotnictví. Pacientům jsou enterokoky podávány ve formě probiotik předepisovaných při léčbě průjmových onemocnění, způsobených otravou z potravin. U enterokoků se mimo jiné využívá jejich schopnosti produkovat bakteriociny (Švec, Franz 2014).

Důležitou roli hrají i v potravinářském průmyslu. Potravinu dokáží, jak znehodnotit, tak chuťově vylepšit. Enterokoky se mohou namnožit na mase a způsobit jeho kažení. Na druhou stranu hrají důležitou roli při zrání a vytváření aroma u tradičních fermentovaných produktů – sýrů a klobás, především v oblasti Balkánu a Středomoří (Švec, Franz 2014). Místo typického výskytu pro dané zástupce je popsáno v tabulce č. 12.

Tabulka 12 Přehled vybraných enterokoků

Zástupci	Výskyt
<i>Enterococcus canis</i>	GIT psů
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	rostliny, siláže, půda
<i>Enterococcus cecorum</i>	GIT prasat, koček, psů, telat
<i>Enterococcus columbae</i>	střeva holubů
<i>Enterococcus hirae</i>	střeva kuřat
<i>Enterococcus durans</i>	GIT štěňat, holubů, telat
<i>Enterococcus faecalis</i>	výkaly člověka a teplokrevných živočichů
<i>Enterococcus faecium</i>	GIT člověka, zelenina, ovoce, sýry
<i>Enterococcus lactis</i>	mléko, mléčné výrobky

3.8.2.1 Výskyt enterokoků v prostředí

Enterokokové bakterie nacházíme v půdě, povrchových vodách, čističkách odpadních vod a odpadních vodách, na povrchu rostlin a uvnitř gastrointestinálního traktu teplokrevných živočichů. Přítomnost těchto bakterií ve vodě je ukazatelem její kvality. Zvýšený výskyt indikuje fekální znečištění (Švec, Franz 2014).

3.8.2.2 *Enterococcus cecorum*

Poprvé byl izolován ze střev slepic, ale přítomen je i u prasat, koček, psů, telat a kachen. *E. cecorum* je komenzální bakterií, která dříve nebyla považována za nebezpečnou, avšak v roce 2002 byly ve Skotsku a Nizozemsku poprvé popsány patogenní kmeny *E. cecorum* napadající chovy slepic. Od té doby je každoročně popisován výskyt i v dalších zemích Evropské unie, Jižní Afriky a Spojených států amerických (Jung et al. 2018).

Zastoupení *E. cecorum* v trávicím traktu slepic se mění v průběhu jejich života. U jednodenních kuřat se *E. cecorum* nevyskytuje. Tří až čtyř týdenní kuřata mají minoritní zastoupení *E. cecorum* mezi enterokokovými a streptokokovými druhy. Dominantním se komenzální *E. cecorum* stává až u dvanácti týdenních jedinců. Patogenní kmeny se ve střevech objevují již sedmý den života kuřat. Jejich zastoupení se snižuje po navýšení koncentrace komenzálních druhů *E. cecorum* (Jung et al. 2018).

3.8.2.3 Patogenní *Enterococcus cecorum*

U brojlerů způsobuje onemocnění skeletu. Nejvýraznějším projevem je paralýza zapříčiněná zánětlivou tkání uvnitř páteřního tunelu na úrovni volného hrudního obratle. Smrt ptáků nastává z důvodu sepse, či dehydratace a podvýživy způsobené paralýzou. Infikovaní jedinci mohou být léčeni antibiotiky, avšak pro již paralyzované ptáky je antibiotická léčba neúčinná a jediným řešením je utracení. Deriváty penicilinu jsou nejčastěji využívanými léčivými. Častá je rezistence na tetracyklin a makrolidy (Jung et al. 2018).

3.8.2.3.1 Rezistence *Enterococcus cecorum* k antibiotikům

Při testech bylo zjištěno, že většina kmenů *E. cecorum* zajištěných z jatečně upravených těl (JUT) zvířat je rezistentní na linkomycin (72 %) a tetracyklin (61,3 %). 70,7 % enterokoků získaných z JUT bylo rezistentních na více než dvě antibiotika (Jackson et al. 2015).

Antibiotická rezistence *E. cecorum* má vliv na zdraví nejen zvířat, ale i lidí. Rozvinutí infekce u člověka je poměrně vzácné. Projevy zahrnují endokarditidu, sepsi a peritonitidu. Náchylnější jsou pacienti dlouhodobě léčení steroidy, podvyživení jedinci či pacienti s cirhózou jater. Zdroj lidské nákazy zůstává neobjasněn. Objevují se domněnky o spojitosti s konzumací infikovaného masa (Jung et al. 2018).

3.8.2.4 *Enterococcus faecium*

E. faecium je společně s *E. faecalis* nejhojněji zastoupeným enterokokem lidského zažívacího traktu. Výkaly obsahují 10^5 - 10^7 *E. faecium* na 1 gram (Fisher, Phillips 2009). Testy byla prokázána přítomnost této bakterie v sýrech, rybách, vepřovém a mletém hovězím mase (Fisher, Phillips 2009). *E. faecium* nalezneme také na zelenině (salát, rajčata, ředkvičky, špenát, celer, zelí) (McGowan et al. 2006).

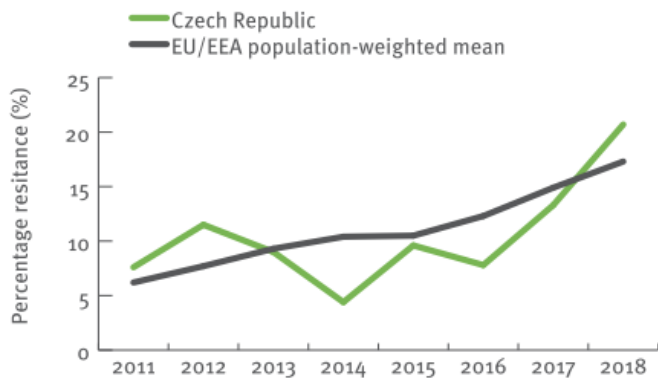
3.8.2.4.1 Rezistence *Enterococcus faecium* k antibiotikům

Vzhledem k dřívějšímu zařazení enterokoků mezi stafylokoky byl k léčbě enterokokových infekcí využíván výhradně penicilin, avšak neúspěšně, protože na většinu enterokoků penicilin nepůsobí baktericidně (Arias, Murray 2012). Penicilinová rezistence je u *E. faecium* dána více faktory. Jedním z nich je přítomnost enzymu transpeptidázy, který syntetizuje materiál buněčné stěny a penicilin jeho činnost v případě enterokoků nijak nenarušuje (Murray 2000).

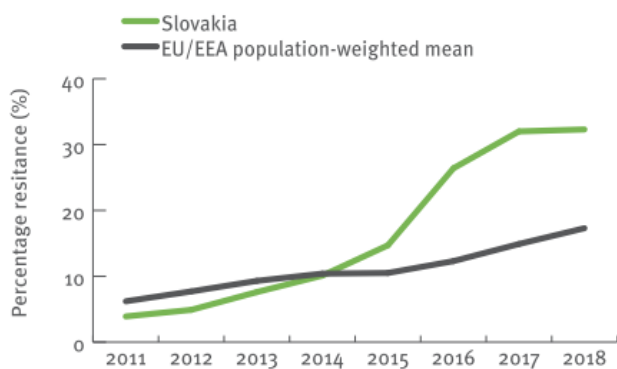
E. faecium také nereaguje na léčbu ampicilinem (širokospektré penicilinové antibiotikum). Bakterie produkují protein vázající penicilin, který má nízkou afinitu k beta-laktamům (Arias, Murray 2012).

Díky přítomnosti chromozomálního genu kódujícího aminoglykosid-modifikující enzym je zabráněno synergii mezi buněčnou stěnou a baktericidními aminoglykosidy (Gold 2001).

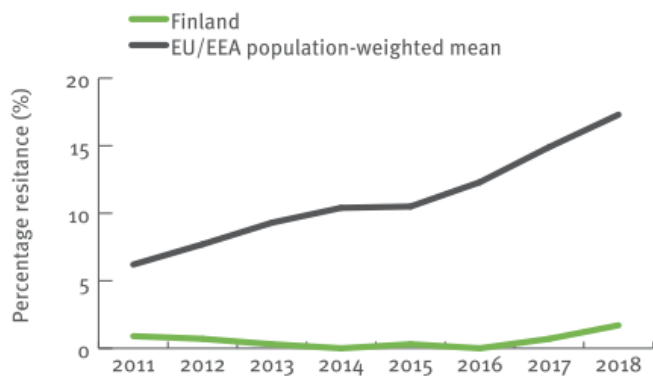
První záznam o rezistenci k vysokým koncentracím vankomycinu pochází z roku 1988, kdy *E. faecium* často způsoboval infekce močových cest u nemocničních pacientů a nedařilo se tlumit infekci (Gold 2001). Vankomycin-rezistentní enterokoky se rychle rozšířili a najdeme je v nemocnicích téměř ve všech zemích světa (Courvalin 2006). Obrázky č. 1 (pro Českou republiku), 2 (pro Slovensko), 3 (pro Finsko) znázorňují procento invazivních izolátů *E. faecium* rezistentních na vankomycin mezi lety 2011-2018 a porovnávají výsledky s průměrem EU. Rozdíly mezi jednotlivými státy EU jsou znatelné. Obecně nejnižší procento rezistentních bakterií nalezneme ve Skandinávii (European Centre for Disease Prevention and Control 2018).



Obrázek 1 Invazivní izoláty *Enterococcus faecium* – ČR dle (European Centre for Disease Prevention and Control 2018)



Obrázek 2 Invazivní izoláty *Enterococcus faecium* – SK dle (European Centre for Disease Prevention and Control 2018)



Obrázek 3 Invazivní izoláty *Enterococcus faecium* – FIN dle (European Centre for Disease Prevention and Control 2018)

4 Metodika

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Materiál využitý v praktické části bakalářské práce

4.1.1.1 Bakteriální kmeny

V tabulce č. 13 je vypsán přehled bakteriálních kmenů, vůči kterým byla zkoumána antimikrobiální aktivita samostatných MK či jejich kombinace s dalšími antibakteriálními látkami.

Tabulka 13 Přehled bakteriálních kmenů

Druh	Kmen	Specifikace
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	MSSA
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300	MRSA
<i>Salmonella enteritidis</i>	147/7F4	klinický izolát – infekce kuřete
<i>Salmonella typhimurium</i>	K3	klinický izolát
<i>Enterococcus faecium</i>	CCM 6226	probiotická kultura
<i>Enterococcus cecorum</i>	CCM 4285	klinický izolát – divoká kachna; játra

Jednotlivé kmeny pocházely z níže uvedených zdrojů:

- ATCC – American Type Culture Collection (Manassas, USA)
- CCM – Česká sbírka mikroorganismů (Masarykova Univerzita, Brno, ČR)
- 147/7F4 a K3 – klinické izoláty (Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, ČR)

4.1.1.2 Aditiva

Celkem byl zkoumán efekt sedmi aditiv v 17 různých kombinacích. Jednalo se o komerční přípravky na bázi MK, citronové kyseliny a skořicové kyseliny poskytnuté holandskou firmou Daa Vision (Oss, Holandsko). Tabulka č. 14 obsahuje seznam všech testovaných aditiv.

Tabulka 12 Přehled testovaných aditiv

Aditiva	
C ₈ /C ₁₀	GML (90)
C ₁₂	GML/CinA (50/50)
C ₁₄	GML+CitA (50/50)
C ₁₂ /C ₁₄ (70/30)	GML+CitA (70/30)
C ₁₂ /CitA (50/50)	C ₁₂ /C ₁₄ +GML
C ₁₂ /CitA (70/30)	C ₁₂ /C ₁₄ +GML (35/15/50)
C ₁₂ /CinA (50/50)	C ₁₂ /C ₁₄ /GML+CitA (24,5/10,5/35/30)
C ₁₂ /CinA (70/30)	C ₁₂ /C ₁₄ +GML+CinA (24,5/10,5/35/30)
C ₁₂ /C ₁₄ +CitA (35/15/50)	

4.1.1.3 Použité chemikálie

Kultivační médium

Bakteriální kmeny byly kultivovány v Müller-Hinton bujónu (MHB), který byl předpřipraven firmou Oxoid (Praha, ČR). Kultivační médium je prodáváno v dehydratované formě. V této podobě může být skladováno při teplotách 10-30 °C. Médium připravené k použití, tedy v kapalně formě, se skladuje při teplotě v rozmezí 2-8 °C. Připravuje se z 21 g dehydratovaného MHB bujónu a 1 litru destilované vody. Plně rozpuštěná směs je sterilována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 min. Při 25 °C se pH média pohybuje v rozmezí 7,3 ± 0.1. V tabulce č.15 je vypsáno složení použitého bujónu.

Tabulka 13 Složení bujónu firmy Oxoid (Praha, ČR)

Standartní složení MHB	g/l
Hovězí maso, dehydratovaný odvar	300
Kaseinový hydrolyzát	17,5
Škrob	1,5

Další využití chemikálie

- Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- Methylthiazolyl diphenyl-tetrazolium bromid (MTT; Sigma Aldrich, ČR)

4.1.1.4 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy
- Třepačka-vortex
- Inkubátor
- Plynový kahan
- Infinite® 200 PRO Microplate Reader (Tecan, Švýcarsko)
- Autokláv
- Mechanické pipety
- Multikanálová pipeta
- Stojan na zkumavky
- Injekční stříkačky

Plastový spotřební materiál

- Špičky k pipetám
- Mikrozukavky s víčkem
- Zkumavky se zátkou a kulatým dnem
- Centrifugační zkumavky se šroubovacím uzávěrem
- Rezervoáry na vzorky pro vícekanálové mikropipety
- 96 - jamkové mikrotitrační destičky

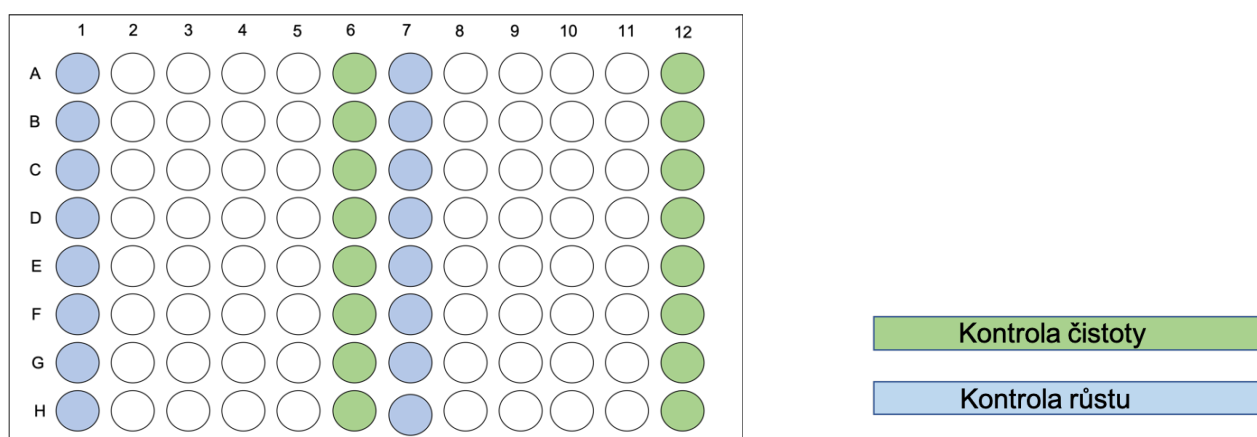
4.1.2 Metody

4.1.2.1 Testování antibakteriální aktivity komerčních přípravků na bázi mastných kyselin, kyseliny skořicové a kyseliny citronové

Ke stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC – minimum inhibitory concentration) komerčních přípravků na bázi mastných kyselin, kyseliny skořicové a kyseliny citronové bylo použito in vitro mikrodiluční metody s tekutým médiem v 96 - jamkové mikrotitrační destičce. Testy byly koncipovány dle nejnovějších poznatků (Cos, Vlietinck, Berghe, & Maes, 2006) (Hecht et al. 2012).

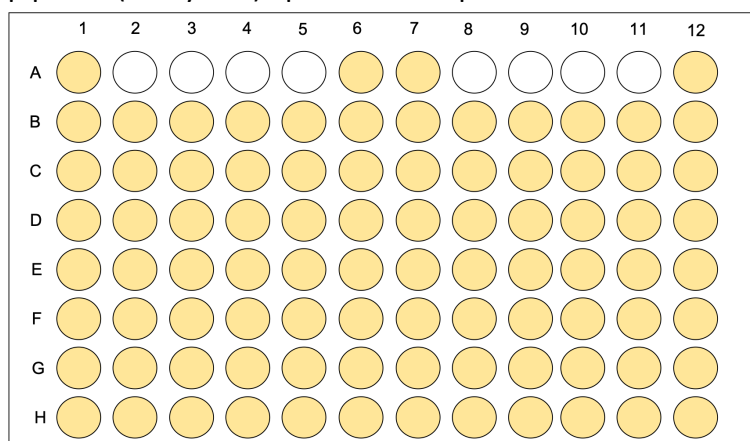
Pro přípravu zásobních roztoků testovaných látek byly výše vypsané komerční přípravky rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO; Sigma-Aldrich, Praha, ČR) na požadovou koncentraci 409 600 µg/ml. Následně byly zásobní roztoky protřepány, aby došlo k řádnému rozpuštění.

Mikrotitrační destička byla uzpůsobena pro testování dvou různých MO, obsahovala sloupce pro kontrolu růstu a kontrolu čistoty viz obr. č. 4. Sloupec kontroly růstu neobsahoval aditiva, ale byly zde naočkovány MO. Naopak sloupec pro kontrolu čistoty by správně neměl vykazovat žádné známky přítomnosti bakterií.



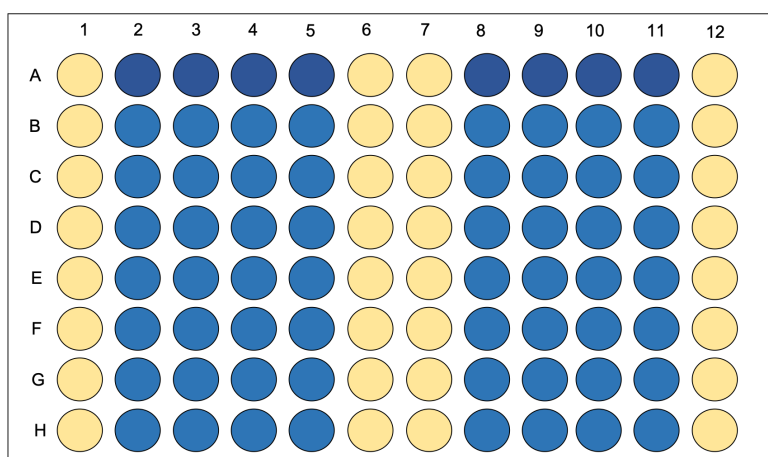
Obrázek 2 Rozvržení mikrotitrační destičky – kontroly

Do každé žlutě vyznačené jamky (viz obr.č. 5) bylo pipetou (řádek A) a multikanálovou pipetou (řádky B-H) aplikováno 90 µl MHB.



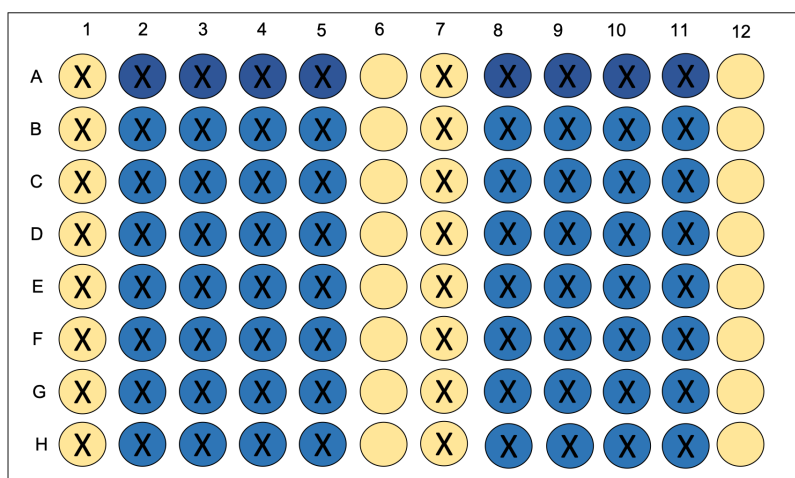
Obrázek 3 Aplikace kultivačního média

Zásobní roztoky byly znovu protřepány a doplněny na požadovaný objem MHB tak, aby koncentrace účinné látky činila 4 096 µg/ml roztoku. Nově vytvořený roztok (na obr. č. 6 znázorněn modrou barvou) byl multikanálovou pipetou aplikován do všech jamek mimo sloupce pro kontrolu růstu a kvality. V prvním řádku (A) bylo aplikováno 2x 90 µl roztoku. Následně bylo multikanálovou pipetou odebráno z řádku (A) 90 µl a přemístěto do řádku (B). Stejný objem byl odebrán a přemístěn i u všech následujících řádků. Z posledního řádku (H) bylo taktéž odebráno 90 µl, které nebyly dále nikam aplikovány. V mikrotitrační destičce byla těmito kroky vytvořena sestupná ředící řada zásobního roztoku testované látky v MHB (90 µl), začínající na koncentraci 4 096 µg/ml.



Obrázek 4 Znáznornění sestupné ředící řady

Takto připravená mikrotitrační destička mohla být naočkována bakteriemi (na obr. č. 7 znázorněno „X“). Inokulum bakterií bylo standardizováno na hustotu $5 \cdot 10^5$ CFU/ml měřením v nefelometru na základě McFarlandovy zákalové stupnice. Inokulum bylo naočkováno do jamek k zásobnímu roztoku testované látky v objemu 10 µL. Destičky s bakteriemi byly inkubovány 24 hodin při 37°C.



Obrázek 5 Zaočkování bakteriemi

4.1.2.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

Inhibiční aktivita byla odvozena dle nárůstu MO v médiu. Nárůst byl posuzován měřením zákalu v jednotlivých jamkách za pomoci Infinite® 200 PRO Microplate Reader (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 405 nm. Pro správnost výsledku je důležité úplné rozpuštění vzorků, nerozpuštěné částice mohou ovlivňovat výsledky měření. Z toho důvodu mikrotitrační destičky obsahovaly kontrolu růstu a kontrolu čistoty.

Nejnižší koncentrace komerčních přípravků, které způsobily 80% úbytek růstu bakterií v jamkách oproti kontrole byly hodnoceny jako MIC. Konečná koncentrace DMSO nepřesáhla ve vzorcích 1 %. Napipetováním 25 µl methylthiazolyl diphenyl-tetrazolium bromidu (MTT; Sigma Aldrich, ČR) do všech jamek mikrotitrační destičky bylo umožněno vizuální zhodnocení a zdokumentování antimikrobiální aktivity. Všechny vzorky byly testovány v triplikátech a ve třech nezávislých experimentech.

5 Výsledky

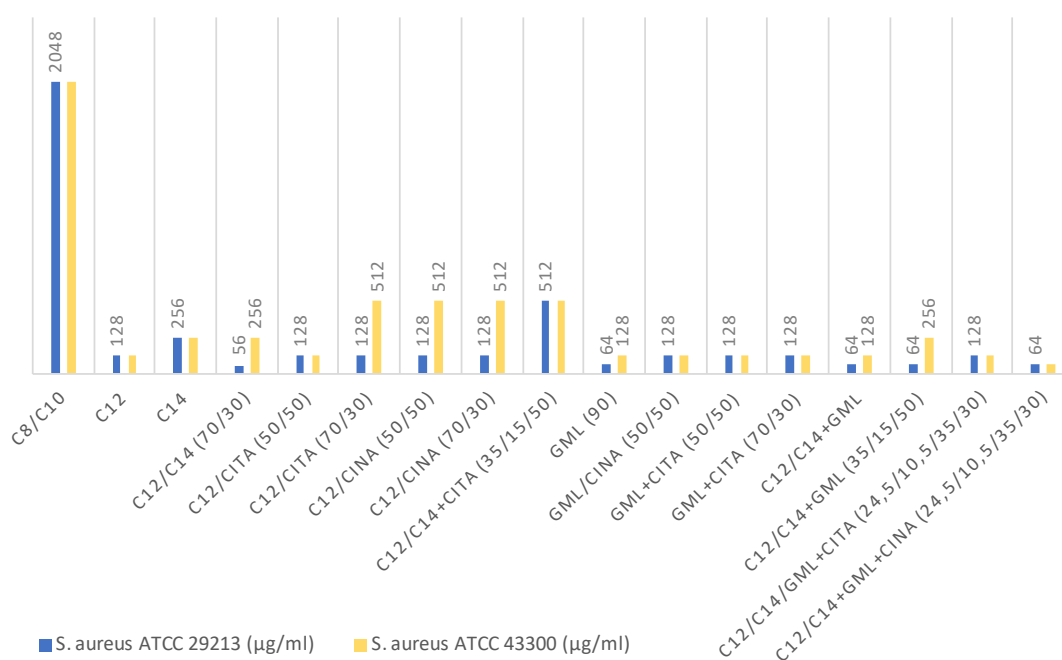
5.1 Minimální inhibiční koncentrace

Po 24 - hodinové inkubaci bakterií v jamkách mikrotitračních destiček byly naměřením hodnot zákalu stanoveny MIC aditiv. Jako MIC je označena minimální koncentrace, která inhibuje růst 80 % přítomných bakterií. Přehled všech MIC je vypsán v tabulce č. 14, která se nachází na str. 43.

5.1.1 MIC-bakterie rodu *Staphylococcus*

Porovnáním námi naměřených MIC zanesených do grafu č. 2 se obecně citlivějším na přítomnost aditiv ukázal být *S. aureus* ATCC 29213 (na grafu znázorněn modře). Tento bakteriální kmen při porovnání účinků jednotlivých aditiv dosahuje stejných, nebo nižších MIC ($\mu\text{g/ml}$) než je tomu u *S. aureus* ATCC 43300.

POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ MIC



Graf 2 Porovnání výsledků MIC pro bakterie rodu *Staphylococcus*

Nejméně účinným aditivem se ukázala být kombinace C₈/C₁₀ a to pro oba dva bakteriální kmeny. MIC pro C₈/C₁₀ činí 2048 $\mu\text{g/ml}$ (zdokumentováno na obr. č. 8 pod textem). Nejvýraznější rozdíly působení aditiv se projeví při aplikaci C₁₂/CitA (70/30), C₁₂/CinA (50/50) a C₁₂/CinA (70/30). MIC pro *S. aureus* ATCC 29213 byla o 384 $\mu\text{g/ml}$ nižší.

Nejnižší inhibiční koncentrace, 56 $\mu\text{g/ml}$, byla naměřena při využití C₁₂/C₁₄ (70/30) na *S. aureus* ATCC 29213 (zdokumentováno na obr. č. 9 pod textem). Druhou nejnižší koncentraci

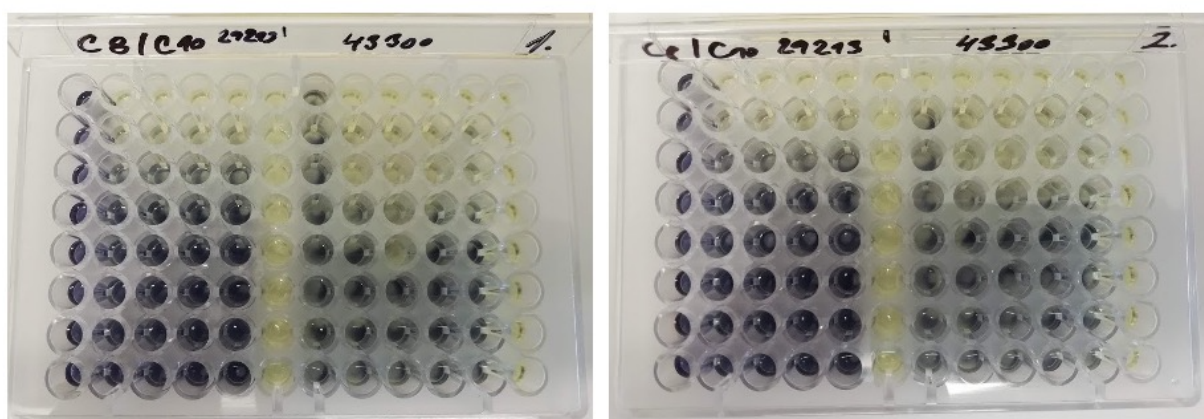
schopnou inhibice (64 µg/ml) vykazovala pro *S. aureus* ATCC 29213 tři aditiva-GML (90), C₁₂/C₁₄ +GML (35/15/50), C₁₂/C₁₄ +GML+CinA (24,5/10,5/35/30).

Pro *S. aureus* ATCC 43300 byla nejnižší MIC (64 µg/ml) naměřena za přidání aditiva C₁₂/C₁₄ +GML+CinA (24,5/10,5/35/30) (zdokumentováno na obr. č. 9 pod textem). *S. aureus* ATCC 43300 z našeho měření v porovnání se *S. aureus* ATCC 43300, vychází jako více odolný vůči působení 7 aditiv – C₁₂/C₁₄ (70/30), C₁₂/CitA (70/30), C₁₂/CinA (50/50), C₁₂/CinA (70/30), GML 90, C₁₂/C₁₄+GML, C₁₂/C₁₄+GML (35/15/50).

Staphylococcus aureus 29213 / *Staphylococcus aureus* 43300

Aditivum: C₈/C₁₀

Aditivum: C₈/C₁₀

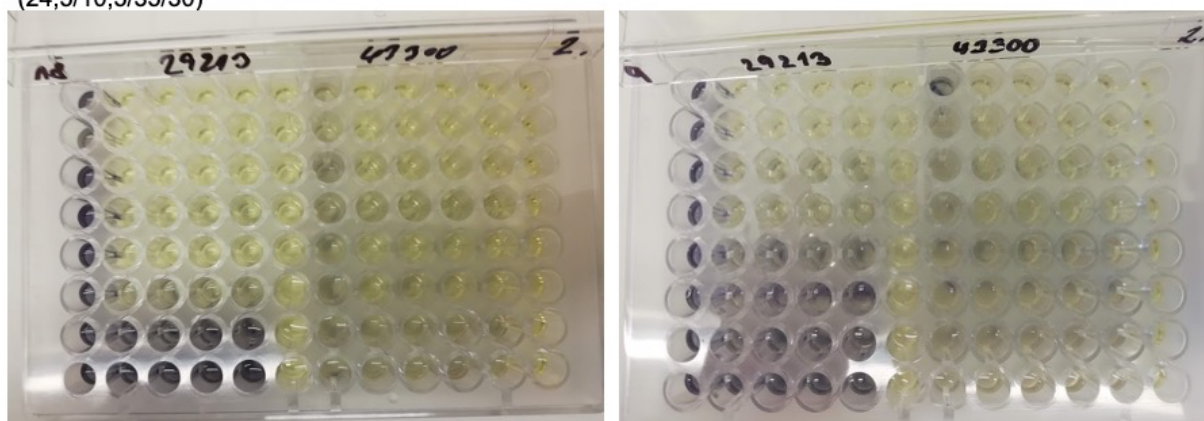


Obrázek 6 Mikrotitrační destičky po 24 hod. inkubaci – *S. aureus* 29213 /*S. aureus* 43300, aditivum C₈/C₁₀ (Foto: Laloučková 2019)

Staphylococcus aureus 29213 / *Staphylococcus aureus* 43300

Aditivum: C₁₂/C₁₄+GML+CinA
(24,5/10,5/35/30)

Aditivum: C₁₂/C₁₄ (70/30)



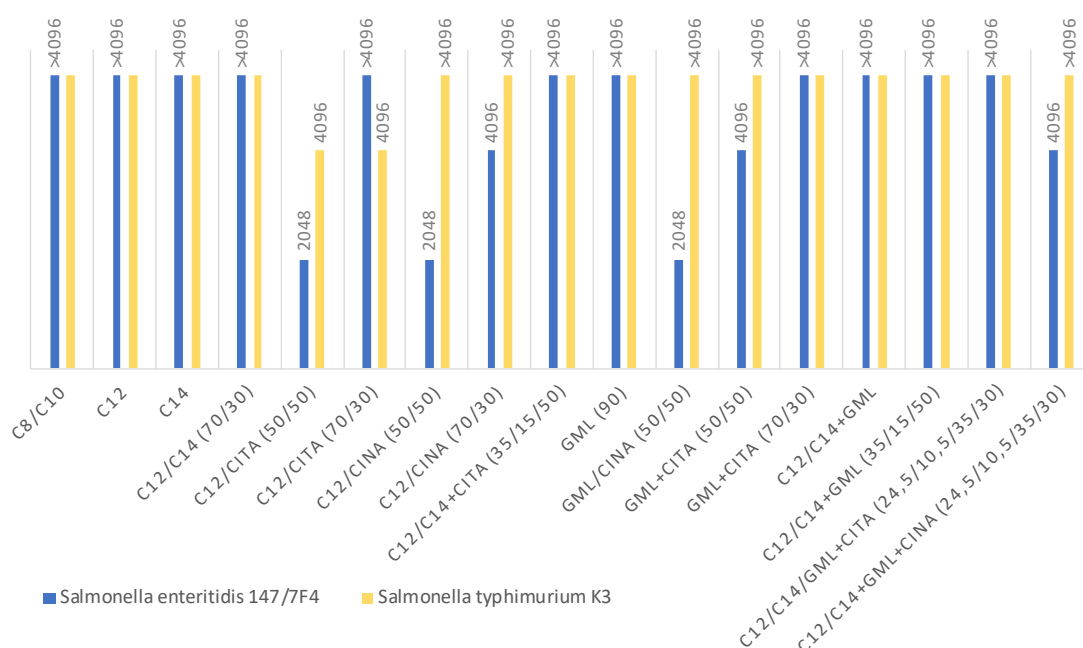
Obrázek 7 Mikrotitrační destičky po 24.hod inkubaci- *S. aureus* 29213 /*S. aureus* 43300, vlevo aditivum C₁₂/C₁₄+GML+CinA (24,5/10,5/35/30), vpravo aditivum C₁₂+C₁₄ (70/30) (Foto: Laloučková 2019)

5.1.2 MIC-bakterie rodu *Salmonella*

Nejméně výrazná antimikrobiální aktivita aditiv byla zaznamenána vůči *S. typhimurium* K3. Reagovala pouze na kombinaci C₁₂/CitA v poměru 50/50 a 70/30. MIC se v průměru rovnala 4096 µg/ml. MIC všech ostatních aditiv byla vyšší než 4096 µg/ml.

S. enteritidis 147/7F4 se prokázala být taktéž velmi odolnou vůči působení aditiv. Nejúčinnější se ukázaly být kombinace CitA/ C₁₂ (50/50), CinA/C₁₂ (50/50), GML/CinA (50/50). MIC činila 2048 µg/ml. U ostatních aditiv MIC přesahovala 4096 µg/ml. Jak vyplývá z grafu č. 3. aditiva byla v 6 případech ze 17 účinnější v inhibici růstu *S. enteritidis* 147/7F4. Bakterie rodu *Salmonella* z našeho měření vycházejí jako nejméně citlivé k aditivům (viz obr. č. 10).

POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ MIC

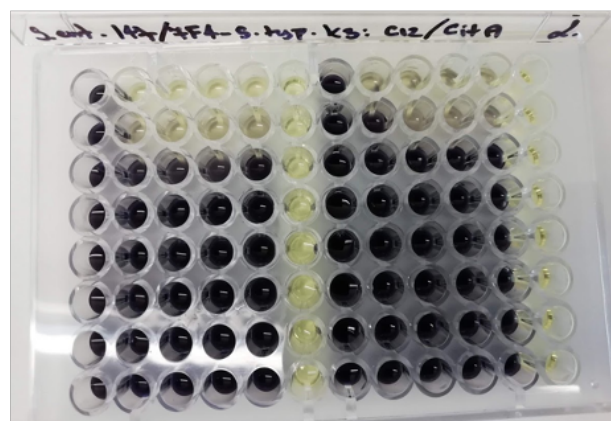
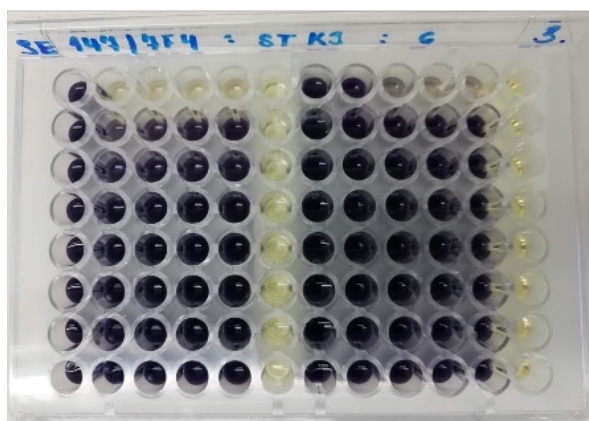


Graf 3 Porovnání výsledků MIC pro bakterie rodu *Salmonella*

Salmonella enteritidis 147/7F4 / *Salmonella typhimurium* K3

Aditivum: C₁₂/CitA (50/50)

Aditivum: C₁₂/CitA (70/30)



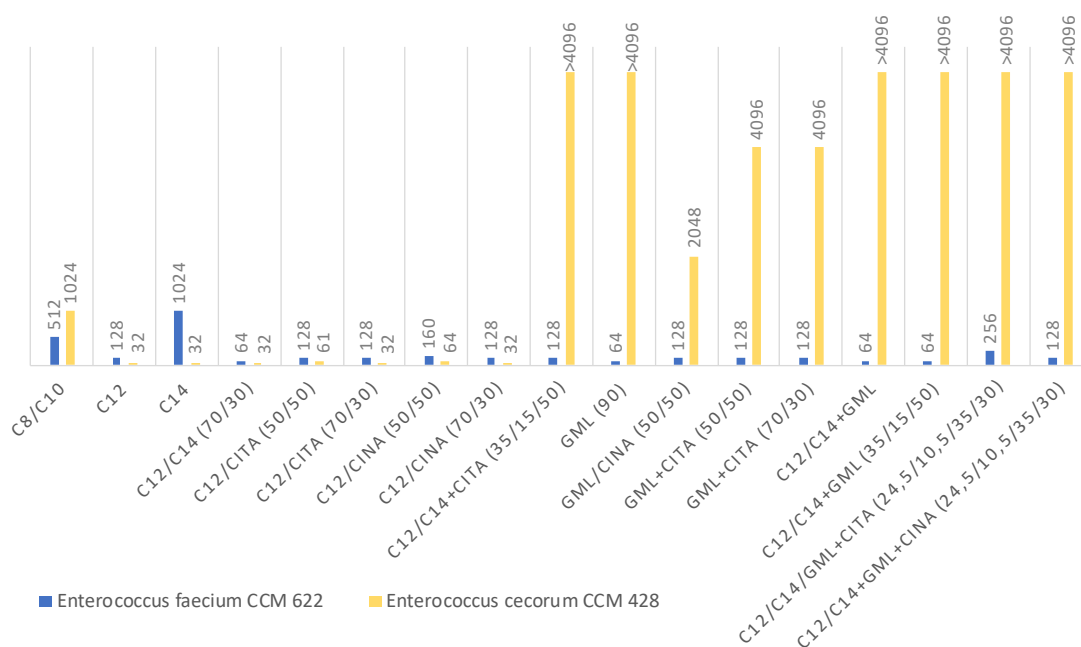
Obrázek 8 Mikrotitrační destičky po 24 hod. inkubaci – *S. enteritidis* 147/7F4 / *S. typhimurium*, vpavo aditivum C₁₂/CitA (50/50), vlevo aditivum C₁₂/CitA (70/30) (Foto: Laloučková 2019)

5.1.3 MIC-bakterie rodu *Enterococcus*

V průměru byl nejcitlivější na přítomnost všech aditiv *E. faecium* CCM 6226. Nejnižší MIC (64 µg/ml) byla naměřena pro čtyři aditiva-C₁₂/C₁₄+GML (35/15/50), C₁₂/C₁₄+GML, GML (90), C₁₂/C₁₄ (70/30). Nejméně reagoval na přítomnost samotné C₁₄, MIC činila 1024 µg/ml.

U *E. cecorum* CCM 4285 byla zaznamenána nejnižší MIC (32 µg/ml) ze všech námi testovaných bakterií. Tuto nejnižší MIC způsobilo pět aditiv-C₁₂, C₁₄, C₁₂/CitA (70/30), C₁₂/CitA (50/50), C₁₂/CinA (70/30). Na druhou stranu u šesti aditiv byla MIC vyšší než 4096 µg/ml, jednalo se převážně o aditiva s obsahem GML. Výsledné MIC všech aditiv jsou vneseny do grafu č. 4.

POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ MIC

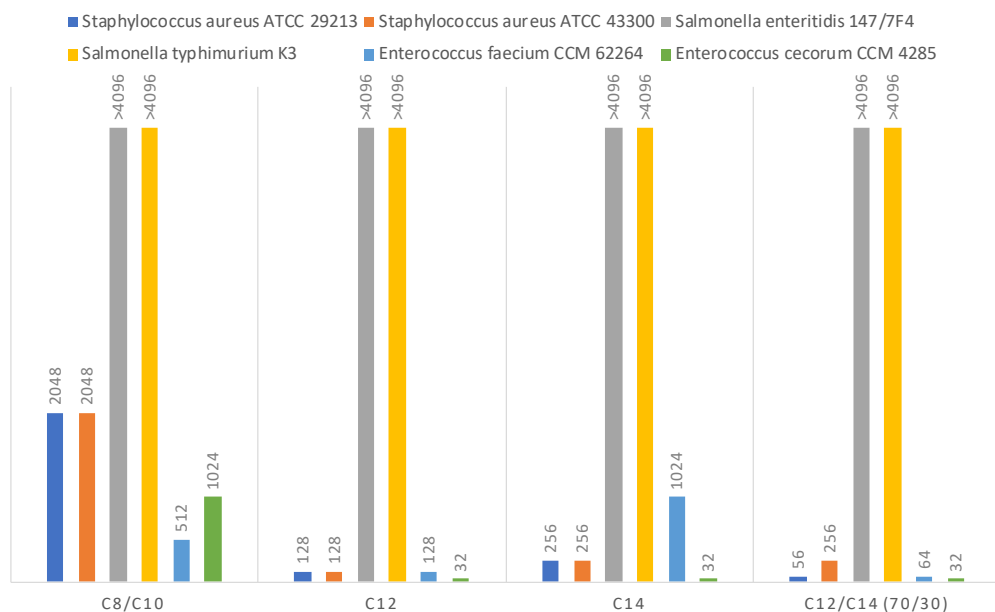


Graf 4 Porovnání výsledků MIC pro bakterie rodu *Enterococcus*

5.1.4 Porovnání účinků aditiv

Z grafu č. 5 vyplývá, že ani jedno z aditiv sestávajících se pouze z MK nebylo účinné na *S. enteritidis* 147/7F4 a *S. typhimurium* K3 v koncentraci nižší než 4096 µg/ml. MCFAs, konkrétně samotná laurová kyselina měla nejnižší MIC pro *E. faecium* CCM 62264. Samotná laurová kyselina či v kombinaci s myristovou kyselinou v poměru (70/30) vykazovaly nejvyšší antimikrobiální aktivitu. Kombinace C₈/C₁₀ měla s výjimkou *E. faecium* CCM 62264 nejnižší antimikrobiální potenciál. Myristová kyselina jako zástupce LCFAs působí méně inhibičně na *E. faecium* CCM 62264 v porovnání s MCFAs.

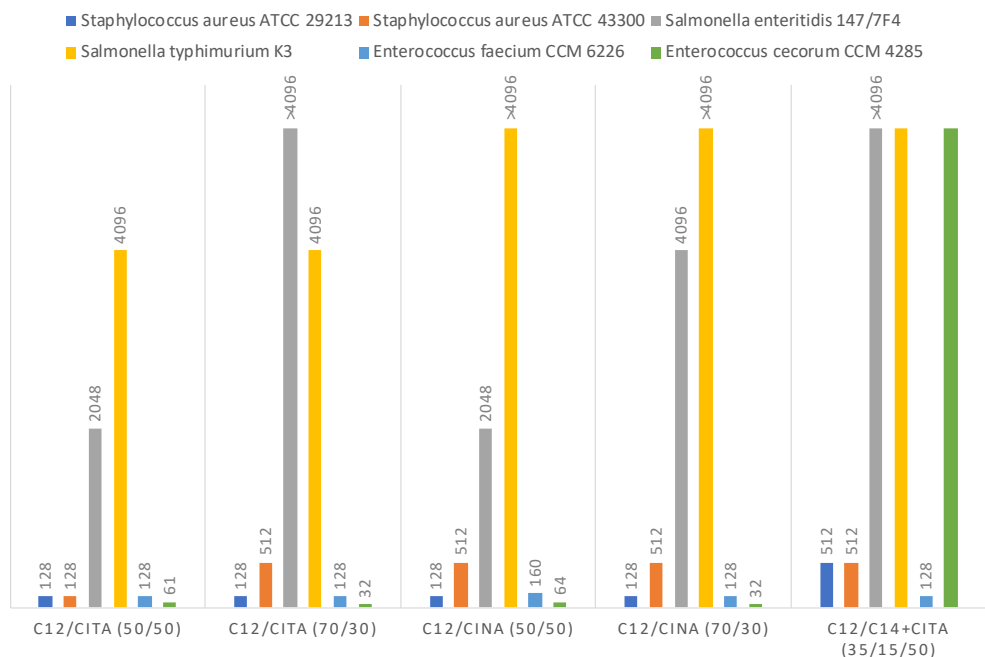
POROVNÁNÍ ÚČINKŮ MK



Graf 5 Porovnání antimikrobiální účinnosti MK

Graf č. 6 zobrazuje inhibiční účinky MK po přidání CitA či CinA v různých poměrech. Kombinace C₁₂/CitA (50/50) má stejné inhibiční účinky na zkoumané bakterie (vyjma salmonel) jako při použití pouhé C₁₂. Při snížení množství citonové kyseliny z poměru C₁₂/CitA 50/50 na poměr 70/30 dojde taktéž ke snížení inhibičního účinku vůči *S. enteritidis* 147/7F4. MIC se navýší z 2048 µg/ml na více než 4096 µg/ml. Stejný trend pozorujeme i při kombinaci C₁₂/CinA. Přídavkem CitA k C₁₂/C₁₄ (50/35/15) dojde ke snížení antibakteriálních účinků v porovnání s C₁₂/C₁₄ (70/30). MIC *E. cecorum* CCM 4285 stoupla z původních 32 µg/ml na více než 4096 µg/ml.

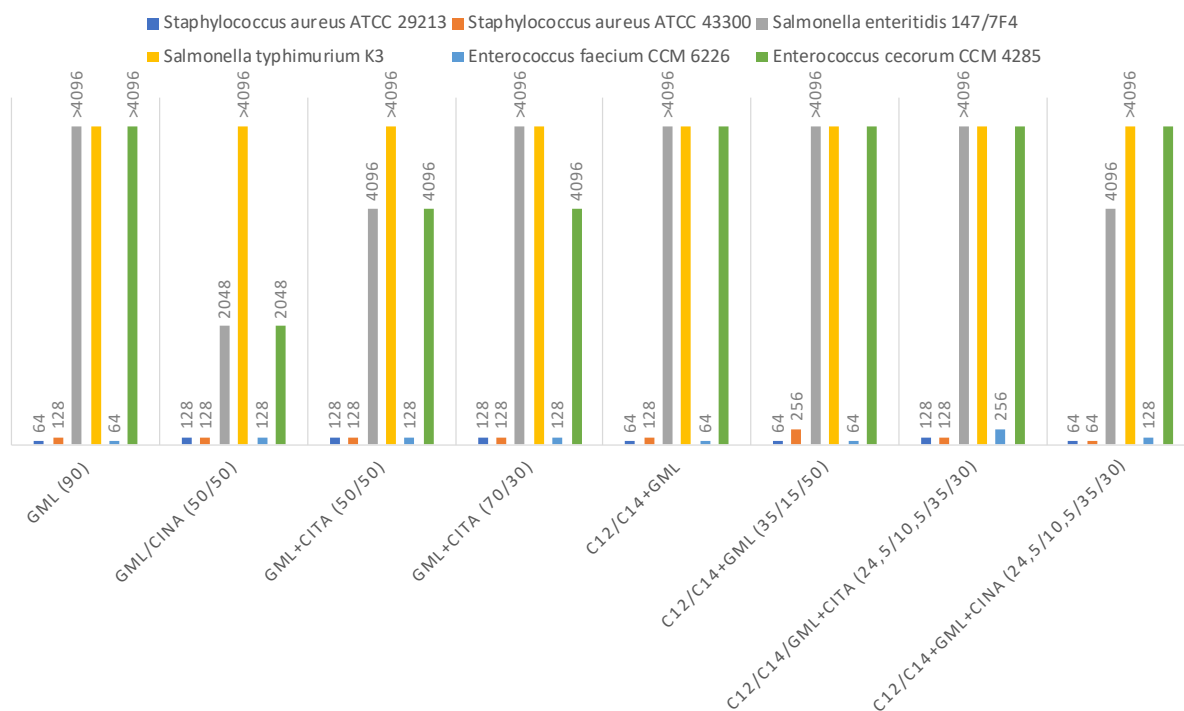
MK V KOMBINACI S KYSELINAMI



Graf 6 Porovnání účinků C12 v kombinaci s kyselinami

Aditiva s obsahem GML, jejichž antibakteriální potenciál je zobrazen na grafu č. 7, dobře inhibují *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300 a *E. faecium* CCM 6226. Inhibiční účinky proti námi zvoleným kmenům salmonel vykazuje jen GML v kombinaci s CinA (50/50). Tato kombinace taktéž inhibuje růst 80 % bakterií *E. cecorum* CCM 4285 při koncentraci 2048 µg/ml. Za přítomnosti GML, CinA prokázala vyšší inhibiční účinky v porovnání s CitA. MIC pro aditiva s CinA dosahují nižších či stejných hodnot jako aditiva s CitA.

ÚČINNOST ADITIV S PŘÍDAVKEM GML



Graf 7 Porovnání účinnosti aditiv v kombinaci s GML

Tabulka 14 MIC všech testovaných aditiv

		MINIMÁLNÍ INHIBIČNÍ KONCENTRACE (µg/ml)					
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	<i>Salmonella enteritidis</i> 147/7F4	<i>Salmonella typhimurium</i> K3	<i>Enterococcus faecium</i> CCM 6226	<i>Enterococcus cecorum</i> CCM 4285
ADITIVUM	C8/C10	2048	2048	>4096	>4096	512	1024
	C12	128	128	>4096	>4096	128	32
	C14	256	256	>4096	>4096	1024	32
	C12/C14 (70/30)	56	256	>4096	>4096	64	32
	C12/CitA (50/50)	128	128	2048	4096	128	61
	C12/CitA (70/30)	128	512	>4096	4096	128	32
	C12/CinA (50/50)	128	512	2048	>4096	160	64
	C12/CinA (70/30)	128	512	4096	>4096	128	32
	C12/C14+CitA (35/15/50)	512	512	>4096	>4096	128	>4096
	GML (90)	64	128	>4096	>4096	64	>4096
	GML/CinA (50/50)	128	128	2048	>4096	128	2048
	GML+CitA (50/50)	128	128	4096	>4096	128	4096
	GML+CitA (70/30)	128	128	>4096	>4096	128	4096
	C12/C14+GML	64	128	>4096	>4096	64	>4096
	C12/C14+GML (35/15/50)	64	256	>4096	>4096	64	>4096
	C12/C14/GML+CitA (24,5/10,5/35/30)	128	128	>4096	>4096	256	>4096
C12/C14+GML+CinA (24,5/10,5/35/30)	64	64	4096	>4096	128	>4096	

6 Diskuze

Tuky jsou nenahraditelnou součástí výživy člověka a zvířat. Primárně poskytují organismu energii, napomáhají lepšímu vstřebávání vitamínů a udržování homeostázy vnitřního prostředí. Prodlužují dobu trávení stravy. Ovlivňují metabolismus na buněčné úrovni. Tuková tkáň je místem syntézy hormonů (Calder 2015).

Setkáváme se s dělením tuků na nasycené, mononenasycené, polynenasycené (Engelking, 2015). Dále jsou kategorizovány dle délky řetězce na ty s krátkým, středně dlouhým, dlouhým a velmi dlouhým řetězcem (Moss et al. 1995).

Každý typ tuku má svůj specifický účinek na organismus. Zařazením určitého druhu tuku do stravy člověka, či krmné dávky zvířete, můžeme ovlivnit zastoupení mikroorganismů v GIT (Hanczakowska et al. 2016), hladinu cholesterolu v krvi (Mensink et al. 2003), či složení tukové tkáně a vytváření tukových zásob u zvířat (Baião & Lara 2005). Do popředí se dostává otázka využití MK jako růstových stimulátorů (Hanczakowska et al. 2016) (Zeit et al. 2015). Jsou možnou alternativou kléčbě bakteriálních infekcí, neboť působí inhibičně na grampozitivní i gramnegativní bakterie (Hanczakowska et al. 2011) (Hankel et al. 2018) (Chen et al. 2019).

Výsledky popsané v praktické části této bakalářské práce potvrzují antibakteriální účinky MK. (McGaw et al. 2002) uvádějí, že grampozitivní bakterie více reagují na MK nežli gramnegativní bakterie z důvodu odlišné stavby bakteriální stěny. Dále poukazují na existenci vztahu mezi délkou řetězce MK a jejím antimikrobiálním účinkem vůči grampozitivním bakteriím. Čím delší řetězec, tím znatelnější jsou inhibiční účinky. Tato tvrzení korespondují s našimi výsledky. Speciální postavení mezi MCFAs má laurová kyselina. (Preuss et al. 2005) konstatují, že laurová kyselina má vyšší antibakteriální potenciál než kaprylová, kaprinová a myristová kyselina. Antibakteriální účinek laurové kyseliny by mohl být potenciálně navýšen při in vivo testech z důvodu přeměny laurové kyseliny na monolaurin o vyšší biologické aktivitě (Lieberman, Enig, & Preuss 2006)

(Batovska et al. 2009) ve své práci uvádějí hodnoty MIC pro tři kmeny *S. aureus* (209, 146 MR, ATCC 33862 USA). Nejnižší MIC zaznamenali při využití laurové kyseliny, a sice 125 µg/ml pro *S. aureus* 209 a více než 500 µg/ml u zbylých dvou bakteriálních kmenů. Ačkoli jsme testy prováděli na odlišných bakteriálních kmenech (ATCC 43300, ATCC 29213), výsledky MIC byly obdobné. Výše uvedení autoři publikovali také MIC myristové kyseliny pro shodné bakteriální kmeny. MIC činila u všech třech >500 µg/ml, což je více než v případě našeho měření. Tyto výsledky dávají za pravdu předpokladu, že rozdílné druhy bakteriálních kmenů reagují odlišně na přítomnost MCFAs. (Melzer et al. 2003) ve své studii poukazují na procentuálně vyšší úmrtnost pacientů v důsledku MRSA infekcí nežli MSSA infekcí. Nejenže má MRSA výhodu v podobě rezistence vůči methicilinu, jak ukázalo naše měření, je i kmen ATCC 43300 (MRSA) více odolný vůči působení sedmi aditiv v porovnání s ATCC 29213 (MSSA) a tím i potenciálně nebezpečnější. (Lieberman, Enig, & Preuss 2006) (Preuss et al. 2005) popisují silné antibakteriální účinky monolaurinu vůči *S. aureus*. (Preuss et al. 2005) určili MIC monolaurinu pro kmen ATCC 33591 - 62,5 µg/ml. (Batovska et al. 2009) naměřili nižší MIC pro

kmen ATCC 33862 USA - 7,8 µg/ml. Námi zjištěné MIC monolaurinu byly vyšší. Opět zřejmě z důvodu rozdílnosti bakteriálních kmenů. (Ruzin & Novick 2000) konstatují, že laurová kyselina může být z části zodpovědná za inhibiční účinky monolaurinu proti *S. aureus*. Činností *Staphylococcus* spp. se monolaurin rychle hydrolyzuje na laurovou kyselinu a glycerol. (Schlievert & Peterson 2012) ve svých výsledcích označují monolaurin za baktericidní při 200x nižší koncentraci, než je koncentrace laurové kyseliny při testech na *S. aureus* MN8. V našem experimentu se tato skutečnost nepotvrdila. Kmen ATCC 29213 měl pouze 2x nižší MIC monolaurinu v porovnání s laurovou kyselinou. MIC pro ATCC 43300 byla pro obě aditiva shodná. Rozdíly jsou pravděpodobně dané odlišností kmenů, to ostatně potvrzuje (Schlievert & Peterson 2012) testem 54 různých kmenů *Staphylococcus* spp. a určením průměrné baktericidní koncentrace monolaurinu 300 µg/ml. (Schlievert et al. 1992) konstatují, že monolaurin je účinný při blokování nebo oddálení produkce exotoxinů patogenními grampozitivními bakteriemi.

Bakterie rodu *Salmonella* spp. nereagovaly ani v jednom případě na samotný monolaurin (MIC >4096 µg/ml). Dospěli jsme ke stejnému závěru jako (Skrivanova et al. 2007), kteří u třech kmenů *Salmonella* spp. naměřili MIC >5000 µg/ml pro monolaurin. Tento výsledek je také ve shodě s (Schlievert, Peterson 2012), kteří spojují monolaurin především s účinky na grampozitivní bakterie. Thormar, Hilmarsson, & Bergsson (2006) konstatují, že schopnost inhibovat gramnegativní bakterie mají především monoacylglyceroly, které mají ve své molekule navázanou jinou mastnou kyselinu než laurovou.

Skřivanová, Savka, & Marounek (2004) označili kaprylovou kyselinu za jedinou MK s antibakteriálními účinky vůči *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. infantis*. Tato kyselina jako jediná z MK snižovala využití glukózy bakteriemi. Inhibiční koncentrace kaprylové kyseliny, při které je bakteriemi využito 50 % glukózy, se pohybuje v rozmezí 0,75-1,17 mg/ml. Inhibiční účinky kaprylové kyseliny jsme v rámci našeho experimentu nepozorovali, neboť samotná kaprylová kyselina nebyla využita ani jako jedno aditivum. V kombinaci s kaprinovou kyselinou nezpůsobila inhibici testovaných kmenů *Salmonella* spp.

Organické kyseliny působí bakteriostaticky na *Salmonella* spp. Citronová kyselina inhibuje růst MO při pH 4,05. Roztok citronové kyseliny o koncentraci 0,75 % snižuje kontaminaci povrchu vajec bakteriemi *Salmonella typhimurium* (Oulkheir et al. 2015). Skrivanova et al. (2007) stanovili MIC, při testech na třech kmenech *Salmonella* spp., vyšší než 5000 µg/ml při použití kyseliny citronové. Kyselina citronová byla proto využívána jako aditivum pouze v kombinaci s dalšími látkami. Antibakteriální efekt byl pozorován pouze v případě využití C₁₂/CitA (50/50) na *S. enteritidis* 147/7F4.

Rostlina skořicovníku obsahuje nepřeberné množství biologicky aktivních látek. Jednou z nich je i kyselina skořicová, látka s významnými antimikrobiálními účinky. Deriváty skořicové kyseliny vykazují antibakteriální, antivirové a antifungální vlastnosti (Sova 2012)(Guzman 2014). Ammar et al. (2016) pozorovali antibakteriální aktivitu esenciálních olejů získaných z *Cinnamomum aromaticum* vůči gramnegativním bakteriím. Chang, Chen, Chang (2001) publikovali hodnoty MIC skořicové kyseliny pro *S. aureus* (MRSA) a *Salmonella* spp., činí

shodných 1000 µg/ml. Na přítomnost skořicové kyseliny v kombinaci s GML (50/50) reaguje kmen 147/7F4 již za nižší koncentrace. Naopak u kmene K3 nebyla prokázána žádná citlivost.

Jak bylo již zmíněno (Schlievert, Peterson 2012) považují monolaurin za látku obecně dobře inhibující grampozitivní bakterie. V rozporu s tímto tvrzením jsou námi naměřené MIC monolaurinu pro grampozitivní *E. cecorum* CCM 4285 (MIC >4096 µg/ml). Možným důvodem je častá rezistence enterokoků na mnoho běžně používaných antibakteriálních činidel, které se využívají k léčbě infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi (Banerjee, Anupurba 2015). Záznamů o působení MK na *E. cecorum* je v odborné literatuře nedostatek. Vyjma monolaurinu je růst *E. cecorum* inhibován všemi testovanými MK, což je ve shodě s předpokladem (Hovorková, Laloučková, & Skřivanová 2018), které ze svých výsledků přisuzovaly především laurové kyselině a dalším MCFAs inhibiční účinky vůči *E. cecorum*.

E. faecium CCM 6226 se ukázal být nejcitlivější kulturou. Všechna aditiva vyvolala inhibiční účinky, včetně těch s GML, což byl hlavní rozdíl oproti *E. cecorum* CCM 4285. Výsledky MIC nebylo možné porovnat, neboť účinkům MK na *E. faecium* se ještě nikdo před námi nevěnoval. Pravděpodobně z důvodu nižšího zastoupení *E. faecium* v GIT. V trávicím traktu ptactva, představuje jen 10,1 % z přítomných enterokoků. Nejhojněji zastoupeným enterokokem je *E. faecalis* - 74,7 % (Stępień-Pyśniak et al. 2016). *E. faecium* byl doposud prozkoumáván spíše jako růstový stimulátor a probiotikum (Hanczakowska et al. 2016).

7 Závěr

Získané výsledky z měření MIC mikrodiluční metodou v 96-jamkových mikrotitračních destičkách, dávají za pravdu řadě publikovaných vědeckých poznatků věnovaných této problematice. Výsledky potvrzují, že aditiva obsahující MCFAs působí inhibičně na námi zkoumané patogenní bakterie. Významné antibakteriální účinky MCFAs byly zaznamenány především vůči grampozitivním bakteriím. Laurová kyselina měla ze všech MCFAs nejvyšší inhibiční potenciál. Její inhibiční účinky byly navýšeny v kombinaci s myristovou kyselinou v poměru 70:30.

Nebyly prokázány antimikrobiální účinky samotných MK na bakterie rodu *Salmonella*. Avšak laurová kyselina v kombinaci s monolaurinem či citronovou nebo skořicovou kyselinou dokázala inhibovat růst *S. enteritidis* 147/7F4. *S. typhimurium* K3 byla odolná vůči působení všech aditiv.

Rozdíl v antibakteriálním účinku monolaurinu nebyl v porovnání s laurovou kyselinou nijak velký. Tento závěr neodpovídá poznatkům z literární rešerše. Otázkou také zůstává, proč aditiva s obsahem monolaurinu obecně neinhibují růst *E. cecorum* CCM 4285 přesto, že se jedná o grampozitivní bakterii. Navíc *E. faecium* CCM 6226 reaguje na všechna aditiva včetně těch s monolaurinem. Pro vytvoření definitivních závěrů o účincích MK na bakterie rodu *Enterococcus* je zapotřebí dalšího zkoumání.

Všechna testovaná aditiva obecně dobře inhibovala růst *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300 a *E. faecium* CCM 6226. Antibakteriální efekt se neprokázal u řady aditiv při působení na *E. cecorum* CCM 4285, *S. enteritidis* 147/7F4, *S. typhimurium* K3.

Lze konstatovat, že MCFAs, monolaurin, citronová a skořicová kyselina jsou příhodnými aditivy do krmných dávek zvířat a možnou alternativou k antibiotické léčbě. Jejich účinků je možno využít i v doplňcích stravy člověka.

8 Literatura

- Abramo, J. M., Reynolds, A., Crisp, G. T., Weurlander, M., Söderberg, M., Scheja, M., ... Rugg, G. (2012). Individuality in music performance. *Assessment & Evaluation in Higher Education*, 37(October), 435. <https://doi.org/10.1007/82>
- Ammar, S. S. M., Mokhtaria, K., Amar, A. A., Tahar, B. B., Moulay, D., Mohamed, H. S., & Laid, B. (2016). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Cinnamomum aromaticum Essential Oil Against Four Enteropathogenic Bacteria Associated with Neonatal Calve's Diarrhea. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 12(1), 24–30. <https://doi.org/10.3923/ajava.2017.24.30>
- Andreoletti, O., Budka, H., Buncic, S., Colin, P., Collins, J. D., De, A., ... Vanopdenbosch, E. (2007). Genetic TSE resistance in goats 1 Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards Adopted on 5 March 2009. *Efsa*, (October), 1–64.
- Aoyama, T., Nosaka, N., & Kasai, M. (2007). Research on the nutritional characteristics of medium-chain fatty acids. *Journal of Medical Investigation*, 54(3–4), 385–388. <https://doi.org/10.2152/jmi.54.385>
- Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012, April). The rise of the Enterococcus: Beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 10, pp. 266–278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2761>
- Baião, N., & Lara, L. (2005). Oil and fat in broiler nutrition. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 7(3), 129–141. <https://doi.org/10.1590/s1516-635x2005000300001>
- Banerjee, T., & Anupurba, S. (2015). Prevalence of Virulence Factors and Drug Resistance in Clinical Isolates of Enterococci: A Study from North India. *Journal of Pathogens*, 2015, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/692612>
- Baron, F., Nau, F., Guérin-Dubiard, C., Bonnassie, S., Gautier, M., Andrews, S. C., & Jan, S. (2016). Egg white versus Salmonella Enteritidis! A harsh medium meets a resilient pathogen. *Food Microbiology*, 53, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.009>
- Bartlett, J. G., Gilbert, D. N., & Spellberg, B. (2013). Seven ways to preserve the Miracle of antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 56(10), 1445–1450. <https://doi.org/10.1093/cid/cit070>
- Batovska, D. I., Todorova, I. T., Tsvetkova, I. V., & Najdenski, H. M. (2009a). Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: Individual effects and synergistic relationships. *Polish Journal of Microbiology*, 58(1), 43–47.
- Beare-Rogers, J. L., Dieffenbacher, A., & Holm, J. V. (2007). Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 73(4), 685–744. <https://doi.org/10.1351/pac200173040685>
- Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., Drira, N. E., & Attia, H. (2004). Date seeds: Chemical composition and characteristic profiles of the lipid fraction. *Food Chemistry*, 84(4), 577–584. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00281-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00281-4)
- Bhunja, A. K. (2008). Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis. In *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74537-4>

- Bortolaia, V., Espinosa-Gongora, C., & Guardabassi, L. (2016). Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.003>
- Brodowska, K., Brodowska, A., Śmigielski, K., & Łodyga-Chruścińska, E. (2016). Antioxidant profile of essential oils and extracts of cinnamon bark (*Cinnamomum cassia*). *European Journal of Biological Research*, 6(4), 310–316. <https://doi.org/10.5281/zenodo.197200>
- C.Lee Ventola, M. (2015, April). The Antibiotic Resistance Crisis. Retrieved July 8, 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>
- Calder, P. C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 39, 18S-32S. <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>
- Chang, S. T., Chen, P. F., & Chang, S. C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1), 123–127. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00273-2)
- Chaudhuri, D., Chowdhury, A. R., Biswas, B., & Chakravorty, D. (2018). Salmonella Typhimurium infection leads to colonization of the mouse brain and is not completely cured with antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01632>
- Chen, X., Zhao, X., Deng, Y., Bu, X., Ye, H., & Guo, N. (2019). Antimicrobial potential of myristic acid against *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Antibiotics*, 72(5), 298–305. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0152-5>
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. Vanden, & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept.” *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290–302. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>
- Courvalin, P. (2006). Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 42(Supplement_1), S25–S34. <https://doi.org/10.1086/491711>
- Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1629–1642. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>
- Deurenberg, R. H., & Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(6), 747–763. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.007>
- Dórea, F. C., Cole, D. J., Hofacre, C., Zamperini, K., Mathis, D., Doyle, M. P., ... Maurer, J. J. (2010). Effect of salmonella vaccination of breeder chickens on contamination of broiler chicken carcasses in integrated poultry operations. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7820–7825. <https://doi.org/10.1128/AEM.01320-10>
- EFSA, & ECDC. (2017). Multi-country outbreak of Salmonella Enteritidis infections linked to Polish eggs. *EFSA Supporting Publications*, 14(12). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.en-1353>
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers*

- in Life Science*, 8(3), 284–293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Engelking, L. R. (2015). Saturated and Unsaturated Fatty Acids. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, 12, 345–350. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-391909-0.50054-2>
- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., & Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7687–7692. <https://doi.org/10.1073/pnas.122108599>
- European Centre for Disease Prevention and Control, 2019. Cover. (2018). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe*. <https://doi.org/10.2900/22212>
- Evropská unie, 2019. (2019). *Cs 2019*. 55. <https://doi.org/doi:10.2865/582110>
- Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, Vol. 155, pp. 1749–1757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>
- Food, E., & Authority, S. (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Fortuoso, B. F., dos Reis, J. H., Gebert, R. R., Barreta, M., Griss, L. G., Casagrande, R. A., ... Da Silva, A. S. (2019). Glycerol monolaurate in the diet of broiler chickens replacing conventional antimicrobials: Impact on health, performance and meat quality. *Microbial Pathogenesis*, 129(January), 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.005>
- German, J. B., & Dillard, C. J. (2010). *Saturated Fats : A Perspective from Lactation and Milk Composition*. 915–923. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3445-9>
- Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., & Portugal, H. (2006). Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. *Phytotherapy Research*, 20(1), 58–61. <https://doi.org/10.1002/ptr.1803>
- Gold, H. S. (2001). Vancomycin-Resistant Enterococci: Mechanisms and Clinical Observations. *Clinical Infectious Diseases*, 33(2), 210–219. <https://doi.org/10.1086/321815>
- Golkar, Z., Bagasra, O., & Gene Pace, D. (2014). Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(2), 129–136. <https://doi.org/10.3855/jidc.3573>
- Guzman, J. D. (2014). Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. In *Molecules* (Vol. 19). <https://doi.org/10.3390/molecules191219292>
- Haenlein, G. F. W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51(2), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.08.010>
- Hallin, M., Denis, O., Deplano, A., De Mendonça, R., De Ryck, R., Rottiers, S., & Struelens, M. J. (2007). Genetic relatedness between methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Results of a national survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(3), 465–472. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl535>
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. (2018, August 3). The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns-an update. *Frontiers in*

Microbiology, Vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791>

- Hanczakowska, E., Świątkiewicz, M., Natonek-Wiśniewska, M., & Okoń, K. (2016). Medium chain fatty acids (MCFA) and/or probiotic *Enterococcus faecium* as a feed supplement for piglets. *Livestock Science*, *192*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.08.002>
- Hanczakowska, E., Szewczyk, A., & Okoń, K. (2011). Effects of dietary caprylic and capric acids on piglet performance and mucosal epithelium structure of the ileum. *Journal of Animal and Feed Sciences*, *20*(4), 556–565. <https://doi.org/10.22358/jafs/66213/2011>
- Hankel, J., Popp, J., Meemken, D., Zeiger, K., Beyerbach, M., Taube, V., ... Visscher, C. (2018). Influence of lauric acid on the susceptibility of chickens to an experimental *Campylobacter jejuni* colonisation. *PLoS ONE*, *13*(9), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204483>
- Hanselman, B. A., Kruth, S. A., Rousseau, J., & Weese, J. S. (2009). Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *Canadian Veterinary Journal*, *50*(9), 954–958.
- Hecht, D. W., Citron, D. M., Dzik-Fox, J., Gregory, W. W., Jacobus, N. V., Jenkins, S. G., ... Wexler, H. (2012). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard – Eighth Edition. CLSI document M11-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, *32*(5), 1–38.
- Houten, S. M., & Wanders, R. J. A. (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *33*(5), 469–477. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9061-2>
- Hovorková, P., Laloučková, K., & Skřivanová, E. (2018). Determination of in vitro antibacterial activity of plant oils containing medium-chain fatty acids against gram-positive pathogenic and gut commensal bacteria. *Czech Journal of Animal Science*, *63*(3), 119–125. <https://doi.org/10.17221/70/2017-CJAS>
- Huang, C. B., Alimova, Y., Myers, T. M., & Ebersole, J. L. (2011). Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*, *56*(7), 650–654. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.01.011>
- Huber, R., Bikker, R., Welz, B., Christmann, M., & Brand, K. (2017). TNF tolerance in monocytes and macrophages: Characteristics and molecular mechanisms. *Journal of Immunology Research*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/9570129>
- Jackson, C. R., Kariyawasam, S., Borst, L. B., Frye, J. G., Barrett, J. B., Hiott, L. M., & Woodley, T. A. (2015). Antimicrobial resistance, virulence determinants and genetic profiles of clinical and nonclinical *Enterococcus cecorum* from poultry. *Letters in Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/lam.12374>
- Jung, A., Chen, L. R., Suyemoto, M. M., Barnes, H. J., & Borst, L. B. (2018). A Review of *Enterococcus cecorum* Infection in Poultry. *Avian Diseases*, *62*(3), 261–271. <https://doi.org/10.1637/11825-030618-review.1>
- Khatib, M. N., Gaidhane, S., Gaidhane, A. M., Simkhada, P., & Zahiruddin, Q. S. (2015). Ghrelin O Acyl Transferase (GOAT) as a novel metabolic regulatory enzyme. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *9*(2), LE01–LE05.

<https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/9787.5514>

- Kim, S. A., & Rhee, M. S. (2013). Marked synergistic bactericidal effects and mode of action of medium-chain fatty acids in combination with organic acids against *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21), 6552–6560. <https://doi.org/10.1128/AEM.02164-13>
- Kirimura, K., Honda, Y., & Hattori, T. (2011). Citric Acid. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Second Edi, Vol. 3). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00169-0>
- Labarthe, F., Gélinas, R., & Des Rosiers, C. (2008). Medium-chain fatty acids as metabolic therapy in cardiac disease. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 22(2), 97–106. <https://doi.org/10.1007/s10557-008-6084-0>
- Leach, M. J., & Kumar, S. (2012). Cinnamon for diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017(12). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007170.pub2>
- Lemarié, F., Beauchamp, E., Drouin, G., Legrand, P., & Rioux, V. (2018). Dietary caprylic acid and ghrelin O-acyltransferase activity to modulate octanoylated ghrelin functions: What is new in this nutritional field? *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 135(March), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.07.009>
- Lemarié, F., Beauchamp, E., Legrand, P., & Rioux, V. (2016). Revisiting the metabolism and physiological functions of caprylic acid (C8:0) with special focus on ghrelin octanoylation. *Biochimie*, 120, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.08.002Review>
- Lieberman, S., Enig, M. G., & Preuss, H. G. (2006). A Review of Monolaurin and Lauric Acid. *Alternative & Complementary Therapies*, (December), 310–314.
- Lindmark Månsson, H. (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food and Nutrition Research*, 52, 1–4. <https://doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1821>
- Marcelo Campos, M. (2017, July 27). Ketogenic diet: Is the ultimate low-carb diet good for you? - Harvard Health Blog - Harvard Health Publishing. Retrieved July 8, 2020, from <https://www.health.harvard.edu/blog/ketogenic-diet-is-the-ultimate-low-carb-diet-good-for-you-2017072712089>
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 718–733. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>
- Marsilio, F., Di Francesco, C. E., & Di Martino, B. (2018). Coagulase-Positive and Coagulase-Negative Staphylococci Animal Diseases. In *Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00004-2>
- McCarty, M. F., & DiNicolantonio, J. J. (2016). Lauric acid-rich medium-chain triglycerides can substitute for other oils in cooking applications and may have limited pathogenicity. *Open Heart*, 3(2), 1–5. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2016-000467>
- McGaw, L. J., Jäger, A. K., & Van Staden, J. (2002). Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *South African Journal of Botany*, 68(4), 417–423. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30367-7](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30367-7)
- McGowan, L. L., Jackson, C. R., Barrett, J. B., Hiott, L. M., & Fedorka-Cray, P. J. (2006). Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits,

- vegetables, and meats. *Journal of Food Protection*, 69(12), 2976–2982. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.12.2976>
- Mella M., S. (2005). Trends in antimicrobial drug development: Implications for the future. *Revista Chilena de Infectología*, 22(2), 1279–1286. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182005000200011>
- Melzer, M., Eykyn, S. J., Gransden, W. R., & Chinn, S. (2003). Is Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* More Virulent than Methicillin-Susceptible *S. aureus*? A Comparative Cohort Study of British Patients with Nosocomial Infection and Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 37(11), 1453–1460. <https://doi.org/10.1086/379321>
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D. M., & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77(5), 1146–1155. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.5.1146>
- Moss, G. P., Smith, P. A. S., & Tavernier, D. (1995). Glossary of class names of organic compounds and reactive intermediates based on structure (IUPAC recommendations 1995). *Pure and Applied Chemistry*, 67(8–9), 1307–1375. <https://doi.org/10.1351/pac199567081307>
- Murray, B. E. (2000). Vancomycin-resistant enterococcal infections. *New England Journal of Medicine*, 342(10), 710–721. <https://doi.org/10.1056/NEJM200003093421007>
- Nakatsuji, T., Kao, M. C., Fang, J. Y., Zouboulis, C. C., Zhang, L., Gallo, R. L., & Huang, C. M. (2009). Antimicrobial property of lauric acid against propionibacterium acnes: Its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(10), 2480–2488. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.93>
- Nielsen, M. K., & Arneborg, N. (2007). The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* cultures. *Food Microbiology*, 24(1), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.005>
- Odongo, N. E., Or-Rashid, M. M., Kebreab, E., France, J., & McBride, B. W. (2007). Effect of supplementing myristic acid in dairy cow rations on ruminal methanogenesis and fatty acid profile in milk. *Journal of Dairy Science*, 90(4), 1851–1858. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-541>
- Oulkheir, S., Ounine, K., Haloui, N., & Attarassi, B. (2015). Antimicrobial Effect of Citric , Acetic , Lactic Acids and Sodium Nitrite against *Escherichia Coli* in Tryptic Soy Broth. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 5(3), 12–20.
- Papamandjaris, A. A., Macdougall, D. E., & Jones, P. J. H. (1998). Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: Obesity treatment implications. *Life Sciences*, 62(14), 1203–1215. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(97\)01143-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(97)01143-0)
- Preuss, H. G., Echard, B., Enig, M., Brook, I., & Elliott, T. B. (2005). Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 272(1–2), 29–34. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-6604-1>
- Rial, S. A., Jutras-Carignan, A., Bergeron, K. F., & Mounier, C. (2020). A high-fat diet enriched in medium chain triglycerides triggers hepatic thermogenesis and improves metabolic

- health in lean and obese mice. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(3), 158582. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158582>
- Rustan, A. C., & Drevon, C. A. (2005). Fatty Acids: Structures and Properties. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0003894>
- Ruzin, A., & Novick, R. P. (2000). Equivalence of lauric acid and glycerol monolaurate as inhibitors of signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2668–2671. <https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2668-2671.2000>
- Sánchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A., & Gómez-Duarte, O. G. (2011). Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 9(6), 263–277. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2011.11.001>
- Schleifer, K., & Bell, J. A. (2015). *Rosenbach 1884*, 18. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00569>.
- Schlievert, P. M., Deringer, J. R., Kim, M. H., Projan, S. J., & Novick, R. P. (1992). Effect of glycerol monolaurate on bacterial growth and toxin production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(3), 626–631. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.3.626>
- Schlievert, Patrick M., & Peterson, M. L. (2012). Glycerol monolaurate antibacterial activity in broth and biofilm cultures. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040350>
- Schönfeld, P., & Wojtczak, L. (2016). Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: The cellular perspective. *Journal of Lipid Research*, 57(6), 943–954. <https://doi.org/10.1194/jlr.R067629>
- Skřivanová, E., Marounek, M., Benda, V., & Brezina, P. (2007). Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Veterinarní Medicina*, 51(3), 81–88. <https://doi.org/10.17221/5524-VETMED>
- Skřivanová, E., Savka, O. G., & Marounek, M. (2004). In vitro effect of C2-C18 fatty acids on salmonellas. *Folia Microbiologica*, 49(2), 199–202. <https://doi.org/10.1007/BF02931402>
- Soni, I., Chakrapani, H., & Chopra, S. (2015). Draft genome sequence of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Genome Announcements*, 3(5), 29213. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01095-15>
- Sova, M. (2012). *Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives*. 749–767. <https://doi.org/10.2174/138955712801264792>
- Spörling, I., Felgner, S., Preuß, M., Eckweiler, D., Rohde, M., Häussler, S., ... Erhardt, M. (2018). Regulation of flagellum biosynthesis in response to cell envelope stress in salmonella enterica serovar Typhimurium. *MBio*, 9(3), 1–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00736-17>
- Stępień-Pyśniak, D., Marek, A., Banach, T., Adaszek, Ł., Pyzik, E., Wilczyński, J., & Winiarczyk, S. (2016). Prevalence and antibiotic resistance of enterococcus strains isolated from poultry. *Acta Veterinaria Hungarica*, 64(2), 148–163. <https://doi.org/10.1556/004.2016.016>
- Stillwell, W. (2016). Membrane Biogenesis. *An Introduction to Biological Membranes*, (Chapter 7), 349–367. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63772-7.00016-6>

- Švec, P., & Franz, C. M. A. P. (2014). The genus *Enterococcus*. In *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (Vol. 9781444333831, pp. 175–211). <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch15>
- Tang, K. L., Caffrey, N. P., Nóbrega, D. B., Cork, S. C., Ronksley, P. E., Barkema, H. W., ... Ghali, W. A. (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health*, *1*(8), e316–e327. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(17\)30141-9](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(17)30141-9)
- Thormar, H., Hilmarsson, H., & Bergsson, G. (2006). Stable concentrated emulsions of the 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(1), 522–526. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.522-526.2006>
- Thung, T. Y., Mahyudin, N. A., Basri, D. F., Wan Mohamed Radzi, C. W. J., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., & Radu, S. (2016). Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in raw chicken meat at retail markets in Malaysia. *Poultry Science*, *95*(8), 1888–1893. <https://doi.org/10.3382/ps/pew144>
- Traul, K. A., Driedger, A., Ingle, D. L., & Nakhasi, D. (2000). Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food and Chemical Toxicology*, *38*(1), 79–98. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00106-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00106-4)
- Trust, T. J., & Bartlett, K. H. (1979). Aquarium pets as a source of antibiotic-resistant salmonellae. *Canadian Journal of Microbiology*, *25*(4), 535–541. <https://doi.org/10.1139/m79-078>
- Witcher, K. J., Novick, R. P., & Schlievert, P. M. (1996). Modulation of immune cell proliferation by glycerol monolaurate. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *3*(1), 10–13. <https://doi.org/10.1128/cdli.3.1.10-13.1996>
- Zeitz, J. O., Fennhoff, J., Kluge, H., Stangl, G. I., & Eder, K. (2015). Effects of dietary fats rich in lauric and myristic acid on performance, intestinal morphology, gut microbes, and meat quality in broilers. *Poultry Science*, *94*(10), 2404–2413. <https://doi.org/10.3382/ps/pev191>

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ATP	adenosintrifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GML	glycerol monolaurát
GOAT	gherlin-O-acyltransferáza
JUT	jatečně upravené tělo
LCFAs	long-chain fatty acids - mastné kyseliny o dlouhé délce řetězce
MCFAs	medium-chain fatty acids - mastné kyseliny o střední délce řetězce
MCT	medium chain triglyceride - triglycerid o střední délce řetězce
MDR	multidrug resistant - rezistentní na více typů léčiv
MHB	Müller-Hinton bujón
MIC	minimal inhibitory concentration - minimální inhibiční koncentrace
MK	mastná kyselina
MO	mikroorganismus
MRSA	methicilin-rezistentní <i>S. aureus</i>
MSSA	methicilin-senzitivní <i>S. aureus</i>
RNA	ribonukleová kyselina
SCFAs	short-chain fatty acids - mastné kyseliny o krátké délce řetězce
VLCFAs	very long-chain fatty acids - mastné kyseliny o velmi dlouhé délce řetězce
VMK	volné mastné kyseliny

