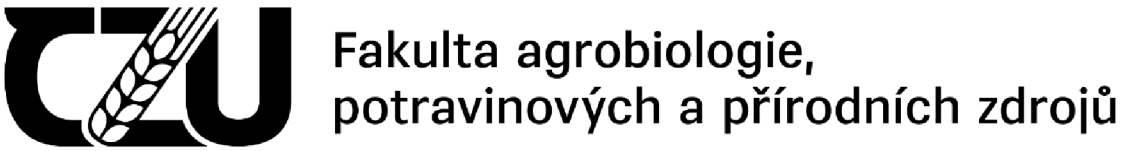
Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie výživy a dietetiky



Interakce bifidobakterií a klostridií ve střevní mikrobiotě kojenců

Diplomová práce

Bc. Blanka Krausová

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Interakce bifidobakterií a klostridií ve střevní mikrobiotě kojenců" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19. 4. 2024 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mé vedoucí diplomové práce doc. Ing. Věře Neužil Bunešové Ph.D. za její cenné rady a čas, který mi během naší spolupráce věnovala, a rovněž za její trpělivost. Dále bych tímto chtěla poděkovat mému příteli a rodině, bez jejichž podpory bych tuto práci nemohla dokončit. V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit vděčnost všem členům Katedry mikrobiologie výživy a dietetiky, kteří mi byli v průběhu tvorby této diplomové práce oporou.

Interakce bifidobakterií a klostridií ve střevní mikrobiotě kojenců

Souhrn

Kojenecké druhy *Bifidobacterium* spp. jsou výjimečné zejména svou schopností utilizovat oligosacharidy mateřského mléka, čímž získávají konkurenční výhodu nad zbytkem mikrobiální populace střeva. V jejich přítomnosti dochází v mikrobiotě k regulaci počtů a negativních účinků klostridií, jimiž jsou například koliky či jiné pro zdraví kojence nežádoucí projevy. Mechanismy účinku inhibice klostridií bifidobakteriemi nejsou plně známy. Navíc není dostatečně známo, jak náhradní forma výživy obsahující pouze minoritní část z komplexu oligosacharidů mateřského mléka může ovlivnit vztahy uvnitř doposud nezralé střevní mikrobioty, ve které mohou být bifidobakterie chybějícím taxonem.

Cílem této práce bylo vypracovat přehled týkající se mikrobiální kolonizace kojenců a zaměřit se především na význam bifidobakterií a klostridií a jejich vzájemné interakce, a dále pak zhodnotit vliv mateřského mléka a náhradní kojenecké výživy ve vztahu k výše uvedenému. Praktická část práce byla zaměřena na testování antimikrobiálního účinku probiotických kmenů bifidobakterií vůči klostridiálním kmenům izolovaných z fekálních vzorků kolitických kojenců. Testování probíhalo na úrovni *in vitro*, a také *ex vivo*, což představovalo komplexnější experimentální systém s intervencí fekální mikrobioty a prebiotické složky a probiotické bifidobakterie. Dále byla zhodnocena schopnost růstu klostridií na 2‘-fukosylaktóze (2’FL) a L-fukóze. Experimentální část práce byla provedena s použitím kultivačně závislých metod.

Výsledek testování antimikrobiální aktivity *in vitro* se lišil v závislosti na použité metodě, přičemž antimikrobiální účinek probiotických kmenů *Bifidobacterium breve* BR03 a *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 byl potvrzen s použitím modifikované spotové metody vůči všem testovaným klostridiálním kmenům zahrnující druhy *Clostridium perfringens*, *C. butyricum*, *C. saccharobutylicum*, *C. neonatale* a *Clostridioides difficile*. Antimikrobiální účinek nebyl potvrzen difúzní metodou. Antimikrobiální účinek pozorovaný v rámci *ex vivo* experimentu se odvíjel od druhu a kmene klostridie přítomné v testovaném vzorku stolice. Mateřské mléko jako zdroj uhlíku bylo lépe využitelné pro *B. breve*. Oproti tomu počáteční náhradní kojenecká výživa podporovala růst fekální mikrobioty zastoupené převážně *C. perfringens*. Variabilita výsledků vystihuje složitost a komplexnost střevního prostředí, ve kterém působí na vzájemné vztahy mikroorganismů řada dosud nepopsaných faktorů. Mimoto, schopnost utilizace L-fukózy prostřednictvím *C. neonatale* může přinést zajímavé poznatky interakce 2’FL s utilizujícími bifidobakteriemi na úrovni cross-feedingu.

Klíčová slova: *Clostridium*; *Bifidobacterium*; kojenec; mikrobiota; probiotika; prebiotika; mateřské mléko; umělá dětská výživa

Interaction of bifidobacteria and clostridia in the gut microbiota of infants

Summary

Infant species of *Bifidobacterium* spp. are exceptional in their ability to utilize the oligosaccharides of breast milk, giving them a competitive advantage over the rest of the microbial population of the gut. In their presence in the microbiota, the numbers and negative effects of clostridia, such as colic and other adverse effects on the health of the infant, are regulated. The mechanisms of action of clostridial inhibition by bifidobacteria are not fully understood. In addition, it is not well known how an infant formula containing only a minority of the breast milk oligosaccharide complex can affect the relationships within the immature gut microbiota, in which bifidobacteria may be the missing taxon.

The aim of this paper is to produce a review focusing on microbial colonization in infants, and here to focus on the importance of bifidobacteria and clostridia, and their interactions. Furthermore, it has the intention to evaluate the impact of breast milk and infant formula in relation to the above. The practical part of the work was aimed at testing the antimicrobial effect of probiotic strains of bifidobacteria against clostridial strains isolated from fecal samples of colitic infants. Testing was conducted at the *in vitro* level, and also *ex vivo,* representing a more complex experimental system with the intervention of the fecal microbiota with prebiotic components and probiotic bifidobacteria. In addition, the ability of clostridia to grow on 2'-fucosylactose and L-fucose was evaluated. The experimental part of the work was carried out using culture-dependent methods.

The result of *in vitro* antimicrobial activity testing varied depending on the method used, and the antimicrobial effect of probiotic strains *Bifidobacterium breve* BR03 and *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 was confirmed using a modified spot method against all tested clostridial strains including *Clostridium perfringens*, *C. butyricum*, *C. saccharobutylicum*, *C. neonatale* and *Clostridiodes difficile* species. The antimicrobial effect was not confirmed by the diffusion method. The antimicrobial effect observed in the *ex vivo* experiment depended on the species and strain of clostridia present in the stool sample tested. Mother's milk as a carbon source was better utilized by *B. breve*. In contrast, the initial infant formula supported the growth of a fecal microbiota represented predominantly by *C. perfringens*. The variability of the results captures the complexity of the intestinal environment, in which a number of previously undescribed factors influence the interrelationships of microorganisms. Furthermore, the ability of L-fucose utilization by *C. neonatale* may provide interesting insights into the interaction with 2'-fucosyllactose utilizing bifidobacteria at the level of cross-feeding.

Keywords: *Clostridium*; *Bifidobacterium*; infant; microbiota; probiotics; prebiotics; breast milk; infant formula

Obsah

1 Úvod **9**

2 Vědecká hypotéza a cíle práce **10**

3 Literární rešerše **11**

3.1 Střevní mikrobiota kojenců **11**

3.1.1 Složení a vývoj střevní mikrobioty 12

3.1.1.1 Sterilní děloha 13

3.1.1.2 Gestační věk 14

3.1.1.3 Porod dítěte 15

3.1.1.4 Antibiotika 16

3.1.1.5 Vnější prostředí 17

3.1.1.6 Výživa 18

3.2 Mateřské mléko **19**

3.2.1 Oligosacharidy mateřského mléka 20

3.2.1.1 Struktura HMO 20

3.2.1.2 Význam HMO 22

3.2.1.3 HMO v prevenci nekrotizující enterokolitidy 23

3.2.2 Mikrobiota mateřského mléka 24

3.3 Náhradní kojenecká výživa **25**

3.3.1 Prebiotika 27

3.3.2 Probiotika 29

3.3.3 Synbiotika 31

3.3.4 Postbiotika 32

3.3.5 Trh s náhradní kojeneckou výživou 33

3.4 *Bifidobacterium* spp. **34**

3.4.1 Kolonizace střevního prostředí 36

3.4.1.1 Extracelulární struktury 36

3.4.1.2 Metabolismus lidských glykanů 36

3.4.2 Kojenecké bifidobakterie 38

3.4.2.1 *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* 38

3.4.2.2 Ostatní druhy kojeneckých bifidobakterií 39

3.4.3 Trh s kojeneckými bifidobakteriálními doplňky stravy 39

3.5 *Clostridium* spp. a další klostridie **40**

3.5.1 Kolonizace klostridiemi 41

3.5.2 Pozitivní vliv *Clostridium* spp. na zdraví 41

3.5.2.1 Přímý vliv na buňky imunitního systému 41

3.5.2.2 Vliv produktů metabolismu 42
3.5.3 Patogenní klostridie 44
3.6 Antimikrobiální aktivita bifidobakterií vůči klostridiím 44
4 Metodika 46
4.1 Cíl metodiky 46
4.2 Metodika odběru vzorků a informace o dárcích 47
4.2.1 Vzorky stolice 47
4.2.2 Vzorky mateřského mléka 47
4.3 Příprava médií, bakteriálních kultur, parabiotik a metabiotik 47
4.3.1 Příprava médií 47
4.3.1.1 Wilkins-Chalgren Anaerobní bujón se sójovým peptonem 47
4.3.1.2 Chudé médium 48
4.3.1.3 Ředící médium 49
4.3.1.4 Cooked Meat Médium 49
4.3.1.5 Bifipufr 49
4.3.1.6 Wilkins-Chalgren Anaerobní agar se sójovým peptonem 50
4.3.2 Příprava bakteriálních kultur 50
4.3.3 Příprava parabiotik a metabiotik 51
4.3.3.1 Metabiotika 52
4.3.3.2 Parabiotika 52
4.4 *In vitro* testování 52
4.4.1 Antimikrobiální aktivita 52
4.4.1.1 Jamková difúzní metoda 53
4.4.1.2 Modifikovaná spotová metoda 54
4.4.2 Stanovení fermentačního profilu 55
4.4.2.1 API 20 A test 55
4.4.2.2 API 50 CHL test 56
4.5 *Ex vivo* testování 58
4.5.1.1 Příprava vzorků 58
4.5.1.2 Plotnová kultivační metoda 60
4.5.1.3 Izolace kolonií 60
4.5.1.4 Vyhodnocení plotnové kultivační metody 60
4.5.1.5 Kontrola čistoty a popis morfologie 61
4.5.1.6 MALDI TOF MS identifikace 61
5 Výsledky 62
5.1 Výsledky testování antimikrobiální aktivity 62
5.1.1 Výsledky testování jamkové difúzní metody 62

5.1.2 Výsledky testování modifikovanou spotovou metodou 63
5.1.3 Porovnání antimikrobiálních metod 64
5.2 Výsledky stanovení fermentačního profilu 64
5.2.1 API 20 A 64
5.2.2 API 50 CHL 66
5.3 Zhodnocení *ex vivo* experimentu 67
5.3.1 Zhodnocení aplikované eseje 67
5.3.2 Vliv přidaného substrátu 69
5.3.3 Hodnocení antimikrobiálního účinku 70

6 Diskuze 73

7 Závěr 78

8 Literatura 79

9 Seznam použitých zkratek a symbolů 107

1 Úvod

Lidská mikrobiota představuje skrytý lidský orgán, který je složen z biliónů mikroorganismů, které koexistují s lidským organismem v mutualistickém vztahu. Úzký vztah k nemocem a zdraví člověka má střevní mikrobiota, která se v případě fyziologického složení podílí na vzniku homeostázy a regulaci imunitního systému lidského organismu. Narušení rovnovážného stavu střevní mikrobioty může vést k rozvoji řady chorobných stavů organismu (Hou et al. 2022). Střevní mikrobiota je utvářena již od samotného narození a vyvíjí se v závislosti na gestačním věku dítěte, způsobu porodu, výživě, antibiotické terapii, vnějším okolí a mnoha dalších faktorech přibližně do věku 2-3 let, kdy se její složení začíná stabilizovat (Tanaka & Nakayama 2017).

Během prvních šesti měsíců je Světovou zdravotnickou organizací doporučováno výhradní kojení matkou. Mateřské mléko je komplexní tekutina představující pro kojence přirozený zdroj potřebných živin a dalších látek, které podporují jeho růst a vývoj odpovídající věku (WHO 2023). Významnou složku představují oligosacharidy mateřského mléka (HMO, human milk oligosaccharides), které se v téměř nedotčené podobě dostávají do tlustého střeva, ve kterém působí kromě jiného jako růstový substrát vybraným druhům bifidobakterií (Bode 2012). Především *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. breve* a *B. bifidum* tak získávají konkurenční výhodu nad ostatními mikroorganismy, které nevlastní komplex enzymů potřebný k degradaci HMO. Produktem fermentace bifidobakterií jsou především mastné kyseliny s krátkým řetězcem a laktát, které přispívají k udržení zdravého střevního prostředí a zároveň slouží jako potrava pro okolní mikrobiotu (Kiely et al. 2023). Konkrétně laktát a acetát jsou využívány butyrát produkující bakteriemi, jimiž jsou *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia* spp. nebo *Clostridium butyricum*. Butyrát představuje hlavní zdroje energie pro buňky střevního epitelu (Singh et al. 2023).

V případě, že matka nemůže či nechce kojit své dítě, bývá kojenci podávána náhradní kojenecká výživa. Kromě všech potřebných živin je náhradní výživa doplňována i o biologicky aktivní látky včetně humánních oligosacharidů mateřského mléka (HiMO, human identical milk oligosaccharides). Bezpečnost několika druhů HiMO ve výživě člověka již byla potvrzena v rámci Evropské unie, nicméně stále se neví mnoho o jejich vlivu na střevní mikrobiotu. Ve střevní mikrobiotě kojenců se mimo jiné přirozeně vyskytuje řada potencionálně patogenních bakterií včetně klostridií. *Clostridioides difficile*, *Clostridium perfringens*, *C. butyricum* a *C. neonatale* a další mohou v případě dysbiózy vyvolat řadu zánětlivých onemocnění (Ferraris et al. 2012). Právě růst některých druhů klostridií může být nepřímo podporován HiMO, jejichž stavební složky jsou uvolňovány během procesu utilizace bifidobakteriemi (Huertas-Díaz et al. 2023).

Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci na téma Výskyt a význam sporulujících bakterií v mikrobiotě kojenců, která byla autorkou obhájena v roce 2022 na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Předpokládáme, že antimikrobiální aktivita bifidobakterií vůči klostridiím bude ovlivněna metodou testování. *In vitro* testování sleduje interakce pouze na úrovni dvou a více čistých kmenů, zatímco vzájemné interakce v rámci *ex vivo* testování jsou ovlivněny řadou faktorů. Komplexní vzorek, jímž je stolice kojence, obsahuje řadu mikroorganismů a produktů jejich metabolismu, které mohou ovlivňovat interakce mezi testovanými druhy bakterií. Vzájemné působení může být rovněž ovlivněno přidaným substrátem. Oligosacharidy mateřského mléka budou dostupné pouze určitým druhům bifidobakterií, zatímco humánní mléčné oligosacharidy, přidávané do náhradní kojenecké výživy, pravděpodobně mohou využívat i některé klostridie.

Cílem práce bylo vypracovat přehled o bifidobakteriích a klostridiích vyskytujících se ve střevní mikrobiotě kojenců a zaměřit se na dosavadní poznatky o jejich vzájemné interakci. Pro literární přehled byl rovněž stanoven cíl na vypracování souhrnu charakteristik mateřského mléka a náhradní kojenecké výživy. Cílem metodické části práce bylo testovat vzájemné interakce mezi probiotickými kmeny bifidobakterií a vybranými kmeny klostridií izolovaných ze stolice klostridiových dětí s kolikami na úrovni *in vitro* a *ex vivo*, ve které byla rovněž sledována intervence prebiotik. Vedle toho byl kultivačně detekován výskyt bifidobakterií a klostridií v mikrobiotě stolice vybraných kojenců, kterým byly podány probiotika s bifidobakteriemi.

3 Literární rešerše

3.1 Střevní mikrobiota kojenců

Termín mikrobiota lze definovat jako uskupení mikroorganismů žijících v určitém biotopu. V rámci lidského těla se jedná o komunity komenzálních mikroorganismů z říše bakterií, hub, virů, protozoi a archei, které koexistují se svým hostitelem v mutualistickém vztahu (Parker et al. 2020; Ignacio et al. 2019; Ishiguro et al. 2018). Naopak pojem mikrobiom pojednává o souboru všech genomů, genů a genových produktů mikrobioty žijící v daném prostředí (Setubal a Dias-Neto 2022). Metabolity produkované mikrobiálním společenstvím zaštituje pojem metabolom, který ve spojení se střevním prostředím zahrnuje rovněž metabolity vyprodukované hostitelem (Cortez et al. 2019). Celkový rozsah lidské mikrobioty se s určitou opatrností odhaduje na počet 10^{13}–10^{14} mikrobiálních buněk. V porovnání s množstvím buněk lidskému tělu vlastnímu, jejichž počet je stanoven přibližně na $3{,}0 \times 10^{13}$, lze s rezervovaným odstupem tvrdit, že početní poměr buněk mikroorganismů ku buňkám lidskému tělu vlastní je 1:1. Uvedené hodnoty ilustrují, jak rozsáhlá je mikrobiota lidského těla a naznačují nemalou roli, kterou mikroorganismy v našem těle pravděpodobně hrají (Sender et al. 2016).

Mikroorganismy kolonizují téměř všechny povrchy lidského těla, které jsou vystaveny vlivům vnějšího okolí, okupují tak nejen naši kůži, močopohlavní a dýchací systém, ale především i náš gastrointestinální systém (GIT) (Serikov et al. 2010). Jednotlivé úseky trávicí trubice lze definovat na základě množství mikroorganismů, které dané segmenty kolonizují. V dutině ústní se množství mikroorganismů pohybuje kolem 10^{8}-10^{10} KJT/g (kolonie tvořící jednotku/g) slin. Oproti tomu v žaludku je počet mikrobiálních buněk značně redukován žaludečními šťávami na 10^{3} KTJ/g. Následuje duodenum a jejunum s rozmezím 10^{2}-10^{4} KTJ/g obsahu a ileum s tlustým střevem, kde počet bakterií vzroste na hodnoty 10^{10}-10^{12} KTJ/g obsahu (Hakansson & Molin 2011). Právě v tlustém střevě se nachází více než 70 % mikroorganismů obývajících lidské tělo, nicméně ani to není kolonizováno rovnoměrně v celém jeho objemu, ale hustota osídlení i druhové složení mikrobiální populace se zde významně liší na základě toho, zda se jedná přímo o povrch epiteliální vrstvy, kryjící hlenové vrstvy, či o samotný lumen střev (Sekirov et al. 2010).

Soužití člověka s mikroorganismy vyústilo v tlustém střevě ve vznik vztahů komenzálních (vztah ve kterém ani jeden z partnerů není znevýhodněn) a symbiotických (vztah prospěšný pro oba partnery), které plynou především z jejich metabolických aktivit (Ventura et al. 2009). Střevní mikrobiota hraje zásadní roli ve fungování imunitního systému, rovněž má významný vliv na trávení a metabolismus živin, ovlivňuje komunikační spoj mezi mozkem a střevy jedince a je zásadní pro normální fyziologii a zdraví střev (Aziz et al. 2013). Jedná se převážně o nepatogenní mikroorganismy žijící společně s enterocyty v symbiotickém vztahu, ve kterém vypomáhají zejména s metabolismem živin a léků, zabraňují kolonizaci patogenními mikroorganismy a také podporují správné fungování střevní bariéry (Jandhyala et al. 2015). Na druhou stranu mají mikroorganismy v rámci našich střev zajištěn volný přístup k živinám společně s kontrolovanou teplotou (Ignacio et al. 2019). Střevní homeostáza může být narušena kvantitativními či kvalitativními změnami ve složení mikrobioty neboli dysbiózou, což může vést k rozvoji rozličných nemocí, jimiž jsou např. obezita, diabetes, alergie či onemocnění

autoimunitního sytému, neurologické poruchy a zánětlivé či infekční choroby (Bibbó et al. 2016; Wang & Roy 2017).

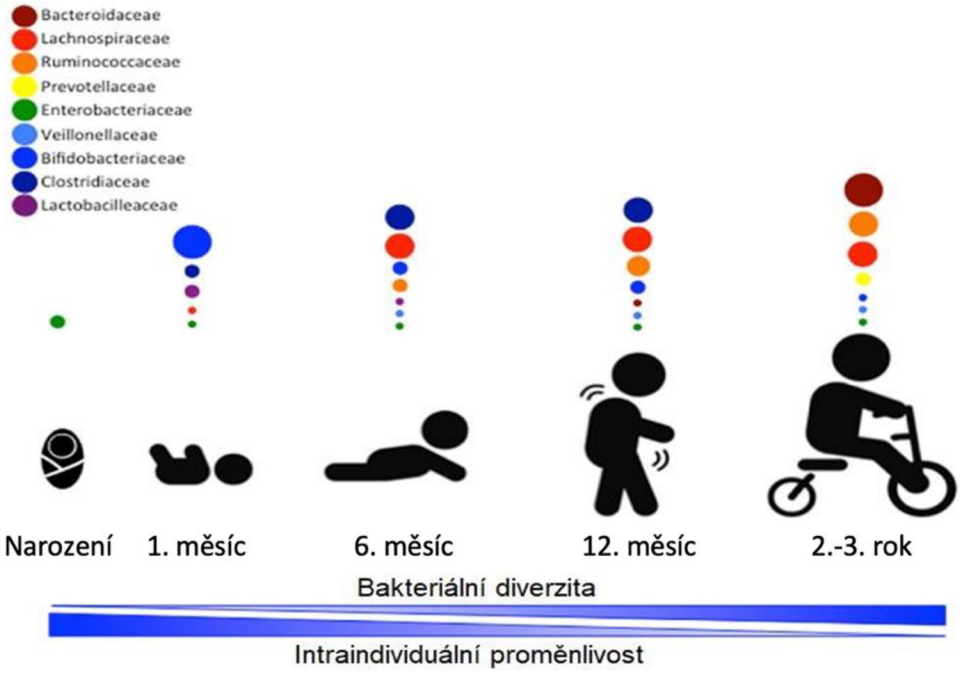
3.1.1 Složení a vývoj střevní mikrobioty

Definice složení „normální“ či „zdravé“ střevní mikrobioty kojenců je obtížná kvůli její značné nestabilitě, vysoké intraindividuální variabilitě, a také z důvodu působení mnoha vnějších i vnitřních faktorů, které vývoj střevní mikrobioty ovlivňují. Jedná se např. o vliv matky, způsob porodu, gestační věk při narození, výživu kojence, jeho zdravotní stav, vliv prostředí a také genetické predispozice jedince. Nekonečné kombinace těchto faktorů dávají vzniknout unikátním bakteriálním populacím ukrývajícím se v prostředí střev každého jedince (Milani et al. 2017).

Mezi první kolonizátory tlustého střeva se řadí fakultativně anaerobní bakterie náležící do čeledí *Enterobacteriacea* a *Lactobacilaceae*, které vyčerpávají přítomný luminální kyslík v období bezprostředně po narození dítěte, čímž utváří přívětivé prostředí pro osídlení obligátně anaerobních bakterií rodu *Bifidobacterium*, *Clostridium* a kmene Bacteroidetes (Matamoros et al. 2013). Během následujících několika týdnů se podoba střevní mikrobioty novorozence odvíjí především od mikrobioty porodních cest či jiných částí těla matky, se kterými novorozenec přišel do styku. Dominujícími bakteriálními taxony se stávají *Enterococcaceae*, *Streptococacceae*, *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae* a *Bifidobacteriaceae* (Arrieta et al. 2014).

V prvních měsících života je pro střevní mikrobiotu kojence charakteristická nízká diverzita a značná dominance kmenů Proteobacteria a Actinobacteria (Rodríguez et al. 2015), přičemž u kojených jedinců dominují bakterie rodu *Bifidobacterium* (Turroni et al. 2012). V období začleňování pevné stravy do jídelníčku kojence dochází k postupné dominanci bakterií kmenů Firmincutes a Bacteroidetes, které bývají typické pro střevní mikrobiotu dospělého člověka (Koenig et al. 2011). Postupný vývoj střevní mikrobioty člověka od narození až do věku 2-3 let je přehledně vyobrazen na obrázku č. 1.

K samotnému ustálení nestálé střevní mikrobioty a její transformaci do podoby stabilnější mikrobioty dospělého člověka dochází pravděpodobně nejdříve v období kolem 31 měsíce po narození (Stewart et al. 2018).



Obrázek č. 1 – vývoj střevní mikrobioty člověka od narození do věku 2-3 let (Arrieta et al. 2014) – pozn.: volně přeloženo z angličtiny.

3.1.1.1 Sterilní děloha

Po mnoho let byla děloha matky považována za sterilní orgán a byl obecně přijímán koncept označovaný jako paradigma sterilní dělohy, podle kterého dohází k vertikálnímu a horizontálnímu přenosu mikroorganismů během porodu a po něm, avšak do té doby je plod udržován ve sterilním stavu. K těmto závěrům dospěla odborná veřejnost z větší míry na základě výsledků založených na mikroskopických a kultivačních analýzách mekonia (smolky, první stolice po narození), plodové vody a tkáně placenty. V případě zjištění přítomnosti mikroorganismů v odebraných vzorcích byly pozitivní výsledky testování připisovány kontaminaci během odběru či časové variabilitě vzorkování. Například sterilita mekonia se v několika studiích odvíjela od doby průchodu trávicím traktem, přičemž indikace bakterií byla spojována s delší časovou periodou mezi porodem a první stolicí dítěte (Perez-Muñoz et al. 2017). Případná přítomnost mikroorganismů a jejich metabolitů v prostředí dělohy byla a je rovněž považována za jeden z možných faktorů komplikovaného těhotenství. V případě nitroděložní infekce může dojít k předčasnému odtoku plodové vody před termínem porodu, v následku čehož zpravidla nastává předčasný porod s vysokou pravděpodobností úmrtí novorozence. U pacientek s těmito komplikacemi byly nejčastěji identifikovány bakterie rodu *Ureaplasma* a bakterie *Sneathia amnii* (Tchirikov et al. 2018).

Avšak jsou zde studie, které hypotézu o sterilní děloze zpochybňují a na základě moderních sekvenčních technologií naznačují, že za sterilní se nedá považovat plod, placenta a ani plodová voda matky (Perez-Muñoz et al. 2017). Aagard et al. 2016 jako první charakterizovali unikátní placentální mikrobiom o nízké početnosti a metabolické bohatosti složený z nepatogenních komenzálních bakterií kmenů Firmincutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroidetes a Fusobacteria, který se profilově podobá ústnímu mikrobiomu negravidního člověka. Autoři spekulují, že bakterie z dutiny ústní matky se mohou dostat skrze

hematogenní šíření do placenty, odkud mohou následně kolonizovat plod (Aagaard et al. 2014). K závěru, že prostředí dělohy není sterilní, a že ke kolonizaci dítěte může docházet již během prenatálního vývoje dospěli rovněž Collado et al. 2016, kteří v placentě a plodové vodě matek rodících císařským řezem v plném termínu charakterizovali mikrobiotu o nízké bohatosti a diverzitě s převahou bakterií kmene Proteobakteria. Podobné mikrobiální rysy byly zjištěny rovněž v mekoniu novorozence, z čehož autoři dovozují, že ke kolonizaci trávicího traktu dochází již ve fázi plodu (Collado et al. 2016).

3.1.1.2 Gestační věk

Za předčasně narozené jsou obecně považovány děti narozené před ukončeným 37. týdnem těhotenství, přičemž dle míry nedonošení lze děti dále dělit do skupin na středně až pozdně narozené (32. – 37. týden), velmi předčasně narozené (28. – 32. týden) a extrémně předčasně narozené (méně něž 28 týdnů). Předčasné narození je spojováno s mnoha vážnými krátkodobými i dlouhodobými následky jimiž jsou např. špatný zdravotní stav, problémy s růstem, duševní a mentální postižení či brzký nástup chronických nemocí. K těmto závažným rizikům se rovněž řadí zvýšená pravděpodobnost novorozeneckého úmrtí, které může dítě postihnout až do věku pěti let (Ohuma et al. 2023).

Děti narozené předčasně mají nedostatečně vyvinutý GIT. Tlusté střevo má špatně vyvinutou peristaltikou, střevní bariéru a sníženou imunitu, což může vést ke vzniku bakteriálních a zánětlivých onemocnění, mezi které se řadí sepse či nekrotizující enterokolitida. Další rizikové faktory, které se pojí s předčasným narozením, jsou např. porod císařským řezem, použití širokospektrálních antibiotik, umělá výživa, zavedení výživové sondy či pobyt novorozence v inkubátoru na novorozenecké jednotce intenzivní péče (Neu et al. 2005; Korpela et al. 2018).

Gestační věk dítěte během narození je zároveň jedním z významných faktorů, které se podepisují na složení střevní mikrobioty jedince. Předčasně narozené děti prokazují nižší zastoupení rodů *Bacteriodes* a *Bifidobacterium*, které jsou naopak typické pro děti narozené bez komplikací v řádném termínu, u nichž nebyla potřeba hospitalizace. Střevní mikrobiota u předčasně narozených dětí prochází několika fázemi vývoje, které začínají dominancí rodu *Staphylococcus* a pokračují dominancemi rodů *Enterococcus*, *Enterobacter* a konečně *Bifidobacterium*. Fáze, při které dochází k přemnožení *Enterococcus* spp. a která vede k narušení vývoje střevní mikrobioty, se vyskytuje pouze u extrémně předčasně narozených dětí. Zdravý vývoj mikrobioty může být podporován podáváním mateřského mléka u středně předčasně narozených jedinců nebo suplementací prebiotik s bifidogenním účinkem u extrémně předčasně narozených jedinců (Walani 2020; Fouhy et al. 2019; Korpela et al. 2018).

Gestační věk při narození vykazuje vliv na modulaci střevní mikrobioty až do čtyř let věku dítěte. U dětí narozených v řádném termínu je charakteristická převaha Bacteroidetes v prvním, Parabacteroides v druhém a *Christensenellacea* ve čtvrtém roce. Pro děti předčasně narozené je naopak typická dominance rodů *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Carnobacterium* ve stejném pořadí roků (Fouhy et al. 2019).

3.1.1.3 Porod dítěte

K nejrannější a velmi významné fázi bakteriální kolonizace, která ovlivňuje skladbu střevní mikrobioty během prvních měsíců života dítěte, dochází během porodu dítěte, kdy je novorozenec vystaven vaginální, kožní i fekální mikrobiotě matky a mikroorganismům nemocničního či jiného prostředí. Ne všechny mikroorganismy jsou však schopné trvale osidlovat prostředí těla novorozence, toho jsou schopné pouze určité skupiny mikroorganismů, které si k tomu osvojily specifické vlastnosti. Například několik druhů bakterií rodů *Bifidobacterium* a *Bacteroides* vlastní jedinečnou schopnost utilizovat oligosacharidy mateřského mléka, díky čemuž se řadí mezi úspěšné perzistentní kolonizátory tlustého střeva novorozenců (Korpela 2021).

V případě přirozeného vaginálního porodu přichází novorozenec nejprve do styku s mikroorganismy kolonizující porodní cesty a GIT systém matky. Jinak je tomu v případě císařského řezu, při kterém dochází k přenosu mikroorganismů na novorozence z prostředí pokožky matky, nemocničního zařízení a zdravotnického personálu (Milani et al. 2017). Vliv dvou rozdílných porodnických operací na skladbu mikrobiálních komunit je znatelný již během prvních dnů jeho života. Děti narozené přirozeným způsobem získávají bakteriální společenství podobná vaginální mikrobiotě matky, v nichž dominují bakterie na úrovni druhů *Prevotella*, *Sneathia* a *Lactobacillus* spp., zatímco u dětí porozených císařským řezem dominují společenstva zastoupená převážně druhy *Propionibacterium*, *Corynebacterium* a *Staphylococcus* spp., které jsou charakteristické pro mikrobiotu lidské pokožky (Dominguez-Bello et al. 2010).

Odlišný vývoj bakteriální kolonizace pokračuje i v následujících týdnech po porodu. Během prvního týdne je možné na základě způsobu porodu pozorovat rozdíl ve složení střevní mikrobioty na úrovni kmenů Actinobacteria, Firmincutes a Bacteroidota. V případě dětí narozených vaginálně dominuje kmen Actinobacteria společně s kmenem Bacteroidetes, přičemž tento stav zůstává až do 24. týdne neměnný. Na rodové úrovni převažují zástupci *Bifidobacterium*, společně s vyšším zastoupením rodu *Bacteroides* a *Clostridium sensu stricto*. Oproti tomu u dětí porozených císařským řezem převládají během 1. týdne zástupci kmene Firmincutes, nicméně se bakteriální složení během následujících týdnů začíná podobat více složení tomu vaginálně narozených dětí a od 8. týdne je téměř shodné. Zároveň u této skupiny můžeme pozorovat během 1. týdne hojnější zastoupení bakterií rodu *Clostridium sensu stricto* (Freitas & Hill 2017).

Způsob porodu má zásadní vliv na kolonizaci zdraví prospěšných bakterií rodu *Bifidobakterium*, které novorozenec získává vaginálním a fekálním přenosem mikrobioty matky během vaginálního porodu. Bifidobakterie jsou v prvních měsících hojněji zastoupeny u kojenců porozených vaginálně, zatímco u dětí narozených císařským řezem jsou hojněji zastoupené potencionálně patogenní a prozánětlivé bakterie. Přítomnost bifidobakterií sice může být podpořena oligosacharidy mateřského mléka (HMO, human milk oligosaccharides) či probiotickými doplňky, nicméně tato podpora nemusí být pro kolonizaci bifidobakteriemi dostatečná (Reyman et al. 2019).

3.1.1.4 Antibiotika

Objev antibiotik způsobil revoluci v léčbě infekčních onemocnění, což ve své době vedlo společně s dalšími faktory ke zvýšení průměrné délky života člověka. Nicméně se časem ukázalo, že nesprávné užívání, nadužívání a zneužívání antibiotik může mít značně škodlivý vliv na naše zdraví a svým způsobem nás může vrátit zpět do doby před jejich objevením (Patangia et al. 2022).

Velkou kapitolou samo o sobě je vznik antimikrobiální rezistence některých patogenních mikroorganismů, vůči kterým se stávají antimikrobiální léčiva neúčinná, čímž dochází ke komplikaci terapie infekčních onemocnění a jejich šíření, což může mít fatální následky na lidskou populaci. Rezistence vzniká přirozeným procesem, během kterého dochází ke změně genetické informace uvnitř patogenu. Tento proces je indikován a urychlován nesprávným zacházením s antimikrobiálními látkami u lidí, zvířat i rostlin. Odhaduje se, že samotná antibakteriální rezistence byla v roce 2019 přímo zodpovědná za 1,27 miliónů úmrtí a k dalším 4,95 případů úmrtí přispěla celosvětově. Jedná se o jednu z největších globálních hrozeb lidského zdraví (WHO 2023).

Druhou kapitolou je vliv širokospektrálních antibiotik na střevní mikrobiotu člověka, jejichž užívání může vést ke vzniku mikrobiální dysbiózy. Narušení struktury střevní komunity může způsobit snadnější kolonizaci patogenními mikroorganismy, které jsou za normálních okolností vystaveny přímé i nepřímé kompetici střevní mikrobioty. Mezi další dopady antibiotické terapie se řadí např. snížená diverzita bakteriální populace a stereotypní změny v rámci relativních četností určitých taxonů (Modi et al. 2014). Jako příklad onemocnění spojeného s mikrobiální dysbiózou vyvolanou antibiotickou léčbou lze uvést infekci bakterií *Clostridioides* (dříve *Clostridium*) *difficile* (*Cl. difficile*) (Theriot et al. 2016).

Kojenecké období se řadí mezi věková období, ve kterém je člověk nejvíce vystavován účinkům antibiotik. Během prvního roku života je přibližně třetině dětí ve vyspělých zemích podána alespoň jedna dávka antibiotik, která jsou ve většině případů předepsána z důvodu akutní infekce dýchacích cest a zánětů středního ucha (Dawson-Hahn a Rhee 2019). Uvedené tvrzení se nicméně vztahuje pouze na přímou expozici novorozence antibiotikům vyžadující jeho zdravotní stav, nicméně může docházet i expozici nepřímé skrze matku, a to během samotného těhotenství nebo během období kojení (Morreale et al. 2023).

Antibiotická terapie je v období těhotenství nejčastěji používána pro případy infekcí močových cest, dýchacích cest, zánětů kůže a uší, kdy jsou nejběžněji předepisována širokospektrální betalaktamová antibiotika, cefalosporiny a antibiotika zaměřená na infekce močových cest (Petersen et al. 2010). Antibiotika jsou rovněž v některých případech preventivně podávána matkám v období během porodu. Například u žen, jejichž gastrointestinální a urogenitální trakt je kolonizován streptokokem skupiny B (*Streptococcus agalactiae*), je přistupováno k perinatální antibiotické profylaxi, díky které dochází k minimalizaci rizika vertikálního přenosu potencionálně nebezpečné bakterie na novorozence, u kterého by její přítomnost mohla vyvolat infekci. K antibiotické profylaxi se rovněž přistupuje u nadcházejících matek podstupujících porod císařským řezem z důvodu snížení rizika infekce endometria a vzniklých ran (Morreale et al. 2023). Následkem podstoupení perinatální antibiotické profylaxe matkou může dojít ke změně složení střevní mikrobioty dítěte v krátkodobém i dlouhodobém horizontu. Během prvních týdnů lze pozorovat odlišný způsob

kolonizace prostředí tlustého střeva, pro které může být charakteristické nízké zastoupení bifidobaktérií a laktobacilů (Mazzola et al. 2016; Zhou et al. 2020). Pro střevní mikrobiotu je rovněž typický nízký relativní podíl kmenů Aktinobacteria a Bacteroidetes a větší počet zástupců kmenů Proteobacteria a Firmincutes (Nogacka et al. 2017). Z dlouhodobějšího hlediska (3 měsíce po porodu) se může střevní mikrobiota dětí vyznačovat nižším zastoupením rody *Bacteroides* a *Prabacteroides*, a naopak vyšším zastoupením rody *Enterococcus* a *Clostridium* společně s čeledí *Enterobacteriaceae* (Mazzola et al. 2016; Forbes et al. 2018). Podání intrapartálních antibiotik může mít vliv na složení orální mikrobioty novorozence (Gomez-Arango et al. 2017).

K přímé expozici antibiotiky dochází především u předčasně narozených novorozenců, kterým jsou podávány širokospektrální antibiotika při podezření na novorozeneckou sepsi, čímž dochází k významnému narušení vývoje střevní mikrobioty. Oproti dětem, které léčbu širokospektrálními antibiotiky v raném věku nepodstoupily, dochází ke změně složení mikrobiální komunity, pro kterou může být charakteristický snížený počet *Bifidobacterium* spp. a zvýšený výskyt *Klebsiella* a *Enterococcus* spp. K normalizaci složení střevní mikrobioty exponovaných dětí dochází během prvního roku života (Reyman et al. 2022). Změna složení střevní mikrobioty v následku antibiotické terapie může u předčasně narozených dětí zvýšit predispozici k infekčním onemocněním, mezi které se řadí například nekrotizující enterokolidita (NEC) (Esaiassen et al. 2017). Studie uvádějí, že expozice antibiotikům v prvních měsících života může mít spojitost se zvýšením rizika vzniku obezity, astmatu, alergie, atopické dermatitidy a idiopatického střevního zánětu v pokročilejším věku života (Patangia et al. 2022).

3.1.1.5 Vnější prostředí

Mezi popsané vnější faktory ovlivňující mikrobiální kolonizaci střev kojence se řadí rodina a blízcí příbuzní, zejména však přítomnost či absence sourozenců. Co se týče vlivu sourozenců, byl zaznamenán vyšší poměr bifidobakterií u dětí majících sourozence oproti dětem jedináčkům a současně byla pozorována pozitivní korelace mezi počtem starších sourozenců a bakteriální diverzitou střevní mikrobioty kojence (Penders et al. 2006; Laursen et al. 2015).

Dalším faktorem je geografické umístění, které může mít vliv na utváření rané střevní mikrobioty člověka, a to především z důvodů rozdílných stravovacích zvyklostí, odlišného způsobu života a variabilních kulturních a náboženských zvyklostí charakteristických pro dané oblasti (Milani et al. 2017). Roli hraje rovněž rozvinutost dané země či regionu, kdy pro populaci chudých oblastí je typičtější strava složená z lokálně vyprodukovaných potravin a plodin s vyšším obsahem vlákniny, přičemž tato strava bývá podávána kojencům současně s mateřským mlékem již v brzkém věku. Chudé státy se zároveň potýkají s problémem malnutrice u většiny obyvatel. Pro rozvinuté státy, ve kterých lidé netrpí nedostatečným příjmem potravy, je naopak charakteristický častý výskyt zánětlivých onemocnění u kojenců. U kojenců pocházejících z těchto dvou rozdílných světů byl vypozorován rozdíl ve složení střevní mikrobioty, kdy u dětí z jihovýchodní Afriky byl zaznamenán vyšší poměr rodu *Bifidobacterium*, zatímco u dětí původem ze severní Evropy byl tento poměr nižší. Zároveň byla u těchto kojenců detekována přítomnost bakterií druhu *Bifidobacterium adolescentis* (*B.*

adolescentis), *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), jejichž přítomnost může reflektovat zvýšené riziko autoimunitních onemocnění (Grzeskowiak et al. 2012).

3.1.1.6 Výživa

Kromě gestačního věku narození, způsobu porodu, antibiotické terapie či způsobu života rodiny se výživa dítěte řadí mezi jeden z hlavních faktorů, které ovlivňují vývoj střevní mikrobioty v raném věku. Studie široce zmapovaly rozdíly ve složení střevní mikrobioty kojenců kojených výhradně mateřským mlékem a těmi krmenými převážně umělou kojeneckou výživou (Harmsen et al. 2000; Azad et al. 2013; Ma et al. 2020). Dle WHO se kojení řadí mezi jeden z nejvíce efektivních způsobů, jak zajistit zdraví a přežití dítěte. Společně s Dětským fondem Organizace spojených národů (UNICEF, United Nations Children's Fund) doporučují, aby matka započala s kojením během prvních čtyř hodin po narození, a aby byl kojenec výhradně kojen během prvních šesti měsíců života. Od šestého měsíce věku by do jídelníčku dítěte měly být zařazovány zdravotně nezávadné a odpovídající příkrmy, avšak částečné kojení by mělo být zachováno až do věku dvou let či déle (WHO 2023). V případě, že kojení není možné, nebo je nedostatečné, je potřeba jej nahradit odpovídající náhradní kojeneckou výživou, která musí splňovat bezpečnostní a nutriční požadavky k podpoře růstu kojence. Kojenecká výživa nicméně neopisuje složení mateřského mléka, které odráží spíše příjem matek, ale zaměřuje se na nutriční potřebu kojenců (EFSA NDA Panel 2014).

Střevní mikrobiota kojenců výhradně krmených mateřským mlékem se oproti kojencům krmených náhradní kojeneckou výživou vyznačuje nízkou alfa diverzitou. Tento jev je vysvětlován příjmem mateřského bohatého na oligosacharidy, jejichž metabolismu jsou schopny pouze specifické druhy bakterií. Právě pro kojence charakteristické druhy bifidobakterií, které během prvního měsíce věku tvoří v průměru 40-60 % fekální mikrobioty výhradně kojených dětí, mají tuto konkurenční výhodu. Počet bifidobakterií nicméně s rostoucím věkem klesá a je výrazně ovlivněn zavedením pevné stravy do jídelníčku dítěte, a to bez ohledu na to, zda je dítě kojeno či nikoliv. Oproti kojencům krmeným náhradní kojeneckou výživou se vyznačují rovněž nižším počtem zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* a *Lachnospriraceae*, rodů *Bacteroides, Clostridium,* konkrétně zástupců klostridiálního klastru XIVa, a dále *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Veilonella* (Fallani et al. 2010; Roger et al. 2010; Bezirtzoglou et al. 2011; Ma et al. 2020). Na druhové úrovni bylo u kojenců krmených náhradní kojeneckou výživou popsáno vyšší zastoupení *Cl. difficile*, *Escherichia* spp. a *Shigella* spp. (Azad et al. 2013).

Zásadní je pro rozvoj střevní mikrobioty rovněž okamžik, ve kterém dochází ke začleňování pevné stravy do jídelníčku dítěte. Jak již bylo řečeno, jídelníček kojence by měl být obohacován o pevnou stravu od 6. měsíce života, nicméně mnoho matek ji zahrnuje do stravy dítěte i před dovršením tohoto věku (Rogers & Blissett 2019). Seznámení kojence s potravinami běžného jídelníčku dospělého člověka je spojené s významnou populační změnou v rámci střevní mikrobioty. Dítě se dostává do kontaktu s řadou dosud nepoznaných nestravitelných polysacharidů, které po vstupu do tlustého střeva fungují jako nové živinové substráty, jež mohou podporovat přežití a následnou dominanci některých bakteriálních druhů, které z dříve přijímaných kabrohydrátů mateřského mléka či kojenecké výživy neprosperovaly

(Fallani et al. 2011). Dochází k nárůstu populace kmene Bacteroidetes, jehož zástupci dokážou rozkládat rostlinné polysacharidy a svou metabolickou aktivitou přímo či nepřímo zvyšovat produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA, short chain fatty acids) ve střevech. Zároveň dochází k obohacení genů spojených s utilizací uhlovodíků, biosyntézou vitamínů a degradací xenobiotik (Koenig et al. 2011). Vybraní zástupci kmenů Firmicutes a Actinobacteria vlastní některé geny umožňující snáze se vyrovnat s přechodem na stravu obsahující nestravitelné rostlinné polysacharidy (Matamoros et al. 2013). Zároveň dochází v rámci střevní mikrobioty novorozence k obohacení bakteriálních druhů produkujících butyrát, jimiž jsou např. *Clostridium leptum*, *Anaerobutyricum hallii* (*A. hallii*, dříve *Eubacterium hallii*) a *Roseburia* spp., které jsou z velké části zodpovědné za utilizaci vlákniny a rezistentního škrobu (Voreades et al. 2014).

3.2 Mateřské mléko

Mateřské mléko je komplexní tekutina produkovaná mléčnou žlázou, která představuje přirozenou potravu pro kojence. Svou energetickou hodnotou, obsahem bílkovin, tuků, sacharidů, minerálních látek a vitamínů naplňuje výživové potřeby kojenců, podstatné pro jejich přirozený růst a vývoj. Obsahem antimikrobiálních a imunomodulačních látek plní rovněž přímou i nepřímou ochrannou funkci, která je zajištěna obsahem imunoglobulinů, leukocytů, lysozymu, laktoferinu, nukleotidů, enzymů, hormonů, cytokinů a oligosacharidů. Kromě toho obsahuje i řadu dalších bioaktivních látek, např. esenciálních mastných kyselin, růstových faktorů a polyaminů (Agostoni et al. 2009).

Složení mateřského mléka je ovlivněno mnoha faktory. Dle fáze laktace lze produkt mléčné žlázy rozdělit na kolostrum (1-5 den), přechodné mléko (6-14 den) a zralé mléko (>14 dnů). Rozdíl v energetické hodnotě a složení jednotlivých makronutrientů kolostra a zralého mateřského mléka je zobrazen níže v tabulce č. 1 (Kim & Yi 2020). Kolostrum neboli mlezivo, je hustá nažloutlá tekutina, která je kromě bílkovin a oligosacharidů bohatší o některé imunologicky aktivní látky a růstové faktory (Castellote et al. 2011). Bylo zjištěno, že podíl jednotlivých složek mateřského mléka se rovněž mění v průběhu jednoho kojení, kdy přední mléko (tzn. první 2-3 minuty po zahájení toku mléka) obsahuje méně tuku a má nižší energetickou hodnotu než mléko zadní (tzn. zbytek mléka do úplného vyprázdnění prsu) (Saarela et al. 2005). Množství obsaženého tuku v mléce je také ovlivněno denní dobou (Khan et al. 2013). Složení je dále ovlivněno gestačním věkem dítěte v době narození, matkou a způsobem nakládání s mlékem. Variabilita ve složení mateřského mléka byla rovněž zaznamenána mezi matkami navzájem i mezi jednotlivými populacemi (Castellote et al. 2011; Ballard & Morrow 2013; Keikha et al. 2017).

Tabulka č. 1 – složení mateřského mléka. Makronutrienty (Kim & Yi 2020).

Proměnná	Kolostrum (1-5 den)	Mateřské mléko (>14 dní)
Energie	50-60 kcal/100 ml	65-70 kcal/100 ml
Sacharidy	50-62 g/1000 ml	60-70 g/1000 ml
Laktóza	20-30 g/1000 ml	67-70 g/1000 ml
Oligosacharidy	20-24 g/1000 ml	12-14 g/1000 ml
Bílkoviny	14-16 g/1000 ml	8-10 g/1000 ml
Tuky	15-20 g/1000 ml	35-40 g/1000 ml

Kromě přirozeného a zároveň nejvhodnějšího zdroje všech potřebných živin a důležitých látek, které dítěti zajišťují věku odpovídající růst, vývoj a ochranu, představuje mateřské mléko současně přirozený zdroj probiotických bakterií a prebiotických látek (Kim et al. 2019).

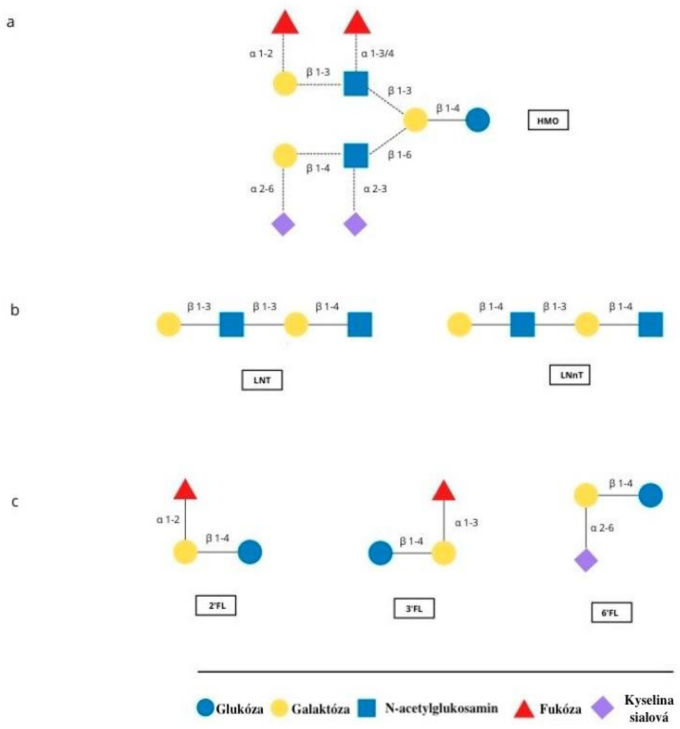
3.2.1 Oligosacharidy mateřského mléka

HMO, dříve známé pod názvem „gynolaktóza“ či „bifidus faktor“, jsou z chemického hlediska rozsáhlou skupinou strukturně variabilních nekonjugovaných glykanů. Jedná se o třetí nejzastoupenější pevnou složku mateřského mléka a o druhý nejčetnější sacharid, jehož obsah je nejvyšší v mlezivu a se zráním mléka postupně klesá (viz. tabulka č.1). Tato unikátní skupina látek se liší v množství i ve strukturálním zastoupení napříč matkami. Odvíjí se převážně od jejich genetické výbavy, ale i od gestačního věku dítěte v době narození (Bode 2012). Bylo zjištěno, že koncentrace HMO je vyšší v mléce matek, kterým se dítě narodilo předčasně, než u matek s dítětem narozeným v termínu (Gabrielli et al. 2011).

3.2.1.1 Struktura HMO

HMO jsou složeny z pěti základních monosacharidů, jimiž jsou glukóza (Glc), galaktóza (Gal), *N*-acetylglukosamin (GlcNAc), fukóza (Fuc) a kyselina sialová (Sia). Na základě množství, zastoupení základních stavebních jednotek a typem jejich vzájemného spojení vznikají rozdílné struktury HMO, kterých bylo identifikováno přes 200 struktur. Všechny HMO nesou laktózu na redukujícím konci (Galβ1-4Glc), kterou je možné prodloužit přidáním lakto-*N*-biózou (LNB, Galβ1-3GlcNAc) nebo *N*-acetyllaktosaminem (Galβ1-4GlcNAc). Za širokou rozmanitostí struktur HMO stojí možnost modifikace laktózy nebo prodlouženého řetězce připojením Sia vazbou α2-3,6 a/nebo fukosylací na vazbě α1-2,3,4 (Bode 2020). Reprezentativní strukturu HMO společně se strukturami nejzastoupenějších HMO zobrazuje obrázek č. 2.

Nejzastoupenější HMO lze současně dělit na základě jejich pH a struktury, konkrétně dle obsazení koncové pozice, na neutrální fukosylované, neutrální obsahující GlcNAc a kyselé sialylované. Neutrální struktury představují přes 75 % celkového obsahu oligosacharidů v mateřském mléce, přičemž zbytek tvoří struktury kyselé. Nicméně, jak již bylo řečeno, složení a množství HMO je vysoce specifické pro každou ženu (Plaza-Díaz et al. 2018).



Obrázek č. 2 - reprezentativní struktura HMO a struktury nejzastoupenějších HMO. (a) Možná spojení základních jednotek HMO. Použité zkratky: (b) LNT – lakto-*N*-tetraózaa, LNnT – lakto-*N*-neotetraóza, (c) 2'FL – 2'-fukosyllaktóza, 3'FL – 3'-fukosyllaktóza, 6'FL – 6'-fukosyllaktóza (6'FL) (Wiciński et al. 2020) – pozn.: volně přeloženo do češtiny.

Při biosyntéze HMO, která probíhá v mléčné žláze, hraje nejvýznamnější roli genetická vybavenost matky. Profil HMO v mateřském mléce ovlivňuje exprese genů zodpovědných glykosyltransferáz. Jedním z těchto enzymů je fukosyltransferáza 2 (FUT2), která katalyzuje navázání fukózy na laktózu nebo na prodloužený konec vazbou α1-2. V závislosti na přítomnost genu pro FUT2 (Se gen) mohou být ženy rozděleny do dvou skupin na tzv. sekreční (Se+) a nesekreční (Se-) typy. Se+ typ žen má mléko bohaté na 2'FL, lakto-*N*-fukopentózu (LNFP) a další fukosylované HMO. Druhým známým enzymem je fukosyltransferáza 3 (FUT3), která katalyzuje napojení fukózy na laktózu nebo na prodloužený konec vazbou α1-3/4. Gen kódující FUT3 (Le gen) je spojený s antigenem Lewisovy krevní skupiny. Dle aktivity FUT3 se ženy dělí na Lewis pozitivní (Le+) a Lewis negativní (Le-) typy (Bode 2020). Na základě exprese FUT2 a FUT3 může být mateřské mléko děleno do čtyř základních skupin, které jsou znázorněny v tabulce č. 2. Nicméně tento systém dělení HMO je značně zjednodušený. Za vznikem HMO nestojí pouze tyto dva enzymy, jejichž fungování je nejlépe popsáno, ale svojí roli zde hrají i jiné glykosyltransferázy, které jsou zodpovědné za tvorbu specifických gykosidických vazeb, avšak doposud nebyly identifikovány (Plaza-Díaz et al. 2018).

Tabulka č. 2 – exprese FUT2 a FUT3 na základě genotypu matky. Procentuální zastoupení jednotlivých genotypů v evropské populaci. Použité zkratky: LNFP – lakto-*N*-fucopentaose (Thurl et al. 1997).

	FUT2	FUT3	Produkované HMO	Zastoupení v evropské populaci [%]
Se+Le+	Aktivní	Aktivní	Všechny typy HMO	70
Se+Le-	Aktivní	Neaktivní	2'FL, 3FL, LNFP-I, LNFP-III	20
Se-Le+	Neaktivní	Aktivní	3FL, LNFP-I, LNFP-III	9
Se-Le-	Neaktivní	Neaktivní	3FL, LNFP-I, LNFP-V	1

3.2.1.2 Význam HMO

HMO se vyznačují velmi nízkou stravitelností. Jako součást mateřského mléka se dostávají do žaludku kojence, ve kterém panuje silně kyselé pH, vůči kterému jsou HMO rezistentní. Nedegradované HMO se dostávají dále do tenkého střeva, ve kterém na ně působí enzymy slinivky břišní a zevní vrstvy kartáčového lemu tenkého střeva. Enzymy přítomné v tenkém střevě jsou schopny degradovat pouze nepatrné množství HMO, které může být následně vstřebáno. Analýza vzorků krve a moči kojenců odhalila přítomnost neporušených struktur HMO i jejich degradačních produktů. Výsledky tak naznačují možnost, že HMO nepůsobí pouze lokálně na úrovni GIT, ale mohou prokazovat i systémové účinky, anebo mohou působit přímo na tkáně, např. tenkého střeva nebo mozku (Rudloff & Kunz 2012). Nicméně většina HMO (99 %) se nedotčena dostává do oblasti distální části tenkého střeva a tlustého střeva, kde podléhá metabolismu střevní mikrobioty a působí pozitivně na zdraví kojence mnoha efekty (Bode 2020).

HMO jsou nejvíce známé pro svůj prebiotický efekt, což znamená, že se v nestrávené podobě dostávají do tlustého střeva, kde slouží jako zdroj potravy potencionálně prospěšným mikroorganismům, čímž podporují vývoj a udržení zdravé střevní mikrobioty (Okburan a Kızıler 2023). Jak už bylo nastíněno v podkapitole Výživa, u kojenců krmených výhradně mateřským mlékem je převážná část mikrobiální populace tvořena rodem *Bifidobacterium*. Tento fakt je připisován na vrub schopnosti bifidobakterií využívat HMO jako zdroj uhlíku a energie. Mezi přední utilizátory HMO se řadí druhy *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (*B. infantis)* a *Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*), tedy dva typičtí představitelé střevní mikrobioty výhradně kojených dětí. Oba druhy jsou schopné degradovat širokou škálu HMO, včetně nižších oligosacharidů a monosacharidů, které vznikají jako vedlejší produkt jejich metabolismu. Jinak je tomu u druhů *Bifidobacterium breve* (*B. breve*) a *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* (*B. longum*), u nichž byla prokázána schopnost utilizovat pouze užší skupinu HMO, např. lakto-*N*-tetraózu a lakto-*N*-neotetraózu (Asakuma et al. 2011; James et al. 2016a). Schopnost degradace některých HMO byla prokázána rovněž u druhů *Bifidobacterium kashiwanohense* (*B. kashiwanohense*), *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* a *Bifidobacterium dentium*, které byly rovněž izolovány z kojenecké stolice, avšak nejsou řazeny mezi

charakteristické zástupce kojenecké střevní mikrobioty (Bunesova et al. 2016; Moya-Gonzálvez et al. 2021). Ne všechny bifidobakterie jsou však schopné utilizovat HMO, a proto používání termínů „bifidogenní“ nebo „bifidus faktor“ ve spojení či jako synonymum pro HMO může být zavádějící. Schopnost růstu na HMO zatím nebyla prokázána u druhů *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (*B. lactis*) a *B. adolescentis* (LoCascio et al. 2009). Některé bifidobakterie a další bakteriální druhy jsou schopné využívat jednodušší produkty degradace HMO, čímž je jim umožněno uchytit se v tlustém střevě kojenců. Konečným produktem metabolismu bifidobakterií jsou SCFA a další látky, které pomáhají vytvářet vhodné podmínky podporující růst komenzálních mikroorganismů, a naopak znesnadňují množení potencionálních patogenů. Metabolity rovněž působí podpůrně pro lidský metabolismus snižováním luminálního pH, ovlivňováním resorpce vody a některých elektrolytů a snižováním biologické dostupnosti toxických aminů (Bottacini et al. 2014). Vedle podpory růstu komenzálních bakterií hrají specifické HMO roli v obraně proti adhezi patogenů na povrch střevního epitelu. Řada virových, protozoálních nebo bakteriálních patogenů potřebuje pro svou kolonizaci, množení a invazi do buněk přilnout k povrchu sliznice. Patogenní bakterie jsou na svém povrchu vybaveny adheziny, které jim umožňují vázat se na specifické receptory. Většinou se jedná o glykany, které jsou součástí extracelulární vrstvy buněk tzv. glykokalyxu. Některé HMO jsou svou strukturou glykanům podobné, čímž matou patogeny, které se na oligosacharidy navážou a jsou spolu s nimi vyloučeny z organismu (Bode 2012). Adhezivní mechanismy využívají například enteropatogenní druhy *Escherichia coli* (*E. coli*, EPEC), které způsobují serózní průjmy u dětí mladších šesti měsíců. Bylo zjištěno, že HMO snižují přilnavost EPEC k povrchu sliznice skrze přilnavost proteinu přítomného v pilech na *N*-acetyllaktosamin, který je součástí glykokalyxu enterocytů a zároveň tvoří páteř většiny HMO (Manthey et al. 2014). Antiadhezivní antimikrobiální působení HMO bylo široce popsáno vůči patogenu *Campylobacter jejuni in vitro* i na zvířecích modelech (Bode 2012).

Jako další benefit spojený s příjmem HMO, lze uvést jejich možný přímý i nepřímý vliv na imunitní systém kojence, který je v tomto nízkém věku nevyzrálý a zranitelný. HMO ovlivňují vývoj střevní bariéry, důležité součásti nespecifické imunity a hlenové vrstvy na jejím povrchu. Dále byl pozorován vliv HMO na proliferaci populace imunitních buněk, produkci cytokinů a vliv na expresi genů epiteliální výstelky přímo i nepřímo skrze mikroorganismy. Na zvířecím kolitickém modelu byl popsán normalizační účinek peptidových bioaktivních faktorů produkovaných bakterií *B. infantis* na střevní permeabilitu, který byl zprostředkován zvýšením exprese genů proteinů těsných spojů (Ewaschuk et al. 2008; Donovan & Comstock 2017). Jak již bylo uvedeno výše, přibližně 1 % HMO se vstřebává a následně dostává do oběhového systému, čímž mohou přímo ovlivnit imunitu a vývoj jiných orgánů lidského těla (Bode 2012; Duska-McEwen et al. 2014).

3.2.1.3 HMO v prevenci nekrotizující enterokolitidy

V neposlední řadě je potřeba zmínit roli HMO v prevenci NEC, jedné z život ohrožujících gastrointestinálních poruch vyskytující se novorozenců. Jedná se o závažné onemocnění postihující převážně oblast ilea a vzestupného tračníku, které postihuje především předčasně narozené děti, nicméně se může vyskytovat i u plně donošených dětí. Přesná příčina vzniku NEC není známá, nicméně mezi odbornou veřejností panuje shoda na tom, že s největší

pravděpodobností jedná o multifaktoriální onemocnění. Mezi příčiny vzniku NEC se řadí nezralost trávicího, oběhového a imunitního systému, dále hypoxie, dysbióza střevní mikrobioty, genetická vlohy a další. Vyšší predispozici pro vznik NEC vykazují novorozenci narození v gestačním věku pod 32 týdnů a s porodní hmotností nižší než 1 500 g. Mortalita je v případě NEC vysoká, pohybuje se od 20 do 40 %, přičemž děti, které přežijí, se mohou potýkat s dlouhotrvajícími neurologickými problémy (Neu & Walker 2011; Trinci et al. 2016). Slibnou cestou vedoucí ke snížení rizika vzniku NEC u novorozenců, by mohla být aplikace mateřského mléka jako výživy v prvních dnech po narození. Bylo popsáno, že u kojenců jejichž enterální strava byla složená minimálně z 50 % mateřským mlékem během prvních dvou týdnů po narození, byla šance na propuknutí NEC šestkrát nižší oproti těm výhradně krmených náhradní kojeneckou výživou (Sisk et al. 2007). Tento efekt je připisován skutečnosti, že mateřské mléko obsahuje HMO, které se zřejmě podílí přímo i nepřímo na snížení rizika vzniku NEC. Studiemi bylo popsáno několik mechanismů, které by za účinkem HMO mohly stát. Vliv příjmu HMO na zmírnění projevů NEC byl úspěšně testován u modelu NEC potkaních mláďat. Studie došla k závěru, že u novorozených potkanů došlo díky příjmu HMO ke snížení příznaků podobných NEC a rovněž k výrazně vyšší šanci na přežití. Výsledky hledání konkrétní skupiny HMO zodpovědné za tento účinek poukázaly na specifický nefukosylovaný oligosacharid disialyllakto-*N*-tetraózu (DSLNT). Závěr testování *in vivo* byl podpořen kohortovou studií, ve které byla zjištěna významná spojitost mezi nízkými koncentracemi DSLNT v mateřském mléce a vznikem NEC u novorozenců s velmi nízkou porodní hmotností. Rovněž bylo popsáno, že koncentrace DSLNT je u jednotlivých žen variabilní. Přesný mechanismus, jakým DSLNT působí, nebyl prozatím popsán, nicméně ze závěrů testování vyplývá, že by se mohlo jednat o vysoce strukturálně specifický účinek potencionálně zprostředkovaný skrze hostitelský receptor (Bode 2018). Koncentrace DSLNT v mléce může mít rovněž vliv na longitudinální vývoj mikrobioty. Nízký obsah DSLNT byl například spojen s opožděným přechodem mikrobioty do podoby bohaté na bifidobakterie, která je typická pro starší kojence (Masi et al. 2021). Kromě DSLNT se na prevenci vzniku NEC na zvířecích modelech prokázaly jako účinné oligosacharidy 2'FL a 6'FL, u kterých byl popsán nový mechanismus účinku. Vznik NEC je připisován mimo jiné i přehnané signalizaci ve střevním epitelu v reakci na aktivaci lipopolysacharidového receptoru toll-like receptoru (TLR), která vede ke střevní ischemii (nedokrevnost, místní anémie). Bylo zjištěno, že 2'FL a 6'FL se dokážou vázat na TLR4 a inhibovat tak jeho signalizaci (Sodhi et al. 2021).

3.2.2 Mikrobiota mateřského mléka

Mateřské mléko bylo dlouho považováno za sterilní tekutinu a přítomnost mikroorganismů byla vysvětlována kontaminací či zdravotním stavem matky. Nicméně studie z posledních desetiletí prokázaly, že mateřské mléko disponuje svou vlastní jedinečnou mikrobiotou, která hraje esenciální roli v utváření kojenecké mikrobioty. Způsob, jakým se mikroorganismy do mléka dostávají, zůstává stále do značné míry neobjasněn. Jedna z hypotéz je založena na tom, že některé mikroorganismy se do mléčné žlázy mohou dostávat z dutiny ústní kojence během sání nebo z okolní prsu matky. Jedná se především o zástupce rodů *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* a *Propionibacterium*, u kterých byl tento exogenní původ zvažován (Mantziari & Rautava 2021). Avšak některé studie poukázaly na

fakt, že mateřské prekolostrum (tekutina vylučovaná některými ženami během pozdního těhotenství) obsahuje typické orální bakterie již před kontaktem s ústní dutinou novorozence, což by naznačovalo, že naopak mikrobiota kojenecké ústní dutiny je obohacena o některé bakterie skrze kojení (Ruiz et al. 2019). Dle jiné hypotézy se mikroorganismy do mléka dostávají enteromamární cestou, mateřské střevní mikroorganismy jsou tedy translokovány do mléčné žlázy. Mechanismus translokace je v počátku zprostředkováván skrze dendritické buňky či makrofágy, které mohou vychytávat nepatogenní mikroorganismy z lumenu střev a přenášet je do oblasti *lamina propria*, odkud se dostávají přes mezenterické lymfatické uzliny dále do lymfatického a krevního oběhu. Popsaný proces mohou podporovat přechodné anatomické a fyziologické změny, které během těhotenství a laktace nastávají. Tato hypotéza by rovněž vysvětlovala přítomnost obligátně anaerobních mikroorganismů v mateřském mléce (Rodríguez 2014).

Složení mikrobioty mateřského mléka se odvíjí od zdravotního stavu matky, její diety, fáze laktace, zeměpisné polohy a rovněž od toho, zda matka kojí přímo z prsu či používá odsávačku mléka (Mantziari a Rautava 2021). Mezi nejčastěji identifikované bakteriální kmeny původem z tkáně prsu či mléka se řadí Proteobacteria, Firmincutes, Actinobacteria a Bacteroidetes. Co se týče druhového zastoupení, patří mezi nejhojněji identifikované bakterie *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus agalactiae*, *Cutibacterium acnes*, *Enterococcus feacalis*, *B. breve*, *E. coli*, *Streptococcus sanguinis*, *Lactobacillus gasseri* a *Salmonella enterica*. Tento výčet zahrnuje druhy, které se vyskytují u žen bez zdravotních problému i žen s infekcí prsu, např. mastitidou. Bifidobakterie, laktobacily a jiné druhy, např. *Faecalibacterium prausnitzii*, byly identifikovány pouze u zdravých žen, což může naznačovat jejich probiotický potenciál v prevenci infekčních onemocnění prsu a kojeneckých infekcí. Zvýšený podíl aerotolerantních bakterií byl naopak spojen s infekčními stavy (Togo et al. 2019a). V mateřském mléce se rovněž nachází zástupci z říše hub, konkrétně druhy *Malassezia*, *Candida* a *Saccharomyces* (Boix-Amorós et al. 2017). Rovněž byla popsána přítomnost archeí, protozoi a virů (Togo et al. 2019b; Jiménez et al. 2015).

3.3 Náhradní kojenecká výživa

Mateřské mléko je stále považováno za nejvhodnější formu výživy u všech zdravých kojenců, avšak v některých případech není kojení dítěte umožněno. Kojení nemusí být matkou zprostředkováno ze zdravotního důvodu, osobních preferencí, pracovních důvodů, nepodpory rodiny a blízkého okolí, pocitu studu, strachu z kojení a mnoha dalších důvodů (Ogbuanu et al. 2009). V tom případě musí být dítěti poskytnuta adekvátní alternativa, která je bezpečná, splňuje výživové požadavky a podoruje jeho růst a vývoj. K tomuto účelu slouží jako plnohodnotná náhrada počáteční kojenecká výživa, která je určena dětem od narození do 6 měsíců věku. Pro děti starší 6 měsíců je vhodná tzv. pokračovací kojenecká výživa, která by měla sloužit pouze jako součást smíšené stravy a nesmí být zaměňována za počáteční kojeneckou výživu (EFSA NDA Panel 2014; Evropská komise 2015).

Požadavky na složení kojeneckých výživ se liší napříč státy a jejich potravinářskými zákony. Podrobné požadavky týkající se složení a informací vztahujících se na počáteční a pokračovací kojeneckou výživu a také požadavky na informace týkající se výživy kojenců a malých dětí jsou pro členské státy Evropské unie (EU) uvedeny v Nařízení Komise v přenesené

pravomoci (EU) 2016/127 ze dne 25. září 2015, kterým se doplňuje Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 609/2013 (dále také jako „Nařízení (EU) 2016/127“). Požadavky na složení jsou uvedeny v přílohách I a II Nařízení (EU) 2016/127. Nařízení se z důvodu vysokého počtu a velkého významu nových požadavků začalo používat až 5 let po jeho vstupu v platnost, tedy v roce 2020. Členské státy mají povinnost zajistit dodržování těchto požadavků provozovateli potravinářských podniků, kteří uvádí počáteční a pokračovací kojeneckou výživu na trh (Evropská komise 2015).

Ve Spojených státech amerických musí náhradní kojenecké výživy splňovat požadavky stanovené Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Food and Drug Administration), které jsou uvedeny ve sbírce federálních předpisů, konkrétně v Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FDA 2024). Tato práce se však bude nadále věnovat požadavkům vztahujících se na státy EU.

Dle Vědeckého stanoviska věnovaného základnímu složení počáteční a pokračovací kojenecké výživy z roku 2014 (dále také jako „Vědecké stanovisko 2014“), které bylo vydáno Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA, European Food Safety Authority), a na základě kterého bylo vypracováno Nařízení (EU) 2016/127, by kojenecká výživa měla hledat inspiraci ve složení mateřského mléka, nicméně by neměla do písmene kopírovat jeho složení, které vždy nemusí odrážet pouze potřeby dítěte. Živiny a látky by měly být obsaženy v takovém množství, aby podporovaly růst a vývoj jedince, avšak by do kojenecké výživy neměly být přidávány v množství nadbytečném, které by mohlo zatěžovat metabolismus či jiné fyziologické funkce kojence (EFSA NDA Panel 2014). Vybrané požadavky na složení počáteční kojenecké výživy vyrobené z bílkovin kravského nebo kozího mléka dle přílohy I Nařízení (EU) 2016/127 jsou uvedeny v tabulce č. 3. Počáteční kojenecká výživa může být rovněž vyrobena z izolátů sójových bílkovin samotných nebo ve směsi s bílkovinami kravského či kozího mléka, anebo z hydrolyzovaných bílkovin. Nařízení se rovněž věnuje požadavkům na minerální látky, vitamíny, nukleotidy a nezbytné a podmíněně nezbytné aminokyseliny (jako referenční bílkovina je použito mateřské mléko). Fruktooligosacharidy (FOS) a galaktooligosacharidy (GOS) lze přidávat v maximálním obsahu 0,8 g na 100 ml v kombinaci 90 % oligogalaktosyl-laktózy a 10 % oligofruktosyl-sacharózy o vysoké molární hmotnosti (Evropská komise 2015).

Počáteční i pokračovací kojenecká výživa může obsahovat i jiné složky potravin, pokud je jejich vhodnost pro kojence prokázána obecně uznávanými vědeckými poznatky. Vhodnost musí být prokázána systematickým přezkumem dostupných údajů a případně nutnosti rovněž odpovídajících studií (Evropská komise 2015).

Tabulka č. 3 – požadavky na složení počáteční kojenecké výživy vyrobené z bílkovin kravského nebo kozího mléka. Použité zkratky: LA – kyselina linolová, ALA – kyselina alfa-linolenová, DHA – kyselina dokosahexaenová (Evropská komise 2015).

Proměnná	Jednotka	Rozsah
Energie	kcal/100 ml	60-70
Bílkoviny	g/100 kcal	1,8-2,5
Celkový tuk	g/100 kcal	4,4-6,0
• **LA**	mg/100 kcal	500-1200
• **ALA**	mg/100 kcal	50-100
• **DHA**	mg/100 kcal	20-50
Sacharidy	g/100 kcal	9-14
• **Laktóza, pokud „bez laktózy“**	g/100 kcal mg/100 kcal	min. 4,5 max. 100

3.3.1 Prebiotika

Mateřské mléko oproti náhradní kojenecké výživě přirozeně obsahuje vysoce variabilní a komplexní směs HMO, která kojenci přináší řadu zdravotních benefitů, které byly popsány v předchozích podkapitolách. Ve státech EU je dle Nařízení (EU) 2016/127 možné přidávat do počáteční a pokračovací kojenecké výživy směs FOS a GOS. Strukturně se jedná o jednodušší sacharidy než HMO. FOS jsou lineární polymery fruktózy s koncovým glukozovým zbytkem spojeným β-(1→2) glykosidickou vazbou, zatímco GOS jsou složené z galaktózových zbytků a koncové glukózy spojených různými typy glykosidických vazeb (Gänzle 2011; Kumar et al. 2018). Zastoupení a poměr FOS a GOS vyplývá ze závěru Vědeckého výboru pro potraviny (SCF, Scientific Committee on Food) 2001d., dle kterého je stanovená směs nestravitelných polysacharidů za daných podmínek použití bezpečná. Bylo prokázáno, že kojenecká výživa doplněná o GOS s krátkým řetězcem samostatně nebo v kombinaci s FOS s dlouhým řetězcem je oproti prebioticky nefortifikovaným výživám schopna lépe napodobovat prospěšné vlastnosti mateřského mléka. Náhradní kojenecká výživa obsahující GOS a FOS působí bifidogenně a podporuje vývoj střevní mikrobioty formulí krmených kojenců do podoby mikrobioty kojenců kojených mateřským mlékem (Borewicz et al. 2019). Byly zkoumány i další oligosacharidy a jejich kombinace z hlediska účinků na zdraví kojence, např. skrze prebiotické účinky na funkci a zdraví střev, infekční onemocnění GIT a horních cest dýchacích, atopické dermatitidy, ekzému, kopřivky a astmatu. Nicméně Panel pro Výživu, nové potraviny a potravinové alergeny (NDA, Nutrition, Novel Foods and Food Allergens) pro Vědecké stanovisko 2014 s ohledem na dostupné údaje a nedostatečnou kvalitu vzniklých studií shledal, že neexistují dostatečné důkazy o příznivých účincích nestravitelných oligosacharidů na zdraví kojenců, a proto nebyly do Nařízení (EU) 2016/127 zahrnuty další prebiotické složky či jejich kombinace (EFSA NDA Panel 2014).

Na žádost Evropské komise vydala EFSA v roce 2015 stanoviska k bezpečnosti LNnT a 2’FL jako nové složky potravin podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 258/97 (dále také jako „Nařízení (EU) 258/97“). NDA Panel stanovil, že LNnT je pro kojence bezpečná v případě, že je do počáteční a pokračovací kojenecké výživy přidávána v kombinaci s 2’FL v koncentracích do 0,6 g/L pro LNnT a do 1,2 g/L pro 2’FL, tedy v poměru 1:2

v rekonstituované výživě (EFSA NDA Panel 2015). V návaznosti na vědecké stanovisko EFSA bylo Prováděcím rozhodnutím Komise (EU) 2016/375 a 2016/376 v souladu s Nařízením 258/97 povoleno uvedení syntetické LNnT a 2'FL na trh jako nové složky potravin. Jednalo se o první tzv. humánní mléčné oligosacharidy (HiMO, human-identical milk oligosaccharides), které byly použity v počáteční a pokračovací kojenecké výživě. Od té doby přijal EFSA NDA Panel řadu několika dalších vědeckých stanovisek s pozitivními výsledky k bezpečnosti synteticky vyrobených HiMO nebo HiMO vyprodukovaných geneticky modifikovanými kmeny (GM kmeny). Stanoviska následně sloužila jako podklad pro zavedení jednotlivých HiMO do kategorie nových potravin nebo jako složek nových potravin (EFSA NDA Panel 2023). Jejich přehled je uveden v tabulce č. 4. Termínem „nová potravina" nebo „složka nové potraviny" se dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283, které přišlo v platnost 1. 1. 2018, rozumí jakákoliv potravina, která se ve významné míře nepoužívala k lidské spotřebě v Unii před 15. květnem 1997, bez ohledu na den přistoupení členských států k Unii, a která spadá alespoň do jedné z vymezených kategorií daného nařízení (Evropský parlament a Rada EU 2015).

Tabulka č. 4 – přehled pozitivně vyhodnocených vědeckých stanovisek EFSA NDA Panelem na téma bezpečnosti HiMO. Použité zkratky: NANA – *N*-acetyl-D-neuraminová kyselina, DFL – difukosyllakóza, 3FL – 3-fukosyllakóza, 6'SL – 6'-sialyllaktóza, 3'SL – 3'-sialyllaktóza, GM kmen – Geneticky modifikovaný kmen (EFSA NDA Panel 2023).

HiMO	Vědecká stanoviska	EFSA NDA Panel
2'FL	• Chemicky syntetizované • Produkované GM kmeny *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032	2015a 2022a
LNnT	• Chemicky syntetizované • Produkované GM kmeny *E. coli* BL21 (DE3) • Produkované GM kmeny *E. coli* K-12 DH1 nebo BL21 (DE3) • Rozšíření použití v doplňcích stravy pro kojence *E. coli* K-12 DH1	2015c 2020a 2019b; 2022e 2022d
LNnT + 2'FL	• Rozšíření použití v doplňcích stravy pro děti chemicky syntetizovaných/pro kojence produkovaných GM kmeny *E. coli* K-12 DH1 2'FL a LNnT	2015b; 2022c
NANA	• Chemicky syntetizované	2017
Směs 2'FL/DFL	• Produkované GM kmeny *E. coli* K-12 DH1 • Rozšíření použití v doplňcích stravy pro kojence	2019a 2022d
3FL	• Produkované GM kmeny *E. coli* K-12 MG1655, *E. coli* BL21 nebo *E. coli* K-12 DH1	2021;2022b; 2023a
Sodné soli 6'SL	• Produkované GM kmeny *E. coli* K-12 DH1, *E. coli* BL21 (DE3) nebo *E. coli* NEO6	2020b; 2022f; 2023b
Sodné soli 3'SL	• Produkované GM kmeny *E. coli* K-12 DH1, *E. coli* BL21 (DE3) nebo *E. coli* NEO6	2020c; 2022g; 2023c

HiMO obsažené v počáteční a pokračovací výživě hrají v GIT kojence stejnou roli, jakou hrají HMO mateřského mléka, tzn. že fungují jako prebiotika, působí jako antiadhezivní antimikrobiální látky, modulují imunitní systém kojence a hrají roli v prevenci NEC. Klinické testy prokázaly bezpečnost, dobrou snášenlivost a podrodu růstu dítěte úměrnou věku u náhradních kojeneckých výživ obohacených o samotnou 2'FL, kombinaci 2'FL a LNnT, a také mix pěti HiMO (2'FL, 3FL, LNnT, 3'FL a 6'FL) (Goehring et al. 2016; Puccio et al. 2017; Parschat et al. 2021). Začlenění HiMO do stravy dítěte se doporučuje zejména v případech, kdy mléko matky neobsahuje dostatečnou koncentraci nebo určitý typ HMO, což by mohlo ovlivňovat vývoj kojence. Dalším důvodem pro HiMO začlenění do výživy může být prevence různých onemocnění, která jsou spojena s raným věkem dítěte (Pérez-Escalante et al. 2022). Studie ukázaly, že mikrobiota dětí krmených náhradní kojeneckou výživou obohacenou o HiMO, konkrétně kombinace 2'FL s LNnT nebo směsi pěti HiMO, se více podobá mikrobiotě dětí kojených mateřským mlékem, pro který je charakteristický vysoký podíl bifidobakterií. Přítomnost HiMO zároveň přispívá ke snížení relativního množství specifických střevních bakteriálních patogenů, a také podporuje vývoj střevního imunitního systému a funkci střevní bariéry (Steenhout et al. 2016; Bosheva et al. 2022). Další studie poukázala na vliv 2'FL podávané formou náhradní kojenecké výživy na imunitní systém kojence. Kojenci krmení náhradní kojeneckou výživou s 2'FL vykazovali nižší *in vivo* a *ex vivo* cytokinové profily oproti kojencům, kteří byli krmeni výživou obsahující pouze GOS, čímž se více podobali kojeným jedincům (Goehring et al. 2016). Doplnění výživy o 2'FL s LNnT může mít souvislost s nižší mírou onemocnění, především infekcemi dolních dýchacích cest, a také užíváním antipyretik a antibiotik v menším rozsahu (Puccio et al. 2017). Málo pozornosti bylo doposud věnováno 3'-galaktosyllaktóze (3'GL), která se nachází v mateřském mléce a je přirozeným derivátem mléčné fermentace, a proto se může vyskytovat v kojenecké výživě získané fermentací (Salminen et al. 2020).

Přidání HiMO do náhradní kojenecké výživy je dobrý krok směřující k přiblížení ke stále nedosažitelnému a jedinečnému efektu, který má mateřské mléko na zdraví kojence. Bezpečnost a dobrá snášenlivost HiMO kojenci byla již prokázána, nicméně je stále potřeba více studií, které by prohloubily a ucelily naše vědění o jejich zdravotních přínosech. Doposud bylo schváleno k používání pouze nepatrné množství HiMO a jejich kombinací v náhradního kojeneckých výživách v rámci EU, avšak mateřské mléko obsahuje více jak 200 strukturálně a funkčně odlišných HMO (Vandenplas et al. 2018).

3.3.2 Probiotika

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství přinášejí hostiteli zdravotní prospěch. Jedná se převážně o bifidobakterie a laktobacily, ale také o zástupce rodů *Bacillus*, *Pediococcus, Streptococcus, Enterococcus, Lactococuss, Escherichia* a některé druhy kvasinek, např. *Saccharomyces boulardii.* Probiotika, která jsou podávána za účelem nastolení mikrobiální rovnováhy v GIT, jsou přijímána ve formě doplňků stravy nebo jako součást potravin. Aby byla probiotika účinná, musí splňovat určitá kritéria zahrnující absolutní bezpečnost pro hostitele, odolnost vůči nízkému pH žaludku a působení pankreatických šťáv, schopnost adheze na sliznici tlustého střeva a snadnou kolonizaci střevního prostředí. V místě účinku působí několika mechanismy, např. snižují střevní pH,

působí antimikrobiálně, znemožňují adhezi patogenů a modifikují imunitní odpověď hostitele (Soccol et al. 2010).

Dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 spadají probiotika do nových potravin kategorie ii) (potraviny sestávající, izolované nebo vyrobené z mikroorganismů, hub nebo řas) a vi) (potraviny sestávající, izolované nebo vyrobené z buněčné nebo tkáňové kultury získané ze zvířat, rostlin, mikroorganismů, hub či řas) (Evropský parlament a Rada EU 2015). Jelikož je většina probiotik klasifikována jako doplňky stravy, vztahují se na ně méně přísná kritéria a postupy kontroly kvality, což může vyvolávat obavy ohledně jejich bezpečnosti (Kolaček et al. 2017). Pro uvedení na trh v EU, musí vybrané mikroorganismy z hlediska bezpečnosti schválit EFSA. Za účelem usnadnění procesu posuzování, zda je mikroorganismus vhodný pro uvedení do potravinového a krmivového řetězce, byl zřízen systém Kvalifikovaného předpokladu bezpečnosti (QPS, Qualified Presumption of Safety). Systém QSP je používán pro posuzování rizik mikroorganismů, u kterých byla podána žádost o uvedení na trh v podobě doplňkových látek v krmivech, potravinářských přídatných látek, potravinářských enzymů a aromat, nových potravin a přípravků na ochranu rostlin (EFSA 2024). EFSA rovněž kontroluje používání termínu „probiotikum“ a považuje uvedení probiotik v potravině za zdravotní tvrzení prokázané klinickými studiemi (Lemoine et al. 2023).

V roce 2011 Výbor pro Evropskou společnost pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu (ESPGHAN, The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition) nedoporučil rutinní užívání výživy doplněné probiotiky u donošených kojenců. Dle Výboru pro ESPGHAN nevede podávání kojenecké náhradní výživy doplněné o probiotika během prvních měsíců života k žádným konzistentním klinickým účinkům. Zároveň chybí údaje o dlouhotrvajících účincích. Jednotlivé studie se zabývaly vlivem konzumace náhradní kojenecké výživy obohacené o probiotika na růst kojenců, snížení rizika GIT infekcí a respiračních onemocnění, nižší frekvenci léčby antibiotiky, frekvenci plačtivých stavů, koliky a podráždění, vznik alergií, a také frekvenci a konzistenci stolice (Braegger et al. 2011). Výsledky studií jsou značně rozmanité a zdravotní přínosy jsou vysoce specifické pro jednotlivé kmeny, dávkování a typu onemocnění.

U kojenců, jež byli krmeni kojeneckou výživou doplněnou o *B. infantis* CECT7210 byla pozorována nižší incidence průjmových epizod, zácpy a byla zaznamenána vyšší frekvence stolice ve srovnání s kontrolní skupinou (Escribano et al. 2018). Podobné výsledky byly pozorovány u studie hodnotící bezpečnost instantní kojenecké výživy obohacené o *Limosilactobacillus* (dříve *Lactobacillus*) *fermentum* (*L. fermentum*) CECT5716 nebo *B. breve* CECT7263, kdy byla takto fortifikovaná na základě hmotnostního přírůstku kojence vyhodnocena jako bezpečná, a kdy sekundární výsledky poukázaly na pozitivní efekt přítomnosti *B. breve* na zmírnění příznaků kojenecké koliky a *L. fermentum* v boji proti GIT infekcím (Maldonado et al. 2019). V prevenci vzniku akutní gastroenteritidy u kojenců se jako efektivní projevila náhradní kojenecká výživa okyselená pomocí bakterií *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) a *Lactobacillus helveticus* a doplněna o probiotická kmen *B. lactis* Bb-12 (Chouraqui et al. 2004). Probiotická výživa rovněž vykazuje vliv na optimalizaci střevního prostředí, složení a metabolickou aktivitu mikrobioty. Studie zabývající se vlivem příjmu probiotické náhradní výživy na střevní mikrobiotu a projevy s ní spojené, popsala zvýšení relativní početnosti kmenů Actinobacteria a Proteobacteria a zvýšení diverzity na

rodové úrovni u kojenců krmených náhradní výživou doplněnou o směs probiotických kmenů *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (*L. rhamnosus*), *L. fermentum* LC40, *Limosilactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) DSM 17938 a *B. lactis* Bb-12. Složení střevní mikrobioty bylo spojováno s vyšší koncentrací butyrátu ve stolici, se zvýšenou frekvencí vyprazdňování a s lepší konzistencí stolice (Eor et al. 2023). Kojenecká náhradní výživa doplněná pouze o *B. lactis* Bb-12 pozitivně ovlivnila složení střevní mikrobioty redukcí *Enterobacteriaceae* a *Clostridium* spp. a zvýšením počtů samotných bifidobakterií (Mohan et al. 2006).

Otázkou také zůstává, zda náhradní kojenecká výživa, která je doplněná pouze o probiotické kmeny, dokáže z dlouhodobého hlediska ovlivnit složení kojenecké střevní mikrobioty. Studie zkoumající efekt obohacené kojenecké výživy o směs bifidobakterií poukázala na neschopnost suplementovaných probiotických kmenů dlouhodobě kolonizovat střevní prostředí (Bazanella et al. 2017). Naopak studie, zkoumající efekt suplementace probiotik společně s prebiotiky v rámci náhradní kojenecké výživy nebo probiotik společně s konzumací mateřského mléka, poukázaly na schopnost probiotických kmenů kolonizovat střevní prostředí v dlouhodobějším horizontu (Simeoni et al. 2016).

3.3.3 Synbiotika

Synbiotikum je definováno jako směs obsahující živé mikroorganismy a substrát(y) selektivně využívaný(é) hostitelskými mikroorganismy, která přináší hostiteli zdravotní prospěch (Swanson et al. 2020). Obsažená prebiotika selektivně podporují růst jak endogenních probiotických kmenů, tak i zdraví prospěšných mikroorganismů stálé střevní mikrobioty. Kombinace probiotik a prebiotik, by mohla představovat účinnou alternativu k mateřskému mléku, které v kojeneckém střevě vytváří ekosystém s převahou bifidobakterií (Lemaire et al. 2018).

Byl zkoumán účinek synbiotických náhradních kojeneckých výživ na růst, toleranci a případný pozitivní efekt na zdraví kojenců. V roce 2011 Výbor pro ESPGHAN uvedl, že kojenecká výživa doplněná o synbiotika pravděpodobně není spojena s nežádoucími účinky, nicméně z důvodu nedostatku důkazů o bezpečnosti a zdravotních účincích nedoporučuje rutinní používání synbioticky fortifikované kojenecké výživy (Braegger et al. 2011). Od té doby se několik studií zabývalo vlivem konzumace kojeneckých formulí obohacených o probiotické kmeny bakterií s přídavkem GOS samostatně nebo v kombinaci s FOS na zdraví a vývoj kojenců. Konzumace kojenecké výživy doplněné o *B. breve* M-16V v kombinaci s GOS a FOS měla vliv na složení střevní mikrobioty, konktrétně na vyšší zastoupení bifidobakterií a nižší zastoupení klostridií a eubakterií. Změna profilu střevní mikrobioty souvisela s okyselením střevního prostředí a zvýšenou produkcí acetátu. U dětí s atopickou dermatitidou může konzumace analogické kojenecké výživy přispět s redukci příznaků podobných astmatu (Van Der Aa et al. 2010; Chua et al. 2017). Příjem hypoalergenní kojenecké výživy se stejnou synbiotickou směsí u dětí s alergií na bílkovinu kravského mléka vedl ke snížení vzniku infekcí, méně časté hospitalizaci, k nižší spotřebě léků a rovněž ke změně složení střevní mikrobioty (Sorensen et al. 2021). Zdravotní přínos vykazovala ve studiích také kojenecká výživa doplněná o *L. fermentum* CECT5716 v kombinaci s GOS, a to konkrétně na snížení rizika komunitních infekcí GIT a horních dýchacích cest (Maldonado et al. 2012; Maldonado-Lobón et al. 2015). Dále byl pospán efekt spojený s příjmem synbiotické směsi skládající se z GOS, FOS a

Lacticaseibacillus paracasei subsp. *paracasei* F19 na snížení počtů epizod infekcí dolních dýchacích cest, a také s příjmem synbiotik se stejnou prebiotickou složkou v kombinaci *L. rhamnosus* LCS-742 a *B. infantis* M63 na ochranný efekt proti vzniku atopické dermatitidy (Szajewska et al. 2017; Rozé et al. 2012). Naopak u dětí krmených kojeneckou formulí doplněnou o *B. lactis* Bb-12 a oligosacharidy původem z kravského mléka sice nebyl pozorován negativní efekt na vývoj či špatná snášenlivost na doplněnou výživu, nicméně takto doplněná výživa nepřinášela kojenců žádný přídavný obohacující účinek na zdraví, jakým je snížení výskytu průjmových a horečnatých infekcí, oproti kojencům přijímajícím nefortifikovanou výživu (Radke et al. 2017).

Dalším krokem, který náhradní kojeneckou výživu přibližuje do podoby mateřského mléka, může být kombinace probiotik s HiMO. Kojenecká výživa doplněná o *L. reuteri* 17938 a 2'FL byla vyhodnocena jako bezpečná, kojenci dobře snášená a zároveň podporovala u konzumentů vývoj odpovídající věku. Zároveň byl u této synbiotické kombinace pozorován vliv na střevní mikrobiotu kojenců, která se složením více přiblížila mikrobiotě kojenců přijímajících mateřské mléko, a také snížením počtů podmíněných patogenů (Alliet et al. 2022). U náhradní kojenecké výživy obohacené o 2'FL a *B. lactis* Bb12 samostatně, nebo v kombinaci s *L. reuteri* DMS17938, byla rovněž prokázána dobrá GIT snášenlivost. Navíc u výživy obohacené o 2'FL a tyto dva probiotické kmeny byl pozorován efekt na zlepšení vznětlivosti vnímanou ošetřovatelem u obzvlášť úzkostlivých kojenců (Czerkies et al. 2019; Storm et al. 2019). Důkazy z reálné praxe potvrdily dobrou snášenlivost, bezpečnost a věku odpovídající podporu růstu u kojenců přijímajících fortifikovanou kojeneckou výživu o 2'FL, LNnT a *L. reuteri* DMS17938 (Román Riechmann et al. 2020).

3.3.4 Postbiotika

V roce 2019 panel odborníků Mezinárodní vědecké asociace pro probiotika a probiotika (ISAPP, International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) definoval postbiotikum jako „přípravek z neživých mikroorganismů a/nebo jejich složek, který přináší hostiteli zdravotní prospěch". Přesněji řečeno „účinná postbiotika musí obsahovat inaktivované mikrobiální buňky nebo buněčné složky s metabolity nebo bez nich k pozorovaným zdravotním účinkům" (Salminen et al. 2021).

Pod definici postbiotik spadají fermentované kojenecké výživy, tedy výživy, které jsou během výrobního procesu fermentovány bakteriemi mléčného kvašení, a které neobsahují podstatné množství životaschopných bakterií v konečném výrobku (Salminen et al. 2021). V roce 2007 Výbor pro výživu ESPGHAN nedospěl pro nedostatek dat k pevnému názoru ohledně zdravotních účincích fermentované kojenecké výživy (Agostoni et al. 2007).

Příjem fermentované kojenecké výživy založené na dvou kmenech *B. breve* C50 a *S. thermophilus* ST065 vedl u intervenovaných kojenců, oproti kontrolní skupině přijímající nedoplněnou výživu, ke zmírnění projevů akutní gastroenteritidy, ke snížení pH stolice a u kojenců s vysokým rizikem atopie prokázal účinnost na respirační a trávicí alergické projevy a biologické známky senzibilizace na potraviny během prvního roku života (Thibault et al. 2004; Indrio et al. 2007; Morisset et al. 2011). U předčasně narozených dětí byla fermentovaná kojenecká výživa založená na stejných bakteriálních kmenech dána do souvislosti se zlepšením GIT tolerance, což se projevilo méně častou distenzí břicha (Campeotto et al. 2011).

Doplněním o GOS a FOS v poměru 9:1 prokazoval tento stejný typ kojenecké výživy vliv na vyšší hladinu sekrečního imunoglobulinu A ve stolici, nižší pH stolice a také na složení střevní mikrobioty, která se svým složením podobala více mikrobiotě výlučně kojených dětí (Béghin et al. 2021).

Počáteční kojeneckou výživu obsahující postbiotikum, konkrétně tepelně inaktivované buňky kmene *B. lactis* CECT8145, je v této době možné najít na evropském trhu. Zdravotní účinek konzumace této kojenecké výživy byl zkoumán v porovnání s účinkem mateřského mléka a standartní nedoplněné kojenecké výživy. U kojenců přijímajících fortifikovanou kojeneckou výživu byl zaznamenám významně nižší výskyt epizod atopické dermatitidy, bronchitidy a bronchiolitidy než u kojenců krmených nefortifikovanou kojeneckou výživou (Plaza-Diaz et al. 2023).

3.3.5 Trh s náhradní kojeneckou výživou

V dnešní době je možné si vybrat z široké nabídky náhradních počátečních a pokračovacích kojeneckých výživ, které se liší výrobcem, složením, specializací pro různá zdravotní omezení, svou konzistencí, velikostí balení, způsobem přípravy a cenou. V pevných obchodech, stejně jako v ochodech internetových, které v rámci svého sortimentu nabízí náhradní kojenecké výživy, dominují dvě značky – Nestlé BEBA a Nutrilon. Obchody nabízejí rovněž celou řadu menších značek, ze kterých je možné jmenovat např. HiPP, Kendamill, Sunar, Hami, Babybio a další.

Značka Nestlé BEBA přišla na trh se dvěma hlavními produktovými řadami počátečních a pokračovacích kojeneckých výživ, COMFORT HMO a SUPREMEpro 6HMO. Obě řady jsou dostupné v instantní i tekuté výrobě, které se liší složením. Instantní forma COMFORT HMO obsahuje 2'FL v kombinaci s *L. reuteri* DSM 17938. Její tekutá podoba je doplněna pouze o 2'FL. Oproti tomu SUPREMEpro 6HMO, jak lze vyčíst už z názvu, obsahuje šest druhů HiMO, konkrétně 2'FL, 3FL, LNnT, DFL a sodné soli 3'SL a 6'SL. Dále je fortifikována probiotickými kmeny *B. infantis* LMG 11588 a *B. lactis* CNCM I-3446. Tekutá podoba je opět chudší o probiotické složky. Na trhu je rovněž dostupná řada OPTIPRO obsahující *B. lactis* CNCM I-3446. Značka Nestlé BEBA na trh přináší rovněž rozsáhlou řadu speciálních kojeneckých výživ určených pro kojence trpících laktózovou intolerancí, zácpou a drobných zažívacích potížích, ublinkávání a pro kojence s rizikem vzniku alergie na mléčnou bílkovinu. Speciální řady kojeneckých náhradních výživ jsou všechny obohaceny o *L. reuteri* DSM 17938, přičemž kojenecká výživa určená k použití v případě zažívacích problému rovněž GOS a FOS v poměru 9:1. V neposlední řadě jsou na trh uvedeny kojenecké výživy určené pro předčasně narozené děti obsahující *B. lactis* CNCM I-3446 v případě, že jde o výživu určenou pro kojence, kteří nemohou být kojeni, nebo bez doplnění o probiotické či prebiotické složky pro kojence, kteří jsou kojeni.

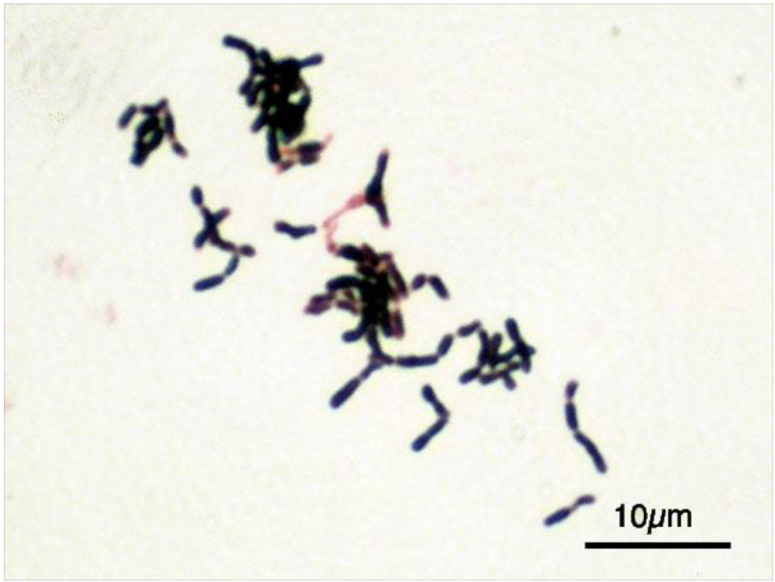
Značka Nutrilon konkuruje na trhu rovněž se dvěma hlavními produktovými řadami Advanced a Profutura DUOBIOTIK, jenž jsou k dostání pouze v instantní formě a které odlišují svým konceptem z hlediska obsahu probiotik a prebiotik od konkurenční značky BEBA. Obě řady jsou doplněny pouze o probiotické složky, konkrétně o GOS, FOS a 3'GL, jejichž koncentrace se mezi výživami Advanced a Profutura DUOBIOTIK liší. Profutura DUOBIOTIK navíc obsahuje 2'FL. Nutrilon pracuje pouze s probiotický kmenem *B. breve* M-

16V, kterým jsou doplněny kojenecké náhradní výživy určené pro kojence s rizikem vzniku alergie na mléčnou bílkovinu a pro kojence narozené pomocí císařského řezu. Obě tyto speciální řady jsou rovněž doplněny o GOS a FOS, v případě výživy pro kojence narozené císařským řezem i o 2'FL. Řada speciálních kojeneckých výživ zahrnuje rovněž variantu bez laktózy, dále speciální výživu určenou při problémech s ublinkáváním a také výživu pro kojence s poruchami trávení, vstřebání a při alergii na bílkovinu kravského mléka.

Značka Hipp nabízí náhradní počáteční a pokračovací kojenecké výživy obsahující *L. fermentum* CECT5716 v kombinaci s GOS. Kedamil oproti tomu na trhu prosazuje kojenecké náhradní výživy obsahující pouze prebiotickou složku tvořenou z GOS, FOS a 3'GL. Sunar přišel s nabídkou synbiotické počáteční kojenecké výživy Sensitiv obsahující *B. longum* BB536 s GOS a s prebiotickou variantou obsahující pouze GOS. Ostatní minoritní značky dále nabízí např. kombinaci *B. lactis*, GOS a FOS (Babybio), 2'FL a LNnT (Alrhéra) či *B. lactis* s GOS a 2'FL (Beggs).

3.4 *Bifidobacterium* spp.

Bifidobakterie jsou gram pozitivní, nepohyblivé, nesporulující, anaerobní, sacharolytické bakterie s vysokým obsahem GC bází v jaderném DNA. Název bifidobakterií se odvíjí od jejich neobvyklého bifidního neboli rozštěpeného tvaru buňky, který je také často přirovnáván k písmenu Y. Polymorfie bifidobakterií se odvíjí od podmínek vnějšího prostředí, na základě kterého nabývají tvaru rozvětveného, tyčinkovitého či vícenásobně rozvětvené tyčinky (viz. obrázek č. 3). Jejich morfologie byla popsána již v roce 1899, kdy byl první bifidobakteriální druh izolován ze vzorku stolice kojence (Turroni et al. 2018). Rod *Bifidobacterium* se taxonomicky řadí do čeledi *Bifidobacteriaceae*, řádu Bifidobacteriales, třídy Actinomycetes, kmene Actinomycetota spadajícího do říše bakterií. Samotný rod *Bifidobacterium* v současnosti čítá celkem 137 uznaných druhů, čímž se stává nejhlouběji rozvětvenou linií v rámci kmene Actinomycetota (Alessandri et al. 2021; LPSN.dsmz 2024).



Obrázek č. 3 – *B. adolescentis* ATCC 15703 (Y tamble 2024).

Bifidobakterie byly izolovány z různých ekologických nik, mezi které se řadí trávicí trakt hmyzu utvářející společenstva, ryb, plazů, ptáků, syrové mléko a sýry z něj vyrobeného, vodní kefír a odpadní vody (Biavati et al. 1982; Delcenserie et al. 2007; Kopečný et al. 2010; Laureys et al. 2016). V rámci lidského těla byly bifidobakterie izolovány z prostředí vagíny, mateřského mléka, krve či dutiny ústní (Hoyles et al. 2002; Martín et al. 2009; Ventura et al. 2009; Freitas & Hill 2017). Nicméně nejpřirozenější prostředí ke kolonizaci představuje pro většinu bifidobakteriálních druhů GIT člověka a dalších savců (Milani et al. 2017). Schopnost bifidobakterií adaptovat se v rozmanitých ekologických nikách zřejmě vyplývá ze skutečnosti, že genom rodu *Bifidobacterium* zahrnuje celou řadu genů kódujících sacharolytické enzymy, což jeho zástupcům umožňuje přístup k široké paletě jednoduchých i složitých glykanů, které jsou přítomny v substrátu, pochází z potravy hostitele nebo jsou původem od hostitele (Turroni et al. 2018). Zástupci rodu *Bifidobacterium* se řadí mezi první kolonizátory GIT novorozence a během prvních měsíců tvoří hlavní podíl populace střevní mikrobioty kojenců. Kolonizace bifidobakteriemi v raném věku je ovlivněna mnoha faktory, přičemž mezi ty pozitivní patří plné donošení, vaginální porod či kojení. Jejich druhové i početní zastoupení ve střevní mikrobiotě se s rostoucím věkem mění, přičemž v dospělém období života se jejich relativní četnost ustálí na 2-14 %. Ve stáří se počty bifidobakterií začínají opět snižovat (Arboleya et al. 2016).

K tomu, aby bifidobakterie mohly úspěšně kolonizovat GIT savců, u nich muselo dojít k vývinu řady adaptivních mechanismů, které jim umožnily čelit mnoha nepříznivým podmínkám, kterým jsou při průchodu trávicím ústrojím vystaveny. Hrozbu pro ně představuje zejména působení kyslíku a jeho volných radikálů, organických kyselin, žlučových solí a kyselin a trávicích enzymů. Genom bifidobakterií neobsahuje geny kódující NADH peroxidázu, katalázu či superoxid dismutázu, které jsou u většiny anaerobních bakterií zodpovědné za obranu proti reaktivní formě kyslíku. Předpokládá se, že u bifidobakterií je aktivován alternativní mechanismus umožňující ochranu buněčných komponentů před poškozením vyvolaným oxidačním stresem. Rozhodující je v případě těchto bakterií pravděpodobně tvorba enzymů alkylhydroperoxidreduktázy, thioredoxinreduktázy a NADH oxidázy, a také přítomnost zvláštního souboru proteinů, které hrají klíčovou roli v několika posttranslačních událostech, aby zabránily denaturaci, agregaci a nesprávnému skládání proteinů v případě působení stresu (Zuo et al. 2018). Tolerance vůči nízkému pH je u bifidobakterií dána aktivitou enzymu F_0F_1-ATPázy, který zajišťuje udržení homeostázy pH intracelulárního prostředí buňky pomocí aktivního vytlačování vodíkových protonů (Matsumoto et al. 2004). Jako ochranu vůči žlučovým kyselinám a jejich solím, které díky svým emulgačním vlastnostem mohou narušit integritu buněčných membrán a pronikat do cytoplazmy, využívají bifidobakterie produkci hydroláz žlučových solí a tvorbu biofilm. Kromě toho mohou modulovat složení membránových lipidů a tím snižovat propustnost buněčné stěny, a rovněž využívat efluxní membránové pumpy k odčerpávání žluči z cytoplazmy ven (Ruiz et al. 2013). Předpokládá se, že některé druhy bifidobakterií produkují inhibitory serinových proteáz, které je chrání před hostitelovými proteázami, což jim poskytuje výhodu v konkurenčním prostředí střev (Alvarez-Martin et al. 2012).

3.4.1 Kolonizace střevního prostředí

Kolonizace střevního prostředí hostitele mikroorganismy začíná již brzy po narození, kdy po vyčerpání kyslíku z lumenu střev dochází k rozsáhlé kolonizaci anaerobními mikroorganismy, mezi nimiž dominují právě bifidobakterie. Jejich dominantní zastoupení ve střevní mikrobiotě kojenců je dáno především jejich jedinečnými metabolickými schopnostmi, ale také jejich extracelulárními strukturami, vylučovanými enzymy a bioaktivními molekulami (Kline et al. 2010). Interakce bifidobakterií s hostitelem a butyrát produkujícími mikroorganismy, které mají vliv na imunitní systém hostitele, jsou znázorněny na obrázku č. 4.

3.4.1.1 Extracelulární struktury

Extracelulární struktury, především pili, se z velké části podílí na interakcích mezi hostitelem a mikroorganismem. Pili jsou definovány jako neflagelární, bílkovinné, vícesubjednotkové povrchové přívěsky vláskovitého tvaru, které bakteriím umožňují především adhezi na různorodé povrchy, bakteriální buňky nebo na buňky hostitele (Kline et al. 2010). V rámci rodu *Bifidobacterium* byly popsány dva druhy pilusů – na sortáze závislé pili a pili typu IV neboli Tad pil.

Název na sortáze závislých pilusů se odvíjí od způsobu jejich stavby, při které je enzym sortáza zodpovědná za polymeraci stavebních podjednotek pilu a následné ukotvení polymeru k buněčnému povrchu (Spirig et al. 2011). Tyto povrchové přívěsky hrají zásadní roli při adhezi na povrch střevního epitelu hostitele, přes který mohou ovlivňovat slizniční imunitní odpověď. Pili druhu *B. bifidum* PRL2010 propůjčují jedinečnou vlastnost modulovat specifické reakce hostitele na mikroorganismus. Bylo zjištěno, že vyvolávají zvýšenou produkci cytokinů TNF-α, které jsou spojovány s výskytem zánětlivých onemocnění, ale zřejmě hrají důležitou roli i při odmítání nádorů a při reakci na infekce (Turroni et al. 2013). Druhý typ pilusů Tad byl doposud charakterizován pouze u druhu *B. breve* UCC2003. Jejich přítomnost se rovněž zdá esenciální pro kolonizaci střevního prostředí a dlouhodobou perzistenci bifidobakterií (O'Connell Motherway et al. 2011).

Dalšími extracelulárními strukturami jsou exopolysacharidy, jejichž prospěšná role při modulaci různých aspektů interakce mezi bifidobakteriemi a hostitelem byla popsána u kmene *B. breve* UCC2003. Přítomnost exopolysacharidů umožňuje daným bakteriím zůstat imunologicky tiché, a naopak poskytovat hostiteli ochranu před patogeny (Fanning et al. 2012).

3.4.1.2 Metabolismus lidských glykanů

Klíčovou vlastností bifidobakterií je jejich schopnost metabolizovat řadu glykanů přijímaných ze stravy hostitele nebo přímo původem od hostitele. Schopnost vybraných zástupců rodu *Bifidobacterium* využívat HMO jako růstový substrát, je předurčuje jako dominantní kolonizátory střevního prostředí kojenců kojených mateřským mlékem (Turroni et al. 2018).

Mléčné glykany jsou první prebiotickou složkou, se kterou se střevní mikrobiota kojence setkává, nicméně pouze malá část mikroorganismů umí HMO metabolizovat. Právě druhy bifidobakterií charakteristických pro kojeneckou mikrobiotu, např. *B. infantis*, mají ve svém genomu zahrnutý tzv. HMO klastr, který kóduje řadu katabolických enzymů, které jsou určeny

pro utilizaci HMO. Konkrétně se jedná se o enzymy ze skupiny fukosidáz, sialydáz, *β*-hexózaaminidáz, *β*-galaktosidáz a lakto-*N*-biosidáz (Turroni et al. 2018). Souhrnně lze tento komplex enzymů zahrnou do skupiny glykosidových hydroláz, jejichž účelem je zjednodušeně řečeno štěpit glykosidické vazby mezi jednotlivými strukturami HMO. Přítomnost genů kódující glykosidické enzymy zodpovědných za degradaci HMO však nemusí znamenat schopnost produkce aktivních enzymů (Kiely et al. 2023).

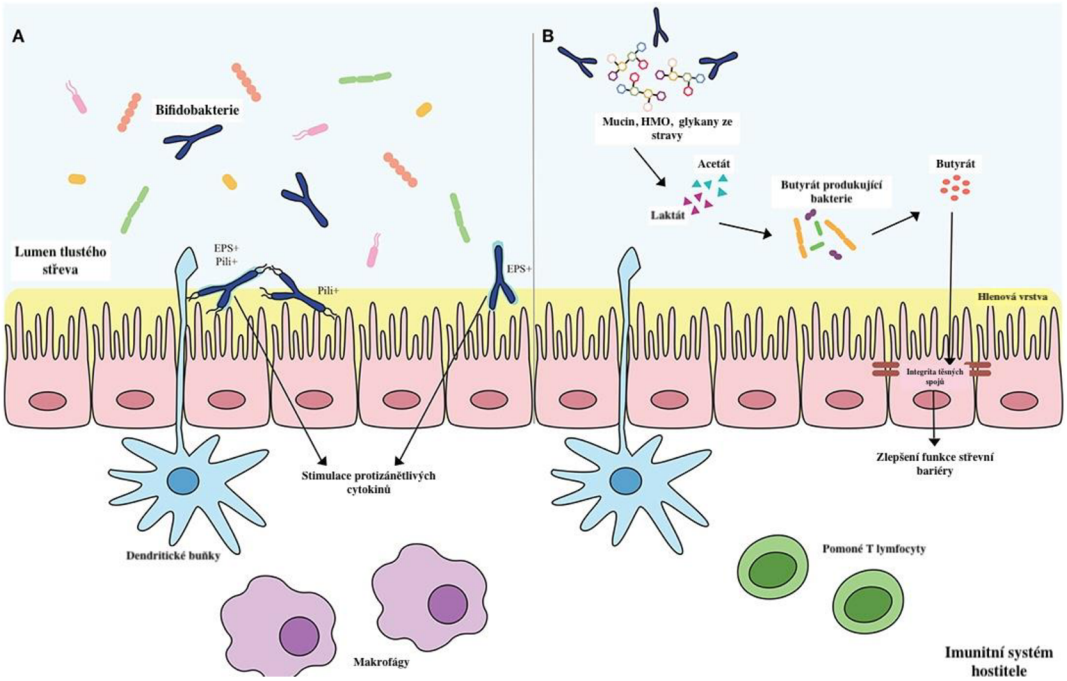
Metabolismus HMO může probíhat intracelulárně nebo extracelulárně v závislosti na metabolické strategii daného bakteriálního druhu, která se odvíjí od jejich genetického základu. Intracelulární degradace spočívá v přenosu molekuly HMO do buňky pomocí ABC (ATP Binding Cassette) transportního proteinu, kde jsou pomocí příslušných glykosidických hydroláz rozkládány na jednodušší molekuly. Popsaný styl degradace je typický pro většinu bifidobakterií, zejména pro *B. infantis*, ale také pro *B. breve* a některé laktobacily. Extracelulární degradace probíhá vně buňky za působení glykosidických hydroláz buněčné stěny. Uvolněné podjednotky mohou být transportovány do buňky, která degradaci zprostředkovala, nebo mohou být využity okolními mikroorganismy. Druhý způsob byl pozorován například u druhu *B. bifidum* (Kiely et al. 2023). Obecně bifidobakterie preferují intracelulární způsob degradace, čímž získávají konkurenční výhodu nad ostatními mikroorganismy tlustého střeva, které degradují sacharidy extracelulárně. Jakmile se monosacharidy hexózy dostanou do cytoplazmy, jsou přeměňovány na acetát a laktát tzv. „bifid shunt“ cestou, při které hraje klíčovou roli enzym fruktóza-6-fosfátfosfoketoláza (Rivière et al. 2016).

Dalším degradovatelným lidským glykanem jsou muciny, které tvoří část hlenové vrstvy na povrchu střevní sliznice a jsou tvořeny monosacharidovými složkami *N*-acetylglukosaminem, *N*-acetylgalaktosaminem, fukózou a glukózou, které mohou být doplněny kyselinou sialovou a/nebo sulfátovými skupinami. Schopnost metabolizovat muciny vyžaduje poměrně rozsáhlý repertoár glykosidových hydroláz. Bylo prokázáno, že řada střevních bakterií, včetně bifidobakterií, dokáže degradovat tento hostitelem produkovaný glykan. V rámci rodu *Bifidobacterium* byla tato schopnost potvrzena pouze u druhu *B. bifidum* (Turroni et al. 2010; Turroni et al. 2018).

Koncovými produkty metabolismu bifidobakterií jsou SCFA a laktát. Z SCFA se jedná především o acetát, ale za daných okolností dochází v menší míře k produkci řady dalších organických sloučenin, např. formátu, ethanolu či sukcinátu. SCFA snižují střevní pH, čímž inhibují růst a aktivitu patogenních mikroorganismů. Většina SCFA, především propionát a acetát, jsou absorbovány střevní sliznicí a skrze portální žílu jsou transportovány do jater, kde podléhají lipogenezi a glukoneogenezi. Nicméně část metabolitů je využita jako substrát okolní mikrobiotou (Egan et al. 2014).

Bifidobakterie se v rámci interakce s ostatními členy střevní mikrobioty podílí na tvz. cross-feedingu, ve kterém hrají roli producentů jednodušších molekul, které mohou sloužit okolním mikroorganismům jako metabolický substrát. Například acetát a laktát, koncové produkty metabolismu bifidobakterií, mohou být využity jako substrát pro butyrát produkující bakterie, jimiž jsou například *F. prausnitzii* či *Roseburia* spp. Podrobný popis produkce butyrátu a jeho vlivu na střevní zdraví je popsán v podkapitole Vliv produktů metabolismu. Cross-feeding byl popsán rovněž mezi bifidobakteriemi navzájem. Bylo poukázáno na schopnost *B. breve* UCC2003 využívat kyselinu sialovou, která byla uvolněna z 3’SL kmenem

B. bifidum PRL2010 (Egan et al. 2014; Turroni et al. 2015). Dále byla *in vitro* testováním prokázána schopnost *B. bifidum* PRL2010 přijímat cukry uvolněné činností *B. adolescentis* 22L, *B. breve* 12L a *Bifidobacterium thermophilum* JCM1207 při rozkladu škrobu a/nebo xylanu (Turroti et al. 2015).



Obrázek č. 4 – přímý a nepřímý vliv bifidobakterií přítomných v prostředí tlustého střeva na imunitu hostitele. Interakce bifidobakterií s hostitelem skrze extracelulární struktury (A). Systém cross-feeding fungující mezi bifidobakteriemi a bakteriemi produkujícími butyrát (B). Použité zkratky: EPS+ – extrapolysacharidy (Alessandri et al. 2019) – pozn.: volně přeloženo z angličtiny.

3.4.2 Kojenecké bifidobakterie

Druhy bifidobakterií je možné dělit dle jejich zastoupení ve střevní mikrobiotě v závislosti na věku jedince. U dospělých jedinců se typicky vyskytují druhy *Bifidobacterium catenulatum* či *B. adolescentis*. Oproti střevní mikrobiotě dospělých jedinců je druhové složení bifidobakterií a jejich početní zastoupení u kojenců odlišné. Toto dělení je nicméně pouze orientační, striktní dělení na druhy kojenecké a dospělé neexistuje (Turroni et al. 2018).

3.4.2.1 *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

B. infantis je považován za jeden z nejvíce charakteristických druhů bifidobakterií, který kolonizuje střevní prostředí kojených dětí. Jeho význam je dán především schopností metabolizovat širokou škálu HMO, což je dáno HMO klastrem, který kóduje všechny potřebné gykosidické hydrolázy (Sela et al. 2008). Schopnost růstu jednotlivých kmenů *B. infantis* na HMO, jako jediném zdroji uhlíku, byla prokázána několika studiemi. Významný růst byl pozorován za přítomnosti 2'FL, 3FL, LNT, LNnT, 3'-SL, 6'SL, lakto-*N*-fukopenózy-I (LNFP-

I) a laktodifukotetraózy (LDFT) (Asakuma et al. 2011; Cheng et al. 2020; Kiely et al. 2023; LoCascio et al. 2009).

B. infantis vykazuje pozitivní vliv na zdraví kojenců několika mechanismy. Prvním je jeho konkurenční výhoda v přítomnosti HMO, která ústí ve zvýšenou kolonizaci *B. infantis* a snížení diverzity střevní mikrobioty a menšímu počtu patogenů. *In vitro* studie rovněž naznačila, že růst *B. infantis* na HMO podporuje jejich přilnavost ke střevnímu epitelu, což by zvyšovalo jejich kolonizační a konkurenční vlastnosti (Chichlowski et al. 2012). *B. infantis* působí protizánětlivě skrze exogenní produkci látek, které urychlují zrání genů střevní vrozené imunitní odpovědi. Právě nezralá exprese genů vrozené imunitní odpovědi je považována za jeden faktorů vzniku NEC (Ganguli et al. 2013). Tento bifidobakteriální druh také vykazuje vliv na snížení střevní permeability a stabilizaci proteinů těsných spojů (Romond et al. 2008). Jak již bylo uvedeno dříve, *B. infantis* zároveň hraje důležitou roli při produkci SCFA a je důležitým článkem kojenecké střevní mikrobioty z hlediska cross-feedingu.

3.4.2.2 Ostatní druhy kojeneckých bifidobakterií

Mezi charakteristické bifidobakteriální druhy, které kolonizují převážně střevní prostředí kojenců se řadí *B. breve*, *B. longum* a *B. bifidum*. Ze vzorku kojenecké stolice byly rovněž izolovány druhy *B. kashiwanohense* a *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. Přestože jsou tyto druhy vázány na střevo kojence, jsou v porovnání se čtyřmi výše zmíněnými kojeneckými druhy identifikovány a charakterizovány pouze v malé míře (Kiely et al. 2023).

3.4.3 Trh s kojeneckými bifidobakteriálními doplňky stravy

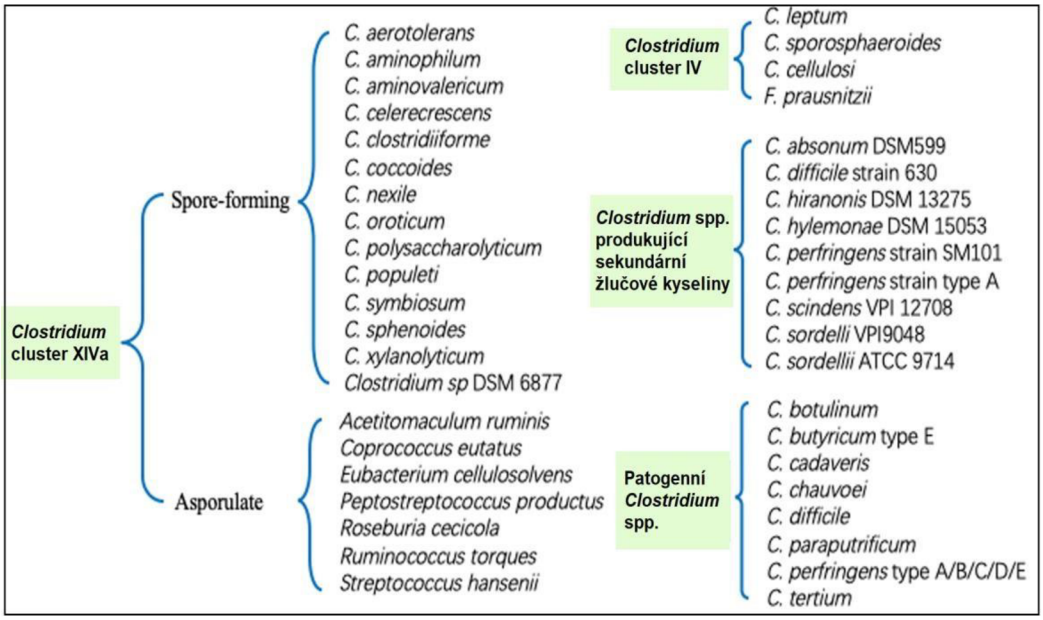
V dnešní době je na českém trhu možné bez předpisu pediatra zakoupit hned několik probiotických bifidobakteriálních přípravků určených pro kojence od 1. týdne věku a starší. Probiotické přípravky ve formě kapek jsou na trhu nejrozšířenější, a to zřejmě díky jejich snadné aplikaci. Zároveň je možné setkat se s formou tobolek či sáčků se sypkým obsahem.

Čistě bifidobakteriální přípravky se na českém trhu vykytují v menší míře zastoupení. K dostání jsou přípravky ve formě kapek obsahující samostatně kmeny *B. lactis* Bb-12, *B. breve* M-16V a kombinaci kmenů *B. breve* BR03 a *B. breve* B63. Častější jsou dostupné přípravky kombinující probiotické bifidobakteriální kmeny s kmeny laktobacilů. Kombinace kmenů *B. lactis* BS01 s *L. rhamnosus* GG, *B. lactis* s *Lactobacillus acidophilus* DDS-1, *Lactiplantibacillu plantarum* GG ATCC 53103 s *B. breve* BR03 nebo *L. casei* LC03 s *B. breve* BR03 je možné zakoupit v populární formě kapek. Ve formě tobolek se prodává kombinace *B. lactis* Bb-12 a *L. rhamnosus* GG.

Na trhu se rovněž objevily synbiotické přípravky, které obsahují FOS. Např. je jedná o tobolky a sáčky obsahující kombinaci *B. infantis, B. bifidum, B. longum, L. acidophilus, L. casei* s FOS či kapky obsahující *L. acidophilus DDS-1, B. lactis* a FOS.

3.5 *Clostridium* spp. a další klostridie

Čeleď *Clostridiaceae* se dle klasifikačního systému řadí pod kmen Firmicutes, třídu *Clostridia* a řád *Clostridiales*, přičemž sama zahrnuje několik rodů včetně rodu *Clostridium*, který se svým počtem bakteriálních druhů řadí mezi jeden z největších. Klostridie jsou tyčinkovité, Gram pozitivní, anaerobní, sporulující bakterie, které jsou neschopné disimilační redukce síranu. Na základě uvedených kritérií došlo k zařazení příslušných bakterií do rodu *Clostridium*, avšak díky analýze sekvence genu 16S rRNA byla zavedena sofistikovanější klasifikace taxonu, která uspořádává rod do 19 klastrů, z nichž jsou některé nadále rozděleny do dalších podskupin. Nově se mezi klostridiální skupiny řadí i druhy nesporulující, například *Roseburia cecicola* či *Coprococcus eutatus*. Druhy klostridiálního klastru XIVa a IV patří mezi nejpočetnější bakterie v lidském střevě, kdy zahrnují 10-40 % všech přítomných bakterií (Dürre 2007; Guo et al. 2020). Přehled klastrů XIVa a IV je znázorněn na obrázku č. 5. Druhy *Clostridium* budou v rámci práce nadále rozebírány na základě této nové klasifikace.



Obrázek č. 5 – přehled bakteriálních druhů řadících se do klostridiálního klastru XIVa a IV. Druhy *Clostridium* produkující sekundární žlučové kyseliny a patogenní druhy *Clostridium* (Guo et al. 2020) – pozn.: volně přeloženo z angličtiny.

Klostridie produkují enzymy, díky kterým jsou schopné rozkládat nestrávené polysacharidy a oligosacharidy za produkce SCFA, jejichž přítomnost je ve střevech důležitá k udržení homeostázy. Část druhů *Clostridium* je schopná produkovat toxiny a být patogenní, nicméně většina klostridií žije se svým hostitelem v komenzálním vztahu. Bakterie *Clostridium* spp. nejsou ve střevech náhodně rozptýleny, nýbrž jsou převážně koncentrovány v oblastech mezi záhyby sliznice vzestupného tlustého střeva, zatímco lumen střev je početně bohatý na čeledě *Bacteroidaceae, Enterococcaceae* a *Lactobacillaceae* (Nagano et al. 2012).

Klostridie za nepříznivých podmínek tvoří metabolicky utlumené a vysoce odolné formy zvané endospory, které jim umožňují tyto nehostinné podmínky přežít. Mezi vnější stresory,

které proces sporulace mohou vyvolat, se řadí např. extrémní teploty, vlhkost, nedostatek živin, nízké pH, kyslík, antibiotika, UV záření či jejich vzájemná kombinace. Proces germinace představuje návrat do vegetativního stádia bakteriální buňky, která je indukována přítomností germinantů v prostředí, jimiž jsou například živiny (Egan et al. 2021). Sporulující bakterie se díky své odolnosti snadno šíří v prostředí, kdy dochází k přenosu mezi rozdílnými ekologickými nikami a časté výměně mezi organismy včetně člověka (Tetz a Tetz 2017). Bylo zjištěno, že schopností tvořit endospory je vybaveno 50-60 % střevních bakteriálních rodů (Appert et al. 2020), což reprezentuje zhruba 30 % celkové střevní mikrobioty. Schopnost sporulace v rámci lidské střevní mikrobioty byla zjištěna napříč čeleděmi *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* a *Bacillaceae* (Egan et al. 2021).

3.5.1 Kolonizace klostridiemi

Klostridie se řadí mezi prvotní bakteriální kolonizátory střeva novorozence, jejich přítomnost ve stolici můžeme detekovat již během prvního týdne života, kdy se jedná především o *Clostridium butyricum* (*C. butyricum*), *Clostridium paraputrificum* (*C. paraputrificum*) a *Cl. difficile* (Guo et al. 2020). V rámci charakteristiky fekální sporobioty zdravých kojenců byly s vysokou frekvencí identifikovány také druhy *Clostridium tertium, Clostridium symbiosum* a *Clostridium ramosum*. Mezi vzácně identifikovány druhy se naopak řadí *Enterocloster bolteae*, *Clostridium baratii* a *Clostridium jeddahense* (Ingribelli et al. 2023).

Větší množství a častější výskyt jmenovaných druhů, společně s *C. tetrium*, byl pozorován první měsíc po narození u dětí krmených kojeneckou výživou oproti dětem kojeným mateřským mlékem (Tonooka et al. 2005). Kojení jedinci prokazují celkově nižší stupeň kolonizace klostridiemi v porovnání s těmi krmenými kojeneckou náhradní výživou (Albenberg & Wu 2014). Znatelný vliv má rovněž způsob porodu, kdy u dětí narozených pomocí císařského řezu byl zaznamenám během prvních šesti měsíců zvýšený výskyt *Clostridium* g4 a *Cl. difficile* (Lee et al. 2016). Během prvního týdne života dochází k postupnému vyčerpání kyslíku ve střevech novorozence, což umožňuje osídlení anaerobními bakteriemi, mezi které rovněž patří *Clostridium* spp. (Alipour et al. 2018).

Nicméně není jisté, zda jsou všechny klostridie schopné dlouhodobě kolonizovat prostředí střev. Příkladem může být druh *C. butyricum*, u kterého v rámci výzkumu došlo pouze k vyklíčení a růstu, avšak nikoli k osídlení střev zkoumaného organismu (Guo et al. 2020).

3.5.2 Pozitivní vliv *Clostridium* spp. na zdraví

Komenzální druhy klostridií interagují s dalšími mikroorganismy střevního prostředí a poskytují specifické a esenciální funkce, kterými přispívají k udržení střevní homeostázy. Stálost prostředí ovlivňují přímo působením na buňky imunitního systému a nepřímo skrze produkty metabolismu (Guo et al. 2020).

3.5.2.1 Přímý vliv na buňky imunitního systému

Střevní epiteliální buňky představují první linii styku mezi hostem a střevní mikrobiotou. Tato jednovrstvá buněčná stěna pokrytá hlenovou vrstvou vykonává důležitou preventivní bariérovou funkci zabraňující adhezi a invazi střevních bakterií a zároveň podporuje

koexistenci mezi střevní mikrobiotou a hostem. Fyziologický stav střevních epiteliálních buněk, společně s celistvostí a vývojem celé střevní bariéry, se odvíjí od tohoto vztahu. Správně regulovaná odpověď na přítomnost střevních mikroorganismů a jejich metabolitů je důležitým aspektem ve zdraví člověka (Korecka et al. 2013). Intraepiteliální lymfocyty a buňky produkující imunoglobulin A hrají v tlustém střevě důležitou roli při utváření odpovídající imunologické odpovědi vyvolané pozřenými antigeny či patogeny. Klostridie podporují rozvoj těchto buněk skrze produkci SCFA a sekundárních žlučových kyselin, jejichž hladinu následně zaznamenávají epitelové buňky, které v návaznosti na danou koncentraci zahajují imunologickou signalizaci (Lopetuso et al. 2013).

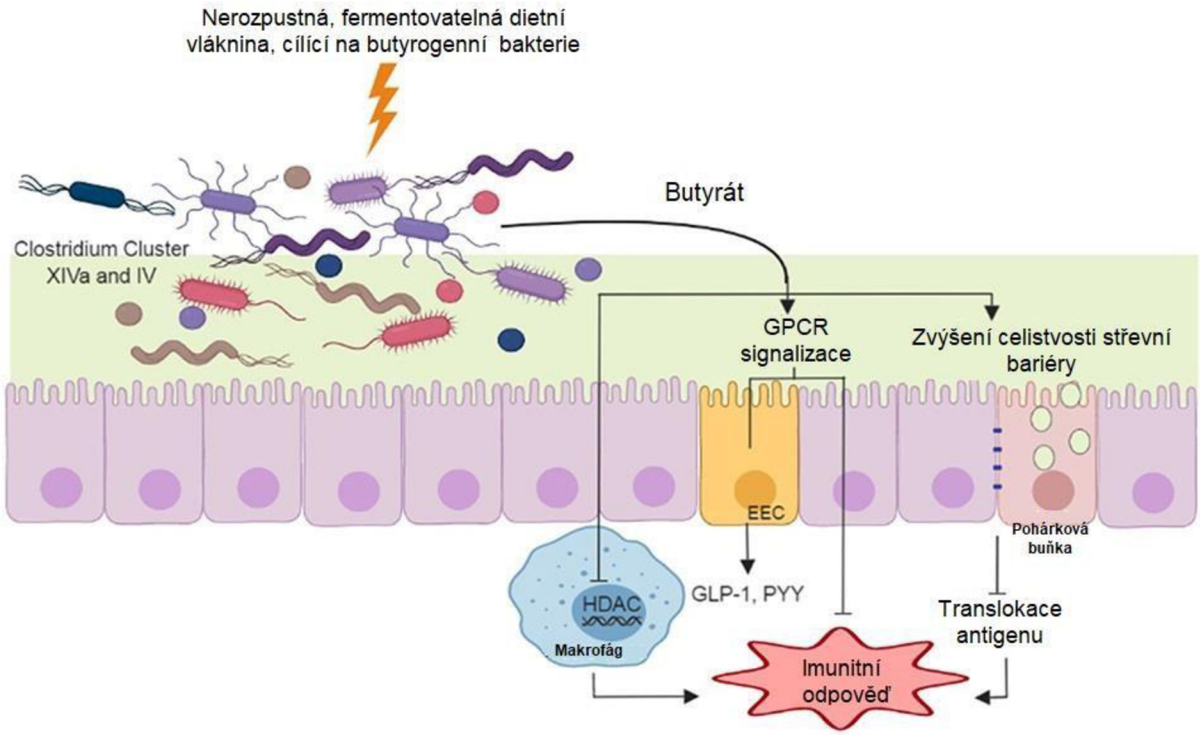
Regulační T buňky patří mezi nejvýznamnější regulační buňky v lidském těle, které sehrávají roli v udržování střevní homeostázy, kontrole zánětlivých reakcí a zachování tolerance vůči střevní mikrobiotě. V rámci lidského těla jich je nejvíce zastoupeno ve střevní bariéře, konkrétně ve vrstvě lamina propria. Toto uspořádání naznačuje, že střevní mikrobiota má vliv na jejich akumulaci a funkci. Výzkumy naznačují, že právě bakteriální druhy klostridiálních klastrů XIVa a IV vykazují významný vliv na hromadění T buněk. U pacientů s diagnostikovanou Crohnovou nemocí byl zaznamenám výrazně nižší počet bakterií klostridiálních klastrů XIVa a IV, kde se jednalo především o *F. prausnitzii*. Naopak tomu bylo u experimentálních modelů se zvýšeným množstvím bakteriálních druhů jmenovaných klastrů, u kterých došlo k resistenci vůči alergiím a střevním zánětům (Atarashi et al. 2011; Lopetuso et al. 2013).

3.5.2.2 Vliv produktů metabolismu

Klostridiální druhy jsou chemoorganotrofní bakterie, které v lidském střevě fermentují především nestrávené polysacharidy za produkce SCFA a dalších látek, ze kterých má většina pozitivní vliv na zdraví střev (Guo et al. 2020). Vyprodukované metabolity slouží jako důležitý zdroj energie pro epiteliální buňky, rovněž mají rozmanité regulační schopnosti a vykazují vliv na fyziologii hosta a jeho imunitu. Jedná se především o acetát, propionát a butyrát, který zastává nejvýznamnější funkci (Appert et al. 2020).

Butyrát je hlavním produktem fermentace u mnoha klostridií (Dürre 2014). Většina butyrátu vzniká z karbohydrátů skrze glukózu, po které následuje přeměna acetylu-CoA na butyryl-CoA. Tvorba butyrátu z butyryl-CoA je možná dvěma cestami, které se odlišují zúčastněnými enzymy a vstupními látkami. První cesta potřebuje pro tvorbu butyrátu exogenní acetát a probíhá za účasti enzymu butyryl CoA:acetát CoA-transferázy. Tato cesta je využívána 85 % butyrát produkujícími bakteriemi střevní mikrobioty dospělého člověka, mezi které se řadí například *F. praustnizii* nebo *Roseburia* spp.. Druhá cesta produkce butyrátu zahrnuje enzymy fosfotransbutyrylázu a butyrát kinázu a je využívána endosporulujícími bakteriemi *Clostridium* sensu stricto, jimiž se myslí například *C. butyricum* a *C. paraputrificum*, a také bakteriemi z čeledě *Peptostreptococcaceae*, zahrnující například *Cl. difficile* (Appert et al. 2020). Pro prosperitu butyrát produkujících bakterií jsou rovněž důležité ostatní produkty fermentace, zejména již zmíněný acetát, jenž je produkován většinou střevních bakterií, ale také laktát, který je metabolitem probiotických bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení. Oba tyto metabolity mohou být využity jako substrát pro tvorbu butyrátu a podporovat růst butyrát produkující populace (Fu et al. 2019).

Bakterie schopné produkovat butyrát jsou rozeseté napříč několika klostridiálními klastry, nicméně mezi nejdůležitější se řadí klastr IV, v čele s *F. prausnitzii* a klastr XIVa, zahrnující *Roseburia* spp. Butyrát je hlavním zdrojem energie pro kolonocyty, který přímo ovlivňuje jejich růst a diferenciaci. Zároveň přispívá k udržení střevní homeostázy, kdy přesný mechanismus akce není zcela objasněn, nicméně má se za to, že butyrát ovlivňuje funkci buněk skrze regulaci exprese genů. Ukázalo se, že zastává důležitou roli při modulaci imunitní a zánětlivé reakce. Mezi nejlépe prostudované protizánětlivé mechanismy se řadí proces, kdy butyrát inhibuje nukleární faktor kappa B (NF-κB), který kontroluje expresi genů kódujících informaci pro prozánětlivé cytokiny, enzymy indukující zánět, adhezní molekuly, růstové faktory, proteiny teplotního šoku a imunitní receptory. Ochranou funkci střevní bariéry podporuje butyrát stimulací produkce hlenu, jehož vrstva chrání střevní epitel proti střevním patogenům. Navíc moduluje expresi proteinů těsných spojů, čímž se minimalizuje mezibuněčná propustnost. Podpora funkce střevní bariéry butyrátem je znázorněna na obrázku č. 6. Butyrát má funkci jako antioxidant, redukuje oxidativní stres vyvolaný zánětem tlustého střeva, který může souviset s narušením střevní bariéry nebo může být příznakem rakoviny. Několik studií poukázalo na spojitost mezi prevencí kolorektálního karcinomu a butyrátem, jenž je schopen indukovat buněčnou apoptózu a zastavit buněčný cyklus. Dle posledních výzkumů by se mohl butyrát navíc podílet na snižování nadváhy člověka a zvýšení senzitivity k inzulinu (Leonel a Alvarez-Leite 2012; Fu et al. 2019).



Obrázek č. 6 – podpora funkce střevní bariéry skrze butyrát produkující bakterie. Použité zkratky: EEC – enteroendokrinní buňka (enteroendocrine cell), GLP-1 – glukagonu podobný peptid-1 (glucagon-like peptide-1), GPCR – receptor spřažený s G proteinem (G protein-coupled with receptor), HDAC – histon deacetyláza (histone deacetylase), PYY – peptid YY (peptide YY) (Cantu-Jungles et al. 2019) – pozn.: volně přeloženo z angličtiny.

3.5.3 Patogenní klostridie

Klostridie mají bezesporu mnoho pozitivních účinků na zdraví člověka, avšak některé druhy vykazují značnou patogenitu. Jedná se především o *Cl. difficile*, *C. perfringens* a *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) (Guo et al. 2020).

Cl. difficile je celosvětově jedním z nejčastějších původců nozokomiálního průjmového onemocnění. Náchylnost k infekcím způsobených *Cl. difficile* se zvyšuje hospitalizací, dlouhodobým pobytem ve zdravotním zařízení, ale především užíváním širokospektrálních antibiotik, která narušují složení a fungování střevní mikrobioty, což má za následek snížení schopnosti pacienta bránit se kolonizaci různými patogeny (Kochan et al. 2018). Vegetativní forma *Cl. difficile* produkuje dva toxiny, toxin A a toxin B. Toxin A působí především na střevní epitel a způsobuje sekreci tekutin, zánět a nekrózu tkáně, zatímco toxin B účinkuje jako potencionální cytotoxin (Heinlen & Ballard 2010).

C. perfringens je bakterie vyskytující se především v půdě, v trávicím traktu lidí a zvířat. *C. perfringens* produkuje čtyři druhy toxinů (α, β, ε, ι) a některé enterotoxiny, na základě jejichž tvorby se *C. perfringens* dělí do pěti skupin (A až E), z nichž nejčastěji se vyskytujícím patogenem u člověka je typ A (Ohtani & Shimizu 2016). U lidí i zvířat způsobuje řadu závažných systémových a střevních chorob, mezi které se řadí plynová gangréna (klostridiální myonekróza), otrava jídlem, průjem a enterokolitida (Kiu & Hall 2018).

C. botulinum vytváří vysoce silný neurotoxický jed botulotoxin způsobující onemocnění potravinový, kojenecký a ranný botulismus. Potravinový botulismus je způsoben pozřením již vzniklého toxinu v potravině, čímž se liší od kojeneckého a raného botulismu, v jejichž případě vzniká toxin *in situ*. Spory *C. botulinum* mohou být obsaženy v medu, proto by neměl být konzumován dětmi mladšími prvního roku. Takto mladé děti nemají dostatečně vyvinutou střevní mikrobiotu, která by pomnožení *C. botulinum* ve střevním prostředí zabránila. Symptomy botulismu jsou především neurologické a můžou vést až k paralýze dýchacího a srdečního svalu (Arnon et al. 1979; Peck et al. 2011).

Mezi další patogenní druhy klostridií se řadí *C. butyricum*, *C. tetrium* a *C. paraputrificum*, které jsou spojovány se vznikem nekrotizující enterokolitidy u předčasně narozených novorozenců (Guo et al. 2020).

3.6 Antimikrobiální aktivita bifidobakterií vůči klostridiím

Střevní dysbióza, která může nastat např. po terapii antibiotiky či u předčasně narozených dětí s velmi nízkou hmotností, může vyústit ve vznik infekčních a zánětlivých onemocnění zažívacího traktu, na kterých se nezřídka kdy podílí patologické druhy klostridií. V případě patologického stavu NEC, jehož vznik je velmi nebezpečný zejména pro předčasně narozené děti, byl několika studii poukázán vliv *C. butyricum* na jeho propuknutí (Cassir et al. 2015; Sato et al. 2018). Infekční příčinnou průjmu způsobeného užíváním antibiotik (AAD, antibiotic-associated diarrhea) je především *Cl. difficile* a v menší míře také *C. perfringens* (Asha et al. 2006). Studie ukázaly, že užívání probiotik může vést v obou případech ke zmírnění stavu (Newberry 2012; Lau & Chamberlain 2015). Mechanismus účinku, který se liší v závislosti na použitém probiotickém kmeni, nicméně není zcela objasněn. Tato část práce se věnuje přehledu

studií, které se zabývaly antimikrobiálním působení bifidobakterií vůči patologickým druhům klostridií.

V roce 2016 testovali Valdés-Varela et al. *in vitro* potenciál kmenů *B. longum* IPLA20022, *B. breve* IPLA20006, *B. bifidum* IPLA20015 a *B. lactis* Bb12 pro inhibici růstu a toxicity *Cl. difficile* na různých zdrojích uhlíku, konkrétně na glukóze, inulinu a dvou komerčních prebiotických přípravcích, jednom obsahující inulin a oligofruktózu a druhém obsahující FOS s krátkým řetězcem. Množství klostridií a bifidobakterií bylo kultivaci stanoveno pomoví kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR, real-time polymerase chain reaction). Dále bylo stanoveno pH a hladina SCFA. Výrazné snížení růst patogenu bylo pozorováno u kultivace společně s *B. longum* IPLA20022 a *B. breve* IPLA20006 v přítomnost SCFA. Tyto kmeny vykazovaly rovněž větší snížení toxicity *Cl. difficile* (Valdés-Varela et al. 2016).

V roce 2019 testovali Monteiro et al. 2019 *in vitro* antimikrobiální aktivitu *B. longum* ATCC 15707 některých fekálních izolátů od novorozenců, které zahrnovaly izoláty *B. longum*, *B. lactis* a *B. bifidum* vůči *Clostridium* spp. Studie se rovněž zabývala vlivem některých referenčních kmenů laktobacilů. Antimikrobiální aktivita byla hodnocena agarózovým spot testem, ve kterém byla naměřeny inhibiční zóny v případě všech bifidobakteriálních kmenů kromě *B. lactis*. Zároveň byla antimikrobiální aktivita prokazována pomocí testu inhibice produkce plynu u *C. butyricum,* kdy v jednom případě bylo médium doplněno o fosfátový pufr, který v případě pozitivního výsledku působení probiotik vylučoval vliv kyselého pH na aktivitu klostridií. Inhibici produkce plynu prokazovali bez i s pufrovaným médiem *B. animalis* a *B. longum* ATCC 15707, bez neutralizační složky působil inhibičně i *B. bifidum*. Studie tímto poukázala na fakt, že na inhibici klostridií se mohou podílet i jiné molekuly než SCFA, a že pozorovaná antimikrobiální aktivita se odvíjí od použité metody testování (Monteiro et al. 2019).

Další studie se věnovala antimikrobiální aktivitě *B. infantis* CECT7210 za přítomnosti oligosacharidů, tedy synbiotické směsi, proti několika patogenům včetně *Cl. difficile*. Synbiotická kombinace *B. infantis* CECT7210 s GOS, nebo se směsí obsahující GOS, prokázala schopnost inhibice *Cl. difficile* v kokultuře (Ruiz et al. 2020).

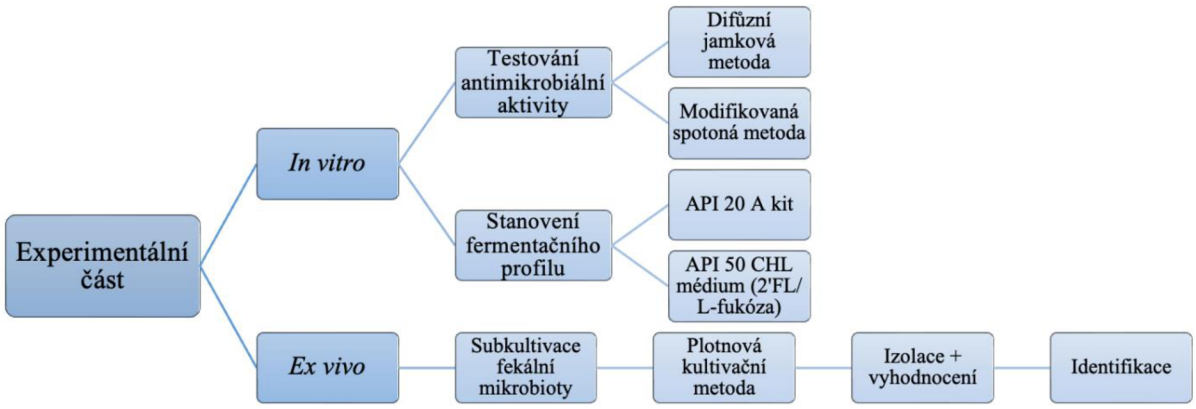
4 Metodika

4.1 Cíl metodiky

Cílem metodické práce bylo pozorovat interakce bifidobakteriálních a klostridiálních kmenů na dvou úrovních testovaní, které se od sebe lišily komplexností a složitostí systému.

První úroveň experimentu byla testována *in vitro*, ve které byla testována antimikrobiální interakce probiotických kmenů bifidobakterií (živé kultury, parabiotik a metabiotik) vůči klostridiálním kmenům izolovaných ze vzorků stolice původem od kolitických dětí. V tomto případě se jednalo o interakci pouze dvou mikroorganismů, či produktů jejich metabolismu nebo buněčných komponentů mezi sebou, a to bez vzájemného působení odlišných mikroorganismů či jiných faktorů. Do části *in vitro* testování bylo rovněž zahrnuto stanovení fermentačního profilu vybraných klostridiálních druhů, které bylo testováno pomocí testu pro biochemickou identifikaci anaerobů API 20 A a API 50 CHL. Médium API 50 CHL bylo také použito pro stanovení schopnosti utilizace 2'FL a L-fukózy.

Druhá část testování byla uskutečněna na *ex vivo* úrovni. Zjednodušená simulace zapojení mikrobioty stolice kojence a jejích dalších komponent byla vytvořena subkultivací (pojmem subkultivace je v tomto případě chápán jako předstupeň kultivace či analýzy vzorku, při kterém dochází k růstu a množení sledovaných mikroorganismů při stanovené teplotě) kojeneckého kolitického fekálního vzorku s bifidobakteriemi z probiotického přípravku. Vzniklý experimentální systém byl rovněž obohacen o zdroj uhlíku ve formě mateřského mléka či náhradní kojenecké výživy. Tímto způsobem byl vytvořen komplikovanější systém, v němž byly interakce mezi sledovanými bakteriemi ovlivněny dalšími faktory, např. schopností utilizovat odlišné substráty či působením okolní mikrobioty. Pro jednodušší orientaci v jednotlivých úrovních experimentální části práce bylo vytvořeno schéma, které je zobraveno na obrázku č. 7.



Obrázek č. 7 – schéma zachycující jednotlivé formy testování, které jsou zahrnuty v experimentální části práce.

4.2 Metodika odběru vzorků a informace o dárcích

4.2.1 Vzorky stolice

Čerstvé vzorky stolice (zhruba 1 g) byly sterilně odebírány ve stanovených intervalech matkou dítěte do předem připravených a zvážených zkumavek s médiem obsahující glycerol a skleněné perly (určené pro budoucí homogenizaci). Odebrané vzorky byly ihned zamraženy. Následná manipulace a transport byly prováděny na ledu. Všechny uvedené analýzy vzorků stolice dítěte byly provedeny s informovaným souhlasem zákonných zástupců dítěte. Odběry a následné zpracování vzorků proběhlo podle metodiky schválené Etickou komisí ČZU s referenčním číslem 06/2022.

Vzorky stolice určené k analýze pocházely od dětí, které byly porozeny vaginálně nebo chirurgicky, v řádném termínu a krom běžných kojeneckých kolik netrpěly žádnými zjevnými zdravotními obtížemi.

4.2.2 Vzorky mateřského mléka

Čerstvé vzorky mateřského mléka byly odebírány kojící matkou do pěti sterilních sáčků v průběhu 8 dnů (březen 2023). Z jejich obsahu byly připraveny směsné vzorky, jimiž byly naplněny 15 ml centrifugační tuby se šroubovacím víčkem. Vzorky mléka byly podrobeny pasterací při teplotě 62,5 °C po dobu 30 minut. Tepelně ošetřené vzorky ve zkumavkách byly zchlazeny, náležitě označeny a následně skladovány v mrazáku při teplotě -22 °C.

4.3 Příprava médií, bakteriálních kultur, parabiotik a metabiotik

4.3.1 Příprava médií

Pro účely kultivace, izolace a uchovávání bakteriálních kultur, a také pro účely samotného testování bylo potřeba připravit řadu různých typů médií. Jednotlivé typy použitých médií, jejich složení a příprava je popsána v následujících podkapitolách.

4.3.1.1 Wilkins-Chalgren Anaerobní bujón se sójovým peptonem

Wilkins-Chalgren Anaerobe bujón je používán pro účely izolace, kultivace a pro účely testování citlivosti široké škály anaerobních mikroorganismů. Pro účely této práce byl použit pro izolaci a kultivaci anaerobních mikroorganismů, konkrétně bifidobakterií a klostridií. Wilkins-Chalgren Anaerobní bujón byl modifikován o sójový pepton a další níže uvedené komponenty (dále jako „WSP bujón“), který podporuje růst anaerobních a dalších bakterií.

Dehydratované médium a další sypké složky byly odváženy na automatických vahách (Kern). Tekuté složky byly odměřeny pomocí injekční stříkačky. Množství jednotlivých složek pro přípravu 1 l média je uvedeno v tabulce č. 5. Veškeré složky byly smíchány s odpovídajícím objemem destilované vody (dH_2O). Obsah byl míchán pomocí magnetického míchadla s ohřevem (Stuart CB162) dokud nedošlo k úplnému rozpuštění všech složek. Následně byla provedena úprava pH pomocí 0,1 M roztoku NaOH (Lach-Ner) na hodnotu pH 7,2. Kyselost roztoku byla stanoveno pH indikátorovými papírky (Macherey-Nagel). Médium bylo rozdávkováno po 9 ml pomocí automatické dávkovací pipety (Eppendorf Multipette E3) do

skleněných zkumavek s gumovou zátkou a šroubovacím víčkem umístěných ve stojánky. Zkumavky naplněné médiem byly vloženy do vodní lázně s teplotou vody 90 °C, kde byly ponechány po dobu 10 minut. Následně byl z WSP bujónu vytěsněn kyslík působením CO_2. Byl použit potravinářský CO_2, proto před použitím procházel plyn kolonou s horkou měděnu výplní, která byla zredukována pomocí H_2, aby došlo ke zvýšení jeho čistoty. Zkumavky byly ihned po vytěsnění kyslíku z objemu utěsněny gumovou zátkou a uzavřeny šroubovacím víčkem. Připravené zkumavky s WSP bujónem byly sterilovány v elektronickém stolním autoklávu (Tuttnauer 2840EL) na program „roztoky“, při kterém jsou roztoky sterilovány při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Tabulka č. 5 – Wilkins-Chalgren Anaerobní Bujón se sójovým peptonem.

Složení	Na 1000 ml dH_2O
Wilkins-Chalgren Anaerobní Bujón (Oxoid)	33 g
Sójový pepton (Oxoid)	5 g
L-cystein monohydrát (Sigma-Aldrich)	0,5 g
Polysorbát 80 (Sigma-Aldrich)	1 ml

4.3.1.2 Chudé médium

Chudé médium, které se používá pro stanovování růstových křivek bakterií, bylo v tomto případě použito pro účely subkultivace fekální mikrobioty kojenců spolu s probiotickými kmeny bifidobakterií v *ex vivo* experimentální části.

Dehydratované médium a další sypké složky byly odváženy na automatických vahách. Tekuté složky byly odměřeny pomocí injekční stříkačky. Množství jednotlivých složek pro přípravu 1 l média je uvedeno v tabulce č. 6. Veškeré složky byly smíchány s odpovídajícím objemem dH_2O. Obsah byl míchán pomocí magnetického míchadla s ohřevem, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění všech složek. K chudému médiu byla přidána kyselina octové (KO) (≥99,7 %, Sigma-Aldrich) v poměru 100 µl kyseliny na 100 ml média. Následný postup odpovídal postupu přípravy WSP bujónu (viz. podkapitola Wilkins-Chalgren Anaerobe bujón se sójovým peptonem).

Tabulka č. 6 – Chudé médium.

Složení	Na 1000 ml dH_2O
Trypton (Oxoid)	10 g
Želatinový pepton (Sigma-Aldrich)	10 g
Kvasnicový extrakt (Oxoid)	5 g
Chlorid sodný (Lachema)	5 g
L-arginin (Sigma-Aldrich)	1 g
Heamin (Sigma-Aldrich)	0,005 g
Menadion (Sigma-Aldrich)	0,0005 g
Pyruvát sodný (Lachema)	1 g
L-cystein hydrochlorid monohydrát	0,5 g
Polysorbát 80	1 ml

4.3.1.3 Ředící médium

Dehydratované médium a další sypké složky byly odváženy na automatických vahách. Tekuté složky byly odměřeny pomocí injekční stříkačky. Množství jednotlivých složek pro přípravu 1 l média je uvedeno v tabulce č. 7. Veškeré složky byly smíchány s odpovídajícím objemem dH_2O. Obsah byl míchán pomocí magnetického míchadla s ohřevem, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění všech složek. Následný postup odpovídal postupu přípravy WSP bujónu (viz. podkapitola Wilkins-Chalgren Anaerobe bujón se sójovým peptonem).

Tabulka č. 7 – ředící médium.

Složení	Na 1000 ml dH_2O
Nutrient Broth No. 2 (Oxoid)	5 g
Trypton	5 g
Kvasnicový extrakt	2,5 g
L-cystein monohydrát	0,25 g
Polysorbát 80	0,5 ml

4.3.1.4 Cooked Meat Médium

Cooked Meat Médium (CMM) (Oxoid) bylo použito pro uchovávání anaerobních endospory tvořících bakterií. Na automatických byl odvážen 1 g dehydratovaného média. Navážka byla převedena do vialek, do kterých bylo následně pomocí automatické dávkovací pipety odměřeno 9 ml dH_2O. Médium bylo ponecháno v lázni s vodou o teplotě 90 °C a po dobu 10 minut. Po uplynutí stanovené doby bylo v médiu vytvořeno anaerobní prostředí pomocí přečištěného CO_2 (viz. podkapitola Wilkins-Chalgren Anaerobe bujón se sójovým peptonem). Vialky byly utěsněny septem a hliníkovým víčkem. Připravené vialky s CMM médiem byly dvakrát sterilovány v elektronickém stolním autoklávu na program „roztoky“, při kterém jsou roztoky sterilovány při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

4.3.1.5 Bifipufr

Bifipufr byl pro účely této práce použit pro přípravu bakteriálních suspenzí. V kombinaci s glycerolem byl použit pro uchovávání bakterií v teplotách pod bodem mrazu. Do skleněných laboratorních lahví se závitem bylo odměřeno potřebné množství dH_2O. Pro variantu s glycerolem bylo k dH_2O rovněž pomocí sérologické pipety odměřeno potřebné množství 95% glycerolu. Sypké složky byly naváženy na laboratorních vahách a následně převedeny do tekuté složky. Množství jednotlivých složek na 100 ml dH_2O je uvedeno v tabulce č. 8. Laboratorní lahve byly ponořeny do vroucí lázně, ve které byly ponechány do doby, než došlo k rozpuštění veškerých sypkých složek. Následně bylo v médiu vytvořeno anaerobní prostředí pomocí přečištěného CO_2 (viz. podkapitola Wilkins-Chalgren Anaerobe bujón se sójovým peptonem). Lahve byly utěsněny pomocí septa a hliníkového šroubovacího uzávěru. Médium bylo sterilováno v tlakovém hrnci (Tefal) po dobu 1 hodiny.

Tabulka č. 8 – bifipufr s glycerolem.

Složení	Na 100 ml dH_2O
Glycerol 95 % (VWR Chemicals)	110 ml
K_2HPO_4 (Lachema)	0,12 g
KH_2PO_4 (Lachema)	0,03 g
L-cystein hydrochlorid monohydrát	0,05 g

4.3.1.6 Wilkins-Chalgren Anaerobní agar se sójovým peptonem

Wilkins-Chalgren Anaerobní agar je považován za univerzální médium určené pro růst anaerobních bakterií a pro účely testování citlivosti na antimikrobiální látky. Podobně jako do WSP bujónu, byl do agarové obdoby přidán sójový pepton a další komponenty uvedené níže (dále jako „WSP agar“).

Dehydratovaný agar a další sypké složky byly odváženy na laboratorních vahách. Tekuté složky byly odměřeny pomocí injekční stříkačky. Množství jednotlivých složek pro přípravu 1 l média je uvedeno v tabulce č. 9. Veškeré složky byly smíchány s odpovídajícím objemem dH_2O v Erlenmayerově baňce, která byla následně utěsněna hliníkovou fólií. Médium bylo rozvařeno a sterilováno v tlakovém hrnci po dobu 1 hodiny. Sterilní média byla umístěna do vodní lázně vytemperované na 51 °C.

Tabulka č. 9 - Wilkins-Chalgren Anaerobní agar se sójovým peptonem.

Složení	Na 1000 ml dH_2O
Wilkins-Chalgren Anaerobní Agar (Oxoid)	43 g
Sójový pepton	5 g
L-cystein hydrochlorid monohydrát	0,5 g
Polysorbát 80	1 ml

4.3.2 Příprava bakteriálních kultur

Pro účely testování antimikrobiální aktivity a stanovení fermentačního profilu byly použity čerstvě narostlé bakteriální kultury. Dohromady byly pro testování použity dva kmeny *Bifidobacterium* spp. a devět kmenů *Clostridium* spp. Veškeré následující kroky byly provedeny asepticky za přítomnosti kahanu.

Bifidobakteriální kmeny byly izolovány ze dvou odlišných probiotických přípravků, které jsou volně dostupné na trhu v České republice, a které jsou určeny jako doplněk stravy pro kojence od narození. Jednalo se o kmeny *B. lactis* Bb-12 a *B. breve* BR03. Kmeny byly uchovávány zmražené ve skleněných vialkách s bifipufrem a glycerolem (5 ml bifipufru s glycerolem na 9 ml bakteriální kultury) při teplotě -22 °C. V případě potřeby čerstvé kultury byly vialky s bakteriální kulturou ponechány při pokojové teplotě do doby roztátí. Z rozmražené a promíchané kultury na vortexu (Stuart SA8) byl pomocí injekční stříkačky odebrán přibližně 1 ml objemu, kterým byl inokulován anaerobní WSP bujón obsažený v uzavíratelné zkumavce. Následná kultivace probíhala při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí doby kultivace byla pomocí světelného mikroskopu s metodou fázového rozlišení

(Nikon Eclipse E200) na základě morfologie a životních projevů buněk zkontrolována čistota bakteriální kultury. V případě čistoty a řádného nárůstu bakteriální kultury byl kmen použit pro následující účely testování.

Klostridiální kmeny použité pro účely testování byly izolovány ze stolice kojenců. Jejich přehled je uveden v tabulce č. 10. Kojenecké kmeny klostridií byly uchovávány v CMM médiu ve skleněných vialkách. V případě potřeby čerstvé kultury bylo odebráno přibližně 0,5 ml CMM média s obsaženou kulturou, kterým byl následně inokulován anaerobní WSP bujón obsažený v uzavíratelné zkumavce. Následující kroky byly shodné s přípravou bifidobakteriálních kultur.

Tabulka č. 10 – přehled kojeneckých dárců vzorků stolice, ze kterých byly izolovány klostridie použité pro účely testování *in vitro*. Stejné vzorky stolice byly použity pro metodu *ex vivo* testování. Použité zkratky: *C. neonatale – Clostridium neonatale*, *C. Saccharobutylicum – Clostridium saccharobutylicum*.

Dárce	***Clostridium* spp.**	**Dále také jako**
Kojenec BN	*C. butyricum*	*CB* BN
	Cl. difficile	*CD* BN
	C. perfringens	*CP* BN
Kojenec AZ2	*C. saccharobutylicum*	*CSB* AZ2
Kojenec AZ1	*C. perfringens*	*CP* AZ1
Kojenec NK	*C. perfringens*	*CP* NK
Kojenec NVz	*C. perfringens*	*CP* NVz
Kojenec OK2	*C. neonatale*	*CN* OK2
Kojenec Z	*C. perfringens*	*CP* Z
Kojenec PB	*C. perfringens*	*CP* PB

4.3.3 Příprava parabiotik a metabiotik

Parabiotika (biologicky aktivní buněčné struktury) a metabiotika (supernatant obsahující metabolity dané bakteriální kultury) byly připraveny pro účely testování antimikrobiální aktivity difúzní jamkovou metodou. Pro jejich přípravu byly použity probiotické bakteriální kmeny *B. lactis* Bb-12 a *B. breve* BR03, které byly popsány v předešlé podkapitole. Veškeré kroky byly provedeny asepticky za přítomnosti kahanu.

Čerstvé a čisté bakteriální kultury, které byly inkubovány v uzavíratelných zkumavkách s WSP bujónem, byly za pomoci vortexu řádně promíseny. Obsah zkumavek byl asepticky přelit do 50 ml centrifugační tuby, ze které byl následně rozdělen do tří 15 ml centrifugačních tub po 6 ml pomocí automatické pipety (Eppendorf Reference 2). Před každým dalším odběrem objemu 6 ml musel být obsah tuby řádně promíchán tak, aby došlo k rovnoměrnému rozptýlení složek v celém objemu. Centrifugační tuby s kulturou byly odstředěny v centrifuze (Universal 320R Hettich Zentrifugen) při 9 000 rpm po dobu 3 minut. Stejná hodnota rpm i doba centrifugace byla použita i v následujících krocích. Od tohoto bodu se již následující kroky přípravy parabiotik a metabiotik liší.

4.3.3.1 Metabiotika

Vzniklý supernatant byl automatickou pipetou asepticky převeden do 5 ml zkumavek typu Eppendorf. Zkumavky s metabiotiky byly následně uzavřeny, náležitě označeny a uchovávány zmražené při teplotě -22 °C. Pro účely testování byla metabiotika rozmrazena při pokojové teplotě.

4.3.3.2 Parabiotika

Supernatant byl slit a vzniklá peleta byla rozptýlena pomocí opakovaného nasátí a vypuštění objemu injekční stříkačkou v 6 ml bifipufru. Obsah zkumavek byl převeden do zkumavek o objemu 25 ml typu Eppendorf, které byly použity pro následný proces sonikace, jenž byl uskutečněn pomocí ultrazvukového homogenizátoru (Bandelin Electronic Sonoplus HD 2070). Doba sonikace byla stanovena na 2 minuty při maximálním výkonu. Po dobu trvání byla zkumavka umístěna v kádince s ledovou tříští, která ochlazovala její obsah, čímž bylo zabráněno denaturaci bílkovinných komponent buněčných struktur. Následně byl obsah převeden do sterilní 15 ml centrifugační tuby a odstředěn. Supernatant byl slit a peleta byla opět rozptýlena v 6 ml bifipufru. Promísené parabiotiku na vortexu bylo v objemu 5 ml převedeno pomocí automatické pipety do 5 ml zkumavky typu Eppendorf. Zkumavky s parabiotiky byly následně uzavřeny, náležitě označeny a uchovávány zmražené při teplotě -22 °C. Pro účely testování byla parabiotika rozmrazena při pokojové teplotě.

4.4 *In vitro* testování

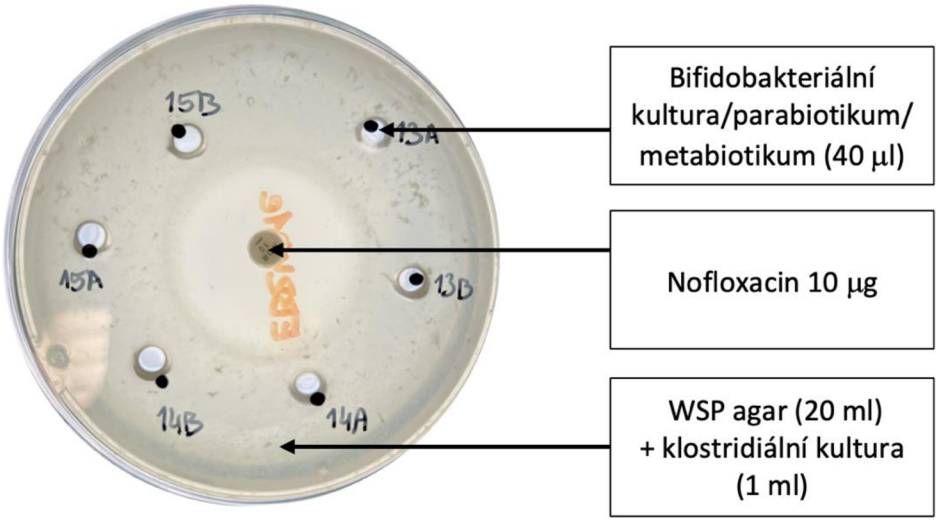
4.4.1 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita bifidobakteriálních kmenů, které byly izolovány ze dvou na českém trhu volně dostupných probiotických přípravků pro kojence od chvíle narození, byla testována vůči klostridiálním kmenů izolovaných ze stolice kolitických kojenců. Antimikrobiální aktivita byla testována vůči klostridiálním kmenům uvedených v tabulce č. 10 vyjma druhu *CP* PB. Testování bylo provedeno dvěma způsoby – jamkovou difúzní metodou a modifikovanou spotovou metodou. Jamkovou difúzní metodou byla testována schopnost živých bifidobakteriálních buněk a z nich vytvořených parabiotik a metabiotik inhibovat růst klostridií.

Testování antimikrobiální aktivity modifikovanou spotovou metodou byla testována schopnost inhibice růstu odlišných druhů klostridií skrze živé bifidobakteriální buňky utvářející kolonie. Veškeré následující kroky byly provedeny asepticky za přítomnosti kahanu.

4.4.1.1 Jamková difúzní metoda

Pro testování antimikrobiální aktivity jamkovou difúzní metodou byly použity Petriho misek (PM) o průměru 90 mm. Spodní víčka PM byla označena tak, aby bylo při vyhodnocení poznat o který klostridiální kmen se jedná, a jaká antimikrobiální suspenze byla pro testování použita. Do PM byl pomocí injekční stříkačky převeden 1 ml čerstvě narostlé pomocí vortexu promísené bakteriální kultury. Inokulát byl následně pomocí sérologické pipety zalit 20 ml WSP agarem. Obsah PM byl promíchán jemnými krouživými pohyby misky do obou stran tak, aby došlo k rovnoměrnému rozptýlení bakteriální kultury v kultivačním médiu. Inokulované médium bylo ponecháno v klidu při pokojové teplotě tak dlouho, dokud nedošlo k jeho zatuhnutí. Následně byly do zatuhnutého agaru pomocí sterilního korkovrtu o průměru 11,25 mm vykrojeny obrysy jamek, jejichž obsah byl injekční jehlou vybrán z výkroje pryč mimo PM. Do jamek bylo pomocí automatické pipety nadávkováno 40 µl vortexem promíseného parabiotika, metabiotika či čerstvě narostlé bakteriální kultury. Na povrch agaru byl umístěn pomocí sterilní pinzety antibiotický disk s koncentrací norfoxacinu 10 µg (Oxoid), který během vyhodnocení sloužil jako kontrola. Takto připravené misky byly naskládány do kovového stojánku a uloženy do anaerostatu (Oxoid) s katalyzátorem (Oxoid) v němž bylo vytvořeno pomocí Gassing systému (Don Whitley Scientific) anaerobní prostředí. Následná inkubace probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin. Výsledná podoba PM připravené pro testování antimikrobiální aktivity jamkovou difúzní metodu je znázorněna na obrázku č. 8.



Obrázek č. 8 – jamková difúzní metoda.

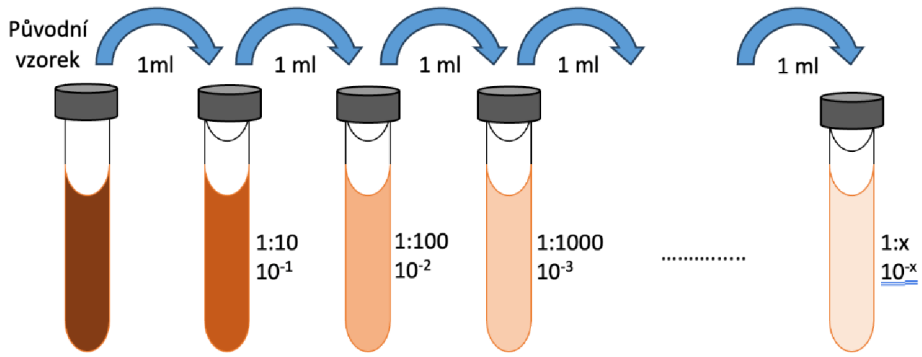
Po uplynutí doby kultivace byl vyhodnocen výsledek testování. Byla hodnocena přítomnost inhibičních zón kolem jamek obsahujících metabiotika, parabiotika či bakteriální

kultury. V případě výskytu inhibiční zóny, byl změřen průměr zóny pomocí digitálního posuvného měřítka (Mitutoyo).

4.4.1.2 Modifikovaná spotová metoda

Test antimikrobiální aktivity modifikovanou spotovou metodou byl proveden ve dvou krocích. První krok spočíval ve vytvoření agarové vrstvy inokulované čerstvou bakteriální kulturou o různém stupni ředění, u které byla stanovována antimikrobiální aktivita. Druhý krok spočíval v přelití první vrstvy agaru vrstvou druhou, která byla inokulována čerstvou bakteriální kulturou, vůči které byla antimikrobiální aktivita testována. Jednotlivé kroky byly rozloženy v čase tak, aby bylo docíleno požadovaného výsledku.

V prvním kroku bylo potřeba naředit čerstvě narostlou bifidobakteriální kulturu na příslušná ředění: 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-7} a 10^{-8} KTJ/ml. Vzorek čerstvé bifidobakteriální kultury představoval „0. ředění“, ze kterého bylo pro zamýšlený experiment nutné vytvořit ředící řadu do „8. ředění“. 1. ředění bylo promícháno pomocí vortexu, aby došlo k rovnoměrnému rozptýlení složek. Injekční stříkačkou byl odebrán 1 ml kultury, kterým bylo inokulováno 1. ředění. Nadcházející ředění byla inokulována vždy 1 ml. Schéma ředění je znázorněno na obrázku č. 9. Z každého ředění bylo pomocí injekční stříkačky převedeno 0,5 ml do malé PM o průměru 60 mm. Inokulum bylo přelito 5 ml WSP agaru vytemperovaného na 51 °C pomocí sérologické pipety. Obsah PM byl promíchán jemnými krouživými pohyby misky do obou stran, aby došlo k rovnoměrnému rozptýlení bakteriální kultury v agaru. PM byly umístěny do anaerostatu s katalyzátorem v němž bylo vytvořeno pomocí Gassing systému anaerobní prostředí. Následná inkubace probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin.



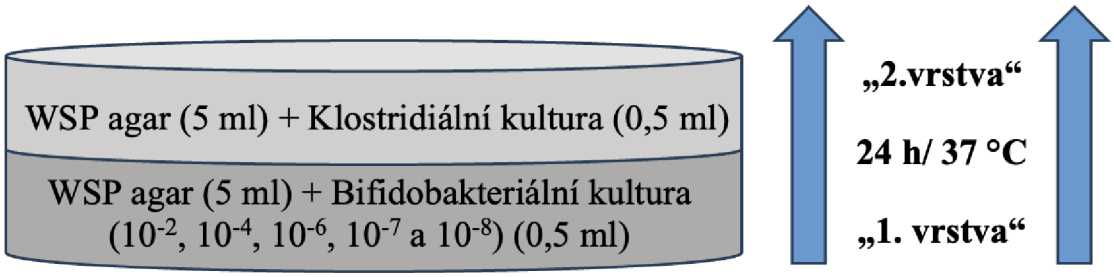
Obrázek č. 9 – schéma způsobu ředění vzorku.

Po uplynutí 24 hodin byly PM vyndány z inkubátoru. Pouhým okem bylo posouzeno, zda je mikrobiální nárůst pro testování dostatečný, tzn. jestli jsou ve hmotě i na povrchu agar všech ředění přítomny okem viditelné kolonie. V případě, že byl nárůst vyhodnocen jako dostatečný, bylo přistoupeno k druhému kroku metody.

V druhé části metody došlo k nanesení druhé vrstvy agaru, která byla inokulována bakteriálním kmenem, vůči kterému byla testována antimikrobiální aktivita. Do Erlenmayerovi baňky byl připraven sterilní WSP agar, který se nechal vytemperovat na 51 °C. Agar byl následně asepticky inokulovát pomocí injekční stříkačky čerstvě narostlou klostridiální

kulturou. Pro 20 ml média byla stanovena inokulační dávka 1 ml. Inokulum bylo krouživými pohyby do obou stran rozptýleno v celém objemu. 5 ml zočkovaného agaru bylo odebráno pomocí serologické pipety a opatrně, tak aby nedošlo k uvolnění vzniklých bakteriální kolonií, byl objem aplikován na první vrstvu agaru. Tento krok byl proveden u všech typů ředění a bifidobakteriálních kmenů. PM byly opět umístěny do anaerostatu s katalyzátorem v němž bylo vytvořeno anaerobní prostředí pomocí Gassing systému. Následná inkubace probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin. Zjednodušené schéma celého postupu je zobrazeno na obrázku č. 10.

Po uplynutí stanovené doby byl vyhodnocen výsledek testování. Vyhodnocovala se přítomnost či nepřítomnost inhibičních zón vzniklých kolem bifidobakteriálních kolonií.



Obrázek č. 10 – zjednodušené schéma postupu testování antimikrobiální aktivity modifikovanou spotovou metodou.

4.4.2 Stanovení fermentačního profilu

Za účelem stanovení fermentačního profilu klostridiálních kmenů byly použity dva druhy biochemických testů – API 20 A a vlastní test využívající médium API 50 CHL (obojí BioMérieux). Pro test API 20 A byl použit kompletní komerční kit tvořený 20 mikrozkumavkami obsahujících odlišné dehydratované substráty a médium, které bylo součástí kitu. Pomocí tohoto testu byl stanoven fermentační profil klostridiálních kmenů uvedených v tabulce č. 10 vyjma druhu *CP PB*. Médium náležící k testu API 50 CHL bylo použit pro stanovení schopnosti vybraných klostridiálních kmenů metabolizovat 2'FL, nebo L-fukózu. Tyto sacharidy sloužili v médiu jako jediný zdroj uhlíku. Jako pozitivní kontrolu byla zvolena D-glukóza, jejíž degradace byly schopny všechny testované klostridiální kmeny (dle výsledků testů API 20 A). Jako negativní kontrola bylo použito API 50 CHL médium bez přidaného substrátu. Testované klostridiální kmeny (celkem 6 kmenů) byly vybrány na základě fermentačního profilu vycházejícího z výsledků testu API 20 A.

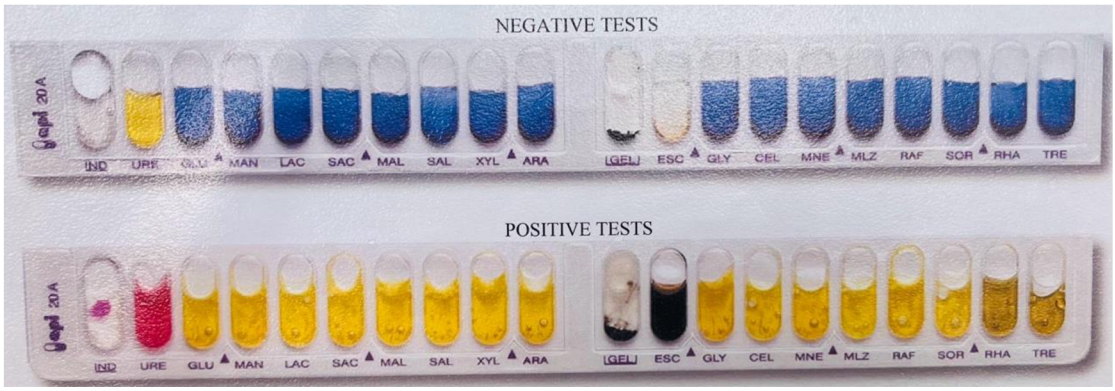
Veškeré kroky byly provedeny asepticky za přítomnosti kahanu.

4.4.2.1 API 20 A test

1 ml čerstvě narostlé klostridiální kultury ve zkumavce s WSP bujónem bylo pomocí injekční stříkačky převedeno do 1,5 ml centrifugační mikrozkumavky typu Eppendorf. Bakteriální kultura byla centrifugována při 14 500 rpm po dobu 2 minut (Epperndorf 5424). Vzniklý supernatant byl slit a jeho zbytek na dně mikrozkumavky byl odstraněn pomocí automatické pipety. K peletě bylo následně přidáno 0,5 ml bifipufru, v němž byla peleta pomocí vortexu rozptýlena. Veškerá bakteriální suspenze byla převeden pomocí automatické pipety do

skleněné ampule obsahující médium API 20 A, ve kterém bylo opakovaným nasátím a vypuštěním automatickou pipetou zhomogenizovaná. Testovací proužek testu API 20 A byl vyjmut z obalu a položen na dno spodní části krytu, jenž byl přiložen k testu, a který byl zvlhčen dH_2O pomocí střičky. Do každé mikrozkumavky s dehydratovaným substrátem bylo injekční stříkačkou aplikováno médium s rozptýlenou bakteriální kulturou tak, aby byla jamka ze 2/3 zaplněna a aby nedocházelo k vzniku vzduchových bublin na dně jamky. Výjimku v aplikaci představovala mikrozkumavka obhajující dehydratovanou želatinu, jejíž objem byl bakteriální suspenzí vyplněn celý. Otvor mikrozkumavky obsahující L-tryptofan (IND) byl překryt minerálním olejem. Testovací proužek byl přikryt horním dílem krytu, náležitě označen a vložen do sáčků určených pro kultivaci v anaerobním prostředí společně s vyvíječem anaerobního prostředí (BioMérieux). Obsah sáčku byl uzavřen a vložen do inkubátoru s vnitřní teplotou 37 °C. Test byl vyhodnocen po 24 ± 2 hodinách.

Po uplynutí kultivační doby došlo k odečítání testovacího proužku a k interpretaci výsledku. Testovací proužek byl odečten pomocí odečítací tabulky, která je zobrazena na obrázku č. 11.



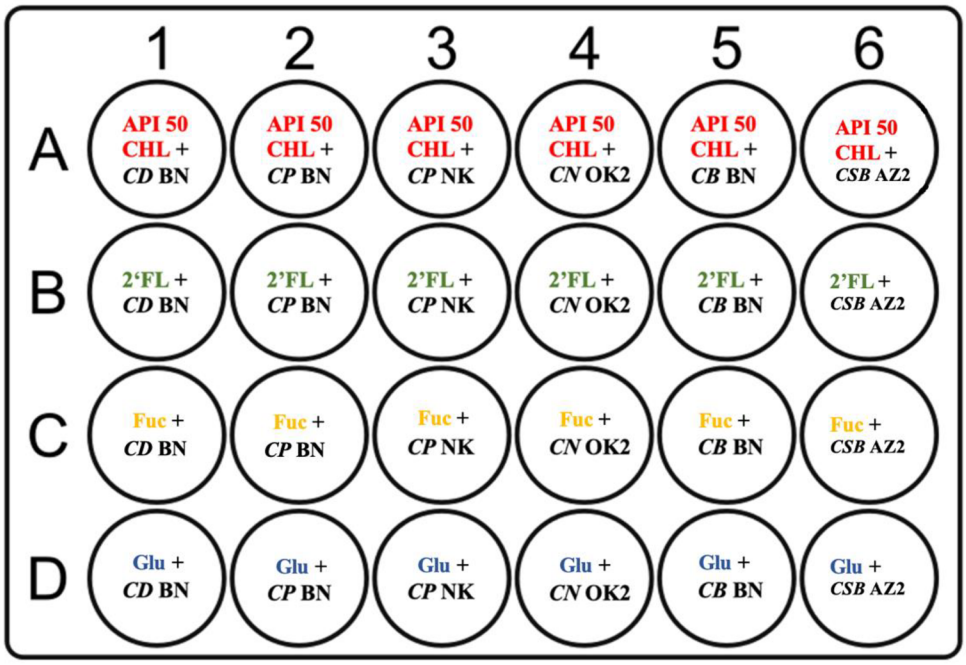
Obrázek č. 11 – odečítací tabulka API 20 A testu. Negativní a pozitivní výsledky testu.

Výsledky spontánních reakcí byly písemně a fotograficky zaznamenány. Pro potvrzení negativního či pozitivního výsledku byla použita další činidla. Do všech mikrozkumavek obsahující cukry byla přidána kapka bromkresolového purpuru (BCP), čímž došlo k vyjasnění výsledků biochemických reakcí. Opět byly odečteny a zaznamenány výsledky testu. Na vrstvu minerálního oleje v mikrozkumavce IND byla přidána jedna kapka xylenu, která byla pomocí tyčinky aplikátoru rozmíchána. Po pěti minutách byly odečteny a zaznamenány výsledky. Na závěr byla hodnocena tvorba katalázy. Hodnocení bylo provedeno půl hodiny od vystavení testovacího proužku vzduchu. Do mikrozkumavek s pozitivní reakcí byly přidány 2 kapky 3% peroxidu vodíku. Vznik bublin signalizoval pozitivní reakci.

4.4.2.2 API 50 CHL test

Do 25 ml kónických zkumavek s plochým víčkem bylo na analytických vahách zvlášť odváženo 0,02 g 2'FL (≥94,00 %, RAW's), L-(-)-fukózy (Sigma-Aldrich) a D-glukózy (Penta). K navážkám bylo následně převedeno 10 ml API 50 CHL média. Médium se substrátem bylo

homogenizováno pomocí vortexu do té doby, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění pevného podílu v tekutině. Finální koncentrace testovaných substrátů v médiu byla 2 g/l. Zároveň byla připraven varianta bez přidaného substrátu, která sloužila jako negativní kontrola. Média s rozpuštěným substrátem i bez něj byla pomocí injekční stříkačky doplněné o 0,22 µl filtr nadávkována po 1 ml do jamek 24-jamkové destičky. Do každé jamky bylo pomocí automatické pipety přidáno 10 µl bakteriální suspenze, která byla připravena stejným způsobem jako v případě API 20 A testu. Schéma plnění a inokulace 24-jamkové destičky je znázorněno na obrázku č. 12. Destička byla přikryta horním krytem, náležitě označena a vložena do sáčku určených pro kultivaci v anaerobním prostředí společně s vyvíječem anaerobního prostředí. Sáček byl utěsněn a vložen do inkubátoru s vnitřní teplotou 37 °C. Test byl vyhodnocen po 24 ± 2 hodinách.



Obrázek č. 12 – schéma plnění a následné inokulace 24-jamkové destičky. Použité zkratky: 2'FL – Médium API 20 CHL + 0,02 g 2'FL, Fuc – Médium API 20 CHL + 0,02 g L-(-)-fukózy, Glu – Médium API 20 CHL + 0,02 g D-glukózy.

Po uplynutí doby kultivace byl biochemický test vyhodnocen na základě barevných změn indikátoru obsaženého v API 50 CHL médiu, které proběhly v případě změny pH média. Žlutá až světle hnědá barva média indikovala pozitivní výsledek, což znamená, že testovaný bakteriální kmen byl schopný metabolizovat obsažený substrát. Naopak modrá až fialová barva značila negativní výsledek. V některých případech mohlo dojít k redukci BCP obsaženého v médiu, které bylo v důsledku tohoto degradačního procesu bez barvy. Výsledek testu byl písemně a fotograficky zaznamenán. Výsledek biochemických reakcí byl rovněž ujasněn přidáním kapky BCP, načež byl písemně a fotograficky zdokumentován. Na závěr bylo změřeno pH obsahu všech jamek pomocí pH metru (Hanna Checker HI98100).

4.5 *Ex vivo* testování

4.5.1.1 Příprava vzorků

Do zkumavky obsahující anaerobně připravené chudé médium s kyselinou octovou byly postupně přidány všechny složky potřebné pro založení *ex vivo* experimentu. Celkem bylo připraveno 9 variant obsahující různé kombinace bifidobakteriálních kmenů a zdrojů uhlíku. Přehled vzniklých kombinací určeným pro subkultivaci je uveden v tabulce č. 11.

Tabulka č. 11 – přehled 9 experimentální systémů vzniklých kombinací chudého média s kyselinou octovou, fekální mikrobiotou, mupirocinem, odlišných probiotických bifidobakteriálních kmenů a zdrojů uhlíku. Použité zkratky: PNKV – počáteční náhradní kojenecká výživa, MM – mateřské mléko.

Médium	**Fekální mikrobiota**	**Antibiotikum**	**Probiotické kmeny**	**Zdroj uhlíku**	**Číslo varianty**
Chudé médium (9 ml) s kyselinou octovou (100µl/ 100 ml)	Fekální vzorek (1 ml ze „2. ředění“)	Mupirocin (1,4 mg/ 9 ml)	-	-	1.
				MM	2.
				PNKV	3.
			B. lactis Bb-12 (6 kapek)	-	4.
				MM	5.
				PNKV	6.
			B. breve BR03 (5 kapek)	-	7.
				MM	8.
				PNKV	9.

Pro účely *ex vivo* testování byly použity fekální vzorky původem od kojenců s projevy koliky, které jsou uvedeny v tabulce č. 10. Vzorky stolice byly uchovávány zmražené v odběrových zkumavkách. Uchovávaný vzorek představoval „1. ředění“, ze kterého bylo pro zamýšlený experiment nutné vytvořit ředící řadu do „3. ředění“, které představovalo samotný experimentální systém. Před vlastní analýzou byly vzorky rozmraženy za pokojové teploty. V momentě, kdy byl obsah zkumavek tekutý, byly promíchány pomocí vortexu, aby došlo k rovnoměrnému rozptýlení složek. Injekční stříkačkou bylo odebráno předem kvantifikované množství stolice vypočítané dle vztahu uvedeného níže. Získaným množstvím vzorku bylo inokulováno 2. ředění. Nadcházející ředění byla inokulována vždy 1 ml („1 g“). Ze 2. ředění byly odebrán 1 ml, jímž byly inokulovány všechny zkumavky s chudým médiem („3. ředění“).

Ve vzorcích stolice byly již dříve v rámci odlišného projektu stanoveny pomocí plotnové kultivační metody počty klostridií, které odpovídaly počtům $>10^8$ KTJ/g. Pro stanovení bylo použito modifikované WSP médiu s přídavkem mupirocinu (Mup) a KO, které je určeno především pro kultivaci bifidobakterií, nicméně se rovněž používá k detekci klostridií ve fekálních vzorcích (Makovska et al. 2023).

Vzoreček pro výpočet odebraného množství vzorku stolice:

$$m_{vz.} = \frac{1}{m_1 - m_2} \ (g)$$

Kde platí:
mvz. – odebrané množství vzorku
m1 – hmotnost zkumavky před odběrem vzorku
m2 – hmotnost zkumavky po odběru vzorku

Vzorek mateřského mléka byl před použitím rozmražen při pokojové teplotě. Pro každý experimentální systém byla vždy použita nová zkumavka se vzorkem smíšeného mléka. V momentě, kdy byl obsah zkumavky tekutý, byl promíchán pomocí vortexu. Následně byl aplikován 1 ml pomocí injekční stříkačky do příslušných zkumavek.

Počáteční náhradní kojenecká výživa (PNKV) v tekuté formě obsahující 2'FL (0,1 g/100 ml výživy) byla uchovávána zmražená při -22 °C v certifikačních 15 ml zkumavkách. Použitá PNKV byla volně zakoupena v obchodě v České republice a pocházela z jednoho balení. Před použitím byla PNKV rozmražena za pokojové teploty. V momentě, kdy byl obsah zkumavky tekutý, byl promíchán pomocí vortexu. Pro každý experimentální systém byla vždy použita nová zkumavka se se vzorkem PNKV. Následně byl aplikován vždy 1 ml PNKV pomocí injekční stříkačky do příslušných zkumavek.

Pro účely testováni byly nadále použity dva probiotické přípravky určené jako doplněk výživy kojencům ve věku od 1. dne narození a starším. Probiotické doplňky byly volně k dostání na trhu v České republice. První probiotický přípravek obsahoval probiotický kmen *B. lactis* Bb-12. Výrobce na obalu deklaroval, že doporučená denní dávka (DDD), která představovala 6 kapek aplikovaných pomocí přiloženého aplikátoru, obsahuje minimálně 1×10^9 *B. lactis* Bb-12 KTJ. Druhý přípravek obsahoval kombinaci probiotických kmenů *B. breve* BR03 a *B. breve* B63. DDD představující 5 kapek přípravku obsahovala 1×10^8 *B. breve* BR03 a 1×10^8 *B. breve* B63 KTJ. Deklarované počty KTJ byly před samotným experimentem ověřeny na plotnové kultivační metodě, pro kterou bylo použito modifikované kultivačním WSP médiu s obsahem Mup a KO. Probiotické přípravky byly skladovány v chladu mimo sluneční záření. Před použitím byla lahvička s přípravkem promíchána protřepáním a DDD byla aplikována pomocí aplikátoru do příslušných zkumavek.

Mupirocin byl přidán pro své bakteriostatické a baktericidní účinky vůči streptokokům a stafylokoků. Jedno celé balení mupirocinových disků (50 disků, 1 disk = 200 μg mupirocinu) bylo převedeno do zkumavky s anaerobním WSP bujónem (9ml). Extrakce antibiotika do

bujónu trvala 30 minut. Následně byl WSP bujón s extrahovaným antibiotikem aplikován pomocí injekční stříkačky po 1 ml do všech zkumavek.

Všechny zkumavky byly označeny příslušným číslem varianty. Subkultivace probíhala v inkubátoru při 37 °C po dobu 24 h.

4.5.1.2 Plotnová kultivační metoda

Po uplynutí stanovené doby subkultivace byly vzorky naředěny na požadovanou koncentraci (10^{-5} až 10^{-9}) způsobem popsaným k podkapitole Test antimikrobiální modifikovanou spotovou metodou. V rámci přípravy ředící řady byl u subkultivovaných vzorků pozorován vznik zákalu a přítomnost plynu. Pro plotnovou kultivační metodu byly použity PM o průměru 60, na jejichž víčko bylo poznamenáno číslo ředění, číslo varianty a typ kultivačního média. Jako kultivační média byla použita WSP agar a WSP agar s Mup (12,5 μg /100 ml) a KO (100 μg /100 ml), která byla vytemperována na 51 °C. Do PM bylo pomocí injekční stříkačky převáděno 0,5 ml zředěného a promíseného vzorku. Inokulum bylo následně zalito příslušným kultivačním agarem do zhruba 1/3 výšky spodního víčka PM. Jemnými krouživými pohyby PM do obou stran byl obsah promísen. Po ztuhnutí agaru byly PM umístěny do anaerostatu s vyvíječem anaerobního prostředí, ve kterých bylo pomocí Gassing systému vytvořeno anaerobní prostředí. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin v inkubátoru.

4.5.1.3 Izolace kolonií

K izolaci jednotlivých kolonií z agarových ploten byly použity jednorázové bakteriologické kličky o objemu 1 μl. Pomocí kličky byly kolonie separovány a přemístěny do uzavíratelné zkumavky s WSP bujónem připravovaným anaerobně. Výběr izolovaných kolonií byl prováděn na základě rozdílných charakteristik. Rozlišována byla například barva, tvar, velikost a rovněž zápach. Izoláty byly umístěny do termostatu na 37 °C po dobu 24 hodin.

4.5.1.4 Vyhodnocení plotnové kultivační metody

Počet kolonií na jednotlivých plotnách byl stanoven pomocí manuální počítačky kolonií (Stuart SC6+). Výsledný počet kolonií byl vynásoben číslem 2 (plotny byly očkovány 0,5 ml inokula). Celkový počet mikroorganismů v 1 g vzorku byl vypočítán dle následujícího vztahu (viz níže). Plotny byly zároveň fotograficky zdokumentovány.

Vzoreček pro výpočet KJT/g:

$$P = \frac{P1 + P2}{11} \times F\ (KJT/g)$$

Kde platí:
P1, P2 – počet kolonií po dvou sobě jdoucích počitatelných plotnách
F – převrácená hodnota nejvyššího ředění

4.5.1.5 Kontrola čistoty a popis morfologie

Po uplynutí doby kultivace bylo přistoupeno ke kontrole čistoty izolovaných kolonií a k následné přípravě izolátů pro identifikační metodu MALDI TOF. Nejdříve byly připraveny kontrolní vzorky, které byly zkoumány pomocí světelného mikroskopu s metodou fázového rozlišení. Byla pozorována morfologie bakteriálních buněk, na jejímž základně byla určena čistota narostlé kolonie. Morfologické rysy mikroorganismů byly následně zaznamenávány a u vybraných izolátů byly rovněž pořízeny fotografie. Vše bylo pozorováno se zvětšením 400x.

4.5.1.6 MALDI TOF MS identifikace

Z izolátů, které byly vyhodnoceny jako čisté, byl pomocí injekční stříkačky odebrán objem 1ml a přemístěn do 1,5 ml mikrozkumavky typu Eppendorf. Označené mikrozkumavky se vzorky byly odstředěny při 14500 rpm po dobu 5 minut. Z odstředěných vzorků byl opatrně slit supernatant tak, aby na dně zůstala peleta, která byla následně rozpuštěna v 500 µl 70 % ethanolu, došlo tak k fixaci vzorku. Vzorky byly znovu odstředěny na stejný počet otáček, po stejnou dobu. Ethanol byl slit a jeho zbytek důkladně odsán pomocí automatické pipety. Zkumavky s peletami byly ponechány 10 minut otevřené, aby došlo k vytěkání zbytku ethanolu. K peletě bylo přidáno 15 µl 70 % mravenčí kyseliny a 15 µl acetonitrilu (obojí Sigma-Aldrich). Obsah byl důkladně zhomogenizován pomocí automatické pipety a následně byl vzorek odstředěn. Na MALDI destičku (MTP 384, leštěná ocel) bylo nanášeno po 1 µl supernatantu vzorku ve dvou kopiích. Po zaschnutí naneseného roztoku bylo na všechny zaplněné terčíky přidáno po 1 µl HCCA matrice (Sigma-Aldrich), kterou bylo nutné nechat při pokojové teplotě uschnout. Všechny obsazené pozice na destičce byly zaznamenány do připravené tabulky. Poté byly vzorky změřeny a identifikovány (Bruker Daltonik GmbH).

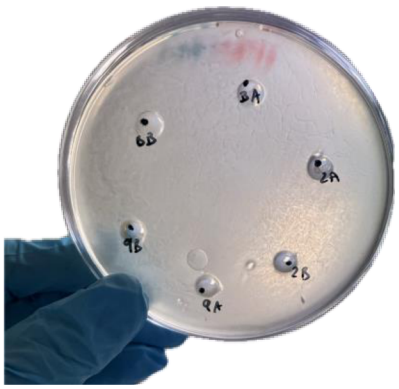
Na základě výsledků byly vybrány klostridiální kultury s nejvyšší jistotou správné identifikace (skóre identifikace >2,00). Z vybraných kultur byl odebrán pomocí injekční stříkačky 1 ml, kterým bylo inokulováno CMM médium. Inokulované médium bylo umístěno do inkubátoru na 37 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí kultivační doby byla vialka klostridiálním kmenem v CMM označena papírovým štítkem s veškerými informacemi o příslušném kmeni a uskladněna při pokojové teplotě.

5 Výsledky

5.1 Výsledky testování antimikrobiální aktivity

5.1.1 Výsledky testování jamkové difúzní metody

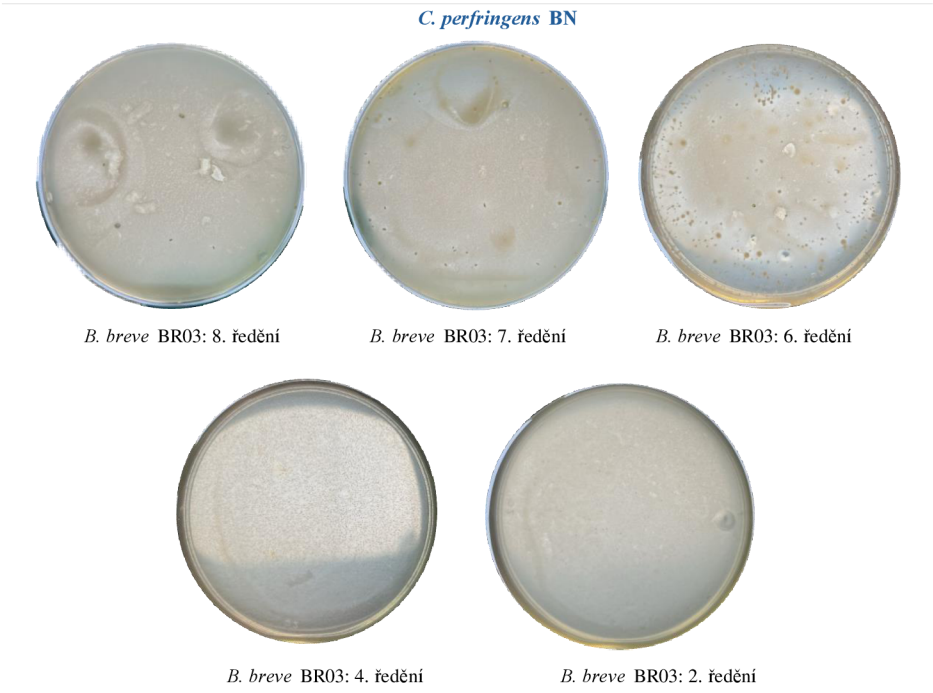
Antimikrobiální účinky živých kultur bifidobakterií a z nich předem připravených parabiotik a metabiotik byly testovány pomocí jamkové difúzní metody vůči vybraným klostridiálním druhům izolovaných ze vzorků stolice kolitických kojenců. Testování antimikrobiální aktivity touto metodou nepřineslo žádné viditelné výsledky. Příklad negativního výsledku inhibice je uveden na obrázku č. 13. Celkem byly otestovány 2 probiotické kmeny (*B. breve* BR03 a *B. lactis* Bb-12) ve třech různých variantách (živá kultura, metabiotikum a probiotikum) proti 9 klostridiím izolovaných ze stolice kojenců s kolitidami; *C. perfringens* (kmeny *CP* BN, *CP* AZ1, *CP* NVz, *CP* NK, *CP* Z), *C. butyricum* BN, *C. neonatale* OK2, *C. saccharobutylicum* AZ2 a *Cl. difficile* BN. Tudíž vzniklo 54 kombinací. Předpokládaným projevem antimikrobiálních účinků vitální bifidobakteriální kultury, jejích metabolitů a buněčných struktur je tvorba inhibičních zón. Zóny inhibice růstu klostridií tvořících zákal v kultivačním médiu nebyly pozorovány u žádné z testovaných kultur, suspenzí či metabolitů s očekávaným antimikrobiálním účinkem. Lze spekulovat, že v případě testování živé bifidobakteriální kultury, nebyl pozorován pozitivní výsledek z důvodu nevhodných podmínek pro aktivaci potřebných mechanismů či produkci látek zajišťujících antimikrobiální účinek probiotickou kulturou. Roli by rovněž mohl hrát nepoměr mezi množstvím buněk klostridií a bifidobakterií. V případě metabiotik mohla hrát roli absence či nízká koncentrace některých antimikrobiálních látek. Jelikož pH metabiotik nebylo upraveno na neutrální hodnotu, lze předpokládat že neobsahovalo ani dostatečnou koncentraci kyselin, které by snižovaly pH na hodnotu dostatečnou k inhibici klostridiálních buněk. Rovněž nebyla potvrzena účinnost parabiotik, jakožto suspenze s antimikrobiálním účinkem. Buněčné komponenty nemusely být obsaženy v suspenzi v dostatečné koncentraci, zároveň mohlo dojít k jejich poškození a deaktivaci během přípravy a/nebo skladování parabiotik. Zároveň se nabízí možnost, že buněčné komponenty testovaných kultur obecně nevykazují antimikrobiální účinek.



Obrázek č. 13 – příklad negativního výsledku inhibice *C. perfringens* BN u jamkové difúzní metody. Pozorované antimikrobiální účinky u *B. breve* BR03, *B. lactis* Bb-12 a z nich připravených parabiotik a metabiotik.

5.1.2 Výsledky testování modifikovanou spotovou metodou

Antimikrobiální účinky čerstvě narostlých kultur bifidobakterií o různých koncentracích KTJ/ml vůči klostridiím byl testován modifikovanou spotovou metodou, kdy narostlá KTJ bifidobakteriální kultury představovala spot. Počet spotů na PM odpovídal patřičnému ředění. Klostridiální kultura byla obsažena v agaru, který byl použit jako druhá vrstva, tedy jako přeliv. Antimikrobiální účinek kmenů *B. breve* BR03 a *B. lactis* Bb-12 byla pozorován vůči všem testovaným klostridiálním kulturám. Účinek se nicméně lišil v závislosti na stupni ředění bifidobakteriální kultury. Inhibiční zóny bylo možné pozorovat od 7. ředění níže, tedy u 6., 4. a 2. ředění. U 7. a 6. ředění *B. breve* BR03 i *B. lactis* Bb-12 bylo možné pozorovat inhibiční zóny vzniklé kolem jednotlivých kolonií. V místech s větší koncentrací bifidobakteriálních kolonií docházelo k úplné inhibici růstu klostridií, čímž došlo k úplnému vymizení klostridiálního zákalu vzniklého v horní vrstvě kultivačního média. Tento jev byl pozorován v celém objemu médií u všech nižších ředění, kde byla vysoká koncentrace KTJ bifidobakteriálních buněk.



Obrázek č. 14 – příklad výsledku testování antimikrobiální aktivity modifikovanou spotovou metodou. Bakteriální druh s antimikrobiálním účinkem: *B. breve* BR03. Bakteriální druh, vůči kterému byl antimikrobiální účinek testován: *C. perfringens* BN.

Naopak v případě nejvyššího ředění (8.ředění), kde byla koncentrace bifidobakteriálních buněk nízká (jednotky až nízké desítky kolonií na PM s průměrem 60 cm) nebyl antimikrobiální účinek pozorován. Lze tvrdit, že s výškou ředění se snižoval antimikrobiální účinek bifidobakteriální kultury. Výsledky modifikované spotové metody se nicméně velmi špatně interpretují z důvodu jejich obtížného měření a odečítání. Příklad výsledku testování antimikrobiálního účinku modifikovanou spotovou metodou je uveden výše na obrázku č. 14.

5.1.3 Porovnání antimikrobiálních metod

Celkově lze říci, že modifikovaná spotová metoda fungovala lépe něž metoda jamková difúzní. Zatímco v případě modifikované spotové metody byl pozorován antimikrobiální účinek u čerstvě narostlých kultur *B. breve* BR03 a *B. lactis* Bb-12 vůči všem druhům klostridií, v případě jamkové difúzní metody nebyl pozorován jediný pozitivní výsledek inhibice vůči identickým druhům klostridií. K inhibici nedošlo v případě čerstvě narostlé bifidobakteriální kultury, jejího supernatantu (metabiotika) či z ní připraveného parabiotika. Lze předpokládat, že produkce metabolitů, antimikrobiálních látek či jiné mechanismy, které jsou zodpovědné za antimikrobiální účinek se odvíjí od zvoleného způsobu testování. V tomto případě byly účinné mechanismy či látky aktivovány či produkovány čerstvě narostlou bifidobakteriální kolonií u modifikované spotové metodě. Svou roli může hrát rovněž poměr koncentrací buněk bakteriálních kultur testovaných proti sobě. Působení metabolitů a buněčných komponent samostatně nelze v tomto případě porovnávat.

5.2 Výsledky stanovení fermentačního profilu

5.2.1 API 20 A

Pomocí biochemického testu API 20 A byl testován fermentační profil 9 klostridiálních kmenů izolovaných ze vzorků stolice kolitických kojenců. Byla testována schopnost klostridií utilizovat 20 druhů substrátů. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 12. Příklad výsledků biochemických testů API 20 A je znázorněn na obrázku č. 15(a) a 15(b).

Obrázek č. 15(a) a 15(b) – příklad testovacího proužku testu API 20 A pro *Cl. difficile* BN (a) před dobarvením BCP a (b) po dobarvení BCP. Testovací proužek zobrazuje výsledky reakcí před přidáním xylózy do mikrozkumavky IND.

Tabulka č. 12 – výsledky biochemického testu API 20 A. Vysvětlivky: (+) pozitivní reakce, (-) negativní reakce, (*) nejasný výsledek. Použité zkratky pro aktivní složky: IND – L-tryptofan, URE – urea, GLU – D-glukóza, MAN – D-mannitol, LAC – D-laktóza, SACH – D-sacharóza, MLA – D-maltóza, SAL – salicin, XYL – D-xylóza, ARA – L-arabinóza, GEL – želatina, ESC – eskulin (citrát železitý), GLY – glycerol, CEL – D-celobióza, MNE – D-manóza, MLZ – D-melezitóza, RAF – D-rafinóza, SOR – D-sorbitol, RHA – L-rhamnóza, TRE – D-trehalóza.

API 20 A										
Testované klostridie	Substráty 1. část									
	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SACH	MAL	SAL	XYL	ARA
Cl. difficile BN	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
C. perfringens NK	*	-	+	-	+	+	+	-	-	-
C. perfringnes BN	*	-	+	-	+	+	+	-	-	-
C. perfringens AZ1	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
C. perfringens Z	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
*C. perfringens N*Vz	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
C. neonatale OK2	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
C. butyricum BN	*	-	+	+	+	+	+	-	+	+
C. saccharobutylicum AZ2	*	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Testované klostridie	Substráty 2. část									
	GEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE
Cl. difficile BN	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
C. perfringens NK	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
C. perfringnes BN	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
C. perfringens AZ1	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
C. perfringens Z	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
*C. perfringens N*Vz	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
C. neonatale OK2	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
C. butyricum BN	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C. saccharobutylicum AZ2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Všechny testované klostridiální druhy vykazovaly pozitivní reakci v přítomnosti D-glukózy, D-laktózy, D-sacharózy, D-maltózy a D-manózy. Na základě těchto výsledků byla zvolena D-glukóza jako pozitivní kontrola pro metabolický test 2'FL a L-fukózy u vybraných druhů klostridií. Zároveň byla u všech kmenů pozorována negativní rekce na tvorbu katalázy.

Pro všechny poddruhy *C. perfringens* byl fermentační profil téměř totožný. Poddruh *C. perfringens* Z vykazoval oproti ostatním pozitivní reakci na eskulin a naopak negativní reakci na glycerol a D-trehalózu. Společně s *C. perfringens* AZ1 a NVz vykazovaly také pozitivní reakci na D-rafinózu. Druh *C. perfringens* byl obecně schopen degradovat želatinu hovězího původu a byl schopný degradace BCP přítomného v médiu, čímž se odlišoval od ostatních klostridiálních druhů

Druh *Cl. difficile*, jehož testovací proužky před a po přidání BCP jsou zobrazeny na obrázku č. 15(a) a 15(b), se odlišoval schopností utilizovat L-tryptofan. Reakce, při které dochází k tvorbě indolu, byla u ostatních druhů vyhodnocena jako negativní nebo byl její výsledek nejasný. Společně s *C. perfringens* nebyl tento druh schopný degradovat D-xylózu a D-arabinózu.

C. butyricum BN a *C. saccharobutylicum* AZ2 vykazovaly pozitivní reakci na téměř u všech cukerných substrátů. Výjimkou byl negativní test na salicin (*CB* BN) a L-arabinózu (*CSB* AZ2).

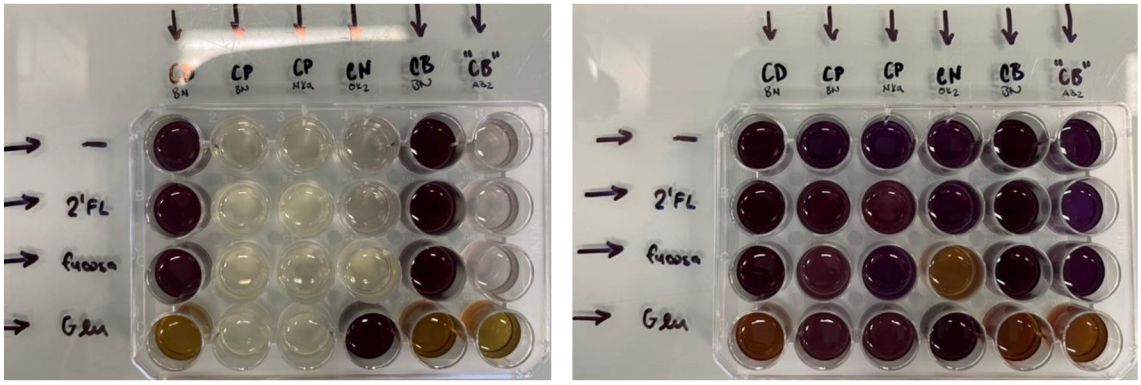
Fermentační profil *C. neonatale* byl nejpodobnější profilu *C. perfringens* AZ. Na rozdíl od *C. perfringens* AZ1 byl druh *C. neonatale* schopný metabolizovat širší škálu cukrů včetně salicinu, D-xylózy, L-arabinózy a D-trehalózy.

5.2.2 API 50 CHL

Médium API 50 CHL bylo použito pro testování vybraných schopnosti klostridiálních kmenů izolovaných ze vzorků stolice kolitických kojenců fermentovat 2'FL a L-fukózu. Schopnost degradace 2'FL nebyla touto metodou prokázána u žádné z 6 testovaných klostridií. Vizuální výsledky testování jsou zachyceny na obrázcích č. 16(a) a 16(b). Přítomnost případných produktů degradace 2'FL nebyla prokázána skrze barevný indikátor přítomný v médiu ani prostřednictvím naměřených hodnot pH. L-fukózu jako růstový substrát byl schopen využít pouze druh *C. neonatale*. Změnu pH, která byla způsobena uvolněním kyselých produktů metabolismu, indikovala změna barvy média. Jak se předpokládalo, naměřená hodnota pH 5,92 byla nižší než hodnoty pH u substrátů se zaznamenanou negativní reakcí. Naopak tato hodnota odpovídala pH naměřeným u pozitivních reakcí kontroly, které v průměru dosahovaly 5,80 ± 0,02. Všechny naměřené hodnoty pH jsou uvedeny v tabulce č. 13. Neočekávaným výsledkem byla negativní reakce u kontroly v případě *C. perfringens* BN, *C. perfringens* NK a *C. neonatale* OK2. U případě testu API 20 A byla schopnost degradace D-glukózy potvrzená v případě všech klostridiálních druhů. Vysvětlení negativního výsledku by bylo možné hledat v samotné přípravě testu, kdy mohlo dojít k příliš dlouhé expozici klostridiálních kultur kyslíku, které jsou na jeho přítomnost jakožto striktně anaerobní organismy velmi citlivé. Tyto stresové podmínky mohly ovlivnit metabolickou aktivitu testovaných klostridií. BCP přítomné v médiu API 50 CHL bylo degradováno *C. perfringens* BN, *C. perfringens* NK, *C. neonatale* OK2 a *C. saccharobutylicum* AZ2. Degradace BCP nebyla zaznamenána v případě *C. neonatale* OK2 v přítomnosti substrátu D-glukózy, což může společně s negativním výsledkem reakce značit, že v tomto konkrétním případě nedošlo k růstu kultury.

Tabulka č. 13 – naměřené hodnoty pH u API 50 CHL testu stanovujícího schopnost degradace 2'FL a L-fukózy.

Výsledky měření pH							
Testovaný bakteriální druh		*CD* BN	*CP* BN	*CP* NK	*CN* OK2	*CB* BN	*CSB* AZ2
Typ substrátu	API 50 CHL	6,51	6,62	6,47	6,52	6,56	6,45
	2'FL	6,52	6,57	6,56	6,54	6,59	6,59
	L-fukóza	6,52	6,34	6,54	5,92	6,59	6,61
	Glukóza	5,79	6,12	6,21	6,51	5,80	5,82



Obrázek č. 16(a) a 16(b) – výsledky API 50 CHL testu stanovujícího schopnost degradace 2'FL a L-fukózy (a) před dobarvením BCP a (b) po dobarvení BCP.

5.3 Zhodnocení *ex vivo* experimentu

Experiment byl zaměřen na testování antimikrobiální aktivity na úrovni fekálního vzorku v laboratorních podmínkách. Vzájemný vztah bifidobakterií byl ovlivněn přítomnou fekální mikrobiotou a také přidaným substrátem. Na antimikrobiální účinek bifidobakterií mohlo vykazovat vliv několik faktorů, které mohly mít za následek rozdíly ve výsledcích inhibice růstu klostridií. Fekální mikrobiota obsahující klostridie byla subkultivována v 9 variantách, které se od sebe lišily přidaným substrátem a probiotickým kmenem bifidobakterií. Celkem bylo testováno 8 vzorků stolice původem od kolitických dětí. Dohromady tedy bylo analyzováno 72 variant experimentálního prostředí. Ve všech testovaných vzorcích nebyli detekovány kultivačně bifidobakterie, nýbrž dominujícím taxony byly klostridie. Kdy 6 vzorků stolice obsahovalo druh *C. perfringens*, z toho jeden spolu s *C. perfringens* také *C. butyricum* a *Cl. difficile*. Dále 1 vzorek obsahoval pouze druh *C. neonatale* a 1 vzorek stolice obsahoval bakteriální druh, který nebyl zařazen v knihovně identifikací MALDI TOF MS, a proto nebylo možné ho pomocí této metody identifikovat. Na základě popisu morfologie a identifikace pomocí sekvenování genu 16S rRNA, která byla provedena dříve v rámci odlišného projektu, bylo zjištěno, že se jedná o *C. saccharobutylicum*. Zhodnocení bakteriálního obsahu experimentálního prostředí bylo provedeno bylo provedeno na základně plotnové kultivační metody. Plotnová kultivační metoda byla vyhotovena na modifikovaném WSP agaru a na modifikovaném WSP agaru doplněném o MUP a KO, která je selektivní pro bifidobakterie a klostridie.

5.3.1 Zhodnocení aplikované eseje

Vytvořené experimentální prostředí se ukázalo jako vhodné pro kultivaci šesti vzorků stolice, jejichž klostridiální mikrobiota byla zastoupena převážně druhem *C. perfringens*. Naopak *ex vivo* vytvořené prostředí se potvrdilo jako nevyhovující pro kultivaci fekálních vzorků obsahujících *C. saccharobutylicum* a *C. neonatale*. Dva zmíněné klostridiální druhy byly schopny minimálního či žádného růstu, množení či konkurence ve vzniklém prostředí *ex vivo* experimentu. *C. saccharobutylicum* bylo detekováno ve třech variantách. V případě kultivace samotného fekálního vzorku spolu s PNKV bylo detekováno v počtech log 7,86

KTJ/ml, nicméně nad ním převažovaly izoláty *E. coli*. V dalším případě bylo identifikováno společně s *B. breve* ve stejných počtech ve variantě osahující probiotikum a MM. Rozbor mimo jiné ukázal převahu bakterií rodů *Enterococcus faecalis* (*Enc. faecalis*) a *K. pneumonie* na plotnách s kultivačním médiem bez Mup a KO, a to i v případě variant s bifidobakteriemi. Lze spekulovat, že v tomto případě vznikla situace, ve kterém okolní fekální mikrobiota potlačila růst klostridií i bifidobakterií, a to i přes to, že médium pro subkultivaci bylo doplněno o látky potlačující jejich růst. Až přídavkem Mup a KO do kultivačního média došlo k inhibici „plevelné" fekální mikrobioty, což se projevilo na snížení počtů KTJ/ml a na výsledcích identifikací.

V případě fekálního vzorku OK2 obsahujícího *C. neonatale* nedošlo k pomnožení buněk klostridií v experimentálním prostředí na detekovatelnou mez, která byla stanovena nejnižším stupněm testovaného ředění (5. ředění). U variant kultivace fekálního vzorku s obohacením o substrát nebo bez něj, byl na kultivačních plotnách s kultivačním médiem bez Mup a KO stanoven počet vegetativních bakteriálních buněk na méně než log 5 KTJ/ml. Výsledky naznačují, že pro *C. neonatale* experimentální prostředí nepředstavovalo vhodné podmínky pro růst. Výsledky identifikací subkultivací fekálních vzorků AZ2 a OK2 jsou uvedeny v tabulce č. 14.

Tabulka č. 14 – kvalitativní a kvantitativní [log KTJ/ml] výsledky subkultivace fekálních vzorků AZ2 a OK2. Vysvětlivky: A – kultivační médium bez Mup a KO, B –kultivační médium s Mup a KO, (-) – nedošlo k izolaci žádných kolonií, (*) – během kultivace nedošlo k růstu izolovaných bakterií.

AZ2	**A**	**Identifikace**	**B**	**Identifikace**
FVz	7,86	*Enc. faecalis, E. coli, K. pneumoniae*	< log 5	-
FVz + MM	7,84	*C. saccharobutylicum, Enc. faecalis*	< log 5	-
FVz + PNKV	7,86	*E. coli, Enc. faecalis*	7,86	*C. saccharobutylicum, E. coli, Enc. faecalis*
FVz + *BB*	8,07	*Enc. faecalis, E. coli, K. pneumoniae*	6,10	-
FVz + *BB* + MM	8,96	*Enc. faecalis, E. coli, K. pneumoniae*	7,96	*B. breve, C. saccharobutylicum*
FVz + *BB* + PNKV	9,43	*Enc. faecalis, E. coli, K. pneumoniae*	6,30	*B. breve*
FVz + *BL*	9,16	*Enc. faecalis, E. coli, B. lactis*	8,96	*B. lactis*
FVz + *BL* + MM	8,16	*E. coli, K. pneumoniae, B. lactis*	8,01	*B. lactis*
FVz + *BL* + PNKV	8,30	*Enc. faecalis, E. coli, K. pneumoniae*	7,97	*B. lactis*
OK2	**A**	**Identifikace**	**B**	**Identifikace**
FVz	6,20	*Cit. freundii*	< log 5	-
FVz + MM	< log 5	-	< log 5	-
FVz + PNKV	5,90	*Cit. freundii*	< log 5	-
FVz + *BB*	9,44	*B. breve*	9,62	*B. breve*
FVz + *BB* + MM	8,96	*B. breve*	8,86	*B. breve*
FVz + *BB* + PNKV	10,25	*B. breve*	10,25	*B. breve*
FVz + *BL*	8,10	*B. lactis*	8,19	*B. lactis*
FVz + *BL* + MM	9,64	*B. lactis*	9,67	*B. lactis*
FVz + *BL* + PNKV	8,15	*B. lactis, Cit. freundii*	8,26	*B. lactis*

Jak už bylo uvedeno, vytvořené experimentální prostředí naopak vyhovovalo druhu *C. perfringens,* který se pro své metabolické vlastnosti stal ideálním bakteriálním prototypem pro *ex vivo* testování vzájemných vztahů mezi klostridiemi a bifidobakteriemi. Jak vyplynulo ze stanovení fermentačního profilu, druh *C. perfringens* je schopen utilizovat širokou škálu substrátů včetně želatiny. Tento druh dokáže využívat bílkoviny jako zdroj uhlíku, čímž získává konkurenční výhodu oproti sacharolytickým klostridiím a dalším mikroorganismům. Enzymatická vybavenost proteolytických klostridií se projevila v případě jejich schopnosti růstu v chudém médiu, které neobsahovalo zdroj sacharidů, ale naopak bylo bohaté na bílkoviny. Naopak sacharolytické druhy klostridií v tomto prostředí nebyly schopné růstu a množení alespoň v takovém množství, aby byly detekovatelné na kultivačních plotnách. Zároveň se tato vlastnost projevila v případě kultivace vzorků stolice, jejichž fekální mikrobiota obsahovala víc jak jeden detekovatelný klostridiální druh. Například ve fekálním vzorku BN, byly detekovány v rámci odlišného projektu tři druhy *C. perfringens*, *C. butyricum* a *Cl. difficile*, nicméně vytvořené experimentální prostředí konkurenčně zvýhodnilo pouze *C. perfringens*.

5.3.2 Vliv přidaného substrátu

V závislosti na přidaném substrátu bylo možné pozorovat odlišné počty KTJ/ml v jednotlivých variantách, jejichž mikrobiota byla po subkultivaci zastoupena zpravidla převážně klostridiemi nebo bifidobakteriemi. Na základě počtů KTJ/ml bylo možné hodnotit, jak druh přidaného substrátu ovlivňuje růst a množení obsažených mikroorganismů. Aritmetické průměry počtů (log) KTJ/ml z jednotlivých subkultivací a variant stanovených na modifikovaném kultivačním médiu jsou uvedeny v tabulce č. 15. Mikrobiota subkultivačních variant obsahujících pouze fekální vzorek samotný nebo s přídavkem substrátu byla převážně zastoupena *C. perfringens*. Průměrné počty KTJ/ml těchto tří variant se odvíjely od přítomnosti substrátu a jeho druhu. Jak bylo možné očekávat, nejnižší průměrné počty KTJ/ml byly stanoveny u varianty bez přidaného substrátu (log 8,85 KTJ/ml). Podobné výsledky bylo možné pozorovat u variant obsahujících MM (log 8,95 KTJ/ml). V případě varianty bez substrátu výsledek počtů (log) KTJ/ml vychází z nepřítomnosti snadno dostupného zdroje uhlíku, jaký představují např. některé sacharidy. Klostridie rovněž nejsou vybaveny potřebným enzymatickým komplexem, který je potřebný pro utilizaci specifických složek MM, jimiž jsou HMO. Klostridiální druhy v tomto případě využívaly jako zdroj uhlíku složky bílkovinné povahy obsažené v chudém médiu a pouze minoritní část složek MM, které pro ně byly využitelné. U variant s obsahem NPKV je znatelné zvýšení průměrných počtů (log) KTJ/ml fekální mikrobioty zastoupené převážně klostridiemi (log 9,65 KTJ/ml). Tento výsledek by mohl naznačovat, že druh *C. perfringens* je schopen lépe využívat jako zdroj energie složky PNKV. Naopak počty KTJ/ml varianty s MM, byly téměř shodné s počty KTJ/ml varianty bez substrátu.

V případě hodnocení schopnosti využití substrátu bifidobakteriemi se výsledky lišily v závislosti na použitém probiotickém kmeni. Nejvyšší průměrné počty (log) KTJ/ml *B. breve* BR03 a B63 byly stanoveny u varianty obsahující MM (log 9,43 KTJ/ml). Výjimku tvořil pouze vzorek NKa, u kterého byly počty (log) KTJ/ml shodné s počty varianty obsahující PNKV. Naopak PNKV se jako růstový substrát osvědčil pro *B. breve* jako méně vhodný. V průměru

byl u varianty obsažené PNKV stanoven počet log 8,63 KTJ/ml, což je téměř o řád nižší než v případě varianty s MM. Tento výsledek by odpovídal schopnosti bifidobakterií, konkrétně *B. breve*, utilizovat specifické složky MM a tím pádem i lépe prosperovat za přítomnosti MM jako substrátu. Oproti tomu u variant obsahujících *B. lactis* Bb-12 nebyly rozdíly v průměrných počtech (log) KTJ/ml mezi MM a PNKV téměř patrné. V případě varianty s MM byl průměrný počet stanoven na log 10,15 KTJ/ml a u PNKV log 10,10 KTJ/ml. Druh *B. lactis* je typický spíše pro mikrobiotu dospělého člověka, jehož strava zpravidla neobsahuje HMO, čemuž je střevní mikrobiota enzymaticky přizpůsobena.

Celkové počty u variant subkultivace obsahující *B. lactis* jsou přibližně o řád vyšší než počty KTJ/ml u variant s *B. breve*. Výsledek se zřejmě odvíjí od vyšší počáteční očkovací dávky probiotického přípravku s *B. lactis* (1×10^9 KTJ živých buněk v DDD) oproti přípravku s B. breve (2×10^8 KTJ živých buněk v DDD).

Tabulka č. 15 – počty mikroorganismů [(log) KTJ/ml] v jednotlivých variantách subkultivací, jejich aritmetické průměry $(\bar{x})$ a směrodatné odchylky (σ). Byly použity počty KTJ z ploten s kultivačním médiem s Mup a KO.

Proměnné	(log) [KTJ/ml]						$\bar{x}$	σ
	NKa	**NVz**	**PB**	**AZ1**	**BN**	**Z**		
FVz	6,69	8,82	9,1	9,66	9,57	9,29	8,85	1,01
FVz+ MM	6,6	8,72	9,42	9,69	9,79	9,5	8,95	1,11
FVz + PNKV	9,1	9,62	9,92	10,15	9,74	9,37	9,65	0,34
FVz + *BB*	9,6	8,81	9,07	8,44	9,85	9,51	9,21	0,49
FVz + *BB* + MM	9,91	8,75	8,83	10,22	9,03	9,82	9,43	0,58
FVz + *BB* + PNKV	10	8,17	7,74	9,22	8,05	8,58	8,63	0,77
FVz + *BL*	9,62	9,98	9,6	9,46	9,97	9,57	9,7	0,20
FVz + *BL* + MM	9,83	10,11	10,15	10,2	10,29	10,33	10,15	0,16
FVz + *BL* + PNKV	9,83	10,25	10,05	10,01	10,16	10,33	10,1	0,16

5.3.3 Hodnocení antimikrobiálního účinku

V případě subkultivace vzorků NK a NVz došlo k úplné inhibici *C. perfringens* ve všech variantách obsahujících probiotické kmeny bifidobakterií, bez ohledu na přidaný substrát či typ přidaného probiotického přípravku. U variant, které obsahovaly probiotické bifidobakteriální kmeny těchto subkultivací nebyla po uplynutí doby kultivace zaznamenána přítomnost plynu, která by indikovala metabolickou aktivitu klostridií. Přítomnost kolonií klostridií nebyla potvrzena ani na plotnách kultivačního nemodifikovaného a modifikovaného média. Jedná se tak o „ideální“ výsledek *ex vivo* experimentu. Výsledky identifikací subkultivací fekálních vzorků NK a NVz jsou uvedeny v tabulce č. 16.

Tabulka č. 16 – kvalitativní a kvantitativní [log KTJ/ml] výsledky subkultivace fekálních vzorků NKa a NVz. Vysvětlivky: A – kultivační médium bez Mup a KO, B – kultivační médium s Mup a KO.

NK	**A**	**Identifikace**	**B**	**Identifikace**
FVz	7,34	*C. perfringens, E. coli*	6,96	*C. perfringens*
FVz + MM	7,80	*C. perfringens*	6,60	*C. perfringens*
FVz + PNKV	9,38	*C. perfringens*	9,10	*C. perfringens*
FVz + *BB*	9,49	*B. breve*	9,60	*B. breve*
FVz + *BB* + MM	10,02	*B. breve*	9,91	*B. breve*
FVz + *BB* + PNKV	10,01	*B. breve*	10,00	*B. breve*
FVz + *BL*	9,60	*B. lactis*	9,62	*B. lactis*
FVz + *BL* + MM	9,82	*B. lactis*	9,83	*B. lactis*
FVz + *BL* + PNKV	9,75	*B. lactis*	9,83	*B. lactis*
NVz	**A**	**Identifikace**	**B**	**Identifikace**
FVz	8,78	*C. perfringens*	8,82	*C. perfringens*
FVz + MM	9,01	*C. perfringens*	8,72	*C. perfringens*
FVz + PNKV	9,65	*C. perfringens*	9,62	*C. perfringens*
FVz + *BB*	8,88	*B. breve*	8,81	*B. breve*
FVz + *BB* + MM	8,74	*B. breve*	8,75	*B. breve*
FVz + *BB* + PNKV	8,26	*B. breve*	8,17	*B. breve*
FVz + *BL*	9,97	*B. lactis*	9,98	*B. lactis*
FVz + *BL* + MM	10,30	*B. lactis*	10,11	*B. lactis*
FVz + *BL* + PNKV	10,17	*B. lactis*	10,25	*B. lactis*

Subkultivace vzorků PB, AZ1, BN a Z se odlišovaly od subkultivací NKa a NVz indikací *C. perfringens* v některých variantách. V případě těchto 4 subkultivací, jejichž výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 17, nedošlo vlivem působení neznámých faktorů k plné inhibici klostridií u všech kultivačních variant obsahujících bifidobakterie. Tento jev nastal v případě subkultivace fekální mikrobioty vzorku AZ1 a PB s *B. lactis* Bb-12 bez přidaného substrátu. Naopak v případě subkultivací vzorků BN a Z byla přítomnost *C. perfringens* zaznamenána u variant obsahujících kombinaci probiotických kmenů *B. breve*. U subkultivace BN se jednalo o varianty bez substrátu nebo s přídavkem MM. Naopak u subkultivace vzorku Z se jednalo o varianty s přidaným MM nebo PNKV. Je možné že tyto poddruhy *C. perfringens* mohou být odolnější vůči antimikrobiálním mechanismům či látkám, které využívají probiotické kmeny bifidobakterií. Nebo naopak nemusely pro bifidobakterie nastat ty správné podmínky, které by dostatečně aktivovaly jejich antimikrobiální složky. Rovněž lze spekulovat, že výsledky u variant bez substrátu se odvíjí od nepřítomnosti zdroje uhlíku, což mohlo mít vliv na metabolismus přítomných mikroorganismů. Za normálních podmínek je substrát bifidobakteriemi degradovaný za vzniku SCFA, které snižují pH okolního prostření, které se tím stává nehostinné pro některé patogenní mikroorganismy.

Nicméně je nutné poznamenat, že výsledky identifikace bakteriálních druhů přítomných na kultivačních plotnách jsou ovlivněny lidským faktorem. Výběr kolonií určených k izolaci a následné identifikaci určen pracovníkem. Proto je možné, že klostridie byly přítomny rovněž v jiných variantách, nicméně nedošlo k jejich izolaci. Pro komplexnější a přesnější kvantitativní

a kvalitativní zhodnocení mikrobioty fekálního prostředí by musela být zvolena přesnější forma analýzy nebo jiné metody hodnocení zastoupení sledovaných skupin bakterií.

Tabulka č. 17 – kvalitativní a kvantitativní [log KTJ/ml] výsledky subkultivace fekálních vzorků PB, AZ1, BN a Z. Vysvětlivky: A – kultivační médium bez Mup a KO, B – kultivační médium s Mup a KO.

PB	**A**	**Identifikace**	**B**	**Identifikace**
FVz	9,34	*C. perfringens*	9,10	*C. perfringens*
FVz + MM	9,44	*C. perfringens*	9,42	*C. perfringens*
FVz + PNKV	9,93	*C. perfringens*	9,92	*C. perfringens*
FVz + *BB*	9,21	*B. breve*	9,07	*B. breve*
FVz + *BB* + MM	8,78	*B. breve*	8,83	*B. breve*
FVz + *BB* + PNKV	7,86	*B. breve*	7,74	*B. breve*
FVz + *BL*	9,62	*B. lactis, C. perfringens*	9,60	*B. lactis, C. perfringens*
FVz + *BL* + MM	10,20	*B. lactis*	10,15	*B. lactis*
FVz + *BL* + PNKV	10,15	*B. lactis*	10,05	*B. lactis*
AZ1	**A**	**Identifikace**	**B**	**Identifikace**
FVz	9,67	*C. perfringens*	9,66	*C. perfringens*
FVz + MM	9,54	*C. perfringens*	9,69	*C. perfringens*
FVz + PNKV	10,14	*C. perfringens*	10,15	*C. perfringens*
FVz + BB	8,44	*E. coli, B. breve*	8,44	*B. breve*
FVz + BB + MM	10,18	*B. lactis*	10,22	*B. breve*
FVz + BB + PNKV	9,34	*B. lactis*	9,22	*B. breve*
FVz + BL	9,46	*C. perfringens, B. lactis, E. coli*	9,46	*B. lactis, C. perfringens*
FVz + BL + MM	10,10	*B. lactis*	10,20	*B. lactis*
FVz + BL + PNKV	10,12	*B. lactis*	10,01	*B. lactis*
BN	**A**	**Identifikace**	**B**	**Identifikace**
FVz	9,46	*C. perfringens, W. neuii*	9,57	*C. perfringens*
FVz + MM	8,62	*C. perfringens*	9,79	*C. perfringens*
FVz + PNKV	9,74	*C. perfringens*	9,74	*C. perfringens*
FVz + *BB*	9,87	*B. breve, C. perfringens*	9,85	*B. breve, C. perfringens*
FVz + *BB* + MM	8,92	*B. breve, C. perfringens*	9,03	*B. breve, C. perfringens*
FVz + *BB* + PNKV	8,23	*B. breve, Enc. faecalis*	8,05	*B. breve*
FVz + *BL*	9,72	*B. lactis*	9,97	*B. lactis*
FVz + *BL* + MM	10,38	*B. lactis, S. hominis*	10,29	*B. lactis*
FVz + *BL* + PNKV	11,38	*B. lactis*	10,16	*B. lactis*
Z	**A**	**Identifikace**	**B**	**Identifikace**
FVz	9,17	*C. perfringens*	9,29	*C. perfringens*
FVz + MM	9,46	*C. perfringens*	9,50	*C. perfringens*
FVz + PNKV	9,51	*C. perfringens*	9,37	*C. perfringens*
FVz + *BB*	9,66	*B. breve*	9,51	*B. breve*
FVz + *BB* + MM	10,51	*B. breve, C. perfringens*	9,82	*B. breve, C. perfringens*
FVz + *BB* + PNKV	8,41	*B. breve, C. perfringens*	8,58	*B. breve, C. perfringens*
FVz + *BL*	9,56	*B. lactis, C. perfringens*	9,57	*B. lactis, C. perfringens*
FVz + *BL* + MM	10,20	*B. lactis*	10,33	*B. lactis*
FVz + *BL* + PNKV	10,23	*B. lactis*	10,33	*B. lactis*

6 Diskuze

Stav homeostázy střevního prostředí hraje důležitou roli ve zdraví člověka. Již v úplných počátcích života jedince dochází ke kolonizaci organismu rozmanitou populací mikroorganismů, kdy se nejhustěji osídlenou částí těla stává prostředí tlustého střeva. Spekuluje se, že ke kolonizaci lidského organismu může docházet již v období plodu skrz prostředí dělohy, které bylo po dlouhou dobu považováno za sterilní. Pro proces kolonizace jsou nicméně esenciální faktory, které působí až během samotného porodu a po něm. Složení a vývoj střevní mikrobioty se odvíjí od gestačního věku dítěte a jeho hmotnosti v době narození, způsobu porodu, stylu výživy, antibiotické terapie, vnějšího okolí a mnoha dalších více minoritních faktorů. Bezprostředně po narození dochází k vyčerpání luminálního kyslíku fakultativně anaerobními bakteriemi, čímž se vytváří vhodné podmínky pro kolonizaci anaerobními bakteriemi rodu *Bifidobacterium*, *Clostridium* a zástupci kmene Bacteroidetes (Adlerberth a Wold 2009). Střevní mikrobiota kojenců bez zdravotních komplikací je charakteristická bakteriální populací, ve které dominují zástupci rodu *Bifidobacterium* (Turroni et al. 2012). Bifidobakterie jsou součástí mateřské fekální a vaginální mikrobioty, která je vertikálně přenášená na kojence během vaginálního porodu. Během následujících měsíců jsou určité druhy bifidobakterií v rámci kojenecké střevní mikrobioty konkurenčně zvýhodňovány specifickými složkami mateřského mléka. Bifidobakterie skrze produkty metabolismu, mezi které se řadí SCFA a laktát a skrze přítomnost extracelulárních komponentů modulují nezralé střevní prostředí kojenců, utváří střevní imunitní odpověď, zapojují se do metabolických vztahů střevní populace a zabraňují kolonizaci potencionálně patogenními mikroorganismy včetně klostridií (Milani et al. 2015; Turroni et al. 2018; Devika a Raman 2019). Klostridie se řadí vedle bifidobakterií mezi prvotní anaerobním kolonizátory kojeneckého střeva. V rámci experimentální části této diplomové práce byly použity vzorky stolice kolitických kojenců a klostridiální kmeny z nich izolované pro účely testování antimikrobiální aktivity. Ve fekální mikrobiotě všech příslušných vzorků stolice byly jako dominantní stanoveny klostridie v počtech > 10^8 KTJ/g, a to plotnovou kultivační metodou na modifikovaném médiu doplněném o mupirocin a kyselinou octovou (Makovska et al. 2023). Bifidobakterie nebyly ve fekálních vzorcích kultivačně detekovány (> 10^5 KTJ/g). Co se týče druhové variability, byly ve vzorcích nejčastěji detekován *C. perfringens*. Dále byly detekovány druhy *Cl. diffcicile*, *C. neonatale*, *C. butyricum* a *C. saccharobutylicum*. V případě dysbiózy střevní mikrobioty může dojít ke vzniku patologických zánětlivých stavů včetně AAD, NEC a také kojenecké kolitidy vyvolané mimo jiné klostridiálními druhy, které se nám podařilo detekovat. Mezi faktory zvyšující pravděpodobnost výskytu zánětlivých a infekčních stavů vyvolaných toxiny se řadí nízký gestační věk, porod císařským řezem, antibiotická terapie či strava založená na náhradní kojenecké výživě (Zhou et al. 2015; Smits et al. 2016; Rhoads et al. 2018). Nicméně některé druhy včetně *C. butyricum* patří mezi významné producenty butyrátu, který je důležitým zdrojem energie pro enterocyty (Stoeva et al. 2021). Období, ve kterém dochází ke stabilizaci střevní mikrobioty je individuální, nicméně většina studí se shoduje, že k tomu dochází přibližně ve věku 2-3 let. Avšak turbulentní vývoj, který tomuto populačnímu ustálení předcházel, může ovlivňovat zdravotní stav jedince celý život (Butel et al. 2018; Stewart et al. 2018).

Vzájemný vztah bifidobakterií a klostridií je možné pozorovat ze dvou úhlu pohledu. Prvním úhlem může být antimikrobiální účinek bifidobakterií vůči klostridiím. Pro testování antimikrobiálního účinku je stěžení difuzní metoda s použitím disků či jamek vytvořených v agaru, která se řadí mezi nejpoužívanější metody testování. Jamková difuzní metoda je vhodná pro testování živé bakteriální kultury, jejích metabolitů, buněčných komponentů či jiných látek s antimikrobiálním účinkem (Monteiro et al. 2019). Mezi další metody testování se řadí např. spotová metoda a její modifikace či testování antimikrobiální aktivity v rámci komplikovanějších systémů, které zahrnují např. působení odlišných faktorů, jimiž může být přítomnost fekální mikrobioty či přídavek substrátu (Monteiro et al. 2019; Valdés-Varela et al. 2016). V rámci této práce bylo provedeno testování antimikrobiální aktivity všemi třemi zmíněnými metodami, přičemž výsledky jednotlivých metod se svým účinkem do značné míry lišily. V experimentální části práce byl hodnocen vzájemný vztah bifidobakterií a klostridií pomocí dvou odlišných *in vitro* metod. Pomocí jamkové difúzní metody a modifikované spotové metody měl být pozorován antimikrobiální účinek dvou živých kultur *B. breve* BR03 a *B. lactis* Bb-12 vůči 9 kmenům klostridií izolovaných ze vzorků stolice kolitických kojenců. Pozitivní výsledky byly pozorovány pouze v případě modifikované spotové metody. Naopak v případě jamkové difúzní metody nebyl zaznamenán jediný pozitivní výsledek. Tento výsledek vyvolává otázky, v jaké fázi růstu bifidobakteriální kultury dochází k vytváření látek s antimikrobiálním účinkem, o jaké látky se jedná a v jaké koncentraci jsou produkovány. Dále zda se antimikrobiální účinek odvíjí od produktů fermentace, bakteriocinů nebo jejich kombinace. Studie zabývající se antimikrobiálním účinkem bifidobakterií a laktobacilů vůči vybraným druhům klostridií, ve které byla použita forma testování antimikrobiální aktivity spotovou metodou, přisoudila inhibiční vlastnosti probiotických kmenů působení bakteriocinů (Monteiro et al. 2019). Bifidobakterie mohou produkovat řadu antimikrobiálních látek tzv. bakteriocinů. Jedná o se převážně o peptidy, které jsou relativně stabilní vůči vysokým teplotám a nízkému pH. Produkce bakteriocinů byla popsána u řady druhů bifidobakterií. U kmene *B. lactis* Bb-12 byla detekována produkce látky pojmenované bifilac Bb-12. Dále byl popsán bakteriocin bifidon I u *B. infantis* BCRC 14602 či bifilong u *B. longum* (Martinez et al. 2013). Lze spekulovat, zda pozitivní výsledky modifikované spotové metody nebyly způsobeny produkcí bakteriocinů, které mohla být vyvolána stresovými faktory v podobně přítomnosti klostridií či vystavení kyslíku během přelivu. Výsledek studie Monteiro et al. (2019) se od výsledků této práce liší nepřítomností inhibičního účinku kmene *B. lactis* vůči kmenům *C. butyricum*, *C. perfringens* a *Cl. difficile.* Naše výsledky antimikrobiální účinek kmene *B. lactis* Bb-12 vůči těmto druhům naopak potvrdily. Může se tak jednat o antimikrobiální účinek vázaný na specifický kmen bifidobakterií (Monteiro et al. 2019).

Co se týče možných inhibičních účinků SCFA a laktátu, byla v experimentální části práce pro testování antimikrobiálních účinků produktů fermentace bifidobakterií *B. breve* BR03 a *B. lactis* Bb-12 (po 24 hodinách kultivace v modifikovaném kultivačním médiu) použita jamková difúzní metoda. Lze předpokládat, že testované metabiotikum obsahovalo určitou koncentraci acetátu a laktátu. Inhibiční účinek metabiotik vůči klostridiím, který by mohl být způsoben právě těmito metabolity, však nebyl pozorován u žádné varianty. To se neshoduje s výsledky studie od Huertas-Díaz et al. (2023), kde byl testován účinek fermentačních produktů bifidobakterií utilizujících HMO zastoupených převážně 2‘FL ve formě acetátu a laktátu o různých koncentracích vůči vybraným střevním mikroorganismům čeledi *Clostridiaceae* a

Peptostreptococcaceae. Antimikrobiální aktivita zde byla testována formou testu dvojnásobného ředění bujónu v mikrotitračních destička a výsledný růst bakterií byl detekován měřením optické hustoty při 590 nm po 24 hodinách inkubace. Jedním ze závěrů této studie byl silnější antimikrobiální účinek kyseliny mléčné vůči *Cl. difficile* a *Intestinibacter bartlettii* v porovnání kyselinou octovou (Huertas-Díaz et al. 2023), což se neshoduje s výsledky jiných studií, které naopak považují za účinnější kyselinu octovou (Chun et al. 2014). Oproti Huertas-Díaz et al. (2023) jsme nevěděli, jaká je konečná koncentrace laktátu a acetátu v testovaném metabiotiku. V souvislosti s těmito výsledky je důležité poznamenat, že doposud nebyla dostatečně velká pozornost věnována skupině aromatických mléčných kyselin indolmléčné, fenylmléčné a 4-hydroxyfenylmléčné, které vznikají z aromatických aminokyselin jako produkty metabolismu bifidobakterií utilizujících složky mateřského mléka. Studie od kolektivu Laursen et al. naznačila, že by aromatické mléčné kyseliny mohly ovlivňovat imunitní funkce v kojeneckém období (Laursen et al. 2021). V rámci *ex vivo* experimentu se výsledný antimikrobiální účinek odvíjel od klostridiálního kmene přítomného ve fekální mikrobiotě.

Bifidobakteriální kmeny jsou pro svůj jednoznačně pozitivní účinek na zdraví kojenců přidávány do náhradních kojeneckých výživ. Na základě průzkumu trhu s kojeneckými výživami v České republice byla identifikována řada výživ obsahujících probiotické kmeny druhů *B. lactis*, *B. infantis* a *B. longum,* a to buď samostatně nebo ve vzájemné kombinaci. Probiotické bifidobakteriální kmeny jsou rovněž k dostání ve formě suplementů, které se doporučují dětem od narození v případě výskytu kolik či zažívacích obtížích. V experimentální části diplomové práce byl pro testování antimikrobiální aktivity *ex vivo* metodou použit právě tento typ přípravků. V jednom případě byl použit probiotický doplněk obsahující směs kmenů *B. breve* BR03 a B63, které byly v DDD představující 5 kapek obsaženy v množství 2×10^8 KTJ/ml. V druhém případě se jednalo o doplněk obsahující *B. lactis* Bb-12 v množství 10^9 KTJ/ml v 6 kapkách představujících. Deklarované množství KTJ/ml bylo ověřeno pomocí plotnové kultivační metody na modifikovaném kultivačním médiu, které bylo doplněno o Mup a KO (Makovská et al. 2023). Použití jednotlivých kmenů v produktech se odvíjí od výsledků studií, které naznačují, že jejich dodatečná suplementace může mít vliv na frekvenci vyprazdňování kojence a vlastnosti samotné stolice, snížení incidence kojeneckých kolik a GIT infekcí a také optimalizaci střevního prostředí z hlediska složení jeho metabolomu a mikrobioty (Mohan et al. 2006; Escribano et al. 2018; Maldonado et al. 2019). Kojeneckou mikrobiotu ovlivňují zvýšením zastoupení bifidobakterií, a naopak snížením některých potencionálně patogenních zástupců. Pro své pozitivní výsledky jsou vybrané probiotické kmeny bifidobakterií doporučovány u novorozenců, kteří se narodili předčasně a hrozí u nich propuknutí NEC (Van Den Akker et al. 2020). Nicméně aby bifidobakterie mohly dlouhodobě kolonizovat prostředí střeva kojence a působit tak pozitivně na jeho zdraví, musí být jejich růst podporován vhodným zdrojem uhlíku. Nejpřirozenějším zdrojem výživy kojenců je mateřské mléko, které obsahuje komplexní směs HMO, jejichž koncentrace a složení je pro každou matku specifické. HMO představují exkluzivní zdroj uhlíku pouze pro vybrané druhy bifidobakterií, které vlastní genetickou a enzymatickou výbavu pro jejich utilizaci. Schopnost utilizace HMO byla popsána u typických kojeneckých bifidobakterií, mezi které se řadí *B. infantis*, *B. longum*, *B. breve* či *B. bifidum* (Asakuma et al. 2011; James et al. 2016a). U méně typických zástupců, jimiž jsou *B. kashiwanohense* a *B. pseudolongum* byla popsána schopnost utilizace HiMO 2'FL a 3FL (Bunešová et al. 2016). V rámci *ex vivo* testování této práce byl

pozorován vliv přidaného substrátu do experimentálního prostření na počty mikroorganismů převážně zastoupenými bifidobakteriemi. Potvrdilo se, že mateřské mléko je jako zdroj uhlíku lépe využitelné pro probiotický kmen *B. breve* BR03 oproti *B. lactis* Bb-12. *B. breve* je oproti *B. lactis* typickým zástupcem kojenecké střevní mikrobioty a na základě několika studií byla u tohoto druhu bifidobakterie popsána schopnost utilizace řady HMO včetně LNT, LnNT a u některých kmenů i 2'FL (Ruiz-Moyano et al. 2013; James et al. 2016). Naopak u druhu *B. lactis,* u kterého v rámci *ex vivo* experimentu nebyl pozorován významný početní rozdíl v KTJ/ml mezi variantou s mateřským mlékem a počáteční kojeneckou výživou obsahující 2'FL, tato schopnost doposud nebyla žádnou studií potvrzena. Na základě tohoto výsledku vyvstává otázka, zda jsou zástupci taxonu *B. lactis* přijímané formou doplněných kojeneckých výživ či probiotických přípravků schopni perzistentní kolonizace střevního prostředí kojence a působit tak pozitivně na zdraví příjemce v předpokládaném místě účinku.

Počáteční kojenecká výživa se složením snaží v posledních letech co nejvíce přiblížit mateřskému mléku, a to především z hlediska obsahu HiMO. Do nedávna bylo možné na českém trhu zakoupit kojenecké výživy s prebiotickou složkou ve formě GOS samotné nebo v její kombinaci s FOS v poměru 9:1. Některé studie se zabývaly schopnostní odlišných fekálních bakterií, než jsou bifidobakterie a laktobacily, využívat komerčních GOS a FOS jako zdroj uhlíku. Studie od Bunešová et al. (2012) potvrdila schopnost komerčně dostupných GOS a FOS stimulovat i ostatní fekální bakterie včetně klostridií (Bunešová et al. 2012), kdy je jejich přítomnost diskutabilní vzhledem k možným kolikám a NEC (REF). V dnešní době je možné zakoupit počáteční kojeneckou výživu obsahující tzv. humánní mléčné oligosacharidy, které jsou strukturou identické s HMO, z čehož vyplývají jejich imunomodulační, antiadhezivní a jejich bifidogenní účinky. Nicméně se z hlediska obsahu oligosacharidů stále jedná o pouhé přiblížení do podoby mateřského mléka, ve kterém bylo identifikováno na 200 různých typů HMO (Bode 2020). Počáteční kojeneckou výživa dostupná v České republice nabízí varianty obsahující kombinaci nanejvýš šesti HiMO, nicméně častější jsou varianty obsahující 2'FL samotnou nebo v kombinaci GOS a FOS. Přítomnost pouze jediného HiMO však nemusí být dostatečná pro dosažení bifidogenního účinku, který poskytuje mateřské mléko s komplexním obsahem HMO, což naznačují i výsledky této práce. Mikrobiota experimentálního prostředí obsahující *B. breve*, která byla kvantitativně i kvalitativně stanovována v rámci *ex vivo* experimentu, byla na KTJ/ml početněji významnější v případě varianty obsahující mateřské mléko oproti variantě obsahují počáteční kojeneckou výživu s obsahem 2'FL. Naopak nebyl pozorován významný rozdíl v počtech KTJ/ml mezi variantou obsahující náhradní kojeneckou výživu s obsahem 2'FL a variantou bez přidaného substrátu. Výsledky naznačují, že kojenecká výživa obsahující pouze jeden druh HiMO nemusí plně podporovat všechny druhy bifidobakterií charakteristických pro kolonizaci střevního prostředí kojenců. Jak už bylo řečeno, většina testovaných kmenů *B. breve* není schopná produkovat enzymy k utilizaci 2'FL. Jak ukázaly výsledky některých studií většina kmenů *B. breve* je schopna využívat 2'FL jako zdroj uhlíku pouze skrze metabolismus jiných mikroorganismů. Lou et al. (2023) přišli s předpokladem, že extracelulární fukosidázy kódované členy fekální mikrobioty, mezi které patří i *Ruminococcus gnavus*, mohou svým působením uvolňovat z 2'FL laktózu, kterou může využívat pro svůj růst právě *B. breve*. Výsledky poukazují na to, že schopnost využití jednotlivých HiMO v závislosti na složení mikrobioty jedince (Lou et al. 2023). Rovněž byla popsána role *B. breve* jako „mrchožrouta", který prostřednictvím tzv. cross-feedingu využívá

jednodušší látky odvozené od HMO, které byly uvolněny v důsledku činnosti jiných druhů bifidobakterií (Egan et al. 2014; Cheng et al. 2020; Walsh et al. 2022).

Jak bylo nastíněno v počátku diskuze, lze na vztah bifidobakterií a klostridií pohlížet ještě z jiného úhlu pohledu. Jedná se o jejich vzájemnou interakci z hlediska cross-feedingu. Bifidobakterie v rámci střevního prostředí kojenců fermentují HMO či HiMO za vzniku jednodušších fermentačních produktů, které mohou být využitelné jako zdroj uhlíku pro butyrát produkující bakterie. Butyrát, jak už bylo řečeno, slouží převážně jako zdroj energie enterocytům. Trofická interakce byla popsána mezi kojeneckými bifidobakteriemi a významem producentem butyrátu *A. hallii*, který byl schopen využívat různé produkty fermentace L-fukózy či 2'FL (Schwab et al. 2017). Nicméně v některých případech můžou být vztahy postavené na metabolické nevázanosti některých bakteriálních druhů pro zdraví hostitele kontraproduktivní. Z výsledku stanovení fermentačního profilu 2'FL a L-fukózy vybraných druhů klostridií vyplynulo, že z žádná testovaných klostridií není schopná přímo využívat 2'FL jako jediný zdroj uhlíku. Nicméně u kmenu *C. neonatale* OK2 byla pozorována pozitivní reakce v přítomnosti L-fukózy. Výsledek potvrzení schopnosti *C. neonatale* využívat L-fukózu jako jediný zdroj uhlíku se shoduje s výsledkem studie od Huertas-Díaz et al. (2023). Naopak se s danou studií rozchází ve výsledcích v pozorováním schopnosti růstu *C. perfringens* a *Cl. dificille* na stejném substrátu, což se v této diplomové práci nepotvrdilo. Zde může hrát roli množství testovaných izolátu. L-fukóza je uvolňována během utilizace 2'FL některými kojeneckými druhy bifidobakterií. Volná fukóza může být následně metabolizována okolní fekální mikrobiotou, která může být zastoupena i *C. neonatale*. V případě kojenecké koliky způsobené druhem *C. neonatale* by tak mohla být suplementace probiotického přípravku s 2'FL využívajícími bifidobakteriemi společně s podáváním kojenecké výživy obsahující 2'FL samotnou či v kombinaci GOS a FOS do značné míry kontraproduktivní. Do budoucna bude proto důležité zaměřit se na vzájemné vztahy bifidobakterií a klostridií nejen z hlediska antimikrobiálního účinku, ale také z hlediska jejich cross-feedingu, který může nastat mezi specifickými zástupci.

7 Závěr

V této práci bylo zjištěno, že antimikrobiální účinek kmenů *B. breve* BR03 a *B. lactis* Bb-12, které se běžně používají jako součást probiotických přípravků určených pro kojence proti 9 klostridiálním kmenům izolovaných ze vzorků stolice kolitických kojenců, se liší v závislosti na použité metodě testování, což potvrdilo naši hypotézu. Inhibiční účinek byl testován vůči kmenům *C. perfringens* BN, *C. perfringens* Z, *C. perfringens* NVz, *C. perfringens* AZ1, *C. perfringens* NK, *C. butyricum* BN, *C. saccharobutylicum* AZ2, *Cl. difficile* BN a *C. neonatale* OK2. Testování antimikrobiální aktivity jamkovou difúzní metodou, kterou byla testována schopnost živých bifidobakteriálních buněk, jejich metabolitů a buněčných komponent inhibice vybraných klostridiální kmenů, se ukázalo bez účinku u všech 54 vzniklých variant. Naopak testování modifikovanou difúzní metodou, kde byla sledována vzájemná interakce pouze na úrovni živých bakteriálních kultur, přineslo pozitivní výsledky z hlediska antimikrobiálního účinku.

Jak bylo předpokládáno, výsledky *ex vivo* testování se lišily v závislosti na několika faktorech. Experimentální prostředí, které bylo vytvořeno pro účely testování vzájemných interakcí mezi bifidobakteriemi a klostridiemi, se ukázalo jako vhodné pouze pro testování kmenů *C. perfringens*. Výsledný antimikrobiální účinek, který byl hodnocen na základě KTJ/ml, se odvíjel od testovaného klostridiálního kmene, přičemž pouze u dvou kmenů bylo dosaženo očekávaného výsledku absolutní inhibice vegetativních forem přítomných klostridií. Vliv substrátu se odrážel především na počtech detekovaných bifidobakterií. Dle očekávání představovalo mateřské mléko vhodnější zdroj uhlíku pro druh *B. breve*, který se řadí mezi typické bifidobakteriální kolonizátory střevního prostředí kojenců. Počáteční náhradní kojenecká výživa s obsahem 2'FL nepředstavovala pro *B. breve* rovnocenný substrát k mateřskému mléku, ale naopak se ukázala jako nejvhodnější substrát pro růst fekální mikrobioty zastoupené převážně klostridiemi. Schopnost růstu klostridiálních kmenů v přítomnosti doplněné kojenecké výživy nicméně s největší pravděpodobností nevycházela z jejich schopnosti utilizovat 2'FL, ale ze schopnosti utilizovat další komponenty umělé kojenecké výživy.

Na základě stanovení fermentačního profilu nebyla prokázána ani u jednoho z 6 testovaných klostridiálních kmenů schopnost růstu na 2'FL jakožto jediném zdroji uhlíku. Nicméně byla pozorována pozitivní reakce u *C. neonatale* OK2 v přítomnosti L-fukózy, která bývá uvolňována z 2'FL pomocí enzymů, kterými jsou vybaveny především druhy kojeneckých bifidobakterií. Právě o 2'FL bývají v dnešní době doplňovány některé náhradní kojenecké výživy. Tento výsledek nastiňuje možnou interakci na úrovni cross-feedingu mezi *C. neonatale* a vybranými druhy bifidobakterií včetně *B. breve*.

Výsledky testování *ex vivo* nastiňují, jakým způsobem by mohlo být optimalizováno experimentální prostředí vzniklé za účelem pozorování vzájemných vztahů fekální mikrobioty kolitických kojenců a probiotických bifidobakteriálních kmenů tak, aby esej vyhovovala širšímu výběru klostridiálních kmenů.

8 Literatura

AAGAARD, Kjersti, Jun MA, Kathleen M ANTONY, Radhika GANU, Joseph PETROSINO a James VERSALOVIC, [b.r.]. The Placenta Harbors a Unique Microbiome [online]. Dostupné z: www.ScienceTranslationalMedicine.org

ADLERBERTH, I a AE WOLD, 2009. Establishment of the gut microbiota in Western infants. Acta Paediatrica [online]. 98(2), 229–238. ISSN 0803-5253. Dostupné z: doi:10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x

AGOSTONI, Carlo, Christian BRAEGGER, Tamas DECSI, Sanja KOLACEK, Berthold KOLETZKO, Kim Fleischer MICHAELSEN, Walter MIHATSCH, Luis A MORENO, John PUNTIS, Raanan SHAMIR, Hania SZAJEWSKA, Dominique TURCK a Johannes VAN GOUDOEVER, 2009. Special Feature Breast-feeding: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition ESPGHAN Committee on Nutrition [online]. Dostupné z: http://journals.lww.com/jpgn

AGOSTONI, Carlo, Olivier GOULET, Sanja KOLACEK, Berthold KOLETZKO, Luis MORENO, John PUNTIS, Jacques RIGO, Raanan SHAMIR, Hania SZAJEWSKA a Dominique TURCK, 2007. Fermented infant formulae without live bacteria. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition [online]. 44(3), 392–397. ISSN 02772116. Dostupné z: doi:10.1097/01.mpg.0000258887.93866.69

ALBENBERG, Lindsey G. a Gary D. WU, 2014. Diet and the intestinal microbiome: Associations, functions, and implications for health and disease. Gastroenterology [online]. 146(6), 1564–1572. ISSN 15280012. Dostupné z: doi:10.1053/j.gastro.2014.01.058

ALESSANDRI, Giulia, Maria Cristina OSSIPRANDI, John MACSHARRY, Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA, 2019. Bifidobacterial Dialogue With Its Human Host and Consequent Modulation of the Immune System. Frontiers in Immunology [online]. 10. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2019.02348

ALESSANDRI, Giulia, Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA, 2021. The genus bifidobacterium: From genomics to functionality of an important component of the mammalian gut microbiota running title: Bifidobacterial adaptation to and interaction with the host [online]. 1. leden 2021. B.m.: Elsevier B.V. ISSN 20010370. Dostupné z: doi:10.1016/j.csbj.2021.03.006

ALIPOUR, Mohammad Jaber, Jonna JALANKA, Tiina PESSA-MORIKAWA, Tuomo KOKKONEN, Reetta SATOKARI, Ulla HYNÖNEN, Antti IIVANAINEN a Mikael NIKU, 2018. The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. Scientific Reports [online]. 8(1). ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-28733-y

ALLIET, Philippe, Yvan VANDENPLAS, Paola ROGGERO, Sabine N.J. JESPERS, Stefaan PEETERS, Jean Philippe STALENS, Guus A.M. KORTMAN, Mailis AMICO, Bernard BERGER, Norbert SPRENGER, Colin I. CERCAMONDI a Giovanni CORSELLO, 2022. Safety and efficacy of a probiotic-containing infant formula supplemented with 2'-

fucosyllactose: a double-blind randomized controlled trial. Nutrition Journal [online]. 21(1). ISSN 14752891. Dostupné z: doi:10.1186/s12937-022-00764-2

ALVAREZ-MARTIN, Pablo, Mary O'CONNELL MOTHERWAY, Francesca TURRONI, Elena FORONI, Marco VENTURA a Douwe VAN SINDEREN, 2012. A Two-Component Regulatory System Controls Autoregulated Serpin Expression in Bifidobacterium breve UCC2003. Applied and Environmental Microbiology [online]. 78(19), 7032–7041. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01776-12

APPERT, Olivia, Alejandro Ramirez GARCIA, Remo FREI, Caroline RODUIT, Florentin CONSTANCIAS, Vera NEUZIL-BUNESOVA, Ruth FERSTL, Jianbo ZHANG, Cezmi AKDIS, Roger LAUENER, Christophe LACROIX a Clarissa SCHWAB, 2020. Initial butyrate producers during infant gut microbiota development are endospore formers. Environmental Microbiology [online]. 22(9), 3909–3921. ISSN 14622920. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.15167

ARBOLEYA, Silvia, Claire WATKINS, Catherine STANTON a R. Paul ROSS, 2016. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. Frontiers in Microbiology [online]. 7. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.01204

ARNON, Stephen S., Thaddeus F. MIDURA, Karla DAMUS, Barbara THOMPSON, Ronald M. WOOD a James CHIN, 1979. Honey and other environmental risk factors for infant botulism. The Journal of Pediatrics [online]. 94(2), 331–336. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-3476(79)80863-X

ARRIETA, Marie Claire, Leah T. STIEMSMA, Nelly AMENYOGBE, Eric BROWN a Brett FINLAY, 2014. The intestinal microbiome in early life: Health and disease [online]. 2014. ISSN 16643224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2014.00427

ASAKUMA, Sadaki, Emi HATAKEYAMA, Tadasu URASHIMA, Erina YOSHIDA, Takane KATAYAMA, Kenji YAMAMOTO, Hidehiko KUMAGAI, Hisashi ASHIDA, Junko HIROSE a Motomitsu KITAOKA, 2011. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. Journal of Biological Chemistry [online]. 286(40), 34583–34592. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M111.248138

ASHA, N. J., D. TOMPKINS a M. H. WILCOX, 2006. Comparative Analysis of Prevalence, Risk Factors, and Molecular Epidemiology of Antibiotic-Associated Diarrhea Due to Clostridium difficile , Clostridium perfringens , and Staphylococcus aureus. Journal of Clinical Microbiology [online]. 44(8), 2785–2791. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00165-06

ATARASHI, Koji, Takeshi TANOUE, Tatsuichiro SHIMA, Akemi IMAOKA, Tomomi KUWAHARA, Yoshika MOMOSE, Genhong CHENG, Sho YAMASAKI, Takashi SAITO, Yusuke OHBA, Tadatsugu TANIGUCHI, Kiyoshi TAKEDA, Shohei HORI, Ivaylo I. IVANOV, Yoshinori UMESAKI, Kikuji ITOH a Kenya HONDA, 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. Science [online]. 331(6015), 337–341. ISSN 10959203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1198469

AZAD, Meghan B., Theodore KONYA, Heather MAUGHAN, David S. GUTTMAN, Catherine J. FIELD, Radha S. CHARI, Malcolm R. SEARS, Allan B. BECKER, James A. SCOTT a Anita L. KOZYRSKYJ, 2013. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. Canadian Medical Association Journal [online]. 185(5), 385–394. ISSN 0820-3946. Dostupné z: doi:10.1503/cmaj.121189

AZIZ, Q., J. DORÉ, A. EMMANUEL, F. GUARNER a E. M. M. QUIGLEY, 2013. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. Neurogastroenterology & Motility [online]. 25(1), 4–15. ISSN 13501925. Dostupné z: doi:10.1111/nmo.12046

BALLARD, Olivia a Ardythe L. MORROW, 2013. Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors [online]. únor 2013. ISSN 00313955. Dostupné z: doi:10.1016/j.pcl.2012.10.002

BAZANELLA, Monika, Tanja V. MAIER, Thomas CLAVEL, Ilias LAGKOUVARDOS, Marianna LUCIO, Maria X. MALDONADO-GÒMEZ, Chloe AUTRAN, Jens WALTER, Lars BODE, Philippe SCHMITT-KOPPLIN a Dirk HALLER, 2017. Randomized controlled trial on the impact of early-life intervention with bifidobacteria on the healthy infant fecal microbiota and metabolome. American Journal of Clinical Nutrition [online]. 106(5), 1274–1286. ISSN 19383207. Dostupné z: doi:10.3945/ajcn.117.157529

BÉGHIN, Laurent, Sebastian TIMS, Mieke ROELOFS, Carole ROUGÉ, Raish OOZEER, Thameur RAKZA, Gaetano CHIRICO, Guus ROESELERS, Jan KNOL, Jean Christophe ROZÉ a Dominique TURCK, 2021. Fermented infant formula (with Bifidobacterium breve C50 and Streptococcus thermophilus O65) with prebiotic oligosaccharides is safe and modulates the gut microbiota towards a microbiota closer to that of breastfed infants. Clinical Nutrition [online]. 40(3), 778–787. ISSN 15321983. Dostupné z: doi:10.1016/j.clnu.2020.07.024

BEZIRTZOGLOU, Eugenia, Arsenis TSIOTSIAS a Gjalt W. WELLING, 2011. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). Anaerobe [online]. 17(6), 478–482. ISSN 10759964. Dostupné z: doi:10.1016/j.anaerobe.2011.03.009

BIAVATI, B., V. SCARDOVI a W. E. C. MOORE, 1982. Electrophoretic Patterns of Proteins in the Genus Bifidobacterium and Proposal of Four New Species. International Journal of Systematic Bacteriology [online]. 32(3), 358–373. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-32-3-358

BIBBÓ S, Ianiro G, Giorgio V, Scaldaferri F, Masucci L, Gasbarrini A, Cammarota G. 2016. The role of diet on gut microbiota composition. European review for medical and pharmacological sciences 20(22):4742-4749.

BODE, Lars, 2012. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama [online]. září 2012. ISSN 09596658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/cws074

BODE, Lars, 2018. Human milk oligosaccharides in the prevention of necrotizing enterocolitis: A journey from in vitro and in vivo models to mother-infant cohort studies [online]. 2018. B.m.: Frontiers Media S.A. ISSN 22962360. Dostupné z: doi:10.3389/fped.2018.00385

BODE, Lars, 2020. Human Milk Oligosaccharides: Structure and Functions. Nestle Nutrition Institute Workshop Series [online]. 94, 115–123. ISSN 16642155. Dostupné z: doi:10.1159/000505339

BOIX-AMORÓS, Alba, Cecilia MARTINEZ-COSTA, Amparo QUEROL, Maria Carmen COLLADO a Alex MIRA, 2017. Multiple Approaches Detect the Presence of Fungi in Human Breastmilk Samples from Healthy Mothers. Scientific Reports [online]. 7(1), 13016. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-13270-x

BOREWICZ, Klaudyna, Maria SUAREZ-DIEZ, Christine HECHLER, Roseriet BEIJERS, Carolina DE WEERTH, Ilja ARTS, John PENDERS, Carel THIJS, Arjen NAUTA, Cordula LINDNER, Ellen VAN LEUSEN, Elaine E. VAUGHAN a Hauke SMIDT, 2019. The effect of prebiotic fortified infant formulas on microbiota composition and dynamics in early life. Scientific Reports [online]. 9(1). ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-38268-x

BOSHEVA, Miroslava, Istvan TOKODI, Aleksander KRASNOW, Helle Krogh PEDERSEN, Oksana LUKJANCENKO, Aron C. EKLUND, Dominik GRATHWOHL, Norbert SPRENGER, Bernard BERGER a Colin I. CERCAMONDI, 2022. Infant Formula With a Specific Blend of Five Human Milk Oligosaccharides Drives the Gut Microbiota Development and Improves Gut Maturation Markers: A Randomized Controlled Trial. Frontiers in Nutrition [online]. 9. ISSN 2296861X. Dostupné z: doi:10.3389/fnut.2022.920362

BOTTACINI, Francesca, Marco VENTURA, Douwe van SINDEREN a Mary O.Connell MOTHERWAY, 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. Microbial Cell Factories [online]. 13(1). ISSN 14752859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S4

BRAEGGER, Christian, Anna CHMIELEWSKA, Tamas DECSI, Sanja KOLACEK, Walter MIHATSCH, Luis MORENO, Małgorzata PIEŚCIK, John PUNTIS, Raanan SHAMIR, Hania SZAJEWSKA, Dominique TURCK a Johannes VAN GOUDOEVER, 2011. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: A systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition [online]. 52(2), 238–250. ISSN 02772116. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0b013e3181fb9e80

BUNESOVA, Vera, Christophe LACROIX a Clarissa SCHWAB, 2016. Fucosyllactose and L-fucose utilization of infant Bifidobacterium longum and Bifidobacterium kashiwanohense. BMC Microbiology [online]. 16(1), 1–12. ISSN 14712180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-016-0867-4

BUNEŠOVÁ, Věra, Eva VLKOVÁ, Vojtěch RADA, Vladimíra KŇAZOVICKÁ, Šárka ROČKOVÁ, Martina GEIGEROVÁ a Matěj BOŽIK, 2012. Growth of infant fecal

bacteria on commercial prebiotics. Folia Microbiologica [online]. 57(4), 273–275. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-012-0123-8

BUTEL, M.-J., A.-J. WALIGORA-DUPRIET a S. WYDAU-DEMATTEIS, 2018. The developing gut microbiota and its consequences for health. Journal of Developmental Origins of Health and Disease [online]. 9(6), 590–597. ISSN 2040-1744. Dostupné z: doi:10.1017/S2040174418000119

CAMPEOTTO, Florence, Antonia SUAU, Nathalie KAPEL, Fabien MAGNE, Vivian VIALLON, Laurent FERRARIS, Anne Judith WALIGORA-DUPRIET, Pascale SOULAINES, Bernard LEROUX, Nicolas KALACH, Christophe DUPONT a Marie José BUTEL, 2011. A fermented formula in pre-term infants: Clinical tolerance, gut microbiota, down-regulation of faecal calprotectin and up-regulation of faecal secretory IgA. British Journal of Nutrition [online]. 105(12), 1843–1851. ISSN 00071145. Dostupné z: doi:10.1017/S0007114510005702

CANTU-JUNGLES, Thaisa M., Heather E. RASMUSSEN a Bruce R. HAMAKER, 2019. Potential of prebiotic butyrogenic fibers in Parkinson's disease [online]. 2019. B.m.: Frontiers Media S.A. ISSN 16642295. Dostupné z: doi:10.3389/fneur.2019.00663

CASSIR, Nadim, Samia BENAMAR, Jacques Bou KHALIL, Olivier CROCE, Marie SAINT-FAUST, Aurélien JACQUOT, Matthieu MILLION, Said AZZA, Nicholas ARMSTRONG, Mireille HENRY, Priscilla JARDOT, Catherine ROBERT, Catherine GIRE, Jean-Christophe LAGIER, Eric CHABRIÈRE, Eric GHIGO, Hélène MARCHANDIN, Catherine SARTOR, Patrick BOUTTE, Gilles CAMBONIE, Umberto SIMEONI, Didier RAOULT a Bernard LA SCOLA, 2015. Clostridium butyricum Strains and Dysbiosis Linked to Necrotizing Enterocolitis in Preterm Neonates. Clinical Infectious Diseases [online]. 61(7), 1107–1115. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1093/cid/civ468

CASTELLOTE, Cristina, Rosario CASILLAS, Carolina RAMÍREZ-SANTANA, Francisco J. PÉREZ-CANO, Margarida CASTELL, M. Glòria MORETONES, M. Carmen LÓPEZ-SABATER a Àngels FRANCH, 2011. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. Journal of Nutrition [online]. 141(6), 1181–1187. ISSN 00223166. Dostupné z: doi:10.3945/jn.110.133652

COLLADO, Maria Carmen, Samuli RAUTAVA, Juhani AAKKO, Erika ISOLAURI a Seppo SALMINEN, 2016. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. Scientific Reports [online]. 6. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep23129

CORTEZ, Ramon V., Luana N. MOREIRA a Carla R. TADDEI, 2019. Metabolome and Microbiome From Infancy to Elderly. In: Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications [online]. B.m.: Elsevier, s. 85–89. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-815249-2.00008-7

CZERKIES, Laura M., Kristen L. FINN, Brian D. KINEMAN, Heidi A. REICHERT, Sarah S. COHEN a Ryan S. CARVALHO, 2019. Use of a Partially Hydrolyzed 100% Whey-Based Infant Formula with Lactobacillus Reuteri in Infants with Caregiver-Perceived

Intolerance. Journal of Pediatric Health and Nutrition [online]. 1(1), 19–26. Dostupné z: doi:10.14302/issn.2691-5014.jphn-19-3067

DAWSON-HAHN, Elizabeth E. a Kyung E. RHEE, 2019. The association between antibiotics in the first year of life and child growth trajectory. BMC Pediatrics [online]. 19(1). ISSN 14712431. Dostupné z: doi:10.1186/s12887-018-1363-9

DELCENSERIE, V., F. GAVINI, H. BEERENS, O. TRESSE, C. FRANSSEN a G. DAUBE, 2007. Description of a new species, Bifidobacterium crudilactis sp. nov., isolated from raw milk and raw milk cheeses. Systematic and Applied Microbiology [online]. 30(5), 381–389. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1016/j.syapm.2007.01.004

DEVIKA, N. T. a Karthik RAMAN, 2019. Deciphering the metabolic capabilities of Bifidobacteria using genome-scale metabolic models. Scientific Reports [online]. 9(1), 18222. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-54696-9

DOMINGUEZ-BELLO, Maria G., Elizabeth K. COSTELLO, Monica CONTRERAS, Magda MAGRIS, Glida HIDALGO, Noah FIERER a Rob KNIGHT, 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [online]. 107(26), 11971–11975. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1002601107

DONOVAN, Sharon M. a Sarah S. COMSTOCK, 2017. Human milk oligosaccharides influence neonatal mucosal and systemic immunity [online]. 1. leden 2017. B.m.: S. Karger AG. ISSN 14219697. Dostupné z: doi:10.1159/000452818

DÜRRE, Peter, 2007. Clostridia. In: eLS [online]. B.m.: Wiley. Dostupné z: doi:10.1002/9780470015902.a0020370

DÜRRE, Peter, 2014. Physiology and Sporulation in Clostridium. Microbiology Spectrum [online]. 2(4). ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.tbs-0010-2012

DUSKA-MCEWEN, Geralyn, Albert P. SENFT, Teah L. RUETSCHILLING, Edward G. BARRETT a Rachael H. BUCK, 2014. Human Milk Oligosaccharides Enhance Innate Immunity to Respiratory Syncytial Virus and Influenza <i>in Vitro</i> Food and Nutrition Sciences [online]. 05(14), 1387–1398. ISSN 2157-944X. Dostupné z: doi:10.4236/fns.2014.514151

EFSA, 2024. Qualified presumption of safety (QPS) [online] [vid. 2024-04-15]. Dostupné z: https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps#:~:text=EFSA's%20role&text=The%20concept%20of%20qualified%20presumption,to%20a%20full%20safety%20assessment.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2014. Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae. *EFSA Journal* 2014; 12(7):3760, 106 pp. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2014.3760

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2015. Scientific opinion on the safety of lacto-*N*-neotetraose as a novel food ingredient pursuant to

Regulation (EC) No 258/97. *EFSA Journal* 2015; 13(7):4183, 32 pp. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2015.4183.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens) Turck, D., Bohn, T., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H.J., Naska, A., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., AguileraGómez, M., Cubadda, F., Frenzel, T., Heinonen, M ., … Knutsen, H. K., 2023. Safety of lacto-N-fucopentaose I/2′-fucosyllactose (LNFP-I/2'-FL) mixture as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, 21(12), e8412. Dostupné z: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8412

EGAN, Muireann, Eugene DEMPSEY, C. Anthony RYAN, R. Paul ROSS a Catherine STANTON, 2021. The Sporobiota of the Human Gut [online]. 2021. B.m.: Bellwether Publishing, Ltd. ISSN 19490984. Dostupné z: doi:10.1080/19490976.2020.1863134

EGAN, Muireann, Mary O'CONNELL MOTHERWAY, Marco VENTURA a Douwe VAN SINDEREN, 2014. Metabolism of Sialic Acid by Bifidobacterium breve UCC2003. Applied and Environmental Microbiology [online]. 80(14), 4414–4426. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01114-14

EOR, Ju Young, Chul Sang LEE, Sung Ho MOON, Ju Young CHEON, Duleepa PATHIRAJA, Byeonghyeok PARK, Min Jae SHIN, Jae-Young KIM, Sangjong KIM, Youngbae NOH, Yunhan KIM, In-Geol CHOI a Sae Hun KIM, 2023. Effect of Probiotic-Fortified Infant Formula on Infant Gut Health and Microbiota Modulation. Food Science of Animal Resources [online]. 43(4), 659–673. ISSN 2636-0772. Dostupné z: doi:10.5851/kosfa.2023.e26

ESAIASSEN, Eirin, Jon Widding FJALSTAD, Lene Kristine JUVET, John N. VAN DEN ANKER a Claus KLINGENBERG, 2017. Antibiotic exposure in neonates and early adverse outcomes: A systematic review and meta-analysis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy [online]. 72(7), 1858–1870. ISSN 14602091. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkx088

ESCRIBANO, Joaquin, Natalia FERRÉ, Mariona GISPERT-LLAURADO, Veronica LUQUE, Carmen RUBIO-TORRENTS, Marta ZARAGOZA-JORDANA, Isabel POLANCO, Francisco M. CODOÑER, Empar CHENOLL, Mireia MORERA, Jose Antonio MORENO-MUÑOZ, Montserrat RIVERO a Ricardo CLOSA-MONASTEROLO, 2018. Bifidobacterium longum subsp infantis CECT7210-supplemented formula reduces diarrhea in healthy infants: A randomized controlled trial. Pediatric Research [online]. 83(6), 1120–1128. ISSN 15300447. Dostupné z: doi:10.1038/pr.2018.34

EVROPSKÁ KOMISE, 2015. NAŘÍZENÍ KOMISE V PŘENESENÉ PRAVOMOCI (EU) 2016/127 ze dne 25. září 2015, kterým se doplňuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 609/2013, pokud jde o zvláštní požadavky týkající se složení a informací, které se vztahují na počáteční a pokračovací kojeneckou výživu, a pokud jde o požadavky na informace týkající se výživy kojenců a malých dětí [online]. 25. září 2015, 2015. [vid. 2024-04-15]. Dostupné z: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0127

EVROPSKÝ PARLAMENT, Rada Evropské unie, 2015. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) 2015/2283 ze dne 25. listopadu 2015 o nových potravinách, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 a o zrušení nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 258/97 a nařízení Komise (ES) č. 1852/2001 [online]. 25. listopad 2015, 2015. [vid. 2024-04-15]. Dostupné z: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0127

EWASCHUK, Julia B., Hugo DIAZ, Liisa MEDDINGS, Brendan DIEDERICHS, Andrea DMYTRASH, Jody BACKER, Mirjam Looijer Van LANGEN a Karen L. MADSEN, 2008. Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology [online]. 295(5). ISSN 01931857. Dostupné z: doi:10.1152/ajpgi.90227.2008

FALLANI, Matteo, Sergio AMARRI, Agneta UUSIJARVI, Rüdiger ADAM, Sheila KHANNA, Marga AGUILERA, Angel GIL, Jose M. VIEITES, Elisabeth NORIN, David YOUNG, Jane A. SCOTT, Joë DORÉ a Christine A. EDWARDS, 2011. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. Microbiology [online]. 157(5), 1385–1392. ISSN 13500872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.042143-0

FALLANI, Matteo, David YOUNG, Jane SCOTT, Elisabeth NORIN, Sergio AMARRI, Rüdiger ADAM, Marga AGUILERA, Sheila KHANNA, Angel GIL, Christine A EDWARDS a Joël DORÉ, 2010. Intestinal Microbiota of 6-week-old Infants Across Europe: Geographic Influence Beyond Delivery Mode, Breast-feeding, and Antibiotics. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition [online]. 51(1), 77–84. ISSN 0277-2116. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0b013e3181d1b11e

FANNING, Saranna, Lindsay J. HALL, Michelle CRONIN, Aldert ZOMER, John MACSHARRY, David GOULDING, Mary O'CONNELL MOTHERWAY, Fergus SHANAHAN, Kenneth NALLY, Gordon DOUGAN a Douwe VAN SINDEREN, 2012. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 109(6), 2108–2113. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1115621109

FDA, 2024. Infant formula [online] [vid. 2024-04-15]. Dostupné z: https://www.fda.gov/food/resources-you-food/infant-formula

FERRARIS, Laurent, Marie José BUTEL, Florence CAMPEOTTO, Michel VODOVAR, Jean Christophe ROZÉ a Julio AIRES, 2012. Clostridia in Premature Neonates' Gut: Incidence, Antibiotic Susceptibility, and Perinatal Determinants Influencing Colonization. PLoS ONE [online]. 7(1), e30594. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0030594

FORBES, Jessica D., Meghan B. AZAD, Lorena VEHLING, Hein M. TUN, Theodore B. KONYA, David S. GUTTMAN, Catherine J. FIELD, Diana LEFEBVRE, Malcolm R. SEARS, Allan B. BECKER, Piushkumar J. MANDHANE, Stuart E. TURVEY, Theo J. MORAES, Padmaja SUBBARAO, James A. SCOTT, Anita L. KOZYRSKYJ, Sonia S.

ANAND, A. Dean BEFUS, Michael BRAUER, Jeff R. BROOK, Edith CHEN, Michael M. CYR, Denise DALEY, Sharon D. DELL, Judah A. DENBURG, Qing L. DUAN, Thomas EIWEGGER, Hartmut GRASEMANN, Kent HAYGLASS, Richard G. HEGELE, D. Linn HOLNESS, Perry HYSTAD, Michael KOBOR, Tobias R. KOLLMANN, Catherine LAPRISE, Wendy Y.W. LOU, Joseph MACRI, Greg MILLER, Peter PARE, Clare RAMSEY, Felix RATJEN, Andrew SANDFORD, Jeremy SCOTT, Frances SILVERMAN, Elinor SIMONS, Tim TAKARO, Scott J. TEBBUTT a Theresa TO, 2018. Association of exposure to formula in the hospital and subsequent infant feeding practices with gut microbiota and risk of overweight in the first year of life. JAMA Pediatrics [online]. 172(7). ISSN 21686203. Dostupné z: doi:10.1001/jamapediatrics.2018.1161

FOUHY, Fiona, Claire WATKINS, Cian J. HILL, Carol Anne O'SHEA, Brid NAGLE, Eugene M. DEMPSEY, Paul W. O'TOOLE, R. Paul ROSS, C. Anthony RYAN a Catherine STANTON, 2019. Perinatal factors affect the gut microbiota up to four years after birth. Nature Communications [online]. 10(1). ISSN 20411723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-09252-4

FREITAS, Aline C. a Janet E. HILL, 2017. Quantification, isolation and characterization of Bifidobacterium from the vaginal microbiomes of reproductive aged women. Anaerobe [online]. 47, 145–156. ISSN 10759964. Dostupné z: doi:10.1016/j.anaerobe.2017.05.012

FU, Xiaodan, Zhemin LIU, Changliang ZHU, Haijin MOU a Qing KONG, 2019. Nondigestible carbohydrates, butyrate, and butyrate-producing bacteria [online]. 2019. B.m.: NLM (Medline). ISSN 15497852. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2018.1542587

GABRIELLI, Orazio, Lucia ZAMPINI, Tiziana GALEAZZI, Lucia PADELLA, Lucia SANTORO, Chiara PEILA, Francesca GIULIANI, Enrico BERTINO, Claudio FABRIS a Giovanni V. COPPA, 2011. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. Pediatrics [online]. 128(6). ISSN 10984275. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2011-1206

GANGULI, Kriston, Di MENG, Samuli RAUTAVA, Lei LU, W. Allan WALKER a Nanda NANTHAKUMAR, 2013. Probiotics prevent necrotizing enterocolitis by modulating enterocyte genes that regulate innate immune-mediated inflammation. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology [online]. 304(2), G132–G141. ISSN 0193-1857. Dostupné z: doi:10.1152/ajpgi.00142.2012

GÄNZLE, M.G., 2011. Lactose and Oligosaccharides | Lactose: Galacto-Oligosaccharides. In: Encyclopedia of Dairy Sciences [online]. B.m.: Elsevier, s. 209–216. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00276-4

GOEHRING, Karen C., Barbara J. MARRIAGE, Jeffery S. OLIVER, Julie A. WILDER, Edward G. BARRETT a Rachael H. BUCK, 2016. Similar to those who are breastfed, infants fed a formula containing 2'-fucosyllactose have lower inflammatory cytokines in a randomized controlled trial. Journal of Nutrition [online]. 146(12), 2559–2566. ISSN 15416100. Dostupné z: doi:10.3945/jn.116.236919

GOMEZ-ARANGO, Luisa F., Helen L. BARRETT, H. David MCINTYRE, Leonie K. CALLAWAY, Mar MORRISON a Marloes Dekker NITERT, 2017. Antibiotic treatment at delivery shapes the initial oral microbiome in neonates. Scientific Reports [online]. 7. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep43481

GRZESKOWIAK, Lukasz, Maria Carmen COLLADO, Charles MANGANI, Kenneth MALETA, Kirsi LAITINEN, Per ASHORN, Erika ISOLAURI a Seppo SALMINEN, 2012. Distinct Gut microbiota in southeastern African and northern European infants. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition [online]. 54(6), 812–816. ISSN 02772116. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0b013e318249039c

GUO, Pingting, Ke ZHANG, Xi MA a Pingli HE, 2020. Clostridium species as probiotics: Potentials and challenges [online]. 20. únor 2020. B.m.: BioMed Central Ltd. ISSN 20491891. Dostupné z: doi:10.1186/s40104-019-0402-1

HAKANSSON, Asa a Goran MOLIN, 2011. Gut microbiota and inflammation [online]. 2011. B.m.: MDPI AG. ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/nu3060637

HARMSEN, Hermie J.M., Alida C.M. WILDEBOER-VELOO, Gerwin C. RAANGS, Arjen A. WAGENDORP, Nicolette KLIJN, Jacques G. BINDELS a Gjalt W. WELLING, 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition [online]. 30(1), 61–67. ISSN 02772116. Dostupné z: doi:10.1097/00005176-200001000-00019

HEINLEN, Latisha a Jimmy D. BALLARD, 2010. Clostridium difficile infection. In: American Journal of the Medical Sciences [online]. B.m.: Lippincott Williams and Wilkins, s. 247–252. ISSN 00029629. Dostupné z: doi:10.1097/MAJ.0b013e3181e939d8

HOU, Kaijian, Zhuo-Xun WU, Xuan-Yu CHEN, Jing-Quan WANG, Dongya ZHANG, Chuanxing XIAO, Dan ZHU, Jagadish B. KOYA, Liuya WEI, Jilin LI a Zhe-Sheng CHEN, 2022. Microbiota in health and diseases. Signal Transduction and Targeted Therapy [online]. 7(1), 135. ISSN 2059-3635. Dostupné z: doi:10.1038/s41392-022-00974-4

HOYLES, Lesley, Elisabeth INGANÄS, Enevold FALSEN, Michel DRANCOURT, Norbert WEISS, Anne L MCCARTNEY a Matthew D COLLINS, 2002. Bifidobacterium scardovii sp. nov., from human sources. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [online]. 52(3), 995–999. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-52-3-995

HUERTAS-DÍAZ, Lucía, Rikke KYHNAU, Eugenio INGRIBELLI, Vera NEUZIL-BUNESOVA, Qing LI, Mari SASAKI, Roger P. LAUENER, Caroline RODUIT, Remo FREI, CK-CARE STUDY GROUP, Ulrik SUNDEKILDE a Clarissa SCHWAB, 2023. Breastfeeding and the major fermentation metabolite lactate determine occurrence of Peptostreptococcaceae in infant feces. Gut Microbes [online]. 15(1). ISSN 1949-0976. Dostupné z: doi:10.1080/19490976.2023.2241209

CHENG, Lianghui, Mensiena B. G. KIEWIET, Madelon J. LOGTENBERG, Andre GROENEVELD, Arjen NAUTA, Henk A. SCHOLS, Marthe T. C. WALVOORT, Hermie J. M. HARMSEN a Paul DE VOS, 2020. Effects of Different Human Milk Oligosaccharides on Growth of Bifidobacteria in Monoculture and Co-culture With Faecalibacterium prausnitzii. Frontiers in Microbiology [online]. 11. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.569700

CHICHLOWSKI, Maciej, Guillaume DE LARTIGUE, J. Bruce GERMAN, Helen E. RAYBOULD a David A. MILLS, 2012. Bifidobacteria Isolated From Infants and Cultured on Human Milk Oligosaccharides Affect Intestinal Epithelial Function. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition [online]. 55(3), 321–327. ISSN 0277-2116. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0b013e31824fb899

CHOURAQUI, Jean-Pierre, †louis-Dominique Van EGROO a Claire FICHOT, 2004. Acidified Milk Formula Supplemented With Bifidobacterium lactis: Impact on Infant Diarrhea in Residential Care Settings [online]. Dostupné z: http://journals.lww.com/jpgn

CHUA, Mei Chin, Kaouther BEN-AMOR, Christophe LAY, Anne G.E. NEO, Wei Chin CHIANG, Rajeshwar RAO, Charmaine CHEW, Surasith CHAITHONGWONGWATTHANA, Nipon KHEMAPECH, Jan KNOL a Voranush CHONGSRISAWAT, 2017. Effect of Synbiotic on the Gut Microbiota of Cesarean Delivered Infants: A Randomized, Double-blind, Multicenter Study. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition [online]. 65(1), 102–106. ISSN 15364801. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0000000000001623

CHUN, Ah Yeong, Liang YUNXIAO, Somasundar ASHOK, Eunhee SEOL a Sunghoon PARK, 2014. Elucidation of toxicity of organic acids inhibiting growth of Escherichia coli W. Biotechnology and Bioprocess Engineering [online]. 19(5), 858–865. ISSN 1226-8372. Dostupné z: doi:10.1007/s12257-014-0420-y

IGNACIO, Aline, Fernanda Fernandes TERRA, Ingrid Kazue Mizuno WATANABE, Paulo José BASSO a Niels Olsen Saraiva CÂMARA, 2019. Role of the microbiome in intestinal barrier function and immune defense. In: Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications [online]. B.m.: Elsevier, s. 127–138. ISBN 9780128152492. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-815249-2.00013-0

INDRIO, Flavia, Grazia LADISA, Angela MAUTONE a Osvaldo MONTAGNA, 2007. Effect of a Fermented Formula on Thymus Size and Stool pH in Healthy Term Infants.

INGRIBELLI, Eugenio, Nikol MODRACKOVA, Vaclav TEJNECKY, Jiri KILLER, Clarissa SCHWAB a Vera NEUZIL-BUNESOVA, 2023. Culture-dependent screening of endospore-forming clostridia in infant feces. BMC Microbiology [online]. 23(1). ISSN 14712180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-023-03104-4

ISHIGURO, Edward, Natasha HASKEY a Kristina CAMPBELL, 2018. An Overview of the Human Microbiome. In: Gut Microbiota [online]. B.m.: Elsevier, s. 1–16. Dostupné z: doi:10.1016/b978-0-12-810541-2.00001-4

JAMES, Kieran, Mary O.Connell MOTHERWAY, Francesca BOTTACINI a Douwe VAN SINDEREN, 2016a. Bifidobacterium breve UCC2003 metabolises the human milk oligosaccharides lacto-N-tetraose and lacto-N-neo-tetraose through overlapping, yet distinct pathways. Scientific Reports [online]. 6. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep38560

JAMES, Kieran, Mary O'Connell MOTHERWAY, Francesca BOTTACINI a Douwe VAN SINDEREN, 2016b. Bifidobacterium breve UCC2003 metabolises the human milk oligosaccharides lacto-N-tetraose and lacto-N-neo-tetraose through overlapping, yet distinct pathways. Scientific Reports [online]. 6(1), 38560. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep38560

JANDHYALA, Sai Manasa, Rupjyoti TALUKDAR, Chivkula SUBRAMANYAM, Harish VUYYURU, Mitnala SASIKALA a D. Nageshwar REDDY, 2015. Role of the normal gut microbiota. World Journal of Gastroenterology [online]. 21(29), 8836–8847. ISSN 22192840. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787

JIMÉNEZ, Esther, Javier DE ANDRÉS, Marina MANRIQUE, Pablo PAREJA-TOBES, Raquel TOBES, Juan F. MARTÍNEZ-BLANCH, Francisco M. CODOÑER, Daniel RAMÓN, Leónides FERNÁNDEZ a Juan M. RODRÍGUEZ, 2015. Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women. Journal of Human Lactation [online]. 31(3), 406–415. ISSN 15525732. Dostupné z: doi:10.1177/0890334415585078

KEIKHA, Mojtaba, Maryam BAHREYNIAN, Mohammad SALEKI a Roya KELISHADI, 2017. Macro- and Micronutrients of Human Milk Composition: Are They Related to Maternal Diet? A Comprehensive Systematic Review [online]. 1. listopad 2017. B.m.: Mary Ann Liebert Inc. ISSN 15568342. Dostupné z: doi:10.1089/bfm.2017.0048

KHAN, Sadaf, Anna R. HEPWORTH, Danielle K. PRIME, Ching T. LAI, Naomi J. TRENGOVE a Peter E. HARTMANN, 2013. Variation in fat, lactose, and protein composition in breast milk over 24 hours: Associations with infant feeding patterns. Journal of Human Lactation [online]. 29(1), 81–89. ISSN 08903344. Dostupné z: doi:10.1177/0890334412448841

KIELY, Leonie Jane, Kizkitza BUSCA, Jonathan A LANE, Douwe VAN SINDEREN a Rita M HICKEY, 2023. Molecular strategies for the utilisation of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bacteria. FEMS Microbiology Reviews [online]. 47(6). ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1093/femsre/fuad056

KIM, Haejin, Alexandra R. SITARIK, Kimberley WOODCROFT, Christine Cole JOHNSON a Edward ZORATTI, 2019. Birth Mode, Breastfeeding, Pet Exposure, and Antibiotic Use: Associations With the Gut Microbiome and Sensitization in Children [online]. 1. duben 2019. B.m.: Current Medicine Group LLC 1. ISSN 15346315. Dostupné z: doi:10.1007/s11882-019-0851-9

KIM, Su Yeong a Dae Yong YI, 2020. Components of human breast milk: From macronutrient to microbiome and microRNA [online]. 1. srpen 2020. B.m.: Korean Pediatric Society. ISSN 27134148. Dostupné z: doi:10.3345/cep.2020.00059

KIU, Raymond a Lindsay J. HALL, 2018. An update on the human and animal enteric pathogen Clostridium perfringens [online]. 1. prosinec 2018. B.m.: Nature Publishing Group. ISSN 22221751. Dostupné z: doi:10.1038/s41426-018-0144-8

KLINE, Kimberly A., Karen W. DODSON, Michael G. CAPARON a Scott J. HULTGREN, 2010. A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. Trends in Microbiology [online]. 18(5), 224–232. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2010.03.002

KOENIG, Jeremy E., Aymé SPOR, Nicholas SCALFONE, Ashwana D. FRICKER, Jesse STOMBAUGH, Rob KNIGHT, Largus T. ANGENENT a Ruth E. LEY, 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [online]. 108(SUPPL. 1), 4578–4585. ISSN 10916490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1000081107

KOCHAN, Travis J., Matthew H. FOLEY, Michelle S. SHOSHIEV, Madeline J. SOMERS, Paul E. CARLSON a Philip C. HANNA, 2018. Updates to Clostridium difficile spore germination. Journal of Bacteriology [online]. 200(16). ISSN 10985530. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00218-18

KOLAČEK, Sanja, Iva HOJSAK, Roberto BERNI CANANI, Alfredo GUARINO, Flavia INDRIO, Rok OREL, Bruno POT, Raanan SHAMIR, Hania SZAJEWSKA, Yvan VANDENPLAS, Johannes VAN GOUDOEVER a Zvi WEIZMAN, 2017. Commercial Probiotic Products: A Call for Improved Quality Control. A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition [online]. 65(1), 117–124. ISSN 15364801. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0000000000001603

KOPEČNÝ, J., J. MRÁZEK a J. KILLER, 2010. The presence of bifidobacteria in social insects, fish and reptiles. Folia Microbiologica [online]. 55(4), 336–339. ISSN 0015-5632. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-010-0053-2

KORECKA, Agata, Tomas DE WOUTERS, Antonietta CULTRONE, Nicolas LAPAQUE, Sven PETTERSSON, Joel DORE, Herve BLOTTIERE a Velmurugesan ARULAMPALAM, 2013. ANGPTL4 expression induced by butyrate and rosiglitazone in human intestinal epithelial cells utilizes independent pathways. AJP-Gastrointestinal and Liver Physiology [online]. 304(11). Dostupné z: doi:10.1152/ajpgi.00293.2012ï

KORPELA, Katri, 2021. Impact of Delivery Mode on Infant Gut Microbiota. Annals of Nutrition and Metabolism [online]. 77(Suppl. 3), 11–19. ISSN 0250-6807. Dostupné z: doi:10.1159/000518498

KORPELA, Katri, Elin W. BLAKSTAD, Sissel J. MOLTU, Kenneth STRØMMEN, Britt NAKSTAD, Arild E. RØNNESTAD, Kristin BRÆKKE, Per O. IVERSEN, Christian A. DREVON a Willem DE VOS, 2018. Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. Scientific Reports [online]. 8(1). ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-20827-x

KUMAR, Chityal Ganesh, Sarada SRIPADA a Yedla POORNACHANDRA, 2018. Status and Future Prospects of Fructooligosaccharides as Nutraceuticals. In: Role of Materials

Science in Food Bioengineering [online]. B.m.: Elsevier, s. 451–503. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811448-3.00014-0

LAU, Christine S.M. a Ronald S. CHAMBERLAIN, 2015. Probiotic administration can prevent necrotizing enterocolitis in preterm infants: A meta-analysis. Journal of Pediatric Surgery [online]. 50(8), 1405–1412. ISSN 00223468. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpedsurg.2015.05.008

LAUREYS, David, Margo CNOCKAERT, Luc DE VUYST a Peter VANDAMME, 2016. Bifidobacterium aquikefiri sp. nov., isolated from water kefir. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [online]. 66(3), 1281–1286. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.000877

LAURSEN, Martin F., Mikiyasu SAKANAKA, Nicole VON BURG, Urs MÖRBE, Daniel ANDERSEN, Janne Marie MOLL, Ceyda T. PEKMEZ, Aymeric RIVOLLIER, Kim F. MICHAELSEN, Christian MØLGAARD, Mads Vendelbo LIND, Lars O. DRAGSTED, Takane KATAYAMA, Henrik L. FRANDSEN, Anne Marie VINGGAARD, Martin I. BAHL, Susanne BRIX, William AGACE, Tine R. LICHT a Henrik M. ROAGER, 2021. Bifidobacterium species associated with breastfeeding produce aromatic lactic acids in the infant gut. Nature Microbiology [online]. 6(11), 1367–1382. ISSN 2058-5276. Dostupné z: doi:10.1038/s41564-021-00970-4

LAURSEN, Martin Frederik, Gitte ZACHARIASSEN, Martin Iain BAHL, Anders BERGSTRÖM, Arne HOST, Kim F. MICHAELSEN a Tine Rask LICHT, 2015. Having older siblings is associated with gut microbiota development during early childhood. BMC Microbiology [online]. 15(1). ISSN 14712180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-015-0477-6

LEE, Eun, Byoung Ju KIM, Mi Jin KANG, Kil Yong CHOI, Hyun Ju CHO, Yeongho KIM, Song I. YANG, Young Ho JUNG, Hyung Young KIM, Ju Hee SEO, Ji Won KWON, Hyo Bin KIM, So Yeon LEE a Soo Jong HONG, 2016. Dynamics of gut microbiota according to the delivery mode in healthy Korean infants. Allergy, Asthma and Immunology Research [online]. 8(5), 471–477. ISSN 20927363. Dostupné z: doi:10.4168/aair.2016.8.5.471

LEMAIRE, M., I. LE HUËROU-LURON a S. BLAT, 2018. Effects of infant formula composition on long-term metabolic health. Journal of Developmental Origins of Health and Disease [online]. 9(6), 573–589. ISSN 2040-1744. Dostupné z: doi:10.1017/S2040174417000964

LEMOINE, Anaïs, Patrick TOUNIAN, Karine ADEL-PATIENT a Muriel THOMAS, 2023. Pre-, pro-, syn-, and Postbiotics in Infant Formulas: What Are the Immune Benefits for Infants? [online]. 1. březen 2023. B.m.: MDPI. ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/nu15051231

LEONEL, Alda J. a Jacqueline I. ALVAREZ-LEITE, 2012. Butyrate: Implications for intestinal function [online]. září 2012. ISSN 13631950. Dostupné z: doi:10.1097/MCO.0b013e32835665fa

LOCASCIO, Riccardo G., Milady R. NIÑONUEVO, Scott R. KRONEWITTER, Samara L. FREEMAN, J. Bruce GERMAN, Carlito B. LEBRILLA a David A. MILLS, 2009. A versatile and scalable strategy for glycoprofiling bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides. Microbial Biotechnology [online]. 2(3), 333–342. ISSN 1751-7915. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00072.x

LOPETUSO, Loris R., Franco SCALDAFERRI, Valentina PETITO a Antonio GASBARRINI, 2013. Commensal Clostridia: Leading players in the maintenance of gut homeostasis [online]. 2013. ISSN 17574749. Dostupné z: doi:10.1186/1757-4749-5-23

LOU, Yue Clare, Benjamin E. RUBIN, Marie C. SCHOELMERICH, Kaden S. DIMARCO, Adair L. BORGES, Rachel ROVINSKY, Leo SONG, Jennifer A. DOUDNA a Jillian F. BANFIELD, 2023. Infant microbiome cultivation and metagenomic analysis reveal Bifidobacterium 2'-fucosyllactose utilization can be facilitated by coexisting species. Nature Communications [online]. 14(1), 7417. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-023-43279-y

MA, Jingran, Zhenghong LI, Wenjuan ZHANG, Chunli ZHANG, Yuheng ZHANG, Hua MEI, Na ZHUO, Hongyun WANG, Lin WANG a Dan WU, 2020. Comparison of gut microbiota in exclusively breast-fed and formula-fed babies: a study of 91 term infants. Scientific Reports [online]. 10(1). ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-72635-x

MAKOVSKA, Marie, Jiri KILLER, Nikol MODRACKOVA, Eugenio INGRIBELLI, Ahmad AMIN, Eva VLKOVA, Petra BOLECHOVA a Vera NEUZIL-BUNESOVA, 2023. Species and Strain Variability among Sarcina Isolates from Diverse Mammalian Hosts. Animals [online]. 13(9), 1529. ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani13091529

MALDONADO, J., M. GIL-CAMPOS, J. A. MALDONADO-LOBÓN, M. R. BENAVIDES, K. FLORES-ROJAS, R. JALDO, I. JIMÉNEZ DEL BARCO, V. BOLÍVAR, A. D. VALERO, E. PRADOS, I. PEÑALVER a M. OLIVARES, 2019. Evaluation of the safety, tolerance and efficacy of 1-year consumption of infant formula supplemented with Lactobacillus fermentum CECT5716 Lc40 or Bifidobacterium breve CECT7263: A randomized controlled trial. BMC Pediatrics [online]. 19(1). ISSN 14712431. Dostupné z: doi:10.1186/s12887-019-1753-7

MALDONADO, José, Francisco CAÑABATE, Luis SEMPERE, Francisco VELA, Ana R. SÁNCHEZ, Eduardo NARBONA, Eduardo LÓPEZ-HUERTAS, Arjan GEERLINGS, Antonio D. VALERO, Mónica OLIVARES a Federico LARA-VILLOSLADA, 2012. Human Milk Probiotic Lactobacillus fermentum CECT5716 Reduces the Incidence of Gastrointestinal and Upper Respiratory Tract Infections in Infants. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition [online]. 54(1), 55–61. ISSN 0277-2116. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0b013e3182333f18

MALDONADO-LOBÓN, J.A., M. GIL-CAMPOS, J. MALDONADO, E. LÓPEZ-HUERTAS, K. FLORES-ROJAS, A.D. VALERO, M.V. RODRÍGUEZ-BENÍTEZ, O. BAÑUELOS, F. LARA-VILLOSLADA, J. FONOLLÁ a M. OLIVARES, 2015. Long-term safety of early consumption of Lactobacillus fermentum CECT5716: A 3-year

follow-up of a randomized controlled trial. Pharmacological Research [online]. 95–96, 12–19. ISSN 10436618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2015.01.006

MANTHEY, Carolin F., Chloe A. AUTRAN, Lars ECKMANN a Lars BODE, 2014. Human milk oligosaccharides protect against enteropathogenic escherichia coli attachment in vitro and EPEC colonization in suckling mice. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition [online]. 58(2), 165–168. ISSN 02772116. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0000000000000172

MANTZIARI, Anastasia a Samuli RAUTAVA, 2021. Factors influencing the microbial composition of human milk. Seminars in Perinatology [online]. 45(8). ISSN 1558075X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semperi.2021.151507

MARTÍN, Rocío, Esther JIMÉNEZ, Hans HEILIG, Leonides FERNÁNDEZ, María L. MARÍN, Erwin G. ZOETENDAL a Juan M. RODRÍGUEZ, 2009. Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. Applied and Environmental Microbiology [online]. 75(4), 965–969. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02063-08

MARTINEZ, Fabio Andres Castillo, Eduardo Marcos BALCIUNAS, Attilio CONVERTI, Paul D. COTTER a Ricardo Pinheiro DE SOUZA OLIVEIRA, 2013. Bacteriocin production by Bifidobacterium spp. A review. Biotechnology Advances [online]. 31(4), 482–488. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2013.01.010

MASI, Andrea C., Nicholas D. EMBLETON, Christopher A. LAMB, Gregory YOUNG, Claire L. GRANGER, Julia NAJERA, Daniel P. SMITH, Kristi L. HOFFMAN, Joseph F. PETROSINO, Lars BODE, Janet E. BERRINGTON a Christopher J. STEWART, 2021. Human milk oligosaccharide DSLNT and gut microbiome in preterm infants predicts necrotising enterocolitis. Gut [online]. 70(12), 2273–2282. ISSN 14683288. Dostupné z: doi:10.1136/gutjnl-2020-322771

MATAMOROS, Sebastien, Christele GRAS-LEGUEN, Françoise LE VACON, Gilles POTEL a Marie France DE LA COCHETIERE, 2013. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health [online]. duben 2013. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2012.12.001

MATSUMOTO, Mitsuharu, Hifumi OHISHI a Yoshimi BENNO, 2004. H+-ATPase activity in Bifidobacterium with special reference to acid tolerance. International Journal of Food Microbiology [online]. 93(1), 109–113. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.009

MAZZOLA, Giuseppe, Kiera MURPHY, R. Paul ROSS, Diana DI GIOIA, Bruno BIAVATI, Luigi T. CORVAGLIA, Giacomo FALDELLA a Catherine STANTON, 2016. Early gut microbiota perturbations following intrapartum antibiotic prophylaxis to prevent group B streptococcal disease. PLoS ONE [online]. 11(6). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0157527

MILANI, Christian, Sabrina DURANTI, Francesca BOTTACINI, Eoghan CASEY, Francesca TURRONI, Jennifer MAHONY, Clara BELZER, Susana DELGADO PALACIO, Silvia Arboleya MONTES, Leonardo MANCABELLI, Gabriele Andrea LUGLI, Juan Miguel RODRIGUEZ, Lars BODE, Willem DE VOS, Miguel GUEIMONDE, Abelardo MARGOLLES, Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA, 2017. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota [online]. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR

MILANI, Christian, Gabriele Andrea LUGLI, Sabrina DURANTI, Francesca TURRONI, Leonardo MANCABELLI, Chiara FERRARIO, Marta MANGIFESTA, Arancha HEVIA, Alice VIAPPIANI, Matthias SCHOLZ, Stefania ARIOLI, Borja SANCHEZ, Jonathan LANE, Doyle V. WARD, Rita HICKEY, Diego MORA, Nicola SEGATA, Abelardo MARGOLLES, Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA, 2015. Bifidobacteria exhibit social behavior through carbohydrate resource sharing in the gut. Scientific Reports [online]. 5(1), 15782. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep15782

MODI, Sheetal R., James J. COLLINS a David A. RELMAN, 2014. Antibiotics and the gut microbiota [online]. 1. říjen 2014. B.m.: American Society for Clinical Investigation. ISSN 15588238. Dostupné z: doi:10.1172/JCI72333

MOHAN, Ruchika, Corinna KOEBNICK, Janko SCHILDT, Sabine SCHMIDT, Manfred MUELLER, Mike POSSNER, Michael RADKE a Michael BLAUT, 2006. Effects of Bifidobacterium lactis Bb12 Supplementation on Intestinal Microbiota of Preterm Infants: a Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study. Journal of Clinical Microbiology [online]. 44(11), 4025–4031. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00767-06

MONTEIRO, Cinara, Monique DO CARMO, Bruna MELO, Matheus ALVES, Camilla DOS SANTOS, Sílvio MONTEIRO, Maria BOMFIM, Elizabeth FERNANDES a Valério MONTEIRO-NETO, 2019. In Vitro Antimicrobial Activity and Probiotic Potential of Bifidobacterium and Lactobacillus against Species of Clostridium. Nutrients [online]. 11(2), 448. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11020448

MORISSET, M., C. AUBERT-JACQUIN, P. SOULAINES, D. A. MONERET-VAUTRIN a C. DUPONT, 2011. A non-hydrolyzed, fermented milk formula reduces digestive and respiratory events in infants at high risk of allergy. European Journal of Clinical Nutrition [online]. 65(2), 175–183. ISSN 09543007. Dostupné z: doi:10.1038/ejcn.2010.250

MORREALE, Chiara, Cristina GIARONI, Andreina BAJ, Laura FOLGORI, Lucia BARCELLINI, Amraj DHAMI, Massimo AGOSTI a Ilia BRESESTI, 2023. Effects of Perinatal Antibiotic Exposure and Neonatal Gut Microbiota [online]. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics

MOYA-GONZÁLVEZ, Eva M., Antonio RUBIO-DEL-CAMPO, Jesús RODRÍGUEZ-DÍAZ a María J. YEBRA, 2021. Infant-gut associated Bifidobacterium dentium strains utilize the galactose moiety and release lacto-N-triose from the human milk oligosaccharides lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose. Scientific Reports [online]. 11(1). ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-02741-x

NAGANO, Yuji, Kikuji ITOH a Kenya HONDA, 2012. The induction of Treg cells by gut-indigenous Clostridium [online]. srpen 2012. ISSN 09527915. Dostupné z: doi:10.1016/j.coi.2012.05.007

NEU, Josef, Mike CHEN a Elizabeth BEIERLE, 2005. Intestinal innate immunity: How does it relate to the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. Seminars in Pediatric Surgery [online]. 14(3), 137–144. ISSN 10558586. Dostupné z: doi:10.1053/j.sempedsurg.2005.05.001

NEU, Josef a W Allan WALKER, 2011. N Engl J Med. 2011 Jan 20;364(3):255-64. Dostupné z: doi: 10.1056/NEJMra1005408.

NEWBERRY, Sydne J., 2012. Probiotics for the Prevention and Treatment of Antibiotic-Associated Diarrhea. JAMA [online]. 307(18), 1959. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2012.3507

NOGACKA, Alicja, Nuria SALAZAR, Marta SUÁREZ, Christian MILANI, Silvia ARBOLEYA, Gonzalo SOLÍS, Nuria FERNÁNDEZ, Lidia ALAEZ, Ana M. HERNÁNDEZ-BARRANCO, Clara G. DE LOS REYES-GAVILÁN, Marco VENTURA a Miguel GUEIMONDE, 2017. Impact of intrapartum antimicrobial prophylaxis upon the intestinal microbiota and the prevalence of antibiotic resistance genes in vaginally delivered full-term neonates. Microbiome [online]. 5(1). ISSN 20492618. Dostupné z: doi:10.1186/s40168-017-0313-3

O'CONNELL MOTHERWAY, Mary, Aldert ZOMER, Sinead C. LEAHY, Justus REUNANEN, Francesca BOTTACINI, Marcus J. CLAESSON, Frances O'BRIEN, Kiera FLYNN, Patrick G. CASEY, Jose Antonio MORENO MUNOZ, Breda KEARNEY, Aileen M. HOUSTON, Caitlin O'MAHONY, Des G. HIGGINS, Fergus SHANAHAN, Airi PALVA, Willem M. DE VOS, Gerald F. FITZGERALD, Marco VENTURA, Paul W. O'TOOLE a Douwe VAN SINDEREN, 2011. Functional genome analysis of Bifidobacterium breve UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 108(27), 11217–11222. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1105380108

OGBUANU, Chinelo A., Janice PROBST, Sarah B. LADITKA, Jihong LIU, JongDeuk BAEK a Saundra GLOVER, 2009. Reasons Why Women Do Not Initiate Breastfeeding. Women's Health Issues [online]. 19(4), 268–278. ISSN 10493867. Dostupné z: doi:10.1016/j.whi.2009.03.005

OHTANI, Kaori a Tohru SHIMIZU, 2016. Regulation of toxin production in clostridium perfringens [online]. 5. červenec 2016. B.m.: MDPI AG. ISSN 20726651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins8070207

OHUMA, Eric O, Ann-Beth MOLLER, Ellen BRADLEY, Samuel CHAKWERA, Laith HUSSAIN-ALKHATEEB, Alexandra LEWIN, Yemisrach B OKWARAJI, Wahyu Retno MAHANANI, Emily White JOHANSSON, Tina LAVIN, Diana Estevez FERNANDEZ, Giovanna Gatica DOMÍNGUEZ, Ayesha DE COSTA, Jenny A CRESSWELL, Julia KRASEVEC, Joy E LAWN, Hannah BLENCOWE, Jennifer REQUEJO a Allisyn C

MORAN, 2023. National, regional, and global estimates of preterm birth in 2020, with trends from 2010: a systematic analysis. The Lancet [online]. 402(10409), 1261–1271. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(23)00878-4

OKBURAN, Gozde a Serap KIZILER, 2023. Human milk oligosaccharides as prebiotics [online]. 1. květen 2023. B.m.: Elsevier (Singapore) Pte Ltd. ISSN 18759572. Dostupné z: doi:10.1016/j.pedneo.2022.09.017

PARKER, Aimée, Sonia FONSECA a Simon R. CARDING, 2020. Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and brain health [online]. 3. březen 2020. B.m.: Taylor and Francis Inc. ISSN 19490984. Dostupné z: doi:10.1080/19490976.2019.1638722

PARSCHAT, Katja, Cathrine MELSAETHER, Kristina Rasch JÄPELT a Stefan JENNEWEIN, 2021. Clinical evaluation of 16-week supplementation with 5HMO-mix in healthy-term human infants to determine tolerability, safety, and effect on growth. Nutrients [online]. 13(8). ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/nu13082871

PATANGIA, Dhrati V., Cornelius ANTHONY RYAN, Eugene DEMPSEY, Reynolds PAUL ROSS a Catherine STANTON, 2022. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health [online]. 1. únor 2022. B.m.: John Wiley and Sons Inc. ISSN 20458827. Dostupné z: doi:10.1002/mbo3.1260

PECK, Michael W., Sandra C. STRINGER a Andrew T. CARTER, 2011. Clostridium botulinum in the post-genomic era [online]. duben 2011. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2010.03.005

PENDERS, John, Carel THIJS, Cornelis VINK, Foekje F. STELMA, Bianca SNIJDERS, Ischa KUMMELING, Piet A. VAN DEN BRANDT a Ellen E. STOBBERINGH, 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Pediatrics [online]. 118(2), 511–521. ISSN 00314005. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2005-2824

PÉREZ-ESCALANTE, Emmanuel, Sergio ALATORRE-SANTAMARÍA, Araceli CASTAÑEDA-OVANDO, Verónica SALAZAR-PEREDA, Mirandeli BAUTISTA-ÁVILA, Alma Elizabeth CRUZ-GUERRERO, Juan Francisco FLORES-AGUILAR a Luis Guillermo GONZÁLEZ-OLIVARES, 2022. Human milk oligosaccharides as bioactive compounds in infant formula: recent advances and trends in synthetic methods [online]. 2022. B.m.: Taylor and Francis Ltd. ISSN 15497852. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2020.1813683

PEREZ-MUÑOZ, Maria Elisa, Marie-Claire ARRIETA, Amanda E. RAMER-TAIT a Jens WALTER, 2017. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. Microbiome [online]. 5(1), 48. ISSN 2049-2618. Dostupné z: doi:10.1186/s40168-017-0268-4

PETERSEN, Irene, Ruth GILBERT, Stephen EVANS, Antonia RIDOLFI a Irwin NAZARETH, 2010. Oral antibiotic prescribing during pregnancy in primary care: UK population-based study. Journal of Antimicrobial Chemotherapy [online]. 65(10), 2238–2246. ISSN 03057453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkq307

PLAZA-DÍAZ, Julio, Luis FONTANA a Angel GIL, 2018. Human milk oligosaccharides and immune system development [online]. 8. srpen 2018. B.m.: MDPI AG. ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/nu10081038

PLAZA-DIAZ, Julio, Francisco Javier RUIZ-OJEDA, Javier MORALES, Ana Isabel Cristina DE LA TORRE, Antonio GARCÍA-GARCÍA, Carlos Nuñez DE PRADO, Cristóbal CORONEL-RODRÍGUEZ, Cyntia CRESPO, Eduardo ORTEGA, Esther MARTÍN-PÉREZ, Fernando FERREIRA, Gema GARCÍA-RON, Ignacio GALICIA, María Teresa SANTOS-GARCÍA-CUÉLLAR, Marcos MAROTO, Paola RUIZ, Raquel MARTÍN-MOLINA, Susana VIVER-GÓMEZ a Angel GIL, 2023. Effects of a Novel Infant Formula on Weight Gain, Body Composition, Safety and Tolerability to Infants: The INNOVA 2020 Study. Nutrients [online]. 15(1). ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/nu15010147

PUCCIO, Giuseppe, Philippe ALLIET, Cinzia CAJOZZO, Elke JANSSENS, Giovanni CORSELLO, Norbert SPRENGER, Susan WERNIMONT, Delphine EGLI, Laura GOSONIU a Philippe STEENHOUT, 2017. Effects of infant formula with human milk oligosaccharides on growth and morbidity: A randomized multicenter trial. In: Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition [online]. B.m.: Lippincott Williams and Wilkins, s. 624–631. ISSN 15364801. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0000000000001520

RADKE, Michael, Jean Charles PICAUD, Andrea LOUI, Gilles CAMBONIE, Dirk FAAS, Harry N. LAFEBER, Nanda DE GROOT, Sophie S. PECQUET, Philippe G. STEENHOUT a Jean Michel HASCOET, 2017. Starter formula enriched in prebiotics and probiotics ensures normal growth of infants and promotes gut health: A randomized clinical trial. Pediatric Research [online]. 81(4), 622–631. ISSN 15300447. Dostupné z: doi:10.1038/pr.2016.270

REYMAN, Marta, Marlies A. VAN HOUTEN, Debbie VAN BAARLE, Astrid A.T.M. BOSCH, Wing Ho MAN, Mei Ling J.N. CHU, Kayleigh ARP, Rebecca L. WATSON, Elisabeth A.M. SANDERS, Susana FUENTES a Debby BOGAERT, 2019. Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. Nature Communications [online]. 10(1). ISSN 20411723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-13014-7

REYMAN, Marta, Marlies A. VAN HOUTEN, Rebecca L. WATSON, Mei Ling J.N. CHU, Kayleigh ARP, Wouter J. DE WAAL, Irene SCHIERING, Frans B. PLÖTZ, Rob J.L. WILLEMS, Willem VAN SCHAIK, Elisabeth A.M. SANDERS a Debby BOGAERT, 2022. Effects of early-life antibiotics on the developing infant gut microbiome and resistome: a randomized trial. Nature Communications [online]. 13(1). ISSN 20411723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-022-28525-z

RHOADS, J. Marc, James COLLINS, Nicole Y. FATHEREE, S. Shahrukh HASHMI, Christopher M. TAYLOR, Meng LUO, Thomas K. HOANG, Wallace A. GLEASON, Melissa R. VAN ARSDALL, Fernando NAVARRO a Yuying LIU, 2018. Infant Colic Represents Gut Inflammation and Dysbiosis. The Journal of Pediatrics [online]. 203, 55-61.e3. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpeds.2018.07.042

RIVIÈRE, Audrey, Marija SELAK, David LANTIN, Frédéric LEROY a Luc DE VUYST, 2016. Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. Frontiers in Microbiology [online]. 7. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.00979

RODRÍGUEZ, Juan M., 2014. The origin of human milk bacteria: Is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? Advances in Nutrition [online]. 5(6), 779–784. ISSN 21565376. Dostupné z: doi:10.3945/an.114.007229

RODRÍGUEZ, Juan Miguel, Kiera MURPHY, Catherine STANTON, R. Paul ROSS, Olivia I. KOBER, Nathalie JUGE, Ekaterina AVERSHINA, Knut RUDI, Arjan NARBAD, Maria C. JENMALM, Julian R. MARCHESI a Maria Carmen COLLADO, 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. Microbial Ecology in Health & Disease [online]. 26(0). ISSN 0891-060X. Dostupné z: doi:10.3402/mehd.v26.26050

ROGER, Laure C., Adele COSTABILE, Diane T. HOLLAND, Lesley HOYLES a Anne L. MCCARTNEY, 2010. Examination of faecal Bifidobacterium populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. Microbiology [online]. 156(11), 3329–3341. ISSN 13500872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.043224-0

ROGERS, Samantha L. a Jackie BLISSETT, 2019. Infant temperament, maternal feeding behaviours and the timing of solid food introduction. Maternal and Child Nutrition [online]. 15(3). ISSN 17408709. Dostupné z: doi:10.1111/mcn.12771

ROMÁN RIECHMANN, Enriqueta, José Manuel MORENO VILLARES, Francisco DOMÍNGUEZ ORTEGA, Alfonso CARMONA MARTÍNEZ, Leandro PICÓ SIRVENT, Luz SANTANA SANDOVAL, José CASAS RIVERO, Ayham ALSHWEKI, Colin CERCAMONDI, Samir DAHBANE a María Luisa VIDAL-GUEVARA, 2020. Real-world study in infants fed with an infant formula with two human milk oligosaccharydes. Nutricion Hospitalaria [online]. 37(4), 698–706. ISSN 16995198. Dostupné z: doi:10.20960/nh.03084

ROMOND, Marie-Bénédicte, Michel COLAVIZZA, Catherine MULLIÉ, Nicolas KALACH, Odile KREMP, Christine MIELCAREK a Daniel IZARD, 2008. Does the intestinal bifidobacterial colonisation affect bacterial translocation? Anaerobe [online]. 14(1), 43–48. ISSN 10759964. Dostupné z: doi:10.1016/j.anaerobe.2007.09.003

ROZÉ, Jean-Christophe, Sébastien BARBAROT, Marie-José BUTEL, Nathalie KAPEL, Anne-Judith WALIGORA-DUPRIET, Inès DE MONTGOLFIER, Magali LEBLANC, Nathalie GODON, Pascale SOULAINES, Dominique DARMAUN, Montserrat RIVERO a Christophe DUPONT, 2012. An α-lactalbumin-enriched and symbiotic-supplemented v. a standard infant formula: a multicentre, double-blind, randomised trial. British Journal of Nutrition [online]. 107(11), 1616–1622. ISSN 0007-1145. Dostupné z: doi:10.1017/S000711451100479X

RUDLOFF, Silvia a Clemens KUNZ, 2012. Milk oligosaccharides and metabolism in infants. Advances in Nutrition [online]. 3(3). ISSN 21618313. Dostupné z: doi:10.3945/an.111.001594

RUIZ, Lorena, Rodrigo BACIGALUPE, Cristina GARCÍA-CARRAL, Alba BOIX-AMOROS, Héctor ARGÜELLO, Camilla Beatriz SILVA, Maria DE LOS ANGELES CHECA, Alex MIRA a Juan M. RODRÍGUEZ, 2019. Microbiota of human precolostrum and its potential role as a source of bacteria to the infant mouth. Scientific Reports [online]. 9(1). ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-42514-1

RUIZ, Lorena, Ana Belén FLÓREZ, Borja SÁNCHEZ, José Antonio MORENO-MUÑOZ, Maria RODRIGUEZ-PALMERO, Jesús JIMÉNEZ, Clara G. de los Reyes GAVILÁN, Miguel GUEIMONDE, Patricia RUAS-MADIEDO a Abelardo MARGOLLES, 2020. Bifidobacterium longum subsp. infantis CECT7210 (B. infantis IM-1®) Displays In Vitro Activity against Some Intestinal Pathogens. Nutrients [online]. 12(11), 3259. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12113259

RUIZ, Lorena, Abelardo MARGOLLES a Borja SÁNCHEZ, 2013. Bile resistance mechanisms in Lactobacillus and Bifidobacterium. Frontiers in Microbiology [online]. 4. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2013.00396

RUIZ-MOYANO, Santiago, Sarah M. TOTTEN, Daniel A. GARRIDO, Jennifer T. SMILOWITZ, J. Bruce GERMAN, Carlito B. LEBRILLA a David A. MILLS, 2013. Variation in Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Infant Gut-Associated Strains of Bifidobacterium breve. Applied and Environmental Microbiology [online]. 79(19), 6040–6049. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01843-13

SAARELA, Timo, Jorma KOKKONEN a Maila KOIVISTO, 2005. Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation. Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics [online]. 94(9), 1176–1181. ISSN 08035253. Dostupné z: doi:10.1080/08035250510036499

SALMINEN, Seppo, Maria Carmen COLLADO, Akihito ENDO, Colin HILL, Sarah LEBEER, Eamonn M.M. QUIGLEY, Mary Ellen SANDERS, Raanan SHAMIR, Jonathan R. SWANN, Hania SZAJEWSKA a Gabriel VINDEROLA, 2021. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics [online]. 1. září 2021. B.m.: Nature Research. ISSN 17595053. Dostupné z: doi:10.1038/s41575-021-00440-6

SALMINEN, Seppo, Bernd STAHL, Gabriel VINDEROLA a Hania SZAJEWSKA, 2020. Infant formula supplemented with biotics: Current knowledge and future perspectives [online]. 1. červenec 2020. B.m.: MDPI AG. ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12071952

SATO, Yukio, Dai KUJIRAI, Katsura EMOTO, Toshiaki YAGAMI, Taketo YAMADA, Manabu IZUMI, Masaki ANO, Kenichi KASE a Kenji KOBAYASHI, 2018. Necrotizing enterocolitis associated with Clostridium butyricum in a Japanese man. Acute Medicine & Surgery [online]. 5(2), 194–198. ISSN 2052-8817. Dostupné z: doi:10.1002/ams2.329

SEKIROV I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. 2010. Gut microbiota in health and disease. Physiological reviews 90(3):859-904.

SELA, D. A., J. CHAPMAN, A. ADEUYA, J. H. KIM, F. CHEN, T. R. WHITEHEAD, A. LAPIDUS, D. S. ROKHSAR, C. B. LEBRILLA, J. B. GERMAN, N. P. PRICE, P. M. RICHARDSON a D. A. MILLS, 2008. The genome sequence of Bifidobacterium longum subsp. infantis reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 105(48), 18964–18969. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0809584105

SENDER, Ron, Shai FUCHS a Ron MILO, 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLoS Biology [online]. 14(8). ISSN 15457885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.1002533

SETUBAL, João C. a Emmanuel DIAS-NETO, 2022. Microbiomes. In: Reference Module in Life Sciences [online]. B.m.: Elsevier. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-822563-9.00081-0

SCHWAB, Clarissa, Hans-Joachim RUSCHEWEYH, Vera BUNESOVA, Van Thanh PHAM, Niko BEERENWINKEL a Christophe LACROIX, 2017. Trophic Interactions of Infant Bifidobacteria and Eubacterium hallii during L-Fucose and Fucosyllactose Degradation. Frontiers in Microbiology [online]. 8. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.00095

SIMEONI, Umberto, Bernard BERGER, Jana JUNICK, Michael BLAUT, Sophie PECQUET, Enea REZZONICO, Dominik GRATHWOHL, Norbert SPRENGER, Harald BRÜSSOW, Hania SZAJEWSKA, J. M. BARTOLI, V. BREVAUT-MALATY, M. BORSZEWSKA-KORNACKA, W. FELESZKO, P. FRANÇOIS, C. GIRE, M. LECLAIRE, J. M. MAURIN, S. SCHMIDT, A. SKÓRKA, C. SQUIZZARO a J. J. VERDOT, 2016. Gut microbiota analysis reveals a marked shift to bifidobacteria by a starter infant formula containing a synbiotic of bovine milk-derived oligosaccharides and Bifidobacterium animalis subsp. lactis CNCM I-3446. Environmental microbiology [online]. 18(7), 2185–2195. ISSN 14622920. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.13144

SINGH, Vineet, GyuDae LEE, HyunWoo SON, Hong KOH, Eun Soo KIM, Tatsuya UNNO a Jae-Ho SHIN, 2023. Butyrate producers, "The Sentinel of Gut": Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics. Frontiers in Microbiology [online]. 13. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2022.1103836

SISK, P. M., C. A. LOVELADY, R. G. DILLARD, K. J. GRUBER a T. M. O'SHEA, 2007. Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. Journal of Perinatology [online]. 27(7), 428–433. ISSN 14765543. Dostupné z: doi:10.1038/sj.jp.7211758

SMITS, Wiep Klaas, Dena LYRAS, D. Borden LACY, Mark H. WILCOX a Ed J. KUIJPER, 2016. Clostridium difficile infection. Nature Reviews Disease Primers [online]. 2(1), 16020. ISSN 2056-676X. Dostupné z: doi:10.1038/nrdp.2016.20

SOCCOL, Carlos Ricardo, Luciana PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, Michele Rigon SPIER, Adriane BIANCHI, Pedroni MEDEIROS, Caroline Tiemi YAMAGUISHI,

Juliano DE, Dea LINDNER, Ashok PANDEY a Vanete THOMAZ-SOCCOL, [b.r.]. The Potential of Probiotics: A Review. ISSN 1330-9862.

SODHI, Chhinder P., Peter WIPF, Yukihiro YAMAGUCHI, William B. FULTON, Mark KOVLER, Diego F. NIÑO, Qinjie ZHOU, Emilyn BANFIELD, Adam D. WERTS, Mitchell R. LADD, Rachael H. BUCK, Karen C. GOEHRING, Thomas PRINDLE, Sanxia WANG, Hongpeng JIA, Peng LU a David J. HACKAM, 2021. The human milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose and 6'-sialyllactose protect against the development of necrotizing enterocolitis by inhibiting toll-like receptor 4 signaling. Pediatric Research [online]. 89(1), 91–101. ISSN 15300447. Dostupné z: doi:10.1038/s41390-020-0852-3

SORENSEN, Katy, Abbie L. CAWOOD, Glenn R. GIBSON, Lisa H. COOKE a Rebecca J. STRATTON, 2021. Amino Acid Formula Containing Synbiotics in Infants with Cow's Milk Protein Allergy: A Systematic Review and Meta-Analysis. Nutrients [online]. 13(3), 935. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu13030935

SPIRIG, Thomas, Ethan M. WEINER a Robert T. CLUBB, 2011. Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. Molecular Microbiology [online]. 82(5), 1044–1059. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07887.x

STEENHOUT, Philippe, Peter SPERISEN, François-Pierre MARTIN, Norbert SPRENGER, Susan WERNIMONT, Sophie PECQUET a Bernard BERGER, 2016. Term Infant Formula Supplemented with Human Milk Oligosaccharides (2′Fucosyllactose and Lacto-N- neo tetraose) Shifts Stool Microbiota and Metabolic Signatures Closer to that of Breastfed Infants. The FASEB Journal [online]. 30(S1). ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fasebj.30.1_supplement.275.7

STEWART, Christopher J., Nadim J. AJAMI, Jacqueline L. O'BRIEN, Diane S. HUTCHINSON, Daniel P. SMITH, Matthew C. WONG, Matthew C. ROSS, Richard E. LLOYD, HarshaVardhan DODDAPANENI, Ginger A. METCALF, Donna MUZNY, Richard A. GIBBS, Tommi VATANEN, Curtis HUTTENHOWER, Ramnik J. XAVIER, Marian REWERS, William HAGOPIAN, Jorma TOPPARI, Anette-G. ZIEGLER, Jin-Xiong SHE, Beena AKOLKAR, Ake LERNMARK, Heikki HYOTY, Kendra VEHIK, Jeffrey P. KRISCHER a Joseph F. PETROSINO, 2018. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. Nature [online]. 562(7728), 583–588. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-018-0617-x

STOEVA, Magdalena K., Jeewon GARCIA-SO, Nicholas JUSTICE, Julia MYERS, Surabhi TYAGI, Madeleine NEMCHEK, Paul J. MCMURDIE, Orville KOLTERMAN a John EID, 2021. Butyrate-producing human gut symbiont, Clostridium butyricum , and its role in health and disease. Gut Microbes [online]. 13(1). ISSN 1949-0976. Dostupné z: doi:10.1080/19490976.2021.1907272

STORM, Heidi M., Julie SHEPARD, Laura M. CZERKIES, Brian KINEMAN, Sarah S. COHEN, Heidi REICHERT a Ryan CARVALHO, 2019. 2′-Fucosyllactose Is Well Tolerated in a 100% Whey, Partially Hydrolyzed Infant Formula With Bifidobacterium lactis: A Randomized Controlled Trial. Global Pediatric Health [online]. 6. ISSN 2333794X. Dostupné z: doi:10.1177/2333794X19833995

SWANSON, Kelly S., Glenn R. GIBSON, Robert HUTKINS, Raylene A. REIMER, Gregor REID, Kristin VERBEKE, Karen P. SCOTT, Hannah D. HOLSCHER, Meghan B. AZAD, Nathalie M. DELZENNE a Mary Ellen SANDERS, 2020. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology [online]. 17(11), 687–701. ISSN 1759-5045. Dostupné z: doi:10.1038/s41575-020-0344-2

SZAJEWSKA, Hania, Marek RUSZCZYŃSKI, Henryk SZYMAŃSKI, Iwona SADOWSKA-KRAWCZENKO, Anna PIWOWARCZYK, Preben Bødstrup RASMUSSEN, Mette Bach KRISTENSEN, Christina E. WEST a Olle HERNELL, 2017. Effects of infant formula supplemented with prebiotics compared with synbiotics on growth up to the age of 12 mo: a randomized controlled trial. Pediatric Research [online]. 81(5), 752–758. ISSN 0031-3998. Dostupné z: doi:10.1038/pr.2017.5

TANAKA, Masaru a Jiro NAKAYAMA, 2017. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. Allergology International [online]. 66(4), 515–522. ISSN 13238930. Dostupné z: doi:10.1016/j.alit.2017.07.010

TETZ, George a Victor TETZ, 2017. Introducing the sporobiota and sporobiome. Gut Pathogens [online]. 9(1). ISSN 17574749. Dostupné z: doi:10.1186/s13099-017-0187-8

THERIOT, Casey M., Alison A. BOWMAN a Vincent B. YOUNG, 2016. Antibiotic-Induced Alterations of the Gut Microbiota Alter Secondary Bile Acid Production and Allow for Clostridium difficile Spore Germination and Outgrowth in the Large Intestine. mSphere [online]. 1(1). ISSN 2379-5042. Dostupné z: doi:10.1128/msphere.00045-15

THIBAULT, H, C AUBERT-JACQUIN a O GOULET, 2004. Effects of Long-term Consumption of a Fermented Infant Formula (with Bifidobacterium breve c50 and Streptococcus thermophilus 065) on Acute Diarrhea in Healthy Infants [online]. Dostupné z: http://journals.lww.com/jpgn

THURL, Stephan, Jobst HENKER, Manfred SIEGEL, Karlheinz TOVAR a Gu¨nther Gu¨nther SAWATZKI, 1997. Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides lacto-N-neotetraose; LNFP I-III, lacto-N-fucopentaoses I-III; LNDFH I-II, lacto-N-difucohexaoses I-II; LNH, lacto-N-hexaose; 2-F-LNH, 2-fucosyllacto-N-hexaose; 3-F-LNH, 3-fucosyllacto-N-hexaose; 2,3-DF-LNH, 2,3-difucosyllacto-N-hexaose.

TCHIRIKOV, Michael, Natalia SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, James MAHER, Jörg BUCHMANN, Yuri NABEREZHNEV, Andreas S. WINARNO a Gregor SELIGER, 2018. Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): Etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome [online]. 26. červenec 2018. B.m.: Walter de Gruyter GmbH. ISSN 16193997. Dostupné z: doi:10.1515/jpm-2017-0027

TOGO, Amadou, Jean Charles DUFOUR, Jean Christophe LAGIER, Gregory DUBOURG, Didier RAOULT a Matthieu MILLION, 2019a. Repertoire of human breast and milk microbiota: A systematic review. Future Microbiology [online]. 14(7), 623–641. ISSN 17460921. Dostupné z: doi:10.2217/fmb-2018-0317

TOGO, Amadou Hamidou, Ghiles GRINE, Saber KHELAIFIA, Clotilde DES ROBERT, Véronique BREVAUT, Aurelia CAPUTO, Emeline BAPTISTE, Marion BONNET, Anthony LEVASSEUR, Michel DRANCOURT, Matthieu MILLION a Didier RAOULT, 2019b. Culture of Methanogenic Archaea from Human Colostrum and Milk. Scientific Reports [online]. 9(1). ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-54759-x

TONOOKA, Toshiki, Shinji SAKATA, Maki KITAHARA, Michio HANAI, Shinobu ISHIZEKI, Masaaki TAKADA, Mitsuo SAKAMOTO a Yoshimi BENNO, 2005. Detection and Quantification of Four Species of the Genus Clostridium in Infant Feces.

TRINCI, Margherita, Claudia Lucia PICCOLO, Antonio Alessandro PALLOTTINO, Francesco ESPOSITO, Massimo ZECCOLINI a Vittorio MIELE, 2016. Necrotizing enterocolitis. In: Imaging Non-Traumatic Abdominal Emergencies in Pediatric Patients [online]. B.m.: Springer International Publishing, s. 53–72. ISBN 9783319418667. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-41866-7_4

TURRONI, Francesca, Francesca BOTTACINI, Elena FORONI, Imke MULDER, Jae Han KIM, Aldert ZOMER, Borja SÁNCHEZ, Alessandro BIDOSSI, Alberto FERRARINI, Vanessa GIUBELLINI, Massimo DELLEDONNE, Bernard HENRISSAT, Pedro COUTINHO, Marco OGGIONI, Gerald F. FITZGERALD, David MILLS, Abelardo MARGOLLES, Denise KELLY, Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA, 2010. Genome analysis of Bifidobacterium bifidum PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [online]. 107(45), 19514–19519. ISSN 10916490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1011100107

TURRONI, Francesca, Christian MILANI, Sabrina DURANTI, Chiara FERRARIO, Gabriele Andrea LUGLI, Leonardo MANCABELLI, Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA, 2018a. Bifidobacteria and the infant gut: an example of co-evolution and natural selection [online]. 1. leden 2018. B.m.: Birkhauser Verlag AG. ISSN 14209071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-017-2672-0

TURRONI, Francesca, Christian MILANI, Sabrina DURANTI, Jennifer MAHONY, Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA, 2018b. Glycan Utilization and Cross-Feeding Activities by Bifidobacteria. Trends in Microbiology [online]. 26(4), 339–350. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2017.10.001

TURRONI, Francesca, Ezgi ÖZCAN, Christian MILANI, Leonardo MANCABELLI, Alice VIAPPIANI, Douwe VAN SINDEREN, David A. SELA a Marco VENTURA, 2015. Glycan cross-feeding activities between bifidobacteria under in vitro conditions. Frontiers in Microbiology [online]. 6. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2015.01030

TURRONI, Francesca, Clelia PEANO, Daniel A. PASS, Elena FORONI, Marco SEVERGNINI, Marcus J. CLAESSON, Colm KERR, Jonathan HOURIHANE, Deirdre MURRAY, Fabio FULIGNI, Miguel GUEIMONDE, Abelardo MARGOLLES, Gianluca DE BELLIS, Paul W. O'TOOLE, Douwe VAN SINDEREN, Julian R. MARCHESI a Marco VENTURA, 2012. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota.

PLoS ONE [online]. 7(5). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0036957

TURRONI, Francesca, Fausta SERAFINI, Elena FORONI, Sabrina DURANTI, Mary O'CONNELL MOTHERWAY, Valentina TAVERNITI, Marta MANGIFESTA, Christian MILANI, Alice VIAPPIANI, Tommaso ROVERSI, Borja SÁNCHEZ, Andrea SANTONI, Laura GIOIOSA, Alberto FERRARINI, Massimo DELLEDONNE, Abelardo MARGOLLES, Laura PIAZZA, Paola PALANZA, Angelo BOLCHI, Simone GUGLIELMETTI, Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA, 2013. Role of sortase-dependent pili of Bifidobacterium bifidum PRL2010 in modulating bacterium–host interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 110(27), 11151–11156. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1303897110

VALDÉS-VARELA, L., Ana M. HERNÁNDEZ-BARRANCO, Patricia RUAS-MADIEDO a Miguel GUEIMONDE, 2016. Effect of Bifidobacterium upon Clostridium difficile Growth and Toxicity When Co-cultured in Different Prebiotic Substrates. Frontiers in Microbiology [online]. 7. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.00738

VAN DEN AKKER, Chris H.P., Johannes B. VAN GOUDOEVER, Raanan SHAMIR, Magnus DOMELLÖF, Nicholas D. EMBLETON, Iva HOJSAK, Alexandre LAPILLONNE, Walter A. MIHATSCH, Roberto BERNI CANANI, Jiri BRONSKY, Cristina CAMPOY, Mary S. FEWTRELL, Nataša FIDLER MIS, Alfredo GUARINO, Jessie M. HULST, Flavia INDRIO, Sanja KOLAČEK, Rok OREL, Yvan VANDENPLAS, Zvi WEIZMAN a Hania SZAJEWSKA, 2020. Probiotics and Preterm Infants: A Position Paper by the European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition and the European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition Working Group for Probiotics and Prebiotics. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition [online]. 70(5), 664–680. ISSN 15364801. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0000000000002655

VAN DER AA, L. B., H. S. HEYMANS, W. M. VAN AALDEREN, J. H. SILLEVIS SMITT, J. KNOL, K. BEN AMOR, D. A. GOOSSENS a A. B. SPRIKKELMAN, 2010. Effect of a new synbiotic mixture on atopic dermatitis in infants: A randomized-controlled trial. Clinical and Experimental Allergy [online]. 40(5), 795–804. ISSN 09547894. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03465.x

VANDENPLAS, Yvan, Bernard BERGER, Virgilio Paolo CARNIELLI, Janusz KSIAZYK, Hanna LAGSTRÖM, Manuel Sanchez LUNA, Nathalia MIGACHEVA, Jean Marc MOSSELMANS, Jean Charles PICAUD, Mike POSSNER, Atul SINGHAL a Martin WABITSCH, 2018. Human milk oligosaccharides: 2'-fucosyllactose (2'-FL) and lacto-n-neotetraose (LNnT) in infant formula [online]. 1. září 2018. B.m.: MDPI AG. ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/nu10091161

VENTURA, Marco, Sarah O'FLAHERTY, Marcus J. CLAESSON, Francesca TURRONI, Todd R. KLAENHAMMER, Douwe VAN SINDEREN a Paul W. O'TOOLE, 2009a. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: Probiogenomics [online]. 2009. B.m.: Nature Publishing Group. ISSN 17401526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2047

VENTURA, Marco, Francesca TURRONI, Aldert ZOMER, Elena FORONI, Vanessa GIUBELLINI, Francesca BOTTACINI, Carlos CANCHAYA, Marcus J. CLAESSON, Fei HE, Maria MANTZOURANI, Laura MULAS, Alberto FERRARINI, Beile GAO, Massimo DELLEDONNE, Bernard HENRISSAT, Pedro COUTINHO, Marco OGGIONI, Radhey S. GUPTA, Ziding ZHANG, David BEIGHTON, Gerald F. FITZGERALD, Paul W. O'TOOLE a Douwe VAN SINDEREN, 2009b. The Bifidobacterium dentium Bd1 Genome Sequence Reflects Its Genetic Adaptation to the Human Oral Cavity. PLoS Genetics [online]. 5(12), e1000785. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1000785

VOREADES, Noah, Anne KOZIL a Tiffany L. WEIR, 2014. Diet and the development of the human intestinal microbiome. Frontiers in Microbiology [online]. 5(SEP). ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2014.00494

WALANI, Salimah R., 2020. Global burden of preterm birth [online]. 1. červenec 2020. B.m.: John Wiley and Sons Ltd. ISSN 18793479. Dostupné z: doi:10.1002/ijgo.13195

WANG, Fuyuan a Sabita ROY, 2017. Gut Homeostasis, Microbial Dysbiosis, and Opioids. Toxicologic Pathology [online]. 45(1), 150–156. ISSN 15331601. Dostupné z: doi:10.1177/0192623316679898

WHO, 2023. Infant and young child feeding [online] [vid. 2024-04-15]. Dostupné z: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infant-and-young-child-feeding

WICIŃSKI, Michał, Ewelina SAWICKA, Jakub GĘBALSKI, Karol KUBIAK a Bartosz MALINOWSKI, 2020. Human milk oligosaccharides: Health benefits, potential applications in infant formulas, and pharmacology. Nutrients [online]. 12(1). ISSN 20726643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12010266

Y TAMBLE, 2024. Bifidobacterium. Wikipedia [online]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Bifidobacterium

ZHOU, Ping, Yanxia ZHOU, Bin LIU, Zhenchao JIN, Xueling ZHUANG, Wenkui DAI, Zhenyu YANG, Xin FENG, Qian ZHOU, Yanhong LIU, Ximing XU a Lian ZHANG, 2020. Perinatal Antibiotic Exposure Affects the Transmission between Maternal and Neonatal Microbiota and Is Associated with Early-Onset Sepsis. mSphere [online]. 5(1). ISSN 23795042. Dostupné z: doi:10.1128/msphere.00984-19

ZHOU, Yanjiao, Gururaj SHAN, Erica SODERGREN, George WEINSTOCK, W. Allan WALKER a Katherine E. GREGORY, 2015. Longitudinal Analysis of the Premature Infant Intestinal Microbiome Prior to Necrotizing Enterocolitis: A Case-Control Study. PLOS ONE [online]. 10(3), e0118632. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0118632

ZUO, Fanglei, Rui YU, Man XIAO, Gul Bahar KHASKHELI, Xiaofei SUN, Huiqin MA, Fazheng REN, Bing ZHANG a Shangwu CHEN, 2018. Transcriptomic analysis of Bifidobacterium longum subsp. longum BBMN68 in response to oxidative shock. Scientific Reports [online]. 8(1), 17085. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-35286-7

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

2'FL	2'-fukosyllaktóza
3'GL	3'-galaktosyllaktóza
3'SL	3'-sialyllaktóza
3'FL	3'-fukosyllakóza
3FL	3-fukosyllaktóza
6'FL	6'-fukosyllaktóza
6'SL	6'-sialyllaktóza
A. hallii	*Anaerobutyricum hallii*
AAD	Průjem způsobený užíváním antibiotik (antibiotic-associated diarrhea)
ABC	ABC transportní protein (ATP Binding Cassette)
ALA	Kyselina alfa-linolenová (alfa-linolenic acid)
ARA	L-arabinóza
B. adolescentis	*Bifidobacterium adolescentis*
B. bifidum	*Bifidobacterium bifidum*
B. breve, BB	*Bifidobacterium breve*
B. infantis	*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*
B. kashiwanohense	*Bifidobacterium kashiwanohense*
B. lactis, BL	*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*
B. longum	*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*
BCP	Bromkresolový purpur (bromocresol purple)
C. botulinum	*Clostridium botulinum*
C. butyricum, CB	*Clostridium butyricum*
C. neonatale, CN	*Clostridium neonatale*
C. paraputrificum	*Clostridium paraputrificum*
C. perfringens, CP	*C. perfringens*
C. saccharobutylicum, CS	*Clostridium saccharobutylicum*
CEL	D-celobióza
Cl. Difficile, CD	*Clostridioides difficile*
CMM	Cooked meat médium
DFL	Difukosyllakóza
DHA	Kyselina dokosahexaenová
DSLNT	Disialyllakto-*N*-tetraóza
EEC	Enteroendokrinní buňka (enteroendocrine cell)
EFSA	Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
Ent. faecalis	*Enterococcus faecalis*
EPEC	Enteropatogenní druh *Escherichia coli*
EPS+	Extrapolysacharidy
ESC	Eskulin, citrát železitý
ESPGHAN	Evropská společnost pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu (The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition)

EU	Evropská unie
F. prausnitzii	*Faecalibacterium prausnitzii*
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FOS	Fruktooligosacharidy
Fuc	Fukóza
FUT2	Fukosyltransferáza 2
FUT3	Fukosyltransferáza 3
Gal	Galaktóza
GEL	Želatina
GIT	Gastrointestinální systém
Glc	Glukóza
GlcNAc	N-acetylglukosamin
GLP-1	Glukagonu podobný peptid-1 (glucagon-like peptide-1)
GLU	D-glukóza
GLY	Glycerol
GM kmeny	Geneticky modifikované kmeny
GOS	Galaktooligosacharidy
GPCR	Receptor spřažený s G-proteinem (G protein-coupled with receptor)
HDAC	Histon deacetyláza (histone deacetylase)
HiMO	Humánní mléčné oligosacharidy (human-identical milk oligosaccharides)
HMO	Oligosacharidy mateřského mléka (human milk oligosaccharides)
IND	L-tryptofan
ISAPP	Mezinárodní vědecká asociace pro probiotika a probiotika (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics)
KO	Kyselina octová
KTJ	Kolonie tvořící jednotku
L. fermentum	*Limosilactobacillus fermentum*
LA	Kyselina linolenová (Linoleic acid)
LAC	D-laktóza
LDFT	Laktodifukotetraóza
Le (-)	Lewis negativní typ
Le (+)	Lewis pozitivní typ
LNB	Lakto-*N*-bióza
LNFP	Lakto-*N*-fukopentóza
MAN	D-mannitol
MLA	D-maltóza
MLZ	D-melezitóza
MM	Mateřské mléko
MNE	D-manóza
Mup	Mupirocin
NADH	Nikotinamidadenidinukleotid
NANA	N-acetyl-D-neuraminová kyselina

Nařízení (EU) 2016/127	Evropské unie (EU) uvedeny v Nařízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2016/127 ze dne 25. září 2015, kterým se doplňuje Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 609/2013
Nařízení (EU) 258/97	Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 258/97
NDA panel	Panel pro Výživu, nové potraviny a potravinové alergeny (Nutrition, Novel Foods and Food Allergens Panel)
NEC	Nekrotizující enterokolitida
NF-kB	Nukleární faktor kappa B
PM	Petriho miska
PNKV	Počáteční náhradní kojenecká výživa
PYY	Peptid YY
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Real-time polymerase chain reaction)
QSP	Kvalifikovaného předpokladu bezpečnosti (Qualified Presumption of Safety)
RAF	D-rafinóza
RHA	L-rhamnóza
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
S. thermophilus	*Staphylococcus thermophilus*
SACH	D-sacharóza
SAL	Salicin
SCF	Vědecký výbor pro potraviny (Scientific Committee on Food)
SCFA	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short chain fatty acids)
Se (-)	Nesekreční typ
Se (+)	Sekreční typ
Sia	Kyselina sialová
SOR	D-sorbitol
TLR	Toll-like receptor
TRE	D-trehalóza
UNICEF	Dětský fond Organizace spojených národů (United Nations Children's Fund)
URE	Urea
Vědecké stanovisko 2014	Vědeckého stanoviska věnovaného základnímu složení počáteční pokračovací kojenecké výživy z roku 2014, které bylo vydáno Evropským úřadem pro bezpečnost potravin
WSP agar	Modifikovaný Wilkins-Chalgren Anaerobe agar
WSP bujón	Modifikovaný Wilkins-Chalgren Anaerobe bujón
XYL	D-xylóza