

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra Mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Stanovení citlivosti probiotických bakterií na antimikrobiální
látky**

Bakalářská práce

Autor práce: Martin Janák

Obor studia: Kvalita produkce ATZK

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

Konzultant: Ing. Hana Salmonová, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci Stanovení citlivosti bakterií na antimikrobiální látky jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17.4.2019

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Šárce Musilové, Ph.D. za skvělé vedení, podporu, odborné rady, vedení při praktické části a za trpělivost. Dále Ing. Haně Salmonové, Ph.D. za konzultace a pomoc při vysvětlování různých nejasností. A na závěr bych chtěl poděkovat svým rodičům, kteří mě podporovali ve studiu.

Stanovení citlivosti probiotických bakterií na antimikrobiální látky

Souhrn

Probiotické bakterie představují skupinu, která pozitivně ovlivňuje zdraví hostitele a napomáhá udržet rovnováhu střevní mikrobioty. Nejtypičtějším příkladem potraviny s probiotiky je jogurt obsahující bakterie mléčného kvašení.

Bakalářská práce je zaměřena na testování citlivost probiotických bakterií, které jsou součástí střevní mikrobioty, na antibiotické látky. V teoretické části jsou detailně popsány probiotické mikroorganismy a jejich využití, se zvláštním zaměřením na rod *Bifidobacterium*, jeho zástupci byly testovány v praktické části. Dále jsou zde popsány antibiotické látky, jejich využití a také negativní dopad při jejich nadužívání.

V praktické části byla testována citlivost 12 kmenů bifidobakterií a to přesněji- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (6 kmenů), *Bifidobacterium longum* subsp. *suis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* (2 kmeny), *Bifidobacterium canis*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium radai*, ve 3 opakováních. Testování probíhalo dle pravidel stanovených Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) na 10 druhů antibiotik: ampicilin, vankomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erytromycin, klindamycin, quinupristin/dalfopristin, tetracycline, chloramfenikol. Pro kultivaci kultur byl použit Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar s přidavkem sójového peptonu, cysteinu a tweenu. Kultivace probíhala za anaerobních podmínek při 37°C po dobu 48 hodin a poté byla změřena inhibiční zóna a vyhodnocena rezistence bifidobakterií na dané antibiotikum.

Z výsledků je patrné, že každý kmen bifidobakterií je jinak rezistentní k různým antimikrobiálním látkám

Klíčová slova: antibiotika, mikrobiální látky, bifidobakterie, probiotikum, rezistence, inhibiční zóna

Determination of the sensitivity of probiotic bacteria to antimicrobial agents

Summary

Probiotic bacteria represent a group that positively affects the host's health and helps maintain the balance of the intestinal microbiota. The most typical example of a probiotic food is yogurt containing lactic acid bacteria.

The bachelor thesis is focused on the testing sensitivity of probiotic bacteria, which are parts of intestinal microbiota, to antibiotic substances. Probiotic microorganisms and their use are described in detail in the theoretical part, with special focus on the genus *Bifidobacterium*, its agents were tested in practical part. Furthermore, there are described antibiotic substances, their use and also the negative impact on their overuse.

In the practical part was tested the sensitivity of 12 strains of bifidobacteria (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (6 strains), *Bifidobacterium longum* subsp. *suis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* (2 strains), *Bifidobacterium canis*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium radai*). The testing was according to the rules of the European Food Safety Authority (EFSA) with 10 types of antibiotic: ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, quinupristin/dalfopristin, tetracycline, and chloramphenicol. Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar with soybean peptone, cysteine and tween was used for cultivation of the bifidobacteria. Bacteria were incubated at 37°C for 48 hours under anaerobic conditions. After incubation was measured zone of inhibition which is in correlation of bifidobacterial resistance.

The results show that each strain of bifidobacteria is otherwise resistant to various antimicrobial substances.

Keywords: antibiotics, microbial substances, bifidobacteria, probiotics, resistance, inhibition zone

1	Úvod	9
2	Cíl práce a vědecká hypotéza	10
2.1	Cíl práce	10
2.2	Hypotéza	10
3	Literární rešerše	11
3.1	Probiotické mikroorganismy	11
3.1.1	Úvod	11
3.1.2	Hlavní rody probiotických organismů	14
3.1.3	Význam probiotik	16
3.1.4	Probiotika v jídle	19
3.1.5	Interakce s prebiotiky	19
3.2	Bakterie rodu <i>Bifidobacterium</i>	21
3.2.1	Charakteristika	21
3.2.2	Výskyt	22
3.3	Význam v GIT	24
3.3.1	Identifikace	26
3.4	Antibiotika a jejich užití	27
3.4.1	Úvod	27
3.4.2	Historie	28
3.4.3	Citlivost na antibiotika	31
3.4.4	Dělení antibiotik dle mechanismu účinku	32
3.4.5	Rozdělení antibiotik dle chemické struktury	33
3.4.6	Negativa	34
3.4.6.1	Dopady na mikrobiom	34
3.4.6.2	Zásobník mikrobiologické rezistence mikrobiomu	35
3.4.6.3	Rezistence	37
4	Materiál a metody	40
4.1	Popis použitých kmenů	40
4.2	Metody mikrobiologických analýz	40
4.3	Metodika	41
4.3.1	Příprava kultivačních pŕd	41
4.3.2	Zpŕsob odbĕru vzorkŕ	41
4.3.3	Zpŕsob ŕčkování	42
4.3.4	Kultivace a hodnocení mikrobiologických rozborŕ a zpŕsob vyhodnocení vŕsledkŕ	42
5	Vŕsledky	42
6	Diskuze	45

7 Závěr	46
8 Seznam použité literatury	47
9 Přílohy.....	59

Seznam použitých zkratk

FAO - Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)

WHO - Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

EFSA - Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)

DNA - Deoxyribonukleová kyselina

RNA - Ribonukleová kyselina

GIT - Gastrointestinální trakt

DHL - Kyselina dihydroxylitová

THL - Kyselina tetrahydroxylitová

AK - Aminokyselina

BMK - Bakterie mléčného kvašení

AIDS - Syndrom získaného selhání imunity (Acquired Immune Deficiency Syndrome)

KTJ - Kolonie tvořící jednotka

PCR - Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

FOS - Fruktooligosacharidy

ARG - Gen zodpovědný za antibiotickou rezistenci (Antibiotic resistance gen)

QPS - Kvalifikovaný předpoklad bezpečnosti (The qualified presumption of safety)

MIC - Mikrobiální inhibiční koncentrace (microbial inhibition concentration)

MALDI-TOF - Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry)

TT - Trávicí trakt

1 Úvod

Mikrobiální rezistence vůči antibiotikům je současný globální problém. Rezistence může být buď primární (přirozená), nebo sekundární (získaná). O primární (přirozené) rezistenci se jedná, pokud všechny kmeny daného druhu jsou rezistentní na stejné antibiotikum. Pokud ale se jedná o odchylku a kmen, který by měl být citlivý na danou antibiotickou látku je rezistentní, tak se jedná o rezistenci sekundární (získanou). Důvodem pro získání rezistence u bifidobakterií, může být horizontální přenos, nebo prostřednictvím mutací původních genů. Příkladem horizontálního přenosu je přenos genů zodpovědných za rezistenci pomocí plazminů (extrachromozomální DNA) z jedné buňky do druhé pomocí konjugace. Tato rezistence je velmi riziková, protože bifidobakterie mohou působit jako rezervoár genů rezistence a tyto geny se mohou přenést na nebezpečné patogeny. Až příliš rychlý vývoj rezistence na antimikrobiální látky, je důsledkem nadužívání antibiotik. Vektorem, který napomáhá šíření rezistence mezi člověkem a zvířaty, jsou nejčastěji potraviny (Kunová et al 2012).

2 Cíl práce a vědecká hypotéza

2.1 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo testování citlivosti probiotických kmenů bifidobakterií na různé druhy antibiotik dle EFSA a nalezení potencionálních probiotických vhodných kmenů jako probiotika, které by pozitivně ovlivnily zdraví konzumenta.

2.2 Hypotéza

Předpokládáme že, jsou bifidobakterie podstatnou a nedílnou součástí TT lidí a zvířat, kde se podílejí na správném fungování střev, boji proti nemocem a působí proti škodlivým látkám. Mohou ale také působit jako rezervoár genů rezistence, které by mohly v konečném důsledku přejít na patogeny. Díky svým vlastnostem jsou bifidobakterie hojně využívány jako probiotikum. Proto hledáme nové kmeny, které by bylo možné použít jako probiotikum.

3 Literární rešerše

3.1 Probiotické mikroorganismy

3.1.1 Úvod

Termín probiotikum poprvé použili Lilly a Stillwell v roce 1965. Označili tak sloučeninu, kterou produkoval jeden druh prvoka, která stimulovala růst jiného prvoka. Později byl tento termín používán pro krmné doplňky hospodářským zvířatům (Rada & Marounek 2005). Pojem zahrnoval buď živé kultury mikroorganismů (Tortuero 1973), nebo jejich metabolity např. enzymy, aminokyseliny, organické kyseliny a antimikrobiální látky, které pozitivně ovlivnili mikrobiotu (Parker 1974). Tato definice by tedy zahrnovala i krmná antibiotika. Sémantický význam slova „probiotikum“ však znamená „pro život“ a je tedy pravým opakem slova antibiotikum (Rada & Marounek 2005). Proto se častěji používá definice dle Fullera: „Probiotika jsou živé mikrobiální krmné doplňky, které příznivě ovlivňují hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiocenoty“ (Fuller 1989). Tato definice klade důraz na použití živých buněk a podle autora odstraňuje zmatek, který vytvářelo slovo „substance“. Dále formulace „příznivě ovlivňuje hostitele“ v sobě zahrnuje všechny pozitivní vlivy – to znamená zlepšení růstu, využitelnost krmiv, vliv na zdravotní stav apod., které byly v předchozích definicích složitě rozepisovány. Definice byla později zjednodušena a v současné době platí formulace vytvořená tzv. „Pracovní skupinou evropských vědců“, která říká, že probiotika jsou „živé mikrobiální krmné přísady, které jsou prospěšné pro zdraví“ (Salminen et al. 1998). O vymezení pojmu se však vede stále diskuze a někteří výzkumníci upozorňují, že z definice by mohlo (mělo) vypadnout slovo „živý“ a to proto, že pozitivní vliv na zdraví (hlavně při pokusech na lidech) měly také inaktivované buňky mikroorganismů, nebo jen části buněčných struktur hlavně bakterií a kvasinek (Isolauri et al. 2002).

„Probiotikum“ je užitečným a uznávaným termínem a jeho definice podle FAO/WHO byla široce přijata a osvědčila se pro výzkumné pracovníky, regulátory a spotřebitele. Bylo však poznamenáno, že gramaticky správnější definice by měla být formulována jako „živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v odpovídajícím množství, poskytují hostiteli zdravotní přínos“ a je podporováno používání tohoto znění v budoucnu. Tato definice zahrnuje širokou škálu mikrobů a aplikací, přičemž zachycuje podstatu probiotik

(mikrobiálních, životaschopných a prospěšných pro zdraví). V několika posledních letech, která uplynuly od doby, kdy byla tato definice navržena, řada výzkumů zpochybnila hranice probiotického konceptu, od živých kultur přítomných ve fermentovaných potravinách až po mikroorganismy obsažené ve výkalech. Tento výraz byl také zjevně zneužit, například u výrobků, jako jsou matrace, šampony, dezinfekční prostředky a voda po holení, pro které životaschopnost a účinnost použitých mikrobů nejsou stanoveny. Použití pojmu probiotikum bylo v některých zemích Evropské unie omezeno a je pro spotřebitele v EU považováno za zavádějící, protože neexistují schválené zdravotní tvrzení. Nyní je zřejmé, že různé interpretace pojmu probiotikum vytvářejí významné obavy pro významné zúčastněné strany, pokud jde o překlad rozsáhlého výzkumu probiotik do potravin obsahující probiotika, které mohou být přínosem pro spotřebitele (Hill et al. 2014).

V posledních několika letech je výzkum zaměřený na mechanismy účinku probiotik a jejich definice se proto neustále mění. Na trhu se objevuje velmi mnoho volně dostupných přípravků s označením probiotikum, ale jen velmi malé množství splňuje podmínky a výše uvedenou definici (Quigley 2010). Proto je tedy důležité pozorovat funkční a technologické vlastnosti probiotických organismů pomocí *in vitro* testů a pro ověření stability probiotik je nutné kontrolovat jejich přežívání v reálných podmínkách výroby a v trávicím traktu (Vlková et al. 2013).

Očekávané vlastnosti a bezpečnostní kritéria probiotik:

-netoxické a nepatogenní, zejména není přípustná:

-tvorba enterotoxinu (toxin účinkující na střevo a vyvolává poruchu některých jeho funkcí)

- tvorba cytotoxinu (toxin poškozující buňky)

-enteroinvazivita (schopnost infekčních mikroorganismů napadat střevní sliznici a popřípadě i hlubší vrstvy střevní stěny)

-hemolýza (rozpad erytrocytů)

-sérorezistence (stav, kdy při řádné léčbě syfilitické infekce zůstává pozitivní sérologická reakce bez klinických příznaků)

-séropatogenita

- přítomnost genů antibiotické rezistence
- přesné taxonomické zařazení
- produkce antimikrobiálních látek
- antagonistický vztah s patogenními bakteriemi
- empiricky ověřený účinek na zdravotní stav
- přežití, kolonizace a metabolická aktivita v cílovém místě, které znamená:
 - odolnost proti působení žaludečních šťáv a žluči
 - perzistence v GIT
 - adheze k epitelu nebo hlenu
 - konkurenceschopnost vůči rezidentní mikrobiotě

V posledních letech je propagován pojem funkčnost probiotik jako výsledná vlastnost vyjadřující efektivní účinky a použitelnost konkrétního výrobku – probiotika (Mattila-Sandholm et al. 2002).

Funkčnost probiotik je ovlivňována řadou faktorů jako je za prvé charakteristika použitých kmenů, charakter použité potraviny, nebo krmiva, denní dávkou a stabilitou produktu. Za druhé potom jsou to faktory působící při výrobě probiotik, jako jsou použité kultivační technologie, technologie použité pro konzervaci kmenů (mražení, sušení lyofilizace) a mikroenkapsulace (Rada & Marounek 2005).

Často užívanými probiotiky ve výživě člověka jsou bifidobakterie a v posledních letech se zvyšuje zájem o jejich používání jako krmný přídatek pro hospodářská zvířata. Bifidobakterie mají řadu pozitivních vlivů na zdraví hostitele (Chaucheyras-Durand & Durand 2010), u hospodářských zvířat se uvádí zlepšení konverze živin, zvyšování užitkovosti a u mladých kategorií zvířat omezení průjmových onemocnění a dalších infekcí (Frizzo et al. 2010). Dalším důvodem používání bifidobakterií je to, že mají dlouhou historii bezpečného používání a riziko infekce při použití bifidobakterií je velmi nízké (Gasser 1999; Isolauri et al. 2002).

Zdravotní přínosy probiotik:

- vytvoření homeostázy
- zabránění osídlení střeva patogenními mikroorganismy
- produkce bakteriocinů
- snížení produkce bakteriálních enzymů s mutagenními účinky
- zmírnění laktosové intolerance
- stimulace a posílení imunitního systému
- syntéza vitamínů
- podpora vstřebávání vápníku
- snížení hladiny cholesterolu v krvi

3.1.2 Hlavní rody probiotických organismů

Jak v minulosti, tak i v současné době se jako probiotika používají bakterie mléčného kvašení BMK a to hlavně rody *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Lactococcus*. Dále se používají i obyvatelé střevní mikrobioty a to rod *Bifidobacterium*. Příčiny jsou nejméně tři a to buď dlouhodobá zkušenost s těmito bakteriemi při zpracování mléka, výrobě nakládané zeleniny a siláže, nebo relativně snadné kultivaci, nebo jsou v drtivé většině nepatogenní (Fuller 1989).

Protože se však v poslední době zdůrazňují i další kritéria pro úspěšnou kolonizaci trávicí trubice mikroorganismy, jako jsou například schopnost adherence na střevní epitel, růstové schopnosti v dietě a chymu, odolnost vůči kyselinám a žluči, nebo antagonistické působení proti jiným (patogenním) bakteriím rozšiřuje se spektrum používaných mikroorganismů (Fuller 1989).

Tabulka č. 1 uvádí přehled používaných mikroorganismů.

Tabulka 1. Mikroorganismy používané jako probiotika (upraveno podle Fuller 1989; Ouwehand et al. 2002)

Bakterie mléčného kvašení

Lactobacillus acidophilus

L. casei

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus*

L. rhamnosus

L. reuteri

L. plantarum

L. fermentum

L. brevis

L. helveticus

Streptococcus thermophilus

Lactococcus lactis

Enterococcus faecium

E. faecalis

Pediococcus pentosaceus

Bifidobakterie

Bifidobacterium bifidum

B. pseudolongum

B. breve

B. thermophilum

Ostatní bakterie

Bacillus subtilis

Ba. cereus

Ba. toyoi

Ba. natto

Ba. mesentericus

Ba. licheniformis

Clostridium butyricum

Mikroskopické houby

Saccharomyces cerevisiae

Aspergillus oryzae

Candida pintolopesii

Na místo původně používaných BMK se v současné době upřednostňují bakterie izolované z trávicího traktu. Nejvýznamnější rod je *Bifidobacterium*. Tyto bakterie jsou přirozeným obyvatelům tlustého střeva lidí a zvířat a byly izolovány také z batoru a výkalového vaku včely medonosné (Scardovi 1986; Rada & Petr 2002). U lidí převažují druhy *B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve* a *B. adolescentis*, zatímco ze zvířat bývá často izolován druh *B. animalis*, který se pro dobré technologické vlastnosti používá i do mléčných kysaných výrobků (Vlková et al. 2004). Bifidobakterie jsou téměř ideální probiotické bakterie, protože jsou v podstatě nepatogenní, jsou to typické střevní mikroorganismy, u kterých jsou navíc doloženy prokazatelné pozitivní efekty na zdravotní stav lidí a zvířat (Mitsuoka 1992). Určitým problémem je jejich citlivost na vnější podmínky, neboť se jedná o striktně anaerobní bakterie (Scardovi 1986).

3.1.3 Význam probiotik

Existuje několik důkazů podporujících potencionální klinickou aplikaci probiotik v prevenci a léčbě onemocnění gastrointestinálního, respiračního a urogenitálního traktu (Ranadheera et al. 2010). Jejich příznivé účinky zahrnují stimulaci imunitního systému, prevenci proti průjmu a zácpě, změny v konjugaci žlučových solí či protizánětlivé účinky (Rada 2010). Probiotika poskytují řadu možných zdravotních výhod a to především zachování dobré rovnováhy střevní mikrobioty, což pomáhá zvýšit schopnost těla odolávat invazi patogenních organismů a udržení zdravotní pohody hostitele (Ranadheera et al. 2010). Kromě toho přispívají k syntéze živin a zlepšují jejich biologickou dostupnost. Probiotika také zmírňují v některých případech příznaky atopického ekzému a alergií, AIDS a infekcí dýchacích a močových cest. Prospěšně působí při zánětlivých střevních onemocněních, jako prevence kolorektálního karcinomu a při rotavirových infekcích kojenců (Pandey et al. 2015). Udržování přirozené střevní mikrobioty, ochrana proti gastrointestinálním patogenům,

zlepšení imunitního systému, snížení laktóзовé intolerance, snížení hladiny cholesterolu a snížení krevního tlaku, antikarcinogenní aktivita, lepší využití živin a zlepšená výživová hodnota potravin, jsou některé ze zjištěných benefitů (Ranadheera et al. 2010). Význam mají rovněž při léčbě bakteriálních vaginóz. V důsledku vaginálního podávání probiotik se udržuje nízké pH a produkují se antimikrobiální látky, jako jsou kyseliny a peroxid vodíku. Recidiva bakteriálních vaginóz je proto u pacientek užívajících probiotické laktobacily méně častá (Lee 2014). Konzumace probiotik pozitivně potlačuje průjmy vzniklé z různých příčin. Při akutních průjmech u dětí, způsobených rotaviry, plní probiotika pomocnou funkci k potřebné dehydrataci (Pandey et al. 2015). Probiotika jsou proto široce používány v terapeutických aplikacích včetně prevence urogenitálních onemocnění, zmírnění zácpy, ochrana proti cestovním průjmům, prevence proti infantilním průjmům, snížení protizánětlivých průjmů, potlačení zánětu a onemocnění střev a proti syndromu dráždivého tračníku (Ranadheera et al. 2010). U průjmů způsobených narušením přirozeného mikrobiomu v důsledku užívání antibiotik působí probiotika preventivně, jako účinné se zdají být například *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *L. fermentum* (McFarland 2006; Lee 2014). V souvislosti se zlepšením průjmových stavů spojených s užíváním antibiotik u kojenců jako účinné *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* a *Streptococcus thermophilus* (Vieira et al. 2013). Pravděpodobnými mechanismy, kterými probiotika zabraňují průjmům nebo je zmírňují, je stimulace imunitního systému, konkurence o vazebná místa na střevním epitelu a produkce bakteriocinů (Pandey et al. 2015).

Probiotika mohou působit preventivně na vznik zhoubného bujení v tlustém střevě. Mezi jejich možné antikarcinogenní mechanismy patří zlepšení imunity hostitele, inaktivace karcinogenních sloučenin v lumenu střeva a antiproliferační účinek dosažený regulací apoptózy a diferenciací buněk. *L. reuteri* může například regulovat buněčnou proliferaci tím, že podporuje apoptózu aktivovaných imunitních buněk prostřednictvím inhibice ubiquitinace a zvýšením pro-apoptické aktivity (Uccello et al. 2012).

Probiotika také produkují antikarcinogenní metabolity (např. mastné kyseliny s krátkým řetězcem a konjugovanou kyselinu linolovou). Zvýšenou produkcí slizu se posílí střevní epitel, což působí jako ochranný účinek. Dalším možným mechanismem je inhibice bakterií produkujících škodlivé enzymy, které mohou v tlustém střevě přeměňovat prokarcinogeny na potenciální karcinogeny. Preventivní působení probiotik je dosaženo také jejich schopností upravit fyzikálně-chemické podmínky v tlustém střevě, například snížením

pH (Kahouli et al. 2013; dos Reis et al. 2017). Účinnost probiotik při prevenci kolorektálního karcinomu však závisí na konkrétním probiotickém kmenu (Chong 2014).

Probiotika rovněž pomáhají při zmírňování laktóзовé intolerance. Ta je způsobena nedostatečným trávením laktózy v důsledku nízké aktivity enzymu β -galaktosidasy. Příznaky laktóзовé intolerance zahrnují průjem, nadýmání, bolest břicha a plynatost. Kromě suplementace β -galaktosidasy v tabletách intoleranci zlepšuje podávání probiotik, jako například *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium breve* (Vonk et al. 2012).

Některá probiotika (například *L. bulgaricus*, *L. reuteri*, *Ba. coagulans*) mají hypocholesterolemický účinek. Jedním z mechanismů snížení cholesterolu v krevním séru může být dekonjugace žlučových kyselin, která je způsobená produkovanými enzymy probiotik. Dekonjugované žlučové kyseliny jsou snadno vstřebány střevem. Tím se sníží obsah cholesterolu v krvi, a probiotika tak působí preventivně na vznik některých kardiovaskulárních onemocnění (Pandey et al. 2015).

S příznivými účinky probiotik je spojena celá řada mechanismů, které zahrnují produkci inhibičních látek (například peroxidu vodíku, bakteriocinů, organických kyselin), blokování míst, na která adherují patogenní bakterie, kompetici s patogeny o živiny, rozklad toxinů, blokování receptorů pro toxiny a imunomodulační účinky (Pandey et al. 2015).

Účinky daného kmene závisí na mnoha okolnostech. Segers & Lebeer (2014) zmiňují, že určujícími faktory je například použitá dávka probiotika, doba jeho podání, délka léčby, věk a genetické predispozice pacienta, ale také třeba jeho endogenní mikrobiom.

Dále probiotika snižují hypercholesterolemii, ochraňují před rakovinou tlustého střeva a močového měchýře, prevence osteoporózy a prevence potravinové alergie a atopie. I když některé z těchto výhod by měly být důkladně prokázány, tak tyto potencionální výhody vyplývají z růstu a působení probiotik během produkce potravin, zatímco některé jsou výsledkem růstu a působení určitých druhů probiotik ve střevě (Ranadheera et al. 2010).

Výskyt nežádoucích účinků probiotik je vzácný, přičemž se nejčastěji projevují nadýmáním. Komplikace nastávají pouze ve výjimečných případech, zvláště u pacientů s oslabenou imunitou (Pandey et al. 2015). Mezi nejčastěji pozorované nežádoucí účinky sepse, fungémie a ischémie GIT (Fijan 2014).

3.1.4 Probiotika v jídle

Obsah tuku, koncentrace a typ bílkovin, cukrů a pH produktu, jsou některé faktory, které mají vliv na růst a přežití probiotik v potravinách. Jídlo, zejména mléčné výrobky jsou považovány za ideální prostředek pro dodávání probiotických bakterií do lidského trávicího traktu (Ranadheera et al. 2010).

V současnosti jsou probiotické bakterie přidávány do mléčných výrobků, jako jsou sýry, jogurty, zmrzliny a další. Dále je důležité vyvinout probiotické produkty, potraviny a nápoje, které jsou součástí každodenní normální stravy (Ranadheera et al. 2010).

Jogurty a fermentované mléčné výrobky jsou považovány za hlavní přenašeče probiotik do těla. Obvykle se jogurt vyrábí tak, že se fermentuje specifickými čistými kulturami bakterií mléčného kvašení (*S. thermophilus* a *L. bulgaricus*). Stále více jogurtů je připravováno s probiotickými mikroorganismy s proměnlivou životaschopností v průběhu skladovatelnosti. Různé druhy jogurtů ukázaly různé úrovně životaschopnosti bakterií po dobu skladovatelnosti. Zjistilo se že, v jogurtech s nerozmíchaným koagulátem se snižuje počet streptokoků o jednu logaritmickou fázi při 6°C po 60 dnech skladovatelnosti. Vyšší obsah mléčného tuku prokázal negativní účinky na probiotické kultury v jogurtech a to zejména *B. bifidum*. Bílé jogurty prokázaly významně vyšší trvanlivost při větším obsahu *L. acidophilus* v porovnání s trvanlivostí v jogurtech obsahujících kousky ovoce nebo bobulí. Později tato studie ukázala, že ovocná buničina pozitivně ovlivňuje pH jogurtu a životaschopnost probiotik (Ranadheera et al. 2010).

3.1.5 Interakce s prebiotiky

Pro příznivé ovlivnění mikrobioty trávicího traktu je možno zvolit v zásadě dva způsoby. První způsob je *per os* podávání živých kultur mikroorganismů. Většinou se používaly laktobacily, ale v nedávné době se čím dál tím více používají bifidobakterie, protože tyto bakterie patří mezi indigenní obyvatele střev. Druhá strategie pro zvýšení jejich počtů je zásobování ve střevě již přítomných bakterií látkami stimulujícími jejich růst. Tyto selektivní složky potravy byly v roce 1995 nazvány „prebiotiky“ (Rada & Marounek 2005). Gibson & Roberfroid (1995) uvádějí, že prebiotika jsou nestravitelné látky obsaženy v potravě, které

příznivě ovlivňují hostitele pomocí selektivní stimulace a/nebo aktivitu jedné, nebo omezené skupiny bakterií v tlustém střevě, což by mohlo zlepšit zdraví hostitele.

V podstatě jakákoliv nestrávená živina, která se dostane až do tlustého střeva je potenciálním prebiotikem. Většina látek označovaných jako prebiotika jsou sacharidy, od jednoduchých alkoholických cukrů, přes disacharidy a oligosacharidy až po polysacharidy (Rastal & Gibson 2002). Jsou zformulovány tři požadavky pro sacharidy, aby mohly být označeny jako prebiotika (Roberfroid 2007):

- 1) musí být rezistentní vůči žaludečním kyselinám a hydrolytickým enzymům v trávicím traktu,
- 2) musí být fermentovatelné střevními bakteriemi,
- 3) musí selektivně stimulovat růst a/nebo aktivitu zdravích prospěšných bakterií.

Některé oligosacharidy jsou díky jejich chemické struktuře rezistentní na zažívací enzymy a díky tomu putují nezměněny až do tlustého střeva, kde jsou dostupné pro sacharolytické bakterie (Shah 2007).

Oligosacharidy jsou přirozeně se vyskytující složkou v mateřském mléce (až 200 druhů) v relativně vysokých koncentracích (5-12 g/l). V kravském mléce je jejich množství až desetinásobně nižší. Oligosacharidy jsou nedílnou součástí různých druhů zeleniny a často jsou složkami glykoproteinů a glykolipidů, a proto se využívají i jako chemické markery. Některé přírodní oligosacharidy, jako jsou deriváty rafinosy, slouží jako zásobárna uhlovodíků v rostlinách, maltodextriny se vyskytují v zrnech obilovin, rýže nebo v rajčatech. Prebiotické fruktooligosacharidy se přirozeně vyskytují v cibuli, pórků, česneku, chřestu, banánech, hroznovém víně, zatímco prebiotické galaktooligosacharidy v obilovinách, sojových bobech a v dalších konzumovaných částech rostlin (Vidová et al. 2013).

Fruktooligosacharidy (FOS) patří mezi jednu z hlavních bifidogenních skupin oligosacharidů, a proto zauímají hlavní pozici v oblasti výzkumu prebiotik. Jedná se o polymery D-fruktosy spojené vazbou β -2 \rightarrow 1 a na konci s napojenou glukosou pomocí vazby α -1 \rightarrow 2. Molekuly, které mají stupeň polymerace vyšší než 20, bývají označovány jako inulin. FOS a inulin jsou přítomny v celé řadě potravin rostlinného původu jako je cibule, česnek, chřest, čekanka, rajčata a banány (Crittenden & Playne 1996).

3.2 Bakterie rodu *Bifidobacterium*

3.2.1 Charakteristika

Bifidobakterie jsou grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé anaerobní tyčinky. Některé druhy mohou být aerotolerantní, ale jen v přítomnosti oxidu uhličitého a prebiotik (Masco et al. 2003). Jejich kolonie jsou na polotuhých médiích hladké, vypuklé s hladkými okraji. Jsou smetanově bílé, lesklé, měkké konzistence. Jejich optimální růst je mezi 37 až 41°C, hraniční teploty jsou v rozmezí 25 až 28°C (minimum) a 43 až 45°C (maximum) Jejich optimální hodnota pH pro růst je 6,5-7,0; nerostou při pH 5,0 až 4,5 a 8,0 až 8,5 (Görner & Valík. 2004).

Bifidobakterie bývají někdy milně označovány za BMK, nicméně se liší enzymatickým aparátem. Bifidobakterie produkují enzym fruktoso-6-fosfát fosfoketolasa, který je pro ně typický. Ze sacharidů produkují kyselinu octovou a kyselinu mléčnou v poměru 3:2, které inhibují nežádoucí bakterie a stimulují intestinální peristaltiku (Görner & Valík 2004).

Růst bifidobakterií podporují tzv. bifidogenní faktory (probiotika): laktulóza (β -galaktosidofruktosa), N-acetyl-D-glukosamin obsahující sacharidy, transgalaktosylované oligosacharidy a další. Tyto látky spolu s obsahovými látkami a vlastnostmi mateřského mléka stimulují růst bifidobakterií v tlustém střevě (Görner & Valík 2004).

Nehledě od těchto známých tzv. bifidogenních faktorů mateřského mléka, mohou se do této skupiny řadit i novější diskutované FOS, neboli deriváty inulinu, rostlinného původu, ale také algináty a jiné. Zjednodušeně řečeno, tyto látky slouží jako selektivní živiny pro bifidobakterie a pravděpodobně i pro jiné bakterie mléčného kvašení. Nejznámějším a komerčně přístupným prebiotikem je v současnosti inulin, oligofruktosa, která se v tenkém střevě neabsorbuje a nehydrolyzuje, a proto není riziková ani z hlediska zvýšené glykémie. Po přechodu do tlustého střeva jsou fermentované jeho střevní mikrobiotou. Z potravinářsko-technologického hlediska je pozoruhodné, že tyto FOS zlepšují texturu i chuť produktu (Görner & Valík 2004).

3.2.2 Výskyt

Ačkoliv je známo, že většina bifidobakterií sídlí ve střevě, nebo v dutině ústní a lidské vagíně, tak byly izolovány také z jiných prostředí, jako jsou odpadní vody a fermentované mléko. Zástupci rodu *Bifidobacterium* dominují v původní mikrobiotě kojenců a v dospělém věku jsou třetí nejhojnější bakteriální skupina po rodech *Bacteroides* a *Eubacterium*. Na základě doporučených probiotických funkcí, kmeny *Bifidobacterium* se z určitého počtu přidávají jako živé kultury do mléčných výrobků, farmaceutických přípravků a krmiv pro zvířata (Masco et al. 2003).

Bifidobakterie se vyskytují především v trávicím traktu zvířat a lidí, kde koexistují s velkou variací bakterií, z nichž je většina obligátně anaerobní. Jednotliví zástupci mikrobioty se liší v různých částech trávicího traktu. Studie ohledně bifidobakterií ve stolici kojenců, ve stolici dospělých, v lidské vagíně a v zubních kazech poukazují na rozdíly v přizpůsobení druhů lidského původu v různých stanovištích. *B. breve* a *B. infantis* jsou druhy typické pro kojené kojence nebo kojence krmené kojeneckou výživou, zatímco *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. longum* a *B. pseudocatenulatum* jsou přítomny buď u novorozenců, nebo u dospělých lidí ve výkalech. *B. adolescentis* byla izolována jen u dospělých. Vaginální obyvatelé *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve* a *B. longum*, *B. denticolens*, *B. dentium* a *B. inopatum* jsou druhy které se často nachází v zubních kazech (Biavati et al. 2000).

Bifidobakterie se nacházejí ve velkém množství ve stolici kojenců krmených mateřským mlékem. V menším množství jsou i ve stolici kojenců krmených náhražkami mateřského mléka na bázi kravského mléka. Největší zastoupení ve stolici mají *Bifidobacterium bifidum* (10^{10} až 10^{11} kolonií tvořících jednotek KTJ), poté následuje *Lactobacillus acidophilus* (10^9 KTJ/g), *Escherichia coli* a ostatní koliformní bakterie (10^8 až 10^9 KTJ/g), enterokok 10^8 až 10^9 KTJ/g, mikrokoky (10^7 KTJ/g), *Proteus* subsp. max. 10^2 KTJ a všechny proteolytické bakterie 10^3 KTJ/g, kvasinky nebyly nalezené (Görner & Valík 2004).

Některé druhy jsou specifické pro určitý druh hostitele: *B. magnum* a *B. cuniculi* byly nalezeny jen ve vzorku fekálií králíka, *B. pullorum* a *B. gallinarum* jen v trávicím traktu slepic. *B. asteroides* je jediný druh nalezený v trávicím traktu včely medonosné (*Apis mellifera*), zatímco včela východní (*Apis cerana Fabricius*) a včela zlatá (*Apis dorsata Fabricius*) přechovávají *B. indicum*. Výkaly kojených telat a kojených dětí obsahují stejný druh bifidobakterií, dosud je to jediný případ, kdy druhy typické pro lidskou mikrobiotu byly

nalezený u zvířat, jak je uvedeno v tabulce níže. Dvanáct druhů *Bifidobacterium* bylo izolováno z odpadních vod a mezi nimi *B. minimum* a *B. subtile* nebyly nalezeny jinde (Biavati et al. 2000).

Tabulka 2. Stanoviště výskytu významných druhů rodu *Bifidobacterium* (Biavati et al. 2000)

Rod	Místo výskytu
<i>B. adolescentis</i>	Výkaly dospělých lidí; hovězí maso; odpadní vody, lidská vagína
<i>B. angulatum</i>	Odpadní vody; výkaly dospělých lidí
<i>B. animalis</i>	Výkaly krys, slepic, králíků, ovcí a morčat; odpadní vody
<i>B. asteroides</i>	Trávicí trakt včely medonosné
<i>B. bifidum</i>	Výkaly dospělých lidí; výkaly kojenců a kojená telata; lidská vagína
<i>B. boum</i>	Hovězí maso; výkaly prasat
<i>B. breve</i>	Výkaly kojenců a kojených telat; lidská vagína, odpadní vody
<i>B. catenulatum</i>	Výkaly kojenců a dospělých lidí; odpadní vody
<i>B. choerinum</i>	Výkaly prasat; odpadní vody
<i>B. coryneforme</i>	Trávicí trakt včely medonosné
<i>B. cuniculi</i>	Výkaly králíků
<i>B. denticolens</i>	Zubní kazy
<i>B. dentium</i>	Zubní kazy a dutina ústní; výkaly dospělého člověka; absces a appendix
<i>B. gallicum</i>	Lidské výkaly
<i>B. gallinarum</i>	Slepé střevo slepice
<i>B. indicum</i>	Trávicí trakt včely východní a včely zlaté
<i>B. infantis</i>	Výkaly kojenců a kojených telat
<i>B. inopinatum</i>	Zubní kazy

<i>B. lactis</i>	Fermentované mléko
<i>B. longum</i>	Výkaly dospělých lidí, kojenců a kojených telat; lidská vagína; odpadní vody
<i>B. magnum</i>	Výkaly králíků
<i>B. merycicum</i>	Hovězí maso
<i>B. minimum</i>	Odpadní vody
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Výkaly kojenců a kojených telat; odpadní vody
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Výkaly prasat, slepic, býků, telat, krys a morčat
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	Výkaly selat, kojených telat, krys, králíků a ovcí; odpadní vody; hovězí maso
<i>B. pullorum</i>	Výkaly slepic
<i>B. ruminantium</i>	Hovězí maso
<i>B. saeculare</i>	Výkaly králíků
<i>B. subtile</i>	Odpadní vody
<i>B. suis</i>	Výkaly selat
<i>B. thermacidophilum</i>	Anaerobní digesce
<i>B. thermophilum</i>	Výkaly prasat, slepic a kojených telat; hovězí maso; odpadní vody

3.3 Význam v GIT

Prozkoumání lidského mikrobiomu je považováno za jeden z deseti poznatků, který od počátku změnil vědu 21. století. Střevní mikrobiota obsahuje největší část tohoto lidského mikrobiomu. Střevní mikrobioty je z většiny složena ze zástupců kmene *Firmicutes* a *Bacteroides* a méně ze zástupců kmene *Actinobacteria*. Tyto kmeny jsou považovány za čím dál tím více hojnější (Qin et al. 2010).

Význam bifidobakterií v lidském těle, není zcela uspokojivě objasněn a rozdílné studie ukázaly poněkud protichůdné výsledky ve vztahu k četnosti těchto mikroorganismů v lidském

střevě. Je však známo, že bifidobakterie dominují v trávicím traktu novorozenců a kojenců, přičemž jejich počet se s věkem snižuje. Dále některé druhy, jako je *B. bifidum*, *B. breve* a *B. longum* subsp. *infantis* jsou typicky spojeny s časnými stádii života, zatímco ostatní jako je *B. adolescents* jsou více spojeny s dospělými. V současné době probíhá intenzivní výzkum, který demonstruje zdraví podporující vlastnosti pomocí těchto mikroorganismů a zde je zdokumentovaný důkaz, že několik bifidobakteriálních kmenů, patřících k různým druhům (*B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve* a *B. animalis*) vykazují specifické zdraví příznivé účinky. Několik klinických studií uvedlo, že léčba zahrnující bifidobakterie snížila výskyt průjmu souvisejícího s antibiotiky nebo jeho příznaky, a to buď preventivním účinkem probiotik, nebo zkrácení intervalů průjmu (Qin et al. 2010). V meta-analýze ze 74 studií a 84 klinických studií (10351 pacientů) v nichž efekt buď jednoho nebo více kmenů bifidobakterií (samostatných nebo v kombinaci s kmeny BMK), měly pozitivní účinky na pouchitidu, infekční průjem, syndrom dráždivého tračníku, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile* a antibiotika spojená s průjmy. Ostatní klinické studie rovněž poukazují na pozitivní účinek produktů obsahující bifidobakterie na atopický ekzém související s alergií na kravské mléko, vředovou kolitidu a nekrotizující enterokolitidu. Navíc jeden z pozitivních účinků probiotik na lidské zdraví měl výrobek obsahující bifidobakterie, který zmírnil příznaky dráždivého tračníku. Zvýšil pohodlí lidí, kteří trpí touto nemocí, včetně snížení nadýmání, bolesti břicha a snížení břišních potíží (Sánchez et al. 2013).

Vzhledem k funkčním vlastnostem bifidobakterií je jeden z cílů potravinářského průmyslu podávat jako doplňkovou kulturu do mléčných výrobků (Masco et al. 2005).

Z těchto důvodů se pro výživu lidí i kojenců průmyslně vyrábí kysané mléčné produkty s obsahem bifidobakterií jako i farmaceutické preparáty z bifidobakterií a látek stimulující jejich růst a metabolismus. U nás se vyrábí kysaný mléčný produkt s obsahem bifidobakterií, který měl obchodní název „Biokys“. Tento výrobek obsahuje dva zástupce střevní mikrobioty *B. bifidum* a *L. acidophilus* a také *Pediococcus acidilactici* (Görner & Valík 2004).

V současnosti se v mlékařském průmyslu vyrábí řada tzv. probiotických kysaných mlék jogurtového typu s uvedenými účinky na složení střevní mikrobioty. K tomuto účelu se používají bakterie původem z lidského střeva, např. *Bifidobacterium longum* BB536, vedle vlastních jogurtových bakterií v kysaném mléčném přípravku jogurtového typu „Probia“. Tzv. probiotické bakterie musí mít schopnost usídlit se v živočišném trávicím traktu člověka, musí mít proto schopnost překonat v žaludku pro ně nepříznivé prostředí (žaludeční šťávy), musí

snášet žlučové kyseliny a nízké povrchové napětí a musí odolávat pohyblivosti střev (peristaltika) (Görner & Valík 2004).

Musíme mít na paměti, že než se bifidobakterie dostane do střeva, musí přežít náročné podmínky, které jsou v GIT, aby alespoň částečně přetrvávaly v našem těle. Aby to bylo možné, musí být bifidobakterie podávány orálně, aby se vypořádaly s překážkami GIT, hlavně s kyselým pH, žaludečními enzymy, žlučí, pankreatickými a dalšími střevními enzymy v tenkém střevě. Tyto stresové faktory mohou ovlivnit metabolický stav bakterií a jejich přežití a tudíž i jejich funkčnost. Bifidobakterie musí mít specifické adaptační vlastnosti v prostředí, ve kterém žijí a jejich strategie hraje klíčovou roli v úspěšnosti působení bifidobakterií jako probiotik. Genetická výbava bifidobakterií naznačuje, že se tato skupina mikroorganismů naučila využívat zdroje energie, které lze nalézt ve střevě. Velká část genetických vlastností, které jsou zodpovědné za evoluční adaptaci na specifické místo, je považována za součást metabolických cest pro nestravitelné polysacharidy a oligosacharidy (Bottacini et al. 2010; Ventura et al. 2012).

Bifidobakterie obsahují specifický detoxikační systém proti škodlivým látkám, které se nalézají ve střevě. Další výhodou těchto bakterií je také, že jsou schopny přizpůsobit svůj enzymatický systém různým překážkám vyskytujících se v GIT. Přinášejí v některých případech specifické změny v metabolických cestách, které zlepšují jejich schopnost přežít a přetrvat ve střevě (Sánchez et al. 2013).

3.3.1 Identifikace

Identifikace druhů bifidobakterií je považována za velice obtížnou, pokud je založena na zjištění fenotypových vlastností bakterií. Klasická kultivační metoda je příliš zdoluhavá, náročná a nedostatečně specifická, proto jsou hlavně používány metody, které využívají molekulární techniku k identifikaci a složení jednotlivých rodů. (Requena et al. 2002).

K identifikaci se běžně používá metoda PCR za účasti specifických primerů (oligonukleotidů ohraničující cílovou sekvenci genu). Princip se skládá z replikace nukleových kyselin a úseky, které se mají amplifikovat, musí být ohraničeny primery. Primery mohou být specifické na úrovni rodu či konkrétního druhu. Jako genetický biomarker se obvykle používá sekvence genu pro 16S rRNA. Identifikace bifidobakterií pomocí těchto primerů je však

komplikovaná, protože nejméně osm druhů bifidobakterií se běžně vyskytuje v lidské střevní mikrobiotě a je těžké je rozlišit (Requena et al. 2002).

Další možná metoda, která by mohla být použita k identifikaci jednotlivých druhů bifidobakterií je hmotnostní spektrometrická metoda MALDI-TOF. Pro přesnou identifikaci se používají specifické kolonie mikroorganismu. Tato metoda je velmi rychlá a jednoduchá. Princip je takový, že vzorek (popř. kolonie) se na kovové destičce po přidavku vody za pokojové teploty vysuší a v hlubokém vakuu ozáří laserem. Vzorek absorbuje přijatou energii a rozkládá se na jednotlivé ionty. Ve vakuu se pohybují tyto ionty úměrnou rychlostí jejich hmotnosti a náboji. Doby letu iontů se přesně měří a pomocí výpočtu se konvertují na poměr molekulové hmotnosti a náboje. Získané informace ohledně hmotnostního spektra, jsou druhově specifické, pro jednotlivé mikroorganismy a představují molekulární identifikátor (Lay 2000).

3.4 Antibiotika a jejich užití

3.4.1 Úvod

Antibiotika jsou přírodní látky produkovány zejména mikroorganismy. Jejich výrazná a selektivní biologická aktivita proti mikroorganismům a jejich nízká toxicita vytvořila možnosti využití některých antibiotik pro eliminaci mikrobů *in vivo*. Vzhledem k těmto vlastnostem si antibiotika ihned našla praktická využití v boji s infekčními nemocemi, včetně sociálních a epidemiologických, z nichž nejdůležitější jsou tuberkulóza, syfilis, nemoci trávicího traktu a přenosné dětské nemoci. Antibiotika způsobila revoluci v lékařství a umožnila léčbu infekcí, které byly kdysi fatální a uskutečnily lékařské procedury, které byly nemyslitelné. Jejich dostupnost zajistila možnost vyléčit se. Tato možnost je dnes považována za samozřejmost, ale v budoucnu tato možnost bude rozptýlena, pokud vývoj rezistence překoná vývoj antibiotik, stejně jako v posledním desetiletí. Studie ohledně antibiotik je založená na mikrobiologických a biochemických metodách, získaných chemickou syntézou. K dnešnímu dni, je více než 800 antibiotik produkováných biosyntézou. Chemickou syntézou se podařilo vytvořit pouze málo antibiotických látek (Livermore 2004).

3.4.2 Historie

Antimikrobiální látky jsou pravděpodobně jednou z nejúspěšnějších forem léčení v dějinách medicíny. Není nutné říkat, kolik životů zachránily a jak významně přispěly v potírání infekčních onemocnění, které byly hlavní příčinou lidské morbidity a úmrtnosti většiny lidské existence. Přesvědčení, že užívání antibiotik patří jen do moderní „éry antibiotik“, je mylné, protože výzkumy ukázaly stopy tetracyklinu v lidských kostních pozůstatcích ze starověké Súdánské Nubie z roku 350-550 n. l. (Aminov 2010). Distribuce tetracyklinu v kostech starověkých lidí je vysvětlitelná pouze po požití potravin, které obsahují tuto látku. Dalším příkladem starobylého působení antibiotik je histologická studie vzorků odebraných z lidských pozůstatků z pozdně Římského období z oázy Dakhleh v Egyptě. Tyto vzorky vykazovaly slabou přítomnost fluorochromu společně s tetracyklínem ve stravě v té době. Předpokládaný příjem tetracyklinu v těchto populacích mohl mít ochranný účinek, protože míra infekčních nemocí zdokumentovaných ve starověké Súdánské Nubii byla nízká (Cook et al. 1989).

Tetracyklin je jedinečný mezi antibiotiky tím, že je to silný chelát začleňuje se do minerální části hydroxyapatitu v kostech, stejně jako v zubní sklovině a tak poskytuje trvalé markery metabolicky aktivních oblastí během odhalování tetracyklinu. Odhalování jiných antibiotik ve starověkých populacích je o mnoho obtížnější a jen přežívající zvyky a anekdotické důkazy mohou na tyto výskyty poukazovat. Například anekdoty o antibiotických vlastnostech červené půdy v Jordánsku, které byly historicky používány pro léčbu kožních infekčních nemocí, vedly k objevení řad bakterií, které produkují antibiotika, a souběžně produkci antibiotik v těchto půdách. Aktinomycety izolované z této půdy produkují aktinomycin C2 a aktinomycin C3, což jsou polypeptidová antibiotika, která se vážou na DNA a jako taková mají velmi malou šanci, aby byla zachována (Aminov 2010).

Další možnost vystavení se antimikrobiálním látkám v období před „érou antibiotik“, mohla být prostřednictvím léků používaných po tisíciletí v tradiční/alternativní čínské medicíně. Nejznámějším příkladem je objev silného antimalárního léku Qinghaosu (artemisinin), který byl extrahován v 70. letech z rostlin *Artemisia* (pelyněk), používaných čínskými lékaři po tisíce let jako lék na mnoho nemocí (Aminov 2010).

Obvykle pojíme počátek moderní „éry antibiotik“ se jmény jako jsou Phaul Ehrlich a Alexander Fleming. Ehrlichova myšlenka „magické střely“, která se selektivně zaměřuje pouze na mikroorganismy způsobující onemocnění, nikoliv na hostitele, byla založena na pozorování, že anilin a jiná syntetická barviva by mohla potlačovat specifické mikroorganismy, ale ne jiné. Ehrlich argumentoval, že chemické sloučeniny by mohly být syntetizovány a „mohly vyvíjet své plné působení výlučně na parazity obsažené v organismu“. Tato myšlenka ho vedla k tomu, aby v roce 1904 zahájil rozsáhlý a systematický screeningový program, aby našel lék proti syfilisu, což bylo v té době časté a neléčitelné onemocnění (Aminov 2010). Tato sexuálně přenosná nemoc, způsobená spirochétou *Treponema pallidum*, byla obvykle léčena anorganickými solemi rtuti, ale léčba měla závažné vedlejší účinky a malou účinnost. Ve své laboratoři spolu s chemikem Alfredem Bertheimem a bakteriologem Sahachiro Hatou syntetizovali stovky organoarsenitých derivátů vysoce toxického léčiva Atoxyl a testovali je na králících infikovaných syfilis. V roce 1909 narazili na šestou sloučeninu testovanou v 600. sérii, čili 606, která vyléčila králíky infikované syfilis a ukázala významný příslib pro léčbu pacientů s tímto pohlavním onemocněním. Navzdory zdlouhavému injekčnímu postupu a vedlejším účinkům tohoto léku, kterou prodávala společnost Hoechst pod názvem Salvarsan, tento lék sklidil velký úspěch společně s rozpustnějším a méně toxickým Neosalvarsanem a užívaly si status nejvíce předepisovaného léku až do jeho nahrazení penicilinem v roce 1940. Je překvapivé, že způsob působení tohoto sto let starého léku je stále neznámý a spekulace ohledně chemické struktury byla vyřešena teprve nedávno (Lloyd et al. 2005).

Systematický screeningový přístup, který zavedl Paul Ehrlich, se stal základním kamenem ve strategii výzkumu léků ve farmaceutickém průmyslu a vyústil v identifikaci tisíce léků zavedených do klinické praxe, samozřejmě včetně řady antimikrobiálních léků. V dřívější době tento výzkum vedl k objevení sulfa léčiv, konkrétně sulfonamidochrysodinu. Bayer Josef Klarer a Fritz Mietzsch syntetizovali tuto sloučeninu a Gerhard Domagk jí testoval na její antimikrobiální aktivitu v řadě nemocí (Aminov 2010). Prontosil se však objevil jako předchůdce aktivního léku a jeho aktivní část, sulfanilamid nebyl patentován, neboť již několik let byl používán v barvířském průmyslu. Protože sulfanilamid nebyl patentován, tak byl levně a hojně vyráběn a z tohoto důvodu jeho sulfanilamidová část byla snadno modifikována. Mnoho společností zahájilo jeho masovou výrobu. Odkaz tohoto nejstaršího antibiotika na trhu se odráží v jednom z nejrozšířenějších případů rezistence vůči lékům:

rezistence na sulfa léčiva (Enne et al. 2004). Navzdory tomu je mnoho kontinuálně modifikovaných derivátů této nejstarší třídy syntetických antibiotik stále používanou možností terapie a odolnost proti sulfanilamidu je jedním z nejlepších příkladů pro boj a možnosti ve zbrojení proti mikrobům. Dvě třídy syntetických antibiotik úspěšných v klinickém použití jsou chinoliny, jako je ciprofloxacin, a oxazolidinony, jako je linezoild (Enne et al. 2004).

Pravděpodobně mnozí z nás jsou obeznámeni s poněkud šťastnou událostí, která se stala 3. září 1928 a to, že Fleming objevil penicilin. Ačkoli antibakteriální vlastnosti plísní byly známy už dávno a vědci před Flemingem dospěli k podobným poznatkům ohledně antimikrobiální aktivity plísně *Penicillium*. Byla to jeho neskutečná vytrvalost a snaha potvrdit jeho myšlenku, která přinesla výsledky. Dvanáct let po svém objevu se A. Fleming snažil každému chemikovi, který chtěl pomoci s přetrvávajícím problémem, dodat kmen *Penicillium*. V roce 1940 opustil tuto myšlenku, ale naštěstí ve stejném roce Oxfordský tým pod vedením Howara Floreyho a Ernesta Chaina publikoval článek popisující extrakci dostatečného množství penicilinu pro klinické testování (Chain et al. 2005). Jejich protokol nakonec vedl k výrobě a distribuci penicilinu v roce 1945. Flemingova screeningová metoda používající inhibiční zóny s patogenními bakteriemi na agaru vyžadovala mnohem méně zdrojů, než jakékoliv testování na zvířatech a tak se tato metoda stala široce používaná ohledně mikroorganismů produkujících antibiotika v akademické a průmyslové oblasti. Fleming byl také mezi prvními, kteří varovali před rezistencí na penicilin, pokud je používán příliš málo nebo příliš krátkou dobu během léčby (Aminov 2010).

Ne moc známá je však skutečnost, že první nemocniční užívání léku, který by se dnes mohl považovat za antibiotikum, je tzv. Pyocyanáza, kterou připravil Emmerich a Löw z *Pseudomonas aeruginosa* (dříve *Bacillus pycyanus*). Důležité je, že Emmerich a Löw si všimli, že bakterie i připravené extrakty byly účinné proti řadě patogenních bakterií a pokusili se tak použít extrakt pro léčbu různých onemocnění. Vzhledem k tomu, že výsledky této léčby nebyly stálé a samotný přípravek by byl pro lidi zcela toxický, tak léčba byla nakonec ukončena. Další výzkumy potvrdily, že *Pseudomonas aeruginosa* skutečně tvoří antibiotika (Dubern & Diggle 2008).

Objev těchto prvních tří antimikrobiálních látek, Salvarsan, Prontosil a penicilin, byl ukázkový příklad, neboť tyto studie vytvořily paradigma pro budoucí výzkum léků. Cesty, které následovali vědci, vyústily v objevení řad nových antibiotik, z nichž některé si našly

využití i na nemocničním lůžku. Období mezi padesátými a sedmdesátými lety byl zlatou dobou v objevování nových forem antibiotik, od té doby nebyly objeveny žádné nové třídy. Proto s poklesem míry objevů je běžným přístupem pro vývoj nových léků, proti vznikající a znovu se objevující odolnosti patogenů vůči antibiotikům, změna stávajících antibiotik (Aminov 2010).

3.4.3 Citlivost na antibiotika

V mikrobiologické laboratoři se identifikované infekční mikroorganismy obvykle testují na stupeň rezistence vůči různým antibiotickým látkám, aby se zabránilo podávání neúčinných léčiv. Lékař je zpravidla informován o výsledcích testů se zprávou, ve které je aktivita jednotlivých léčiv proti izolovanému mikroorganismu rozdělena do tří termínů a to „citlivý“, „mírně citlivý“ a „rezistentní“. Tato informace by mohla být použita k upravení léčby pro každého pacienta, zatímco souhrnně mohou být údaje tohoto typu použity k vytvoření obrazu stupně rezistence vůči každému léku v celé populaci. Za druhé je to důležitým kritériem při výběru antibiotik pro počáteční („empirickou“) léčbu infekčních onemocnění (Rodloff et al. 2008).

Výsledek testování minimální inhibiční koncentrace (MIC) u konkrétního antibiotika používaného proti určitému infekčnímu mikroorganismu je vyjádřen jako koncentrace mg/l. Tato část informace, společně s farmakokinetickými parametry látky, mohou být použity k posouzení předpokládaného stupně terapeutické účinnosti léčiva. V individuálních případech lze vzít v úvahu další speciální charakteristiky pacienta. To však vyžaduje znalost příslušné farmakokinetiky. Pro účely zjednodušení bylo stanoveno standardizované schéma hodnocení, v němž se míra účinnosti léku hodnotí jako „citlivý“, „mírně citlivý“ a „rezistentní“ v závislosti na výsledcích MIC. Podle nového standardu ISO 20776-1, který je platný po celém světě, jsou tyto pojmy definovány takto:

Citlivé: Bakteriální kmen je považován za citlivý k danému antibiotiku, když je inhibován *in vitro* koncentrací tohoto léčiva, která je spojena s vysokou úspěšností terapeutického úspěchu (průměr inhibiční zóny < 12 mm).

Částečně citlivé: Citlivost bakteriálního kmene na dané antibiotikum je považována za přechodnou, když je inhibována *in vitro* koncentrací toho léčiva, která je spojena s nejistým terapeutickým účinkem (průměr inhibiční zóny 12-16 mm).

Rezistentní: Bakteriální kmen je považován za rezistentní vůči danému antibiotiku, když je inhibován *in vitro* koncentrací tohoto léčiva, která je spojena s vysokou pravděpodobností selhání léčby (průměr inhibiční zóny > 16 mm) (Rodloff et al. 2008).

3.4.4 Dělení antibiotik dle mechanismu účinku

Jedním z výsledků širokého využití antibiotik byl vznik antibiotik rezistentních patogenů, což je fenomén, který představuje hrozbu pro úspěšnou léčbu infekčních onemocnění. Pro pochopení mechanismů rezistence, je důležité připomenout, že antibiotika jsou klasifikována na základě mechanismu jejich působení (Soares et al. 2012).

Inhibitory syntézy buněčné stěny jsou jako antibakteriální léčiva vhodná, protože lidské buňky buněčnou stěnu nemají. Tato farmaka působí na rostoucí a množící se mikroby baktericidně. Tímto způsobem účinkují β -laktamová antibiotika peniciliny a cefalosporiny a dále bacitracin a vankomycin (Lüllmann et al. 2012).

Antibakteriální látky mohou inhibovat syntézu kyseliny tetrahydrolistové. Kyselina tetrahydrolistová (THL) (tetrahydrofolová) je jeden z koenzymů při syntéze purinu a tymidinu. Tyto látky jsou složky DNA a RNA a jsou nutné pro růst a dělení buněk. Nedostatek kyseliny tetrahydrolistové vede k inhibici buněčného dělení a množení. THL se tvoří z kyseliny dihydrolistové (DHL) katalickým působením enzymu dihydrofolátreduktázy. DHL se v lidských buňkách tvoří z kyseliny listové (folové), která má pro lidský organizmus charakter vitamínu, nemohl by se u člověka syntetizovat a musí se přijímat zvenčí. Většina bakterií kyselinu listovou zvenčí přijímat nemusí; samy totiž dovedou kyselinu listovou, přesněji řečeno kyselinu dihydrolistovou, syntetizovat z prekurzorů. Cílený rušivý zásah do bakteriální syntézy THL umožňuje podání sulfonamidů a trimetoprimu (Lüllmann et al. 2012).

Další možností inhibice pomocí antibiotik je inhibice funkce DNA. Kyselina deoxyribonukleová (DNA) funguje jako matrice pro syntézu nukleových kyselin. Ribonukleové kyseliny (RNA) zahajují proces syntézy bílkovin a umožňují tak buněčný růst. Syntéza DNA de novo je nutný předpoklad buněčného dělení. Látky inhibující transkripci genetické informace

z matrice DNA poškozují regulační centrum buněčného metabolismu. Látky, jako je chinolin, metronidazol a rifampicin, jsou vhodné jako antibakteriální léčiva, protože nepoškozují lidské buňky (Lüllmann et al. 2012).

Další účinek antibiotik inhibuje proteosyntézu. Proteosyntéza znamená přenos (translaci) genetické informace, předtím převedené na mRNA, do peptidického řetězce. Sestavování aminokyselin (AK) probíhá na ribozomu. Rozdílné molekuly transferových RNA (tRNA), z nichž každá váže určitou AK, přinášejí aminokyseliny k mRNA. Určitá tRNA se hodí k jedné určité kódující jednotce mRNA (kodonu, který sestává ze tří bází). Jednotlivé dílčí pochody se dají inhibovat antibiotiky různých skupin. Zástupci těchto látek, které uvádíme, pocházejí primárně z bakterií druhu *Streptomyces*, některé aminoglykosidy také z druhů *Micromonospora*. Mezi jednotlivé antibakteriální látky, které inhibují proteosyntézu, patří tetracyklin, aminoglykosid, chloramfenikol a makrolid (Lüllmann et al. 2012).

3.4.5 Rozdělení antibiotik dle chemické struktury

Chemická struktura je jedinečnou vlastností, která jednoznačně rozlišuje jedno antibiotikum od druhého. Právě chemická struktura určuje všechny fyzikální, chemické, mikrobiologické, farmakologické a nakonec i klinické vlastnosti. Vztah mezi strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi je zřejmý, ale ne méně než mezi strukturou a biosyntézou. Je také možné, že je spojení mezi původem a strukturou (Bérdy 2012).

Vztah mezi strukturou a různými biologickými aktivitami je zřejmý. Antibiotika podobné struktury většinou vykazují podobnou mikrobiologickou aktivitu. Například makrolidy jsou účinné proti grampozitivním bakteriím, gramnegativním kokům a mykoplazmatům. Jsou mírně toxické a mají podobné vedlejší účinky. Polyenové makrolidy vykazují široké spektrum účinnosti proti fungicidům a jsou obecně neúčinné proti bakteriím. Tetracykliny mají široké antibakteriální spektrum; antracyklinové glykosidy jsou aktivní pouze proti grampozitivním bakteriím, ale obecně mají cytotoxické a protinádorové vlastnosti. Specifická biologická aktivita často spočívá v některých menších částech dané struktury. V případě ve vodě rozpustných, zásaditých, aminoglykosidových nebo polypeptidových antibiotik se stoupajícím počtem aminoskupin, mění antibakteriální spektrum ve směru gramnegativních bakterií. Mírné změny ve struktuře jsou často následovány dramatickými

změnami v celkové účinnosti. Metodika a rozsáhlá systematizace podle chemické struktury by mohla pomoci při porozumění několika hlubším vzájemným vztahům v oblasti molekulární biologie a chemoterapie (Bérdy 2012).

Brzká systematizace podle struktury měla být jen dočasná, kvůli nedostatku znalostí ohledně chemické struktury antibiotik. V současnosti je známo více než 4000 antibiotik pocházející z čistě přírodních zdrojů. Dokonce počet s mikrobiálním původem dosahuje více než 3200 látek. Vynecháním blízkých homologů a identických analogů, je stále jejich počet větší než 2500 (Bérdy 2012).

Jednotlivé skupiny si uvedeme podle seznamu, který uvedl Hejzlar (1995):

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Peniciliny | 9. Glykopeptidy – lipopeptidy |
| 2. Cefalosporiny (parenterální) | 10. Ansamyciny |
| a. 1. Generace | 11. Chinolinová antibiotika |
| b. 2. Generace | 12. Makrolidy |
| c. 3. Generace | 13. Linkosamidy |
| d. 4. Generace | 14. Chloramfenikol |
| 3. Cefalosporiny (perorální) | 15. Tetracykliny |
| 4. Monolaktamy | 16. Polyenová antibiotika |
| 5. Karbapenemy | 17. Imidazoly |
| 6. Aminoglykosidy | 18. Sulfoamidy (Lüllmann et al. 2012) |
| 7. Aminocyklitoly | |
| 8. Peptidy (peptolidy) | |

3.4.6 Negativa

3.4.6.1 Dopady na mikrobiom

Antibiotika mohou mít dopad na lidský mikrobiom tím, že buď redukují přirozenou mikrobiotu TT, nebo bakterie v GIT mohou sloužit jako rezervoár genů rezistence. Potlačení a eliminace mikrobiálních patogenů antibiotiky představuje v lékařském managementu časově prověřený postup. Nicméně nedávné studie zdůraznily velké změny v mikrobiálních populacích, které vyplývají z použití antimikrobiálních látek. Molekulární profilování

mikroorganismů ve výkalech kojence po léčbě antibiotiky, ukázalo drastické snížení celkové hustoty bakterií a jejich změn v populačním složení (Palmer et al. 2007). Tyto změny lidské mikrobioty jsou obvykle dočasné (vzácně trvají až 2 měsíce) (De La Cochetière et al. 2008). Nová generace DNA pyrosekvenční technologie byla nedávno použita ke studiu fluorochinolonem vyvolaných poruch ve složení lidského mikrobiomu (Huse et al. 2008). Ačkoli celková střevní mikrobiální populace zůstala odolná při léčbě ciprofloxacinem, počty některých mikrobiálních taxonů zůstaly sníženy i 6 měsíců po ukončení antibiotické léčby (Dethlefsen et al. 2008). Díky zvířecím modelům se zjišťují dopady antibiotik na mikrobiální populace. Studie za pomoci mikročipů u mláďat potkanů ukázaly například změny vyvolané ampicilinem v mikrobiální populaci, které zahrnovaly delecí rodu *Lactobacillus*; tyto změny byly spojeny s významnými změnami téměř jedné třetiny vývojově regulovaných genů (Schumann et al. 2005). Dále nedávné metabolomické studie ukázaly, že delece grampozitivních bakterií vankomycinem narušuje fermentaci sacharidů u myši; tyto změny vedly ke zvýšení množství nefermentovaných oligosacharidů ve výkalech a snížené koncentrace mastných kyselin s krátkým řetězcem, včetně acetátu, n-butyrátu, propionátu a laktátu (Yap et al. 2008). Významné změny ve složení gastrointestinální mikrobiální populace mohou vést k významným funkčním rozdílům v hostitelském metagenomu (Preidis & Versalovic 2009).

Změny ve složení GIT mikrobiomu vyvolané antibiotiky zvyšují riziko onemocnění zvýšením citlivosti na GIT infekce. S antibiotiky spojený průjem a kolitida mohou být způsobeny klostridiálními patogeny, jako je *Clostridium difficile* nebo *Clostridium perfringens* (Bartlett 2002). Nedávná studie u myši ukázala zvýšenou citlivost zvířat na invazivní salmonelózu po narušení mikrobioty streptomycinem a vankomycinem (Sekirov et al. 2008). Kromě toho antibiotická léčba u dětí infikovaných kmenem *E. coli* O157:H7 by mohla zvýšit riziko hemolyticko-uremického syndromu a prodlužuje vyloučení stolice. Neúmyslné změny lidského mikrobiomu antibiotiky mohou tedy ovlivnit citlivost na patogeny (Preidis & Versalovic 2009).

Není divu, že antimikrobiální léčba *Helicobacter pylori* vyvolává výrazné poruchy ve střevní mikrobiotě. Kultury ze stolice od pacientů s *H. pylori* před, během a po trojnásobné terapii ukázala drastické změny, včetně celkového prořídnutí diverzity rodů bakterií, se specifickou redukcí rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* z jejich původního množství (Buhling et al. 2001). Samostatná studie ukázala přerůstání potencionálně patogenních

mikroorganismů, včetně *Enterobacteriaceae* a kvasinek rezistentních na léky (Adamsson et al. 1999). Probiotika, pokud se užívají v kombinaci se standardní antibiotickou terapií proti infekci *H. pylori*, zvýšila eradikaci patogenů a snížení vedlejších účinků GIT při konvenční terapii, jak bylo potvrzeno meta-analýzou čtrnácti náhodných studií (Tong et al. 2006). Důkazy naznačují, že probiotické bakterie potlačují gastrointestinální patogeny a posilují účinnost antibiotik produkcí antibakteriálních faktorů, včetně bakteriocinů a malých organických molekul (Cotter et al. 2005; Spinler et al. 2008). Malé molekuly vylučované probiotiky, jako je *Lactobacillus acidophilus* a některé kmeny *Lactobacillus reuteri*, snížily úroveň exprese enterohemoragických virulentních genů *E. coli*. Navíc bakteriocin produkovaný *Lactobacillus salivarius* byl zodpovědný za prevenci invazivních infekcí u myši způsobených bakterií *Listeria monocytogenes*. Je zřejmé, že „endogenní“ antimikrobiální látky produkované domácími bakteriemi mohou přispět k prospěšným účinkům probiotik (Preidis & Versalovic 2009).

3.4.6.2 Zásobník mikrobiologické rezistence mikrobiomu

Narušení rovnováhy mezi jednotlivými druhy střevních bakterií (dysbiosis), kterou způsobila antibiotika, nese další nevýhodu v obohacení mikrobioty o rezistentní organismy. Lidská střevní mikrobiota byla stanovena jako významný rezervoár antibiotické rezistence (Francino 2016). Rozsah problému by mohl být dán skutečností, že analýza metagenomiky 252 fekálních vzorků z různých zemí identifikovala gen zodpovědný za antibiotickou rezistenci pro 50 z 68 tříd a podtříd antibiotik, které byly podrobeny screeningu (Forslund et al. 2013). Tato studie také ukázala, že hojnost genu zodpovědného za antibiotickou rezistenci (ARG) je nejvyšší na antibiotika, která byla na trhu delší dobu a u těch, které byly schváleny pro použití na zvířatech, jako je tetracyklin, bacitracin a cefalosporin. Také evropské vzorky ukázaly zvýšení rezistence vůči vankomycinu ve srovnání se vzorky z USA, kde nebyl nikdy použit analog vankomycinu, který se používá k léčbě zvířat v Evropě. Kromě toho byl výskyt genů rezistentních na antibiotika ve vzorcích z jižní Evropy vyšší než v zemích severní Evropy a koreloval s opatřeními celkového užívání ambulantních antibiotik v různých zemích. Tato řada pozorování potvrzuje názor, že vyšší vystavení antibiotikům zvyšuje pravděpodobnost rezistence střevní mikrobioty (Francino 2016).

Znepokojivě, nejen mikrobiota dospělých vykazuje geny rezistentních na antibiotika, se i u dětí a kojenců se tyto geny objevují. Nedávné analýzy ukázaly, že ve skutečnosti mohou být četné ARG již identifikované ve výkalech jednotýdenních dětí a dokonce i v mekonium, první výkaly dítěte, které jsou tvořeny materiálem akumulovaným v GIT během života plodu (Gosalbes et al. 2016). Pozoruhodné je, že ARG nejsou detekovány pouze u dospělých dětí, které podstoupily antibiotickou léčbu, ale také u kojenců a v izolovaných lidských populacích, kterým se nikdy nepodávaly antibiotika (Francino 2016). To ukazuje, že ARG mohou být stabilně udržovány v lidském střevním mikrobiomu v nepřítomnosti přímé antibiotické selekce a je v souladu se skutečností, že ARG mohou být detekovány ve velkém rozsahu přírodních prostředí, včetně těch, u nichž se očekává, že budou mít malou expozici antibiotikům, které se používají na lidech (Field & Hershberg 2015).

V případě kojenců by mohla být rezistence vertikálně zděděna, protože mikroby z mateřských střev mohou být přenášeny na potomky, toto je podloženo řadou důkazů, které naznačují, že takové přenesení skutečně začíná před narozením. Několik studií prokázalo sdílenou zásobu ARG mezi vzorky mateřské a kojenecké stolice a v některých případech přítomnost sdílených ARG v mekonium, kolostru nebo mateřském mléce (Francino 2016). Tyto studie však také zjistily ARG u kojenců, které nebyly přítomny u matek a byly s největší pravděpodobností získány z jiných zdrojů. Co se týče vzdálených lidských populací, tak přítomnost ARG v jejich mikrobiotách naznačuje dvě možnosti. Buď jejich ARG jsou dědičné a byly přítomny před nekontrolovaným rozšířením rezistence v důsledku použití antibiotik u lidí, pravděpodobně kvůli selektivním tlakům vyvolaným přirozeně se vyskytujícími antibiotiky, nebo byly nedávno získány díky bakteriálním kmenům rezistentních na antibiotika z jiných oblastí, nebo horizontálním přenosem genů z takových kmenů do jejich místních bakteriálních populací. Fylogenetické a populační analýzy by měly být schopny rozlišit tyto dvě alternativy (Francino 2016).

Důležité je, že lidská střeva, vzhledem ke svému obrovskému množství bakteriálních buněk a druhovému bohatství, jsou pravděpodobně náchylná zejména k horizontální genové výměně a přispívá k šíření a opětovnému třídění ARG mezi bakteriálními taxony. Přenos genů zodpovědných za antibiotickou rezistenci mezi izoláty rodu *Bacteroides* ze střevní mikroflóry byl zdokumentován, stejně jako mezi bakteriemi *Bacteroides* a gram-pozitivními bakteriemi (Shoemaker et al. 2001). Identické ARG sekvence byly ve skutečnosti identifikovány u bakterií koexistujících ve střevě jediného jedince, včetně různých kmenů *E. coli* (Karami et al.

2007), stejně jako u vzdálených organismů (de Vries et al. 2011). Experimentální práce potvrdila, že transpozony nesoucí ARG mohou být přeneseny mezi bakteriálními druhy ve střevech potkanů a myší (Francino 2016). Kromě toho by mohl být přenos konjugačních transpozonů stimulován nízkými koncentracemi antibiotik (Whittle et al. 2002). Největší znepokojení však přináší ARG přítomné ve střevní mikrobiotě, které mohou být přeneseny od a k příchozím patogenním druhům. Jak ukázala skutečnost, že mnoho z genů zodpovědných za antibiotickou rezistenci identifikovaných v lidských střevních izolátech byl totožných na nukleotidové úrovni ke genům z lidského patogenního izolátu. Proto je možné uvažovat o lidském střevě, nejen jako o místě hromadění ARG, ale také o prostředí, kde se tyto geny mohou mimo druhově šířit (Francino 2016).

3.4.6.3 Rezistence

Rezistenci bakterií k antibiotikům je možné definovat jako schopnost bakteriální populace přežít účinek definované koncentrace antibiotika. Existují v podstatě dva základní typy bakteriální rezistence, a to rezistence přirozená (primární) a rezistence získaná (sekundární), která je z klinického hlediska mnohem závažnější (Kolář et al. 2002).

Jedno z nejdůležitějších selekčních kritérií bakteriálních kmenů určených pro použití v potravinářském průmyslu je jejich bezpečnost. V Evropě, podle přístupu ke kvalifikovanému předpokladu bezpečnosti (QPS), zaveden Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (The EFSA Journal 2008), by charakter jakékoliv antibiotické rezistence přítomné v mikroorganismu měl být nejdříve schválen statusem QPS. Proto rezistence vůči antibiotikům jako taková není bezpečnostním problémem; stává se tak pouze tehdy, když je riziko přenosu rezistence (Gueimonde et al. 2013).

Bifidobakterie patří mezi druhy, které byly zahrnuty do QPS seznamu dle EFSA (The EFSA Journal 2012) mají vynikající výsledky ohledně bezpečnosti a škodlivé účinky vzniklé v důsledku jejich požití jsou velmi vzácné (Gouriet et al. 2012). Úplné posouzení bezpečnosti nepochybně začíná řádnou identifikací kmene a *in vitro* hodnocení potencionálních rizik. V tomto ohledu, přítomnost antibiotické rezistence a jejich potencionálnímu přenosu, si zaslouží speciální pozornost. V současné době je obecně přijímána možnost, že přenos souvisí s genetickým základem mechanismu rezistence, tj. zda je rezistence přirozená, získaná

v důsledku chromozomální mutace nebo získaná horizontálním přenosem genů (Gueimonde et al. 2013).

Většina probiotik je běžným obyvatelům lidské střevní mikrobioty a jsou ve velkém množství používány ve funkčních potravinách a přítomnost antibiotické rezistence a jejich determinantů v jejich genomu musí být systematicky vyšetřována. Pro představu, bifidobakteriální populace v lidském střevě by mohla být vysoká až 10^{11} bakterií/g a to i v případě, že přítomné rezistentní geny nejsou hrozbou, pokud jsou přítomny v bifidobakteriálních buňkách vzhledem k jejich malé infekčnosti, mohou představovat rezervoár, ze kterého mohou být geny přenášeny na patogenní bakterie. Je tedy velký zájem prozkoumat zda tyto determinanty mohou být přeneseny do jídla nebo do střevní mikrobioty. (Gueimonde et al. 2013).

Závažné infekce způsobené bakteriemi, které se staly rezistentními vůči běžně používaným antibiotikům, se staly hlavním globálním problémem 21. století. Nejenže jsou závažnější a vyžadují delší a složitější léčbu, ale také dražší diagnostiku. Zpočátku byla antibiotická rezistence problémem nemocničního prostředí, spojených se zvýšenou nemocniční infekcí u kriticky nemocných a imunosupresivních pacientů, ale teď je rozšířená do komunity způsobující těžké infekce, které se těžko diagnostikují a léčí. Molekulární mechanismy, kterými se bakterie stávají rezistentními vůči antibiotikům, jsou různé a složité. Bakterie vyvinuly rezistenci na všechny objevené třídy antibiotik. Nejčastější způsob rezistence je získání a předání horizontálně pomocí konjugace plazmidu. V nedávné době nové mechanismy rezistence vedly k současnému rozvoji rezistence na několik tříd antibiotik, které vytvářejí velmi nebezpečné bakteriální kmeny, které jsou rezistentní na více léků. Neselektivní a nevhodné užívání antibiotik v ambulancích, u hospitalizovaných pacientů a v potravinářském průmyslu jsou faktory, které vedou k rezistencím na antibiotika. V posledních letech se počet nových antibiotik licencovaných pro lidské použití v různých částech světa zmenšil (Alanis 2005).

Známé mechanismy rezistence vůči antibiotikům, jako např. efluxní pumpy, modifikující enzymy a cílové mutace, se nezdají, že by byly odpovědné za ochranu bakterií v biofilmu. I citlivé bakterie, které nemají známý genetický základ pro rezistenci, mohou mít hluboce sníženou citlivost, když tvoří biofilm. Předběžné důkazy naznačují, že konvenční mechanismy antibiotické rezistence nejsou dostačující k vysvětlení většiny případů rezistentních na antibiotika (Stewart & William Costerton 2001).

Mechanismy rezistence na antibiotika v bakteriálních biofilmech začínají být objasňovány a jsou zde 3 hypotézy (Mah & O'Toole 2001). První hypotéza je možnost pomalého nebo neúplného proniknutí antibiotika do biofilmu (Stewart 1996). Neexistuje žádná obecná bariéra pro difúzi rozpuštěných látek o velikosti antibiotik přes matici biofilmu, kterou je většinou voda. Pokud je však antibiotikum deaktivováno v biofilmu, penetrace by mohla být výrazně zpomalena. U divokého kmene bakterií v biofilmu je antibiotikum deaktivováno na povrchu vrstvy rychleji, než se stihne rozšířit na ostatní bakteriální buňky. Antibiotika, která se adsorbují do matrixu biofilmu, mohou mít také zpomalenou penetraci, která by mohla být příčinou pomalého pronikání aminoglykosidových antibiotik. Tyto pozitivně nabitá činidla se váží na negativně nabitý polymeru v matrixu biofilmu (Stewart & William Costerton 2001).

Druhá hypotéza závisí na změně mikroprostředí z chemického hlediska v rámci biofilmu. Mikroskopický gradient v koncentraci živin je dobře známým znakem biofilmu. Zjištění ze studií s miniaturními elektrodami ukázalo, že kyslík by mohl být úplně spotřebován v povrchové vrstvě biofilmu, a tím dochází k anaerobním odchylkám v biofilmu (de Beer et al. 1994). Lokální akumulace kyselých odpadních produktů by mohla vést k rozdílům pH větším než 1 mezi objemovou tekutinou a vnitřkem biofilmu, která by mohla přímo antagonizovat účinek antibiotik. Aminoglykosidová antibiotika jsou zjevně méně účinná proti stejnému mikroorganismu v anaerobních podmínkách než v aerobních podmínkách (Tack & Sabath 1985).

Třetí a stále spekulativní mechanismus antibiotické rezistence je to, že subpopulace mikroorganismů v biofilmu tvoří jedinečný a vysoce chráněný fenotyp diferenciací buněk podobné tvorbě spór. Tato hypotéza je podporována výsledky studií, které vykazují rezistenci v nově vytvořených biofilmech, i když jsou příliš tenké, aby představovaly bariéru pro pronikání antimikrobiálního činidla nebo metabolických substrátů (Das et al. 1998; Cochran et al. 2001).

4 Materiál a metody

4.1 Popis použitých kmenů

Pro testování byly použity pouze kmeny bifidobakterií pocházející ze sbírky DSMZ (Německá sbírka pro mikroorganismy a buněčné kultury) a kmeny pocházející z KMVD (Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky).

V následující tabulce číslo 3 je uveden původ, označení a taxonomické zařazení testovaných kmenů na antimikrobiální citlivost.

Tabulka 3. Popis použitých kmenů

Druh	Původ	KMEN
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	výkaly ovce okapi	ZDK-7
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	výkaly paovce hřivnatá	ZDK-4
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	výkaly ovce okapi	ZDK-8
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	izolát z čerstvého ovčího sýra	S7
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	výkaly divoké myši	ANIM26074
<i>B. longum</i> subsp. <i>suis</i>	trávicí trakt telat	5/9
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	izolát z kojenecké výživy	Nestlé
<i>B. canis</i>	štěněcí výkaly	Canis
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	výkaly muflona	Muf1
<i>B. choerinum</i>	trávicí trakt telat	023/2
<i>B. radai</i>	mléko německého ovčáka	Rada1
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	krysí výkaly	ANIM20104

4.2 Metody mikrobiologických analýz

Citlivost dvanácti kmenů bifidobakterií (tabulka 3) na antibiotika byla testována plotnovou, diskovo-difúzní metodou, která využívala difúzní vlastnosti antibiotik z papírových disků. Bylo použito 10 antibiotik, které doporučuje k testování EFSA (The EFSA Journal 2008), konkrétně, ampicilin (10 µg), vankomycin (5 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), streptomycin (25 µg), erytromycin (15 µg), klindamycin (2 µg), quinupristin/dalfopristin (15 µg), tetracyklin (30 µg) a chloramfenikol (30 µg, všechna antibiotika Oxoid, UK). Po kultivaci byla následně odečtena velikost inhibiční zóny v mm, podle které se klasifikovalo, jestli je kmen rezistentní (průměr inhibiční zóny < 12 mm), citlivý (průměr inhibiční zóny > 16 mm),

mírně citlivý (průměr inhibiční zóny 12-16 mm). Vlastnímu testování předcházelo zkontrolování čistoty kultury pomocí mikroskopu.

4.3 Metodika

4.3.1 Příprava kultivačních pŮd

Pro stanovení citlivosti bifidobakterií na jednotlivá antibiotika byl použit Wilkins-Chalgren Anaerobe agar se sójovým peptonem (GMO-Free soya pepton), L-cysteinem a tweenem.

Příprava živného agaru

Receptura:	destilovaná voda	100 ml
	Wilkins-Chalgren Anaerobe AGAR	4,3 g
	GMO-Free soya pepton	0,5 g
	L-cystein	0,05 g
	tween	0,1 g

Příprava:

Jednotlivé složky se nasypaly do erlenmeyerovi baňky se zábrusem ve které byla destilovaná voda, promíchalo se a uzavřelo alobalem. Baňka se dala vysterilovat přesně na 60 minut do sterilátoru. Po vysterilování se nechala v lázni vychladnout na 49°C.

4.3.2 Způsob odběru vzorků

Jednotlivé kultury byly připravené v penicilínkách, které obsahovaly Wilkins-Chalgren bujón, který byl probublán CO₂, kvůli vytvoření anaerobního prostředí. Z příslušné penicilínky se odebral vzorek skrz oflambovaný gumový špunt pomocí injekční stříkačky o objemu 0,5 ml a převedl se do Petriho misky.

4.3.3 Způsob očkování

Byl použit způsob přímého výsevu vzorku do živné půdy. Postup byl takový, že na dno sterilní označené Petriho misky se převedlo 0,5 ml vzorku, ten se převede tak, že se z části nadzvedne víčko Petriho misky a do ní se převedl z injekční stříkačky vzorek a ihned se zavřelo víčko, aby se předešlo kontaminaci. Vše se provádělo rychle, protože se jednalo striktně anaerobní bakterie. Po převedení vzorku se napipetovalo 20 ml sterilního 49°C ochlazeného agaru pomocí sklopné pipety do Petriho misky. Krouživými pohyby se vzorek spojil s živnou půdou. Po promíchání, se nechal vzorek s agarem zatuhnout v olihované ledničce. Po zatuhnutí se převedl zpět na laboratorní stůl a připravila se následně antibiotika, které doporučovala EFSA: ampicilin 30 µg, vankomycin 5 µg, gentamicin 10 µg, kanamycin 30 µg, streptomycin 25 µg, erytromycin 15 µg, klindamycin 2 µg, quinpristin/dalfopristin 15 µg, tetracykline 30 µg a chloramfenikol 30 µg. Pomocí speciálního nanášeče (dispensoru) se nanesly disky na živnou půdu a ihned se Petriho miska uzavřela. Po úspěšném nanesení všech antibiotických disků na všechny Petriho misky se přenesly Petriho misky do anaerostatu, do které se vložil katalyzátor (Anaerogen) vytvářející anaerobní prostředí (Oxoid, UK). Anaerostat se uzavřel pomocí šroubu a dalo se do termostatu kultivovat po dobu 48 hodin a 37 °C.

4.3.4 Kultivace a hodnocení mikrobiologických rozborů a způsob vyhodnocení výsledků

Kultivace na Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar byla provedena v termostatu při teplotě 37°C po dobu 48 hodin. Po této době byla změřena inhibiční zóna a spočítal se aritmetický průměr a zjistilo se, jestli je kmen na dané antibiotikum rezistentní, mírně citlivý nebo citlivý. Výsledky jsou prezentovány v mm inhibiční zóny ± směrodatná odchylka.

5 Výsledky

Všechny testované bifidobakterie byly rezistentní na gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg) a streptomycin (25 µg). Na erytromycin (15 µg) byl rezistentní pouze kmen *B. radai* RADA11 izolovaný z mléka Německého ovčáka. Tento kmen byl taktéž rezistentní na ampicilin

(10 µg), *B. choerinum* izolovaný z TT telete a *B. animalis* subsp. *lactis* izolovaný z výkalů muflona byly mírně citlivé na toto antibiotikum. Na vankomycin (5 µg) byla většina kmenů mírně citlivá, ale *B. animalis* subsp. *animalis* izolovaný z krysích výkalů a *B. longum* subsp. *suís* izolovaný z TT telat byly na toto antibiotikum citlivé. *B. animalis* subsp. *animalis* izolovaný z výkalů divoké myši a *B. canis* izolovaný ze štěněcích výkalů vykazovali rezistenci vůči klindamycinu (2 µg), *B. longum* subsp. *suís* izolovaný z TT telat byl na toto antibiotikum rezistentní a ostatní kmeny citlivé. Na antibiotikum quinupristin/dalfopristin (15 µg) byly všechny kmeny citlivé, mimo *B. longum* subsp. *suís* izolovaný z TT telat, který byl mírně citlivý. Všechny kmeny byly citlivé na chloramfenikol (30 µg). Na tetracyklin (30 µg) vykazovali citlivost kmeny *B. animalis* subsp. *animalis* izolovaný z výkalů divoké myši, *B. canis* izolovaný ze štěněcích výkalů, *B. radai* izolovaný z mléka německého ovčáka a *B. animalis* subsp. *animalis* izolovaný z krysích výkalů. Ostatní kmeny byly mírně citlivé na toto antibiotikum.

V tabulce číslo 4 je ukázán přehled citlivosti, mírné citlivosti a rezistenci jednotlivých kmenů na různá antibiotika. V tabulce číslo 5 a 6 je ukázána detailně velikost inhibiční zóny, kde první číslo je průměr ze tří měření ± směrodatná odchylka.

Tabulka 4. Citlivost bifidobakterií vůči antibiotikům

KMEN	AMP (10 µg)	VA (5 µg)	GN (10 µg)	K (30 µg)	S (25 µg)	E (15 µg)	DA (2 µg)	QD (15 µg)	TE (30 µg)	C (30 µg)
ZDK-7	S	R/S	R	R	R	S	S	S	R/S	S
ZDK-4	S	R/S	R	R	R	S	S	S	R/S	S
ZDK-8	S	R/S	R	R	R	S	S	S	R/S	S
S7	S	R/S	R	R	R	S	S	S	R/S	S
ANIM26074	S	R/S	R	R	R	S	R	S	S	S
5/9	S	S	R	R	R	S	R/S	R/S	R/S	S
Nestlé	S	R/S	R	R	R	S	S	S	R/S	S
Canis	S	R/S	R	R	R	S	R	S	S	S
Muf1	R/S	R/S	R	R	R	S	S	S	R/S	S
023/2	R/S	R/S	R	R	R	S	S	S	R/S	S
Rada11	R	R/S	R	R	R	R	S	S	S	S
ANIM20104	R/S	S	R	R	R	S	S	S	S	S

R-rezistentní (průměr inhibiční zóny < 12 mm), S – citlivé (průměr inhibiční zóny > 16 mm), R/S – mírně citlivé (průměr inhibiční zóny 12-16 mm)

AMP – ampicilin, VA – vankomycin, GN – gentamicin, K – kanamycin, S – streptomycin, E – erytromycin, DA – klindamycin, QD – quinupristin/dalfopristin, TE – tetracyklin, C – chloramfenikol

Tabulka 5. Velikost inhibiční zóny na jednotlivá antibiotika

KMEN	AMP (10 µg)	VA (5 µg)	GN (10 µg)	K (30 µg)	S (25 µg)
ZDK-7	18,33±0,58	12,66±0,58	6±0	6±0	6±0
ZDK-4	23,33±0,58	14,33±0,58	7±0	7±0	8±0
ZDK-8	17,66±0,58	12,66±0,58	7±0	7±0	7±0
S7	18,33±0,58	12±0	8±0	7±0	7±0
ANIM26074	20,33±0,58	15,33±0,58	6±0	6±0	8±0
5/9	16,66±0,58	16,33±0,58	6±0	6±0	6±0
Nestlé	17,66±0,58	13,66±0,58	6±0	6±0	8±0
Canis	18,33±0,58	14,66±0,58	6±0	6±0	6±0
Muf1	15,33±0,58	15±0	6±0	6,66±0,58	10,33±0,58
023I2	15±0	12,66±0,58	7±0	7,33±0,58	7,33±0,58
Radal1	7,66±0,58	15,33±0,58	6,33±0,58	6±0	6,33±0,58
ANIM20104	12,33±0,58	16,33±0,58	6±0	7,33±0,58	6,66±0,58

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka

Tabulka 6. Velikost inhibiční zóny na jednotlivá antibiotika

KMEN	E (15 µg)	DA (2 µg)	QD (15 µg)	TE (30 µg)	C (30 µg)
ZDK-7	20,33±0,58	20±0	20,33±0,58	13,33±0,58	20±0
ZDK-4	23,33±0,58	23,33±0,58	22±0	14,33±0,58	23,33±0,58
ZDK-8	21,66±0,58	20,33±0,58	20±0	15±0	21,33±0,58
S7	20,33±0,58	22,33±0,58	22±0	15,33±0,58	22,66±0,58
ANIM26074	24±0	6±0	22,33±0,58	23,33±0,58	20,33±0,58
5/9	25,66±0,58	14,66±0,58	15,66±0,58	12,33±0,58	25,66±0,58
Nestlé	19,66±0,58	24,33±0,58	22,66±0,58	15,66±0,58	22,66±0,58
Canis	24,33±0,58	7,66±0,58	21,33±0,58	19,66±0,58	21,66±0,58
Muf1	25,33±0,58	23,66±0,58	24,66±0,58	12,66±0,58	25,66±0,58
023I2	25,66±0,58	20,33±0,58	20,33±0,58	15,66±0,58	22,66±0,58
Radal1	8,66±0,58	20,33±0,58	20,33±0,58	21,33±0,58	24,33±0,58
ANIM20104	20±0	20,33±0,58	20,33±0,58	16,66±0,58	20,66±0,58

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka

6 Diskuze

Probiotické organismy jsou nezbytně důležité pro hostitele a pozitivně ovlivňují jeho zdraví a imunitu. Tyto mikroorganismy jsou testovány na citlivost na antibiotické látky z hlediska bezpečnosti, aby se nepřenášel gen zodpovědný za rezistenci z probiotik na potencionální patogeny. Všechny námi testované kmeny byly citlivé pouze na chloramfenikol. Inhibiční působení těchto antibiotických látek se projevilo vytvořením inhibičních zón kolem disků na živné půdě (Kunová et al. 2012). Tato terapeutika se používají v praxi, proto je tento poznatek pozitivní. Bifidobakterie jsou ve většině případů citlivé na vankomycin, u našeho testování byly pouze dva kmeny citlivé a to *B. longum* subsp. *suis* izolovaný z trávicího traktu telete a *B. animalis* subsp. *animalis* izolovaný z krysích výkalů. Ostatní kmeny byly pouze mírně citlivé na toto antibiotikum. Častá je také přítomnost genu zodpovědného za rezistenci na tetracyklin u BMK, tak i u rodu *Bifidobacterium*. Rezistence nebyla detekována, avšak kmeny *B. choerinum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. longum* subsp. *suis*, byly již mírně citlivé. Všechny kmeny byly také citlivé na quinupristin/dalfopristin, jediný kmen *B. longum* subsp. *suis*, který byl izolován z TT telete, byl mírně citlivý.

Na ampicilin byla většina kmenů citlivá, mimo kmenů *B. animalis* subsp. *lactis* izolovaný z výkalů muflona, *B. choerinum* izolovaný z TT telat a *B. animalis* subsp. *animalis* izolovaný z krysích výkalů, které byly mírně citlivé. *B. radai* izolovaný z mléka Německého ovčáka byl však rezistentní a dá se předpokládat, že tento kmen přijal gen zodpovědný za rezistenci na ampicilin a mohl by představovat určité riziko.

Většina kmenů byla citlivá na klindamycin a *B. longum* subsp. *suis* izolovaný z TT telete byl mírně citlivý. Avšak, *B. canis* izolovaný ze štěněcích výkalů a *B. animalis* subsp. *animalis* izolovaný z výkalů divoké myši byly na toto antibiotikum rezistentní a dá se předpokládat, že se jedná o rezistenci získanou a představuje určité riziko. Pouze jeden kmen byl rezistentní na erytromycin a to *B. radai* izolovaný z mléka Německého ovčáka, ostatní kmeny byly citlivé a předpokládá se, že to je rezistence získaná.

Vysoký stupeň rezistence bifidobakterie byl detekován u antibiotik, jako jsou gentamicin, kanamycin a streptomycin. Všechny testované kmeny byly 100% rezistentní na tato antibiotika. Rezistence k těmto antibiotikům je velice rozšířená a dá se předpokládat, že se jedná o rezistenci přirozenou (Kunová et al. 2012).

Bifidobakterie jsou nedílnou součástí GIT a jsou často používané jako probiotikum. Vzhledem k jejich vlastnostem se používají v potravinářství, a proto se testují na citlivost k antibiotikům, aby se zabránilo přenosu genů zodpovědných za rezistenci. Podle dostupných informací, se objevuje zvýšený výskyt ARG i u této skupiny bakterií. To je důvod, proč by GIT lidí a zvířat mohl působit, jako rezervoár genů rezistence, které by mohly být přeneseny později na patogeny (Kunová et al. 2012).

Metody, které jsou kvalitativní a semi-kvantitativní, k určení MIC nepřímo, kam patří i difúzní metoda, jsou na testování nepřijatelné. Nicméně, EFSA připouští tyto metody pro sledování antibiotické rezistence u rodů *Bifidobacterium* sp., *Propionibacterium* sp., *Lactobacillus* sp. a *Leuconostoc* sp. Jedním z možných důvodů je interference s růstovým médiem, což by mohlo zkomplikovat testování. Plotnová metoda, která se použila, spolehlivě potvrdila citlivost testovaných kmenů vůči požadovaným antibiotikům (Kunová et al 2012).

7 Závěr

Cílem praktické části bylo otestování rezistence dvanácti kmenů bifidobakterií vůči deseti antibiotikům, které doporučuje EFSA.

Rezistence bifidobakteriálních kmenů k významným terapeutickým antibiotikům je důležitá z možného použití daných kmenů jako probiotika. Použité kmeny byly rezistentní vůči aminoglykosidovým antibiotikům (gentamicin, streptomycin a kanamycin). Zde se jedná, ale o rezistenci přirozenou pro rod *Bifidobacterium*. Kmen *B. radai* izolovaný z mléka Německého ovčáka, který vykázal rezistenci vůči ampicilinu a kmeny *B. canis* izolovaný ze štěněcích výkalů a *B. animalis* subsp. *animalis* izolovaný z výkalů divoké myši vykázaly rezistenci vůči klindamycinu, které se běžně používají jako terapeutická léčiva a předpokládá se, že tato rezistence je získaná a mohla by působit problémy jako rezervoár genů rezistence, které by mohly přejít na patogeny. Ostatní kmeny byly citlivé na terapeutická antibiotika a proto je možné, je použít jako probiotikum.

8 Seznam použité literatury

- Adamsson I, Nord CE, Lundquist P, Sjöstedt S, Edlund C. 1999. Comparative effects of omeprazole, amoxicillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **44**:629–640. Oxford University Press. Dostupné z <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/44.5.629> (viděno březem 15, 2019).
- Alanis AJ. 2005. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research* **36**:697–705. Elsevier. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0188440905002730> (viděno březem 19, 2019).
- Aminov RI. 2010. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology* **1**:134. Frontiers. Dostupné z <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2010.00134/abstract> (viděno březem 3, 2019).
- Bartlett JG. 2002. Antibiotic-Associated Diarrhea. *New England Journal of Medicine* **346**:334–339. Dostupné z <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMcp011603> (viděno březem 14, 2019).
- Bérdy J. 2012. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics* **65**:385–395. Nature Publishing Group. Dostupné z <http://www.nature.com/articles/ja201227> (viděno dubem 6, 2019).
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Strana Annals of Microbiology*. Dostupné z <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.583.7996&rep=rep1&type=pdf> (viděno únor 25, 2019).
- Bottacini F, Medini D, Pavesi A, Turrone F, Foroni E, Riley D, Giubellini V, Tettelin H, van Sinderen D, Ventura M. 2010. Comparative genomics of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology* **156**:3243–3254. Microbiology Society. Dostupné z <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.039545-0> (viděno únor 26, 2019).
- Buhling A, Radun D, Muller WA, Malfertheiner P. 2001. Influence of anti-*Helicobacter* triple-

- therapy with metronidazole, omeprazole and clarithromycin on intestinal microflora. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **15**:1445–1452. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111). Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2036.2001.01033.x> (viděno březem 15, 2019).
- Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, Sanders AG, Peltier LF. 2005. THE CLASSIC: Penicillin as a Chemotherapeutic Agent. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **439**:23–26. Dostupné z <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003086-200510000-00007> (viděno březem 4, 2019).
- Chaucheyras-Durand F, Durand H. 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes* **1**:3–9. Wageningen Academic Publishers. Dostupné z <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/BM2008.1002> (viděno dubem 10, 2019).
- Chong ESL. 2014. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **30**:351–374. Springer Netherlands. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/s11274-013-1499-6> (viděno dubem 10, 2019).
- Cochran WL, McFeters GA, Stewart PS. 2001. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *Journal of Applied Microbiology* **88**:22–30. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111). Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2000.00825.x> (viděno březem 14, 2019).
- Cook M, Molto E, Anderson C. 1989. Fluorochrome labelling in roman period skeletons from dakhleh oasis, Egypt. *American Journal of Physical Anthropology* **80**:137–143. John Wiley & Sons, Ltd. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1002/ajpa.1330800202> (viděno březem 4, 2019).
- Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* **3**:777–788. Nature Publishing Group. Dostupné z <http://www.nature.com/articles/nrmicro1273> (viděno březem 15, 2019).
- Crittenden RG, Playne MJ. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* **7**:353–361. Elsevier. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224496100388> (viděno dubem 10, 2019).

- Das JR, Bhakoo M, Jones M V, Gilbert P. 1998. Changes in the biocide susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* cells associated with rapid attachment to plastic surfaces. *Journal of applied microbiology* **84**:852–8. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9674140> (viděno březem 14, 2019).
- de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z. 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and Bioengineering* **43**:1131–1138. John Wiley & Sons, Ltd. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260431118> (viděno březem 14, 2019).
- De La Cochetière MF, Durand T, Lalande V, Petit JC, Potel G, Beaugerie L. 2008. Effect of Antibiotic Therapy on Human Fecal Microbiota and the Relation to the Development of *Clostridium difficile*. *Microbial Ecology* **56**:395–402. Springer-Verlag. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/s00248-007-9356-5> (viděno březem 14, 2019).
- de Vries LE, Vallès Y, Agersø Y, Vaishampayan PA, García-Montaner A, Kuehl J V., Christensen H, Barlow M, Francino MP. 2011. The Gut as Reservoir of Antibiotic Resistance: Microbial Diversity of Tetracycline Resistance in Mother and Infant. *PLoS ONE* **6**:e21644. Public Library of Science. Dostupné z <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0021644> (viděno březem 18, 2019).
- Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. 2008. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biology* **6**:e280. Public Library of Science. Dostupné z <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0060280> (viděno březem 14, 2019).
- dos Reis SA, da Conceição LL, Siqueira NP, Rosa DD, da Silva LL, Peluzio M do CG. 2017. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutrition Research* **37**:1–19. Elsevier. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531716303943> (viděno dubem 10, 2019).
- Dubern J-F, Diggle SP. 2008. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Molecular BioSystems* **4**:882. The Royal Society of Chemistry. Dostupné z <http://xlink.rsc.org/?DOI=b803796p> (viděno březem 4, 2019).
- Enne VI, Bennett PM, Livermore DM, Hall LMC. 2004. Enhancement of host fitness by the *sul2*-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **53**:958–963. Oxford University Press. Dostupné z

- <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkh217> (viděno březem 4, 2019).
- Field W, Hershberg R. 2015. Alarming High Segregation Frequencies of Quinolone Resistance Alleles within Human and Animal Microbiomes Are Not Explained by Direct Clinical Antibiotic Exposure. *Genome Biology and Evolution* **7**:1743–1757. Oxford University Press. Dostupné z <https://academic.oup.com/gbe/article-lookup/doi/10.1093/gbe/evv102> (viděno březem 18, 2019).
- Fijan S. 2014. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **11**:4745–4767. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Dostupné z <http://www.mdpi.com/1660-4601/11/5/4745> (viděno dubem 10, 2019).
- Forslund K, Sunagawa S, Kultima JR, Mende DR, Arumugam M, Typas A, Bork P. 2013. Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome. *Genome research* **23**:1163–9. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23568836> (viděno březem 18, 2019).
- Francino MP. 2016. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. *Frontiers in Microbiology* **6**:1543. Frontiers. Dostupné z <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01543/abstract> (viděno březem 18, 2019).
- Frizzo LS, Bertozzi E, Soto LP, Sequeira GJ, Rodriguez Armesto R, Rosmini MR. 2010. Studies on translocation, acute oral toxicity and intestinal colonization of potentially probiotic lactic acid bacteria administered during calf rearing. *Livestock Science* **128**:28–35. Elsevier. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871141309003400> (viděno dubem 10, 2019).
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* **66**:365–378. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111). Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x> (viděno březem 31, 2019).
- Gasser F (Institut PP (France). D de B et GMU de R de l'Expression G. 1999. Bulletin de l'Institut Pasteur. Strana Bulletin de l'Institut Pasteur (France). Elsevier Science Pub. Co. Dostupné z <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR9500297> (viděno dubem 10, 2019).

- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition* **125**:1401–1412. Narnia. Dostupné z <https://academic.oup.com/jn/article/125/6/1401/4730723> (viděno duben 10, 2019).
- Görner F, Valík L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívateľín. Malé centrum. Dostupné z https://scholar.google.sk/citations?user=yPq9oHEAAAAJ&hl=sk#d=gs_md_cita-d&u=%2Fcitations%3Fview_op%3Dview_citation%26hl%3Dsk%26user%3DyPq9oHEAAAAJ%26citation_for_view%3DyPq9oHEAAAAJ%3AqSd0DAb9jMoC%26tzom%3D-60 (viděno březen 17, 2019).
- Gosalbes MJ et al. 2016. High frequencies of antibiotic resistance genes in infants' meconium and early fecal samples. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* **7**:35–44. Cambridge University Press. Dostupné z http://www.journals.cambridge.org/abstract_S2040174415001506 (viděno březen 18, 2019).
- Gouriet F, Million M, Henri M, Fournier P-E, Raoult D. 2012. *Lactobacillus rhamnosus* bacteremia: an emerging clinical entity. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **31**:2469–2480. Springer-Verlag. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/s10096-012-1599-5> (viděno březen 20, 2019).
- Gueimonde M, Sánchez B, G. de los Reyes-Gavilán C, Margolles A. 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology* **4**:202. Frontiers. Dostupné z <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00202/abstract> (viděno březen 20, 2019).
- Hill C et al. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **11**:506–514. Dostupné z <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66> (viděno březen 29, 2019).
- Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Welch DM, Relman DA, Sogin ML. 2008. Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRNA Hypervariable Tag Sequencing. *PLoS Genetics* **4**:e1000255. Public Library of Science. Dostupné z <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1000255> (viděno březen 14, 2019).
- Isolauri E, Ouwehand AC, Salminen S. 2002. Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular*

- Microbiology **82**:279–289.
- Kahouli I, Tomaro-Duchesneau C, Prakash S. 2013. Probiotics in colorectal cancer (CRC) with emphasis on mechanisms of action and current perspectives. *Journal of Medical Microbiology* **62**:1107–1123. Microbiology Society. Dostupné z <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.048975-0> (viděno duben 10, 2019).
- Karami N, Martner A, Enne VI, Swerkeresson S, Adlerberth I, Wold AE. 2007. Transfer of an ampicillin resistance gene between two *Escherichia coli* strains in the bowel microbiota of an infant treated with antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60**:1142–1145. Oxford University Press. Dostupné z <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkm327> (viděno březen 18, 2019).
- Kolář M, Látal T, Čermák P. 2002. Klinicko-mikrobiologické podklady racionální antibiotické léčby. Trios. Dostupné z <https://books.google.cz/books?id=2O1XAAAACAAJ&dq=nicko-mikrobiologické+podklady+racionální+antibiotické+léčby.+2002&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwj07tHOkZHhAhXh0qYKHUvTDI0Q6AEIKjAA> (viděno březen 20, 2019).
- Kunová G, Vidailiac A, Ročková Š, Rada V, Lisová I. 2012. Testování bifidobakterií na citlivost vůči antimikrobiálním látkám. *Mlékařské listy* **135**:1-5
- Lay J. 2000. MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **19**:507–516. Elsevier. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993600000273> (viděno březen 30, 2019).
- Lee YK. 2014. What could probiotic do for us? *Food Science and Human Wellness* **3**:47–50. Elsevier. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213453014000196> (viděno listopad 3, 2018).
- Livermore DM. 2004. The need for new antibiotics. *Clinical Microbiology and Infection* **10**:1–9. Elsevier. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X1560088X> (viděno březen 4, 2019).
- Lloyd NC, Morgan HW, Nicholson BK, Ronimus RS. 2005. The Composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a Century-Old Debate. *Angewandte Chemie International*

- Edition **44**:941–944. John Wiley & Sons, Ltd. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200461471> (viděno březem 4, 2019).
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L, Wirth J, Wenke M. 2012. Barevný atlas farmakologie. Grada. Dostupné z https://books.google.cz/books/about/Barevný_atlas_farmakologie_Překlad_4_a.html?hl=cs&id=40uMuH7uZLwC&output=html_text&redir_esc=y (viděno březem 18, 2019).
- Mah T-FC, O'Toole GA. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* **9**:34–39. Elsevier Current Trends. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X00019132> (viděno březem 14, 2019).
- Masco L, Huys G, De Brandt E, Temmerman R, Swings J. 2005. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* **102**:221–230. Elsevier. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160505000590> (viděno únor 26, 2019).
- Masco L, Huys G, Gevers D, Verbruggen L, Swings J. 2003. Identification of Bifidobacterium Species Using rep-PCR Fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology* **26**:557–563. Urban & Fischer. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202004702222> (viděno únor 15, 2019).
- Mattila-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R, Saarela M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* **12**:173–182. Elsevier. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694601000991> (viděno duben 10, 2019).
- McFarland L V. 2006. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of Clostridium difficile disease. *American Journal of Gastroenterology* **101**:812–822.
- Mitsuoka T. 1992. The Human Gastrointestinal Tract. Strany 69–114 The Lactic Acid Bacteria Volume 1. Springer US, Boston, MA. Dostupné z http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-3522-5_4 (viděno duben 12, 2019).
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. 2007. Development of the Human

- Infant Intestinal Microbiota. PLoS Biology **5**:e177. Public Library of Science. Dostupné z <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0050177> (viděno březem 14, 2019).
- Pandey KR, Naik SR, Vakil B V. 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. Journal of Food Science and Technology **52**:7577–7587.
- Preidis GA, Versalovic J. 2009. Targeting the Human Microbiome With Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era. Gastroenterology **136**:2015–2031. W.B. Saunders. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508509002935> (viděno březem 14, 2019).
- Qin J et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature **464**:59–65. Nature Publishing Group. Dostupné z <http://www.nature.com/articles/nature08821> (viděno únor 26, 2019).
- Quigley EMM. 2010. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. Pharmacological Research **61**:213–218.
- Rada V. 2010. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. Interní medicína pro praxi. **12**:92–97.
- Rada V, Marounek M. 2005. Probiotika a Prebiotika Ve Výživě Zvířat. Dostupné z www.vuzv.cz (viděno listopad 2, 2018).
- Rada V, Petr J. 2002. Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. Veterinarni Medicina **47**:1–4.
- Ranadheera RDCS, Baines SK, Adams MC. 2010. Importance of food in probiotic efficacy. Food Research International **43**:1–7. Elsevier. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996909002749> (viděno únor 26, 2019).
- Rastal RA, Gibson GR. 2002. Probiotics and Prebiotics: Where are We Going? - Google Books. Dostupné z [https://books.google.cz/books?hl=en&lr=&id=INM6Us4rdRQC&oi=fnd&pg=PA107&dq=Rastall,+R.A.,+Gibson,+G.R.+\(2002\).+Prebiotic+oligosaccharides:+Evaluation+of+biological+activities+and+potential+future+developments.+In:+Tannock+GW+\(ed\)+Probiotics+and+Prebiotics](https://books.google.cz/books?hl=en&lr=&id=INM6Us4rdRQC&oi=fnd&pg=PA107&dq=Rastall,+R.A.,+Gibson,+G.R.+(2002).+Prebiotic+oligosaccharides:+Evaluation+of+biological+activities+and+potential+future+developments.+In:+Tannock+GW+(ed)+Probiotics+and+Prebiotics) (viděno březem 31, 2019).
- Requena T, Burton J, Matsuki T, Munro K, Simon MA, Tanaka R, Watanabe K, Tannock GW. 2002. Identification, detection, and enumeration of human bifidobacterium species by PCR targeting the transaldolase gene. Applied and environmental microbiology

- 68**:2420–7. American Society for Microbiology. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11976117> (viděno únor 15, 2019).
- Roberfroid M. 2007. Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition* **137**:830S–837S. Oxford University Press. Dostupné z <https://academic.oup.com/jn/article/137/3/830S/4664774> (viděno březem 20, 2019).
- Rodloff A, Bauer T, Ewig S, Kujath P, Müller E. 2008. Susceptible, intermediate, and resistant - the intensity of antibiotic action. *Deutsches Arzteblatt international* **105**:657–62. Deutscher Arzte-Verlag GmbH. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19626213> (viděno březem 6, 2019).
- Salminen S, Ouwehand AC, Isolauri E. 1998. Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal* **8**:563–572.
- Sánchez B, Ruiz L, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P, Margolles A. 2013. Adaptation of bifidobacteria to the gastrointestinal tract and functional consequences. *Pharmacological Research* **69**:127–136. Academic Press. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661812002253> (viděno únor 26, 2019).
- Scardovi V. 1986. Genus Bifidobacterium. Strany 1418–1434 *Bergey's manual of systemic bacteriology*. Williams and Wikins. Dostupné z <http://ci.nii.ac.jp/naid/10005960277/en/> (viděno duben 12, 2019).
- Schumann A, Nutten S, Donnicola D, Comelli EM, Mansourian R, Cherbut C, Corthesy-Theulaz I, Garcia-Rodenas C. 2005. Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiological Genomics* **23**:235–245. American Physiological Society. Dostupné z <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physiolgenomics.00057.2005> (viděno březem 14, 2019).
- Segers ME, Lebeer S. 2014. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microbial Cell Factories* **13**:S7. BioMed Central. Dostupné z <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-S1-S7> (viděno duben 12, 2019).
- Sekirov I, Tam NM, Jogova M, Robertson ML, Li Y, Lupp C, Finlay BB. 2008. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infection and immunity* **76**:4726–36. American Society for Microbiology Journals.

- Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18678663> (viděno březem 14, 2019).
- Shah N. 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* **17**:1262–1277. Elsevier. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694607000696?via%3Dihub> (viděno únor 27, 2019).
- Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA. 2001. Evidence for Extensive Resistance Gene Transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and Other Genera in the Human Colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:561–568. American Society for Microbiology. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157217> (viděno březem 18, 2019).
- Soares GMS, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte PM, Feres M. 2012. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *Journal of Applied Oral Science* **20**:295–309. Faculdade De Odontologia De Bauru - USP. Dostupné z http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572012000300002&lng=en&tlng=en (viděno březem 12, 2019).
- Spinler JK, Taweechoatipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. 2008. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* **14**:166–171. Academic Press. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996408000231> (viděno březem 15, 2019).
- Stewart PS. 1996. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**:2517–22. American Society for Microbiology Journals. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8913456> (viděno březem 14, 2019).
- Stewart PS, William Costerton J. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* **358**:135–138. Elsevier. Dostupné z <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673601053211> (viděno březem 12, 2019).
- Tack KJ, Sabath LD. 1985. Increased Minimum Inhibitory Concentrations with Anaerobiasis for Tobramycin, Gentamicin, and Amikacin, Compared to Latamoxef, Piperacillin, Chloramphenicol, and Clindamycin. *Chemotherapy* **31**:204–210. Karger Publishers.

- Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3888545> (viděno březem 14, 2019).
- The EFSA Journal. 2008. Technical guidance - Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA Journal* **6**. John Wiley & Sons, Ltd. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2008.732> (viděno březem 31, 2019).
- The EFSA Journal. 2012. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update). *EFSA Journal* **10**. John Wiley & Sons, Ltd. Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2012.3020> (viděno březem 20, 2019).
- TONG JL, RAN ZH, SHEN J, ZHANG CX, XIAO SD. 2006. Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **25**:155–168. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111). Dostupné z <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2036.2006.03179.x> (viděno březem 15, 2019).
- Tortuero F. 1973. Influence of the implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. *Poultry science* **52**:197–203.
- Uccello M, Malaguarnera G, Basile F, Dagata V, Malaguarnera M, Bertino G, Vacante M, Drago F, Biondi A. 2012. Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC Surgery* **12**.
- Ventura M, Turrone F, van Sinderen D. 2012. Probiogenomics as a tool to obtain genetic insights into adaptation of probiotic bacteria to the human gut. *Bioengineered* **3**:73–79. Taylor & Francis. Dostupné z <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/bbug.18540> (viděno únor 26, 2019).
- Vidová M, Hronská H, Tokořová S, Rosenberg M. 2013. Importance of prebiotic and probiotic: the role of galactooligosaccharides as prebiotic additives: a review. *Potravinářstvo* **7**:28–35. Dostupné z <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/251> (viděno březem 30, 2019).
- Vieira AT, Teixeira MM, Martins FS. 2013. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Frontiers in immunology* **4**:445. Frontiers Media SA. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24376446> (viděno listopad 3, 2018).

- Vlková E, Bunešová V, Rada V. 2013. Podávání bifidobakterií mláďatům přežvýkavců. *Veterinářství*. **63**:371-374.
- Vlková E, Rada V, Bujňáková D, Kmeť V. 2004. Enumeration, isolation, and identification of bifidobacteria from infant feces. *Folia Microbiologica* **49**:209–212. Springer Netherlands. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/BF02931404> (viděno duben 10, 2019).
- Vonk RJ, Reckman, Gerlof AR, Harmsen HJM, Priebe MG. 2012. Probiotics and lactose intolerance. Strany 149–160 *Probiotics*.
- Whittle G, Shoemaker NB, Salyers AA. 2002. The role of *Bacteroides* conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **59**:2044–2054. Birkhäuser Verlag. Dostupné z <http://link.springer.com/10.1007/s000180200004> (viděno březen 18, 2019).
- Yap IKS et al. 2008. Metabonomic and Microbiological Analysis of the Dynamic Effect of Vancomycin-Induced Gut Microbiota Modification in the Mouse. *Journal of Proteome Research* **7**:3718–3728. American Chemical Society. Dostupné z <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr700864x> (viděno březen 14, 2019).

9 Přílohy

Příloha 1 Inhibiční zóny kolem antibiotických disků (ampicilin, kanamycin, chloramfenikol, tetracyklin, gentamicin, streptomycin) u kmene *B. animalis* subsp. *lactis*

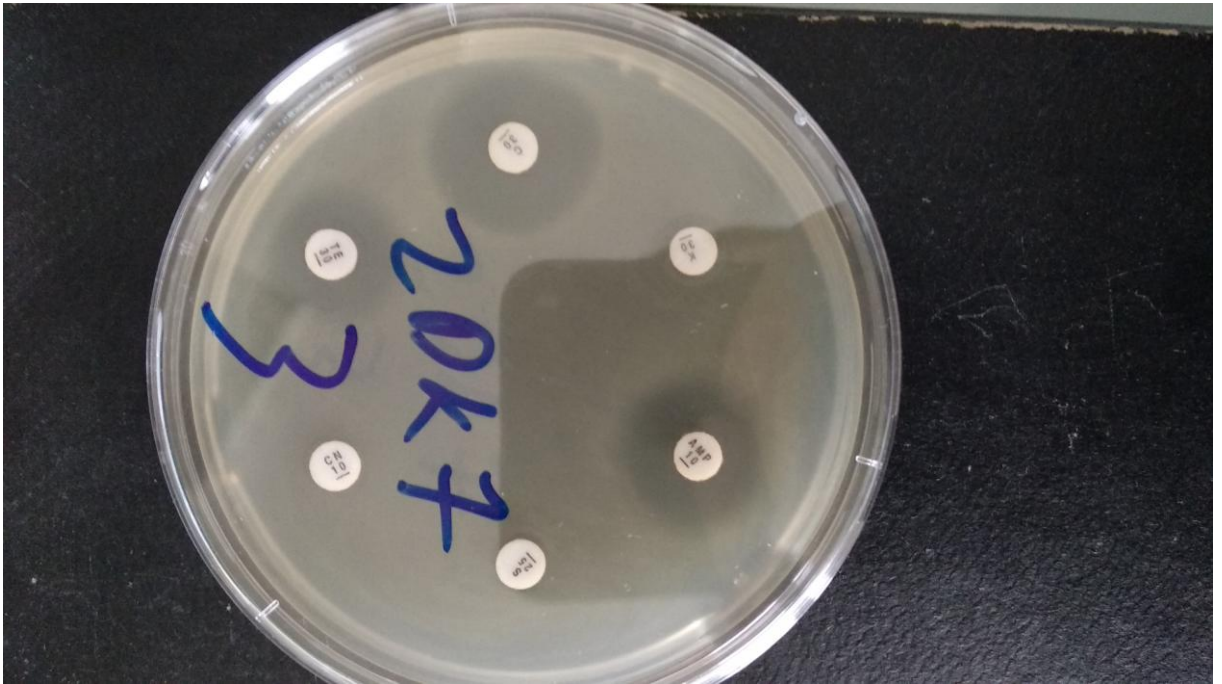
ZDK-7

Příloha 2 Inhibiční zóny kolem antibiotických disků (klindamycin, quinupristin/dalfopristin, vankomycin, erytromycin) u kmene *B. animalis* subsp. *lactis* ZDK-7

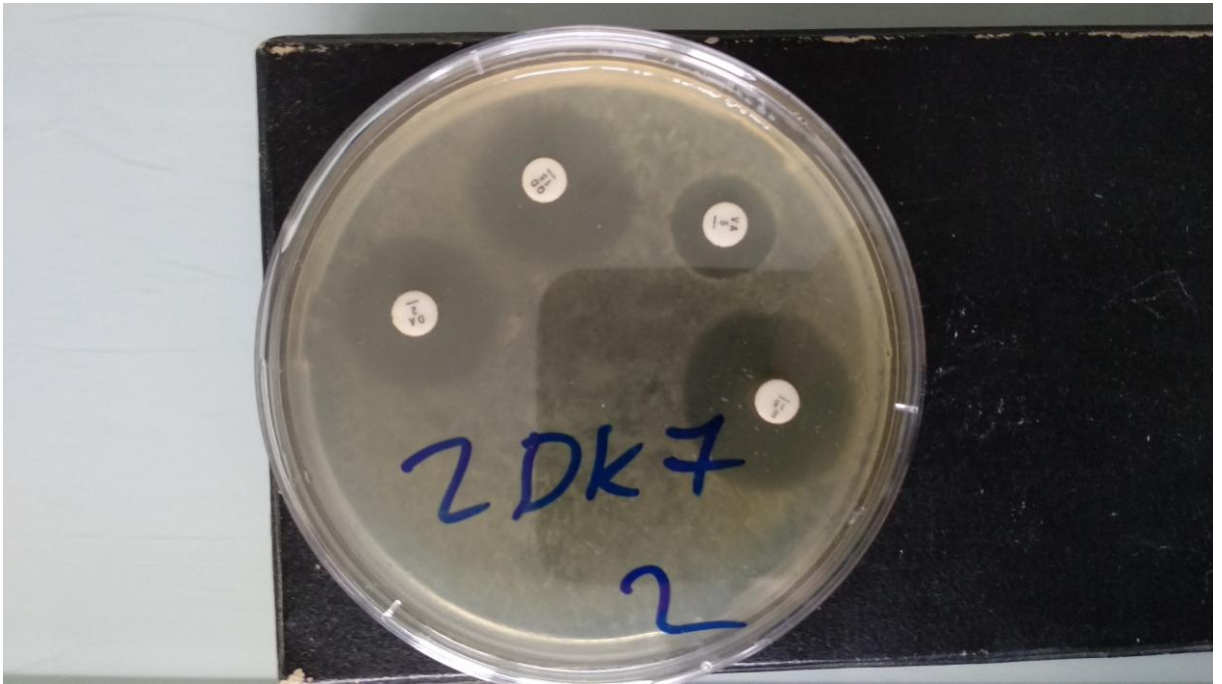
Příloha 3 Inhibiční zóny kolem antibiotických disků (klindamycin, quinupristin/dalfopristin, vankomycin, erytromycin) u kmene *B. animalis* subsp. *lactis*

ZDK-8

Příloha 1



Příloha 2



Příloha 3

