

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Diverzita bakterií rodu *Bifidobacterium* v trávicím traktu
dětí s Crohnovou chorobou**

Bakalářská práce

Angelika Procházková

Výživa a potraviny

Vedoucí práce doc. Ing. Věra Neužil Bunešová, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Diverzita bakterií rodu *Bifidobacterium* v trávicím traktu dětí s Crohnovou chorobou" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, PhD. za odborné vedení mé práce, poskytnutí cenných rad, připomínek, trpělivosti, a zvláště za čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnutí pracovního prostoru, vytvoření vhodných pracovních podmínek a vedení při práci v laboratoři. Rovněž děkuji za odborné konzultace a spolupráci na laboratorních pracích Ing. Nikol Modráčkové. Děkuji také mé rodině za jejich trpělivost a příjemné pracovní zázemí.

Diverzita bakterií rodu *Bifidobacterium* v trávicím traktu dětí s Crohnovou chorobou

Souhrn

Crohnova choroba (CD) spadá do zánětlivých střevních onemocnění, jež mají negativní dopad na pacientův celkový zdravotní stav a jeho každodenní život. Toto onemocnění se vyznačuje dysbiózou gastrointestinálního traktu, kde je zvýšené množství patogenních mikroorganismů a snížený počet komenzálů jako jsou bifidobakterie. Bifidobakterie poskytují příznivý vliv na hostitele jako je ochrana proti patogenům, produkce pozitivních látek a trávení složitých látek. Podle literární rešerše dochází u pacientů s Crohnovou chorobou k redukci diverzity i kvantitativního zastoupení bifidobakterií.

Tato bakalářská práce byla zaměřena na detekci a kvantifikaci bifidobakterií izolovaných z fekálních vzorků 11 dětí s CD odebraných ve spolupráci s nemocnicí Motol a analyzovaných na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky (ČZU v Praze). Ke stanovení bifidobakterií byla použita desková kultivační metoda se dvěma variantami selektivních médií pro bifidobakterie za využití modifikovaného Wilkins-Chalgren agaru (WSP) s mupirocinem a kyselinou octovou (BIF-MUP) a totéž médium doplněno ještě o norfloxacin (BIF-NORF). Základní médium WSP bylo použito pro stanovení celkového počtu anaerobů. Narostlé kolonie byly spočteny a na základě kultivačních znaků kolonií bylo cílem získat alespoň celkem 12 izolátů pro další identifikaci. Získané izoláty byly rodově a druhově identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI TOF MS).

Z výsledků byla stanovena mikrobiální diverzita izolovaných kolonií na selektivních agarech pro bifidobakterie a jejich počty u pacientů s CD. Bifidobakterie byly identifikovány pouze u 8 z 11 pacientů a zastoupení tohoto rodu činilo 51,18 % ze všech testovaných izolátů. Průměrné počty bifidobakterií izolovaných na selektivních médiích byly výrazně sníženy ($6,99 \pm 1,45$ log KTJ/g stolice na BIF-MUP a $6,40 \pm 1,63$ log KTJ/g stolice na BIF-NORF) ve srovnání se zdravými kontrolami, kde počty bifidobakterií dosahují hodnot 10^9 KTJ/g stolice. Rovněž byly u těchto pacientů identifikované i jiné mikrobiální rody (48,82 %), které by mohly působit dysbioticky či patogenně zvláště u jedinců se sníženou imunitou. Na médiích pro bifidobakterie byly detekovány druhy jako *Propionibacterium acnes*, *P. australiense*, *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. parasanguinis*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus hominis*, *S. epidermidis* a *Bacillus cereus*. Zároveň se díky nižšímu zastoupení bifidobakterií ve stolici podařilo vyizolovat zástupce rodu *Bacteroides*.

Z výsledků této práce vyplývá snížená diverzita a kvantitativní zastoupení *Bifidobacterium* spp., což zjevně souvisí s dysbiotickým stavem jedinců s Crohnovou chorobou.

Klíčová slova: Crohnova choroba; bifidobakterie; identifikace; MALDI TOF MS; probiotika

Diversity of the genus *Bifidobacterium* in the gastrointestinal tract of children with Crohn's disease

Summary

Crohn's disease (CD) belonging to inflammatory bowel diseases (IBD) has a negative impact on the patient's overall health and his or her everyday life. This illness is characterized by its dysbiosis of gastrointestinal tract including higher quantities of pathogenic microorganisms and lower counts of beneficial commensals like bifidobacteria. Bifidobacteria have a positive effect on the host such as protection against pathogens, production of health-promoting substances and digestion of complex substances. According to literary research, patients with CD have reduced bifidobacterial diversity and even lowered quantitative representation.

This bachelor thesis was focused on the detection and quantification of bifidobacteria isolated from fecal samples of 11 children with CD collected in cooperation with Motol University Hospital and analysed at the Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics (CULS Prague). Determination of bifidobacteria was carried out using the plate technique with two selective modified Wilkins-Chalgren agars (WSP) with mupirocin and acetic acid (BIF-MUP) and the same modified medium enhanced with norfloxacin (BIF-NORF). Nonselective WSP agar was applied for determination of the total count of anaerobes. Colonies grown on these agars were then counted and the objective was to attain at least 12 isolates selected based on their cultivation characteristics. Acquired isolates were further identified on genus and species level using mass spectrometry (MALDI TOF MS).

Results were used for the determination of microbial diversity of the colonies isolated on selective bifidobacterial agars and their counts in patients with CD. *Bifidobacterium* spp. was detected only in 8 out of 11 patients and representation of this genus was 51,18 % out of all tested isolates. Average number of isolated bifidobacteria were greatly lowered ($6,99 \pm 1,45$ log CFU/g stool on BIF-MUP agar and $6,40 \pm 1,63$ log CFU/g stool on BIF-NORF) compared to the healthy control group, where the bifidobacterial numbers reached values of 10^9 CFU/g stool. Also other microbial genera were identified (48,82 %) in the patients with CD and could act in dysbiotic way or as pathogens, especially in individuals with reduced immunity. On the bifidobacterial selective media were detected species including *Propionibacterium acnes*, *P. australiense*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. parasanguinis*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus hominis*, *S. epidermidis* and *Bacillus cereus*. Also because of the reduced levels of bifidobacteria in the stool, there was a successful isolation of representatives of the genus *Bacteroides*.

Our results show that, there was reduced bifidobacterial diversity and quantitative representation. This is evidently connected with the dysbiotic state of individuals with CD.

Keywords: Crohn's disease; *Bifidobacterium*; identification; MALDI TOF MS; probiotics

Obsah

1 Úvod	7
2 Cíl práce	8
3 Hypotéza	8
4 Literární rešerše	9
4.1 Charakteristika gastrointestinálního traktu člověka	9
4.1.1 Mikrobiota	10
4.1.1.1 Osídlení gastrointestinálního traktu mikrobiotou	10
4.1.1.2 Rozvoj a modifikace mikrobioty GIT.....	10
4.1.1.3 Složení intestinální mikrobioty ve zdraví a během nemoci	16
4.1.1.4 Zdravotní přínosy mikrobioty.....	18
4.2 Zánětlivá střevní onemocnění	18
4.2.1 Crohnova choroba.....	19
4.2.2 Ulcerózní kolitida	20
4.2.3 Rozdíly mezi Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou.....	21
4.3 Rod <i>Bifidobacterium</i>	21
4.3.1 Morfologie a fyziologie	21
4.3.2 Taxonomie a výskyt.....	23
4.3.3 Význam a funkce bifidobakterií v trávicím traktu.....	24
5 Metodika	26
5.1 Odběr vzorků a seznam dárců	26
5.2 Kultivační stanovení	26
5.3 Izolace bifidobakterií	27
5.4 Identifikace bifidobakterií	28
5.4.1 Detekce enzymu F6PPK	28
5.4.2 Hmotnostní spektrometrie (MALDI TOF MS)	28
6 Výsledky	30
7 Diskuze	33
7.1 Bifidobakterie a CD	33
7.2 Jiné detektované mikroorganismy	34
8 Závěr	37
9 Literatura	38
10 Samostatné přílohy	i

1 Úvod

Bifidobakterie činí důležitou část střevní mikrobioty člověka a patří mezi vyhledávaná probiotika. Tento rod má významný vliv na zdravotní stav hostitele produkcí prospěšných metabolitů, trávením složitějších látek nestravitelných pro hostitele a poskytováním ochrany před možnými škodlivými mikroorganismy.

Crohnova choroba (CD) je závažné zánětlivé střevní onemocnění postihující celý gastrointestinální trakt, které je charakteristické dysbiózou gastrointestinálního traktu, a tedy i úbytkem komenzálních mikroorganismů jako jsou například bifidobakterie. CD je často doprovázena možnými komplikacemi jako podvýživa, retardace růstu, průjem, bolesti břicha, průjmy, přítomnost vředů a ovlivňuje negativně každodenní život pacienta. Kvůli tomu, že žádný terapeutický postup u CD není stoprocentně účinný, je tomuto onemocnění věnována značná pozornost. Léčba CD je zaměřena na zmírnění jejích symptomů a aplikace probiotik, jako jsou například bifidobakterie, může napomoci zlepšením stavu dysbiózy.

V rámci této bakalářské práce byla využita kultivační metoda a metoda hmotnostní spektrometrie MALDI TOF MS k detekci a izolaci bifidobakterií a dalších bakteriálních druhů nalezených v trávicím traktu dětí s CD.

2 Cíl práce

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou řazeny mezi pozitivně působící komenzální probiotické bakterie. Jejich výskyt v trávicím traktu hostitele je spojen s celou řadou zdravotních přínosů. Crohnova choroba (CD) je řazena do skupiny zánětlivých střevních onemocnění a u jedinců s tímto onemocněním dochází k poklesu výskytu bifidobakterií.

Cílem této práce byla kvantifikace a detekce bifidobakterií ve vzorcích stolice jedinců s CD.

3 Hypotéza

Předpokládáme, že u jedinců s CD bude nižší nejen kvantitativní zastoupení, ale i diverzita rodu *Bifidobacterium*.

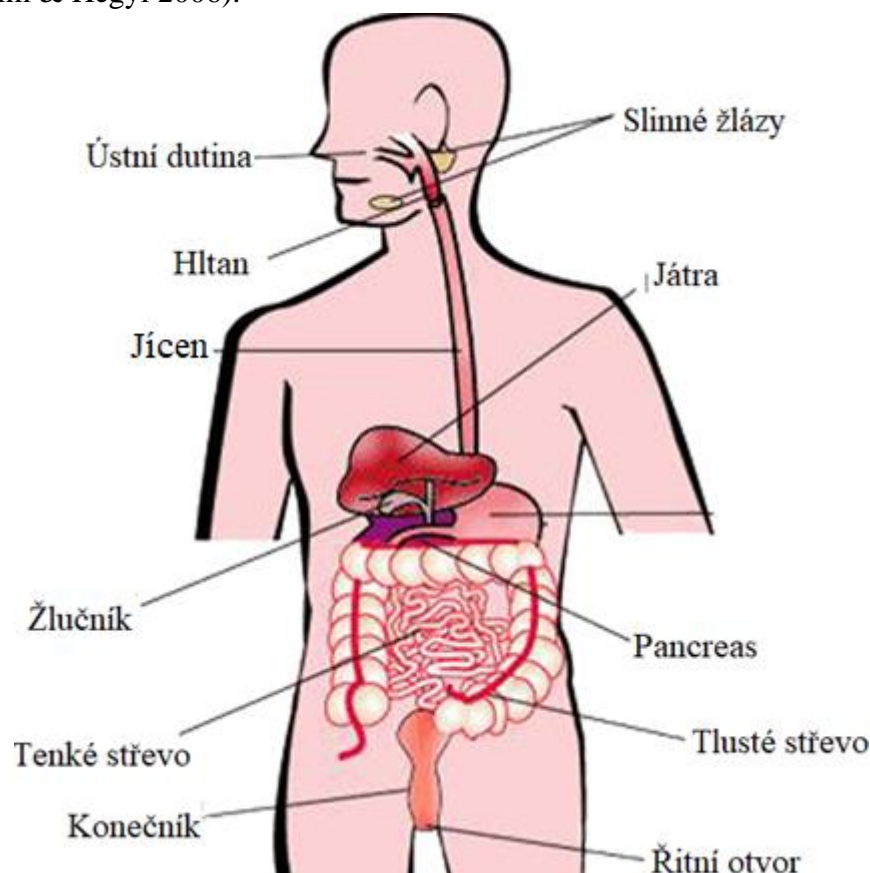
4 Literární rešerše

4.1 Charakteristika gastrointestinálního traktu člověka

U Obrázek 1 je popsána stavba gastrointestinálního traktu člověka. Lidský gastrointestinální trakt se skládá z dutiny ústní, hltanu, jícnu, žaludku, tenkého a tlustého střeva a je zakončen rektumem. K němu je přidruženo i několik nezbytných žláz jako jsou slinné žlázy, pankreas a játra. Oddíly navazující na dutinu ústní jsou ovlivňovány autonomním nervovým systémem (sympatikus a parasympatikus) a jsou tvořeny hladkou svalovinou. Pouze terminální úseky (dutině ústní a konečník) jsou přímo pod volní kontrolou (Wilhelm & Hegyi 2006; Wilhelm 2011).

Zakladní uspořádání trávicí trubice se v různých částech GIT jen nepatrně liší závisle na jejím umístění a funkci. Trávicí trubice může být rozdělena na části, kde dochází primárně k transportu potravy (dutině ústní, hltan, jícen, konečník a řitní otvor) a oblasti, kde je vysoká míra absorpce živin (žaludek, tenké a tlusté střevo) (DeSesso & Jacobson 2001).

Pozitivní vlastnosti komenzálních bakterií se odvíjí na jejich lokalizaci, a proto mohou v různých částech GIT působit zcela jinak, než ve kterých se běžně nachází. Tlusté střevo je obohaceno velkým množstvím komenzální mikrobioty, tudíž i tu probíhá absorpce látek, které byly těmito bakteriemi vytvořeny. Tlusté střevo se dělí na slepé střevo, vzestupný tračník, příčný tračník, sestupný tračník, esovitou kličku, konečník a řitní otvor (DeSesso & Jacobson 2001; Wilhelm & Hegyi 2006).



Obrázek 1: Anatomie gastrointestinálního traktu (Iannitti a Palmieri 2010)

4.1.1 Mikrobiota

Mikrobiota je soubor všech mikroorganismů, které se nachází na a v definované části těla jako například mikrobiota kůže nebo mikrobiota gastrointestinálního traktu. Jedná se o komplexní dynamický ekosystém, který má velký vliv na metabolismus hostitele. Termín mikrobiota vyjadřuje ekologickou komunitu komenzálů a potenciálních patogenů žijících v hostitelském prostředí. Genom veškerých mikrobiálních částic je označován pojmem mikrobiom (Gill S et al. 2006; Frühauf 2017). Skutečnost, že lidské tělo obsahuje 10^{13} - 10^{14} mikrobiálních buněk a až 150-krát více genů než je lidský genom, zrcadluje, jak je mikrobiota v těle hostitele významná (Whitman et al. 1998; Ursell et al. 2012; Frühauf 2017). Mikrobiota zahrnuje široké spektrum domén jako viry (bakteriofágy), archea (methanogeny), eukaryota (*Candida* spp., *Blastocystis* spp.) a bakterie (Walker & Lawley 2013).

4.1.1.1 Osídlení gastrointestinálního traktu mikrobiotou

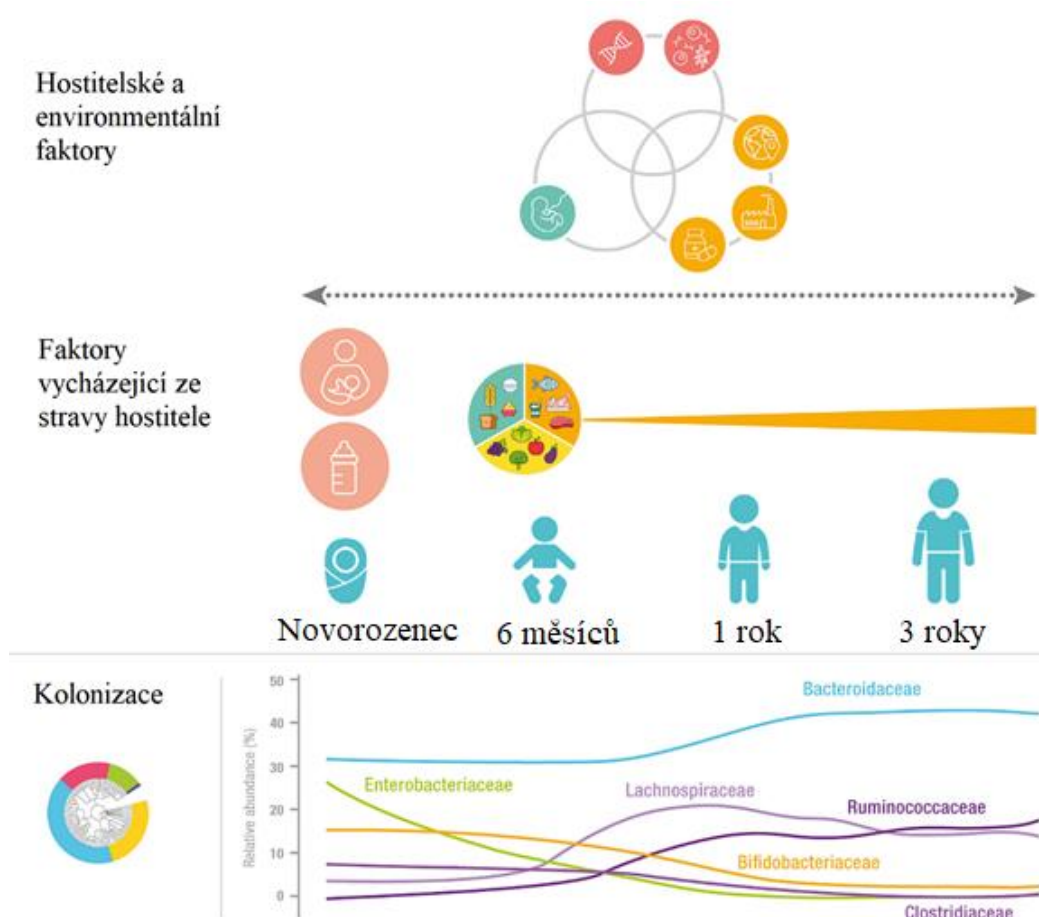
Z hlediska lokalizace je GIT rozdělen na mikrobiom střevní, orální, kožní, dýchacích cest a podobně (Ryšávka 2019). Ústní dutina je bohatá na aeroby i fakultativní anaeroby zahrnující rody *Streptococcus* spp. (*Streptococcus viridans*, *S. pneumoniae*), *Rothia* spp., *Neisseria* spp., *Candida* spp. (*C. albicans*), *Veillonella* spp., *Staphylococcus* spp. (*S. aureus*) a *Actinomyces* spp. V žaludku a dvanáctníku jsou nejvíce zastoupeny laktobacily, bifidobakterie, koliformní bakterie, streptokoky a fusobakterie. Lidské tlusté střevo je velmi složitý ekosystém a je osídlen čtyřmi hlavními kmeny bakterií: gramnegativní *Bacteroides* (zaujímá 16- 23% střevní mikrobioty), grampozitivní *Firmicutes* (49- 76 % střevní mikrobioty), *Actinobacteria* a *Proteobacteria* (Clemente et al. 2012; Matsuoka & Kanai 2015). Do přítomných mikrobiorganismů lze zařadit bifidobakterie (kmen *Actinobacteria*), bakteroidy (kmen *Bacteroidetes*), *Prevotellaceae* (kmen *Bacteroidetes*), laktobacily (kmen *Firmicutes*), enterokoky (kmen *Firmicutes*), streptokoky (kmen *Firmicutes*), klostridie (kmen *Firmicutes*), *Ruminococcaceae* (kmen *Firmicutes*), veilonely (kmen *Firmicutes*), *Roseburia* spp. (kmen *Firmicutes*), eubakterie (kmen *Firmicutes*), stafylokok (kmen *Firmicutes*), kmen *Methanobacteria*, kmen *Fusobacteria*, a kvasinky (Švestka 2007; Lloyd-Price et al. 2016). Mezi proteobakterie tlustého střeva se řadí gramnegativní, fakultativně anaerobní organizmy, jež jsou často oportunistickými patogeny se zástupci *Escherichia* spp., *Hafnia* spp., *Campylobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Helicobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Oxalobacter* spp., *Pseudomonas* spp. a *Proteus* spp. (Walker & Lawley 2013).

4.1.1.2 Rozvoj a modifikace mikrobioty GIT

Mikrobiom a jeho složení je velmi variabilní a je silně ovlivňován zevními faktory, kterým je vystavován hostitel (Ryšávka 2019). Tento ekosystém se dynamicky mění závisle na hostiteli, jeho věku, pohlaví, zdravotním stavu, genotypu a vnějším prostředí (výživa, životní styl, eventuální antibiotikoterapie) (Lee & Sullivan 2010; Frühauf 2017). Mikrobiotu lze modifikovat s použitím vhodných prostředků jako jsou probiotika, synbiotika, antibiotika či změnou stravovacích návyků (Walker a Lawley 2013; Barko et al. 2018).

Lidé jsou narozeni s téměř zcela sterilním vnitřním prostředím a mikrobiální kolonizace nastává až během porodu (D'Argenio & Salvatore 2015). U kojenců narozených císařským

řezem byly pár dnů po porodu detekovány signifikantně vyšší hladiny bakterií typické pro kožní mikrobiotu (*Staphylococcus* spp. a *Propionibacterium* spp.) a nižší hladiny bifidobakterií a laktobacilů ve srovnání s dětmi narozených vaginálním porodem. Zřejmě kvůli kojení nebyly detekovány tak velké rozdíly u množství laktobacilů (Barko et al. 2018; Gregora & Strakonice 2013; Clemente et al. 2012). Slabě vyvinutý mikrobiom jedince může poskytnout prostor oportunistickým mikroorganismům, které přetrvávají až do jednoho roku dítěte (*Haemophilus* spp., *Enterobacter cancerogenus*, *E. hormaechei*, *Veillonella dispar*, *V. parvula* a *Staphylococcus* spp.) (Lloyd-Price et al. 2016). Další vliv na skladbu mikrobiomu má výživa. Oligosacharidy mateřského mléka jsou využity bifidobakteriemi a rodem *Bacteroides*, což je důvodem, jejich vyššího rozšíření v GIT kojenců (Derrien et al. 2019). Rovněž jsou tu velké rozdíly mezi kojenci, jež vyrůstají na mateřském mléku oproti dětem s přísunem mléčných náhražek. U dětí vyrůstajících na mateřském mléku byla nalezena nižší diverzita mikrobioty, avšak mnohem vyšší hladiny rodu *Bifidobacterium* (*B. breve*, *B. bifidum*, zvláště pak *B. longum*) (Walker & Lawley 2013; Derrien et al. 2019). Tento stav se rapidně změní, když je dítě odstaveno a přejde na stravu bohatou na vlákninu a jiné složky potravy. Tato změna je asociována s nárůstem bakteriální diverzity a celkových počtů bakterií, zvýšeného množství krátkých mastných kyselin a převahou rodů *Bacteroides* a kmene *Firmicutes*, které lépe štěpí komplexní sacharidy. Tento vztah je popsán u Obrázek 2 (Clemente et al. 2012b; Walker & Lawley 2013; Lloyd-Price et al. 2016; Derrien et al. 2019). I když mikrobiota každého člověka je jedinečná, tak rozvoj tohoto ekosystému není nahodilý. U příbuzných jedinců bydlící v jedné domácnosti bylo zjištěno podobné složení mikrobioty než u jedinců nepříbuzných. Také platí to, že v rozvinutých zemích je konzistentně přítomná redukováná mikrobiální diverzita gastrointestinálního traktu zřejmě kvůli jídelníčku konstituovaného z velké části tuků, vysoce rafinovaného cukru a nízkého zastoupení vlákniny. A i když je tento stav v rámci generace obnovitelný přechodem na stravu s vysokým podílem vlákniny, tak po čtyřech generacích se tento stav upevní. Tyto rozdíly v lidské dietě mohou být natolik rozdílné, že ovlivňují celé populace. Například děti v Africe oproti evropským dětem mají větší množství *Bacteroidetes* spp. a méně *Firmicutes*, což je zřejmě díky jejich stravě bohaté na vlákninu (Yatsunencko et al. 2012; Clemente et al. 2012b; Walker a Lawley 2013; Derrien et al. 2019).



Obrázek 2: Změny mikrobioty v průběhu lidského života (Derrien et al. 2019)

4.1.1.2.1 Antibiotická léčba

Antibiotická léčba může být vhodná ke snížení počtu patogenních bakterií (např. *Helicobacter pylori*) a zlepšení zdravotního stavu hostitele. Tyto látky mají velký dopad na organismus, což je patrné, když při eradikační antibiotické léčbě dojde k poklesu diverzity střevního mikrobiomu až o 25 %. Avšak při nadměrné aplikaci antibiotik přetrvávají antibioticky rezistentní druhy mikroorganismů, které se mohou začít proliferovat a působit patogenně. Častá antibiotická léčba v raném věku zvyšuje pravděpodobnost vyvinutí Crohnovy choroby a u jedinců s tímto onemocněním má negativní na celkovou strukturu mikrobioty. Vysoká expozice antibiotik může indukovat dysbiózu, jež je definovaná jako abnormální poměr mezi prospěšnými a patogenními mikroorganismy (Comito et al. 2014; Bäckhed et al. 2012). Tato pozměněná rovnováha v ekosystému a úbytek ochranných mikrobů má za následek sekundární kolonizaci a proliferaci potencionálně škodlivých bakteriálních druhů jako například *Clostridium difficile*, jehož toxiny vyvolávají kolitidy (Bäckhed et al. 2012; Matsuoka & Kanai 2015; Gevers et al. 2017; Frühauf 2017; Ryšávka 2019).

4.1.1.2.2 Prebiotika

Prebiotika jsou definované jako nestravitelné složky stravy, které slouží jako substrát pro růst komenzální mikrobioty hostitele, a jsou tudíž prospěšné pro jeho zdraví (GIT, stimulace imunity, inhibice patogenů). Aplikací prebiotik mohou být ovlivněny prospěšné druhy bakterií, ale i druhy na které daná prebiotika nejsou zcela cílena (Ventura et al. 2007; Walker & Lawley

2013; Gibson et al. 2017; Cremon et al. 2018). Cíl aplikace prebiotik je podpora probiotických rodů jako bifidobakterie, laktobacily, *Roseburia* spp., *Eubacterium* spp., *Faecalibacterium* spp. a dalších (Cremon et al. 2018). Vliv prebiotik na zdraví hostitele musí být prokázán v cílovém organismu a zdravotní účinky zprostředkován hostitelskou mikrobiotou (Gibson et al. 2017).

Prebiotika jsou součástí běžné stravy hostitele skládající se převážně z neškrobnatých polysacharidů a oligosacharidů (Cremon et al. 2018). Patří do nich inulin, neškrobnaté polysacharidy, disaccharidy (laktulóza), inulin, arabinoxylany (AX), fruktooligosacharidy (FOS) a galaktooligosacharidy (GOS). Prebiotický efekt na bifidobakterie byl zaznamenán u FOS, GOS, AX, inulinu a laktulózy (Walker & Lawley 2013; O'Callaghan & van Sinderen 2016; Barko et al. 2018). Dalšími prebiotiky jsou oligosacharidy mateřského mléka (HMO), jež jsou produkovány mléčnou žlázou. Jsou to komplexní nekonjugované glykany, které jsou důležitým substrátem komenzálních bakterií přítomné zvláště u novorozenců. Jsou odolné vůči gastrointestinálnímu trávení a jejich přítomnost v tlustém střevu zřejmě slouží jako selektivní živný substrát pro bifidobakterie. Utilizace HMO tímto rodem se u jednotlivých druhů liší: *B. longum* subsp. *infantis* je zvládá nejlépe degradovat, *B. bifidum* naproti němu HMO zpracovává extracelulárně a v menším rozsahu, *B. breve* a *B. longum* subsp. *longum* využívají pouze malou část těchto prebiotik (Bottacini et al. 2017). Prebiotika jsou směsí polysacharidů, u nichž je obtížně určit jejich štěpné produkty, které by byly využitelné pro intestinální mikrobiotu. Proto je u nich obtížně určit účinnou dávku. Denní dávka tohoto substrátu je odhadována na 1- 3 g/den u dětí a 10- 15 g/den u dospělých (Frič 2010).

Prebiotika jsou fermentovány bakteriemi tlustého střeva a přetvořeny na výsledné produkty jako mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které slouží jako výživa intestinálnímu epitelium. Rovněž indukují protizánětlivé látky a snižují lumenální pH, čímž se podílí na ochraně hostitele proti infekci (Walker & Lawley 2013; Barko et al. 2018). Další pozitivní vlastností této skupiny je podpora absorpce iontů a stopových prvků jako je vápník, železo a hořčík (Cremon et al. 2018).

Prebiotika jsou předmětem studia kvůli svému vysokému potenciálu posílit zdravotní stav hostitele, předejít či řešit intestinální choroby a modifikovat intestinální mikrobiotu (Bäckhed et al. 2012). Imunitní systém hostitele je posilován možným zvýšením produkce IgA či modulací produkce cytokinů. Aplikace prebiotik je možná u zánětlivých střevních onemocněních, konstipace, celkového zdravotního stavu GIT rizikové populace (novorozenci; a starší generace), alergií, hepatické encefalopatie, průjmových cestovatelských nemocí, zánětlivá střevní onemocnění, urogenitální zdraví a metabolické zdraví (obezita či podvýživa). Aplikace prebiotik u zánětlivých střevních onemocněních není vždy zcela žádoucí kvůli možné produkci plynů z jejich fermentace, která hostiteli může přinést zhoršení jeho symptomů. Dalším úskalím je aplikace prebiotik u jedinců se sníženou bakteriální diverzitou, kdy s nově dostupným substrátem může získat převahu patogenní mikrobiota. Bylo zjištěno, že prebiotika jako galaktooligosacharidy a fruktooligosacharidy podporují růst jak komenzálních rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, tak i potenciálně patogenních (*E. coli*, klostridie). Proto je doporučováno podávat spolu s nimi probiotika (probiotika + prebitotika = synbiotika), které společně s nimi podporují růst komenzálních mikrobů (Bunešová et al. 2012; Cremon et al. 2018).

4.1.1.2.3 Probiotika

Probiotika jsou definované jako žijící mikroorganismy, které ve vhodném množství jsou pro hostitele prospěšné (Barko et al. 2018). Probiotika jsou předmětem studia kvůli svému vysokému potenciálu posílit zdraví hostitele, modifikovat střevní mikrobiotu a předejít či řešit intestinální choroby (Bäckhed et al. 2012). Je několik základních znaků, jež by daný mikroorganismus měl splňovat: podrobnou definici, odolnost k trávicím sekretům, schopnost přežít v dostatečném množství v hostitelském prostředí (HCl a trávicí enzymy v žaludku; trávicí šťávy a žluč ve střevech a rozdíly v pH) a zahrnovat mechanismy sloužící k adhezi ke střevnímu epitelu; antagonismus vůči patogenům, žádné patogenní vlastnosti a celkovou bezpečnost; příznivý účinek na zdraví hostitele a rezistenci vůči technologickým metodám jako je lyofilizace a snadnost obstarání vyššího množství mikrobiální hmoty. Lidský původ je žádoucí, ale není podmínkou (Biavati et al. 2000; FAO 2006; Frič 2010; Hill et al. 2014; Barko et al. 2018). Jako probiotika jsou běžně využívány bifidobakterie, laktobacily, *Bacteroides fragilis*, *Bacillus* spp. (*Bacillus coagulans*), *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. (*E. faecium*) *Saccharomyces boulardii* a některé nepatogenní druhy *Echerichia coli* (Frič 2010; Barko et al. 2018). Probiotické druhy se podílí na kompetici s ostatní mikrobiotou GIT o možné živiny, životní prostředí či přímo produkují látky, jež mají vliv na pokles potenciálních patogenů (Fuller & Gibson 1998).

Mezi vlastnosti a funkce probiotik patří kompetice s patogenními mikroby v adhezi na střevní epitel a po-tenciace imunitní odpovědi na patogeny. Tímto způsobem se mikrobiální druhy podílí na imunitní odpovědi a její regulaci. Dále mikroorganismy produkují peptidické sloučeniny s bakteriostatickými účinky (mikrociny, koliciny, bakteriociny a lanthanoidy) a podílí se na modulaci střevní mikrobioty. Také se podílí na metabolizaci mnohých látek, které jsou přeměňovány na produkty, z nichž samy čerpají energii, nebo jsou lépe vstřebatelné pro hostitele, čímž se mohou podílet na eliminaci toxinů. Jedním z příkladů je produkce krátkých mastných kyselin či tvorba steroidů z cholesterolu (Frič 2010; Cremon et al. 2018). Dalším pozitivním významem probiotik je jejich vliv na střevní funkce, jež zahrnuje vstřebávání, motilitu, sekreci a splachnickou cirkulaci (Frič 2010).

Mezi klinickou aplikací těchto látek se řadí podpora léčby idiopatických střevních zánětů (IC, UC, CD), infekční enterokolitidy a intolerance laktózy (Frič 2010; Rossi et al. 2016a; Cremon et al. 2018). Kvůli velké škále probiotických druhů, kmenů a jejich dávkování nelze obecně doporučit konkrétní strategii aplikace probiotik u IBD a zaručit její efektivitu vlivu na IBD (Rafieian-kopaei 2017; Cremon et al. 2018). Podle studie vedené Rafieian-kopaei (2017) by aplikace probiotik *Lactobacillus* GG a VSL#3 mohla mít podstatný vliv u pacientů s CD zejména po operačním zákroku. Nicméně mnoho studií (Derwa et al. 2017a; Derwa et al. 2017b; Eom et al. 2018) odkazuje na to, že aplikace probiotik u CD nemá prokazatelný příznivý vliv na vyvolání remise či zábraně relapsu v porovnání s placebem. Derwa et al. (2017b) a Eom et al. (2018) popsali pozitivní vliv VSL#3 na nastolení remise u aktivní formy UC a téměř podobnou efektivitu jako kyselina 5-aminosalicylová (5-ASA) v prevenci relapsu. Podobný vliv na nastolení remise u UC a pouchitidy měl kmen *E. coli* Nissle 1917 (Wasilewska & Wroblewska 2018). Studie vedené Derwa et al. (2017) či Dore et al. (2019) nezaznamenaly žádný nepříznivý vliv na IBD při podání probiotik ve srovnání s placebem či 5-ASA, a probiotika se zdají bezpečná při podpoře léčby IBD (Derwa et al. 2017b). Je nutné však vzít v úvahu možné nebezpečí bakteriémie (kvůli možné translokaci ze střevního lumenu do

krevního řečiště) vyvolanou probiotiky u imunosupresovaných pacientů s aktivní vážnou formou IBD a vždy před podáním probiotika zvážit míru aktivity nemoci, předcházející infekce pacienta a pacientovu léčbu (Vahabnezhad et al. 2013; Wasilewska a Wroblewska 2018).

Aplikace probiotik má významnou funkci při obnově mikrobiální rovnováhy (například při léčbě infekce z důvodu *Helicobacter pylori*), při a po antibiotické léčbě či onemocnění jako jsou enterokolitidy (příčinou bývají často viry (retroviry) nebo *Clostridium difficile*). Možná prevence akutní formy průjmového onemocnění či formy způsobenou *Clostridium difficile* pomocí probiotik je slibná, ale zatím není dostatečně popsána. Probiotika by mohly být uplaněny i u léčby jaterních chorob, kdy štěpí nevstřebatelné cukry a vytváří krátké mastné kyseliny. Jejich přítomností je sníženo pH v játrech, jež má vliv na pokles množství mikrobioty spolu s poklesem toxických produktů, zejména amoniaku tvořícího se ve střevech (Švestka 2007; Cremon et al. 2018). Podání druhů *Lactobacillus rhamnosus GG*, *S. boulardii* a *L. reuterii* při akutní gastroenteritidě snížilo dobu trvání nemoci přibližně o jeden den a u kojeneckých kolik byl redukován s nimi spojený neklid. Dále určité druhy laktobacilů (*L. rhamnosus GG*, *L. reuteri*) mohou sloužit jako prevence průjmových potíží spojených s podáváním antibiotik či jako prevence infekce spojené s nehygienickým prostředím (cestovatelské průjmové onemocnění) (Frühauf 2017). U kojenců je rovněž kritické nastolit zdravou mikrobiotu, což může být docíleno obohacením GIT synbiotickými rody jako jsou *Bacteroides* spp., *Parabacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. a druhem *Faecalibacterium prausnitzii*. Ty jsou významnými producenty krátkých mastných kyselin, jež jsou významným zdrojem energie, mají imunomodulační vlastnosti a podílí se na inhibici běžných patogenů (Lloyd-Price et al. 2016).

U zánětlivých střevních onemocnění, aplikace probiotik má pozitivní dopad na zdravotní stav hostitele svou kompeticí s patogenními druhy, zlepšením funkce střevní bariéry (snížení propustnosti, zvýšená tvorba kátkých MK a mucinu) a úpravou regulace slizničního imunitního systému (indukce syntézy a exprese určitých imunitních signálních molekul –IL-10, TGF- β , IgA, a snížení exprese TNF- α). U zánětlivých střevních onemocnění lze v závislosti na průběhu a aktivitě choroby vhodně kombinovat účinky probiotik, prebiotik a antibiotik (Frič 2010). Byla zjištěna zvýšená účinnost při podání různých probiotik zejména v kombinaci s protizánětlivým lékem v léčbě a prevenci těchto onemocnění (Švestka 2007). Ve stádiu remise mírné či slabé formy ulcerózní kolitidy je doporučováno suplementovat probiotiky jako je *E. coli* Nissle 1917, která pomáhají udržovat tento stav (Cremon et al. 2018). U léčby těchto onemocnění se bohužel zatím neví, jaká probiotika by byla pro podporu léčby vhodná a tudíž je to předmětem výzkumů (Frühauf 2017).

Účinnost probiotik je závislá na množství mikrobiálních entit v cílové lokalizaci. Za fyziologický účinek je považována koncentrace 10^8 KTJ/g preparátu, pro terapeutický účinek je koncentrace minimálně 10^{10} KTJ/g. Bohužel nelze s přesností říct, jaké množství fyziologicky životaschopných mikroorganismů se doopravdy dostane do cílového místa. Celkový efekt je ovlivněn mnoha faktory zahrnující kvalitu ochranného obalu, účinku trávicích sekretů hostitele a funkčních vlastností komenzálních mikrobů. Probiotika obsahující živé mikroby se doporučuje uchovávat při teplotách do 8°C, přičemž jejich expirační doba je zpravidla kratší než u farmak užívaných ve stejné indikaci (Švestka 2007; Frič 2010). Podle pokynů FAO by měli producenti probiotik registrovat jejich konkrétní bakteriální kmeny u mezinárodních úschoven kvůli různorodým vlastnostem jednotlivých kmenů, které v konečném důsledku

mohou značně ovlivnit jeho aktivitu v těle hostitele (antimikrobiální, imunomodulační, neurologické a endokrinní vlastnosti) (FAO 2006; Cremon et al. 2018).

4.1.1.2.4 Synbiotika

Synbiotiky jsou kombinované preparáty prebiotik a probiotik, jež mají pozitivní dopad na střevní mikrobiotu. Těmito přípravky jsou zároveň navyšovány počty probiotických bakterií a je jim dodán potřebný živný substrát. Tímto způsobem je zajištěna ochrana GIT před možnou proliferací patogenních druhů (Frič 2010; Cremon et al. 2018). Obě dvě složky synbiotik by měly být kombinovány v účinném poměru a prebiotikum by mělo mít prokazatelný pozitivní vliv na uplatněné probiotikum. Kýžený efekt se dostavuje například kombinací frukto-oligosacharidů s bifidobakteriemi či laktikol s laktobacily (Bronský 2010).

Další způsob, jak lze modifikovat střevní mikrobiotu je fekální bakterioterapie, kdy se hostiteli podá celková komplexní mikrobiota izolovaná z fekálního vzorku. Ta se využívá například u rekurentních závažných průjemových onemocnění způsobených *Clostridium difficile*, který je rezistentní na antibiotika. Tato léčba pomůže nastolit celkovou stabilitu střevního mikrobiomu a diverzitu, kdy pacienti mají snížené množství fekálních *Bacteroides* a *Firmicutes*. Pozitivní je, že zhruba 90 % pacientů je po tomto zákroku vyléčeno. Dokonce je tento postup zvažován jako možná léčba opakovaných zánětlivých střevních onemocněních (Bäckhed et al. 2012; Barko et al. 2018).

4.1.1.3 Složení intestinální mikrobioty ve zdraví a během nemoci

Diverzita mikrobioty v konkrétním prostředí označuje množství a hojnost rozložení určitého typu mikroorganismu a je spojena s několika lidskými onemocněními. Nízká diverzita v gastrointestinálním traktu, je rozšířená u obou typů diabetes, obezity a Crohnovy choroby. Naproti tomu vysoká různorodost v poševní oblasti je znakem bakteriální vaginální infekce (Lloyd-Price et al. 2016). U lidí s průjemovými potížemi byly značně sníženy počty komenzálních bakterií jako *Escherichia coli*, určité druhy enterokoků (*E. faecium*, *E. casseliflavus*) a anaerobů (*Bacteroides uniformis* a *B. vulgatus*, *Clostridium bifermetas*, *C. orbiscindens*, *C. perfringens*, *C. symbosium* a *C. glycolycum*). Rovněž byl patrný nárůst rodu *Bacillus* spp. (*B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. mojavensis* a *B. pumilus*). Vzrostly i počty nežádoucích bakterií jako *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* a *Streptococcus anginosus* (Hugon et al. 2014; Schäffler et al. 2016).

Tabulka 11 hlouběji rozebírá změny mikrobioty ve spojení s uvedenými onemocněními. Definice zdravé mikrobioty je důležitá v léčbě a prevenci onemocnění mikrobiálního původu. Termín „zdravý“ označuje stav organismu bez zjevné choroby. Složení mikrobioty je dynamický proces a ekologická diverzity mezi zdravými jedinci se liší, proto charakterizace obecného zdravého mikrobiomu je náročná. Zdravý mikrobiom by neměl kódovat látky škodlivé pro hostitele nebo by tyto vlastnosti měly být dobře regulované hostitelem. Další vlastností je odolnost a adaptabilita ke změnám prostředí (výživa, ontogenetický vývoj hostitele aj.) či syntéza látek, kterým hostitele obohacuje a přináší potencionální základ pro symbiotický vztah (Lloyd-Price et al. 2016). Zdravé společenství je stabilní, tudíž schopné odolávat změnám vyvolané ekologickým stresem a vrátit se zpět do původního rovnovážného stavu (Bäckhed et

al. 2012). *Helicobacter pylori* je dobrým příkladem toho, že definice zdravé mikrobioty je obtížná. Přítomnost *H. pylori* zvyšuje pravděpodobnost vývinu žaludečních vředů a karcinomu žaludku. Zároveň jeho přítomnost snižuje gastroezofageální reflux a dětské astma, což je v tomto ohledu přínosné (Cho & Blaser 2012). Mezi prospěšné bakteriální druhy můžeme řadit výše zmíněné probiotické rody (Lynch & Pedersen 2016).

Tabulka 1: Změny v mikrobiotě GIT spojené s onemocněními

(Clemente et al. 2012; Cho a Blaser 2012)

Onemocnění	Konkrétní změny v přítomné mikrobiotě	Obecná charakteristika změn mikrobioty
Alergie	<i>Lactobacillus</i> spp. ↓ <i>Bifidobacterium adolescentis</i> ↓ <i>Clostridium difficile</i> ↓ <i>Helicobacter pylori</i> ↓	Brzká kolonizace GIT laktobacily a časně osídlení mikrobiotou s vyšší diverzitou je spojováno se zmírněním alergií
Celiakie	<i>Bacteroides vulgatus</i> ↑ <i>Echerichia coli</i> ↓ <i>Clostridium coccooides</i> ↓	U pacientů s celiakií se nachází vyšší diverzita intestinální mikrobioty
Karcinom žaludku	<i>H. pylori</i> ↑	<i>H. pylori</i> je spojován s tvorbou gastrických adenokarcinomů
Obezita	<i>Bacteroides</i> ↓ <i>Lactobacillus</i> ↑ Podíl Firmicutes/Bacteroidetes ↓ <i>Methanobrevibacter smithii</i> ↓	S obezitou jsou spojeny velké změny ve složení střevní mikrobioty.
Anorexie	<i>Methanobrevibacter smithii</i> ↑	<i>Bacteroidetes</i> , <i>Firmicutes</i> a <i>Lactobacillus</i> spp. jsou podobně zastoupeny jako u štíhlých pacientů
Zánětlivá střevní onemocnění	<i>Bacteroidetes</i> ↓ <i>Lachnospiraceae</i> ↓ <i>Actinobacteria</i> ↑ <i>Proteobacteria</i> ↑ <i>Clostridium leptum</i> ↓ <i>Clostridium coccooides</i> ↓ <i>Faecalibacterium prasnityii</i> ↓ Podíl Firmicutes/Bacteroidetes ↓ Bifidobakterie ↓	Zánětlivá střevní onemocnění jsou spjata s celkovou dysbiózou.
Crohnova nemoc	<i>Bacteroides ovatis</i> ↓ <i>Bacteroides vulgatus</i> ↓ <i>Bacteroides uniformis</i> ↓	U pacientů s CD se vyskytuje celková nižší mikrobiální diverzita
Diabetes 2. typu	Firmicutes ↓ <i>Clostridium</i> spp. ↓ <i>Betaoroteobacteria</i> ↑ Podíl Firmicutes/Bacteroidetes ↑	Změny mikrobioty GIT jsou spjaté s hladinou glukózy v krevní plazmě

4.1.1.4 Zdravotní přínosy mikrobioty

Střevní mikrobiota může pozitivně působit na hostitele. Střevní mikrobiotou je vykonáváno hned několik důležitých rolí zahrnujících: metabolismus nutričních složek a cholesterolu, enteropatický cyklus žlučových kyselin, syntézu vitamínů (vitamín K, vitamíny skupiny B), střevní pohyby a modulaci imunitního systému. Mezi hlavní důsledky patří štěpení komplexních sacharidů, tudíž zpřístupnění živin a tvorba mastných kyselin s krátkým řetězcem (kyselina octová, propionová a butyrová). Tímto způsobem je zvyšována rychlost proliferace střevního epitelu, je posilována jeho integrita spolu s regulací diferenciací buněk, čím je sníženo karcinogenní riziko. Dalšími poli působnosti je ochrana proti patogenům a modulace imunitního systému. Pomocí bakteriálních signálů určených imunitnímu systému GIT má mikrobiota vliv na kontrolu lokálních i systematických zánětů. Zároveň se mikrobiota podílí na neutralizaci toxických metabolitů utvářených játry a tím na detoxikaci organismu (Comito et al. 2014; Frühauf 2017).

4.2 Zánětlivá střevní onemocnění

Zánětlivá střevní onemocnění (IBD) jsou chronická navracející se onemocnění postihující gastrointestinální trakt, přičemž nejvíce postiženými skupinami jsou lidé ve věku 15-25 let a 50-80 roků. Korelace mezi IBD a pohlavím nebyla prokázána. Do zánětlivých střevních onemocnění spadá ulcerózní kolitida (UC), Chrohnova choroba (CD) a interdeterminovaná kolitida (IC), která má znaky na pomezí CD a UC. Tato onemocnění jsou velmi vysilující a často bolestivé s negativním dopadem na celkový stav pacienta, proto je nezbytná včasná léčba. Příčina těchto onemocnění není dosud známá. Projev zánětlivých střevních onemocnění lze ve zkratce uvést jako selhání schopnosti regulovat imunitní odpovědi a útlum tolerogenní reakce slizničního imunitního systému na antigenní substance vyskytující se ve střevním obsahu (mikrobi, kvasinky, či antigeny jiné povahy) u geneticky disponovaného jedince. To je patrně kvůli chybnému rozeznání molekulárních vlastností zdravé či patogenní mikrobioty GIT a s tím spojeným abnormálním vylučováním antimikrobiálních látek. U IBD dochází nejspíše k polygennímu typu dědičnosti (detekováno více než 60 genových lokusů), kdy se vnější vlivy (prostředí, stres, kouření, antibiotikoterapie, výživa, infekce aj.) podílí na roli spouštěče (Lukáš 2009; Frič 2010; Ehrmann & Konečný 2011; Mitrová 2012; Matsuoka & Kanai 2015). U IBD není prokázán přenos onemocnění z pacienta na druhou osobu, avšak byla popsána kolerace nižšího výskytu IBD v zemích s nízkou incidencí střevních nemocí a nízkou hygienickou úrovní (Shanahan 2002; Ehrmann & Konečný 2011).

U jedinců, jejichž mikrobiota se neliší od zdravé populace, IBD nemůže vzniknout. Proto je dysbióza nejvíce pozorovaným parametrem této nemoci, ale zatím se neví, zda je příčinou či následkem IBD. Příkladem dysbiózy přítomné u IBD je rodový a druhový nárůst kmenu *Proteobacteria*, *Actionbacteria* a úbytek kmenu *Bacteroidetes* (*Bacteroides fragilis*) a *Firmicutes* (*Faecalibacterium prausnitzii*) (Frič 2010; Ehrmann & Konečný 2011; Bäckhed et al. 2012; Comito et al. 2014; Matsuoka & Kanai 2015; Alhagamhmad et al. 2019). Za původce dysbiózy jsou považovány rody a druhy *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas*, *Peptostreptococcus* a enteroinvazivní kmeny *Escherichia coli*. Zánětlivá odpověď GIT je spouštěna a udržována střevní mikrobiotou, proto je k léčbě

doporučována změna a regulace hostitelského mikrobiálního prostředí. Kvůli tomu jsou důkladně studovány příčiny dysbiózy jako způsob porodu, opakovaná antibiotikoterapie v dětství, umělá výživa kojenců, způsob a skladování potravin či hygienická úroveň v postižených rodinách (Frič 2010; Ehrmann & Konečný 2011). Rovněž léčba může být zaměřena na cílenou modifikaci intestinální mikrobioty pomocí prebiotik, probiotik, či antibiotik (Lukáš 2009).

Pro zánětlivá střevní onemocnění neexistuje žádná definitivní léčba. Je zaměřena hlavně na léčbu relapsu (aktivní stádium nemoci provázené zhoršením zánětů) a na nastolení a udržení remise (klidové stádium nemoci), hojení intestinální sliznice, léčbu komplikací, potlačení symptomů IBD a zvýšení celkové kvality života pacienta. Léčba je dlouhodobá a kombinovaná, aby se předešlo nežádoucím vedlejším účinkům. Terapie závisí na typu a aktivitě nemoci a lze ji podle toho intenzifikovat či přizpůsobovat jednotlivým požadavkům (Lukáš 2011; Šachlová 2011; Mitrová 2012; Občanské sdružení pacientů s idiopatickými střevními záněty et al. 2016; Dujsíková 2018).

V období remise je nasazena udržovací léčba, jejíž základem je konzervativní (medikamentózní) terapie do níž spadají aminosalicyláty, imunosupresiva a biologická léčba. Během komplikací a relapsu dochází k nasazení intenzivní terapie jako aminosalicyláty, biologická léčba, kortikoidy či antibiotika. Cílem léčby v období relapsu, je co nejrychleji potlačit zánětlivou aktivitu a zajistit ústup symptomů nemoci (Lukáš 2009; Ehrmann & Konečný 2011; Lukáš 2011; Mitrová 2012; Dujsíková 2018).

4.2.1 Crohnova choroba

Crohnova choroba (CD) je autoimunitní onemocnění, které může postihnout jakoukoli část gastrointestinálního traktu. Kvůli možnému rozšíření CD do všech částí GIT, je důležitá endoskopie horní a dolní části GIT, což zahrnuje esofagogastroduodenoskopii a kolonoskopii s intubací terminálního ilea. V případě prohlídky tračníku, je kolonoskopie spjata s biopsií. U lokalizace v tenkém střevě je aplikována magnetická rezonance případně i enteroskopie. Další metody (např. zobrazovací) slouží k vyloučení komplikací a přesnější diagnostice (Ehrmann & Konečný 2011; Mitrová 2012).

Průběh CD může být indolentní, fibrotizující, stenozující či agresivní. Příznaky Crohnovy choroby se liší v závislosti na lokalizaci nemoci a jejím vývoji. Tato nemoc je typická přítomností segmentálního (prolínání zdravých a nemocných úseků), granulomatózního, transmuralního zánětu procházející celou intestinální stěnou GIT, přičemž počáteční drobné roztroušené mělké ulcerace (vředy) mohou vést ke zvětšeným vředovým formacím. Kvůli tomu, že zánět může prostupovat celou stěnou střeva, mohou se objevovat jisté komplikace jako perforace střeva (píštěle), abscesy, stenotické úseky, zhoršená peristaltika střev či intestinální krvácení. Nejčastěji je postihována oblast ileocekální (45- 60% incidence) a tračnicková (25- 45 %). Postižení pouze tenkého střeva (5- 15 %), atypických lokalit jako dutina ústní, jícen nebo žaludek (do 5 %) či výlučně oblasti konečníku spolu s anální oblastí (5 %) se pohybuje v rámci incidence u CD až na posledním místě (Ehrmann & Konečný 2011; Mitrová 2012; Urbanska et al. 2016; Dujsíková 2018).

Pokud je postižena oblast terminálního ilea, dochází často k bolesti břicha (hlavně v oblasti pravého podbřišku), nechutenství, úbytku na hmotnosti a poruše růstu. V případě

lokalizace v tlustém střevě, pacient trpí průjmovitou stolicí a enterorhagií. Postižení horní části gastrointestinálního traktu je doprovázeno symptomy jako nevolnost nebo zvracení. Při lokalizaci v perianální oblasti je tato nemoc doprovázena možnou manifestací různých modifikací alimentární trubice (píštěle, fisury, enterorhagie, abscesy či strážné hrbolky) (Ehrmann & Konečný 2011; Mitrová 2012).

Dysbióza přítomna u CD je velmi značná a dokonce mnohem vyšší než u ulcerózní kolitidy (Pascal et al. 2017). Běžnými příznaky CD je snížená bakteriální diverzita, vyšší míra dočasné nestability ekosystému, snížení hojnosti komenzálních bakterií jako *Bacteroides*, *Firmicutes* (*Faecalibacterium prausnitzii*, laktobacily), *Veillonellaceae* (*Dialiooster*), *Roseburia* (*R. faecis*), *Coprococcus*, *Gemmiger* (*G. Formicilis*), *Ruminococcus bromii*, a bifidobakterií. Mnozí z těchto komenzálů (*Roseburia*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*) produkují krátké mastné kyseliny. U jedince s CD jich může být nedostatek. U CD se vyskytovaly zvýšené počty proteobakterií, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium perfringens*, *Ruminococcus gnavus* či *Bacteroides fragilis* (Walker & Lawley 2013; Alhagamhmad et al. 2019). Zvýšené počty *Enterobacteriaceae* u IBD indikují pouze CD. Snížené množství ileálních *Faecalibacterium prausnitzii* je spojeno s vysokou pravděpodobností raného vývinu aktivní ileální formy CD či relapsu. Mikrobiální změny mohou poukazovat na průběh nemoci, a proto mohou poskytnout vhodný nástroj včasné prognózy průběhu CD (Fujimori et al. 2007; Comito et al. 2014; Alhagamhmad et al. 2019; Kowalska-Duplaga et al. 2019).

4.2.2 Ulcerózní kolitida

Ulcerózní kolitida (UC) se projevuje vředy a hemoragicko-katarálními záněty intestinální sliznice v oblasti tlustého střeva a/nebo konečníku. U dětských pacientů může dojít k opoždění puberty, poruše růstu (zejména u těžké pankolitidy) a úbytek na hmotnosti není běžně závažný. Hepatobilirní komplikace zahrnují u UC sklerózující cholangitidu (Mitrová 2012). V rámci diagnostiky UC, se laboratorně stanovuje přítomnost protilátek proti neutrofilním leukocytům. Mezi další metody diagnostiky je často řazena endoskopie, kdy u UC je stěžejní nález při kolonoskopii. K té je doporučováno i dodatečné vyšetření horní části GIT kvůli kompletní diagnostice, které může být doplněno histologickými poznatky. Další metody jsou využívány k vyloučení komplikací (Ehrmann & Konečný 2011; Mitrová 2012)

Pro UC je typické, že vždy postihuje konečník, postupuje orálním směrem a kolon může postihnout jen zčásti nebo i zcela. Toto onemocnění může být děleno na různé typy dle jeho rozsahu. Typ E1 (ohraničený typ) postihuje konečník a distální části *pars descendens*, E2 působí i v levém tračníku a E3 je pankolitida. Pankolitida postihuje celý rozsah kolonu a projevuje se nejčastěji u dětí. Při proktokolitidě je postiženo rektum a nepřesahuje za lienální ohbí. U extenzivního tvaru je přesáhnuo lienální ohbí orálním směrem. Při fulminantní kolitidě zánět napadá všechny intestinální vrstvy, hrozí střevní paralýza či perforace a již ohrožuje život pacienta. U UC po odstranění tlustého střeva může vzniknout zánět vaku vytvořeného z tenkých kliček, jež se nazývá pouchitida. UC může mít několik typů průběhů jako intermitující, remitující nebo epizodický. Ulcerózní kolitida může být doprovázena bolestí břicha, krvácením konečníku, ztrátou hmotnosti, horečkami, anémií, únavou či tenezmy (Ehrmann & Konečný 2011; Mitrová 2012; Urbanska et al. 2016; Dujsíková 2018).

UC je onemocnění, jehož zánětlivé příznaky a morfologické změny sídlí primárně v tlustém střevu. Střevní mikrobiota u pacientů s touto nemocí je značně narušena a je podobná dalším jiným zánětlivým střevním onemocněním (Walker & Lawley 2013).

4.2.3 Rozdíly mezi Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou

UC a CD patří do zánětlivých střevních onemocnění a v několika ohledech mají hodně společného. Vyskytují se tu však důležité rozdíly, o nichž pojednává.

Tabulka 22 zmiňuje roli výživových doplňků při léčbě.

Tabulka 2: Rozdíly mezi Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou

Sledovaný znak	Specifika u CD	Specifika u UC
Postižení GIT	Může být u jakékoli části GIT	Oblast tlustého střeva, vždy konečníku Postupuje aborálním směrem
Symptomy	Může být zvracení, autoimunitní hepatitida	Může být sklerózující cholangitida
Změny v mikrobiotě	Zvýšené počty <i>Enterobacteriaceae</i> , horší stav dysbiózy než u UCs	Podobná mikrobiota jako u IBD
Výživové doplňky	U probiotik nebyl prokázán větší vliv na nemoc	Probiotika mají příznivý vliv na UC
	Při relapsu bezzbytková dieta	Probiotika snižují počet relapsů
	Při relapsu exkluzivní enterální výživa	Probiotika zlepšují endoskopické nálezy Dieta podobná jiným u IBD

4.3 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie se řadí mezi komnzální skupinu bakterií mikrobioty trávicího traktu. Jejich přítomnost ve vysokých počtech je spojena se zdravotním přínosem, což vede k jejich použití jako probiotik (Bottacini et al. 2017). U lidí s CD byl zaznamenán jejich snížený výskyt či absence (Alhagamhmad et al. 2016).

4.3.1 Morfologie a fyziologie

Bifidobakterie patří mezi nesporulující a nepohyblivé grampozitivní bakterie. Složení buněčné stěny je typické pro grampozitivní bakterie. *Bifidobacterium* spp. je anaerobní, nebo fakultativně anaerobní a kataláza negativní. Bifidobakterie mají tvar buňky podobající se „Y“ či „V“ tvaru. Nízká koncentrace N-acetylaminosacharidů, vápenatých iontů či určitých aminokyselin (alanin, glutamová kyselina, serin) v kultivačním médiu, mohou vyvolat změny tohoto typického tvaru (Biavati et al. 2000; Lee & Sullivan 2010).

Hlavními fyziologickými znaky bifidobakterií je sacharolytický typ metabolismu, nulová schopnost tvořit plyn a negativní kataláza. Optimální podmínky růstu pro bifidobakterie zahrnuje anaerobní prostředí, pH v rozmezí mezi 6,0 a 7,5 a teplotu 37-41 °C. Při teplotách nižších 20 °C a vyšších 46 °C je zastaven jejich růst s výjimkou *B. callitrichidarum*, pro něhož je teplotní optimum 45 °C či *Bifidobacterium thermacidophilum*, který je schopen růstu dokonce při 49,5 °C. Některé druhy bifidobakterií jsou tolerantní i vůči vyšší aciditě (*B. samirii* a *B. callimiconis* jsou schopny růst při pH 4-6). Při pH pod 4,0 a nad 8,0 bifidobakterie nejsou

schopny růst (Biavati et al. 2000; Alp & Aslim 2010; Modesto et al. 2018; Duranti et al. 2019; Modesto et al. 2019; Eckel et al. 2020; Modesto et al. 2020).

Tento rod je převážně striktně anaerobní, avšak citlivost vůči kyslíku je různá u jednotlivých druhů a najdou se i výjimky jako *Bifidobacterium psychroaerophilum*, který je schopen růstu i za aerobních podmínek (Biavati et al. 2000; Simpson et al. 2004; Lee & Sullivan 2010). Citlivost na oxidativní stres se u jednotlivých druhů bifidobakterií může lišit, přičemž nejvyšší toleranci má *Bifidobacterium psychroaerophilum* a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Reaktivní formy kyslíku (ROS) spolu s vodou vytváří vysoce toxický peroxid vodíku. V případě akumulace H₂O₂ dochází k inhibici F6PPK až k zániku buňky. K odstranění reaktivních forem kyslíku anaerobními bakteriemi jsou využívány různé mechanismy zahrnující enzymy jako NADH oxidáza, NADH peroxidáza, kataláza nebo superoxid dismutáza. Avšak genomové studie bifidobakterií neprokázaly přítomnost příslušných kódujících genů pro výše zmíněné enzymy (až na analog genu pro NADH oxidázu, při jejíž aktivitě by došlo k akumulaci H₂O₂). Zřejmě bifidobakterie využívají pro odbourávání ROS thioredoxin reduktázu, jež je u všech kódována (Lee & Sullivan 2010).

Velká část bifidobakterií se vyskytuje v lidském GIT. Kvůli tomu musí být schopné odolávat prostředí, kde jsou vystaveny kyslíkovým radikálům, organickým kyselinám, žluči (jejím kyselinám a solím) a osmotickému stresu. Odolnost vůči žluči je nezbytná kvůli průchodu bakterií tenkým střevem a je zajištěna enzymatickými mechanismy jako jsou odtokové pumpy, transportéry žluči a hydrolázy žlučových solí. ATPázy jsou odtokové pumpy aktivně vylučují kationty z bakteriální buňky a zajišťují její ochranu. Zvláště rezistence vůči potenciálně škodlivým látkám lokalizovaných v GIT umožňuje probiotickým bakteriím lepší životaschopnost a konkurenceschopnost. Dobrým příkladem je *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, jež je rezistentní vůči arsenu, který je v nízkých koncentracích obsažen v lidské stravě (Bottacini et al. 2014; Lee & Sullivan 2010).

Serinový proteázový inhibitor (Serpin) zvyšuje ochranu bakterií vůči lidským protolytickým enzymům jako jsou α -antitrypsin a lidská neutrofilní elastáza. Vyskytuje se u některých druhů bifidobakterií (například *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium dentium*) a představuje pro ně určitou konkurenční výhodu (Ventura et al. 2007; Turrone et al. 2010).

Pro metabolismus tohoto rodu je typická metabolická fermentace hexózy, jejíž klíčovým enzymem je fruktóza-6-fosfát fosfoketoláza (F6PPK). Hexóza (glukóza či fruktóza) je pomocí tohoto enzymu štěpena na erytrózu-4-fosfát a acetylfosfát a dalšími reakcemi až na acetát a laktát. 1 mol glukózy je přeměněn na 2,5 molekuly ATP; 1,5 molu acetátu a 1 molu laktátu (Biavati et al. 2000; Bottacini et al. 2014). Tyto molekuly jsou dále využity na produkci energie. Bifidobakterie jsou jedny z mála intestinálních bakterií, které mají F6PPK, a proto se tento enzym využívá k jejich rodové identifikaci. Nicméně jsou i výjimky, kdy je tento enzym přítomný u jiných taxonů jako jsou *Gardnella vaginalis* (fylogeneticky si jsou příbuzné) či *Acetobacter xylinum* (gramnegativní) (Lee & Sullivan 2010).

Bifidobakterie jsou schopny zužitkovat oligosacharidy a komplexní sacharidy nestrávené hostitelem. Tyto komplexní látky jsou štěpeny na jednodušší a tím je zlepšována stravitelnost nedostupných živin pro hostitele. Zbylých 10- 15 % těchto živin je přeměněno na krátké řetězce mastných kyselin, které je hostitel již schopen strávit (Ventura et al. 2007). Schopnost zužitkovat složitější látky je nezbytná při zužitkování látek v hostitelském prostředí chudém na živiny a v rámci posílení konkurenceschopnosti mezi střevní mikrobiotou (Lee & Sullivan 2010).

4.3.2 Taxonomie a výskyt

Rod *Bifidobacterium* taxonomicky patří do domény *Bacteria*, kmenu a třídy *Actinobacteria*, řádu *Bifidobacteriales*, čeledi *Bifidobacteriaceae* (Ventura et al. 2007; Klein et al. 1998; Lugli et al. 2018). V dnešní době se rod *Bifidobacterium* dělí do sedmi fylogenetických kategorií: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium boum*, *B. longum*, *Bifidobacterium pullorum* a *B. pseudolongum* (Ventura et al. 2006; Alberoni et al. 2019).

Bifidobakterie byly izolovány z rozdílných ekologických nik jako jsou gastrointestinální trakt živočichů, dutina ústní, lidská potrava, hmyzí útroby, fermentované mléčné výrobky a odpadní vody (*B. minimum* a *B. subtile*). Výskyt těchto zmíněných druhů mnohdy vypovídá již z jejich názvu: *Bifidobacterium adolescentis* byl izolován z fekálních vzorků dospělých jedinců. *B. longum* subsp. *infantis* z fekálních vzorků kojenců, *B. dentium* z dutiny ústní, *B. animalis* subsp. *lactis* z fermentovaného mléka, *B. bombi* z trávicího traktu čmeláka a *B. boum* a *B. ruminantium* z kravského bachoru (Ventura et al. 2007; Bottacini et al. 2014).

Typickými druhy u dospělého člověka jsou *B. adolescentis*. Druhy *B. angulatum*, *B. dentium* a *B. longum* subsp. *longum* a *B. catenulatum* byly izolovány jak u dospělých, tak u dětí. Mezi bifidobakterie typické pro kojence patří *B. breve* a *B. longum* subsp. *infantis*. Mikrobiota se s věkem, zdravím a stravou hostitele dynamicky mění, a tudíž novorozenci mohou mít až 10^6 - 10^{11} kolonie tvořících jednotek bifidobakterií v 1 gramu stolice, což se vzrůstajícím věkem zpravidla klesá. U novorozenců přivedené na svět císařským řezem je mnohem méně bifidobakterií, protože neprošly vaginálním traktem matky. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* je schopen účinně využít mateřské mléko spolu s plným využitím močoviny a tím pokrýt své požadavky na dusík a zbytečně o něj neobírat hostitele, který potřebuje co nejvíce dusíku k růstu. S nástupem odstavu od mateřského mléka se rozšíření *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* v lidském GIT snižuje a je nahrazen druhem *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. Ten na rozdíl od *B. longum* subsp. *infantis* je schopen lépe zužitkovat komplexní sacharidy a polyoly, které jsou typické pro rostlinnou stravu (obsahuje více genů pro tvorbu arabinofuranosidáz, xylanáz a genů pro využití polyolů) (Lee & Sullivan 2010). Kvůli své schopnosti štěpit nestrávené komplexní sacharidy, bifidobakterie osidlují dolní část GIT. V horní části GIT se vyskytují rody bakterií jako *Lactobacillus* spp., jež využívají méně komplexní látky (mono-, di-, trisacharidy...). Tímto způsobem si tyto rody mezi sebou nekonkurují a vzniká mezi nimi symbiotický vztah (Ventura et al. 2007).

Bifidobacterium animalis, *B. longum* subsp. *longum*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. pseudolongum* či *B. dentium* jsou druhy bifidobakterií, které se běžně vyskytují v GIT různých živočichů (pes domácí, různá primáta, hlodavci, hmyz aj.). Početná skupina nově popsaných druhů bifidobakterií pochází z novosvětských druhů opic a zahrnuje například *B. parmae* (izolováno z výkalů kosmana zakrslého), *B. margollesii* (kosman zakrslý), *B. imperatoris* (tamarin vousatý), *B. reuteri* (kosman bělovousý), *B. stollenboschense* (tamarin žltoruký) (Bottacini et al. 2014; Lugli et al. 2018), *B. catulorum* (kosman bělovousý) (Modesto et al. 2018a) či *B. jacchi* (kosman bělovousý) (Modesto et al. 2019). *B. animalis* subsp. *lactis* (mléko), *B. boum*, *B. crudilactis* (čerstvé mléko), *B. merycicum*, *B. ruminantium* a *B. pseudolongum* subsp. *globosum* byly izolovány ze vzorků skotu (Lee & Sullivan 2010;

Bottacini et al. 2014). Mezi izoláty pocházející ze slepic patří *B. gallinarum* a *B. pullorum* (Lee & Sullivan 2010; Bottacini et al. 2014). Prasečí izoláty zahrnují *B. choerinum* (selata), *B. longum* subsp. *suis*, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*, *B. psychroaerophilum*, *B. thermacidophilum* a *B. thermophilum* (Lee & Sullivan 2010; Bottacini et al. 2014). Mezi izoláty/druhy z hmyzu patří *B. bombi* (čmelák), *B. asteroides*, *indicum* a *coryneforme* (včela medonosná) (Lee & Sullivan 2010; Bottacini et al. 2014). *B. animalis* subsp. *lactis* se vyskytuje v prostředí, kde probíhá možná fermentace laktózy, tudíž ve fermentovaných mléčných výrobcích (Lee & Sullivan 2010; Bottacini et al. 2014)

4.3.3 Význam a funkce bifidobakterií v trávicím traktu

Bifidobakterie jsou komenzálními bakteriemi GIT, s jehož mikrobiotou a zároveň s ním samotným interagují. Mezi tímto rodem a ostatními mikroorganismy je vytvořena konkurence o živiny, respektive o životní podmínky. S ostatní mikrobiotou naopak jsou schopny vytvářet synergický vztah. Tento účinek byl pozorován u pokusech na myších, kdy *Bifidobacterium* spp. a *Bacteroides* spp. společně byly schopné degradovat širší spektrum polysacharidů a docházelo k celkovému lepšímu zužitkování živin. (Lee & Sullivan 2010)

Některé bakterie jsou charakteristické produkcí bakteriocinů, jež jim zajišťuje výhodnou pozici z hlediska konkurenceschopnosti v přírodním ekosystému. Bakteriociny jsou drobné antimikrobiální peptidy, které inhibují podobné či příbuzné bakteriální rody. Mezi bakteriociny patří i široká skupina pod názvem lantibiotika, který je produkován například poddruhem *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*. Tyto látky na rozdíl od bakteriocinů obsahují i posttranslačně upravené aminokyseliny jako je lantionin, α -methylantionin a cyklické sloučeniny (Lee & Sullivan 2010). Bylo pozorováno, že bakteriocin konkrétně produkováný *B. bifidum* je schopen aktivně zasahovat proti rodům *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. a *Pediococcus* spp. (Biavati et al. 2000).

Bifidobakterie se zaslouhují o modulaci určitých bakteriálních skupin, které by mohly negativně ovlivňovat hostitele. Byla pozorována korelace, kdy se vzrůstajícím počtem bifidobakterií u hostitele klesaly počty *Escherichia coli* a klostridií, což fungovalo i opačným způsobem. U vyššího počtu bifidobakterií je rovněž snižována koncentrace škodlivých produktů jako jsou amoniak, fenol, p-kresol a i enzymů, které se podílí na jejich produkci (ureáza, tryptofanáza, β -glukorinadáza) (Lee & Sullivan 2010).

Bifidobakterie jsou také prospěšné svými konečnými metabolickými produkty. Do těchto látek patří vitamíny, krátké řetězce mastných kyselin (MK), kyseliny a polynenasycené mastné kyseliny (CLA) (Bottacini et al. 2014).

MK s krátkým řetězcem (acetát, laktát) jsou produkty fermentace komplexních polysacharidů v GIT. Jejich přítomnost hraje klíčovou roli v lidském metabolismu prostřednictvím stimulace absorpce sodíku a vody. Zároveň je díky MK snižováno pH lumenu a biologická dostupnost toxických aminů. Acetát posiluje intestinální obranyschopnost zprostředkovanou epitelálními buňkami, chrání před infekcí způsobenou *Escherichia coli* a je také živinou pro bakterie produkující butyrát, jež je živným substrátem pro kolonocyty a podílí se na udržování epitelální celistvosti (Bottacini et al. 2014; O'Callaghan & van Sinderen 2016; Alhagamhmad et al. 2019).

Konjugovaná kyselina listová zahrnuje polohové a geometrické izomery esenciální mastné kyseliny linolenové (CLA; C18:2, cis-9, cis-12 oktadekadienová kyselina) a je

produkována bakteriálními rody zahrnující *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Enterococcus* a *Lactoccus*. *B. breve* má z bifidobakterií nejvyšší produkci CLA. Tato látka přináší mnoho zdravotního užitku jako je silná protizánětlivá, imunomodulační aktivita a schopnost mírnit obezitu (Bottacini et al. 2014).

Další kladnou rolí tohoto rodu je syntéza vitaminů. Studie zjistily, že druhy *B. bifidum*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. longum* subsp. *infantis* a *B. longum* subsp. *longum* jsou schopné syntetizovat vitaminy skupiny B (thiamin (B₁), pyridoxin (B₆) a kyselina listová (B₉)) (Lee & Sullivan 2010).

Bifidobakterie jsou schopné degradovat pro hostitele nestravitelné látky a tím ho obohacovat. Patří mezi ně komplexní sacharidy jako jsou glykany rostlinného původu (glukany, fruktany, xylany, rezistentní škrob, pektiny, celulóza, arabinoxylan a produkty degradace jejich oligosacharidů) a hostitelné glykany (HMO a glykany mucinového typu O- a N-glykany). V okamžiku, kdy se látka ocitne uvnitř bakteriální cytoplazmy je podrobena enzymatickým procesům (hydrolýza, epimerizace, deacetylace, deaminace a možná fosforylace) zahrnující enzymy jako glykosylovou hydrolázu, fosforylázu sacharidů, epimerázu, mutázu a/nebo kinázu. HMO jsou syntetizovány v mléčné žláze a obsahují glukózu, galaktózu, N-acetylglukosamin, fukózu a sialovou kyselinu. Glykany mucinového typu i mateřského mléka jsou velmi podobné a v případě jejich degradace by mohly být propojeny glykosidickými vazbami, čehož jsou schopny druhy *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. Rozkladem těchto složitých látek bakteriálními druhy jsou vytvořeny menší produkty, které jsou využitelné i pro ostatní mikrobiální druhy a tímto způsobem jsou bifidobakterie schopné modulovat intestinální mikrobiotu (Bottacini et al. 2014).

5 Metodika

Cílem metodické části práce bylo z fekálních vzorků nově diagnostikovaných pacientů s Crohnovou chorobou (CD) kvantifikovat, izolovat a identifikovat bifidobakterie. Kvantifikace a izolace byla provedena pomocí selektivních médií kombinací metod zahrnující morfologickou analýzu, biochemické testování specifického enzymu (fruktóza-6-fosfát-fosfoketoláza), a hmotnostní spektrometrie (MALDI TOF MS). Informace ke vzorkům a detailní postup provedených analýz je popsán níže.

5.1 Odběr vzorků a seznam dárců

Fekální vzorky dětí s CD (n=11) byly sbírány ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Motol a byly analyzovány na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky (ČZU v Praze). Jednalo se o 5 chlapců a 6 dívek.

Rodiče dětí či děti obdrželi návod, jak vzorek řádně odebrat a uchovat. Vzorek stolice o velikosti lískového oříšku byl sterilně odebrán do 9 mL fyziologického roztoku s glycerínem (roztok byl před sterilací probublán CO₂ pro optimalizaci podmínek pro anaerobní bakterie). Bezprostředně po odběru byl vzorek transportován do nemocnice, odkud byl převezen na univerzitu pro provedení jeho mikrobiologického rozboru. Vzorek byl transportován na ledu a byla zde snaha jej zpracovat do 12 hodin po odběru, což nebylo vždy reálné.

5.2 Kultivační stanovení

Na prokázání přítomnosti a počtů bifidobakterií byly použity dvě selektivní média. Jednalo se o agary: Wilkins-Chalgren s octovou kyselinou a mupirocinem (BIF-MUP) a Wilkins-Chalgren s mupirocinem a norfloxacinem (BIF-NORF). Pro kontrolní stanovení celkového počtu anaerobních balterií ve vzorku byl použit agar Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem bez selektivních složek. Přesné složení médií je patrné z Tabulka 3.

Wilkins-Chalgren agary spolu se sójovým peptonem, cysteinem a Tweenem byly rozpuštěny v destilované vodě a sterilovány. Po vytemperování na 50 °C ve vodní lázni, byly přidány kyselina octová, norfloxacin a mupirocin.

Tabulka 3: Složení kultivačních médií (Vlková et al. 2015)

Médium	Podmínky kultivace	Složení selektivního média na 1000 ml
Wilkins-Chalgren agar (WSP) pro celkové počty bakterií (kontrola)	37 °C, 48 hodin, anaerobní atmosféra	43 g Wilkins-Chalgren anaerobe agar (OXOID); 5 g Sójový pepton (OXOID); 0,5g L-cystein (Sigma); 1 ml Tween (Sigma)
Wilkins-Chalgren agar s mupirocinem (BIF-MUP: pro <i>Bifidobacterium</i> sp.)	37 °C, 48 hodin, anaerobní atmosféra	43 g Wilkins-Chalgren anaerobe agar; 5 g Sójový pepton; 0,5g L-cystein; 1 ml Tween; 100 mg mupirocin (OXOID), 1 ml ledová kyselina octová (Sigma)
Wilkins-Chalgren agar s norfloxacinem (BIF-NORF: pro <i>Bifidobacterium</i> sp.)	37 °C, 48 hodin, anaerobní atmosféra	43 g Wilkins-Chalgren anaerobe agar; 5 g Sójový pepton; 0,5g L-cystein; 1 ml Tween, 100 mg mupirocin, 200 mg norfloxacin (Sigma), 1 ml ledová kyselina octová

Odběrová skleněná zkumavka se vzorkem (1. ředění) byla zvážena před a po vložení vzorku, aby bylo možné z rozdílů hodnot vypočítat množství vzorku, které má být inokulováno do 2. ředění. Každý vzorek stolice byl dále sériově naředěn v poměru 1:9. Mikrobiologický rozbor byl proveden pomocí deskové metody, kdy jednotlivá ředění byla inokulována do Petriho misek. Ty byly zality příslušnými médii (WSP, BIF-MUP, BIF-NORF) ve dvou kopiích. Zalité misky byly anaerobně kultivovány v anaerostatech (Anaerobic Plus System, OXOID) s přiloženými paladiovými katalyzátory (Sigma Aldrich) při 37 °C v atmosféře CO₂/H₂ po dobu 48 hodin.

Narostlé kolonie bakterií po kultivaci byly spočteny a z nich odebrány izoláty. Z množství narostlých bakterií byly zjištěny počty kolonií tvořících jednotku (KTJ) v 1 g vzorku stolice, dle vzorce níže.

$$P = [(P1 + P2) / 11] * F \text{ (KTJ/g)}$$

P1, P2 – počet kolonií na dvou po sobě jdoucích počitatelných plotnách

F – převrácená hodnota nejvyššího ředění

KTJ – kolonie tvořící jednotka

5.3 Izolace bifidobakterií

Kolonie bakterií s různými kultivačními charakteristikami (barva, tvar, struktura kolonie) narostlé na Petriho miskách se selektivním médiem pro bifidobakterie byly sterilně odebrány bakteriologickou kličkou a vloženy do zkumavek s WSP bujónem. Takto vytvořený izolát byl následně inkubován při 37 °C po dobu 24 hodin.

Následný den byl z každého izolátu injekční stříkačkou sterilně nanesen drobný vzorek (kapka) na mikroskopické sklíčko. Mikroskopický preparát byl zkoumán ve fázovém mikroskopu pod zvětšením 400x. Takto bylo možné pozorovat morfologické vlastnosti dané kultury i její čistotu. Pokud se jednalo o čistou kulturu s nepravidelnými tyčinkami byl tento izolát podroben identifikaci.

5.4 Identifikace bifidobakterií

5.4.1 Detekce enzymu F6PPK

Detekce enzymu fruktóza-6-fosfoketolázy (F6PPK) je využívána při rodové identifikaci bifidobakterií, pro které je jeho přítomnost typická. Tabulka 4 popisuje jednotlivé složení všech použitých chemikálií.

1,5 ml čerstvě narostlé kultury bylo stočeno při 14500 otáček za minutu po dobu 3 minut. Supernatant byl slit a pelety resuspendovány v 75 µl bifipufu a 50 µl roztoku CTAB s promícháním a následnou inkubací po dobu 5-ti minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 31 µl roztoku číslo 2 a stejné množství roztoku s číslem 7 s inkubací při 37 °C po dobu 30 minut. Následně bylo přidáno 188 µl roztoku číslo 3 s inkubací 10 minut při laboratorní teplotě a poté bylo ještě přidáno 125 µl roztoku číslo 4, 125 µl roztoku 5 a 125 µl roztoku 6.

Detekce enzymu F6PPK (pozitivní reakce) je provázena změnou barvy ze žluté na fialovou až hnědou barvu.

Tabulka 4: Složení chemikálií na F6PPK

Chemikálie na F6PPK	Složení chemikálií
Bifipuf	0,36 g K ₂ HPO ₄ ; 0,10 g KH ₂ PO ₄ ; 0,15 g cystein; 300 ml destilovaná voda
Roztok číslo 2	120 mg NaI; 200 mg Na-iodoacetát; 20 ml destilovaná voda
Roztok číslo 3	4,17 mg Hydroxylamin; 30 ml destilované vody; upravení pH na 6,5 pomocí 2 ml 40 % vodného roztoku NaOH
Roztok číslo 4	3 g Trichloroctová kyselina; 20 ml destilovaná voda
Roztok číslo 5	2,48 g ml HCl; 17,52 destilovaná voda
Roztok číslo 6	1 g FeCl ₃ ; 62 µl HCl; 20 ml destilovaná voda
Roztok číslo 7	Na jeden vzorek potřebuju 0,00165 g soli pro enzym fruktóza-6-fosfát, jež se rozpustí v 50 µl destilované vody
CTAB	45 mg Hexadecyltrimethylamonium bromid; 100 ml destilovaná voda

5.4.2 Hmotnostní spektrometrie (MALDI TOF MS)

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI TOF MS) je metoda hmotnostní spektrometrie, která analyzuje délku letu ionizovaných částic desorbovaných od vrstvy matrix a analytu pomocí využití laserových paprsků (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry). Na základě analýzy detekovaných spekter ribozomálních proteinů a srovnání s dostupnou databází (Bruker, Německo) byly identifikovány jednotlivé izoláty bakterií. Jedná se o metodu, která je velmi přesná (přesnost identifikace bakterií se pohybuje přes 91 %). Zároveň se může provozovat v běžných laboratořích díky své nenáročnosti a rychlosti identifikace (Veen et al. 2010; Sogawa et al. 2011).

1 ml čerstvě narostlé kultury každého testovaného vzorku byl centrifugován při 14500 otáček za minutu po dobu 3 minut. Supernatant byl slit a pelety resuspendovány v 0,5 ml 70 % ethanolu. Následovalo vortexování a další centrifugace za stejných podmínek po dobu 2 minut.

Zbytkový ethanol byl odebrán a vzorek byl „sušen“ (odpaření zbytkového ethanolu) 10 minut při pokojové teplotě. Promyté pelety byly resuspendovány v 20 μ l 70% mravenčí kyseliny a ve stejném množství acetonitrilu. Po dalším zvortexování byl vzorek opět zcentrifugován při stejných podmínkách po dobu 2 minut.

1 μ l supernatantu byl ve dvou kopiích aplikován na destičku (Bruker, USA) a po zaschnutí byl překryt 1 μ l matrice (Bruker). Tato matrice obsahuje kyselinu α -kyano-4-hydroxyskořicovou v 50% acetonitrilu a 2,5% trifluoroctové kyselině (HCCA matrice) (Sogawa et al. 2011; Veen et al. 2010). Kvůli fotosenzitivitě hydroxyskořicové kyseliny, byla zaschlá identifikační destička vložena na temné místo. Takto připravená destička byla neprodleně analyzována.

MALDI TOF MS analýzy byly provedeny na přístroji Autoflex II TOF/TOF hmotnostním spektrometru od firmy Bruker Daltonics (Billerica, Massachusetts) (www.bruker.com, 2019). Spolu s výrobními instrukcemi a software Flexcontrol 3.0 (Bruker Daltonics) byla provedena identifikace v lineárním pozitivním módu v rámci rozsahu 2 až 20 kDa. Tento spektrometr byl pravidelně kalibrován externě s bakteriálním testovacím standardem od firmy Bruker Daltonics (extrakty *Escherichia coli* zahrnující dodatečné proteiny RNáza A a myoglobin) (Sogawa et al. 2011).

Záznamy u jednotlivých píků byly použity ke srovnání s databází Biotyper (Bruker Daltonics, Německo), která je pravidelně aktualizovaná společností Bruker (Van Veen et al. 2010). Tento krok byl proveden automaticky algoritmem programu porovnávající výsledky již naměřených spekter a díky tomu byla spektra přesně přiřazena s daným druhem, který byl zaznamenaný v databázi. Výsledky úspěšnosti přiřazování programem bylo ohodnoceno skórem s hodnotami od 0 do 3. Skóre pod hodnotou 1,7 bylo považováno jako nedostatečné a je tudíž považováno pouze jako identifikace rodu. Hodnota skóre nad 2.0 indikuje identifikace druhu (Veen et al. 2010; Sogawa et al. 2011).

6 Výsledky

Cílem této práce bylo zjistit kvantitativní a kvalitativní zastoupení bifidobakterií ve vzorcích stolice dětí s CD.

Pro stanovení vybraných skupin bakterií byla použita kultivační desková metoda. Pro kontrolní stanovení celkového počtu anaerobních bakterií ve vzorku byl použit modifikovaný Wilkins-Chalgren agar se sójovým peptonem, cysteinem a tweenem bez selektivních složek (CP). Pro bifidobakterie byly použity dva typy selektivních agarů-modifikovaný Wilkins-Chalgren agar s octovou kyselinou a mupirocinem (BIF-MUP) a Wilkins-Chalgren agar s mupirocinem a norfloxacinem (BIF-NORF). Médium BIF-NORF obsahovalo kombinaci dvou antibiotik, a tudíž byla u něj očekávaná vyšší selektivita.

Po kultivaci byly kvantifikovány detekované počty bakterií (Tabulka 5). Průměrné počty bifidobakterií detekované na agaru s norfloxacinem se pohybovaly v hodnotě $6,40 \pm 1,63$ log KTJ/g stolice. U agaru, který obsahoval pouze mupirocin byla průměrná hodnota $6,99 \pm 1,45$ log KTJ/g stolice. Detekované hodnoty bakterií u BIF-NORF se pohybovaly od 4,02 do 7,89 log KTJ/g stolice. U BIF-MUP se hodnoty pohybovaly mezi 4,20- 8,48 log KTJ/g stolice. BIF-NORF obsahoval nižší průměrné počty bakterií na gram stolice než BIF-MUP, tudíž byla u něj prokázána vyšší selektivita. To se shoduje i s prvotní domněnkou a potvrzuje ji. Jako kontrolní médium pro celkové počty anaerobů byl použit neselektivní agar, a proto byl zjištěn vyšší průměrný počet bakterií ($7,96 \pm 0,54$ log KTJ/g stolice) ve srovnání s BIF-MUP nebo BIF-NORF.

Tabulka 5: Detekované počty bakterií u jednotlivých vzorků

Vzorek	Detekované počty bakterií log KTJ/g stolice		
	CP	BIF - NORF	BIF - MUP
Pacient 1	8,76	6,56	6,60
Pacient 2	8,15	7,89	7,83
Pacient 4	8,26	4,02	4,20
Pacient 5	7,37	6,57	7,32
Pacient 6	8,24	6,59	7,64
Pacient 7	7,33	4,95	5,38
Pacient 9	8,09	7,17	8,48
Pacient 10	8,39	7,23	8,23
Pacient 11	8,03	7,80	7,76
Průměrný počet \pm SD	$7,96 \pm 0,54$	$6,40 \pm 1,63$	$6,99 \pm 1,45$

Vysvětlivky: SD-směrodatná odchylka

Po kvantifikaci mikrobiálních skupin, následovala izolace bakteriálních kolonií s cílem identifikovat dané bifidobakteriální druhy případně detekovat a identifikovat další izolované mikroorganismy. Při detekci jiných mikroorganismů, bylo cílem zjistit míru selektivity daného média pro danou mikrobiální skupinu.

Snahou této práce bylo odebrat z každého použitého selektivního média co nejvíce reprezentativních vzorků (kolonie různými kultivačními charakteristikami). Na základě kultivačních znaků kolonií bylo cílem získat alespoň 12 izolátů, přičemž polovina byla

odebrána z BIF-MUP a druhá z BIF-NORF. Pokud se na selektivním médiu vyskytovala okem rozeznatelná vyšší variabilita kolonií, bylo odebráno více izolátů. Jednotlivé kolonie byly kultivovány a identifikovány pomocí MALDI TOF MS, kde byly vzorky extrahovány do ethanolu spolu za použití kyseliny mravenčí, hydroxyskořicové a acetonitrilu. Díky této metodě se podařilo identifikovat celkem 127 izolátů, přičemž 5 z nich nebylo identifikováno z důvodu stejných morfologických vlastností pod mikroskopem jako u jiných izolátů ze stejného vzorku (pacient 1, *Candida glabrata*). Z celkového počtu odebraných izolátů bylo 65 izolátů (51,18 %) identifikováno jako bifidobakterie. Zbývajících 48,81 % izolátů bylo identifikováno jako jiný mikroorganismus a selektivita daných kultivačních médií byla vyhodnocena jako nedostatečná. Přehled identifikovaných druhů je uveden v Tabulka 6.

Z celkového počtu 11 pacientů s CD byly bifidobakterie detakovány pouze u osmi. U třech pacientů se tento rod tedy nepodařilo vůbec kultivačně stanovit. Nejčastěji identifikovaným bifidobakteriálním druhem byl *B. longum* (pacienti 2, 5, 6, 8, 9), dále *B. adolescentis* (pacienti 5, 6, 8, 10) a *B. bifidum* (pacienti 2,10). V případě *B. breve* (pacient 11) a *B. dentium* (pacient 7) byl každý z nich nalezen pouze u jednoho pacienta. Identifikace *B. indicum* byla zřejmě mylná, protože MALDI TOF MS skóre u *B. breve* a *B. indicum* jsou si velmi podobná a rovněž u tohoto pacienta (11) převažoval *B. breve*. Lze tedy konstatovat, že použitá metoda izoláty nebyla schopna zcela přesně rozlišit. U tohoto pacienta byly identifikovány ještě další 3 mikrobiální druhy (*Escherichia coli*, *Staphylococcus hominis* a *S. warneri*), přičemž *E. coli* a *S. hominis* byly nalezeny výhradně pouze u tohoto pacienta. *S. warneri* se vyskytoval i u jednoho dalšího pacienta (4), u kterého byly nulové počty bifidobakterií a převaha *Lactobacillus murinus*, který u nikoho jiného nebyl izolován. Pacienti (1, 3, 4), u kterých nebyli identifikovány bifidobakterie, měli převahu jiné mikrobioty. Vzorek pacienta 1 obsahoval kvasinku (*Candida glabrata*), *Bacillus cereus* a *Staphylococcus epidermidis*. *Candida* spp. i *S. epidermidis* se také vyskytovaly u dítěte čísla 8, kde byl přítomným pouze druh *Candida albicans* a jeho typ *africana*. U tohoto pacienta byly zastoupeny rovněž tři druhy *Streptococcus* spp. (*S. oralis*, *S. pneumoniae* a *S. sanguinis*), které byly izolovány z obou médií. Do tohoto rodu můžeme začlenit *S. parasanguinis*, který byl u pacienta 6. Izoláty tohoto jedince zahrnovala krom bifidobakterií a streptokoka, ještě *Bacteroides uniformis*. Rod *Bacteroides* byl detekován u 4 z 11 pacientů a vždy narostl na médiu BIF-NORF, tudíž je zjevně rezistentní norfloxacinu. Pacienti s přítomnými *Bacteroides* spp. měli až na jednoho výrazně snížené zastoupení bifidobakterií (pacient 6- 80 %, oproti tomu 5- 41,67 %, 7- 45,45 %, 9- 63,64 %). Detekování zástupci rodu *Bacteroides* byly *B. uniformis* (pacient 6, 7, 9), *B. thetaiotaomicron* (pacient 5, 9), *B. caccae* (pacient 9) a *B. ovatus* (pacient 7). Dalšími zastoupenými druhy u pacientů s CD byly *Enterococcus faecalis* (pacient 3) a *E. canintestini* (pacient 5), které rostly na obou médiích. Bakterie s nejnižším výskytem byly *Clostridium difficile* (pacient 3), *Corynebacterium tuberculostearicum* (pacient 10), *Propionibacterium acnes* (pacient 3) a *Propionibacterium australiense* (pacient 10). Je zajímavé, že u pacienta 10 byly bifidobakterie silně zastoupeny (83,33 %) a další bakteriální druhy téměř nebyly detekovány (*Corynebacterium tuberculostearicum* na BIF-NORF, *Propionibacterium australiense* na BIF-MUP).

Často byly mikrobiální skupiny vyjma bifidobakterií přítomny na BIF-NORF, který je více selektivní. Příčina tohoto jevu mohla být možná z důvodu nežádoucí vyšší citlivosti bifidobakterií na BIF-NORF (Samostatné přílohy

Tabulka 7). Testování izolátů na přítomnost enzymu F6PPK bylo prováděno pouze náhodně, tedy u zajímavých izolátů. Kdy výsledky korespondovaly s MALDI TOF identifikací a předchozím morfologickým screeningem.

Tabulka 6: Identifikované mikroorganismy u pacientů s CD

Pacient	Identifikované bifidobakterie (n)	Ostatní mikroorganismy identifikované na médiu pro bifidobakterie (n)	Izolátů celkem	Bif. izoláty	% Bif.
1	nedetekováno	<i>Candidida glabrata</i> (10), <i>Bacillus cereus</i> (1), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (1)	12	0	0
2	<i>B. bifidum</i> (11), <i>B. longum</i> (1)	nedetekováno	12	12	100
3	nedetekováno	<i>Enterococcus faecalis</i> (9), <i>Clostridium difficile</i> (1), <i>Propionibacterium acnes</i> (1), <i>Staphylococcus warneri</i> (1)	12	0	0
4	nedetekováno	<i>Lactobacillus murinus</i> (8), <i>Staphylococcus warneri</i> (1)	9	0	0
5	<i>B. longum</i> (3), <i>B. adolescentis</i> (2)	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (6), <i>Enterococcus canintestini</i> (1)	12	5	41,67
6	<i>B. longum</i> (7), <i>B. adolescentis</i> (1)	<i>Bacteroides uniformis</i> (1), <i>Streptococcus parasanguinis</i> (1)	10	8	80,00
7	<i>B. dentium</i> (5)	<i>Bacteroides ovatus</i> (5), <i>Bacteroides uniformis</i> (1)	11	5	45,45
8	<i>B. adolescentis</i> (3), <i>B. longum</i> (2)	<i>Candida albicans</i> (1), <i>Candida albicans (africana)</i> (1), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (1), <i>Streptococcus oralis</i> (1), <i>Streptococcus pneumoniae</i> (1), <i>Streptococcus sanguinis</i> (1)	11	5	45,45
9	<i>B. longum</i> (7)	<i>Bacteroides uniformis</i> (2), <i>Bacteroides caccae</i> (1), <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (1)	11	7	63,64
10	<i>B. adolescentis</i> (5), <i>B. bifidum</i> (5)	<i>Corynebacterium tuberculoostearicum</i> (1), <i>Propionibacterium australiense</i> (1)	12	10	83,33
11	<i>B. breve</i> (11), <i>B. indicum</i> (2)	EC DD (1), <i>Staphylococcus hominis</i> (1), <i>Staphylococcus warneri</i> (1)	15	13	86,67
Celkem identifikovaných izolátů			127	65	51,18

n-počet identifikovaných izolátů
EC-*Escherichia coli*

7 Diskuze

7.1 Bifidobakterie a CD

Bifidobakterie jsou nedílnou součástí gastrointestinálního traktu a jsou běžně využívány jako probiotika kvůli jejich zdravotním přínosům, zdravotní nezávadnosti i jejich finanční dostupnosti a jednoduchosti aplikace (Steed et al. 2010; O'Callaghan & van Sinderen 2016). Znalost bifidobakterií a jejich vliv na střevní mikrobiotu a na hostitele, může pomoci vyvinout nové terapeutické strategie založených na využití tohoto rodu (Turrone et al. 2017). Nicméně nebyl popsán prokázaný významný vliv probiotik na CD (Guandalini 2010). U zánětlivých střevních onemocněních jsou množství i diverzita tohoto rodu značně redukovány, což může celkově přispívat k nežádoucímu stavu hostitele (Alhagamhmad et al. 2016). To vyplývá i ze srovnání výsledků této bakalářské práce s studií zabývající se zdravými jedinci publikovanou Bunešovou et al. (2017). V rámci této bakalářské práce na selektivním agaru BIF-MUP pro bifidobakterie narostlo průměrně $6,99 \pm 1,45$ log KTJ/g stolice bakterií. To je o dost méně ve srovnání se zdravými jedinci ($9,36 \pm 0,57$ log KTJ/g stolice u konvenční diety a $9,62 \pm 0,35$ log KTJ/g stolice u vegetariánů), což publikovala Bunešová et al. (2017). Bifidobakterie byly izolovány jen u 8 pacientů z celkových 11 a zastoupení tohoto rodu činilo 51,18 % ze všech detekovaných izolátů. Převažujícím bifidobakteriálním druhem byl *B. longum* (u 5 pacientů), dále *B. adolescentis* (u 4 pacientů) a *B. bifidum* (u 2 pacientů). *B. breve* a *B. dentium* byly nalezeny pouze u jednoho pacienta. Při srovnání se stejnou studií (Bunešová et al. 2017), u dětí s CD byla detekována obdobná kvalitativní diverzita bifidobakterií. U této studie bylo detekováno celkem 5 bifidobakteriálních druhů od 11 pacientů s CD (*B. longum*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. dentium*) a u zdravých jedinců se podařilo izolovat 5 bifidobakteriálních druhů od 10 jedinců (*B. adolescentis*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. catenulatum*). Zastoupení jednotlivých druhů u jedinců bylo v obou případech individuální. Na rozdíl od pacientů s CD, bifidobakterie byly detekovány u všech testovaných jedinců.

Bifidobakterie se podílí na modulaci intestinální mikrobioty svými metabolity a konkurenceschopností o dostupné živiny. Bifidobakterie jsou schopny syntetizovat látky (lantibiotika, bakteriociny, organické kyseliny) jimiž potlačují činnost i růst Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií a tím posilují zdravou mikrobiotu gastrointestinálního traktu (Guandalini 2010; O'Callaghan & van Sinderen 2016). Byla zjištěna kladná bifidobakteriální kompetice s patogenními druhy jako *Escherchia coli*, *Salmonella enteritica*, *Klebsilla pneumonia*, *Clostridium perfringens* či *Clostridium difficile* (O'Callaghan & van Sinderen 2016). Aplikace bifidobakterií má vliv na kojenecké koliky způsobené rotavirem či antibiotikoterapií (O'Callaghan & van Sinderen 2016). Rovněž bylo pozorováno, že aplikace synbiotik (*B. animalis* subsp. *lactis* a inulin) snižuje akutní průjem a redukuje množství patogenů (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *Adenovirus*, *Entamoeba histolytica* a *Clostridium difficile*) ve stolici (O'Callaghan & van Sinderen 2016). To by mohlo pomoci i pacientům s CD, u nichž byly v rámci této práce detekovány již zmíněné patogenní druhy (*C. difficile*, *E. coli*) a jiné mikrobiální skupiny, jež mohou vyvolat dysbiózu (Sanders et al. 2013). Aplikace bifidobakterií má také pozitivní vliv během antibiotikoterapie, kdy pomáhá zvýšit výskyt prospěšných mikroorganismů v dané mikrobiotě. Antibiotika jsou podstatnou

součástí léčby CD. Probiotika jsou proto často začleňována při podpoře léčby CD (Iannitti & Palmieri 2010; Dujsíková 2018).

Bifidobakterie produkují mnoho látek (MK s krátkým řetězcem, vitamíny, CLA), jimiž mohou kladně ovlivňovat zdravotní stav hostitele. I když bifidobakterie (*B. longum*) neprodukuje butyrát, tak jejich produkty (acetát) mohou sloužit jako substrát bakteriím (*Eubacterium rectale*) produkující tuto látku. Butyrát je protizánětlivá látka, jež může sloužit jako substrát kolonocytům a přispívat k homeostáze trávicí trubice (Lee & Sullivan 2010; Bottacini et al. 2014; O'Callaghan & van Sinderen 2016; Turroni et al. 2017). Snížením lumenálního pH rovněž vzroste dostupnost obsažených živin (hořčík, vápník), který může velmi napomoci hostiteli s narušenou absorpcí způsobenou například CD (O'Callaghan & van Sinderen 2016).

I když nebyl potvrzen stejný účinek u CD, u ulcerativní kolitidy má *Bifidobacterium longum* značný vliv na udržení remise (Fujimori et al. 2007; O'Callaghan & van Sinderen 2016). Tento druh byl detekován u 5 z 11 pacientů s CD a byl nejhojnějším izolovaným bifidobakteriálním druhem této bakalářské práce. Rovněž bifidobakterie posilují pravidelnost pohybů tlustého střeva a mohou sloužit jako prevence a úleva při konstipaci. Mechanismus tohoto procesu není zcela znám, ale i tak tato aktivita může sloužit k odlehčení symptomů spojených s CD, jako například zhoršená peristaltika (O'Callaghan & van Sinderen 2016). Probiotikum VSL#3 obsahující 3 kmeny bifidobakterií (*B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*) snižuje riziko pooperační recidivy CD (Seksik et al. 2003). *B. longum* a *B. breve* byly u pacientů s CD v rámci této práce detekovány, i když *B. breve* se vyskytoval pouze u jednoho pacienta. *B. infantis* ve fekálních vzorcích pacientů s CD nebyl izolován, protože se vyskytuje zejména u kojenců (Turroni et al. 2011). Přímý pozitivní dopad na CD mělo ve studii vedené Steed et al. (2010) podání synbiotik (*B. longum*, inulin a oligofruktóza) po dobu 6 měsíců, kdy byly významně redukovány některé indexy zánětlivé aktivity CD. *B. bifidum* 231 je schopen vyvinout protizánětlivou aktivitu pomocí modulace slizničního imunitního systému (SIS) a jejich zánětlivých a protizánětlivých cytokinů (up-regulace IL-10 a snížení IL-1 β) (Satish Kumar et al. 2017). U této práci se podařilo izolovat u jednoho pacienta *B. bifidum*. Některé bifidobakterie jsou schopné indukovat produkci mukusu a přilnost k mukózní vrstvě trávicí trubice. Tímto způsobem mohou přispět k ochraně slizniční vrstvy trávicí trubice, která je obzvláště narušená při zánětlivých onemocněních jako je CD (Martín et al. 2016).

7.2 Jiné detektované mikroorganismy

Na selektivních médiích BIF-MUP a BIF-NORF narostly i jiné mikroorganismy mimo bifidobakterií. Jednalo se o zástupce rodů a druhů *Streptococcus* spp. (*S. oralis*, *S. pneumoniae*, *S. parasanguinis* a *S. sanguinis*), *Staphylococcus* spp. (*S. hominis*, *S. warneri* a *S. epidermidis*), *Enterococcus* spp. (*E. faecalis* a *canintestini*), *Escherichia coli*, *Lactobacillus murinus*, *Candida* spp. (*C. glabrata*, *C. albicans*), *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium tuberculostearicum*, *Propionibacterium acnes*, *P. australiense* a *Bacteroides* spp. (*B. uniformis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. caccae* a *B. ovatus*), jež narostly pouze na selektivním médiu BIF-NORF. Tyto mikrobiální druhy mohly narůst z důvodu dysbiotického stavu mikrobioty GIT u pacienta s CD a velká řada z nich by mohla působit patogenně.

Propionibacterium acnes a *P. australiense* patří mezi kožní mikrobiotu a mohou přežívat i v GIT. Propionibakterie jsou Grampozitivní a mohou být prospěšné svými metabolickými přeměnami (jednoduché cukry, alkoholol), metabolity (acetát, propionát, vitamíny) či produkcí antimikrobiálních látek (bakteriociny)(Campaniello et al. 2015). Na druhou stranu se mohou chovat jako oportunistické patogeny, jež mohou vyvolat zánětlivou aktivitu na pokožce (akné) či infekci při chirurgických zákrocích, kdy mohou kontaminovat předměty použité při operaci (prostetický ramenní/kolení kloub, prostatická srdeční chlopně) a vytvořit na nich biofilm (McDowell & Nagy 2014).

Bacteroides spp. je Gramnegativní nesporulující nepohyblivý rod, který patří mezi komenzální lidskou mikrobiotu nacházející se v lidském GIT. *B. thetaiotaomicron* se vyskytuje v oblasti sestupného tračníku a je považován za více virulentní kvůli jeho vyšší rezistenci vůči antibiotikům (Tan et al. 2019). Byla popsána rezistence *Bacteroides* spp. na fluorochinolony a metronidazol (Miragliotta et al. 2006). Z toho vyplývá i jejich možná kultivace na více selektivním médiu BIF-NORF, který je na bázi fluorochinolonů. *B. ovatus* má příznivé účinky na hostitele jako potlačení sekreci zánětlivých faktorů (TNF- α) a podporu produkce mucinu. *B. uniformis* se podílí na snížení koncentrace cholesterolu, triacylglyceridů a krevní glukózy (Tan et al. 2019).

Laktobacily patří mezi probiotické bakterie, které mohou mít pozitivní dopad na hostitele (Heeney et al. 2018). *L. murinus* může mít zdravotní přínosy jako je soutěživost s ostatní mikrobiotou v GIT (*Faecalibacterium prausnitzii*) a je běžně přítomen v lidském GIT (Huang et al. 2016; Heeney et al. 2018).

Kvasinky z rodu *Candida* jsou běžní patogeny, které mohou způsobovat povrchové systemické infekce. *Candida albicans* a *C. glabrata* jsou běžně přítomné u zdravého jedince (GIT, urogenitální a dýchací soustava) a patří mezi oportunistické patogeny. *C. albicans* a *C. glabrata* mohou napadat slizniční vrstvu či způsobovat infekce krevního řečiště (sepsy), kostí nebo mozku (Kaur et al. 2005; Dadar et al. 2018).

C. difficile je sporulující, Grampozitivní bakterie nacházející se v trávicím traktu u živočichů a lidí. Tento druh je častou příčinou infekčních průjemových onemocnění a je běžným původcem nemocničních infekcí. Nakažený může mít asymptomatický průběh nemoci či příznaky pohybující se od mírných po těžké průjmy, poškození trávicí trubice až smrt. Dysbióza způsobená antibiotiky či celkovým stavem mikrobioty, jak to může být u CD, může zapříčinit proliferaci *C. difficile* a následnou infekci. Tento druh je možné potlačit antibiotiky (metronidazol, vankomycin), ale to může způsobit další dysbiózu (Elliott et al. 2017). Rizikové faktory zahrnují věk, imunita, imunitní suprese a aplikace širokospektrálních antibiotik, jež bohužel pacienti s CD často splňují, a tudíž jsou náchylní k možné infekci (Planche & Karunaharan 2017).

Streptococcus spp. je Grampozitivní, nesporulující rod, jež tvoří páry či řetízky. Zástupci tohoto rodu jsou komenzálové osidlující GIT (tenké střevo, horní část GIT), kteří však mohou být i oportunistickými patogeny. *S. oralis* je přítomný v mikrobiotě dutiny ústní a hltanu. Tento druh byl izolovaný při onemocnění infekční endokarditidy, Kawasakiho syndromu a meningitidy, kde se podílí na celkové dysbióze. *S. parasanguinis* byl izolován z krve, moči a lidské dutiny ústní. *S. parasanguinis* se nachází v dutině ústní zdravých jedinců a může být hojnější u Kawasakiho syndromu. *S. sanguinis* byl detekován u endokarditidy a zánětlivých stavů aorty, které vedou k atheroskleróze. *S. pneumoniae* je přítomný u zápalu plic, zánětu

středního ucha, endokarditidě či meningitidě. syndromu (Köhler 2007; Peters et al. 2017; Hashizume-Takizawa et al. 2019).

Rod *Enterococcus* zahrnuje běžné Grampozitivní komenzály GIT. *Enterococcus faecalis* osidluje GIT a vyskytuje se běžně u zdravého člověka. Může však způsobit řadu onemocnění jako endokarditidu, sepsi, infekce močového ústrojí a meningitidu. *E. canintestini* byl poprvé izolován z fekálních vzorků zdravých psů (Murray 1990; Köhler 2007; Huang et al. 2016).

Staphylococcus spp. je nesporeující, Grampozitivní, nepohyblivý rod, jež často tvoří útvary připomínající hrozny či páry. *S. hominis* je komenzální druh vyskytující se na lidské kůži a je možným oportunistickým patogenem. Může způsobit infekce krevního řečiště či endokarditidu. *S. epidermidis* je častý komenzál osidlující lidskou pokožku a slizniční vrstvy. Tento druh však může způsobit infekci například z důvodu kontaminace nástrojů (při implantaci) a vytvořením biofilmu, který dokáže odolávat antibiotikům i hostitelské imunitě. Průběh této infekce je chronický či subakutní a často je závažný pro kompromitované pacienty s imunosupresivní terapií či potlačenou imunitou (Vuong a Otto 2002; Zhang et al. 2013; Peters et al. 2017). *S. warneri* byl detekován u infekcí kůže, měkkých tkání, endokarditidy a ortopedických infekcí. Tato patogenita musí být ještě podpořena dalším zkoumáním (Lozano-León et al. 2008).

Bacillus cereus patří mezi Grampozitivní sporotvorné komenzály lidského GIT a může být využit jako probiotikum (Bactisubtil®)(Cutting 2011; Rouzeau-Szynalski et al. 2020). Některé jeho typy působí patogenně tím, že mohou způsobit mírnou otravu potravy kvůli jejich enterotoxinům. To může být doprovázeno zvracením či průjmy (Cutting 2011; Rouzeau-Szynalski et al. 2020).

Escherichia coli je symbiotický Gramnegativní druh v lidském tlustém střevě, který zřídka způsobuje infekci u zdravých jedinců. Existuje však hodně typů *E. coli*, které mohou vyvolat průjmy a extraintestinální potíže i u zdravých lidí (Gomes et al. 2016).

Cornybacterium tuberculostearicum je komenzální Gram-pozitivní bakterie osidlující kůži a slizniční vstrvu. Tento druh je rezistentní vůči široké škále antibiotikům, tak je možné, že u pacientů s CD budou mít větší zastoupení (Hinić et al. 2012).

8 Závěr

Bifidobacterium spp. je v dnešní době vyhledávaným probiotickým rodem kvůli svým mnoha zdravotním přínosům. Cílem této práce byla kvantifikace a detekce bifidobakterií ve vzorcích stolice jedinců s Crohnovou chorobou (CD) s předpokladem, že bude přítomné nižší kvantitativní zastoupení i diverzita tohoto rodu.

Bifidobakterie byly kultivačně detekované pouze u 8 z celkového počtu 11 pacientů. Průměrné počty bifidobakterií byly výrazně nižší ve srovnání s dostupnými daty pro zdravé jedince. U těchto pacientů byly identifikované i jiné mikrobiální rody, které by mohly působit patogenně zvláště u jedinců se sníženou imunitou. Ve srovnání se zdravou populací bylo u dětí s CD detekováno nižší kvalitativní zastoupení bifidobakteriálních druhů.

Hypotéza této práce byla potvrzena. U dětí s CD byla prokázána snížená diverzita i kvantitativní zastoupení bifidobakterií. I když vliv bifidobakterií na zlepšení zdravotního stavu u pacientů s CD není zatím zcela prokázán, kvůli snížené celkové diverzitě bifidobakterií u pacientů s CD a přítomné mikrobiální dysbióze, je vhodné pokračovat v dalším studiu této problematiky.

9 Literatura

- ALBERONI, Daniele, Francesca GAGGIÀ, Loredana BAFFONI, Monica Marianna MODESTO, Bruno BIAVATI a Diana DI GIOIA, 2019. *Bifidobacterium xylocopae* sp. nov. and *Bifidobacterium aemilianum* sp. nov., from the carpenter bee (*Xylocopa violacea*) digestive tract. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2019, roč. 42, č. 2, s. 205–216. ISSN 16180984. Dostupné na: doi:10.1016/j.syapm.2018.11.005
- ALHAGAMHMAD, Moftah H., Andrew S. DAY, Daniel A. LEMBERG a Steven T. LEACH, 2016. An overview of the bacterial contribution to Crohn disease pathogenesis. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2016, roč. 65, č. 10, s. 1049–1059. ISSN 00222615. Dostupné na: doi:10.1099/jmm.0.000331
- ALP, Gulcin a Belma ASLIM, 2010. Anaerobe Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe* [online]. 2010, roč. 16, č. 2, s. 101–105. ISSN 1075-9964. Dostupné na: doi:10.1016/j.anaerobe.2009.06.006
- BÄCKHED, Fredrik, Claire M. FRASER, Yehuda RINGEL, Mary Ellen SANDERS, R. Balfour SARTOR, Philip M. SHERMAN, James VERSALOVIC, Vincent YOUNG a B. Brett FINLAY, 2012. Defining a healthy human gut microbiome: Current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host and Microbe* [online]. 2012, roč. 12, č. 5, s. 611–622. ISSN 19313128. Dostupné na: doi:10.1016/j.chom.2012.10.012
- BARKO, P. C., M. A. MCMICHAEL, K. S. SWANSON a D. A. WILLIAMS, 2018. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine* [online]. 2018, roč. 32, č. 1, s. 9–25. ISSN 19391676. Dostupné na: doi:10.1111/jvim.14875
- BIAVATI, Bruno, M. VESCOVO, S. TORRIANI a V. BOTTAZZI, 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*. 2000, roč. 131, č. 50, s. 117–131. ISSN 1590-4261.
- BIELECKA, Maria, 2006. *Probiotics in food* [online]. Dostupné na: doi:10.1201/9781420009613.ch16
- BOTTACINI, Francesca, Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA, 2017. Omics of bifidobacteria: Research and insights into their health-promoting activities. *Biochemical Journal* [online]. 2017, roč. 474, č. 24, s. 4137–4152. ISSN 14708728. Dostupné na: doi:10.1042/BCJ20160756
- BOTTACINI, Francesca, Marco VENTURA, Douwe van SINDEREN a Mary O. Connell MOTHERWAY, 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories* [online]. 2014, roč. 13, č. 1, s. 1–15. ISSN 14752859. Dostupné na: doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S4
- BRONSKÝ, Jiří, 2010. Probiotika v pediatrické praxi. *Pediatric pro praxi*. 2010, roč. 11, č. 3, s. 162–164. ISSN 1213-0494.
- BUNEŠOVÁ, Věra, M. JOCH, S. MUSILOVÁ a V. RADA, 2017. Bifidobacteria, Lactobacilli, and Short Chain Fatty Acids of Vegetarians and Omnivores. *Scientia Agriculturae Bohemica* [online]. 2017, roč. 48, č. 1, s. 47–54. ISSN 18059430. Dostupné na: doi:10.1515/sab-2017-0007
- BUNEŠOVÁ, Věra, Eva VLKOVÁ, Vojtěch RADA, Vladimíra KŇAZOVICKÁ, Šárka ROČKOVÁ, Martina GEIGEROVÁ a Matěj BOŽIK, 2012. Growth of infant fecal bacteria on commercial prebiotics. *Folia Microbiologica* [online]. 2012, roč. 57, č. 4, s. 273–275. ISSN 00155632. Dostupné na: doi:10.1007/s12223-012-0123-8
- CAMPANIELLO, Daniela, Antonio BEVILACQUA, Milena SINIGAGLIA a Clelia ALTIERI, 2015. Screening of *Propionibacterium* spp. for potential probiotic properties. *Anaerobe* [online]. 2015, roč. 34, č. August, s. 169–173. ISSN 10958274. Dostupné na: doi:10.1016/j.anaerobe.2015.06.003

- CHO, Ilseung a Martin J. BLASER, 2012. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2012, roč. 13, č. 4, s. 260–270. ISSN 14710056. Dostupné na: doi:10.1038/nrg3182
- CLEMENTE, Jose C., Luke K. URSELL, Laura Wegener PARFREY a Rob KNIGHT, 2012a. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* [online]. 2012, roč. 148, č. 6, s. 1258–1270. ISSN 00928674. Dostupné na: doi:10.1016/j.cell.2012.01.035
- CLEMENTE, Jose C, Luke K URSELL, Laura Wegener PARFREY a Rob KNIGHT, 2012b. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* [online]. 2012, roč. 148, č. 6, s. 1258–1270. ISSN 00928674. Dostupné na: doi:10.1016/j.cell.2012.01.035
- COMITO, Donatella, Antonio CASCIO a Claudio ROMANO, 2014. Microbiota biodiversity in inflammatory bowel disease. *Italian Journal of Pediatrics* [online]. 2014, roč. 40, č. 32, s. 1–6. ISSN 1824-7288. Dostupné na: doi:10.1186/1824-7288-40-32
- CREMON, Cesare, Maria Raffaella BARBARO, Marco VENTURA a Giovanni BARBARA, 2018. Pre- and probiotic overview. *Current Opinion in Pharmacology* [online]. 2018, roč. 43, s. 87–92. ISSN 14714973. Dostupné na: doi:10.1016/j.coph.2018.08.010
- CUTTING, Simon M., 2011. Bacillus probiotics. *Food Microbiology* [online]. 2011, roč. 28, č. 2, s. 214–220. ISSN 07400020. Dostupné na: doi:10.1016/j.fm.2010.03.007
- D'ARGENIO, Valeria a Francesco SALVATORE, 2015. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2015, roč. 451, č. December, s. 97–102. ISSN 18733492. Dostupné na: doi:10.1016/j.cca.2015.01.003
- DADAR, Maryam, Ruchi TIWARI, Kumaragurubaran KARTHIK, Sandip CHAKRABORTY, Youcef SHAHALI a Kuldeep DHAMA, 2018. Candida albicans - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2018, roč. 117, č. April, s. 128–138. ISSN 10961208. Dostupné na: doi:10.1016/j.micpath.2018.02.028
- DERRIEN, Muriel, Anne Sophie ALVAREZ a Willem M. DE VOS, 2019. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology* [online]. 2019, roč. 27, č. 12, s. 997–1010. ISSN 18784380. Dostupné na: doi:10.1016/j.tim.2019.08.001
- DERWA, Y, D J GRACIE a P J Hamlin A C FORD, 2017a. Systematic review with meta-analysis : the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* [online]. 2017, č. April, s. 389–400. Dostupné na: doi:10.1111/apt.14203
- DERWA, Y, D J GRACIE a P J Hamlin A C FORD, 2017b. Systematic review with meta-analysis : The efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* [online]. 2017, č. April, s. 389–400. Dostupné na: doi:10.1111/apt.14203
- DESESSO, J. M. a C. F. JACOBSON, 2001. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2001, roč. 39, č. 3, s. 209–228. ISSN 02786915. Dostupné na: doi:10.1016/S0278-6915(00)00136-8
- DORE, Maria Pina, Stefano BIBB, Gianni FRESI, Gabrio BASSOTTI a Giovanni Mario PES, 2019. Side Effects Associated with Probiotic Use in Adult Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients*. 2019, roč. 11, č. 2913, s. 1–12.
- DUJSÍKOVÁ, Hana, 2018. Farmakoterapie idiopatických střevních zánětů. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2018, roč. 32, č. 3, s. 7–10. ISSN 12127299. Dostupné na: https://www.internimedica.cz/artkey/int-201901-0006_farmakoterapie_idiopatickych_strevnich_zanetu.php

- DURANTI, Sabrina, Gabriele Andrea LUGLI, Stefania NAPOLI, Rosaria ANZALONE, Christian MILANI, Leonardo MANCABELLI, Giulia ALESSANDRI, Francesca TURRONI, Maria Cristina OSSIPRANDI, Douwe Van SINDEREN a Marco VENTURA, 2019. Characterization of the phylogenetic diversity of five novel species belonging to the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium castoris* sp. nov., *Bifidobacterium callimiconis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2019, roč. 69, s. 1288–1298. Dostupné na: doi:10.1099/ijsem.0.003306
- ECKEL, Viktor P. L., Marie ZIEGLER, Rudi F VOGEL a Matthias EHRMANN, 2020. *Bifidobacterium tibiigranuli* sp. nov. isolated from homemade water kefir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2020, č. 70, s. 1562–1570. Dostupné na: doi:10.1099/ijsem.0.003936
- EHRMANN, Jiří a Michal KONEČNÝ, 2011. Diagnostika a léčba idiopatických střevních zánětů. *Medicína pro praxi*. 2011, roč. 8, č. 10, s. 435–437. ISSN 1214-8687.
- ELLIOTT, Briony, Grace O. ANDROGA, Daniel R. KNIGHT a Thomas V. RILEY, 2017. *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. 2017, roč. 49, č. April, s. 1–11. ISSN 15677257. Dostupné na: doi:10.1016/j.meegid.2016.12.018
- EOM, Taekil, Yong Sung KIM, Chang Hwan CHOI a Michael J SADOWSKY, 2018. Current understanding of microbiota- and dietary-therapies for treating inflammatory bowel disease. *Journal of Microbiology* [online]. 2018, roč. 56, č. 3, s. 189–198. Dostupné na: doi:10.1007/s12275-018-8049-8
- FRIČ, Přemysl, 2010. Ekosystém a Probiotika. *Medicína pro praxi*. 2010, roč. 7, č. 11, s. 408–413.
- FRÜHAUF, Pavel, 2017. Střevní mikrobiota a možnosti ovlivnění. *Pediatric pro Praxi*. 2017, roč. 18, č. 4, s. 239–242. ISSN 18035264.
- FUJIMORI, Shunji, Atsushi TATSUGUCHI, Katya GUDIS, Teruyuki KISHIDA, Keigo MITSUI, Akihito EHARA, Tsuyoshi KOBAYASHI, Yoshihisa SEKITA, Tsuguhiko SEO a Choitsu SAKAMOTO, 2007. High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* [online]. 2007, roč. 22, č. 8, s. 1199–1204. ISSN 14401746. Dostupné na: doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04535.x
- FULLER, R. a G. GIBSON, 1998. *Probiotics and prebiotics* [online]. 1998. ISBN 9780122266942. Dostupné na: doi:10.1016/B0-12-226694-3/00267-2
- GEVERS, Dirk, Subra KUGATHASAN, Dan KNIGHTS, Aleksandar D KOSTIC, Rob KNIGHT a Ramnik J XAVIER, 2017. Commentary A Microbiome Foundation for the Study of Crohn's Disease. *Cell Host and Microbe* [online]. 2017, roč. 21, č. 3, s. 301–304. ISSN 1931-3128. Dostupné na: doi:10.1016/j.chom.2017.02.012
- GIBSON, Glenn R., Robert HUTKINS, Mary Ellen SANDERS, Susan L. PRESCOTT, Raylene A. REIMER, Seppo J. SALMINEN, Karen SCOTT, Catherine STANTON, Kelly S. SWANSON, Patrice D. CANI, Kristin VERBEKE a Gregor REID, 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2017, roč. 14, č. 8, s. 491–502. ISSN 17595053. Dostupné na: doi:10.1038/nrgastro.2017.75
- GILL S, POP M, DEBOY R, ECKBURG P, TURNBAUGH P, SAMUEL B a GORDON J, 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* [online]. 2006, roč. 312, č. 5778, s. 1355–1359. ISSN 1095-9203. Dostupné na: doi:10.1126/science.1124234.Metagenomic
- GOMES, Tânia A.T., Waldir P. ELIAS, Isabel C.A. SCALETSKY, Beatriz E.C. GUTH, Juliana F. RODRIGUES, Roxane M.F. PIAZZA, Luís C.S. FERREIRA a Marina B.

- MARTINEZ, 2016. Diarrheagenic Escherichia coli. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. 2016, roč. 47, č. Suppl 1, s. 3–30. ISSN 16784405. Dostupné na: doi:10.1016/j.bjm.2016.10.015
- GREGORA, Martin, 2013. Porod císařským řezem a jeho možná negativa pro novorozence. *Pediatric pro praxi*. 2013, roč. 14, č. 6, s. 404–406.
- GUANDALINI, Stefano, 2010. Update on the role of probiotics in the therapy of pediatric inflammatory bowel disease. *Expert Review of Clinical Immunology* [online]. 2010, roč. 6, č. 1, s. 47–54. ISSN 1744666X. Dostupné na: doi:10.1586/eci.09.70
- HASHIZUME-TAKIZAWA, Tomomi, Yohei YAMAGUCHI, Ryoki KOBAYASHI, Noriko SHINOZAKI-KUWAHARA, Masanori SAITO a Tomoko KURITA-OCHIAI, 2019. Oral challenge with Streptococcus sanguinis induces aortic inflammation and accelerates atherosclerosis in spontaneously hyperlipidemic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2019, roč. 520, č. 3, s. 507–513. ISSN 10902104. Dostupné na: doi:10.1016/j.bbrc.2019.10.057
- HEENEY, Dustin D., Mélanie G. GAREAU a Maria L. MARCO, 2018. Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride? *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2018, roč. 49, č. February, s. 140–147. ISSN 18790429. Dostupné na: doi:10.1016/j.copbio.2017.08.004
- HINIĆ, V., C. LANG, M. WEISSER, C. STRAUB, R. FREI a D. GOLDENBERGER, 2012. Corynebacterium tuberculostearicum: A potentially misidentified and multiresistant Corynebacterium species isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2012, roč. 50, č. 8, s. 2561–2567. ISSN 00951137. Dostupné na: doi:10.1128/JCM.00386-12
- HUANG, Chung Hsiung, Chien Chang SHEN, Yu Chih LIANG a Tong Rong JAN, 2016. The probiotic activity of Lactobacillus murinus against food allergy. *Journal of Functional Foods* [online]. 2016, roč. 25, č. 1, s. 231–241. ISSN 17564646. Dostupné na: doi:10.1016/j.jff.2016.06.006
- IANNITTI, T. a B. PALMIERI, 2010. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical Nutrition* [online]. 2010, roč. 29, č. 6, s. 701–725. ISSN 02615614. Dostupné na: doi:10.1016/j.clnu.2010.05.004
- KAUR, Rupinder, Renee DOMERGUE, Margaret L. ZUPANCIC a Brendan P. CORMACK, 2005. A yeast by any other name: Candida glabrata and its interaction with the host. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2005, roč. 8, č. 4, s. 378–384. ISSN 13695274. Dostupné na: doi:10.1016/j.mib.2005.06.012
- KLEIN, Günter, Alexander PACK, Christine BONAPARTE a Gerhard REUTER, 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1998, roč. 41, č. 2, s. 103–125. ISSN 01681605. Dostupné na: doi:10.1016/S0168-1605(98)00049-X
- KÖHLER, Werner, 2007. The present state of species within the genera Streptococcus and Enterococcus. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. 2007, roč. 297, č. 3, s. 133–150. ISSN 16180607. Dostupné na: doi:10.1016/j.ijmm.2006.11.008
- KOWALSKA-DUPLAGA, Kinga, Tomasz GOSIEWSKI, Przemysław KAPUSTA, Agnieszka SROKA-OLEKSIK, Andrzej WĘDRYCHOWICZ, Stanisław PIECZARKOWSKI, Agnieszka H. LUDWIG-SŁOMCZYŃSKA, Paweł P. WOŁKOW a Krzysztof FYDEREK, 2019. Differences in the intestinal microbiome of healthy children and patients with newly diagnosed Crohn's disease. *Scientific Reports* [online]. 2019, roč. 9, č. 1, s. 1–11. ISSN 20452322. Dostupné na: doi:10.1038/s41598-019-55290-9
- LEE, J.-H. a D. J. O'SULLIVAN, 2010. Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2010, roč. 74, č. 3, s. 378–416. ISSN 1092-2172. Dostupné na: doi:10.1128/mmbr.00004-10

- LLOYD-PRICE, Jason, Galeb ABU-ALI a Curtis HUTTENHOWER, 2016. The healthy human microbiome. *Genome Medicine* [online]. 2016, roč. 8, č. 1, s. 1–12. ISSN 1756994X. Dostupné na: doi:10.1186/s13073-016-0307-y
- LOZANO-LEÓN, Antonio, Jose IGLESIAS-CANLE, Susana SEIJO-RIOS a J. E. DOMINGUEZ-MUÑOZ, 2008. *First Reported Isolation of Multiresistant Staphylococcus warneri in Gastrointestinal Disease* [online]. Dostupné na: doi:10.1016/j.clinmicnews.2008.09.002
- LUGLI, Gabriele Andrea, Marta MANGIFESTA, Sabrina DURANTI, Rosaria ANZALONE, Christian MILANI, Leonardo MANCABELLI, Giulia ALESSANDRI, Francesca TURRONI, Maria Cristina OSSIPRANDI, Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA, 2018. Phylogenetic classification of six novel species belonging to the genus *Bifidobacterium* comprising *Bifidobacterium anseris* sp. nov., *Bifidobacterium criceti* sp. nov., *Bifidobacterium imperatoris* sp. nov., *Bifidobacterium italicum* sp. nov., *Bifidobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2018, roč. 41, č. 3, s. 173–183. ISSN 16180984. Dostupné na: doi:10.1016/j.syapm.2018.01.002
- LUKÁŠ, Milan, 2009. Farmakoterapie idiopatických střevních zánětů. *Praktické lékárenství* [online]. 2009, roč. 5, č. 4, s. 164–167. Dostupné na: www.praktickelekarenstvi.cz
- LUKÁŠ, Milan, 2011. Možnosti medikamentózní léčby u Crohnovy nemoci a ulcerózní kolitidy. *Interní medicína pr.* 2011, roč. 8, č. 9, s. 360–363. ISSN 12127299.
- LYNCH, Susan V. a Oluf PEDERSEN, 2016. The human intestinal microbiome in health and disease. *New England Journal of Medicine* [online]. 2016, roč. 375, č. 24, s. 2369–2379. ISSN 15334406. Dostupné na: doi:10.1056/NEJMra1600266
- MARTÍN, Rebeca, Laure LAVAL, Florian CHAIN, Sylvie MIQUEL, Jane NATIVIDAD, Claire CHERBUY, Harry SOKOL, Elena F. VERDU, Johan VAN HYLCKAMA VLIET, Luis G. BERMUDEZ-HUMARAN, Tamara SMOKVINA a Philippe LANGELLA, 2016. *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CNCM-I2494 restores gut barrier permeability in chronically low-grade inflamed mice. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, roč. 7, č. May, s. 1–12. ISSN 1664302X. Dostupné na: doi:10.3389/fmicb.2016.00608
- MATSUOKA, Katsuyoshi a Takanori KANAI, 2015. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in Immunopathology* [online]. 2015, roč. 37, č. 1, s. 47–55. ISSN 18632300. Dostupné na: doi:10.1007/s00281-014-0454-4
- MCDOWELL, Andrew a István NAGY, 2015. Propionibacteria and Disease. V: *Molecular Medical Microbiology: Second Edition* [online]. s. 837–858. ISBN 9780123971692. Dostupné na: doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00046-9
- MIRAGLIOTTA, Giuseppe, Tito DEL GAUDIO, Ernesto TAJANI a Adriana MOSCA, 2006. *Bacteroides thetaiotaomicron* in posthysterectomy infection. *Anaerobe* [online]. 2006, roč. 12, č. 5–6, s. 276–278. ISSN 10759964. Dostupné na: doi:10.1016/j.anaerobe.2006.07.002
- MITROVÁ, Katarína, 2012. Zánětlivá střevní onemocnění u dětí. *Pediatric pro Praxi* [online]. 2012, roč. 13, č. 6, s. 388–390. Dostupné na: http://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2012/06/07.pdf
- MODESTO, Monica, Samanta MICHELINI, Kaihei OKI, Bruno BIAVATI, Koichi WATANABE a Paola MATTARELLI, 2018a. *Bifidobacterium catulorum* sp. nov., a novel taxon from the faeces of the baby common marmoset (*Callithrix jacchus*) [online]. 2018, s. 575–581. Dostupné na: doi:10.1099/ijsem.0.002545
- MODESTO, Monica, Samanta MICHELINI, Maria Cristina SANSOSTI, Carlotta De FILIPPO, Duccio CAVALIERI, Linnea QVIRIST, Thomas ANDLID, Caterina SPIEZIO, Camillo SANDRI, Stefano PASCARELLI, Barbara SGORBATI a Paola MATTARELLI, 2018b. *Bifidobacterium callitrichidarum* sp. nov. from the faeces of the emperor tamarin (*Saguinus imperator*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

[online]. 2018, č. 68, s. 141–148. Dostupné na: doi:10.1099/ijsem.0.002472

MODESTO, Monica, Maria SATTI, Koichi WATANABE, Edoardo PUGLISI, Lorenzo MORELLI, Chien-hsun HUANG, Jong-shian LIOU, Mika MIYASHITA, Tomohiko TAMURA, Satomi SAITO, Koji MORI, Lina HUANG, Piero SCIAVILLA, Camillo SANDRI, Caterina SPIEZIO, Francesco VITALI, Duccio CAVALIERI, Giorgia PERPETUINI, Rosanna TOFALO, Andrea BONETTI, Masanori ARITA a Paola MATTARELLI, 2020. Characterization of Bifidobacterium species in faeces of the Egyptian fruit bat : Description of *B. vespertilionis* sp. nov. and *B. rousetti* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2020, roč. 42, č. 6, s. 126017. ISSN 0723-2020. Dostupné na: doi:10.1016/j.syapm.2019.126017

MODESTO, Monica, Koichi WATANABE, Masanori ARITA, Maria SATTI, Kaihei OKI, Piero SCIAVILLA, Claudio PATAVINO, Samanta MICHELINI, Barbara SGORBATI, Paola MATTARELLI a Cesare CAMM, 2019. Bifidobacterium jacchi sp. nov., isolated from the faeces of a baby common marmoset (*Callithrix jacchus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2019, č. 69, s. 2477–2485. Dostupné na: doi:10.1099/ijsem.0.003518

MURRAY, Barbara E., 1990. The life and times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1990, roč. 3, č. 1, s. 46–65. ISSN 0047-2336. Dostupné na: doi:10.1080/00472331003798640

O'CALLAGHAN, Amy a Douwe VAN SINDEREN, 2016. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, roč. 7, č. 925, s. 1–23. ISSN 1664302X. Dostupné na: doi:10.3389/fmicb.2016.00925

OBCĀNSKÉ SDRUŽENÍ PACIENTŮ S IDIOPATICKÝMI STŘEVNÍMI ZÁNĚTY, ZÁNĚTY a Česká Střevní gastroenterologická společnost ČLS JEP. Pracovní skupina pro idiopatické střevní ZÁNĚTY, 2016. *Všechno, co jste chtěli vědět o idiopatických střevních zánětech, ale báli se zeptat I. díl*. 2nd vyd. Praha: Občanské sdružení pacientů s idiopatickými střevními záněty- Pacienti IBD : Pracovní skupina pro idiopatické střevní záněty. ISBN 9788090512054.

PASCAL, Victoria, Marta POZUELO, Natalia BORRUEL, Francesc CASELLAS, David CAMPOS, Alba SANTIAGO, Xavier MARTINEZ, Encarna VARELA, Guillaume SARRABAYROUSE, Kathleen MACHIELS, Severine VERMEIRE, Harry SOKOL, Francisco GUARNER a Chaysavanh MANICHANH, 2017. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* [online]. 2017, roč. 66, č. 5, s. 813–822. ISSN 14683288. Dostupné na: doi:10.1136/gutjnl-2016-313235

PETERS, Joanna, James PRICE a Martin LLEWELYN, 2017. Staphylococcal and streptococcal infections. *Medicine (United Kingdom)* [online]. 2017, roč. 45, č. 12, s. 727–734. ISSN 13654357. Dostupné na: doi:10.1016/j.mpmed.2017.09.010

PLANCHE, Tim a Natasha KARUNAHARAN, 2017. Clostridium difficile. *Medicine (United Kingdom)* [online]. 2017, roč. 45, č. 10, s. 634–638. ISSN 13654357. Dostupné na: doi:10.1016/j.mpmed.2017.07.008

RAFIEIAN-KOPAEI, Mahmood, 2017. Probiotics Are a Good Choice in Remission of Inflammatory Bowel Diseases: A Meta Analysis and Systematic Review. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2017, č. March. Dostupné na: doi:10.1002/jcp.25911

ROSSI, Roberta E, Tara WHYAND, Charles D MURRAY, Mark I HAMILTON, Dario CONTE a Martyn E CAPLIN, 2016a. The role of dietary supplements in inflammatory bowel disease : a systematic review [online]. 2016, č. August. Dostupné na: doi:10.1097/MEG.0000000000000728

ROSSI, Roberta E, Tara WHYAND, Charles D MURRAY, Mark I HAMILTON, Dario CONTE a Martyn E CAPLIN, 2016b. The role of dietary supplements in inflammatory bowel disease: A systematic review. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*

- [online]. 2016, č. August. Dostupné na: doi:10.1097/MEG.0000000000000728
- ROUZEAU-SZYNALSKI, Katia, Katharina STOLLEWERK, Ute MESSELHÄUSSER a Monika EHLING-SCHULZ, 2020. Why be serious about emetic *Bacillus cereus*: Cereulide production and industrial challenges. *Food Microbiology* [online]. 2020, roč. 85, č. February 2019, s. 103279. ISSN 10959998. Dostupné na: doi:10.1016/j.fm.2019.103279
- RYŠÁVKA, Petr, 2019. Mikrobiom a vybraná onemocnění. *Pediatric pro Praxi* [online]. 2019, roč. 20, č. 3, s. 192–195. ISSN 18035264. Dostupné na: https://www.pediatricpropraxi.cz/artkey/ped-201903-0013_mikrobiom_a_vybrana_onemocneni.php
- ŠACHLOVÁ, Milana, 2011. Jakou volit stravu u pacientů Crohnovou chorobou? *Interní medicína pro praxi*. 2011, roč. 13, č. 10, s. 403–405. ISSN 12127299.
- SAMB-BA, Bissoume, Catherine MAZENOT, Amy GASSAMA-SOW, Grégory DUBOURG, Hervé RICHET, Perrine HUGON, Jean Christophe LAGIER, Didier RAOULT a Florence FENOLLAR, 2014. MALDI-TOF identification of the human gut microbiome in people with and without diarrhea in Senegal. *PLoS ONE* [online]. 2014, roč. 9, č. 5, s. 1–12. ISSN 19326203. Dostupné na: doi:10.1371/journal.pone.0087419
- SANDERS, Mary Ellen, Francisco GUARNER, Richard GUERRANT, Peter R. HOLT, Eamonn M.M. QUIGLEY, R. Balfour SARTOR, Philip M. SHERMAN a Emeran A. MAYER, 2013. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut* [online]. 2013, roč. 62, č. 5, s. 787–796. ISSN 00175749. Dostupné na: doi:10.1136/gutjnl-2012-302504
- SATISH KUMAR, C. S.V., K. KONDAL REDDY, G. BOOBALAN, A. GOPALA REDDY, C. H. SUDHA RANI CHOWDHARY, A. VINOTH, K. JAYAKANTH a G. SRINIVASA RAO, 2017. Immunomodulatory effects of *Bifidobacterium bifidum* 231 on trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Research in Veterinary Science* [online]. 2017, roč. 110, č. February, s. 40–46. ISSN 15322661. Dostupné na: doi:10.1016/j.rvsc.2016.10.010
- SCHÄFFLER, Holger, Annika KASCHITZKI, Christian ALBERTS, Peggy BODAMMER, Karen BANNERT, Thomas KÖLLER, Philipp WARNKE, Bernd KREIKEMEYER a Georg LAMPRECHT, 2016. Alterations in the mucosa-associated bacterial composition in Crohn's disease: a pilot study. *International Journal of Colorectal Disease* [online]. 2016, roč. 31, č. 5, s. 961–971. ISSN 14321262. Dostupné na: doi:10.1007/s00384-016-2548-z
- SEKSIK, P., L. RIGOTTIER-GOIS, G. GRAMET, M. SUTREN, P. POCHART, P. MARTEAU, R. JIAN a J. DORÉ, 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* [online]. 2003, roč. 52, č. 2, s. 237–242. ISSN 00175749. Dostupné na: doi:10.1136/gut.52.2.237
- SHANAHAN, Fergus, 2002. Crohn's disease. *The Lancet*. 2002, roč. 359, č. January 5, s. 62–69.
- SIMPSON, Paul J., R. Paul ROSS, Gerald F. FITZGERALD a Catherine STANTON, 2004. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2004, roč. 54, č. 2, s. 401–406. ISSN 14665026. Dostupné na: doi:10.1099/ijs.0.02667-0
- SOGAWA, Kazuyuki, Masaharu WATANABE, Kenichi SATO, Syunsuke SEGAWA, Chisato ISHII, Akiko MIYABE, Syota MURATA, Tomoko SAITO a Fumio NOMURA, 2011. Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2011, roč. 400, č. 7, s. 1905–1911. ISSN 16182642. Dostupné na: doi:10.1007/s00216-011-

- STEED, H., G. T. MACFARLANE, K. L. BLACKETT, B. BAHRAMI, N. REYNOLDS, S. V. WALSH, J. H. CUMMINGS a S. MACFARLANE, 2010. Clinical trial: The microbiological and immunological effects of synbiotic consumption - A randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* [online]. 2010, roč. 32, č. 7, s. 872–883. ISSN 02692813. Dostupné na: doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04417.x
- ŠVESTKA, Tomislav, 2007. Mikroflóra trávicího traktu a probiotika. *Pediatric pro praxi*. 2007, roč. 8, č. 4, s. 220–221. ISSN 1234-5678.
- TAN, Huizi, Qixiao ZHAI a Wei CHEN, 2019. Investigations of Bacteroides spp. towards next-generation probiotics. *Food Research International* [online]. 2019, roč. 116, č. 1800, s. 637–644. ISSN 18737145. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodres.2018.08.088
- TURRONI, Francesca, David BERRY a Marco VENTURA, 2017. Editorial: Bifidobacteria and Their Role in the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, roč. 7, č. 10, s. 1957–1958. Dostupné na: doi:10.1038/nrmicro
- TURRONI, Francesca, Elena FORONI, Mary O. Connell MOTHERWAY, Francesca BOTTACINI, Vanessa GIUBELLINI, Aldert ZOMER, Alberto FERRARINI, Massimo DELLEDONNE, Ziding ZHANG, Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA, 2010. Characterization of the serpin-encoding gene of bifidobacterium breve 210B. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2010, roč. 76, č. 10, s. 3206–3219. ISSN 00992240. Dostupné na: doi:10.1128/AEM.02938-09
- TURRONI, Francesca, Douwe VAN SINDEREN a Marco VENTURA, 2011. Genomics and ecological overview of the genus Bifidobacterium. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2011, roč. 149, č. 1, s. 37–44. ISSN 01681605. Dostupné na: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.010
- URBANSKA, Aleksandra M., Emmanouil D. KARAGIANNIS, Andrew S. AU, Si Yuan DAI, Masoud MOZAFARI a Satya PRAKASH, 2016. What's Next for Gastrointestinal Disorders: No Needles? *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, roč. 221, č. January, s. 48–61. ISSN 18734995. Dostupné na: doi:10.1016/j.jconrel.2015.11.031
- URSELL, Luke K., Jessica L. METCALF, Laura Wegener PARFREY a Rob KNIGHT, 2012. Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews* [online]. 2012, roč. 70, č. SUPPL. 1, s. S38–S44. ISSN 00296643. Dostupné na: doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x
- VAHABNEZHAD, Elaheh, Albert Brian MOCHON, Joyce WOZNIAK a David Alexander ZIRING, 2013. Lactobacillus Bacteremia Associated With Probiotic Use in a Pediatric Patient With Ulcerative Colitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2013, roč. 47, č. 5, s. 437–439.
- VAN VEEN, S. Q., E. C.J. CLAAS a Ed J KUIJPER, 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2010, roč. 48, č. 3, s. 900–907. ISSN 00951137. Dostupné na: doi:10.1128/JCM.02071-09
- VENTURA, M., C. CANCHAYA, A. TAUCH, G. CHANDRA, G. F. FITZGERALD, K. F. CHATER a D. VAN SINDEREN, 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2007, roč. 71, č. 3, s. 495–548. ISSN 1092-2172. Dostupné na: doi:10.1128/MMBR.00005-07
- VENTURA, Marco, Carlos CANCHAYA, Antonio DEL CASALE, Franco DELLAGLIO, Erasmo NEVIANI, Gerald F. FITZGERALD a Douwe VAN SINDEREN, 2006. Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *International*

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [online]. 2006. ISSN 14665026.

Dostupné na: doi:10.1099/ijs.0.64233-0

VLKOVÁ, Eva, Hana SALMONOVÁ, Věra BUNEŠOVÁ, Martina GEIGEROVÁ, Vojtěch RADA a Šárka MUSILOVÁ, 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe* [online]. 2015, roč. 34, č. August, s. 27–33. ISSN 10958274. Dostupné na:

doi:10.1016/j.anaerobe.2015.04.001

VUONG, Cuong a Michael OTTO, 2002. Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes and infection* [online]. 2002, roč. 18, č. 4, s. 481–489. ISSN 14695146. Dostupné na: doi:10.1017/S0021859600009278

WALKER, Alan W. a Trevor D. LAWLEY, 2013. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacological Research* [online]. 2013, roč. 69, č. 1, s. 75–86. ISSN 10436618. Dostupné na: doi:10.1016/j.phrs.2012.09.008

WASILEWSKA, Ewa a Barbara WROBLEWSKA, 2018. Effectiveness and safety of probiotic preparations in clinical treatment of inflammatory bowel disease. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* [online]. 2018, roč. 72, č. March, s. 159–174. Dostupné na: doi:10.5604/01.3001.0011.6471

WHITMAN, William B, David C COLEMAN a William J WIEBE, 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1998, roč. 95, č. June, s. 6. Dostupné na: papers3://publication/uuid/605B518B-C33B-400F-B525-8B1F02CD745A

WILHELM, Mudr Zdeněk a Mudr Peter HEGYI, 2006. Fyziologické poznámky ke gastrointestinálnímu traktu. *Praktické lékařství*. 2006, č. 1, s. 36–38.

WILHELM, Zdeněk, 2011. Digestce a resorpce. *Praktické lékařství*. 2011, roč. 7, č. 2, s. 71–75. ISSN 1801-2434.

YATSUNENKO, T, FE REY, MJ MANARY, I TREHAN, MG DOMINGUEZ-BELLO, M CONTRERAS, M MAGRIS, G HIDALGO, RN BALDASSANO, AP ANOKHIN, AC HEATH, B WARNER, J REEDER, J KUCZYNSKI, JG CAPORASO, CA LOZUPONE, C LAUBER, JC CLEMENTE, D KNIGHTS, R KNIGHT a Jeffrey GORDON, 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* [online]. 2012, roč. 486, č. 7402, s. 222–227. Dostupné na: doi:10.1038/nature11053.Human

ZHANG, Liangfen, Jonathan C. THOMAS, Maria MIRAGAIA, Ons BOUCHAMI, Fernando CHAVES, Pedro A. D'AZEVEDO, David M. AANENSEN, Herminia DE LENCASTRE, Barry M. GRAY a D. Ashley ROBINSON, 2013. Multilocus Sequence Typing and Further Genetic Characterization of the Enigmatic Pathogen, *Staphylococcus hominis*. *PLoS ONE* [online]. 2013, roč. 8, č. 6. ISSN 19326203. Dostupné na: doi:10.1371/journal.pone.0066496

10 Samostatné přílohy

Tabulka 7: Počty narostlých kolonií ze vzorků stolice dětí s CD

VZORKY MOTOL STUDIE EN (A)										KTJ/g	10*	log KTj/g
Pacient 1	Vzorek 1	2	3	4	5	6	7	8	9			
	CP						60	4	0	5,82	8	8,76
	Norfloxacin			364	36	2	0	0	0	3,62	6	6,56
	Mupirocin			392	44	4	0	0	0	3,96	6	6,60
Pacient 2	Vzorek 2	2	3	4	5	6	7	8	9			
	CP					112	38	8	0	1,42	8	8,15
	Norfloxacin				684	74	12	0	0	7,82	7	7,89
	Mupirocin					70	4	0	0	6,72	7	7,83
Pacient 3	Vzorek 3	2	3	4	5	6	7	8	9			
	CP					112	10	0	0	1,09	8	8,04
	Norfloxacin					216	22	2	0	2,16	8	8,33
	Mupirocin					188	18	2	0	1,87	8	8,27
Pacient 4	Vzorek 4	2	3	4	5	6	7	8	9			
	CP					168	30	4	0	1,82	8	8,26
	Norfloxacin	108	8	0	0	0	0	0	0	1,05	4	4,02
	Mupirocin	160	14	0	0	0	0	0	0	1,58	4	4,20
Pacient 5	Vzorek 5	2	3	4	5	6	7	8	9			
	CP					22	4	0	0	2,36	7	7,37
	Norfloxacin			368	38	4	0	0	0	3,69	6	6,57
	Mupirocin				208	20	2	0	0	2,07	7	7,32
Pacient 6	Vzorek 6	2	3	4	5	6	7	8	9			
	CP					156	32	4	0	1,73	8	8,24
	Norfloxacin			392	38	4	0	0	0	3,91	6	6,59
	Mupirocin				432	44	4	0	0	4,32	7	7,64
ANIČKA - VZORKY Z MOTOLU (B)												
Pacient 7	Vzorek 1	2	3	4	5	6	7	8	9			
	CP				204	26	8	2	0	2,16	7	7,33
	Norfloxacin		88	10	2	0	0	0	0	9,00	4	4,95
	Mupirocin		232	30	2	0	0	0	0	2,38	5	5,38
Pacient 8	Vzorek 2	2	3	4	5	6	7	8	9			
	CP				80	10	4	0	0	8,47	6	6,93
	Norfloxacin	22	0	0	0	0	0	0	0	2,2	3	3,34
	Mupirocin		148	10	0	0	0	0	0	1,44	5	5,16
Pacient 9	Vzorek 3	2	3	4	5	6	7	8	9			
	CP					776	120	16	0	1,23	8	8,09
	Norfloxacin				152	10	2	0	0	1,48	7	7,17
	Mupirocin					282	48	2	0	2,99	8	8,48
Pacient 10	Vzorek 4	2	3	4	5	6	7	8	9			
	CP					250	18	2	0	2,43	8	8,39
	Norfloxacin				150	34	4	0	0	1,69	7	7,23
	Mupirocin				1296	166	22	0	0	1,71	8	8,23
Pacient 11	Vzorek 17	2	3	4	5	6	7	8	9			
	CP					106	12	2		1,08	8	8,03
	Norfloxacin					52	18			6,36	7	7,8

Identifikace vytvořených izolátů pomocí MALDI TOF MS; NI= vzorek se nepodařilo identifikovat							
Pacient	Izolát	Maldi TOF MS identifikace	Skóre	Pozice	Datum identifikace	Poznámky-morfologie	Další identifikovaný mikroorganismus
1	A 1/4 NA	<i>Candidida glabrata</i>	1,828	K24	11.06.2019	kvasinka	
1	A 1/4 NB	NI			13.06.2019	kvasinka	
1	A 1/5 NA	<i>Candidida glabrata</i>	1,00	L3	11.06.2019	kvasinka	
1	A 1/5 NB	<i>Candidida glabrata</i>	1,754	L5	11.06.2019	kvasinka	
1	A 1/5 NC	<i>Bacillus cereus</i>	2,187	A21	13.06.2019	tlustá tyčinka	
1	A 1/6 NA	<i>Candidida glabrata</i>	2,028	L7	11.06.2019	kvasinka	
1	A 1/4 A	NI			13.06.2019	kvasinka	
1	A 1/4 B	NI			13.06.2019	kvasinka	
1	A 1/4 C	NI			13.06.2019	kvasinka	
1	A 1/5 A	<i>Candidida glabrata</i>	1,974	L8	11.06.2019	kvasinka	
1	A 1/5 B	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,038	L10	11.06.2019	kvasinka, diplokoky	
1	A 1/5 C	NI			13.06.2019	kvasinka	
2	A 2/5 NA	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,096	L12	11.06.2019	tyčinky delší nepravidelné	
2	A 2/5 NB	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,19	L15	11.06.2019	tyčinky delší nepravidelné	
2	A 2/6 NA	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,315	L16	11.06.2019	agregující nepravidelné tyčinky	
2	A 2/6 NB	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,314	L19	11.06.2019	agregující nepravidelné tyčinky	
2	A 2/7 NA	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,331	L20	11.06.2019	agregující nepravidelné tyčinky	
2	A 2/7 NB	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,196	L23	11.06.2019	agregující nepravidelné tyčinky	
2	A 2/5 A	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,144	M1	11.06.2019	nepravidelné mimě agregující tyčinky	
2	A 2/5 B	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,095	A24	13.06.2019	nepravidelné tyčinky	
2	A 2/6 A	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1,938	M3	11.06.2019	nepravidelné tyčinky	
2	A 2/6 B	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,006	M5	11.06.2019	nepravidelné tyčinky	
2	A 2/6 C	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,245	M7	11.06.2019	nepravidelné tyčinky	
2	A 2/6 D	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,265	M8	11.06.2019	delší nepravidelné tyčinky	
3	A 3/2 NA	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,14	M10	11.06.2019	klostridie + přínos řetízků	<i>Clostridium difficile</i>
3	A 3/2 NB	<i>Clostridium difficile</i>	2,3003	M13	11.06.2019	klostridie	
3	A 3/2 NC	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,406	M15	11.06.2019	koky	
3	A 3/2 ND	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,436	M17	11.06.2019	koky	
3	A 3/3 NA	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,458	B3	13.06.2019	enterokok	
3	A 3/3 NB	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,005	B6	13.06.2019	enterokok	
3	A 3/2 A	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,387	M18	11.06.2019	koky + nepravidelné tyčinky	
3	A 3/2 B	<i>Propionibacterium acnes</i>	2,235	M21	11.06.2019	diplokoky- nepravidelné Propionibacterium	
3	A 3/2 C	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,407	M23	11.06.2019	koky + diplokoky- nepravidelné Propionibacterium	
3	A 3/2 D	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,348	B2	13.06.2019	enterokok	
3	A 3/3 A	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,262	B7	13.06.2019	kokultura	
3	A 3/3 B	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,305	B9	13.06.2019	kokultura	
4	A 4/2NA	<i>Lactobacillus murinus</i>	2,202	J5	17.06.2019	tyčinky tlusté rovné	
4	A 4/2 NB	<i>Lactobacillus murinus</i>	2,201	J7	17.06.2019	pravidelné tlusté tyčinky + koky	
4	A 4/3 NA	<i>Lactobacillus murinus</i>	2,226	J10	17.06.2019	kokultura, tlusté tyčinky, hubené tyčinky, koky	
4	A 4/3 NB	<i>Lactobacillus murinus</i>	2,181	J12	17.06.2019	kokultura, tlusté tyčinky, hubené tyčinky, koky	
4	A 4/2 A	<i>Lactobacillus murinus</i>	2,168	J13	17.06.2019	kokultura, tlusté tyčinky, hubené tyčinky, koky	
4	A 4/2 B	<i>Lactobacillus murinus</i>	2,281	J15	17.06.2019	kokultura, tlusté tyčinky, hubené tyčinky, koky	
4	A 4/2 C	<i>Lactobacillus murinus</i>	2,22	J17	17.06.2019	tlusté rovné tyčinky + hubené diplotyčinky	
4	A 4/3A	<i>Lactobacillus murinus</i>	2,186	J19	17.06.2019	diplokoky+ řetízky koků + tlusté tyčinky	
4	A 4/3B	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,088	J22	17.06.2019	drobné diplokoky	
5	A 5/4 NA	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2,305	J23	17.06.2019	diplotyčinky krátké tlusté	
5	A 5/4 NB	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2,361	K2	17.06.2019	diplotyčinky krátké tlusté	
5	A 5/4 NC	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2,379	K3	17.06.2019	diplotyčinky krátké tlusté	
5	A 5/5 NA	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2,361	K5	17.06.2019	diplotyčinky krátké tlusté	
5	A 5/5 NB	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2,25	K8	17.06.2019	diplotyčinky krátké tlusté	
5	A 5/6 NA	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2,315	K10	17.06.2019	diplotyčinky krátké tlusté	
5	A 5/3 A	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,05	K12	17.06.2019	drobné nepravidelné tyčinky, místy agregace	
5	A 5/3 B	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,266	K13	17.06.2019	drobné nepravidelné tyčinky, místy agregace	
5	A 5/4 A	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,133	K15	17.06.2019	nepravidelné tyčinky, větvené	
5	A 5/5 A	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,2	K18	17.06.2019	nepravidelné tyčinky, větvené	
5	A 5/6 A	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,167	K19	17.06.2019	nepravidelné tyčinky, větvené	
5	A 5/7 A	<i>Enterococcus canintestini</i>	2,204	K21	17.06.2019	drobné koky řetízky	
6	A 6/4 NA	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,257	K23	17.06.2019	nepravidelné tyčinky	
6	A 6/4NB	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,132	L2	17.06.2019	nepravidelné tyčinky	
6	A 6/4 NC	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,212	L4	17.06.2019	nepravidelné tyčinky	
6	A 6/5 NA	<i>Bacteroides uniformis</i>	2,308	L5	17.06.2019	nepravidelné tyčinky	
6	A 6/4 A	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,066	L7	17.06.2019	nepravidelné tyčinky	<i>Bifidobacterium longum</i>
6	A 6/4 B	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,14	L10	17.06.2019	nepravidelné tyčinky	
6	A 6/5 A	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,141	L11	17.06.2019	nepravidelné tyčinky	
6	A 6/5 B	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,199	L14	17.06.2019	nepravidelné tyčinky	
6	A 6/6 A	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,124	L15	17.06.2019	nepravidelné tyčinky	
6	A 6/7 A	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1,741	L17	17.06.2019	nepravidelné tyčinky	<i>Bifidobacterium longum</i>

Identifikace vytvořených izolátů pomocí MALDI TOF MS							NI=vzorek se nepodařilo identifikovat	
Pacient	Izolát	Maldi TOF MS identifikace	Skóre	Pozice	Datum identifikace	Poznámky-morfologie	Další identifikovaný mikroorganismus	
7	A 1/2 NA	<i>Bacteroides uniformis</i>	2,386	C16	24.06.2019	velmi dlouhé tyčinky, diplokoky		
7	A 1/3NA	<i>Bacteroides ovatus</i>	2,334	C17	24.06.2019	krátké tyčinky, diploky		
7	A 1/3NB	<i>Bacteroides ovatus</i>	2,406	C19	24.06.2019	diploky		
7	A 1/4 NA	<i>Bacteroides ovatus</i>	2,292	C22	24.06.2019	diploky		
7	A 1/4 NB	<i>Bacteroides ovatus</i>	2,325	C23	24.06.2019	diploky		
7	A 1/5 NA	<i>Bacteroides ovatus</i>	2,395	D2	24.06.2019	diploky		
7	A 1/3 A	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2,406	D4	24.06.2019	nepravidelné tyčinky		
7	A 1/3 B	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2,379	D5	24.06.2019	nepravidelné tyčinky		
7	A 1/4 A	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2,367	D7	24.06.2019	nepravidelné tyčinky		
7	A 1/4 B	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2,07	G10	24.06.2019	nepravidelné tyčinky		
7	A 1/5 A	<i>Bifidobacterium dentium</i>	2,008	G11	24.06.2019	nepravidelné tyčinky		
8	A 2/2 NA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2,19	G13	24.06.2019	koky, místy řetízky	<i>Streptococcus oralis</i>	
8	A 2/2 NB	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,998	F12	24.06.2019	řetízky koků a kvasinek		
8	A 2/2 NC	NI			24.06.2019	agregace ve zkumavce, řetízky koků a kvasinky		
8	A 2/2 ND	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,818	F15	24.06.2019	agregace ve zkumavce, koky, diplokoky		
8	A 2/2 NE	<i>Candida albicans</i>	2,127	F18	24.06.2019	nepravidelné tyčinky vytvářející útvary hvězd	<i>Candida albicans (africana)</i>	
8	A 2/4 A	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,261	G15	24.06.2019	tyčinky, místy vytváří řetízky		
8	A 2/4 B	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1,977	G18	24.06.2019	agregace ve zkumavce, nepravidelné tyčinky, agregace		
8	A 2/5 A	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,281	G20	24.06.2019	drobné tyčinky		
8	A 2/5 B	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,141	G21	24.06.2019	nepravidelné tyčinky		
8	A 2/5 C	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,127	G23	24.06.2019	agregace ve zkumavce, nepravidelné tyčinky, agregace		
9	A 3/4 NA	<i>Bifidobacterium longum</i>	1,858	F19	24.06.2019	nepravidelné tlustší tyčinky, agregující		
9	A 3/5 NA	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2,405	H1	24.06.2019	krátké rovné tlustší pravidelné tyčinky, místy tvoří řetízky		
9	A 3/5 NB	<i>Bacteroides uniformis</i>	2,463	H4	24.06.2019	krátké rovné tlustší pravidelné tyčinky, místy tvoří řetízky		
9	A 3/6 NA	<i>Bacteroides caccae</i>	2,35	H6	24.06.2019	krátké rovné tlustší pravidelné tyčinky, místy tvoří řetízky		
9	A 3/6 NB	<i>Bacteroides uniformis</i>	1,828	F22	24.06.2019	koky + pohyblivé tyčinky		
9	A 3/7 NA	<i>Bacteroides caccae</i>	2,375	H8	24.06.2019	krátké rovné tlustší pravidelné tyčinky, místy tvoří řetízky		
9	A 3/5 A	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,112	H9	24.06.2019	nepravidelné tyčinky		
9	A 3/6 A	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,09	F24	24.06.2019	nepravidelné tlustší tyčinky, agregující		
9	A 3/6 B	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,03	G1	24.06.2019	nepravidelné tlustší tyčinky, agregující		
9	A 3/7 A	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,173	H11	24.06.2019	nepravidelné tyčinky, více se rozvětvují		
9	A 3/7 B	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,178	G4	24.06.2019	nepravidelné tlustší tyčinky, agregující		
9	A 3/8 A	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,127	G5	24.06.2019	nepravidelné tlustší tyčinky, agregující		
10	A 4/5 NA	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,353	H14	24.06.2019	nepravidelné tyčinky, Bifida?		
10	A 4/5 NB	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,297	H16	24.06.2019	nepravidelné tyčinky, Bifida?		
10	A 4/6 NA	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,395	H18	24.06.2019	nepravidelné tyčinky, Bifida?		
10	A 4/6 NB	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,358	H19	24.06.2019	nepravidelné tyčinky, Bifida?		
10	A 4/6 NC	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2,339	H22	24.06.2019	nepravidelné tyčinky, Bifida?		
10	A 4/7 NA	<i>Corynebacterium tuberculostea</i>	2,103	G8	24.06.2019	nepravidelná morfologie		
10	A 4/6 A	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,367	H24	24.06.2019	nepravidelné tyčinky, Bifida?		
10	A 4/6 B	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1,838	I2	24.06.2019	agregace ve zkumavce, místy agregující velmi drobné tyčinky		
10	A 4/6 C	<i>Propionibacterium australiensis</i>	1,734	I3	24.06.2019	agregace ve zkumavce, místy agregující velmi drobné tyčinky		
10	A 4/7 A	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,305	I5	24.06.2019	nepravidelné tyčinky		
10	A 4/7 B	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,234	I8	24.06.2019	nepravidelné tyčinky		
10	A 4/7 C	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,379	I10	24.06.2019	nepravidelné tyčinky		
11	A 17/4 NA	<i>Staphylococcus warneri</i>	1,713	O5	15.08.2019	diplokoky, místy tyčinky, Streptococcus		
11	A 17/4 NB	<i>Staphylococcus hominis</i>	1,82	O7	15.08.2019	diplokoky, místy tyčinky, Streptococcus		
11	A 17/5 NA	<i>Bifidobacterium breve</i>	1,987	O10	15.08.2019	drobné tyčinky, <i>Bifidobacterium breve</i>		
11	A 17/5 NB	<i>Bifidobacterium breve</i>	1,986	O12	15.08.2019	drobné tyčinky, <i>Bifidobacterium breve</i>		
11	A 17/5 NC	<i>Bifidobacterium breve</i>	1,993	O13	15.08.2019	drobné tyčinky, <i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium indicum*</i>	
11	A 17/6 NA	<i>Bifidobacterium breve</i>	2,022	O15	15.08.2019	drobné tyčinky, <i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium indicum*</i>	
11	A 17/6 NB	<i>Bifidobacterium breve</i>	1,922	O18	15.08.2019	drobné tyčinky, <i>Bifidobacterium breve</i>		
11	A 17/6 NC	<i>Bifidobacterium breve</i>	2,079	O19	15.08.2019	drobné tyčinky, <i>Bifidobacterium breve</i>		
11	A 17/4 A	<i>Bifidobacterium breve</i>	2,107	O22	15.08.2019	drobné tyčinky, <i>Bifidobacterium breve</i>		
11	A 17/4 B	<i>Bifidobacterium breve</i>	2,059	O23	15.08.2019	drobné tyčinky, <i>Bifidobacterium breve</i>		
11	A 17/5 A	<i>Bifidobacterium breve</i>	2,014	P1	15.08.2019	drobné tyčinky, <i>Bifidobacterium breve</i>		
11	A 17/5 B	<i>Bifidobacterium indicum</i>	1,766	P4	15.08.2019	drobné tyčinky, <i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium breve*</i>	
11	A 17/6 A	<i>Bifidobacterium indicum</i>	1,872	P5	15.08.2019	drobné tyčinky, <i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Bifidobacterium breve*</i>	
11	A 17/6 B	<i>Bifidobacterium breve</i>	1,849	P7	15.08.2019	drobné tyčinky, <i>Bifidobacterium breve</i>		
11	A 17/7 A	<i>Bifidobacterium breve</i>	1,921	P9	15.08.2019	drobné tyčinky, <i>Bifidobacterium breve</i>		
11	A CP 17/7	EC DD	2,415	P12	15.08.2019	megakolonie na miskách, inhibice jiných rodů	EC AI, EC CA, EC CI	