

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Probiotika a enterální výživa jako podpůrné terapie
Crohnovy choroby**

Diplomová práce

**Autor práce: Bc. Karolína Hlaváčová
Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.
Konzultant práce: doc. Ing. Věra Nežil Bunešová, Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Probiotika a enterální výživa jako podpůrné terapie Crohnovy choroby" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24.07. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za pomoc a užitečné rady při konzultacích spojených s touto prací, dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Věře Bunešové, Ph.D. za trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování metodické části práce věnovala.

Probiotika a enterální výživa jako podpůrné terapie Crohnovy choroby

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá alternativními možnostmi terapie Crohnovy choroby, tj. probiotiky a enterální výživou. Cílem práce bylo vytvořit ucelený literární přehled o roli probiotických bakterií a enterální výživy při léčbě zánětlivých střevních onemocnění, zejména pak Crohnovy choroby. Z rešerše vyplývá, že u většiny provedených studií byl zaznamenán velmi slabý nebo žádný přínos probiotik na zachování remise při terapii pacientů s Crohnovou chorobou. U enterální výživy se naopak autoři shodují v tom, že je účinným druhem terapie (zejména ve formě exkluzivní enterální výživy) k vyvolání remise Crohnovy choroby u kojenců, ačkoli mechanismus účinku není zcela objasněn.

Cílem praktické části bylo stanovení druhového zastoupení bifidobakterií u specifické skupiny pacientů na enterální výživě a ověřit selektivitu kultivačních médií, určené pro detekci přítomnosti rodu *Bifidobacterium*. Jednotlivé vzorky stolice byly kultivovány a následně analyzovány metodou MALDI-TOF MS, pomocí které byly identifikovány bifidobakterie na druhové úrovni. Z výsledků práce vyplývá, že u vzorků nejvíce převažovaly tyto druhy bifidobakterií: *B. longum*, *B. breve*, *B. animalis*, *B. adolescentis* a *B. bifidum*.

Selektivita kultivačních médií s přidavkem antibiotik byla ověřena. Vyšší počty bifidobakterií byly na B-NOR. Z B-MUP bylo izolováno celkem 53 kmenů bakterií, z toho 39 kmenů bakterií bylo zařazeno do rodu *Bifidobacterium*, to znamená, že spolehlivost toho média je 73,58 %. U B-NOR bylo 37 izolátů, ale pouze 3 kmeny byly zařazeny jinam než do rodu *Bifidobacterium*, to znamená, že u B-NOR je spolehlivost vyšší, tj. 91,89 %.

Hypotézou práce bylo, že množství a druhové zastoupení bifidobakterií u zdravých lidí a pacientů na enterální výživě je rozdílné. Na základě porovnání výsledků práce s počtem bifidobakterií u zdravých lidí, byla stanovená hypotéza potvrzena a bylo prokázáno, že zastoupení bifidobakterií je u pacientů na enterální výživě nižší a druhově rozdílné oproti zastoupení bifidobakterií zdravých lidí.

Klíčová slova: bifidobakterie, Crohnova choroba; enterální výživa; probiotika; zánětlivá střevní onemocnění

Probiotics and enteral nutrition in the therapy of Crohn's disease

Summary

This diploma thesis deals with alternative treatment options for Crohn's disease, ie probiotics and enteral nutrition. The aim of the work was to create a comprehensive literature review of the role of probiotic bacteria and enteral nutrition in the treatment of inflammatory bowel diseases, especially Crohn's disease. The research showed that most of the studies showed very little or no benefit of probiotics in in order to maintain a remission in the treatment of patients with Crohn's disease. On the other hand, enteral nutrition was evaluated by the authors as an effective type of therapy (especially exclusive enteral nutrition) to induce remission of Crohn's disease in infants, although the mechanism of action is not fully elucidated.

The aim of the practical part was to determine the species representation of bifidobacteria in a specific group of patients on enteral nutrition and to verify the selectivity of culture media for bifidobacteria. Individual stool samples were cultured and subsequently analyzed by MALDI-TOF MS, where bifidobacteria were identified at the species level. The results showed that in the samples predominated these following species of bifidobacteria: *B. longum*, *B. breve*, *B. animalis*, *B. adolescentis* and *B. bifidum*.

The selectivity of the culture media with the addition of antibiotics was verified. Higher numbers were on B-NOR. A total of 53 strains of bacteria were isolated from B-MUP, of which 39 strains of bacteria were included in the genus *Bifidobacterium*, I.e. the reliability of this medium is 73.58%. There were 37 isolates in B-NOR, but only 3 strains were classified other than in the genus *Bifidobacterium*, which means that the reliability is higher in B-NOR, ie 91.89%.

The hypothesis of the work was that the amount and a representation of bifidobacterial species in healthy people and patients on enteral nutrition is different. Based on the comparison of the results of the work with the number of bifidobacteria in healthy people, the hypothesis was confirmed and it was shown that the proportion of bifidobacteria in patients on enteral nutrition is lower and different in species compared to the proportion of bifidobacteria in healthy people.

Keywords: bifidobacteria, Crohn's disease; enteral nutrition; probiotics; inflammatory bowel disease

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Mikrobiota gastrointestinálního traktu	10
3.1.1 Charakteristika mikrobioty	10
3.1.2 Vývoj lidské mikrobioty.....	11
3.1.3 Funkce lidské mikrobioty	12
3.1.4 Mikrobiota pacientů s Crohnovou chorobou	13
3.2 Probiotika, probiotika a synbiotika	14
3.3 Imunitní funkce gastrointestinálního traktu	16
3.4 Zánětlivá střevní onemocnění	17
3.4.1 Crohnova choroba	17
3.4.2 Projevy choroby.....	18
3.4.3 Příčiny vzniku choroby.....	19
3.4.3.1 Genetické faktory	19
3.4.3.2 Imunodeficience	19
3.4.3.3 Faktory zevního prostředí.....	20
3.4.4 Léčba	23
3.5 Využití probiotik při terapii Crohnovy choroby	24
3.5.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG).....	24
3.5.2 Synbiotika	25
3.5.3 <i>Saccharomyces boulardii</i>	26
3.6 Enterální výživa	27
4 Materiál a metody	30
4.1 Vzorky	30
4.2 Použití média	31
4.2.1 Použitá média	31
4.2.2 Vlastní rozbor a kultivace vzorku	32
4.2.3 Kvantifikace bakterií	33
4.2.4 Morfologická kontrola izolátů	33
4.2.5 Postup rozboru a identifikace bifidobakterií na rodovou úroveň pomocí testu F6PPK	33
4.2.6 Metoda MALDI-TOF MS.....	35
5 Výsledky	36
6 Diskuze	41

7 Závěr	46
8 Literatura.....	47
9 Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Mezi zánětlivá střevní onemocnění patří ulcerózní kolitida a Crohnova choroba. Zánětlivá střevní onemocnění jsou chronické intestinální zánětlivé poruchy charakterizované dysregulací imunitní odpovědi a střevní nestabilitou (disbióza). Crohnova choroba je geneticky podmíněné onemocnění. Na jejím vzniku se podílí mutace genů, v současné době je definováno dvanáct genů, které se podílí na indukci Crohnovy choroby. Dále se diskutuje o vlivu enviromentálních faktorů, především vlivu stresu a dále ovlivnění střevní mikrobioty nevhodnou stravou. Primární terapií Crohnovy choroby je podávání medikamentů, mezi které patří – kortikosteroidy (prednison, budesonid), aminosalicyláty (mesalazin, olsalazin, sulfasalazin) a imunosupresiva (azathioprin, metotrexát). Tyto terapie mohou vyvolat remisi u mnoha pacientů, ale zároveň mohou mít nežádoucí účinky, např. nauzea. Dále je často je k léčbě choroby zapotřebí operace. Mezi podpůrné terapie Crohnovy choroby patří probiotika a enterální výživa. Probiotika jsou v dnešní době definována jako živé mikroorganismy, které v případě, že jsou podány ve vhodných dávkách, mohou podpořit zdraví hostitele. Na rozdíl od pozitivních výsledků s pacienty s ulcerózní kolitidou, naznačilo několik metaanalýz velmi slabý nebo žádný přínos probiotik pro zachování remise při terapii pacientů s Crohnovou chorobou.

Další terapeutickou možností, při léčbě Crohnovy choroby je enterální výživa. Enterální výživou se rozumí podávání farmaceuticky připravených roztoků obsahujících cukry, tuky, bílkoviny, ionty, vitamíny, stopové prvky a vodu do tenkého střeva. Autoři se shodují, že enterální výživa, zejména ve formě exkluzivní enterální výživy, je účinným druhem terapie k vyvolání remise Crohnovy choroby u kojenců, ačkoli mechanismus účinku pro zmírnění symptomů zánětlivých střevních onemocnění není zcela objasněn.

Praktická část práce se zabývá metodami ke stanovení bifidobakterií na rodové a druhové úrovni. Mezi provedené metody patří kultivační metody, F6PPK test a analytická metoda MALDI-TOF MS.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Množství a druhové zastoupení bifidobakterií u zdravých lidí a pacientů na enterální výživě je rozdílné.

Cílem diplomové práce je vytvořit ucelený literární přehled o roli probiotických bakterií a enterální výživy při léčbě zánětlivých střevních onemocnění, zejména pak Crohnovy choroby. Cílem praktické části je stanovení druhového zastoupení bifidobakterií u specifické skupiny pacientů na enterální výživě, dále byla na těchto vzorcích ověřena selektivita kultivačních médií pro bifidobakterie.

3 Literární rešerše

3.1 Mikrobiota gastrointestinálního traktu

3.1.1 Charakteristika mikrobioty

Lidský gastrointestinální trakt je kolonizován 10^{13} - 10^{14} mikroorganismy, souhrnně nazývanými jako střevní mikrobiota (dříve označována jako mikroflóra) (Dicks et al., 2018). Pojem mikrobiota vyjadřuje ekologickou komunitu komenzálních a potenciálně patogenních mikroorganismů žijících v našem organismu. O mikrobiotě se často mluví jako o „superorganismu“ a „zapomenutém orgánu“. Mezi mikroorganismy tvořící mikrobiotu gastrointestinálního traktu patří bakterie, houby, viry (převážně bakteriofágy) a archea. Často je mikrobiota nesprávně zaměňována s mikrobiomem, který označuje genom mikrobioty. Celková hmotnost střevní mikrobioty je 1–2 kg. Pozitivní úloha lidské mikrobioty je známá po celá desetiletí, zejména úloha střevních bakterií, které zajišťují živiny, vitamíny (vitamín K, E a vitamíny skupiny B), trávicí enzymy a ochrannou funkci před patogeny. V historii se předpokládalo, že tato ochranná funkce mikrobioty je založena na pouhé konkurenci mezi střevními bakteriemi a invazivními patogenními bakteriemi, dnes je známo, že střevní bakterie hrají klíčovou roli ve vývoji a imunitní funkci střevních buněk. Bakterie hrají nejdůležitější roli ve výživě, imunitním vývoji, produkci vitaminů a udržování vyvážené (homeostatické) mikrobiální populace (Fung et al., 2017).

Počet bakterií v gastrointestinálním traktu kaudálním směrem stoupá – v žaludku je 10^1 / g obsahu, v tenkém střevě se v duodenu (dvanáctníku) nachází 10^3 / g obsahu, v jejunu (lačníku) je počet 10^4 / g obsahu a ileum je osídleno počtem 10^7 – 10^8 / g obsahu. Nejvyšší počet bakterií obsahuje tlusté střevo (10^{12} / g obsahu). Složení bakteriálního osídlení je nestálé a mění se zejména v závislosti na čase a prostředí hostitele (Oka et Sartor, 2020).

Mezi dominantní bakteriální kmeny lidské mikrobioty patří Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria a Verrucomicrobia, přičemž většina (> 90 %) zjištěných bakterií v lidské stolici a/nebo střevní sliznici pochází z kmenů Bacteroidetes a Firmicutes. Kmen Firmicutes se skládá z více než 200 různých rodů jako je *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*., *Enterococcus*. a *Ruminococcus*. U kmenu Bacteroidetes převládá zastoupení rodu *Bacteroides*. a *Prevotella*. Kmen Actinobacteria je méně početný a hlavním zástupcem je rod *Bifidobacterium*. (Ianiro et al., 2016, Rinninella et al., 2019).

3.1.2 Vývoj lidské mikrobioty

U zdravého jedince se nachází přirozená neboli normální mikrobiota. Za normálních podmínek se předpokládá, že se člověk rodí s epiteliálními povrchy bez mikrobů a proces kolonizace začíná během porodu (Prakash et al., 2011).

V neonatální (novorozenecké) střevní mikrobiotě mezi kolonizujícími střevními bakteriemi dominuje rod *Bifidobacterium*. Bifidobakterie a laktobacily přispívají k přirozené i získané imunitní odpovědi u zdravých novorozenců. Snížený výskyt fekálních bifidobakterií dávají studie do souvislosti s vyšším rizikem vzniku onemocnění jako je např. atopický ekzém nebo obezita. Přítomnost bifidobakterií je u dospělých snížena, což naznačuje, že je přítomnost rodu *Bifidobacterium* specifická hlavně pro raný život. Osídlení střevního traktu je důležité pro zachování střevní homeostázy u novorozence, která určuje imunologický a fyziologický vývoj (Kapourchali et Cresci, 2020).

Trávicí trakt novorozence později kolonizují kmeny Bacteroidetes a Firmicutes. Díky tomu mikrobiom novorozence získá geny pro metabolizaci rostlinných polysacharidů. U novorozenců porozených vaginálně vzniká mikrobiom, jenž odráží mikrobiotu trávicí a pohlavní soustavy matky, zatímco u dětí porozených císařským řezem převládají kmeny osídľující typicky kůži nebo mikroorganismy z prostředí, např. *Clostridium difficile*, rod *Bacillus* a enterobakterie (Korpela et de Vos, 2018). Tento rozdíl vede k opožděné mikrobiální kolonizaci rody *Bacteroides*, *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* (Dicks et al., 2018).

Na lidskou střevní mikrobiotu v průběhu života působí na střevní mikrobiotu endogenní a exogenní faktory, mezi které patří způsob porodu, kojení, krmení, podávání doplňků stravy, xenobiotika (cizorodé látky – např. léky), životní styl a expozice mikrobům. Relativní vliv těchto faktorů na složení a funkci lidské střevní mikrobioty se podstatně liší s pohlavím, věkem, stravou a úrovní expozice antimikrobiálními látkám. Mikrobiální složení gastrointestinálního traktu dítěte se během života mění, hlavně díky přechodu z mateřského mléka na tuhou stravu. Počáteční kolonizace střeva je spojena s vývojem střevního imunitního systému a narušení mikrobioty v tomto rozhodujícím období může později vést k negativním zdravotním důsledkům (Kapourchali et Cresci, 2020).

Po zavedení tuhé stravy dochází u střevní mikrobioty k největší změně mikrobiální kompozice. Dále se po zavedení tuhé stravy zvyšuje vznik mastných kyselin s krátkým řetězcem (short fatty acids, SCFA), produkovaných střevní mikrobiotou, které slouží jako zdroj energie pro kolonocyty (střevní buňky). Zavedení tuhé stravy mj. zvyšuje expresi genů pro metabolismus sacharidů, biosyntézu vitamínů, a xenobiotickou degradaci. Mikrobiální

populace u zdravého dítěte rychle se dynamicky rozvíjí od narození do 2 až 3 let věku, kdy dosáhne mikrobiota složení a stability jako u dospělých (Fung et al., 2017).

U dospělých je doloženo, že mikrobiota představuje poměrně stabilní společenství charakterizované v průběhu celého dospělého života, přítomen je mírný vliv stárnutí (Dicks et al., 2018). Střevní mikrobiota zdravého člověka se podílí na syntéze a absorpci živin, vytváří mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short fatty acids, SCFA), udržuje funkci střevní slizniční bariéry, chrání před patogenními bakteriemi a translokací endotoxinů, stimuluje vývoj imunitního systému, poskytuje protizánětlivé signály hostiteli a ovlivňuje růst kojenců (Gensollen et al., 2016).

Narušení střevní mikrobioty (disbióza) je spojeno se vznikem nekrotizující enterokolitidy (život ohrožující porucha adaptace trávicího systému většinou nedonošeného novorozence) a některých chronických onemocnění, jako jsou zánětlivá střevní onemocnění, diabetes 1. typu, obezita, cukrovka, rakovina, alergie, astma a neurologická onemocnění (McVey Neufeld et al., 2011), Studie Vijay-Kumar et al. (2010) potvrdila souvislost narušené mikrobioty a rizika vzniku hyperfagie a metabolického syndromu na myších modelech. Naopak novější studie provedená Ahlqvist et al., (2019) neodhalila žádné významné klinické spojení mezi porodem císařským řezem a rozvojem obezity.

3.1.3 Funkce lidské mikrobioty

Mezi přínosné vlivy střevních bakterií patří (Rada et Marounek, 2005):

1. Bariérový efekt – produkce antimikrobiálních substancí, blokování adherence patogenů, produkce živin pro kolonocyty (kyselina máselná), produkce defenzinů
2. Redukce kolonizace, invazivity, metabolismu a množení patogenních bakterií
3. Ovlivnění složení střevní mikrobioty prostřednictvím poklesu pH, produkcí metabolitů, ovlivnění aktivity mikrobiálních enzymů a ovlivnění střevní motility
4. Imunostimulační účinky – podpora fagocytózy, produkce protilátek a cytokinů.

U zdravého člověka převažují přínosné vlivy střevní mikrobioty a vytváří se bariéra proti vstupu patogenů do organismu (Thaiss et al., 2016).

Při narušení střevní mikrobioty (disbióza) dochází k negativním vlivům střevní mikrobioty, jako je (Zhang et al., 2015):

1. Aktivace a syntéza rakovinotvorných a genotoxických látek
2. Pro hostitele nepříznivý metabolismus bakterií tlustého střeva aktivující enzymy, např. betaglukuronidasu, což je hlavní enzymatický systém střevní mikrobioty
3. Syntéza toxinů

3.1.4 Mikrobiota pacientů s Crohnovou chorobou

Mikrobiota střev pacientů trpících Crohnovou chorobou se liší od mikrobioty zdravých lidí. Studie prokázaly, že u pacientů je přítomen vyšší počet bakterií, které mohou být invazivnější ve slizniční vrstvě, také se u nich vyskytuje snížená biologická diverzita (rozmanitost) mikrobioty (Cammarota et al., 2015).

Nejvýraznější změny na kmenové úrovni v mikrobiotě střev u pacientů s Crohnovou chorobou zahrnují: zvýšení počtu proteobakterií a pokles zastoupení bakterií kmene Firmicutes. U proteobakterií je signifikantní nárůst bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, a to zejména adherentně-invazivních bakterií rodu *Escherichia coli* (Ianiro et al., 2016). Dominance zmíněných patogenů, vede ke změně složení mikrobioty (disbióza). Patogeny upřednostňují proliferaci bakteriálních pro-IBD (IBD, irritable bowel disease, zánětlivé střevní onemocnění) rodů, spolu s odstraňováním prospěšných bakteriálních rodů (Younis et al., 2020).

Změny počtu bakterií kmene Firmicutes zahrnují především snížení počtu bakterií rodu *Lactobacillus*, také dochází k poklesu počtu dalších producentů krátkých mastných kyselin (short chain fatty acids, SCFA), ke kterým patří bakterie čeledi *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae* (Willing et al., 2018).

Dále bylo opakovaně zjištěno u pacientů s Crohnovou chorobou snížení výskytu *Faecalibacterium prausnitzii*, což je striktně anaerobní bakterie, která podporuje produkci protizánětlivých faktorů (Sokol et al., 2008). Dále bylo četnými studiemi prokázáno, že je u pacientů trpících zánětlivými střevními onemocněními snížena přítomnost methanogenních archea. *Methanobrevibacter smithii* je dominantní methanogenní archea v tlustém střevě zdravých i nemocných jedinců. (Scanlan et al., 2008). Ghavami et al. (2018) provedli studii s cílem zhodnotit přítomnost *Methanobrevibacter smithii* u iránských pacientů trpících zánětlivými střevními chorobami. Pro detekci *M. smithii* byla provedena kvantitativní metoda PCR. Oproti zdravým subjektům byla zjištěna mezi pacienty výrazně snížená přítomnost *M. smithii*.

3.2 Probiotika, probiotika a synbiotika

V roce 2001 Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) a Světová zdravotnická organizace (WHO) definovaly probiotika jako „živé mikroorganismy, které v případě, že jsou podány v přiměřeném množství, poskytují hostiteli zdravotní přínos a umožňují předejít nebo zlepšit průběh některých onemocnění (FAO/WHO, 2001).

Definice probiotik byla později upravena a v současné době jsou probiotika definována jako „živé mikroorganismy, které v případě, že jsou podány ve vhodných dávkách, mohou podpořit zdraví hostitele“ (Hill et al., 2014). Jedním z hlavních zdrojů komerčních probiotik je lidský gastrointestinální trakt (GIT). Většina probiotických kmenů GIT byla izolována ze vzorků stolice zdravých dospělých a kojenců. Izolace probiotik se neomezuje pouze na lidský organismus. Dalšími zdroji probiotik jsou také čeledi několika živočišných druhů. Účinky probiotik se však liší v závislosti na kmeni. Jako probiotika se uplatňují bakterie mléčného kvašení, zejména rod: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacteria* a některé kvasinky např. *Saccharomyces boulardii* (Maldonado Galdeano et al., 2019).

Probiotika jsou také často nazývány jako tzv. „přátelské bakterie“. Na zvířecích modelech byly prokázány příznivé účinky probiotik, jako je ochrana proti infekcím, zklidnění příznaků dráždivého tračníku, inhibice růstu *Helicobacter pylori*, prevence vzniku rakoviny tlustého střeva a alergií, účinné se probiotika ukázaly i jako ochrana před vznikem zánětu střeva (Maldonado Galdeano et al., 2019).

Klinické studie potvrdily terapeutickou účinnost při léčbě různých onemocnění, např. infekčních, diabetes, syndrom dráždivého tračníku, zánětlivá střevní onemocnění a mohou být použity v doplňkové a alternativní léčbě např. Crohnovy choroby. V současné době nejsou probiotika považována za součást konvenční medicíny a FAO/WHO stanovuje podmínky, za kterých je možné daný mikrobiální kmen používat jako probiotikum (Maldonado Galdeano et al., 2019).

Další možnost pozitivního ovlivnění střevní mikrobioty je podáváním prebiotik, která rovněž příznivě ovlivňují zažívání, tím že podporují rozvoj pozitivně působících mikroorganismů v trávicím traktu. Prebiotika, byla poprvé definována a pojmenována Marcelem Roberfroidem v r. 1995 jako nestravitelné složky potravin, které podporují růst nebo aktivitu střevní mikrobioty a zlepšují tak zdravotní stav konzumenta (Gibson et Roberfroid, 1995). Mezi prebiotika se řadí především oligosacharidy a fruktooligosacharidy. Bylo

prokázáno, že k výraznému zvýšení počtu bifidobakterií v tlustém střevě dojde při podávání 4-8 g fruktooligosacharidů denně (O'Keefe, 2008).

Synbiotika jsou podle definice Gibsona a Roberfroida (1995) kombinace probiotik a prebiotik. Příznivě by hostitele měla tato kombinace ovlivňovat kombinací efektu (synergismem) a urychlit tak růst prospěšných bakterií, jako jsou např. bakterie rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* (Gibson and Roberfroid, 1995). Jednou z hlavních výhod synbiotik je delší přetrvávání probiotik v gastrointestinálním traktu (Watson et Preedy, 2015).

Historická data naznačují, že probiotické laktobacily a bifidobakterie podávané v potravinách a ve formě kapsulí jsou bezpečné pro lidské použití. Avšak za určitých podmínek může nastat např. průnik probiotika do organismu nebo dojde k vzniku vzácných infekcí (např. u některých bakterií rodu *Enterococcus* byla prokázána patogenita). Totéž platí o *Saccharomyces boulardii*, což je mikroorganismus používaný jako probiotikum, pokud pronikne ze střeva do krevního řečiště, může způsobit fungémii (přítomnost hub v krvi) (Pieniz et al., 2014).

3.3 Imunitní funkce gastrointestinálního traktu

Střevní imunitní systém je největším imunitním orgánem v těle a je zodpovědný za adaptivní (získanou) a vrozenou imunitní odpověď. Střevní sliznice tvoří bariéru, která zabraňuje vniknutí a působení látek ze zevního prostředí, tj. xenobiotika (cizorodé látky), antigeny a alergeny z potravy a virové, bakteriální a parazitické patogeny. Kromě mechanické funkce, ve střevní sliznici probíhají sekreční a absorpční procesy, které rovněž pomáhají před vznikem infekce (Posovszky et Barth, 2020).

Střevní imunitní systém je součástí slizniční bariéry a tvoří jej lymfatická tkáň ve stěně gastrointestinálního traktu, lymfocyty, plazmatické buňky, lymfatické uzliny v mezenteriu (zdvojená vrstva pobřišnice připevňující střevo k zadní stěně dutiny břišní, obsahuje četné lymfatické uzliny a vedou jím ke střevu cévy a nervy) a makrofágový systémem jater. Buňky střevní sliznice transportují antigeny k imunokompetentním buňkám, (buňky zprostředkovávající imunitní odpověď) které produkují protilátky (imunoglobuliny – IgA, IgM). Protilátky působí lokálně a prostupují do mimobuněčných prostor střevní sliznice, nebo jsou přeneseny do lumen střeva. V podslizniční vrstvě se nachází granulocyty a monocyty, které mají funkci fagocytózy a rozpoznávání mikroorganismů, jež pronikly slizniční bariérou (Langmeier, 2009). Dalším obranným mechanismem střevního imunitního systému je střevní mikrobiota, její imunitní funkce jsou v této práci již popsány v kapitole 3.2 Mikrobiota gastrointestinálního traktu. Vrozená imunodeficiencie může vést k chronickým průjmům, malabsorpci živin nebo vzniku zánětlivého střevního onemocnění nebo infekčních onemocnění.

3.4 Zánětlivá střevní onemocnění

Zánět je odpověď lidského organismu na poškození tkání a představuje hlavní homeostatický endogenní mechanismus, který vede k reparaci tkání. Pokud není tato zánětlivá odpověď dostatečně regulována protizánětlivými mechanismy, může být zánět poškozující reakcí organismu. Nedostatečná endogenní protizánětlivá odpověď byla prokázána také v u pacientů se zánětlivými střevními onemocněními (Baumgart et Sandborn, 2012).

Mezi zánětlivá střevní onemocnění řadíme Crohnovu chorobu (*ileitis terminalis*) a ulcerózní kolitidu (*proctocolitis idiopathica*). Jde o chronická onemocnění trávicího traktu, která mají často gastrointestinální příznaky. Příčina onemocnění zatím není známa. Pravděpodobně se jedná o poruchu střevní bariéry a dysregulaci imunitní odpovědi na běžné bakteriální antigeny. Během autoimunitní reakce pak vzniká transmurální zánět, tj. zánět, který postihne celou stěnu střeva, který často přejde i na mezenterium, s poškozením střevní sliznice. Choroby propukají v dětství nebo během dospívání. Druhý vrchol obou nemocí se pak objevuje až u starších pacientů, nástup projevů se však stále posouvá do stále mladších věkových skupin (Lukáš et al., 2014).

Zánětlivá střevní onemocnění jsou považována za jedny z hlavních problémů moderní populace, neboť přímo ovlivňují kvalitu života. Studie také ukazují vysoký výskyt problematických těhotenství u žen, které těmito onemocněními trpí. Bylo zjištěno, že ženy s Crohnovou chorobou nebo ulcerózní kolitidou mají vyšší pravděpodobnost předčasného porodu a jejich děti se rodí s nízkou porodní hmotností (Kostic et al., 2015). Důležitým faktorem, který v některých případech zhoršuje situaci pacientů se zánětlivými střevními onemocněními, je pozdní diagnóza onemocnění, tato skutečnost pak vede ke zvýšené úmrtnosti pacientů (Oliveira et Monteiro, 2017).

3.4.1 Crohnova choroba

Crohnova choroba je pojmenována po americkém gastroenterologovi, který ji i první popsal, Burrillu Bernardu Crohnovi. Je to chronické onemocnění, autoimunitního původu a příznaky se podobá ulcerózní kolitidě. Přesto mají obě choroby několik charakteristických znaků, které je od sebe odlišují. Ulcerózní kolitida postihuje pouze submukózu a mukózu stěny tlustého střeva, a někdy vyvolává vznik vředů. Crohnova choroba však na rozdíl od ulcerózní kolitidy může postihnout kterýkoli oddíl trávicího ústrojí od úst až po rektum (Lukáš, 1998).

Podle místa výskytu můžeme Crohnovu chorobu rozdělit do pěti kategorií (Zonderman et Vender, 2000):

- 1.) Crohnova choroba postihující oblast ileocékální (přechod kyčelníku do slepého střeva)
- 2.) Crohnova choroba tenkého střeva
- 3.) Crohnova choroba tlustého střeva
- 4.) Crohnova choroba postihující oblast rekta a análního kanálu
- 5.) Crohnova choroba v atypické lokalizaci.

3.4.2 Projevy choroby

Charakteristickým znakem Crohnovy choroby je střídání období zhoršení (relapsů) a zklidnění (remisí) zánětu (Baumgart et Sandborn, 2012).

Mezi běžné střevní projevy Crohnovy choroby patří dlouhodobě přetrvávající průjem s příměsí krve nebo hlenu. Mohou se vyskytovat křečovitě a trvalé bolesti břicha. Ztrátou krve ze střeva, která nemusí být vždy patrná, pak dochází nezřídka také k chudokrevnosti. U některých pacientů se příznaky objeví několik let před diagnózou. Občas je prvním zaznamenaným příznakem nemoci střevní obstrukce, perforace nebo krvácení (Bernstein et al., 2012).

Kromě GI (gastrointestinálních) příznaků má téměř 25 % pacientů také extraintestinální projevy, např. erythema nodosum (forma zánětu podkožní tukové tkáně), zánětlivá artropatie (onemocnění kloubu se zánětlivým charakterem), nefrolitiáza (znamená přítomnost kamenů nebo krystalických částic v parenchymu ledvin), osteoporóza (onemocnění kostní tkáně, které vede ke zvýšené křehkosti kostí), episkleritida (zánět pojivové tkáně mezi spojivkou a sklérou) a žilní a arteriální tromboembolismus (vznik krevní sraženiny uvnitř cévního řečiště (trombóza) a vmetení sraženiny do cév na jiném místě těla (embolie). Z důvodu těchto extraintestinálních projevů a souvisejících zánětlivých imunitních poruch, je Crohnova choroba definována jako systémové zánětlivé onemocnění. Pacienti mohou mít také jiné systémové příznaky jako horečka, snížení chuti k jídlu, úbytek hmotnosti, únava, noční pocení a ztráta normálního menstruačního cyklu (Baumgart et Sandborn, 2012).

Dále u pacientů, mimo symptomy vyvolané v důsledku aktivity zánětu, dochází k narušení absorpčního povrchu střevní sliznice, v důsledku může být narušené trávení a vstřebání živin. To může vést k proteino-energetické malnutrici, nízkým hladinám minerálů včetně železa,

vitaminů, stopových prvků a metabolicky podmíněné osteoporóze. Tudíž, nemoc může způsobit zastavení růstu a fyzického vývoje u dětí (Feuerstein et Cheifetz, 2017).

V průběhu Crohnovy choroby se zhruba u třetiny pacientů objeví perianální absces (bolestivé zánětlivé ložisko v okolí řitního otvoru), fisura (řitní trhlina) nebo píštěl. Píštělem se rozumí zánětem postižené střevo, které může vyústit například na kůži nebo do jiného úseku střeva. Mezi nejběžnější místa vyústění píštěle patří močový měchýř (enterovesické), vagina (enterovaginální), střevo (enteroenterické), a kůže (enterokutánní) (Feuerstein et Cheifetz, 2017).

3.4.3 Příčiny vzniku choroby

Příčina zánětlivých střevních onemocnění není doposud zcela objasněna, proto se mluví o tzv. nespecifickém zánětu. Existují různé teorie o jejich příčinách vzniku. Protože k nárůstu výskytu obou onemocnění dochází především v rozvinutých zemích, předpokládá se významný vliv faktorů prostředí (Kaplan et Ng, 2017).

3.4.3.1 Genetické faktory

Svůj vliv na vznik Crohnovy choroby mají i genetické faktory. Již od poloviny 70. let minulého století se v epidemiologických studiích zjišťuje nápadně vysoký familiární výskyt Crohnovy choroby (Lukáš et al., 1998). Riziko vzniku této choroby je tak pro zdravé členy takových rodin 3-5× vyšší v porovnání s rizikem v běžné populaci a familiární výskyt byl zjištěn u 15-20 % případů onemocnění (Bartošová et al., 2009).

Se vznikem Crohnovy choroby je spojováno několik kandidátních genů, jejichž produkty ovlivňují průběh zánětlivé reakce. Jedná se např. o geny: NOD2 / CARD15, ICAM-1, CCR5, MDR1, TLR4 a další. (Lu et Hunt, 2013, Bartošová et al., 2009).

Geny spojené se vznikem Crohnovy choroby lze rozdělit do tří kategorií, podle působení na různých kontrolních bodech zánětlivé dráhy: 1.) rozpoznávání patogenů, 2.) odstranění patogenu vrozenou imunitou a 3.) zabránění invaze patogenu skrz střevní mukózní bariéru (Younis et al., 2020).

3.4.3.2 Imunodeficeience

Imunodeficeience je poruchou imunitního systému, která vzniká na základě aktivity některých onemocnění, mj. i Crohnovy choroby. Studie na pacientech prokázaly, že Crohnova choroba je důsledek narušené vrozené imunity a reakcí na akutní zánětlivou odpověď a poškození tkáně. V patogenezi Crohnovy choroby je známo dominantní postavení T-

lymfocytů, zvláště jejich subpopulace CD4+, která produkují zvýšené množství cytokinů (skupina menších signálních proteinů, účastnících se významně v imunitní odpovědi). Od šedesátých let minulého století bylo u člověka popsáno více než 100 cytokinů. Mezi cytokiny se řadí interferony (INF), interleukiny (IL), růstové faktory (growth factor, GF), faktory nekrotizující nádory (tumor necrosis factor, TNF), diferenciacní faktory (colony stimulating factor, erythropoetin, trombopoetin) a chemokiny (faktory buněčné migrace). Poruchy imunitního systému vzhledem k účinnosti cytokinů využívají patogenní mikroorganismy a manipulují s imunitní odpovědí svého hostitele. U pacientů s Crohnovou chorobou bylo prokázána zvýšená hladina prozánětlivých cytokinů např. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 a chemokinů (Abraham et Cho, 2009).

3.4.3.3 Faktory zevního prostředí

Narušení střevní mikrobioty pacientů s Crohnovou chorobou způsobují faktory zevního prostředí, tj. strava, kouření cigaret, stres, xenobiotika (rezidua, kontaminanty, léčiva – antibiotika, perorální antikoncepce) a mj. se diskutuje o vlivu infekčních agens (Chen et al., 2019)

3.4.3.3.1 Strava

Hlavním ovlivnitelným zevním faktorem rozvoje zánětlivých střevních onemocnění je strava, která má vliv na střevní mikrobiom a následně na rozvoj zánětu (Lee et al., 2015). Uvádí se, že mikrobiota může být ovlivněna stravou až ze 60 % (Faith et al., 2011). Diskutuje se zejména o škodlivém působení některých aditiv, zvýšené konzumaci cukru a nízkém příjmu vlákniny. Dále je nutné z jídelníčku vyloučit vysokotučná špatně stravitelná jídla. Což potvrzují studie, poukazující na zvýšené riziko vzniku zánětlivých střevních onemocnění u lidí, kteří konzumují větší množství masa a tuků, zejména polynenasycené mastné kyseliny a omega-6 mastné kyseliny, a naopak nižší riziko u lidí s dietou zahrnující konzumaci vyššího množství ovoce a zeleniny (Papada et al., 2020).

Některé složky stravy mohou narušit střevní epitelální buňky a zvyšovat tak střevní permeabilitu (propustnost). Pokud se poruší střevní bariéra, může docházet k nadměrnému přestupu střevních bakterií a jejich vzniklých produktů, které svými antigeny stimulují imunitní systém. V důsledku disbiózy (narušení střevní mikrobioty) dochází k zvýšené produkci specifických cytokinů a vzniká nepřiměřená zánětlivá odpověď (Levine et Wine, 2013).

Mezi další výživové faktory podílející se na vzniku onemocnění patří nedostatek vitamínu D. Dle Ananthkrishnan et al., (2012) vyšší hladina vitamínu D v krevní plazmě významně snižuje riziko výskytu Crohnovy choroby.

3.4.3.3.2 Kouření cigaret

Dalším z možných diskutovaných příčin vzniku Crohnovy choroby je kouření cigaret. Je známo, že kouření cigaret zvyšuje náchylnost organismu k vzniku Crohnovy choroby a zhoršuje její klinický průběh. Co se týče hlediska vlivu pohlaví, bylo prokázáno, že vztah mezi vznikem Crohnovy choroby a kouřením je silnější u žen než u mužů (Cosnes, 2004).

U pacientů kuřáků se objevuje větší množství relapsů, více střevních komplikací, horší reakce a vyšší požadavky na léčbu onemocnění než nekuřáci. Průzkum ve Francii zjistil, že u nekuřáků byl vznik nemoci méně pravděpodobný ve srovnání s lehkými kuřáky (33 % oproti 38 %) (Seksik et al., 2009). Další studie potvrdila, že nepřetržité kouření vedlo k progresi u pacientů s Crohnovou chorobou (Nunes et al., 2013).

Kouření může také způsobit histologické změny ve střevě. Fricker et al. (2018) pozorovali u pacientů kuřáků změny ve střevní tkáni, včetně zvýšeného počtu lymfocytů a zvýšení hladin cytokinů. Studie zjistila, že změny ve střevní stěně vedly ke gastrointestinální imunitní dysfunkci.

Pacientům trpícím Crohnovou chorobou je důrazně doporučováno s kouřením přestat. Což potvrdila studie dle Cosnes et al. (2001), u pacientů, kteří přestali kouřit na více než 1 rok, byl průběh nemoci mírnější. Pokud pacient přestane kouřit úplně, výrazně se sníží i riziko recidivy onemocnění (Higuchi et al., 2012).

3.4.3.3.3 Stres

Uvádí se, že stres je spojen se zvýšenou aktivitou Crohnovy choroby. Účinek stresu na zánětlivá střevní onemocnění je zprostředkován tzv. „osou mozek-střevo“, která spojuje gastrointestinální trakt s centrálním nervovým systémem. Výskyt emočních poruch je u Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy vyšší ve srovnání s běžnou populací. Kromě toho deprese a úzkost ovlivňují průběh a závažnost (zvyšuje aktivitu) obou onemocnění. Proto je u pacientů důležité zvážit vhodnou psychologickou terapii (Sgambato et al., 2017).

Vlivem stresu na aktivitu Crohnovy choroby se zabývala studie provedená Mackner et al. (2020). Autoři zmíněné studie prokázali, že pacienti vystavení vyšší úrovni vnímaného stresu oproti pacientům nevystaveným stresu vykazovali změny v mikrobiomu. Došlo u nich ke zvýšení

aktivity onemocnění a dále k poklesu relativního zastoupení bakterií kmenu Firmicutes a rodu *Anaerostipes*. Naopak byl u pacientů zaznamenán nárůst u rodu *Parabacteroides*.

3.4.3.3.4 Xenobiotika

Spekuluje se, že expozice xenobiotikům (cizorodým látkám), (nejčastěji autoři uvádí léčiva), může zapříčinit vznik Crohnovy choroby. Užívání antibiotik tedy může být jedna z dalších příčin vzniku Crohnovy choroby. Tuto teorii potvrdily studie Troelsen et Jick (2019) a Zou et al. (2020), které prokázaly souvislost mezi užíváním antibiotik v dětství se vznikem zánětlivých střevních onemocnění.

Mezi další xenobiotikum dávané do souvislosti s rozvojem Crohnovy choroby patří perorální antikoncepce. Což potvrdila metaanalýza Ortizo et al. (2017), která prokázala o 24 % vyšší riziko vzniku Crohnovy choroby u pacientů užívajících antikoncepční tablety.

3.4.3.3.5 Vliv infekčních agens

Od počátku třicátých let minulého století se diskutuje o tom, že Crohnova choroba je zoonotické onemocnění přenášené potravinami způsobené *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis* (MAP), což potvrdila studie Monif (2020). Dle Monif (2020), imunitní systém novorozence, který se nakazí MAP v období imunologické zranitelnosti (absence získané imunity) ztrácí schopnost potlačit replikaci mykobakterií. U novorozence se tak zvýší riziko vzniku Crohnovy choroby.

Rodriguez et al. (2020) uvádějí jako patogen, působící na vznik Crohnovy choroby bakterii *Clostridium difficile*. *C. difficile* je střevní patogen považovaný za hlavní příčinu průjmů a kolitidy při užívání antibiotik, a který mj. může vyvolat vzplanutí Crohnovy choroby

Shaler et al., (2019) dávají do souvislosti s vznikem Crohnovy choroby bakterii *E. coli*. Tato bakterie je přítomná v lidském mikrobiomu a žije komenzálním a patogenním životem. Na konci 90. let minulého století byl objeven patotyp (populace patogenu, ve které všichni jedinci mají společnou určitou patogenitu) adherentně invazivní *E. coli* (AIEC), který bývá spojován s patogenezí Crohnovy choroby. Uvádí se, že AIEC není ani komenzální, ani patogenní varianta *E. coli*, ale tzv. pathobiont (dočasně benigní mikrob nebo komenzální, které může vlivem prostředí nebo hostitele způsobit onemocnění).

3.4.4 Léčba

V současné době je Crohnova choroba medikamentózně i chirurgicky nevléčitelné onemocnění. V klinické praxi lze tuto chorobu léčit primárně následujícími způsoby (Michetti, 2000):

1. Léky modulující zánětlivou odpověď organismu – (biologická léčba, kortikosteroidy, imunosupresiva, aminosalicyláty)
2. Operace (při selhání medikamentózní léčby a řešení komplikací)
3. Jako podpůrná léčba se používají například probiotika a exklusivní enterální výživa

Dále jako novou potenciální terapeutickou možnost v posledních letech autoři uvádí tzv. transplantaci fekálních mikroorganismů (FMT). Terapie založené na mikrobech, včetně FMT a probiotik jsou považována za bezpečná a mohou potenciálně napravit disbiózu, která řídí dysregulovanou imunitní odpověď (Sartor et Wu, 2017).

3.5 Využití probiotik při terapii Crohnovy choroby

Probiotika jsou bakterie, které mají příznivý účinek na strukturu a funkci střev, protože mají protizánětlivý účinek a zvyšují střevní bariéru. Bylo navrženo několik mechanismů pro vysvětlení potenciální terapeutické úlohy těchto bakterií. Studie *in vitro* a *in vivo* ukazují, že probiotika, zejména bakterie mléčného kvašení, vykazují významný antioxidační potenciál. Účinky probiotik na zánětlivá střevní onemocnění zkoumalo již velké množství studií. Existují domněnky, že probiotika mohou vyvolat příznivé účinky na Crohnovu chorobu tím, že budou působit proti aktivitě patogenních bakterií prostřednictvím inhibice (potlačení) jejich růstu a proliferace (množení) a snížením pH střev. Probiotika inhibují adherenci (přilnavost) patogenních bakterií a jejich translokaci (přestup) přes epitel. Navíc bylo prokázáno, že probiotika stimulují imunitní systém, podporují produkci protizánětlivých cytokinů a posilují některé funkce střeva, zejména přispívají k vytváření těsných spojení a redukuje apoptózu (programovaná buněčná smrt) epiteliálních buněk (Mack, 2011). V následujícím textu byly zpracovány studie i metaanalýzy týkající se použití probiotik při terapii Crohnovy choroby. Na rozdíl od pozitivních výsledků s pacienty s ulcerózní kolitidou, naznačilo několik metaanalýz velmi slabý nebo žádný probiotik na zachování remise při terapii pacientů s Crohnovou chorobou (Gionchetti et al., 2006).

3.5.1 *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)

V následujícím textu jsou výsledky 4 studií, které byly zaměřeny na účinek probiotika *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) při léčbě Crohnovy choroby.

Gupta et al. (2000) uvádějí, že po 6 měsících podávání probiotika LGG došlo ke značnému zlepšení stavu pacientů, které bylo udržováno po celou dobu studie.

Schultz et al., (2004) uskutečnili studii, ve které byly pacientům podávány kortikosteroidy spolu s probiotikem LGG nebo bez probiotika. Po šesti měsících léčby nebyl pozorován žádný rozdíl v klinických remisích.

Bousvaros et al. (2005) uskutečnili multicentrickou, dvojité zaslepenou, randomizovanou studii. Pacientům bylo podáváno probiotikum LGG s prebiotikem inulinem nebo samotný inulin. Ve skupině s LGG došlo dokonce ke zhoršení symptomů a v důsledku toho byla studie předčasně zastavena po 42 měsících.

Ke stejnému závěru došli Prantera et al. (2006), autoři zjistili, že po 1 roce léčby s použitím LGG nebyl pozorován žádný rozdíl v míře klinických remisí.

Kmeny rodu *Lactobacillus* testované randomizovanými kontrolními studiemi pozitivní účinek neprokázaly (Lorea Baroja et al., 2007).

3.5.2 Synbiotika

Probiotické kmeny jsou terapeutikum, které je velmi často podáváno jako tzv. synbiotika, tj. s přidavkem prebiotika.

Fujimori et al. (2007) provedli otevřenou, nekontrolovanou studii s použitím synbiotik. Pacientům bylo podáváno synbiotikum sestávající ze tří probiotických kmenů: *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus casei* a *Bifidobacterium longum* a prebiotika psyllia (*Plantago ovata*). Dva pacienti po ukončení studie ukončili medikamentózní léčbu a čtyřem pacientům v důsledku užívání bylo možné snížit dávku kortikosteroidů. S výjimkou břišního nadýmání, které mizelo s přerušáním užívání psyllia, však nedošlo k nežádoucím účinkům.

Steed et al. (2010) podávali pacientům synbiotika složená z *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* a komerčního prebiotického přípravku Synergy 1, složeného z oligofruktózy a inulinu. Pacienti byli požádáni, aby pokračovali ve stabilních dávkách běžných léků, které dostávali při zahájení studie. Ve výsledku došlo k signifikantnímu klinickému zlepšení příznaků a bylo také pozorováno významné zvýšení počtu bifidobakterií v mukózní vrstvě.

Willert et al. (2010) uskutečnili randomizovanou, dvojitě zaslepenou, placebem kontrolovanou studii s komerčním přípravkem VSL#3. Přípravek VSL#3 je složený ze tří druhů bakterií rodu *Bifidobacterium*, čtyř druhů bakterií rodu *Lactobacillus* a rodu *Streptococcus thermophilus*. Studie byla založena na perorálním (ústním) podání této probiotické kombinace. Ukázalo se, že přípravek VSL#3 je účinný při zachování remise u ulcerózní kolitidy, ale při léčbě Crohnovy choroby byl dokonce spojen s větším počtem „znovuvzplanutí“ choroby.

Fedorak et al., (2015). prokázali pozitivní účinek preparátu VSL#3 u pacientů s Crohnovou chorobou, kteří byli po chirurgickém zákroku. Ve srovnání s placebem byla u skupiny, které byl podáván preparát, prokázána vyšší míra remise, snížení aktivity onemocnění. U pacientů po ročním podávání tohoto přípravku došlo ke snížení hladin zánětlivých cytokinů.

Také Derwa et al. (2017) provedli rozsáhlou metaanalýzu studií do listopadu 2016 zkoumajících účinnost synbiotika VSL#3 v terapii zánětlivých střevních onemocnění. Závěr metaanalýzy zní, že symbiotický přípravek VSL#3 může být účinný při vyvolání remise u aktivním ulcerózní kolitidy a terapie probiotiky má podobný účinek jako aminosalicyláty v prevenci recidivy ulcerózní kolitidy. Naopak u Crohnovy choroby metaanalýza nezjistila přínos v indukci remise, ani v prevenci recidivy.



Obrázek č.1: Komerční probiotický přípravek VSL#3.

(<http://www.fermented-foods.com/probiotic-supplements/vsl-3-review-one-best-probiotic-supplements>)

3.5.3 *Saccharomyces boulardii*

Bourreille et al. (2013) podávali pacientům buď jen probiotikum *S. boulardii* nebo placebo. Recidivy vznikaly u 47,5 % pacientů léčených *S. boulardii* v porovnání s recidivami u 53,2 % pacientů s placebem. Autoři usoudili, že probiotikum *S. boulardii* nemá žádné příznivé účinky u pacientů s Crohnovou chorobou v remisi po terapii steroidy, třebaže je probiotikum *S. boulardii* považováno za bezpečné a pacienty dobře snášeno.

V klinické praxi nebyly příznivé účinky probiotik vždy potvrzeny, jak pro jednotlivé probiotické kmeny, tak pro probiotické kombinace. Proto podle nejnovějších doporučení Evropské společnosti pro Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu (ECCO) není podpořeno používání probiotik k podpůrné léčbě Crohnovy choroby, ačkoli uznávána určitá role pro komerční přípravek s názvem VSL#3 (Dignass et al., 2014).

3.6 Enterální výživa

Další z možností jako snížit projevy Crohnovy choroby a dosáhnout tak remise je enterální výživa sloužící k prevenci malnutrice, která je u pacientů se zánětlivými onemocněními častá. Enterální výživu můžeme definovat jako podávání farmaceuticky připravených roztoků obsahujících cukry, tuky, bílkoviny, ionty, vitamíny, stopové prvky a vodu do tenkého střeva. U pacientů v kritické péči je možné podávat jen malá množství (Forbes et al., 2017). Uvádí se, že pokud je trávicí trakt schopen podané živiny využít (vstřebat), dává se přednost enterální výživě před parentální výživou. Parentální výživu definujeme jako náhradní výživu, jež organismu zajišťuje podávání energetických substrátů a živin přímo do krve, tedy mimo gastrointestinální trakt, s cílem udržet dlouhodobě uspokojivý nutriční stav a stálost vnitřního prostředí (homeostázu) pacienta (Lochs et al., 2006).

Enterální výživa se podle dávky rozděluje na doplňkovou: 300–600 kcal/den, doplňkovou noční: 1000 kcal/den a úplnou (exkluzivní enterální výživa, EEV): 2000–2500 kcal/den (Lukáš et Kostrejšová, 2018). Kromě dodání živin v potřebném množství má enterální výživa i další funkce, např. výživu kolonocytů, dále slouží jako prevence bakteriální translokace a udržuje střevní bariéru (Lochs et al., 2006).

Podle složení se přípravky pro enterální výživu dělí na dvě základní skupiny, a to polymerní a oligomerní. U většiny pacientů se při léčbě využívá polymerní výživa, která je určená pro sipping (popíjení) nebo podávání sondou do žaludku a duodena. Tato výživa je nutričně definovaná a obsahuje polymery jednotlivých živin, často v původní formě – proteiny (především kasein), polysacharidy (škroby) a tuk, převážně ve formě triglyceridů s dlouhými řetězci (LCT tuky). Oligomerní výživa je chemicky definovaná, nízkomolekulární a obsahuje rozštěpené živiny: aminokyseliny nebo oligopeptidy, disacharidy, maltodextrin a MCT (medium chain triglycerides, triglyceridy se středně dlouhým řetězcem) oleje. Stravitelnost MCT olejů je lepší než u LCT (long chain triglycerides, triglyceridy s dlouhým řetězcem). Dále na rozdíl od polymerní výživy oligomerní roztoky neobsahují vlákninu, laktózu ani cholesterol a většinou jsou bezlepkové (Gu et Feagins, 2020).

Existují dva způsoby aplikace enterální výživy: tzv. sipping (popíjení) a podávání sondou. Sonda může být nazogastrická (podávaná do žaludku), nazojejunální (podávaná do tenkého střeva) nebo tzv. PEG. PEG, jinak také perkutánní endoskopická gastrostomie, slouží k dlouhodobému podávání enterální výživy a představuje zavedení nutriční sondy do žaludku. Enterální výživa může mít i negativní dopad na stav pacienta. Může dojít k tzv. kontraindikaci.

Kontraindikace enterální výživy dělíme dle Lochs (2006) na absolutní a relativní.

Do absolutní kontraindikace se řadí náhlé příhody břišní. Je známo, že u pacientů v šokovém stavu je kontraindikační jakákoliv forma výživy. Relativní kontraindikací se rozumí např. těžké zánětlivé poškození tenkého střeva, případně opakované zvracení. Mezi další kontraindikaci je nutné považovat i etické hledisko, pokud enterální výživa nemá pozitivní přínos v terminální fázi onemocnění (Lochs, 2006).

Účinnost enterální výživy jako primární terapie aktivní Crohnovy choroby zkoumalo několik studií. Některé studie se shodly v pozitivním působení enterální výživy, další přinesly negativní závěry. V historii se autoři studií, např. Griffiths et al., (1995) shodovali, že jsou kortikosteroidy účinnější v terapii Crohnovy choroby než enterální výživa. Ale novější studie toto vyvracejí. Studie dle Hirai et al., (2019) prokázala, že má enterální výživa inhibiční účinek na nádorový nekrotický faktor (TNF) -alfa a je účinná pro udržení remise Crohnovy choroby. Příznivé účinky enterální výživy na střevní mikrobiotu potvrdila i studie Caro et al., (2019). Závěr zní, že u pacientů s aktivní Crohnovou chorobou může enterální výživa přispět k obnově homeostázy střeva a prodloužit tak remisi.

Většina nově provedených studií se shoduje hlavně na terapeutickém účinku enterální výživy ve formě exkluzivní enterální výživy. Mechanismus účinku pro zmírnění symptomů není ani v současnosti zcela objasněn, ale předpokládá se, že vyloučení řady antigenů ze stravy, úprava střevní permeability i mikrobioty má za následek snížení produkce prozánětlivých cytokinů a tím snižuje zánětlivost střev, to má za následek zlepšení jejich nutričního stavu, a u některých pacientů není nadále potřebný chirurgický zákrok (Hansen et Duerksen, 2018).

Studie provedené na dětech s Crohnovou chorobou potvrdily účinnost exkluzivní enterální výživy a přirovnávají ji k terapeutické účinnosti kortikosteroidů. Některé studie, provedené na dospělých účinnost enterální výživy potvrdily, další stanovisko vyvracejí. Možným důvodem je omezená tolerance pacienta k formě podání. Dále je známa studie, kde bylo zaznamenán úspěch s enterální výživou při stenóze (zúžení) střeva (Hu et al., 2014).

V historii studie naznačily, že exkluzivní enterální výživa nemusí být účinná při léčbě Crohnovy choroby, pokud je chorobou primárně postižené tlusté střevo (Afzal et al., 2005). Novější studie provedená Buchanan et al. (2009) ale došla k závěru, že lokalizace choroby vliv na pravděpodobnost výskytu klinické remise po podání exkluzivní enterální výživy nemá.

K negativnímu hledisku exkluzivní enterální výživy ve formě sippingu patří chuť. Studie dle Svolos et al. se zaměřila na vylepšení chuti a napodobila exkluzivní enterální výživu (CD-TREAT dieta). Studie prokázala, že po podávání CD-TREAT diety byla po 8 týdnech u skupiny dětí s aktivní Crohnovou chorobou navozena z 60 % remise a došlo k 55% poklesu

koncentrace fekálního kalprotektinu (protein, neinvazivní marker v diagnostice Crohnovy choroby) (Svolos et al., 2019).

Podobně byla v randomizované kontrolované studii provedené Levine et al., (2019) využita vylučovací dietní strava (CDED, Crohn's disease exclusion diet – vyloučení lepku, živočišných tuků, mléka a mléčných výrobků) s částečnou enterální výživou (PEN, partial enteral nutrition) u dětských pacientů s mírnou formou Crohnovy choroby. Výsledky ukázaly, že jak CDED + PEN, tak EEN vedou k vysoké míře remise bez kortikosteroidů se signifikantním snížením zánětu. A způsob podání CDED a PEN bylo pacienty výrazně lépe přijímáno než exkluzivní enterální výživa.

Tyto studie nabízejí velmi slibné výsledky, ale je zapotřebí provést další studie, ve kterých by mohly dietní úpravy či nově vyvinuté přípravky přispět k léčbě Crohnovy choroby.

4 Materiál a metody

Praktická část mé diplomové práce se věnuje několika analýzám mikrobioty vzorků stolice. Ačkoli rešerše pojednává o Crohnově chorobě, je obtížné získat vzorky stolice od pacientů s Crohnovou chorobou. Díky dlouhodobé spolupráci s dětským oddělením gastroenterologie FN Motol v Praze jsme měli k dispozici vzorky stolice pacientů s PEG (označení pro umístění setu pro výživu přes stěnu břišní do žaludku). Jedná se o modelový příklad pacientů na enterální výživě. Pacienti sice netrpěli Crohnovou chorobou, ale byl sledován vliv enterální výživy na zastoupení bifidobakterií. Vzorky stolice byly podrobeny kultivační analýze, kde jsme zjistili počty bifidobakterií. To, zda se jedná skutečně o bifidobakterie, jsme zjišťovali tak, že jsme z agaru odebrali izoláty, nechali narůst, zkontrolovali morfolologii a pak ověřili identitu na druhovou úroveň pomocí F6PPK. Finální identifikace izolátů na úroveň rodu a druhu proběhla pomocí MALDI-TOF MS.

4.1 Vzorky

K analýze mikrobioty bylo použito fekálních vzorků pacientů s PEG (označení pro umístění setu pro výživu přes stěnu břišní do žaludku). Vzorky byly obdrženy z Dětského oddělení gastroenterologie FN Motol v Praze. Jednalo se o 14 vzorků stolice od 14 dětských pacientů se speciálním dietním režimem, tj. dlouhodobým přijímáním potravy prostřednictvím sondy PEG. Obecně se jednalo o děti s pohybovými, nebo vývojovými vadami a jejich stav neumožňoval běžný příjem potravy. Z hlediska ochrany dárce vzorku a jeho dat je v práci uvedeno pouze pohlaví a věk jedinců. Tabulka č. 1 se seznamem dárců je uvedena níže. V tabulce č. 1 je dále uvedeno, zda jednotlivý pacient užíval antibiotika nebo probiotika.

Tabulka č. 1 – Seznam pacientů s PEG

Vzorek	Pohlaví	Věk (let)	ATB	Probiotika
PEG 1	chlapec	16	ne	ano
PEG 2	chlapec	4	Biseptol (dlouhodobě)	ne
PEG 3	chlapec	2	ne	ne
PEG 4	chlapec	6	ne	ne
PEG 5	dívka	6	ne	ne
PEG 6	chlapec	10	ne	ne
PEG 7	dívka	11	ne	ne
PEG 8	dívka	11	ne	ne
PEG 9	chlapec	13	ne	ne
PEG 10	chlapec	11	Biseptol (dlouhodobě)	ne
PEG 11	dívka	6	ne	ne
PEG 12	chlapec	5	ne	ne
PEG 13	chlapec	13	ne	ne
PEG 14	dívka	5	ne	ne

4.2 Použití média

4.2.1 Použitá média

Základním médiem pro kultivační stanovení byl modifikovaný Wilkins-Chalgren agar k zjištění celkového počtu anaerobních bakterií, dále byl tento agar ještě doplněn buď přídatkem mupirocinu a kyseliny octové nebo přídatkem mupirocinu, norfloxacinu a kyseliny octové pro selektivní stanovení bifidobakterií.

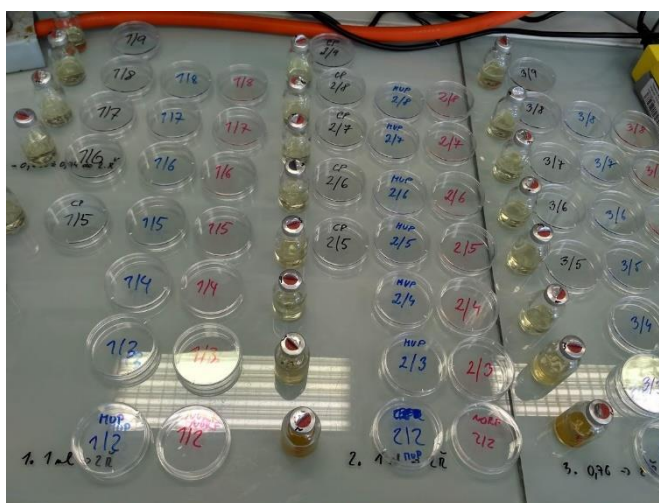
Příprava Wilkins-Chalgren agaru se sójovým peptonem začíná navážením Wilkins-Chalgren agaru, sójového peptonu, cysteinu a tweenu a následně rozmícháním všech složek v destilované vodě. Dále je agar potřeba rozvařit a sterilovat. Po vytemperování ve vodní lázni na 48 °C byl do 2. agaru přidán mupirocin, kyselina octová a směs byla opět promíchána. Pro 3. agar je postup přípravy stejný, jen bylo přidáno navíc antibiotikum norfloxacin. Složení jednotlivých agarů je uvedeno v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2 - Složení použitých médií

Médium	Kultivace	Složení selektivního média na 100 ml
Wilkins-Chalgren (WSP agar pro stanovení celkových počtů anaerobních bakterií)	48 h, anaerobní, při 37 °C	4,3 g Wilkins-Chalgren anaerobní agar (OXOID), 0,5 g Sojový pepton (OXOID), 0,05g Cystein (OXOID), 0,1 ml Tween (Sigma)
Wilkins-Chalgren agar (WSP Mup agar pro <i>Bifidobacterium</i> sp.)	48 h anaerobní, při 37°C	4,3 g Wilkins-Chalgren anaerobní agar (OXOID), 0,5 g Sojový pepton (OXOID), 0,05g Cystein (OXOID), 0,1 ml Tween (Sigma), 10 mg Mupirocin, 100 µl kys. octová
Wilkins-Chalgren agar s norfloxacinem (Bif-NORF pro <i>Bifidobacterium</i> sp.)	48 h, anaerobní, při 37 °C	4,3 g Wilkins-Chalgren anaerob agar (OXOID, UK), 0,5 g Sojový pepton (OXOID), 0,05 g Cystein (OXOID), 0,1 ml Tween (Sigma), 10 mg Mupirocin, 20 mg Norfloxacin, 100 µl kys. octová

4.2.2 Vlastní rozbor a kultivace vzorku

Pro kultivaci mikroorganismů jsme připravili ředící řady vzorků desítkovým ředěním. Z této řady bylo vybráno ředění, ve kterých byl předpokládán nárůst kolonií stanovovaných bakterií, které je možno v tomto ředění i detekovat. Pro CP bylo použito ředění 5-9, pro BIF 2-8 (obě média). Takto naředěné vzorky byly napipetovány po 0,5 ml na Petriho misky a zality připravenými selektivními médii. Dále byly použité misky kultivovány 48-72 h v anaerostatu s vyvíječem anaerobní atmosféry.



Obrázek č. 2 – Petriho misky před procesem pipetování (Foto autor textu)

4.2.3 Kvantifikace bakterií

Kvantifikací bakterií se rozumí stanovení počtu mikroorganismů, jejichž výsledkem je hodnota vyjádřená jednotkou Colony Forming Unit (CFU) nebo kolonie tvořící jednotky (KTJ) v určitém objemu nebo hmotnosti vzorku. Narostlé kolonie byly spočítány pomocí počítadla kolonií. Výsledkem jednotlivého výpočtu je logaritmičticky vyjádřený počet KTJ/g stolice. Počet KTJ byl vypočítán podle vzorce:

$$\text{KTJ/g} \quad \left[\frac{\sum a+b+c}{111} \cdot 10^n \right] = y \cdot 10^n \quad \log y = \text{xx} \dots \text{KTJ} = y \cdot 10^{n, \text{xx}}$$

a, b, c	součty všech kolonií spočítaných na vybraných plotnách
111	počet ploten použitých pro výpočet (každá plotna 1)
n	číslo nejvyššího ředění

Příklad výpočtu: CP: 2⁹, 16⁸, 82⁷

- 2 + 16 + 82 = 100
- 100 : 111 = 0,9009
- 0,9009 x 10⁷ = 9,01 x 10⁶ KTJ/g stolice

Vyjádření v log: log KTJ/g stolice:

- 9,01 x 10^{6,95} → log 9,01 = 0,95

Výsledek: 6,95 log KTJ/g stolice

4.2.4 Morfologická kontrola izolátů

Ze selektivních médií byly izolovány typické kolonie, které byly pomnoženy ve WSP bujónu v anaerobní atmosféře. Mikroskopicky byla zkontrolována čistota a morfologie buněk. K dalším testům byly použité kmeny s jednotnou morfologií, a to nepravidelné nesporulující tyčinky.

4.2.5 Postup rozboru a identifikace bifidobakterií na rodovou úroveň pomocí testu F6PPK

F6PPK test je enzymatický test, který funguje na základě detekce enzymu účastnícího se metabolismu sacharidů u bifidobakterií. Tím se rozumí, že bakterie rodu *Bifidobacterium*

spolu s dalšími bakteriemi čeledi *Bifidobacteriaceae* štěpí hexosy pomocí enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolasy (EC 4.1.2.22, F6PPK), Pro detekci F6PPK je nutné nejprve rozbít bakteriální buňky, aby se jejich obsah společně s intracelulárními enzymy vylil do roztoku. K rozrušení buněk byl použit detergent CTAB. Dále jsou k roztoku přidána činidla, která způsobí jeho barevnou reakci. V případě, že buňka obsahuje enzym F6PPK, je fruktoso-6-fosfát rozštěpen tímto enzymem na erytroso-4-fosfát a acetyl-1-fosfát, který reaguje s FeCl_3 za vzniku komplexní sloučeniny, která má fialové zbarvení a značí pozitivní reakci, tj. přítomnost bifidobakterií. Při negativní reakci dochází ke žlutému zbarvení roztoku (upraveno dle Orban et Patterson, 2000). V tabulce č. 3 je uvedeno složení použitých roztoků.

Tabulka č. 3 – Použitá činidla

Činidla	Složení
Roztok 1	0,36 g K_2HPO_4 , 0,10 g KH_2PO_4 , 0,15 g cystein, 300 ml H_2O
Roztok 2	120 mg NaF, 200 mg Na-iodoacetát, 20 ml H_2O
Roztok 3	4,17 g hydroxylamin, 30 ml H_2O (pH 6,5 – upravit 2 ml 40% NaOH)
Roztok 4	3 g TCA (trichloroctová kyselina), 20 ml H_2O
Roztok 5	2,48 ml HCl, 17,52 ml H_2O
Roztok 6	1 g FeCl_3 , 62 μl HCl, 20 ml H_2O
Roztok 7	290 mg fruktosa-6-fosfát, 5,5 ml H_2O
Roztok CTAB	detergent cetridium bromid (45 mg/100 ml H_2O)

Postup:

- 1 ml čisté kultury převést do 2 ml mikrozkušavek typu Eppendorf a stočit v centrifuze po dobu 2,5 minut na 14 500 otáček/minutu při teplotě 20 °C.
- Slít supernatant a zbylý obsah mikrozkušavky resuspendovat v 75 μl roztoku 1.
- Přidat 50 μl CTAB, zvortexovat a nechat inkubovat 5 minut.
- Přidat 31 μl roztoku 2 a 50 μl roztoku 7, 30 minut inkubovat při 37 °C ve vodní lázni.
- Přidat 188 μl roztoku 3, inkubovat 10 minut při pokojové teplotě.
- Přidat 125 μl roztoku 4, 5, 6.

4.2.6 Metoda MALDI-TOF MS

Identifikace mikroorganismů pomocí metody MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spektrometry, hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem) je vysoce přesná, aplikovatelná pro široké spektrum mikroorganismů a mnohem rychlejší ve srovnání s tradičními metodami. Pomocí analytické metody MALDI-TOF MS lze rozlišit bakterie či jiné mikroorganismy na rodové, druhové a často i na kmenové úrovni. Jejich přesné stanovení může sloužit pro monitoring životního prostředí, zpracování potravin, ochranu veřejného zdraví či klinickou diagnostiku (Huong et al., 2014).

Pro identifikaci bifidobakterií byla zvolena metoda extrakce pomocí acetonitrilu a kyseliny mravenčí, které předcházela fixace etanolem.

Postup:

1. 1 ml čisté kultury přelit do zkumavky typu Eppendorf a stočit po dobu 3 minut při 14 000 otáčkách/ min.
2. Odlít supernatant a odpipetovat zbývající kapalinu.
3. Nechat vyschnout po dobu 5 minut.
4. Resuspendovat pelet v 15 µl 70% FA (kyselina mravenčí).
5. Resuspendovat pelet v 15 µl 100% AN (acetonitril) a zvortexovat.
6. Stočit po dobu 3 minut při 14 000 otáčkách.
7. 1 µl supernatantu aplikovat na „MALDI destičku“.
8. Po zaschnutí překrýt 1 µl „MALDI matricí“.
9. Vložit „MALDI destičku“ do MALDI-TOF MS přístroje.

Tabulka č. 4 – Vyhodnocení spolehlivosti a úrovně identifikace

Rozsah bodové hodnoty	Popis úrovně identifikace	Symbol uvedený u výsledku	Barva označení výsledku
2,300 – 3,000	Vysoce pravděpodobná identifikace na druhovou úroveň	(+++)	Zelená
2,000 – 2,229	Spolehlivá identifikace na rodovou úroveň, možná identifikace na úroveň druhu	(++)	Zelená
1,700 – 1,999	Možná rodová identifikace	(+)	Žlutá
0,000 – 1,699	Nespolehlivá identifikace	(-)	Červená

(www.bruker.com).

5 Výsledky

Tabulka č. 5. Souhrn počtu mikroorganismů stanovených ve vzorcích stolice na různých médiích a detekovaných druhů mikroorganismů na médiích pro bifidobakterie

označení	CP	B-NOR	B-MUP	Detekované bifidobakterie	Ostatní bakterie detekované na bifi médiích
PEG 1	7,09	3,00	3,46 B/ 4,60 CL	<i>B. longum</i>	<i>Eubacterium limosu</i> , klostridie (stanoveny podle morfologie)
PEG 2	10,25	10,28	10,33	<i>B. breve</i>	klostridie (stanoveny podle morfologie)
PEG 3	8,13	7,37	6,72	<i>B. breve</i> , <i>B. longum</i>	x
PEG 4	8,50	8,03	7,62	<i>B. animalis</i> , <i>B. longum</i>	x
PEG 5	7,78	<10 ²	6,21	<i>B. longum</i>	<i>Lbc. plantarum</i> (F+)
PEG 6	9,36	8,99	9,47	<i>B. longum</i> , <i>B. adolescenti</i>	<i>Streptococcus lutetiensis</i> , NRI, <i>Lbc. fermentum</i> (F+)
PEG 7	9,19	8,66	8,41	<i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i>	<i>Lbc. plantarum</i> (F+)
PEG 8	8,12	3,49	5,75	<i>B. longum</i>	<i>Cl. perfringens</i> , NRI
PEG 9	7,48	6,37	6,30	<i>B. longum</i>	x
PEG 10	7,76	3,90	4,44	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i>	x
PEG 11	10,93	7,80	10,19	<i>B. animalis</i> , <i>B. breve</i>	x
PEG 12	9,56	4,51	6,81	x	<i>Cl. perfringens</i> , NRI
PEG 13	8,27	7,15	7,41	<i>B. longum</i>	x
PEG 14	8,36	8,16	8,20	<i>B. longum</i> , <i>B. adolescentis</i>	x

Tabulku č. 5 získal autor práce v rámci spolupráce s konzultantem práce po provedení příslušných metod. Tabulka č. 5 ukazuje celkové počty bakterií (CP) a počty bifidobakterií na médiích s antibiotiky – norfloxacinem a mupirocinem ve vzorcích stolice dětských pacientů s PEG z oddělení gastroenterologie FN Motol v Praze. Jednalo se o modelový příklad pacientů na enterální výživě. Podrobnější informace o dárkách lze nalézt v kapitole materiály a metody.

V případě B-MUP, jakožto selektivního média pro rod *Bifidobacterium* se množství bifidobakterií se pohybovalo v rozmezí od <10² do 8,51 log KTJ/g stolice. U B-NOR se množství bifidobakterií se pohybovalo v rozmezí od 3,46 do 10,33 log KTJ/g stolice. Celkový počet mikroorganismů, tj. bakterií se pohyboval od 7,09 do 10,93 log KTJ/g stolice.

Pokud byly detekovány jiné bakterie než bifidobakterie, vždy se jednalo o médium B-MUP, protože médium B-NOR zvyšuje selektivitu média. Celkově se dá zhodnotit, že vyšší počty byly na médiu B-NOR. Selektivita kultivačních médií s přidavkem antibiotik byla

ověřena. Vyšší počty byly na B-NOR. Z B-MUP bylo izolováno celkem 53 kmenů bakterií, z toho 39 kmenů bakterií bylo zařazeno do rodu *Bifidobacterium*, to znamená, že spolehlivost toho média je 73,58 %. U B-NOR bylo 37 izolátů, ale pouze 3 kmeny byly zařazeny jinam než do rodu *Bifidobacterium*, to znamená, že u B-NOR je spolehlivost vyšší, tj. 91,89 %.

PEG 1 - viz tabulka č. 5, u vzorku č. 1 bylo detekováno *Bifidobacterium longum*, dále zde bylo detekováno *Eubacterium limosu* a klostridie, které byly stanoveny podle morfologie. Počet celkových bakterií byl 7,09 log KTJ/g stolice. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 3,00 log KTJ/g stolice, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství bifidobakterií, tj. 3,46 log KTJ/g stolice. U B-MUP bylo zároveň stanoveno také množství klostridií, které bylo vyčísleno na 4,60 log KTJ/g stolice.

PEG 2 - viz tabulka č. 5, u vzorku č. 2 bylo detekováno *Bifidobacterium breve*, mezi další detekované bakterie patřily klostridie, které byly stanoveny podle morfologie. Počet celkových bakterií byl 10,25 log KTJ/g stolice. Na médiu B-NOR bylo stanoveno bifidobakterie v množství 10,28 log KTJ/g stolice a na médiu B-MUP bylo stanoveno podobné množství, tj. 10,33 log KTJ/g stolice.

PEG 3 - viz tabulka č. 5, u vzorku č. 3 bylo detekováno *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium longum*. Počet celkových bakterií byl 8,13 log KTJ/g stolice. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 7,37 log KTJ/g stolice, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno nižší množství, tj. 6,72 log KTJ/g.

PEG 4 - viz tabulka č. 5, u vzorku č. 4 bylo detekováno *Bifidobacterium animalis* a *Bifidobacterium longum*. Počet celkových bakterií byl 8,50 log KTJ/g. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 8,03 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno nižší množství, tj. 7,62 log KTJ/g.

PEG 5 - viz tabulka č. 5, u vzorku č. 5 bylo detekováno *Bifidobacterium longum*. Dalším detekovaným mikroorganismem bylo *Lbc. Plantarum* (F+). Počet celkových bakterií byl 7,78 log KTJ/g. Na médiu B-NOR byly stanoveny v množství $<10^2$ KTJ/g bifidobakterií, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 6,21 log KTJ/g.

PEG 6 - viz tabulka č. 5, u vzorku č. 6 bylo detekováno *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium adolescenti*. Dále byl detekován *Streptococcus lutetiensis*, *NRI*, *Lbc. fermentum* (F+) Počet celkových bakterií byl 9,36 log KTJ/g. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 8,99 log KTJ/g bifidobakterií, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 9,47 log KTJ/g.

PEG 7 - viz tabulka č. 5, u vzorku č. 7 bylo detekováno *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium bifidum*. Dále bylo detekováno *Lbc. fermentum* (F+). Počet celkových bakterií byl 9,19 log KTJ/g. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 8,66 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno nižší množství, tj. 8,41 log KTJ/g.

PEG 8 - viz tabulka č. 5, u vzorku č. 8 bylo detekováno *Bifidobacterium longum*. Dále byl detekován *Cl. perfringens*, *NRI*. Počet celkových bakterií byl 8,12 log KTJ/g. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 3,49 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 5,75 log KTJ/g.

PEG 9 – viz tabulka č. 5, u vzorku č. 9 bylo detekováno *Bifidobacterium longum*. Počet celkových bakterií byl 7,48 log KTJ/g. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 6,37 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno podobné množství, tj. 6,30 log KTJ/g.

PEG 10 – viz tabulka č. 5, u vzorku č. 10 bylo detekováno *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum*. Počet celkových bakterií byl 7,76 log KTJ/g. Na médiu B-NOR byly stanoveny v množství 3,90 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 4,44 log KTJ/g.

PEG 11 – viz tabulka č. 5, u vzorku č. 11 bylo detekováno *Bifidobacterium animalis* a *Bifidobacterium breve* Počet celkových bakterií byl 10,93 log KTJ/g. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 7,80 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 10,19 log KTJ/g.

PEG 12 – viz tabulka č. 5, u vzorku č. 12 nebyl detekován převažující druh bifidobakterií, ale byly detekovány zvýšené hodnoty *Cl. perfringens*. Počet celkových bakterií byl 9,56 log KTJ/g. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie, v množství 4,51 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 6,81 log KTJ/g.

PEG 13 – viz tabulka č. 5, u vzorku č. 13 bylo detekováno *Bifidobacterium longum*. Počet celkových bakterií byl 8,27 log KTJ/g. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 7,15 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 7,41 log KTJ/g.

PEG 14 - viz tabulka č. 5, u vzorku č. 14 bylo detekováno *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium adolescentis*. Počet celkových bakterií byl 8,36 log KTJ/g. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 8,16 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno podobné množství, tj. 8,20 log KTJ/g.

Výsledky práce dále obsahuje Tabulka č. 6, která je kvůli své rozsáhlosti uvedena v příloze práce. Tabulka č. 6 shrnuje výsledky analytické metody MALDI-TOF MS a mikrobiologické metody F6PPK-test, které byly provedeny na jednotlivých kmenech izolovaných z dodaných vzorků stolice dětských pacientů s PEG. Výsledky z metody MALDI-TOF MS jsou uvedeny ve formě M-skóre pro jednotlivé kmeny.

Tabulka č. 7 – Tabulka hodnocení spolehlivosti identifikace pomocí metody MALDI-TOF MS

Úroveň identifikace	Počet kmenů
Vysoce pravděpodobná identifikace na druhovou úroveň	5
Spolehlivá identifikace na rodovou úroveň, možná identifikace na úroveň druhu	58
Možná rodová identifikace	21
Nespolehlivá identifikace	6

Jak ukazuje Tabulka č. 7, při identifikaci kmenů bakterií pomocí metody MALDI-TOF MS byl u 63 kmenů určen druh a rod s vysokou pravděpodobností. U 21 kmenů byl rod určen pravděpodobně a 6 kmenů bylo určeno nespolehlivě.

Přítomnost bifidobakterií byla také stanovena mikrobiologickou metodou, a sice F6PPK-testem. Výsledky F6PPK testu jsou uvedeny rovněž v Tabulce č. 6 v příloze práce.

Tabulka č. 8 – Tabulka hodnocení F6PPK testu

Reakce	Počet kmenů
Pozitivní	78
Nejistá	3
Negativní	9

Z Tabulky č. 8 je patrné, že u jednotlivých kmenů převažuje prokázaná přítomnost bifidobakterií. Jako pozitivní na fosfoketolázu se ukázalo 78 kmenů. 3 kmeny byly vyhodnoceny nejistě a 9 bylo negativních.

6 Diskuze

Tato práce má návaznost na bakalářskou práci s názvem Význam probiotik v prevenci a terapii Crohnovy choroby z roku 2018, zde byla provedena izolace DNA a následně posouzena její koncentrace a čistota. Výzkum diplomové práce spočíval ve stanovení přítomnosti a zastoupení rodu *Bifidobacterium* sp. v rámci dětské skupiny pacientů ve věku od 2 do 16 let.

Bifidobakterie jsou grampozitivní, striktně anaerobní, nesporulující tyčinky, které se mj. vyskytují v lidském trávicím traktu. Bifidobakterie byly objeveny v roce 1900 Henry Tissierem ve stolici kojenců. (Russell et al., 2011).

Pomocí kultivačních metod byly bifidobakterie stanoveny a kvantifikovány ve vzorcích. Jednalo se o 14 vzorků stolice dětských pacientů s PEG (perkutánní endoskopická gastrostomie). Více informací o dárcích vzorků je uvedeno v části materiály a metody. Pro izolaci a selektivní stanovení bifidobakterií byla využita selekční kultivační média. První použité médium bylo médium s mupirocinem (B-MUP). Mupirocin je antibiotikum a spolu s ledovou kyselinou octovou tvoří velmi používané selekční médium pro detekci bifidobakterií. Mupirocinová média jsou spolehlivá hlavně pro vzorky stolice, ve kterých převládají bifidobakterie. Avšak u komplexních vzorků obsahujících rozmanitější mikrobiotu je selektivita mupirocinového média omezená. Rezistence na mupirocin byla prokázána u mnoha anaerobních bakterií. Pro komplexnější fekální vzorky je vhodné použití média obsahující norfloxacin (200 mg / l) v kombinaci s mupirocinem (100 mg / l) a ledovou kyselinou octovou (1 ml / l) (B-NOR) (Vlková et al., 2015). Pro stanovení celkového počtu byl použit WSP agar bez přídavku antibiotik. Ze vzorků byly izolovány jednotlivé kmeny bakterií (viz Tabulka č. 6 uvedená v příloze práce). Dále byla ověřena selektivita zmiňovaných kultivačních médií. Vyšší počty bifidobakterií byly na B-NOR. Z B-MUP bylo izolováno celkem 53 kmenů bakterií, z toho 39 kmenů bakterií bylo zařazeno do rodu *Bifidobacterium*, to znamená, že spolehlivost toho média je 73,58 %. U B-NOR bylo 37 izolátů, ale pouze 3 kmeny byly zařazeny jinam než do rodu *Bifidobacterium*, to znamená, že u B-NOR je spolehlivost vyšší, tj. 91,89 %.

V případě B-MUP, jakožto selektivního média pro rod *Bifidobacterium* sp. se množství bifidobakterií se pohybovalo v rozmezí od $<10^2$ do 8,51 log KTJ/g stolice. U B-NOR se množství bifidobakterií se pohybovalo v rozmezí od 3,46 do 10,33 log KTJ/g stolice. Celkový počet bakterií se pohyboval od 7,09 do 10,93 log KTJ/g stolice. Dle Parracho et al. (2005) je průměrná hodnota celkového počtu bakterií u zdravých dětí věku 2-10 let 10,41 log KTJ/g

stolice. Celkové počty bakterií byly až na vzorek č. 11 v porovnání s hodnotami zdravých dětí rovněž nižší, což může být dáno vodnatou konzistencí stolice.

Dále byl proveden F6PPK test. F6PPK test je další možná mikrobiologická metoda průkazu přítomnosti rodu *Bifidobacterium* sp., která byla provedena na jednotlivých kmenech (viz Tabulka č. 6) izolovaných z dodaných vzorků stolice dětských pacientů s PEG. U jednotlivých kmenů převažovala prokázaná přítomnost rodu *Bifidobacterium* sp. Jako pozitivní na fosfoketolázu se ukázalo 78 kmenů. 3 kmeny byly vyhodnoceny nejistě a 9 bylo negativních. Pokud je přítomnost bifidobakterií nejistá, jednalo se, buď o směsnou kulturu, nebo byl vzorek kontaminovaný, případně byla slabá aktivita fosfoketolázy.

Následně byly vzorky analyzovány metodou MALDI-TOF MS, kdy bylo zjištěno M-skóre pro jednotlivé kmeny. Při identifikaci kmenů bakterií pomocí metody MALDI-TOF MS byl u 63 kmenů určen druh a rod s vysokou pravděpodobností. U 21 kmenů byl rod určen pravděpodobně a 6 kmenů bylo určeno nespolehlivě. Dále byly pomocí MALDI-TOF MS identifikovány bifidobakterie na druhové úrovni. Nejčastěji byly ve vzorcích stolice dětských pacientů s PEG přítomny tyto druhy bifidobakterií: *B. longum*, *B. breve*, *B. animalis*, *B. adolescentis* a *B. bifidum*. Mezi další bakterie detekované ve vzorcích patřilo *Eubacterium limosu*, klostridie, *Lbc. plantarum* (F+), *Streptococcus lutetiensis* nebo *Cl. perfringens*.

Hypotézou práce je, že množství a druhové zastoupení bifidobakterií u zdravých lidí a pacientů na enterální výživě je rozdílné. Fung et al. (2017) zjistili, že v 2. – 3. roku věku je složení mikrobioty trávicího traktu dětí téměř totožné s dospělými. Dle Adamberg et al. (2018) jsou hlavními druhy bifidobakterií střevního traktu zdravých dospělých lidí *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. longum* a *B. pseudocatenulatum*. V porovnání s výsledky práce se *B. pseudocatenulatum* u pacientů s PEG nevyskytoval. U pacientů s PEG převažoval mj. také druh *B. breve* a *B. animalis*, který v trávicím traktu zdravých lidí nepřevažuje. Co se týče kvantifikace, dle studie Bunešová et al. (2017) je medián počtu bifidobakterií u zdravých dospělých lidí s konvenční dietou $9,36 \pm 0,57$ log KTJ/g stolice.

U vzorku č. 1 bylo detekováno *Bifidobacterium longum*, dále zde bylo detekováno *Eubacterium limosu* a klostridie, které byly stanoveny podle morfologie. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 3,00 log KTJ/g stolice, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství bifidobakterií, tj. 3,46 log KTJ/g stolice. U B-MUP bylo zároveň stanoveno také množství klostridií, které bylo vyčísleno na 4,60 log KTJ/g stolice. V porovnání s mediánem

hodnot u zdravých lidí jsou výsledky z B-NOR, B-MUP nízké, navíc byly ve vzorku detekovány klostridie ve zvýšeném množství.

U vzorku č. 2 bylo detekováno *Bifidobacterium breve*, mezi další detekované bakterie patřily klostridie, které byly stanoveny podle morfologie. Na médiu B-NOR bylo stanoveny bifidobakterie v množství 10,28 log KTJ/g stolice a na médiu B-MUP bylo stanoveno podobné množství, tj. 10,33 log KTJ/g stolice. Zde byly všechny stanovené hodnoty vyšší než medián hodnot u zdravých lidí, jednalo se však o jednu z mála výjimek.

U vzorku č. 3 bylo detekováno *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium longum*. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 7,37 log KTJ/g stolice, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno nižší množství, tj. 6,72 log KTJ/g. Hodnoty byly nižší než medián hodnot u zdravých lidí.

U vzorku č. 4 bylo detekováno *Bifidobacterium animalis* a *Bifidobacterium longum*. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 8,03 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno nižší množství, tj. 7,62 log KTJ/g. Hodnoty byly rovněž nižší než medián hodnot u zdravých lidí.

U vzorku č. 5 bylo detekováno *Bifidobacterium longum*. Dalším detekovaným mikroorganismem bylo *Lbc. Plantarum* (F+). Na médiu B-NOR byly stanoveny v množství $<10^2$ KTJ/g bifidobakterií, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 6,21 log KTJ/g. Hodnoty byly rovněž nižší než medián hodnot u zdravých lidí, u B-NOR byla navíc zjištěna výrazně nízká hodnota.

U vzorku č. 6 bylo detekováno *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium adolescenti*. Dále byl detekován *Streptococcus lutetiensis*, *NRI*, *Lbc. fermentum* (F+). Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 8,99 log KTJ/g bifidobakterií, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 9,47 log KTJ/g. Zde byly všechny stanovené hodnoty vyšší než medián hodnot u zdravých lidí.

U vzorku č. 7 bylo detekováno *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium bifidum*. Dále bylo detekováno *Lbc. fermentum* (F+). Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství

8,66 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno nižší množství, tj. 8,41 log KTJ/g. Hodnoty byly opět nižší než medián hodnot u zdravých lidí.

U vzorku č. 8 bylo detekováno *Bifidobacterium longum*. Dále byl detekován *Cl. perfringens*, *NRI*. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 3,49 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 5,75 log KTJ/g. Hodnoty byly opět nižší než medián hodnot u zdravých lidí.

U vzorku č. 9 bylo detekováno *Bifidobacterium longum*. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 6,37 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno podobné množství, tj. 6,30 log KTJ/g. Hodnoty byly opět nižší než medián hodnot u zdravých lidí.

U vzorku č. 10 bylo detekováno *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum*. Na médiu B-NOR byly stanoveny v množství 3,90 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 4,44 log KTJ/g. Hodnoty byly opět nižší než medián hodnot zdravého dospělého člověka. Hodnoty byly opět nižší než medián hodnot u zdravých lidí.

U vzorku č. 11 bylo detekováno *Bifidobacterium animalis* a *Bifidobacterium breve*. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 7,80 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 10,19 log KTJ/g. U tohoto případu byla hodnota stanovená na B-NOR nižší a hodnota stanovená na B-MUP byla vyšší než medián hodnot u zdravých lidí.

U vzorku č. 12 nebyl detekován převažující druh bifidobakterií, ale bylo detekováno *Cl. perfringens*, *NRI*. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie, v množství 4,51 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 6,81 log KTJ/g. Hodnoty byly opět nižší než medián hodnot u zdravých lidí

U vzorku č. 13 bylo detekováno *Bifidobacterium longum*. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 7,15 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno vyšší množství, tj. 7,41 log KTJ/g. Hodnoty byly opět nižší než medián hodnot u zdravých lidí.

U vzorku č. 14 bylo detekováno *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium adolescentis*. Na médiu B-NOR byly stanoveny bifidobakterie v množství 8,16 log KTJ/g, oproti tomu na B-MUP bylo stanoveno podobné množství, tj. 8,20 log KTJ/g. Hodnoty byly opět nižší než medián hodnot u zdravých lidí.

U 11 vzorků z celkových 14 bylo zjištěno na obou selektivních médiích nižší množství bifidobakterií, než je medián hodnot u zdravých lidí. U dvou vzorků bylo zjištěno vyšší množství bifidobakterií na jednom z médií a u jednoho vzorku bylo zjištěno vyšší množství na obou médiích. Celkově lze říct, že množství bifidobakterií v trávicím traktu dětských pacientů na enterální výživě se liší, jak druhově, tak kvantitativně od mikrobioty zdravých lidí, což potvrzuje stanovenou hypotézu práce.

7 Závěr

Byly stanoveny dva cíle práce. Prvním cílem práce bylo na základě literární dat posoudit vliv probiotik a enterální výživy jako podpůrné terapie Crohnovy choroby. Rešerše na zadané téma byla sepsána. Z rešerše vyplývá, že u většiny provedených studií byl zaznamenán velmi slabý nebo žádný pozitivní vliv probiotik na zachování remise při terapii pacientů s Crohnovou chorobou. U enterální výživy se naopak autoři shodují v tom, že je účinným druhem terapie (zejména ve formě exkluzivní enterální výživy) k vyvolání remise Crohnovy choroby u kojenců, ačkoli mechanismus účinku není zcela objasněn a bude zapotřebí provést více studií na toto téma.

Druhým cílem v praktické části práce bylo stanovení druhového zastoupení bifidobakterií u specifické skupiny pacientů na enterální výživě a dále ověření selektivity kultivačních médií pro bifidobakterie. Tento cíl byl rovněž splněn, ke splnění bylo použito různých mikrobiologických a analytických metod. Konkrétně se jedná o kultivační stanovení bifidobakterií a celkových počtů anaerobních bakterií, dále identifikace bifidobakterií pomocí F6PPK testu a identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS.

Selektivita kultivačních médií s přídavkem antibiotik byla ověřena. Vyšší počty bifidobakterií byly na B-NOR a bylo prokázáno, že u média B-NOR je spolehlivost vyšší.

Hypotézou práce bylo, že množství a druhové zastoupení bifidobakterií u zdravých lidí a pacientů na enterální výživě je rozdílné. Na základě porovnání výsledků práce s počtem bifidobakterií u zdravých lidí, byla stanovená hypotéza potvrzena a bylo prokázáno, že zastoupení bifidobakterií je u pacientů na enterální výživě nižší a druhově rozdílné oproti zastoupení bifidobakterií zdravých lidí.

8 Literatura

- Abraham, C., Cho, J. H. 2009. Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*. 361 (21). 2066–2078. doi: 10.1056/NEJMra0804647.
- Adamberg, K., Adamberg, S., Ernits, K., Larionova, A., Voor, T., Jaagura, M., Visnapuu, T., Alamäe, T. 2018. Composition and metabolism of fecal microbiota from normal and overweight children are differentially affected by melibiose, raffinose and raffinose-derived fructans. *Anaerobe*. 52 . 100–110. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.06.009>.
- Afzal, N. A., Davies, S., Paintin, M., Arnaud-Battandier, F., Walker-Smith, J. A., Murch, S., Heuschkel, R., Fell, J. 2005. Colonic Crohn's disease in children does not respond well to treatment with enteral nutrition if the ileum is not involved. *Digestive Diseases and Sciences*. 50 (8). 1471–1475. doi: 10.1007/s10620-005-2864-6.
- Ahlqvist, V. H., Persson, M., Magnusson, C., Berglind, D. 2019. Elective and nonelective cesarean section and obesity among young adult male offspring: A Swedish population-based cohort study. *PLoS Medicine*. 16 (12). e1002996. doi: 10.1371/journal.pmed.1002996.
- Ananthakrishnan, A. N., Khalili, H., Higuchi, L. M., Bao, Y., Korzenik, J. R., Giovannucci, E. L., Richter, J. M., Fuchs, C. S., Chan, A. T. 2012. Higher Predicted Vitamin D Status Is Associated With Reduced Risk of Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 142 (3). 482–489. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.040>.
- Bartošová, L., Kolorz, M., Hošek, J., Dvořáčková, D., Loučka, P., Zbořil, V., Bétovský, M., Díte, P., Bartoš, M. 2009. Gene polymorphisms - IBD predisposing factor and their association with clinical manifestation of the disease and pharmacotherapy. *Ceska a Slovenska Gastroenterologie a Hepatologie*. 63 . 265–274.
- Baumgart, D. C., Sandborn, W. J. 2012. Crohn's disease. *Lancet*. 380 (9853). 1590–605. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60026-9.
- Bernstein, C. N., Loftus, E. V, Ng, S. C., Lakatos, P. L., Moum, B. 2012. Hospitalisations and surgery in Crohn's disease. *Gut*. 61 (4). 622–629. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301397.
- Bourreille, A., Cadiot, G., Le Dreau, G., Laharie, D., Beaugerie, L., Dupas, J. L., Marteau, P., Rampal, P., Moyse, D., Saleh, A., Le Guern, M. E., Galliche, J. P. 2013. *Saccharomyces boulardii* does not prevent relapse of crohn's disease. *Clinical*

- Gastroenterology and Hepatology. 11 (8). 982–987. doi: 10.1016/j.cgh.2013.02.021.
- Bousvaros, A., Guandalini, S., Baldassano, R. N., Botelho, C., Evans, J., Ferry, G. D., Goldin, B., Hartigan, L., Kugathasan, S., Levy, J., Murray, K. F., Oliva-Hemker, M., Rosh, J. R., Tolia, V., Zholudev, A., Vanderhoof, J. A., Hibberd, P. L. 2005. A randomized, double-blind trial of Lactobacillus GG versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 11 (9). 833–839. doi: 10.1097/01.mib.0000175905.00212.2c.
- BUCHANAN, E., GAUNT, W. W., CARDIGAN, T., GARRICK, V., MCGROGAN, P., RUSSELL, R. K. 2009. The use of exclusive enteral nutrition for induction of remission in children with Crohn's disease demonstrates that disease phenotype does not influence clinical remission. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 30 (5). 501–507. doi: 10.1111/j.1365-2036.2009.04067.x.
- Bunešová, V., Joch, M., Musilová, S., Rada, V. 2017. Bifidobacteria, Lactobacilli, and Short Chain Fatty Acids of Vegetarians and Omnivores. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 48 (1). 47–54. doi: <https://doi.org/10.1515/sab-2017-0007>.
- Cammarota, G., Ianiro, G., Cianci, R., Bibbò, S., Gasbarrini, A., Currò, D. 2015. The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: Potential for therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 149 . 191–212. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.12.006>.
- Caro, D., Fragkos, K., Keetarut, Koo, Sebepos-Rogers, G., Saravanapavan, Barragry, Rogers, Mehta, Rahman, F. 2019. Enteral Nutrition in Adult Crohn's Disease: Toward a Paradigm Shift. *Nutrients*. 11 . 2222. doi: 10.3390/nu11092222.
- Chen, Y., Wang, Y., Shen, J. 2019. Role of environmental factors in the pathogenesis of Crohn's disease: a critical review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE*. 34 (12). 2023–2034. doi: 10.1007/s00384-019-03441-9.
- Cosnes, J. 2004. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 18 (3). 481–496. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.12.003>.
- Cosnes, J., Beaugerie, L., Carbonnel, F., Gendre, J. 2001. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: An intervention study. *Gastroenterology*. 120 (5). 1093–1099. doi: <https://doi.org/10.1053/gast.2001.23231>.
- Derwa, Y., Gracie, D. J., Hamlin, P. J., Ford, A. C. 2017. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 46 (4). 389–400. doi: 10.1111/apt.14203.

- Dicks, L. M. T., Geldenhuys, J., Mikkelsen, L. S., Brandsborg, E., Marcotte, H. 2018. Our gut microbiota: A long walk to homeostasis. *Beneficial Microbes*. 9 (1). 3–20. doi: 10.3920/BM2017.0066.
- Dignass, A., Allez, M., Danese, S., Marteau, P. 2014. Introduction. *Digestive Diseases*. 32(suppl 1 (Suppl. 1)). 1. Retrieved from <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000367977>
- Faith, J., McNulty, N., Rey, F., Gordon, J. 2011. Predicting a Human Gut Microbiota's Response to Diet in Gnotobiotic Mice. *Science (New York, N.Y.)*. 333 . 101–104. doi: 10.1126/science.1206025.
- Fedorak, R. N., Feagan, B. G., Hotte, N., Leddin, D., Dieleman, L. A., Petrunia, D. M., Enns, R., Bitton, A., Chiba, N., Pare, P., Rostom, A., Marshall, J., Depew, W., Bernstein, C. N., Panaccione, R., Aumais, G., Steinhart, A. H., Cockeram, A., Bailey, R. J., Gionchetti, P., Wong, C., Madsen, K. 2015. The probiotic VSL#3 has anti-inflammatory effects and could reduce endoscopic recurrence after surgery for Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*. 13 (5). 928–35.e2. doi: 10.1016/j.cgh.2014.10.031.
- Feuerstein, J. D., Cheifetz, A. S. 2017. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clinic Proceedings*.
- Forbes, A., Escher, J., Hébuterne, X., Kłęk, S., Krznaric, Z., Schneider, S., Shamir, R., Stardelova, K., Wierdsma, N., Wiskin, A. E., Bischoff, S. C. 2017. ESPEN guideline: Clinical nutrition in inflammatory bowel disease. *Clinical Nutrition*. 36 (2). 321–347. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.12.027>.
- Fricker, M., Goggins, B. J., Mateer, S., Jones, B., Kim, R. Y., Gellatly, S. L., Jarnicki, A. G., Powell, N., Oliver, B. G., Radford-Smith, G., Talley, N. J., Walker, M. M., Keely, S., Hansbro, P. M. 2018. Chronic cigarette smoke exposure induces systemic hypoxia that drives intestinal dysfunction. *JCI Insight*. 3 (3). doi: 10.1172/jci.insight.94040.
- Fujimori, S., Tatsuguchi, A., Gudis, K., Kishida, T., Mitsui, K., Ehara, A., Kobayashi, T., Sekita, Y., Seo, T., Sakamoto, C. 2007. High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 22 (8). 1199–1204. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04535.x.
- Fung, T. C., Olson, C. A., Hsiao, E. Y. 2017. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience*. 20 (2). 145–155. doi: 10.1038/nn.4476.

- Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L., Blumberg, R. S. 2016. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science (New York, N.Y.)*. 352 (6285). 539–544. doi: 10.1126/science.aad9378.
- Ghavami, S. B., Rostami, E., Sephay, A. A., Shahrokh, S., Balaii, H., Aghdaei, H. A., Zali, M. R. 2018. Alterations of the human gut *Methanobrevibacter smithii* as a biomarker for inflammatory bowel diseases. *Microbial Pathogenesis*. 117 . 285–289. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.029>.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 125 (6). 1401–1412. doi: 10.1093/jn/125.6.1401.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Lammers, K.-M., Morselli, C., Sollazzi, L., Davies, S., Tambasco, R., Calabrese, C., Campieri, M. 2006. Antibiotics and probiotics in treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 12 (21). 3306–3313. doi: 10.3748/wjg.v12.i21.3306.
- Griffiths, A. M., Ohlsson, A., Sherman, P. M., Sutherland, L. R. 1995. Meta-analysis of enteral nutrition as a primary treatment of active crohn’s disease. *Gastroenterology*. 108 (4). 1056–1067. doi: [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90203-1](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90203-1).
- Gu, P., Feagins, L. A. 2020. Dining With Inflammatory Bowel Disease: A Review of the Literature on Diet in the Pathogenesis and Management of IBD. *INFLAMMATORY BOWEL DISEASES*. 26 (2). 181–191. doi: 10.1093/ibd/izz268.
- Gupta, P., Andrew, H., S. Kirschner, B., Guandalini, S. 2000. Is *Lactobacillus GG* Helpful in Children With Crohn’s Disease? Results of a Preliminary, Open-Label Study *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. Vol. 31. p. 453–457.
- Hansen, T., Duerksen, D. R. 2018. Enteral Nutrition in the Management of Pediatric and Adult Crohn’s Disease. *Nutrients*. 10 (5). doi: 10.3390/nu10050537.
- Higuchi, L. M., Khalili, H., Chan, A. T., Richter, J. M., Bousvaros, A., Fuchs, C. S. 2012. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *The American Journal of Gastroenterology*. 107 (9). 1399–1406. doi: 10.1038/ajg.2012.196.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G., Merenstein, D., Pot, B., Morelli, L., Berni Canani, R., Flint, H., Salminen, S., Calder, P., Sanders, M. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*. 11 . doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.

- Hirai, F., Takeda, T., Takada, Y., Kishi, M., Beppu, T., Takatsu, N., Miyaoka, M., Hisabe, T., Yao, K., Ueki, T. 2019. Efficacy of enteral nutrition in patients with Crohn's disease on maintenance anti-TNF-alpha antibody therapy: a meta-analysis. *Journal of Gastroenterology*. doi: 10.1007/s00535-019-01634-1.
- Hotel, A. 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria – Joint FAO/WHO Expert Consultation. . 2014 .
- Hu, D., Ren, J., Wang, G., Li, G., Liu, S., Yan, D., Gu, G., Zhou, B., Wu, X., Chen, J., Ding, C., Wu, Y., Wu, Q., Liu, N., Li, J. 2014. Exclusive Enteral Nutritional Therapy Can Relieve Inflammatory Bowel Stricture in Crohn's Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 48 (9). Retrieved from https://journals.lww.com/jcge/Fulltext/2014/10000/Exclusive_Enteral_Nutritional_Therapy_Can_Relieve.9.aspx
- Ianiro, G., Tilg, H., Gasbarrini, A. 2016. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: Between good and evil. *Gut*. 65 (11). 1906–1915. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312297.
- Kaplan, G. G., Ng, S. C. 2017. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 152 (2). 313-321.e2. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.020>.
- Kapourchali, F. R., Cresci, G. A. M. 2020. Early-Life Gut Microbiome—The Importance of Maternal and Infant Factors in Its Establishment. *Nutrition in Clinical Practice*. 35 (3). 386–405. doi: 10.1002/ncp.10490.
- Korpela, K., de Vos, W. M. 2018. Early life colonization of the human gut: microbes matter everywhere. *Current Opinion in Microbiology*. 44 . 70–78. doi: 10.1016/j.mib.2018.06.003.
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., Gevers, D. 2015. The Microbiome in Inflammatory Bowel Diseases: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology*. 146 (6). 1489–1499. doi: 10.1053/j.gastro.2014.02.009.The.
- Lee, D., Albenberg, L., Compher, C., Baldassano, R., Piccoli, D., Lewis, J. D., Wu, G. D. 2015. Diet in the Pathogenesis and Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 148 (6). 1087–1106. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.01.007>.
- Levine, A., Wine, E. 2013. Effects of Enteral Nutrition on Crohn's Disease: Clues to the Impact of Diet on Disease Pathogenesis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 19 . doi: 10.1097/MIB.0b013e3182802acc.
- Levine, A., Wine, E., Assa, A., Sigall Boneh, R., Shaoul, R., Kori, M., Cohen, S., Peleg, S., Shamaly, H., On, A., Millman, P., Abramson, L., Ziv-Baran, T., Grant, S., Abitbol, G.,

- Dunn, K. A., Bielawski, J. P., Van Limbergen, J. 2019. Crohn's Disease Exclusion Diet Plus Partial Enteral Nutrition Induces Sustained Remission in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology*. 157 (2). 440-450.e8. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.04.021>.
- Lochs, H., Dejong, C., Hammarqvist, F., Hebuterne, X., Leon-Sanz, M., Schütz, T., van Gemert, W., van Gossum, A., Valentini, L., Lübke, H., Bischoff, S., Engelmann, N., Thul, P. 2006. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: *Gastroenterology. Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 25 (2). 260–274. doi: 10.1016/j.clnu.2006.01.007.
- Lorea Baroja, M., Kirjavainen, P. V, Hekmat, S., Reid, G. 2007. Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clinical and Experimental Immunology*. 149 (3). 470–479. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03434.x.
- Lu, K. C., Hunt, S. R. 2013. Surgical management of Crohn's disease. *The Surgical Clinics of North America*. 93 (1). 167—185. doi: 10.1016/j.suc.2012.09.002.
- Lukáš, M. 1998. *Idiopatické střevní záněty: nejistoty, současné znalosti a klinický přístup*. Galén. Praha. 363 s. ISBN 80-85824-79-5.
- Mack, D. R. 2011. *Probiotics in inflammatory bowel diseases and associated conditions*. Nutrients. ISBN: 2072-6643.
- Mackner, L. M., Hatzakis, E., Allen, J. M., Davies, R. H., Kim, S. C., Maltz, R. M., Bailey, M. T. 2020. Fecal microbiota and metabolites are distinct in a pilot study of pediatric Crohn's disease patients with higher levels of perceived stress. *Psychoneuroendocrinology*. 111 . 104469. doi: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.104469>.
- Maldonado Galdeano, C., Cazorla, S. I., Lemme Dumit, J. M., Vélez, E., Perdigon, G. 2019. Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 74 (2). 115–124. doi: 10.1159/000496426.
- McVey Neufeld, K. A., Kang, N., Bienenstock, J., Foster, J. 2011. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and Motility*. 23 . 255–264.
- Michetti, P. 2000. Intestinal pathogen or IBD, same T-cell response. *Inflammatory Bowel Diseases*. 6 (1). 63–64. doi: 10.1097/00054725-200002000-00014.
- Monif, G. R. G. 2020. MAP template controlling Crohn's disease? *Medical Hypotheses*. 138 . 109593. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109593>.
- Nunes, T., Etchevers, M. J., Domènech, E., García-Sánchez, V., Ber, Y., Peñalva, M., Merino, O., Nos, P., Garcia-Planella, E., Casbas, A. G., Esteve, M., Taxonera Samsó, C.,

- Montoro Huguet, M., Gisbert, J. P., Martín Arranz, M. D., García-Sepulcre, M. F., de Acosta, M. B., Beltrán, B., Alcaide Suárez, N., Saro Gismera, C., Cabriada, J. L., Cañas-Ventura, A., Gomollón, F., Panés, J., of GETECCU, T.-E. S. G. 2013. Smoking does influence disease behaviour and impacts the need for therapy in Crohn's disease in the biologic era. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 38 (7). 752–760. doi: 10.1111/apt.12440.
- O'Keefe, S. J. D. 2008. Nutrition and colonic health: The critical role of the microbiota. *Current Opinion in Gastroenterology*. 24 (1). 51–58. doi: 10.1097/MOG.0b013e3282f323f3.
- Oka, A., Sartor, R. B. 2020. Microbial-Based and Microbial-Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. *DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES*. 65 (3, SI). 757–788. doi: 10.1007/s10620-020-06090-z.
- Oliveira, S. B., Monteiro, I. M. 2017. Diagnosis and management of inflammatory bowel disease in children. *BMJ*. 357 . Retrieved from <http://www.bmj.com/content/357/bmj.j2083.abstract>
- Orban, J. I., Patterson, J. A. 2000. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 40 (3). 221–224. doi: 10.1016/S0167-7012(00)00133-0.
- Ortiz, R., Lee, S. Y., Nguyen, E. T., Jamal, M. M., Bechtold, M. M., Nguyen, D. L. 2017. Exposure to oral contraceptives increases the risk for development of inflammatory bowel disease: a meta-analysis of case-controlled and cohort studies. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 29 (9). Retrieved from https://journals.lww.com/eurojgh/Fulltext/2017/09000/Exposure_to_oral_contraceptives_increases_the_risk.14.aspx
- Papada, E., Amerikanou, C., Forbes, A., Kaliora, A. C. 2020. Adherence to Mediterranean diet in Crohn's disease. *European Journal of Nutrition*. 59 (3). 1115–1121. doi: 10.1007/s00394-019-01972-z.
- Parracho, H. M. R. T., Bingham, M. O., Gibson, G. R., McCartney, A. L. 2005. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *Journal of Medical Microbiology*. 54 (10). 987–991. doi: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46101-0>.
- Pieniz, S., Andrezza, R., Anghinoni, T., Camargo, F., Brandelli, A. 2014. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*. 37 . 251–256. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.055>.

- Posovszky, C., Barth, T. F. E. 2020. Der Darm im Fokus des Immunsystems. *Der Pathologe*. 41 (3). 211–223. doi: 10.1007/s00292-020-00775-y.
- Prakash, S., Rodes, L., Coussa-Charley, M., Tomaro-Duchesneau, C. 2011. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*. 5 . 71–86. doi: 10.2147/BTT.S19099.
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., Mele, M. C. 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *MICROORGANISMS*. 7 (1). doi: 10.3390/microorganisms7010014.
- Rodriguez, C., Romero, E., Garrido-Sanchez, L., Alcain-Martinez, G., Andrade, R. J., Taminiau, B., Daube, G., Garcia-Fuentes, E. (n.d.) Microbiota insights in *Clostridium difficile* infection and inflammatory bowel disease. *GUT MICROBES*. doi: 10.1080/19490976.2020.1725220.
- Russell, D. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. 2011. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 149 (1). 88–105. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.003>.
- Sartor, R. B., Wu, G. D. 2017. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology*. 152 (2). 327-339.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.012.
- Scanlan, P. D., Shanahan, F., Marchesi, J. R. 2008. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis. *BMC Microbiology*. 8 (1). 79. doi: 10.1186/1471-2180-8-79.
- Schultz, M., Timmer, A., Herfarth, H. H., Sartor, R. B., Vanderhoof, J. A., Rath, H. C. 2004. *Lactobacillus GG* in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterology*. 4 . 5. doi: 10.1186/1471-230X-4-5.
- Seksik, P., Nion-Larmurier, I., Sokol, H., Beaugerie, L., Cosnes, J. 2009. Effects of light smoking consumption on the clinical course of Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 15 (5). 734–741. doi: 10.1002/ibd.20828.
- Sgambato, D., Miranda, A., Ranaldo, R., Federico, A., Romano, M. 2017. The Role of Stress in Inflammatory Bowel Diseases. *Current Pharmaceutical Design*. 23 (27). 3997—4002. doi: 10.2174/1381612823666170228123357.
- Shaler, C. R., Elhenawy, W., Coombes, B. K. 2019. The Unique Lifestyle of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. 431 (16). 2970–2981. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.023>.

- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L. G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottiere, H. M., Dore, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105 (43). 16731–16736. doi: 10.1073/pnas.0804812105.
- Steed, H., Macfarlane, G. T., Blackett, K. L., Bahrami, B., Reynolds, N., Walsh, S. V, Cummings, J. H., Macfarlane, S. 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 & Therapeutics*. 32 (7). 872–883. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04417.x.
- Svolos, V., Hansen, R., Nichols, B., Quince, C., Ijaz, U. Z., Papadopoulou, R. T., Edwards, C. A., Watson, D., Alghamdi, A., Brejnrod, A., Ansalone, C., Duncan, H., Gervais, L., Tayler, R., Salmond, J., Bolognini, D., Klopffleisch, R., Gaya, D. R., Milling, S., Russell, R. K., Gerasimidis, K. 2019. Treatment of Active Crohn's Disease With an Ordinary Food-based Diet That Replicates Exclusive Enteral Nutrition. *Gastroenterology*. 156 (5). 1354-1367.e6. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.002>.
- Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M., Elinav, E. 2016. The microbiome and innate immunity. *Nature*. 535 (7610). 65–74. doi: 10.1038/nature18847.
- Troelsen, F. S., Jick, S. 2019. Antibiotic Use in Childhood and Adolescence and Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Case–Control Study in the UK Clinical Practice Research Datalink. *Inflammatory Bowel Diseases*. 26 (3). 440–447. doi: 10.1093/ibd/izz137.
- Vijay-Kumar, M., Aitken, J. D., Carvalho, F. A., Cullender, T. C., Mwangi, S., Srinivasan, S., Sitaraman, S. V, Knight, R., Ley, R. E., Gewirtz, A. T. 2010. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science (New York, N.Y.)*. 328 (5975). 228–231. doi: 10.1126/science.1179721.
- Vlková, E., Salmonová, H., Bunešová, V., Geigerová, M., Rada, V., Musilová, Š. 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe*. 34 . 27–33. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.04.001.
- Willing, B. P., Dicksved, J., Halfvarson, J., Andersson, A. F., Lucio, M., Zheng, Z., Järnerot, G., Tysk, C., Jansson, J. K., Engstrand, L. 2018. A Pyrosequencing Study in Twins Shows That Gastrointestinal Microbial Profiles Vary With Inflammatory Bowel Disease

Phenotypes. *Gastroenterology*. 139 (6). 1844-1854.e1. doi:
10.1053/j.gastro.2010.08.049.

Younis, N., Zarif, R., Mahfouz, R. 2020. Inflammatory bowel disease: between genetics and microbiota. *Molecular Biology Reports*. 47 (4). 3053–3063. doi: 10.1007/s11033-020-05318-5.

Zhang, Y.-J., Li, S., Gan, R.-Y., Zhou, T., Xu, D.-P., Li, H.-B. 2015. Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 16 (4). 7493–7519. doi: 10.3390/ijms16047493.

Zou, Y., Wu, L., Xu, W., Zhou, X., Ye, K., Xiong, H., Song, C., Xie, Y. 2020. Correlation between antibiotic use in childhood and subsequent inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 55 (3). 301–311. doi: 10.1080/00365521.2020.1737882.

9 Samostatné přílohy

Tabulka č. 6 – Hodnocení aktivity fosfoketolázy a metody MALDI-TOF MS v rámci jednotlivých izolovaných kmenů

Kmen	F6PPK	MALDI	M-score	
B-NOR PEG 11/7	+	Bifidobacterium animalis	2.248	
B-MUP PEG 11/8A	+	Bifidobacterium breve	2.144	
B-MUP PEG 11/8C	+/-	Enterococcus gallinarum	2.282	
B-MUP PEG 10/3A	+	Bifidobacterium bifidum	2.176	
B-MUP PEG 10/3C	+	Bifidobacterium bifidum	2.235	
B-MUP PEG 11/8D	+	Bifidobacterium breve	1.828	
B-NOR PEG 11/6A	+	Bifidobacterium animalis	2.038	
B-NOR PEG 11/6B	+	Bifidobacterium animalis	2.033	
B-NOR PEG 10/3A	+	Bifidobacterium longum	1.99	
B-MUP PEG 10/3B-A	+	Bifidobacterium longum	2.192	
B-MUP PEG 10/3B-C	+	Bifidobacterium longum	1.94	
B-NORx PEG 10/2A-1	+	Bifidobacterium longum	1.997	
B-MUP PEG 1/3	+	Bifidobacterium longum	1.719	
B-NOR PEG 10/2A	+	not reliable identification	1.436	<i>B. dentium</i>
B-NOR PEG 10/2B	+	Bifidobacterium longum	2.093	
B-NOR PEG 10/2A-2	+	not reliable identification	1.64	<i>B. dentium</i>
B-MUP PEG 10/3B-B	+	Bifidobacterium longum	1.828	
B-NOR PEG 14/7A	+	Bifidobacterium longum	2.068	
B-NOR PEG 14/7B	+	Bifidobacterium longum	2.363	
B-NOR PEG 14/6A	+	Bifidobacterium adolescentis	2.198	
B-NOR PEG 14/6B	+	Bifidobacterium longum	2.177	
B-MUP PEG 14/8	+	Bifidobacterium longum	2.219	

B-MUP PEG 14/7A	+	Bifidobacterium adolescentis	2.442
B-MUP PEG 4/6D	+	Bifidobacterium animalis	2.187
B-MUP PEG 4/6A	+	Bifidobacterium animalis	2.219
B-MUP PEG 14/7C	+	Bifidobacterium longum	2.127
B-NOR PEG 4/7A	+	Bifidobacterium longum	2.157
B-NOR PEG 4/7B	+	Bifidobacterium animalis	2.283
B-MUP PEG 8/4A	-	<i>Clostridium perfringens</i>	2.367
B-MUP PEG 8/4B	+	Bifidobacterium longum	2.029
B-MUP PEG 8/5B	-	not reliable identification	1.516
B-NOR PEG 8/2A	+	Bifidobacterium longum	2.079
B-NOR PEG 8/2C	+	Bifidobacterium longum	2.137
B-NOR PEG 8/2E	+	Bifidobacterium longum	1.868
B-NOR PEG 8/2F	+	Bifidobacterium longum	02.VIII
B-NOR PEG 8/3A	+	Bifidobacterium longum	2.017
B-NOR PEG 8/3B	+	Bifidobacterium longum	2.103
B-MUP PEG 12/5A	-	<i>Clostridium perfringens</i>	2.361
B-MUP PEG 12/5B	-	not reliable identification	1.569
B-MUP PEG 12/5C	-	not reliable identification	1.587
B-MUP PEG 14/6B	+	Bifidobacterium bifidum	2.304
B-MUP PEG 1/2A	+	Bifidobacterium longum	2.104
B-MUP PEG 1/2C	+	Bifidobacterium longum	2.007
B-MUP PEG 1/3A	+	Bifidobacterium longum	1.959
B-MUP PEG 1/3C	-	Eubacterium limosum	2.028
B-MUP PEG 1/4A	-	Eubacterium limosum	2.042
B-MUP PEG 1/4C	-	Eubacterium limosum	2.173

B-NOR PEG 1/2B	+	Bifidobacterium longum	2.010
B-MUP PEG 2/9B	+	Bifidobacterium breve	1.997
B-MUP PEG 2/8A	+	Bifidobacterium breve	2.079
B-MUP PEG 2/8B	+	Bifidobacterium breve	1.819
B-MUP PEG 3/5A	+	Bifidobacterium breve	2.078
B-MUP PEG 9/4B	+	Bifidobacterium longum	1.906
B-MUP PEG 3/5B	+	Bifidobacterium breve	2.070
B-MUP PEG 3/5C	+	Bifidobacterium breve	2.107
B-MUP PEG 3/6C	+	Bifidobacterium breve	2.122
B-NOR PEG 2/8C	+	Bifidobacterium breve	2.014
B-NOR PEG 2/9A	+	Bifidobacterium breve	1.933
B-NOR PEG 2/9B	+	Bifidobacterium breve	2.021
B-NOR PEG 3/5C	+	Bifidobacterium longum	1.914
B-NOR PEG 9/4C	+	Bifidobacterium longum	2.181
B-MUP PEG 9/6	+	Bifidobacterium longum	1.903
B-MUP PEG 9/5B	+	Bifidobacterium longum	1.929
B-MUP PEG 9/5C	+	Bifidobacterium longum	2.037
B-NOR PEG 9/5A	+	Bifidobacterium longum	2.141
B-NOR PEG 9/5B	+	Bifidobacterium longum	1.982
B-NOR PEG 9/5C	+	Bifidobacterium longum	1.863
B-MUP PEG 3/5D	+	Bifidobacterium longum	2.067
B-MUP PEG 3/5A	+	Bifidobacterium longum	1.77
B-MUP PEG 13/5A	+	Bifidobacterium longum	1.993
B-MUP PEG 13/5B	+	Bifidobacterium longum	2.030
B-MUP PEG 13/7	-	Enterococcus faecium	2.206

B-NOR PEG 13/5A	+	Bifidobacterium longum	2.099	
B-NOR PEG 13/6A	+	Bifidobacterium longum	2.070	
B-NOR PEG 13/6B	+	Bifidobacterium longum	2.025	
B-MUP PEG 6/8A	+	Bifidobacterium longum	2.158	
B-MUP PEG 6/8B	+	Lactobacillus fermentum	1.925	
B-MUP PEG 6/8C	+	Bifidobacterium adolescentis	2.310	
B-MUP PEG 6/7A	-	not reliable identification	1.688	ag+
B-MUP PEG 7/6A	+	Lactobacillus plantarum	2.091	
B-MUP PEG 6/9B	+/-	Bifidobacterium adolescentis	2.260	
B-NOR PEG 7/7C	+	Bifidobacterium longum	2.174	
B-MUP PEG 7/7C	+/-	Bifidobacterium bifidum	1.945	
B-NOR PEG 6/8A	+	Bifidobacterium adolescentis	2.118	
B-NOR PEG 6/7B	+	Bifidobacterium longum	2.159	
B-NOR PEG 6/7C	-	Streptococcus lutetiensis	2.288	
B-MUP PEG 5/4A	+	Lactobacillus plantarum	2.108	
B-MUP PEG 5/4B	+	Bifidobacterium longum	2.020	
B-NOR PEG 7/8	+	Bifidobacterium longum	2.074	
B-MUP PEG 7/8	+	Bifidobacterium bifidum	2.099	

Kódování kmenů: B-NOR – médium pro bifidobakterie s mupirocinem a norfloxacinem, B-MUP – médium pro bifidobakterie pouze s mupirocinem, PEG1-14 – označení dítěte, číslo za lomítkem – označení kmene.