

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**

**Studium interakcí antibakteriálních látek přírodního charakteru  
v kombinaci s vybranými antibiotiky**

doktorská disertační práce

**Autor: Ing. Klára Laloučková**

**Školitel: prof. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.**

**Konzultant: Ing. Johana Rondevaldová, Ph.D.**  
**Fakulta tropického zemědělství, ČZU v Praze**

**Praha 2 0 2 1**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou doktorskou disertační práci s názvem "Studium interakcí antibakteriálních látek přírodního charakteru v kombinaci s vybranými antibiotiky" zpracovala s použitím zdrojů, které jsou v práci citovány a uvedeny v seznamu literatury. Jako autorka uvedené práce dále prohlašuji, že všechny texty v práci jsou originální, a že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne

.....

Klára Laloučková

## **Poděkování**

Chtěla bych na tomto místě poděkovat za veškeré vedení své školitelce, prof. MVDr. Evě Skřivanové, Ph.D., bez níž bych nikdy doktorské studium nebyla schopna absolvovat, a díky které jsem viděla nová místa, poznala nové lidi a rozšířila si obzory nejen v akademických souvislostech. Rovněž děkuji své školitelce-specialistce, Ing. Johaně Rondevaldové, Ph.D., za rady i optimismus, který mi její slova vždy přináší. Za poznání, jak náročným, ale důležitým procesem je psaní vědeckých publikací, děkuji prof. Ing. Ladislavu Kokoškovi, Ph.D.

Velké díky patří také mým kolegům z Výzkumného ústavu živočišné výroby, v.v.i. v Praze-Uhřetěvesi, kteří mi v průběhu studia vždy nabídli povzbuzení, konkrétně pak Ing. Eleně Kudrnové a Mgr. Ladislavu Čermákovi, Ph.D., stejně jako vedoucí oddělení prof. Ing. Věře Skřivanové, CSc.

Za finanční podporu děkuji České zemědělské univerzitě (projekty CIGA 20172020 a 20175001), Ministerstvu zemědělství (VÚŽV projekt RO-0714 a RO-0718) a Evropskému regionálnímu rozvojovému fondu (projekt NutRisk Centre No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000845).

Dále bych chtěla poděkovat všem z mého okolí, kteří jsou na této krásné cestě se mnou do dnes, i těm, kteří během ní bohužel odešli. A tatškovi.

## Souhrn

Jednou z možností, jak snížit progresi bakteriální antibiotické rezistence a omezit její následky v terapii infekčních onemocnění způsobených rezistentními bakteriemi, je tzv. kombinační léčba. S ohledem na danou skutečnost bylo cílem této doktorské disertační práce studovat možnosti působení vybraných látek přírodního charakteru v kombinaci s antibiotiky na určité patogenní bakterie pomocí laboratorních mikrobiologických metod. Práce byla koncipována jako komentovaný soubor čtyř prací souvisejících s tématem bakteriální antibiotické rezistence, antimikrobiálních účinků štěpených rostlinných olejů bohatých na středně dlouhé mastné kyseliny (MCFA) vůči grampozitivním patogenům trávicího traktu, komenzálním bakteriím a původcům bovinních mastitid, a následně s tématem možných interakcí vybraných hydrolyzovaných rostlinných olejů bohatých na MCFA po výše uvedeném testování jejich antibakteriálních vlastností s oxacilinem vůči *Staphylococcus aureus*. Studie publikované v rámci této práce prokázaly *in vitro* mikrodiluční metodou v bujónu, že rostlinné oleje (babassu, *Cuphea*, kokosový, murumuru, palmojádrový a tucuma olej) štěpené porcinní pankreatickou lipázou potlačují růst enteropatogenů (*Clostridium perfringens*, *Enterococcus cecorum*, *Listeria monocytogenes* a *S. aureus*) při hodnotách minimálních inhibičních koncentrací (MIC) v rozmezí od 140 µg/ml do 4500 µg/ml v závislosti na testovaném bakteriálním druhu a kmeni. Navíc byl zjištěn pozitivní fakt, a sice, že štěpené rostlinné oleje bohaté na MCFA nemají vliv (MIC < 4500 µg/ml) na růst komenzálních, zdraví prospěšných bakterií trávicího traktu (*Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp.). Následně bylo prokázáno, že vybrané palmové oleje bohaté na MCFA (kokosový, palmojádrový a tucuma olej) hydrolyzované lipázou z *Mucor javanicus* jsou antibakteriálními látkami schopnými potlačit růst bakterií *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Str. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* a *Str. uberis* při MIC odpovídajících hodnotám 2048–8192 µg/ml, 64–1024 µg/ml, 1024–2048 µg/ml, a 128–2048 µg/ml pro každý bakteriální druh. Dále bylo *in vitro* pomocí šachovnicové mikrodiluční metody v bujónu zjištěno, že tři vybrané palmové oleje bohaté na MCFA (kokosový, palmojádrový a tucuma olej) štěpené porcinní pankreatickou lipázou vykazují v kombinaci s oxacilinem antagonistické interakce vůči standardním kmenům i klinickým izolátům *S. aureus* v koncentracích  $\geq 1024$  µg/ml. Plynovou chromatografií s ionizačním plameným detektorem bylo zjištěno, že hlavní mastnou kyselinou v testovaných olejích je kyselina laurová, jež následně s oxacilinem vykazovala také antagonistické kombinační účinky ve shodných

koncentracích jako štěpené oleje, tedy  $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$ . Na základě růstových křivek kmenů *S. aureus* v různých koncentracích testovaných látek lze předpokládat, že mechanismem antagonistického působení mezi MCFA-bohatými rostlinnými oleji po jejich hydrolyzaci a oxacilinem je zastavení dělení bakterií *S. aureus*, čímž je přerušena produkce cílových míst oxacilinu (penicilin-vázající proteiny buněčné stěny bakterií), a látky tak negativně ovlivní svůj účinek.

Lze předpokládat, že vysoké dávky rostlinných (palmových) olejů bohatých na MCFA mohou při současné koadministraci negativně ovlivnit léčbu stafylokokových infekcí  $\beta$ -laktamovými antibiotiky, čímž byla potvrzena hypotéza práce, a sice, že budou vybrané antibakteriální látky přírodního charakteru (štěpené rostlinné oleje bohaté na MCFA) v kombinaci s antibiotiky ( $\beta$ -laktamy, resp. oxacilin) vykazovat modulovanou aktivitu na základě působení látkových interakcí, které se budou projevovat případnou změnou antibakteriálního účinku (antagonismus).

## Summary

One of the possible ways of reducing the progression of bacterial antibiotic resistance and restriction of its consequences on the treatment of infectious diseases caused by resistant bacteria is the so-called combination therapy. With regard to this fact, the aim of this doctoral dissertation thesis was to study the possible action of selected substances with natural origin in combination with antibiotics on certain pathogenic bacteria using laboratory microbiological methods. The work was conceived as an annotated set of four papers related to the topic of bacterial antibiotic resistance, antimicrobial effects of cleaved vegetable oils rich in medium fatty acids (MCFA) against gram-positive gastrointestinal pathogens, commensal bacteria and bovine mastitis causative environmental pathogens, and subsequently on the topic of possible interactions of selected hydrolyzed vegetable oils rich in MCFA after the above testing of their antibacterial properties with oxacillin against *Staphylococcus aureus*. Studies published in this work have shown *in vitro* by microdilution in broth that vegetable oils (babassu, *Cuphea*, coconut, murumuru, palm kernel and tucuma oil) cleaved by porcine pancreatic lipase suppress the growth of enteropathogens (*Clostridium perfringens*, *Enterococcus cecorum*, *Listeria monocytogenes* and *S. aureus*) at minimum inhibitory concentration (MIC) values ranging from 140 µg/mL to 4500 µg/mL depending on the bacterial species and strain tested. In addition, a positive fact was found that cleaved vegetable oils rich in MCFA do not have an effect (MIC <4500 µg/mL) on the growth of commensal, beneficial bacteria of the digestive tract (*Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp.). Subsequently, selected palm oils rich in MCFA (coconut, palm kernel and tucuma oil) hydrolyzed by lipase from *Mucor javanicus* were shown to be antibacterial agents capable of inhibiting the growth of *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Str. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* and *Str. uberis* at MICs corresponding to 2048–8192 µg/mL, 64–1024 µg/mL, 1024–2048 µg/mL, and 128–2048 µg/mL for each bacterial species. Furthermore, using a checkerboard microdilution method in broth *in vitro*, it was found that three selected palm oils rich in MCFA (coconut, pean kernel and tucuma oil cleaved by porcine pancreatic lipase) in combination with oxacillin show antagonistic interactions against standard strains and clinical isolates of *S. aureus* at concentrations  $\geq 1024$  µg/mL. Gas chromatography with an ionization flame detector revealed that the major fatty acid in tested oils was lauric acid, which subsequently also showed antagonistic combinatory effect with oxacillin at the same concentrations as the cleaved oils, meaning

$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ . Based on the growth curves of *S. aureus* strains at different concentrations of tested substances, it can be assumed that the mechanism of antagonistic action between MCFA-rich vegetable oils after their hydrolysis and oxacillin is in the termination of the division of *S. aureus* bacteria, thereby interrupting the production of oxacillin-target spots (penicillin-binding proteins in the bacterial cell wall), and the substances thus adversely affect themselves.

It can be assumed that high doses of vegetable (palm) oils rich in MCFA may when co-administrated, adversely affect the treatment of staphylococcal infections with  $\beta$ -lactam antibiotics, confirming the hypothesis that selected natural antibacterial substances (cleaved vegetable oils rich in MCFA) in combination with antibiotics ( $\beta$ -lactams or oxacillin) show modulated activity based on the action of substance interactions, which will be manifested by a possible change in the antibacterial effect (antagonism).

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literární přehled.....</b>	<b>2</b>
2.1	Vybraní původci bakteriálních zoonóz a alimentárních onemocnění.....	2
2.1.1	<i>Clostridium perfringens</i> .....	2
2.1.1.1	Charakteristika.....	2
2.1.1.2	Patogenita.....	3
2.1.1.3	Epidemiologická situace.....	5
2.1.1.4	Možnosti léčby a prevence.....	6
2.1.2	<i>Enterococcus</i> spp. ....	7
2.1.2.1	Charakteristika.....	7
2.1.2.2	Patogenita.....	8
2.1.2.3	Epidemiologická situace.....	11
2.1.2.4	Možnosti léčby a prevence.....	12
2.1.3	<i>Listeria</i> spp. ....	13
2.1.3.1	Charakteristika.....	13
2.1.3.2	Patogenita.....	14
2.1.3.3	Epidemiologická situace.....	15
2.1.3.4	Možnosti léčby a prevence.....	16
2.1.4	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
2.1.4.1	Charakteristika.....	17
2.1.4.2	Patogenita.....	18
2.1.4.3	Epidemiologická situace.....	19
2.1.4.4	Možnosti léčby a prevence.....	22
2.1.5	<i>Streptococcus</i> spp. ....	24
2.1.5.1	Charakteristika.....	24
2.1.5.2	Patogenita.....	25
2.1.5.3	Epidemiologická situace.....	26
2.1.5.4	Možnosti léčby a prevence.....	27
2.2	Významné druhy komenzálních bakterií GIT.....	28
2.2.1	<i>Bifidobacterium</i> spp. ....	29



2.2.1.1	Charakteristika.....	29
2.2.1.2	Ekologie.....	30
2.2.1.3	Probiotické vlastnosti a jejich využití v praxi .....	31
2.2.2	<i>Lactobacillus</i> spp. ....	32
2.2.2.1	Charakteristika.....	32
2.2.2.2	Ekologie.....	34
2.2.2.3	Probiotické vlastnosti a jejich využití v praxi .....	35
2.3	Antibakteriální látky .....	36
2.3.1	Antibiotika .....	36
2.3.1.1	Antibiotická bakteriální rezistence .....	40
2.4	Alternativní antibakteriální látky .....	43
2.4.1	Rostlinné oleje s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce .....	44
2.4.1.1	Charakteristika.....	44
2.4.1.2	Mechanismus antibakteriálního účinku .....	45
2.4.1.3	Metabolismus .....	46
2.4.1.4	Zdravotní aspekty příjmu .....	48
2.4.1.5	Efekt na kvalitu živočišných produktů .....	49
2.5	Interakce látek.....	51
2.5.1	Typy interakcí.....	51
2.5.1.1	Klasifikace <i>in vitro</i> detekovaných interakcí mezi látkami šachovnicovou metodou.....	52
2.5.2	Terapeuticky významné lékové interakce .....	52
<b>3</b>	<b>Hypotéza práce.....</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>Antibiotic Resistance in Livestock Breeding: A Review .....</b>	<b>58</b>
5.1	Abstract.....	58
5.2	Literature review .....	59
5.3	Conclusion .....	66
5.4	References.....	66
<b>6</b>	<b>Determination of <i>in vitro</i> antibacterial activity of plant oils containing medium-chain fatty acids against Gram-positive pathogenic and gut commensal bacteria.....</b>	<b>72</b>

6.1	Abstract.....	72
6.2	Introduction.....	73
6.3	Material and methods.....	74
6.3.1	Bacterial strains and culture conditions .....	74
6.3.2	Plant oils .....	76
6.3.3	Determination of fatty acid composition of oils .....	76
6.3.4	Preparation of plant oils for microdilution tests .....	76
6.3.5	Determination of in vitro antibacterial activity of plant oils .....	77
6.4	Results.....	77
6.4.1	Fatty acid composition of plant oils.....	77
6.4.2	<i>In vitro</i> antibacterial activity of plant oils.....	78
6.5	Discussion.....	81
6.6	Conclusion .....	83
6.7	References.....	84
<b>7</b>	<b><i>In vitro</i> antimicrobial effect of palm oils rich in medium-chain fatty acids on mastitis-causing Gram-positive bacteria .....</b>	<b>87</b>
7.1	Abstract.....	87
7.2	Introduction.....	88
7.3	Materials and methods .....	89
7.3.1	Chemicals.....	89
7.3.2	Bacterial cultures and their maintenance .....	90
7.3.3	Determination of the minimum inhibitory concentrations .....	90
7.4	Results.....	92
7.5	Discussion.....	93
7.6	Conclusions.....	95
7.7	References.....	95
<b>8</b>	<b><i>In vitro</i> Antagonistic Inhibitory Effects of Palm Seed Crude Oils and their Main Constituent, Lauric Acid, with Oxacillin in <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>99</b>
8.1	Abstract.....	99
8.2	Introduction.....	100
8.3	Results.....	103

8.3.1	Fatty acid composition of crude oils.....	103
8.3.2	Antistaphylococcal antagonistic effect of crude oils and oxacillin .....	105
8.3.3	Antagonistic growth-inhibitory effect of lauric acid with oxacillin against <i>S. aureus</i> .....	106
8.4	Material and Methods .....	111
8.4.1	Chemicals and samples preparation.....	111
8.4.2	Bacterial strains and media .....	111
8.4.3	Determination of fatty acid composition .....	112
8.4.4	Evaluation of minimum inhibitory concentrations and antagonistic combinatory effect.....	112
8.4.5	Growth rates determination .....	113
8.5	Discussion.....	114
8.6	References.....	119
<b>9</b>	<b>Souhrnná diskuze.....</b>	<b>128</b>
<b>10</b>	<b>Doporučení pro další výzkum.....</b>	<b>138</b>
<b>11</b>	<b>Doporučení pro praxi .....</b>	<b>139</b>
<b>12</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>140</b>
<b>13</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>142</b>
<b>14</b>	<b>Přílohy - články a abstrakty publikované mimo rozsah disertace.....</b>	<b>A</b>

## Seznam obrázků a tabulek

### Seznam obrázků

**Figure 5.1:** Formation and transmission of antimicrobial resistance in microorganisms .....63

**Figure 8.1:** Growth curves of *Staphylococcus aureus* strains upon different concentrations of hydrolyzed palm oils or lauric acid determined spectrophotometrically .....110

### Seznam tabulek

**Tabulka 2.1:** *Clostridium perfringens* typizační schéma založené na produkci toxinů .....4

**Tabulka 2.2:** Přehled virulenčních faktorů a jejich biologických účinků u enterokoků .....9

**Tabulka 2.3:** Antimikrobiální rezistence enterokoků .....10

**Tabulka 2.4:** Podíl MRSA izolátů v 52 zemích OECD.....21

**Tabulka 2.5:** Seznam patogenů prioritních pro výzkum a vývoj nových antibiotik dle WHO .....41

**Table 5.1:** Types of antimicrobials use in food animals .....60

**Table 5.2:** Restrictions on the use of antibiotics in livestock in OECD countries.....65

**Table 6.1:** Growth media and conditions .....75

**Table 6.2:** Bacterial strains used in this study.....75

**Table 6.3:** Fatty acid profile of selected oils.....79

**Table 6.4:** Minimum inhibitory concentrations of selected plant oils .....80

**Table 7.1:** Bacterial strains and their specification .....91

**Table 7.2:** Minimum inhibitory concentrations of tested palm oils.....93

**Table 8.1:** Fatty acid profile of crude palm seed oils.....104

**Table 8.2:** Combinatory effect of crude palm seed oils and oxacillin against *Staphylococcus aureus* determined by checkerboard method .....107

**Table 8.3:** Combinatory effect of lauric acid and oxacillin against *Staphylococcus aureus* determined by checkerboard method .....109

## Seznam zkratek

ADP	-	adenosindifosfát
AGP(s)	-	antibiotický stimulátor růstu
ATCC	-	Sbírka amerických typových kultur
CCM	-	Česká sbírka mikroorganismů
CDC	-	Centra pro kontrolu a prevenci nemocí v USA
CFU	-	kolonie tvořící jednotka
CIP	-	Sbírka Pasteurova Institutu
CLSI	-	Institut pro klinické a laboratorní normy
CNCTC	-	Česká národní sbírka typových kultur
Coa	-	koaguláza
CPE	-	<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin
DMSO	-	dimethylsulfoxid
DSM	-	Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur
EARS-Net	-	Síť národních systémů surveillance antibiotické rezistence
ECDC	-	Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí
EFSA	-	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
EMA	-	Evropská agentura pro léčivé přípravky
EU/EHP	-	Evropská unie/Evropský hospodářský prostor
FA(s)	-	mastná kyselina
FDA	-	Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FIC/FICI	-	frakční inhibiční koncentrace/index frakční inhibiční koncentrace

GC	-	plynová chromatografie
GIT	-	gastrointestinální trakt
LA	-	kyselina laurová
MCFA(s)	-	mastné kyseliny se střední délkou uhlíkového řetězce
MIC	-	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	-	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	-	methicilin-senzitivní <i>Staphylococcus aureus</i>
MUFA	-	mononenasyčené mastné kyseliny
MZ	-	Ministerstvo zdravotnictví
OECD	-	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PBP	-	penicilin-vázající protein
PUFA	-	polynenasycené mastné kyseliny
ROS/RNS	-	reaktivní formy kyslíku/dusíku
SFA	-	nasyčené mastné kyseliny
TMP/SMX	-	trimethoprim/sulfamethoxazol
UN	-	Spojené národy
VISA	-	vankomycin-intermediate-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
VR	-	vankomycin-rezistentní
VRE	-	vankomycin-rezistentní enterokok
VRSA	-	vankomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
WHO	-	Světová zdravotnická organizace

# 1 Úvod

Celosvětově byly patogenní organismy primární příčinou úmrtí značné části lidské i zvířecí populace a objev antibiotik v polovině dvacátého století znamenal významný mezník, který přinesl lidstvu možnost, jak s tímto problémem účinně bojovat. Antibakteriální látky jsou užívány za účelem léčby a v určitých státech stále i jako prevence bakteriálních onemocnění. Mezi nejvýznamnější skupiny antibiotik jsou v současnosti řazeny např.  $\beta$ -laktamy, sulfonamidy, polypeptidy, aminoglykosidy, tetracykliny a makrolidy. Od chvíle, kdy začala být antibiotika masově používána v klinické praxi, však došlo k výraznému posunu v nakládání s těmito látkami především s ohledem na uvážlivější dávkování. Důvodem ke změně v přístupu užívání antibiotik je stále se rozvíjející schopnost bakterií účinně překonávat účinky antibiotik – tzv. bakteriální antibiotická rezistence. Běžně se u nich lze setkat s tendencí akumulace rozdílných mechanismů rezistence vlivem antibiotického tlaku indukovaného právě nadměrným užíváním antibiotik v populaci a na základě přirozené selekce bakterií, mezi které patří např. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, či *Streptococcus pneumoniae*. Vzhledem k této skutečnosti dochází po celém světě k opatřením směřujícím k omezení šíření bakteriální antibiotické rezistence a jejímu předcházení, mezi která se řadí doporučení Světové zdravotnické organizace o omezení užívání antibiotik v případech, kdy existují jiné metody léčby, zákaz užívání antibiotických stimulátorů růstu v živočišné produkci v rámci zemí Evropského společenství, a také hledání alternativních zdrojů antibakteriálních látek pro užití jak v humánní, tak veterinární medicíně. Ověřenými alternativami jsou například terapie aktivovanými fágy, či pasivní imunizace osob. V živočišné produkci se užívá antibakteriálních vlastností tzv. neantibiotických stimulátorů růstu, jakými jsou bakteriociny, bakteriofágy, enzymatické preparáty, jílovité částice, organické kyseliny, prebiotika, probiotika a synbiotika, či rostlinné extrakty. Využívání antibakteriálních účinků některých alternativních látek jako je oxid zinečnatý musí být v současnosti regulováno z důvodu negativního dopadu na životní prostředí, čímž je potenciální využití antibakteriálních vlastností těchto látek limitováno. Zároveň i k alternativám antibiotickým látkách se postupem času objevuje bakteriální rezistence a jejich omezením bývá často také jejich nedostatečná aktivita. Možností, jak snížit dopad užívání některých antibiotik, či alternativních antibakteriálních látek na okolí, či v kontextu bakteriální antibiotické rezistence spočívá v kombinaci několika látek v nižším množství, než by bylo dávkování jedné samostatně, za účelem dosažení požadovaného účinku a využití takzvaných interakcí látek mezi sebou.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Vybraní původci bakteriálních zoonóz a alimentárních onemocnění

Zoonotická onemocnění jsou infekce, které mohou být přenášeny mezi zvířaty a lidmi s využitím různých vektorů, ale i bez nich, přičemž na světě existuje kolem 1 500 patogenů, o nichž je známo, že mohou způsobit infekce u člověka, z nichž 61 % způsobuje zoonotická onemocnění (Taylor et al. 2001). Cantas a Suer (2014) ve své práci řadí mezi možnosti, jak může být bakteriální zoonotické onemocnění přeneseno ze zvířat na člověka (a) kousnutí a poškrábání zvířaty; (b) vektory, často členovce, jako jsou komáři, klíšťata, blechy a vši, kteří mohou aktivně nebo pasivně přenášet bakteriální zoonotické choroby na člověka; (c) nákazu veterinárních lékařů a pracovníků v živočišné produkci, kteří se zároveň mohou stát přenašeči bakteriálního onemocnění v rámci komunity; (d) hnojem kontaminované půdy a vody, jež představují rezervoár zoonitických bakterií; a (e) přímou fekálně-orální cestu, tj. přenos kontaminovanými živočišnými produkty.

Pro některé mikroorganismy mohou potraviny sloužit také jako zdroj živin, které metabolizují a využívají pro růst a tvorbu vedlejších produktů, které činí potraviny nepoživatelnými, nebo mohou po konzumaci způsobovat zdravotní problémy. Předpokládá se, že alimentární onemocnění jsou v 66 % případů způsobeny bakteriemi (Addis & Sisay 2015). Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation, WHO) (2015) odhaduje, že celosvětově se ročně vyskytne kolem 600 milionů případů alimentárních onemocnění (30 % u dětí mladších pěti let), na něž 420 000 lidí zemře.

#### 2.1.1 *Clostridium perfringens*

##### 2.1.1.1 Charakteristika

*Clostridium perfringens* je bakteriální druh řazený do rodu *Clostridium*, který představují grampozitivní tyčinky produkující velmi odolné, oválné či sférické endospory (Rainey et al. 2009). Tato bakterie byla poprvé izolována a identifikována jako nová bakterie v roce 1891 Williamem H. Welchem z těla, v jehož infikovaných krevních cévách byly pozorovány bublinky plynu (Welch 1892), přičemž její schopnost (původní pojmenování *Bacillus aerogenes capsulatus*, latinsky *aerogenes* doslova znamená „produkovat vzduch“) produkovat plyny byla později spojena s příznaky plynové gangrény, vyskytující se u



britských a francouzských vojáků během první světové války (Kiu & Hall 2018). *C. perfringens* je všudypřítomnou bakterií distribuovanou v různých prostředích včetně půdy, odpadních vod a potravy (Uzal et al. 2014). Dále lze bakterie *C. perfringens* nalézt např. ve výkalech a jako součást mikrobioty zvířat i člověka, kterého kolonizuje, jak bylo dokázáno sekvenací přes pět tisíc let starého gastrointestinálního traktu (GIT) mumie Ötziho, již od nepaměti (Lugli et al. 2017).

Uvádí se, že *C. perfringens* je striktní anaerob, avšak bylo zjištěno, že může existovat také v kyslíkové atmosféře, anebo při nízkých koncentracích superoxidu či sloučenin generujících hydroxylové radikály (Briolat & Reysset 2002). Jako aerotolerantní anaerob může tedy *C. perfringens* potenciálně přežívat v aerobním prostředí, které může usnadnit přenos bakterií mezi hostiteli, kontaminovat různé povrchy, či vyvolat onemocnění v aerofilním prostředí (Kiu & Hall 2018). V současnosti představuje *C. perfringens* ze známých organismů jeden z nejrychleji se množících: Li & McClane (2006) pozorovali generační interval klostridie v optimálním prostředí, který při 43 °C činil 8–12 minut a při 37 °C 12–17 minut.

*C. perfringens* tvoří spóry, které jí umožňují přežít v extrémních podmínkách nebo v prostředích s nedostatkem živin. Sporulace hraje zásadní roli při přenosu této bakterie z různých prostředí na hostitele (Li et al. 2016). Bylo prokázáno, že některé spory *C. perfringens* (zejména kmenů spojených s otravou jídlem) odolávají extrémním teplotním podmínkám, což může přispět k přežití *C. perfringens* a následné patologii onemocnění (Li & McClane 2008; Orsburn et al. 2008). Účinnost sporulace *C. perfringens*, která je iniciována transkripčním faktorem Spo0A (kódovaný *spo0A*) (Myers et al. 2006), zajišťuje transkripční regulátor CcpA (kódovaný *ccpA*) (Varga et al. 2004). Regulace tohoto procesu je zajišťována faktory Sigma, včetně SigF, SigE, SigG a SigK (geny *sigF*, *sigE*, *sigG* a *sigK*) (Harry et al. 2009; Li & McClane 2010), a Agr-podobným quorum-sensing systémem, který je u kmenů způsobujících otravy z jídla potenciálně podporován genem *codY* (Li et al. 2011; Li et al. 2017). Je také známo, že *C. perfringens* během sporulace produkuje enterotoxiny, což koreluje s patogenezí průjmů spojených s otravami z jídla (Silva et al. 2015; Li et al. 2016).

### **2.1.1.2 Patogenita**

Kiu a Hall (2018) řadí mezi virulenční faktory *C. perfringens* komplement extracelulárních toxinů a hydrolytických enzymů (> 20), schopnost přežívat v aerobním prostředí, produkci toxických plynů a rychlý růst. Tyto vlastnosti jí dávají schopnost způsobovat různé

histotoxické infekce člověka, gastroenteritidy u dospělých jedinců, nekrotické enteritidy u zvířat i předčasně narozených dětí (McClane et al. 2006).

*C. perfringens* byla historicky klasifikována do pěti toxigenních typů v závislosti na její schopnosti produkovat čtyři hlavní exotoxiny, jmenovitě alpha- ( $\alpha$ ), beta- ( $\beta$ ), epsilon- ( $\epsilon$ ) a ióta-toxin ( $\iota$ ), kódované geny *cpa*, *cpb*, *etx* a *iap/ibp* (Li et al. 2013; Chukwu et al. 2017). Na základě nedávno zavedeného typizačního systému na bázi toxinů je však *C. perfringens* nyní překlasifikována do sedmi toxinotypů (A-G), viz Tabulka 2.1 (Rood et al. 2018).

**Tabulka 2.1:** *Clostridium perfringens* typizační schéma založené na produkci toxinů (převzato z Rood et al. 2018)

Toxinotyp	$\alpha$ -toxin	$\beta$ -toxin	$\epsilon$ -toxin	$\iota$ -toxin	CPE	NetB
<b>A</b>	+	-	-	-	-	-
<b>B</b>	+	+	+	-	-	-
<b>C</b>	+	+	-	-	+/-	-
<b>D</b>	+	-	+	-	+/-	-
<b>E</b>	+	-	-	+	+/-	-
<b>F</b>	+	-	-	-	+	-
<b>G</b>	+	-	-	-	-	+

(+) = toxinotyp produkuje toxin; (-) = toxinotyp neprodukuje toxin; (+/-) = toxinotyp ne vždy produkuje toxin

Některé kmeny také produkují enterotoxin *C. perfringens* (CPE), protein odpovědný za průjemy a většinu případů otrav z potravin způsobených touto bakterií (Kokai-Kun et al. 1994; Freedman et al. 2016). Gen *cpe* se nachází buď na chromozomu, nebo na velkých konjugativních plasmidech, a nejčastěji se s ním lze setkat u toxinotypu F, který je spojován s otravami z potravin a s antibiotiky-asociovanými průjemy (Rood et al. 2018; Freedman et al. 2016). CPE pozitivní kmeny toxinotypů C, D a E jsou neobvyklé, a doposud nebyla potvrzena produkce CPE ani kmeny toxinotypu A, B a G (Rood et al. 2018). Všechny toxinotypy *C. perfringens* mohou navíc také produkovat doplňkový toxin známý jako  $\beta$ 2-toxin kódovaný genem *cpb211* (Vilei et al. 2005).  $\beta$ 2-toxin je cytolyzin vytvářející póry, čímž se podílí na enterických onemocněních souvisejících s *C. perfringens* (Fisher et al. 2006; Li et al. 2007; Uzal et al. 2010). Navíc produkují některé kmeny *C. perfringens* také plasmidově kódovaný toxin nazývaný NetB, který je hlavní příčinou nekrotické enteritidy drůbeže (Fisher et al. 2005). Exprese proteinů asociovaných s virulencí, zejména produkce různých toxinů kmenů *C. perfringens*, jsou přísně regulovány specifickými systémy pro regulaci genů, včetně

dvousložkového systému přenosu signálu VirR/VirS a systému doplňkového regulátoru genů (*agr*) (Ohtani & Shimizu 2016; Yu et al. 2017).

### 2.1.1.3 Epidemiologická situace

*C. perfringens* je hlavní příčinou traumatické plynové gangrény (McClane & Rood 2001) a onemocnění přenášených potravinami, a je druhou nejčastější bakteriální příčinou otrav potravinami v USA (Scharff 2012; Grass et al. 2013; Marlow et al. 2017). Kromě toho je tato bakterie zodpovědná za přibližně 5–15 % všech případů průjmů souvisejících s antibiotiky (Carman 1997), které se vyskytují u 5–40 % všech pacientů léčených antibiotiky (McFarland 2007). Způsobuje také často smrtelné onemocnění člověka nazývané klostridiální nekrotická enteritida (Gui et al. 2002). Jako zvířecí patogen je *C. perfringens* zodpovědná za několik závažných onemocnění, včetně ptačí nekrotické enteritidy, na jejíž léčbu se v minulosti celosvětově v zemědělství vydávaly až 2 miliardy USD ročně (Keyburn et al. 2010). Kromě toho se v živočišné produkci praktikuje rozsáhlá vakcinace sloužící k ochraně hospodářských zvířat před enteritidou a enterotoxemiemi vyvolanými toxiny *C. perfringens*, které jsou absorbovány do oběhu a poté ovlivňují další orgány, jako je mozek (Uzal et al. 2010). Marlow et al. (2017) pozorovali výskyt otravy z jídla v důsledku kontaminace *C. perfringens* v nápravných zařízeních v USA a odhalili, že tato bakterie byla za otravu zodpovědná ve 28 % (36 ze 128 případů). Kiu a Hall (2018) odhadují, že se ročně v členských státech Evropské unie vyskytne přibližně 5 milionů případů otravy z potravin souvisejících s *C. perfringens*. V souhrnné zprávě Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority, EFSA) a Evropského střediska pro prevenci a kontrolu nemocí (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) o zoonózách v Evropské unii v průběhu roku 2018 se však uvádí, že otrava z jídla kontaminovaného toxiny *C. perfringens*, byla prokázána ve čtrnácti členských státech u 1 783 obyvatel ze 71 ohnisek. Zpráva dále konstatuje, že z celkového počtu nakažených bylo pouze 18 hospitalizováno a 2 zemřeli (míra úmrtnosti 0,1 %) (EFSA & ECDC 2019a). Kiu a Hall (2018) předpokládají, že počty hlášených případů spojených s otravou z potravin kontaminovaných *C. perfringens* jsou značně podhodnoceny vzhledem k spontánně mizejícím příznakům, takže statistiky zveřejněné na základě laboratorně potvrzených případů mohou být nižší než skutečné počty, což naznačuje vyšší skutečný epidemiologický dopad.

#### 2.1.1.4 Možnosti léčby a prevence

Protože většina akutních průjmových onemocnění souvisejících s *C. perfringens* odeznívá sama, je k udržení euvolemického stavu zapotřebí pouze podpůrná péče a antibiotika obecně nebývají indikována (Yao & Annamaraju 2020). Výjimkou jsou závažné, s CPE-asociované průjmy, v případě kterých Borriello a Williams (1985) navrhuje léčbu metranidazolem. Dalším případem, kdy je použití antibiotik na místě je klostridiální seps, která se často projevuje septickým šokem s možnou intravaskulární hemolýzou v důsledku destrukce červených krvinek zprostředkované  $\alpha$ -toxinem, přičemž letálním následkům onemocnění lze předcházet právě včasnou antibiotickou léčbou penicilinem G a klindamycinem, tetracyklinem nebo metronidazolem v kombinaci s chirurgickým odstraněním nekrotické tkáně (Bätge et al. 1992; Van Bunderen et al. 2010). Yang et al. (2013) konstatují, že vzhledem k vysoké míře úmrtnosti na bakteriemii způsobenou *C. perfringens* (37–44 %), je zapotřebí včas aplikovat vhodnou antibiotickou léčbu, kterou však dle Kiu a Hall (2018) může výrazně zkomplikovat bakteriální antibiotická rezistence *C. perfringens*.

Silva et al. (2015) konstatují, že pokud dojde v chovu prasat i přes vakcinaci k šíření s CPE-asociovaných průjmů selat, přidávají se do krmiv antibiotika jako je bacitracin, linkomycin, sulfatrimethoprim a tylosin, či se injekčně aplikuje penicilin.

Pestrá paleta genů rezistence k antibiotikům činí z bakterie *C. perfringens* klinicky velmi významného patogena, jelikož se u ní lze setkat s multirezistencí k antibiotikům, jakými jsou tetracykliny (Lyras & Rood 1996), makrolidy, linkosaminy (Slavić et al. 2011; Ngamwongsatit et al. 2016), rifampicin (Li et al. 2017) a aminoglykosidy (Udhayavel et al. 2017).

Allaart et al. (2013) navrhuje možné přístupy prevence indukce *C. perfringens* asociované enteridity, mezi které řadí (i) probiotické kmeny bakterií schopné omezit růst, kolonizaci a produkci toxinů *C. perfringens* ve střevním traktu, a tím i snížit výskyt onemocnění spojených s tímto bakteriálním druhem; (ii) prebiotické substráty fermentovatelné bifidobakteriemi a laktobacily, kteří mimo jiné potlačují růst patogenů; (iii) rostlinné extrakty a fytochemikálie s antimikrobiálním spektrem účinku vůči grampozitivním sporulujícím bakteriím včetně *C. perfringens*, jako je např. řebříček obecný (*Achillea millefolium*), myrtovník citrónový (*Backhousia citriodora*), tymol, či cinnamaldehyd; (iii) organické kyseliny včetně kyselin se střední délkou uhlíkatého řetězce; (iv) bakteriofágy, lysozomy a antimikrobiální peptidy.

## 2.1.2 *Enterococcus* spp.

### 2.1.2.1 Charakteristika

Rod *Enterococcus*, náležící do čeledi *Enterobacteriaceae*, v sobě ukrývá grampozitivní, nesporotvorné, většinou pohyblivé, vejčité, jednotlivě, v párech, či krátkých řetězcích se vyskytující bakteriální buňky (Schleifer & Kilpper-Bälz 1984). Enterokoky jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní, heterofermentativní bakterie, které ve většině případů z glukózy produkují kyseliny mléčnou, a proto jsou řazeny mezi bakterie mléčného kvašení (Švec & Devriese 2009).

Termín „entérocoque“ poprvé vytvořil Thiercelin v roce 1899, když popsal střevní bakterie se schopností stát se patogenními (Thiercelin 1899). Vzhledem k morfologickým a některým biochemickým podobnostem byly enterokoky považovány za zástupce rodu *Streptococcus* (Frobisher & Denny 1928) a jako řádně uznávaný rod oddělený od streptokoků se objevily až v edičním dodatku k vydání publikace Bergey's Manual of Systematic Bacteriology v roce 1986 (Mundt 1986). Identifikace enterokoků na druhové úrovni má klinický význam z důvodu analýzy rezistenčních profilů různých patogenních enterokoků na antibiotika (García-Solache & Rice 2019). V tuto chvíli má dle Seznamu prokaryotických jmen se stálým názvoslovím rod *Enterococcus* 60 popsaných druhů s platnými publikacemi (Parte 2018).

Enterokoky lze snadno izolovat z širokého spektra hostitelů, včetně bezobratlých, hmyzu a savců, což zdůrazňuje umění enterokoků přežít v prostředí střev, kde jsou schopni odolávat rozmanitým mechanismům vrozené obrany hostitele (Van Tyne & Gilmore 2014). Enterokoky jsou jedněmi z prvních kolonizátorů střeva kojenců a ve výsledku jsou klíčovými členy lidského střevního mikrobiomu (Eggesbø et al. 2011; Lawley & Walker 2013). Jsou také běžnými zástupci komenzální mikrobioty domestikovaných a divokých zvířat, u kterých však také mohou způsobovat infekce (Martin & Mundt 1972; Chadfield et al. 2005). Vzhledem k jejich rozšířenému výskytu u člověka a různých druhů zvířat, kolonizují enterokoky snadno okolí obývané těmito hostiteli, jako jsou rostliny, půda a voda (Byappanahalli et al. 2012). Předpokládá se, že enterokoky pak v takovém prostředí přetrvávají, ale masivně se nerozmnožují (Fiore et al. 2019). Vzhledem k toleranci vůči solím a kyselinám jsou kmeny *Enterococcus* spp. vysoce specializované pro několik potravinových systémů, a mají tak podíl na fermentační aktivitě tradičně vyráběných sýrů a suchých uzenin, a předpokládá se, že přispívají k rozvoji organoleptických vlastností těchto produktů

(Foulquié Moreno et al. 2006). Kromě toho bylo popsáno několik kmenů enterokoků, které produkují antimikrobiální sloučeniny včetně bakteriocinů, které jsou využívány při konzervaci široké škály potravinářských produktů (Yang et al. 2014a), a které jsou považovány za slibnou alternativu v boji proti antimikrobiální rezistenci (Cotter et al. 2013; Hammami et al. 2013).

Enterokoky jsou, jak bylo zmíněno výše, považovány za komenzální mikroorganismy lidského GIT, mohou však být také patogenní, a způsobovat infekce, ve většině případů spojených s nemocničním prostředím (García-Solache & Rice 2019). Raza et al. (2018) uvádí, že hlavními faktory přispívajícími k tomu, že se enterokoky stávají významnými patogeny, je především jejich všudypřítomná distribuce a selekční tlaky způsobené masivním používáním širokospektrálních antibiotik. Patogenním enterokokem, který byl původně považován pouze za komenzální bakterii je např. *E. cecorum*, který byl poprvé izolován ze střev drůbeže, ale vyskytuje se u množství jiných živočišných druhů, včetně člověka, u kterého může také vyvolávat infekční onemocnění (Delaunay et al. 2015; Dolka et al. 2017).

Mezi onemocnění způsobené patogenními kmeny rodu *Enterococcus* jsou obvykle řazeny infekce močových cest (Swaminathan & Alangaden 2010), bakteremie (Noskin et al. 1995), endokarditida (Slipczuk et al. 2013), infekce popálenin (Jones et al. 1986) a ran v místě chirurgického zákroku (Pochhammer et al. 2017), infekce břicha a žlučových cest (Lewis & Zervos 1990) a infekce katetrů a dalších implantovaných lékařských zařízení (Sandoe et al. 2003). Uvádí se, že enterokoky jsou po streptokokích, *Staphylococcus aureus* a *S. viridans* třetí nejčastější příčinou nativní endokarditidy chlopní (Slipczuk et al. 2013). Enterokoky také byly třetím nejčastějším nozokomiálním patogenem a způsobily 14 % nemocničních infekcí v USA mezi lety 2011 a 2014 (Weiner et al. 2016).

### **2.1.2.2 Patogenita**

Aby enterokoky způsobily onemocnění, musí zdolat řadu překážek, mezi něž lze zařadit překonání kolonizační rezistence konkurenční mikrobioty a obranných mechanismů hostitele (žaludeční kyselina a žluč), a schopnost kolonizovat střevní trakt, odkud se bakterie mohou množit a šířit na místa náchylná k infekci (Fiore et al. 2019). K té tedy dochází, pokud enterokoky přemohou obranu hostitele, replikují se s dostatečnou rychlostí a intenzitou, a pokud dojde k patologickým změnám zapříčiněným přímou toxinovou aktivitou nebo nepřímo poškozením tkání zánětlivou odpovědí (Johnson 1994).

U člověka jsou nejčastějšími patogenními enterokoky s infekčním potenciálem *E. faecium* a *E. faecalis* (Zhou et al. 2020). Během posledních dvou dekad se *E. faecium* celosvětově rychle rozšířil jako nozokomiální patogen díky úspěšnému přizpůsobení se podmínkám prostředí a získání odolnosti vůči léčbě glykopeptidy (Bonten et al. 2001; Top et al. 2008).

Enterokoky mají virulenční faktory především ve formě agregačních látek, enterokokového povrchového proteinu, cytolysinu, gelatinázy, genů rezistence na antibiotika (Sava et al. 2010) a schopnosti produkce superoxidů (Wang & Huycke 2007) – viz Tabulka 2.2. Mnoho z genů pro faktory enterokokové virulence se nalézá na konjugativních plazmidech nebo je kódováno v transpozonech, takže mohou být snadno přenosné (Palmer et al. 2010). Enterokoky mají schopnost výměny genetických determinant nejen mezi sebou, ale také s bakteriemi jiného rodu (Sung & Lindsay 2007). Pro přežití v hustě osídlené nice, jakou jsou střeva teplokrevných savců, produkují enterokoky bakteriociny, kódované mobilními elementy (Brock et al. 1963).

**Tabulka 2.2:** Přehled virulenčních faktorů a jejich biologických účinků u enterokoků (převzato z Vu & Carvalho 2011)

virulenční faktor	biologický účinek
agregační látky (povrchové adheziny)	usnadňuje vazbu k hostitelským buňkám umožňuje mezibuněčný kontakt při konjugaci
enterokokový povrchový protein	umožňuje přilnavost k povrchům; podílí se na tvorbě biofilmu
cytolysin	inhibice růstu grampozitivních bakterií lýza makrofágů a neutrofilů
gelatináza	hydrolýza želatiny, kolagenu, kaseinu a hemoglobinu
extracelulární superoxid	neznámý; možný podíl na lýze erytrocytů
antibiotická rezistence	rezistence např. k aminoglykosidům, $\beta$ -laktamům a vankomycinu

Komplikaci při léčbě infekcí způsobených enterokoky představuje jejich omezená citlivost vůči antibiotikům indukovaná rezistenčními geny (viz Tabulka 2.3), které jsou enterokokům vlastní, či geny získanými. Uvádí se, že enterokoky mají primární rezistenci vůči cefalosporinům, aminoglykosidům, linkosamidům a streptograminům (Hollenbeck & Rice 2012). U pacientů léčených antibiotiky se enterokoky akumulují ve vysokém počtu (Taur et al. 2012) a koexistují a spolupracují s jinými mikroby rezistentními na antibiotika, což jim dává možnost získat nové rezistenční mechanismy kódované mobilními prvky (Fiore et al. 2019). Přehled antibiotik, pro něž byla u enterokoků zjištěna snížená citlivost je uveden v Tabulce 2.3. Nejvýznamnější hrozbu, která je v rámci odolnosti enterokoků vůči antibiotikům sledována, představují vankomycin-rezistentní (VR) *E. faecalis* a *E. faecium* (Ahmed & Baptiste 2018). Raza et al. (2018) uvádí, že VR enterokoky jsou přítomné v podstatě u všech pacientů, u nichž se po chirurgickém zákroku, či během gastrointestinálního onemocnění vyvine bakterémie, a že tato okolnost je spojena s vysokou mírou úmrtnosti.

**Tabulka 2.3:** Antimikrobiální rezistence enterokoků (převzato z García-Solache & Rice 2019)

Antimikrobiální třída (látka)	Reprezentativní gen rezistence/operon	Rezistenční mechanismus
aminoglykosidy (gentamicin, kanamycin)	<i>aac-2'-aph-2''-Ie, aph-3'-IIIa</i>	modifikace aminoglykosidu
β-laktamy	<i>pbp4 (E. faecalis)</i> <i>pbp5 (E. faecium)</i>	snížená afinita k antibiotiku
chloramfenikol	<i>cat</i>	acetylace chloramfenikolu
klindamycin	<i>lsa(A)</i>	eflux antibiotika (pravděpodobně)
daptomycin	<i>liaFSR</i>	alterace membránového napětí a fluidity
erythromycin	<i>ermB</i>	ribozomální metylace



Pokračování Tabulky 2.3

fluorochinolony	<i>gyrA, parC</i>	modifikace oblasti determinující chinolonovou rezistenci
glykopeptidy	<i>vanA, vanB, vanD, vanM/vanC, vanE, vanG, vanL, vanN</i>	modifikace peptidoglykanového prekurzoru ukončeného D-laktátem/D-serinem
oxalidazony	geny Rrna <i>cfr</i>	mutace snižující afinitu metylace 23S rRNA
rifampin	<i>rpoB</i>	bodová mutace snižující afinitu
streptomycin	<i>ant-6</i>	modifikace streptomycinu
tetracykliny	<i>tet(L)</i> <i>tet(M)</i>	eflux antibiotika ribozomální ochrana
tigecyklin	<i>tet(L), tet(M)</i>	zvýšená exprese

### 2.1.2.3 Epidemiologická situace

Enterokoky (včetně *E. faecalis* a *E. faecium*) jsou celosvětově druhou nejčastěji izolovanou grampozitivní bakterií související s infekcemi, vyskytující se v přibližně 19,5 % případů (Huang et al. 2019). V minulosti byly enterokoky spojovány hlavně s infekcemi močových cest, ale v poslední době se stále větší počet enterokoků izoluje z jiných infekcí, především v nemocničních zařízeních (Uçkay et al. 2017).

Vankomycinová rezistence je považována za významnou hrozbu ve zdravotnictví, a proto je VR *E. faecium* veden na seznamu prioritních patogenů (priorita vysoká – stupeň 2 ze 3), pro které je nový vývoj a objev antibiotik nezbytný (WHO 2017). VR enterokoky jsou také monitorovány jak prostřednictvím ECDC v Evropské unii, tak Centry pro kontrolu a prevenci nemocí v USA (Centers for Disease Control and Prevention, CDC). V průběhu roku 2019 byl v Evropské unii/Evropském hospodářském prostoru (EU/EHP) zachycen výskyt 25 041 izolátů *E. faecalis*, z kterých u 13 368 (53 %) byla testována citlivost k vysokým dávkám gentamicinu odhalující 26,6% míru rezistence k tomuto antibiotiku (pokles z 31,9 % v roce

2015); a 16 632 izolátů *E. faecium*, z kterých u 16 432 (99 %) bylo provedeno testování citlivosti k vankomycinu, které prokázalo VR v 18,3 % případů (nárůst z 10,5 % v roce 2015). Distribuce VR *E. faecium* v EU/EHP nevykazuje žádný výrazný geografický vzorec a pouze 13 ze 30 zemí, kde byl VR *E. faecium* detekován, vykazuje míru výskytu pod 5 %. Nejvyšší výskyt VR *E. faecium* byla zaznamenána na Kypru ( $\geq 50$  %) (ECDC 2020a). CDC odhaduje, že v roce 2017 bylo hospitalizováno 54,5 tisíce pacientů s VR *E. faecium*, kvůli nemuž zemřelo 5 400 osob, a považuje tohoto patogena, vzhledem k vzrůstajícímu trendu počtu nakažených osob, za velmi významného (stupeň 2 ze 3) (CDC 2019). Shiadeh et al. (2019) na základě dat WHO a dostupných studií konstatují, že s nejvyšší mírou výskytu krevních izolátů VR *E. faecium* se lze setkat především v jihovýchodní Asii a ve východním Středomoří.

#### **2.1.2.4 Možnosti léčby a prevence**

Tradičně léčba enterokokových infekcí spočívá ve využití synergických účinků aminoglykosidu a antibiotika, ovlivňujícího buněčnou stěnu bakterií, jako je ampicilin nebo vankomycin (Vu & Carvalho 2011).

Pokud enterokoky nevykazují vysokou rezistenci vůči  $\beta$ -laktamům (ampicilin), aminoglykosidům (streptomycin) nebo glykopeptidům (vankomycin), může mít kombinace  $\beta$ -laktamu nebo glykopeptidu a aminoglykosidu baktericidní účinek (López et al. 2009). Látka aktivně ovlivňující bakteriální buněčnou stěnu (glykopeptidy nebo  $\beta$ -laktamy) blokuje syntézu peptidoglykanu, čímž umožňuje vstup aminoglykosidu, a proto tato synergie může mít pozitivní výsledky (Arias et al. 2010). Možnosti léčby VR enterokoků pak dále zahrnují tigeicyklin, linezolid, daptomycin, quinipristindalfopristin, platensimycin, nitrofurantoin a fosfomycin, avšak lze nalézt zprávy o rezistenci i k těmto látkám, a proto je důležitý management antibiotické terapie konkrétních izolátů (O'Driscoll & Crank 2015). Modifikace struktury vankomycinu mohou být v budoucnu také přínosné pro léčbu infekcí způsobených VR enterokoky (Isenman & Fisher 2016).

Strategie prevence a kontroly pro VR enteroky zahrnují omezení nadměrného užívání vankomycinu a cefalosporinů, vyhýbání se zbytečné hospitalizaci, školení nemocničních pracovníků pro rychlý screening a hlášení VR u enterokoků a zavedení bezdotykové sanitace prostředí, aby se zabránilo komunitnímu přenosu enterokoků (Isenman & Fisher 2016).

## 2.1.3 *Listeria* spp.

### 2.1.3.1 Charakteristika

Rod *Listeria*, pojmenovaný po Lordu Listerovi, britském chirurgovi a průkopníkovi antiseptiky, zahrnuje všudypřítomné, pravidelné, pomocí bičíků se pohybující krátké tyčinky s rovnoběžnými stranami a tupými konci o velikosti  $0,4\text{--}0,5 \times 1\text{--}2 \mu\text{m}$ , které se obvykle vyskytují jednotlivě nebo v krátkých řetězcích, (McLauchlin & Rees 2009). Listerie jsou grampozitivní, nesporotvorné, aerobní, či fakultativně anaerobní bakterie s nízkým obsahem GC, které jsou blízce příbuzné rodům *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, a *Staphylococcus* (Vázquez-Boland et al. 2001). Dosud bylo identifikováno celkem 21 druhů (Parte 2018), z nichž pouze dva, *L. monocytogenes* a *L. ivanovii*, jsou patogeny člověka (*L. ivanovii* velmi vzácně), resp. přežvýkavců (Guillet et al. 2010). Optimální teplota pro růst *L. monocytogenes*, která je schopna změny mezi saprofytismem a virulencí v závislosti na prostředí (David & Cossart 2017), je mezi 30 až 37 °C, avšak listerie toleruje i nízké teploty (kolem 1 °C), kyselé pH a vysoké koncentrace solí, což z ní činí významný potravinový patogen (Tasara & Stephan 2006; Gandhi & Chikindas 2007).

Bakterie *Listeria* spp. mohou být izolovány z různých zdrojů životního prostředí, včetně půdy, vody, odpadních vod, velkého množství potravin a výkalů lidí a zvířat (Fenlon 1999). Zdá se, že výskyt *L. monocytogenes* v povrchových vodách souvisí s přímým využíváním půdy proti proudu řek, konkrétně s pěstováním plodin, výrobou siláží a chovem dobytka, přičemž siláž je nejběžnějším zdrojem kontaminace *L. monocytogenes* (Khan et al. 2016). Za přirozené prostředí listerií se považuje rozkládající se rostlinná hmota, kde žijí jako saprofyté. Klíčovou roli při uchování listerií v prostředí hrají domestikovaní i divoce žijící přežvýkavci, kteří jsou nezbytnou součástí tzv. nepřetržitého cyklu fekálně-orálního obohacování (Weis & Seeliger 1975). Lyautey et al. (2007) ve své studii potvrzují že prevalence *L. monocytogenes* u divokých zvířat může dosahovat až 60 %. Jak již bylo uvedeno, patogen také obývá gastrointestinální trakt lidí a zvířat; nehygienické postupy proto mohou usnadnit jeho šíření prostřednictvím kontaminovaných potravin a provozů (Davis et al. 2019).

### 2.1.3.2 Patogenita

Studie buněčné patogeneze listeriózy prokázaly, že *L. monocytogenes* je fakultativní intracelulární patogen, který má jedinečnou schopnost využívat proteiny hostitelské buňky k šíření mezi buňkami. Schopnost *L. monocytogenes* přímo se šířit z buňky do buňky (bez kontaktu s extracelulárním prostředím) poskytuje morfologické vysvětlení, proč buněčná imunita hraje klíčovou roli v ochraně proti listerióze (Abuaita & O’Riordan 2014). Z *in vitro* tkáňových modelů infekce *L. monocytogenes* lze definovat následující stadia infekce: 1) internalizace *L. monocytogenes* v hostitelské buňce (Pizarro-Cerdá et al. 2012); 2) bakteriální únik z hostitelské vakuoly (Marquis et al. 1995); 3) množení bakterie v cytoplazmě hostitelské buňky (Chico-Calero et al. 2002) a pohyb cytoplazmou pomocí bakteriálně řízené polymerace hostitelských aktinových vláken (Goldberg 2001); 4) bakteriální pohyb na povrch hostitelských buněk a vytlačování bakteriálních buněk ve strukturách podobných pseudopodiím (Sechi et al. 1997); 5) fagocytóza těchto struktur sousedními buňkami, následovaná únikem bakterie z výsledné dvoumembránové vakuoly, což umožňuje opakování cyklu (Chaturongakul et al. 2008).

Listerie oplývají celou řadou virulenních faktorů, které umožňují výše popsaný parazitární cyklus množení uvnitř buněk hostitele, přičemž hemolytická aktivita listerií je dávana do přímé souvislosti s jejich patogenitou (Skalka et al. 1982). Proto mezi jedny z nejvýznamnějších virulenních faktorů patří hemolysiny, jako je např. listeriolysin O, který umožňuje bakteriím únik z fagozomu (Gedde et al. 2000). Dále se lze u listerií setkat s produkcí fosfatidylinositol-specifické fosfolipázy C, kódované genem *plcA*, a nespecifické fosfatidylcholin fosfolipázy C, kódované genem *plcB*, které společně s jinými faktory, či samostatně, umožňují bakteriálním buňkám únik z dvoumembránové vakuoly, či fagozomu (Camilli et al. 1993; Smith et al. 1995). Protein *actA*, kódovaný genem *actA*, zpřístupňuje shromažďování a polymeraci aktinu, a umožňuje intracelulární motilitu patogenních listerií (Vázquez-Boland et al. 2001). Na tvorbě biofilmů (Marino et al. 2000) a na průchodu placentární a střevní bariérou (Bonazzi et al. 2009) se podílejí neméně důležité faktory, internaliny, proteiny kódované geny, které jsou dávány do souvislosti s virulencí patogenních druhů listerií (Vázquez-Boland et al. 2001).

### 2.1.3.3 Epidemiologická situace

*L. monocytogenes*, jako hlavní původce lidské listeriózy, je intracelulární bakterie schopná infikovat pestrou škálu typů buněk a procházet střevní, hematoencefalickou a placentární bariérou (Rahimi et al. 2014). Humánní listerióza je sporadicky se vyskytující onemocnění přenášené potravinami, které je epidemiologicky spojeno s konzumací kontaminovaných potravinářských výrobků (Jalali & Abedi 2008). U zdravého člověka mohou být příznaky listeriózy mírné, projevující se pouze jako spontánně mizející onemocnění podobné chřipce nebo febrilní gastroenteritidě, avšak u citlivých jedinců může způsobovat závažné systémové infekce včetně meningitidy, septikémie a potratů (Rahimi et al. 2014). Vysoce rizikovými skupinami jsou těhotné ženy, novorozenci, starší lidé, jedinci se sníženou imunitou, anebo rakovinou (Mateus et al. 2013). Listeriόza může být vážným onemocněním s přibližně 20% úmrtností, která může narůst u skupin se zvýšeným rizikem (Allerberger 2003). S ohledem na její širokou distribuci v potravinách a vysokou míru úmrtí na listeriόzu, je *L. monocytogenes* považována za jeden z hlavních problémů veřejného zdraví (Vázquez-Boland et al. 2001). Grif et al. (2003) navíc odhalili, že *L. monocytogenes* lze detekovat ve stolici malého procenta asymptomatických, zdravých dobrovolníků.

Identifikace listeriόzy probíhá na základě případů invazivního onemocnění, která se vyskytují samostatně, či ohniskově, a prostřednictvím programů bezpečnosti potravin (Drevets & Bronze 2008). Doposud celosvětově největší ohnisko listeriόzy bylo zaznamenáno v Jihoafrické republice od ledna 2017 do července 2018, kdy bylo hlášeno celkem 1 060 případů s odhadovanou úmrtností 30 %, přičemž nejpravděpodobnějším zdrojem nákazy byly zpracované masné výrobky určené k přímé spotřebě (Smith et al. 2019).

V EU/EHP bylo v roce 2017 potvrzeno 2 502 případů listeriόzy (vzestupný trend) s věkově standardizovanou incidencí (vážený průměr věkově specifických incidencí) 0,42 případů/100 000 obyvatel a nejvyšším výskytem u skupiny osob starších 64 let. Nejvyšší počet potvrzených případů mělo Německo a Francie (44 % všech případů hlášených v EU/EHP). Nejvyšší míry oznámení byly poté pozorovány na Islandu a ve Finsku (ECDC 2020b). Nižší počty zaznamenali o rok později v USA, kdy zde bylo potvrzeno 864 případů listeriόzy, s incidenční mírou výskytu 0,26/100 000 obyvatel (CDC 2019b).

#### 2.1.3.4 Možnosti léčby a prevence

Jelikož je listerióza relativně vzácné onemocnění, neexistují žádné prospektivní *in vivo* antibiotické studie, a jako základní vstupní informace se v terapii využívají *in vitro* studie, kazuistiky a odborné posudky (Janakiraman 2008). Kvůli intracelulární povaze listerií je výběr účinné antimikrobiální léčby obtížný, jelikož antibiotikum musí pronikat do hostitelské buňky (ideálně aktivním, popř. pasivním transportem), a vzhledem k virulentní povaze listerií a její perzistenci se musí antibiotikum pevně vázat na intracelulární cíl, kterým jsou penicilin-vázající proteiny, a musí mít schopnost deponace bez změny intracelulárního pH (Hof 1991).

Antibiotiky první volby pro léčbu infekcí způsobených listeriem jsou nejčastěji  $\beta$ -laktamová antibiotika (amoxicilin, ampicilin a penicilin), v druhé linii následovaná trimethoprim/sulfamethoxazolem (TMP/SMX) a erytromycinem pro pacienty s alergií na penicilin, a v případě asociované infekční endokarditidy také vankomycin (Temple & Nahata 2000).

V současnosti se lze u listerií setkat s akvizicí rezistenčních mechanismů, komplikujících léčbu listeriózy ještě výrazněji, mezi něž lze počítat: (i) horizontální přenos rezistenčních genů, který byl potvrzen konjugací plazmidu udělujícího *Streptococcus agalactiae* rezistenci k makrolidům, lincosamidům, chloramfenikolu, a streptograminům do listerie (Evans & Macrina 1983; Charpentier & Courvalin 1999); (ii) tvorbu perzistentních populací v nečinném stavu, které se nedělí, což jim umožňuje odolávat baktericidním antibiotikům a podmínkám prostředí (Knudsen et al. 2013); (iii) tvorbu biofilmů, zvyšujících toleranci listerií ke kvarterním amoniovým sloučeninám, které se využívají jako dezinfekční prostředky (Borucki et al. 2003; Yoon et al. 2015); a (iv) efluxní pumpy, jako je třeba Lde, která udává rezistenci listerií ke fluorochinolům a ciprofloxacinu (Godreuil et al. 2003; Jiang et al. 2018).

Epidemiologické výzkumy prokázaly, že listerie mohou být přenášeny téměř veškerými druhy potravin, avšak většina samostatných i všechny ohniskové případy jsou spojeny s průmyslovými potravinami (Heikkinen et al. 2000). Listeriíóza s ohniskovým výkytem bývá často indukována „ready-to-eat“ masem (např. masová paštika) (Kurpas et al. 2018) a mléčnými výrobky (zejména měkké sýry) (Jackson et al. 2018). Pasterizace ničí buňky listerií, a proto ohniska listeriíózy z mléka souvisejí většinou se sekundární kontaminací, či nedokonalou pasterizací (Cherubin et al. 1991). Vzhledem k tomu, že jsou listerie všudypřítomné, vytvoření plánů, které by naprosto vyloučily kontaminaci, je v podstatě

nemožné. Riziko je možné snížit omezením příjmu nepasterizovaných mléčných výrobků, minimalizací křížové kontaminace a důkladnou dezinfekcí povrchů, jež se dostávají do kontaktu s potravou (Janakiraman 2008).

## 2.1.4 *Staphylococcus aureus*

### 2.1.4.1 Charakteristika

*Staphylococcus aureus*, z řeckého *staphylé* – hrozen, *kokkos* – bobule a latinského *aureus* – zlatý, je druh nepohyblivých, nesporulujících grampozitivních bakterií náležících k rodu *Staphylococcus*. Bakterie průměrné velikosti 0,5–1  $\mu\text{m}$  se vyskytují samostatně, v párech, či tvoří shluky ve vypouklých, hladkých, lesklých, průsvitných koloniích s ucelenými okraji, jejichž pigmentace se pohybuje v odstínech šedé, žluté až oranžové (Schleifer & Bell 2009). *S. aureus* byl poprvé identifikován v hnisavé tekutině z abscesu nohy Ogstonem v 80. letech 19. století a krátce nato formálně izolován Rosenbachem (Newsom 2008), který rozlišil lidské stafylokokové izoláty na základě pigmentace jejich kolonie, navrhuje nomenklaturu *S. aureus* a *S. albus* pro žluté, respektive bílé kolonie (Rosenbach 1884). Posledně jmenovaný druh je nyní označován jako *S. epidermidis* (Thomer et al. 2016). Stafyloxantin, karotenoid vázaný na membránu, produkovaný *S. aureus*, je zodpovědný za žlutou pigmentaci kolonií. Produkci pigmentu jsou zachycovány reaktivní formy kyslíku, čímž je *S. aureus* chráněn před fagocytární eliminací (Clauditz et al. 2006). Schopnost srážet lidskou a živočišnou krev nebo plazmu je charakteristickým znakem *S. aureus* a je zprostředkován dvěma secernovanými produkty, koagulázami (Coa) a von Willebrand-faktor vázajícím proteinem; *S. epidermidis* je Coa negativní, *S. aureus* Coa pozitivní (Cheng et al. 2010). Mezi Coa pozitivní stafylokokové druhy jsou dále řazeny např. *S. delphini*, *S. intermedius*, či *S. pseudintermedius*, druh, který se přizpůsobil různým hostitelům (norek, liška, holub a pes), ale nekolonizuje lidskou populaci (Guardabassi et al. 2012).

*S. aureus* stabilně kolonizuje nozdry, kůži, či perineum přibližně jedné třetiny lidské populace, zatímco další třetina je kolonizovaná pouze občasně (van Belkum et al. 2009). *S. aureus* je také invazivním patogenem a častou příčinou onemocnění kůže a měkkých tkání, krevního řečiště a také původcem otrav z jídla (Schleifer & Bell 2009). Jakmile patogen vstoupí do krve, replikuje se a šíří na mnoho různých míst těla, což ústí v závažné projevy onemocnění, jako je sepse, infekční endokarditida a hluboké abscesy prakticky v každé možné orgánové soustavě (David & Daum 2010). Komplikací infekcí *S. aureus* je tzv.

syndrom toxického šoku indukovaný produkcí enterotoxinů (A, B, C – 3 typy, D a E), kdy patogen na vstup do organismu odpovídá produkcí enterotoxin-podobných proteinů (Silversides et al. 2010).

#### **2.1.4.2 Patogenita**

*S. aureus* má rozsáhlý repertoár virulenčních faktorů, který mu umožňuje přežít extrémní podmínky v hostiteli. K infekcím dochází často v důsledku přímého vniku *S. aureus* do otevřené rány, či predispozičním poškozením sliznice v důsledku virové infekce, kdy se předpokládá, že počáteční expozice bakterií *S. aureus* vůči hostitelským (především mukózním) tkáním či kůži vyvolává upregulaci virulenčních genů (Novick 2003). Na tvorbu bakteriálních produktů, či poškození tkáně reagují fagocyty a buněčný epitel hostitele aktivací imunitního systému, kdy jsou peptidoglykan a lipoproteiny *S. aureus* rozpoznány pattern recognition receptory (Fournier & Philpott 2005; Hashimoto et al. 2006). Produkty rozkladu hyaluronanu (Scheibner et al. 2006) a endogenní ligandy „toll-like“ receptorů (RNA, DNA, HMGB1) uvolňované nekrotickými tkáněmi (Pisetsky 2007; Cavassani et al. 2008) během infekce dále zvyšují prozánětlivou signalizaci organismu vedoucí k aktivaci lokálních imunitních buněk a množení neutrofilů a makrofágů (Liu 2009). Po dosažení místa infekce uvolní neutrofilové řadu antimikrobiálních látek, včetně antimikrobiálních peptidů, reaktivních forem kyslíku (ROS), reaktivních forem dusíku (RNS), proteáz a lysozymu. Obrana proti ROS je u bakterií *S. aureus* zprostředkována aktivací velkého počtu antioxidantních enzymů (např. katalázy, pigmenty, superoxid dismutáza), které neutralizují ROS a RNS (Foster 2005). Antimikrobiální peptidy, které cílí na negativně nabitou bakterie, nejsou vůči *S. aureus* účinné, neboť tento mění své povrchové napětí (Peschel et al. 2001; Collins et al. 2002). Navíc jsou antimikrobiální peptidy degradovány (aureolysin) (Sieprawska-Lupa et al. 2004) a neutralizovány (stafylokináza) (Jin et al. 2004). Bakteriální invaze a přežití v hostiteli nezávisí pouze na úspěšném vzdorování imunitnímu systému, ale také na úspěšném získávání živin, zejména železa (Maresso & Schneewind 2006). Během bakteriální infekce je 95 % železa deponováno bezpečně v hostitelských buňkách a sérové železo je většinou vázáno na hostitelské proteiny, které nejsou snadno přístupné. Pokud dochází u *S. aureus* k nedostatku železa, bakterie vylučují vysoce afinitní sloučeniny vázající železo (aureochelin a stafyloferrin) (Drechsel et al. 1993). Navíc, pokud *S. aureus* detekuje nízký obsah železa, iniciuje transkripci programu pro získávání železa, který umožňuje zachycování hemu a



haptoglobinu na buněčném povrchu, transport komplexu železa přes plazmatickou membránu a následnou oxidační degradaci hemu v cytoplazmě (Maresso & Schneewind 2006).

Běžně indukuje bakteriální infekce u hostitele adaptivní imunitní odpověď do sedmi až deseti dnů, čímž se omezí probíhající infekce a zabrání se tak budoucí reinfekci. Jedním z charakteristických znaků *S. aureus* je však schopnost patogena infikovat stejného hostitele opakovaně po celý život. Základním mechanismem alterace adaptivní imunitní odpovědi jsou stafylokokové enterotoxiny, toxiny syndromu toxického šok a Eap (analog hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy), měnící funkci T-buněk prostřednictvím změny aktivačního procesu jejich receptorů (Lee et al. 2002; Llewelyn & Cohen 2002), čímž *S. aureus* brání rozvoji dlouhodobé imunitní paměti. Goodyear a Silverman (2004) prokazují, že *S. aureus* produkuje protein A, který odčerpává B-buňky z marginální zóny sleziny, čímž dochází k poškození tvorby specifické odpovědi B-lymfocytů. Tyto mechanismy spojené s výše popsanými strategiemi blokuji účinnou protilátkovou vazbu na bakteriální povrch, což je dle Liu (2009) důvodem náchylnosti k opakovaným infekcím *S. aureus* během života stejného hostitele. Další virulenční mechanismy klinického významu *S. aureus* zahrnují a) tvorbu biofilmu, který umožňuje přežívání bakterie např. na plastových površích a odolávání obraně hostitele nebo antibiotikům (Foster 2005) a b) tvorbu malých kolonií, které umožňují *S. aureus* přežít v metabolicky neaktivním stavu nepříznivé životní podmínky. Varianta malých kolonií se účastní také chronických infekcí, jakými je např. osteomyelitida (von Eiff et al. 2006).

Dalším fenoménem spojovaným s bakterií *S. aureus* je fakt, že produkuje v reakci na různé stresy tzv. perzistery, kteří představují určitou část bakteriální populace, která vykazuje toleranci k antibiotikům (Kubistova et al. 2018). Podle zjištění Peyrussona et al. (2020), *S. aureus* v přítomnosti vysoké koncentrace různých antibiotik, vykazuje dvoufázový způsob usmrcování, což znamená, že většina bakteriální populace je citlivá a rychle usmrcena, zatímco subpopulace s pomalejší rychlostí usmrcování přetrvává mnohem delší časové období. Perzistentní populace navíc vykazuje reverzibilitu fenotypu po odstranění antibiotika.

#### **2.1.4.3 Epidemiologická situace**

Jak již bylo uvedeno výše, *S. aureus* je běžným komenzálem asi 30 % lidské populace (Wertheim et al. 2005). Zároveň je hlavní příčinou bakterémie a infekční endokarditidy, jakož i infekcí souvisejících s osteoartikulárními, kožními a měkkými tkáněmi, pleuropulmonárními

chorobami, infekcemi močového traktu a je spojen také se syndromem toxického šoku, meningitidou, či septickou tromboflebitidou (Tong et al. 2015). Díky své vysoké rezistenci a široké škále onemocnění, jež je schopen vyvolat, je hlavní infekcí, kterou lze získat přenosem v nemocničních zařízeních (Weinstein et al. 2001). S tímto fenoménem je spojen především tzv. meticilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA), vysoce rezistentní bakterie, která díky přítomnosti *mecA* genu odolává léčbě penicilinovými antibiotiky produkcí tzv. penicilináz ( $\beta$ -laktamáz) (Rice 2006). Vzhledem k tomu, že je MRSA jednou z celosvětově nejdůležitějších příčin infekcí spojených se zdravotní péčí a antimikrobiálními látkami, implementovalo během posledního desetiletí několik evropských zemí národní akční plány zaměřené na omezení šíření MRSA ve zdravotnických zařízeních (ECDC 2015). Z výsledků monitoringu ECDC (2015) poté vyplývá, že procento izolátů *S. aureus* hlášených jako MRSA se ve většině evropských zemí stabilizuje či snižuje a průměrný výskyt MRSA na obyvatele se také postupně snižuje, avšak především v jižní a východní Evropě zůstává stále vyšší než 25 %.

Tuto situaci potvrzují také Hashiguchi et al. (2019), kteří řadí mezi evropské státy s nejvyšším podílem výskytu MRSA Rumunsko, Maltu, Portugalsko, Kypr a Řecko. Celosvětově je pak zemí s nejvyšším procentem MRSA rezistentních izolátů Indonésie, následovaná Čínou, Japonskem a Peru (Tabulka 2.4). Mediánová hodnota počtu osob nakažených na území EU/EHP bakteriemi MRSA se v roce 2015 pohybovala okolo 150 tisíc, přičemž je odhadováno, že z těchto přibližně 7 tisíc osob na následky onemocnění zemřelo (Cassini et al. 2019). MRSA je bakterií zvyšující nejen mortalitu a morbiditu, ale i výdaje za nemocniční péči a prodlužuje samotnou dobu léčení postižených osob (Monecke et al. 2011). Bylo zjištěno, že 18 % infekčních epidemií v letech 1946–2005 bylo v USA způsobeno mikroorganismy se zvýšenou odolností k určitému druhu léčiv, jakými je *S. aureus* (Archibald & Jarvis 2011). Na společném území EU, Islandu a Norska se MRSA onemocnění krevního řečiště nejvíce vyskytuje v populaci průměrného věku 20-30 let, což se výrazně odlišuje od dalších bakterií způsobujících infekce krve (vankomycin-rezistentní *Enterococcus faecium* a penicilin-rezistentní *Streptococcus pneumoniae*), nejčastěji se vyskytujících u dětí kolem deseti let věku (ECDC & EMEA 2009).

**Tabulka 2.4:** Podíl MRSA izolátů v 52 zemích OECD (převzato z Hashiguchi et al. 2019)

Stát	% MRSA rezistentních izolátů	Stát	% MRSA rezistentních izolátů	Stát	% MRSA rezistentních izolátů
Rumunsko	57	Lucembursko	9	Švýcarsko	4
Řecko	39	Francie	16	Turecko	25
Slovensko	28	Německo	11	Peru	53
Itálie	34	Estonsko	4	SAE	37
Bulharsko	13	Belgie	12	Mexiko	31
Kypr	43	UK	11	Kolumbie	43
Polsko	16	Rakousko	8	Brazílie	44
Chorvatsko	25	Dánsko	2	Argentina	45
Portugalsko	47	Finsko	2	Kostarika	45
Malta	49	Švédsko	1	JAR	30
Maďarsko	25	Norsko	1	Izrael	44
Lotyšsko	9	Nizozemí	1	USA	43
Litva	6	Island	0	Čile	26
Španělsko	25	Indie	45	Japonsko	53
ČR	14	Čína	57	NZ	36
Írsko	18	Rusko	22	Kanada	18
Slovinsko	9	Indonésie	70	Austrálie	18

Legenda: Barevné schéma – minimum v modré, střední hodnota v bílé, maximum v červené

#### 2.1.4.4 Možnosti léčby a prevence

Prakticky všechny kmeny bakterií *S. aureus* byly na počátku 40. let dvacátého století, kdy byl penicilin G oficiálně představen, citlivé vůči tomuto antibiotiku, avšak již v roce 1944 se objevily první zprávy o penicilin-rezistentním *S. aureus* a dnes jsou prakticky všechny kmeny rezistentní na přírodní peniciliny, aminopeniciliny, antipseudomonální peniciliny (Neu 1992) a vlivem zkřížené rezistence také na oxacilin (Cormican & Jones 1996). Nejprve byly případy penicilin-rezistentního *S. aureus* omezené a objevovaly se pouze ve zdravotnických zařízeních, avšak v průběhu času byly detekovány rezistentní druhy rozšiřující se ve stále širší komunitě (Chambers 2001). Posléze byl k léčbě infekcí způsobených na penicilin rezistentním *S. aureus* vyvinut meticilin a další peniciliny rezistentní na penicilinázy, které se setkaly s počátečním úspěchem, nicméně v průběhu času se začaly objevovat a šířit kmeny MRSA – nejprve v nemocničním prostředí a posléze v rámci běžné populace (Rice 2006). Pravidelná ohniska MRSA byla pozorována v různých státech od 70. let 20. století a obvykle byla spojována s vysokým užíváním meticilinu na jednotkách intenzivní péče (Palavecino 2004), ale až v 80. letech se MRSA stal opravdu závažným problémem (Panlilio et al. 1992). V současné době je MRSA považován za hlavní problém v nemocničních zařízeních, ale i v širší populaci po celém světě (Diekema et al. 2001), a je také uveden na seznamu prioritních patogenů Světové zdravotnické organizace (důležitost vysoká – stupeň 2 ze 3), pro které je nový vývoj a objev antibiotik nezbytný (WHO 2017).

Běžnou praxí v léčbě infekcí způsobených na  $\beta$ -laktamázy-pozitivními MRSA izoláty je kombinace  $\beta$ -laktamového antibiotika (amoxicilin) spolu s  $\beta$ -laktamázovým inhibitorem (kyselina klavulanová) (Jamil et al. 2017). Obecně je nozokomiální MRSA rezistentní k širšímu spektru antibiotik (tzv. multirezistence) díky tomu, že exprese genu *mecA* kódujícího nízkoafinitní penicilin vázající protein (PBP2a) uděluje *S. aureus* kromě meticilinu rezistenci i k jiným  $\beta$ -laktamům (Utsui & Yokota 1985). Zároveň tato rezistence zahrnuje typicky i jiné třídy antibiotik (Aucken et al. 2002), a infekce způsobené MRSA je tak těžké léčit vzhledem k tomu, že multirezistence zahrnuje dále aminoglykosidy, makrolidy, linkosamidy, tetracykliny, cefalosporiny, karbapenemy, kombinace zahrnující  $\beta$ -laktamázové inhibitory, trimethoprim, sulfonamidy a chinolony (Baquero 1997). V nedávné době byla identifikována u lidských i zvířecích MRSA izolátů nová varianta *mecA* známá jako *mecC* (*mecC*-MRSA), kódující PBP2c, který však nezprostředkovává přímo rezistenci na penicilin (García-Álvarez et al. 2011). Širokospektrá rezistence  $\beta$ -laktamů u kmenů *mecC*-MRSA je

spíše zprostředkována kombinací PBP2c a odlišné  $\beta$ -laktamázy kódované bla<sub>ZLGA251</sub>, která je součástí *mecC* kódujícího SCC<sub>mec</sub> typu XI. (Ba et al. 2015). Vzhledem k výskytu multirezistentních kmenů *S. aureus* je v klinické praxi k léčbě infekcí MRSA běžně používán vankomycin (Tabuchi et al. 2017). Avšak i u tohoto antibiotika byl nedávno hlášen výskyt rezistentních kmenů, tzv. vankomycin-intermediate-rezistentních *S. aureus* (VISA), které vykazují slabou toleranci vůči vankomycinu (MIC 4–8  $\mu\text{g/ml}$ ) (Howden et al. 2010) a vankomycin-rezistentních kmenů *S. aureus* (VRSA), které jsou vysoce rezistentní vůči vankomycinu, díky přítomnosti exogenních genů, jakým je např. *vanA* (Chang et al. 2003; Melo-Cristino et al. 2013). Vzhledem k prevalenci infekcí způsobených bakteriemi *S. aureus*, může být empirická terapie peniciliny nebo cefalosporiny nedostatečná (Elliott et al. 2009). Lee et al. (2011a) proto doporučují kombinovanou terapii penicilinu rezistentního na penicilinázu nebo cefalosporinu (v případě, že bakterií je meticilin-senzitivní *S. aureus*) v kombinaci s klindamycinem nebo chinolonem. Jiní navrhují použití klindamycinu, TMP/SMX, rifampinu, doxycyklinu nebo chinolonu spíše v kombinaci než samostatně, a tak se v regionech s relativně nízkým výskytem rezistence na klindamycin tento může stát preferovanou ambulantní antibiotickou terapií (ve srovnání s TMP/SMX) (Williams et al. 2011).

Omezení šíření bakteriálních infekcí způsobených *S. aureus* je spojeno především s prevencí vzniku biofilmů, které jsou tímto bakteriálním patogenem tvořeny na mnoha různých površích (Bhattacharya et al. 2015) a také s dodržováním správné hygienické praxe při kontaktu s nakaženými MRSA v nemocničních zařízeních (Bamberger & Boyd 2005). První bod zahrnuje prevenci adherence bakterie k povrchům za pomoci antibakteriálních povlaků jako je např. chitosan (Carlson et al. 2008), lysostafin (Windolf et al. 2014), organický selen (Tran et al. 2012), nanočástice stříbra (Stevens et al. 2009), nebo chelátory vápníku (Abraham et al. 2012), či přímou vakcinaci vůči *S. aureus* (van den Berg et al. 2015). Druhým opatřením je izolace a dodržování přísných hygienických opatření při kontaktu s pacientem nakaženým MRSA – nošení rukavic a ochranných obleků při vstupu do místnosti, pokud se předpokládá kontakt s pacientem nebo předměty v místnosti, mytí rukou po odstranění rukavic apod. (Boyce et al. 2004).

## 2.1.5 *Streptococcus* spp.

### 2.1.5.1 Charakteristika

Název bakterií rodu *Streptococcus*, vycházející z latinského spojení slov *streptus* a *coccus*, je označuje jako poddajné hrozny, což vystihuje jejich morfologické znaky, mezi které náleží sférický nebo vejčitý tvar, velikost menší než 2  $\mu\text{m}$  v průměru, a výskyt v řetězcích nebo v párech. Grampozitivní, fakultativně anaerobní buňky streptokoků jsou dále charakteristické nepohyblivostí, neschopností tvořit spóry, chemoorganotrofií s fermentativním metabolismem produkujícím laktózu bez tvorby plynů, a negativním katalázovým testem (Whiley & Hardie 2009).

Tradičně se streptokoky subklasifikují dle vzhledu na krevním agaru, který určuje jejich rozdělení na základě stupně hemolýzy do tří skupin na alfa-hemolytické, indukující na krevním agaru pouze částečnou hemolýzu; beta-hemolytické s plnou hemolytickou aktivitou (s výjimkou *Str. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, který není beta-hemolytický, ale je do této skupiny zařazen z taxonomických důvodů); a ne-hemolytické (Parks et al. 2015; Abranches et al. 2019). Facklam (2002) dělí streptokoky pouze na beta-hemolytické a ne-hemolytické, jelikož tvrdí, že složení média včetně typu krve a inkubační atmosféry může ovlivnit, zda dojde k tzv. „alfa“ hemolýze, a že neexistuje žádný zdokumentovaný enzym nebo toxin, který by ovlivňoval červené krvinky a umožňoval streptokokům alfa-, tedy částečnou hemolýzu.

Pomocí sérologického systému vyvinutého Rebecou Lancefieldovou v roce 1933, jsou druhy beta-hemolytických streptokoků dále klasifikovány podle typu hlavního povrchového polysacharidového antigenu (Lancefield 1933). Druhy beta-hemolytických streptokoků nejčastěji spojovaných s humánními a veterinárními chorobami jsou řazeny do Lancefieldových skupin A, B, C, a G. Antigen skupiny A a skupiny B je charakteristický pro konkrétní druhy, zatímco antigeny skupin C a G se vyskytují na malém počtu blízké příbuzných druhů (často souhrnně nazývané jako tzv. skupina C/G) (Facklan 2002). Konkrétně, skupina A zahrnuje např. *Str. pyogenes*, nejvíce patogenní druh streptokoků, způsobující život ohrožující invazivní infekce, jako je nekrotizující fasciitida a syndrom toxického šoku, který je spojen s vysokou morbiditou a mortalitou (Ibrahim et al. 2016); skupinu B představuje *Str. agalactiae*, patogen, který je častou příčinou morbidit a mortality ve vysoce rizikových populacích (těhotné ženy, novorozenci a starší osoby) a podílí se na vzniku bovinních mastitid (Raabe & Shane 2019); skupina C zahrnuje především zvířecí

patogeny, jako je *Str. dysgalactiae* subs. *dysgalactiae*, který mimo jiné vyvolává zánět vemene (Rato et al. 2011); skupina G poté zahrnuje lidské i zvířecí druhy streptokoků, jako je *Str. canis*, který způsobuje např. infekce močových cest a kůže, či syndrom toxického šoku (Lam et al. 2007).

Streptokoky však také mohou být děleny pomocí sekvenačních metod na základě podobnosti jejich 16S rRNA do šesti skupin, jmenovitě pyogeni, mitis, salivarius, bovis, mutans a hyovaginalis. Skupina streptokoků pyogenních (*Str. pyogenes* a *Str. agalactiae*) a mitis (*Str. pneumoniae*) zahrnuje jak komenzální, tak těžce patogenní druhy způsobující závažné infekce u lidí i u zvířat. Skupina salivarius slučuje streptokoky, jejichž společným znakem je mimo jiné přítomnost významného množství kyseliny eikosanové (např. *Str. salivarius*, *Str. thermophilus*). Skupina bovis představuje soubor streptokoků lidského a zvířecího původu, jejichž klasifikace byla dlouho problematická (např. *Str. bovis* nebo *Str. pasteurianus*). Do skupiny mutans jsou řazeny streptokoky spojené se zubním plakem u člověka a několika druhů zvířat (např. *Str. mutans*, *Str. sobrinus*). Skupina hyovaginalis, jak již název napovídá, slučuje streptokoky vyskytující se v genitáliích, ale také dýchacích cestách domácích zvířat a ptáků (př. *Str. hyovaginalis*, *Str. thoralensis* a *Str. pluranimalium*) (Whiley & Hardie 2009).

### 2.1.5.2 Patogenita

Mnoho druhů invazivních streptokokových infekcí je v celosvětovém měřítku považováno za hrozbu pro veřejné zdraví (O'Brien et al. 2009). Bylo také prokázáno, že např. *Str. agalactiae* může být spolu s jinými streptokoky zoonotickým patogenem (Barkema et al. 2009). Nejlépe jsou prozkoumány mechanismy patogenity beta-hemolytické skupiny A, zahrnující *Str. pyogenes*, a poznatky o chování tohoto druhu jsou aplikovatelné obecně i na ostatní streptokoky (Facklam 2002). V první fázi infekce streptokoky obvykle kolonizují slizniční orgány, jako je nosohltan a obecně dýchací, gastrointestinální a urogenitální trakt (Hasty et al. 1992). Po tomto úvodním kolonizačním kroku se bakterie šíří do dalších orgánů (Akuzawa & Kurabayashi 2016). Na nově osídlených místech se streptokoky mohou setkat s odlišnými podmínkami daného prostředí hostitele, zahrnujícími oxidaci, teplotu, pH anebo nedostatek živin, které mohou v bakteriích vyvolat stresové reakce (Trainor et al. 1999). Druhy *Streptococcus* spp. proto mají vyvinutou řadu mechanismů, jak je překonat a přežít v daném prostředí (Hassett & Cohen 1989; Johnston et al. 2004; Abranches et al. 2006;

Froehlich et al. 2009; Hua et al. 2014). Bylo také prokázáno, že streptokokové dvousložkové systémy jsou hlavní cestou regulace genů souvisejících se stresem u těchto bakterií (Downey et al. 2014).

Řada studií potvrdila, že streptokoky skupiny A mají potenciál invaze do lidských epiteliálních buněk, a to s frekvencí stejnou nebo dokonce i vyšší než klasické intracelulární bakteriální patogeny, jako jsou *Listeria* a *Salmonella* spp. (Haidan et al. 2000; Benga et al. 2004; Ochel et al. 2014). Navíc je známo, že streptokoky skupiny A jsou antifagocytické v důsledku povrchově exponovaného M proteinu a kapsule s kyselinou hyaluronovou (Moses et al. 1997). Byly navrženy dva mechanismy, které vysvětlují antifagocytární chování M-pozitivních streptokoků. Prvním z mechanismů je vazba faktoru H, který inhibuje aktivaci dráhy komplementu (de Córdoba et al. 2004), a druhým mechanismem je schopnost fibrinogenu vázat se na M protein, čímž dochází k blokaci aktivace komplementu (Carlsson et al. 2005).

Pro kolonizaci hostitelských tkání a buněk využívají streptokoky celou řadu virulenních faktorů, mezi které jsou řazeny např. M proteiny (adheziny) a kyselina lipoteichoová pro připojení k hostitelskému povrchu; kapsule s kyselinou hyaluronovou, která inhibuje fagocytózu (Cunningham 2000); extracelulární produkty, jako je pyrogenní (erytrogenní) toxin, který způsobuje spálu (McCormick et al. 2001); streptokináza, která přispívá k streptokokové virulenci tvorbou plazminu, což vede k bakteriálnímu šíření z primárního místa infekce tím, že způsobuje fibrinolýzu a degradaci složek extracelulární matrix a bazální membrány (Molae et al. 2013); a streptoliziny O a S, zodpovědné za charakteristickou zónu beta-hemolýzy obklopující kolonie pěstované na krevním agaru (Sierig et al. 2003).

### **2.1.5.3 Epidemiologická situace**

Jediným druhem streptokoků, který je vzhledem ke své antibiotické rezistenci zapojený v monitorovacím systému států EU a USA, je *Str. pneumoniae* (EFSA & ECDC 2019b; CDC 2019a). Tzv. pneumokok je oportunistický patogen, který kolonizuje slizniční povrchy horních cest dýchacích člověka a Weiser et al. (2018) uvádí, že až 27–65 % dětí a <10 % dospělých jsou přenašeči při komenzálním vztahu mezi bakterií a hostitelem (Abdullahi et al. 2012). Pneumokoky mohou způsobovat infekce celé řady tkání včetně plicního parenchymu a mozkových blan, jsou hlavní příčinou komunitní pneumonie a důležitou příčinou bakterémie, zejména u kojenců a starších osob (Parks et al. 2015). Vzhledem k vysoké prevalenci výskytu



byly vyvinuty systémy vakcinace proti *Str. pneumoniae*, např. v ČR je však ze zdravotního pojištění plně hrazené očkování dětí nepovinné (MZ ČR 2010). Penicilin-necitlivé *Str. pneumoniae* jsou zařazeny mezi patogeny se střední prioritou (stupeň 3 ze 3; nejnižší), pro než je nezbytný nový vývoj a objevy antibiotik (WHO 2017).

V roce 2019 nahlásilo 29 zemí EU/EHP výskyt 19 611 izolátů *Str. pneumoniae*, přičemž u 18 112 (92 %) izolátů byla testována citlivost vůči penicilinu a u 18 832 (96 %) izolátů bylo provedeno testování citlivosti k makrolidům. Celkově bylo 1 811 (16,2 %) izolátů rezistentních alespoň k jedné třídě antibiotik, 751 (6,7 %) izolátů alespoň ke dvěma třídám antibiotik, 45 (0,4 %) izolátům alespoň ke třem třídám antibiotik, a 1 (<0,1 %) izolát alespoň ke čtyřem třídám antibiotik. Rezistence *Str. pneumoniae* k penicilinu se vyskytla u 4,9 % izolátů, rezistence k makrolidům u 6,4 % izolátů a kombinovaná rezistence vůči penicilinu i makrolidům u 6,5 % izolátů. Nejvyšší míru (25 – <50 %) výskytu penicilin-rezistentních *S. pneumoniae* na území EU/EHP vykazuje Francie a Malta (EFSA & ECDC 2019b). Centrum pro kontrolu onemocnění v USA považuje *Str. pneumoniae* za závažného patogena (stupeň závažnosti 2 ze 3) a předpokládalo v roce 2014 výskyt přibližně 900 000 případů infekce rezistentních *Str. pneumoniae*, s nimiž spojená ekonomická zátěž se pohybovala kolem 4 miliardy USD. Dále CDC odhadovalo, že v důsledku této nákazy zemře kolem 3 600 osob. V USA jsou mimo jiné považovány za znepokojivou hrozbu (stupeň závažnosti 3 ze 3; nejnižší stupeň) erythromycin-rezistentní streptokoky skupiny A (vzhledem k rostoucímu trendu počtů výskytu) a klindamycin-rezistentní streptokoky skupiny B (vzhledem k limitacím, jež léčba těchto rezistentních patogenů přináší) (CDC 2019a). Song et al. (2004) uvádí, že se penicilinová rezistence *Str. pneumoniae* u izolátů z 11 asijských zemí vyskytuje ve 29,4 % případů s nejvyšší prevalencí ve Vietnamu (71,4 %).

#### **2.1.5.4 Možnosti léčby a prevence**

Vzhledem k druhové rozmanitosti streptokoků a množství onemocnění, které mohou způsobovat je výčet možných terapií veliký, avšak penicilin zůstává lékem první volby pro beta-hemolytické streptokoky skupiny A, včetně senzitivních kmenů *Str. pyogenes* (Robertson et al. 2005; Camara et al. 2013). Peniciliny dodnes slouží také jako profylaxe recidivy streptokoky vyvolané spály (Gerber et al. 2009). Včasná léčba infekcí penicilinem brání imunitní odpovědi vůči streptokokovým antigenům a současně předchází následkům streptokokální revmatické horečky a glomerulonefritidy (Cunningham 2000). Problémy

s neúspěchem antibiotické léčby infekcí způsobených streptokoky mohou souviset s nesnadnou eradikací bakteriálních biofilmů (Baldassarri et al. 2006). Jako příklad diverzity možností antibiotické léčby infekcí způsobených invazivními streptokoky pak lze uvést, že Cunningham (2000) navrhuje k léčbě streptokokového zánětu nosohltanu cefalosporiny, erythromycin a amoxicilin-klavulanát, ale lékem první volby zůstává penicilin.

Šíření *Str. pneumoniae* rezistentních na penicilin a jiná antibiotika se stal celosvětovou mikrobiální hrozbou (Jensen et al. 2015). Izoláty by proto měly být laboratorně vyšetřeny a měla by být určena rezistence k jednotlivým třídám antibiotik, pokud tato není prokázána, infekce by měla být v první řadě léčena peniciliny (Choby 2009). U meningeální infekce rezistentními kmeny streptokoků je doporučována léčba kombinací vankomycinu s ceftriaxonem, nebo cefotaximem (Hameed & Tunkel 2010). Pro dosažení maximálního efektu v nejkratším časovém horizontu, znamenajícím minimalici ztrát, Hillerton a Kliem (2002) popisují jako nejúčinnější formu terapie streptokokálních mastitid dojeného skotu agresivní intramamární aplikaci kombinace prekurzoru penicilinu (penetamát hydrojodidu), neomycinu a streptomycinu s prednisolonem.

Alves-Barroco et al. (2020) doporučují jako alternativní léčbu streptokokárních infekcí použití bakteriocinů, bakteriofágů a nanočástic stříbra či mědi, a zároveň konstatují, že účinnost těchto látek není srovnatelná s účinností terapie antibiotiky, avšak doporučují kombinaci konvenčních a alternativních antibakteriálních látek pro zajištění maximálního účinku s možným přispěním k omezování šíření bakteriální rezistence. Ve standardech správné hygienické praxe ve zdravotnictví pro omezení šíření *Str. pyogenes* se lze setkat s obecnými doporučeními pro omezení bakteriálního šíření, které zahrnují časté mytí rukou, nošení ochranných prostředků a izolaci infikovaného pacienta (Ostrowsky & Rosenthal 2018).

## **2.2 Významné druhy komenzálních bakterií GIT**

Odhaduje se, že GIT člověka i zvířat obývají biliony mikrobů (Bermudez-Humaran & Langella 2012). Martín et al. (2013) konstatují, že tento mikroekosystém je zásadní pro udržení homeostázy zdravého jedince, jelikož komenzální bakterie poskytují hostiteli nejen základní živiny a metabolizují nestravitelné sloučeniny, ale i brání kolonizaci oportunních patogenů a přispívají mimo jiné k rozvoji střevní architektury i ke stimulaci imunitního

systemu. Taktéž je známo, že původní mikroorganismy se přizpůsobily, aby si udržely výhody (živiny, stabilní prostředí), které jim soužití s hostilem přináší (Yamashiro 2017).

Mezi nejznámější druhy komenzálních bakterií, které obývají GIT člověka a zvířat, se řadí bakterie rodu *Lactobacillus* spp. a *Bifidobacterium* spp. (He & Shi 2017). Tyto druhy jsou zároveň s jinými bakteriemi také probiotické a jejich role v prevenci degenerativních onemocnění, jako je obezita, cukrovka, rakovina, kardiovaskulární onemocnění, malignita, onemocnění jater a zánětlivé onemocnění střev, je intenzivně studována (Azad et al. 2018).

## **2.2.1 *Bifidobacterium* spp.**

### **2.2.1.1 Charakteristika**

Rod *Bifidobacterium* patří do kmene Actinobacteria a spolu s dalšími devíti rody tvoří čeleď *Bifidobacteriaceae* (Turroni et al. 2011). Jeho název vychází z latinského spojení *bifidus* (rozštěpený, rozdělený) a *bacterium* (malá tyčinka), označující bifidobakterie jako rozštěpené tyčinky. Název vystihuje morfologickou stavbu těchto bakterií, kterou představují tyčinky variabilního tvaru. Lze se setkat s krátkými, pravidelnými, tenkými buňkami se zašpičatělými konci; pravidelnými kokoidními buňkami; dlouhými buňkami s mírnými ohyby, výčnělky, nebo s velmi rozsáhlým větvením; nebo špičatými buňkami s mírně rozvětvenými konci kyjovitého, či špachtlovitého tvaru. Takto tvarované buňky se mohou vyskytovat v prostředí samostatně, navázané v mnohobuněčných řetízích, v hvězdicovitých agregátech, uspořádané do tvaru písmena „V“, či do palisád (Biavati & Mattarelli 2009). Bifidobakterie vykazují větvení a pleomorfismus především za nepříznivých podmínek, za běžných okolností jsou tyčinkovitého tvaru (Rašić & Kurmann 1983). Jsou řazeny mezi grampozitivní (avšak často se nepravidelně barvíci methylenovou modří), nesporulující, nepohyblivé bakterie, které nevykazují acidorezistenci v průběhu Ziehl-Neelsenova barvení (Biavati & Mattarelli 2009). Tento bakteriální druh je popisován jako striktně anaerobní, ačkoli některé kmeny mohou tolerovat kyslík (Simpson et al. 2004). Citlivost ke kyslíku se však může lišit mezi jednotlivými druhy, a dokonce také mezi různými kmeny v rámci jednoho druhu (Shimamura et al. 1992; Ahn et al. 2001; Talwalkar & Kailasapathy 2003). Některé druhy a kmeny mohou tolerovat kyslík, ale pouze v přítomnosti oxidu uhličitého, přičemž jiné druhy (*B. psychraerophilum*, *B. scardovii* a *B. tsurumiense*) mohou růst dokonce i za aerobních podmínek (Okamoto et al. 2008).

V současné době se rod *Bifidobacterium* skládá z 85 (pod)druhů, které jsou rozloženy v sedmi různých ekologických nikách, zahrnujících GIT lidí, savců, ptáků a sociálního hmyzu; odpadní vodu; a ústní dutinu (Ventura et al. 2007; Turroni et al. 2011). Bifidobakterie byly původně izolovány a popsány mezi lety 1899–1900 Henrym Tissierem, který pozoroval rozdíly mezi hojně se vyskytujícími nepravidelnými bakteriemi ve tvaru Y ve výkalech dětí kojených a dětí krmených z lahví. Tato bakterie byla původně pojmenována *Bacillus bifidus* (Leahy et al. 2005). Orla-Jensen (1924), dánský mikrobiolog navrhl klasifikovat *B. bifidus* jako samostatný druh rodu *Bifidobacterium*, když vysvětlil, že různé druhy bifidobakterií bezpochyby tvoří samostatný rod, který možná tvoří spojovací článek mezi bakteriemi mléčného kvašení a bakteriemi rodu *Propionbacterium*. Taxonomická shoda pro tento nový rod však nebyla nalezena a po většinu 20. století byly bifidobakterie, vzhledem k jejich tyčinkovitému tvaru a obligátním fermentačním vlastnostem, klasifikovány jako zástupci rodu *Lactobacillus*. Nakonec byl však, na základě studií popisujících hybridizaci DNA, obsah GC a jejich jedinečné metabolické schopnosti, rod *Bifidobacterium* ustanoven (Ventura et al. 2004).

### 2.2.1.2 Ekologie

Na úvod zmíněné ekologické původy bifidobakterií představují společnou biologickou niku, která je charakterizována skutečností, že velký počet bifidobakteriálních hostitelů pečuje o své potomky (Turroni et al. 2019). Ekologický původ tedy pravděpodobně umožňuje maternální dědivost bifidobakteriálních buněk. Tento předpoklad byl potvrzen zmapováním podobnosti kmenů bifidobakterií matek a jejich potomků (Milani et al. 2015; Avershina et al. 2016). Malý počet bifidobakteriálních (pod)druhů, jako jsou *B. pseudolongum*, *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum* a *B. bifidum*, byl izolován z různých živočišných hostitelů, a z tohoto důvodu jsou tyto uznávány jako kosmopolitní bifidobakteriální taxony. Naproti tomu jiné (pod)druhy, jako je např. *B. breve*, se zdají být mnohem méně rozšířené, pravděpodobně z důvodu adaptivního chování, které je hostitelsky specifické (Milani et al. 2017). Z bifidobakterií, které se vyskytují u primátů, jsou některé druhy běžně identifikovány u dospělých lidí (*B. adolescentis* a *B. catenulatum*), zatímco jiné se běžněji vyskytují ve vzorcích stolice kojených dětí (*B. bifidum*, *B. breve* a *B. longum* subsp. *infantis*) (Turroni et al. 2012). Nebylo však potvrzeno absolutní dělení bifidobakteriálních (pod)druhů na kojenecké a adultní. Taková zjištění mají smysl z hlediska vertikálního přenosu bifidobakteriálních druhů z matky na dítě, který zahrnuje i druhy „dospělého“ typu, jako je *B. adolescentis*

(Duranti et al. 2014; Duranti et al. 2016). Rozdílná převaha jednoho druhu nad jinými v GIT dospělých a novorozenců je ovlivněna odlišným komplexním složením střevní mikrobioty, která je zase výrazně určena stravou hostitele (Turroni et al. 2018).

### 2.2.1.3 Probiotické vlastnosti a jejich využití v praxi

Termín probiotikum je slovo, znamenající v překladu „pro život“ a v současné době se používá k označení bakterií spojovaných s příznivými účinky na zdraví člověka a zvířat (Sanders et al. 2019). Další definicí tohoto slova může být, že probiotikum jsou „živé mikroorganismy, které při konzumaci v přiměřeném množství poskytují pozitivní účinek na zdraví hostitele“ (Guarner & Schaafsma, 1998). Jako příklad prospěšnosti bifidobakterií mimo trávící trakt lze uvést výzkum Lee et al. (2011b), kteří potvrdili, že kmeny *Bifidobacterium* mohou být použity v prevenci vzniku zubního kazu bez následných nepříznivých účinků. Rod *Bifidobacterium* zahrnuje čtyři probiotické kmeny, jmenovitě *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve* a *B. longum* (Chalas et al. 2016).

*B. animalis* je bakterie kolonizující tlusté střevo většiny savců, včetně lidí. Dříve samostatně klasifikované druhy, *B. animalis* a *B. lactis*, byly v současnosti identifikovány jako jeden – *B. animalis* se dvěma poddruhy, *B. animalis* subsp. *animalis* a *B. animalis* subsp. *lactis* (Masco et al. 2004). Guyonnet et al. (2007) zkoumali benefity konzumace fermentovaného mléka obsahujícího *B. animalis* u pacientů se syndromem dráždivého tračníku a došli k závěru, že přispívá ke zvýšení kvality života subjektů, přičemž potvrdili přínos probiotické léčby u této terapie (Isselbacher et al. 2005).

*B. bifidum* osidluje sliznici tlustého střeva a pochvy, čímž zabraňuje střevní kolonizaci druhy jako je *Salmonella* spp. a *Clostridium* spp. u člověka i zvířat (Tejero-Sariñena et al. 2013; El-Sharkawy et al. 2020). Jeho probiotická aktivita souvisí s produkcí kyselin mléčné a octové, které snižují hladinu pH ve střevě a zabraňují tak růstu patogenů (Sarkar & Mandal 2016). Kromě toho *B. bifidum* umožňuje zvýšení absorpce železa, zinku, vápníku a hořčíku ve střevě (Chalas et al. 2016). Tento kmen může být využit při léčbě cirhózy jater (Lo et al. 2014), zácpy a zažívacích poruch u kojenců (Tabbers et al. 2011), a při regulaci postantibiotické funkce střev (Ojima et al. 2020).

*B. breve* vykazuje schopnost inhibovat velké množství patogenních bakterií (Simone et al. 2014), stejně tak jako schopnost utilizovat rostlinnou vlákninu (Crittenden et al. 2002).

Existuje řada studií, jež potvrzují rozvoj nemocí, jako jsou alergie (Ren et al. 2018), či syndrom dráždivého tračníku (Saggiaro 2004), v prostředí se sníženým počtem *B. breve*. Hlavní funkcí této bakterie je provádět fermentaci cukrů za vzniku kyseliny mléčné a octové (Soccol et al. 2010). Bylo prokázáno, že aplikace *B. breve* pozitivně ovlivňuje léčbu řady dětských onemocnění trávicího traktu, včetně post-antibiotického průjmu (Bozzi Cionci et al. 2018).

*B. longum* je prvotním kolonizátorem dětského zažívacího traktu a zároveň nejrepresentativnější součástí dětské přirozené mikrobioty (Garrido et al. 2013). Díky postupnému osidlování jinými bakteriemi (*Eubacterium* a *Bacteroides*) však v dospělosti zastupuje pouze minoritní součást celkového mikrobiomu trávicího traktu člověka (Rinninella et al. 2019). V roce 2002 byly tři dříve odlišované druhy, *B. longum*, *B. suis*, *B. infantis*, klasifikovány společně jako *B. longum*, protože jejich DNA vykazuje významné analogie s 97% podobností 16S rRNA (Sakata et al. 2002). Přítomnost těchto bakterií v GIT má příznivý vliv na snížení laktóзовé intolerance (Oak & Jha 2019) a omezení potravinových alergií (Özdemir 2010), v prevenci průjmů (Szymański et al. 2008) a snížení kolonizace GIT patogeny (Wong et al. 2019). Perzistence těchto bakterií ve střevním traktu je spojena s přítomností fimbrií a silnými elektrostatickými vlastnostmi, které umožňují adhezi *B. longum* ke stěně epitelu (Inturri et al. 2014; Chalas et al. 2016). Tuto adhezi posiluje kyselina teichoová, prvek buněčné stěny *B. longum* (Westermann et al. 2016). Určitá část konkrétních kmenů *B. longum* také vykazuje antioxidační vlastnosti inhibicí peroxidace kyseliny linolové (Lin & Chang 2000). Zmiňovaný mikroorganismus navíc hydrolyzuje žlučové kyseliny, čímž přispívá ke snížení hladiny cholesterolu v těle (Kumar et al. 2012). *B. longum* bylo také úspěšně aplikováno v terapii rakoviny, jelikož bylo odhaleno, že dokáže lokalizovat hypoxické oblasti solidních nádorů a zde po intravenózním podání proliferovat (Yazawa et al. 2000). Může být také využito při regulaci imunitní odpovědi organismu (Ruiz et al. 2017), a regeneraci pokožky (Lukic et al. 2017).

## **2.2.2 *Lactobacillus* spp.**

### **2.2.2.1 Charakteristika**

Laktobacily (z latinského *lactis* – mléko, a *bacillus* – tyčinka) jsou většinou nepohyblivé, fakultativně anaerobní, grampozitivní, nesporulující, dlouhé a štíhlé, někdy zahnuté tyčinky až krátké koryneformní kokobacily (často se spojující do řetízků) s fermentativním

metabolismem (Hammes & Hertel 2009). V současné době je v literatuře popsáno více jak 250 druhů laktobacilů, a neustále jsou výzkumem identifikovány nové, a jedná se tak o nejhojnější rod řádu *Lactobacillales* (Afouda et al. 2017). Jsou to mikroorganismy fermentující sacharidy a hlavním konečným produktem tohoto metabolismu je kyselina mléčná, což laktobacily řadí mezi tzv. bakterie mléčného kvašení (Cai et al. 2012; Herbel et al. 2013). Laktobacily produkují velké množství enzymů zapojených do metabolismu řady sacharidů a lze je klasifikovat podle asimilace hexóz (glukóza, manóza, galaktóza, fruktóza) a pentóz (arabinóza a xylóza), jakožto i dalších druhů sacharidů (El Kaoutari et al. 2013; Drissi et al. 2017). Podle finálního produktu fermentace se laktobacily dělí do dvou skupin: homofermentativní a heterofermentativní, přičemž heterofermentativní laktobacily mohou být dále děleny na fakultativní a obligátní.

Homofermentativní laktobacily jsou klasifikovány výlučně jako obligátní, protože vždy sacharidy metabolizují glykolýzou a produkují pouze kyselinu mléčnou (> 85 %) právě Embden-Meyerhof-Parnasovou dráhou (glykolýzou) asimilací z hexóz, které jsou transportovány membránovými proteiny zvanými permeázy, ABC transportéry (adenosintrifosfát vázající kazetové transportéry) a fosfoenolpyruvát-dependentním fosfotransferázovým systémem. Tento metabolismus je charakterizován rozkladem fruktóza-1,6-bisfosfátu na dvě molekuly glycerinaldehyd-3-fosfátu, které se převádějí na laktát (Pessione 2012; Salvetti et al. 2012).

Obligátně heterofermentativní laktobacily mohou fermentací hexóz produkovat kyselinu mléčnou, kyselinu octovou, ethanol a oxid uhličitý; a fermentací pentózy poté kyselinu mléčnou, kyselinu octovou, a ethanol pomocí fosfoglukonátové a fosfoketolázové dráhy. Tato skupina postrádá aldolázu, která je klíčovým enzymem glykolytického metabolismu (Abdel-Rahman et al. 2013).

Druhy laktobacilů náležící do fakultativně heterofermentativní skupiny mohou využívat jak homo-, tak heterofermentativní metabolismus v závislosti na dostupnosti sacharidů. Mohou fermentovat hexózu glykolytickými cestami nebo použít pentózo-fosfátovou cestu k asimilaci pentózy, protože vlastní enzymy obou drah – aldolázu i fosfoketolázu. Při fermentaci pentóz však na rozdíl od obligátně heterofermentativních druhů neprodukují oxid uhličitý (Sutula et al. 2012; Von Wright & Axelsson 2012; Drissi et al. 2017).

### 2.2.2.2 Ekologie

Koexistence laktobacilů s rostlinami a zvířaty trvá na Zemi již miliony let (Battistuzzi et al. 2004). Laktobacily jsou omezeny náročnými požadavky na růst, a proto osidlují habitaty bohaté na živiny, mezi něž patří: a) fermentované nebo zkažené potraviny a krmivo pro zvířata, b) environment včetně povrchu rostlin a půdy, c) těla bezobratlých a obratlovců (Duar et al. 2017).

Bylo prokázáno, že zástupci rodu *Lactobacillus* se běžně vyskytují v mléčných výrobcích, jako jsou jogurty a sýry, a hrají důležitou roli při jejich výrobě (Mannan et al. 2017). Laktobacily dominují mikrobiotě převážné většiny fermentovaných potravin a jsou organismy schopnými přispívat k jejich kažení (Hammes & Hertel 2009; Gänzle 2015). Fermentace siláže, zeleniny a mnoha obilovin je závislá na mikrobiotě surového materiálu, který je zdrojem bakteriálního inokula, zahrnujícího také laktobacily (Duar et al. 2017). Různé druhy kvašení, včetně procesů mléčného kvašení, vzniku kvásku a fermentace masa, jsou kontrolovány přetrvávající původní mikrobiotou (zahrnující laktobacily), přímo spojenou s produkčním prostředím (Scheirlinck et al. 2009; Chaillou et al. 2013; Ripari et al. 2016). Organismy jsou v průběhu těchto fermentačních procesů vystaveny nepřetržitému množení po celá desetiletí nebo dokonce staletí, a v podstatě jsou v daných fermentačních prostředích zdomácnělé (van de Guchte et al. 2006; Vogel et al. 2011; Ding et al. 2014). Adaptace k habitatu fermentace potravin může být demonstrována např. rychlým a trvalým zmenšováním velikosti genomu *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (van de Guchte et al. 2006); na druhou stranu, genomická analýza izolátů *L. reuteri* ze střeva a kvásku prokázala rozdílné selektivní tlaky ze dvou prostředí, nikoliv však fylogenetickou diferenciaci (Zheng et al. 2015), což naznačuje, že ekologická nika fermentovaných potravin není primárním stanovištěm laktobacilů (Duar et al. 2017).

Laktobacily mohou být často nalezeny v odpadních vodách jako důsledek fekální kontaminace, a příležitostně v půdách jako součást rizosféry rostlin, nebo v důsledku odplavování z fylosféry (Hammes & Hertel 2009). Přestože mohou být laktobacily příležitostně izolovány z rostlinného materiálu jako je např. pšenice, jsou jen vzácnou a minoritní složkou rostlinných endofytů (Minervini et al. 2015) a mohou být detekovány pouze na rostlinném povrchu, kde se nacházejí stopová množství sacharidů podporující jejich růst (Mercier & Lindow 2000). Počet laktobacilů se však zvyšuje při poškození rostlinných pletiv,



kdy se jednoduché a složité sacharidy mohou stát substráty dostupnými pro laktobacily. Vzhledem k tomu, že je výskyt laktobacilů v této ekologické nise pouze sporadický, nejsou považovány za rostlinné symbionty, ale spíše za jejich epifyty (Müller & Lier 1994).

Laktobacily jsou běžně izolovány z různých druhů hmyzu, včetně much a včel, a z obratlovců, zejména pak ptáků, hlodavců, lidí a hospodářských zvířat. Hostitelský rezervoár laktobacilů je však pravděpodobně širší, protože vědecké výzkumy bývají z velké části omezeny na domestikovaná zvířata a lidi (McFrederick et al. 2013; Martino et al. 2016). Primárním stanovištěm u zvířat jsou tělesné orgány, v nichž je skladována potrava (např. předžaludek a vole), a které lze nalézt jak u hmyzu (mouchy, včely, čmeláci), tak u obratlovců (drůbež, hlodavci) (Duar et al. 2017). U člověka se laktobacily vyskytují v ústní dutině, GIT a ve vagině (Walter 2008).

### **2.2.2.3 Probiotické vlastnosti a jejich využití v praxi**

Zdravotní přínosy fermentovaných potravin a přidaná hodnota požití bakterií mléčného kvašení, včetně laktobacilů, za účelem prevence nebo léčby některých konkrétních onemocnění, byly již v minulosti prokázány, a lze konstatovat, že bez ohledu na původ (tradiční nebo průmyslový) jsou fermentované potraviny aktivními zdroji laktobacilů, kteří vstupují do zažívacího traktu, kde mohou mít pozitivní, ale i negativní vliv na hostitele (George et al. 2018).

Probiotika zahrnující bakterie mléčného kvašení se používají při léčbě široké škály gastrointestinálních onemocnění, zahrnující infekční průjemy, syndrom dráždivého tračníku a zánětlivá onemocnění střev (Coriat et al. 2017). Adheze laktobacilů ke střevní tkáni epitelu souvisí nejen s jejich dobrou adhezní schopností, ale také s přítomností mucinů potřebných k zachycení, ochraně a pokrytí střevního povrchu (Nishiyama et al. 2016). Navíc může adheze laktobacilů zahrnovat vazbu na specifický buněčný povrchový receptor, hydrofobní interakci mezi buněčným povrchem a povrchem střevní buňky, nebo může dojít k vazbě na extracelulární matici jako např. fibronectin, kolagen a vitronektin (Howard et al. 2000).

Laktobacily přežívají a množí se ve střevech v porovnání s řadou jiných probiotických bakterií lépe, jelikož mají geny zodpovědné za degradaci a využití jak jednoduchých cukrů, tak komplexních sacharidů, a jsou schopny přežít i ve velmi kyselém prostředí (Corcoran et al. 2005). Laktobacily jsou dále známy svou schopností produkovat širokou škálu sloučenin,

kteře působí přímým antimikrobiální účinek proti virům a bakteriím. Mezi tyto sloučeniny patří organické kyseliny, peroxid vodíku a bakteriociny (Lebeer et al. 2008; Liévin-Le Moal & Servin 2014; Gaspar et al. 2018). Kyselina mléčná (či kyselina octová) v nedisociované formě může difúzně, či s podporou nosičů procházet plazmatickou membránou patogenních bakterií do cytoplazmy, kde uvolní protony, což způsobí její okyselení, a v konečné fázi poškození bílkovin a DNA, a následnou inhibici energetických procesů a syntézy makromolekul bakteriální buňkou (Ogawa et al. 2001; Lebeer et al. 2008). Antimikrobiální účinek peroxidu vodíku je spojen s akutní toxicitou samotné molekuly, či hydroxylových a superoxidových radikálů, které vedou k oxidačnímu stresu a zhoršují funkce bakteriálních buněk (Tomás et al. 2003). Bakteriociny laktobacilů mají široké spektrum účinku zahrnující anaeroby, grampozitivní bakterie, i gramnegativní bakterie (Drissi et al. 2015).

Laktobacily přispívají k udržování zdraví gastrointestinálního traktu a nejsou obvykle považovány za patogeny u zdravých hostitelů, s výjimkou zubního kazu (Aguirre & Collins 1993; Cannon et al. 2005). Přestože jsou tedy obecně považovány za ochranné organismy, stále častěji je popisována jejich role v patogenizi některých onemocnění, obzvláště u imunokompromitovaných pacientů (Schlegel et al. 1998). Mezi tato onemocnění je řazena např. infekční endokarditida, bakterémie a lokalizované infekce (Cannon et al. 2005).

## **2.3 Antibakteriální látky**

Z historického hlediska jsou antibakteriální látky patrně nejúspěšnější formou chemoterapie uplatňované v humánní i veterinární medicíně (Aminov 2010). V nepřímé formě byly antibakteriální látky konzumovány s potravou již ve starověku (Cook et al. 1989; Nelson et al. 2010) a např. v čínské lidové medicíně jsou takto používány dodnes (Wong et al. 2010). Cílené podávání antiinfektiv v podobě antibiotik je poté datováno do druhé poloviny dvacátého století (Mahoney et al. 1943).

### **2.3.1 Antibiotika**

Zavedení antibiotik do klinické praxe způsobilo revoluci v léčbě a managementu infekčních chorob vzhledem k tomu, že v předchozích staletích byla tato onemocnění hlavní příčinou nemoci a úmrtnosti lidské populace (Aminov 2017). Prvním masově produkovaným antibiotikem se stal po objevu Alexandra Fleminga penicilin (Chain et al. 2005). Identifikace kyseliny 6-aminopenicilanové jako jádra penicilinu vědci Beecham Research Laboratories ve

Velké Británii poté umožnila syntézu a výrobu četných polosyntetických penicilinů (Batchelor et al. 1959). Hlavní vývoj byl zaměřen na peniciliny rezistentní na penicilinázu, jako je methicilin, oxacilin a nafcillin; následované deriváty účinnými proti gramnegativním bakteriím - aminopeniciliny (ampicilin, amoxicilin a bacampicilin), karboxypeniciliny (karbenicilin a tikarcilin) a ureidopeniciliny (mezlocillin, azlocillin a piperacilin). Další vývoj, směřující k překonávání rezistence a rozšiřování rozsahu cílových organismů, vedl ke vzniku kombinací inhibitorů  $\beta$ -laktamáz (kyselina klavulanová, sulbaktam nebo tazobaktam) a aminopenicilinu, tikarcilinu nebo piperacilinu (Wright 1999). Přestože je tato skupina antibiotik sjednocena pod záštitou  $\beta$ -laktamové struktury, je někdy dělena do tří tříd: peniciliny, cefalosporiny a karbapenemy (Aminov 2017). Jedná se o nejčastěji předepisovaná širokospektrá antibiotika v ambulantní péči (Lee et al. 2014; Yimenu et al. 2019), a jako taková přispěla k významnému problému rezistence vůči  $\beta$ -laktamům u patogenních bakterií (Boucher et al. 2009).

Opravdovou první masově produkovanou skupinou antibiotik byly sulfonamidy, které mezi lety 1937 a 1943 přispěly k 24–36% poklesu poporodní úmrtnosti, 17–32% poklesu úmrtnosti v důsledku zápalu plic a k 52–65% poklesu úmrtnosti na spálu (Jayachandran et al. 2010). Celkově sulfonamidy snížily úmrtnost o 2–3 % a prodloužily délku života o 0,4–0,7 roku (Aminov 2017). S od počátku nedostatečnou regulací trhu těchto antibakteriálních látek se pojí široce rozšířená rezistence, která je všeobecně spojena s integrony 1. třídy, kdy mobilní genetické elementy napomáhají rychlému šíření genů antimikrobiální rezistence (Aminov 2011).

Další skupinou s omezeným použitím, avšak ne z důvodu bakteriální rezistence, ale kvůli samotnému mechanismu účinku jsou polypeptidy (Prenner et al. 1997). Tato antibiotika fungují jako kanály a zvyšují propustnost bakteriální buněčné membrány, do které se začlení, čímž se poruší iontový gradient mezi cytoplazmou a extracelulárním prostředím (Urry 1971). Pokud jsou polypeptidy lidem či zvířatům podány v koncentracích nižších, než je třeba k potlačení bakteriálního růstu, působí hemolyticky, a proto jsou obvykle používány pouze k topickému ošetření neporušených tkání (Oddo & Hansen 2017).

Antibiotikem, které zaznamenalo výrazné úspěchy v léčbě dalšího smrtelného onemocnění – tuberkulózy, je streptomycin, náležící do skupiny aminoglykosidů (Grove & Hetzel 1968). S postupně se rozvíjející rezistencí původce onemocnění, *Mycobacterium tuberculosis* (Plikaytis et al. 1994), byly aminoglykosidy nahrazeny účinnějšími antibakteriálními látkami

s menšími vedlejšími účinky (Krause et al. 2016), avšak např. gentamicin se stále používá v nemocničních zařízeních k léčbě závažných infekcí (Kushner et al. 2016) a amikacin se běžně používá na jednotkách intenzivní péče pro léčbu život ohrožujících infekcí způsobených gramnegativními bakteriemi (Marsot et al. 2017).

První látkou, která v klinických testech prokázala stejně širokou použitelnost jako penicilin, byl v roce 1945 ze *Streptomyces aureofaciens* izolovaný chlortetracyklin (Wright & Schreiber 1949). Tetracyklin byl také prvním antibiotikem, na kterém byly v podobě krmného aditiva přímo demonstrovány vlastnosti stimulující růst zvířat (Castanon 2007). Vzhledem k tomu, že po tomto objevu byly antibiotické stimulatory růstu hojně podávány hospodářským zvířatům, došlo k masivnímu rozvoji bakteriální rezistence u tetracyklinů první generace (Chopra & Roberts 2001). Tento fakt přispěl k zákazu užívání antibiotických stimulatorů růstu v živočišné produkci na území EU s účinností od roku 2006 (EU 2003). Chemická struktura přírodních tetracyklinů položila základy vývoji druhé generace (doxycyklin, minocyklin), která je dodnes jednou z nejúčinnějších tříd antibiotik uplatňujících se v boji proti bakteriální rezistenci (Nelson & Levy 2011). Kromě antibakteriálních účinků vykazují tetracykliny také antioxidační aktivitu a modulují aktivaci a proliferaci imunitních buněk (Aminov 2013). Dále je u nich možné pozorovat silné protizánětlivé účinky, mají neuroprotektivní, antiproteolytické a antiapoptotické vlastnosti a inhibují angiogenezi a metastatický růst (Garrido-Mesa et al. 2013). Nová (třetí) generace tetracyklinů (tigecyklin) je užívána k intravenózní léčbě komplikovaných kožních, abdominálních a respiračních infekcí. Je aktivní vůči multirezistentním mikroorganismům zahrnujícím *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* a *E. coli* a i po letech užívání nepřekračuje míra rezistence u těchto bakterií 10 % (Pournaras et al. 2016).

U některých tříd antibiotik, jako jsou pro léčbu bakteriální meningitidy používané amfenikoly, se lze setkat s toxicitou a vedlejšími účinky při dlouhodobém používání (Chambers 2005). Aby se předešlo těmto problémům, byly syntetizovány jiné deriváty amfenikolu a některé z nich (thiamfenikol, azidamfenikol a florfenikol) vstoupily do klinické a veterinární praxe. Relativně jednoduchá molekula chloramfenikolu také otevřela možnost vzniku hybridních antibiotik, ve kterých jsou segmenty dvou léčiv kovalentně spojeny do jedné molekuly (Dinos et al. 2016).

Mezi další třídy antibiotik jsou řazeny např. lipoproteiny s nejvýznamnějším zástupcem kolistinem (polymyxin E) (Storm et al. 1977). Toto antibiotikum, které bylo kvůli svým výrazným vedlejším účinkům používáno pouze omezeně, je nyní vzhledem k rezistenci gramnegativních bakterií vůči celé řadě antibiotik tzv. antibiotikem poslední volby proti závažným a obtížně léčitelným infekcím, jako jsou ty způsobené multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae* a *A. baumannii* (Falagas et al. 2008). Rezistence bakterií (např. *E. coli*) ke kolistinu je v současnosti velice rychle se šířícím fenoménem představujícím závažnou hrozbu pro lidské zdraví (Yamaguchi et al. 2020).

Z hlediska kontroly infekcí, jsou makrolidy (např. erytromycin) druhou nejvíce předepisovanou třídou antibiotik po  $\beta$ -laktamech, která se zaměřuje na podobně širokou škálu bakteriálních patogenů, i když s menší účinností proti gramnegativním bakteriím (Aminov 2017; Yimenu et al. 2019). Zjevná výhoda makrolidů oproti  $\beta$ -laktamům je jejich působení proti bakteriím, kterým chybí buněčná stěna (mykoplazmata) (Block et al. 1995). Makrolidy patří také mezi první možnosti léčby u pacientů s alergiemi na penicilin (Solensky et al. 2000).

Klinicky neúčinnou antibiotickou látkou proti gramnegativním patogenům vzhledem k bakteriální efluxní aktivitě (Livermore 2003a), avšak významnou při léčbě infekcí způsobených multirezistentními streptokoky, VR enterokoky a MRSA je linezolid (oxazolidinonové antibiotikum) (Hashemian et al. 2018).

Významné místo zaujímá glykopeptidové antibiotikum vankomycin, které je možností poslední volby pro život ohrožující stavy, jakými je septikémie a komplikované infekce dolních cest dýchacích, kůže a kostí, způsobených gram pozitivními bakteriemi (Boneca & Chiosis 2003). Vznik a šíření VR enterokoků (Arias & Murray 2012), VISA (Hiramatsu et al. 1997) a VRSA (Chang et al. 2003; Gardete & Tomasz 2014) je však současným významným problémem v léčbě onemocnění.

Jedinečnost streptograminových antibiotik tkví v tom, že kmen, kterým jsou syntetizována, produkuje dvě nepřibuzná antibiotika: streptogramin A, což je cyklická hybridní peptid-polyketidová makrolaktonová sloučenina; a streptogramin B, který je cyklickým depsipeptidem (Cocito 1983). Kombinace těchto dvou sloučenin má za následek silný synergický antibakteriální účinek, protože navázání streptograminu A na bakteriální ribozom

usnadňuje vazbu streptograminu B na stejný cíl a synergický účinek látek tak má za následek rychlou smrt bakteriálních buněk (Di et al. 1989).

Další třídou s jedinečným mechanismem antibakteriální aktivity jsou ansamyciny, konkrétně rifamycin, který se zaměřuje na bakteriální DNA-dependentní RNA polymerázu, bez zkřížené rezistence s jinými antibiotiky (Wehrli & Staehelin 1971).

Třetí místo nejčastěji předepisovaných skupin antibiotik po  $\beta$ -laktamech a makrolidech zaujímají chinolony (Yimenu et al. 2019). Vzhledem k tomu, že syntéza a testování fluorochinolonů byly zaměřeny na širokou škálu bakterií, jsou vhodnými léky pro kontrolu infekcí, způsobených jak grampozitivními, tak gramnegativními bakteriemi. Proto byly chinolony v posledních letech preferovanými antibiotiky v ambulantní péči. Tento trend je však vysoce nežádoucí, protože časté používání takto širokospektrálních antibiotik může vést k prohlubování problému bakteriální antibiotické rezistence (FDA 2016).

### **2.3.1.1 Antibiotická bakteriální rezistence**

Schopnost patogenů eliminovat antibakteriální aktivitu penicilinu degradací za pomoci enzymů byla zaznamenána již na počátku jeho užívání (Barber 1947). Antimikrobiální rezistence je tak přirozeným biologickým fenoménem, vznikajícím přímou expozicí infekčních agens antimikrobiálními látkami používaných v medicíně, či v zemědělství (Byarugaba 2005), avšak v současnosti dochází k urychlení rozvoje rezistence patogenů (Budiño et al. 2005) a k reziduální kontaminaci potravního řetězce antibiotickými látkami (Roselli et al. 2005). WHO (2017) dělí bakteriální patogeny rezistentní vůči antibiotikům do tří skupin dle důležitosti výzkumu a vývoje účinných antibiotik – Tabulka 2.5.

Vznik bakteriální rezistence k antibiotikům je jedním z nejlépe zdokumentovaných případů současné biologické evoluce, přestože původ a princip vzniku rezistenčních mechanismů není stále přesně známý (Davies 1994). Geny, které se v současnosti uplatňují v rámci bakteriální antibiotické rezistence, se vyvinuly pravděpodobně za jinými účely (Baquero & Blázquez 1997). Předpokládá se, že mnoho determinant rezistence, které se nyní nacházejí na plasmidech, pochází z chromozomů jiných druhů, ačkoli jen několik z původních organismů bylo s určitostí identifikováno (Livermore 2003b). Z tohoto pohledu lze rezistenci považovat za náhodný produkt, daný interakcí antibiotika a konkrétního genotypu, kdy akvizice některých genů je v převládajícím antibiotickém prostředí téměř neutrální, avšak může

představovat latentní potenciál pro selekci, která se uplatní pouze za podmínek antibiotického tlaku (Shapiro 1997). Lze tedy rozlišit mikroorganismy považované za „přirozeně“ rezistentní (primární rezistence) na jednu nebo více antimikrobiálních látek, a poté mikroorganismy se „získanou rezistencí“ (sekundární rezistence), které byly původně citlivé na antimikrobiální sloučeninu, avšak důsledkem mutací v chromozomálních genech nebo získáním externích genetických determinant rezistence nabyly schopnost antibakteriálním sloučeninám vzdorovat (Munita & Arias 2016).

**Tabulka 2.5:** Seznam patogenů prioritních pro výzkum a vývoj nových antibiotik dle WHO (dle WHO 2017)

<b>PRIORITA 1: KRITICKÁ</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i> : karbapenemy-rezistentní
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : karbapenemy-rezistentní
<i>Enterobacteriaceae</i> *: karbapenemy-rezistentní, třetí generace cefalosporinů-rezistentní
<b>PRIORITA 2: VYSOKÁ</b>
<i>Enterococcus faecium</i> : vankomycin-rezistentní
<i>Staphylococcus aureus</i> : meticilin-rezistentní, vankomycin-intermediate a rezistentní
<i>Helicobacter pylori</i> : klaritromycin-rezistentní
<i>Campylobacter</i> : fluorochinolony-rezistentní
<i>Salmonella</i> spp.: fluorochinolony-rezistentní
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> : třetí generace cefalosporinů-rezistentní, fluorochinolony-rezistentní
<b>PRIORITA 3: STŘEDNÍ</b>
<i>Streptococcus pneumoniae</i> : penicilin-necitlivý
<i>Haemophilus influenzae</i> : ampicilin-rezistentní
<i>Shigella</i> spp.: fluorochinolony-rezistentní

\* *Enterobacteriaceae* zahrnují: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp.

Tímto způsobem se vyvinuly rozdílné mechanismy bakteriální rezistence, jakými je dle Fluit et al. (2001): přítomnost enzymu, který inaktivuje antimikrobiální látku; přítomnost alternativního enzymu namísto enzymu, který je inhibován antibakteriální látkou; mutace cílového místa působení antibiotika, která snižuje vazbu antimikrobiálního činidla; posttranskripční nebo posttranslační modifikace cílového místa působení antibiotika, která snižuje vazbu antimikrobiálního činidla; snížené vychytávání antimikrobiální látky; aktivní eflux antibiotika z buňky; nadprodukce cílového místa působení antibiotika; či exprese nebo suprese genu *in vivo* v porovnání se situací *in vitro*.

Bakteriální antibiotická rezistence je celosvětově monitorována WHO, která stanovila 5 cílů k omezení šíření tohoto nežádoucího fenoménu: a) zlepšit informovanost a porozumění antimikrobiální rezistenci prostřednictvím efektivní komunikace, vzdělávání a školení, b) posílit znalostní základnu a podávat důkazy prostřednictvím pozorování a výzkumu, c) omezit výskyt infekcí prostřednictvím účinné sanitace, hygieny a opatřeními vedoucími k prevenci vzniku onemocnění, d) optimalizovat používání antimikrobiálních léčiv u lidí i zvířat, a e) rozvíjet důvody pro ekonomicky udržitelné investice, které berou v úvahu potřeby všech zemí a zvýšit investice do vývoje nových léků, diagnostických nástrojů, vakcín a jiných intervenčních nástrojů (WHO 2015).

V Evropské unii je monitoringem antibiotické rezistence pověřeno ECDC. V roce 2018 bylo v EU zahájeno několik urgentních šetření s podezřením na šíření antibiotické rezistence – jeden se týkal přeshraničního šíření karbapenemázy-produkující *K. pneumoniae* cestovateli (ECDC 2018a), dalších pět se týkalo zdravotnických prostředků, včetně protetických chlopní, endoskopů, ústních vod a rukavic, které byly kontaminovány *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, netuberkulózními mykobakteriemi a smíšenými koloniemi mikroorganismů (ECDC 2018b). A dále ECDC zveřejnilo informace o výskytu rezistence na ceftazidim-avibactam u enterobakterií rezistentních na karbapenemy (ECDC 2018c). Česká republika je také zapojena do programu zaměřeného na monitoring a omezování antimikrobiální rezistence v rámci Sítě evropského dohledu nad antimikrobiální rezistencí (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, EARNS-net). Podle průběžných hlášení je míra reprezentativnosti vzorků z tohoto území vysoká a do dohledu se zapojuje 100 laboratoří, které pracují v souladu s EARNS-net pokyny, dle kterých testují klinické vzorky, a pokrývající celkově 85 % populace ČR. Z výsledků poté vyplývá, že míra výskytu



rezistentních patogenů je v České republice pod hranicí evropského průměru např. v případě *S. aureus*, tak *E. coli*, *K. pneumoniae* i *E. faecium* (ECDC 2018b).

## 2.4 Alternativní antibakteriální látky

V současné době hrají přírodní látky stále velmi významnou roli v procesu objevování a vývoje nových léčiv (Newman & Cragg 2020), protože přírodní produkty jsou bohatým zdrojem sloučenin s antibakteriální aktivitou (Saleem et al. 2010). Významné procento nových antibiotik jsou buď samotné přírodní produkty, nebo jsou z nich odvozeny (Gohel et al. 2006). V mnoha případech lze přírodní alternativy v podobě jedinečných bioaktivních sloučenin nalézt v mikroorganismech, rostlinách a živočišných druzích, kterým se daří v extrémním prostředí, jako jsou deštné pralesy, pouště a horké prameny (Dai et al. 2020). Stávající antibiotická bakteriální rezistence a obavy z nemožnosti zastavit její šíření, vzhledem k rostoucímu počtu multirezistentních organismů, směřují současný výzkum a vývoj třemi hlavními proudy: hledání nových antibiotik, vývoj nových antibiotických pomocných látek a screening alternativ k antibiotikům (Liu et al. 2019) jak v humánní medicíně (Rello et al. 2019), tak v živočišné produkci (Van Boeckel et al. 2015).

V humánní medicíně se v současnosti lze setkat s alternativami k antibiotikům ve formě přírodních léčiv (Charlop-Powers et al. 2015), a látek s novými mechanismy účinku (Ling et al. 2015). Dále také s modifikací léčiv (Bush & Bradford 2016), jejich hybridizací (Domalaon et al. 2018) a s použitím nanočástic (Kwon et al. 2017), s fágovou terapií (Abedon et al. 2017) či endolysiny (Schmelcher et al. 2012), vakcinací (Atkins & Flasche 2018) a použitím protilátek (DiGiandomenico & Sellman 2015), imunomodulací (Hancock et al. 2012), virulencními supresory (Roberts et al. 2018), modifikací mikrobioty (Raffatellu 2018), antimikrobiálními peptidy (Izadpanah & Gallo 2005), inhibitory antibiotické rezistence (Wong & van Duin 2017), bakteriociny (Cavera et al. 2015), predátorskými bakteriemi (Kadouri et al. 2013) a RNA terapií (Greene 2018). V živočišné produkci se na území EU se zákazem užívání antibiotických stimulátorů růstu (EU 2003) vývoj a výzkum na poli antibakteriálních substancí zaměřuje především na hledání nových neantibiotických látek se stimulačním účinkem na produkci zvířat (Roselli et al. 2005) a na omezení možného rizika kontaminace živočišných produktů při zastavení subterapeutického podávání antibiotik, jak bylo v předchozích dekádách zvykem (Skřivanová et al. 2011). Mezi takovéto látky se řadí: fytogenní doplňkové látky, např. skořice (Toghyani et al. 2011), tymián

(Jarriyawattanachaikul et al. 2016), či černucha setá (Ghasemi et al. 2014); esenciální oleje např. z oregana (Peng et al. 2016) nebo máty peprné (Emami et al. 2012); probiotika a synbiotika (Marinho et al. 2007); synbiotika (Bomba et al. 2006); jílové minerály (Lemke et al. 2001); a organické kyseliny (Hansen et al. 2007). Užívání některých neantibiotických stimulátorů růstu, používaných za účelem zvýšení produkce namísto antibiotik, je v současné době také omezováno. Příkladem mohou být veterinární přípravky pro potravinová zvířata s obsahem oxidu zinečnatého, u kterého je celková bilance přínosů a rizik negativní. Důvodem je skutečnost, že hodnota anti-diarrhoálního účinku oxidu zinečnatého nepřekračuje hodnotu jeho akumulací rychlosti v životním prostředí a riziko jeho potenciálního příspěvku ke zvýšení bakteriální rezistence (EMA 2017).

## **2.4.1 Rostlinné oleje s obsahem mastných kyselin o střední délce řetězce**

### **2.4.1.1 Charakteristika**

Rostlinné oleje jsou základními složkami výživy lidí a zvířat po celém světě a obsahují různé biologicky aktivní složky, jako jsou karotenoidy, tokoferoly (Chiu et al. 2009), koenzym Q10 (de Souza Guedes et al. 2017), vitamíny, kyselina lipová, deriváty polyfenolů a jiné (Gulaboski et al. 2013). Jejich hlavní složku však představují mastné kyseliny (Anushree et al. 2017), což jsou karboxylové kyseliny s nerozvětvenými uhlíkovými řetězci, z nichž některé mohou obsahovat dvojně vazby (McGaw et al. 2002). Mastné kyseliny s dvojnými vazbami mezi některými z uhlíků jsou klasifikovány jako nenasycené a ty bez dvojných vazeb jako nasycené. Dále lze tyto sloučeniny dělit podle délky jejich uhlíkových řetězců na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (<6 uhlíků; SCFA), mastné kyseliny se středním řetězcem (6 až 12 uhlíků; MCFA), mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (13 až 21 uhlíků; LCFA) a mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (> 22 uhlíků; VLCA). Biologická aktivita mastných kyselin se liší v závislosti na stupni jejich nenasycení a délce (Desbois & Smith 2010).

Plody tropických palm, jakými jsou např. tucuma (*Astrocaryum vulgare*), kokosovník (*Cocos nucifera*) a palma olejná (*Elaeis guineensis*), jsou jedním z ekonomicky nejdůležitějších zdrojů rostlinných olejů, o nichž je známo, že obsahují hlavně MCFA, s prevalencí kyseliny laurové (C<sub>12:0</sub>; LA). Předpokládá se, že mastné kyseliny jsou odpovědné za antibakteriální aktivitu palmových olejů, protože se ale obvykle vyskytují ve formě triglyceridů, bylo prokázáno, že pro uplatnění jejich antibakteriálního účinku je nezbytné štěpení do podoby volných mastných kyselin, či monoglyceridů (Hovorková et al. 2018).

MCFA vykazují inhibiční účinek vůči růstu řas (McGrattan et al. 1976), plísní (Era et al. 2015), prvoků (Faciola & Broderick 2014), a jak gramnegativních (Sun et al. 2003; Skřivanová et al. 2006; Thormar et al. 2006), tak grampozitivních bakterií (Bergsson et al. 2001). Také inhibují produkci bakteriálních virulenčních faktorů jako jsou  $\beta$ -laktamázy, toxiny syndromu toxického šoku (Ruzin & Novick 2000) a hemolysiny (Liaw et al. 2004). Kromě LA obsahují oleje výše uvedených palem také určitý podíl kyseliny kaprylové (C<sub>6:0</sub>), kaprinové (C<sub>8:0</sub>) a kapronové (C<sub>10:0</sub>), které také vykazují různé antimikrobiální vlastnosti (Hanczakowska et al. 2011; Huang et al. 2011; Kollanoor-Johny et al. 2012). Batovska et al. (2009) dochází k závěru, že jejich účinek vůči růstu bakterií je zesílen, když jsou MCFA esterifikovány glycerolem a vytvářejí např. monolaurin. Ubgogu et al. (2006) pozorují *in vitro* inhibiční účinek oleje z palmových jader *E. guineensis* na *S. aureus*. Dále je známo, že LA vykazuje synergickou antistafylokokovou aktivitu v kombinaci s monolaurinem (Batovska et al. 2009), kyselinou mléčnou (Tangwatcharin & Khopaibool 2012), a zejména pak s gentamycinem (Kitahara et al. 2006).

#### **2.4.1.2 Mechanismus antibakteriálního účinku**

Přesný mechanismus účinku podílící se na antimikrobiálních vlastnostech mastných kyselin a monoglyceridů nebyl doposud objasněn. Ve skutečnosti mohou být různé bakterie a viry inaktivovány různými mechanismy, pro něž bylo identifikováno několik možných cílů (Desbois & Smith 2010). Yoon et al. (2015 & 2017) použil mikrobalační disipaci křemene (Quartz crystal microbalance-dissipation; QCM-D) a fluorescenční mikroskopii pro zkoumání působení LA, laurylsulfátu, monolaurinu, kyseliny kaprinové a monokaprinu na destabilizaci bakteriálních lipidových dvojvrstev, které tvoří membránu bakteriálních buněk. Tyto studie prokázaly, že testované antimikrobiální látky měly odlišné účinky na lipidovou dvojvrstvu, přičemž LA, laurylsulfát a kyselina kaprinová způsobily tvorbu tubulů, laurylsulfát a monokaprin úplnou solubilizaci dvojvrstvy, a monolaurin svým působením vytvořil sférické výčnělky z lipidové dvojvrstvy. Zmíněné výsledky naznačují, že ne všechny mastné kyseliny a jejich deriváty narušují bakteriální membrány stejným způsobem, i když jsou délky jejich uhlíkových řetězců stejné (Yoon et al. 2015; Yoon et al. 2017). V nižších koncentracích mohou mastné kyseliny a monoglyceridy inhibovat bakteriální růst tím, že brání dělení buněk interferencí s esenciálními buněčnými procesy v důsledku ztráty buněčného obsahu skrz membránu se zvýšenou permeabilitou. Ačkoli tímto není buňka usmrcena, ztráta materiálu její dělení zastaví za předpokladu interakce mastných kyselin či jejich monoglyceridů s

intracelulárním cílem (Churchward et al. 2018). Předpokládá se, že membránové proteinové komplexy, vázané ve vnitřní membráně a zapojené do transportního řetězce elektronů, by mohly být inhibovány přítomností mastných kyselin, anebo monoglyceridů mimo buňku, přičemž jejich průnik vnější membránou, peptidoglykanovou vrstvou a periplazmatem nemusí být nutný. Mastné kyseliny a monoglyceridy mohou také interferovat s jinými buněčnými procesy vázanými na membránu, jakými je příjem živin nebo inhibice enzymů (Desbois & Smith 2010). Mechanismem účinku, který by vyžadoval vstup antibakteriální látky do buňky, je inhibice biosyntézy mastných kyselin uvnitř samotné bakteriální buňky (Zheng et al. 2005; Sado-Kamdem et al. 2009). Inhibice biosyntézy mastných kyselin je již dlouho cílem ve vývoji léčiv, protože nabízí cíl, který stávající antimikrobiální látky nevyužívají, čímž existuje pouze malá šance na vznik zkřížené rezistence (Wang et al. 2020).

Nejen lipidová struktura buněčné membrány se může měnit vlivem exogenních lipidů, jelikož významně může být ovlivněna také struktura proteinová. Organizaci membránových proteinů mohou totiž ovlivňovat různé faktory, včetně membránového napětí (Robertson 2018). Lze předpokládat, že se zvyšujícím se membránovým napětím, například po ošetření lipidových dvouvrstev vysokými koncentracemi LA (Yoon et al. 2015), je funkce membránového proteinu pozměněna (Zhang & Li 2019). Taková okolnost může ovlivnit antibakteriální aktivitu antibiotik, jako je například oxacilin, která silně závisí na jeho schopnosti inhibovat syntézu bakteriální buněčné stěny přednostně vazbou na proteiny vázající penicilin (penicillin binding proteins; PBPs), které jsou umístěny uvnitř bakteriální buněčné stěny (Papich 2007). Protože stabilita membránového proteinu závisí také na membránové energii, může LA snížit fluiditu membrány a narušit systém transportu elektronů, pravděpodobně v důsledku omezení pohybu nosičů uvnitř membrány (Desbois & Smith 2010). Případné poškození membránových elektronových nosičů může vést ke změně intracelulárního a extracelulárního pH, což může způsobit srážení PBPs (Roch et al. 2019) a ztrátu schopnosti interakce s antibiotiky. Kromě toho může změna extracelulárního pH ovlivnit aktivitu antibiotických látek, protože účinnost těchto látek je na pH závislá (Baudoux et al. 2007; Yang et al. 2014b).

#### **2.4.1.3 Metabolismus**

Absorpce a transport MCFA se vzhledem ke strukturálním rozdílům významně odlišuje od procesů, jimž podléhají v těle LCFA (Marten et al. 2006). Po hydrolizaci lipázami dutiny ústní a žaludku v gastrointestinálním traktu jsou všechny mastné kyseliny, včetně MCFA,

uvolněny z triglyceridů. Na rozdíl od MCFA, jsou LCFA kombinovány s bílkovinami zabalením do tzv. chylomikronů – lipoproteinů (Traul et al. 2000), které jsou poté transportovány do periferního krevního oběhu lymfatickým systémem a většinou obcházejí játra (Ockner et al. 1972; Ruppín & Middleton 1980). Oproti tomu kratší řetězce MCFA umožňují jejich přímou přepravu do jater bez tvorby chylomikronů (Bloom et al. 1951). Lipoproteiny vytvořené z LCFA cirkulují v krvi a dodávají mastné kyseliny do tkání, přičemž mohou přispívat k hromadění tělesného tuku na stěnách tepen, což zvyšuje riziko vzniku kardiometabolických poruch na rozdíl od MCFA, které odolávají přilnavání ke stěnám tepen, jelikož nejsou snadno re-esterifikovatelné. Z tohoto důvodu je méně pravděpodobné, že MCFA přispívají k ukládání a tuhnutí tuků v krevním řečišti (Wallace 2019). Metabolismus všech mastných kyselin probíhá v játrech  $\beta$ -oxidací na vnější mitochondriální membráně a je katalyzován acyl-koenzymem A syntetázou (Black & DiRusso 2003). MCFA se v játrech vždy oxidují na ketolátky, zatímco metabolismus LCFA závisí na celkovém metabolickém stavu organismu. Pokud organismus potřebuje energii, LCFA jsou transportovány do mitochondrií, kde pokračuje jejich oxidační proces, karnitinpalmitoyltransferázu I (CPT1). Naproti tomu, MCFA nevyžadují pro přepravu do mitochondrií CPT1, protože mohou vstupovat do mitochondrií přímo a k přenosu MCFA do jater tak dochází velice rychle (Zulkanain et al. 2020). Transport MCFA není navíc pod metabolickou kontrolou L-malonyl-CoA a jejich depozice v tukových tkáních je nízká (Schönfeld & Wojtczak 2016). Mitochondriální metabolismus MCFA vede enzymaticky přes acyl-CoA dehydrogenázu středně dlouhých mastných kyselin k produkci ketolátek, jakými jsou především  $\beta$ -hydroxybutyrát (BHB), acetoacetát a aceton (Papamandjaris et al. 1998). Tyto ketolátky se dále přeměňují na acetyl-CoA, hlavní substrát pro produkci adenosintrifosfátu v Krebsově cyklu (Lei et al. 2016). MCFA jsou schopné procházet mitochondriální membránou svalů bez zprostředkování karnitinovým transportním, tzv. kyvadlovým systémem, což z nich dělá snadno dostupný zdroj energie (Williamson et al. 1968). Množství energie získané z ketonových látek je vzhledem k rozdílům v jejich mitochondriálním metabolismu ve srovnání s glukózou vyšší (Kashiwaya et al. 1994). Ketolátky, které vznikají oxidací MCFA, mohou být transportovány do různých tkání, včetně mozku, který však primárně závisí na glukóze jakožto zdroji energie, protože mastné kyseliny nemohou procházet na rozdíl od ketolátek hematoencefalickou bariérou, a ty tím tak přispívají k udržení energetické homeostázy mozku (Lei et al. 2016; Wallace 2019). Ketolátky vzniklé z MCFA jsou využívány jako zdroj energie během nedostatku glukózy, stavu známém jako ketóza (Morris 2005; Sumithran et al.

2013). Acetoacetát a BHB mohou, jak již bylo zmíněno výše, procházet buněčnými membránami volně a být tak převedeny zpět na acetyl-CoA, který vstupuje do cyklu kyseliny citronové a oxiduje se v mitochondriích, čímž poskytuje adenosintrifosfát (Sato et al. 1995) a další prekurzory acetylcholinu v neuronech (Hasselbalch et al. 1994). Celkovým výsledkem rychlejší metabolické přeměny MCFA je, že místo toho, aby byly ukládány jako tuk, energie z nich generovaná může být zcela přeměněna na substrát pro okamžité použití mozkiem, orgány, anebo svaly. Panuje předpoklad, že právě kvůli odlišnému metabolismu absorpce a rozkladu mohou mít MCFA z produktů, jako je kokosový olej, jedinečné účinky na zdraví lidí a zvířat, včetně prevence kardiovaskulárních onemocnění a Alzheimerovy choroby (Wallace 2019).

#### **2.4.1.4 Zdravotní aspekty příjmu**

V současnosti se lze setkat s rostoucí spotřebou kokosového oleje a souvisejících produktů v určitých populacích vzhledem k jejich možným přínosům spojeným se zdravím (Santos et al. 2019). Některé epidemiologické studie naznačují, že diety bohaté na MCFA mohou být účinné v prevenci indukce diabetes mellitus typu 2 a kardiovaskulárních onemocnění (Dayrit 2003), přestože většina MCFA dostupných v potravinách, jako je kokosový olej, je nasycená a nasycené tuky jsou obecně spojovány se zvýšeným rizikem vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Nicméně, u myši bylo prokázáno, že MCFA zlepšují zdravotní parametry spojené s cukrovkou typu 2 (Nunes et al. 2020). Mezi tyto parametry náleží např. snížení hladiny celkového cholesterolu a nízkodenzitních lipoproteinů v krvi, snížení aktivity aspartát transaminázy, snížení tělesné hmotnosti a indexu tělesné hmotnosti (Airhart et al. 2016). Haynes et al. (2020) navíc prokazují pozitivní vliv (snížený příjem potravy a zvýšený výdej energie) příjmu MCFA oproti LCFA na energetický metabolismus jejich přednostní oxidací hypothalamickými neurony regulujícími příjem potravy *in vitro* a *in vivo* u myši. Předpokládá se, že příjem MCFA má terapeutický účinek na poruchy nálady a kognitivní dysfunkce (Augustin et al. 2018; Ota et al. 2016; Ota et al. 2019), a bylo prokázáno, že kokosový olej zabraňuje stresem vyvolanému depresivnímu a úzkostnému chování hlodavců (da Silva et al. 2018). MCFA poskytují tělu nejen ketolátky, jako je acetát a BHB (Nonaka et al. 2016; Thevenet et al. 2016), ale také chrání kortikální neurony před toxicitou vyvolanou  $\beta$ -amyloidy (Nafar et al. 2017). Dále bylo prokázáno, že v rámci stravovacího trendu, jakým je ketogenní dieta, spočívajícím v konzumaci vysokého množství lipidů, odpovídajícího množství proteinů, a velmi nízkého množství sacharidů (Laux & Blackford 2013; Airhart et al. 2016), může

kokosový olej obsahující MCFA najít řadu uplatnění (Wallace 2019). Ketogenní dieta je dopopručována např. v případě léčby metabolických poruch souvisejících s pyruvát dehydrogenázou (Pavlu-Pereira et al. 2020); psychiatrických onemocnění jako je bipolární porucha (Chatterjee et al. 2020), či deprese (Operto et al. 2020); nervových degenerativních onemocnění, jakými jsou Parkinsonova a Alzheimerova choroba (Kraeuter et al. 2020); maligních nádorů jako rakovina prostaty (Kaiser et al. 2019); či obezity a diabetu (Kumar et al. 2020).

Existuje řada doporučení zdůrazňující pozitivní účinky kokosového oleje na zdraví, opírající se o epidemiologické studie populací, které konzumují značné množství kokosových produktů (především však dužiny a krému, ne přímo oleje) jako součást tradičních diet s nízkým příjmem zpracovaných potravin (Stanhope et al. 1981; Lindeberg et al. 1997; Abeywardena 2003). Bylo však prokázáno, že přechod k tzv. západní dietě v těchto populacích vede k nárůstu obezity a zhoršenému zdravotnímu stavu (Parry 2010), a proto nelze pokládat tato doporučení za jednoznačná (DiBello et al. 2009). Jak totiž zdůrazňují Eyres et al. (2016) v přehledové studii zaměřující se na účinky kokosového oleje na parametry související s kardiovaskulárními onemocněními, vzhledem k vysokému obsahu nasycených mastných kyselin byl kokosový olej vždy klasifikován spolu s máslem, palmovým olejem a živočišnými tuky jako zdroj nasycených tuků, a konstatuje, že ve srovnání s *cis* nenasycenými rostlinnými oleji zvyšuje kokosový olej celkový obsah cholesterolu, vysokodenzitních i nízkodenzitních lipoproteinů, přestože v menší míře než máslo. Je tedy nutno konstatovat, že při konzumaci kokosového oleje bohatého na MCFA je třeba brát na zřetel doporučení ke snížení příjmu nasycených mastných kyselin a jejich nahrazení nenasycenými mastnými kyselinami v dietě, aby se snížilo riziko aterosklerózy a diabetu typu 2 (Lenighan et al. 2019; Wu et al. 2020).

#### **2.4.1.5 Efekt na kvalitu živočišných produktů**

MCFA jsou v živočišné produkci používány jako zdroj energie podporující růst zvířat, pro kontrolu patogenů, podporu přirozené mikrobioty GIT, rozvoj imunity, a eradikaci patogenů v krmivu (Jackman et al. 2020). Nejčastěji jsou využívány především v chovech monogastričních zvířat jako je drůbež (Khatibjoo et al. 2018) a prasata (Nguyen & Kim 2020), kde přispívají k optimalizaci produkce, avšak své uplatnění nalézají také v chovech přežvýkavců především jakožto regulátory metanogeneze (Yanza et al. 2020). Je však nutné konstatovat, že vliv MCFA na růst a užitkovost přímo souvisí s množstvím přídatku MCFA

do diety zvířat; typem zařazovaných MCFA; charakteristikami základní diety; a také s fyziologickým stavem zvířat (Geng et al. 2016).

MCFA mají specifickou nutriční hodnotu (Wiseman 1984), jako zdroj energie se špatně ukládají v podkožní tukové tkáni, což má zejména u prasat a také brojlerů zvláštní význam, protože jatečně upravená těla s menším obsahem tuku mají vyšší komerční hodnotu a tento druh masa je více žádaný spotřebiteli (Ngapo et al. 2010). U brojlerů je typické, že v prvních dnech života je vstřebávání tuků v GIT omezené, stejně jako celková schopnost jejich trávení kvůli nízkému množství syntetizovaných žlučových solí a lipázy, přičemž celková stravitelnost tuků je u mláďat o 6 % nižší než u dospělých jedinců (Freitas et al. 2005). Chu a Chiang (2016) neprokázali přítomnost kyseliny kapronové v kuřecím mase na rozdíl od přítomnosti kyseliny kaprinové, jejíž obsah byl vyšší než obsah kyseliny kaprylové, přičemž obsah obou těchto MCFA se v mase z kuřecích stehen a prsou zvyšoval úměrně s rostoucím podílem těchto mastných kyselin v krmivu pro brojlery. Použití mikroenkapsulované směsi organických kyselin s MCFA v krmivu pro nosnice ve studii Lee et al. (2015) vedlo k lepším výsledkům produkce, jelikož vejce měla silnější skořápky s vyšším obsahem vápníku, zároveň byl kvalitnější obsah vaječných bílkovin, přičemž se ve výkalech zvýšil obsah bakterií *Lactobacillus* a snížil obsah bakterií *E. coli*. Své uplatnění v živočišné produkci nalézají MCFA, jak již bylo uvedeno výše, právě také pro své antibakteriální účinky, především s ohledem na možnost eradikace patogenních mikroorganismů, jako jsou grampozitivní koky (Bergsson et al. 2001), *E. coli* (Skřivanová et al. 2009; Hanczakowska et al. 2016), či *Clostridium perfringens* a *Salmonella* spp. (Skřivanová et al. 2006).

Ve výživě prasat mají MCFA nezastupitelnou roli již po odstavu, jelikož bylo prokázáno, že vykazují pozitivní vliv na růstovou schopnost odstavených selat. Rodas a Maxwell (1990) zjistili, že průměrný denní přírůstek a účinnost krmiva odstavených prasat byly lineárně zvýšeny zahrnutím MCFA do krmiva během prvního týdne po odstavu ve srovnání s těmi, kterým byl podáván lůj, nebo mléčný tuk. Podobné účinky prokázali také Hong et al. (2012), kteří pozorovali zlepšení průměrného denního přírůstku při začlenění MCFA do diety prasat během prvních 2 týdnů po odstavu, a současné zlepšení zdánlivé stravitelnosti sušiny, dusíkatých látek a energie v celém trávicím traktu na konci druhého a pátého týdne po odstavu. Bylo též prokázáno, že stravitelnost diety obsahující středně dlouhé triacylglyceroly (98,5 %) je u nově odstavených prasat vyšší než stravitelnost diety s dlouhými triacylglyceroly (93,4 %) (Price et al. 2013).



## 2.5 Interakce látek

Počet objevů nových antibiotik za posledních dvacet let znatelně poklesl v porovnání s předešlými desetiletími (Santos et al. 2017), oproti čemuž se naopak zvýšil výskyt (multi)rezistentních bakterií (Snitkin et al. 2012). Proto jsou potřebné nové přístupy k léčbě jimi vyvolaných infekcí, mezi které se řadí také synergické interakce léčiv (látek). Přínosy využívání lékových interakcí zahrnují například rozšířené použití antibiotika pro širší paletu patogenů, což je obzvláště důležité hlavně v případě závažných infekcí, u kterých je včasné zahájení efektivní léčby nezbytné (Zilberberg et al. 2014). Dalším přínosem lékových kombinací je také překonání bakteriální antibiotické rezistence (Qin et al. 2017), jako je např. užití  $\beta$ -laktamázových inhibitorů v kombinaci s  $\beta$ -laktamovým antibiotikem k léčbě bakterií s  $\beta$ -laktamázovou aktivitou (Fleisher et al. 1983); využití kombinační terapie při snížení vývoje antibiotické rezistence (Aldeyab et al. 2008); působení synergického efektu prostřednictvím různých mechanismů účinku (Ejim et al. 2011; Nichols et al. 2011). Synergické lékové kombinace jsou užitečné obzvláště u látek, u kterých byl jejich účinek sám o sobě identifikován jako slabý, a proto nemohou být užity samostatně, avšak v kombinaci jsou účinné dostatečně (Zheng et al. 2018). Například ampicilin a methanolový extrakt z granátového jablka je kombinací působící synergicky *in vitro* proti MRSA (Braga et al. 2005). Podobně methylestery mastných kyselin získané ze sójových bobů, kukuřice a slunečnicových olejů zesilují antimykotický účinek itraconazolu *in vitro* (Pinto et al. 2017).

### 2.5.1 Typy interakcí

Lékové synergie, potencující účinnost léčiv, jsou vysoce žádaným cílem kombinované lékové terapie (Fitzgerald et al. 2006). Ukázalo se, že synergické lékové kombinace jsou nejen vysoce účinné, ale i terapeuticky více specifické (Lehár et al. 2009). Na druhou stranu, lékové antagonismy jsou často nežádoucí, jelikož v řadě případů působí významné komplikace v léčbě (Cascorbi 2012). Přesto však mohou hrát poměrně významnou roli při omezování bakterií rezistentních na určitá léčiva, jelikož kombinace může učinit určitou léčbu selektivní vůči alele rezistence k léku (Chait et al. 2007). Nejen z těchto důvodů je tedy testování látkových (lékových) interakcí důležitou součástí vědecké práce např. na poli farmacie.

Definice, které pro jednotlivé typy interakcí používá již v roce 1993 Renneberg, popisují synergie jako pozitivní interakce, při kterých je výsledek výrazně vyšší než očekávaný; antagonismus jako negativní interakce, kdy je kombinovaný účinek látek (léků) na základě

jejich nezávislých účinků výrazně nižší, než by se dalo očekávat; aditivní účinek jako prostý součet samostatné aktivity dvou látek použitých zároveň; a indiferenci jako účinek kombinace dvou látek, který je stejný jako účinek aktivnější z testovaných při použití samostatně (Renneberg 1993). Tyto popisné charakteristiky jsou platné do současnosti, avšak nepanuje jednotný systém určující hranice jednotlivých interakcí.

Hodnotit kombinační efekt lze *in vitro* řadou metod, přičemž mezi ty nejvýznamnější dle Doerna (2014) patří šachovnicová metoda, tzv. vícenásobné kombinační baktericidní testování (multiple combination bactericidal testing) a sledování baktericidního účinku v čase (time-kill assay), a v neposlední řadě E-test.

### **2.5.1.1 Klasifikace *in vitro* detekovaných interakcí mezi látkami šachovnicovou metodou**

Stanovení kombinačního účinku se přímo odvíjí od užití výše popsanych metod. Šachovnicová metoda je jednou z nejznámějších a velmi jednoduchých forem testování kombinačního efektu dvou látek, ve kterém se jako základ pro výpočet indexu frakční inhibiční koncentrace (fractional inhibitory concentration index, FICI) používá dvourozměrná řada sériových koncentrací testovaných sloučenin pro ověření, zda má kombinace látek antibakteriální účinky, které jsou větší než součet jejich samotných účinků (synergie;  $FICI < 1,0$ ), nebo menší než součet jejich samotných účinků (antagonismus;  $FICI > 1,0$ ) (Odds 2003). Samotné stanovení druhu pozorované interakce dle hodnoty FICI není však mezi různými autory jednotné. Např. evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (European committee for antimicrobial susceptibility testing, EUCAST), který doporučuje šachovnicovou metodu jako nejvhodnější metodu pro testování kombinačního efektu dvou látek, vyhodnocuje možné interakce jako synergické ( $FICI \leq 0,5$ ), aditivní ( $FICI > 0,5-1$ ), indiferentní ( $FICI > 1-2$ ) a antagonistické ( $FICI \geq 2$ ) (EUCAST 2000). Naproti tomu v novější metodice Odds (2003) trvá na tom, aby se další autoři omezili pouze na hodnocení synergií ( $FICI \leq 0,5$ ), antagonismů ( $FICI > 4,0$ ) a vztahů bez interakcí ( $FICI > 0,5-4,0$ ), jelikož jiná rozmezí hodnot FICI určující např. částečnou synergii mohou být zapříčiněna experimentálními chybami, a přispívají k tzv. kladným zjištěním výzkumu.

### **2.5.2 Terapeuticky významné lékové interakce**

Interakce mezi léčivými látkami jsou mezi profesionály ve zdravotnictví dobře známy, protože kombinace různých léků je běžná praxe, která je používána k dosažení požadovaných

(zvýšených) účinků, např. v anestezii a při léčbě bolesti, v důsledku čehož je jejich výskyt často omezen již při předepisování léčiv, či pokud se vyskytnou, jsou rychle klinicky rozpoznány a léčeny (Dumbreck et al. 2015). Může však dojít k paralelnímu zesílení nežádoucích účinků, což u některých látek vede k omezení terapeutické užitečnosti (Zanderigo et al. 2006). Naproti tomu informace o interakcích mezi léčivými a potravními, anebo bylinami a potravou nejsou často dostatečně známé, a proto je není snadné identifikovat, omezit, a léčit (Hermann & von Richter 2012; Boullata 2013; Oga et al. 2016; Péter et al. 2017). Takové případy jsou známy právě u kombinace léčiv s různými potravinami a potravinářskými výrobky, kdy interakce léčivo-jídlo jsou definovány jako změny v účinnosti a/nebo toxicitě farmaceutických léčiv vyvolané konzumací jakéhokoli potravinového produktu, včetně funkčních potravin a doplňků stravy (Mouly et al. 2017). Farmakokinetické a farmakodynamické změny plynoucí z tohoto typu interakcí mohou způsobit toxicitu nebo subterapeutické výsledky spojené s nežádoucími klinickými důsledky (Gurley 2012; Gurley et al. 2012; Segal et al. 2014; De Boer et al. 2015; Alissa 2015).

Do této doby byly popsány a prozkoumány různé typy interakcí mezi léčivými a potravními, či jejich složkami, konkrétně jsou známy kombinace (a) léčivo-živina, kdy velké množství léků obecně interaguje s obsahem tuku v potravě, a proto je nutné je přijímat až v určitém časovém horizontu po požití potravy/před požitím potravy (Boullata & Hudson 2012), či jako v konkrétním případě, kdy současné podávání fluorochinolonů (ciprofloxacin) a výrobků bohatých na vápník může snížit biologickou dostupnost tohoto léku, čímž může vést k rezistenci na tuto skupinu antibiotik (Neuhofel et al. 2002; Pápai et al. 2010); (b) léčivo-potravina, jako je např. mnoho známých antagonistických interakcí mezi léčivými a grapefruitovou šťávou nebo sójou (Cheng 2006; Pirmohamed 2013); (c) interakce léčivo-bylina, jako je inhibiční účinek čaje (flavonoidy) nebo kávy (polyfenoly) na vstřebávání doplňků železa (Zijp et al. 2000; Tamilmanni & Pandey 2016), interakce kumarinu (složka heřmánku *Matricaria chamomilla*) s warfarinem zvyšující riziko krvácení (Holbrook et al. 2005; Segal & Pilote 2006; Milić et al. 2014), či četné lékové interakce jinanu dvoulaločnatého (*Ginkgo biloba*) nebo třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*) (Fugh-Berman 2000).

Nejznámějším příkladem interakce léčivo-potravina je grapefruitová šťáva, která může inhibovat střevní metabolismus více jak 85 léčiv alterací izoforem cytochromu P450 (Bailey et al. 2013). Jednou z předních interakcí mezi grapefruitovým džusem a léčivem je jeho vliv

na inhibitory HMG-CoA reductázy, běžněji známými jako statiny, u kterých může grapefruitový džus, přijímaný ve velkém množství ( $\geq 950$  ml), zvyšovat biologickou dostupnost inhibicí cytochromu P450 3A4 a zvyšovat tak riziko nežádoucích účinků souvisejících se statiny, zejména pak svalové toxicity, která se může projevit jako myalgie, myopatie nebo rhabdomyolýza (Huang & Lesko 2004; Leibovich et al. 2004). Dalšími klinicky významnými léčivy, jejichž farmakokinetika je grapefruitovým džusem ovlivněna jsou např. někteří antagonisté vápníkového kanálu, inhibitory fosfodiesterázy používané k léčbě erektilní dysfunkce, perorální estrogenová antikoncepce, tricyklická antidepresiva, benzodiazepiny a imunosupresiva (Libersa et al. 2000; Hulisz & Jakab 2007). Dle Kanazawa et al. (2001), grapefruitová šťáva také zvyšuje biologickou dostupnost erytromycinu v tenkém střevě, čímž umožňuje indukci možných nepříznivých účinků jako je srdeční dysritmie.

Vzhledem k velké diverzitě, je velice obtížné předpovídat možné nežádoucí účinky současné koadministrace léčiv s bylinami, či jejich biologicky účinnými látkami, a potravinami (Orellana-Paucar & Vintimilla-Rojas 2020). Je však známo, že u orálně podávaných léků může konzumace jídla v době podání léku změnit jeho absorpci (Fleisher et al. 1999). Efekt potravy ovlivňující účinnost léků je rozšířený do té míry, že u více než 40 % perorálně podávaných léků schválených americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) nebo evropskou lékovou agenturou (European Medicines Agency, EMA) byla za poslední dekádu zaznamenána změna farmakokinetických vlastností právě vlivem potravy (O'Shea et al. 2019). Zdravotnické úřady proto očekávají, že žadatelé o schválení léčiva předem charakterizují účinky potravy nebo jídla na danou drogu (FDA 2019). Zatímco hodnocení vlivu potravy se obvykle provádí se standardizovaným jídlem s vysokým obsahem tuku, v určitých případech může být doporučeno vyhodnocení různých druhů jídel (tj. různého obsahu živin a energie). Pokud potrava nemá klinicky významný dopad na farmakokinetiku léčiva, mohou garanti žádající o jeho schválení provést požadované testy bez ohledu na potraviny a na etiketě může být uvedeno, že lék může být užíván bez ohledu na požití potravy. V případě klinicky významného farmakokinetického účinku však musí být podáno zvláštní doporučení pro podávání léku; například lék může být podána pouze nalačno, nebo se užívá s jídlem, aby se maximalizovala absorpce léčiva (Riedmaier et al. 2020).

Mnoho léků mění své farmakokinetické vlastnosti na základě obsahu tuku v potravě. Obecně tuky snižují maximální koncentrace příjmu, avšak nemění celkovou absorpci léčiva, a ta tedy

zůstává stejná (Lacy et al. 2006). Například některá antifungální léčiva, mají výrazně zvýšenou absorpci, pokud jsou užívána s jídlem, zejména pak s jídlem s vysokým obsahem tuku, a proto se doporučuje je užívat s tučným jídlem, aby bylo možné z této interakce profitovat (Hardman et al. 2001).

Cascorbi (2012) mezi příčiny nežádoucích účinků a interakcí řadí špatný výběr léků do kombinace, nezohlednění možných účinků na ledviny, špatné dávkování, špatný výběr administrace léčiv a chyby vzniklé při podání léčiva.

### **3 Hypotéza práce**

Vybrané antibakteriální látky přírodního charakteru budou v kombinaci s antibiotiky vykazovat modulovanou aktivitu na základě působení látkových interakcí, které se budou projevovat případnou změnou antibakteriálního účinku.

## **4 Cíle práce**

Cílem této práce bylo studovat možnosti antibakteriálního působení vybraných látek přírodního charakteru v kombinaci s antibiotiky na určité patogenní bakterie pomocí laboratorních mikrobiologických metod. Do experimentů byly zařazeny látky přírodního charakteru a běžně používaná antibiotika. Účinek byl stanoven pro vybrané patogenní bakterie (standardní kmeny, klinické izoláty).

## 5 Antibiotic Resistance in Livestock Breeding: A Review

**Převzato z:** Laloučková K, Skřivanová E. 2019. Antibiotic Resistance in Livestock Breeding: A Review. *Scientia Agriculturae Bohemica* **50**:15-22.

Klára Laloučková je autorkou původního textu článku.

### 5.1 Abstract

Antibiotic resistance represents a serious threat worldwide. When considering the increasing ability of bacteria to effectively resist antibacterial agents, it is necessary to reduce the consumption of antibiotic substances in animal production in order to preserve their effectiveness in the future. Attention should be paid to multidrug resistant microorganism's occurrence, which can be for the breeder very exhausting not only from the economic point of view. Therefore, alternative sources of antibacterials should be considered due to the limited possibilities of using conventional antibiotics in animal breeding – there comes application for various substances, including organic acids, clay minerals etc. Nowadays, the research in this field also focuses on the combinatory effect of such compounds, which can also find the perspective for use in the animal breeding. This article provides an overview of problems connected with the resistance of diverse bacteria to antibiotic treatment in livestock breeding. It emphasizes the need of alternate resources' usage with the aim to lower the environmental burden caused by overuse of antimicrobials used in subclinical doses in the past and with the expanding bacterial resistance.

**Key words:** antibacterial; alternative; antibiotic growth promoters; combinatory effect; microorganism



## 5.2 Literature review

**Introduction.** The occurrence of alimentary diseases is a serious threat for inhabitants of both developed (Havelaar et al. 2010) and developing (Byarugaba 2004) countries connected primarily to inappropriate dealing with products of animal origin, their further modifications, and consumption. Since the undesirable bacterial contamination is one of the agents causing food-borne diseases (Levin & Antia 2001), its eradication is sought already at the beginning of food-production process: in animal breeding. This can be achieved by using various antimicrobials, such as antibiotics. These are anti-effective drugs discovered from natural and chemical products and derived semi-synthetically with phenotypic methods during the second half of 20<sup>th</sup> century (Power 2006). Generally, three periods of bacterial diseases' therapy are distinguished: pre-antibiotic, antibiotic, and period of antibiotic resistance's development that is happening right now (with possible transition back to the principles of pre-antibiotic period in certain countries). Antibiotics are used to decrease the infectious pressure causing difficulties in animal husbandry and across human population since their discovery (Aminov 2010). Antibiotics for treating diseases, and in prevention as prophylactic agents against bacterial infections and as antibiotic growth promoters (AGPs), have been used in animal production (Tab. 1) since the very beginnings of antibiotic therapy with the aim to maximize production and to get the highest possible profit. (Moore et al. 1946; Jukes et al. 1950). Using AGPs for longer term may lead to the natural selection of surviving resistant bacteria and strains able to transport such an ability to other bacterium and make them resistant (Aarestrup 1999). The ability of microorganisms to conquer antibiotic treatment by different mechanisms is called antibiotic resistance (Ronquillo & Hernandez 2017). This property is not a novel phenomenon – contrariwise is true: healthcare systems worldwide are facing this situation both in human and veterinary medicine since the very beginnings of antibiotic's treatment applications (Barbosa & Levy 2000). For example, just two years after penicillin has been introduced in 1941 as an anti-staphylococcal treatment, the resistance level increased to 6% and after a decade even to 50% in hospital-acquired infections (Barber & Rozwadowska-Dowzenko, 1948). This makes antibiotic resistance an issue targeting not only medicine, but different fields – politics, economics, biology, sociology and ecology – with unknown result and solution (Balsalobre et al. 2014).

Increasing number of inhabitants and economic prosperity is globally connected with rising demand for proteins of animal origins resulting in the estimated increase of animal production by 70% to feed the population of 9.6 billion of people living on the Earth by 2050 (Gerber et al. 2013). The rise of animal production is logically connected (especially in developing countries) with higher production and usage of antimicrobials in food-producing species according to its above mentioned (sub)therapeutical and growth-promotory activity. This occurrence is supposed to lead to estimated grow of antibiotic production by 67%, meaning 105.596 ( $\pm 3.605$ ) tons by 2030. Approximately 2/3 of increase is expected to be due to higher numbers of reared animals, and 1/3 because of the shift towards intensified animal breeding (Van Boeckel et al. 2015). Nowadays, approximately 60% of nation's annual consumption of medically important antimicrobials in the USA are used for disease prevention and growth promotion in food-producing animals (FDA 2017). According to previously stated data of production and consumption of antibacterial compounds (more than one ton per day in various European countries), it is rational to mention that the progression of bacterial resistance against antibiotics is going to evolve further, and is one of the best documented cases of biological evolution in progress even nowadays (Baquero & Blázquez 1997).

**Table 5.1:** Types of antimicrobials use in food animals (McEwen & Fedorka-Cray 2002)

Type of antibiotic use	Purpose	Route or vehicle of administration	Administration to individuals or group	Diseased animals
Therapeutic	Therapy	Injection, feed, water	Individual or group	Diseased individuals; in groups, may include some animals that are not diseased or are subclinical
Metaphylactic	Disease prophylaxis, therapy	Injection (feedlot calves), feed, water	Group	Some
Prophylactic	Disease prevention	Feed	Group	None evident, although some animals may be subclinical
Subtherapeutic	Growth promotion	Feed	Group	None
	Feed efficiency	Feed	Group	None
	Disease prophylaxis	Feed	Group	None

To understand the resistance of bacteria against antimicrobials, it is necessary to know the bacterial mechanisms of resistance and to clarify the impact of resistant bacteria on humans. This is going to be described further in next paragraphs altogether with the summary of possible precautions that can be made in order to preserve the ability of antibiotics to effectively act against bacteria in the future.

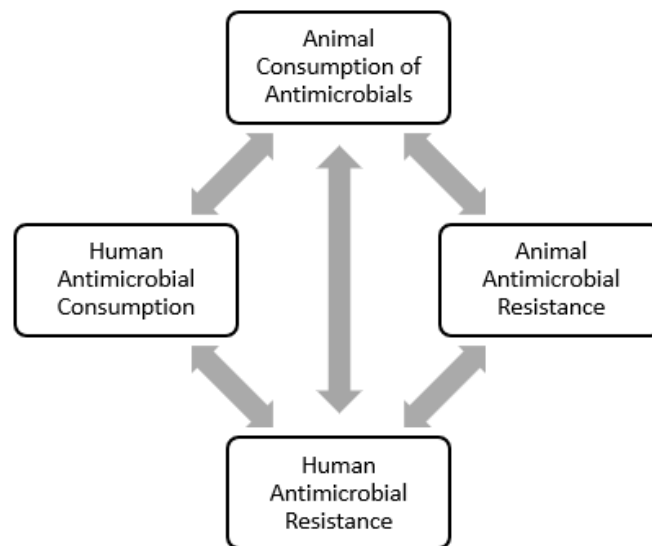
**Mechanisms of resistance.** Both mutation and selection for the growth when higher concentrations of antibiotics used, contribute to the increase in profound ability of microorganisms to resist the antimicrobial effect of various compounds, as well as acquiring other factors of resistance (Berger-Bächli 2005). Rich variability of mechanisms that cause resistance gains an ability to defeat antibiotics in microorganisms, increases their chance to survive in environment containing antibiotics, and allows researchers even to predict a probability of resistance's origins itself. The resistance is believed to be originating out of so-called "pre-resistant molecules" that arose during different evolutionary processes – e.g. appearance of thirty genes able to modify aminoglycosides (Payie et al. 1995), or seventeen genes for resistance against tetracycline that has developed among diverse bacterial species (Johnson, Adams 1992). Basically, five targets of antibiotic therapy include: cell wall synthesis, protein synthesis, DNA synthesis, DNA-directed RNA polymerase and essential metabolic enzymes (Coates et al. 2002). Bacterial resistance to antibiotics is caused by various mechanisms, that can be divided into two groups: (A) direct attribute of the bacterial cell causing antibiotics resistance: (a) genetic modification – e.g. ADP-ribosyl transferases mutation making bacteria resistant to rifampicin (Mazel & Davies 1999), (b) enzymatic modification – e.g. methylation of adenine residuals in 23S rRNA causing resistance to macrolides (Zalacain & Cundliffe 1990), (c) replacement – e.g. ribosomal protection to antibiotic binding through Tet(O) protein causing tetracycline resistance (Li et al. 2013), (d) protection on cellular or population level – e.g. ability to secrete big amount of exopolysaccharides, that creates a barrier impeding antibiotic binding (Nwodo et al. 2012), and (B) bacterium initiated change of antibiotic causing its deactivation: (a) antibiotic modification – e.g. aminoglycoside's acetylation (Ramirez & Tolmasky, 2010), (b) antibiotic destruction – e.g. beta-lactamases influence on beta-lactam antibiotics (Sandanyaka & Prashad 2002), and (c) elimination of antibiotic out of the cell – e.g. elimination by efflux pump (Soto 2013). Generally, this categorisation is artificial, and not every mechanism is possible to sort into mentioned group. As an example, so-called "kin selection" can be used. This mechanism of resistance roots in an ability of drug resistant mutants of bacteria to shield

the less resistant isolates by production of certain metabolite under antibiotic stress (Lee et al. 2010). Therefore, kin selection can cause difficulties when trying to eradicate populations of diverse bacterial strains or species as in biofilms.

**Health-threatening bacteria.** Nowadays, there are no commercially available antibiotics at disposal that do not exhibit any bacterial resistance pattern against at least single microorganism (Brachman & Abrutyn 2009; Cushnie & Lamb 2011). The European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC) oversees resistant microorganisms within the EARS-Net Surveillance Network on Antibiotic Resistance (EARS-Net) in the European Union. ECDC sets sensitivity/resistance criteria of microorganisms to antibiotics and settles rules for detection methods of resistance for these microorganisms: *Acinetobacter* spp., *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pneumoniae* (ECDC 2016). Multidrug-resistant microorganisms represent the most serious threat to public health (Nicasio et al. 2008; Kumarasamy et al. 2010) among which are listed, for example: vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing Gram-negative bacteria, carbapenemases producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC), and multi-drug resistant Gram-negative rod-shaped bacteria: *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* (Boucher et al. 2009). The nature of multiresistance (resistance of microorganisms to more than three groups of antibiotics) is often derived from genetically mobile organelles, such as plasmids, transposons and integrons (Dessen et al. 2001), therefore its reduction is a major challenge for researchers and an important concern for the community (Byarugaba 2010). According to the World Health Organization (WHO), many of these multi-drug resistant bacteria are pathogens of the digestive tract (WHO 2015), causing considerable economic losses in animal breeding (Graham et al. 2007). Above that, some resistant bacteria of animal origin may be indirectly transmissible to humans through the outside environment (Graham et al. 2009), and products of animal origin (Price et al. 2005), or directly by contact of farm workers with animals (Smith et al. 2013) (Fig. 1). In case of *Clostridium perfringens*, the world's most widespread pathogen, which produces many endotoxins and exotoxins, the acquisition of resistance properties is gradually being begun, and this problem needs to be taken into consideration in a timely manner (Rainey et al. 2009). Another important factor contributing to the increase of bacterial resistance to antibiotics is the ability of some of the above-mentioned to form a

biofilm (Parsek & Singh 2003; Kong et al. 2006) - a generic and species-diverse society of to the substrate adhered microorganisms surrounded by a layer of exopolysaccharides that are produced by these bacteria (Davies 2003). This phenomenon can be encountered not only in *S. aureus*, but also in other pathogens, e.g. in the oral cavity (Jenkinson & Lamont 2005).

**Figure 5.1:** Formation and transmission of antimicrobial resistance in microorganisms (EFSA 2016)



**Monitoring of resistance.** Globally used antimicrobial agents include 27 antibacterial classes, 9 of which are used exclusively in animals (Pagel & Gautier 2012). Highest consumption of antibiotics can be observed in poultry and pig farms, but the increasing trend in aquaculture consumption cannot be overlooked. The consumption of antibiotics as growth promoters in the United States, Brazil and Argentina is also not negligible (Gelband et al. 2015). Macrolides, penicillins and tetracyclines, which are the world's best-selling antibiotic groups, are classified as critical in human medicine (WHO 2011). The highest resistance is described in poultry among the EU's states - from 0.9% in the case of aminoglycosides, 6% in macrolides and up to 59.6% in tetracyclines. The most significant is resistance of salmonellas and campylobacters to tetracyclines (5.6 - 82.4% and 1 - 87.5% respectively) and quinolones (3.6 - 94.1 % and 3.96-96.3% respectively) in broiler breeds (EFSA, 2016). In the United States, 22 % resistance to fluoroquinolones and 95.4 % to gentamycin is reported in poultry with the highest numbers in salmonella strains resistant to tetracyclines (41-46%) being consistent with the EU, the decreasing trend of resistance is then reported in salmonellas with relation to cephalosporins (decrease from 38 to 18%) within

chickens in the retail network (CDC 2014). From 2011 to 2014, reported overall sales of veterinary antimicrobials (in mg/PCU) decreased in 14 European countries and sales of 3rd and 4th-generation cephalosporins and fluoroquinolones decreased in 10 and 11 European countries, respectively (ECDC et al. 2017). Such a decline in sales of veterinary antimicrobials among EU countries correlates also with the average annual change (between years 2012-2016) showing slight decline (-0,01) in consumption of antibiotics for systemic use in the community in EU/EEA countries (ECDC 2017).

**Antimicrobial resistance precautions.** It is well known that antibiotic pressure will boost the resistance because of the selection allowing only the fittest bacteria to survive even more in the future (Martínez et al. 2007). Such a circumstance may have a negative impact on profound resistance in multi-drug resistant microorganisms. According to the above-mentioned danger of overuse of antibiotics, there is a need to act - one of the attempts to reduce their overuse has become the awareness of the use of antibiotics in human medicine, and in agriculture the ban on antibiotic growth stimulators (EU 2003) (Tab. 2). Options to reduce the consumption of classical antibiotics and prevent the associated development of resistance include alternative sources of substances with antibiotic effects, e. g. prebiotics (Abd El-Khalek et al. 2010), probiotics (Marinho et al. 2007), enzymes (Shim et al. 2005), organic acids (Marounek et al. 2007), synbiotics (Bomba et al. 2002), bacteriocins, bacteriophages (Caly et al. 2015), plant extracts (Jouany & Morgavi 2007), zinc oxide (Ou et al. 2007), or clay minerals (Phillips et al. 2002). In relation with the previous list of non-antibiotic growth promoters, it is necessary to mention, that also in this group of antimicrobials, restrictions of usage will apply in the future. As an example, the zinc oxide can be used: it was recently stated that overall benefit-risk balance for veterinary medicinal products containing zinc oxide to be administered orally to food-producing species is negative. This is due to the fact, that the zinc's anti-diarrhoeal effect value is not exceeding the value of its accumulation rate in the environment and its potential contribution in increase of the bacterial resistance. According to these findings, no more new marketing authorisations will be issued and the withdrawals of the existing marketing authorisations for veterinary medicinal products containing zinc oxide will be implemented in the European Union (EMA 2017). Therefore, another possibility to reduce bacterial antibiotic resistance due to reduced dosage of antibiotics is the use of the combinatory effect of various plants (Garvey et al. 2011; Pervaiz et al. 2016), or synthetic substances (El-Shafaea et al. 2016; Lefebvre et al. 2016) both with each other and in combination with antibiotics. Synergistic

reactions of two compounds are clearly beneficial for combating bacterial infections, bringing into treatment a perspective of not only reduction of antibacterial resistance, but also a potential in reduced dosage of individual substances used in the combination; extension of antimicrobial treatment; reduced side effects of individual substances; and lowered environmental burden (Aktas & Derbentli 2016). On the other hand, antagonistic interaction between two solely active agents is able to bring undesirable circumstances into treatment that can be even life-threatening (Cascorbi 2012). Nevertheless, by theoretical models, antagonism could be useful in reducing the potential for evolving resistance more than synergism that is enhancing it by the selection pressure allowing very strongly resistant bacteria to outlast (Michel et al. 2008).

**Table 5.2:** Restrictions on the use of antibiotics in livestock in OECD countries (Laxminarayan et al. 2015)

Legislative status of country in terms of animal use of antibiotics		
OECD member country	Ban on antibiotic growth-promoters (AGPs)	Prescription requirement to use antibiotics in animals
Australia	No, but some AGPs are banned (fluoroquinolones, avoparcin, virginiamycin, etc.) (Australian Commission on safety and quality in health care 2013)	Nearly all veterinary antibiotics can only be sold on a veterinarian prescription.
Canada	No. The Canadian government issued a notice in April 2014 to stakeholders mimicking the FDA approach to voluntarily phase out use of medically important antibiotics as growth promoters (Government of Canada 2014).	No. Plan to develop options to strengthen the veterinary oversight of antibiotic use in food animals in line with the FDA approach.
EU member states	Yes. All AGPs banned in 2006 (European Unio, 2003).	Yes.
Japan	No (Maron et al. 2013).	Yes.
Mexico	Yes, AGPs were banned in 2007 with some exceptions (avoparcin, vancomycin, bacitracin, tylosin, virginiamycin, etc.) (Maron et al. 2013).	Yes.
New Zealand	Yes, for the critically and highly important antibiotics listed by both WHO and OIE (MAF New Zealand 2011).	Yes, for antibiotics identified with the potential for resistance problems.
South Korea	Yes, since 2011 AGP use has been discontinued until a veterinary oversight system can be put in place (USDA 2011)	Yes, the veterinary oversight system is currently being developed.
USA	No. The FDA released voluntary guidelines for the industry to withdraw the use of medically important antibiotics as growth promoters (U.S. Food and Drug Administration 2013).	No. Under the new FDA guidance for industry, use of medically important antibiotics will be under the oversight of licensed veterinarians.

### 5.3 Conclusion

Given the general concerns about the progress of antimicrobial resistance in microorganisms to an extent that is not compatible with available drugs, it is highly desirable to limit the consumption of these pharmaceuticals in especially food-producing animals such as poultry and pigs to the lowest acceptable level. Such a minimization can be achieved not only through legislative interventions, but also by the prevention of disease or using alternative sources of antibacterial agents and also by the combinatory effect of various compounds.

### 5.4 References

- Aarestrup FM. 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *International Journal of Antimicrobial Agents* **12**:279-285.
- Abd El-Khalek E, Kalmar I, De Vroey M, Ducatelle R, Pasmans F, Werquin G, Janssens G. 2010. Indirect evidence for microbiota reduction through dietary mannanoligosaccharides in the pigeon, an avian species without functional caeca. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **96**:1084-1090.
- Aktas G, Derbentli S. 2016. *In vitro* activity of daptomycin combined with dalbavancin and linezolid, and dalbavancin with linezolid against MRSA strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **72**:441-443.
- Aminov RI. 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology* (134) DOI: 10.3389/fmicb.2010.00134.
- Balsalobre LC, Dropa M, Matté MH. 2014. An overview of antimicrobial resistance and its public health significance. *Brazilian Journal of Microbiology* **45**:1-6.
- Baquero F, Blázquez J. 1997. Evolution of antibiotic resistance. *Trends in Ecology & Evolution* **12**:482-487.
- Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M. 1948. Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet* **252**:641-644.
- Barbosa TM, Levy SB. 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates* **3**:303–311.
- Bbosa GS, Mwebaza N. 2013. Global Irrational Antibiotics/Antibacterial Drugs Use: A Current and Future Health and Environmental Consequences. Pages 1645-1655 in Méndez-Vilas A, editor. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, 1st Ed. Formatex Research Center, Badajoz.



- Berger-Bächi B. 2005. Resistance mechanisms of gram-positive bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* **292**:27-35.
- Bomba A, Nemcova R, Gancarcikova S, Herich R, Guba P, Mudronova D. 2002. Improvement of the probiotic effect of micro-organisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition (S95-S9)* DOI: 10.1079/BJN2002634.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J (2009): Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48, 1-12. doi: 10.1086/599017.
- Brachman PS, Abrutyn E. 2009. *Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control*, 4th Ed. Springer, Berlin.
- Byarugaba D. 2004. Antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *International Journal of Antimicrobial Agents* **24**:105-110.
- Byarugaba DK. 2010. Mechanisms of antimicrobial resistance. Pages 15-26 in Sosa A, Byarugaba DK, Amabile C, Hsueh PR, Kariuki S, Okeke IN, editors. *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*, 1st Ed. Springer, New York.
- Caly DL, D'Inca R, Auclair E, Drider D. 2015. Alternatives to Antibiotics to Prevent Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Microbiologist's Perspective. *Frontiers in Microbiology* (1336) DOI: 10.3389/fmicb.2015.01336.
- Cascorbi I. 2012. Drug interactions-principles, examples and clinical consequences. *Deutsches Ärzteblatt International* **109**:546-555.
- CDC. 2014. *NARMS Integrated Report: 2014*, 1st Ed. CDC, Atlanta.
- Coates A, Hu Y, Bax R, Page C. 2002. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **1**:895-910.
- Cushnie TT, Lamb AJ. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* **38**:99-107.
- Davies D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery* **2**:114-122.
- Dessen A, Di Guilmi A, Vernet T, Dideberg O. 2001. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in gram-positive pathogens. *Current Drug Target -Infectious Disorders* **1**:63-77.
- ECDC. 2016. *Antimicrobial resistance reporting protocol 2016*. EARS-Net Documents, Stockholm.
- ECDC. 2017. *Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union*. ESAC-Net surveillance data, Stockholm. Available from

- [www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Final\\_2017\\_EAAD\\_ESAC-Net\\_Summary-edited%20-%20FINALwith%20erratum.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Final_2017_EAAD_ESAC-Net_Summary-edited%20-%20FINALwith%20erratum.pdf). (accessed March 2018).
- ECDC, EFSA BIOHAZ Panel, CVMP. 2017. ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals. *EFSA Journal* (5017) DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5017.
- EFSA. 2016. Scientific report of EFSA and ECDC - The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal* (4380) DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4380.
- El-Shafaey ES, Elseady Y, El-Khodery S. 2016. Comparative therapeutic effect of antiseptic-antibiotic paste for topical treatment of digital dermatitis in dairy cows. *Veterinarski Arhiv* **86**:197-208.
- EMA. 2017. Questions and answers on veterinary medicinal products containing zinc oxide to be administered orally to food-producing species: Outcome of a referral procedure under Article 35 of Directive 2001/82/EC (EMA/V/A/118). European Medicines Agency, London.
- EU. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union*, L268, 29-43.
- FDA. 2017. CVM 2016 Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Food-Producing Animals. Rockville, FDA. Available from [www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/AnimalDrugUserFeeActADUFA/UCM588085.pdf](http://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/AnimalDrugUserFeeActADUFA/UCM588085.pdf). (accessed March 2018).
- Garvey MI, Rahman MM, Gibbons S, Piddock LJ. 2011. Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* **37**:145-151.
- Gelband H, Molly Miller P, Pant S, Gandra S, Levinson J, Barter D, White A, Laxminarayan R. 2015. The state of the world's antibiotics 2015. *Wound Healing Southern Africa* **8**:30-34.
- Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Falcucci A, Tempio G. 2013. Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities, 1st Ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Graham JP, Boland JJ, Silbergeld E. 2007. Growth promoting antibiotics in food animal production: an economic analysis. *Public Health Reports* **122**:79-87.
- Graham JP, Evans SL, Price LB, Silbergeld EK. 2009. Fate of antimicrobial-resistant enterococci and staphylococci and resistance determinants in stored poultry litter. *Environmental Research* **109**:682-689.

- Havelaar AH, Brul S, De Jong A, De Jonge R, Zwietering MH, Ter Kuile BH. 2010. Future challenges to microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology* (S79-S94) DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.015.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. 2005. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology* **13**:589-595.
- Johnson R, Adams J. 1992. The ecology and evolution of tetracycline resistance. *Trends in Ecology & Evolution* **7**:295-299.
- Jouany JP, Morgavi D. 2007. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* **1**:1443-1466.
- Jukes TH, Stokstad E, Tayloe R, Cunha T, Edwards H, Meadows G. 1950. Growth-promoting effect of aureomycin on pigs. *Archives of Biochemistry* **26**:324-325.
- Kong KF, Vuong C, Otto M. 2006. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *International Journal of Medical Microbiology* **296**:133-139.
- Kumarasamy KK, et al. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infectious Diseases* **10**:597-602.
- Laxminarayan R, Van Boeckel T, Teillant A. 2015. *The Economic Costs of Withdrawing Antimicrobial Growth Promoters from the Livestock Sector*, 1st Ed. OECD Publishing, OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers No. 78, Paris.
- Lee HH, Molla MN, Cantor CR, Collins JJ. 2010. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* **467**:82-85.
- Lefebvre E, Vighetto C, Di Martino P, Garde VL, Seyer D. 2016. Synergistic antibiofilm efficacy of various commercial antiseptics, enzymes and EDTA: a study of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* **48**:181-188.
- Levin BR, Antia R. 2001. Why we don't get sick: the within-host population dynamics of bacterial infections. *Science* **292**:1112-1115.
- Li W, et al. 2013. Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nature Communications* (1477) DOI: 10.1038/ncomms2470.
- Marinho M, Lordelo M, Cunha L, Freire J. 2007. Microbial activity in the gut of piglets: I. Effect of prebiotic and probiotic supplementation. *Livestock Science* **108**:236-239.
- Marounek M, Freire J, Castro-Solla L, Pinheiro V, Mourão J, Maertens L. 2007. Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review. *World Rabbit Science* **15**:127-140.
- Martínez JL, Baquero F, Andersson DI. 2007. Predicting antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* **5**:958-965.

- Mazel D, Davies J. 1999. Antibiotic resistance in microbes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**:742-754.
- McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. 2002. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Diseases* **34**:93-106.
- Michel JB, Yeh PJ, Chait R, Moellering RC, Kishony R. 2008. Drug interactions modulate the potential for evolution of resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:14918-14923.
- Moore P, Evenson A, Luckey T, McCoy E, Elvehjem C, Hart E. 1946. Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *Journal of Biological Chemistry* **165**:437-441.
- Nicasio AM, Kuti JL, Nicolau DP. 2008. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. *Pharmacotherapy* **28**:235-249.
- Nwodo UU, Green E, Okoh AI. 2012. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences* **13**:14002-14015.
- Ou D, Li D, Cao Y, Li X, Yin J, Qiao S, Wu G. 2007. Dietary supplementation with zinc oxide decreases expression of the stem cell factor in the small intestine of weanling pigs. *Journal of Nutritional Biochemistry* **18**:820-826.
- Pagel SW, Gautier P. 2012. Use of Antimicrobial Agents in Livestock. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties* **31**:145-88.
- Parsek MR, Singh PK. 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology* **57**:677-701.
- Payie KG, Rather PN, Clarke AJ. 1995. Contribution of gentamicin 2'-N-acetyltransferase to the O acetylation of peptidoglycan in *Providencia stuartii*. *Journal of Bacteriology* **177**:4303-4310.
- Pervaiz A, Khan R, Anwar F, Mushtaq G, A Kamal M, Khan H. 2016. Alkaloids: an emerging antibacterial modality against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Pharmaceutical Design* **22**:4420-4429.
- Phillips TD, Lemke SL, Grant PG. 2002. Characterization of clay-based enterosorbents for the prevention of aflatoxicosis. Pages 157-171 in DeVries JW, Trucksess MW, Jackson LS, editors. *Mycotoxins and food safety. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 504, 1st Ed. Springer, Boston.
- Power E. 2006. Impact of antibiotic restrictions: the pharmaceutical perspective. *Clinical Microbiology and Infection* **12**:25-34.
- Price LB, Johnson E, Vailes R, Silbergeld E. 2005. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* isolates from conventional and antibiotic-free chicken products. *Environmental Health Perspectives* **113**:557-560.

- Rainey FA, Hollen BJ, Small A. 2009. Genus *Clostridium*. Pages 738-828 in Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; Volume 3: The Firmicutes*. Springer, New York.
- Ramirez MS, Tolmasky ME. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates* **13**:151-171.
- Ronquillo MG, Hernandez JCA. 2017. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. *Food Control* **72**:255-267.
- Sandanayaka VP, Prashad AS. 2002. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics: structure and mechanism based design of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* **9**:1145-1165.
- Shim S, Verstegen M, Kim I, Kwon O, Verdonk J. 2005. Effects of feeding antibiotic-free creep feed supplemented with oligofructose, probiotics or synbiotics to suckling piglets increases the preweaning weight gain and composition of intestinal microbiota. *Archives of Animal Nutrition* **59**:419-427.
- Smith TC, et al. 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA. *PLOS ONE* (e63704) DOI: 10.1371/journal.pone.0063704.
- Soto SM. 2013. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* **4**:223-229.
- Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**:5649-5654.
- WHO. 2011. *Critically important antimicrobials for human medicine*, 3rd Ed. World Health Organisation, Geneva.
- WHO. 2015. *WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne Diseases Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015*, 1st Ed. World Health Organisation, Geneva.
- Zalacain M, Cundliffe E. 1990. Methylation of 23S ribosomal RNA due to carB, an antibiotic-resistance determinant from the carbomycin producer, *Streptomyces thermotolerans*. *European Journal of Biochemistry* **189**:67-72.

## 6 Determination of *in vitro* antibacterial activity of plant oils containing medium-chain fatty acids against Gram-positive pathogenic and gut commensal bacteria

**Převzato z:** Hovorková P, Laloučková K, Šřivanová E. 2018. Determination of *in vitro* antibacterial activity of plant oils containing medium-chain fatty acids against Gram-positive pathogenic and gut commensal bacteria. Czech Journal of Animal Science **63**:119-125.

Klára Laloučková prováděla testy v laboratoři a je spoluautorkou textu článku.

### 6.1 Abstract

Increasing antibiotic resistance has led to a ban on antibiotic use in feed additives in the EU. Therefore, new non-antibiotic, pathogen-inhibiting agents are urgently needed. Inhibitory effects of eight plant oils containing medium-chain fatty acids (MCFAs) were evaluated against Gram-positive pathogenic and beneficial bacteria. The oils tested were palm, red palm, palm kernel (*Elaeis guineensis*), coconut (*Cocos nucifera*), babassu (*Attalea speciosa*), murumuru (*Astrocaryum murumuru*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*), and *Cuphea* oil (*Cuphea ignea*); the method used was broth microdilution, and the findings were expressed as minimum inhibitory concentration (80%). Both hydrolyzed and unhydrolyzed forms of the oils were tested. MCFA hydrolysis was catalyzed by porcine pancreas lipase. The selective effect of the hydrolyzed forms of tested oils was highly evident. While the hydrolyzed oils were active against all tested bacteria (*Clostridium perfringens*, *Enterococcus cecorum*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*), at 0.14–4.5 mg/ml, the same oils did not show any effect on commensal bacteria (*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp.). Tucuma and *Cuphea* seed oils showed the strongest antibacterial activity. Unhydrolyzed forms of all tested oils exerted no antibacterial effect against any test bacteria. This study, thus, forms a basis for the development of selective inhibitors in animal husbandry.

**Keywords:** antimicrobial effect; gastrointestinal tract; pathogens; palm oil; lauric acid; capric acid

## 6.2 Introduction

Industrialized countries have been reporting an ever-increasing burden of zoonoses and foodborne diseases. Although fresh products have represented a very important source of foodborne infections in recent years, infections caused by consumption and mishandling of food of animal origin are still a major concern (Havelaar et al. 2010).

Gram-positive bacteria represent the causative agents of both animal intestinal diseases and potentially lethal foodborne diseases in humans. For instance, *Clostridium perfringens* can cause food poisoning and necrotic enteritis, sometimes with fatal outcomes (Songer 2010). *Enterococcus cecorum* has recently been identified as a significant problem in broilers, and is increasingly being reported as an important cause of arthritis and osteomyelitis in chickens (Boerlin et al. 2012). Similarly, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* are considered to be the widespread pathogens causing serious illnesses and systematic disorder both in animals and humans (McLauchlin & Rees 2009).

Food-producing animals are an important reservoir of some of these serious pathogens. Therefore, there is increasing concern about controlling the spread of bacterial pathogens in animal husbandry. „Pathogen reduction“ strategies in the food chain can also result in significant economic gain. The incidence of foodborne pathogens is usually controlled with antibiotics. However, because of the public health concern, the use of antibiotics in both human and veterinary medicine has been viewed with caution. Consequently, there is widespread interest in the research and development of alternative antibacterial compounds. A valuable property of these antibacterial compounds is selective activity without causing harm to the commensal microbiota (Huyghebaert et al. 2011).

Phytogenic additives, including organic acid, present a plausible alternative as they enhance a number of important processes in the animal body as well as they can be used also in the food industry because of their antibacterial properties (Karaskova et al. 2015). Organic acids can also be used as feed or drinking water additives (Windisch et al. 2008). Medium-chain fatty acids (MCFAs) form a promising group of antibacterial agents. These saturated and unbranched monocarboxylic acids are present in various feed materials, especially coconut, palm, and *Cuphea* seed oils (Dierick et al. 2003). The MCFA group consists of caproic acid (C<sub>6:0</sub>, hexanoic acid), caprylic acid (C<sub>8:0</sub>, octanoic acid), capric acid (C<sub>10:0</sub>, decanoic acid), and lauric acid (C<sub>12:0</sub>, dodecanoic acid) (Bach & Babayan 1982). MCFAs have long been used in

feed preservation, especially in silage and foods, owing to their antibacterial effects, especially against Gram-positive bacteria (Kabara 1983).

Although the effects of plant oils in animal nutrition have been already observed, for example on ruminal fermentation and protozoal populations (Majewska et al. 2017) or milk performance in dairy cows (Dai et al. 2011), only few studies have discussed the antibacterial activity of plant oils against pathogenic and commensal bacteria present in gastrointestinal tract (Lee et al. 2015).

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of plant oils containing MCFAs against pathogenic and gut commensal Gram-positive bacteria, including five foodborne and six beneficial intestinal strains.

## **6.3 Material and methods**

### **6.3.1 Bacterial strains and culture conditions**

Thirteen bacterial strains were used to assess the antibacterial properties of plant oils, including seven pathogenic and six beneficial intestinal strains. All strains were grown and maintained in appropriate broth (Oxoid, UK). These strains were incubated at 37°C for 24/48 h under aerobic or anaerobic conditions, as appropriate (Table 6.1). The sources of bacterial strains (listed in Table 6.2) were as follows: CCM, Czech Collection of Microorganisms (Brno, Czech Republic); ATCC, American Type Culture Collection (Manassas, USA); CNCTC, Czech National Collection of Type Cultures (National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic); and CIP, Collections of Pasteur Institute (Paris, France). *C. perfringens* No. 56 was kindly provided by prof. F. Van Immerseel from the Ghent University (Belgium). *Bifidobacterium animalis* MA5 is an isolate from the culture collection of the Czech University of Life Sciences Prague.



**Table 6.1:** Growth media and conditions

<b>Bacteria</b>	<b>Medium</b>	<b>Condition</b>	<b>Incubation</b>
<i>Enterococcus cecorum</i>	Wilkins-Chalgren	aerobic	24 h
<i>Clostridium perfringens</i>	Wilkins-Chalgren	anaerobic	48 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	Brain-Heart Infusion	aerobic	24 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	Wilkins-Chalgren	aerobic	24 h
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Wilkins-Chalgren + BifiBuffer	anaerobic	48 h
<i>Lactobacillus spp.</i>	de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)	microaerophilic	48 h

**Table 6.2:** Bacterial strains used in this study

<b>Species</b>	<b>Strain</b>
<i>Enterococcus cecorum</i>	CCM 3659, CCM 4285
<i>Clostridium perfringens</i>	CIP 105178, CNCTC 5454, UGent 56
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Bifidobacterium animalis</i>	CCM 4988, MA5
<i>Bifidobacterium longum</i>	TP 1, CCM 4990
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CCM 91
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCM 4833

### **6.3.2 Plant oils**

Plant oils known to contain high percentage of MCFAs (Bach & Babayan 1982), (*Elaeis guineensis*) oils, were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Palm, red palm (*Elaeis guineensis*), babassu (*Attalea speciosa*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*) oils, and murumuru butter (*Astrocaryum murumuru*) were purchased from Sweet Natural Botanicals (USA). *Cuphea* seeds were purchased from the US Department of Agriculture - Agricultural Research Service (ARS; Plant Germplasm Inspection Station, USA), and dried and extracted using 80 g/kg methanol for 24 h. This extract was filtered and dried at 40°C by using a vacuum dryer Rotavapor R-200 (Buchi, Switzerland).

### **6.3.3 Determination of fatty acid composition of oils**

The fatty acid (FA) composition of the oils was determined by gas chromatography/flame ionization detection (GC-FID) at the Institute of Animal Science Prague-Uhřetíněves, Czech Republic. Alkaline trans-methylation of the extracted FAs was performed according to the standard ISO 5509 (1994) procedure. For GC analysis of methyl esters, a HP 6890 gas chromatograph (Agilent Technologies, Inc., USA) with a programmed 60-m DB-23 capillary column (J&W Scientific, USA) was used. FAs were identified based on retention times by comparing with the retention times of FAME Mix 37 standards (Sigma-Aldrich).

### **6.3.4 Preparation of plant oils for microdilution tests**

The oils were weighed and diluted in the same amount of dimethylsulfoxide (DMSO) (LachNer, Czech Republic), followed by the addition of a detergent Tween 80 (Sigma-Aldrich) to form an emulsion. After preliminary antibacterial tests with unhydrolyzed oils (data not shown), we concluded that in order to examine the antimicrobial properties of the oils, FA moieties esterified to the glycerol backbone of triacylglycerol must first be hydrolyzed into their free forms (free FAs). This hydrolysis was catalyzed by lipase from porcine pancreas (Sigma-Aldrich). The minimum amount of lipase required was calculated based on the molecular weight of the predominant FA (i.e. lauric or capric acid), as well as the enzyme activity specified by the manufacturer. The emulsion obtained as previously described was diluted in appropriate medium (depending on microorganism) containing lipase, resulting in a final oil concentration of 4.5 mg/ml. The final concentrations of DMSO

and Tween 80 did not exceed 1% and 0.1%, respectively. The resulting emulsion of the medium, lipase, and oil was warmed to 37°C and shaken for 1 h.

### **6.3.5 Determination of *in vitro* antibacterial activity of plant oils**

The antibacterial activity of the tested oils was evaluated *in vitro* by the broth microdilution method using 96-well microtiter plates, modified according to the proposed recommendations for effective assessment of the anti-infective potential of natural products (Cos et al. 2006). Samples were two-fold diluted in broth with porcine lipase, as stated in previous section, starting with an initial concentration of 4.5 mg/ml. The dilutions of each compound were prepared in appropriate medium (Table 6.1) recommended for the cultivation of certain bacteria (Oxoid). The bacterial inoculum was standardized to a density of  $1 \times 10^5$  CFU/ml by using the McFarland scale, and inoculated into the wells (10  $\mu$  l/well). The plates containing anaerobic bacteria were prepared in an anaerobic chambre (Bugbox; BioTrace, UK). The plates were incubated at 37°C for 24/48 h under aerobic, anaerobic, or microaerophilic conditions (Table 6.1). Microbial growth was assessed by culture turbidity, determined by the Infinite® 200 PRO Microplate Reader (Tecan, Switzerland) at 405 nm. The minimum inhibitory concentration for 80% (MIC80) was expressed as the lowest concentration of the compound that resulted in 80% reduction in growth compared to that in the extract-free, blank medium, without microorganisms. The susceptibility of all microorganisms to penicillin G was evaluated as a control. The positive control tubes contained 10 $\mu$ l of the bacterial suspension and 90  $\mu$ l of broth, while the negative control tubes contained 100  $\mu$ l of broth. Both controls contained 1% DMSO. All samples were tested in three independent experiments, each carried out in triplicate.

## **6.4 Results**

### **6.4.1 Fatty acid composition of plant oils**

Results of FA profile analysis are shown in Table 6.3. The composition of both palm oil and red palm oil was very similar, with the predominance of palmitic (C<sub>16:0</sub>; 41%) and oleic (C<sub>18:1</sub>; 40%) acids, while only trace amounts of MCFAs were noted. Lauric acid was detected as the dominant FA in tucuma oil (53%), murumuru butter (46%), palm kernel (45%), babassu (44%), and coconut oil (42%). In *Cuphea* oil, capric acid (C<sub>10:0</sub>) was found dominant (54%).

#### 6.4.2 *In vitro* antibacterial activity of plant oils

Minimum inhibitory concentrations (MIC<sub>80</sub>; 80% reduction of bacterial growth) of selected plant oils are shown in Table 6.4. As it is evident from our results, plant oils were ineffective toward the Gram-positive commensals (*Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp.). Also some of oil samples with high lauric acid content displayed antibacterial activity in our study. However, low or no antibacterial activity was observed in the case of coconut, red palm, and palm oils. Tucuma oil was effective against both strains of *E. cecorum* (2.25 mg/ml), two strains of *C. perfringens* (0.14–2.5 mg/ml), and *S. aureus* (0.56 mg/ml). Murumuru butter inhibited both all strains of *E. cecorum* (1.13–2.25 mg/ml) and *C. perfringens* (0.28–1.13 mg/ml), as well as *S. aureus* (1.13 mg/ml). Palm kernel oil had the inhibitory effect against *E. cecorum* (2.25 mg/ml), two strains of *C. perfringens* (1.13–2.25 mg/ml), and *S. aureus* (1.13 mg/ml). Babassu oil inhibited *E. cecorum* (2.25–4.5 mg/ml), *C. perfringens* (0.56 mg/ml), and *S. aureus* (1.13 mg/ml). *L. monocytogenes* was inhibited only by *Cuphea* oil (13 mg/ml). No oil samples exhibited considerable effect against pathogenic bacteria before hydrolysis (> 4.5 mg/ml; data not shown).

**Table 6.3:** Fatty acid profile of selected oils (%)<sup>1</sup>

Fatty acid	Oil							
	palm	red palm	palm kernel	coconut	babassu	murumuru	tucuma	<i>Cuphea</i>
Caproic	nd	nd	0.25	0.55	0.43	0.10	0.21	0.01
Caprylic	nd	nd	3.48	6.73	6.05	1.29	2.47	0.82
Capric	nd	nd	3.27	5.29	5.52	1.30	2.15	54.04
Lauric	0.20	0.23	45.24	41.31	43.98	46.34	53.37	3.63
Myristic	1.10	1.05	15.85	16.5	15.56	28.72	24.82	11.31
Palmitic	42.93	41.96	9.46	9.05	8.72	7.30	5.41	8.74
Palmitoleic	0.20	0.18	0.03	nd	nd	0.04	0.02	0.06
Stearic	4.43	4.84	2.66	2.92	3.73	2.93	1.89	1.40
Oleic	40.28	40.6	16.54	11.72	13.62	7.98	6.47	12.47
Linoleic	10.29	10.43	2.68	4.79	2.39	3.55	2.77	5.98
$\alpha$ -Linolenic	0.19	0.31	0.03	0.88	nd	0.05	0.06	0.53
Arachidonic	0.40	0.41	0.13	0.13	nd	0.12	0.07	0.12
Eicosenoic	nd	nd	0.10	0.15	nd	0.05	0.05	0.25

nd = not detected

<sup>1</sup>average of two analyses, each performed in triplicate

**Table 6.4:** Minimum inhibitory concentrations of selected plant oils (mg/ml)<sup>1</sup>

Species	Strain	Oil								penicilin G (mg/ml)
		palm	coconut	babassu	red palm	<i>Cuphea</i> seed	palm kernel	murumu ru	tucuma	
<i>Enterococcus cecorum</i>	CCM 3659	> 4.5	2.25	4.5	> 4.5	2.25	2.25	2.25	2.25	0.001
	CCM 4285	> 4.5	1.13	2.25	> 4.5	1.13	2.25	1.13	2.25	0.001
<i>Clostridium perfringens</i>	CNCTC 5454	> 4.5	> 4.5	0.56	> 4.5	4.5	1.13	1.13	2.50	0.00003
	UGent 56	> 4.5	> 4.5	0.56	> 4.5	2.25	> 4.5	0.56	1.13	0.00003
	CIP 105178	> 4.5	> 4.5	0.56	> 4.5	0.56	2.25	0.28	0.14	0.00003
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	1.13	> 4.5	> 4.5	> 4.5	0.001
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	> 4.5	0.56	1.13	> 4.5	2.25	1.13	1.13	0.56	0.00003
<i>Bifidobacterium animalis</i>	CCM 4988	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	0.00025
	MA5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	0.00025
<i>Bifidobacterium longum</i>	CCM 4990	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	0.0005
	TP1	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	0.001
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CCM 91	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	0.000125
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCM 4833	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	> 4.5	0.000125

<sup>1</sup>modus of three analyses, each performed in triplicate

## 6.5 Discussion

The plant oils are a heterogeneous mixture of FAs and it is necessary to know their prevalences in observed samples. Therefore, the analysis of the fatty acids composition in samples was performed prior to the antibacterial testing of plant oils. Contrary to other oil samples, in *Cuphea* seed oil (*Cuphea ignea*), capric acid was determined as a dominant fatty acid (Table 6.3). This percentage is lower compared to results of Zentek et al. (2011) (i.e.  $\pm$  85%). The fatty acid composition depends on the stability of the patterns under varying geographical and ecological conditions, as well as on the selected method and conditions of extraction. Lauric acid was detected as the dominant FA in samples of tucuma, murumuru, palm kernel, babassu, and coconut oil (Table 6.3), which is generally in agreement with previous findings (Dubois et al. 2007). This FA is considered the most effective MCFA against pathogenic bacteria (Galbraith et al. 1971).

Reduction of foodborne pathogens can be both costly and challenging, particularly in the light of the current microbial resistance status in both animal and human medicine. Antibiotics also frequently affect not only a certain pathogenic agent, but also the beneficial microbiota of the host (WHO 2017). In our study, none of the oils at tested concentrations showed any inhibition towards commensal bacteria (*Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp.), while all tested oils, excluding palm and red palm oil, possessed some degree of inhibitory activity against pathogens (Table 6.4). The resistance of *Bifidobacterium* to MCFAs can be caused by the lack of ferredoxin system responsible for the reduction of the nitro group in metronidazole, resulting in higher resistance to metronidazole, an antibiotic effective against most obligatory anaerobes (Pelissier et al. 2010). The negative antibacterial effect against *Lactobacillus acidophilus* and *L. fermentum* observed in our study corresponds to the findings of a previous study by Kodicek and Worden (1945), wherein they observed only low inhibition of *L. helveticus* inoculated in the medium containing riboflavin and salt. This finding represents the beneficial effects of MCFAs. In general, the antimicrobial susceptibility testing of anaerobic and slowly growing bacteria is complicated, and warrants further studies.

All of the effective oils were active only after hydrolysis. These findings are in agreement with the generally accepted mechanism of their antibacterial action, since the free FAs are believed to be the effective compounds (Lee et al. 2015). Fatty acids can pass across the bacterial cell membrane only in free form and subsequently, they can cause the intracellular

acidification and bacterial growth inhibition (Sun et al. 1998). FAs can also cause the conformational changes in the plasma membrane structure, thus affect the membrane permeability and disrupt the electron transport chain. The balancing of the membrane potential using ion pumps is energy-exhausting for the cell. Other processes contributing to bacterial growth inhibition may be the influence of enzyme activity, impairment of nutrient uptake, and generation of toxic peroxidation and autooxidation products (Desbois & Smith 2010). Based on the above mentioned facts it is evident that the hydrolysis (the releasing of bounds on glycerol, respectively) represents the key process of antibacterial properties of the oils.

In the current trial, the broadest range of antibacterial activity was observed in hydrolyzed *Cuphea* oil, where all tested bacteria, excluding beneficial microbiota, were inhibited (0.56-4.5 mg/ml) (Table 6.4). *Cuphea* oil, containing high amounts of capric acid (Table 6.3), was effective against all Gram-positive pathogenic strains examined (*E. cecorum*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes*, and *S. aureus*). The beneficial effect of whole *Cuphea* seeds, combined with exogenic lipase, was already observed by Dierick et al. (2003) in the experiments with piglets, where not only an antibacterial activity was observed, but also the enlargement of the villi in the small intestine was documented. This positive attribute was assigned to the high capric acid content of *Cuphea* seed oil.

In addition, *Cuphea* seed oil was the only one which inhibited *L. monocytogenes* in this trial. In some previous studies, *L. monocytogenes* was inhibited by capric acid at 0.15 mg/ml (Mbandi et al. 2004). Lauric acid also possessed anti-listerial activity in these studies. In Parfene et al. (2013), coconut oil exerted an inhibitory effect on *L. monocytogenes* at 0.312 mg/ml. However, we observed no inhibition of this pathogen by coconut oil. This difference could be due to different exposure times or higher percentage of lauric acid in the coconut oil used in the previous study (70% vs 41% in the current study).

Several previous studies were focused on the inhibition of *C. perfringens* using MCFAs. Skrivanova et al. (2005) estimated the effective concentrations of lauric acid for the inhibition of this pathogen at 0.04 mg/ml, in another study (Skrivanova et al. 2014) a 30-minute incubation with lauric acid (2 mg/ml) revealed disintegration of the cell wall in some cells of *C. perfringens*. However, cytoplasmic membrane appeared to remain intact. Galbraith et al.



(1971) also reported that the most effective MCFA inhibiting *C. perfringens* was lauric acid (0.05 mg/ml).

*S. aureus*, a pathogen listed in Global priority list of antibiotic-resistant bacteria (WHO 2017), was susceptible to all oils with the predominance of lauric acid (Table 6.4). Coconut and tucuma oil were the most effective (0.56 mg/ml). Ruzin and Novick (2000) also reported that lauric acid might be, at least, partially responsible for the inhibitory effect of glycerol monolaurate against *S. aureus*.

Very little is known about the antibacterial effect of FAs on *E. cecorum*. However, Orhan et al. (2011) observed the significant inhibitory effect of edible oils rich in long-chain fatty acids against *E. faecalis*. A lag period in the growth of *E. faecalis* in the presence of monolaurin, a monoacylglycerol of lauric acid, was also observed (Buňková et al. 2011). Based on these facts and our results, it can be assumed that lauric acid and other MCFAs represent the significant inhibitors of *E. cecorum*.

In conclusion, murumuru butter, tucuma, palm kernel, and babassu oils seem to be the compounds with most promising antibacterial effect (after hydrolysis), probably because they represent the compounds with lauric acid being the predominant FA. *Cuphea* seed oil with high capric acid content, on the other hand, displayed the broadest spectrum of antibacterial activity in our study. Low or no antibacterial activity was observed in the case of coconut, red palm, and palm oil. As mentioned above, no oil sample inhibited the commensal bacteria (*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp.). Since the effect would be highly undesirable, the inactivity against these bacterial strains poses the considerable benefit.

## **6.6 Conclusion**

In this study, a pronounced antibacterial effect of MCFA-containing plant oils was observed in the case of Gram-positive bacteria, without any inhibitory effect on the beneficial commensal bacteria. Since only a limited number of strains were used in our study, the antibacterial effect of these oils should be verified using additional bacterial strains in subsequent experiments. MCFAs are commonly available and can be developed as promising suitable alternatives to the banned growth-promoting antibiotics for use in animal husbandry; however, in vivo experiments are necessary prior to their practical implementation.

## 6.7 References

- Bach AC, Babayan VK. 1982. Medium-chain triglycerides: an update. *American Journal of Clinical Nutrition* **36**:950-962.
- Boerlin P, Nicholson V, Brash M, Slavic D, Boyen F, Sanei B, Butaye P. 2012. Diversity of *Enterococcus cecorum* from chickens. *Veterinary Microbiology* **157**:405-411.
- Bunkova L, Bunka F, Janis R, Krejci J, Dolezalkova I, Pospisil Z, Ruzicka J, Tremlova B. 2011. Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on foodborne pathogens or spoilage bacteria. *Acta Veterinaria Brno* **80**:29-39.
- Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. 2006. Antiinfective potential of natural products: how to develop stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology* **106**:290-302.
- Dai XJ, Wang C, Zhu Q. 2011. Milk performance of dairy cows supplemented with rapeseed oil, peanut oil and sunflower seed oil. *Czech Journal of Animal Science* **56**:181-191.
- Desbois AP, Smith VJ. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**:1629-1642.
- Dierick NA, Decuypere JA, Degeyter I. 2003. The combined use of whole *Cuphea* seeds containing medium chain fatty acids and an exogenous lipase in piglet nutrition. *Archives of Animal Nutrition* **57**:49-63.
- Dubois V, Breton S, Linder M, Fanni J, Parmentier M. 2007. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology* **109**:710-732.
- Galbraith H, Miller TB, Paton AM, Thompson JK. 1971. Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *Journal of Applied Bacteriology* **34**:803-813.
- Havelaar AH, Brul S, de Jong A, de Jonge R, Zwietering MH, Ter Kuile BH. 2010. Future challenges to microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology* **139**:79-94.
- Huyghebaert G, Ducatelle R, Van Immerseel F. 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Veterinary Journal* **187**:182-188.
- Kabara JJ. 1983. Medium-chain fatty acids and esters. Pages 109-140 in Branen AL, Davidson PM, editors. *Antimicrobials in Foods*. Marcel Dekker, New York.
- Karaskova K, Suchy P, Strakova E. 2015. Current use of phytogetic feed additives in animal nutrition: a review. *Czech Journal of Animal Science* **60**:521-530.

- Kodicek E, Worden A. 1945. The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram-positive micro-organisms. *Biochemical Journal* **39**:78-85.
- Lee ST, Ariffin AA, Radu S, Mohd Ghazali H. 2015. Effect of lipase hydrolysis on the antibacterial activity of coconut oil, palm mesocarp oil and selected seed oils against several pathogenic bacteria. *International Food Research Journal* **22**:46-54.
- Majewska M.P., Miltko R., Belzecki G., Skomial J., Kowalik B. (2017): Supplementation of rapeseed and linseed oils to sheep rations: effects on ruminal fermentation characteristics and protozoal populations. *Czech Journal of Animal Science*, 62, 527-538.
- Mbandi E, Brywig M, Shelef LA. 2004. Antilisterial effects of free fatty acids and monolaurin in beef emulsions and hot dogs. *Food Microbiology* **21**:815-818.
- McLauchlin J, Rees CE. 2009. Genus *Listeria*. Pages 244-257 in Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; Volume 3: The Firmicutes*. Springer, New York.
- Orhan IE, Ozcelik B, Sener B. 2011. Evaluation of antibacterial, antifungal, antiviral, and antioxidant potentials of some edible oils and their fatty acid profiles. *Turkish Journal of Biology* **35**:251-258.
- Parfene G, Horincar V, Tyagi AK, Malik A, Bahrim G. 2013. Production of medium chain saturated fatty acids with enhanced antimicrobial activity from crude coconut fat by solid state cultivation of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chemistry* **136**:1345-1349.
- Pelissier MA, Vasquez N, Balamurugan R, Pereira E, Dossou-Yovo F, Suau A, Magne F. 2010. Metronidazole effects on microbiota and mucus layer thickness in the rat gut. *FEMS Microbiology Ecology* **73**:601-610.
- Ruzin A, Novick RP. 2000. Equivalence of lauric acid and glycerol monolaurate as inhibitors of signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **182**:2668-2671.
- Skřivanová E, Marounek M, Dlouhá G, Kaňka J. 2005. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C2-C18 fatty acids. *Letters of Applied Microbiology* **41**:77-81.
- Skřivanová E, Pražáková S, Benada O, Hovorková P, Marounek M. 2014. Susceptibility of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* to sucrose monoesters of capric and lauric acid. *Czech Journal of Animal Science* **59**:374-380.
- Songer JG. 2010. Clostridia as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology* **140**:399-404.
- Sun CQ, O' Connor CJ, Turner SJ, Lewis GD, Stanley RA, Robertson AM. 1998. The effect of pH on the inhibition of bacterial growth by physiological concentrations of butyric acid: implications for neonates fed on suckled milk. *Chemico-Biological Interactions* **113**:117-131.

WHO. 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organisation, Geneva. Available from [www.who.int/entity/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en](http://www.who.int/entity/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en) (accessed February 2017).

Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A. 2008. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science* **86**:140-148.

Zentek J, Buchheit-Renko S, Ferrara F, Vahjen W, Van Kessel A, Pieper R. 2011. Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets. *Animal Health Research Reviews* **12**:83-93.

## 7 *In vitro* antimicrobial effect of palm oils rich in medium-chain fatty acids on mastitis-causing Gram-positive bacteria

**Převzato z:** Laloučková K, Malá L, Slaničková P, Skřivanová E. 2019. *In vitro* antimicrobial effect of palm oils rich in medium-chain fatty acids on mastitis-causing Gram-positive bacteria. Czech Journal of Animal Science **64**:325-331.

Klára Laloučková navrhla a prováděla experiment v laboratoři, zpracovávala výsledky a je autorkou původního textu článku.

### 7.1 Abstract

Various pathogens causing mastitis in dairy cattle are of serious concern due to their increasing antibacterial resistance and potential transmission to other cows, calves, and the environment, especially through the milking process. Therefore, alternative approaches to antimicrobial usage in the treatment or control of mastitis in dairy cattle are severely needed. The antibacterial effect of medium-chain fatty acids (MCFAs) is known to be significant for various pathogens, but there is only limited information about the activity of MCFAs on mastitis-causing pathogens. Moreover, no evidence about the antimicrobial effects of palm oils rich in MCFAs, such as coconut, palm kernel, and tucuma oil, can be found in the current literature. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antibacterial effect of palm oils rich in MCFAs, after cleavage by an exogenous lipase from *Mucor javanicus*, on bovine mastitis-causing strains (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis*) by the broth microdilution method. All tested palm oils exerted antibacterial activity towards eight tested bacterial strains in the range of 64 – 8192  $\mu\text{l/mL}$  with *Str. agalactiae* being the most sensitive and *S. aureus* being the most resistant species. The results of the present study demonstrate that palm oils rich in MCFAs can serve as an alternative to the predominantly used predip and postdip procedures in bovine mastitis control, but further *in vivo* studies are needed to confirm the findings for their possible applications.

**Keywords:** antibacterial; bovine; *Staphylococcus*; *Streptococcus*; vegetable oil

## 7.2 Introduction

Bovine mastitis affects the dairy industry worldwide. Defined as ‘inflammation of the mammary gland,’ mastitis is currently the most common reason for the use of antibacterials in lactating dairy cattle (Erskine et al. 2004). Van Boeckel (2015) estimated the global annual consumption of antimicrobials per kilogram of animal produced is  $45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  in cattle. The economic impact of bovine mastitis is tremendous – the annual losses have been estimated to be approximately 2 billion dollars in the US (Hossain et al. 2017). The loss comprises production losses connected with reduced milk production, treatment losses linked to necessary remedies, and loss of animal value due to the fibrotic changes to the udders (Jingar et al. 2017). The frequency of mastitis is usually higher in later lactations compared to that in the first lactation (Kašná et al. 2018).

The classical approach to cure mastitis in cattle is antibiotics, but this treatment is accompanied by various disadvantages, including a low cure rate, increasing occurrence of resistance, and the presence of antibiotic residues in milk (Gomes & Henriques 2016). Intramammary antibiotic treatment is usual praxis for mastitis treatment or control in dairy cattle herds. Commonly used drugs include betalactams, macrolides and lincosamides (Barkema et al. 2006). Cure rates rarely reach 50% in mastitis-causing *S. aureus* strains with currently available therapies (Ster et al. 2013). The antibiotic therapy of bovine mastitis has been related to emerging antimicrobial resistance in various bacterial strains, including isolates from the infected cows, other animals from the same herd, and even from food products of infected/cured animal origin (Silva et al. 2018). The modern concepts of mastitis cure and prevention include nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Breen 2017) and intramammary teat seals (Krömker et al. 2014). Nevertheless, the occurrence of antibiotic resistance in dairy cattle mastitis isolates is still of serious concern and is a reason for seeking an alternative treatment in current research.

Organic acids are promising alternatives to antibiotics due to their antimicrobial activity in controlling bacterial contamination and their ability to boost animal production (Polycarpo et al. 2017). Unbranched saturated fatty acids with medium-chain lengths of carbons, namely, caproic ( $\text{C}_{6:0}$ ), caprylic ( $\text{C}_{8:0}$ ), capric ( $\text{C}_{10:0}$ ) and lauric ( $\text{C}_{12:0}$ ) acids, are a group of antibacterials occurring naturally (e.g., in cow milk) (Legrand 2008). These fatty acids exhibit antimicrobial properties against a wide variety of pathogens, including gram-positive bacteria

(Hovorková et al. 2018). Their bactericidal or bacteriostatic effect is believed to occur through their ability to incorporate into bacterial membranes, increasing the fluidity of the membrane and resulting in leakage of the internal content from the cells (Chamberlain et al. 1991). Medium-chain fatty acids (MCFAs) frequently occur in oils of tropical palms originating in tropical and subtropical areas (Van der Vossen et al. 2001). It has been proven by previous research that the antibacterial effect of palm oils rich in MCFAs, such as babassu (*Attalea speciosa*), coconut (*Cocos nucifera*), murumuru (*Astrocaryum murumuru*), palm kernel (*Elaeis guineensis*), and tucuma (*Astrocaryum vulgare*) oils, is exerted only after their cleavage, meaning after their release from triglycerides; the most prevalent of the detected MCFAs is dodecanoic (lauric) acid followed by the tetradecanoic (myristic) acid, with the total MCFAs content higher than 50%, and saturated fatty acids content more than 80% in all the tested oils (Hovorková et al. 2018). The antibacterial properties of free MCFAs and their monoesters against various pathogens (Buňková et al. 2011), including staphylococci (Batovska et al. 2009) and streptococci (Schlievert & Peterson 2012), are well known. Nair (2005) evaluated the *in vitro* antibacterial activity of capric acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens in milk and found it to be effective. Unlike free fatty acids, palm oils are complex substances with enhanced sensory properties and lower prices, but there are no studies about the inhibitory activity of palm oils rich in MCFAs towards bovine mastitis-causing bacteria.

The present research was carried out to evaluate the possible application of palm oils rich in MCFAs with the aim of decreasing undesirable bacterial colonization of udders of dairy cows, especially during the milking process.

## **7.3 Materials and methods**

### **7.3.1 Chemicals**

Coconut oil (*C. nucifera*) and palm kernel oil (*E. guineensis*) were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, CZ), while tucuma oil (*A. vulgare*) was obtained from Natural Sweet Botanicals (Panama City, FL, USA). The oils used in this experiment were prepared according to previous research (Hovorková et al. 2018). Briefly, the oils were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and emulsified by Tween 80 (both Sigma-Aldrich, Prague, CZ) to ensure sufficient dispersion into an emulsion with a final concentration of 819200 µg/mL. The final concentration of solvents in the tested samples did not exceed 1%; thus, the bacterial

viability could not be influenced (Wadhvani et al. 2009). Appropriate volumes of previously obtained emulsions with 100x higher concentrations were finally diluted in tryptic soy broth (TSB; Oxoid, Brno, CZ) or TSB enriched with yeast extract (Oxoid, Brno, CZ) to reach a final concentration of 8192 µg/mL. This oil-medium emulsion was further supplemented with a lipase from *Mucor javanicus* (Sigma-Aldrich, Prague, CZ), according to its lipolytic activity at 2.73 mg/mL in culture media. The solution consisting of tested oil, an appropriate cultivation medium chosen according to the tested strain, and the lipase from *M. javanicus* was then shaken in a water bath heated to 37°C for one hour to release MCFAs from triglycerides and to facilitate their antibacterial action. Penicillin G (Sigma-Aldrich, Prague, CZ) was used as a growth control for bacterial cultures. A row of wells filled with medium only and a row with bacteria in medium without palm oil emulsion were included in every microtiter plate as a negative control and positive bacterial growth control, respectively.

### **7.3.2 Bacterial cultures and their maintenance**

To evaluate the antibacterial potential of the abovementioned palm oils rich in MCFAs towards bovine mastitis pathogens, 8 strains of bacteria that were proven mastitis-causing pathogens were chosen. The strains listed in Table 7.1 were purchased from the Czech Collection of Microorganisms and from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Aliquots of bacterial cultures were stored at -80°C in 20% glycerol until use in TSB or TSB with yeast extract. Stock cultures of microorganisms were cultivated in medium at 37°C for 24 hours prior to testing.

### **7.3.3 Determination of the minimum inhibitory concentrations**

Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined using the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013) to evaluate the antibacterial activity of coconut, palm kernel, and tucuma oil against chosen gram-positive bovine mastitis-causing strains. The *in vitro* broth microdilution method performed in 96-well microtiter plates was used to test the antimicrobial susceptibility of palm oils rich in MCFAs. The initial concentration of palm oils for susceptibility testing was 8192 µg/mL. Plates were inoculated by bacterial suspension to a final density of  $5 \cdot 10^5$  CFU/mL, which was controlled using a McFarland Densitometer Biosan DEN-1 (BioTech, Prague, CZ), and incubated at 37°C for 24 hours.



**Table 7.1:** Bacterial strains and their specification

Bacterium	Strain	Specification	Other designation
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach 1884 <sup>AL</sup>	CCM 4442	bovine mastitis isolate (CZ); production of $\beta$ -haemolysin; atypical strain: phosphatase and clumping factor negative	P. Benda M 27/92
	CCM 6188	bovine mammary gland isolate; loss of haemolysins production	B. Skalka K 126
	DSM 6732	bovine udder isolate; murein: A11.3; no toxin genes present (PCR)	ATCC 25178
<i>Streptococcus agalactiae</i> Lehmann and Neumann 1896 <sup>AL</sup>	CCM 6187	bovine mammary gland isolate (CZ); test organism for CAMP-test, production strain for CAMP-factor; control strain for PYRAtest	J. Smola 3767
	DSM 6784	bovine udder infection isolate; Lancefield group B; beta-haemolytic; recommended as reference strain for cAMP test	ATCC 27956
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> (ex Diernhofer 1932) Garvie et al. 1983 emend. Vieira et al. 1998	DSM 20662	cow isolate	ATCC 43078 NCDO 2023
<i>Streptococcus uberis</i> Diernhofer 1932 <sup>AL</sup>	CCM 4617	subclinical bovine mastitis isolate (CZ); control strain for STREPTOtest and HIPPURATEtest	P. Benda 1268
	DSM 20569	type strain	ATCC 19436 CCUG 17930 JCM 5709 NCDO 2038 NCTC 3858

Bacterial growth before and after incubation was evaluated spectrophotometrically by a Tecan Infinite® 200 PRO microplate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) at a wavelength of 405 nm. MICs were expressed as the lowest palm oil concentration that resulted in 80% growth reduction compared to the oil-free growth control. In addition, a susceptibility test of all strains to penicillin G was also performed by MIC determination, as in the case of palm oils. All combinations of oil/penicillin G per strain were tested in three individual experiments, each of which was carried out in triplicate. The final MIC was determined as the mode of all values. In accordance with turbidity values measured in the wells of the microtiter plates before and after incubation of the stock solution of three tested palm oils and eight bacterial strains, MIC values for the selected oils and bacteria were calculated. No antimicrobial activity of palm oils was observed without prior lipase cleavage (Hovorková et al. 2018); therefore, the results mentioned below only apply to oils after cleavage by a lipase from *M. javanicus*.

## 7.4 Results

The minimum inhibitory concentrations (MICs) displayed in Table 7.2 show susceptibility of all tested gram-positive bovine mastitis-causing pathogenic strains to the chosen palm oils in the concentration range of 64 (*S. aureus*) – 8192 µg/mL (*Str. agalactiae*). The most sensitive of the tested bacterial strains according to the lowest measured modal MIC value was *Str. agalactiae* CCM 6178 (64 µg/mL in the case of palm kernel oil), followed by *Str. agalactiae* DSM 6784, and *Str. uberis* DSM 20569 (128 µg/mL for tucuma and palm kernel oil, respectively). The inhibitory activity, viewed as the average of the MIC values for each oil against all strains, showed palm kernel oil to be the most effective (average MIC 1720 µg/mL), followed by tucuma oil (average MIC 1776 µg/mL), and coconut oil (average MIC 3040 µg/mL). The most sensitive species of tested bacteria was *Str. agalactiae* with an average MIC value of 331 µg/mL for all tested oils, followed by *Str. uberis* (1045 µg/mL), *Str. dysgalactiae* (1707 µg/mL), and *S. aureus* (4323 µg/mL). *Str. agalactiae* was also the most sensitive species (average MIC 0.00037 µg/mL), and *S. aureus* was the most resistant species (average MIC 0.00138 µg/mL) to antibiotic control as demonstrated by penicillin G. The susceptibility pattern of the species to palm oils was similar to that of penicillin G, except for the switch between susceptibility of *Str. dysgalactiae* and *Str. uberis*.

**Table 7.2:** Minimum inhibitory concentrations of tested palm oils ( $\mu\text{g/mL}$ )<sup>1</sup>

Strain		modus MIC [ $\mu\text{g/mL}$ ]				average MIC of oils	average MIC of penicillin G
		coconut oil	palm kernel oil	tucuma oil	penicillin G		
<i>S. aureus</i>	CCM 4442	2048	2048	2048	0.001953	4324	0.00138
	CCM 6188	8192	4096	4096	0.001953		
	DSM 6732	8192	4096	4096	0.000244		
<i>Str. agalactiae</i>	CCM 6187	1024	64	256	0.000244	331	0.00037
	DSM 6784	256	256	128	0.00049		
<i>Str. dysgalactiae</i>	DSM 20662	2048	2048	1024	0.000488	1707	0.00049
<i>Str. uberis</i>	CCM 4617	2048	1024	2048	0.000488	1045	0.00061
	DSM 20569	512	128	512	0.000977		
total average MIC		3040	1720	1776	0.00082		

<sup>1</sup>modus of triplicates of three independent experiments

## 7.5 Discussion

Increasing resistance to drugs in many bacteria has resulted in a ban on the use of antibiotic growth promoters in livestock farming among EU states (Regulation EC No. 1831/2003 of the European Parliament and the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition). As there is a potential threat of spreading antibiotic resistance genes between bacterial strains causing mastitis in bovines, it is necessary to look for new natural antibacterial compounds acting specifically against mastitis-causing pathogens. Plant (palm) oils containing medium-chain lipids can be found in natural products such as milk and are nontoxic to mucosa while being able to inhibit a wide variety of human and animal pathogens (Churchward et al. 2018). Moreover, all MCFAs, their triglycerides, and coconut oil have

GRAS status meaning, that they are generally recognized as safe for use in human nutrition (FDA 2019).

A number of biological agents are already known to possess *in vitro* antibacterial activity against both contagious and environmental bovine mastitis-causing strains. These substances include extracts of various plants, such as *Alternanthera brasiliana*, *Achillea millefolium*, *Baccharis trimera*, *Cedrus deodara*, *Curcuma longa*, *Eucalyptus globulus*, *Ocimum sanctum*, *Origanum vulgare*, *Solidago chilensis*, *Thymus vulgaris*, etc. (Mushtaq et al. 2018).

MCFAs are well known to possess *in vitro* antibacterial properties towards various pathogens, but to the best of our knowledge, there is no evidence about the antibacterial properties of palm oils rich in MCFAs against bovine mastitis-causing staphylococci and streptococci. Batovska (2009) evaluated the antibacterial activity of MCFAs towards *S. aureus* 209, *S. aureus* 146 MR, and *S. aureus* ATCC 33862 USA by the agar-well diffusion method and discovered that capric acid inhibits all three strains at concentrations of 250 – 500 µg/mL and that lauric acid inhibits *S. aureus* 209 at a concentration of 125 µg/mL. These concentrations inhibiting staphylococcal growth are approximately 10x lower than in the case of the palm oils tested in this study (2048 – 8192 µg/mL). In addition, Schlievert and Peterson (2012) evaluated the inhibitory activity of lauric acid – in the form of glycerol monolaurate (monolaurin) – against 54 different *S. aureus* strains and found its MIC to be 300 µg/mL. Because palm oils are diverse combinations of fatty acids, not only MCFAs but also tocopherols, polyphenols, phytosterols, and phenolic acids (Srivastava et al. 2016), it can be assumed that these compounds interact due to their mechanisms of action and thus reduce the antibacterial activity of the oils themselves. Another reason for the decreased antibacterial activity of palm oils when compared to pure MCFAs can be due to their incomplete release from triglycerides during the cleavage by lipase. This fact was confirmed in a trial by Nair (2005), where the growth of 15 clinical isolates of mastitis-causing pathogens including *S. aureus*, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, and *Str. uberis* was inhibited by caprylic acid and monocaprylin. The authors concluded that the most effective concentration inhibiting the abovementioned mastitis-causing isolates in autoclaved milk was 100 mM ( $6.93 \cdot 10^{-4}$  mg/mL) of caprylic acid and 50 mM ( $2.29 \cdot 10^{-4}$  mg/mL) of monocaprylin. Monolaurin is effective against the growth of *Str. agalactiae*, as shown in a study by Schlievert and Peterson (2012), where glucose monolaurate had antibacterial activity against three strains of this bacterium at an MIC 30 of µg/mL. In our study, the effective concentration of oil against *Str. agalactiae*

was up to 34x higher than that of glucose monolaurate in the case of coconut oil and the CCM 6178 strain, but only 2x higher in the case of palm kernel oil against the same bacterial strain. This difference could be due to the different degree of hydrolysis in both oils during the cleavage process. The susceptibility of *S. aureus* to the oils was significantly higher than the susceptibility of other species not only in the present study – average MIC 13x higher than in *Str. agalactiae* species – but also in other studies, as mentioned above. The probable reason for the profound resistance of *S. aureus* is believed to be caused by its capsule, which is formed by exopolysaccharides, and slime production has also been shown to exist in mastitis-causing strains (Baselga et al. 1994).

As there is a known link between bacterial udder contamination causing mastitis and hygiene (Schreiner & Ruegg 2003), a variety of pre- and postmilking teat disinfection procedures are used in praxis. The most commonly applied treatments, especially after milking, are iodine-based (iodophors) and chlorhexidine-based; however, both types of disinfectants currently struggle with bacteria that are gaining resistance to these substances (Behiry et al. 2012). The antibacterial properties of plant oils rich in MCFAs against mastitis-causing pathogens are therefore desirable. The advantage of plant oils rich in MCFAs lies within their positive effect on skin conditions (Oyedeji & Okeke 2010), as well as their antibacterial activity; therefore, using plant oils rich in MCFAs as a part of teat preparation and treatment during the milking process can be beneficial.

## **7.6 Conclusions**

The potential health risk of foodborne transmission of antibiotic-resistant animal pathogenic bacterial strains has led to the need for new alternative antibacterial sources in the dairy industry. In this study, the antibacterial effect of palm oils rich in MCFAs, namely, coconut, palm kernel, and tucuma oil (after cleavage with a lipase from *Mucor javanicus*) was observed against eight bovine mastitis-causing pathogens *in vitro*. The results offer an alternative approach to mastitis prevention in cattle herds since oils rich in MCFAs are valuable antibacterial remedies suitable for use in teat preparation and treatment.

## **7.7 References**

Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. 2006. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* **89**:1877-1895.

- Baselga R, Albizu I, Amorena B. 1994. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Veterinary Microbiology* **39**:195-204.
- Batovska DI, Todorova T, Tsvetkova V, Najdenski HM. 2009. Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationships. *Polish Journal of Microbiology* **58**:43-47.
- Behiry AE, Schlenker G, Szabo I, Roesler U. 2012. *In vitro* susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis to different antimicrobial agents. *Journal of Veterinary Science* **13**:153-161.
- Breen J. 2017. The importance of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in mastitis therapeutics. *Livestock* **4**:182-185.
- Buňková L, Buňka F, Janiš R, Krejčí J, Doležalková I, Pospíšel Z, Růžička J, Tremlová B. 2011. Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on foodborne pathogens or spoilage bacteria. *Acta Veterinaria Brno* **80**:29-39.
- Chamberlain NR, Mehrtens B, Xiong Z, Kapral F, Boardman J, Rearick JI. 1991. Correlation of carotenoid production, decreased membrane fluidity, and resistance to oleic acid killing in *Staphylococcus aureus* 18Z. *Infection and Immunity* **59**:4332-4337.
- Churchward CP, Alany RG, Snyder LA. 2018. Alternative antimicrobials: the properties of fatty acids and monoglycerides. *Critical Reviews in Microbiology* **44**:561-570.
- CLSI. 2013. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard M07-A10, 10th Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Erskine R, Cullor J, Schaellibaum M, Yancey B, Zecconi A. 2004. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. *National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings* **1**:400-414.
- FDA. 2019. *Electronic Code of Federal Regulations*. U.S. Food & Drug Administration, College Park. Available from [www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=3ee286332416f26a91d9e6d786a604ab&mc=true&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21tab\\_02.tpl](http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=3ee286332416f26a91d9e6d786a604ab&mc=true&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21tab_02.tpl) (accessed February 2019).
- Gomes F, Henriques M. 2016. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology* **72**:377-382.
- Hossain MK, Paul S, Hossain MM, Islam MR., Alam MGS. 2017. Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test. *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry* **4**:1030.
- Hovorková P, Laloučková K, Skřivanová E. 2018. Determination of *in vitro* antibacterial activity of plant oils containing medium-chain fatty acids against Gram-positive pathogenic and gut commensal bacteria. *Czech Journal of Animal Science* **63**:119-125.

- Jingar SC, Singh M, Roy AK. 2017. Economic losses due to Clinical Mastitis in Cross-Bred Cows. *International Journal of Livestock Research* **8**:254-263.
- Kašná E, Zavadilová L, Stipkova M. 2018. Genetic evaluation of clinical mastitis traits in Holstein cattle. *Czech Journal of Animal Science* **63**:443-451.
- Krömker V, Grabowski NT, Friedrich J. 2014. New infection rate of bovine mammary glands after application of an internal teat seal at dry-off. *Journal of Dairy Research* **81**:54-58.
- Legrand P. 2008, Nutritional interest of different fatty acids from milk fat. *Sciences des Aliments* **28**:34-43.
- Mushtaq S, Shah AM, Shah A, Lone SA, Hussain A, Hassan QP, Ali MN. 2018. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microbial Pathogenesis* **114**:357-361.
- Nair MKM, Joy J, Vasudevan P, Hinckley L, Hoagland TA, Venkitanarayanan KS. 2005. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* **88**:3488-3495.
- Oyedeki FO, Okeke IE. 2010. Comparative analysis of moisturizing creams from vegetable oils and paraffin oil. *Research Journal of Applied Sciences* **5**:157-160.
- Polycarpo GV, Andretta I, Kipper M, Cruz-Polycarpo VC, Dadalt JC, Rodrigues PHM, Albuquerque R. 2017. Meta-analytic study of organic acids as an alternative performance-enhancing feed additive to antibiotics for broiler chickens. *Poultry Science* **96**:3645-3653.
- Schlievert PM, Peterson ML. 2012. Glycerol monolaurate antibacterial activity in broth and biofilm cultures. *PLOS ONE* (e40350) DOI: 10.1371/journal.pone.0040350.
- Schreiner DA, Ruegg PL. 2003. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science* **86**:3460-3465.
- Silva JG, Alcântara AM, Mota RA. 2018. Bovine mastitis caused by *Staphylococcus* spp. Methicillin-resistant: literature review. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **38**:223-228.
- Srivastava Y, Semwal AD, Majumdar A. 2016. Quantitative and qualitative analysis of bioactive components present in virgin coconut oil. *Cogent Food & Agriculture* (1164929) DOI: 10.1080/23311932.2016.1164929.
- Ster C, Allard M, Boulanger S, Boulet ML, Mulhbacher J. 2013. Experimental treatment of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. *Journal of Dairy Science* **96**:1000-1008.
- Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**:5649-5654.
- Van der Vossen HAM, Umali BE, Oyen LPA, Jansen PCM. 2001. Vegetable oils and fats. Pages 13-170 in Jansen PCM, Westphal E, Wulijarni-Soetjipto N, editors. *Plant Resources of South-East Asia, Volume 14*. Backhuys Publishers, Leiden.

Wadhvani T, Desai K, Patel D, Lawani D, Bahaley P, Joshi P, Kothari V. 2009. Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. *Internet Journal of Microbiology* 7:1-13.



## 8 In vitro Antagonistic Inhibitory Effects of Palm Seed Crude Oils and their Main Constituent, Lauric Acid, with Oxacillin in *Staphylococcus aureus*

**Převzato z:** Lalouckova K, Skrivanova E, Rondevaldova J, Frankova A, Soukup J, Kokoska L. 2021. In vitro Antagonistic Inhibitory Effects of Palm Seed Crude Oils and their Main Constituent, Lauric Acid, with Oxacillin in *Staphylococcus aureus*. Scientific Reports **11**:1-12.

Klára Laloučková prováděla experiment v laboratoři, zpracovávala výsledky a je autorkou původního textu článku.

### 8.1 Abstract

Infections caused by *Staphylococcus aureus* are a serious global threat, and with the emergence of antibiotic resistance, even more difficult to treat. One of the possible complications in antistaphylococcal therapy represents negative interactions of antibiotics with food. In this study, the *in vitro* interaction between oxacillin and crude palm seed oil from *Astrocaryum vulgare*, *Cocos nucifera*, and *Elaeis guineensis* against nine strains of *S. aureus* was determined using the checkerboard method. Lauric acid was identified as a major constituent of all tested oils by gas chromatography. The results showed strong concentration dependent antagonistic interactions between palm oils and oxacillin with values of fractional inhibitory concentrations indices ranging from 4.02–8.56 at concentrations equal or higher than 1024 µg/mL of the tested oils. Similarly, lauric acid in combination with oxacillin produced antagonistic action with fractional inhibitory concentration indices ranging from 4.01–4.28 at 1024 µg/mL. These findings suggest that interference between oxacillin and palm oils and their constituents can negatively affect the treatment of staphylococcal infections in humans and other animals.

**Key words:** medium-chain fatty acid; interaction; coconut oil; tucuma oil; palm kernel oil

## 8.2 Introduction

*Staphylococcus aureus*, a gram-positive bacterium, occurs naturally on the skin and mucus membranes of healthy individuals and is a common cause of pneumonia, skin infections, and systemic infections in humans and other animals (Vos et al. 2011). Its ability to resist a broad range of antibacterials in a short period makes it one of the most dangerous microorganisms influencing the global population, with strains resistant to beta-lactams, such as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) being considered a high priority pathogen (WHO 2017). However, currently used antistaphylococcal antibiotics (e.g., vancomycin, daptomycin, and linezolid) are struggling against rising resistance, serious side effects, and relatively high costs (Rodvold & McConeghy 2014). Hence, steps toward elimination of bacteremia caused by multi-drug resistant strains are still needed. Among other possible options, combinatory treatment is valuable for eradicating evolution of resistance by targeting different sites of the bacterial cell (Aldeyab et al. 2008; Qin et al. 2017). For example, the combination of vancomycin and a beta-lactam antibiotic (oxacillin) is currently being used effectively in the treatment of MRSA (Tabuchi et al. 2017). A combination of beta-lactam antibiotic and beta-lactamase inhibitors, such as co-amoxiclav consisting of amoxicillin and clavulanic acid, has also been used for MRSA therapy (Ba et al. 2015). However, combinations of certain antibiotics can produce negative interactions and undesirable side effects. Antagonistic action generally occurs in the treatment of infection when mixing bactericidal and bacteriostatic drugs (Ocampo et al. 2014), as seen when using a combination of the slow acting bactericidal vancomycin and bacteriostatic clindamycin against *S. aureus* (Booker et al. 2004). Generally faster acting agents, such as clindamycin or oxacillin, inhibit the function of vancomycin, which has a gradual onset of action and exhibits antibacterial properties only on replicating cells (Ho & Klempner 1986).

Combining various drugs is the prevalent praxis used to obtain an increase of the desired effects, such as in anesthesia and pain management. However, enhancement of the undesired effects might also occur, limiting the therapeutic value (Zanderigo et al. 2006). Such interactions are also known to occur when combining drugs with various foods and food products. Drug-food interactions are defined as changes in efficacy and/or toxicity of pharmaceutical drugs induced by the consumption of any food product, including functional foods and dietary supplements (Mouly et al. 2017). Various drug-food interactions (e.g., drug interaction with the fat content of the meal), drug-nutrient interactions (e.g., with grapefruit

juice or soy) and herb-drug interactions (e.g., with ginkgo or St John's wort) have been described and reviewed (Fugh-Berman 2000; Cheng 2006; Boullata & Hudson 2012; Pirmohamed 2013). The most well-known example of drug-food interaction is that of grapefruit juice that can inhibit the intestinal metabolism of more than 85 drugs by altering cytochrome P450 (CYP3A4) isoforms (Bailey et al. 2013). Grapefruit juice, combined with erythromycin, increases the bioavailability of the antibiotic in the small intestine (Kanazawa et al. 2001), thereby increasing the possibility of adverse effects, such as cardiac dysrhythmias (Genser 2008). In contrast, a combination of ampicillin and pomegranate methanol extract acts synergistically *in vitro* against MRSA (Braga et al. 2005). Similarly, fatty acid methyl esters obtained from soybean, corn, and sunflower crude oils potentiate the antifungal effect of itraconazole *in vitro* (Pinto et al. 2017).

Vegetable oils are essential components of animal nutrition and contain various biologically active constituents such as carotenoids, tocopherols (Chiu et al. 2009), coenzyme Q10 (de Souza Guedes et al. 2017), and fatty acids (Anushree et al. 2017). These are carboxylic acids with long, unbranched carbon chains, some of which may contain double bonds (McGaw et al. 2002). In general, fatty acids are believed to be responsible for the antibacterial activity of palm oils. They usually occur in the form of triglycerides; their hydrolysis into free fatty acids is necessary for their antibacterial effect to be exerted (Tangwacharin & Khopaibool 2012; Lee et al. 2015; Hovorková et al. 2018). The seeds of tropical palms such as tucuma (*Astrocaryum vulgare*), coconut (*Cocos nucifera*), and African oil (*Elaeis guineensis*) palm are one of the most economically important sources of plant oils, and are known to contain mainly fatty acids of medium-chain length (MCFAs), with a prevalence of lauric acid (C<sub>12:0</sub>; LA). Apart from various physiological functions, the LA produces a growth-inhibitory effect against algae (McGrattan et al. 1976), fungi (Era et al. 2015), protozoa (Dohme et al. 2004), and both gram-negative (Sun et al. 2003; Skřivanová et al. 2006; Thormar et al. 2006) and gram-positive bacteria (Bergsson et al. 2001). It also inhibits the production of bacterial virulence factors such as beta-lactamases, a group of exoproteins inducing beta-lactams inactivation and moreover enhancing toxin production by *S. aureus* at subinhibitory antibiotic concentrations (Projan et al. 1994); toxic shock syndrome toxins (Ruzin & Novick 2000); and hemolysins (Liaw et al. 2004). In addition to LA, tropical palms contain caproic (C<sub>6:0</sub>), caprylic (C<sub>8:0</sub>), and capric (C<sub>10:0</sub>) acids that also possess various antimicrobial properties (Hanczakowska et al. 2011; Huang et al. 2011; Kollanoor-Johny 2012). In addition, MCFAs

are known to be effective against *S. aureus*. Batovska et al. (2009) concluded that when these fatty acids are esterified with glycerol and create e.g., monolaurin, their direct antistaphylococcal effect is intensified. Ubogogu et al. (2006) observed a noticeable *in vitro* inhibitory effect of *E. guineensis* palm kernel oil against *S. aureus*. The mechanism of antimicrobial action of fatty acids is not fully known, the prime target seems to be the bacterial cell membrane together with various essential processes that occur within and at the membrane, including nutrient uptake or enzyme inhibition (Desbois & Smith 2010). The amphiphilic nature of fatty acids enables them to act as detergents at high concentrations and aid the solubilization of the lipids in the membranes (Churchward et al. 2018). It has been experimentally proven that doses of LA equal to or higher than 100 µg/mL ( $\geq 500$  µM) induce reversible morphological changes of lipid bilayers (Yoon et al. 2015), cause partial solubilization of the cell membrane, and interfere with metabolic regulation, leading to the inhibition of bacterial growth (Desbois & Smith 2010). It is well known that bactericidal drugs are most potent with actively growing cells and that inhibition of growth, induced by a combination with a bacteriostatic drug, can result in reduction of drug efficacy (Ocampo et al. 2014).

Besides the antimicrobial properties, LA is known to exhibit synergistic antistaphylococcal activity in combination with monolaurin (Batovska et al. 2009), lactic acid (Tangwatcharin & Khopaibool 2012), and gentamicin (Kitahara et al. 2006). However, limited information is available regarding the possible negative interactions of palm oils with antimicrobial agents. Therefore, we decided to perform a screening test, focused on determining the combined effect of the chosen palm oils and free MCFAs ( $C_{6:0} - C_{12:0}$ ) with representatives of all major antibiotic groups, namely beta-lactams (amoxicillin, ampicillin, and oxacillin), tetracyclines (tetracycline), glycopeptides (vancomycin), and aminoglycosides (gentamicin), against three reference strains of *S. aureus*. Among the free MCFAs, only LA showed above mentioned synergism with gentamicin against chosen *S. aureus* strains; the interactions of all free MCFAs with tetracycline and vancomycin were indifferent, but beta-lactams, namely amoxicillin, ampicillin and especially oxacillin, showed results that were warranted further investigation with LA showing the strongest antagonistic interactions (K. Lalouckova and L. Kokoska, unpublished data). In the present study, we evaluated *in vitro* combinatory effect of *A. vulgare*, *C. nucifera*, and *E. guineensis* seed crude oils and their main constituent LA with oxacillin, using the checkerboard microdilution method, against different strains of *S. aureus*.

## 8.3 Results

### 8.3.1 Fatty acid composition of crude oils

In the first part of the study, fatty acid composition of the tested oils was identified using GC-FID. As shown in Table 8.1, oils from *A. vulgare*, *C. nucifera*, and *E. guineensis* consisted mainly of 58.2, 53.88 and 52.24 mg/g of MCFAs, respectively. LA was a major constituent of the oils, present at a concentrations of 53.37 mg/g in *A. vulgare*, 45.24 mg/g in *E. guineensis*, and 41.31 mg/g in *C. nucifera* oil. This profile corresponded with the total saturated fatty acid composition, where *A. vulgare* is followed by *C. nucifera* and *E. guineensis* oil with values of 90.32, 82.35, and 80.21 mg/g, respectively. The contents of other MCFAs, namely caprylic, capric, and caproic acids, were 6.73, 5.29, and 0.55 mg/g in *C. nucifera*, 3.48, 3.27, and 0.25 mg/g in *E. guineensis*, and 2.47, 2.15, and 0.21 mg/g in *A. vulgare* oil, respectively. In addition to MCFAs, saturated fatty acids consisted of myristic, palmitic, and stearic acids. Their respective contents were 24.82, 5.41, and 1.89 mg/g in *A. vulgare*; 16.5, 9.05, and 2.92 mg/g in *C. nucifera*; and 15.85, 9.46, and 2.66 mg/g in *E. guineensis* oil.

Although saturated fatty acids were the major constituents of all oils analysed, the composition of monounsaturated (MUFAs) and polyunsaturated (PUFAs) fatty acids was also determined. MUFAs, consisting of oleic, eicosenoic, and palmitoleic acids, were the most abundant in *E. guineensis* oil (16.67 mg/g), and were present at relatively lower concentrations in *C. nucifera* and *A. vulgare* oil (11.87 and 6.55 mg/g, respectively). The oleic acid content was the highest in all samples, ranging from 6.47–16.54 mg/g. In contrast, eicosenoic (0.05–0.15 mg/g) and palmitoleic acid ( $\leq 0.03$  mg/g) were present in minor amounts.

PUFA content in *C. nucifera* oil (5.8 mg/g) was double that of *A. vulgare* (2.9 mg/g) and *E. guineensis* (2.84 mg/g) oil. In *C. nucifera* oil, linoleic acid was the most abundant PUFA, similar to *A. vulgare* and *E. guineensis* oil at 4.79, 2.77, and 2.68 mg/g, respectively. The second most abundant PUFA in *C. nucifera* oil was  $\alpha$ -linoleic acid (1.88 mg/g), which was also present in lower amounts in *A. vulgare* (0.06 mg/g) and *E. guineensis* (0.03 mg/g) oil. Compared to *C. nucifera* and *A. vulgare* oil (both 0.13 mg/g), arachidonic acid was the least abundant PUFA in *E. guineensis* oil (0.07 mg/g).

**Table 8.1:** Fatty acid profile of crude palm seed oils. Data are presented as average of two analyses, each performed in triplicate

<b>Fatty acid</b>	<b>Plant species/fatty acids content (mg/g)</b>		
	<i>Astrocaryum vulgare</i>	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Elaeis guineensis</i>
<b>Saturated fatty acids (SFA)</b>			
Caproic (C <sub>6:0</sub> )	0.21	0.55	0.25
Caprylic (C <sub>8:0</sub> )	2.47	6.73	3.48
Capric (C <sub>10:0</sub> )	2.15	5.29	3.27
Lauric (C <sub>12:0</sub> )	53.37	41.31	45.24
Myristic (C <sub>14:0</sub> )	24.82	16.5	15.85
Palmitic (C <sub>16:0</sub> )	5.41	9.05	9.46
Stearic (C <sub>18:0</sub> )	1.89	2.92	2.66
Total SFA	90.32	82.35	80.21
Total MCFA	58.2	53.88	52.24
<b>Monounsaturated fatty acids (MUFA)</b>			
Palmitoleic (C <sub>16:1</sub> )	0.02	-	0.03
Oleic (C <sub>18:1</sub> )	6.47	11.72	16.54
Eicosenoic (C <sub>20:1</sub> )	0.05	0.15	0.10
Total MUFA	6.55	11.87	16.67
<b>Polyunsaturated fatty acids (PUFA)</b>			
Linoleic (C <sub>18:2</sub> )	2.77	4.79	2.68
$\alpha$ -Linoleic (C <sub>18:3</sub> )	0.06	0.88	0.03
Arachidonic (C <sub>20:4</sub> )	0.07	0.13	0.13
Total PUFA	2.9	5.8	2.84

### 8.3.2 Antistaphylococcal antagonistic effect of crude oils and oxacillin

In the first step, the susceptibility of the three tested *S. aureus* strains to oxacillin and hydrolyzed seed oils of *A. vulgare*, *C. nucifera*, and *E. guineensis* was determined using broth microdilution method to evaluate the suitable starting concentrations for combined effect (MIC – minimum inhibitory concentration – values for all tested oils in non-hydrolyzed forms > 8192 µg/mL; data not shown). *A. vulgare* oil induced the strongest antistaphylococcal effect, with MIC values ranging from 240–356 µg/mL, followed by that of *C. nucifera* (MIC values from 241–512 µg/mL) and *E. guineensis* (MIC values from 427–512 µg/mL). The MIC values of oxacillin ranged from 0.72–56.89 µg/mL.

Further, analysis of the combined effect of tested seed crude oils and oxacillin was performed by the checkerboard method. The results showed some degree of antagonism in all tested strains at certain concentrations of combinations, with FIC indices ranging between 8.56–4.02. In addition, a consistently antagonistic, concentration-dependent effect of the selected palm oils at concentration of 2048 µg/mL, and in some cases 1024 µg/mL, was seen, when combined with oxacillin against all tested *S. aureus* strains. All other combinations showed an indifferent relationship between tested agents, as shown in Table 8.2.

A strong antagonistic effect, manifested by very high FIC indices of 8.56 (clinical isolate SA1) and 8.51 (MSSA ATCC 29213), was observed for *A. vulgare* oil at a concentration 2048 µg/mL, when combined with oxacillin. At the same concentration, *A. vulgare* oil caused an adverse interaction in MRSA ATCC 43300 with a FICI of 5.78. This antagonistic effect was also observed at a concentration of 1024 µg/mL with the MSSA clinical isolate, SA1 (FICI 4.30), and the reference strain, ATCC 29213 (FICI 4.27). Indifferent relationships were displayed in all other combinations for both agents. Interestingly, a significant increase in MIC of oxacillin was observed when combined with *A. vulgare* oil at two lowest concentrations tested (32 and 16 µg/mL). In these cases, the MIC values rose by approximately 1/3 and 3/4, respectively, when compared to the MIC of the antibiotic alone, against MSSA ATCC 29213. In combination with oxacillin, *C. nucifera* and *E. guineensis* oils also exerted antagonistic properties in all tested strains, at a concentration of 2048 µg/mL (FICI 4.02–6.28). *C. nucifera* oil showed the strongest antagonistic effect for MRSA ATCC 43300 strain, followed by MRSA clinical isolate SA1 and MSSA ATCC 29213 strain (FICI values were 6.28, 6.03, and 4.09, respectively). *E. guineensis* oil exerted similar antagonistic

activity in MSSA ATCC 29213, MRSA clinical isolate SA1, and MRSA ATCC 43300 strain, with FICI values of 4.88, 4.83, and 4.02, respectively. The rise of oxacillin MIC, when combined with the lowest concentrations (16–64 µg/mL) of the tested oils, was even more pronounced with *C. nucifera*. It induced an increase of MIC in MSSA ATCC 29213 strain up to more than two times. A slight increase of oxacillin MIC was also detected in ATCC 29213 strain at a concentration of 0.32 µg/mL of *E. guineensis* oil.

### **8.3.3 Antagonistic growth-inhibitory effect of lauric acid with oxacillin against *S. aureus***

As mentioned above, GC-FID analysis revealed LA to be the predominant fatty acid in all tested oils. Based on this result, the susceptibility of nine *S. aureus* strains to oxacillin, LA, and a combination of oxacillin and LA was investigated using the same methodology as that used for palm oils. As shown in Table 8.3, MIC values of oxacillin ranged from 0.53–683 µg/mL. MIC values of LA were the same for all *S. aureus* strains at 256 µg/mL, except for MRSA ATCC 43300, where the MIC of LA decreased to 242 µg/mL.

Subsequently, FICI values were calculated and the effect of combinations was analysed. Antagonistic mode of action was observed for LA at a concentration of 1024 µg/mL, when combined with oxacillin (FICI values were 4.01–4.28) in all tested *S. aureus* strains; the strongest antagonistic interaction was exhibited for the MRSA ATCC 43300 strain. Other combinations of concentrations revealed indifferent relationships, except for a combination of LA at 32 µg/mL with oxacillin against the *S. aureus* ATCC BAA 976 strain. In this case, the MIC of oxacillin increased four times, to 128 µg/mL, and the FICI value was 4.13. In all tested bacterial strains, rise of MIC values of tested antibiotics occurred when combined with LA at certain concentrations (16–256 µg/mL), up to two times with the average increase by nearly two-thirds.

To determine whether the hydrolyzed seed oils of *A. vulgare*, *C. nucifera*, and *E. guineensis* and LA influence the growth of *S. aureus* strains, the analysis of growth curves of three *S. aureus* strains, namely ATCC 29213, ATCC 43300, and clinical isolate SA1, was performed. According to Figure 1, the graphical evaluation of bacterial growth upon increasing concentrations of hydrolyzed oils and LA revealed decreasing growth rate and increase in generation time for all tested *S. aureus* strains.



**Table 8.2:** Combinatory effect of crude palm seed oils and oxacillin against *Staphylococcus aureus* determined by checkerboard method

	MIC of compounds alone ( $\mu\text{g/mL}$ ):		oxacillin with <i>Astrocaryum vulgare</i> oil at concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ):															
			2048	1024	512		256		128		64		32	16				
<i>S. aureus</i> strain	MIC OXA	MIC OIL	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI
29213	1.67	242	0.06	<b>8.51</b>	0.06	<b>4.27</b>	0.06	2.16	0.23	1.20	0.44	0.80	1.11	0.93	2.22	1.47	2.89	1.80
43300	56.89	356	1	<b>5.78</b>	1	2.90	6	1.55	7	0.84	21.67	0.74	30.22	0.71	43.56	0.86	53.33	0.98
SA1	2	240	0.06	<b>8.56</b>	0.06	<b>4.30</b>	0.07	2.17	0.21	1.17	0.41	0.74	0.63	0.58	1.06	0.66	1.88	1

	MIC of compounds alone ( $\mu\text{g/mL}$ ):		oxacillin with <i>Cocos nucifera</i> oil at concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ):															
			2048	1024	512		256		128		64		32	16				
<i>S. aureus</i> strain	MIC OXA	MIC OIL	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI
29213	0.72	512	0.06	<b>4.09</b>	0.71	2.98	0.32	1.44	0.38	1.02	0.71	1.23	0.94	1.43	2.39	3.37	2	2.80
43300	49.78	327	1	<b>6.28</b>	1	3.15	1	1.59	6.89	0.92	14.22	0.68	21.33	0.62	28.44	0.67	32	0.69
SA1	2	241	0.06	<b>6.03</b>	0.06	3.03	0.08	1.54	0.28	0.89	0.58	0.67	1	0.69	1.33	0.76	2	1.05

<i>S. aureus</i> strain	MIC of compounds alone ( $\mu\text{g/mL}$ ):		oxacillin with <i>Elaeis guineensis</i> oil at concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ):																
	MIC OXA	MIC OIL	2048		1024		512		256		128		64		32		16		
			MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	
29213	0.75	427	0.06	<b>4.88</b>	0.06	2.48	0.09	1.32	0.31	1.02	0.53	1	0.69	1.08	0.78	1.11	0.56	0.78	
43300	56.89	512	1	<b>4.02</b>	1	2.02	7	1.12	15.78	0.78	19.56	0.59	32	0.69	37.33	0.72	42.67	0.78	
SA1	2	427	0.06	<b>4.83</b>	0.07	2.43	0.21	1.30	0.40	0.80	0.89	0.74	1.53	0.93	2	1.08	2	1.04	

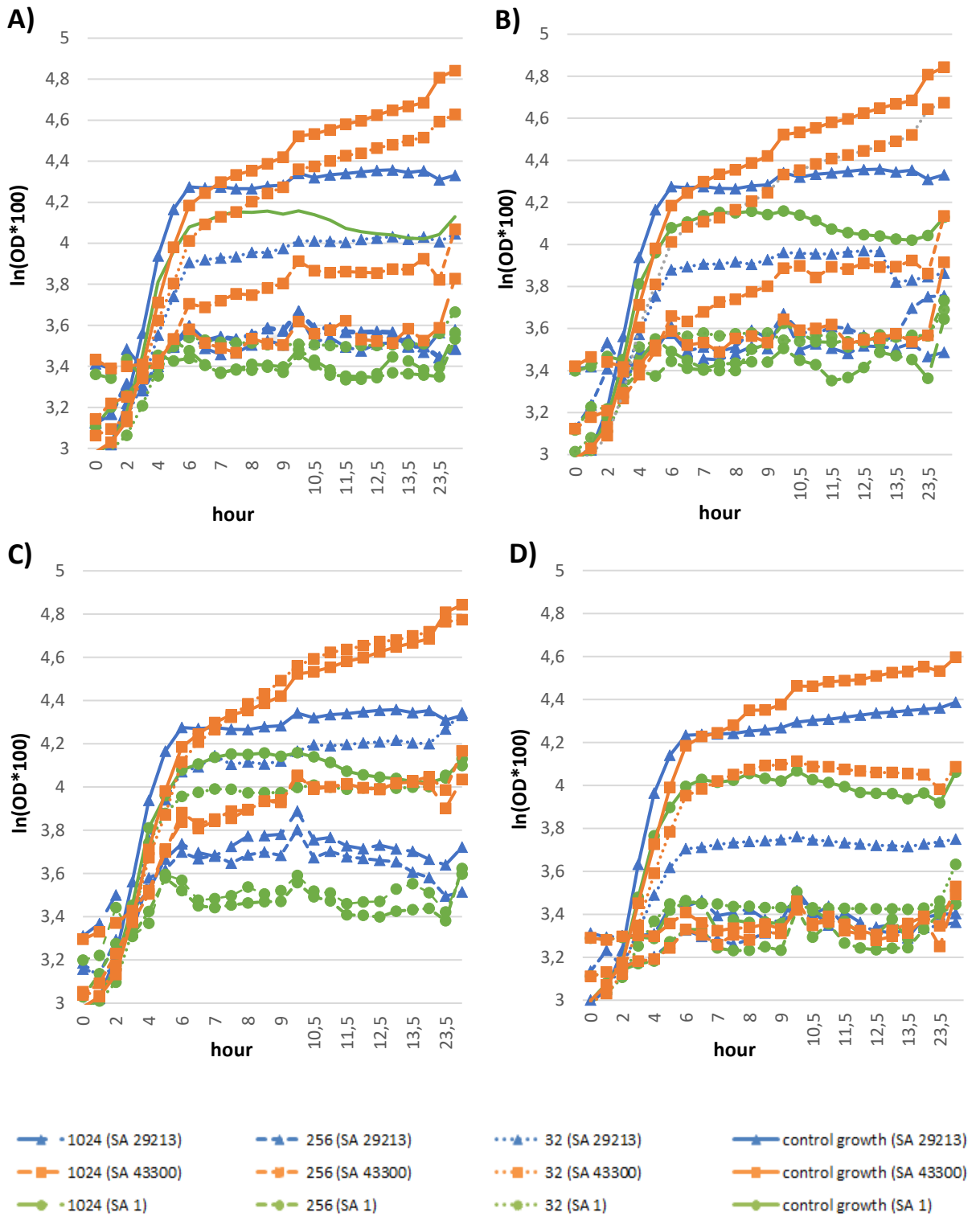
Data are presented as average of three analyses, each performed in triplicate. Bold values: antagonism ( $\Sigma\text{FIC} > 4$ ). *S. aureus* *Staphylococcus aureus*, MIC minimum inhibitory concentrations, FICI fractional inhibitory concentrations index, OXA oxacillin.

**Table 8.3:** Combinatory effect of lauric acid and oxacillin against *Staphylococcus aureus* determined by checkerboard method

	MIC of compounds alone (µg/mL):		oxacillin with lauric acid at concentration (µg/mL):															
			1024		512		256		128		64		32		16		8	
<i>S. aureus</i> strain	MIC OXA	MIC LA	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI	MIC OXA	FICI
29213	0.53	256	0.01	<b>4.01</b>	0.01	2.01	0.01	1.02	0.58	1.61	0.67	1.51	0.78	1.6	0.89	1.75	0.78	1.5
33591	683	256	8	<b>4.01</b>	8	2.01	8	1.01	319.56	0.97	853	1.5	1024	1.63	1024	1.5	1024	1.53
33592	569	256	8	<b>4.01</b>	8	2.01	8	1.01	112.89	0.7	512	1.15	682.49	1.33	568.89	1.06	512	0.97
43300	46.22	242	2	<b>4.28</b>	2.22	2.17	2.67	1.12	9.11	0.73	33.78	1	103.11	2.36	110.22	2.45	67.56	1.49
EMRSA 15	99.56	256	1	<b>4.01</b>	1	2.01	1	1.01	8.22	0.58	112	1.38	>128	>1.41	128	1.35	128	1.32
BAA 976	32	256	0.83	<b>4.03</b>	0.83	2.03	0.83	1.03	19.56	1.11	85.33	2.92	128	<b>4.13</b>	118.86	3.78	64	2.03
SA 1	1.44	256	0.13	<b>4.09</b>	0.13	2.09	0.13	1.09	0.39	0.77	1	0.94	1.78	1.36	1.89	1.37	2.22	1.57
SA 2	67.56	256	2	<b>4.03</b>	2	2.03	7.11	1.11	24	0.86	74.64	1.36	92.44	1.49	85.33	1.33	74.67	1.14
SA3	0.47	256	0.06	<b>4.13</b>	0.06	2.13	0.06	1.13	0.5	1.56	0.83	2.01	0.61	1.24	1.17	2.53	0.69	1.49

Data are presented as average of three analyses, each performed in triplicate. Bold values: antagonism ( $\Sigma FIC > 4$ ). *S. aureus* *Staphylococcus aureus*, *MIC* minimum inhibitory concentrations, *FICI* fractional inhibitory concentrations index, *OXA* oxacillin, *LA* lauric acid.

**Figure 8.1:** Growth curves of *Staphylococcus aureus* strains upon different concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ ) of hydrolyzed palm oils or lauric acid (A – *Astrocaryum vulgare* oil; B – *Cocos nucifera* oil; C – *Elaeis guineensis* oil; D – lauric acid) determined spectrophotometrically. SA, *Staphylococcus aureus*; OD, optical density.



## 8.4 Material and Methods

### 8.4.1 Chemicals and samples preparation

LA, *C. nucifera* and *E. guineensis* oils, and oxacillin sodium monohydrate were obtained from Sigma-Aldrich (Prague, CZ). *A. vulgare* oil was purchased from Sweet Natural Botanicals (Panama City, FL, USA). LA and *A. vulgare*, *C. nucifera*, and *E. guineensis* oils were dispersed in dimethyl sulfoxide, which was previously proposed for sparingly soluble substances (Balakin et al. 2004), including the LA (Yang et al. 2009) and palm oil (Salhin et al. 2013); and emulsified using Tween 80 (Sigma-Aldrich, Prague, CZ), that is a common procedure of hydrophobic sample preparation (Deng et al. 2016), not influencing the antibacterial properties of tested compounds when used in recommended concentrations (Castro et al. 1995; Hood et al. 2003). Complete dissolution of LA was achieved by heating (70°C for 10 min) it in an ultrasonic-bath. Analysed plant oils were selected based on the high content of LA as described in literature (McCarty & DiNicolantonio 2016; Harwood et al. 2017; Didonet et al. 2020). Hydrolysis of oils, to induce antimicrobial properties, was achieved by adding  $5 \times 10^{-3}$  mg/mL of porcine pancreatic lipase (Sigma-Aldrich, Prague, CZ) and shaking for 1 h in a water-bath heated to 37°C. Degree of hydrolysis of oils was dependent on the lipolytic activity of the enzyme. One unit of porcine pancreatic lipase hydrolyzes 1.0 microequivalent of fatty acid from triacetin in 1 h at pH 7.4, at 37°C.

### 8.4.2 Bacterial strains and media

In this study, nine *S. aureus* strains were tested. Five reference strains including methicillin sensitive (MSSA) ATCC 29213, MRSA ATCC 33591, ATCC 33592, ATCC 43300 and ATCC BAA 976 were purchased from Oxoid (Basingstoke, UK). Three clinical isolates of drug resistant *S. aureus* (SA1, SA2, and SA3) and one epidemic MRSA strain (EMRSA-15) were obtained from the Motol University Hospital (Prague, CZ). Oxacillin, gentamicin, tetracycline, and penicillin were used as markers of the antibiotic resistance as it has been previously determined (Rondevaldova et al. 2017; Rondevaldova et al. 2018; Frankova et al. 2021). Based on the MIC values, clinical isolates were identified to be resistant to: SA1 – resistant to gentamicin (MIC 8 µg/mL) and tetracycline (MIC 8 µg/mL); SA2 – resistant to oxacillin (MIC 68 µg/mL), gentamicin (MIC 16 µg/mL) and tetracycline (MIC 8 µg/mL); SA3 – resistant to gentamicin (MIC 8 µg/mL) and penicillin (MIC 18.67 µg/mL); EMRSA-15 – resistant to oxacillin (MIC 99.56 µg/mL) and penicillin (MIC 16 µg/mL). The clinical

isolates were identified using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), as described previously by Rondevaldova et al. (2018). Bacterial stocks were stored at 4°C on Müller-Hinton agar (Oxoid, Basingstoke, UK). Working cultures were maintained in Müller-Hinton broth at 37°C for 24 h before testing.

#### **8.4.3 Determination of fatty acid composition**

To evaluate fatty acid composition of oils obtained from *A. vulgare*, *C. nucifera*, and *E. guineensis*, alkaline trans-methylation of fatty acids was carried out as described by Raes et al. (Raes et al. 2003). Analysis of methyl esters was performed using gas chromatography (GC) with the HP 6890 chromatograph (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), equipped with a 60 m DB-23 capillary column (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm) and a flame-ionization detector (FID); split injections were performed using an Agilent autosampler. A total of 1 µL of standards in hexane were injected in split mode (1:40 ratio) into the injector, heated to 230°C. The column temperature was initially set at 120°C for 6 min then programmed to 170°C at a rate of 15°C/min. The temperature gradient was further configured to 210°C at the rate of 3°C/min and held for 13.5 min. Finally, the temperature was programmed to 230°C at the rate of 40°C/min and held for 7 min. Nitrogen was used as the carrier gas, at a flow rate of 0.8 mL/min. Supelco 37 Component FAME Mix, PUFA 1, PUFA 2, PUFA 3, *trans*-vaccenic acid, and a mixture of conjugated isomers of linoleic acid (Sigma-Aldrich, Prague, CZ) were used as standards. Fatty acids were identified based on retention times with respect to standards.

#### **8.4.4 Evaluation of minimum inhibitory concentrations and antagonistic combinatory effect**

Using guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (2018), the antibacterial activities of oxacillin; oils extracted from *A. vulgare*, *C. nucifera*, and *E. guineensis*; and LA were evaluated *in vitro* by the broth microdilution method, modified as per the recommendations of Cos et al. (2006), for effectively assessing the anti-infective potential of the natural products. Antistaphylococcal effect of a combination of oxacillin/LA or oxacillin/palm oil was tested *in vitro* using the microdilution broth checkerboard method, as described in the Clinical Microbiology Procedures Handbook (Leber 2016). The determination of MIC of oxacillin, palm oils and LA, as well as oxacillin/LA or oxacillin/*A. vulgare* oil/*C. nucifera* oil/*E. guineensis* oil combinatory effect evaluation by indices of

fractional inhibitory concentration (FICI) was performed in 96-well microtiter plates. For the testing of combinatory effects, eight two-fold serial dilutions of oxacillin were placed in the horizontal rows of the plate and were subsequently cross-diluted vertically by eight two-fold serial dilutions of the test compound (palm oil or LA), resulting in 64 different combinations of concentrations. The initial concentration for palm oils was 4096  $\mu\text{g/mL}$  and for LA 2048  $\mu\text{g/mL}$ ; the starting concentration of antibiotic was adjusted according to the tested strain. The microtiter plate assay was performed using the automatic pipetting platform, Freedom EVO 100 equipped with a four-channel liquid handling arm (Tecan, Männedorf, CH). Cation-adjusted Müller-Hinton broth, equilibrated to a final pH of 7.6 with Trizma base (Sigma-Aldrich, Prague, CZ) was used as growth medium. Buffering the culture media was performed to ensure the stability of oxacillin that is known to decrease under the low pH conditions (Rad et al. 2011). Inoculation of the plates was carried out using bacterial suspensions, at a final density of  $5 \times 10^5$  CFU/mL, standardized using Densi-La-Meter II by adjusting turbidity of the microorganism suspension to 0.5 McFarland standard. Next, incubation at 37°C for 24 h was performed. Evaluation of bacterial growth was performed spectrophotometrically using multimode reader Cytation 3 (BioTek Instruments, Winooski, VT) at 405 nm. MIC values were expressed as the lowest compound concentrations that resulted in  $\geq 80\%$  growth reduction compared to that of the agent-free growth control. The lipase added to the Müller-Hinton broth, in concentrations ranging from 0.005– $9.77 \times 10^{-6}$  mg/mL did not affect the growth of any strain of *S. aureus* tested when assayed as a negative control. FICI values were determined as  $\Sigma\text{FIC}$ , derived from the equation,

$$\Sigma\text{FIC} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B$$

where,  $\text{FIC}_A = \frac{\text{MIC}_A(\text{in the presence of B})}{\text{MIC}_A(\text{alone})}$  and  $\text{FIC}_B = \frac{\text{MIC}_B(\text{in the presence of A})}{\text{MIC}_B(\text{alone})}$ .

According to the value of FIC, three different effects could be observed according to Odds (2003) - synergy ( $\Sigma\text{FIC} \leq 0.5$ ), indifference ( $\Sigma\text{FIC} > 0.5-4$ ), and antagonism ( $\Sigma\text{FIC} > 4$ ). All compounds and their combinations were tested in three independent experiments, each carried out in triplicate; MIC values and FICs presented in this paper are average values.

#### **8.4.5 Growth rates determination**

To evaluate the influence of tested palm oils and LA concentrations on parameters of the *S. aureus* growth, standardised microdilution assay was used (CLSI 1999). Briefly, the

determination in 96-well microtiter plates where eight two-fold serial dilutions of tested compound (LA or *A. vulgare*/*C. nucifera*/*E. guineensis* oil emulsion cleaved by porcine pancreatic lipase as described previously) starting at concentration 4096 µg/mL in cation-adjusted Müller-Hinton broth was performed. Next, the plates were inoculated with bacterial suspensions at a final density of  $5 \times 10^5$  CFU/mL, standardized using Densi-La-Meter II by adjusting turbidity of the microorganism suspension to 0.5 McFarland standard, same as in case of MIC and FIC determination. Subsequently, incubation at 37°C was performed, measuring the absorbance of each well spectrophotometrically by multimode reader Cytation 3 (BioTek Instruments, Winooski, VT) at 405 nm every half-to-one hour for 14 hours and after 24 hours.

## 8.5 Discussion

In our study, crude seed oils rich in MCFAs, hydrolyzed by porcine pancreatic lipase, and LA showed *in vitro* growth-inhibitory effect against reference strains and clinical isolates of *S. aureus*. As per the results of GC analysis, the oils used for antibacterial testing were of standard composition, as reported by other groups, who also identified LA as the major constituent of *A. vulgare* (Mambrin & Arellano 1997), *C. nucifera* (Marina et al. 2009), and *E. guineensis* oils (Edem 2002). In this study, the MIC values of LA against the tested *S. aureus* strains (242–256 µg/mL) were comparable to those reported by other authors. For example, Batovska et al. (2009) reported an MIC values for LA, measured by the macrodilution method against *S. aureus* strains at  $\geq 125$  µg/mL. Moreover, Nitbani et al. (2016) reported the antibacterial activity of LA isolated from *C. nucifera* oil against *S. aureus*. In contrast, Parsons et al. (2012) determined an MIC value of 50 µg/mL (250 µM) for LA against *S. aureus*, using the broth microdilution method. Similarly, Kelsey et al. (2006) observed MIC values equal to 50 µg/mL of LA against three different *S. aureus* strains, using turbidimetry with visual evaluation and ethanol as a solvent; however, these variations could be caused by the different methodologies and *S. aureus* strains used. To the best of our knowledge, there is only limited information on the antibacterial properties of palm oils rich in MCFAs. Free-fatty acids are known to have antibacterial activity in contrast with those bound to triglycerides (Lee et al. 2015). As described by various authors previously (Parsons et al. 2012; Yoon et al. 2015), the antistaphylococcal effect of fatty acids is induced by disruption of bacterial cell membrane resulting in its destabilization by inducing tubule formation on the lipid bilayer and cell lysis; thus, the antimicrobial activity of oils containing



fatty acids is facilitated only upon hydrolysis of triglycerides (Tangwatcharin & Khopaibool 2012; Lee et al. 2015; Hovorková et al. 2018). In contrast, Ubgogu (2006) showed that *E. guineensis* oil exerted slight antibacterial effect on *S. aureus*, without getting hydrolyzed, using the disc diffusion technique. This result is the opposite of that observed in this study, where the oils acted as an antibacterial only after being hydrolyzed by the porcine pancreatic lipase. Rossato et al. (2019) also observed no antistaphylococcal activity of unhydrolyzed *A. vulgare* oil. Results of *in vitro* screening of *C. nucifera* oil and other MCFA-containing fats, with lipolytic enzymes that simulated gastric conditions in piglets, showed a significant change in suppression of gut microbiota (total anaerobes and *E. coli*) (Dierick et al. 2002). This finding suggests that MCFA-rich oils exert their antibacterial effects after enzymatic hydrolysis by lipases synthesized in the gastrointestinal tracts of humans and other animals.

Studies on the combinatory effect of MCFAs and their esters with different organic acids, inorganic compounds, and antibiotics against various bacteria, including *S. aureus*, can be found in literature (Kitahara et al. 2006; Batovska et al. 2009; Tangwatcharin & Khopaibool 2012; Rosenblatt et al. 2015). However, the findings of these studies markedly vary, depending on the class of antimicrobial agent used. For example, Kitahara et al. (2006) observed synergistic interaction of LA at 50 µg/mL with gentamicin (FICI values were 0.25–0.31) and imipenem (0.13–0.25) and indifferent interactions of LA (50 µg/mL) with ampicillin and oxacillin, against MRSA clinical isolates. Similarly, Hess et al. (2014) observed indifferent interactions of the LA-ampicillin or vancomycin combination against *S. aureus* biofilms and a synergistic interaction between LA and streptomycin. We observed indifferent antistaphylococcal action of oxacillin and LA (50 µg/mL); however, increasing the amount ( $\geq 1024$  µg/mL) of LA, produced strong antagonism in the presence of the antibiotic. The reason for the lack of antagonism in Kitahara et al. (2006) and Hess et al. (2014) could be the concentration of LA used in the study, which probably did not reach a sufficient value for the antagonism to be exerted. There is no information on the interaction of palm oils rich in MCFAs as their antibacterial activity was not confirmed in the study (Ferreira et al. 2011; Rossato et al. 2019) because hydrolysis of oils was not performed (Tangwatcharin & Khopaibool 2012).

From the results presented in this study, it is not possible to infer by which mechanism the antagonism between LA, tested oils and oxacillin occurs. Nevertheless, the detected prolongation of the generation time resulting in the decrease of specific growth rate arising

with increasing concentrations of LA and LA-rich tested palm oils indicates that a possible mechanism underlying the antagonistic interactions between tested compounds might lie in the halting of cell division caused by LA/*A. vulgare*/*C. nucifera*/*E. guineensis* oil. It can be assumed that while the LA temporarily prevents the growth of bacterial cells, oxacillin is not able to properly exert its activity. However, it is not just the membrane lipid structure that can change under the influence of exogenous lipids but the protein structure as well. Other factors including membrane strain may account for the organization of membrane proteins (Robertson 2018). It can be hypothesized that under increased membrane strain, such as after the treatment of lipid bilayers with high concentrations of LA (Yoon et al. 2015), membrane protein function is altered (Zhang & Li 2019). Such a circumstance can affect the antibacterial activity of oxacillin, which strongly depends on its ability to inhibit bacterial cell wall synthesis by preferentially binding to penicillin-binding proteins (PBPs) that are located inside the bacterial cell wall (Papich 2007). Therefore, oxacillin probably becomes ineffective after change in PBP function, induced by LA. As membrane protein stability also depends on membrane energetics, LA can reduce membrane fluidity and disrupt the electron transport system, perhaps by restricting the movement of carriers within the membrane (Desbois & Smith 2010). The eventual impairment of membrane electron carriers can lead to a change in the intracellular and extracellular pH, which can cause the precipitation of PBPs (Roch et al. 2019) and make them to lose the ability to interact with oxacillin. In addition, the change in extracellular pH can affect chemical structure of oxacillin as this drug is highly unstable in acidic environments (Rad et al. 2011). Moreover, *S. aureus* is known to produce persisters, which are representing a fraction of the bacterial population that exhibits tolerance to antibiotics in response to various stresses (Kubistova et al. 2018). According to the finding of Peyrusson et al. (2020), *S. aureus* in the presence of high concentration of various antibiotics including oxacillin showed a biphasic killing manner, meaning that a bulk of the bacterial population was susceptible and rapidly killed while a subpopulation with a slower killing rate was persisting for a much longer period of time, in addition showing the reversibility of the phenotype after antibiotic removal. Therefore, another possible explanation of antagonism between oxacillin and LA/LA-rich palm oils, can be in inducing persister cells of *S. aureus* in the presence of high concentrations of tested compounds.

Food-drug interactions are a major threat to safe and effective oral pharmacotherapy and can result in decreased bioavailability of a drug, which predisposes the patient to treatment

failure, increases the risk of adverse events, and may even precipitate toxicities (Genser 2008; Koziolok et al. 2019). For this reason, coadministration of a drug with specific foods is noted in medical leaflets. Generally, food intake can influence the effectiveness of an antibiotic (Hodel & Genné 2009). Ingestion of food, dietary fiber, or milk reduces the bioavailability of most antibiotics, including some penicillins (Schmidt & Dalhoff 2002). For example, minerals in milk and cheese create complexes with antibiotics that decrease their absorption (Bushra et al. 2011), and as seen in the case of isoxazolyl penicillins, when administered shortly before or after a meal, delayed gastric emptying and increased acidity interfere with their absorption (Marcy & Klein 1970). The consumption of coconut oil and related products is currently growing among certain populations, for the claimed health benefits associated with cardiovascular disease and weight loss (Santos et al. 2019). On the other hand, recommendations of lowering intake of saturated fatty acids and replacing them with unsaturated fatty acids exist in order to reduce risk of atherosclerosis and type-2 diabetes (Lenighan et al. 2019; Wu et al. 2020). The average concentration of LA in human serum of healthy adult male and female blood donors, ages ranging from 18 to 55 years, was found to be  $< 10 \mu\text{g/mL}$  (Sera et al. 1994). It has, however, been proven that higher (14.2 – 140 g/day) intakes of MCFAs in diet may result in higher concentrations of high density lipoprotein cholesterol than found with long-chain fatty acids, highlighting the importance of considering chain length when measuring the effect of dietary saturated fatty acids on lipid profile (Panth et al. 2018). Moreover, in a high-carbohydrate, high-fat diet, the increases in systolic blood pressure and diastolic stiffness in the heart were inhibited in mice with diet enriched by virgin coconut oil, composed predominantly of LA, at concentrations of 200 g/kg (Panchal et al. 2017). Our results showing strong *in vitro* antagonistic effect of oxacillin with LA or LA-rich palm oils at concentrations  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$  (meaning approximately  $\geq 1.113 \text{ g/kg}$ ; 1 g/kg of body mass) suggest that simultaneous administration of these agents can negatively affect their pharmacological properties. The recommended intake of fats in the diet of men is estimated to be around 65 g/day (daily energy intake 2 000 kcal with fats representing 30 % of it) (Lewis 2019). According to FAO (2004), average energy requirement of an adult female is 2 410 kcal/day and of an adult men is 3 100 kcal/day. Counting daily intake of fats as 30 % of total energy requirement, the daily intake of fats can be estimated to be 80 g/day for women and 103 g/day for men. Studies on coconut oil supplementation in diet usually focus on the addition of the oil in range 20 – 50 g/day (Harris et al. 2017; Khaw et al. 2018; Korrapati et al. 2019). Nevertheless, there have been reports on even higher daily

consumption of coconut oil reaching up to 80 g/day (Reiser et al. 1985; Ng et al. 1991; Maki et al. 2018). Therefore, the observed antagonistic action between LA-rich oils/LA may be important especially in high-fat diets. Thus, our results showing strong *in vitro* antagonistic effect of oxacillin with LA or LA-rich palm oils suggest that simultaneous administration of these agents in high, but still reachable concentrations can negatively affect their pharmacological properties in the treatment of *S. aureus*. The risk of antagonistic interactions between oxacillin and LA-rich oils might be primarily important to systemic application, as their antibacterial effect is attributed to fatty acids unleashed from triglycerides only, therefore the topical application of LA-rich oils such as *A. vulgare*/*C. nucifera*/*E. guineensis* should not influence the antibacterial activity of oxacillin. But, according to Verallo-Rowell et al. (2008), 5 mL of extra virgin coconut oil applied two times a day on the affected areas that include the test sites is able to decolonise skin from *S. aureus* in adults with atopic dermatitis. This discrepancies between the theoretical background and practice can be debited to the lipolytic activity of skin microbiota, including staphylococci (Kwaszewska et al. 2014), highlighting the importance of possible negative effect of LA-rich oils on topical treatment of *S. aureus*. Moreover, LA was previously tested *in vitro* at concentration of 0.24-500 µg/mL to evaluate its antibacterial properties against various bacteria causing inflammatory acne vulgaris, including *S. aureus*, proposing it as an promising remedy in the treatment of staphylococcal skin infections (Nakatsuji et al. 2009). However, the mentioned tested concentrations of LA were not high enough for the antagonism with oxacillin to be exerted. Nevertheless, these hypotheses must be confirmed by further *in vitro* and *in vivo* tests and clinical trials because physiological processes can also induce changes in antibacterial activity of tested compounds.

In summary, this *in vitro* study revealed a concentration-dependent antagonistic effect between *A. vulgare*, *C. nucifera*, and *E. guineensis* oils when combined with oxacillin in higher amounts against various strains of *S. aureus*. The strongest antagonism was observed for *A. vulgare* oil, which contains the highest amount of LA. This compound was identified as the main agent responsible for antagonistic antistaphylococcal action of all oils assayed. To the best of our knowledge, this is the first study to report the antagonistic interactions between these agents. The mechanism underlying the antagonistic action of tested agents probably acts at the cellular level and is linked to the cell membranes. These findings suggest that interference between oxacillin and palm oils and their constituents can negatively affect the treatment of staphylococcal infections in humans and animals. However, these assumptions

are based on *in vitro* tests and the negative interactions of the above-mentioned combinations should be confirmed by *in vivo* trials.

## 8.6 References

Aldeyab MA, Monnet DL, López-Lozano JM, Hughes CM, Scott MG, Kearney MP, Magee FA, McElnay JC. 2008. Modelling the impact of antibiotic use and infection control practices on the incidence of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a time-series analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **62**:593-600.

Anushree S, André M, Guillaume D, Frédéric F. 2017. Stearic sunflower oil as a sustainable and healthy alternative to palm oil. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **37**:18. DOI: 10.1007/s13593-017-0426-x.

Ba X, Harrison EM, Lovering AL, Gleadall N, Zadoks R, Parkhill J, 2015. Old drugs to treat resistant bugs: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with *mecC* are susceptible to a combination of penicillin and clavulanic acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**:7396-7404.

Bailey DG, Dresser G, Arnold JMO. 2013. Grapefruit–medication interactions: forbidden fruit or avoidable consequences?. *Canadian Medical Association Journal* **185**:309-316.

Balakin KV, Ivanenkov YA, Skorenko AV, Nikolsky YV, Savchuk NP, Ivashchenko AA. 2004. *In silico* estimation of DMSO solubility of organic compounds for bioscreening. *Journal of Biomolecular Screening* **9**:22-31.

Batovska DI, Todorova T, Tsvetkova V, Najdenski HM. 2009. Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationships. *Polish Journal of Microbiology* **58**:43-47.

Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrímsson Ó, Thormar H. 2001. Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS* **109**:670-678.

Booker BM, Stahl L, Smith PF. 2004. *In vitro* antagonism with the combination of vancomycin and clindamycin against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Research* **4**:385-395.

Boullata JI, Hudson LM. 2012. Drug–nutrient interactions: a broad view with implications for practice. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* **112**:506-517.

Braga LC, Leite AAM, Xavier KGS, Takahashi JA, Bemquerer MP, Chartone-Souza E, Nascimento AMA. 2005. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Canadian Journal of Microbiology* **51**:541-547.

Bushra R, Aslam N, Khan AY. 2011. Food-drug interactions. *Oman Medical Journal* **26**:77-83.

- Castro CA, Hogan JB, Benson KA, Shehata CW, Landauer MR. 1995. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, tween-20, tween-80, and emulphor-620. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **50**:521-526.
- CLSI. 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline, vol. 19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI. 2018. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard M07-A10 – 11th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. 2006. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *Journal of Ethnopharmacology* **106**:290-302.
- de Souza Guedes L, Jardim ICSF, de Melo LV, Beppu MM, Breitzkreitz MC, Santana CC. 2017. Study of the effect of the operating parameters on the separation of bioactive compounds of palm oil by ultra-high performance supercritical fluid chromatography using a design of experiments approach. *Canadian Journal of Chemical Engineering* **95**:2306-2314.
- Deng L-L, Taxipalati M, Que F, Zhang H. 2016. Physical characterization and antioxidant activity of thymol solubilized tween 80 micelles. *Scientific Reports* (38160) DOI: 10.1038/srep38160.
- Desbois AP, Smith VJ. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**:1629-1642.
- Didonet AA, et al. 2020. Characterization of amount and quality of tucuman kernel oil as a potential biomass. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **97**, 955–962, DOI: 10.1002/aocs.12374.
- Dierick N, Decuypere J, Molly K, Van Beek E, Vanderbeke E. 2002. The combined use of triacylglycerols containing mediumchain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition: I. In vitro screening of the release of MCFAs from selected fat sources by selected exogenous lipolytic enzymes under simulated pig gastric conditions and their effects on the gut flora of piglets. *Livestock Production Science* **75**:129-142.
- Dohme F, Machmüller A, Sutter F, Kreuzer M. 2004. Digestive and metabolic utilization of lauric, myristic and stearic acid in cows, and associated effects on milk fat quality. *Archives of Animal Nutrition* **58**:99-116.
- Edem D. 2002. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: A review. *Plant Foods for Human Nutrition* **57**:319-341.

- Era M, Sakai S, Tanaka A, Kawahara T, Kanyama T, Morita, H. 2015. Antifungal Activity of Fatty Acid Salts Against *Penicillium pinophilum*. Japan Journal of Food Engineering **16**:99-108.
- FAO. 2004. Human Energy Requirements: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation: Rome, 17–24 October 2001. Food and Agriculture Organization, Rome.
- Ferreira BS, De Almeida CG, Faza LP, De Almeida A, Diniz CG, Silva VLD, Grazul RM, Le Hyaric M. 2011. Comparative properties of amazonian oils obtained by different extraction methods. Molecules **16**:5875–5885.
- Frankova A, Vistejnova L, Merinas-Amo T, Leheckova Z, Dosekocil I, Soon JW, Kudera T, Laupua F, Alonso-Moraga A, Kokoska L. 2021. *In vitro* antibacterial activity of extracts from samoan medicinal plants and their effect on proliferation and migration of human fibroblasts. Journal of Ethnopharmacology (113220) DOI: 10.1016/j.jep.2020.113220.
- Fugh-Berman A. 2000. Herb-drug interactions. Lancet **355**:134-138.
- Genser D. 2008. Food and drug interaction: consequences for the nutrition/health status. Annals of Nutrition and Metabolism **52**:29-32.
- Hanczakowska E, Szewczyk A, Okon K. 2011. Caprylic, capric and/or fumaric acids as antibiotic replacements in piglet feed. Annals of Animal Science **11**:115-124.
- Harris M, Hutchins A, Fryda L. 2017. The impact of virgin coconut oil and high-oleic safflower oil on body composition, lipids, and inflammatory markers in postmenopausal women. Journal of Medicinal Food **20**:345-351.
- Harwood JL, Woodfield HK, Chen G, Weselake RJ. 2017. Modification of oil crops to produce fatty acids for industrial applications. Pages 187-236 in Ahmad MU, editor. Fatty Acids. Elsevier, Hoboken.
- Hess DJ, Henry-Stanley MJ, Wells CL. 2014. Antibacterial synergy of glycerol monolaurate and aminoglycosides in *Staphylococcus aureus* biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **58**:6970-6973.
- Ho JL, Klempner MS. 1986. *In vitro* evaluation of clindamycin in combination with oxacillin, rifampin, or vancomycin against *Staphylococcus aureus*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease **4**:133-138.
- Hodel M, Genné D. 2009. Antibiotics: drug and food interactions. Revue Médicale Suisse **5**:1979-1984.
- Hood JR, Wilkinson JM, Cavanagh HM. 2003. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. Journal of Essential Oil Research **15**:428-433.

- Hovorková P, Laloučková K, Skřivanová E. 2018. Determination of *in vitro* antibacterial activity of plant oils containing medium-chain fatty acids against Gram-positive pathogenic and gut commensal bacteria. *Czech Journal of Animal Science* **63**:119-125.
- Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL. 2011. Short-and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology* **56**:650-654.
- Cheng TO. 2006. Food-drug interactions. *International Journal of Cardiology* **106**:392-393.
- Chiu MC, de Morais Coutinho C, Gonçalves LAG. 2009. Carotenoids concentration of palm oil using membrane technology. *Desalination* **245**:783-786.
- Churchward CP, Alany RG, Snyder LA. 2018. Alternative antimicrobials: the properties of fatty acids and monoglycerides. *Critical Reviews in Microbiology* **44**:561-570.
- Kanazawa S, Ohkubo T, Sugawara K. 2001. The effects of grapefruit juice on the pharmacokinetics of erythromycin. *European Journal of Clinical Pharmacology* **56**:799-803.
- Kelsey J, Bayles KW, Shafii B, McGuire M. 2006. Fatty acids and monoacylglycerols inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. *Lipids* **41**:951-961.
- Khaw K-T, Sharp SJ, Finikarides L, Afzal I, Lentjes M, Luben R, Forouhi NG. 2018. Randomised trial of coconut oil, olive oil or butter on blood lipids and other cardiovascular risk factors in healthy men and women. *BMJ Open* (e020167) DOI: 10.1136/bmjopen-2017-020167.
- Kitahara T, Aoyama Y, Hirakata Y, Kamihira S, Kohno S, Ichikawa N, Nakashima M, Sasaki H, Higuchi S. 2006. *In vitro* activity of lauric acid or myristylamine in combination with six antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Antimicrobial Agents* **27**:51-57.
- Kollanoor-Johny A, Mattson T, Baskaran SA, Amalaradjou MAR, Hoagland TA, Darre MJ, Khan MI, Schreiber DT, Donoghue AM, Donoghue DJ, Venkitanarayanan K. 2012. Caprylic acid reduces *Salmonella enteritidis* populations in various segments of digestive tract and internal organs of 3- and 6-week-old broiler chickens, therapeutically. *Poultry Science* **91**:1686-1694.
- Korrapati D, Jeyakumar SM, Putcha UK, Mendu VR, Ponday LR, Acharya V, Koppala SR, Vajreswari A. 2019. Coconut oil consumption improves fat-free mass, plasma hdl-cholesterol and insulin sensitivity in healthy men with normal bmi compared to peanut oil. *Clinical Nutr* **38**:2889-2899.
- Kozioliek M, et al. 2019. The mechanisms of pharmacokinetic food-drug interactions—a perspective from the ungap group. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **134**:31-59.



- Kubistova L, Dvoracek L, Tkadlec J, Melter O, Licha I. 2018. Environmental stress affects the formation of *Staphylococcus aureus* persists tolerant to antibiotics. *Microbial Drug Resistance* **24**:547-555.
- Kwaszewska A, Sobis-Glinkowska M, Szewczyk EM. 2014. Cohabitation-Relationships of corynebacteria and staphylococci on human skin. *Folia Microbiologica* **59**:495-502.
- Leber A. 2016. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. Pages 5.16.1-5.16.23 in Leber A, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington, DC.
- Lee ST, Ariffin AA, Radu S, Mohd Ghazali H. 2015. Effect of lipase hydrolysis on the antibacterial activity of coconut oil, palm mesocarp oil and selected seed oils against several pathogenic bacteria. *International Food Research Journal* **22**:46-54.
- Lenighan YM, McNulty BA, Roche HM. 2019. Dietary fat composition: Replacement of saturated fatty acids with PUFA as a public health strategy, with an emphasis on  $\alpha$ -linolenic acid. *Proceedings of the Nutrition Society* **78**:234-245.
- Lewis J. 2019. *Codex Nutrient Reference Values: Especially for Vitamins, Minerals and Protein*. FAO & WHO, Rome.
- Liaw S-J, Lai H-C, Wang W-B. 2004. Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA protein in *Proteus mirabilis*. *Infection and Immunity* **72**:6836-6845.
- Maki KC, Hasse W, Dicklin MR, Bell M, Buggia MA, Cassens ME, Eren F. 2018. Corn oil lowers plasma cholesterol compared with coconut oil in adults with above-desirable levels of cholesterol in a randomized crossover trial. *Journal of Nutrition* **148**:1556-1563.
- Mambrin M, Arellano DB. 1997. Characterization of palm tree fruit oils from brazilian amazonia region. *Grasas y Aceites* **48**:154-158.
- Marcy SM, Klein JO. 1970. The isoxazolyl penicillins: oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin. *Medical Clinics of North America* **54**:1127-1143.
- Marina A, Che Man Y, Nazimah S, Amin I. 2009. Chemical properties of virgin coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **86**:301-307.
- McCarty MF, DiNicolantonio JJ. 2016. Lauric acid-rich medium-chain triglycerides can substitute for other oils in cooking applications and may have limited pathogenicity. *Open Heart* (e000467) DOI: 10.1136/openhrt-2016-000467.
- McGaw LJ, Jäger AK, Van Staden J, Houghton PJ. 2002. Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *South African Journal of Botany* **68**:417-423.
- McGrattan CJ, Sullivan JD, Ikawa M. 1976. Inhibition of chlorella (chlorophyceae) growth by fatty acids, using the paper disc method. *Journal of Phycology* **12**:129-131.

- Mouly S, Lloret-Linares C, Sellier PO, Sene D, Bergmann JF. 2017. Is the clinical relevance of drug-food and drug-herb interactions limited to grapefruit juice and Saint-John's Wort?. *Pharmacological Research* **118**:82-92.
- Nakatsuji T, Kao MC, Fang J-Y, Zouboulis CC, Zhang L, Gallo RL, Huang C-M. 2009. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: Its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology* **129**:2480-2488.
- Ng T, Hassan K, Lim J, Lye M, Ishak R. 1991. Nonhypercholesterolemic effects of a palm-oil diet in Malaysian volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition* (1015S-1020S) DOI: 10.1093/ajcn/53.4.1015S.
- Nitbani FO, Jumina, Siswanta D, Solikhah EN. 2016. Isolation and antibacterial activity test of lauric acid from crude coconut oil. *Procedia Chemistry* **18**:132-140.
- Ocampo PS, Lázár V, Papp B, Arnoldini M, zur Wiesch PA, Busa-Fekete R, Fekete G, Pál C, Ackermann M, Bonhoeffer S. 2014. Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**:4573-4582.
- Odds FC. 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**:1.
- Panchal, S. K., Carnahan, S. & Brown, L. 2017. Coconut products improve signs of diet-induced metabolic syndrome in rats. *Plant Foods for Human Nutrition* **72**:418-424.
- Panth N, Abbott KA, Dias CB, Wynne K, Garg ML. 2018. Differential effects of medium-and long-chain saturated fatty acids on blood lipid profile: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition* **108**:675-687.
- Papich MG. 2007. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*. Elsevier, Hoboken.
- Parsons JB, Yao J, Frank MW, Jackson P, Rock CO. 2012. Membrane disruption by antimicrobial fatty acids releases low-molecular-weight proteins from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **194**:5294-5304.
- Peyrusson F, Varet H, Nguyen TK, Legendre R, Sismeiro O, Coppée J-Y, Wolz C, Tenson T, Van Bambeke F. 2020. Intracellular *Staphylococcus aureus* persists upon antibiotic exposure. *Nature Communication* **11**:1-14.
- Pinto MEA, Araujo SG, Morais MI, Sa NP, Lima CM, Rosa CA, Siqueira EP, Johann S, Lima LARS. 2017. Antifungal and antioxidant activity of fatty acid methyl esters from vegetable oils. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **89**:1671-1681.
- Pirmohamed M. 2013. Drug-grapefruit juice interactions. *BMJ* (f1) DOI: 10.1136/bmj.f1.

- Projan SJ, Brown-Skrobot S, Schlievert PM, Vandenesch F, Novick RP. 1994. Glycerol monolaurate inhibits the production of beta-lactamase, toxic shock toxin-1, and other staphylococcal exoproteins by interfering with signal transduction. *Journal of Bacteriology* **176**:4204-4209.
- Qin X, Tran BG, Kim MJ, Wang L, Nguyen DA, Chen Q, Jie S, Laud PJ, Stone GG, Chow JW. 2017. A randomised, double-blind, phase 3 study comparing the efficacy and safety of ceftazidime/avibactam plus metronidazole versus meropenem for complicated intra-abdominal infections in hospitalised adults in Asia. *International Journal of Antimicrobial Agents* **49**:579-588.
- Rad I, Croitoru M, Gyéresi Á. 2011. Improvements of oxacillin stability in a ph = 1.2 acidic environment. *Acta Medica Marisiensis* **57**:328-330.
- Raes K, De Smet S, Balcaen A, Claeys E, Demeyer D. 2003. Effect of diets rich in N-3 polyunsaturated fatty acids on muscle lipids and fatty acids in Belgian Blue double-muscled young bulls. *Reproduction Nutrition Development* **43**:331-345.
- Reiser R, Probstfield JL, Silvers A, Scott LW, Shorney ML, Wood RD, O'Brien BC, Gotto Jr AM, Insull Jr W. 1985. Plasma lipid and lipoprotein response of humans to beef fat, coconut oil and safflower oil. *American Journal of Clinical Nutrition* **42**:190-197.
- Robertson JL. 2018. The lipid bilayer membrane and its protein constituents. *Journal of General Physiology* **150**:1472-1483.
- Rodvold KA, McConeghy KW. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clinical Infectious Diseases* (S20–S27) DOI: 10.1093/cid/cit614.
- Roch M, Lelong E, Panasenko OO, Sierra R, Renzoni A, Kelley WL. 2019. Thermosensitive PBP2a requires extracellular folding factors PrsA and HtrA1 for *Staphylococcus aureus* MRSA  $\beta$ -lactam resistance. *Communications Biology* **2**:1-11.
- Rondevaldova J, Hummelova J, Tauchen J, Kokoska L. 2018. *In vitro* antistaphylococcal synergistic effect of isoflavone metabolite demethyltaxasin with amoxicillin and oxacillin. *Microbial Drug Resistance* **24**:24-29.
- Rondevaldova J, Novy P, Urban J, Kokoska L. 2017. Determination of anti-staphylococcal activity of thymoquinone in combinations with antibiotics by checkerboard method using EVA capmat as a vapor barrier. *Arabian Journal of Chemistry* **10**:566-572.
- Rosenblatt J, Reitzel RA, Raad I. Caprylic acid and glyceryl trinitrate combination for eradication of biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**:1786-1788.
- Rossato A, da Silva Silveira L, Soares Lopes LQ, De Sousa Filho WP, Finger Schaffer L, Viana Santos RC, Sagrillo MR. 2019. Evaluation in vitro of antimicrobial activity of tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*). *Archives of Biosciences & Health* **1**:99–112.

- Ruzin A, Novick RP. 2000. Equivalence of lauric acid and glycerol monolaurate as inhibitors of signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **182**:2668-2671.
- Salhin A, Ali M, Abdurrahman A. 2013. Determination of free fatty acids in palm oil samples by non-aqueous flow injection using colorimetric reagent. *Chemical and Materials Engineering* **1**:96-103.
- Santos HO, Howell S, Earnest CP, Teixeira FJ. 2019. Coconut oil intake and its effects on the cardiometabolic profile-a structured literature review. *Progress in Cardiovascular Diseases* **62**:436-443.
- Sera RK, McBride JH, Higgins SA, Rodgerson DO. 1994. Evaluation of reference ranges for fatty acids in serum. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **8**:81-85.
- Schmidt L, Dalhoff K. 2002. Food–drug interactions. *Drugs* **62**:1481-1502.
- Skřivanová E, Marounek M, Benda V, Březina P. 2006. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Veterinární Medicína Praha* **51**:81-88.
- Sun CQ, O'Connor CJ, Robertson AM. 2003. Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **36**:9-17.
- Tabuchi F, Matsumoto Y, Ishii M, Tatsuno K, Okazaki M, Sato T, Moriya K, Sekimizu K. 2017. Synergistic effects of vancomycin and  $\beta$ -lactams against vancomycin highly resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antibiotics* **70**:771-774.
- Tangwatcharin P, Khopaibool P. 2012. Activity of virgin coconut oil, lauric acid or monolaurin in combination with lactic acid against *Staphylococcus aureus*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health* **43**:969-985.
- Thormar H, Hilmarsson H, Bergsson G. 2006. Stable concentrated emulsions of the 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:522-526.
- Ubgogu O, Onyeagba R, Chigbu O. 2006. Lauric acid content and inhibitory effect of palm kernel oil on two bacterial isolates and *Candida albicans*. *African Journal of Biotechnology* **5**:1045-1047.
- Verallo-Rowell VM, Dillague KM, Syah-Tjundawan BS. 2008. Novel antibacterial and emollient effects of coconut and virgin olive oils in adult atopic dermatitis. *Dermatitis* **19**:308-315.

Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB. 2011. Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes, vol. 3. Springer Science & Business Media, Athens, USA.

WHO. 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization, Geneva.

Wu H, Xu L, Ballantyne CM. Dietary and pharmacological fatty acids and cardiovascular health. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **105**:1030-1045.

Yang D, Pornpattananankul D, Nakatsuji T, Chan M, Carson D, Huang C-M, Zhang L. 2009. The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*. *Biomaterials* **30**:6035-6040.

Yoon BK, Jackman JA, Kim MC, Cho NJ. 2015. Spectrum of membrane morphological responses to antibacterial fatty acids and related surfactants. *Langmuir* **31**:10223–10232.

Zanderigo E, Sartori V, Svetcic G, Bouillon T, Schumacher P, Morari M, Curatolo M. 2006. The Well-being Model: A New Drug Interaction Model for Positive and Negative Effects. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* **104**:742-753.

Zhang XC, Li H. 2019. Interplay between the electrostatic membrane potential and conformational changes in membrane proteins. *Protein Science* **28**:502-512.

## 9 Souhrnná diskuze

Antibiotická rezistence je proces, během něhož mikroorganismy, včetně bakterií, získávají schopnost odolávat různými způsoby lokálním i globálním eradikačním postupům v podobě antibiotické terapie, která je aplikována také vůči nejvýznamnějším původcům zoonóz a alimentárních onemocnění (viz kapitola 5; Článek 1: Laloučková et al. 2019). Koordinační skupina Spojených národů (United nations, UN) pro antimikrobiální rezistenci (2019) odhaduje, že na následky onemocnění způsobených rezistentními mikroorganismy na světě každoročně zemře nejméně 700 000 lidí, přičemž asi 230 000 úmrtí je zapříčiněno multirezistentní tuberkulózou (bakterie *Mycobacterium tuberculosis* komplexu), a zároveň predikuje, že počet úmrtí spojených s rezistencí k léčivům by mohl do roku 2050 vzrůst celosvětově až na 10 milionů (2,4 milionu v zemích s vysokými příjmy), pokud nebudou přijata jakákoliv opatření. Za více než 50 let nebyla schválena ani jedna sloučenina s novou chemickou strukturou určená k primárnímu použití u gramnegativních bakterií (Kingwell 2018). Stephens et al. (2020) konstatují, že i kdyby byla v příštích 10 letech vyvinuta řada sloučenin, které se zaměří na patogeny s nejvyšší prioritou, a bude s nimi nešetřně nakládáno, jako v předchozích dekadách, bude lidstvo stále ohrožováno antimikrobiální rezistencí.

Jako velice významný rezervoár genů bakteriální rezistence vůči antibiotikům byla detekována živočišná produkce, jelikož zdrojem šíření rezistentních bakterií mohou být přímo zvířata (Speer et al. 2013), živočišné produkty (Ma et al. 2020), i biologický odpad, který v průběhu produkce živočišných komodit vzniká (He et al. 2020). Významně také přispívá k rozvoji bakteriální rezistence fakt, že byla a v některých zemích doposud jsou (kriticky důležitá) antibiotika používána profylakčně u hospodářských zvířat pro snížení infekčního tlaku a maximalizaci profitu stimulací růstu a produkce (Van Boeckel et al. 2015; Scott et al. 2019). Z tohoto důvodu, jak je zmíněno v kapitole 5 (Článek 1: Laloučková et al. 2019), přijímá celosvětově řada států restrikce v používání antibiotik u hospodářských zvířat, což vede k potřebě hledat nové zdroje látek, jež by přinášely živočišné produkci podobné benefity, jako antibiotika (Manafi 2015). Mezi řadou skupin, které jsou navrhovány jako neantibiotické stimulatory růstu, či jako mechanismy prevence bakteriální kontaminace, vynikají organické kyseliny, jež se v praxi běžně využívají jak v potravinářství (Coban 2020), tak v živočišné produkci (Hassan et al. 2010).

Pro naplnění cíle této práce, a to sice studovat možnosti antibakteriálního působení vybraných látek přírodního charakteru v kombinaci s antibiotiky na určité patogenní bakterie pomocí laboratorních mikrobiologických metod, byly právě z důvodu praktického využití v praxi vybrány organické kyseliny, konkrétně zdroje MCFA, kterými jsou palmové oleje (Yanza et al. 2020), nebo oleje lisované ze semen některých druhů hlazence (*Cuphea*) (Dierick et al. 2003). Antibakteriální aktivita volných MCFA, či jejich monoesterů, vůči rozsáhlému spektru mikroorganismů, především však grampozitivním bakteriím, byla v minulosti intenzivně studována (McGrattan et al. 1976; Era et al. 2015; Sun et al. 2003; Skřivanová et al. 2006). Množství informací o antibakteriálních účincích jejich primárních zdrojů je však velmi limitované, a proto ve dvou studiích, které jsou součástí této práce, proběhlo její hodnocení. K naplnění cíle práce došlo po následující ose: 1. ověření antibakteriálního potenciálu hydrolyzovaných olejů bohatých na MCFA vůči grampozitivním patogenům a komenzálním bakteriím GIT (Hovorková et al. 2018); 2. ověření antibakteriálního potenciálu štěpěných olejů bohatých na MCFA vůči grampozitivním původcům bovinních mastitid (Laloučková et al. 2019); 3. zjištění možnosti kombinačního působení hydrolyzovaných olejů bohatých na MCFA v kombinaci s komerčně používanými antibiotiky vůči standardním kmenům i klinickým izolátům *S. aureus* (Lalouckova et al. 2021).

V průběhu první studie (kapitola 6; Článek 2: Hovorková et al. 2018) bylo provedeno testování *in vitro* antibakteriální aktivity celkem osmi druhů především palmových olejů vůči standardním kmenům i klinickým izolátům komenzálních bakterií trávicího traktu (*Bifidobacterium animalis*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*) a grampozitivním původcům alimentárních onemocnění (*Clostridium perfringens*, *Enterococcus cecorum*, *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*). Následovala druhá studie (kapitola 7; Článek 3: Laloučková et al. 2019), jež hodnotila *in vitro* antibakteriální aktivitu tří vybraných palmových olejů, vůči grampozitivním původcům bovinních mastitid, jmenovitě *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Str. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* a *Str. uberis*. Konkrétně byl v první studii zkoumán antibakteriální potenciál olejů získaných z plodů *Astrocaryum murumuru* (palma murumuru), *Astrocaryum tucuma* (palma tucuma), *Attalea speciosa* (palma babassu), *Cocos nucifera* (kokosovník ořechoplodý), *Cuphea lanceolata* a *Cuphea ignea* (hlazenec kopinatý a hlazenec ohnivý; směs) a *Eleaeis guineensis* (palma olejná; 3 druhy oleje: palmový, palmový červený,

palmojádrový). Do druhé studie byl poté s ohledem na dostupnost zařazen pouze kokosový, palmojádrový a tucuma olej.

Pro potvrzení příslušnosti ke skupině olejů bohatých na MCFA byla provedena identifikace obsahu mastných kyselin vybraných olejů metodou plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem, která odhalila predominanci LA v palmojádrovém (45,24 %), kokosovém (41,31 %), babassu (43,98 %), murumuru (46,34 %) a tucuma (53,37 %) oleji; převahu kyseliny kaprinové ve směsném *Cuphea* oleji (54,04 %); a majoritní zastoupení kyseliny palmitové a olejové v palmovém (42,93 % a 40,28 %) a palmovém červeném (41,96 % a 40,6 %) oleji, což z posledně jmenovaných činí oleje s převahou LCFA, na rozdíl od ostatních, které obsahovaly nejvíce MCFA. Tato zjištění jsou obecně ve shodě s Dubois et al. (2007), který zkoumal obsah mastných kyselin v osmdesáti různých rostlinných olejích. Výjimku tvoří v porovnání s jinými studiemi (Kleiman 1990, Zentek et al. 2011) detekovaný nižší obsah kyseliny kaprinové v *Cuphea* oleji (téměř o 30 %), který může být přičítán klimatickým podmínkám a rozdílům v metodě extrakce.

V průběhu první studie byl navržen model *in vitro* štěpení testovaných rostlinných olejů, jelikož bylo v literatuře a experimentálně předem ověřeno, že nenaštěpené oleje nevykazují *in vitro* antibakteriální aktivitu. Disproporce byla zjištěna pouze u práce Ubgogu et al. (2006), kteří pozorovali antibakteriální účinky palmojádrového oleje bez jeho předchozí hydrolyzace, avšak zároveň konstatovali, že inhibice byla minimální, a lze tudíž předpokládat, že k ní mohlo dojít např. z důvodu špatné laboratorní praxe. Zjištění nutnosti štěpení olejů pro to, aby působily jako antibakteriální činidla, naopak potvrdily výsledky novějších studií Rossato et al. (2019) a Tangwatcharin & Khopaibool (2012), kteří uvádí, že tucuma, resp. kokosový olej nepotlačují růst bakterií *S. aureus*. Analogií však může být výzkum Dierick et al. (2002), kteří na základě výsledků *in vitro* screeningu inhibičních účinku kokosového oleje s lipolytickými enzymy simulovali žaludeční podmínky u selat, a pozorovali jeho schopnost významně potlačit patogenní střevní mikrobiotu (celkový počet anaerobních mikroorganismů a *E. coli*).

Štěpící proces zahrnoval přípravu olejové emulze rozpuštěním příslušného množství oleje v dimethylsulfoxidu s přidávkem malého množství Tween 80 (celková koncentrace neschopna ovlivnit antibakteriální aktivitu testovaných látek). Tato byla posléze přidána v odpovídajícím množství k příslušnému kultivačnímu médiu (na základě testovaného bakteriálního druhu, viz Hovorková et al. 2018; Laloučková et al. 2019), do kterého byla předem přidána pankreatická porcinní lipáza (první studie), nebo lipáza z *Mucor javanicus*



(druhá studie) v množství odpovídajícím jejich hydrolytické aktivitě. Takto připravený vzorek byl posléze hodinu inkubován při současně probíhající třeptání ve vodní lázni o teplotě 37 °C.

Stručně, k testování *in vitro* antibakteriální aktivity byla použita mikrodiluční bujónová metoda standardizovaná Institutem pro klinické a laboratorní normy (CLSI 2015), provedená v 96 jamkové mikrotitrační destičce, v níž byly vytvořeny dvounásobné ředící řady příslušných naštěpených olejů, a která byla posléze inokulována testovanými bakteriálními kmeny a inkubována danou dobu v požadované atmosféře a při doporučené teplotě na základě požadavků mikroorganismů. Evaluace antibakteriálních účinků testovaných rostlinných olejů byla poté provedena spektrofotometricky, kdy na základě inhibice bakteriálního růstu byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace (minimum inhibitory concentration, MIC), jež představovaly koncentrace způsobující alespoň 80% úbytek bakteriálního růstu v porovnání s bujónem bez testované látky (podrobnější postup v publikovaných studiích). V obou studiích byla také provedena evaluace bakteriálního růstu na základě citlivosti k penicilinu G.

Vybrané hydrolyzované oleje bohaté na MCFA vykazaly velice pozitivní trend, a sice že byly efektivní v inhibici bakteriálního růstu veškerých vybraných patogenních grampozitivních bakterií, a zároveň neinhibovaly růst zdraví prospěšných kmenů rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Lze předpokládat, že negativní schopnost inhibovat růst bifidobakterií, přestože jsou grampozitivními bakteriemi, je spojena s absencí ferredoxinového systému u některých kmenů, kterážto vlastnost udává naprostě většině obligátních anaerobů rezistenci k metronidazolu, a může se podílet také na rezistenci vůči dalším antibakteriálním látkám (Moubareck et al. 2005). Nižší aktivita MCFA vůči gramnegativním bakteriím (Skřivanová et al. 2006) pak může být dávana do souvislosti s neprokázanou inhibicí laktobacilů štěpenými oleji, která byla pozorována v průběhu první provedené studie (Hovorková et al. 2018).

Nejširší spektrum účinku prokázal v průběhu první studie štěpený směsný olej ze semen rostliny *Cuphea*, který inhiboval růst všech testovaných patogenů (jako jediný včetně *L. monocytogenes*) v rozmezí MIC 560–4500 µg/ml, což odpovídá výsledkům studie, kde se krmení přídatkem semen *Cuphea* do diety selat ukázalo jako efektivní vzhledem k tomu, že byla inhibována patogenní mikrobiota střev, a zároveň byly zlepšeny jejich morfologické vlastnosti (Dierick et al. 2003). Kyselina kaprinová, která je dominantně zastoupená právě v tomto oleji, má silné antibakteriální účinky (Batovska et al. 2009) a je pravděpodobnou příčinou pozorované inhibice nejširšího testovaného spektra bakterií. Ještě nižší MIC byly pak

zaznamenány ve druhé studii, kdy byl jeden kmen *Str. agalactiae* (CCM 6187) inhibován štěpeným palmojádrovým olejem v koncentraci 64 µg/ml, druhý kmen (DSM 6784) štěpeným tucuma olejem v koncentraci 128 µg/ml, stejně jako *Str. uberis* (DSM 20569) štěpeným palmojádrovým olejem.

Nejcitlivější v kontextu nejnižší zaznamenané MIC byl v průběhu první studie jeden kmen *C. perfringens* (CIP 105178) inhibovaný hydrolyzovaným tucuma olejem v koncentraci 140 µg/ml, což jsou však vyšší hodnoty než v literatuře zaznamenané MIC volné LA (Galbraith et al. 1971; Skřivanová et al. 2005). Tato disproporce naznačuje nižší antibakteriální aktivitu štěpených olejů v porovnání s volnými mastnými kyselinami, vyvolanou pravděpodobně neúplnou hydrolyzací veškerých MCFA v průběhu štěpícího procesu, a tudíž nižší koncentrace volných MCFA, schopných inhibovat bakteriální růst. Nejcitlivějšími se s ohledem na množství olejů, kterými byly inhibovány v první studii, ukázaly být kmeny bakterií *E. cecorum* a *S. aureus*, jejichž růst byl inhibován všemi hydrolyzovanými oleji bohatými na MCFA. Citlivější z těchto druhů byl poté kmen stafylokoků (ATCC 25923), který byl inhibován štěpenými oleji v rozmezí MIC 560–2250 µg/ml, kdy MIC 560 µg/ml byla pozorována dokonce u dvou olejů – kokosového a tucuma; dva kmeny enterokoka byly inhibovány v rozmezí MIC 1130–4500 µg/ml. *S. aureus* se naopak prokázal být méně citlivý v porovnání se streptokoky, kdy v průběhu *in vitro* testování antibakteriální aktivity vůči grampozitivním standardním kmenům způsobujícím záněty vemene ve druhé studii, byl inhibován při vyšších koncentracích štěpených olejů (2048–8192 µg/ml) v porovnání se 3 různými druhy streptokoků (256–2048 µg/ml).

Prokázaný antibakteriální účinek MCFA, uvolněných z olejů při štěpení, vůči stafylokokům a streptokokům je ve shodě s výsledky Nair et al. (2005) a Schlievert a Peterson (2012), kteří však testovali pouze účinky kyseliny kaprylové, monokaprinu a glycerol monolaurátu, tedy látek s prokazatelně vyšším inhibičním účinkem (Tangwatcharin & Khopaibool 2012), a tudíž pozorovali nižší MIC. Obecně lze pak předpokládat, že vyšší citlivost streptokoků v porovnání se stafylokoky, pozorovaná v průběhu druhé studie, může být dána přítomností exopolysacharidové kapsule na povrchu buněk *S. aureus*, která pravděpodobně přispívá k omezené schopnosti inkorporace štěpených olejů, resp. jejich volných mastných kyselin do buněčné stěny těchto bakterií, což je primární mechanismus antibakteriálního účinku MCFA (Yoon et al. 2017). Důvodem, proč byl *S. aureus* v průběhu druhé studie inhibován vyššími koncentracemi hydrolyzovaných olejů bohatých na MCFA, než ve studii první, přestože

citlivost k penicilinu G byla nižší u kmene testovaného právě v první studii, může být dán pravděpodobně omezenější schopností lipázy z *M. javanicus* hydrolyzovat triacylglyceroly vybraných olejů v porovnání s porcinní pankreatickou lipázou.

Rozdíly v metodikách štěpení olejů, dané použitím rozdílných lipolytických enzymů, byly ve srovnávaných studiích implementovány s ohledem na zamýšlené aplikace testovaných olejů bohatých na MCFA. Možné využití antibakteriální aktivity rostlinných olejů bohatých na MCFA *in vivo* vůči grampozitivním enteropatogenům trávicího traktu (studie 1; Hovorková et al. 2018) předpokládá průchod trávicím traktem člověka nebo zvířat, což ospravedlňuje použití porcinní pankreatické lipázy k hydrolyze testovaných olejů *in vitro*. Oproti tomu testování antibakteriální aktivity vybraných olejů vůči grampozitivním původcům bovinních mastitíd předpokládá jejich topickou aplikaci *in vivo*, a z toho důvodu byla záměrně použita lipáza z *M. javanicus*, simulující potenciální lipolýzu testovaných olejů na povrchu kůže člověka a zvířat (studie 2; Laloučková et al. 2019).

Na základě výsledků *in vitro* antibakteriální aktivity hydrolyzovaných rostlinných olejů bohatých na MCFA, prokázaných v průběhu prvních dvou studií, byl pro *in vitro* testování interakcí, což byl primární cíl této práce, vybrán *S. aureus*. Důvodem byla jeho prokázaná citlivost k nejširšímu spektru vybraných štěpených olejů. Dalším selekčním kritériem byl fakt, že *S. aureus* je jedním z nejrozšířenějších patogenů s prokázanou rezistencí k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, což z něj činí celosvětově závažnou hrozbu (Chambers & DeLeo 2009). Skutečnost, že omezení bakteriální antibiotické rezistence pro léčiva, k nimž již byla prokázána, je jedním z cílů kombinační terapie (Qin et al. 2017), podporuje výběr *S. aureus* jakožto modelového organismu studia interakcí štěpených rostlinných olejů bohatých na MCFA.

Vzhledem k testování citlivosti oxacilinu, jakožto markeru methicilinové rezistence *S. aureus* (CDC 2019c), byl tento zvolen pro testování interakcí v kombinaci s vybranými štěpenými oleji bohatými na MCFA, a jejich dominantní mastnou kyselinou (LA) vůči *S. aureus* ve třetí studii, která je součástí této disertační práce (viz kapitola 8; Článek 4; Laloučková et al. 2021). Jeho *in vitro* interakční potenciál s volnými MCFA vůči třem kmenům *S. aureus* byl nejprve ověřen preliminárním testováním kombinačního efektu spolu s dalšími zástupci hlavních tříd antibiotik, jmenovitě  $\beta$ -laktamů (amoxicilin, ampicilin, a oxacilin), tetracyklinů (tetracyklin), glykopeptidů (vancomycin), a aminoglykosidů (gentamicin). Z volných MCFA pouze LA vykazovala synergické interakce s gentamicinem vůči vybraným kmenům

*S. aureus*, avšak tato skutečnost byla v literatuře již zaznamenána (Kitahara et al. 2006), a proto nebylo její další zkoumání zahrnuto do následujícího výzkumu. Testované interakce všech volných MCFA s tetracyklinem a vankomycinem byly indiferentní, ale  $\beta$ -laktamy, jmenovitě amoxicilin, ampicilin a zejména oxacilin, ukázaly výsledky, které vyžadovaly další zkoumání, přičemž LA vykazovala v kombinaci s oxacilinem nejsilnější antagonistické interakce (Laloučková a Kokoška, nepublikovaná data).

Pro ověření vědecké hypotézy této práce, a sice zda budou vybrané hydrolyzované palmové oleje bohaté na MCFA a LA v kombinaci s oxacilinem vykazovat modulovanou aktivitu na základě působení látkových interakcí byl proveden následující experiment.

V průběhu třetí studie (Laloučkova et al. 2021) byly tedy *in vitro* testovány kombinační účinky tří štěpených palmových olejů (kokosový, palmojádrový a tucuma) a oxacilinu vůči třem vybraným kmenům *S. aureus*, a LA v kombinaci s oxacilinem vůči devíti kmenům *S. aureus*. Do studie bylo celkem zapojeno pět standardních kmenů včetně jednoho methicilin-senzitivního (MSSA) a čtyř MRSA, a čtyři klinické izoláty (dva MSSA a dva MRSA), poskytnuté Fakultní nemocnicí v Motole, předem analyzované hmotnostní spektrometrií pomocí laserové desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI-TOF MS) dle Rondevaldova et al. (2018).

Nejdříve byly u tří vybraných hydrolyzovaných olejů (použito štěpení porcinní pankreatickou lipázou), LA, a oxacilinu analyzovány MIC vůči všem devíti kmenům *S. aureus* metodou *in vitro*, která byla použita v předchozích studiích (viz výše). Detekované hodnoty posloužily pro stanovení počátečních koncentrací látek při testování kombinačního účinku. Nejsilnější antistafylokokový účinek, s hodnotami MIC v rozmezí 240–356  $\mu\text{g/ml}$ , byl sledován u tucuma oleje, který byl následován kokosovým (MIC 241–512  $\mu\text{g/ml}$ ) a palmojádrovým (MIC 427–512  $\mu\text{g/ml}$ ). Tyto hodnoty bohužel není možné porovnat se soudobou literaturou, jelikož postup *in vitro* štěpení rostlinných olejů exogenními lipázami, jak je popsán v této práci, nebyl jinými autory aplikován, a jak již bylo zmíněno výše, autoři z tohoto důvodu nepozorují schopnost olejů bohatých na MCFA inhibovat bakteriální růst (Tangwatcharin & Khopaibool 2012; Rossato et al. 2019). LA vykazovala inhibiční účinek vůči všem testovaným kmenům *S. aureus* v rozmezí 242–256  $\mu\text{g/ml}$ , což odpovídá hodnotám pozorovaným jinými autory (Batovska et al. 2009; Nitbani et al. 2016). Je však nutno podotknout, že např. Parsons et al. (2012) a Kelsey et al. (2006) pozorovali možnost inhibice *S. aureus* již při koncentraci LA 50  $\mu\text{g/ml}$ , což naznačuje silnou závislost na metodice *in vitro* stanovení MIC, a především

na zvoleném testovaném kmeni. MIC oxacilinu se pohybovaly v rozmezí 0,53–683 µg/ml, přičemž jednotlivé hodnoty odpovídaly senzitivitě/rezistenci testovaného kmenu *S. aureus* k oxacilinu.

Na základě stanovených MIC byl *in vitro* v 96 jamkových mikrotitračních destičkách šachovnicovou metodou dle Příručky o klinických mikrobiologických postupech (Leber 2016) stanoven kombinační účinek hydrolyzovaného kokosového, palmojádrového a tucuma oleje (štěpení porcinní pankreatickou lipázou, viz výše) s oxalicinem vůči třem kmenům *S. aureus* (jeden klinický izolát, jeden sbírkový kmen MSSA a jeden sbírkový kmen MRSA). Stručně, po vytvoření 64 různých kombinací koncentrací oxacilinu a příslušné testované látky, rozpuštěných v pufovaném Müller-Hintonově bujónu, byly mikrotitrační destičky inokulovány testovanými bakteriálními kmeny a inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C v termoboxech. Hodnocení kombinačního účinku bylo provedeno výpočtem indexů frakčních inhibičních koncentrací (fractional inhibitory concentration index; FICI) z hodnot spektrofotometricky stanovených MIC. Druh interakce byl poté stanoven na základě hodnoty FICI, podle které je možno rozlišovat synergie (FICI ≤ 0,5), indiference (FICI > 0,5–4), a antagonismy (FICI > 4) (Odds 2003).

Na základě výše popsané metodiky byly pozorovány na koncentraci závislé antagonistické interakce (FICI 8,56–4,02) všech testovaných hydrolyzovaných olejů v koncentracích 2048 µg/ml, u tucuma oleje dokonce při koncentraci 1024 µg/ml, přičemž nejvyšší FICI vykazala kombinace oxacilinu právě s tucuma olejem v koncentraci 2048 µg/ml. Bohužel nelze srovnávat získaná data, jelikož tato studie přinesla první poznatky o interakcích vysokých koncentracích *in vitro* štěpených palmových olejů s oxalicinem vůči *S. aureus*.

Antagonistický způsob účinku byl pozorován také pro LA v koncentraci 1024 µg/ml kombinovanou s oxalicinem (hodnoty FICI 4,01–4,28) u všech testovaných kmenů *S. aureus*, kdy nejsilnější antagonistická interakce byla prokázána pro MRSA sbírkový kmen. Ostatní kombinace štěpených olejů, nebo LA s oxalicinem testované vůči *S. aureus* vykazaly indiferentní vztahy s výjimkou kombinace LA v koncentraci 32 µg/ml s oxalicinem u jednoho standardního kmene MRSA. Ve srovnání s hydrolyzovanými palmovými oleji, byly interakce LA a jejích esterů v kombinaci s množstvím látek vůči různým bakteriálním druhům popsány v literatuře mnohem častěji (Kitahara et al. 2006; Batovska et al. 2009; Tangwatcharin & Khopaibool 2012; Rosenblatt et al. 2015). Za zmínku stojí hlavně studie Kitahara et al.

(2006), ve které je popsán synergický účinek LA s gentamycinem u *S. aureus*, a kde autoři zaznamenávají indiferentní vztah mezi oxacilinem a LA u *S. aureus*, přičemž lze předpokládat, že antagonismus nebyl pozorován z důvodu testování LA v nižších koncentracích.

Jelikož není znám možný mechanismus indukce antagonistického účinku vysokých koncentrací LA, štěpeného kokosového, palmojádrového a tucuma oleje v kombinaci s oxacilinem vůči *S. aureus*, bylo provedeno *in vitro* testování růstových parametrů tří kmenů *S. aureus* v různých koncentracích výše jmenovaných látek standardizovanou metodou modelování růstových křivek (CLSI 1999). Ve stručnosti, pomocí *in vitro* mikrodilučního testování růstu *S. aureus* v 96 jamkových mikrotitračních destičkách se sestupnými dvounásobnými ředěními vybraných látek v Müller-Hintonově bujónu byly zaznamenávány hodnoty optické denzity měřené spektrofotometricky každou půl hodinu po dobu 14 hodin a posléze po 24 hodinách od inokulace destiček bakteriemi *S. aureus*. Stonásobné hodnoty přirozených logaritmů optických denzit byly poté vyneseny do grafů a byly sestrojeny růstové křivky. Grafické vyhodnocení růstu bakterií pak odhalilo snižování rychlosti růstu a tím tedy i prodloužení generačního intervalu u všech tří testovaných kmenů *S. aureus* v závislosti na zvyšující se koncentraci hydrolyzovaných palmových olejů. Lze konstatovat, že pozorované prodloužení generační doby a snížení specifické rychlosti růstu vznikající se zvyšující se koncentrací LA a testovaných štěpených palmových olejů naznačují, že možný mechanismus antagonistických interakcí mezi testovanými sloučeninami a oxacilinem může spočívat v zastavení buněčného dělení způsobeného LA, či štěpeným olejem. Známý mechanismus antagonismu mezi bakteriocidními a bakteriostatickými antibiotiky (Ocampo et al. 2014) tak může být aplikovatelný na antagonismus mezi LA, štěpenými palmovými oleji a oxacilinem, jelikož zatímco LA, či z olejů uvolněné MCFA dočasně brání růstu bakteriálních buněk, oxacilin pravděpodobně není schopen správně vykonávat svou antibakteriální činnost, jelikož je aktivní pouze u dělících se bakteriálních buněk.

Další možnostmi indukce antagonismu mezi LA, štěpenými palmovými oleji a oxacilinem jsou diskutovány ve třetí studii této práce (Lalouckova et al. 2021) a zahrnují (i) alteraci PBP v membránách bakterií vyvolanou změnou membránového potenciálu na základě působení MCFA (Yoon et al. 2015), způsobující nemožnost připoutání oxacilinu k vazebnému místu (Papich 2007); (ii) destabilizaci proteinů buněčné membrány v důsledku snížení její fluidity omezením pohybu elektronových přenašečů při přítomnosti MCFA (Desbois & Smith 2010),

vedoucím ke změně pH a srážení PBP (Roch et al. 2019), čímž jsou deaktivována vazebná místa pro oxacilin; (iii) inaktivaci oxacilinu změnou pH prostředí vyvolanou poškozením membránového elektronového transportu, způsobující destabilizaci oxacilinu v kyselém prostředí (Rad et al. 2011); a (iv) přítomnost perzistentních (nedělicích se) buněk, na něž oxacilin nepůsobí (Peyrusson et al. 2020).

Pozorované interakce tedy naznačují, že současná koadministrace vysokých dávek LA, či hydrolyzovaných palmových olejů bohatých na MCFA může negativně ovlivnit farmakologické účinky oxacilinu. Limitace třetí studie, publikované v rámci této práce, tkví především v tom, že pozorovaný antagonismus byl indukován až při koncentracích LA a štěpených palmových olejů odpovídajících příjmu 1 g/kg tělesné hmoty. Tato skutečnost však nemusí omezovat praktický dopad této práce, jelikož doporučený denní příjem tuků je 65 g (Lewis 2019), přičemž na základě doporučení FAO (2004) je dokonce možné předpokládat, že denní příjem tuků u žen může činit kolem 80 g a u mužů dokonce přes 100 g denně. Tvrzení možnosti dosáhnout dostatečného příjmu MCFA, či štěpeného palmového oleje, který by byl v kombinaci s oxacilinem schopný indukovat nežádoucí antagonistické reakce, podporují také studie zkoumající efekt vysokolipidových diet, při nichž příjem kokosového oleje dosahuje až 80 g/den (Reiser et al. 1985; Ng et al. 1991; Maki et al. 2018).

Nelze také opomenout fakt, že kokosový olej je běžnou součástí přípravků sloužících pro topické ošetření, přestože tato práce potvrzuje, že je nutné oleje naštěpit, aby se projevily jejich antibakteriální účinky a tím i možné interakce. Štěpení palmových olejů může být totiž uskutečněno prostřednictvím lipolytických enzymů bakterií přítomných na povrchu těla (Kwaszewska et al. 2014), jelikož byl prokázán antibakteriální účinek kokosového oleje i LA vůči *S. aureus* při léčbě kožních onemocnění (Verallo-Rowell et al. 2008; Nakatsuji et al. 2009).

## 10 Doporučení pro další výzkum

Vzhledem k problémům, kterým je lidstvo v současnosti vystaveno nejen v důsledku bakteriím rezistentním na antibiotika, ale i v důsledku jiných infekčních agens, je celosvětově vývoj účinných léčiv jedním z klíčových středobodů zájmu výzkumných institucí zaměřených na antiinfektivní látky, či farmacii. Možnost využití různých látek, jako jsou např. obsolentní, málo účinná, či do určité míry toxická léčiva, které vykazují potenciál být zapojeny do kombinační terapie s pozitivními výsledky na zdraví lidí i zvířat, je jednou z cest, jak se postavit hrozbě, které v tuto chvíli čelíme.

V kontextu této práce je jednoznačným směrem, kterým by se měl ubírat další výzkum popsaného antagonistické působení MCFA, resp. olejů bohatých na MCFA a oxacilinu, studium mechanismu této interakce. Bylo by vhodné popsat, jakým způsobem se mění pH extra a intracelulárního prostoru buňky *S. aureus* při současném ošetření látkami, které indukují antagonismus. K tomu by mohlo být využito měření sodno-draselného potenciálu pomocí příslušných detekčních postupů, na základě kterých by bylo zjištěno, zda nedochází k poruše acidobazické rovnováhy, která by narušila integritu buněčné membrány. Dále by bylo vhodné využít elektronové mikroskopie pro zobrazení případných morfologických změn, pokud k nim dochází, při vystavení bakterií látkám indukujícím rezistenci, čímž by se objasnilo, zda jsou poškozovány určité části buňky, či bakteriální buněčné membrány. Další možností je ověření antibiotiky indukované tvorby perzistentních populací za pomoci barvení propidium jodidem a oxidačně citlivým barvivem pro třídění buněk.

Následně by mělo být také ověřeno, zda nedochází k antagonistickým interakcím také vůči jiným, především grampozitivním, bakteriím, a jestli je případně tato interakce významná z medicínského hlediska, či jestli by mohla mít medicínský dopad.

V neposlední řadě by také mělo dojít k ověření pozorované interakce *in vivo* experimentálně na zvířatech infikovaných kmeny *S. aureus*, protože není jasné, zda detoxikační procesy organismu, či prosté trávení neomezí negativní dopady koadministraci oxacilinu a např. kokosového oleje.



## 11 Doporučení pro praxi

Přestože byly popsány praktické dopady na zdraví člověka i zvířat přímo v souhrnné diskuzi této práce, mezi něž patří možné selhání léčby antistafylokokové léčby ve spojení s vysokolipidovou dietou (např. ketodieta), další z možností, jak předcházet nežádoucím interakcím mezi potravou a léčivem, by mohlo být vypracování volně dostupné databáze interakcí léčiv s potravou a jinými látkami (ideálně s oporou v legislativě), kam by výrobci zadávali (povinně) informace o případném kombinačním účinku registrovaných léčiv, které by mohli (museli) být aktualizovatelné buď právě výrobcem, nebo orgány ochrany veřejného zdraví. Při zpracovávání této práce, resp. při sepisování rukopisu Článku 4 (Lalouckova et al. 2021), byla totiž jedním z velkých limitů právě nemožnost ověření, zda je známo, jakým způsobem oxacilin interaguje s potravou, či zda jsou známy jeho interakce s jinými látkami. Přestože státní ústav pro kontrolu léčiv i ústav pro kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv zveřejňuje příbalové letáky léčiv, tyto informace v nich nelze nalézt a volně dostupná databáze bez placeného přístupu neexistuje, a ve většině případů se omezuje pouze na interakce mezi léčivy. Není tedy možné si bez konzultace s odborníkem ověřit, zda se např. užívaný vitaminový doplněk, či doplněk na bázi fytochemikálií, který je volně prodejný, negativně neovlivňují navzájem, či zda jejich účinky nejsou ovlivňovány (specifickou) dietou. Přestože státní ústav pro kontrolu léčiv nabízí veřejnosti možnost položit dotaz ohledně léčiv, byla by celistvá databáze jednodušším prostředkem pro především laickou veřejnost. Podklady do Článku 4 o interakcích se nakonec podařilo získat zasláním dotazu do lékového informačního centra farmaceutické fakulty Karlovy univerzity v Hradci Králové, které však poskytuje informace výhradně zdravotnickým pracovníkům, a proto je pro veřejnost nevyužitelná.

## 12 Závěr

Antibiotické látky jsou důležitým prostředkem v boji s patogeny způsobujícími jak zoonotická, tak alimentární onemocnění. Někteří původci těchto nemocí se v průběhu krátké doby, kdy jsou antibiotika masově využívána v humánní i veterinární medicíně a živočišné produkci, dokázali díky selekčnímu tlaku přizpůsobit, a nabyli na základě akvizice genů, či mobilních genetických elementů schopnost využívat různé mechanismy, zabraňující účinku antibiotik. Onemocnění jako listerióza, pneumonie, kampylobakterová enteritida, mastitida, či infekční endokarditida jsou závažná, leckdy až život ohrožující onemocnění, která nejen, že stojí ročně tisíce lidských životů, ale jsou také velkou finanční zátěží pro ekonomiky jak rozvinutých, tak rozvojových zemí. Implementace legislativních kroků omezujících spotřebu antibiotik v zemědělství, i výzvy pro omezení spotřeby antibiotik jak v humánní, tak veterinární medicíně, jsou běžnou součástí celosvětových plánů pro zmírnění dopadů bakteriální antibiotické rezistence.

Z výše uvedených důvodů je nutnost hledat zástupné přístupy k potlačení odolnosti bakterií vůči antibiotikům, jako jsou např.  $\beta$ -laktamy, velice důležitým a aktuálním výzkumným tématem. Jednou z možností, kterými lze antibiotika, především v zemědělství nahradit, jsou i mastné kyseliny se střední délkou řetězce, které díky svým antibakteriálním vlastnostem nacházejí uplatnění i v potravinářství. Tyto látky, představující hlavní složku některých rostlinných olejů, jako jsou kokosový, palmojadrový, či olej ze semen hlazence, po *in vitro* štěpení exogenními lipázami, které bylo navrženo pro tuto práci, vykázaly antibakteriální aktivitu (MIC 64–4500  $\mu\text{g/ml}$  v závislosti na testovaném druhu a kmeni) vůči širokému spektru grampozitivních původců alimentárních onemocnění a zoonóz (např. *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*), přičemž nebyl prokázán negativní vliv na trávení prospěšné mikroorganismy (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*). Následně byla ověřena možnost kombináční aplikace hydrolyzovaného kokosového, palmojadrového, nebo tucamu oleje v kombinaci s oxacilinem, jakožto markerem methicilinové rezistence, k potlačení růstu bakterií *S. aureus*. Tento výzkum prokázal závažný antagonistický vztah mezi štěpenými oleji ( $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$ ), či jejich hlavní mastnou kyselinou (kyselina laurová) a oxacilinem vůči testovanému vzorku bakteriálních kmenů *S. aureus*, včetně rezistentních zástupců a klinických izolátů.

Cíle práce zahrnující studium možných kombinačních účinků vybraných přírodních látek a antibiotik byly splněny. Do experimentů ověřujících kombinační účinek byly zařazeny patogenní kmeny, a do experimentů studujících antibakteriální účinek i komenzální druhy bakterií. Pro ověření hypotézy, která byla potvrzena, jelikož kombinace štěpených palmových olejů nebo kyseliny laurové v kombinaci s oxacilinem vykazala modulovanou aktivitu v kontextu antagonistických interakcí, byly využity *in vitro* mikrodiluční laboratorní metody.

Je nutno konstatovat, že *in vitro* pozorované kombinační účinky mohou mít dopad na zdraví lidí i zvířat, jelikož může dojít k negativnímu ovlivnění antistafylokokové léčby při současném příjmu vysookolipidové diety s majoritním zastoupením středně dlouhých mastných kyselin. Mechanismus vzniku této interakce je pravděpodobně založen na nežádoucím vlivu bakteriostaticky působících středně dlouhých mastných kyselin na baktericidní oxacilin, který nemůže uplatnit svůj účinek, pokud dojde k zastavení bakteriálního dělení právě prostřednictvím středně dlouhých mastných kyselin. K ověření této teorie je však zapotřebí dalších *in vitro* i *in vivo* testů. Přesto je závěrem této práce doporučení k omezení příjmu vysokého množství středně dlouhých nasycených tuků v dietě při současné medikaci  $\beta$ -laktamů pro léčbu stafylokokových onemocnění.

### 13 Seznam použité literatury

- Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances* **31**:877-902.
- Abdullahi O, Karani A, Tigoi CC, Mugo D, Kungu S, Wanjiru E, Jomo J, Musyimi R, Lipsitch M, Scott JAG. 2012. The prevalence and risk factors for pneumococcal colonization of the nasopharynx among children in Kilifi District, Kenya. *PLOS ONE* (e30787) DOI: 10.1371/journal.pone.0030787.
- Abedon ST, García P, Mullany P, Aminov R. 2017. Phage therapy: past, present and future. *Frontiers in Microbiology* **8**:981. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00981.
- Abeywardena MY. 2003. Dietary fats, carbohydrates and vascular disease: Sri Lankan perspectives. *Atherosclerosis* **171**:157-161.
- Abraham NM, Lamlerthton S, Fowler VG, Jefferson KK. 2012. Chelating agents exert distinct effects on biofilm formation in *Staphylococcus aureus* depending on strain background: role for clumping factor B. *Journal of Medical Microbiology* **61**:1062-1070.
- Abranches J, Lemos JA, Burne RA. 2006. Osmotic stress responses of *Streptococcus mutans* UA159. *FEMS Microbiology Letters* **255**:240-246.
- Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer S, Chakraborty B, Wen Z, Richards VP, Brady LJ, Lemos JA. 2019. Biology of Oral Streptococci. *Microbiology Spectrum* **6**:10. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018.
- Abuaita BH, O’Riordan MX. 2014. *Listeria* exploits damage and death to spread bad news. *Trends in Microbiology* **22**:370-371.
- Addis M, Sisay D. 2015. A review on major food borne bacterial illnesses. *Journal of Tropical Diseases & Public Health* **3**:1-7.
- Afouda P, Fournier PE, Raoult D, Merhej V. 2017. ‘*Lactobacillus timonensis*’ sp. nov., a new bacterial species isolated from the human gut. *New Microbes and New Infections* **19**:121-122.
- Aguirre M, Collins MD. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology* **75**:95-107.
- Ahmed MO, Baptiste KE. 2018. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. *Microbial Drug Resistance* **24**:590-606.
- Ahn JB, Hwang HJ, Park JH. 2001. Physiological responses of oxygen-tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**:443-451.

- Airhart S, et al. 2016. A diet rich in medium-chain fatty acids improves systolic function and alters the lipidomic profile in patients with type 2 diabetes: a pilot study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **101**:504-512.
- Akuzawa N, Kurabayashi M. 2016. Bacterial pneumonia caused by *Streptococcus pyogenes* infection: a case report and review of the literature. *Journal of Clinical Medicine Research* **8**:831-835.
- Aldeyab MA, Monnet DL, López-Lozano JM, Hughes CM, Scott MG, Kearney MP, Magee FA, McElnay JC. 2008. Modelling the impact of antibiotic use and infection control practices on the incidence of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a time-series analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **62**:593-600.
- Alissa EM. 2015. Medicinal herbs and therapeutic drugs interactions. *Therapeutic Drug Monitoring* **36**:413-422.
- Allaart JG, van Asten AJ, Gröne A. 2013. Predisposing factors and prevention of *Clostridium perfringens*-associated enteritis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **36**:449-464.
- Allerberger F. 2003. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **35**:183-189.
- Alves-Barroco C, Rivas-García L, Fernandes AR, Baptista PV. 2020. Tackling multidrug resistance in Streptococci—From novel biotherapeutic strategies to nanomedicines. *Frontiers in Microbiology* (579916.) DOI: 10.3389/fmicb.2020.579916.
- Aminov R. 2017. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology* **133**:4-19.
- Aminov RI. 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology* **1**:134. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00134.
- Aminov RI. 2011. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology* **2**:158. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00158.
- Aminov RI. 2013. Biotic acts of antibiotics. *Frontiers in Microbiology* **4**:241. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00241.
- Anushree S, André M, Guillaume D, Frédéric F. 2017. Stearic sunflower oil as a sustainable and healthy alternative to palm oil. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **37**:18. DOI: 10.1007/s13593-017-0426-x.
- Archibald LK, Jarvis WR. 2011. Health care-associated infection outbreak investigations by the Centers for Disease Control and Prevention, 1946–2005. *American Journal of Epidemiology* **174**:S47-S64. DOI: 10.1093/aje/kwr310.

- Arias CA, Contreras GA, Murray BE. 2010. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection* **16**:555-562.
- Arias CA, Murray BE. 2012. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology* **10**:266-278.
- Atkins KE, Flasche S. 2018. Vaccination to reduce antimicrobial resistance. *The Lancet Global Health* (e252) DOI: 10.1016/S2214-109X(18)30043-3.
- Aucken HM, Ganner M, Murchan S, Cookson BD, Johnson AP. 2002. A new UK strain of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA-17) resistant to multiple antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**:171-175.
- Augustin K, Khabbush A, Williams S, Eaton S, Orford M, Cross JH, Heales SJR, Walker MC, Williams RS. 2018. Mechanisms of action for the medium-chain triglyceride ketogenic diet in neurological and metabolic disorders. *The Lancet Neurology* **17**:84-93.
- Avershina E, Lundgård K, Sekelja M, Dotterud C, Storrø O, Øien T, Johnsen R, Rudi K. 2016. Transition from infant-to adult-like gut microbiota. *Environmental Microbiology* **18**:2226-2236.
- Azad M, Kalam A, Sarker M, Li T, Yin J. 2018. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *BioMed Research International* (9478630) DOI: 10.1155/2018/9478630.
- Ba X, Harrison EM, Lovering AL, Gleadall N, Zadoks R, Parkhill J, 2015. Old drugs to treat resistant bugs: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with *mecC* are susceptible to a combination of penicillin and clavulanic acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**:7396-7404.
- Bailey DG, Dresser G, Arnold JMO. 2013. Grapefruit–medication interactions: forbidden fruit or avoidable consequences?. *Canadian Medical Association Journal* **185**:309-316.
- Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Imperi M, Facinelli B, Giovanetti E, Pataracchia M, Alfarone G, Orefici G. 2006. Therapeutic failures of antibiotics used to treat macrolide-susceptible *Streptococcus pyogenes* infections may be due to biofilm formation. *Journal of Clinical Microbiology* **44**:2721-2727.
- Bamberger DM, Boyd SE. 2005. Management of *Staphylococcus aureus* infections. *American Family Physician* **72**:2474-2481.
- Baquero F, Blázquez J. 1997. Evolution of antibiotic resistance. *Trends in Ecology & Evolution* **12**:482-487.
- Baquero F. 1997. Gram-positive resistance: challenge for the development of new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **39**:1-6.

- Barber M. 1947. Staphylococcal infection due to penicillin-resistant strains. *British Medical Journal* **2**:863-865.
- Barkema HW, Green MJ, Bradley AJ, Zadoks RN. 2009. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of Dairy Science* **92**:4717-4729.
- Bätge B, Filejski W, Kurowski V, Klüter H, Djonlagic H. 1992. Clostridial sepsis with massive intravascular hemolysis: rapid diagnosis and successful treatment. *Intensive Care Medicine* **18**:488-490.
- Batchelor FR, Doyle FP, Nayler JHC, Rolinson GN. 1959. Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature* **183**:257-258.
- Batovska DI, Todorova T, Tsvetkova V, Najdenski HM. 2009. Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationships. *Polish Journal of Microbiology* **58**:43-47.
- Battistuzzi FU, Feijao A, Hedges SB. 2004. A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC Evolutionary Biology* (44) DOI: 10.1186/1471-2148-4-44.
- Baudoux P, Bles N, Lemaire S, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM, Van Bambeke F. 2007. Combined effect of pH and concentration on the activities of gentamicin and oxacillin against *Staphylococcus aureus* in pharmacodynamic models of extracellular and intracellular infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**:246-253.
- Benga L, Goethe R, Rohde M, Valentin-Weigand P. 2004. Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells. *Cellular Microbiology* **6**:867-881.
- Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrímsson Ó, Thormar H. 2001. Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS* **109**:670-678.
- Bermudez-Humaran LG, Langella P. 2012. Importance of commensal and probiotic bacteria in human health. *Current Immunology Reviews* **8**:248-253.
- Bhattacharya M, Wozniak DJ, Stoodley P, Hall-Stoodley L. 2015. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* **13**:1499-1516.
- Biavati B, Mattarelli P. 2009. Genus *Bifidobacterium*. Pages 171-206 in Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*; Volume 5: The Actinobacteria, Part A, Springer, New York.
- Black PN, DiRusso CC. 2003. Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**:454-472.

- Block S, Hedrick J, Hammerschlag MR, Cassell GH, Craft JC. 1995. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in pediatric community-acquired pneumonia: comparative efficacy and safety of clarithromycin vs. erythromycin ethylsuccinate. *Pediatric Infectious Disease Journal* **14**:471-477.
- Bloom B, Chaikoff IL, Reinhardt WO. 1951. Intestinal lymph as pathway for transport of absorbed fatty acids of different chain lengths. *American Journal of Physiology-Legacy Content* **166**:451-455.
- Bomba A, et al. 2006. The improvement of probiotics efficacy by synergistically acting components of natural origin: a review. *Biologia* **61**:729-734.
- Bonazzi M, Lecuit M, Cossart P. 2009. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: From bench to bedside. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (a003087) DOI: 10.1101/cshperspect.a003087.
- Boneca IG, Chiosis, G. 2003. Vancomycin resistance: occurrence, mechanisms and strategies to combat it. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **7**:311–328.
- Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA. 2001. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?. *The Lancet Infectious Diseases* **1**:314-325.
- Borriello SP, Williams RKT. 1985. Treatment of *Clostridium perfringens* enterotoxin-associated diarrhoea with metronidazole. *Journal of Infection* **10**:65-67.
- Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. 2003. Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:7336–7342.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett, J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* **48**:1-12.
- Boullata JI, Hudson LM. 2012. Drug–nutrient interactions: a broad view with implications for practice. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* **112**:506-517.
- Boullata JI. 2013. Drug and nutrition interactions: not just food for thought. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* **38**:269-271.
- Boyce JM, Havill NL, Kohan C, Dumigan DG, Ligi CE. 2004. Do infection control measures work for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*?. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **25**:395-401.
- Bozzi Cionci N, Baffoni L, Gaggia F, Di Gioia D. 2018. Therapeutic microbiology: The Role of *Bifidobacterium breve* as food supplement for the prevention/treatment of paediatric diseases. *Nutrients* (1723) DOI: 10.3390/nu10111723.



- Braga LC, Leite AAM, Xavier KGS, Takahashi JA, Bemquerer MP, Chartone-Souza E, Nascimento AMA. 2005. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Canadian Journal of Microbiology* **51**:541-547.
- Briolat V, Reysset G. 2002. Identification of the *Clostridium perfringens* genes involved in the adaptive response to oxidative stress. *Journal of Bacteriology* **184**:2333-2343.
- Brock TD, Peacher B, Pierson D. 1963. Survey of the bacteriocines of enterococci. *Journal of Bacteriology* **86**:702-707.
- Budiño FEL, Thomaz MC, Kronka RN, Nakaghi LSO, Tucci FM, Fraga AL, Scandolera AJ, Huaynate RAR. 2005. Effect of probiotic and prebiotic inclusion in weaned piglet diets on structure and ultra-structure of small intestine. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **48**:921-929.
- Bush K, Bradford PA. 2016.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **6**:a025247. DOI: 10.1101/cshperspect.a025247.
- Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. 2012. Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**:685-706.
- Byarugaba DK. 2005. Antimicrobial resistance and its containment in developing countries. Pages 617-647 in Gould I, van der Meer JWM, editors. *Antibiotic Policies: Theory and Practise*. Springer, Boston.
- Cai Y, Pang H, Kitahara M, Ohkuma M. 2012. *Lactobacillus nasuensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus *Lactobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**:1140-1144.
- Camara M, Dieng A, Boye CSB. 2013. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pyogenes* isolated from respiratory tract infections in Dakar, Senegal. *Microbiology Insights* (S12996) DOI: 10.4137/MBI.S12996.
- Camilli A, Tilney LG, Portnoy DA. 1993. Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Molecular Microbiology* **8**:143-157.
- Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT, Danziger LH. 2005. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **24**:31-40.
- Cantas L, Suer K. 2014. The important bacterial zoonoses in “one health” concept. *Frontiers in Public Health* (144) DOI: 10.3389/fpubh.2014.00144.
- Carlson RP, Taffs R, Davison WM, Steward PS. 2008. Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **19**:1035-1046.

- Carlsson F, Sandin C, Lindahl G. 2005. Human fibrinogen bound to *Streptococcus pyogenes* M protein inhibits complement deposition via the classical pathway. *Molecular Microbiology* **56**:28-39.
- Carman RJ. 1997. *Clostridium perfringens* in spontaneous and antibiotic-associated diarrhoea of man and other animals. *Reviews in Medical Microbiology* (S46) DOI: 10.1097/00013542-199712001-00024.
- Cascorbi I. 2012. Drug interactions-principles, examples and clinical consequences. *Deutsches Ärzteblatt International* **109**:546–556.
- Cassini A, et al. 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases* **19**:56-66.
- Castanon JIR. 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science* **86**:2466-2471.
- Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. 2008. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *Journal of Experimental Medicine* **205**:2609-2621.
- Cavera VL, Arthur TD, Kashtanov D, Chikindas ML. 2015. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents* **46**:494-501.
- CDC. 2019a. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. Available from [www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf](http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf) (accessed February 2021).
- CDC. 2019b. National Notifiable Diseases Surveillance System, 2018 Annual Tables of Infectious Disease Data. CDC Division of Health Informatics and Surveillance, Atlanta, GA. Available from [www.cdc.gov/nndss/infectious-tables.html](http://www.cdc.gov/nndss/infectious-tables.html) (accessed February 2021).
- CDC. 2019c. Laboratory detection of: oxacillin/methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Available from [www.cdc.gov/hai/settings/lab/lab\\_mrsa.html](http://www.cdc.gov/hai/settings/lab/lab_mrsa.html) (accessed January 2021).
- Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Götz F. 2006. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infection and Immunity* **74**:4950-4953.
- CLSI. 1999. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

- CLSI. 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard M07-A10 – Tenth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Coban HB. 2020. Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **43**:569-591.
- Cocito C. 1983. Properties of virginiamycin-like antibiotics (synergimycins), inhibitors containing synergistic components. Pages 296-332 in Hahn FE, editor. *Modes and Mechanisms of Microbial Growth Inhibitors*. Springer, Berlin.
- Collins LV, Kristian SA, Weidenmaier C, Faigle M, Van Kessel KP, Van Strijp JA, Gotz F, Neumeister B, Peschel A. 2002. *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *Journal of Infectious Diseases* **186**:214-219.
- Cook M, Molto E, Anderson C. 1989. Fluorochrome labelling in Roman period skeletons from Dakhleh Oasis, Egypt. *American Journal of Physical Anthropology* **80**:137-143.
- Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. 2005. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:3060-3067.
- Coriat BJ, Azuero OAJ, Gil Tamayo S, Rueda Rodríguez MC, Castañeda Cardona C, Rosselli D. 2017. A Review of the Literature on the Use of Probiotics to Treat Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease. *Revista Colombiana de Gastroenterología* **32**:141-149.
- Cormican MG, Jones RN. 1996. Emerging resistance to antimicrobial agents in gram-positive bacteria: enterococci, staphylococcus and nonpneumococcal streptococci. *Drugs* **51**:6–12.
- Cotter PD, Ross RP, Hill C. 2013. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology* **11**:95-105.
- Crittenden R, Karppinen S, Ojanen S, Tenkanen M, Fagerström R, Mättö J, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Poutanen K. 2002. *In vitro* fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**:781-789.
- Cunningham MW. 2000. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical Microbiology Reviews* **13**:470-511.
- da Silva DDC, Tavares MG, do Nascimento CKB, Lira EC, Dos Santos ÂA, de Seixas Maia LMS, Hornsby MBDO. 2018. Can coconut oil and treadmill exercise during the critical period of brain development ameliorate stress-related effects on anxiety-like behavior and episodic-like memory in young rats?. *Food & Function* **9**:1492-1499.

- Dai J, Han R, Xu Y, Li N, Wang J, Dan W. 2020. Recent progress of antibacterial natural products: future antibiotics candidates. *Bioorganic Chemistry* (103922) DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103922.
- David DJ, Cossart P. 2017. Recent advances in understanding *Listeria monocytogenes* infection: the importance of subcellular and physiological context. *F1000Research* (1126) DOI: 10.12688/f1000research.11363.1.
- David MZ, Daum RS. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews* **23**:616–87.
- Davies J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**:375-382.
- Davis ML, Ricke SC, Donaldson JR. 2019. Establishment of *Listeria monocytogenes* in the Gastrointestinal Tract. *Microorganisms* (75) DOI: 10.3390/microorganisms7030075.
- Dayrit CS. 2003. Coconut oil: atherogenic or not? *Philippine Journal of Cardiology* **31**:97-104.
- De Boer A, van Hunsel F, Bast A. 2015. Adverse food-drug interactions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **73**:859-865.
- de Córdoba SR, Esparza-Gordillo J, de Jorge EG, Lopez-Trascasa M, Sánchez-Corral P. 2004. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Molecular Immunology* **41**:355-367.
- de Souza Guedes L, Jardim ICSF, de Melo LV, Beppu MM, Breitzkreitz MC, Santana CC. 2017. Study of the effect of the operating parameters on the separation of bioactive compounds of palm oil by ultra-high performance supercritical fluid chromatography using a design of experiments approach. *Canadian Journal of Chemical Engineering* **95**:2306-2314.
- Delaunay E, Abat C, Rolain JM. 2015. *Enterococcus cecorum* human infection, France. *New Microbes and New Infections* **7**:50-51.
- Desbois AP, Smith VJ. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**:1629-1642.
- Di MG, Chinali G, Cocito C. 1989. The molecular basis of the inhibitory activities of type A and type B synergimycins and related antibiotics on ribosomes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **24**:485-507.
- DiBello JR, McGarvey ST, Kraft P, Goldberg R, Campos H, Quested C, Laumoli TS, Baylin A. 2009. Dietary patterns are associated with metabolic syndrome in adult Samoans. *Journal of Nutrition* **139**:1933-1943.

- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M. 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clinical Infectious Diseases* (S114-S132) DOI: 10.1086/320184.
- Dierick N, Decuypere J, Molly K, Van Beek E, Vanderbeke E. 2002. The combined use of triacylglycerols containing mediumchain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition: I. In vitro screening of the release of MCFAs from selected fat sources by selected exogenous lipolytic enzymes under simulated pig gastric conditions and their effects on the gut flora of piglets. *Livestock Production Science* **75**:129-142.
- Dierick NA, Decuypere JA, Degeyter I. 2003. The combined use of whole *Cuphea* seeds containing medium chain fatty acids and an exogenous lipase in piglet nutrition. *Archives of Animal Nutrition* **57**:49-63.
- DiGiandomenico A, Sellman BR. 2015. Antibacterial monoclonal antibodies: the next generation?. *Current Opinion in Microbiology* **27**:78-85.
- Ding XF, Wu CD, Zhang LQ, Zheng J, Zhou RQ. 2014. Characterization of eubacterial and archaeal community diversity in the pit mud of Chinese Luzhou-flavor liquor by nested PCR–DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **30**:605-612.
- Dinos G, Athanassopoulos C, Missiri D, Giannopoulou PC, Vlachogiannis IA, Papadopoulos GE, Papaioannou D, Kalpaxis DL. 2016. Chloramphenicol derivatives as antibacterial and anticancer agents: historic problems and current solutions. *Antibiotics* **5**:20. DOI: 10.3390/antibiotics5020020.
- Doern CD. 2014. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *Journal of Clinical Microbiology* **52**:4124-4128.
- Dolka B, Chrobak-Chmiel D, Czopowicz M, Szeleszczuk P. 2017. Characterization of pathogenic *Enterococcus cecorum* from different poultry groups: Broiler chickens, layers, turkeys, and waterfowl. *PLOS ONE* (e0185199) DOI: 10.1371/journal.pone.0185199.
- Domalaon R, Idowu T, Zhanel GG, Schweizer F. 2018. Antibiotic hybrids: the next generation of agents and adjuvants against Gram-negative pathogens?. *Clinical Microbiology Reviews* (e00077-17) DOI: 10.1128/CMR.00077-17.
- Downey JS, Mashburn-Warren L, Ayala EA, Senadheera DB, Hendrickson WK, McCall LW, Sweet JG, Cvitkovitch DG, Spatafora GA, Goodman SD. 2014. *In vitro* manganese-dependent cross-talk between *Streptococcus mutans* VicK and GcrR: implications for overlapping stress response pathways. *PLOS ONE* (e115975) DOI: 10.1371/journal.pone.0115975.

- Drechsel H, Freund S, Nicholson G, Haag H, Jung O, Zahner H, Jung G. 1993. Purification and chemical characterization of staphyloferrin B, a hydrophilic siderophore from staphylococci. *Biometals* **6**:185-192.
- Drevets DA, Bronze MS. 2008. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **53**:151-165.
- Drissi F, Buffet S, Raoult D, Merhej V. 2015. Common occurrence of antibacterial agents in human intestinal microbiota. *Frontiers in Microbiology* (441) DOI: 10.3389/fmicb.2015.00441.
- Drissi F, Raoult D, Merhej V. 2017. Metabolic role of lactobacilli in weight modification in humans and animals. *Microbial Pathogenesis* **106**:182-194.
- Duar RM, Lin XB, Zheng J, Martino ME, Grenier T, Pérez-Muñoz ME, Leulier F, Gänzle M, Walter J. 2017. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews* (S27-S48) DOI: 10.1093/femsre/fux030.
- Dubois V, Breton S, Linder M, Fanni J, Parmentier M. 2007. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology* **109**:710–732.
- Dumbreck S, Flynn A, Nairn M, Wilson M, Treweek S, Mercer SW, Alderson P, Thompson A, Payne K, Guthrie B. 2015. Drug-disease and drug-drug interactions: systematic examination of recommendations in 12 UK national clinical guidelines. *BMJ* (h949) DOI: 10.1136/bmj.h949.
- Duranti S, et al. 2016. Evaluation of genetic diversity among strains of the human gut commensal *Bifidobacterium adolescentis*. *Scientific Reports* (23971) DOI: 10.1038/srep23971.
- Duranti S, Turrone F, Lugli GA, Milani C, Viappiani A, Mangifesta M, Gioiosa L, Palanza P, van Sinderen D, Ventura M. 2014. Genomic characterization and transcriptional studies of the starch-utilizing strain *Bifidobacterium adolescentis* 22L. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:6080-6090.
- ECDC, EMEA. 2009. ECDC/EMEA joint technical report - The bacterial challenge: time to react. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm.
- ECDC. 2015. Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm.
- ECDC. 2018a. Rapid risk assessment: Carbapenemase-producing (OXA-48) *Klebsiella pneumoniae* ST392 in travellers previously hospitalised in Gran Canaria, Spain. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm.

- ECDC. 2018b. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm.
- ECDC. 2018c. Rapid risk assessment: Emergence of resistance to ceftazidime-avibactam in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm.
- ECDC. 2020a. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2019. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm.
- ECDC. 2020b. Listeriosis - Annual Epidemiological Report for 2017. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm. Available from [www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/listeriosis-annual-epidemiological-report-2017.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/listeriosis-annual-epidemiological-report-2017.pdf) (accessed February 2021).
- EFSA, ECDC. 2019a. Scientific report on the European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA Journal (5926) DOI: 10.2903/j.efsa.2019.5926.
- EFSA, ECDC. 2019b. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. EFSA Journal (5598) DOI: 10.2903/j.efsa.2019.5598.
- Eggesbø M, Moen B, Peddada S, Baird D, Rugtveit J, Midtvedt T, Bushel PR, Sekelja M, Rudi K. 2011. Development of gut microbiota in infants not exposed to medical interventions. *Apmis* **119**:17-35.
- Ejim L, Farha MA, Falconer SB, Wildenhain J, Coombes BK, Tyers M, Brown ED, Wright GD. 2011. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nature Chemical Biology* **7**:348-350.
- El Kaoutari A, Armougom F, Gordon JI, Raoult D, Henrissa, B. 2013. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology* **11**:497-504.
- Elliott DJ, Zaoutis TE, Troxel AB, Loh A, Keren R. 2009. Empiric antimicrobial therapy for pediatric skin and soft-tissue infections in the era of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatrics* **123**:e959-e966. DOI: 10.1542/peds.2008-2428.
- El-Sharkawy H, et al. (2020). Evaluation of Bifidobacteria and *Lactobacillus* Probiotics as Alternative Therapy for *Salmonella typhimurium* Infection in Broiler Chickens. *Animals* (1023) DOI: 10.3390/ani10061023.
- Emami NK, Samie A, Rahmani HR, Ruiz-Feria CA. 2012. The effect of peppermint essential oil and fructooligosaccharides, as alternatives to virginiamycin, on growth performance,

digestibility, gut morphology and immune response of male broilers. *Animal Feed Science and Technology* **175**:57-64.

EMA. 2017. Questions and answers on veterinary medicinal products containing zinc oxide to be administered orally to food-producing species: Outcome of a referral procedure under Article 35 of Directive 2001/82/EC (EMA/V/A/118). European Medicines Agency, London.

Era M, Sakai S, Tanaka A, Kawahara T, Kanyama T, Morita, H. 2015. Antifungal Activity of Fatty Acid Salts Against *Penicillium pinophilum*. *Japan Journal of Food Engineering* **16**:99-108.

EU. 2003. Nařízení č. 1831/2003/CE o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat. Pages 29-43 in Úřední věstník Evropské unie L268. Evropská unie.

EUCAST. 2000. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection* **6**:503-508.

Evans RP, Macrina FL. 1983. Streptococcal R plasmid pIP501: endonuclease site map, resistance determinant location, and construction of novel derivatives. *Journal of Bacteriology* **154**:1347-1355.

Eyres L, Eyres MF, Chisholm A, Brown RC. 2016. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. *Nutrition Reviews* **74**:267-280.

Faciola AP, Broderick GA. 2014. Effects of feeding lauric acid or coconut oil on ruminal protozoa numbers, fermentation pattern, digestion, omasal nutrient flow, and milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **97**:5088-5100.

Facklam R. 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews* **15**:613-630.

Falagas ME, Grammatikos AP, Michalopoulos A. 2008. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* **6**:593-600.

FAO. 2004. Human Energy Requirements: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation: Rome, 17–24 October 2001. Food and Agriculture Organization, Rome.

FDA. 2016. Fluoroquinolone Antibacterial Drugs: Drug Safety Communication – FDA Advises Restricting Use for Certain Uncomplicated Infections. FDA, College Park. Available from [www.fda.gov/media/97602/download](http://www.fda.gov/media/97602/download) (accessed August 2019).

FDA. 2019. Assessing the Effects of Food on Drugs in INDs and NDAs — Clinical Pharmacology Considerations, Guidance for Industry. Available from [www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/assessing-effects-food-drugs-inds-and-ndas-clinical-pharmacology-considerations](http://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/assessing-effects-food-drugs-inds-and-ndas-clinical-pharmacology-considerations) (accessed February 2021). (bylo 2012?)



- Fenlon DR. 1999. *Listeria monocytogenes* in the natural environment. Pages 21-38 in Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria: Listeriosis, and Food Safety*. Marcel Dekker, New York.
- Fiore E, Van Tyne D, Gilmore MS. 2019. Pathogenicity of enterococci. Pages 378-397 in Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Braunstein M, Rood JI, editors. *Gram-Positive Pathogens*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Fisher DJ, Fernandez-Miyakawa ME, Sayeed S, Poon R, Adams V, Rood JI, Uzal FA, McClane BA. 2006. Dissecting the contributions of *Clostridium perfringens* type C toxins to lethality in the mouse intravenous injection model. *Infection and Immunity* **74**:5200-5210.
- Fisher DJ, Miyamoto K, Harrison B, Akimoto S, Sarker MR, McClane BA. 2005. Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Molecular Microbiology* **56**:747-762.
- Fitzgerald JB, Schoeberl B, Nielsen UB, Sorger PK. 2006. Systems biology and combination therapy in the quest for clinical efficacy. *Nature Chemical Biology* **2**:458-466.
- Fleisher D, Li C, Zhou Y, Pao LH, Karim A. 1999. Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. *Clinical Pharmacokinetics* **36**:233-254.
- Fleisher GR, Wilmott CM, Campos JM. 1983. Amoxicillin combined with clavulanic acid for the treatment of soft tissue infections in children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **24**: 679-681.
- Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **14**:836-871.
- Foster TJ. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology* **3**:948-958.
- Foulquié Moreno M, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* **106**:1-24.
- Fournier B, Philpott DJ. 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clinical Microbiology Reviews* **18**:521-540.
- Freedman JC, Shrestha A, McClane BA. 2016. *Clostridium perfringens* enterotoxin: action, genetics, and translational applications. *Toxins* (73) DOI: 10.3390/toxins8030073.
- Freitas ER, Sakomura NK, Neme R, Santos ALD. 2005. Valor energético do óleo ácido de soja para aves. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **40**:241-246.
- Frobisher Jr M, Denny ER. 1928. A study of *Micrococcus zymogenes*. *Journal of Bacteriology* **16**:301-314.

- Froehlich BJ, Bates C, Scott JR. 2009. *Streptococcus pyogenes* CovRS mediates growth in iron starvation and in the presence of the human cationic antimicrobial peptide LL-37. *Journal of Bacteriology* **191**:673-677.
- Fugh-Berman A. 2000. Herb-drug interactions. *Lancet* **355**:134-138.
- Galbraith H, Miller TB, Paton AM, Thompson JK. 1971. Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *Journal of Applied Bacteriology* **34**:803-813.
- Gandhi M, Chikindas ML. 2007. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* **113**:1-15.
- Gänzle MG. 2015. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science* **2**:106-117.
- García-Álvarez L, et al. 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases* **11**:595-603.
- García-Solache M, Rice LB. 2019. The Enterococcus: a model of adaptability to its environment. *Clinical Microbiology Reviews* (e00058-18) DOI: 10.1128/CMR.00058-18.
- Gardete S, Tomasz A. 2014. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation* **124**:2836-2840.
- Garrido D, Ruiz-Moyano S, Jimenez-Espinoza R, Eom HJ, Block DE, Mills DA. 2013. Utilization of galactooligosaccharides by *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* isolates. *Food Microbiology* **33**:262-270.
- Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Gálvez J. 2013. Minocycline: far beyond an antibiotic. *British Journal of Pharmacology* **169**:337-352.
- Gaspar C, Donders GG, Palmeira-de-Oliveira R, Queiroz JA, Tomaz C, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira A. 2018. Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *AMB Express* **8**:1-8.
- Gedde MM, Higgins DE, Tilney LG, Portnoy DA. 2000. Role of Listeriolysin O in Cell-to-Cell Spread of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* **68**:999-1003.
- Geng CY, Zhang M, Li CY, Jin YH, Yan CG, Jin Y. 2016. Effectiveness of medium-chain fatty acids on feed intake and weight gain in animal: Depending on balance. *Indian Journal of Animal Research* **50**:885-892.
- George F, Daniel C, Thomas M, Singer E, Guilbaud A, Tessier FJ, Revol-Junelles A-M, Borges F, Foligné, B. 2018. Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: A multifaceted functional health perspective. *Frontiers in Microbiology* (2899) DOI: 10.3389/fmicb.2018.02899.

- Gerber MA, Baltimore RS, Eaton CB, Gewitz M, Rowley AH, Shulman ST, Taubert KA. 2009. Prevention of rheumatic fever and diagnosis and treatment of acute *Streptococcal pharyngitis*: a scientific statement from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, the Interdisciplinary Council on Functional Genomics and Translational Biology, and the Interdisciplinary Council on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* **119**:1541-1551.
- Ghasemi HA, Kasani N, Taherpour K. 2014. Effects of black cumin seed (*Nigella sativa* L.), a probiotic, a prebiotic and a synbiotic on growth performance, immune response and blood characteristics of male broilers. *Livestock Science* **164**:128-134.
- Godreuil S, Galimand M, Gerbaud G, Jacquet C, Courvalin P. 2003. Efflux pump Lde is associated with fluoroquinolone resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**:704-708.
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology* **5**:54-72.
- Goldberg MB. 2001. Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**:595-626.
- Goodyear CS, Silverman GJ. 2004. Staphylococcal toxin induced preferential and prolonged *in vivo* deletion of innate-like B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**:11392-11397.
- Grass JE, Gould LH, Mahon BE. 2013. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998–2010. *Foodborne Pathogens and Disease* **10**:131-136.
- Greene AC. 2018. CRISPR-based antibacterials: transforming bacterial defense into offense. *Trends in Biotechnology* **36**:127-130.
- Grif K, Patscheider G, Dierich MP, Allerberger F. 2003. Incidence of fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in three healthy volunteers: a one-year prospective stool survey. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **22**:16-20.
- Grove RD, Hetzel AM. 1968. *Vital Statistics Rates in the United States, 1940-1960*: No. 1677. U.S. Government Printing Office, Washington DC.
- Guardabassi L, Schmidt KR, Petersen TS, Espinosa-Gongora C, Moodley A, Agersø Y, Olsen JE. 2012. Mustelidae are natural hosts of *Staphylococcus delphini* group A. *Veterinary Microbiology* **159**:351–53
- Guarner F, Schaafsma GJ. 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology* **39**: 237-238.

- Gui L, Subramony C, Fratkin J, Hughson MD. 2002. Fatal enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic adult. *Modern Pathology* **15**:66-70.
- Guillet C, et al. 2010. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases* **16**:136-138.
- Gulaboski R, Mirčeski V, Mitrev S. 2013. Development of a rapid and simple voltammetric method to determine total antioxidative capacity of edible oils. *Food Chemistry* **138**:116-121.
- Gurley BJ, Fifer EK, Gardner Z. 2012. Pharmacokinetic herb-drug interactions (part 2): drug interactions involving popular botanical dietary supplements and their clinical relevance. *Planta Medica* **78**:1490-1514.
- Gurley BJ. 2012. Pharmacokinetic herb-drug interactions (part 1): origins, mechanisms, and the impact of botanical dietary supplements. *Planta Medica* **78**:1478-1489.
- Guyonnet D, Chassany O, Ducrotte P, Picard C, Mouret M, Mercier CH, Matuchansky C. 2007. Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **26**:475-486.
- Haidan A, Talay SR, Rohde M, Sriprakash KS, Currie BJ, Chhatwal GS. 2000. Pharyngeal carriage of group C and group G streptococci and acute rheumatic fever in an Aboriginal population. *Lancet* **356**:1167-1169.
- Hameed N, Tunkel AR. 2010. Treatment of drug-resistant pneumococcal meningitis. *Current Infectious Disease Reports* **12**:274-281.
- Hammami R, Fernandez B, Lacroix C, Fliss I. 2013. Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**:2947-2967.
- Hammes WP, Hertel C. 2009. Genus *Lactobacillus*. Pages 493-511 in Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; Volume 3: The Firmicutes*. Springer, New York.
- Hancock RE, Nijnik A, Philpott DJ. 2012. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nature Reviews Microbiology* **10**:243-254.
- Hanczakowska E, Świątkiewicz M, Natonek-Wiśniewska M, Okoń K. 2016. Medium chain fatty acids (MCFA) and/or probiotic *Enterococcus faecium* as a feed supplement for piglets. *Livestock Science* **192**:1-7.
- Hanczakowska E, Szewczyk A, Okon K. 2011. Caprylic, capric and/or fumaric acids as antibiotic replacements in piglet feed. *Annals of Animal Science* **11**:115-124.

- Hansen CF, Riis AL, Bresson S, Højbjerg O, Jensen BB. 2007. Feeding organic acids enhances the barrier function against pathogenic bacteria of the piglet stomach. *Livestock Science* **108**:206-209.
- Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. 2001. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 10th ed. McGraw-Hill, New York.
- Harry KH, Zhou R, Kroos L, Melville SB. 2009. Sporulation and enterotoxin (CPE) synthesis are controlled by the sporulation-specific sigma factors SigE and SigK in *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology* **191**:2728-2742.
- Hashemian SMR, Farhadi T, Ganjparvar M. 2018. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Design, Development and Therapy* **12**:1759-1767.
- Hashiguchi TCO, Ouakrim DA, Padget M, Cassini A, Cecchini M. 2019. Resistance proportions for eight priority antibiotic-bacterium combinations in OECD, EU/EEA and G20 countries 2000 to 2030: a modelling study. *Eurosurveillance* (1800445). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.20.1800445.
- Hashimoto M, Tawaratsumida K, Kariya H, Kiyohara A, Suda Y, Krikae F, Kirikae T, Gotz F. 2006. Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology* **177**:3162-3169.
- Hassan HMA, Mohamed MA, Youssef AW, Hassan ER. 2010. Effect of using organic acids to substitute antibiotic growth promoters on performance and intestinal microflora of broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **23**:1348-1353.
- Hasselbalch SG, Knudsen GM, Jakobsen J, Hageman LP, Holm S, Paulson OB. 1994. Brain metabolism during short-term starvation in humans. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **14**:125-131.
- Hassett DJ, Cohen MS. 1989. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *FASEB Journal* **3**:2574-2582.
- Hasty DL, Ofek I, Courtney HS, Doyle RJ. 1992. Multiple adhesins of streptococci. *Infection and Immunity* **60**:2147-2152.
- Haynes VR, Michael NJ, van den Top M, Zhao FY, Brown RD, De Souza D, Dodd GT, Spanswick D, Watt MJ. 2020. A Neural basis for Octanoic acid regulation of energy balance. *Molecular metabolism* **34**:54-71.
- He M, Shi B. 2017. Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics. *Cell & Bioscience* **7**:1-14.
- He Y, Yuan Q, Mathieu J, Stadler L, Senehi N, Sun R, Alvarez PJ. 2020. Antibiotic resistance genes from livestock waste: Occurrence, dissemination, and treatment. *npj Clean Water* **3**:1-11.

- Heikkinen T, Laine K, Neuvonen PJ, Ekblad U. 2000. The transplacental transfer of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin and azithromycin. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* **107**:770-775.
- Herbel SR, Vahjen W, Wieler LH, Guenther S. 2013. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. *Gut Pathogens* **5**:1-13.
- Hermann R, von Richter O. 2012. Clinical evidence of herbal drugs as perpetrators of pharmacokinetic drug interactions. *Planta Medica* **78**:1458-1477.
- Hillerton JE, Kliem KE. 2002. Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. *Journal of Dairy Science* **85**:1009-1014.
- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **40**:135-136.
- Hof H. 1991. Therapeutic activities of antibiotics in listeriosis. *Infection* **19**:S229-S233.
- Holbrook AM, Pereira JA, Labiris R, McDonald H, Douketis JD, Crowther M, Wells PS. 2005. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *JAMA Internal Medicine* **165**:1095-1106.
- Hollenbeck BL, Rice LB. 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* **3**:421-569.
- Hong SM, Hwang JH, Kim IH. 2012. Effect of medium-chain triglyceride (MCT) on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics in weanling pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **25**:1003-1007.
- Hovorková P, Laloučková K, Skřivanová E. 2018. Determination of *in vitro* antibacterial activity of plant oils containing medium-chain fatty acids against Gram-positive pathogenic and gut commensal bacteria. *Czech Journal of Animal Science* **63**:119–125.
- Howard JC, Heinemann C, Thatcher BJ, Martin B, Gan BS, Reid G. 2000. Identification of Collagen-Binding Proteins in *Lactobacillus* spp. with Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization–Time of Flight ProteinChip Technology. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:4396-4400.
- Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. 2010. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* **23**:99-139.
- Hua CZ, Howard A, Malley R, Lu YJ. 2014. Effect of nonheme iron-containing ferritin Dpr in the stress response and virulence of pneumococci. *Infection and Immunity* **82**:3939-3947.

- Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL. 2011. Short-and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology* **56**:650-654.
- Huang L, Zhang R, Hu Y, Zhou H, Cao J, Lv H, Chen S, Ding S, Chen G. 2019. Epidemiology and risk factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci infections in Zhejiang China from 2015 to 2017. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **8**:1-9.
- Huang SM, Lesko LJ. 2004. Drug-drug, drug-dietary supplement, and drug-citrus fruit and other food interactions: what have we learned?. *Journal of Clinical Pharmacology* **44**:559-569.
- Hulisz D, Jakab J. 2007. Food-Drug Interactions: Which Ones Really Matter?. *U.S. Pharmacist* **32**:93-98.
- Chadfield MS, Christensen JP, Juhl-Hansen J, Christensen H, Bisgaard M. 2005. Characterization of *Enterococcus hirae* outbreaks in broiler flocks demonstrating increased mortality because of septicemia and endocarditis and/or altered production parameters. *Avian Diseases* **49**:16-23.
- Chaillou S, Lucquin I, Najjari A, Zagorec M, Champomier-Verges MC. 2013. Population genetics of *Lactobacillus sakei* reveals three lineages with distinct evolutionary histories. *PIOS ONE* (e73253) DOI: 10.1371/journal.pone.0073253.
- Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, Sanders AG, Peltier LF. 2005. The classic: penicillin as a chemotherapeutic agent. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **439**:23-26.
- Chait R, Craney A, Kishony R. 2007. Antibiotic interactions that select against resistance. *Nature* **446**:668-671.
- Chalas R, Janczarek M, Bachanek T, Mazur E, Cieszko-Buk M, Szymanska J. 2016. Characteristics of oral probiotics—a review. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences* **29**:8-10.
- Chambers HF, DeLeo FR. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology* **7**:629-641.
- Chambers HF. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. *Emerging Infectious Diseases* **7**:178-182.
- Chambers HF. 2005. Protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. Page 2021 in Brunton LL, Lazo JS, Parker K, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th ed. McGraw-Hill, New York.
- Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK. 2003. Infection with vancomycin-resistant

*Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. New England Journal of Medicine **348**:1342-1347.

Charlop-Powers Z, Owen JG, Reddy BVB, Ternei MA, Guimarães DO, de Frias UA, Pupo MT, Seepe P, Feng Z, Brady SF. 2015. Global biogeographic sampling of bacterial secondary metabolism. Elife (e05048) DOI: 10.7554/eLife.05048.

Charpentier E, Courvalin P. 1999. Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. Antimicrobial agents and Chemotherapy **43**:2103-2108.

Chatterjee P, et al. 2020. Potential of coconut oil and medium chain triglycerides in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. Mechanisms of Ageing and Development (111209) DOI: 10.1016/j.mad.2020.111209.

Chaturongakul S, Raengpradub S, Wiedmann M, Boor KJ. 2008. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. Trends in Microbiology **16**:388-396.

Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O. 2010. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. PLOS Pathogens (e1001036) DOI: 10.1371/journal.ppat.1001036.

Cheng TO. 2006. Food-drug interactions. International Journal of Cardiology **106**:392-393.

Cherubin CE, Appleman MD, Heseltine PN, Khayr W, Stratton CW. 1991. Epidemiological spectrum and current treatment of listeriosis. Reviews of Infectious Diseases **13**:1108-1114.

Chico-Calero I, Suárez M, González-Zorn B, Scotti M, Slaghuis J, Goebel W, Vázquez-Boland JA. 2002. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. Proceedings of the National Academy of Sciences **99**:431-436.

Chiu MC, de Moraes Coutinho C, Gonçalves LAG. 2009. Carotenoids concentration of palm oil using membrane technology. Desalination **245**:783-786.

Choby BA. 2009. Diagnosis and treatment of streptococcal pharyngitis. American Family Physician **79**:383-390.

Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews **65**:232-260.

Chu HC, Chiang SH. 2016. Deposition of Dietary Bioactive Fatty Acids in Tissues of Broiler Chickens. Journal of Poultry Science **54**:173-178.

Chukwu EE, Nwaokorie FO, Coker AO, Avila-Campos MJ, Ogunsola FT. 2017. Genetic variation among *Clostridium perfringens* isolated from food and faecal specimens in Lagos. Microbial Pathogenesis **111**:232-237.



- Churchward CP, Alany RG, Snyder LA. 2018. Alternative antimicrobials: the properties of fatty acids and monoglycerides. *Critical Reviews in Microbiology* **44**:561-570.
- Ibrahim J, Eisen JA, Jospin G, Coil DA, Khazen G, Tokajian S. 2016. Genome analysis of *Streptococcus pyogenes* associated with pharyngitis and skin infections. *PLOS ONE* (e0168177) DOI: 10.1371/journal.pone.0168177.
- Inturri R, Stivala A, Sinatra F, Morrone R, Blandino G. 2014. Scanning electron microscopy observation of adhesion properties of *Bifidobacterium longum* W11 and chromatographic analysis of its exopolysaccharide. *Food and Nutrition Sciences* (4991) DOI: 10.4236/fns.2014.518192.
- Isenman H, Fisher D. 2016. Advances in prevention and treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *Current Opinion in Infectious Diseases* **29**:577-582.
- Isselbacher KJ. 2005. Gastrointestinal Disease: Irritable bowel syndrome: the possible benefits of probiotics. *Postgraduate Medicine* **117**:7-7.
- Izadpanah A, Gallo RL. 2005. Antimicrobial peptides. *Journal of the American Academy of Dermatology* **52**:381-390.
- Jackman JA, Boyd RD, Elrod CC. 2020. Medium-chain fatty acids and monoglycerides as feed additives for pig production: towards gut health improvement and feed pathogen mitigation. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **11**:1-15.
- Jackson KA, Gould LH, Hunter JC, Kucerova Z, Jackson B. 2018. Listeriosis outbreaks associated with soft cheeses, United States, 1998–2014. *Emerging Infectious Diseases* **24**:1116–1118.
- Jalali M, Abedi D. 2008. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. *International Journal of Food Microbiology* **122**:336-340.
- Jamil S, Saad U, Hafiz S. 2017. Can amoxicillin clavulanate be used for treating MRSA?. *Journal of Pharmacology Research* **1**:21-23.
- Janakiraman V. 2008. Listeriosis in pregnancy: diagnosis, treatment, and prevention. *Reviews in Obstetrics and Gynecology* **1**:179-185.
- Jariyawattanachaikul W, Chaveerach P, Chokesajjawatee N. 2016. Antimicrobial activity of Thai-herbal plants against food-borne pathogens *E. coli*, *S. aureus* and *C. jejuni*. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* **11**:20-24.
- Jayachandran S, Lleras-Muney A, Smith KV. 2010. Modern medicine and the twentieth century decline in mortality: evidence on the impact of sulfa drugs. *American Economic Journal: Applied Economics* **2**:118-46.

- Jensen A, Valdórrsson O, Frimodt-Møller N, Hollingshead S, Kilian M. 2015. Commensal streptococci serve as a reservoir for  $\beta$ -lactam resistance genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**:3529-3540.
- Jiang X, Yu T, Xu P, Xu X, Ji S, Gao W, Shi L. 2018. Role of efflux pumps in the *in vitro* development of ciprofloxacin resistance in *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology* (2350) DOI: 10.3389/fmicb.2018.02350.
- Jin T, Bokarewa M, Foster T, Mitchell J, Higgins J, Tarkowski A. 2004. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *The Journal of Immunology* **172**:1169-1176.
- Johnson A. 1994. The pathogenicity of enterococci. *FEMS Microbiology Reviews* **33**:1083-1089.
- Johnston JW, Myers LE, Ochs MM, Benjamin WH, Briles DE, Hollingshead SK. 2004. Lipoprotein PsaA in virulence of *Streptococcus pneumoniae*: surface accessibility and role in protection from superoxide. *Infection and Immunity* **72**:5858-5867.
- Jones WG, Barie PS, Yurt RW, Goodwin CW. 1986. Enterococcal burn sepsis: a highly lethal complication in severely burned patients. *Archives of Surgery* **121**:649-653.
- Kadouri DE, To K, Shanks RM, Doi Y. 2013. Predatory bacteria: a potential ally against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *PLOS ONE* (e63397) DOI: 10.1371/journal.pone.0063397.
- Kaiser A, Haskins C, Siddiqui MM, Hussain A, D'Adamo C. 2019. The evolving role of diet in prostate cancer risk and progression. *Current Opinion in Oncology* **31**:222-229.
- Kanazawa S, Ohkubo T, Sugawara K. 2001. The effects of grapefruit juice on the pharmacokinetics of erythromycin. *European Journal of Clinical Pharmacology* **56**:799-803.
- Kashiwaya Y, Sato K, Tsuchiya N, Thomas S, Fell DA, Veech RL, Passonneau JV. 1994. Control of glucose utilization in working perfused rat heart. *Journal of Biological Chemistry* **269**:25502-25514.
- Kelsey J, Bayles KW, Shafii B, McGuire M. 2006. Fatty acids and monoacylglycerols inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. *Lipids* **41**:951-961.
- Keyburn AL, Bannam TL, Moore RJ, Rood JI. 2010. NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins* **2**:1913-1927.
- Khan I, Khan J, Miskeen S, Tango CN, ParK YS, Oh DH. 2016. Prevalence and control of *Listeria monocytogenes* in the food industry-a review. *Czech Journal of Food Sciences* **34**:469-487.
- Khatibjoo A, Mahmoodi M, Fattahnia F, Akbari-Gharaei M, Shokri AN, Soltani S. 2018. Effects of dietary short-and medium-chain fatty acids on performance, carcass traits, jejunum

morphology, and serum parameters of broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research* **46**:492-498.

Kingwell K. 2018. New antibiotic hits Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Drug Discovery* **17**:785-785.

Kitahara T, Aoyama Y, Hirakata Y, Kamihira S, Kohno S, Ichikawa N, Nakashima M, Sasaki H, Higuchi S. 2006. *In vitro* activity of lauric acid or myristylamine in combination with six antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Antimicrobial Agents* **27**:51-57.

Kiu R, Hall LJ. 2018. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging Microbes & Infections* **7**:1-15.

Kleiman R. 1990. Chemistry of new industrial oilseed crops. Pages 196-203 in Janick J, Simon J., editors. *Advances in New Crops*. Timber Press, Portland.

Knudsen GM, Ng Y, Gram L. 2013. Survival of bactericidal antibiotic treatment by a persister subpopulation of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **79**:7390-7397.

Kokai-Kun JF, Songer JG, Czczulin JR, Chen F, McClane BA. 1994. Comparison of Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. *Journal of Clinical Microbiology* **32**: 2533-2539.

Kollanoor-Johny A, et al. 2012a. Reduction of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization in 20-day-old broiler chickens by the plant-derived compounds trans-cinnamaldehyde and eugenol. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:2981–2987.

Krauter AK, Phillips R, Sarnyai Z. 2020. Ketogenic therapy in neurodegenerative and psychiatric disorders: From mice to men. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* (109913) DOI: 10.1016/j.pnpbp.2020.109913.

Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. 2016. Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* (a027029) DOI: 10.1101/cshperspect.a027029.

Kumar M, et al. 2012. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental Diabetes Research* (902917) DOI: 10.1155/2012/902917.

Kumar S, Behl T, Sachdeva M, Sehgal A, Kumari S, Kumar A, Kaur G, Yadav HN, Bungau S. 2020. Implicating the effect of ketogenic diet as a preventive measure to obesity and diabetes mellitus. *Life Sciences* (118661) DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118661.

Kurpas M, Wiczorek K, Osek J. 2018. Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Veterinary Research* **62**:49-55.

- Kushner B, Allen PD, Crane BT. 2016. Frequency and demographics of gentamicin use. *Otology & Neurotology* **37**:190-195.
- Kwaszewska A, Sobis-Glinkowska M, Szewczyk EM. 2014. Cohabitation-Relationships of corynebacteria and staphylococci on human skin. *Folia Microbiologica* **59**:495-502.
- Kwon EJ, Skalak M, Bertucci A, Braun G, Ricci F, Ruoslahti E, Sailor MJ, Bhatia SN. 2017. Porous Silicon Nanoparticle Delivery of Tandem Peptide Anti-Infectives for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections. *Advanced Materials* (1701527) DOI: 10.1002/adma.201701527.
- Lacy CF, Armstrong LL, Goldman MP, Lance LL. 2006. Lexi-Drugs-Comprehensive and specialty fields. Lexi-Comp, Hudson.
- Lam MM, Clarridge JE, Young EJ, Mizuki S. 2007. The other group G *Streptococcus*: increased detection of *Streptococcus canis* ulcer infections in dog owners. *Journal of Clinical Microbiology* **45**:2327-2329.
- Lancefield RC. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *The Journal of Experimental Medicine* **57**:571-595.
- Laux L, Blackford R. 2013. The ketogenic diet in Dravet syndrome. *Journal of Child Neurology* **28**:1041-1044.
- Lawley TD, Walker AW. 2013. Intestinal colonization resistance. *Immunology* **138**:1-11.
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. 2005. Getting better with *Bifidobacteria*. *Journal of Applied Microbiology* **98**:1303-1315.
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**:728-764.
- Leber A. 2016. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. Pages 5.16.1-5.16.23 in Leber A, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press, Washington, DC.
- Lee DK, et al. 2011b. Antimicrobial activity of *Bifidobacterium* spp. isolated from healthy adult Koreans against cariogenic microflora. *Archives of Oral Biology* **56**:1047-1054.
- Lee GC, Reveles KR, Attridge RT, Lawson KA, Mansi IA, Lewis JS, Frei CR. 2014. Outpatient antibiotic prescribing in the United States: 2000 to 2010. *BMC Medicine* (96) DOI: 10.1186/1741-7015-12-96.
- Lee LY, Miyamoto YJ, McIntyre BW, Hook M, McCrea KW, McDevitt D, Brown EL. 2002. The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *The Journal of Clinical Investigation* **110**:1461-1471.

- Lee S, Choe PG, Song KH, Park SW, Kim HB, Kim NJ, Kim EC, Park WB, Oh MD. 2011a. Is cefazolin inferior to nafcillin for treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia?. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**:5122-5126.
- Lee SI, Kim HS, Kim I. 2015. Microencapsulated organic acid blend with MCFAs can be used as an alternative to antibiotics for laying hens. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **39**:520-527.
- Lehár J, et al. 2009. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. *Nature Biotechnology* **27**:659-666.
- Lei E, Vacy K, Boon WC. 2016. Fatty acids and their therapeutic potential in neurological disorders. *Neurochemistry International* **95**:75-84.
- Leibovich ER, Deamer RL, Sanserson LA. 2004. Food-drug interactions: careful drug selection and patient counseling can reduce the risk in older patients. *Geriatrics* **59**:19-33.
- Lemke SL, Mayura K, Reeves WR, Wang N, Fickey C, Phillips TD. 2001. Investigation of organophilic montmorillonite clay inclusion in zearalenone-contaminated diets using the mouse uterine weight bioassay. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **62**:243-258.
- Lenighan YM, McNulty BA, Roche HM. 2019. Dietary fat composition: Replacement of saturated fatty acids with PUFA as a public health strategy, with an emphasis on  $\alpha$ -linolenic acid. *Proceedings of the Nutrition Society* **78**:234-245.
- Lewis CM, Zervos MJ. 1990. Clinical manifestations of enterococcal infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **9**:111-117.
- Lewis J. 2019. Codex Nutrient Reference Values: Especially for Vitamins, Minerals and Protein. FAO & WHO, Rome.
- Li C, Yan X, Lillehoj HS. 2017. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens* LLY\_N11, a necrotic enteritis-inducing strain isolated from a healthy chicken intestine. *Genome Announcements* (e01225-17) DOI: 10.1128/genomeA.01225-17.
- Li J, Adams V, Bannam TL, Miyamoto K, Garcia JP, Uzal FA, Rood JI, McClane BA. 2013. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **77**: 208-233.
- Li J, Freedman JC, Evans DR, McClane BA. 2017. CodY promotes sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A strain SM101. *Infection and Immunity* (e00855-16) DOI: 10.1128/IAI.00855-16
- Li J, Chen J, Vidal JE, McClane BA. 2011. The Agr-like quorum-sensing system regulates sporulation and production of enterotoxin and beta2 toxin by *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease strain F5603. *Infection and Immunity* **79**:2451-2459.

- Li J, McClane BA. 2006. Further comparison of temperature effects on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:4561-4568.
- Li J, McClane BA. 2008. A novel small acid soluble protein variant is important for spore resistance of most *Clostridium perfringens* food poisoning isolates. *PLOS Pathogens* (e1000056) DOI: 10.1371/journal.ppat.1000056.
- Li J, McClane BA. 2010. Evaluating the involvement of alternative sigma factors SigF and SigG in *Clostridium perfringens* sporulation and enterotoxin synthesis. *Infection and Immunity* **78**:4286-4293.
- Li J, Miyamoto K, McClane BA. 2007. Comparison of virulence plasmids among *Clostridium perfringens* type E isolates. *Infection and Immunity* **75**:1811-1819.
- Li J, Paredes-Sabja D, Sarker MR, McClane BA. 2016. *Clostridium perfringens* sporulation and sporulation-associated toxin production. Pages 331-347 in Driks A, Eichenberger P, editors. *The Bacterial Spore: from Molecules to Systems*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Liaw S-J, Lai H-C, Wang W-B. 2004. Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA protein in *Proteus mirabilis*. *Infection and Immunity* **72**:6836-6845.
- Libersa CC, Brique SA, Motte KB, Caron JF, Guédon-moreau LM, Humbert L, Vincent A, Devos P, Lhermitte MA. 2000. Dramatic inhibition of amiodarone metabolism induced by grapefruit juice. *British Journal of Clinical Pharmacology* **49**:373-378.
- Liévin-Le Moal V, Servin AL. 2014. Anti-infective activities of lactobacillus strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clinical Microbiology Reviews* **27**:167-199.
- Lin MY, Chang FJ. 2000. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive Diseases and Sciences* **45**:1617-1622.
- Lindeberg S, Berntorp E, Nilsson-Ehle P, Terént A, Vessby B. 1997. Age relations of cardiovascular risk factors in a traditional Melanesian society: the Kitava Study. *American Journal of Clinical Nutrition* **66**:845-852.
- Ling LL, et al. 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **517**:455-459.
- Liu GY. 2009. Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatric Research* (71R-77R) DOI: 10.1203/PDR.0b013e31819dc44d.

- Liu Y, Li R, Xiao X, Wang Z. 2019. Antibiotic adjuvants: an alternative approach to overcome multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* **45**:301-314.
- Livermore DM. 2003a. Linezolid *in vitro*: mechanism and antibacterial spectrum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (ii9-ii16) DOI: 10.1093/jac/dkg249.
- Livermore DM. 2003b. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases* (S11-S23) DOI: 10.1086/344654.
- Llewelyn M, Cohen J. 2002. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infectious Diseases* **2**:156-162.
- Lo RS, Austin AS, Freeman JG. 2014 Is there a role for probiotics in liver disease?. *Scientific World Journal* (874768) DOI: 10.1155/2014/874768.
- López M, Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Martínez S, del Campo R, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Torres C. 2009. Detection of vanA and vanB2-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *International Journal of Food Microbiology* **133**:172-178.
- Lugli GA, Milani C, Mancabelli L, Turrone F, Ferrario C, Duranti S, van Sinderen D, Ventura M. 2017. Ancient bacteria of the Ötzi's microbiome: a genomic tale from the Copper Age. *Microbiome* **5**:1-18.
- Lukic J, Chen V, Strahinic I, Begovic J, Lev-Tov H, Davis SC, Tomic-Canic M, Pastar I. 2017. Probiotics or pro-healers: the role of beneficial bacteria in tissue repair. *Wound Repair and Regeneration* **25**:912-922.
- Lyautey E, et al. 2007. Characteristics and frequency of detection of fecal *Listeria monocytogenes* shed by livestock, wildlife, and humans. *Canadian Journal of Microbiology* **53**:1158-1167.
- Lyras D, Rood JI. 1996. Genetic organization and distribution of tetracycline resistance determinants in *Clostridium perfringens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**:2500-2504.
- Ma F, Xu S, Tang Z, Li Z, Zhang L. 2020. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health* (in press) DOI: 10.1016/j.bsheal.2020.09.004.
- Mahoney JF, Arnold RC, Harris AD. 1943. Penicillin treatment of early syphilis—a preliminary report. *American Journal of Public Health and the Nations Health* **33**:1387-1391.

- Maki KC, Hasse W, Dicklin MR, Bell M, Buggia MA, Cassens ME, Eren F. 2018. Corn oil lowers plasma cholesterol compared with coconut oil in adults with above-desirable levels of cholesterol in a randomized crossover trial. *Journal of Nutrition* **148**:1556-1563.
- Manafi M. 2015. Comparison study of a natural non-antibiotic growth promoter and a commercial probiotic on growth performance, immune response and biochemical parameters of broiler chicks. *Journal of Poultry Science* **52**:274-281.
- Mannan SJ, Rezwana R, Rahman MS, Begum K. 2017. Isolation and biochemical characterization of *Lactobacillus* species from yogurt and cheese samples in Dhaka metropolitan area. *Bangladesh Pharmaceutical Journal* **20**:27-33.
- Maresso AW, Schneewind O. 2006. Iron acquisition and transport in *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials* **19**:193-203.
- Marinho M, Lordelo M, Cunha L, Freire J. 2007. Microbial activity in the gut of piglets: I. Effect of prebiotic and probiotic supplementation. *Livestock Science* **108**:236-239.
- Marino M, Braun L, Cossart P, Ghosh P. 2000. A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria internalins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**:8784-8788
- Marlow MA, Luna-Gierke RE, Griffin PM, Vieira AR. 2017. Foodborne disease outbreaks in correctional institutions-United States, 1998-2014. *American Journal of Public Health* **107**:1150-1156.
- Marquis H, Doshi V, Portnoy DA. 1995. The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infection and Immunity* **63**:4531-4534.
- Marsot A, Guilhaumou R, Riff C, Blin O. 2017. Amikacin in critically ill patients: a review of population pharmacokinetic studies. *Clinical Pharmacokinetics* **56**:127-138.
- Marten B, Pfeuffer M, Schrezenmeir J. 2006. Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal* **16**:1374-1382.
- Martin JD, Mundt JO. 1972. Enterococci in insects. *Applied Microbiology* **24**:575-580.
- Martín R, Miquel S, Ulmer J, Kechaou N, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. 2013. Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease. *Microbial Cell Factories* **12**:1-11.
- Martino ME, Bayjanov JR, Caffrey BE, Wels M, Joncour P, Hughes S, Gillet B, Kleerebezem M, van Hijum SAFT, Leulier F. 2016. Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Environmental Microbiology* **18**:4974-4989.



- Masco L, Ventura M, Zink R, Huys G, Swings, J. 2004. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:1137-1143.
- Mateus T, Silva J, Maia RL, Teixeira P. 2013. Listeriosis during pregnancy: a public health concern. *International Scholarly Research Notices* (851712) DOI: 10.1155/2013/851712.
- McClane BA, Rood JJ. 2001. Clostridial toxins involved in human enteric and histotoxic infections. Page 169-209 in Bahl H, Dürre P, editors. *Clostridia: biotechnology and medical applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- McClane BA, Uzal FA, Miyakawa MF, Lyerly D, Wilkins T. 2006. The enterotoxigenic clostridia. *Prokaryotes* **4**:698-752.
- McCormick JK, Pragman AA, Stolpa JC, Leung DY, Schlievert PM. 2001. Functional characterization of streptococcal pyrogenic exotoxin J, a novel superantigen. *Infection and Immunity* **69**:1381-1388.
- McFarland LV. 2007. Diarrhoea associated with antibiotic use. *BMJ* **335**:54-5.
- McFrederick QS, Cannone JJ, Gutell RR, Kellner K, Plowes RM, Mueller UG. 2013. Specificity between lactobacilli and hymenopteran hosts is the exception rather than the rule. *Applied and Environmental Microbiology* **79**:1803-1812.
- McGaw LJ, Jäger AK, Van Staden J, Houghton PJ. 2002. Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *South African Journal of Botany* **68**:417-423.
- McGrattan CJ, Sullivan JD, Ikawa M. 1976. Inhibition of chlorella (chlorophyceae) growth by fatty acids, using the paper disc method. *Journal of Phycology* **12**:129-131.
- McLauchlin J, Rees CE. 2009. Genus *Listeria*. Pages 244-257 in Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; Volume 3: The Firmicutes*. Springer, New York.
- Melo-Cristino J, Resina C, Manuel V, Lito L, Ramirez M. 2013. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet* **382**:205.
- Mercier J, Lindow SE. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:369-374.
- Milani C, et al. 2015. Exploring vertical transmission of bifidobacteria from mother to child. *Applied and Environmental Microbiology* **81**:7078-7087.

- Milani C, et al. 2017. Unveiling bifidobacterial biogeography across the mammalian branch of the tree of life. *ISME Journal* **11**:2834-2847.
- Milić N, Milosević N, Golocorbin Kon S, Bozić T, Abenavoli L, Borrelli F. 2014. Warfarin interactions with medicinal herbs. *Natural Product Communications* **9**:1211–1216.
- Minervini F, Celano G, Lattanzi A, Tedone L, De Mastro G, Gobbetti M, De Angelis M. 2015. Lactic acid bacteria in durum wheat flour are endophytic components of the plant during its entire life cycle. *Applied and Environmental Microbiology* **81**:6736-6748.
- Molae N, Abtahi H, Mosayebi G. 2013. Expression of recombinant streptokinase from streptococcus pyogenes and its reaction with infected human and murine sera. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* **16**:985-989.
- Monecke S, et al. 2011. A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE* (e17936) DOI: 10.1371/journal.pone.0017936.
- Morris AAM. 2005. Cerebral ketone body metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **28**:109-121.
- Moses AE, Wessels MR, Zalcman K, Albertí S, Natanson-Yaron S, Menes T, Hanski E. 1997. Relative contributions of hyaluronic acid capsule and M protein to virulence in a mucoid strain of the group A *Streptococcus*. *Infection and Immunity* **65**:64-71.
- Moubareck C, Gavini F, Vaugien L, Butel MJ, Doucet-Populaire F. 2005. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacteria*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**:38-44.
- Mouly S, Lloret-Linares C, Sellier PO, Sene D, Bergmann JF. 2017. Is the clinical relevance of drug-food and drug-herb interactions limited to grapefruit juice and Saint-John's Wort?. *Pharmacological Research* **118**:82-92.
- Müller M, Lier D. 1994. Fermentation of fructans by epiphytic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **76**:406-411.
- Mundt JO. 1986. Enterococci. Pages 1065-1065 in Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Munita JM, Arias CA. 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum* **4**:1-24. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Myers GS, et al. 2006. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Research* **16**:1031-1040.
- MZ ČR. 2010. Tisková zpráva 8.1.2010: Nový systém očkování dětí proti pneumokokovým nákazám je výhodný pro pacienty i lékaře. Ministerstvo zdravotnictví ČR, Praha.

- Nafar F, Clarke JP, Mearow KM. 2017. Coconut oil protects cortical neurons from amyloid beta toxicity by enhancing signaling of cell survival pathways. *Neurochemistry International* **105**:64-79.
- Nair MKM, Joy J, Vasudevan P, Hinckley L, Hoagland TA, Venkitanarayanan KS. 2005. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* **88**:3488-3495.
- Nakatsuji T, Kao MC, Fang J-Y, Zouboulis CC, Zhang L, Gallo RL, Huang C-M. 2009. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: Its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology* **129**:2480-2488.
- Nelson ML, Dinardo A, Hochberg J, Armelagos GJ. 2010. Brief communication: mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350–550 CE. *American journal of Physical Anthropology* **143**:151-154.
- Nelson ML, Levy SB. 2011. The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1241**:17-32.
- Neu HC. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**:1064-1073.
- Neuhofel AL, Wilton JH, Victory JM, Hejmanowsk LG, Amsden GW. 2002. Lack of bioequivalence of ciprofloxacin when administered with calciumfortified orange juice: a new twist on an old interaction. *Journal of Clinical Pharmacology* **42**:461-466.
- Newman DJ, Cragg GM. 2020. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* **83**:770-803.
- Newsom SWB. 2008. Ogston's coccus. *Journal of Hospital Infection* **70**:369-372.
- Ng T, Hassan K, Lim J, Lye M, Ishak R. 1991. Nonhypercholesterolemic effects of a palm-oil diet in Malaysian volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition* (1015S-1020S) DOI: 10.1093/ajcn/53.4.1015S.
- Ngamwongsatit B, Tanomsridachchai W, Suthienkul O, Urairong S, Navasakuljinda W, Janvilisri T. 2016. Multidrug resistance in *Clostridium perfringens* isolated from diarrheal neonatal piglets in Thailand. *Anaerobe* **38**:88-93.
- Ngapo TM, Fortin J, Martin JF. 2010. Do pig farmers preferences bias consumer choice for pork? Response to critique of the pork preference studies. *Meat Science* **85**:788-791.
- Nguyen DH, Kim IH. 2020. Protected Organic Acids Improved Growth Performance, Nutrient Digestibility, and Decreased Gas Emission in Broilers. *Animals* (416) DOI: 10.3390/ani10030416.

- Nichols RJ, Sen S, Choo YJ, Beltrao P, Zietek M, Chaba R, Lee S, Kazmierczak KM, Lee KJ, Wong A, Shales M, Lovett S, Winkler ME, Krogan NJ, Typas A, Gross CA. 2011. Phenotypic landscape of a bacterial cell. *Cell* **144**:143-156.
- Nishiyama K, Sugiyama M, Mukai T. 2016. Adhesion properties of lactic acid bacteria on intestinal mucin. *Microorganisms* (34) DOI: 10.3390/microorganisms4030034.
- Nitbani FO, Jumina, Siswanta D, Solikhah EN. 2016. Isolation and antibacterial activity test of lauric acid from crude coconut oil. *Procedia Chemistry* **18**:132-140.
- Nonaka Y, Takagi T, Inai M, Nishimura S, Urashima S, Honda, K, Aoyama T, Terada S. 2016. Lauric acid stimulates ketone body production in the KT-5 astrocyte cell line. *Journal of Oleo Science* (ess16069) DOI: 10.5650/jos.ess16069.
- Noskin GA, Peterson LR, Warren JR. 1995. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* bacteremia: acquisition and outcome. *Clinical Infectious Diseases* **20**:296-301.
- Novick RP. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology* **48**:1429-1449.
- Nunes ÂA, Buccini DF, dos Santos Jaques JA, Portugal LC, Guimaraes RCA, Favaro SP, Cladas RA, Carvalho CME. 2020. Effect of dietary *Acrocomia aculeata* kernel oil rich in medium chain fatty acids on type 2 diabetic rats. *Journal of Functional Foods* (104295) DOI: 10.1016/j.jff.2020.104295.
- O'Driscoll T, Crank CW. 2015. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance* **8**:217-230.
- Oak SJ, Jha R. 2019. The effects of probiotics in lactose intolerance: a systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**:1675-1683.
- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS, Cherian T. 2009. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* **374**:893-902.
- Ocampo PS, Lázár V, Papp B, Arnoldini M, zur Wiesch PA, Busa-Fekete R, Fekete G, Pál C, Ackermann M, Bonhoeffer S. 2014. Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**:4573-4582.
- Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RB, Ho WK. 1972. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science* **177**:56-58.
- Oddo A, Hansen PR. 2017. Hemolytic activity of antimicrobial peptides. Pages 427-435 in Hansen P, editor. *Antimicrobial Peptides. Methods in Molecular Biology*, vol 1548. Humana Press, New York.
- Odds FC. 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**:1.

- Oga EF, Sekine S, Shitara Y, Horie T. 2016. Pharmacokinetic Herb-Drug Interactions: Insight into Mechanisms and Consequences. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetic* **41**:93–108.
- Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Tanaka R, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda T, Takeda Y. 2001. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology* **68**:135-140.
- Ohtani K, Shimizu T. 2016. Regulation of toxin production in *Clostridium perfringens*. *Toxins* (207) DOI: 10.3390/toxins8070207.
- Ochel A, Rohde M, Chhatwal GS, Talay SR. 2014. The M1 protein of *Streptococcus pyogenes* triggers an innate uptake mechanism into polarized human endothelial cells. *Journal of Innate Immunity* **6**:585-596.
- Ojima MN, Gotoh A, Takada H, Odamaki T, Xiao JZ, Katoh T, Katayama T. 2020. *Bifidobacterium bifidum* Suppresses Gut Inflammation Caused by Repeated Antibiotic Disturbance Without Recovering Gut Microbiome Diversity in Mice. *Frontiers in Microbiology* (1349) DOI: 10.3389/fmicb.2020.01349.
- Okamoto M, Benno Y, Leung KP, Maeda N. 2008. *Bifidobacterium tsurumiense* sp. nov., from hamster dental plaque. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**:144-148.
- Operto FF, Matricardi S, Pastorino GMG, Verrotti A, Coppola G. 2020. The Ketogenic Diet for the Treatment of Mood Disorders in Comorbidity With Epilepsy in Children and Adolescents. *Frontiers in Pharmacology* (1847) DOI: 10.3389/fphar.2020.578396.
- Orellana-Paucar A, Vintimilla-Rojas D. 2020. Interactions of clinical relevance associated with concurrent administration of prescription drug and food or medicinal plants: a systematic review protocol. *Systematic Reviews* **9**:1-6.
- Orla-Jensen S. 1924. La classification des bactéries lactiques. *Le Lait* **4**:468-474.
- Orsburn B, Melville SB, Popham DL. 2008. Factors contributing to heat resistance of *Clostridium perfringens* endospores. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:3328-3335.
- O'Shea JP, Holm R, O'Driscoll CM, Griffin BT. 2019. Food for thought: formulating away the food effect – a PEARRL review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **71**:510–35.
- Ostrowsky B, Rosenthal VD. 2018. Guide to infection control in the healthcare setting *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococcal Infections). International Society for Infectious Diseases Brookline, MA.

- Ota M, et al. 2019. Effects of a medium-chain triglyceride-based ketogenic formula on cognitive function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* **690**:232-236.
- Ota M, Matsuo J, Ishida I, Hattori K, Teraishi T, Tonouchi H, Ashida K, Takahashi T, Kunugi H. 2016. Effect of a ketogenic meal on cognitive function in elderly adults: potential for cognitive enhancement. *Psychopharmacology* **233**:3797-3802.
- Özdemir Ö. 2010. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. *Clinical & Experimental Immunology* **160**:295-304.
- Palavecino E. 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clinics in Laboratory Medicine* **24**:403-418.
- Palmer K, et al. 2010. High-quality draft genome sequences of 28 *Enterococcus* sp. isolates. *Journal of Bacteriology* **192**:2469-2470.
- Panlilio AL, Culver DH, Gaynes RP, Banerjee S, Henderson TS, Tolson JS, Martone WJ. 1992. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in US hospitals, 1975–1991. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **13**:582-586.
- Pápai K, Budai M, Ludányi K, Antal I, Klebovich I. 2010. *In vitro* food-drug interaction study: Which milk component has a decreasing effect on the bioavailability of ciprofloxacin? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **52**:37–42
- Papamandjaris AA, MacDougall DE, Jones PJ. 1998. Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sciences* **62**:1203-1215.
- Papich MG. 2007. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*. Elsevier, Hoboken.
- Parks T, Barrett L, Jones N. 2015. Invasive streptococcal disease: a review for clinicians. *British Medical Bulletin* **115**:1-13.
- Parry J. 2010. Pacific islanders pay heavy price for abandoning traditional diet. *Bulletin of the World Health Organization* **88**:484-485.
- Parsons JB, Yao J, Frank MW, Jackson P, Rock CO. 2012. Membrane disruption by antimicrobial fatty acids releases low-molecular-weight proteins from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **194**:5294-5304.
- Parte AC. 2018. LPSN–List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68**:1825-1829.
- Pavlu-Pereira H, et al. 2020. Pyruvate dehydrogenase complex deficiency: updating the clinical, metabolic and mutational landscapes in a cohort of Portuguese patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **15**:1-14.

- Peng QY, Li JD, Li Z, Duan ZY, Wu YP. 2016. Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* **214**:148-153.
- Peschel A, et al. 2001. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *Journal of Experimental Medicine* **193**:1067-1076.
- Pessione E. 2012. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (86) DOI: 10.3389/fcimb.2012.00086.
- Péter S, et al. 2017. Public health relevance of drug-nutrition interactions. *European Journal of Nutrition* **56**:23-36.
- Peyrusson F, Varet H, Nguyen TK, Legendre R, Sismeiro O, Coppée J-Y, Wolz C, Tenson T, Van Bambeke F. 2020. Intracellular *Staphylococcus aureus* persists upon antibiotic exposure. *Nature Communication* **11**:1–14.
- Pinto MEA, Araujo SG, Morais MI, Sa NP, Lima CM, Rosa CA, Siqueira EP, Johann S, Lima LARS. 2017. Antifungal and antioxidant activity of fatty acid methyl esters from vegetable oils. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **89**:1671-1681.
- Pirmohamed M. 2013. Drug-grapefruit juice interactions. *BMJ* (f1) DOI: 10.1136/bmj.f1.
- Pisetsky DS. 2007. The role of nuclear macromolecules in innate immunity. *Proceedings of the American Thoracic Society* **4**:258-262.
- Pizarro-Cerdá J, Kühbacher A, Cossart P. 2012. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, (a010009) DOI: 10.1101/cshperspect.a010009.
- Plikaytis BB, Marden JL, Crawford JT, Woodley CL, Butler WR, Shinnick TM. 1994. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* **32**:1542-1546.
- Pochhammer J, Kramer A, Schäffer M. 2017. Enterococci and surgical site infections: Causal agent or harmless commensals?. *Der Chirurg; Zeitschrift für Alle Gebiete der Operativen Medizin* **88**:377-384.
- Pournaras S, Koumaki V, Spanakis N, Gennimata V, Tsakris A. 2016. Current perspectives on tigecycline resistance in *Enterobacteriaceae*: susceptibility testing issues and mechanisms of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* **48**:11-18.
- Prenner EJ, Lewis RN, Neuman KC, Gruner SM, Kondejewski LH, Hodges RS, McElhaney RN. 1997. Nonlamellar phases induced by the interaction of gramicidin S with lipid bilayers. A possible relationship to membrane-disrupting activity. *Biochemistry* **36**:7906-7916.

- Price KL, Lin X, Van Heugten E, Odle R, Willis G, Odle J. 2013. Diet physical form, fatty acid chain length, and emulsification alter fat utilization and growth of newly weaned pigs. *Journal of Animal Science* **91**:783-792.
- Qin X, Tran BG, Kim MJ, Wang L, Nguyen DA, Chen Q, Jie S, Laud PJ, Stone GG, Chow JW. 2017. A randomised, double-blind, phase 3 study comparing the efficacy and safety of ceftazidime/avibactam plus metronidazole versus meropenem for complicated intra-abdominal infections in hospitalised adults in Asia. *International Journal of Antimicrobial Agents* **49**:579-588.
- Raabe VN, Shane AL. 2019. Group B streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). Page 228-238 in Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Braunstein M, Rood JI, editors. *Gram-Positive Pathogens*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Rad I, Croitoru M, Gyéresi Á. 2011. Improvements of oxacillin stability in a ph = 1.2 acidic environment. *Acta Medica Marisiensis* **57**:328-330.
- Raffatellu M. 2018. Learning from bacterial competition in the host to develop antimicrobials. *Nature Medicine* **24**:1097-1103.
- Rahimi E, Momtaz H, Behzadnia A, Baghbadorani ZT. 2014 Incidence of *Listeria* species in bovine, ovine, caprine, camel and water buffalo milk using cultural method and the PCR assay. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **4**:50-53.
- Rainey FA, Hollen BJ, Small A. 2009. Genus *Clostridium*. Pages 738-828 in Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; Volume 3: The Firmicutes*. Springer, New York.
- Rašić JL, Kurmann JA. 1983. *Bifidobacteria* and Their Role. Microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography. Birkhäuser Verlag AG, Basel.
- Rato MG, Nerlich A, Bergmann R, Bexiga R, Nunes SF, Vilela CL, Santos-Sanches I, Chhatwal GS. 2011. Virulence gene pool detected in bovine group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolates by use of a group A *S. pyogenes* virulence microarray. *Journal of Clinical Microbiology* **49**:2470-2479.
- Raza T, Ullah SR, Mehmood K, Andleeb S. 2018. Vancomycin resistant *Enterococci*: A brief review. *Journal of Pakistan Medical Association* **68**:768-772.
- Reiser R, Probstfield JL, Silvers A, Scott LW, Shorney ML, Wood RD, O'Brien BC, Gotto Jr AM, Insull Jr W. 1985. Plasma lipid and lipoprotein response of humans to beef fat, coconut oil and safflower oil. *American Journal of Clinical Nutrition* **42**:190-197.
- Rello J, Eshwara VK, Lagunes L, Alves J, Wunderink RG, Conway-Morris A, Rojas JN, Alp E, Zhang Z. 2019. A global priority list of the TOP TEN resistant Microorganisms (TOTEM)



- study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **38**:319-323.
- Ren J, et al. 2018. Immunomodulatory effect of *Bifidobacterium breve* on experimental allergic rhinitis in BALB/c mice. *Experimental and Therapeutic Medicine* **16**:3996-4004.
- Renneberg J. 1993. Definitions of antibacterial interactions in animal infection models. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **31**:167-175.
- Rice LB. 2006. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *American Journal of Infection Control (S11-S19)* DOI: 10.1016/j.amjmed.2006.03.012.
- Riedmaier AE, et al. 2020. Use of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling for Predicting Drug-Food Interactions: an Industry Perspective. *The AAPS Journal* **22**:1-15.
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggianno GAD, Gasbarrini A, Mele MC. 2019. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms* (14) DOI: 10.3390/microorganisms7010014.
- Ripari V, Gänzle MG, Berardi E. 2016. Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials. *International Journal of Food Microbiology* **232**:35-42.
- Roberts PA, Huebinger RM, Keen E, Krachler AM, Jabbari S. 2018. Predictive modelling of a novel anti-adhesion therapy to combat bacterial colonisation of burn wounds. *PLOS Computational Biology* (e1006071) DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006071.
- Robertson JL. 2018. The lipid bilayer membrane and its protein constituents. *Journal of General Physiology* **150**:1472-1483.
- Robertson KA, Volmink JA, Mayosi BM. 2005. Antibiotics for the primary prevention of acute rheumatic fever: a meta-analysis. *BMC Cardiovascular Disorders* **5**:1-9.
- Rodas BD, Maxwell CV. 1990. The effect of fat source and medium-chain triglyceride level on performance of the early-weaned pig. *Animal Science Research Report* **MP-129**:278-287.
- Roch M, Lelong E, Panasenko OO, Sierra R, Renzoni A, Kelley WK. 2019. Thermosensitive *pbp2a* requires extracellular folding factors *prsa* and *htra1* for *Staphylococcus aureus* MRSA  $\beta$ -lactam resistance. *Communications Biology* **2**:1-11.
- Rondevaldova J, Hummelova J, Tauchen J, Kokoska L. 2018. *In vitro* antistaphylococcal synergistic effect of isoflavone metabolite demethyltexasin with amoxicillin and oxacillin. *Microbial Drug Resistance* **24**:24-29.
- Rood JJ, et al. 2018. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe* **53**:5-10.

- Roselli M, Finamore A, Britti MS, Bosi P, Oswald I, Mengheri E. 2005. Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: Evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of *in vitro* and *in vivo* results. *Animal Research* **54**:203-218.
- Rosenbach FJ. 1884. Microorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Pages 1-122 in Bergmann JF editor. Bergmann's Verlag. Verlag, Wiesbaden.
- Rosenblatt J, Reitzel RA, Raad I. 2015. Caprylic acid and glyceryl trinitrate combination for eradication of biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**:1786-1788.
- Rossato A, da Silva Silveira L, Soares Lopes LQ, De Sousa Filho WP, Finger Schaffer L, Viana Santos RC, Sagrillo MR. 2019. Evaluation in vitro of antimicrobial activity of tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*). *Archives of Biosciences & Health* **1**:99–112.
- Ruiz L, Delgado S, Ruas-Madiedo P, Sánchez B, Margolles A. 2017. *Bifidobacteria* and their molecular communication with the immune system. *Frontiers in Microbiology* (2345) DOI: 10.3389/fmicb.2017.02345.
- Ruppin DC, Middleton WRJ. 1980. Clinical use of medium chain triglycerides. *Drugs* **20**:216-224.
- Ruzin A, Novick RP. 2000. Equivalence of lauric acid and glycerol monolaurate as inhibitors of signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **182**:2668-2671.
- Sado-Kamdem SL, Vannini L, Guerzoni ME. 2009. Effect of alpha-linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* **129**:288–294.
- Saggiaro A. 2004. Probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *Journal of Clinical Gastroenterology* (S104-S106) DOI: 10.1097/01.mcg.0000129271.98814.e2.
- Sakata S, Kitahara M, Sakamoto M, Hayashi H, Fukuyama M, Benno Y. 2002. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**:1945-1951.
- Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, Jabbar A. 2010. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Natural Product Reports* **27**:238-254.
- Salvetti E, Torriani S, Felis GE. 2012. The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **4**:217-226.
- Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA. 2019. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **16**:605-616.

- Sandoe JA, Witherden IR, Cove JH, Heritage J, Wilcox MH. 2003. Correlation between enterococcal biofilm formation *in vitro* and medical-device-related infection potential *in vivo*. *Journal of Medical Microbiology* **52**:547-550.
- Santos HO, Howell S, Earnest CP, Teixeira FJ. 2019. Coconut oil intake and its effects on the cardiometabolic profile-a structured literature review. *Progress in Cardiovascular Diseases* **62**:436-443.
- Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG, Karlsson A, Al-Lazikani B, Hersey A, Oprea TI, Overington JP. 2017. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* **16**:19-34.
- Sarkar A, Mandal S. 2016. *Bifidobacteria*-Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. *Microbiological Research* **192**:159-171.
- Sato K, Kashiwaya Y, Keon CA, Tsuchiya N, King MT, Radda GK, Chance B, Clarke K, Veech RL. 1995. Insulin, ketone bodies, and mitochondrial energy transduction. *FASEB Journal* **9**:651-658.
- Sava IG, Heikens E, Huebner J. 2010. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection* **16**:533-540.
- Scott HM, et al. 2019. Critically important antibiotics: criteria and approaches for measuring and reducing their use in food animal agriculture. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1441**:8-16.
- Segal EM, Flood MR, Mancini RS, Whiteman RT, Friedt GA, Kramer AR, Hofstetter MA. 2014. Oral Chemotherapy Food and Drug Interactions: A Comprehensive Review of the Literature. *Journal of Oncology Practice* (e255-268) DOI: 10.1200/JOP.2013.001183.
- Segal R, Pilote L. 2006. Warfarin interaction with *Matricaria chamomilla*. *Canadian Medical Association Journal* **174**:1281-1282.
- Sechi AS, Wehland J, Small JV. 1997. The isolated comet tail pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: a tail of two actin filament populations, long and axial and short and random. *Journal of Cell Biology* **137**:155-167.
- Shapiro JA. 1997. Genome organization, natural genetic engineering and adaptive mutation. *Trends in Genetics* **13**:98-104.
- Shiadeh SMJ, Pormohammad A, Hashemi A, Lak P. 2019. Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug Resistance* **12**:2713-2725.
- Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, Miyakawa H, Yaeshima T, Araya T, Tomita M. 1992. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *Journal of Dairy Science* **75**:3296-3306.

- Scharff RL. 2012. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *Journal of Food Protection* **75**:123-131.
- Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. 2006. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *The Journal of Immunology* **177**:1272-1281.
- Scheirlinck I, Van der Meulen R, De Vuyst L, Vandamme P, Huys G. 2009. Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments. *Journal of Applied Microbiology* **106**:1081-1092.
- Schlegel L, Lemerle S, Geslin P. 1998. *Lactobacillus* species as opportunistic pathogens in immunocompromised patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **17**:887-888.
- Schleifer KH, Bell JA. 2009. Genus *Staphylococcus*. Pages 392-421 in Whitman WB editor. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology; Volume 3: The Firmicutes*. Springer, New York.
- Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **34**:31-34.
- Schlievert PM, Peterson ML. 2012. Glycerol monolaurate antibacterial activity in broth and biofilm cultures. *PLOS ONE* (e40350) DOI: 10.1371/journal.pone.0040350.
- Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. 2012. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiology* **7**:1147-1171.
- Schönfeld P, Wojtczak L. 2016. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: The cellular perspective. *Journal of Lipid Research* **57**:943-954.
- Sieprawska-Lupa M, et al. 2004. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**:4673-4679.
- Sierig G, Cywes C, Wessels MR, Ashbaugh CD. 2003. Cytotoxic effects of streptolysin O and streptolysin S enhance the virulence of poorly encapsulated group A streptococci. *Infection and Immunity* **71**:446-455.
- Silva ROS, Oliveira Junior, CA, Guedes RMC, Lobato FCF. 2015. *Clostridium perfringens*: a review of the disease in pigs, horses and broiler chickens. *Ciência Rural* **45**:1027-1034.
- Silversides JA, Lappin E, Ferguson AJ. 2010. Staphylococcal toxic shock syndrome: mechanisms and management. *Current Infectious Disease Reports* **12**:392-400.

- Simone M, Gozzoli C, Quartieri A, Mazzola G, Di Gioia D, Amaretti A, Raimondi S, Rossi M. 2014. The probiotic *Bifidobacterium breve* B632 inhibited the growth of *Enterobacteriaceae* within colicky infant microbiota cultures. *BioMed Research International* (301053) DOI: 10.1155/2014/301053.
- Simpson PJ, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2004. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:401-406.
- Skalka B, Smola J, Elischerová K. 1982. Routine test for *in vitro* differentiation of pathogenic and apathogenic *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **15**:503-507.
- Skřivanová E, Marounek M, Benda V, Březina P. 2006. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Veterinární Medicína Praha* **51**:81-88.
- Skřivanová E, Marounek M, Dlouhá G, Kaňka J. 2005. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C2-C18 fatty acids. *Letters of Applied Microbiology* **41**:77-81.
- Skřivanová E, Molatová Z, Matěnová M, Houf K, Marounek M. 2011. Inhibitory effect of organic acids on arcobacters in culture and their use for control of *Arcobacter butzleri* on chicken skin. *International Journal of Food Microbiology* **144**:367-371.
- Skřivanová E, Molatová Z, Skřivanová V, Marounek M. 2009. Inhibitory activity of rabbit milk and medium-chain fatty acids against enteropathogenic *Escherichia coli* O128. *Veterinary microbiology* **135**:358-362.
- Slavić Đ, Boerlin P, Fabri M, Klotins KC, Zoethout JK, Weir PE, Bateman D. 2011. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research* **75**:89-97.
- Slipczuk L, Codolosa JN, Davila CD, Romero-Corral A, Yun J, Pressman GS, Figueredo VM. 2013. Infective endocarditis epidemiology over five decades: a systematic review. *PLOS ONE* (e82665) DOI: 10.1371/journal.pone.0082665.
- Smith AM, Tau NP, Smouse SL, Allam M, Ismail A, Ramalwa NR, Disenyeng B, Ngomane M, Thomas J. 2019. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 2017–2018: laboratory activities and experiences associated with whole-genome sequencing analysis of isolates. *Foodborne Pathogens and Disease* **16**:524-530.
- Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA, Goldfine H. 1995. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infection and Immunity* **63**:4231-4237.
- Snitkin ES, Zelazny AM, Thomas PJ, Stock F, Henderson DK, Palmore TN, Segre JA. 2012. Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-

genome sequencing. *Science Translational Medicine* (148ra116)  
DOI: 10.1126/scitranslmed.3004129.

Socol CR, Vandenberghe LPDS, Spier MR, Medeiros ABP, Yamagishi CT, Lindner JDD, Pandey A, Thomaz-Socol V. 2010. The potential of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology* **48**:413-434.

Solensky R, Earl HS, Gruchalla RS. 2000. Clinical approach to penicillin-allergic patients: a survey. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **84**:329-333.

Song JH, et al. 2004. High prevalence of antimicrobial resistance among clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asia (an ANSORP study). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**:2101-2107.

Spoor LE, McAdam PR, Weinert LA, Rambaut A, Hasman H, Aarestrup FM, Kearns AM, Larsen AR, Skov R, Fitzgerald JR. 2013. Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio* (e00356-13)  
DOI: 10.1128/mBio.00356-13.

Stanhope JM, Sampson VM, Prior IA. 1981. The Tokelau Island migrant study: serum lipid concentrations in two environments. *Journal of Chronic Diseases* **34**:45-55.

Stephens LJ, Werrett MV, Sedgwick AC, Bull SD, Andrews PC. 2020. Antimicrobial innovation: a current update and perspective on the antibiotic drug development pipeline. *Future Medicinal Chemistry* **12**:2035-2065.

Stevens KN, Crespo-Biel O, van den Bosch EEM, Dias AA, Knetsch MLW, Aldenhoff YBJ, van der Veen FH, Maessen JG, Stobberingh EE, Koole LH. 2009. The relationship between the antimicrobial effect of catheter coatings containing silver nanoparticles and the coagulation of contacting blood. *Biomaterials* **30**:3682-3690.

Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. 1977. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annual Review of Biochemistry* **46**:723-763.

Sumithran P, Prendergast LA, Delbridge E, Purcell K, Shulkes A, Kriketos A, Proietto J. 2013. Ketosis and appetite-mediating nutrients and hormones after weight loss. *European Journal of Clinical Nutrition* **67**:759-764.

Sun CQ, O'Connor CJ, Robertson AM. 2003. Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **36**:9-17.

Sung JML, Lindsay JA. 2007. *Staphylococcus aureus* strains that are hypersusceptible to resistance gene transfer from enterococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**:2189-2191.

- Sutula J, Coulthwaite L, Verran J. 2012. Culture media for differential isolation of *Lactobacillus casei* Shirota from oral samples. *Journal of Microbiological Methods* **90**:65-71.
- Swaminathan S, Alangaden GJ. 2010. Treatment of resistant enterococcal urinary tract infections. *Current Infectious Disease Reports* **12**:455-464.
- Szymański H, Armańska M, Kowalska-Duplaga K, Szajewska H. 2008. *Bifidobacterium longum* PL03, *Lactobacillus rhamnosus* KL53A, and *Lactobacillus plantarum* PL02 in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a randomized controlled pilot trial. *Digestion* **78**:13-17.
- Švec P, Devriese LA. 2009. Genus *Enterococcus*. Pages 594-607 in Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*; Volume 3: The Firmicutes. Springer, New York.
- Tabbers MM, de Milliano I, Roseboom MG, Benninga MA. 2011. Is *Bifidobacterium breve* effective in the treatment of childhood constipation? Results from a pilot study. *Nutrition Journal* **10**:1-5.
- Tabuchi F, Matsumoto Y, Ishii M, Tatsuno K, Okazaki M, Sato T, Moriya K, Sekimizu K. 2017. Synergistic effects of vancomycin and  $\beta$ -lactams against vancomycin highly resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antibiotics* **70**:771-774.
- Talwalkar A, Kailasapathy K. 2003. Metabolic and biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *Journal of Dairy Science* **86**:2537-2546.
- Tamilmani P, Pandey MC. 2016. Iron binding efficiency of polyphenols: Comparison of effect of ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid on catechol and galloyl groups. *Food Chemistry* **197**:1275-1279.
- Tangwatcharin P, Khopaibool P. 2012. Activity of virgin coconut oil, lauric acid or monolaurin in combination with lactic acid against *Staphylococcus aureus*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health* **43**:969-985.
- Tasara T, Stephan R. 2006. Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: a review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *Journal of Food Protection* **69**:1473-1484.
- Taur Y, et al. 2012. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Infectious Diseases* **55**:905-914.
- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **356**:983-989.
- Tejero-Sariñena S, Barlow J, Costabile A, Gibson GR, Rowland I. 2013. Antipathogenic activity of probiotics against *Salmonella Typhimurium* and *Clostridium difficile* in anaerobic

batch culture systems: is it due to synergies in probiotic mixtures or the specificity of single strains?. *Anaerobe* **24**:60-65.

Temple ME, Nahata MC. 2000. Treatment of listeriosis. *Annals of Pharmacotherapy* **34**:656-661.

Thevenet J, De Marchi U, Domingo JS, Christinat N, Bultot L, Lefebvre G, Sakamoto K, Descombes P, Masoodi M, Wiederkehr A. 2016. Medium-chain fatty acids inhibit mitochondrial metabolism in astrocytes promoting astrocyte-neuron lactate and ketone body shuttle systems. *FASEB Journal* **30**:1913-1926.

Thiercelin ME. 1899. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie* **50**:269-271.

Thomer L, Schneewind O, Missiakas D. 2016. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **11**:343-364.

Thormar H, Hilmarsson H, Bergsson G. 2006. Stable concentrated emulsions of the 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:522-526.

Toghyani M, Toghyani M, Gheisari A, Ghalamkari G, Eghbalsaied S. 2011. Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. *Livestock Science* **138**:167-173.

Tomás MSJ, Bru E, Nader-Macías ME. 2003. Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture conditions. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **188**:35-44.

Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews* **28**:603-661.

Top J, Willems R, Bonten M. 2008. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **52**:297-308.

Trainor VC, Udy RK, Bremer PJ, Cook GM. 1999. Survival of *Streptococcus pyogenes* under stress and starvation. *FEMS Microbiology Letters* **176**:421-428.

Tran PL, et al. 2012. An organoselenium compound inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms on hemodialysis catheters *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**:972-978.

Traul KA, Driedger A, Ingle DL, Nakhasi D. 2000. Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food and Chemical Toxicology* **38**:79-98.



- Turrone F, Duranti S, Milani C, Lugli GA, van Sinderen D, Ventura M. 2019. *Bifidobacterium bifidum*: a key member of the early human gut microbiota. *Microorganisms* (544) DOI: 10.3390/microorganisms7110544.
- Turrone F, et al. 2012. Diversity of Bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLOS ONE* (e36957) DOI: 10.1371/journal.pone.0036957.
- Turrone F, Milani C, Duranti S, Ferrario C, Lugli GA, Mancabelli L, van Sinderen D, Ventura M. 2018. Bifidobacteria and the infant gut: An example of co-evolution and natural selection. *Cellular and Molecular Life Sciences* **75**:103-118.
- Turrone F, van Sinderen D, Ventura M. 2011. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology* **149**:37-44.
- Ubogogu O, Onyeagba R, Chigbu O. 2006. Lauric acid content and inhibitory effect of palm kernel oil on two bacterial isolates and *Candida albicans*. *African Journal of Biotechnology* **5**:1045-1047.
- ubistova L, Dvoracek L, Tkadlec J, Melter O, Licha I. 2018. Environmental stress affects the formation of *Staphylococcus aureus* persists tolerant to antibiotics. *Microbial Drug Resistance* **24**:547-555.
- Uçkay I, Pires D, Agostinho A, Guanziroli N, Öztürk M, Bartolone P, Tscholl P, Betz M, Pittet D. 2017. Enterococci in orthopaedic infections: Who is at risk getting infected?. *Journal of Infection* **75**:309-314.
- Udhayavel S, Ramasamy GT, Gowthaman V, Malmarugan S, Senthilvel K. 2017. Occurrence of *Clostridium perfringens* contamination in poultry feed ingredients: Isolation, identification and its antibiotic sensitivity pattern. *Animal Nutrition* **3**:309-312.
- UN. 2019. Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. No Time to Wait: Securing the Future from Drug-Resistant Infections Report to the Secretary-General of the United Nations. April 2019. United Nations, New York. Available from [www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG\\_final\\_report\\_EN.pdf?ua=1](http://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_EN.pdf?ua=1) (accessed February 2021).
- Urry DW. 1971. The gramicidin A transmembrane channel: a proposed  $\pi$  (L, D) helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **68**:672-676.
- Utsui Y, Yokota T. 1985. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **28**:397-403.
- Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, Theoret JR, Garcia J, Awad MM, Adams V, Moore RJ, Rood JJ, McClane BA. 2014. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiology* **9**:361-377.

- Uzal FA, Vidal JE, McClane BA, Gurjar AA. 2010. *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases. *Open Toxinology Journal* **2**:24-42.
- van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, van Leeuwen WB, van Wamel W, Vos MC, Wertheim HFL, Verbrugh HA. 2009. Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution* **9**:32–47.
- Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**:5649-5654.
- Van Bunderen CC, Bomers MK, Wesdorp E, Peerbooms P, Veenstra J. 2010. *Clostridium perfringens* septicaemia with massive intravascular haemolysis: a case report and review of the literature. *Netherlands Journal of Medicine* **68**:343-346.
- van de Guchte M, et al. 2006. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:9274-9279.
- van den Berg S, Koedijk DGAM, Back JW, Neef J, Dreisbach A, van Dijl JM, Bakker-Woudenberg IAJM, Buist G. 2015. Active immunization with an octa-valent *Staphylococcus aureus* antigen mixture in models of *S. aureus* bacteremia and skin infection in mice. *PLOS ONE* (e0116847) DOI: 10.1371/journal.pone.0116847.
- Van Tyne D, Gilmore MS. 2014. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annual Review of Microbiology* **68**:337-356.
- Varga J, Stirewalt VL, Melville SB. 2004. The CcpA protein is necessary for efficient sporulation and enterotoxin gene (cpe) regulation in *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology* **186**:5221-5229.
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* **14**:584-640.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**:495-548.
- Ventura M, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R. 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**:205-223.
- Verallo-Rowell VM, Dillague KM, Syah-Tjundawan BS. 2008. Novel antibacterial and emollient effects of coconut and virgin olive oils in adult atopic dermatitis. *Dermatitis* **19**:308-315.

- Vilei EM, Schlatter Y, Perreten V, Straub R, Popoff MR, Gibert M, Gröne A, Frey J. 2005. Antibiotic-induced expression of a cryptic *cpb2* gene in equine  $\beta$ 2-toxigenic *Clostridium perfringens*. *Molecular Microbiology* **57**:1570-1581.
- Vogel RF, Pavlovic M, Ehrmann MA, Wiezer A, Liesegang H, Offschanka S, Voget S, Angelov A, Liebl W. 2011. Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. *Microbial Cell Factories* (S6) DOI: 10.1186/1475-2859-10-S1-S6.
- von Eiff C, Peters G, Becker K. 2006. The small colony variant (SCV) concept-the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury* (S26-S33) DOI: 10.1016/j.injury.2006.04.006.
- Von Wright A, Axelsson L. 2011. Lactic acid bacteria: an introduction. Pages 1-16 in Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A, editors. *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. CRC Press, Boca Raton.
- Vu J, Carvalho J. 2011. *Enterococcus*: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Frontiers in Biology* **6**:357-366.
- Wallace TC. 2019. Health effects of coconut oil-A narrative review of current evidence. *Journal of American College of Nutrition* **38**:97-107.
- Walter J. 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:4985-4996.
- Wang J, et al. 2020. Discovery of Novel Antibiotics as Covalent Inhibitors of Fatty Acid Synthesis. *ACS Chemical Biology* **15**:1826-1834.
- Wang X, Huycke MM. 2007. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells. *Gastroenterology* **132**:551-561.
- Wehrli W, Staehelin M. 1971. Actions of the rifamycins. *Bacteriological Reviews* **35**:290-309.
- Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, Edwards JR, Sievert DM. 2016. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **37**:1288-1301.
- Weinstein RA, Bonten MJ, Austin DJ, Lipsitch M. 2001. Understanding the spread of antibiotic resistant pathogens in hospitals: mathematical models as tools for control. *Clinical Infectious Diseases* **33**:1739-1746.

- Weis J, Seelig HPR. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied Microbiology* **30**:29-32.
- Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. 2018. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nature Reviews Microbiology* **16**:355-367.
- Welch WH. 1892. A gas-producing bacillus capable of rapid development in the blood vessels after death. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* **3**:81.
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infectious Diseases* **5**:751-762.
- Westermann C, Gleinser M, Corr SC, Riedel CU. 2016. A critical evaluation of bifidobacterial adhesion to the host tissue. *Frontiers in Microbiology* (1220) DOI: 10.3389/fmicb.2016.01220.
- Whiley RA, Hardie JM 2009. Genus *Streptococcus*. Pages 655-711 in Whitman WB, editor. *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*; Volume 3: The Firmicutes. Springer, New York.
- WHO. 2015. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. World Health Organization, Geneva.
- WHO. 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization, Geneva.
- Williams DJ, Cooper WO, Kaltenbach LA, Dudley JA, Kirschke DL, Jones TF, Arbogast PG, Griffin MR, Creech CB. 2011. Comparative effectiveness of antibiotic treatment strategies for pediatric skin and soft-tissue infections. *Pediatrics* (e479-e487) DOI: 10.1542/peds.2010-3681.
- Williamson JR, Browning ET, Scholz R, Kreisberg RA, Fritz IB. 1968. Inhibition of fatty acid stimulation of gluconeogenesis by (+)-decanoylcarnitine in perfused rat liver. *Diabetes* **17**:194-208.
- Windolf CD, Lögters T, Scholz M, Windolf J, Flohé S. 2014. Lysostaphin-coated titan-implants preventing localized osteitis by *Staphylococcus aureus* in a mouse model. *PLOS ONE* (e115940) DOI: 10.1371/journal.pone.0115940.
- Wiseman J. 1984. Assessment of the digestible and metabolisable energy of fats for non-ruminants. *Proceedings of the 37th Nottingham Easter School*. Butterworths, London.
- Wong CB, Odamaki T, Xiao JZ. 2019. Beneficial effects of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536 on human health: Modulation of gut microbiome as the principal action. *Journal of Functional Foods* **54**:506-519.

- Wong D, van Duin D. 2017. Novel beta-lactamase inhibitors: unlocking their potential in therapy. *Drugs* **77**:615-628.
- Wong R, Hägg U, Samaranayake L, Yuen M, Seneviratne C, Kao R. 2010. Antimicrobial activity of Chinese medicine herbs against common bacteria in oral biofilm. A pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **39**:599-605.
- Wright AJ. 1999. The Penicillins. *Mayo Clinic Proceedings* **74**:90–307.
- Wright LT, Schreiber H. 1949. The clinical value of aureomycin: a review of current literature and some unpublished data. *Journal of the National Medical Association* **41**:195-201.
- Wu H, Xu L, Ballantyne CM. 2020. Dietary and pharmacological fatty acids and cardiovascular health. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **105**:1030-1045.
- Yamaguchi T, Kawahara R, Hamamoto K, Hirai I, Khong DT, Nguyen TN, Tran HT, Motooka D, Nakamura S, Yamamoto Y. 2020. High Prevalence of Colistin-Resistant *Escherichia coli* with Chromosomally Carried mcr-1 in Healthy Residents in Vietnam. *mSphere* (e00117-20) DOI: 10.1128/mSphere.00117-20.
- Yamashiro Y. 2017. Gut microbiota in health and disease. *Annals of Nutrition and Metabolism* **71**:242-246.
- Yang CC, Hsu PC, Chang HJ, Cheng CW, Lee MH. 2013. Clinical significance and outcomes of *Clostridium perfringens* bacteremia—a 10-year experience at a tertiary care hospital. *International Journal of Infectious Diseases* (e955-e960) DOI: 10.1016/j.ijid.2013.03.001.
- Yang L, Wang K, Li H, Denstedt JD, Cadieux, PA. 2014b. The influence of urinary pH on antibiotic efficacy against bacterial uropathogens. *Urology* (731.e1-731.e7) DOI: 10.1016/j.urology.2014.04.048.
- Yang S-C, Lin C-H, Sung CT, Fang J-Y. 2014a. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology* (241) DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241.
- Yanza YR, Szumacher-Strabel M, Jayanegara A, Kasenta AM, Gao M, Huang H, Patra AK, Warzych E, Cieślak A. 2020. The effects of dietary medium-chain fatty acids on ruminal methanogenesis and fermentation in vitro and in vivo: A meta-analysis. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (**00**:1-16) DOI: 10.1111/jpn.13367.
- Yao P, Annamaraju P. 2020. *Clostridium perfringens*. StatPearls Publishing, Treasure Island. Available from [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559049/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559049/) (accessed February 2021).
- Yazawa K, Fujimori M, Amano J, Kano Y, Taniguchi SI. 2000. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Therapy* **7**:269-274.

- Yimenu DK, Emam A, Elemineh E, Atalay W. 2019. Assessment of antibiotic prescribing patterns at outpatient pharmacy using world health organization prescribing indicators. *Journal of Primary Care & Community Health* (10) DOI: 10.1177/2150132719886942.
- Yoon BK, Jackman JA, Kim MC, Cho NJ. 2015. Spectrum of membrane morphological responses to antibacterial fatty acids and related surfactants. *Langmuir* **31**:10223–10232.
- Yoon BK, Jackman JA, Kim MC, Sut TN, Cho NJ. 2017. Correlating membrane morphological responses with micellar aggregation behavior of capric acid and monocaprin. *Langmuir* **33**:2750–2759.
- Yu Q, et al. 2017. The Agr-like quorum sensing system is required for pathogenesis of necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* in poultry. *Infection and Immunity* (e00975-16) DOI: 10.1128/IAI.00975-16.
- Zanderigo E, Sartori V, Svetcic G, Bouillon T, Schumacher P, Morari M, Curatolo M. 2006. The Well-being Model: A New Drug Interaction Model for Positive and Negative Effects. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* **104**:742-753.
- Zentek J, Buchheit-Renko S, Ferrara F, Vahjen W, Van Kessel A, Pieper R. 2011. Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets. *Animal Health Research Reviews* **12**:83-93.
- Zhang XC, Li H. 2019. Interplay between the electrostatic membrane potential and conformational changes in membrane proteins. *Protein Science* **28**:502-512.
- Zheng CJ, Yoo JS, Lee TG, Cho HY, Kim YH, Kim WG. 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters* **579**:5157-5162.
- Zheng J, Zhao X, Lin XB, Gänzle M. 2015. Comparative genomics *Lactobacillus reuteri* from sourdough reveals adaptation of an intestinal symbiont to food fermentations. *Scientific Reports* **5**:1-11.
- Zheng W, Sun W, Simeonov A. 2018. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. *British Journal of Pharmacology* **175**:181-191.
- Zhou X, Willems RJ, Friedrich AW, Rossen JW, Bathoorn E. 2020. *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **9**:1-13.
- Zijp IM, Korver O, Tijburg LB. 2000. Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **40**:371-98.
- Zilberberg MD, Shorr AF, Micek ST, Vazquez-Guillamet C, Kollef MH. 2014. Multi-drug resistance, inappropriate initial antibiotic therapy and mortality in Gram-negative severe sepsis and septic shock: a retrospective cohort study. *Critical Care* (596) DOI: 10.1186/s13054-014-0596-8.

Zulkanain IN, Ab-Rahim S, Camalxaman SN, Mazlan M. 2020. Medium-chain fatty acids in nutritional therapy: A review. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences* **16**:318-323.

## 14 Přílohy – články a abstrakty publikované mimo rozsah disertace

### VĚDECKÉ PUBLIKACE S IF

Tůmová E, Chodová D, Skřivanová E, Laloučková K, Šubrtová-Salmonová H, Ketta M, Machander V, Cotozzolo E. 2021. Research Note: The effects of genotype, sex, and feeding regime on performance, carcasses characteristic, and microbiota in chickens. *Poultry Science* **100**:760-764.

### RECENZOVANÉ VĚDECKÉ PUBLIKACE

Malá L, Laloučková K, Hovorková P, Skřivanová E. 2020. Susceptibility of *Aeromonas hydrophila* to Medium-chain Fatty Acids and Their Monoesters. *Scientia Agriculturae Bohemica* **51**:58-64.

Čermák L, Vlčková J, Skřivanová E, Laloučková K, Englmaierová M. 2019. Effect of Genotype on Ileal and Caecal Microbiota in Pasture-Reared Dominant Cockerels. *Scientia Agriculturae Bohemica* **50**:89-95.

### ODBORNÉ PUBLIKACE

Skřivanová E, Laloučková K. 2020. Bakteriální rezistence k antibiotikům. Studium prevalence kolistin-rezistentních *E. coli* v kuřecím mase z české maloobchodní sítě. Vědecký výbor výživy zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby. ISBN 978-80-7403-232-5.

Laloučková K, Skřivanová E, Vlková E. 2020. Antibiotická rezistence v chovech hospodářských zvířat. *Náš chov* **80**:61-62.

### PŘÍSPĚVKY NA KONFERENCÍCH

Skřivanová E, Laloučková K. 2020 Antimikrobiální aktivita palmových olejů bohatých na mastné kyseliny o střední délce řetězce vůči grampozitivním původcům mastitid dojeného skotu: *in vitro* studie. In Aktuální poznatky ve výživě a zdraví zvířata bezpečnosti produktů 2020. Praha Uhřetěves, Czech Republic, pp. 4 - 11. ISBN 978-80-7403-237-0.

Laloučková K, Malá L, Slaničková P, Skřivanová E. 2020. The antimicrobial action of palm oils containing medium-chain fatty acids against gram-positive bacteria associated with mastitis in dairy cattle: *in vitro* study. In Proceedings of Reviewed Scientific Papers – NutriNET 2020. Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovak Republic, pp. 453 – 168. ISBN 978-80-552-2200-4.

Lalouckova K, Skrivanova E. 2019 *In vitro* antagonistic combinatory effect of palm oils rich in lauric acid with oxacillin towards *Staphylococcus aureus*. In Proceedings of 6th World Congress and Expo on Applied Microbiology and 8th Edition of International Conference on



Antibiotics, Antimicrobials and Resistance and 12th International Conference on Allergy and Immunology. Rome, Italy: Antibiotics 2019, p. 35. ISSN 2472-1093.

Skrivanova E, Lalouckova K. 2018. Antibacterial effect of plant oils rich in medium chain fatty acids and their possible interactions with antibiotics. *Journal of Food: Microbiology, Safety and Hygiene* 3:63. DOI: 10.4172/2476-2059-C1-008.

Skrivanova E, Lalouckova K. 2018. Interactions of vegetable oils rich in lauric acid (C12:0) with oxacillin towards *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food: Microbiology, Safety and Hygiene* 3:71. DOI: 10.4172/2476-2059-C1-009.

Laloučková K, Skřivanová E, Hovorková P. 2018. Study on Antibacterial Properties of Edible Oils containing Medium-Chain Fatty Acids. In *Proceedings of Reviewed Scientific Papers – NutriNET 2018*. Brno, Czech Republic, pp. 66 – 76. ISSN 978-80-7509-600-5.

Skrivanova E, Lalouckova K, Geigerova M, Svejstl R. 2017. A Possible Prebiotic Effect of Dietary Lupin (*Lupinus Albus*) in Broiler Chickens and Ducks [Abstract]. In *International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics*. Budapest, Hungary, p. 131. ISBN 978-80-89589-16.6.

Skrivanova E, Hovorkova P, Lalouckova K. 2016. The Study on Antibacterial Activity of Plant Oils Containing Medium-Chain Fatty Acids [Abstract]. In *25th International ICFMH Conference –FoodMicro 2016*.

Laloučková K, Skřivanová E, Hovorková, P. 2016. Antibacterial effect of plant oils containing medium-chain fatty acids [Abstract]. In *ELLS Student Scientific Conference - Bio-Based Economy for a Sustainable Future*. Stuttgart, Germany, p. 116.