

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Antibiotická rezistence bifidobakterií k metronidazolu

Diplomová práce

Autor: Bc. Hana Ludvíková

**Obor studia: Kvalita potravin a zpracování zemědělských
produktů**

Vedoucí práce: doc. Ing. Věra Neuzil Bunešová, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antibiotická rezistence bifidobakterií k metronidazolu" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.04.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Věře Neužil Bunešové, Ph.D. za odbornou pomoc při vedení mé práce, za čas, který mi věnovala a v neposlední řadě za ochotu a trpělivost, kterou se mnou měla. Dále bych ráda poděkovala členům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, že mi umožnili realizovat experimentální část této diplomové práce. A na konec bych chtěla poděkovat mé rodině, díky které jsem měla skvělé zázemí a podporu při studiu.

Antibiotická rezistence bifidobakterií k metronidazolu

Souhrn

Bifidobakterie jsou součástí střevní mikrobioty a existují vědecky doložené výsledky, že mají pozitivní vliv na zdraví hostitele. To by mohlo být využito při léčbě antibiotiky, aby se předešlo střevní dysbióze. Metronidazol je často využívané antibiotikum při léčbě Crohnovy choroby, střevních zánětlivých onemocnění nebo se podává k profylaxi vzniku infekcí při operacích.

Cílem této diplomové práce bylo přinést nové experimentální poznatky k problematice rezistence bifidobakterií k metronidazolu. Testování probíhalo na čistých kulturách bifidobakterií a dále byly v laboratorních podmínkách kultivovány vzorky stolice spolu s metronidazolem. Na získaných izolátech bifidobakterií probíhala detekce citlivosti na metronidazol diskovou metodou.

V této práci byla analyzována dříve naměřená data pomocí diskové difúzní metody s daty nově naměřenými prostřednictvím e-testu. Při testování *in vitro* bylo zjištěno, že se bifidobakteriální kmeny liší nejenom z hlediska citlivosti na úrovni druhu, ale byla detekována i kmenová variabilita. U testování diskovou difúzní metodou při koncentraci 5 µg i 50 µg metronidazolu byla zaznamenána častá rezistence. Celkem bylo otestováno 63 bifidobakteriálních kmenů (36 typových náležících 36 druhům/podruhům a 27 divokých kmenů lidského původu náležících k druhům *B. adolescentis*, *B. animalis* ssp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, a *B. longum* ssp. *longum*). Pokud kmen vykazoval rezistenci k 50 µg metronidazolu, tak byl rezistentní i na celé koncentrační škále e-testu (0,016 - 256 µg). Koncentrace 50 µg se zdá být vhodnou pro screening rezistence k metronidazolu diskovou metodou. V případě testování antibiotické citlivosti diskovou metodou byl zjištěn pozoruhodný výsledek. V inhibičních zónách spontánně vznikaly kolonie rezistentních mutantů. Testování těchto kolonií pomocí diskové metody i e-testu rezistenci potvrdilo.

Testováním fekálních vzorků kultivovaných s metronidazolem bylo dosaženo dalšího zajímavého poznatku. Potvrdil se výsledek z laboratorního testování čistých kultur a to, že mohou vznikat mutanti v inhibiční zóně. Byla potvrzena druhová a kmenová variabilita v rámci bifidobakterií. Navíc testované kmeny *Bifidoacterium animalis* ssp. *lactis*, které se nejčastěji používají jako probiotické kmeny, se chovaly jinak než ostatní bakterie a vykazovaly adaptaci na metronidazol, rezistenci získávali postupně. Přítomnost genu na rezistenci k 5-nitroimidazolovým antibiotikům byla nalezena ve více genomech typových kmenů lidského nebo zvířecího původu. K dispozici byla genomová data pro 13 testovaných typových kmenů. Nicméně přítomnost tohoto genu nekorespondovala s daty detekovanými *in vitro* pomocí diskové difúzní metody a e-testu. Rezistence byla detekována pouze u 4 kmenů ze 13. Abychom byli schopni daný gen detekovat u divokých izolátů bylo by třeba vyvinout funkční primery pro PCR detekci. To se nepodařilo, protože docházelo k nespecifickým reakcím.

Z výsledků je patrné, že rezistence vůči metronidazolu je u bifidobakteriálních druhů a kmenů celkem běžná. Je zřejmé, že mechanismů rezistence bude více, a že studium uvedené problematiky může přinést další zajímavé výsledky.

Klíčová slova: Bifidobakterie; PCR; MIC; rezistence; mutace; nitroimidazol

Antibiotic resistant of bifidobacteria to metronidazole

Summary

Bifidobacteria are a part of intestinal microbiota and there are scientifically documented results that bifidobacteria have positive effect on health of its host. That could be used during an antibiotic treatment to prevent intestinal dysbiosis. Metronidazole is often used as an antibiotic for the treatment of Crohn's disease, inflammatory bowel diseases or for the prophylaxis of surgical infections.

The aim of the thesis was to bring new experimental knowledge concerning the issue of bifidobacterial resistance to metronidazole. Testing was performed on pure cultures of bifidobacteria. Furthermore, there were faecal samples cultured together with metronidazole under laboratory conditions. Sensitivity to metronidazole was being detected in the obtained bifidobacterial isolates using the disk method. In this thesis the data previously acquired using the disk diffusion method were analysed and compared to data newly measured by e-test. *In vitro* testing showed that bifidobacterial strains differ not only in susceptibility at the species level, but also in its strain variability. Frequent resistance was noted during disk diffusion testing with both metronidazole concentrations of 5 µg and 50 µg. There were 63 strains tested at total (36 type strains belonging to 36 species / subspecies and 27 wild strains of human origin belonging to following species: *B. adolescentis*, *B. animalis* ssp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, a *B. longum* ssp. *longum*. In cases in which the strain was resistant to 50 µg of metronidazole, the resistance was also detected throughout the entire concentration scale of e-test (0,016 – 256 µg). The concentration of 50 µg appears to be suitable for screening for metronidazole resistance by the disk method. In case of testing antibiotic susceptibility by disk diffusion method a noteworthy outcome was recorded. The mutant colonies that were resistant to metronidazole were detected in inhibition zones. The testing of the colonies by both disk diffusion method and e-test confirmed such resistance.

The testing of faecal samples which were cultivated with metronidazole brought yet another interesting piece of knowledge. The result of laboratory testing of clean cultures was validated. The mutant colonies can originate in an inhibition zone. The variability of species and strains of bifidobacteria was proven. Furthermore, the tested strains of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, which are most often used as probiotic strains, behaved differently from other bacteria and showed signs of adaptation to metronidazole, acquiring resistance gradually. The presence of a gene for resistance to 5-nitroimidazole antibiotics was recorded in multiple genomes of type strains of human or animal origin. Genomic data were available for 12 types of tested strains. However, the presence of this gene did not correspond to the data detected *in vitro* using the disk diffusion method and e-test. The antibiotic resistance was detected only for 3 strains out of 12. In order to be able to detect such gene in wild isolates, it would be necessary to develop functional primers for PCR detection. That was, however, not possible because of non-specific reactions during testing. The results show that resistance to metronidazole is in bifidobacterial species and strains quite common. It is clear that there will be more mechanisms of resistance and that studying this issue may yield other interesting results.

Keywords: Bifidobacteria, PCR, MIC, resistance, mutation, nitroimidazole

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Rod <i>Bifidobacterium</i>.....	10
3.1.1 Historie	12
3.1.2 Morfologie	12
3.1.3 Fyziologie	13
3.1.4 Metabolismus.....	14
3.1.5 Bifidobakterie jako probiotika	15
3.2 Antibiotika obecně	16
3.2.1 Charakteristika antibiotik.....	16
3.2.2 Parametry vyjadřující účinnost antibiotik.....	17
3.2.3 Rozdělení antibiotik.....	18
3.2.3.1 Mechanismy působení účinku antibiotik.....	18
3.3 Bifidobakterie & antibiotika	20
3.3.1 Laboratorní testování antibiotické rezistence bifidobakterií	20
3.3.2 Rezistom bifidobakterií	22
3.4 Antibiotikum metronidazol.....	24
3.4.1 Nitroimidazolová léčiva.....	24
3.4.2 Chemická struktura metronidazolu.....	25
3.4.3 Farmakokinetické vlastnosti	25
3.4.4 Princip účinku.....	25
3.4.5 Použití metronidazolu	27
3.4.6 Rezistence k metronidazolu	28
4 Metodika	31
4.1 Příprava kultivačních médií.....	31
4.1.1 Médium WSP-Wilkins-Chalgren agar.....	31
4.1.2 Wilkins-Chalgren médium (bujón).....	32
4.1.3 LSM agar	32
4.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace metronidazolu pro bifidobakterie...	33
4.2.1 Původ bakteriálních kultur.....	33
4.2.2 Příprava bifidobakteriálních kultur k testování	33
4.2.3 Ověření identity pomocí MALDI TOF MS.....	33
4.2.4 Kontrola čistoty a morfologie.....	33
4.2.5 Stanovení MIC pomocí e-testu	34

4.3	<i>In vitro</i> kultivace vzorků stolice s metronidazolem a následným testování citlivosti izolovaných bifidobakterií k danému antibiotiku.....	34
4.3.1	Příprava vzorků.....	34
4.3.2	Příprava agaru ke kultivaci	35
4.3.3	Rozbor.....	35
4.3.4	Kontrola čistoty a morfologie.....	37
4.3.5	Ověření rodové a druhové identity	37
4.3.6	Zkoumání antibiotické rezistence	37
4.3.7	Detekce genu pro rezistenci 5-nitroimidazolu pomocí PCR	37
5	Výsledky	39
5.1	Testování antibiotické rezistence typových a sbírkových kmenů.....	39
5.1.1	Testování rezistence diskovou metodou	39
5.1.2	Testování MIC pomocí e-testu	39
5.2	Ověření výsledků u lidských divokých izolátů	41
5.3	Testování <i>in vitro</i> kultivace fekálních vzorků.....	43
5.4	Vliv přítomnosti genu pro rezistenci 5-nitroimidazolu na citlivost/rezistenci detekovanou <i>in vitro</i>	45
6	Diskuze	46
7	Závěr	49
8	Literatura.....	50
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	62
10	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

V poslední době se velmi často setkáváme s rezistencí bakterií k antibiotikům. Tento problém je zapříčiněn nadužíváním antimikrobiálních látek, nesprávným dávkováním a špatně zvoleným antibiotikem vůči danému patogenu. Rezistence je velkou hrozbou v medicíně, neboť vede k nedostačující terapeutické léčbě, která následně zvyšuje morbiditu pacientů. Tato diplomová práce se zabývá rezistencí bifidobakterií k antibiotiku metronidazol. Toto antibiotikum se používá proti anaerobním bakteriím. Citliví jsou na něj především G- bakterie jako např. *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Helicobacter pylori*. Metronidazol je aplikován u infekcí gastrointestinálního traktu nebo infekcí, které v něm vznikají. Indikuje se po operačních zákrocích v oblasti břicha a pánve, při septických onemocněních. Dále se předepisuje při anaerobních infekcích měkkých tkání, průjmech a pseudomembranózní kolitidě způsobené *Clostridium difficile*. Metronidazol je důležitým lékem při antibiotické terapii Crohnovy choroby. Při konzervativní léčbě u pacientů, kteří mají střevo postižené v kolonické a perianální oblasti, se používá jako medikament první volby. Samozřejmě dlouhodobé užívání antibiotika vede k nežádoucím účinkům jako je například diskomfort v břišní oblasti v důsledku mikrobiální dysbiózy. Tento problém by byl možný vyřešit vhodným probiotickým preparátem, který by zajišťoval příhodné osídlení střevní mikrobioty a zabraňoval by nepříjemným pocitům v oblasti břicha. Dříve publikované výsledky naznačují možnou rezistenci bifidobakterií vůči metronidazolu, které by bylo možné využít. Vybrané druhy/ kmeny bifidobakterií by mohly být užívány společně s antibiotikem jako podpůrný preparát – probiotikum. K tomu je však potřeba pochopit princip této rezistence.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

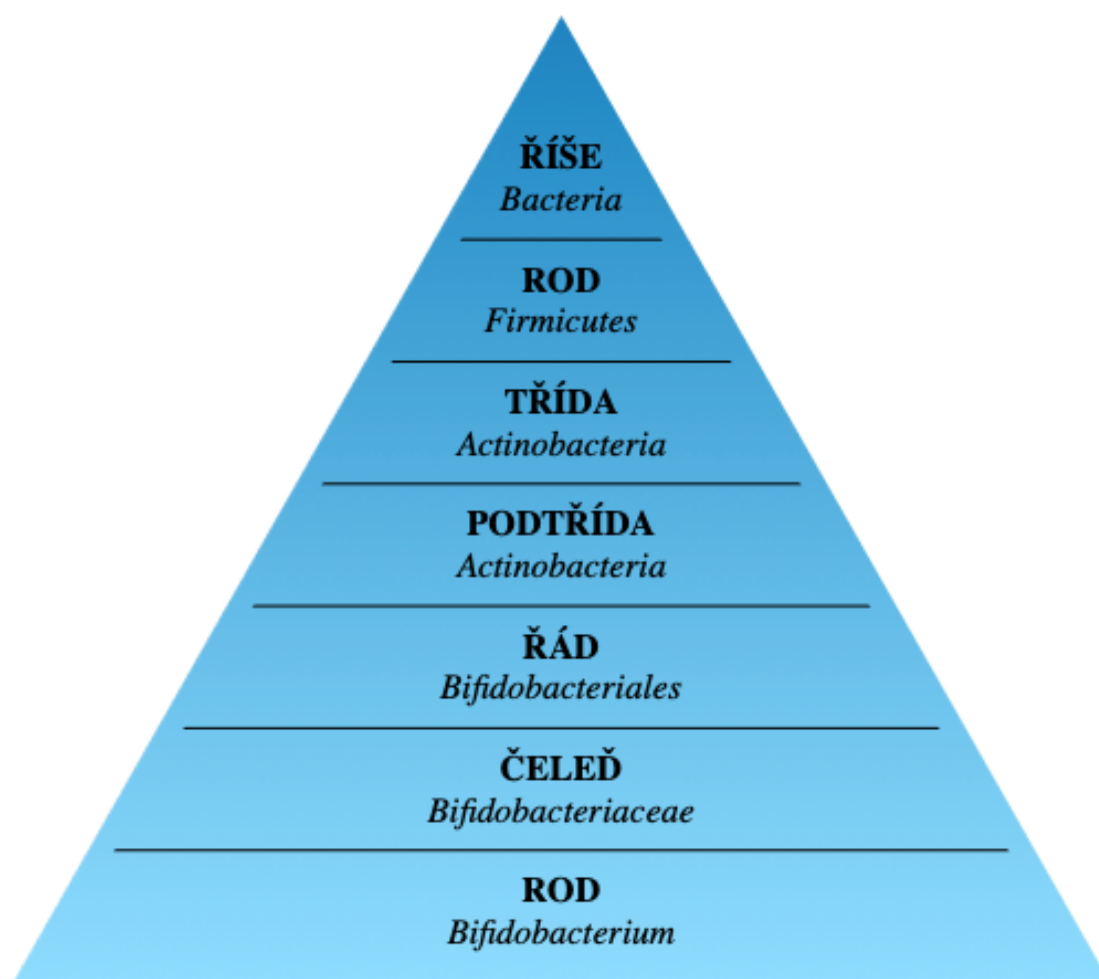
Předpokládáme, že vybrané druhy a kmeny bifidobakterií budou mít ve svém genomu přítomný gen pro rezistenci na 5-nitroimidazolová antibiotika, který může být zodpovědný za laboratorně detekovanou rezistenci. Nicméně, očekáváme také kmeny bifidobakterií, kde tento gen detekován nebude a bude se jednat o rezistenci vzniklou mutací.

Cílem práce je přinést nové experimentální poznatky k problematice rezistence bifidobakterií k metronidazolu. Prakticky bude práce zaměřena na testování bifidobakterií na citlivost vůči metronidazolu včetně stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Výsledky získané pomocí kultivačních technik budou porovnány s metodou polymerázové řetězové reakce (PCR), kdy budou vybrané rezistentní kmeny testovány na přítomnost genu rezistence k 5-nitroimidazolovým antibiotikům detekovaného v genomu některých bifidobakterií.

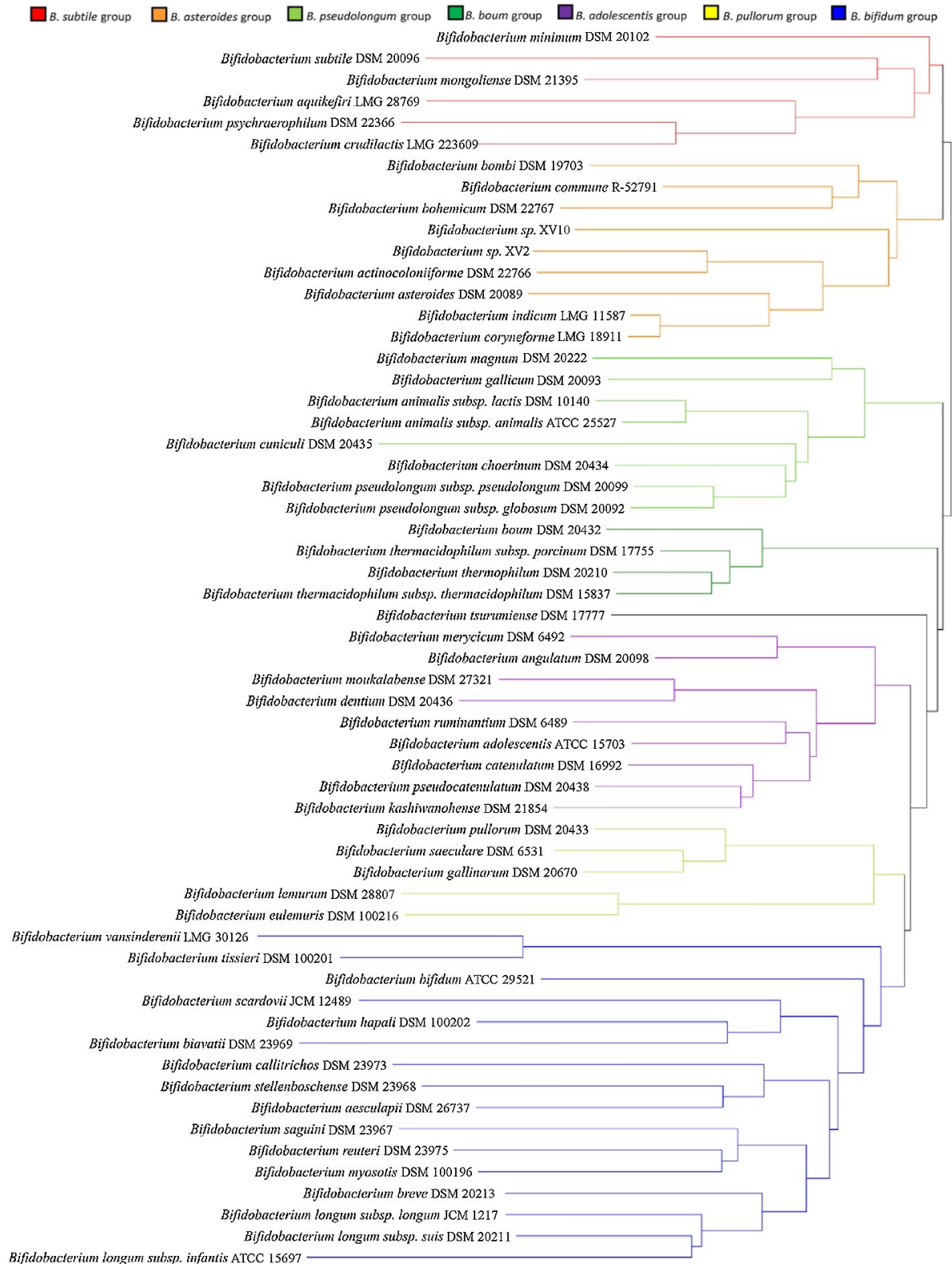
3 Literární rešerše

3.1 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou komenzální skupinou bakterií hrající významnou roli ve střevní mikrobiotě. Pro jejich pozitivní vliv na hostitele jsou řazeny mezi probiotické bakterie. Ve fylogenetickém stromu bakterií je rod *Bifidobacterium* řazen do skupiny grampozitivních anaerobních bakterií. Náleží do třídy *Actinobacteria*, jež je jednou z nejpočetnějších taxonomických jednotek. Taxonomické zařazení viz Obrázek č.1. Všechny druhy patřící do rodu *Bifidobacterium* byly identifikovány na základě analýzy genů pro 16S rRNA a 23S rRNA, díky níž byla vylepšena taxonomie a vytvořena nezávislá fylogenetická větev (Ventura et al. 2014; Alberoni et al. 2019). Na obrázku č. 2 je zobrazen fylogenetický strom založen na pangenomu. Uvedený strom zahrnuje druhy dostupné v čase publikace citovaného výstupu Alberoni et al. 2019).



Obrázek 1: Taxonomické zařazení rodu *Bifidobacterium*
(upraveno podle Ventury et al. 2014)



Obrázek 3: Fylogenetický strom založený na pan-genomové analýze (Alberoni et al. 2019)

3.1.1 Historie

Bakterie rodu *Bifidobacterium* byly poprvé objeveny Henri Tissieren, který je roku 1899 izoloval ze stolice kojenců a pojmenoval je *Bacillus bifidus*. Charakterizoval je jako bakterie s podivným tvarem písmene Y, které jsou anaerobní, gram pozitivní a nevytváří žádný plyn během růstu. V roce 1917 byly zařazeny do čeledi *Lactobacillaceae* a o tři roky později je Holland pojmenoval jako *Lactobacillus bifidus*. Přestože Orla-Jensen roku 1947 uznal existenci rodu *Bifidobacterium* jako samostatný taxon, byly tyto bakterie chybně, kvůli své podobnosti s rodem *Lactobacillus*, zaměňovány po dalších 30 let. V roce 1957 si Denhart všiml existence rozmanitých biotopů bifidobakterií a navrhl schéma pro jejich diferenciaci na základě struktury sacharidové fermentace. Reuter roku 1963 rozpoznal a pojmenoval sedm známých druhů *Bifidobacterium*, včetně prvně popsáno *Bifidobacterium bifidum*. V roce 1965 byla díky Scardovii a Trovatelli objevena charakteristická metabolická dráha bifidobakterií, kde hlavním enzymem je fruktóza-6-fosfát fosfoketoláza. Až v 8. vydání Bergey's manual of determinative bacteriology roku 1974 byl uveden samostatný rod *Bifidobacterium* s 8 druhy. Po zavedení elektroforézy rozpustných buněčných proteinů na polyakrylamidovém gelu bylo objeveno a popsáno dalších 24 druhů. Prostřednictvím 16S rRNA analýzy byla navržena nová hierarchická struktura shromažďující rod *Bifidobacterium* s rodem *Gardnerella* do jediné čeledi *Bifidobacteriaceae* (Biavati et al. 2000). V současnosti rod *Bifidobacterium* zahrnuje okolo 100 druhů a poddruhů (<https://www.bacterio.net/genus/bifidobacterium>) a předpokládá se, že toto číslo poroste.

V roce 2020 byly vyizolovány kmeny *Bifidobacterium*, ze Lvíčka tamarského a Tamarína skákavého, *Bifidobacterium cebidarum* sp. nov. a *Bifidobacterium leontopithecii* sp. nov. (Duranti et al. 2020). Dále byl na ČZU v Praze objeven a popsán nový druh bifidobakterií u štěněte Německého ovčáka pojmenovaný *Bifidobacterium canis* (Neuzil-Bunesova et al. 2020). V Číně v roce 2021 Chen J. a kolektiv objevili nové druhy *Bifidobacterium* u včel. Jednalo se o *Bifidobacterium apousia* sp. nov., *Bifidobacterium choladohabitans* sp. nov., *Bifidobacterium polysaccharolyticum* (Chen et al. 2021). V současnosti se bifidobakterie a jejich taxonomie posuzují především na základě genomických analýz. Příklad takovéto klasifikace je uveden v Obrázku č. 2 (Alberoni et al. 2019).

3.1.2 Morfologie

Zástupci rodu *Bifidobacterium* tvoří spory, jsou grampozitivní, acidotolerantní, nepohyblivé mikroorganismy. Většina zástupců tohoto rodu nevykazuje katalázovou aktivitu a neredukuje nitráty. Obvykle mají pleomorfní tvar buněk. Tělo bakterií je tvořeno od krátkých pravidelných štíhlých tyčinek, kokoidních pravidelných tvarů, až po dlouhé tyčky s různým typem zakončení. Jejich tvar se mění v závislosti na druhu bakterie a živné půdě, na které jsou kultivované (Scardovi 1986). Kolonie vytvořené na agarových plotnách jsou rovné, konvexní, krémové nebo bílé, lesklé, hladké, upravené, lepkavé a měkké. Na agarových plotnách se kolonie bifidobakterií růstem velmi podobají bakteriím mléčného kvašení (zejména laktobacilům) (Görner 2004).

Buněčná stěna bifidobakterií má typickou grampozitivní strukturu tvořenou silným 90% peptidoglykanovým obalem složeným z polysacharidů, proteinů, kyseliny teichoové a lipoteichové.

Aminokyselinové složení základních tetrapeptidů mureinu se liší mezi druhy nebo kmeny stejného druhu, díky čemuž je umožněna diferenciaci (Lauer & Kandler 1983; Tamime et al. 1995). Obvykle L-alanine, kyselina D-glutamová, L-ornitin a D-alanin tvoří tetrapeptidy, ovšem v některých kmenech může být ornithin nahrazen lysinem. Rozsah zkřížení vazby mezi sousedními tetrapeptidy, tj. spojením mezi jednou nebo více aminokyselinami může pomoci k dalšímu rozlišení mezi kmeny (Nagaoka et al. 1995, 1996).

Hlavními složkami polysacharidů v buněčné stěně jsou zejména glukóza, galaktóza a ramnóza. Na základě kvalitativní a kvantitativní analýzy můžeme rozeznat od sebe navzájem druhy i kmeny (Nagaoka et al. 1995, 1996).

Lipoteichoové kyseliny tvoří vazby s polysacharidovými řetězci, díky nimž může dojít k adhezi buněk na stěnu střeva. Několik druhů bifidobakterií obsahuje lipoglykany různých struktur, substituované L-alaninem místo obvyklého D-izomeru (Iwasaki et al. 1990). Imunologické studie prokázaly, že lipoteichoové kyseliny jsou běžným antigenem rodu *Bifidobacterium*, které navíc spolu s proteiny tvoří hydrofobní charakter povrchu (Op Den Camp et al. 1985).

Bifidobakterie jsou charakterizovány jako nepatogenní. Výjimkou jsou bifidobakterie vyzolované ze zubního kazu, na jehož vzniku se podílejí. Zubní kaz je způsoben interakcí mezi acidogenními bakteriemi a uhlohydrátovým substrátem, kterým je často sacharóza. Je známo málo faktorů, které ovlivňují kolonizaci chrupu mikroorganismem *B. dentium*. Výskyt na zubním povrchu bez kazu je velmi nízký, avšak hojně se vyskytuje v hlubokých lézích. To by mohlo být zapříčiněné tím, že výskytem *Streptococcus mutant* a jiných druhů v poškozeném zubu dochází k usnadnění připojení a proliferaci *B. dentium*. Tento druh špatně kolonizuje dentální tvrdé povrchy. Proto může být *B. dentium* považováno za velmi specifický „pozdní marker“ progresu kazu (Henne et al. 2015).

3.1.3 Fyziologie

Bifidobakterie patří mezi mezofilní bakterie, pro něž je optimální teplota k růstu mezi 20-40 °C. U lidských druhů je teplota růstu kolem 36-38 °C, u zvířecích druhů je teplota vyšší kolem 41-43 °C (Gavini et al. 1991). Jedinou výjimkou je *Bifidobacterium thermacidophilum* schopný růstu za mírně termofilních podmínek 49,5 °C (Dong et al. 2000). Na molekulární úrovni bylo zjištěno, že bifidobakterie a mnoho dalších bakterií mají funkční gen *dnaK*, který má funkci ochrany proti četným nepříznivým podmínkám včetně tepelného šoku a osmotického stresu (Schmidt & Zink 2000). Bylo zjištěno, že exprese tohoto genu se zvyšuje po expozici žlučových solí v bifidobakteriích (Vernazza et al. 2006).

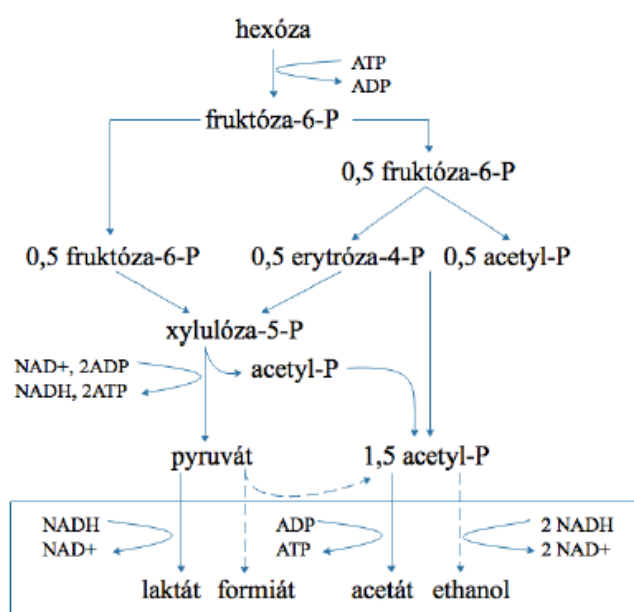
Optimální pH je mezi 6,5 a 7,0. Žádný růst není zaznamenán při pH nižším než 4,5 (pouze *B. thermacidophilum* má zpomalený růst při pH 4) a vyšším než 8,5 (Bottacini et al. 2014). V případě, kdy prostředí dosahuje nižších hodnot včetně 4,1 pH při teplotě 4 °C dochází k vyhynutí většiny druhů těchto bifidobakterií již do jednoho týdne. Téměř pro všechny druhy dokonce stačí méně než tři hodiny při kyselosti pod 2,5 pH, aby došlo k jejich usmrcení (Fuquay et al. 2011).

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou řazeny mezi striktní anaeroby, ačkoli existují i výjimky. Některé druhy mohou kyslík tolerovat a jiné ho tolerují pouze v přítomnosti oxidu

uhličitého či v přítomnosti redukčních činidel v kapalných médiích (Kheadr et al. 2007). Většina kmenů nemůže růst v 90 % vzduchu a 10 % CO₂ (Xuedong & Yuging. 2015).

3.1.4 Metabolismus

Zástupci rodu *Bifidobacterium* fermentují hexózy v unikátní metabolické dráze označované jako fruktózo-6-fosfátová dráha, ve které je klíčovým enzymem fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza (F-6-PPK). Již v roce 1967 vědci de Vries a Stouthamer prokázali přítomnost enzymu F-6-PPK u bifidobakterií, ale také absenci dvou dalších enzymů, aldolázy a glukóza-6-fosfát dehydrogenázy, které se nacházejí u laktobacilů. U bifidobakterií byly popsány 2 typy tohoto enzymu: fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza, charakteristická pro druhy vyskytující se u člověka a xylulózo-5-fosfát/fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza, charakteristická pro druhy vyskytující se u zvířat. Enzym F-6-PPK je pro rod *Bifidobacterium* a čeleď *Bifidobacteriaceae*



Obrázek 4: Fruktóza-6-fosfátová dráha (upraveno podle Amarettiho et al. 2007)

typickým a je důležitým znakem při jeho identifikaci. U ostatních rodů grampozitivních bakterií, jako jsou například *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Propionibacterium* nebo čeleď *Actinomycetaceae*, se kterými by mohly být zaměněny, není tento enzym přítomen. Enzym štěpí hexózový fosfát na erytrózu-4-fosfát a acetylfosfát (Fuquay et al. 2011). Z fosfátů tetrózy a hexózy postupným působením transaldelázy a transketolázy, se tvoří pentózové fosfáty, které obvyklým 2. - 3. štěpením získávají kyselinu mléčnou a kyselinu octovou v teoretickém konečném poměru 1,0: 1,5. Kyselina mléčná a octová okyselují tlusté střevo a omezují hnilobu a potenciálně patogenní bakterie. Dalšími vedlejšími produkty mohou být kyselina mravenčí, etanol a kyselina jantarová, jejichž produkce může změnit rovnováhu kvašení, tedy poměr kyseliny mléčné a kyseliny octové. Různé druhy produkují za stejných podmínek různá množství octanu, laktátu a etanolu (Biavati et al. 2000). Kyselina mravenčí a etanol jsou spolu s malým množstvím kyseliny octové vytvářeny při degradaci pyruvátu. Kyselina jantarová vzniká při fixaci CO₂ bakteriemi (Meulen et al. 2006). Oxid uhličitý se touto dráhou nevytváří, vzniká však při degradaci glukonátu (Ventura et al. 2004).

3.1.5 Bifidobakterie jako probiotika

Probiotika jsou definována jako „živé mikroorganismy, které, když jsou podávány v adekvátním množství, prospívají hostiteli“ (Hill et al. 2014). Nejčastěji se používají rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Tyto mikroorganismy byly specificky vybrány tak, aby nepřispívali k šíření antibiotické rezistence, která se může přenášet z živočicha na živočicha. Do jaké míry probiotika přímo zabraňují přenosu antibiotické rezistence, se stále zkoumá. Bylo prokázáno, že antibiotika a probiotika užívaná společně snižují závažnost, trvání a výskyt průjmu souvisejícího s antibiotiky (Ouweland et al. 2016).

Funkční vlastnosti bifidobakterií přispívají přímo nebo nepřímo k několika zdravotním výhodám, jako je například ochrana před patogenními mikroby, hypertenzí, záněty, cukrovkou, oxidačním stresem atd. Tyto mikroby zahrnují také modulaci mikrobiomu, imunitní modulaci a anti-cholesterolemickou aktivitu (Novik & Savich 2020).

Probiotika jsou široce zkoumána z hlediska jejich role v ose střeva-mozek při řešení psychologických poruch. Střevní mikrobiota je s mozkem propojena obousměrnou komunikační sítí. Zahrnuje imunitní cestu, endokrinní cestu a nervovou cestu, která je zprostředkována především bloudivým nervem. Tento nerv přenáší dostředivé i odstředivé signály mezi mozkem a střevem. Střevní bakterie ovlivňují mozek pomocí jejich metabolitů, které se dostávají do krve, kde působí na bloudivý nerv a posléze na funkci mozku. Vzájemný vliv osy střeva-mozek může být v obou směrech velice významný (Cryan & Dinan 2012). Bylo zjištěno, že jedinci s depresí mají obecně nižší počet bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* oproti kontrolním osobám bez deprese (Aizawa et al. 2016). Z tohoto zjištění lze předpokládat, že vhodnou modulací střevního osídlení lze podporovat léčbu psychických onemocnění. Preparáty, které mají za úkol pozitivně ovlivňovat psychiku změnou složení mikrobioty, se označují jako psychobiotika. Tyto produkty často obsahují probiotika i prebiotika. Psychobiotika produkují neuroaktivní látky, které mají schopnost ovlivňovat funkci mozku. Snižují příznaky deprese, úzkosti a celkově napomáhají ke zlepšení nálady (Sarkar et al. 2020). Bakterie rodu *Bifidobacterium* můžou ovlivňovat fungování mozku a centrálního nervového systému, což vede ke změnám v chování u lidí i zvířat. Kyselina gama aminomáselná (GABA) je hlavní inhibiční neurotransmitter hrající klíčovou roli v úzkostných a depresivních poruchách u savců, který je produkován bifidobakteriálními kmeny. Mezi různými kmeny bifidobakterií představuje *Bifidobacterium adolescentis* modelového producenta GABA v lidském gastrointestinálním traktu. V *in vivo* studii na krysách, vedené Duranti a spol. v roce 2020, byla potvrzena schopnost probiotických mikroorganismů: *B. adolescentis* PRL2019 a *B. adolescentis* HD17T2H produkovat GABA. Podobných výsledků bylo dosaženo díky *B. adolescentis* 150, který je také účinným producentem GABA. Při testu na myších BALB/c, které musely nuceně plavat, dokázal zklidnit chování podobné depresi (Yunes et al. 2020). V myším modelu *B. adolescentis* vykazoval anxiolytické a antidepresivní účinky, které souvisely se snížením zánětlivých cytokinů a obnovením rovnováhy střevní mikrobioty (Guo et al. 2019).

U *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* bylo prokázáno, že zlepšuje centrální adipozitu u dospělých s jednoduchou obezitou. U dětí trpících Prader-Williho syndromem, vzácnou genetickou poruchou, spotřeba probiotik snížila adipozitu břicha a zlepšila koncentraci inzulínu

nalačno spolu s mírným zlepšením některých symptomů týkajících se duševního zdraví (Amat-Bou et al. 2020).

Většina kmenů *Bifidobacterium* je schopna biosyntézy vitaminů, jako je: thiamin (B1), pyridoxin (B6), kyselina listová (B11) a nikotinová kyselina (niacin, B3). Některé kmeny navíc disponují genem pro vytvoření vitamínu B2 tzv. riboflavinu (Ventura et al. 2009). Schopnost produkce určitých vitamínů pomocí bifidobakterií vědce přiměla ke zkoumání možného probiotického znaku. 76 kmenů rodu *Bifidobacterium*, patřících do 9 různých druhů, bylo testováno na produkci folátu a schopnost poskytovat proliferující kolonocyty s kyselinou listovou. Dle studie, požití identifikovaných bifidobakteriálních kmenů produkujících folát by mohlo být použito k prevenci nebo potlačení lokalizovaného deficitu folátu, které je spojeno s premaligními změnami v epitelu tlustého střeva (Pompei et al. 2007).

Ve srovnání s bakteriemi mléčného kvašení bifidobakterie přednostně produkují L formu kyseliny mléčné, která je snadněji metabolizována lidmi a může být důležitá v případech kojenců nebo lidí s metabolickou acidózou. Potravinové produkty obsahující bifidobakterie mohou také zlepšit biologickou dostupnost minerálů usnadněním jejich ionizace (McCartney 2003). Nejběžněji vyskytující se druhy *Bifidobacterium* kolonizující lidské střeva jsou *B. animalis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* a *B. longum*. Tyto druhy se taktéž nejčastěji používají v probiotických preparátech (O'Callaghan & van Sinderen 2016).

3.2 Antibiotika obecně

Jako antibiotika jsou definovány nízkomolekulární látky, které jsou přirozeného nebo umělého původu. Používají se k léčbě infekcí způsobené mikroorganismy. V humánní medicíně se antibiotika začala používat od čtyřicátých let 20. století, kdy započala průmyslová výroba penicilinu pomocí *Penicillium chrysogenum* (Beneš 2018). Antibiotika se stala nejvýznamnější třídou léčiv. V boji proti bakteriím a zachránila miliony životů (Cunha et al. 2019).

Světová zdravotnická organizace (WHO, World Health Organization) v rámci anatomicko-terapeuticko-chemické klasifikace ve skupině „antibakteriální léčiva pro systémovou aplikaci“ registruje přes 250 chemických substancí využitelných v humánní a veterinární medicíně. Antibiotika se podávají nejenom k přímé léčbě, ale i profylakticky v souvislosti s chirurgickými výkony (Fryčák 2020).

Většina antibiotik, která se v současné době používá v medicíně, je přirozenou sekrecí environmentálních bakterií nebo hub. Přibližně jedna polovina pochází z rodu *Streptomyces* (Durand et al. 2019). Ve svém přirozeném prostředí musí mikroorganismy proti sobě bojovat produkcí antimikrobiálních látek a musí vyvinout mechanismy odolnosti vůči jiným podobným látkám (Raoult 2016). Kromě toho druhy přirozeně produkující antibiotika mají také geny rezistence na tyto látky, aby se zabránilo vlastní toxicitě, umístěné v biosyntetickém antibiotickém operonu (Davies 1994).

3.2.1 Charakteristika antibiotik

Antibiotika jsou organické látky řadící se do skupiny antiinfektiv. Jedná se o léky působící proti patogenním mikroorganismům. Antiinfektiva se vyznačují selektivním účinkem proti daným organismům. Inhibují růst, množení a vývoj patogenů, avšak hostitelský

organismus nebývá těmito prostředky poškozen. Díky selektivním účinkům se mohou užívat k vnitřní léčbě (Beneš 2018). Tabulka číslo 1 obsahuje třídy antiinfektiv.

Tabulka 1: Třídy antiinfektiv (Beneš, 2018)

Název skupiny léků	Cílový organismus
antivirotika	viry
antibiotika	bakterie
antimykotika	houby
antiprotozoika	prvoci
antihelmintika	červi

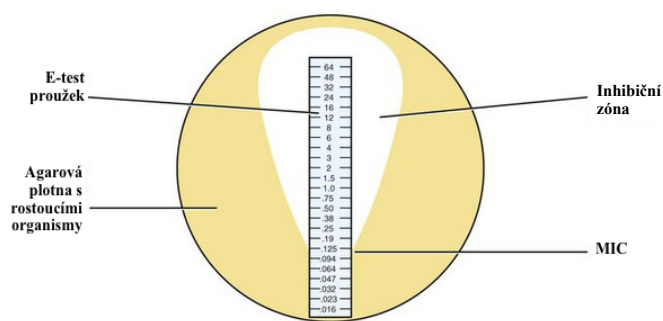
3.2.2 Parametry vyjadřující účinnost antibiotik

V závislosti na koncentraci podaného léku existují 3 kategorie antibakteriálního účinku:

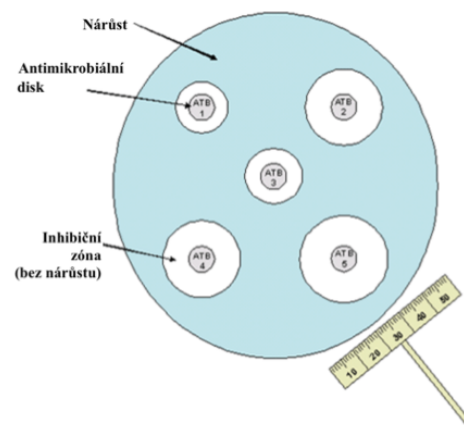
- Subinhibiční – poškozuje bakterie v malé míře – omezení vitality, poškození mikroorganismy mohou kompenzovat. Dochází ke vzniku rezistentních kmenů.
- Bakteriostatický – inhibuje růst a množení bakterií, reversibilní děj.
- Baktericidní – usmrcuje bakterie, ireversibilní děj.

Působení antibiotik je charakterizováno těmito parametry:

- MAC** (minimální antibakteriální koncentrace) – jedná se o nejnižší koncentraci antibiotika, která dokáže způsobit změny morfologie nebo chování bakterií. Jedná se o teoretický význam, neboť v praxi je složité jej stanovit a těžce se standardizuje.
- MIC** (minimální inhibiční koncentrace) – jedná se o nejnižší koncentraci, při které dochází k zabránění růstu bakteriální populace. Tato hodnota se nejčastěji využívá jako ukazatel účinnosti antibiotik. V praxi se například měří velikost inhibiční zóny na diskové difúzní metodě nebo se odečítá stupnice při používání E–testu.



Obrázek 5: mikrobiologický E-test
(<https://basicmedicalkey.com/principles-of-antimicrobial-chemotherapy/>)



Obrázek 6: Disková difúzní metoda
(<https://germguy.files.wordpress.com/2017/02/zone-inhibition.gif>)

- MBC** (minimální baktericidní koncentrace) – jedná se o nejnižší koncentraci, která je schopna za standardních podmínek během 24 hodin usmrtit 99,9 % bakterií. Vyšetření této hodnoty je namáhavé nýbrž je potřeba dvojí kultivace (Beneš 2018).

3.2.3 Rozdělení antibiotik

Existuje celá řada antimikrobiálních látek působící specificky na určitý mikroorganismus, za jistých podmínek. Proto máme rozsáhlé dělení. Antibiotika se mohou rozdělovat dle typu účinku viz kapitola **Parametry vyjadřující účinnost antibiotik**. Dále dle spektra účinnosti – úzké spektrum účinnosti (známe původce onemocnění), střední spektrum účinnosti, širokospektrální (neznáme původce onemocnění). Jako další rozdělení se používá místo a mechanismus působení antibiotik a v neposlední řadě chemická struktura (Simon & Stille 1998).

3.2.3.1 Mechanismy působení účinku antibiotik

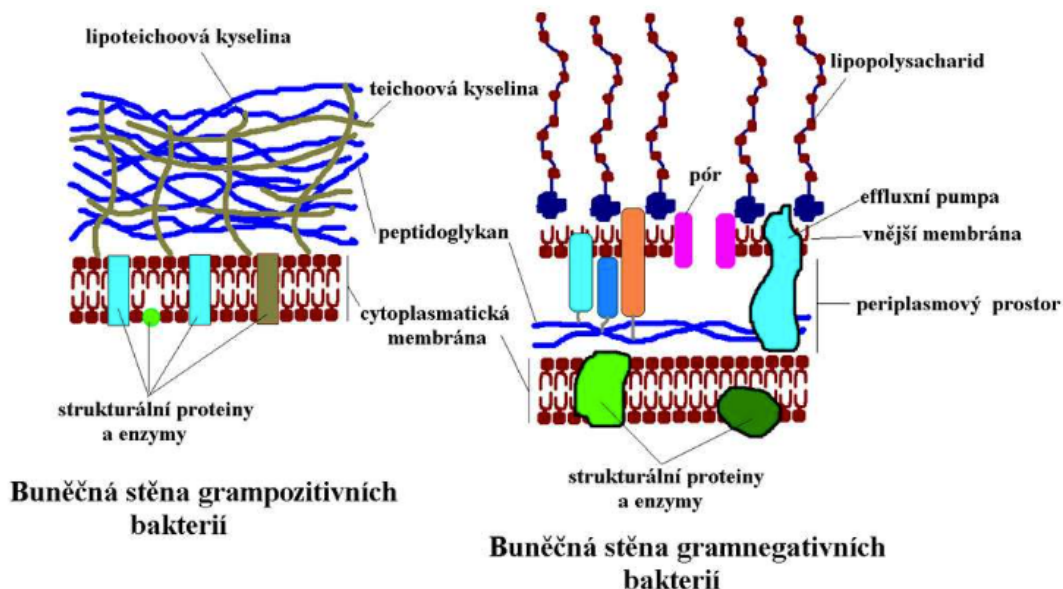
a) Inhibice syntézy nukleových kyselin

Mezi nejběžnější nukleové kyseliny patří ribonukleová kyselina (RNA) a deoxyribonukleová kyselina (DNA). RNA zahajuje proces syntézy bílkovin a zajišťuje tak buněčný růst. DNA má nejhlavnější funkci v podobě uložení genetické informace. V bakteriální buňce je genetický materiál tvořen jedním chromozomem, který je složen z cyklické molekuly DNA (Lüllmann 2007).

Určitá antibiotika poškozují syntézu nukleových kyselin a tím zabraňují i buněčnému dělení. Důsledkem je bakteriostatický či baktericidní účinek látky. Vzhledem k podobnosti mechanismus syntézy DNA u živočichů i bakterií je podobný, míra toxicity antibakteriálních látek je poměrně nebezpečná. Mezi nejpočetnější skupiny antimikrobiálních látek jakožto inhibitory syntézy nukleových kyselin patří chinolony (kyselina nalixidová, ciprofloxacin). Chinolony působí na enzymy, které slouží k syntéze DNA. Další skupinou jsou nitroimidazoly (metronidazol, ornidazol). Tyto látky poškozují bakteriální DNA. Bakterie, které mají dostatečně nízký redoxní potenciál jsou ideální k redukcí nitroimidazolů na toxické složky. Vzniklé toxiny se následovně připojí na DNA a poškodí ji. Vhodné prostředí pro tuto přeměnu se nachází u anaerobních bakterií. Pro ně je poté účinek antibiotik baktericidní (Votava 2005).

b) Inhibice buněčné stěny

Buněčná stěna bakterií je tvořena peptidoglykany. Buněčná stěna gramnegativních bakterií (*Helicobacter*, *Salmonella*, *Enterobacter*) obsahuje pouze tenkou vrstvou peptidoglykanu o tloušťce 3-6 nm a lipopolysacharidy a lipoproteiny. Oproti tomu buněčnou stěnu grampozitivních bakterií (*Bifidobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*) tvoří vícevrstevný peptidoglykan silný 10-100 nm, kyselina teichoová a další sekundární metabolity (Egan et al. 2017; Mistou et al. 2016). Viz obrázek č.6. Výsledkem interakce těchto složek vzniká propletená síť, která zajišťuje bakterii ochranu, odolnost vůči buněčnému turgoru a udává buňce tvar (Mistou et al. 2016).



Obrázek 7: Popis struktury buněčné stěny u grampozitivních a gramnegativních bakterií (<https://adoc.pub/obecna-mikrobiologie-bakterie-viry-paraziti-houby.html>)

Vzhledem k významnosti peptidoglykanu v buněčné stěně bakterií, jsou enzymy sloužící k jeho syntéze ideálním cílem antibiotik. Výhodou antibiotik jejichž cílem je buněčná stěna je fakt, že živočišné eukaryotické buňky tuto stěnu nemají. Díky tomu mají antimikrobiální látky, určené proti syntéze buněčné stěny, selektivní účinek a nízkou toxicitu pro živočichy. Inhibitory syntézy buněčné stěny jsou tak jednou z neúčinnějších a nejrozsáhlejších tříd (Sarkar et al. 2017). Při zásahu do syntézy buněčné stěny bakteriální buňka ztrácí podstatnou část své mechanické odolnosti, dochází ke změně tvaru a velikosti buňky, k zastavení dělení a následné lýzi buňky (Kohanski et al. 2010). Jako inhibitory syntézy buněčné stěny se používá nejobsáhlejší a nejpoužívanější skupina antibiotik β -laktamy. Tato skupina zahrnuje například třídu penicilin, cefalosporiny, karbapenemy (Beneš 2018).

c) Inhibice cytoplazmatické membrány

Cytoplazmatická membrána na rozdíl od buněčné stěny má podobné složení, jak u gramnegativních, tak i grampozitivních bakterií. Jedná se o semipermeabilní membránu složenou z dvojvrstvy fosfolipidů a proteinů. Tato membrána slouží jako bariéra a tvoří vnitřní prostředí buňky. Díky membránovým proteinům je schopna zajišťovat transfer látek (voda, ionty, živiny). Mezi přenášené látky patří například aminokyseliny (puriny, pyrimidiny apod.). Tyto dusíkaté sloučeniny slouží k syntéze DNA a syntéze buněčné stěny. Dále může buňka pomocí cytoplazmatické membrány přijímat signály z vnějšího prostředí a tvořit enzymatickou aktivitu. U grampozitivních bakterií je ve vnějším listu cytoplazmatické membrány se navíc vyskytuje lipoteichoová kyselina, která dále prostupuje peptidoglykanovou vrstvou (Epanč & Epanč 2009).

Antimikrobiální látky cílí na rozrušení membrány začleněním antimikrobiálního peptidu. Tento peptid se může integrovat do vnější fosfolipidové vrstvy čímž dochází k narušení celistvosti membrány. Dále je schopen tvořit oligomery, které deformují a zodpovídají za rozpad membrány. Taktéž dochází k porušení membránového potenciálu buňky. Ve chvíli, kdy je narušená funkce cytoplazmatické membrány unikají z buňky důležité ionty a látky. Takto

poškozená buňka není schopna další existence. Antibiotika narušující cytoplazmatickou membránu jsou: polymyciny, antifungální polyeny či imidazolová antimykotika (Melo et al. 2009).

d) Inhibice proteosyntézy

Proteosyntéza je složitý mechanismus, zajišťující syntézu bílkovin. V bakteriální buňce se odehrává přímo v cytoplazmě. Syntéza probíhá na ribozomálních podjednotkách 30S a 50S, kde dochází k prodlužování peptidového řetězce a vzniku nových proteinů důležitých pro stavbu buněčné stěny. Tento proces má 2 kroky: transkripci (přepis) a translaci (překlad). Při transkripci dochází k přepisu informací z jednoho řetězce DNA do mRNA. V druhém kroku – translaci, se ze vzniklé mRNA na ribozomu vytvoří za pomoci tRNA primární struktura bílkovin (Durante-Mangoni 2009).

Inhibitory proteosyntézy zamezí vzájemné interakci tRNA a mRNA. To vede k inhibici elongace peptidů a následnému bakteriostatickému účinku. Mezi antibiotika působící na proteosyntézu patří tetracykliny, aminoglykosidy, makrolidy, linkosamidy a chloramfenikol (Marek 2011). Aminoglykosidy působí na 30S podjednotku ribozomu, brání prodlužování peptidového řetězce a tím dochází k nesprávnému čtení mRNA na ribozomu a celkovému zastavení syntézy bílkovin. Oproti tomu tetracykliny působí na 50S podjednotku. Místem účinku je transferáza, která spojuje aminokyseliny v peptidový řetězec (Finch & Garrod 2003).

3.3 Bifidobakterie & antibiotika

Bifidobakterie jsou kategorizovány jako zdraví prospěšné mikroorganismy (probiotika) v gastrointestinálním traktu lidí a zvířat. Citlivost na antibiotika je klíčovým kritériem pro výběr vhodného probiotického preparátu. Někteří autoři tvrdí, že v případech současného podávání s antibiotiky k prevenci a léčbě střevních poruch by probiotika měla být odolná vůči určitým antibiotikům, aby přežila v gastrointestinálním traktu (Danielsen & Wind 2003). Tento názor je však kontroverzní. Probiotika mohou mít geny zodpovědné za rezistenci a tudíž mohou mít negativní důsledky pro lidské zdraví. Při vzájemném užívání antibiotik a probiotik by mohlo dojít k přenosu antibiotické rezistence (AR) z probiotik na jiné střevní mikroorganismy. Proto je důležité minimalizovat tuto možnost při vývoji probiotických produktů (Onyibe et al. 2013). Vzhledem k využívání bifidobakterií nejenom v probiotických preparátech, ale i v potravinářství se musí v průběhu let opakovat zkouška na AR (Kunová a další, 2012). EFSA (European Food Safety Authority) požaduje testování AR vůči osmi antibiotikům, které se používají v humánní a veterinární medicíně. Jsou to ampicilin, vankomycin, gentamicin, streptomycin, erytromycin, klindamycin, tetracyklin a chloramfenikol (EFSA 2012).

3.3.1 Laboratorní testování antibiotické rezistence bifidobakterií

Moubareck et al. v roce 2005 analyzovali citlivost 50 kmenů rodu *Bifidobacterium* izolovaných z různého původu vůči běžným skupinám antimikrobiálních látek. Všechny kmeny byly citlivé na obvyklá anti-grampozitivní antibiotika (erythromycin, telithromycin). Dále žádný z bifidobakteriálních kmenů nebyl odolný vůči klindamycinu nebo pristamycinu. U 26 % kmenů byla pozorována rezistence na cefotetan, což je antibiotikum spadající do kategorie β -laktamová antibiotika. Rezistence vůči β -laktamovým antimikrobiálním látkám se

může objevit řadou mechanismů, včetně produkce β -laktamázy, která hydrolyzuje antibiotikum (Quintiliani et al. 1999). Takový mechanismus rezistence nebyl v této studii pozorován, což naznačuje alternativní mechanismy rezistence vůči β -laktamům, jako je nepropustnost buněčné stěny nebo změna proteinů vázajících penicilin (Quintiliani et al. 1999). Ve studii Moubareck et al. (2005) byla pozorována ve vysoké míře (38 % testovaných bifidobakterií) rezistence k metronidazolu testováním pomocí diskové difúzní metody. Aktivita metronidazolu je způsobena přednostní redukcí mateřské sloučeniny bakteriálním ferredoxinovým systémem, čímž se vytváří meziprodukt zodpovědný za zlomy ve dvouvláknové DNA (Miller-Catchpole 1989). Některé kmeny bifidobakterií postrádají ferredoxinový systém odpovědný za redukcí mateřské sloučeniny a vykazují vysoké procento rezistence k metronidazolu (Behra-Miellet et al. 2003). Dle Moubareck et al. (2005) relativní rezistence na metronidazol může být prospěšná v případech současného podávání bifidobakterií s tímto antibiotikem, např. u průjmu souvisejícího s antibiotiky. Přežití bifidobakterií v tlustém střevě může být ovlivněno koncentrací antibiotika, které se dostane do distální části gastrointestinálního traktu. Protože se antibiotika vstřebávají hlavně v ileu, terapeutická dávka, která se dostane do tlustého střeva, může být nízká ve srovnání s počáteční dávkou. Dále testované kmeny byly odolné vůči aminoglykosidům. V tomto případě se jedná o přirozenou rezistenci. Odolnost vůči aminoglykosidům u anaerobních mikroorganismů je považována za přirozenou kvůli absenci cytochromem zprostředkovaného lékového transportního systému, který brání medikamentu dosáhnout svého cíle (Bryan et al. 1979; Bryan & Kwan 1981). Dále byla ve studii pozorována rezistence na kanamycin při množství 30 μg a na gentamicin při množství 15 μg . Za to při zvýšeném množství těchto antimikrobiálních látek a to 1000 μg kanamycinu a 500 μg gentamicinu byla 100 % citlivost na tato antibiotika. Tři kmeny *B. pseudocatenulatum*, dva *B. longum* a dva *B. bifidum* byly rezistentní na tetracyklin, s MIC rovnými buď 16 nebo 64 mg/l. Rezistence na tetracyklin byla ve všech případech spojena s rezistencí na minocyklin. Zbývající kmeny byly citlivé na tuto skupinu antibiotik. PCR provedené na sedmi kmenech rezistentních na tetracyklin odhalily pozitivní amplifikace s degenerovanými primery pro *B. bifidum* R2, *B. longum* B36 a *B. pseudocatenulatum* R47. Gen *tet* (W) byl detekován ve stejných kmenech *B. bifidum* a *B. pseudocatenulatum*, které poskytly pozitivní výsledky pro degenerovanou PCR.

V roce 2012 Kunová et al. testovali citlivost bifidobakterií na antimikrobiální látky. Zjistili, že všechny testované kmeny (*B. bifidum*, *B. longum* ssp. *longum*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. animalis* ssp. *lactis*) byly citlivé na ampicilin, vankomycin, erytromycin, klindamycin, quinupristin (dalfopristin), tetracyklin a chloramfenikol. Tato antibiotika se běžně používají v medicíně. Dále bylo potvrzeno, tak jako ve studii Moubarecka z roku 2005, že *Bifidobacterium* vykazují vysoký stupeň rezistence vůči aminoglykosidovým antibiotikům (streptomycin, gentamicin, kanamycin).

Nejhojnějšími genetickými determinanty odpovědnými za fenotypovou rezistenci na tetracyklin u bifidobakterií jsou geny *tet* kódující proteinovou ochranu ribozomů (Roberts 2005). Wang et al. (2017) zkoumali 92 bifidobakteriálních kmenů, pocházejících z lidského gastrointestinálního traktu, z nichž u 29 kmenů byla tetracyklinová rezistence zprostředkována genem *tet* (W), *tet* (O) nebo *tet* (S). Výsledky této práce naznačují, že geny rezistence na tetracyklin, které obsahují lidské střevní bifidobakterie, mohou být zpočátku přeneseny z patogenů a že každý druh genu rezistence na tetracyklin může mít tendenci se vkládat do

blízkosti specifických genů bifidobakterií. Tento fakt potvrzuje studie provedena Duranti et al. z roku 2017, která též testovala citlivost u 91 kmenů rodu *Bifidobacterium* na antibiotika. V této studii byla pozorována citlivost vůči streptomycinu a tetracyklinu na intraspecifické úrovni pro *B. bifidum*, *B. breve*, *B. animalis* a *B. adolescentis*. Tyto informace dle studie naznačují, že AR u bifidobakterií zřejmě neprobíhá vertikální cestou evoluce, ale mohla být získána horizontálním přenosem genů, podobným způsobem, jaký byl dříve pozorován u jiných střevních komenzálních mikroorganismů (Huddleston 2014).

Morovic et al. (2017) zkoumali AR na ampicilin, gentamicin, kanamycin, erytromycin, klindamycin, tetracyklin, chloramfenikol, streptomycin, vankomycin u *B. animalis* ssp. *lactis* BI-04 a Bi-07 dle postupů vydaných EFSA (2012). Zjistili, že *B. lactis* BI-04 vykazoval zvýšenou rezistenci vůči tetracyklinu. Kmeny *B. lactis* Bi-07 a BI-04 mají identickou strukturu lokusu, jak je popsáno v Gueimonde et al. (2010), kteří uvedli, že transposon *trp* a *tet* (*W*) byly společně transkripovány na genom *B. lactis*. *MiaA* gen, který ovlivňuje účinnost *tet* (*W*), je také identický mezi těmito dvěma kmeny (Milani et al. 2013). Ovšem rezistentní byl pouze kmen *B. lactis* BI-04. Vědci usoudili, že samotný gen *tet* (*W*) není zodpovědný za rezistenci, ale že další mutace napomáhají vzniku AR (Morovic et al. 2017).

3.3.2 Rezistom bifidobakterií

Nadměrné používání antibiotik může podpořit rozvoj AR u bakterií osídlující organismus a následně vyvolat selekci mikroorganismů odolným vůči antimikrobiálním látkám (Ouweland et al. 2016). V této souvislosti je kolektivní genetický arzenál zodpovědný za vznik AR, ke které dojde inaktivací a/nebo odstraněním antibiotik. Tyto geny kódující bakteriální rezistenci vůči antibiotikům se nazývají rezistom. Velká část rezistomu je obsažena v chromozomální DNA (Duranti et al. 2017). Výskyt *AR* genů může zvýšit ekologickou zdatnost bakterie a tím i její schopnost kolonizovat a přetrvávat ve specifickém prostředí (Wiedenbeck & Cohan 2011).

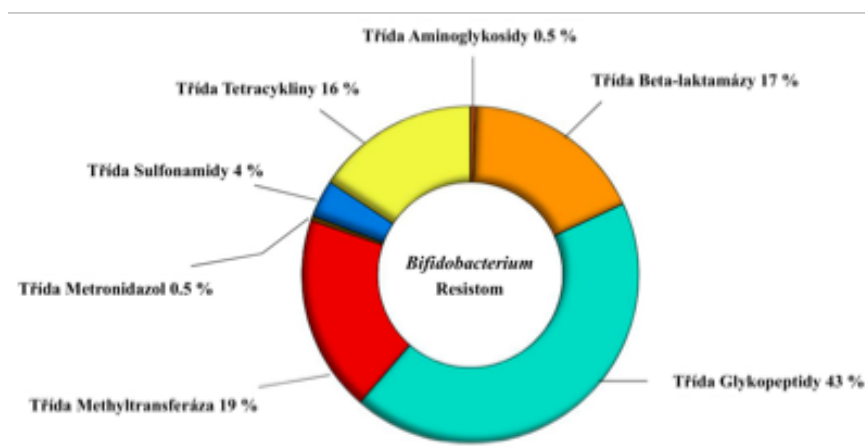
Již některé studie dokázaly častý výskyt horizontálního přenosu genů mezi bakteriemi sídlícími ve střevě lidí a zvířat (Brito et al. 2016; Hagbo et al. 2019). Příčinou přenosu AR genů na lidské či zvířecí patogeny nebo jiné mikroorganismy je přítomnost AR genů v mobilních genetických elementech, kterými disponují patogenní i nepatogenní mikroorganismy (Hagbo et al. 2019). Sbírkou mobilních genetických elementů se nazývá mobilom. Jedná se o genetické prvky, které se mohou pohybovat v rámci genomu a mezi různými genomy. Mobilom zahrnuje plazmidy, profágy či transposázy (Guglielmetti 2013).

Studie od Duranti et al. z roku 2016 identifikovala 208 genů AR umístěných v genomových oblastech, které byly údajně získány horizontálním přenosem genů, což představuje předpovězený horizontálně získaný bifidobakteriální rezistom. Tento horizontálně získaný bifidobakteriální rezistom představuje asi 27 % předpokládaného bifidobakteriálního rezistomu, bez ohledu na blízkost genů k transponovatelným prvkům. Celkově vzato tyto výsledky naznačují, že podstatná část identifikovaných bifidobakteriálních genů AR byla získána pomocí horizontálního přenosu genů. Dále bylo zjištěno, že bifidobakteriální mobilní gen AR, u kterého se předpokládá, že bude nesen na konjugativním transpozonu, je reprezentován genem *tet* (*W*), který se nalézá po boku mobilního elementu v genomech všech testovaných *B. animalis* ssp. *lactis*. Gen *tet W* je mezi různými druhy dobře upevněný, což by

mohlo vypovídat o horizontálním přenosu genů, které mohly přenést tento gen rezistence na tetracyklin do různých bifidobakteriálních kmenů.

V roce 2017 Duranti et al. dělali další genovou analýzu. V této studii bylo zjištěno, že mezi nejčastěji zastoupenými bifidobakteriálními geny AR v souborech metagenomických dat ze vzorků dospělých lidí patří rozsáhlý repertoár specifických genů kódujících AR. Jsou to ty, které specifikují β -laktamázy a udělují rezistenci vůči penicilinu, cefalosporinu, karbapenemu a monobaktamu. Taková zjištění posilují názor, že navzdory nižšímu výskytu bifidobakterií detekovaných ve střevě dospělého člověka, může být jejich funkční příspěvek k lidskému střevnímu mikrobiomu důležitý především z hlediska AR a tím ovlivnění udržení střevního klimaxu po antibiotické léčbě.

Mancino et al. (2019) zkoumali mobilom a rezistom z genomů u 625 bifidobakterií. V rezistomu bifidobakterií bylo identifikováno 7 tříd genů AR viz obrázek č. 7. Nejvyšší počet zástupců měla třída s glykopeptidovou rezistencí, která obsahovala 5999 enzymů působících proti glykopeptidovým antibiotikům. Dle studie kmeny *B. bifidum* 791, *B. longum* ssp. *infantis* 1888B a *B. bifidum* AM42-15AC obsahovaly nejvyšší počet genů, o kterých se předpokládá, že patří do třídy proti glykopeptidovým antibiotikům. Další třídou byla rezistence na tetracyklin, pro kterou bylo identifikováno 2178 genů. Tyto geny obsahovalo až 77,5 % testovaných bifidobakteriálních kmenů. Další třídou byly geny kódující rezistenci proti beta-laktamázovým antibiotikům. Byla zjištěna methyltransferázová AR, sulfonamidová AR. Nejméně zastoupenými třídami u genů AR byla třída aminoglykosidů a třída metronidazolu. V případě metronidazolu se jednalo pouze o 64 identifikovaných genů kódujících AR. Tato studie odhalila nedostatek specifických *Bifidobacterium* AR genů, což potvrzuje bezpečnější chování rodu *Bifidobacterium* ve srovnání s jinými lidskými střevními kmeny. Dále byla opět potvrzena přítomnost genu *tet W*. Tento gen byl v genomech patřících zástupcům *B. adolescentis*, *B. animalis* ssp. *animalis*, *B. breve*, *B. longum* spp., *B. pseudolongum* ssp. *pseudolongum* a druhy *Bifidobacterium pullorum*. Tato studie objasnila bezpečnost rodu *Bifidobacterium* ve srovnání s jinými taxony, jako je *Escherichia coli*, u které bylo prokázáno, že přispívá k vysoké zátěži antibiotické rezistence v lidské mikrobiotě (Parnanen et al. 2018).



Obrázek 9: Předpokládaný rezistom rodu *Bifidobacterium*. Množství tříd genů rezistence na antibiotika identifikovaných mezi 625 analyzovanými genomy *Bifidobacterium* (Přeloženo od: Mancino et al. 2019).

3.4 Antibiotikum metronidazol

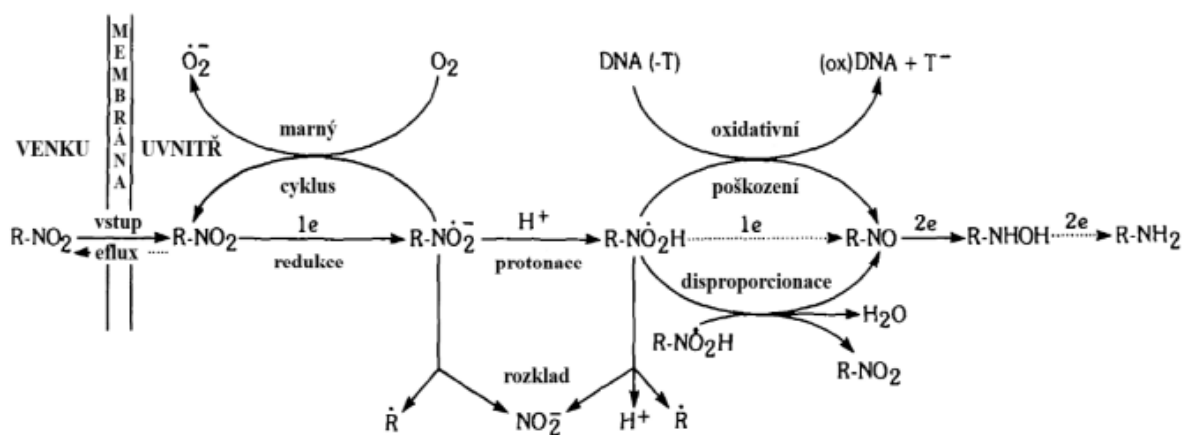
Antibiotikum metronidazol patří mezi nitroimidazoly a je syntetickým derivátem azomycinu izolovaného ze *Streptomyces* sp. (Duchêne 2016).

V lékařské praxi se začalo používat od roku 1959 k léčbě infekcí způsobených *Trichomonas vaginalis*. Díky svým antibakteriálním a antiprotozoálním účinkům se využívá i proti jiným patogenním organismům u lidí a zvířat (Sydney & Finegold 1980). Metronidazol je uváděn na trh pod obchodními značkami Flagyl, Amrizol a dalšími. Používá se buď samostatně, nebo s jinými antibiotiky k léčbě zánětlivých onemocnění pánve, endokarditidy a bakteriální vaginózy. Je účinný při drakunkulóze, giardioze, trichomoniáze a améboze (Blatzer et al. 2013). Metronidazol hraje klíčovou roli ve farmakologické léčbě Crohnovy choroby. Podrobnější popis najdete v kapitole Použití metronidazolu.

3.4.1 Nitroimidazolová léčiva

Tato skupina léčiv, do které spadá i metronidazol, je používána proti anaerobním bakteriím (G⁺, G⁻) a anaerobním parazitickým prvokům (*Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis*). Nitroimidazoly jsou nitroheterocyklické sloučeniny. K léčbě onemocnění se používá celá škála jejich derivátů. Významná je 5-nitroskupina, která má antimikrobiální, ale také mutagenní účinek (Duchêne 2016).

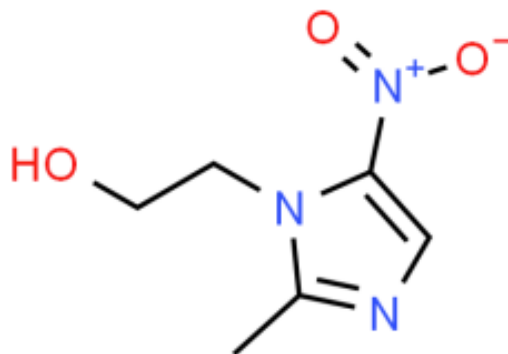
Při redukci této 5-nitroskupiny dochází ke vzniku krátkodobého intermediátu hydroxylaminu, který se dokáže kovalentně vázat na různé tkáňové makromolekulární struktury, jako je například DNA. Po navázání na deoxyribonukleovou kyselinu dochází ke ztrátě spirálovitého uspořádání. To vede k zabránění syntézy nukleových kyselin a poté nastává buněčná smrt (Jiang & Lin 2006). Obecný mechanismus účinku nitroimidazolů je na obr. 7.



Obrázek 11: Mechanismus účinku nitroimidazolů (Edwards 1993)

3.4.2 Chemická struktura metronidazolu

Metronidazol je sloučeninou patřící do skupiny 5-nitroimidazolů, která je tvořena imidazolovým kruhem s navázanou nitroskupinou (NO_2^-) na 5. atomu kruhu (Ang et al. 2017).



Obrázek 13: Strukturní vzorec metronidazolu (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4029.html?rid=1cb30654-cbc7-4104-9527-8e04c57fa6a>)

Strukturní vzorec metronidazolu je: 2-(2-methyl-5-nitro-1-imidazolyl)ethanol viz obrázek č.8 (SÚKL, 2017). Tato látka je lipofilní molekula s nízkou vazbou na proteiny a středním až velkým distribučním objemem, což umožňuje rozsáhlou distribuci do různých tkání (Nagel & Aronoff 2015).

3.4.3 Farmakokinetické vlastnosti

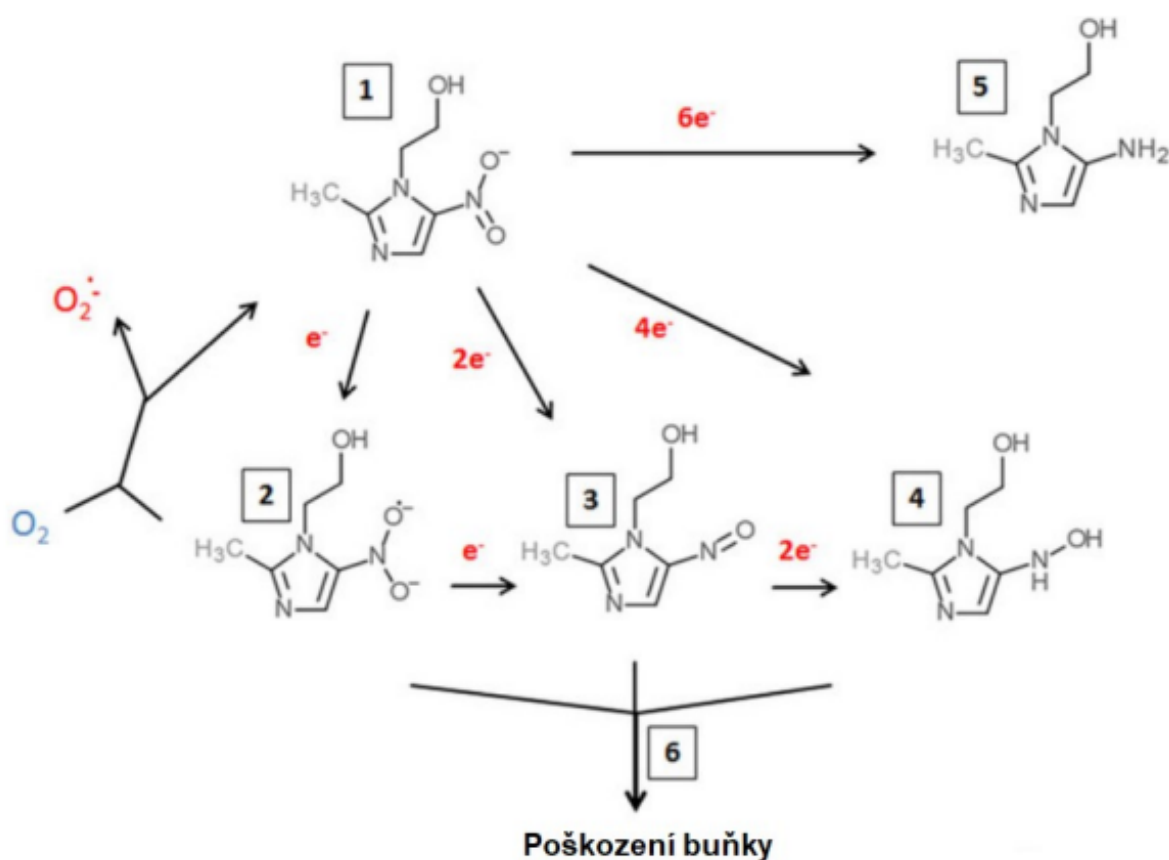
Metronidazol se absorbuje velmi rychle perorálním podáním. Jeho maximální plazmatická hladina nastává 1-2 hodiny po užití. Oproti tomu při lokálním podání se sliznicí nevstřebává téměř vůbec. Má nízkou schopnost vázat se na proteiny a to kolem 20 %. Je schopný procházet přes placentu a ve vysokých koncentracích se dostává do mateřského mléka. Metronidazol je výborně distribuován do tělesných tkání a tekutin. Vstupuje do žlučových cest, abscesů, slin, sekretů, cerebrospinální tekutiny, do kostí, žlučových cest apod. Metabolizace tohoto antibiotika probíhá především v játrech hydroxylací za vzniku konjugátu s kyselinou glukuronovou. Konjugát je vyloučen ledvinami. Většina metronidazolu je vylučována v nezměněné podobě. Biologický poločas rozpadu je 8,5 hodiny díky čemuž je možné dávkovat metronidazol po 12 hodinách (Lincová & Farghali 2007).

3.4.4 Princip účinku

Metronidazol je v neredukovaném stavu netoxický, aby bylo dosaženo terapeutického účinku je nutné nejdříve redukovat nitroskupinu na cytotoxický reakční produkt. Redukce nitroskupiny se docílí tím, že se metronidazol stane alternativním akceptorem elektronů. Přenašeč s vyšším redoxním potenciálem má vždy větší sklon k přijetí elektronu než ten s nižším redoxním potenciálem. U anaerobních organismů figurují přenašeče o velmi nízkém redoxním potenciálu, nižším, než má nitroskupina metronidazolu. Z toho důvodu je metronidazol účinný především v buňkách mikroorganismů s anaerobním metabolismem. Oproti tomu v buňkách aerobních organismů (*Enterobacteriaceae*) mají přenašeče o dost vyšší

redoxní potenciál než metronidazol a u nich z tohoto důvodu téměř nedochází k redukci nitroskupiny a následnému účinku (Smith and Edwards 1995).

Na základě celé řady výzkumu o mechanismu působení metronidazolu jsou předpokládány 4 klíčové fáze účinku: **1.** vstup do bakteriální buňky – metronidazol proniká do buňky pasivní difúzí jako neaktivní prekurzor (Müller and Gorrell 1983). **2.** Aktivace v podobě redukce nitroskupiny proběhne v cytoplazmě buňky nebo v konkrétní organelle prvoků – vytvoří se cytotoxický intermediát dle počtu elektronů přenesených na nitroskupinu (viz obrázek č. 9), který může reagovat s DNA, RNA nebo s buněčnými proteiny **3.** Cytotoxický účinek – hlavní mechanismus účinku není dosud plně objasněn. Zahrnuje potlačení replikace DNA. Poškození molekuly DNA pomocí oxidace, čímž vznikají jednořetězcové a dvouřetězcové trhliny, které vedou k degradaci DNA a následné smrti organismů (Diniz et al. 2000). **4.** Uvolnění konečných produktů – nemají podstatný význam (Freeman et al. 1997)



Obrázek 15: Aktivace metronidazolu a jeho cytotoxicita v buňkách mikroaerofilů a anaerobů (Převzato a upraveno z Leitsch (2019)).

Na obrázku číslo 9 metronidazol vstupuje do buňky jako neaktivní prekurzor [1]. O podobě další formy rozhoduje počet elektronů přenesených na nitroskupinu. Jako prvním možným intermediátem po dodání jednoho elektronu je nitroradikálový aniont [2]. Po přidání celkově dvou elektronů nám vzniká nitrosoimidazol [3]. Dodáním celkově čtyř elektronů vzniká poslední možný reaktivní intermediát – hydroxylaminimidazol [4]. K reakci může dojít buďto postupně (1→2→3→4) nebo může být reakce jednokroková (1→4). Na levé straně obrázku je zobrazena situace, kdy se metronidazol ocitne v buňce s vysokou koncentrací

kyslíku. V tom případě je nitroradikálový aniont velmi rychle zpětně oxidován na původní neaktivní prekurzor. Reaktivní formy [2, 3, 4] vedou k cytotoxickému poškození buňky [6] (Leitsch 2019).

3.4.5 Použití metronidazolu

Metronidazol se může podávat intravenózně, perorálně či lokálně ve formě tablet nebo čípků (Lüllmann et al. 2007). Jak již bylo popsáno v předchozí kapitole, metronidazol je účinný proti anaerobním organismům. Původně byl používán při gynekologických onemocněních způsobených *Trichomonas vaginalis*. Postupem času se jeho využití rozšířilo. Používá se proti dalším prvokům *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*. Velice citliví na metronidazol jsou G- bakterie jako např. *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Helicobacter pylori* (Freeman et al. 1997). Metronidazol vykazuje v klinických podmínkách slabý účinek proti běžným G+ anaerobům jiným než *Clostridium* spp. jako jsou např. *Lactobacillus* (Rieber et al. 2018).

Metronidazol je z hlediska farmakokinetiky a farmakodynamiky velice účinné antibiotikum. Má akceptující profil nežádoucích účinků. Jeho pořizovací náklady jsou nízké. A proto je hojně využíván v lékařství (Freeman et al. 1997).

Je aplikován u infekcí gastrointestinálního traktu nebo infekcí, které v něm vznikají. Indikuje se po operačním zákroku, při zánětech pobříšnice, při abscesech, při hnisavých onemocněních v oblasti břicha a pánve, při septických onemocněních. Dále jej lékaři předepisují u gynekologických infekcí. Taktéž je využíván u infekce dolních cest dýchacích – především u zápalu plic s rozpadem tkáně. Je používán k profylaxi vzniku infekcí při operačních zákrocích. U operací je zvýšené riziko, že může dojít ke kontaminaci anaeroby, např. při operacích v gastrointestinálním traktu, v oblasti ženských pohlavních orgánů, v dutině ústní a hltanu, při peritonitidě nebo při abscesu v oblasti břicha nebo pánve (Serag-Wiessner 2013). Dále je metronidazol lékem volby při anaerobních infekcích měkkých tkání, průjmech a pseudomembranózní kolitidě způsobené *Clostridium difficile* či při infekci tetanusem (Lincová & Farghali 2007).

Metronidazol je důležitým lékem při antibiotické terapii Crohnovy choroby. Při konzervativní léčbě u pacientů, kteří mají střevo postižené v kolonické a perianální oblasti, se používá jako medikament první volby. Antibiotikum by se mělo užívat dlouhodobě několik týdnů až měsíců a případně i opakovaně. U střevních idiopatických zánětů v případě septických komplikací by se měla dávka metronidazolu podávat v množství 20 mg/kg/den. Při Crohnově kolitidě je doporučeno 10 mg/kg/den (Lukáš & Chalupná 2005).

Závažný nežádoucí účinek při dlouhodobém podávání metronidazolu je periferní polyneuropatie. Dalšími nežádoucími účinky mohou být: kovová pachuť v ústech, diskomfort v břišní oblasti v důsledku mikrobiální dysbiózy, intolerance alkoholu, nauzea, zvracení, kožní alergické projevy či poruchy CNS jako jsou závratě, bolesti hlavy, deprese (Perencevich & Burakoff 2006).

3.4.6 Rezistence k metronidazolu

Velmi často se v poslední době setkáváme v klinické praxi se vzrůstající rezistencí mikroorganismů na antibiotika. Jedná se o jeden z nejdůležitějších problémů současné medicíny. Hrozí selhání antibiotické léčby, která bude souviset s větší morbiditou i mortalitou (Kolář & Štrbová 2015). Podle zprávy Centra pro kontrolu nemocí z roku 2019 ve Spojených státech vzniká v USA ročně více než 2,8 milionu infekcí rezistentních na antibiotika, což má za následek více než 35 000 úmrtí (European Centre for Disease Prevention and Control 2020). Vznik antimikrobiální rezistence je přirozenou evoluční reakcí na antimikrobiální expozici (Holmes et al. 2016). Bakterie odolné vůči antimikrobiálním látkám byly nalezeny v každém dosud zkoumaném prostředí, včetně Antarktidy, moře, půdy či pitné vody (Walsh et al. 2011).

Rezistence vzniká nejenom mutací genů kódovaných na mikrobiálních chromozomech, ale také výměnou genetického materiálu mezi organismy (Holmes et al. 2016).

Většina anaerobních patogenů si nevytváří rezistenci k metronidazolu v takové míře, jako k jiným druhům antibiotik (Holmes et al. 2016). Průřezová studie od Al-Shukri et al. (2021) potvrdila, že se u anaerobní G+ bakterie rezistence k metronidazolu vyskytuje jen vzácně.

Rezistentní organismy typicky nedostatečně aktivují metronidazol. Existuje korelace mezi rezistencí k metronidazolu a neefektivní aktivací antibiotika. Ve většině případů je rezistence na metronidazol spojena s existencí genů *nim* („nitroimidazole resistance genes“), které byly poprvé popsány jako přenosné determinanty rezistence na toto antibiotikum. *Nim* geny jsou kódované na mobilních genetických elementech a chromozomech. Jsou přenosné konjugativním procesem. Kódují reductázy, které přeměňují nitroskupinu metronidazolu na amin díky přenosu dvou elektronů a znemožňují tak jeho aktivaci (Patel et al. 2009). Dalším důvodem rezistence může být snížený import antibiotika do buňky (Edwards 1993).

Dle Butta et al. (2017) bifidobakterie mohou získat rezistenci k metronidazolu pokud se objevují jako původci pyogenních infekcí samostatně a nebo společně s dalšími bakteriemi jako je například *E. coli*. Tato studie přináší poznatky o tom, že se druhy rodu *Bifidobacterium* podílí na vzniku pyogenních infekcí jako patogeny. Proto by se mělo zaměřit na jejich identifikaci ve všech klinických pyogenních vzorcích.

Rezistence k metronidazolu u G- bakterií *Bacteroides fragilis* byla popsána již v roce 1978 u pacienta trpícího Crohnovou chorobou s následnou dlouhodobou terapií metronidazolu (Edwards 1993). *Ba. fragilis* způsobuje nebezpečné infekce při operacích (Edwards 1993). *Ba. fragilis* byli izolováni z extraintestinálních infekcí jako je např. infekce diabetické nohy, abscesy mozku, plic, břicha a pánve (Nagy & Urbán 2001). Dále *Ba. fragilis* způsobuje průjemové onemocnění u lidí, které je jednou z největších příčin morbidity a mortality u dětí (Chen et al. 2015). Metronidazol je užitečné antimikrobiální léčivo, které se běžně podává pro profylaxi a léčbu infekcí *Ba. fragilis* (Akhi et al. 2017). Bohužel se v poslední době zvýšil počet selhání léčby v důsledku rezistence *Ba. fragilis* vůči tomuto léku (Löfmark et al. 2005). Rezistence se vyskytuje u 7,8 % *Ba. fragilis* po celém světě (Nagy & Urbán 2011). Ve většině případů je rezistence na metronidazol spojena s existencí genů *nim*, které byly poprvé popsány jako přenosné determinanty rezistence na metronidazol (Trinh & Reysset 1996). Přítomnost genu *nim* sama o sobě nemusí nutně způsobit rezistenci na metronidazol, protože geny *nim* byly hlášeny u kmenů *Ba. fragilis*, které mají MIC pod terapeutickou hranicí 16 µg/ml a nejsou tedy považovány za rezistentní na metronidazol (Leitsch et al. 2014). *Nim*-

negativní kmeny vyjadřující vysokou úroveň rezistence, což ukazuje na důležitost dalších mechanismů rezistence. Přítomnost genů *nim* však významně zvyšuje riziko snížené citlivosti na metronidazol (Löfmark et al. 2005). Dalším mechanismem vedoucí k rezistenci vůči metronidazolu je nadměrná exprese proteinu *RecA*. Jedná se o hlavní opravný protein DNA, který provádí opravu homologní rekombinací a řídí expresi mnoha dalších opravných proteinů DNA (Aranda et al. 2011). Metronidazol způsobuje poškození DNA. Steffens a kolektiv popsali u *Ba. fragilis* nadměrnou expresi DNA opravného proteinu *RecA*, který zvyšuje rezistenci na metronidazol. Toto zjištění představuje nový mechanismus lékové rezistence u *Bacteroides* (Steffens et al. 2010). Mezi čtyři obecné mechanismy antibiotické rezistence patří změna cíle, inaktivace léčiva, snížená permeabilita a zvýšený eflux, což znamená odpuzování léků efluxními pumpami. Systém efluxních pump (membránových transportérů) je hlavní příčinou mnohočetné lékové rezistence. Tento typ pump se nachází téměř u všech bakteriálních druhů a geny kódující tuto třídu proteinů mohou být chromozomální nebo umístěné na přenosných prvcích, jako jsou plazmidy (Poole 2007). Efluxní pumpy nejen vytlačují širokou škálu antibiotik díky multisubstrátové specifitě, ale také podporují získání dalších mechanismů rezistence snížením intracelulární hladiny antibiotika (Sun et al. 2014). Wexler (2012) identifikoval u *Ba. fragilis* multilékovou efluxní pumpu typu RND, která může odčerpávat širokou škálu substrátů včetně metronidazolu. Studie u *Ba. fragilis* naznačují, že rezistentní izoláty mají snížený příjem metronidazolu kvůli snížené aktivitě pyruvát: ferredoxin oxidoreduktázy. Tím je snížena míra redukce nitroimidazolu. Nedochozí tak ke vstupu metronidazolu do buňky díky koncentračnímu gradientu (Edwards 1993).

Rezistence k metronidazolu byla objevena u G- patogenní bakterie *Helicobacter pylori*. Prevalence rezistence na metronidazol u *H. pylori* se v různých zemích pohybuje mezi 8 a 80 % (Suzuki et al. 2010). Tato bakterie roste v trávicím traktu a může být přítomna u více než poloviny světové populace (Hooi et al. 2017). Způsobuje chronickou gastritidu, žaludeční a duodenální vředy, rakovinu žaludku a mnoho dalších gastrointestinálních onemocnění (Lembo et al. 2009). *H. pylori* je obtížné vymýtit, protože je schopna vyvinout rezistenci. Proto se obvykle podávají dva nebo více druhů antibiotik. Aktivace metronidazolu je zprostředkována hlavně nitroreduktázou NADPH (*rdxA*), NADPH-flavinoxidoreduktázou (*frxA*) a enzymy podobnými ferredoxinu (*frxB*) u *H. pylori* (Francesco et al. 2011). Důvodem silné rezistence jsou specifické mechanismy aktivace antibiotika, kterými se liší od jiných patogenů. U kmenů rezistentních na metronidazol byly identifikovány různé mutace genů *rdxA* a *fdxA* kódující NADPH nitroreduktázy (Jenks et al. 1999; Kwon et al. 2000). Tyto genetické změny vyvolají předčasné zastavení translatovaného proteinu, čímž dojde k inaktivaci nitroreduktázy (Goodwin et al. 1998). Bylo prokázáno, že mutace ve dvou dalších genech *frxA* a *frxB*, oba kódují NAD(P)H-flavinoxidoreduktázy, zvyšují rezistenci *H. pylori*. Mutace *frxA* zvyšuje mutaci genu *rdxA* a tím celkovou rezistenci vůči metronidazolu. (Francesco et al. 2011; Yang et al. 2004). Přesný mechanismus rezistence na metronidazol je však stále diskutován, vzhledem k tomu, rezistence k metronidazolu se může objevit i bez mutace v *rdxA* a *frxA*, což naznačuje, že jsou v mechanismu rezistence k metronidazolu zahrnuty ještě i jiné genetické elementy (Kim et al. 2009).

Mezi další mechanismy rezistence u *H. pylori* patří mutace proteinu *Fur*, který zvyšuje hladiny superoxidodismutázy k detoxikaci druhů reaktivních na nitroimidazol (Tsugawa et al.

2011). Rezistence k metronidazolu je typická u pacientů, kteří byli již v minulosti tímto antibiotikem léčeni (Diaconu et al. 2017).

Metronidazol se používá k léčbě klostridiových kolitid. Avšak klinické studie prokazují v řadě zemí sníženou citlivost k metronidazolu. V rámci České republiky je rezistence k metronidazolu stále raritou. Vzhledem k dosažení nedostatečné koncentrace metronidazolu ve střevním obsahu není považován za lék pro žádnou z forem klostridiových infekcí (Ooijevaar et al. 2018). Z důvodu vysokého riziku selhání terapie by neměl být metronidazol používán při infekcích způsobených *Clostridioides difficile* (Stebel et al. 2020). *C. difficile* je G+, anaerobní, sporotvorná bakterie, která je nejčastějším původcem nemocničních průjmů. Klinické příznaky *C. difficile* infekce (CDI) se pohybují od mírného až těžkého průjmu, který může vést k fulminantní kolitidě, toxickému megakolonu, perforaci střeva, sepsi a nakonec ke smrti (Evans & Safdar 2015). Molekulární studie epidemiologie CDI prokázala, že významně rostoucí počet ohnisek je způsoben kmeny ribotypu (RT) 027 a 078 (Collins et al. 2013). CDI začíná neobvyklým vystavením normální střevní mikrobioty antibiotikům. Tato změna má za následek narušení původní mikrobioty, která umožňuje množení *C. difficile* způsobující onemocnění (Sun & Hirota 2015). Přestože míra rezistence kmenů *C. difficile* na metronidazol je velmi nízká několik studií uvádí selhání léčby po antibiotické léčbě metronidazolem (Debast et al. 2015; Jarrad et al. 2015). Nedávné studie zjistily, že v Izraeli je míra rezistence *C. difficile* vůči metronidazolu přibližně 20,25 % (Tkhawkho et al. 2017). *C. difficile* vyvinula několik mechanismů antimikrobiální rezistence. Faktory přispívající k tomuto rozvoji antimikrobiální rezistence zahrnují geny spojené s rezistencí ukryté v bakteriálním chromozomu, mobilní genetické elementy, změny v antibiotických cílech antibiotik nebo v metabolických drahách u *C. difficile* a tvorbu biofilmu. Genom *C. difficile* skrývá řadu genů rezistence odpovědných za rezistenci vůči různým třídám antibiotik. Konjugace, transdukce nebo transformace mobilních genetických elementů, zejména transpozomů mezi kmeny *C. difficile* nebo mezi *C. difficile* a jinými bakteriálními druhy, jsou důležitými mechanismy pro *C. difficile* k získání genů antimikrobiální rezistence (Spigaglia 2016). Změny v antibiotických cílech nebo v metabolických drahách u *C. difficile* představují další mechanismus zprostředkovávající rezistenci tohoto mikroorganismu na antibiotika. Důležité je, že se předpokládá, že tento mechanismus umožňuje rezistenci na metronidazol u *C. difficile*, ačkoli přesný mechanismus není zcela objasněn (Spigaglia 2016; Norman et al. 2014). Současná data naznačují, že rezistence na metronidazol je pravděpodobně způsobena několika změnami v dosud nedefinovaných metabolických drahách, jako jsou ty, které zahrnují aktivitu nitroreduktáz, vychytávání železa a opravu DNA (Chong et al. 2014; Moura et al. 2014). U *C. difficile* se předpokládá, že tvorba biofilmu hraje roli v rezistenci k metronidazolu. Biofilm se skládá z tlusté vícenosložkové matrice biofilmu, který obsahuje proteiny, DNA a polysacharidy. Tvorba biofilmu je řízena především vnitřními mechanismy *C. difficile*, jako jsou Cwp84, bičíky a LuxS. Konkrétní podrobnosti o tom, jak klostridiové biofilmy přispívají k získání antimikrobiální rezistence *C. difficile* jsou špatně srozumitelné. Hypotézou je, že matrice biofilmu a fyziologický stav společně přispívají k antimikrobiální rezistenci (Dapa et al. 2013).

4 Metodika

Praktický experiment této diplomové práce je rozdělen do několika na sebe navazujících pokusů. Prvním úkolem práce bylo stanovení MIC (pomocí metody e-testu) u vybraných kmenů bifidobakterií, které byly charakterizovány a testovány v rámci dříve provedených experimentů.

Další část představuje *in vitro* experiment, kdy byly vzorky stolice lidských dárců kultivovány bez a s metronidazolem. Poté byly vzorky kultivovány na selektivním médiu s cílem izolace bifidobakterií. Získané izoláty bifidobakterií byly dále testovány pomocí diskové difúzní metody na citlivost k metronidazolu v koncentraci 5 a 50 µg. Identifikace bifidobakteriálních izolátů byla provedena pomocí metody hmotnostní spektrofotometrie MALDI TOF.

Vybrané citlivé i rezistentní kmeny a komplexní vzorky z *in vitro* experimentu byly dále analyzovány pomocí PCR s cílem detekce genu rezistence k 5-nitroimidazolovým antibiotikům.

4.1 Příprava kultivačních médií

Pro potřeby níže uvedeného experimentu a s ním související kultivaci testovaných mikrobiálních kultur byly použity 3 kultivační média. Pro rutinní kultivaci bifidobakteriálních kultur byl použit modifikovaný Wilkins Chalgren agar nebo bujón. Pro vlastní testování antibiotické citlivosti a stanovení MIC bylo použito LSM médium. Více k přípravě a složení uvedených médií níže. Jednotlivé složky pro použité agary byly zváženy a postupně přidány do kónické Erlenmeyerovy baňky. Obsah byl řádně promíchán. Baňky byly opatřené alobalovým uzávěrem a byly sterilovány v Papinově hrnci (čistý čas sterilace po natlakování hrnce 45 minut). Po sterilizaci byly baňky s médiem temperovány na 50 °C ve vodní lázni.

4.1.1 Médium WSP-Wilkins-Chalgren agar

Wilkins-Chalgren agar je základní kultivační médium pro anaerobní bakterie. Na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky se používá jako modifikované, tedy vylepšené o níže uvedené komponenty.

Tabulka 2: WSP agar

Médium	Podmínky kultivace	Složení selektivního média na 1000 ml
Modifikované Wilkins-Chalgren agar (WSP)	48 h, anaerobní, při 37 °C	1 l demineralizované vody, 43 g Wilkins-Chalgren agar, 5 g GMO – sojového peptonu (obojí Oxoid), 0,5 g L-cysteinu 1 ml tweenu 80 (Sigma-Aldrich)

4.1.2 Wilkins-Chalgren médium (bujón)

Tabulka 3: WSP bujón

Médium	Podmínky kultivace	Složení selektivního média na 1000 ml
Modifikované Wilkins-Chalgren (WSP)	48 h, anaerobní, při 37 °C	1 l demineralizované vody, 33 g Wilkins-Chalgren bujónu, 5 g GMO – sojového peptonu (obojí Oxoid), 0,5 g L-cysteinu, 0,5 ml tweenu 80 (obojí Sigma-Aldrich)

Jednotlivé složky bujónu byly zváženy a postupně přidány do kónické Erlenmeyerovy baňky. Obsah byl řádně promíchán a rozvařen. Po provaření bylo dávkováno 9 ml média do zkumavek a ty byly zahřívány alespoň 10 minut ve vodní lázni na 100 °C, aby došlo k redukci obsahu kyslíku. Všechny zkumavky byly poté „proublány“ oxidem uhličitým, aby bylo dosaženo anaerobního prostředí, které je potřebné pro růst bifidobakterií a dalších anaerobů. Poté byly lahvičky uzavřeny gumovou zátkou. Zkumavky byly vloženy do autoklávu a sterilizovány (na 121 °C po dobu 15 minut).

4.1.3 LSM agar

Pro testování citlivosti bifidobakterií na zvolená antibiotika byl použit LSM agar doporučený normou ISO 10932:2010/ IDF 223:2010.

Tabulka 4: LSM agar

Médium	Podmínky kultivace	Složení selektivního média na 1000 ml
LSM agar	48 h, anaerobní, při 37 °C	1 l demineralizované vody, 28,26 g ISO-sensitest agaru (Oxoid), 6,2 g MRS agar (Oxoid)

4.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace metronidazolu pro bifidobakterie

Cílem laboratorní práce bylo detekovat případnou antibiotickou rezistenci bifidobakterií k antibiotiku metronidazol a zároveň stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) u citlivých kmenů.

4.2.1 Původ bakteriálních kultur

Pro stanovení MIC deskovou metodou pomocí e-testu, bylo vybráno 43 předem identifikovaných sbírkových a divokých kmenů rodu *Bifidobacterium* ze sbírky doc. Ing. Věry Neužil Bunešové, Ph.D. a Ing. Nikol Modráčkové, Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky (KMVD). Podrobný seznam testovaných kultur je uveden v kapitole **Samostatné přílohy** v tabulkách č. 9 a č 10.

4.2.2 Příprava bifidobakteriálních kultur k testování

Sbírka zmražených bakteriálních kultur, které byly uchovávány v -20 °C s 30% obsahem glycerolu byla rozmrazena. Z každého vzorku bylo dávkováno po kapce bakteriální kultury na WSP agar a LSM agar, které byly připraveny dle návodu z kapitol **Médium WSP-Wilkins-Chalgren agar a LSM agar**. Následně byly kultura rozetřena křížovým nátěrem sterilní plastovou tyčkou. Takto připravené misky byly vloženy do nádoby s anaerobním vyvíječem (AnaeroGen, Oxoid) a byly kultivovány 2 dny při 37 °C.

Po dvou dnech proběhla kontrola narostlých kolonií. Z každé Petriho misky byla odebrána, sterilní bakteriální kličkou, jedna kolonie a vložena do anaerobní zkumavky obsahující WSP bujón. Vzorky ve zkumavkách byly kultivovány 24 hodin při 37 °C. Taktéž se z každé misky odebraly kolonie ve dvou kopiích pro kontrolu identity pomocí MALDI TOF-MS.

4.2.3 Ověření identity pomocí MALDI TOF MS

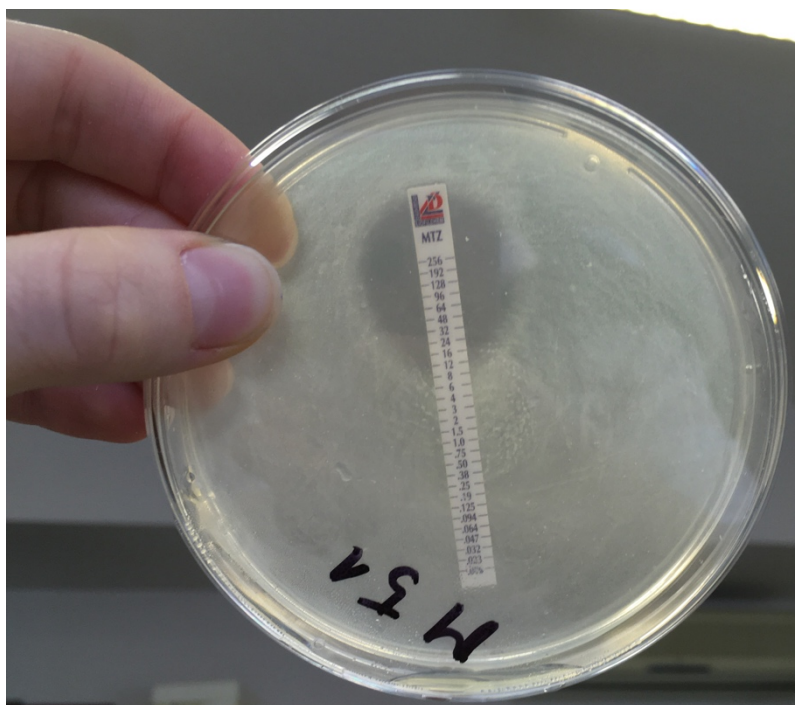
Ověření identity bylo na katedře KMVD provedeno pomocí MALDI TOF MS. Z každé misky byly odebrány narostlé kolonie sterilní špičkou ve dvou kopiích a aplikovány na MALDI destičku. Po zaschnutí vzorků bylo aplikováno na každý spot destičky po 1 µl 70% kyseliny mravenčí (Sigma-Aldrich). Po opětovném zaschnutí byl nanesen 1 µl matrice (Bruker). Poté byly vzorky analyzovány (SW Bruker Biotyper).

4.2.4 Kontrola čistoty a morfologie

Dále byla provedena kontrola narostlých bakteriálních kultur pod světelným mikroskopem s fázovým kontrastem (Nikon ECLIPSE E200). Kontrola byla provedena z důvodu ověření morfologie, čistoty a nárůstu kultury.

4.2.5 Stanovení MIC pomocí e-testu

Po ověření identity bakteriální kultury na MALDI TOF – MS a kontrole pod světelným mikroskopem byla vybrána ze dvou kopií vždy jedna zkumavka s lepším nárůstem bifidobakterií. Tyto vybrané kmeny byly použity pro finální testování e – testem. Ze zkumavky byl asepticky injekční stříkačkou odebrán 1 ml narostlé kultury a aplikován na velkou Petriho misku. Do misky bylo dávkováno 20 ml základního kultivačního média LSM agar vysterilizovanou sklopnou pipetou. Obsah v Petriho misce byl dostatečně krouživými pohyby promíchán. Po zatuhnutí agarů se do středu misky vložil sterilní pinzetou e-test obsahující antibiotikum metronidazol, který měl na sobě stupnici koncentrace použitého antibiotika (0,016 - 256 µg/ml, Biovendor LM). Zatuhlé misky s aplikovaným e-testem byly vloženy do sáčku s vyvíječem anaerobního prostředí (AnaeroGen, Oxoid) a byly kultivovány v termostatu 24 hodin při 37 °C. Druhý den byly na Petriho miskách vyhodnoceny zóny s MIC.



Obrázek 16: E-test se stupnicí koncentrace metronidazolu provedený na LSM agaru

4.3 *In vitro* kultivace vzorků stolice s metronidazolem a následným testování citlivosti izolovaných bifidobakterií k danému antibiotiku

4.3.1 Příprava vzorků

Dárcům fekálních vzorků byla poskytnuta zkumavka s 10 ml anaerobně připraveného WSP bujonu. Probandi byli seznámeni s experimentem a poskytli informovaný souhlas. Jejich úkolem bylo vložit do zkumavky vzorek stolice o velikosti lískového oříšku. Zkumavky se vzorky byly v laboratoři zváženy. Od navážky se vzorkem byla odečtena navážka bez vzorku. Dle vzorce: $\frac{1}{\text{rozdíl navážky}}$ bylo vypočítáno množství, které bylo poté ze zkumavky odebráno k analýze. Uvedené množství vzorku bylo naočkováno ve dvou kopiích do zkumavek

obsahující anaerobně připravený WSP bujón (9 ml/ zkumavka) doplněný o kyselinu octovou (1 ml/l) a mupirocin (100 mg/l), které jsou používány jako selektivní faktory pro kultivaci bifidobakterií. Do jedné z kopií byl navíc přidán metronidazol v koncentraci (25 mg/l). Takto byly uvedené vzorky kultivovány po dobu 24 h při 37 °C a následně analyzovány.

4.3.2 Příprava agaru ke kultivaci

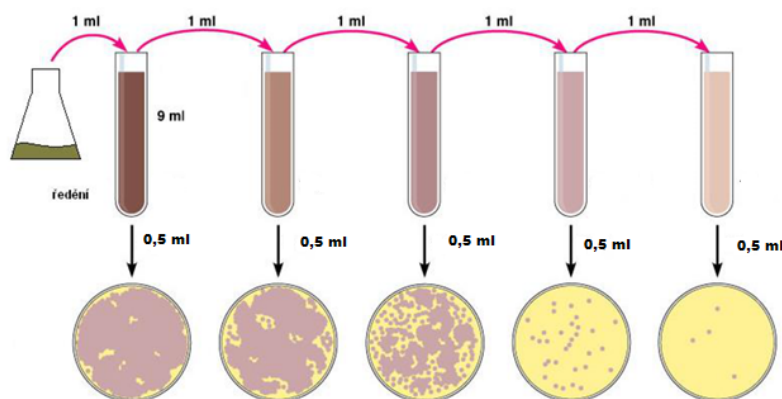
K tomuto druhu experimentu byl připraven základní kultivační médium WSP agar dle receptu z kapitoly **Médium WSP-Wilkins-Chalgren agar**, který byl po uvaření obohacen o kyselinu octovou a roztok z vylouhovaného 1 balení Mupirocinu 200 µg od značky Oxoid v 10 ml WSP bujónu.

Tabulka 5: WSP agar s kys. octovou a mupirocinem

Médium	Podmínky kultivace	Složení selektivního média na 1000 ml
Obohacený Wilkins-Chalgren (WSP) agar	48 h, anaerobní, při 37 °C	1 l WSP agaru, 1 ml kyseliny octové, Mupirocinu 100 mg/l

4.3.3 Rozbor

Po 24 hodinách proběhlo vyjmutí zkumavek z termostatu. Pro každou ze zkumavek byly připraveny ředící řady (9 ml) v penicilínových lahvičkách do 8. ředění. Prvním ředění byly vykultivované kultury, které byly naočkovány den předem. Ze zkumavky byl asepticky injekční stříkačkou odebrán 1 ml suspenze a přenesen do penicilinové lahvičky určené pro druhé ředění. Analogickým postupem se došlo až k 8. ředění. Ke každé ředící penicilinové lahvičce byla připravena 1 malá Petriho miska nadepsána druhem vzorku a číslem ředění. Po dokončení ředících řad se z každé penicilinové lahvičky odebralo 0,5 ml obsahu, který byl nadávkován do Petriho misky.



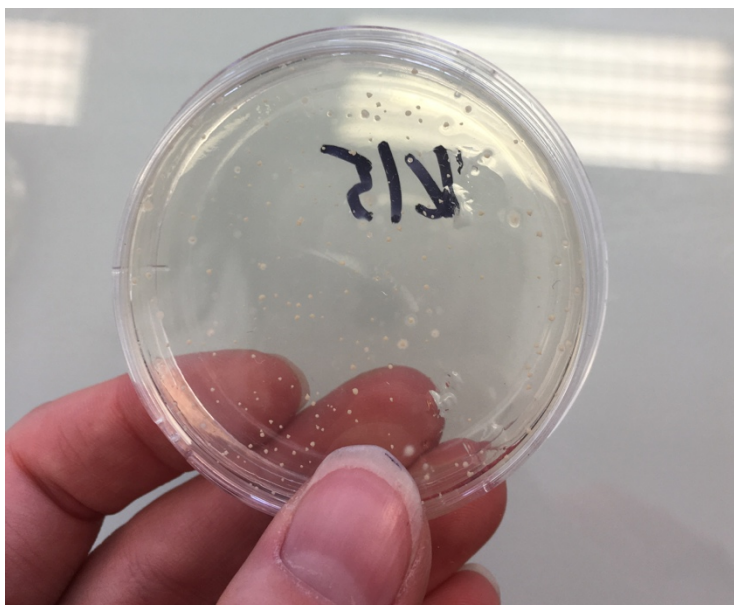
Obrázek 18: Schéma ředící řady (www.e-learning.vscht.cz)

Misky byly, neprodleně po aplikaci bakteriální kultury, zality připraveným WSP agarem obohaceným o kyselinu octovou (1 ml/l) a mupirocinem (100 mg/l). Po zatuhnutí agarů byly Petriho misky dány do boxu s vyvíječem anaerobního prostředí a vloženy do termostatu na 2 dny při 37 °C.



Obrázek 19: Petriho misky v boxu s anaerobním vyvíječem

Za 48 hodin proběhla kontrola misek. Byly spočítány kolonie, které narostly na miskách. Z daného vzorku bylo vybráno 20 kolonií. Kolonie byly jednotlivě odebrány z agarů bakteriální kličkou za sterilních podmínek a vloženy do předem připravených a nadepsaných zkumavek. Zkumavky obsahovaly 9 ml základního kultivačního média WSP a zajišťovaly anaerobní podmínky. Tyto zkumavky byly opět dány do termostatu na 24 hodin při 37 °C.



Obrázek 20: Petriho miska s narostlými koloniemi

4.3.4 Kontrola čistoty a morfologie

Stejně jako u předchozího pokusu, bylo podstatné zkontrolovat čistotu a morfologii bakteriální kultury. Po 24 hodinách byly vyjmuty zkumavky z termostatu. Asepticky se z každé zkumavky odebralo malé množství suspenze injekční stříkačkou a bylo přeneseno na podložní sklíčko. Kontrola byla provedena opět pomocí světelným mikroskopem s fázovým kontrastem.

4.3.5 Ověření rodové a druhové identity

Před zahájením pokusu bylo důležité ověřit rodovou a druhovou identitu testovaných kmenů. Ze zkumavek s nárůstem bakteriálního kmene byl odebrán 1 ml vzorku do Eppendorfovy zkumavky o objemu 1,5 ml. Mikrozkumavky byly vloženy do centrifugy na 3 minuty při 14 500 otáčkách za minutu a byly stočeny. V Eppendorfově zkumavce (1,5 ml) se na dně usadil sediment bakterií tzv. peleta.

Veškerý supernatant, který byl tvořen médiem byl odstraněn. K peletě bylo přidáno 0,5 ml 70% etanolu z důvodu fixace buněk. Suspenze byla primárně promíchána pomocí špičky pipety. K sekundárnímu promíchání byla použita třepačka Vortex. Takto promíchaná směs byla opět vložena do centrifugy a stočena po dobu 2 minut při stejných otáčkách.

Znovu došlo k usazení pelety na dně mikrozkumavky a následnému vylití supernatantu. Pomocí pipety byly odsáty zbytky etanolu okolo pelety a po dobu deseti minut vzorek vysychal na vzduchu.

Po deseti minutách bylo do Eppendorfovy zkumavky přidáno 20 μ l 70% kyseliny mravenčí.

Opět byla suspenze promíchána nejdříve pomocí špičky pipety a poté na třepačce. Po promísení bylo přidáno 20 μ l acetonitrilu a na třepačce se směs homogenizovala. Kyselina mravenčí spolu s acetonitrilem sloužila k porušení buňky a vylití ribozomálního proteinu.

Po homogenizaci byly mikrozkumavky vloženy naposled do centrifugy. Po stočení zkumavek, byl využit supernatant. Byl odebrán 1 μ l vzorku, který byl aplikován na MALDI destičku (ve dvou kopiích). Po zaschnutí vzorku byla nanášena matrice (Bruker). Poté byl vzorek analyzován.

4.3.6 Zkoumání antibiotické rezistence

Po zdařilých kontrolách byl ze zkumavky, obsahující narostlé kmeny rodu *Bifidobacterium*, odebrán asepticky 1 ml bakteriální kultury injekční stříkačkou. Vzorek byl nanášen na velkou Petriho misku. Miska byla přelita předem připraveným a vytemperovaným WSP agarem. Po zatuhnutí agaru, byly pomocí aplikátoru, položeny disky metronidazolu (Oxoid) a to v koncentraci 5 μ g a 50 μ g. Tyto misky se opět vložily do termostatu na 24 hodin při 37 °C. Druhý den byly pravítkem změřeny zóny pro MIC.

4.3.7 Detekce genu pro rezistenci 5-nitroimidazolu pomocí PCR

Ve spolupráci s docentem Jiřím Killerem z AV ČR byl na základě sekvencí genu pro rezistenci 5-nitroimidazolu detekovaných v genomech typových kmenů bifidobakterií dostupných v databázi NCBI v programu (Geneious, Nový Zéland) navržen pár primerů

k detekci tohoto genu. Návrh primeru byl omezen na druhy typické pro člověka a *B. longum* ssp. *suis* (podruh *longum*, velká podobnost k ostatním, navíc výskyt zaznamenám i u kojence). Seznam je uvedený v kapitole **Samostatné přílohy** v tabulce č. 9, kde jsou uvedeny i další typové kmeny s výskytem genu, bez ohledu na původ hostitele.

Sekvence navrženého páru primerů o délce 14 bp byly MetBifReF (5'-GCGTAAKRAYGAGC-3') a MetBifReR (5'-ATCGACTTGAACGC-3'). Pro uvedený pár primerů byl navržen program; počáteční denaturace 3 min. 94 °C, dále 30 cyklů (denaturace 94 °C 30 s, annealing 45-55 °C 30 s, elongace 72 °C 30 s), dále finální elongace 72 °C po dobu 4 minut. Detekovaný gen pro rezistenci 5-nitroimidazolu, je velmi variabilní pro jednotlivé druhy bifidobakterií, u kterých byl detekován, a tudíž bylo velmi obtížné ho designovat. Optimalizace PCR programu pro daný pár primeru probíhala v laboratoři profesora K. Domiga univerzity BOKU ve Vídni, se kterou katedra spolupracovala na projektu Česko-rakouské spolupráce, kde jedním z cílů projektu bylo testování antibiotické rezistence u bifidobakterií. PCR reakce probíhala podle protokolu AccuStart II PCR ToughMix (QuantaBio).

Zmíněný pár primerů se bohužel nepodařilo optimalizovat tak, aby vznikal specifický PCR produkt očekávané velikosti, tudíž nebyl ani dále testován na kmenech charakterizovaných v této diplomové práci.

5 Výsledky

V rámci této diplomové práce byla testovaná citlivost a rezistence bifidobakterií k nitroimidazolovému antibiotiku metronidazol. Tato práce navazovala na již provedené experimenty na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky. Tyto studie vznikly v rámci česko-rakouské spolupráce s laboratoří profesora K. Domiga z vídeňské univerzity BOKU.

5.1 Testování antibiotické rezistence typových a sbírkových kmenů

V rámci testování MIC byla použita data z předchozího experimentu, ve kterém byly použity ke screeningu antibiotické disky s metronidazolem v koncentraci 5 µg a 50 µg.

Bylo otestováno 36 sbírkových kmenů *Bifidobacterium*, které se skládaly z typových a oficiálních sbírkových kmenů a 4 spontánně rezistentních mutantních variant těchto kmenů, jež se vyskytly u 4 z 36 testovaných sbírkových kmenů při první screeningu testování antibiotické rezistence. Mutanti vznikali v inhibiční zóně (IZ) kolem antibiotika. Jednalo se o čirou zónu bez nárůstu bakterií, ve které se vyskytovaly okem viditelné malé kolonie mikroorganismů. Tyto kolonie byly vyizolovány a opětovně zidentifikovány pomocí MALDI – TOF MS. I když originální kopie daného kmene byla na metronidazol citlivá, tak mutanti následně vykazovali rezistenci vůči metronidazolu v koncentraci 5 µg i 50 µg.

Různorodost hostitelů byla variabilní. Jednalo se převážně o zvířecí hostitele a lidské izoláty. Nejvíce kmenů pocházelo z opic a to 13 kmenů. Lidské izoláty pocházely z dospělých jedinců či kojenců. V rámci druhové variability bifidobakterií se vyskytovala rezistence a citlivost na antibiotikum, která se projevovala různě velkými IZ.

5.1.1 Testování rezistence diskovou metodou

U 55 % kmenů byla detekována rezistence bifidobakterií ke koncentraci 5 µg metronidazolu. Celková rezistence u testovaných kmenů byla nezávislá na původním hostiteli i druhu. Průměrná IZ u koncentrace 5 µg byla 13,5 mm. Ze 4 zástupců *B. longum* byla pouze u 1 kmenu potvrzena citlivost, viz tabulka č. 2. U kmenu *B. longum* ssp. *suis* DSM 20211 v IZ vznikli mutanti. U těchto mutantů se změnila citlivost k metronidazolu. Mutanti se stali rezistentní vůči 5 µg, ale i 50 µg metronidazolu velikost IZ viz tabulka č.6. Další mutanti vznikli u kmenu *B. pseudocatenulatum* DSM 20438, *B. roussetti* DSM 109961 a *B. stellenboschense* DSM 23968. U všech nově vzniklých mutantů v IZ byla prokázána rezistence nezávisle na velikosti IZ mateřského kmenu. Ze 13 testovaných kmenů pocházejících z opic bylo rezistentních 46 %.

Při 10x vyšší koncentraci 50 µg metronidazolu byla rezistence detekována u 45 % testovaných kmenů bifidobakterií. Průměrná IZ při testování 50 µg byla 30,24 mm. Čtyři kmény, které byly rezistentní při koncentraci 5 µg začaly být citliví na metronidazol při 50 µg. Jedná se o *B. breve* ATCC 15700, *B. catenulatum* DSM 16992, *B. longum* ssp. *infantis* DSM 20088 a *B. catulorum* DSM 103154.

5.1.2 Testování MIC pomocí e-testu

Pomocí e-testu, který měl rozmezí koncentrace metronidazolu od 0,016 do 256 µg byla měřena minimální inhibiční koncentrace. V tomto případě platí pravidlo, že čím je větší

citlivost/ IZ u diskové metody, tím menší by měla být MIC. Celkem bylo otestováno 36 typových kmenů a 4 spontánně rezistentní mutanti. MIC koncentrace stanovená pomocí e-testu byla velmi variabilní což je patrné z dat uvedených v tabulce č. 6. Nejnižší hodnota MIC 2 µg byla naměřena u druhu *B. lemurum* DSM 28807 a nejvyšší, pokud nebudeme brát v potaz rezistenci, u druhu *B. catenulatum* DSM 16992 (64 µg). V rámci MIC byl zaznamenán rozdíl mezi poddruhy. *B. animalis* ssp. *animalis* DSM 20104 tento kmen měl společně s *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140 téměř stejnou velikost IZ, ale hodnota MIC byla odlišná viz tabulka č. 6. Podobný jev byl zaznamenán v rámci poddruhů u kmenů *B. longum* ssp. *longum* ATCC 15707 a *B. longum* ssp. *suis* DSM 20211. Zajímavé je, že u *B. catenulatum* DSM 16992 byl zaznamenán průměr IZ 36 mm a MIC 64 µg, což neodpovídá tomu, že při větší IZ by měla být hodnota MIC menší. Nicméně v případě detekce rezistence diskovou metodou při koncentraci 50 µg, došlo k potvrzení prostřednictvím e-testu, rezistence byla tedy potvrzena i při koncentraci metronidazolu 256 µg. To odpovídá 45 % testovaným kmenům.

Tabulka 6: Výsledky měření typových kmenů

Bifidobakteriální kmeny	Původ kmene	MTZ (5 µg)	MTZ (50 µg)	MIC (µg)
<i>B. actinocoloniiforme</i> DSM 22766	Hmyz	12,33 ± 2,05	33,00 ± 0,82	12
<i>B. aerophilum</i> DSM 100689 ^{MTZR}	Opice	R	R	R
<i>B. aesculapii</i> DSM 26737	Opice	10,00 ± 0	37,00 ± 0	8
<i>B. angulatum</i> DSM 20098	Člověk (dospělý)	R	R	R
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> DSM 20104	Hlodavec	10,00 ± 0	22,33 ± 0,94	48
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140	Mléčný výrobek	9,33 ± 0,47	23,67 ± 0,47	32
<i>B. asteroides</i> DSM 20089	Hmyz	R	R	R
<i>B. avesanii</i> DSM 100685 ^{MTZR}	Opice	18,33 ± 2,36	55,67 ± 3,30	3
<i>B. bombi</i> DSM 19703	Opice	15,00 ± 1,41	40,67 ± 1,89	3
<i>B. breve</i> ATCC 15700 ^{MTZR}	Člověk (kojenec)	R	21,33 ± 0,47	24
<i>B. callitrichidarum</i> DSM 103152 ^{MTZR}	Opice	R	R	R
<i>B. callitrichos</i> DSM 23973	Opice	R	R	R
<i>B. castoris</i> LMG 30937	Bobr	R	R	R
<i>B. catenulatum</i> DSM 16992 ^{MTZR}	Člověk (dospělý)	R	36,00 ± 1,41	64
<i>B. catulorum</i> DSM 103154	Opice	R	20,67 ± 0,47	16
<i>B. crudilactis</i> LMG 23609 ^{MTZR}	Mléčný výrobek	R	R	R
<i>B. lemurum</i> DSM 28807	Lemur	21,00 ± 1	30,50 ± 1,50	2
<i>B. longum</i> ssp. <i>infantis</i> DSM 20088 ^{MTZR}	Člověk (kojenec)	R	23,00 ± 4,08	24
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> ATCC 15707 ^{MTZR}	Člověk (dospělý)	14,00 ± 0	35,33 ± 0,47	16
<i>B. longum</i> ssp. <i>suillum</i> DSM 28597	Prase	R	R	R
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> DSM 20211	Prase	R	R	R
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> DSM 20211 ^{MTZR}	Prase	11,67 ± 0,47	35,33 ± 1,25	3
<i>B. merycicum</i> DSM 6492 ^{MTZR}	Přežvýkavec	R	R	R
<i>B. minimum</i> DSM 20102	Odpadní vody	R	R	R
<i>B. myosotis</i> DSM 100196	Opice	19,33 ± 0,47	38,33 ± 0,47	4
<i>B. pseudocatenulatum</i> DSM 20438 ^{MTZR}	Člověk (kojenec)	10,00 ± 0	26,67 ± 0,47	8
<i>B. pseudocatenulatum</i> DSM 20438	Člověk (kojenec)	R	R	R

<i>B. pseudolongum</i> sup. <i>pseudolongum</i> DSM 20099	Prase	R	R	R
<i>B. ramosum</i> DSM 100688 ^{MTZR}	Opice	15,33 ± 0,57	34,67 ± 0,47	4
<i>B. reuteri</i> DSM 23975	Opice	R	R	R
<i>B. roussetti</i> DSM 109961	Netopýr	20,33 ± 1,25	39,00 ± 0,82	4
<i>B. roussetti</i> DSM 109961	Netopýr	R	R	R
<i>B. saeculare</i> DSM 6531	Králík	R	R	R
<i>B. saguini</i> DSM 23967	Opice	12,00 ± 0,82	34,00 ± 0,82	8
<i>B. stellenboschense</i> DSM 23968	Opice	R	R	R
<i>B. stellenboschense</i> DSM 23968	Opice	17,67 ± 0,47	32,33 ± 1,25	3
<i>B. thermacidophilum</i> ssp. <i>porcinum</i> DSM 17755	Prase	10,33 ± 0,47	36,00 ± 4,24	3
<i>B. thermacidophilum</i> ssp. <i>thermacidophilum</i> DSM 15837	Odpadní vody	13,00 ± 0,82	25,33 ± 0,47	12
<i>B. tissieri</i> DSM 100201 ^{MTZR}	Opice	13,33 ± 0,47	22,67 ± 0,47	3
<i>B. tsurumiense</i> DSM 17777	Hlodavec	R	R	R

^{MTZR}přítomnost genu pro rezistenci 5-nitroimidazolu v genomu

5.2 Ověření výsledků u lidských divokých izolátů

V tomto experimentu bylo otestováno 27 různých bifidobakteriálních kmenů původem z odlišných hostitelů. V testování byly zastoupeny tyto druhy: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis* ssp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. longum* ssp. *longum*. Opět bylo vycházeno z dat získaných v předchozích testech, kdy byla použita disková difúzní metoda s 5 µg a 50 µg metronidazolu ve třech kopiích.

Z celkových 27 testovaných kmenů bylo vůči diskové difúzní metodě o koncentraci 5 µg metronidazolu rezistentní 52 % kmenů. Jednalo se o všechny zástupce *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum* a *B. dentium*, dále o jeden kmen *B. catenulatum* ze dvou a jeden kmen *B. longum* ssp. *longum* z 8 kmenů. Průměrná IZ u všech citlivých kmenů byla 14 mm.

V případě použití disků s koncentrací 50 µg bylo rezistentních 33 % z testovaných divokých kmenů, což je téměř o polovinu méně než u koncentrace 5 µg metronidazolu. U kmenů *B. adolescentis* byla detekována u 3 kmenů citlivost. Tyto kmene byly rezistentní na koncentraci 5 µg a u koncentrace 50 µg u nich vznikly IZ viz tabulka č. 7. Stejný úkaz se stal u jednoho z kmenů *B. catenulatum*. Poslední změna z rezistentního kmenu k antibiotiku na citlivý byla u jednoho z kmenů *B. longum* ssp. *longum*.

Vyskytovala se zde kmenová variabilita v rámci testovaných druhů. V případě druhu *B. adolescentis* bylo zastoupeno 6 kmenů z nichž 3 byly rezistentní k 5 µg i 50 µg metronidazolu. Dále byl testován druh *B. angulatum* se dvěma zástupci. U obou byla detekována komplexní rezistence, která korelovala s výsledkem u typového kmenu *B. angulatum* DSM 20098. Aby bylo možné potvrdit toto zjištění, bylo by třeba mít více izolátů divokých kmenů *B. angulatum*. Rezistence byla detekována i u *B. bifidum* a 3 kmenů *B. dentium*. U všech 5 druhů *B. animalis* ssp. *lactis* se vyskytovala citlivost odpovídající typovému kmenu *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140. Podobné výstupy byly zaznamenány u 7 z 8 kmenů *B. longum* ssp. *longum*. Sedm kmenů bylo citlivých na obě koncentrace antibiotika v rámci diskové metody podobně jako u typového kmenu *B. longum* ssp. *longum* ATCC 15707. Výsledky se lišily u 2 zástupců *B. catenulatum*. Jeden divoký kmen odpovídal typovému kmenu *B. catenulatum* DSM 16992, kdy nejdříve byla detekována rezistence u 5 µg

a u 50 µg již detekována nebyla. Rozdíl mezi těmito kmeny byl ve velikosti IZ u 50 µg viz tabulka č. 7. U druhého divokého kmenu v rámci *B. catenulatum* nebyla pozorována žádná rezistence.

K testování e–testem bylo použito celkem 27 kmenů. MIC stanovená pomocí e-testu byla velmi variabilní v rámci druhů, ale i kmenů viz tabulka č 7. U druhu *B. longum* ssp. *longum* HM5.2 byla naměřena nejnižší hodnota MIC 1,5 µg. Nejvyšší zaznamenaná hodnota MIC v případě, že nezahrnujeme rezistenci byla 32 µg u kmene *B. adolescentis* DB2.1. V rámci 6 testovaných kmenů druhu *B. adolescentis* byla u 2 kmenů zaregistrována velká odlišnost v hodnotě MIC, přestože tyto kmeny měly podobně velikou IZ viz tabulka č. 7. Kmen *B. adolescentis* DB2.1 měl nejvyšší MIC 32 µg a kmen *B. adolescentis* DM6.2 měl nejnižší MIC 4 µg. U 5 testovaných zástupců *B. animalis* ssp. *lactis* se MIC pohybovala od 6 µg do 16 µg metronidazolu. Zajímavý výsledek u MIC byl shledán u druhu *B. longum* ssp. *longum*. Oba kmeny *B. longum* ssp. *longum* DM5.1 a *B. longum* ssp. *longum* HM14.2 dosahovaly stejné hodnoty MIC 6 µg, ačkoliv jejich IZ byla jiná (podrobné výsledky viz tabulka č. 7). Jinak u tohoto druhu se pohybovala MIC od 1,5 µg do 16 µg.

Tabulka 7: Výsledky testování lidských izolátů

Bifidobakteriální kmeny	MTZ (5 µg)	MTZ (50 µg)	MIC
<i>B. adolescentis</i> DB10.1	R	R	R
<i>B. adolescentis</i> DB2.1	R	12,00 ± 0,82	32
<i>B. adolescentis</i> DB9.1	R	R	R
<i>B. adolescentis</i> DM6.2	R	12,67 ± 0,47	4
<i>B. adolescentis</i> DV3.1	R	R	R
<i>B. adolescentis</i> HM4.3	R	21,67 ± 0,47	12
<i>B. angulatum</i> HM3.1	R	R	R
<i>B. angulatum</i> HM3.2	R	R	R
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DB4.1	10,00 ± 0,82	22,00 ± 1,41	16
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DM10.1	9,33 ± 0,47	23,33 ± 1,25	12
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DM3.2	10,33 ± 1,25	23,67 ± 2,49	12
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> HM4.2	9,33 ± 0,47	29,67 ± 0,47	12
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> HM9.2	12,00 ± 0	24,33 ± 1,70	6
<i>B. bifidum</i> DB3.1	R	R	R
<i>B. catenulatum</i> DM12.1	R	19,33 ± 0,94	24
<i>B. catenulatum</i> HM8.2	12,33 ± 0,47	25,33 ± 0,47	4
<i>B. dentium</i> DM2.1	R	R	R
<i>B. dentium</i> DM2.2	R	R	R
<i>B. dentium</i> DM4.1	R	R	R
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DM1.1	R	31,33 ± 1,25	16
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DM12.1	11,67 ± 0,47	21,00 ± 0	3
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DM12.2	12,00 ± 0,82	23,67 ± 1,25	3
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DM20.1	16,33 ± 0,47	28,00 ± 0,82	3
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DM5.1	24,00 ± 4,08	45,00 ± 1,63	6
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> HM14.2	9,33 ± 0,47	25,33 ± 0,47	6
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> HM5.1	21,33 ± 2,49	41,33 ± 0,94	16
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> HM5.2	25,67 ± 3,30	45,67 ± 3,30	1,5

5.3 Testování *in vitro* kultivace fekálních vzorků

V rámci tohoto experimentu byly kultivovány vzorky stolice s metronidazolem a bez metronidazolu. Celkem bylo otestováno 5 vzorků stolice od lidských dárců, přesněji od 2 dospělých jedinců a 3 kojenců. Přestože dospělí jedinci si nebyli vědomi toho, že by byli v minulosti léčeni metronidazolem, lze předpokládat, že byli v průběhu života léčeni jinou antibiotickou terapií. U kojenců bylo jisté, že léčba metronidazolem během jejich života neproběhla a taktéž ani u matky v průběhu těhotenství.

V případě počtu bakterií bylo v původním 1 ml inokula (10x naředěná stolice) 10^8 - 10^9 KTJ/ml. Po subkultivaci došlo logicky k poklesu buněk. Jednalo se o uzavřený systém, ve kterém bylo použito selektivní médium pro bifidobakterie, které bylo v jedné kopii navíc doplněno o metronidazol, kde lze očekávat citlivost bifidobakterií na uvedené antibiotikum. Počty se taktéž lišily v závislosti na jedinci viz tabulka č. 8. Po subkultivaci v uzavřeném systému ve zkumavce s kyselinou octovou a mupirocinem bez metronidazolu byl počet bifidobakterií nižší většinou o 2 řády oproti původnímu inokulu. Největší pokles bifidobakterií byl zaznamenán u kojence (vzorek 2). Z původních 10^9 KTJ/ml bylo po subkultivaci spočítáno cca 10^6 KTJ/ml. V rámci testování bifidobakteriálních kultur ve zkumavkách s kyselinou octovou, mupirocinem a metronidazolem počet bakterií vzorků klesl o méně, než-li ve variantě bez metronidazolu. Výjimkou byl vzorek dospělého jedince (vzorek 1), kde byl opačný trend než u jiných vzorků. V tomto případě byl pokles bifidobakterií, v rámci testování s metronidazolem, větší než ve variantě bez metronidazolu. Bylo napočítáno 10^4 KTJ/ml z původních skoro 10^{10} KTJ/ml. Podrobné výsledky počtu bakterií viz tabulka č. 8.

Tabulka 8: Počty inokulovaných a detekovaných bifidobakterií

VZOREK (KTJ/ml inokula)	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5
Původní inokulum stolice	8,78	9,21	8,44	9,36	9,43
Subkultivace bez MTZ	6,85	5,67	6,52	7,45	7,81
Subkultivace s MTZ	4,47	6,9	7,02	7,62	7,73

Testování antibiotické citlivosti ku koncentraci 5 μ g a 50 μ g metronidazolu diskovou metodou probíhalo po izolaci a následné kultivaci narostlých kolonií na WSP agaru. Narostlé izoláty byly mikroskopicky zkontrolovány. Narostlá kultura bez podezření kontaminací byla připravena na identifikaci pomocí MALDI TOF MS. Ta samá kopie byla testována diskovou metodou. Z každého analyzovaného vzorku stolice bylo takto otestováno cca 20 izolátů vykultivovaných bez a s metronidazolem v selektivním médiu pro bifidobakterie.

U všech pěti testovaných vzorků stolice došlo po subkultivaci za výše uvedených podmínek s následnou kultivací na neselektivním WSP agaru k nárůstu kolonií bifidobakterií. Jejich druhová identita byla variabilní v závislosti na jedinci a také s ohledem na použité metronidazolu.

V případě prvního vzorku stolice od dospělého jedince (vzorek 1), byla zaznamenána největší variabilita druhů u izolátů pocházejících z kultivace bez metronidazolu. Byly detekovány kmeny náležícím ke druhům *B. longum*, *B. animalis* ssp. *lactis* a *B. adolescentis*. Všechny tyto kmeny byly citlivé na metronidazol při obou koncentracích. Kromě kmenu

1_19 *B. adolescentis*, který vykazoval rezistenci na metronidazol při koncentraci 5 µg. Průměrná IZ testovaných kmenů vykultivovaných bez metronidazolu byla u 5 µg metronidazolu 11 mm. Průměrná IZ u 50 µg metronidazolu byla 23 mm. Identifikace bakterií kultivovaných v metronidazolu byla unifikovaná. Zde byly izolovány pouze kmeny druhu *B. animalis* ssp. *lactis*. Z 20 kmenů bylo ke koncentraci 5 µg metronidazolu rezistentních 30 %. Průměrná velikost IZ u citlivých kmenů byla 9,5 mm. Při koncentraci 50 µg byly citlivé všechny kmeny a průměrná velikost IZ byla 20 mm. V porovnání s izoláty bez metronidazolu došlo ke snížení citlivosti, výsledek naznačoval možnou adaptaci na metronidazol. Vzorky 2_10 a 2_17 byly znovu subkultivovány s metronidazolem a při následné testování citlivosti diskovou metodou byly rezistentní i vůči 50 µg.

Ve druhém fekálním vzorku patřící 6. měsíčnímu kojenci (vzorek 2), byl identifikován pouze druh *B. longum*. Tento druh byl detekován jak u kultivace bez metronidazolu, tak i s ním. Kmeny pocházející z kultivace bez metronidazolu vykazovaly citlivost vůči 5 µg i 50 µg metronidazolu. Průměrná IZ kmenů při 5 µg koncentrace byla 11 mm. U disku s koncentrací 50 µg metronidazolu byla průměrná IZ 25 mm. Zajímavým jevem byl výskyt mutantů u kmenů 3_5 a 3_13 při vyšší koncentraci 50 µg. Kolonie mutantů vznikaly jako v předchozích testováních v IZ. Tito mutanti při dalším testování byli plně rezistentní u obou koncentrací (5 µg a 50 µg). U kmenů *B. longum* vyizolovaných z média s metronidazolem byla opět detekována 100% citlivost. V případě 5 µg byla průměrná IZ 11 mm tedy úplně stejná jako u kmenů kultivovaných z média bez metronidazolu. Podobného závěru bylo dosaženo i při měření u koncentrace 50 µg. Průměrná IZ zkoumaných kmenů byla 24 mm což téměř odpovídalo paralelně testovaným kmenům kultivovaných bez metronidazolu, jejichž průměrná IZ byla 25 mm. Opět byly nalezeny mutantní kolonie vyskytující se v IZ u 3 vzorků (4_3, 4_4, 4_5) při koncentraci 50 µg. U těchto mutantů platilo to stejně, jako v předchozích experimentech, mutanti byli rezistentní vůči 5 µg i 50 µg.

U třetího vzorku, vykultivovaného z média bez metronidazolu, pocházejícího od dospělého jedince (vzorek 3), bylo opět zidentifikováno pouze druh *B. longum*. Průměrná IZ kmenů při koncentraci 5 µg metronidazolu byla 14 mm. U koncentrace 50 µg byla IZ velká v průměru 26 mm. I zde vznikaly mutantní kolonie v IZ u 9 testovaných kmenů (viz tabulka č. 13 v kapitole **Samostatné přílohy**). Ke kultivaci bakterií s metronidazolem bylo vybráno celkem 16 izolátů. V tomto případě bylo ztotožněno 15 kmenů *B. longum* a 1 kmen *B. pseudocatenulatum*. U koncentrace 5 µg metronidazolu byla většina kmenů *B. longum* rezistentní. Jediný kmen 6_1 byl citlivý a měl velikost IZ 15 mm. Taktéž *B. pseudocatenulatum* vykazovalo citlivost vůči antibiotiku s velikostí IZ 11 mm. Stejně kmeny, které byly rezistentní na 5 µg metronidazolu vykazovaly rezistenci i k 50 µg. Kmen 6_1 *B. longum* a kmen *B. pseudocatenulatum* reagovaly na 50 µg metronidazolu velikostí IZ 25 mm. U kmenu 6_1 byly detekovány kolonie spontálních mutantů, po jejich subkultivaci byla opět prokázána rezistence k antibiotiku metronidazol.

Zajímavější zastoupení druhů bakterií bylo ztotožněno ve vzorku stolice, od 12. měsíčního kojence (vzorek 4), vykultivovaných bez metronidazolu. Vyskytovaly se zde druhy *B. bifidum*, *B. breve* a *B. longum*. Bohužel zástupci druhu *B. bifidum* a kmen *B. longum* 7_21 při testování citlivosti vůbec na agaru v Petriho misce nenarostli. *B. breve* byl při 5 µg metronidazolu rezistentní. Kmeny *B. longum* byly jako u předchozích vzorků citlivé a jejich průměrná IZ byla 18 mm. V rámci testování kmenů na 50 µg metronidazolu všechny kmeny

B. longum včetně *B. breve* byli citliví s průměrnou IZ 33 mm. U *B. breve*, a 7 kmenů *B. longum* vyrostlo v IZ kolonie mutantů. Identifikace bakterií kultivovaných z 16 izolátů v metronidazolu určila 2 zástupce druhu *B. animalis* ssp. *lactis* a 14 kmenů *B. longum*. Všechny testované kmeny *B. longum* byly rezistentní k 5 µg i 50 µg metronidazolu, stejně tak, jak se tomu stalo u vzorku č 3. Kmeny *B. animalis* ssp. *lactis* byly citliví na obě koncentrace. U 5 µg metronidazolu byla průměrná velikost IZ 8 mm a u 50 µg byla průměrná velikost IZ 20 mm.

V posledním fekálním vzorku, od 2. měsíčního kojence (vzorek 5), byly identifikovány pouze kmeny druhu *B. breve*. Jak u kultivace bez metronidazolu, tak i u kultivace s metronidazolem. Všechny kmeny byly rezistentní k 5 µg i 50 µg metronidazolu bez výjimky.

5.4 Vliv přítomnosti genu pro rezistenci 5-nitroimidazolu na citlivost/rezistenci detekovanou *in vitro*

V genomech některých druhů typových kmenů bifidobakterií byl detekován *in gen* pro rezistenci 5-nitroimidazolu. Na základě sekvencí tohoto genu, vyskytujících se u druhů typických pro lidského hostitele, byl navržen pár primerů MetBifReF a MetBifReR k detekci genu. Bohužel PCR metoda pro detekci uvedeného genu pomocí navrženého páru primerů nebyla optimalizována, a více se jí tato práce nezabývá.

Nicméně, v tabulce č. 6 jsou vyznačeny typové kmeny, u kterých byl uvedený gen detekován označeny MTZR. Avšak výsledek detekce genu nekoresponduje u většiny testovaných kmenů s výsledkem detekovaným *in vitro* pomocí diskové metody a e-testu, shoda byla zaznamenána pouze u *B. aerophilum* DSM 100689, *B. callitrichidarum* DSM 103152, *B. crudilactis* LMG 23609, *B. merycicum* DSM 6492,

6 Diskuze

Metronidazol je nitroimidazolové antibiotikum izolované z vláknitých bakterií rodu *Streptomyces*. V neredukovaném stavu je netoxický pro mikroorganismy. Důležitá je 5-nitroskupina, která má antimikrobiální, ale také mutagenní účinek (Duchêne 2016). Při redukci této skupiny dochází ke vzniku hydroxylaminu, který se dokáže vázat na DNA. Po navázání nastává ztráta spirálovitého uspořádání což vede k inhibici syntézy nukleových kyselin a nastává buněčná smrt (Jiang & Lin 2006). Metronidazol je účinný proti anaerobním mikroorganismům. V 50. letech 20. století byl používán proti *Trichomonas vaginalis*, která způsobovala gynekologické potíže. V průběhu let se tento lék začal používat i proti jiným bakteriím. Velice citlivé jsou k němu G- bakterie (*Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp. a *Helicobacter pylori*) (Freeman et al. 1997). V dnešní době je používán při infekcích gastrointestinálního traktu, zánětech pobřišnice, hnisavých onemocnění v oblasti břicha a pánve, při léčbě Crohnovy choroby, a nebo k profylaxi vzniku infekcí při operačních zákrocích (Serag-Wiessner 2013). Mezi nežádoucí účinky při léčbě tímto antibiotikem patří diskomfort v břišní oblasti způsobený střevní mikrobiální dysbiózou, periferní polyneuropatie, nauzea nebo poruchy CNS (Perencevich & Burakoff 2006).

Erikstrup et al. (2012) se ve své studii zabývali testováním citlivosti *C. difficile* k metronidazolu pomocí diskové difúzní metody. Výsledkem experimentu byla zjištěna snížená citlivost k tomuto antibiotiku. Studie od Tkhawko et al. (2017) popisuje míru rezistence *C. difficile* k metronidazolu v Izraeli. Jedná se přibližně o 20,25 % rezistentních kmenů. Prozatím získaná data napovídají, že rezistence na metronidazol je zřejmě zapříčiněna několika změnami v dosud nedefinovaných metabolických drahách, jako jsou ty, které zahrnují aktivitu nitroreduktáz, vychytávání železa a opravu DNA (Chong et al. 2014; Moura et al. 2014).

V rámci laboratorního mikrotetování doposud publikované výsledky přinesly informaci o možné rezistenci bifidobakterií k metronidazolu. Mezi bifidobakteriemi byly nalezené citlivé, ale i rezistentní kmeny. Moubareck et al. (2005) testovali 50 kmenů rodu *Bifidobacterium* pocházejících z různých hostitelů pomocí diskové difúzní metody. U 38 % testovaných bakterií byla detekována rezistence k metronidazolu. Existuje málo studií, které by se zaměřily na změnu mikrobioty v důsledku užívání metronidazolu. Péliissier (2010) et al. zkoumali účinky metronidazolu na mikrobiotu ve střevě potkanů. Odhalili zvýšenou populaci bifidobakterií o 2 log. Množství bifidobakterií bylo vyšší než u kontrolní skupiny. Dominantní byl druh *B. pseudolognum*. Důvodem rezistence v tomto případě může být nízké množství metronidazolu, které se dostane do tlustého střeva, ve srovnání s počáteční dávkou, protože antibiotika se absorbují hlavně v ileu.

V této diplomové práci bylo otestováno *in vitro* 36 typových kmenů a 27 divokých kmenů, pocházejících od různých hostitelů, diskovou difúzní metodou a e-testem. Erikstrup et al. (2012) vyhodnotili diskovou difúzní metodu jako vhodnou k testování citlivosti bakterií na antibiotika. Jedná se o levnou a snadno proveditelnou metodu. V rámci typových kmenů byla zjištěna rezistence k 5 µg metronidazolu u 55 % kmenů a k 50 µg metronidazolu u 45 % testovaných zástupců. V případě experimentu s divokými izoláty pocházejících od lidí bylo k 5 µg metronidazolu rezistentních 52 % kmenů a k 50 µg metronidazolu 33 % bifidobakterií. Byla objevena nejenom mezidruhová variabilita, ale i variabilita v rámci jednoho druhu, tedy

na úrovni kmene. Toto zjištění bylo detekováno u zástupců druhu *B. adolescentis* a *B. longum*. Navíc bylo zjištěno, že disková metoda s koncentrací 50 µg metronidazolu je vhodná ke stanovení rezistence k metronidazolu u bifidobakterií.

Pro *Bifidobacterium* nejsou prozatím popsány žádné mechanismy rezistence k metronidazolu. V případě rezistence si mikroorganismy nedostatečně aktivují metronidazol. Rezistence k tomuto antibiotiku je spojena s geny *nim* („nitroimidazole resistance genes“). Tyto geny jsou kódované na mobilních genetických elementech a chromozomech a jsou přenosné konjugativním procesem (Patel et al. 2009). Dalším mechanismem, který zapříčiňuje rezistenci na metronidazol je nadměrná exprese proteinu *RecA*. Tento protein je využíván k opravě DNA (Steffens et al. 2010). Za rezistenci bifidobakterií k metronidazolu může být zodpovědný chybějící ferredoxinový systém, který je odpovědný za redukci mateřské sloučeniny metronidazolu (Behra-Miellet et al. 2003).

V našem testování diskovou difúzní metodou se podařilo detekovat spontánní mutace. Krasovec (2020) ve své práci zjistil, že rychlost spontánní mutace je velmi proměnlivá. Hlavním důvodem je vliv prostředí na rychlost mutace. Spontánní mutace je ovlivněna rychlostí metabolismu, dobou množení či oxidačním stresem. Kvůli tomu mohou být velké rozdíly mezi druhy nebo dokonce mezi populacemi stejného druhu. V našem případě byl výskyt mutantů zaznamenán především u druhů *B. longum* vyizolovaných z fekálních vzorků a dále u typových kmenů *B. pseudocatenulatum*, *B. roussetti* a *B. stellenboschense*. V inhibičních zónách u disků s koncentrací 50 µg vznikali rezistentní mutanti. Tito mutanti byli při dalším testování citlivosti zcela rezistentní k metronidazolu. Vznik spontánních mutantů není ojedinělý. V roce 2007 Vitali et al. zkoumali vývoj rezistence metodou *in vitro* na antibiotikum rifaximin u *B. breve*, *B. infantis* a *B. adolescentis*. I v této studii byl objeven výskyt spontánních mutantů s podobným závěrem. Mutanti se též začali vyskytovat při vyšších koncentracích antibiotika, jako v našem případě. Vitali et al. (2007) studovali stabilitu rezistence mutantů. Dospěli k názoru, že rezistence u mutantů přetrvává i po více než 400 bakteriálních generací. Další zajímavý mechanismus, byl zaznamenán u *B. animalis* ssp. *lactis*. U tohoto druhu vznikala postupná rezistence při kontaktu s metronidazolem.

Prozatím není stanovena žádná MIC k metronidazolu pro rod *Bifidobacterium*. Zprvée neexistuje mnoho vědeckých prací ohledně tohoto tématu. Moubareck et al. (2005) byli jedni z mála, kteří zkoumali pomocí diskové difúzní metody rezistenci bifidobakterií k metronidazolu. Navíc je stanovení MIC velice obtížné, protože se vyskytuje obrovská variabilita i v rámci druhu. V našem testování e-testy vykazovaly např. u *B. longum* ssp. *longum* MIC v rozpětí od 1,5 µg po 16 µg. Tyto poznatky jsou velmi různorodé k jasnému stanovení MIC. Celkem bylo otestováno 63 kmenů. Výsledky diskové difúzní metody často korespondovaly s výsledky e-testu. Stejně shody mezi diskovou difúzí a e-testem dosáhli Erikstrup et al. (2012), kteří testovali citlivost *C. difficile* k metronidazolu a k dalším antibiotikům. V případě, že bifidobakteriální kmen byl rezistentní k 50 µg metronidazolu, tak rezistence byla zaznamenána i na celé koncentrační škále e-testu. Tento fakt vede k tomu, že disková difúzní metoda je dostačující pro screening citlivosti a rezistence u bifidobakterií k metronidazolu. Ammor et al. (2008) testovali citlivost 143 kmenů bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií k 6 různým antibiotikům (chloramfenikol, klindamycin, erytromycin, streptomycin, tetracyklin a vankomycin). Pro různé druhy a kmeny byly nalezeny různé hodnoty MIC. Rozsah některých hodnot MIC u těchto antibiotik naznačoval, že některé

z testovaných kmenů mají získanou rezistenci vůči antibiotikům. To znamená, že kmen typicky citlivého druhu je odolný vůči antibiotiku. O přirozenou rezistenci se jedná v případě, kdy rezistence vůči danému antibiotiku je typická pro všechny kmeny daného druhu. K získávání rezistence dochází prostřednictvím mutací původních genů nebo horizontálním přenosem.

Rezistence je v rámci probiotik považována za nežádoucí. Existuje riziko šíření rezistence horizontálním přenosem (Onyibe et al. 2013). Některé výzkumy dokázaly častý výskyt horizontálního přenosu genů mezi bakteriemi vyskytujícími se ve střevě lidí a zvířat (Brito et al. 2016; Hagbo et al. 2019). Moubareck et al. (2005) ve své práci popisuje, že relativní rezistence k metronidazolu může být přínosná. Souběžně s antibiotikem by se mohlo užívat vhodné probiotikum, které by zabránilo inhibici pozitivně působících bakterií. Dle výsledků z naší práce by vhodným kandidátem, díky postupné rezistenci, mohl být zástupce druhu *B. animalis* ssp. *lactis*. Tento druh je nejčastěji používaný pro výrobu komerčních probiotik díky svým dobrým technologickým vlastnostem. Je odolný vůči kyslíku a kyselinám (Palaria et al. 2012). Dalším kandidátem pro probiotikum v kombinaci s metronidazolem by mohl být druh *B. breve* a *B. longum*. Všechny kmeny *B. breve* byly v našem testování u fekálních vzorků *in vitro* zcela rezistentní. A u kmenů *B. longum*, které byly kultivované v metronidazolu byla taktéž detekována rezistence. Navíc u *B. longum* byly nalezeny spontánně rezistentní mutanti. K přesnému určení příhodných bifidobakteriálních druhů pro výrobu probiotik, které by se daly užívat společně s metronidazolem by bylo třeba otestovat více vzorků.

Geny kódující bakteriální rezistenci proti antibiotikům se nazývají rezistom. Velká část rezistomu je obsažena v chromozomální DNA (Duranti et al. 2017). V dnešní době je celá řada studií zabývajících se analýzou genomu u bifidobakterií. Ovšem jen v některých je zmíněn metronidazol. Mancino et al. (2019) ve své studii analyzovali databázi složenou z 625 bifidobakteriálních genomů. Celkový počet genů rezistence na antibiotika identifikovaných mezi těmito 625 genomy byl 13 870, což představuje méně než 1 % z celkového počtu analyzovaných genů bifidobakterií. Pouze 64 genů bylo identifikováno jako geny zodpovědné za rezistenci k metronidazolu. Výsledkem studie bylo, že se na šíření antibiotické rezistence podílí pravděpodobně jen omezený počet bifidobakteriálních genů. V rámci analýz této diplomové práce bylo zjištěno, že i když byla na základě genomových informací nalezena přítomnost genu zodpovědného za rezistenci, výsledek testování *in vitro* neodpovídal tomuto genu. Toto zjištění poukazuje to na to, že mechanismů zodpovědných za rezistenci bude více.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo objevit mechanismy antibiotické rezistence bakterií rodu *Bifidobacterium* a určit jejich MIC k metronidazolu. Jestliže by byly shledány rezistentní druhy, mohly by být využity jako probiotika při antibiotické léčbě metronidazolem. Bylo vycházeno z hypotézy, že určité druhy a kmeny bifidobakterií budou mít ve svém genomu gen sloužící k rezistenci na 5-nitroimidazolová antibiotika.

Hypotézu se nepodařilo potvrdit. Z 13 typových kmenů, pro něž byla k dispozici genomová data o přítomnosti genu na rezistenci k 5-nitroimidazolovým antibiotikům, byla detekována rezistence při zkoumání *in vitro* pouze u 4 kmenů. Nicméně bylo objeveno několik zajímavých poznatků ohledně citlivosti a rezistence k metronidazolu.

V rámci testování typových a divokých kmenů bifidobakterií *in vitro* bylo zjištěno, že se kmeny liší z hlediska citlivosti k metronidazolu nejenom na úrovni druhové, ale i mezi kmeny stejného druhu. Při testování koncentrace 5 μg a 50 μg metronidazolu diskovou difúzní metodou byla zaznamenána častá rezistence. V případě, že kmen byl rezistentní k 50 μg metronidazolu, výsledek koreloval s vyhodnocením e-testu, kde byl kmen rezistentní na celém koncentračním měřítku. Toto zjištění potvrdilo, že koncentrace 50 μg metronidazolu je vhodným ukazatelem pro určení rezistence bifidobakterií. Dále byly objeveny při koncentraci 50 μg metronidazolu v IZ mutantní kolonie. Tito mutantí vznikali spontánně a při dalších testování byli zcela rezistentní vůči metronidazolu.

U testování fekálních vzorků, které byly kultivované bez metronidazolu a s ním, byly potvrzeny výsledky z měření čistých kmenů. Objevila se druhová i kmenová variabilita. Opět docházelo ke vzniku mutantů v IZ, kteří byli při dalších experimentech taktéž rezistentní. U kmenů *B. animalis* ssp. *lactis* byla detekována postupná rezistence k metronidazolu. Bakterie, které nebyly kultivované s metronidazolem byly více citlivé k tomuto antibiotiku.

K objevení genu na rezistenci proti imidazolovým antibiotikům by bylo třeba vyvinout funkční primer pro PCR detekci. Je složité určit MIC kvůli velké variabilitě v rámci druhů a kmenů. Taktéž je třeba otestovat více vzorků k přesnějším závěrům ohledně rezistence. To by pomohlo určit vhodné adepty k složení probiotických preparátů při léčbě metronidazolem.

8 Literatura

Aizawa E, Tsuji H, Asahara T, et al. 2016. Possible association of Bifidobacterium and Lactobacillus in the gut microbiota of patients with major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders* **202**: 254–257.

Akhi MT, Ghotaslou R, Beheshitirouy S et al. 2017. Nim gene-independent metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis* in surgical site infections. *GMS hygiene Infection Control* **12**:13

Alberoni D, Gaggia F, Baffoni L, Modesto MM, Biavati B, Gioia D. 2019. *Bifidobacterium xylocopae* sp. nov. and *Bifidobacterium aemilianum* sp. nov., from the carpenter bee (*Xylocopa violacea*) digestive tract. *Systematic and Applied Microbiology* **42**: 205-16

Al-Shukri MSM, Hmood AM, Al-Charrakh AH. 2021. Sequencing of *Clostridium perfringens* toxin genes (cpa, etx, iap) from Iraqi hospitals and detection by PCR of the genes encoding resistance to metronidazole, tetracycline, and clindamycin. *Indian Journal of Medical Microbiology* **39**: 289-294. DOI: 10.1016/j.jmmb.2021.03.017

Amat-Bou M, Garcia-Ribera S, Climent E, Piquer-Garcia I, Corripio R, Sanchez-Infantes D, et al. 2020. Effects of bifidobacterium animalis subsp. lactis (BPL1) supplementation in children and adolescents with prader–willi syndrome: A randomized crossover trial *Nutrients* **12**: 3123

Amaretti A, Bernardi T, Tamburini E, Zanoni S, Lomma M, Matteuzzi D, Rossi M. 2007. Kinetics and metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 growing on glucose, galactose, lactose, and galactooligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* **73** DOI: 10.1128/AEM.02914-06

Ammor MS, Flórez AB, Van Hoek AHAM, De Los Reyes-Gavilán CG, Aarts HJM, Margolles A, Mayo B. 2008. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **14**: 6–15

Ang CW, Jarrad AM, Cooper MA, Blaskovich MAT. 2017. Nitroimidazoles: Molecular fireworks that combat a broad spectrum of infectious diseases. *J. Med. Chem.* **60**: 7636–7657

Aranda J, Bardina C, Beceiro A, Rumbo S, Cabral MP, Barbé J, Bou G. 2011. *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. *J. Bacteriol.* **193**: 3740-3747

Behra-Miellet J, Calvet L, Dubreuil L. 2003. Activity of linezolid against anaerobic bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* **22**: 28-34

- Beneš J. 2018. Antibiotika systematika, vlastnosti a použití. Grada Publishing a.s., Praha.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology* **50**: 117-131.
- Bottacini F, Ventura M, Van Sinderen D, Motherway MOC. 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. In *Microbial cell factories* **13** DOI: 10.1186/1475-2859-13-S1-S4
- Bratzler DW, Dellinger EP, Olsen KM, et al. 2013. Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. *Weinstein.Surgical Infections* **14**: 73-156. DOI: 10.1089/sur.2013.9999
- Brito IL, Yilmaz S, Huang K, et al. 2016. Mobile genes in the human microbiome are structured from global to individual scales. *Nature* **535**: 435–439.
- Bryan LE, Kwan S. 1981. Mechanisms of aminoglycoside resistance of anaerobic bacteria and facultative bacteria grown anaerobically. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **8**:1-8
- Bryan LE, Kowand SK, Van den Elzen HM. 1979. Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteriodes fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **15**: 7-13
- Butta H, Sardana R, Vaishya R, Singh KN, Mendiratta L. 2017. Bifidobacterium: an emerging clinically significant metronidazole-resistant anaerobe of mixed pyogenic infections. *Cureus* **9**: 1134. DOI: 10.7759/cureus.1134
- Chen L, Van Meerbeke S, Albesiano E, Goodwin A, Wu S, Yu H, Carroll K, Sears C. 2015. Fecal detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* **34**: 1871-1877
- Chen J, Wang J, Zheng H. 2021. Characterization of *Bifidobacterium apousia* sp. nov., *Bifidobacterium choladohabitans* sp. nov., and *Bifidobacterium polysaccharolyticum* sp. nov., three novel species of the genus *Bifidobacterium* from honey bee gut. *Systematic and Applied Microbiology* **44** DOI: 10.1016/j.syapm.2021.126247
- Chong PM, Lynch T, McCorrister S, Kibsey P, Miller M, Gravel D, Westmacott GR, Mulvey MR, Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). 2014. Proteomic analysis of a NAP1 *Clostridium difficile* clinical isolate resistant to metronidazole. *PLoS One* **9**:e82622. doi:10.1371/journal.pone.0082622.

- Collins DA, Hawkey PM, Riley TV. 2013. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* **2**: article 21 DOI: 10.1186/2047-2994-2-21
- Cryan JF, Dinan TG. 2012. Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience* **13**: 701–712
- Cunha BR, Fonseca LP, Calado CRC. 2019. Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go?. *Antibiotics*: **8** DOI: 10.3390/antibiotics8020045
- Dapa T, Leuzzi R, Baban ST, Ng YK, Adamo R, Kuehne SA, Scarselli M, Minton NP, Serruto D, Unnikrishnan M. 2013. Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* **195**:545–555. DOI:10.1128/JB.01980-12.
- Danielsen M, Wind A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology* **82**: 1-11
- Davies J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, **264**: 375-382
- Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, et al. 2015. European society of clinical microbiology and infectious diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology and Infection* **20**: 1–26. DOI: 10.1111/1469-0691.12418.
- Diaconu S, Predescu A, Moldoveanu A, Pop CS, Fierbinteanu-Braticevici C. 2017. *Helicobacter pylori* infection: old and new. *J Med Life* **10**:112-117
- Diniz CG, Santos SG, Pestana ACN, Farias LM, Carvalho MAR. 2000. Chromosomal breakage in the *B. Fragilis* group induced by metronidazole treatment. *Anaerobe* **6**: 149-153
- Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X, Ling D. 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 119-125
- Duchêne M, Walochnik J. 2016. Protozoan Parasites and Their Molecules. *Molecular Parasitology*. Springer- Verlag: 325-379, DOI: 10.1007/978-3-7091-1416-2_11
- Durand GA, Raoult D, Dubourg G. 2019. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents* **53**: 371-382 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>.
- Durante-Mangoni, E. a kol. 2009. Do we still need the aminoglycosides? *International Journal of Antimicrobial Agents* **3**: 201-205.

- Duranti S, Lugli GA, Mancabelli L, et al. 2017. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes among Human Gut-Derived Bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**
- Duranti S, et al. 2019. Characterization of the phylogenetic diversity of five novel species belonging to the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium castoris* sp. nov., *Bifidobacterium callimiconis* sp. nov., *Bifidobacterium goeldii* sp. nov., *Bifidobacterium samirii* sp. nov. and *Bifidobacterium dolichotidis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **69**: 1288-98.
- Duranti S, et al. 2020. Characterization of the phylogenetic diversity of two novel species belonging to the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium cebidarum* sp. nov. and *Bifidobacterium leontopithecii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **70** DOI: 10.1099/ijsem.0.004032
- Duranti S, Ruiz L, Lugli GA, Tames H, Milani C, Mancabelli L, et al. 2020. *Bifidobacterium adolescentis* as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. *Scientific Reports* **10**: DOI: 10.1038/s41598-020-70986-z
- Edwards DI. 1993. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms I. Mechanism of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **31**: 9–20 DOI: 10.1093/jac/31.1.9
- EFSA. 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J* **10**: 2740
- EFSA. 2012. Technical Guidance, Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J* :732: 1-15.
- Egan AJ, Cleverley RM, Peters K, Lewis RJ, Vollmer W. 2017. Regulation of bacterial cell wall growth. *FEBS J.* 2017 Mar 284(6): 851-867 DOI: 10.1111/febs.13959
- Epand RM, Wang G, Berno B, Epand RM. 2009. Lipid segregation explains selective toxicity of a series of fragments derived from the human cathelicidin LL-37. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53** (9): 3705- 3714
- Erikstrup LT, Danielsen TKL, Hall V, Olsen KEP, Kristensen B, Kahlmeter G, Fuursted K, Justesen US. 2012. Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. *Clinical Microbiology and Infection* **18**: E266-E272. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03907.x
- European Centre for Disease Prevention and Control. 2020. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019. *Trop Doct*, **30**:114-116

- Evans CT, Safdar N. 2015. Current trends in the epidemiology and outcomes of *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases* **60**: 66–71. DOI: 10.1093/cid/civ140
- Finch R., Garrod L P. 2003. Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy. New York: Churchill Livingstone. 11-24
- Francesco VD, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Rosania R, Ierardi E. 2011. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: an updated appraisal. *World J. Gastrointest. Pathophysiol* **2**: 35–41. DOI: 10.4291/wjgp.v2.i3.35
- Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC. 1997. Metronidazole. *Drugs* **54**: 679–708. DOI: 10.2165/00003495-199754050-00003
- Fryčák P. 2020. Vztah výskytu reziduí antibiotik a bakteriální rezistence v odpadních a přírodních vodách. *Chemické listy* **114**: 815-822
- Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PLH. 2011. Encyclopedia of dairy sciences 2nd ed. Academic Press, Amsterdam
- Gavini F, Pourcher AM, Neut C, Monget D, Romond C, Oger C, Izard D. 1991. Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **4**: 548-557
- Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJ, Berg DE, Hoffman PS. 1998. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol* **28**: 383–393
- Görner F, Valík L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívatin 1. vyd. Malé centrum, Bratislava
- Gueimonde M, Florez AB, van Hoek AH, Stuer-Lauridsen B, Stroman P, de los Reyes-Gavilan CG, et al. 2010. Genetic basis of tetracycline resistance in *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*. *Appl. Environ. Microbiol* **76**: 3364-3369
- Guglielmetti S, Mayo B, Alvarez-Martin P. 2013. Mobilome and genetic modification of bifidobacteria. *Benef. Microbes*. **4**: 143–166.
- Hagbo M, Ravi A, Angell, et al. 2019. Experimental support for multidrug resistance transfer potential in the preterm infant gut microbiota. *Pediatr. Res.* **231**.
- Henne K, Rheinberg A, Melzer-Krick B, Conrads G. 2015. Aciduric microbial taxa including *Scardovia wiggisiae* and *Bifidobacterium* spp. in caries and caries free subjects. *Anaerobe* **35**: 60-65

- Hill C, Guarner F, Reid G. et al. 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**: 506–514. DOI:10.1038/nrgastro.2014.66
- Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, et al. 2017. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* **153**: 420–429
- Huddleston JR. 2014. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist* **7**:167–176. DOI: 10.2147/IDR.S48820.
- Iwasaki H, Araki Y, Ito E, Nagaoka M, Yokokura T. 1990. Structure of macroam- phiphiles from several *Bifidobacterium* strains. *Journal of Bacteriology* **172**: 845-852
- Jiang X, Lin X. 2006. Voltammetry of the interaction of metronidazole with DNA and its analytical applications. *Bioelectrochemistry* **68**: 206–212 DOI: 10.1016/j.bioelechem.2005.08.003
- Jenks, PJ, Ferrero RL, Labigne A. 1999. The role of the *rdxA* gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**: 753–758.
- Kheadr E, Dabour N, von Ah U, Lacroix C, Meile L, Fliss I. 2007. Genetic and phenotypic diversity of *Bifidobacterium thermacidophilum* fecal isolates from newborns. *Canadian Journal of Microbiology* **53**: 1348–1359
- Kim SY, Joo YM, Lee HS, Chung IS, Yoo YJ, Merrell DS, Cha JH. 2009. Genetic analysis of *Helicobacter pylori* clinical isolates suggests resistance to metronidazole can occur without the loss of functional *rdxA*. *Journal of Antibiotics* **62**: 43-50
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* **8(6)**: 423-435 DOI:10.1038/nrmicro2333
- Kolář M, Štrbová P. 2015. Vývoj rezistence invazivních bakterií v souvislosti se spotřebou antibiotik. *Klinická farmakologie a farmacie* **29**: 49–52
- Krasovec M. 2020. The spontaneous mutation rate of *Drosophila pseudoobscura*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **11**. Genetics Society of America.
- Kunová G, Vidailac A, Ročková Š, Rada V, Lisová I. 2012. Testování bifidobakterií na citlivost vůči antimikrobiálním látkám. *Mlekarske listy* **135**: 1-3
- Kwon DH, Kato M, El-Zaatari FAK, Osato MS, Graham DY. 2000. Frameshift mutations in NAD(P)H flavin oxidoreductase encoding gene (*frxA*) from metronidazole resistant *Helicobacter pylori* ATCC43504 and its involvement in metronidazole resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**: 197–202.

- Leitsch D, Sóki J, Kolarich D, Urbán E, Nagy E. 2014. A study on Nim expression in *Bacteroides fragilis*. *Microbiology* **160**: 616-622
- Leitsch D. 2019. A review on metronidazole: an old warhorse in antimicrobial chemotherapy. *Parasitology* **146**: 1167–1178.
- Lincová D a Faghali H. 2007. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén, Praha
- Löfmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C. 2005. Inducible metronidazole resistance and nim genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. *Antimicrob. Agents Chemother* **49**: 1253-1256
- Lukáš M, Chalupná P. 2005. Antibiotika v terapii idiopatických střevních zánětů. *Ces.Slov.Gastroent.hepatol.* **3**: 122-126
- Lüllman H, Mohr K, Hein L. 2007. *Barevný atlas farmakologie*. Grada Publishing, Praha
- Mancino W, Lugli GA, van Sinderen D, Ventura M, Turrone F. 2019. Mobilome and Resistome Reconstruction from Genomes Belonging to Members of the Bifidobacterium Genus. *Microorganisms* **7**: 638 DOI: 10.3390/microorganisms7120638
- McCartney AL. 2003. Bifidobacteria IN foods. *Encyclopedia of food sciences and nutrition* 463-470. DOI: 10.1016/B0-12-227055-X/00094-8
- Melo MN, Ferre R, Castanho MA. 2009. Antimicrobial peptides: Linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol* **7**, 245–250
- Meulen RV, Adriany T, Verbrugghe K, Vuyst L. 2006. Kinetic analysis of bifidobacterial metabolism reveals a minor role for succinic acid in the regeneration of NAD⁺ through its growth-associated production. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5204-5210.
- Milani C, Duranti S, Lugli GA, Bottacini F, Strati F, Arioli S, et al. 2013. Comparative genomics of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* reveals a strict monophyletic bifidobacterial taxon. *Appl. Environ. Microbiol* **79**: 4304-4315
- Miller-Catchpole, R. 1989. *Bifidobacteria in clinical microbiology and medicine*. *Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria* 177-200. CRC Press, Boca Raton, CA, USA.
- Mistou MY, Sutcliffe IC, van Sorge NM. 2016. Bacterial glycobiology: rhamnase-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **40**(4): 464-79. DOI: 10.1093/femsre/fuw006

- Morovic W, Roper JM, Smith AB, et al. 2017. Safety evaluation of HOWARU® restore (*Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus paracasei* Lpc-37, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04 and *B. lactis* BI-07) for antibiotic resistance, genomic risk factors, and acute toxicity. *Food and Chemical Toxicology* **110**: 316-324. DOI: 10.1016/j.fct.2017.10.037
- Moura I, Monot M, Tani C, Spigaglia P, Barbanti F, Norais N, Dupuy B, Bouza E, Mastrantonio P. 2014. Multidisciplinary analysis of a nontoxigenic *Clostridium difficile* strain with stable resistance to metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:4957–4960. DOI: 10.1128/AAC.02350-14.
- Moubareck C, Gavini F, Vaugien L, Butel MJ, Doucet-Populaire F. 2005. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**: 38–44 DOI: 10.1093/jac/dkh495
- Müller M, Gorrell TE. 1983. Metabolism and metronidazole uptake in *Trichomonas vaginalis* isolates with different metronidazole susceptibilities. *Antimicrob. Agents Chemother* **24**: 667–673
- Nagaoka M, Hashimoto S, Shibata H, Kimura I, Kimura K, Sawada H, Yokokura T. 1996. Structure of a galactan from cell walls of *Bifidobacterium catenulatum* YIT4016. *Carbohydrate Research* **281**: 285-291.
- Nagaoka M, Shibata H, Kimura I, Hashimoto S, Kimura K, Sawada H, Yokokura T. 1995. Structural studies on a cell wall polysaccharide from *Bifidobacterium longum* YIT4028. *Carbohydrate Research* **274**: 245-249.
- Nagel JL, Aronoff DM. 2015. 28-Metronidazol. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* **1**: 350-357
- Nagy E, Urbán E. 2011. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**: 371-379
- Neuzil-Bunesova V, Lugli GA, Modrackova N, Makovska M, Mrazek J, Mekadim C, Musilova S, Svobodova I, Spanek R, Ventura M, Killer J. *Bifidobacterium canis* sp. nov., a novel member of the *Bifidobacterium pseudolongum* phylogenetic group isolated from faeces of a dog (*Canis lupus f. familiaris*), *Int J Syst Evol Microbiol.* DOI: 10.1099/ijsem.0.004378
- Norman KN, Scott HM, Harvey RB, Norby B, Hume ME. 2014. Comparison of antimicrobial susceptibility among *Clostridium difficile* isolated from an integrated human and swine population in Texas. *Foodborne Pathog Dis* **11**:257–264. DOI: 10.1089/fpd.2013.1648
- Novik G, Savich V. 2020. Beneficial microbiota. Probiotics and pharmaceutical products in functional nutrition and medicine. *Microbes and Infection* **22**: 8-18

- Onyibe JE, Oluwole OB, Ogunbanwo ST, Sanni AI. 2013. Antibiotic susceptibility profile and survival of *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium catenulatum* of human and avian origin in stored yoghurt. *Nigerian Food Journal* **31**: 73-83. DOI: 10.1016/S0189-7241(15)30079-5.
- Ooijevaar RE, Van Beurden YH, Terveer EM et al. 2018. Update of treatment algorithms for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* **24**: 452–462.
- Op den Camp HJM, Oosterhof A, Veerkamp JH. 1985. Cell surface hydrophobicity of *Bifidobacterium bifidum* subsp. *pennsylvanicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **51**: 303-312.
- O'Callaghan A, van Sinderen D. 2016. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. *Frontiers in Microbiology* **7** DOI: 10.3389/fmicb.2016.00925
- Ouwehand AC, Forssten S, Hibberd AA, Lyra A, Stahl B. 2016. Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Ann Med* **48**: 246-255 DOI: 10.3109/07853890.2016.1161232
- Palaria A, Johnson-Kanda I, O'Sullivan J. 2012. Effect of a synbiotic yogurt on levels of fecal *Bifidobacteria*, *Clostridia*, and *Enterobacteria*. *Appl. Environ. Mikrobiol* **78**: 933-940.
- Patel EH, Paul LV, Casanueva AI, Patrick S, Abratt VR. 2009. Overexpression of the rhamnose catabolism regulatory protein, RhaR: a novel mechanism for metronidazole resistance in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **64**: 267-273
- Parnanen K, Karkman A, Hultman J, et al. 2018. Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements. *Nat. Commun.* **9**: 3891
- Pélissier MA, Vasquez N, Balamurugan R, Pereira E, Dossou-Yovo F, Suau A, Pochart P, Magne F. 2010. Metronidazole effects on microbiota and mucus layer thickness in the rat gut. *FEMS Microbiology Ecology* **73**: 601–610. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2010.00916.x
- Perencevich M, Burakoff R. 2006. Use of antibiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **12**: 651–664.
- Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D, Rossi M. 2007. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 179–185
- Pool K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.* **39**: 162-176
- Quintiliani R, Jr Sahm DF, Courvalin P. 1999. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In *Manual of Clinical Microbiology*, **7**: 1505- 1525

- Raoult D. 2016. Alice's living croquet theory. *Int J Antimicrob Agents* **47**: 249 DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.01.013
- Rieber H, Frontzek A, Jerosch J, et al. 2018. Periprosthetic joint infection caused by anaerobes retrospective analysis reveals no need for prolonged cultivation time if sensitive supplemented growth media are used. *Anaerobe* **50**: 12-18
- Roberts, M. C. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **245**:195-203.
- Sarkar SR, Mazumder MP, Banerjee S. 2020. Probiotics protect against gut dysbiosis associated decline in learning and memory. *Journal of Neuroimmunology* **348**
- Sarkar P, Yarlagadda V, Ghosh C, Haldar J. 2017. A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics. *Medchemcomm* **8(3)**: 516-533. DOI:10.1039/c6md00585c
- Scardovi V.1986. Genus *Bifidobacterium* Orla – Jensen 1924. 1418 – 1434 in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2*. Sneath P, Williams E, Wilkins W, Baltimore
- Schmidt G, Zink R. 2000. Basic features of the stress response in three species of bifidobacteria: *B. longum*, *B. adolescentis*, and *B. breve*. *International Journal of Food Microbiology* **55**: 41–45.
- SERAG-WIESSNER. 2013. Příbalový leták- Metronizadole- Serag. <https://pribaloveletaky.cz/metronidazol-serag> ke dni 27.12.2021
- Simon C, Stille W, Hejzlar M. 1998. *Antibiotika v současné lékařské praxi*. Grada, Praha
- Smith MA, Edwards DI. 1995. Redox potential and oxygen concentration as factors in the susceptibility of *Helicobacter pylori* to nitroheterocyclic drugs. *J. Antimicrob. Chemother* **35**: 751–764.
- Spigaglia P. 2016. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection. *Ther Adv Infect Dis* **3**:23–42. DOI:10.1177/2049936115622891.
- Státní ústav pro kontrolu léčiv. 2017. *Český lékopis*. SÚKL, Praha
- Stebel R, Vojtilová L, Husa P. 2020. Aktuality v léčbě a prevenci klostridiové kolitidy. *Vnitřní lékařství* **66**: e24-e28
- Steffens LS, Nicholson S, Paul LV, Nord CE, Patrick S, Abratt VR. 2010. *Bacteroides fragilis RecA* protein overexpression causes resistance to metronidazole. *Res. Microbiol.* **161**: 346-354

Sun J, Deng Z, Yan A. 2014. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**: 254-267

Sun X, Hirota SA. 2015. The roles of host and pathogen factors and the innate immune response in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Molecular Immunology* **63**: 193–202. doi: 10.1016/j.molimm.2014.09.005.

Suzuki H, Nishizawa T, Hibi T. 2010. *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Future Microbiol* **5**: 639–648. DOI: 10.2217/fmb.10.25

Sydney M, Finegold MD. 1980. Metronidazole. *Annals of Internal Medicine* **93**: 585-586

Tkhawkho L, Nitzan O, Pastukh N, Brodsky D, Jackson K, Peretz A. 2017. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolates in Israel. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* **10**: 161–164. doi: 10.1016/j.jgar.2017.04.005

Trinh S, Reysset G. 1996. Detection by PCR of the nim genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2078-2084

Tsugawa H, Suzuki H, Satoh K, Hirata K, Matsuzaki J, Saito Y, Suematsu M, Hibi T. 2011. Two amino acids mutation of ferric uptake regulator determines *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole. *Antioxid Redox Signal* **14**:15–23.

Venema K, Carmo AP. 2015. Probiotics and prebiotics: Current research and future trends. Caister Academic Press, London

Ventura M, Turrone F, Lugli GA, van Sinderen D. 2014. Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**: 163-168.

Vernazza CL, Gibson GR, Rastall RA. 2006. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 846-853.

Vitali B, Turrone S, Dal Piaz F, Candela M, Wasinger V, Brigidi P. 2007. Genetic and proteomic characterization of rifaximin resistance in *Bifidobacterium infantis* BI07. *Research in Microbiology* **158**:355–362

Votava M. 2005. Mikrobiologie obecná. 2. vyd. Brno: Neptun. 351 strana

Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* **11**: 355-362

- Wang N, Hang X, Zhang M et al. 2017. Analysis of newly detected tetracycline resistance genes and their flanking sequences in human intestinal bifidobacteria. *Sci Rep* **7**: 6267. DOI: 10.1038/s41598-017-06595-0
- Wexler HM. 2012. Pump it up: occurrence and regulation of multi-drug efflux pumps in *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe* **18**: 200-208
- Wiedenbeck J, Cohan FM. 2011. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 957–976.
- Xuedong Z, Yuging L. 2015. Atlas of Oral Microbiology, From healthy microflora to disease. Academic Press. ISBN: 978-0-12-802234-4
- Yang YJ, Wu JJ, Sheu BS, Kao AW, Huang AH. 2004. The *rdxA* gene plays a more major role than *frxA* gene mutation in high-level metronidazole resistance of *Helicobacter pylori* in Taiwan *Helicobacter* **9**:400–407. doi:10.1111/j.1083-4389.2004.00270.x
- Yunes RA, Poluektova EU, Vasileva EV, Odorskaya MV, Marsova MV, Kovalev GI, et al. 2020. A multi-strain potential probiotic formulation of GABA-producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with antidepressant effects. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **12**: 973-979 DOI: 10.1007/s12602-019-09601-1

Seznam obrázků:

Obrázek 1: Taxonomické zařazení rodu <i>Bifidobacterium</i> (upraveno podle Ventury et al. 2014)	10
Obrázek 2: Fylogenetický strom založený na pan-genomové analýze (Alberoni et al. 2019)	11
Obrázek 3: Fruktóza-6-fosfátová dráha (upraveno podle Amarettiho et al. 2007)	14
Obrázek 4: Mikrobiologický E-test (https://basicmedicalkey.com/principles-of-antimicrobial-chemotherapy/).....	17
Obrázek 5: Disková difúzní metoda (https://germguy.files.wordpress.com/2017/02/zone-inhibition.gif)	17
Obrázek 6: Popis struktury buněčné stěny u grampozitivních a gramnegativních bakterií (https://adoc.pub/obecna-mikrobiologie-bakterie-viry-paraziti-houby.html).....	19
Obrázek 7: Předpokládaný rezistom rodu <i>Bifidobacterium</i>. Množství tříd genů rezistence na antibiotika identifikovaných mezi 625 analyzovanými genomy <i>Bifidobacterium</i> (Mancino et al. 2019).....	23
Obrázek 8: Mechanismus účinku nitroimidazolů (Edwards 1993).....	24
Obrázek 9: Strukturální vzorec metronidazolu (http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4029.html?rid=1cb30654-cbc7-4104-9527-8e04c57fa6a)	25
Obrázek 10: Aktivace metronidazolu a jeho cytotoxicita v buňkách mikroaerofilů a anaerobů (Převzato a upraveno z Leitsch (2019)).....	26
Obrázek 11: E-test se stupnicí koncentrace metronidazolu provedený na LSM agaru ...34	
Obrázek 12: Schéma ředící řady (www.e-learning.vscht.cz)	35
Obrázek 13: Petriho misky v boxu s anaerobním vyvíječem	36
Obrázek 14: Petriho miska s narostlými koloniemi	36

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

AR= antibiotická rezistence

CDI = *Clostridioides difficile* infekce

CNS = centrální nervová soustava

EFSA = Evropský úřad pro bezpečnost potravin

GABA = kyselina gama-aminomáselná

IZ= inhibiční zóna

MIC = minimální inhibiční koncentrace

PCR = polymerázová řetězová reakce

10 Samostatné přílohy

Tabulka 9: Testování typových kmenů

Code	<i>Bifidobacterium</i> strain	Strain origin	MTZ5_A	MTZ5_B	MTZ5_C	MTZ5_M	MTZ50_A	MTZ50_B	MTZ50_C	MTZ50_M	MIC
M26	<i>B. actinocoloniiforme</i> DSM 22766	Insect	15	10	12	12,33	34	32	33	33,00	12
M4.2	<i>B. aerophilum</i> DSM 100689 *	Monkey	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M10.2	<i>B. aesculapii</i> DSM 26737	Monkey	10	10	10	10,00	37	37	37	37,00	8
M62	<i>B. angulatum</i> DSM 20098	Human	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M55	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> DSM 20104	Rodent	10	10	10	10,00	23	23	21	22,33	48
M44	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 10140	Dairy	9	9	10	9,33	23	25	23	23,67	32
M38.3	<i>B. asteroides</i> DSM 20089	Insect	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M41	<i>B. avesanii</i> DSM 100685*	Monkey	20	20	15	18,33	55	60	52	55,67	3
M85	<i>B. bombi</i> DSM 19703	Insect	16	16	13	15,00	42	42	38	40,67	3
M46	<i>B. breve</i> ATCC 15700*	Human (infant)	R	R	R	R	21	21	22	21,33	24
M65.2	<i>B. callitrichidarum</i> DSM 103152*	Monkey	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M17	<i>B. callitrichos</i> DSM 23973	Monkey	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M53	<i>B. castoris</i> LMG 30937	Beaver	R	R	R	R	R	-	R	R	R
M16	<i>B. catenulatum</i> DSM 16992*	Human	R	R	R	R	35	38	35	36,00	64
M28	<i>B. catulorum</i> DSM 103154	Monkey	R	R	9	R	20	21	21	20,67	16
M59	<i>B. crudilactis</i> LMG 23609*	Dairy	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M2.2	<i>B. lemurum</i> DSM 28807	Lemur	-	20	22	21,00	-	32	29	30,50	2
M12	<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> DSM 20088*	Human (infant)	R	R	R	R	28	23	18	23,00	24
M49	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> ATCC 15707*	Human (adult)	14	14	14	14,00	36	35	35	35,33	16
M33	<i>B. longum</i> subsp. <i>suillum</i> DSM 28597	Swine	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M70R	<i>B. longum</i> subsp. <i>suus</i> DSM 20211	Swine	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M70	<i>B. longum</i> subsp. <i>suus</i> DSM 20211*	Swine	11	12	12	11,67	37	34	35	35,33	3
M3.2	<i>B. merycicum</i> DSM 6492*	Ruminant	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M71	<i>B. minimum</i> DSM 20102	Sewage	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M8	<i>B. myosotis</i> DSM 100196*	Monkey	20	19	19	19,33	38	39	38	38,33	4
M51	<i>B. pseudocatenulatum</i> DSM 20438*	Human (infant)	R	10	10	10,00	27	27	26	26,67	8
M51R	<i>B. pseudocatenulatum</i> DSM 20438	Human (infant)	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M13	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> DSM 20099	Swine	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M23	<i>B. ramosum</i> DSM 100688*	Monkey	15	15	16	15,33	35	35	34	34,67	4
M5	<i>B. reuteri</i> DSM 23975	Monkey	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M67	<i>B. roussetii</i> DSM 109961	Bat	22	20	19	20,33	40	38	39	39,00	4
M67R	<i>B. roussetii</i> DSM 109961	Bat	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M68	<i>B. saeculare</i> DSM 6531	Rabbit	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M6	<i>B. saguini</i> DSM 23967*	Monkey	11	13	12	12,00	35	33	34	34,00	8
M47R	<i>B. stellenboschense</i> DSM 23968	Monkey	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M47	<i>B. stellenboschense</i> DSM 23968	Monkey	18	18	17	17,67	34	32	31	32,33	3
M9	<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i> DSM 17755	Swine	10	11	10	10,33	30	39	39	36,00	3
M45	<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i> DSM 15837	Sewage	14	12	13	13,00	26	25	25	25,33	12
M25	<i>B. tissieri</i> DSM 100201*	Monkey	13	14	13	13,33	22	23	23	22,67	3
M15.2	<i>B. tsurumiense</i> DSM 17777	Rodent	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	*přítomnost genu pro rezistenci 5-nitroimidazolu v genomu										

Tabulka 10: Testování lidských izolátů

Code 1	<i>Bifidobacterium</i> strain	MTZ5_A	MTZ5_B	MTZ5_C	MTZ5_M	MTZ50_A	MTZ50_B	MTZ50_C	MTZ50_M	MIC
M10/2	<i>B. adolescentis</i> DB10.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M2/8	<i>B. adolescentis</i> DB2.1	R	R	R	R	12	11	13	12,00	32
M9/7	<i>B. adolescentis</i> DB9.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
N6A.2	<i>B. adolescentis</i> DM6.2	R	R	R	R	13	12	13	12,67	4
B3/2	<i>B. adolescentis</i> DV3.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
N4/7D	<i>B. adolescentis</i> HM4.3	R	R	R	R	22	21	22	21,67	12
N3/7D.2	<i>B. angulatum</i> HM3.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
N3/7E	<i>B. angulatum</i> HM3.2	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M4/5	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DB4.1	11	9	10	10,00	23	20	23	22,00	16
N10A	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DM10.1	10	9	9	9,33	23	22	25	23,33	12
M3F	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DM3.2	12	10	9	10,33	23	27	21	23,67	12
M4/7A	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> HM4.2	10	9	9	9,33	30	29	30	29,67	12
M9/7F	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> HM9.2	12	12	12	12,00	26	25	22	24,33	6
M3/6	<i>B. bifidum</i> DB3.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
N12A.2	<i>B. catenulatum</i> DM12.1	R	R	R	R	20	18	20	19,33	24
N8/8A	<i>B. catenulatum</i> HM8.2	12	12	13	12,33	26	25	25	25,33	4
M2A	<i>B. dentium</i> DM2.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M2B	<i>B. dentium</i> DM2.2	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M4E	<i>B. dentium</i> DM4.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
M1/6	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DM1.1	R	R	R	R	33	31	30	31,33	16
M12/3A	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DM12.1	12	12	11	11,67	21	21	21	21,00	3
M12C	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DM12.2	13	12	11	12,00	25	24	22	23,67	3
M20A	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DM20.1	16	17	16	16,33	28	29	27	28,00	3
N5F	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> DM5.1	24	19	29	24,00	45	43	47	45,00	6
	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> HM14.2	9	9	10	9,33	26	25	25	25,33	6
N5/7E	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> HM5.1	24	22	18	21,33	40	42	42	41,33	16
M5/7C	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> HM5.2	22	25	30	25,67	48	41	48	45,67	1,5

Tabulka 11: Vzorek 1 testování fekálního vzorku – dospělý

VZOREK bez MTZ				VZOREK s MTZ (25 mg/l)			
kmen	MALDI identifikace	MTZ_5	MTZ_50	kmen	MALDI identifikace	MTZ_5	MTZ_50
1_1	<i>B. longum</i>	10	20	2_1	<i>B. animalis (lactis)</i>	10	20
1_22	<i>B. longum</i>	10	22	2_2	<i>B. animalis (lactis)</i>	10	20
1_23	<i>B. longum</i>	11	20	2_3	<i>B. animalis (lactis)</i>	10	20
1_24	<i>B. animalis (lactis)/ B. adolescentis^{xx}</i>	12	22	2_4	<i>B. animalis (lactis)</i>	10	20
1_6	<i>B. longum</i>	12	25	2_5	<i>B. animalis (lactis)</i>	10	20
1_7	<i>B. longum</i>	10	25	2_6	<i>B. animalis (lactis)</i>	10	20
1_8	<i>B. animalis (lactis)^A</i>	15	30	2_7	<i>B. animalis (lactis)</i>	10	20
1_9	<i>B. longum</i>	12	28	2_8	<i>B. animalis (lactis)</i>	10	20
1_10	<i>B. animalis (lactis)^A</i>	12	24	2_9	<i>B. animalis (lactis)^{A+}</i>	R	20
1_11	<i>B. adolescentis</i>	12	24	2_10	<i>B. animalis (lactis)</i>	R	20
1_12	<i>B. animalis (lactis)/ B. longum</i>	12	24	2_11	<i>B. animalis (lactis)</i>	10	20
1_13	chybně připravený vzorek	12	24	2_12	<i>B. animalis (lactis)</i>	10	20
1_14	<i>B. animalis (lactis)/ B. adolescentis</i>	13	23	2_17	<i>B. animalis (lactis)^{A+}</i>	R	20
1_15	chybně připravený vzorek	12	22	2_18	<i>B. animalis (lactis)</i>	8	20
1_16	chybně připravený vzorek	13	25	2_19	<i>B. animalis (lactis)</i>	8	20
1_17	chybně připravený vzorek	10	20	2_20	<i>B. animalis (lactis)</i>	R	20
1_18	<i>B. longum</i>	12	25	2_21	<i>B. animalis (lactis)</i>	R	20
1_19	<i>B. adolescentis</i>	R	15	2_22	<i>B. animalis (lactis)</i>	R	20
1_20	<i>B. longum</i>	10	22	2_23	<i>B. animalis (lactis)</i>	8	20
1_21	<i>B. longum</i>	10	20	2_24	<i>B. animalis (lactis)</i>	10	20
Vysvětlivky: ^{A+} vzorek znovu subkultivován s MTZ (25 mg/L), poté shledán rezistentní MTZ v koncentraci 5 i 50 µg							
R - rezistence (nevizní inhibiční zóna, velikost antibiotického disku 6 mm)							
^{xx} - kokultura							

Tabulka 12: Vzorek 2 testování fekálního vzorku – kojenec

VZOREK bez MTZ				VZOREK s MTZ (25 mg/l)			
kmen	MALDI identifikace	MTZ_5	MTZ_50	kmen	MALDI identifikace	MTZ_5	MTZ_50
3_1	<i>B. longum</i>	12	20	4_1	<i>B. longum</i>	10	22
3_2	<i>B. longum</i>	8	22	4_3	<i>B. longum</i>	15	26+M*
3_3	<i>B. longum</i>	10	30	4_4	<i>B. longum</i>	12	25+M
3_4	<i>B. longum</i>	13	28	4_5	<i>B. longum</i>	10	25
3_5	<i>B. longum</i>	10	25+M*	4_7	<i>B. longum</i>	12	26
3_7	<i>B. longum</i>	10	25	4_8	<i>B. longum</i>	12	25+M
3_8	<i>B. longum</i>	13	30	4_10	<i>B. longum</i>	12	25
3_9	<i>B. longum</i>	10	23	4_11	<i>B. longum</i>	12	25
3_10	<i>B. longum</i>	8	22	4_12	<i>B. longum</i>	8	25
3_11	<i>B. longum</i>	10	25	4_13	<i>B. longum</i>	10	25
3_13	<i>B. longum</i>	15	25+M*	4_14	<i>B. longum</i>	8	25
3_14	<i>B. longum</i>	12	25	4_15	<i>B. longum</i>	10	23
3_15	<i>B. longum</i>	12	23	4_16	<i>B. longum</i>	8	25
3_16	<i>B. longum</i>	10	25	4_17	<i>B. longum</i>	13	28
3_17	<i>B. longum</i>	15	30	4_18	<i>B. longum</i>	10	23
3_18	<i>B. longum</i>	10	20	4_19	<i>B. longum</i>	10	23
3_19	<i>B. longum</i>	12	25	4_21	<i>B. longum</i>	R	20
3_20	<i>B. longum</i>	15	25	4_23	<i>B. longum</i>	10	25
3_21	<i>B. longum</i>	10	22	4_24	<i>B. longum</i>	10	24
3_22	<i>B. longum</i>	10	25				
Vysvětlivky: M - přítomnost kolonií mutantů v inhibiční zóně							
* - testování mutantů s MTZ 5 a 50 µg							
detekovaná rezistence mutantů							
R - rezistence (nevizní inhibiční zóna, velikost antibiotického disku 6 mm)							

Tabulka 13: Vzorek 3 testování fekálního vzorku – dospělý

VZOREK bez MTZ				VZOREK s MTZ (25 mg/l)			
kmen	MALDI identifikace	MTZ_5	MTZ_50	kmen	MALDI identifikace	MTZ_5	MTZ_50
5_1	<i>B. longum</i>	15	25+M*	6_1	<i>B. longum</i>	15	25+M*
5_2	<i>B. longum</i>	15	30+M	6_4	<i>B. longum</i>	R	R
5_3	<i>B. longum</i>	15	30+M	6_5	<i>B. longum</i>	R	R
5_4	<i>B. longum</i>	15	30+M	6_6	<i>B. longum</i>	R	R
5_7	<i>B. longum</i>	18	30+M	6_7	<i>B. longum</i>	R	R
5_8	<i>B. longum</i>	13	25+M	6_8	<i>B. longum</i>	R	R
5_9	<i>B. longum</i>	10	25	6_9	<i>B. longum</i>	R	R
5_10	<i>B. longum</i>	10	25	6_10	<i>B. longum</i>	R	R
5_12	<i>B. longum</i>	12	25+M*	6_11	<i>B. longum</i>	R	R
5_13	<i>B. longum</i>	12	25+M*	6_12	<i>B. longum</i>	R	R
5_14	<i>B. longum</i>	12	25+M*	6_13	<i>B. longum</i>	R	R
5_15	<i>B. longum</i>	12	25+M*	6_14	<i>B. longum</i>	R	R
5_16	<i>B. longum</i>	15	25+M*	6_15	<i>B. longum</i>	R	R
5_17	<i>B. longum</i>	15	28+M	6_16	<i>B. pseudocatenuatum</i>	11	25
5_18	<i>B. longum</i>	16	25	6_17	<i>B. longum</i>	R	R
5_19	<i>B. longum</i>	15	22	6_18	<i>B. longum</i>	R	R
5_20	<i>B. longum</i>	12	25+M				
5_21	<i>B. longum</i>	15	25+M				
5_22	<i>B. longum</i>	15	25				
5_23	<i>B. longum</i>	15	25				
Vysvětlivky: M - přítomnost kolonií mutantů v inhibiční zóně							
* - testování mutantů k s MTZ 5 a 50 µg							
detekovaná rezistence mutantů							
R - rezistence (nevzniká inhibiční zóna, velikost antibiotického disku 6 mm)							

Tabulka 14: Vzorek 4 testování fekálního vzorku – kojeneček

VZOREK bez MTZ				VZOREK s MTZ (25 mg/l)			
kmen	MALDI identifikace	MTZ_5	MTZ_50	kmen	MALDI identifikace	MTZ_5	MTZ_50
7_1	<i>B. bifidum</i>	NG		8_1	<i>B. animalis (lactis)</i> ^{A+}	8	20
7_2	<i>B. longum</i>	NG		8_2	<i>B. animalis (lactis)</i> ^{A+}	8	20
7_3	<i>B. longum</i>	18	30+M*	8_3	<i>B. longum</i>	R	R
7_4	<i>B. breve</i>	R	20+M*	8_4	<i>B. longum</i>	R	R
7_5	<i>B. longum</i>	15	30+M*	8_5	<i>B. longum</i>	R	R
7_6	<i>B. bifidum</i>	NG		8_6	<i>B. longum</i>	R	R
7_7	<i>B. longum</i>	15	30+M	8_7	<i>B. longum</i>	R	R
7_8	<i>B. longum</i>	15	30+M*	8_8	<i>B. longum</i>	R	R
7_9	<i>B. longum</i>	18	40	8_9	<i>B. longum</i>	R	R
7_10	<i>B. longum</i>	20	40	8_10	<i>B. longum</i>	R	R
7_11	<i>B. longum</i>	15	30+M	8_11	<i>B. longum</i>	R	R
7_12	<i>B. longum</i>	15	25+M	8_12	<i>B. longum</i>	R	R
7_13	<i>B. longum</i>	20	40	8_13	<i>B. longum</i>	R	R
7_14	<i>B. longum</i>	18	40	8_14	<i>B. longum</i>	R	R
7_18	<i>B. longum</i>	20	30	8_15	<i>B. longum</i>	R	R
7_19	<i>B. longum</i>	20	40	8_16	<i>B. longum</i>	R	R
7_20	<i>B. longum</i>	20	30				
7_21	<i>B. longum</i>	NG					
7_22	<i>B. longum</i>	20	40				
7_23	<i>B. longum</i>	20	40+M				
Vysvětlivky: NG - kultura nenarostla, nejsou data							
M - přítomnost kolonií mutantů v inhibiční zóně							
* - testování mutantů k s MTZ 5 a 50 µg							
detekovaná rezistence mutantů							
R - rezistence (nevzniká inhibiční zóna, velikost antibiotického disku 6 mm)							

Tabulka 15: Vzorek 5 testování fekálního vzorku – kojeneček

VZOREK bez MTZ				VZOREK s MTZ (25 mg/l)			
kmen	MALDI identifikace	MTZ_5	MTZ_50	kmen	MALDI identifikace	MTZ_5	MTZ_50
9_1	<i>B. breve</i>	R	R	10_1	<i>B. breve</i>	R	R
9_2	<i>B. breve</i>	R	R	10_2	<i>B. breve</i>	R	R
9_3	<i>B. breve</i>	R	R	10_3	<i>B. breve</i>	R	R
9_4	<i>B. breve</i>	R	R	10_4	<i>B. breve</i>	R	R
9_5	<i>B. breve</i>	R	R	10_5	<i>B. breve</i>	R	R
9_6	<i>B. breve</i>	R	R	10_7	<i>B. breve</i>	R	R
9_8	<i>B. breve</i>	R	R	10_8	<i>B. breve</i>	R	R
9_9	<i>B. breve</i>	R	R	10_9	<i>B. breve</i>	R	R
9_10	<i>B. breve</i>	R	R	10_11	<i>B. breve</i>	R	R
9_11	<i>B. breve</i>	R	R	10_12	<i>B. breve</i>	R	R
9_13	<i>B. breve</i>	R	R	10_13	<i>B. breve</i>	R	R
9_14	<i>B. breve</i>	R	R	10_14	<i>B. breve</i>	R	R
9_15	<i>B. breve</i>	R	R	10_15	<i>B. breve</i>	R	R
9_16	<i>B. breve</i>	R	R	10_16	<i>B. breve</i>	R	R

Vysvětlivky: R - rezistence (nevniká inhibiční zóna, velikost antibiotického disku 6 mm)